

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
การสังเคราะห์และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารไตรเอริลมีเทน  
แบบไม่สมมาตร  
Synthesis and anti-inflammatory activity of asymmetrical  
triarylmethanes

โดย

ผศ.ดร. จเร.จรัสจรรยาพงศ์

อ. ดร. ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 46

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณปี 2557

## บทคัดย่อ

สาร Tert-butyl 2-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate หรือ JJSRUN16 เป็นสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ไตรเอริลมีเทนแบบไม่สมมาตร ในการศึกษาทำการตรวจสอบกลไกในการต้านอักเสบของสาร JJSRUN16 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) ผู้วิจัยพบว่าสาร JJSRUN16 มีศักยภาพในการลดการผลิต ไนตริกออกไซด์ การแสดงออกโปรตีนและ mRNA ของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น สาร JJSRUN16 ไม่มีผลต่อการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> และการแสดงออกของเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) และสารยังไม่ลดการแสดงออกของยีน COX-1 สาร JJSRUN16 สามารถยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของ NF- $\kappa$ B p65 ได้ นอกจากนี้สาร JJSRUN16 ลดการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ c-Jun N-terminal kinases (JNKs) และ p38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่ยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของ extracellular signal-regulated kinases (ERKs) ดังนั้น จากข้อมูลของผู้วิจัยชี้ให้เห็นว่า สาร JJSRUN16 สามารถไปกุดการตอบสนองต่อการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS โดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ผ่านการยับยั้งวิถีสัญญาณ JNK/p38 MAPK และ NF- $\kappa$ B

**คำสำคัญ:** ไตรเอริลมีเทนแบบไม่สมมาตร, ไนตริกออกไซด์, พรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

## ABSTRACT

Tert-butyl 2-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate or JJSRUN16 is a novel synthetic derivative of asymmetrical triarylmethane. In the present study, JJSRUN16 was investigated the mechanism underlying its anti-inflammatory effect in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. We found that JJSRUN16 potently reduced inducible nitric oxide (NO) production, expression of mRNA and protein of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a concentration-dependent manner. Production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression were not effected by JJSRUN16. Also, the compound did not decrease the expression of COX-1 gene. JJSRUN16 inhibited nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 subunit into the nucleus. Furthermore, JJSRUN16 significantly decreased phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK) but not extracellular signal-regulated kinases (ERKs). Taken together, our data suggest that JJSRUN16 suppresses LPS-stimulated inflammatory response by inhibition of NO production through inhibition of the JNK/p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways.

**Keywords:**Asymmetrical triarylmethanes, Nitric oxide, ProstaglandinE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, Anti-inflammatory effect

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาววิภาดา ศิริตันหยงและนางสาวฐิติพร ทองเย็นสำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

## สารบัญ

หน้า	
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทนำ	5
วิธีการทดลอง	19
ผลการทดลอง	28
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	37
บรรณานุกรม	41
ผลผลิตของโครงการวิจัย	44

# บทที่ 1

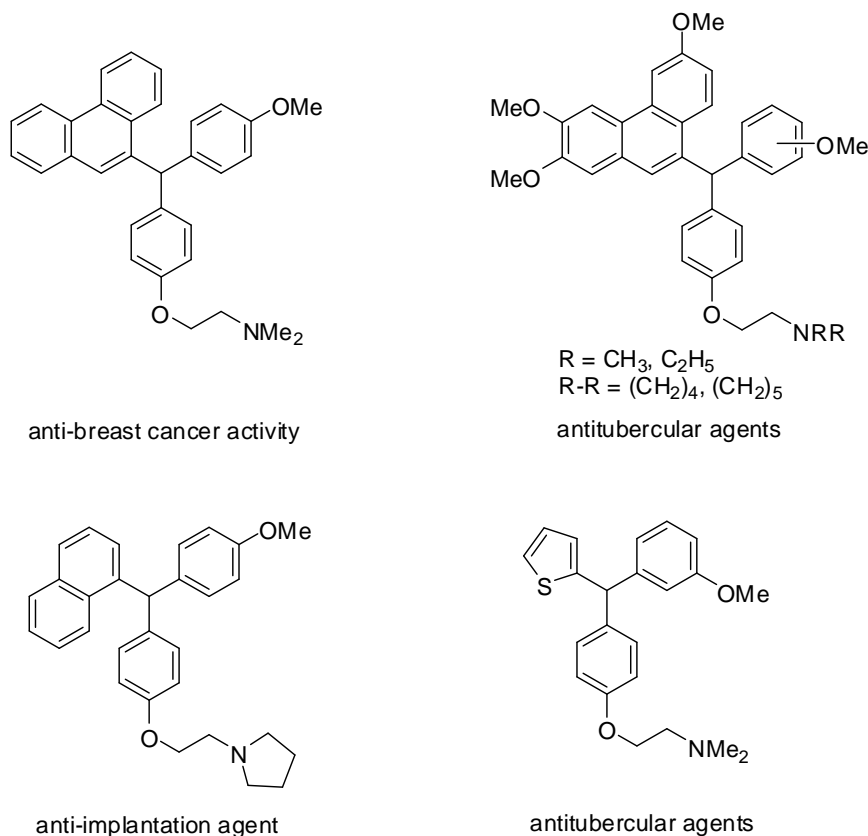
## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารเคมีที่ใช้เป็นยารักษาโรคในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสารที่สกัดแยกได้มาจากธรรมชาติทั้งจากพืชและสัตว์ อย่างไรก็ตามกระบวนการแยกสารจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์นั้นมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณที่ได้รับไม่เพียงพอกับความต้องการ ดังนั้นการสังเคราะห์สารขึ้นมาใช้เป็นยาจึงก้าวมามีบทบาทอย่างมากเนื่องจากสามารถสังเคราะห์สารได้ในปริมาณมากๆ อีกทั้งยังสามารถปรับปรุงโครงสร้างของสารเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางยาที่เพิ่มสูงขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นและมีผลข้างเคียงลดน้อยลง

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาอันซับซ้อนที่เนื้อเยื่อต่างๆ ตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ รวมทั้ง ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และโพรสตาแกลดิน E2 (Prostaglandins E2) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ ทั้งไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลดิน E2 มีฤทธิ์ส่งเสริมการอักเสบ ในปัจจุบันมีรายงานว่า การอักเสบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ เป็นต้น

สารในกลุ่ม asymmetrical triarylmethane (TRAMs) เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งเต้านม (anti-breast cancer activity) (Shagufta et.al., 2006) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควัณโรค (antitubercular หรือ anti-TB) (Parai et.al., 2008) และมีฤทธิ์เป็น ligand ที่สามารถจับกับ estrogen receptor ทำให้เกิดการยับยั้งการฝังตัวของฮอร์โมนเอสโตรเจนทั้งใน พลาสมาเมมเบรน และ cytoplasm ของเซลล์ (anti-implantation agent) (Srivastva et.al., 2004) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1-1 นอกจากนี้ในทางอุตสาหกรรมสามารถนำอนุพันธ์ของสาร asymmetric triarylmethane มาใช้เป็นสีย้อม (dyes) (Nair et.al., 2006) ได้อีกด้วย



รูปที่ 1-1 ตัวอย่างของสารอนุพันธ์ของ asymmetric triarylmethane ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการค้นหาข้อมูลพบว่า การสังเคราะห์สารในกลุ่ม asymmetric triarylmethane ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ยังมีอยู่ไม่กี่วิธี และส่วนใหญ่จะต้องใช้วิธีการที่ยุ่งยากหรือต้องใช้สภาวะที่รุนแรง เช่น ปฏิกริยาการเติมหมู่คาร์บอนิลของอัลดีไฮด์หรือคีโตนด้วยสารประกอบ organometallic หรือ Grignard reagent ได้เป็น diarylcarbinol ซึ่งต้องทำปฏิกิริยาต่อกับ phenolic compound ในสภาวะกรดจึงจะได้ asymmetric triarylmethane นอกจากนี้ยังได้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ต่ำอีกด้วย ( Parai, 2008) อีกวิธีการหนึ่งได้แก่ปฏิกิริยาระหว่าง arylboronic acid กับ arylaldehyde ภายใต้สภาวะที่มี พาลาเดียม( II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น diarylcarbinol ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับ electron-rich arene ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น asymmetric triarylmethane (Lin, S. & Lu, X., 2007, Yu, J-Y. & Kuwano, R., 2008) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts alkylation และ aza-Friedel-Crafts reaction ของสารประกอบอะโรมาติกกับอะโรมาติกอัลดีไฮด์หรืออะโรมาติกอิมีนภายใต้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารประกอบ asymmetric triarylmethane สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เคยมีรายงานไว้ ได้แก่ [ Ir(COD)Cl]<sub>2</sub>-SnCl<sub>4</sub> (Podder et. al. 2007), Cu(OTf)<sub>2</sub> (Esquivias et.al., 2006), FeCl<sub>3</sub> (Li et.al., 2008) และ ZnBr<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> (Kodomari et.al., 2008) อย่างไรก็ตามตัวเร่งปฏิกิริยาส่วนใหญ่เป็นสารที่มีราคาแพงหรือต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรงและวิธีการเตรียม asymmetric triarylmethane ยังมีข้อจำกัดอยู่ ดังนั้นการศึกษาหาตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้

เกิดผลิตภัณฑ์ทั้ง asymmetric triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก ไม่มีหรือมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย และใช้สภาวะในการทดลองที่ไม่รุนแรงยังเป็นหัวข้อของงานวิจัยที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก

ไอโอดีน (I<sub>2</sub>) เป็นรีเอเจนต์ที่มีการค้นพบมาอย่างยาวนาน (>100 ปี) อย่างไรก็ตามการนำไอโอดีนมาใช้ประโยชน์ด้านการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้มีการศึกษาเมื่อประมาณสิบกว่าปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์พบว่าสามารถนำไอโอดีนมาใช้ทำปฏิกิริยาได้หลายชนิด เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของอัลกอฮอล์ เอมีน ซัลไฟด์และสารอะโรมาติก เป็นตัวเร่งสำหรับปฏิกิริยา protection และ deprotection ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ปฏิกิริยาการปิดวงแหวน (iodocyclization) ปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนกับคาร์บอน และปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบเฮทเทอโรอะโรมาติก เป็นต้น นอกจากนี้ไอโอดีนสามารถใช้สังเคราะห์สารชนิดต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งที่น่าสนใจของไอโอดีน ก็คือ เป็นสารที่มีราคาถูก มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย ใช้วิธีการที่ง่ายไม่ซับซ้อน และสามารถสังเคราะห์สารในปริมาณมากๆได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นวิธีการสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรม (Togo, H. & Iida, S., 2006, Jereb et.al.,2011)

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะหาวิธีสังเคราะห์สาร asymmetric triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts แบบขั้นตอนเดียวของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ aromatic aldehyde, tert-butyl carbamate และ electron-rich arene โดยใช้ไอโอดีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น diarylmethylcarbamate ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำคัญที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น asymmetric triarylmethane และสารอนุพันธ์อื่นๆมากมาย นอกจากนี้ในงานวิจัยจะนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ด้านการออกฤทธิ์ เพื่อหวังว่าจะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ด้านการออกฤทธิ์ที่สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย ในปริมาณมาก มีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและไม่มีผลข้างเคียงเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไปสารเคมีที่ใช้เป็นยารักษาโรคในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสารที่สกัดแยกได้มาจากธรรมชาติทั้งจากพืชและสัตว์อย่างไรก็ตามกระบวนการแยกสารจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์นั้นมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณที่ได้รับไม่เพียงพอกับความต้องการ ดังนั้นการสังเคราะห์สารขึ้นมาใช้เป็นยาจึงก้าวข้ามมีบทบาทอย่างมากเนื่องจากสามารถสังเคราะห์สารได้ในปริมาณมากๆ อีกทั้งยังสามารถปรับปรุงโครงสร้างของสารเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางยาที่เพิ่มสูงขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นและมีผลข้างเคียงลดน้อยลง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร asymmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการออกฤทธิ์ด้านการออกฤทธิ์
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร asymmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการออกฤทธิ์ด้านการออกฤทธิ์



### 1.3ขอบเขตของการทดลอง

ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ tert-butyl 2-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate(JJSRUN16) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ asymmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านอักเสบในการโครงการวิจัยในปีที่ 1 จากนั้นนำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ JJSRUN16 มาทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 246.7 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิต ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในระดับโปรตีนและ mRNA รวมทั้งทดสอบการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ transcription factor NF- $\kappa$ B p65 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 246.7 และการยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของ mitogen-activated protein kinase (MAPKs)

