



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ขั้นตอนทางชีวสารสนเทศสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบ  
ในเซลล์แมคโครฟาจหนู

Bioinformatics workflow to inflammatory responsive network discovery  
in murine macrophage

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802083

สัญญาเลขที่ 98/2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ขั้นตอนทางชีวสารสนเทศสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบ  
ในเซลล์แมคโครฟาจหนู

Bioinformatics workflow to inflammatory responsive network discovery  
in murine macrophage

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อโครงการวิจัย      ขั้นตอนทางชีวสารสนเทศสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบ  
ในเซลล์แมคโครฟาจหนู

หัวหน้าโครงการวิจัย      ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย      รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

หน่วยงาน      ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) รหัส 2560A10802083

### บทคัดย่อ

การอักเสบเป็นสิ่งสำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อและเป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน การศึกษาข้อมูลการแสดงออกของยีนหลายหมื่นยีนพร้อมกันภายใต้สภาวะที่สนใจโดยใช้เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการทำความเข้าใจกลไกทางชีวเคมีของการอักเสบ ในปัจจุบันฐานข้อมูลและเครื่องมือต่าง ๆ ในด้านชีวสารสนเทศนั้นมีมากมายสำหรับการนำไปใช้เพื่ออธิบายกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบ ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยเครือข่ายที่แตกต่างกันสามเครือข่าย ได้แก่ เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โดยทำการตรวจสอบที่ 4 ช่วงระยะเวลาของการตอบสนองการอักเสบซึ่งจะทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยและแปลผลทางชีวภาพ โดยกระบวนการของวิถีพาธเวย์ NF- $\kappa$ B มีการแสดงออกในช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง เมื่อเวลา 8 และ 18 ชั่วโมงวิถีการตอบสนองการอักเสบหลากหลายวิถีเกิดขึ้น จากกระบวนการวิเคราะห์เครือข่ายข้างต้น จะทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยเพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบเพื่อช่วยในการตัดสินใจและอธิบายกลไกการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรสำหรับการตรวจสอบผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่อไป

Research Project      Bioinformatics workflow to inflammatory responsive network discovery  
in murine macrophage

Head of Project      Asst. Prof. Dr. Pitak Sootanan

Co-Researcher      Assoc. Prof. Dr. Klaokwan Srisook

Affiliation      Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

This research was supported by Burapha University through its grant number 2560A10802083

### **Abstract**

Inflammation is important in tissue repair and is an important part in stimulating gene expression. Study of gene expression data for tens of thousands of genes simultaneously under favorable conditions using microarray technology is important for better systematic understanding biochemical mechanism of inflammation. At present, databases and tools in bioinformatics approach are abundant for applying to explain the mechanism of inflammatory response. In this study, inflammatory response from microarray data in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage was analyzed with three difference networks such as gene regulatory network, co-expression network and protein-protein interaction network. Inflammatory modules of 4 time points of LPS-stimulated macrophage microarray data were selected and interpreted their biological function. The process of the NF-KB pathway was differentially expressed at 3 and 6 hours. At 8 and 18 hours, all of the major pathways of inflammatory response were occurred. From the above process, the selected subnetwork can be used as a prototype model to help make decisions and explain the anti-inflammatory mechanisms of the active ingredient from medicinal plants that are important in the future for further examination of laboratory results.

## ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากการช่วยเหลือและร่วมกันทำงานของนิสิตระดับปริญญาตรีที่ทำโครงการวิจัยระดับปริญญาตรีสาขาชีวเคมีร่วมกัน ได้แก่ นางสาวรัชตา คงพรศิริ และ นางสาวรุ่งทิwa สุดถิ่น รวมถึงนิสิตระดับปริญญาโท ได้แก่ นางสาวฐิติรัตน์ นุชศิลา ที่ร่วมกันฝึกผ่าอุปกรณ์และทำงานมาด้วยกันตั้งแต่ทำโครงการวิจัยระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จนกระทั่งศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่ถือว่าเป็นหัวแรงหลักของการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข ที่ให้เกียรติเป็นผู้ร่วมโครงการวิจัย และขอขอบคุณผู้มีส่วนช่วยเหลืออื่นที่ไม่ได้เอ่ยนาม โดยเฉพาะครอบครัวที่มีส่วนสำคัญ และเป็นแรงใจจนสามารถทำเล่มรายงานเพื่อปิดโครงการวิจัยนี้ลงได้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์

หัวหน้าโครงการวิจัย

15 สิงหาคม พ.ศ. 2562

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
ปกใน	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
ประกาศคุณูปการ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
2.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	12
3.1 วัสดุ และอุปกรณ์	13
3.1.1 เครื่องมือและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ	13
3.2 วิธีการทดลอง	14
3.2.1 การตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม	16
3.2.2 การพัฒนาเครือข่ายที่ตอบสนองการอักเสบ	19

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
4.1 การตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม	21
4.2 การพัฒนาเครือข่ายที่ตอบสนองการอักเสบ	29
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	47
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	47
5.2 สรุปผลการทดลอง	50
5.3 ข้อเสนอแนะ	51
5.4 ผลผลิต (Output)	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก นำเสนอรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ	60
ภาคผนวก ข นำเสนอรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมทางวิชาการระดับชาติ	72
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	83

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	แสดงรายละเอียดชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง	17
3-2	ข้อมูลจำนวนโพรบและจำนวนยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง	18
4-1	ตารางแสดงรายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีการ จากทั้งหมดสามวิธีการ คือ SAM, eBayes, และ PLS-CV ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง	22
4-2	ตารางแสดงการแปลผลทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกในแต่ละช่วงเวลา โดยการ ใช้โปรแกรมออนไลน์ DAVID ตามลักษณะของยีนออนโทโลยี 3 ลักษณะ คือ Biological Process, Cell Component และ Molecular Function	22
4-3	ตารางแสดงรายชื่อและแหล่งอ้างอิงข้อมูลทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ (TF) ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน	23
4-4	การค้นหายีนที่มีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาจากเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน	30
4-5	การค้นหายีนที่มีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน	34
4-6	ตารางการแสดงจำนวนยีนที่ถูกพบของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนภายใต้สภาวะที่เปลี่ยนแปลงไป	42



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	กลไกการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นของ LPS ที่มีต่อเซลล์แมคโครฟาจ	7
2-2	วิธีการส่งผ่านสัญญาณ TLR4 ภายหลังจากการเข้าจับของ LPS จะมีการส่งผ่านสัญญาณผ่านโมเลกุลอะแดปเตอร์ MyD88 และ TRIF	9
2-3	เครือข่ายการควบคุมกระบวนการทรานสคริปชันที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกันขณะที่มี LPS ในระบบ	9
2-4	เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สำคัญซึ่งเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นผ่านวิถีสัญญาณของ NF- $\kappa$ B	10
3-1	ผังงานของโครงการขั้นตอนทางชีวสารสนเทศสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจหนู	15
4-1	จำนวนยีนที่ผ่านการคัดเลือกขึ้นด้วยวิธีการ SAM, eBayes, และ PLS-CV ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง	21
4-2	เวนนไดอะแกรมแสดงจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งตรวจสอบได้จาก 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ Uniprot, Disgenet, และ OMIM โดยยีนที่ตรวจสอบพบจาก 2 ใน 3 ฐานข้อมูล จะนำมาใช้เป็นยีนการอักเสบเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป	24
4-3	ภาพแสดงแบบแผนการแสดงออกของยีนที่เกิดจากการจัดกลุ่มการแสดงออกของยีนในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง โดยโปรแกรม DREM	25
4-4	ภาพแสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม DREM ก่อนที่จะทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถแสดงผลเครือข่ายได้	26
4-5	(A) เครือข่ายขนาดใหญ่จาก DREM, (B) เครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกด้วยยีนของ ทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, (C) เครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกด้วยยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา (D) โมดูลการอักเสบที่ถูกคัดเลือกด้วย JActiveModules และข้อมูลทางชีวภาพ	27
4-6	โมดูล A และ โมดูล B ของเครือข่ายย่อยที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-5D) ตามลำดับโหนดสีเหลี่ยมคือทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ โหนดวงกลมคือยีนเป้าหมาย และลูกศรแสดงการทิศทางการควบคุม จากภาพ *โหนด (node) คือ ยีน (gene) และ **เอตจ์ (edge) คือ ปฏิสัมพันธ์	28
4-7	โมดูล A และ โมดูล B ของเครือข่ายย่อยที่เวลา 8 และ 18 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-5D) ตามลำดับโหนดสีเหลี่ยมคือทรานส์คริปชันแฟคเตอร์	28
4-8	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีน และเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกออกมาด้วยยีนที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการคัดเลือกยีนในแต่ละช่วงเวลา	30
4-9	โมดูลที่ 3-3, 6-3, 8-4 และ 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง	31

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-10	เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกการอักเสบของยีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และผลจากการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4CS ที่เวลา 8 ชั่วโมง	31
4-11	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน และเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกออกมาด้วยยีนที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการคัดเลือกยีนในแต่ละช่วงเวลา	34
4-12	โมดูลที่ 3-1, 6-5, 8-3 และ 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์และแปลผลการแสดงออกของยีนการอักเสบ ในช่วงเวลาที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง	35
4-13	เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนการอักเสบที่ถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4CS ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง	35
4-14	เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	36
4-15	เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeoniflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	37
4-16	เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeonol ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	38
4-17	เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ EGCG จากชุดข้อมูล GSE21320 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	39
4-18	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกออกมาด้วยยีนที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการคัดเลือกยีนในแต่ละช่วงเวลา	42
4-19	โมดูลที่ 3-1, 6-5, 8-2 และ 18-3 เป็นตัวแทนของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์และแปลผลการแสดงออกของยีนการอักเสบ ในช่วงเวลาที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง	43
4-20	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกระหว่างโปรตีนการอักเสบที่ถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4CS ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง	43
4-21	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	44
4-22	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeoniflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	45

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-23	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeonol ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง	46
5-1	ภาพแสดงขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยอาศัยวิธีการ เครื่องมือ และฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	51

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์และคำย่อ	คำอธิบาย
AP-1	Activator protein 1
BIND	Biomolecular interaction network database
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CD3E	T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain
CD79A	B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain
COX-2	Cyclooxygenase-2
DDBJ	The dna data bank of japan database
DIP	Database of interacting proteins
EMBL	The european molecular biology laboratory database
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ERG	Erythroblast transformation-specific-related gene
FAG-EC	Fast agglomerate algorithm for mining functional modules based on the edge clustering coefficients
GeneMANIA	The GeneMANIA prediction server
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
HC gp-39	Human cartilage glycoprotein 39
I2D	Interologous interaction database
IFN	Interferon
IFN $\beta$	Interferon Beta
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IKK $\alpha$	Inhibitor of <b>KB</b> kinase alpha
IKK $\beta$	Inhibitor of <b>KB</b> kinase beta
IKK $\gamma$	Inhibitor of <b>KB</b> kinase gamma (NEMO)
IL-1	Interleukin-1
IL-2 family	Interleukin-2 family

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สัญลักษณ์และคำย่อ	คำอธิบาย
InnateDB	Innate database
iNOS, NOS2	Inducible nitric oxide synthase
IRF3	Interferon (IFN)-regulatory factor 3
<b>I</b> KB kinase	Inhibitor of nuclear factor <b>K</b> B kinase
JAK2	Janus kinase2
KEGG pathway =	Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway database
MAL	Myeloid differentiation primary-response gene 88 (MyD88)-adaptor-like protein
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MatrixDB	The extracellular matrix interaction database
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MEK1/2	MAP kinase kinase
MINT	Molecular interaction database
MKK3/6	MAP kinase kinase
MKK4/7	MAP kinase kinase
MPIDB	The microbial protein interaction database
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
OMIM	Online mendelian inheritance in man database
p50	Nuclear factor-kappa B p50 subunits
p65	Nuclear factor-kappa B p65subunits
p70S6K	P70 S6 kinase
Pfam	Protein families database
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PINA	Protein Interaction Network Analysis database
PRKCQ	Protein kinase C theta
SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สัญลักษณ์และคำย่อ	คำอธิบาย
STAT5	Signal transducer and activator of transcription5
SwissPROT	Swiss prot database
TAK1	Transforming growth factor- $\beta$ (TGF $\beta$ )-activated kinase 1
TRAF6	Tumour-necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRANSFAC	Transcription factor database
TRIF	TIR (Toll/IL-1 receptor) domain-containing adaptor inducing interferon
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์หน้าด่านในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อการป้องกันการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก โดยจะประกอบไปด้วยกลไกการจดจำสิ่งแปลกปลอมผ่านตัวรับสัญญาณที่จดจำรูปแบบ (pattern recognition receptors, PRRs) ที่จะเข้าจับอย่างจำเพาะกับส่วนประกอบของจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอม ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) เป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ถูกจดจำโดยโปรตีนกลุ่มทอลล์ (toll-like receptor, TLR) ชนิด TLR4 ที่จะส่งผ่านสัญญาณเพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของแมคโครฟาจโดยการปลดปล่อยสารประกอบไซโตไคน์ (cytokines) และเคโมไคน์ (chemokines) ที่จะส่งผลเหนี่ยวนำให้เซลล์อื่นที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันเกิดการแสดงออกร่วมกันในการจำกัดการแพร่กระจายการติดเชื้อแบคทีเรีย (Foster และ Medzhitov, 2009) โดยการแสดงออกดังกล่าวส่วนหนึ่งจะก่อให้เกิดการอักเสบแก่เนื้อเยื่อข้างเคียงอันเนื่องมาจากเสียสมดุลของภาวะธำรงดุล (homeostatic imbalance) เนื่องจากการผลิตสารสื่อกลางบางชนิด เช่น แบรดีไคนิน (bradykinin), เซโรโทนิน (serotonin), ฮิสตามีน (histamine), พรอสตาแกรนดินส์ (prostaglandins, ตัวอย่างเช่น PGE2), ลิวโคเทรียน (leukotrienes) และไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) (Mequanint, 2011) ซึ่งการอักเสบที่เกิดขึ้นนั้นสามารถก่อให้เกิดโรคอักเสบเรื้อรังที่เกี่ยวข้องได้อย่างหลากหลายชนิดจากการศึกษาในโมเดลของหนู ซึ่งประกอบไปด้วย โรคลำไส้อักเสบโครห์น (Crohn's disease), โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis), โรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis), โรคเบาหวาน (diabetes), และ มะเร็งตับ (liver cancer) (Karin, 2006) การบรรเทาอาการหรือผลจากการอักเสบที่เกิดขึ้นสามารถทำได้โดยการใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านทานการอักเสบ โดยการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานการอักเสบที่เกิดขึ้นนิยมใช้เซลล์ไลน์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่นิยมใช้เป็นโมเดลเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านทานการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ (de Mejia และ Dia, 2009; Uto, 2012; Srisook, 2012; และ Buapool, 2013) เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง มีการพัฒนา และดำรงสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเซลล์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1978 โดย Raschke และคณะ (Raschke, 1978)

การทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อ LPS และกลไกที่เกิดขึ้นจากการออกฤทธิ์ต้านทานการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ สามารถตรวจสอบได้ในภาพรวมโดยอาศัยวิธีการทางชีววิทยาระบบเชิงบูรณาการ (integrative systems biology) ซึ่งเป็นการศึกษาในแบบสหวิทยาการเพื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลภายในระบบทางชีวภาพ โดยอาศัยการติดตามและตรวจวัดชีวโมเลกุลทั้งระบบที่มีการแสดงออกภายใต้สภาวะที่ศึกษา โดยใช้กระบวนการและเครื่องมือทางชีวภาพสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง ซึ่งการตรวจวัดดังกล่าวจะทำให้ได้ข้อมูลการแสดงออกของชีวโมเลกุลเป็นจำนวนมากในการตรวจวัดพร้อมกันเพียงครั้งเดียว (Kitano, 2002) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาฐานข้อมูลฐานข้อมูลสาธารณะที่รวบรวมข้อมูลการแสดงออกของยีน (Edgar, 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ที่สามารถตรวจพบและดาวน์โหลดข้อมูลการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อ LPS ที่มีการศึกษาตามช่วงเวลาการ

ตอบสนองการอักเสบที่แตกต่างกัน (Comer, 2006; Shell, 2005; Hammer, 2010 และ Schott, 2014) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการตรวจสอบการตอบสนองที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการทางชีววิทยาเชิงระบบที่เกี่ยวข้องได้ โดยสามารถนำมาคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองในแต่ละช่วงเวลาโดยอาศัยเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (<http://www.arraymining.net/R-php-1/ASAP/microarrayinfobiotic.php>) (Glaab, 2009) การสืบค้นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบด้วยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลแบบเทกซ์ (text-mining) PolySearch (<http://wishart.biology.ualberta.ca/polysearch/>) (Cheng, 2008) หรือการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนภายใต้ฐานข้อมูลยีนออนโทโลยีที่ถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์ DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Huang, 2009) การสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนจากข้อมูลทรานสคริปชันแพคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ (Nilsson, 2006; Ravasi, 2007 และ Weintz 2010) และข้อมูลของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ (Rutledge, 2012 และ Mages, 2008) รวมทั้งข้อมูลทรานสคริปชันแพคเตอร์กับยีนเป้าหมายที่สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ Integrated Transcription Factor Platform, ITFP (Zheng, 2008; <http://itfp.biosino.org/itfp/>) การสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์การแสดงออกของยีนเพื่อค้นหากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสอดคล้องกับลักษณะที่สนใจคือการตอบสนองการอักเสบ โดยอาศัยการประมวลผลด้วยโปรแกรมเฉพาะด้านที่เกี่ยวข้อง (Ng, 2006 และ Skinner, 2011) และการเปรียบเทียบกับข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction, PPI) จากฐานข้อมูลสาธารณะ BioGrid (Chatr-Aryamontri, 2012) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นก็สามารถนำมาสร้างเป็นต้นแบบของเครือข่ายการส่งผ่านสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อให้เข้าใจการทำงานหรือกลไกของสารเหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น

การวิจัยครั้งนี้จะดำเนินการเพื่อคัดเลือกขั้นตอนที่เหมาะสมของการทำงานโดยอาศัยวิธีการ เครื่องมือ และฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง สำหรับนำมาใช้ในการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจของหนู โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นโมเดลของการอักเสบที่เกิดขึ้น โดยจะเริ่มต้นดำเนินการวิจัยด้วยการรวบรวมและเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีต่อ LPS ตามช่วงเวลา (Shell, 2005; Comer, 2006; Hammer, 2010 และ Schott, 2014) ก่อนจะนำมาทำการคัดเลือกยีนหลักที่แสดงออกอย่างเด่นชัดในแต่ละช่วงเวลาโดยอาศัยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ เช่น ArrayMining (Glaab, 2009) ก่อนนำผลที่ได้มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับข้อมูลยีนที่ได้จากการสืบค้นโดยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลแบบเทกซ์ เช่น PolySearch (Cheng, 2008) และการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนตามฐานข้อมูลยีนออนโทโลยี เช่น DAVID (Huang, 2009) ก็จะทำให้ได้รายชื่อของกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา สำหรับข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีนตามช่วงเวลาจะถูกนำมาใช้ในการค้นหาทรานสคริปชันแพคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาศัยโปรแกรม ตัวอย่างเช่น Dynamic Regulatory Events Miner (DREM) (Schulz, 2012) และการค้นหาความสัมพันธ์ของแบบแผนการแสดงออกระหว่างยีนโดยโปรแกรม ตัวอย่างเช่น Cladist (Fukuchi, 2009) ที่จะทำให้ได้เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory network) และเครือข่ายการแสดงออกร่วม (co-expression network) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ ตามลำดับ ต่อจากนั้นจะนำเครือข่ายที่ได้มาวิเคราะห์ห้วงร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Chatr-Aryamontri, 2012) กับข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลา (Comer, 2006; Shell,



2009; Hammer, 2010 และ Schott, 2014) โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ แสดงผล และแปรผลเครือข่าย ตัวอย่างเช่น Cytoscape (Cline, 2007) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรแกรมปลั๊กอินที่นิยมใช้กันเป็นจำนวนมากซึ่งเหมาะสมกับลักษณะงานที่หลากหลายรูปแบบ (Saito, 2012) จากเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจหนูที่ได้สามารถนำไปใช้ในการตัดสินใจเพื่อการออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด เช่น สารออกฤทธิ์จากใบขลุ่ยที่ได้ผ่านการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการและได้มีการรายงานฤทธิ์การต้านทานการอักเสบมาแล้ว (Srisook, 2012; และ Buapool, 2013) เพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาในลำดับถัดไป และขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่ได้ก็สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อสถานะอื่นที่สนใจต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยอาศัยวิธีการ เครื่องมือ และฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง
2. เพื่อพัฒนาเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบที่ได้นำมาใช้เป็นโมเดลต้นแบบเพื่อช่วยตัดสินใจในการศึกษาและอธิบายกลไกการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรไทยที่สำคัญในอนาคตได้

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. สืบค้นข้อมูลการแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา จากฐานข้อมูลสาธารณะ แล้วนำข้อมูลที่ปรับแต่งและเตรียมความพร้อม เพื่อทำการค้นหากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา แล้วนำรายชื่อของกลุ่มยีนที่ได้มาตรวจสอบกลไกการตอบสนองการอักเสบผ่านเครือข่ายการส่งผ่านสัญญาณระดับโมเลกุลที่เกิดจากการบูรณาการข้อมูลของ เครือข่ายการควบคุมการแสดงออก เครือข่ายการแสดงออกร่วม เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และข้อมูลการแสดงผลของยีนที่ตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา
2. นำเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ได้มาตรวจสอบกับข้อมูลการทดสอบสารออกฤทธิ์ด้านการอักเสบหลากหลายชนิด เพื่อพัฒนาเครือข่ายที่ได้สำหรับการนำไปใช้ในการเป็นโมเดลต้นแบบเพื่อช่วยตัดสินใจในการศึกษาและอธิบายกลไกการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์บางชนิด

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้
2. ได้เครือข่ายที่ตอบสนองการอักเสบเพื่อนำมาใช้อธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้
3. เผยแพร่องค์ความรู้ และบทความวิจัย ในรูปแบบสิ่งตีพิมพ์และงานประชุมวิชาการในระดับชาติและ/หรือนานาชาติ

## บทที่ 2

### ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

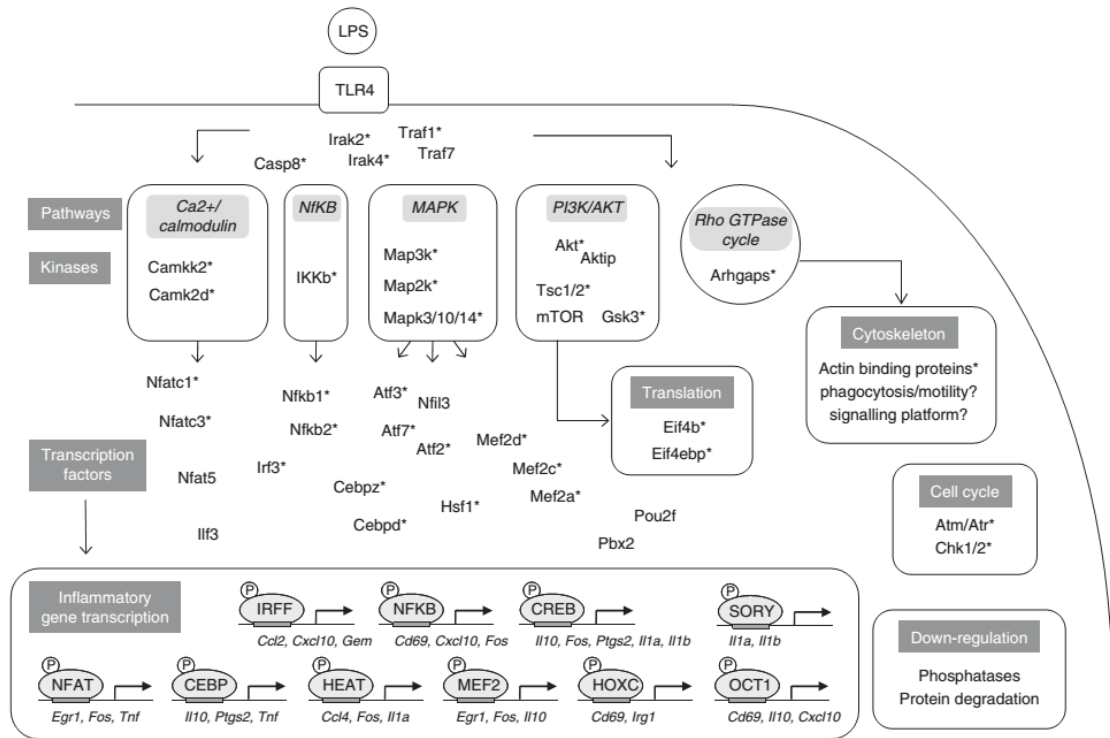
#### 2.1 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การอักเสบอันเนื่องมาจากการติดเชื้อเป็นอีกสาเหตุหลักที่ส่งผลต่อการเกิดโรคเรื้อรังที่หลากหลายในมนุษย์ ซึ่งประกอบไปด้วย โรคลำไส้อักเสบโครห์น (Crohn's disease), โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis), โรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis), โรคเบาหวาน (diabetes), และ มะเร็งตับ (liver cancer) (Karin, 2006) การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบส่วนใหญ่มักเริ่มการศึกษาโดยใช้เซลล์แมคโครฟาจที่เป็นเซลล์แรกในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่จะเริ่มต้นกลไกเพื่อการป้องกันการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก โดยเซลล์ต้นแบบที่นิยมใช้ในการศึกษาการอักเสบก็คือเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Raschke, 1978) ซึ่งศึกษาในระบบการตอบสนองต่อ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ถูกจดจำโดยโปรตีนกลุ่มทอลล์ (toll-like receptor, TLR) ชนิด TLR4 ที่จะส่งผ่านสัญญาณเพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของแมคโครฟาจโดยการปลดปล่อยสารประกอบไซโตไคน์ (cytokines) และเคโมไคน์ (chemokines) ที่จะส่งผลเหนี่ยวนำให้เซลล์อื่นที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันเกิดการแสดงออกพร้อมกันในการจำกัดการแพร่กระจายการติดเชื้อแบคทีเรีย (Foster และ Medzhitov, 2009) เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เป็นเซลล์ไลน์ของหนูที่นิยมใช้เป็นโมเดลต้นแบบ สำหรับใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านทานการอักเสบของสารสกัดจากธรรมชาติ (de Meija และ Dia, 2009; Uto, 2012; Srisook, 2012; และ Buapool, 2013) ดังนั้นการศึกษาและเรียนรู้กลไกในระดับโมเลกุลอย่างเป็นระบบในการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อสิ่งแปลกปลอมที่ใช้ในการทดสอบก็คือ LPS ก็เป็นอีกส่วนหนึ่งที่จะทำให้สามารถทำความเข้าใจภาพรวมของการตอบสนองที่เกิดขึ้นได้ เพื่อนำไปอธิบายกลไกที่ควรจะต้องเกี่ยวข้องเมื่อมีการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ว่าการต้านทานหรือการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นเกิดขึ้นได้ที่บริเวณใด เวลาใด และอย่างไร ซึ่งจะทำให้สามารถนำไปสู่การพัฒนาตัวยาหรือสารออกฤทธิ์ที่ส่งผลต่อการต้านทานการอักเสบที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคตต่อไป

ชีววิทยาเชิงระบบโดยกระบวนการทางชีวสารสนเทศ เป็นการศึกษาสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลระดับจีโนมในการออกแบบการตรวจวัดชนิดและปริมาณของชีวโมเลกุลที่มีการแสดงออกในระดับต่างๆ เช่น การตรวจวัดชนิดและปริมาณการแสดงออกของยีนโดยการตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอ และโปรตีน หรือการตรวจวัดชนิดและปริมาณการแสดงออกของเมตาบอไลต์ เพื่อนำมาศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงหรือการตอบสนองของสภาวะที่ศึกษา ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลการแสดงออกของชีวโมเลกุลในแต่ละชนิดอย่างเป็นระบบ ทำให้เราสามารถทำความเข้าใจและอธิบายกลไก รวมถึงวิธีการส่งผ่านสัญญาณระดับโมเลกุลได้ครบถ้วนสมบูรณ์ดีขึ้นกว่าการศึกษาชีวโมเลกุลในแบบดั้งเดิมที่เป็นการศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงหรือการตอบสนองของชีวโมเลกุลเพียงชนิดเดียวหรือกลุ่มเดียว (Kitano, 2002) ซึ่งการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ นั้นเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์เป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถศึกษาการแสดงออกของยีนจำนวนเป็นหลักหมื่นยีนในเวลาเดียวกัน โดยการตรวจวัดชนิดและปริมาณของอาร์เอ็นเอ ของยีนทั้งหมดภายใต้สภาวะที่สนใจ (Miller and Tang, 2009) ซึ่งการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีอย่างรวดเร็วและเป็นที่ยอมรับในการใช้งาน จึงทำให้มีการสร้างข้อมูลจากการใช้งานไมโครอาร์เรย์ภายใต้สภาวะต่างๆ อยู่เป็นจำนวนมาก และมีการ

เก็บรวบรวมข้อมูลการแสดงออกของยีนด้วยไมโครอาร์เรย์เหล่านี้ในฐานะข้อมูลสาธารณะซึ่งเป็นฐานข้อมูลเปิดที่นักวิจัยโดยทั่วไปสามารถเข้าไปดาวน์โหลดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยได้ ตัวอย่างเช่น ฐานข้อมูลสาธารณะ Gene Expression Omnibus, GEO (Edgar, 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) โดยสามารถตรวจสอบพบข้อมูลไมโครอาร์เรย์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อ LPS และทดสอบการออกฤทธิ์ของ Bacillus anthracis edma toxin (GSE4712; Comer, 2006) การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช Hypericum perforatum (GSE21841; Hammer, 2010) และการตรวจสอบบทบาทของยีน CstF-64 ที่เกี่ยวข้องกับ การตอบสนองการอักเสบ (GSE2002; Shell, 2005) ที่สามารถคัดเลือกข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในตัวอย่างที่เกี่ยวข้องซึ่งมีการศึกษาการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง มาใช้ในการสร้างเครือข่ายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบได้ นอกจากนี้ล่าสุดได้มีการตีพิมพ์และเผยแพร่ข้อมูลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยอาศัยเทคโนโลยีการหาลำดับเบสยุคใหม่ (next generation sequencing, NGS) (Schendure and Ji, 2008) โดยอาศัยเทคนิค RNA-seq ในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในเซลล์ RAW264.7 ที่มีต่อการกระตุ้นด้วย LPS ในช่วงเวลาสองชั่วโมงแรก โดยแบ่งเวลาการตรวจวัดที่ 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, และ 120 นาที (Schott, 2014) ซึ่งข้อมูลชุดนี้ก็ถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะ GEO (Edgar, 2002) ด้วยเช่นกัน โดยเราสามารถนำข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้มาคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองในแต่ละช่วงเวลาโดยอาศัยเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (Glaab, 2009) แล้วนำมาตรวจสอบกับรายชื่อของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่ผ่านการสืบค้นด้วยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลแบบเทกซ์ (text-mining) PolySearch (Cheng, 2008) หรือการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนภายใต้ฐานข้อมูลยีนออนโทโลยี (Gene Ontology, GO) ที่ถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์ DAVID (Huang, 2009) เพื่อจะทำให้ได้กลุ่มยีนที่มีบทบาทต่อการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลาอย่างแท้จริง

ส่วนข้อมูลเชิงระบบของทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบก็สามารถค้นหาได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Nilsson, 2006; และ Ravasi, 2007) โดย Weintz และคณะ (2010) ได้รายงานถึงการควบคุมในระดับการถอดรหัสโดยกลุ่มของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจระหว่างที่มีการตอบสนองต่อ LPS (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นการศึกษาฟอสโฟโปรตีนไอมของแมคโครฟาจที่มีการตอบสนองต่อ LPS ทำให้สามารถตรวจพบการตอบสนองโดยรวมของฟอสโฟโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผ่านสัญญาณของโปรตีนในการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจที่มีต่อ LPS (Weintz, 2010)



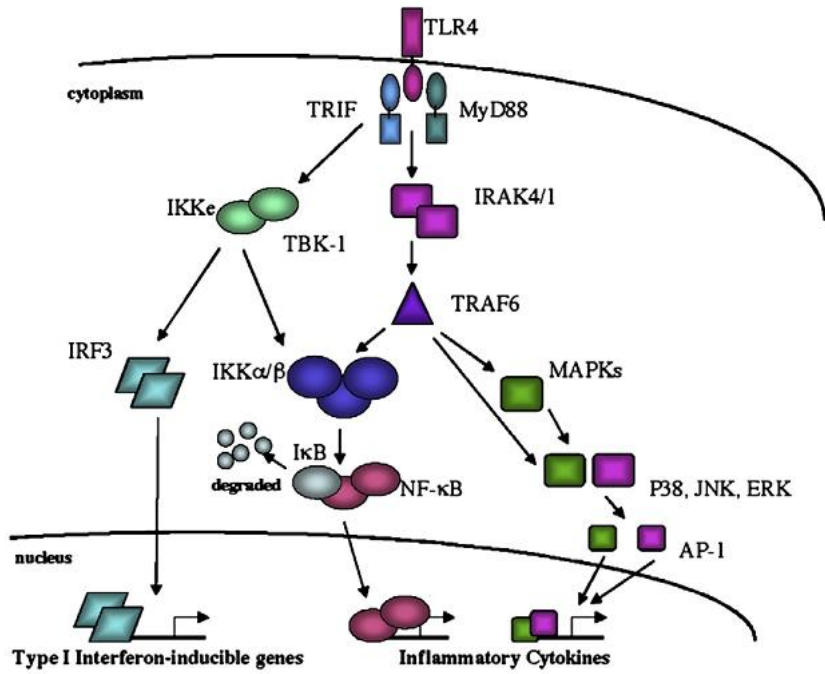
ภาพที่ 2-1 กลไกการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นของ LPS ที่มีต่อเซลล์แมคโครฟาจาจากการตรวจวัดโปรตีนทั้งหมดที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตหรือฟอสโฟโปรตีน (Weintz, 2010)

ในส่วนข้อมูลของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบนอกจากการสืบค้นจากโปรแกรมออนไลน์ PolySearch (Cheng, 2008) แล้ว ก็สามารถตรวจสอบได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ตัวอย่างเช่นข้อมูลของ Rutledge และคณะ (2012) ที่กล่าวถึงผลการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจาที่มีต่อ LPS ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีการที่แตกต่างกันโดยใช้ไมโครอาร์เรย์เป็นวิธีการตรวจวัดการแสดงออกของยีนก่อนที่จะยับยั้งผลของยีนบางกลุ่มด้วย quantitative real-time RT-PCR (Rutledge, 2012) ซึ่งจะพบว่ายีนที่แสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการมีกับไม่มี LPS ส่วนหนึ่งจะอยู่ในพาธเวย์ที่เกี่ยวข้องกับ IL-6 signaling, Interferon signaling, NF- $\kappa$ B signaling, p38MAPK signaling, และ Apoptosis signaling ซึ่งเป็นพาธเวย์ที่มีการรายงานกันมาอย่างต่อเนื่องว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบเมื่อมีการทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจาด้วย LPS (Mages, 2008) ต่อจากนั้นข้อมูลของทรานสคริปชันแฟคเตอร์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่ได้จะนำมาจัดกลุ่มเพื่อสร้างเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบโดยอาศัยข้อมูลทรานสคริปชันแฟคเตอร์กับยีนเป้าหมายที่สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ Integrated Transcription Factor Platform, ITFP (Zheng, 2008; <http://itfp.biosino.org/itfp/>) ซึ่งจะทำให้ได้เครือข่ายของทรานสคริปชันแฟคเตอร์กับยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบก่อนที่จะนำไปบูรณาการร่วมกับเครือข่ายที่ได้จากข้อมูลไมโครอาร์เรย์เพื่อเพิ่มความถูกต้องของการส่งผ่านสัญญาณในข้อมูลระดับยีนและโปรตีนเพิ่มมากขึ้น แล้วนำเครือข่ายที่ได้นำไปตรวจสอบและเปรียบเทียบเชิง

