



**โครงการ: ผลของยาต้านอักเสบต่อการอยู่รอด
ของเซลล์เพาะเลี้ยงรกชนิด cytotrophoblast
(เซลล์ BeWo และ JAR)**

โดย ดร.อริป นิลแก้ว และคณะ

พฤษภาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ผลของยาต้านอักเสบต่อการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงรกชนิด
cytotrophoblast (เซลล์ BeWo และ JAR)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.อริป นิลแก้ว

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ผศ.ดร.สุทธินิ ภูวนาถ

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การใช้ยาด้านอักเสบในระหว่างตั้งครรภ์นั้นพบได้บ่อย และใช้เพื่อการรักษาโรคต่างๆ ตั้งแต่รักษาอาการไข้ แก้ปวด จนถึงโรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้และโรคผิวหนัง การใช้อย่างกล่าวในปริมาณที่สูงมักส่งผลเสียต่อทั้งมารดาและทารกในครรภ์ ตัวอย่างของความผิดปกติของการตั้งครรภ์ที่เกิดจากการใช้ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ทารกเสียชีวิต ทารกน้ำหนักแรกเกิดต่ำ และพัฒนาการของทารกผิดปกติ ซึ่งพยาธิสภาพเหล่านั้นส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากการรบกวนพัฒนาการของรก อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับปฏิกิริยาของยากับเซลล์รกของคน ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ผู้ดำเนินโครงการวิจัยได้ศึกษาผลของยาด้านอักเสบ 6 ชนิดได้แก่ ยา aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, และ sulfasalazine ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์รกโทรโฟบลาสต์ของคน (JAR และ BeWo) ในแง่ผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ความเป็นพิษ การดำเนินของวงจรเซลล์ การกระตุ้นการตาย การแสดงออกของจีน และการรุกรแพร่ของเซลล์

จากการทดลองพบว่าในเซลล์ทั้งสองชนิดพบว่ายา indomethacin มีความเป็นพิษมากที่สุดและยา mesalamine มีความเป็นพิษน้อยที่สุดโดยเปรียบเทียบจากค่า IC50 กล่าวคือ ค่า IC50 ของยาในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ JAR มีค่าเป็น 69.35 µg/mL, 68.43 µg/mL, 10.96 µg/mL, 59.92 µg/mL, 17.31 µg/mL และ 69.35 µg/mL ในยา aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, และ sulfasalazine ตามลำดับ ส่วนในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ BeWo มีค่าเป็น 116.57 µg/mL, 80.48 µg/mL, 17.58 µg/mL, 192.54 µg/mL, 81.13 µg/mL และ 79.04 µg/mL ตามลำดับ ยาทุกชนิดส่งผลให้เซลล์มีการปล่อยเอนไซม์แล็กเตทดีไฮโดรจีเนสเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยาทุกชนิดมีผลยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ JAR แต่ไม่มีผลดังกล่าวต่อการเกาะติดของเซลล์ BeWo

การศึกษากลไกของยาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์พบว่ายาทุกชนิดมีผลทำให้การดำเนินวงจรเซลล์ช้าลง และทำให้เกิดการตายในที่สุดโดยยาทุกชนิดมีผลกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในการศึกษาผลของยาต่อการแสดงออกของจีนที่สร้างฮอร์โมน hCG พบว่า ยาทุกตัวมีแนวโน้มทำให้การแสดงออกของจีนลดลง เช่นเดียวกับจีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย *bax* และ *bcl-2* นอกจากนี้พบว่าดังกล่าวยายังการรุกรแพร่ของเซลล์รกได้อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบค่า IC50 และค่าช่วงความเข้มข้นของยาเหล่านี้กับค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารกพบว่าค่า IC50 ของยา aspirin มีค่าต่ำกว่าค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารกประมาณ 25-40 เท่า ส่วน IC50 ของยา naproxen นั้นมีค่าเป็น 0.25-1.2 เท่าของค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารก จากค่าดังกล่าวนี้เองน่าจะแสดงให้เห็นว่าการใช้ยาทั้งสองชนิดนี้นั้นควรต้องเป็นไปอย่างระมัดระวัง ส่วน IC50 ของยาที่เหลือในการทดลองนี้นั้นมีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายา dexamethasone, indomethacin, mesalamine และ sulfasalazine น่าจะปลอดภัยต่อการตั้งครรภ์มากกว่ายา aspirin และ naproxen อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มักก่อให้เกิดผลร้ายแรงต่อการตั้งครรภ์ถ้าใช้ในไตรมาสสุดท้ายหรือใกล้คลอดบุตร

เมื่อกล่าวโดยรวมแล้วผลการทดลองจากงานวิจัยชิ้นนี้ได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ยาต่างชนิดที่มีโครงสร้างโมเลกุลของต่างกัน แต่มีกลไกทางเภสัชวิทยาที่คล้ายกันนั้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์รกได้ต่างกัน กลไกของความเป็นพิษต่อเซลล์รกรุนก่อนข้างคล้ายกัน ข้อมูลจากการทดลองนี้น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในอนาคตและในการใช้ยาในขณะตั้งครรภ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อลดผลเสียต่อการตั้งครรภ์ให้มากที่สุด

คำหลัก: เซลล์รกไซโทรโทรโฟบลาสต์, ยาด้านอักเสบ, การเพิ่มจำนวนเซลล์, การเกาะติดของเซลล์, ความเป็นพิษต่อเซลล์, การดำเนินของวงจรเซลล์, การตายของเซลล์, การแสดงออกของจีน, การรุกรแพร่, ยา aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, sulfasalazine

ABSTRACT

Anti-inflammatory drugs are among the most frequently used medication during pregnancy. The drugs are beneficial for treatment of several symptoms, including fever, pain, arthritis, autoimmunity and colitis. High doses of the drugs often result in maternal and fetal morbidity and mortality. Examples of the adverse outcomes of pregnancy after taking the drugs are perinatal mortality, intrauterine growth retardation, and birth defect from drug teratogenic effects. Pathogenesis of these disorders is partially attributed to interference of placental development by the drugs. However, there is no report demonstrating the interaction of these drugs with human placenta cells. In this study, we therefore determined the effects of aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen and sulfasalazine on human placental trophoblast cell lines (JAR and BeWo) for cell proliferation, cell adhesion, cytotoxicity, cell cycle progression, cell death, gene expression and cell invasion.

By comparing the IC₅₀ value for cell proliferation, indomethacin exerts the most toxicity while mesalamine is the least cytotoxic drug to cytotrophoblast cell lines. IC₅₀ values of these drugs on JAR cell proliferation are 69.35 µg/mL, 68.43 µg/mL, 10.96 µg/mL, 59.92 µg/mL, 17.31 µg/mL and 69.35 µg/mL for aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, and sulfasalazine, respectively. IC₅₀ values of these drugs on BeWo cell proliferation are 116.57 µg/mL, 80.48 µg/mL, 17.58 µg/mL, 192.54 µg/mL, 81.13 µg/mL and 79.04 µg/mL, respectively. In a related experiment, all drug treatments resulted in increase of lactate dehydrogenase to the conditioned media. In addition, all drugs treatments reduced JAR cells, but not BeWo cells, adhesion during the first 3 hours of drug exposure.

Further analysis on the effects of these drugs on trophoblast cell cycle progression revealed that all drug treatments resulted in a delayed cell cycle, followed by the induction of apoptosis cell death. In addition, we also demonstrated that all drugs decreased human chorionic gonadotropin gene expression, as well as *bax* and *bcl-2*. Also, we demonstrated that all drug treatments resulted in a decrease cell invasion.

By comparing the IC₅₀ values of trophoblast proliferation, IC₅₀ of aspirin is 25-40 times lower, and IC₅₀ of naproxen is 0.25-1.2 times lower than their corresponding drug fetal plasma concentrations. This indicates that the usage of aspirin and naproxen should be highly cautious. IC₅₀ of dexamethasone, indomethacin, mesalamine and sulfasalazine are higher than their corresponding drug fetal plasma concentrations. This may indicate that dexamethasone, indomethacin, mesalamine and sulfasalazine are alternative drug of choice other than aspirin and naproxen. However, the usage of these drugs may result in adverse outcome of pregnancy, if use during the 3rd trimester or near delivery.

In conclusion, results from our research project clearly demonstrate, for the first time, that different anti-inflammatory drugs with different molecular structures, however have similar pharmacological actions, exert different degree of toxicity to human placental cells. Our data are definitely beneficial for the future study and the usage of these drugs during pregnancy.

Keywords: cytotrophoblast, anti-inflammatory drugs, cell proliferation, cell adhesion, cytotoxicity, cell cycle progression, cell death, gene expression, invasion, aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, sulfasalazine

EXECUTIVE SUMMARY

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

รก (placenta) เป็นอวัยวะที่มีลักษณะแบนและมีด้านหนึ่งเชื่อมติดกับมดลูก (uterus) และอีกด้านหนึ่งเชื่อมต่อกับตัวอ่อน (fetus) โดยสายสะดือ (umbilical cord) เนื้อเยื่อรกถูกหล่อเลี้ยงด้วยระบบเลือดของตัวอ่อน รกทำหน้าที่สำคัญและขาดไม่ได้สำหรับการตั้งครรภ์ เนื่องจากรกทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาหลายประการที่จำเป็นสำหรับการอยู่รอดของตัวอ่อน เริ่มตั้งแต่กระบวนการฝังตัว (blastocyst implantation) จนถึงการคลอด ตัวอย่างเช่น รกทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างตัวอ่อนและแม่ ส่งผ่านน้ำ สารอาหาร แอนติบอดี และยาจากแม่ไปยังตัวอ่อน ทำหน้าที่ในการกำจัดของเสียจากตัวอ่อน นอกจากนี้ยังทำหน้าที่สำคัญในการสร้างฮอร์โมนที่จำเป็นอย่างยังต่อการตั้งครรภ์ได้แก่ ฮอร์โมน human choriongonadotropin (hCG) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และเอสโตรเจน (estrogen)

เนื้อเยื่อรกประกอบขึ้นมาจากเซลล์หลายประเภท โดยชั้นนอกสุดของรกที่อยู่ใกล้ชิดกับระบบเลือดของแม่นั้นเป็นเซลล์รกชนิดซินซิโอโทรโฟบลาสต์ (syncytiotrophoblast) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมีหลายนิวเคลียส เซลล์นี้ทำหน้าที่หลักในการตอบสนองต่อการตอบสนองต่างๆจากแม่ และเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมน hCG เซลล์ชนิดนี้พัฒนามาจากเซลล์ไซโตโทรโฟบลาสต์ (cytotrophoblast) ที่อยู่ในชั้นถัดไปนั่นเอง เซลล์มีเซนไคมัล (mesenchymal) ที่อยู่ในชั้นถัดไปนั้นทำหน้าที่หลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์เอนโดทีเลียล (endothelial) ที่ประกอบตัวกับเป็นเส้นเลือดเล็กในรก นอกจากนี้ในรกรังยังมีเซลล์ฮอฟbauer (Hofbauer) ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) การศึกษาสมบัติ กลไกการพัฒนารก และการอยู่รอดของเซลล์เหล่านี้นับว่ามีประโยชน์ทางด้านการแพทย์โดยเฉพาะการตั้งครรภ์เป็นอย่างมาก และสามารถอธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพในเกิดจากความผิดปกติของการพัฒนารก รวมทั้งการกำเนิดของมะเร็งรกหรือการก่อให้เกิดภาวะ IUGR (intrauterine growth retardation) หรือการเกิด miscarriage ได้

การใช้ยาต้านอักเสบในช่วงระหว่างตั้งครรภ์นั้นพบได้บ่อยแม้ว่ายาบางตัวไม่เหมาะสม เนื่องจากยาในกลุ่มนี้สามารถจัดซื้อได้ง่ายและราคาไม่แพง และเป้าหมายหลักของการใช้ยาคือการรักษาอาการไข้ ปวดศีรษะ หรือไข้บรรเทาอาการปวดจากโรคที่เกิดจากปฏิกิริยาการอักเสบ การใช้ยาในขนาดที่ไม่เหมาะสมย่อมส่งผลเสียต่อการตั้งครรภ์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาปฏิกิริยาของยาต้านอักเสบต่อความอยู่รอดของเซลล์รกของคน ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจะศึกษาผลของยาต้านอักเสบ ต่อการเพิ่มจำนวน ระดับความเป็นพิษ วงจรเซลล์ การกระตุ้นการตายของเซลล์ และการแสดงของของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และกระบวนการ differentiation ของเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์ (เซลล์ JAR และ BeWo) ในระดับ *in vitro*

2. วัตถุประสงค์

- 2.1. เพื่อศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการเกาะติดของเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์
- 2.2. เพื่อศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์
- 2.3. เพื่อศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการดำเนินของวงจรเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์
- 2.4. เพื่อศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการกระตุ้นกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์
- 2.5. เพื่อศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการรุกรานแพร่กระจายของเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์
- 2.6. เพื่อศึกษาผลของยาต้านอักเสบการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายและ differentiation ของเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์

3. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะดำเนินการทดลองโดยใช้ยาต้านอักเสบทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ aspirin, dexamethasone, indomethacin, naproxen, mesalamine และ sulfasalazine โดยทำการศึกษาในเซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์ 2 ชนิดคือ JAR cells และ BeWo cells

เซลล์ JAR และเซลล์ BeWo เป็นเซลล์มะเร็งรกและจัดเป็นเซลล์รกไซโตโทรโพลาสต์ สามารถผลิต estrogen , progesterone , gonadotrophin และ lactogen ได้ โดยซื้อเซลล์นี้จาก ATCC, Manassas, VA นำมาเพาะเลี้ยงใน RPMI-1640 สำหรับเซลล์ JAR และอาหาร DMEM/F-12 สำหรับเซลล์ BeWo ที่เติม FBS (fetal Bovine Serum) 10% และยาปฏิชีวนะชนิด penicillin G 100 unit/mL, streptomycin sulfate 100 µg/mL และ amphotericin B 0.25 µg/mL บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

๑. การศึกษาผลยาต้านอักเสบต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวิธี MTT

การศึกษานี้เป็นการทดสอบระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ใช้ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์รกโดยวิธี MTT Assay ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถใช้เพื่อศึกษาทั้งปริมาณเซลล์ที่เกาะติดกับภาชนะ การเติบโต การเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide MTT) ซึ่งมีสีเหลืองเป็น formazan salt ซึ่งไม่ละลายน้ำ ด้วย succinate-tetrazolium reductase system ซึ่งพบในกระบวนการ respiratory chain ใน mitochondria ของเซลล์ ตะกอนของ formazan salt สามารถละลายได้ในสารละลายที่เฉพาะ เกิดเป็นสารละลายสีม่วง และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorption) ได้ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm ค่าการดูดกลืนที่ได้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งเป็นเซลล์ที่เกาะติดกับภาชนะเพาะเลี้ยง

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์รก (10,000 เซลล์/หลุม) ปริมาณ 200 µL ของอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 96-well tissue culture plate ชนิดกันแบนที่เคลือบด้วย collagen I และในอาหารเลี้ยงเซลล์มียาต้านอักเสบที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นละ 6 ขั้ว) บ่มเซลล์ที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ และไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเติม 20 µL สารละลาย MTT (5 mg/mL) บ่มเซลล์ต่ออีก 4 ชั่วโมง ตะกอนของ formazan salt ที่เกิดขึ้นจะถูกทำลายโดยใช้สารละลายตะกอน เกิดเป็นสารละลายสีม่วง แล้ววัดค่า optical density ของสารละลายที่ความยาวคลื่น 595 nm ค่า absorption value ของสารละลายมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลล์ ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลด้วย One Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม แล้วคำนวณค่า IC₅₀ (Inhibitory concentration 50 %)

๒. การศึกษาความเป็นพิษของยาต้านอักเสบต่อเซลล์โดยการวัดเอนไซม์ LDH

Lactate dehydrogenase (LDH) เป็น stable cytoplasmic enzyme และจะถูกหลั่งมานอกเซลล์เมื่อมีการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) หรือ มีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ดังนั้นตรวจวัด LDH สามารถบอกลักษณะของผลยาต้านอักเสบต่อเซลล์ได้ ว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นหรือไม่ และการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองที่ ๑

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์และทดสอบเช่นเดียวกับในการศึกษาในข้อ ๑ แล้วแยกเฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ออกมาโดยนำจานอาหารเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำ 100 µL ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไปบ่มร่วมกับ 100 µL ของ reaction mixture ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 50 µL ของ 1 N HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นวัดค่า optical density ของสารละลายด้วย ELISA-readers ที่ 490 nm ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ด้วย One Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ LDH ที่หลั่งนอกเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม

๓. การศึกษาผลยาต้านอักเสบต่อการเกาะติดของเซลล์รกไซโตโทรโพลาสต์

การศึกษานี้เป็นการทดสอบผลของยาต้านอักเสบต่อการเกาะติดพื้นที่ผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ถึงความน่าจะเป็นที่จะเกิดขึ้นในระดับ *in vivo* ถึงผลของยาต่อการเกาะติดของเซลล์กับผนังมดลูกทั้งในระยะที่เกี่ยวข้องกับการฝังตัวของตัวอ่อนและระยะการพัฒนารก (implantation/placentation)

วิธีการทดลอง ถ่ายเซลล์รก (10,000 เซลล์/หลุม) ในปริมาณ 200 µL ของอาหารเลี้ยงเซลล์ ใน 96-well tissue culture plate ชนิดกันแบน และในอาหารเลี้ยงเซลล์มียาต้านอักเสบที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นละ 6 ขั้ว) บ่มเซลล์ที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วค่อยๆ ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS แล้วเติม

สารละลาย MTT บ่มเซลล์ต่ออีก 4 ชั่วโมง ตะกอนของ formazan salt ที่เกิดขึ้นจะถูกทำลายโดยใช้สารละลายตะกอน เกิดเป็นสารละลายสีม่วง แล้ววัดค่า optical density ของสารละลายที่ความยาวคลื่น 595 nm ค่า absorption value ของสารละลายมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้นหลุม ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลด้วย One Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่เกาะที่ก้นหลุมระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม

๔. การศึกษาผลของยาด้านอักษะต่อวงจรเซลล์รกไซโตโทโรโพลาสต์

เป็นการศึกษาผลยาด้านอักษะต่อวงจรเซลล์รก โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของ cell cycle (G_0/G_1 , S, G_2 และ M) กับกลุ่มควบคุม ด้วยการศึกษาปริมาณของ DNA ภายในเซลล์ที่ย้อมด้วย propidium iodide ณ เวลาต่างๆ กัน ด้วย flow cytometry และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และการศึกษาสามารถบอกกลไกของยาต่อเซลล์ได้ว่าเป็นการกระตุ้นหรือยับยั้งวงจรเซลล์

