บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

มะระ (*Momordica charantia* L.) เป็นพืชตระกูล Cucurbitaceae ชื่อสามัญ Balsam Apple, Balsam Pear, Bitter Cucumber, Bitter Gourd, Bitter Melon, Bitter Squash, Carilla Fruit (วัชรี, 2542) ในประเทศไทยมีมะระ 2 ชนิด ได้แก่ มะระจีน (Chinese bitter gourd) และมะระขี้นก (Thai bitter gourd) (วีณา, 2543) ซึ่งข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ได้จำแนก *Momordica charantia* ออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง (wild form) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Momordica charantia* spp. *abbreviata* (Ser.) Grebensc. และพันธุ์ปลูก (cultivated form) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Momordica charantia* spp. *charantia* (Siemonsma and Piluek, 1994) ซึ่งพันธุ์พื้นเมืองมีผลยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนพันธุ์ปลูก ผลมีความยาวถึง 25 เซนติเมตร (Robinsons and Decker-Walters, 1997) มะระขี้นกเป็นพืชเขตร้อนทางแถบโลกเก่าพบที่แอฟริกามีทั้งพืชป่าและพืชปลูกแพร่กระจายทั่วไปกลายเป็นพืชปลูกตามบ้านทางตะวันออกของอินเดีย และทางใต้ของจีน แหลมมลายู อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และประเทศไทย (วัชรี, 2542) การเรียกมะระขี้นกจะเรียกได้หลายอย่างในประเทศไทย คือ ภาคเหนือเรียกว่ามะไห่ (เหนือ), สพะซู, สุพะเด (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), มะร้อยรู (กลาง), มักเหย (สงขลา), ผักไห (นครศรีธรรมราช), มะระเล็ก, มะระขี้นก (ทั่วไป) ส่วนในประเทศจีนจะเรียกว่า โกควยเกี๋ยะ (สมพร, 2542) ผักไซ (อุบลราชธานี), ผักใส่ (มุกดาหาร), มะไห่ (ภูเก็ต), มะห่อย (กำแพงแสน) (วัชรี, 2542) พันธุ์มะระที่ใช้ปลูกในประเทศไทยสามารถแยกได้เป็น 4 พันธุ์ (บรรยงศ์, 2528 และรุ่งรัตน์, 2540) คือ

1. มะระขี้นกเป็นมะระพันธุ์ป่า มีผลขนาดเล็กรูปร่างป้อม ผิวขรุขระอาจมีหนามแหลม เนื้อบาง ปลูกง่าย ผลดก มีรสขมจัด
2. มะระจีนมีผู้นำมาจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนมะระชนิดนี้มีลักษณะผลโตรูปร่างยาวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7-8 เซนติเมตร ยาว 15-30 เซนติเมตร ผิวสีเขียวอ่อน เนื้อหนา รสดี รสขมน้อย
3. มะระสองพี่น้องเป็นมะระที่เก็บเมล็ดมาจากมะระจีนจึงเป็นมะระที่กลายพันธุ์มาจากมะระจีน ผลมีลักษณะเช่นเดียวกับมะระจีน ปลูกมากที่สุพรรณบุรี

4. มะระพันธุ์ย่างกุ้งเป็นพันธุ์ที่ได้จากประเทศพม่ามะระนี้มีผลขนาดเล็กยาวแต่มีรูปร่างยาว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 นิ้ว ผิวขรุขระเป็นหนามแหลมปลายและหัวผลมีรสดีขมเล็กน้อย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะระขี้นก

โครงการพัฒนาเทคนิคการทำยาสมุนไพร (2522) และรุ่งรัตน์ (2540) อธิบายถึงลักษณะของส่วนต่างๆ ของมะระขี้นกไว้ดังต่อไปนี้

ลำต้น เป็นไม้เถาเลื้อย ขนาดเล็ก ลำต้นมีขนนุ่มๆ สั้นๆ เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledon) มีมือเกาะ (tendril) ซึ่งเป็นลำต้นที่แปรรูปเป็นเส้นขดเกลียว ยืดหยุ่นได้ ใช้เกาะพันหลักไต่ขึ้นที่สูง

ใบ เป็นใบเดี่ยว (simple leaf) หมายถึงมีแผ่นใบหรือตัวใบเดียว (blade หรือ lamina) บนก้านใบ (petiole) เส้นใบเป็นร่างแห (netted reticulated veins) การติดของใบบนต้นเป็นแบบเรียงสลับกัน (alternate) หมายถึงแต่ละข้อมีใบติดอยู่เพียงใบเดียว ใบต่อไปอยู่สลับคนละด้าน ก้านใบยาวประมาณ 3-6 เซนติเมตร ขอบใบเว้าลึก 5-7 หยัก ใบกว้างและยาวประมาณ 5-12 เซนติเมตร มีขนขนาดเล็ก