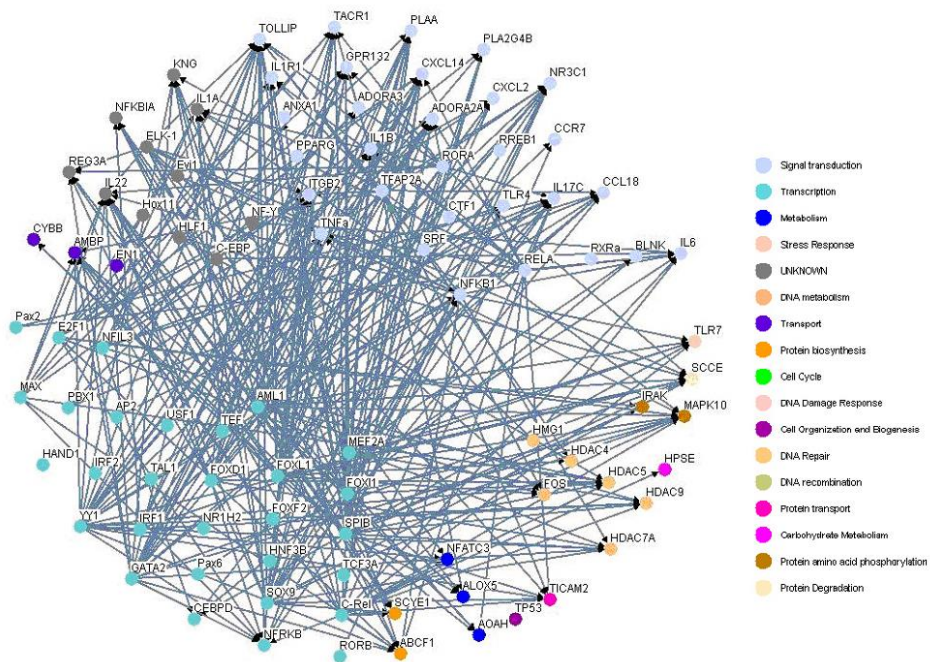
ชีวภาพกับข้อมูลที่ได้จากแหล่งอ้างอิงที่เป็นบทความวิชาการที่น่าเชื่อถือ (Medzhitov และ Hornig, 2009; และ Foster และ Medzhitov, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 2 ที่แสดงถึงส่วนหนึ่งของวิถีการส่งผ่าน TLR 4 ที่เกี่ยวข้องกับ การตอบสนองต่อ LPS ของเซลล์แมคโครฟาจที่จะส่งผ่านโมเลกุลอะแดปเตอร์ที่สำคัญสองชนิดคือ MyD88 และ TRIF

สำหรับข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีนตามช่วงเวลาจะถูกนำมาใช้ในการค้นหาทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาศัยโปรแกรม Dynamic Regulatory Events Miner หรือ DREM (Schulz, 2012) ที่จะทำให้ได้เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory network) และการตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบบแผนการแสดงออกของยีนโดย Pearson Correlation Coefficient (PCC) ภายใต้โปรแกรม Cladist (Fukuchi, 2009) ก็จะทำให้ได้เครือข่ายการแสดงออกร่วม (co-expression network) ซึ่งจะนำเครือข่ายทั้งสองข้างต้นมาวิเคราะห์ร่วมกันกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Chatr-Aryamontri, 2012) กับข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลาที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ (Comer, 2006; Shell, 2009; Hammer, 2010 และ Schott, 2014) โดยใช้โปรแกรม Cytoscape (Cline, 2007) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเครือข่ายและการแปลผลที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยโปรแกรมปลั๊กอินที่บรรจุภายใน (Saito, 2012) เมื่อสามารถค้นพบและจัดกลุ่มยีนที่อยู่ภายใต้เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกที่มีการแสดงออกร่วมกันในแต่ละช่วงเวลาแล้ว ก็จะนำยีนที่มีความสำคัญของแต่ละช่วงเวลามาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอ พร้อมคัดเลือกยีนที่มีลักษณะการแสดงออกที่เด่นชัดมาตรวจสอบเพิ่มเติมในช่วงเวลาที่ละเอียดขึ้น พร้อมยืนยันผลเพิ่มเติมในระดับโปรตีน ที่จะทำให้ได้แบบแผนการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา

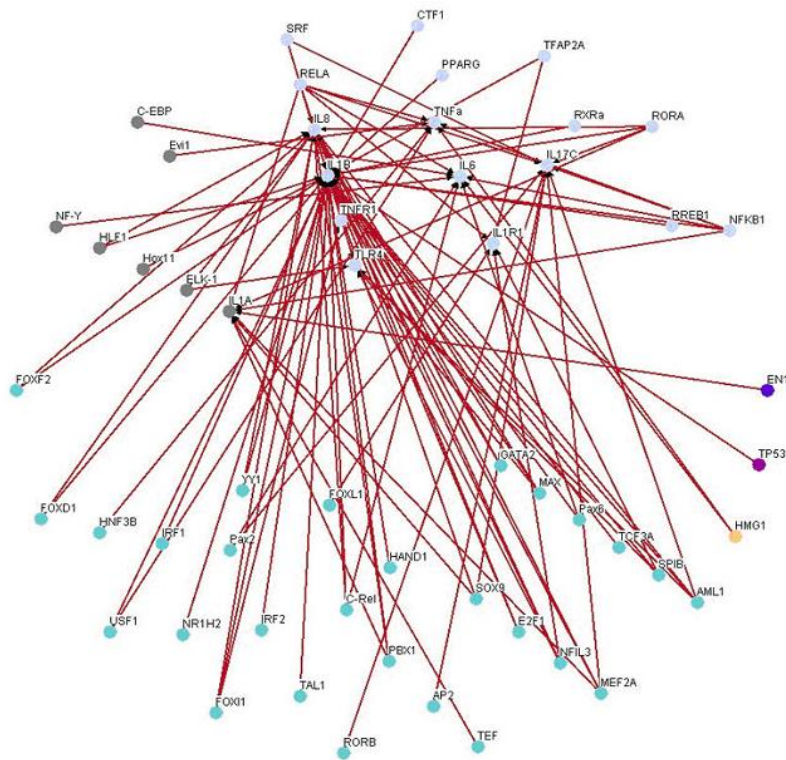
จากตัวอย่างการศึกษาโดย Chen และคณะ (2008) ที่ได้สร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory network) ที่เกี่ยวข้องกับระบบการตอบสนองต่อการอักเสบ (inflammatory response system) โดยได้ใช้กระบวนการทางเหมืองข้อมูล (data mining) และการวิเคราะห์เครือข่ายแบบไดนามิก (dynamic network analysis) มาใช้ในการสร้างเครือข่ายที่แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งเป็นเครือข่ายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในขณะที่มี LPS อยู่ในระบบ และในรูปที่ 4 ซึ่งเป็นเครือข่ายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สำคัญซึ่งเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นผ่านวิถีสัญญาณของ NF- $\kappa$ B ในระบบภูมิคุ้มกันในขณะที่มี LPS อยู่ในระบบ ที่ทำให้สามารถพิจารณาการส่งผ่านของข้อมูลหรือสัญญาณที่เกิดขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบจากการศึกษาได้อย่างครอบคลุมมากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 2-2 วิธีการส่งผ่านสัญญาณ TLR4 ภายหลังจากการเข้าจับของ LPS จะมีการส่งผ่านสัญญาณผ่านโมเลกุลอะแดปเตอร์ MyD88 และ TRIF (Foster และ Medzhitov, 2008)



ภาพที่ 2-3 เครือข่ายการควบคุมกระบวนการทรานสคริปชันที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกันขณะที่มี LPS ในระบบ (Chen, 2008)



ภาพที่ 2-4 เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สำคัญซึ่งเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นผ่านวิถีสัญญาณของ NF-κB ในระบบภูมิคุ้มกันในขณะที่มี LPS อยู่ในระบบ (Chen, 2008)

## 2.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เป็นเซลล์ไลน์ของหนูที่นิยมใช้เป็นโมเดลต้นแบบที่ได้รับการพัฒนาและดำรงสายพันธุ์อย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเซลล์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1978 โดย Raschke และคณะ (Raschke, 1978) เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 นี้นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านทานการอักเสบที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำโดย LPS ของสารสกัดจากธรรมชาติ ตัวอย่างเช่นการใช้สารสกัดกลุ่มลูนาซิน (lunasin) และกลุ่มเปปไทด์ที่คล้ายลูนาซิน (lunasin-like peptides) ที่ได้จากถั่วเหลือง (de Mejia และ Dia, 2009) การศึกษาสารสกัดจากพืช *Euphorbia fischeriana* (Uto, 2012) และการศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านทานการอักเสบของสารสกัดจากใบขลุ่ย *Pluchea indica* Less. (Srisook, 2012; และ Buapool, 2013) ดังนั้นการศึกษาและเรียนรู้กลไกในระดับโมเลกุลอย่างเป็นระบบในการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อสิ่งแปลกปลอมที่ใช้ในการทดสอบก็คือ LPS ก็เป็นอีกส่วนหนึ่งที่จะทำให้สามารถทำความเข้าใจภาพรวมของการตอบสนองที่เกิดขึ้นได้ เพื่อนำไปอธิบายกลไกที่ควรเกี่ยวข้องเมื่อมีการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ว่าการต้านทานหรือการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นเกิดขึ้นได้ที่บริเวณใด เวลาใด และอย่างไร

การศึกษาชีววิทยาเชิงระบบโดยกระบวนการทางชีวสารสนเทศของการตอบสนองการอักเสบสามารถทำได้โดยอาศัยข้อมูลการแสดงออกของยีนที่บรรจุอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะ ซึ่งเป็นฐานข้อมูลเปิดที่นักวิจัยโดยทั่วไปสามารถเข้าไปดาวน์โหลดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยได้ ซึ่งฐานข้อมูลที่ได้รับความนิยมก็คือ GEO



(Edgar, 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ที่สามารถตรวจสอบพบข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อ LPS โดยทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของ Bacillus anthracis edma toxin ที่ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลภายใต้รหัส GSE4712 (Comer, 2006) การทดสอบการต้านทานการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีต่อ LPS โดยใช้สารสกัดที่ได้จากพืช Hypericum perforatum ที่ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลภายใต้รหัส GSE21841 (Hammer, 2010) การตรวจสอบบทบาทของยีน CstF-64 ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีต่อ LPS ซึ่งถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลภายใต้รหัส GSE2002 (Shell, 2005) และล่าสุดกับชุดข้อมูล GSE52320 (Schott, 2014) ที่อาศัยเทคนิค RNA-seq ในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในเซลล์ RAW264.7 ที่มีต่อการกระตุ้นด้วย LPS ในช่วงเวลาสองชั่วโมงแรก โดยแบ่งเวลาการตรวจวัดเป็น 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, และ 120 นาที (Schott, 2014) ซึ่งชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนข้างต้นเป็นเพียงส่วนหนึ่งที่พบในฐานข้อมูล GEO ที่มีการบรรจุข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองการอักเสบโดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS มาตรวจสอบกลไกการอักเสบ หรือทดสอบการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหรือสารสังเคราะห์ ซึ่งเราสามารถคัดเลือกข้อมูลการแสดงออกของยีนในตัวอย่างเฉพาะที่ต้องการมาใช้ในการสร้างเครือข่ายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบได้ โดยการเริ่มต้นด้วยการนำข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้มาคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองในแต่ละช่วงเวลาโดยอาศัยเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (Glaab, 2009) ในการคัดเลือกด้วยวิธีการที่หลากหลายเพื่อให้ได้กลุ่มยีนที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องอย่างแท้จริง ก่อนที่จะนำมาตรวจสอบกับรายชื่อของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่ผ่านการสืบค้นด้วยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลแบบเท็กซ์ (text-mining) PolySearch (Cheng, 2008) เพื่อยืนยันผลเพิ่มเติมถึงความเกี่ยวข้องและนำรายชื่อยีนที่ได้มาผ่านการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนโดยอาศัยฐานข้อมูลยีนออนโทโลยีภายใต้โปรแกรมออนไลน์ DAVID (Huang, 2009) เพื่อจะได้ตรวจสอบหน้าที่และการทำงานของยีนเหล่านั้นตามการแปลผลยีนออนโทโลยี 3 ลักษณะ คือ Biological Process (BP), Cell Component (CC), และ Molecular Function (MF) ที่จะทำให้ทราบได้ว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกในแต่ละช่วงเวลาเกี่ยวข้องกับการทำงานในการตอบสนองต่อการอักเสบอย่างไร และเกิดขึ้นที่บริเวณใดของเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นของการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลา

ส่วนข้อมูลเชิงระบบของทรานสคริปชันแฟคเตอร์และยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบก็สามารถค้นหาได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่นการศึกษาชีววิทยาเชิงระบบของการควบคุมการแสดงออกของยีนในแมคโครฟาจ (Ravasi, 2007) ซึ่งเป็นบทความวิชาการที่ได้สรุปวิสัยทัศน์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของเครือข่ายการควบคุมการแสดงในระดับทรานสคริปชันในระหว่างที่มีการตอบสนองต่อ LPS ของเซลล์แมคโครฟาจ โดยทำการเรียบเรียงเนื้อหาและกลไกที่สำคัญมาจากบทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Nilsson, 2006) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการตรวจวัดฟอสโฟโปรตีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกในระหว่างที่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS ของเซลล์แมคโครฟาจ โดยอาศัยวิธีการศึกษาที่เรียกว่า ฟอสโฟโปรตีโอมิกส์ (phosphoproteomics) เนื่องจากการตรวจวัดโปรตีนในระหว่างที่มีการส่งผ่านข้อมูลหรือสัญญาณที่มักจะถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในรูปที่มีหมู่ฟอสเฟตผ่านปฏิกิริยาฟอสโฟริเซชัน (phosphorylation) ทำให้ได้ทราบกลไกที่เกิดขึ้นในขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ (proteomics) อาจตรวจสอบไม่พบ (Weintz, 2010) สำหรับข้อมูลของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบก็สามารถตรวจสอบได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตัวอย่างเช่นข้อมูลของ Rutledge และคณะ (2012) ที่กล่าวถึงผลการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจที่มีต่อ LPS ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน โดยการใช้ไมโครอาร์เรย์เป็นวิธีการตรวจวัดการแสดงออก

ของยีนก่อนที่จะยืนยันผลของยีนบางกลุ่มด้วย quantitative real-time RT-PCR (Rutledge, 2012) ต่อจากนั้นข้อมูลของทรานสคริปชันแฟคเตอร์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่ได้จะนำมาจัดกลุ่มเพื่อสร้างเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบโดยอาศัยข้อมูลทรานสคริปชันแฟคเตอร์กับยีนเป้าหมายที่สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ Integrated Transcription Factor Platform, ITFP (Zheng, 2008) สำหรับข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีนตามช่วงเวลาจะถูกนำมาใช้ในการค้นหาทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาศัยโปรแกรม Dynamic Regulatory Events Miner หรือ DREM (Schulz, 2012) ที่จะทำได้เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory network) ซึ่งเป็นเครือข่ายของ ทรานสคริปชันแฟคเตอร์กับยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ

การสร้างเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบจากข้อมูลการแสดงออกของยีนสามารถสร้างได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกสอดคล้องกัน แล้วสร้างเป็นคู่ของยีนที่มีการแสดงออกสอดคล้องกันในระดับค่าน้ำหนักความสัมพันธ์ที่แตกต่างกันที่จะทำให้ได้เครือข่ายของยีนที่มีการแสดงออกร่วมกัน (co-expression network) ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการทำนายหน้าที่ของยีนและการค้นหาเครือข่ายหมายทางชีวภาพจากชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนได้ (Zhang, 2012) ในปัจจุบันมีการสร้างโปรแกรมสำเร็จรูปที่เป็นโปรแกรมซึ่งสามารถดาวน์โหลดและใช้งานได้ฟรีที่สามารถนำมาใช้ในการสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออก ตัวอย่างเช่น โปรแกรม DAPfinder และ DAPview (Skinner, 2011) ที่สามารถสร้างและเปรียบเทียบเครือข่ายของยีนที่มีความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกซึ่งทั้งสองโปรแกรมเป็นโปรแกรมปลั๊กอินของ BRB-ArrayTools (Simon, 2007) ที่สามารถช่วยในการจำแนกคู่ของยีนที่มีการแสดงออกสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่สนใจได้ และยังมีโปรแกรม Cladist ซึ่งเป็นโปรแกรมที่สามารถนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่มีมาสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกของยีนได้ โดยจะมีการเชื่อมโยงข้อมูลที่วิเคราะห์ได้กับ pSTING ซึ่งเป็นโปรแกรมออนไลน์ (Ng, 2006) ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ผ่านการสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ของโปรแกรมข้างต้นไปแสดงผลภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Cline, 2007) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ได้รับความนิยมในเรื่องของการศึกษาเครือข่ายทางชีวภาพ และล่าสุดก็ได้มีการออกแบบทศวรรษวิชาการเพื่อแนะนำปลั๊กอินที่สำคัญเพื่อการใช้งาน Cytoscape ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ที่ประกอบไปด้วยปลั๊กอินจำนวน 152 ปลั๊กอินที่ได้รับการตีพิมพ์สำหรับการใช้งาน Cytoscape เวอร์ชัน 2.5–2.8 (Saito, 2012) ที่จะทำให้การนำเสนอและการแปลผลทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองการอักเสบหรือการออกฤทธิ์ของสารสกัดมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น (Merico, 2009)

## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

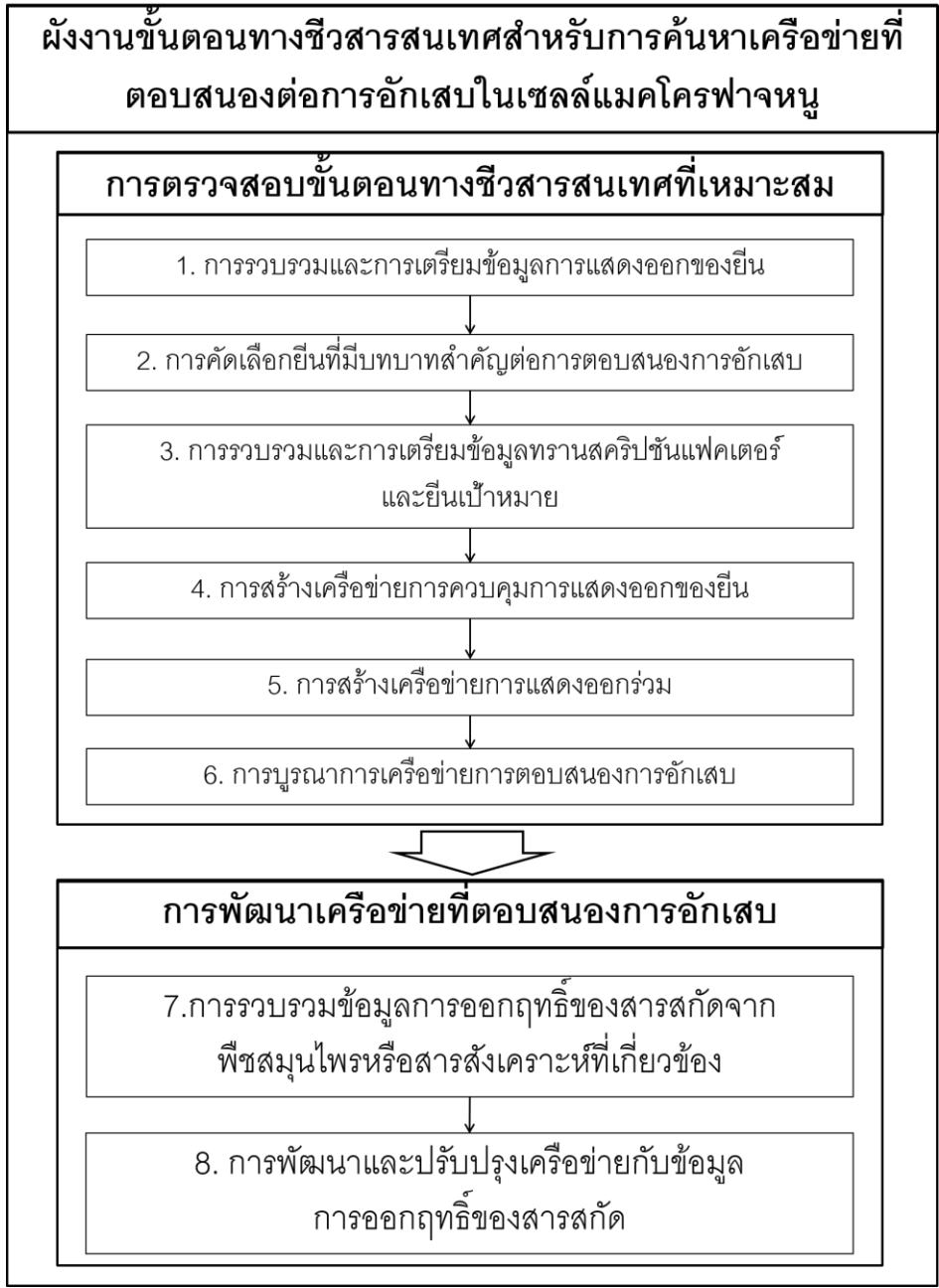
#### 3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

##### 3.1.1 เครื่องมือและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ

1. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal Computer)
  - a. Processor: Intel® Core™ i3-2365 CPU @1.40 GHz  
Installed memory: (RAM) 4.00 GB  
System type: 64-bit Operating System
  - b. Processor: Intel® Core™ i3-2350 CPU @2.30 GHz NVIDIA GeForce GT650M  
Installed memory: (RAM) 8.00 GB DDR3  
System type: 64-bit Operating System
  - c. Processor: Intel® Core™ i5-2450M CPU @2.40 GHz NVIDIA GeForce GT650M  
Installed memory: (RAM) 8.00 GB DDR3  
System type: 64-bit Operating System
2. ระบบปฏิบัติการไมโครซอฟวินโดวส์สิบ (Windows 10)
3. โปรแกรมไมโครซอฟท์เอกซ์เซล (Microsoft Excel 2010, 2013)
4. โปรแกรม DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, version 6.7; Huang, Sherman and Lempicki, 2009)
5. โปรแกรม Cytoscape version 2.6.3 (<http://www.cytoscape.org>; Cline et al., 2007)
6. โปรแกรม Arraymining (<http://www.arraymining.net/R-php-1> / ASAP/microarrayinfobiotic.php; Glaab et al., 2009)
7. โปรแกรม STRING (<http://string-db.org/>; Szklarczyk et al., 2017)
8. โปรแกรม Cladist (Fukuchi et al., 2009)
9. โปรแกรม DREM 2.0 (Dynamic Regulatory Events Miner version 2.0; Schulz et al., 2012)
10. โปรแกรม JactiveModules (Ideker et al., 2002)
11. โปรแกรม BiNGO version 3.2.0 (Maere, Heymans and Kuiper, 2005)
12. ฐานข้อมูล GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Barrett and Edgar, 2006)
13. ฐานข้อมูล KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>; Kanehisa, 2010)

### 3.2 วิธีการทดลอง

การตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยอาศัยวิธีการ เครื่องมือ และฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ มีขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัยดังแผนงานรูปที่ 3-1 ที่จะเริ่มต้นจากการรวบรวมและการเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีต่อการกระตุ้นด้วย LPS จากฐานข้อมูลสาธารณะ ก่อนจะทำการคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา โดยการตรวจสอบด้วยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูล โปรแกรมการสืบค้นข้อมูลเท็กซ์ และโปรแกรมการแปลผลทางชีวภาพที่เหมาะสม ก่อนนำข้อมูลรายชื่อยีนที่ได้มาบูรณาการร่วมกับ เครือข่ายการตอบสนองการอักเสบที่สร้างขึ้นจาก ข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีน ข้อมูลทรานสคริปชันแฟคเตอร์พร้อมด้วยยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ โดยอาศัยการสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออก (gene-regulatory network) เครือข่ายการแสดงออกร่วม (co-expression network) และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction network) เพื่อจะทำให้ได้ขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบ และนำผลของเครือข่ายที่ได้มาสร้างรูปแบบของกลไกการตอบสนองที่ควรจะเป็นเพื่อการใช้งานสำหรับการออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์ต่อไป ลูกศรแสดงการทำงานจากขั้นตอนหนึ่งไปสู่อีกขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3-1 ผังงานของโครงการขั้นตอนทางชีวสารสนเทศสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจหนู

รายละเอียดของการดำเนินการวิจัยในแต่ละขั้นตอนมีดังต่อไปนี้

### 3.2.1 การตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม

#### 1. การรวบรวมและการเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีน

ในการวิจัยนี้จะเริ่มต้นโดยการรวบรวมและจัดเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีน โดยทำการดาวน์โหลดชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO (Edgar et al., 2002, Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ซึ่งเป็นชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ตรวจสอบค่าการแสดงออกของยีนที่อยู่ในรูปแบบไฟล์ series expression matrix ในเบื้องต้นทำการคัดเลือกข้อมูลเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์จำนวนทั้งสิ้น 3 ชุดข้อมูล ที่อยู่ภายใต้แพลตฟอร์ม Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 array (GPL1261) ได้แก่ ชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ GSE4712 และ GSE21841 และแพลตฟอร์ม Affymetrix Mouse Expression 430A Array (GPL339) ได้แก่ชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ GSE2002 โดยชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้นำมาวิเคราะห์นั้น จะคัดเลือกตัวอย่างมาจาก 2 กลุ่มการทดลองคือ กลุ่มตัวอย่างของเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจหนู สายพันธุ์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา ที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง รายละเอียดของแต่ละชุดข้อมูลแสดงใน ตารางที่ 3-1

เนื่องจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ทั้งสามชุดข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาจากแหล่งที่มาแตกต่างกัน จึงต้องมีการนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์ไปผ่านกระบวนการจัดเตรียมข้อมูล และผ่านกระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชัน (Normalization) โดยการใช้ Z-score เพื่อปรับมาตรฐานค่าของตัวเลขให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน แล้วทำการคัดเลือกโพรบ (probe) ที่มีค่าการแสดงออกสูงสุดเป็นตัวแทนการแสดงออกของยีน (gene) (one gene one probe) จากในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ GSE4712 และ GSE21841 จากแพลตฟอร์ม GPL1261 มีจำนวนโพรบ 45,101 โพรบ จำนวนยีน 21,495 ยีน และชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ GSE2002 จากแพลตฟอร์ม GPL339 มีจำนวนโพรบ 22,690 โพรบ จำนวนยีน 13,480 ยีน ซึ่งจะทำการคัดเลือกจำนวนยีนตามชุดข้อมูลที่มีน้อยที่สุด ทำให้ได้ข้อมูลของยีนที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เท่ากับ 13,480 ยีน (ตารางที่ 3-2)

ตารางที่ 3-1 แสดงรายละเอียดชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง

GSE ID	หัวข้อ	เอกสารอ้างอิง	แพลตฟอร์ม	ตัวอย่าง	แหล่งของ LPS
GSE4712	Edema Toxin-treated Macrophage Study.	Comer <i>et al.</i> , 2006	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (GPL1261)	9 ตัวอย่าง untreated=3 3hr. LPS=3 6hr. LPS=3	LPS (0.01ng/ml; Sigma Aldrich)
GSE21841	Expression data from LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages treated with Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents	Hammer <i>et al.</i> , 2010	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (GPL1261)	6 ตัวอย่าง untreated=3 8hr. LPS=3	LPS (1ug/ml; Sigma Aldrich)
GSE2002	CstF-64 Influenced Gene Expression	Shell <i>et al.</i> , 2005	Affymetrix Mouse Expression 430A Array (GPL339)	6 samples Untreated = 3 18 hr. LPS = 3	LPS (100 ng/ml; Sigma Aldrich)
GSE9632	Gene expression profiles of RAW264.7 macrophage cells treated with Paeony root-derived compounds	Huang <i>et al.</i> , 2006	ABI Mouse Genome Survey Microarray (GPL2995)	33 ตัวอย่าง -untreated = 3 -6 Hrs. LPS = 3 -6 Hrs. LPS & albiflorin (1, 10 and 100 ug/ml) = 9 -6 Hrs. LPS & paeoniflorin (1, 10 and 100 ug/ml) = 9 - 6 Hrs. LPS & paeonol (1, 10 and 100 ug/ml) = 9	GSE9632
GSE21320	TLR 4 Signaling Inhibitory Pathway Induced by Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate through 67-kDa Laminin Receptor	Hong <i>et al.</i> , 2010	ARIM-GX (GPL10321)	12 ตัวอย่าง-untreated = 3 6 Hrs. EGCE = 3 -6 Hrs. LPS = 3 -6 Hrs. EGCG & LPS = 3	LPS (50 ng/ml; Sigma Aldrich)

ตารางที่ 3-2 ข้อมูลจำนวนโพรบและจำนวนยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดข้อมูล	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)	แพลตฟอร์ม	จำนวนโพรบ (โพรบ)	จำนวนยีน (ยีน)	จำนวนยีนที่ถูก นำมาใช้ในการ ทดลอง (ยีน)
GSE4712	3	GPL1261	45,101	21,495	13,480
	6				
GSE21841	8				
GSE2002	18	GPL339	22,690	13,480	
GSE9632	6	GPL2995	33013	33013	33,013
GSE21320	6	GPL10321	211	211	211

## 2. การคัดเลือกยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบ

นำข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้มาคัดเลือกกลุ่มยีนบทบาทอย่างเด่นชัดต่อการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา ในที่นี้จะเลือก 3 วิธี ในการคัดเลือกยีน ได้แก่ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000) ซึ่งถูกบรรจุอยู่ภายในโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (Glaab, 2009) และจะทำการคัดเลือกเฉพาะยีนที่ถูกคัดเลือกโดย 2 วิธีการ จากทั้งหมด 3 วิธีการ เพื่อให้ได้กลุ่มยีนที่มีความสำคัญเชิงสถิติอย่างแท้จริง ก่อนที่จะนำมาตรวจสอบกับรายชื่อของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่ผ่านการสืบค้นด้วยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลแบบเท็กซ์ (text-mining) PolySearch (Cheng, 2008) เพื่อยืนยันผลเพิ่มเติมถึงความเกี่ยวข้อง และนำรายชื่อยีนที่ได้มาผ่านการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนโดยอาศัยฐานข้อมูลยีนออนโทโลยีภายใต้โปรแกรมออนไลน์ DAVID (Huang, 2009) เพื่อจะได้ตรวจสอบหน้าที่และการทำงานของยีนเหล่านั้นตามการแปลผลยีนออนโทโลยี 3 ลักษณะ คือ Biological Process (BP), Cell Component (CC), และ Molecular Function (MF) ที่จะทำให้ทราบได้ว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกในแต่ละช่วงเวลาเกี่ยวข้องกับการทำงานในการตอบสนองต่อการอักเสบอย่างไร และเกิดขึ้นที่บริเวณใดของเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นของการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลา และนำมาเป็นเกณฑ์การตัดสินใจคัดเลือกยีนที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไป

## 3. การรวบรวมและการเตรียมข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมาย

ข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบจะถูกรวบรวมข้อมูลโดยอาศัยการสืบค้นจากเอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Nilsson, 2006; Ravasi, 2007; และ Weintz 2010) และฐานข้อมูลสาธารณะ (Kanamori 2004, <http://genome.gsc.riken.jp/TFdb/>) สำหรับข้อมูลของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบก็รวบรวมโดยการสืบค้นจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Rutledge, 2012 และ Mages, 2008) และทำการรวบรวมข้อมูลของทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับยีนเป้าหมาย เพื่อนำมาเป็นแม่แบบสำหรับการสืบค้นเพื่อให้ได้เครือข่ายของทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยสามารถดาวน์โหลดข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับยีนเป้าหมายได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ Integrated Transcription Factor Platform, ITFP (Zheng, 2008; <http://itfp.biosino.org/itfp/>)



#### 4. การสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene regulatory network)

จากข้อมูลทรานสคริปชันแฟคเตอร์และยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ และข้อมูลการควบคุมยีนเป้าหมายของทรานสคริปชันแฟคเตอร์แต่ละชนิดจะถูกรวบรวมเพื่อนำมาสร้างเป็นเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน ร่วมกับข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีนตามช่วงเวลา โดยจะนำข้อมูลทั้งหมดมาเป็นข้อมูลเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์ภายใต้โปรแกรม Dynamic Regulatory Events Miner หรือ DREM (Schulz, 2012) ที่จะทำการคัดเลือกทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนซึ่งมีแบบแผนการแสดงออกในแบบเดียวกัน ก่อนที่จะนำผลจากการคัดเลือกทรานสคริปชันแฟคเตอร์และยีนเป้าหมายที่ได้มาแสดงผลเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกโดยอาศัยการแสดงผลภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Cline, 2007) เพื่อจัดเตรียมข้อมูลเครือข่ายสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

#### 5. การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วม (Co-expression network)

นำข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีนมาตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่คัดเลือกมาก่อนหน้านี้ โดยนำมาตรวจวัด Pearson Correlation Coefficient (PCC) ภายใต้โปรแกรม Cladist (Fukuchi, 2009) ที่จะทำให้ได้ผลของกลุ่มยีนที่มีแนวโน้มการแสดงออกหรือความสัมพันธ์ของแบบแผนการแสดงออกร่วมกัน ซึ่งกำหนดให้ค่า cut-off อยู่ที่ระดับ  $\pm 0.9$  ก็จะทำให้ได้กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกร่วมกันอย่างแท้จริง ก่อนที่จะนำข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างยีนเหล่านี้มาสร้างเป็นเครือข่ายการแสดงออกร่วมภายใต้การแสดงผลบนโปรแกรม Cytoscape (Cline, 2007) เพื่อตรวจสอบและเตรียมข้อมูลสำหรับการใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

#### 6. การบูรณาการเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบ

จากข้อมูลเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน และเครือข่ายการแสดงออกร่วม จะถูกนำมาบูรณาการกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network) เพื่อให้ได้เครือข่ายการตอบสนองการอักเสบ โดยอาศัยเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการจัดการเครือข่ายที่มีอยู่ในโปรแกรม Cytoscape (Saito, 2012, Cline, 2007) รวมถึงปลั๊กอิน jActiveModules (Ideker, 2002) ที่ใช้ในการคัดเลือกโมดูลหรือเครือข่ายย่อยที่มีบทบาทสำคัญที่อาศัยการวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลการแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงเวลา ก่อนทำการแปลผลของกลุ่มยีนเป้าหมายที่คัดเลือกได้ด้วย BiNGO (Maere, 2005) เพื่อตรวจสอบหน้าที่และการทำงานเชิงชีวภาพที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำไปใช้ในการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลาในเชิงชีวภาพ และเตรียมพร้อมสำหรับการคัดเลือกยีนเพื่อใช้ตรวจสอบและยืนยันผลระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนทางห้องปฏิบัติการต่อไป

### 3.2.2 การพัฒนาเครือข่ายที่ตอบสนองการอักเสบ

#### 1. การรวบรวมข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้อง

จะทำการรวบรวมข้อมูลระดับโปรตีนจากผลการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของทีมิวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องจากฐานข้อมูลสาธารณะ รวมถึงข้อมูลการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่มีการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยในการศึกษาผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบขลุ่ย (Srisook, 2012; และ Buapool, 2013) เพื่อเพิ่มเติมข้อมูลและความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองการอักเสบที่เกิดขึ้นภายใต้กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้อง

## 2. การพัฒนาและปรับปรุงเครือข่ายกับข้อมูลระดับโปรตีนและข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารสกัด

จากข้อมูลระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีต่อ LPS และข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารสกัดข้างต้น จะถูกนำมาพัฒนาและปรับปรุงเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบที่ได้จากการสร้างด้วยข้อมูลการแสดงออกของยีนและข้อมูลทรานสคริปชันแพคเตอร์และยีนเป้าหมาย เพื่อให้เครือข่ายดังกล่าวมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้นสำหรับการนำไปใช้ในการทดสอบและอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานการอักเสบที่เกิดขึ้น เพื่อให้การบูรณาการข้อมูลซึ่งเป็นข้อมูลการแสดงออกคนละระดับกัน จึงควรจะต้องใช้ความรู้พื้นฐานที่มีอยู่มาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงเพื่อช่วยในการบูรณาการ เช่น การใช้ข้อมูลของวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) ที่สามารถหาได้จากฐานข้อมูลสาธารณะเช่น KEGG (Kanehisa, 2010; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) หรือการนำเอาการหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างข้อมูลมาใช้ในการสร้างเครือข่ายระหว่างยีน โปรตีน หรือข้อมูลการควบคุมการแสดงออกทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนมาช่วยในการพิจารณาโดยอาศัยโปรแกรม Cytoscape (Cline, 2007) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการแสดงผลเครือข่ายมาช่วยในการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องของเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบที่ได้ (Merico, 2009) ซึ่งเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบที่สร้างขึ้นนี้ก็จะเป็ต้นแบบเพื่อนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบกลไกที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ต้องการตรวจสอบชนิดอื่นๆ ในอนาคตต่อไปได้ เพื่อตรวจสอบว่ามียีนหรือโปรตีนใดบ้างที่ควรจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบที่เกิดขึ้นได้บ้าง ทำให้สามารถทำความเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น

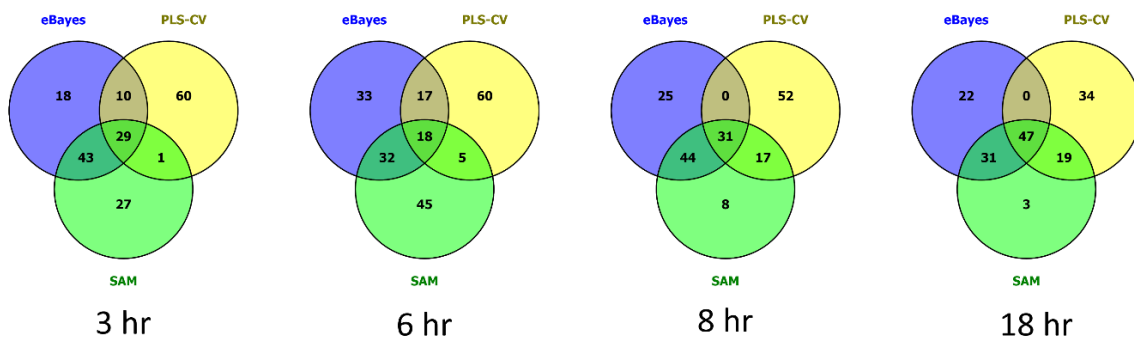
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม

จากข้อมูลการแสดงออกของยีนในชุดไมโครอาร์เรย์ที่ได้ นำมาคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีบทบาทอย่างเด่นชัดต่อการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา ในที่นี้จะทำการคัดเลือกด้วยสามวิธีการ ได้แก่ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000) ซึ่งทั้งสามวิธีการนี้ถูกบรรจุอยู่ในโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (Glaab, 2009) และจะทำการคัดเลือกเฉพาะยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีการ มาใช้เป็นกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบ เพื่อให้ได้กลุ่มยีนที่มีความสำคัญอย่างแท้จริง จากภาพที่ 4-1 แสดงเวนนไดอะแกรมของการคัดเลือกกลุ่มยีนจากทั้งสามวิธีการ ในแต่ละช่วงเวลาของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ ซึ่งจะช่วยให้ได้กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง เป็นจำนวน 83 ยีน ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง เป็นจำนวน 72 ยีน ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง เป็นจำนวน 92 ยีน และที่ช่วงเวลา 18 ชั่วโมง เป็นจำนวน 97 ยีน โดยรายชื่อยีนทั้งหมด แสดงในตารางที่ 4-1

จากรายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในแต่ละช่วงเวลาก่อนหน้านี้ จะถูกนำมาผ่านการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนโดยอาศัยฐานข้อมูลยีนออนโทโลยีภายใต้โปรแกรมออนไลน์ DAVID (Huang, 2009) เพื่อจะได้ตรวจสอบหน้าที่และการทำงานของยีนเหล่านั้นตามการแปลผลยีนออนโทโลยี 3 ลักษณะ คือ Biological Process (BP), Cell Component (CC), และ Molecular Function (MF) ที่จะทำให้ทราบได้ว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกในแต่ละช่วงเวลาเกี่ยวข้องกับการทำงานในการตอบสนองต่อการอักเสบอย่างไร และเกิดขึ้นที่บริเวณใดของเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นของการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลา และนำมาเป็นเกณฑ์การตัดสินใจคัดเลือกยีนที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบแสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการอธิบายและแปลผลต่อไป



ภาพที่ 4-1 จำนวนยีนที่ผ่านการคัดเลือกยีนด้วยวิธีการ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000) ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-1 ตารางแสดงรายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีการ จากทั้งหมดสามวิธีการ คือ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000) ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง

3 hr			6 hr			8 hr			18 hr		
Mocos	Gap43	Lao1	Rnf208	Nebi	Sfxn4	C78513	Hs6st1	Cldn11	Nrm	Sfn1	Cp
Dcblid1	S100b	Yes1	Larp6	Agt	Tmem150b	Il1b	3930401819Rik	Fas	Cenpa	D17H6S56E-5	Ccnb2
Aoah	Cyp24a1	Cntn1	1700011H14Rik	Vmn1r44	Tagln	Sl3gal1	Arhgef3	Hoxb13	Bst2	Gbp2	Irf7
1700011H14Rik	Rtkn2	Hes2	Aspn	Moxd1	Rel2	Cd83	Nfic	App2	Traf1	Pdprn	Ube2c
Car14	Zfp759	Saa4	2310057118Rik	Steap3	Serpinb5	Ifnb1	Zfp36l2	Vegf	Haus4	Blvrb	Ube2t
Scg2	Fcamr	Tulp2	Klra1	Armcx4	Dqx1	Socs3	Lyl1	Rcan3	Ptpn23	Serpinb2	Cenpf
Rnf208	Vmn1r46	Hoxc4	Dcblid1	Cntn1	Heph	Gadd45b	Mtss1	Ripk2	Tspo	Cdc25c	Lgals9
Kif9	Zfp825	Hes5	Defb1	2310030G06Rik	Twist1	Asic5	Aldh1a2	LOC624295	C78513	Ptgs2	Ptgs5
Enthd2	Rdh16	AY074887	Lama1	Efnb3	Itpka	Ccl5	Sipa1	Gp49a	Kif11	Procr	Gbp2b
Slc22a7	Dqx1	Plazr1	Klra16	Bhlhe22	Bnpl	Lif	Haus4	Il1rn	Dlgap5	Hdc	Magee1
Gabrq	Naa11	Crygn	Tspan1	Mansc1	Fam65b	BC057675	Tsc22d1	Zbtb8a	Rgl1	Casp4	Pdc4d
Cald1	Dpf3	Ijd	AA517023	Rapsn	Tsga8	Tnc	Cflar	Saa3	Ncapd2	Ccnb1	Gata3
Mcpt2	Tmed6	Fgf20	Ropn1l	Gm6277	Cldn7	Sdc4	H1f0	S8sia4	C920025E04Rik	Il1b	Cd300ff
Auts2	Hoxb2	Nat3	Exd2	Serpina1a	Serpina1a	Cer2	1200003110Rik	Tnfrsf1b	Cebpb	1200015M12Rik	Ccl6
Ppp1r42	Atp1b4	Aanat	Pdyn	Magea6	Magea6	Lrrc8c	Pde4b	Il6	Birc5	Mki67	Saa3
Trpc4	Vmn1r11	Myf5	Tal2	Ly75	Ly75	Mum1	Mum1	Hnf1b	Pik3	Cdc3	Nusap1
Cubn	Sntg2	Bicd1	Adra2b	Cyp2c39	Cyp2c39	Tnfrfp3	C80360	Tslp	Glrx	Dgkg	Lcn2
Dsc3	Cdh1	Gbp8	Tbx4	Slco1c1	Slco1c1	Mtmr7	Cxcl2	Edn1	Mad2l1	Hist2h2aa2	Cd274
Rhod	Ap1m2	Gm20362	Cchr2	Krtap16-3	Krtap16-3	Il15ra	Pim1	Gbp2b	Cena2	Iggap3	Ms4a4c
Itpka	Rnf17	Rgs8	Havcr1	Atp1b4	Atp1b4	Col5a3	Impa2	Lix1	Pbk	Cenpn	Maff
Scml4	Ccr8	Vangl2	Ttc39c	Vipr2	Vipr2	Csf2	Gbp7	D7Ert187e	Rad51ap1	Anln	Cep55
Sult1b1	Adipoq	Ccdc64	Gpr131b	Il7	Il7	Il1a1	Tnfrsf22	Ngef	Zc3h12a	Zbp1	Tnfrsf1b
Moxd1	Kcnj14	Efh1	Gm11559	Spint2	Gas1	Gm8615	Bmyc	Ceacam14	Pik1	Pole	Car13
Eppk1	Prl8a9	Agr2	Pdzd9	Spink4	C530030P08Rik	Il15	F8a	Fpr1	3930401819Rik	Kif2c	Clec4n
Fstf3	Hspa1a	Gsx1	Ppp1r42	Gpc6	Armcx4	Tnfrfp2	Dhcr7	Dusp2	Slc7a2	Ect2	Vegfc
Ano1	Ace2	Sost	Gipcc3	B930003M22Rik	Cntn1	Cd274	Ung	Nlrp3	Melk	Sod2	1200003110Rik
Cend1	Dnase2b	Myh11	Uchl4	S100b	2310030G06Rik	Rps6ka2	Phlda1	Chaf1b	Rps6ka2	Il13ra2	Depd1a
Avpr2	Srd5a2		Ephb3	Slc38a4	Efnb3	Il1a	Tmem206	Fbxo21	Gint2	Ccl2	Wdr62
			Gm6277	Grtp1	Bhlhe22	Olfr1508	Frm4d4b	Rasa3	Plagl2	Hmhr	Il1rn
			Spint2	Gas1	Mansc1	Ccl22	Timp1	Maf	Kif20a	Oasl2	Cfb
			Spink4	C530030P08Rik	Rapsn	Marcks	Wdhd1		Brcal	Nuf2	Nos2
			Gpc6	Nebi	Slc38a4				Erc6l	Slc15a3	Ms4a6d
			B930003M22Rik	Agt	Grtp1				Socs3		
			S100b	Vmn1r44	Moxd1						
			Steap3								

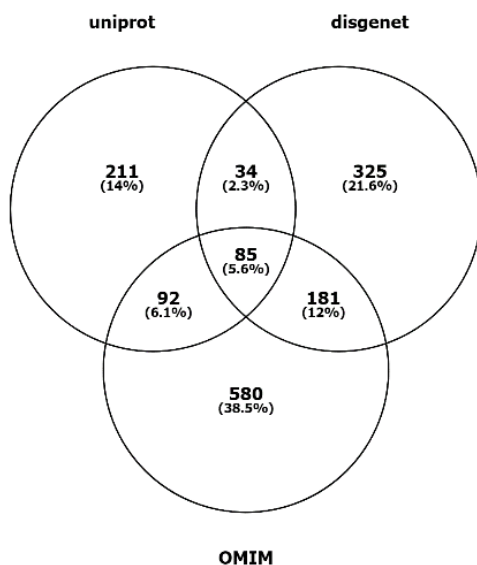
ตารางที่ 4-2 ตารางแสดงการแปลผลทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกในแต่ละช่วงเวลา โดยการใช้โปรแกรมออนไลน์ DAVID (Huang, 2009) ตามลักษณะของยีนออนโทโลยี 3 ลักษณะ คือ (A) Biological Process (B) Cell Component และ (C) Molecular Function

A. Biological Process			
3 hr	6 hr	8 hr	18 hr
neuron projection development N-terminal protein amino acid acetylation astrocyte differentiation steroid metabolic process ossification hypothalamus development establishment of epithelial cell polarity multicellular organism development positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation nervous system development digestive tract morphogenesis anterior/posterior pattern specification positive regulation of cell-cell adhesion inner ear receptor stereocilium organization	positive regulation of blood pressure cell surface receptor signaling pathway iron ion homeostasis axon guidance palate development central nervous system projection neuron axonogenesis positive regulation of organ growth extracellular matrix organization positive regulation of cell motility morphogenesis of an epithelium odontogenesis regulation of long-term neuronal synaptic plasticity negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand nervous system development	immune response inflammatory response cellular response to lipopolysaccharide positive regulation of gene expression positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade positive regulation of T cell proliferation cytokine-mediated signaling pathway positive regulation of prostaglandin secretion wound healing cellular response to tumor necrosis factor positive regulation of stress-activated MAPK cascade positive regulation of JNK cascade positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity chemokine-mediated signaling pathway JAK-STAT cascade	immune system process mitotic nuclear division cellular response to interleukin-1 innate immune response cytokinesis inflammatory response negative regulation of apoptotic process negative regulation of interferon-gamma production negative regulation of T cell proliferation fever generation hepatocyte proliferation cytokine-mediated signaling pathway positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling nitric oxide biosynthetic process
B. Cell Component			
3h	6h	8h	18h
extracellular region cell periphery basolateral plasma membrane cell-cell junction	plasma membrane integral component of plasma membrane extracellular region membrane anchored component of membrane proteinaceous extracellular matrix integral component of membrane extracellular space	extracellular space cytoplasm CD95 death-inducing signaling complex symbiont-containing vacuole membrane external side of plasma membrane basal part of cell spindle membrane raft	chromosome, centromeric region kinetochore cytoplasm spindle cytoskeleton spindle microtubule centriole neuronal cell body
C. Molecular Function			
3h	6h	8h	18h
protein dimerization activity arylamine N-acetyltransferase activity dynactin binding receptor activity glycoprotein binding dynein binding receptor binding chemoattractant activity	serine-type endopeptidase inhibitor activity carbohydrate binding RNA polymerase II transcription factor activity sequence-specific DNA binding	cytokine activity interleukin-1 receptor binding protease binding chemokine activity core promoter proximal region DNA binding receptor binding tumor necrosis factor-activated receptor activity protein binding	microtubule binding ATP binding RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding ubiquitin protein ligase binding microtubule motor activity interleukin-1 receptor binding cytokine activity

ข้อมูลทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (TF) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบจะถูกรวบรวมข้อมูลโดยอาศัยการสืบค้นจากเอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Nilsson, 2006; Ravasi, 2007; Medzhitov, 2009; และ Weintz 2010) ก่อนทำการตรวจสอบข้อมูลเพิ่มเติมกับฐานข้อมูลทางชีวภาพ เช่น Genecard และ Uniprot ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นของ TF ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 46 ยีน ดังแสดงรายชื่อ ในตารางที่ 4-3 และการใช้ข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ตรวจสอบได้จากฐานข้อมูลสาธารณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้แก่ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero *et al.*, 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler *et al.*, 2004) ทำให้ได้จำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจำนวนทั้งสิ้น 392 ยีน โดยแสดงในภาพที่ 4-2 ซึ่งแสดงเวเน่ไดอะแกรมของยีนที่ถูกตรวจสอบพบได้จากฐานข้อมูลทั้งสามข้างต้น โดยยีนทั้ง 392 ยีน นี้จะถูกนำมาตรวจสอบอีกครั้ง เพื่อพิจารณาว่า ยีนใดจะมีบทบาทเป็น TF และ ยีนใดจะมีบทบาทเป็น TG ก่อนทำการจัดจำแนกกลุ่มยีนการอักเสบทั้งหมดนี้ จากข้อมูลของ TF และ TG ซึ่งจะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์เครือข่ายควบคุมการตอบสนองการอักเสบต่อไป

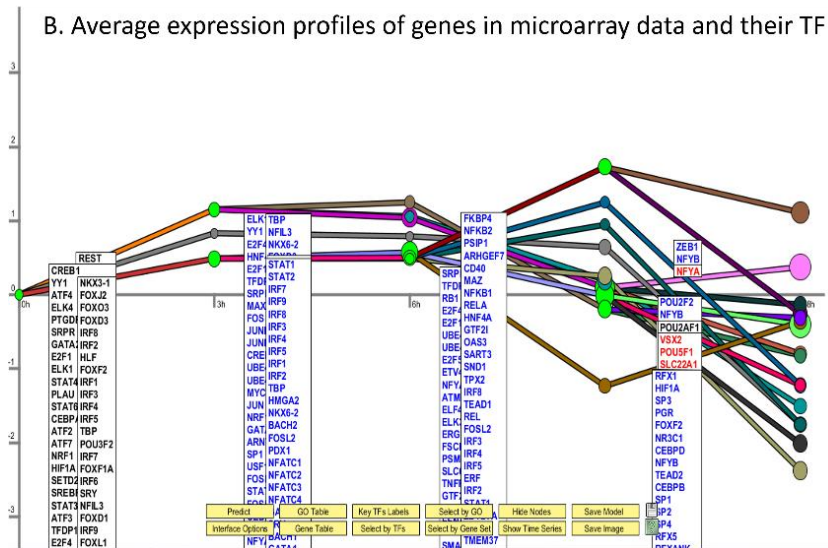
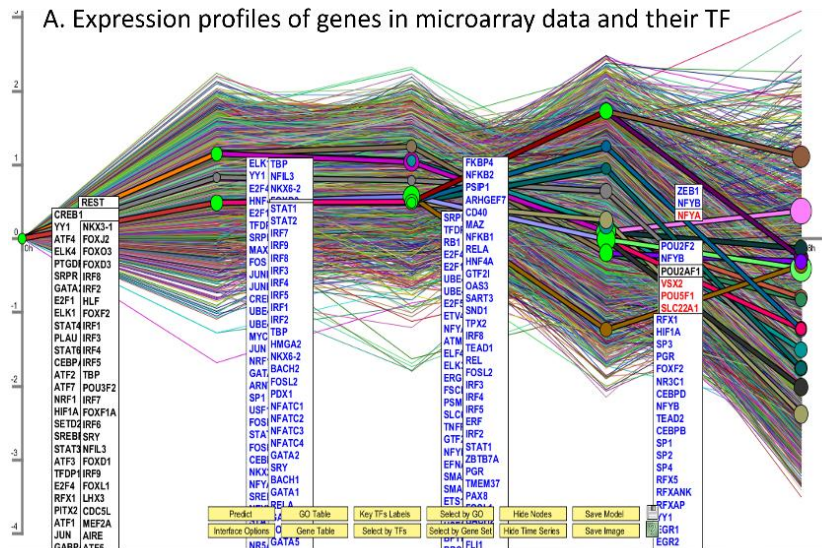
ตารางที่ 4-3 ตารางแสดงรายชื่อและแหล่งอ้างอิงข้อมูลทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (TF) ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน

TF	แหล่งอ้างอิง	บทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
NRF-2	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/NRF2">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/NRF2</a>	Transcriptional network dynamics in macrophage activation _Genomics2006_NilssonR	
E74A	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/?query=E74A&amp;sort=score">http://www.uniprot.org/uniprot/?query=E74A&amp;sort=score</a>		
Adf-1	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/P05552">http://www.uniprot.org/uniprot/P05552</a>		
TGA1b	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/?query=TGA1b&amp;sort=score">http://www.uniprot.org/uniprot/?query=TGA1b&amp;sort=score</a>		
CBF1	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/?query=CBF1&amp;sort=score">http://www.uniprot.org/uniprot/?query=CBF1&amp;sort=score</a>		
ATF	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20</a>		
NF-Y	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/NF-Y/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/NF-Y/0/20</a>		
GABP	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/GABP/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/GABP/0/20</a>		
StuAp	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9312029">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9312029</a>		
c-Ets-1 68	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Ets-1/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Ets-1/0/20</a>		
ATF-4	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20</a>		
CRE-BP1	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/?query=CRE-BP1&amp;sort=score">http://www.uniprot.org/uniprot/?query=CRE-BP1&amp;sort=score</a>		
Arnt	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Arnt/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Arnt/0/20</a>		
Nrf-1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nrf-1/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nrf-1/0/20</a>		
CREB	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/CREB/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/CREB/0/20</a>		
IRF	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20</a>		
Rb/E2F-1/DP-1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Rb">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Rb</a>		Transcriptional control of the inflammatory response _NatureRevImmuno2009_MedzhitovR
NF-muE1	<a href="http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/db_tf/NF-MUE1-index.html">http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/db_tf/NF-MUE1-index.html</a>		
c-Ets-1	-		
ATF3	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20</a>		
C/EBPδ	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/?query=C%2FEBP%CE%B4&amp;sort=score">http://www.uniprot.org/uniprot/?query=C%2FEBP%CE%B4&amp;sort=score</a>		
RUNX1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/RUNX1">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/RUNX1</a>		
IRF8	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20</a>		
Irf3	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20</a>		
Ilf3	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Ilf3/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Ilf3/0/20</a>		
Nfatc1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfatc1/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfatc1/0/20</a>		
Nfatc3	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfatc3/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfatc3/0/20</a>		
Nfat5	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfat5/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfat5/0/20</a>		
Nfkb1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfkb1/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfkb1/0/20</a>		
Nfkb2	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfkb2/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfkb2/0/20</a>		
Nfil3	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfil3/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Nfil3/0/20</a>		
Cebpz	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Cebpz/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Cebpz/0/20</a>	The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophage _MolSysBiol2010_WeintzG	
Cebpd	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Cebpd/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Cebpd/0/20</a>		
Atf7	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20</a>		
Atf2	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/ATF/0/20</a>		
Hsf1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Hsf1/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Hsf1/0/20</a>		
Mef2d	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Mef2d/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Mef2d/0/20</a>		
Mef2c	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Mef2c/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Mef2c/0/20</a>		
Mef2a	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Mef2a/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Mef2a/0/20</a>		
Pou2f	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Pou2f/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Pou2f/0/20</a>		
Pbx2	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Pbx2/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Pbx2/0/20</a>		
RUNX2	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/RUNX2/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/RUNX2/0/20</a>		Systems biology of transcription control in macrophages _BioEssays2007_RavasiT
Ets2	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Ets2/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/Ets2/0/20</a>		
Irf7	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20</a>		
Icsbp	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/?query=Icsbp&amp;sort=score">http://www.uniprot.org/uniprot/?query=Icsbp&amp;sort=score</a>		
Irf1	<a href="http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20">http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/IRF/0/20</a>		



ภาพที่ 4-2 เวนน์ไดอะแกรมแสดงจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งตรวจสอบได้จาก 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ Uniprot, Disgenet, และ OMIM โดยยีนที่ตรวจสอบพบจาก 2 ใน 3 ฐานข้อมูล จะนำมาใช้เป็นยีนการอักเสบเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

จากข้อมูลการแสดงผลของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ตามช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง จะถูกนำมาจัดเตรียมเพื่อนำมาเป็นข้อมูลเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์ภายใต้โปรแกรม Dynamic Regulatory Events Miner หรือ DREM (Schulz, 2012) ที่จะทำการคัดเลือกทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนซึ่งมีแบบแผนการแสดงออกในแบบเดียวกัน ก่อนที่จะนำผลจากการคัดเลือกทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมายที่ได้มาแสดงผลเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกโดยอาศัยการแสดงผลภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Cline, 2007) เพื่อจัดเตรียมข้อมูลเครือข่ายสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป จากภาพที่ 4-3 ซึ่งแสดงแบบแผนการแสดงออกของยีนที่เกิดจากการจัดกลุ่มการแสดงออกของยีนในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นผลจากโปรแกรม DREM ที่แสดงให้เห็นถึงแบบแผนการแสดงออกของยีนทั้งหมดจากชุดข้อมูล (4-3A) และ แบบแผนของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มแบบแผนการแสดงออก (4-3B) ทั้งสองภาพแสดงพร้อมรายชื่อทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (TF) ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม



ภาพที่ 4-3 ภาพแสดงแบบแผนการแสดงออกของยีนที่เกิดจากการจัดกลุ่มการแสดงออกของยีนในชุดข้อมูล ไมโครอาร์เรย์ ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง โดยโปรแกรม DREM (A) แสดงแบบแผนการแสดงออกของยีนทั้งหมดจากชุดข้อมูล และ (B) แสดงแบบแผนของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มแบบแผน พร้อมแสดงรายชื่อทรานส์คริปชันแฟกเตอร์ (TF) ที่เกี่ยวข้อง

จากการวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกด้วยโปรแกรม DREM จะทำให้ได้ตารางเมทริกซ์ ที่แสดงถึงการควบคุมการแสดงออกโดยทรานส์คริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor, TF) ที่มีต่อยีนเป้าหมาย (target gene, TG) จะต้องถูกนำมาแปลงข้อมูลเพื่อให้ได้เป็นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่แสดงถึงคู่ของยีน/โปรตีน ที่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในแต่ละแถว (ภาพที่ 4-4A) ก่อนจะนำข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่ได้นั้นไปแสดงผลเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการตอบสนองการอักเสบ ด้วยโปรแกรม Cytoscape (ภาพที่ 4-4B)

A

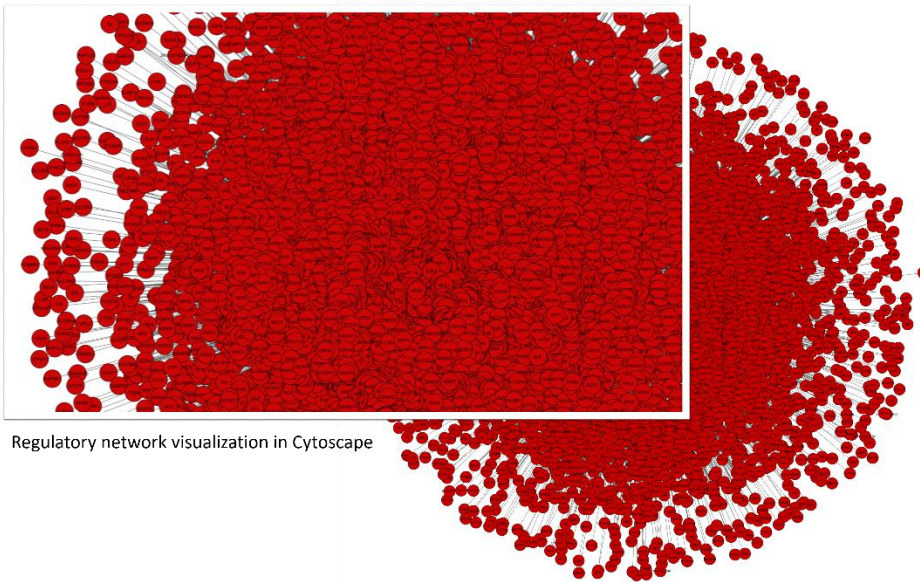
Gene	Spot	0h	3h	6h	8h	18h	CD40	NFKB1	NFKB2	AR	PSP1	ZFP238	ARHGGEF	FKBP4
March2	ID_1	0	0.91	1.02	0.93	-1.57	0	0	0	0	0	0	0	0
March5	ID_2	0	0.47	0.53	1.51	-1.19	0	0	0	0	0	0	0	0
March6	ID_3	0	0.71	0.57	0.71	-1.07	0	0	0	0	0	0	0	0
March7	ID_4	0	0.17	0.27	1.36	-1.2	0	0	0	0	0	0	0	0
March9	ID_5	0	0.22	1.11	-0.52	-0.43	1	1	1	1	1	0	1	1
Sep15	ID_6	0	0.22	0.22	1.19	-1.64	0	0	0	0	0	0	0	0
061005C13RIK	ID_7	0	1.57	1.83	-0.38	-0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
061007P14RIK	ID_8	0	0.79	0.66	0.71	-1.99	0	0	0	0	0	0	0	0
061009B22RIK	ID_9	0	0.54	0.11	0.73	-1.96	0	0	0	1	0	0	0	0
061009O20RIK	ID_10	0	1.13	1.1	0.13	-2.02	0	0	0	1	0	0	0	0
061010I06RIK	ID_11	0	0.35	0.29	0.87	-2.08	0	0	0	0	0	0	0	0
061020I0C1RIK	ID_12	0	0.52	0.59	0.91	-1.77	1	1	1	1	1	0	1	1
061021L2G03RIK	ID_13	0	0.93	0.73	0.16	-1.25	0	0	0	0	0	0	0	0
0610037L13RIK	ID_15	0	1.01	0.91	0.61	-1.82	0	0	0	0	0	0	0	0
0610040I01RIK	ID_16	0	0.53	0.62	0.17	-1.41	0	0	0	0	0	1	0	0
111000L03RIK	ID_17	0	0.78	0.5	0.64	-2.24	0	0	0	0	0	0	0	0
111000I0309RIK	ID_18	0	0.64	0.48	0.64	-2.33	0	0	0	0	0	0	0	0
111000M10RIK	ID_19	0	0.66	0.65	1.22	-1.46	0	0	0	0	0	0	0	0
1110007C09RIK	ID_21	0	1.04	1	0.49	-0.73	0	0	0	1	0	0	0	0
1110008F13RIK	ID_22	0	0.79	0.74	0.97	-1.55	0	0	0	0	0	0	0	0
1110008P14RIK	ID_23	0	1.44	1.29	0.29	-0.06	0	0	0	0	0	0	0	0
111001L11RIK	ID_24	0	0.76	0.67	0.84	-1.47	0	0	0	0	0	0	0	0
111002S11RIK	ID_25	0	1.21	1.09	-0.09	-0.17	0	0	0	1	0	0	0	0
111003ZAG03RIK	ID_26	0	1	1.16	0.02	-1.38	0	0	0	0	0	0	0	0
1110037F02RIK	ID_28	0	0.6	0.41	1.17	-1.76	0	0	0	0	0	0	0	0
1110038F14RIK	ID_29	0	0.93	0.72	0.84	-1.72	0	0	0	0	0	0	0	0
111005L020RIK	ID_30	0	1.42	1.31	0.21	-1.39	0	0	0	0	0	0	0	0
1110057G04RIK	ID_32	0	1.18	1.16	0.27	-1.65	0	0	0	0	0	0	0	0
111005R19RIK	ID_33	0	0.67	0.4	0.77	-1.77	0	0	0	0	0	0	0	0
1110059E24RIK	ID_34	0	0.69	0.42	0.92	-1.27	0	0	0	0	0	0	0	0
1110059G10RIK	ID_35	0	0.59	0.64	0.81	-1.69	0	0	0	0	0	0	0	0
1190002N15RIK	ID_36	0	0.05	-0.01	0.83	-1.97	1	1	0	0	0	0	1	0
1200003I10RIK	ID_38	0	0.77	0.97	1.85	-1.09	0	0	0	0	0	0	0	0
1200014I11RIK	ID_39	0	1.08	1	0.6	-1.69	0	0	0	0	0	0	0	0
1200015M12RIK	ID_40	0	0.65	0.84	1.96	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0
1300017J02RIK	ID_41	0	1.01	0.7	-0.61	-0.73	0	0	0	0	0	0	0	0
1500002F19RIK	ID_42	0	0.37	0.68	0.47	-1.48	0	0	0	0	0	0	0	0
150000A13RIK	ID_43	0	1.68	1.64	0.46	-0.85	0	0	0	0	0	0	0	0
1500015O10RIK	ID_44	0	1.19	0.87	0.14	-1.28	0	0	0	0	0	0	0	0
1600012H06RIK	ID_45	0	0.53	0.31	1.5	-0.98	0	0	0	0	0	0	0	0

Output from DREM

TF	TG
CD40	March9
CD40	0610010K14RIK
CD40	1190007N15RIK
CD40	2210018M11RIK
CD40	2310011J03RIK
CD40	2410013M20RIK
CD40	2510009F07RIK
CD40	2610002I02RIK
CD40	2610015P09RIK
CD40	2700062C07RIK
CD40	2810004N23RIK
CD40	3110009E18RIK
CD40	4632428N05RIK
CD40	4930427A07RIK
CD40	AACS
CD40	AAMP
CD40	ABAT
CD40	ABCA3
CD40	ABCC3
CD40	ABCG1
CD40	ABHD3
CD40	ABHD4
CD40	ABR
CD40	ACAD11
CD40	ACHE
CD40	ACOT7
CD40	ACOX2
CD40	ACSS1
CD40	ACSS2
CD40	ACTB
CD40	ACTG1
CD40	ACTN1
CD40	ACVR2B
CD40	ADA
CD40	ADAM15
CD40	ADA3
CD40	ADC4
CD40	ADCY4
CD40	ADL1
CD40	ADRA2B

Input for Cytoscape

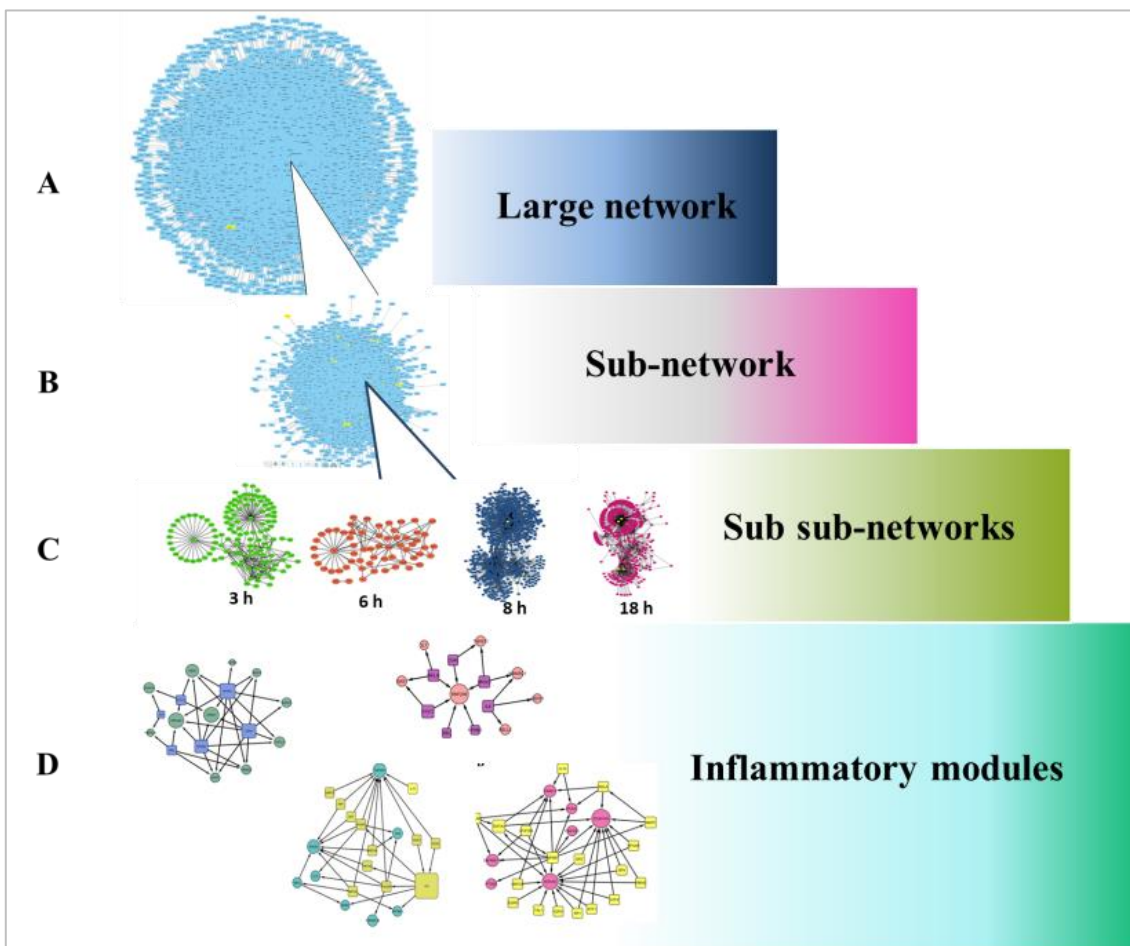
B



ภาพที่ 4-4 ภาพแสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในช่วงเวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม DREM ก่อนที่จะทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถแสดงผลเครือข่ายได้ภายในโปรแกรม Cytoscape (A) และ (B) ตัวอย่างการแสดงผลในโปรแกรม Cytoscape เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

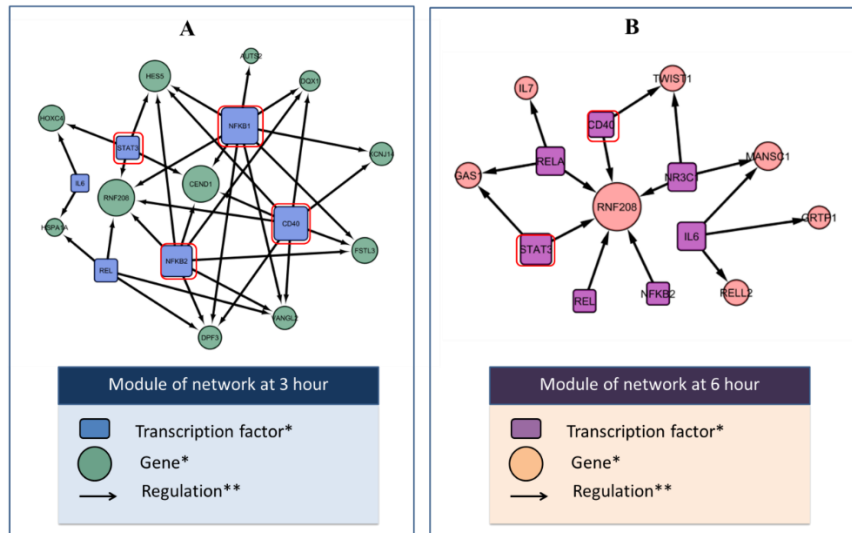


จากผลที่ได้จะทำให้ได้เครือข่ายที่ประกอบไปด้วยจำนวนยีนทั้งหมด 10,364 ยีน และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 325,358 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-5A) เครือข่ายย่อย (sub-networks) ที่ถูกคัดเลือกด้วยยีนของ ทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory TF) จำนวน 311 ยีน ทำให้ได้เครือข่ายย่อยที่มีขนาด 7,308 ยีน และ 32,986 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-5B) เครือข่ายย่อยของเครือข่ายย่อย (sub-sub-networks) ที่ถูกคัดเลือกด้วยยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ (inflammatory responsive genes) ในแต่ละช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง โดยที่ 3 ชั่วโมงได้เครือข่ายที่มีขนาด 125 ยีน 192 ปฏิสัมพันธ์ ที่ 6 ชั่วโมง ได้เครือข่ายขนาด 62 ยีน 91 ปฏิสัมพันธ์ ที่ 8 ชั่วโมง ได้เครือข่ายขนาด 948 ยีน 1,449 ปฏิสัมพันธ์ และ 417 ยีน 888 ปฏิสัมพันธ์ แสดงดังภาพที่ 4-5C และโมดูลการอักเสบ (inflammatory modules) ซึ่งถูกคัดเลือกด้วย JActiveModules โดยการไ้ระดับการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง และข้อมูลทางชีวภาพ (ภาพที่ 4-5D)