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์รกใน 6-well tissue culture plate ด้วย 2 mL ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 80% แล้ว synchronize เพื่อให้เซลล์ทั้งหมดเริ่มต้นอยู่ในระยะเดียวกัน ด้วยวิธีการดซึ่ม และการใช้สารเคมี hydroxyurea เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำให้เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ S แล้วจึงกระตุ้นวงจรเซลล์ต่อด้วยการใช้ 2% FBS (กลุ่มควบคุม) หรือ FBS และยาด้านอักษะที่ความเข้มข้น IC_{50} ทำการย้อม DNA ด้วย propidium iodide ณ เวลาต่างๆ กัน และตรวจนับเซลล์ (30,000 เซลล์) ด้วย flow cytometer และวิเคราะห์และเปรียบเทียบระยะต่างๆ ของเซลล์ด้วยสถิติ One Way ANOVA ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วยยาด้านอักษะ

๕. การศึกษาผลของยาด้านอักษะต่อการกระตุ้นกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์รกไซโตโทโรโพลาสต์

การศึกษาการแตกหักของ DNA

การแตกหักของ DNA (DNA laddering) เป็นลักษณะสำคัญของการเกิด apoptosis สามารถเห็นได้โดยการสกัด DNA แล้วนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide จะสามารถมองเห็นแถบชิ้นส่วนแตกหักของ DNA ได้ภายใต้แสง UV การศึกษานี้จะบอกผลของยาด้านอักษะต่อการกระตุ้นการตายของเซลล์ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การศึกษากลไกละเอียดได้ในอนาคต และจะเป็นข้อมูลทางการใช้ยาด้านอักษะอย่างปลอดภัยในระหว่างตั้งครรภ์ได้

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์ใน 6-well tissue culture plate ด้วย 2 mL ของอาหารเลี้ยงเซลล์ และ 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 80-90% แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ด้วย RPMI-1640 ที่มียาด้านอักษะความเข้มข้นเดียวกันกับการทดลอง ๑ รวมอยู่ด้วย แล้วบ่มเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง และสกัด DNA เพื่อวิเคราะห์การแตกหักโดยการแยกใน agarose gel electrophoresis

การยืนยันการเกิด Apoptosis ด้วย apoptosis detection kit

วิธีการนี้อาศัย Terminal deoxy nucleotidyl transferase (TdT) ที่สามารถเติม nucleotide ไปยังส่วน fragmented DNA ในนิวเคลียสของเซลล์ สามารถตรวจวัดการเรืองแสงได้ด้วย fluorescence microscope

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์ใน 6-well tissue culture plate ที่มีแผ่นสไลด์แก้ว ด้วย 2 mL ของ ยางเซลล์อาหารเลี้ยงที่มี FBS 10% จนเซลล์มีความหนาแน่นเพียงพอ แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มียาด้านอักษะในความเข้มข้นที่สอดคล้องกับการทดลองข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างสไลด์แก้วด้วย PBS ทำการตรึง แผ่นสไลด์แก้วด้วยสารละลาย 3.7% paraformaldehyde ที่เตรียมใหม่ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS อีกครั้ง นำไปบ่มเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย permeabilisation เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นสไลด์แก้วด้วย washing buffer แล้วบ่มเลี้ยงเซลล์ต่อกับ TdT reaction mixture เป็นเวลา 60 นาที ที่ 37°C แล้วหยุดปฏิกิริยา แล้วบ่มเลี้ยงเซลล์กับ streptavidin-FITC เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS อีกครั้งหนึ่ง ตรวจวัดการเรืองแสงได้ด้วย fluorescence microscope เซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis นั้นนิวเคลียสจะย้อมติดสีเขียวของ FITC

๖. การศึกษาผลยาต้านอักเสบต่อการแสดงออกของจีน

การศึกษาการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์

จีนสองจีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์และจะนำมาศึกษาในครั้งนี้คือ *bax* (เป็นจีนที่สร้างโปรตีน Bax ที่ชักนำสู่กระบวนการการตาย) และ *bcl-2* (เป็นจีนที่สร้างโปรตีน Bcl-2 ที่ยับยั้งกระบวนการการตาย) ในกระบวนการการชักนำการตายของเซลล์นั้นขึ้นกับสมดุลของโปรตีนที่ชักนำและยับยั้งการตาย การศึกษานี้สามารถบอกแนวโน้มและสามารถใช้ยืนยันผลที่สอดคล้องกับการทดลองอื่นได้ โดยการใช้วิธี RT-PCR ขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วย การสกัด RNA โดยวิธี acid-guanidine thiocyanate phenol/chloroform extraction (หรือชุดน้ำยาสกัด) จากเซลล์เพาะเลี้ยง การสังเคราะห์ cDNA และการเพิ่มจำนวน DNA

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์มีปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อที่จะศึกษาการแสดงออกของจีน *bax* และ *bcl-2* เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มียาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง แล้วสกัด RNA เพื่อการศึกษาการสร้าง mRNA ต่อไป สำหรับ primers ที่ใช้คือ

จีน	Primers	ขนาดของ PCR product
<i>bax</i>	Upstream: 5' GGC CCA CCA GCT CTG AGC AGA 3' Downstream: 5' GCC ACG TGG GCG TCC CAA AGT 3'	479 bp
<i>bcl-2</i>	Upstream: 5' GTG GAG GAG CTC TTC AGG GA 3' Downstream: 5' AGG CAC CCA GGG TGA TGC AA 3'	304 bp
<i>g3pdh</i> (house keeping gene)	Upstream: 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3' Downstream: 5' CAT GTG GGC ATG AGG TCC ACC AC 3'	983 bp

การศึกษาการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ differentiation ของเซลล์

เซลล์รกไซโตโทรโฟบลาสต์ นั้นเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ differentiation จะมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณวิทยาเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีหลายนิวเคลียส ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์หลายเซลล์มารวมกัน เซลล์ที่มีลักษณะใหม่นี้มีชื่อเรียกว่า syncytiotrophoblast ซึ่งสามารถตรวจพบได้เป็นเซลล์ชั้นนอกสุดของเนื้อเยื่อรก เซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมน hCG ที่มีความจำเป็นต่อการตั้งครรภ์ ดังนั้นฮอร์โมนชนิดนี้สามารถใช้เป็น molecular marker ของกระบวนการ differentiation ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการสร้าง mRNA ของ hCG โดยการใช้วิธี RT-PCR

วิธีการทดลอง เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์มีปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อที่จะศึกษาการแสดงออกของจีน α -hCG และ β -hCG เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มียาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง แล้วสกัด RNA เพื่อการศึกษาการสร้าง mRNA ต่อไป สำหรับ primers ที่ใช้คือ

จีน	Primers	ขนาดของ PCR product
α -hCG	Upstream: 5' TGC AGG ATT GCC CAG AAT GC 3' Downstream: 5' CCG TGT GTT CTC CAC TTT G 3'	233 bp
β -hCG	Upstream: 5' TGG CTG TGG AGA AGG AGG GC 3' Downstream: 5' GGA AGC GGG GGT CAT CAC AG 3'	300 bp
<i>g3pdh</i> (house keeping gene)	Upstream: 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3' Downstream: 5' CAT GTG GGC ATG AGG TCC ACC AC 3'	983 bp

๗. การศึกษาผลยาต้านอักเสบต่อการรุกราน (invasion) ของเซลล์รกไซโตโทรฟوبลาสต์

การศึกษานี้ทำโดยการใช่วิธี Modified Boyden Chamber invasion assay เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาสมบัติ invasiveness ของเซลล์มะเร็งได้โดยอาศัยการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในภาชนะที่แบ่งเป็นสองส่วน (chambers) และทั้งสองส่วนถูกกั้นด้วยเมมเบรนที่สามารถให้เซลล์ผ่านได้เนื่องจากมีรูขนาด 8 μm อยู่

วิธีการทดลอง ทำการเลี้ยงเซลล์บนภาชนะส่วนบนที่เคลือบไว้ด้วย collagen R แล้ว ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และในส่วนล่างของภาชนะมีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาต้านการอักเสบที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นละ 2 ขั้ว) แล้วบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงถอดภาชนะส่วนบนออก ใช้ไม้พันก้านสำลีเช็ดเซลล์ที่อยู่ด้านบนของเมมเบรนออก แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่แบบ semi-qauntitative ด้วยวิธี MTT จากนั้นย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเล็ตและถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัล ทำการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์จากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วยยาต้านอักเสบด้วยสถิติ One Way ANOVA

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

แผนงาน	มิ.ย.48–พ.ย.48	ธ.ค.48–พ.ค.49	มิ.ย.49–พ.ย.49	ธ.ค.49–พ.ค.50
การเกาะติดของเซลล์	←→			
การเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษ	←→			
ศึกษาวางจรเซลล์		←→		
ศึกษาการตายของเซลล์		←→		
ศึกษาการแสดงออกของจีน			←→	
ศึกษาสมบัติการรุกรานกระจาย				←→
เตรียมรายงาน				←→

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Effect of anti-inflammatory drugs on choriocarcinoma cell line JAR.

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Reproductive Toxicology และ Impact Factor = 1.868 หรือวารสารอื่น

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Cytotoxic effect of anti-inflammatory drugs on human placental BeWo cells.

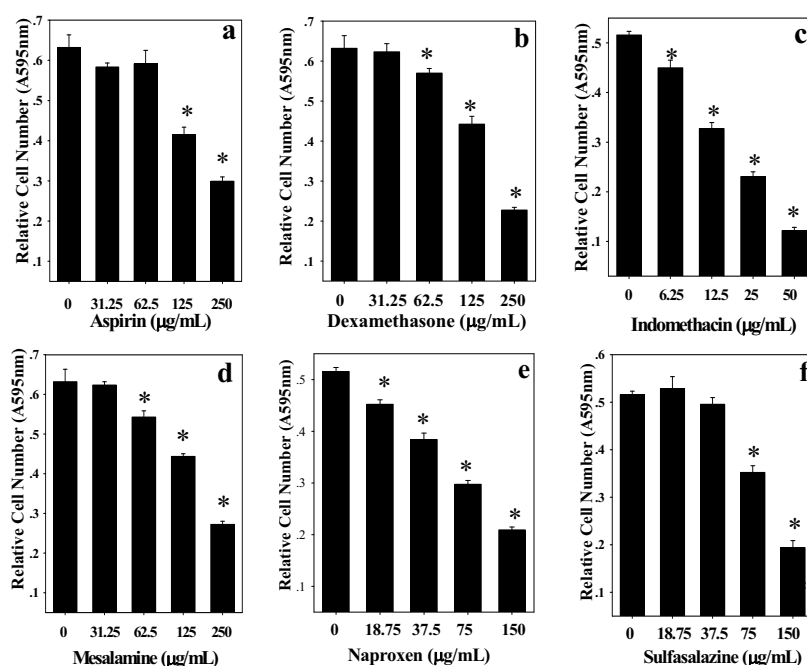
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Reproductive Toxicology และ Impact Factor = 1.868 หรือวารสารอื่น

เนื้อหาทงานวิจัย

๑. การศึกษาผลยาต้านอักเสบต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์รกไฮโดรโทโพลาสต์

ในการศึกษาที่ใช้เซลล์รก BeWo นั้น เมื่อเปรียบเทียบผลของยาต้านอักเสบแต่ละชนิดต่อจำนวนของเซลล์ที่ลดลง (%) ดังรูปที่ 1 พบว่ายา aspirin ที่ระดับความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, และ 250 $\mu\text{g/mL}$ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 7.73, 6.47, 34.28, และ 52.70 % ตามลำดับ ยา dexamethasone ที่ระดับความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, และ 250 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง 1.4, 9.83, 29.37 และ 64.05% ตามลำดับ ยา indomethacin ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง 12.79, 36.55, 55.27 และ 76.39% ตามลำดับ ยา mesalamine ที่ระดับความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, และ 250 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง 1.4, 14.14, 29.86 และ 36.94% ตามลำดับ

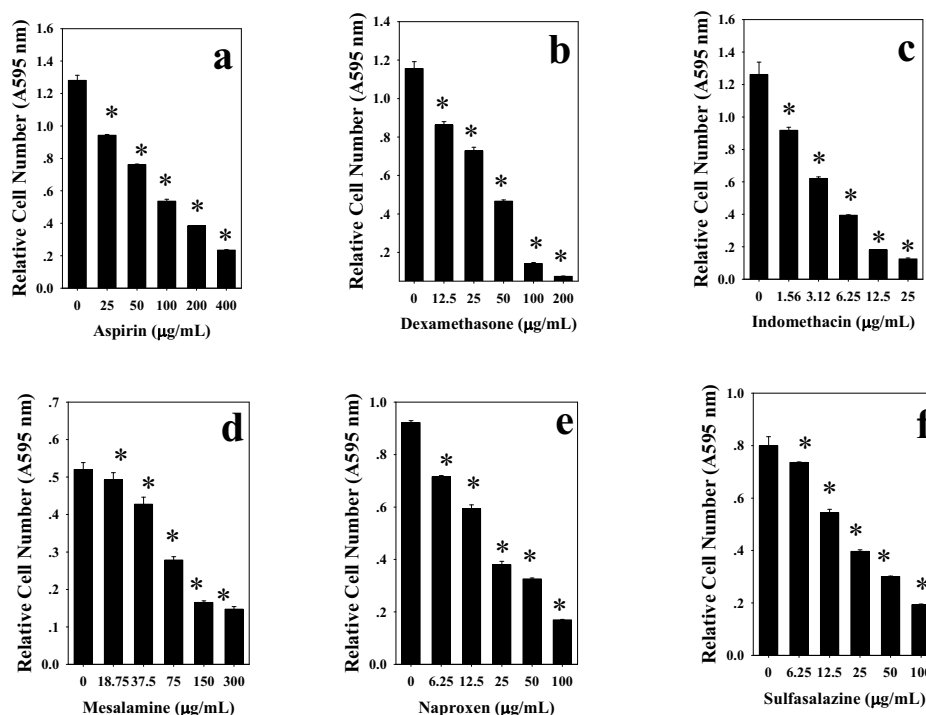
ยา naproxen ที่ระดับความเข้มข้น 18.75, 37.5, 75 และ 150 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 20.51, 25.51, 42.36 และ 59.44% ตามลำดับ และยา sulfasalazine ซึ่งมีความเข้มข้นเช่นเดียวกับยา naproxen ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 0, 4, 31.72, และ 62.4% ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายาต้านอักเสบทั้ง 6 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบ dose-dependent fashion โดย aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, และ sulfasalazine มีค่า IC_{50} 116.57, 80.48, 17.58, 192.54, 81.13, และ 79.04 $\mu\text{g/mL}$ โดยยา indomethacin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงสุด



รูปที่ 1 ผลของยาต้านอักเสบต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์ BeWo 10^4 เซลล์ต่อหลุม (96-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% และความเข้มข้นของยาต้านอักเสบจาก 0-250 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้ววัดปริมาณเซลล์ (Mean OD $\pm$ S.E.M) โดยวิธี MTT และเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method), a= aspirin, b= dexamethasone, c= indomethacin, d= mesalamine, e= naproxen, f= sulfasalazine

ในการศึกษาที่ใช้เซลล์รก JAR เมื่อเปรียบเทียบผลของยาต้านอักเสบแต่ละชนิดต่อจำนวนของเซลล์ JAR ที่ลดลง (%) ดังรูปที่ 2 พบว่ายา aspirin ที่ระดับความเข้มข้น 25.00, 50.00, 100.00, 200.00 และ 400.00 $\mu\text{g/mL}$ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 26.41, 40.45, 58.07, 70.00 และ 81.76 % ตามลำดับ ยา dexamethasone ที่ระดับความเข้มข้น 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ลดลง 24.91, 36.67, 59.48, 87.70 และ 90.43% ตามลำดับ ยา indomethacin ที่ระดับความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.50 และ 25.00 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ลดลง 27.16, 50.73, 68.75, 85.65 และ 90.08% ตามลำดับ ยา mesalamine ที่ระดับความเข้มข้น 18.75, 37.50, 75.00, 150.00 และ 300.00 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ลดลง 5.22, 17.78, 46.47, 68.20 และ 71.63% ตามลำดับ

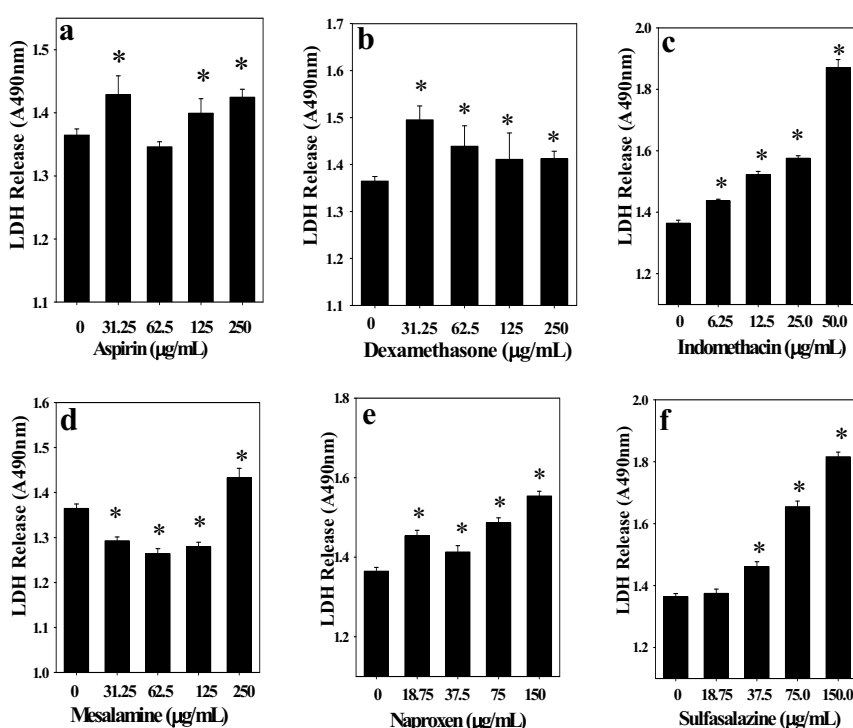
ยานaproxen ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 และ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 22.37, 35.37, 59.27, 64.64 และ 81.59% ตามลำดับ และยา sulfasalazine ซึ่งมีความเข้มข้นเช่นเดียวกับยา naproxen มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 8.00, 32.00, 50.40, 62.43 และ 75.81% ตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายาต้านอักเสบทั้ง 6 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR แบบ dose-dependent fashion โดย aspirin, dexamethasone, indomethacin, mesalamine, naproxen, และ sulfasalazine มีค่า IC_{50} 69.35, 68.43, 10.96, 59.92, 17.31, และ 16.93 $\mu\text{g/mL}$ โดยพบว่ายา indomethacin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR สูงสุด



