



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของโปรตีนเอเอ็มพีเคในเซลล์ลำไส้ในการเป็นเป้าหมายของยารักษาภาวะลำไส้
อักเสบและโรคเมตาบอลิกซินโดรม

**Role of AMPK in intestinal epithelial cells as a therapeutic target for alleviating intestinal
inflammation and metabolic syndrome**

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.นพ. ฉัตรชัย เหมือนประสาท และคณะ

มิถุนายน 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของโปรตีนเอเอ็มพีเคในเซลล์ลำไส้ในการเป็นเป้าหมายของยารักษาภาวะลำไส้
อักเสบและโรคเมตาบอลิกซินโดรม

ผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. รศ.ดร.นพ. ฉัตรชัย เหมือนประสาท | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล |
| 2. ศ.ดร.วรรณช ฉัตรสุทธิพงษ์ | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล |
| 3. นายปวิณทร์ พงศ์กอบปรสกล | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล |
| 4. นายศราวุธ สาธิตศรี | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล |
| 5. น.ส. ปรีดาจิตต์ วงศ์กระสันต์ | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล |
| 6. นายเอกชา มูลวิริยะกิจ | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยมหิดล
ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาบทบาทของโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้ในการควบคุมการอักเสบ หน้าที่ปกป้อง และการหลั่งฮอร์โมน ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับภาวะลำไส้อักเสบ เช่น โรคอุจจาระร่วง และโรคเมตาบอลิกซินโดรม นอกจากนี้ยังมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาบทบาทของโปรตีนตัวรับสารอาหารอันได้แก่ GPR39 (ตัวรับสังกะสี) GPR40 (ตัวรับโอเมก้า 3) และตัวรับแคลเซียม (CaSR) ในการควบคุมการทำงานของโปรตีน AMPK และหน้าที่ของเนื้อเยื่อลำไส้ ทางเดินหายใจ และผิวหนัง การศึกษาในเซลล์ลำไส้พบว่าสาร LPS จากแบคทีเรียแกรมลบยับยั้งโปรตีน AMPK ซึ่งผลจะเพิ่มขึ้นด้วย TNF- α ผ่าน NF- κ B และ MAPK นอกจากนี้ TNF- α ยังมีผลเพิ่มฤทธิ์ของ LPS ในการยับยั้งการประกอบตัวของ tight junction ในเซลล์ลำไส้ จากการศึกษาผลของสารที่กระตุ้นตัวรับ GPR39 พบว่าทำให้เกิดการกระตุ้นของโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้ที่ทำหน้าที่ปกป้องและหลั่งฮอร์โมน ทำให้เพิ่มหน้าที่ปกป้องและลดการอักเสบในเซลล์ดังกล่าวได้ ผู้วิจัยได้ขยายขอบเขตของการวิจัยเพื่อศึกษาบทบาทของโปรตีน AMPK ในการยับยั้งการอักเสบในโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน โรคข้อเข่าเสื่อม และภาวะการอักเสบของทางเดินหายใจและผิวหนัง ในหนูที่เป็นโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน โรคข้อเข่าเสื่อม และภาวะการอักเสบของทางเดินหายใจและผิวหนัง ในหนูที่เป็นโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ยาที่ออกฤทธิ์โปรตีน AMPK คือ flufenamic acid สามารถยับยั้งการเกิดอาการอุจจาระร่วงและลดการอักเสบในลำไส้ของหนูที่ติดเชื้อฮิวราห์ได้ผ่านการกระตุ้นโปรตีน CaMKK β นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่กระตุ้น CaSR คือ chitosan oligosaccharide (COS) สามารถยับยั้งการอักเสบในเนื้อเยื่อหุ้มช่องกระต่ายและมนุษย์ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK และเมื่อให้สาร COS แก่กระต่ายที่เหนียวน่าให้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมพบว่า COS สามารถลดการอักเสบในข้อเข่าได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจพบว่า สารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน GPR40 สามารถกระตุ้นการเพิ่มหน้าที่ปกป้องของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK และสามารถป้องกันการทำลายหน้าที่ปกป้องของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจที่เหนียวน่าด้วย TNF- α และ IL-1 β การศึกษาในเซลล์ผิวหนังพบว่า สารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน GPR39 สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังและยับยั้งการอักเสบในเซลล์ผิวหนังผ่านการกระตุ้นโปรตีน mTOR และ AMPK ตามลำดับ ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าโปรตีน AMPK และโปรตีนตัวรับสารอาหารอันได้แก่ โปรตีนตัวรับสังกะสี กรดไขมันโอเมก้า 3 และแคลเซียมเป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับการพัฒนาวิธีการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบของลำไส้ โรคเมตาบอลิกซินโดรม ข้อเข่าเสื่อม โรคระบบหายใจ และโรคผิวหนัง

คำสำคัญ: เซลล์ลำไส้ โปรตีนเอเอ็มพีเค การอักเสบ โปรตีนตัวรับสารอาหาร

Abstract

This research project is aimed to investigate role of AMPK in the intestinal epithelial cells in regulating inflammatory responses, barrier function and enteroendocrine function, which are related to inflammatory intestinal conditions including diarrheas and metabolic syndrome. In addition, we sought to determine the role of nutrient-sensing receptors including GPR39 (zinc-sensing receptor), GPR40 (omega-3 receptor) and calcium-sensing receptors (CaSR) in regulating AMPK activation and governing epithelial functions. Using T84 cells as a model of intestinal epithelial cells, we found that LPS suppressed AMPK and this effect was potentiated by TNF- α via NF- κ B and MAPK pathways. In addition, TNF- α potentiated an effect of LPS on suppressing tight junction assembly in T84 cells. GPR39 agonist was found to activate AMPK in both T84 cells and STC-1 cells, enteroendocrine cells and promote tight junction assembly in T84 cell monolayers and suppress inflammation in STC-1 cells. Stimulation of CaSR by fructose oligosaccharide (FOS) activated AMPK and tight junction assembly in T84 cells via CaMKK β -AMPK pathways. FOS also suppressed LPS-induced AMPK inhibition and tight junction disruption in T84 cells. On top of this, we expand our study to investigate role of AMPK and effect of AMPK activators in suppressing inflammation in cholera diarrheas, osteoarthritis and airway and skin inflammation. We found that AMPK activator flufenamic acid suppressed inflammation and diarrheal response in a mouse model of cholera via mechanism involving direct interaction with CaMKK β . Another AMPK activator chitosan oligosaccharide (COS) was also found to suppress TNF- α -induced inflammatory responses in synovial fibroblasts from both rabbits and humans. Oral administration of COS reduced synovial inflammation and activated AMPK in synovial membrane in the rabbit model of ACL transection-induced osteoarthritis. We found that stimulation of GPR40 in airway epithelial cells resulted in AMPK activation, promotion of tight junction assembly and suppression of TNF- α plus IL-1 β -induced inflammatory responses and barrier disruption in airway epithelial (Calu-3) cells. Lastly, we investigated effect of GPR39 in human skin epithelial cells (HaCaT cells) and found that GPR39 receptor activation led to increased cell proliferation and suppression of inflammatory responses in these cells via mTOR and AMPK-mediated signaling pathways respectively. In summary, our findings indicate that AMPK and nutrient-sensing receptors represent promising drug targets for the treatment of inflammation-associated diseases of the intestine, joint, airway and skin and metabolic syndrome.

Keywords: intestinal epithelial cells, AMPK, inflammation, nutrient-sensing receptor

Executive Summary

This research project is aimed to investigate role of AMPK in the intestinal epithelial cells in regulating inflammatory responses, barrier function and enteroendocrine function, which are related to inflammatory intestinal conditions including diarrheas and metabolic syndrome. In addition, we sought to determine the role of nutrient-sensing receptors including GPR39 (zinc-sensing receptor), GPR40 (omega-3 receptor) and calcium-sensing receptors (CaSR) in regulating AMPK activation and governing epithelial functions. Using T84 cells as a model of intestinal epithelial cells, we found that LPS suppressed AMPK and this effect was potentiated by TNF- α via NF- κ B and MAPK pathways. In addition, TNF- α potentiated an effect of LPS on suppressing tight junction assembly in T84 cells. GPR39 agonist was found to activate AMPK in both T84 cells and STC-1 cells, enteroendocrine cells and promote tight junction assembly in T84 cell monolayers and suppress inflammation in STC-1 cells. Stimulation of CaSR by fructose oligosaccharide (FOS) activated AMPK and tight junction assembly in T84 cells via CaMKK β -AMPK pathways. FOS also suppressed LPS-induced AMPK inhibition and tight junction disruption in T84 cells. On top of this, we expand our study to investigate role of AMPK and effect of AMPK activators in suppressing inflammation in cholera diarrheas, osteoarthritis and airway inflammation. We found that AMPK activator flufenamic acid suppressed inflammation and diarrheal response in a mouse model of cholera via mechanism involving direct interaction with CaMKK β . Another AMPK activator chitosan oligosaccharide (COS) was also found to suppress TNF- α -induced inflammatory responses in synovial fibroblasts from both rabbits and humans. Oral administration of COS reduced synovial inflammation and activated AMPK in synovial membrane in the rabbit model of ACL transection-induced osteoarthritis. We found that stimulation of GPR40 in airway epithelial cells resulted in AMPK activation, promotion of tight junction assembly and suppression of TNF- α plus IL-1 β -induced inflammatory responses and barrier disruption in airway epithelial (Calu-3) cells. Lastly, we investigated effect of GPR39 in human skin epithelial cells (HaCaT cells) and found that GPR39 receptor activation led to increased cell proliferation and suppression of inflammatory responses in these cells via mTOR and AMPK-mediated signaling pathways respectively. In summary, our findings indicate that AMPK and nutrient-sensing receptors represent promising drug targets for the treatment of inflammation-associated diseases of the intestine, joint, airway and skin and metabolic syndrome.

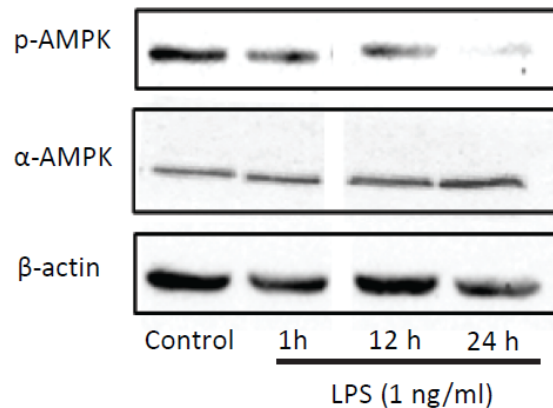
This project produced 9 publications in international journals, 1 patent and 5 Ph.D. graduates.

เนื้อหางานวิจัย

1) การศึกษาผลของ LPS ต่อโปรตีน AMPK

1.1) การศึกษาผลของ LPS ต่อโปรตีน AMPK และผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ลำไส้

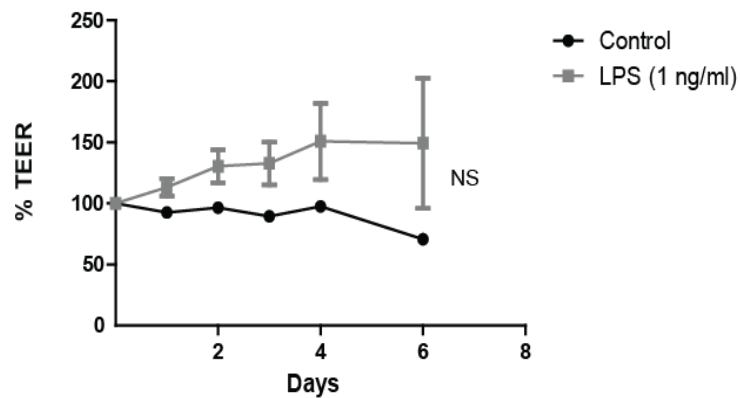
ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของ LPS ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL ซึ่งถือเป็น physiological dose ต่อเซลล์ T84 ที่เวลา 1, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า LPS ลดการแสดงออกของ phosphorylated AMPK (p-AMPK) ที่ 24 ชั่วโมง (รูปด้านล่าง) โดยไม่มีผลต่อการแสดงออกของ total α -AMPK



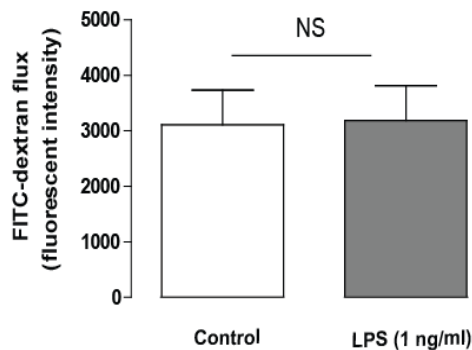
รูปแสดง ผลของ LPS ต่อการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้

1.2) การศึกษาผลของ LPS ต่อ barrier function ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของ LPS ต่อ barrier function ของเซลล์ T84 โดยได้เลี้ยงเซลล์ T84 cell monolayer ในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้น 1 ng/mL เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 6 วัน โดยพบว่าไม่มีผลต่อ transepithelial electrical resistance (TEER) (รูปด้านล่าง) ซึ่งแสดงว่าไม่มีผลต่อ barrier function ซึ่งก็ได้ยืนยันด้วยการวัด FITC-dextran (4 kDa) flux ซึ่งพบว่า LPS ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL ที่เวลา 6 วัน ไม่มีผลต่อ FITC-dextran flux (รูปด้านล่าง) ซึ่งบ่งชี้ว่าไม่มีผลต่อ barrier function ซึ่งไม่ตรงกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ ซึ่งอาจเกิดจากการที่โปรตีน AMPK ไม่ได้มีผลต่อการรักษา barrier function แต่มีผลต่อ tight junction assembly ซึ่งต้องวัดด้วย Calcium switch assay ต่อไป



รูปแสดง ผลของ LPS ต่อ barrier function ของเซลล์ลำไส้ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการวัด TEER

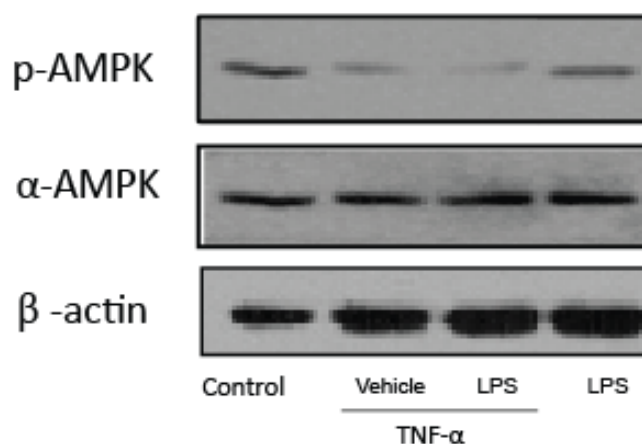


รูปแสดง ผลของ LPS ต่อ barrier function ของเซลล์ลำไส้ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการวัด FITC-dextran (4 kDa)

2) การศึกษาผลของ $\text{TNF-}\alpha$ ในการเสริมฤทธิ์ของ LPS ในการยับยั้ง AMPK และการทำหน้าที่ของเซลล์ลำไส้

2.1) ผลของ $\text{TNF-}\alpha$ และ LPS ต่อ AMPK

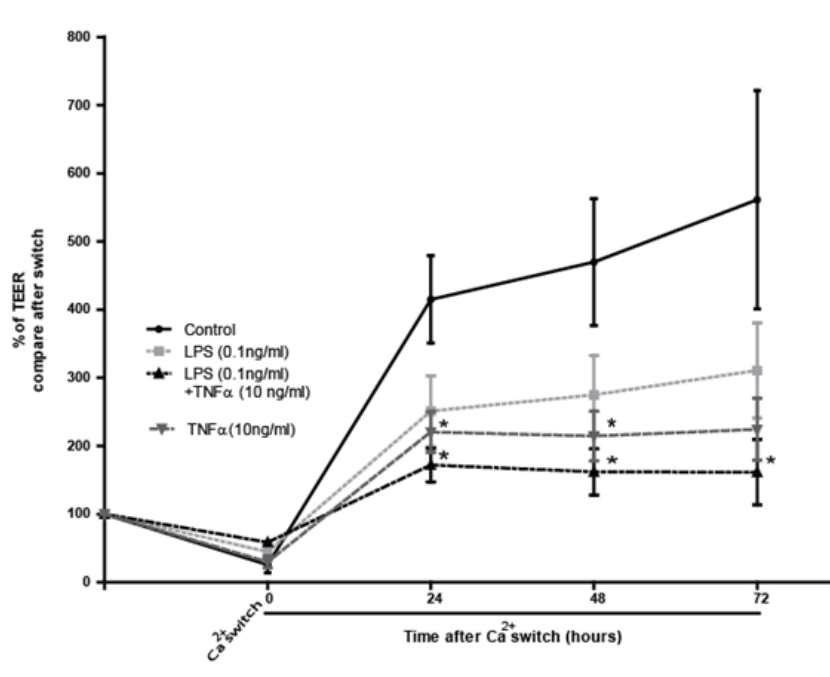
จากการทดลองก่อนหน้านี้ เราพบว่า LPS ลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK ได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ng/mL ในเซลล์ลำไส้ T84 และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่า $\text{TNF}\alpha$ มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Toll Like Receptor4 (TLR4) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่ง TLR4 เป็น membrane receptor ของ LPS ในการกระตุ้นการอักเสบผ่านทางโปรตีน nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF- KB) ในเซลล์หลายๆชนิด เราจึงตั้งสมมุติฐานว่า LPS ทำงานร่วมกับ $\text{TNF-}\alpha$ เพื่อลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK โดยพิสูจน์สมมุติฐานข้างต้นด้วยการลดความเข้มข้นของ LPS เหลือ 0.1 ng/mL ร่วมกับ $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้กระตุ้นการอักเสบได้ดีที่สุดในเซลล์ลำไส้ T84 หลังจากนั้นวิเคราะห์ AMPK phosphorylation ที่ 24 ชั่วโมง พบว่า LPS + $\text{TNF-}\alpha$ ลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK มากกว่ากลุ่มของ LPS หรือ $\text{TNF-}\alpha$ เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงสรุปได้ว่า $\text{TNF}\alpha$ เสริมฤทธิ์ของ LPS ในการลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปแสดง ผลของ TNF- α ในการเสริมฤทธิ์ของ LPS ในการยับยั้งโปรตีน AMPK ในเซลล์ T84

2.2) ผลของ TNF- α และ LPS ต่อ tight junction assembly

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของ TNF- α และ LPS ต่อ tight junction assembly ซึ่งวัดด้วย calcium switch assay ซึ่งมีหลักฐานว่า AMPK เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ ผลการทดลองพบว่า LPS + TNF α ลด tight junction assembly อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 24-72 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มควบคุม และลดมากกว่าการป้อนด้วย LPS หรือ TNF α อย่างเดียว (*, p-value < 0.05) ดังแสดงในรูปด้านล่าง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า LPS และ TNF α ออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อลด tight junction assembly ในเซลล์ลำไส้ (T84)



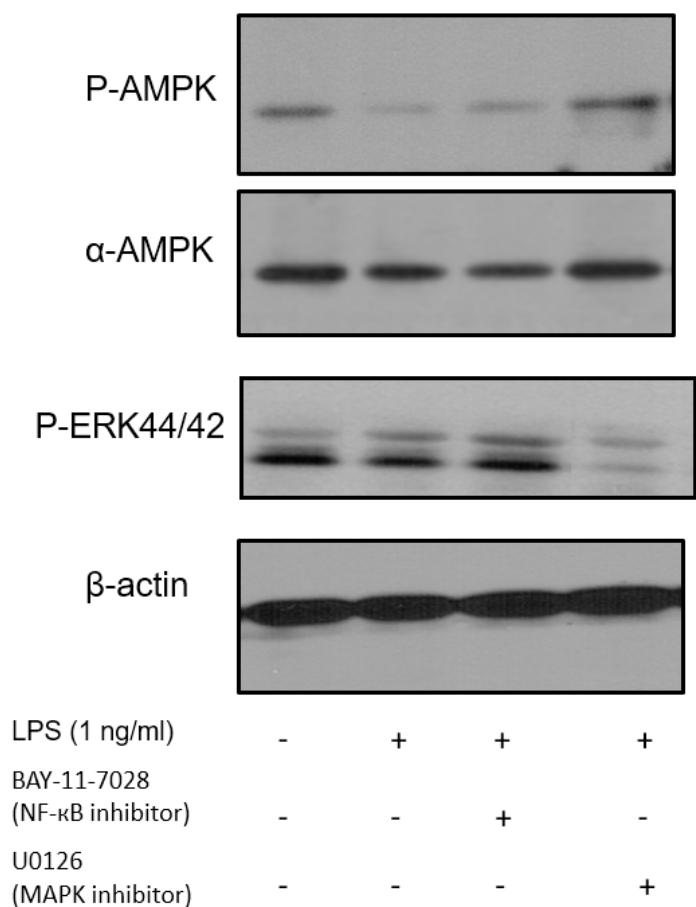
รูปแสดง ผลของ TNF- α และ LPS ต่อ tight junction assembly ในเซลล์ T84

3) การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของผลของ LPS ต่อการยับยั้ง AMPK และหน้าที่ปกป้องของลำไส้

1. ศึกษากลไกของ LPS ต่อการยับยั้งโปรตีน AMPK

จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า LPS ลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK ได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ng/ml ในเซลล์ลำไส้ T84 และ Tumor necrosis factor- α (TNF- α ; 10 ng/ml) มีผลร่วมกัน (additive effect) ลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK ในรูป Active form (p-AMPK) จึงตั้งข้อเสนอนี้ว่า LPS และ TNF α สามารถยับยั้ง p-AMPK ได้โดย TNF α อาจจะไม่เพิ่ม TLR-4 เพื่อทำให้ความรุนแรงของโรคในการติดเชื้อ LPS รุนแรงขึ้น เราจึงสนใจศึกษากลไกการทำงานของ LPS ต่อการแสดงออกของโปรตีน AMPK

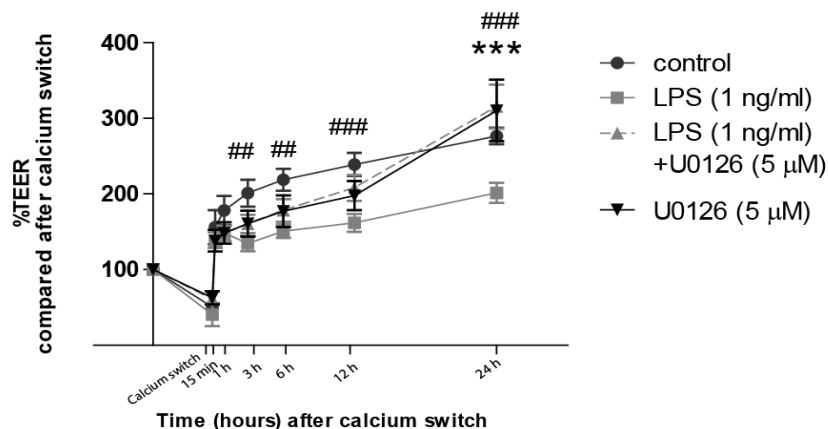
เนื่องจาก LPS ในการกระตุ้นการอักเสบผ่านทางโปรตีน Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cell (NF-KB) และ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) แต่ยังไม่มีการศึกษาว่า โปรตีน 2 ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับโปรตีน AMPK เราจึงตั้งสมมติฐานว่า LPS ยับยั้งโปรตีน AMPK โดยผ่านทางกระตุ้นโปรตีน NFKB และ MAPK ได้นำเซลล์ลำไส้ T84 บ่มด้วยสารที่ยับยั้งการทำงานของ NFKB หรือ MAPK ร่วมกับ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดลอง western blot เพื่อสังเกตการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK ซึ่งเป็น Active form ของโปรตีน AMPK พบว่าผลของ LPS ที่ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK มีผลลดลงในกลุ่มที่บ่มร่วมกับ NF-KB inhibitor และ MAPK inhibitor จึงสรุปได้ว่า LPS ออกฤทธิ์ผ่าน โปรตีน NF-KB และ MAPK เพื่อลดการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK ซึ่ง MAPK อาจเป็น downstream ต่อ NF-KB หรือคนละ pathway จึงทำการแสดงออกของโปรตีน p-ERK44/42 ต่อ พบว่าผลของ LPS ต่อการกระตุ้นโปรตีนของ MAPK pathway คือ p-ERK44/42 ไม่เปลี่ยนแปลงในกลุ่มที่บ่มด้วย NF-KB inhibitor จึงสรุปได้ว่า LPS ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK โดยกระตุ้นโปรตีน NF-KB ไม่ได้เป็น upstream ต่อ MAPK ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปแสดง การศึกษากลไกของ LPS ในการยับยั้งโปรตีน AMPK

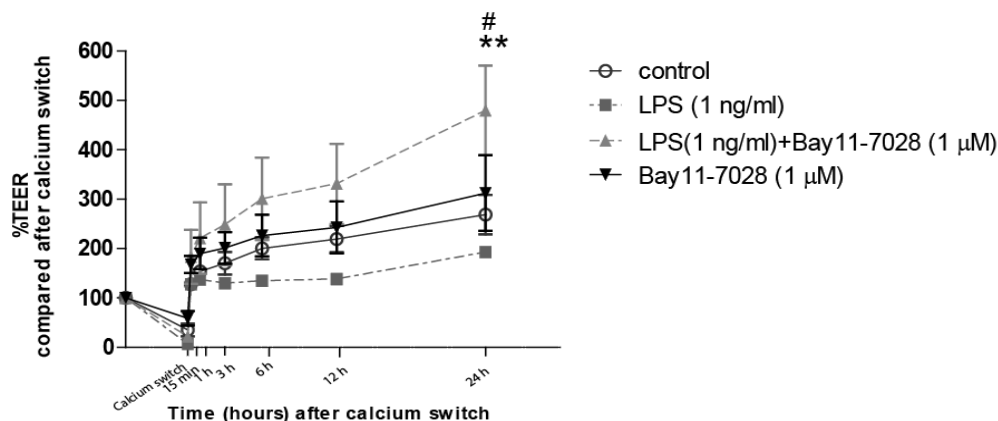
2. การศึกษากลไกของ LPS ในการทำลายหน้าที่ปกป้องของเซลล์ลำไส้

เพื่อเป็นการทดสอบว่า LPS ลด tight junction reassembly ผ่านทาง NF-KB และ MAPK เซลล์ลำไส้ T84 ซึ่งเลี้ยงใน transwell plate ขณะที่ Transelectrical epithelial resistance (TEER) ประมาณ 3,000-4,000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ถูกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีส่วนประกอบของแคลเซียม (Calcium switch assay) เพื่อทำลาย barrier function หลังจากนั้น 16 ชั่วโมง จึงทำการวัด TEER จะพบว่า TEER จะลดลงจาก TEER ตั้งต้นประมาณ 50% หลังจากนั้นทำการบ่มเซลล์ด้วย LPS ร่วมกับ NF-KB inhibitor หรือ MAPK inhibitor ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีส่วนประกอบของแคลเซียมเปรียบเทียบร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ TEER เทียบกับเวลาตั้งต้น (0 ชั่วโมง) หลัง Calcium switch ที่เวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 15 นาที, 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าผลของ LPS ยับยั้ง tight junction reassembly อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และผลดังกล่าวลดลง (##, p-value < 0.01, ###, p-value < 0.001) เมื่อบ่มร่วมกับ MAPK inhibitor ซึ่งมีนัยสำคัญที่ 24 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว (***, p-value < 0.001) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า LPS กระตุ้นโปรตีน MAPK เพื่อออกฤทธิ์ยับยั้ง tight junction reassembly (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง กลไกของ LPS ในการยับยั้ง tight junction reassembly ผ่าน MAPK ในเซลล์ T84

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาบทบาทของ NF- κ B โดยพบว่าผลของ LPS ที่ยับยั้ง tight junction reassembly มีนัยสำคัญตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมง และผลดังกล่าวลดลง (#, p-value < 0.05) เทียบกลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับ NF- κ B inhibitor ซึ่งมีนัยสำคัญที่ 24 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว (**, p-value < 0.01) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า LPS กระตุ้นโปรตีน NF- κ B เพื่อออกฤทธิ์ยับยั้ง tight junction reassembly ด้วย



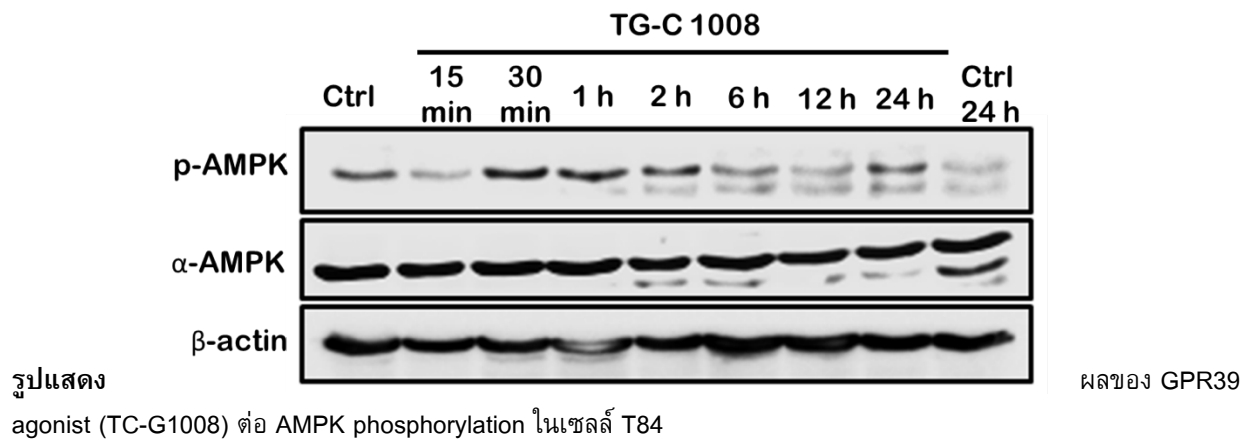
รูปแสดง กลไกของ LPS ในการยับยั้ง tight junction reassembly ผ่าน NF- κ B ในเซลล์ T84

4) การศึกษาผลของการกระตุ้นตัวรับบนผิวเซลล์ต่อโปรตีน AMPK และผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ลำไส้

