

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินศักยภาพของอนุพันธ์ ferulic acid ในการเป็นยา
ต้านอักเสบชนิดใหม่

Potential evaluation of ferulic acid derivatives
as novel anti-inflammatory agents

โดย

ผศ. ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
งบประมาณปี 2554

17 เม.ย. 2555

KK0143243

301496

เริ่มบริการ

23 พ.ค. 2555

บทคัดย่อ

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมและการบาดเจ็บของเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดอันตรายกับเซลล์ ในขณะที่มีการอักเสบนี้แมคโครฟาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ และควบคุมการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) จะผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ที่จะช่วยในการต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA) เป็นอนุพันธ์ของ ferulic acid ชนิดใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของสาร EAMA ยังไม่เป็นที่เข้าใจทั้งหมด ดังนั้นเพื่อความเข้าใจการทำงานของสารนี้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโปรไฟล์ของการแสดงออกของโปรตีนในแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ในสภาวะที่มีและไม่มีสาร EAMA ในช่วงเวลาต่างๆ โดยเทคนิค 1-dimensional SDS-PAGE และ nano-LC-MS/MS. พบโปรตีนทั้งหมดถึง 2,429 ชนิด แต่มีเพียง 1,100 ชนิดที่สามารถระบุรายละเอียดโดยโปรแกรม STRAP (Software Tool for Researching Annotations of Proteins) และสามารถแบ่งกลุ่มโปรตีนทั้งหมดนี้ได้เป็น 6 กลุ่มตามตำแหน่งองค์ประกอบภายในเซลล์ดังนี้ 1) นิวเคลียส 2) เยื่อพลาสมา 3) ไซโทพลาซึม 4) เอนโดพลาสมิกเรติ 5) เพอร์ออกซิโซม ไมโทคอนเดรีย และโครงร่างค้ำจุนเซลล์ และ 6) ไรโบโซม เอนโดโซม และสารประกอบเชิงซ้อนกับสารมโหมเกลกุล เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจโดยโปรแกรม MeV (MultiExperiment Viewer) ระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA พบการแสดงออกของโปรตีน 9 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่าง ได้แก่ โปรตีน apoptosis related protein 3, T25C8.2, espin isoform 1, H2A histone family member V isoform 1, vasopressin-neurophysin 2-copeptin, protocadherin-12, thymidine kinase 1. poly(A)-specific ribonuclease PARN-like domain-containing protein 1-lik และ CDNA sequence BC068157 โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างค้ำจุนเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ กระบวนการเอนโดไซโทซิส การตายของเซลล์แบบ apoptosis การส่งสัญญาณ การยึดจับของเซลล์ และกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก ในขณะที่การเปรียบเทียบโปรไฟล์ของโปรตีนในสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม พบว่ามีโปรตีน 24 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกัน โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างค้ำจุนเซลล์ การยึดจับของเซลล์ การส่งสัญญาณ การควบคุมการถอดรหัส กระบวนการ rRNA processing การขนส่งกรดอะมิโน (amino acid transport) การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน กระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก และกระบวนการเมแทบอลิซึมของ GDP-mannose ได้ทำการเลือกโปรตีน 3 ชนิด คือ apoptosis related protein 3, thymidine kinase 1 และ 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA โดยเทคนิค qRT-PCR พบว่ามีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างจากโปรตีน ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนหรือแตกต่างกันของการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนสะท้อนถึงกลไกการควบคุมที่ซับซ้อนภายในเซลล์แมคโครฟาจที่ตอบสนองต่อ LPS และ EAMA

คำสำคัญ: การอักเสบ, EAMA, แมคโครฟาจ, SDS-PAGE, LC-MS/MS

ABSTRACT

Inflammation is a natural defense of the body to protect against foreign organism or tissue injury causing harm to the body. During inflammation, macrophages play an important role in inflammation and regulate immune response. Macrophages induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) secreting a large number of inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO) to help fighting the bacterial infection. Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA), a ferulic acid derivatives, is a novel synthetic compound which has been shown previously to possess an inhibitory effect on NO production in LPS-stimulated macrophages RAW 264.7 without affecting cell viability. But the mechanisms involved are not yet fully understood. To better understand its function, the differentially expressed proteins of the LPS-treated murine macrophage cells response to EAMA was observed by a label-free quantitative proteomic approach. A total of 2,429 peptides were identified using 1-dimensional SDS-PAGE combined with nano-LC-MS/MS. Only 1,100 proteins could be annotated by STRAP (Software Tool for Researching Annotations of Proteins) and grouped into 6 categories of molecular function, including (i) binding activity, (ii) catalytic activity, (iii) molecular transducer activity, (iv) regulator activity, (v) structural molecular activity. The proteomics data was further analyzed the protein expression pattern by using MeV (MultiExperiment Viewer) program. The MeV results showed 9 differential expressed proteins of LPS treated cells compared with co-treated with LPS and EAMA cells. They were apoptosis related protein 3, T25C8.2, espin isoform 1, H2A histone family member V isoform 1, vasopressin-neurophysin 2-copeptin, protocadherin-12, thymidine kinase 1, poly(A)-specific ribonuclease PARN-like domain-containing protein 1-like, and CDNA sequence BC068157. These proteins involved in cytoskeleton, cell proliferation, endocytosis, apoptosis, signal transduction, cell adhesion, and nucleic acid metabolic process. While The MeV results showed 24 differential expressed proteins of EAMA treated cells and the control cells. These proteins involved in immune response, nucleic acid metabolic process, rRNA processing, GDP-mannose metabolic process, cell adhesion, amino acid transport, signal transduction, transcriptional regulation and cytoskeleton. Three proteins including apoptosis related protein 3, thymidine kinase 1 and 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor, were selected to analyze the mRNA expression by qRT-PCR. In this comparison, mRNA expression pattern of 3 selected proteins changed in different pattern with protein. The results indicated that, the different changes between mRNA and protein expression reflected complex regulatory mechanisms for macrophage response to LPS and EAMA.

Keywords: Inflammation, EAMA, Macrophage, SDS-PAGE, LC-MS/MS

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษารั้้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนานิวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณ นางสาวจิราภา จันทิมาลย์ นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
ABSTRACT	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทนำ	1
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	5
ผลการทดลอง	10
อภิปรายผลการทดลอง	36
บรรณานุกรม	39

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาอันซับซ้อนที่เนื้อเยื่อต่างๆ ตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมโครฟาจ โดยไนตริกออกไซด์มีฤทธิ์ส่งเสริมการอักเสบ ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) ในปัจจุบันพบว่า NOS มี 3 isoform ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และinducible NOS (iNOS) โดยที่ nNOS และ eNOS เป็น constitutive form ในขณะที่ iNOS เป็น inducible form การเร่งปฏิกิริยาของ NOS ต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH₄) และฮีม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF- κ B ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะถูกจับโดย I κ B และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวภาพให้มีการสลาย I κ B ส่งผลให้ NF- κ B เกิด translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS

ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมโครฟาจ (Coleman, 2001) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อกจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมโครฟาจ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้จะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) การยับยั้งการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ iNOS (iNOS regulator) หรือยีนสำหรับสร้างโคแฟกเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิทยาต้านการอักเสบต่อไป

HO-1 (EC 1.14.99.3) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกลุ่มฮีโมได้ผลผลิตเป็นเหล็ก (Fe^{2+}) คาร์บอน มอนออกไซด์ (CO) และ biliverdin ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อเป็น bilirubin โดยเอนไซม์ biliverdin reductase ทั้ง biliverdin และ bilirubin หน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ส่วนคาร์บอนมอนอกไซด์ถูกรายงานว่าสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และลดการแสดงออกของ iNOS (Sarady-Andrews, 2005; Sawles, 2005; Srisook และคณะ, 2006) ดังนั้นการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 นอกจากที่จะลดการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว ยังสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระอื่นๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการตอบสนองการอักเสบ (immune response) ได้อีกด้วย จึงทำให้การด้านการอักเสบมีประสิทธิภาพมากขึ้นและไม่ทำให้สมดุลของ oxidative stress เสียไป

N-acetyl-3-O-methyldopamine (NAMDA) เป็นสารเมทาบอลไลต์ของ dopamine ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) สาร NAMDA แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ microglia ของหนู (BV-2) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยผ่านการยับยั้งการผลิต BH_4 นอกจากนี้ NAMDA ยังมีผลในการปกป้องเซลล์สมองชนิด CA1 hippocampus จากการถูกทำลายด้วยไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไป (Cho, 1999) ถึงแม้ว่า NAMDA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ระดับความเข้มข้นที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้อยู่ที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 1-3 mM นอกจากนี้ Seo และคณะ (2005, 2008) ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของ NAMDA และพบว่าอนุพันธ์ NAMDA ที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ BV-2 ลงประมาณ 60% นอกจากนี้กลุ่มวิจัยของเราได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ จำนวน 43 สาร เมื่อศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับ in vitro โดยพบว่าสารที่มีโครงสร้างคล้าย ferulic acid จำนวน 10 สารจากทั้งหมด 43 สาร ที่ความเข้มข้น 100 μM แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ และสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ได้มากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (Karnkla, 2008 และ Mongkol, 2009) จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า อนุพันธ์ ferulic acid ที่มีโครงสร้างคล้าย ferulic acid ทั้ง 10 สารนี้ สามารถลดปริมาณโปรตีนของ iNOS โดยมีสารเหล่านั้นนอกจากจะมีฤทธิ์ลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้มากแล้วยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน HO-1 ได้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ ferulic acid ชนิดใหม่เหล่านี้มีศักยภาพที่จะถูกพัฒนาไปเป็นยาต้านการอักเสบได้ เนื่องจากมีความสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสาร BMC41 หรือ EAMA ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร EAMA นี้ได้ทำการศึกษาไปบางส่วน โดยกลไกหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ การลดการผลิตไนตริกออกไซด์ผ่านการเหนี่ยวนำการ และยับยั้งการฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) ของ c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร EAMA โดยการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Gel-based LC-MS/MS (GeLC-MS/MS) เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์ที่สัมผัสสาร EAMA อันจะนำไปสู่แนวทางในการยับยั้งการอักเสบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

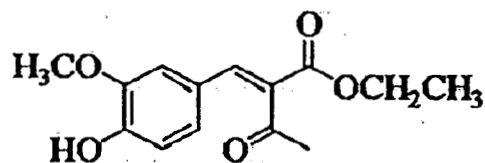
เพื่อวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และที่สัมผัสกับอนุพันธ์ ferulic acid ร่วมกับ LPS

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการวิเคราะห์โปรตีโอมด้วยเทคนิค Gel-based LC-MS/MS สดท้ายทำการยืนยันระดับการแสดงออกของยีนสำหรับโปรตีนบางชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อวิเคราะห์โปรตีโอม

