

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารไตรเอริลมีเทน

แบบสมมาตร

**Synthesis and anti-inflammatory activity of symmetrical
triarylmethanes**

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรณพงศ์

อ.ดร. ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. ก่อวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณปี 2557

บทคัดย่อ

การผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ที่เกิดจากเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และพรอสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) ที่เกิดจากเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ที่มากเกินไปโดยแมคโครฟาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดพยาธิสภาพของกับโรคที่เกิดจากการอักเสบหลายชนิด ดังนั้นการยับยั้งการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบเหล่านี้เป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาโรคการอักเสบต่างๆ สาร tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane (JJST5) เป็นอนุพันธ์ไตรเอริลมีเทนแบบสมมาตรที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในการศึกษาทำการตรวจสอบกลไกระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์การต้านการอักเสบของ JJST5 ในเซลล์แมคโคร-ฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (LPS) สาร JJST5 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ JJST5 สามารถลดการแสดงออกของ iNOS ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 อีกทั้ง JJST-5 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ COX-1 นอกจากนี้ JJST5 ไม่สามารถลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ nuclear factor-κB p65 (NF-κB) ในขณะที่ JJST5 ยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของ c-Jun N-terminal kinases (JNKs) แต่ไม่มีผลต่อ extracellular-signal-regulated kinases (ERKs) และ p38 kinases จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า JJST5 ลดการตอบสนองการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ผ่านการยับยั้งการกระตุ้น JNK ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสังเคราะห์ JJST5 ในการเป็นสารนำในการพัฒนายาต้านการอักเสบชนิดใหม่ได้

คำสำคัญ : ไตรเอริลมีเทนแบบสมมาตร, ไนตริกออกไซด์, พรอสตาแกลนดิน E₂, iNOS, COX-2, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ABSTRACT

Overproduction of inducible nitric oxide synthase (iNOS)-catalyzed nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2)-catalyzed prostaglandin E₂ (PGE₂) by macrophages is involved in pathogenesis of various inflammation-related conditions. Thus, inhibition of such pro-inflammatory mediator productions could be a therapeutic approach for treatment of inflammatory diseases. The newly synthesized tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane (JJST5), a symmetrical triarylmethanes derivative has been shown potent inhibitory effect on NO production. This study, the molecular mechanism underlying anti-inflammatory effect of JJST5 was investigated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. JJST5 significantly inhibited the production of NO and PGE₂ in LPS-stimulated macrophages in a dose-dependent manner. The compound also dose-dependently suppressed the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) at mRNA and protein levels but did not inhibit significantly cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. The expression of COX-1 mRNA was not affected by JJST5. Furthermore, JJST5 had no effect on the nuclear translocation of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B) whereas it inhibited the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs) but not extracellular-signal-regulated kinases (ERKs) and p38 kinases. Taken together, these data indicate that JJST5 suppresses LPS-stimulated inflammatory responses via blockade of JNK activation. The obtained results present the potential utilization of a synthetic compound, JJST5 as a lead compound for the development of novel anti-inflammatory drugs.

Keywords: Symmetrical triarylmethanes, Nitric oxide, ProstaglandinE₂, iNOS, COX-2, Anti-inflammatory effect

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี และโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยใน โครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวเพชรรัตน์ ไสว นางสาวกาญจนา ดวงเกตุ และนางสาวสรินพร อุดม พงษ์ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

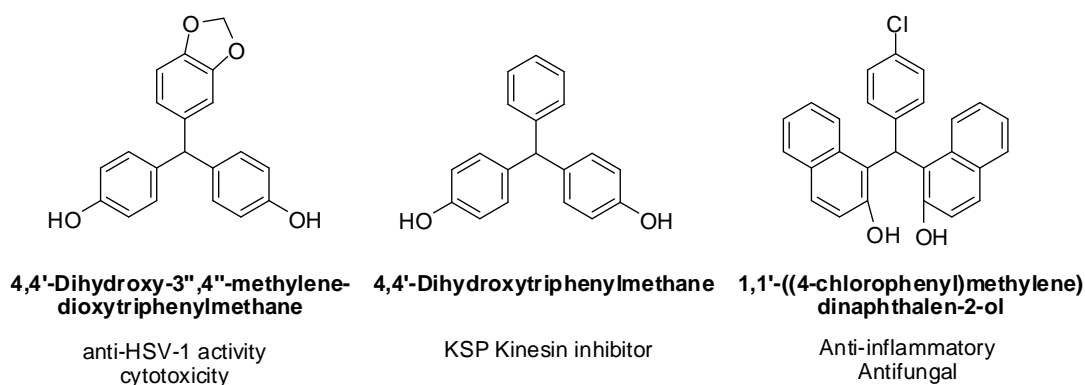
	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทนำ	5
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลอง	27
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	43
บรรณานุกรม	47
ผลผลิตของโครงการวิจัย	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

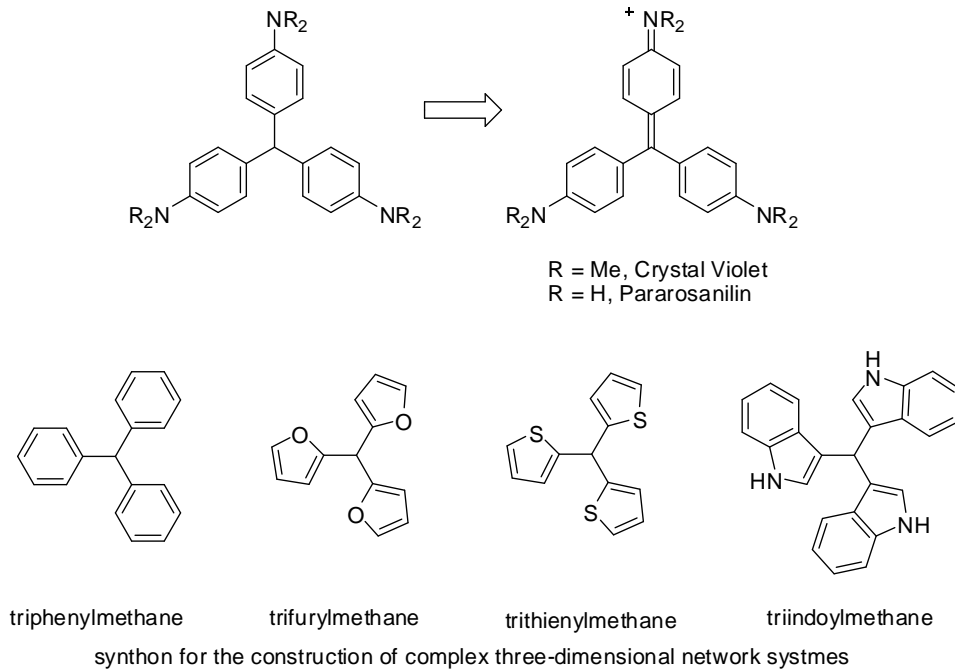
สารในกลุ่ม triarylmethane (TRAMs) เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น 4,4'-dihydroxy-3'',4''-methylenedioxytriphenylmethane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิด herpes simplex virus type 1 (Anti-HSV-1) (Mibu et al., 2005), 4,4'-dihydroxytriphenylmethane ยับยั้งเชื้อ KSC Kinesin (Podder et al., 2007) 1,1'-((4-chlorophenyl)methylene)dinaphthalen-2-ol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และยับยั้งเชื้อรา (antifungal) (Lewis et al., 1952) ดังแสดงในรูปที่ 1-1 เมื่อเร็วๆ นี้ยังพบว่าอนุพันธ์ของ triarylmethane บางชนิดมีฤทธิ์เป็น antitubercular (anti-TB) (Parai et al., 2008) นอกจากนี้ในทางอุตสาหกรรมสามารถนำอนุพันธ์ของสาร triarylmethane มาใช้เป็นสีย้อม (dyes) เป็นหมู่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา (protective group) และใช้เป็น photochromic agent (Esquivias et al., 2006) ได้อีกด้วย



รูปที่ 1-1 ตัวอย่างของสารอนุพันธ์ของ triarylmethane ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

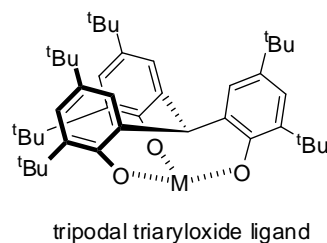
สารประกอบ symmetrical triarylmethane หรือ สารประกอบไตรเอริลมีเทนแบบสมมาตร เป็นสารประกอบ triarylmethane ชนิดหนึ่งที่คาร์บอนอะตอมสร้างพันธะกับหมู่ aryl ที่เหมือนกันทั้งสามหมู่ ส่วนใหญ่เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในทางอุตสาหกรรมการผลิตสีย้อม (dyes) เป็นสาร photochromic agent เป็นหมู่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา (protective group) ในปฏิกิริยาของสารประกอบนิวคลีโอไซด์ โอลิโกนิวคลีโอ

โอไซด์ เปปไทน์และคาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นโครงสร้างพื้นฐานสำหรับการสร้างระบบโครงตาข่ายแบบสามมิติ (three-dimensional network system) และใช้เป็นสารเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry (Nair et al., 2006) ดังแสดงในรูปที่ 1-2



รูปที่ 1-2 ตัวอย่างของสารอนุพันธ์ของ symmetrical triarylmethane ที่สำคัญ

นอกจากนี้ยังสามารถนำอนุพันธ์ของ symmetrical triarylmethane เป็น ligand ชนิด tripodal triaryloxyde (Akagi et al., 2005) ดังแสดงในรูปที่ 1-3



รูปที่ 1-3 tripodal triaryloxyde ligand

การสังเคราะห์สารในกลุ่ม triarylmethane ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้มีหลายวิธีแต่ส่วนใหญ่จะต้องจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น triarylmethane ที่มีหมู่ aryl เหมือนกัน 2 หมู่ ขณะที่วิธีการสังเคราะห์ symmetrical triarylmethane หรือ triarylmethane ที่มีหมู่แทนที่ซ้ำกันสามหมู่ยังมีอยู่น้อยและส่วนใหญ่จะใช้รีเอเจนต์ที่มีราคาแพง ใช้เบสที่ไวต่อความชื้น หรือต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง (Nair et al., 2006) ดังนั้นการศึกษาหาปฏิกิริยาการเตรียม symmetrical triarylmethane วิธีใหม่ๆ และใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ symmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก ไม่มีหรือมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย และใช้สภาวะในการทดลองที่ไม่รุนแรงยังเป็นหัวข้อของงานวิจัยที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก

ไอโอดีน (I_2) เป็นรีเอเจนต์ที่มีการค้นพบมาอย่างยาวนาน (>100 ปี) อย่างไรก็ตามการนำไอโอดีนมาใช้ประโยชน์ด้านการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้มีการศึกษาเมื่อประมาณสิบกว่าปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์พบว่าสามารถนำไอโอดีนมาใช้ทำปฏิกิริยาได้หลายชนิด เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของอัลกอฮอล์ เอมีน ซัลไฟด์และสารอะโรมาติก เป็นตัวเร่งสำหรับปฏิกิริยา protection และ deprotection ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ปฏิกิริยาการปิดวงแหวน (iodocyclization) ปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนกับคาร์บอน และปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบเฮเทอโรอะโรมาติก เป็นต้น นอกจากนี้ไอโอดีนสามารถใช้สังเคราะห์สารชนิดต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งที่น่าสนใจของไอโอดีน ก็คือ เป็นสารที่มีราคาถูก มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย ใช้วิธีการที่ง่ายไม่ซับซ้อน และสามารถใส่สังเคราะห์สารในปริมาณมากๆ ได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นวิธีการสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรม (Togo, H. & Iida, S., 2006, Jereb et.al, 2011)

สารเคมีที่ใช้เป็นยารักษาโรคในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสารที่สกัดแยกได้มาจากธรรมชาติทั้งจากพืชและสัตว์ อย่างไรก็ตามกระบวนการแยกสารจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์นั้นมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณที่ได้รับไม่เพียงพอกับความต้องการ ดังนั้นการสังเคราะห์สารขึ้นมาใช้เป็นยาจึงก้าวมามีบทบาทอย่างมากเนื่องจากสามารถสังเคราะห์สารได้ในปริมาณมากๆ อีกทั้งยังสามารถปรับปรุงโครงสร้างของสารเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางยาที่เพิ่มสูงขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นและมีผลข้างเคียงลดน้อยลง

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาอันซับซ้อนที่เนื้อเยื่อต่างๆ ตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ รวมทั้ง ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และโพรสตาแกลนดิน E2 (Prostaglandins E2) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ ทั้งไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 มีฤทธิ์ส่งเสริมการอักเสบ ในปัจจุบันมีรายงานว่า การอักเสบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์

(Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยด้านการสังเคราะห์สารเพื่อหาตัวยาใหม่ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบจึงเป็นหัวข้องานวิจัยที่น่าสนใจ

อนุพันธ์ triarylmethanes (TRAMs) มีโครงสร้างเป็นวงเฮเทอโรอะโรมาติกที่มีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ในวง ซึ่งมีรายงานหลายฉบับที่แสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของอนุพันธ์ triarylmethane และสารที่มีโครงสร้างเป็นวงเฮเทอโรอะโรมาติกที่มีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ในวง เช่น 1,5-diaryl-2-ethyl pyrrole derivatives (Biava et al., 2009), 3-(4-hydroxyphenyl)-4-(4-thiomethoxyphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (HMP) (Shin et al., 2012), 1,5-diarylpyrrole Nitrooxyalkyl (Anzini et al., 2013), 1,1'-(((4-chlorophenyl)methylene)dinaphthalen)-2-ol (Lewis and Goland, 1952), 4,4'-dihydroxy-3'',4''-methylenedioxytriphenylmethane (Mibu et al., 2003), 4,4'-dihydroxytriphenyl methane (Roy et al., 2007) และ triarylmethane ที่มี thiophene เป็นองค์ประกอบ (Parai et al., 2008) เป็นต้น งานวิจัยนี้ทำการพัฒนาการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ชนิดต่าง ๆ ของ symmetrical triarylmethane เพื่อต้องการหาหรือสารที่สามารถรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและต้องการพัฒนาการสังเคราะห์สารให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น จึงได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบ symmetrical triarylmethane หรือสารประกอบไตรเอริลมีเทนแบบสมมาตรซึ่งเป็นสารประกอบ triarylmethanes ชนิดหนึ่งที่คาร์บอนอะตอมสร้างพันธะกับหมู่ aryl ที่เหมือนกันทั้งสามหมู่ขึ้นเป็นจำนวนเก้าชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบแล้วพบว่าสาร tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane (JJST5) ซึ่งโครงสร้างเป็นวงเฮเทอโรอะโรมาติกที่มีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ในวงนั้นสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (จเร จรัสจรรยาพงศ์ และคณะ, 2556) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสาร tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane (JJST5) มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อรองรับการใช้ประโยชน์จากสารสังเคราะห์อนุพันธ์ triarylmethanes (tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane) และเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดีกว่าเดิม

