วิธีดำเนินการวิจัย

1. ข้อมูล

สืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล Medline, Chemical Abstract Search (CAS) และ Napralert ของพืชต่อไปนี้

Terminalia catappa Linn. (หูกวาง)

Termanalia alata Heyne ex Roth (รกฟ้า)

Bridelia retusa Spreng. (เต็งหนาม)

Bryenia angustifolia Hook. f (ก้างปลาขาว)

Drypetes roxburghii Wall. (ประคำไก่)

Securinega leuopyrus Muell. Arg. (ก้างปลาแดง)

Schrebera swietenioides Roxb. (มะกอกดอน)

Coptis chinensis Linn. (อึ้งเน้ย)

Gardenia coronaria Ham. (พร้าด้าม)

Paranephelium longifoliolatum Lec. (ลำไยป่า)

Harrisonia perforata Merr. (สีฟันคนทา)

Duabanga sonneratioides Ham. (ลำพูป่า)

Turpinia cochinchinensis Merr. (ม่วงก้อม)

Aporusa villosa Baill. (เหมือดโลด)

Anthurium warocqueanum Moore. (เจ้าหน้าวัว)

Centella asiatica Urban (บัวบก)

Euphorbia hirta Linn. (น้ำนมราชสีห์)

Bacopa monnieri Pennell (พรมมิ)

Moringa oleifera Lamk. (มะรุม)

Perilla frutescens Britt. (งาขี้ม้อน)

Angelica acutiloba Kitagawa (ตังกุย)

Fagopyrum cymosum Meissn (ผักบุ้งส้ม)

Glycine max Merr. (ถั่วเหลือง)

Dyera costulata Hook.f (ตีนเป็ดแดง)

Calendula officinalis Linn. (ดาวเรืองฝรั่ง)

Occimum sanctum Linn. (กะเพรา)

สรุปสาระข้อมูลของพืชดังกล่าวข้างต้นไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พืชที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ HIV เสริมภูมิคุ้มกันและต้านมะเร็ง

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				Primary	Secondary
1. หูกวาง *Terminalia catappa* COMBRETACEAE	stem	cytotoxic CA 9KB	EtOH : H_2O 1:1 ext.		Napralert Database
	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database M 26894 Napralert Database
2. รกฟ้า *Terminalia alata* COMBRETACEAE	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	M 26894 Napralert Database
3. เต็งหนาม *Bridelia retusa* EUPHORBIACEAE	dried seed	cytotoxic LEUK-P388 (inactive CA 9KB)	EtOH (defatted with petroleum ether) ext.		Napralert Database
	Stem bark	anti RDV, VV	NS	Ind. J. Exp. Biol 9, 91, 1971	Economic 2 .Med.Pi. Res. vol 5 p176
	Aerial bark	anti RDV	NS	Ind. J. Med. Res. 76 (supp.) 54 (1982)	
	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 Reverse transcriptase	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	M 26894 Napralert Database
4. ก้างปลาขาว *Breynia angustifolia* EUPHORBIACEAE	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	M 26894 Napralert Database

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				Primary	Secondary
5. ประคำไก่ ***Drypetes roxburghii*** – ***Putranjiva roxburghii*** **EUPHORBIACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
6. ก้างปลาแดง ***Securinega leuopyrus*** **EUPHORBIACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
7. มะกอกดอน ***Schrebera swietenoides*** **OLEACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
8. อึ้งเน้ย ***Coptis chinensis*** **RANUNCULACEAE**	rhizome	anti-HIV ทดสอบใน H9 lymphocyte	hot H_2O ext.	Antiviral Res. 9, 163 (1988)	Economic and Medicinal Plant Research vol. 5, 1991 p185, 217
	Root	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext. berberine	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
9. ผ่าด้าม ***Gardenia coronania*** **RUBIACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				Primary	Secondary
10. ลำใยป่า ***Paranephelium longifoliolatum*** **SAPINDACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
11. คนทา ***Harrisonia perforata*** **SIMAROUBACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	MeOH	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
12. ลำพูป่า ***Duabanga sonneratioides*** ***D. grandiflora*** **SONNERATIACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
13. ม่วงก้อม ***Turpinia cochinchinensis*** ***T. nepalensis*** **STAPHYLEACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database
14. เหมือดโลด ***Aporusa villosa*** **EUPHORBIACEAE**	dried leaf+stem	ยับยั้ง HIV-1 RT	EtOH ext.	J. Nat. Prod. 54(1), 143-54, 1991	Napralert Database

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				Primary	Secondary
15. บัวบก *Centella asiatica* UMBELLIFERAE	NS	anti-HSV 2	water ext.	J. trad. Chin. Med. 9(2), 113-6, 1989	Med line Database
	leaf and stem	immunostimulant	suspension of powdered plant and MeOH ext.	J. Riticuloendothelial Soc. 1, 224, (1964) Korean J. Pharmacog. 20(3), 180-187 (1989)	Napralert Database
	NS	immunostimulant	polysaccharide fraction	Proceeding of Princess Congress I, 1987	
	NS	cytotoxic	fresh juice	Chin. J. microbiol. 5(1/2) 76-81, 1972	CA: 3835 สำนักงานข้อมูลสมุนไพร
	dried entire plant	cytotoxic ต่อ fibroblast human	triterpene fraction		Napralert Database
16. น้ำนมราชสีห์ *Euphorbia hirta* EUPHORBIACEAE	aerial part	immunostimulant	suspension of powdered plant	J. Reticuloendothelial Soc. 1, 224 (1964)	Napralert Database
	dried leaf and stem	immunostimulant	aqueous (dialysed) and aq-alcohol ext.	Patent-Ger offen-4, 102, 054, 1992 (Ger.)	Napralert Database

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				Primary	Secondary
17. พรมมิ ***Bacopa monnieri*** ***Herpestis monnieri*** **SCROPHULARIACEAE**	entire plant	cytotoxic CA 9KB	EtOH 95% ext.		Napralert Database
18. มะรุม ***Moringa oleifera*** ***M. pterygosperma*** **MORINGACEAE**	dried aerial part	cytotoxic CA 9KB	EtOH : H_2O 1:1 ext.		Napralert Database
19. งาขี้ม้อน ***Perilla frutescens*** ***P. ocymoides*** **LABIATAE**	dried leaf	cytotoxic human embryonic HE-1	aq. ext.		Napralert Database
	NS	anti-HSV 2	NS	J. trad. Chin. Med. (china) 9, 113 (1989)	Economic & Med. Pl. Res. vol. 5 p. 178
20. ตังกุย ***Angelica acutiloba*** **UMBELLIFERAE**	dried root	กระตุ้น interfereron	polysaccharide fraction	Planta Medica 50(2) 1984 p. 163-167	
	root	immunostimulant	polysacch. fr.	Immunology 47(1), 75-83, 1982	
	NS	stimulate T lympocyte	polysacch. fr.	J. Pharmacobio-Dynamics 8(6), 417-24, 1985	Med line Database
	root	กระตุ้น complement	pectic polysaccharide	Kitasato Archives of Exp. Med. 64(4), 167-77, 1991	Med line Database

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				1°	2°
21. ผักปุ้งส้ม *Fagopynum cymosum* POLYGONACEAE	NS	ยับยั้ง clonal formation ของ human tumor cell 4 ชนิด (GLC, Hela, SGC and KB) *in vitro*	NS	Chung-kuo Chung Yao Tsa-China J of Materia Medica 18(8), 498-500, 511 (1993)	Med line Database
	dried root	immunostimulant activity	hot H_2O ext.	Yao Hsuch Pao 16, 247-52, 1981	Napralert Database
22. ถั่วเหลือง *Glycine max* PAPILIONACEAE	hypocotyls	anti-HIV ใน infected MT-4 cells	triterpene saponin	Jpn. Patent 01.100.126 (1986)	Economic & Med. Pl. Res. vol. 5 p. 220 Chem. Abstr. 111:201597 j
	sprouting hypocotyls	เพิ่ม rabbit polyclonal antibody	enz. alkaline invertase	Arch. of Biochem. Biophy. 295(1), 61-69, 1992	
	dried seed	immunostimulant	peptides	Nutr. Biochem. 6(6), 310-3, 1995	Napralert Database
	dried seed	cytotoxic ต่อ Leuk-K 562, lymphoma-YAC-I	saponin fr.		Napralert Database
	dried seed	cytotoxic ต่อ CA-FM 3A	chromatographic fr.		Napralert Database
	dried seed	cytotoxic ต่อ LEUK-P815	fueze dry from H_2O ext.		Napralert Database

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Plant	Part used	Biological activity	Active fraction/ principle	Reference	
				Primary	Secondary
23. ดาวเรืองฝรั่ง ***Calendula officinalis*** **COMPOSITAE**	dried entire plant or flower	immunostimulant	polysaccharide fr. water sol., acidic branched chain heteroglycans	Arzneimittel-Forschung. 35(7):1069-75, 1985 (Ger.) 34(6):659-61, 1984(Ger.)	Napralert Database & Med line Database
	dried flower + leaves +stem	cytotoxic ต่อ CA EHRLICH-ascites และ cells-MRC5	EtOH (80%) ext.	Pharmazie 43(3) 220-1, 1988	Napralert Database & Med line Database
	flower	anti-HSV, IVA	tincture	Farmakol Toksikol 33(3) 349-55, 1970	Economic & Med. Pl. Res. vol. 5 และ Biological Abstr. 52:106341
24. กะเพรา ***Ocimum sanctum*** **LABIATAE**	shade-dried leaves	immunostimulant	MeOH ext. และ aq. suspension	J. Ethnopharmaco 24, 193-8 (1988)	Napralert Database & Med line Database
	dried leaves	immunostimulant	essential oil	Indian J of Medical Res. 87, 384-6, 1988	Napralert Database & Med line Database

นำพืชที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-RT มาจัดลำดับความสำคัญ โดยอาศัยข้อมูลที่รวบรวมจาก CAS สามารถจัดลำดับพืชที่จะนำมาศึกษาวิจัยตามสัดส่วนของข้อมูลที่ได้ พืชที่มีข้อมูลน้อยจะถูกจัดไว้ลำดับต้นๆ ดังนี้

1. *Aporusa villosa* Baill. (เหมือดโลด) วงศ์ Euphorbiaceae [0]
2. *Breynia angustifolia* Hooks.f (ก้างปลาขาว) วงศ์ Euphorbiaceae [0]
3. *Paranephelium longifoliolatum* Lec. (ลำใยป่า) วงศ์ Sapindaceae [0]
4. *Gardenia coronaria* Ham. (พร้าด้าม) วงศ์ Rubiaceae [0]
5. *Turpinia cochinchinensis* Merr. (ม่วงก้อม) วงศ์ Staphyleaceae [0]
6. *Securinega leucopyrus* Muell. Arg. (ก้างปลาแดง) วงศ์ Euphorbiaceae [0]
7. *Drypetes roxburghii* Wall. (มะคำไก่) วงศ์ Euphorbiaceae [2]
8. *Duabanga sonneratioides* Ham. (ลำพูป่า) วงศ์ Sonneratiaceae [3]
9. *Schrebera swietenoides* Roxb. (มะกอกดอน) วงศ์ Oleaceae [3]
10. *Bridelia retusa Spreng.* (เต็งหนาม) วงศ์ Euphorbiaceae [4]
11. *Harrisonia perforata* Merr. (สีฟันคนทา) วงศ์ Simaroubaceae [5]

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บปีกกา แสดงจำนวน literature ที่ปรากฏใน Chemical Abstract

พืชทั้ง 11 ต้นข้างต้น จัดเป็นพืชที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาวิจัย เนื่องจากยังมีข้อมูลน้อย สำหรับพืชที่มีผู้ศึกษาวิจัยและสามารถทราบถึงสารเคมีที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV reverse transcriptase ได้แก่

1. *Coptis chinensis* Franch. (อึ้งเน้ย) วงศ์ Rununculaceae
2. *Momordica charantia* L. (มะระ) วงศ์ Cucurbitaceae
3. *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz วงศ์ Cucurbitaceae

พืชที่ได้มีการศึกษาวิจัยด้านองค์ประกอบเคมีที่แสดงฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งสมควรที่จะนำมาตรวจสอบคุณสมบัติต้านเอดส์ ได้แก่

1. *Trichosanthes cucumerina* L. (บวบขม) วงศ์ Cucurbitaceae
2. *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy (หญ้าปักกิ่ง) วงศ์ Commelinaceae

จากสถานการณ์โรคเอดส์ของประเทศที่น่าเป็นห่วง ทำให้ต้องเร่งพัฒนายารักษาเอดส์จากสมุนไพรในประเทศ ผู้วิจัยได้ตัดสินใจเลือกมะระเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงสุด เนื่องจากมีข้อมูลสนับสนุนคุณสมบัติต้านเอดส์มากพอ เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย และใช้เป็นอาหาร **มะระเป็นพืชที่ผู้วิจัยจะทำการศึกษาวิจัยอย่างละเอียด**

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เก็บพืชตัวอย่างอีก 4 ชนิด ได้แก่ ลำพู ก้างปลาขาว สีฟันคนทา และก้างปลาแดง สำรวจองค์ประกอบเคมีและคุณสมบัติต้านเอดส์เบื้องต้น

ข้อมูลของพืช 13 ต้น ด้านองค์ประกอบเคมีและคุณสมบัติด้านเอดส์ พืชทั้ง 13 ต้น ได้แก่

1. เหมือดโลด *Aporusa villosa* Baill. (Euphorbiaceae)
2. ก้างปลาขาว *Breynia angustifolia* Hook.f (Euphorbiaceae)
3. ลำไยป่า *Paranephelium longifoliolatum* Lec. (Sapindaceae)
4. พร้าด้าม *Gardenia coronaria* Ham. (Rubiaceae)
5. ม่วงก้อม *Turpinia cochinchinensis* Merr. (Staphyleaceae)
6. ก้างปลาแดง *Securinega leucopyrus* Muell. Arg. (Euphorbiaceae)
7. มะคำไก่ *Drypetes roxburghii* Wall. (Euphorbiaceae)
8. ลำพูป่า *Duabanga sonneratioides* Ham. (Sonneratiaceae)
9. มะกอกคอน *Schrebera swietenoides* Roxb. (Oleaceae)
10. เต็งหนาม *Bridelia retusa Spreng.* (Euphorbiaceae)
11. สีฟันคนทา *Harrisonia perforata* Merr. (Simaroubaceae)
12. บวบขม *Trichosanthes cucumerina* L. (Cucurbitaceae)
13. มะระ *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae)

ข้อมูลด้านองค์ประกอบเคมีและคุณสมบัติต้านเอดส์ของพืชทั้ง 13 ต้น มีดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Aporusa villosa* Baill.

ชื่อไทย เหมือดโลด

วงศ์ Euphorbiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 µg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 60%

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

ไม่พบ

เอกสารอ้างอิง

Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Breynia angustifolia* Hook.f

ชื่อไทย ก้างปลาขาว

วงศ์ Euphorbiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 57%

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

ไม่พบ

เอกสารอ้างอิง

Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Paranephelium longifoliolatum* Lec.

ชื่อไทย ลำไยป่า

วงศ์ Sapindaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 45%

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

ไม่พบ

เอกสารอ้างอิง

Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Gardenia coronaria* Ham.

ชื่อไทย พร้าด้าม

วงศ์ Rubiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 45%

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

ไม่พบ

เอกสารอ้างอิง

Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Turpinia cochinchinensis* Merr.