ตอนที่ 1 การกระตุ้นตัวรับ GPR39 หรือ Zn-sensing receptor

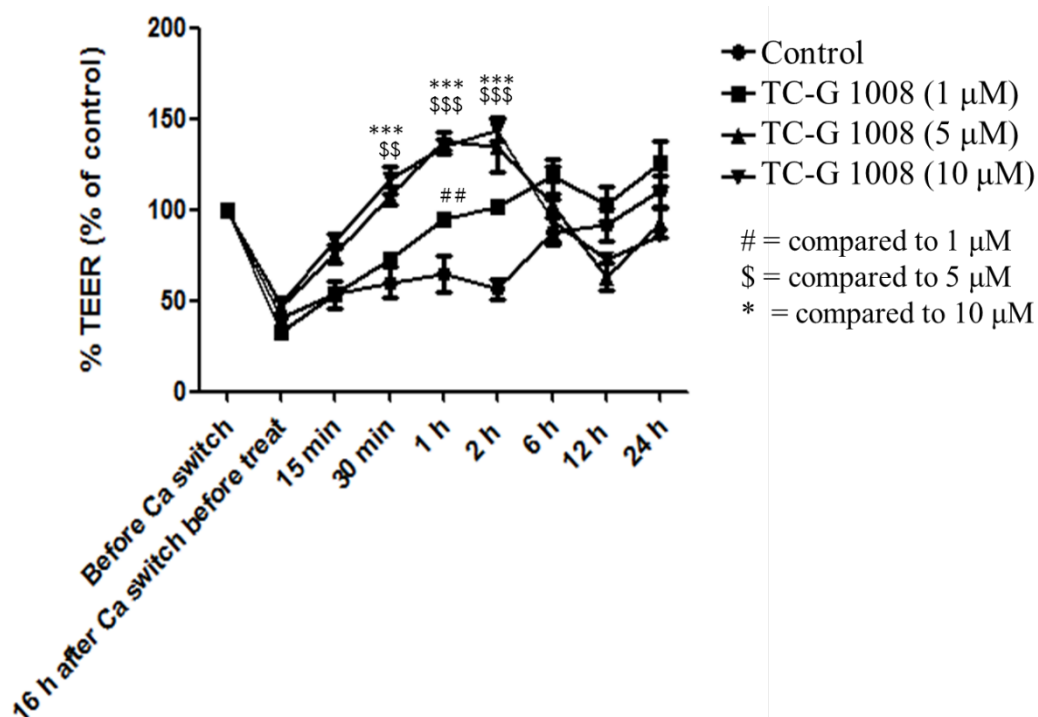
1) ผลของการกระตุ้นตัวรับ GPR39 ต่อ AMPK phosphorylation

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของการกระตุ้นโปรตีน GPR39 ด้วย TC-G1008 ซึ่งเป็น GPR39 agonist ที่ความเข้มข้น 10 μ M ด้วยเวลาต่างๆกัน พบว่า TC-G1008 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด AMPK phosphorylation ที่เวลา 30 นาที และที่ 1, 2 และ 24 ชม แสดงว่าการกระตุ้น GPR39 สามารถนำไปสู่การกระตุ้นโปรตีน AMPK ได้ตรงตามสมมติฐานที่ตั้งไว้



2) ผลของการกระตุ้นโปรตีนตัวรับ GPR39 ต่อ tight junction assembly ในเซลล์ T84

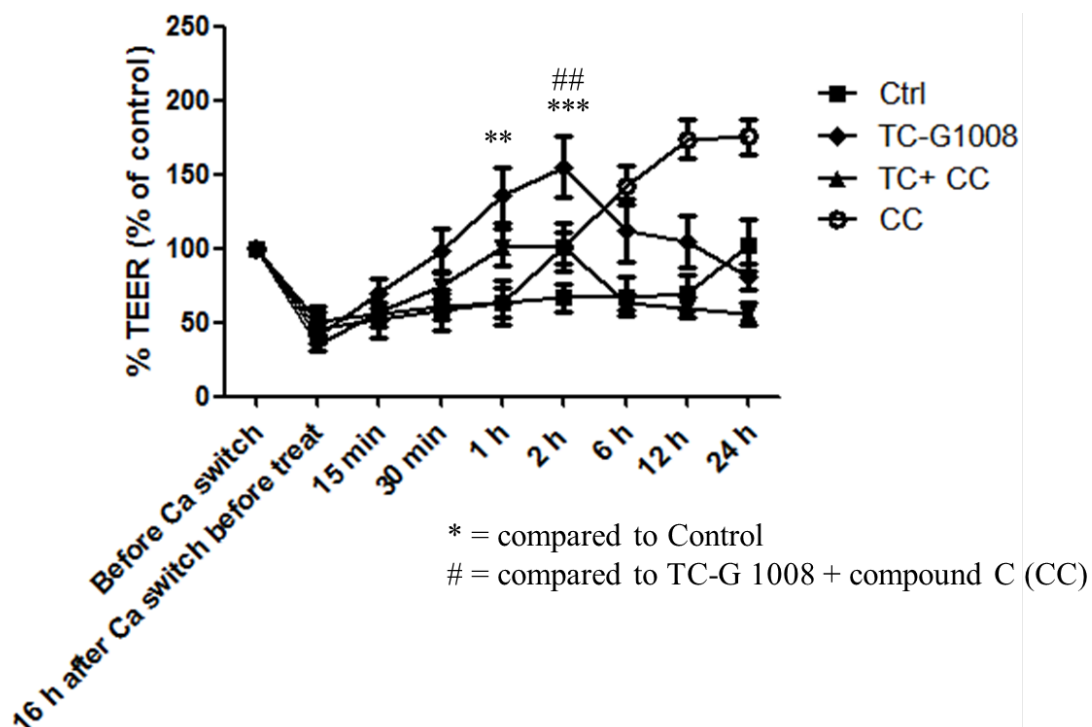
ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของการกระตุ้นโปรตีนตัวรับ GPR39 ด้วย TC-G1008 ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 μM ต่อ tight junction assembly โดยใช้เทคนิค Calcium switch assay พบว่าเพิ่มอัตราการการเพิ่มขึ้นของ TEER อย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง) ซึ่งบ่งชี้ว่า GPR agonist กระตุ้น tight junction assembly ในเซลล์ T84



รูปแสดง ผลของ GPR39 agonist (TC-G1008) ต่อ tight junction assembly ในเซลล์ T84

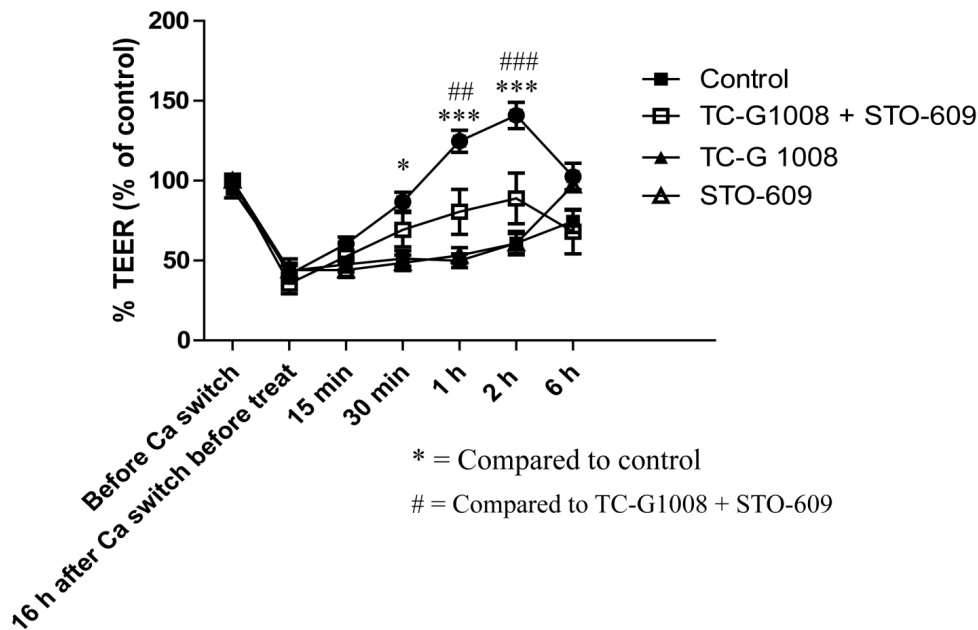
หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาว่าสาร TC-G1008 ออกฤทธิ์ดังกล่าวผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK หรือไม่ โดยได้ทำการ pretreat เซลล์กับ compound C ซึ่งเป็นสารยับยั้งโปรตีน AMPK พบว่า compound C ยับยั้งฤทธิ์ในการเพิ่ม TEER ของ

TC-G1008 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง) ซึ่งบ่งชี้ว่า TC-G1008 กระตุ้น tight junction assembly ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK ดังที่ได้ตั้งสมมติฐานไว้



รูปแสดง ผลของ GPR39 agonist (TC-G1008) ต่อการเหนี่ยวนำ tight junction assembly ผ่านโปรตีน AMPK ในเซลล์ T84

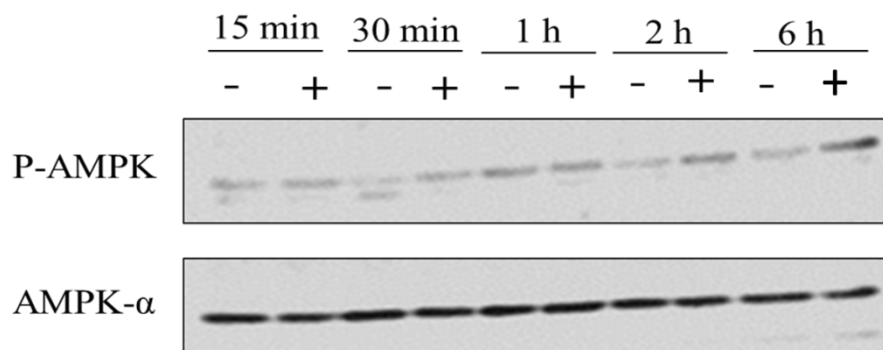
เนื่องจากการกระตุ้นโปรตีน GPR39 สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปสู่การกระตุ้นโปรตีน CaMKK β ซึ่งเป็น upstream ของโปรตีน AMPK ดังนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาว่าผลของสาร TC-G1008 ต่อการเพิ่ม tight junction assembly ออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นโปรตีน CaMKK β หรือไม่ โดยได้ทำการ pretreat เซลล์ด้วย STO-609 ซึ่งเป็นสารยับยั้งโปรตีน CaMKK β พบว่า STO-609 ยับยั้งฤทธิ์ในการเพิ่ม transepithelial electrical resistance (TEER) ของ TC-G1008 ได้อย่างมีนัยสำคัญดังรูปด้านล่าง ซึ่งบ่งชี้ว่า TC-G1008 กระตุ้น tight junction assembly ในเซลล์ลำไส้ผ่านการกระตุ้นโปรตีน CaMKK β และ AMPK



รูปแสดง แสดงผลของการศึกษาผลของ GPR39 agonist (TC-G1008) ต่อการเหนี่ยวนำ tight junction assembly ผ่านโปรตีนCaMKK β ในเซลล์ T84

3) ผลของการกระตุ้นโปรตีนตัวรับ GPR39 ต่อ AMPK phosphorylation ใน enteroendocrine cells

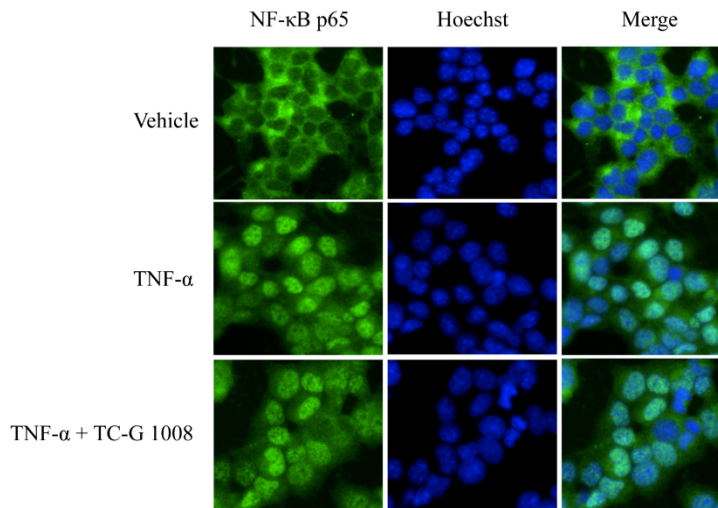
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของการกระตุ้นตัวรับ GPR39 ในเซลล์ STC-1 (enteroendocrine cells) ด้วย TC-G1008 ที่ความเข้มข้น 10 μ M ที่เวลา 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์ AMPK phosphorylation ด้วย western blot analysis และพบว่า TC-G1008 กระตุ้น AMPK phosphorylation ตั้งแต่ 15 นาที จนกระทั่ง 6 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปแสดง ผลของ GPR39 agonist ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์ STC-1

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของ GPR39 agonist (TC-G1008) ต่อการอักเสบในเซลล์ STC-1 ซึ่งเป็น enteroendocrine cells เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า TNF- α เป็น cytokine ที่มีบทบาทสำหรับการทำให้เกิดการอักเสบในผู้ป่วย

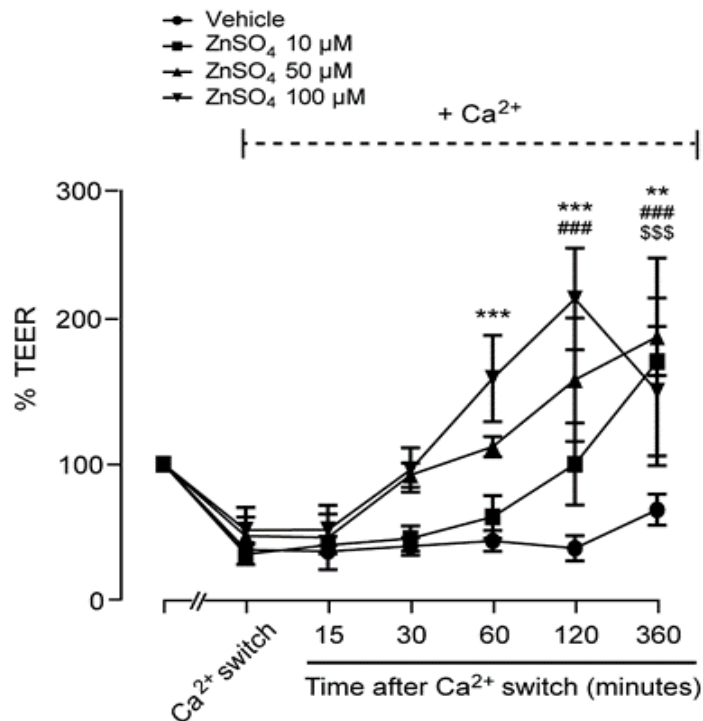
type 2 diabetes mellitus นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า TNF- α ลดการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 ผ่านทางการกระตุ้น NF-KB ทั้งนี้ ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การกระตุ้นโปรตีน AMPK โดย สาร TC-G1008 อาจยับยั้งการกระตุ้น NF-KB ในเซลล์ STC-1 และมีผลเพิ่มการหลั่ง GLP-1 ในภาวะที่มีการอักเสบได้ จากผลการทดลองพบว่า สาร TC-G1008 ไม่ได้ยับยั้ง TNF- α -induced NF-KB nuclear translocation ในเซลล์ดังกล่าว ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปแสดง ผลของสาร TC-G1008 ต่อ TNF- α -induced NF-KB nuclear translocation ในเซลล์ STC-1

4) ผลของสังกะสีต่อการเพิ่ม TEER ในเซลล์ลำไส้

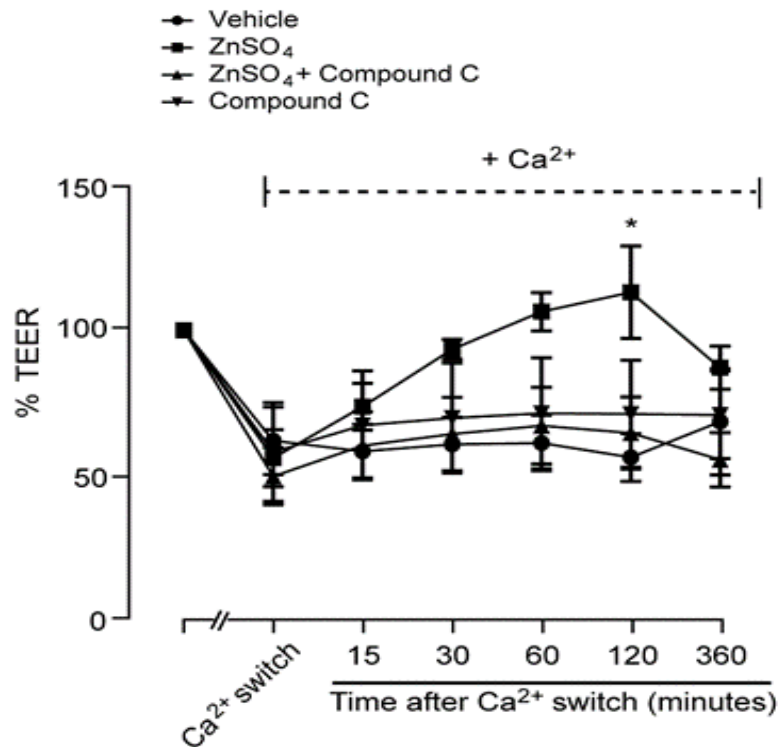
จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า กระตุ้นตัวรับ GPR39 สามารถเพิ่ม TEER ซึ่งบ่งบอกถึงการเพิ่ม tight junction assembly โดยเป็นที่ยอมรับกันดีว่า ตัวรับ GPR39 เป็นตัวรับสังกะสี ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบผลของสังกะสีต่อ TEER ในเซลล์ T84 เพื่อเป็นยืนยันผลการทดลองก่อนหน้านี้ โดยจากผลการทดลอง พบว่า สังกะสีสามารถเพิ่ม TEER ในลักษณะของ Dose- และ time-dependent effect ทั้งนี้ 100 μ M ZnSO₄ มีการกระตุ้นการเพิ่ม TEER สูงสุด เกิดขึ้นที่เวลา 2 ชั่วโมง (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง ผลของสังกะสีต่อการเพิ่ม TEER. **, *** $p = 0.01$ และ 0.001 ตามลำดับ กลุ่ม ZnSO₄ (100 μM) เทียบกับกลุ่ม Vehicle. ### $p = 0.001$ ZnSO₄ (50 μM) เทียบกับกลุ่ม Vehicle. \$\$\$ $p = 0.001$ ZnSO₄ (10 μM) เทียบกับกลุ่ม Vehicle

5) บทบาทของโปรตีน AMPK ต่อการเพิ่ม tight junction assembly โดยสังกะสี

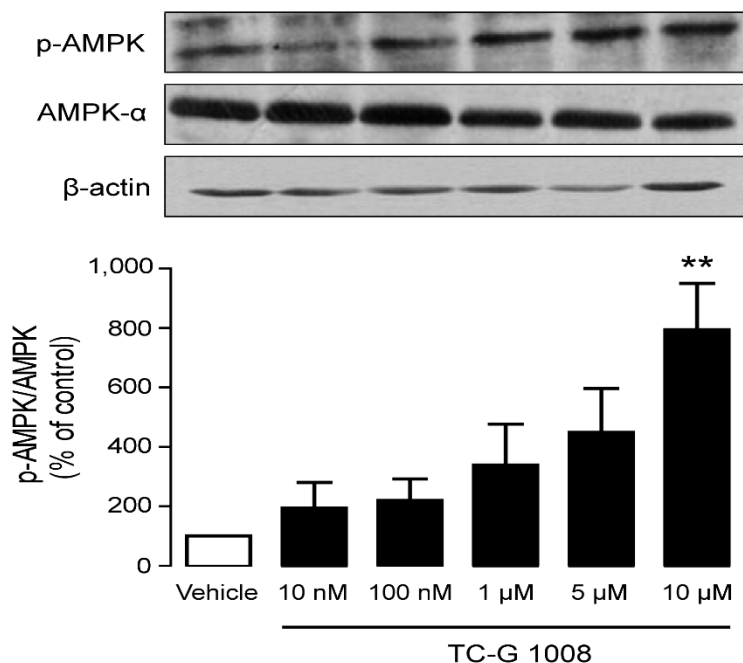
จากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า การกระตุ้นตัวรับ GPR39 สามารถเพิ่ม TEER ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยทำการทดสอบบทบาทของ AMPK ต่อการเพิ่มขึ้นของ TEER โดยสังกะสี จากผลการทดลอง พบว่า ผลของสังกะสีต่อการเพิ่มขึ้นของ TEER ในเซลล์ลำไส้ถูกยับยั้งโดยสาร compound C ซึ่งเป็น AMPK inhibitor (รูปด้านล่าง) สรุปได้ว่า การกระตุ้น tight junction assembly ในเซลล์ลำไส้โดยสังกะสี มีกลไกผ่านทางการกระตุ้น AMPK ซึ่งเหมือนกับการกระตุ้นกระตุ้นตัวรับ GPR39 โดยตรง จึงยืนยันได้ว่า บทบาทของสังกะสีต่อการกระตุ้น tight junction assembly เกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของ GPR39



รูปแสดง สังกะสีเพิ่ม TEER ผ่านทางโปรตีน AMPK * $p = 0.05$ กลุ่ม ZnSO₄ เทียบกับกลุ่ม Vehicle

6) การศึกษา Dose-dependent effect ของสาร TC-G 1008 ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้

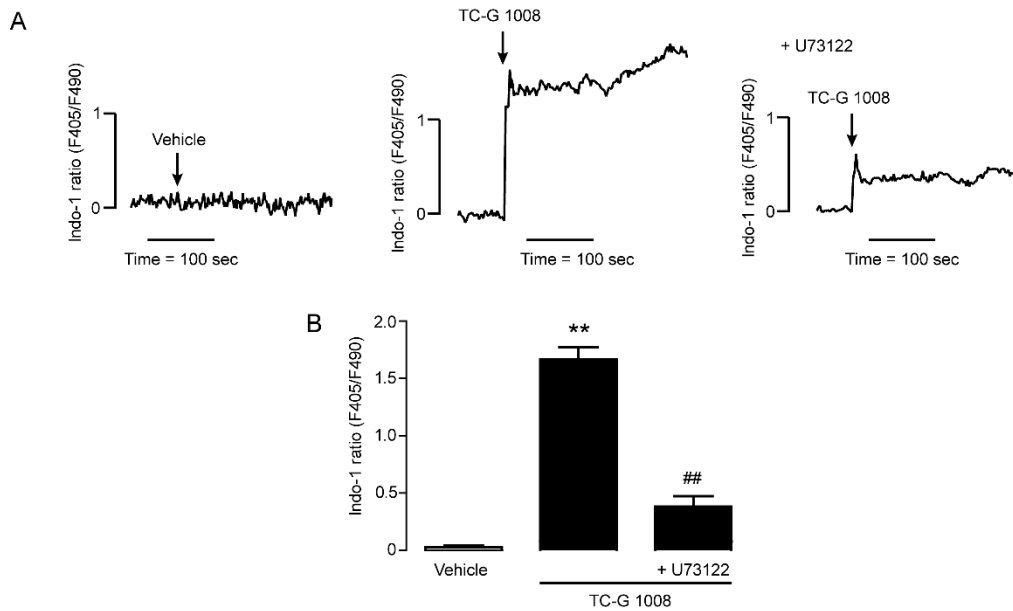
จากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า การกระตุ้นตัวรับ GPR39 มีผลต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK ซึ่งนำไปสู่การเพิ่ม tight junction assembly เพื่อที่จะศึกษาบทบาททางเภสัชวิทยาของตัวรับ GPR39 ต่อการกระตุ้น AMPK เพิ่มเติม ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงใช้วิธี Western Blot เพื่อทำการศึกษาดose-dependent effect ของสาร TC-G 1008 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นตัวรับ GPR39 ที่มีความเฉพาะเจาะจง จากผลการทดลอง พบว่า สาร TC-G 1008 สามารถกระตุ้นการ phosphorylation ของโปรตีน AMPK ในลักษณะ dose-dependent โดยสามารถกระตุ้นได้ที่สูงสุดและมีนัยสำคัญทางสถิติที่ Dose 10 μM (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง Dose-dependent effect ของสาร TC-G 1008 ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK. ** $p = 0.01$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม Vehicle

7) ผลของสาร TC-G 1008 ต่อการเพิ่ม calcium ภายในเซลล์ลำไส้

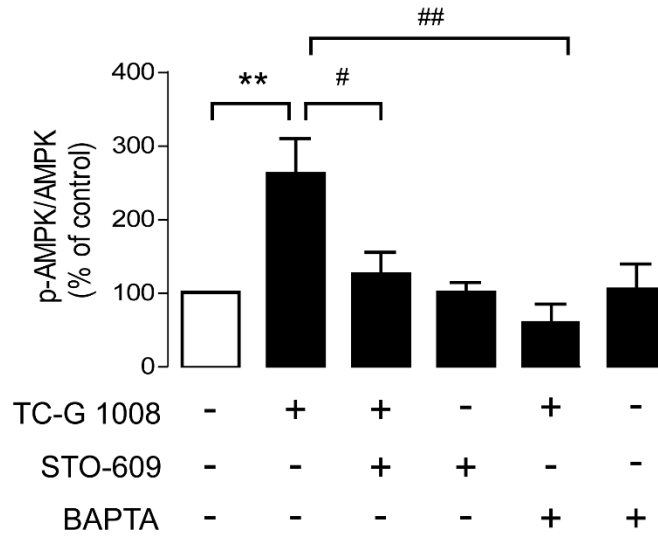
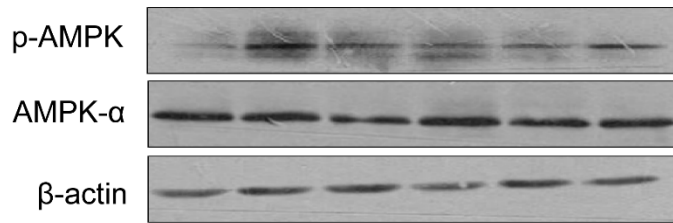
เนื่องจาก GPR39 เป็น G-protein coupled receptor ที่จับกับ G_{α_q} subunit โดยการกระตุ้น subunit นี้จะทำให้เกิดการเพิ่ม calcium ภายในเซลล์ ผ่านทางการกระตุ้นโปรตีน Phospholipase C (PLC) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการวัด calcium ภายในเซลล์โดยใช้ indo-1 calcium-sensitive fluorescent dye จากผลการทดลอง พบว่า สาร TC-G 1008 สามารถเพิ่มแคลเซียมภายในเซลล์ T84 โดยสังเกตจาก fluorescent intensity ที่เพิ่มขึ้นของ indo-1 dye และ การเพิ่มขึ้นของ calcium ภายในเซลล์โดยสาร TC-G 1008 ถูกยับยั้งโดยสาร U73122 ซึ่งเป็น PLC inhibitor (รูปด้านล่าง) จึงสรุปได้ว่าสาร TC-G 1008 สามารถเพิ่ม calcium ในเซลล์ผ่านทาง $G\alpha_q$ -PLC pathway



รูปแสดง ผลของสาร TC-G 1008 ต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ calcium ในเซลล์ T84

8) กลไกการกระตุ้นโปรตีน AMPK โดย GPR39 agonist TC-G 1008

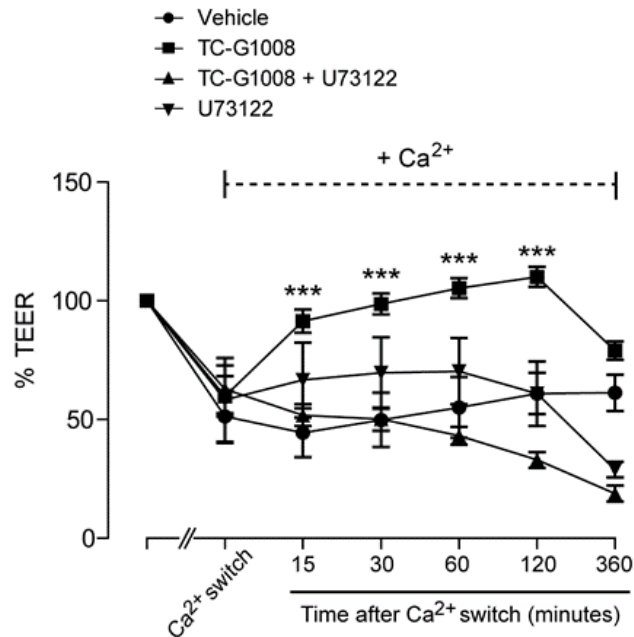
เนื่องจากโปรตีน AMPK สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยการเพิ่มของ calcium ภายในเซลล์ ผ่านทางโปรตีน CaMKK β และการทดลองทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า CaMKK β inhibitor สามารถยับยั้งผลของ GPR39 agonist ต่อการเพิ่มขึ้นของ TEER และการกระตุ้นตัวรับ GPR39 เพิ่ม calcium ในเซลล์ ดังนั้น ผู้จึงตั้งสมมติฐานว่า การกระตุ้น ตัวรับ GPR39 สามารถเพิ่มการกระตุ้นโปรตีน AMPK ผ่านทาง Calcium-CaMKK β pathway จากผลการทดลองโดยใช้เทคนิค Western blot สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว โดยพบว่า GPR39 agonist สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ และผลการกระตุ้นดังกล่าวถูกยับยั้งโดย calcium chelator (BAPTA) และ CaMKK β inhibitor (STO-609) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยที่ BAPTA และ CaMKK β inhibitor ไม่ได้มีผลต่อการทำงานของโปรตีน AMPK เมื่อเทียบกับกลุ่ม control (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง บทบาทของโปรตีน CaMKK β และ calcium ในเซลล์ต่อการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK โดย GPR39 agonist

9) บทบาทของโปรตีน PLC ต่อการเพิ่ม tight junction assembly โดย GPR39 agonist

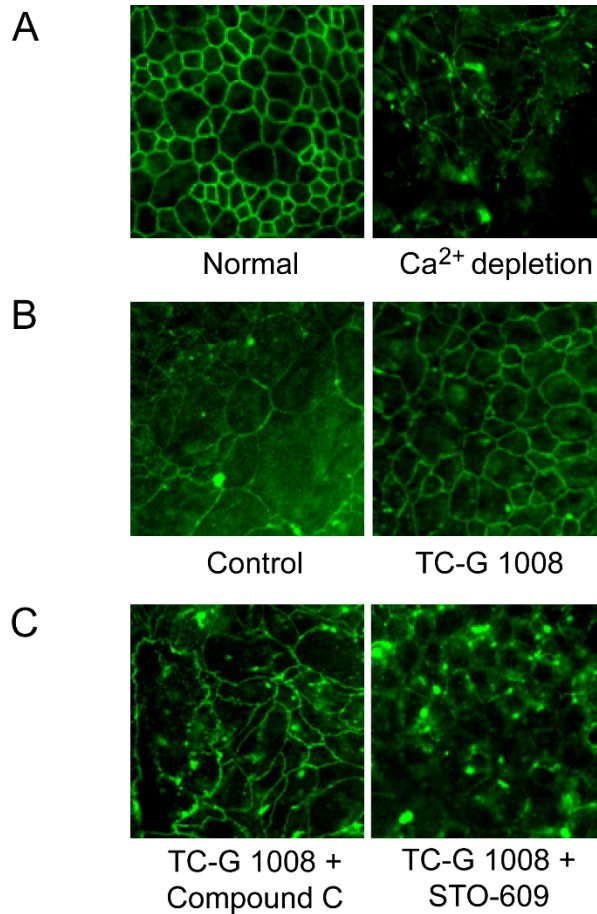
จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า PLC มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับ calcium หลังจากที่มีการกระตุ้นตัวรับ GPR39 ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์บทบาทของ PLC ต่อการเพิ่ม tight junction assembly ด้วยการวัดค่า TEER และพบว่า การเพิ่มขึ้นของ TEER โดย GPR39 agonist TC-G 1008 ถูกยับยั้งโดย PLC inhibitor (U73122) ซึ่ง U73122 เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อค่า TEER เมื่อเทียบกับกลุ่ม control (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง บทบาทของโปรตีน PLC ต่อการเพิ่ม TEER ในเซลล์ลำไส้

