



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อช่วยในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของ  
สารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทธ์ชัย สุตรอนันต์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ -

สัญญาเลขที่ 137/2561

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อช่วยในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของ  
สารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุธรอนันต์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อโครงการวิจัย      กระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อช่วยในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของ  
สารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก

หัวหน้าโครงการวิจัย      ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย      รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

หน่วยงาน      ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) รหัส 137/2561

### บทคัดย่อ

จากการนำข้อมูลสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพร *Pluchea indica* (L.) Less และพืชสมุนไพรชนิดอื่น ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก มาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงเพื่อนำมาใช้ในการค้นหาโปรตีนเป้าหมายและกลุ่มโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วม โดยการใช้ฐานข้อมูลสาธารณะและเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่ประกอบไปด้วย (1) การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ (2) การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (3) การค้นหาข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (4) การวิเคราะห์เครือข่ายและการค้นหาโมดูลร่วมกับการใช้ข้อมูลของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และ (5) การแปลผลทางชีวภาพ ภายหลังจากตรวจสอบเครือข่ายทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin แล้ว พบโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 12 โมดูล และเมื่อนำผลของสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของใบขลุ่ยและพืชกลุ่มชามาพิจารณา ก็จะพบโปรตีนเป้าหมายจำนวน 25 โปรตีน ที่มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบของสารออกฤทธิ์ 8 ชนิด และที่เกี่ยวข้องกับวิถีพาธเวย์หลักที่นิยมศึกษาในห้องปฏิบัติการได้แก่ วิธีการส่งสัญญาณ MAPK, NF- $\kappa$ B และ JAK-STAT ก็จะพบโปรตีนเป้าหมายจำนวน 6 โปรตีน ได้แก่ PTGS2, NFKB1, MAPK14, NOS2, RELA และ IL6 ที่สามารถนำมาใช้พิจารณาเพื่อการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองการอักเสบในระดับห้องปฏิบัติการของพืชสมุนไพรขลุ่ย เช่นเดียวกันกับตัวอย่างการประยุกต์กับหัวหอม ที่สามารถนำกระบวนการทางชีวสารสนเทศนี้มาประยุกต์กับพืชสมุนไพรชนิดอื่นเพื่อช่วยลดต้นทุนและเวลาที่ใช้ในการทำวิจัยเพื่อการตัดสินใจในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

Research Project      Bioinformatics approaches in the study of the anti-inflammatory mechanisms of natural active compounds from the medicinal plants in Eastern Thailand

Head of Project      Asst. Prof. Dr. Pitak Sootanan

Co-Researcher      Assoc. Prof. Dr. Klaokwan Srisook

Affiliation      Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

This research was supported by Burapha University through its grant number 137/2561.

### Abstract

The active compounds of klue (*Pluchea indica* (L.) Less), a medicinal plant in the Eastern Thailand, and other medicinal plants were used as a primary reference source to search for target proteins and their interacted proteins by using public databases and bioinformatics tools. There were consisted of (1) searching for the target protein of the active compounds (2) searching for protein-protein interaction information (3) searching for inflammatory genes (4) network analysis and functional module-base analysis with inflammatory genes information and (5) biological interpretation. After construction and analysis of the biological networks of the 10 active compounds including Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin and Theaflavin, the number from 1 to 12 inflammatory modules were found. Then 8 active compounds in klue tea and other tea plants effected to the 25 target proteins that may play an important role in anti-inflammatory response. The 6 target proteins, namely PTGS2, NFKB1, MAPK14, NOS2, RELA and IL6 were found to be the target for anti-inflammatory laboratory studies in the three common pathways such as the MAPK, NF- $\kappa$ B and JAK-STAT signaling pathways. This method can be applied to onion and other medicinal plants to reduce the cost and time spent in researching for decision making at the laboratory level.

## ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากการช่วยเหลือและร่วมกันทำงานของนิสิตระดับปริญญาตรีที่ทำโครงการวิจัยระดับปริญญาตรีสาขาชีวเคมีร่วมกัน ได้แก่ นางสาวจารินี คงทรัพย์ รวมถึงนิสิตระดับปริญญาโท ได้แก่ นางสาวจิตาภา สอนศิริ ที่ร่วมกันฝึกฝนอุปกรณ์และทำงานมาด้วยกันตั้งแต่ทำโครงการวิจัยระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จนกระทั่งศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่ถือว่าเป็นหัวแรงหลักของการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข ที่ให้เกียรติเป็นผู้ร่วมโครงการวิจัย และขอขอบคุณผู้มีส่วนช่วยเหลืออื่นที่ไม่ได้เอ่ยนาม โดยเฉพาะครอบครัวที่มีส่วนสำคัญ และเป็นแรงใจจนสามารถทำเล่มรายงานเพื่อปิดโครงการวิจัยนี้ได้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์

หัวหน้าโครงการวิจัย

21 พฤษภาคม พ.ศ. 2562

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
ปกใน	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
ประกาศคุณูปการ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
2.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	12
3.1 วัสดุ และอุปกรณ์	12
3.1.1 เครื่องมือและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ	12
3.2 วิธีการทดลอง	13
3.2.1 การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์	14
3.2.2 การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน	15
3.2.3 การค้นหากลุ่มยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ	15

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.2.4 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญ	15
3.2.5 การแปลผลทางชีวภาพ	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
4.1 การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์	17
4.2 การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน	20
4.3 การค้นหากลุ่มยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ	21
4.4 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญ	34
4.5 การแปลผลทางชีวภาพ	56
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	61
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	61
5.2 สรุปผลการทดลอง	65
5.3 ข้อเสนอแนะ	66
5.4 ผลผลิต (Output)	67
รายงานการเงิน	68
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก นำเสนอรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ	74
ภาคผนวก ข นำเสนอบทคัดย่อแบบขยาย งานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ	86
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	89

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	การแปลผลทางชีวภาพของโมดูลทั้ง 19 โมดูล โดยอาศัยข้อมูลกระบวนการทางชีวภาพของยีนออนโทโลยี	7
4-1	จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์จากการสืบค้นด้วยฐานข้อมูล ChEMBL, STITCH และ STRING	18
4-2	รายละเอียดโปรตีนการอักเสบทั้ง 403 ชนิด	22
4-3	ขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่ายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด	34



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์เคอร์คูมินกับโปรตีนเป้าหมาย และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน	6
2-2	โมดูลที่ถูกคัดเลือกจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน จำนวนทั้งสิ้น 19 โมดูล	6
3-1	ภาพรวมของกระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อช่วยในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก	14
4-1	ตัวอย่างผลที่ได้จากการสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของโปรตีน TP53	20
4-2	ข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่มีร่วมกันที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VENNY	21
4-3	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	35
4-4	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Fisetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	36
4-5	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	37
4-6	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	38
4-7	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Myricetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	39
4-8	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Isorhamnetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	40
4-9	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Catechin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	41
4-10	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epigallocatechin gallate และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	42
4-11	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epicatechin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	43
4-12	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Theaflavin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological	44
4-13	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin	46
4-14	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Fisetin	47

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-15	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol	48
4-16	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin	49
4-17	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Myricetin	50
4-18	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Isorhamnetin	51
4-19	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Catechin	52
4-20	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epigallocatechin gallate	53
4-21	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epicatechin	54
4-22	โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Theaflavin	55
4-23	วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่พบในไขชูลู่และพืชกลุ่มชา	57
4-24	วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่นิยมศึกษาที่พบในไขชูลู่และพืชกลุ่มชา	58
4-25	วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่พบในหัวหอม	59
4-26	วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่นิยมศึกษาที่พบในหัวหอม	60
5-1	กระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ	66

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

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

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

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

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

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

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองทางชีวภาพที่ซับซ้อนของร่างกายที่มีต่อสิ่งกระตุ้น จากภายนอกและภายใน เช่น จุลชีพก่อโรคและชิ้นส่วนของเซลล์ (Ham, et al., 2015) โดยเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบ เช่น เซลล์แมคโครฟาจจะมีการผลิตไซโตไคน์ (cytokine) สารเอนโดทอกซิน (endotoxins) และสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และ พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins, PG) (Kazłowska, et al., 2010) ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่สำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการอักเสบ การตอบสนองของสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปเป็นสาเหตุของความเสียหายที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์และส่งผลกระทบต่อโรคที่เกี่ยวข้อง เช่น โรคไขข้ออักเสบ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคอัลไซเมอร์ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นการยับยั้งกระบวนการตอบสนองการอักเสบโดยการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบจึงเป็นสิ่งสำคัญ (Yang, et al., 2013) โดยสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ (natural active compounds) โดยเฉพาะสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) และแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ที่สามารถพบได้ในพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด ที่คนในท้องถิ่นนิยมรับประทาน (Andarwulan, et al., 2012 และ Suriyaphan, 2014) โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรเหล่านี้มักเป็นกลุ่มเป้าหมายของการนำมาใช้ในการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory activities) เช่น การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของชาจากใบชา (Srisook, et al., 2012) เป็นต้น แต่การศึกษาส่วนใหญ่ยังไม่ได้ศึกษาผลในรายละเอียดของกลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นจริงว่าการยับยั้งดังกล่าว เกิดขึ้นในขั้นตอนและกระบวนการใดในระดับโมเลกุล อันเนื่องมาจากกระบวนการในระดับโมเลกุลมีเป็นจำนวนมากและต้นทุนการวิจัยที่มีมูลค่าสูง ดังนั้นหากสามารถศึกษาและทราบถึงกลไกการยับยั้งในระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพร ก็จะทำให้เรารู้คุณค่าที่แท้จริงของพืชสมุนไพรเหล่านี้ได้ว่ามีบทบาทที่สำคัญอย่างไรในระดับโมเลกุล ที่ทำให้สามารถควบคุมการยับยั้งการอักเสบที่เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเหล่านี้ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์อื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป

การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของกระบวนการยับยั้งการอักเสบในเบื้องต้น สามารถทำได้ในคอมพิวเตอร์โดยอาศัยฐานข้อมูลและกระบวนการทางชีวสารสนเทศ ในการทำนายและค้นหากลุ่มยีนหรือโปรตีนที่มีความสำคัญซึ่งถูกยับยั้งและถูกควบคุมการทำงานโดยสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ โดยอาศัยกระบวนการวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง (Charitou, et al., 2016 และ Barabási, et al., 2011) ซึ่งกระบวนการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบในระดับโมเลกุลส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านสัญญาณของสารออกฤทธิ์กับโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเป็นเครือข่ายทางชีวภาพ (biological network) ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับโปรตีน (chemical-protein interaction) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein interaction) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ โดยข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับโปรตีนเป้าหมายข้างต้น มีการเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะออนไลน์ ตัวอย่างเช่น ฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับโปรตีน ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) และฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน STRING (Szklarczyk, et al. 2017) เป็นต้น โดยอาศัยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพ

ตัวอย่างเช่น โปรแกรมวิเคราะห์เครือข่าย Cytoscape (Shannon, et al., 2003) พร้อมกับโปรแกรมปลั๊กอินที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ MCODE (Bader and Hogue, 2003) และ BiNGO (Maere, et al., 2005) เป็นต้น จากตัวอย่างของการศึกษาที่ได้มีการทำนายกลไกระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ เคอร์คูมิน (curcumin) (Gan, et al., 2015) แทนชินอน IIA (tanshinon IIA) (Zheng, et al., 2014) และ กรดซัลเวียโนลิกบี (salvianolic acid B) (Ren, et al., 2014) รวมทั้งสารออกฤทธิ์ที่มีในยาจากสูตรพืชสมุนไพร Qishen Yiqi (Zheng, et al., 2015) ที่ทำให้ทราบบทบาทของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่มีต่อกลไกระดับโมเลกุลของเซลล์ แต่งานวิจัยข้างต้นไม่ได้แสดงถึงความเชื่อมโยงระหว่างบทบาทของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อกลไกการอักเสบ และยังขาดวิธีการที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการอธิบายและแปลผลเชิงชีวภาพ ซึ่งสามารถนำมาช่วยในการอธิบายกลไกระดับโมเลกุลของกระบวนการยับยั้งการอักเสบได้อย่างชัดเจนและมีประสิทธิภาพ

โครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการออกแบบกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม สำหรับการทำนายและศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบ ซึ่งเป็นบทบาทหนึ่งที่สำคัญของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก พร้อมกับค้นหาวีธีการเพื่อช่วยในการอธิบายและแปลผลทางชีวภาพที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบให้มีความชัดเจนและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบในพืชสมุนไพรของแถบประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งมีชนิดของสายพันธุ์เช่นเดียวกันกับที่พบในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย (Andarwulan, et al., 2012) และจากการรวบรวมข้อมูลของบทความวิจัยของส่วนประกอบสารออกฤทธิ์ และการประยุกต์ใช้ของพืชสมุนไพร *Pluchea indica* (L.) Less (Suriyaphan, 2014) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญของภาคตะวันออก จะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงข้อมูลเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบของใบชู่ เพื่อนำมาใช้ในการค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ในฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) ซึ่งจะช่วยให้ได้ข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับโปรตีน ก่อนจะนำข้อมูลของโปรตีนเป้าหมายที่ได้มาทำการสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk, et al. 2017) และนำข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ภายในโปรแกรมวิเคราะห์เครือข่าย Cytoscape (Shannon, et al., 2003) ร่วมกับการใช้ข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ตรวจสอบได้จากฐานข้อมูลสาธารณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้แก่ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler et al., 2004) ซึ่งข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจะเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกเครือข่ายย่อย หรือโมดูลที่ถูกวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์และโปรตีนโดยอาศัยโปรแกรมการคัดเลือกโมดูลที่มีฟังก์ชันสอดคล้องกัน ตัวอย่างเช่น โปรแกรม MCODE (Bader and Hogue, 2003) ก่อนทำการแปลผลทางชีวภาพโดยใช้ข้อมูลของยีนสมาชิกภายในโมดูลที่ถูกคัดเลือกด้วยโปรแกรม BiNGO (Maere, et al., 2005) และนำข้อมูลการแปลผลที่ได้มาทำการจัดกลุ่มเพื่อค้นหาความเชื่อมโยงระหว่างกลุ่มยีนสมาชิกภายในโมดูลเพื่อนำไปใช้ในการแปลผลเปรียบเทียบของกลไกการตอบสนองในระดับโมเลกุล กับผลการตอบสนองการอักเสบในระดับสรีรวิทยา (physiology) เพื่อสามารถนำข้อมูลความเชื่อมโยงที่ได้มาใช้ในการอธิบายกลไกการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบของสารออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลให้ชัดเจนและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการค้นหาบทบาทของกลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบของพืชสมุนไพรชนิดอื่น และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการอธิบายกลไกระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติในกระบวนการทางชีวภาพอื่น เช่น กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก
2. เพื่อค้นหาเครือข่ายย่อยหรือโมดูลของกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

จากข้อมูลสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพร *Pluchea indica* (L.) Less (Suriyaphan, 2014) และพืชสมุนไพรชนิดอื่น (Andarwulan, et al., 2012) จะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงข้อมูลเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบ เพื่อนำมาใช้ในการค้นหาโปรตีนที่มีความสัมพันธ์และเป็นเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ โดยใช้ฐานข้อมูลและเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ ที่ประกอบไปด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่ประกอบไปด้วย (1) การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์โดยใช้ฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) (2) การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk, et al. 2017) (3) การค้นหาข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยอาศัยการสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้แก่ ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler et al., 2004) (4) การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์เครือข่าย Cytoscape (Shannon, et al., 2003) พร้อมด้วยโปรแกรมปลั๊กอินที่ใช้ในการค้นหาโมดูล เช่น MCODE (Bader and Hogue, 2003) เป็นต้น ร่วมกับการใช้ข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ตรวจสอบได้ และ (5) การแปลผลทางชีวภาพโดยใช้ข้อมูลของยีนสมาชิกภายในโมดูลที่ถูกคัดเลือกด้วยโปรแกรมปลั๊กอิน BiNGO (Maere, et al., 2005) และนำข้อมูลการแปลผลทางชีวภาพที่ได้ มาทำการจัดกลุ่มเพื่อค้นหาความเชื่อมโยงระหว่างกลุ่มยีนสมาชิกภายในโมดูลเพื่อนำไปใช้ในการแปลผลเปรียบเทียบของกลไกการตอบสนองในระดับโมเลกุล กับผลการตอบสนองการอักเสบในระดับสรีรวิทยา

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้กระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก
2. ได้เครือข่ายย่อยหรือโมดูลของกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญ ต่อการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก



## บทที่ 2

### ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

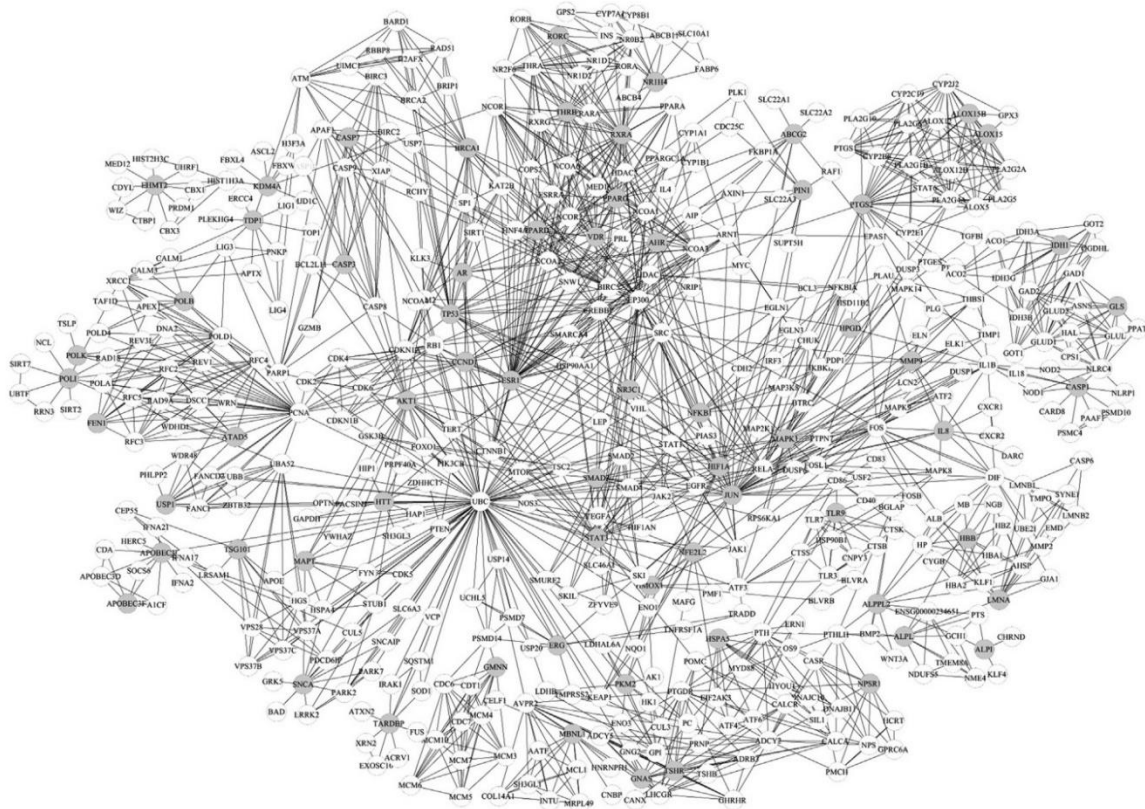
#### 2.1 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การอักเสบ (inflammation) เป็นการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน ซึ่งการตอบสนองโดยกระบวนการอักเสบประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลกระทบที่เกิดกับร่างกายทั้งระบบ (systemic effect) กระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นในระบบหลอดเลือดฝอยภายในเนื้อเยื่อ และเป็นกระบวนการที่ช่วยให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกไป รวมทั้งกำจัดเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากการเข้ามาของสิ่งแปลกปลอม หากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ และเนื้อเยื่อจะเกิดการบาดเจ็บโดยที่ไม่มีการซ่อมแซม ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อนั้นๆ ผิดปกติไป (Ham, et al., 2015) อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบที่มากเกินไปเป็นสาเหตุหลักของการอักเสบเรื้อรังและก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคภูมิแพ้ โรคหอบหืด โรคไขข้ออักเสบ อัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดและหัวใจ และโรคมะเร็ง ซึ่งการอักเสบเรื้อรังนี้มีผลมาจากสารสื่อกลางการอักเสบซึ่งรวมทั้ง pro-inflammatory cytokines เช่น ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), อินเตอร์ลูคิน-1 เบต้า (interleukin-1-beta, IL-1 $\beta$ ) และอินเตอร์ลูคิน-6 (interleukin-6, IL-6) และ pro-inflammatory factors อย่างเช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และ พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins, PG) การสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์จะสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (iNOS) เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ไนตริกออกไซด์จากแอล-อาร์จินีน (L-arginine) โดยใช้ NADPH และโมเลกุลออกซิเจน และการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดินจะอาศัยเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase, COX-2) เป็นสารสื่อกลางที่เปลี่ยนกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid) เป็นพรอสตาแกลนดิน ซึ่งไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน เป็นตัวควบคุมที่สำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการอักเสบ (Kazłowska, et al., 2010)

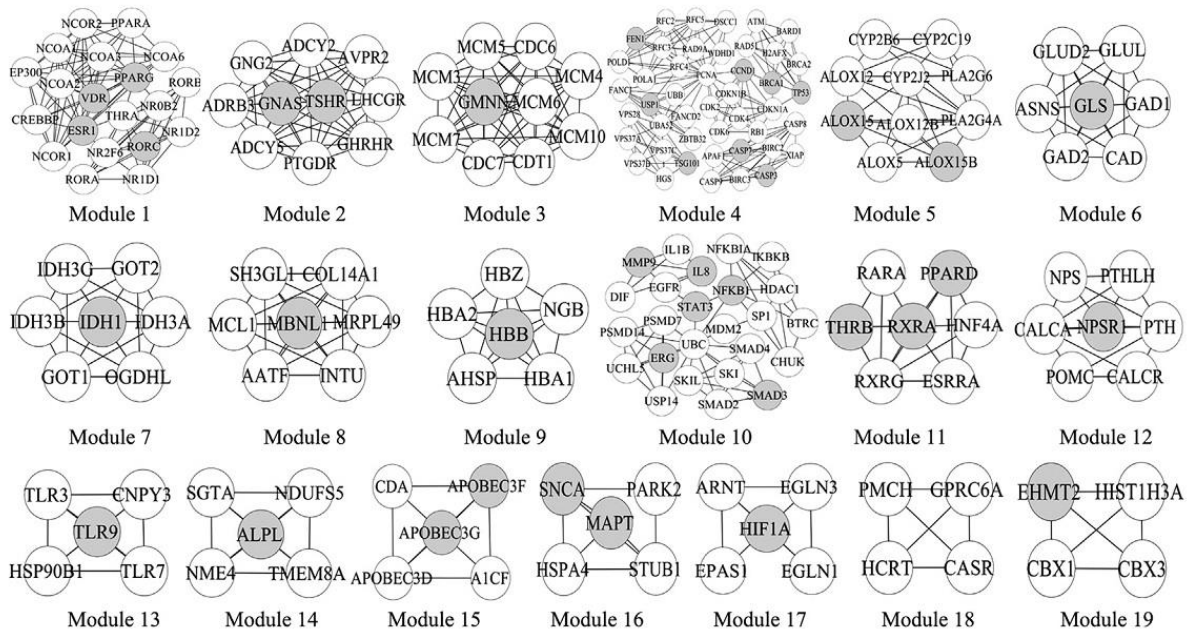
ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต เช่น การสื่อสารของเซลล์ การตอบสนองภูมิคุ้มกัน การควบคุมการแสดงออกของยีน เป็นต้น รวมถึงการค้นหาทำงานของโปรตีน โดยปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมีความน่าสนใจในทางชีววิทยาเนื่องจากควบคุมการทำงานทุกกระบวนการของเซลล์ รวมทั้งกระบวนการทางเมแทบอลิซึม กระบวนการแสดงออกของยีนและการจำลองตัวของดีเอ็นเอ วิธีการส่งสัญญาณที่แตกต่างกันและกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ อีกมากมาย โปรตีนสามารถทำหน้าที่ผ่านการมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนตัวอื่น (Lage, 2014) และยังพบว่าโปรตีนไม่สามารถพบอยู่เพียงลำพังแต่จะมีการส่งสัญญาณผ่านการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเพื่อทำหน้าที่ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน สามารถทำให้เกิดความเข้าใจพื้นฐานขององค์ประกอบของเซลล์และกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญและมีวิธีการตรวจสอบที่หลากหลาย นอกจากการทดลองในห้องปฏิบัติการแล้ว ยังมีการทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่สามารถเกิดขึ้นได้จากข้อมูลระดับจีโนมของสิ่งมีชีวิต (Zahiri, et al., 2013) ปัจจุบันข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเป็นสิ่งที่น่าสนใจในสาขาต่างๆ เช่น ชีววิทยาโครงสร้าง, อนุชีววิทยา, ชีววิทยาเชิงระบบ และการค้นหายาใหม่ โดยอาศัยกระบวนการในการวิเคราะห์เครือข่ายเพื่อช่วยในการรวบรวม นำเสนอ

และวิเคราะห์ข้อมูลระดับจีโนมที่เกี่ยวข้อง (Charitou, et al., 2016) โดยการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Szkarczyk, et al. 2017) ร่วมกับข้อมูลปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์กับโปรตีน (Davies, et al., 2015 และ Szkarczyk, et al. 2016) ก็จะทำให้สามารถได้เครือข่ายที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับโปรตีนเป้าหมาย เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายกลไกการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่สนใจได้

ตัวอย่างเช่น การทำนายกลไกระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน (curcumin) โดย Gan และคณะ (2015) ดังรูปที่ 2-1 ซึ่งแสดงให้เห็นเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์เคอร์คูมินกับกลุ่มโปรตีนเป้าหมาย (seed nodes, วงกลมสีเทา) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (วงกลมสีขาว) ซึ่งแสดงให้เห็นเครือข่ายที่มีขนาดใหญ่ของโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจำเป็นต้องทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยหรือโมดูลที่ประกอบไปด้วยกลุ่มยีนหรือโปรตีนที่มีฟังก์ชันการทำงานร่วมกัน โดยการใช้โปรแกรมการคัดเลือกโมดูล MCODE (Bader and Hogue, 2003) ที่ทำให้เหลือโมดูลสำหรับการวิเคราะห์กลไกการตอบสนองที่เกี่ยวข้องจำนวน 19 โมดูล (รูปที่ 2-2) ที่ทำให้การพิจารณาและแปลผลทางชีวภาพทำได้ง่ายยิ่งขึ้นดังเช่นตารางที่ 2-1 ที่แสดงถึงการแปลผลทางชีวภาพของทั้ง 19 โมดูล โดยใช้ GO (Gene Ontology) ของกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) โดยทางผู้วิจัยได้ให้ความสนใจในโมดูลที่ 10 และโมดูลที่ 13 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Cellular response to growth factor stimulus และ Toll-like receptor signaling pathway ตามลำดับ และพยายามอธิบายความเกี่ยวข้องของโปรตีนในโมดูลกับการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยให้ความสนใจไปที่โปรตีน SMAD3 และ ERG จากโมดูล 10 และโปรตีน TLR9 จากโมดูล 13 ว่าน่าจะเป็นโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับบทบาทการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน



ภาพที่ 2-1 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์เคอร์คูมินกับโปรตีนเป้าหมาย และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Gan, et al., 2015)



ภาพที่ 2-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน จำนวนทั้งสิ้น 19 โมดูล (Gan, et al., 2015)

ตารางที่ 2-1 การแปลผลทางชีวภาพของโมดูลทั้ง 19 โมดูล โดยอาศัยข้อมูลกระบวนการทางชีวภาพของยีนออนโทโลยี (Gan, et al., 2015)

Module	GO term	P value
Module 1	Transcription initiation from RNA polymerase II promoter	$7.6587 \times 10^{-32}$
Module 2	G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	$3.8329 \times 10^{-20}$
Module 3	M/G1 transition of mitotic cell cycle	$7.7133 \times 10^{-27}$
Module 4	Response to DNA damage stimulus	$2.0766 \times 10^{-32}$
Module 5	Fatty acid derivative metabolic process	$2.0128 \times 10^{-16}$
Module 6	Glutamine family amino acid catabolic process	$5.7668 \times 10^{-18}$
Module 7	Tricarboxylic acid cycle	$1.6501 \times 10^{-13}$
Module 8	Negative regulation of superoxide anion generation	$2.30 \times 10^{-4}$
Module 9	Hydrogen peroxide catabolic process	$1.5518 \times 10^{-8}$
Module 10	Cellular response to growth factor stimulus	$4.6078 \times 10^{-16}$
Module 11	Transcription initiation from RNA polymerase II promoter	$6.9789 \times 10^{-16}$
Module 12	G-protein coupled receptor signaling pathway	$2.3039 \times 10^{-10}$
Module 13	Toll-like receptor signaling pathway	$5.23 \times 10^{-7}$
Module 14	Cementum mineralization	$1.31 \times 10^{-4}$
Module 15	DNA cytosine deamination	$2.1272 \times 10^{-11}$
Module 16	Negative regulation of thrombin receptor signaling pathway	$1.64 \times 10^{-4}$
Module 17	Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia	$4.5178 \times 10^{-16}$
Module 18	G-protein coupled receptor signaling pathway	$6.04 \times 10^{-5}$
Module 19	Chromatin organization	$4.23 \times 10^{-5}$

P value is the probability of obtaining the observed effect, a very small P value indicates that the observed effect is very unlikely to have arisen purely by chance, and therefore provides evidence against the null hypothesis.