รูปที่ 2 ผลของยาต้านอักเสบต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR 10^4 เซลล์ต่อหลุม (96-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี FBS 0.5% และความเข้มข้นของยาต้านอักเสบจาก 0-400 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้ววัดปริมาณเซลล์ (Mean OD $\pm$ S.E.M) โดยวิธี MTT และเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method), a= aspirin, b= dexamethasone, c= indomethacin, d= mesalamine, e= naproxen, f= sulfasalazine

๒. การศึกษาความเป็นพิษของยาต้านอักเสบต่อเซลล์โดยการวัดเอนไซม์ LDH

ในการศึกษาที่ใช้เซลล์รก BeWo นั้น ในการศึกษาความเป็นพิษของยาต้านอักเสบต่อเซลล์โดยการตรวจวัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (ดังรูปที่ 3) พบว่ายาต้านอักเสบทุกชนิดมีผลต่อการหลั่งของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในยา aspirin ระดับของ LDH เพิ่มขึ้นประมาณ 5% ที่ระดับความเข้มข้น 31.25 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในยา dexamethasone ระดับของ LDH เพิ่มขึ้นประมาณ 10 % ที่ระดับความเข้มข้น 31.25 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยา indomethacin ระดับของ LDH เพิ่มขึ้นประมาณ 15 % ที่ระดับความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ ยา mesalamine ระดับของ LDH เพิ่มขึ้นประมาณ 5 % ที่ระดับความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ ในยา naproxen ระดับของ LDH เพิ่มขึ้นประมาณ 14 % ที่ระดับความเข้มข้น 150 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนยา sulfasalazine ระดับของ LDH เพิ่มขึ้นประมาณ 33 % ที่ระดับความเข้มข้น 150 $\mu\text{g/mL}$ จากผลการทดลองนี้เนื่องจากระดับของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับยา ประกอบทั้งจากผลการทดลองของการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ลดลง สามารถสรุปได้ว่าการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยยาต้านอักเสบนั้นส่วนหนึ่งเกิดจากการกระตุ้นการตายของเซลล์



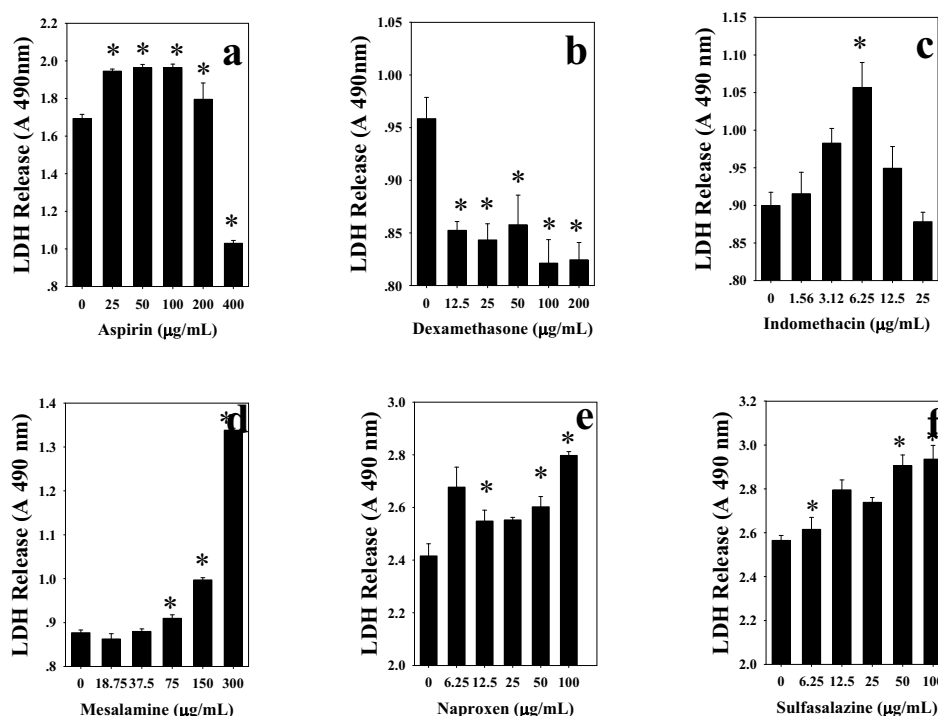
รูปที่ 3 ความเป็นพิษของยาต้านอักเสบต่อเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์ BeWo 10^4 เซลล์ต่อหลุม (96-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% และความเข้มข้นของยาต้านอักเสบจาก 0-250 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้ววัดปริมาณ LDH (Mean OD $\pm$ S.E.M) ที่หลั่งจากเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี LDH Assay และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุมโดยวิธี One Way ANOVA (Dunnnett's method), a= aspirin, b= dexamethasone, c= indomethacin, d= mesalamine, e= naproxen, f= sulfasalazine

ในการศึกษาความเป็นพิษของยาต้านอักเสบต่อเซลล์ JAR โดยการตรวจวัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (ดังรูปที่ 4) พบว่ายา aspirin ที่ระดับความเข้มข้น 25.00, 50.00, 100.00, 200.00 และ 400.00 $\mu\text{g/mL}$ ระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้นที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ระดับ LDH ลดลงเนื่องจากปริมาณเซลล์เหลือน้อย, ยา indomethacin ที่ระดับความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.50 และ 25.00 $\mu\text{g/mL}$ ระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 6.25 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เพียงความเข้มข้นเดียว, ยา mesalamine ที่ระดับความ

เข้มข้น 18.75, 37.50, 75.00, 150.00 และ 300.00 $\mu\text{g/mL}$ ระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 75.00-300.00 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งระดับ LDH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในขณะที่ความเข้มข้นของยาเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ 0.5% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในยา naproxen ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 และ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ ระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 6.25, 50.00 และ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) , sulfasalazine ซึ่งมีความเข้มข้นเช่นเดียวกับยา naproxen ระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 12.50, 50.00 และ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ แต่ในขณะที่ระดับ LDH ในยา dexamethasone มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของยาเพิ่มมากขึ้น 6.25-200 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลของยาด้านอักเสบแต่ละชนิดต่อการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ LDH พบว่า aspirin ชักนำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นถึง 16% แต่ไม่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับยา dexamethasone ยา indomethacin ชักนำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นถึง 10%, ยา naproxen ชักนำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นถึง 27%, ยา sulfasalazine ชักนำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นถึง 15% และยา mesalamine ชักนำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นถึง 53%

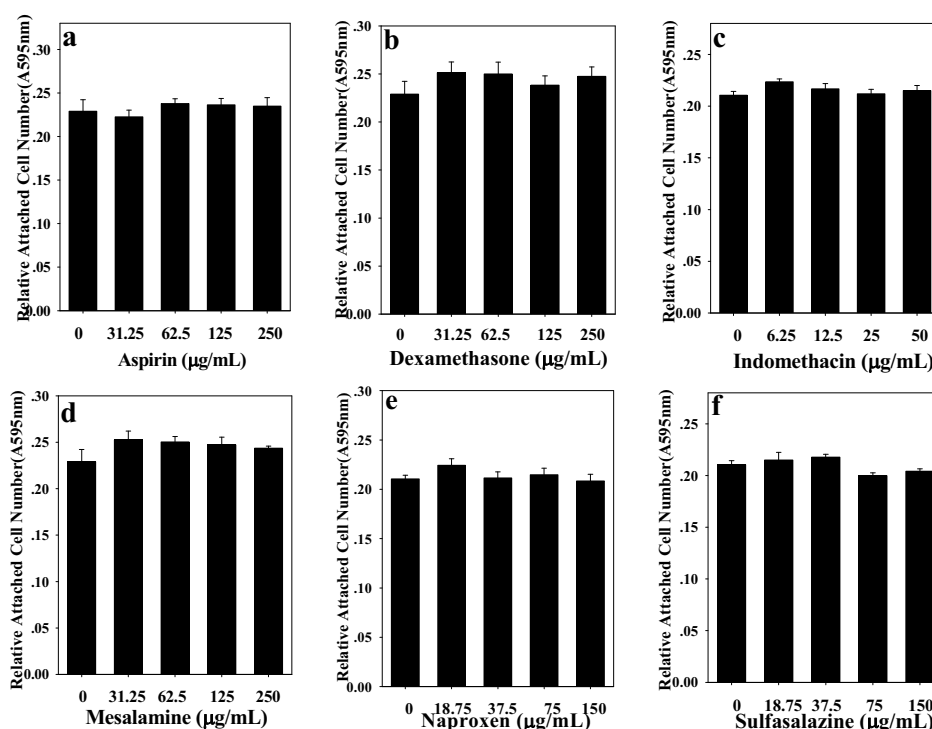


รูปที่ 4 ความเป็นพิษของยาด้านอักเสบต่อเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR 10^4 เซลล์ต่อหลุม (96-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% และความเข้มข้นของยาด้านอักเสบจาก 0-400 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้ววัดปริมาณ LDH (Mean OD $\pm$ S.E.M) ที่หลังจากเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี LDH Assay และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาด้านอักเสบและกลุ่มควบคุมโดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method), a= aspirin, b= dexamethasone, c= indomethacin, d= mesalamine, e= naproxen, f= sulfasalazine

๓. การศึกษาผลยาด้านอักเสบต่อการเกาะติดของเซลล์รกไซโตโทรโพลาสต์

ในการศึกษาที่ใช้เซลล์รก BeWo นั้น พบว่ายาด้านอักเสบทั้ง 6 ชนิดไม่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ BeWo ใน 3 ชั่วโมงของการให้ยาเนื่องจากปริมาณเซลล์ที่เกาะที่ภาชนะเพาะเลี้ยงมีปริมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับยา

และกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 5 จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยยาต้านอักเสบนั้นเกิดขึ้นหลัง 3 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา

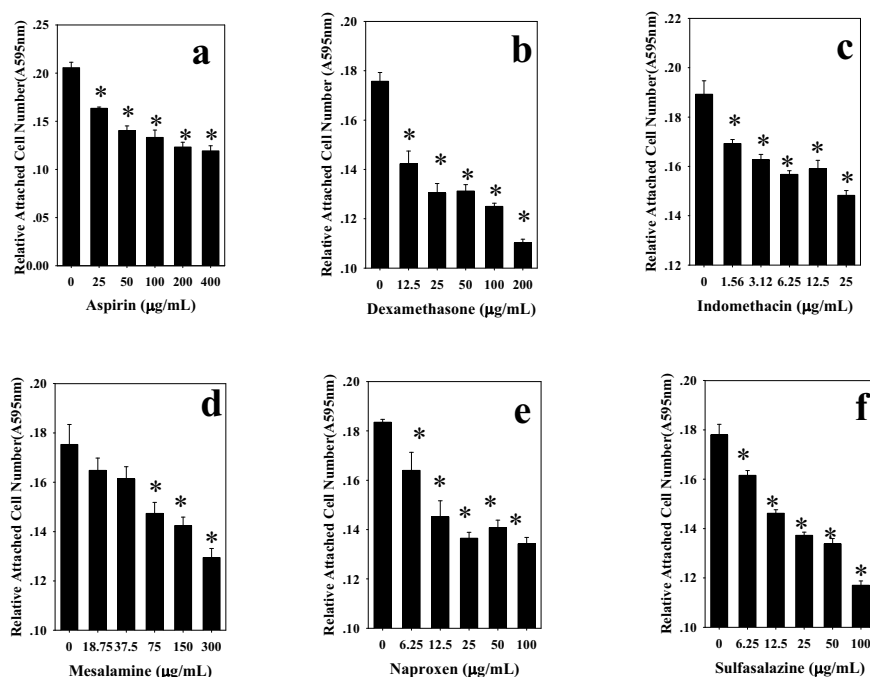


รูปที่ 5 ผลของยาต้านอักเสบต่อการเกาะติดของเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์ BeWo 10^4 เซลล์ต่อหลุม (96-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% และความเข้มข้นของยาต้านอักเสบจาก 0-250 µg/mL เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ววัดปริมาณเซลล์ที่เกาะติดที่ภาชนะเพาะเลี้ยง (Mean OD $\pm$ S.E.M) โดยวิธี MTT และเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method), a= aspirin, b= dexamethasone, c= indomethacin, d= mesalamine, e= naproxen, f= sulfasalazine

ในการศึกษาที่ใช้เซลล์ JAR นั้น จากการศึกษาโดยใช้ยาต้านอักเสบ aspirin, dexamethasone, indomethacin, naproxen, sulfasalazine และ mesalamine ที่ความเข้มข้น 0-400.00 µg/mL, 0-200.00 µg/mL, 0-25.00 µg/mL, 0-100.00 µg/mL, 0-100.00 µg/mL และ 0-300 µg/mL ตามลำดับต่อการเกาะติดพื้นที่ผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ JAR ด้วยวิธี MTT พบว่า ยา aspirin ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 25.00-400.00 µg/mL, ยา dexamethasone 12.50-200.00 µg/mL, ยา indomethacin 1.56-25.00 µg/mL, ยา naproxen 6.25-100.00 µg/mL, ยา sulfasalazine 6.25-100.00 µg/mL และ ยา mesalamine 75.00-300.00 µg/mL ยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ JAR เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีเฉพาะ 0.5% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 6 ในขณะที่ DMSO ไม่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์ JAR แต่อย่างไรเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลของยาต้านอักเสบแต่ละชนิดต่อการเกาะติดของเซลล์ JAR ที่ลดลง (%) พบว่า aspirin ที่ระดับความเข้มข้น 25.00, 50.00, 100.00, 200.00 และ 400.00 µg/mL ยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ JAR มีจำนวนเซลล์ในการเกาะติดลดลงเท่ากับ 11.67, 24.10, 27.97, 33.40 และ 35.56% ตามลำดับ ยา dexamethasone ที่ระดับความเข้มข้น 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 µg/mL มีจำนวนเซลล์ในการเกาะติดลดลงเท่ากับ 18.71, 25.42, 25.00, 28.57 และ 36.57% ตามลำดับ

ยา indomethacin ที่ระดับความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.50 และ 25.00 µg/mL มีจำนวนเซลล์ในการเกาะติดลดลงเท่ากับ 10.44, 13.88, 17.06, 15.87 และ 21.56% ตามลำดับ ยา mesalamine ซึ่งมีความเข้มข้น 18.75, 37.50,

75.00, 150.00 และ 300.00 $\mu\text{g/mL}$ และมีผลต่อการเกาะติดของเซลล์ลดลงเท่ากับ 5.80, 7.77, 15.77, 18.62 และ 26.00% ส่วนยา naproxen ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 และ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ในการเกาะติดลดลงเท่ากับ 10.86, 21.08, 25.81, 23.50 และ 27.03% ตามลำดับ และในยา sulfasalazine ซึ่งมีความเข้มข้นเช่นเดียวกับยา naproxen มีจำนวนการเกาะติดของเซลล์ลดลงเท่ากับ 9.21, 17.86, 22.89, 24.83 และ 34.26%



รูปที่ 6 ผลของยาต้านอักเสบต่อการเกาะติดของเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR 10^4 เซลล์ต่อหลุม (96-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% และความเข้มข้นของยาต้านอักเสบจาก 0-400 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ววัดปริมาณเซลล์ที่เกาะติดที่ภาชนะเพาะเลี้ยง (Mean OD $\pm$ S.E.M) โดยวิธี MTT และเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method), a= aspirin, b= dexamethasone, c= indomethacin, d= mesalamine, e= naproxen, f= sulfasalazine

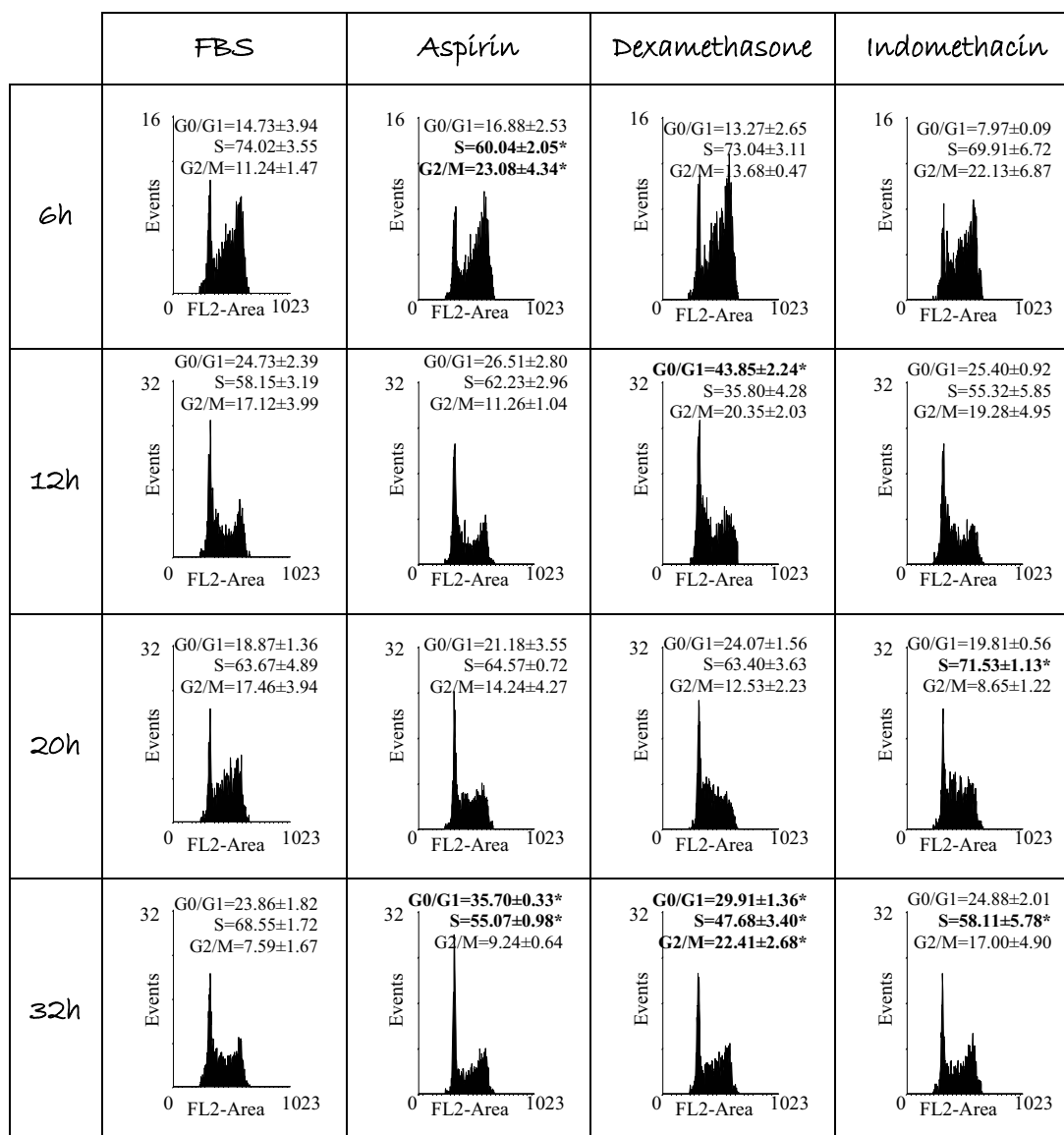
การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายาด้านอักเสบทั้ง 6 ชนิดคือ aspirin, dexamethasone, indomethacin, naproxen, sulfasalazine และ mesalamine มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ JAR แบบ dose-dependent fashion โดยแสดงให้เห็นว่าเป็นยาต้านอักเสบที่ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของจำนวนของเซลล์ JAR ได้ และกล่าวได้ว่ายาเหล่านี้ออกฤทธิ์ตั้งแต่ 3 ชั่วโมงแรกหลังจากเซลล์ได้รับยา