10) บทบาทของการกระตุ้นตัวรับ GPR39 ต่อการเรียงตัวของ tight junction protein ZO-1 และกลไกที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากการกระตุ้นโปรตีน AMPK สามารถเพิ่มการ re-assembly ของโปรตีน ZO-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของ tight junction ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า การกระตุ้นตัวรับ GPR39 สามารถการ re-assembly ของโปรตีน ZO-1 ผ่านทาง AMPK pathway เพื่อที่จะพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว ทางผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค Immunofluorescence เพื่อย้อมการเรียงตัวของ ZO-1 โดยพบว่า ในภาวะปกติ ZO-1 จะเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในบริเวณขอบของเซลล์ซึ่งแสดงในรูปด้านล่าง A (ซ้าย) แต่ในภาวะ Ca²⁺ depletion ในรูปด้านล่าง A (ขวา) จะพบว่า การเรียงตัวของโปรตีน ZO-1 ไม่มีความต่อเนื่องเหมือนกับในภาวะปกติ ในขณะที่ 2 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นตัวรับ GPR39 ด้วยสาร TC-G 1008 พบว่าการ re-assembly ของ ZO-1 สู่บริเวณของ tight junction มีมากกว่ากลุ่ม control อย่างเห็นได้ชัด (รูปด้านล่าง B) นอกจากนี้ ยังพบอีกว่า ZO-1 re-assembly โดยสาร TC-G 1008 ถูกยับยั้งโดย AMPK inhibitor (รูปด้านล่าง C ซ้าย) และ CaMKK β inhibitor (รูปด้านล่าง C ขวา) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การกระตุ้น GPR39 สามารถเพิ่มการเรียงตัวใหม่ของ ZO-1 สู่บริเวณ tight junction ผ่านทางกลไก CaMKK β -AMPK pathway

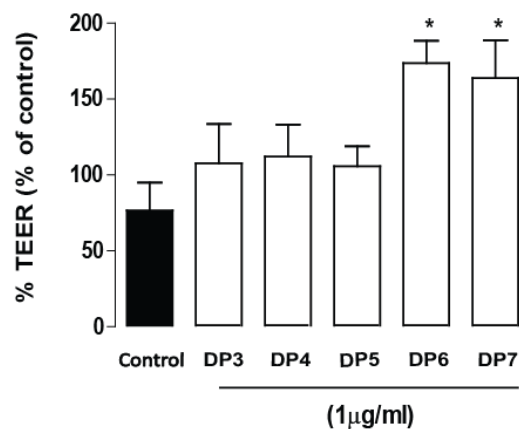


รูปแสดง ผลของการกระตุ้นตัวรับ GPR39 ต่อการเรียงตัวของโปรตีน ZO-1 และกลไกที่เกี่ยวข้อง

ตอนที่ 2 การกระตุ้นตัวรับ calcium-sensing receptor (CaSR)

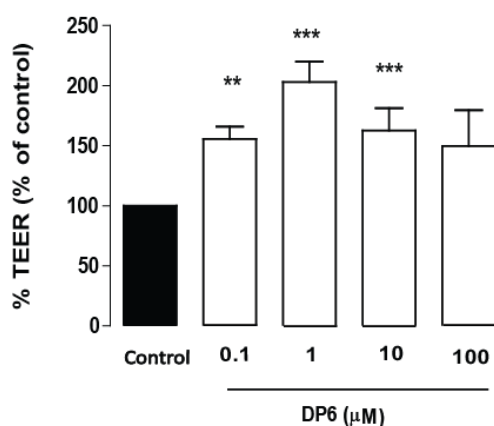
1) ผลของการกระตุ้นตัวรับ CaSR ต่อ tight junction assembly ในเซลล์ T84

เดิมผู้วิจัยวางแผนกระตุ้นโปรตีน CaSR ด้วย chitosan oligosaccharide แต่จากการทดสอบ oligosaccharide ต่างๆหลายชนิด พบว่า fructose oligosaccharide (FOS) ซึ่งเตรียมจากน้ำตาลทรายด้วยปฏิกิริยาทางเอนไซม์สามารถกระตุ้นโปรตีน AMPK ได้ potent กว่า COS จึงเปลี่ยนแผนการศึกษาโดยศึกษาผลของ FOS โดยเริ่มต้นทำการศึกษโดยหาอนุพันธ์ของ FOS ที่สามารถกระตุ้น intestinal barrier ได้สูงสุดในเซลล์ T84 ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$ โดยพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สารอนุพันธ์ที่มี degree of polymerization (DP) เท่ากับ 6 สามารถกระตุ้นการเพิ่มของ TEER ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง) ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาอนุพันธ์ DP6 นี้ต่อไป



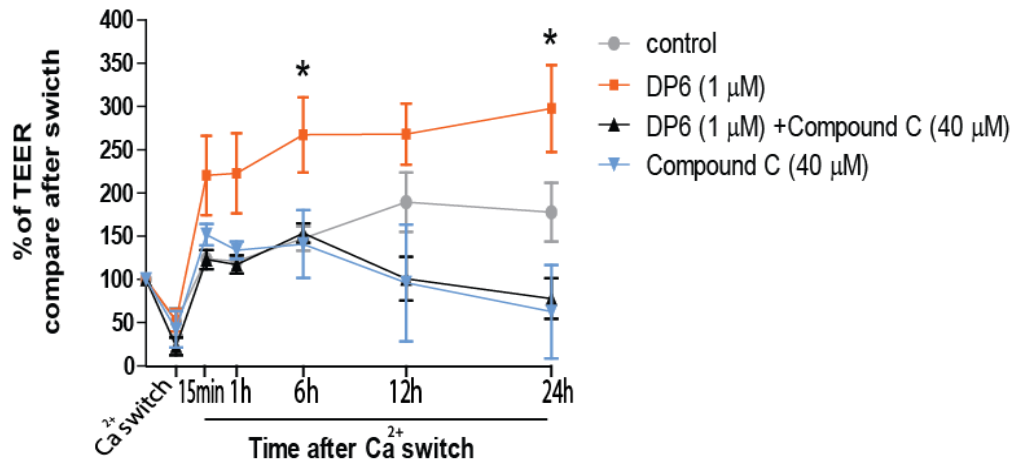
รูปแสดง ผลของ FOS ที่มี degree of polymerization (DP) ต่างๆกันต่อ TEER ในเซลล์ T84

หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดสอบผลของ FOS ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 1 μM สามารถกระตุ้น TEER ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง) อย่างมีนัยสำคัญ



รูปแสดง ผลของ FOS ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ TEER ในเซลล์ T84

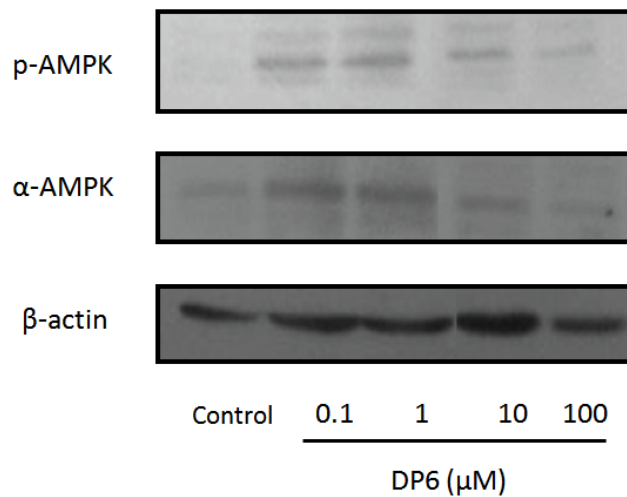
ผู้วิจัยได้ศึกษา Time course ของการเพิ่มขึ้นของ TEER ที่เหนี่ยวนำด้วย FOS ที่ความเข้มข้น 1 μM และพบว่าสามารถเห็นย่นำการเพิ่มของ TEER ได้อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 6 ชั่วโมงหลังทดสอบฤทธิ์ โดยที่สารยับยั้งโปรตีน AMPK (compound C/CC) (รูปด้านล่าง) สามารถยับยั้งฤทธิ์ดังกล่าวของ FOS ได้ บ่งชี้ว่า FOS กระตุ้น intestinal barrier function ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK



รูปแสดง Time course ของการกระตุ้น barrier function ด้วย FOS และกลไกการออกฤทธิ์ผ่านโปรตีน AMPK ในเซลล์ T84

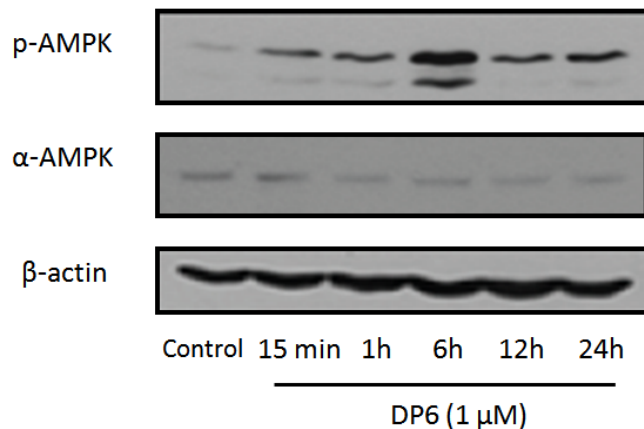
2) ผลของ FOS ต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของ FOS ต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ T84 โดยทดสอบที่หลายความเข้มข้นและวัด AMPK ที่ 6 ชั่วโมงหลังให้สาร โดยพบว่า FOS ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 μM สามารถกระตุ้น AMPK phosphorylation ได้ (รูปด้านล่าง) โดยที่ความเข้มข้น 1 μM เห็นว่า AMPK phosphorylation ได้สูงสุดสอดคล้องกับการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ TEER



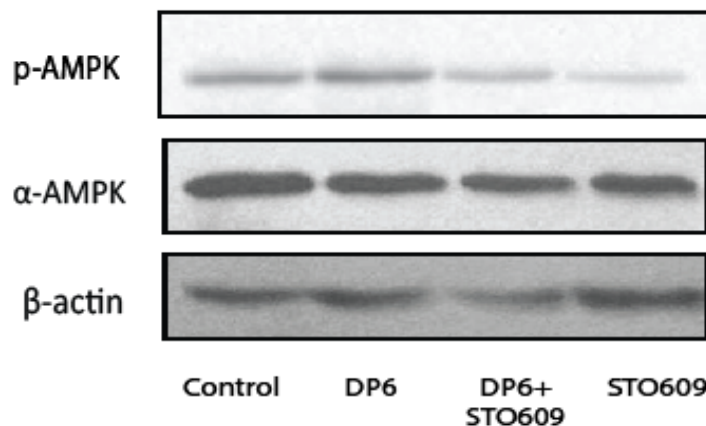
รูปแสดง ผลของ FOS ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยได้ศึกษา Time course ของการกระตุ้นโปรตีน AMPK ด้วย FOS ที่ความเข้มข้น 1 μM พบว่า AMPK phosphorylation เกิดขึ้นตั้งแต่ 15 นาที และสูงสุดที่ 6 ชั่วโมงหลังให้สาร ดังแสดงในรูปด้านล่าง



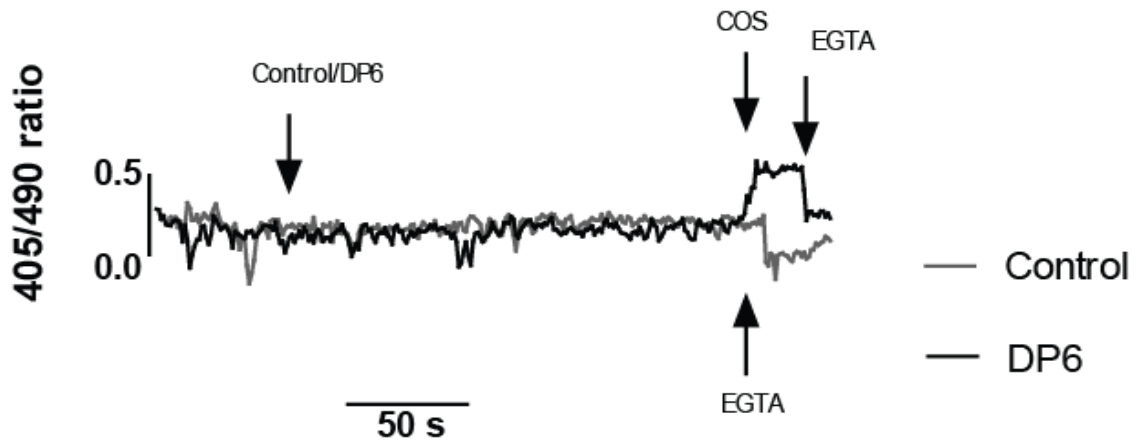
รูปแสดง Time course ของ AMPK phosphorylation ที่เหนี่ยวนำด้วย FOS ที่ความเข้มข้น 1 μM ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ FOS โดยเซลล์ T84 ถูกป้อนก่อนด้วยสาร STO609 ซึ่งเป็น CaMKK β inhibitor (5 μM) 30 นาที ก่อนใส่สาร FOS ที่มี degree of polymerization (DP) เท่ากับ 6 (DP-6) (1 μM) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดลอง western blot เพื่อวัดการกระตุ้นของโปรตีน AMPK จาก AMPK phosphorylation ได้ผลดังรูปด้านล่าง



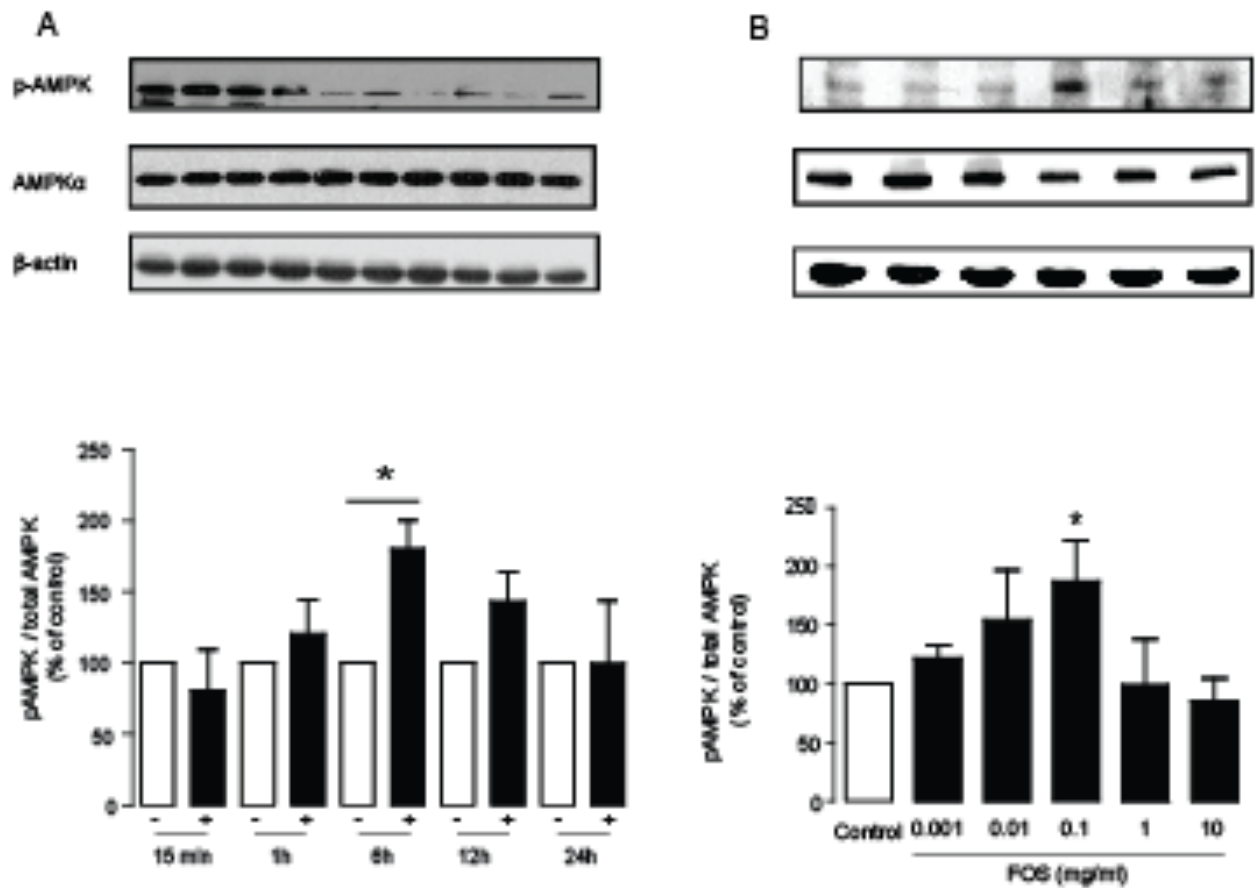
รูปแสดง ผลของการศึกษาบทบาทของโปรตีน CaMKK β ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK ด้วย FOS (DP6) ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยศึกษาว่า FOS กระตุ้นโปรตีน AMPK ด้วยการเพิ่มระดับของแคลเซียมหรือไม่โดยทำการวัดปริมาณของแคลเซียมภายในเซลล์ด้วย indo-1 ซึ่งเป็น calcium indicator พบว่า FOS ที่ความเข้มข้นที่กระตุ้นโปรตีน AMPK คือ 1 μM ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง fluorescence ratio ของ indo-1 ในขณะที่ chitosan oligosaccharide (COS, positive control) มีผลดังกล่าวดังแสดงในรูปด้านล่าง ผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถสรุปได้ว่า FOS กระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้ผ่านโปรตีน CaMKK β และไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับของแคลเซียมภายในเซลล์



รูปแสดง ผลของการศึกษาผลของ FOS (DP6) ต่อระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ T84

เนื่องจากก่อนหน้านี้เราใช้ DP6 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ FOS และทราบถึงผลต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK และ tight junction reassembly เราจึงต้องการทราบศักยภาพของ FOS ต่อผลดังกล่าว โดยผู้วิจัยได้ทดสอบผลของ FOS ต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ T84 ผู้วิจัยได้ศึกษา Time course ของการกระตุ้นโปรตีน AMPK ด้วย FOS ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml พบว่า AMPK phosphorylation เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 6 ชั่วโมงหลังให้สาร ดังแสดงในรูปด้านล่าง (รูป A) ต่อมาจึงทดสอบ FOS ที่หลายความเข้มข้น (0.001-10 mg/ml) และวัด AMPK phosphorylation ที่ 6 ชั่วโมงหลังให้สาร โดยพบว่า FOS ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml สามารถเหนี่ยวนำ AMPK phosphorylation ได้สูงสุด (รูป B) (รูปด้านล่าง)

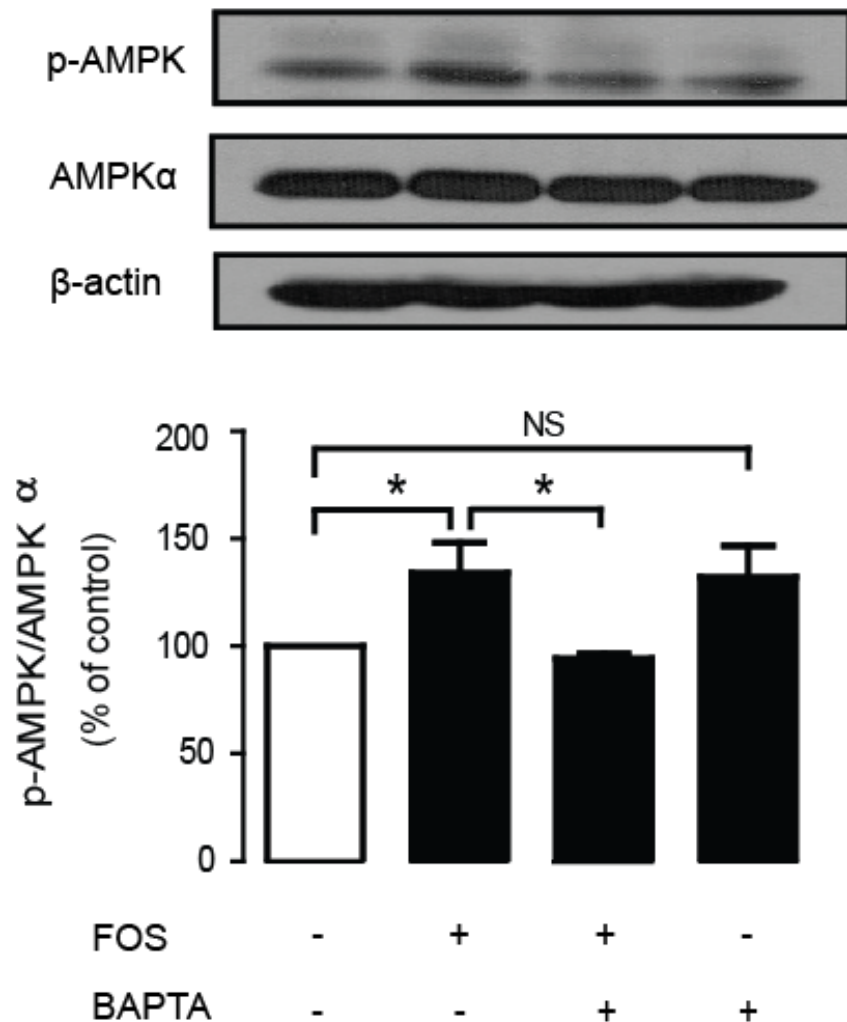


รูปแสดง (A) Time course ของ AMPK phosphorylation ที่เหนี่ยวนำด้วย FOS ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในเซลล์ T84 (B) ผลของ FOS ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ T84

3) การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ FOS ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK

เนื่องจาก CAMKK β ถูกกระตุ้นได้โดยการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมในเซลล์ เพื่อพิสูจน์ว่าการกระตุ้นโปรตีน AMPK อาศัยการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมในเซลล์ ผู้วิจัยจึงใช้ Calcium chelator (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 10 μ M, BAPTA) ป้อนร่วมกับ FOS หลังจากนั้นทำการทดลอง western blot เพื่อวัดการกระตุ้นของโปรตีน AMPK จาก AMPK phosphorylation ได้ผลดังรูปด้านล่าง

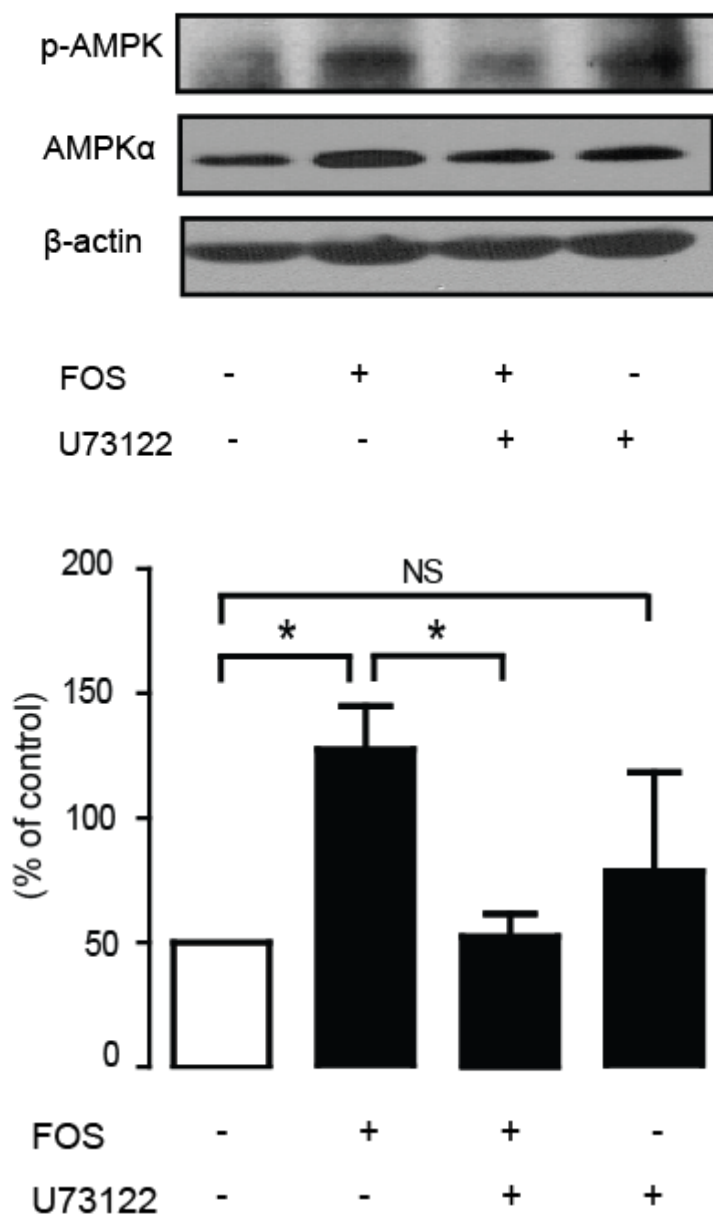
ผลการทดลอง พบว่าผลของ FOS ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK ลดลงเมื่อป้อน FOS ร่วมกับ BAPTA จึงสรุปได้ว่า FOS กระตุ้นโปรตีน AMPK โดยการเพิ่มแคลเซียมในเซลล์



รูปแสดง ผลของ FOS ต่อโปรตีน AMPK ในภาวะที่ไม่มีแคลเซียมในเซลล์

เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแคลเซียม อาจเพิ่มขึ้นได้ด้วยการกระตุ้น CaSR ซึ่งจะทำการกระตุ้นโปรตีน Phospholipase C (PLC) ได้โดยตรง เพื่อพิสูจน์ว่า FOS กระตุ้นโปรตีน AMPK ผ่านการกระตุ้นโปรตีน PLC ผู้วิจัยจึงใช้ PLC inhibitor, U73122 10 μ M บ่มร่วมกับ FOS หลังจากนั้นทำการทดลอง western blot เพื่อวัดการกระตุ้นของโปรตีน AMPK จาก AMPK phosphorylation ได้ผลดังรูปด้านล่าง

ผลการทดลอง พบว่าผลของ FOS ต่อการกระตุ้นโปรตีน AMPK ลดลงเมื่อบ่ม FOS ร่วมกับ U73122 จึงสรุปได้ว่า FOS กระตุ้นโปรตีน AMPK โดยการกระตุ้นโปรตีน PLC

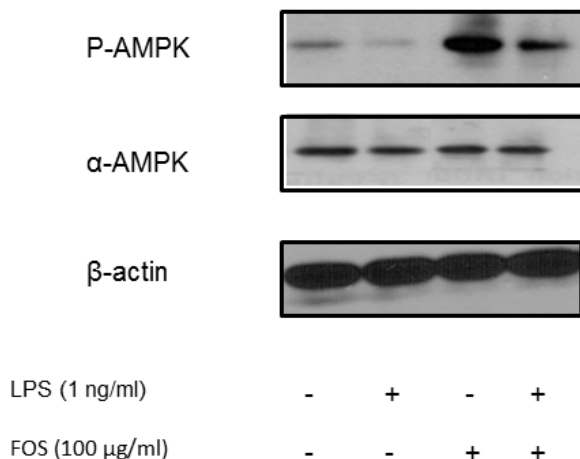


รูปแสดง ผลของ FOS ต่อโปรตีน AMPK ในภาวะที่ยับยั้งการกระตุ้นโปรตีน PLC

4) การศึกษาบทบาทของ FOS ต่อของ LPS ในการยับยั้งโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้

เพื่อเป็นการทดสอบว่า FOS (100 µg/ml) ยับยั้งผลของ LPS ที่ลดการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK จึงนำเซลล์ลำไส้ T84 บ่มด้วย LPS (1 ng/ml) ร่วมกับ FOS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดลอง western blot เพื่อสังเกตการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK ซึ่งเป็น Active form ของโปรตีน AMPK จากการทดลองพบว่า FOS สามารถกระตุ้นโปรตีน p-AMPK ได้ในภาวะที่ไม่มี LPS และผลของ LPS ที่ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน p-AMPK ลดลงในกลุ่มที่บ่ม FOS

สรุปได้ว่า FOS กระตุ้นโปรตีน p-AMPK และยับยั้งผลของ LPS ที่จะทำให้เกิดการอักเสบในเซลล์ลำไส้ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปแสดง ผลของ FOS ในการยับยั้งผลของ LPS ต่อโปรตีน AMPK

5) การศึกษาบทบาทของ FOS ต่อ LPS ที่มีผลยับยั้ง barrier function ในเซลล์ลำไส้

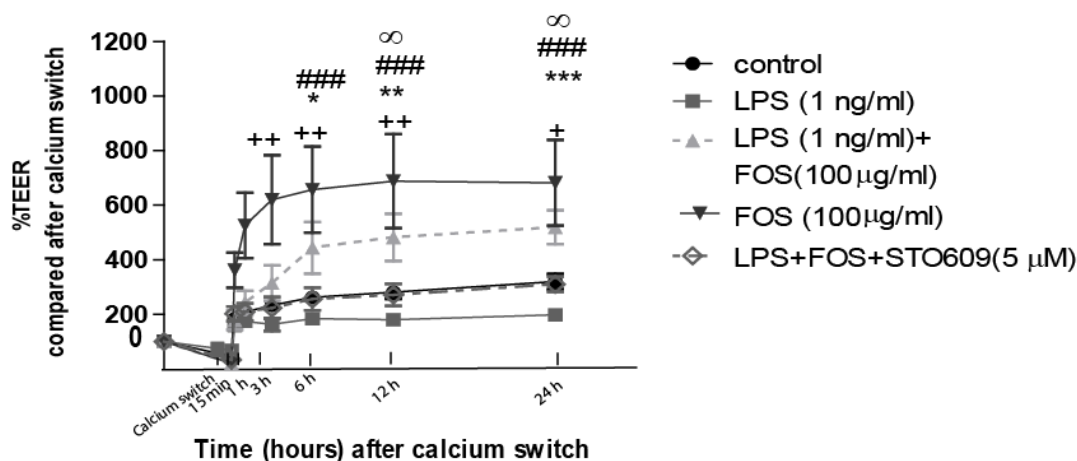
เพื่อเป็นการทดสอบว่า FOS ที่กระตุ้นโปรตีน p-AMPK มีฤทธิ์ยับยั้งผลของ LPS ต่อการลด tight junction reassembly จึงนำเซลล์ลำไส้ T84 ซึ่งเลี้ยงใน transwell plate ขณะที่ Transelectrical epithelial resistance (TEER) ประมาณ 3,000-4,000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ถูกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีส่วนประกอบของแคลเซียม (Calcium switch assay) เพื่อทำลาย barrier function หลังจากนั้น 16 ชั่วโมง จึงทำการวัด TEER จะพบว่า TEER จะลดลงจาก TEER เริ่มต้นประมาณ 50% หลังจากนั้นทำการบ่มเซลล์ก่อนด้วย FOS 30 นาที แล้วบ่มร่วมกับ LPS ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีส่วนประกอบของแคลเซียม เนื่องจากกลไกการกระตุ้น p-AMPK ทำได้โดยผ่านทาง calcium calmodulin kinase kinase β (CaMKK β) จึงพิสูจน์ว่า ผลของ FOS ที่ยับยั้งผลของ LPS ผ่านการทำงานของ CaMKK β เราจึงใช้ STO609 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ CaMKK β ในการทดลองด้วย แล้วเปรียบเทียบร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ TEER เทียบกับเวลาตั้งต้น (0 ชั่วโมง) หลัง Calcium switch ที่เวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 15 นาที, 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปด้านล่าง คือ