แต่จากข้อมูลข้างต้นจะสังเกตเห็นว่า เป็นการอธิบายบทบาทของสารออกฤทธิ์โดยให้ความสำคัญกับข้อมูลของโปรตีนเป้าหมายที่คัดเลือกจากโมดูลที่สนใจอีกครั้ง แต่ไม่สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการอธิบายกลไกการตอบสนองของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างเป็นระบบ ดังนั้นหากสามารถรวบรวมและหาความสัมพันธ์ของข้อมูลการแปลผลทางชีวภาพจากกระบวนการทางชีวภาพของยีนออนโทโลยี กับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองการอักเสบได้ ก็จะทำให้สามารถอธิบายกลไกดังกล่าวข้างต้นอย่างเป็นระบบได้ชัดเจนและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และสามารถใช้ฐานข้อมูลและเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ จากการศึกษาของ Gan และคณะ (2015) มาเป็นต้นแบบของกระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อทำการค้นหามหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติของพืชสมุนไพรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยอาศัยข้อมูลรายชื่อของสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ตัวอย่างเช่น ข้อมูลส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์จากใบขลุ่ย และพืชชนิดอื่นที่สามารถพบได้ในประเทศไทย (Andarwulan, et al., 2012 และ Suriyaphan, 2014) ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อให้เกิดความถูกต้องและเหมาะสมเพิ่มมากยิ่งขึ้น สำหรับการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์กับโปรตีนเป้าหมายและการค้นหาโมดูลที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของสารออกฤทธิ์ รวมไปถึงการปรับปรุงกระบวนการแปลผลทางชีวภาพเพื่อให้สามารถอธิบายกลไกในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการกลไกการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่เกี่ยวข้องไปจนถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับสรีรวิทยาได้

## 2.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ กรดซัลเวียโนลิกบี (salvianolic acid B) (Ren, et al., 2014) โดยใช้การวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล (module-based network analysis) เพื่อค้นหาโมดูลหรือบทบาทใหม่ของกรดซัลเวียโนลิกบี จากการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นซึ่งมีขนาด 852 โหนด (nodes) และ 8,626 ปฏิสัมพันธ์ (interactions) ทำให้สามารถคัดเลือกเครือข่ายย่อยหรือโมดูลออกมาได้ 11 โมดูล ก่อนจะทำการแปลผลด้วยยีนออนโทโลยี (GO) พบว่ากรดซัลเวียโนลิกบี มีบทบาทสำคัญหลายกระบวนการทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจ (cardiovascular disease) ที่มีแสดงให้เห็นในตำรับยาจีน และยังพบความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบผ่านการควบคุมกลุ่มโปรตีน IL-2 family, CD3E, CD79A, MAP3K7 และ PRKCO ต่อมาได้มีการใช้การวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล เพื่อทำนายกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารแทนชินอน IIA (tanshinon IIA) (Zheng, et al., 2014) บนข้อมูลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นเครือข่ายที่ประกอบไปด้วย 281 โหนด และ 814 ปฏิสัมพันธ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยยีนออนโทโลยีโดยใช้ Markov cluster algorithm (MCL) แล้วพบว่า มี 3 โมดูลที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบ ซึ่งสารแทนชินอน IIA เข้าไปเกี่ยวข้องกับโปรตีน TRAF2, TRAF3 และ TRAF6 ในการยับยั้งวิถีสัญญาณผ่านทอลล์-ไลค์ รีเซปเตอร์ (toll-like receptor signaling pathway) และเชื่อมโยงกับโปรตีน AGER และยังรวมถึงการใช้การวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูลในการทำนายกลไกการยับยั้งการอักเสบของสารเคอร์คูมิน (curcumin) (Gan, et al., 2015) โดยการใช้ข้อมูลสารออกฤทธิ์กับโปรตีนเป้าหมายจากฐานข้อมูลออนไลน์ ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) และนำข้อมูลโปรตีนเป้าหมายของเคอร์คูมินที่ได้มาทำการค้นหาโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องจากฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk, et al. 2017) ที่จะทำได้เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ประกอบไปด้วย 482 โหนด และ 1688 ปฏิสัมพันธ์ ก่อนจะนำมาวิเคราะห์เพื่อค้นหาโมดูลโดยอาศัยข้อมูลยีนออนโทโลยีบนพื้นฐานของการตรวจจับโมเลกุลเชิงซ้อนด้วยโปรแกรม MCODE (Bader and Hogue, 2003) ซึ่งเป็นโปรแกรมปลั๊กอินในโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) จากโมดูลจำนวน 19 โมดูลได้ พบว่ามีอยู่ 2 โมดูลที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ เมื่อวิเคราะห์ฟังก์ชันในโมดูลแล้วพบว่า ผลการยับยั้งการอักเสบโดยเคอร์คูมินนั้นออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับโปรตีน SMAD, ERG และ TLR9 ที่อาจจะนำมาใช้เป็นเป้าหมายของการรักษาการอักเสบที่เกิดขึ้นได้

นอกจากการศึกษาบทบาทของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดแล้ว ก็ยังมีการศึกษาบทบาทของสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารผสมซึ่งปรากฏในตำรับยาจากสูตรพืชสมุนไพร Qishen Yiqi (Zheng, et al., 2015) ที่มีฤทธิ์ในการเสริมปราณ (tonifying Qi) และช่วยระบบหมุนเวียนโลหิต (promoting blood circulation) ซึ่งมีการใช้อย่างกว้างขวางในการบำบัดโรคหัวใจและอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบหมุนเวียนโลหิต การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล กับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ Qishen Yiqi ทำให้สามารถตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์อย่างเป็นระบบของตำรับยาจากพืชสมุนไพรนี้ได้ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า Qishen Yiqi น่าจะมีผลต่อการควบคุมเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เมแทบอลิซึมของลิพิด และเมแทบอลิซึมของ cAMP ในขณะที่ Qishen Yiqi เองยังมีส่วนช่วยระบบการหมุนเวียนโลหิตผ่านการควบคุมแข็งตัวของเลือด (blood coagulation) และการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle contraction) แต่จากผลของงานวิจัยข้างต้นไม่ได้แสดงถึงความเชื่อมโยงระหว่างบทบาทของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อกลไกการอักเสบโดยตรง มักเป็นการค้นหาโมดูลที่มีโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ และอธิบายความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ

จากรายชื่อของโปรตีนแต่ละชนิดที่เป็นสมาชิกในแต่ละโมดูล และยังขาดวิธีการที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการอธิบายและแปลผลทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการแสดงให้เห็นถึงบทบาทของสารออกฤทธิ์แต่ละประเภทที่ทำการศึกษารูปแบบเป็นระบบใน ที่แสดงถึงความเชื่อมโยงระหว่างกลไกระดับโมเลกุลกับการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นในระดับสรีรวิทยาของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดนั้น ซึ่งจะสามารถนำมาช่วยในการอธิบายกลไกระดับโมเลกุลของกระบวนการยับยั้งการอักเสบได้อย่างชัดเจนและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

จากผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบในพืชสมุนไพรจำนวนทั้งสิ้น 24 ชนิด ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศอินโดนีเซีย ที่มีชนิดและสายพันธุ์เช่นเดียวกับที่พบในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย (Andarwulan, et al., 2012) โดยทำการตรวจสอบปริมาณของสารออกฤทธิ์ในกลุ่มโพลีฟีนอลจำพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่ประกอบไปด้วย myricetin, luteolin, quercetin, apigenin และ kaempferol การตรวจวัดปริมาณสารประกอบในกลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid และ ferulic acid และการตรวจวัดปริมาณรวมของสารประกอบจำพวก phenols, anthocyanin,  $\beta$ -carotene และ ascorbic acid รวมถึงการวัดระดับความชื้น (moisture) และโปรตีน ที่ทำให้พบว่าพืชสมุนไพรแต่ละชนิดนั้นเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบเชิงฟังก์ชัน (functional components) ที่สำคัญ โดยเฉพาะสารในกลุ่มโพลีฟีนอลและกรดแอสคอบิก ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ซึ่งการอักเสบที่เกิดขึ้นนั้นถือว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักที่รู้จักกันดีว่ามีผลต่อการเกิดโรคเรื้อรังในมนุษย์ได้หลากหลายชนิด การอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute inflammation) เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และโฮสต์ (host) ก็สามารถเกิดกระบวนการป้องกันตนเองและกลับคืนสู่สมดุลของร่างกายได้โดยง่าย ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) ที่นำไปสู่การเปลี่ยนชนิดของเซลล์ที่ถูกนำเข้าสู่บริเวณที่อักเสบและมีลักษณะพิเศษของการทำลายเซลล์ที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการรักษาเนื้อเยื่อที่เกิดกระบวนการอักเสบ โดยในกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นอาศัยการส่งผ่านข้อมูลด้วยไซโตไคน์ ที่อาจส่งผลการควบคุมการสื่อสารระหว่างเซลล์ที่ผิดปกติ และก่อให้เกิดความเสียหายของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป้าหมายของการศึกษาสารออกฤทธิ์ก็เพื่อลดการอักเสบเรื้อรังที่มีส่วนช่วยลดอัตราการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพืช ผัก และผลไม้ ที่ได้มาการสรุปองค์ความรู้และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบของสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ รวมถึงผลกระทบที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของการเกิดโรคเรื้อรังหลากหลายชนิด (Pan, et al., 2010) ที่ทำให้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ เช่น ฟลาโวนอยด์ นี้มีความสำคัญต่อการยับยั้งการอักเสบอย่างไร

และจากการรวบรวมข้อมูลของบทความวิจัยของส่วนประกอบสารออกฤทธิ์และการประยุกต์ใช้ของพืชสมุนไพร ชลู่ (Pluchea indica (L.) Less โดย Suriyaphan (2014) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรและเป็นพืชท้องถิ่นที่สำคัญของภาคตะวันออก ที่นิยมนำมาใช้รับประทาน เช่น ยอดอ่อนนำมาทำเป็นผักจิ้มกับน้ำพริก ลาบ หรือเป็นเครื่องเคียงขนมจีน ส่วนใบอ่อนนำไปลวกใช้รับประทานเป็นผักจิ้มกับน้ำพริก หรือใส่ในแกงคั่ว ส่วนดอกก็มีการนำไปย่ำร่วมกับเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ได้ เป็นต้น และยังสามารถนำไปมาผึ่งให้แห้งและต้มกับน้ำดื่มหรือชงแทนชา ซึ่งจะช่วยลดน้ำหนักได้ นอกจากประโยชน์ข้างต้นแล้ว ในส่วนของใบชลู่ยังอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สำคัญ ได้แก่  $\beta$ -carotene, chlorogenic acid, caffeic acid และ quercetin ซึ่งใบชลู่ได้ถูกนำมาทำเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในประเทศไทย จากการวิจัยในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งจากน้ำและแอลกอฮอล์จากใบชลู่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (scavenging of free radicals) รวมถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammation)

เช่นเดียวกับการรายงานของ Srisook และคณะ (2012) ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากใบขลุ่ย หรือ ขาใบขลุ่ยนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ จากการทดสอบกับ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, superoxide และ hydroxyl radical และสามารถยับยั้งการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถลด การผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และ พลอสตาแกลนดิน (prostaglandin E2, PGE2) ที่เกิดการ ผลิตขึ้นในเซลล์ต้นแบบแมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) (Buapool, et al., 2013) ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้น ขลุ่ย จึงเป็นพืชเป้าหมายที่เป็น พืชสมุนไพรจากภาคตะวันออก ที่จะถูกนำมาใช้เพื่อทำการศึกษาและค้นหากลไกการยับยั้งการอักเสบของสาร ออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญ เพื่อนำมาอธิบายภาพรวมในเชิงระบบ ว่าสารออกฤทธิ์จากใบขลุ่ยนี้มี บทบาทและความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการตอบสนองการอักเสบได้อย่างไรบ้าง

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและสารโมเลกุลขนาดเล็กเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในกระบวนการทาง ชีวภาพของสิ่งมีชีวิต สารออกฤทธิ์จากธรรมชาติก็เป็นสารเคมีที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่จะมีปฏิสัมพันธ์ที่จำเพาะ กับกลุ่มโปรตีนเป้าหมายของเซลล์ ที่ทำให้เกิดผลตอบสนองเชิงระบบผ่านกลไกของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน หรือการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ ปัจจุบันได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสาร โมเลกุลขนาดเล็กไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะออนไลน์ ตัวอย่างเช่น ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) ที่ทำให้ผู้วิจัยที่มีความสนใจสามารถเข้าถึงและดาวน์โหลดข้อมูล ปฏิสัมพันธ์เหล่านี้มาใช้ในการวิจัยได้ ChEMBL (Davies, et al., 2015) เป็นฐานข้อมูลที่มีขนาดใหญ่ซึ่งได้มีการ พัฒนาขึ้นมาเพื่อรองรับการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นหายาชนิดใหม่ (drug discovery) และงานเคมีทาง การแพทย์ (medicinal chemistry) เป็นฐานข้อมูลที่ทำให้การเก็บรวบรวมข้อมูลเชิงสัมพันธ์ของลิแกนด์และชีว โมเลกุลเป้าหมาย ที่มีการรายงานในบทความวิจัยเคมีทางการแพทย์ ซึ่งผ่านการตรวจทานและดึงข้อมูลโดย ทีมงานผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งได้มีการปรับปรุงฐานข้อมูลล่าสุดเป็นเวอร์ชัน 2.0.x (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/api/data/docs>) นอกจากนี้ยังสามารถค้นหาข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีนและสารออกฤทธิ์ได้จากฐานข้อมูล STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) ที่มีการปรับปรุงข้อมูลล่าสุด เป็นเวอร์ชัน 5.0 โดยฐานข้อมูล STITCH (Search Tool for Interacting Chemicals) อาศัยการรวบรวม ข้อมูลปฏิสัมพันธ์จากฐานข้อมูลอื่น (many databases) บทความวิจัย (texts) และกระบวนการทำนาย ปฏิสัมพันธ์ (prediction methods) แล้วนำมาทำให้สามารถนำเสนอผลการสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของสารเคมี จำนวนมากกว่า 430,000 ชนิด อยู่ในรูปแบบของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ (interaction network) ที่ง่ายต่อการ ใช้งานและการทำความเข้าใจว่าสารเคมีแต่ละชนิดนั้นมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมายอย่างไรบ้าง โดยในเวอร์ ชันล่าสุดนี้สามารถคัดกรองโปรตีนหรือสารเคมีที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาได้ จาก ฐานข้อมูลที่กล่าวถึงข้างต้นทั้งสองฐานข้อมูลนี้จะเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสาร ออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่เราสนใจ

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่จะต้องนำมาใช้เพื่อสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่ง สามารถทำได้โดยใช้ข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูล สาธารณะ STRING (Szklarczyk, et al. 2017) เนื่องจากกระบวนการระดับเซลล์ และชีววิทยาเชิงระบบ ส่วนมากเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ร่วมกันซึ่งเกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน อย่างไรก็ตามข้อมูล ปฏิสัมพันธ์ที่รู้จักกันอยู่แล้วกับที่ถูกทำนายขึ้นมามีการเก็บรวบรวมอย่างกระจัดกระจายในหลายแหล่งฐานข้อมูล ซึ่งมีความแตกต่างกันในมาตรฐานและรูปแบบของการจัดเก็บ ฐานข้อมูลสาธารณะ STRING จึงได้ทำการ รวบรวมและผสมผสานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนเหล่านี้เข้าด้วยกัน อันประกอบไปด้วย

ปฏิสัมพันธ์ทางตรง (direct or physical interaction) และปฏิสัมพันธ์โดยอ้อม (indirect or functional interaction) โดยในเวอร์ชันล่าสุดของ STRING คือเวอร์ชัน 10.0 ที่ประกอบได้ด้วยข้อมูลจากสิ่งมีชีวิตมากกว่า 2,000 ชนิด ที่มีการแสดงความเชื่อมโยงของข้อมูลและการจัดกลุ่มโปรตีนออร์โธโลยี (orthology) ระหว่างสิ่งมีชีวิต รวมทั้งการจัดจำแนกความสัมพันธ์แบบไฟโลเจเนติก ดังนั้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่ได้จากฐานข้อมูล STRING ก็จะทำให้เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนกับสารออกฤทธิ์มีความครบถ้วนและสมบูรณ์เพิ่มมากขึ้น และพร้อมที่จะนำไปวิเคราะห์เครือข่ายร่วมกับยีนการอักเสบที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้แก่ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler et al., 2004) เพื่อค้นหาโมดูลที่มียีนสมาชิกซึ่งเป็นยีนการอักเสบซึ่งจะทำให้ทราบบทบาทที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สนใจเบื้องต้น

การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติซึ่งมีขนาดใหญ่สามารถโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) ในการแสดงผลและวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์เครือข่ายข้างต้นยังไม่เพียงพอต่อการอธิบายและค้นหามหาบทบาทที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ จึงต้องมีการคัดเลือกเครือข่ายย่อยหรือโมดูลที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของสารออกฤทธิ์ และสามารถนำมาแปลผลทางชีวภาพได้โดยง่าย ซึ่งการคัดเลือกโมดูลนี้สามารถทำได้โดยการใช้โปรแกรมปลั๊กอินของโปรแกรม Cytoscape ตัวอย่างเช่น โปรแกรม MCODE (Molecular Complex Detection) (Bader and Hogue, 2003) ที่จะทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยหรือโมดูลที่มีการเชื่อมต่อกันอย่างหนาแน่น ที่ถือว่าเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันและมีลักษณะเป็นสารชีวโมเลกุลเชิงซ้อน (biomolecular complexes) โดยอาศัยวิธีการจัดกลุ่มความหนาแน่นของการมีปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนบนพื้นฐานของ graph clustering methods โดยในงานวิจัยนี้ได้ทดลองการใช้ MCODE ในการคัดเลือกโมดูลของกลุ่มโปรตีนจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งพบว่าโมดูลส่วนใหญ่ที่ค้นพบมีความสอดคล้องกับสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน (protein complexes) ที่รู้อยู่แล้ว

ภายหลังการคัดเลือกโมดูลที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน จากเครือข่ายขนาดใหญ่ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์ที่สนใจแล้ว ก็จะนำโมดูลเหล่านี้มาทำการแปลผลทางชีวภาพโดยใช้ข้อมูลของยีนสมาชิกภายในโมดูลที่ถูกคัดเลือก มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BiNGO (Biological Networks Gene Ontology) (Maere, et al., 2005) ซึ่งเป็นโปรแกรมปลั๊กอินของโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) เช่นเดียวกัน โดย BiNGO จะอาศัยข้อมูลยีนออนโทโลยี (Gene Ontology, GO) มาทำการค้นหาฟังก์ชันของกลุ่มยีนที่เป็นสมาชิกในเครือข่ายที่ทำการวิเคราะห์ โดยผลที่ได้จะเป็นรายชื่อของฟังก์ชันยีนออนโทโลยีที่น่าจะเป็นฟังก์ชันหลักของกลุ่มยีนเหล่านั้น ทำให้การแปลผลฟังก์ชันยีนออนโทโลยีของยีนสมาชิกในโมดูลในบางครั้งเป็นเรื่องที่ยาก จึงจำเป็นต้องมีวิธีการที่จะทำการจัดกลุ่มฟังก์ชันที่ได้เหล่านี้เพื่อหาความสัมพันธ์ของโมดูลผ่านฟังก์ชันยีนออนโทโลยี ซึ่งจะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะทำการพัฒนาในโครงการวิจัยนี้ เพื่อให้ได้ผลของฟังก์ชันจากแต่ละโมดูลที่พร้อมจะนำมาใช้ในการอธิบายกลไกการยับยั้งการอักเสบของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สนใจศึกษา ซึ่งในที่นี้จะเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์จากตัวอย่างพืชสมุนไพรท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ชลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less (Suriyaphan, 2014) เพื่อค้นหามหาบทบาทของกลุ่มสารออกฤทธิ์จากไบโชนูที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบ และเพื่อนำมาเป็นต้นแบบของการพัฒนากระบวนการทางชีวสารสนเทศที่สามารถนำไปใช้ในการค้นหามหาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบ ที่อาจนำไปประยุกต์ใช้กับโรคหรืออาการทางการแพทย์อื่นที่น่าสนใจต่อไปในอนาคต



## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

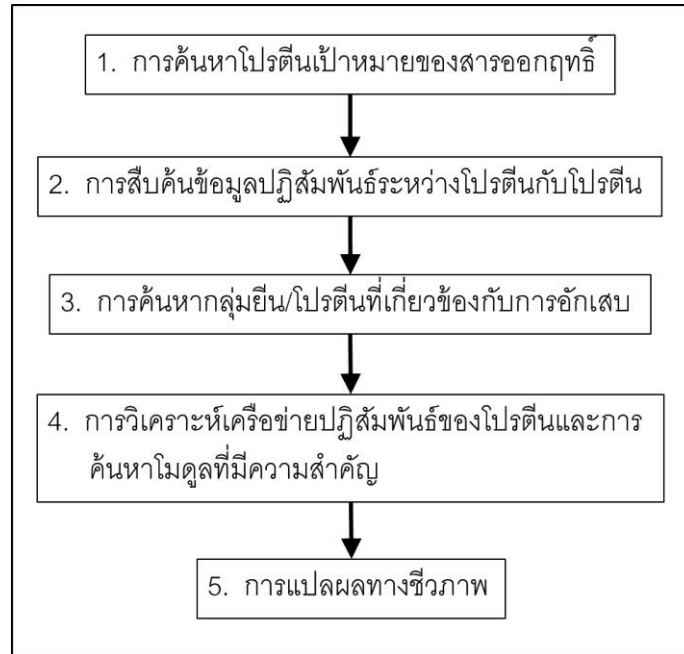
##### 3.1.1 เครื่องมือและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ

1. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal Computer)
  - a. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal Computer)  
Processor: Intel(R) Core™ i5-4200U CPU @ 1.60GHz 1.60GHz  
Installed RAM: 4.00 GB  
System type: 64-bit Operating System, x64-based processor
  - b. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล  
Processor: Intel® Core™ i5-7200U CPU @ 2.50Ghz 2.71GHz  
Installed RAM: 4.00 GB  
System type: 64-bit Operating System, x64-based processor
2. โปรแกรม Cytoscape version 3.6.1 (Shannon, et al., 2003) เป็นแพลตฟอร์มที่ใช้สำหรับงานด้านชีวสารสนเทศในการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระดับโมเลกุล เพื่อศึกษาพฤติกรรมรวมถึงรูปแบบของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนหรือยีนที่สนใจ โดยสามารถดาวน์โหลดโปรแกรมที่เว็บไซต์ (<http://www.cytoscape.org/>)
3. โปรแกรมไมโครซอฟท์เอกซ์เซล (Microsoft Excel) version 14.0.4760.1000(64-bit) (©2010 Microsoft Corporation)
4. โปรแกรม Notepad++ version 6.9.2 (<http://notepad-plus-plus.org/>)
5. ฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) (Davies, et al., 2015)
6. ฐานข้อมูลสาธารณะ STITCH version 5.0 (<http://stitch.embl.de/>) (Szklarczyk, et al., 2016)
7. ฐานข้อมูลสาธารณะ STRING version 10.5 (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk, et al., 2017)
8. ฐานข้อมูลสาธารณะ DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>) (Piñero, et al., 2015)
9. ฐานข้อมูลสาธารณะ OMIM (<http://www.omim.org/>) (McKusick, 2007)
10. ฐานข้อมูลสาธารณะ UniProt (<http://www.uniprot.org/>) (Apweiler et al., 2004)
11. ฐานข้อมูลสาธารณะ David version 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Jiao, et al., 2012)
12. ฐานข้อมูลสาธารณะ GeneCard (<https://www.genecards.org/>) (Stelzer, et al., 2016)
13. ฐานข้อมูลสาธารณะ Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases (<https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search/list>)
14. โปรแกรม MCODE version 1.5.1 (Bader & Hogue, 2003) เป็นปลั๊กอินของ Cytoscape ที่ใช้สำหรับการจัดกลุ่มเครือข่าย การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์และความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเชิงซ้อน โดยสามารถติดตั้งโปรแกรมปลั๊กอิน MCODE version 1.4.2 โดยดาวน์โหลดผ่านโปรแกรม Cytoscape หรือดาวน์โหลดปลั๊กอินได้ที่เว็บไซต์ (<http://apps.cytoscape.org/apps/mcode>)

15. โปรแกรม BiNGO version 3.0.3 (Maere, Heymans, & Kuiper, 2005) เป็นปลั๊กอินของ Cytoscape ที่ใช้สำหรับการค้นหาความสัมพันธ์และหน้าที่ของกลุ่มยีนด้วยยีนออนโทโลยี (Gene Ontology, GO) โดยสามารถติดตั้งปลั๊กอิน BiNGO version 3.0.3 โดยดาวน์โหลดผ่านโปรแกรม Cytoscape หรือดาวน์โหลดปลั๊กอินได้ที่เว็บไซต์ (<http://apps.cytoscape.org/apps/bingo>)
16. โปรแกรม VENNY version 2.1 (Oliveros, 2007) เป็นโปรแกรมที่ใช้เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างชุดข้อมูล ซึ่งสามารถใช้งานได้ที่เว็บไซต์(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)

### 3.2 วิธีการทดลอง

การตรวจสอบกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกโมดูลเพื่อศึกษา กลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก จะเริ่มการศึกษาโดยอาศัยข้อมูล สารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพร ชลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less (Suriyaphan, 2014) และพืชสมุนไพรชนิดอื่น (Andarwulan, et al., 2012) ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงข้อมูลเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ที่เป็น ส่วนประกอบ และนำมาใช้ในการค้นหาโปรตีนที่เป็นเป้าหมายและมีความสัมพันธ์ของการออกฤทธิ์ของสารที่ เป็นส่วนประกอบ โดยอาศัยกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่ประกอบไปด้วยขั้นตอนดังนี้ คือ (1) การค้นหา โปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์โดยใช้ฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) (2) การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk, et al. 2017) (3) การค้นหาข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ตรวจสอบได้จากฐานข้อมูล สาธารณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้แก่ ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler et al., 2004) (4) การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการ ค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์เครือข่าย Cytoscape (Shannon, et al., 2003) พร้อม ด้วยโปรแกรมปลั๊กอินที่ใช้ในการค้นหาโมดูล เช่น MCODE (Bader and Hogue, 2003) เป็นต้น โดยวิเคราะห์ เครือข่ายและค้นหาโมดูลร่วมกับข้อมูลยีนการอักเสบ และ (5) การแปลผลทางชีวภาพโดยใช้ข้อมูลของยีน สมาชิกภายในโมดูลที่ถูกคัดเลือกด้วยโปรแกรมปลั๊กอิน BiNGO (Maere, et al., 2005) และนำข้อมูลการแปล ผลทางชีวภาพที่ได้ มาทำการจัดกลุ่มเพื่อค้นหาความเชื่อมโยงระหว่างกลุ่มยีนสมาชิกภายในโมดูลเพื่อนำไปใช้ ในการแปลผลเปรียบเทียบของกลไกการตอบสนองในระดับโมเลกุล กับผลการตอบสนองการอักเสบในระดับ สรีรวิทยา โดยภาพรวมของการวิจัย แสดงดัง รูปที่ 3-1 และรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนมีดังต่อไปนี้



ภาพที่ 3-1 ภาพรวมของกระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อช่วยในการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรในภาคตะวันออก

### 3.2.1 การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์

จากการรวบรวมข้อมูลของบทความวิจัยของส่วนประกอบสารออกฤทธิ์และการประยุกต์ใช้ของพืชสมุนไพร *Pluchea indica* (L.) Less โดย Suriyaphan (2014) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรและเป็นพืชท้องถิ่นที่สำคัญของภาคตะวันออก ที่นิยมนำมาใช้รับประทาน และยังสามารถนำไปมาผึ่งให้แห้งและต้มกับน้ำดื่มหรือชงแทนชา ซึ่งในส่วนของใบช่่วยังอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สำคัญ ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลของสารออกฤทธิ์จากใบช่่วย ได้แก่  $\beta$ -carotene, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol, myricetin, luteolin, apigenin, anthocyanins และ carotenoids เป็นต้น รวมถึงข้อมูลจากผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบในพืชสมุนไพรจำนวนทั้งสิ้น 24 ชนิด ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศอินโดนีเซีย ที่มีชนิดและสายพันธุ์เช่นเดียวกันกับที่พบในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย (Andarwulan, et al., 2012) ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงเพิ่มเติมสำหรับการศึกษาเปรียบเทียบกับพืชสมุนไพรชนิดอื่น และอาจจะพัฒนารูปแบบของการใช้ข้อมูลของปริมาณสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบต่อไปในอนาคต จากข้อมูลสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของใบช่่วย จะนำมาสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและสารโมเลกุลขนาดเล็ก ที่มีการเก็บรวบรวมข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารโมเลกุลขนาดเล็กไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะออนไลน์ ตัวอย่างเช่น ChEMBL (Davies, et al., 2015) เป็นฐานข้อมูลที่มีขนาดใหญ่ซึ่งได้มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อรองรับการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นหายาชนิดใหม่ (drug discovery) และงานเคมีทางการแพทย์ (medicinal chemistry) นอกจากนี้ยังสามารถค้นหาข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและสารออกฤทธิ์ได้จากฐานข้อมูล STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) ที่มีการปรับปรุงข้อมูลล่าสุดเป็นเวอร์ชัน 5.0 เมื่อได้ข้อมูลของโปรตีนเป้าหมายแล้วก็จะนำมาทำการตรวจสอบโปรตีนเหล่านั้นอีกครั้งหนึ่งก่อนที่จะนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้เป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่เราสนใจ เพื่อนำไปสืบค้นในขั้นตอนต่อไป

### 3.2.2 การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

จากข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์ข้างต้น จะนำมาใช้ในการค้นหาข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน โดยการใช้ข้อมูลรายชื่อ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และข้อมูลเชิงโครงสร้าง มาใช้ในการสืบค้น ข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ STRING (Szklarczyk, et al. 2017) เนื่องจากกระบวนการระดับเซลล์ และชีววิทยาเชิงระบบส่วนมากเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ร่วมกันซึ่งเกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน อย่างไรก็ตามข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่รู้จักกันอยู่แล้วกับที่ถูกทำนายขึ้นมามีการเก็บรวบรวมอย่างกระจัดกระจายในหลายแหล่งฐานข้อมูล ซึ่งมีความแตกต่างกันในมาตรฐานและรูปแบบของการจัดเก็บ ฐานข้อมูลสาธารณะ STRING จึงได้ทำการรวบรวมและผสมผสานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนเหล่านี้เข้าด้วยกัน อันประกอบไปด้วยปฏิสัมพันธ์ทางตรง (direct or physical interaction) และปฏิสัมพันธ์โดยอ้อม (indirect or functional interaction) โดยในเวอร์ชันล่าสุดของ STRING คือเวอร์ชัน 10.0 ที่ประกอบได้ด้วยข้อมูลจากสิ่งมีชีวิตมากกว่า 2,000 ชนิด ที่มีการแสดงความเชื่อมโยงของข้อมูลและการจัดกลุ่มโปรตีนออร์โธโลยี (orthology) ระหว่างสิ่งมีชีวิต ดังนั้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่ได้จากฐานข้อมูล STRING ก็จะทำให้เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนกับสารออกฤทธิ์มีความครบถ้วนและสมบูรณ์เพิ่มมากขึ้น