ชื่อไทย ม่วงก้อม

วงศ์ Staphyleaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 45%

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

ไม่พบ

เอกสารอ้างอิง

Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Securinega leucopyrus* Muell. Arg.

ชื่อไทย ก้างปลาแดง

วงศ์ Euphorbiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 68% (1)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารสกัดของ aerial part ด้วย EtOH-H_2O (1:1) แสดงคุณสมบัติ antispasmodic ลดอุณหภูมิของร่างกายและขับปัสสาวะ (2)

สารเคมีที่พบในเปลือก คือ สาร friedelin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม triterpenes (2,3)

เอกสารอ้างอิง

1. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.
2. Anjaneyuke B, Rao VB. Ganguly AR, et al. Chemical investigation of some Indian plants. Indian J. Chem. 1965; 3:237.
3. Dhawan BN, Patnaik GK, Rastogi RP, et al. Screening of Indian plants for biological activity VI. Indian J. Exp. Biol. 1977; 15:208-219.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Drypetes roxburghii* Wall.

ชื่อไทย มะคำไก่

วงศ์ Euphorbiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 µg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 45% (1)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

ยาชงของใบแห้งมีสรรพคุณแผนโบราณช่วยเพิ่มความต้านทานโรคแก่ร่างกาย (adaptogens) (2)

สารเคมีที่พบในพืชชนิดนี้ได้แก่สารประเภท lignins และ phenylpropranoids (2)

เอกสารอ้างอิง

1. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.
2. Sipahimalani A, Norr AH, Wagner H. Phenylpropanoid glycosides and tetrahydrofuro furanlignar glycosides from the adaptogenic plant drugs *Tinospora cordifolia* and *Drypetes roxburghii*, Planta. Med. 1994; 60:596.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Duabanga sonneratioides* Ham.

ชื่อไทย ลำพูป่า

วงศ์ Sonneratiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 µg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 94% (1)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารสกัดอัลกอฮอล์-น้ำ (1:1) ของเปลือกลำต้นมีคุณสมบัติ antispasmodic และ antitumor (2)

สารเคมีที่พบในเปลือกลำต้น ได้แก่ hentriacontane-1-ol และ β-sitosterol (3)

เอกสารอ้างอิง

1. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.
2. Bhakuni DS, Dhar ML, Dhar MM, et al. Screening of Indian plants for biological activity. part III. Ind. J. Exp. Biol. 1971; 9:91.
3. Bhakuni DS, Gupta NC, Satish S, et al. Chemical constituents of *Actinodaphne augustifolia, Croton sparsiflarus Duabanga sonnerationdes, Glycosmis mauritiana, Hedyotis auricularia, Lyonia ovalifolia, Micromelum pubescens, Pyrus pashia and Rhododendon nivcum.* Phytochemistry. 1971; 10:2247-9.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Schrebera swietenoides* Roxb.

ชื่อไทย มะกอกดอน

วงศ์ Oleaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 53% (1)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารสกัดอัลกอฮอล์-น้ำ (1:1) ของลำต้นมีคุณสมบัติลดอุณหภูมิของร่างกาย (2)

สารเคมีที่พบในเมล็ดเป็นสารประเภท triterpenes(3) และไม่พบ tannins ในส่วนของลำต้น(4)

เอกสารอ้างอิง

1. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.
2. Bhakuni DS, Dhar ML, Dhar MM, et al. Screening of Indian plants for biological activity. part III. Ind. J. Exp. Biol. 1971; 9:91.
3. Vidya AV, Subba R. Chemical investigation of the dry fruits of *Schrebera swietenioides*. J. Ind. Chem. Soc. 1984; 60(10):1004.
4. Atal CK, Srivastava JB, Wali BK, et al. Screening of Indian plants for biological activity. Part VIII. Indian J. Exp. Biol. 1978; 16:330-349.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bridelia retusa Spreng.*

ชื่อไทย เต็งหนาม

วงศ์ Euphorbiaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดอัลกอฮอล์ของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 45% (1)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารสกัดอัลกอฮอล์ของเมล็ดแห้ง (หลังจากสกัดไขมันออกด้วย petroleum ether แล้ว) แสดงคุณสมบัติ cytotoxic ต่อเซลล์มะเร็งชนิด P 388 โดยมีค่า ED_{50} 7.8 μg/ml (2,3)

สารสกัดอัลกอฮอล์-น้ำ (1:1) ของเปลือกลำต้นแห้งมีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง เมื่อฉีดเข้าช่องท้องในหนูขาว มีผลต่อต้านไวรัสชนิด Ranikhet virus และ vacinia virus ในความเข้มข้น 50 μg/ml น้ำหนักตัว (4)

ไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีของพืชชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.
2. Mayer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, et al. Brine shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982; 45:31.
3. Ferrigni NR, Putnam JE, Anderson B, et al. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seed. J. Nat. Prod. 1982; 45:679.
4. Bhakuni DS, Dhar ML, Dhar MM, et al. Screening of Indian plants for biological activity. part III. Ind. J. Exp. Biol. 1971; 9:91.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Harrisonia perforata* Merr.

ชื่อไทย สีฟันคนทา

วงศ์ Simaroubaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

สารสกัดเมทานอลของใบและลำต้นแห้ง ในความเข้มข้น 200 μg/ml แสดงคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลองได้ 68% (1)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารสกัดอัลกอฮอล์-น้ำ (1:1) ของรากและลำต้น มีผลต้านฤทธิ์ histamine (2)

องค์ประกอบทางเคมีของพืชนี้ที่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้ ได้แก่ สารประเภท coumarins, phenylpropanoids, steroids, benzenoids, chromone triterpenes

เอกสารอ้างอิง

1. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod. 1991; 54(1):143-154.
2. Mokkhasmit M, Ngamwathana W, Sawasaimongkol K, et al. Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants (continued). J. Med. Ass. Thai. 1971; 54:490.
3. Roengsumran S, Ruangkrit S. Abstract 10th Conference of Science and Technology Thailand. Chiengmai University, Chiengmai, Thailand 1984:393.
4. Tran VS, Nguyen MP, Kamperdick C, et al. Perforatinolone, a limonoid from *Harrisonia perforata*. Phytochem. 1995; 38:213.
5. Tanaka T, Koide K, Mitsunaga K, et al. Chromones from *Harrisonia perforata*. Phytochem. 1995; 40:1987.
6. Thadaniti S, Archakumakorn W, Tuntivachwuttikul P, et al. Chromones from *Harrisonia perforata*. J. Sci. Soc Thailand 1994; 20:183.
7. Wang MX, Zhand MS, Liu WZ, et al. Isolation and structure determination of perforatic acid from Chenese folk medicine Niu-jin-guo (*Harrisonia perforata*). Yao Hsuch Hsuch Pao 1984; 19:760.
8. Wang MX, Zhang MS, Zhu YL. Studies on the chemical constituentsof a Chinese folk medicine Niu-Jin-Guo (*Harrisonia perforata*). Yao Hsuch Hsuch Pao. 1983; 15:113.

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Trichosanthes cucumerina* L.

ชื่อไทย บวบขม

วงศ์ Cucurbitaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

ไม่พบ แต่มีรายงานว่า trichosanthin ซึ่งเป็นโปรตีนที่แยกได้จากพืชใน genus เดียวกันคือ *Trichosanthes kirilowii* แสดงคุณสมบัติต้านเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารเคมีที่พบคือ

1. cucurbitacin B ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ

   - antihepatotoxic

- antiinflammatory
- cancer-preventive
- cytotoxic

2. cucurbitacin E ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ
   - antihepatotoxic
   - cytotoxic

สารเคมีอื่นๆ ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids คือ cynaroside และ สารกลุ่ม steroids คือ daucosterol และ β-sitosterol

สารสกัดด้วยอัลกอฮอล์, น้ำ และเมทธานอล แสดงฤทธิ์ antibacterial ในหลอดทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. MeGrath MS, Hwang KM, Caldwill SE, et al. GLQ 223 : An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. 1989; 86:2544-2848.
2. Biological assay of antitumor agents from natural products. Abstract on the Seminar on the Development of Drugs from Medicinal Plants. Bangkok, Thailand. 1982; 129.
3. Sribenjapanon N, Chaikangwan C, Kanchanaraksa P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Trichosanthes* cucumerina L. Undergraduate special project report, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand. 1981; 39 pp.
4. Silapa-archa W, Picha P, Lurwongrattana O, et al. Investigation of the triterpenes in the Cucurbitaceae prevalent in Thailand. Mahidol University. J. Pharm. Sci. 1981; 8(1):58.
5. Silapa-archa W, Picha P, Antineoplastic substances from *Trichosanthes cucumeriana* L. NRCT-JSPS Rattanakosin Bicentennial Joint Seminar on Chemistry of Natural Products. Bangkok, Thailand. 1982 : 47.
6. Tiangda C, Silapa-archa W, Wiwat C, Picha P. Chemical composition, acute toxicity and pharmacological screening of *Trichosanthes cucumerina* L. Asian J. Pharm. Suppl. 6. 1986; 8:133.
7. Jiratchariyakul W, Frahm AW. Cucurbitacin B and dihydrocucurbitacin B from *Trichosanthes cucumerina* L. Mahidol University. J. Pharm. Sci. 1992; 19:5-12.
8. Hanit M, Rathee PS. Antibacterial activity of unsaponifiable fraction of the fixed oil of *Trichosanthes* seeds. Asian J. Chem. 1995; 7(4):908-911.
9. George M, Pandalai KM. Investigation of plant antibiotics. part IV. Further search for antibiotic substances in Indian medicinal plants. Indian J. Med. Res. 1949; 37:169-181.

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Momordica charantia* L.

ชื่อไทย มะระ

วงศ์ Cucurbitaceae

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์

กลุ่มสารที่แสดงคุณสมบัติต้านเอดส์ในมะระเป็นโปรตีนที่แยกได้จากเมล็ดและผลสุก bioactive protein นี้มีชื่อว่า MAP 30 มีสูตรโครงสร้างเป็น polypeptide single chain น้ำหนักโมเลกุล 30 kD มีลำดับของ amino acids 44 ตัวแรกที่เรียงจาก N-terminal ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับของ amino acid 44 ลำดับจากส่วน N-terminal ของ MAP 30 เปรียบเทียบกับ Trichosanthin และ Ricin A chain

	1									10
MAP 30	Asp-	Val-	Asn-	Phe-	Asp-	Leu-	Ser-	Thr-	Ala-	Thr-
Tri 1	Asp-	Val-	Ser-	Phe-	Arg-	Leu-	Ser-	Gly-	Ala-	Thr-
Ric A	Pro- Ile-	Ile-	Asn-	Phe-	Thr-	Thr-	Ala-	Gly-	Ala-	Thr
	11									20
MAP 30	Ala-	Lys-	Thr-	Thr-	Thr-	Lys-	Phe-	Ile-	Glu-	Asp-
Tri 1	Ser-	Ser-	Ser-	Tyr-	Gly-	Val-	Phe-	Ile-	Ser-	Asn-
Ric A	Val-	Gln-	Ser-	Tyr-	Thr-	Asn-	Phe-	Ile-	Arg-	Ala-
	21									30
MAP 30	Phe-	Arg-	Ala-	Thr-	Leu-	Pro-	Phe-	Ser-	His-	Lys-
Tri 1	Leu-	Arg-	Lys-	Ala-	Leu-	Pro-	Asn-	Glu-	Arg-	Lys-
Ric A	Val-	Arg-	Gly-	Arg-	Leu-	Thr-	Thr-	Gly-	Ala-	Asp-
	31									40
MAP 30	Val-	Tyr-	Asp-	Ile-	Pro-	Leu-	Leu-	Tyr-	Ser-	Thr-
Tri 1	Leu-	Tyr-	Asp-	Leu-	Pro-	Leu-	Ile-	Arg-	Ser-	Ser-
Ric A	Val-	Arg-	His-	Glu-	Ile-	Pro-	Val-	Arg-	Leu-	Pro-
	41			44						
MAP 30	Ile-	Ser-	Asp-	Pro-						
Tri 1	Leu-	Pro-	Gly-	Ser-						
Ric A	Leu-	Pro-	Ile-	Asn-						

MAP 30 แสดงฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง โดยยับยั้งการติดเชื้อด้วยขบวนการยับยั้งการเกิด syncytium ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อ HIV กับเซลล์ใหม่ มีผลยับยั้งการขยายพันธุ์ของไวรัส HIV โดยยับยั้งเอนไซม์ HIV reverse transcriptase และเอนไซม์ HIV integrase นอกจากนั้นยังยับยั้งการสร้าง viral core protein ของเชื้อ HIV (1-4)

สารเคมี/สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่นๆ

สารเคมีในส่วนผลและเมล็ดของมะระขี้นก แบ่งเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ proteins, triterpenes , steroids, carbohydrate และ lipids (5)

สารเคมีที่มีความสำคัญ ได้แก่ สารกลุ่ม proteins ซึ่งมีการค้นพบแล้วประมาณ 20 ชนิด นอกจากคุณสมบัติต่อต้านเชื้อ HIV ของ MAP 30 ดังกล่าวข้างต้นแล้ว proteins ชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากมะระยังมีคุณสมบัติทางชีววิทยาอื่นๆ อีกมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญอีกประการหนึ่งของผลและเมล็ดมะระ คือ ฤทธิ์ในการรักษาโรคเบาหวาน โดยน้ำสกัดจากผลมะระสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดยการกระตุ้นการหลั่ง insulin จากตับอ่อน (47) น้ำคั้นจากผลมะระ ทำให้ glucose tolerance ในผู้ป่วยเบาหวานดีขึ้น (48) และโดยกลไกอื่นๆ (49, 50) ได้มีผู้สกัด polypeptide-p ซึ่งมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดจากผลมะระ (46)

สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของมะระให้ผลทางชีววิทยาต่างๆ มากมาย เช่น ลดไขมันในเลือด ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial), cytotoxic และต้านมะเร็ง (antitumor) เป็นต้น (5)

ตารางที่ 3 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของโปรตีนชนิดต่างๆ ที่แยกได้จาก *Momordica charantia*

ชื่อสาร	ส่วนของพืช	คุณสมบัติทางเคมี	คุณสมบัติทางชีววิทยา	เอกสารอ้างอิง
MAP 30	เมล็ดและผลสุก	polypeptide, single chain น้ำหนักโมเลกุล 30 kD	- ribosome inactivating activity ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนใน cell free system ไม่มีผลใน whole cell system - ต่อต้าน HSV infection ในหลอดทดลอง	2, 6
Momordica charantia trypsin inhibitor (MCTI)	เมล็ด			7 - 12
MCTI - I		polypeptide, 30 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 34 kD	serine proteinase inhibitor, trypsin inhibiting activity - MCTI - I & II ทำให้ activated partial thromboplastin time ของ plasma ของคนยาวนานขึ้น - MCTI - II ทำให้ prothrombin time ของ plasma ของคนยาวนานขึ้น - MCTI - I, II & III ยับยั้ง amidolytic activity ของ fraction XII a, plasma kallikrein และ factor X a ผลดังกล่าวทำให้สารเหล่านี้มีความน่าสนใจในการพัฒนาเป็นยาในระบบหัวใจและหลอดเลือด	
MCTI - II		polypeptide, 28 amino acid มี 3 disulfide bridge น้ำหนักโมเลกุล 32 kD		
MCTI - III		polypeptide, 30 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 33 kD		