1. LPS ยับยั้งการเกิด tight junction reassembly ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่เวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง (*, p-value < 0.05, **, p-value < 0.01)
2. FOS ลดผลของ LPS ที่มีต่อการยับยั้ง tight junction reassembly อย่างมีนัยสำคัญ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง (###, p-value < 0.001, FOS vs FOS+LPS)

3. FOS สามารถกระตุ้น tight junction reassembly ได้อย่างมีนัยสำคัญ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง (+, p-value < 0.05, ++, p-value < 0.01, FOS vs control)

4. ผลของ FOS ที่ลดผลของ LPS ที่มีต่อการยับยั้ง tight junction reassembly หายไปเมื่อบ่มร่วมกับ CaMKK β inhibitor และมีนัยสำคัญ 12, และ 24 ชั่วโมง (δ , p-value < 0.05, LPS+FOS vs LPS+FOS+STO609)

จึงสรุปได้ว่า FOS ยับยั้งผลของ LPS ที่ทำลาย barrier function ผ่าน CaMKK β ซึ่งเป็นกลไกหลักของการกระตุ้นโปรตีน AMPK

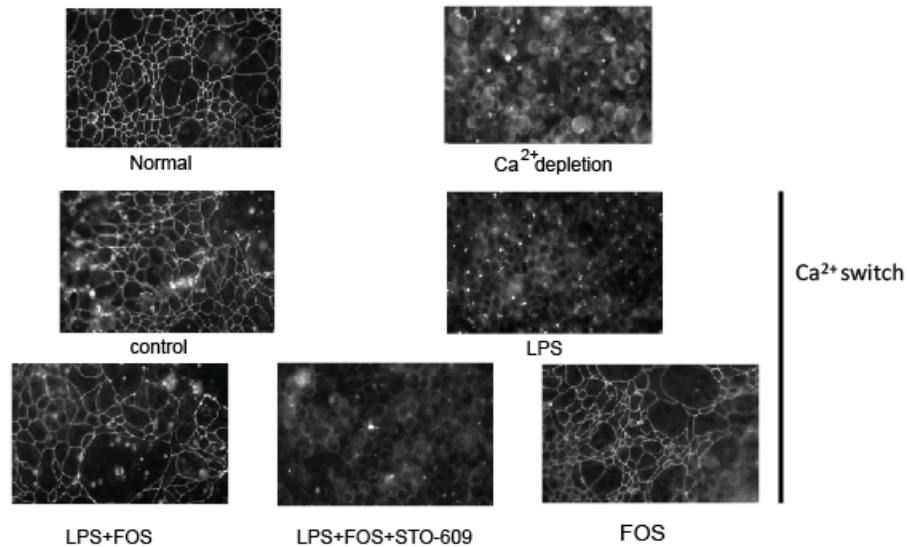


รูปแสดง การศึกษาบทบาทของ FOS ต่อ LPS ที่มีผลยับยั้ง barrier function ในเซลล์ลำไส้

6) การศึกษาบทบาทของ FOS ต่อ LPS ที่มีผลยับยั้ง โปรตีน ZO-1

เพื่อเป็นการทดสอบว่า FOS ที่เพิ่ม tight junction reassembly อาจมาจากผลของการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนของ tight junction คือ Zonula occludens-1 (ZO-1) ที่ตั้งอยู่บริเวณ cell membrane เซลล์ลำไส้ T84 ซึ่งเลี้ยงใน 96-black well plate เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของ tight junction หลังจากนั้น จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีส่วนประกอบของแคลเซียม (Calcium switch assay) เพื่อลดการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 หลังจากนั้น 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการบ่มเซลล์ก่อนด้วย FOS 30 นาที แล้วบ่มร่วมกับ LPS ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบมีส่วนประกอบของแคลเซียม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากกลไกการกระตุ้น p-AMPK ทำได้โดยผ่านทาง calcium calmodulin kinase kinase β (CaMKK β) จึงพิสูจน์ว่า ผลของ FOS ที่ยับยั้งผลของ LPS ผ่านการทำงานของ CaMKK β เราจึงใช้ STO609 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ CaMKK β ในการทดลองด้วย หลังจากนั้นจึงใช้การทดลอง Immunofluorescence ของ ZO-1 โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ของ ZO-1 ที่มีสีเขียวบริเวณ Cell membrane

ผลการทดลอง พบว่า FOS สามารถยับยั้งผลของ LPS ที่มีผลต่อการลดการแสดงออก ZO-1 ซึ่งเกาะบริเวณ cell membrane และเมื่อบ่ม FOS ร่วมกับ STO609 ผลดังกล่าวได้หายไป จึงสรุปได้ว่า FOS ยับยั้งผลของ LPS ที่ลดการแสดงออกของโปรตีน ZO-1

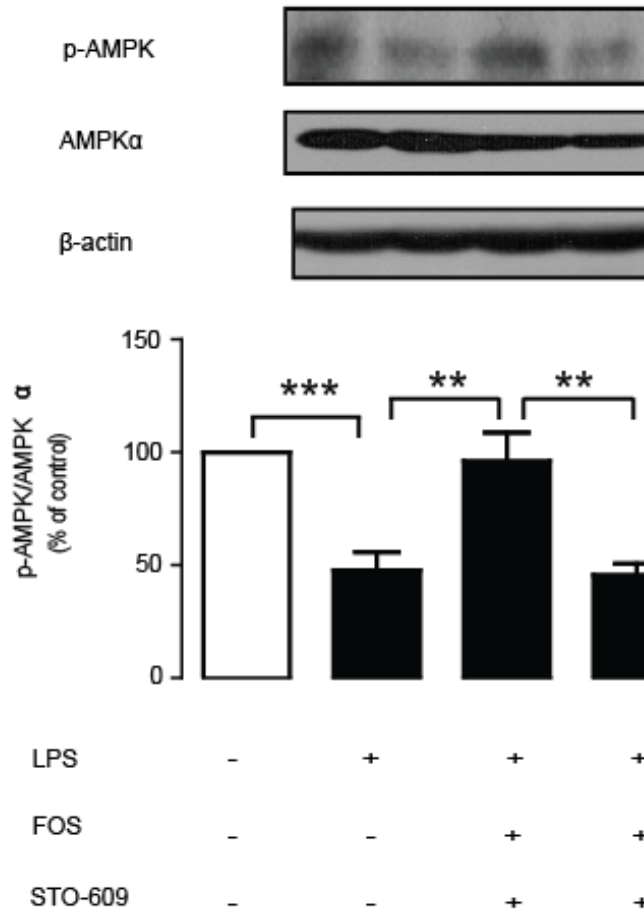


รูปแสดง การศึกษาบทบาทของ FOS ต่อ LPS ที่มีผลยับยั้ง โปรตีน ZO-1 ในเซลล์ลำไส้

7) กลไกการออกฤทธิ์ของ FOS ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน AMPK ในภาวะที่มี LPS

เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้เราพบว่า LPS ลดการแสดงออกโปรตีน AMPK โดย FOS สามารถยับยั้งผลดังกล่าวได้ แต่ยังทราบกลไกการออกฤทธิ์ของ FOS ต่อ AMPK ผู้วิจัยศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ FOS โดยเซลล์ T84 FOS ถูกบ่มร่วมด้วยสาร STO609 ซึ่งเป็น CaMKK β inhibitor (5 μ M) FOS เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดลอง western blot เพื่อวัดการกระตุ้นของโปรตีน AMPK จาก AMPK phosphorylation ได้ผลดังรูปด้านล่าง

ผลการทดลอง พบว่า FOS สามารถยับยั้งผลของ LPS ที่มีผลต่อการลดการโปรตีน AMPK และเมื่อบ่ม FOS ร่วมกับ STO609 ผลดังกล่าวได้หายไป จึงสรุปได้ว่า FOS ยับยั้งผลของ LPS ที่ลดการแสดงออกของโปรตีน AMPK

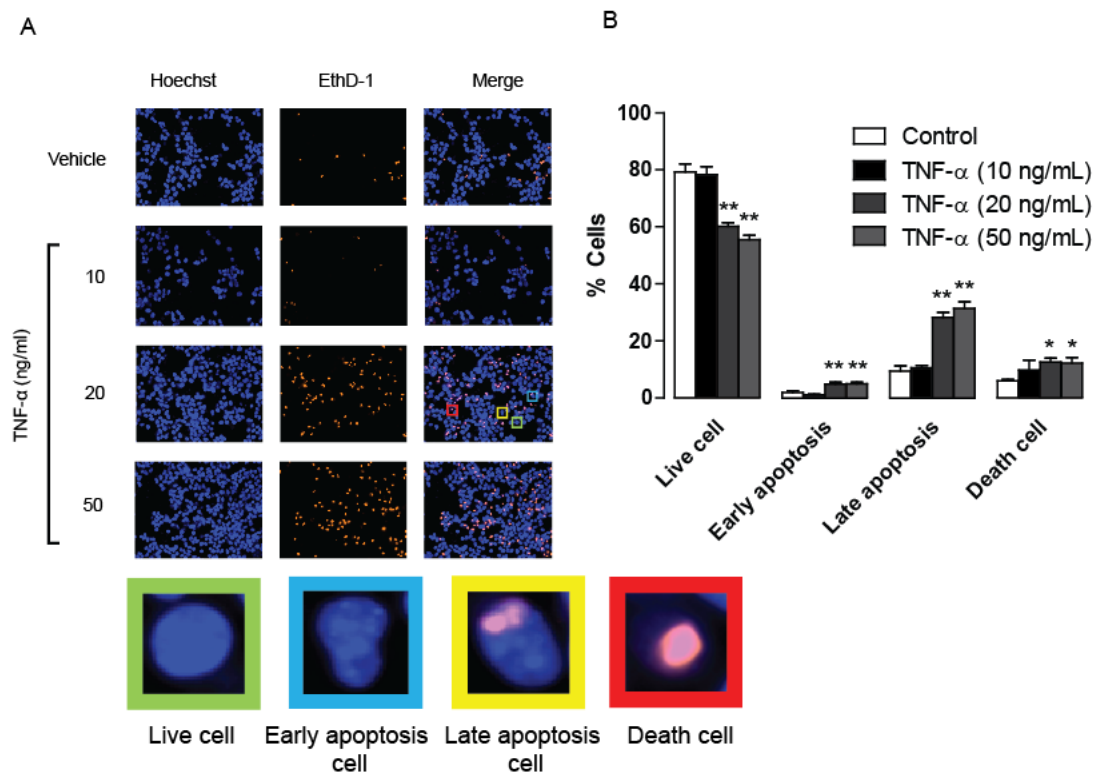


รูปแสดง ผลของ FOS ในการยับยั้งผลของ LPS ต่อโปรตีน AMPK ผ่าน CaMKKβ

8) การศึกษาบทบาทของ FOS ต่อการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 และการตายของ L-cells ในภาวะที่มีการอักเสบโดยการกระตุ้นด้วย TNF-α

เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า TNF-α เป็น cytokine ที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดลำไส้อักเสบในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า TNF-α ลดการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 ที่หลั่งมาจาก L-cell ผ่านทางการกระตุ้น NF-κB และ ส่งผลต่อการตายของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ตับ โดยการกระตุ้นโปรตีน iNOS และ Cleaved Caspase-3 และ FOS มีผลลดความรุนแรงของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในหนูทดลอง ทั้งนี้ ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า FOS อาจจะสามารถลดความรุนแรงของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ โดยเพิ่มการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 และ ลดการตายของ L-cell

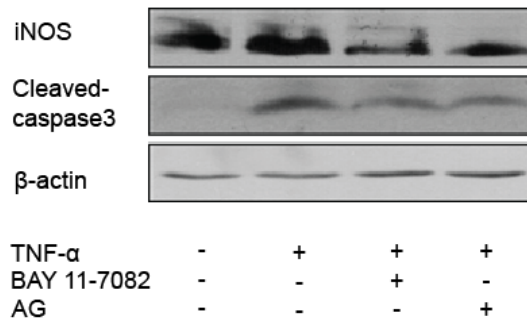
เพื่อยืนยันว่า TNF-α กระตุ้นการเกิดการตายของ L-cell ผู้วิจัยได้ใช้ STC-1 cell ซึ่งเป็น L-cell ที่ได้จากหนูทดลอง บ่มกับ TNF-α ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 10, 20 และ 50 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองโดยใช้ Cell death assay พบว่า TNF-α ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 ng/ml มีผลต่อการตายของ L-cell อย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปด้านล่าง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ TNF-α 20 ng/ml ในการทดลองต่อไป



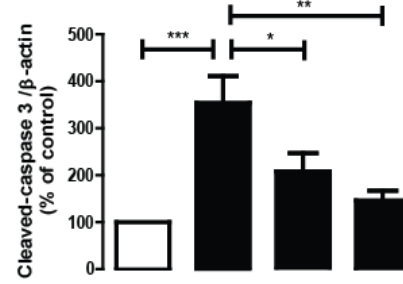
รูปแสดง ผลของ TNF- α ต่อการตายของ L-cell แต่ละระยะ ได้แก่ early apoptosis, Late apoptosis และ Death cell

เพื่อศึกษากลไกของ TNF- α ต่อการตายของ L-cell ผู้วิจัยได้ TNF- α บ่มร่วมกับ BAY 11-7082 (NF-KB inhibitor) 10 μ M หรือ aminoguanidine (AG)(iNOS inhibitor) 1 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ Cleaved-Caspase-3 โดยใช้ Western blot จากการทดลองพบว่า TNF- α เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ Cleaved-Caspase-3 และ เมื่อบ่ม TNF- α ร่วมกับ BAY 11-7082 หรือ aminoguanidine ผลของ TNF- α ต่อการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปด้านล่าง จึงสรุปได้ว่า TNF- α อาจกระตุ้นการตายของ L-cell ผ่านการกระตุ้น NF-KB-iNOS-Cleaved-Caspase-3

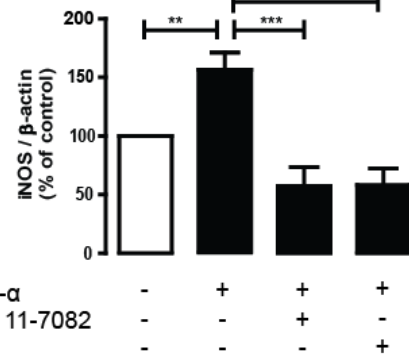
C



D

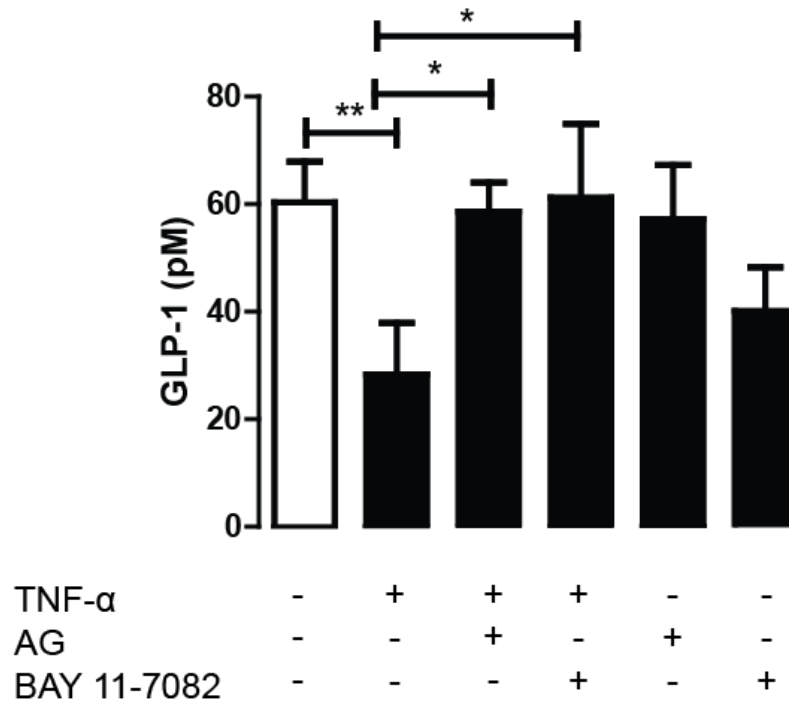


E



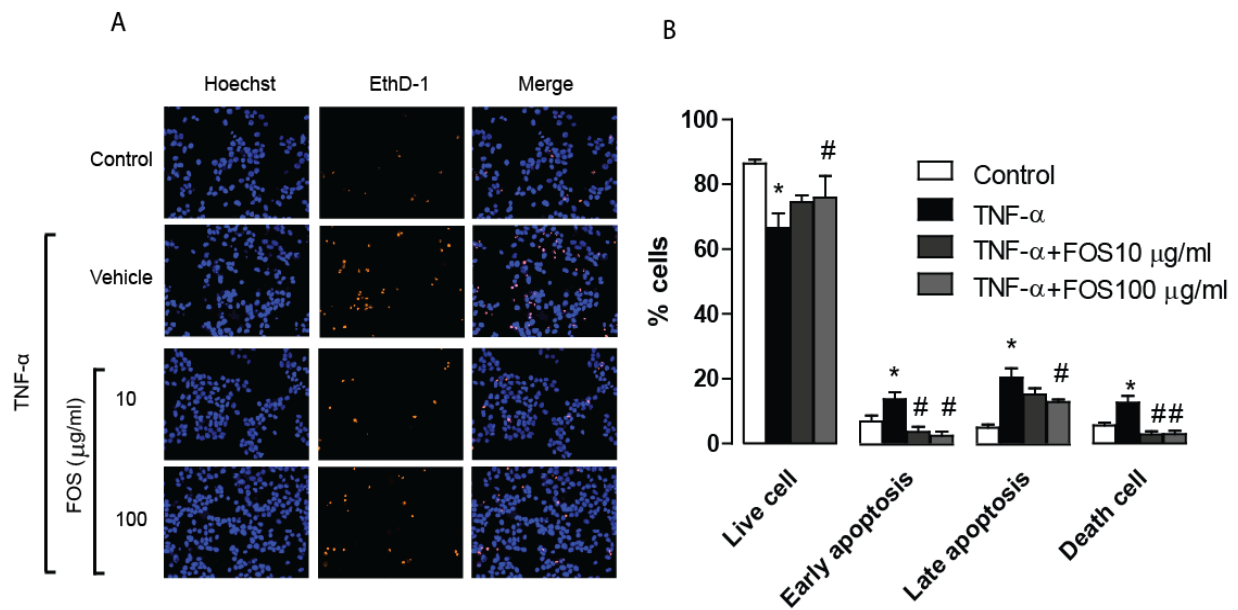
รูปแสดง ผลและกลไกของ TNF- α ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ Cleaved-Caspase-3

เพื่อศึกษาผลและกลไกของ TNF- α ต่อการลดการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 ผู้วิจัยได้ใช้ TNF- α บ่มร่วมกับ BAY 11-7082 (NF-KB inhibitor) 10 μ M หรือ aminoguanidine (iNOS inhibitor) 1 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บ medium มาวัดการปริมาณ GLP-1 โดยใช้ GLP-1 secretion assay จากผลการทดลองพบว่า TNF- α ลดการหลั่ง GLP-1 อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อบ่ม TNF- α ร่วมกับ BAY 11-7082 หรือ aminoguanidine ผลของ TNF- α ต่อการหลั่งยับยั้ง GLP-1 ได้ลดลง ดังรูปด้านล่าง จึงสรุปได้ว่า TNF- α ยับยั้งการหลั่ง GLP-1 ผ่านทางการกระตุ้นการทำงานของ NF-KB-iNOS



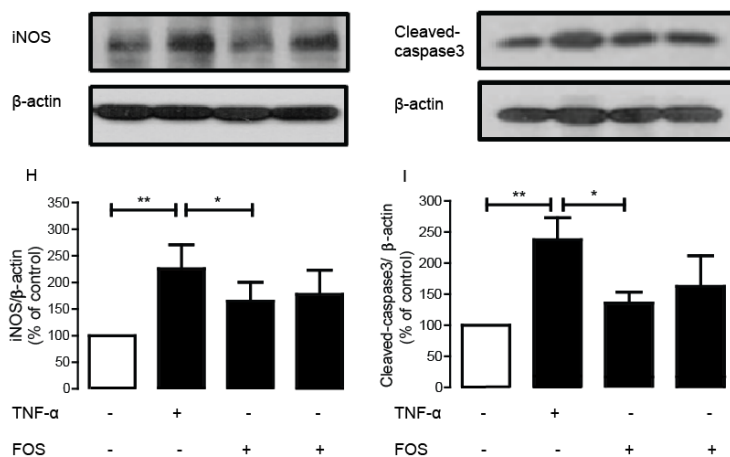
รูปแสดง ผลและกลไกของ TNF- α ต่อการลดการหลั่งฮอร์โมน GLP-1

ต่อมาผู้วิจัยได้ศึกษาผลของ FOS ต่อการตายของ L-cell โดยการกระตุ้นด้วย TNF- α โดยใช้ Cell death assay จากการทดลองพบว่า TNF- α มีผลกระตุ้นการตายของ L-cell อย่างมีนัยสำคัญ และ FOS 100 μ g/ml สามารถลดผลของ TNF- α ต่อการตายของ L-cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ



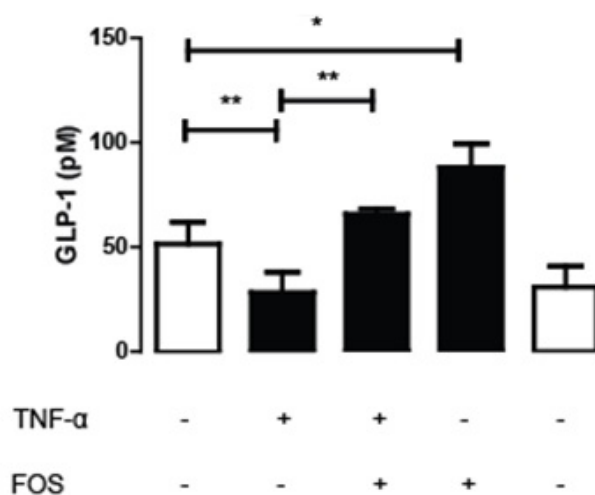
รูปแสดง ผลของ FOS ต่อการลดผลของ TNF- α ต่อการตายของ L-cell

ต่อมาเราศึกษากลไกของ FOS ต่อการลดผลของการตายของ L-cell โดยใช้ Western blot ผลการทดลองพบว่า TNF- α กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ Cleaved Caspase-3 และ FOS สามารถลดผลดังกล่าว จึงสรุปได้ว่า FOS อาจยับยั้งการตายของ L-cells โดยการกระตุ้นด้วย TNF- α ผ่านทางการลดโปรตีน iNOS และ Cleaved Caspase-3



รูปแสดง ผลของ FOS ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ Cleaved-caspase-3 ในภาวะที่กระตุ้นด้วย TNF- α

นอกจากนี้เรายังการทดสอบผลของ FOS ต่อการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 โดยใช้ GLP-1 secretion assay ผลการทดลองพบว่า TNF- α ลด GLP-1 secretion อย่างมีนัยสำคัญ และ FOS สามารถลดผลดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน จึงสรุปได้ว่า FOS ยับยั้งผลของ TNF- α ต่อการลดการหลั่ง GLP-1 ใน L-cell

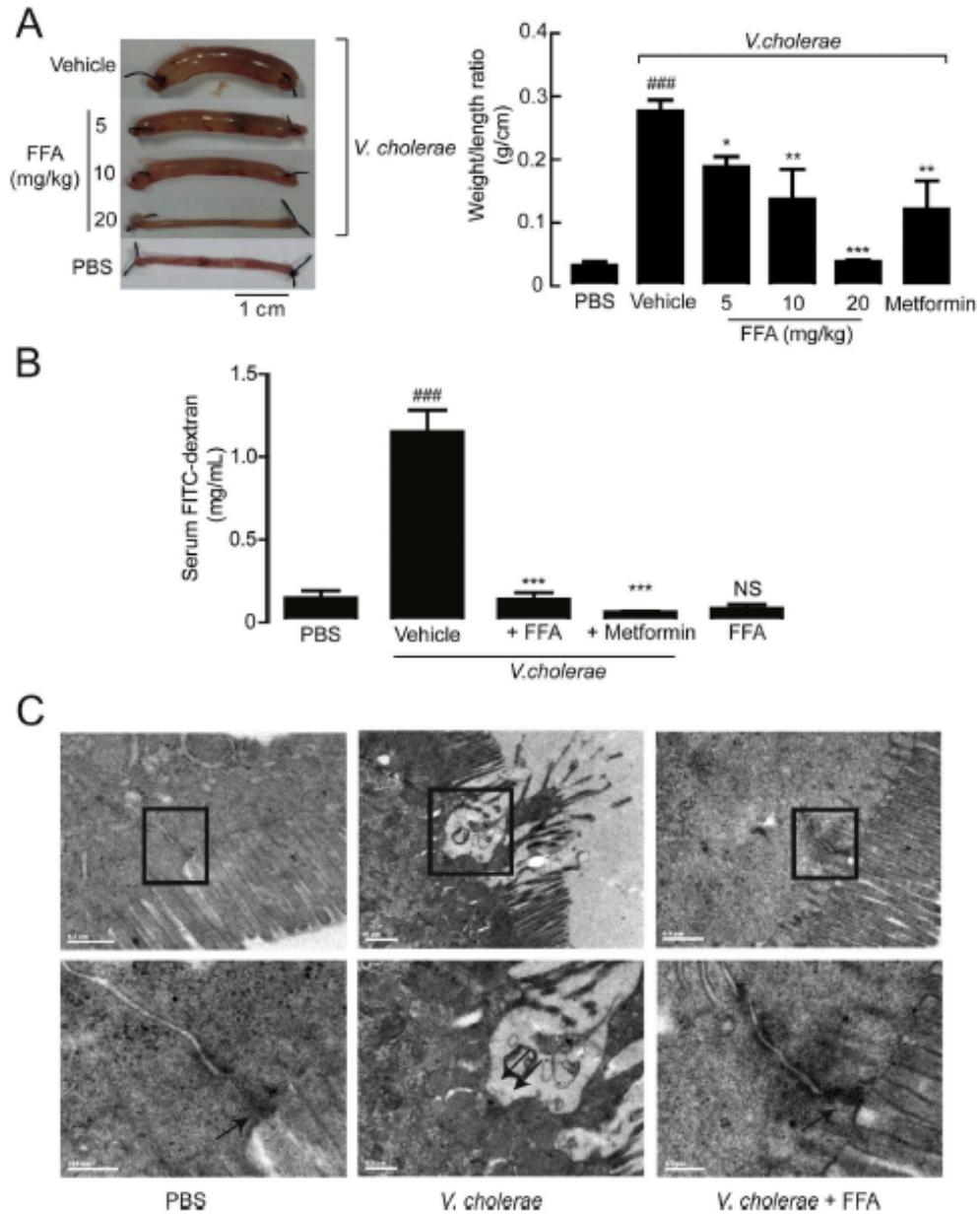


รูปแสดง ผลของ FOS ต่อการลดการหลั่งฮอร์โมน GLP-1 โดย TNF- α

5) บทบาทของโปรตีน AMPK ในการลดการอักเสบของลำไส้ในโรคอหิวาตกโรค

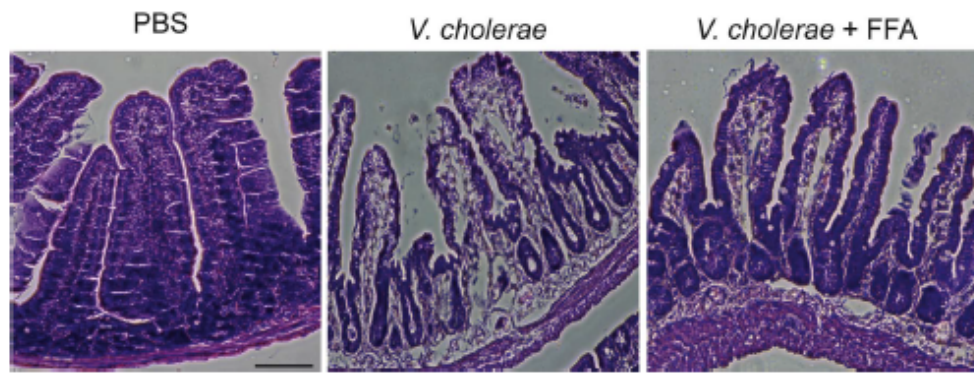
เนื่องจากกลุ่มวิจัยของเราค้นพบว่า กระบวนการอักเสบในลำไส้ผ่าน NF-KB มีบทบาทสำคัญในการตัดหลังสารน้ำและทำลาย barrier function ในหนูที่เหนียวน่าให้เป็นโรคท้องร่วงอหิวาตกโรคด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่กำลังระบาดอยู่หรือสายพันธุ์ El Tor variant ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน AMPK ในการลดการอักเสบและลดความรุนแรงของโรคอหิวาตกโรคโดยใช้ยาที่ออกฤทธิ์กระตุ้น AMPK คือ flufenamic acid (FFA)

ผู้วิจัยพบว่าสาร FFA สามารถลดการตัดหลังสารน้ำได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสาร FFA ที่ปริมาณ 20 มก/กก สามารถลดการตัดหลังสารน้ำได้ประมาณร้อยละ 95 และยา metformin ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน AMPK ก็มีฤทธิ์เช่นเดียวกันดังแสดงในรูปด้านล่าง A และเมื่อวัด barrier leakage ด้วย FITC-dextran flux assay ก็พบว่ายา FFA และ metformin สามารถลด barrier leakage ได้ (รูปด้านล่าง B) ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ ultrastructure ของ tight junction ด้วย transmission electron microscopy ซึ่งพบว่า FFA ช่วยลดการทำลายของ tight junction ในภาวะที่เกิดอหิวาตกโรคได้ (รูปที่ 27C)