### 3.2.3 การค้นหากลุ่มยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

ในการค้นหากลุ่มยีน/โปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จะอาศัยการสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะของยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค จำนวนอย่างน้อย 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler et al., 2004) ซึ่งในแต่ละฐานข้อมูลจะมีวิธีการเก็บรวบรวมและวิธีการได้มาซึ่งข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างยีน/โปรตีนและคำสำคัญของโรคที่เกี่ยวข้องแตกต่างกันไป ดังนั้นจากการสืบค้นกลุ่มยีน/โปรตีน โดยการใช้ใช้คำสำคัญ (keyword) ว่า “inflammation” ในแต่ละฐานข้อมูล ก็จะทำให้ได้ชุดข้อมูลของกลุ่มยีน/โปรตีน ออกมาจากแต่ละฐานข้อมูลที่มีทั้งเหมือนและแตกต่างกัน โดยจะทำการคัดเลือกกลุ่มยีน/โปรตีน ที่มีความเหมือนหรือสามารถสืบค้นได้ตั้งแต่สองฐานข้อมูลขึ้นไป นำมาใช้เป็นกลุ่มยีน/โปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory genes/proteins) เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์กับข้อมูลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติต่อไป

### 3.2.4 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญ

จากข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์ และข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน จะถูกนำมาประมวลผลกันและนำไปแสดงผลและวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) ที่จะทำการผสมผสานข้อมูลของโปรตีนหรือโหนด (node) และข้อมูลปฏิสัมพันธ์หรือเอดจ์ (edge) ที่เป็นส่วนประกอบในเครือข่ายทั้งหมดมาใช้เป็นส่วนร่วมของการวิเคราะห์เครือข่าย ตัวอย่างเช่น ข้อมูลกลุ่มยีน/โปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ข้อมูลของระดับค่าการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน เป็นต้น ซึ่งจะนำมาทำการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์โดยอาศัยเครื่องมือพื้นฐานของโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) พร้อมด้วยการใช้โปรแกรมปลั๊กอินที่มีลักษณะการทำงานเฉพาะด้าน เช่น โปรแกรมที่ใช้ในการค้นหาเครือข่ายย่อยหรือโมดูลที่มีความสำคัญจากโครงสร้างของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ เช่น โปรแกรม MCODE (Bader and Hogue, 2003) ที่จะทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยหรือโมดูลที่มีการเชื่อมต่อกันอย่างหนาแน่น ที่ถือว่าเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน มีหน้าที่และการทำงานร่วมกัน

รวมทั้งอาจเป็นสารชีวโมเลกุลเชิงซ้อน (biomolecular complexes) ที่สำคัญในระบบทางชีวภาพ เพื่อนำโมดูลที่ถูกคัดเลือกนำมาแปลผลทางชีวภาพต่อไป

### 3.2.5 การแปลผลทางชีวภาพ

จากโมดูลที่ถูกคัดเลือกจะนำมาทำการแปลผลทางชีวภาพ โดยใช้โปรแกรม BiNGO (Biological Networks Gene Ontology) (Maere, et al., 2005) ซึ่งเป็นโปรแกรมปลั๊กอินของโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) ในการวิเคราะห์ข้อมูลฟังก์ชันทางชีวภาพของยีนสมาชิกในแต่ละโมดูล โดยผลที่ได้จะเป็นรายชื่อของฟังก์ชันยีนออนโทโลยี (GO, Gene Ontology) ที่น่าจะเป็นฟังก์ชันหลักของกลุ่มยีนเหล่านั้น ซึ่งจะมีการแสดงผล GO ที่ผ่านค่าความน่าเชื่อถือในระดับที่ผู้วิจัยสามารถปรับแต่งค่าได้ แต่ก็จะทำให้ได้จำนวนของ GO ในแต่ละโมดูลมีผลออกมาเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการแปลผลฟังก์ชันยีนออนโทโลยีของยีนสมาชิกในโมดูลในบางครั้งจึงเป็นเรื่องที่ยาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมามีวิธีการที่จะทำการจัดกลุ่มฟังก์ชันที่ได้เหล่านี้ เพื่อหาความสัมพันธ์ของโมดูลผ่านฟังก์ชันยีนออนโทโลยี ซึ่งจะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะทำการพัฒนาในโครงการวิจัยนี้ เพื่อให้ได้ผลของฟังก์ชันจากแต่ละโมดูลที่พร้อมจะนำมาใช้ในการอธิบายกลไกระดับโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับสรีรวิทยา ของการยับยั้งการอักเสบของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สนใจศึกษา ซึ่งในที่นี้จะป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์จากตัวอย่างพืชสมุนไพรท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ชลู่ (Pluchea indica (L.) Less (Suriyaphan, 2014) เพื่อค้นหาค้นหาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากใบชลู่ที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบ และเพื่อนำมาเป็นต้นแบบของการพัฒนากระบวนการทางชีวสารสนเทศที่สามารถนำไปใช้ในการค้นหาค้นหาบทบาทของสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบ หรืออาการทางการแพทย์อื่นที่น่าสนใจต่อไปในอนาคต

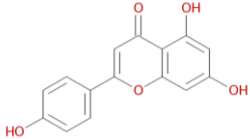
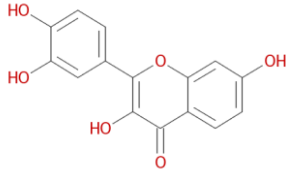
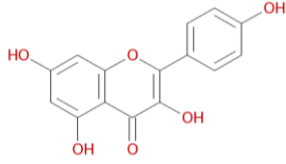
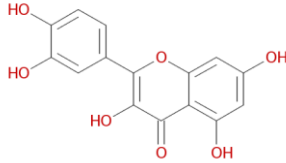
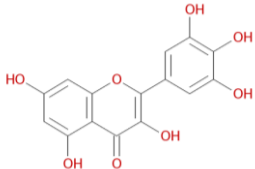
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

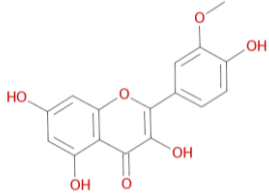
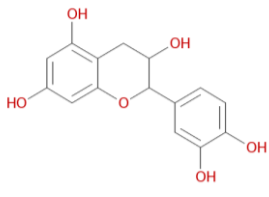
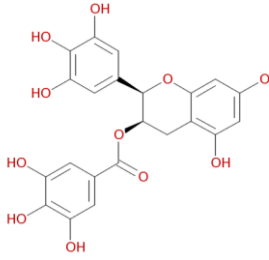
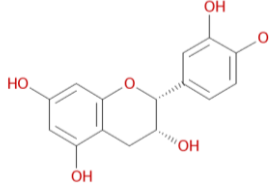
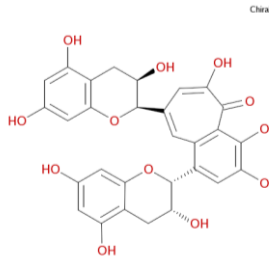
#### 4.1 การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์

การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์จะนำข้อมูลสารแต่ละชนิดที่พบในพืชกลุ่มชาใบชาและหัวหอมจำนวนทั้งสิ้น 10 ชนิด ได้แก่ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin เพื่อนำมาใช้ในการหากลไกการยับยั้งการอักเสบ ซึ่งจะอาศัยข้อมูลโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในมนุษย์ที่ได้จากการดาวน์โหลดข้อมูลภายใต้ฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (Davies, et al., 2015) และฐานข้อมูลสาธารณะ STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) โดยมีรายละเอียดของข้อมูลสารออกฤทธิ์ และจำนวนโปรตีนเป้าหมายที่ค้นพบเพื่อนำไปค้นหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน จากฐานข้อมูลสาธารณะ STRING (Szklarczyk, et al., 2017) แสดงดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์จากการสืบค้นด้วยฐานข้อมูล ChEMBL, STITCH และ STRING

กลุ่มสาร	สาร	จำนวนโปรตีนเป้าหมายที่ค้นพบจากฐานข้อมูล ChEMBL และ STITCH	จำนวนโปรตีนเป้าหมายที่สืบค้นในฐานข้อมูล STRING
Flavones	Apigenin 	196	193
Favonols	Fisetin 	69	69
	Kaempferol 	90	90
	Quercetin 	164	159
	Myricetin 	95	95

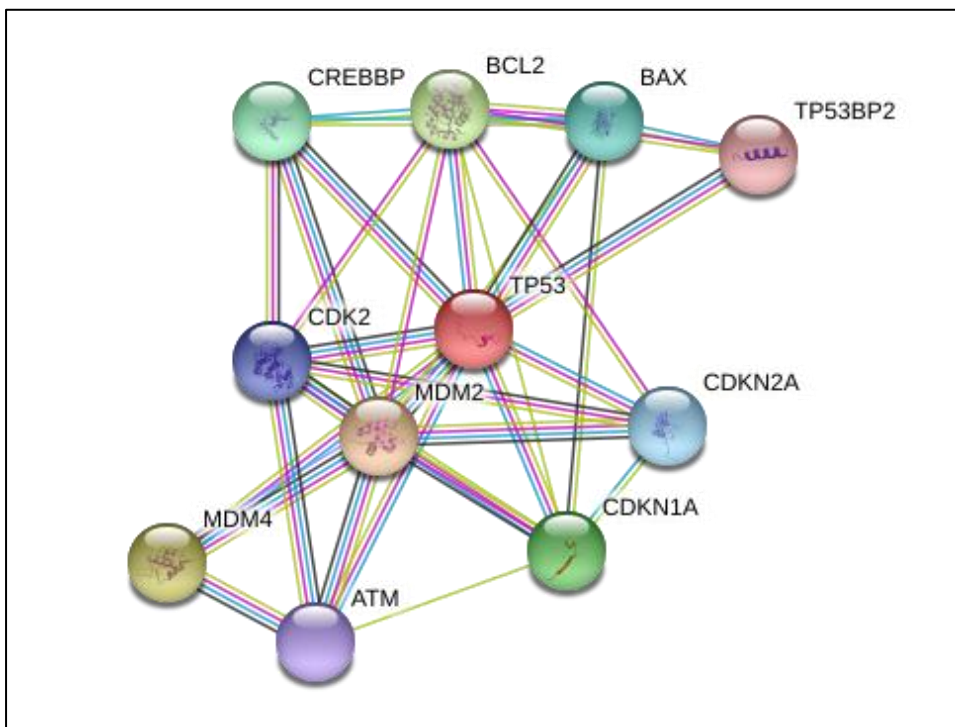
ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

กลุ่มสาร	สาร	จำนวนโปรตีนเป้าหมายที่ ค้นพบจากฐานข้อมูล ChEMBL และ STITCH	จำนวนโปรตีนเป้าหมายที่ สืบค้นในฐานข้อมูล STRING
Favonols	Isorhamnetin 	23	23
Flavanols	Catechin 	47	44
	Epigallocatechin gallate 	56	56
	Epicatechin 	42	42
	Theaflavin 	11	11



## 4.2 การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

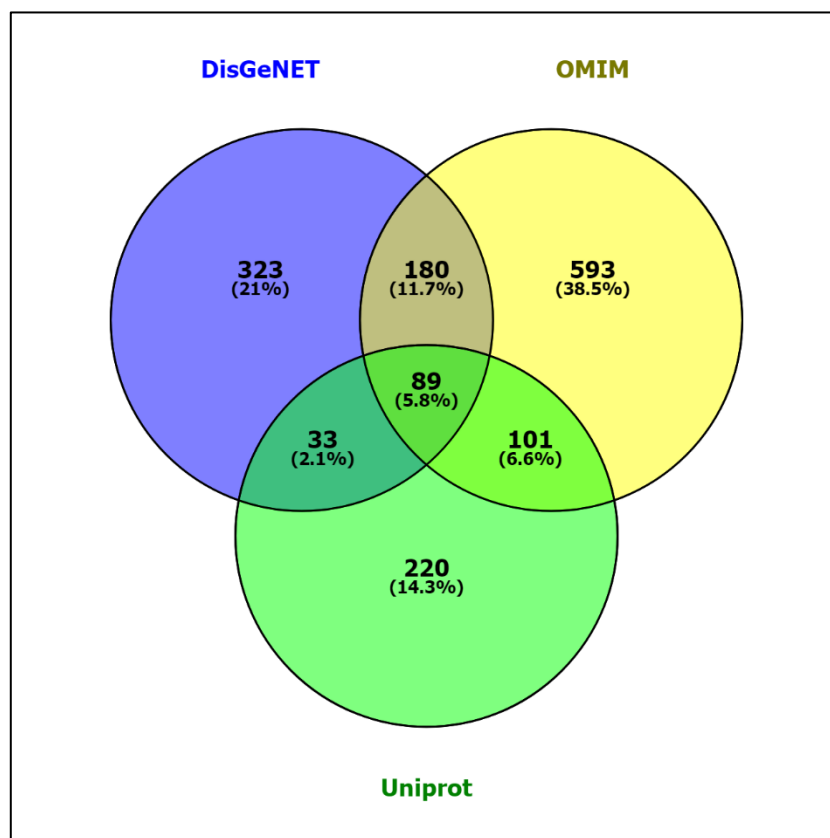
จากข้อมูลโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิดที่พบในสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ ทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin จะถูกนำมาสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของมนุษย์ (Homo sapiens) ภายใต้ฐานข้อมูลสาธารณะ STRING (Szklarczyk, et al., 2017) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและครอบคลุมสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก โดยตัวอย่างผลที่ได้จากการสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของโปรตีน TP53 จะแสดงดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างผลที่ได้จากการสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของโปรตีน TP53

### 4.3 การค้นหากลุ่มยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

การสืบค้นข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่พบในมนุษย์จะอาศัยการสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะของยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ DisGeNET (Piñero et al., 2015), OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler, et al., 2004) แล้วเปรียบเทียบหาโปรตีนการอักเสบที่มีร่วมกันด้วยโปรแกรม VENNY (Oliveros, 2007) จะได้ผลปรากฏดังภาพที่ 4-2 ซึ่งจะพบโปรตีนที่มีร่วมกันทั้ง 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ DisGeNET, OMIM และ UniProt มีจำนวน 89 ชนิด โปรตีนที่มีร่วมกันใน 2 ฐานข้อมูล ได้แก่ DisGeNET และ OMIM จำนวน 180 ชนิด, DisGeNET และ UniProt จำนวน 33 ชนิด, OMIM และ UniProt จำนวน 101 ชนิด โดยในงานวิจัยนี้จะคัดเลือกรายชื่อโปรตีนที่มีความเหมือนกันตั้งแต่สองฐานข้อมูลขึ้นไปซึ่งมีจำนวน 403 ชนิด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชกลุ่มชาใบชู่และหัวหอม ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งแสดงรายละเอียดข้อมูลโปรตีนการอักเสบดังตารางที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่มีร่วมกันที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VENNY

ตารางที่ 4-2 รายละเอียดโปรตีนการอักเสบทั้ง 403 ชนิด

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
A4GNT	Alpha-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase	A4GNT
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1	P08183
ABCB4	ATP binding cassette subfamily B member 4	P21439
ABCC6	ATP binding cassette subfamily C member 6	O95255
ACKR1	Atypical chemokine receptor 1 (Duffy blood group)	Q16570
ACKR2	Atypical chemokine receptor 2	O00590
ACP5	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	P13686
ADA	Adenosine deaminase	P00813
ADCYAP1	Adenylate cyclase activating polypeptide 1	P18509
ADGRE2	Adhesion G protein-coupled receptor E2	Q9UHX3
ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	P00326
ADIPOQ	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Q15848
ADIPOR1	Adiponectin receptor 1	Q96A54
ADIPOR2	Adiponectin receptor 2	Q86V24
ADRB2	Adrenoceptor beta 2	P07550
AGER	Advanced glycosylation end-product specific receptor	Q15109
AGT	Angiotensinogen	P01019
AHR	Aryl hydrocarbon receptor	P35869
AIM2	Interferon-inducible protein AIM2	O14862
AIMP1	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	Q12904
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	P31749
ALOX5AP	Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	P20292
ANG	Angiogenin	P03950
ANGPT1	Angiopoietin 1	Q15389
ANGPT2	Angiopoietin 2	O15123
ANXA1	Annexin A1	P04083
APOE	Apolipoprotein E	P02649
APP	Amyloid beta precursor protein	P05067
ARG1	Arginase 1	P05089
ATG16L1	Autophagy-related protein 16-1	Q676U5
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein	P41182
BDKRB1	Bradykinin receptor B1	P46663
BDKRB2	Bradykinin receptor B2	P30411
BDNF	Brain derived neurotrophic factor	P23560

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
BSG	Basigin (Ok blood group)	P35613
BUD23	Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	O43709
C1QBP	Complement C1q binding protein	Q07021
C2CD4A	C2 calcium-dependent domain-containing protein 4A	Q8NCU7
C2CD4B	C2 calcium-dependent domain-containing protein 4B	A6NLJ0
C2CD4C	C2 calcium-dependent domain-containing protein 4C	Q8TF44
C3	Complement C3	P01024
C4A	Complement C4A (Rodgers blood group)	P0C0L4;P0C0L5
C4B	Complement C4B (Chido blood group)	P0C0L4;P0C0L5
C5	Complement C5	P01031
C5AR1	Complement C5a receptor 1	P21730
CACNA1C	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C	Q13936
CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	P49913
CARD17	Caspase recruitment domain family member 17	Q5XLA6
CASP1	Caspase 1	P29466
CASP4	Caspase-4	P49662
CCL11	C-C motif chemokine ligand 11	P51671
CCL13	C-C motif chemokine ligand 13	Q99616
CCL18	C-C motif chemokine ligand 18	P55774
CCL19	C-C motif chemokine ligand 19	Q99731
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	P13500
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	P78556
CCL21	C-C motif chemokine ligand 21	O00585
CCL25	C-C motif chemokine 25	O15444
CCL26	C-C motif chemokine ligand 26	Q9Y258
CCL3	C-C motif chemokine ligand 3	P10147
CCL4	C-C motif chemokine ligand 4	P13236;Q8NHW4
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	P13501
CCL7	C-C motif chemokine 7	P80098
CCL8	C-C motif chemokine ligand 8	P80075
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2	P41597
CCR3	C-C motif chemokine receptor 3	P51677
CCR6	C-C motif chemokine receptor 6	P51684
CCR8	C-C motif chemokine receptor 8	P51685
CD14	CD14 molecule	P08571

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
CD163	CD163 molecule	Q86VB7
CD200R1	CD200 receptor 1	Q8TD46
CD40	CD40 molecule	P25942
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	P16070
CD55	CD antigen CD55	P08174
CD99	CD99 molecule	P14209
CFH	Complement factor H	P08603
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	P13569
CHI3L1	Chitinase 3 like 1	P36222
CHIA	Acidic mammalian chitinase	Q9BZP6
CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	O15111
CLEC12A	C-type lectin domain family 12 member A	Q5QGZ9
CLEC5A	C-type lectin domain family 5 member A	Q9NY25
CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A	Q9BXN2
CLU	Clusterin	P10909
CNR1	Cannabinoid receptor 1	P21554
CNR2	Cannabinoid receptor 2	P34972
CPB2	Carboxypeptidase B2	Q96IY4
CRH	Corticotropin releasing hormone	P06850
CRHR1	Corticotropin releasing hormone receptor 1	P34998
CRP	C-reactive protein	P02741
CRYAB	Crystallin alpha B	P02511
CSF1	Colony stimulating factor 1	P09603
CSF2	Colony stimulating factor 2	P04141
CST9	Cystatin-9	Q5W186
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	P16410
CTNNB1	Catenin beta 1	P35222
CTRC	Chymotrypsin-C	Q99895
CTSG	Cathepsin G	P08311
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	P78423
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	P49238
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	P09341
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	P02778
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	O14625
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12	P48061

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
CXCL13	C-X-C motif chemokine 13	O43927
CXCL14	C-X-C motif chemokine ligand 14	O95715
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	P19875
CXCR1	C-X-C motif chemokine receptor 1	P25024
CXCR2	C-X-C motif chemokine receptor 2	P25025
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3	P49682
CXORF40A	Chromosome X open reading frame 40A	Q8TE69
CYP7B1	Cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1	O75881
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61	O00622
DEFB114	Beta-defensin 114	Q30KQ6
DEFB4A	Defensin beta 4A	O15263
DNASE1	Deoxyribonuclease-1	P24855
EDN1	Endothelin 1	P05305
EGFR	Epidermal growth factor receptor	P00533
ELANE	Elastase, neutrophil expressed	P08246
ELF3	E74 like ETS transcription factor 3	P78545
EP300	Histone acetyltransferase p300	Q09472
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule	P16422
EPO	Erythropoietin	P01588
EREG	Proepiregulin [Cleaved into: Epiregulin (EPR)]	O14944
F2	Coagulation factor II, thrombin	P00734
F2R	Coagulation factor II thrombin receptor	P25116
F2RL1	F2R like trypsin receptor 1	P55085
F3	Coagulation factor III, tissue factor	P13726
F5	Coagulation factor V	P12259
FAM213A	Redox-regulatory protein FAM213A	Q9BRX8
FAS	Fas cell surface death receptor	P25445
FASLG	Fas ligand	P48023
FCGR2A	Fc fragment of IgG receptor IIa	P12318
FCGR3A	Fc fragment of IgG receptor IIIa	P08637
FFAR2	Free fatty acid receptor 2	O15552
FFAR4	Free fatty acid receptor 4	Q5NUL3
FLG	Filaggrin	P20930
FLNC	Filamin-C	Q14315
FLT1	Fms related tyrosine kinase 1	P17948

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
FOXJ1	Forkhead box protein J1	Q92949
FOXP3	Forkhead box P3	Q9BZS1
FPR1	Formyl peptide receptor 1	P21462
FPR2	Formyl peptide receptor 2	P25090
GAL	Galanin and GMAP prepropeptide	P22466
GC	GC, vitamin D binding protein	P02774
GHRL	Ghrelin and obestatin prepropeptide	Q9UBU3
GNE	Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase	Q9Y223
GRN	Granulin precursor	P28799
GSTM1	Glutathione S-transferase mu 1	P09488
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	P09211
HAMP	Hepcidin antimicrobial peptide	P81172
HBB	Hemoglobin subunit beta	P68871
HFE	Hemochromatosis	Q30201
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	Q16665
HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	P01889; P03989; P10319
HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	P04222; P10321; P30499
HLA-DQA1	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	P01909
HLA-DQB1	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	P01920
HLA-DRB1	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	P01911; P01912; P04229
HLA-DRB3	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	P79483
HLA-DRB4	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	P13762
HMGB1	High mobility group box 1	P09429
HMOX1	Heme oxygenase 1	P09601
HNF1A	HNF1 homeobox A	P20823
HP	Haptoglobin	P00738
HPGD	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	P15428
HRH1	Histamine receptor H1	P35367
HSPA1A	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	P0DMV8;P0DMV9
HSPA1B	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B	P0DMV8;P0DMV9
HTR1A	5-hydroxytryptamine receptor 1A	P08908

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	P14902
IFNG	Interferon gamma	P01579
IFRD1	Interferon related developmental regulator 1	O00458
IGF1	Insulin like growth factor 1	P05019
IKBKB	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	O14920
IKBKE	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon	Q14164A
IKBKG	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma	Q9Y6K9
IL10	Interleukin 10	P22301
IL10RA	Interleukin 10 receptor subunit alpha	Q13651
IL10RB	Interleukin 10 receptor subunit beta	Q08334
IL12A	Interleukin 12A	P29459
IL12B	Interleukin 12B	P29460
IL13	Interleukin 13	P35225
IL15	Interleukin 15	P40933
IL16	Interleukin 16	Q14005
IL17A	Interleukin 17A	Q16552
IL17F	Interleukin 17F	Q96PD4
IL18	Interleukin 18	Q14116
IL1A	Interleukin 1 alpha	P01583
IL1B	Interleukin 1 beta	P01584
IL1R1	Interleukin 1 receptor type 1	P14778
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	Q9NPH3
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	P18510
IL2	Interleukin 2	P60568
IL22	Interleukin 22	Q9GZX6
IL23A	Interleukin 23 subunit alpha	Q9NPF7
IL23R	Interleukin-23 receptor	Q5VWK5
IL25	Interleukin 25	Q9H293
IL27	Interleukin 27	Q8NEV9
IL2RA	Interleukin 2 receptor subunit alpha	P01589
IL2RB	Interleukin 2 receptor subunit beta	P14784
IL32	Interleukin 32	P24001
IL33	Interleukin 33	O95760



ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
IL36A	Interleukin 36, alpha	Q9UHA7
IL36B	Interleukin-36 beta	Q9NZH7
IL36G	Interleukin-36 gamma	Q9NZH8
IL36RN	Interleukin-36 receptor antagonist protein	Q9UBH0
IL4	Interleukin 4	P05112
IL4R	Interleukin 4 receptor	P24394
IL5	Interleukin 5	P05113
IL6	Interleukin 6	P05231
IL6R	Interleukin 6 receptor	P08887
IL8	Interleukin-8	P10145
IL9	Interleukin 9	P15248
IRF1	Interferon regulatory factor 1	P10914
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein	A1A4Y4
IRS1	Insulin receptor substrate 1	P35568
ITCH	E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	Q96J02
ITGA1	Integrin subunit alpha 1	P56199
ITGB1	Integrin subunit beta 1	P05556
ITGB2	Integrin beta-2	P05107
KLF2	Kruppel like factor 2	Q9Y5W3
KNG1	Kininogen 1	P01042
KSR2	Kinase suppressor of Ras 2	Q6VAB6
LCN2	Lipocalin 2	P80188
LEP	Leptin	P41159
LGALS3	Galectin-3	P17931
LIPC	Lipase C, hepatic type	P11150
LIPE	Lipase E, hormone sensitive type	Q05469
LRP1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	Q07954
LST1	Leukocyte specific transcript 1	O00453
LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase	P09960
LTB4R	Leukotriene B4 receptor	Q15722
LTB4R2	Leukotriene B4 receptor 2	Q9NPC1
LTC4S	Leukotriene C4 synthase	Q16873
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	Q16539
MARK2	Serine/threonine-protein kinase MARK2	Q7KZI7
MAZ	MYC associated zinc finger protein	P56270

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
MEFV	MEFV, pyrin innate immunity regulator	O15553
MEP1B	Meprin A subunit beta	Q16820
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	P14174
MMP1	Matrix metalloproteinase 1	P03956
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	P08253
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	P14780
MPO	Myeloperoxidase	P05164
MTHFD1	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolate synthetase 1	P11586
MTOR	Mechanistic target of rapamycin	P42345
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	P15941
MUC5B	Mucin-5B	Q9HC84
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	Q99836
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	P43490
NDFIP1	NEDD4 family-interacting protein 1	Q9BT67
NFE2L2	Nuclear factor, erythroid 2 like 2	Q16236
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	P19838
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	Q00653
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	P25963
NFKBIZ	NF-kappa-B inhibitor zeta	Q9BYH8
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4	Q9NPP4
NLRP1	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1	Q9C000
NLRP10	NLR family pyrin domain containing 10	Q86W26
NLRP12	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12	P59046
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	Q96P20
NLRX1	NLR family member X1	Q86UT6
NOD1	Nucleotide binding oligomerization domain containing 1	Q9Y239
NOD2	Nucleotide binding oligomerization domain containing 2	Q9HC29
NOS2	Nitric oxide synthase 2	P35228
NOS3	Nitric oxide synthase 3	P29474
NOX1	NADPH oxidase 1	Q9Y5S8
NR1H2	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 2	P55055
NR1H3	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3	Q13133
NR1H4	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4	Q96R11

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	P04150
OTULIN	Ubiquitin thioesterase otulin	Q96BN8
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1	P09874
PECAM1	Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1	P16284
PF4	Platelet factor 4	P02776
PGF	Placental growth factor	P49763
PIAS1	Protein inhibitor of activated STAT protein 1	O75925
PIK3CG	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform	P48736
PLA2G2F	Group IIF secretory phospholipase A2	Q9BZM2
PLA2G4A	Phospholipase A2 group IVA	P47712
PLA2G7	Phospholipase A2 group VII	Q13093
PLAA	Phospholipase A2 activating protein	Q9Y263
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	P00749
PLG	Plasminogen	P00747
PNOC	Prepronociceptin	Q13519
POLA1	DNA polymerase alpha catalytic subunit	P09884
PON1	Paraoxonase 1	P27169
PON3	Paraoxonase 3	Q15166
PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	Q07869
PPARD	Peroxisome proliferator activated receptor delta	Q03181
PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	P37231
PRG2	Proteoglycan 2	P13727
PRKAA1	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	Q13131
PRKCD	Protein kinase C delta	Q05655
PROC	Protein C, inactivator of coagulation factors Va and VIIIa	P04070
PROS1	Protein S (alpha)	P07225
PRSS1	Trypsin-1(Serine protease 1)	P07477
PRTN3	Proteinase 3	P24158
PSMA6	Proteasome subunit alpha 6	P60900
PSMB8	Proteasome subunit beta type-8	P28062
PSTPIP1	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	O43586
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	P60484
PTGDR2	Prostaglandin D2 receptor 2	Q9Y5Y4
PTGER2	Prostaglandin E receptor 2	P43116

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
PTGER3	Prostaglandin E receptor 3	P43115
PTGER4	Prostaglandin E receptor 4	P35408
PTGFR	Prostaglandin F receptor	P43088
PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	P23219
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	P35354
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	Q9Y2R2
PYCARD	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	Q9ULZ3
RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1	Q9BYM8
RC3H1	Roquin-1 (RING finger and C3H zinc finger protein 1)	Q5TC82
RC3H2	Roquin-2 (RING-type E3 ubiquitin transferase Roquin-2)	Q9HBD1
REL	REL proto-oncogene, NF-kB subunit	Q04864
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	Q04206
RELB	Transcription factor RelB	Q01201
RETN	Resistin	Q9HD89
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1	Q13546
RIPK3	Receptor interacting serine/threonine kinase 3	Q9Y572
RNF31	E3 ubiquitin-protein ligase RNF31	Q96EP0
RORC	RAR related orphan receptor C	P51449
S100A12	S100 calcium binding protein A12	P80511
S100A8	Protein S100-A8	P05109
S100A9	S100 calcium binding protein A9	P06702
SAMD9	Sterile alpha motif domain-containing protein 9	Q5K651
SCGB1A1	Secretoglobin family 1A member 1	P11684
SCN1A	Sodium channel protein type 1 subunit alpha	P35498
SCNN1A	Sodium channel epithelial 1 alpha subunit	P37088
SELE	Selectin E	P16581
SELENOS	Selenoprotein S	Q9BQE4
SELP	Selectin P	P16109
SELPLG	Selectin P ligand	Q14242
SEMA7A	Semaphorin-7A	O75326
SERPINA1	Serpin family A member 1	P01009
SERPINA3	Serpin family A member 3	P01011
SERPINB3	Serpin family B member 3	P29508
SERPINB4	Serpin family B member 4	P48594
SFTPA1	Pulmonary surfactant-associated protein A1	Q8IWL2