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อสาร	ส่วนของพืช	คุณสมบัติทางเคมี	คุณสมบัติทางชีววิทยา	เอกสารอ้างอิง
Momordica charantia elastase inhibitor (MCEI) MCEI - I MCEI - II MCEI - III MCEI - IV	เมล็ด	polypeptide, 28 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 32 kD polypeptide, 29 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 33 kD polypeptide, 30 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 34 kD polypeptide, 31 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 35 kD	serine proteinase inhibitor, elastase inhibiting activity มีความน่าสนใจในการพัฒนาเป็นยาในระบบหัวใจและหลอดเลือด	7 - 12
Bitter Gourd Inhibitor (BGIA)	เมล็ด	polypeptide น้ำหนักโมเลกุล 7,419	ยับยั้งเอนไซม์ endopeptidase ของ *Sterptomyces griseus* ที่เฉพาะเจาะจงต่อ acidic amino acid อย่าง competitive	13

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อสาร	ส่วนของพืช	คุณสมบัติทางเคมี	คุณสมบัติทางชีววิทยา	เอกสารอ้างอิง
Momorcharin I	เมล็ด	glycoprotein น้ำหนักโมเลกุล 26 kD 1.6% sugar content	ribosome inactivating activity, ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนใน cell free system	14
Momorcharin II	เมล็ด	glycoprotein น้ำหนักโมเลกุล 28 kD 2.0% sugar content		
Momorcharin α	เมล็ด	basic glycoprotein น้ำหนักโมเลกุล 29-32 kD 1.6% sugar content	- abortifacient - anti-tumor - immunosuppsessive - ribosome inactivating activity	15 - 28
Momorcharin β	เมล็ด	basic glycoprotein น้ำหนักโมเลกุล 28-29 kD 1.3/3.5% sugar content		
Momordin	เมล็ด	lictin, polypeptide single chain น้ำหนักโมเลกุล 24 kD	- ribosome inactivating activity, ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนใน whole cell system - haemagglutinating - conjugate กับ anti-CD5 monoclonal antibody ซึ่งอาจใช้ประโยชน์ในการลดการต่อต้านของร่างกายในกรณีปลูกถ่ายอวัยวะ และอาจมีศักยภาพในการใช้รักษามะเร็งต่อมน้ำเหลือง ซึ่งเกี่ยวข้องกับ CD5	29 - 36

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อสาร	ส่วนของพืช	คุณสมบัติทางเคมี	คุณสมบัติทางชีววิทยา	เอกสารอ้างอิง
Momordica charantia lectin	เมล็ด	lectin, 116 µg ของ galactose ต่อ 1 mg ของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล 115 kD ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 30.5 kD, 29 kD, 28.5 kD, และ 27 kD	- ribosome inactivating activity, ยับยั้งการสร้างโปรตีนใน cell free system และยับยั้งการสร้างโปรตีนได้บางส่วนใน whole cell system - haemagglutinating activity	37 - 38
Momordica charantia inhibitor	เมล็ด	basic glycoprotein น้ำหนักโมเลกุล 23 kD 1.74% sugar content	- ribosome inactivating activity, ยับยั้งการสร้างโปรตีนใน cell free system - ยับยั้งการขยายพันธุ์ของไวรัส (HSV-1) โดยยับยั้งการสร้างโปรตีน	37 - 39
other lectins	เมล็ด	glycoprotein น้ำหนักโมเลกุล 129 kD ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 29 kD 32 kD 2 หน่วยย่อย และ 36 kD จับกันด้วย cysteine bridge 4.1% sugar content	ribosome inactivating activity, ยับยั้งการสร้างโปรตีนใน whole cell system	40 - 44

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อสาร	ส่วนของพืช	คุณสมบัติทางเคมี	คุณสมบัติทางชีววิทยา	เอกสารอ้างอิง
other lectins	เมล็ด	lectin น้ำหนักโมเลกุล 115 kD	- ribosome inactivating activity ยับยั้งการสร้างโปรตีนใน cell free system - haemagglutinating activity	40 - 44
		lectins มี amino acid 27 ตัว	haemagglutinating activity	
Momordica charantia cytostatic factor	ไม่ระบุ	purified factor น้ำหนักโมเลกุล 40 kD	- cytostatic ต่อ BHK-21 cells และ IM 9 leukemic cell lines - ยับยั้งการทำงานของ RNA และการสังเคราะห์โปรตีนใน whole cell และ cell free system	45
polypeptide - p	ผล เมล็ด tissue culture	polypeptide ประกอบด้วย 166 amino acid น้ำหนักโมเลกุล 11,000	ลดน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลองและผู้ป่วยเบาหวาน	46

ในมะระมีโปรตีนหลายชนิด มีผู้แยกสารประเภทโปรตีนเหล่านี้ รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางชีววิทยาไว้แล้วประมาณ 20 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการแยกจากเมล็ด องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนที่แยกจากเมล็ด/มะระเป็น polypeptide หรือ glycoprotein ซึ่งมักจะมีคุณสมบัติเป็น ribosome inactivating proteins (RIPs) สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. RIPs ที่มีความเป็นพิษสูง กลุ่มนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนทั้งใน cell free และ whole cell system

2. RIPs ที่ไม่มีความเป็นพิษ ยับยั้งการสร้างโปรตีนเฉพาะใน cell free system แต่มีผลน้อย หรือไม่มีเลยใน whole cell system

RIPs กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปใน cell ปกติได้ จึงไม่เป็นพิษต่อ eukaryotic cell MAP 30 ซึ่งแยกจากผลสุกและเมล็ดของมะระ และแสดงคุณสมบัติต้านเอดส์ในหลอดทดลองก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่แยกได้จากเมล็ดของมะระและมีคุณสมบัติจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 นี้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามยังมิได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติต้านเอดส์ของโปรตีนเหล่านี้

มีการทดลองซึ่งชี้ให้เห็นว่า RIPs สามารถขัดขวางการขยายพันธุ์ของ virus โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ virus-infected cell ในขณะที่ไม่มีผลต่อ cell ปกติ ซึ่งตั้งสมมุติฐานไว้ว่า RIPs สามารถเข้าสู่ cell ที่ติดเชื้อไวรัสได้ง่ายกว่า cell ปกติ (38) จึงเห็นว่า RIPs ที่แยกได้จากเมล็ดของมะระควรมีคุณสมบัติต้านเอดส์เช่นเดียวกับ MAP 30 ซึ่งต้องการการยืนยันจากการศึกษาวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Huang SL, Huang PL, Nara PL, et al. MAP 30 : A new inhibitor of HIV-1 infection and replication, FEBS Lett. 1990; 272:12.
2. Huang SL, Chen HC, Kung H, et al. Plant proteins with antiviral activity against human immunodeficiency virus in : "Natural products as antiviral agents" Chu CK, Cutler HG, eds, Plenum Press, New York. 1992.
3. Huang SL, Huang PL, Nara PL, et al. A plant protein useful for treating tumors and HIV infection. PCT Int. Appl. WO 92 06, 106; 1990:58 pp.
4. Huang SL, Huang PL, et al. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type I by anti-HIV plant proteins MAP 30 and GAP 31. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995; 92:8818-22.
5. NAPRALERT Database. N.R. Fransworth ed., University of Illinois, Chicago.
6. Bourinbaiar AS, Huang SL. The activity of plant derived antiretroviral proteins MAP 30 and GAP 31 against herpes simplex virus infection *in vitro*, Biochem. Biophy. Res Comm. 1996; 219:923.

7. Hara S, Makino J, Ikenaka T. Amino acid sequences and disulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* Linn.) seeds, J. Biochem. 1989; 105:88.

8. Hamato N, Koshiba T, Pham TN, et al. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica chsrantia* Linn.) seeds : Purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors, J. Biochem. 1995; 117:432.

9. Zeng FY, Qian RQ, Wang Y. The amino acid sequence of a trypsin inhibitor from the seeds of *Momordica charantia* Linn. Cucurbitaceae, FEBS Lett. 1988; 234:35.

10. Huang Q, Liu S, Tang Y, et al. Amino acid sequencing of a trypsin inhibitor by refined 1.6 A^{o} X-ray crystal structure of its complex with porcine beta-trypsin, FEBS Lett. 1992; 297:143.

11. Huang Q, Liu S, Tang Y. Refined 1.6 A^{o} resolution crystal structure of the complex formed between porcine β-trypsin and MCTI-A, a trypsin inhibitor of the squash family. J. Mol. Biol. 1993; 229:1022.

12. Hauashi K, Takehisa T, Hamato N, et al. Inhibition of serine proteases of the blood coaggulation system by squash family protease inhibitors. J. Biochem. 1994; 116:1013.

13. Ogata F, Miyata T, Fujii N, et al. Purification and amino acid sequence of a bitter gourd inhibitor against an acidic amino acid-specific endopeptidase of *Streptomyces griseus*. J. Biol. Chem. 1991; 266:16715.

14. Zheng S, LiG, Yang SH. Purification and characterization of the analogs of momorcharin. Shengwu Huaxue Zazhi. 1992; 8:429.

15. Ng TB, Liu WK, Sze SF, et al. Action of alpha-momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines. Gen. Pharmaco. 1994; 25:75.

16. Xiong JP, Xia ZX, Zhang L, et al. Crystallization and preliminary crystallographic study of β-momorcharin. J. Mol. Biol. 1994; 238:284.

17. Hg TB, Chan WY, Yeung HW. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. Gen. Pharmaco. 1992; 23:579.

18. Ho WKK, Liu SC, Shaw PC, et al. Cloning of the cDNA of α-momorcharin : A ribosome inactivating protein. Biochem. et Biophy. Acta. 1991; 1088:311.

19. Yeung HW, Ng TB, LiWW, et al. Partial chemical characterization of alpha- and beta-momorcharins. Planta Med. 1987; 53:164.

20. Ho WKK, Liu SX, Chan WY. Cloning of the anti-HIV plant protein α-momorcharin cDNA. FASEB-J. 1990; 4:A491.

21. Yeung HW, Li WW, Chan WY. Purification and characterization of momorcharins, abortifacient proteins from the crude drugs kuguazi (*Momordica charantia* seeds). Abstr. International symposium on Chinese medicinal material research. Hong Kong. June 12-14, 1984:Abstr. -17.

22. Chan WY, Tam PPL, Yeung HW. Biological effects of beta-momorcharin on early mouse embryos and endometrial cells. Abstr. International Symposium on Chinese medicinal materials research. Hong Kong June 12-14, 1984. Abstr. -59.

23. Yeung HW, Li WW, Law LK, et al. Purification and partial characterization of momorcharins, abortifacient proteins from the Chinese drugs, kuguazi (*Momordica charantia* seeds), in : "Advances in Chinese medicinal material research", World Scientific Press U.S.A. 1984.

24. Chan WY, Tam PPL, Choi HL, et al. Effects of momorcharins on the mouse embryo at the early organogenesis stage. Contraception. 1986; 34:537.

25. Chan WY, Tam PPL, Yeung HW. The termination of early pregnancy in the mouse by β-momorcharin. Contraception. 1984; 29:91.

26. Leung SO, Yeung HW, Leung KN. The immunosuppressive activities of two abortifacient proteins isolated from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). Immunopharmaco. 1987; 13:159.

27. Ng TB, Yeung HW. Bioactive constituents of cucurbitaceae plants with special emphasis on *Momordica charantia* and *Trichosanthes kirilowii*. Proc. Fifth Asian Symposium on Medicinal Plants and Spices. Seoul. Korea. 20-24 Aug. 1984.

28. Yeung HW, Li WW, Feng Z, et al. Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta-momorcharin : Identify of abortifacient and ribosome inactivating proteins. Int. J. Peptide Prot. Res. 1988; 31:265.

29. Lin JY, Hou MJ, Chen YC. Isolation of toxic and non toxic lectins from the bitter pear melon *Momordica charantia*. Toxicon. 1978; 16:653.

30. Wang RH, Chen X, Li W, et al. Immunotoxins composed of monoclonal antihuman T Lymphocyte antibody and single ribosome-inactivating proteins : Antitumor effect *in vitro*, Zhonghua Mazuixul Zazhi, 1992; 8:356.

31. Porro G, Bolognesi A, Caretto P, et al. *Invitro* and *in vivo* properties of and anti-CD5-momordin immunotoxin on normal and neoplastic T-lymphocytes. Cancer Immuno. Immunother. 1993; 36:346.

32. Barbieri L, Stoppa C, Bolognese A. Large scale chromatographic purification of ribosome inactivating proteins. J. Chromatogr. 1987; 408:235.

33. Husain J, Tickle IJ, Wood SP. Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. FEBS Lett. 1994; 342:154.

34. Minami YJ, Funatsu JK. The complete amino acid sequence of momordin-A, a ribosome-inactivating protein from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*). Biosci. Biotech. Biochem. 1993; 57:1141.

35. Kimura Y, Minami Y, Tokuda T, et al. Primary structure of N-linked oligosaccharides of momordin A, a ribosome inactivating protein from *Momordica charantia* seeds. Agr. Biol. Chem. 1991; 55:2031.

36. Minami Y, Nakahara Y, Funatsu Y. Isolation and characterization of two momordins, ribosome inactivating proteins from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*). Biosci. Biotech. Biochem. 1992; 56:1470.

37. Barbieri L, Zamboni M, Lorenzone E, et al. Inhibition of protein synthesis *in vitro* by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (Bitter Pear Melon). Biochem. J. 1980; 186:443.

38. Falasca A, Campani AG, Abbondanza A, et al. Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Momordica charantia* inhibitor, and dianthins. Biochem. J. 1982; 207:505.

39. Tomasi LF, Fiume GC, Barbieri L, et al. Effect of ribosome-inactivating proteins on virus-infected cells. Inhibition of virus multiplication and of protein synthesis. Arch. Virology. 1982; 71:323.

40. Ng TB, Wong CH, Li WW, et al. Isolation and characterization of a galactose binding lectin with insulinomimetic activity from the seeds of the bitter gourd *Momordica charantia* (Family Cucurbitaceae). Int. J. Peptide Prot. Res. 1986; 28:163.

41. Licastro F, Franceschi C, Barbieri L, et al. Toxicity of *Momordica charantia* lectin and inhibitor for human normal and leukemic lymphocytes. Vinchows Arch. 1980; 33:257.

42. Horejsi V, Ticha M, Novotny J. Studies on Lectins XLVII. Some properties of D-galactoside binding lectins isolated from the seeds of *Butea frondasa*, *Erythrina indica* and *Momordica charantia*. Biochem. Biophy. Acta. 1980; 623:439.

43. Barbieri L, Lorenzoni E, Stripe F. Inhibition of protein synthesis *in vitro* by a lectin from *Momordica charantia*. Biochem. J. 1979; 182:633.

44. Li SSL, Purification and partial characterization of two lectins from *Momordica charantia*. Experientia. 1980; 36:524.

45. Tokemoto DJ, Jilka C, Rockenbach S, et al. Purification and characterization of a cytostatic factor with anti-viral activity from bitter melon. Prep. Biochem. 1983; 13:397.

46. Khanna P, Jain SC. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. J. Nat. prod. 1981; 44:648.

47. Welihinda J, Arvidson G, Gylfe E, Hellman B and Karlsson E. The insulin-releasing activity of the tropical plant *Momordica charantia*. Acta Biologica et Medica Germanica. 1982; 41(12):1229.

48. Welihinda J, Karunanayake EH, Sheriff MHR and Jayasinghe KSA. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabets. J. Ethno Pharmacol. 1986; 17(3):277.

49. Welihinda J and Karunanayake EH. Extrapancreatic effects of *Momordica charantia* in rats. J. Ethno Pharmacol. 1986; 17(3):247.