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีรายงานว่า *N*-acetyl-3-*O*-methyldopamine (NAMDA) เป็นเมทาบอลไลต์ของ dopamine ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ซึ่งมีรายงานว่า สามารถลดการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทโดยยับยั้งการสังเคราะห์ของ NOS cofactor, BH₄ ในเซลล์ microglial BV-2 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย LPS โดย NAMDA จะยับยั้งเอนไซม์ GTP cyclohydrolase I ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ควบคุมอัตราการเร่งปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ BH₄ (Cho et al., 1999) แม้ว่า NAMDA จะไม่มีพิษแต่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ด้วยความเข้มข้นสูง ต่อมา Seo และคณะ (2005, 2008) ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์ NAMDA และพบว่าอนุพันธ์บางชนิดมีความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ต่อมา Karnkla (2008) ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ จำนวน 43 สาร และพบว่าอนุพันธ์ NAMDA มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Mongkol, 2009) โดยการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับ *in vitro* พบว่าอนุพันธ์ NAMDA บางชนิดสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และจากการศึกษาของ กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข (2554) พบว่าสาร EAMA หรือสาร ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate ซึ่งเป็นอนุพันธ์ NAMDA ที่มีโครงสร้างคล้ายอนุพันธ์ ferulic acid ดังแสดงในรูปที่ 1-1 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์



รูปที่ 1-1 โครงสร้างของสาร ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate (EAMA)

สาร EAMA นี้สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.1 μ M ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ข้อมูลของ western-blot และ reverse transcription-polymerase chain reaction พบว่าสาร EAMA สามารถลดปริมาณโปรตีน และ mRNA ของ iNOS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นเหมือนกับการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ การต้านอักเสบของสาร EAMA เกิดขึ้นโดยการยับยั้ง iNOS promoter activity และการลดการเคลื่อนที่ของ nuclear factor KB p65 (NF-KB) เข้าสู่นิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบว่าสาร EAMA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน และ mRNA ของ HO-1 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบและเวลาที่สัมผัสสารทดสอบ การยับยั้งแอกติวิตีของ HO-1 โดย tin protoporphyrin IX (SnPP IX) ซึ่งเป็นสารยับยั้งแอกติวิตีของ HO-1 และการกำจัดคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) โดยฮีโมโกลบิน

(hemoglobin) สามารถลดการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร EAMA ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสาร EAMA มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ โดยอย่างน้อยเกิดผ่านการกระตุ้น HO-1 นอกจากนี้ยังพบว่า สาร EAMA สามารถยับยั้งการฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) ของ c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่ยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของ p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPKs) (Srisook และคณะ, 2012)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี

Lipopolysaccharide หรือ LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4) ซื้อจาก Sigma Chemical (St.Louis, MO, USA), Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, Trypsin, sequencing grade modified ซื้อจาก Promega (Madison, WI, USA) Fetal bovine serum (FBS), Penicillin-Streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM และ UltraPure™ Distilled Water ซื้อจาก Invitrogen/Gibco (Grans Island, NY, USA) Oligo (dT)₁₅ primer ซื้อจาก Operon Biotechnologies (Germany) Oligonucleotide primers ซื้อจาก BioDesign (ประเทศไทย) TRI reagent ซื้อจาก Molecular Research Center (Cincinnati, OH, USA) Acrylamide PAGE 40% Solution และ Iodoacetamide ซื้อจาก GE Healthcare (UK) Deoxycholic acid sodium salt, DOC และ Dithiothreitol ซื้อจาก USB corporation (U.S.A.) และ 2X Prime Q-master Mix with SYBR Green I ซื้อจาก Genet Bio (Korea)

2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ ferulic acid ที่ใช้ในการทดสอบ

สังเคราะห์อนุพันธ์ ferulic acid หรือสาร ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate-(EAMA) ที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอกับการทดสอบ

2.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS-DMEM บนจานเพาะเลี้ยง (1×10^6 เซลล์/จาน) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเซลล์โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เซลล์เกาะพื้นผิว จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเติมสารทดสอบ แล้วจึงนำไปบ่มที่ 37°C ในตู้บ่มเซลล์ตามช่วงเวลาต่างๆ โดยแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

1. กลุ่มควบคุม จะทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
2. กลุ่มที่สัมผัสกับ LPS (1μl/อาหาร 1ml) จะทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
3. กลุ่มที่สัมผัสกับสาร EAMA (100 μM) จะทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
4. กลุ่มที่สัมผัสกับ LPS (1μl/อาหาร 1ml) ร่วมกับสาร EAMA (100 μM) จะทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

ในแต่ละกลุ่มการทดลองและในแต่ละช่วงเวลาจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 3 จานเพาะเลี้ยง และเมื่อครบเวลาการบ่มด้วยสารทดสอบ เซลล์แต่ละกลุ่มจะถูกสกัดโปรตีนเพื่อทำการทดลองต่อไป

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำเซลล์ที่บ่มครบตามเวลาแล้วมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่เย็น 2 ครั้ง จากนั้นเติม 0.1% SDS ให้ท่วมเซลล์ แล้วจึงนำไปบ่มที่ -80°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลงประมาณ 15-20 ครั้ง ก่อนดูดไปเก็บในหลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 15 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วจึงตกตะกอนโปรตีนโดยการเติม acetone ที่เย็นปริมาณเป็น 2 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 1 คืน ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้ว

นำตะกอนไปละลายใน 0.15% (w/v) deoxycholic acid sodium salt (DOC) ปริมาตร 30-50 μ l เพื่อเตรียมตัวอย่างในการวัดปริมาณโปรตีนต่อไป

2.2.4 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ผสมกับสารละลาย 0.15% DOC ตามปริมาณที่แสดงในตารางด้านล่างเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมโปรตีนตัวอย่างโดยเติม 0.15% DOC ให้มีปริมาตร 10 μ l จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาเติม reagent A (0.2% CuSO_4 , 0.4% tartaric acid, 20% Na_2CO_3 , 0.8 N NaOH, 5% SDS) ปริมาตร 200 μ l บ่มนาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติม reagent B (0.2% Folin-ciocalteu phenol) ปริมาตร 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm จากนั้นนำ ค่าที่ได้มาหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น

2.2.5 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ดูดสารละลายโปรตีน 45 μg เติมสีย้อม 5 μ l และเติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 13 μ l จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นตกก่อนดูดสารละลายโปรตีนที่ได้มา 10 μ l นำมาโหลดลงเจล (4% stacking gel และ 12.5% separating gel) และทำการแยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 50 โวลต์จนกระทั่งแถบสีย้อมเคลื่อนที่มาถึง separating gel และเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 70 โวลต์ จนกว่าแถบสีย้อมจะถึงขอบล่างของกระจกจึงหยุด นำเจลที่ได้มาทำการย้อมโดยใช้ silver

2.2.6 การย้อมเจลโดย silver

เติมสารละลาย fixing (50% methanol, 12% acetic acid, 37% formaldehyde) ปริมาตร 200 ml จากนั้นแช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีด้วยเครื่อง shaker แล้วจึงเททิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย washing (35% ethanol ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ) และแช่ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นเททิ้ง และเติมสารละลาย sensitizing (sodium thiosulfate 1.26 mM) ปริมาตร 200 ml และแช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเททิ้ง แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 200 ml และแช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงเททิ้ง แล้วเติมสารละลาย staining (silver nitrate 11.8 mM) ปริมาตร 200 ml แล้วแช่เป็นเวลา 20 นาที แล้วเททิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย developing (sodium carbonate 0.57 M, sodium thiosulfate 1.26 mM, 37% formaldehyde) ปริมาตร 200 ml บ่มไว้จนกว่าจะปรากฏแถบโปรตีน แล้วจึงเทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย stopping (sodium EDTA 39.2 mM) ปริมาตร 200 ml แช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งและล้างน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเจลที่ได้เก็บไว้ใน 0.1% (v/v) acetic acid รอการวิเคราะห์ผลต่อไป

2.2.7 การย่อยภายในเจล (In-gel digestion)

ทำการตัดเจลของแต่ละตัวอย่างออกเป็น 17 ช่วง และนำเจลแต่ละช่วงมาตัดให้มีขนาด $1\times1\times1\text{ mm}^3$ นำเจลที่ได้ใส่ลงใน 96-well plate (well ละไม่เกิน 10 ชิ้น) จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 ครั้ง ดูดน้ำออกและเติม 100% (v/v) acetonitrile ปริมาตร 200 μ l แช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูด acetonitrile ออกแล้วปล่อยให้เจลแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จึงเติมสารละลาย 10 mM ammonium bicarbonate ที่มี 10 mM DTT ปริมาตร 50 μ l ก่อนตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด 10 mM ammonium bicarbonate ที่มี 10 mM DTT ออกไป ต่อมาเติมสารละลาย 10 mM ammonium bicarbonate ที่มี 100 mM iodoacetamide ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดูด 10 mM ammonium

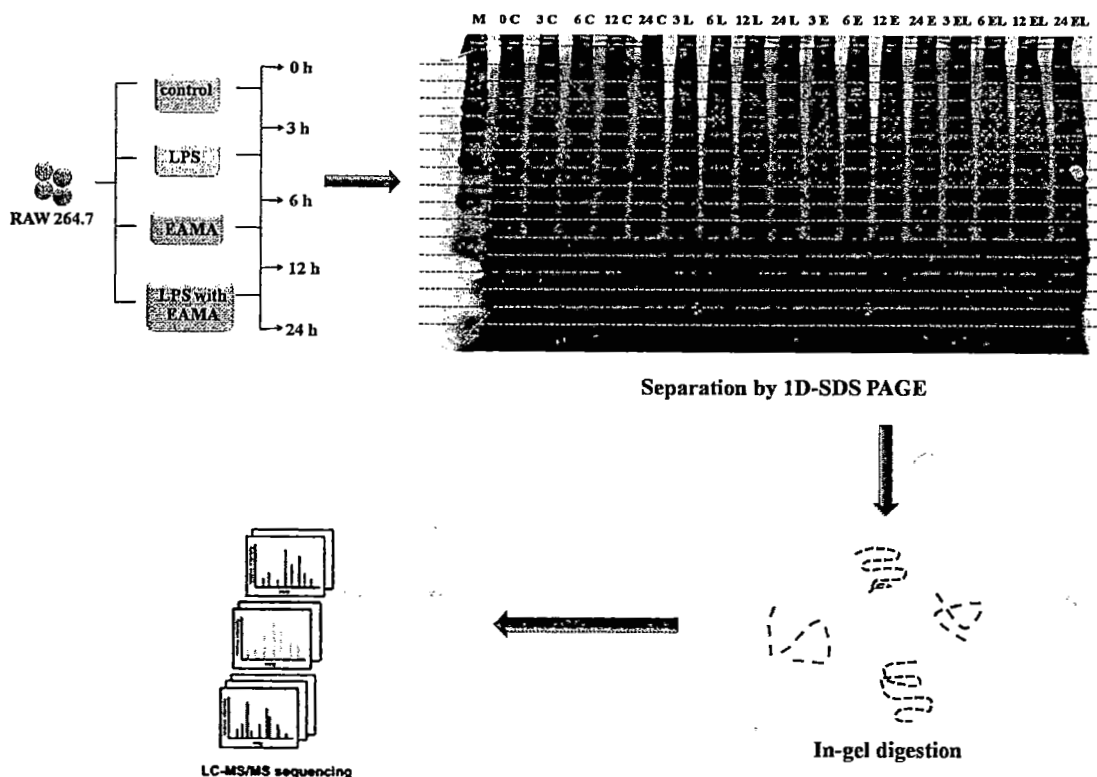
bicarbonate ที่มี 100 mM iodoacetamide ทิ้งไป และเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 μ l เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด acetonitrile ออก (ทำซ้ำ 2 รอบ) จากนั้นย่อยโปรตีนด้วย 10 ng trypsin ใน 10mM ammonium bicarbonate ที่มี 50% acetonitrile ปริมาตร 20 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ก่อนเติม 30% acetonitrile ปริมาตร 20 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 1 คืน ต่อมาดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างใส่ใน 96-well plate อันใหม่ (1 ตัวอย่าง ต่อ 1 หลุม) จากนั้นเติมสารละลาย 50% acetonitrile ที่มี 0.1% formic acid ปริมาตร 30 μ l ใน 96-well plate อันเดิม เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ใน 96-well plate อันใหม่ (ทำซ้ำอีก 2 รอบ) ทำตัวอย่างให้แห้งด้วย incubator ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือ 1 คืน นำตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาที่ -20°C รอการนำไปวิเคราะห์ผลด้วย LC/MS/MS