๔. การศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อวงจรเซลล์

ในการศึกษาที่ใช้เซลล์ BeWo นั้น ดังผลการทดลองในรูปที่ 7 และ 8 หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 2% FBS และยาต่างๆเป็นเวลา 6 ชั่วโมงพบว่า ยา aspirin, mesalamine, และ naproxen สามารถกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มี FBS เพียงอย่างเดียว ($p < 0.05$) ส่วนเปอร์เซ็นต์เซลล์ในแต่ละระยะที่ได้รับยา dexamethasone, indomethacin และ sulfasalazine นั้นไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม

เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงพบว่า ยา dexamethasone, mesalamine และ naproxen ชักนำให้ปริมาณเซลล์ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีความแตกต่างในกลุ่มที่ได้รับยา aspirin, indomethacin, sulfasalazine

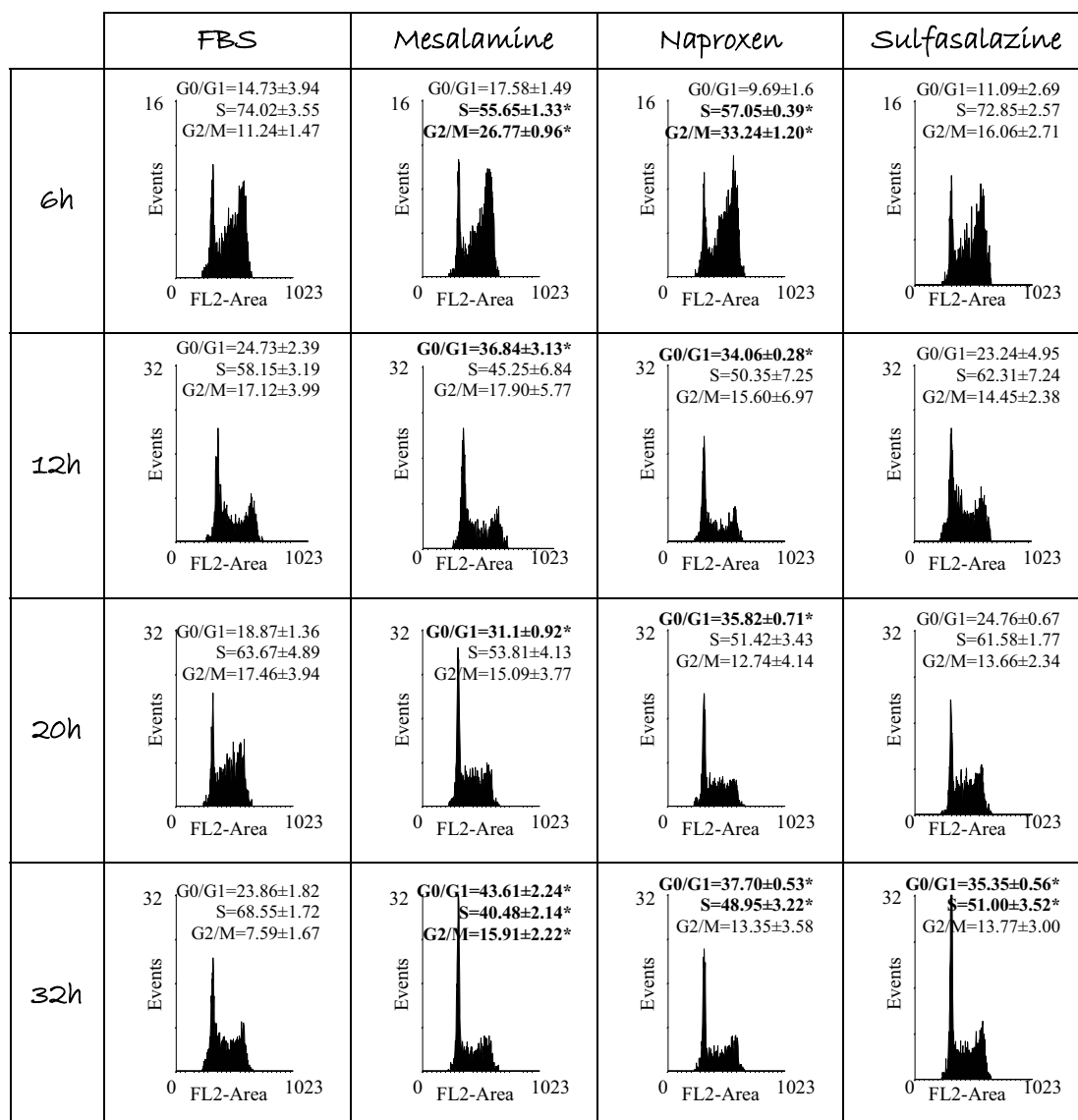
เมื่อเวลาผ่านไป 20 ชั่วโมงพบว่า ยา naproxen และ mesalamine ยังคงส่งผลให้เซลล์ในระยะ G0/G1 มีปริมาณมากขึ้น ในขณะที่ในช่วงเวลาเดียวกันยา indomethacin ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในช่วง S



รูปที่ 7 ผลของยาต้านอักเสบต่อวงจรเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์ BeWo 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม (6-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการ synchronization แล้วเปลี่ยนอาหารที่มี FBS เพียงอย่างเดียว หรือที่มี aspirin, dexamethasone และ indomethacin ที่ IC50 รวมอยู่ด้วยเป็นเวลา 6, 12, 20 และ 32 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวัดแล้วคำนวณปริมาณ (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิคทาง flow cytometry แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method)

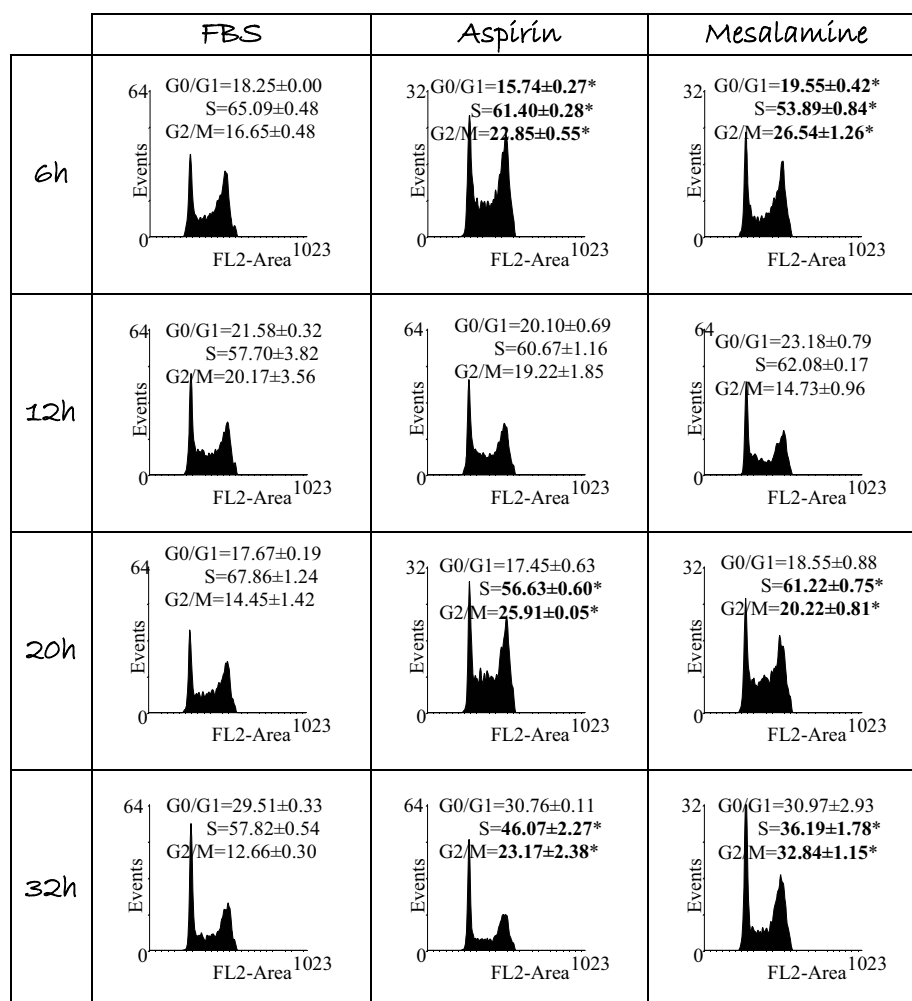
ในขณะที่เมื่อเวลาผ่านไป 32 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาพบว่า ยาทุกชนิดยกเว้น indomethacin ส่งผลให้เซลล์ถูกกักอยู่ในระยะ G0/G1 จากการทดลองนี้ในเซลล์ BeWo พบว่ายาต้านอักเสบที่ใช้ในการศึกษานี้มีผลในการควบคุมการดำเนินของวงจรเซลล์กล่าวคือยา indomethacin ชักนำให้มีการชลอวงจรเซลล์โดยเซลล์ถูกกักในระยะ S มากขึ้น และยาชนิดอื่นๆนั้นส่งผลให้มีการชลอวงจรเซลล์โดยเซลล์ถูกกักในระยะ G0/G1 มากขึ้น จากผลการทดลองนี้และการทดลองอื่นๆสรุปได้ว่าการชลอวงจรเซลล์รักโดยเป็นอีกกลไกหนึ่งของยาต้านอักเสบในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์

BeWo นอกเหนือไปจากความเป็นพิษต่อเซลล์ที่คาดว่าจะเกิดจากการกระตุ้นการตายของเซลล์ และในการทดลองต่อไปเป็นการพิสูจน์สมมุติฐานว่ายาดังกล่าวสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือไม่



รูปที่ 8 ผลของยาต้านอักเสบต่อวงจรเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์ BeWo 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม (6-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการ synchronization แล้วเปลี่ยนอาหารที่มี FBS เพียงอย่างเดียว หรือที่มี mesalamine, naproxen และ sulfasalazine ที่ IC50 รวมอยู่ด้วยเป็นเวลา 6, 12, 20 และ 32 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวัดแล้วคำนวณปริมาณ (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิคทาง flow cytometry แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method)

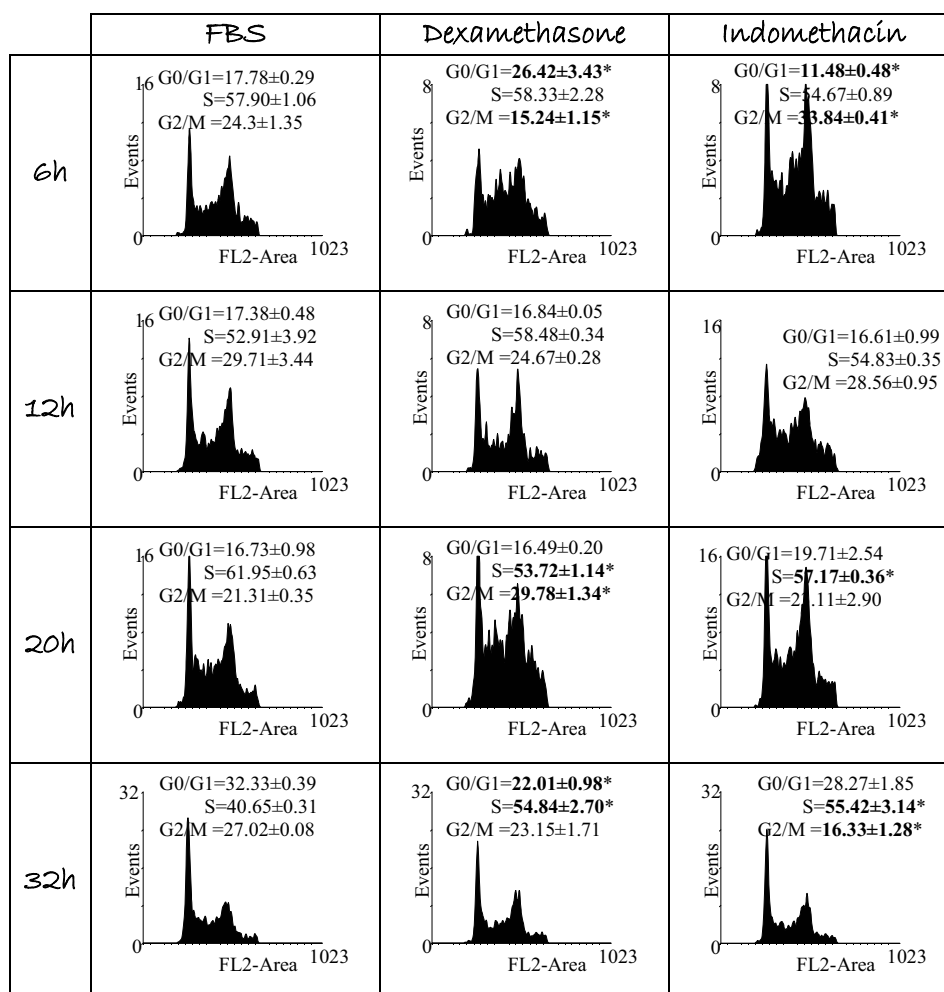
ในการศึกษาที่ใช้เซลล์รก JAR นั้น ดังผลการทดลองในรูปที่ 9, 10 และ 11 หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 2% FBS และยาต่างๆเป็นเวลา 6 ชั่วโมงพบว่า ยา aspirin, mesalamine, และ indomethacin สามารถกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มี FBS เพียงอย่างเดียว ($p < 0.05$) ส่วนยา dexamethasone ส่งผลให้มีเซลล์ในระยะ G0/G1 เพิ่มมากขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์เซลล์ในแต่ละระยะที่ได้รับยา indomethacin และ sulfasalazine นั้นไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 9 ผลของยาต้านอักเสบต่อวงจรเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม (6-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการ synchronization แล้วเปลี่ยนอาหารที่มี FBS เพียงอย่างเดียว หรือที่มี aspirin และ mesalamine ที่ IC50 รวมอยู่ด้วยเป็นเวลา 6, 12, 20 และ 32 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวัดแล้วคำนวณปริมาณ (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิคทาง flow cytometry แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method)

ในเวลา 12 ชั่วโมงพบว่ายา naproxen และ sulfasalazine ส่งผลให้มีเซลล์ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์เซลล์ในแต่ละระยะที่ได้รับยาชนิดอื่นนั้นไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ในเวลา 20 ชั่วโมงพบว่ามีเพียงยา dexamethasone เท่านั้นที่กระตุ้นให้ปริมาณเซลล์ในระยะ G2/M เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ในเวลา 32 ชั่วโมงพบว่ายา aspirin, mesalamine และ sulfasalazine กระตุ้นให้ปริมาณเซลล์ในระยะ G2/M เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนยา naproxen นั้นออกฤทธิ์ให้เซลล์ JAR มีปริมาณเซลล์ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยา dexamethasone และ indomethacin นั้นทำให้มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในระยะ S เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองนี้และการทดลองอื่นๆ สรุปได้ว่าการชลวงจรเซลล์รักโดยเป็นอีกกลไกหนึ่งของยาต้านอักเสบในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ JAR นอกเหนือไปจากความเป็นพิษต่อเซลล์ที่คาดว่าจะเกิดจากการกระตุ้นการตายของเซลล์ และในการทดลองต่อไปเป็นการพิสูจน์สมมุติฐานว่ายาดังกล่าวสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือไม่