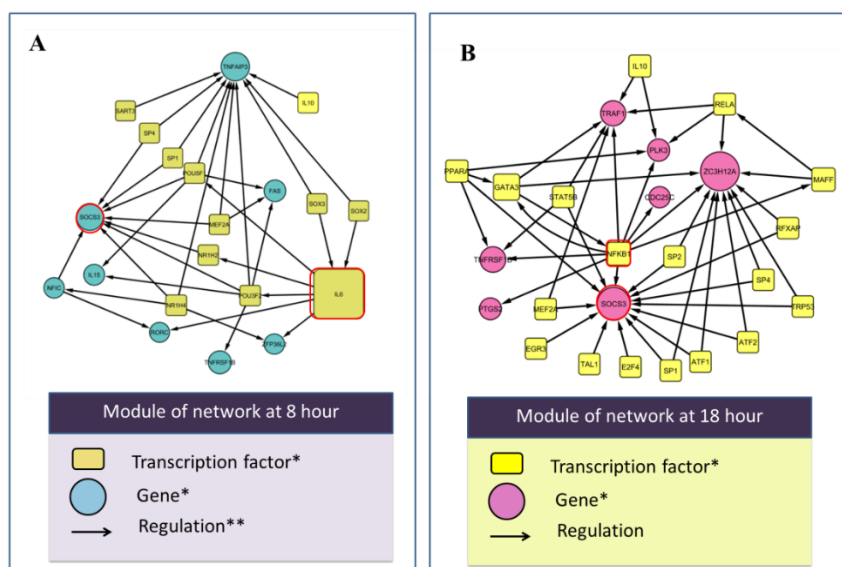


ภาพที่ 4-5 (A) เครือข่ายขนาดใหญ่จาก DREM, (B) เครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกด้วยยีนของ ทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, (C) เครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกด้วยยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา (D) โมดูลการอักเสบที่ถูกคัดเลือกด้วย JActiveModules และข้อมูลทางชีวภาพ

ในช่วงเวลา 8 และ 18 ชั่วโมง จำนวนของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ และปฏิสัมพันธ์ที่สูง อันอาจจะเป็นเนื่องจากเป็นช่วงเวลาพิเศษที่มีการสะสมของยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบเพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเหล่านี้ถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกด้วยสัญญาณระดับโมเลกุลทั้งจากปัจจัยภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (internal and external cellular factors) เพื่อเป็นการตอบสนองในเบื้องต้นสำหรับการลดอันตรายอันอาจเกิดจากสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ได้ (Sherwood, 2004; Sorci and Faivre, 2009)



ภาพที่ 4-6 โมดูล A และ โมดูล B ของเครือข่ายย่อยที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-5D) ตามลำดับโหนดสีเหลี่ยมคือทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ โหนดวงกลมคือยีนเป้าหมาย และลูกศรแสดงการทิศทางการควบคุม จากภาพ \*โหนด (node) คือ ยีน (gene) และ \*\*เอ็ดจ์ (edge) คือ ปฏิสัมพันธ์



ภาพที่ 4-7 โมดูล A และ โมดูล B ของเครือข่ายย่อยที่เวลา 8 และ 18 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-5D) ตามลำดับโหนดสีเหลี่ยมคือทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ โหนดวงกลมคือยีนเป้าหมาย และลูกศรแสดงการทิศทางการควบคุม จากภาพ \*โหนด (node) คือ ยีน (gene) และ \*\*เอ็ดจ์ (edge) คือ ปฏิสัมพันธ์

## 4.2 การพัฒนาเครือข่ายที่ตอบสนองการอักเสบ

เนื่องด้วยเกิดข้อจำกัดเรื่องของข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้อง เพราะจำนวนข้อมูลที่ได้มีข้อมูลของยีนหรือโปรตีนที่ศึกษาน้อยและไม่ตรงกับกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกได้ข้างต้นจึงได้ทำการตรวจสอบข้อมูลอื่นเพื่อนำมาพัฒนาการใช้ประโยชน์ของเครือข่ายดังต่อไปนี้

### 4.2.1 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงของยีน (Gene regulatory network, GRN)

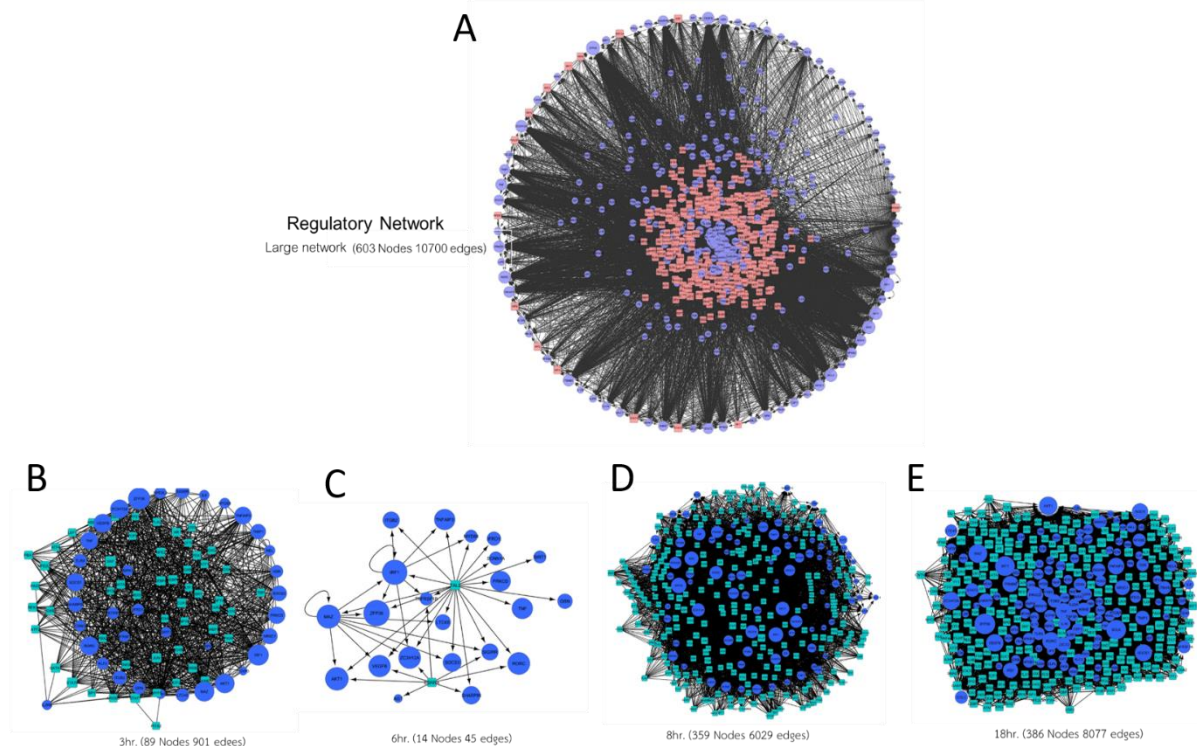
ตารางที่ 4-4 แสดงผลจากการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกการอักเสบโดยการนำการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไนด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 มาทำการคัดกรองด้วยกลุ่มทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์การอักเสบทั้งหมด 310 ตัว ที่ได้จากฐานข้อมูล OMIM (McKusick, 2007) และ GeneCard (Safran et al., 2010) มาสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยใช้โปรแกรม DREM 2.0 และแสดงผลผ่านโปรแกรม Cytoscape ทำให้ได้เครือข่ายที่มีขนาด 603 โหนด 10,700 ปฏิสัมพันธ์ แสดงดังภาพที่ 4-8A เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่ได้นั้นจะถูกนำมาค้นหาเครือข่ายย่อยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบอย่างเด่นชัดในแต่ละช่วงเวลา (differentially expression) ซึ่งได้จากการคัดเลือกยีนที่ (feature selection) เพื่อนำมาเป็นตัวแทนเครือข่ายย่อยของแต่ละช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-8B ถึง 4-8E ตามลำดับ

เมื่อการค้นหาเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะของการทดลองในส่วนของแต่ละช่วงเวลา เครือข่ายย่อยที่ได้ยังคงมีขนาดใหญ่ยากต่อการวิเคราะห์จึงมีการนำโปรแกรม JactiveModule มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อค้นหาโมดูลย่อยที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญภายใต้การตอบสนองการอักเสบภายใต้ช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-9 A ถึง D ตามลำดับ

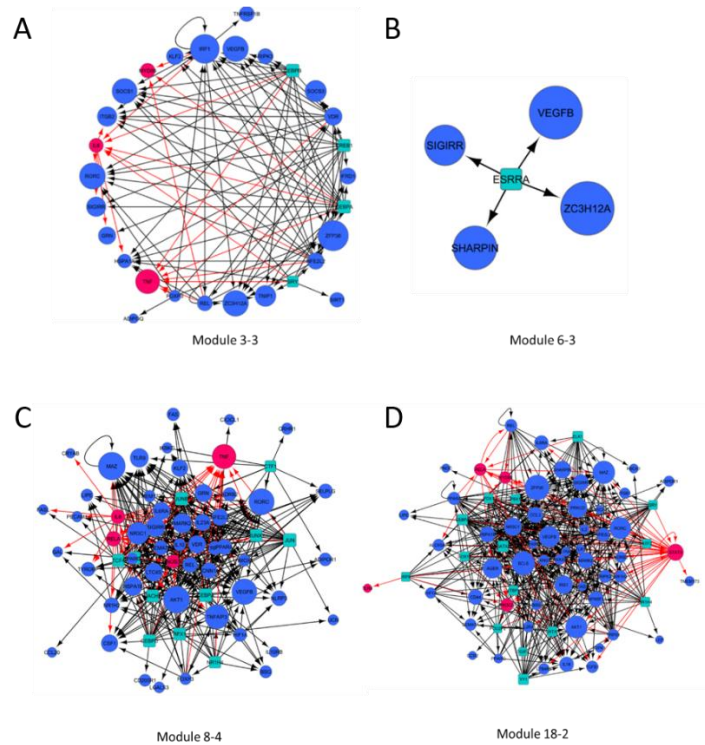
เมื่อเราได้เครือข่ายต้นแบบสำหรับการอธิบายการตอบสนองของยีนการอักเสบแล้วนั้นจึงนำมาทำการประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์ ในเครือข่ายการแสดงออกการอักเสบนั้นนั้นจะเห็นว่าสีนั้นแตกต่างกันมันบ่งบอกถึงการแสดงออกการอักเสบเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS และมีการลดการแสดงออกเมื่อมีสารออกฤทธิ์มายับยั้งการแสดงออกสีเขียวแสดงถึงการ ในหัวข้อนี้ยังคงอยู่ที่เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกการตอบสนองการอักเสบ ในภาพที่ 4-10 เป็นผลการแสดงออกของชุดข้อมูล GSE210841 ในช่วงเวลา 8 ชั่วโมง ที่ถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์ที่ได้จากสมุนไพร *Hypericum perforatum* ที่เรียกว่า 4CS (4-component-system) ที่มีการทำงานร่วมกันในการต้านการอักเสบ โดยภาพรวมของการแสดงออกนั้นเมื่อมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์นั้นมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น และเมื่อมีการทดสอบสารออกฤทธิ์ 4CS การแสดงออกของยีนและทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์นั้นลดลงตัวอย่างเช่น JUN และด้วยเครือข่ายต้นแบบการควบคุมการแสดงออกที่เวลา 6 ชั่วโมงนั้นไม่พบโหนดที่ตรงกันกับชุดข้อมูล GSE21320 และ GSE9632 จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลการยับยั้งการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ได้

ตารางที่ 4-4 การค้นหาฮีนที่มีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาจากเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของฮีน

เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของฮีน		สภาวะ	กลุ่มฮีนที่ถูกคัดเลือกเมื่อทำการค้นหาเครือข่ายย่อยของแต่ละสภาวะ		Frist Neighbors of Selected Nodes (Undirected)	Edge
			ชั่วโมง	จำนวนฮีนที่ค้นหา	จำนวนฮีนที่พบ	จำนวนฮีนที่พบ
โหนด	603	3	83	3	89	901
		6	103	2	24	45
เอดจ์	10,700	8	92	17	356	6,029
		18	97	17	386	8,077

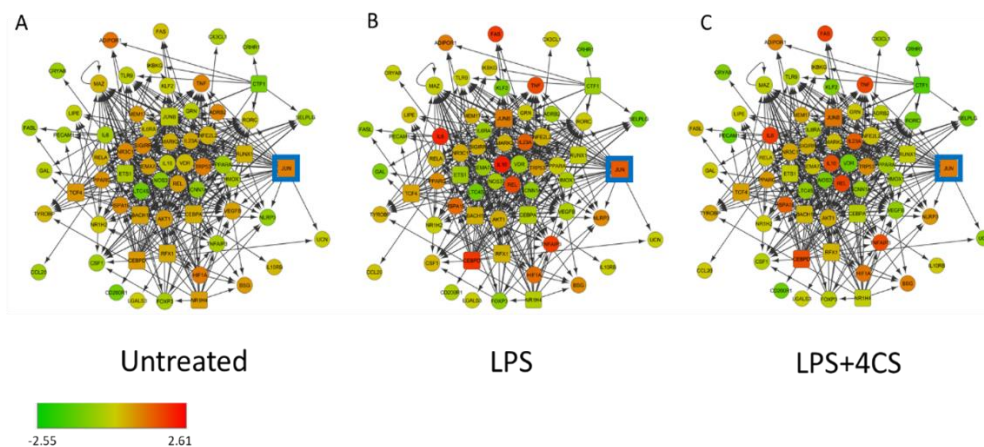


ภาพที่ 4-8 (A) เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของฮีน และเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกออกมาด้วยฮีนที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการคัดเลือกฮีนในแต่ละช่วงเวลา (B) 3 hr (C) 6 hr (D) 8 hr และ (E) 18 hr (หมายเหตุ: ในเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของฮีนนั้น โหนดสีฟ้าและเหลี่ยมหมายถึงทรานส์สคริปชันแฟคเตอร์ โหนดสีน้ำเงินหมายถึงฮีนเป้าหมาย และขนาดของโหนดจะขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างฮีน เอดจ์ที่มีลูกศรหมายถึงทิศทางของการควบคุมการแสดงออก เอดจ์ที่ไม่มีลูกศรหมายถึงทิศทางของการควบคุมการแสดงออก)



ภาพที่ 4-9 โมดูลที่ (A) 3-3, (B) 6-3, (C) 8-4 และ (D) 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ในเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนนั้น โหนดสีฟ้าและเหลี่ยมหมายถึงทรานส์สคริปชันแฟคเตอร์ โหนดสีน้ำเงินหมายถึงยีนเป้าหมาย สีชมพูหมายถึง ขนาดของโหนดจะขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนเอดจ์ที่มีลูกศรหมายถึงทิศทางของการควบคุมการแสดงออก)

#### 4CS



ภาพที่ 4-10 เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกการอักเสบของยีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และผลจากการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4CS ที่เวลา 8 ชั่วโมงในสภาวะ (A) ไม่มี LPS, (B) มี LPS และ (C) เมื่อมี LPS และมีสาร 4CS (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น สีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

#### 4.2.2 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน (Gene co-expression network, GCN)

ตารางที่ 4-5 แสดงผลจากการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน โดยการนำการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไนด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 มาสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีนซึ่งจะเป็นปฏิสัมพันธ์ที่ไม่มีทิศทางที่ทำให้ได้เครือข่ายที่มีขนาด 322 โหนด 6,244 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-11A) เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่ได้นั้นจะถูกนำมาค้นหาเครือข่ายย่อยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบอย่างเด่นชัดในแต่ละช่วงเวลา (differentially expression) ซึ่งได้จากการคัดเลือกยีนที่ (feature selection) เพื่อนำมาเป็นตัวแทนเครือข่ายย่อยของแต่ละช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-11B ถึง 4-11E ตามลำดับ

เมื่อการค้นหาเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน ภายใต้สภาวะของการทดลองในส่วนของแต่ละช่วงเวลา เครือข่ายย่อยที่ได้ยังคงมีขนาดใหญ่ยากต่อการวิเคราะห์จึงมีการนำโปรแกรม JactiveModule มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อค้นหาโมดูลย่อยที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญภายใต้การตอบสนองการอักเสบภายใต้ช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-12 A ถึง D ตามลำดับ

เราได้เลือกโมดูลบางโมดูลของแต่ละสภาวะคือช่วงเวลาที่เลือกมาวิเคราะห์และยีนบางตัวที่มีการรายงานมาอย่างต่อเนื่องมาเพื่อวิเคราะห์และอธิบายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมของยีน ในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมง จำนวนโหนดมีเพียง 2 โหนดหลังจากที่ทำการค้นหาเครือข่ายย่อยจากขั้นตอนการคัดเลือกเครือข่ายอย่างมีนัยสำคัญทำให้เพียง 2 โหนด 1 ปฏิสัมพันธ์เท่านั้นจึงไม่นำวิเคราะห์ต่อ (ภาพที่ 4-12A) ในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมง เราเลือกโมดูลที่ 6-5 (ภาพที่ 4-12B) จะมีตัวยีนหลักๆที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัดนั้นคือ *Tlr4*, *Cd14* และ *Mapk14* ซึ่งยีนเหล่านี้มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงเวลานี้และมีส่งผลต่อการแสดงออกต่อโหนดอื่นๆ เช่นกัน ในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมง เราเลือกโมดูล 8-3 (ภาพที่ 4-12C) มาวิเคราะห์ผลในช่วงเวลานี้จะมียีน *Cd14* และ *Stat3* ที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง และยังมีผลต่อการแสดงออกต่อยีนอื่นๆ และที่สภาวะ 18 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS ได้ทำการการเลือกโมดูลที่ 18-2 (ภาพที่ 4-12D) ซึ่งในโมดูลนี้พบ *Tnf*, *Ptger2* และ *Ptgs2* มีการแสดงออกที่เด่นชัด

เมื่อนำชุดข้อมูล GSE21841 ที่ทำการทดสอบการต้านการแสดงออกของสารออกฤทธิ์มาทำการวิเคราะห์กับเครือข่ายการแสดงออกร่วมระหว่างยีนต้นแบบพบว่าในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมงนั้นการแสดงออกของยีนการอักเสบเมื่อมีการกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS พบว่ามีการแสดงออกของยีนการอักเสบที่เพิ่มขึ้นเมื่อสังเกตจากสีที่เปลี่ยนแปลงไปและเมื่อทำการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4CS พบว่าสารออกฤทธิ์นี้สามารถไปลดการแสดงออกของยีนการอักเสบเมื่อเทียบกันทั้งหมด 3 เครือข่ายภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน การเทียบการลดการแสดงออกของยีน *Stat3* และ *Cd14* เมื่อทำการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ในการต้านการแสดงออกของสารออกฤทธิ์นั้นยังไม่ค่อยชัดเจนเมื่อสังเกตจากสีที่เปลี่ยนแปลงหลังจากที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 4-13)

ชุดข้อมูล GSE9632 ได้ทำการการแสดงผลของยีนการอักเสบและทำการทดสอบสารออกฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารสกัด 3 ชนิด ได้แก่ albiflorin, paeoniflorin และ paeonol จากรากของต้นโบทัน (paeony) ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml ตามลำดับ ในภาพที่ 4-14A เครือข่ายการแสดงผลออกกร่วมยีนการอักเสบเมื่อทำการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ albiflorin ในขนาดปริมาณ 1 ug/ml หลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงผลของยีนการอักเสบด้วย LPS พบว่าภาพรวมของเครือข่ายนั้นยังไม่สามารถลดปริมาณการอักเสบได้เมื่อเทียบกับระหว่างเครือข่ายที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเครือข่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อเพิ่มปริมาณสาร albiflorin 10 และ 100 ug/ml ตามลำดับ จะเห็นว่าสารออกฤทธิ์ albiflorin นั้นสามารถลดการแสดงผลของยีนการอักเสบเมื่อสังเกตจากสีที่เปลี่ยนแปลงไป (ภาพที่ 4-14B และ 4-14C ตามลำดับ)

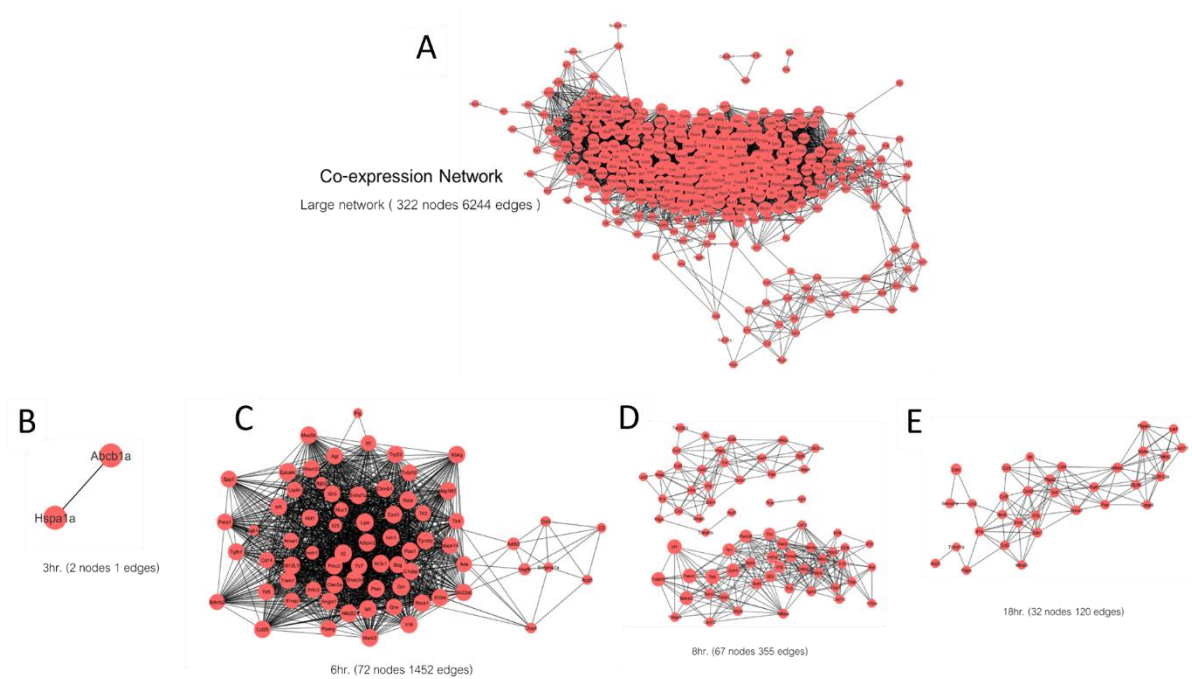
ในการทดสอบการแสดงผลออกกร่วมของยีนการอักเสบและการต้านการอักเสบในสารออกฤทธิ์ paeoniflorin จากรากของต้นโบทัน (ภาพที่ 4-15) ในปริมาณ 1 ug/ml พบว่าเมื่อเทียบกับทั้ง 3 เครือข่าย (ภาพที่ 4-15A) สารออกฤทธิ์ paeoniflorin นั้นลดการแสดงผลออกยีนการอักเสบได้เมื่อสังเกตจากสีที่เปลี่ยนแปลงไป และสามารถลดการอักเสบได้ดีในปริมาณที่ 10 ug/ml (ภาพที่ 4-15B) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ paeoniflorin เป็น 100 ug/ml แล้วนั้นความสามารถในการลดของการแสดงผลออกยีนการอักเสบนั้นน้อยลงเมื่อเทียบกับ 10 ug/ml (ภาพที่ 4-15C)

และผลจากการทดสอบการต้านการแสดงผลออกของสารออกฤทธิ์ paeonol ในปริมาณ 1 ug/ml นั้นสามารถลดการแสดงผลออกของยีนการอักเสบได้เมื่อเทียบกับเครือข่ายการแสดงผลออกของยีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเครือข่ายการการแสดงผลออกยีนการอักเสบที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (ภาพที่ 4-16A) และเมื่อเทียบขนาดปริมาณด้วยกันสารออกฤทธิ์ที่ 1 ug/ml จะสามารถลดได้ดีกว่า 10 และ 100 ug/ml แต่ในยีนบางตัวยังคงลดได้น้อยเมื่อเทียบกับปริมา 10 และ 100 ug/ml (ภาพที่ 4-16) สารออกฤทธิ์ paeonol ในปริมาณ 10 และ 100 ug/ml สามารถลดการแสดงผลออกของยีนการอักเสบได้เมื่อเทียบกับเครือข่ายที่ไม่มีการกระตุ้นด้วย LPS

และที่ถูกระตุ้นด้วย LPS ในชุดข้อมูล GSE21320 ได้ทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) ที่ได้จากชาเขียวกับฤทธิ์การต้านการอักเสบที่เวลา 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-17) เมื่อเรานำเครือข่ายต้นแบบการแสดงผลออกกร่วมยีนการอักเสบมาวิเคราะห์ร่วมด้วยพบว่ามียีนการอักเสบจำนวน 4 ตัวที่ตรงกันกับชุดข้อมูลคือ *C3*, *Mapk14*, *Spp1* และ *Tnfrsf1a* เมื่อทำการวิเคราะห์ระหว่างเครือข่ายที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเครือข่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS นั้น สารออกฤทธิ์ EGCG มีผลต่อการแสดงผลออกของยีนทั้ง 4 ตัว สามารถไปลดการแสดงผลออกของยีนการอักเสบเมื่อสังเกตจากสีที่เปลี่ยนแปลงไป

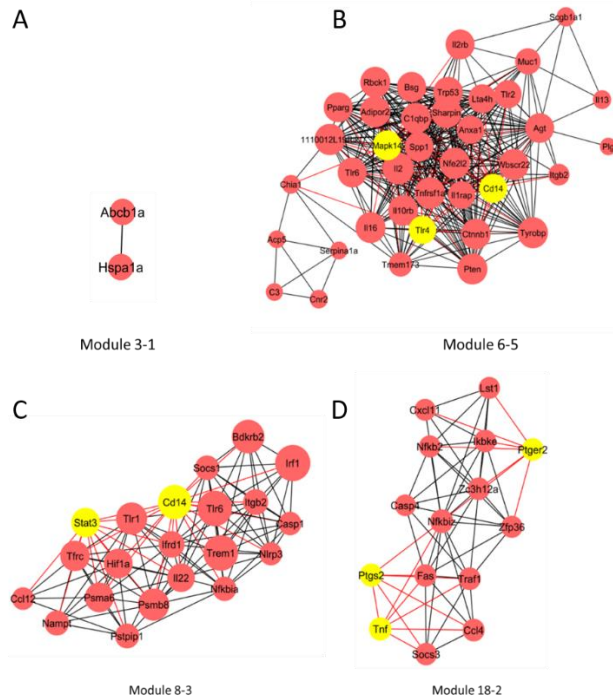
ตารางที่ 4-5 การค้นหาเอ็นที่มีมีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน

เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การ แสดงออกร่วมระหว่างยีน		สภาวะ	กลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกเมื่อ ทำการค้นหาเครือข่าย ย่อยของแต่ละสภาวะ		Frist Neighbors of Selected Nodes (Undirected)	Edge
			ชั่วโมง	จำนวนยีน ที่ค้นหา	จำนวนยีน ที่พบ	จำนวนยีนที่พบ
โหนด	322	3hr	83	1	2	1
		6hr	103	2	72	1,452
เอดจ์	6,244	8hr	92	27	67	355
		18hr	97	29	32	120

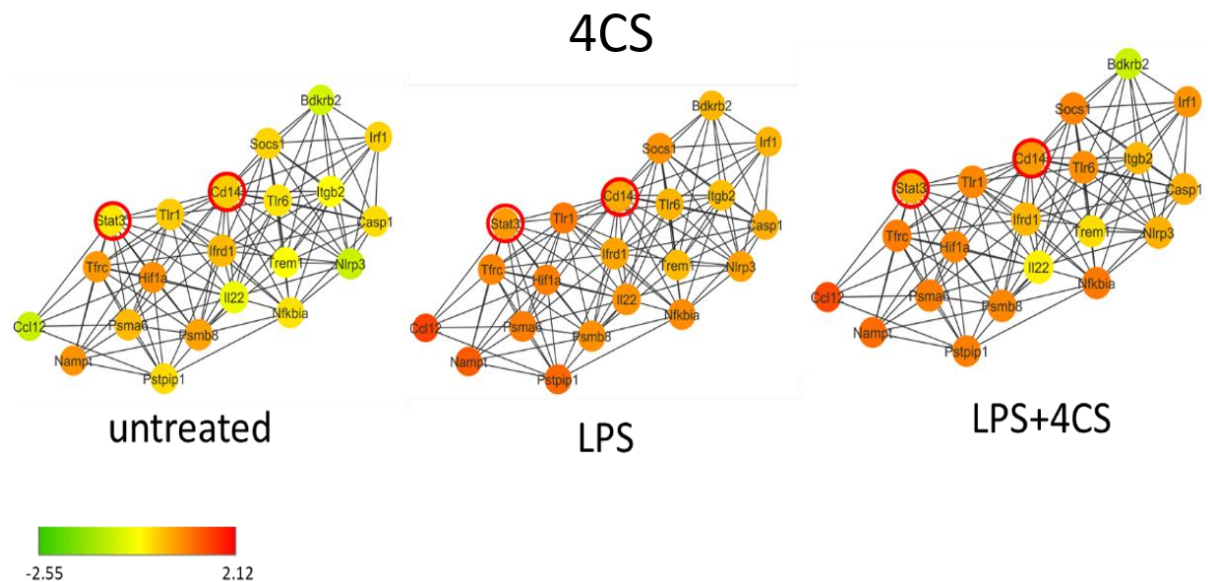


ภาพที่ 4-11 (A) เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมระหว่างยีน และเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกออกมาด้วยยีนที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการคัดเลือกยีนในแต่ละช่วงเวลา (B) 3 hr (C) 6 hr (D) 8 hr และ (E) 18 hr



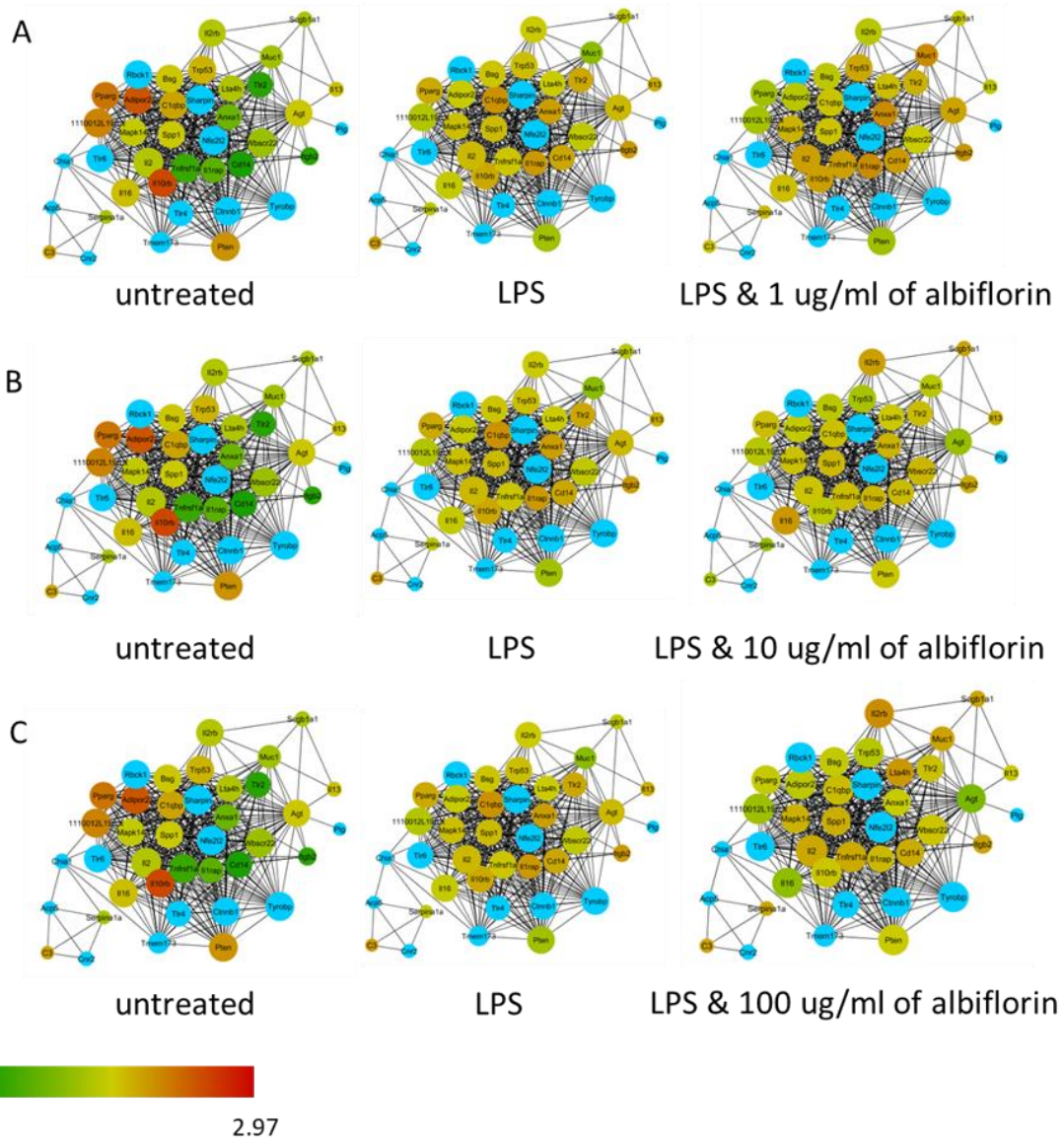


ภาพที่ 4-12 โมดูลที่ (A) 3-1, (B) 6-5, (C) 8-3 และ (D) 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การ แสดงออกร่วมระหว่างยีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์และแปลผลการแสดงออก ของยีนการอักเสบ ในช่วงเวลาที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การ แสดงออกร่วมระหว่างยีน โหนดสีชมพูคือยีนทั่วไป และโหนดสีเหลืองคือยีนการอักเสบ)



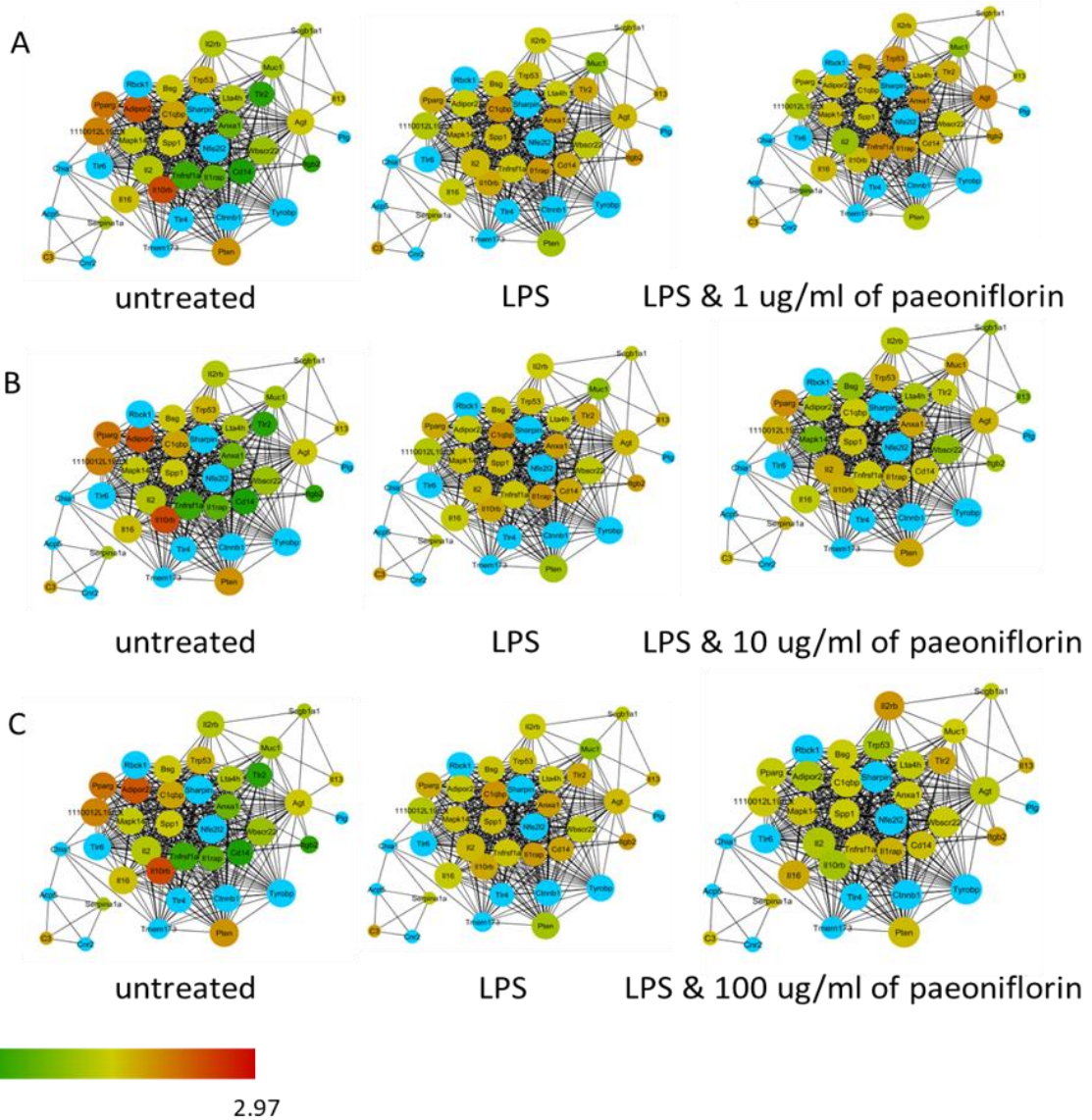
ภาพที่ 4-13 เครือข่ายการแสดงผลออกมัยการอักเสบที่ถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4-component-system (4CS) ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออก ของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่า แสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