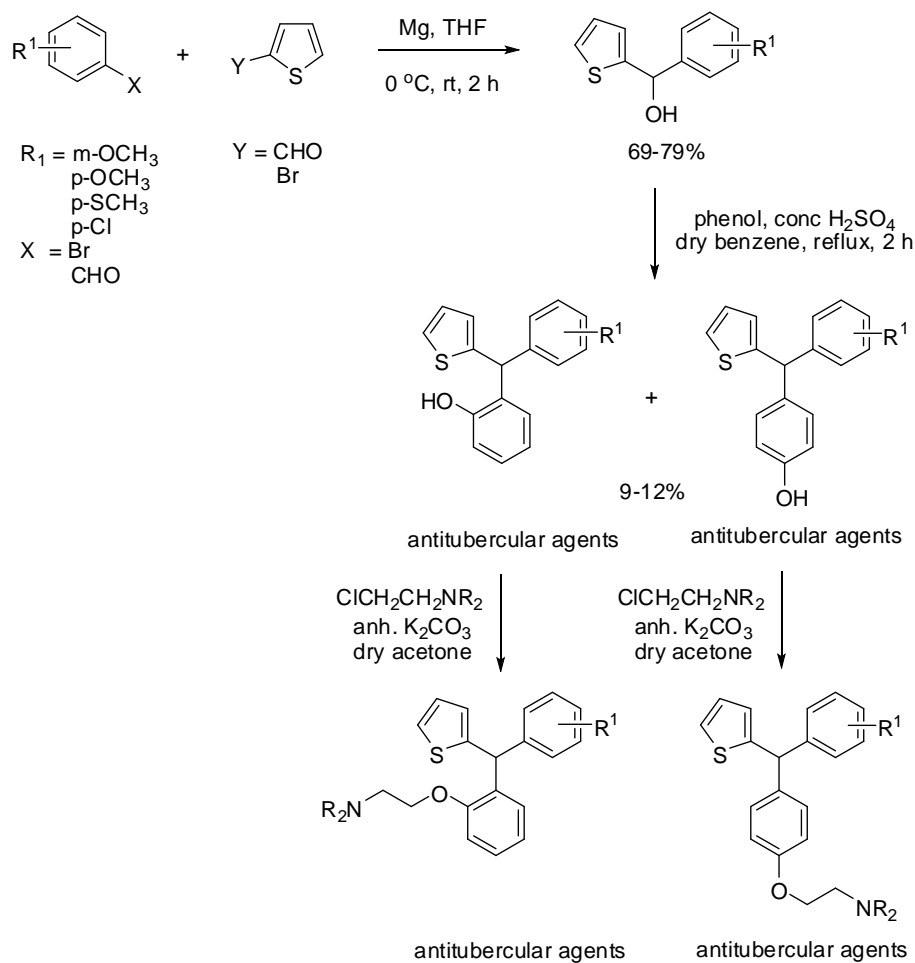
### 1.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

#### 1.4.1 การสังเคราะห์สาร asymmetric triarylmethane

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบ asymmetric triarylmethanes เป็นงานที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญและมีรายงานอย่างต่อเนื่องในวารสารนานาชาติเนื่องจากพบว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของยาและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย อีกทั้งสารประกอบเหล่านี้ยังเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบชนิดอื่นๆ ได้มากมาย งานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นพัฒนา รีเอเจนต์ (reagent) ชนิดใหม่เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์และการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบ asymmetric triarylmethanes ตัวอย่างการสังเคราะห์ที่เคยมีรายงานไว้มีดังนี้

- 1) การสังเคราะห์ asymmetric triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง aldehyde กับ Grignard reagents

ในปี ค.ศ. 2008 Panda และคณะ (Parai et.al., 2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบ asymmetric triarylmethane ที่มีวง thiophene อยู่ในโมเลกุล โดยขั้นตอนได้เตรียมสารประกอบ carbinol จากปฏิกิริยาระหว่าง aldehyde กับ Grignard reagent จากนั้นนำ carbinol ไปทำปฏิกิริยาต่อกับ phenol โดยมีกรดซัลฟูริกเข้มข้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าได้อนุพันธ์ของ asymmetric triarylmethane ที่มีวง thiophene อยู่ในโมเลกุลเพียงเปอร์เซ็นต์เล็กน้อยเท่านั้น (9-12%) นอกจากนี้ยังได้ผลิตผลิตภัณฑ์สองชนิดที่เป็นไอโซเมอร์กันอีกด้วย นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้เปลี่ยนหมู่ hydroxyl ของ phenol ไปอนุพันธ์ของ aminoalkylether ชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรค (antitubercular agents) ดังแสดงในรูปที่ 1-2

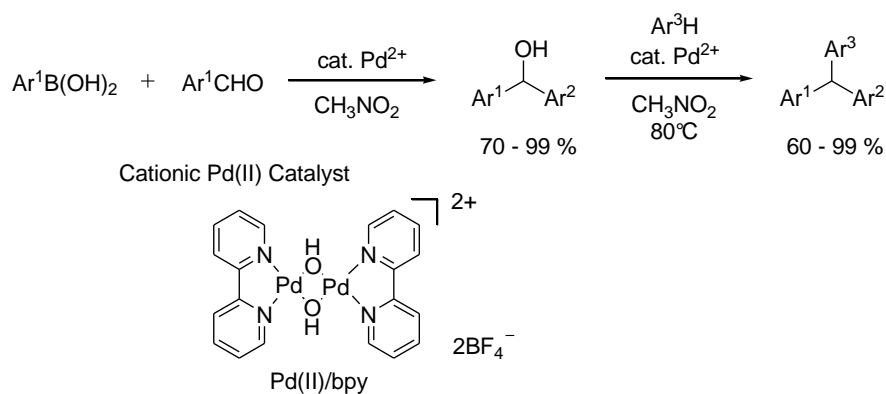


รูปที่ 1-2

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรค (antitubercular agents) พบว่า สาร asymmetric triarylmethane ที่สังเคราะห์ข้างต้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> ในระดับ 3.12-12.5 µg/mL ในหลอดทดลอง

2) การสังเคราะห์ asymmetric triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง aldehyde กับ arylboronic acids

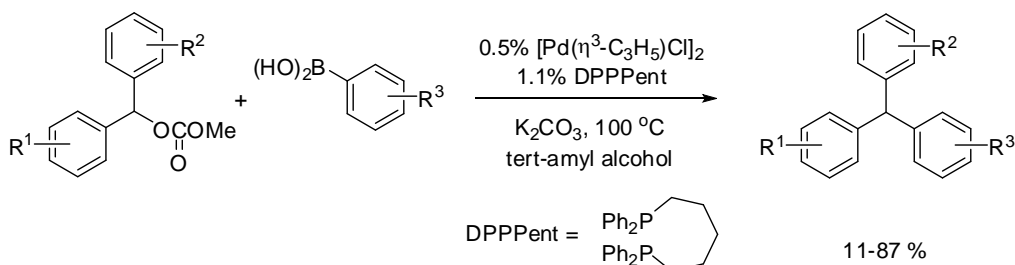
ในปี ค.ศ. 2007 Lu และ Lin (Lin, S. & Lu, X., 2007) ได้ใช้ Pd<sup>2+</sup> ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแคทไอออนิก (cationic) ในปฏิกิริยาการเติมโดยใช้สารตั้งต้นเป็น arylboronic acid ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehyde และ electron-rich arene เพื่อสังเคราะห์ asymmetric triarylmethane ดังรูปที่ 1-3 แม้ว่าวิธีการนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ที่ดี แต่สารประกอบ arylboronic acid และ Pd<sup>2+</sup> ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ค่อนข้างมีราคาแพง และมีข้อจำกัดในการเตรียมสารตั้งต้นอีกด้วย



รูปที่1-3ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane โดยใช้ Pd(II)/bipyridine

3) การสังเคราะห์ asymmetric triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยา Suzuki-Miyaura coupling ระหว่าง diarylmethylcarbonate กับ arylboronic acids

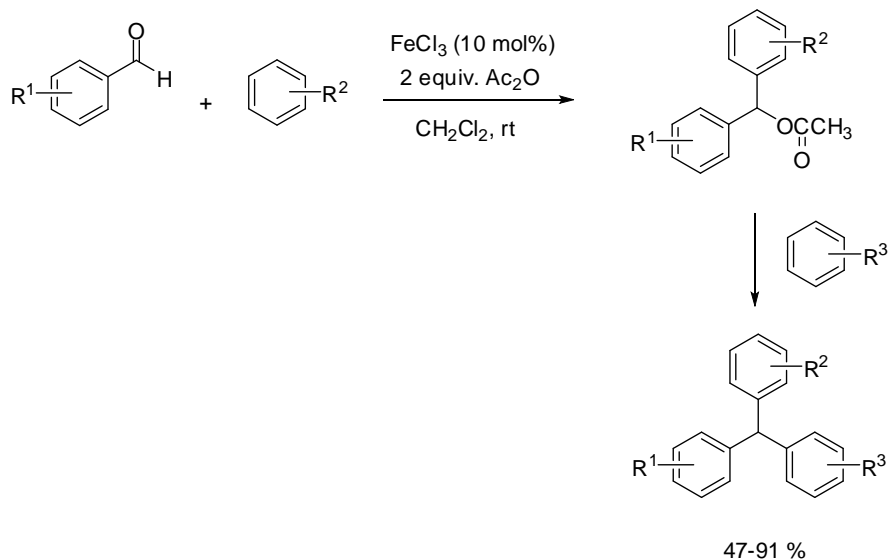
ในปี ค.ศ. 2008 Yu และ Kuwano (Yu, J.-Y. & Kuwano, R., 2008) ได้ใช้ Pd-complex เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Suzuki-Miyaura coupling ระหว่าง diarylmethylcarbonate กับ arylboronic acids พบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น asymmetric triarylmethane ในเปอร์เซ็นต์ต่ำถึงสูง (11-87%) และต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง (100 °C) ดังรูปที่ 1-4



รูปที่1-4ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วย Suzuki-Miyaura coupling

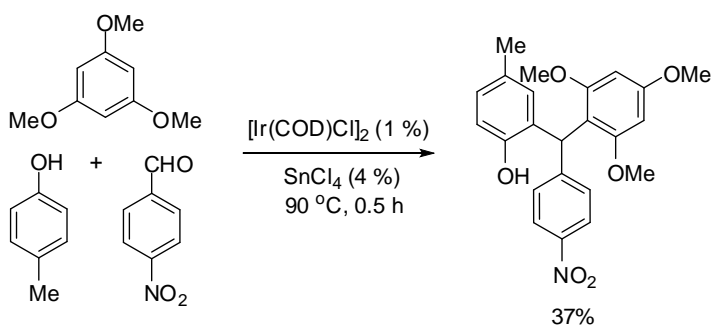
4) การสังเคราะห์ asymmetric triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา Friedel-Crafts alkylation Wu และคณะ (Li et al., 2008) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ asymmetric triarylmethane จากอะโรมาติกอัลดีไฮด์กับ electron-rich arenes โดยใช้ FeCl<sub>3</sub> เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 1-5

ข้อดีของวิธีการนี้คือ สามารถเตรียม asymmetric triarylmethane ภายในขั้นตอนเดียวและได้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ปานกลางถึงสูง อย่างไรก็ตามต้องใช้ acetic anhydride ซึ่งในปัจจุบันเป็นสารประเภทยาเสพติดให้โทษ ทำให้ซื้อได้ยาก



รูปที่ 1-5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ triarylmethane โดยใช้  $Ac_2O$  และ  $FeCl_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

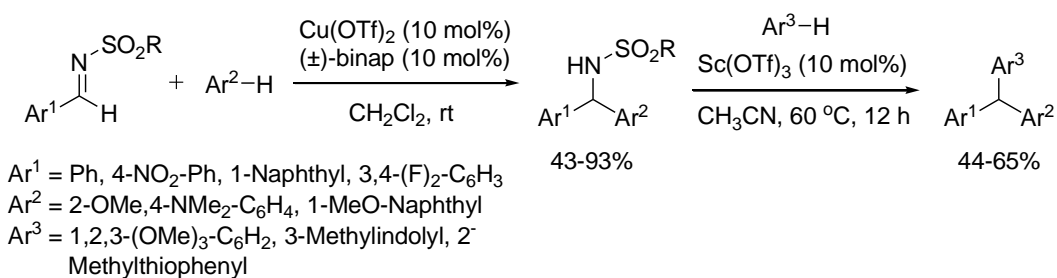
ในปี ค.ศ. 2007 Podder และคณะ (Podder et.al. 2007) ได้ศึกษาปฏิกิริยาของ 4-nitrobenzaldehyde (1 mmol) กับ 1,3,5-trimethoxybenzene (1 mmol) และ 4-methylphenol (1 mmol) ภายใต้สภาวะที่มีสารผสมของโลหะสองชนิดได้แก่  $[Ir(COD)Cl]_2-SnCl_4$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ  $90^\circ C$  พบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น asymmetric triarylmethane 37% (รูปที่ 1-6).