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร symmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร symmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ triarylmethanes (tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane, JJST5) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ symmetrical triarylmethane ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านการอักเสบในการโครงการวิจัยในปีที่ 1 จากนั้นนำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ JJST5 มาทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 246.7 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในระดับโปรตีนและ mRNA รวมทั้งทดสอบการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ transcription factor NF- κ B p65 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 246.7 และการยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของ mitogen-activated protein kinase (MAPKs)

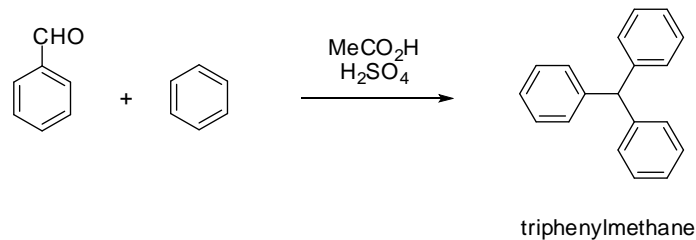
1.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

1.4.1 การสังเคราะห์สาร symmetrical triarylmethane

จากการค้นหาข้อมูล พบว่า การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบ symmetrical triarylmethanes เป็นงานที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญและมีรายงานอย่างต่อเนื่องในวารสารนานาชาติ เนื่องจากพบว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของยาและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย อีกทั้งสารประกอบเหล่านี้ยังเป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมสี การสังเคราะห์ symmetrical triarylmethanes ส่วนใหญ่สังเคราะห์จากปฏิกิริยาระหว่าง electrophilic reagents เช่น triethyl orthoformate หรือ คลอโรฟอร์ม กับ arenes nucleophile (Nair et al., 2006) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาส่วนใหญ่ทำภายใต้สภาวะกรดที่รุนแรง ต้องใช้กรดเป็นปริมาณมาก และยังมีข้อจำกัดในการเตรียม symmetrical triarylmethane บางชนิด ตัวอย่างการสังเคราะห์ที่เคยมีรายงานไว้มีดังนี้

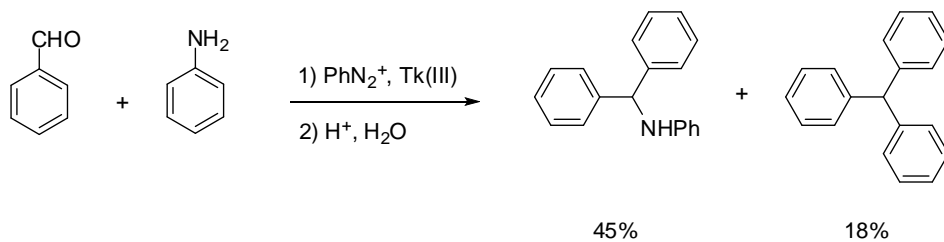
- 1) การสังเคราะห์ symmetrical triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง aromatic aldehyde กับ arenes

จากการรวบรวมงานวิจัยของ Nair และคณะ (Nair et al., 2006) พบว่า ในปี 1900 Gomberg ได้รายงานการสังเคราะห์ triphenylmethane จากปฏิกิริยาระหว่าง benzaldehyde กับ benzene ในสถานะที่มีกรดอะซิติกและกรดซัลฟูริก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 4)



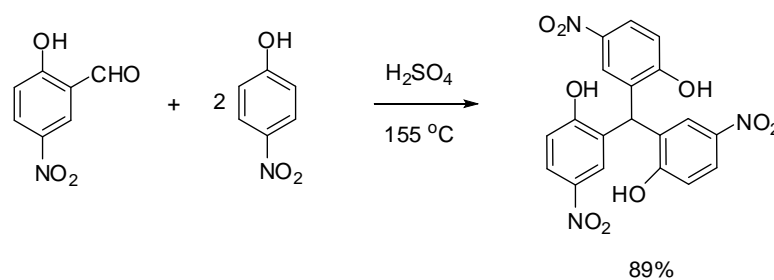
รูปที่ 4

ในปี 2005 Cannella และคณะ (Cannella et al. 2005) ได้รายงานการสังเคราะห์ symmetrical triarylmethane จากปฏิกิริยาการเติม alkyl radical ที่สารละลายผสมระหว่าง aldehyde กับ aniline อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ต่ำ (รูปที่ 5)



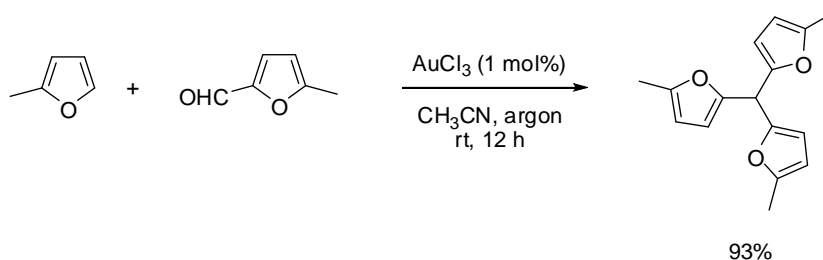
รูปที่ 5

ในปีเดียวกัน Rudzevich และคณะ (Rudzevich et al., 2005) ได้สังเคราะห์ tri-(2-alkoxy-5-ureido-phenyl)methanes จากปฏิกิริยา condensation ระหว่าง 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde กับ p-nitrophenol 2 equivalent โดยมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 6)

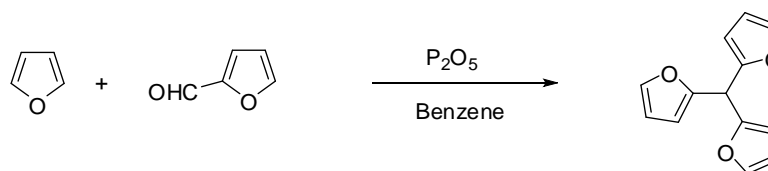
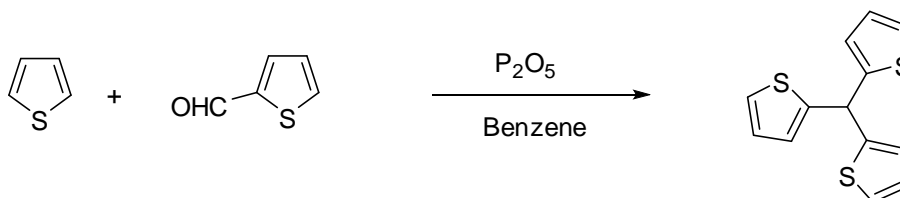


รูปที่ 6

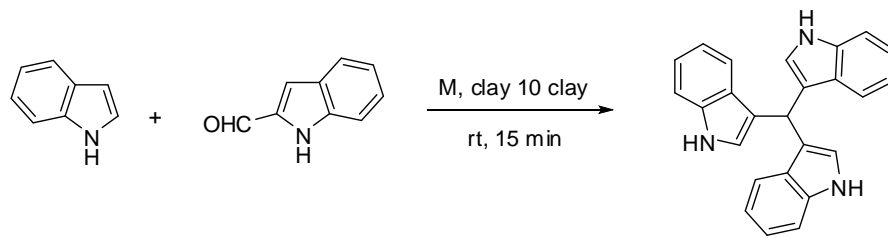
ในปี 2005, Nair และคณะ (Nair et al., 2006a) ได้ใช้ gold(III) chloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ symmetrical และ unsymmetrical triheteroaylmethanes โดยเมื่อใช้ 2-methylfuran ทำปฏิกิริยากับ 5-methyl-2-furylcarbaldehyde พบว่าจะได้ tri(5-methylfur-2-yl)methane ในเปอร์เซ็นต์สูงถึง 90% (รูปที่ 7)



นอกจากนี้ ในรายงานวิจัยของ Nair และคณะ (Nair et al., 2006b) ยังได้เตรียม tris-2-trienylmethane และ tris-2-furylmethane โดยวิธีการของ Nakayama โดยการนำ thiophene หรือ furan มาทำปฏิกิริยากับ thienyl-2-carbaldehyde หรือ furyl-2-carbaldehyde ในตัวทำละลายเบนซีน และมี phosphorus pentaoxide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 8 และ 9)



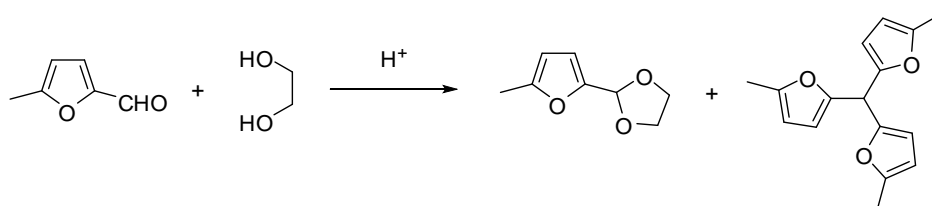
ในปี 2002, Chakrabarty และคณะ (Chakrabarty et al., 2002) ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ symmetrical triindolylmethanes จากปฏิกิริยาระหว่าง indole กับอนุพันธ์ indol-3-carbaldehyde โดยมี clay เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 10)



รูปที่ 10

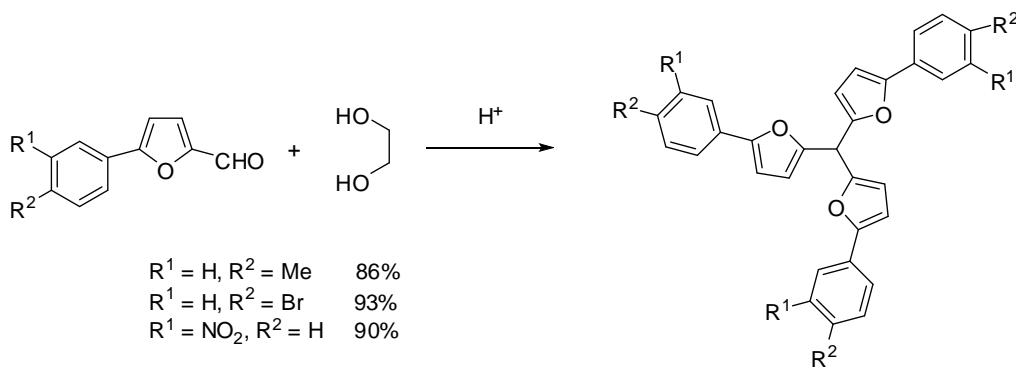
2) การสังเคราะห์ symmetrical triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง aromatic or heteroaromatic aldehyde กับ ethylene glycol

ในปี 2000 Stroganova และคณะ (Stroganove et al., 2000) ได้รายงานการสังเคราะห์ symmetrical trifurylmethane จากปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ของ furyl 2-carbaldehyde กับ ethylene glycol ภายใต้สภาวะกรดแก่ (TsOH) ขณะที่ถ้าทำปฏิกิริยาภายใต้กรดอ่อน เช่น ion-exchange resin จะได้ dioxolane เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังรูปที่ 11

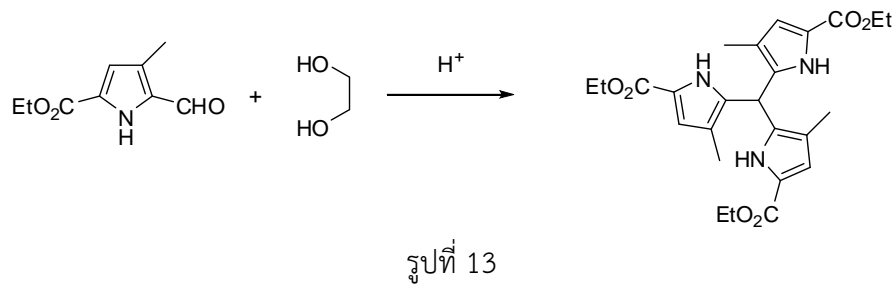


รูปที่ 11

นอกจากนี้ Stroganova และคณะ ยังได้ใช้วิธีการเดียวกันนี้ ในการเตรียม symmetrical triaryl methane และ tripyrrolylmethane (รูปที่ 12 และ 13)

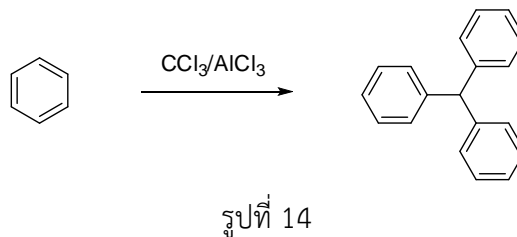


รูปที่ 12

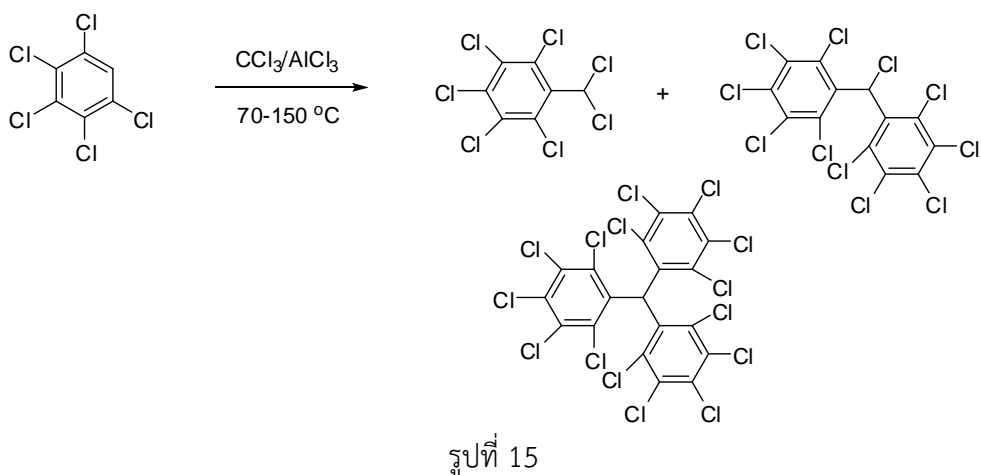


3) การสังเคราะห์ symmetrical triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง arenes กับ chloroform

จากการรวบรวมงานวิจัยของ Nair และคณะ (Nair et al., 2006) พบว่า Gomberg ได้นำ benzene มาทำปฏิกิริยากับ chloroform โดยมี aluminium trichloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็น triphenylmethane (รูปที่ 14)

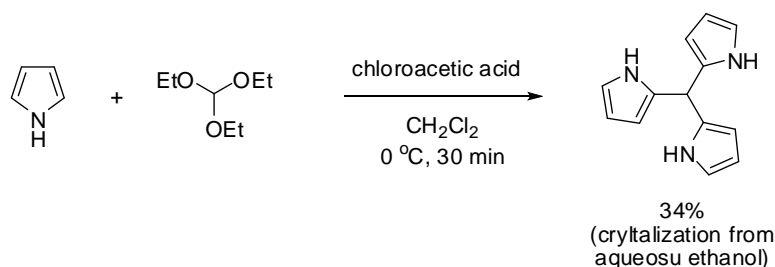


ในปี 1986 Ballaster และคณะ (Ballaster et al., 1986) ได้รายงานวิธีการสังเคราะห์ chlorinated aryl-, diaryl- และ triarylmethane อย่างมีประสิทธิภาพจากปฏิกิริยาระหว่าง chloroform และ chlorinated benzene โดยใช้ aluminium trichloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิระหว่าง 70-150 °C (รูปที่ 15) จากการทดลองพบว่าปริมาณของ chlorinated benzene ที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นตัวควบคุมชนิดของผลิตภัณฑ์



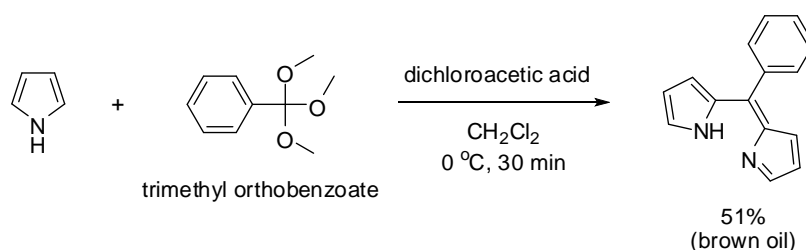
4) การสังเคราะห์ symmetrical triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง arenes กับ trialkyl orthoformate

ในปี 2001 Reese และ Yan (Reese. & Yan, 2001) ได้ศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง triethyl orthoformate, trimethyl orthoacetate และ triethyl orthopropionate กับ pyrrole และ chloroacetic acid จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ ethyl orthoformate (1 equiv) ทำปฏิกิริยากับ pyrrole (9 equiv) และ chloroacetic acid (9 equiv) ในตัวทำละลาย dichloromethane ที่ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที จะให้ tri-pyrrole-2-yl)methane เป็นผลิตภัณฑ์หลังจากตกผลึกด้วย ethanol/น้ำ 34% (รูปที่ 16)



รูปที่ 16

ในการทดลอง Reese และ Yan (Reese, & Yan, 2001) ยังพบว่า เมื่อเปลี่ยนจาก triethyl orthoformate เป็น trimethyl orthobenzoate จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น meso-substituted dipyrin เป็นน้ำมันสีน้ำตาล (brown oil) 51% ดังรูปที่ 17

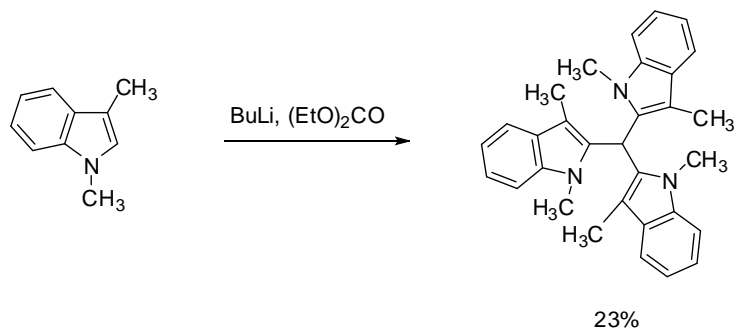


รูปที่ 17

5) การสังเคราะห์ symmetrical triarylmethanes ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง arenes กับ dialkyl carbonate และ strong base

ในปี 1989 Avendano และคณะ (Nair et al., 2006) ได้สังเคราะห์สารประกอบ tris-[(1,3-dimethyl-2-indolyl)methane ด้วยปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ 2-lithio ของ 1,3-dimethylindole กับ

diethyl carbonate แต่วิธีการนี้ได้ผลิตภัณฑ์เพียง 23% เท่านั้น และต้องใช้สภาวะการทดลองที่แห้งและใช้เบสที่รุนแรง (รูปที่ 18)



1.4.2 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของ asymmetrical triarylmethanes

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

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

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรงของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ่มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัด และทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหาย หรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เซลล์เม็ดเลือดออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดภัยอันตราย ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนหายได้ดี แต่ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะหรือการทำงานของระบบบกพร่องรุนแรง แต่หากระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมสาเหตุก่อการอักเสบเฉียบพลันไม่ได้ดี ทำให้การทำลายลุกลาม รุกรานอย่างต่อเนื่องนานออกไปอีก ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างกันไปจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้นและหากการควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555a)

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

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

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ HBSS [5 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM glucose, 4 mM NaHCO_3] ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียม ที่เย็นจำนวน 10 ml ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำจานเพาะเลี้ยงออกจากตู้อบ และนำมาเข้าตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ที่ขูดเซลล์ (cell scraper) ขูดเซลล์เบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ ใช้ปิเปตพลาสติกขนาด 10 ml ดูดสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อล้างเอาเซลล์ที่ยังติดอยู่บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดพร้อมกับเอียงจานเพาะเลี้ยงเซลล์เล็กน้อยเพื่อดูดสารละลายแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดพลาสติก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 4 นาที แล้วดูดสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไร้เชื้อ และเสริมด้วยซีรัมเข้มข้นร้อยละ 10 (V/V) ลงในหลอดแล้วทำการกระจายเซลล์โดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี 0.4% trypan blue แล้วนับเซลล์บน hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วแบ่งเซลล์ลงในภาชนะอันใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการ

2.3 การทดสอบความมีชีวิตรอดโดยวิธี MTT assay (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555a)

ทำการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS (1 µg/ml) และไม่มี LPS

แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml หลุมละ 500 μ l แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง โดย MTT เป็นสารสีเหลืองละลายน้ำได้ จะเข้าไปในไมโทคอนเดรียของเซลล์ ในเซลล์ที่มีชีวิตจะพบแอกติวิตีของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) จะทำการรีดิวซ์ MTT ไปเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซน (formazan) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ปริมาณของสารฟอร์มาแซนที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งก่อน เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) หลุมละ 500 μ l เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซน นำไปบ่มต่อ 5 นาที จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน ดูดสารแขวนลอยเซลล์จากแต่ละหลุม ปริมาตร 200 μ l ใส่ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ในเชิงสัมพัทธ์ เทียบกับสถานะของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบจากสูตรดังต่อไปนี้

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

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์โดยปฏิกิริยา Griess (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554)k

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS (1 μ g/ml) และไม่มี LPS รวมทั้ง amino guanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 50 μ M ซึ่งเป็นสารควบคุม แบบบวก และ 0.2% (v/v) DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารทดสอบ แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml และปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g นาน 4 นาที แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 μ l ใส่ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุมแล้วผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphyl)ethylene-diamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric acid] ปริมาตร 100 μ l และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 546 nm ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบ ไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น 0-50 μ M

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน (PGE₂)

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) และไม่มี LPS รวมทั้ง indomethacin (IMC) ที่มีความเข้มข้น 1 μM ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E₂ โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PGE₂ competitive enzyme immune assay kit (R&D Systems) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g นาน 5 นาที แล้วเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 150 μl ด้วย calibrator diluent RD5-56 ปริมาตร 300 μl จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 μl ลงในไมโครเพลทที่เคลือบกันหลุมด้วย goat anti-mouse polyclonal antibody เติมสารละลาย primary antibody ปริมาตร 50 μl แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ปิดฝาไมโครเพลทให้สนิท เมื่อบ่มเสร็จเติม PGE₂ conjugate ปริมาตร 50 μl แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมงพร้อมเขย่า จากนั้นล้างหลุมไมโครเพลทด้วย wash buffer ปริมาตร 400 μl จำนวน 4 ครั้ง แล้วเติม substrate solution ปริมาตร 200 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีพร้อมทั้งห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสงโดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution ปริมาตร 100 μl โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซึ่งความเข้มของสีจะขึ้นอยู่กับปริมาณของพรอสตาแกลนดิน E₂ ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 450 และ 540 nm ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณหาความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดิน E₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายพรอสตาแกลนดิน E₂ ที่ทราบความเข้มข้น (0-2,500 pg/ml)

2.6 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

2.6.1 การเตรียมโปรตีนรวมสำหรับวิเคราะห์ iNOS และ COX-2 (สาวิณีย์ สีมาจันทร์, 2554)

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อจาน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) และไม่มี LPS รวมทั้ง 0.2% (v/v) DMSO แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄] ที่เย็น 1 ครั้ง แล้วเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% SDS, 1%

sodium deoxycholate, 1% nonidet P-40, 1 mM DTT, 1X protease inhibitors (PI)] ปริมาตร 50 μ l จากนั้นใช้ที่ขูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml และเติม RIPA protein lysis buffer อีก 50 μ l ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกเติม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติกใหม่ นำโปรตีนรวมที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot สามารถเก็บโปรตีนส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.6.2 การเตรียมโปรตีนของนิวเคลียสสำหรับวิเคราะห์ NF- κ B (สาวินีย์ สีมาจันทร์, 2554)

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 100 มิลลิเมตร จำนวน 5×10^6 เซลล์ต่อจาน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาใส่ LPS (1 μ g/ml) แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจากนั้นทำการสกัดโปรตีนจากนิวเคลียส โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นขูดเก็บเซลล์โดยใช้ที่ขูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml 2 ครั้ง โดยใช้ 1X PBS ครั้งละ 500 μ l และปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งและเก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 [25 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10X PI] ปริมาตร 200 μ l ลงไปพร้อมทำลายตะกอนให้แตกด้วยการ vortex ให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว บ่มในน้ำแข็งพร้อมเขย่านาน 20 นาที โดยเขย่าผสมสารทุก 5 นาที (จะสังเกตเห็นว่าสารละลายจะขุ่น) จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 [5% (v/v) nonidet P-40 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1] ปริมาตร 200 μ l บ่มในน้ำแข็งพร้อมเขย่านาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เก็บส่วนใส (cytoplasmic protein) ในหลอดพลาสติก 1.5 ml (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 3 [ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 และสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ในอัตราส่วน 1:1] ปริมาตร 200 μ l ลงส่วนที่เป็นตะกอนนิวเคลียส พร้อมทั้ง vortex ให้ตะกอนหลุดออกจากกันหลอดเพื่อล้างตะกอนนิวเคลียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ทิ้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 4 [25 mM HEPES (pH 7.9), 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 20% (v/v) glycerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF] ปริมาตร 70 μ l พร้อมละลายตะกอนให้แตก บ่มในน้ำแข็งพร้อมเขย่านาน 40 นาที โดยเขย่าผสมสารทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (nuclear protein) ลงใน

หลอดทดลองขนาด 1.5 ml (สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) หรือนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot.....

2.6.3 การเตรียมโปรตีนรวมสำหรับวิเคราะห์ MAPKs

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 100 มิลลิเมตร จำนวน 5×10^6 เซลล์ต่อจาน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาใส่ LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาจากนั้นทำการสกัดโปรตีน โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นดูดเก็บเซลล์โดยใช้ที่ดูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml 2 ครั้ง โดยใช้ RIPA protein lysis buffer ปริมาตร 50 μl จากนั้นใช้ที่ดูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml และเติม RIPA protein lysis buffer อีก 50 μl ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกเติม และปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติกใหม่ นำโปรตีนรวมที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot สามารถเก็บโปรตีนส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 องศา-เซลเซียส

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำการวิเคราะห์โดยนำโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น 8 μl ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม แล้วทำการผสมกับสารละลาย 1x quick start Bradford dye reagent ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลทและคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่มีปริมาณ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 ไมโครกรัม...

2.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555b)

ทำการเตรียม 10% SDS-PAGE จากนั้นนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ ซึ่งโปรตีน iNOS, COX-2, NF- κ B และ MAPKs จะใช้โปรตีน 25, 25, 40 และ 40-60 ไมโครกรัม ตามลำดับ นำโปรตีนมาหยอดลงในหลุมโดยทำการเจือจางสารละลายโปรตีนตัวอย่างด้วย 6X protein loading buffer [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 12% (w/v) SDS, 0.06% (w/v) bromophenol blue, 60% (v/v) glycerol, 1.2 M β -mercaptoethanol] ในอัตราส่วน 5:1 และให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนนำสารละลายไปหยอดลงในเจล ทำการแยกโปรตีนในสารละลาย 1X Running buffer [0.0625 M Tris, 0.192

M Glycine, 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 80 V จน Bromophenol blue tracking dye เคลื่อนที่เข้าสู่ Separating gel จึงปิดสวิตช์เครื่อง Power supply ก่อนเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 100 V และให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จึงปิดสวิตช์เครื่อง Power supply แล้วย้ายแถบโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ทำการpretreated โดยแช่ใน absolute methanol ประมาณ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่เมมเบรนใน Transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (w/v) methanol] ประมาณ 5 นาที และผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 25 V เป็นเวลาประมาณ 14 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.8.1 การวิเคราะห์โปรตีน iNOS และ COX-2

s

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

2.8.2 การวิเคราะห์โปรตีน NF- κ B

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

อัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือนำเมมเบรนแช่ใน primary antibody solution ที่จำเพาะต่อโปรตีน Lamin A ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน นำเมมเบรนไปแช่ใน secondary antibody solution (horse-radish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (H+L)) ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:5,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ผสมสารละลายซับสเตรท enhanced chemiluminescence (ECL) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ไว้ประมาณ 1 นาที แล้วนำเมมเบรนมาบ่มกับสารละลายซับสเตรทจนทั่วแผ่นเมมเบรน ก่อนนำไปประกบฟิล์ม X-ray ในห้องมืด วิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ NF- κ B p65 และ Lamin A กับโปรตีนมาตรฐาน

2.8.3 การวิเคราะห์โปรตีน MAPKs

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

2.8.4 การรีโพรบแผ่นเมมเบรน PVDF

นำแผ่นเมมเบรนล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T 5 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลาย stripping [10% SDS, 2M Tris-HCl (pH 7.4), 98 mM β -mercaptoethanol] ควรเตรียมสารละลาย stripping แช่ไว้ในอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสก่อน 30 นาที แล้วเอาเมมเบรนใส่ลงในสารละลาย stripping พร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำเมมเบรนมาบ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-1.5 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody และสารละลาย secondary antibody ต่อไป ตามวิธีในข้อ 2.8.1-2.8.3

2.9 การสกัด RNA

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อจาน แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 9 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารละลาย Tri-reagent ปริมาตร 1 ml ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ทั่วพร้อมทั้งดูดสารละลายขึ้นลงแล้วดูดสารละลายเก็บลงในหลอดพลาสติก 1.5 ml (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) เติมคลอโรฟอร์ม 200 μl ผสมให้สารละลายเข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 15 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนจำนวน 400 μl ใส่ในหลอดพลาสติกหลอดใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) หลอดละ 400 μl พร้อมผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนเทสารละลายส่วนใสทิ้งและใช้กระดาษทิชชูซับตรงปลายหลอดให้สารละลายส่วนใสออกให้มากที่สุด แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล 1 มิลลิลิตร พร้อม vortex จนตะกอนหลุด นำไปปั่นเหวี่ยง 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายเอทานอลทิ้งและใช้กระดาษทิชชูซับตรงปลายหลอดให้สารละลายส่วนใสออกให้มากที่สุด จากนั้นนำมาให้ความร้อนด้วยเครื่องทำความร้อน (heat box) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ให้เอทานอลระเหยออกให้หมด แล้วเติมน้ำที่ปราศจาก DNase และ RNase ปริมาตร 50 μl บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ตะกอน RNA ละลายได้ดีขึ้น นำสารละลาย RNA 5 μl มาเจือจางกับน้ำกลั่นที่ผสมกับ 0.1% (v/v) DEPC ปริมาตร 495 μl แล้วทำการวัดปริมาณ RNA โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (UV-

2501PC) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร หาค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่อยู่ในช่วง 1.6 -1.8 แสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และสามารถนำไปใช้ได้...

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

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากสารละลาย RNA ที่สกัดได้ และ 5X iScript™ Reverse Transcription Supermix [iScript MMLV-RT (RNaseH⁺), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primers, buffer, MgCl₂, stabilizers] ปริมาตร 4 µl แล้วเติมน้ำที่ปราศจาก nuclease ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl ลงในหลอด PCR ซึ่งสามารถคำนวณหาความเข้มข้น RNA ได้จากสมการต่อไปนี้

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

โดยที่ RNA ความเข้มข้น 40 µg/ml สามารถดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ได้ 1 หน่วย สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำการตรวจสอบ cDNA ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ในสารละลาย (1X) TBE บัฟเฟอร์ [90 mM Tris-borate และ 0.2 mM EDTA] เพื่อตรวจสอบปริมาณ cDNA ที่ได้ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน iNOS, COX-1, COX-2 และ elongation factor (EF-2)

ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย 2X iTag™ Universal SYBR® Green supermix [antibody-mediated hot-start iTag™ DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers, blend of passive reference dyes] จำนวน 10 µl forward primer ที่มีความเข้มข้น 10 µM จำนวน 0.5 µl reverse primer ที่มีความเข้มข้น 10 µM จำนวน 0.5 µl และ cDNA จำนวน 2 µl แล้วเติมน้ำที่ปราศจาก nuclease ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl โดยทำซ้ำปฏิกิริยาละ 2 หลอด (duplicate) สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR ของยีน iNOS, COX-1, COX-2 และ EF-2 แสดงในตารางที่ 2-1 จากนั้นทำ melting curve ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที จนถึงอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวิเคราะห์หา cycle of threshold (Cq) นำมาหาปริมาณดีเอ็นเอด้วย comparative threshold method เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบค่า Cq ของปฏิกิริยา PCR ของดีเอ็นเอที่เราศึกษากับค่า Cq ของ housekeeping gene จากตัวอย่างเดียวกันโดยคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้ (Giulietti et al., 2001)f

$$2^{-\Delta\Delta C_{tq}} = \text{ปริมาณดีเอ็นเอ}$$

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

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

ค่าที่ได้เป็นปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผ่านการ normalized ด้วยดีเอ็นเอของ housekeeping gene โดยเปรียบเทียบเชิงสัมพัทธ์กับตัวอย่างควบคุม (calibrator)

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

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

2.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ส

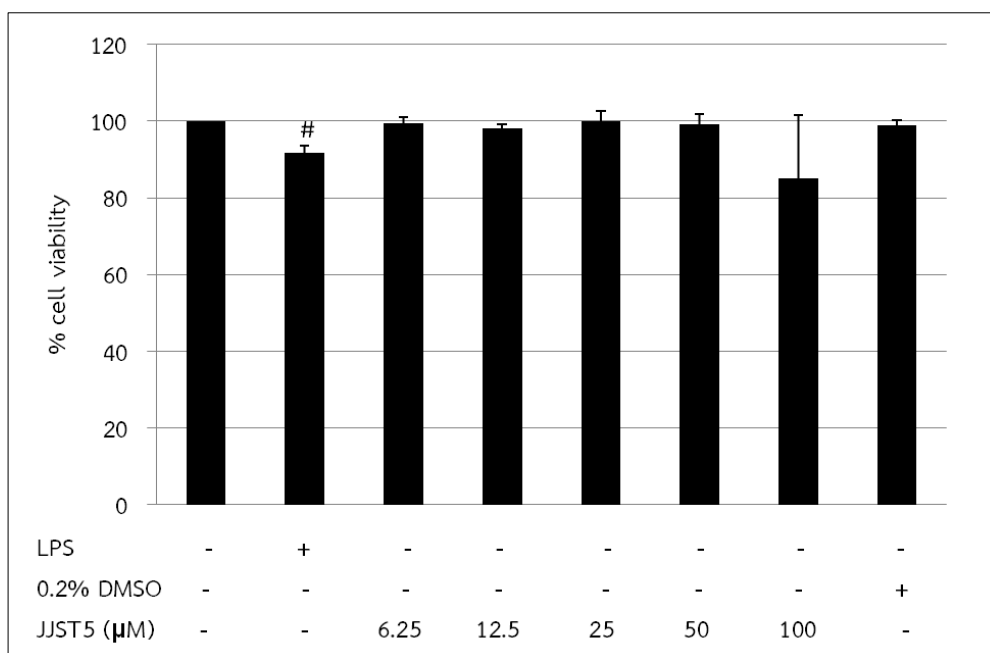
ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเฉลี่ยเบนมาตรฐานของการทดลองอิสระต่อกัน อย่างน้อยจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ซึ่งเป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่มเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ Student' t-test สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันของ 2 กลุ่มข้อมูล โดยใช้โปรแกรม SPSS...

บทที่ 3

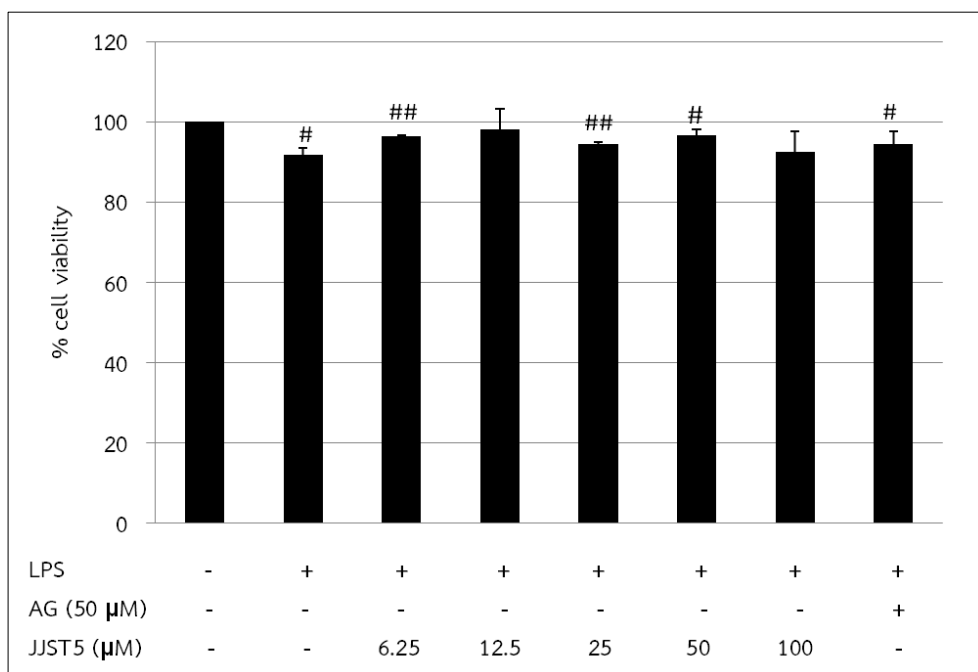
ผลการทดลอง

3.1 ผลของสาร JJST5 ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์

ผลการศึกษาความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 6.25-100 μM พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือเพียง 85.13 ± 16.56 แต่เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 92.42 ± 5.09 ส่วนความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก และ DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-1 และ 3-2)



ภาพที่ 3-1 ผลการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทดสอบโดยวิธี MTT ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% (v/v) dimethyl sulfoxide

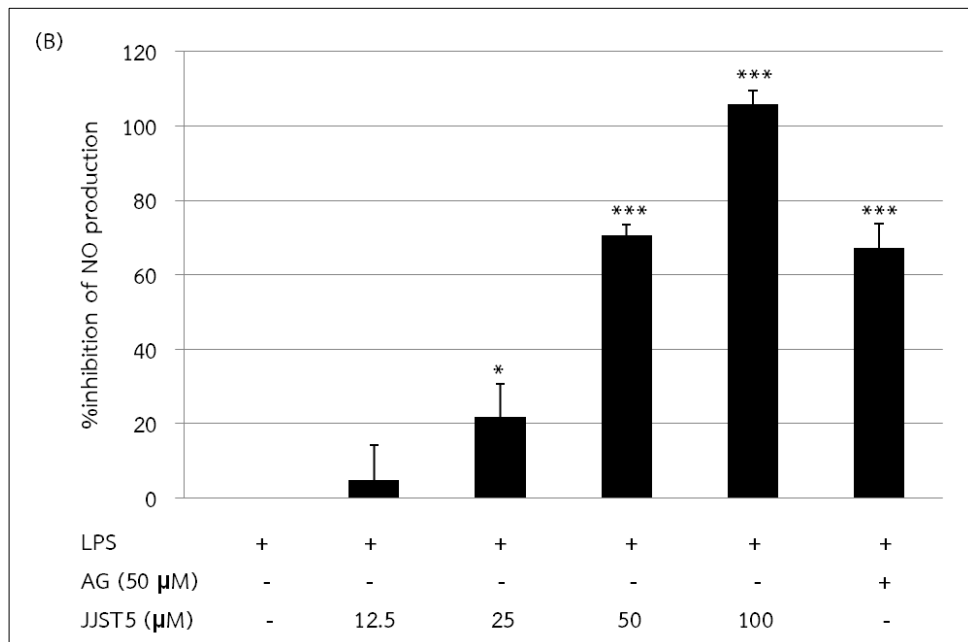
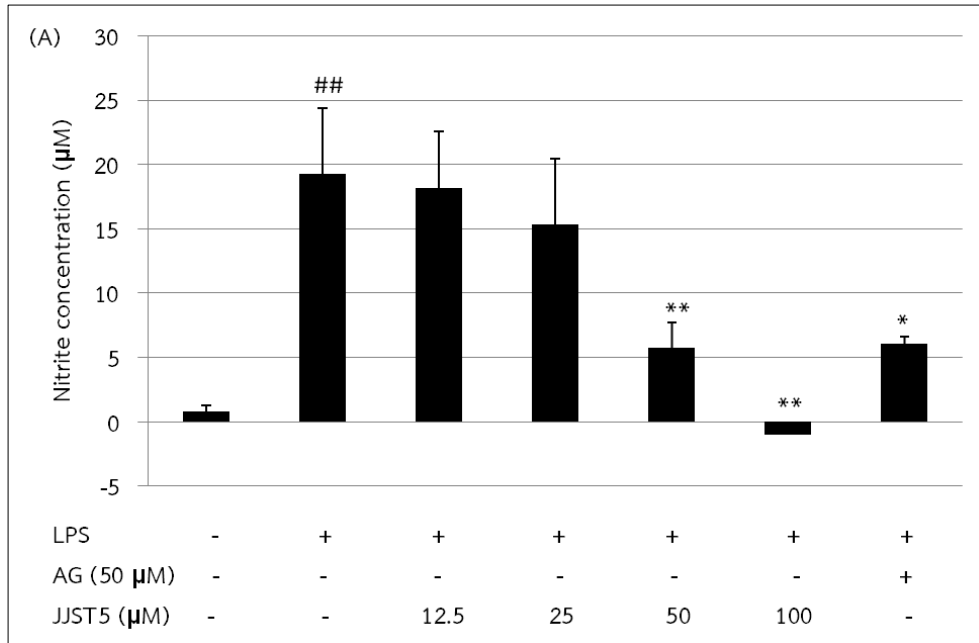


ภาพที่ 3-2 ผลการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี MTT ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ # $p < 0.05$ และ ## $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม โดยให้ AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ 50 μM

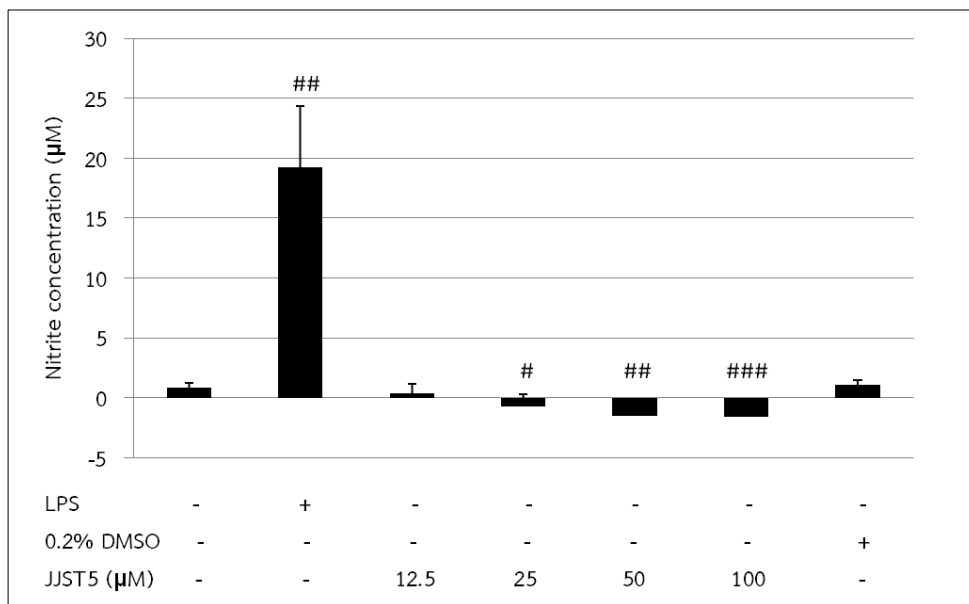
3.2 ผลของสาร JJST5 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์

การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เป็นเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 0.81 ± 0.42 และ 19.24 ± 5.12 μM ตามลำดับ เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 12.5-100 μM และถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่าปริมาณไนโตรเจนลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-3A) และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-3B) โดยเซลล์ที่สัมผัสกับ JJST5 ที่ความเข้มข้น 25-100 μM มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 46.04 ± 3.41 μM ส่วน aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 50 μM มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 67.28 ± 6.55 μM สำหรับเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25-100 μM เพียงอย่างเดียว มีปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ที่น้อยกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3-4) ในขณะที่เซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย มีปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์มีค่าเท่ากับ $1.10 \pm 0.35 \mu\text{M}$ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



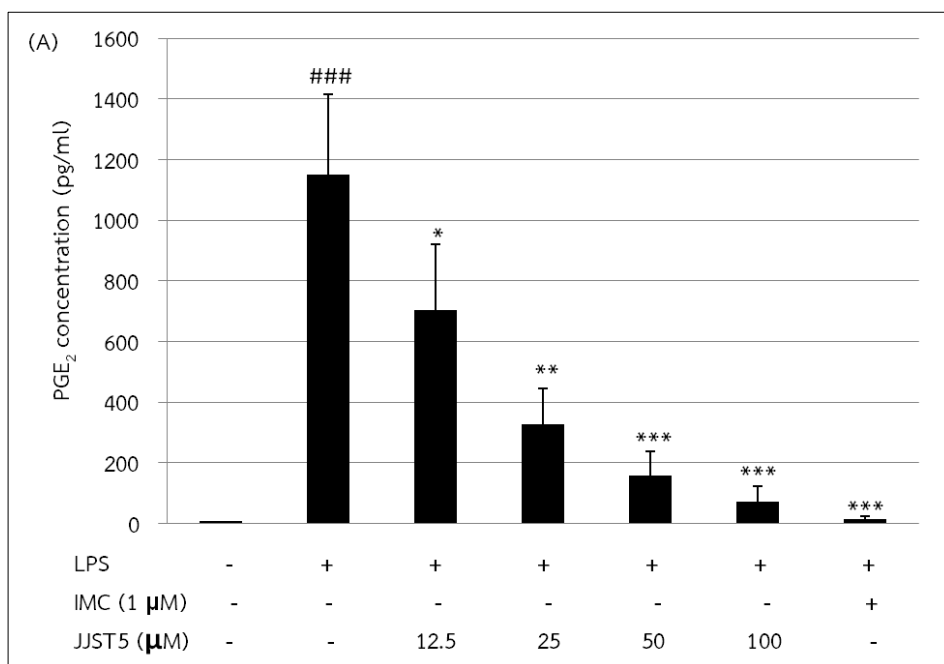
ภาพที่ 3-3 ปริมาณไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (A) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (B) เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ $^{##}P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ $50 \mu\text{M}$

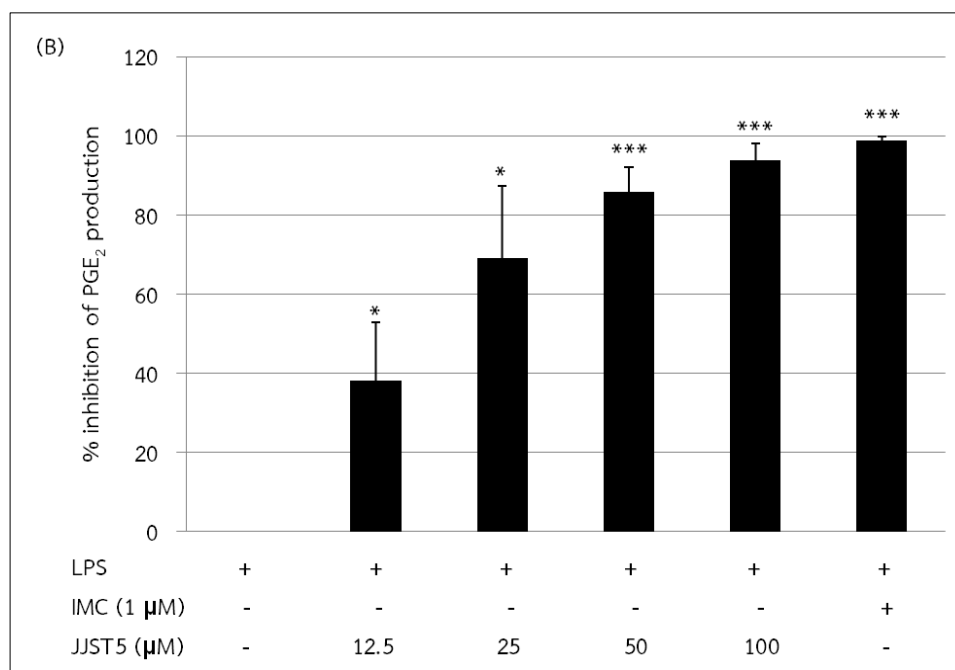


ภาพที่ 3-4 ผลของสาร JJST5 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ $100 \mu\text{M}$ ในสถานะที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ $^{\#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$ และ $^{###}p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม โดยให้ DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% (v/v) dimethyl sulfoxide

3.3 ผลของสาร JJST5 ต่อการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂

การผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เป็นเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณพรอสตาแกลนดิน E₂ มีค่าเท่ากับ 6.82 ± 2.45 และ 1148.89 ± 265.47 pg/ml ตามลำดับ เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 12.5-100 μ M และถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่าปริมาณพรอสตาแกลนดิน E₂ ลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-5A) และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-5B) โดยเซลล์ที่สัมผัสกับ JJST5 ที่ความเข้มข้น 12.5-100 μ M มีการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 23.06 ± 5.61 μ M ส่วน indomethacin (IMC) (สารยับยั้งเอนไซม์ COX-2) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 1 μ M มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ ได้ $98.80 \pm 0.91\mu$ M



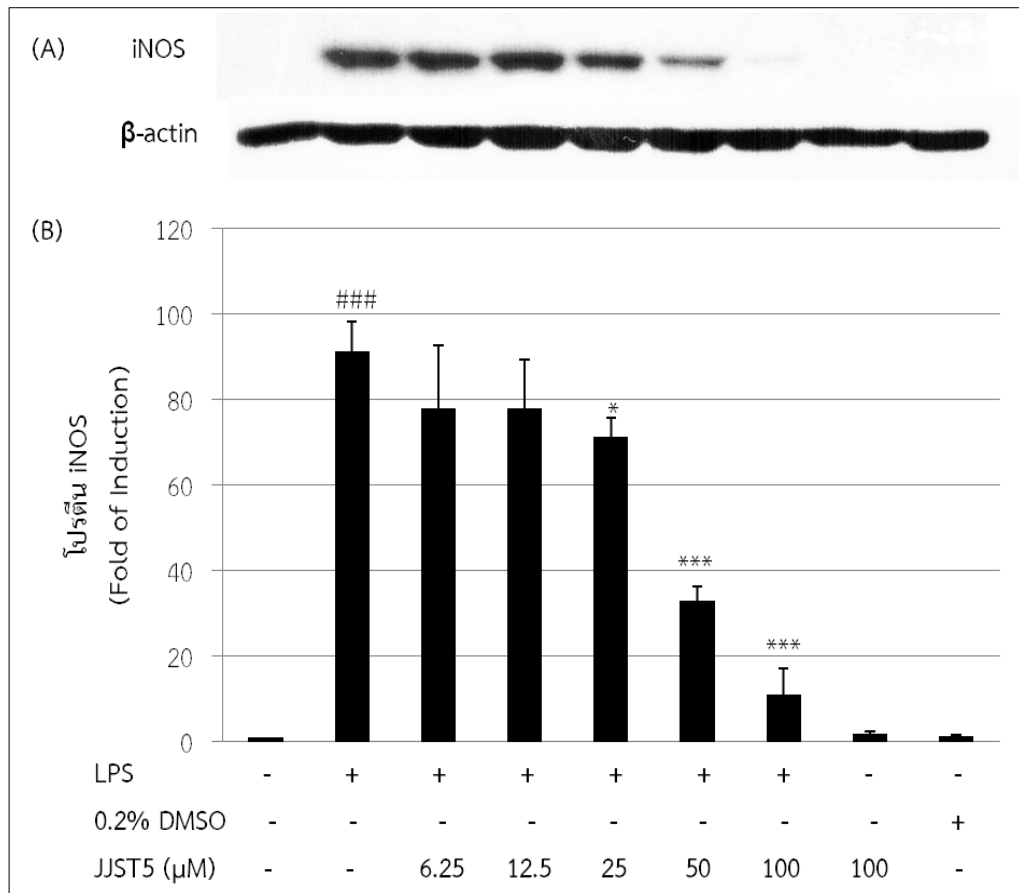


ภาพที่ 3-5 ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (A) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 (B) เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาพที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ IMC = เซลล์ที่สัมผัสกับ indomethacin ที่ ความเข้มข้น 1 μM

3.4 ผลของสาร JJST5 ต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2

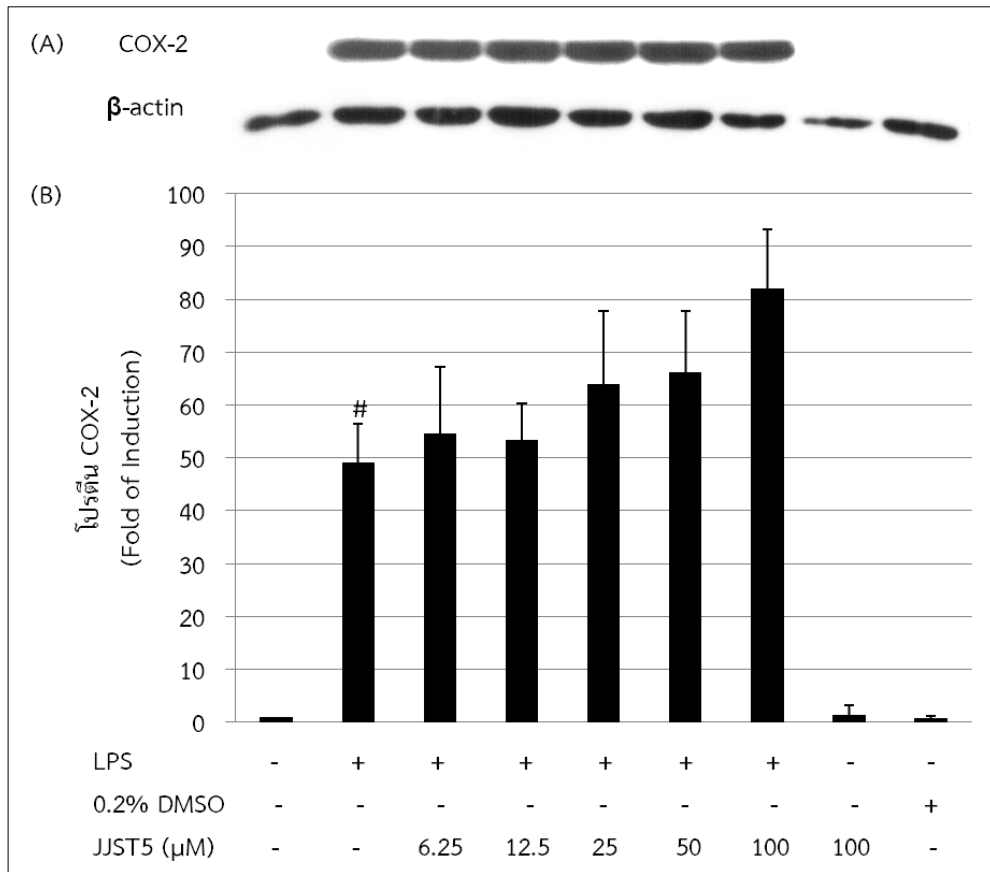
ผลของการศึกษาปริมาณโปรตีน iNOS จะเห็นว่าเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณโปรตีน iNOS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 μM จะเห็นว่าปริมาณโปรตีน iNOS ลดลงตามความเข้มข้นของสาร JJST5 โดยเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM สามารถลดปริมาณโปรตีน iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนโปรตีน iNOS ของเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2% และสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน iNOS ไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-6)

เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 6.25-100 μM จะเห็นว่าปริมาณโปรตีน COX-2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2% และสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน COX-2 ไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-7)



ภาพที่ 3-6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน iNOS โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 และเหนี่ยวนำด้วย LPS หรือไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ รวมทั้ง 0.2% (v/v) DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารทดสอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) ภาพตัวอย่างของผล Western blot (B) กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน iNOS หลังจาก normalized ด้วย β -actin ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน #### $p < 0.001$

เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ *p < 0.05, ***p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว



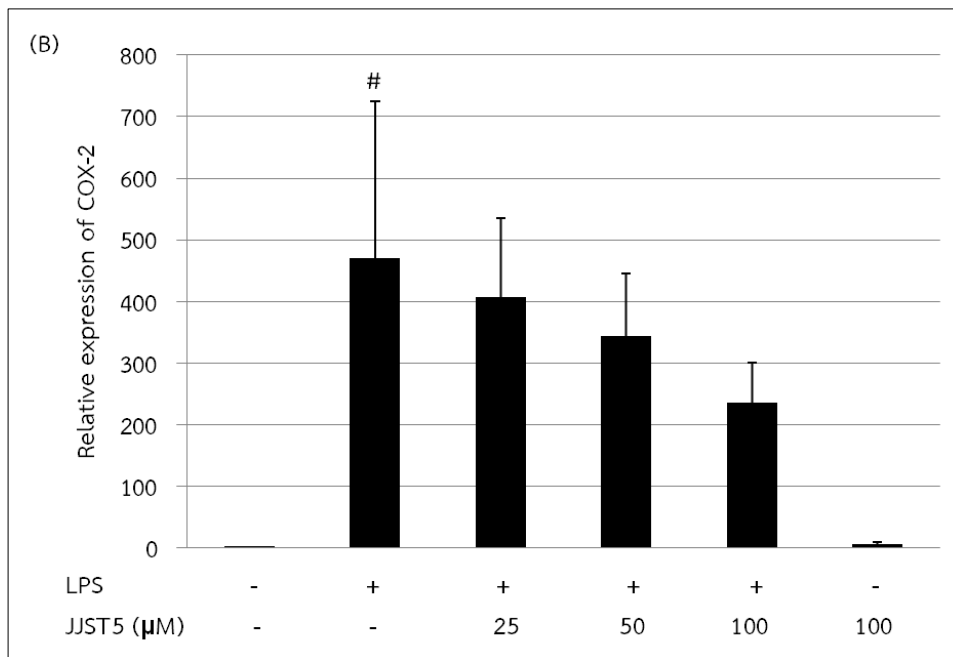
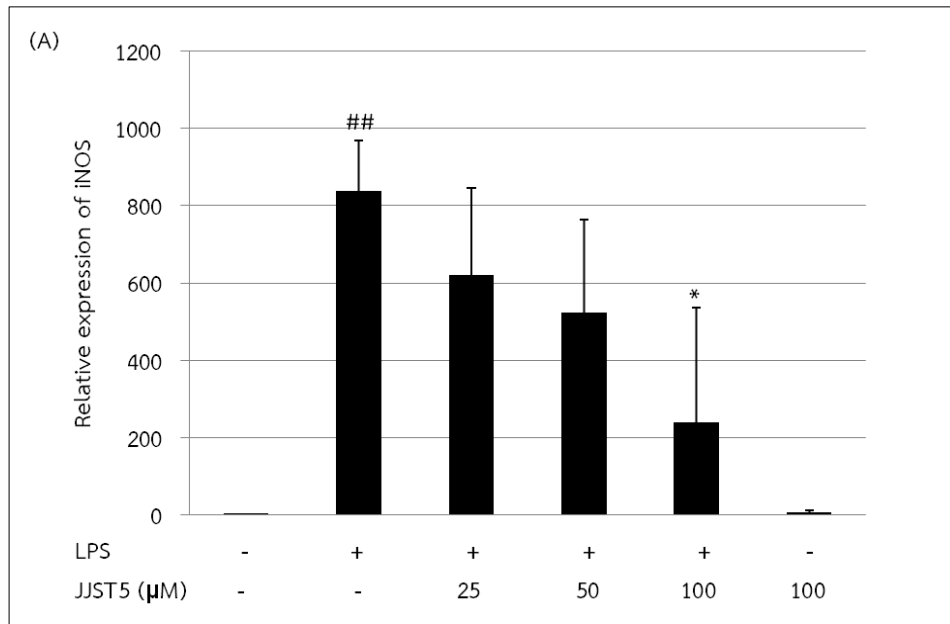
ภาพที่ 3-7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน COX-2 โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 และเหนี่ยวนำด้วย LPS หรือไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml รวมทั้ง 0.2% (v/v) DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารทดสอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) ภาพตัวอย่างของผล Western blot (B) กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน COX-2 หลังจาก normalized ด้วย β-actin ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน [#]p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

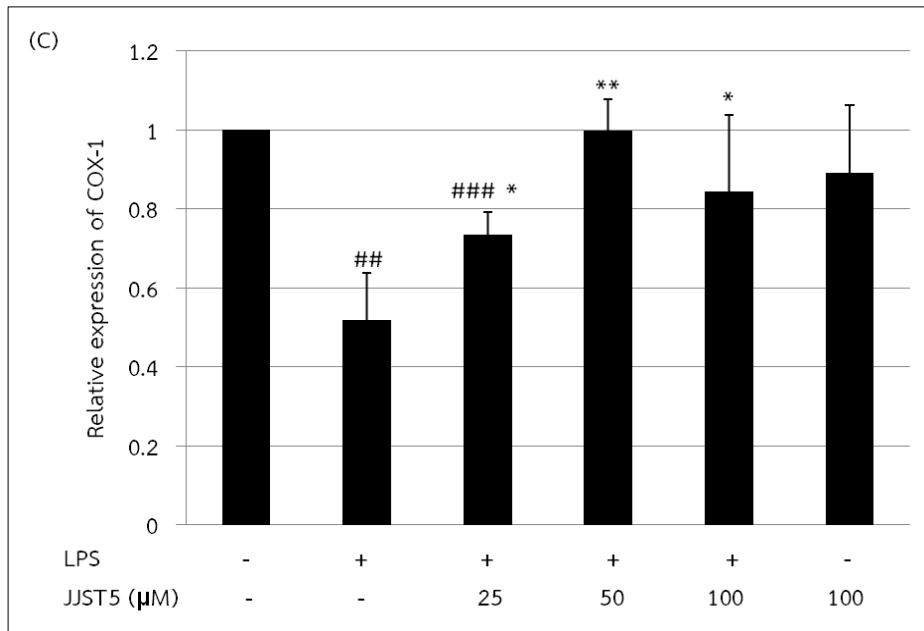
3.5 ผลของสาร JJST5 ต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX2 และ COX-1 ในระดับ mRNA

เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน iNOS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM จะเห็นว่าปริมาณ mRNA ของยีน iNOS ลดลงตามความเข้มข้นของสาร JJST5 โดยเซลล์ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถลดปริมาณ mRNA ของยีน iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วน mRNA ของยีน iNOS ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณ mRNA ของยีน iNOS ไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-8A)

ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 จะเห็นว่าเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM จะเห็นว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 ลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วน mRNA ของยีน COX-2 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณ mRNA ของยีน COX-2 ไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-8B)

เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM ปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุมยกเว้นที่ความเข้มข้น 25 μM ส่วน mRNA ของยีน COX-1 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณ mRNA ของยีน COX-1 ไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-8C)

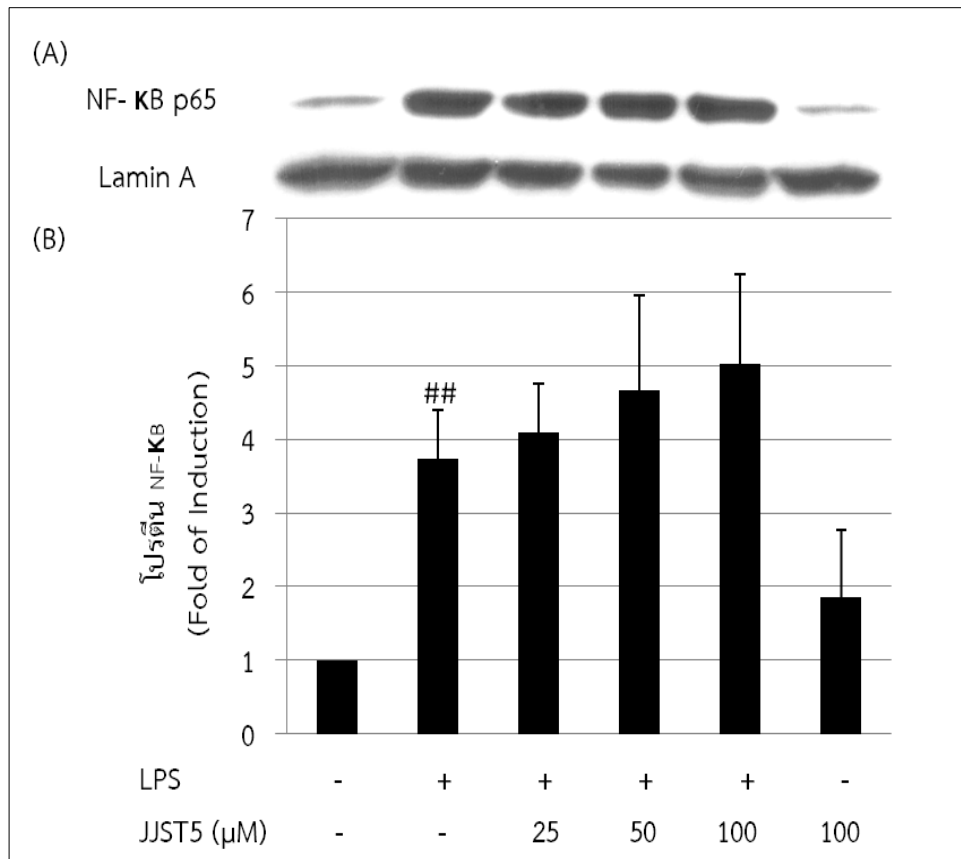




ภาพที่ 3-8 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีน iNOS (A), COX-2 (B) และ COX-1 (C) โดยเทคนิค Real-time RT-PCR ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ และ ### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

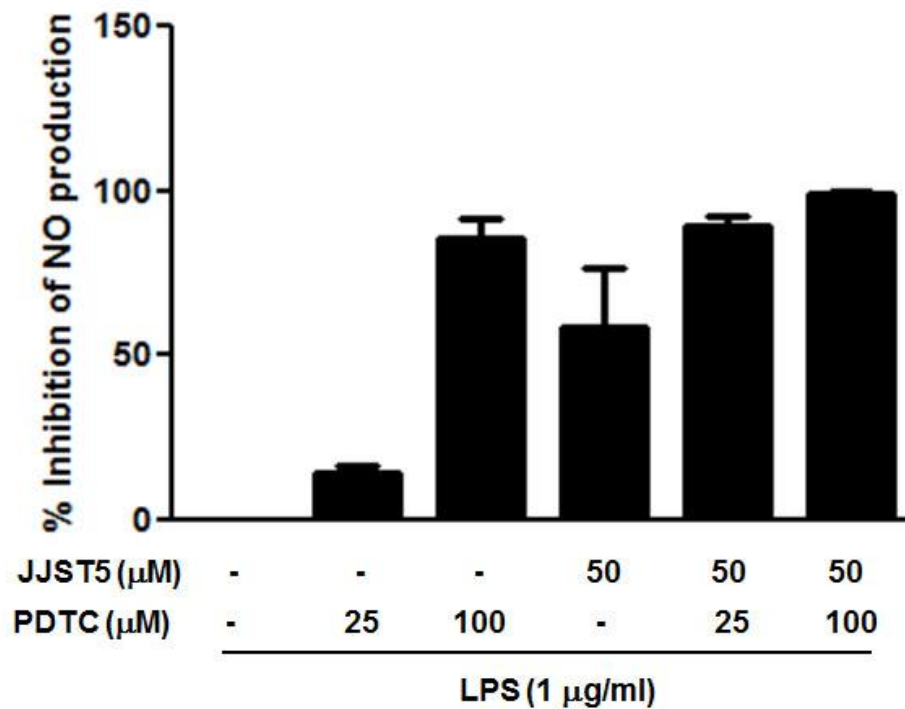
3.6 ผลของสาร JJST5 ต่อปริมาณโปรตีน NF-κB p65 ในนิวเคลียส

เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณโปรตีน NF-κB p65 ในนิวเคลียสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM จะเห็นว่าปริมาณโปรตีน NF-κB p65 ที่เคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสไม่แตกต่างกันกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ในขณะที่สาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน NF-κB p65 ที่เคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 3-9) เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ PCTC (สารยับยั้ง NF-κB) ที่ทราบกันดี กับ LPS พบว่ามีการผลิตไนตริกออกไซด์ลดลง แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับสาร PCTC, LPS และ JJST5 พบว่ามีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 3-9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน NF-κB p65 ในนิวเคลียส โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJST5 30 นาที (A) ภาพตัวแทนผลการทดลอง วิธี Western blot (B) กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน NF-κB หลังจาก normalized ด้วย Lamin A ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a ข้อมูล

แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน $^{###} p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