50. Cakici I, Hurmoglu C, Tunctan B, et al. Hypoglycemic effect of *Momordica charantia* extracts in normoglycemic or cyproheptadine-induced hyperglycaemic Mice. J. Ethno. Pharmacol. 1994; 44:117.

2. การทดลอง

2.1 การตรวจสอบองค์ประกอบเคมี เบื้องต้นของพืช 4 ชนิด

เก็บตัวอย่างพืช เมื่อ 29 กรกฎาคม 2539 ณ จังหวัดสมุทรปราการ และระยอง ตัวอย่างพืชที่เก็บได้ คือ ลำพู (สมุทรปราการ) ก้างปลาขาว (ระยอง) สีฟันคนทา (ระยอง) ก้างปลาแดง (สมุทรปราการ)

ตรวจหาสารกลุ่มแทนนิน* โดยนำพืชสดหนัก 20 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และตำให้แหลก ละลายและหมักใน acetone หรือ ethanol ค้างคืน นำสารสกัดมาระเหยแห้ง เจือจางด้วย ethanol จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน หยดน้ำยา ethanolic ferric chloride** 1-2 หยด เขย่า สังเกตสี หากมีสีน้ำเงินหรือเขียว ถือว่าให้ผลบวก (ตารางที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจ tannins ในพืชสดที่หมักด้วย acetone

พืช***	น้ำหนัก	สีของสารสกัด	สารสกัดกับ eth. $FeCl_3$
ลำพู (Sonneratia caseollaris)	20 กรัม	น้ำตาลแดง	สีน้ำเงินอมเขียว
ก้างปลาขาว (Breynia angustifolia)	20 กรัม	น้ำตาล	สีน้ำเงินอมเขียว
สีฟันคนทา (Harrisonia perforata)	20 กรัม	น้ำตาล	สีน้ำเงินอมเขียว
ก้างปลาแดง (Securinega leucopyrus)	20 กรัม	น้ำตาลแดง	สีเหลือง

* แทนนิน (tannins) เป็นสารประกอบในพืชที่ละลายน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 500-3,000 ดาลตัน สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน ทำให้โปรตีนตกตะกอน จัดเป็นสารที่มีพิษมากโดยเฉพาะต่อตับ เมื่อสำรวจคุณสมบัติต้านเอดส์ของพืชสมควรกำจัดแทนนินออกก่อน เพื่อป้องกันผลบวกอันเนื่องจากแทนนิน

** ethanolic ferric chloride ประกอบด้วย $FeCl_3$ 5 กรัม ละลายใน ethanol 100 มิลลิลิตร

*** ใบและกิ่งก้าน

ตารางที่ 5 ผลการตรวจ tannins ในพืชสดที่หมักด้วย ethanol

พืช	ส่วนของพืช	น้ำหนัก	สีของสารสกัดอัลกอฮอล์	สารสกัดกับ eth. $FeCl_3$
ลำพู	ใบ	5 กรัม	น้ำตาลอมเขียว	สีน้ำเงิน
	กิ่งและก้าน	5 กรัม	เหลือง	สีเหลือง
ก้างปลาขาว	ใบ	5 กรัม	น้ำตาลอมเขียว	สีน้ำเงิน
	กิ่งและก้าน	5 กรัม	น้ำตาลอมเหลือง	สีเหลือง
สีฟันคนทา	ใบ	5 กรัม	น้ำตาลอมเหลือง	สีเหลือง
	กิ่งและก้าน	5 กรัม	เขียวเข้ม	สีน้ำเงิน
ก้างปลาแดง	ใบ	5 กรัม	เขียวเข้ม	สีเหลือง
	กิ่งและก้าน	5 กรัม	น้ำตาลอมเหลือง	สีเหลือง

ผลการทดลอง พบสารกลุ่ม tannins ในใบลำพู ใบก้างปลาขาว และกิ่ง ก้านของสีฟันคนทา สารกลุ่ม tannins มีรายงานว่ามีคุณสมบัติต้านเชื้อ HIV แต่จะมีพิษสูง เบื้องต้นผู้วิจัยประสงค์จะตรวจสอบคุณสมบัติต้านเชื้อ HIV ของสารกลุ่มอื่นก่อนจึงคัดเลือก พืชส่วนที่ไม่มีกลุ่มสารแทนนินเพื่อตรวจหาองค์ประกอบเคมีต่อไป

2.2 การเตรียมสารสกัดพืชเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต้านเอดส์เบื้องต้น

หมักผงยาที่ไม่มีแทนนิน (ตารางที่ 4, 5) 40 กรัม ด้วย 95%EtOH นาน 1 สัปดาห์ เปลี่ยน solvent วันเว้นวัน จากนั้นนำไประเหยแห้ง ชั่งน้ำหนัก residue ที่ได้

ตารางที่ 6 แสดงผลการสกัดผงยา เพื่อส่งตรวจสอบคุณสมบัติต้านเอดส์

พืช (ส่วนที่ใช้)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	สารสกัดที่ส่งตรวจ (กรัม)	
		RT-inh.	Imm. activity
ลำพู (กิ่งก้าน)	1.0	0.27	0.27
ก้างปลาขาว (กิ่งก้าน)	2.2	0.53	0.52
สีฟันคนทา (ใบ)	7.3	0.53	0.59
ก้างปลาแดง (กิ่งก้าน)	1.3	0.33	0.31
ก้างปลาแดง (ใบ)	2.7	0.57	0.56

2.3 Thin-layer chromatography ของสารสกัดจากพืช

Sample Preparation

เตรียมผงยาของพืชทั้ง 4 ได้แก่ ลำพู (กิ่งก้าน) ก้างปลาขาว (กิ่งก้าน) สีฟันคนทา (ใบ) ก้างปลาแดง (กิ่งก้าน) และก้างปลาแดง (ใบ) นำผงยา 1 กรัม สกัดด้วย 95% EtOH บน water bath นาน 30 นาที กรองส่วนใสที่ได้นำไประเหยแห้ง เมื่อจะนำมา spot ให้เติมอัลกอฮอล์เล็กน้อย และ streak บน plate 20 µl

Reference preparation

0.1% phytosterol (a) และ 0.1% phytosteryl glucoside (b) ใน $CHCl_3$-MeOH (1:1) spot ครั้งละ 3 µl

Adsorbent : Silica gel F254, Alufolien (Merck)

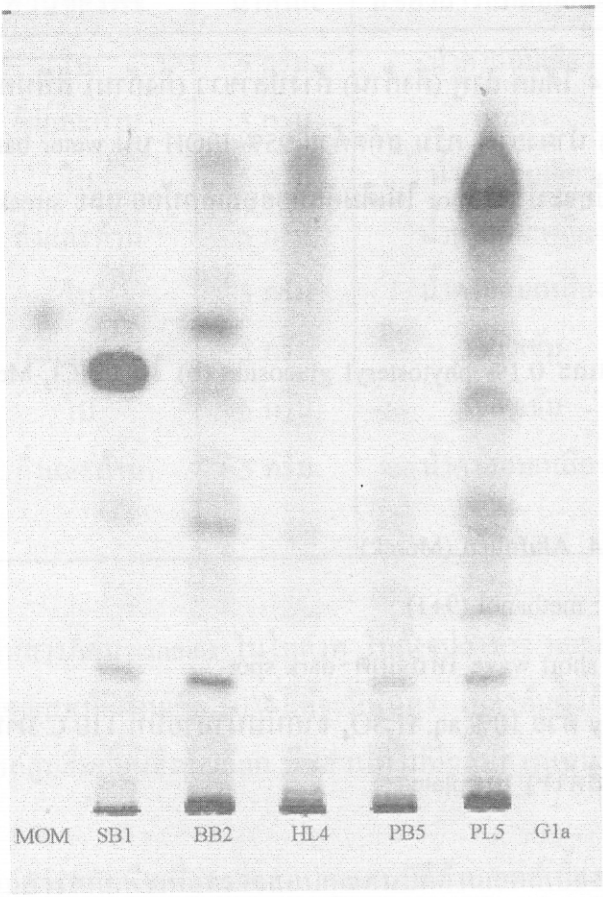
Solvent system : chloroform : methanol (9+1)

Detection : 1) under UV short wave ให้สังเกต dark spot

2) นำมา spray ด้วย 10% aq. H_2SO_4 จากนั้นนำมาอบที่ 110°C นาน 2-3 นาที จะปรากฏสีต่างๆ บน plate

(a) = a mixture of 24β-ethyl-cholasta-5, 25(27)-diene-3β-ol (clerosterol)and 24 α-ethyl-cholesta-5-ene-3β-ol (β-sitosterol) แยกได้จากมะระ

(b) = 3β-O-D-glucopyranosyl-24 ξ-ethyl-cholesta-5-ene แยกได้จากหญ้าปักกิ่ง



รูปที่ 1 Thin-Layer chromatogram ของสารสกัดจากพืช 4 ชนิดที่ส่งตรวจสอบคุณสมบัติต้านเอดส์

MOM = Phytosterol
SB1 = ลำพู (กิ่งก้าน)
BB2 = ก้างปลาขาว (กิ่งก้าน)
HL4 = สีฟันคนทา (ใบ)
PB5 = ก้างปลาแดง (กิ่งก้าน)
PL5 = ก้างปลาแดง (ใบ)
G1a = Phytosteryl glucoside

2.4 การสกัดและแยกโปรตีนจากมะระ

ผู้วิจัยได้คัดเลือกมะระเป็นพืชที่จะทำการวิจัยโดยละเอียด เนื่องจากมีข้อมูลสนับสนุนคุณสมบัติต้านเอดส์มากพอ เป็นพืชที่หาได้ทั่วไป รับประทานได้ ประกอบกับความจำเป็นที่ต้องเร่งค้นหายารักษาโรคเอดส์ มะระจึงเป็นพืชที่มีศักยภาพมากที่สุดในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคเอดส์

ทำการสำรวจปริมาณโปรตีนในผลและเมล็ดมะระ โดยทำการสกัดโปรตีนตามรูปที่ 3 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BioRad protein kit, หน้า 77) ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณโปรตีนรวม (total proteins) ในเมล็ดมะระขี้นก (MTS) มะระป่า (MWS) และผลมะระขี้นกดิบและสุก

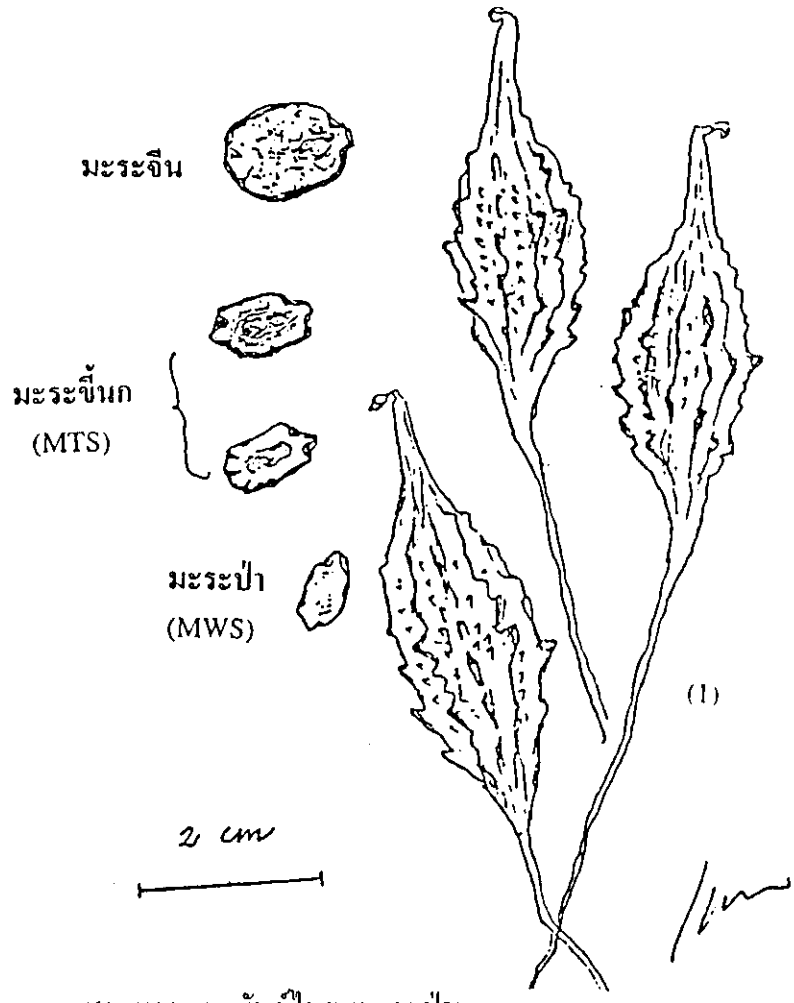
ตัวอย่าง	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาตร protein supernatant (ml)	ปริมาณโปรตีนรวม (mg/ml) (BioRad Protein kit)
1. ผลมะระขี้นกดิบ	50.330	250	0.0316
2. ผลมะระขี้นกสุก	50.004	225	0.2018
3. ผลสุก lypophilized (มะระขี้นก)	10.021	68	0.3147
4. เมล็ดมะระป่า (MWS)	11.733	25	0.9343
5. เมล็ดมะระขี้นก (MTS)	51.133	125	0.5290

มะระที่พบในประเทศไทย ได้แก่ มะระจีน (MC)* มะระขี้นก (MT)* มะระป่า (MW)* ผู้วิจัยได้เลือกมะระขี้นก และมะระป่าศึกษาวิจัย ผลของมะระขี้นกมีขนาดใหญ่กว่ามะระป่า 3-5 เท่า เก็บผลสุกสีส้มแดง ของมะระทั้งสอง จากอำเภอสามพราน และอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม นำมาแยกเมล็ดออก ล้างเนื้อผลและเนื้อสีแดงที่หุ้มเมล็ดออก นำเมล็ดแช่ในตู้แช่แข็ง (-70°C) เมล็ดของมะระขี้นก มีรหัส MTS และของมะระป่า รหัส MWS

หมายเหตุ * MC หมายถึง *Momordica, chinese*
MT หมายถึง *Momordica, thai*
MW หมายถึง *Momordica, wild*

การสกัดแยกโปรตีนจากเมล็ดมะระ*

นำเมล็ดมะระ MTS และ MWS มาสกัดแยกโปรตีนตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 3 นำ protein supernatant ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bio Rad Protein Assay (หน้า 76) พบว่า protein supernatant ของมะระ MTS มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. ของมะระ MWS 2.7 มก./มล. และ characterize protein supernatant ด้วย SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (รูปที่ 4 และ 5) นำ protein supernatant ไปผ่านขั้นตอน ammonium sulfate fractionation