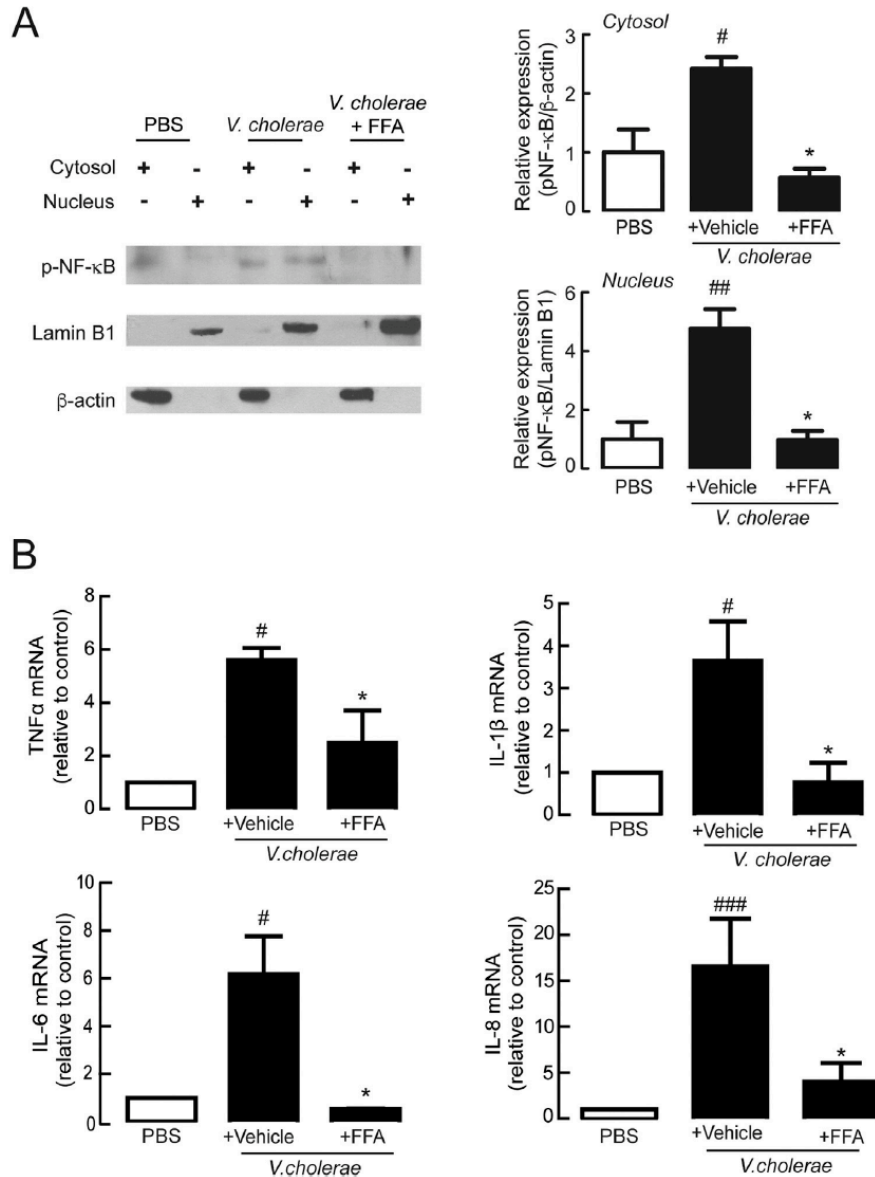
รูปแสดง ผลของ FFA ต่อการคั่งหลังสารน้ำ (A) barrier leakage (B) และโครงสร้างของ tight junction (C) ในภาวะที่ติดเชื้อ *V. Cholerae* El Tor variant

เมื่อวิเคราะห์ histology ด้วย H&E staining พบว่า FFA สามารถลดอาการอักเสบในเนื้อเยื่อลำไส้ของหนูที่ติดเชื้ออหิวาห์ได้ โดยจะเห็นได้จากการลดลงของอาการบวมและปริมาณเม็ดเลือดขาวในเนื้อเยื่อลำไส้ (รูปด้านล่าง)



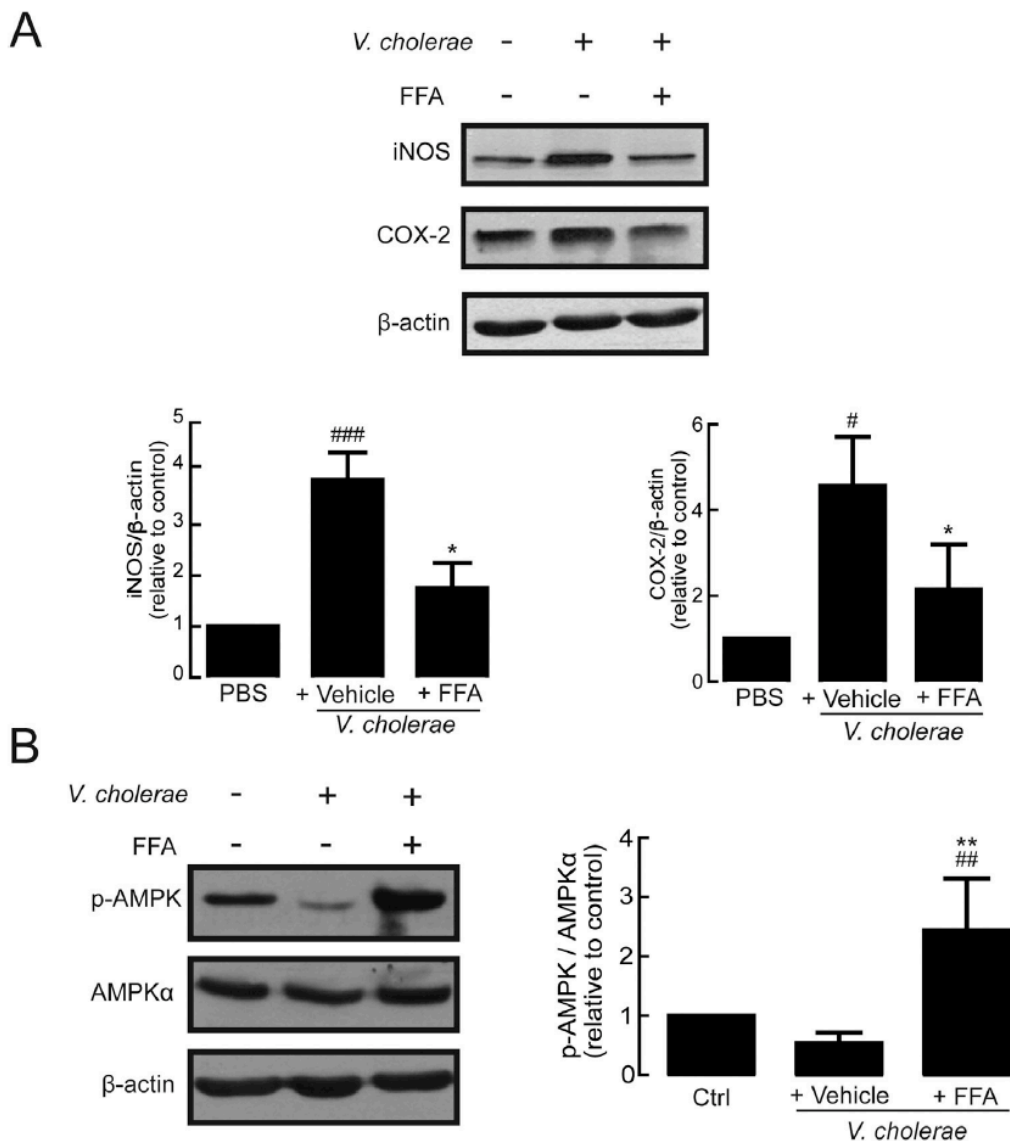
รูปแสดง การวิเคราะห์ผลด้านการอักเสบของ FFA ในเนื้อเยื่อลำไส้หนูที่ติดเชื้อหิวาห์

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของยา FFA ในการยับยั้ง NF- κ B signaling พบว่า FFA ยับยั้ง nuclear translocation ของ phosphorylated NF- κ B ในลำไส้หนูที่ติดเชื้อหิวาห์ได้ (รูปด้านล่าง A) และลดการแสดงออกของยีนของ pro-inflammatory cytokines ในหนูที่ติดเชื้อหิวาห์ อันได้แก่ TNF- α , IL-1 β , IL-6 และ IL-8 ได้ (รูปด้านล่าง B)



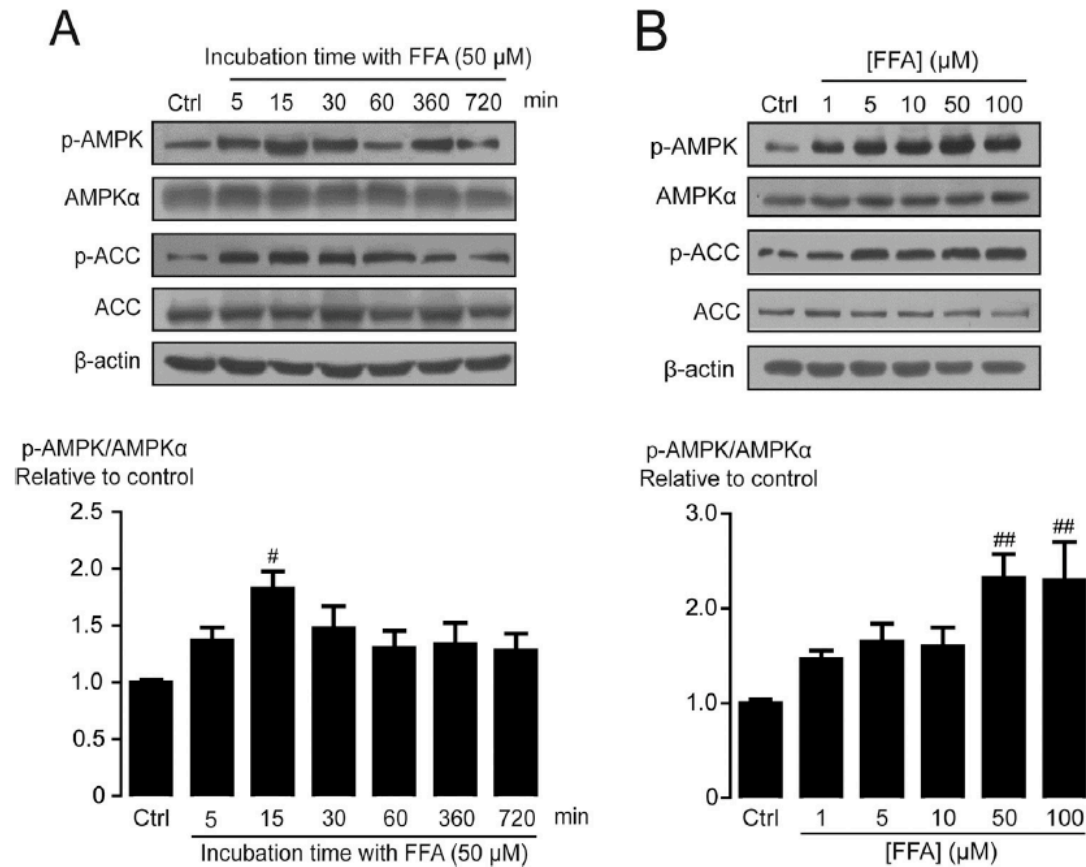
รูปแสดง ผลของ FFA ต่อ NF-KB translocation และการแสดงออกของ proinflammatory cytokines ในลำไส้ของหนูที่ติดเชื้อมีพยาธิ

เนื่องจากผู้วิจัยได้พบว่า pro-inflammatory mediator ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ NF-KB ได้แก่ iNOS และ COX-2 มีบทบาทในการเกิดอาการท้องร่วงในหนูที่ติดเชื้อมีพยาธิ จึงได้ศึกษาผลของ FFA ต่อการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 พบว่า FFA สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ได้ (รูปด้านล่าง A) ผู้วิจัยได้ทำการยืนยันกลไกการออกฤทธิ์ของยา FFA ด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกของ phosphorylated AMPK ซึ่งบ่งชี้ถึงการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนตัวนี้ พบว่า FFA สามารถออกฤทธิ์กระตุ้น AMPK phosphorylation ได้ (รูปด้านล่าง B)



รูปแสดง ผลของยา FFA ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 (A) และการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK (B)

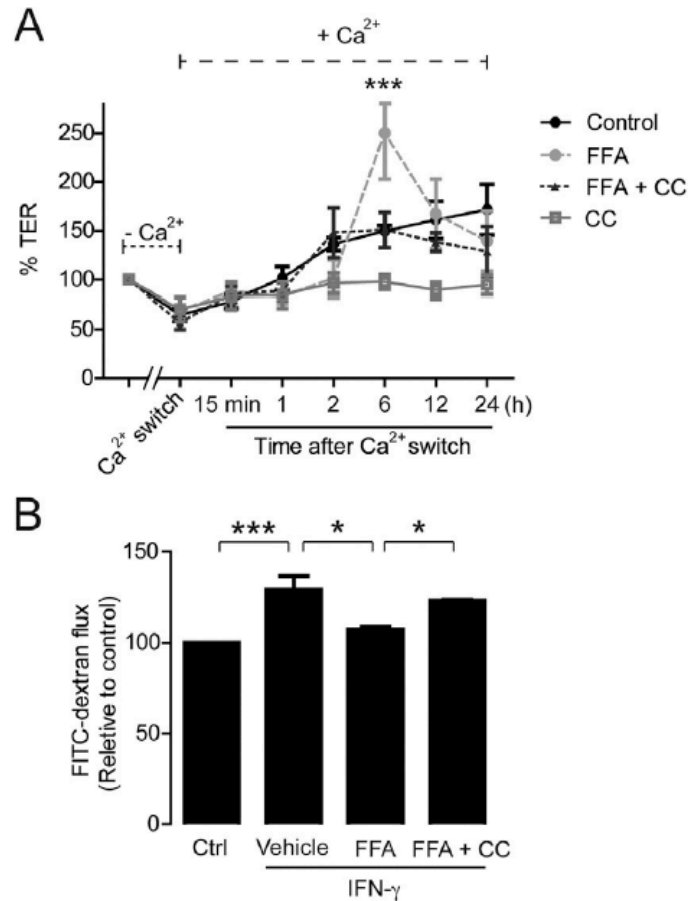
ผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ในเซลล์ลำไส้ ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์คือ เซลล์ T84 โดยเริ่มต้นด้วยการศึกษา time course พบว่า FFA (50 μ M) กระตุ้น AMPK phosphorylation ตั้งแต่ 5 นาที และฤทธิ์คงอยู่ถึง 6 ชั่วโมง ฤทธิ์สูงสุดที่ 15 นาที (รูปด้านล่าง A) จึงได้เลือกเวลาที่ 15 นาทีในการศึกษาลำดับต่อไป และได้ศึกษา Dose-response พบว่ายา FFA ที่ความเข้มข้น 50 μ M ออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน AMPK ได้สูงสุด (รูปด้านล่าง B) จึงได้ใช้เวลาและความเข้มข้นนี้ในการศึกษาการออกฤทธิ์ต่อไป



รูปแสดง การศึกษา time course และ dose-response ของการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ด้วย FFA ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของยา FFA ในการกระตุ้น tight junction assembly ด้วยเทคนิค calcium switch assay พบว่า FFA สามารถกระตุ้นให้เพิ่มความต้านทาน (transepithelial electrical resistance or TER) ของเนื้อเยื่อเซลล์ลำไส้ T84 cells ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่สารยับยั้งโปรตีน AMPK คือ compound C (CC) สามารถยับยั้งฤทธิ์ดังกล่าวของยา FFA ซึ่งบ่งบอกว่า FFA กระตุ้น tight junction assembly ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK (รูปด้านล่าง A)

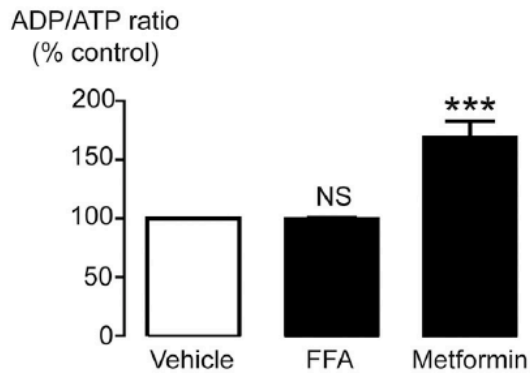
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ของ FFA ในการต้านการทำลาย barrier function ด้วย pro-inflammatory cytokine คือ Interferon-gamma (IFN- γ) โดยใช้เทคนิคการวัด FITX-dextran flux ในเซลล์ T84 และพบว่า FFA ยับยั้งการทำลายของ barrier function ที่เหนี่ยวนำด้วย IFN- γ ได้ ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK (รูปด้านล่าง B)



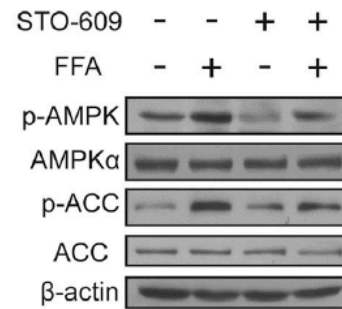
รูปแสดง ผลของ FFA ต่อ barrier function ในภาวะที่ไม่มีการอักเสบ (A) และเมื่อมีการอักเสบ (B) ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน AMPK ของ FFA พบว่า FFA ไม่มีผลต่อระดับของ ADP/ATP ratio ในขณะที่ metformin มีผลเพิ่ม ADP/ATP ratio (positive control) (รูปด้านล่าง A) การกระตุ้น AMPK phosphorylation โดย FFA สามารถยับยั้งได้ด้วย STO-609 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta หรือ CaMKK β) (รูปด้านล่าง B) แต่ BAPTA (calcium chelator) และ cyclosporine (mitochondrial calcium release inhibitor) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ FFA (รูปด้านล่าง C) และ FFA ไม่มีผลต่อการเพิ่มของระดับแคลเซียมในเซลล์ (รูปด้านล่าง D) ข้อมูลทั้งหมดนี้บ่งชี้ว่า FFA กระตุ้นโปรตีน AMPK โดยการกระตุ้นโปรตีน CaMKK β โดยตรงโดยไม่ผ่านการเปลี่ยนแปลงระดับ ADP/ATP และแคลเซียมภายในเซลล์

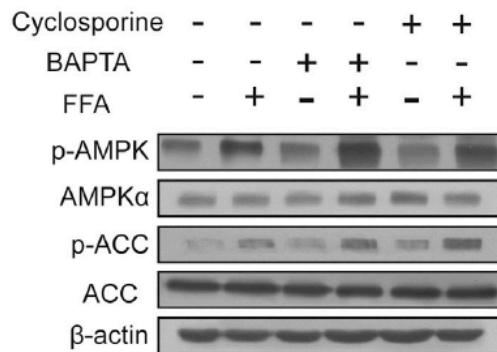
A



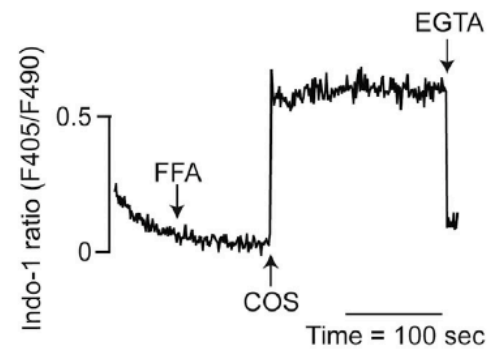
B



C

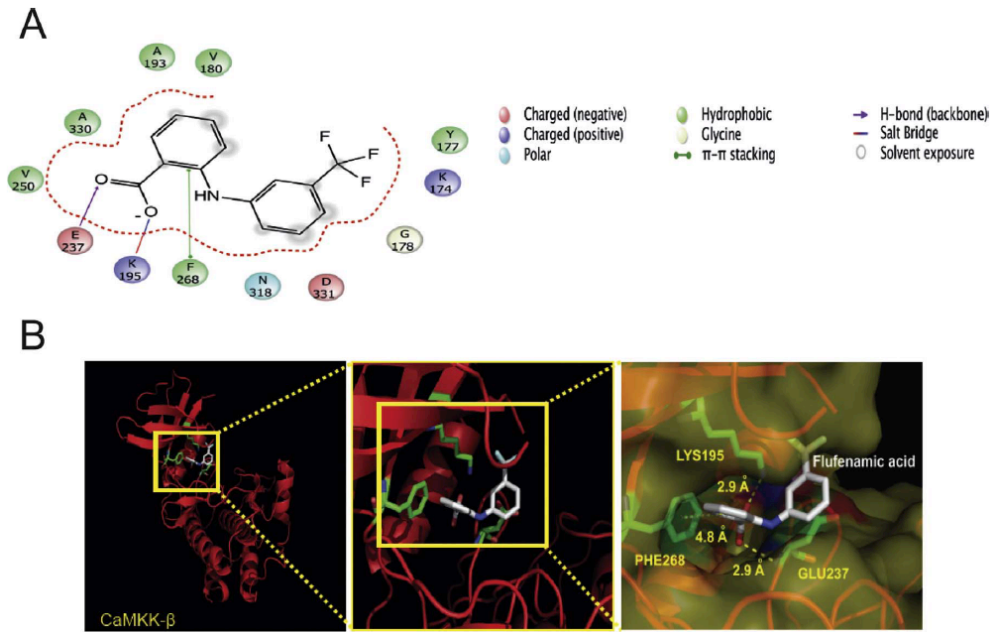


D



รูปแสดง กลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน AMPK ของ FFA ในเซลล์ T84

ผู้วิจัยยืนยันกลไกของ FFA ในการกระตุ้นโปรตีน CaMKK β โดยตรงด้วยเทคนิค molecular docking โดยพบว่า FFA สามารถจับกับโปรตีน CaMKK β ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจนที่ Glu-237 (2.9 Å) ด้วย π - π stacking interaction ที่ Phe-268 (4.8 Å) และด้วย salt-bridge interaction ที่ Lys-195 (2.9 Å) และคำนวณ docking score ได้ -5.9 kcal/mol (รูปด้านล่าง)

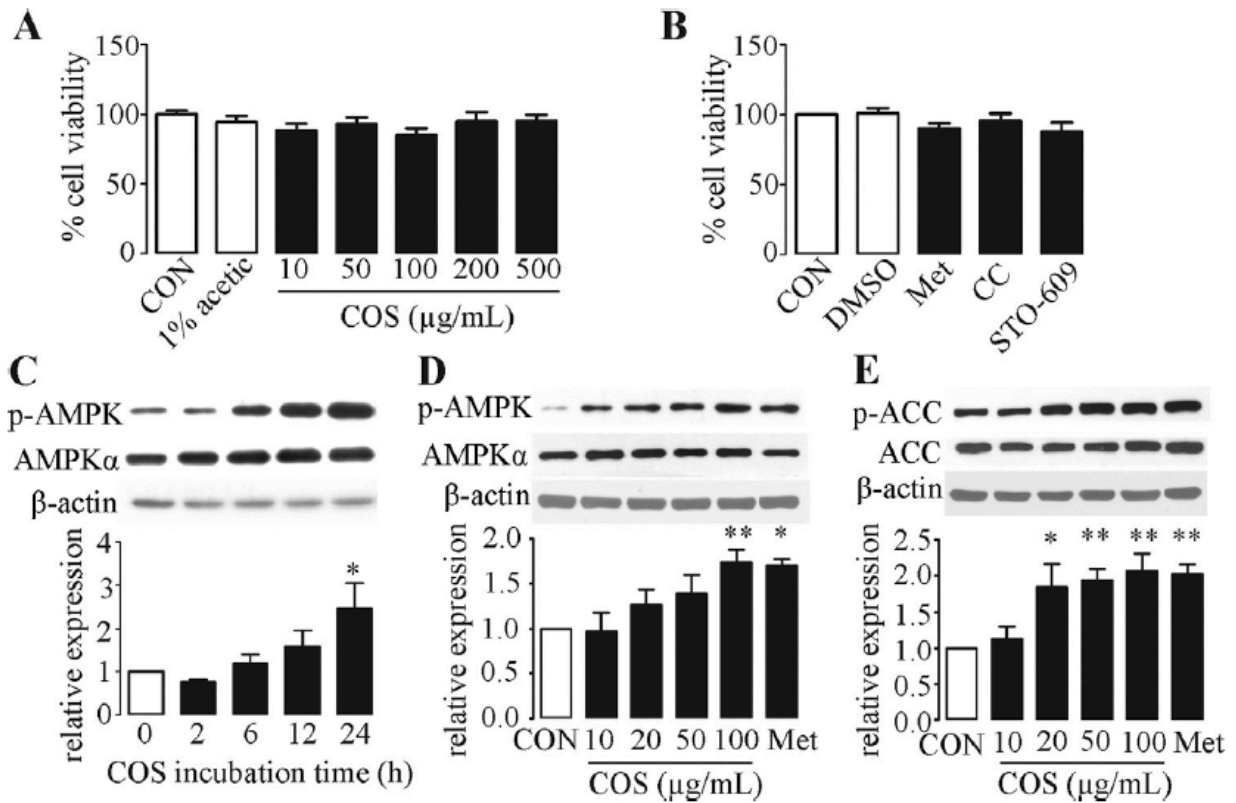


รูปแสดง Molecular docking study แสดงในลักษณะ 2D (A) และ 3D (B)

6) บทบาทของโปรตีน AMPK ในการลดการอักเสบในเซลล์ข้อเข่าและโรคข้อเข่าเสื่อม

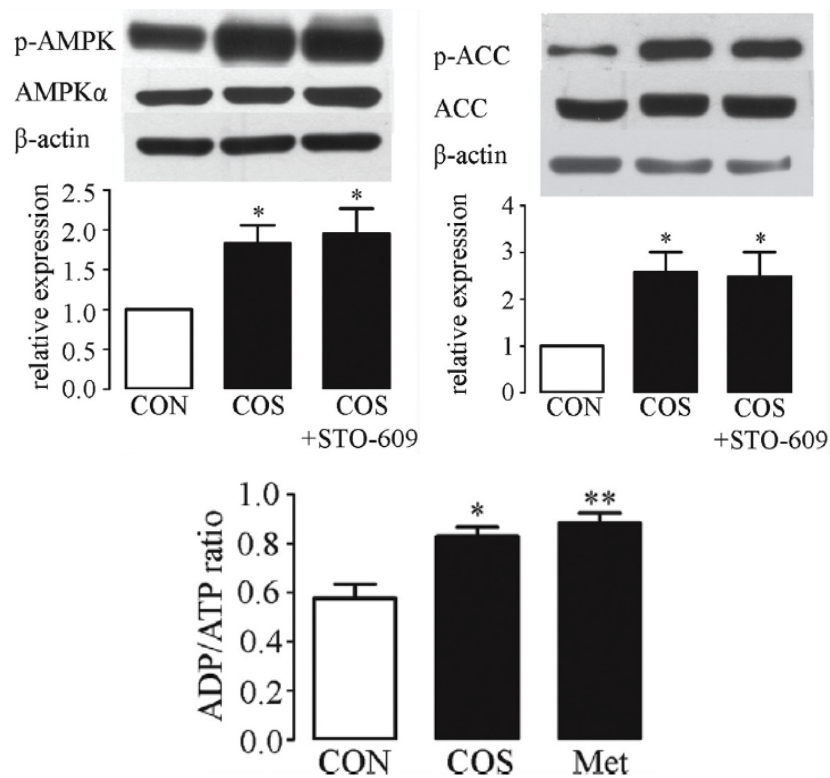
จากการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ผู้วิจัยพบว่า chitosan oligosaccharide (COS) จากเปลือกกุ้งสามารถกระตุ้นโปรตีน AMPK ได้โดยการจับกับโปรตีนตัวรับ calcium-sending receptor (CaSR) ในเซลล์ลำไส้เพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายการสนับสนุนทุนวิจัยเพื่อสร้างนวัตกรรมและเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดของทุนวิจัย ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนแผนงานวิจัยโดยได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน AMPK ในการอักเสบของเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่า (synovial fibroblast) และในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม โดยใช้เซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่าย เซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และในกระต่ายที่เหนียวน้ำให้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม ตามลำดับ โดยผู้วิจัยได้ศึกษาความเป็นพิษของ COS และสารเคมีอื่นๆที่จะใช้ในการทดลองต่อไปด้วย MTT assay โดยพบว่าสารดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่ายที่เวลา 24 ชั่วโมง (รูปด้านล่าง A-B)

ผู้วิจัยศึกษา time course และ dose-response ของการกระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่าย พบว่า COS สามารถออกฤทธิ์กระตุ้น AMPK phosphorylation โดยสามารถกระตุ้นกระตุ้นสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง (รูปด้านล่าง C) ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ (รูปด้านล่าง D) และได้วัด downstream target ของ AMPK คือ acetyl co-A carboxylase (ACC) พบว่า COS เหนียวนำการ phosphorylation ของ ACC ได้ ซึ่งบ่งชี้ว่า COS สามารถกระตุ้นการทำงานของ AMPK ได้ (รูปด้านล่าง E)



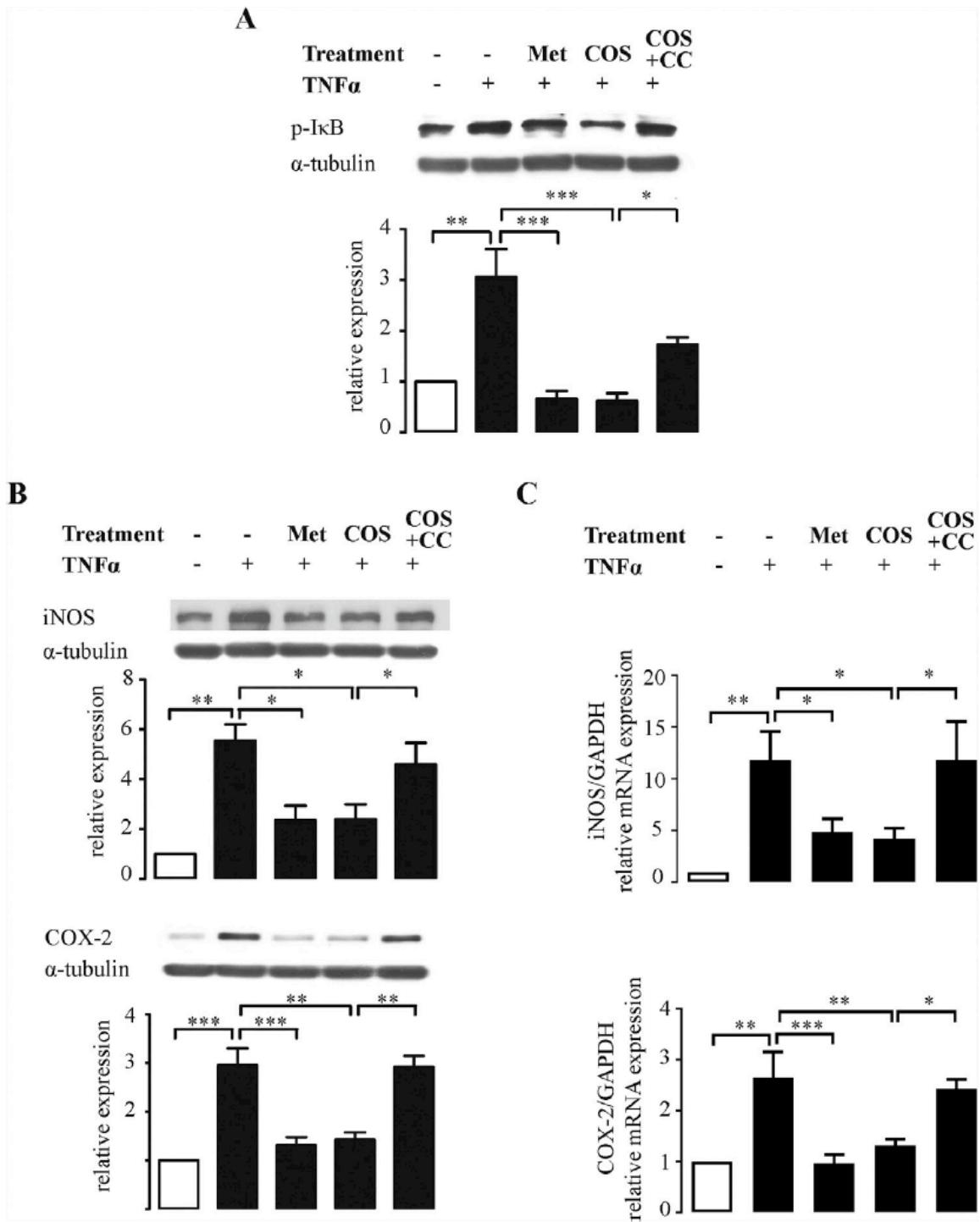
รูปแสดง การศึกษาความเป็นพิษของ COS (A) และสารที่ใช้ในการทดลอง (B) และผลของ COS ในการกระตุ้น AMPK phosphorylation (C,D) และ ACC phosphorylation (E) ในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่าย

ผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่ายด้วยสารยับยั้งโปรตีน CaMKKβ (STO-609) พบว่า STO-609 ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ COS ในการกระตุ้น AMPK phosphorylation และ ACC phosphorylation แต่ COS มีผลเพิ่ม ADP/ATP ratio ซึ่งบ่งชี้ว่า COS กระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่ายโดยการเพิ่มระดับของ ADP/ATP ratio (รูปด้านล่าง)



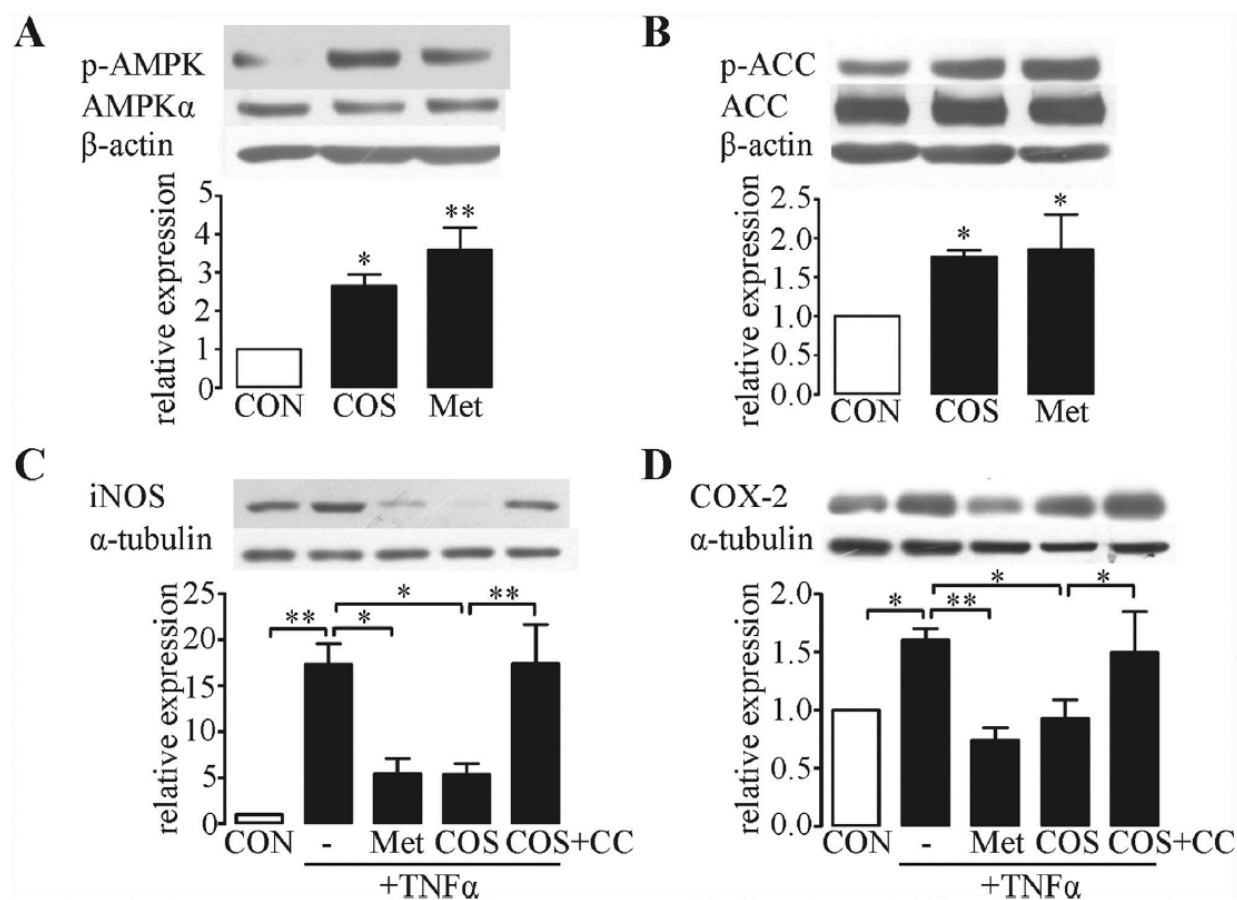
รูปแสดง กลไกการกระตุ้นโปรตีน AMPK โดย COS ในเซลล์เยื่อหุ้มเข้ากระต่าย

ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของ COS ในเซลล์เยื่อหุ้มเข้ากระต่าย โดยใช้ TNF- α เหนียวทำให้เกิดการอักเสบ พบว่า COS สามารถยับยั้ง IKB phosphorylation และการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ของ iNOS และ COX-2 ได้เช่นเดียวกับ metformin โดยที่สารยับยั้ง AMPK (compound CC หรือ CC) สามารถลดฤทธิ์ด้านการอักเสบของ COS ได้ ซึ่งบ่งชี้ว่า COS สามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อหุ้มเข้ากระต่ายได้ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK (รูปด้านล่าง)



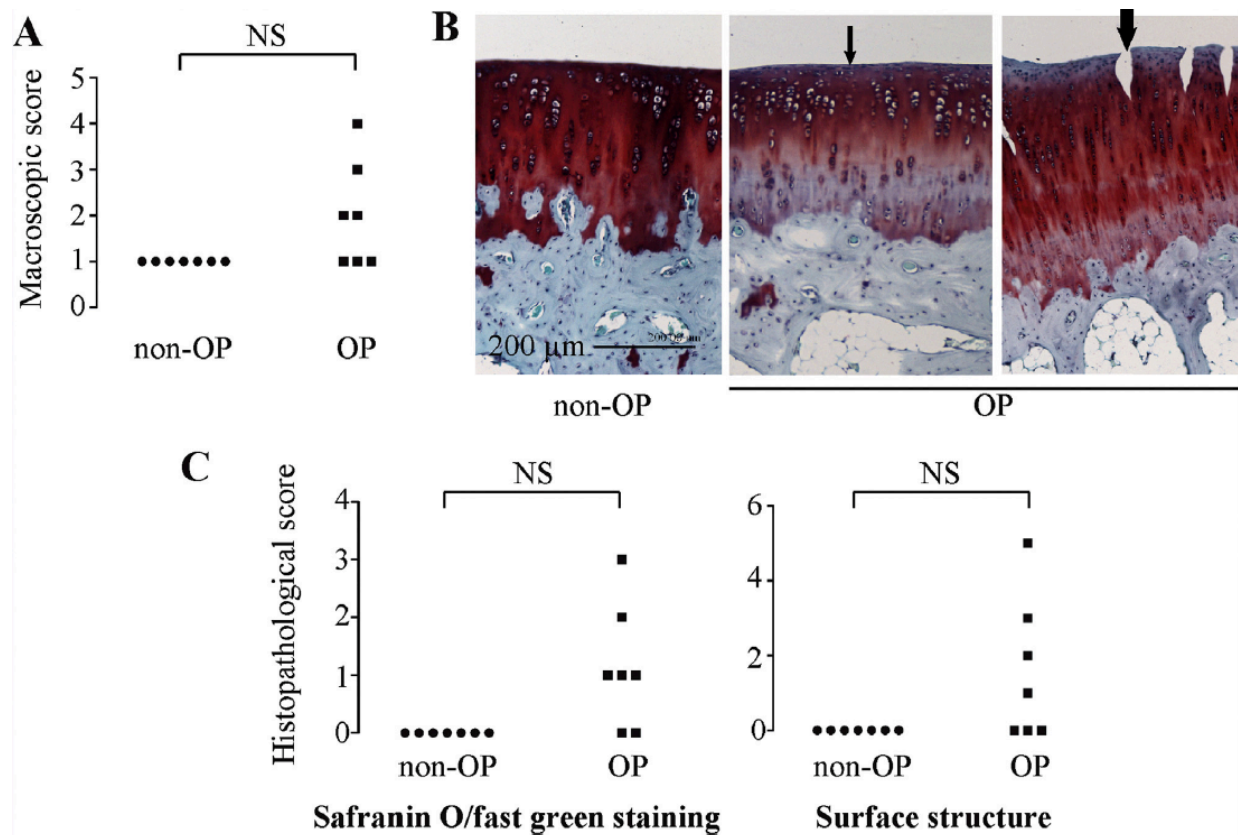
รูปแสดง ผลของ COS ต่อการอักเสบในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่ากระต่ายที่เหนี่ยวนำด้วย TNF- α (A) ผลต่อ IKB phosphorylation (B) ผลต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 (C) ผลต่อการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS และ COX-2

ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของ COS ในเซลล์เยื่อหุ้มข้อผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม โดยใช้ $\text{TNF-}\alpha$ เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ พบว่า COS สามารถกระตุ้นโปรตีน AMPK และ ACC ได้ (รูปด้านล่าง A-B) และสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ได้เช่นเดียวกับ metformin โดยที่สารยับยั้ง AMPK (compound CC หรือ CC) สามารถลดฤทธิ์ต้านการอักเสบของ COS ได้ ซึ่งบ่งชี้ว่า COS สามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อหุ้มข้อมนุษย์ได้ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์กระต่าย(รูปด้านล่าง)



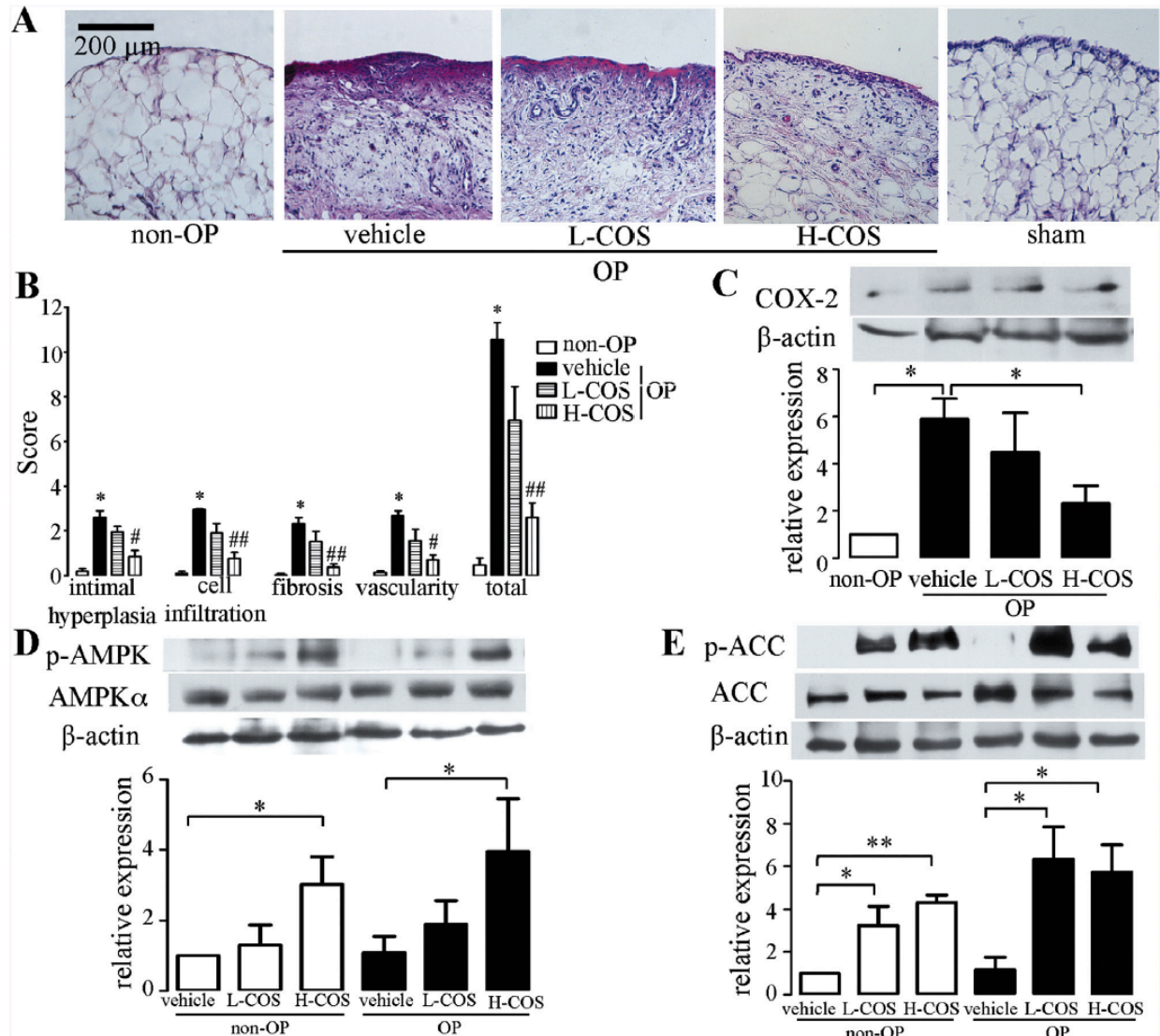
รูปแสดง ผลของ COS ต่อการอักเสบในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่าที่แยกจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย $\text{TNF-}\alpha$ (A) ผลต่อ AMPK phosphorylation (B) ผลต่อ ACC phosphorylation (C,D) ผลต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2

ผู้วิจัยได้ศึกษาศักยภาพของการกระตุ้นโปรตีน AMPK ด้วย COS ในการลดการอักเสบของเยื่อหุ้มข้อเข่าโดยใช้โมเดล ACL transection ในกระต่ายซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ ผู้วิจัยพบว่าโมเดลที่พัฒนาขึ้นมามีลักษณะการทำลายของข้อเข่าแต่ไม่รุนแรงมากต่างจากกลุ่มควบคุม (non-operated) บ่งชี้ว่า ข้อเข่าเสื่อมที่พบเป็นระยะเริ่มแรก (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง การวิเคราะห์ภาวะข้อเข่าเสื่อมในกระต่ายที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยวิธี ACL transection

ผู้วิจัยศึกษาศักยภาพของ COS ในการลดการอักเสบในเยื่อหุ้มข้อเข่าของกระต่ายโดยการป้อน COS ที่ปริมาณ 5 มก/กก/วัน (L-COS) หรือ 10 มก/กก/วัน (H-COS) โดยพบว่า H-COS สามารถลดลักษณะของการอักเสบในเนื้อเยื่อข้อเข่าของกระต่ายได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง A-B) และ H-COS ยังสามารถลดการแสดงออกของ COX-2 (รูปด้านล่าง C) และกระตุ้น AMPK phosphorylation (รูปด้านล่าง D) และ ACC phosphorylation (รูปด้านล่าง E) ในเนื้อเยื่อกระต่ายที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมได้



รูปแสดง ผลของ COS ต่อการลดการอักเสบในเนื้อเยื่อหุ้มข้อเข้าของกระต่ายที่เหนียวน่าให้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมระยะเริ่มต้น

ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการกระตุ้นโปรตีน AMPK ด้วย COS จากเปลือกกุ้งในการลดการอักเสบในเซลล์เยื่อหุ้มข้อเข่าและในการป้องกันและรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

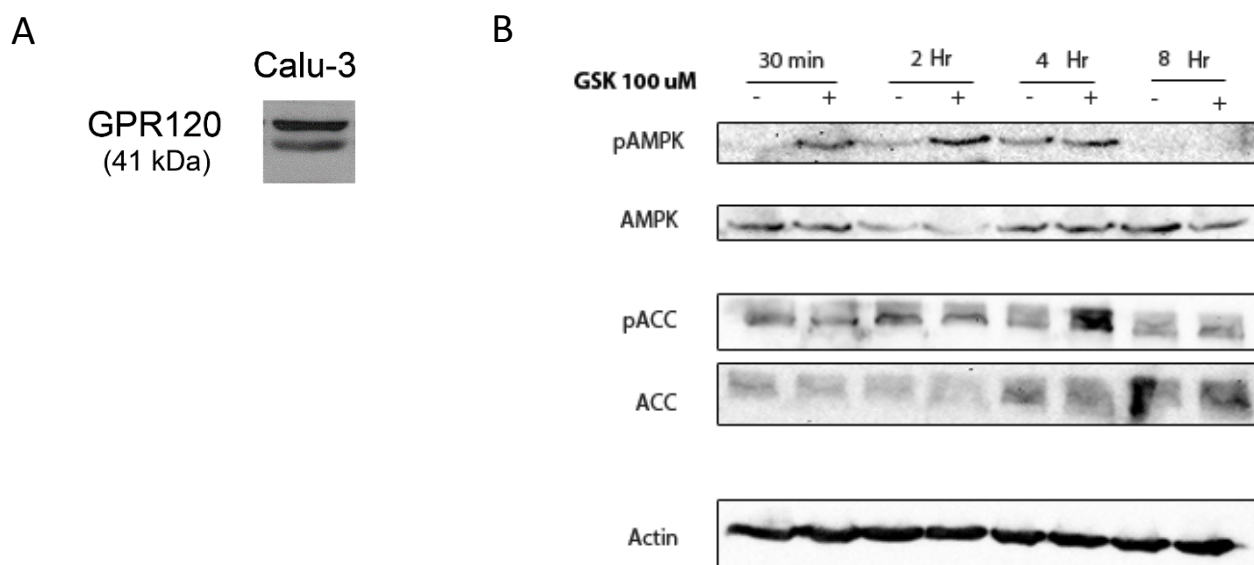
7) บทบาทของ GPR 40/120 ในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ

เนื่องจากเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจมีกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบและการควบคุม barrier function ที่คล้ายคลึงกับลำไส้ อีกทั้งยังมีส่วนสำคัญในการเกิดโรคเมตาบอลิกที่สำคัญในผู้สูงอายุคือ โรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease หรือ COPD) อีกทั้งยังมีการแสดงออกของ GPR120 และ GPR40 ซึ่งจับกับ Omega-3 แล้วทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ ผู้วิจัยจึงไปปรับแผนการวิจัยโดยการขยายงานไปยังเยื่อบุท่อ

ทางเดินหายใจและศึกษาบทบาทของโปรตีน AMPK และตัวรับ GPR 40/120 ในการควบคุม barrier function การอักเสบ และการเกิดโรค COPD

1) ผลของสารกระตุ้น GPR 40/120 ต่อการทำงานของโปรตีน AMP-activated protein kinase (AMPK) ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลมมนุษย์ (เซลล์ Calu-3)

การศึกษาที่ผ่านมารายงานถึงความสำคัญของโปรตีน AMPK ในการต่อต้านภาวะทางเดินหายใจอักเสบที่เกี่ยวข้องกับโรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรังและภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน และยังมีการค้นพบว่าสารกระตุ้น GPR120 สามารถกระตุ้นการทำงานของ AMPK ในเซลล์กล้ามเนื้อลายได้ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าการกระตุ้น GPR120 สามารถเพิ่มการทำงานของโปรตีน AMPK ผู้วิจัยใช้เทคนิค western blot เพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีนตัวรับ GPR120 ในเซลล์ Calu-3 (รูปด้านล่าง A) หลังจากนั้นจึงใส่สารกระตุ้น GPR120 ที่มีชื่อว่า GSK 137647 แล้ววัดการแสดงออกของโปรตีน phosphorylated AMPK (pAMPK) และ phosphorylated ACC (pACC) ที่บ่งบอกถึงการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ ในการทดลองนี้พบว่าสาร GSK 137647 สามารถเพิ่มการทำงานของโปรตีน AMPK ในช่วงเวลา 30 นาที จนถึง 4 ชั่วโมง (รูปด้านล่าง B)



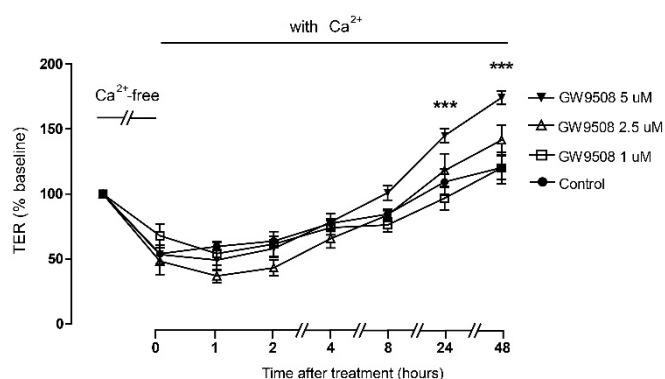
รูปแสดง (A) การแสดงออกของโปรตีน GPR120 ใน เซลล์ Calu-3 (B) ผลของสาร GSK 137647 ต่อการทำงานของ AMPK ที่เวลาต่างๆ

2) ผลของสารกระตุ้น GPR120 ต่อการฟื้นฟู barrier function

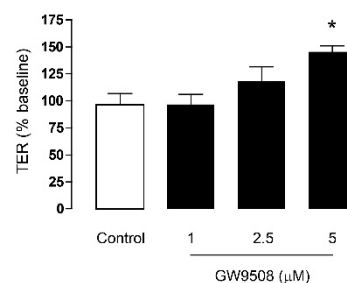
เนื่องจากผู้วิจัยพบว่าสารกระตุ้น GPR120 สามารถกระตุ้นการทำงานของ AMPK ได้ ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ถูกรายงานมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสามารถช่วยฟื้นฟู barrier function ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบผลของสารกระตุ้น GPR120 ต่อการฟื้นฟู barrier function โดยการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่านเซลล์ (trans-epithelial electrical resistance (TER)) ผู้วิจัยทำลาย airway barrier function ด้วยภาวะปลอดแคลเซียมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสภาวะที่มีแคลเซียมตามปกติพร้อมกับได้รับสาร GSK 137647 เพื่อกระตุ้น GPR120 ใน

ความเข้มข้นต่างๆ หรือ ได้รับยา metformin (2 mM) เพื่อเร่งการฟื้นฟู barrier function (positive control) 6 ชั่วโมง พบว่า GSK 137647 (200 μ M) สามารถเร่งการฟื้นฟู TER ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง A) เพื่อยืนยันผลของการกระตุ้น GPR120 ผู้วิจัยจึงใช้สารกระตุ้น GPR120 อีกชนิดที่มีชื่อว่า GW9508 (ซึ่งสามารถกระตุ้น GPR40 ด้วย) แล้ววัดการเปลี่ยนแปลง TER พบว่า GW9508 (50 μ M) สามารถเพิ่ม TER ได้เช่นกัน บ่งชี้ว่า GPR40/120 มีบทบาทในการเพิ่ม barrier function ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด หลังจากนั้นผู้วิจัยได้เปลี่ยนใช้สาร GW9508 เพื่อศึกษาบทบาทของ GPR40 และ GPR120 เนื่องจากทั้งสองโปรตีนมีการแสดงออกในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ และสารตัวนี้มีการใช้ในการศึกษาและทราบข้อมูลในแง่ความจำเพาะและความเป็นพิษมากกว่า GSK137647

A



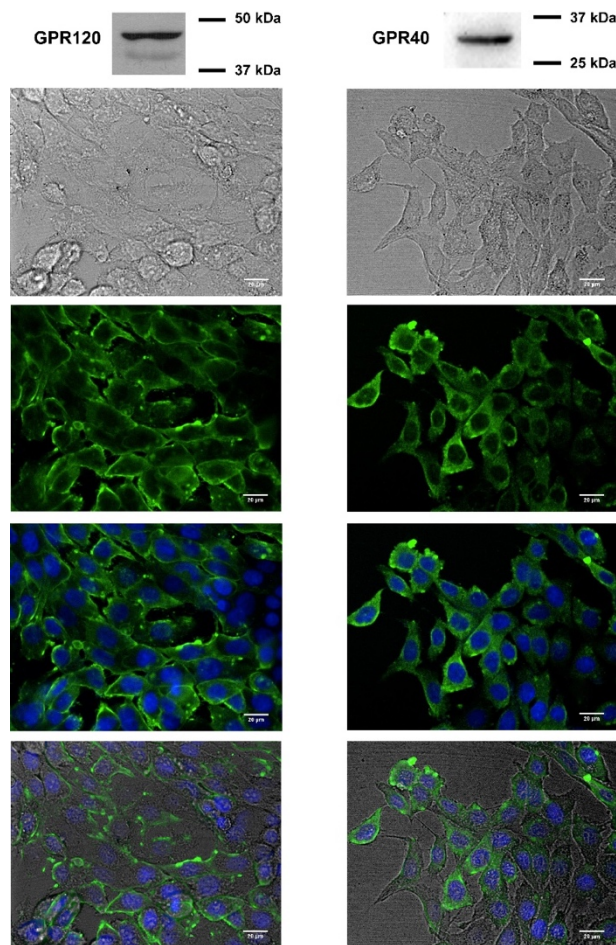
B



รูปแสดง ผลของสารกระตุ้น GPR40/120 ต่อการฟื้นฟู TER ในเซลล์ Calu-3. * ; ($p \leq 0.05$). ** ; ($p \leq 0.01$)

2.1) การแสดงออกของ GPR40 และ GPR120 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์

ผู้วิจัยยืนยันการแสดงออกของโปรตีนตัวรับ GPR120 (รูปด้านล่าง A) และ GPR40 (รูปด้านล่าง B) ในเซลล์ Calu-3 โดยใช้เทคนิค western blot และ immunofluorescence ได้ผลดังรูปด้านล่าง



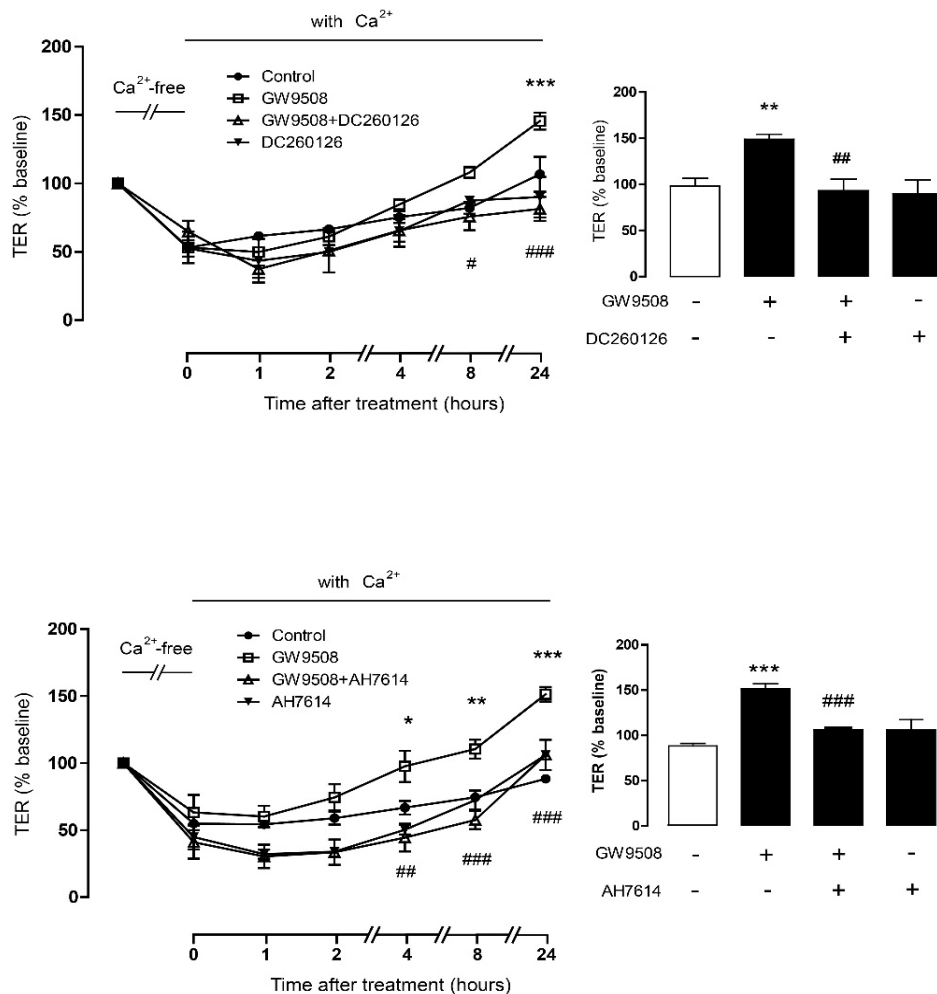
A

B

รูปแสดง การแสดงออกของโปรตีน GPR120 และ GPR40 ในเซลล์ Calu-3

2.2) ผลของสารกระตุ้น GPR40 และ GPR120 ต่อการฟื้นฟู barrier function

ผู้วิจัยทำการทดสอบผลของสารกระตุ้น GPR40 และ GPR120 ต่อการฟื้นฟู barrier function โดยการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่านเซลล์ (trans-epithelial electrical resistance (TER) ผู้วิจัยทำลาย airway barrier function ด้วยภาวะปลอดแคลเซียมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสภาวะที่มีแคลเซียมตามปกติพร้อมกับได้รับสาร GW9508 ในความเข้มข้นต่างๆเพื่อกระตุ้น GPR40/GPR120 พบว่า GW9508 (5 μ M) สามารถเร่งการฟื้นฟู TER ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปด้านล่าง) เพื่อยืนยันผลของสาร GW9508 เกิดจากการกระตุ้น GPR40/GPR120 แล้วทำให้เร่งการฟื้นฟู TER ผู้วิจัยจึงทำการทดลองโดยใช้สารยับยั้ง GPR40 (DC260126) และ GPR120 (AH7614) พบว่าสาร DC260126 (รูปด้านล่าง) และ AH7614 (รูปด้านล่าง) สามารถยับยั้งการเร่งการฟื้นฟู TER ได้อย่างมีนัยสำคัญ