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
SFTPA2	Pulmonary surfactant-associated protein A2	Q8IWL1
SFTPD	Surfactant protein D	P35247
SHARPIN	Sharpin	Q9H0F6
SIGIRR	Single Ig IL-1-related receptor	Q6IA17
SIRT1	Sirtuin 1	Q96EB6
SLC22A5	Solute carrier family 22 member 5	O76082
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1	O15524
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	O14543
SPINK1	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	P00995
SPINK5	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	Q9NQ38
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	P10451
STAP2	Signal-transducing adaptor protein 2	Q9UGK3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	P40763
TAC1	Tachykinin precursor 1	P20366
TBX21	T-box 21	Q9UL17
TFRC	Transferrin receptor	P02786
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	P01137
THBS1	Thrombospondin 1	P07996
TICAM1	TIR domain-containing adapter molecule 1	Q8IUC6
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	P35625
TIRAP	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein	P58753
TLR1	Toll-like receptor 1	Q15399
TLR2	Toll like receptor 2	O60603
TLR3	Toll like receptor 3	O15455
TLR4	Toll like receptor 4	O00206
TLR5	Toll-like receptor 5	O60602
TLR6	Toll like receptor 6	Q9Y2C9
TLR7	Toll like receptor 7	Q9NYK1
TLR8	Toll like receptor 8	Q9NR97
TLR9	Toll like receptor 9	Q9NR96
TMEM173	Transmembrane protein 173	Q86WV6
TMEM79	Transmembrane protein 79 (Mattrin)	Q9BSE2
TNF	Tumor necrosis factor	P01375
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	P21580

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ชื่อโปรตีน	ชื่อเต็มของโปรตีน	Uniprot ID
TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6	P98066
TNFAIP8L2	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2	Q6P589
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b	O00300
TNFRSF1A	TNF receptor superfamily member 1A	P19438
TNFRSF1B	TNF receptor superfamily member 1B	P20333
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9	Q07011
TNFSF10	Tumor necrosis factor superfamily member 10	P50591
TNFSF13	Tumor necrosis factor superfamily member 13	O75888
TNFSF14	Tumor necrosis factor superfamily member 14	O43557
TNFSF15	Tumor necrosis factor superfamily member 15	O95150
TNFSF18	Tumor necrosis factor superfamily member 18	Q9UNG2
TNIP1	TNFAIP3-interacting protein 1	Q15025
TP53	Tumor protein p53	P04637
TRAF1	TNF receptor associated factor 1	Q13077
TREM1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	Q9NP99
TREX1	Three prime repair exonuclease 1	Q9NSU2
TRPA1	Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	O75762
TRPM3	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	Q9HCF6
TRPV1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	Q8NER1
TSC22D3	TSC22 domain family protein 3	Q99576
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin	Q969D9
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	O43914
UCN	Urocortin	P55089
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	P19320
VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	P11473
VEGFB	Vascular endothelial growth factor B	P49765
VNN1	Vanin-1	O95497
ZC3H12A	Endoribonuclease ZC3H12A	Q5D1E8
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	P26651

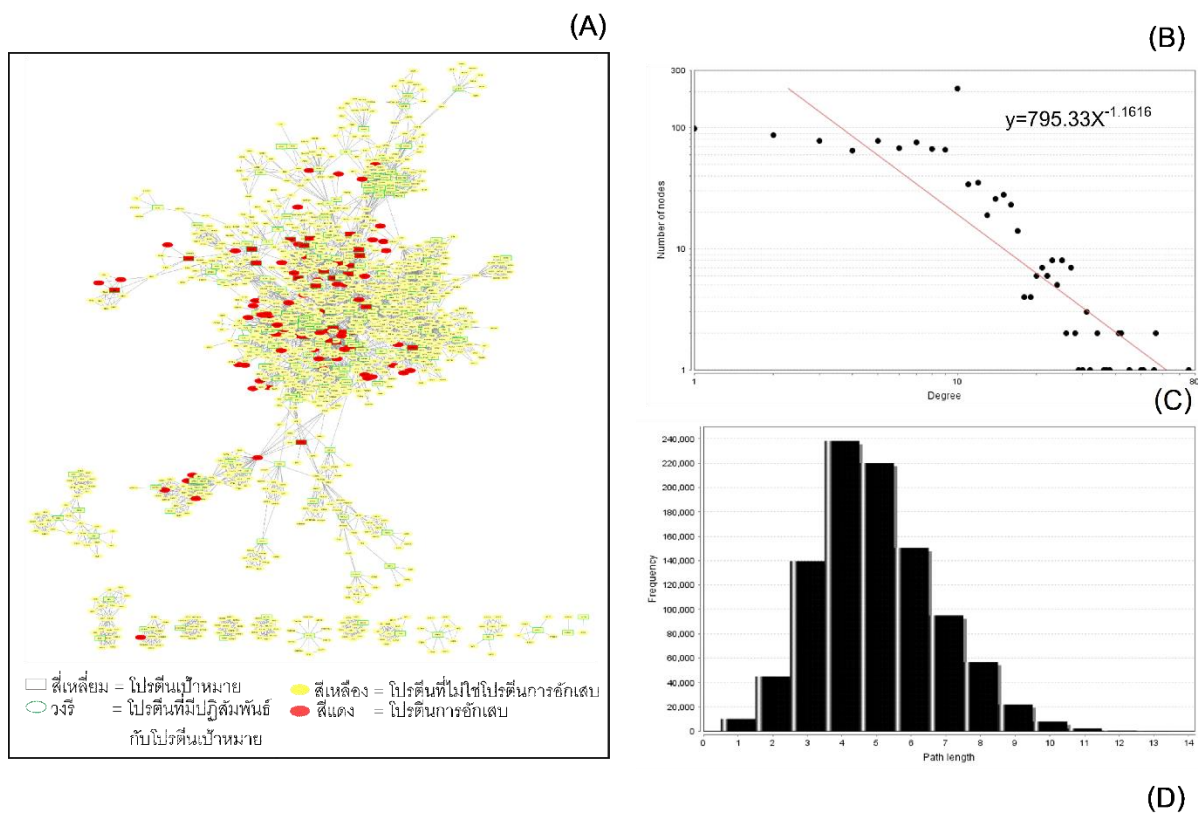
#### 4.4 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญ

จากข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของโปรตีนเป้าหมายในสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดจะนำมาแสดงผลและวิเคราะห์เครือข่ายด้วยโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) แล้วทำการระบุข้อมูลโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย รวมถึงข้อมูลของโปรตีนการอักเสบ ซึ่งจะทำให้ได้เครือข่ายของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin (ภาพที่ 4-3A, 4-4A, 4-5A, 4-6A, 4-7A, 4-8A, 4-9A, 4-10A, 4-11A, 4-12A) รวมถึงขนาดของเครือข่ายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด และโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่ายแสดงดังตารางที่ 4-3 เช่น เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin มีจำนวน 1,153 โปรตีน 5,013 ปฏิสัมพันธ์ และพบโปรตีนการอักเสบทั้งสิ้น 91 ชนิด, เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol มีจำนวน 641 โปรตีน 2,200 ปฏิสัมพันธ์ และพบโปรตีนการอักเสบทั้งสิ้น 47 ชนิด และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin มีจำนวน 1,076 โปรตีน 4,523 ปฏิสัมพันธ์ และพบโปรตีนการอักเสบทั้งสิ้น 97 ชนิด

จากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์จะนำไปทำการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ด้วยปลั๊กอิน Network Analyzer ภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) จะทำให้ได้ผลคุณสมบัติ Topological ที่จะทำให้เข้าใจลักษณะโครงสร้างของเครือข่ายทางชีวภาพของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin ที่แสดงผลกราฟ Degree distribution กราฟ Shortest path length distribution และค่าพารามิเตอร์ของ Topological ซึ่งแสดงรายละเอียดดังภาพที่ 4-3 ถึง 4-12 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-3 ขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่ายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด

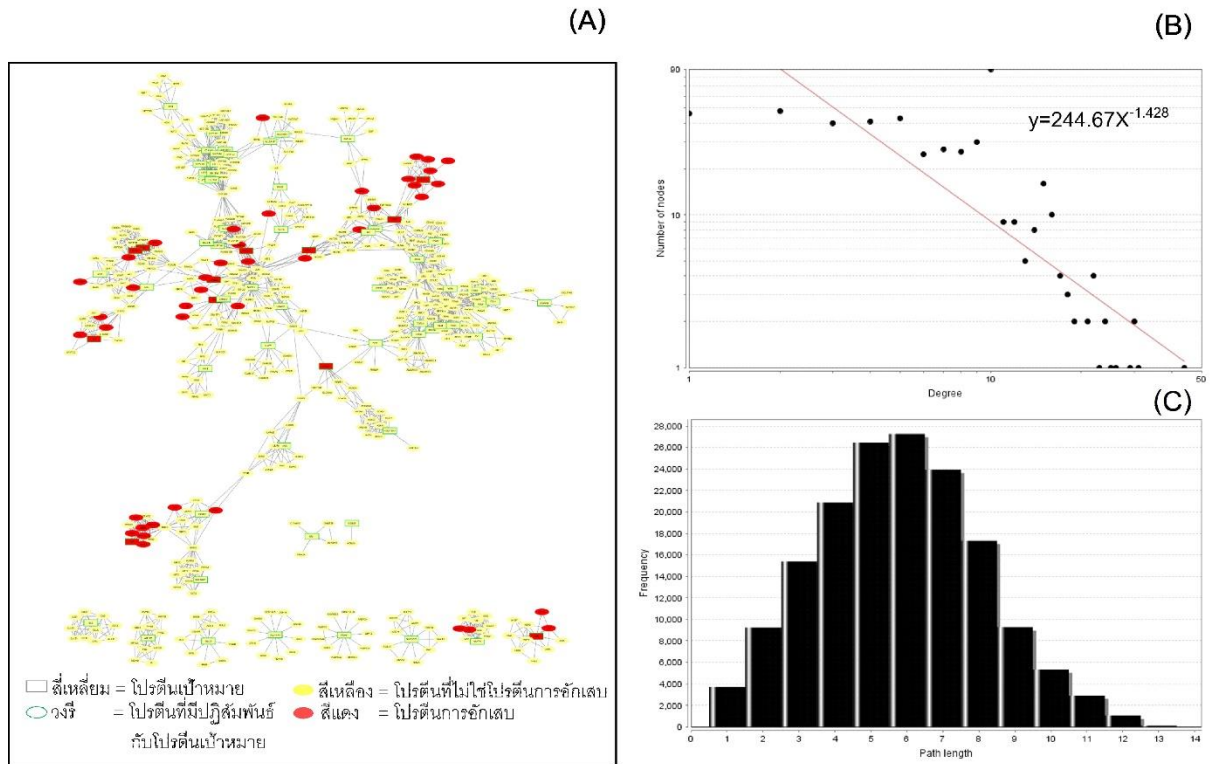
กลุ่มสาร	สาร	ขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน	โปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่าย
Flavones	Apigenin	1153 โปรตีน 5013 ปฏิสัมพันธ์	91
Favonols	Fisetin	498 โปรตีน 1859 ปฏิสัมพันธ์	54
	Kaempferol	641 โปรตีน 2200 ปฏิสัมพันธ์	47
	Quercetin	1076 โปรตีน 4523 ปฏิสัมพันธ์	97
	Myricetin	694 โปรตีน 2613 ปฏิสัมพันธ์	40
	Isorhamnetin	174 โปรตีน 520 ปฏิสัมพันธ์	26
Flavanols	Catechin	323 โปรตีน 1112 ปฏิสัมพันธ์	28
	Epigallocatechin gallate	457 โปรตีน 1594 ปฏิสัมพันธ์	60
	Epicatechin	348 โปรตีน 1195 ปฏิสัมพันธ์	39
	Theaflavin	90 โปรตีน 305 ปฏิสัมพันธ์	18



พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Apigenin	Random Network
Clustering coefficient	0.683	0.007
Connected component	15	1
Network diameter	13	6
Network centralization	0.059	0.009
Shortest path	987524 (74%)	1328246 (100%)
Characteristic path length	4.962	3.501
Network heterogeneity	0.831	0.34

ภาพที่ 4-3 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

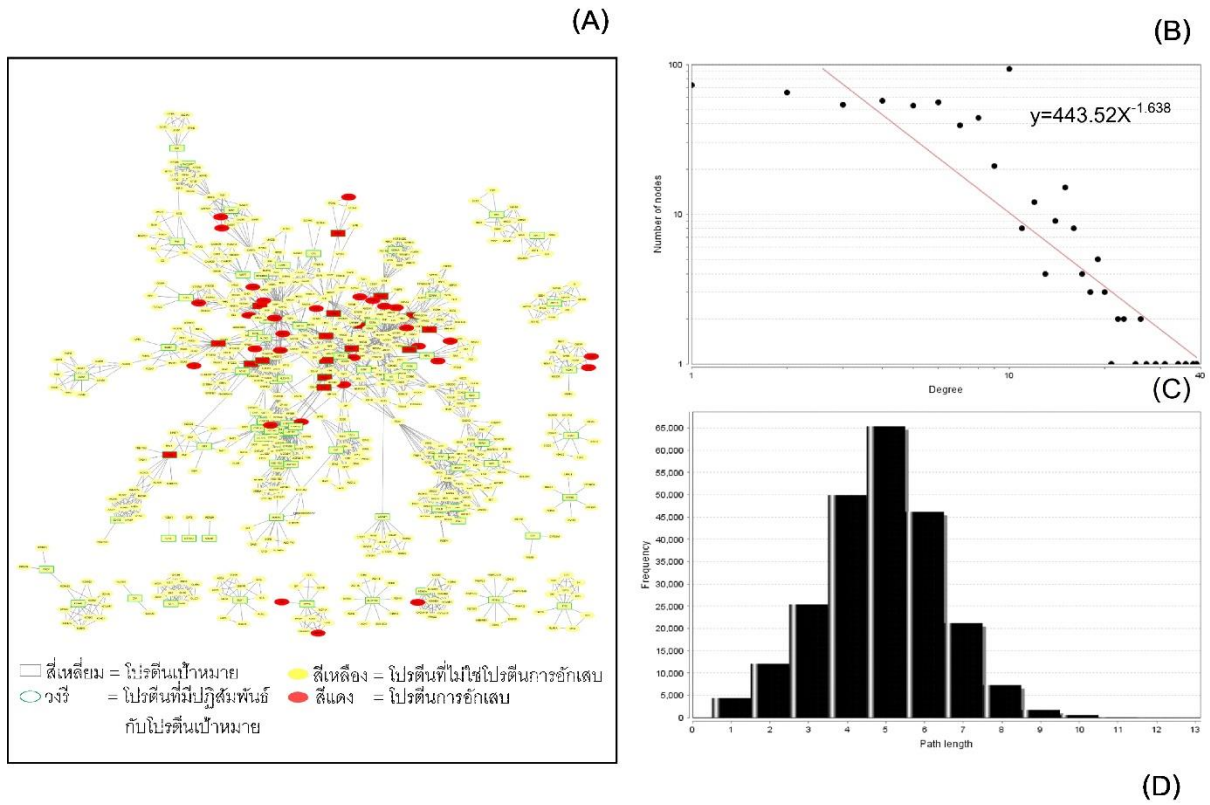




(D)

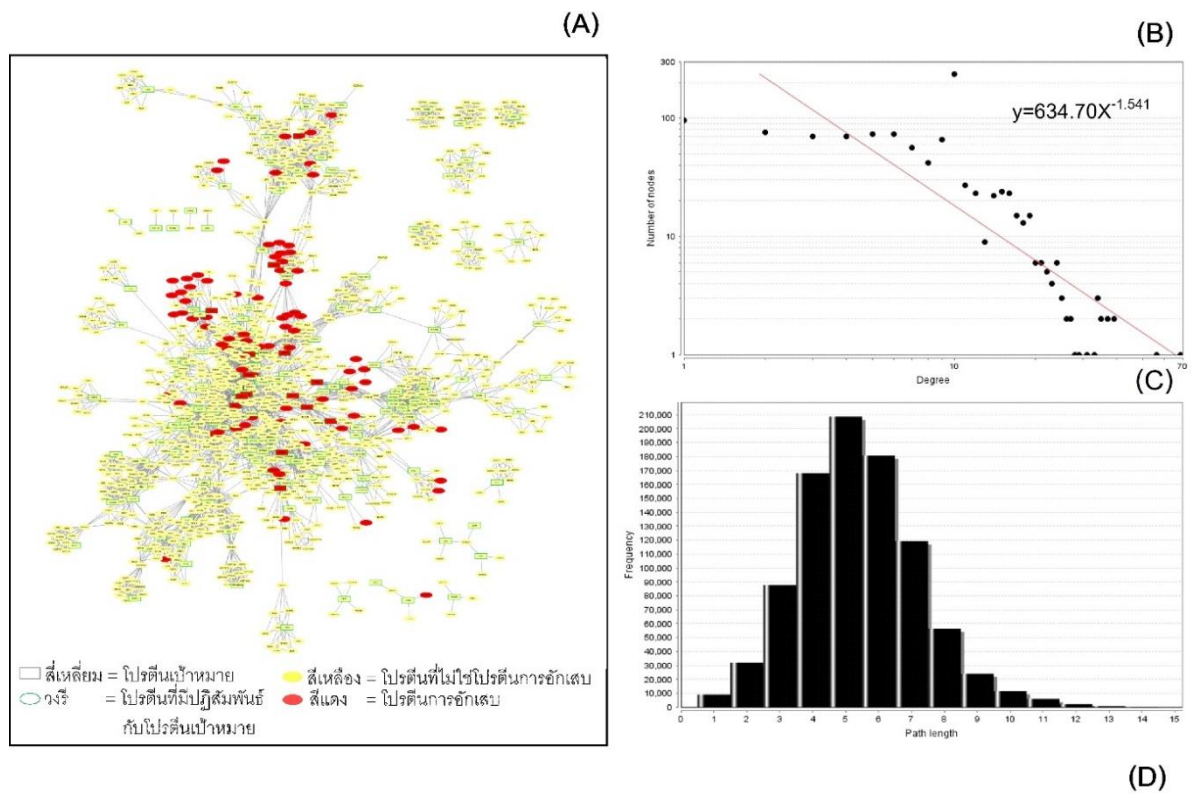
พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Fisetin	Random Network
Clustering coefficient	0.713	0.012
Connected component	11	2
Network diameter	13	6
Network centralization	0.074	0.019
Shortest path	162908 (65%)	246512 (99%)
Characteristic path length	5.753	3.307
Network heterogeneity	0.736	0.366

ภาพที่ 4-4 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Fisetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

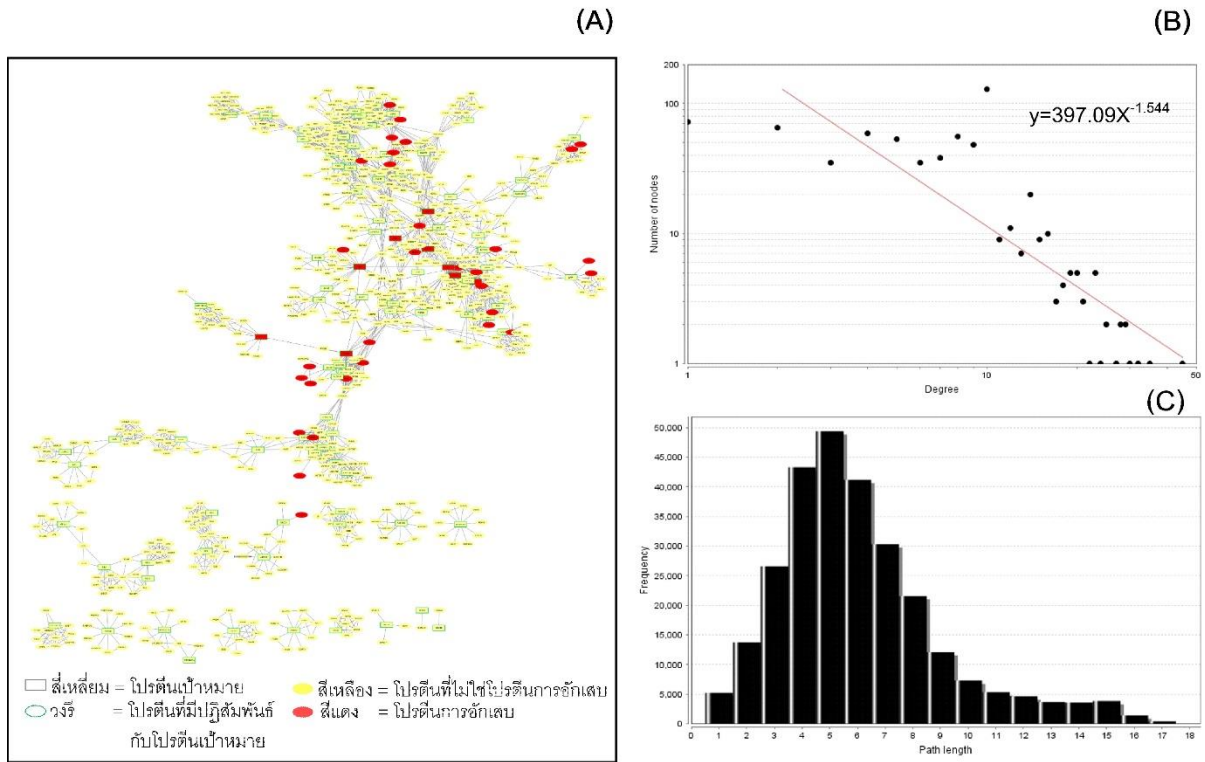


พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Kaempferol	Random Network
Clustering coefficient	0.693	0.010
Connected component	19	1
Network diameter	12	7
Network centralization	0.050	0.014
Shortest path	234356 (57%)	410240 (100%)
Characteristic path length	4.857	3.572
Network heterogeneity	0.786	0.379

ภาพที่ 4-5 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโพรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโพรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



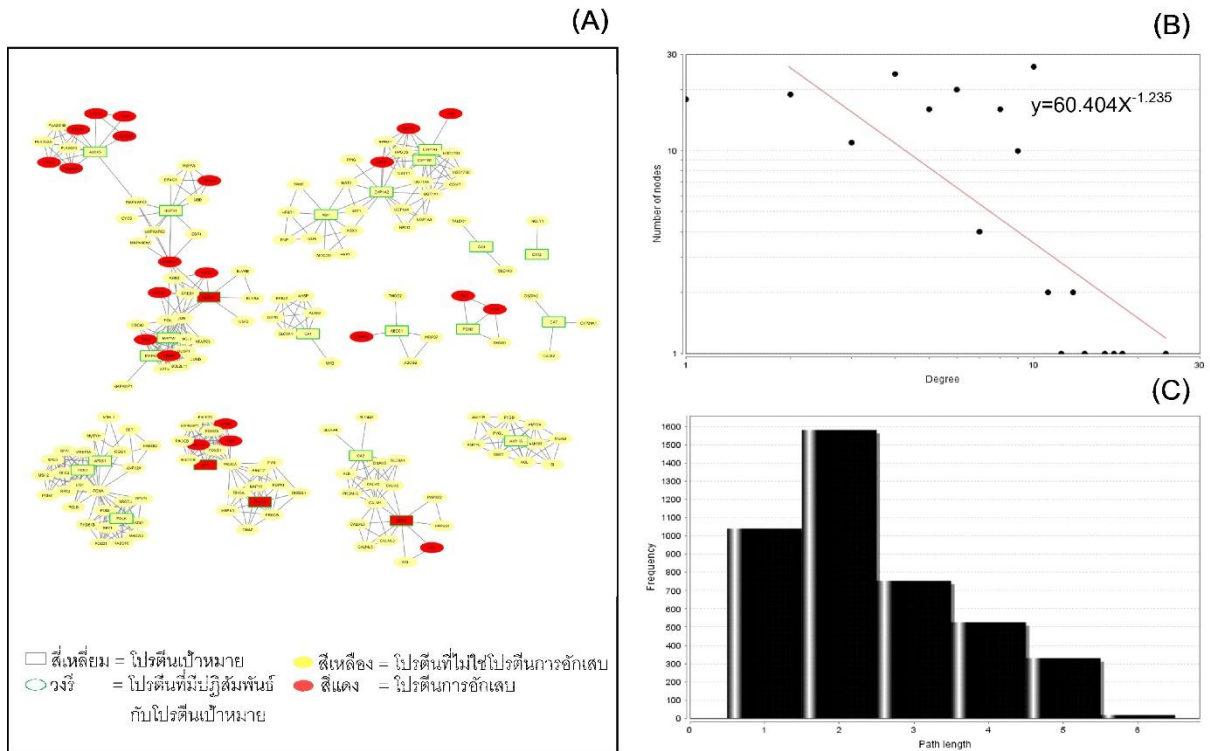
ภาพที่ 4-6 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(D)

พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Myricetin	Random Network
Clustering coefficient	0.708	0.015
Connected component	16	1
Network diameter	17	6
Network centralization	0.054	0.015
Shortest path	273582 (56%)	480942 (100%)
Characteristic path length	6.011	3.469
Network heterogeneity	0.727	0.375

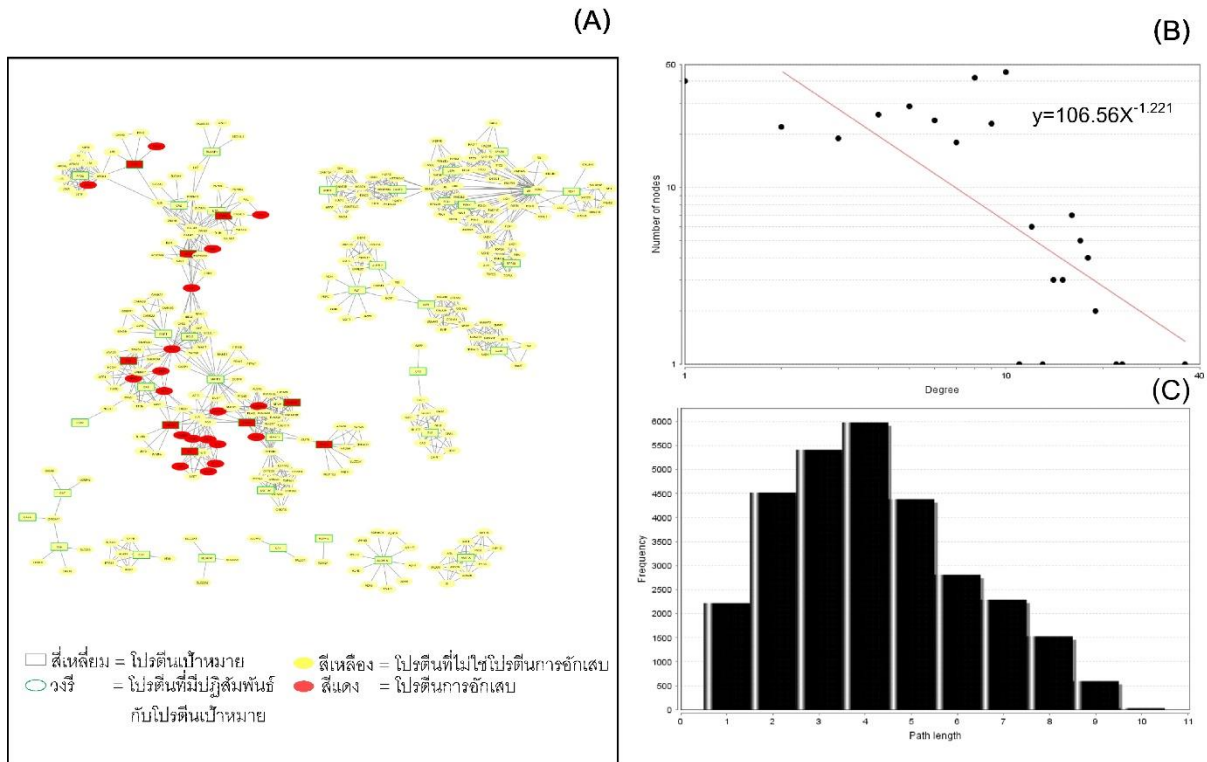
ภาพที่ 4-7 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Myricetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(D)

พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Isorhamnetin	Random Network
Clustering coefficient	0.733	0.037
Connected component	12	1
Network diameter	6	6
Network centralization	0.105	0.047
Shortest path	4248 (14%)	30102 (100%)
Characteristic path length	2.430	3.096
Network heterogeneity	0.631	0.400

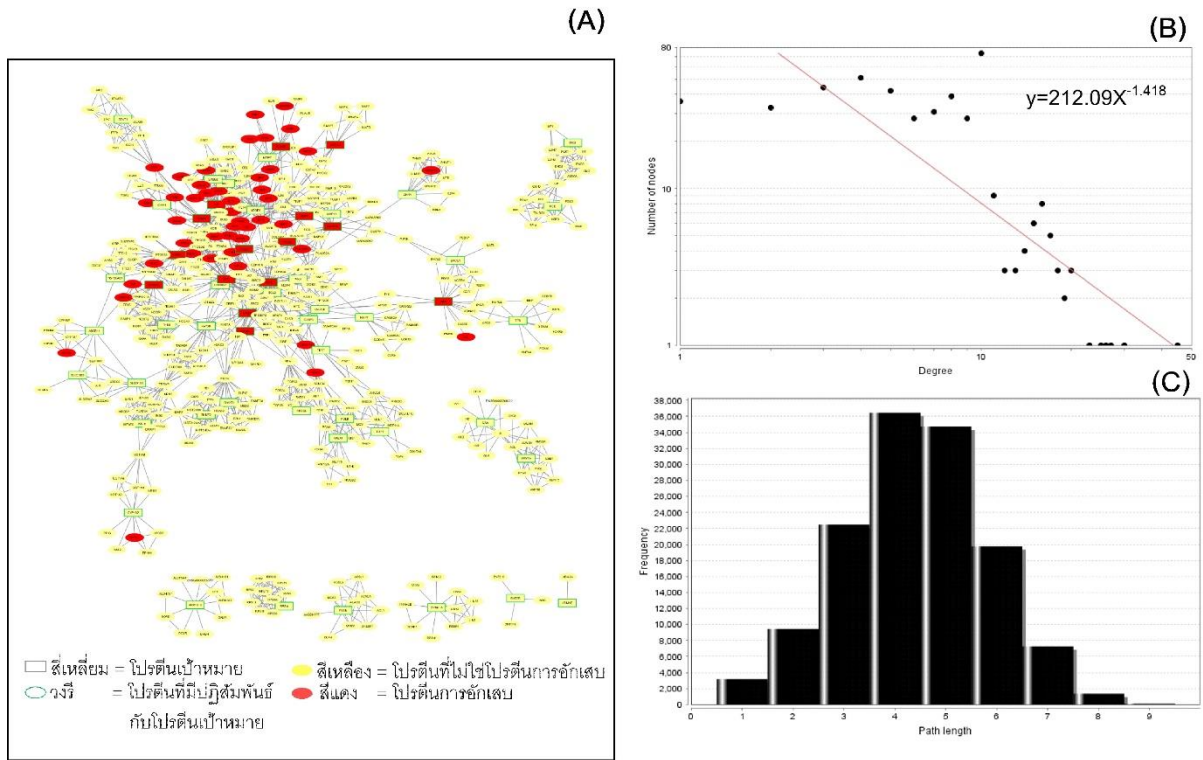
ภาพที่ 4-8 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Isorhamnetin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(D)

พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Catechin	Random Network
Clustering coefficient	0.688	0.018
Connected component	11	1
Network diameter	10	6
Network centralization	0.091	0.022
Shortest path	29776 (28%)	104006 (100%)
Characteristic path length	4.170	3.205
Network heterogeneity	0.671	0.350