ดอก เป็นดอกเดี่ยวออกตามซอกใบ สถานะของดอกไม่สมบูรณ์เพศ (imperfect หรือ unisexual) แต่เป็นพืชที่มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่ภายในต้นเดียวกัน (monoecious plant) กลีบดอกมีสีเหลือง 5 กลีบ กลีบเลี้ยงรูปไข่ปลายแหลมมีสีเขียวอ่อน 5 กลีบแยกจากกัน มีใบประดับ ทรงกลมขอบเรียบอยู่กึ่งกลางหรือใกล้ฐานดอก ดอกเพศผู้มีก้านยาว 5-28 มิลลิเมตร กลีบดอกยาว 11-22 มิลลิเมตร กว้าง 7-15 มิลลิเมตร มีเกสรเพศผู้ 3 อัน อับเรณูสีส้มอยู่ชิดติดกันกลางดอก ส่วนดอกเพศเมียมีก้านดอกยาว 2-50 มิลลิเมตร กลีบดอกยาว 7-12 มิลลิเมตร กว้าง 3-6 มิลลิเมตร เกสรเพศเมียมีสีเขียวอ่อนเมื่อสังเกตให้ดีจะเห็นก้านใต้ดอกพองออกนั้น คือ รังไข่ที่เป็นแบบรังไข่ใต้วงกลีบ (inferior ovary) เมื่อดอกได้รับการผสมเกสรแล้วกลีบดอกเหี่ยวแล้วเจริญเป็นผลต่อไป

Maharana *et al.* (1995) ศึกษาถึงการออกดอกของ *Momordica charantia* พบว่า ระยะบานของดอก (anthesis) เกิดในตอนเช้าช่วงเวลา 03.30-06.30 นาฬิกา ดอกบานนานกว่า 2 ชั่วโมง ความมีชีวิตของละอองเรณู (pollen) ที่พร้อมผสมนาน 48 ชั่วโมง เกสรเพศเมียยอมรับการผสมได้นาน 12 ชั่วโมง และ การผสมเกสรด้วยมือเกิดการติดผลได้ดีกว่าปล่อยให้ผสมเองตามธรรมชาติ

ผล เป็นผลเดี่ยว (simple fruit) ที่เกิดจากดอกเดี่ยวมีรังไข่อันเดียวและผลเป็นผลสดแบบที่เรียกว่า ผลแบบแตง (pepo) ผลมีเนื้อหลายเมล็ด (berry) ที่มีเปลือกชั้นนอก หนา แข็งและเหนียว เนื้ออุ้มน้ำเกิดมาจากรังไข่แบบรังไข่อยู่ใต้วงกลีบ (inferior ovary) ผลมีรูปร่างคล้ายกระสวยผิวภายนอกสีเขียวเมื่อยังดิบ เมื่อสุกผิวผลภายนอกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มมีเส้นแบ่งเรียงตามยาว 8-9 แถว ระหว่างแถวมีตุ่มเล็กๆ ขนาดไม่เท่ากันมากมายทำให้ผิวเปลือกมีลักษณะขรุขระ เนื้อผลมีสีนวลขาว

ฟ่าม เมื่อสุกเนื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม ผลสุกเมื่อแก่เต็มที่จะแตกออก ผลยาวประมาณ 4-6 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางผลประมาณ 2-5 เซนติเมตร ส่วนของเนื้อผลของพืชตระกูล *Cucurbitaceae* ประกอบด้วย 2 ส่วนเท่านั้นคือ ผนังผล (pericarp) และเยื่อหุ้มเมล็ด (extracarpellary tissue) ทั้งสองส่วนไม่มีเส้นที่แบ่งแยกกันให้เห็นชัดเจน ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างผนังผล ซึ่งเป็นส่วนเนื้อของผลกับเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) (Esau, 1977)

เมล็ด มีลักษณะแบน สีเหลืองอ่อนฝังอยู่ในเนื้อผล เมื่อสุกเมล็ดถูกห่อหุ้มด้วยชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงสดอิ่มน้ำ ถ้าแกะชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดออกจาก เมล็ดๆมีสีเหลืองอ่อน ภายหลังจากตากแห้งแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และ Esau (1977) กล่าวถึงเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ของพืชตระกูล *Cucurbitaceae* ว่าเกิดจากส่วนของผนังออวุล (integuments) 2 อัน ด้านนอกของแต่ละอันประกอบด้วยเนื้อเยื่อ (layer) 3 ชั้น ส่วนของด้านในประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อที่มีหลายชั้นกว่ามาก เนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis) ด้านในประกอบด้วยเซลล์เล็กๆ บางครั้งมีสีเขียวและมีส่วนของกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่ให้กำเนิดนิวเซลลัส (nucellus) ปรากฏให้เห็นอีก 2-4 ชั้น ในเมล็ดที่แก่เต็มที่มีสารเคลือบผิว (cuticle) เมื่อเมล็ดแห้งคลอเรงคิมา (chlorenchyma) ปรากฏให้เห็นเป็นเยื่อบาง (membrane) สีเขียว (Esau, 1977)

เมื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (inheritance) พบว่า ผลอ่อนสีเขียวเป็นลักษณะเด่นต่อผลอ่อนสีขาวที่ควบคุมด้วยยีนเดี่ยว (monogenetic dominance) เปลือกหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลเป็นลักษณะเด่นต่อเปลือกหุ้มเมล็ดสีอ่อนกว่าและเมล็ดขนาดเล็กเป็นลักษณะเด่นต่อเมล็ดขนาดใหญ่ (Srivastava and Nath, 1972) และผลมะระสีขาวพันธุ์ White Long ให้ผลผลิตและเมล็ดในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์อื่นๆ (Davadas and Ramadas, 1993) โดยทั่วไปเมล็ดมะระมีความงอกต่ำ มีเปลือกหุ้มเมล็ดแข็ง (hard seed coat) ทางสมาคมผู้ตรวจสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (Internation Seed Testing Association, ISTA) ได้กำหนดการทดสอบความงอกของเมล็ดโดยให้เพาะเมล็ดภายใต้สภาพอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ความชื้นต่ำ และมีแสงสว่าง เป็นปัจจัยที่ทำลายการพักตัว (breaking dormancy) ของเมล็ดมะระขี้นกได้ (นงลักษณ์, 2528) ส่วนการทำลายการพักตัวของมะระขี้นก Pinmanee *et al.* (1999) พบว่าการจุ่มน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสสามารถทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดมะระขี้นกเพิ่มขึ้นเป็น 75 เปอร์เซ็นต์