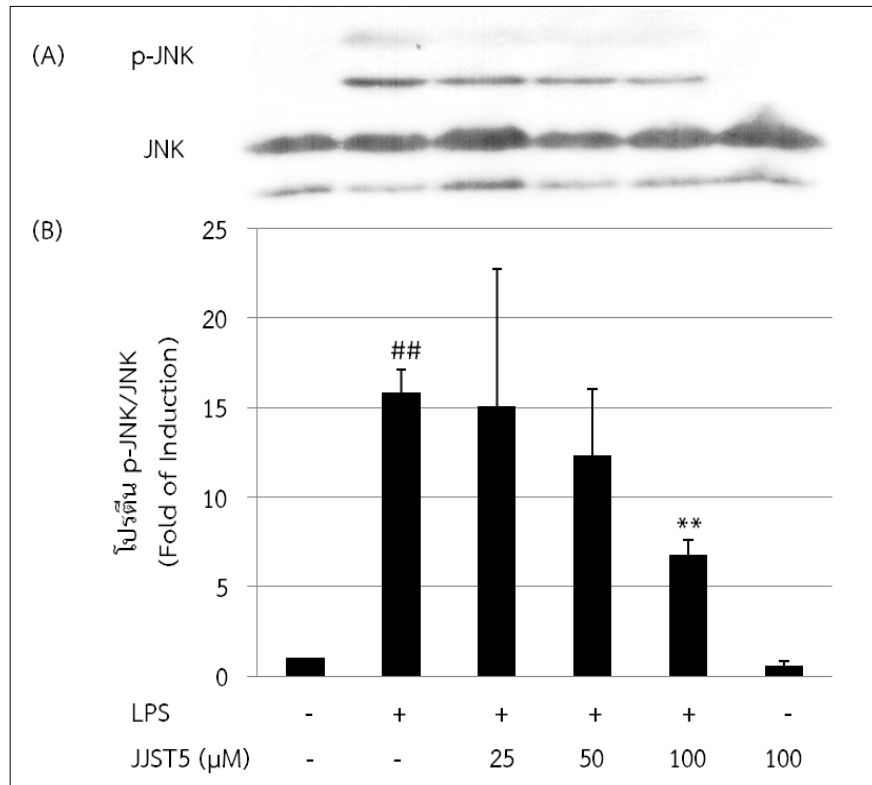


ภาพที่ 3-10 เปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 และ PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการสัมผัสกับ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรทีโนอาหารเลี้ยงเซลล์ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

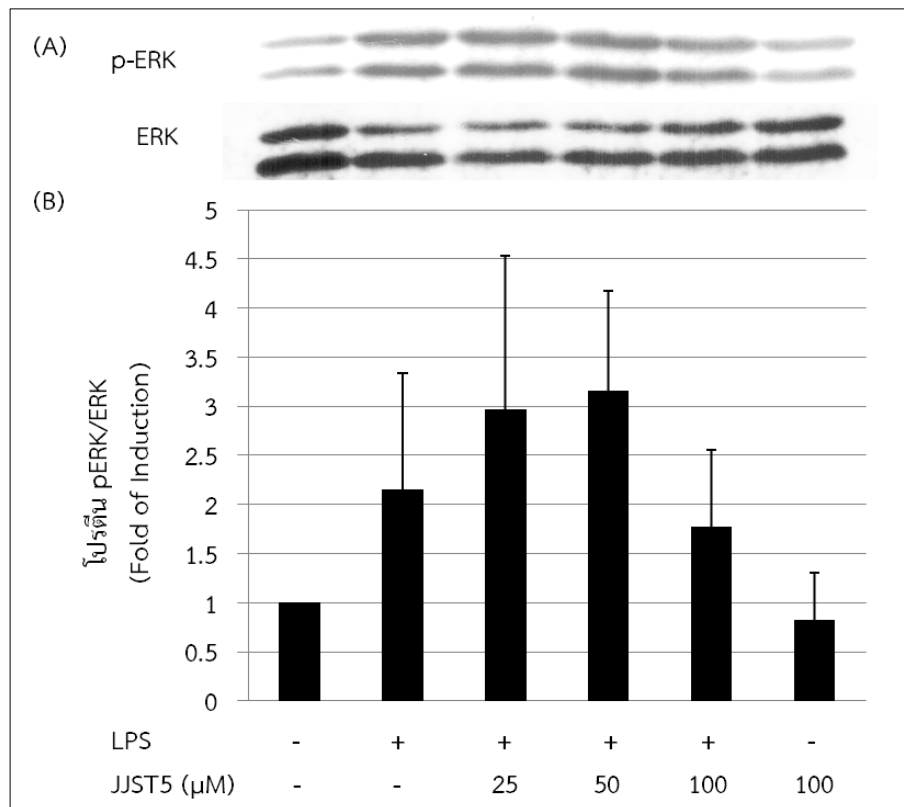
3.7 ผลของสาร JJST5 ต่อการฟอสโฟรีเลชันของ MAPKs

เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณโปรตีน JNK, ERK และ p38 รูปที่เติมฟอสเฟต (p-JNK, p-ERK และ p-p38) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมดังแสดงในภาพ 3-11 ถึง 3-13 แต่เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μ M จะเห็นว่าปริมาณโปรตีน p-JNK ลดลงตามความเข้มข้นของ JJST5 โดยสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถลดปริมาณโปรตีน p-JNK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-11) และเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS และสัมผัสกับ

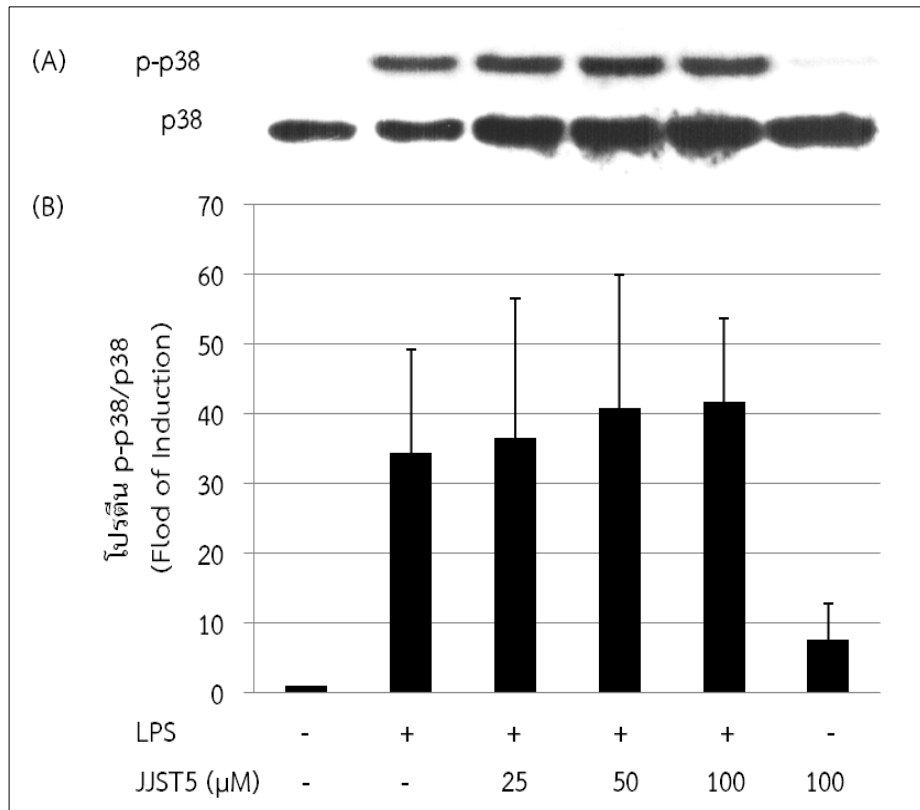
สาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM จะเห็นว่าปริมาณโปรตีน p-ERK และ p-p38 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-12 และ 3-13) ส่วนสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 100 μM เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน p-JNK, p-ERK และ p-p38 ไม่แตกต่างกันกับเซลล์ควบคุม



ภาพที่ 3-11 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-JNK และ JNK โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโคร-ฟาจ ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJST5 30 นาที (A) ภาพตัวแทนผลการทดลอง วิธี Western blot (B) กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ ของโปรตีน p-JNK หลังจาก normalized ด้วย JNK ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ^{##} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ ^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 3-12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-ERK และ ERK โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโคร-ฟาจ RAW 264.7 ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml เป็นเวลา 30 นาที หลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJST5 30 นาที (A) ภาพตัวแทนผลการทดลอง วิธี Western blot (B) กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน p-ERK หลังจาก normalized ด้วย ERK ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน



ภาพที่ 3-13 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-p38 และ p38 โดยวิธี Western blot เซลล์แมคโคร-ฟาจ RAW 264.7 ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml เป็นเวลา 30 นาที หลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสาร JJST5 30 นาที (A) ภาพตัวแทนผลการทดลอง วิธี Western blot (B) กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน p-p38 หลังจาก normalized ด้วย p38 ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้มุ่งหวังในการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบชนิดใหม่ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบ symmetrical triarylmethane จำนวน 9 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 แล้วพบว่าสาร tris(5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl)methane (JJST5) สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (จเร จรัสจรรยาพงศ์ และคณะ, 2556) ในการจะนำสาร JJST5 ไปใช้ในการพัฒนายาต้านอักเสบชนิดใหม่ จำเป็นต้องทราบกลไกในการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าว ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการประเมินศักยภาพและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลของสาร JJST5 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS

การศึกษานี้จะใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เป็นโมเดลในการศึกษา แมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการอักเสบ ถูกเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นสารประกอบของแบคทีเรียแกรมลบเพื่อที่จะจำลองการติดเชื้อและกระบวนการอักเสบ (Kim et al., 2009) จากการศึกษาเมื่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 6.25-100 μM และ LPS พบว่าความมีชีวิตรอดของเซลล์มีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และสาร JJST5 มีฤทธิ์ในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $46.04 \pm 3.41 \mu\text{M}$ และ $23.06 \pm 5.61 \mu\text{M}$ ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E_2 ของสาร JJST5 นั้นมาจากความสามารถของสารเอง ไม่ได้มาจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร JJST5 เนื่องจากความมีชีวิตรอดของเซลล์มีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร JJST5 กับ aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 50 μM พบว่าสาร JJST5 นั้นมีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ใกล้เคียงกับ AG โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.66 ± 2.90 และ 67.28 ± 6.55 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ของสาร JJST5 กับ indomethacin (IMC) ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 1 μM พบว่าสาร JJST5 มีประสิทธิภาพต่ำกว่าสาร IMC โดยสาร JJST5 ที่ความเข้มข้น 12.5 μM มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 38.14 ± 14.81 ในขณะที่สาร IMC ที่ความเข้มข้น 1 μM มีการยับยั้งเท่ากับ 98.80 ± 0.91 เปอร์เซ็นต์

ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจในขณะที่มีการอักเสบนั้น จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์ iNOS การควบคุมการแสดง ออกของ iNOS ถูกควบคุมหลักที่ระดับการถอดรหัส (transcriptional level) (Turko and Murad, 2002) ส่วนในการสังเคราะห์พรอสตราแกลนดิน E₂ จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์ COX-2 ถูกควบคุมทั้งในระดับการถอดรหัสและหลังถอดรหัส (post-transcriptional levels) (Kaul et al., 2006) การศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบกลไกการลดการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตราแกลนดิน E₂ ของสาร JJST5 ในระดับ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 พบว่าสาร JJST5 สามารถลด ปริมาณทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ iNOS ของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ ในลักษณะที่ ขึ้นกับความเข้มข้น (ภาพที่ 3-6 และ 3-8A) แสดงว่าการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร JJST5 อาจเป็น ผลมาจากการลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ iNOS ในการศึกษาที่ยังพบว่าสาร JJST5 ไม่สามารถ ลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ COX-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สาร JJST5 สามารถลดการ ผลิตพรอสตราแกลนดิน E₂ โดยอาจจะเป็นผลจากสาร JJST5 ยับยั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งต้องมีการ ศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การสังเคราะห์สารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตราแกลนดิน E₂ ในเซลล์ แมคโครฟาจเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยมี TLR4 เป็นตัวรับสัญญาณ จะเกิดขึ้นผ่านการทำงานของวิถี สัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ วิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPKs (Tham et al., 2011) โดย NF- κ B เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ที่มีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ ไซโตไคน์ ต่างๆ เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 เป็นต้น (Shao et al., 2013) จึงได้ทำการตรวจสอบวิถีสัญญาณที่ เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยเริ่มศึกษาจากวิถีสัญญาณ NF- κ B ในสภาวะปกติที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS NF- κ B จะจับกับโปรตีน I κ B อยู่ในไซโตพลาสซึม ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้ ซึ่ง NF- κ B ที่พบมากประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ได้แก่ p65 และ p50 แต่ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS จะทำให้เกิด กระบวนการฟอสโฟรีเลชันไปที่ I κ B โดยเอนไซม์ IKK การเติมฟอสเฟตไปที่ I κ B ซึ่งจับอยู่กับ NF- κ B จะทำให้ I κ B นั้นถูกนำไปสลายโดย proteasome จึงทำให้ NF- κ B หลุดออกเป็นอิสระและสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสได้ เมื่อ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียสแล้วจะเข้าไปจับกับส่วนควบคุมแสดงออกของยีนทำให้เกิดการ ถอดรหัสของยีนเป้าหมาย (Shao et al., 2013) จากการศึกษาพบว่าสาร JJST5 ไม่สามารถลดปริมาณโปรตีน NF- κ B p65 ในนิวเคลียสเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-9) เมื่อให้เซลล์ สัมผัสกับสาร PDTC ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B (Lim et al., 2004) แต่ไม่มีผลต่อ activating protein-1 (AP-1) (Schreck et al., 1992; Liu et al. 1999) ทำให้ลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS พบว่ามีปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ที่เหนี่ยวนำโดย LPS น้อยลง สาร JJST5 มีผลเช่นเดียวกับสาร PDTC คือลดการผลิตไนตริกออกไซด์ แต่เมื่อให้เซลล์สัมผัสทั้งสาร LPS, PDTC และ JJST5 พบว่ามีการยับยั้ง