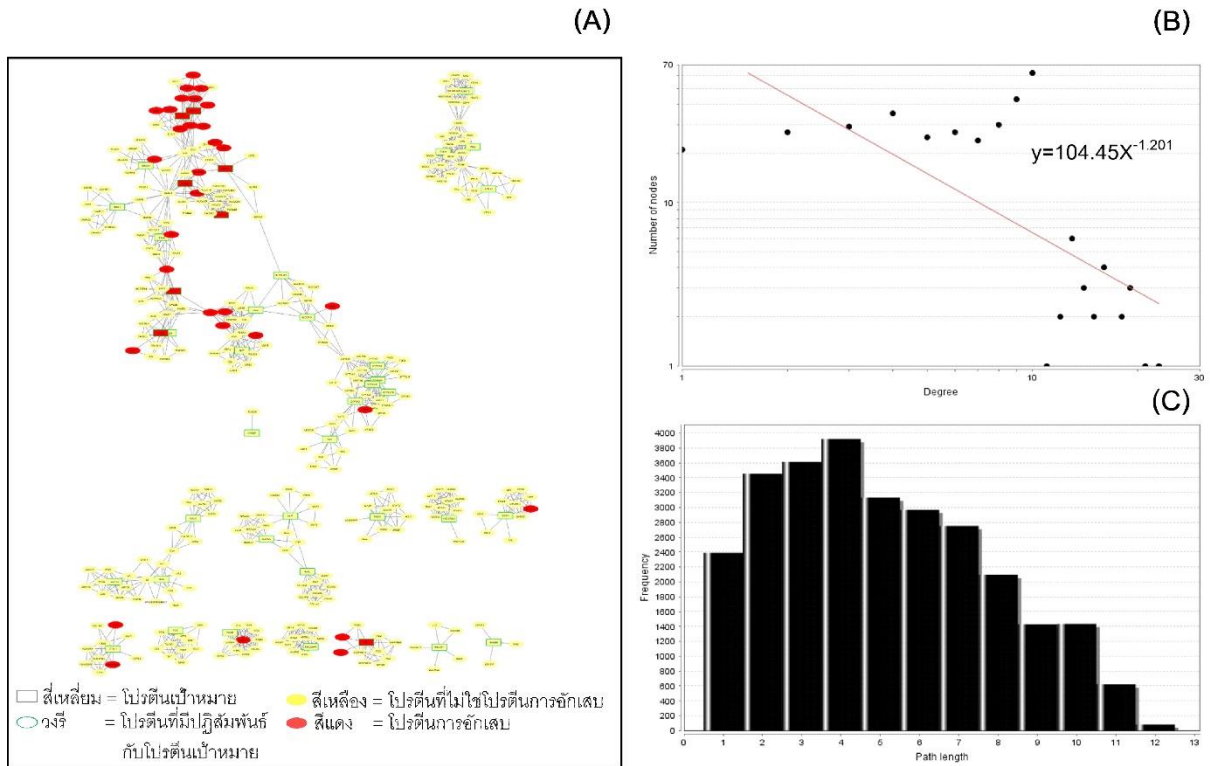
ภาพที่ 4-9 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Catechin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(D)

พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Epigallocatechin Gallate	Random Network
Clustering coefficient	0.722	0.016
Connected component	9	1
Network diameter	9	6
Network centralization	0.084	0.024
Shortest path	134844 (64%)	208392 (100%)
Characteristic path length	4.378	3.368
Network heterogeneity	0.697	0.378

ภาพที่ 4-10 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epigallocatechin gallate และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

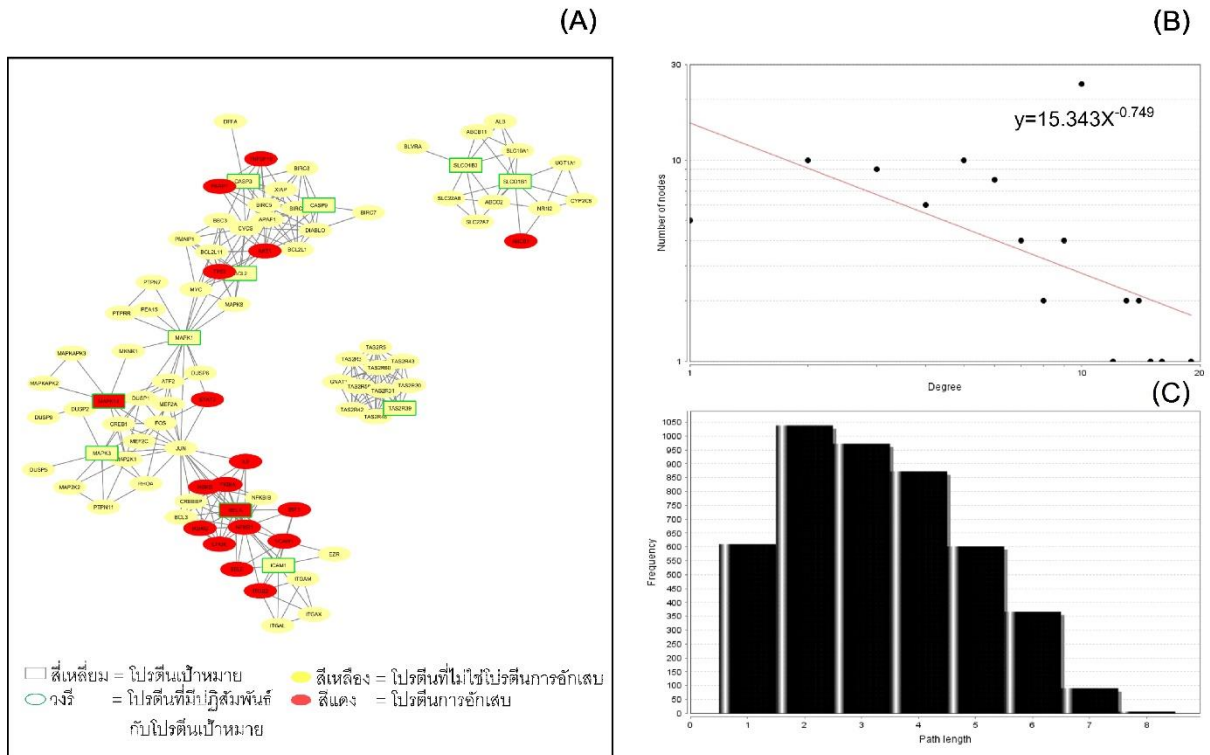


(D)

พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Epicatechin	Random Network
Clustering coefficient	0.765	0.022
Connected component	15	2
Network diameter	12	6
Network centralization	0.047	0.021
Shortest path	27906 (23%)	120062 (99%)
Characteristic path length	5.033	3.243
Network heterogeneity	0.557	0.372

ภาพที่ 4-11 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epicatechin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



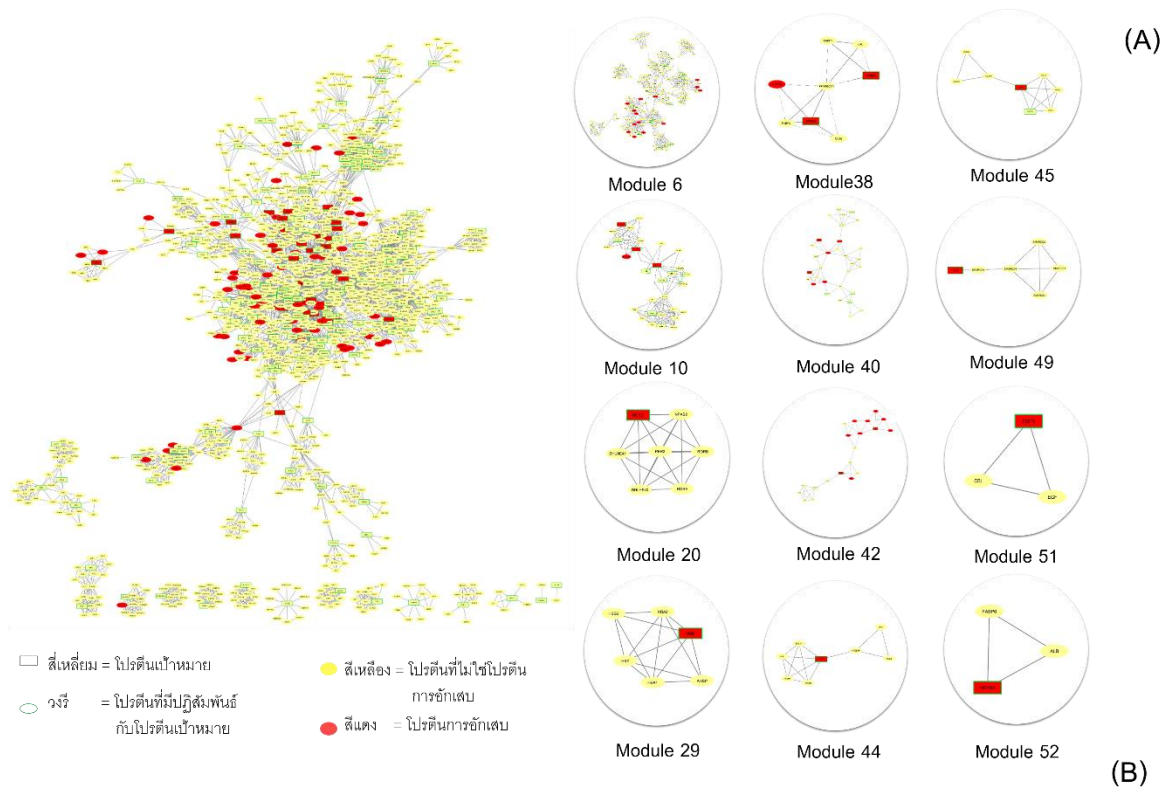


(D)

พารามิเตอร์	เครือข่าย	
	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Theaflavin	Random Network
Clustering coefficient	0.732	0.086
Connected component	3	1
Network diameter	8	4
Network centralization	0.140	0.083
Shortest path	4556 (56%)	8010 (100%)
Characteristic path length	3.287	2.526
Network heterogeneity	0.580	0.372

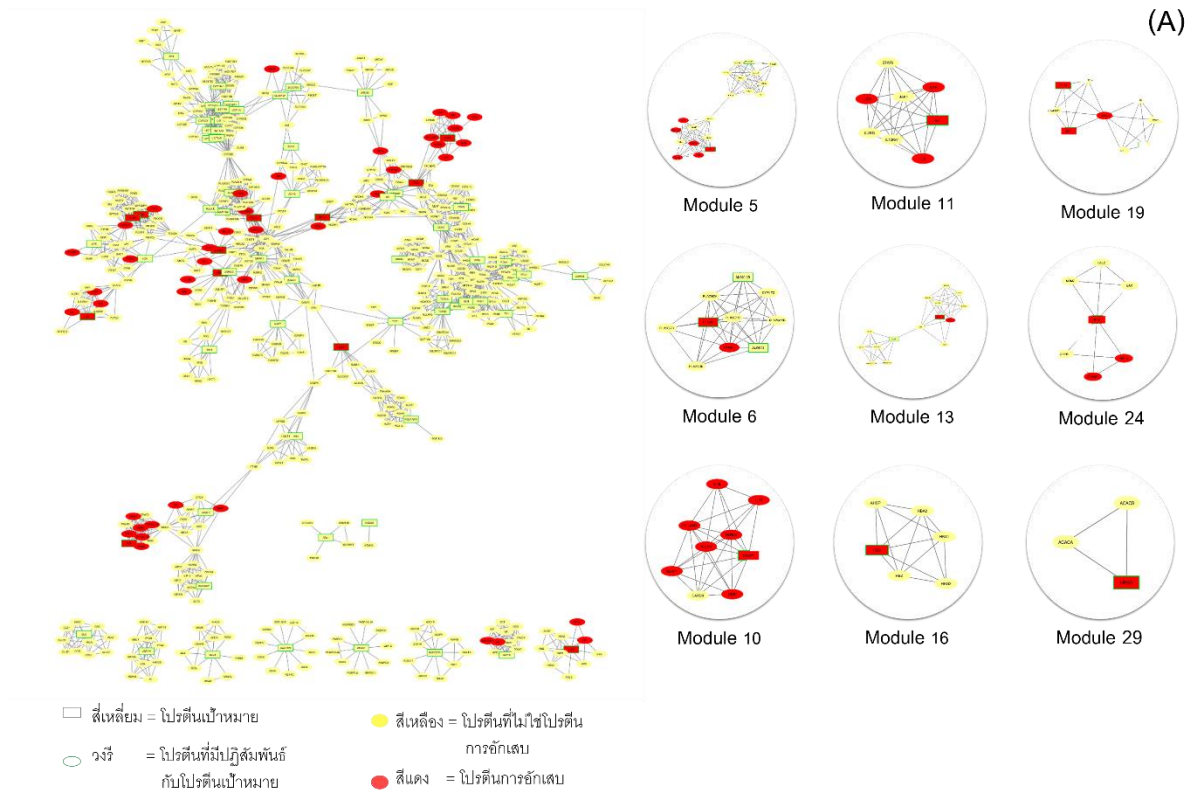
ภาพที่ 4-12 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Theaflavin และคุณสมบัติเครือข่ายแบบ Topological โดยภาพ A แสดงเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดง Degree distribution; ภาพ C แสดง Shortest path length distribution; ภาพ D แสดงค่าพารามิเตอร์ Topological ที่ได้จากการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดจะนำมาวิเคราะห์โมดูลด้วยโปรแกรม MCODE (Bader and Hogue, 2003) ภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) ซึ่งจำนวนโมดูลที่พบในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin จะแสดงดังภาพที่ 4-13B, 4-14B, 4-15B, 4-16B, 4-17B, 4-18B, 4-19B, 4-20B, 4-21B และ 4-22B เช่น เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin จะพบโมดูลทั้งสิ้น 65 โมดูล แต่จะพบโมดูลการอักเสบ 23 โมดูล และโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย 12 โมดูล, เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol จะพบโมดูลทั้งสิ้น 52 โมดูล แต่จะพบโมดูลการอักเสบ 15 โมดูล และโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย 9 โมดูล, เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin จะพบโมดูลทั้งสิ้น 68 โมดูล แต่จะพบโมดูลการอักเสบ 21 โมดูล และโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย 11 โมดูล เป็นต้น โดยโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดจะแสดงดังภาพที่ 4-13A, 4-14A, 4-15A, 4-16A, 4-17A, 4-18A, 4-19A, 4-20A, 4-21A และ 4-22A



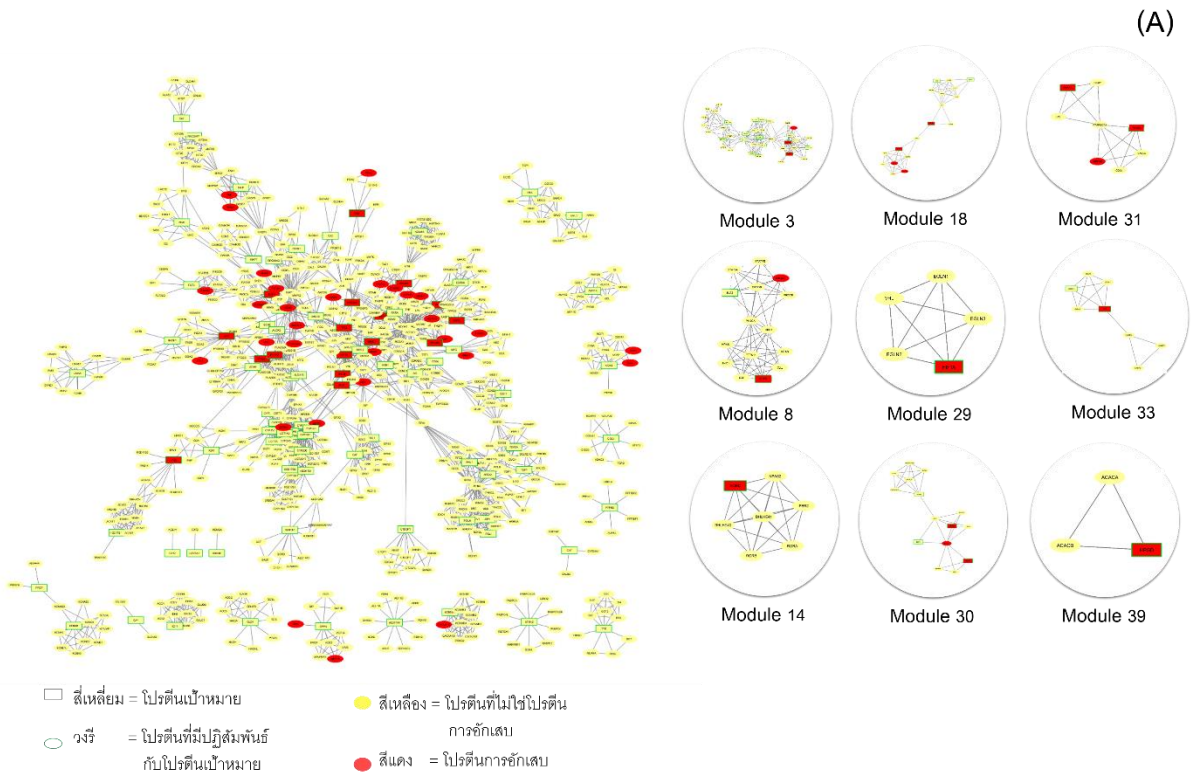
เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Apigenin	1153 โปรตีน 5013 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	65
โมดูลการอักเสบ	23
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	12

ภาพที่ 4-13 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Fisetin	498 โปรตีน 1859 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	41
โมดูลการอักเสบ	15
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	9

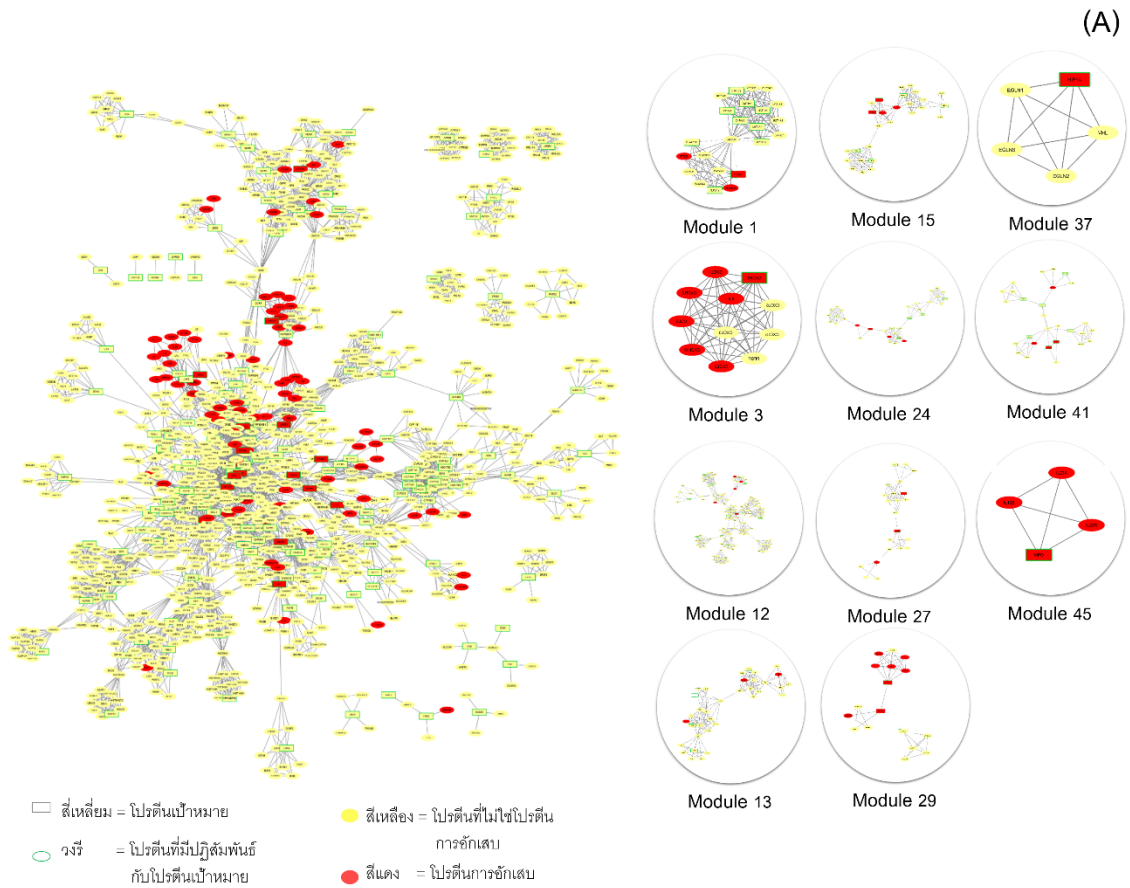
ภาพที่ 4-14 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Fisetin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลมุลการอักเสบที่เป็นโปรตีนหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(B)

เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Kaempferol	641 โปรตีน 2200 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	52
โมดูลการอักเสบ	15
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	9

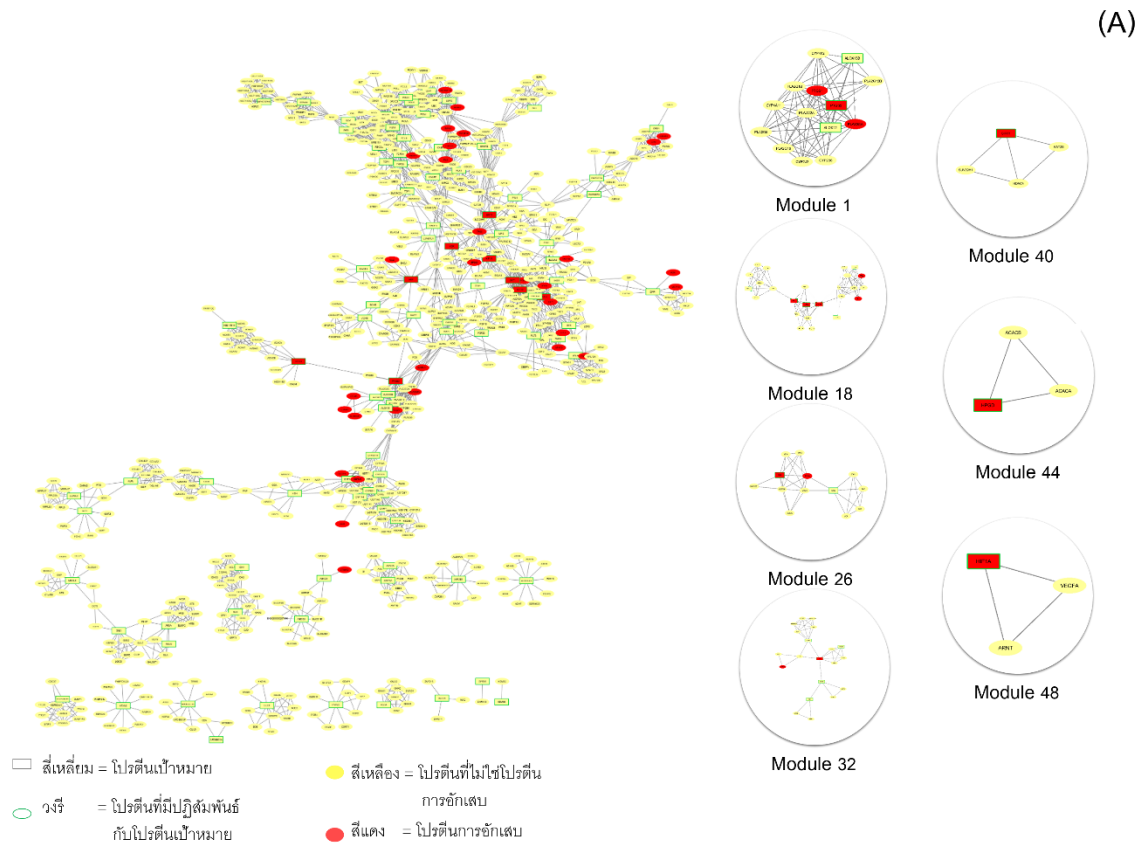
ภาพที่ 4-15 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(B)

เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Quercetin	1076 โปรตีน 4523 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	68
โมดูลการอักเสบ	21
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	11

ภาพที่ 4-16 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

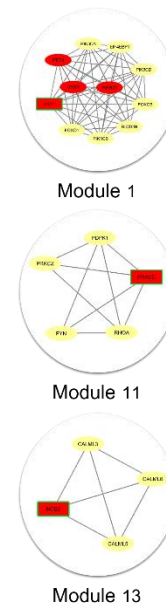
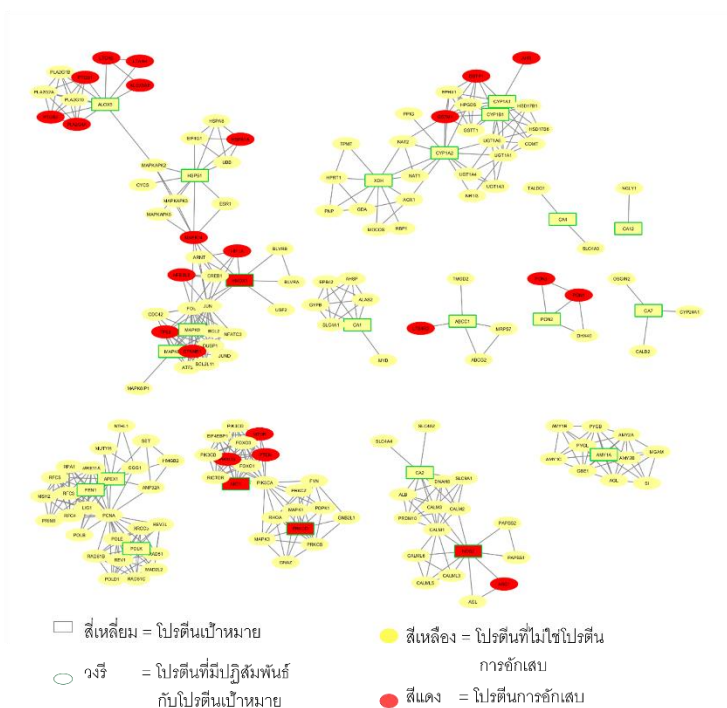


(B)

เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Myricetin	694 โปรตีน 2613 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	52
โมดูลการอักเสบ	15
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	7

ภาพที่ 4-17 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Myricetin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

(A)

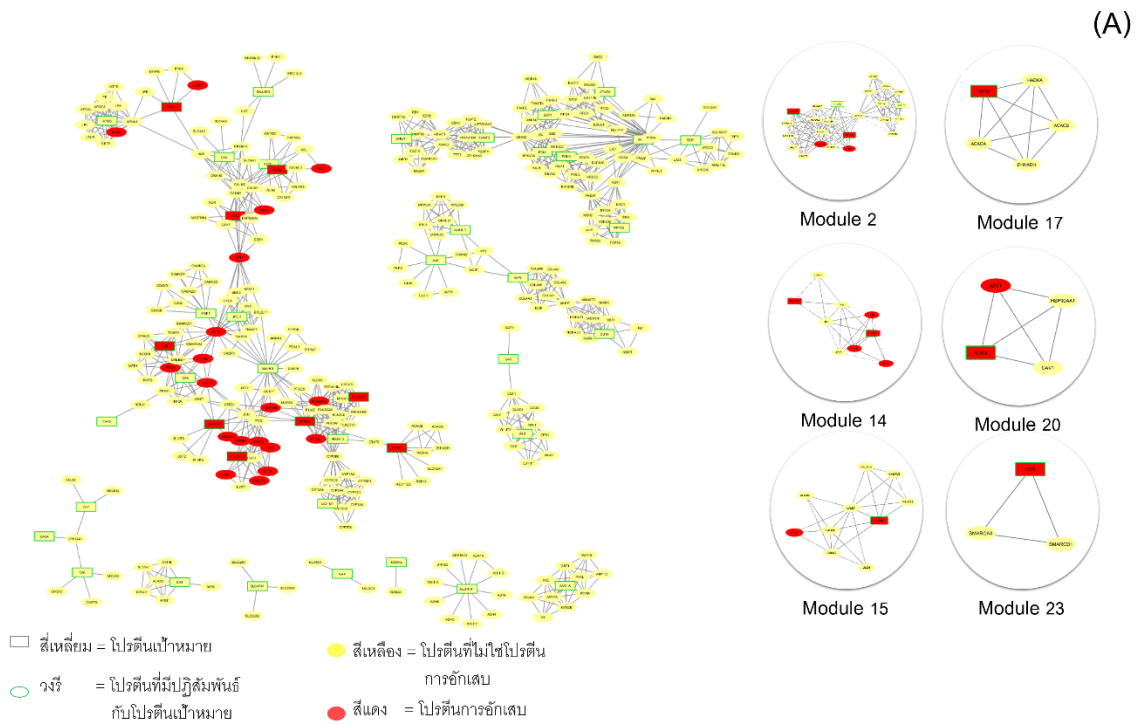


(B)

เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Isorhamnetin	174 โปรตีน 520 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	17
โมดูลการชักเสบ	7
โมดูลการชักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	3

ภาพที่ 4-18 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Isorhamnetin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลมูลการชักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

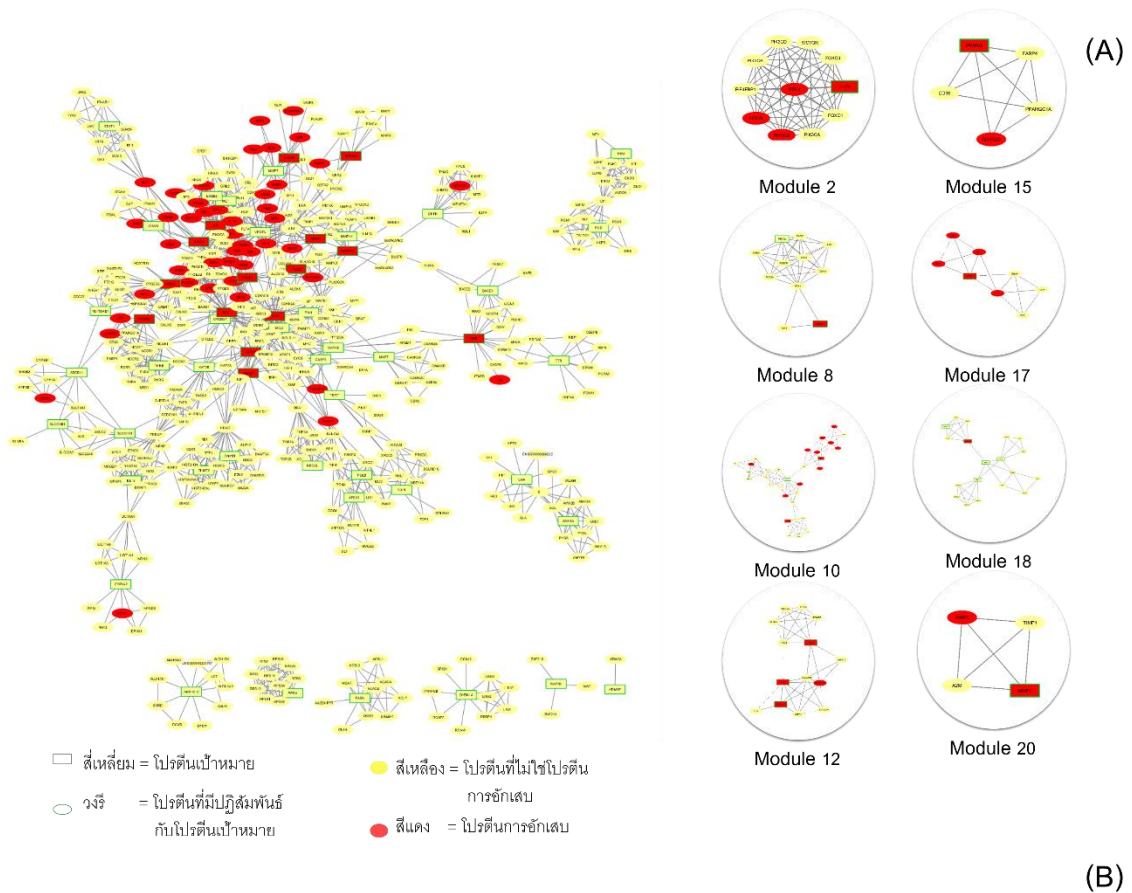




(B)