ได้ทำการเตรียมเพปไทด์ตัวอย่างที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค LC-MS-MS ทั้งหมด 289 ตัวอย่าง

2.2.8 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS

แยกเพปไทด์ด้วย HPLC ชนิด reverse-phase chromatography โดยใช้คอลัมน์ C18 (200 μ m x 5 mm) และใช้ flow rate เท่ากับ 1 μ l/min โดย mobile phase ใช้กรดเดียนของ 10% (v/v) acetonitrile ใน 0.1% formic acid ถึง 70% (v/v) acetonitrile ใน 0.1% formic acid ในเวลา 13 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็น 90% acetonitrile (v/v) ใน 0.1% formic acid เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนการศึกษาสรุปไว้ในแผนภาพด้านล่าง



2.2.9 การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกและชนิดของโปรตีน

นำผลจาก LC-MS/MS มาวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของเพปไทด์ด้วยโปรแกรม Decyder MS (DeCyderMS, GE Healthcare) จากนั้นนำผลจากโปรแกรม DeCyder MS มาวิเคราะห์ชนิดของ

โปรตีนด้วย MASCOT (Matrix Science, London, UK) โดยใช้ฐานข้อมูลจาก NCBI โดยตั้งค่าดังนี้

Taxonomy : mammals

Enzyme : trypsin

Missed cleavages : 1

Fixed modifications : carbamidomethyl

Variable modifications : oxidation

Peptide tolerance : 1.2 Da

Peptide charge : 1+, 2+ and 3+

2.2.10 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1×10^6 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีโรลอะซิเตทที่มีความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการดูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมีวิธีดังนี้ เติมนิวคลีโอไรฟอร์มจำนวน 0.2 mL และผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลจำนวน 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดบรรจุ RNA เข้าเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อระเหย เอทานอล ก่อนเติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 μL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ RNA ละลายได้ดีขึ้น ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย $1 A_{260}$ เท่ากับ 40 $\mu\text{g/mL}$ ของ RNA

2.2.11 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ปฏิกิริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย RNA จำนวน 2 μg , 3U AMV reverse transcriptase, 1X buffer [50 Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 10mM MgCl_2 , 0.5mM spermidine และ 10mM DTT], 0.083 mM oligo (dT)₁₅ primer, 0.67 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor และเติมน้ำปราศจาก RNase และ DNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 μL สภาพที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 42°C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-Time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนต่างๆ ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ขนาดของผลผลิต และเลข Accession ในการทำปฏิกิริยา qRT-PCR

Target	Primer sequences	Product size (bp)	Accession no.
Apr3	5'-TTGGCCAACACCTTCCGTGG-3' (forward) 5'-TGGGCTTCCAGTGCTATTGC-3' (reverse)	162	NM027855.3
Tk1	5'-CTGTGAAATGATGGCCAACGAGG-3' (forward) 5'-CTCTTCGTGTAGGCAGCTTCTCG-3' (reverse)	171	NM009387.2
Pts	5'-CGAATGGCCACGGGCACAAC-3' (forward) 5'-GTACGGCACATCCAGGTCCAG-3' (reverse)	161	NM011220.2
iNOS	5'-GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC-3' (forward) 5'-AGCCAGCGTACCGGATGAGC-3' (reverse)	156	NM010927.3
HO-1	5'-GGCCCTGGAAGAGGAGATAGAGCG-3' (forward) 5'-GCTGGCGTGCAAGGGATGATTTC-3' (reverse)	153	NM010442.2
EF-2	5'-CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA-3' (forward) 5'-GGGTCAGATTCTTGATGGGGATG-3' (reverse)	155	NM007907.2

ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย 2X Prime Q-Master Mix with SYBR Green I จำนวน 10 μ L, 10 μ M Forward primer จำนวน 0.4 μ L, 10 μ M Reverse primer จำนวน 0.4 μ L, cDNA จำนวน 1 μ L และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 20 μ L ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 95 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 °C นาน 30 วินาที, 60 °C นาน 30 วินาที, 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ในเครื่อง real-time PCR (iQ5 Real-Time PCR detection system, BIO-RAD, U.S.A.) และวิเคราะห์หาค่า cycle of threshold (C_T) ของแต่ละปฏิกิริยา (Giulietti et al., 2001) จากนั้นนำมาคำนวณหา copy number ของ mRNA สำหรับแต่ละยีน จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่มีชิ้น cDNA เป้าหมายของยีน ซึ่งแสดงผลในรูปของอัตราส่วนของ copy number ของยีนเป้าหมายต่อ EF-2

2.2.12 วิเคราะห์ความแตกต่างในรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน

เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของเพปไทด์ของโปรตีนแต่ละชนิดในกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสด้วย LPS อย่างเดียวกับกลุ่มที่สัมผัสด้วย LPS ร่วมกับสาร EAMA โดยใช้การวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Student's t-test ($p < 0.1$)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์

การศึกษาโปรไฟล์ของการแสดงออกของโปรตีนในแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ในสภาวะที่มีและไม่มีสาร EAMA ทำการวิเคราะห์โปรตีโอมที่เวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร โดยเทคนิค GeLC-MS และวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Decyder MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT

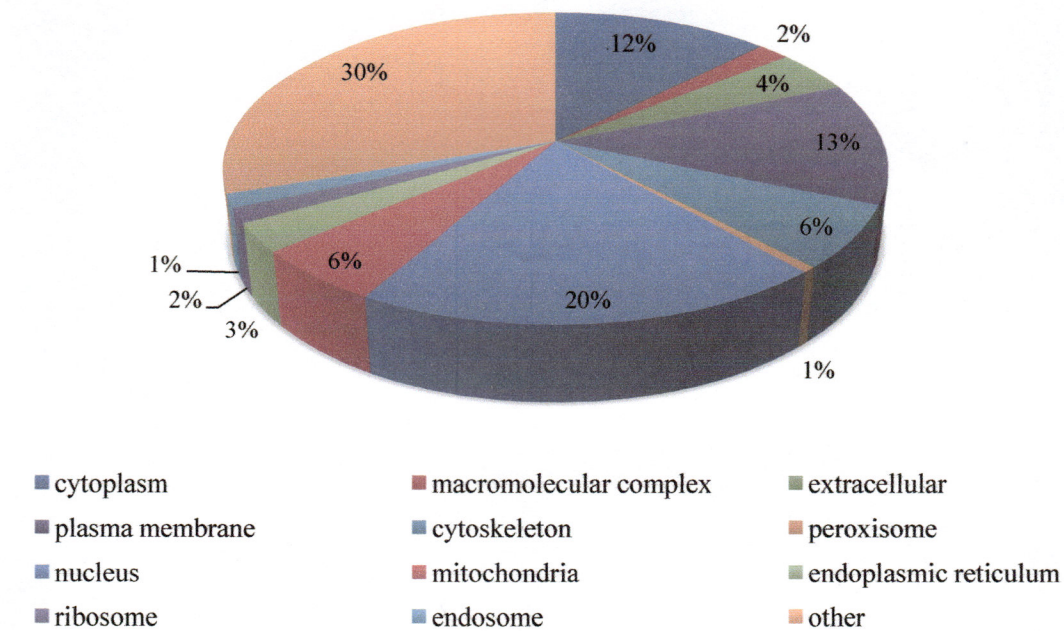
3.1.1 การระบุชนิดของโปรตีน

จากการทดลองสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้โดยเทคนิค GeLC-MS จำนวนทั้งหมด 2,429 ชนิด และเมื่อทำการแบ่งกลุ่มของโปรตีนโดยยีนออนโทโลยี (gene ontology, GO) พบว่ามีโปรตีนจำนวน 1,100 ชนิดที่สามารถให้รายละเอียดของโปรตีน ที่สังเคราะห์จากยีนนั้นในเซลล์ ในด้านต่างๆ คือ ตำแหน่งองค์ประกอบภายในเซลล์ เชิงหน้าที่ระดับโมเลกุล กระบวนการชีวภาพ โดย STRAP (Software Tool for Researching Annotations of Proteins) และระบุความเกี่ยวข้องในวิถีทางชีวภาพ โดยโปรแกรม Panther

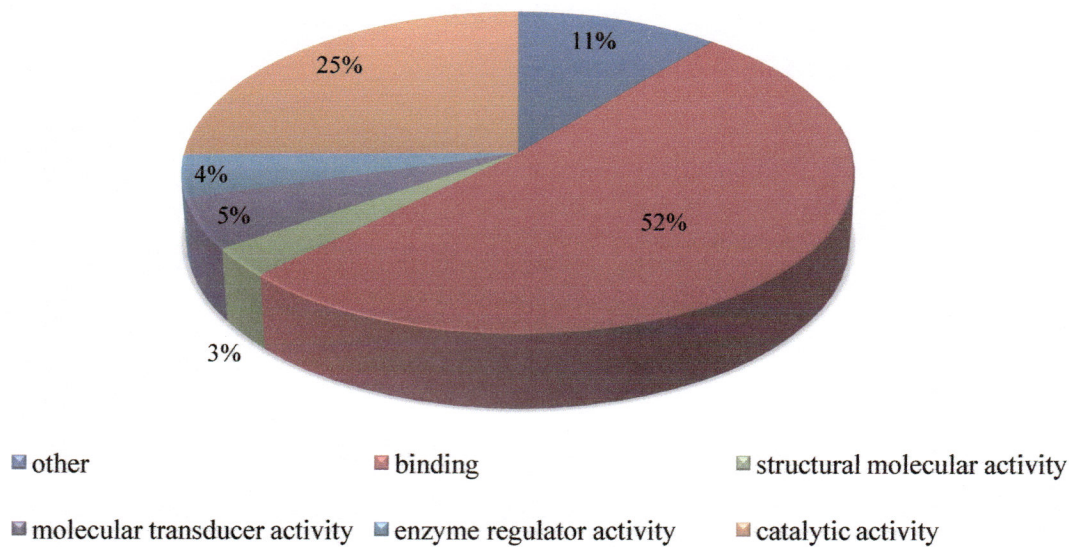
โปรตีนทั้งหมดนี้สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่มตามตำแหน่งองค์ประกอบภายในเซลล์ดังนี้ 1) นิวเคลียสมี 20% 2) เยื่อพลาสมา (plasma membrane) มี 13% 3) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) มี 12% 4) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) มี 3% 5) เพอรอกซิโซม (peroxisome) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และไซโทสเกลิตัน (cytoskeleton) มี 6% 6) ไรโบโซม (ribosome) เอนโดโซม (endosome) และสารประกอบเชิงซ้อนกับสารมหโมเลกุล (macromolecular complex) มี 6% แต่มีโปรตีนจำนวน 30 % ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนอื่นของเซลล์ รูปที่ 3-1 แสดงแผนภาพสรุปการแบ่งโปรตีนตามตำแหน่งองค์ประกอบภายในเซลล์