การผลิตไนตริกออกไซด์มากขึ้นกว่าเซลล์ที่สัมผัส LPS และ PDTC หรือเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS และ JJST5 ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร JJST5 อาจเกิดผ่านการยับยั้งการกระตุ้นวิถีสัญญาณของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ตัวอื่นนอกเหนือจาก NF- κ B เช่น AP-1 เป็นต้น (Liew et al., 2011) จึงทำให้เซลล์สัมผัสทั้งสาร LPS, PDTC และ JJST5 ถูกยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B โดยสาร JJST5 และถูกยับยั้งการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ตัวอื่นโดยสาร JJST5 จึงทำให้มีการยับยั้งการผลิตไนตริก ออกไซด์มากยิ่งขึ้น มีรายงานว่าสารสังเคราะห์หลายชนิดที่ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยไม่ผ่านวิถีสัญญาณ NF- κ B p65 ดังเช่นงานวิจัยของสาวินีย์ สีมานันท์ (2554) ที่รายงานว่าสารสังเคราะห์ JJSK14 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E₂ ได้ ผ่านการลดปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ iNOS โดยผ่านวิถีการส่งสัญญาณที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B p65

ขั้นต่อมาทำการศึกษาวิถีสัญญาณที่มีการรายงานว่ามียับยั้งบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย LPS คือ วิถีสัญญาณ MAPKs (Shao et al., 2013) วิถีสัญญาณ MAPKs จะประกอบไปด้วยเอนไซม์ ERK, JNK และ p38 ในสถานะที่เซลล์แมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วย LPS จะเกิดการฟอสโฟรีเลชันบน MAPKs ให้อยู่ในรูปที่ถูกเติมฟอสเฟต คือ p-ERK, p-JNK และ p-p38 ซึ่งเป็นรูปที่ทำงานได้ (active) แล้วจึงจะทำการเติมฟอสเฟตไปบนทรานสคริปชันแฟกเตอร์เป้าหมาย (Kaminska, 2005) โดย p-ERK จะเติมฟอสเฟตไปที่ Elk1 เอนไซม์ p-JNK จะเติมฟอสเฟตไปที่ c-Jun และเอนไซม์ p38 จะเติมฟอสเฟตไปที่ ATF-2 (Liew et al., 2011) จากการศึกษาพบว่า สาร JJST5 ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนของ ERK, JNK และ p38 เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบใดและพบว่าสาร JJST5 ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนของ p-ERK และ p-p38 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3-12 และ 3-13) แต่สามารถลดปริมาณโปรตีนของ p-JNK (ภาพที่ 3-11) ซึ่งให้ผลคล้ายกับงานวิจัยของ Chen et al. (2014) ซึ่งมีการรายงานว่าสาร curcumol สามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ทั้งในระดับโปรตีน และ mRNA จึงส่งผลให้ลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยผ่านการลดการเติมฟอสเฟตไปที่ JNK แต่ไม่ลดการเติมฟอสเฟตไปที่ ERK และ p38 ดังนั้นการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร JJST5 อาจเป็นผลมาจากการลดการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ JNK ส่งผลให้มีการลดการกระตุ้นโปรตีน c-Jun ซึ่งเป็นส่วนประกอบของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP-1 และลดการแสดงออกของ iNOS ในที่สุด อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอนไซม์ COX ประกอบไปด้วย 2 ไอโซฟอร์ม นอกจาก COX-2 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่แสดงออกในสถานะที่ถูกกระตุ้นและมีบทบาทในการอักเสบแล้ว ยังมีไอโซฟอร์ม COX-1 ที่แสดงออกในสภาวะปกติ และตอบสนองต่อหน้าที่ทางสรีระวิทยา (พรทวิ เลิศศรีสถิต และสุชีลา จันทรวิทยานุชิต, ม.ป.ป.) การใช้ยาด้านอักเสบกลุ่ม NSAIDs ในปัจจุบันนั้น มีผลยับยั้งทั้งเอนไซม์ COX-2 และ COX-1 เช่น indomethacin และ

aspirin ทำให้เกิดผลข้างเคียง โดยเฉพาะที่ระบบทางเดินอาหาร ไต และการทำงานของเกล็ดเลือด (ธงชัย ก่อสันติรัตน์, 2553) ดังนั้นสารต้านอักเสบที่ดีควรมีความจำเพาะในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 แต่ไม่ควรมีผลต่อเอนไซม์ COX-1 การทดลองนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ COX-1 จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียวมีปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ COX-1 ลดลง ซึ่งให้ผลคล้ายกับงานวิจัยของ ราณี ชื่นคำ และ คณาภรณ์ พันสีทา (2556); ภัศรา ทองจุไร และ ญฐานิต กิจวิวัฒน์ (2556) และ Utar et al. (2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร JJST5 สามารถเพิ่มปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ COX-1 ของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น และมีปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุมที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μM (ภาพที่ 3-8) ในขณะที่สาร IMC ลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-1 (Utar et al., 2011) อันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดผลข้างเคียง แต่จากผลการทดลองในการศึกษานี้จะเห็นว่าสาร JJST5 ไม่ลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-1 ดังนั้นสาร JJST5 จึงไม่น่าจะมีผลต่อการสร้างพรอสตาแกลนดินที่ทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา แม้ว่าประสิทธิภาพในการลดการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 จะต่ำกว่ายา IMC แต่ผลการศึกษานี้ ทำให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดีกว่าเดิม และมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ COX-2

4.2 สรุปผลการทดลอง

1. สาร JJST5 สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
2. สาร JJST5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น แต่ไม่ลดระดับ mRNA ของเอนไซม์ COX-1 ซึ่งการยับยั้งไม่ได้เกิดผ่านการเคลื่อนที่ของ NF- κ B แต่เกิดผ่านการยับยั้งวิถีสัญญาณ JNK

4.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาฤทธิ์ของสาร JJST5 ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS และ COX-2.....
2. ควรมีการศึกษาฤทธิ์ของสาร JJST5 เพิ่มเติมไปที่ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ตัวอื่นนอกเหนือจาก NF- κ B เช่น AP-1 เป็นต้น

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555a). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ. เอส. พริ้นติ้ง. เข้าสื่: กรุงเทพมหานคร.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555b). เอกสารประกอบการสอนวิชา 316322 Biochemical Techniques1 (Part: Electrophoresis and Immunochemistry). ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จเร จรัสจรรยาพงศ์, ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2556). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารไตรเออร์ลิมีเทนแบบสมมาตร”. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พรทวี เลิศศรีสถิต และ สุชีลา จันทร์วิทยานุกิต. (ม.ป.ป.). ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์. [Online]. แหล่งเข้าถึง med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/.../NSAIDS.pdf [สืบค้นวันที่ 01/04/2557]
- ภัศรา ทองจู่ไร และ ฐานันต กิจวิวัฒน์. 2556. ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของ trans-4-methoxycinnamaldehyde จากเหง้าของเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำ โดย LPS. ปรินญาณินพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รานี ชื่นคำ และ คณาภรณ์ พันสีทา. 2556. ฤทธิ์ของสารประกอบที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมต่อการแสดงออกของยีน Cyclooxygenase-1 (COX-1). ปรินญาณินพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สาวินีย์ สีมาพันธ์. 2554. กลไกการต้านอักเสบของสาร tert-butyl (2,4,6-trimethoxyphenyl) (cyclopentyl) methylcarbamate. ปรินญาณินพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2554). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ “การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง”. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Anzini M, Di Capua A, Valenti S, Brogi S, Rovini M, Giuliani G, Cappelli A, Vomero S, Chiasserini L, Segà A, Poce G, Giorgi G, Calderone V, Martelli A, Testai L, Sautebin L, Rossi A, Pace S, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Benetti V, Giordani A, Anzellotti P, Dovizio M, Patrignani P, Biava M. (2013). Novel analgesic/anti-inflammatory agents: 1,5-diarylpyrrole nitrooxyalkyl ethers and related compounds as cyclooxygenase-2 inhibiting nitric oxide donors. Journal of Medicinal Chemistry. 56 : 3191–3206.

- Ballester, M., Riera, J., Castaner, J., Rovira, C. and Armed, O. (1986). An easy, high-yield synthesis of highly chlorinated mono-, di- and triarylmethanes. Synthesis 64-66.
- Biava M, Porretta GC, Poce G, Logu AD, Meleddu R, Rossi ED, Manetti F, Botta M. (2009). 1,5-Diaryl-2-ethyl pyrrole derivatives as antimycobacterial agents: Design, synthesis, and microbiological evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry. 44 : 4734–4738.
- Cannella, R., Clerici, A., Pastori, N., Regolini, E. and Porta, O. (2005). One-pot four-component reaction: Aqueous $\text{TiCl}_3/\text{PhN}_2^+$ -mediated alkyl radical addition to imines generated in situ. Organic Letters 7, 645-648.
- Chen X, Zong C, Gao Y, Cai R, Fang L, Lu J, Liu F, Qi Y. (2014). Curcumol exhibits anti-inflammatory properties by interfering with the JNK-mediated AP-1 pathway in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. European Journal of Pharmacology. 723 : 339–345.
- Dhikav, V., Singh, S., Anand, K.S., (2002). Newer non-steroidal anti-inflammatory drugs—a review of their therapeutic potential and adverse drug reactions. Journal of Indian Academic Chemistry and Medicine 3, 332–338.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods. 25 : 386–401.
- Kaminska B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochimica et Biophysica Acta. 1754 : 253-262.
- Kaul R, Verma SC, Murakami M, Lan K, Choudhuri T, Robertson ES. (2006). Epstein-barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis Nm23-H1. Journal of Virology. 80(3) : 1321-31.
- Kim JY, Shin JS, Ryu JH, Kim SY, Cho YW, Choi JH, Lee KT. (2009). Anti-inflammatory effect of anemarsaponin B isolated from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* in LPS-induced RAW 264.7 macrophages is mediated by negative regulation of the nuclear factor- κ B and p38 pathways. Food and Chemical Toxicology 47 : 1610–1617

- Katzung, B.G. Basic & Clinical Pharmacology. (2001), International Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Lim S, Kang KW, Park SY, Kim SI, Choi YS, Kim ND, Lee KU, Lee HK, Pak YK. (2004). Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression by a novel compound, mercaptopyrazine, through suppression of nuclear factor-kappaB binding to DNA. Biochemical Pharmacology. 68 :719-728.
- Lewis MR, Goland PP. (1952). Tumor-inhibitory activity of diaryl-and triarylmethane dyes. Cancer research. 12 : 130-136.
- Liew CY, Lam KW, Kim MK, Harith HH, Tham CL, Cheah YK, Sulaiman MR, Lajis NH, Israf DA. (2011). Effects of 3-(2-Hydroxyphenyl)-1-(5-methyl-furan-2-yl) propenone (HMP) upon signalling pathways of lipopolysaccharide-induced iNOS synthesis in RAW 264.7 cells. International Immunopharmacology. 11(1) : 85-95.
- Liu SF., Ye X., Malik AB. (1999). Inhibition of NF-kB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. Circulation. 100; 1330-1337.
- Mibu N, Yokomizo K, Uyeda M, Sumoto K. (2003). Synthesis and antiviral activities of some 4,4'-dihydroxytriphenylmethanes. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 51 : 1325-1327.
- Nair, V., Abhilash, K. G. and Vidya, N. (2006). Efficient condensation reactions of electron-rich arenes with aldehydes and enals promoted by gold(III) chloride: Practical synthesis of triaryl- and triheteroarylmethanes and related compounds. Synthesis 21, 3647-3653.
- Nair, V., Thomas, S., Mathew, S. C. and Abhilash, K. G. (2006). Recent advances in the chemistry of triaryl- and triheteroarylmethanes. Tetrahedron 62: 6731-6747.
- Parai MK, Panda G, Chaturvedi V, Manju YK, Sinha S. (2008). Thiophene containing triaryl-methanes as antitubercular agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 18 : 289-292.
- Reese, C. B. and Yan, H. (2001). Reactions between pyrrole and orthoesters: preparation of tri-(pyrrol-2-yl)alkanes. Tetrahedron Letters 42: 5545-5547.

- Roy S, Podder S, Choudhury J, Roy UK. (2007). Dual-reagent catalysis within Ir-Sn domain : highly selective alkylation of arenes and heteroarenes with aromatic aldehyde. Journal of Organic Chemistry. 72 : 3100-3103.
- Rudzevich, Y., Rudzevich, V., Schollmeyer, D., Thondord, I. and Bohmer, V. (2005). Hydrogen bonded dimers of triurea derivatives of triphenylmethanes. Organic Letters 7, 613-616.
- Shao J, Li Y, Wang Z, Xiao M, Yin P, Lu Y, Qian X, Xu Y, Liu J. (2013). A novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2- and p38 MAPK-mediated activation of NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. International Immunopharmacology. 17(2) : 216-228.
- Shin JS, Noh YS, Yoo MS, Lee JY, Cho YW, Lee KT. (2012). Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of new synthetic 3-(4-hydroxyphenyl)-4-(4-thiomethoxyphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 22 : 2221-2225.
- Schreck R., Meier B., Mannel DN., Droge W., Baeuerle PA. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. Journal of Experimental Medicine. 175; 1181-1194.
- Tham CL, Lam KW, Rajajendram R, Cheah YK, Sulaiman MR, Lajis NH, Kim MK, Israf DA. (2011). The effects of a synthetic curcuminoid analogue, 2,6-bis-(4-hydroxyl-3-methoxybenzylidene)cyclohexanone on proinflammatory signaling pathways and CLP-induced lethal sepsis in mice. European Journal of Pharmacology. 652 : 136-144.
- Tunctan, B., Altug, S., Uludağ, O., Demirkay, B., Abacıoğlu, N., (2003). Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. Pharmacological Research 48, 37-48.
- Turko IV, Murad F. (2002). Protein nitration in cardiovascular diseases. Pharmacological Reviews. 54 : 619-634.

Utar Z, Majid MI, Adenan MI, Jamil MF, Lan TM. (2011). Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E₂ production induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 136(1) : 75-82.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. Klaokwan Srisook, Petcharat Sawai, Kanjana Duangkate, JarayJarajaronphong. The molecular mechanism of anti-inflammatory effect of 1,1-bis-[2-(5-methylfuryl)]-4-nitrophenyl methane in LPS-induced macrophages.. (Manuscript in preparation).
2. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จำนวน 2 คน คือ นางสาวเพชรรัตน์ ไสว และนางสาวกาญจนา ดวงเกตุ