ประเทศไทยสามารถปลูกมะระได้ตลอดปีโดยจะให้ผลผลิตดีที่สุดในฤดูหนาว แต่ถ้าปลูกในฤดูฝนควรเพาะเมล็ดให้งอกก่อนเพื่อป้องกันเมล็ดเน่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการปลูกอยู่ระหว่าง 18-25 องศาเซลเซียส โดยเพาะเมล็ดลงในแปลงเพาะ เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 2 ใบให้ย้ายไปปลูก การเตรียมแปลงปลูกจะต้องพรวนดินลึกประมาณ 20-25 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างหลุม 50 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร (รุ่งรัตน์, 2540) จากบทความของปริญญา และบัญชา

(2532) ในการปลูกมะระจะต้องทำค้าง โดยขึงตาข่ายดักเถามะระจีนตั้งแต่เริ่มปลูก เพราะสะดวก ไม่เสียเวลาในการจัดยอด ใช้งานครั้งเดียวได้ผลตอบแทนคุ้มค่าและเพื่อใช้การที่ดินอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการขึงตาข่ายนั้นจะขึงตาข่ายในแนวตั้งตามความยาวของแปลงปลูกแทนการทำขึงตาข่ายแบบรูปจั่ว ส่วนในการดูแลรักษานั้นการให้น้ำควรรดน้ำให้ชุ่มแต่ไม่ขัง การใส่ปุ๋ยจะใส่หลังย้ายกล้าไปแล้ว 7 วันและใส่เป็นระยะ ๆ ปุ๋ยที่ใส่เป็นปุ๋ยสูตร 12-24-12 หรือปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต และเมื่อมะระเริ่มออกดอกใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ใส่ในอัตรา 15-24 กิโลกรัมต่อไร่ แมลงศัตรูพืชได้แก่ แมลงวันทอง หนอนเจาะเถา เพลี้ย และโรคราน้ำค้างหรือโรคเหี่ยวตาย การเก็บเมล็ดเพื่อทำพันธุ์ต่อไปจะเก็บผลสุกที่มีผลสีส้มผ่าเอาเมล็ดออกล้างน้ำตากแดดในที่ร่มจนแห้งสนิทแล้วเก็บเป็นเมล็ดพันธุ์ต่อไป

สรรพคุณ

รุ่งรัตน์ (2540) กล่าวถึงคุณสมบัติสรรพคุณของมะระไว้ ดังต่อไปนี้ ช่วยเจริญอาหาร ใช้เนื้อของผลที่ยังไม่สุกใช้เป็นอาหาร ผักจิ้ม ต้ม แกง ลดน้ำตาลในเลือด รักษาเบาหวาน ใช้ผลโตเต็มที่หั่นเนื้อมะระตากแห้งชงน้ำรับประทานต่างชา แก้ไข ผลต้มรับประทานแต่น้ำเป็นยาแก้ไขหรือใช้น้ำคั้นจากผล ปากเปื่อย ปากเป็นขุย น้ำคั้นจากผลใช้อม บำรุงระดู ใช้น้ำคั้นจากผล แผลฝี ใช้ผลตำพอกฝี แก้บวม เจ็บปวด ชันตุ ผลดิบตำคั้นน้ำผสมดินสอพองทาหัวชันตุ ข้ออักเสบรูมาตอยและเก๊าต์ โรคของม้ามและตับ บำรุงน้ำดี ขับพยาธิ

คุณค่าทางอาหาร

เกษตรธรรมชาติ (2542) กล่าวถึงคุณค่าทางอาหารของผลมะระขี้นก โดยในผลมะระขี้นก 100 กรัม ให้พลังงานแก่ร่างกาย 17 กิโลแคลอรี ประกอบด้วยเส้นใย 12 กรัม แคลเซียม 3 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัม ธาตุเหล็ก 0.2 มิลลิกรัม วิตามินเอ 2924 IU วิตามินบีหนึ่ง 0.09 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.05 มิลลิกรัม ไนอาซีน 0.4 มิลลิกรัม วิตามินซี 190 มิลลิกรัม ส่วนวัชรี (2542) กล่าวถึงคุณค่าทางอาหารจากผลน้ำหนัก 100 กรัม ประกอบด้วยน้ำ 83-92 กรัม โปรตีน 1.5-2 กรัม ไขมัน 0.21-1 กรัม คาร์โบไฮเดรท 4-10.5 กรัม เส้นใย 0.8-1.7 กรัม พลังงาน 105-250 kJ