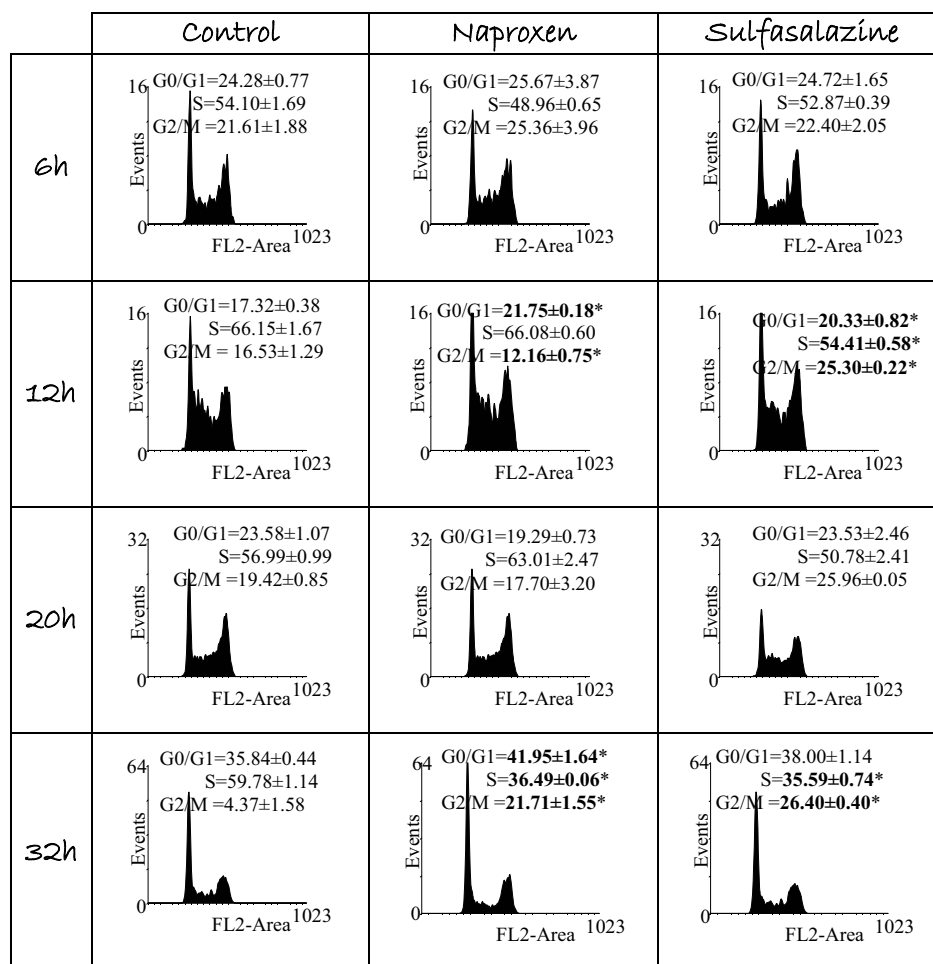
รูปที่ 10 ผลของยาต้านอักเสบต่อวงจรเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม (6-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการ synchronization แล้วเปลี่ยนอาหารที่มี FBS เพียงอย่างเดียว หรือที่มี dexamethasone และ indomethacin ที่ IC50 รวมอยู่ด้วยเป็นเวลา 6, 12, 20 และ 32 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวัดแล้วคำนวณปริมาณ (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิคทาง flow cytometry แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnett's method)

๕. การศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการกระตุ้นกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์รก

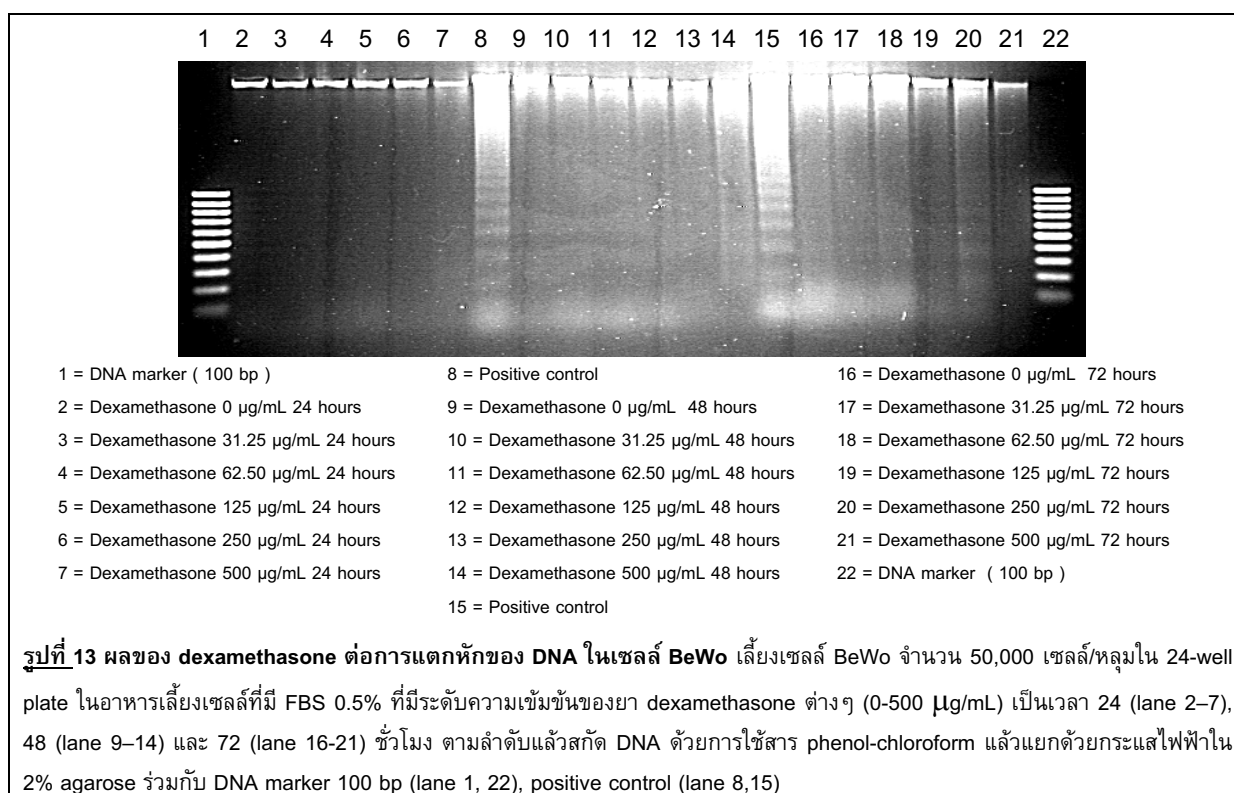
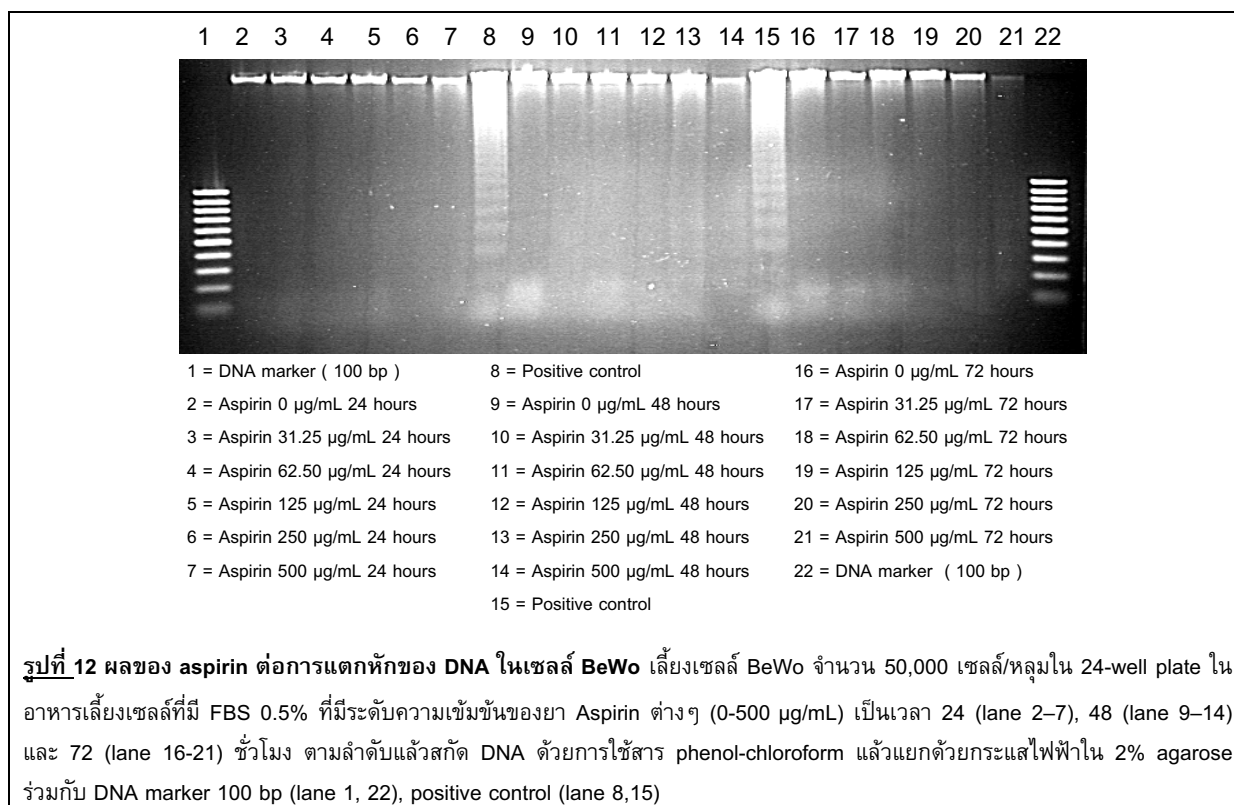
ในการศึกษาผลของยาต้านอักเสบทั้งหกชนิดต่อการกระตุ้นการตายของเซลล์รกนั้น ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีการสองวิธีที่นำมายืนยันผลกันและกัน วิธีแรกนั้นศึกษาการแตกหักของ DNA โดยการดูแถบของ DNA ใน agarose gel เรียกวิธีนี้ว่า DNA laddering technique เทียบกับ DNA ของเซลล์ที่สกัดจากเซลล์ที่ถูกบำบัดด้วยยา actinomycin-D เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (เป็น positive control) โดยยาดังกล่าวจะกระตุ้นให้เซลล์เริ่มต้นกระบวนการตายที่สังเกตได้จากการแตกหักของ DNA

เมื่อเซลล์ BeWo ได้รับยา aspirin พบว่าความเข้มข้นของยาที่สูงนั้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการแตกหักของ DNA ได้ดังรูปที่ 12 จากการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ BeWo ร่วมกับยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น 0, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 (lane 2 - 7), 48 (lane 9 - 14) และ 72 (lane 16 - 21) ชั่วโมงตามลำดับ พบการแตกหักของ DNA เมื่อใช้ยาความเข้มข้นสูงและได้รับยาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังรูปที่ 13 ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับยา indomethacin นั้นมีการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นเมื่อได้รับยาที่มีความเข้มข้นสูงดังรูปที่ 14

จากการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ BeWo ร่วมกับยา mesalamine (ดังรูปที่ 15) ที่ความเข้มข้น 0, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 (lane 2 - 7), 48 (lane 9 - 14) และ 72 (lane 16 - 21) ชั่วโมงตามลำดับ ไม่พบการแตกหักของ DNA จากการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ BeWo ร่วมกับยา naproxen (ดังรูปที่ 16) ที่ความเข้มข้น 0, 18.75, 37.50, 75, 150 และ 300 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 (lane 2 - 7), 48 (lane 9 - 14) และ 72 (lane 16 - 21) ชั่วโมงตามลำดับ พบการแตกหักของ DNA ที่เวลา 72 ชั่วโมง (lane 16-18) ซึ่งแสดงว่าเกิดการตายแบบ apoptosis

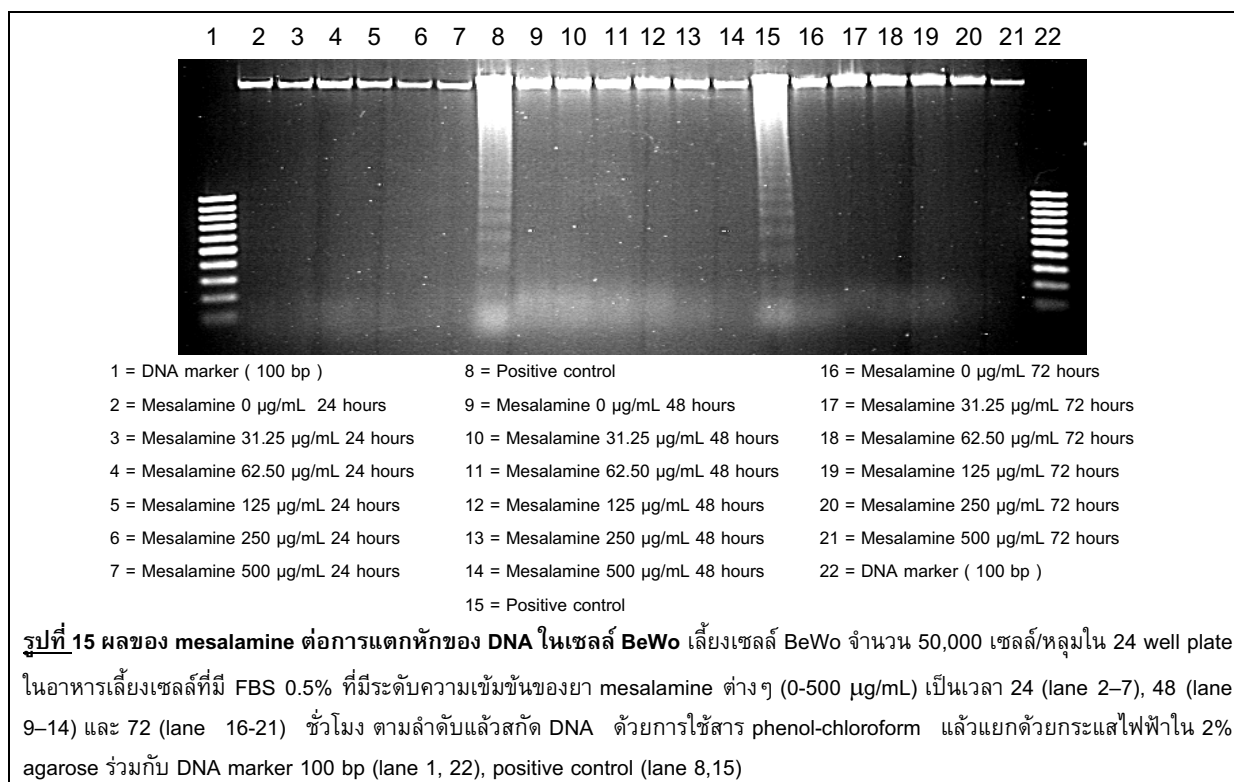
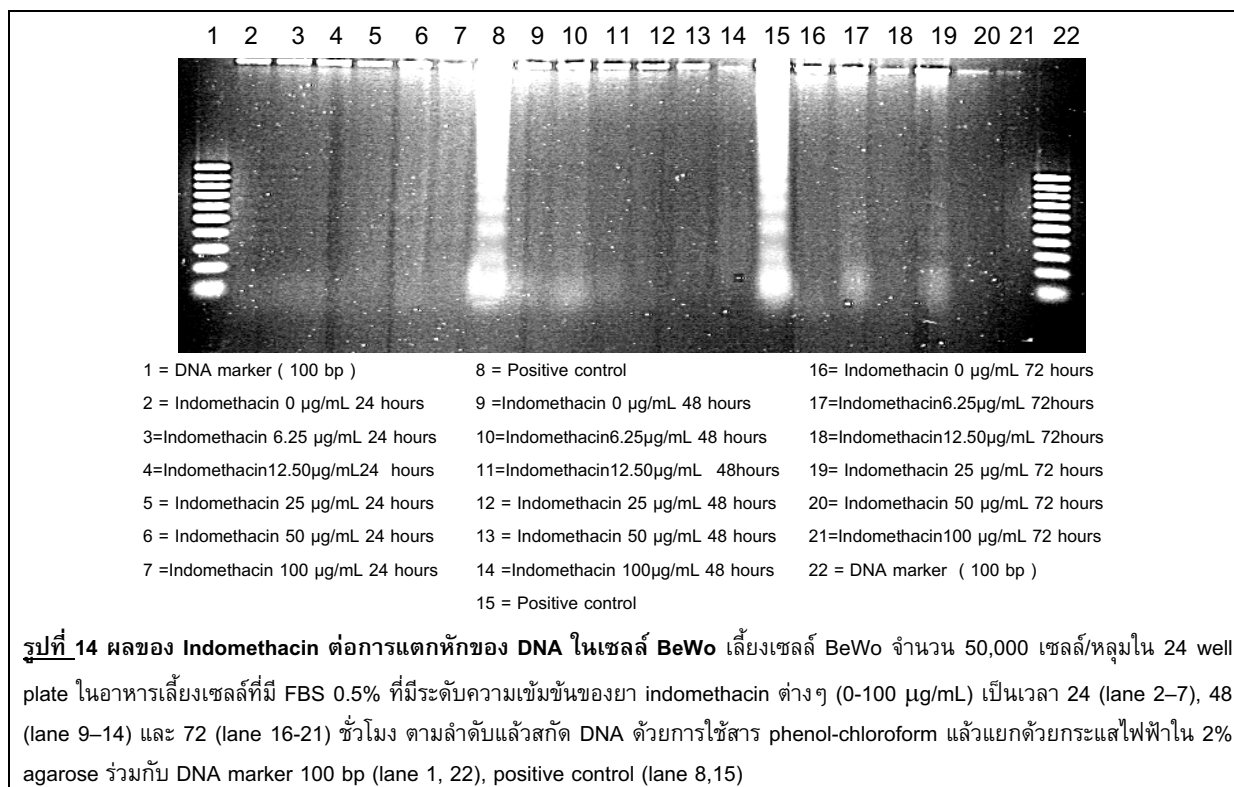