การแบ่งโปรตีนเหล่านี้ตามหน้าที่ระดับโมเลกุลสามารถแบ่งได้ดังนี้ 1) หน้าที่เกี่ยวกับการจับ (binding activity) มี 52% 2) หน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic activity) มี 25% 3) หน้าที่เป็นโมเลกุลในการส่งสัญญาณ (molecular transducer activity) มี 5% 4) หน้าที่ควบคุมเอนไซม์ (enzyme regulator activity) มี 4% และ 5) หน้าที่เป็นโมเลกุลโครงสร้าง มี 3% รูปที่ 3-2 แสดงแผนภาพสรุปการแบ่งโปรตีนตามหน้าที่ระดับโมเลกุล

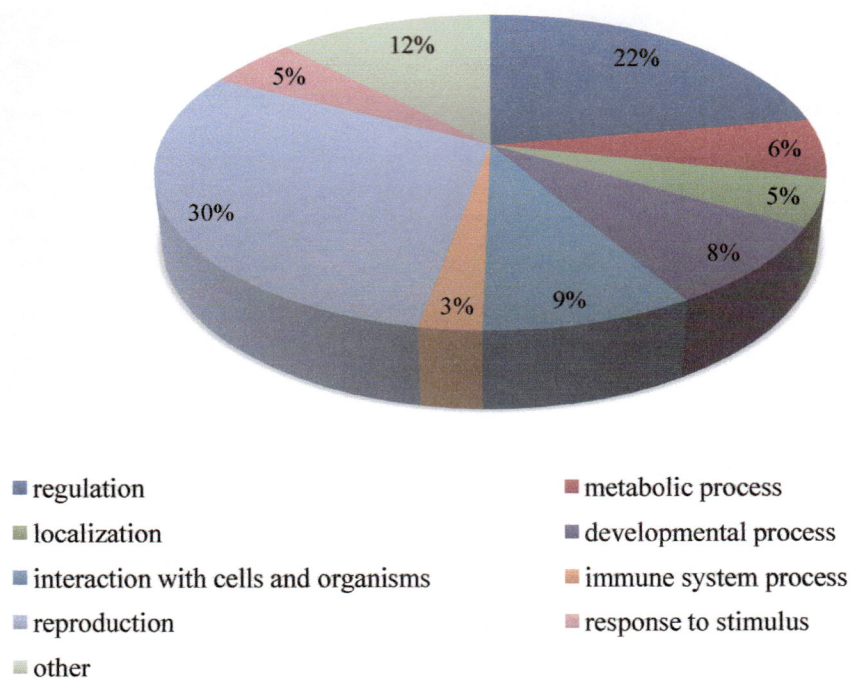
การแบ่งโปรตีนเหล่านี้ตามกระบวนการชีวภาพ แสดงในรูปที่ 3-3 พบว่าโปรตีนทั้ง 1,100 ชนิดนี้สามารถแบ่งเป็น 9 กลุ่ม ดังนี้ 1) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reproduction มี 30% 2) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ regulation มี 22% 3) เกี่ยวข้องกับการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ มี 9% 4) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต (development process) มี 9% 5) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic process) มี 6% 6) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ localization มี 5% 7) เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น (response to stimulus) มี 5% 8) เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) มี 3% และ 9) โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ มี 12 %



รูปที่ 3-1 การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เมื่อแบ่งตามตำแหน่งองค์ประกอบภายในเซลล์โดย STRAP



รูปที่ 3-2 การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เมื่อแบ่งตามหน้าที่ระดับโมเลกุลภายในเซลล์โดย STRAP



รูปที่ 3-3 การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เมื่อแบ่งตามกระบวนการชีวภาพภายในเซลล์โดย STRAP

โปรตีนทั้งหมด 2,429 ชนิดที่ถูกระบุโดยเทคนิค GeLC-MS พบว่าเมื่อใช้โปรแกรม Panther สามารถระบุโปรตีน ได้ 456 ชนิด โดยเกี่ยวข้องกับวิถีทางชีวภาพต่างๆ จำนวน 68 วิถี ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 เปอร์เซนต์ของโปรตีนในวิถีต่างๆ โดยโปรแกรม Panther

Pathway	Protein hit	Percent
Unclassified	381	83.6
PDGF signaling pathway	8	1.8
Wnt signaling pathway	7	1.5
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	6	1.3
Apoptosis signaling pathway	6	1.3
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	6	1.3
Integrin signaling pathway	5	1.1
Interleukin signaling pathway	5	1.1

ตารางที่ 3-1 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในวิถีต่างๆ โดยโปรแกรม Panther (ต่อ)

Pathway	Protein hit	Percent
TGF-beta signaling pathway	5	1.1
EGF receptor signaling pathway	5	0.9
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	4	0.9
Endothelin signaling pathway	4	0.9
B cell activation	4	0.9
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	4	0.9
Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	4	0.9
Huntington disease	3	0.7
Angiogenesis	3	0.7
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	3	0.7
T cell activation	3	0.7
p53 pathway	3	0.7
Parkinson disease	3	0.7
VEGF signaling pathway	3	0.7
Glycolysis	3	0.7
Transcription regulation by bZIP transcription factor	3	0.7
General transcription regulation	3	0.7
De novo purine biosynthesis	3	0.7
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	3	0.7
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	3	0.7
Cadherin signaling pathway	3	0.4
FGF signaling pathway	2	0.4
PI3 kinase pathway	2	0.4
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	2	0.4
Ras Pathway	2	0.4
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	2	0.4

ตารางที่ 3-1 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในวิถีต่างๆ โดยโปรแกรม Panther (ต่อ)

Pathway	Protein hit	Percent
Fructose galactose metabolism	1	0.2
Cholesterol biosynthesis	1	0.2
Vasopressin synthesis	1	0.2
ATP synthesis	1	0.2
Circadian clock system	1	0.2
Pentose phosphate pathway	1	0.2
Mannose metabolism	1	0.2
Asparagine and aspartate biosynthesis	1	0.2
Triacylglycerol metabolism	1	0.2

3.1.2 รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจโดยโปรแกรม MeV

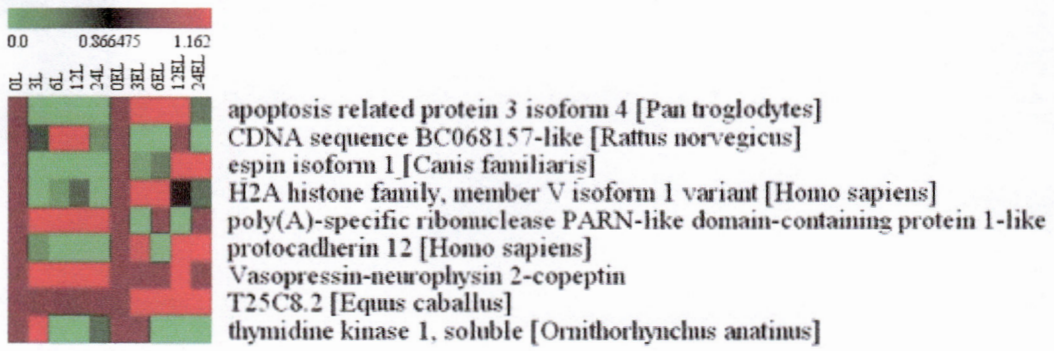
ข้อมูลโปรตีนถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม MeV (MultiExperiment Viewer) เพื่อที่จะเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนเนื่องจากผลของ LPS และสาร EAMA ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลาโดยใช้ Student's *t* test และพิจารณาที่ค่า $p < 0.05$ จึงมีนัยสำคัญทางสถิติ แผนที่ความร้อน (heatmap) ที่สร้างจากโปรแกรม MeV ที่แสดงการควบคุมโปรตีนแบบบวกและลบ เพื่อที่จะให้เห็นรูปแบบการแสดงออกโดยทำการเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA สภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว และสภาวะที่สัมผัส EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุมที่เซลล์ไม่ได้สัมผัสสารทดสอบใด

3.1.2.1 การเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA

รูปที่ 3-4 แสดงแผนที่ความร้อนเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน 9 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA พบว่าโปรตีน 5 ชนิดจาก 9 ชนิดที่ถูกกระตุ้น (ควบคุมแบบบวก) และโปรตีน 4 ชนิดที่ถูกยับยั้งการแสดงออก (ควบคุมแบบลบ) โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างค้ำจุนเซลล์ (cytoskeleton) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) กระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) การตายของเซลล์แบบ apoptosis การส่งสัญญาณ (signal transduction) การยึดจับของเซลล์ (cell adhesion) และกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid metabolic process) ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในวิถีต่างๆ โดยโปรแกรม Panther (ต่อ)

Pathway	Protein hit	Percent
5HT2 type receptor mediated signaling pathway	2	0.4
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	2	0.4
Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway	2	0.4
Oxytocin receptor mediated signaling pathway	2	0.4
Toll receptor signaling pathway	2	0.4
Oxidative stress response	2	0.4
Ionotropic glutamate receptor pathway	2	0.4
Histamine H1 receptor mediated signaling pathway	2	0.4
p53 pathway feedback loops 2	2	0.4
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction	2	0.4
Alpha adrenergic receptor signaling pathway	2	0.4
Axon guidance mediated by netrin	2	0.4
Arginine biosynthesis	2	0.4
Ubiquitin proteasome pathway	1	0.2
Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	2	0.4
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	1	0.2
Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	1	0.2
Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	1	0.2
Axon guidance mediated by semaphorins	1	0.2
FAS signaling pathway	1	0.2
Hypoxia response via HIF activation	1	0.2
p53 pathway by glucose deprivation	1	0.2
De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis	1	0.2
TCA cycle	1	0.2
General transcription by RNA polymerase I	1	0.2
Salvage pyrimidine ribonucleotides	1	0.2



รูปที่ 3-4 แผนที่ความร้อนแสดงการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว (L) กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA (EL) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยโปรแกรม MeV

ตารางที่ 3-2 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA

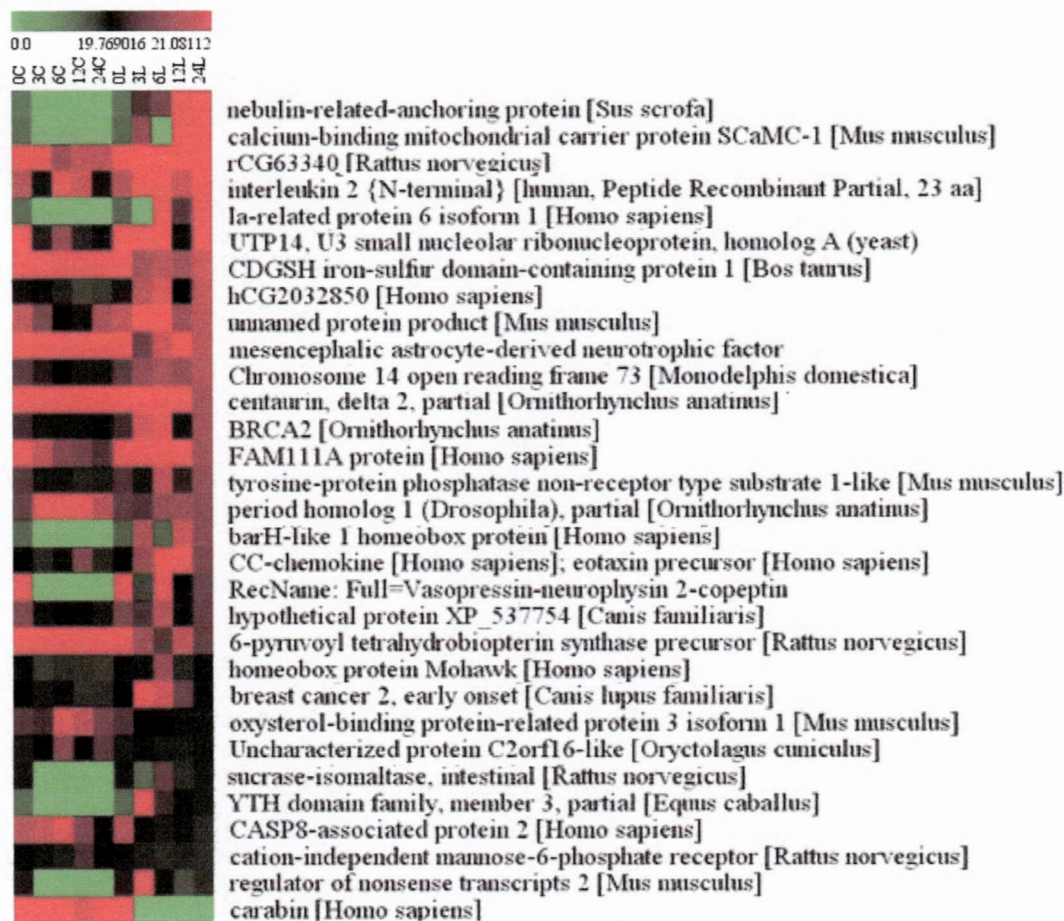
Protein name	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
apoptosis related protein 3 isoform 4 [Pan troglodytes]	gi 114576571	6.39	LGHARGR	769.088111	- cell cycle arrest - apoptosis
T25C8.2 [Equus caballus]	gi 194213328	5.7	KNLQDPPNM VEDK	1669.43411	- embryo development ending in birth or egg hatching - growth - receptor-mediated endocytosis - tube formation
espin isoform 1 [Canis familiaris]	gi 73994212	8.82	ACATTATGR	907.5965281	- actin filament network formation - locomotory behavior - negative regulation of cytoskeleton organization - parallel actin filament bundle assembly - sensory perception of sound
H2A histone family, member V isoform 1 variant [Homo sapiens]	gi 62087582	10.55	EGARPGGGVG AENMAGGK	1670.399341	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - organelle organization - establishment or maintenance of chromatin architecture
vasopressin-neurophysin 2-copeptin	gi 128087	14.06	RVXASDR	805.9045411	- positive regulation of cAMP biosynthetic process - vasoconstriction

ตารางที่ 3-2 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA (ต่อ)

Protein name	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
protocadherin-12 [Homo sapiens]	gi 119582302	3.7	QRHLNGK	850.486973	- calcium-dependent cell-cell adhesion - glycogen metabolic process - homophilic cell adhesion - neuron recognition - signal transduction
thymidine kinase 1 [Ornithorhynchus anatinus]	gi 149582772	9.46	MGVAWKGEGP SPR	1390.215368	- DNA replication - protein homotetramerization - pyrimidine base metabolic process - pyrimidine nucleoside salvage
poly(A)-specific ribonuclease PARN-like domain-containing protein 1-like [Sus scrofa]	gi 311243695	7.05	NVTKDVWK	988.9858674	- nucleic acid binding

3.1.2.2 การเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม

รูปที่ 3-5 แสดงแผนที่ความร้อนเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน 31 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม พบว่าโปรตีน 20 ชนิดจาก 31 ชนิดที่ถูกกระตุ้น และโปรตีน 10 ชนิดที่ถูกยับยั้งการแสดงออก ในขณะที่มีโปรตีน 1 ชนิดที่มีรูปแบบการควบคุมแบบผสม โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ กระบวนการซ่อมดีเอ็นเอ (DNA repair) การตายของเซลล์แบบ apoptosis การส่งสัญญาณ การควบคุมการถอดรหัส (transcriptional regulation) การขนส่งลิพิด (lipid transport) การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (immune response) กระบวนการ proteolysis กระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และลิพิด การควบคุมการขนส่งอิเล็กตรอน และปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation) ดังแสดงในตารางที่ 3-3



รูปที่ 3-5 แผนที่ความร้อนแสดงการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว (L) กับสภาวะควบคุม(C) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยโปรแกรม MeV

ตารางที่ 3-3 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม

Protein	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
nebulin-related-anchoring protein [Sus scrofa]	gi 113205908	9.28	KPDTIKFTAVVD SPDLVHAK	2179.607	- actin cytoskeleton organization
YTH domain family, member 3, partial [Equus caballus]	gi 194214877	5.92	ASGDSRGGR	864.2562	-
barH-like 1 homeobox protein [Homo sapiens]	gi 14149728	2.66	LDKSGSNASSDS EYK	1584.829	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - ectoderm development - nervous system development
chromosome 14 open reading frame 73 [Monodelphis domestica]	gi 126290447	6.84	GSPVSPK	669.5497	-
breast cancer 2, early onset [Canis lupus familiaris]	gi 61557477	3.01	FIPCGPGK	876.2018	- double-strand break repair via homologous recombination - regulation of S phase of mitotic cell cycle
oxysterol-binding protein-related protein 3 isoform 1 [Mus musculus]	gi 50510597	3.44	GILKYAK	792.042	- lipid transport
6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor [Rattus norvegicus]	gi 8394115	17.15	NAAVGLR	698.5465	- cellular amino acid metabolic process - central nervous system development - tetrahydrobiopterin biosynthetic process

ตารางที่ 3-3 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

Protein	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
rCG63340 [Rattus norvegicus]	gi 149045152	6.47	TAASTPTR	806.4502	-
carabin [Homo sapiens]	gi 38348348	7.1	LAGAQIFEAQ QLAGVR	1742.006	- Rab GTPase activator activity
mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor-like [Callithrix jacchus]	gi 296225321	4.35	GXWHVGGR	866.4902	- response to unfolded protein - growth factor activity
regulator of nonsense transcripts 2 [Mus musculus]	gi 124487283	8.3	RILHSK	752.1244	- mRNA export from nucleus - nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay
vasopressin-neurophysin 2-copeptin	gi 128087	14.06	RVXASDR	805.9045	- positive regulation of cAMP biosynthetic process - vasoconstriction
sucrase-isomaltase, intestinal [Rattus norvegicus]	gi 6981536	13.7	INMYLPGDK	1063.603	- carbohydrate metabolic process - protein metabolic process
homeobox protein Mohawk [Homo sapiens]	gi 178057337	2.7	VPLVQQF	830.7069	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - ectoderm development - nervous system development

ตารางที่ 3-3 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

Protein	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
hCG2032850 [Homo sapiens]	gi 119588250	1.64	GSGGGGGEAR	806.0693	-
CC-chemokine [Homo sapiens]	gi 1531983	4.11	SPTPKP	622.3218	- immune response
centaurin, delta 2, partial [Ornithorhynchus anatinus]	gi 149419743	18.22	VATPSGEIR	929.0409	- signal transduction
calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1 [Mus musculus]	gi 27369998	11	GITPNFMK	925.2556	- cation transport - phosphate transport - lipid transport - nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport - phosphate metabolic process - nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - lipid metabolic process
la-related protein 6 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 37537710	14.04	MAQSGGEARPG PKTAVQIR	1970.469	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
CASP8-associated protein 2 [Homo sapiens]	gi 6912288	3.35	EGKPHSDK	894.7622	- apoptosis - signal transduction

ตารางที่ 3-3 โปรตีนที่มิมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

Protein	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1-like [Mus musculus]	gi 309266712	7.51	MSSWAIK	850.3717	- actin cytoskeleton reorganization - blood coagulation - interferon-gamma-mediated signaling pathway - negative regulation of insulin receptor signaling pathway - regulation of endocytosis - regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway - regulation of type I interferon-mediated signaling pathway - type I interferon-mediated signaling pathway
period homolog 1 (Drosophila), partial [Ornithorhynchus anatinus]	gi 149544118	1.19	LTPYAMK	839.514	- regulation of transcription, DNA-dependent
cation-independent mannose-6-phosphate receptor [Rattus norvegicus]	gi 6981078	1.45	GISMGTPKLIR	1189.047	- intracellular protein transport - endocytosis

11037
 171311
 2054
 203
 301496

ตารางที่ 3-3 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

Protein	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 [Bos taurus]	gi 77404223	4.55	SMTSSVR	768.0611	- regulating maximal capacity for electron transport and oxidative phosphorylation - Fe-S cluster shuttling and/or in redox reactions
interleukin 2 {N-terminal} [human, Peptide Recombinant Partial, 23 aa]	gi 385717	7.95	ATXSSTKK	849.975	- immune response - negative regulation of inflammatory response - negative regulation of lymphocyte proliferation - positive regulation of activated T cell proliferation - positive regulation of immunoglobulin secretion - positive regulation of isotype switching to IgG isotypes - positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter - positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat5 protein - regulation of T cell homeostatic proliferation

ตารางที่ 3-3 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

Protein	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
hypothetical protein XP_537754 [Canis familiaris]	gi 73967289	7.71	MPKGNLPGK	945.1773	-
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 74137803	6.26	NDLGGCNGTST MTVIK	1673.73	-
FAM111A protein [Homo sapiens]	gi 47939119	6.71	FHSPKK	744.5058	- proteolysis
BRCA2 [Ornithorhynchus anatinus]	gi 149635814	1.7	ELQEMR	823.1122	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog A (yeast) [Monodelphis domestica]	gi 126342348	14.72	DKLEAEK	832.4775	- rRNA processing
uncharacterized protein C2orf16-like [Oryctolagus cuniculus]	gi 291387009	7.56	TLQSLERR	1087.032	-

3.1.2.3 การเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม

ทำการเปรียบเทียบโปรไฟล์ของโปรตีนในสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม พบว่ามีโปรตีน 24 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่ต่างจากกัน (รูปที่ 3-6) พบว่าโปรตีน 16 ชนิดที่ถูกกระตุ้น และโปรตีน 7 ชนิดที่ถูกยับยั้งการแสดงออก ในขณะที่มีโปรตีน 1 ชนิดที่มีรูปแบบการควบคุมแบบผสม โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างค้ำจุนเซลล์ การยึดจับของเซลล์ การส่งสัญญาณ การควบคุมการถอดรหัส กระบวนการ rRNA processing การขนส่งกรดอะมิโน (amino acid transport) การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน กระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก และกระบวนการเมแทบอลิซึมของ GDP-mannose ดังแสดงในตารางที่ 3-4



รูปที่ 3-6 แผนที่ความร้อนแสดงการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ในสภาวะที่สัมผัส EAMA อย่างเดียว (E) กับสภาวะควบคุม(C) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยโปรแกรม MeV

ตารางที่ 3-4 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม

Protein name	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
YTH domain family, member 3, partial [Equus caballus]	gi 194214877	5.92	ASGDSRGGR	864.2562	-
nuclear receptor subfamily 0 group B member 1 [Mus musculus]	gi 6671531	2.67	EAPEAHRR	966.5662	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - sex determination
FX [Monodelphis domestica]	gi 126323104	5.53	VGVMGGR	747.5376	- 'de novo' GDP-L-fucose biosynthetic process - GDP-mannose metabolic process - leukocyte cell-cell adhesion
TNF-alpha converting enzyme [Monodelphis domestica]	gi 126303867	11.07	KGVQCSDR	951.3859	- processing of tumor necrosis factor alpha - inflammatory response
coagulation factor VIII isoform b precursor [Homo sapiens]	gi 10518506	9.95	MRIQDPGK	944.9602	- acute phase - blood coagulation
cationic amino acid transporter 3 [Bos taurus]	gi 118151126	16.88	LWQALCR	944.8173	- amino acid transport - cellular amino acid and derivative metabolic process
sucrase-isomaltase, intestinal [Rattus norvegicus]	gi 6981536	13.7	INMYLPGDK	1063.603	- carbohydrate metabolic process - protein metabolic process
hypothetical protein isoform 1 [Pan troglodytes]	gi 114659086	2.67	MDTAAKAILLEQ SGK	1596.291	-

ตารางที่ 3-4 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

Protein name	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 773223	18.96	EVQLQSGPXR	1285.076	-
adrenocorticotrophic hormone receptor [Mus musculus]	gi 6678820	3.41	ISTLPR	687.3332	- visual perception - sensory perception - cell surface receptor linked signal transduction - intracellular signaling cascade - cell-cell signaling
ewing sarcoma breakpoint region 1 [Mus musculus]	gi 56206935	15.28	GGPGGMFR	778.3652	- nucleic acid binding - nucleotide binding - zinc ion binding
lama5 protein [Mus musculus]	gi 20071526	5.02	ISFEK	623.9347	- cell-cell adhesion - protein localization
homeobox protein Mohawk [Homo sapiens]	gi 178057337	2.7	VPLVQQF	830.7069	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - ectoderm development - nervous system development
translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon [Mus musculus]	gi 26986557	14.22	VLHFQK	768.9831	- carbohydrate metabolic process - lipid metabolic process - protein metabolic process

ตารางที่ 3-4 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

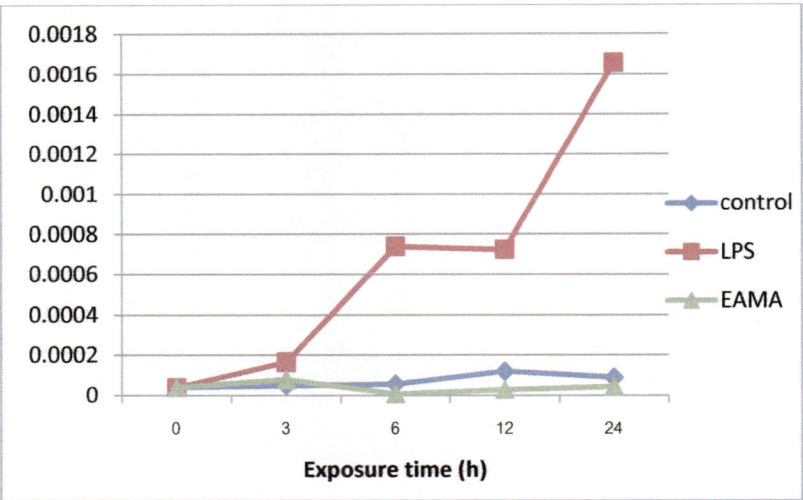
Protein name	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor [Rattus norvegicus]	gi 8394115	17.15	NAAVGRL	698.5465	- cellular amino acid metabolic process - central nervous system development - tetrahydrobiopterin biosynthetic process
KIAA1089 protein [Monodelphis domestica]	gi 126322585	11.29	GIDVYRR	877.795	-
hypothetical protein [Monodelphis domestica]	gi 126324809	9.56	NILKPIGGK	941.5212	-
zinc finger protein 500 [Canis familiaris]	gi 73958144	12.01	GTRAATGGPAR	1014.112	- transcriptional regulation
Ig lambda pseudogene	gi 223260	8.26	ALAMFPDTK	993.2255	- innate immune response
nebulin-related-anchoring protein [Sus scrofa]	gi 113205908	9.28	KPDTIKFTAVID SPDLVHAK	2179.607	- actin cytoskeleton organization
barH-like 1 homeobox protein [Homo sapiens]	gi 14149728	2.66	LDKSGSNASSDS EYK	1584.829	- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process - ectoderm development - nervous system development
hypothetical protein XP_537754 [Canis familiaris]	gi 73967289	7.71	MPKGNLPGK	945.1773	-
rCG64311 [Rattus norvegicus]	gi 149046870	6.47	HFAHYFGQMRN LR	1694.144	-

ตารางที่ 3-4 โปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียว กับสภาวะควบคุม (ต่อ)

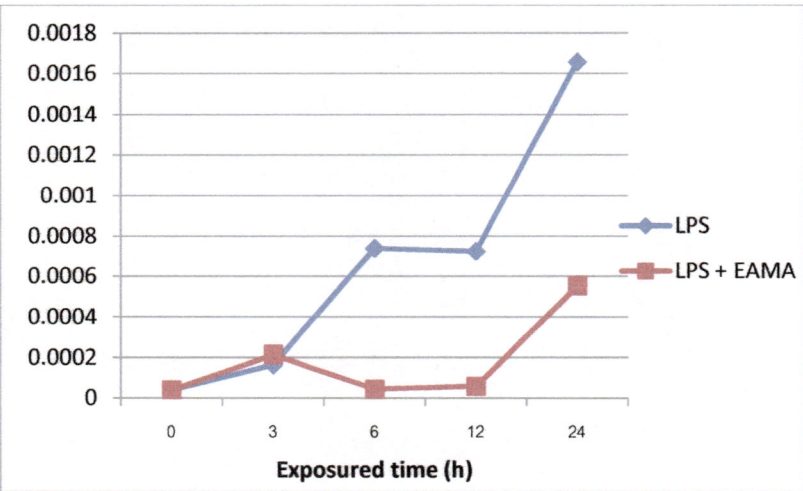
Protein name	Accession number	ID score	Peptide sequence	MH+	Function
MYST histone acetyltransferase 2 [Pan troglodytes]	gi 114669400	9.31	ELGSGK	592.6118	- sequence-specific DNA binding transcription factor activity - transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups - zinc ion binding

3.2 การวิเคราะห์โปรไฟล์การแสดงออกของยีน

ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS และ HO-1 ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS รูปแบบการแสดงออกถูกศึกษาโดยเทคนิค qRT- PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณของ mRNA พบว่าการแสดงออกของยีน iNOS เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย LPS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (control) แต่ในขณะที่สาร EAMA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS (รูปที่ 3-7) เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และสาร EAMA พบว่าปริมาณ mRNA ของ iNOS ลดลง (รูปที่ 3-8)

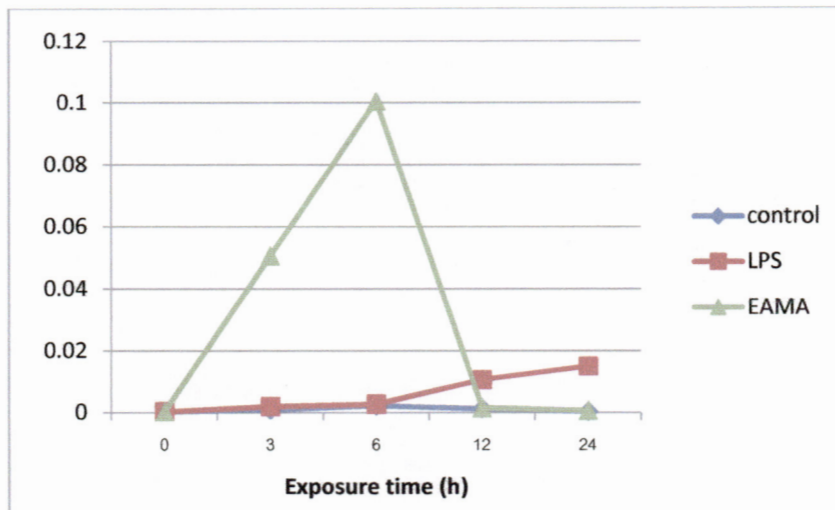


รูปที่ 3-7 รูปแบบการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

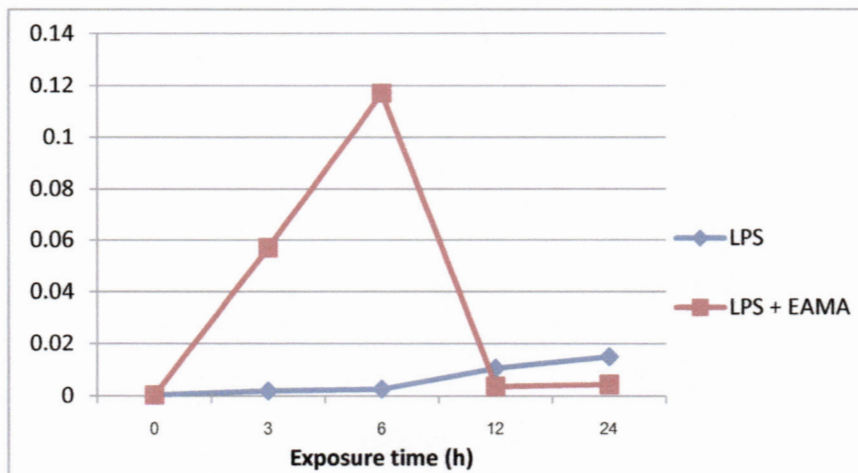


รูปที่ 3-8 รูปแบบการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ในสถานะที่มี และไม่มีสาร EAMA

ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในสภาวะควบคุมไม่พบการแสดงออกของยีน HO-1 ส่วนรูปแบบการแสดงออกของยีน HO-1 ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS พบการแสดงออกของยีน HO-1 ที่เวลาตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป (รูปที่ 3-9) ในขณะที่สาร EAMA เพียงอย่างเดียว สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน HO-1 ได้ตั้งแต่เวลา 3 ชั่วโมง สูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง และกลับสู่ระดับปกติที่เวลาตั้งแต่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และสาร EAMA พบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน HO-1 มีความคล้ายคลึงกับรูปแบบของการแสดงออกที่พบในเซลล์ที่สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว แต่มีปริมาณ mRNA ของ HO-1 สูงกว่า (รูปที่ 3-10)

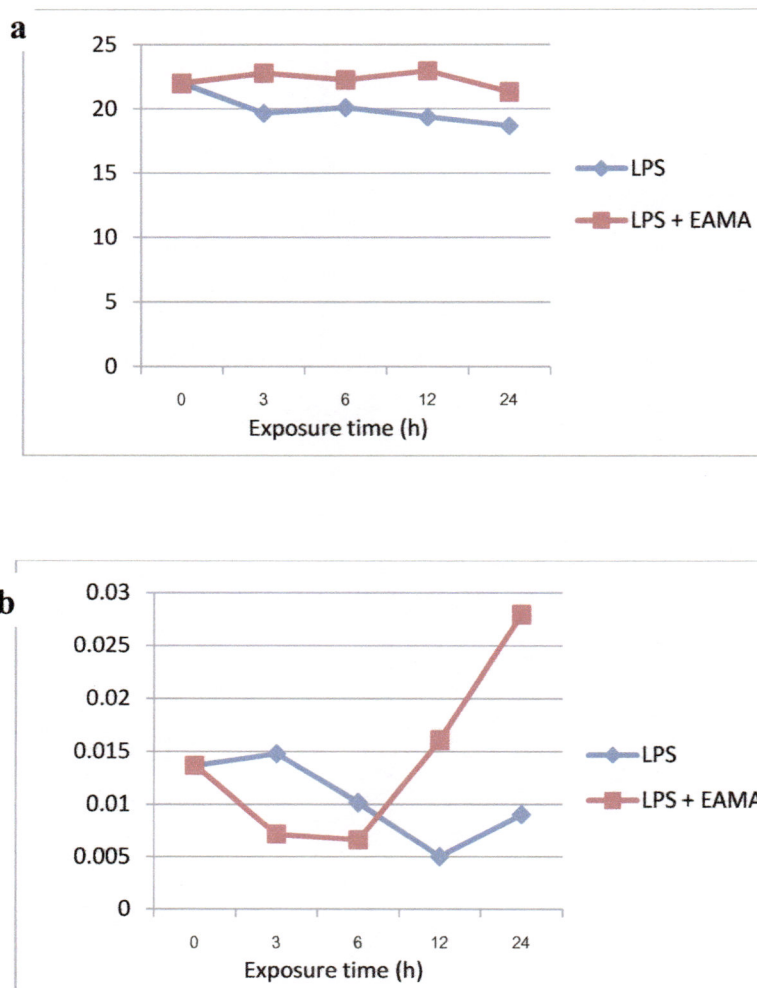


รูปที่ 3-9 รูปแบบการแสดงออกของยีน HO-1 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

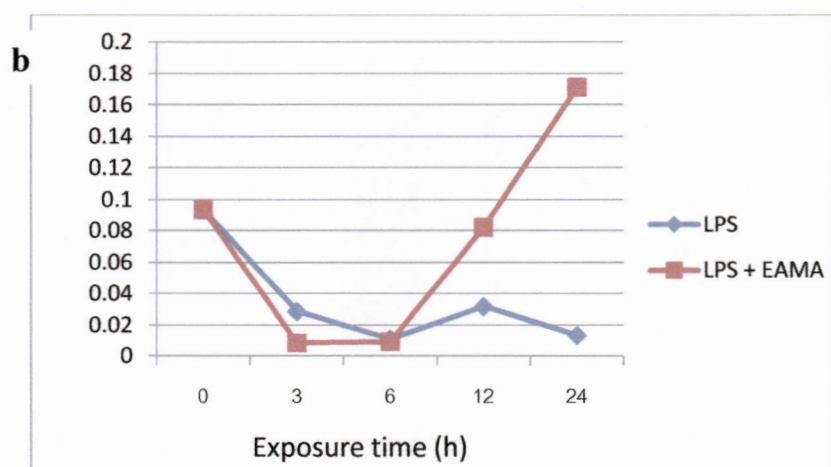
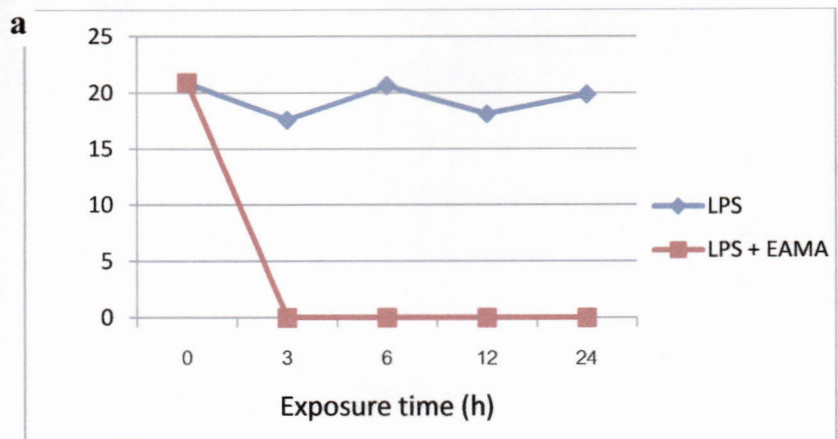


รูปที่ 3-10 รูปแบบการแสดงออกของยีน HO-1 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ในสภาวะที่มี และไม่มีสาร EAMA

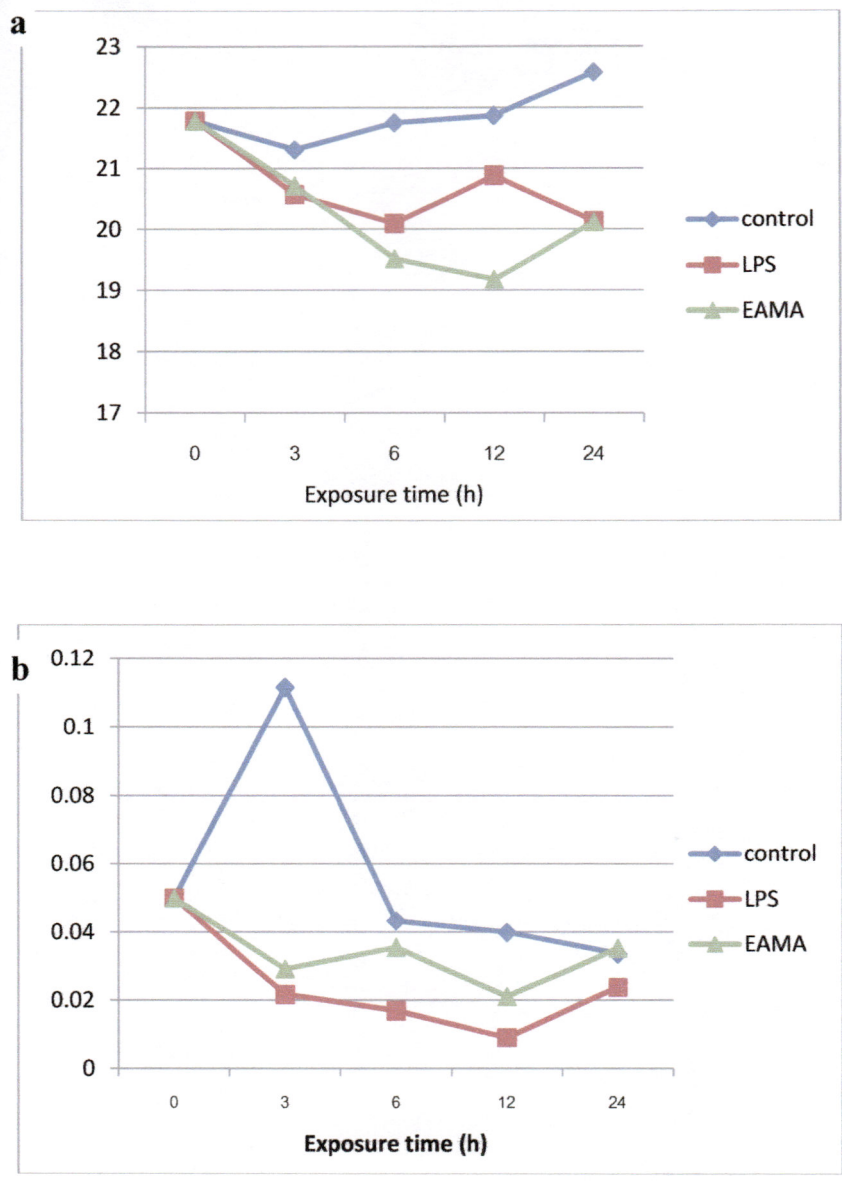
เพื่อทำการยืนยันผลจากการวิเคราะห์โปรตีนไอโอมิกส์ จึงทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ ยีนของโปรตีน 3 ชนิด โดยเทคนิค qRT-PCR คือ apoptosis related protein 3 isoform 4, thymidine kinase 1 และ 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor ผลการวิเคราะห์ พบการแสดงออกของยีนของโปรตีน 3 ชนิด มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากรูปแบบการแสดงของ โปรตีน (รูปที่ 3-11 ถึง 3-13)



รูปที่ 3-11 รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน apoptosis related protein 3 isoform 4 (a) และการแสดงออกของยีน (b) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA



รูปที่ 3-12 รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน thymidine kinase 1 (a) และการแสดงออกของยีน (b) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA



รูปที่ 3-13 รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor (a) และการแสดงออกของยีน (b) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสถานะที่สัมผัส สาร EAMA และสภาวะควบคุม

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น เชื้อจุลชีพ และส่วนประกอบต่างๆของจุลชีพ ในการเกิดอักเสบนี้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ เข้าไปยังบริเวณที่มีการอักเสบ แมคโครฟาจเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตในแมคโครฟาจนี้เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตมากเกินไปจะส่งผลร้ายต่อร่างกาย และนำไปสู่การเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ ในการวิจัยนี้ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ให้ผลิตสารสื่อกลางการอักเสบรวมทั้งไนตริกออกไซด์ จึงเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในหลอดทดลอง ในรูปที่ 3-7 แสดงการแสดงออกของยีน iNOS เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย LPS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมยืนยันถึงการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ และยังพบมีการแสดงออกของยีน HO-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Srisook และ Cha (2004) การแสดงออกของยีน HO-1 นี้เป็นกลไกหนึ่งที่เกิดขึ้นเพื่อลดการอักเสบของเซลล์ และมีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ iNOS และ HO-1 มีการควบคุมการแสดงออกของกันและกัน (Sarady-Andrews, 2005; Sawles, 2005; Srisook และคณะ, 2006) ในขณะที่สาร EAMA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS แต่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน HO-1 ได้ (รูปที่ 3-9) เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และสาร EAMA พบว่าปริมาณ mRNA ของ iNOS ลดลง (รูปที่ 3-8) แสดงถึงการแสดงออกของยีน HO-1 เป็นผลให้การลดลงของโปรตีน iNOS และการผลิตไนตริกออกไซด์ ผลการทดลองนี้เหมือนผลการศึกษาที่รายงานโดยกล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข (2554)

การศึกษาโปรไฟล์ของการแสดงออกของโปรตีนในแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ในสภาวะที่มีและไม่มีสาร EAMA ในช่วงเวลาต่างๆ พบโปรตีนทั้งหมดถึง 2,429 ชนิด แต่มีเพียง 1,100 ชนิดที่สามารถระบุตำแหน่งที่อยู่องค์ประกอบภายในเซลล์ เซิงหน้าทีระดับโมเลกุล หรือกระบวนการชีวภาพ หรือยีนออนโทโลยี ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 3-1 ถึง 3-3 เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจโดยโปรแกรม MeV ระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA พบการแสดงออกของโปรตีน 9 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่าง (ตารางที่ 3-2) เช่น โปรตีน apoptosis related protein 3 (Apr3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homologous) กับโปรตีน Notch4 ที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis ถึง 45% (Zhu และคณะ., 2000) ในการวิเคราะห์โครงสร้างโดยโปรแกรม InterPro และ PROSITE พบว่าโปรตีน Apr3 ประกอบด้วยโดเมนหลายโดเมน ได้แก่ signal sequence ด้านปลายเอ็น, โดเมน EGF, โดเมน transmembrane และปลายซีซึ่งอยู่ในเซลล์ จากการวิเคราะห์โครงสร้างนี้ชี้ให้เห็นว่า โปรตีน Apr3 อาจเป็นโปรตีนที่เยื่อเซลล์แมคโครฟาจเหมือนการรายงานในเซลล์ MCF-7 และ HeLa ที่พบว่าโปรตีน Apr3 เป็นโปรตีนที่เยื่อเซลล์ และส่วนโดเมน transmembrane เป็นโดเมนที่ทำหน้าที่ (Yu และคณะ.,2007) ดังนั้นโปรตีน Apr3 อาจเป็นโปรตีนที่เป็นตัวรับ (receptor) ของสาร EAMA ซึ่งจะส่งสัญญาณจากเยื่อเซลล์เข้าไปในไซโทซอล เพื่อควบคุมการทำงานของ transcription factors และการถอดรหัสของยีนเป้าหมายในที่สุด (Yu และคณะ.,2007) อย่างไรก็ตามโปรตีนมีการกระจายตัวอยู่ในไซโทซอล โดยมีอยู่มากรอบและบนเยื่อหุ้มนิวเคลียสในเซลล์