องค์ประกอบทางเคมีของมะระขี้นก

ปัทมา (2541) กล่าวถึงองค์ประกอบทางเคมีของมะระขี้นกมีดังต่อไปนี้ ต้นของมะระขี้นกมีสารอัลคาลอยด์ (alkaloids), ซาโปนิน (saponin) และผสมสเตียรอล (sterols) มีชื่อว่าชาเรนทิน (charantin) เมล็ดพบโปรตีนหลายชนิดได้แก่ MAP30 (30 KDa), Momordin (24 KDa), *Momordica charantia* agglutinin (32 KDa), *Momordica charantia* lectin (115 KDa), *Momordica charantia* inhibitor (23 KDa), *Momordica charantia* cytostatic factor (40 KDa), α-momorcharin (32 KDa), β-momorcharin (29 KDa), p-insulin (11 KDa), amino acid เช่น α-aminobutyric acid สารจำพวก triterpenes ได้แก่ momordicoside A-E, vicine ผลมี อัลคาลอยด์ (alkaloids), ซาโปนิน (saponin), amino acid (citrulline), 5-hydroxytryptamine (sterols) (charantin β-sitosterol stigmasterol acylgucosyl sterols) triterpenes (cucurbitacin glycosides, momordicoside F1, F2, G, I, K และ L), polypeptide (p-insulin) ใบมี triterpenes ได้แก่ momordicine, momordicine I, II, และ III , cucurbitan-triterpenes (III, IV, V) รากมี อัลคาลอยด์ (alkaloids) ชนิดหนึ่งชื่อ momordicine และซาโปนิน (saponin)

การศึกษาทางเภสัชวิทยา

ผลการลดน้ำตาลในเลือด

ผลจากการศึกษาทางเภสัชวิทยา ปัทมา (2541) สกัดมะระขี้นกด้วย 95% แอลกอฮอล์ น้ำ น้ำคั้น และยาชง พบว่า น้ำคั้นจากผลมะระสามารถลดน้ำตาลในเลือดของกระต่าย และคนได้ สารที่ออกฤทธิ์คือ p-insulin เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11,000 ดัลตัน นอกจากนั้นยังพบ *Momordica charantia* lectin ที่แยกได้จากเมล็ดมีผลต่อน้ำตาลในเลือดคล้าย insulinomimetic agent และยังมีผลในการต้านมะเร็งโดยที่มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ guanylate cyclase inhibitor ซึ่งสกัดได้จากผลสุก จากงานวิจัยของกฤษณา (2541) พบว่าสารสกัดของเถา (ลำต้น) มะระขี้นกที่ละลายใน n-butanol สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ถึง 34%

คุณสมบัติต้านมะเร็งและเนื้องอก

ผลต้านมะเร็งเป็นการศึกษาใน cell line เช่น human lymphoblast, human leukemic lymphocyte, melanoma-βcell-M9 เป็นต้น องค์ประกอบทางเคมีที่มีการศึกษาผลต้านมะเร็งได้แก่ guanylate cyclase inhibitor ซึ่งสกัดได้จากผลมะระสุก MAP30 สกัดจากผลสุกและเมล็ดในผลสุก α-momorcharin, β-momorcharin, *Momordica charantia* cytostatic factor ซึ่งแยกจากเมล็ด

carotene, beta: 5-6 epoxide ใน pericarp stigmasta-5-25 (27) –diene- 3β-6′, 3-0-(6′-0-palmitoyl-β-D-glucosyl) และ stigmasta-5-25 (27)-dine-3β-ol,-3-0-(6′-0-stearoyl-β-D-glucosyl) ในผลดิบ (ปัทมา, 2541) จากการศึกษาของ Lee-Huang *et al.* (2000) ศึกษาโปรตีนที่ 30 กิโลดัลตันในมะระขี้นกเมื่อให้ 10 ไมโครกรัมต่อครั้ง จำนวน 10 ครั้ง เพิ่มหนูที่รอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญ 20-25% ของหนูที่หายจากเป็นเนื้องอกภายใน 96 วัน

คุณสมบัติต้าน Human Immunodeficiency Virus (HIV)

เมื่อ Chinese Medical Material Research Center, Chinese University ประเทศฮ่องกง ได้ค้นพบโปรตีนชนิดหนึ่งในมะระที่สามารถต่อต้านไวรัส HIV (Ng *et al.* 1992 และ 1997) ต่อมาทราบว่าโปรตีนชนิดนั้น คือ MAP30 (*Momordica* anti-viral protein of 30 kDa) และได้ศึกษาถึงกระบวนการยับยั้งไวรัส HIV โดย Lee-Huang *et al.* (1990, 1995a and 1995b) ได้ทำการแยก MAP30 จากผลและเมล็ดมะระขี้นกที่สามารถต่อต้านไวรัส HIV ในประเทศไทยการศึกษาวิจัยมะระขี้นก ปัทมา (2541) พบว่าคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ HIV ของมะระขี้นก โดยมีโปรตีนที่เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซม (Ribosome Inactivating Proteins, RIPs) ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa โปรตีนนี้มีชื่อว่า MAP30 (*Momordica* anti-viral protein of 30 kDa) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านไวรัส HIV ในหลอดทดลอง ยับยั้งการติดเชื้อด้วยกระบวนการยับยั้งการเกิด syncytium ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อ HIV กับเซลล์ใหม่ โดยยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase และ integrase และยับยั้งการสร้าง viral core protein ของเชื้อ HIV

จากงานวิจัยของ Barbieri *et al.* (1993) พบว่า โปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีลักษณะที่มีความสามารถยับยั้งการแปลผลโปรตีนในการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่ยังเจริญไม่เต็มที่ของกระต่าย

ในพืชมีโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมสามารถจำแนกได้อย่างกว้างๆ 3 ประเภท (Kantawong, 2003)