# Albiflorin



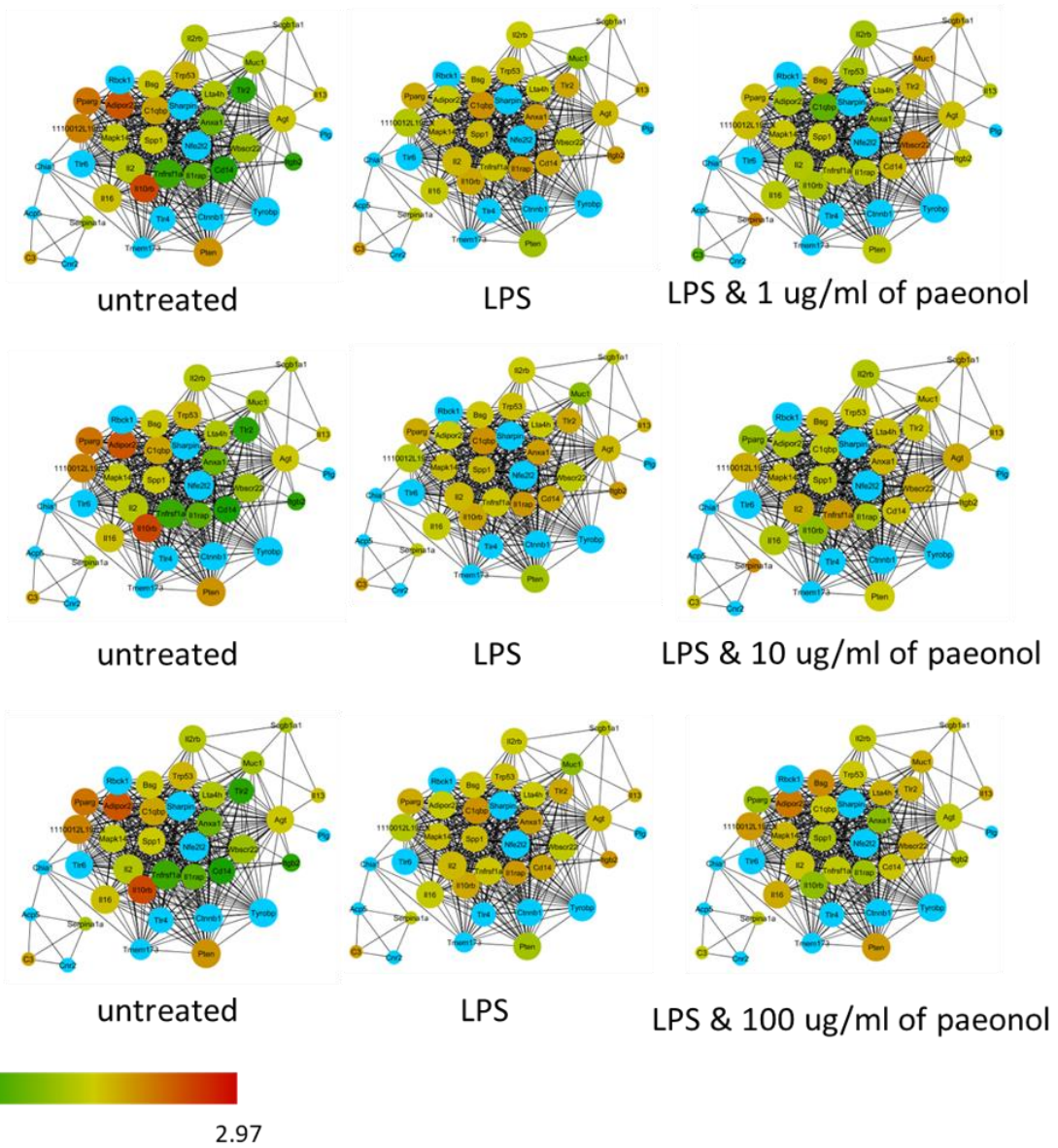
ภาพที่ 4-14 เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

# Paeoniflorin



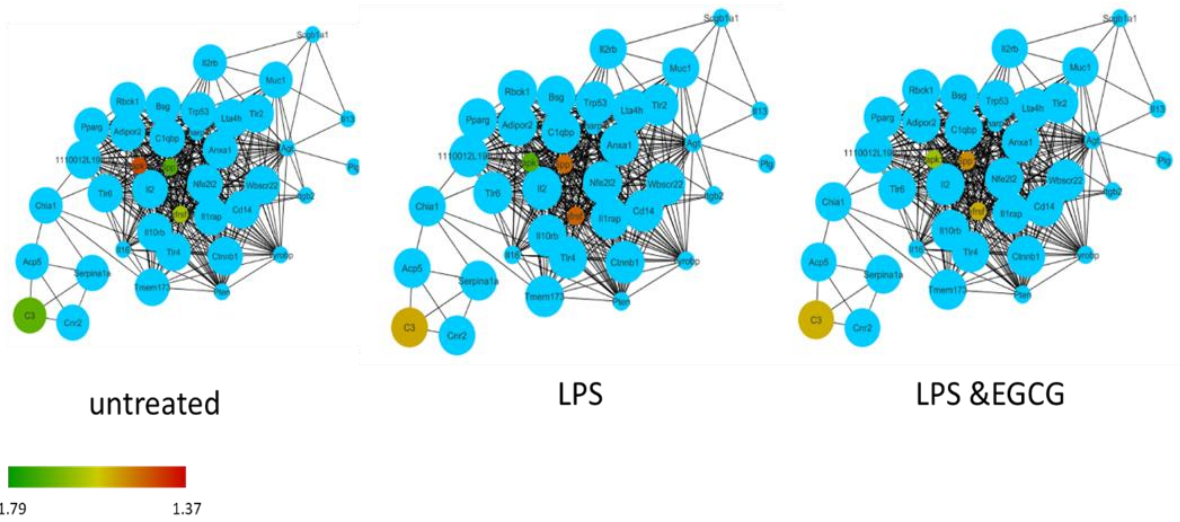
ภาพที่ 4-15 เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeoniflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

# Paeonol



ภาพที่ 4-16 เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeonol ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

## EGCG



ภาพที่ 4-17 เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ EGCG จากชุดข้อมูล GSE21320 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของ โหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

#### 4.2.3 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction networks (PPI))

ตารางที่ 4-6 แสดงผลจากการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โดยได้ทำการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนโดยการสืบค้นข้อมูลโปรตีนการอักเสบจากฐานข้อมูล STRING แล้วมาแสดงผลด้วยโปรแกรม Cytoscape ทำให้ได้เครือข่ายที่มีขนาด 1,480 โหนด 7,776 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-18A) เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่ได้นั้นจะถูกนำมาค้นหาเครือข่ายย่อยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบอย่างเด่นชัดในแต่ละช่วงเวลา (differentially expression) ซึ่งได้จากการคัดเลือกยีนที่ (feature selection) เพื่อนำมาเป็นตัวแทนเครือข่ายย่อยของแต่ละช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-18B ถึง 4-18E ตามลำดับ

เมื่อการค้นหาเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ภายใต้สภาวะของการทดลองในส่วนของแต่ละช่วงเวลา เครือข่ายย่อยที่ได้ยังคงมีขนาดใหญ่ยากต่อการวิเคราะห์จึงมีการนำโปรแกรม JactiveModule มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อค้นหาโมดูลย่อยที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญภายใต้การตอบสนองต่อการอักเสบภายใต้ช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4-19 A ถึง D ตามลำดับ

เราได้เลือกโมดูลบางโมดูลของแต่ละสภาวะคือช่วงเวลาที่เลือกมาวิเคราะห์และยีนบางตัวที่มีการรายงานมาอย่างต่อเนื่องมาเพื่อวิเคราะห์และอธิบายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมงเราได้ทำการคัดเลือกโมดูลที่ 3-1 (ภาพที่ 4-19A) พบ RELA, NFKB1 และ IL6 ในเครือข่ายและมีปฏิสัมพันธ์กัน และขนาดของโหนดในเครือข่ายนั้นจะแปรผันตรงตามปฏิสัมพันธ์ ที่เวลา 3 ชั่วโมง โหนดของ IL6 มีขนาดที่ใหญ่ปฏิสัมพันธ์ค่อนข้างที่เชื่อมโปรตีนอื่นอีกหลายตัว ในเวลาที่ 6 ชั่วโมงเราเลือกโมดูล 6-5 (ภาพที่ 4-19B) ขนาดของโหนดภายในเครือข่ายและการแสดงออกร่วมกันเราพบโปรตีน Agtr2, Ace และ Ren1 เมื่อทำการค้นหาข้อมูลพบว่า โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด โมดูลที่ 8-2 ถูกเลือกมาเป็นต้นแบบของการอธิบายการตอบสนองต่อการอักเสบในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-19C) พบว่าโหนด IL6 ค่อนข้างที่จะมีขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับที่เวลา 3 ชั่วโมง และยังพบอีกว่าโปรตีน IL6 มีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับ TLR4, MAPK3, IFNG ซึ่งโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ และในช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงคัดเลือกโมดูลที่ 18-3 มาอธิบาย (ภาพที่ 4-19D) พบว่าในโมดูลมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ Ikbkb, Rela, Mapk14, Tlr4, Stat3, Mapk3, Il1a และ Myd88 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กัน

เมื่อนำโมดูลที่ 8-2 มาวิเคราะห์ต่อจะเห็นว่าเมื่อนำชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนชุด GSE21841 มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่า สารออกฤทธิ์นั้นมีผลต่อการแสดงออกของยีนการอักเสบ โดยเฉพาะ IL6 มีเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อทำการเทียบกับเครือข่ายที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วย LPS และมี LPS ดังนั้นผลของสารออกฤทธิ์สามารถไปยับยั้งการทำงานของ IL6 (ภาพที่ 4-20)

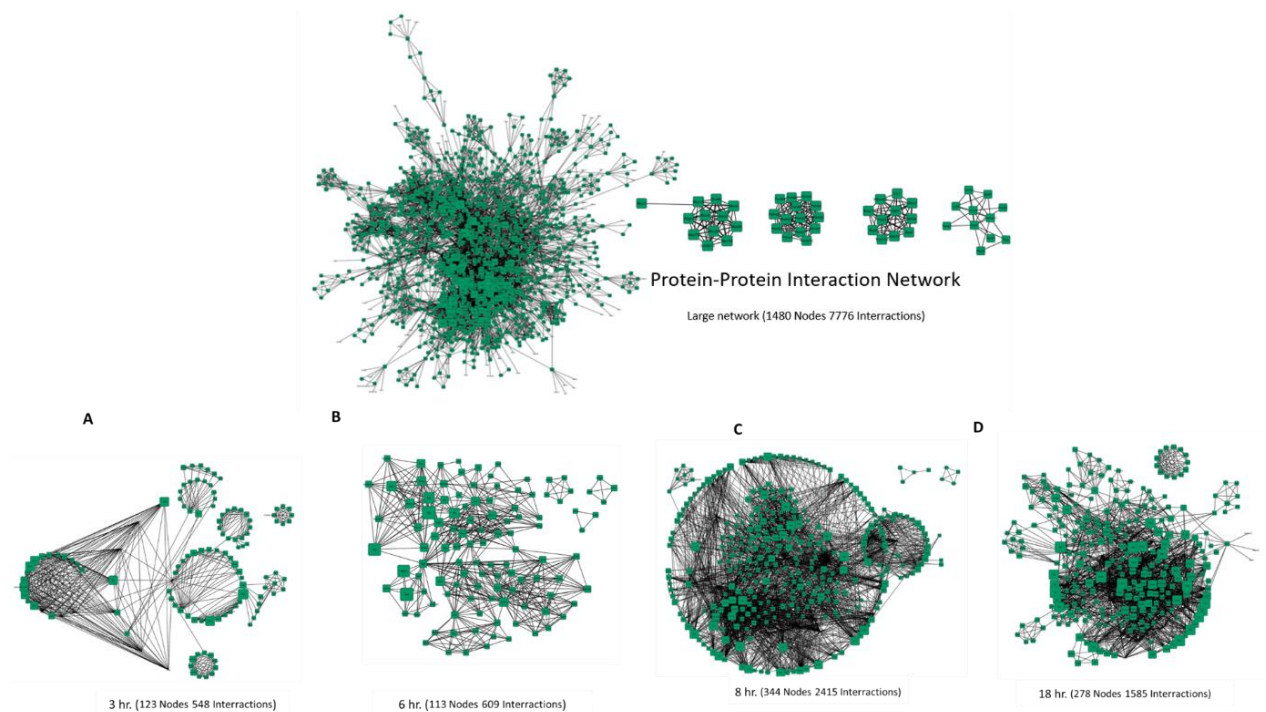
ในภาพที่ 4-21 เป็นผลจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกระหว่างโปรตีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าในภาพรวมของเครือข่าย albiflorin ในปริมาณ 1 ug/ml สามารถลดการแสดงออกของยีนการอักเสบได้ค่อนข้างน้อย และเมื่อเพิ่มปริมาณ 10 และ 100 ug/ml ตามลำดับ สีที่เห็นคือเปลี่ยนไปทางเขียวการลดการอักเสบนั้นค่อนข้างดีขึ้นตามลำดับของการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ albiflorin

ภาพที่ 4-22 คือเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกระหว่างโปรตีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ paeoniflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมงพบว่าเมื่อมีการทดสอบการสารออกฤทธิ์ที่ 1 ug/ml ไม่สามารถลดการแสดงออกของโปรตีนการอักเสบได้หรืออาจจะได้น้อย และเมื่อเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์พบว่ามีแนวโน้มการลดการแสดงออกของโปรตีนนั้นเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับทั้ง 3 ปริมาณที่ทำการทดสอบ

ภาพที่ 4-23 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกระหว่างโปรตีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ paeonol ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า สารออกฤทธิ์ paeonol สามารถลดการแสดงออกของโปรตีนการอักเสบ ตั้งแต่ปริมาณสารที่ 1 ug/ml แล้ว และเมื่อเพิ่มปริมาณอีกมีแนวโน้มที่ลดลงอีกเมื่อเทียบกันทั้ง 6 เครือข่ายทั้งที่ถูกทดสอบด้วย LPS และ ไม่ถูกทดสอบด้วย LPS และในสารออกฤทธิ์จากชุดข้อมูล GSE21320 (211genes) ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนที่ตรงกันดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ต่อได้ในโมดูลต้นแบบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง

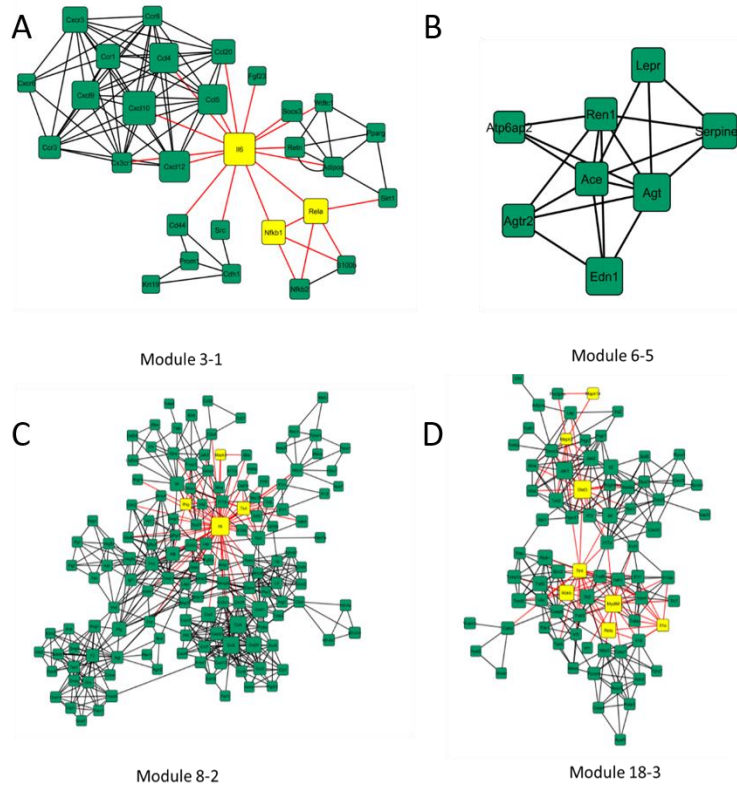
ตารางที่ 4-6 ตารางการแสดงจำนวนยีนที่ถูพบของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนภายใต้สภาวะที่เปลี่ยนแปลงไป

เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน		สภาวะ	กลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกเมื่อทำการค้นหาเครือข่ายย่อยของแต่ละสภาวะ		Frist Neighbors of Selected Nodes (Undirected)	Edge
			ชั่วโมง	จำนวนยีนที่ค้นหา	จำนวนยีนที่พบ	จำนวนยีนที่พบ
โหนด	1,480	3hr	83	10	123	548
		6hr	103	10	113	609
เอดจ์	7,776	8hr	92	27	344	2,415
		18hr	97	29	278	1,585



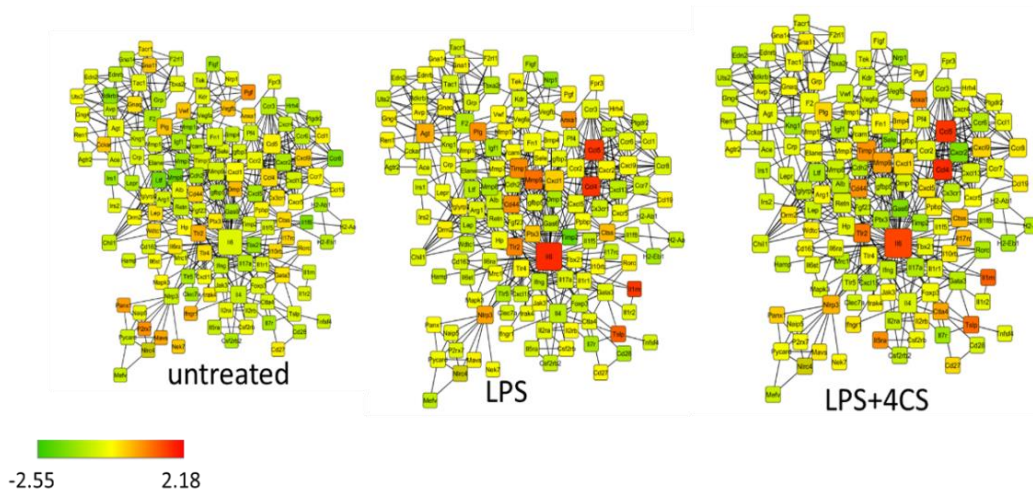
ภาพที่ 4-18 (A) เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกออกมาด้วยยีนที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการคัดเลือกยีนในแต่ละช่วงเวลา (B) 3 hr (C) 6 hr (D) 8 hr และ (E) 18 hr





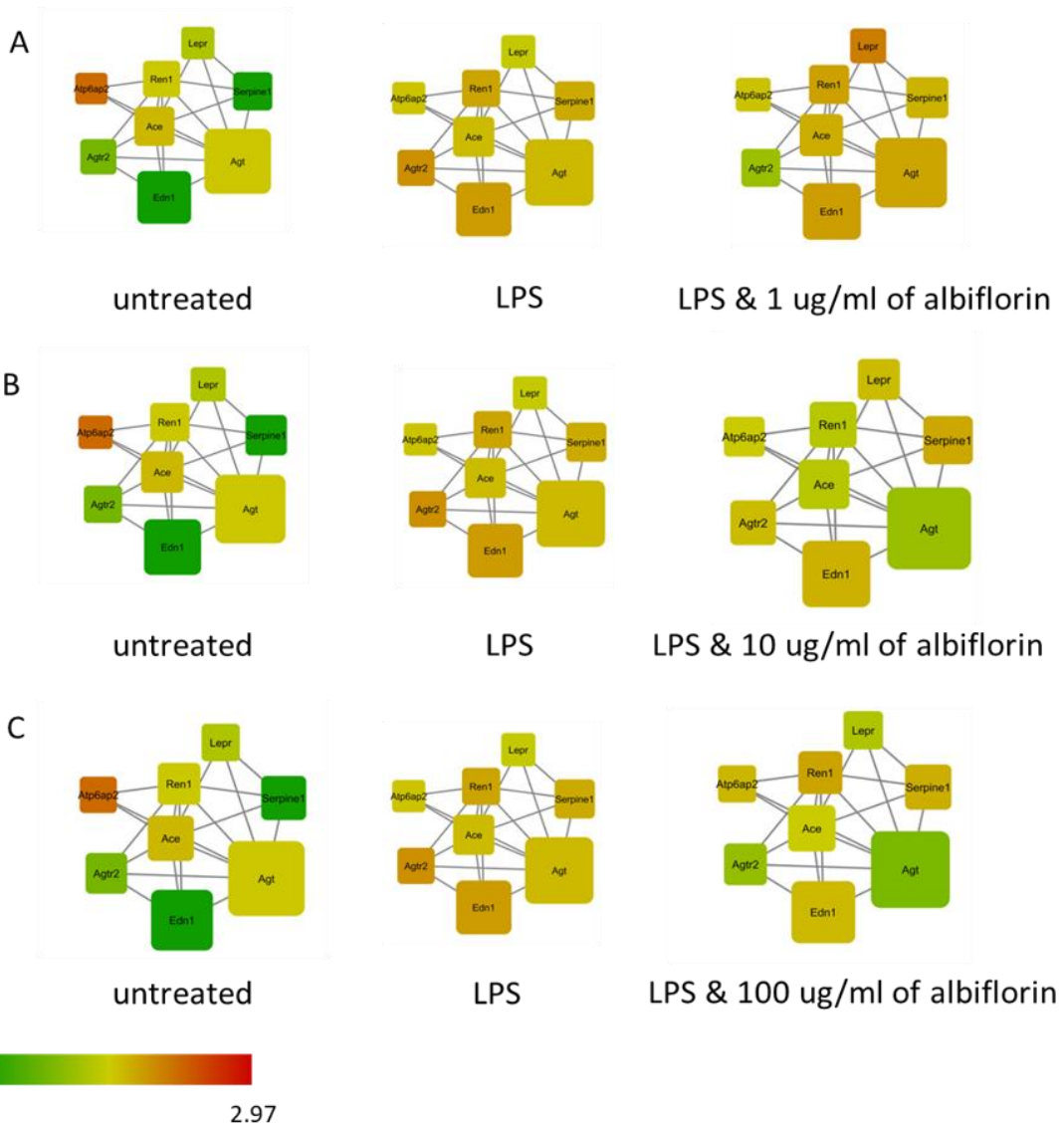
ภาพที่ 4-19 โมดูลที่ (A) 3-1, (B) 6-5, (C) 8-2 และ (D) 18-3 เป็นตัวแทนของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์และแปลผลการแสดงออกของยีนการอักเสบในช่วงเวลาที่ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โหนดสีเขียวคือยีนทั่วไป และโหนดสีเหลืองคือยีนการอักเสบ)

### 4CS



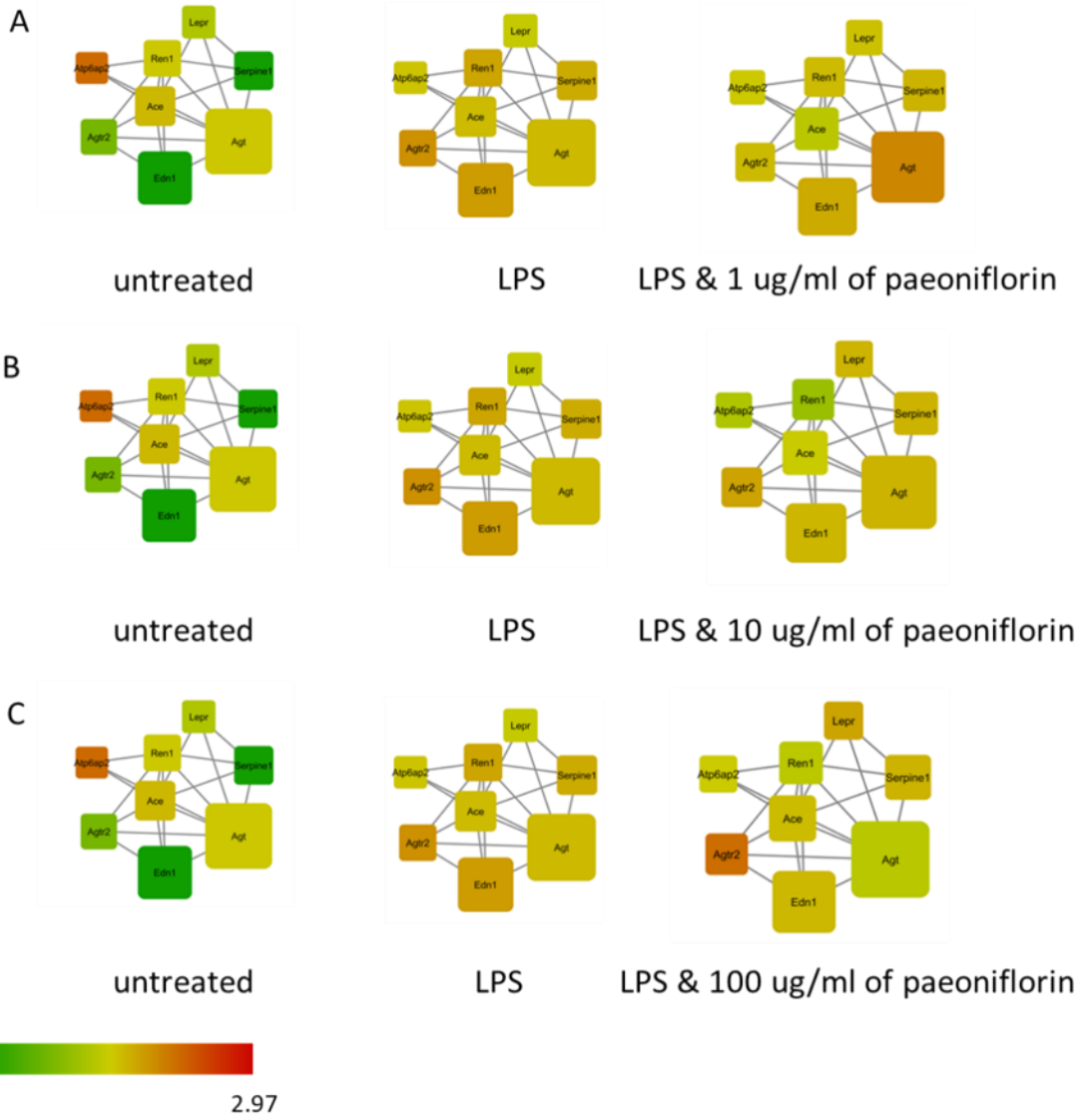
ภาพที่ 4-20 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกระหว่างโปรตีนการอักเสบที่ถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4-component-system (4CS) ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มข้นของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

# Albiflorin



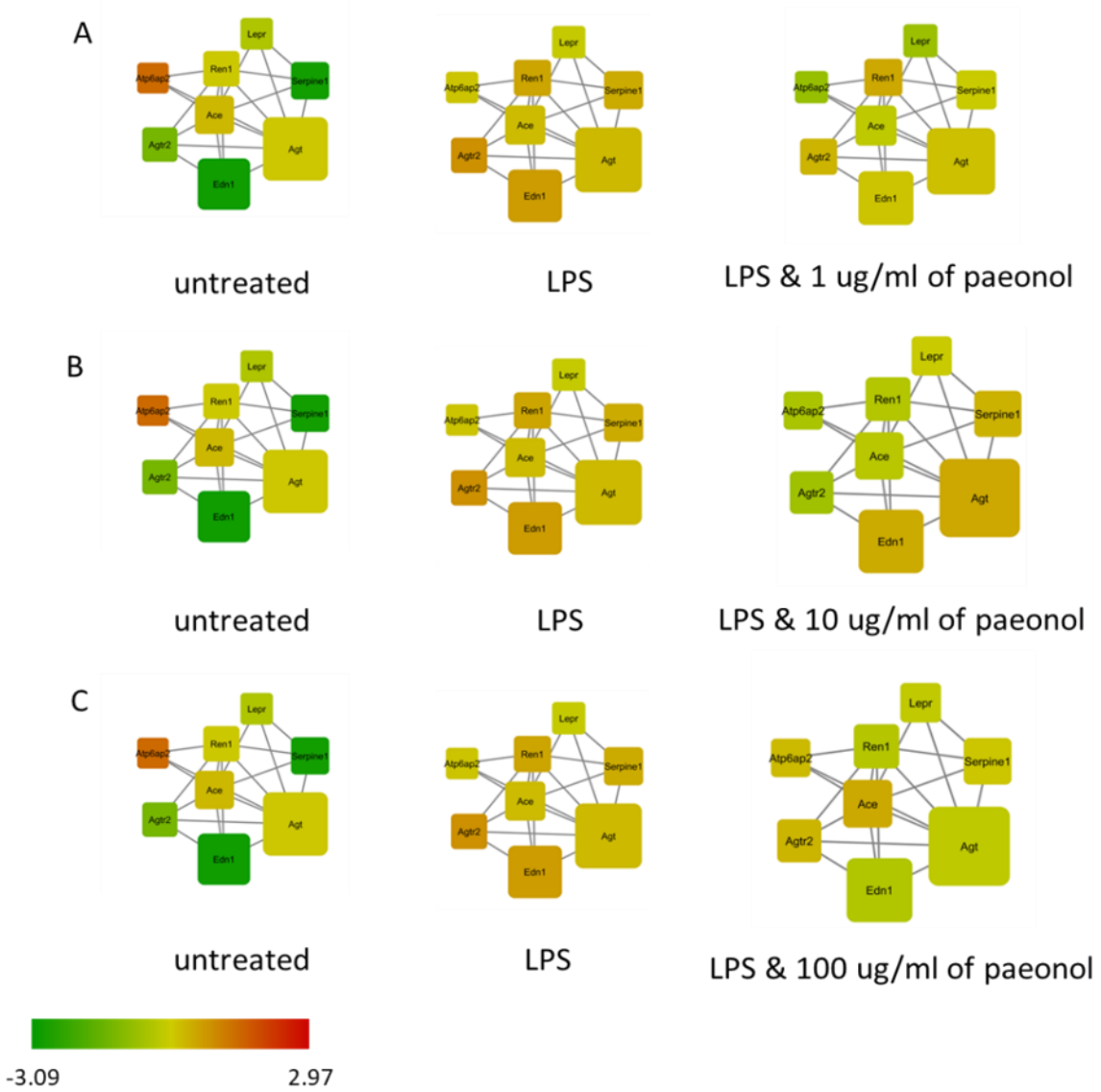
ภาพที่ 4-21 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

# Paeoniflorin



ภาพที่ 4-22 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeoniflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น สีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

# Paeonol



ภาพที่ 4-23 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการต้านการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ Paeonol ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml จากชุดข้อมูล GSE9632 ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: ความเข้มสีของโหนดหมายถึงการแสดงออกของยีน สีแดงคือการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นสีเขียวคือการแสดงออกที่ลดลง สีฟ้าคือโหนดที่ไม่พบค่าแสดงออกในเครือข่ายต้นแบบ และขนาดของโหนดขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนด)

## บทที่ 5

### อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ผลจากการนำเชื้อเข้าทั้งสามเชื้อมาทำการวิเคราะห์พบว่าการแสดงออกยีนในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมงนั้นมีการแสดงออกเกิดขึ้นทั้งสามเชื้อเข้าแต่ยังไม่ค่อยชัดเจนอาจเป็นเพราะว่าเป็นช่วงแรกของการตอบสนองของกลไกการอักเสบ และการแสดงออกของยีนที่ไม่ใช่ยีนหลักนั้นอาจมีการแสดงที่ค่อนข้างเด่นชัดจึงทำให้ยีนที่พบในโมดูลย่อยนั้นอาจจะไม่สอดคล้องกับสามเชื้อเข้า จากเชื้อเข้าควบคุมการแสดงออกยีนการอักเสบนั้น CEBPA และ CEBPB มีการแสดงออกพร้อมกันในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมง ที่เห็น CEBPB มีผลต่อการแสดงออกของ IL6 เนื่องจาก LPS ไปจับกับ TLR4 ทำให้เกิดการการส่งสัญญาณของ MYD88 ผ่านวิถีของ NF-kappa B signaling pathway ทำให้เกิดการสังเคราะห์ TNF ซึ่งเป็น positive feedback กลับไปกระตุ้นการส่งสัญญาณของวิถี TNF signaling pathway ไปกระตุ้นให้ CEBPB สร้าง IL6 ซึ่งเป็น inflammatory cytokine และเชื่อมโยงอีกหลายวิถีอีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบอีกมากมาย และ CEBPA ซึ่งหน้าที่ไปควบคุมการสังเคราะห์ IL6 ที่เกี่ยวข้องกับวิถีกลไกของมะเร็ง เชื้อเข้าปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนการอักเสบที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงนั้นจะเห็นว่ามี IL6 เช่นกันซึ่งมันก็สอดคล้องกันกับเชื้อเข้าควบคุมการแสดงออกของยีนการอักเสบ ที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดขึ้นมา ในโมดูลนี้ก็จะมีการตอบสนองของวิถี NF-kappa B signaling pathway เนื่องจากมีการพบ RelA และ Nfkb1 ที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดขึ้นมาอาจเป็นเพราะการทำงานร่วมกัน ในวิถี NF-kappa B signaling pathway เนื่องจาก NF-kappa-B จะประกอบด้วย NFKB1 หรือ NFKB2 ร่วมกับ REL, RELA หรือ RELB ทำให้เกิดมีการแสดงออกพร้อมกัน (Askari et al., 2010) และเชื้อเข้าการแสดงออกยีนการอักเสบมีจำนวนยีนการอักเสบจำนวนน้อยอาจเป็นเพราะขั้นตอนของการนำรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมงซึ่งในช่วงเวลานั้นอาจมีหลากหลายยีนที่มีการตอบสนองอย่างเด่นชัดแต่อาจจะไม่ใช่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยตรงจึงทำให้การนำรายชื่อเหล่านี้มาทำการค้นหาเชื้อเข้าย่อยของช่วงเวลาและการคัดเลือกโมดูลย่อยนั้นมีผลต่อจำนวนยีนภายในเชื้อเข้า

เมื่อเวลาที่ 6 ชั่วโมงเช่นเดียวกับที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนการอักเสบแต่อาจจะไม่ใช่ยีนหลักที่ทำการศึกษาและการรายงานกันอย่างต่อเนื่องเป็นไปได้ว่าการที่โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกมานั้นกลุ่มยีนการอักเสบในวิถีกลไกของนั้นมีการแสดงออกอย่างเด่นชัดเช่นกันจึงทำให้ภายในเชื้อเข้าแต่ละเชื้อเข้าพบยีนการอักเสบหลักๆ ค่อนข้างน้อย เนื่องจากโปรแกรม Jactive นั้นคัดเลือกโมดูลย่อยจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนและความสัมพันธ์ระหว่างโหนดอย่างมีนัยสำคัญเป็นไปได้ว่ายีนอื่นอาจมีการแสดงออกอย่างเด่นชัดมากกว่าจึงทำให้ถูกคัดเลือกขึ้นมา แต่ในเชื้อเข้าการแสดงออกยีนการอักเสบนั้นพบว่าการแสดงออกเด่นชัดของ Mapk14, Tlr4 และ Cd14 ซึ่งยีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อการอักเสบและการแสดงออกของยีนเหล่านี้นั้นมีการแสดงออกที่ชัดเจนในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นการแสดงออกการอักเสบด้วย LPS ถ้าทำการเปรียบเทียบกับช่วงเวลา 3 ชั่วโมง จะเห็นว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีนการอักเสบด้วย LPS นั้นการแสดงออกของ Cd14 และ Tlr4 เป็นช่วงแรกๆ ของการตอบสนองต่อการอักเสบเนื่องจาก Cd14 ทำงานร่วมกับ TLR4 ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่จำเพาะต่อ LPS ในกลไกการตอบสนองการอักเสบ (Zanoni et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ Mapk14 หรือ p38 ที่เด่นชัด หากย้อนกลับไปช่วงเวลา 3 ชั่วโมง เริ่มมีการตอบสนองของ TNF signaling

pathway และ MAPK signaling pathway ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นต่อการแสดงออกของ p38 (Xu and Derynck, 2010) และก็สอดคล้องกับช่วงเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากที่มีการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ ดังนั้นจากการแสดงออกของยีนและโปรตีนการอักเสบชี้ให้เห็นว่าในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมงเป็นช่วงแรกของการตอบสนองการอักเสบจะสังเกตเห็นว่ายีนหรือโปรตีนนั้นที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดจะไปอยู่ที่โปรตีนกลุ่มแรกๆของการส่งสัญญาณ แต่ว่าโปรตีนกลุ่มอื่นก็ยังคงมีการแสดงออกแต่ยังไม่ชัดเจนเท่าไร