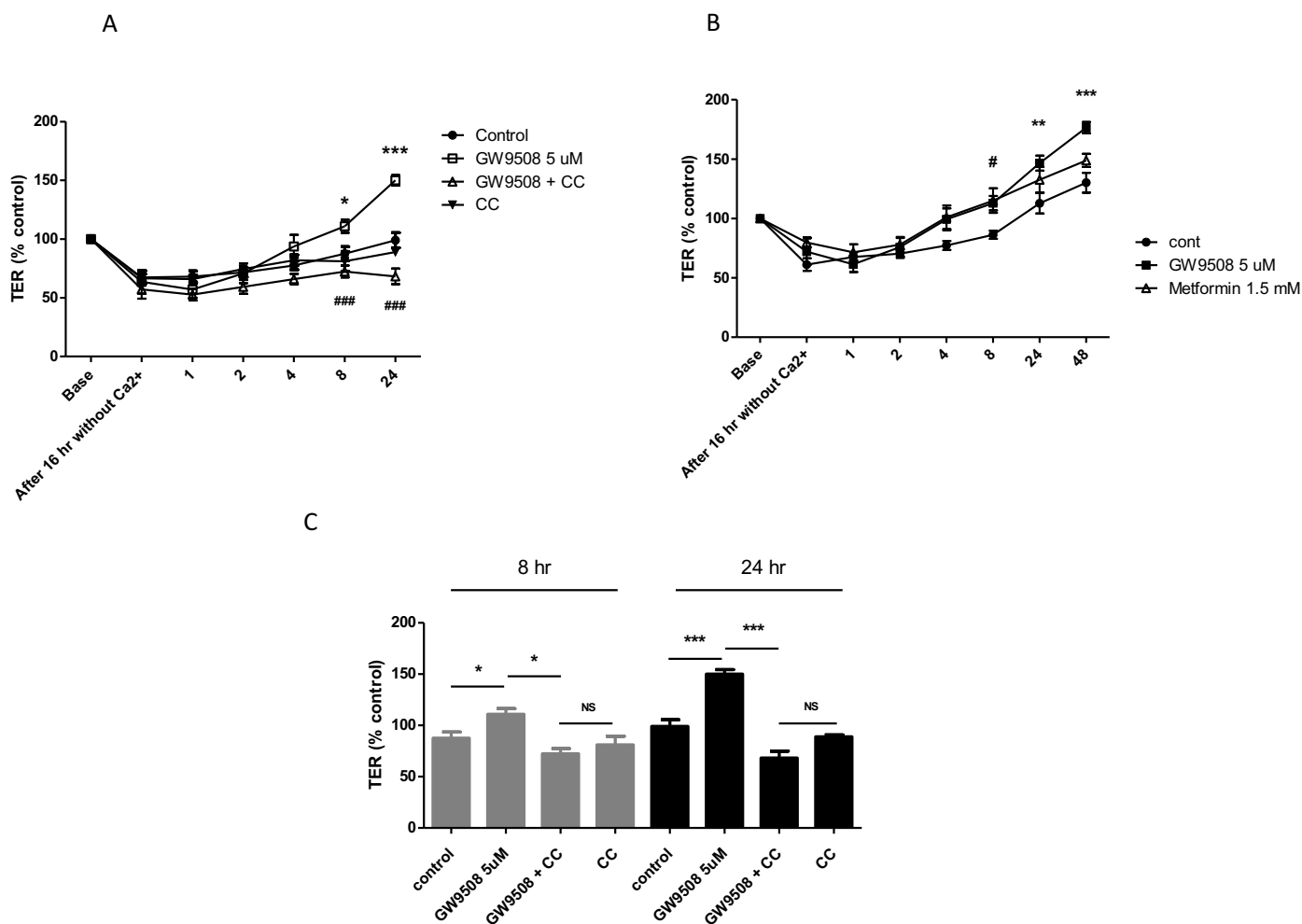


รูปแสดง ผลของสาร GW9508 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการฟื้นฟู barrier function และบทบาทของโปรตีน GPR40 และ GPR120 ต่อผลของการฟื้นฟู barrier function ของสาร GW9508

2.3) บทบาทของ AMPK ต่อการฟื้นฟู barrier function

เนื่องจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการกระตุ้น GPR40/GPR120 สามารถกระตุ้นการทำงานของ AMPK ได้ ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ถูกรายงานมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสามารถช่วยฟื้นฟู barrier function ได้ รวมถึงผู้วิจัยพบว่าผลของสาร GW9508 และ ยา Metformin (1.5 mM) ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK มีผลใกล้เคียงกันในการฟื้นฟู barrier function (รูปด้านล่าง A) ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าผลของการกระตุ้น GPR40/GPR120 ฟื้นฟู barrier function โดยการกระตุ้นโปรตีน AMPK จากผลการวิจัยพบว่าสารยับยั้งโปรตีน AMPK

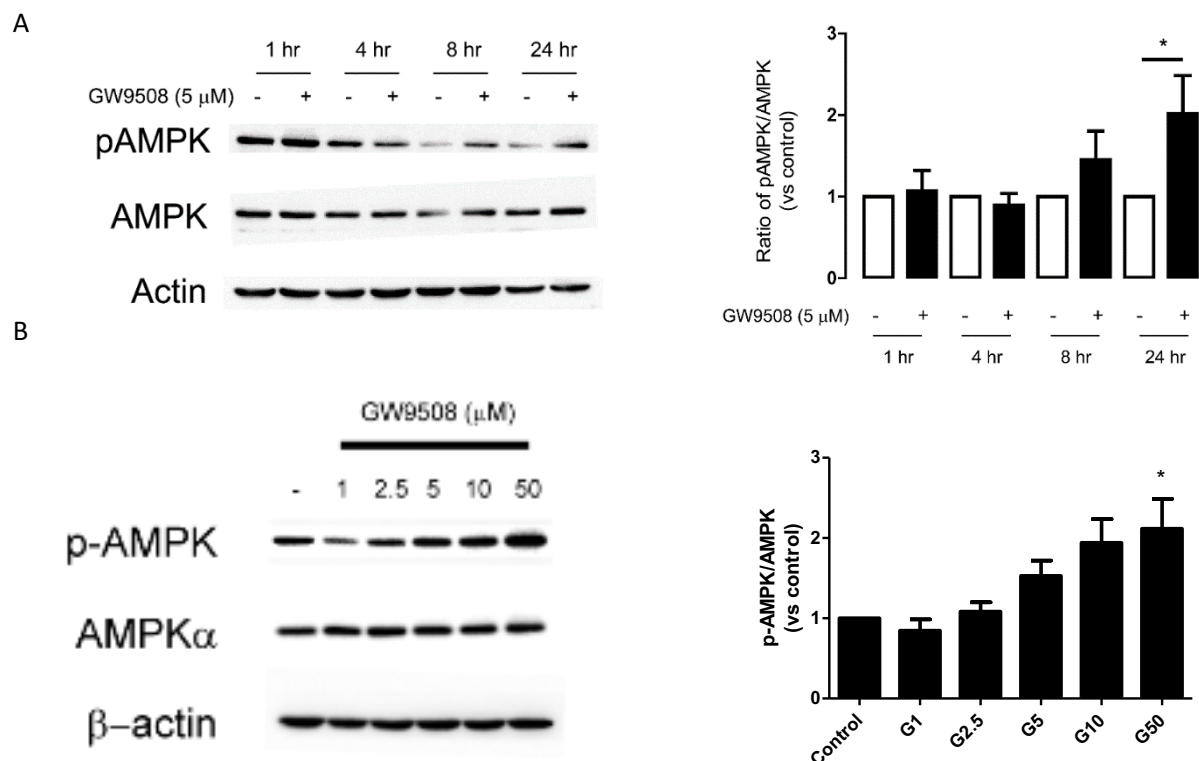
หรือสาร Compound C (CC) สามารถยับยั้งความเสียหายในการฟื้นฟู barrier function ที่เกิดจากการกระตุ้น GPR40/GPR120 (รูปด้านล่าง B) และ (รูปด้านล่าง C)



รูปแสดง บทบาทของโปรตีน AMPK ต่อการฟื้นฟู barrier function

2.4) ผลของสารกระตุ้น GPR40/120 ต่อการทำงานของโปรตีน AMPK ในเซลล์ Calu-3

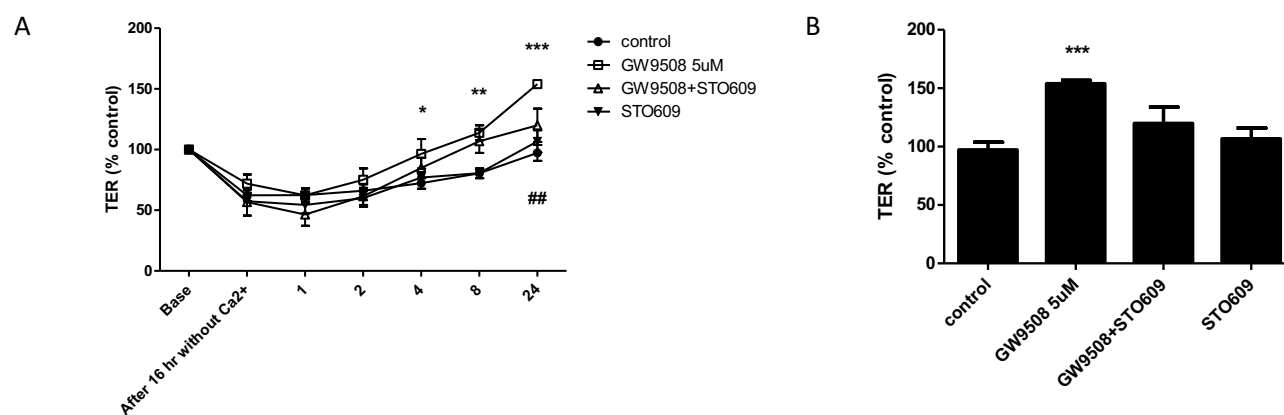
เนื่องจากผู้วิจัยตั้งข้อสงสัยว่าการกระตุ้น GPR40/GPR120 ฟื้นฟู barrier function ได้ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK ดังนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาศักยภาพของการกระตุ้นโปรตีนการทำงานของ AMPK โดยใช้เทคนิค western blot ในการทดลองนี้พบว่า สาร GW9508 สามารถเพิ่มการทำงานของโปรตีน AMPK เป็นไปในลักษณะ time-dependence (รูปด้านล่าง A) และ dose-dependence (รูปด้านล่าง B)



รูปแสดง ผลของสารกระตุ้น GPR40/120 ต่อการทำงานของโปรตีน AMPK

2.5) บทบาทของ calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta (CaMKK β) ต่อการฟื้นฟู barrier function

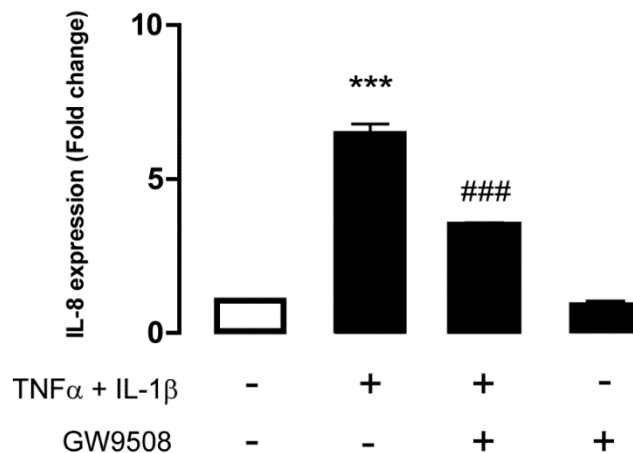
ผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน AMPK โดยตั้งสมมติฐานว่า การกระตุ้น AMPK phosphorylation โดย GPR40/GPR120 เกิดจากการกระตุ้นโปรตีน CaMKK β จึงได้ทำการทดสอบสมมติฐานดังกล่าวโดยใช้สาร STO-609 เพื่อยับยั้งการทำงานของ CaMKK β ผลการทดลองบ่งชี้ว่า STO-609 (5 μM) สามารถยับยั้งผลของ GW9508 ในการกระตุ้น AMPK phosphorylation (รูปด้านล่าง A) และการฟื้นฟู barrier function (รูปด้านล่าง B)



รูปแสดง (A) บทบาทของ CaMKK β ในการกระตุ้น AMPK (B) บทบาทของ CaMKK β ในการฟื้นฟู barrier function

3) ผลของสารกระตุ้น GPR 40/120 ต่อการป้องกันภาวะอักเสบ

การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน GPR120 และ AMPK ถูกรายงานมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสามารถยับยั้งกลไกการเกิดภาวะอักเสบในเนื้อเยื่อต่างๆ ในขณะที่โรคหลอดเลือดอุดตันเรื้อรังมีภาวะอักเสบและทำให้เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดผลิต cytokine คือ IL-8 เพื่อเรียกเม็ดเลือดขาวและทำให้ภาวะอักเสบรุนแรงยิ่งขึ้น ผู้วิจัยคาดว่า การกระตุ้น GPR120 หรือ GPR40 จะสามารถป้องกันการเกิดภาวะอักเสบในหลอดเลือดได้ เพื่อเลียนแบบกลไกการเกิดโรค ผู้วิจัยเหนี่ยวนำภาวะอักเสบโดยใช้ TNF- α และ IL-1 β พร้อมกับใส่สารกระตุ้น GPR 40/120 คือ GW9508 (50 μ M) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตรวจการแสดงผลของยีน IL-8 ด้วยเทคนิค reverse transcript real-time PCR ผู้วิจัยพบว่าสาร GW9508 ป้องกันการแสดงผลของ IL-8 ที่ถูกกระตุ้นด้วย cytokines ได้ (รูปด้านล่าง) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า GPR 40/120 มีผลในการลดการอักเสบในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

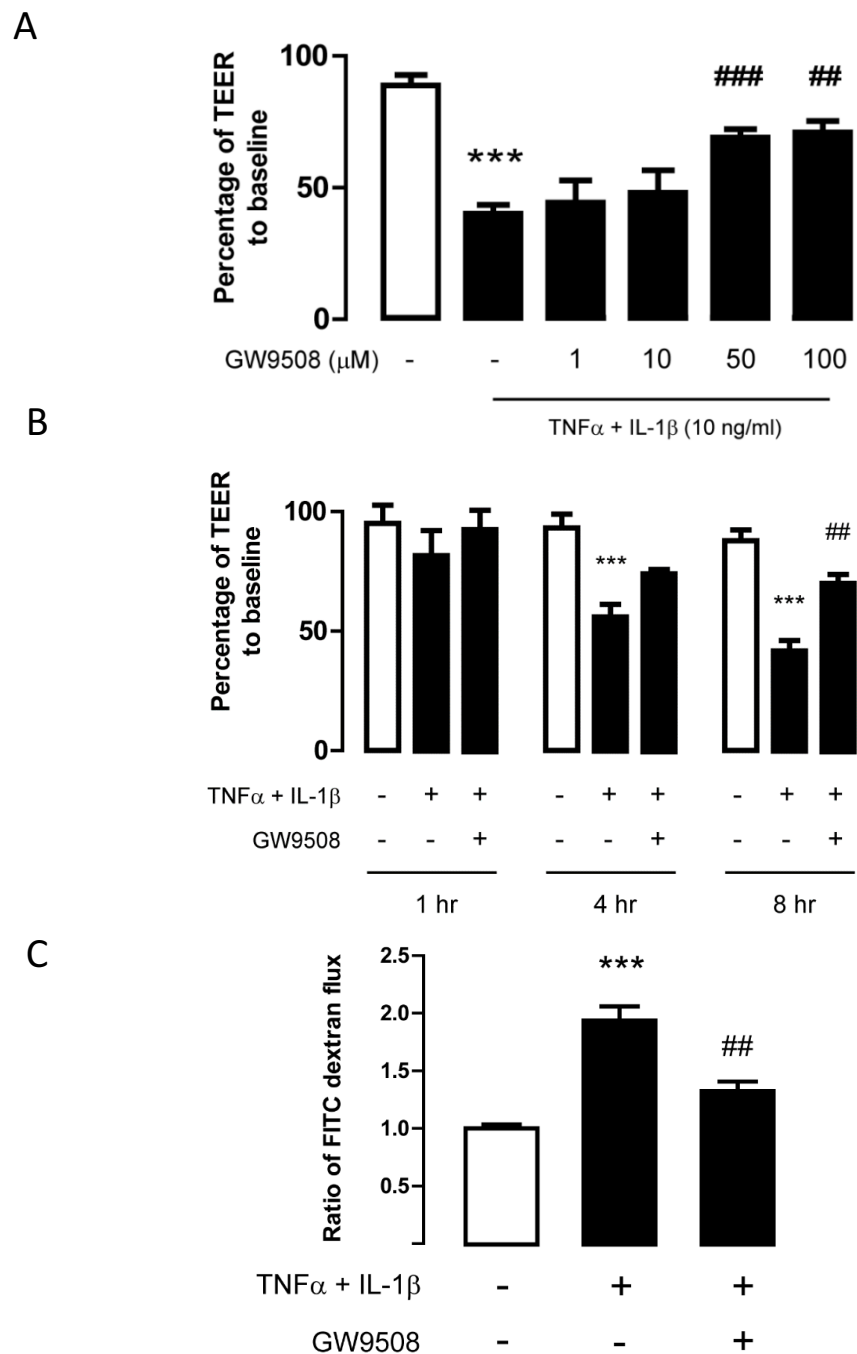


รูปแสดง การแสดงผลของยีน IL-8 และผลของสาร GW9508 ต่อการป้องกันการอักเสบ. *** ; ($p \leq 0.001$) เทียบกับกลุ่ม control. ### ; ($p \leq 0.001$) เทียบกับกลุ่ม TNF- α + IL-1 β

4) ผลของสารกระตุ้น GPR120 ต่อการฟื้นฟู airway barrier ที่ถูกทำลายด้วยภาวะอักเสบ

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าสารกระตุ้น GPR120 สามารถยับยั้งการเกิดภาวะอักเสบได้ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า GPR120 ยังสามารถป้องกันการทำลาย airway barrier ที่ถูกทำลายโดยภาวะอักเสบ ในการทดลองนี้ผู้วิจัยใช้ TNF- α และ IL-1 β ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ในการเหนี่ยวนำการอักเสบ และใช้เทคนิคการวัด TER และการแพร่ของสาร FITC-dextran ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ผ่านชั้นเซลล์ ที่บ่งบอกถึง airway barrier พบว่า TNF- α และ IL-1 β ทำลาย airway barrier โดยลด TER (รูปด้านล่าง A, B) และเพิ่มการแพร่ของ FITC-dextran (รูปด้านล่าง C) สารกระตุ้น GPR120 GW9508 ช่วย

ป้องกันการทำลาย airway barrier โดยที่ผลการทดลองเป็นไปในลักษณะ dose-dependence (รูปด้านล่าง A) และ time-dependence (รูปด้านล่าง B)



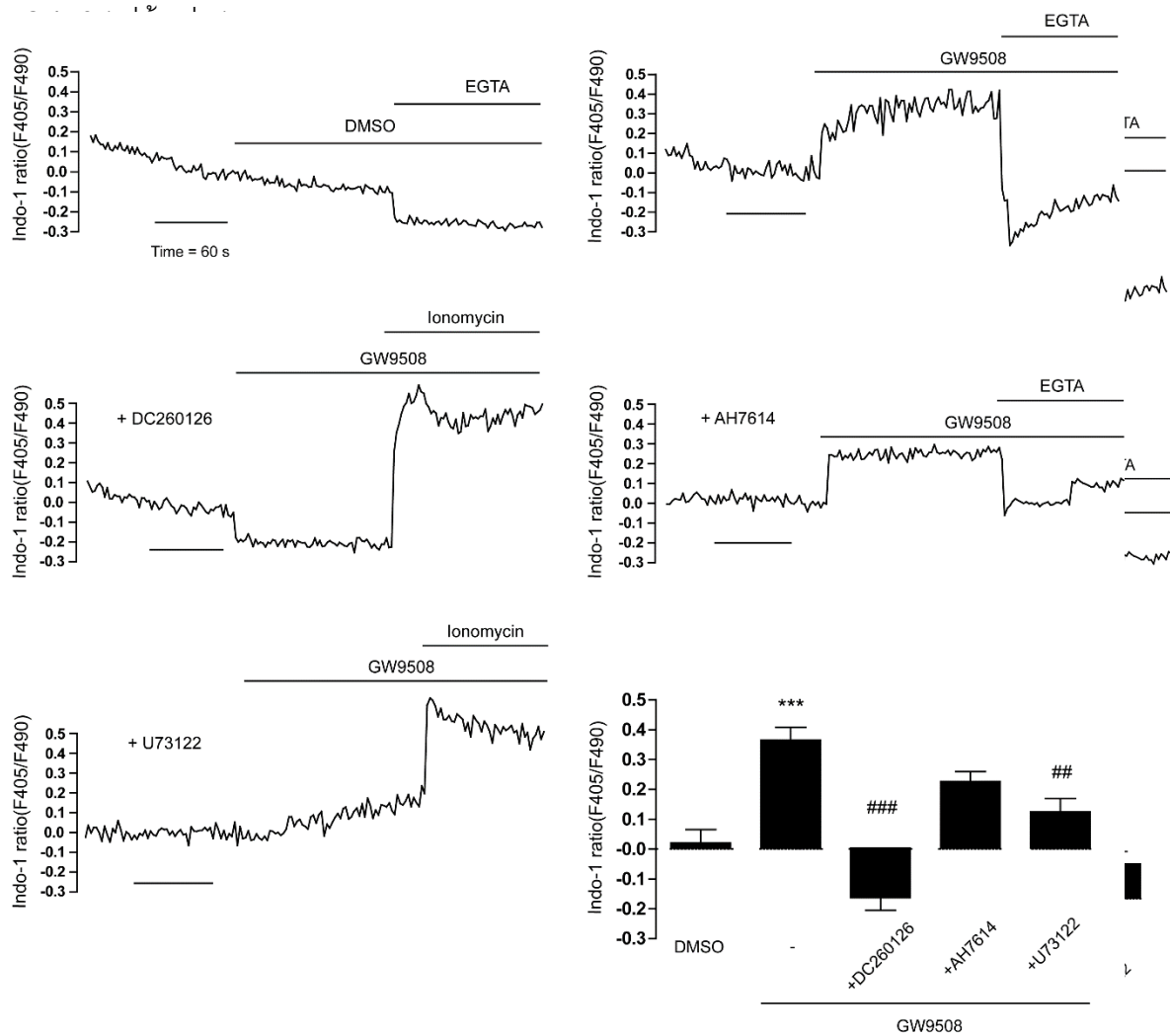
รูปแสดง A. ผลของสาร GW9508 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการป้องกันการลดลงของ TER ณ เวลา 8 ชั่วโมง

B. ผลของสาร GW9508 50 μM ที่ระยะเวลาต่างๆต่อการป้องกันการลดลงของ TER C. ผลของสาร GW9508 50 μM ต่อ

การป้องกันการแพร่ของ FITC-dextran ผ่านชั้นเซลล์. *** ; ($p \leq 0.001$) เทียบกับกลุ่ม control. ## ; ($p \leq 0.01$) เทียบกับกลุ่ม TNF- α + IL-1 β . ### ; ($p \leq 0.001$) เทียบกับกลุ่ม TNF- α + IL-1 β

5) การกระตุ้น GPR40 ในเซลล์เยื่อบุหลอดลมมนุษย์

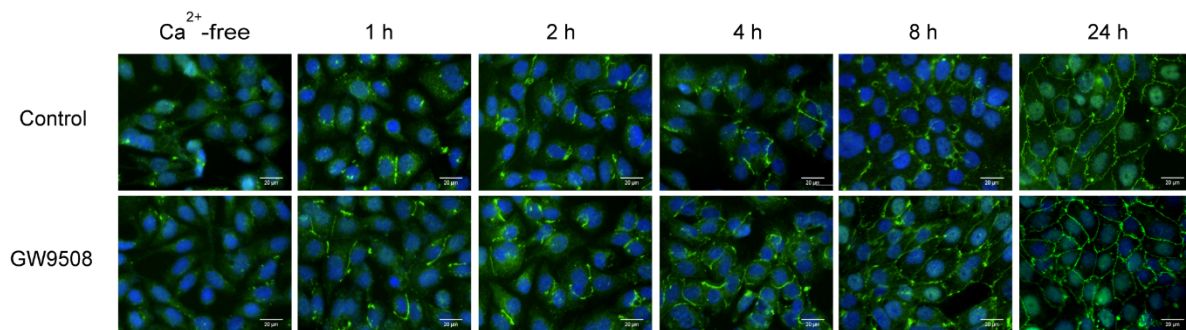
ผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าการแสดงออกโปรตีน GPR40 และ GPR120 ในเซลล์ Calu-3 โดยที่เมื่อ GPR40 และ GPR120 ถูกกระตุ้นจะทำให้เซลล์มีปริมาณแคลเซียมมากขึ้นผ่านการทำงานของ PLC ผู้วิจัยจึงทดสอบการกระตุ้น GPR40 และ GPR120 ด้วยสาร GW9508 เพื่อยืนยันว่า GPR40สามารถทำงานได้จริง โดยวัดระดับของแคลเซียมภายในเซลล์โดยใช้สี indo-1 AM พบว่า สาร GW9508 เพิ่มปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ได้ และการใช้สารยับยั้ง GPR40 (DC260126) หรือ สารยับยั้ง PLC (U73122) สามารถลดความสามารถของ GW9508 ได้ ในขณะที่การใช้สารยับยั้ง GPR120 แทนไม่สามารถเหตุการณ์ดังกล่าวได้ ผลการทดลองสรุปได้ว่า GW9508 กระตุ้นการทำงานของ GPR40ในเซลล์



รูปที่ 45 การกระตุ้น GPR40 ในเซลล์ Calu-3

6) ผลของสารกระตุ้น GPR40 ต่อ tight junction assembly

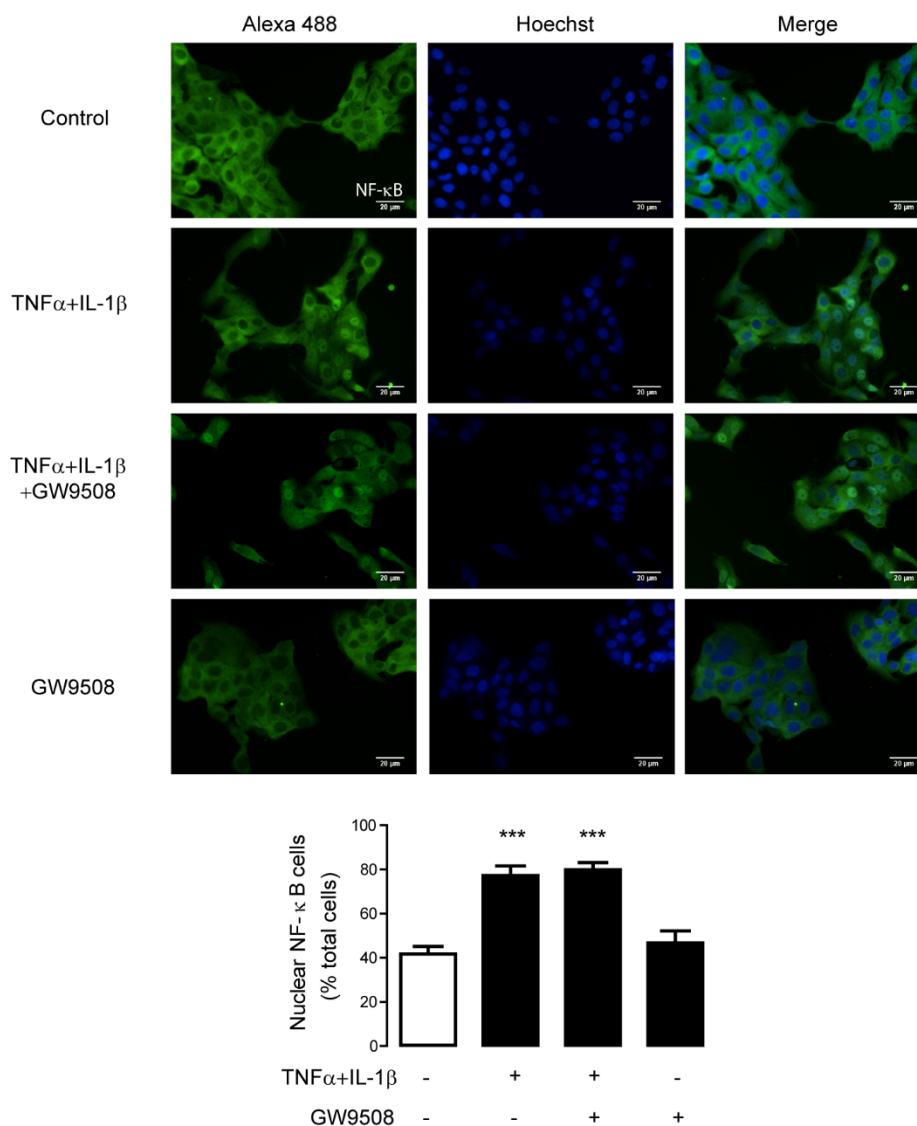
ผู้วิจัยทำการทดสอบผลของสารกระตุ้น GPR40 ต่อการฟื้นฟู barrier function โดยใช้วิธี immunofluorescence เพื่อติดตาม zonula occluden-1 (ZO-1) ซึ่งเป็นโปรตีน tight junction ที่ปกติแล้วจะอยู่ในบริเวณขอบเซลล์ เมื่อผู้วิจัยทำให้ tight junction แยก tight junction ออกจากกันด้วยภาวะปลอดแคลเซียมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า ZO-1 (สีเขียว) อยู่ตรงบริเวณไซโตพลาสซึม หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสภาวะที่มีแคลเซียมตามปกติพร้อมกับได้รับสาร GW9508 (5 μ M) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณของ ZO-1 ที่ปรากฏบริเวณขอบเซลล์ได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่า GPR40 กระตุ้น tight junction assembly (รูปด้านล่าง)



รูปแสดง ผลของสารกระตุ้น GPR40 ต่อ tight junction assembly

7) GPR40 ยับยั้งการการทำลาย airway barrier ที่ถูกเหนี่ยวนำจาก TNF α และ IL-1 β โดยไม่เกี่ยวข้องกับกลไก NF-kB

จากผลการทดลองในที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่า การกระตุ้น GPR40 สามารถยับยั้งการการทำลาย airway barrier จาก TNF α และ IL-1 β ผู้วิจัยจึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ GPR40 โดยเริ่มจากการศึกษาบทบาทของ NF-kB ซึ่งเป็นกลไกต่อการออกฤทธิ์ของ TNF α และ IL-1 β เพื่อศึกษาบทบาทของ GPR40 ต่อการทำงานของ NF-kB ผู้วิจัยจึงใช้วิธี immunofluorescence เพื่อติดตาม NF-kB ซึ่งเป็น transcription factor และจะอยู่ภายในนิวเคลียสเวลาที่ถูกกระตุ้น จากการทดลองพบว่า TNF α และ IL-1 β เพิ่มปริมาณ NF-kB (สีเขียว) ที่อยู่ภายในนิวเคลียส (สีน้ำเงิน) ได้อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ แต่การกระตุ้น GPR40 ไม่สามารถหยุดยั้งการเพิ่มขึ้นของ NF-kB ได้ จึงสรุปว่า GPR40 ยับยั้งการการทำลาย airway barrier ที่ถูกเหนี่ยวนำจาก TNF α และ IL-1 β ไม่เกี่ยวข้องกับกลไก NF-kB (รูปด้านล่าง)