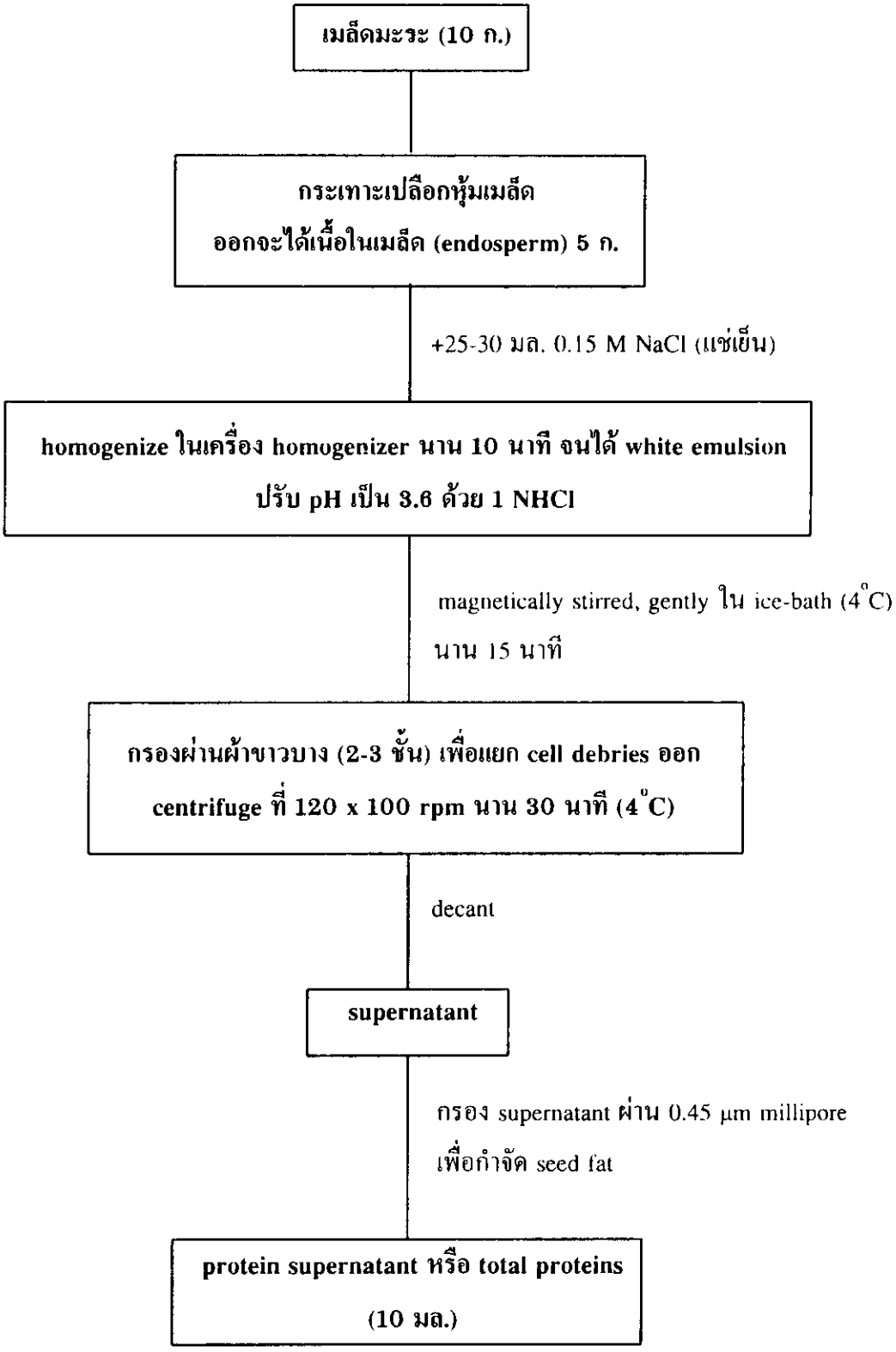


(1) ผลมะระพันธุ์ไทย (มะระป่า)
เมล็ดมะระจีน
เมล็ดมะระขี้นก (MTS)
เมล็ดมะระป่า (MWS)

รูปที่ 2 ผลมะระพันธุ์ไทย (มะระป่า) และเมล็ด (MWS) เปรียบเทียบขนาดและลักษณะเมล็ดของมะระป่า มะระขี้นกและมะระจีน

* ผู้วิจัยทดลองวิธีสกัดแยกโปรตีน ณ ห้องปฏิบัติการ Pharmacognosy and Phytochemistry คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยโตเกียว ภายใต้คำแนะนำของ Assoc. Prof. Isao Fujii และ Prof. Yutaka Ebizuka

รูปที่ 3 การสกัดแยกโปรตีนจากเมล็ดมะระ



Ammonium sulfate fraction*

เตรียม protein supernatant (ตามรูปที่ 3) ให้ได้ประมาณ 120 มล. นำมาผ่านการ fractionation ด้วย ammonium sulfate ดังนี้

0-30% Ammonium sulfate

วัดปริมาตร protein supernatant 100 มล. ชั่ง ammonium sulfate 16.6 ก. บดในโกร่ง quartz ให้ละเอียด ค่อยๆ เติมลงใน supernatant ทีละน้อย พร้อมทั้ง magnetically stirred ใน ice bath เมื่อเติม ammonium sulfate หมดแล้วทิ้งไว้ใน ice bath พร้อมกับ magnetically stirred นาน 20 นาที จากนั้นจึงนำไป centrifuge ที่ 120 x 100 rpm. นาน 30 นาที ที่ 4°C จะได้ตะกอน นำตะกอนมาละลายใน 8 มล. 50 mM $NaPO_4$ buffer, pH 6.3 ปริมาตรของ supernatant ที่วัดได้จะใช้คำนวณน้ำหนักของ ammonium sulfate ที่ต้องใช้เพื่อการ fractionation ด้วย 30-60% ammonium sulfate

30-60% Ammonium sulfate

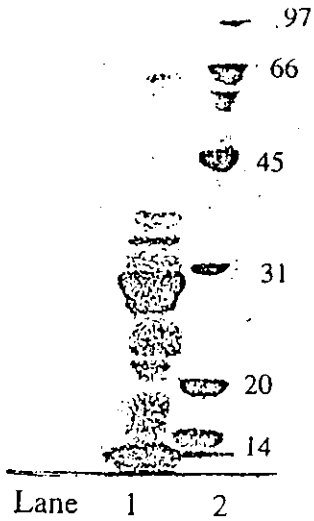
ชั่ง ammonium sulfate 19.5 ก. และปฏิบัติเช่นเดียวกับการ fractionation ข้างต้น ตะกอนที่ได้นำมาละลายใน 9 มล. 50 mM $NaPO_4$ buffer, pH 6.3

60-90% Ammonium sulfate

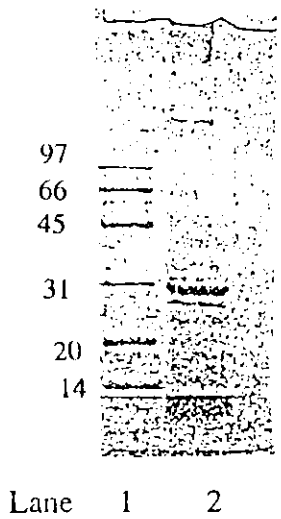
ชั่ง ammonium sulfate 23.26 ก. และปฏิบัติเช่นเดียวกับการ fractionation ข้างต้น ตะกอนที่ได้นำมาละลายใน 8 มล. 50 mM $NaPO_4$ buffer, pH 6.3

นำ fractionation ทั้งสามมาทำการ dialysis ผ่าน 20 mM $NaPO_4$ buffer, pH 6.3 2 ครั้ง (2 x 1 L) นานครั้งละ 3 ชั่วโมง นำ fractionation ทั้งสามมา characterize ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 6)

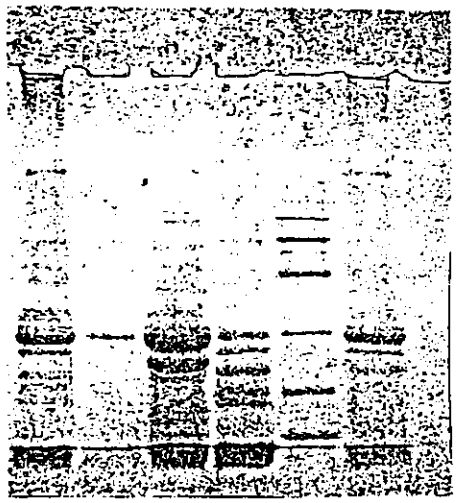
* Dawson RMC, Elliott DC, Elliot WH, M-Jones K. Data for Biochemical Research. 3rd ed. Clarenden Press-Oxford. 1986:538



รูปที่ 4 SDS-PAGE ของ protein supernatant MTS (Lane 1) เปรียบเทียบกับ mol. wt. marker (Lane 2)



รูปที่ 5 SDS-PAGE ของ protein supernatant MWS (Lane 2) เปรียบเทียบกับ mol. wt. marker (Lane 1)



Lane 1 2 3 4 5 6

รูปที่ 6 SDS-PAGE ของ ammonium sulfate fraction ของ supernatant

lane 1, 6 = protein supernatant MTS และ MWS ตามลำดับ

lane 2 = 0-30% amm. sulfate fractionation protein

lane 3 = 30-60% amm. sulfate fractionation protein

lane 4 = 60-90% amm. sulfate fractionated protein

lane 5 = mol. wt. marker

นำ protein fraction ที่ 30-60% ammonium sulfate saturation ซึ่งเป็น fraction ที่มีโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 30 kD อยู่มากมาแยกโปรตีน ให้บริสุทธิ์ต่อด้วย superose 12 gel chromatography ที่ต่อเข้ากับเครื่อง hplc ฉีด protein fraction ครั้งละ 200 µl เงื่อนไขของการแยกโปรตีนมีดังนี้

HPLC System

1. Water 510 HPLC Pump (Water, MA., USA)
2. Water 486 Tunable Absorbance Detector (Water, MA., USA.)
3. Water 712 WISP Autosampler (Water, MA., USA.)
4. Maxima 820 Programme Control (Water, MA., USA.) (Software)

Column : Superose 12 HR10/30 (Phamacia, Sweden)

Mobile phase : 50 mM Sodium Phosphate Buffer + 0.2 M NaCl (pH 6.3)

Flow rate : 0.5 ml/min

Detector : UV 280 nm

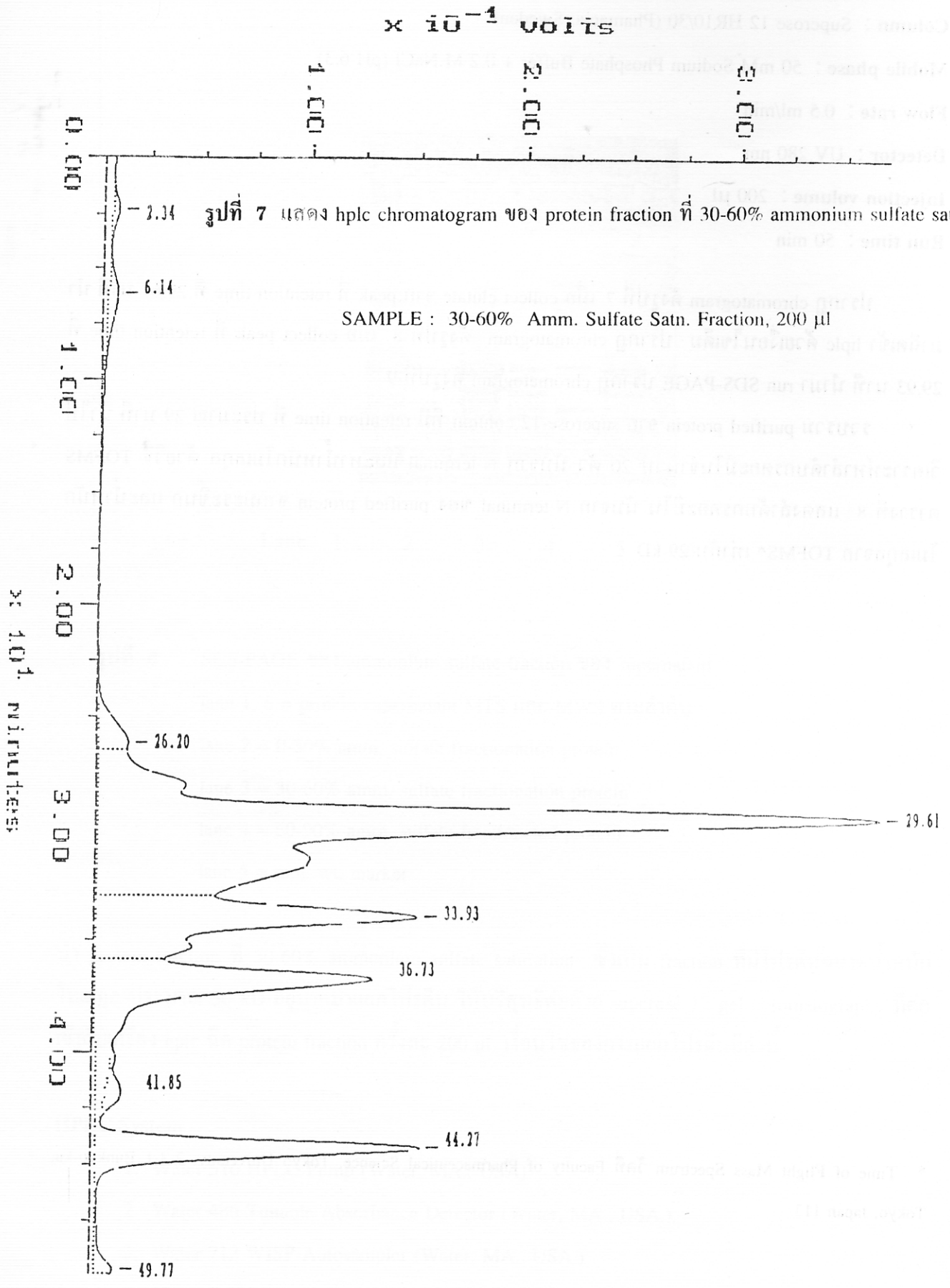
Injection volume : 200 µl

Run time : 50 min

ปรากฏ chromatogram ดังรูปที่ 7 เมื่อ collect elutate จาก peak ที่ retention time ที่ 29.61 นาที นำมาฉีดเข้า hplc ด้วยเงื่อนไขเดิม ปรากฏ chromatogram ดังรูปที่ 8 เมื่อ collect peak ที่ retention time ที่ 29.93 นาที นำมา run SDS-PAGE ปรากฏ chromatogram ดังรูปที่ 9

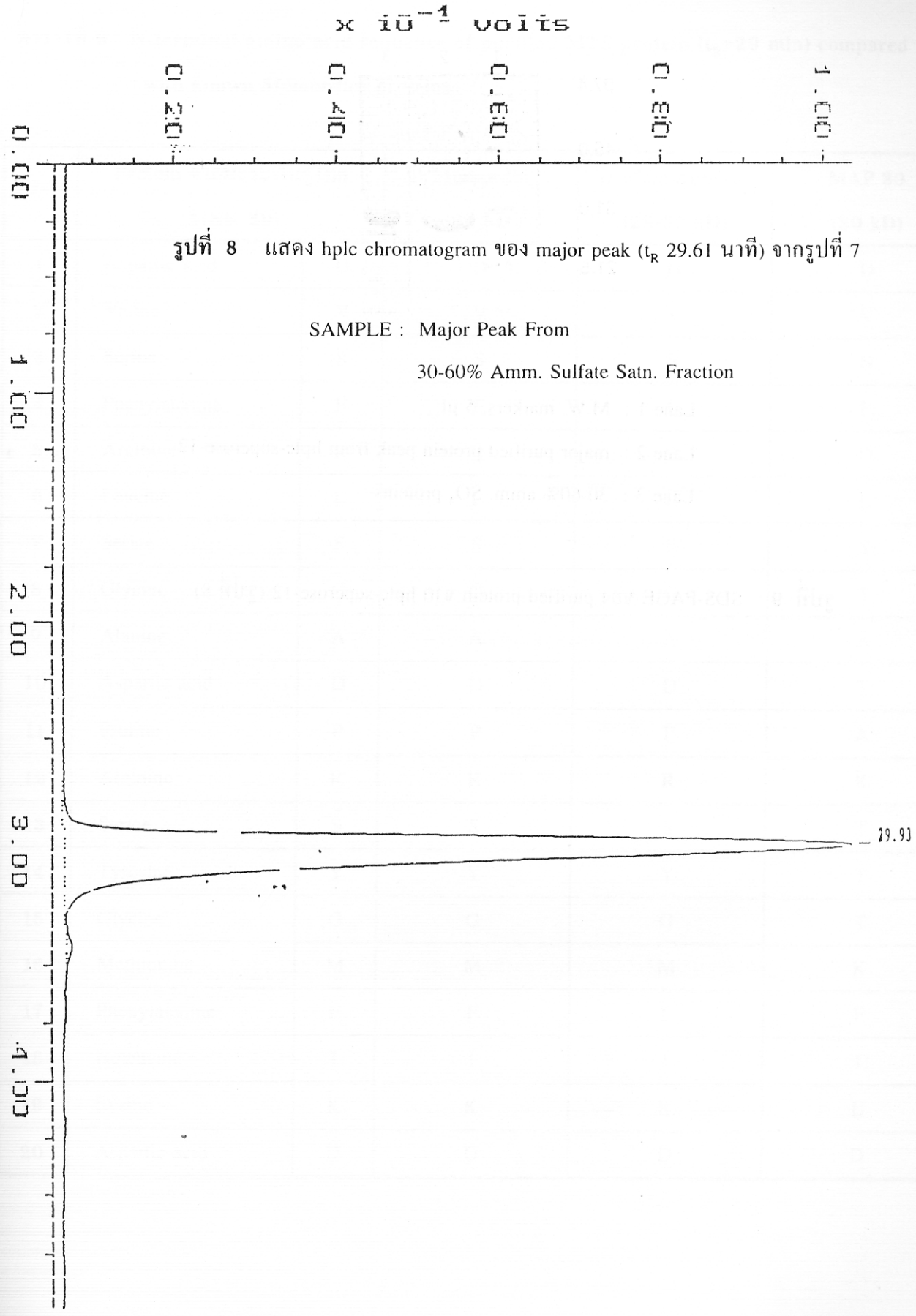
รวบรวม purified protein จาก superose-12 column ที่มี retention time ที่ ประมาณ 29 นาที นำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว นับจาก N-terminal และหาน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี TOFMS ตารางที่ 8 แสดงลำดับกรดอะมิโน นับจาก N-terminal ของ purified protein จากมะระขี้นก และน้ำหนักโมเลกุลจาก TOFMS* เท่ากับ 29 kD

* Time of Flight Mass Spectrum วัดที่ Faculty of Pharmaceutical Science, Tokyo University, 7-3-1 Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113



รูปที่ 7 แสดง hplc chromatogram ของ protein fraction ที่ 30-60% ammonium sulfate saturation

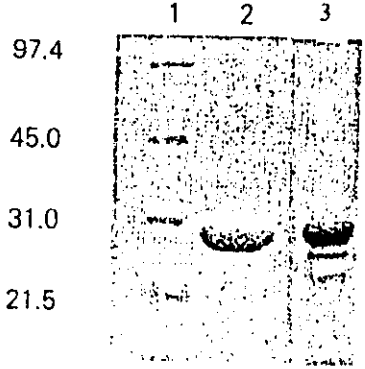
SAMPLE : 30-60% Amm. Sulfate Satn. Fraction, 200 µl



รูปที่ 8 แสดง hplc chromatogram ของ major peak (t_R 29.61 นาที) จากรูปที่ 7

SAMPLE : Major Peak From

30-60% Amm. Sulfate Satn. Fraction



Lane 1 : M.W. markers, 5 µl

Lane 2 : major purified protein peak from hplc-superose-12

Lane 3 : 30-60% amm. SO_4 proteins

รูปที่ 9 SDS-PAGE ของ purified protein จาก hplc-superose-12 (รูปที่ 8)

ตารางที่ 8 N-terminal amino acid sequence of purified MTS protein (t_R~29 min) compared with known *Momordica* proteins

Cycle	Protein จากมะระพันธุ์ไทย (MRK 29)		Momordin 24 kD	α-Momorcharin (29-32 kD)	MAP 30 (30 kD)
1	Aspartic acid	D	D	D	D
2	Valine	V	V	V	V
3	Serine	S	S	S	N
4	Phenylalanine	F	F	F	F
5	Arginine	R	R	R	D
6	Leucine	L	L	L	L
7	Serine	S	S	S	S
8	Glycine	G	G	G	T
9	Alanine	A	A	A	A
10	Aspartic acid	D	D	D	T
11	Proline	P	P	P	A
12	Arginine	R	R	R	K
13	Serine	S	S	S	T
14	Tyrosine	Y	Y	Y	T
15	Glycine	G	G	G	T
16	Methionine	M	M	M	K
17	Phenylalanine	F	F	F	F
18	Isoleucine	I	I	I	I
19	Lysine	K	K	K	E
20	Aspartic acid	D	D	D	D

จากการสกัดแยกโปรตีนจากมะระขี้นก สรุปความสำคัญได้ดังนี้

เมล็ดมะระขี้นก (สด) 100 ก. ให้โปรตีนรวม (total protein) 125 มก.

เมล็ดมะระขี้นก (สด) 100 ก. ให้ protein fraction ที่ 30-60% ammonium sulfate saturation (active protein fraction) 28 มก.

เมล็ดมะระขี้นก (สด) 100 ก. ให้ purified protein ซึ่งมี retention time ที่ ~ 29 นาที และ น้ำหนักโมเลกุล 29.1 kD 3 มก. (MRK 29)

ส่ง total proteins, active protein fraction และ MRK 29 ตรวจสอบคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase และผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

2.5 การตรวจสอบคุณสมบัติต้านเอดส์โดยวิธี reverse transcriptase inhibition

ตรวจสอบคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV reverse transcriptase โดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope assay) มีหลักการทดสอบดังนี้

1. สารละลายและเอนไซม์

1.1 การเตรียม mixture solution

mixture solution ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	7.57	ml
2MKCl	0.5	ml
2MDTT	0.03	ml
1M trisHCl pH 8.0	1	ml
1M Mg $(OAc)_2$	0.1	ml
2.5% Nonidet P-40	0.8	ml

mixture solution นี้ใช้เป็นสารละลายหลักในการเตรียม mixture I และ mixture II solution

1.2 การเตรียม mixture I solution

mixture I solution ประกอบด้วย

mixture solution	40	µl
2.9 mg/ml dTTP	10	µl
น้ำกลั่น	12	µl
50/µCi/ml (^{3}H)-dTTP	5	µl

1.3 การเตรียม mixture II solution

mixture II solution ประกอบด้วย

mixture solution	10	µl
10 mg/ml bovine serum albumin	2	µl
1 unit/µl HIV-1-RT	1	µl

1.4. Poly(A). $(DT)_{15}$ ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้น 0.8 µl/ml สารละลายทุกชนิดเตรียมใหม่ทันทีก่อนใช้ และเก็บใน ice-box ตลอดการทดลอง

2. ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ HIV-I retroviral reverse transcriptase ใช้ตัวอย่างทดสอบ 10 µl ผสมให้เข้ากันกับสารละลายต่างๆ ตามลำดับดังนี้

mixture solution I 67 µl สารละลาย poly (A). $(dT)_{15}$ 10 µl และ mixture solution II 13 µl นำไปบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที

เติม 5% trichloroacetic acid (TCA) ที่เย็น 1 ml กรองผ่าน nitrocellulose membrane(0.45 µm) ล้าง membrane ด้วย 5% TCA ที่เย็น 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย 1% acetic acid ทำให้แห้งภายใต้ infrared lamp นำมาใส่ใน scintillation cocktail และ count โดยใช้ liquid scintillation system

ทำการทดลอง 2 ชุด ชุดที่ 1 ใช้ตัวทำละลายของตัวอย่างทดสอบ แทนที่จะใช้ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 2 ประกอบด้วยส่วนผสมเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase

ผลการทดลองแสดงเป็น % of relative inhibitory ratio (%IR) ซึ่งได้จากการคำนวณ ดังนี้

$$\%IR = 100 - \frac{CPM(Complete\ System) - CPM(Complete - RT)}{CPM(Complete - Sample) - CPM(Complete - RT)} \times 100$$

ตารางที่ 9 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ HIV-RT ของสารสกัดจากพืชและโปรตีนจากมะระขี้นก

Plant	solvent	conc. (μg/ml)	%IR
กิ่งลำพู	water	200	37.38
กิ่งก้างปลาขาว	water	200	1.45
ใบสีฟันคนทา	water	200	0
ใบก้างปลาแดง	water	200	0
กิ่งก้างปลาแดง	water	200	0
มะระ			
1. total proteins	water	90	31.8
2. active protein fraction	water	120	48.75
3. MRK 29	water	17.97	46.62

ตารางที่ 10 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ HIV-RT ของ active protein fraction จากมะระขี้นก (MTS) และมะระป่า (MWS)

Sample	concentration (μg/ml)	%IR
MTS protein fraction	11.5	46
MWS protein fraction	5	50

หมายเหตุ : MAP 30 มี 50 %IR ที่ความเข้มข้น 1 μg

จากผลการตรวจสอบคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HIV-reverse transcriptase แสดงว่า สารสกัดจากพืช คือ กิ่งลำพู กิ่งก้างปลาขาว ใบสีฟันคนทา ใบก้างปลาแดงและกิ่งก้างปลาแดง ไม่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์

สำหรับการตรวจสอบโปรตีนที่แยกได้จากมะระขี้นก พบว่า active protein fraction แสดง 50%IR ที่ความเข้มข้น 120 μg/ml และ MRK 29 ซึ่งเป็น major protein ใน active protein fraction แสดง 50%IR ที่ความเข้มข้น 17.97 μg/ml

ได้เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์ HIV-reverse transcriptase ของ active protein fraction จากมะระขี้นก และมะระป่า พบว่า active protein fraction จากมะระป่า ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่า (ตารางที่ 10)

2.6 การตรวจสอบผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory activity)

2.6.1 การแยกเซลล์ mononuclear (lymphocyte , macrophage)

การแยกเซลล์ mononuclear ใช้วิธีการ density centrifugation คือ ใช้สารผสม Ficoll/Hypaque ที่มีความหนาแน่น 1.07 g/ml หรือใช้สารผสมสำเร็จ ชื่อ Lymphoprep (Pharmacia) เป็นสารที่ใช้แยก mononuclear จากตัวอย่างเลือดของคนปกติ (ผู้ที่มาบริจาคโลหิตที่หน่วยโลหิตวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี) โดยใช้ Heparin (Leo) เป็นสารกันเลือดแข็ง ขั้นตอนในการทำมีย่อๆ ดังนี้

ก. Ficoll : Hypaque หรือ Lymphoprep solution เป็นปริมาตร 2.5 ml ใส่ใน tube 13 x 100 mm.

ข. Overlayer ตัวอย่างเลือด ประมาณ 3 ml อย่างเบาๆ (ให้แยกเป็นชั้นอยู่)

ค. นำไป centrifuge ที่ 400 g, 30 นาที, 25°C

ง. ใช้ pasteur pipette ดูดเอาส่วนขุ่น (เป็นชั้นของเซลล์ mononuclear) ระหว่างรอยต่อของ plasma (ชั้นบน) และสารผสม ficoll : hypaque หรือ lymphoprep

จ. ทำการล้างเซลล์ mononuclear โดยใช้ culture medium หรือ phosphate buffer saline ปั่นล้างโดย centrifuge ที่ 400 g, 10 นาที, 25°C ใน centrifuge tube (12 ml) เป็นจำนวน 3 ครั้ง

ฉ. ทำการตรวจนับจำนวน living cell โดยการย้อมด้วยสี 0.1% tryphan blue นับภายใต้ microscope บน hemacytometer จะสามารถคำนวนจำนวน living cell ทั้งหมดและสามารถปรับความเข้มข้นให้ได้ตามต้องการ

ช. ทำการตรวจชนิดของเซลล์ที่ได้ โดยการทำเป็น film บน slide (เช่นเดียวกับการทำ blood film) ย้อมด้วยสี giemsa และทำการตรวจหาชนิดของเซลล์ว่ามี polymorphonuclear cell ปะปนหรือไม่

ซ. ทำการแยกชนิดเซลล์ mononuclear ให้เป็น lymphocyte (plastic non-adherance cell) และ macrophage/monocyte (plastic adherance cell) โดยการปรับความเข้มข้นของเซลล์ mononuclear ที่เตรียมได้ให้เป็น 2 x 10^6 เซลล์/ml ใส่ใน tissue culture petri-dish (sterile) นำไปวางใน incubator 37°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำออกมาดูดเอาสารน้ำจาก petri-dish ใส่ในcentrifuge tube นำไป centrifuge จะได้เซลล์ที่จัดว่าเป็น lymphocyte (plastic non-adherance cell) สำหรับใช้ทดสอบต่อไป

สำหรับ macrophage/monocyte (plastic adherance cell) จะได้จากการเติมสารละลาย EDTA 5 mM ลงใน petri-dish (ที่ใช้ดังกล่าวข้างต้น) นำไปวางใน incubator 37°C, 30 นาที หลังจากนั้นนำออกมา และดูดเอาสารน้ำออกจาก

petri-dish ทั้งหมดใส่ลงใน centrifuge tube ปั่นเซลล์ลงจะได้เซลล์ชนิด macrophage/monocyte (plastic adherance) สำหรับทดสอบต่อไป

ฌ. เซลล์ plastic adherance ทำการตรวจสอบว่าเป็นเซลล์ macrophage/monocyte โดยการย้อมด้วย non-specific esterase staining ซึ่งจะให้สีแดง, น้ำตาล ใน cytoplasm ของเซลล์พวก macrophage/monocyte (plastic adherance) โดยวิธีการนี้จะเตรียม macrophage/monocyte ได้จำนวนประมาณ 3% ของเซลล์ mononuclear ที่ทำการแยก

2.6.2 การจัดตั้งวิธีการทำ proliferation

เป็นการติดตามการตรวจหาความสามารถของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน คือ mononuclear cell (ได้แก่ T lymphocyte, B lymphocyte และ monocyte) เมื่อมีการกระตุ้นด้วยสารพวก mitogen ได้แก่ Phytohemagglutinin-P (PHA-P), Concanavalin-A (Con-A) และ Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในห้องปฏิบัติการที่จะสามารถศึกษาว่าเซลล์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการทำงานคือสามารถเพิ่มจำนวนเมื่อได้รับการกระตุ้นหรือไม่ ซึ่งอาจหมายถึงเซลล์เหล่านั้นย่อมมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในร่างกายและมีผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานให้เป็นประโยชน์สำหรับบุคคลนั้นๆ

ก. การกระตุ้นด้วย PHA-P

1. โดยการใช้ความเข้มข้น PHA-P ต่างกัน และจำนวนเซลล์ที่ใช้ต่างกัน (สำหรับหาภาวะที่ให้ผลดีที่สุด และหรือในกรณีที่มีเซลล์สำหรับนำมาทดสอบจำนวนจำกัด) ผลดังนี้

จำนวนเซลล์/200µl	ค่า Stimulation index		
	PHA-P (0.2 µg/ml)	PHA-P (1.0 µg/ml)	PHA-P (1.5 µg/ml)
$1x10^4$	7.5	5.9	25.2
$2x10^4$	-	-	31.0
$3x10^4$	28.4	22	28.5
$4x10^4$	-	-	40
$5x10^4$	61.8	51.3	43