เมื่อเวลาที่ 8 ชั่วโมงจากภาพจะเห็นได้ว่าเครือข่ายนั้นค่อนข้างใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงอาจจะเป็นไปได้ว่าที่ช่วงเวลาตั้งแต่ 8 ชั่วโมงนั้นกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบนั้นมีค่อนข้างมากในช่วงเวลานี้เพื่อที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกไป เมื่อเรามาวิเคราะห์ที่ตัวเครือข่ายโดยการเทียบกันระหว่างเครือข่ายนั้นจะเห็นว่าเครือข่ายทั้งสามเครือข่ายมีการแสดงออกที่สอดคล้องกัน เนื่องจากว่าเราพบ IL6 ในเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนการอักเสบและเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน บ่งบอกถึงการแสดงออกของ IL6 นั้นการแสดงออกค่อนข้างเด่นชัด นอกจากนี้ยังพบ Cd14 ในเครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนซึ่งมีสอดคล้องกับการพบการแสดงออกที่เด่นชัดของ TLR4 ในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ในเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนนั้นจะเห็นว่าโหนดของ TNF นั้นมีขนาดค่อนข้างใหญ่พร้อมกับการแสดงออกของ IL6, Rela และ Nos3 ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในวิถีกลไกของ TNF และ MAPK signaling pathway ซึ่งถ้าย้อนไปที่ช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงจะเห็นว่ามีการสังเคราะห์โปรตีน TNF ในวิถีของ NF- $\kappa$ B pathway เกิดขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับไปกระตุ้นการส่งสัญญาณต่อใน TNF และ MAPK signaling pathway ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากมีการกระตุ้นด้วย LPS แต่การส่งสัญญาณของ NF- $\kappa$ B signaling pathway ก็ยังคงเกิดต่อเนื่องถ้าสังเกตจากเครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนการอักเสบและเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และเมื่อมาวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนนั้นจะเห็นว่า Tlr4, Mapk3, Il6 และ Ifng มีการแสดงออกเกิดขึ้นพร้อมกันบ่งบอกถึงการมีปฏิสัมพันธ์กันซึ่งสอดคล้องกับกลไกการส่งสัญญาณการตอบสนองของ Toll-like receptor signaling pathway หลังจาก LPS มากระตุ้นการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจที่เวลา 8 ชั่วโมง โดยการที่ TLR4 เป็นรีเซปเตอร์ที่ตอบสนองจำเพาะต่อ LPS ซึ่งการจะตอบสนองต่อ LPS ซึ่ง TLR4 receptor นั้นต้องการ co-receptors มาทำงานร่วมกันนั้นคือ CD14 และ MD2 เพื่อที่จะจับกับ LPS (Ifng et al., 2016) แล้วส่งสัญญาณการตอบสนองภายในเซลล์ทั้งกลไกของ NF- $\kappa$ B pathway และ MAPK signaling pathway เกิดการส่งสัญญาณของ ERK1 หรือ MAPK3 (Zarubin and Han, 2005) ไปกระตุ้นการสังเคราะห์พวก Inflammatory cytokine เช่น TNF, IL6 และ IFNG (Acheh et al., 2016) แล้ว cytokine ก็จะไปจับกับ cytokine-cytokine receptor ทำให้เกิดการส่งสัญญาณของ stat3 (Numata et al., 2005) ในวิถีกลไก Jack-Stat signaling pathway (Harrison, 2012) ซึ่งก่อให้เกิดกระบวนการหลายอย่างเช่น ก่อให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ กระบวนการแบ่งเซลล์ และการแสดงออกของโปรตีนภายในเครือข่ายยังไปเกี่ยวข้องกับวิถีกลไกการตอบสนองของมะเร็งอีกด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าทั้งสามเครือข่ายนี้มีการแสดงออกที่เด่นชัดของโปรตีนภายในเครือข่ายและระหว่างเครือข่ายมีความสอดคล้องและเชื่อมโยงกัน

ช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกของเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS เช่นเดียวกับเวลาที่ 8 ชั่วโมงมีการแสดงออกของกลุ่มยีนการอักเสบที่สอดคล้องกันทั้งสามเครือข่ายพบยีนและโปรตีนในกลุ่มเดียวกันยังคงพบการแสดงออกของกลุ่มยีนและโปรตีนในวิถีกลไกหลักๆ ทั้งการส่งสัญญาณในกลไก NF- $\kappa$ B, Jack-Stat และ MAPK signaling ในเครือข่าย GRN จะเห็นว่าในเครือข่าย IRF9 ซึ่งมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกยีนเป้าหมายหลายตัวเช่น Il6 โดยการแสดงออกของ Il6 นั้นถูกกระตุ้นโดย ISGF3 (Tyrosine-phosphorylated STAT1/2 heterodimers bind to IRF9, forming IFN-stimulated gene

factor 3) ซึ่งจะไปจับกับ ISREs (IFN-stimulated response elements) ในโปรโมเตอร์ของ IFN-induced genes เพื่อให้เกิดการถอดรหัสและส่งผลต่อการแสดงออกของ STAT3 เช่นกัน (Nan et al., 2018) นอกจากนี้ IRF9 ยังมีผลต่อการแสดงออกของ PIK3CG ซึ่งเชื่อมโยงไปที่กระบวนการกระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดและเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดนำไปสู่การฟื้นฟูบาดแผล (Huang et al., 2016) ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและโปรตีนที่มีลักษณะเด่นชัดนั้นในช่วงที่ 8 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมงจะเป็นช่วงของการตอบสนองการอักเสบและกำจัดสิ่งแปลกปลอมรวมถึงการกระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเพื่อให้บาดแผลนั้นปิด

เมื่อนำสารออกฤทธิ์มาวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมง เนื่องจากสารออกฤทธิ์ 4CS (4-component-system จากสมุนไพร Hypericum perforatum) ถูกทดสอบการต้านการอักเสบที่ช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมง (ชุดข้อมูล GSE21841) พบว่าในเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนการอักเสบนั้น สารออกฤทธิ์ 4CS มีผลต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายและทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์เนื่องจาก 4CS ไปลดการแสดงออกของ JUN TNF และ IL6 นั้นลดลงหลังจากกลุ่มยีนเหล่านี้มีแนวโน้มการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหลังจากที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนการอักเสบด้วย LPS ในเครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนการอักเสบนั้นพบว่าการแสดงออกของยีน Stat3 และ Cd14 นั้นมีการแสดงออกที่ลดลงแต่การที่ออกที่ลดลงนั้นอาจจะยังไม่เห็นชัดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้น 4CS มีผลต่อการแสดงออกของยีน Stat3 และ Cd14 และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเช่นเดียวกันกับเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกยีนการอักเสบคือมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน IL6 และโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารออกฤทธิ์ 4-component-system จากสมุนไพร Hypericum perforatum สามารถต้านการอักเสบได้

ชุดข้อมูล GSE9632 ได้ทำการการแสดงออกของยีนการอักเสบและทำการทดสอบสารออกฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารสกัด 3 ชนิด ได้แก่ albiflorin, paeoniflorin และ paeonol จากรากของต้นโบทัน (paeony) ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml ตามลำดับ พบว่าเมื่อทดสอบกับเครือข่ายต้นแบบนั้นเครือข่ายแรกคือเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกยีนการอักเสบนั้นรายชื่อในชุดข้อมูล GSE9632 ไม่ตรงกับเครือข่ายควบคุมการแสดงออกต้นแบบซึ่งในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงของเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกการอักเสบนั้นค่อนข้างที่จะมีขนาดเล็กและในการคัดเลือกโดยโปรแกรม jactive module คัดเลือกเครือข่ายที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดช่วงเวลานั้นๆ จึงเป็นไปได้ว่ายีนไม่พบในเครือข่าย เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีนการอักเสบกับสารออกฤทธิ์ albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 ug/ml ตามลำดับ จะเห็นว่าจากผลการวิเคราะห์นั้นสารออกฤทธิ์ albiflorin ในปริมาณที่ 10 และ 100 ug/ml สามารถต้านการอักเสบได้ดีกว่าที่ 1 ug/ml ซึ่งให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ albiflorin สามารถที่จะยับยั้งการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพจะอยู่ในปริมาณที่ 10 และ 100 ug/ml สารออกฤทธิ์ paeoniflorin เมื่อทดสอบกับเครือข่ายต้นแบบพบว่าในปริมาณ 1 ug/ml นั้นลดการแสดงออกของยีนอักเสบได้ และลดการแสดงออกของยีนอักเสบได้ดีใน 10 ug/ml แต่สามารถลดได้น้อยลงในปริมาณที่ 100 ug/ml ซึ่งให้เห็นว่า paeoniflorin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและสามารถต้านการออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วง 10 ug/ml สารออกฤทธิ์ paeonol สามารถลดการแสดงออกการอักเสบได้ดีใน 1 ug/ml เมื่อเทียบกับปริมาณ 10 และ 100 ug/ml ซึ่งให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการต้านการออกฤทธิ์ของสาร paeonol นั้นจะอยู่ที่ 1 ug/ml และเมื่อเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์อาจจะก่อให้เกิดการอักเสบที่เพิ่มขึ้น ในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกระหว่างโปรตีนเมื่อถูกทดสอบการต้านการออกฤทธิ์ของสาร albiflorin paeoniflorin และ paeonol โดยภาพรวมเช่นเดียวกันกับเครือข่ายการ

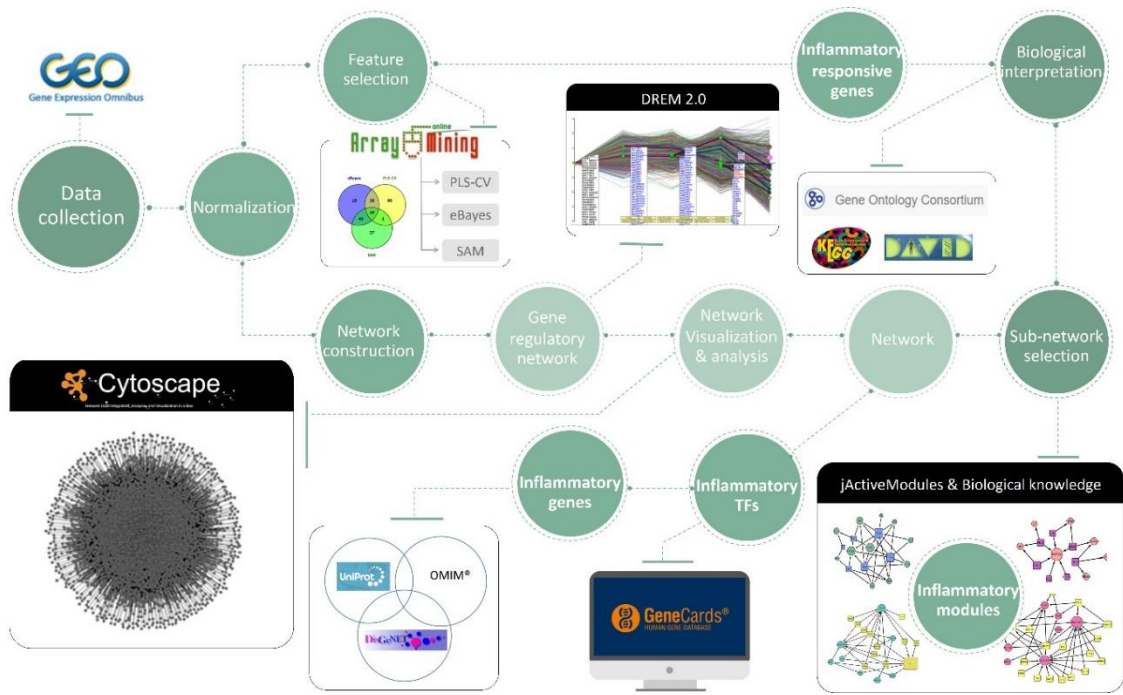
แสดงออกยีนการอักเสบในเรื่องของการต้านการอักเสบที่ปริมาณเท่าไร? ดังนั้นสรุปคือ ในการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์ albiflorin ที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือ 10 และ 100 ug/ml ในสารออกฤทธิ์ paeoniflorin สามารถต้านการอักเสบได้ดีในปริมาณที่ 10 ug/ml และสารออกฤทธิ์ paeonol สามารถต้านการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพจะอยู่ที่ 1 ug/ml ดังนั้นจะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์นั้นไม่ได้สามารถต้านการอักเสบได้ดีเสมอไป แต่ว่าการที่สารออกฤทธิ์ที่มีมากเกินไปนั้นอาจจะก่อให้เกิดการอักเสบที่เพิ่มขึ้นได้ในสารออกฤทธิ์ ผลการต้านการอักเสบนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารออกฤทธิ์และปริมาณของสารออกฤทธิ์ถึงแม้ว่าจะมาจากพืชชนิดเดียวกับผลการยับยั้งการอักเสบก็แตกต่างกัน

ในชุดข้อมูล GSE21320 นั้นสามารถวิเคราะห์ได้แค่เพียงเครือข่ายการแสดงออกยีนการอักเสบเท่านั้นเนื่องจากด้วยขนาดของข้อมูลชุดนี้นั้นมีขนาดเล็กประมาณ 211 ยีนทำให้การค้นหาในเครือข่ายการควบคุมการแสดงและเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกของโปรตีนนั้นไม่พบด้วยที่ตัวเครือข่ายต้นแบบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมงนั้นค่อนข้างที่จะเล็กและการคัดเลือกโมดูลต้นถูกเลือกมาจากการแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนยีนที่มีการแสดงออกที่โดดเด่นในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงทำให้ไม่พบ ในเครือข่ายการแสดงออกยีนพบเพียง 4 ตัวที่ตรงกันกับชุดข้อมูล ซึ่งผลจากการวิเคราะห์จะเห็นว่าสารออกฤทธิ์ EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) ที่ได้จากชาเขียวที่เวลา 6 ชั่วโมงสามารถที่จะไปลดการแสดงออกของยีน C3, Mapk14, Spp1 และ Tnfrsf1a ได้ ซึ่งยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งให้เห็นว่า EGCG มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ การนำกระบวนการทางชีวสารสนเทศโดยใช้เครือข่ายทั้ง 3 เครือข่ายมาช่วยค้นหากระบวนการวิเคราะห์กลไกการตอบสนองการอักเสบพบว่าทั้ง 3 เครือข่ายสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หรืออธิบายกลไกการเกิดการตอบสนองการอักเสบได้ แต่พบว่าในเครือข่ายการแสดงออกยีนและเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจะช่วยในการอธิบายได้ดีกว่า

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

1. จากการตรวจสอบขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยอาศัยวิธีการ เครื่องมือ และฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง ทำให้ได้กระบวนการทางชีวสารสนเทศที่ประกอบไปด้วย การจัดเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีน การคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญ การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน ที่ประกอบไปด้วย เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีน เครือข่ายการแสดงออกยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน การคัดเลือกเครือข่ายย่อย และการบูรณาการเครือข่ายกับข้อมูลทางชีวภาพ แสดงดังภาพที่ 5-1
2. จากกระบวนการข้างต้นทำให้ได้เครือข่ายย่อยซึ่งมีกลุ่มยีนที่มีบทบาทและความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบที่สามารถนำมาใช้เป็นโมเดลต้นแบบเพื่อช่วยตัดสินใจในการศึกษาและอธิบายกลไกการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรไทยที่สำคัญในอนาคต และเป็นตัวเลือกสำหรับการตรวจสอบผลในระดับห้องปฏิบัติการต่อไปได้





ภาพที่ 5-1 ภาพแสดงขั้นตอนทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยอาศัยวิธีการ เครื่องมือ และฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากเป็นโครงการวิจัยที่ต้องใช้เวลากับการทดสอบและทำความเข้าใจหลักการพื้นฐานของเครื่องมือและกระบวนการทางชีวสารสนเทศซึ่งไม่มีสอนในรายวิชาปกติของนิสิตระดับปริญญาตรี ทำให้เป็นข้อจำกัดของพื้นฐานความรู้ของนิสิตที่เข้าร่วมการทำวิจัยที่ส่วนใหญ่เป็นนิสิตระดับปริญญาตรี ทำให้มีปัญหาในการทำความเข้าใจและการใช้งานเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ ดังนั้นโครงการวิจัยแบบนี้จึงเหมาะสมกับนิสิตหรือนักศึกษาในระดับปริญญาโทและปริญญาเอกมากกว่า เพราะต้องการทักษะและความเชี่ยวชาญที่สูงกว่าระดับปริญญาตรี แต่ถึงแม้จะมีนิสิตระดับปริญญาโทมาร่วมทำวิจัยก็พบข้อจำกัดเรื่องของความใส่ใจและเวลา รวมถึงการสืบค้นองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องของนิสิตที่มีให้กับการทำงานวิจัย
2. เนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลการแสดงออกของยีนที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูลมีเป็นจำนวนน้อย ไม่มากพอที่จะสามารถสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่มีความน่าเชื่อถือ และครอบคลุมการตอบสนองในแต่ละช่วงเวลาได้มากกว่าที่เคยทำมา ทำให้โครงการวิจัยยังคงมีปัญหาในเรื่องของการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่สร้างจากข้อมูลจำนวน เพียง 3 ชุดข้อมูล และ 4 ช่วงเวลา และยังขาดกระบวนการคัดเลือกเครื่องมือการสร้างเครือข่ายทำให้ไม่ทราบแน่ชัดว่าเครือข่ายที่สร้างได้มีความเหมาะสมเพียงพอหรือไม่ รวมถึงปัญหาของการบูรณาการเครือข่ายและการแปลผลเครือข่ายย่อยกับข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรอันเนื่องมาจากข้อจำกัดของจำนวนข้อมูลการแสดงออกที่สืบค้นได้จากข้างต้น

## 5.4 ผลผลิต (Output)

การนำเสนอเป็นโปสเตอร์ บทความย่อ รายงานสืบเนื่องการประชุม ผ่านการประชุมวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ ดังนี้

1. Nuchсила, T., Srisook, K. and Soonanan, P. (2018). Gene regulatory network analysis of inflammation from microarray data in LPS-stimulated macrophages. The 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2018). November 22-23, 2018 Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand. MBB-P-05: page 1 – 11. (ภาคผนวก ก)
2. รัชดา คงพรศิริ และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2561). เครื่องมือทางชีวสารสนเทศสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์. การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์ ครั้งที่ 10, วันที่ 1 มิถุนายน 2561. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ. หน้า 8 – 12. (ภาคผนวก ข1)
3. รุ่งทิวา สุตถิน และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2561). เวิร์กโฟลว์ของการทำเหมืองข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศของการตอบสนองต่อการอักเสบในข้อมูลไมโครอาร์เรย์. การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์ ครั้งที่ 10, วันที่ 1 มิถุนายน 2561. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ. หน้า 13 – 17. (ภาคผนวก ข2)

## เอกสารอ้างอิง

- Achek, A., Yesudhas, D., & Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of pharmacal research*, 39(8), 1032-1049.
- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M. (2004). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*. 32: D115-D119.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 146:495–504.
- Chatr-Aryamontri, A., Breitkreutz, B.J., Heinicke, S., Boucher, L., Winter, A., Stark, C., Nixon, J., Ramage, L., Kolas, N., O'Donnell, L., Reguly, T., Breitkreutz, A., Sellam, A., Chen, D., Chang, C., Rust, J.M., Livstone, M.S., Oughtred, R., Dolinski, K., Tyers, M. 2012. The BioGRID Interaction Database: (2013) update. *Nucleic Acids Research*, (Database issue): D816-23. doi: 10.1093/nar/gks1158.
- Chen, B-S., Yang, S-K., Lan, C-Y., Chuang, Y-J. (2008). A systems biology approach to construct the gene regulatory network of systemic inflammation via microarray and databases mining. *BMC Medical Genomics*, 1:46, doi:10.1186/1755-8794-1-46.
- Cheng, D., Knox, C., Young, N., Stotharc, P., Damaraju, S., Wishart, D.S. (2008). PolySearch: a web-based text mining system for extracting relationships between human diseases, genes, mutations, drugs and metabolites. *Nucleic Acids Research*, 36 (Web Server issue): W399–W405. Doi:10.1093/nar/gkn296.
- Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinshy, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., Hanspers, K., Isserlin, R., Kelley, R., Killcoyne, S., Lotia, S., Maere, S., Morris, J., Ono, K., Pavlovic, V., Pico, A.R., Vailaya, A., Wang, P-L., Adler, A., Conklin, B.R., Hood, L., Kuiper, M., Sander, C., Schmulevich, I., Schwikowski, B., Warner, G.J., Ideker, T., Bader, G.D. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nature Protocols*, 2(10):2366–2382.
- Comer, J.E., Galindo, C.L., Zhang, F., Wenglikowski, A.M., Bush, K.L., Garner, H.R., Peterson, J.W., Chopra, A.K. (2006). Murine macrophage transcriptional and functional responses to *Bacillus anthracis* edema toxin. *Microbial Pathogenesis*, 41(2–3):96–110.
- de Mejia, E.G., Dia, V.P. (2009). Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- $\kappa$ B pathway in the macrophage. *Peptides*, 30:2388–2398.

- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30: 207–210.
- Foster, S.L., Medzhitov, R. (2009). Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*, 130:7–15.
- Fukuchi, S., Homma, K., Minezaki, Y., Gojobori, T., Nishikawa, K. (2009). Development of an accurate classification system of proteins into structured and unstructured regions that uncovers novel structural domains its application to human transcription factors. *BMC Structural Biology*. 9: 26-35.
- Glaab E, Garibaldi JM, Krasnogor N. (2009). ArrayMining: a modular web-application for microarray analysis combining ensemble and consensus methods with cross-study normalization. *BMC bioinformatics*. 10: 358.
- Hall, M.A. (2000). Correlation-based feature selection for discrete and numeric class machine learning. *Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning*, Stanford University, Stanford, United States of America.
- Hammer K. D, Yum MY, Dixon PM, Birt DF. (2010). Identification of JAK–STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a *Hypericum perforatum* fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*. 71: 716-725.
- Harrison, D. A. (2012). The jak/stat pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3), a011205.
- Hong Byun E., Fujimura Y., Yamada K., and Tachibana H. (2010). TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *The Journal of Immunology*. 185(1):33-45.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1): 44–57.
- Huang, H., Park, C. K., Ryu, J. Y., Chang, E. J., Lee, Y., Kang, S. S., & Kim, H. H. (2006). Expression profiling of lipopolysaccharide target genes in RAW264.7 cells by oligonucleotide microarray analyses. *Archives of pharmacal research*, 29(10), 890-897.
- Huang, X., Dai, Z., Cai, L., Sun, K., Cho, J., Albertine, K. H., Malik, A.B., Schraufnagel, D.E., & Zhao, Y. Y. (2016). Endothelial p110 $\beta$ PI3K mediates endothelial regeneration and vascular repair after inflammatory vascular injury. *Circulation*, 133(11), 1093-1103.
- Ideker, T., Ozier, O., Schwikowski, B., Siegel, A.F. (2002). Discovering regulatory and signaling circuits in molecular interaction networks. *Bioinformatics*, 18 Suppl. 1: S233–S240.

- Kanamori, M., Konno, H., Osato, N., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Suzuki, H. (2004). A genome-wide and nonredundant mouse transcription factor database. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322:787–793.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M., Hirakawa, M. (2010). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 38:D355–D360.
- Karin, M., Lawrence, T., Nizet, V. (2006). Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124(4):823–835.
- Kitano, H., 2002. Systems Biology: A Brief Overview. *Science*, 296 (5560): 1662–1664.
- Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 21(16): 3448–3449.
- Mages, J., Dietrich, H., Lang R. (2008). A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology*, 212:723–737.
- McKusick VA. (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *American journal of human genetics*. 80: 588.
- Medzhitov R, Horg T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews Immunology*. 9: 692-703.
- Mequanint, W., Makonnen, E., Urga, K. (2011). In vivo anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamiifolium* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 134:32–36.
- Merico D, Gfeller D, Bader GD. (2009). How to visually interpret biological data using networks. *Nature biotechnology*. 27: 921.
- Miller, M.B., Tang, Y.-W. (2009). Basic concepts of microarray and potential applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4): 611–633.
- Nan, J., Wang, Y., Yang, J., & Stark, G. R. (2018). IRF9 and unphosphorylated STAT2 cooperate with NF- $\kappa$ B to drive IL6 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), 3906-3911.
- Ng, A., Bursteinas, B., Gao, Q., Mollison, E. Zvelebil, M. (2006). pSTING: a ‘systems’ approach towards integrating signalling pathways, interaction and transcriptional regulatory networks in inflammation and cancer. *Nucleic Acids Research*, 34: D527–D534.
- Nilsson, R., Bajic, V.B., Suzuki, H., di Bernardo, D., Björkegren, J., Katayama, S., Reid, J.F., Sweet, M.J., Cariboldi, M., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Hume, D.A., Tegner, J., Ravasi, T.

- (2006). Transcriptional network dynamics in macrophage activation. *Genomics*, 88:133–142.
- Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., ... & Nakajima, H. (2005). Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12621-12629.
- Piñero J, Queralt-Rosinach N, Bravo À, Deu-Pons J, Bauer-Mehren A, Baron M, Sanz F, L. Furlong I. (2015). DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database*. 2015.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., Ninko, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15:261–267.
- Ravasi, T., C. A. Wells & D. A. Hume (2007). Systems biology of transcription control in macrophages. *Bioessays*. 29: 1215-1226.
- Rutledge, H.R., Jiang, W., Yang, J., Wang, L.A., Schwartz, D.A., Pisetsky, D.S., Yang, I.V. (2012). Gene expression profiles of RAW264.7 macrophages stimulated with preparations of LPS differing in isolation and purity. *Innate Immunity*, 18 : 80 , doi:10.1177/1753425910393540.
- Safran M1, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, Nativ N, Bahir I, Doniger T, Krug H, Sirota-Madi A, Olender T, Golan Y, Stelzer G, Harel A, Lancet D. (2010). GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)*. doi: 10.1093/database/baq020.
- Saito, R., Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P-L., Lotia, S., Pico, A.R., Bader, G.D., Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods*, 9(11):1069–1076.
- Schendure, J., Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10): 1135–1145.
- Schott, J., Reitter, S., Philipp, J., Haneke, K., Schäfer, H., Stoecklin, G. (2014). Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation. *PLoS Genetics*, 10(6): e1004368. Doi:10.1371/journal.pgen.1004368.
- Schulz, M.H., Devanny, W.E., Gitter, A., Zhong, S., Ernst, J., Joseph, Z.B. (2012). DREM 2.0: improved reconstruction of dynamic regulatory networks from time-series expression data. *BMC Systems Biology*. 6: 104.

- Sharif-Askari, E., Vassen, L., Kosan, C., Khandanpour, C., Gaudreau, M. C., Heyd, F., ... & Zeng, H. (2010). Zinc finger protein Gfi1 controls the endotoxin-mediated Toll-like receptor inflammatory response by antagonizing NF- $\kappa$ B p65. *Molecular and cellular biology*, 30(16), 3929-3942.
- Shell, S.A., Hesse, C., Morris, S.M.Jr, Milcarek, C. (2005). Elevated levels of the 64-kDa cleavage stimulatory factor (CstF-64) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages influence gene expression and induce alternative poly(A) site selection. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48): 39950–39961.
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3): 385-405.
- Simon, R., Lam, A., Li, M-C., Ngan, M., Menezes, S., Zhao, Y. (2007). Analysis of gene expression data using BRB-Array tools. *Cancer Informatics*, 3:11–17.
- Skinner, J., Kotliarov, Y., Varma, S., Mine, K.L., Yambartsev, A., Simon, R., Huyen, Y., Morgun, A. (2011). Construct and compare gene coexpression networks with DAPfinder and DAPview. *BMC Bioinformatics*, 12:286.
- Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Application in Genetics and Molecular Biology*. (3): 1027-1030.
- Sorci, G., & Faivre, B. (2009). Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1513): 71-83.
- Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(23):4077–4081.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L.J., & von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362-D368.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(9): 5116–5121.
- Uto, T., Qin, G., Morinaga, O., Shoyama, Y. (2012). 17-Hydroxy-jolkinolide B, a diterpenoid from *Euphorbia fischeriana*, inhibits inflammatory mediators but activates heme oxygenase-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 12:101–109.

- Weintz, G., Olsen, J.V., Frühauf, K., Niedzielska, M., Amit, I., Jantsch, J., Mages, J., Frech, C., Dölken, L., Mann, M., Lang, R. (2010). The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophages. *Molecular Systems Biology*, 6:371, doi:10.1038/msb.2010.29.
- Xu, P., & Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell*, 37(4), 551-566.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4), 868-880.
- Zarubin, T., & Jiahuai, H. A. N. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research*, 15(1), 11.
- Zhang, J., Lu, K., Xiang, Y., Islam, M., Kotian, S., Kais, Z., Lee, C., Arora, M., Liu, H-W., Parvin, J.D., Huang, K. (2012). Weighted frequent gene co-expression network mining to identify genes involved in genome stability. *PLoS Computational Biology*, 8(8):e1002656, doi:10.1371/journal.pcbi.1002656.
- Zheng, G., Tu, K., Yang, Q., Xiong, Y., Wei, C., Xie, L., Zhu, Y., Li, Y. (2008). ITFP: an integrated platform of mammalian transcription factors. *Bioinformatics*, 24(20):2416–2417.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

นำเสนอรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

The 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and  
International Conference 2018 (TSB2018).

22 – 23 November 2018, Bangkok, Thailand.

Nuchsil, T., Srisook, K. and Soonanan, P. (2018). Gene regulatory network analysis of inflammation from microarray data in LPS-stimulated macrophages. The 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2018). November 22-23, 2018 Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand. MBB-P-05: page 1 – 11.

MBB-P-05

**Gene regulatory network analysis of inflammation from microarray data in LPS-stimulated macrophages**

Thitirat Nuchsil<sup>1</sup>, Klaokwan Srisook<sup>2</sup> and Pitak Sootanan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Biological Science Graduate Programs, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

\*Email: pitak@buu.ac.th

**ABSTRACT**

Inflammation is a component of tissue repair and in stimulating gene expression. Gene expression for tens of thousands of genes simultaneously under favorable conditions using microarray technology enhances systematic understanding of the biochemical mechanism of inflammation. At present, databases and tools for a bioinformatics approach are abundant and facilitate the mechanism of inflammation. In this study, inflammation from microarray data in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage was analyzed with gene regulatory network analysis. Inflammatory modules of 4 time points of LPS-stimulated macrophage microarray data were selected for interpretation of their biological function. The process of the NF-kappaB pathway was differentially expressed at 3 and 6 hours. At 8 and 18 hours, all major pathways of inflammation occurred. This suggests that gene regulatory network analysis of microarray data can help to explain the mechanism of inflammation in LPS-stimulated macrophages.

**KEYWORDS:** Gene regulatory network analysis, Microarray data; Inflammation; LPS-stimulated macrophages

## INTRODUCTION

Inflammation is a physiological response to injury, an invasion by specific harmful microorganisms and their subsequent elimination by macrophages in the body. Inflammation occurs when the macrophages, dendritic cell, neutrophils ingest bacteria and release cell wall proteins such as lipopolysaccharide (LPS). These stimulate the immune system to secrete chemical mediators such as nitric oxide (NO), prostaglandins E2 (PGE2) and leukotriene that inhibit harmful microorganism. However, when excessive, tissue damage can occur, resulting in abnormal functions, disease or death. Regulation of the cellular inflammatory response is therefore essential (Acheke, 2016) to control the expression of inflammatory genes. The present study using current microarray technology measured the expression of all genes in the cell genome. These measurements will yield information on the amount of mRNA in all genes at the same time (Bumgarner, 2013). Inflammatory response experiments actually used a RAW 264.7 macrophage cell line that was stimulated with LPS as a model for the anti-inflammatory activity of natural agents.

At present, gene expression assays of inflammatory studies in LPS-stimulated macrophage RAW 264.7 at different times in 3, 6, 8 and 18 hours can be downloaded (Comer et al., 2006; Shell et al., 2009; Hammer et al., 2010) from GEO (Gene Expression Omnibus) (Edgar et al., 2002). This can be used as basic information for surveying biological systemic response. Biological networks are useful for analyzing and visualizing complex activities to describe interactions among systematic units. With increasing data and bioinformatics programs processing data and program selection is important for good translation. Mechanisms involved in inflammatory response in LPS-stimulated macrophage RAW 264.7 cells is important to better understand inflammatory diseases. It is based on tracking and measuring gene expression under study conditions to determine interactions between among molecules within the system. This can be done by searching for genes with markedly different expressions through online data mining tools (Glaab et al., 2009). Gene regulatory networks of transcriptional data related to inflammatory response were constructed and analyzed (Chen et al., 2008; Weintz, 2010) from gene expression data. The function of these member genes in selected sub-networks in each stimulated time were interpreted with the gene ontologies database technology (Huang et al., 2009).

This study explained inflammatory response mechanisms using gene regulatory network analysis in microarray gene expression data. Inflammatory modules were selected for easier interpretation and explanation of time-based inflammatory response mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Data Collection and Preparation

The inflammatory response mechanism of LPS-stimulated RAW264.7 macrophages in 3, 6, 8 and 18 hours were analyzed. Microarray gene expression data in previous conditions were retrieved from the GEO Public Database (Edgar et al. 2002) including GSE4712 (Comer et al., 2006), GSE21841 (Hammer et al., 2010) and GSE2002 (Shell et al., 2005). Only unstimulated samples and those were stimulated with LPS were selected for further analysis. Data set are in the form of a series matrix that contains the expression value of the probes and have already pre-processed, which were normalized to calibrate the data by using log<sub>2</sub> and z-score.

### 2.2 Feature Selection of Inflammatory Responsive Genes

Selection methods in Array Mining (Glaab et al., 2009) used in this study included SAM, a statistical method to detect altered expression genes from microarray genes and nonparametric statistics to analyze microarray data with small numbers but a large number of genes (Tusher et al., 2001). eBayes is a method used to test t-test statistics (Smyth, 2004). Genes were selected with PLS-CV by analyzing their coefficients from the training data (Hall, 2000). Subsequently, inflammatory responsive genes were selected from at least two of three methods to confirm they were differentially expressed.

### 2.3 Gene Regulatory Network Analysis

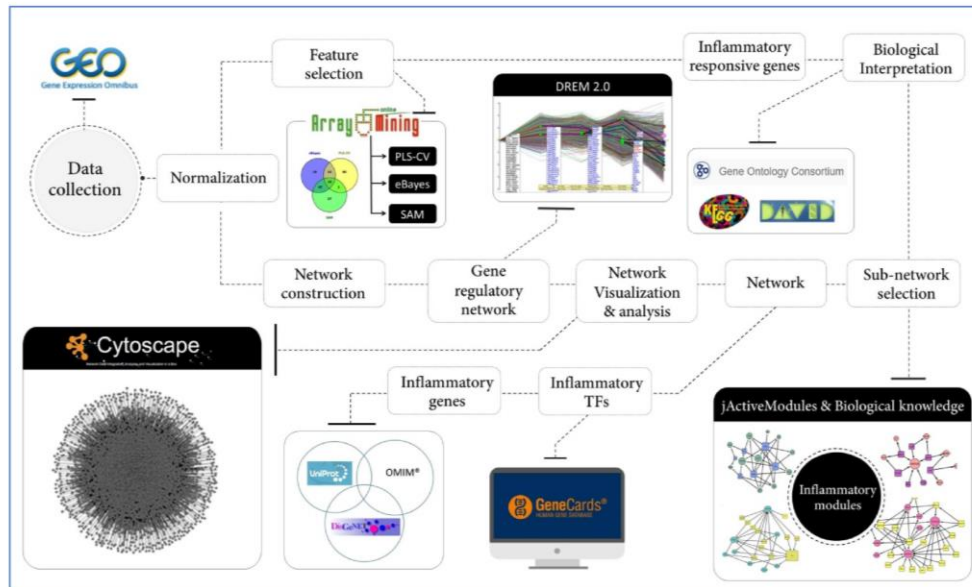
Normalized microarray data sets were constructed as gene regulatory network by DREM (Schulz et al., 2012) and then visualized and analyzed by the Cytoscape program (Shannon et al., 2003). A mouse (*Mus musculus*) model was selected as it is the origin of macrophage RAW264.7 cell (Ernst et al., 2010). This data consists of 335 transcription factors, 16,640 target genes, and 468,319 interactions between transcriptional factors and target genes.

### 2.4 Searching for Inflammatory Genes and Modules

The list of inflammatory genes was derived from three databases, including the OMIM database (McKusick et al., 2007), DisGeNET (Piñero et al., 2015), and UniProt (Apweiler et al., 2004). Transcription factor (TF) data were retrieved from GeneCards® Database (Rebhan, 1998). 331 inflammatory TFs, 335 inflammatory genes were used to select inflammatory TFs from the previous TF data. There was The Cytoscape plug-in jActiveModules (Ideker, 2002), biological knowledge such as inflammatory genes and TFs data were applied to select sub-networks or modules involved in inflammation that response in each time for interpretation their biological function.

## 2.5 Biological Interpretation

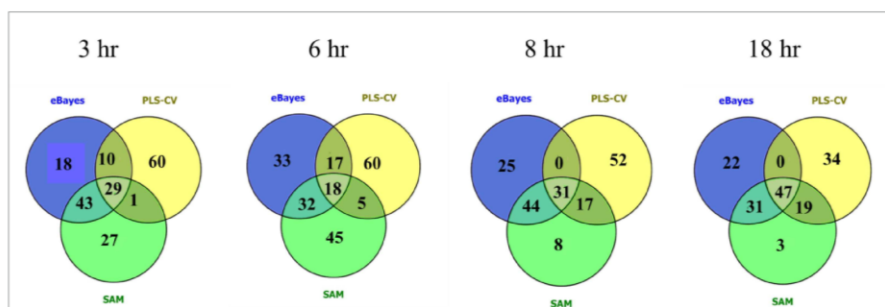
Biological functions of inflammatory modules were interpreted using public database online tool DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang et al., 2009).



**Figure 1** Research overview.

## RESULTS AND DISCUSSION

The three different feature selection approaches in online data mining tools ArrayMining (Glaab et al., 2009) were used to select inflammatory responsive genes. Figure 2 shows the number of inflammatory responsive genes that were selected at least two different methods from three methods. There were 83, 72, 92 and 97 inflammatory genes time that macrophages were stimulated by LPS at 3, 6, 8 and 18 hours, respectively. Inflammatory responsive genes were selected at least two out of three methods to confirm reliability because the analysis process of each method is different statistical approaches.

