ปาลิตา แปวไธสง : การดัดแปลงพันธุกรรมเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ตรวจหาสารไฟโตเอสโตรเจนในพืชสมุนไพรและยาแผนโบราณบางชนิด (GENETIC MODIFICATION OF YEAST CELLS TO DETECT PHYTOESTROGENS IN SOME MEDICINAL PLANTS AND TRADITIONAL MEDICINES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สินีนาฏ ศิริ, 230 หน้า.

ประเทศไทยมีการใช้พืชสมุนไพรในตำรับยาแผนโบราณมาเป็นเวลานานเพื่อช่วยบรรเทาอาการจากประจำเดือนในสตรี อย่างไรก็ตาม ยังมีการตรวจวัดฤทธิ์เอสโตรเจนของพืชเหล่านี้น้อยมาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างระบบยีสต์ทูไฮบริดเพื่อใช้ในการตรวจวัดฤทธิ์เอสโตรเจนในพืชสมุนไพร 10 ชนิด และยาสมุนไพรที่มีการจำหน่าย 8 ชนิด โดยระบบยีสต์ทูไฮบริดที่สร้างขึ้นอาศัยหลักการปฏิสัมพันธ์ระหว่างบางส่วนของเอสโตรเจนรีเซฟเตอร์ชนิดแอลฟ่า (estrogen receptor, ERα) หรือเบต้า (estrogen receptor, ERβ) ลิแกนด์ (ligand) และโปรตีนโคแอคติเวเตอร์ (coactivator protein) คือ สเตียรอยด์รีเซฟเตอร์โคแอคติเวเตอร์ 1 (steroid receptor coactivator 1, SRC1) หรือ ทรานสคริปชันอินเตอร์มีเดียทแฟคเตอร์ 2 (transcription intermediated factor 2, TIF2) ระบบยีสต์ทูไฮบริดที่ดีที่สุด 2 ระบบที่ใช้ ERα และ ERβ ได้ถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็นระบบตรวจวัดฤทธิ์เอสโตรเจน ซึ่งเรียกว่าระบบ ERα-Y2H และ ERβ-Y2H โดยทั้งสองระบบมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารมาตรฐาน 17 บีต้าเอสตราไดออล (17β-estradiol) และจีนิสทีน (genistein)

ระบบยีสต์ทูไฮบริดทั้งสองได้ใช้ในการตรวจวัดฤทธิ์เอสโตรเจนของสารสกัดเอทานอลและน้ำของพืชสมุนไพร 10 ชนิด คือ โกฐเชียง (*Angelica sinensis*) โกฐสอ (*Angelica dahurica*) คำฝอย (*Carthamus tinctorius*) ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*) กระดูกอึ่ง (*Dendrolobium lanceolatum*) ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) ชะเอมจีน (*Glycyrrhiza uralensis*) ยอป่า (*Morinda coreia*) กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) และ ขิง (*Zingiber officinale*) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลของพืชมีฤทธิ์เอสโตรเจนสูงกว่าสารสกัดน้ำ นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์เอสโตรเจนผ่าน ERβ มากกว่า ในขณะที่สารสกัดน้ำมีฤทธิ์เอสโตรเจนผ่าน ERα มากกว่า จากสารสกัดทั้งหมดพบว่าสารสกัดเอทานอลของกระดูกอึ่งมีฤทธิ์เอสโตรเจนสูงที่สุดและผ่าน ERβ สารสกัดเอทานอลและน้ำจากพืชชนิดเดียวกันมีฤทธิ์เอสโตรเจนแตกต่างกัน ชี้ให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน เมื่อนำสารสกัดเหล่านี้ไปย่อยแบบ *in vitro* พบว่ามีฤทธิ์เอสโตรเจนที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเกิดจากสารเมแทบอไลต์ต่าง ๆ ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ สำหรับสารสกัดเอทานอลที่ผ่านการย่อย พบว่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์เอสโตรเจนลดลงผ่านทั้ง ERα และ ERβ ในขณะที่มีสารสกัดเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์เอสโตรเจนเพิ่มขึ้น ในทางตรงข้าม พบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่ผ่านการย่อย ส่วนใหญ่มีฤทธิ์เอสโตรเจนผ่าน ERα เพิ่มขึ้น แต่มีฤทธิ์เอสโตรเจนผ่าน ERβ ลดลง

นอกจากนี้ได้ใช้ระบบ ERα-Y2H และ ERβ-Y2H ในการตรวจวัดฤทธิ์เอสโตรเจนของยาสมุนไพรทางการค้าจำนวน 8 ชนิด ซึ่งอ้างถือเป็น S1-S8 พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์เอสโตรเจน

สูงกว่าสารสกัดน้ำ โดยส่วนใหญ่มีฤทธิ์เอสโตรเจนผ่าน ERα จากยาสมุนไพรทั้งแปดชนิด พบว่า S3 มีฤทธิ์เอสโตรเจนสูงที่สุด เมื่อสารสกัดนี้ผ่านการย่อยในหลอดทดลอง พบว่าฤทธิ์เอสโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผ่าน ERα นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่ผ่านการย่อยมีฤทธิ์เอสโตรเจนสูงกว่าสารสกัดจากเอทานอล ทั้งนี้สารสกัด S8 ที่ผ่านการย่อย มีฤทธิ์เอสโตรเจนสูงที่สุด ซึ่งมีค่า relative estrogenic activity ผ่าน ERα เท่ากับ 101.32% ทั้งนี้สันนิษฐานว่าฤทธิ์เอสโตรเจนของสารสกัด S8 นี้เป็นผลจากสารเมแทบอไลต์ของ ปักคี้ (*Astragalus membranaceus*) ชะเอมจีน (*Glycyrrhiza uralensis*) และแปะเจียก (*Paeonia lactiflora*) ที่เป็นองค์ประกอบหลัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

PALITA PAEWTHAISONG : GENETIC MODIFICATION OF YEAST CELLS TO DETECT PHYTOESTROGENS IN SOME MEDICINAL PLANTS AND TRADITIONAL MEDICINES THESIS ADVISOR :
ASSOC. PROF. SINEENAT SIRI, Ph.D. 230 PP.

ESTROGENIC ACTIVITY/MEDICINAL PLANTS/PHYTOESTROGEN/ TRADITIONAL MEDICINCES/YEAST TWO HYBRID

In Thailand, medicinal plants have long been used in traditional recipes for improving menstruation symptoms in females; however, their estrogenic activities have been poorly evaluated. Thus, this study aimed to construct the yeast two-hybrid system (Y2H) to determine estrogenic activities of ten medicinal plants and eight commercially traditional medicines. The produced Y2H systems were based on the specific interaction among the partial estrogen receptors alpha or beta, the ligands, and the coactivator proteins. Two best Y2H systems were chosen for determining estrogenic activity based on ERα and ERβ, referred to as ERα-Y2H and ERβ-Y2H systems. Both systems efficiently detected estrogenic activities of the standard 17β-estradiol and genistein. Both Y2H systems were used to detect the estrogenic activity of ethanolic and water extracts of 10 medicinal plants; *Angelica sinensis*, *Angelica dahurica*, *Carthamus tinctorius*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Dendrolobium lanceolatum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Morinda coreia*, *Pueraria mirifica*, and *Zingiber officinale*. The results revealed that the ethanolic extracts of these plants exhibited estrogenic activities higher than their water extracts. Also, the ethanolic extracts exhibited estrogenic activities preferentially via ERβ, whereas their water extracts were preferentially via ERα interaction. Among extracts, the ethanolic extract

of *D. lanceolatum* exhibited the highest estrogenic activity via ERβ. The ethanolic and water extracts of the same plant species exhibited different estrogenic activities, suggesting different active compounds obtained by different extraction solvents. When these extracts were *in vitro* digested, their estrogenic activities were changed, likely due to their different metabolites obtained by the enzymatic digestion. For the ethanolic extracts, their digested extracts mostly exhibited the reduction of estrogenic activity via both ERα and ERβ, whereas only a few digested extracts possessed increased estrogenic activity. In contrast, the digested water extracts mostly exhibited increased estrogenic activity via ERα, whereas possessed the reduction of estrogenic activity via ERβ.

ERα-Y2H and ERβ-Y2H systems were also used to detect the estrogenic activity of 8 commercially traditional medicines referred to as S1-S8. Their ethanolic extracts exhibited higher estrogenic activities than their water extracts. Also, their estrogenic activities were more potent via ERα. Among eight medicines, S3 exhibited the highest estrogenic activity. When these extracts were *in vitro* digested, their estrogenic activities significantly increased, particularly via the interaction with ERα. Also, the digested water extracts exhibited significantly higher estrogenic activities than those of ethanolic extracts. The digested S8 exhibited the highest estrogenic activity with the relative estrogenic activity of 101.32% via ERα. This estrogenic activity of the digested S8 was hypothesized to be resulted from the metabolites derived from *A. membranaceus*, *G. uralensis*, and *P. lactiflora*, which were the major ingredients.

School of Biology — Student's Signature P. Paeratthaisong

Academic Year 2020 — Advisor's Signature