* กระตุ้น 3 วัน ^{3}HT 18 ชั่วโมง

$$\text{Stimulation index} = \frac{\text{ค่า dpm } ^3\text{H จากการกระตุ้นด้วย PHA-P}}{\text{ค่า dpm } ^3\text{H จากการไม่กระตุ้น}}$$

2. โดยการทดลองเปรียบเทียบเวลาการกระตุ้น 1,2,3 วัน เมื่อใช้กระตุ้นด้วย PHA-P ที่ความเข้มข้น 1.5 μg/ml มีผลดังนี้

จำนวนเซลล์/200μl	ค่า Stimulation index		
	1 วัน	2 วัน	3 วัน
$1x10^4$	6.0	13.8	25.2
$2x10^4$	7.6	57.0	31.0
$3x10^4$	12.3	48.2	28.5
$4x10^4$	8.8	25.6	40
$5x10^4$	13.8	22	43

^{3}HT 18 ชั่วโมง

ข. กระตุ้นด้วย Con-A

ใช้ความเข้มข้น 4 μg/ml

1. กระตุ้น 3 วัน ^{3}HT 18 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ต่างๆ ได้ผลดังนี้

จำนวนเซลล์/200 μl	ค่า Stimulation index
$1x10^4$	2.7
$2x10^4$	10.6
$3x10^4$	15.3
$4x10^4$	19.3

2. กระตุ้น 1, 2 วัน ^{3}HT 6 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ต่างๆ ผลดังนี้

	ค่า Stimulation index	
จำนวนเซลล์/200 μl	1 วัน	2 วัน
$1x10^4$	1.5	22.9
$2x10^4$	2.0	3.3
$3x10^4$	4.8	7.0
$4x10^4$	6.9	11.5
$5 x 10^4$	7.5	8.6

ค. การกระตุ้นด้วย LPS

ใช้ความเข้มข้น 0.04 μg/ml

1. กระตุ้น 3 วัน ^{3}HT 18 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ต่างๆ ได้ผลดังนี้

จำนวนเซลล์/200 μl	ค่า Stimulation index
$1x10^4$	1.1
$2x10^4$	1.2
$3x10^4$	1.0
$4x10^4$	1.1
$5 x 10^4$	1.1

2. กระตุ้น 1, 2 วัน ^{3}HT 6 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ต่างๆ ผลดังนี้

	ค่า Stimulation index	
จำนวนเซลล์/200 μl	1 วัน	2 วัน
$1x10^4$	1.2	1.4
$2x10^4$	1.2	1.2
$3x10^4$	1.5	1.2
$4x10^4$	1.1	1.2
$5 x 10^4$	0.7	1.0

2.6.3 การจัดตั้งวิธีการทำ cytotoxic assay

เป็นการตรวจหาประสิทธิภาพของ mononuclear cell ชนิด Natural Killer (NK) เซลล์ โดยการทำวิธี ^{51}Cr released assay เป็นวิธีการที่จะต้องใช้สาร $Na_2{}^{51}CrO_4$ solution ติดเข้ากับเซลล์ชนิด K 562 (Leukemic cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่จะถูกทำลายโดยเซลล์ NK ของคน นำ mononuclear เซลล์ที่จะศึกษามาผสมร่วมกับเซลล์ K 562 ที่ติดฉลากด้วย ^{51}Cr และให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสม ($37^{\circ}C$, $5\%CO_2$) นานประมาณ 4 ชั่วโมง ตรวจหาจำนวนของ ^{51}Cr ที่มีออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ จะทำให้แสดงประสิทธิภาพของ NK เซลล์จากตัวอย่างที่ศึกษาได้ โดยคำนวนผลเป็นค่า % cytotoxicity

2.6.4 การจัดตั้งวิธีการหาชนิดของเซลล์ lymphocyte

เป็นการใช้สาร monoclonal antibody ในการตรวจหา ชนิดของ monoclonal antibody จะเป็นชนิดที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อโมเลกุล CD ดังนี้ เช่น CD 3 (ต่อ T lymphocyte), CD4 (ต่อ T helper/TCD 4+), CD 8 (ต่อ T cytotoxic/TCD 8+) โดยการย้อมเซลล์และตรวจนับโดยเครื่อง Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) หรือการย้อมทาง immunohistology เช่นใช้ alkaline phosphatase-anti alkali phosphatase

ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory activity)

ผลการวิจัย

1. โปรตีนจากมะระขี้นก (I) และมะระป่า (II)

1.1 total protein I

1.2 major protein I

1.3 total protein II

1.4 major protein II

1.5 active protein fraction II

ก. ทดสอบคุณสมบัติเป็น polyclonal mitogen

วิธีทดลอง แยก periperal blood mononuclear cells (PBMC) จากคนแข็งแรงปกติ (จำนวน 5 ราย) นำมา culture ร่วมกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 2 ความเข้มข้น (1, 10 µg/ml สำหรับตัวอย่าง 1.1, 1.2 และ 10, 100 µg/ml สำหรับตัวอย่าง 1.3, 1.4, 1.5) เป็นเวลานาน 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน อ่านผลโดยใช้ PHA (Phytoheamagglutinin) เป็น positive control ด้วยการ label DNA synthesis โดย ^{3}H Thymidine เปรียบเทียบผลเป็น Stimulation index (S.I.) มีค่าเป็น dpm Experiment/dpm Control

ผล

1. เมื่อ culture นาน 3 วัน

	จำนวน PBMC/well 200 µl			
	$5x10^4$		$1x10^5$	
ค่า S.I. ของ PHA	96.4		20.9	
	เข้มข้น 1	**เข้มข้น 2**	**เข้มข้น 1**	**เข้มข้น 2**
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.1	0.9	1.1	0.5	0.3
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.2	0.9	1.0	0.3	0.4
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.3	1.2	0.9	0.4	0.3
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.4	0.8	0.9	0.2	0.3
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.5	0.9	0.9	0.3	0.2

2. เมื่อ culture นาน 5 วัน

	จำนวน PBMC/well 200 µl			
	$5x10^4$		$1x10^5$	
ค่า S.I. ของ PHA	16.1		28.3	
	เข้มข้น 1	**เข้มข้น 2**	**เข้มข้น 1**	**เข้มข้น 2**
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.1	0.4	0.4	1.0	1.0
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.2	0.4	0.4	0.8	1.0
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.3	0.4	1.0	1.1	0.9
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.4	0.4	0.7	1.2	1.1
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.5	0.4	0.6	0.9	1.0

3. เมื่อ culture นาน 7 วัน

	จำนวน PBMC/well 200 µl			
	$5x10^4$		$1x10^5$	
ค่า S.I. ของ PHA	10.0		6.6	
	เข้มข้น 1	**เข้มข้น 2**	**เข้มข้น 1**	**เข้มข้น 2**
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.1	0.5	0.9	1.4	1.1
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.2	0.5	0.5	1.1	1.2
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.3	1.0	0.9	1.3	0.9
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.4	0.6	1.7	1.0	1.3
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.5	0.7	1.0	1.1	1.1

4. เมื่อ culture นาน 10 วัน

	จำนวน PBMC/well 200 µl			
	$5x10^4$		$1x10^5$	
ค่า S.I. ของ PHA	3.0		6.1	
	เข้มข้น 1	**เข้มข้น 2**	**เข้มข้น 1**	**เข้มข้น 2**
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.1	1.6	0.5	1.1	1.1
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.2	0.5	0.6	1.3	1.3
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.3	0.7	0.8	2.0	2.2
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.5	0.8	0.6	1.6	1.0

5. เมื่อ culture นาน 14 วัน

	จำนวน PBMC/well 200 µl			
	$5x10^4$		$1x10^5$	
ค่า S.I. ของ PHA	3.3		1.2	
	เข้มข้น 1	**เข้มข้น 2**	**เข้มข้น 1**	**เข้มข้น 2**
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.1	0.8	0.9	0.9	3.0
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.2	2.1	0.4	2.1	2.2
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.3	1.2	1.2	1.0	2.5
ค่า S.I ตัวอย่าง 1.5	0.9	1.5	0.9	0.8

ข. ทดสอบคุณสมบัติต่อการตอบสนองของ PBMC ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย T cell mitogen (คือ PHA)

วิธีทดลอง ใช้ PBMC จากคนปกติ 3 ราย ทดสอบกับสารตัวอย่าง 3 ชนิด คือ ตัวอย่าง 1.3, 1.4, 1.5 (1.1, 1.2 หมด) โดย

1. culture PBMC และสารตัวอย่างร่วมกับ PHA และหาค่า S.I. (เช่นเดียวกับข้อ ก.)
2. culture PBMC ร่วมกับสารตัวอย่างนาน 3 วัน แล้วจึง culture ร่วมกับ PHA หาค่า S.I.

ผล การทดสอบแบบ 1

ค่า S.I.	คนที่ 1
PHA	9
PHA + สารตัวอย่าง 1.3	3.5
PHA + สารตัวอย่าง 1.4	6.1
PHA + สารตัวอย่าง 1.5	11.3

การทดสอบแบบ 2

ค่า S.I.	คนที่ 1	คนที่ 2	คนที่ 3
PHA	6.5	1.5	1.4
PHA + สารตัวอย่าง 1.3	7.5	2.3	4.7
PHA + สารตัวอย่าง 1.4	9.5	0.5	1.9
PHA + สารตัวอย่าง 1.5	6.9	0.5	3.1

ค. ทดสอบผลต่อความสามารถของ NK (Natural Killer) cell

วิธีทดลอง ใช้ PBMC ของคนปกติแข็งแรง 3 ราย ทดสอบกับสารตัวอย่าง 3 ชนิด (ตัวอย่าง 1.3, 1.4, 1.5) โดย culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน 3 วัน แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการทำลาย (cytotoxic) เซลล์ K562 ที่ label ด้วย ^{51}Cr

ผล ค่า % cytotoxicity (Effector : Target = 100 : 1)

	คนที่ 1	**คนที่ 2**	**คนที่ 3**
PBMC ปกติ	0	0	0
PBMC + ตัวอย่าง 1.3	0	0	0
PBMC + ตัวอย่าง 1.4	7	0	0
PBMC + ตัวอย่าง 1.5	3	0	50

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{cpm Experiment - cpm Spontaneous}}{\text{cpm Maximum - cpm Spontaneous}} \times 100$$

ง. ทดสอบผลต่อความสามารถของ monocyte/macrophage (adherence) cell

วิธีทดลอง ใช้ PBMC ของคนปกติ 3 ราย ทดสอบกับสารตัวอย่าง 3 ชนิด (ตัวอย่าง 1.3, 1.4, 1.5) โดย culture ร่วมกับสารตัวอย่างทดสอบทันทีหรือนาน 3 วัน ใช้สารละลาย EDTA เป็นวิธีนำเซลล์ที่ adhere กับ tissue culture flask มาทดสอบความสามารถของเซลล์ในการหลั่งสาร TNF (Tumor Necrosis Factor) เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (Lipopolysaccharide) ตรวจสาร TNF โดยวิธี Bioassay กับเซลล์ L929

ผล แสดงผลเป็นค่า % Lysis ของเซลล์ L929

1. เมื่อ adherence cell (monocyte/macrophage) ทดสอบทันทีเมื่ออยู่ร่วมกับสารตัวอย่าง

	คนที่ 1	คนที่ 2	คนที่ 3
ไม่มีสารตัวอย่าง	22	10	11
มีสารตัวอย่าง 1.3	32	29	25
มีสารตัวอย่าง 1.4	22	16	5
มีสารตัวอย่าง 1.5	64	33	31

2. เมื่อ adherence cell (monocyte/macrophage) culture ร่วมกับสารตัวอย่าง นาน 3 วัน

	คนที่ 1	คนที่ 2	คนที่ 3
ไม่มีสารตัวอย่าง	9	6	21
มีสารตัวอย่าง 1.3	-3	-9	-11
มีสารตัวอย่าง 1.4	-6	-13	-15
มีสารตัวอย่าง 1.5	2	0	4

2. สารสกัดจากพืชต่อไปนี้

1. ลำพู (กิ่ง)
2. ก้างปลาขาว (กิ่ง)
3. สีฟันคนทา (ใบ)
4. ก้างปลาแดง (กิ่ง)
5. ก้างปลาแดง (ใบ)
6. สารสกัดโปรตีนจากมะระ (0-30% amm.SO_4 satn.)
7. สารสกัดโปรตีนจากมะระ (30-60% amm.SO_4 satn.)
8. สารสกัดโปรตีนจากมะระ (60-90% amm.SO_4 satn.)

ก. การติดตาม PBMC ที่มี surface marker CD 3/4 และ CD 3/8 จากคนปกติ จำนวน 4 ราย เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่าง 8 ชนิด นาน 5, 7 วัน

วิธีทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 2 ก. และตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติด CD 3/4 หรือ CD 3/8 ด้วยเครื่อง FACS

ผล แสดงค่า percentage ของ CD 3/4 และ CD 3/8 ของแต่ละคนดังนี้

1. PBMC ของคนที่ 1

	0 วัน		5 วัน		7 วัน	
	% CD 3/4	% CD 3/8	% CD 3/4	% CD 3/8	CD 3/4	CD 3/8
ไม่มีสาร	25	30				
ตัวอย่างสาร 1			36	37	38	31
ตัวอย่างสาร 2			37	37	39	29
ตัวอย่างสาร 3			34	39	39	30
ตัวอย่างสาร 4			37	39	39	36
ตัวอย่างสาร 5			37	35	39	33
ตัวอย่างสาร 6			35	35	37	33
ตัวอย่างสาร 7			36	38	38	29
ตัวอย่างสาร 8			34	34	38	30

2. PBMC ของคนที่ 2

	0 วัน		5 วัน		7 วัน	
	% CD 3/4	% CD 3/8	% CD 3/4	% CD 3/8	CD 3/4	CD 3/8
ไม่มีสาร	17	35				
ตัวอย่างสาร 1			33	32	20	18
ตัวอย่างสาร 2			33	33	25	19
ตัวอย่างสาร 3			34	35	36	19
ตัวอย่างสาร 4			33	30	29	20
ตัวอย่างสาร 5			34	35	18	12
ตัวอย่างสาร 6			35	32	24	17
ตัวอย่างสาร 7			36	32	23	18
ตัวอย่างสาร 8			36	34	24	16

3. PBMC ของคนที่ 3

	0 วัน		5 วัน		7 วัน	
	% CD 3/4	% CD 3/8	% CD 3/4	% CD 3/8	CD 3/4	CD 3/8
ไม่มีสาร	22	24	36	30	31	33
ตัวอย่างสาร 1			32	33	36	26
ตัวอย่างสาร 2			-	-	29	27
ตัวอย่างสาร 3			32	34	31	28
ตัวอย่างสาร 4			31	34	31	32
ตัวอย่างสาร 5			31	32	30	32
ตัวอย่างสาร 6			31	31	31	30
ตัวอย่างสาร 7			30	36	33	30
ตัวอย่างสาร 8			34	35	33	32

4. PBMC ของคนที่ 4

	0 วัน		5 วัน		7 วัน	
	% CD 3/4	% CD 3/8	% CD 3/4	% CD 3/8	CD 3/4	CD 3/8
ไม่มีสาร	29	23	26	18	41	28
ตัวอย่างสาร 1			22	22	42	30
ตัวอย่างสาร 2			22	18	42	31
ตัวอย่างสาร 3			24	16	38	28
ตัวอย่างสาร 4			22	17	41	33
ตัวอย่างสาร 5			21	14	41	29
ตัวอย่างสาร 6			24	14	39	29
ตัวอย่างสาร 7			23	17	42	29
ตัวอย่างสาร 8			23	15	38	31