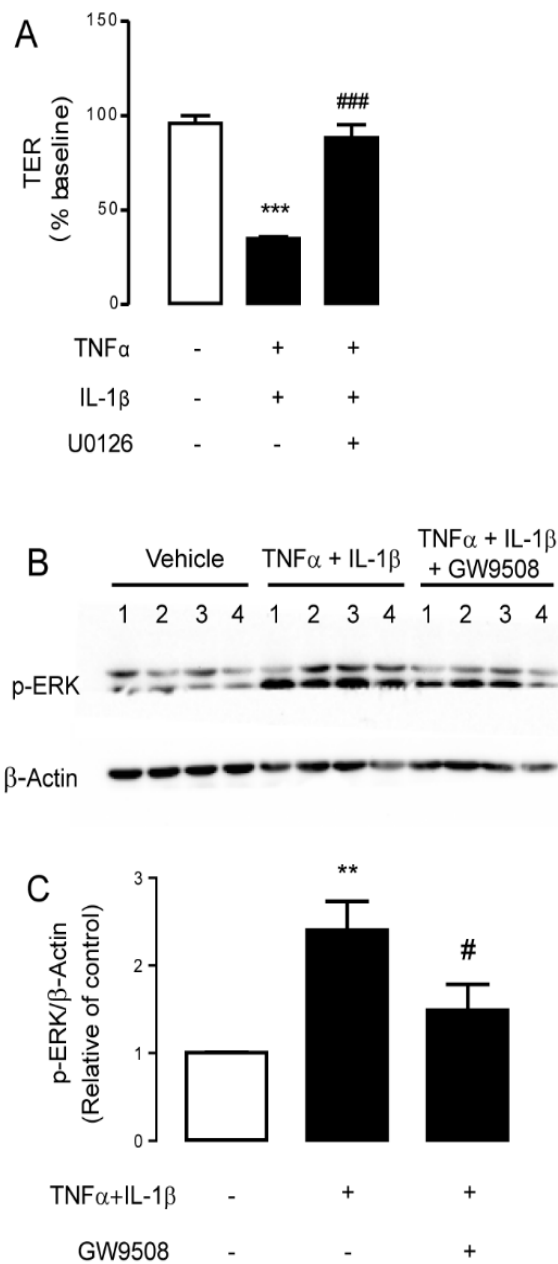


รูปแสดง GPR40 ยับยั้งการการทำลาย airway barrier ที่ถูกเหนี่ยวนำจาก TNF α และ IL-1 β โดยไม่เกี่ยวข้องกับกลไก NF- κ B

8) บทบาทของ ERK ต่อการออกฤทธิ์ของ GPR40 ในการยับยั้ง TNF α และ IL-1 β

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า TNF α และ IL-1 β สามารถออกฤทธิ์ผ่านกลไกในการกระตุ้น ERK และอาจนำไปสู่การทำลาย airway barrier เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว ผู้วิจัยจึงทดลองโดยใช้สารยับยั้ง ERK (U0126) จากรูปด้านล่าง A พบว่า U0126 สามารถยับยั้งการทำลาย airway barrier โดย TNF α และ IL-1 β ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงพิสูจน์ต่อว่าการกระตุ้น GPR40 สามารถลดการทำงานของ ERK ได้จริง ผู้วิจัยวัดการทำงานของ ERK โดยใช้วิธี western blot ต่อ phospho-ERK ที่บ่งบอกถึงการกระตุ้น ERK จากรูปด้านล่าง B และ C พบว่า GPR40 สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ

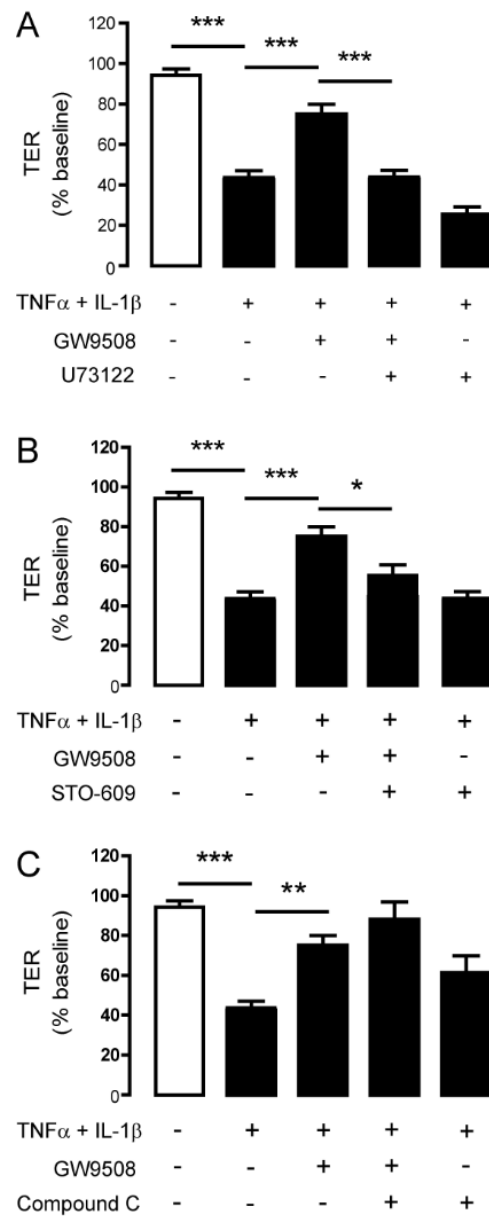
phospho-ERK จากการกระตุ้นด้วย $\text{TNF}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$ ได้ จึงสรุปว่า GPR40 ยับยั้งผลของ $\text{TNF}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$ โดยการยับยั้ง ERK



รูปแสดง บทบาทของ ERK ต่อการออกฤทธิ์ของ $\text{TNF}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$

9) บทบาทของ PLC และ $\text{CaMKK}\beta$ ต่อการออกฤทธิ์ของ GPR40 ในการยับยั้ง $\text{TNF}\alpha$ และ $\text{IL-1}\beta$

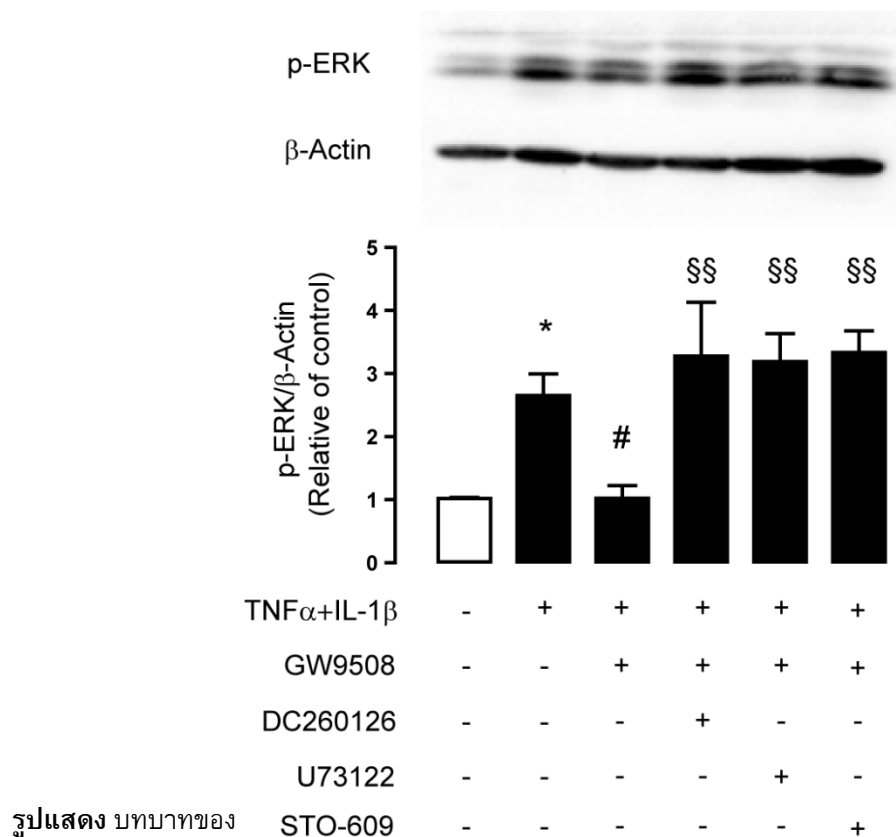
จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า GPR40 สามารถกระตุ้น tight junction assembly ผ่านกลไก PLC-CaMKK β -AMPK ดังนั้นผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า GPR40 อาจยับยั้งการออกฤทธิ์ของTNF α และ IL-1 β โดยผ่านกลไกเดียวกัน ผู้วิจัยจึงทดสอบสมมติฐานโดยใช้สารยับยั้ง PLC (รูปด้านล่าง A) CaMKK β (รูปด้านล่างB) และ AMPK (รูปด้านล่าง C) พบว่า GPR40 ไม่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของTNF α และ IL-1 β ที่ทำลาย airway barrierได้ เมื่อใช้สารยับยั้ง PLC (รูปด้านล่าง A) หรือสารยับยั้ง CaMKK β (รูปด้านล่าง B) ในขณะที่สารยับยั้ง AMPK ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ GPR40 (รูปด้านล่าง C) การทดลองนี้บ่งชี้ว่า GPR40 ยับยั้ง TNF α และ IL-1 β ที่ทำลาย airway barrierได้โดยผ่าน PLC และ CaMKK β



รูปแสดง บทบาทของ PLC และ CaMKK β ต่อการออกฤทธิ์ของ GPR40 ในการยับยั้ง TNF α และ IL-1 β

10) บทบาทของ PLC และ CaMKK β ต่อการออกฤทธิ์ของ GPR40 ในการยับยั้ง ERK

เพื่อยืนยันว่า GPR40 ออกฤทธิ์โดยผ่าน PLC และ CaMKK β แล้วยับยั้ง ERK ผู้วิจัยจึงทำการทดลองโดยวัด phospho-ERK จากผลการทดลองพบว่า การลดลงของ phospho-ERK ซึ่งเป็นผลมาจาก GW9508 สามารถยับยั้งได้เมื่อใช้สารยับยั้ง GPR40 สารยับยั้ง PLC และ สารยับยั้ง CaMKK β จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าการกระตุ้น GPR40 สามารถป้องกันการทำลาย airway barrier จาก TNF α และ IL-1 β โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน PLC-CaMKK-ERK (รูปด้านล่าง)

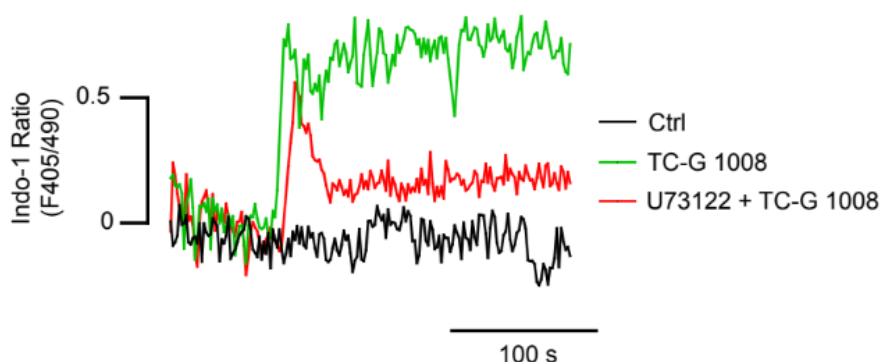


8) บทบาทของ GPR39 ในเซลล์ผิวหนัง

1) ผลของการกระตุ้น GPR39 ต่อระดับcalcium ในเซลล์ HaCaT

สังกะสี เป็นแร่ธาตุสำคัญของร่างกาย มีการรายงานว่าการรับประทานอาหารเสริมที่มีสังกะสี สามารถลดความรุนแรงของอาการผิวหนังอักเสบและช่วยสมานบาดแผลได้ โดยที่ยังไม่ทราบ molecular target ที่ชัดเจน ผู้วิจัยตั้งสมมติฐาน

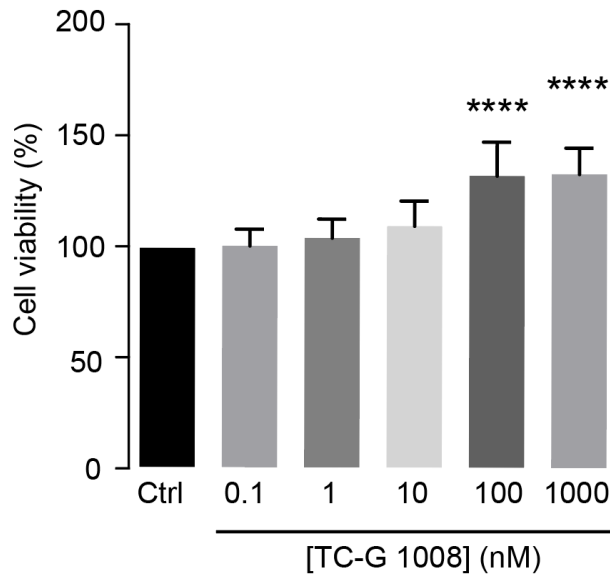
ว่า ผลของสังกะสีที่ช่วยลดอาการความผิดปกติทางผิวหนังเหล่านี้ อาจเกี่ยวข้องกับ GPR39 ซึ่งเป็นตัวรับของสังกะสีในผิวหนังมนุษย์ ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ใช้ TC-G 1008 ซึ่งเป็น GPR39 agonist เพื่อดูผลของการกระตุ้น GPR39 ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (immortalize human keratinocyte, HaCaT) โดยเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่า การกระตุ้น GPR39 จะสามารถเพิ่ม Calcium ในเซลล์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้การเพิ่มขึ้นของระดับ Calcium ในเซลล์เป็นการตัวบ่งบอกถึงการกระตุ้น GPR39 โดยใช้ Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye คือ Indo-1 พบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย TC-G-1008 (1 μM) fluorescent ratio ของ indo-1 เพิ่มขึ้น ดังรูปด้านล่าง และลดลงเมื่อมีการ pretreat ด้วย U73122 (phospholipase C inhibitor) (10) μM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้ยืนยันว่า TC-G-1008 สามารถกระตุ้น GPR39 ได้



รูปแสดง การกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของระดับ calcium ในเซลล์ HaCaT ผ่านโปรตีน phospholipase C โดยสาร TC-G 1008 (1 μM)

2) ผลของการกระตุ้น GPR39 ต่อ cell viability

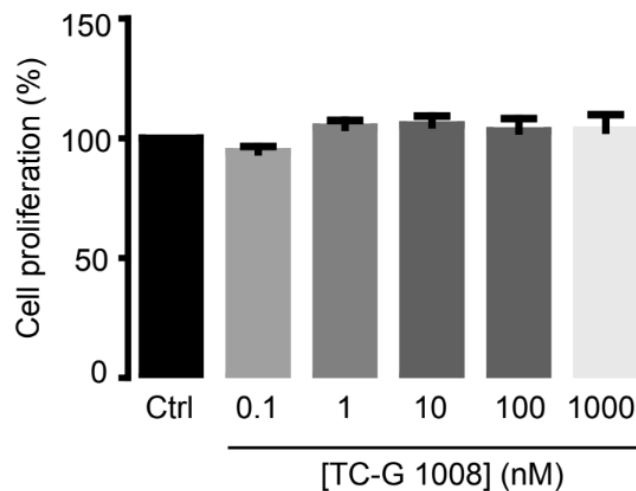
หนึ่งในการกลไกสำคัญของร่างกายในการสมานแผลที่ผิวหนัง คือ การเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ ในชั้นต้น ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของการกระตุ้น GPR39 กับ cell viability โดยใช้ Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide dye (MTT) ใน HaCaT cells ผลการทดลอง พบว่า เมื่อใส่ TC-G 1008 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 100 nM ($p < 0.0001$) และ 1000 nM ($p < 0.0001$) (รูปที่ 2)สรุปได้ว่า การกระตุ้น GPR39 สามารถเพิ่ม cell viability ซึ่งนำไปสู่การศึกษา การแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังในการทดลองต่อไป



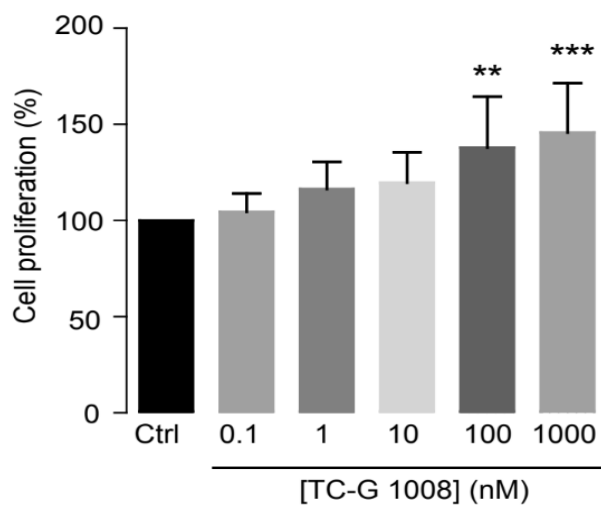
รูปแสดง ผลของการกระตุ้น GPR39 ด้วย TC-G 1008 ต่อ cell viability เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์ HaCaT

3) ผลของการกระตุ้น GPR39 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์

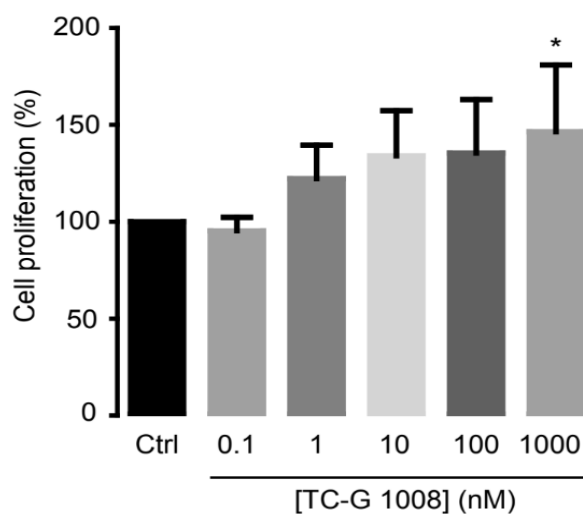
จากการทดลองข้างต้น หนึ่งในกลไกสำคัญของร่างกายในการสมานแผลที่ผิวหนัง คือ การเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ เพื่อศึกษาผลของ GPR39 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ผู้วิจัยวัดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย BrdU incorporation assay ผลการทดลอง พบว่า TC-G 1008 ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปด้านล่าง แต่มีฤทธิ์เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 100 nM ($p < 0.01$) และ 1 μ M ($p < 0.001$) ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และ 1 μ M ($p < 0.05$) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า การกระตุ้น GPR39 เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังมนุษย์



รูปแสดง ผลของการกระตุ้น GPR39 ด้วย TC-G 1008 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



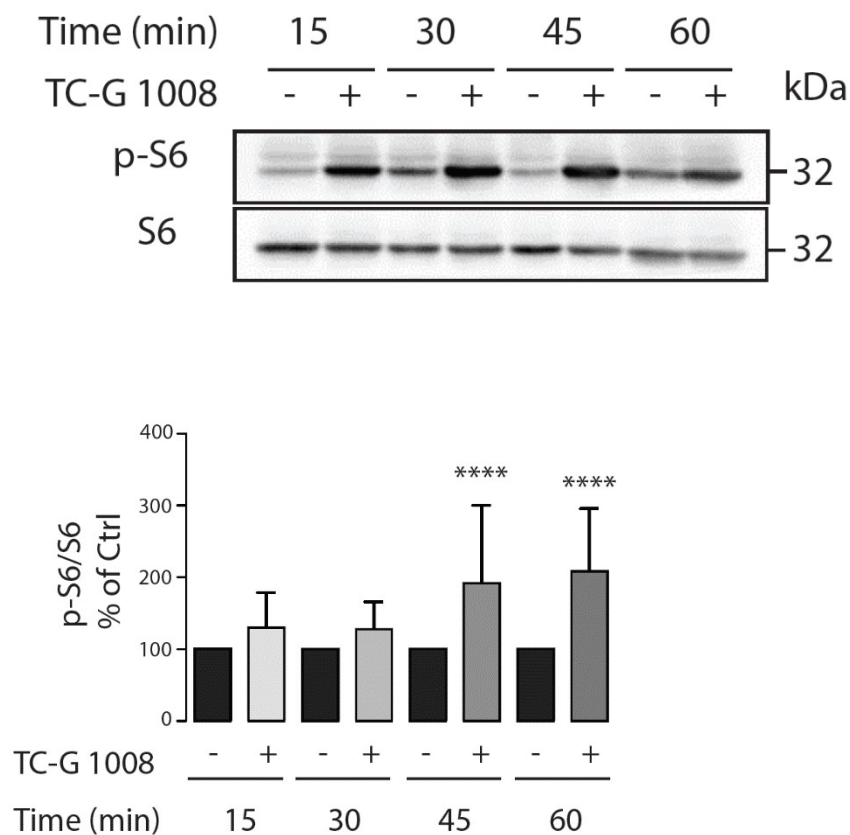
รูปแสดง ผลของการกระตุ้น GPR39 ด้วย TC-G 1008 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปแสดง ผลของการกระตุ้น GPR39 ด้วย TC-G 1008 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4). ผลของการกระตุ้นตัวรับสังกะสี GPR39 ต่อ mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation

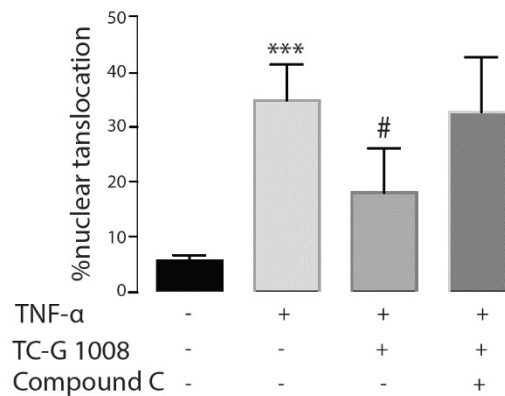
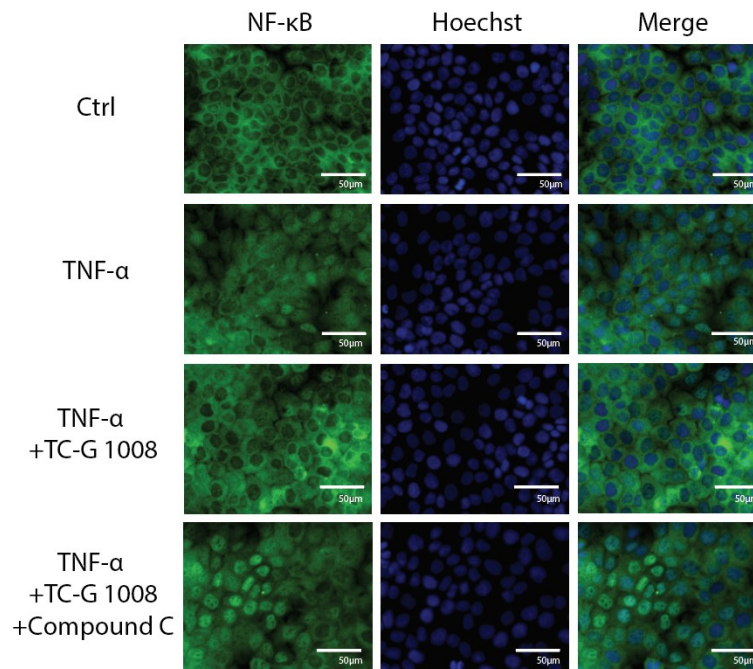
mTOR เป็นหนึ่งในโปรตีนที่สำคัญและมีบทบาทต่อการควบคุมการแบ่งเซลล์ (Cell proliferation) จากการทดลองก่อนหน้านี้ของผู้วิจัย พบว่าการกระตุ้นตัวรับสังกะสี GPR39 สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า การกระตุ้นตัวรับสังกะสี GPR39 ด้วยสาร TC-G 1008 อาจจะเพิ่มการแบ่งเซลล์ผิวหนังผ่านทางกระตุ้นโปรตีน mTOR ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของ ตัวกระตุ้น GPR39 ต่อ mTOR พบว่า TC-G 1008 ที่ความเข้มข้น 1 μM ซึ่งกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ได้ดีที่สุด เพิ่ม S6 phosphorylation (downstream ของ mTOR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นกับเวลาในการกระตุ้น



รูปแสดง ผลของการกระตุ้น GPR39 ด้วย TC-G 1008 1 μM ต่อ S6 phosphorylation ในเซลล์ HaCaT เป็นเวลา 15-60 นาที

5). ผลของการกระตุ้น GPR39 ต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์ผิวหนัง ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK

เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้น GPR39 ต่อการอักเสบของเซลล์ผิวหนัง ผู้วิจัยได้ศึกษาการเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสของโปรตีน NF-KB ใน HaCaT เมื่อกระตุ้นการอักเสบด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml พบว่า TC-G 1008 ที่ความเข้มข้น 1 μ M สามารถลดการเคลื่อนที่ของโปรตีน NF-KB เข้าไปในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะเดียวกัน ผลข้างต้นนี้ ถูกยับยั้งในสภาวะที่มี compound C หรือ Dorsomorphin (AMPK inhibitor) ที่ความเข้มข้น 80 μ M จึงสรุปได้ว่า TC-G 1008 ยับยั้งการอักเสบของเซลล์ผิวหนัง ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK



รูปแสดง Immunofluorescence staining ของโปรตีน NF-KB แสดงผลการยับยั้งการอักเสบของ TC-G 1008 ผ่านการกระตุ้นโปรตีน AMPK ใน HaCaT

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ผลงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยนี้ได้รับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 9 เรื่องอันได้แก่

1. **Muanprasat C***, Chatsudthipong V. Chitosan oligosaccharide: biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* (2017); 170:80-97 (Impact factor = 11.127)
2. Pongkorpsakol P, Satitsri S, Wongkrasant P, Chittavanich P, Kittayaruksakul S, Srimanote P, Chatsudthipong V, **Muanprasat C***. Flufenamic acid protects against intestinal fluid secretion and barrier leakage in a mouse model of *Vibrio cholerae* infection through NF-KB inhibition and AMPK activation. *Eur. J. Pharmacol.* (2017); 798:94-104 (Impact factor = 2.896)
3. Pongkorpsakol P, Moonwiriyaakit A, **Muanprasat C***. Fatty acid and mineral receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. *Future Med. Chem.* (2017); 9(3):315-334 (Impact factor = 3.556)
4. Kunanusornchai W, Witoonpanich B, Pichyangkura R, Chatsudthipong V, **Muanprasat C***. Chitosan oligosaccharide suppresses synovial inflammation via AMPK activation: An *in vitro* and *in vivo* study. *Pharmacol Res.* (2016); 113:458-467 (Impact factor = 4.816)
5. Pongkorpsakol P, Yimnual C, Chatsudthipong V, Rukachaisirikul V, **Muanprasat C***. Cellular mechanisms underlying the inhibitory effect of flufenamic acid on chloride secretion in human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Sci.* (2017); 134(2):93-100 (Impact factor = 2.415)
6. Muangnil P, Satitsri S, Tadpetch K, Saparpakorn P, Chatsudthipong V, Hannongbua S, Rukachaisirikul V, **Muanprasat C***. A fungal metabolite zearalenone as a CFTR inhibitor and potential therapy of secretory diarrheas. *Biochem Pharmacol.* (2018);150:293-304 (Impact factor 4.752)
7. Moonwiriyaakit A, Wattanaphichet P, Chatsudthipong V, **Muanprasat C***. GPR40 receptor activation promotes tight junction assembly in airway epithelial cells via AMPK-dependent mechanisms. *Tissue Barriers.* (2018); 18:1-26 (Impact factor 4.438)
8. Pongkorpsakol P, Buasakdi C, Chantivas T, Chatsudthipong V, **Muanprasat C***. An agonist of a zinc-sensing receptor GPR39 enhances tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol.* (2019) ;842:306-313 (Impact factor 3.170)
9. Moonwiriyaakit A, Koval M, **Muanprasat C***. Pharmacological stimulation of G-protein coupled receptor 40 alleviates cytokine-induced epithelial barrier disruption in airway epithelial Calu-3 cells. *Int Immunopharmacol.* 2019;73:353-361. (Impact factor 3.361)

2. สิทธิบัตร

ยื่นอนุสิทธิบัตรเรื่อง “วิธีการเตรียมสากสกัดจากพริกไทยดำที่มีฤทธิ์ยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ในเซลล์เยื่อบุลำไส้”
ยื่นเมื่อ 2 มีนาคม 2561 เลขที่คำขอ 1803000553

3. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

นำเสนอผลงานการวิจัยในการประชุม Experimental Biology 2017 ระหว่างวันที่ 22-26 เมษายน 2560 ณ เมืองชิคาโก ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 1 เรื่อง คือ “Flufenamic Acid Prevents *Vibrio cholerae* El Tor Variant-Induced Diarrhea via AMPK Activation and Suppression of NF- κ B Mediated Inflammation”

นำเสนอผลงานการวิจัยในการประชุม Experimental Biology 2019 ระหว่างวันที่ 6-9 เมษายน 2562 ณ เมืองออนแทรีโอ ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 2 เรื่อง คือ “Fructooligosaccharides induce tight junction assembly in intestinal epithelial cells via AMPK activation” และ “Effect of fructooligosaccharides on apoptosis and inflammation in enteroendocrine cells”

4. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

ไม่มี

5. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

1. มีความร่วมมือการวิจัยกับ Professor Mark Donowitz แห่งมหาวิทยาลัย Johns Hopkins University ในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำไส้มนุษย์ (Human enteroids) ผ่านการส่งนักศึกษาทุน คปก ไปปฏิบัติการวิจัยเป็นระยะเวลา 8 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – พฤษภาคม 2560

2. มีความร่วมมือในการพัฒนาแบบจำลองภาวะลำไส้อักเสบโดยใช้เชื้ออหิวาห์กับ ผศ. ดร. พจนีย์ ศรีมานิชญ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

3. มีความร่วมมือในการเตรียมสาร oligosaccharide ของ chitosan และ fructose กับ ผศ. ดร. รัฐ พิษณุวงกูร ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. รางวัลที่ได้รับ

รางวัล 2017 TRF-OHEC-Scopus Researcher Award สาขา Health Science จาก สกว. สกอ. และสำนักพิมพ์ Elsevier

7. นักศึกษาที่สำเร็จการศึกษา

1. ดร.ศราวุธ สาริตศรี ปริญญาเอก สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ดร.ปวินทร์ พงศ์กอบปรสกล ปริญญาเอก สาขาเวชศาสตร์ปริวรรต คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

3. ดร.ภราดร เมืองนิล ปริญญาเอก สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

4. ดร.เอกชา มุลวิริยะกิจ ปริญญาเอก สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

5. นายวัลลภ คุณานุสรณ์ชัย ปริญญาเอก สาขาวิทยาศาสตร์การออกกำลังกาย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล