

การทดลองฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-alpha reductase

- ชื่อตัวอย่าง : 1) สารสกัดสมุนไพร Topaz
2) สารสกัดสมุนไพร Kerra
3) สารสกัดสมุนไพร Vitalplus
- รูปแบบผลิตภัณฑ์ : สารสกัดหยาบ (Crude extract)
- ลักษณะทางกายภาพ : ของแข็ง
- ผู้ทำการทดลอง : ศิริวรรณ แซ่หลี่

วิธีการทดลอง

1. การแตกเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

นำตะกอนเซลล์ต่อมลูกหมาก PC-3 มาละลายใน lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF และ 20% Glycerol ปริมาตร 200 μ L ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปทำการแตกเซลล์โดยใช้เครื่อง Ultrasonic (20% Amp, Pulse on-off 5s/10s) เป็นเวลา 60 นาที แช่น้ำแข็งต่อมา เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกตะกอนเซลล์และส่วนใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) ไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง nanodrop และแบ่งเก็บโปรตีนที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

ทำการชั่งสารสกัดสมุนไพร Topaz, Kerra และ Vitalplus ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะได้ stock สารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม stock สารละลายของยา Finasteride ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL ด้วยตัวทำละลาย DMSO จากนั้นเจือจางสารละลายสารสกัด Kerra, Topaz และ Vitalplus ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายยา Finasteride ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α - reductase

การทดสอบกิจกรรมยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α - Reductase เริ่มต้นจากเติมสารละลายสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด และสารละลายยา Finasteride ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ 96 well plate transparent ที่มีบัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl และ 1 mM EDTA) ปริมาตร 73 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ 5 α - Reductase ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μ L ตามด้วยสารละลายฮอร์โมน Testosterone ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10

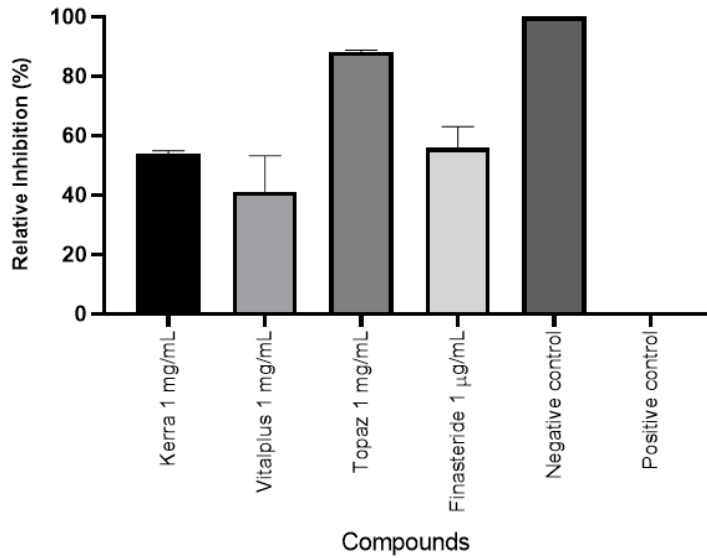
ไมโครลิตร และสารละลาย β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Tetrasodium Salt reduced form (β -NADPH) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาของกกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) และกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) จะเติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรแทนสารละลายของสารสกัด และปฏิกิริยาของตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) จะเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 5ไมโครลิตรแทนเอนไซม์สารละลาย β -NADPH จากนั้นวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นสร้างกราฟเส้นและหาค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α -Reductase จากสูตร

$$\% 5\alpha - \text{Reductase inhibition} = \frac{[(\text{Slope positive} - \text{Slope negative}) - (\text{Slope sample})]}{(\text{Slope positive} - \text{Slope negative})} \times 100$$

จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะทำการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ (mean \pm standard derivation) และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูปโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism8

ผลการทดลอง

จากการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α - Reductase ของสารสกัด Topaz, Kerra และ Vitalplus ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งอยู่ที่ 88.298 \pm 0.501, 53.901 \pm 1.003 และ 41.135 \pm 12.036 ตามลำดับ ในขณะที่ยา Finasteride ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ร้อยละ 56.028 \pm 7.021 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α - reductase ได้ดีที่สุดคือสารสกัดสมุนไพร Topaz ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α - Reductase ของของสารสกัดสมุนไพร Topaz, Kerra และ Vitalplus ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับยามาตรฐาน Finasteride ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α - Reductase ของสารสกัดสมุนไพร Topaz, Kerra และ Vitalplus ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับยามาตรฐาน Finasteride ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 α -Reductase (Mean \pm SD.)
Finasteride	0.001	56.028 \pm 7.021
Topaz	1	88.298 \pm 0.501
Kerra	1	53.901 \pm 1.003
Vitalplus	1	41.135 \pm 12.036

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Topaz, Kerra และ Vitalplus ในยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

5 α - reductase ซึ่งสารสกัดสมุนไพร Topaz เป็นชนิดสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ
เอนไซม์ 5 α - reductase ได้ดีที่สุด