ข. ทดสอบผลต่อความสามารถของ NK cell

วิธีทดลอง ใช้ PBMC จากคนปกติ 4 ราย นำมา culture ร่วมกับสารตัวอย่าง 8 ชนิด นาน 5, 7 วัน ทดสอบความสามารถของ NK cell ใน PBMC โดยวิธี Cytotoxic ต่อ ^{51}Cr K562

ผล คำนวนเป็นค่า % cytotoxic ดังนี้

1. PBMC รายที่ 1

	% cytotoxic (Effector : Target = 50 : 1) เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	0	1
สารตัวอย่าง 2	0	1
สารตัวอย่าง 3	2	-
สารตัวอย่าง 4	0	-
สารตัวอย่าง 5	5	1
สารตัวอย่าง 6	-	1
สารตัวอย่าง 7	3	-
สารตัวอย่าง 8	4	1

2. PBMC รายที่ 2

	% cytotoxic (Effector : Target = 50 : 1) เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	0	2
สารตัวอย่าง 2	0	0
สารตัวอย่าง 3	5	2
สารตัวอย่าง 4	0	2
สารตัวอย่าง 5	4	3
สารตัวอย่าง 6	0	3
สารตัวอย่าง 7	0	1
สารตัวอย่าง 8	0	2

3. PBMC รายที่ 3

	% cytotoxic (Effector : Target = 50 : 1) เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	0	0
สารตัวอย่าง 2	2	0
สารตัวอย่าง 3	0	0
สารตัวอย่าง 4	1	0
สารตัวอย่าง 5	1	0
สารตัวอย่าง 6	1	4
สารตัวอย่าง 7	3	0
สารตัวอย่าง 8	3	0

4. PBMC รายที่ 4

	% cytotoxic (Effector : Target = 50 : 1) เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	3	0
สารตัวอย่าง 2	2	0
สารตัวอย่าง 3	3	0
สารตัวอย่าง 4	4	0
สารตัวอย่าง 5	4	0
สารตัวอย่าง 6	2	2
สารตัวอย่าง 7	1	0
สารตัวอย่าง 8	2	0

ค. ทดสอบผลต่อ monocyte/macrophage (adherence cell ใน PBMC)

วิธีทดลอง ใช้ adherence cell จาก PBMC ที่ culture ร่วมกับสารตัวอย่าง 8 ชนิด ทดสอบความสามารถในการสร้าง TNF เมื่อกระตุ้นด้วย LPS โดย L929 cytolysis bioassay

ผล คำนวนค่า % L929 cytolysis

1. PBMC ของคนที่ 1

	ค่า % L929 cytolysis เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	0	24
สารตัวอย่าง 2	5	39
สารตัวอย่าง 3	0	7
สารตัวอย่าง 4	0	21
สารตัวอย่าง 5	0	0
สารตัวอย่าง 6	0	18
สารตัวอย่าง 7	0	40
สารตัวอย่าง 8	0	3

2. PBMC ของคนที่ 2

	ค่า % L929 cytolysis เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	56	0
สารตัวอย่าง 2	12	0
สารตัวอย่าง 3	5	16
สารตัวอย่าง 4	46	0
สารตัวอย่าง 5	9	13
สารตัวอย่าง 6	0	17
สารตัวอย่าง 7	22	29
สารตัวอย่าง 8	17	24

3. PBMC ของคนที่ 3

	ค่า % L929 cytolysis เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	3	0
สารตัวอย่าง 2	6	0
สารตัวอย่าง 3	6	0
สารตัวอย่าง 4	0	0
สารตัวอย่าง 5	0	0
สารตัวอย่าง 6	0	0
สารตัวอย่าง 7	0	0
สารตัวอย่าง 8	0	0

4. PBMC ของคนที่ 4

	ค่า % L929 cytolysis เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	3	38
สารตัวอย่าง 2	0	11
สารตัวอย่าง 3	0	9
สารตัวอย่าง 4	21	28
สารตัวอย่าง 5	6	0
สารตัวอย่าง 6	26	0
สารตัวอย่าง 7	5	27
สารตัวอย่าง 8	0	41

ง. ทดสอบผลต่อความสามารถของ PBMC เมื่อกระตุ้นด้วย polyclonal mitogen

1. ผล proliferation เป็นค่า S.I. ต่อ T cell mitogen (PHA)

1.1 PBMC ของคนที่ 1

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	59	12
สารตัวอย่าง 2	53	14
สารตัวอย่าง 3	48	1.1
สารตัวอย่าง 4	40	-
สารตัวอย่าง 5	59	4.3
สารตัวอย่าง 6	31	11
สารตัวอย่าง 7	40	11
สารตัวอย่าง 8	45	11
ไม่มีสารตัวอย่าง = 62		

1.2 PBMC ของคนที่ 2

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	36	15
สารตัวอย่าง 2	39	9
สารตัวอย่าง 3	23	1.1
สารตัวอย่าง 4	37	7
สารตัวอย่าง 5	32	7
สารตัวอย่าง 6	38	8
สารตัวอย่าง 7	28	7
สารตัวอย่าง 8	34	8
ไม่มีสารตัวอย่าง = 22		

1.3 PBMC ของคนที่ 3

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	51	19
สารตัวอย่าง 2	45	22
สารตัวอย่าง 3	40	16
สารตัวอย่าง 4	55	16
สารตัวอย่าง 5	50	24
สารตัวอย่าง 6	36	14
สารตัวอย่าง 7	49	19
สารตัวอย่าง 8	40	20
ไม่มีสารตัวอย่าง = 38		

1.4 PBMC ของคนที่ 4

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	17	19
สารตัวอย่าง 2	13	15
สารตัวอย่าง 3	9	-
สารตัวอย่าง 4	9	-
สารตัวอย่าง 5	12	14
สารตัวอย่าง 6	10	12
สารตัวอย่าง 7	9	23
สารตัวอย่าง 8	12	19
ไม่มีสารตัวอย่าง = 64		

2. ผล proliferation เป็นค่า S.I. ต่อ B cell mitogen (PWM)

2.1 PBMC ของคนที่ 1

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	23	3
สารตัวอย่าง 2	18	4
สารตัวอย่าง 3	27	1
สารตัวอย่าง 4	19	-
สารตัวอย่าง 5	29	4
สารตัวอย่าง 6	19	4
สารตัวอย่าง 7	28	4
สารตัวอย่าง 8	31	3
ไม่มีสารตัวอย่าง = 23		

2.2 PBMC ของคนที่ 2

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	19	4
สารตัวอย่าง 2	21	4
สารตัวอย่าง 3	14	1
สารตัวอย่าง 4	18	1
สารตัวอย่าง 5	17	2
สารตัวอย่าง 6	20	1
สารตัวอย่าง 7	17	1
สารตัวอย่าง 8	18	1
ไม่มีสารตัวอย่าง = 12		

2.3 PBMC ของคนที่ 3

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	31	4
สารตัวอย่าง 2	22	5
สารตัวอย่าง 3	18	4
สารตัวอย่าง 4	25	4
สารตัวอย่าง 5	21	6
สารตัวอย่าง 6	21	3
สารตัวอย่าง 7	25	5
สารตัวอย่าง 8	21	7
ไม่มีสารตัวอย่าง = 20		

2.4 PBMC ของคนที่ 4

	ค่า S.I. เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	3	4
สารตัวอย่าง 2	4	4
สารตัวอย่าง 3	3	-
สารตัวอย่าง 4	2	-
สารตัวอย่าง 5	3	1
สารตัวอย่าง 6	3	3
สารตัวอย่าง 7	3	5
สารตัวอย่าง 8	3	4
ไม่มีสารตัวอย่าง = 26		

จ. ทดสอบผลต่อลักษณะของ PBMC

วิธีทดลอง ใช้ PBMC ของคนปกติ 2 ราย culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน 7 วัน ตรวจดูลักษณะ nucleus ของเซลล์ โดยการย้อมด้วย DAPI

ผล นับเซลล์ทั้งหมด 200 เซลล์ ดูขนาดและลักษณะ nucleus แสดงผลเป็นค่า percentage

1. PBMC ของคนที่ 1

	เซลล์ขนาดปกติ		เซลล์ขนาดใหญ่	
	% nucleus ปกติ	% nucleus แตก	% nucleus ปกติ	% nucleus แตก
ไม่มีสารตัวอย่าง	45	1	52	1
สารตัวอย่าง 1	55	13	29	3
สารตัวอย่าง 2	48	2	40	10
สารตัวอย่าง 3	76	11	11	2
สารตัวอย่าง 4	45	8	47	2
สารตัวอย่าง 5	64	5	29	2
สารตัวอย่าง 6	73	13	16	1
สารตัวอย่าง 7	64	8	24	0
สารตัวอย่าง 8	69	11	22	1

2. PBMC ของคนที่ 2

	เซลล์ขนาดปกติ		เซลล์ขนาดใหญ่	
	% nucleus ปกติ	% nucleus แตก	% nucleus ปกติ	% nucleus แตก
ไม่มีสารตัวอย่าง	54	6	36	4
สารตัวอย่าง 1	58	4	37	1
สารตัวอย่าง 2	77	8	15	0
สารตัวอย่าง 3	60	6	33	1
สารตัวอย่าง 4	75	3	20	2
สารตัวอย่าง 5	56	5	39	0
สารตัวอย่าง 6	69	6	25	0
สารตัวอย่าง 7	57	4	27	2
สารตัวอย่าง 8	74	1	28	1

ฉ. ผลต่อ viability ของ adherence cell ใน PBMC

วิธีทดลอง ใช้สารละลาย EDTA เก็บ adherence cell เมื่อ culture PBMC รวมกับสารตัวอย่าง นาน 5, 7 วัน ย้อมด้วยสี Tryphan blue

ผล คำนวนเป็นค่า % viability ของ adherence cell

1. PBMC ของคนที่ 1

	% viability ของ adherence cell เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	100	100
สารตัวอย่าง 2	88	100
สารตัวอย่าง 3	100	100
สารตัวอย่าง 4	85	100
สารตัวอย่าง 5	94	100
สารตัวอย่าง 6	100	100
สารตัวอย่าง 7	100	100
สารตัวอย่าง 8	98	98

2. PBMC ของคนที่ 2

	% viability ของ adherence cell เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	95	99
สารตัวอย่าง 2	98	98
สารตัวอย่าง 3	88	99
สารตัวอย่าง 4	88	97
สารตัวอย่าง 5	93	100
สารตัวอย่าง 6	93	97
สารตัวอย่าง 7	91	100
สารตัวอย่าง 8	96	98

3. PBMC ของคนที่ 3

	% viability ของ adherence cell เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	98	78
สารตัวอย่าง 2	96	99
สารตัวอย่าง 3	100	98
สารตัวอย่าง 4	99	99
สารตัวอย่าง 5	99	96
สารตัวอย่าง 6	97	97
สารตัวอย่าง 7	97	96
สารตัวอย่าง 8	94	98

4. PBMC ของคนที่ 4

	% viability ของ adherence cell เมื่อ culture ร่วมกับสารตัวอย่างนาน	
	5 วัน	7 วัน
สารตัวอย่าง 1	98	96
สารตัวอย่าง 2	100	100
สารตัวอย่าง 3	98	94
สารตัวอย่าง 4	100	100
สารตัวอย่าง 5	100	100
สารตัวอย่าง 6	100	100
สารตัวอย่าง 7	98	100
สารตัวอย่าง 8	100	100

สรุปผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

การตรวจหาคุณสมบัติ immunomodulatory activity

มะระ total proteins จากมะระขี้นก

MRK 29 จากมะระขี้นก

total protein จากมะระป่า

MRK 29 จากมะระป่า

active protein fraction จากมะระป่า

ก. ไม่มีคุณสมบัติเป็น polyclonal mitogen (non-specific) ในการ culture ร่วมกับ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 3 ราย นาน 14 วัน ทั้ง 5 ตัวอย่าง

ข. มีแนวโน้มที่เสริม/เพิ่ม การตอบสนองของเซลล์ peripheral blood mononuclear cell ต่อการกระตุ้นด้วย PHA (T cell mitogen) สำหรับ total proteins, active protein fraction และ MRK 29

ค. ไม่มีผลเสริม/เพิ่มความสามารถของ Natural Killer (NK) cells โดยการใช้วิธี ^{51}Cr released assay

ง. มีแนวโน้มผลเสริม/เพิ่ม ความสามารถของเซลล์ macrophage ในการหลั่งสาร Tumor necrosis factor (TNF) เมื่อกระตุ้นด้วยสาร Lipopolysaccharide (ใช้วิธี L929 bioassay) สำหรับ total protein, MRK 29 และ active protein fraction ของมะระ

ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดสมุนไพรต่อไปนี้

1. ลำพู (กิ่ง)
2. ก้างปลาขาว (กิ่ง)
3. สีฟันคนทา (ใบ)
4. ก้างปลาแดง (กิ่ง)
5. ก้างปลาแดง (ใบ)
6. สารสกัดโปรตีนจากมะระ (0-30% amm. SO_4 satn.)
7. สารสกัดโปรตีนจากมะระ (30-60% amm. SO_4 satn.)
8. สารสกัดโปรตีนจากมะระ (60-90% amm. SO_4 satn.)

ก. ผลการติดตาม PBMC ที่มี CD 3/4, 3/8 ในจำนวน 4 คน ที่เวลา 0, 5, 7 วัน

1. CD 3/4 มีการเพิ่มค่า % CD 3/4 (มากกว่า 10%) ในคน 2 คน (จาก 4 ราย) ที่ 5 และ 7 วัน จากวันที่ 0 ทุกตัวอย่างสมุนไพรสกัด 8 ชนิด

2. CD 3/8 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (เกิน 10%) ในคน 3 คน และใน 1 คน พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของ % CD 3/8 ในตัวอย่าง 3, 4 และ 7, 8 เมื่อเปรียบเทียบที่ 5 วัน กับ 0 วัน

ข. ผลต่อความสามารถของ NK cell เมื่อ PBMC culture กับตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด นาน 5, 7 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ค. ผลต่อความสามารถของเซลล์ macrophage/monocyte ต่อการสร้าง TNF ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ง. ผลต่อความสามารถของ PBMC ต่อการกระตุ้นด้วย polyclonal mitogen

1. PHA

คนที่ 1	ไม่เปลี่ยนแปลงในตัวอย่าง	1, 2, 5
	ลดลงในตัวอย่าง	3, 4, 6, 7, 8,
คนที่ 2	เพิ่มขึ้นในตัวอย่าง	1, 2, 4, 5, 6, 8
	ไม่เปลี่ยนแปลง ตัวอย่าง	3, 7
คนที่ 3	เพิ่มขึ้นในตัวอย่าง	1, 2, 4, 5, 7
	ไม่เปลี่ยนแปลง ตัวอย่าง	3, 6, 8
คนที่ 4	ลดลงในตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด	

2. PWM

คนที่ 1 ไม่เปลี่ยนในทุกตัวอย่าง (8 ตัวอย่าง)

คนที่ 2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในตัวอย่าง 2, 6

คนที่ 3 เพิ่มขึ้นในตัวอย่าง 1

มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในตัวอย่าง 4, 7

คนที่ 4 แสดงค่าลดลงในทุกตัวอย่าง (8 ตัวอย่าง)