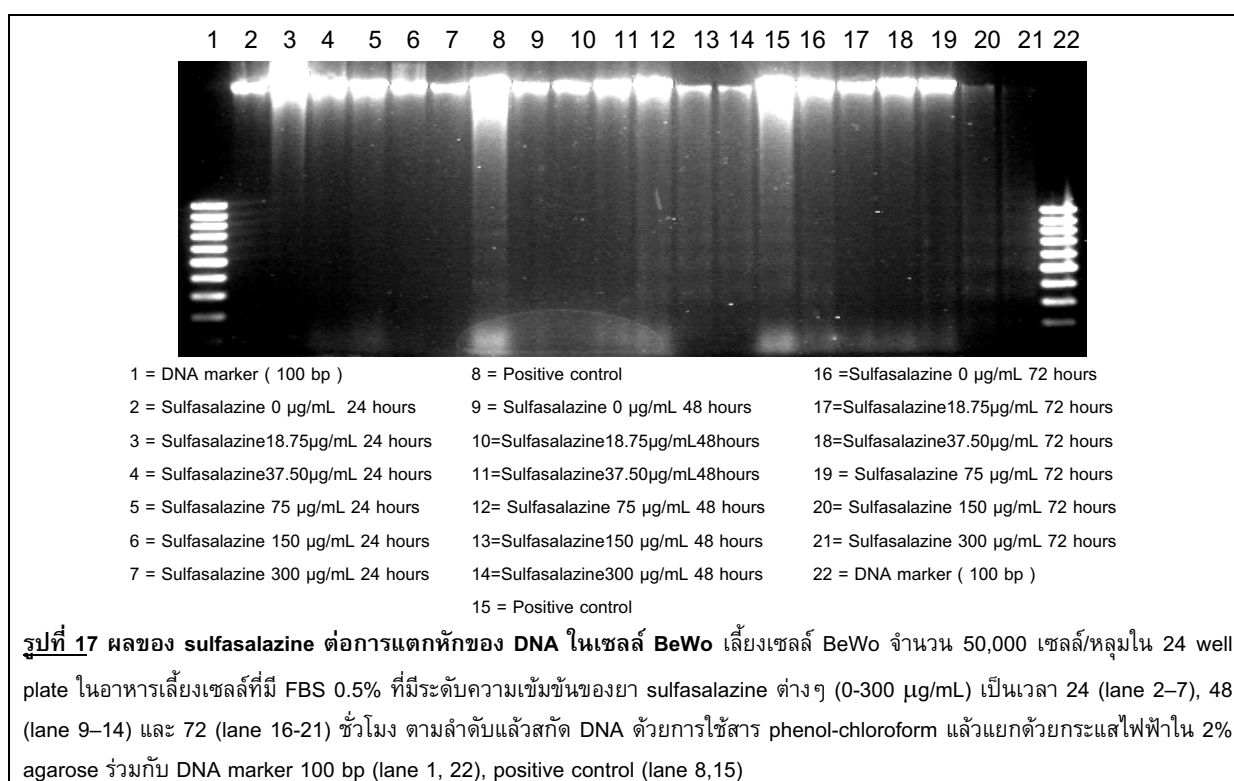
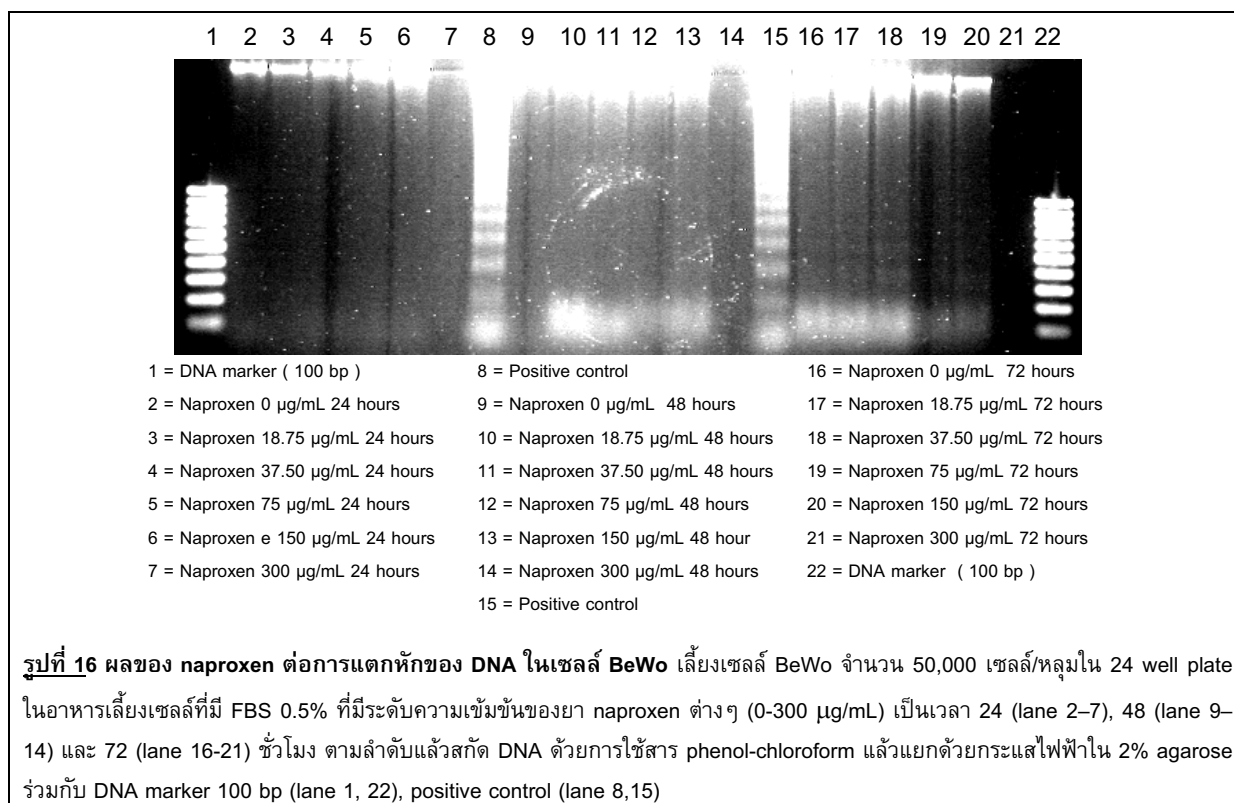
รูปที่ 11 ผลของยาต้านอักเสบต่อวงจรเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม (6-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการ synchronization แล้วเปลี่ยนอาหารที่มี FBS เพียงอย่างเดียว หรือที่มี naproxen และ sulfasalazine ที่ IC50 รวมอยู่ด้วยเป็นเวลา 6, 12, 20 และ 32 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวัดแล้วคำนวณปริมาณ (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิคทาง flow cytometry แล้วเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียาต้านอักเสบและกลุ่มควบคุม โดยวิธี One Way ANOVA (Dunnnett's method)



จากการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ BeWo ร่วมกับยา sulfasalazine (ดังรูปที่ 17) ที่ความเข้มข้น 0, 18.75, 37.50, 75, 150 และ 300 µg/mL เป็นเวลา 24 (lane 2 - 7), 48 (lane 9 - 14) และ 72 (lane 16 - 21) ชั่วโมงตามลำดับ พบ

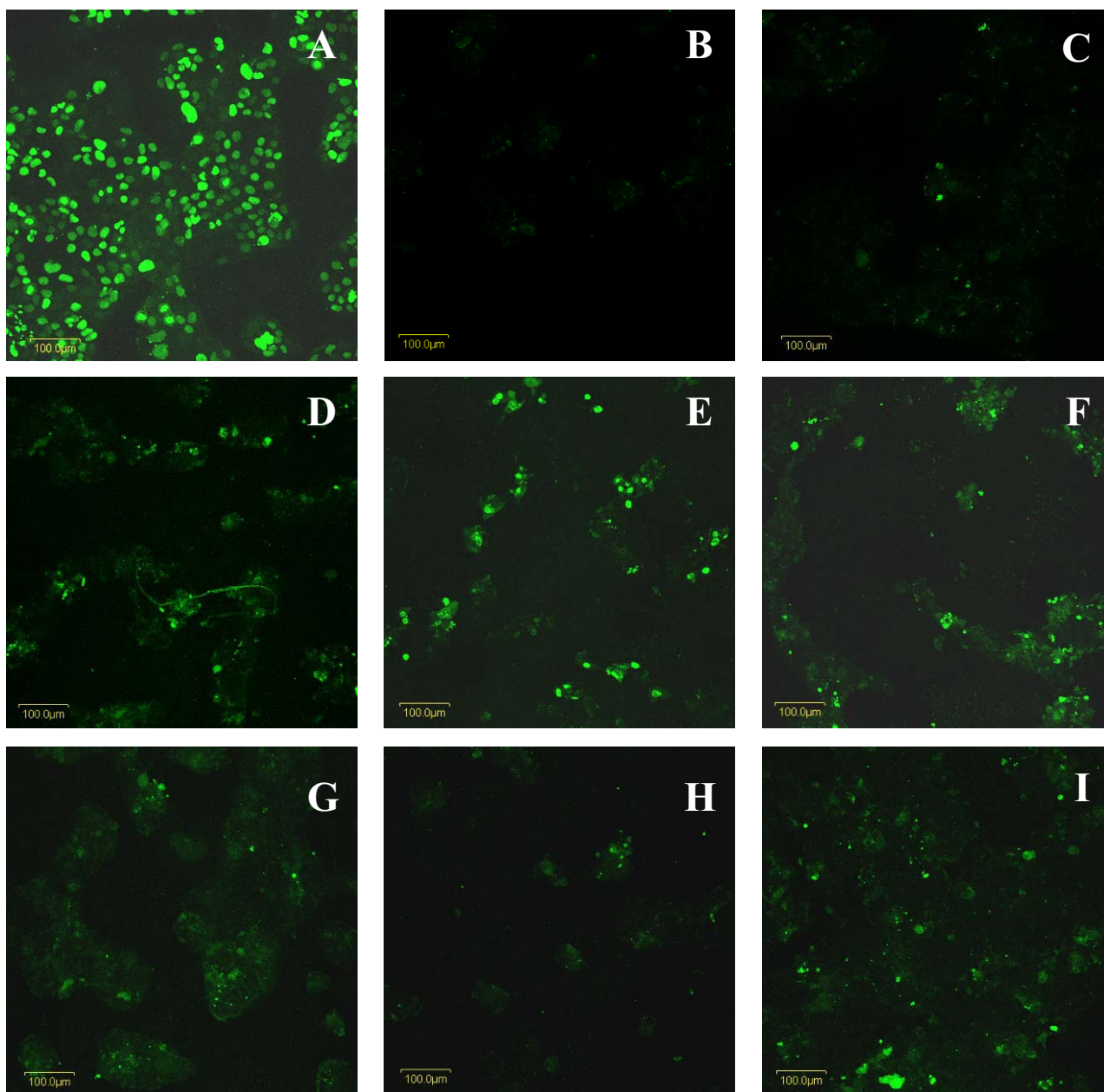
การแตกหักของ DNA ที่เวลา 48 ชั่วโมง (lane 12-14) และที่เวลา 72 ชั่วโมง (lane 16-21) ซึ่งแสดงว่าเกิดการตายแบบapoptosis





การยืนยันการเกิด Apoptosis โดยวิธี Fluorescent microscope ด้วย apoptosis detection kit

พบว่ายาต้านอักเสบทุกชนิดที่ใช้มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการแตกหักของ DNA แล้วสามารถย้อมด้วยสารเรืองแสงและมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในการทดลองมีประโยชน์ในการยืนยันผลร่วมกับเทคนิค DNA laddering แต่สามารถแสดงให้เห็นผลที่เกิดในระดับเซลล์เดียวได้ ดังรูปที่ 18 จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ายาต้านอักเสบยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์รก BeWo โดยการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis และอาจเกิดจากการตายแบบ necrosis ร่วมด้วยในยา mesalamine เนื่องจากมีจำนวนเซลล์น้อยที่ย้อมติดสารเรืองแสง

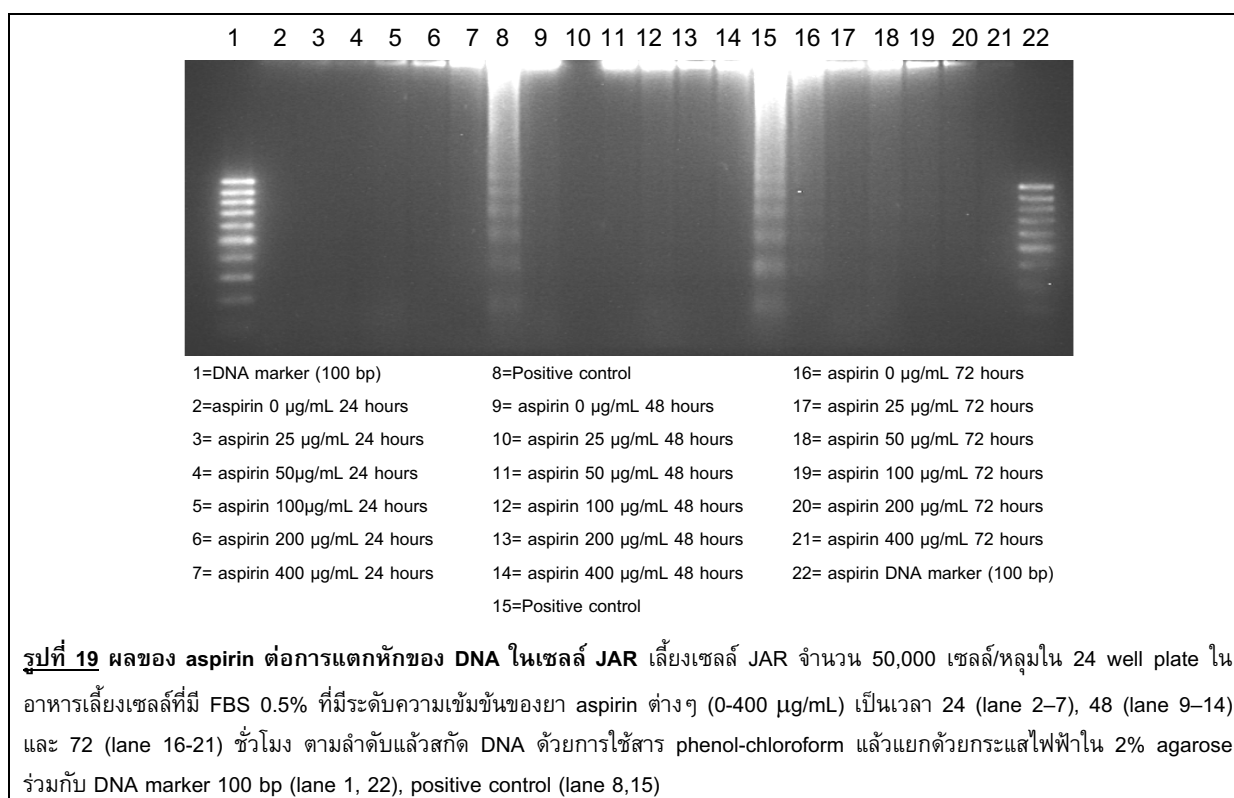


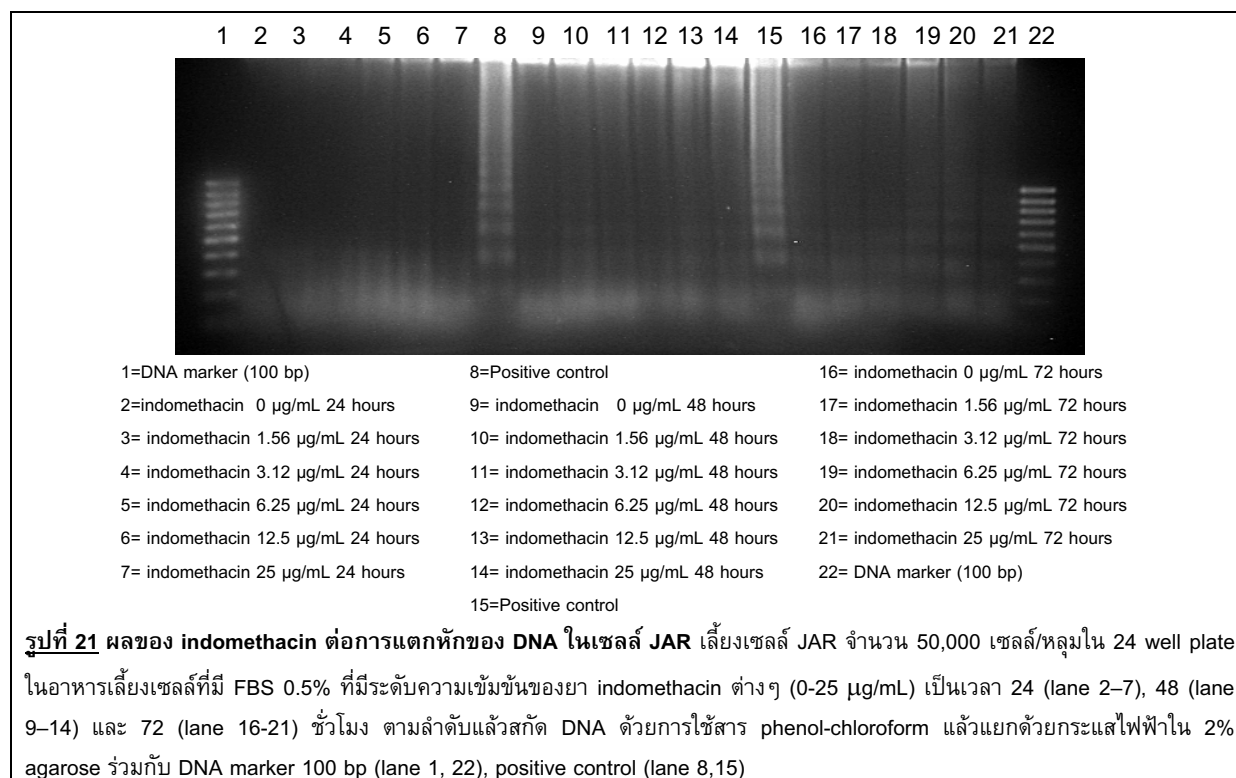
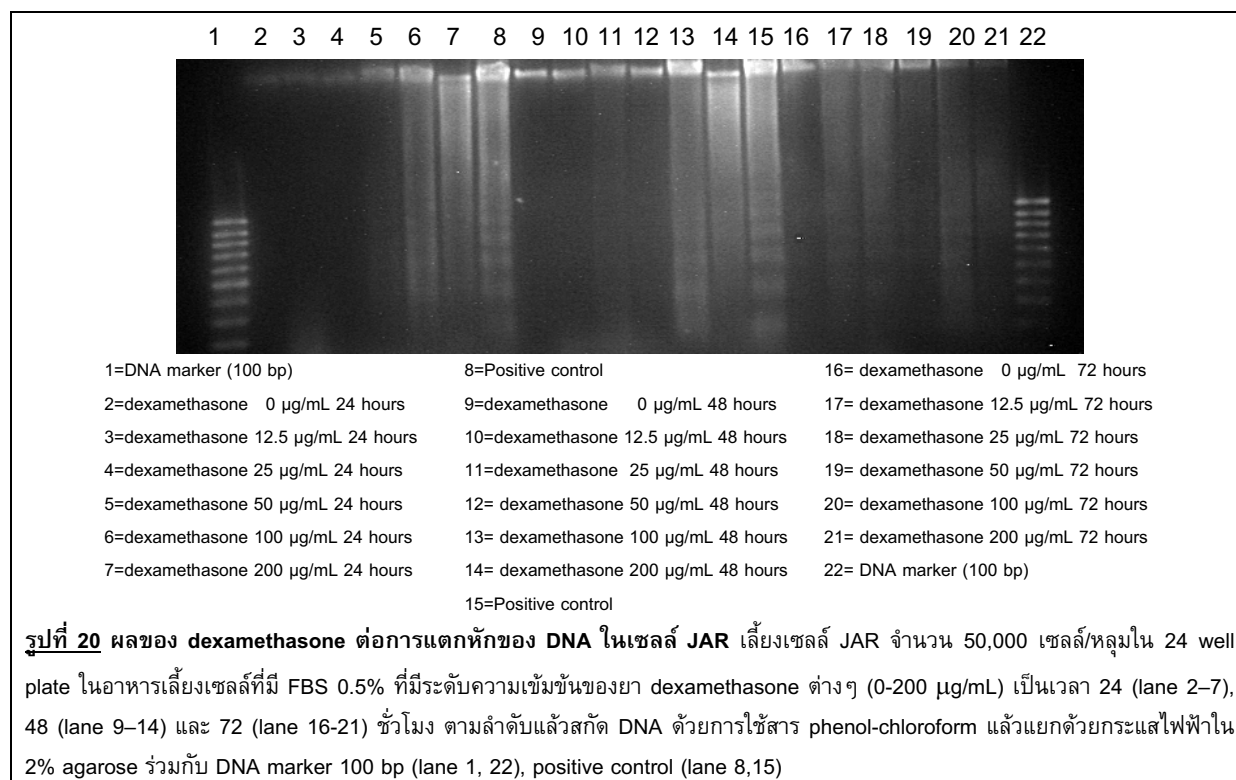
รูปที่ 18 ผลของยาต้านอักเสบต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์ BeWo จำนวน 50,000 เซลล์/หลุมบนสไลด์แก้วใน 24 well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วย้อมสไลด์เพื่อตรวจหาเซลล์ที่กำลังตายแบบ apoptosis ด้วยวิธี TUNEL, A= positive staining, B= negative staining, C= non-treatment control, D= aspirin, E= dexamethasone, F= indomethacin, G= mesalamine, H= naproxen, I= sulfasalazine

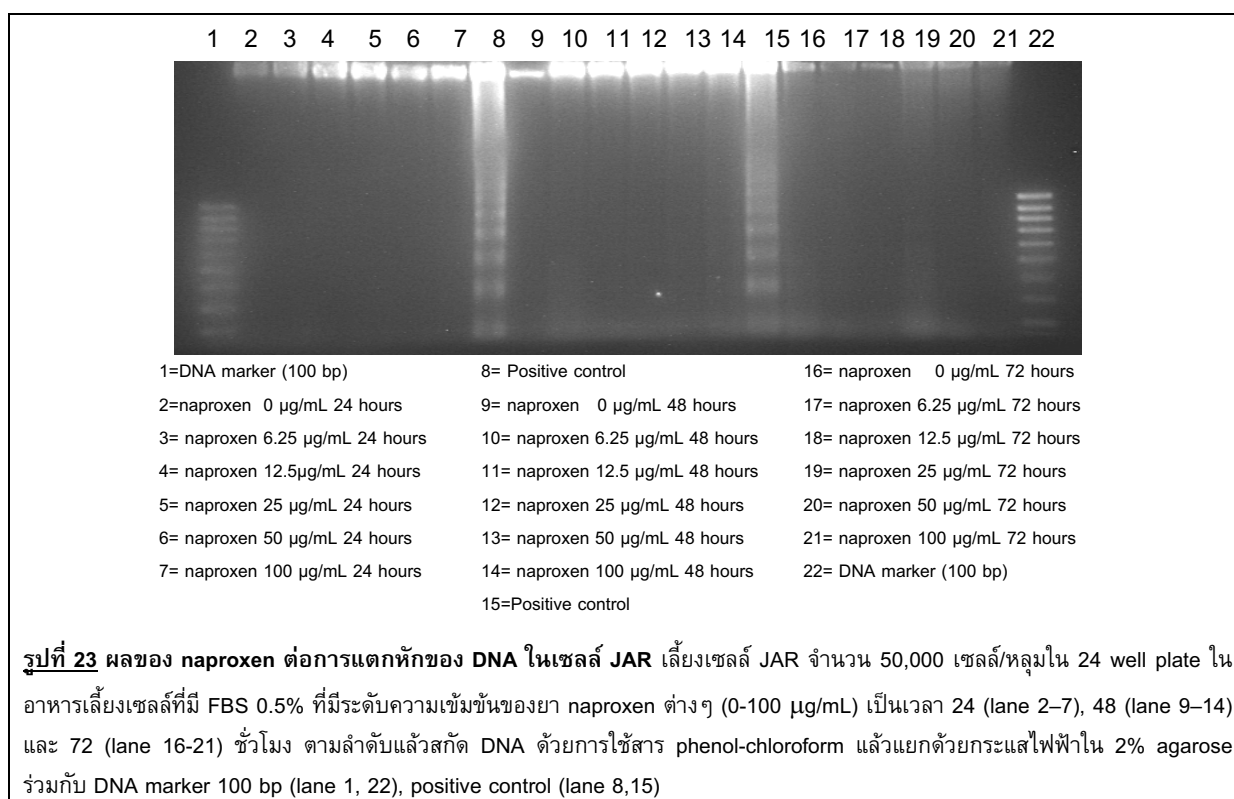
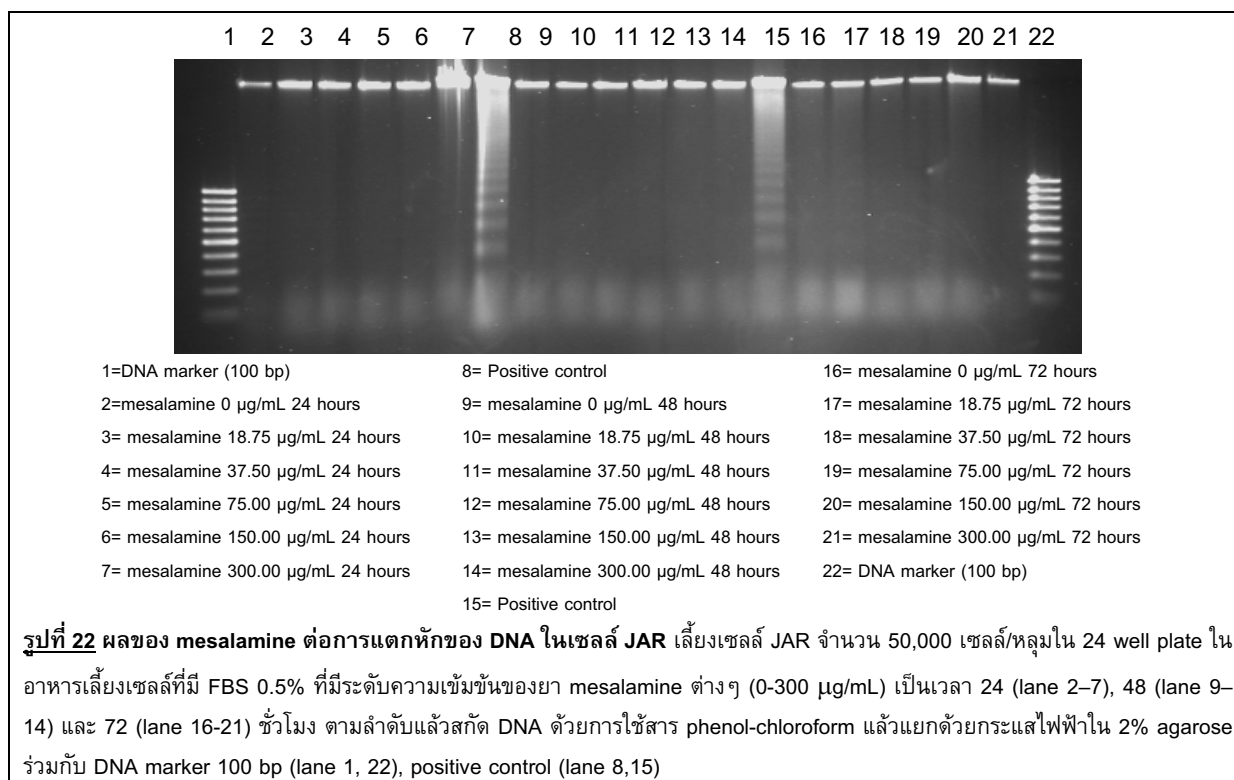
การศึกษาผลของยาด้านอักเสบต่อการกระตุ้นกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์รกร JAR

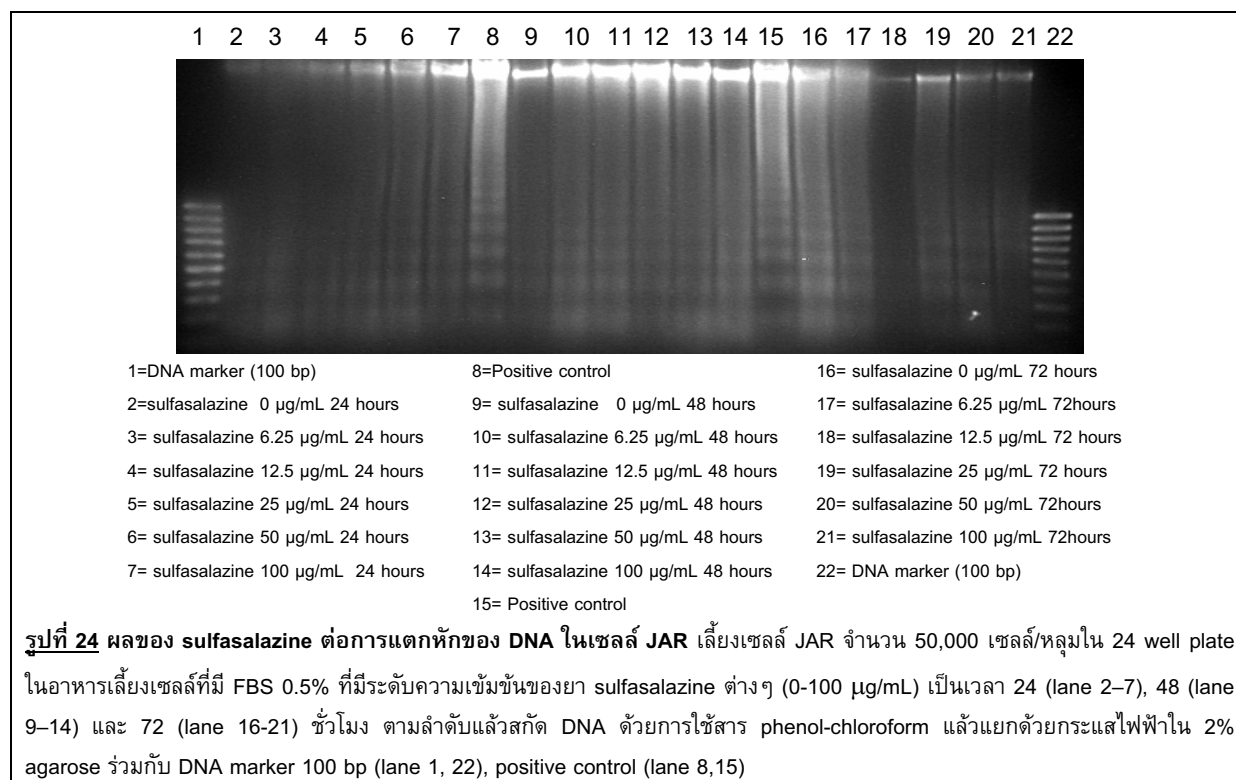
จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่ายาด้านการอักเสบทั้ง 6 ชนิด มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ อย่างไรก็ดีตามเพื่อที่จะอธิบายชนิดของกระบวนการตายของเซลล์ ในการศึกษาส่วนต่อไปนี้จะเป็นการศึกษาการแตกหักของ DNA ที่เป็นลักษณะเด่นของการตายของเซลล์ ในกลุ่มทดสอบจากการศึกษาพบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมกับยา aspirin (ดังรูปที่ 19) ที่เวลา 24 ชั่วโมงไม่พบการแตกหักของ DNA แต่อย่างใด ในขณะที่เวลา 48 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้น 100-400 µg/mL (lane 12-14) และที่ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-400 µg/mL (lane 16-21) พบการแตกหักของ DNA ซึ่งมีลักษณะเป็นขั้นบันได (ladder) ได้ สำหรับเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมกับ dexamethasone (ดังรูปที่ 20) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบการแตกหักของ DNA ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 µg/mL (lane 6-7 และ lane 13-14) และที่ 72 ชั่วโมง พบการแตกหักของ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 µg/mL (lane 17-21)

เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมกับ indomethacin (ดังรูปที่ 21) พบการแตกหักของ DNA ได้ ที่ความเข้มข้น 0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 µg/mL เวลา 24, 48 และที่ 72 ชั่วโมง (lane 2-7, 9-14 และ 16-21) ในขณะที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ JAR ที่ได้รับยา mesalamine (ดังรูปที่ 22) นั้นเกิดการแตกหักของ DNA เมื่อได้รับยาที่ความเข้มข้นสูง เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมกับ naproxen (ดังรูปที่ 23) พบการแตกหักของ DNA ที่ระดับความเข้มข้นของยาสูง เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมกับ sulfasalazine (ดังรูปที่ 24) พบการแตกหักของ DNA ได้ ที่ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 และ 100.00 µg/mL เวลา 24, 48 และที่ 72 ชั่วโมง (lane 2-7, 9-14 และ 16-21)



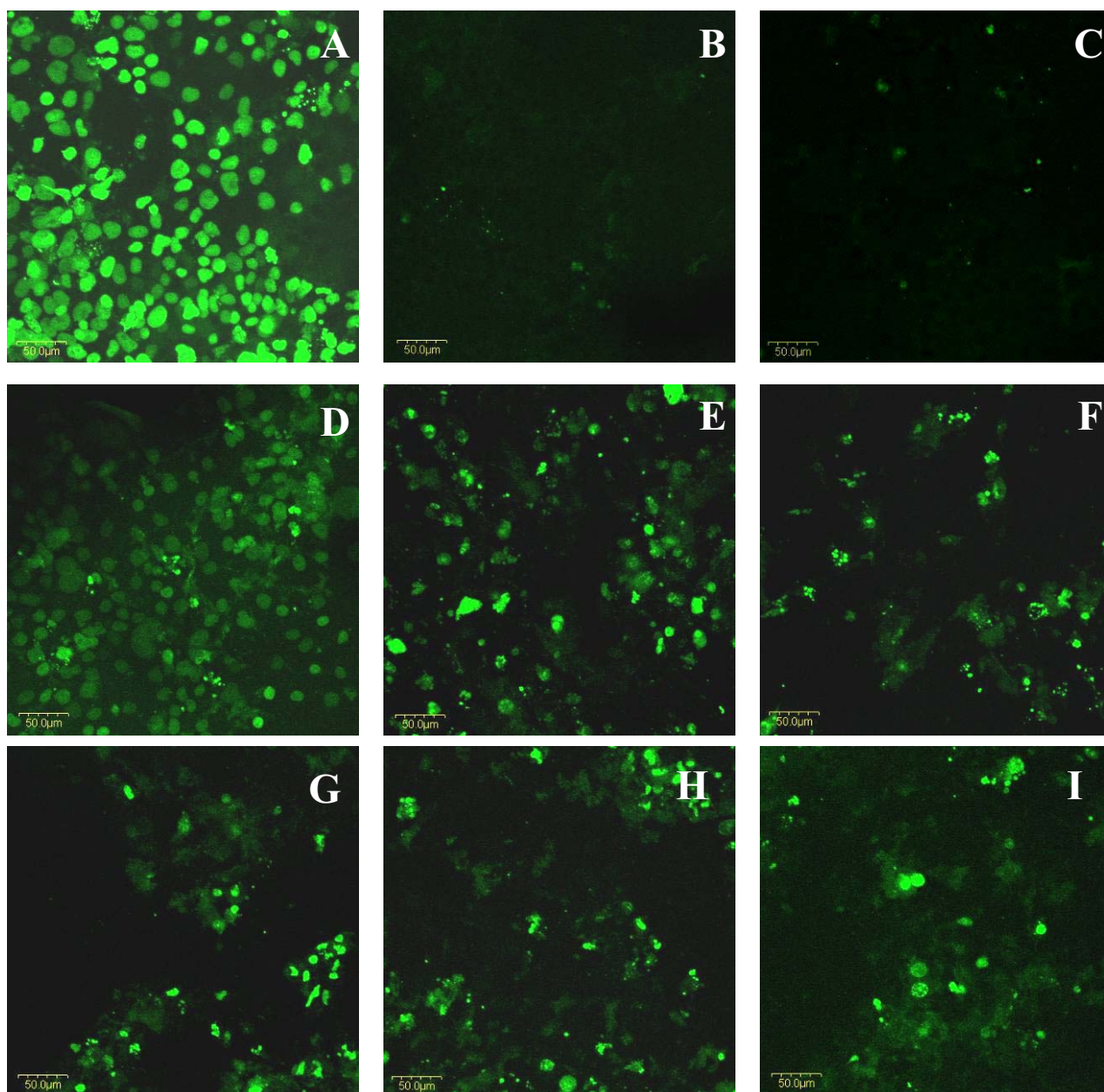






การยืนยันการเกิด Apoptosis โดยวิธี Fluorescent microscope ด้วย apoptosis detection kit

พบว่ายาต้านอักเสบทุกชนิดที่ใช้มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการแตกหักของ DNA แล้วสามารถย้อมด้วยสารเรืองแสงและมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในการทดลองมีประโยชน์ในการยืนยันผลร่วมกับเทคนิค DNA laddering แต่สามารถแสดงให้เห็นผลที่เกิดในระดับเซลล์เดียวได้ นอกจากนี้อาจย้อมติดใน apoptotic body ที่มี DNA และสารอื่นของเซลล์รวมอยู่ด้วยเมื่อกระบวนการตายสิ้นสุดลง ดังรูปที่ 25 จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ายาต้านอักเสบยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR โดยการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis และอาจเกิดจากการตายแบบ necrosis ร่วมด้วยในยา mesalamine เนื่องจากพบการแตกหักของ DNA จากเทคนิค DNA laddering ได้น้อย



รูปที่ 25 ผลของยาด้านอักเสบต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์ JAR จำนวน 50,000 เซลล์/หลุมบนสไลด์แก้วใน 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาด้านอักเสบที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วย้อมสไลด์เพื่อตรวจหาเซลล์กำลังตายแบบ apoptosis ด้วยวิธี TUNEL, A= positive staining, B= negative staining, C= non-treatment control, D= aspirin, E= dexamethasone, F= indomethacin, G= mesalamine, H= naproxen, I= sulfasalazine

๖. การศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการแสดงออกของจีนสร้างฮอร์โมน hCG