- ประเภท 1 เกิดจากสายโพลิเป็ปไทด์สายเดี่ยว มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดัลตัน และแสดงระยะความกว้างคลื่นแสงของกิจกรรมทางด้านสารตั้งต้นกรดนิวคลีอิกหลายชนิด เช่น ribosomal RNA จากแหล่งที่แตกต่างกัน ดีเอ็นเอ และโพลีเอ ซึ่งโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมสามารถเอาอะดินีนออกไปหนึ่งตัวหรือมากกว่าจากสารตั้งต้นกรดนิวคลีอิก ด้วยเหตุนี้ทำให้กรดนิวคลีอิกเกิดความเสียหาย และเกิดผลกระทบหน้าที่ทางด้านชีววิทยาของพวกมัน ตัวอย่างของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภท 1 คือ ซาโปนิน ไตรโคแซนทิน และ pokeweed antiviral protein (PAP)

- ประเภท 2 เป็นการสร้างขึ้นมาจาก promoters 1, 2 หรือ 4 ตัว ซึ่งแต่ละตัวประกอบขึ้นจากเปปไทด์ที่ทำงานได้ 2 สาย สายเอเป็นสายที่คล้ายโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภท 1 ด้วยเหตุนี้สายบีจึงควบคุมกิจกรรมการจับคาร์โบไฮเดรต แม้ว่าไม่ต้องการกิจกรรมของเอนไซม์ การเพิ่มสายบีจะช่วยโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภท 2 ในการจดจำ และการจับกับตัวรับเฉพาะที่เจาะจงบนเซลล์เนื้อเยื่อและหลังจากที่เข้ามาสู่เซลล์ ตัวอย่างของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภท 2 คือ ริซิน และเอ็บริน
- ประเภท 3 มีความเหมือนโปรตีนที่เรียกว่า JIP60 จากใบข้าวบาร์เลย์เป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่มีน้ำหนัก 60 กิโลดัลตัน เกิดจาก N-terminal domain คล้ายกับโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภท 1 เชื่อมเข้ากับ unrelated C-terminal domain กับฟังก์ชั่นที่ไม่ทราบ

โปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมที่พบในมะระขี้นกเป็นประเภทที่ 1 ที่สามารถยับยั้ง translation ในยูแคริโอต (eukaryote) ซึ่งพบว่าทำให้เซลล์ตายโปรตีนนี้ที่รู้จักกันดี คือ α-momorcharin, β-momorcharin และ Momordica Anti-HIV Protein (MAP30) พบในเมล็ด ผล และใบของมะระขี้นก

- α- และ β-momorcharin (α-MMC และ β-MMC) เป็นไกลโคโปรตีนสายเดี่ยว (มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 2% มีน้ำหนักโมเลกุล 2900 และ 2800 ดัลตันตามลำดับ (Yeung *et al.*, 1986) โดยในปี 1999 พบว่า α-MMC ยับยั้งการจำลองตัว HIV-1 ได้เป็นอย่างดี แต่ไม่ทำให้เรื้อรังใน T-lymphocytes ที่ติดเชื้อ จากการจำแนกกิจกรรมการต้านเชื้อ HIV-1 อย่างรุนแรงของ α-momorcharin จากมะระขี้นก และติดเชื้อเรื้อรังใน T-lymphocytes ผลกระทบจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของ α-momorcharin ถูกทดสอบโดย trypan blue dye exclusion หรือ colorimetric MTT assay ผลการทดลองพบว่า α-momorcharin ถูกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการสร้าง HIV-1 และ ลดการแสดงออกของแกนของสารที่กระตุ้นการสร้าง p24 และจำนวนของสารที่กระตุ้นการสร้างเซลล์บวก HIV อย่างรุนแรง แต่ไม่มีผลกับเชื้อ HIV-1 ที่ติดเชื้ออย่างรื้อรังที่ได้จากการการเพาะเลี้ยง (Zheng *et al.*, 1999)

- MAP30 เป็นโปรตีนสายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 263 ตัว (มีน้ำหนักประมาณ 30 กิโลดัลตัน) (Lee-Huang *et al.*, 1995a) มีรายงานการต่อต้านเนื้องอกและกิจกรรมของเชื้อ HIV ของ MAP30 และ RIPs (Lee-Huang *et al.*, 1990 and 1991 ; Zarling *et al.*, 1990 และ Tumer *et al.*, 1997)

คุณสมบัติของ MAP30

1. ยับยั้ง HIV integrase (Lee-Huang *et al.*, 1995b)
2. มีความสัมพันธ์ที่ไม่กระตุ้น viral กลับไปเป็น DNA (Lee-Huang *et al.*, 1995a)
3. จดจำสารตั้งต้นทั้ง DNA และ RNA (Lee-Huang *et al.*, 1995c)
4. เลือกทำลายเนื้องอกที่เปลี่ยนรูปแบบและทำลายเชื้อ HIV (Lee-Huang *et al.*, 1995a)

Buchakul (2001) รวบรวมข้อมูล MAP30 ว่า MAP30 ได้มาจากเมล็ดของผลสุกมะระขี้นก เป็นโปรตีนพื้นฐานมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดัลตัน MAP30 มีความเข้มข้นที่สามารถทำการยับยั้งการเข้าทำลายเซลล์อิสระของเชื้อเอชไอวีประเภทที่หนึ่ง และการจำลองตัว โดยวัดได้จาก (i) จำนวนของจุดที่เกี่ยวกับการสร้าง syncytium บน CEM-SS monolayers (ii) โปรตีน p24 ที่แสดงออก viral core และกิจกรรม reverse transcriptase (RT) ที่เกี่ยวเนื่องกับไวรัส HIV-1 ที่เข้าทำลายเซลล์ H9 ขนาดที่ต้องการใช้ในการยับยั้ง 50% (ID50) การตรวจสอบนี้ได้ 0.83, 0.22 และ0.33 nm ตามลำดับ ไม่มีผลต่อ cytotoxic หรือ cytostatic พบภายใต้สภาพที่ตรวจสอบ ข้อมูลเหล่านี้ทำให้คิดได้ว่า MAP30 อาจจะใช้ประโยชน์ในการต่อต้าน therapeutic ในวิธีการเข้าทำลายของ HIV-1 ลำดับ N-terminal ของ MAP30 ที่ตรวจสอบได้ มีกรดอะมิโน 44 ตัว โดยลำดับ กรดอะมิโน N-terminal ของ MAP30 จะมีลักษณะใกล้เคียงกับ trichosanthin (สกัดได้จากรากของ *Trichosanthes kirilowii* และริซินสาย 60 สกัดได้จากเมล็ดของ *Ricinus communis*)

MAP30 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ไม่ติดเชื้อเพราะว่า MAP30 ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ที่มีความสมบูรณ์ได้ ในการรวมตัวกัน MAP30 มีขั้นตอนการยับยั้ง topological มีผลกับ HIV-DNA มันสามารถคลายเกลียว DNA ของ HIV-1 ไม่ให้กลับสภาพเดิม และ catalyzing ตัดสายคู่จากผลผลิต topologically inactive ซึ่งไม่สามารถทำให้เกลียว (supercoils) ย้อนกลับโดยใช้ DNA gyrase ได้ปรากฏการณ์นี้คล้ายคลึงกับการกระทำของ topoisomerase ภายในเซลล์ในปัจจุบัน ตัวยับยั้ง topoisomerase คือ elliticine และยาต้านเนื้องอก

ความสามารถของ MAP30 จะขัดขวาง topological ที่จำเป็นในการแปลงกลับของ DNA มีกลไกใหม่ๆ เกิดขึ้นสำหรับการต่อต้านเชื้อไวรัสและเนื้องอก (Battelli *et al.*, 1995) โดยเซลล์เนื้องอกที่เต้านม, CNS, melanoma และ myeloma จะอ่อนไหวมาก ด้วยค่า EC_{50} ในช่วงของ 0.21-0.38 nM Prostate และ epidimoid อ่อนไหวน้อยที่สุดที่ค่า EC_{50} คือ 3.42 และ 1.88 nM ตามลำดับ (Lee-Huang *et al.*, 1995 b) ในการรวมตัวกัน MAP30 เข้าทำลายไวรัสโรคเริมทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ในสภาพทดลอง EC_{50} อยู่ที่ 0.3-0.5 μM และ 0.1-0.2 μM สำหรับไวรัสโรคเริมทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ตามลำดับ (Bourinbaiar *et al.*, 1996)

วิธีการสกัดโปรตีนที่ 30 กิโลดัลตัน

Jiratchariyakul *et al.* (2001) สกัดโปรตีน MRK29 โดยนำเมล็ดมะระขี้นกจากผลแก่ที่มีสีส้มแดง 20 กิโลกรัมจากต้นมะระขี้นกที่ปลูกจังหวัดราชบุรี มีวิธีการสกัดดังนี้ นำเอ็นโดสเปิร์มที่แช่แข็งมา 50 กรัมบดให้เข้ากันด้วยเกลือมีความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปรับ pH ให้ได้ 3.6-4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีความเข้มข้น 2 นอมอล โดยตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้น นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm เพื่อเอาไขมันของเมล็ดออก นำสารละลายที่กรองได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 30-60%ammonium sulfate ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel filtration column ซึ่ง column ต่อเข้ากับระบบ HPLC โดยเพ็ญศิริ (2544) และบุญยืน (2522) กล่าวถึงหลักการของการตกตะกอนโปรตีน โดยการใช้ neutral salt ว่าถ้าความเข้มข้นของเกลือเช่น $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้นสูงทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ (salting out) เนื่องจากไอออนของเกลือจะดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีโอกาสจับกัน และตกตะกอนลงมา ส่วน Paul *et al.* (1999) สกัด δ-momorcharin นำเมล็ดแห้งของมะระขี้นกโดยซื้อมาจากตลาดในท้องถิ่น ก่อนสกัดนำเมล็ดมาบดด้วยโกร่งและสากให้ได้เป็นผงแล้วนำผงมา 5 กรัม ผสมให้เข้ากันใน 10 mM NaH_2PO_4 (pH7) จำนวน 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งตะกอน นำสารละลายที่ได้กรองผ่านผ้าฝ้าย และทำการแยกส่วนต่างๆ ออกโดยผ่านเนื้อเยื่อ (dialyze) ข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส เอาเกลือออก หลักการขบวนการแยกส่วนต่างๆโดยผ่านเนื้อเยื่อ (dialysis) บุญยืน (2522) ได้กล่าวว่า สารโมเลกุลเล็กที่ปะปนอยู่กับโปรตีนอาจแยกออกได้โดยขบวนการแยกส่วนต่างๆโดยผ่านเนื้อเยื่อ ซึ่งขบวนที่น้ำซึมผ่านเยื่อบางชนิดเซมิเพอมีเอเบิลเข้าสู่สารละลายของโปรตีนภายในถุงที่ทำด้วยเยื่อชนิดนี้ เรียกว่า ปรากฏการณ์ที่ของเหลวผ่านแผ่นเยื่อหรือสารที่มีรูพรุน (osmosis) โดยใช้ถุงแผ่นเนื้อเยื่อ (dialysis bag) ที่มีหน้าตัดเพื่อเก็บโมเลกุลที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่า 3500 ลงมา นำสารละลายที่แยกส่วนต่างๆออกโดยผ่านเนื้อเยื่อแล้วมาผสมด้วย Affi-gel blue gel ให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4800 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เตรียมเจลด้วยบัฟเฟอร์และใส่เข้าไปใน column หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไว้มานำโปรตีนออกโดยผ่าน column แล้วล้างด้วย 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์ นำสารละลายที่ผ่าน column แล้วมาทำการแยกส่วนต่างๆ ออกโดยผ่านเนื้อเยื่อ ใน 2 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5) หลังจากนั้นนำไปผ่าน Mono S HR 5/5 FPLC column แล้วนำไปทำการแยกส่วนต่างๆออกโดยผ่านเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ และทำการแยกส่วนต่างๆ ออกโดยผ่านเนื้อเยื่ออีกครั้งในน้ำกลั่น จะได้สารละลายที่มี δ-momorcharin อยู่