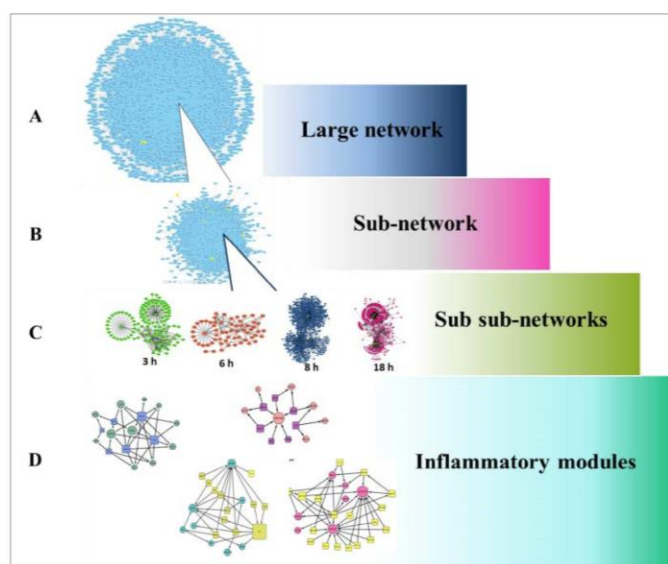


**Figure 2** The number of selected inflammatory responsive genes by SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), and PLS-CV (Hall, 2000) in the 3, 6, 8, and 18 hours.

The large network included 10,364 genes and 325,358 interactions (DREM, Figure 3A) and visualized the network in Cytoscape (Shannon, 2003). The sub-network selected with 311 inflammatory TFs is illustrated in Figure 3B and the sub sub-networks in Figure 3C. The latter were inflammatory responsive genes from feature selection at 3, 6, 8 and 18 hours. These inflammatory networks have a total of 7,308 genes and 32,986 interactions. At 3, 6, 8 and 18 hours, there were 125 genes and 192 interactions, 62 genes and 91 interactions, 948 genes and 1,449 interactions and 417 genes and 888 interactions, respectively. At 8 and 18 hours, numbers of inflammatory responsive genes and their interactions were both high. Pointed out that when the time increases, the response of the gene expression is accumulate increased, if observed from the results of inflammatory response from the time of this report were analyzed. It is possible that this process is within the range of amplification or transmission of signals by internal and external cellular factors. But the innate immune system is still responding quickly to infection. Macrophages provide an early response to injurious factors in an effort to contain and eliminate harmful stimuli (Sherwood, 2004; Sorci and Faivre, 2009).

Inflammatory modules with the same or similar gene hubs perhaps indicating the same biological function (Figure 4, 5) were selected for biological interpretation. Gene ontology in Biological Process (BP) was applied for interpretation using DAVID program (Huang, 2009). At 3 hours (Figure 4A), genes in the inflammatory module involved in the cellular response to lipopolysaccharide; interleukin-6-mediated signaling pathway; positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; and positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter at nucleus, nucleoplasm, cytoplasm. It is responsible for transcriptional activator activity; RNA polymerase II core promoter; proximal region sequence-specific binding; chromatin DNA binding; and zinc ion binding. These indicate that most of their functions are related to the biological

mechanisms to transfer signaling information from foreign substances into the cell such as toll-like receptor signaling pathway (Achek, 2016).



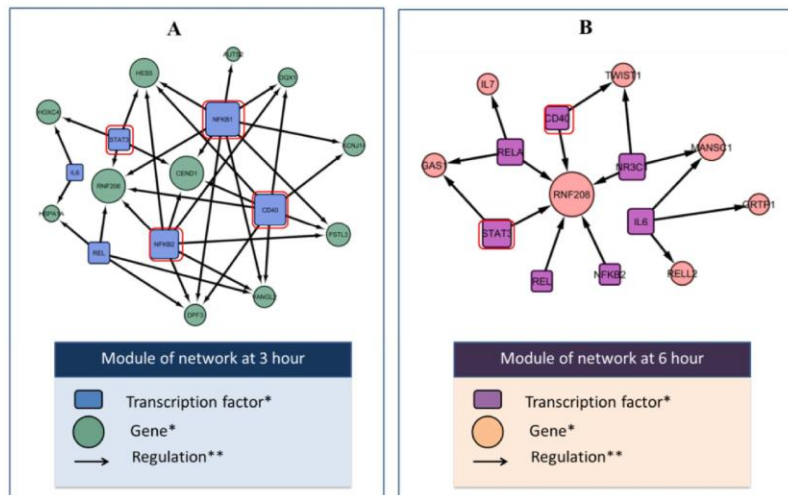
**Figure 3** (A) Large network is gene regulatory network and it was constructed normalized microarray data sets from DREM, (B) sub-networks are involved in regulatory expression of inflammatory genes, (C) sub sub-networks were selected by inflammatory responsive genes in each stimulated time include 3, 6, 8 and 18 hours and (D) inflammatory modules were selected by JActiveModules, biological knowledge and stimulated time include 3, 6, 8 and 18 hours.

Genes in the inflammatory module at 6 hours (Figure 4B) are related to regulation of the adaptive immune response; positive regulation of lymphocyte activation, positive regulation of leukocyte activation; positive regulation of nucleobase; wound healing; cell migration and response to molecule of bacterial origin at extracellular region; plasma membrane, integral to membrane and intrinsic to membrane and have a duty in enzyme binding; transcription factor activity; and RNA polymerase II transcription factor activity. Results indicate that those genes are associated with the inflammatory mechanism of pathways in chemokine signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interaction and toll-like receptor signaling pathway (Achek, 2016). Three main pathways, NF-kappaB, MAPK, and JAK-STAT, play major roles in inflammation. We found *NFKB1* and *NFKB2* to be highly interactive (Figure 4A and 4B). It is possible that during 3 and 6 hours, the signaling process of



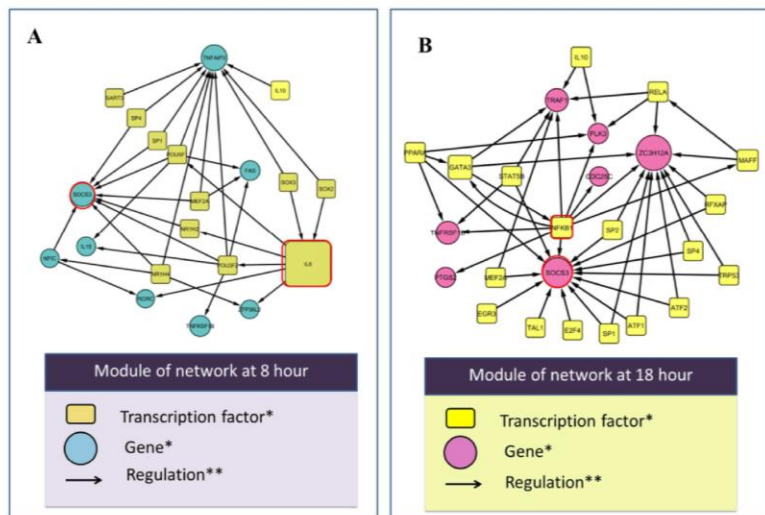
the NF-kappaB pathway is very important because of the small time that macroscopic cells are stimulated with LPS to eliminate the incoming foreign substances (Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

NF-kappaB transcription factors are precious players in a complicated system that allows cells to adapt and respond to environmental changes for survival. *CD40*, *STAT3*, *IL6* are transcription factors found in two inflammatory modules that regulate expression of mutual target genes. Because of CD40 ligand relies on *IKK $\alpha$*  is consistent with non-canonical signaling to NF-kappaB, specific members of the TNF cytokine family. *IKK $\alpha$*  requires activation of NIK (NF-kappaB-inducing kinase), which is responsible for stimulating *IKK $\alpha$* -activating kinase and scaffold linking *IKK $\alpha$*  and p100 (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). *STAT3* protein is a part of the immune system involved in the regulation of infection through the self-destruction of cells (apoptosis) and if severe inflammation, it may cause several chronic diseases and in this response correspond to pathways to cancer (Sherwood, 2004).



**Figure 4** Module A and B represent the sub-module at 3 and 6 hours, respectively. The rectangular and rounded nodes are TF and the target gene. Arrow means regulation of gene expression and the size of the node depends on the expression value of gene. Module A has 6 TFs consist *NFKB1* (NF-kappaB1), *NFKB2* (NF-kappaB2), *CD40*, *IL6*, *REL* and *STAT3*. Module B has 7 TFs include *STAT3*, *RELA*, *CD40*, *REL*, *NFKB2* (NF-kappaB2), *IL6* and *NR3C*. \*nodes->genes, \*\*edges->interactions

In Figure 5A, genes in the module at 8 hours were involved in transcription activity and sequence-specific DNA binding; DNA- template, regulation of MAPK cascade; response to wounding at nucleus, cytosol and nucleoplasm. Genes in the module at 18 hours (Figure 5B) were active in inflammation; transcription; DNA-template; positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; NIK/NF-kappaB signaling; responding to cytokine; cellular response to lipopolysaccharide; platelet formation; negative regulation of apoptotic process; cellular response to tumor necrosis factor at I-kappaB/NF-kappaB complex, nucleoplasm; cytoplasm and transcription factor activity; sequence-specific DNA binding; RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific binding; and regulatory region DNA binding. Genes in 8 and 18 hours inflammatory modules indicate the mechanism of inflammatory pathways such as Jak-STAT signaling pathway; NF-kappaB signaling pathway; Apoptosis; Transcriptional mis-regulation in cancer; T cell receptor signaling pathway; and MAPK signaling pathway and that transfer signaling between macrophages and the other cells through, for example; SOCS3 protein (Tanaka et al., 2014).



**Figure 5** Module A and B represent the sub-module at 8 and 18 hours, respectively. The rectangular and rounded nodes are TF and the target gene. Arrow means regulation of gene expression and the size of the node depends on the expression value of gene. Module A has 12 TFs, *IL6* affects the expression of *SOCS3* expression by controlling the expression of *NRIH2*, *POU5F* and *POU3F2* TFs. Module B has 18 TFs, *NFKB1* affects the expression *SOCS3*. \*nodes->genes, \*\*edges->interactions

In Figure 5A and B, we found *IL6* and *SOCS3* are hub nodes with high interaction. It is possible that these nodes are critical to inflammation at 8 hours. *SOCS3* was found in both modules, indicating *SOCS3* gene plays a role in inflammation and it is a gene with interconnected hubs at other high nodes. *SOCS3* expressed as a SOCS3 protein and is classified as a STAT-induced STAT inhibitor (SSI), and as a suppressor of cytokine signaling (SOCS) and to function as cytokine-inducible negative regulators of cytokine signaling. SOCS3 is induced when stimulated by LPS, IL-1, IL-6, IL-11 and IL-10. It also plays an important role in inhibiting TAK1 stimulation via NF-kappaB and MAPK pathways. TBK1 stimulates the action of transcription factor IRFs. The *SOCS3* gene regulates the activity of Janus kinase (JAK) activation and is bound to the JAK-proximal sites on the cytokine receptor (Liu et al., 2015). IL-6 is a cytokine with pleiotropic activity that induces synthesis of acute phase proteins such as fibrinogen that causes blood vessels to occlude and blood to clot. From resulting, it is possible that the 8 and 18 hours period is the time of elimination of the foreign matter and there is a period of tissue injury treatment (Tanaka et al., 2014).

## CONCLUSION

In summary, inflammatory mechanism in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage from microarray data was analyzed with gene regulatory network analysis. Inflammatory modules of 4 time points of LPS-stimulated macrophage microarray data were selected for interpretation of their biological function. The process of the NF-kappaB pathway was differentially expressed at 3 and 6 hours. We found *NFKB1* and *NFKB2* that are genes expressed to transcription factors to be the hubs of these networks. At 8 and 18 hours, all major pathways for elimination of foreign matter and tissue injury treatment of inflammation occurred. This suggests that gene regulatory network analysis of microarray data can help to explain the mechanism of inflammation in LPS-stimulated macrophages.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Burapha University through its research grant number 98/2560. We are grateful to Prof. Dr. Frederick W.H. Beamish for proof reading our manuscript and Miss Jarinee Kongtrub for our beautiful pictures.

## REFERENCES

- Achek, A., Yesudhas, D. & Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of pharmacal research*, 39(8): 1032-1049.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., & Magrane, M. (2004). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_1): D115-D119.

- Bumgarner, R. (2013). DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Current Protocols in Molecular Biology*, doi:10.1002/0471142727.mb2201s101.
- Chen, B. S., Yang, S. K., Lan, C. Y., & Chuang, Y. J. (2008). A systems biology approach to construct the gene regulatory network of systemic inflammation via microarray and databases mining. *BMC Medical Genomics*, 1(1): 46.
- Comer, J. E., Galindo, C. L., Zhang, F., Wenglikowski, A. M., Bush, K. L., Garner, H. R., Peterson, J. W., & Chopra, A. K. (2006). Murine macrophage transcriptional and functional responses to Bacillus anthracis edema toxin. *Microbial pathogenesis*, 41(2-3): 96-110.
- Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, 30(1): 207-210.
- Fronczuk, M., Raftery, A. E., & Yeung, K. Y. (2015). CyNetworkBMA: a Cytoscape app for inferring gene regulatory networks. *Source code for biology and medicine*, 10(1): 11.
- Glaab, E., Garibaldi, J. M., & Krasnogor, N. (2009). ArrayMining: a modular web-application for microarray analysis combining ensemble and consensus methods with cross-study normalization. *BMC bioinformatics*, 10(1): 358.
- Hall, M. A. (2000). Correlation-based feature selection of discrete and numeric class machine learning.
- Hammer, K. D., Yum, M.-Y., Dixon, P. M., & Birt, D. F. (2010). Identification of JAK-STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*, 71(7): 716-725.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2008). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1): 44.
- Ideker, T., Ozier, O., Schwikowski, B., & Siegel, A. F. (2002). Discovering regulatory and signalling circuits in molecular interaction networks. *Bioinformatics*, 18(suppl\_1): S233-S240.
- Liu, Z., Gan, L., Zhou, Z., Jin, W., & Sun, C. (2015). SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. *Immunobiology*, 220(8): 947-953.
- McKusick, V. A. (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4): 588-604.
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10.1101.
- Piñero, J., Queralt-Rosinach, N., Bravo, À., Deu-Pons, J., Bauer-Mehren, A., Baron, M., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2015). DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database*, 2015.

- Rebhan, M., Chalifa-Caspi, V., Prilusky, J., & Lancet, D. (1998). GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *14*(8): 656-664.
- Schulz, M. H., Devanny, W. E., Gitter, A., Zhong, S., Ernst, J., & Bar-Joseph, Z. (2012). DREM 2.0: Improved reconstruction of dynamic regulatory networks from time-series expression data. *BMC systems biology*, *6*(1): 104.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, *13*(11): 2498-2504.
- Shell, S. A., Hesse, C., Morris, S. M., & Milcarek, C. (2005). Elevated levels of the 64-kDa cleavage stimulatory factor (CstF-64) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages influence gene expression and induce alternative poly (A) site selection. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(48): 39950-39961.
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, *18*(3): 385-405.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, *3*(1): 1-25.
- Sorci, G., & Faivre, B. 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *364*(1513): 71-83.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10.1101.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(9): 5116-5121.
- Weintz, G., Olsen, J. V., Frühauf, K., Niedzielska, M., Amit, I., Jantsch, J., Mages, J., Frech, C., Dölken, L., & Mann, M. (2010). The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophages. *Molecular systems biology*, *6*(1): 371.

## ภาคผนวก ข

### นำเสนอรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมทางวิชาการระดับชาติ

#### การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์ ครั้งที่ 10

วันที่ 1 มิถุนายน 2561 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ

รัชตา คงพรศิริ และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2561). เครื่องมือทางชีวสารสนเทศสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์. การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์ ครั้งที่ 10, วันที่ 1 มิถุนายน 2561. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ. หน้า 8 – 12.

รุ่งทิwa สุดถิ่น และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2561). เวิร์กโฟลว์ของการทำเหมืองข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศของการตอบสนองการอักเสบในข้อมูลไมโครอาร์เรย์. การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์ ครั้งที่ 10, วันที่ 1 มิถุนายน 2561. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ. หน้า 13 – 17.

# เครื่องมือทางชีวสารสนเทศสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ Bioinformatics tool for microarray data analysis of inflammatory response genes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage

รัชดา คงประศิริ และ พิทักษ์ สุตรอนันต์\*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

แสนสุข ชลบุรี 20131 Email: pitak@buu.ac.th

## บทคัดย่อ

ปัจจุบันชีวสารสนเทศมีบทบาทมากขึ้นในการนำมาใช้เป็นเครื่องมือเพื่อแก้ปัญหาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อนำมาวิเคราะห์และอธิบายกลไกระดับโมเลกุลของสภาวะที่สนใจได้ ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศจากโปรแกรมออเรนจ์ (Orange) เพื่อค้นหาหลักไครระดับโมเลกุลของการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่มีต่อการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ ซึ่งถูกคัดเลือกส่วนใหญ่มีการแสดงออกในช่วงเวลา 18 ชม. ทำให้สามารถแปลผลทางชีวภาพได้เป็นจำนวนมาก สรุปได้ว่า เครื่องมือทางชีวสารสนเทศในออเรนจ์สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน แต่ยังต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาเครื่องมือเพื่อการแปลผลที่มากยิ่งขึ้น

## Abstract

Bioinformatics is increasingly used as a tool to solve biological problems at the molecular level in recent studies for analyzing and explaining their mechanisms of interest states. In this study, we used the bioinformatics tool in Orange program to search for the molecular mechanism of inflammatory response in microarray expression data of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage. The results showed that the most of responsive genes associated with inflammatory response were selected in 18 hours-stimulation that lead to be explained more biological interpretation. It can be concluded that the bioinformatics tools in Orange can be used to analyze gene expression data but it also needs to be improved and developed for its better interpretation results.

Keywords: Bioinformatics, Microarray data, Inflammation

## 1. คำนำ

ศาสตร์การเรียนรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงใหม่ หรือที่เรียกว่าชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) [1] ก่อกำเนิดมาในยุคของโครงการจีโนมมนุษย์ ในศตวรรษที่ 21 จากความร่วมมือในหลายประเทศ โดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสารสนเทศร่วมกับงานทางด้านชีววิทยาโมเลกุล เพื่อใช้ในการจัดเก็บรวบรวมข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตสำหรับทำนายแนวโน้มความเป็นไปได้ของผลการทดลองที่อาจจะเกิดขึ้นก่อนการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ [2] ซึ่งข้อมูลระดับจีโนมของสิ่งมีชีวิตเป็นข้อมูลทางชีวภาพที่มีจำนวนมากมหาศาลและซับซ้อนเพื่อแสดงถึงการทำงานร่วมกันของยีน ดังนั้นการแปลผลข้อมูลจึงต้องใช้เทคโนโลยี

สารสนเทศที่เชื่อมโยงกับการพัฒนาเทคโนโลยีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ข้อมูลขนาดใหญ่ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างเช่น การตรวจวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน โดยเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ (Microarray technology) หรือชิปยีน (GeneChip) [3] เพื่อแสดงให้เห็นภาพโดยรวมของกลไกการทำงานของยีนระดับจีโนมในการตอบสนองต่อการกระตุ้นทางชีวภาพที่สนใจ เช่น การตอบสนองต่อการอักเสบ เป็นต้น

เพื่อการจัดเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ จึงได้มีการพัฒนาฐานข้อมูลและชุดซอฟต์แวร์ต่างๆ เพื่อการใช้งาน ได้แก่ ฐานข้อมูล GEO (Gene expression omnibus) [4] ที่มีการเก็บรวบรวมชุดข้อมูล (Gene Data Set; GDS) ของข้อมูลการแสดงออกของยีนในหลากหลายแพลตฟอร์มของเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ และการพัฒนาซอฟต์แวร์เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวสารสนเทศสำหรับการวิเคราะห์ชุดข้อมูลการแสดงออกของยีน ได้แก่ โปรแกรมออเรนจ์ (Orange) [5] ซึ่งเป็นชุดซอฟต์แวร์สาธารณะที่บรรจุเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ และประกอบไปด้วยเครื่องมือทางการเรียนรู้ข้อมูล (Machine learning) การวิเคราะห์และแสดงผลข้อมูล (Analysis and visualization) ที่มีลักษณะเป็นวิดเจ็ต (Widget) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเหมือนคำสั่งทางการเขียนโปรแกรมเพื่อนำมาใช้ในการสร้างเวิร์กโฟลว์ (Workflow) สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงโต้ตอบที่สะดวกและรวดเร็ว โดยวิดเจ็ตที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนเพื่อค้นหาหลักไครระดับโมเลกุลและการแปลผลทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง จะอยู่ในกลุ่มวิดเจ็ตชีวสารสนเทศ โดยมีวิดเจ็ตซึ่งเป็นเครื่องมือหลักทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ GEO Data Sets, Differential Expression, Heat Map, Gene Info และ KEGG pathways เป็นต้น

การอักเสบ เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ และสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย ในขณะที่มีกระบวนการตอบสนองการอักเสบเกิดขึ้นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เพื่อช่วยในการกำจัดจุลชีพและสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ แต่ถ้าหากเกิดการตอบสนองที่มากเกินไปก็อาจส่งผลเสียหายต่อเซลล์ เนื้อเยื่อ และก่อให้เกิดโรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องได้ [6] การตรวจสอบกลไกระดับโมเลกุลของการตอบสนองการอักเสบจึงมีความจำเป็นเพื่อทำความเข้าใจและวางเป้าหมายเพื่อการควบคุมการตอบสนองการอักเสบไม่ให้ลุกลามจนเกิดเป็นโรคเรื้อรังได้ โดยอาศัยการศึกษาจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของการแสดงออกของยีนภายในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) [7] ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศจากโปรแกรมออเรนจ์ มาค้นหาหลักไครระดับโมเลกุลจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีต่อการกระตุ้นด้วย LPS ในแต่ละช่วงเวลา

**2. วิธีการทดลอง**

ภาพรวมการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 และเวิร์กโฟลว์ของวิธีดำเนินการในโปรแกรมออร์เรนจ์แสดงดังภาพที่ 2 โดยมีรายละเอียดดังนี้

**2.1 การค้นหาข้อมูล (Data Collection)**

การค้นหาข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูล GEO Dataset ซึ่งเป็นเว็บไซต์หนึ่งในโปรแกรม Orange ที่มีการเชื่อมโยงการค้นหาชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูล NCBI และแสดงรายละเอียดของงานวิจัยในชุดข้อมูลนั้นๆ และสามารถเข้าถึงรายละเอียดของชุดข้อมูลดังกล่าวได้ โดยขอบเขตของชุดข้อมูลที่น่าสนใจ จะเลือกศึกษาเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในช่วงเวลาต่างๆ เทียบกับเซลล์ควบคุมของชุดข้อมูล ได้แก่ ชุดข้อมูล GDS2410 [8] และ GDS1285 [9] (เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL และ 100 ng/mL ตามลำดับ)

**2.2 การคัดเลือกยีน (Gene Selection)**

การตรวจสอบวิธีทางสถิติที่ใช้ในการคัดเลือกยีน ที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ด้วยวิธีเจต Differential Expression เพื่อคัดเลือกวิธีการทางสถิติที่ให้ผลการแสดงออกของยีนได้ดีที่สุด โดยทำการทดสอบในชุดข้อมูลสมมติที่มีการออกแบบใหม่มีจำนวนพีเจอร์ที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มตัวอย่างจากมากไปน้อยจำนวนทั้งสิ้น 20,000 พีเจอร์ ร่วมกับชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่คัดเลือกมาจำนวนสองชุดข้อมูล วิธีการทางสถิติที่ใช้ทดสอบมีทั้งหมด 8 วิธี ได้แก่ 1) Fold Change 2) Log<sub>2</sub> (Fold Change) 3) T-Test 4) t-test P-value 5) ANOVA 6) ANOVA P-value 7) Signal to Noise Ratio และ 8) Mann-Whitney และแสดงผลที่วิเคราะห์ได้ในรูปของแผนภาพความร้อน (Heat Map)

**2.3 การวิเคราะห์ยีน (Gene Analysis)**

จากแผนผังขั้นตอนการดำเนินงานของออร์เรนจ์ (ภาพที่ 2) ในการวิเคราะห์ยีน การค้นหาชุดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะใช้เว็บไซต์ GEO Dataset ชุดข้อมูลที่ถูกเลือกจะดูส่งไปที่เว็บไซต์ Select Rows เพื่อคัดเลือกรุ่นตัวอย่างที่จะศึกษา

โดยจะเลือกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ข้อมูลที่ถูกเลือกจะผ่านการคำนวณด้วยวิธีทางสถิติต่างๆ ผ่านเว็บไซต์ Differential Expression

**2.3.1 เพื่อพิจารณาความแตกต่างของการแสดงออกของยีน**

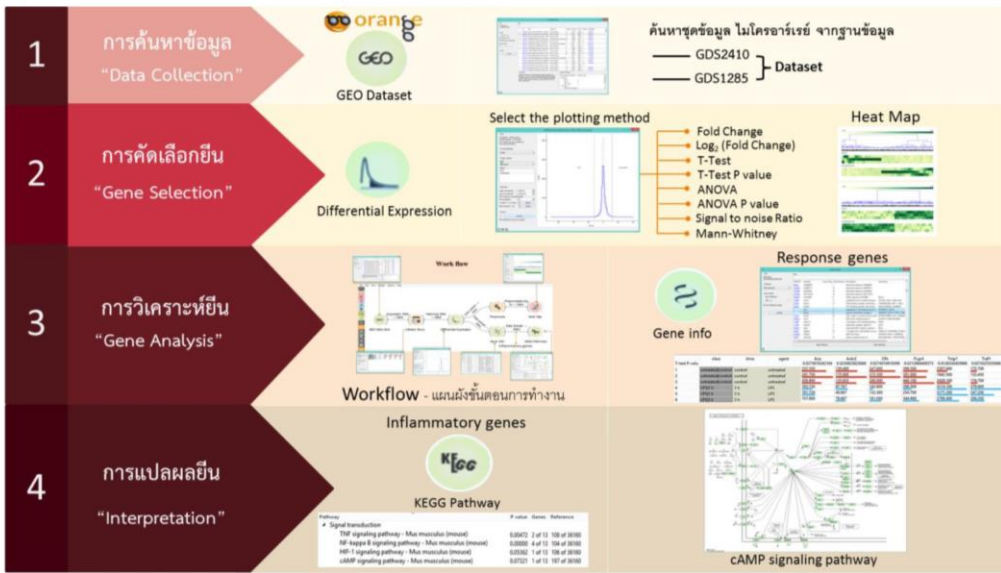
โดยจะทำการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่ตีที่สุดจำนวน 500 ยีน และทำการ Normalization ข้อมูล ด้วยวิธีเจต Preprocess เพื่อควบคุมความเข้มข้นของข้อมูลและหลีกเลี่ยงความผิดปกติของข้อมูล และส่งผ่านไปยังเว็บไซต์ Heat Map เพื่อแสดงผลจากการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกต่างกันได้ดีที่สุดในจำนวน 500 ยีน

**2.3.2 เพื่อพิจารณาบทบาทของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ**

จากยีนที่ถูกคัดเลือกจะนำมาพิจารณาบทบาทของยีนด้วยเว็บไซต์ Gene info โดยเว็บไซต์จะทำการแสดงรายชื่อยีน ซึ่งจะแสดงรายละเอียดของยีน และมีข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ในการทำงานของยีน ซึ่งยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบจะถูกคัดกรองด้วยรายชื่อยีน/โปรตีนการอักเสบ (inflammatory genes/proteins) ที่ถูกคัดเลือกมาจากรายชื่อข้อมูลสาธารณะจำนวนสามฐานข้อมูล ได้แก่ DisGeNET (<http://www.disgenet.org>), OMIM (<https://www.omim.org/>) และ UniProt (<http://www.uniprot.org/>) ก่อนนำมาคัดเลือกในเว็บไซต์ Gene Info โดยการคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบด้วยเว็บไซต์ Gene info ก่อนส่งต่อข้อมูลไปที่ KEGG Pathways เพื่อการแปลผลยีนต่อไป

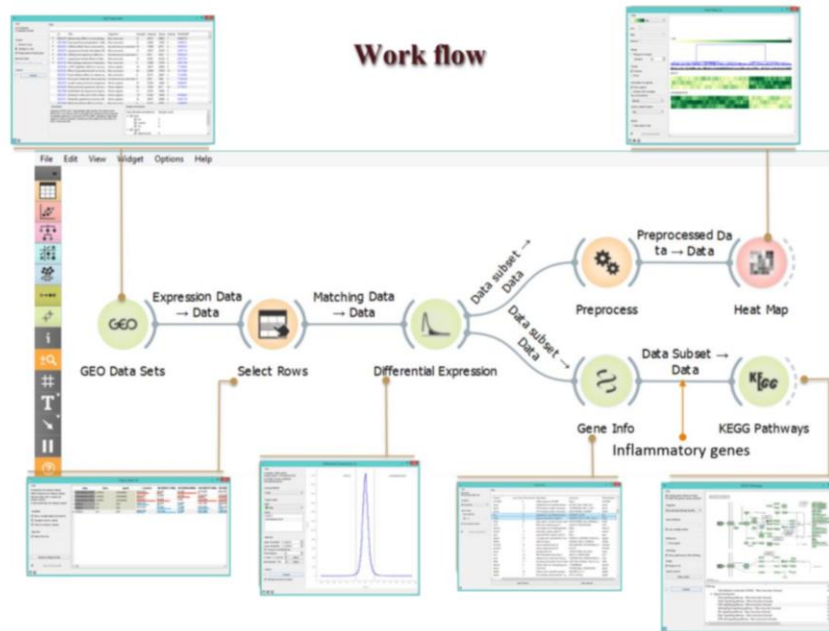
**2.4 การแปลผลยีน (Interpretation)**

การแปลผลทางชีวภาพของยีนที่ถูกคัดเลือก จะทำโดยอาศัยเว็บไซต์ KEGG Pathways ซึ่งจะแสดงข้อมูลและภาพพาเรอของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ โดยทำการคัดเลือกแสดงผลเฉพาะพาเรอของ Immune system และ Signal transduction เพื่ออธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านสัญญาณและการควบคุมการแสดงออกของยีนในการตอบสนองต่อการอักเสบ



ภาพที่ 1 : ภาพรวมการทดลอง





ภาพที่ 2 : แผนผังขั้นตอนการทำงานของวิดิเจ็ดในออเรนจ์ และการแสดงผลในแต่ละขั้นตอน

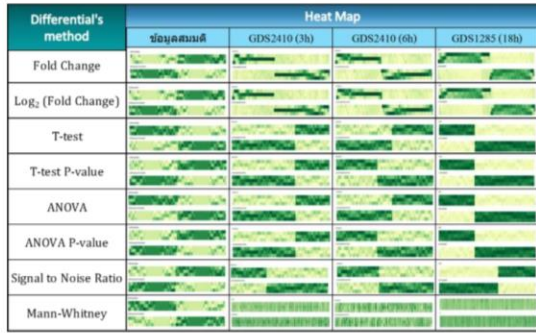
### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 การตรวจสอบวิธีการคัดเลือกยีน

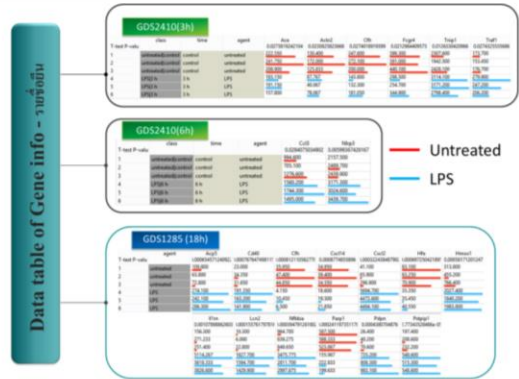
จากการตรวจสอบวิธีการคัดเลือกยีนด้วยวิธีการทางสถิติ 8 วิธี ภายในวิดิเจ็ด Differential Expression และแสดงผลด้วยแผนภาพความร้อนผ่านวิดิเจ็ด Heat Map ข้อมูลที่ใช้ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการแสดงผลของยีน เป็นชุดข้อมูลสมมติของตัวอย่างยีนจำนวน 20,000 ยีน เทียบกับ ชุดข้อมูลที่ศึกษา ได้แก่ GDS2410 (3h), GDS2410 (6h) และ GDS1285 (18h) ผลจากแผนภาพ Heat Map ในภาพที่ 3 แสดงกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ควบคุมกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยเทียบผลลัพธ์กับชุดข้อมูลสมมติ ที่ได้จากการจำลองข้อมูลยีนสมมติขึ้นโดยใช้โปรแกรม Excel โดยจัดรูปแบบให้ตรงกับชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จริง เพื่อเทียบกับชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ศึกษาได้แก่ GDS2410 และ GDS1285 ผลที่ได้เมื่อเทียบกับชุดข้อมูลสมมติ แสดงให้เห็นว่า วิธีการทางสถิติที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้งาน คือ T-test, T-test P-value, ANOVA, ANOVA P-value เนื่องจากเป็นวิธีการที่แสดงภาพความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์ควบคุมกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างชัดเจนในชุดข้อมูลตัวอย่างทั้งสองชุดข้อมูลในสามช่วงเวลา แต่ไม่พบความแตกต่างในชุดข้อมูลสมมติโดยในการคัดเลือกยีนขั้นตอนต่อไปจะเลือกใช้วิธี T-Test หรือ T-test P-value โดยการทดสอบ T-test เป็นวิธีการทางสถิติที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ และเป็นการทดสอบ ตัวแปรเพียง 2 ตัวแปร ซึ่งก็คือ เซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ส่วน T-test P-value เป็นวิธีที่ไม่ต่างกันมากนัก เพียงแค่นำค่า P-value แสดงผล ซึ่งผลที่ได้มีค่าต่างกันเล็กน้อย แต่จำนวนยีนที่ถูกคัดเลือกมีจำนวนเท่ากัน วิธีการดังกล่าวจึงไม่มีผลต่อการคัดเลือกยีน

#### 3.2 รายชื่อยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ (ภาพที่ 4)

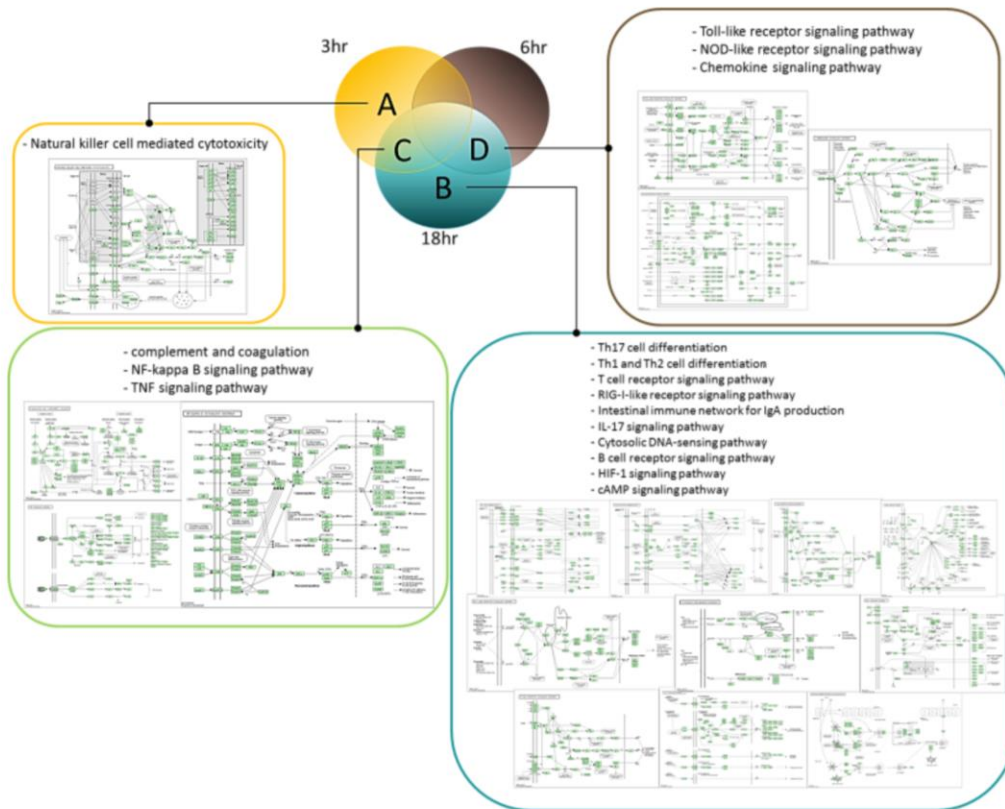
รายชื่อยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ ซึ่งได้จากการคัดเลือกด้วย Differential Expression และแสดงผลด้วย Gene Info ของชุดข้อมูล GDS2410 (3h) คือ *Ace, Achr2, Cfh, Fcgr4, Tnfr1, Traf1* ชุดข้อมูล GDS2410 (6h) คือ *Ccl3, Nlrp3* และชุดข้อมูล GDS1285 (18h) คือ *Acp5, Cd40, Cfh, Cxcl14, Cxcl2, Hfe, Hmox1, Il1rn, Lcn2, Nfkbia, Parp1, Pdpn* และ *Pstpip1* โดยรายชื่อยีนต่างๆที่มีผลในการตอบสนองต่อการอักเสบ ถูกคัดเลือก เพื่อคำนวณค่าทางสถิติ และรายงานผลออกมาเป็นค่าทางสถิติที่บ่งบอกความมากน้อยในการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ โดยถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อเทียบกับระหว่างเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นของชุดข้อมูลที่ทดสอบ จากผลดังภาพที่ 4 ในตารางรายชื่อยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ จะเห็นได้ว่า ในชุดข้อมูล GDS2410 ยีน *Ace, Achr2, Cfh,* และ *Fcgr4* มีค่าการแสดงออกของยีนในเซลล์ควบคุมมากกว่าในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แสดงออกมากในยีน *Tnfr1, Traf1, Ccl3, และ Nlrp3* สำหรับในช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมง (GDS1285) พบยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบในจำนวนที่มากกว่าช่วงเวลาอื่นๆ และมีค่าการแสดงออกของยีนมาก ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และมีความต่างในการแสดงออกของยีนอย่างเห็นได้ชัด ยกเว้นยีน *Cfh, Cxcl14, Hfe,* และ *Parp1* ที่แสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาการรับมของ LPS มาก จะทำให้พบยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบเป็นจำนวนเพิ่มมากขึ้น และระดับการแสดงออกของยีนในการตอบสนองต่อการอักเสบจะมีระดับที่เพิ่มมากขึ้นด้วยตามช่วงเวลา



ภาพที่ 3 : ตารางเปรียบเทียบวิธีการทางสถิติและการแสดงออกของยีนด้วย Heat Map



ภาพที่ 4 : รายชื่อยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ



ภาพที่ 5 : Pathways แสดงเครือข่ายของยีนที่ตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจที่มีต่อการกระตุ้นด้วย LPS

### 3.3 วิธีการทำงานของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ

จากรูป Pathways การทำงานของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ (ภาพที่ 5) ที่ได้จากการแปลผลข้อมูลยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบที่ถูกคัดเลือกจาก Gene info จากยีนที่มีค่าการแสดงออกจากการคำนวณทางสถิติสูงสุด 500 ยีน ด้วย KEGG Pathways พบว่า ในช่วงเวลา 3 ชม. มี Pathway ที่แสดงกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบในระดับโมเลกุล ที่สำคัญ ได้แก่ Natural killer cell mediated cytotoxicity, complement and coagulation, NF-kappa B signaling pathway, และ TNF signaling pathway ในช่วงเวลา 6 ชม. ได้แก่ Toll-like receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, และ Chemokine signaling pathway และใน ช่วงเวลา 18 ชม. ได้แก่ Toll-like receptor signaling pathway, Chemokine signaling pathway, Th1 7 cell differentiation, Th1 and Th2 cell differentiation, T cell receptor signaling pathway, RIG-I-like receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, Intestinal immune network for IgA production, IL-17 signaling pathway, Cytosolic DNA-sensing pathway, B cell receptor signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, cAMP signaling pathway, Complement and coagulation, NF-kappa B signaling pathway, และ TNF signaling pathway

### 4. สรุปและอภิปราย

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในชุดข้อมูล GDS2410 และ GDS1825 มีวิถีพาหะยีนของการทำงานของยีนในช่วงเวลาที่คาบเกี่ยวกัน ที่เวลา 3 และ 18 ชม. ตามลำดับ ได้แก่ complement and coagulation cascades, NF-kappa B signaling pathway, TNF signaling pathway ส่วนชุดข้อมูล GDS2410 และ GDS1825 ที่เวลา 6 และ 18 ชม. ตามลำดับ คือ Toll-like receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, Chemokine signaling pathway สำหรับที่ช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงซึ่งเป็นชุดข้อมูลเดียวกันจึงอาจทำให้มีวิถีการทำงานของยีนเกิดขึ้นได้น้อย รวมทั้งมีการทดสอบในช่วงเวลาที่สั้น เมื่อเทียบกับอีกชุดข้อมูลที่ทดสอบในช่วงเวลา 18 ชั่วโมง จึงมียีนที่แสดงออกมาในจำนวนน้อย สำหรับในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงนั้น จะมีการแสดงออกของยีนในวิถีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเป็นจำนวนมาก โดยยีนมีการทำงานร่วมกันในกระบวนการต่างๆ อีกทั้งมีการระบุตำแหน่งที่เกิดการแสดงออกของยีนใน pathway โดยจะแสดงเป็นเครือข่ายการทำงานของยีนของกระบวนการต่างๆ ในกลไกการอักเสบ ซึ่งการคัดเลือกยีนการอักเสบสามารถศึกษาทำความเข้าใจฟังก์ชัน การทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ และจากผลการแสดง Pathways ของกลไกการอักเสบ ที่ตำแหน่งต่างๆ มีการทำงานร่วมกันของยีนที่มีซับซ้อน ถูกแปลผลอยู่ในรูปของ วิถีสัญญาณ เพื่อการศึกษาและเข้าใจในกลไกได้ง่ายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเส้นทางการทำงานร่วมกันของยีนใน pathways สามารถทำนายกลไก หรือแนวโน้มของการอักเสบที่จะเกิดขึ้นก่อนที่การทดลองในอนาคต ซึ่งสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนที่น่าจะเกิดขึ้นจากการอักเสบได้ โดยข้อมูลการทำงานร่วมกันของยีนส่วนที่คัดกรองมานั้นสามารถถูกนำไปใช้เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป เช่น การศึกษาลำดับของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการอักเสบ โดยการอักเสบที่ทำให้เกิดโรคเกิดจากยีนหลากหลายยีน ที่มีความซับซ้อนกันในการทำงานร่วมกันของยีนหลายชนิด รวมทั้งปัจจัยภายนอกที่กระตุ้นให้เกิดอาการของโรค ซึ่งยากต่อการรักษา และทำความเข้าใจโปรแกรมออเรนจ์จึงเป็นโปรแกรมที่มีเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่สามารถนำมาใช้ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ทั้งหน้าที่ และการทำงานร่วมกันในวิถีต่างๆ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนา วิธีการแพทย์เพื่อควบคุมการตอบสนองการอักเสบของผู้ป่วยต่อไปได้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2560 สัญญาเลขที่ 98/2560

### เอกสารอ้างอิง

- [1] C. Virunanon and W.Chulalaksananukul, "Bioinformatics : Application in Biological Science Research", *Burapha Science Journal*, vol.15, no.2, pp. 99-106, 2010.
- [2] S. A. Sousa, J. H. Leitao, R. C. Martins, J. M. Sanches, J. S. Suri, and A. Giorgetti, "Bioinformatics Applications in Life Sciences and Technologies", *BioMed Research International*, vol. 2016, 2 pages, 2016.
- [3] C. Mongkolsirawatana, "GeneChip technology", *Thai Journal of Genetics*, vol.2, no.2, pp. 84-102, 2009.
- [4] R. Edgar, M. Domrachev, and A. E. Lash, "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository", *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 1, pp. 207-210, 2002.
- [5] J. Demsar, T. Curk, A. Erjavec, C. Gorup, T. Hocevar, M. Milutinovic, M. Mozina, M. Polajnar, M. Toplak, A. Staric, M. Stajdohar, L. Umek, L. Zagar, J. Zbontar, M. Zitnik, and B. Zupan, "Orange: Data Mining Toolbox in Python", *Journal of Machine Learning Research*, vol. 14, pp. 2349-2353, 2013.
- [6] N. Fujiwara and K. Kobayashi, "Macrophages in Inflammation", *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, vol. 4, no.3, pp. 281-286, 2005.
- [7] P. Baiya, W. Sritaboot, and P. Sootanan, "Gene regulatory network of inflammatory response from microarray data", *Burapha Science Journal*, special issue, pp. 173-184, 2014.
- [8] J. E. Comer, C. L. Galindo, F. Zhang, A. M. Wenglikowski, K. L. Bush, H. R. Garner, J. W. Peterson, and A. K. Chopra, "Murine macrophage transcriptional and functional responses to Bacillus anthracis edema toxin", *Microbial Pathogenesis*, vol.41, no. 2-3, pp. 96-110, 2006.
- [9] S. A. Shell, C. Hesse, S. M. Morris Jr, and C. Milcarek, "Elevated levels of the 64-kDa cleavage stimulatory factor (CstF-64) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages influence gene expression and induce alternative poly(A) site selection", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 39950-39961, 2005.

เวิร์กโฟลว์ของการทำเหมืองข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ  
ของการตอบสนองการอักเสบในข้อมูลไมโครอาร์เรย์  
A data mining workflow for bioinformatics analysis of  
inflammatory response in microarray data

รุ่งทิพา สุดดิน, พิทักษ์ สุดรอนันต์\*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

แสนสุข ชลบุรี 20131 Email: pitak@buu.ac.th

**บทคัดย่อ**

การทำเหมืองข้อมูลเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการจัดเตรียมและวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวภาพขนาดใหญ่ที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ในการวิจัยนี้จะประยุกต์ใช้เครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลในการจัดเตรียมและวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงผลของยีนจากการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกพัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า การแปลผลทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในช่วงเวลาของการบ่มด้วย LPS ที่ 4, 6 และ 24 ชั่วโมง จะมีความแตกต่างกัน กล่าวโดยสรุป เครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดเตรียมและวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวภาพที่มีขนาดใหญ่เพื่อใช้อธิบายกลไกระดับโมเลกุลที่สนใจได้

**Abstract**

Data mining is an important tool in the preparation and analysis of large scale biological data. This research utilizes a data mining tool to prepare and analyze gene expression data of inflammatory response in LPS-stimulated macrophage cells derived from bone marrow. The results show that the biological interpretation of genes involved in inflammatory response at the time of incubation with LPS at 4, 6 and 24 h was different. In conclusion, data mining tools can be used to prepare and analyze large-scale biological data to describe molecular mechanisms of interest.

Keywords: Data mining, Bioinformatics, Microarray data, Inflammation

**1. คำนำ**

การทำเหมืองข้อมูลเป็นเทคนิคที่ใช้ในการค้นหารูปแบบ (Pattern) และความสัมพันธ์ของข้อมูลจากข้อมูลปริมาณมหาศาล โดยใช้กระบวนการทางสถิติ การเรียนรู้ผ่านระบบคอมพิวเตอร์ และหลักทางคณิตศาสตร์เป็นองค์ประกอบ การทำเหมืองข้อมูลนั้นมีขั้นตอนการดำเนินงานซึ่งต้องอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น การคัดเลือกฟีเจอร์ การค้นหาความสัมพันธ์ และการพยากรณ์ เพื่อหาองค์ความรู้ใหม่ สร้างการพยากรณ์ และการออกแบบจำลอง โดยมีเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูล อาทิเช่น โปรแกรม WEKA [1] และโปรแกรม Orange [2] ซึ่งโปรแกรม Orange เป็น โปรแกรมแบบเปิดที่ใช้ในการวิเคราะห์และแสดงผล ซึ่งทำงานบนไพทอนสคริปต์ เหมาะสำหรับผู้เริ่มต้น และผู้เชี่ยวชาญทางวิเคราะห์ข้อมูล การทำเหมืองข้อมูล

สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ ได้แก่ การค้นหายีน การตรวจสอบฟังก์ชันการทำงานของโปรตีน การวินิจฉัยโรค การพยากรณ์โรค การวิเคราะห์เครือข่ายการทำงานร่วมกันของโปรตีนและยีน และการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของการแสดงออกของยีน โดยใช้ฐานข้อมูลสาธารณะออนไลน์ Gene Expression Omnibus Datasets (GEO DataSets) [3] เป็นต้น

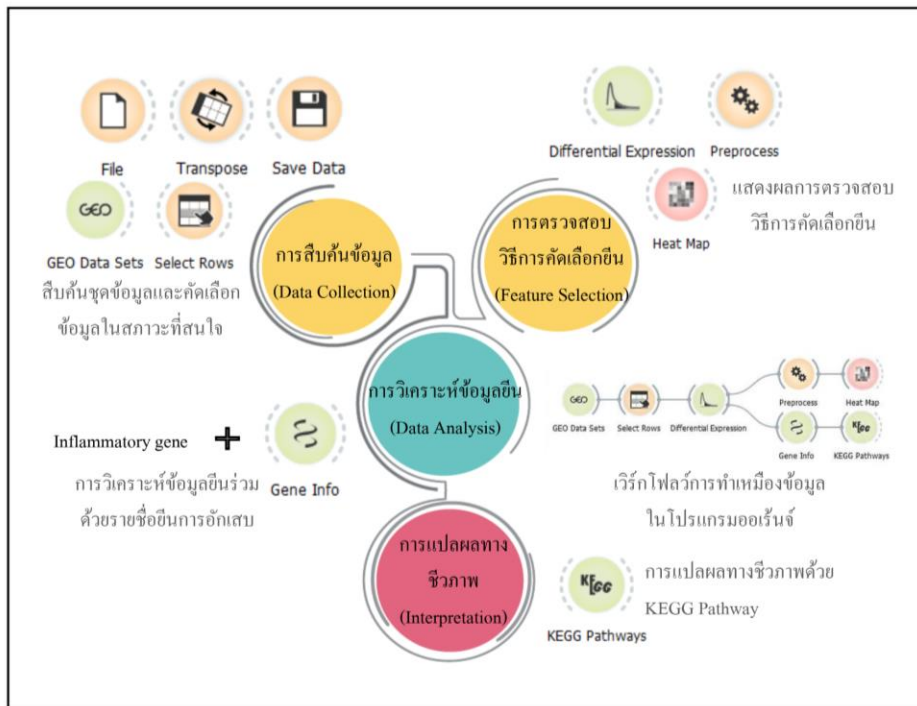
ฐานข้อมูล GEO DataSets [3] เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคที่หลากหลาย ได้แก่ เทคนิคไมโครอาร์เรย์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ที่สามารถศึกษาในตัวอย่างจำนวนมาก และทำได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งใช้แพลตฟอร์มต่างๆ อาทิเช่น แพลตฟอร์ม Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array และ Illumina MouseRef-8 v2.0 expression [4] ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้เทคนิคไมโครอาร์เรย์ คือ การศึกษาการใช้อินเตอร์เฟอรอน แกมมา (Interferon gamma) เพื่อยับยั้งส่วนหนึ่งของโปรแกรมการอักเสบและการแสดงออกการเข้าสู่บริเวณอักเสบของนิวโทรฟิล (Neutrophil) โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์แมคโครฟาจจากไขกระดูก (Bone marrow derived macrophage) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS [5] ซึ่งข้อมูลไมโครอาร์เรย์ข้างต้นสามารถนำมาใช้ในการจัดเตรียมและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการทำเหมืองข้อมูลโดยอาศัยโปรแกรมประยุกต์ขั้นพื้นฐานได้ ในการวิจัยนี้จะทำการประยุกต์ใช้เครื่องมือพื้นฐานในโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูล Orange เพื่อใช้ในการจัดเตรียมและการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงผลของยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล GEO [3] เพื่อค้นหากลุ่มยีน และอธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจจากไขกระดูกที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

**2. วิธีการทดลอง**

สืบค้นชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของการแสดงออกของยีนในฐานข้อมูลจีโอคาต้าเซ็ท บินวิดเจ็ต จีอีโอ คาต้าเซ็ท (GEO DataSets) ในโปรแกรม Orange ซึ่งวิดเจ็ต GEO DataSets เป็นฐานข้อมูลการแสดงผลของยีนที่จัดทำโดย NCBI และรวมอยู่ใน Genni Expression Omnibus โดยวิดเจ็ตนี้ให้สิทธิ์การเข้าถึงชุดข้อมูลทั้งหมดและนำเสนอชุดข้อมูลที่เลือกไว้สำหรับการประมวลผล สามารถดาวน์โหลดชุดข้อมูลที่ต้องการได้ โดยชุดข้อมูลจะถูกจัดเก็บไว้ในอุปกรณ์ โดยวิดเจ็ตนี้สามารถดูข้อมูลเบื้องต้นของชุดข้อมูลได้ เช่น สภาวะการทดลอง จำนวนตัวอย่าง และจำนวนยีนที่ใช้ในการทดลอง

และสามารถใช้เครื่องมือคัดกรองคำค้นหายานในวิเคาเจ็ดได้ เช่น Bone marrow derived macrophage และ LPS และจัดเตรียมชุดข้อมูลสมมติด้วยการอาศัยวิเคาเจ็ดต่างๆ ภายในโปรแกรม เช่น วิเคาเจ็ดทรานสโพส (Transpose) เพื่อจัดเตรียมข้อมูลด้วยการสลับพีเจอรและแอทริบิวต์หรือวิเคาเจ็ดไฟล์ (File) และการใช้วิเคาเจ็ดเซฟ (Save) เพื่อนำชุดข้อมูลการแสดงผลภายในฐานข้อมูล ไปเป็นต้นแบบเพื่อใช้ในการสร้างชุดข้อมูลสมมติ เพื่อนำชุดข้อมูลสมมติมาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบการคัดเลือกโดยวิธีการทางสถิติ ด้วยวิเคาเจ็ด Differential Expression กับชุดข้อมูลที่ถูกคัดเลือกในวิเคาเจ็ด GEO Datasets นำชุดข้อมูลสมมติและชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ถูกคัดเลือกมาตรวจสอบวิธีการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสองสภาวะ คือ สภาวะที่บ่มและไม่บ่มด้วย LPS โดยวิเคาเจ็ดดิฟเฟอเรนเชียล เอกซ์เพรสชัน (Differential Expression) ซึ่งเป็นวิเคาเจ็ดที่แสดงกราฟการแสดงผลของยีนในสภาวะที่สนใจ โดยการใช้วิธีการทางสถิติทั้งหมด 8 วิธี ได้แก่ Fold change, Log2Fold Change, T-Test, T-Test-P-value, ANOVA, ANOVAP-value, Signal to noise และ Mann-Whitney และคัดเลือกยีน (พีเจอร) จากการจัดลำดับความแตกต่างของการแสดงผล

ที่แตกต่างกันมากที่สุดจำนวน 200 ยีน และแสดงผลด้วยแผนภาพความร้อน (Heat map) เมื่อทำการปรับค่าการแสดงผลของข้อมูลให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน (Normalize Feature)แล้ว ด้วยวิเคาเจ็ดพรีโพรเซส (Preprocess) โดยจัดกลุ่มรูปแบบการแสดงผลของยีนที่คล้ายกันไว้ด้วยกัน (Cluster columns) สามารถปรับการตั้งค่าการแสดงผลได้ จากนั้นวิเคราะห์ยีนที่ถูกคัดเลือกด้วยวิเคาเจ็ดยีนอินโฟ (Gene Info) ร่วมกับรายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ วิเคาเจ็ด Gene Info เป็นวิเคาเจ็ดที่นำเสนอข้อมูลสารสนเทศที่เกี่ยวข้องกับยีนจากฐานข้อมูล NCBI สามารถเลือกรายชื่อยีนที่สนใจแล้วส่งข้อมูลออกไปยังวิเคาเจ็ดอื่นๆ และเมื่อคลิกที่ NCBI ID สามารถศึกษาข้อมูลของยีนนั้นๆ ผ่านทางเว็บไซต์ NCBI ได้ และทำการแปลผลทางชีวภาพเพื่ออธิบายกลไกระดับโมเลกุลด้วยวิเคาเจ็ดเค็กพาทเวย์ (KEGG Pathway) ซึ่งจะแสดงกลไกการส่งสัญญาณในวิธีการส่งสัญญาณต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับตอบสนองต่อการอักเสบ ของยีนต่างๆ ที่ถูกคัดเลือก โดยสามารถตั้งค่าพารามิเตอร์ได้ เช่น Organism และ ค่าความน่าเชื่อถือ และยังสามารถนำไฟล์จากภายนอกมาวิเคราะห์ภายในโปรแกรมได้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ภาพรวมการทดลองประกอบด้วย การสืบค้นข้อมูล การตรวจสอบวิธีการคัดเลือกยีน การวิเคราะห์ข้อมูลยีน และการแปลผลทางชีวภาพ

### 3. ผลการทดลองและอภิปราย

จากการสืบค้นข้อมูลจากวิกิเจ็ต GEO DataSets พบชุดข้อมูลที่นำมาดำเนินการทำเหมืองข้อมูลคือ ชุดข้อมูล GDS5385 [6], GDS5623 [5], และชุดข้อมูล GDS5196 [7] โดยคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนในสภาวะที่มีและไม่มี LPS ของเซลล์แมโครโครฟาจจากไขกระดูกในหนู โดยใช้ช่วงเวลาการบ่ม LPS ปริมาณ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในชุดข้อมูล GDS5385 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในชุดข้อมูล GDS5623 และ GDS5196 ที่ 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีจำนวนยีนทั้งหมดในทั้งสามชุดข้อมูลเท่ากับ 26,681, 18,033 และ 26,681 ยีนตามลำดับ และทำการจัดเตรียมข้อมูลสมมติที่มีตัวอย่างยีนจำนวน 20,000 ยีน ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างกันในสภาวะที่มีและไม่มี LPS จำนวนทั้งสิ้น 140 ยีน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 0.7 ของทั้งหมด เพื่อนำมาตรวจสอบวิธีการคัดเลือกยีนในขั้นตอนต่อไป

นำชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่คัดเลือกได้และชุดข้อมูลสมมติมาทำการตรวจสอบวิธีการคัดเลือกยีนด้วยวิธีการทางสถิติโดยวิกิเจ็ต Differential Expression และแสดงผลด้วยวิกิเจ็ต Heat map ในชุดข้อมูล GDS5385, GDS5623, GDS5196 และชุดข้อมูลสมมติ พบว่าวิธีการทางสถิติ Fold change, Log2Fold Change, Signal to noise และ Mann-Whitney ทำให้เกิดการแสดงผลที่ได้จากการทดลองซ้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งบ่งชี้ถึงความไม่น่าเชื่อถือในการนำไปวิเคราะห์ต่อไป แต่วิธีการทางสถิติ T-Test, T-Test P-value, ANOVA และ ANOVAP-value แสดงให้เห็นถึงรูปแบบการแสดงผลออกในการทดลองซ้ำที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งบ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือในการนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งผู้วิจัยได้คัดเลือกวิธีการทางสถิติ T-Test ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากวิธีการทางสถิติ T-Test เป็นการทดสอบสมมติฐานของสองประชากร ซึ่งในที่นี้คือการเดิมและไม่มี LPS (ภาพที่ 2)

Gene	สัญญาณ	GDS5196	GDS5385	GDS5623
Fold change				
Log2(fold change)				
T-test				
T-test P-value				
ANOVA				
ANOVA p-value				
Signal to noise				
Mann-Whitney				

ภาพที่ 2 แผนภาพ Heat Map จากการคัดเลือกด้วยวิธีการทางสถิติทั้งหมด 8 วิธี กับชุดข้อมูลสมมติและชุดข้อมูลที่ถูกลคัดเลือก

การวิเคราะห์ข้อมูลที่ถูกคัดเลือกจากวิกิเจ็ต Differential Expression ด้วยวิกิเจ็ต Gene Info ร่วมกับรายชื่อยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ พบรายชื่อยีนดังนี้ คือ ชุดข้อมูล GDS5385 (4 ชั่วโมง) พบยีน *Adipor1, Ccl12, Ccl3, Ccl7, Cd40, Cxcl11, Edn1, Fpr2, Il10, Il15, Il6, Muc1, Nfkb2, Pigs2* และ *Tnfrsf1b* ชุดข้อมูล GDS5623 (6 ชั่วโมง) พบยีน *Adrb2, Casp4, Ccl5, Ccl8, Cer5, Cd40, Cxcl2, Edn1, Fpr2, Ikbke, Il12a, Il15, Il18, Il27, Il6, Irf1, Irgm2, Socs3, Tlr1, Tnfrsf10, Vcam1* และ *Zc3h12a* และชุดข้อมูล GDS5196 (24 ชั่วโมง) พบยีน *Abcb1b, Ccl5, Igf1, Il1rn, Nampt, Psmb8* และ *Tnfrsf1b* (ภาพที่ 3) ซึ่งยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกลไกในวิถีการส่งสัญญาณตอบสนองต่อการอักเสบหลัก ที่เวลาบ่ม LPS 4 ชั่วโมง คือ *Ccl3, Cd40, Cxcl11, Il6, Nfkb2, Pigs2, Il10, Il15* และ *Il6* โดยมีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Chemotactic effects ในเซลล์ Natural Killer เซลล์ Neutrophils

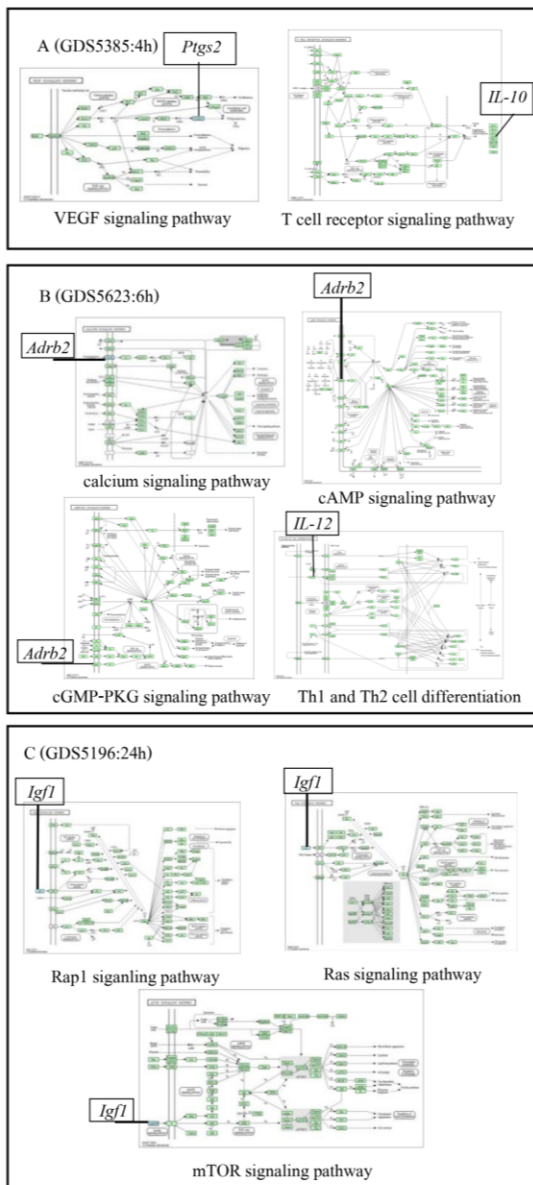
และทีเซลล์ (T-cell) และกระตุ้นวิถีสัญญาณ Cytokine-Cytokine receptor interaction สำหรับในเวลามบ LPS 6 ชั่วโมง จะตรวจสอบพบยีน *Cd40, Ikbke, Cxcl2, Vcam1, Il12a, Il15* และ *Il27* ซึ่งมีหน้าที่การทำงานเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ Myeloieiss และ B-cell lymphoieiss เป็น Protein kinase และเกี่ยวข้องกับ Cytokine-Cytokine receptor interaction และ ยีน *Ccl5* และ *Igf1* ที่พบได้ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ เซลล์ Natural Killer และ Neutrophil และเกี่ยวข้องับวิถีของ Classical MAPK Pathway ตามลำดับ และจะนำรายชื่อยีนเหล่านี้ไปแปลผลเพื่อศึกษาต่อไป

DATA SET	Selected gene	Data Table of selected gene
GDS5385	<i>Adipor1, Ccl12, Ccl5, Ccl7, Cd40, Cxcl11, Edn1, Fpr2, Il10, Il15, Il6, Muc1, Nfkb2, Pigs2, Tnfrsf1b</i>	
GDS5623	<i>Adrb2, Casp4, Ccl5, Ccl8, Cer5, Cd40, Cxcl2, Edn1, Fpr2, Ikbke, Il12a, Il15, Il18, Il27, Il6, Irf1, Irgm2, Socs3, Tlr1, Tnfrsf10, Vcam1, Zc3h12a</i>	
GDS5196	<i>Abcb1b, Ccl5, Igf1, Il1rn, Nampt, Psmb8, Tnfrsf1b</i>	

ภาพที่ 3 รายชื่อยีนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย Differential Expression และรายชื่อยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ และแสดงผลด้วย Gene Info

การแปรผลทางชีวภาพด้วยวิกิเจ็ต KEGG Pathway พบกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบของข้อมูลการแสดงผลออกของยีนจากการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมโครโครฟาจที่ถูกพัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกในหนูที่จำเพาะต่อช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ วิถีสัญญาณของ VEGF และ T-cell ซึ่งเป็นวิถีการส่งสัญญาณย่อยในวิถีสัญญาณหลัก PI3K/Akt ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ และการสร้างเส้นเลือด และวิถีสัญญาณนิวเคลียร์แฟคเตอร์ คีปป์ บี (Nuclear Factor Kappa B: NF-κB) ซึ่งมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ chemokine [6] ตามลำดับโดยยีน *Pigs2* และ *Il-10* ที่เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 4A) วิถีสัญญาณของ Calcium, cAMP และ cGMP-PKG ที่มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ [8] และวิถีสัญญาณของ Th1 และ Th2 differentiation ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย [9] โดยยีน *Adrb2* และ *Il-12* ที่เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4B) และ วิถีสัญญาณของ mTOR ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ [10], วิถีสัญญาณ RAS ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของตัวรับสัญญาณที่หลากหลาย เพื่อนำไปสู่การอยู่รอดและเพิ่มจำนวนของเซลล์ และวิถีสัญญาณของ RAP1 ที่จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ RAS ลดลงเมื่อกลไกการป้องกันทางชีวภาพเข้าสู่สมดุล [11] โดยยีน *Igf1* ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4C)

นอกจากนี้ยังพบรายชื่อยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีหลักที่เกี่ยวข้องกับกลไกในวิถีการส่งสัญญาณตอบสนองต่อการอักเสบในช่วงเวลาการบ่มด้วย LPS ที่แตกต่างกัน คือ วิถีการส่งสัญญาณของตัวรับ Toll-like (Toll-like receptor pathway) พบยีน *Ccl3, Cd40, Cxcl11* และ *Il6* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 4 ชั่วโมง พบยีน *Cd40, Ikbke* และ *Cxcl2* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 6 ชั่วโมง และพบยีน *Ccl5* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 24 ชั่วโมง โดยยีนข้างต้นมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune response) วิถีสัญญาณ MAPK พบยีน *Nfkb2* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 4 ชั่วโมง และพบยีน *Igf1* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 แสดงกลไกการตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่จำเพาะต่อช่วงเวลาของการบ่มด้วย LPS ที่แตกต่างกัน

และวิถีสัญญาณนิวเคลียร์-แฟกเตอร์ คีปป์บี (Nuclear Factor-kappaB: NF-KB) พบยีน *Cd40*, *Nfkb2* และ *Ptgs2* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 4 ชั่วโมง และพบยีน *Cxcl2* และ *Vcam1* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 6 ชั่วโมง ซึ่งยีนข้างต้นมีความ

เกี่ยวข้องกับการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ และวิถีสัญญาณเจ็นส-แอสโซซิเอตีด ไคเนส-ซิกแนลทรานสดิวเซอร์ แอนด์ แอคติเวเตอร์ ออฟ ปรोटิน (Janus-associated kinases-Signal Transducer and Activator of Transcription proteins: JAKs-STATs) พบยีน *Il10*, *Il15* และ *Il6* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 4 ชั่วโมง และพบยีน *Il12a*, *Il15* และ *Il27* ที่เวลาบ่มด้วย LPS 6 ชั่วโมง โดยยีนข้างต้นมีความเกี่ยวข้องกับการผลิตสารไซโตไคน์ (Cytokines)

#### 4. สรุปผลการทดลอง

จากตัวอย่างการใช้งานและทดสอบเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลจากโปรแกรมออเรนจ์ (Orange) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดทำเวิร์กโฟลว์เพื่อใช้ในการจัดเตรียมและวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ซึ่งเป็นข้อมูลทางชีวภาพที่มีขนาดใหญ่เพื่อใช้ในการค้นหากลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมโครฟาจจากไขกระดูกในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และอธิบายกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องได้

#### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2560 สัญญาเลขที่ 98/2560

#### เอกสารอ้างอิง

- [1] M. Hall, E. Frank, G. Holmes, B. Pfahringer, P. Reutemann and I. H. Witten, "The WEKA Data Mining Software: An Update", *SIGKDD Explorations*, vol. 11, no. 1, 2009.
- [2] J. Demsar, T. Curk, A. Erjavec, C. Gorup, T. Hocevar, M. Milutinovic, M. Mozina, M. Polajnar, M. Toplak, A. Staric, M. Stajdohar, L. Umek, L. Zagar, J. Zbontar, M. Zitnik and B. Zupan, "Orange: Data Mining Toolbox in Python", *Journal of Machine Learning Research*, vol.14, pp. 2349-2353, 2013.
- [3] R. Edgar, M. Domrachev and A. E. Lash, "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository" *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 1, pp. 207-210, 2002.
- [4] T. Curk, J. Demsar, Q. Xu, G. Leban, U. Petrovic, I. Bratko, G. Shaulsky and B. Zupan, "Microarray data mining with visual programming", *Bioinformatics*, vol. 21, no. 3, pp. 396-398, 2005
- [5] M. A. Hoeksema, B. P. Scicluna, M. C. S. Boshuizen, S. van der Velden, A. E. Neele, J. V. den Bossche, H. L. Matlung, T. K. van den Berg, P. Goossens and M. P. J. de Winther, "IFN- $\gamma$  Priming of Macrophages Represses a Part of the Inflammatory Program and Attenuates Neutrophil Recruitment", *The Journal of Immunology*, vol. 194, no. 8, pp. 3909-3916, 2015.
- [6] S. M. Rowley, T. Kuriakose, L. M. Dockery, T. T. Ngyuen, A. D. Gingerich, L. Wei and W. T. Watford, "Tumor Progression Locus 2 (Tpl2) Kinase Promotes Chemokine Receptor Expression and Macrophage Migration during Acute Inflammation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 289, no. 22, pp. 15788-15797, 2014.

- [7] R. Noubade, K. Wong, N. Ota, S. Rutz, C. Eidenschenk, P. A. Valdez, J. Ding, I. Peng, A. Sebrell, P. Caplazi, J. DeVoss, R. H. Soriano, T. Sai, R. Lu, Z. Modrusan, J. Hackney and W. Ouyang, "NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity", *Nature*, vol. 509, pp. 235–239, 2014.
- [8] H. Witwicka, M. Kobiańska, J. Siednienko, M. Mitkiewicz and W.A. Gorczyca, "Expression and activity of cGMP-dependent phosphodiesterases is up-regulated by lipopolysaccharide (LPS) in rat peritoneal macrophages", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1773, no. 2, pp. 209-218, 2007.
- [9] C. S. Hsieh, S. E. Macatonia, A. O'Garra and K. M. Murphy, "T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro", *Journal of Experimental Medicine*, vol. 181, no. 2, pp. 713-721, 1995.
- [10] Y. Hu, J. Lou, Y. Y. Mao, T. W. Lai, L. Y. Li, C. Zhu, C. Zhang, J. Liu, Y. Y. Li, F. Zhang, W. Li, S. M. Ying, Z. H. Chen and H. H. Shen, "Activation of MTOR in pulmonary epithelium promotes LPS-induced acute lung injury", *Autophagy*, vol. 12, no. 12, pp. 2286-2299, 2016.
- [11] S. Shah, E. J. Brock, K. Ji and R. R. Mattingly. RAS and RAPI: A tale of two GTPases , *Seminars in Cancer Biology*, In Press, 2018.



## ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

1. หัวหน้าโครงการ      นาย พิทักษ์ สุตรอนันต์  
ตำแหน่ง                    ผู้ช่วยศาสตราจารย์  
คุณวุฒิ                    Ph.D., Science and Technology (Bioinformatics)  
ประสบการณ์ในงานวิจัย    ชีววิทยาเชิงระบบ ชีวสารสนเทศ การทำเหมืองข้อมูลทางชีวเคมี  
หน่วยงาน                    ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
สถานที่ติดต่อ            169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองฯ จังหวัดชลบุรี 20131  
โทรศัพท์                    0-3810-3058  
โทรสาร                      0-3839-3495  
E-mail                      pitak@buu.ac.th  
ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ      คิดเป็น 90% ของงานทั้งหมด  
บทบาทของนักวิจัย      เป็นนักวิจัยหลักที่คอยดูแลให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์
2. ผู้ร่วมงานวิจัย            นาง กล่าวขวัญ ศรีสุข  
ตำแหน่ง                    รองศาสตราจารย์  
คุณวุฒิ                    Ph.D., Medical Science  
ประสบการณ์ในงานวิจัย    ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ และออกซิเจนชีววิทยา  
หน่วยงาน                    ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
สถานที่ติดต่อ            169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองฯ จังหวัดชลบุรี 20131  
โทรศัพท์                    0-3810-3058  
โทรสาร                      0-3839-3495  
E-mail                      klaokwan@buu.ac.th  
ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ      คิดเป็น 10% ของงานทั้งหมด  
บทบาทของนักวิจัย      เป็นนักวิจัยที่คอยให้คำปรึกษาและแนะแนวทางการดำเนินงาน
3. หน่วยงานสังกัด            ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
สถานที่ตั้ง                    169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองฯ จังหวัดชลบุรี 20131  
โทรศัพท์                    0-3810-3058  
โทรสาร                      0-3839-3495