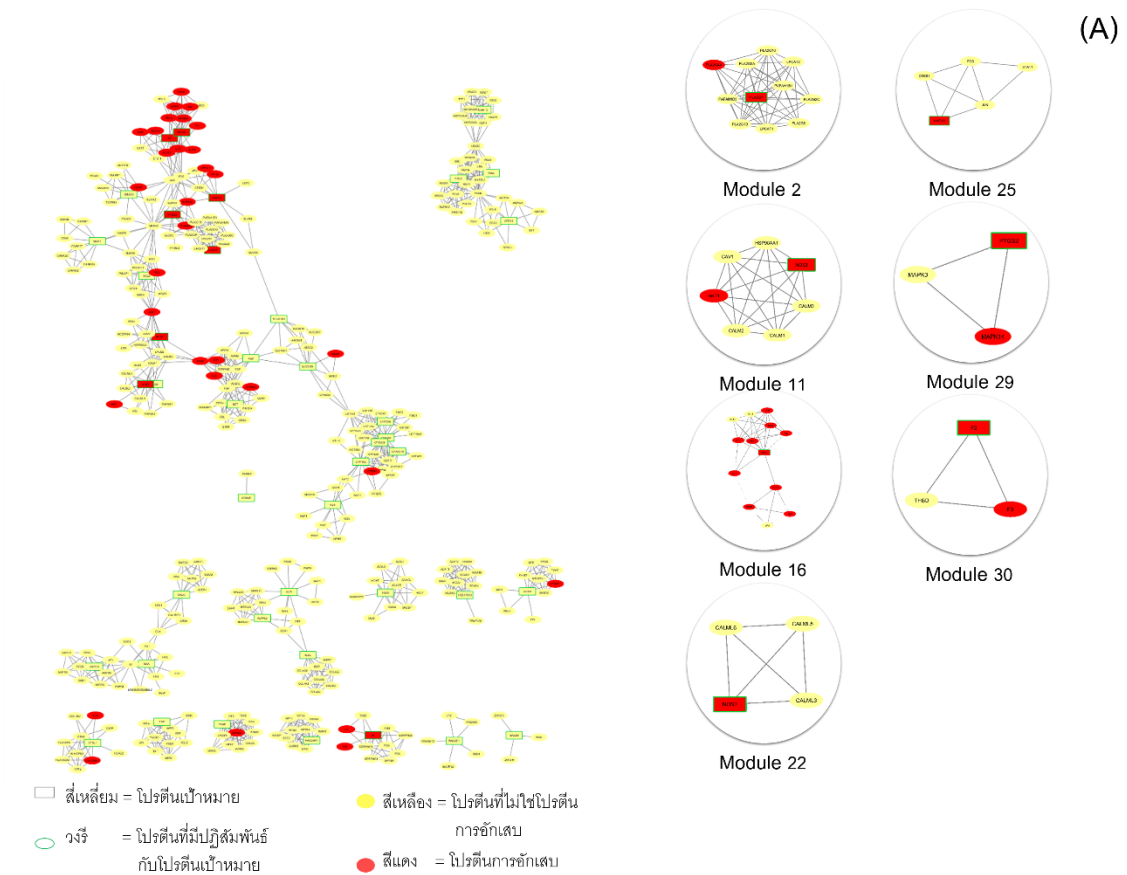
เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Catechin	323 โพรตีน 1112 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	25
โมดูลการอึกเสบ	9
โมดูลการอึกเสบที่เป็นโพรตีนเป้าหมาย	6

ภาพที่ 4-19 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโพรตีนเป้าหมายของสาร Catechin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอึกเสบที่เป็นโพรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Epigallocatechin Gallate	457 โปรตีน 1594 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	34
โมดูลการชักเสบ	17
โมดูลการชักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	8

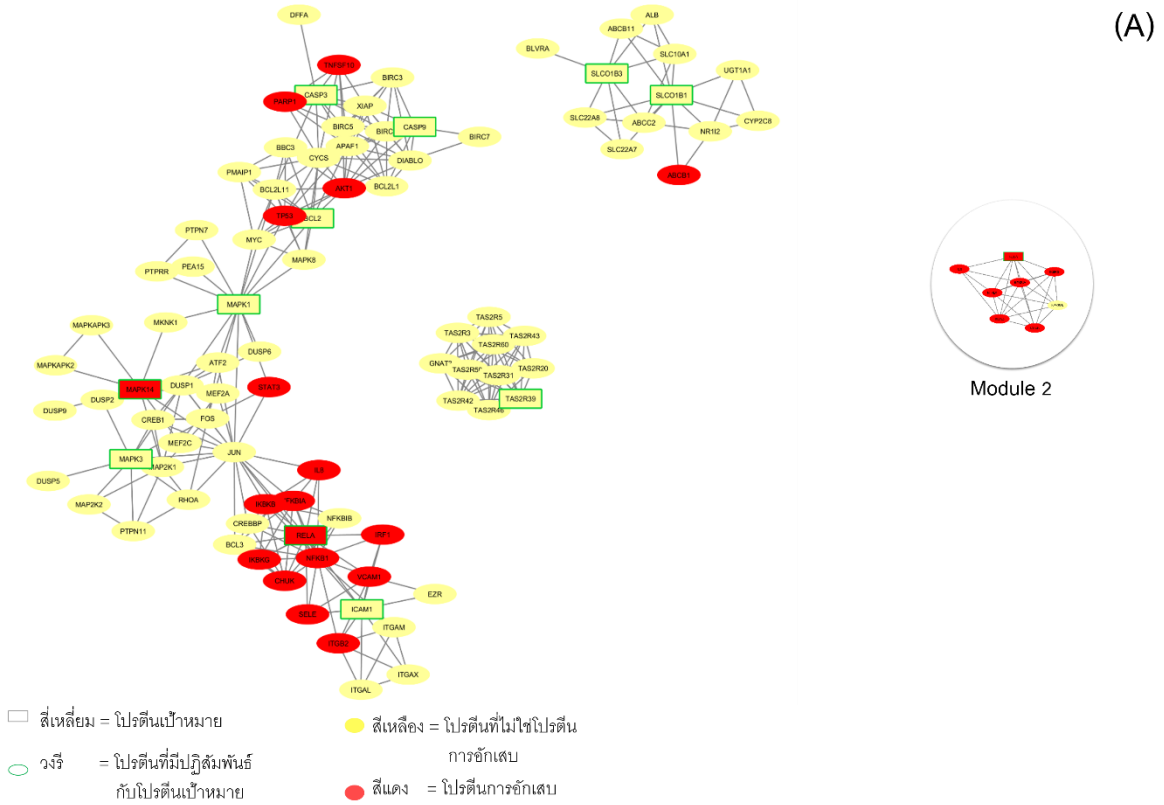
ภาพที่ 4-20 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epigallocatechin gallate และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลมูลการชักเสบที่เป็นโปรตีนหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



(B)

เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Epicatechin	348 โปรตีน 1195 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	34
โมดูลการอักเสบ	14
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	7

ภาพที่ 4-21 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Epicatechin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์



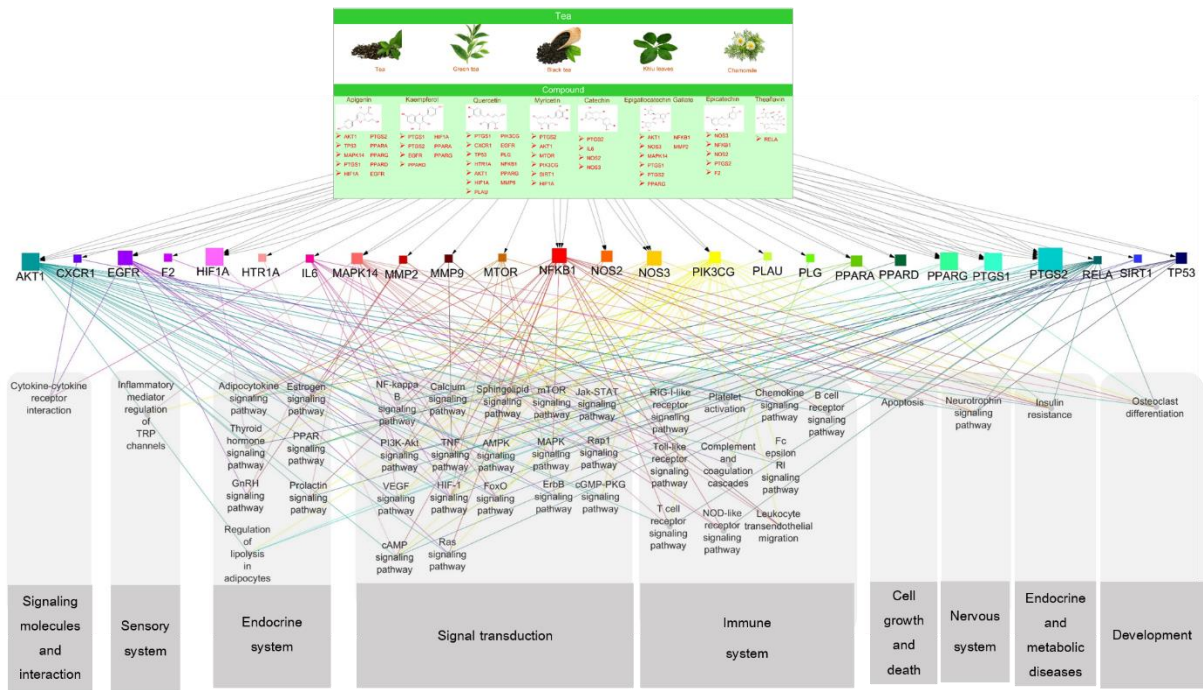
(B)

เครือข่าย	จำนวน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของ Theaflavin	90 โปรตีน 305 ปฏิสัมพันธ์
โมดูล	7
โมดูลการอักเสบ	4
โมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย	1

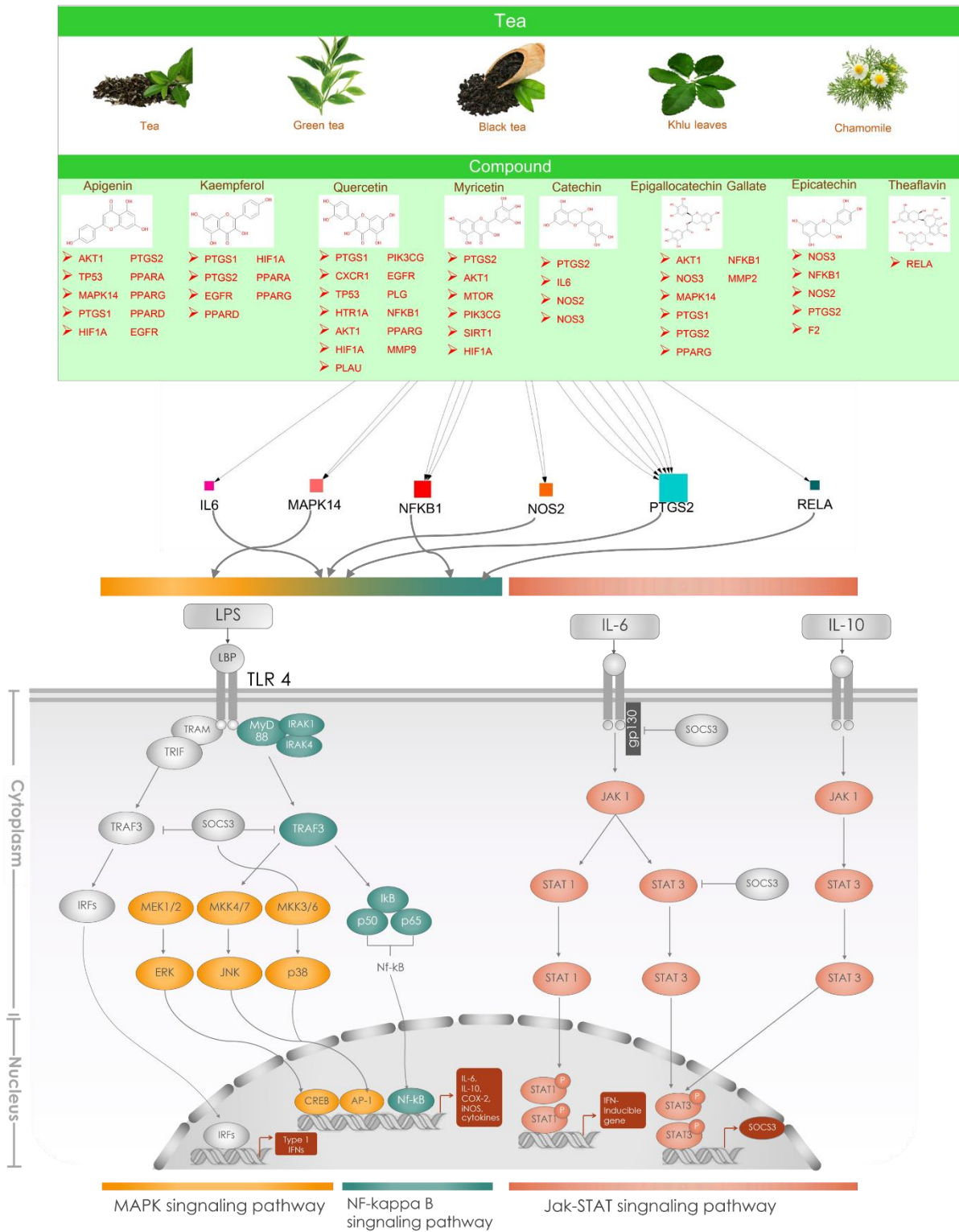
ภาพที่ 4-22 โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Theaflavin และจำนวนโมดูล โดยภาพ A แสดงโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย; ภาพ B แสดงขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโมดูลภายในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

## 4.5 การแปลผลทางชีวภาพ

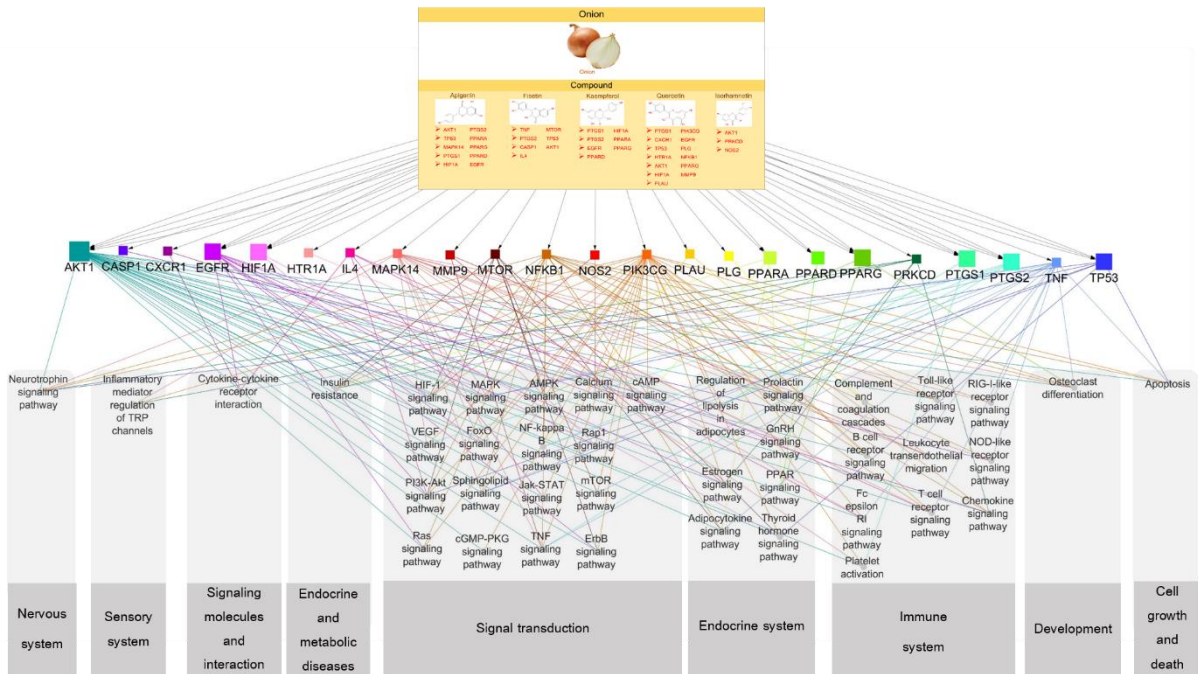
จากโมดูลที่ถูกคัดเลือกจะนำมาทำการแปลผลทางชีวภาพ โดยใช้โปรแกรม BiNGO (Biological Networks Gene Ontology) (Maere, et al., 2005) ซึ่งเป็นโปรแกรมปลั๊กอินของโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) แต่เพื่อให้การแปลผลมีความทันสมัยของข้อมูลมากขึ้น จึงเปลี่ยนมาใช้โปรแกรม DAVID (Jiao, et al., 2012) ในการแปลผลทางชีวภาพของยีนสมาชิกในแต่ละโมดูล โดยผลที่ได้จะเป็นรายชื่อของฟังก์ชันยีนออนโทโลยี (GO, Gene Ontology) โดยอาศัยการแปลผลยีนออนโทโลยีของกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) เนื่องจากสามารถแปลผลได้ง่ายในเบื้องต้นเพื่อให้ได้ผลของฟังก์ชันจากแต่ละโมดูลที่พร้อมจะนำมาใช้ในการอธิบายกลไกระดับโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับสรีรวิทยา ของการยับยั้งการอักเสบของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่สนใจศึกษา ซึ่งในที่นี่จะเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์จากตัวอย่างพืชสมุนไพรท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ขลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less (Suriyaphan, 2014) ที่จะทำการแปลผลเป็นพืชกลุ่มชาที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบ โดยภาพรวมของการแปลผลทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์จากพืชกลุ่มชา แสดงดังภาพที่ 4-23 และภาพรวมการแปลผลทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์จากหัวหอม แสดงดังภาพที่ 4-25 และเมื่อคัดเลือกเฉพาะกลุ่มโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบในระดับห้องปฏิบัติการของวิถิพาเวทย์ที่นิยมศึกษากันเพื่อเป็นแนวทางในการสำหรับพืชกลุ่มชาและหัวหอม ก็สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 4-24 และ 4-26 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-23 วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่พบในไขข้อและพืชกลุ่มชา

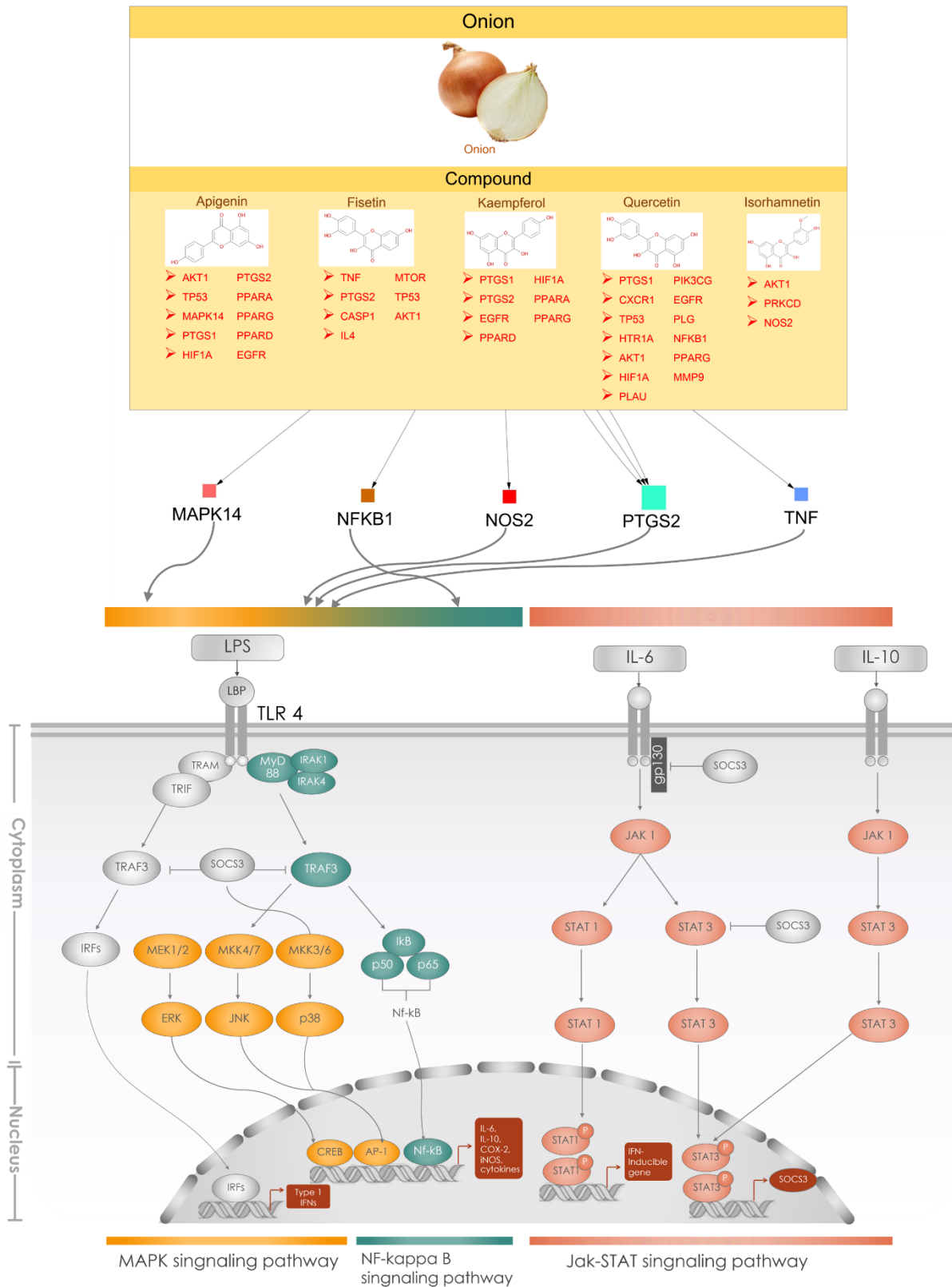


ภาพที่ 4-24 วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่นิยมศึกษาที่พบในใบชาและพืชกลุ่มชา



ภาพที่ 4-25 วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่พบในหัวหอม





ภาพที่ 4-26 วิธียับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่นิยมศึกษาที่พบในหัวหอม

## บทที่ 5

### อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากข้อมูลภายในบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรท้องถิ่นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชลู่ (Suriyaphan, 2014) รวมถึงพืชในกลุ่มชา ที่จะนำมาผึ่งให้แห้ง หรืออบและต้มหรือชงกับน้ำดื่ม จะมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่สามารถต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมถึงการมีประสิทธิภาพในการยับยั้งภาวะไขมันสูงในเลือด จะประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Apigenin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin (Suzuki, et al., 2006; Luo, et al., 2012; Kuo, et al., 2005; Buapool, et al., 2013; Pan, Lai and Ho, 2010) เช่นเดียวกับหัวหอมที่เป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และช่วยป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด และนิยมนำมาปรุงอาหาร จะประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ สาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin (Nasri, Anoush and Khatami, 2012; Pan, Lai and Ho, 2010) จากข้อมูลของสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์จากพืชกลุ่มชาและหัวหอมข้างต้น จะนำมาทำการสืบค้นโปรตีนเป้าหมายที่พบในมนุษย์ (Homo sapiens) ด้วยฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL ซึ่งเป็นฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารโมเลกุลขนาดเล็กที่ใช้ในการค้นหาชนิดใหม่และการวิจัยทางด้านเคมียาที่มีการเก็บรวบรวมข้อมูลทางชีวภาพของโมเลกุล โปรตีนเป้าหมาย และยา (Davies et al., 2015) และฐานข้อมูลสาธารณะ STITCH ซึ่งเป็นฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์ที่มีการรวบรวมข้อมูลปฏิสัมพันธ์จากหลากหลายแหล่งข้อมูล จึงทำให้สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของสารเคมีที่อยู่ในรูปของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ได้เป็นจำนวนมาก (Szklarczyk, et al., 2016) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4-1 ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในพืชกลุ่มชาใบชู่และหัวหอม จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin

จากข้อมูลโปรตีนเป้าหมายจะนำมาสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนด้วยฐานข้อมูลสาธารณะ STRING ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่มีการเก็บรวบรวมข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน และทำนายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนสำหรับสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย (Szklarczyk, et al., 2017) ซึ่งจะทำให้ข้อมูลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์ที่มีความครบถ้วนมากยิ่งขึ้น โดยพบว่า สาร Apigenin ไม่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน STK10, STK17A และ CDKL1 สาร Tangeretin ไม่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน SLCO2B1 สาร Quercetin ไม่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน CA5B, CA14, CDKL1, STK17A และ SLCO2B1, สาร Catechin ไม่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน CA5B, CA13 และ CA14 เนื่องจากมีค่า Confidence score ต่ำกว่าค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด โดยค่า Confidence score เป็นค่าการให้คะแนนจากค่าน้ำหนักของเส้นปฏิสัมพันธ์ในเครือข่ายที่สามารถอธิบายความน่าจะเป็นของปฏิสัมพันธ์ทางชีววิทยาโดยเฉพาะและสามารถทำซ้ำได้โดยมีหลักฐานสนับสนุน โดยการให้คะแนนของค่าน้ำหนักของเส้นปฏิสัมพันธ์เป็นค่าที่ได้จากหลักฐานสนับสนุนซึ่งมีทั้งหมด 7 ช่องทาง คือ ช่องทางการทดลอง ช่องทางฐานข้อมูล ช่องทางฐานข้อมูลเอกสาร ช่องทางการแสดงออกพร้อม (Coexpression) ช่องทางโปรตีนที่มี

ร่วมกันระหว่างสปีชีส์ (Neighborhood) ช่องทางที่โปรตีนหนึ่งคู่จะได้รับคะแนนความสัมพันธ์เมื่อมีสิ่งมีชีวิตอย่างน้อยหนึ่งชนิดที่มี Orthologs ได้หลอมรวมกันเป็นรวมเป็นหนึ่งเดียว (Fusion) และช่องทางการประเมินการกระจายวิวัฒนาการของ orthologs ของโปรตีนทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตที่กำหนด (Co-occurrence) (Szkarczyk, et al., 2017) งานวิจัยนี้จึงไม่ได้นำข้อมูลโปรตีนเป้าหมายที่ไม่สามารถสืบค้นเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเหล่านี้ไปทำการวิเคราะห์ต่อ ข้อมูลของจำนวนโปรตีนที่สืบค้นได้ในฐานข้อมูล STRING แสดงดังตารางที่ 4-1 จากนั้นจะทำการสืบค้นข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่พบในมนุษย์จากฐานข้อมูลสาธารณะของยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ DisGeNET (Piñero, et al., 2015), OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler, et al., 2004) แล้วเปรียบเทียบหาโปรตีนการอักเสบที่มีร่วมกันด้วยโปรแกรม VENNY (Oliveros, 2007) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบชุดข้อมูลโดยการสร้างเวนนไดอะแกรม (ภาพที่ 4-2) และคัดเลือกโปรตีนการอักเสบที่มีความเหมือนกันตั้งแต่ 2 ฐานข้อมูลขึ้นไปซึ่งพบจำนวนโปรตีนการอักเสบทั้งสิ้น 403 ชนิด (ตารางที่ 4-2)

จากข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่สืบค้นภายใต้ฐานข้อมูล STRING (Szkarczyk, et al., 2017) ที่มีการรวบรวมข้อมูลของปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์กับโปรตีนเป้าหมาย โปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย และข้อมูลโปรตีนการอักเสบ จะถูกนำมาวิเคราะห์และแสดงผลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Cytoscape (Shannon, et al., 2003) ก่อนที่จะทำการหลอมรวมเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละประเภทเพื่อคัดเลือกปฏิสัมพันธ์ที่เหมือนกันออกด้วย Advanced Network Merge ที่จะทำให้ได้ขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนและโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่ายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 4-3 สำหรับการตรวจสอบการใช้ข้อมูลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสาร Apigenin ในมนุษย์แทนการใช้เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของหนูจะสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของหนูจากการนำข้อมูลโปรตีนทั้งหมดภายในเครือข่ายของสาร Apigenin มาค้นหาโปรตีนที่พบในหนู (*Mus Musculus*) ด้วยฐานข้อมูลสาธารณะ GeneCard (Stelzer, et al., 2016) แล้วคัดเลือกโปรตีนและปฏิสัมพันธ์จากเครือข่ายของสาร Apigenin ที่พบในมนุษย์ ทำให้ได้เครือข่ายที่มีขนาด 1,138 โปรตีน 3,891 ปฏิสัมพันธ์ และมีโปรตีนการอักเสบจำนวน 91 ชนิด และมีโปรตีนพบในมนุษย์แต่ไม่พบในหนูจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ HIST3H3, KDM4E, AHSP, PABPC1L2B, CDRT1, ERV3-1, OVCH1, MST4, CALML6, ckshs1, C1orf63, ENSG00000263020, ARSH, STS และ GSTT1 ซึ่งโปรตีนทั้ง 15 ชนิดนี้ไม่ใช่โปรตีนการอักเสบเมื่อเทียบกับรายชื่อของโปรตีนการอักเสบทั้ง 403 ชนิด ที่ตรวจสอบไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งทำให้ทราบว่า การวิเคราะห์และแปลผลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนนี้ สามารถใช้ข้อมูลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของมนุษย์แทนของหนูในการตรวจสอบกลไกของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบได้ เนื่องจากโปรตีนโดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนกลุ่มเดียวกัน และโปรตีนที่พบในมนุษย์แต่ไม่พบในหนูทั้ง 15 ชนิด ก็ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ (Sornsiri, et al., 2018)

จากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์จะนำไปทำการวิเคราะห์พฤติกรรมของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ด้วยปลั๊กอิน Network Analyzer ภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) จะทำให้ได้ผลคุณสมบัติ Topological ที่จะทำให้เข้าใจลักษณะโครงสร้างของเครือข่ายทางชีวภาพของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin คือ ผลกราฟ Degree distribution ที่เป็นระดับการกระจายที่คำนวณจากการนับจำนวนการเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนต่างๆ ภายในเครือข่ายซึ่งแสดงดังภาพ 4-3B, 4-4B, 4-5B, 4-6B, 4-7B, 4-8B, 4-9B, 4-10B, 14-11B และ 4-12B

ตามลำดับ โดยสมการที่พบจากผลกราฟ Degree distribution ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์มี Degree distribution เป็นไปตามกฎของการกระจายแบบกำลัง (Power law distribution) คือ  $(k) \sim k^{-\gamma}$  ( $\gamma < 3$ ) ซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติการเป็น scale-free และจากผลกราฟ Shortest path length distribution ซึ่งแสดงดังภาพ 4-3C, 4-4C, 4-5C, 4-6C, 4-7C, 4-8C, 4-9C, 4-10C, 4-11C และ 4-12C ตามลำดับ พบว่า ความยาวของเส้นทางเครือข่ายของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin มีความถี่มากใน ระยะทางที่ 4-5, 4-7, 4-6, 4-6, 4-6, 1-2, 2-5, 3-6, 2-7 และ 2-4 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่ามีความยาวที่สั้นที่สุด แสดงว่าโปรตีนส่วนใหญ่ในเครือข่ายมีการเชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดและมีคุณสมบัติเป็น small world

และจากภาพค่าพารามิเตอร์ของ Topological ซึ่งแสดงดังภาพที่ 4-3D, 4-4D, 4-5D, 4-6D, 4-7D, 4-8D, 4-9D, 4-10D, 4-11D และ 4-12D ตามลำดับ พบว่าค่า Clustering coefficient ที่เป็นค่าความหนาแน่นเฉลี่ยของโหนดใกล้เคียงในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin มีค่าเท่ากับ 0.683, 0.713, 0.693, 0.705, 0.708, 0.733, 0.688, 0.722, 0.765 และ 0.732 ตามลำดับ และมีค่า Clustering coefficient ของ Random network คือ 0.007, 0.012, 0.010, 0.009, 0.015, 0.037, 0.018, 0.016, 0.022 และ 0.086 ตามลำดับ ถ้าค่า Clustering coefficient ในเครือข่ายสูงกว่า Random network แสดงว่ามีคุณสมบัติของ modularity ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติการเป็นเครือข่ายทางชีวภาพเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น scale-free, small world และ modularity (Zheng, Zhang and Qiao, 2015) ที่แสดงคุณสมบัติของเครือข่ายที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โหนดต่อไปได้

เมื่อนำโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายที่พบในโมดูลการอักเสบของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดไปทำการแปลผลทางชีวภาพด้วยโปรแกรม DAVID (Jiao et al., 2012) พบว่า โปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายในโมดูลการอักเสบ ได้แก่ IL8, PARP1, NR1H4, PLA2G7, HMOX1 และ GSTP1 ไม่มีผลของวิถีทางชีวภาพเนื่องจากโปรตีนการอักเสบเหล่านี้�าจจะยังไม่มีข้อมูลวิถีทางชีวภาพในโปรแกรม David (Jiao et al., 2012) ที่ใช้ในการแปลผลทางชีวภาพ ทำให้ไม่สามารถแปลผลวิถีทางชีวภาพได้ โดยสาร Apigenin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin ที่เป็นองค์ประกอบในพืชกลุ่มชาจะมีเกี่ยวข้องกับวิถีการอักเสบหลากหลายวิถี (ภาพที่ 4-23) แต่จะประกอบไปด้วยวิถีการอักเสบที่นิยมศึกษา ได้แก่ วิถีการส่งสัญญาณ NF- $\kappa$ B และวิถีการส่งสัญญาณ MAPK โดยมีโปรตีนที่พบในวิถีการส่งสัญญาณ คือ IL6, MAPK14, NFKB1, NOS2, PTGS2 และ RELA (ภาพที่ 4-24) และใน หัว หอม จะ ประกอบ ไป ด้วย สาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin ซึ่งมีวิถีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ (ภาพที่ 4-25) และประกอบไปด้วยวิถีการอักเสบที่นิยมศึกษาได้แก่ วิถีการส่งสัญญาณ NF- $\kappa$ B และวิถีการส่งสัญญาณ MAPK ซึ่งมีโปรตีนที่พบในวิถีการส่งสัญญาณ คือ MAPK14, NFKB1, NOS2, PTGS2 และ TNF (ภาพที่ 4-26)

จากการแปลผลทางชีวภาพของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin พบว่าสามารถลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบผ่านวิถีสัญญาณ NF- $\kappa$ B ซึ่ง NF- $\kappa$ B เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมในรูปที่ไม่สามารถใช้งานได้และเมื่อเกิดการกระตุ้น NF- $\kappa$ B จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสจึงทำให้เกิด

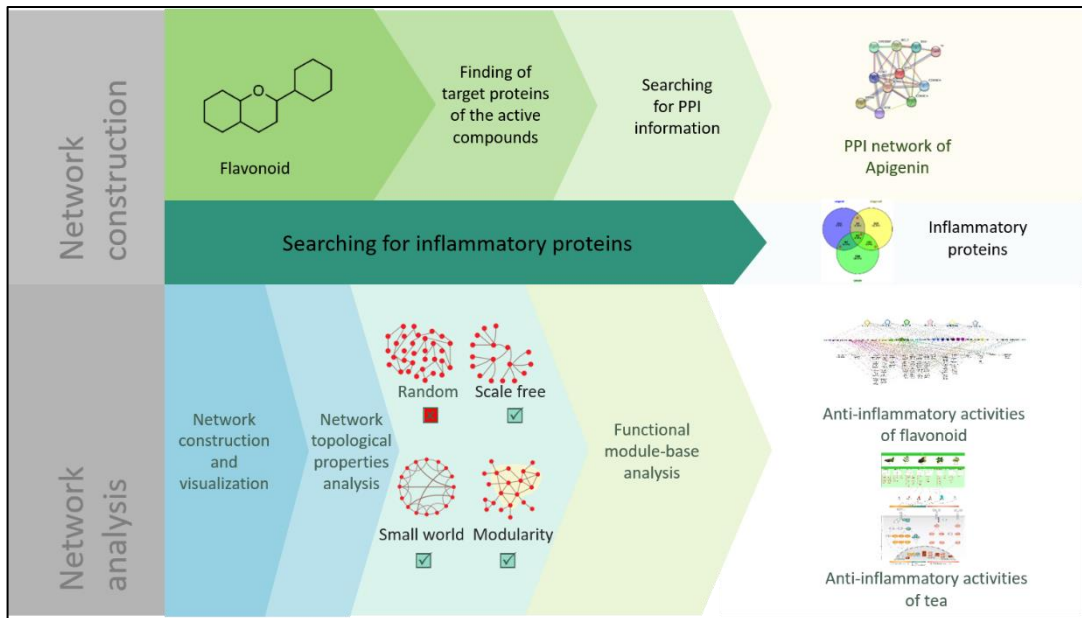
การผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ โดยสาร Apigenin จะยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของ IKK และยับยั้งย่อยสลายของ IKB จึงทำให้ IKB จับกับ NF- $\kappa$ B จึงยับยั้งการเคลื่อนที่ของ NF- $\kappa$ B ไปยังนิวเคลียสจึงทำให้สามารถยับยั้งการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ(Liang, et al., 1999), สาร Fisetin สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 และการฟอสโฟริเลชันของ IKB $\alpha$  โดย IKB $\alpha$  มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของ p65 (Kim, Kim, et al., 2015),สาร Kaempferol สามารถลดระดับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ p65 และ p50 ซึ่งทรานสคริปชันแฟคเตอร์จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการถอดรหัสของ NF- $\kappa$ B ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ (Kim, Park, et al., 2015), สาร Quercetin ช่วยยับยั้งการสลายตัวของ IKB- $\alpha$  และการเคลื่อนที่ของ p65 เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งแสดงถึงบทบาทของ NF- $\kappa$ B ในการลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ (Lee, et al., 2018), สาร Myricetin ลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ p65 และช่วยทำให้เกิดการสลายตัวของ IKB $\alpha$  ในไซโตพลาสซึมจึงช่วยป้องกันการตอบสนองการอักเสบผ่านวิถีการส่งสัญญาณ NF- $\kappa$ B (Cho, et al., 2016), สาร Isorhamnetin สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B ที่เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่สำคัญในการแสดงออกปลระการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ (Hämäläinen, et al., 2007)

สำหรับสาร Apigenin และ Epigallocatechin gallate ยังมีความเกี่ยวข้องกับ MAPK 14 หรือ p38 ที่อยู่ในวิถีการส่งสัญญาณผ่าน MAPK โดย Apigenin สามารถลดการฟอสโฟริเลชันของ p38 ซึ่ง p38 จะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโมเลกุลยึดเกาะและไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Yang, et al., 2015) และ Epigallocatechin gallate สามารถยับยั้งการฟอสโฟริเลชันของ ERK1/2, JNK และ p38 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในวิถีการส่งสัญญาณ MAPK โดยวิถีการส่งสัญญาณ MAPK จะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่างๆ เช่น การผลิตไซโตไคน์และคีโมไคน์, การดีแกรนูเลชันของนิวโทรฟิลที่เป็นกระบวนการการกลืนกินอาศัยการโอบล้อมเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์ และรวมเชื้อโรคเข้ากับไลโซโซมจึงทำให้แกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของนิวโทรฟิลลดลง รวมถึงมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 (Joom et al., 2012) ซึ่งจะเห็นได้การทำนายกลไกต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ในพืชกลุ่มชาและหัวหอมมีความเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณทางการอักเสบที่มีการศึกษาอยู่ก่อนหน้านี้ และน่าจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของกลไกการอักเสบในระดับคอมพิวเตอร์เป็นประโยชน์ต่อกิจวิจัยที่สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางที่ช่วยในการตัดสินใจในการนำไปการศึกษาต่อในระดับห้องปฏิบัติการต่อไปได้ และนอกจากกับวิถีการส่งสัญญาณทางการอักเสบที่นิยมศึกษาแล้วก็ยังคงพบว่ามีวิถีการส่งสัญญาณอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่น่าสนใจในพืชกลุ่มชาและหัวหอมซึ่งน่าจะนำไปใช้ในการศึกษากลไกการอักเสบต่อไป (ภาพที่ 4-24 และ 4-26)

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

จากการนำข้อมูลสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพร ชลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less) (Suriyaphan, 2014) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพืชสมุนไพรชนิดอื่น (Andarwulan, et al., 2012) มาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์เพื่อนำมาใช้ในการค้นหาโปรตีนเป้าหมายและกลุ่มโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วม โดยการใช้ฐานข้อมูลสาธารณะและเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่ประกอบไปด้วย (1) การค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์โดยใช้ฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (Davies, et al., 2015) และ STITCH (Szkarczyk, et al. 2016) (2) การสืบค้นข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (Szkarczyk, et al. 2017) (3) การค้นหาข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยอาศัยการสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้แก่ ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler et al., 2004) (4) การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการค้นหาโมดูลที่มีความสำคัญโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์เครือข่าย Cytoscape (Shannon, et al., 2003) พร้อมด้วยโปรแกรมปลั๊กอินที่ใช้ในการค้นหาโมดูล เช่น MCODE (Bader and Hogue, 2003) เป็นต้น ร่วมกับการใช้ข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ตรวจสอบได้ และ (5) การแปลผลทางชีวภาพโดยใช้ข้อมูลของยีนสมาชิกภายในโมดูลที่ถูกคัดเลือกด้วยโปรแกรมปลั๊กอิน BiNGO (Maere, et al., 2005) และ DAVID (Jiao, et al., 2012) โดยในที่นี้จะเน้นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นหลักก่อน เนื่องจากเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Pan, et al., 2010) รายละเอียดของกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เลือกใช้แสดงดังภาพที่ 5-1

ภายหลังการตรวจสอบเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin และ Theaflavin แล้วพบว่าเครือข่ายทั้งหมดมีคุณสมบัติ scale-free, small-world และ modularity ซึ่งแสดงถึงความเป็นเครือข่ายทางชีวภาพที่สามารถนำมาค้นหาเครือข่ายย่อยหรือโมดูลที่มีฟังก์ชันทางชีวภาพที่สำคัญต่อไปได้ (Zheng, Zhang and Qiao, 2015) โดยจะพบโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ทั้ง 10 ชนิด จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 12 โมดูล ซึ่งถือว่าเป็นโมดูลของกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบของสารออกฤทธิ์ที่ถูกคัดเลือกมา โดยกระบวนการวิเคราะห์ฟังก์ชันนอลโมดูลด้วย MCODE (Bader and Hogue, 2003) และคัดกรองด้วยโปรตีนเป้าหมายที่เป็นโปรตีนการอักเสบ และเมื่อนำผลของสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของพืชกลุ่มชาซึ่งมีใบชลู่เป็นส่วนหนึ่งด้วย ก็จะพบโปรตีนเป้าหมายที่มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบของสารออกฤทธิ์ 8 ชนิด จำนวน 25 โปรตีน (ภาพที่ 4-23) ถ้าหากพิจารณาเฉพาะกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับวิถีพาธเวย์หลักที่นิยมศึกษาในห้องปฏิบัติการได้แก่ วิถีการส่งสัญญาณ MAPK, NF- $\kappa$ B และ JAK-STAT ก็ จะพบโปรตีนเป้าหมายจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ PTGS2, NFKB1, MAPK14, NOS2, RELA และ IL6 (ภาพที่ 4-24) ที่สามารถนำมาใช้พิจารณาเพื่อการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองการอักเสบในระดับห้องปฏิบัติการของพืชสมุนไพร ชลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less) ที่เป็นพืชท้องถิ่นของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่นเดียวกันกับตัวอย่างการประยุกต์กับหัวหอม (ภาพที่ 4-25 และ 4-26) ที่สามารถนำกระบวนการทางชีวสารสนเทศข้างต้นนี้มาประยุกต์กับพืชสมุนไพรชนิดอื่นได้เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 5-1 กระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากพืชที่นำมาใช้เป็นตัวแทนพืชสมุนไพรภาคตะวันออกคือ ชลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less) และพืชสมุนไพรประเภทอื่น จะมีสารออกฤทธิ์หลากหลายประเภทที่ไม่จำเพาะเพียงแค่สารออกฤทธิ์ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่ทำการศึกษาในการวิจัยนี้เท่านั้น จึงควรที่จะทำการตรวจสอบสารประเภทอื่นด้วย เช่น  $\beta$ -carotene, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, myricetin, luteolin, anthocyanins และ carotenoids เป็นต้น เพื่อให้ได้ความครบถ้วนของสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของใบชลู่ หรือพืชสมุนไพรประเภทอื่นที่สนใจ
2. เครือข่ายทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่เก็บรวบรวมได้จากฐานข้อมูล ChEMBL (Davies, et al., 2015), STITCH (Szklarczyk, et al. 2016) และ STRING (Szklarczyk, et al. 2017) สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอ้างอิงเพื่อประยุกต์กับการศึกษากลไกระดับโมเลกุลที่มีต่ออาการหรือโรคประเภทอื่นที่สนใจนอกจากการอักเสบตามสรรพคุณของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่มีการรายงานได้ เช่น โรคไขข้ออักเสบ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคอัลไซเมอร์โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง และการยับยั้งแบคทีเรีย เป็นต้น
3. เนื่องจากการรวบรวมเครือข่ายทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์เป็นจำนวนมาก จึงมีความจำเป็นที่ในอนาคตจะต้องมีการสร้างฐานข้อมูลเครือข่ายชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทั้งหมดที่เก็บรวบรวมนี้ขึ้นมาเพื่อสามารถนำมาประยุกต์ให้ตรงตามความต้องการของกลุ่มผู้ใช้งาน ได้แก่ นักวิจัยที่ทำการศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ที่จะช่วยลดต้นทุนและเวลาที่ใช้ในการทำวิจัยเพื่อการตัดสินใจในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

## 5.4 ผลผลิต (Output)

การนำเสนอเป็นโปสเตอร์ บทความย่อ รายงานสืบเนื่องการประชุม ผ่านการประชุมวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ ดังนี้

1. Sornsiri, J., Srisook, K. and Soonanan, P. (2018). Biological interpretation of anti-inflammatory effect of apigenin in mouse cell by using human protein interaction network analysis. The 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2018). November 22-23, 2018 Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand. MBB-P-06: 1 – 11. (ภาคผนวก ก)
2. Sootanan, P. Pumthong, S. and Sornsiri, J. (2018). Anti-inflammatory effects of active compounds in onion. The 6th international conference on Computational Systems-Biology and Bioinformatics 2015 (CSBio2018). 11–12 December 2018. Bangkok, Thailand. (ภาคผนวก ข)



## รายงานการเงิน

ประเภทงบประมาณ	รายละเอียด	จำนวน (บาท)
งบบุคลากร	ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาตรี จำนวน 1 คน	144,000
งบดำเนินการ: ค่าตอบแทน	ค่าตอบแทนนักวิจัย	20,000
งบดำเนินการ: ค่าใช้สอย	ค่าจ้างนิสิตช่วยงานวิจัยระดับปริญญาโท จำนวน 2 คน เงินประกันสังคม ค่าใช้สอยอื่นๆ	125,600
งบดำเนินการ: ค่าวัสดุ	ค่าวัสดุสำนักงาน ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์ ค่าจัดทำเอกสาร คู่มือและรายงาน	12,800
งบดำเนินการ: ค่าธรรมเนียม อุดหนุนสถาบัน	ค่าสาธารณูปโภค (ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน 10%)	33,600
รวมตลอดโครงการ		336,000

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ลงชื่อ.....  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ สุตรอนันต์)  
 หัวหน้าโครงการวิจัย  
 วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

## เอกสารอ้างอิง

- Andarwulan, N., Kurniasih, D., Apriady, R. A., Rahmat, H., Roto, A.V., Bolling, B.W. (2012). Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4:339–347.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N., & Yeh, L.S. (2004). UniProt: The Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 32, D115-119.
- Bader, G.D., & Hogue C.W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4, 2.
- Barabási, A.L., Gulbahce, N., Loscalzo, J. (2011). Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature Reviews Genetics*, 2:56–68.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., & Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2), 495-504.
- Charitou, T., Bryan, K., Lynn, D.J. (2016). Using biological networks to integrate, visualize and analyze genomics data. *Genetics Selection Evolution*, 48(27): 12 pages. DOI 10.1186/s12711-016-0250-1.
- Cho, B.O., Yin, H.H., Park, S.H., Byun, E.B., Ha, H.Y., & Jang, S.I. (2016). Anti-inflammatory activity of myricetin from *Diospyros lotus* through suppression of NF- $\kappa$ B and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(8), 1520-1530.
- Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L., & Overington, J.P. (2015). ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Research*, 43, W612–W620.
- Gan, Y., Zheng, S., Baak, J.P., Zhao, S., Zheng, Y., Luo, N., Liao, W., Fu, C. (2015). Prediction of the anti-inflammatory mechanisms of curcumin by module-based protein interaction network analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(6): 590-595.
- Ham, Y.M., Yoon, W.J., Lee, W.J., Kim, S.C., Baik, J.S., Kim, J.H., Lee, G.S., Lee, N.H., Hyun, C.G. (2015). Anti-inflammatory effects of isoketocharbroic acid from brown alga, *Sargassum micracanthum*. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 14: 1116–1121.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein

- inhibit STAT-1 and NF-**KB** activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-**KB** activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, 2007:45673. doi: 10.1155/2007/45673.
- Jiao, X., Sherman, B.T., Huang, D.W., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., & Lempicki, R.A. (2012). DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics*, 28(13), 1805-1806.
- Joo, S.Y., Song, Y.A., Park, Y.L., Myung, E., Chung, C.Y., Park, K.J., Cho, S.B., Lee, W.S., Kim, H.S., Rew, J.S., Kim, N.S., & Joo, Y.E. (2012). Epigallocatechin-3-gallate inhibits LPS-induced NF-**KB** and MAPK signaling pathways in bone marrow-derived macrophages. *Gut and liver*, 6(2), 188.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C.C., Yang, W.C., Tsai, G.J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentate*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1):123–130.
- Kim, J.H., Kim, M.Y., Kim, J.H., & Cho, J.Y. (2015). Fisetin suppresses macrophage-mediated inflammatory responses by blockade of Src and Syk. *Biomolecules & therapeutics*, 23(5), 414.
- Kim, S.H., Park, J.G., Lee, J., Yang, W.S., Park, G.W., Kim, H.G., Yi, Y.S., Baek, K.S., Sung, N.Y., Hossen, M.J., Lee, M.N., Kim, J.H., & Cho J.Y. (2015). The dietary flavonoid Kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. *Mediators of inflammation*, 2015:904142. doi: 10.1155/2015/904142.
- Kuo, K.L., Weng, M.S., Chiang, C.T., Tsai, Y.J., Lin-Shiau, S.Y., & Lin, J.K. (2005). Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 480-489.
- Lage, K. 2014. Protein-protein interactions and genetic diseases: *The Interactome. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10): 1971–1980.
- Lee, H.N., Shin, S.A., Choo, G.S., Kim, H.J., Park, Y.S., Kim, B.S., Kim, S.K., Cho, S.D., Nam, J.S., Choi, C.S., Che, J.H., Park, B.K., & Jung, J.Y. (2018). Anti-inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages and DNCB-induced atopic dermatitis animal models. *International journal of molecular medicine*, 41(2), 888-898.
- Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., & Lin, J.K. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20(10), 1945-1952.

- Luo, X.Y., Takahara, T., Hou, J., Kawai, K., Sugiyama, T., Tsukada, K., Takemoto, M., Takeuchi, M., Zhong, L., & Li, X.K. (2012). Theaflavin attenuates ischemia–reperfusion injury in a mouse fatty liver model. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(1), 287-293.
- Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 21(16):3448–3449.
- McKusick, V.A. (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 588-604.
- Nasri, S., Anoush, M., & Khatami, N. (2012) Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effects of fresh onion juice in experimental animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(23), 1679-1684.
- Oliveros, J.C. (2007). Venny diagram: VENNY 2.1.0. Retrieved from <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>
- Pan, M-H., Lai, C-S., Ho, C-T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Function*, 1:15–31.
- Piñero, J., Queralt-Rosinach, N., Bravo, À., Deu-Pons, J., Bauer-Mehren, A., Baron, M., Sanz, F., Furlong, L.I. (2015). DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2015:bav028.
- Ren, Z., Wang, X., Wan, S., Zhai, C., He, Y., Zhang, Y., Qiao, Y. (2014). Mechanism of action of salvianolic acid B by module-based network analysis. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24:1333–1340.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(23):4077–4081.
- Sornsiri, J., Srisook, K. and Soonanan, P. (2018). Biological interpretation of anti-inflammatory effect of apigenin in mouse cell by using human protein interaction network analysis. The 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2018). November 22-23, 2018 Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand. MBB-P-06: 1 – 11.

- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T.I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 20; 54:1.30.1-1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5.
- Suriyaphan, O. (2014). Nutrition, health benefits and applications of *Pluchea indica* (L.) Less leaves. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(4):1–10.
- Suzuki, J., Ogawa, M., Sagesaka, Y.M., & Isobe, M. (2006). Tea catechins attenuate ventricular remodeling and graft arterial diseases in murine cardiac allografts. *Cardiovascular research*, 69(1), 272.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L.J., & von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362-D368.
- Szklarczyk, D., Santos, A., von Mering, C., Jensen, L.J., Bork, P., & Kuhn, M. (2016). STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D380–D384.
- Yang, E.J., Ham, Y.M., Yang, K.W., Lee, N.H., Hyun, C.G. (2013). Sargachromenol from *Sargassum micracanthum* Inhibits the lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *The Scientific World Journal*. 2013(712303): 6 pages.
- Yang, X., Yang, J., Hu, J., Li, X., Zhang, X., & Li, Z. (2015). Apigenin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via the inactivation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular medicine reports*, 12(5), 6873-6878.
- Zahiri, J., Bozorgmehr, J.H., Masoudi-Nejad, A. (2013). Computational prediction of protein-protein interaction networks: algorithms and resources. *Current Genomics*, 14(6): 397–414.
- Zheng, S., Ren, Z., Zhang, Y., Qiao, Y. (2014). Anti-inflammatory mechanism research of tanshinone IIA by module-based network analysis. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24:3815–3824.
- Zheng, S., Zhang, Y., Qiao, Y. (2015). The mechanism research of qishen yiqi formula by module-network analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(497314): 12 pages.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

นำเสนอรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

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

22 – 23 November 2018, Bangkok, Thailand.

Sornsiri, J., Srisook, K. and Soonanan, P. (2018). Biological interpretation of anti-inflammatory effect of apigenin in mouse cell by using human protein interaction network analysis. The 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2018). November 22-23, 2018 Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand. MBB-P-06: 1–11.

MBB-P-06

**Biological interpretation of anti-inflammatory effect of apigenin in mouse cell by using  
human protein interaction network analysis**

Jidapa Sornsiri<sup>1</sup>, Klaokwan Srisook<sup>2</sup>, and Pitak Sootanan<sup>2\*</sup>

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

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

\*Email: pitak@buu.ac.th

**ABSTRACT**

A large amount of human genome data is available, especially, protein-protein interactions (PPI) and their biological functions. In addition, extensive similarities between human and mouse genomes permit valuable insights into biological function and the aetiology of human disease. The molecular biological tests often use mouse cells as models for anti-inflammatory effect studies with natural active compounds. This research aims to investigate feasibility of the PPI network of human instead PPI network of mouse to describe the molecular mechanisms of apigenin in anti-inflammatory response effects in mouse model. Results indicated the only small number of human target proteins that cannot be matched to their mouse orthologs. These are not associated with the inflammation response process. The constructed PPI network in the humans and mouse contained the same 91 inflammatory proteins and 5 inflammatory modules. These inflammatory modules associated with signaling through NF-KappaB and MAPK pathways, consistent with the inflammation processes. Therefore, the functional module-base analysis of a human PPI network provides both comprehensive information and process suitable to guideline for elucidating the anti-inflammatory mechanism studies. This research can also help to increase the resources needed to study natural active compounds and future drugs development.

**KEYWORDS:** Anti-inflammation; Apigenin; Biological function; Functional module-based analysis; Protein-protein interaction network



## INTRODUCTION

Biological networks play an important role in visualizing process interactions such as gene expressions, protein-protein interactions (PPI) and metabolic networks (Schreiber et al., 2009). A large amount of human genome information is available, especially, protein-protein interactions and their biological functions (Lehne and Schlitt, 2009). PPI network analyses using bioinformatic processes can be useful in understanding molecular mechanisms (Zahiri et al., 2013) and treatment of diseases, especially, anti-inflammatory responses (Pan et al., 2010). Molecular biological laboratory tests often use mouse cells to describe anti-inflammatory effects of natural active compounds due to the extensive similarities between genomes of human (*Homo sapien*) and mouse (*Mus Musculus*) (Emes et al., 2003) and is important in understanding the role of bioactive compounds and in the development of less toxic drugs design.

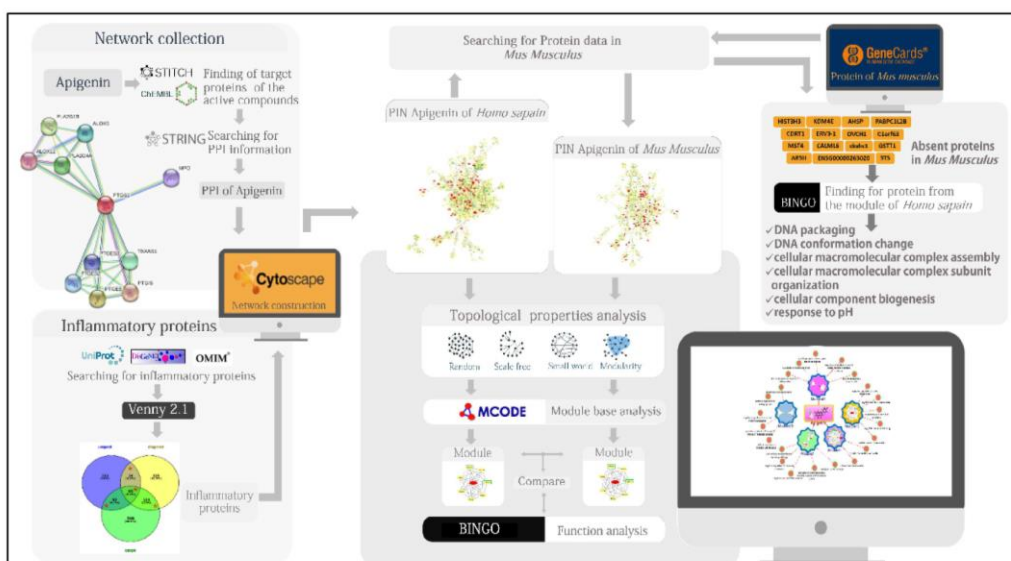
Apigenin is a flavonoid found in fruits and vegetables with anti-inflammatory and pharmacological properties. Therefore, apigenin has been of interest in laboratory-level studies (Zhang et al., 2014). In the presence of apigenin, NO production is suppressed and COX-2 expression reduced. Apigenin also inhibits the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) which stimulates adhesion molecule production (Lee et al., 2007). In addition, apigenin blocks p65 translocation through inhibition of p65/PPAR $\gamma$  complex translocation into nucleus leads to decreases inflammatory mediators via NF-KappaB inactivation (Feng et al., 2016). Functional module-based analysis of PPI networks may provide an efficient way to demonstrate the biochemical mechanism of anti-inflammation for several bioactive compounds such as curcumin (Gan et al., 2015). Model organisms such as mouse cells have been used but their PPI network and biological functions were small relative to human cells. Therefore, a PPI network of human cells was selected to describe the molecular mechanisms of anti-inflammation of the natural active compounds.

In this study, the mechanism of anti-inflammatory response of apigenin is examined along with their protein targets and inflammatory protein. PPI networks were analyzed by Cytoscape (Shannon et al., 2003). Member proteins within the apigenin PPI network in humans were the queries to find their orthologs in mouse. The orthologs are the genes that have the same ancestor in different species (Reed et al., 2003). Mouse protein will be used to construct a PPI network of apigenin by selecting proteins and their interactions within the PPI network in humans. The network behavior was analyzed as a biological network. Then module base analysis was used to select modules that have inflammatory proteins. Biological function was interpreted by using the information of human proteins. This can explain the role and molecular mechanisms involved in inflammation that may lead to validate in the wet lab for its further clinical application.