ส่วน Buchakul (2001) แยกโปรตีนออกจากเมล็ดมะระขี้นก โดยนำเมล็ดมะระขี้นกที่ลอกออกเปลือกจำนวน 200.16 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยสารละลายน้ำเกลือ 1,000 มิลลิลิตร ในภาชนะที่เย็นหลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 3.6 ด้วย 2 นอมอลกรดไฮโดรคลอริก (2 N HCl) ผสมให้เข้ากันที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสกรองผ่าน 0.45 μm millipore เพื่อนำไขมันในเมล็ดออกได้สารละลาย 860 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปทำการแยกส่วนต่างๆ ออกโดยผ่านเนื้อเยื่อ และทำให้แห้งด้วยความเย็นด้วยเครื่อง lyophilizer ได้สารสกัดดิบ (crude extract) 8.8357 กรัม

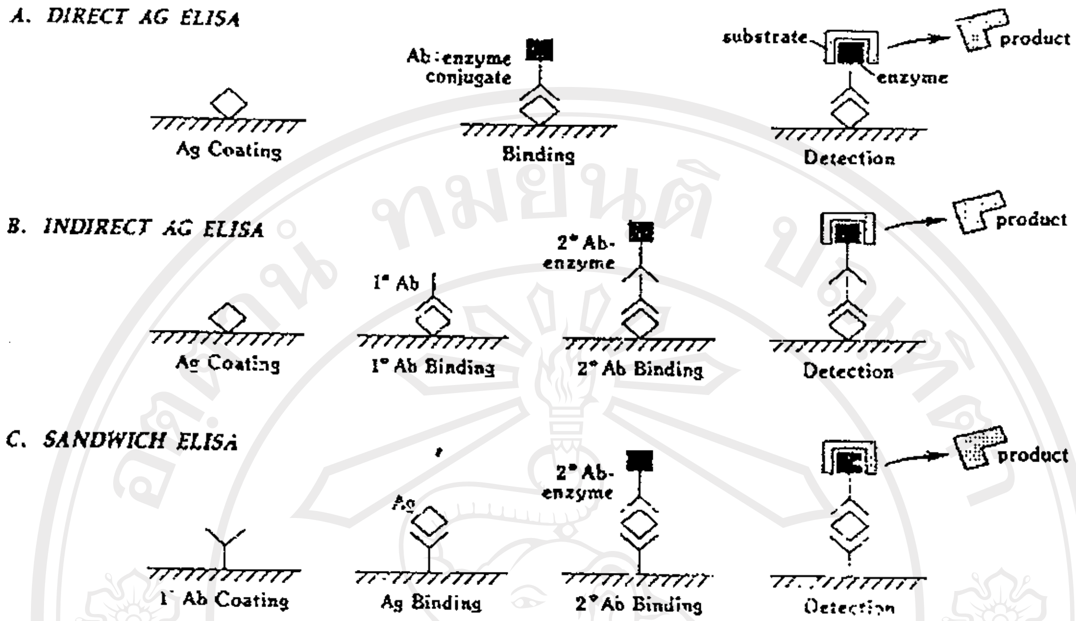
การหาปริมาณโปรตีนโดยการวัดแอคติวิตี้ (วีระศักดิ์, 2544 และ นภาธร, 2536)

วิธีการนี้อาศัยคุณสมบัติทางชีววิทยาที่จำเพาะ เช่น แอคติวิตี้ของเอนไซม์หรือการจับกับแอนติบอดี้ วิธีอิมมูโนแอสเส (immunoassay) ที่ขึ้นกับปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับแอนติบอดี้จัดเป็นการวัดแอคติวิตี้ที่สามารถใช้หาความบริสุทธิ์ได้ โดยทั่วไปการวัดแอคติวิตี้จะต้องวัดค่าสองค่าด้วยกัน คือ มวลโดยรวมของโปรตีนตัวอย่าง และค่าแอคติวิตี้ หาค่าความบริสุทธิ์สัมพันธ์โดยเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้ที่หาได้กับแอคติวิตี้ที่คาดไว้

วิธีอิมมูโนแอสเสอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี้ เทคนิคการหาปริมาณ โปรตีนที่สำคัญเช่น radioimmunoassay (RIA) หรือ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีการทั่วไปในการหาปริมาณโปรตีนจำเพาะ ข้อแตกต่างของทั้งสองวิธีอยู่ที่สารติดฉลากที่ใช้ วิธี RIA ใช้สารรังสีในการติดฉลากโปรตีนเพื่อให้ตรวจสอบหาปริมาณได้ง่าย ส่วน ELISA จะใช้เอนไซม์ที่ใช้เชื่อมต่อกับแอนติบอดี้