Saos2, U2OS, 293T และ Cos-7 การกระจายตัวของโปรตีน Apr3 ในเซลล์ต่างๆนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Apr3 ส่งสัญญาณชีวภาพในวิถีที่แตกต่างกันเพื่อควบคุมการทำงานที่ต่างๆในเซลล์แต่ละชนิด (Zou และคณะ.,2011) ในปี 2007 มีการรายงานว่าโปรตีน Apr3 เกี่ยวข้องกับสัญญาณที่เหนี่ยวนำให้เกิดการชะงักของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) โดยยับยั้งการแสดงออกของ cyclin D1 (Yu และคณะ.,2007)

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่แตกต่างกันระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียว กับสภาวะที่สัมผัส LPS และสาร EAMA คือ โปรตีน thymidine kinase 1 (TK) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในวิถี salvage ของการสังเคราะห์ dTMP จากการนำกลุ่มฟอสเฟตมาจาก ATP มาให้กับ thymidine (Ke และคณะ, 2005) นอกเหนือจากการสังเคราะห์โดยวิถี *de novo* โดยเอนไซม์ thymidylate synthetase ซึ่งสุดท้ายจะได้เป็น dTTP การสังเคราะห์ dTTP จะถูกควบคุมโดยระดับ dGTP และมีความสำคัญต่อกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ และการซ่อมดีเอ็นเอ ในเซลล์ทุกชนิด (Chen และคณะ, 2010) ในการศึกษาเซลล์แมคโครฟาจสัมผัสกับ LPS ทำให้มีการแสดงออกของยีน iNOS ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้การกระตุ้นด้วย LPS ทำให้มีการสังเคราะห์อนุมูล superoxide ซึ่งจะรวมกับไนตริกออกไซด์กลายเป็นสารต่างๆ เช่น NO_2^- , ONOO^- , N_2O_3 และ HNO_2 ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่ทำให้เบสต่างๆของดีเอ็นเอเกิดการกลายพันธุ์และเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (Halliwell และ Gutteridge, 2007) การตอบสนองของเซลล์ต่อการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยการชะงักของวัฏจักรเซลล์ การซ่อมดีเอ็นเอ และการ apoptosis ดังนั้นการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ TK เป็นกลไกที่เซลล์ตอบสนองต่อการเพิ่มระดับของ dGTP ซึ่งเป็นผลมาจากความเสียหายของดีเอ็นเอ

นอกจากนี้ในการศึกษาพบโปรตีน 31 ชนิดที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างระหว่างสภาวะที่สัมผัส LPS อย่างเดียวกับสภาวะควบคุม และโปรตีน 24 ชนิดที่มีความแตกต่าง ระหว่างสภาวะที่สัมผัสสาร EAMA อย่างเดียวกับสภาวะควบคุม เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดพบโปรตีน 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างใน 3 สภาวะการทดลองนี้ โปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ (6R)-5, 6, 7, 8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4) โดย BH_4 มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ เช่น การส่งสัญญาณประสาท (neurotransmission) การคลายตัวของหลอดเลือด (vasorelaxation) และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (immune response) BH_4 ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ catecholamine และ serotonin (Alderton, 2001; Leitner และคณะ, 2003) กระบวนการสังเคราะห์ BH_4 ในวิถี *de novo* ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTPS), and sepiapterin reductase (Oppliger และคณะ, 1999) แอกติวิตีของ PTPS ในเซลล์แมคโครฟาจของคนมีระดับค่อนข้างต่ำ ดังนั้น PTPS จึงเป็นจุดควบคุมความเร็วในการควบคุมการแสดงออกของ GTP cyclohydrolase I ที่ถูกกระตุ้นด้วย cytokines (Leitner และคณะ, 2003) โปรตีน 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor เมื่อถูกสร้างขึ้นแล้วจะต้องถูกดัดแปลงโครงสร้างหลังการแปลรหัสพันธุกรรม โดยการตัดกรดอะมิโนตัวที่ 1-4 จากด้านปลายเอ็นจาก 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor ก่อนมีแอกติวิตีเป็น PTPS (Thony และคณะ, 2000) จากการศึกษาพบว่าในสภาวะที่เซลล์สัมผัสกับ EAMA มีปริมาณโปรตีน 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase precursor ต่ำกว่าในสภาวะที่เซลล์สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนหรือแตกต่างกันของการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนสะท้อนถึงกลไกการควบคุมที่ซับซ้อนภายในเซลล์แมคโครฟาจที่

ตอบสนองต่อ LPS และEAMA

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข (2554) รายงานการวิจัยเรื่อง การประเมินศักยภาพของอนุพันธ์ ferulic acid ในการเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., & Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357,593-615.
- Chen, Y.L., Eriksson, S., and Chang, Z.F. 2010. Regulation and Functional Contribution of Thymidine Kinase 1 in Repair of DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 27327–27335.
- Cho, S.H., Volpe, B.T., Bae, Y.M., Hwang, O.Y., Choi, H.J., Gal, J., et.al. (1999). Blockade of Tetrahydrobiopterin Synthesis Protects Neurons after Transient Forebrain Ischemia in Rat: A Novel Role for the Cofactor. *Journal of Neuroscience*, 19, 878-889
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Inter Immunopharm.* 1: 1397-1406.
- Cross, R. K, Wilson, K. T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 9: 179-189.
- Dorheim, M.A., Tracey, W.R., Pollock, J.S., Grammas, P. (1994). Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochemical Biophysical Research and Communications*, 205, 659-665.
- Grisham, M. B, Jourd'Heuil, D., Wink, D. A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites:implications in inflammation. *Am J Physiol.* 276: G315-321.
- Guzik, T.J., Korbout, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469-487.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.,Oxford University Press, New York, 851 p.
- Karnkla, S.2008. The synthesis of a series of NAMDA derivatives and their biological activity. Master's thesis, Department of chemistry, Graduate school, Burapha University.
- Ke, P.Y., Kuo, Y.Y., Hu, C.M., and Chang, Z.F. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev.* 2005 19: 1920-1933.
- Kim, B.H., Reddy, A.M., Lee, K.H., Chung, E.Y., Cho, S.M., Lee, H., Min, K.R., &Kim, Y. (2004). Inhibitory mechanism of chroman compound on LPS-induced nitric oxide production and nuclear factor- κ B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 223-228.
- Kim, Y.H., Kim, J., & Kim, H.P. (2007). Anti-inflammatory activity of the synthetic chalcone derivatives: Inhibition of inducible nitric oxide synthase-catalyzed nitric oxide

- production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(8), 1450-1455.
- Latham, K.A., Whittington, K.B., Zhou, R., Qian, Z., Rosloniec, E.F. (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, S.H., Seo, G.S., Kim, J.Y., Jin, X.Y., Kim, H.D., & Sohn, D.H. (2006). Heme oxygenase 1 mediates anti-inflammatory effects of 2',4',6'-tris (methoxymethoxy) chalcone. *European Journal of Pharmacology*, 532, 178-186.
- Leitner, K.L., Meyer, M., Leimbacher, W., Peterbauer, A., Hofer, S., Heufler, C., et al. Low tetrahydrobiopterin biosynthetic capacity of human monocytes is caused by exon skipping in 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biochem. J.* (2003) **373**, 681-688.
- Mongkol, N. (2009). Investigation of anti-inflammatory activity and mechanism of NAMDA derivatives in murine macrophages. Master's thesis in Biological Science Program, Graduate school, Burapha University.
- Sarady, J.K., Otterbein, S.L., Liu, F., Otterbein, L.E., Choi, A.M., 2002. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27, 739-745.
- Sarady-Andrews JK., Liu F., Gallo D., Nakao A., Overhaus M., Ollinger R., Choi A.M., Otterbein L.E. (2005). Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L1131-L1137.
- Sawle P., Foresti R., Mann B.E., Johnson T.R., Green C.J., Motterlini R. (2005). Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol*, 145, 800-810.
- Seo, J.W., Srisook, E., Son, H.J., Hwang, O.Y., Cha, Y.N., Chi, D.Y. (2005). Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3369-3373.
- Seo, J.W., Srisook, E., Son, H.J., Hwang, O.Y., Cha, Y.N., Chi, D.Y. (2008). Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells. *Eur J Med Chem*, 43, 1160-1170.
- Srisook, K., Jung N.H., Kim B.R., Cha S.H., Kim H.S., Cha Y.N., 2004. Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotection effect by NO on cadmium induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. *Toxicology in Vitro* 19, 31-39.
- Srisook, K., Cha, Y.N. 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.

- Srisook, K., Kim, C., and Cha, Y.N. 2005. Role of NO in enhancing the expression of HO-1 in LPS-stimulated macrophages. *Methods in enzymology*. 396, 368-377
- Srisook, K., Han, S.S., Choi, H.S., Li, M.H., Ueda, H., Kim, C.K., Cha, Y.N. (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.
- Srisook, K., Palachot, M., Mongkol, N., Srisook, E., Saraputit, 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*. *Journal of Ethnopharmacology*. 133; 1008-1014.
- Srisook K, Mongkol N, Srisook E, Jitrapakdee S. 2012. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*; (Submitted).
- Thony, Auerbach, and Blau, 2000. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J*. 347, 1-16.
- 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, C. E., Rees, D.D., Moncada, S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*, 26, 48-57.
- Yu, F., Yang, G., Zhao, Z., Ji, L., Cao, Y., Bai, L., Lu, F., Fu, H., Huang, B., Li, H., Zhang, J., Yao, L., and Lu, Z. 2007. Apoptosis related protein 3, an ATRA-upregulated membrane protein arrests the cell cycle at G1/S phase by decreasing the expression of cyclin D1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358: 1041-1046.
- Zhu, F., Yan, W., Zhao, Z.L., Chai, Y.B., Lu, F., Wang, Q., Peng, W.D., Yang A.-G., and Wang, C.J. 2000. Improved PCR-Based Subtractive Hybridization Strategy for Cloning Differentially Expressed Genes. *BioTechniques* 29:310-313.
- Zou, X., Shen, J., Chen, F., Ting, K., Zheng, Z., Pang, S., Zeng, J.N., Adams, J.S., Soo, C., and Zhang, X. 2011. NELL-1 binds to APR3 affecting human osteoblast proliferation and differentiation. *FEBS Letters* 585: 2410-2418.

Outputs

1. 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.
2. Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, Klaokwan Srisook. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. Proceeding of the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.
3. Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, Klaokwan Srisook. Differential expression of proteome of LPS-treated murine macrophages in response to ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Journal of Proteomics. (Manuscript in preparation).