## **MATERIALS AND METHODS**

Biological interpretation of the anti-inflammatory effect of apigenin starts with the target proteins of apigenin obtained from ChEMBL (Davies et al., 2015) and STITCH (Szkarczyk et al., 2016). As shown in Figure 1. These target proteins were examined only in humans and for each, PPI information was collected from STRING database (Szkarczyk et al., 2017). PPI information collected and stored for all apigenin target proteins was used to analyze the PPI network. The three online disease databases, including DisGeNET (Piñero et al., 2015), OMIM (McKusick, 2007) and UniProt (Apweiler et al., 2004), were applied to search for inflammatory proteins, defined as the proteins found in two of three databases using Venn diagram. These inflammatory proteins store data that were used in the analysis in conjunction with the network.

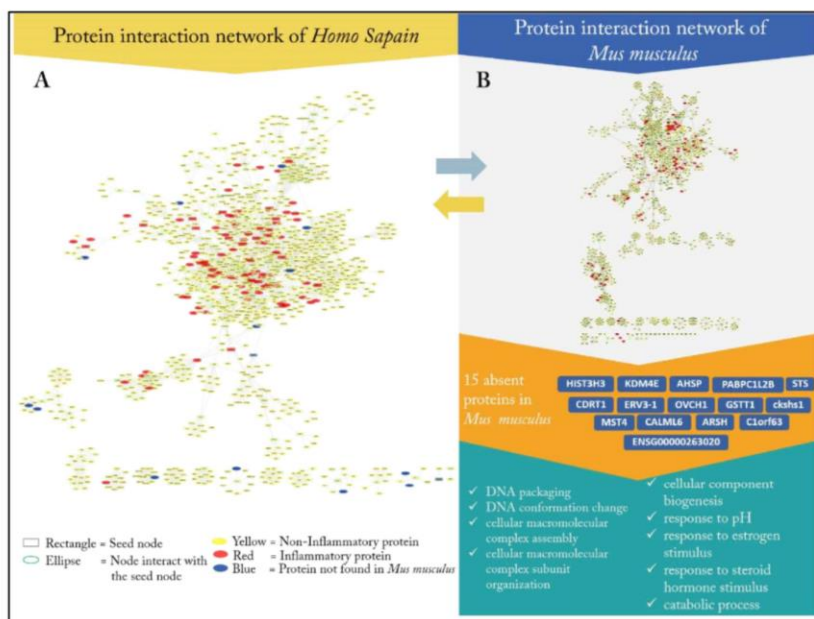
PPI information for all target proteins in apigenin was analyzed and visualized by Cytoscape software (Shannon et al., 2003). Target proteins, their interactions and information on inflammatory proteins were analyzed with the network. Network proteins for mouse were searched in the GeneCard database (Rappaport et al., 2017). These proteins were used to construct the PPI network of apigenin in mouse from those in the PPI network of apigenin in humans. Proteins absent in mouse but present in humans were stored for further analyses. Behavior of PPI networks of apigenin in humans and mouse were analyzed using Network Analyzer (Assenov et al., 2008) based on Cytoscape software and analyzed into a module by MCODE (Bader and Hogue, 2003) that selects clusters of highly interconnected modules in the network. Identical inflammatory modules from both network and modules containing proteins found in humans but not in mouse were selected. These modules were analyzed for their function using BiNGO (Maere et al., 2005) algorithm to explain biological functions of interesting modules.



**Figure 1** Overall experiment

## RESULTS AND DISCUSSION

Target proteins of apigenin contain 196 proteins but only PPI information for 193 targets were selected due to confidence scores  $<0.7$ . STK10, STK17A and CDKL1 proteins were not used in network construction. Searching for human inflammatory proteins are those associated with “inflammation” in two of three online databases, such as DisGeNET (Piñero et al., 2015) OMIM (McKusick, 2007) and UniProt (Apweiler et al., 2004). These 403 Inflammatory proteins were found. Target proteins, their interactions and inflammatory protein information were identified in the PPI network. The constructed PPI network of apigenin contained 1,153 nodes (proteins) with 5,013 interactions and 91 inflammatory proteins (Figure 2A). Apigenin proteins in the PPI network were searched in the 1,138 mouse proteins in the GeneCard database (Rappaport et al., 2017). Absent mouse proteins ( $n=15$ ) were not inflammatory and included HIST3H3, KDM4E, AHSP, PABPC1L2B, CDRT1, ERV3-1, OVCH1, MST4, CALML6, ckshs1, C1orf63, ENSG00000263020, ARSH, STS and GSTT1. Further, they were used to select proteins and interactions from apigenin in the human PPI network to construct those in mouse. Apigenin in the PPI network of mouse contained 1,138 nodes with 3,851 interactions and 91 inflammatory proteins (Figure 2B). Both PPI networks were used to analyze network behavior, resulting in the analysis of topological properties.



**Figure 2** PPI network of apigenin. (A) The PPI network in human; (B) The PPI network in mouse, a list of 15 absent proteins in mouse and their functions in biological processes.

These topological properties will help to understand the composition and structure of large biological networks (Figure 3). Degree distribution graph was calculated by counting the number of connections between the PPI network proteins in humans and mouse. Equations of apigenin PPI networks in humans and mouse,  $y=795.33X^{-1.1616}$  and  $y=890.04X^{-1.710}$ , respectively (Figure 3A and 3D) have a power law degree distribution ( $k \sim k^{-\gamma}$  ( $\gamma < 3$ )). Average shortest path length was average density length between all pairs of protein pairs in the network (Figure 3B and 3E). Apigenin PPI network in humans was mostly concentrated in steps 4-5 with the shortest path length between any two proteins, 4.962 (Figure 3C). Apigenin PPI network in mouse was mostly concentrated in steps 5-7 with the shortest path length between any two proteins, 6.251 (Figure 3F). Thus, most proteins were closely linked with and an apigenin PPI network in humans and mouse having a small world property. The degree to which nodes clustered within a network and represented by a cluster coefficient in the present study were 0.683 and 0.677, respectively for apigenin PPI networks in humans and mouse (Figure 3C and 3F). Clustering coefficients of a random network of apigenin in humans and mouse are 0.007 and 0.006, respectively suggesting both PPI networks have modular properties. Network behavior analysis suggest human and mouse apigenin PPI networks possess a scale-free property and a small world property and modular properties (Zheng, Zhang et al., 2015).

Apigenin PPI networks in humans and mouse were analyzed using MCODE algorithm (Bader and Hogue, 2003) base on Cytoscape program (Shannon et al., 2003). The module based analysis of PPI network in humans identified 65 modules with 23 inflammatory modules, including 1, 6, 9, 10, 13, 14, 18, 20, 29, 30, 34, 38, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 51, 52, 54 and 65. In mouse, 88 modules were identified with 26 inflammatory modules. These 26 modules included 2,8, 9, 17, 18, 20, 24, 29,30, 39, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 57, 59, 63, 66, 70, 74 and 87 with five common to both networks and module 1 in humans identical to that of module 2 in mouse (module 1 ↔ module2), module 9 ↔ module 20, module 13 ↔ module 24, module 45 ↔ module 59 and module 65 ↔ module 87.

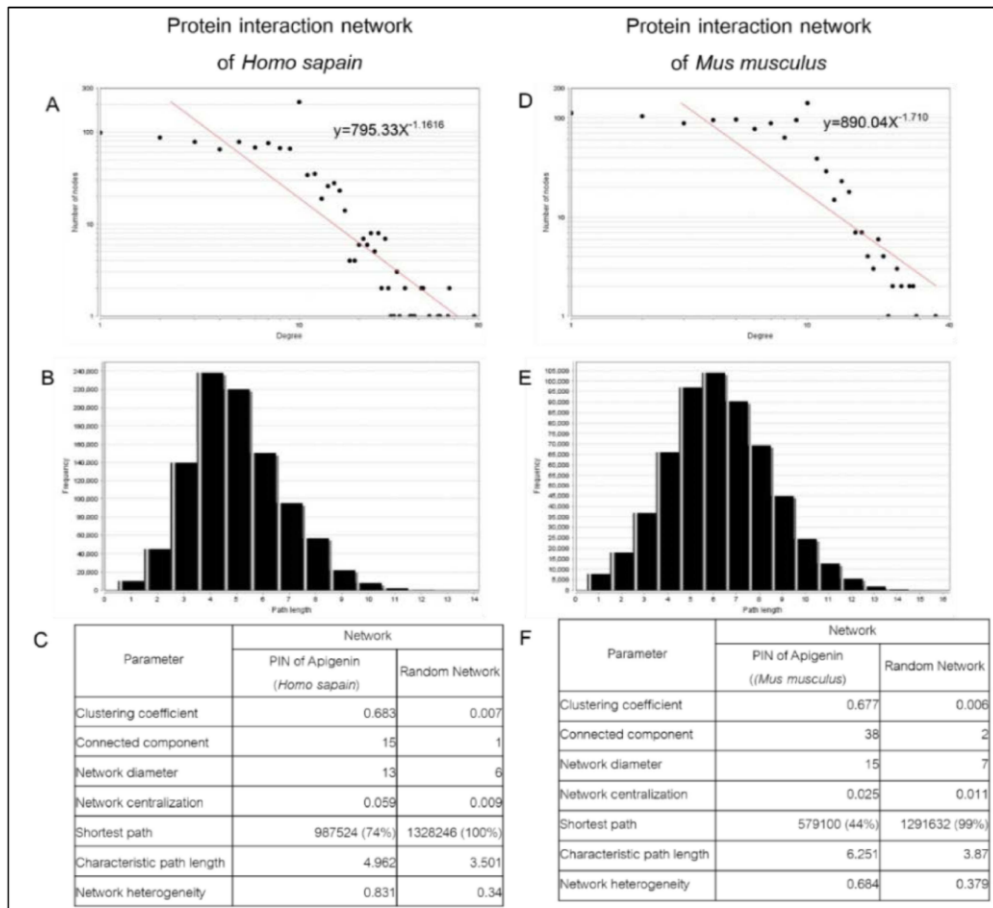
The inflammatory module of apigenin in humans and mouse have same biological processes (Figure 4), including that to stimuli in modules 1 and 65, signaling of inflammatory response through signaling pathways found in modules 1, 45 and 65, inflammatory mediators production processes found in modules 65 and regulation of wound healing found in modules 13. The predictive power of this in silico approach is based on consideration between the results of the biological interpretation of functional modules and research articles that related to anti-inflammatory effects of apigenin. Apigenin can inhibit activation of MAPK signaling pathways involved in the expression of inflammatory mediators. In addition, apigenin can inhibit activation of NF-KappaB signaling pathways, associated with production of inflammatory mediators and adhesion molecular during inflammation (Wang et al., 2012), resulting in inhibition of COX-2 expression and NO production. COX-2 is an important enzyme in inflammation that converts arachidonic acid to prostaglandins (PGE<sub>2</sub>). PGE<sub>2</sub> and NO are involved in the pathophysiology of inflammatory disease and play a key role in the synthesis of inflammatory mediators (Lee et al., 2007). In addition, apigenin inhibits phosphorylation of ERK, JNK and p38 proteins in MAPKs signaling pathways that can also regulate cell migration. Cell migration is extremely important in tissue formation, wound healing, immune surveillance, inflammatory response, and tumor metastasis (Qingxin et al., 2011). Apigenin also has a biological process consistent with inflammatory responses associated with cell cycle found in module 45 and regulates apoptosis in module 65. Apigenin was associated with induced G2/M Phase cell cycle arrest and regulated apoptosis. These processes are related to physiological processes regulating cellular balance through the PI3K / Akt signaling pathway. The PI3K / Akt signaling pathway regulates the Bcl-2 family of proteins. Apigenin activates caspase-3 and led to PARP cleavage, resulting in the apoptosis (Zhu et al., 2013).

Human proteins in mouse apigenin PPI network contained 91 inflammatory proteins (Figure 2B). Meanwhile, 15 proteins absent in mouse were found in these inflammatory modules and do not affect module analysis and biological interpretation. These shows that the biological interpretation of inflammatory modules may be likely to have the same biological processes, due to these are the same proteins. 15 absent proteins in mouse will be searched for the module in the network, which found HIST3H3 in module 5, AHSP in module 29, STS in module 8, MST in module 22, GSTT1 in module

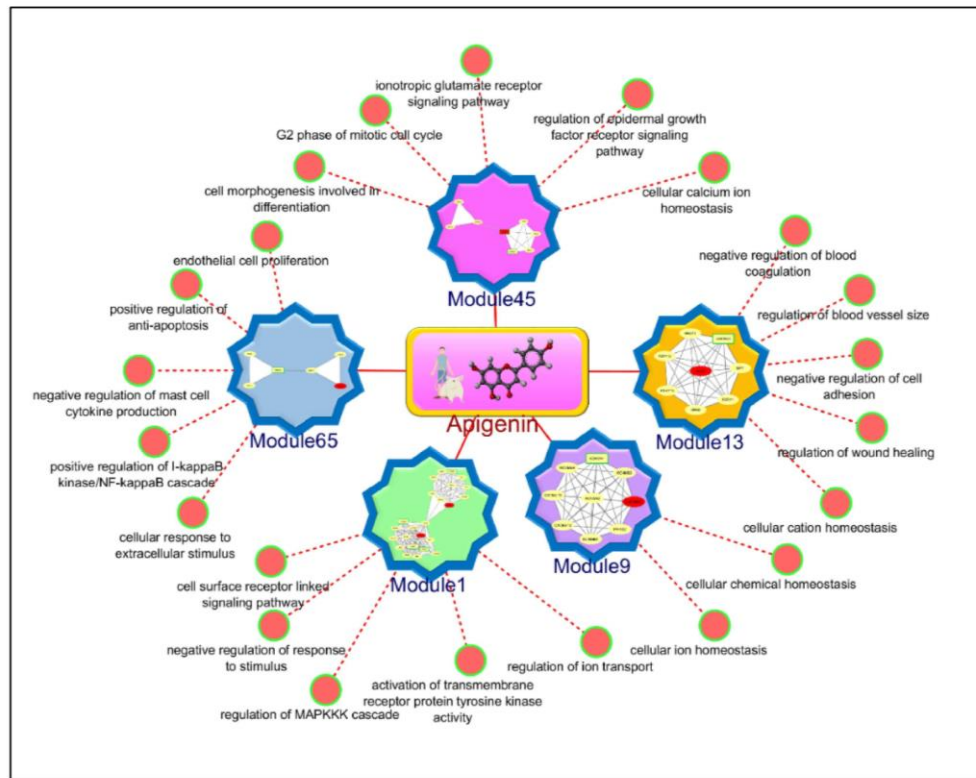
30, ERV3- 1 in modules 47 and CALML6 in module 56. These modules were interpreted the biological processes by using BINGO (Maere et al., 2005). The absent proteins in mouse were selected to interpret the biological processes. Only HIST3H3 and STS were interpreted, due to other proteins may not yet have the linkage of the gene ontology in the BINGO algorithm resulting cannot be interpreted. The result of HIST3H3 and STS are associated with DNA packaging, DNA conformation change, response to pH and response to steroid hormone stimulus (Figure 2B). These processes show that the biological processes are not associated with the inflammatory response in molecular mechanisms (Wang et al., 2012; Lee et al., 2007; Qingxin et al., 2011; Zhu et al., 2013). Therefore, application of the apigenin PPI network from humans as the model organism is appropriate to analyze inflammatory modules and interpret their biological processes and the molecular mechanisms involved in inflammation. Therefore, biological interpretation of apigenin in mouse cells from human PPI network analysis can be used to guide decisions for the selection of apigenin information for further analysis in the related future studies.

## **CONCLUSION**

In summary, PPI network of apigenin analysis described the anti-inflammatory mechanism. The online databases and public tools were applied for PPI network construction and analysis. Apigenin PPI network in humans contained 1,153 nodes with 5,013 interactions and 91 inflammatory proteins and the apigenin PPI network in mouse contained 1,138 nodes with 3,851 interactions and 91 inflammatory proteins. The two networks possess topological properties of scale-free, small world, and modularity that were important features for the functional module-based analysis. 65 Modules with 23 inflammatory modules were identified from the apigenin PPI network in human. The apigenin PPI network in mouse contained 88 modules with 26 inflammatory modules. There are 5 similar inflammatory modules of apigenin PPI networks in human and mouse. The present study demonstrated the anti-inflammatory effect of apigenin in mouse cell by using human PPI network analysis may be partly attributable to regulation of signaling through NF-KappaB and MAPK signaling pathways. Therefore, the analysis of the apigenin PPI network in humans instead of using the mouse information as an experimental animal may represent the result that can be analyzed for anti-inflammatory response process at the computer level. The result indicated the only small number of human target proteins that cannot be matched to their mouse orthologs and these are not associated with the inflammation response process. This is potentially valuable contribution and it can help optimize resources needed to study natural active compounds and future drugs.



**Figure 3** Topological properties of PPI network. (A) degree distribution of the PPI network in humans; (B) shortest path length distribution of the PPI network in humans; (C) topological parameter analyses of PPI network behavior in humans; (D) degree distribution of the PPI network in mouse; (E) shortest path length distribution of PPI network in mouse; (F) topological parameters analysis of PPI network behavior in mouse.



**Figure 4** Anti-inflammatory activities of inflammatory modules in the apigenin PPI networks in humans and mouse

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Burapha University through its research grant number 137/2561. We are grateful to Prof. Dr. Frederick W.H. Beamish for proof reading our manuscript and Miss Jarinee Kongtrub for our beautiful pictures.

#### REFERENCES

- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi, N. & Yeh, L. S. (2004). UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), D115-119.
- Assenov, Y., Ramirez, F., Schelhorn, S.E., Lengauer, T., Albrecht, M. (2008). Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*, 24, 282 - 284.
- Bader, G. D. & Hogue, C. W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4: 2.



- Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L. & Overington, J. P. (2015). ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W612-620.
- Emes, R. D., Goodstadt, L., Winter, E. E. & Ponting, C. P. (2003). Comparison of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology. *Human molecular genetics*, *12*(7), 701-709.
- Feng, X., Weng, D., Zhou, F., Owen, Y. D., Qin, H., Zhao, J., Huang, Y., Chen, J., Fu, H. & Yang, N. (2016). Activation of PPAR $\gamma$  by a natural flavonoid modulator, apigenin ameliorates obesity-related inflammation via regulation of macrophage polarization. *EBioMedicine*, *9*, 61-76.
- Gan, Y., Zheng, S., Baak, J. P., Zhao, S., Zheng, Y., Luo, N., Liao, W. & Fu, C. (2015). Prediction of the anti-inflammatory mechanisms of curcumin by module-based protein interaction network analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *5*(6), 590-595.
- Lee, J. H., Zhou, H. Y., Cho, S. Y., Kim, Y. S., Lee, Y. S., & Jeong, C. S. (2007). Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Archives of Pharmacal Research*, *30*(10), 1318-1327.
- Lehne, B. & Schlitt, T. (2009). Protein-protein interaction databases: keeping up with growing interactomes. *Human genomics*, *3*(3), 291.
- Maere, S., Heymans, K. & Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, *21*(16), 3448-3449.
- McKusick, V. A. (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, *80*(4), 588-604.
- Pan, M. H., Lai, C. S. & Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, *1*(1), 15-31.
- Piñero, J., Queralt-Rosinach, N., Bravo, À., Deu-Pons, J., Bauer-Mehren, A., Baron, M., Sanz, F. & Furlong, L. I. (2015). DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database*, 2015.
- Qingxin, L., Xiangui, C., Guolin, Y., Xuewen, M. & Maoxian, D. (2011). Apigenin inhibits cell migration through MAPK pathways in human bladder smooth muscle cells. *Biology of the Cell*, *35*(3), 71-79.
- Rappaport, N., Fishilevich, S., Nudel, R., Twik, M., Belinky, F., Plaschkes, I., Stein, T. I., Cohen, D., Oz-Levi, D. & Safran, M. (2017). Rational confederation of genes and diseases: NGS interpretation via GeneCards, MalaCards and VarElect. *Biomedical engineering online*, *16*(1), 72.

- Reed, J. C., Doctor, K., Rojas, A., Zapata, J. M., Stehlik, C., Fiorentino, L., Roth, W., Matsuzawa, S., Newman, R., Takayama, S., Marusawa, H., Xu, F., Salvesen, G., Godzik, A., RIKEN GER Group & GSL Members. (2003). Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome research*, 13(6b), 1376-1388.
- Schreiber, F., Dwyer, T., Marriott, K. & Wybrow, M. (2009). A generic algorithm for layout of biological networks. *BMC bioinformatics*, 10(1), 375.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A. & Bork, P. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362-D368.
- Szklarczyk, D., Santos, A., von Mering, C., Jensen, L. J., Bork, P. & Kuhn, M. (2016). STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D380-384.
- Wang, J., Liao, Y., Fan, J., Ye, T., Sun, X. & Dong, S. (2012). Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation*, 35(4), 1466-1476.
- Zahiri, J., Hannon Bozorgmehr, J. & Masoudi-Nejad, A. (2013). Computational prediction of protein–protein interaction networks: algorithms and resources. *Current Genomics*, 14(6), 397-414.
- Zhang, X., Wang, G., Gurley, E. C. & Zhou, H. (2014). Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One*, 9(9), e107072.
- Zheng, S., Zhang, Y. & Qiao, Y. (2015). The Mechanism Research of Qishen Yiqi Formula by Module-Network Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 497314.
- Zhu, Y., Mao, Y., Chen, H., Lin, Y., Hu, Z., Wu, J., Xu, X., Xu, X., Qin, J. & Xie, L. (2013). Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer Cell International*, 13(1), 54.

ภาคผนวก ข

นำเสนอบทความย่อแบบขยาย งานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

The 6<sup>th</sup> international conference on Computational Systems-Biology and  
Bioinformatics 2018 (CSBio2018)

11–12 December 2018. Bangkok, Thailand.

Sootanan, P. Pumthong, S. and Sornsiri, J. (2018). Anti-inflammatory effects of active compounds in onion. The 6<sup>th</sup> international conference on Computational Systems-Biology and Bioinformatics 2018 (CSBio2018). 11–12 December 2018. Bangkok, Thailand.

Please tick as appropriate

- Oral presentation  
 Poster presentation

## Anti-inflammatory effects of active compounds in onion

Extended Abstract<sup>†</sup>

Pitak Sootanan\*

Sunida Pumthong

Jidapa Sornsiri

Department of Biochemistry, Faculty of  
 Science, Burapha University, Chonburi  
 20131, Thailand

Department of Biochemistry, Faculty of  
 Science, Burapha University, Chonburi  
 20131, Thailand

Biological Science Graduate Programs,  
 Faculty of Science, Burapha University,  
 Chonburi 20131, Thailand

pitak@buu.ac.th

sunida.aun@gmail.com

Jidapa\_1627@hotmail.com

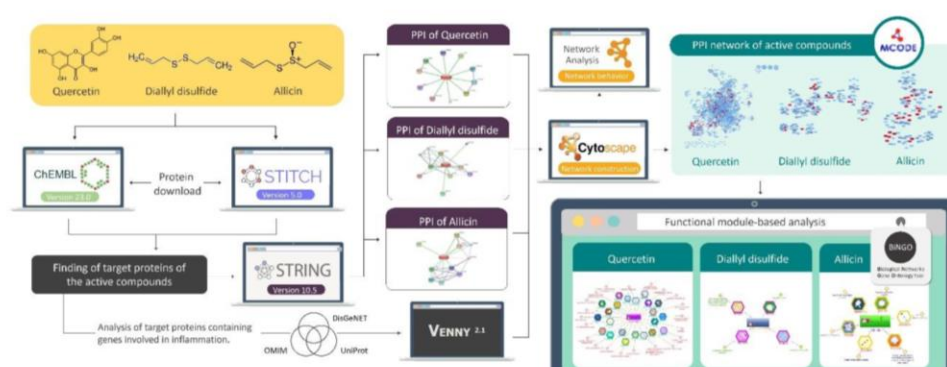


Figure 1: Overall experiment.

### ABSTRACT

Three active compounds in onion such as quercetin, diallyl disulfide and allicin were studied in their anti-inflammatory effects by using public online databases and bioinformatics tools. Inflammatory modules of PPI networks were identified by functional module-based analysis and enriched with GO based on protein complex detection. These are basic to understanding the role of active compounds in onion at the computer level and provide an important guideline to validate its clinical application and further drug development.

### CSBio 2018 themes:

“Other applications for Life Sciences”

### ADDITIONAL KEYWORDS AND PHRASES

Anti-inflammation, Functional module-based analysis, Protein-protein interaction network, Onion

### 1 INTRODUCTION

Inflammation is the reaction of body response to stimuli that cause tissue injury. Excessive inflammatory responses are the principal

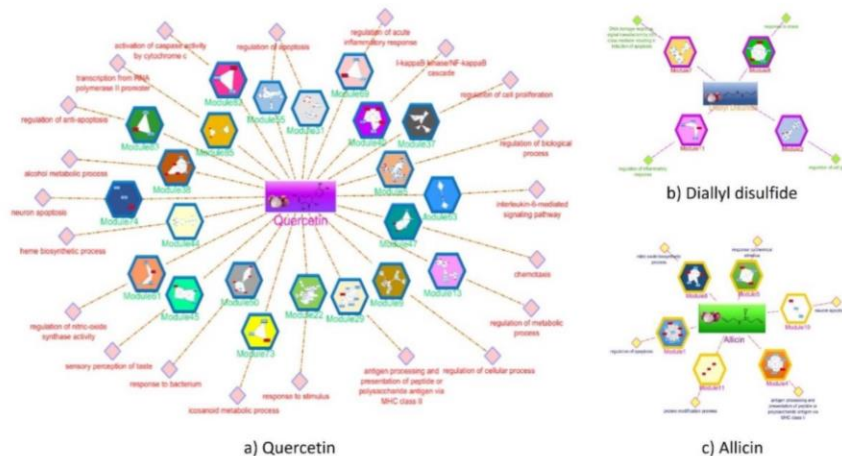
causes many inflammation related diseases [1]. Onion (*Allium cepa*) is a popular herb used in cooking and has properties in the treatment of inflammatory diseases. This is an important source of dietary phytochemicals with proven anti-inflammation such as quercetin, diallyl disulfide and allicin [2]. Biological networks represent the collaboration of interactions and forms of processes within a cell, such as protein-protein interactions (PPI), gene regulatory, or metabolic networks [3]. PPI networks are pivotal to the proper functioning of basic biochemical mechanisms within cells [4]. In this study, anti-inflammatory effects from onion-derived active compounds, quercetin, diallyl disulfide and allicin are examined along with their protein targets for further wet lab validation. PPI networks were constructed and the properties of networks were analyzed based on topological parameters. Inflammatory modules of PPI networks were identified and enriched with GO based on protein complex detection.

### 2 EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL DETAILS

The overall experiment is shown in Figure 1. Targeted proteins of quercetin, diallyl disulfide and allicin, the major active ingredients of onion were retrieved from ChEMBL 23.0

(<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) and STITCH 5.0 (<http://stitch.embl.de/>). Their protein symbol and amino acid sequences store data are used to find out the PPI information of target proteins from STRING 10.5 (<https://string-db.org/>). The PPI information for all target proteins of three bioactive compounds, such as quercetin, diallyl disulfide and allicin, with a confidence score >0.7 were selected to construct the PPI network using open-source Cytoscape 3.5.1 software [5]. Venny program was applied to search for inflammatory proteins that can be found associated to "inflammation" in two of three databases, including DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/>), OMIM (<https://www.omim.org/>) and UniProt (<https://www.uniprot.org/>). These set of

inflammatory proteins were used to analyze target proteins that associated with inflammation. PPI networks was analysed their topological properties with Network Analyzer [6], a plug-in of Cytoscape [5], compared with the random network. Properties of scale-free, small world and modularity of these PPI networks were also investigated. The PPI networks were further divided into modules by the MCODE 1.4.2 [7], a plug-in of Cytoscape [5], using a cutoff value for the connectivity degree of nodes (proteins in the network) equal to 3. Inflammatory modules that contained inflammatory proteins were analyzed with GO functional annotation and enrichment using BiNGO 3.0.3 [8], plug-in of Cytoscape [5].



**Figure 2:** Biological processes in the anti-inflammatory effects of (a) quercetin (b) diallyl disulfide and (c) allicin

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

PPI networks from bioactive compounds, quercetin, diallyl disulfide and allicin present in onion examine inflammatory mechanisms by functional module-based analysis. The three networks possess topological properties of scale-free, small world, and modularity, important features in functional module-based analyses [9]. There were 25, 6, and 6 inflammatory modules identified from the quercetin, diallyl disulfide and allicin networks, respectively (Figure 2). The inflammatory modules of these three networks were interpreted to involve many inflammatory processes. This study demonstrated the anti-inflammatory effects from quercetin, diallyl disulfide and allicin may be partly attributable to regulation of several signalling pathways related to the production of proinflammatory cytokines and inflammatory mediators such as I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade, apoptosis and nitric oxide biosynthesis [10]. These are basic to understanding the role of active compounds in onion at the computer level and provide an important guideline to validate its clinical application and further drug development.

### 4 CONCLUSIONS

This result can be used as preliminary data indicate the role and mechanisms of inflammation are useful for researchers to the

important guideline to assist in bringing the active compound to study in the wet lab and further drug development.

### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Burapha University through its research grant number 137/2561. We are grateful to Miss Jarinec Kongtrub for our beautiful pictures.

### REFERENCES

- [1] FUJIWARA, N., AND KOBAYASHI, K. 2005. *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy.* 4(3), 281-286.
- [2] ZENG, Y., LI, Y., YANG, J., PU, X., DU, J., YANG, X., YANG, T., AND YANG, S. 2017. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 17, 9402849, 13 pages.
- [3] FAISAL, F. E., MENG, L., CRAWFORD, J., AND MILENKOVIC, T. 2015. *EURASIP J Bioinform Syst Biol.* 3, 19 pages.
- [4] KUZMANOV, U., AND EMILI, A. 2013. *Genome Med.* 5(37), 12 pages.
- [5] SHANNON, P., MARKIEL, A., AND OZIER, O. 2003. *Genome Res.* 13(11), 2498-2504.
- [6] ASSENOV, Y., RAMIREZ, F. SCHELHORN, S.E., LENGAUER, T., AND ALBRECHT, M. 2008. *Bioinformatics.* 24, 282 - 284.
- [7] BADER, G.D., AND HOGUE, C. W. 2003. AN AUTOMATED METHOD FOR FINDING MOLECULAR COMPLEXES IN LARGE PROTEIN INTERACTION NETWORKS. *BMC Bioinformatics.* 4(2), 27 pages.
- [8] MAERE, S., HEYMANS, K., AND KUIPER, M. 2005. *Bioinformatics.* 21(16), 3448-3449.
- [9] GAN, Y., ZHENG, S., BAAK, J. P., ZHAO, S., ZHENG, Y., LUO, N., LIAO, W., AND FU, C. 2015. *Acta Pharm Sin B.* 5(6), 590-595.
- [10] LI, Y., YAO, J., HAN, C., YANG, J., CHAUDHRY, M. T., WANG, S., LIU, H., AND YIN, Y. 2016. *Nutrients.* 8(3), 167, 14 pages.