



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินศักยภาพของ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate
ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมในการเป็นสารต้านอักเสบชนิดใหม่
(Potential evaluation of 4-methoxycinnamyl 4-coumarate
isolated from *Etlingera pavieana* rhizome as a novel anti-
inflammatory agent)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 103216

สัญญาเลขที่ 44/2558

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินศักยภาพของ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate
ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมในการเป็นสารต้านอักเสบชนิดใหม่
(Potential evaluation of 4-methoxycinnamyl 4-coumarate
isolated from *Etlingera pavieana* rhizome as a novel anti-
inflammatory agent)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

การเกิดพยาธิสภาพของโรคจากการอักเสบต่างๆ เกี่ยวข้องกับการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO) พรอสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น interleukin-1 β (IL-1 β) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) ที่มีการหลั่งมากและนานเกินไป สาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) ถูกแยกจากเหง้าเร่วหอม ในการศึกษานี้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร MCC ในการยับยั้งการผลิต NO, PGE₂, IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (LPS) สาร MCC ที่ความเข้มข้นสูงถึง 37.5 μ M ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ สาร MCC สามารถยับยั้งการผลิต NO, PGE₂ และ IL-1 β ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.2 \pm 2.3, 32.7 \pm 4.7 และ 2.9 \pm 0.5 μ M ตามลำดับ แต่ไม่มีผลยับยั้งการผลิต TNF- α สารนี้ยังยับยั้งการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ IL-1 β ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ที่น่าสนใจคือ สาร MCC ลดการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เรายังพบว่าสาร MCC ลดการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ JNK และ p38 MAPKs ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่าสาร MCC มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยอย่างน้อยผ่านการยับยั้งสารสื่อกลางและไซโตไคน์ในการอักเสบ ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งวิถี JNK และ p38 MAPKs ดังนั้นสาร MCC นี้อาจถูกนำไปใช้พัฒนาเป็นสารที่ใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

คำสำคัญ: 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, ไนตริกออกไซด์, พรอสตาแกลนดิน E₂, iNOS, COX-2, สารต้านอักเสบ

Abstract

Overproduced or prolonged synthesis of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), and pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have been involved in pathogenesis of various inflammatory disorders. 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) was isolated from the rhizomes of *Etingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. In the present study, we investigated an inhibitory effect of MCC on NO, PGE₂, IL-1 β and TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. The significant cytotoxicity of MCC associated with concentrations of up to 37.5 μ M did not appear. MCC dose-dependently inhibited LPS-induced the production of NO, PGE₂ and IL-1 β with IC₅₀ values of 14.2 \pm 2.3, 32.7 \pm 4.7 and 2.9 \pm 0.5 μ M, respectively but not affect TNF- α production. The compound downregulated the expression of iNOS, COX-2 and IL-1 β both at protein and mRNA levels in a dose-dependent manner. Interestingly, MCC attenuated the suppression of COX-1 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. We also demonstrated that the compound decreased phosphorylation of JNK and p38 MAPKs. Our data suggest that MCC exerts anti-inflammatory effect, at least in part, via the suppression of pro-inflammatory mediators and cytokines via inhibition of JNK and p38 MAPK pathway. The compound might be used for the development of therapeutic agent for inflammation-related diseases.

Keywords: 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, nitric oxide, prostaglandin E₂, iNOS, COX-2, anti-inflammatory agent

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ นางสาวสาวิณี สีมาพันธ์ และนางสาวสกุลรัตน์ มั่นคง สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญภาพ	5
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	7
บทนำ	8
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลองและอภิปราย	23
สรุปผลการทดลอง	39
บรรณานุกรม	41
ผลผลิตของโครงการวิจัย	46
ประวัตินักวิจัย	47

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2-1	โครงสร้างทางเคมีของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอม	15
ภาพที่ 3-1	สเปกตรัม NMR ของสาร MCC	17
ภาพที่ 4-1	การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC	23
ภาพที่ 4-2	การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่ม ด้วยสาร MCC	25
ภาพที่ 4-3	การผลิต PGE ₂ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC	27
ภาพที่ 4-4	การผลิต IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC	28
ภาพที่ 4-5	การผลิต TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC	29
ภาพที่ 4-6	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์ แมคโครฟาจหนู RAW 264.7	30
ภาพที่ 4-7	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์ แมคโครฟาจหนู RAW 264.7	31
ภาพที่ 4-8	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β และ TNF- α ในเซลล์ แมคโครฟาจหนู RAW 264.7	32
ภาพที่ 4-9	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน COX-1 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู	34

		หน้า
	RAW 264.7	
ภาพที่ 4-10	ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี JNK ในเซลล์แมคโครฟาจหนู	36
	RAW 264.7	
ภาพที่ 4-11	ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี p38 MAPKs ในเซลล์แมคโครฟาจหนู	37
	RAW 264.7	
ภาพที่ 4-12	ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี ERK1/2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู	38
	RAW 264.7	

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

MCC 4-methoxycinnamyl p-coumarate

NO Nitric oxide

PGE₂ Prostaglandin E₂,

IL-1 β Interleukin-1 β

TNF- α Tumor necrosis factor- α

LPS Lipopolysaccharide

AP-1 Activate protein-1

NF- κ B Nuclear factor kappa B

iNOS Inducible nitric oxide synthase

COX Cyclooxygenase

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลาย ความรุนแรงของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือ ปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัดและทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหาย หรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้โปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวนี้เคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดอันตราย เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนกิน (phagocytosis) และหลั่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนไม่พบความผิดปกติ แต่หากระบบภูมิคุ้มกันควบคุมสาเหตุก่อนการอักเสบเฉียบพลันได้ไม่ดี ทำให้มีการหลั่ง pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines อย่างต่อเนื่องนานออกไป จึงมีการทำลาย ลุกลามอย่างต่อเนื่อง ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างกันจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น และหากการควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคหอบหืด โรคไขข้ออักเสบ

รูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และโรคเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005)

ในการอักเสบทั้งชนิดฉับพลันและเรื้อรัง จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบหลายชนิด เช่น พรอสตาแกลนดิน E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และ cytokines เป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้จะเป็นเครื่องมือทำให้เกิดการตอบสนอง และการอักเสบมากขึ้น (Van der Vliet, 2000) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้การอักเสบลดลง เป้าหมายของยาต้านการอักเสบจึงมุ่งยับยั้งหรือลดการหลั่งสารเหล่านี้ แต่ยาส่วนใหญ่ยังขาดความจำเพาะ และมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาเป็นเวลานาน (Seibert et al., 1994; Dhikav, 2002) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะหาวิธีใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิต pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบ ดังนั้นเพื่อเป็นการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้ายาต้านการอักเสบจากต่างประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาต้านการอักเสบจึงมีความจำเป็น โดยเฉพาะจากพืชและสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการต้านการอักเสบ เช่น สาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ที่เป็นสารจากเหง้าเร่วหอม (*Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรต์ (LPS) และสารนี้มีฤทธิ์สูงกว่า aminoguanidine ซึ่งเป็นสารที่รู้จักกันดีว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) คณะผู้วิจัยเล็งเห็นศักยภาพของสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate ในการนำไปพัฒนาเป็นสารต้านการอักเสบชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามเรายังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์กลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลของสารประกอบ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ที่แยกจากเหง้าเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อเป็นข้อมูลในการนำสารนี้ไปพัฒนาเป็นยาด้าน

การอักเสบ หรือในการนำไปเป็นสารนำ (lead compound) ในการพัฒนายาต้านอักเสบในอนาคต เป็นการลดการนำเข้ายาต้านอักเสบจากต่างประเทศ เป็นการประหยัดงบประมาณและอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบในระดับโมเลกุลของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

นำสารประกอบ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากเหง้าเร่วหอม ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิต ไนตริกออกไซด์, PGE₂, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง ศึกษาผลของสารต่อปริมาณโปรตีนและ mRNA ของเอนไซม์ iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 รวมทั้งเอนไซม์ COX-1 ศึกษาวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการลดการอักเสบของสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate เช่น วิถี MAPKs ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลาย ความรุนแรงของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง ตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือ ปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น ในขณะที่มีการอักเสบจะมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อหลอดเลือด จึงเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านหลอดเลือด เป็นผลให้สารน้ำและเซลล์เม็ดเลือดขาว ออกจากหลอดเลือดมายังบริเวณที่มีการอักเสบ เป็นผลให้เกิดการบวม แดง ร้อนของบริเวณที่มีการอักเสบ เม็ดเลือดขาวที่ออกมาออกหลอดเลือด เช่น นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจจะถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอมที่รุกรานทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี หลังสารสื่อกลางในการอักเสบ (Pro-inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น แบรดตีไคนิน (bradykinin), ฮีสตามีน (histamine), ไนตริกออกไซด์ และ พรอสตาแกลนดิน เป็นต้น รวมทั้ง pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) และ interleukin-6 (IL-6) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ (พิรยูท สิทธิไชยากุล, 2552; Kumar et al., 2007) ซึ่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ที่ถูกหลั่งมากเกินไป หรือหลั่งต่อเนื่องในระยะเวลาหลายๆ จะทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ มีรายงานว่า การอักเสบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกวานิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin

mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH4) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ iNOS ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity) แมคโครฟาจทำหน้าที่กำจัดจุลชีพที่บุกรุก โดยผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมากจากเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine, endotoxin ของแบคทีเรีย หรือไลโปพอลิแซกคาไรด์ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย (Coleman, 2001) การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

โพรสตาแกลนดิน (prostaglandins, PGs) เป็นสารตัวกลางในกลุ่มลิพิดที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น ควบคุมความดันโลหิต การแข็งตัวของหลอดเลือด และตอบสนองต่อการอักเสบ ในกระบวนการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์หลักคือ COX เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินที่ทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา ควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (Rao and Knaus, 2008) และอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดินในปริมาณมาก (Katzung, 2001; Rao and Knaus, 2008) PGE₂ เป็นไอโซฟอร์มหนึ่งของพรอสตาแกลนดินทำหน้าที่ร่วมกับสารในร่างกายในการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การขยายตัว

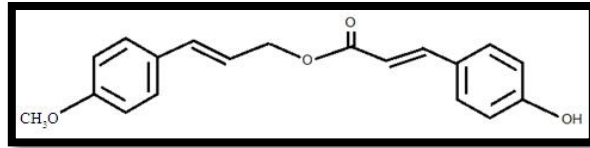
และบีบตัวของหลอดเลือด ควบคุมความดันเลือด (Serhan and Levy, 2003) และเป็นตัวกลางการอักเสบที่ กระตุ้นการทำลายเนื้อเยื่อ

มีการรายงานว่า LPS จะเข้าจับที่ Toll-like receptor 4 (TLR4) และกระตุ้นการส่งสัญญาณเพื่อ กระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ก่อให้เกิดการ แสดงออกของ iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokines (Lowenstein et al., 1993; Zhang et al., 2012) ในสถานะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จับกับโปรตีน inhibitor of κ B (I κ B) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF- κ B ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ ไซโตไคน์ต่างๆ จะเกิดการจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor) ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ inhibitor of κ B kinase (I κ B kinase) ทำให้เกิด กระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) จากนั้น I κ B จะถูกทำลายด้วยการกระบวน proteasome-mediated proteolytic ทำให้ NF- κ B อยู่ในสภาพ heterodimer ของ p65 ที่รวมกับ p50 หรือ p52 (Tak and Firestein, 2001) ทำให้สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF- κ B binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัส ของยีน การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ MAPKs อีกด้วย (Lu et al., 2012) นอกจากนี้ยังมี transcription factor ตัวอื่นที่ควบคุมการแสดงออกของยีน COX-2 และ iNOS เช่น activate protein-1 (AP-1), c-AMP response element binding protein (C/EBPs) และ CREB เป็นต้น (Yang et al., 2012)

2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

เร่วหอม [*Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.] เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและปุด พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น ระยอง จันทบุรี และ ตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลมและแก้

ห้องอัด ห้องเพื่อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย มีการนำเหง้าของ
เร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียียง ก๋วยเตี๋ยวเนื้อเลียียง แกงป่า และผัดเผ็ด การ
ปลูกเร่วหอมแต่ดั้งเดิมเป็นการปลูกเป็นพืชสวนครัว และปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย ใน
ปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้
เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (วารสารเคหเกษตร, มปป.;
รายการเกษตรกรนารู, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระ (Srisook และ Srisook, 2011) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อย
เอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริก
ออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 (PGE_2) ใน
เซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิ
เตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ลดการกระตุ้น
nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของ
เอนไซม์ iNOS และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (Palachot, 2012) ต่อมา
มีการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 4-
methoxycinnamyl 4-coumarate, p-anisic acid, p-hydroxy benzaldehyde, 4-methoxycinnamyl
alcohol, p-coumaric acid, trans-4-methoxycinnamaldehyde, สาร (E)-methyl isoeugenol,
trans-anethole และ , p-anisaldehyde และพบว่าสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate (แสดง
โครงสร้างทางเคมีในภาพที่ 1-1) ซึ่งเป็นสารที่มีการพบเป็นครั้งแรกในเหง้าเร่วหอม มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้ง
การผลิตไนตริกออกไซด์ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และสารนี้ยังลด
ปริมาณ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555)



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate
ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอม

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

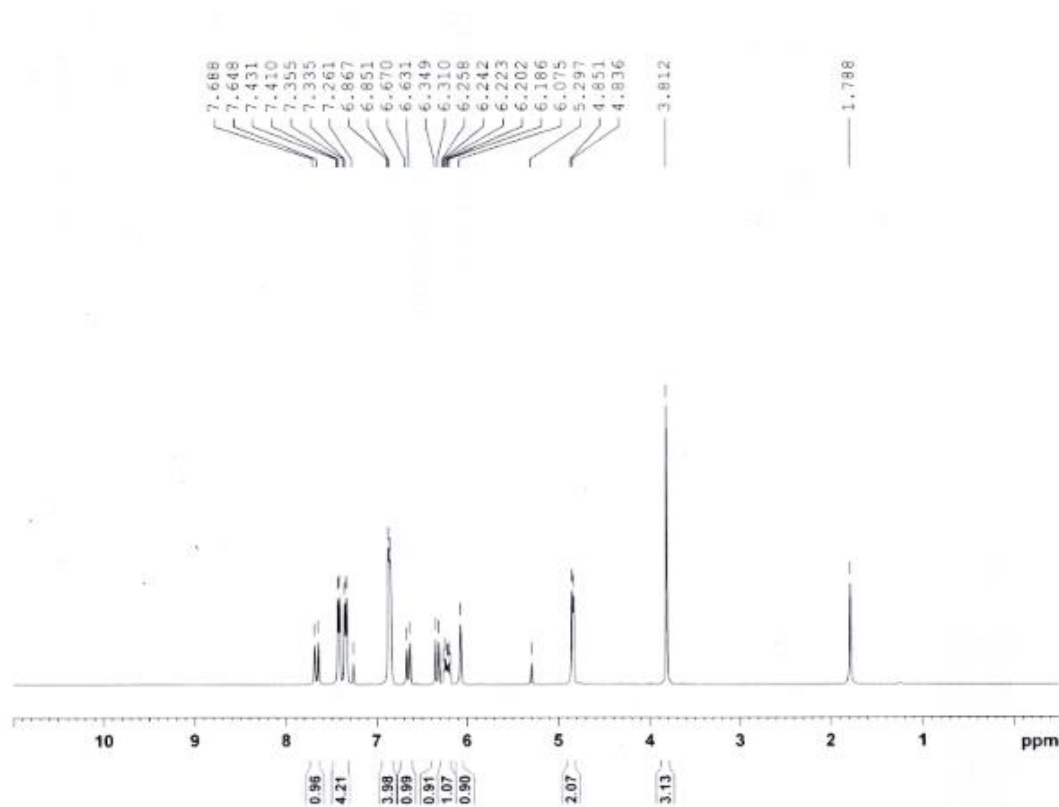
3.1 การสกัดสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) จากเหง้าเร่วหอม

นำสมุนไพรเร่วหอมประมาณ 40 กิโลกรัมจาก จังหวัดจันทบุรี มาล้างด้วยน้ำประปา และอบแห้ง บด ให้ละเอียด และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการกรอง จากนั้นนำผงพืชมาแช่ในเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้มา ทำให้แห้งโดยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ จากนั้นสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอล มาสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ

แยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากเหง้าเร่วหอมโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel เป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ 10-80% เอทิลอะซิเตต (EtOAc) ต่อเฮกเซน ตามด้วย 100% EtOAc และนำสารที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 5 ส่วนสกัดย่อย (sub fractions, SF 1-5) นำส่วนสกัดย่อย SF2 มาแยกต่อในคอลัมน์ที่บรรจุ silica เฟสเคลื่อนที่คือ 1-5 % เมทานอล (MeOH) ต่อไดคลอโรมีเทน (DCM) ตามด้วย 10% MeOH/DCM นำสารที่แยกได้ไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 2 คือส่วนสกัดย่อย SF2-1 และส่วนสกัดย่อย SF2-2 จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF2-1 แยกในคอลัมน์ที่บรรจุ silica gel และเฟสเคลื่อนที่คือ 100% DCM-5% MeOH/DCM ตามด้วย 10% MeOH/DCM และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 7 ส่วนสกัดย่อย (sub fractions, SF2-1.1-2-1.7)

นำส่วนสกัดย่อย SF2-1.4 รวมกับ SF2-1.5 และแยกในคอลัมน์ที่บรรจุ silica gel เฟสเคลื่อนที่คือ 100% DCM-5% MeOH/DCM ตามด้วย 10% MeOH/DCM และนำสารที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 3 ส่วนสกัดย่อย (sub fractions, SF2-1.4-1-2-1.4-3) จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF4 แยกในคอลัมน์ที่บรรจุ silica gel เฟสเคลื่อนที่คือ 100% DCM-5% MeOH/DCM ตาม

ด้วย 10% MeOH/DCM และนำสารที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (sub fractions, SF4-1 -4-4) ทำการตกผลึกสาร MCC ได้จากส่วนสกัดย่อย SF2-1.1 และ SF2-1.3 นำสาร MCC ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR เพื่อยืนยันว่าสารที่ได้เป็น MCC ดังแสดงสเปกตรัม NMR ในภาพที่ 2-1



ภาพที่ 3-1 สเปกตรัม NMR ของสาร MCC

3.2 การทดสอบกลไกระดับโมเลกุลในการต้านอักเสบของสาร MCC

3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสาร MCC

เซลล์ที่ใช้ศึกษากลไกในการยับยั้งการอักเสบของสาร MCC คือ เซลล์ไลน์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml

streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

จากนั้นทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสาร MCC ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อนำช่วงความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบในการทดลองต่อไป วิธีการโดยย่อดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-200 μM) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook และ Cha, 2004) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.2.2 การทดสอบสาร MCC ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$

ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS-DMEM) เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCC ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ 37 องศาเซลเซียส ที่ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 μl ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μl จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005)

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ตามสภาวะที่กล่าวไว้ด้านบนมาทดสอบการยับยั้งการผลิต PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$ ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$ ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ชุด ELISA kit สำหรับวิเคราะห์ PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$ ตามลำดับ ในการ

ทดสอบผลของสารทดสอบต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ นี้ จะใช้ยาแก้อักเสบที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ และมีเป้าหมายที่เอนไซม์ iNOS และ COX-2 ที่ขายในท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารบริสุทธิ์ที่ได้ ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.2.3 การทดสอบสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β ด้วยเทคนิค real time-reverse-transcription polymerase chain reaction (real time-RT-PCR) โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCC ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และสกัด RNA ทั้งหมด ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A₂₆₀ เท่ากับ 40 μ g/mL ของ RNA สังเคราะห์ cDNA จาก RNA ทั้งหมดที่ได้การทำปฏิกิริยากับ 5x RT supermix ซึ่งประกอบด้วย (iScript MMLV-RT (RNaseH+), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primer, buffer, MgCl₂) ปริมาตร 4 μ l และเติมน้ำที่ปราศจาก Nuclease ปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 25 °C นาน 5 นาที, 42 °C นาน 30 นาทีและ 82 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ elongation factor (EF-2) (Buapool et al., 2013) ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย (2X) iTaq™ Universal SYBR® Green supermix [antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers และ blend of passive reference dyes] จำนวน 10 μ l, 10 μ M Forward primer จำนวน 0.5 μ l, 10 μ M Reverse primer จำนวน 0.5 μ l, cDNA ที่สังเคราะห์ จำนวน 2 μ l และปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase ในสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Real-time PCR ของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ EF-2 และวิเคราะห์หา cycle of threshold (Ct) ของแต่ละปฏิกิริยาจากนั้นนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณหาโดยเปรียบเทียบเชิงสัมพัทธ์กับตัวอย่างควบคุม ตามสมการด้านล่าง

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (ตัวอย่างทดสอบ) - ΔCt (ตัวอย่างควบคุม)

$\Delta Ct = Ct$ of target gene - Ct of housekeeping gene

ในการศึกษานี้ใช้ EF-2 เป็น housekeeping gene ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

การทดสอบปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 โดยวิธี Western blot analysis โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCC ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้ง LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% (v/v) SDS, 1% (v/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40] ปริมาตร 50 μ L ที่เติมสารละลาย 1X protease inhibitors จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นเจล 10% separating gel และ 4% stacking gel นำสารละลายโปรตีนรวมที่สกัดได้ 30 μ g ผสมกับ (1X) protein loading dye [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 10% (v/v) glycerol และ 200 mM β -mercaptoethanol] และน้ำกลั่น จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ ก่อนหยอดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนจะย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่าน

กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS, COX-2 และ β -actin ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย anti-mouse IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน iNOS และ COX-2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.2.4 การทดสอบสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs

วิถี MAPKs เป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ประกอบด้วยเอนไซม์หลักคือ p38 MAPK, JNK, ERK เอนไซม์เหล่านี้เมื่อถูกกระตุ้นจะถูก phosphorylation ทำให้อยู่ในรูปที่ active โดยจะไปทำหน้าที่เร่งการ phosphorylation ให้กับ transcription factor เป้าหมาย เช่น NF- κ B และ AP-1 การทดสอบให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสาร MCC ในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 30 นาทีก่อนใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer ที่มี protease inhibitor และ phosphatase inhibitor ตามวิธีที่อธิบายไว้ใน Buapool et al. (2013) จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบน เก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป โดยวิเคราะห์โปรตีนต่างๆ ดังนี้ phospho-p38, total p38, phospho-JNK, total

JNK, phospho-ERK และ total ERK ในการศึกษาจะใช้ inhibitor ของวิถี p38 MAPK, JNK, ERK เป็น positive control ร่วมด้วยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.2.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

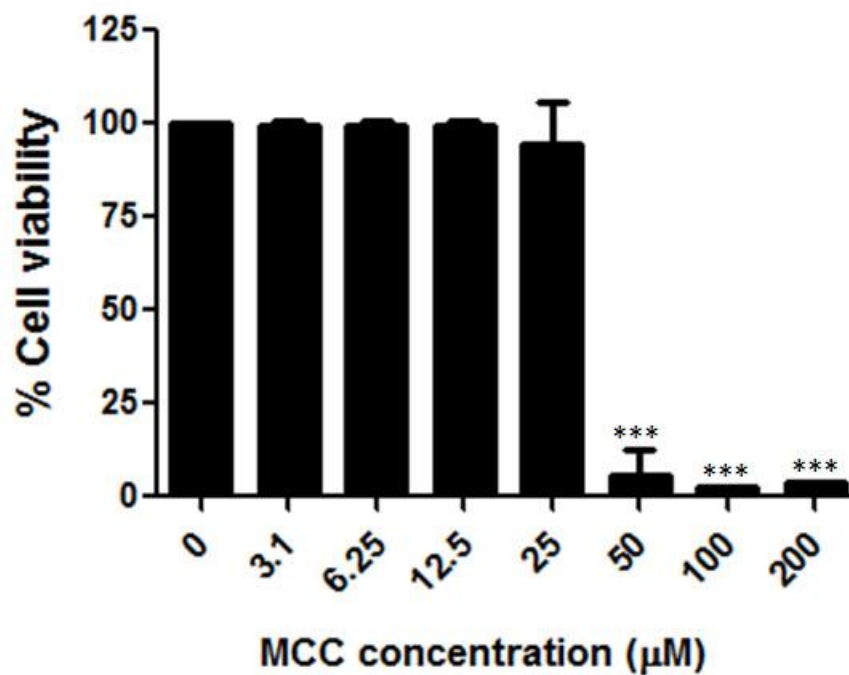
ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสาร MCC

ทำการบ่มเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้น 3.1-200 μM พบว่าสารที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 μM เป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับสารที่ 50, 100 และ 200 μM มีค่าเท่ากับ 5.75, 2.69 และ 3.76 % ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 4-1) ดังนั้นความเข้มข้นของสารทดสอบ MCC ที่ใช้ในการทดลองต่อไปจะทำการที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 μM เพื่อหลีกเลี่ยงการตายของเซลล์อันเป็นผลมาจากความเป็นพิษของสารทดสอบ



ภาพที่ 4-1 การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการ

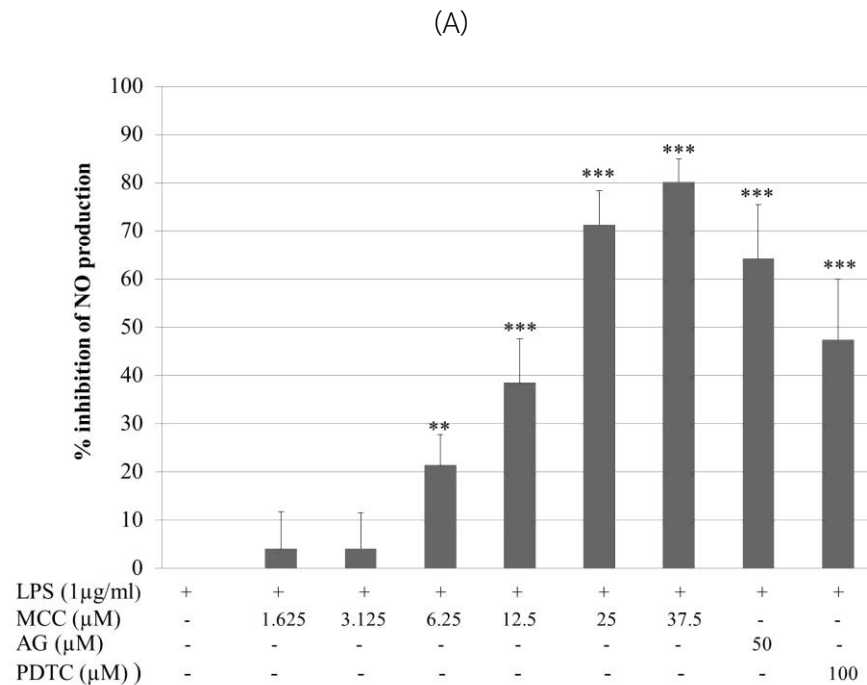
ทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่อิสระต่อกัน แต่ครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับ MCC แต่สัมผัสกับ 0.4 % (v/v) DMSO

4.2 ผลของสาร MCC ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂, TNF- α และ IL-1 β

ทำการบ่มเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ด้วย LPS กับ สาร MCC ที่ความเข้มข้น 0.7-37.5 μM และวิเคราะห์ปริมาณไนโตรทในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่บ่งบอกปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เซลล์ผลิตขึ้นมา พบว่าสาร MCC สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 4-2 มีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีค่าเท่ากับ $14.2 \pm 2.3 \mu\text{M}$ ในการทดลองนี้ใช้สารควบคุมแบบบวก 2 สาร คือ aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็น iNOS inhibitor ที่มีความจำเพาะที่ทราบกันดี (Alderton et al., 2001) ที่ความเข้มข้น 50 μM สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ประมาณ 62.2 % มีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีค่าเท่ากับ $51.1 \pm 18.7 \mu\text{M}$ อีกสารหนึ่งคือ PDTC ที่เป็น NF- κB inhibitor (Liu et al., 1999) ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ประมาณ 47.5 % จากผลที่ได้นี้จะเห็นว่าสาร MCC มีศักยภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีกว่า aminoguanidine เนื่องจากสาร MCC ที่มีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ต่ำกว่า aminoguanidine นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับสาร MCC ที่ความเข้มข้น 1.625-37.5 μM ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO

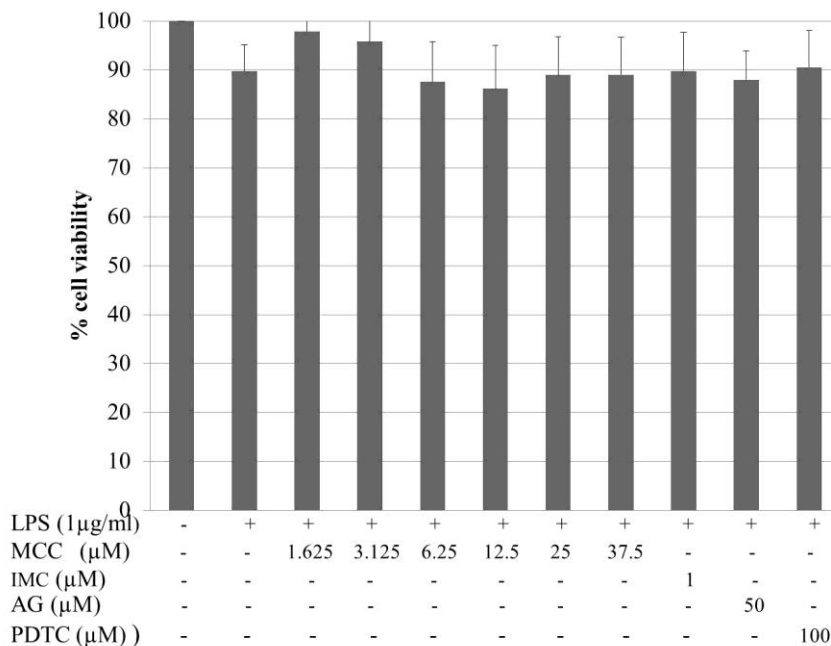
การศึกษาผลของสาร MCC ต่อการผลิต PGE₂ และ IL-1 β พบว่าสาร MCC สามารถยับยั้งการผลิต PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 25 และ 37.5 μM (ภาพที่ 4-3) มีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการผลิต PGE₂ เท่ากับ $32.7 \pm 4.7 \mu\text{M}$ สาร indomethacin (IMC) ที่เป็น COX inhibitor ที่ความเข้มข้น 1 μM สามารถยับยั้งการผลิต PGE₂ ได้ 98.8 % แสดงให้เห็นว่าศักยภาพในการยับยั้งการผลิต PGE₂ ของสาร MCC ต่ำกว่ายา indomethacin

สาร MCC ยังสามารถยับยั้งการผลิต IL-1 β ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ภาพที่ 4-4) มีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการผลิต IL-1 β มีค่าเท่ากับ 2.9 \pm 0.5 μ M สาร BAY 11-7082 ที่เป็น NF- κ B inhibitor (Strickson et al., 2013) ที่ความเข้มข้น 5 μ M สามารถยับยั้งการผลิต IL-1 β ได้ 59.9%



ภาพที่ 4-2 การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อประเมินด้วย MTT assay (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ **, *** p<0.01 และ p<0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

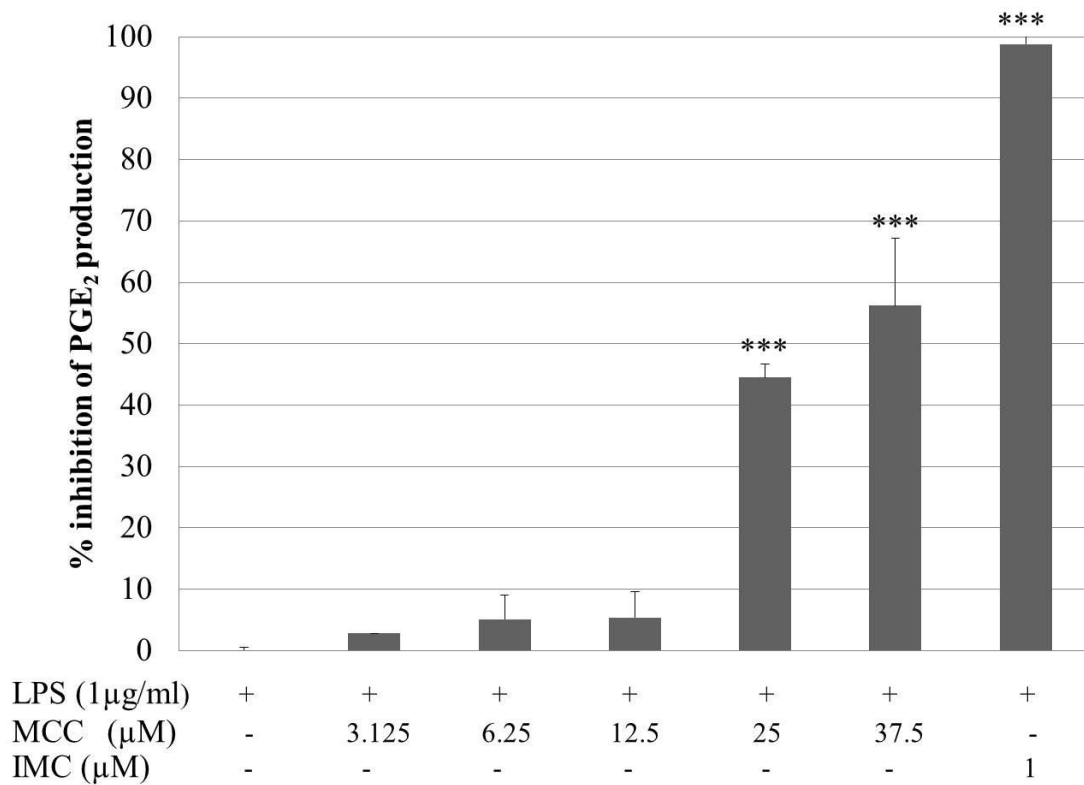
(B)



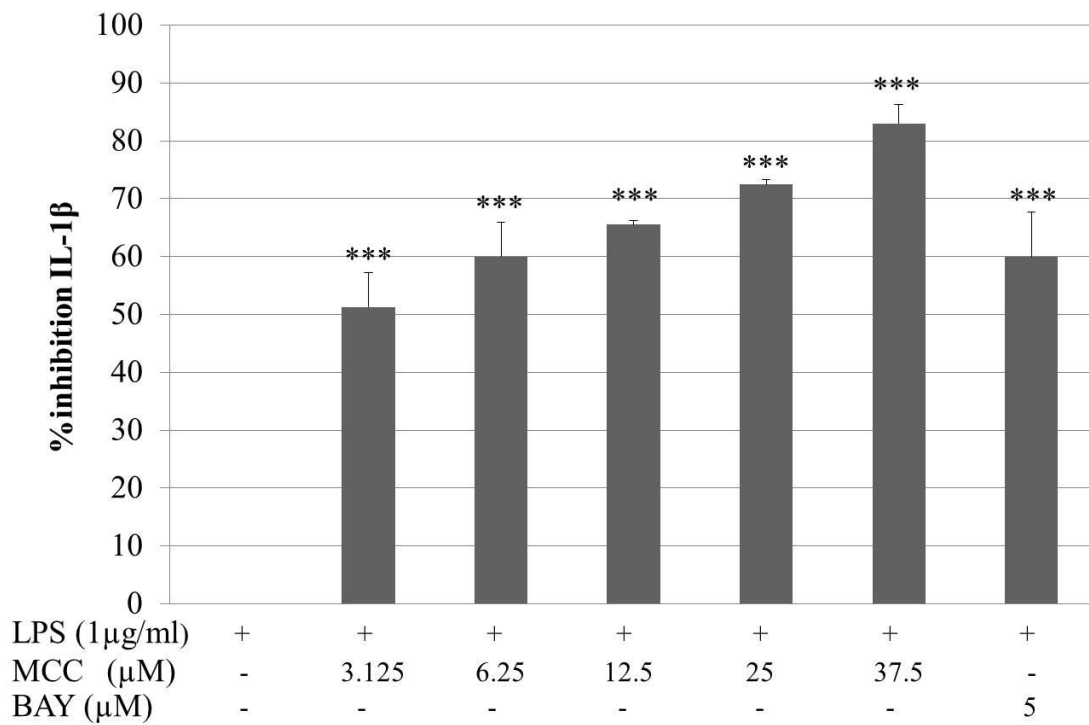
ภาพที่ 4-2 (ต่อ) การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และควมมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อประเมินด้วย MTT assay (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ **, *** $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสาร MCC ต่อการผลิต TNF- α พบว่าสาร MCC ที่ความเข้มข้น 0.7-37.5 μ M ไม่สามารถยับยั้งการผลิต TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 4-5 ในขณะที่สาร BAY ที่เป็น NF- κ B inhibitor ที่ความเข้มข้น 5 μ M สามารถยับยั้งการผลิต TNF- α ได้เพียง 15.5 %

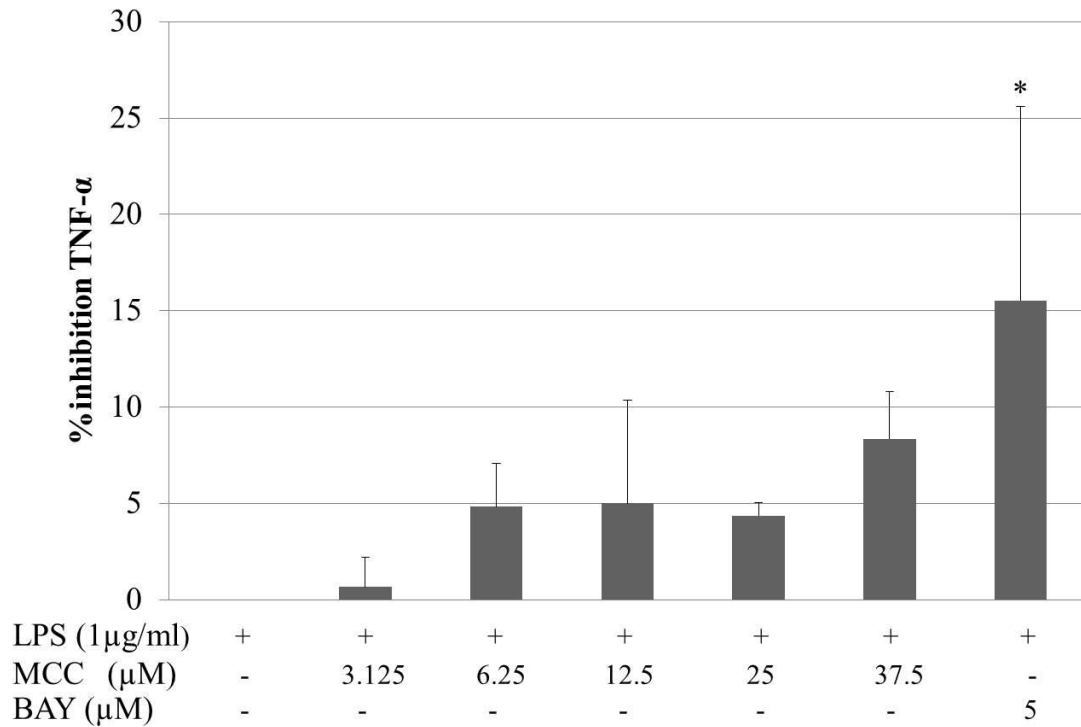
จากผลการทดลองที่ได้แสดงถึงการลดลงของปริมาณไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β ไม่ได้เกิดจากการตายของเซลล์ แต่เกิดจากการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β ของสาร MCC เอง การที่สาร MCC มีผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β แต่ไม่ยับยั้งการผลิต TNF- α นี้ อาจเป็นเพราะว่าสาร MCC ไปมีผลต่อการแสดงออกของยีนแต่ละตัวที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4-3 การผลิต PGE₂ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 4-4 การผลิต IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 1 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

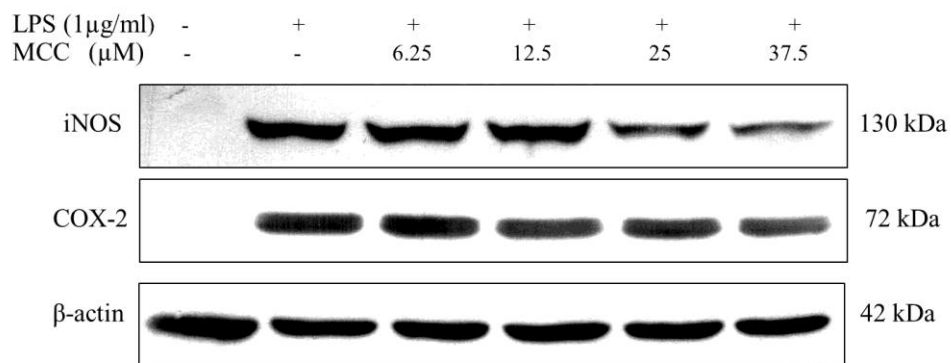


ภาพที่ 4-5 การผลิต TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 1 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4.3 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β

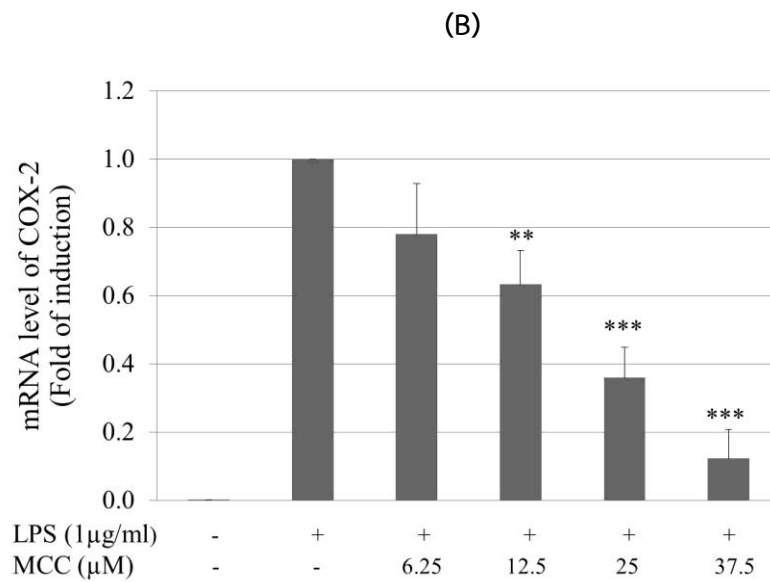
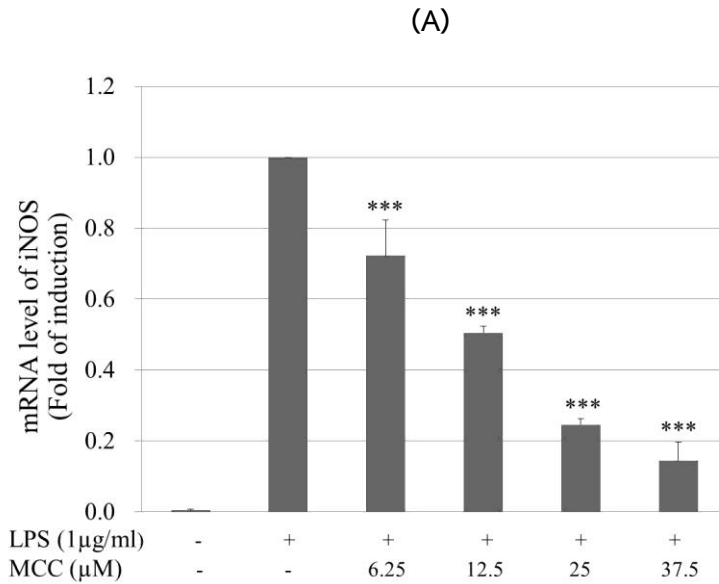
หลังจากพบว่าสาร MCC มีผลทำให้การผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β ลดลง ซึ่งการลดลงนี้อาจเป็นผลมาจากการลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุม pro-inflammatory mediator เหล่านี้ เราจึงทำการศึกษาผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β ที่ควบคุมการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂, TNF- α และ IL-1 β ตามลำดับ ผลจาก Western blot ในภาพที่ 4-6 แสดงให้เห็นว่า LPS เหนี่ยวนำให้มีปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด ในขณะที่สาร MCC ยับยั้งปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 ได้ใน

ลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ภาพที่ 4-6) โดยที่สาร MCC สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS ได้มากกว่าโปรตีน COX-2 ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ โดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.2±2.3 μM ซึ่งต่ำกว่าค่า IC₅₀ ของการผลิต PGE₂ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.7±4.7 μM

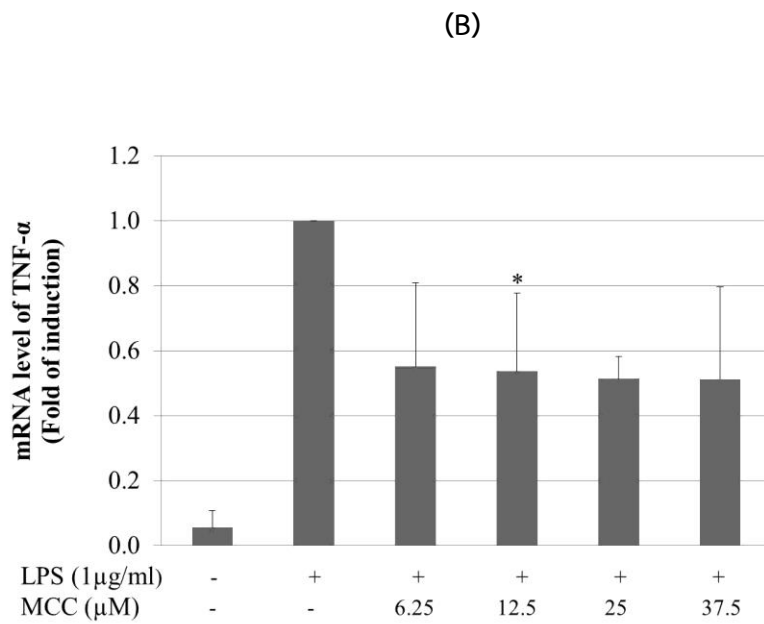
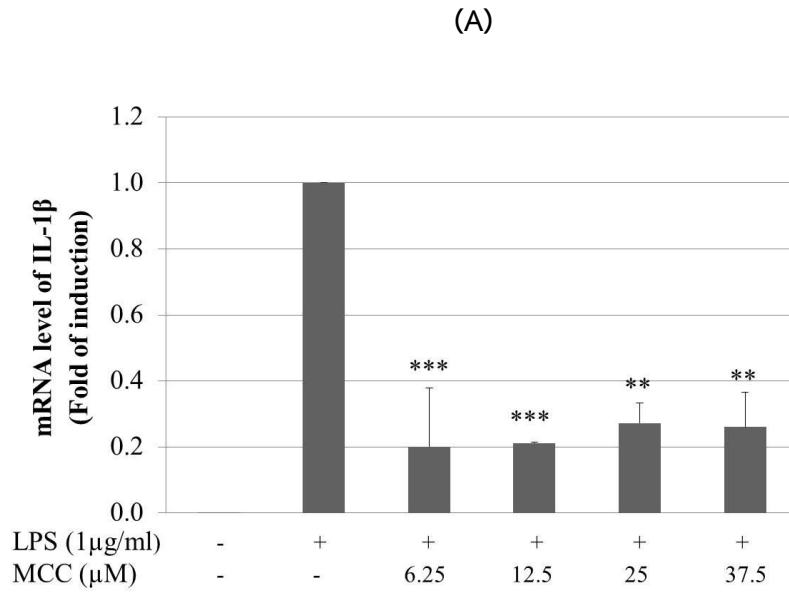


ภาพที่ 4-6 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผล Western blot ที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง

จากนั้นทำการศึกษาผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β โดยเทคนิค real time-RT-PCR พบว่าสาร MCC ลดการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ IL-1 β ที่ระดับ mRNA ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 4-7 และ 4-8A แต่ในขณะที่สาร MCC ไม่ยับยั้งปริมาณ mRNA ของ TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ภาพที่ 4-8B) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ถูกควบคุมโดยยีนเหล่านี้ (ภาพที่ 4-4 ถึง 4-6) ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่าการลดลงของการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β ที่เป็นผลของสาร MCC อาจเกิดจากการที่สาร MCC ไปลดการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ IL-1 β และทำให้ปริมาณโปรตีน iNOS, COX-2 และ IL-1 β ลดลง ส่งผลให้มีปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β ลดลงในที่สุด



ภาพที่ 4-7 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นค่า fold of induction ของ relative expression ของการแสดงออกของยีน iNOS (A) และ COX-2 (B) เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด วิเคราะห์ผลโดยเทคนิค real time-RT-PCR ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ



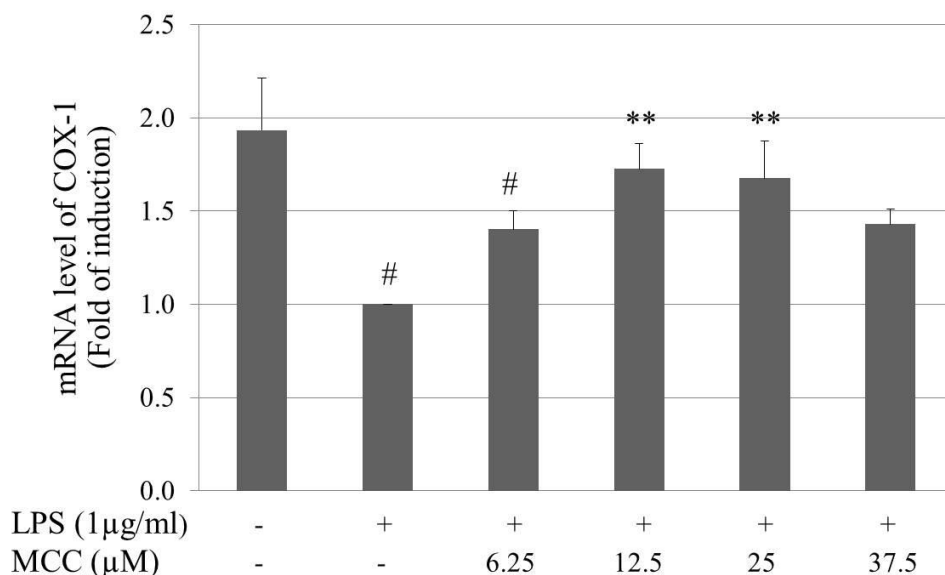
ภาพที่ 4-8 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-1 β ในเซลล์แมโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นค่า fold of induction ของ relative expression ของการแสดงออกของยีน TNF- α (A) และ IL-1 (B) เมื่อ

เทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด วิเคราะห์ผลโดยเทคนิค real time-RT-PCR ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

4.4 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน COX-1

สารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้มักจะส่งผลยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ด้วย จึงเกิดความไม่จำเพาะของการยับยั้งเอนไซม์ COX เมื่อนำไปใช้ในระดับคลินิกจึงทำให้เกิดอาการข้างเคียง เกิดแผลในกระเพาะอาหาร และมีผลให้ไตทำงานบกพร่อง (Seibert et al., 1994; Dhikav, 2002; Rao and Knaus, 2008) ดังนั้นเราจึงทำการทดสอบผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน COX-1 ภาพที่ 4-9 แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด แต่เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร MCC ที่ความเข้มข้น 25 และ 37.5 μ M และ LPS พบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 สูงกว่าเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลับมามีปริมาณไม่ต่างจากเซลล์ควบคุม ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่าสาร MCC นี้ไม่ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบผลของสาร MCC ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-1 เพื่อยืนยันผลที่ได้

การที่ LPS สามารถลดการแสดงออกของยีน COX-1 ที่มีการแสดงออกในลักษณะเป็น constitutive อาจเนื่องมาจากการควบคุมการแสดงออกของยีน COX เกิดขึ้นที่ระดับ transcription โดยยีน COX-1 ถูกควบคุมโดย transcription factor ที่ชื่อว่า Sp-1 ซึ่งมีการรายงานที่ LPS สามารถลด transcription activity ของ Sp-1 (Lee et al., 2011) จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้การแสดงออกของยีน COX-1 ในสถานะที่มี LPS ลดลง



ภาพที่ 4-9 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของยีน COX-1 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นค่า fold of induction ของ relative expression ของการแสดงออกของยีน COX-1 เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด วิเคราะห์ผลโดยเทคนิค real time-RT-PCR ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

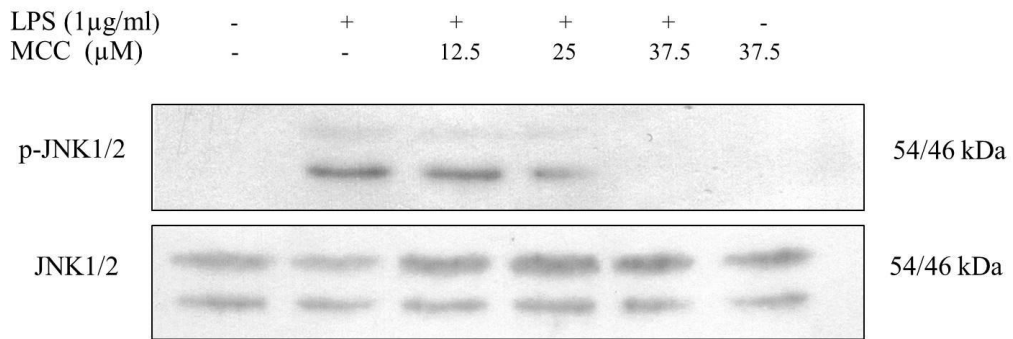
4.5 ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs

การทดลองต่อไปเป็นการศึกษาวิถีสัญญาณทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบของสาร MCC เราจึงศึกษาผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs เนื่องจากวิถี MAPKs เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน pro-inflammatory (Lu et al., 2012) จากผลการทดลองที่แสดงในภาพที่ 4-10 ถึง 4-12 พบว่า LPS กระตุ้นการ phosphorylation ของ JNK, ERK1/2 และ p38-MAPKs ซึ่งเป็นภาพของเอนไซม์ JNK, ERK1/2 และ p38-MAPKs ที่ถูกกระตุ้นในวิถีสัญญาณ MAPKs (Kaminska, 2005) เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร MCC พบว่าปริมาณการ phosphorylation ของเอนไซม์ JNK และ p38-MAPKs ลดลงในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น แต่ปริมาณการ phosphorylation ของเอนไซม์ ERK1/2 ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่

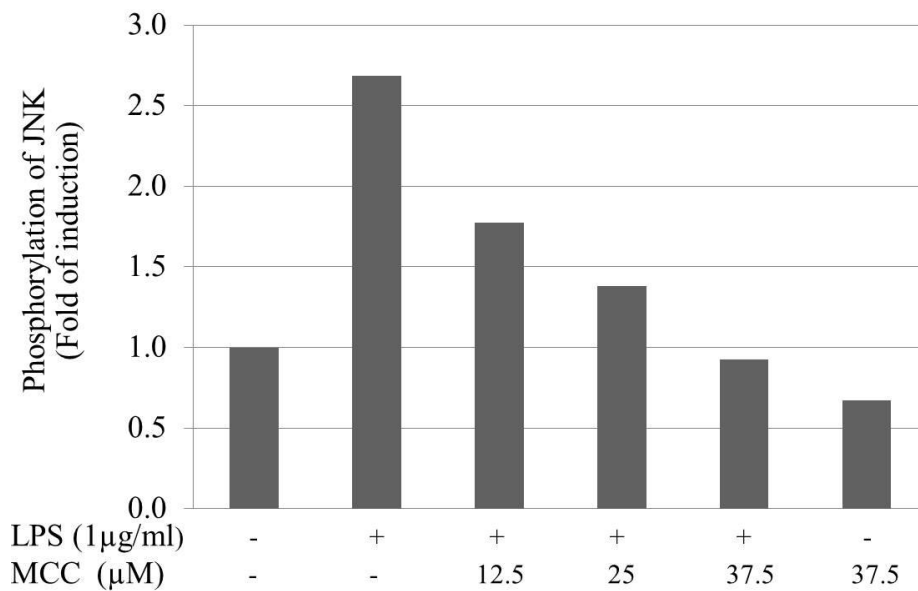
สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว สาร MCC เพียงอย่างเดียวไม่ส่งผลกับการ phosphorylation ของ JNK, ERK1/2 และ p38-MAPKs เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

Transcription factor ที่เป็นเป้าหมายหลักของเอนไซม์ JNK และ p38-MAPKs คือ c-Jun และ ATF-2 ตามลำดับ (Liew et al., 2011) ซึ่ง transcription factor ทั้งสองนี้เป็นองค์ประกอบของ activating protein-1 (AP-1) ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 (Liew et al., 2011) ดังนั้นการลดการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE₂ ของสาร MCC อาจเป็นผลมาจากการลดการ phosphorylation บนเอนไซม์ JNK และ p38-MAPKs ส่งผลให้มีการลดการกระตุ้นโปรตีน c-Jun และ ATF-2 (นั่นคือลด การ phosphorylation ของโปรตีน c-Jun และ ATF-2) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ transcription factor แฟกเตอร์ AP-1 และลดการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ในที่สุด

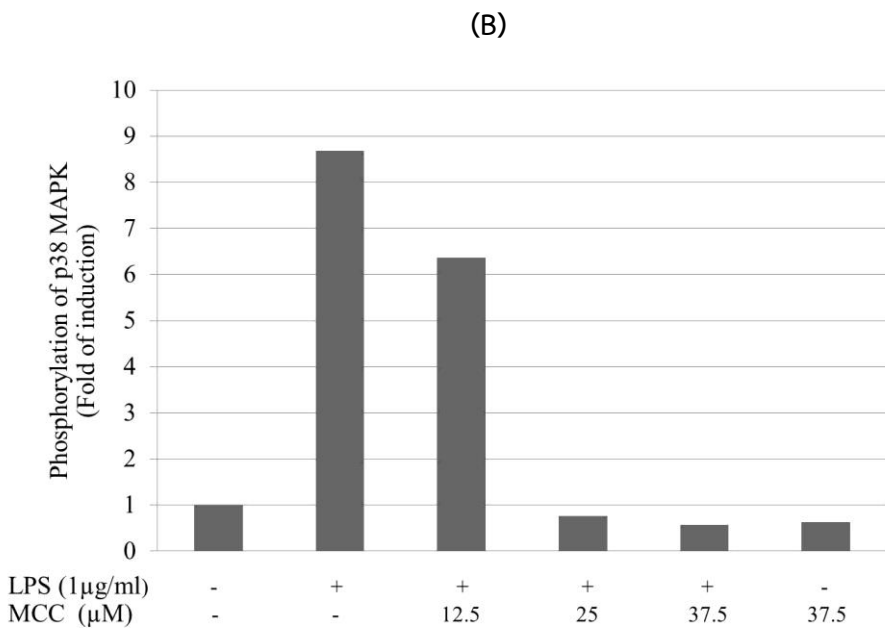
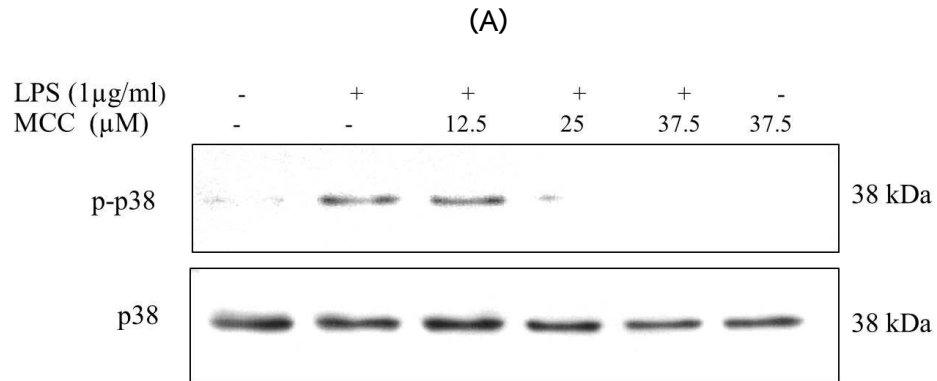
(A)



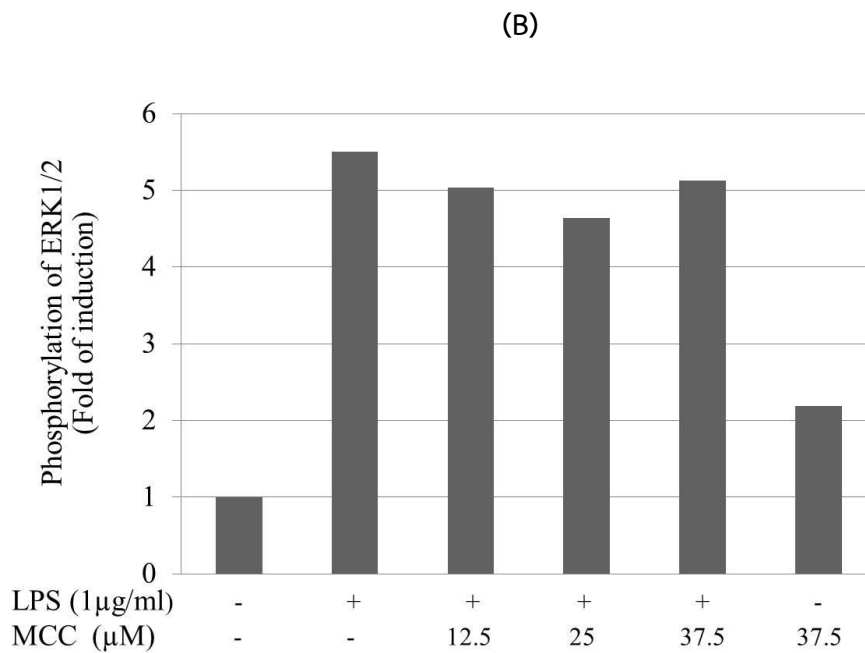
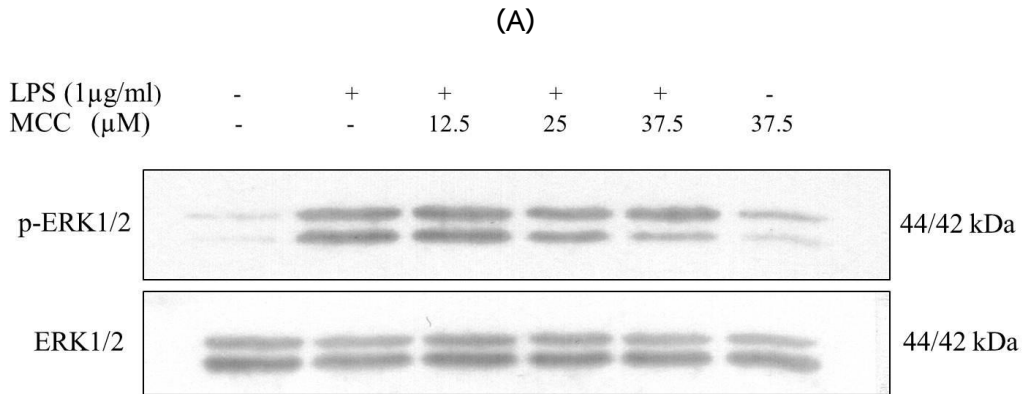
(B)



ภาพที่ 4-10 ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี JNK ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนบ่มด้วย LPS เป็นเวลา 30 นาที (A) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน iNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใดผล ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ของการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 4-11 ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี p38 MAPK ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนบ่มด้วย LPS เป็นเวลา 30 นาที (A) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน iNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใดผล ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ของการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 4-12 ผลของสาร MCC ต่อการกระตุ้นวิถี ERK1/2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนบ่มด้วย LPS เป็นเวลา 30 นาที (A) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน iNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใดผล ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ของการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. สาร MCC มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.2 \pm 2.3, 32.7 \pm 4.7 และ 2.9 \pm 0.5 μ M ตามลำดับ แต่สาร MCC ไม่ลดการผลิต TNF- α
2. สาร MCC ลดการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC แต่สาร MCC ไม่ลดการแสดงออกของยีน TNF- α
3. สาร MCC ลดการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC
4. สาร MCC เพิ่มการแสดงออกของยีน COX-1 ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
5. สาร MCC ลดการ phosphorylation ของ JNK และ p38-MAPKs ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร MCC แต่สาร MCC ไม่ลดการ phosphorylation ของ ERK1/2

ดังนั้นกลไกในการต้านอักเสบของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate หรือ MCC ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS คือการยับยั้งการผลิต pro-inflammatory mediators ได้แก่ ไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ IL-1 β และการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ IL-1 β โดยผ่านวิถีสัญญาณชีวภาพ JNK และ p38-MAPKs นอกจากนี้สาร MCC ยังไม่ยับยั้ง

การแสดงออกของยีน COX-1 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสาร MCC มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบ หรือนำไปใช้เป็น lead compound ในการพัฒนายาต้านอักเสบชนิดใหม่ ที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ COX-2 แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่แน่ชัดในการต้านอักเสบ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษของสาร MCC ในสัตว์ทดลองต่อไป

บรรณานุกรม

- พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณัภรณ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เระว้หอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเระว้หอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- พีรยุทธ สิทธิไชยากุล. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชา 499303 หลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์. ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเระว้หอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.
- 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 : 465-504.
- Coleman JW. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 1:1397-1406.
- Dhikav, V., Singh, S., Anand, K.S., (2002). Newer non-steroidal anti-inflammatory drugs—a review of their therapeutic potential and adverse drug reactions. *J. Ind. Acad. Chem. Med.* 3, 332–338.

- Dorheim MA, Tracey WR, Pollock JS, Grammas P. (1994). Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 205:659-665.
- Guzik TJ, Korbout R, Guzik TA. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54:469-487.
- Huang GJ., Pan CH., Liu FC., Wu TS., Wu CH. (2012). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the Λ -carrageenan-induced paw edema model. *Food Chem Toxicol*. 2012 May;50(5):1485-93.
- Kaminska B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1754 : 253-262.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N., (2007). *Robbins Basic Pathology*, eight ed. Elsevier Saunders, United States of America.
- Latham KA, Whittington KB, Zhou R, Qian Z, Rosloniec EF. (2005). Ex vivo characterization of the autoimmune T cell response in the HLA-DR1 mouse model of collagen-induced arthritis reveals long-term activation of type II collagen-specific cells and their presence in arthritic joints. *Journal of Immunology*. 174:3978-3985.
- Lee KH, Abas F, Alitheen NB, Shaari K, Lajis NH, Ahmad S. (2011). Curcumin Derivative, 2, 6-Bis(2, 5-dimethoxybenzylidene)- cyclohexanone (BDMC33) Attenuates Prostaglandin E2 Synthesis via Selective Suppression of Cyclooxygenase-2 in IFN- γ /LPS Stimulated Macrophages. *Mol*. 16:9728-9738.

- Liew CY, Lam KW, Kim MK, Harith HH, Tham CL, Cheah YK, Sulaiman MR, Lajis NH, Israfi DA .(2011). Effects of 3-(2-Hydroxyphenyl)-1-(5-methyl-furan-2-yl) propenone (HMP) upon signalling pathways of lipopolysaccharide-induced iNOS synthesis in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol.* 11: 85-95.
- Liu, S.F., Ye, X., Malik, A.B. (1999). .Inhibition of NF- κ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation.* 100(12):1330-1337.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America.* 90:9730-9734.
- Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, Jin Y, Li X, Hwang SL, Kwon O, Chang YC, Park YG, Park SS, Son JK, Kim CH, Chang HW. (2012). Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- κ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology.* 12:175–181.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology.* 15:323-350.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2008. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2001. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.

- Palachot M. 2012. Investigation of anti-inflammatory activity and molecular mechanism of the action of selected zingiberaceae plant extract. Master thesis. Biological science Faculty of Science, Burapha University.
- Pangoop, R. (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of the methanol extract from *Garcinia wallichii choisy* in animal models. Thesis in Master of Science. Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Rao PP, Knaus EE. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) : Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 11 : 81s-110s.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 : 12013-12017.
- Serhan CN, Levy B. (2003). Success of prostaglandin E₂ in structure–function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 : 8609-8611.
- Srisook, K., Srisook, E. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).
- Strickson, S., Campbell, D.G., Emmerich, C.H., Knebel, A., Plater, L., Ritorto, M.S., Shpiro, N., Cohen, P. (2013). The anti-inflammatory drug BAY 11-7082 suppresses the MyD88-dependent signalling network by targeting the ubiquitin system. *Biochem J*. 451(Pt 3): 427–437.

- Tak PP, Firestein GS. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 107 : 7-11.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E., (2000). Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Research* 1:67–72.
- Wright CE, Rees DD, Moncada S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*. 26:48-57.
- Yang Y, Moh SH, Yu T, Park JG, Yoon DH, Kim TW, Kim SH, Lee S, Hong S, Cho JY. (2012). Methanol extract of *Osbeckia stellata* suppresses lipopolysaccharide and HCL/ethanol-induced inflammatory responses by inhibiting Src/Syk and IRAK-1. *Journal of Ethnopharmacology*. 143 : 876-883.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141 : 206-211.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. โครงการวิจัยนี้ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี จำนวน 1 คน คือ นางสาวสกุลรัตน์ มั่นคง (อยู่ในระหว่างการศึกษา)
2. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ คาดว่าจะนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้ Sakulrut Mankhong, Ekaruth Srisook and Klaokwan Srisook. Inhibition of prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 expression by 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from the rhizomes of *Etlingera pavieana* in macrophage. Immunopharmacology and Immunotoxicology (Manuscript in preparation).
3. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของเร่วหอมที่เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของภาคตะวันออก นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของชุมชนในภาคตะวันออกของไทย

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. ชื่อ นางกล่าวขวัญ ศรีสุข
Mrs. Klaokwan Srisook
2. ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745-900 ต่อ 3058 E-mail: klaokwan@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

<u>ปี พ.ศ.</u>	<u>คุณวุฒิ</u>	<u>สาขาวิชา</u>	<u>สถานศึกษา</u>
2547	Ph.D.	Medical Science	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ อนุมูลชีววิทยา และการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

6. ผลงานทางวิชาการ

Books

กล่าวขวัญ ศรีสุข. (๒๕๕๖). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (พิมพ์ครั้งที่ ๒).

กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์.

Srisook, K. & Cha, Y. N. (2005). Biphasic induction of HO-1 in macrophages treated with lipopolysaccharide: role of HO-1 induction in cell survival from oxidative stress. In Y.J. Surh & L. Packer (Eds), *Oxidative stress, Inflammation and Health* (pp. 145-193). Boca Raton: Taylor & Francis.

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา ทริมเพ็ง และคณะ. (๒๕๕๗). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, ๑๙, ๓๐๔-๓๑๑.

กล่าวขวัญ ศรีสุข*, ปรีดาพรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ เอกรัฐ ศรีสุข. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Klaiwattana, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

, **K.**, Srisook, E., Nachaiyo, W., Chan-In, M., Thongbai, J., Wongyoo, K., et al. (2015). Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 94-102.

Jaratjaroonphong, J., Tuengpanya, S., Saeeng, R., Udompong, S., & **Srisook, K.** (2014). Green synthesis and anti-inflammatory studies of a series of 1,1-bis(heteroaryl)alkane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 561-568.

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.

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, 4077-4081.

Srisook, K., Palachot, M., Mongkol, N., Srisook, E., & Sarapusit, S. (2011). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn. may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 1008-1014.

Klaokwan Srisook, Shan-Shu Han, Hyung-Sim Choi, Mei-Hua Li, Hideo Ueda, Chaekyun Kim, Young-Nam Cha. (2006). CO from enhanced HO activity or from CO-donor inhibits both O_2^- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 71: 307-318.

Klaokwan Srisook, Nam-Hee Jung, Bum-Rae Kim, Seok-Ho Cha, Hye-Sun Kim, Young-Nam Cha. (2005). Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotection effect by NO on cadmium induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. *Toxicology in Vitro*. 19: 31-39.

Klaokwan Srisook and Young-Nam Cha. (2005). Superinduction of heme oxygenase-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 12: 70-79.

Klaokwan Srisook, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Role of NO in enhancing the expression of HO-1 in LPS-stimulated macrophages. *Methods in Enzymology*. 396: 368-377.

Klaokwan Srisook, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Cytotoxic and cytoprotective actions of O_2^- and NO ($ONOO^-$) are determined both by cellular GSH level and HO activity in macrophages. *Methods in Enzymology*. 396: 414-424.

Klaokwan Srisook, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: De-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxidants Redox Signaling*. 7: 1674-1687.

Klaokwan Srisook, Nopporn Sarataphan Kosum Chansiri. (2005). Detection of *Babesia bovis* in Cow Blood by PCR-ELISA. *Burapha Science Journal*. 10: 49-57.

Klaokwan Srisook and Young-Nam Cha. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.

Chantra Tananyutthawongese, **Klaokwan Saengsombut**, Wasana Sukhumsirichat, Walaya Uthaisang, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. (1999). Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. *ScienceAsia* 25: 85-90.

Proceedings

Srisook, K., Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.

Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. *Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.

Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. *Proceeding of the 5th international Conference on Natural Products*

for Health and Beauty (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCS Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCS) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).

Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaroonphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.

Srisook, K., Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). .A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.

Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA).

Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).

Klaokwan Srisook*, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).

Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.

Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***. Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Klaokwan Srisook and Nadtaya Mongkol. Effect of carboxy-PTIO on heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages. *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand, 2006.

Klaokwan Saengsombut, Wasana Sukhumsirichart, Jarun Boonchai, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. *Analysis of partial sequences of LSUrRNA genes of Theileria parasites isolated in Thailand and T. sergenti*. *The 25th Congress on Science and Technology of Thailand*, Pitsanuloke, Thailand, 1999, p. 804-805.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

1. ชื่อ นายเอกรัฐ ศรีสุข
Mr. Ekaruth Srisook
2. ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3009 E: mail ekaruth@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

<u>ปี พ.ศ.</u>	<u>คุณวุฒิ</u>	<u>สาขาวิชา</u>	<u>สถานศึกษา</u>
2548	Ph.D.	Chemistry	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	อินทรีย์เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่ชำนาญพิเศษ

Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural products

6. ผลงานทางวิชาการ

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมานันท์, ปรียาภา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา ทริมเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19, 304-311

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยวลักษณ์ เจริญสุข และ **เอกรัฐ ศรีสุข**. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Keun Sam Jang, Dong Seok Shin, **Ekaruth Srisook**, Ho-Chun Song, Dae Yoon Chi. (2016). Versatile functionalization of electron rich-fused heterocyclic arenes via electrophilic aromatic addition reaction and their applications. *Tetrahedron*. (In press). doi: 10.1016/j.tet.2016.07.010.

Klaiwattana, P., Srisook, K., **Srisook, E.**, Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

Klaokwan Srisook*, **Ekaruth Srisook***, Wenuka Nachaiyo, Mingkwan Chan-In, Jitra Thongbai, Karnjanapa Wongyoo, Sasithorn Chawsuanthong, Kanita Wannasri, Sudarat Intasuwan and Kingkan Watcharanawee. (2015). Bioassay-guided fractionation of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. leaves and its mechanistic action through the suppression of iNOS and COX-2 pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 165, 94-102.

Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, **Srisook E**, Rongnoparut P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 30, 174-181.

- Rattanawadee Kotewong, Panida Duangkaew, **Ekaruth Srisook**, Songklod Sarapusit, Pornpimol Rongnoparut. Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. *Parasitology research*. 2014; 113(9): 3381-3392.
- Phisit Pouyfung, Aruna Prasopthum, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2014; 29:75-83.
- Klaokwan Srisook, Doungnapa Buapool, Rattiya Boonbai, Panadda Simmasut, Yaowaluck Charoensuk, **Ekaruth Srisook**. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6; 4077-4081.
- Sirikun Pethuan, Panida Duangkaew, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Inhibition against mosquito cytochrome P450 enzymes by rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on cypermethrin cytotoxicity in *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Medical Entomology*. 2012 49(5):993-1000
- Seo JW, **Srisook E**, Son HJ, Hwang O, Cha YN, Chi DY. Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells *Eur J Med Chem*. 2008 Jun;43(6):1160-70
- Ekaruth Srisook**,^{*} Areerat Makbodee and Supatra Karngla “Synthesis of 3-Substituted-*p*-cresol via 2,5-Cyclohexadienone Intermediate” *Burapha Science Journal*. 2006, 11 (2).

JaeWoong Seo, **Ekaruth Srisook**, Hyo Jin Son, Oon Yoo Hwang, Young Nam Cha, Dae Yoon Chi. Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005,15:3369-3373.

Han Young Choi, **Ekaruth Srisook**, Kun Sam Jung, Dae Yoon Chi. Electrophilic Aromatic Addition : Electrophilic Attack at H Position. *J. Org. Chem*. 2005, 70, 1222-1226.

Ekaruth Srisook and Dae Yoon Chi, The Syntheses of 3-Substituted 4-(Pyridin-2-ylthio)indoles via Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2004, 25, 895-899.

Gloria L. Silva, Roberto R. Gil, Baoliang Cui, Heebyung Chai, Thawatchai Santisuk, **Ekaruth Srisook**, Vichai Reutrakul, Patoomratana Tuchinda, Smaisukh Sophasan, Suparp Sujarit *et al.* Novel cytotoxic ring-a seco-cycloartane triterpenes from *Gardenia coronaria* and *G. sootepensis*. *Tetrahedron*, 1997, 53, 529-538.

Proceedings

Srisook, K., Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.

Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. *Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.

- Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. *Proceeding of the 5th international Conference on Natural Products for Health and Beauty* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.
- Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSC Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSC) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).
- Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaronphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.
- Srisook, K.**, Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). .A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.
- Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).

Klaokwan Srisook*, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etingera paviana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).

Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.

Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9^h National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Phrommanich, S., Techasauvapak, P., **Srisook, E.**, Mujchacheep, S., Hrimpeng, K. *Screening for anti-Staphylococcus aureus activity of plant extracts*. The 18th Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2000.8.

Ekaruth Srisook, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. Syntheses and biological activity of NAMDA derivatives. The 1st Congress on Chemistry and Applied Chemistry, Chonburi, Thailand, Mar 2007.

Ekaruth Srisook*, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. "Syntheses of NAMDA derivatives as nitric oxide reducing agents." *The 6th National Symposium on Graduate Research, Bangkok, Thailand, 2006*.