รูปที่ 1-6 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ triarylmethane โดยใช้  $Ac_2O$  และ  $FeCl_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

5) การสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา Aza-Friedel-Crafts

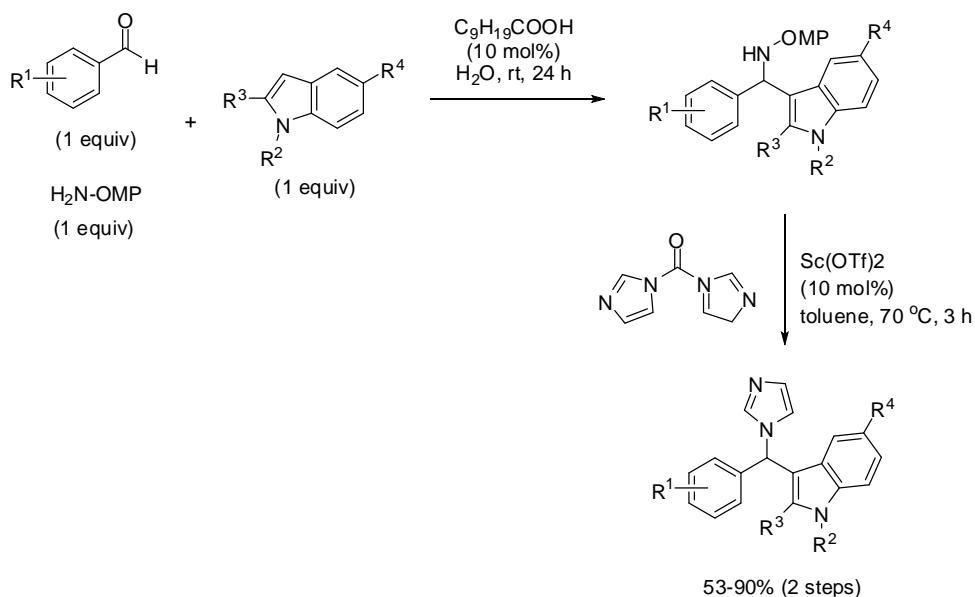
ในปี ค.ศ. 2006 Arrayás และ Carretero (Esquivias et.al. 2006) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts reaction ระหว่าง arenes ชนิดต่างๆ กับ aromatic N-tosyl-imine โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$  ร่วมกับ ( $\pm$ )-binap ได้ผลิตภัณฑ์เป็น diarylmethylamine จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ arenes โมเลกุลที่สองโดยใช้  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้ asymmetrical triarylmethane เป็นผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในรูปที่ 1-7



รูปที่ 1-7 การใช้  $\text{Cu}(\text{OTf})_2/(\pm)\text{-binap}$  และ  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์

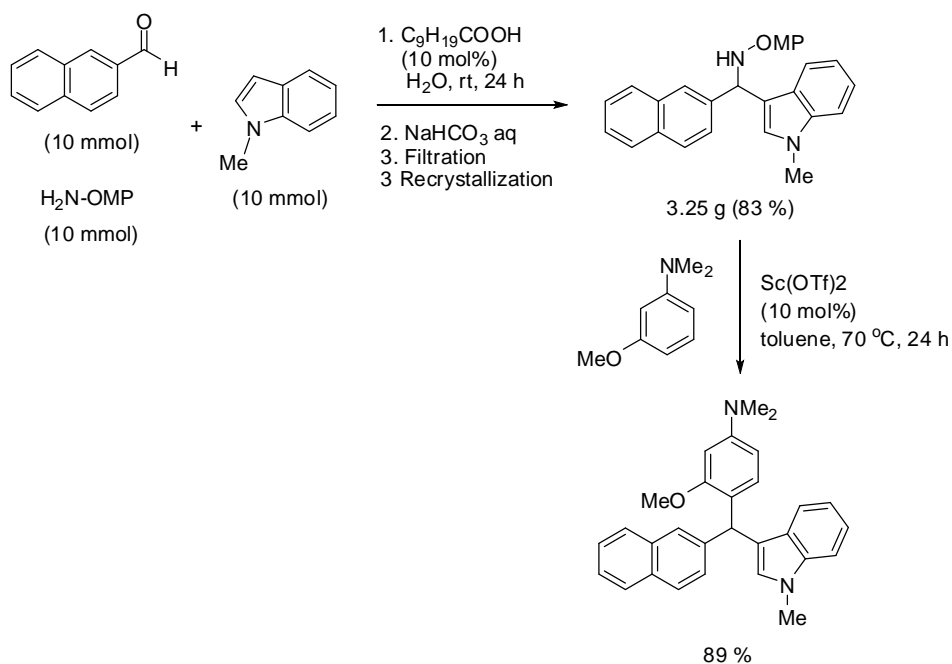
asymmetrical triarylmethanes

ในปีเดียวกัน Shirakawa และ Kobayashi (Shirakawa, S. & Kobayashi, S., 2006) ใช้กรดคาร์บอกซิลิก (decadeic acid) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Aza-Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ aldehyde, o-anisidine ( $\text{H}_2\text{N-O-MP}$ ) และสารประกอบ indole ในน้ำ พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-substituted indoles จากนั้นเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบ imidazole ในเปอร์เซ็นต์ปานกลางถึงสูง (53-90%, 2 ขั้นตอน) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารประกอบที่มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ aromatase โดยการทำให้ปฏิกิริยาต่อกับ N,N'-carbonyldiimidazole (CDI) และ  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  ในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ  $70^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1-8



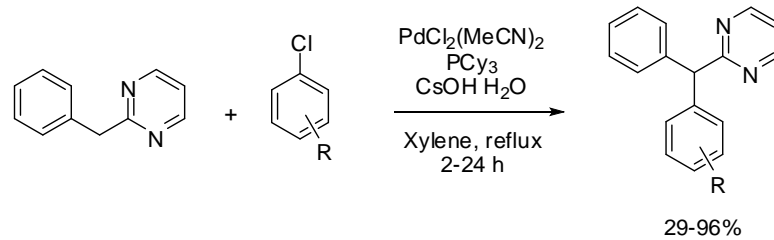
รูปที่1-8การสังเคราะห์สารประกอบที่เป็น aromatase inhibitor ด้วยปฏิกิริยา Aza-Friedel-Crafts ในน้ำ

นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้เตรียมสารประกอบอนุพันธ์ของ naphthyl indolylmethylamineจากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ N,N-dimethyl-m-anisidine (1.2 equiv) และ  $\text{Sc(OTf)}_3$ ในตัวทำละลายโทลูอีน ที่อุณหภูมิ  $70^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้ผลิตภัณฑ์เป็น asymmetric triarylmethane ในเปอร์เซ็นต์สูง (89%) ดังรูปที่ 1-9



รูปที่1-9การสังเคราะห์ asymmetric triarylmethane ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง naphthyl indolylmethylamine derivative กับ N,N-dimethyl-m-anisidine และ  $\text{Sc(OTf)}_3$

6) การสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา direct arylation ของ aryl(azaaryl)methane กับ aryl halide โดยมี palladium เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในปี ค.ศ. 2007 Niwa และคณะ (Niwa et.al., 2007) ได้ใช้ palladium เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา direct arylation ของ aryl(azaaryl)methane กับ aryl halide โดยมี hydroxide เป็นเบส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น asymmetric triarylmethane ในเปอร์เซ็นต์สูง (<1-96%) ดังรูปที่ 1-10



รูปที่ 1-10 การสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา direct arylation ของ aryl(azaaryl)methane กับ aryl halide โดยมี palladium เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

#### 1.4.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร asymmetrical triarylmethanes

สารในกลุ่มไตรเอริลมีเทน (triarylmethanes, TRAMs) เป็นสารที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและเป็นสารสังเคราะห์ที่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสชนิด herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (Mibu et al., 2005) ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ Mycobacterium tuberculosis (MTB) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดวัณโรค (Parai et al., 2008) ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli (Li et al., 2014) และฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Jaratjaroonphong et al., 2014) เป็นต้น โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์สารประกอบ Tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane (JJST5) ซึ่งเป็นสารประกอบไตรเอริลมีเทนแบบสมมาตร (symmetrical triarylmethane) ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และ พรอสตาแกลนดิน E2 แต่อย่างไรก็ตาม JJST5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ใกล้เคียงกับ aminoguanidine (AG) ที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่ผลิตไนตริกออกไซด์ และการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 มีประสิทธิภาพต่ำกว่า indomethacin (IMC) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ cyclo-oxygenase (COX) นอกจากนั้นสาร JJST5 ยังไม่ลดการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ COX-1 (กาญจนา ดวงเกตุ และเพชรรัตน์ ไสว , 2556) เพื่อพัฒนาให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดีขึ้น จเร จรัสจรรยาพงศ์ ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ และกล่าวขวัญ ศรีสุข ( 2556) จึงทำการสังเคราะห์สารประกอบไตรเอริลมีเทนชนิดใหม่จำนวน 35 ชนิด ซึ่งเป็นสารประกอบไตรเอริลมีเทนแบบไม่สมมาตร ( unsymmetrical triarylmethane) โดยพบว่าสาร tert-butyl 2-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate (JJSRUN16)

สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสาร JJSRUN16 เพื่อนำสาร JJSRUN16 ไปพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบ หรือใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาต้านอักเสบในอนาคต

#### 1.4.3 การอักเสบ

กระบวนการอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม หรือจุลชีพที่เข้ามาโจมตีร่างกายให้เกิดการบาดเจ็บ โดยผลของการอักเสบนั้นจะทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพออกไป ซึ่งหากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ กระบวนการอักเสบสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) โดยที่การอักเสบแบบเฉียบพลันนั้น จะมีระยะเวลาการเกิดที่รวดเร็วมาก อาจจะเป็นวินาทีหรือนาทีหลังจากที่ได้รับสิ่งกระตุ้น และจะคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน อาการหลักๆ ของการอักเสบเฉียบพลันนั้น คือ เกิดการบวมของเนื้อเยื่อ (edema) มีสารน้ำที่มีโปรตีนอยู่ภายในเนื้อเยื่อ (exudate) และยังพบเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิลล์ในปริมาณมาก รองลงมา คือ เซลล์แมคโครฟาจ ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังนั้น มีระยะเวลาการเกิดที่นานกว่า โดยอาการของการอักเสบเรื้อรังนั้น คือ เกิดการสร้างเนื้อเยื่อพังผืด (fibrosis) และเซลล์อักเสบหลักที่พบ คือ เซลล์แมคโครฟาจและลิมโฟไซต์ (lymphocytes) (พีรยุทธ สิทธิไชยา กุล, 2552)

เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการอักเสบ คือ แมคโครฟาจ เป็นเซลล์ที่มีการเจริญมาจากโมโนไซต์ (monocyte) เมื่อสิ่งมีชีวิตถูกโจมตีจากสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพนั้น ในช่วง 24-48 ชั่วโมง โมโนไซต์จะมาถึงและจะเคลื่อนตัวออกจากหลอดเลือด กลายเป็นแมคโครฟาจ แล้วทำการจับกินสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธีฟาโกไซโทซิสและแมคโครฟาจมีการหลั่งสารตัวกลางในการอักเสบ เช่น  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , พรอสตาแกลนดิน  $E_2$  ( $PGE_2$ ) หรือ ไนตริกออกไซด์ (NO) เป็นต้น แมคโครฟาจนั้นสามารถคงอยู่ได้ในระยะเวลาที่นานกว่าเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ที่สลายตัวไปภายในไม่กี่วัน แมคโครฟาจจะได้รับกระตุ้นจากสารหลายชนิด เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) ที่หลั่งจาก T-lymphocyte หรือเอ็นโดทอกซิน (endotoxin) ของแบคทีเรีย เป็นต้น โดยแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น (activated) จะมีขนาดเซลล์ที่โตขึ้น มีเอนไซม์ใน lysosome เพิ่มมากขึ้น มีเมแทบอลิซึมในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น และมีความสามารถจับกินและทำลายเชื้อโรคที่เพิ่มสูงขึ้น (สุรพันธ์ คุณอมรพงศ์, ม.ป.ป.)

หากแมคโครฟาจมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบต่างๆ ที่มากเกินไป ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อได้ และยังหลั่งสารที่ทำให้เซลล์อักเสบชนิดอื่นๆ เข้ามายังบริเวณที่เกิดโรคและเพิ่มจำนวนขึ้น จึงทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ การอักเสบที่ซ้ำซ้อน กลายเป็นการอักเสบที่มีความเรื้อรังมากขึ้น ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของร่างกาย อาจนำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังขึ้นได้ เช่น โรค autoimmune diseases โรคมะเร็งโรควัลไฮ-เมอร์หรือโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) เป็นต้น (ปารวี สุวรรณาลัย, ม.ป.ป.; Peart, 2015)



#### 1.4.3.1 การสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ แลโปรสตาแกลนดิน

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin ของแบคทีเรีย หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคต่างๆ เช่น โรคจากการอักเสบต่างๆ ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และ ischemia/reperfusion injury

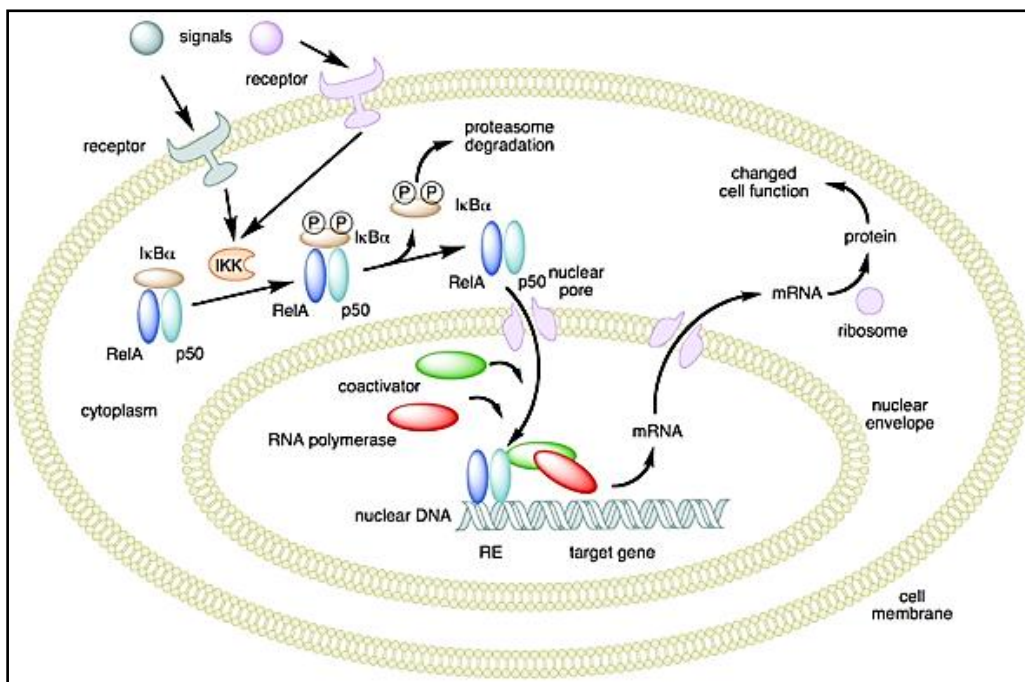
โปรสตาแกลนดิน เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อหลอดเลือด ระบบประสาท และเซลล์ ในการตอบสนองต่อการอักเสบ ในการสังเคราะห์โปรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase (COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโปรสตาแกลนดินเพื่อควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโปรสตาแกลนดิน E2 ในปริมาณมากและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Katzung, 2001) มียาที่ให้ผลยับยั้งต่อ COX-2 อย่างเฉพาะเจาะจงถูกพัฒนาขึ้น และใช้ในการรักษาอาการอักเสบ (Dhikav, 2002) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดต่อการตอบสนองต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (Tunçtan, 2003)

#### 1.4.3.2 วิธีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

##### 1 ) วิธีสัญญาณ nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B signaling pathway)

nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) เป็น transcription factor ที่ควบคุมกระบวนการต่างๆในเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การตอบสนองต่อการอักเสบของระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการพัฒนาและการเจริญของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น และการอะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นต้น NF- $\kappa$ B เป็น transcription factor ที่ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยที่พบมากที่สุดที่เซลล์ทั่วไป คือ p50 และ p65 (หรือรู้จักในชื่อว่า RelA) ในสภาวะปกติ NF- $\kappa$ B

ไม่มีการทำงาน จะจับกับตัวโปรตีนยับยั้ง คือ Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor (IKB) รวมกันเป็น NF- $\kappa$ B:IKB complex อยู่ในไซโตซอลของเซลล์ แต่ถ้าหากเซลล์นั้นเกิดการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมหรือเกิดการอักเสบขึ้น จะเกิดการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ที่ IKB โดยเอนไซม์ I- $\kappa$ B kinase (IKK) complex จากนั้น IKB ที่ถูกฟอสโฟรีเลชันแล้วจะเกิดการย่อยสลายที่โปรตีโอโซม (proteasome) ทำให้ NF- $\kappa$ B เป็นอิสระแล้วจึงเกิดการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารสื่อกลางในการอักเสบ เช่น iNOS และ COX-2 จึงนำไปสู่การผลิตของไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน ตามลำดับ และรวมไปถึงสารตัวกลางในการอักเสบเช่น IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  เป็นต้น (ภาพที่ 1-11) (Karin, 2009; Staudt, 2010)



ภาพที่ 1-11 วิธีสัญญาณ nuclear factor kappa B

(ที่มา: Clark, 2011)

2 ) วิธีสัญญาณ mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (นันทกานต์ เมืองพิล, 2550)

mitogen-activated protein kinases (MAPKs) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณควบคุมการทำงานของเซลล์ เช่น กระบวนการอักเสบ การตายของเซลล์ การแบ่งตัว และการควบคุมวัฏจักรเซลล์ เป็นต้น MAPKs จะทำการส่งสัญญาณโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปยังโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน Serine หรือ Threonine (Serine/Threonine kinase) ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์จะเกิดการกระตุ้นขึ้นแบบต่อเนื่องกัน ไปยังโปรตีนเป้าหมาย แบ่งได้เป็น 3 ลำดับ คือ

1. สัญญาณจากภายนอกกระตุ้นเอนไซม์ MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) เติมฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ MAP kinase kinase (MAPKK)

2. เอนไซม์ MAPKK เติมฟอสเฟตให้แก่เอนไซม์ MAP kinase (MAPK)

3. เอนไซม์ MAPK ส่งสัญญาณไปยังโปรตีนเป้าหมาย เช่น c-jun, p-53 หรือ Elk-1 เป็นต้น

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถี MAPKs แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) ได้แก่ ERK1 และ ERK2 เป็นโปรตีนกลุ่มที่จะตอบสนองต่อสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามหน้าที่เฉพาะของเซลล์

2. C-Jun N-terminal kinases (JNKs) ตอบสนองต่อสัญญาณความเครียดของเซลล์ สารตัวกลางในการอักเสบ รั้งสีอัลตราไวโอเล็ต

3. p38 ตอบสนองต่อสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ การแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนชนิดของเซลล์ การตายของเซลล์ ความเครียดของเซลล์ และ สารตัวกลางในการอักเสบ

4. ERK5 ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นทั้งความเครียด การแบ่งเซลล์ และการเจริญของเซลล์

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (กล่าวขวัญ ศรีสุข , 2555a).....

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไร้เชื้อ และเสริมด้วยซีรัมเข้มข้นร้อยละ 10 (V/V) สารละลายยาเพนิซิลลิน (100 U/ml) และสเตรปโตไมซิน (100 µg/ml) บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 100 มิลลิเมตร และนำไปบ่มเซลล์ในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 2 คีน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำเซลล์ไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ต่ออีก 1 คีน เมื่อเซลล์เจริญเต็มโตประมาณร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง จึงทำการเก็บเซลล์ออกจากผิว ภาชนะโดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping).

#### 2.2 การ subculture โดยวิธี scraping (กล่าวขวัญ ศรีสุข , 2555a).....

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงแล้วเติมบัฟเฟอร์ HBSS [5 mM KCl, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.6 mM Glucose และ 4 mM NaHCO<sub>3</sub>] ที่เย็น ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นขูดเซลล์ด้วยที่ขูดเซลล์ ( cell lifter) เบาๆ ดูดสารละลายตะกอนเซลล์โดยใช้ปิเปตต์ พลาสติกขนาด 10 ml ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 3 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เสริมด้วย 10% FBS (v/v) 5 ml ดูดขึ้นลงเพื่อ กระจายเซลล์ แล้วทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตโดยย้อมด้วยสี 0.4% trypan blue บนสไลด์สำหรับนับเซลล์แบบ improved Neubauer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ และคำนวณเพื่อแบ่งเซลล์ลงในภาชนะใหม่ตามจำนวน ที่ต้องการ เพื่อจะนำไปทดสอบกับสารต่อไป

#### 2.3 การทดสอบความมีชีวิตโดยวิธี MTT assay (กล่าวขวัญ ศรีสุข , 2555a).....

กระจายเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยแต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ นำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยง เซลล์ทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน แบบทั้งมี LPS (1 µg/ml) และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml หลุมละ 500 µl จากนั้นนำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย MTT เป็นสารสีเหลืองละลายน้ำได้ สามารถแทรกตัวเข้าไปในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต เนื่องจากในเซลล์ที่มี ชีวิตจะพบเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ( succinate dehydrogenase) ที่จะทำให้การรีดิวซ์ MTT

เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ปริมาณผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อครบเวลาบ่มแล้วนำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกมาดูอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วจึงเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 500  $\mu$ l เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จนได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน ดูดสารแขวนลอยเซลล์จากแต่ละหลุม ปริมาตร 200  $\mu$ l ใส่ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm คำนวณค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ในเชิงสัมพัทธ์ เทียบกับสถานะเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบจากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

## 2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข , 2554)

กระจายเซลล์ลงงานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยแต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี phenol red ที่มีสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แบบทั้งมี LPS (1  $\mu$ g/ml) และไม่มี LPS รวมทั้ง amino guanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ M เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ iNOS โดยใช้เป็นสารควบคุมแบบบวก (positive control) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และ 0.4% (v/v) DMSO เป็นตัวทำละลายสารทดสอบ จากนั้นบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,800 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100  $\mu$ l ใส่ในแต่ละหลุมของไมโครเพลทแบบ 96 หลุม ผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphyl)ethylene-diaminedihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric acid] ปริมาตร 100  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณหาความเข้มข้นไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรต์ ( $\text{NaNO}_2$ ) ที่ความเข้มข้น 0-50  $\mu$ M

## 2.5 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน ( $\text{PGE}_2$ ) ด้วยเทคนิค ELISA

ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวนหลุมละ  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่มี LPS (1  $\mu$ g/ml) และไม่มี LPS รวมทั้ง indomethacin (IMC) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้ โดยใช้เป็นสารควบคุมแบบบวก จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน  $\text{E}_2$  โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป  $\text{PGE}_2$  Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays) ตามที่ผู้ผลิตแนะนำดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100  $\mu$ l ด้วย assay buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l แล้วเปิดต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 100  $\mu$ l ลงในไมโครเพลทที่เคลือบด้วย goat anti-mouse IgG เติมสารละลาย  $\text{PGE}_2$  conjugate ปริมาตร 25  $\mu$ l จากนั้นเติม anti

PGE2 antibody ปริมาตร 50  $\mu$ l ปิดเพลทด้วย sealer แล้วเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างหลุมด้วย wash buffer ปริมาตร 300  $\mu$ l จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย TMB substrate ปริมาตร 100  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาให้เติม stop solution ปริมาตร 50  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ 450 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดิน E2 จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากพรอสตาแกลนดินที่ทราบความเข้มข้น (0-1000 pg/ml)

## 2.6 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot.....

### 2.6.1 การเตรียมโปรตีนรวมสำหรับวิเคราะห์ iNOS และ COX-2

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อจาน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS (1  $\mu$ g/ml) และไม่มี LPS รวมทั้ง 0.2% (v/v) DMSO แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ] ที่เย็น 1 ครั้ง แล้วเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% nonidet P-40, 1 mM DTT, 1X protease inhibitors (PI)] ปริมาตร 50  $\mu$ l จากนั้นใช้ที่ดูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml และเติม RIPA protein lysis buffer อีก 50  $\mu$ l ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกเต็มแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติกใหม่ นำโปรตีนรวมที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot สามารถเก็บโปรตีนส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2.6.2 การเตรียมโปรตีนของนิวเคลียสสำหรับวิเคราะห์ NF- $\kappa$ B

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 100 มิลลิเมตร จำนวน  $5 \times 10^6$  เซลล์ต่อจานแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาใส่ LPS (1  $\mu$ g/ml) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจากนั้นทำการสกัดโปรตีนจากนิวเคลียส โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นขูดเก็บเซลล์โดยใช้ที่ดูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml 2 ครั้ง โดยใช้ 1X PBS ครั้งละ 500  $\mu$ l และปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งและเก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 [25 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM KCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10X PI] ปริมาตร 200  $\mu$ l ลงไปพร้อมทำลายตะกอนให้แตกด้วยการ vortex ให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว บ่มในน้ำแข็งพร้อมเขย่านาน 20 นาที โดยเขย่าผสมสารทุก 5 นาที (จะสังเกตเห็นว่าสารละลายจะขุ่น) จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 [5% (v/v) nonidet P-40 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1] ปริมาตร 200  $\mu$ l บ่มในน้ำแข็ง

พร้อมเขย่านาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เก็บส่วนใส (cytoplasmic protein) ในหลอดพลาสติก 1.5 ml (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ 3 [ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 และสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ในอัตราส่วน 1:1] ปริมาตร 200µl ลงส่วนที่เป็นตะกอนนิวเคลียส พร้อมทั้ง vortex ให้ตะกอนหลุดออกจากกันหลอดเพื่อล้างตะกอนนิวเคลียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ที่ทิ้ง แล้วเติมนสารละลายบัฟเฟอร์ 4 [25 mM HEPES (pH 7.9), 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% (v/v) glycerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF] ปริมาตร 70 µl พร้อมละลายตะกอนให้แตกบ่มในน้ำแข็งพร้อมเขย่านาน 40 นาที โดยเขย่าผสมสารทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (nuclear protein) ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml (สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) หรือนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot.....

### 2.6.3 การเตรียมโปรตีนรวมสำหรับวิเคราะห์ MAPKs

กระจายเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร จำนวน 5 x 10<sup>6</sup> เซลล์ต่อจาน นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม LPS (1 µg/ml) นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเช่นเดิม เมื่อครบเวลาที่กำหนด เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ 1 X PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 ml จากนั้นเติม RIPA protein lysis buffer ที่มี 1mM DTT, 1X PI และ 1X phosphatase inhibitor cocktail (PhosStop) ปริมาตร 50 µl ทำการขูดเก็บเซลล์ลงหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml เติมน RIPA protein lysis buffer ปริมาตร 50 µl และขูดเก็บเซลล์อีกครั้ง นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนในหลอดพลาสติก 1.5 ml นำโปรตีนรวมที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย Bradford assay แล้วจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โปรตีนส่วนที่เหลือให้เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford.....

นำโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 1µl ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 9µl ลงแต่ละหลุมของไมโครเพลทแบบ 96 หลุม ทำการผสมกับสารละลาย 1X Protein Assay Dye Reagent Concentrate ปริมาตรหลุมละ 200 µl เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีปริมาณ 0, 0.5, 1, 2, 4 และ 6 ไมโครกรัม

### 2.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555b).....

ทำการเตรียม 10% SDS-PAGE จากนั้นนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ซึ่งโปรตีน iNOS, COX-2, NF-κB และ MAPKs จะใช้โปรตีน 25, 25, 40 และ 40-60 ไมโครกรัม ตามลำดับ นำโปรตีนมาหยอดลงใน

หลุมโดยทำการเจือจางสารละลายโปรตีนตัวอย่างด้วย 6X protein loading buffer [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 12% (w/v) SDS, 0.06% (w/v) bromophenol blue, 60% (v/v) glycerol, 1.2 M  $\beta$ -mercaptoethanol] ในอัตราส่วน 5:1 และให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ก่อนนำสารละลายไปหยอดลงในเจล ทำการแยกโปรตีนในสารละลาย 1X Running buffer [0.0625 M Tris, 0.192M Glycine, 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 80 V จน Bromophenol blue tracking dye เคลื่อนที่เข้าสู่ Separating gel จึงปิดสวิตช์เครื่อง Power supply ก่อนเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 100 V และให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จึงปิดสวิตช์เครื่อง Power supply แล้วย้ายแถบโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ทำการpretreated โดยแช่ใน absolute methanol ประมาณ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่เมมเบรนใน Transfer buffer [192 mM glycine, 25mM Tris, 10% (w/v) methanol] ประมาณ 5 นาที และผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 25 V เป็นเวลาประมาณ 14 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2.8.1 การวิเคราะห์โปรตีน iNOS และ COX-2

เมื่อย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้ว จึงนำเมมเบรนมาบ่มด้วยสารละลาย TBS-T buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5 (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS และ COX-2 ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่มี 0.5% BSA และ 0.05% (v/v) Tween 20 ในอัตราส่วน 1:500 และ 1:1,000 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะหรือนำเมมเบรนแช่ใน primary antibody solution ที่จำเพาะต่อโปรตีน  $\beta$ -actin ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:5,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรนนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย secondary antibody (horse-radish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (H+L)) ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:5,000 สำหรับโปรตีน iNOS และ COX-2 และในอัตราส่วน 1:10,000 สำหรับโปรตีน  $\beta$ -actin ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรนผสมสารละลายซับสเตรท enhanced chemiluminescence (ECL) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ไว้ประมาณ 1 นาที แล้วนำเมมเบรนมาบ่มกับสารละลายซับสเตรทจนทั่วแผ่นเมมเบรนก่อนนำไปประกบฟิล์ม X-ray ในห้องมืด วิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ iNOS COX-2 และ  $\beta$ -actin กับโปรตีนมาตรฐาน

### 2.8.2 การวิเคราะห์โปรตีน NF- $\kappa$ B

เมื่อย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้ว จึงนำเมมเบรนมาบ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย rabbit anti NF- $\kappa$ B p65 monoclonal antibody ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่มี 0.5% BSA และ 0.05% (v/v) Tween 20 ใน



อัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือนำเมมเบรนแช่ใน primary antibody solution ที่จำเพาะต่อโปรตีน Lamin A ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน นำเมมเบรนไปแช่ใน secondary antibody solution (horse-radish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (H+L)) ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:5,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรนผสมสารละลายซับสเตรท enhanced chemiluminescence (ECL) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ไว้ประมาณ 1 นาที แล้วนำเมมเบรนมาบ่มกับสารละลายซับสเตรทจนทั่วแผ่นเมมเบรน ก่อนนำไปประกบฟิล์ม X-ray ในห้องมืด วิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ NF- $\kappa$ Bp65 และ Lamin A กับโปรตีนมาตรฐาน

### 2.8.3 การวิเคราะห์โปรตีน MAPKs.....

เมื่อย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้ว จึงนำเมมเบรนมาบ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody ได้แก่ rabbit anti p-ERK1/2 และ rabbit anti p-p38 ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5% (w/v) BSA ในอัตราส่วน 1:1,000, mouse anti p-SAPK/JNK ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่มี 0.5% BSA และ 0.05% (v/v) Tween 20 ในอัตราส่วน 1:2,000 หรือบ่มในสารละลาย rabbit anti ERK1/2 ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5% (w/v) BSA ในอัตราส่วน 1:2,500, rabbit anti p38 และ rabbit anti SAPK/JNK ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่มี 0.5% BSA และ 0.05% (v/v) Tween 20 ในอัตราส่วน 1:2,500, 1:500 ตามลำดับ) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน นำเมมเบรนไปแช่ใน horse-radish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) แต่สำหรับ p-SAPK/JNK ใช้ horse-radish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (H+L) ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:5,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรนผสมสารละลายซับสเตรท enhanced chemiluminescence (ECL) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ไว้ประมาณ 1 นาที แล้วนำเมมเบรนมาบ่มกับสารละลายซับสเตรทจนทั่วแผ่นเมมเบรน ก่อนนำไปประกบฟิล์ม X-ray ในห้องมืด วิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ศึกษา กับโปรตีนมาตรฐาน

### 2.8.4 การรีโพรบแผ่นเมมเบรน PVDF.....

นำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T buffer จำนวน 1 ครั้ง นาน 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย stripping buffer [10% SDS, 2 M Tris-HCl (pH 7.4), 98 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] ก่อน

นำสารละลาย stripping buffer มาใช้ควรถ่ายไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเอาเมมเบรนลงแช่ในสารละลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าเป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พร้อมเขย่าภาชนะใส่เมมเบรน จากนั้นจึงบ่มเมมเบรนด้วย blocking solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-1.30 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody และสารละลาย secondary antibody ตามวิธีในข้อ 2.8.1-2.8.3

## 2.9 การสกัด RNA.....

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร จานละ  $1 \times 10^6$  เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เสริมด้วย 10% FBS บ่มเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีสารทดสอบ และ LPS แล้วบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์อีก 9 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บและสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin®RNA โดยทำตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำดังนี้ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารละลาย lysis buffer [lysis buffer RA1 450  $\mu$ l,  $\beta$ -mercaptoethanol 4.5  $\mu$ l] ปริมาตร 455  $\mu$ l ดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วเก็บลงในหลอดขนาด 1.5 ml ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้ววางในไตรเจนเหลวเพื่อยับยั้งการทำงานของ DNase และ RNase (สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) นำตัวอย่างมาละลายแล้ว vortex แรงๆ แล้วนำไปโหลดลงในคอลัมน์ที่มีวงแหวนสีม่วงในหลอดขนาด 2 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 455  $\mu$ l ดูดขึ้นลงประมาณ 5 ครั้ง ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมคอลัมน์สีฟ้าใส่ในหลอดขนาด 2 ml (หลอดใหม่) แล้วโหลดตัวอย่างลงในคอลัมน์สีฟ้าปริมาตร 750  $\mu$ l จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์สีฟ้าใส่ลงในหลอดขนาด 2 ml (หลอดใหม่) แล้วเติม membrane desalting buffer (MBA) ปริมาตร 350  $\mu$ l ลงบนเมมเบรนเพื่อล้างเกลือออกจากเมมเบรน ปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์สีฟ้าใส่ลงในหลอดขนาด 2 ml (หลอดใหม่) เติมนานา DNase reaction mixture [Reconstituted rDNase ปริมาตร 10  $\mu$ l และ Reaction buffer for rDNase ปริมาตร 90  $\mu$ l] ปริมาตร 95  $\mu$ l ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม wash buffer RAW2 ปริมาตร 200  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml (หลอดใหม่) แล้วเติม wash buffer RA3 ปริมาตร 600  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml (หลอดใหม่) แล้วเติม RNase-free H<sub>2</sub>O ปริมาตร 25  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เติมนานา RNase-free H<sub>2</sub>O ปริมาตร 25  $\mu$ l อีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง สามารถเก็บสารละลาย RNA ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของ RNA โดยนำสารละลาย RNA ปริมาตร 5  $\mu$ l ผสมกับ น้ำกลั่นที่ผสมด้วย 0.1% (v/v) DEPC ปริมาตร 495  $\mu$ l แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV-2501PC) คำนวณความบริสุทธิ์โดย นำค่าการดูดกลืนที่ 260 nm หารด้วย ค่าการดูดกลืนที่ 280 nm ถ้าค่าอยู่ในช่วง 1.9-2.1 แสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และสามารถ

นำไปใช้ได้ โดยสามารถคำนวณความเข้มข้นของ RNA ได้จากสมการต่อไปนี้ (RNA ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml จะสามารถดูดกลืนแสงที่ 260 nm ได้ 1 หน่วย)

$$\text{ความเข้มข้น RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}$$

## 2.10 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดยเทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากสารละลาย RNA ที่สกัดได้และ 5X iScript™ Reverse Transcription Supermix [iScript MMLV-RT (RNaseH<sup>+</sup>), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primers, buffer, MgCl<sub>2</sub>, stabilizers] ปริมาตร 4 µl แล้วเติมน้ำที่ปราศจาก nuclease ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl ลงในหลอด PCR สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำการตรวจสอบ cDNA ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ในสารละลาย (1X) TBE บัฟเฟอร์ [90 mM Tris-borate และ 0.2 mM EDTA] เพื่อตรวจสอบปริมาณ cDNA ที่ได้ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน iNOS, COX-1, COX-2 และ elongation factor (EF-2)

ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย 2X iTag™ Universal SYBR® Green supermix [antibody-mediated hot-start iTag™ DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers, blend of passive reference dyes] จำนวน 10 µl forward primer ที่มีความเข้มข้น 10 µM จำนวน 0.5 µl reverse primer ที่มีความเข้มข้น 10 µM จำนวน 0.5 µl และ cDNA จำนวน 2 µl แล้วเติมน้ำที่ปราศจาก nuclease ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl โดยทำซ้ำปฏิกิริยาละ 2 หลอด (duplicate) สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR ของยีน iNOS, COX-1, COX-2 และ EF-2 แสดงในตารางที่ 1 จากนั้นทำ melting curve ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที จนถึงอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสแล้วนำมาวิเคราะห์หา cycle of threshold (Cq) นำมาหาปริมาณดีเอ็นเอด้วย comparative threshold method เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบค่า Cq ของปฏิกิริยา PCR ของดีเอ็นเอที่เราศึกษากับค่า Cq ของ housekeeping gene จากตัวอย่างเดียวกันโดยคำนวณได้จากสมการด้านล่าง (Giulietti et al., 2001)

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{ปริมาณดีเอ็นเอ}$$

$$\text{โดยที่ } \Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{sample}) - \Delta Cq (\text{calibrator})$$

$$\text{และ } \Delta Cq = Cq \text{ of target gene} - Cq \text{ of housekeeping gene}$$

ค่าที่ได้เป็นปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผ่านการ normalized ด้วยดีเอ็นเอของ housekeeping gene โดยเปรียบเทียบเชิงสัมพัทธ์กับตัวอย่างควบคุม (calibrator)

ตารางที่ 1สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR ของยีน iNOS, COX-1, COX-2 และ EF-2.....

ยีน	จำนวนรอบ (cycle)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
COX-1, COX-2, iNOS และ EF-2	Cycle 1: (1X) Step 1:	95.0	3.00
	Cycle 2: (40X)Step 1:	95.0	0.10
	(40X)Step 2:	63.0	0.20
	Cycle 4: (1X) Step 1:	95.0	0.10

### 2.11การวิเคราะห์ทางสถิติ

ส

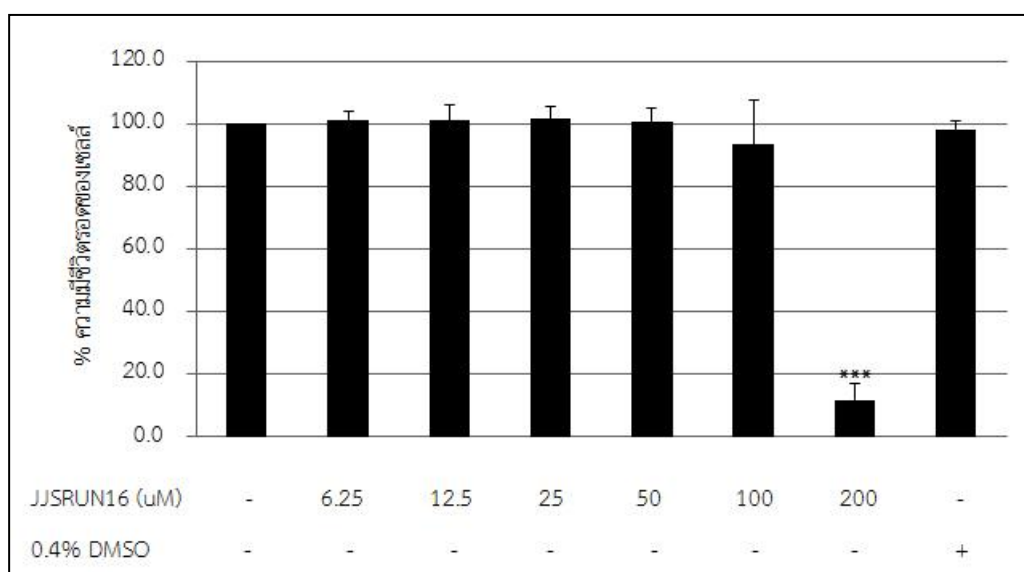
ข้อมูลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน โดยทำการทดลองละ 3 ซ้ำ ซึ่งความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในการทดลองคนละซ้ำ นั้นจะถูกวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันของ 2 กลุ่มโดยใช้ Student's *t*-test ของโปรแกรม SPSS

## บทที่ 3

### ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์

ความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 6.25-200  $\mu\text{M}$  พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{M}$  ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือเพียง  $10.16 \pm 5.77$  (ภาพที่ 3-1) ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS อย่างเดียวหรือเซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ iNOS เพียงอย่างเดียวนั้นจะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ส่วนความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO 0.4% (v/v) ซึ่งเป็นตัวทำละลายนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-1)



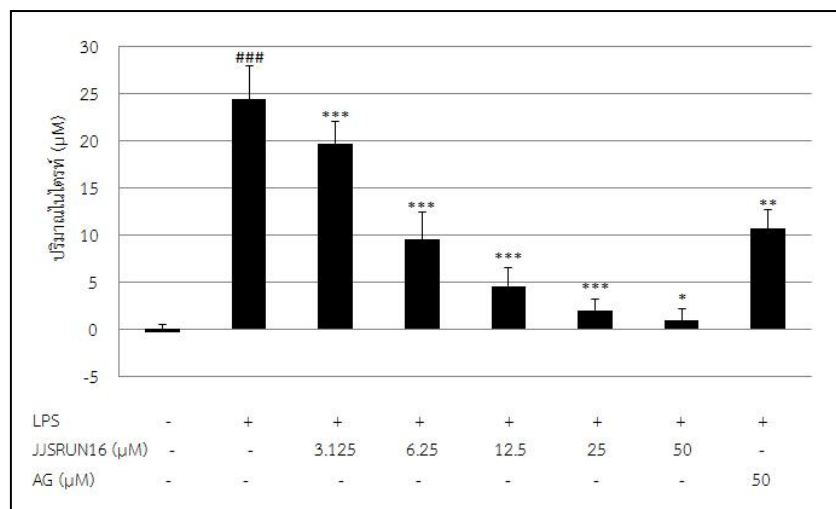
ภาพที่ 3-1 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี MTT ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ \*\*\*P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

#### 3.2 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์

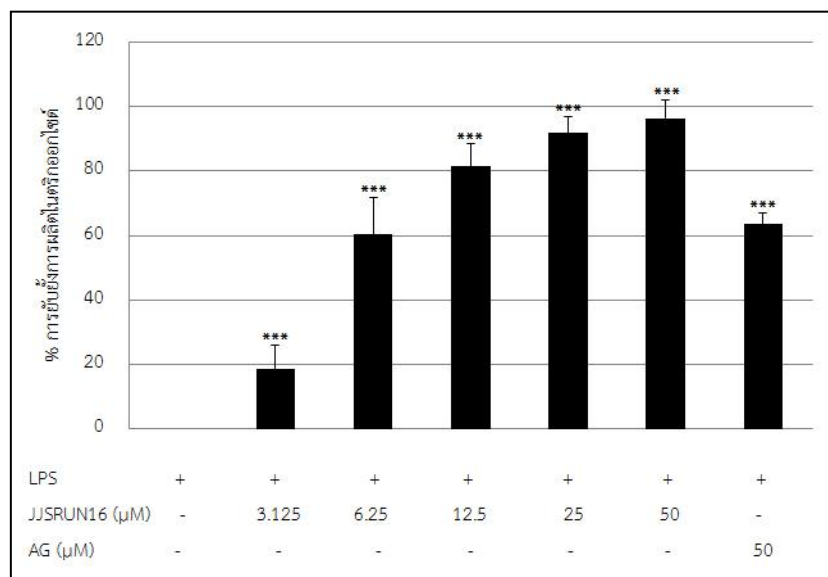
ปริมาณไนโตรทีโนอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เป็นเซลล์ควบคุมและเซลล์

ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียวนั้นมีปริมาณการผลิตไนโตรท์เท่ากับ  $-0.3 \pm 0.82 \mu\text{M}$  และ  $24.34 \pm 3.56 \mu\text{M}$  ตามลำดับ เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น  $3.125-50 \mu\text{M}$  ร่วมกับการถูกเหนี่ยวนำโดย LPS พบว่าปริมาณของไนโตรท์นั้นลดลงตามความเข้มข้นของสาร JJSRUN16 ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-2A) โดยเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น  $3.125-50 \mu\text{M}$  มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4- 2B) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $6.77 \pm 1.79 \mu\text{M}$  ในส่วน aminoguanidine (AG)(สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ซึ่งเป็นตัวควบคุมในทางบวก ที่ความเข้มข้น  $50 \mu\text{M}$  มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์  $63.48 \pm 13.72$  เปอร์เซ็นต์

(A)



(B)

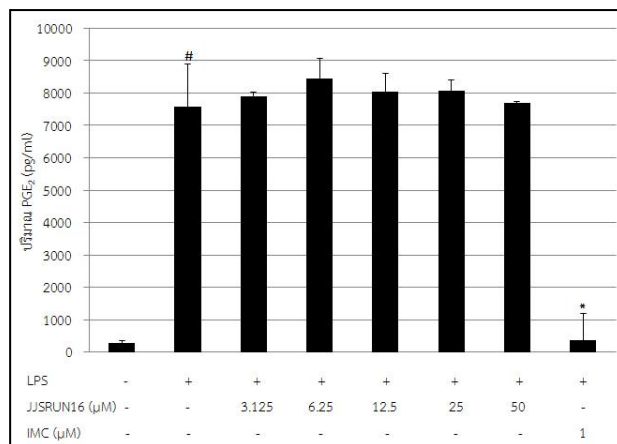


ภาพที่ 3-2 ปริมาณไนโตรทีนในอาหารเลี้ยงเซลล์(A) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์(B) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน โดยแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยที่ ###P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine

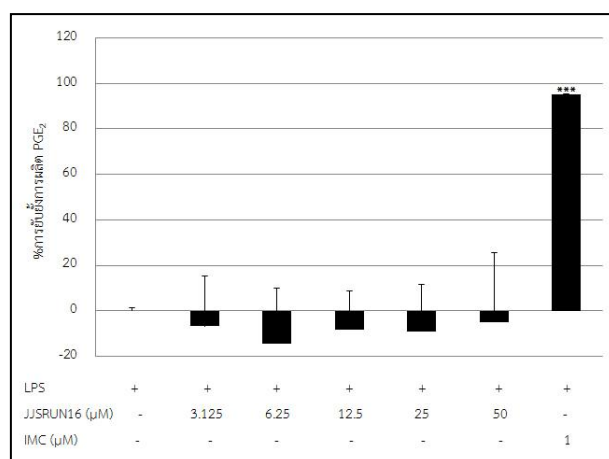
### 3.3 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub>

ปริมาณการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เป็นเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว คือ 268.84  $\pm$  68.61 และ 7570.31  $\pm$  1332.55 pg/ml ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ที่มีการสัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-50  $\mu$ M ร่วมกับการเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่าปริมาณการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> นั้นไม่ได้มีปริมาณที่ลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-3A) ส่วน indomethacin (IMC) (สารยับยั้งเอนไซม์ COX-2) ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 1  $\mu$ M นั้นมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งถึง 95.20  $\pm$  1.30 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3-3B)

(A)



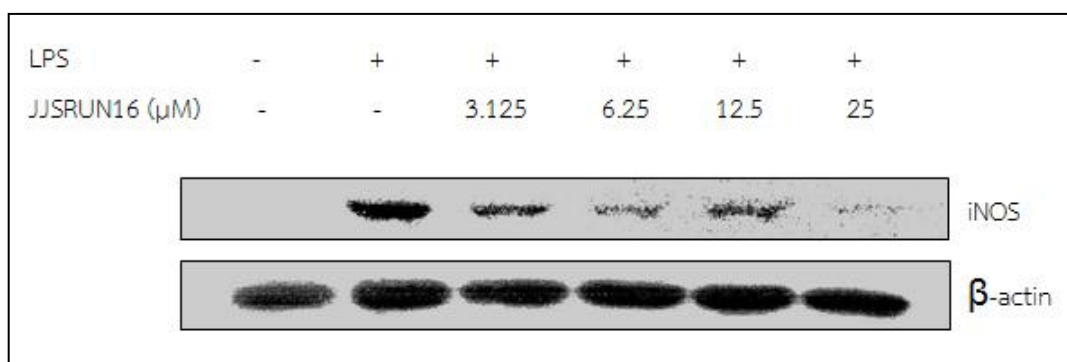
(B)



**ภาพที่ 3-3** ปริมาณพรอสตาแกลนดิน  $E_2$  ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (A) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน  $E_2$  (B) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบน-มาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน โดยแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ #P <0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมและ \*P <0.05, \*\*\*P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ IMC = เซลล์ที่สัมผัสกับ indomethacin

### 3.4 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2

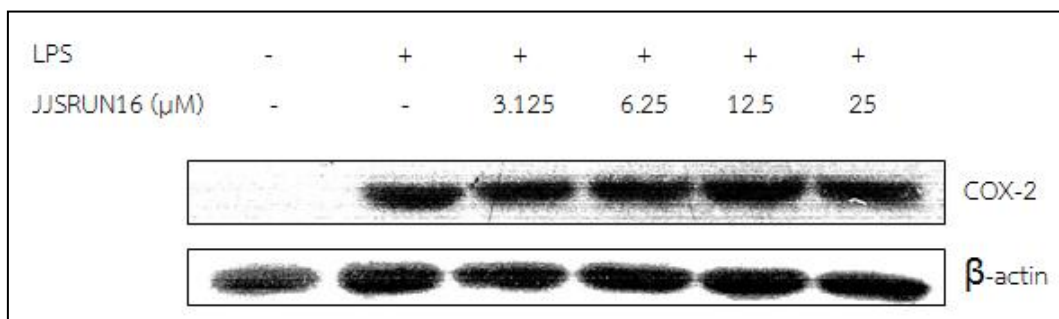
ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีการเหนี่ยวนำโดย LPS พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน iNOS ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-4) แต่ในเซลล์ที่มีการสัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-25  $\mu$ M และถูกเหนี่ยวนำโดย LPS จะพบว่าการลดลงของโปรตีน iNOS ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-4) ในส่วนของการศึกษาสาร JJSRUN16 ต่อการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่มีการเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียวจะเห็นได้ว่าการแสดงออกของโปรตีนที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 4-5) และในส่วนของเซลล์ที่มีการสัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-25  $\mu$ M และถูกเหนี่ยวนำโดย LPS นั้น พบว่า ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน COX-2 นั้นไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-5)



**ภาพที่ 3-4** การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน iNOS โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW



264.7 สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนของ Western blot จำนวน 3 ครั้ง



ภาพที่ 3-5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน COX-2 โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนของ Western blot จำนวน 3 ครั้ง

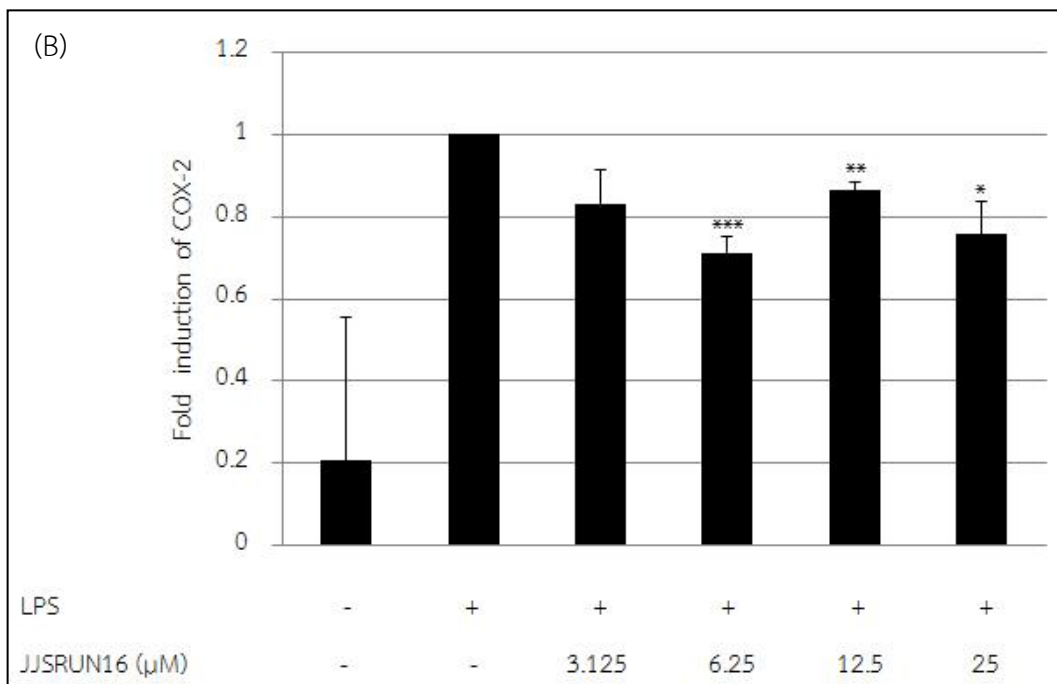
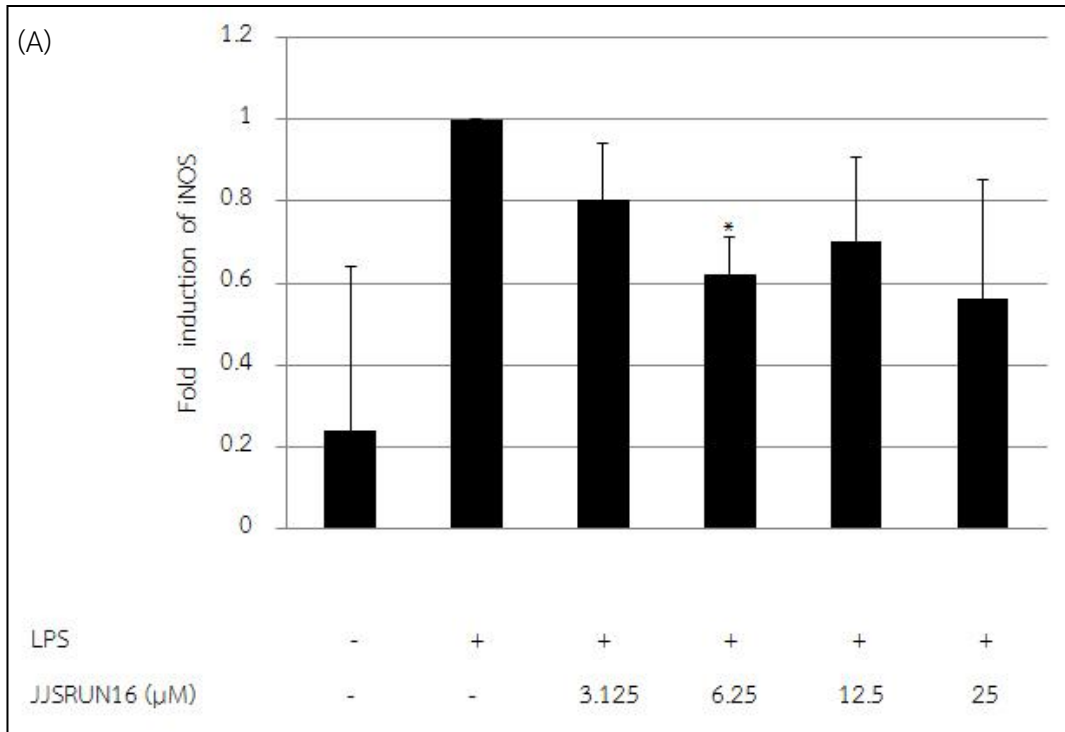
### 3.5 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อการแสดงออกของยีน COX-1, COX-2 และ iNOS ในระดับ mRNA

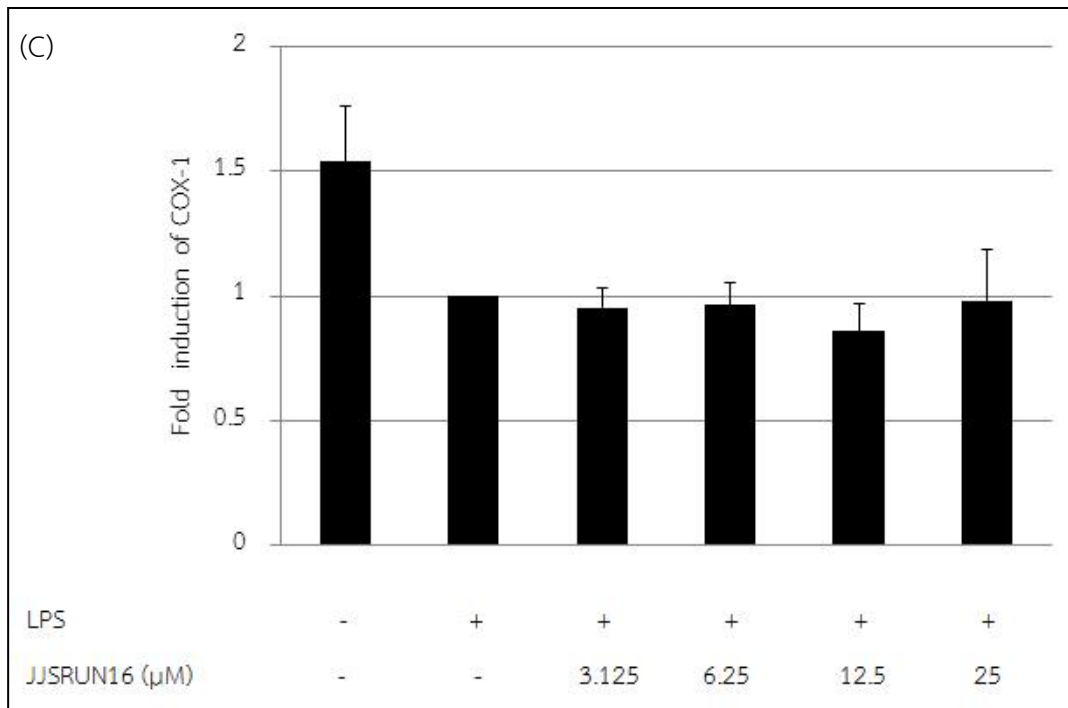
ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ของยีน iNOS เพิ่มสูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม และเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ร่วมกับการสัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-25 µM เห็นได้ว่า ปริมาณ mRNA ของยีน iNOS มีปริมาณลดลงโดยเซลล์ที่สัมผัสกับสารที่ความเข้มข้น 6.25 µM มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-6A)

ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 จะเห็นว่าเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 เพิ่มสูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมและเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ร่วมกับการสัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-25 µM เห็นได้ว่า ปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 ในเซลล์ที่สัมผัสกับสารที่ความเข้มข้น 6.25-25 µM มีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3-6B)

เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 จะเห็นว่าเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 ลดลงอย่างไม่มี

นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมและเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ร่วมกับการสัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-25  $\mu\text{M}$  เห็นได้ว่า ปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 มีปริมาณไม่แตกต่างกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-6C)

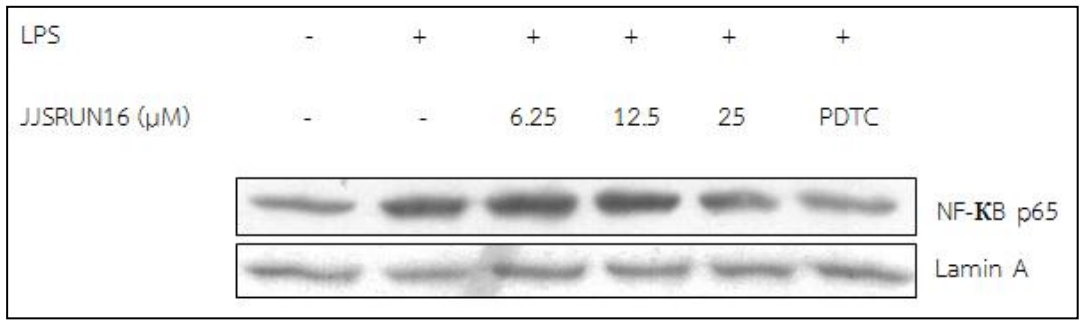




ภาพที่ 3-6 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีน iNOS (A), COX-2 (B) และ COX-1 (C) โดยเทคนิค real-time PCR ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN ร่วมกับการเหนี่ยวนำโดย LPS และไม่ร่วมกับ LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน โดยที่ \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว

### 3.6 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อปริมาณโปรตีน NF-KB p65 ในนิวเคลียส

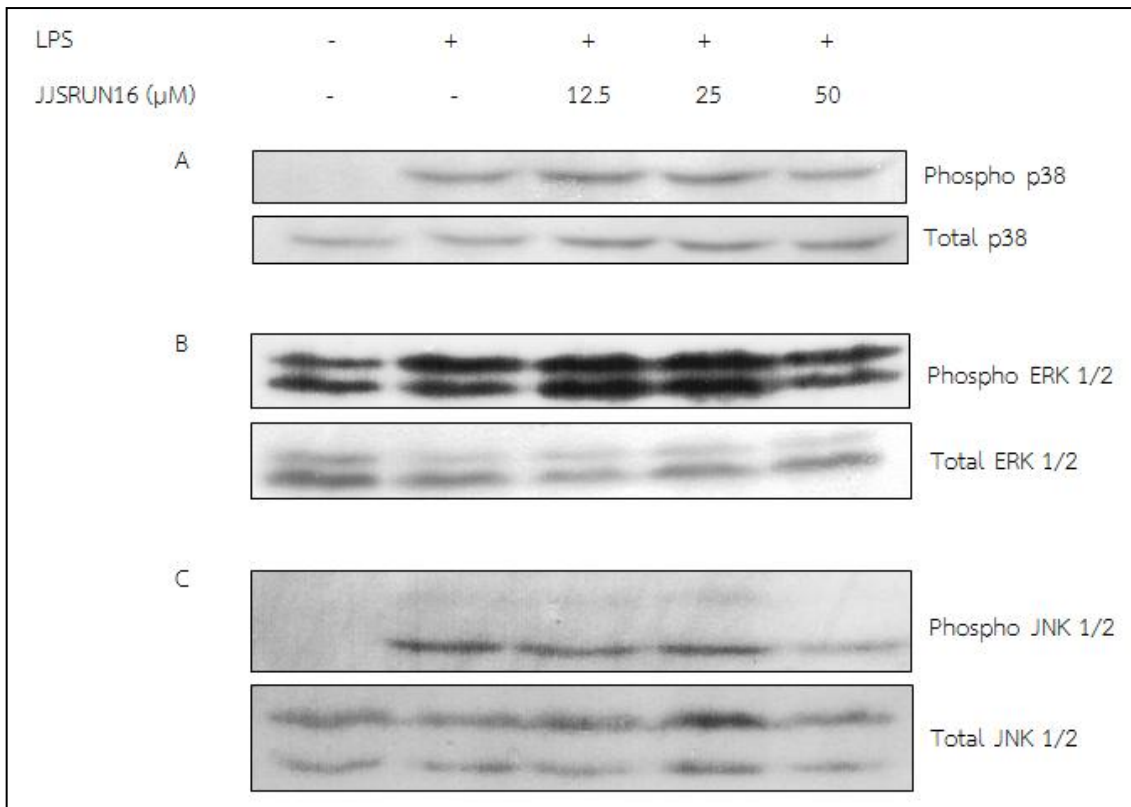
การศึกษาผลของสาร JJSRUN16 ต่อปริมาณของโปรตีน NF-KB p65 ในนิวเคลียสของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว นั้นมีปริมาณโปรตีน NF-KB p65 ที่มากกว่าเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-7) แต่ในเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 6.25-25 μM และถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ร่วมด้วยนั้น พบว่าปริมาณของโปรตีน NF-KB p65 ในนิวเคลียส ที่เซลล์สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 25 μM นั้นมีปริมาณโปรตีน NF-KB p65 ในนิวเคลียสที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS อย่างเดียว และในส่วนของเซลล์ที่สัมผัสกับสาร PDTC ร่วมกับการถูกเหนี่ยวนำโดย LPS มีการลดลงของปริมาณโปรตีน NF-KB p65 เล็กน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-7)



ภาพที่ 3-7 ผลของการวิเคราะห์โปรตีน NF- $\kappa$ B p65 ในนิวเคลียส โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 30 นาที หลังจากสัมผัสกับสาร JJSRUN16 เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือ PDTC ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนของ Western blot จำนวน 3 ครั้งโดยให้ PDTC = เซลล์ที่สัมผัสกับ Pyrrolidinedithiocarbamate 100  $\mu\text{M}$

### 3.7 ผลของสาร JJSRUN16 ต่อการกระตุ้นของ MAPKs

เมื่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีน p38, ERK และ JNK ในรูปเติมฟอสเฟต (p-p38, p-ERK และ p-JNK) เพิ่มขึ้นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ดังแสดงในภาพ 3-8 แต่เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 12.5-50  $\mu\text{M}$  และถูกเหนี่ยวนำโดย LPS พบว่าปริมาณโปรตีน p-p38 และ p-JNK ในเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-9) ในขณะที่ปริมาณโปรตีน p-ERK ในเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 12.5-50  $\mu\text{M}$  ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 3-8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในวิถี MAPKs โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ที่ความเข้มข้น 1  $\mu$ g/ml เป็นเวลา 30 นาที หลังจากสัมผัสกับสาร JJSRUN16 เป็นเวลา 30 นาที ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนของการทำ Western blot จำนวน 3 ครั้ง

## บทที่ 4

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

#### 4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการประเมินประสิทธิภาพ และศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของ สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไทรเออร์มีเทนแบบไม่สมมาตร JJSRUN16 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่าสาร JJSRUN16 สามารถลดการอักเสบได้ โดยลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ผ่านการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-**K**B และยับยั้งผ่านวิถีสัญญาณ JNK และ p38 MAPKแมคโครฟาจ เป็นเซลล์ที่มีบทบาทมากที่สุดในกระบวนการอักเสบแบบเรื้อรัง สามารถพบได้ทั้งในกระแสเลือดในรูปของ เซลล์โมโนไซต์ ( blood monocytes) และเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ (พีรยุทธ ลิทธิไชยากุล , 2552) ใน การศึกษานี้จึงใช้เซลล์ไลน์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีคุณสมบัติเป็นสารพิษเอ็นโดทอกซินเพื่อจำลองสภาวะการอักเสบ แมคโคร ฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS จะส่งสัญญาณการตอบสนองผ่านตัวรับสัญญาณ (receptor) ที่สำคัญ 3 ตัวคือ cluster of differentiation 14 (CD14), Toll-like receptor 4 (TLR4) และ myeloid differentiation protein-2 (MD-2) (Fujihara et al., 2003) การส่งสัญญาณการกระตุ้นด้วย LPS จะเกิดผ่านวิถีที่สำคัญคือ NF-**K**B และ MAPKs ซึ่งจะทำให้เกิดการตอบสนองที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ คือ การแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ที่จะผลิตไนตริกออกไซด์ และเอนไซม์ COX-2 ที่ผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 เป็นต้น ( Shao et al., 2013)

ในการศึกษาความเป็นพิษของสาร JJSRUN16 ต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 พบว่าเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 100 และ 200  $\mu$ M มีผลทำให้ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือเพียง  $93.23 \pm 24.93$  และ  $10.09 \pm 5.96$  ตามลำดับ (ภาพที่ 3-1) ดังนั้นในการทดลองต่อไปผู้วิจัยเลือกใช้สาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 50  $\mu$ M เพื่อศึกษาประสิทธิภาพที่แท้จริงในการต้านอักเสบของสาร JJSRUN16 และหลีกเลี่ยงผลอันเกิดจากความเป็นพิษของสาร JJSRUN16 ในการวิเคราะห์ผลของสาร JJSRUN16 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์พบว่า JJSRUN16 มีฤทธิ์ในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร เมื่อเปรียบเทียบกับ aminoguanidine (AG) ที่เป็นสารควบคุมในทางบวกที่มีความจำเพาะต่อ iNOS โดยการลดแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS (Farhad et al., 2011) พบว่าสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ M มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีกว่า AG โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของ JJSRUN16 และ AG เท่ากับ  $96.45 \pm 5.57$  และ  $63.48 \pm 13.72$  ตามลำดับ (ภาพที่ 3-3)

การสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS นั้นจะเกิดจากเอนไซม์ iNOS โดยการแสดงออกของ iNOS จะถูกควบคุมการแสดงออกในระดับการถอดรหัส (transcription level) (Kleinert et al., 2004) สำหรับในงานวิจัยนี้พบว่าสาร JJSRUN16 สามารถลดปริมาณการแสดงออกของ iNOS ได้ทั้งในระดับโปรตีน และ mRNA ดังนั้นการลดลงของไนตริกออกไซด์อาจจะเป็นผลมาจากการลดปริมาณการแสดงออกในระดับโปรตีน และ mRNA ของ iNOS จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อมีการดัดแปลงโครงสร้างของสารไตรเอริลมีเทนจากสาร JJST5 ที่มีกลุ่มเอริลเป็นวงอะโรมาติกที่มีโครงสร้างเหมือนกันทั้งสามวงและมีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในวง (กาญจนา ดวงเกตุ และเพชรรัตน์ ไสว, 2556) มาเป็นสาร JJSRUN16 ที่มีกลุ่มเอริลที่แตกต่างกันทั้ง 3 วง พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีมากขึ้น

นอกเหนือจากไนตริกออกไซด์ เซลล์แมคโครฟาจยังหลั่งพรอสตาแกลนดิน E2 โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ COX-2 เอนไซม์นี้ถูกควบคุมการแสดงออกทั้งในระดับการถอดรหัส และหลังถอดรหัส (post-transcriptional) (Capper et al., 2008) จากผลการทดลองพบว่าสาร JJSRUN16 ที่ความเข้มข้น 3.125-50  $\mu\text{M}$  ไม่สามารถลดการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 ได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน COX-2 แต่ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ COX-2 พบว่า สาร JJSRUN16 นั้นสามารถลดปริมาณ mRNA ได้ ผลที่ได้นี้แตกต่างจากผลของสาร JJST5 ที่สามารถลดการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 ได้ แต่ไม่สามารถลดปริมาณโปรตีน COX-2 โดยสารอาจไปมีผลลดแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 โดยตรง (กาญจนา ดวงเกตุ และเพชรรัตน์ ไสว, 2556)

ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS นั้น จะมีตัวรับสัญญาณ คือ TLR4 ซึ่งเกิดผ่านวิถีสัญญาณ NF- $\text{KB}$  และ MAPKs นำไปสู่การสังเคราะห์สารตัวกลางในการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 (Küper, Beck and Neuhofer, 2012) ในสภาวะปกติ NF- $\text{KB}$  อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถทำงานได้ จะจับกับตัวโปรตีนยับยั้ง I $\text{KB}$  อยู่ในไซโตซอลของเซลล์ แต่ถ้าหากเซลล์นั้นถูกเหนี่ยวนำโดย LPS จะเกิดการฟอสโฟรีเลชัน ที่ I $\text{KB}$  โดยเอนไซม์ IKK จากนั้น I $\text{KB}$  ที่ถูกฟอสโฟรีเลชันแล้วจะเกิดการย่อยสลายที่โปรตีโอโซม ทำให้ NF- $\text{KB}$  เป็นอิสระ เกิดการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารสื่อกลางในการอักเสบ ไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน E2 รวมทั้ง IL-1 $\beta$ , IL-6 และ TNF- $\alpha$  เป็นต้น (Karin, 2009; Staudt, 2010) ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบวิถีสัญญาณ NF- $\text{KB}$  จากการศึกษาพบว่า สาร JJSRUN16 สามารถลดปริมาณโปรตีน NF- $\text{KB}$  p65 ในนิวเคลียสได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-7) กลไกการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์นี้ให้ผลที่คล้ายกับงานวิจัยของ Lin และคณะ (2007) พบว่าสารสังเคราะห์ 4-(2-(cyclohex-2-enylidene)hydrazinyl)quinolin-2(1H)-one (CYL-4d) สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์และลดการแสดงออกของ iNOS แต่ไม่ลดการแสดงออกของ COX-2 สาร CYL-4d สามารถลดปริมาณโปรตีน NF- $\text{KB}$  p65 ในนิวเคลียสได้ โดยไม่ผ่านการลดการฟอสโฟรีเลชันของ I $\text{KB}$  แต่ไปทำการรบกวนการเคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสของ NF- $\text{KB}$  p65 ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS ของสาร JJSRUN16 อาจเกิดจากสารไปรบกวนการเคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสของ NF- $\text{KB}$  p65 เมื่อเปรียบเทียบกับ

ทำงานของสาร JJST5 พบว่าสารสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้เช่นกัน แต่ไม่ได้เกิดผ่านการลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-KB p65 (กาญจนา ดวงเกตุ และเพชรรัตน์ ไสว, 2556) ขั้นตอนต่อมาจึงทำการศึกษาวិถีสัญญาณ MAPKs ซึ่งเป็นวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างสารตัวกลางในการอักเสบต่างๆ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS (Küper, Beck and Neuhofer, 2012) จากการศึกษาพบว่าสาร JJSRUN16 นั้นสามารถลดปริมาณโปรตีน p-JNK ได้อย่างชัดเจน และลดปริมาณโปรตีน p-p38 ได้เพียงเล็กน้อย แต่ไม่ลดปริมาณโปรตีน p-ERK 1/2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-8) มีการรายงานว่าวิถีสัญญาณ JNK เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS (Lin et al., 2007) ดังนั้นการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS โดยสาร JJSRUN16 นอกเหนือจากการลดการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของ NF-KB p65 อาจจะเป็นผลมาจากการลดการฟอสโฟรีเลชัน หรือลดการกระตุ้นเอนไซม์ JNK อีกทางหนึ่งด้วย มีรายงานว่าโปรตีน CCAAT-enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) และ cyclic-AMP response element binding protein (CREB) มีบทบาทสำคัญในระยะเวลาแรกของการกระตุ้นการถอดรหัสของ ยีน COX-2 และ LPS สามารถกระตุ้น C/EBP $\beta$  และ CREB ผ่านทางวิถีสัญญาณ ERK1/2 และ p38 MAPK ได้ (Lin et al., 2007) ดังนั้นการที่สาร JJSRUN16 ไม่ลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 น่าจะเป็นผลมาจาก การที่สารไม่สามารถลดการกระตุ้นวิถี ERK ได้ รวมทั้งลดการกระตุ้นวิถี p38 MAPK ได้เพียงเล็กน้อย ทำให้ยังคงมีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 และการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 ได้

เอนไซม์ COX เป็นเอนไซม์สำคัญที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดิน ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ยาลดอักเสบกลุ่ม NSAIDs เป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา และบรรเทาอาการของโรคที่เกิดจากการอักเสบแต่เนื่องจาก NSAIDs จะออกฤทธิ์ในการยับยั้งทั้ง COX-1 และ COX-2 เมื่อผู้ป่วยได้รับยาเป็นเวลานาน และในปริมาณมาก จะทำให้เกิดผลข้างเคียงคือ การตกเลือดในทางเดินอาหาร เกิดแผลอักเสบ หรือกระเพาะอาหารทะลุ (พิสิฐ วงศ์วัฒน์ , 2552) การเลือกใช้ยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ COX-2 เพียงอย่างเดียวจึงมีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารน้อยกว่า NSAIDs แต่ยาในกลุ่มนี้ก็ยังสามารถทำให้เกิดปัญหาต่อระบบหัวใจ และหลอดเลือดได้ (พรทวี เลิศศรีสถิต และสุชีลา จันทร์วิทย์านุชิต , ม.ป.ป.) (ศศิกานต์ นิมมานรัชต์, 2553) ในการศึกษาเห็นชัดเจนว่าสาร JJSRUN16 นั้นไม่มีผลต่อปริมาณ mRNA ของ COX-1 จึงน่าจะไม่มีผลต่อพรอสตาแกลนดินที่ควบคุมระบบสรีระวิทยา ถึงแม้ว่าสาร JJSRUN16 จะไม่สามารถลดปริมาณพรอสตาแกลนดิน E2 ได้ แต่สาร JJSRUN16 ก็ยังมีประสิทธิภาพในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่า AG จากงานวิจัยนี้ทำให้เราทราบถึงศักยภาพ และกลไกในการต้านการอักเสบของสาร JJSRUN16 ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา และปรับปรุงโครงสร้างของสารเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดียิ่งขึ้น และมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยที่สุด

## 4.2 สรุปผลการทดลอง.....

1. สารสังเคราะห์ JJSRUN16 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS



และการยับยั้งเกิดผ่านการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF-**K**B และวิถีสัญญาณ JNK และ p38 MAPK

2. สารสังเคราะห์ JJSRUN16 ไม่สามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 และการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ได้ รวมทั้งไม่มีผลต่อ mRNA ของ COX-1

## บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555a). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ. เอส. พริ้นติ้ง. เข้าส่: กรุงเทพมหานคร.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข . (2555b).เอกสารประกอบการสอนวิชา 316322 Biochemical Techniques1 (Part: Electrophoresis and Immunochemistry). ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จเรจรังสรุณพงศ์, ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2556). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารไตรเอริลมีเทนแบบไม่สมมาตร”. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- นันทกานต์ เมืองพิล. 2550. การเปรียบเทียบวิธีการส่งสัญญาณไมโทเจน-แอกทิเวเตดโปรตีนไคนเนส และ วิถีวัฏจักรเซลล์ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง 6 ชนิดที่ทราบรหัสจีโนมแล้วโดยเทียบรหัสสายลำดับ กรดอะมิโนของโปรตีนที่ตรงกับรหัสโปรตีนของคน. ปริญญาานิพนธ์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ปารวี สุวรรณาลัย. ม.ป.ป. ข้ออักเสบรูมาตอยด์ [Online]. แหล่งเข้าถึง [http://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/Rheu\\_matooid%20arthritis.pdf](http://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/Rheu_matooid%20arthritis.pdf) สืบค้นเมื่อ [23/11/2557]
- พีรยุทธ ลิทธิไชยากุล. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชาหลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ 499303. ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- สุรพันธุ์คุณอมรพงศ์. ม.ป.ป. การอักเสบและการซ่อมแซม. พยาธิวิทยาทั่วไป [ Online]. แหล่งเข้าถึง [www.med.cmu.ac.th/dept/patho/.../07-09-inflammation&repair-text.pdf](http://www.med.cmu.ac.th/dept/patho/.../07-09-inflammation&repair-text.pdf) สืบค้นเมื่อ [23/11/2557]
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข . (2554). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ “การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง”. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Esquivias, J., Arrayas, R. G. and Carretero, J. C., (2006) “A copper(II)-catalyzed aza-Friedel-Crafts reaction of *N*-(2-pyridyl)sulfonyl aldimines: synthesis of unsymmetrical diary amines and triarylmethanes”. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 629-633 and references cited therein.
- Jereb, M., Vrazic, D. and Zupan, M (2011) “Iodine-catalyzed transformation of molecules containing oxygen functional group”. *Tetrahedron* 67: 1355-1387.

- Karin M. (2009). NF- $\kappa$ B as a critical link between Inflammation and cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1 : 1-14.
- Kodomari, M., Nagamatsu, M. Akaike, M. and Aoyama, T. (2008) "Convenient synthesis of triarylmethanes and 9,10-diarylanthracenes by alkylation of arenes with aromatic aldehydes using acetyl bromide and ZnBr<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>". *Tetrahedron Letters* 49: 2537-2540.
- Katzung, B.G. Basic & Clinical Pharmacology. (2001), International Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York
- .Li, Z., Duan, Z., Kang, J., Wang, H., Yu, L. and Wu, Y. (2008) "A simple access to triarylmethane derivatives from aromatic aldehydes and electron-rich arenes catalyzed by FeCl<sub>3</sub>". *Tetrahedron* 64: 1924-1930.
- Lin, S. and Lu, X. (2007) "Cationic Pd(II)/bipyridine-catalyzed addition of arylboronic acids to arylaldehydes. One-Pot synthesis of unsymmetrical triarylmethanes" *Journal of Organic Chemistry* 72: 9757-9760.
- Nair, V., Thomas, S., Mathew, S.C. and Abhilash, K. G. (2006) "Recent advances in the chemistry of triaryl- and triheteroarylmethanes". *Tetrahedron* 62: 6731-6747.
- Niwa, T., Yorimitsu, H. and Oshima, K. (2007) "Palladium-catalyzed direct arylation of aryl(azaaryl)methanes with aryl halides providing triarylmethanes". *Organic Letters* 9: 2373-2375.
- Mibu N, Yokomizo K, Uyeda M, Somoto K. (2005). Synthesis and antiviral activities of some 4,4'- and 2,2'-Dihydroxytriphenylmethanes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 53 : 1171-1174
- Parai, M. K., Panda, G., Chaturvedi, V., Manju, Y. K. and Sinha, S. (2008) "Thiophene containing triarylmethanes as antitubercular agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 289-292.
- Podder, S., Choudhury, J., Roy, U. K. and Roy, S. (2007) "Dual-reagent catalysis within Ir-Sn domain: Highly selective alkylation of arenes and heteroarenes with aromatic aldehydes". *Journal of Organic Chemistry* 72: 3100-3103.

- Shagufta, Srivastava, A. K. Sharma, R., Mishra, R. Balapure, A. K., Murthy, P. S. R. and Panda, G. (2006) "Substituted phenanthrenes with basic amino side chains: A new series of anti-breast cancer agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*14: 1497-1505.
- Shirakawa, S. and Kobayashi, S. (2006) "Carboxylic acid catalyzed three-component aza-Friedel-Crafts reactions in water for the synthesis of 3-substituted indoles". *Organic Letters*8: 4939-4942.
- Srivastava, N., Sangita, Ray, S. Singh, M. M., Dwivedi, A. and Kumar, A. (2004) "Diaryl naphthylmethanes a novel class of anti-implantation agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*12: 1011-1012.
- Staudt LM. (2010). Oncogenic Activation of NF- $\kappa$ B. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.2 : 1-30.
- Togo, H. and Iida, S. (2006) "Synthetic use of molecular iodine for organic synthesis". *Synlett*14: 2159-2175.
- Tunctan, B., Altug, S., Uludağ, O., Demirkay, B., Abacıoğlu, N., (2003). Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacological Research* 48, 37.
- Yu, J.-Y. and Kuwano, R. (2008) "Suzuki-Miyaura coupling of diarylmethyl carbonates with arylboronic acids: A new access to triarylmethanes". *Organic Letters*10: 973-976.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E., 2000. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Research* 1, 67.

## ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. Klaokwan Srisook, Wipada Siritanyong, Titiporn Tongyen, JarayJaratjaroonphong. The molecular mechanism of anti-inflammatory effect of tert-butyl 2-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate in LPS-induced macrophages.. (Manuscript in preparation).
2. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จำนวน 2 คน คือ นางสาวจิตติพร ทองเย็นและนางสาววิภาดา ศิริตันหยง