ELISA จะใช้แอนติบอดี้ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ด้วยพันธะทางเคมีเพื่อใช้ตรวจการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างแอนติเจน และเอนติบอดี้บนผิวเฟสของแข็งเช่นในหลุมของ microtitre plate เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่สามารถเกาะบนผิวพลาสติกได้ เป็นรูปแบบที่นิยมใช้ของ ELISA ข้อดีของ ELISA คือ สามารถหาปริมาณโปรตีนได้หลายชนิด ได้ผลดี ในสารเคมีที่เสถียรอย่างประหยัด

วิธีที่ใช้ใน ELISA (รูป 1) สำหรับ direct antigen ELISA จะนำ ELISA plate มาเคลือบด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณ นำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนและติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมมาเติมลงไปให้เกิดปฏิกิริยาจับตัวได้สารเชิงซ้อนระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี้หลังจากชะล้างสารส่วนเกินออกไป จะเติมสับสเตรทสำหรับเอนไซม์ที่ทำให้สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตรเมทรี (spectrophotometer)


A. DIRECT AG ELISA
Ab:enzyme conjugate
substrate
enzyme
product
Ag Coating
Binding
Detection
B. INDIRECT AG ELISA
2° Ab-enzyme
1° Ab
product
Ag Coating
1° Ab Binding
2° Ab Binding
Detection
C. SANDWICH ELISA
2° Ab-enzyme
Ag
product
1° Ab Coating
Ag Binding
2° Ab Binding
Detection

รูป 1 ขั้นตอนที่ใช้ใน enzyme immunoassay (A) Direct antigen ELISA (B) Indirect antigen ELISA (C) Sandwich ELISA

สำหรับวิธี indirect antigen ELISA จะเป็นวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป หลังจากเคลือบเพลทด้วยแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณแล้วจะเติมแอนติบอดี้ตรวจสอบที่จำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่งเป็นแอนติบอดี้ที่ไม่ติดฉลาก ตรวจหาปริมาณแอนติเจนโดยเติมแอนติบอดี้ที่แสดงผลซึ่งเป็นแอนติบอดี้ติดฉลากด้วยเอนไซม์จากสัตว์อีกสปีชี่ที่ต้านแอนติบอดี้ทุกตัวจากสัตว์สปีชี่ที่ใช้ทำแอนติบอดี้ตรวจสอบ เติมสับสเตรทเพื่อวัดผลต่อไป ข้อดีของวิธีนี้ คือ จะใช้แอนติบอดี้ติดฉลากเพียงชนิดเดียว คือ แอนติบอดี้แสดงผลซึ่งสามารถหาซื้อได้ง่าย

วิธี sandwich ELISA assay จะใช้เมื่อต้องการปฏิกิริยาจำเพาะที่มี background ต่ำวิธีนี้จะใช้โมโนโคลนอลหรือโพลีโคลนอลแอนติบอดี้สองชนิดที่จับกับแอนติเจนที่ตำแหน่งต่างกัน ขั้นตอนแรกจะเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดี้ตรวจสอบ ตามด้วยการเติมแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณ เติมแอนติบอดี้แสดงผลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อหาปริมาณแอนติเจน วิธีนี้จะเพิ่มความจำเพาะเนื่องจากใช้แอนติเจนสองชนิดและมีความไวสูง เนื่องจากการใช้แอนติบอดีตัวแรกจะช่วยให้แอนติเจนเกาะเพลทได้ดีขึ้น

การสร้างแอนติบอดี้ (วีระศักดิ์, 2544)

เมื่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้รับแอนติเจนชนิดใหม่ แอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นมาจะไม่ตอบสนองต่อผิวโมเลกุลของแอนติเจนทั้งหมด แต่จะตอบสนองกับส่วนจำเพาะบางแห่งที่เรียกว่าอีปีโทป (epitopes) ในโมเลกุลของแอนติเจนอาจมีอีปีโทปจึงมีการเหนี่ยวนำให้สร้างแอนติบอดี้หลายตัวขึ้น เช่นเซลล์แบคทีเรียซึ่งมักมีอีปีโทปจำนวนมาก จะมีการเหนี่ยวนำให้สร้างแอนติบอดี้ที่มีจำนวนแบบมากกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เมื่อแยกส่วนอิมมูโนกลอบบูลินออกจากน้ำเลือดออกมา อิมมูโนกลอบบูลินที่แยกได้จะประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวนมาก ทั้งแอนติบอดี้สำหรับแอนติเจนที่สนใจ และแอนติบอดี้อื่นๆที่สัตว์สร้างมาก่อนหน้านี้แล้ว ส่วนผสมแอนติบอดี้นี้เรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี้ (polyclonal antibody) ในส่วนของ Immunoglobulins แบ่งออกเป็น 5 ประเภท ให้ชื่อเป็น immunoglobulins G, A, M, D และ E ทุกประเภทมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกันประกอบด้วยเปีปไทด์หลายสาย ซึ่ง IgG จัดเป็นแอนติบอดี้หลักที่ทำหน้าที่ทำลายแอนติเจนแปลกปลอม พบในน้ำเลือดในปริมาณสูงกว่าแอนติบอดี้ชนิดอื่น