ฮอร์โมน hCG เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการตั้งครรภ์และเริ่มสร้างจากเซลล์โทรโพบลาสต์ของบลาสโตซิส ก่อนที่จะมีการฝังตัวที่ผนังมดลูก หลังจากนั้นรกและผนังมดลูกสร้างฮอร์โมนนี้ตลอดเวลาการตั้งครรภ์ หน้าที่หลักอย่างหนึ่งคือช่วยทำให้ผนังมดลูกมีพัฒนาการที่พร้อมสำหรับการตั้งครรภ์ และยังทำหน้าที่ช่วยการเจริญของรกด้วย เมื่อมีการตั้งครรภ์แล้วเซลล์รกชั้นซิซิโอโทรโพบลาสต์สร้างฮอร์โมนชนิดนี้เป็นปริมาณมาก และเนื่องจากเซลล์นี้พัฒนา (differentiate) มาจากเซลล์ไซโทโทรโพบลาสต์ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ฮอร์โมน hCG เป็นโปรตีนที่แสดงความสามารถของการพัฒนาการของเซลล์ไซโทโทรโพบลาสต์ได้อีกด้วย

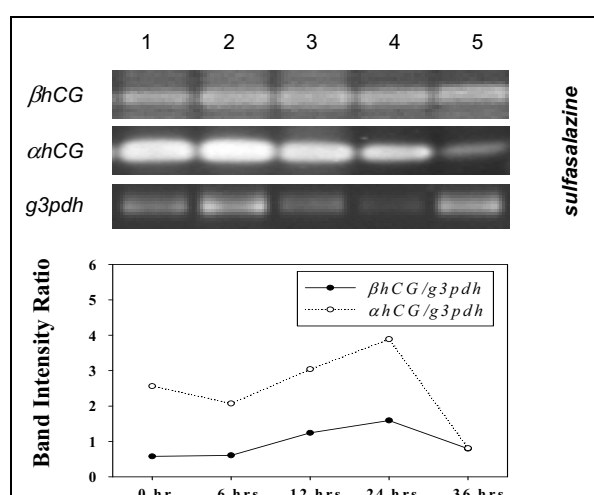
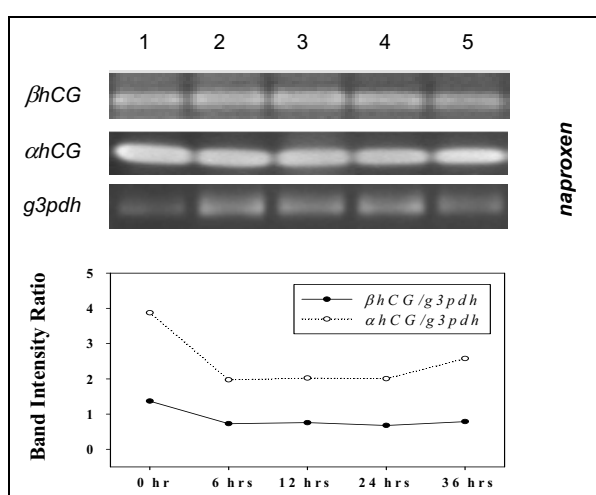
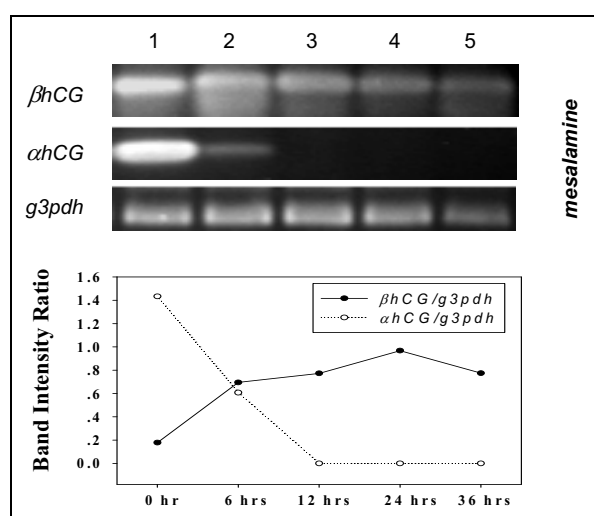
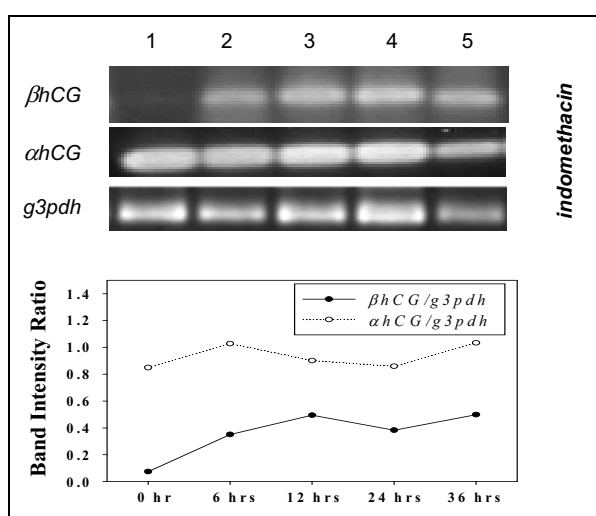
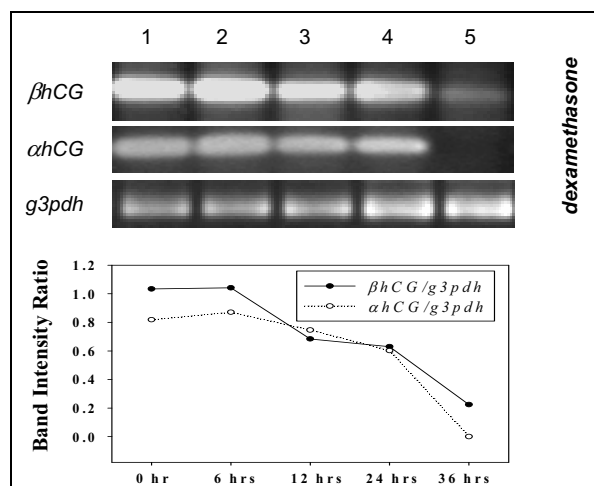
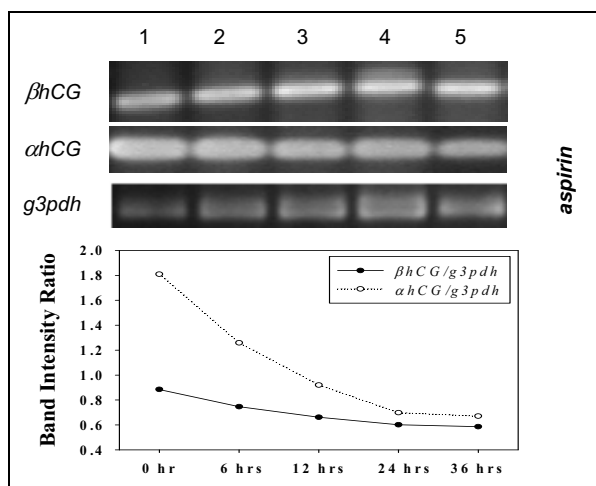
ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาผลของยาต่อการแสดงออกของจีนที่สร้างฮอร์โมน hCG ทั้ง α -CG และ β -hCG โดยระดับหรือปริมาณของ mRNA สามารถตรวจสอบในเชิงกึ่งปริมาณได้โดยการศึกษา RT-PCR นำค่าความเข้มของแถบ PCR product ของแต่ละจีนหารด้วยค่าความเข้มของแถบ PCR product ของ *g3pdh* ซึ่งเป็นจีนควบคุมภายใน แล้วนำค่าดังกล่าวมาสร้างกราฟ ดังในรูปที่ 26 และ 27

จากการศึกษาในเซลล์ BeWo ดังในรูปที่ 26 พบว่ายา aspirin ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 63% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกยับยั้งได้ถึง 33% ในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 100% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกยับยั้งได้ถึง 78% ในเวลา 36 ชั่วโมง

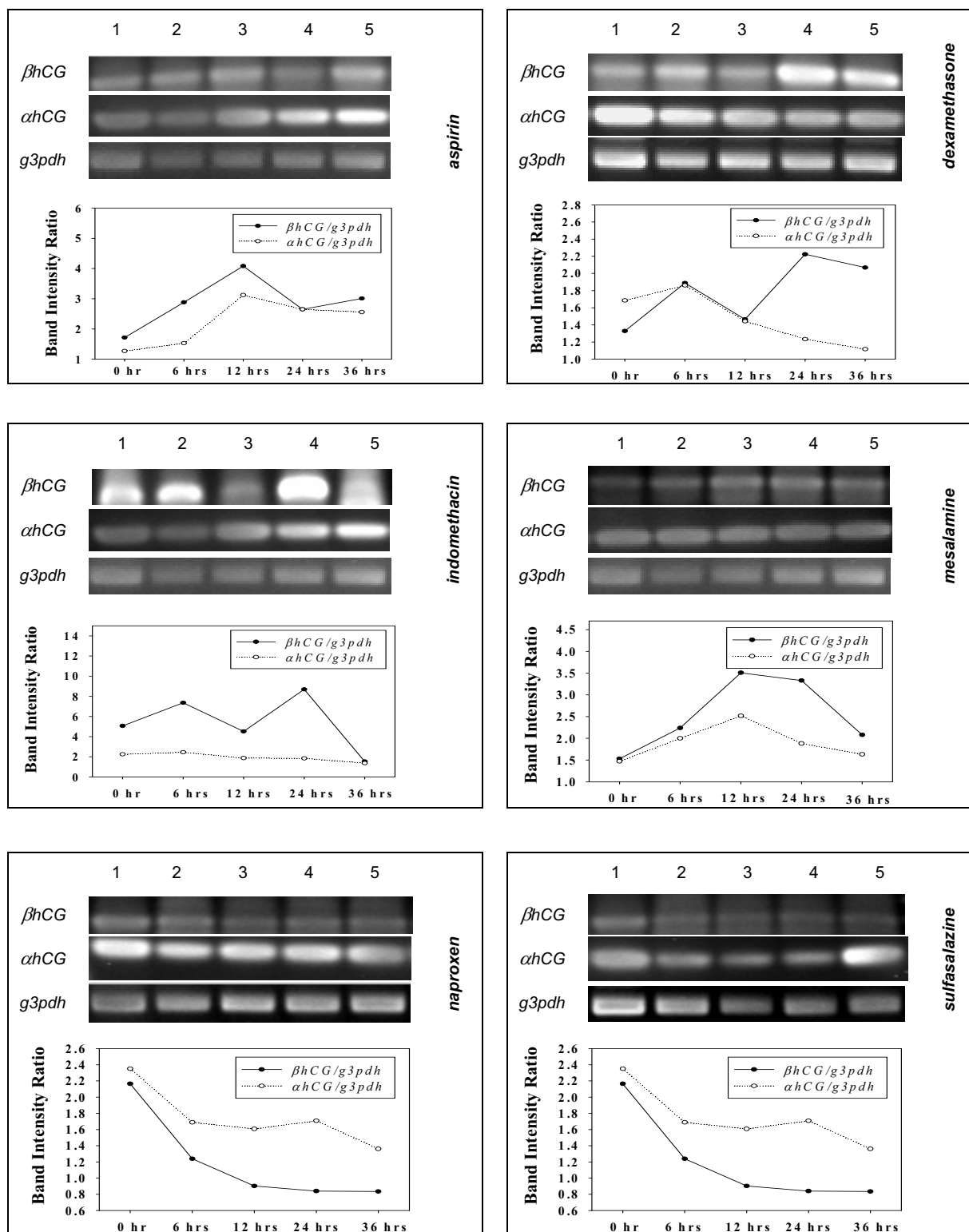
เมื่อเซลล์ได้รับยา indomethacin ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถเพิ่มการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 17% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG เพิ่มขึ้น 614% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา mesalamine ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 100% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG เพิ่มขึ้น 333% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา naproxen ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 33% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกยับยั้งได้ถึง 42% ในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา sulfasalazine ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 68% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วนการแสดงออกของ β -hCG ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาในเซลล์ JAR ดังในรูปที่ 27 พบว่ายา aspirin ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 101% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกกระตุ้นได้ถึง 76% ในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 33% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกกระตุ้นได้ถึง 55% ในเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเซลล์ได้รับยา indomethacin ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 39% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกยับยั้ง 47.5% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา mesalamine ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 11% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ลดลง 36% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา naproxen ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 42% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน β -hCG ถูกยับยั้งได้ถึง 62% ในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา sulfasalazine ที่ความเข้มข้น IC50 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีนที่สร้าง α -CG ได้ถึง 58% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วนการแสดงออกของ β -hCG ถูกยับยั้งได้ 32% ในเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 26 ผลของยาต้านอักเสบต่อการแสดงออกของจีนสร้างฮอร์โมน hCG ในเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์จำนวน 350,000 เซลล์/หลุมใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 0 (lane 1), 6 (lane 2), 12 (lane 3), 24 (lane 4) และ 36 (lane 5) ชั่วโมง แล้วทำการสกัด RNA จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ แล้วเพิ่มจำนวนต่อด้วยวิธี PCR



รูปที่ 27 ผลของยาต้านอักเสบต่อการแสดงออกของจีนสร้างฮอร์โมน hCG ในเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์จำนวน 350,000 เซลล์/หลุมใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 0 (lane 1), 6 (lane 2), 12 (lane 3), 24 (lane 4) และ 36 (lane 5) ชั่วโมง แล้วทำการสกัด RNA จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ แล้วเพิ่มจำนวนต่อด้วยวิธี PCR

๗. การศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการแสดงออกของยีนของการตาย

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าความเป็นพิษของยาต้านอักเสบต่อเซลล์รกโทรโปบลาสต์นั้นเกิดจากการกระตุ้นการตายของเซลล์ การยับยั้งการสร้างฮอโมนที่จำเป็นต่อการพัฒนาการของเซลล์ดังนั้นการศึกษาผลของยาดังกล่าวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายจะเป็นการช่วยยืนยันผลที่ผ่านมาในระดับโมเลกุลได้ดียิ่งขึ้น

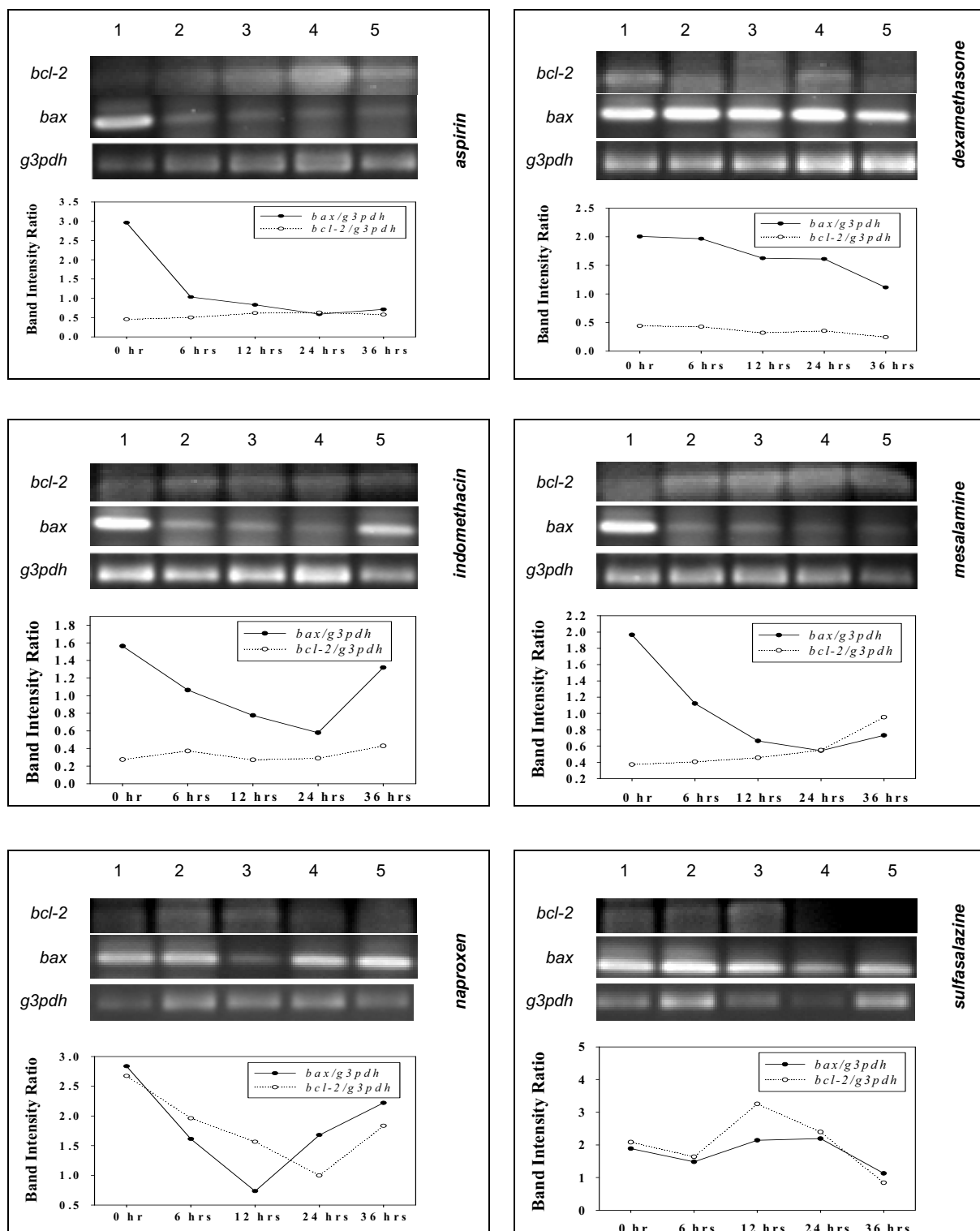
ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาผลของยาต่อการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการตายแบบ apoptosis และยีนที่สร้างโปรตีน *bcl-2* ที่เป็นโปรตีนยับยั้งการตายของเซลล์ ทำการวัดระดับหรือปริมาณ mRNA สามารถตรวจสอบในเชิงปริมาณได้โดยการศึกษา RT-PCR นำค่าความเข้มของแถบ PCR product ของแต่ละยีนหารด้วยค่าความเข้มของแถบ PCR product ของ *g3pdh* ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายใน แล้วนำค่าดังกล่าวมาสร้างกราฟ ดังในรูปที่ 28 และ 29

จากการศึกษาในเซลล์ BeWo ดังในรูปที่ 28 พบว่ายา aspirin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 76% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกกระตุ้นถึง 26% ในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 44% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกยับยั้งถึง 43% ในเวลา 36 ชั่วโมง

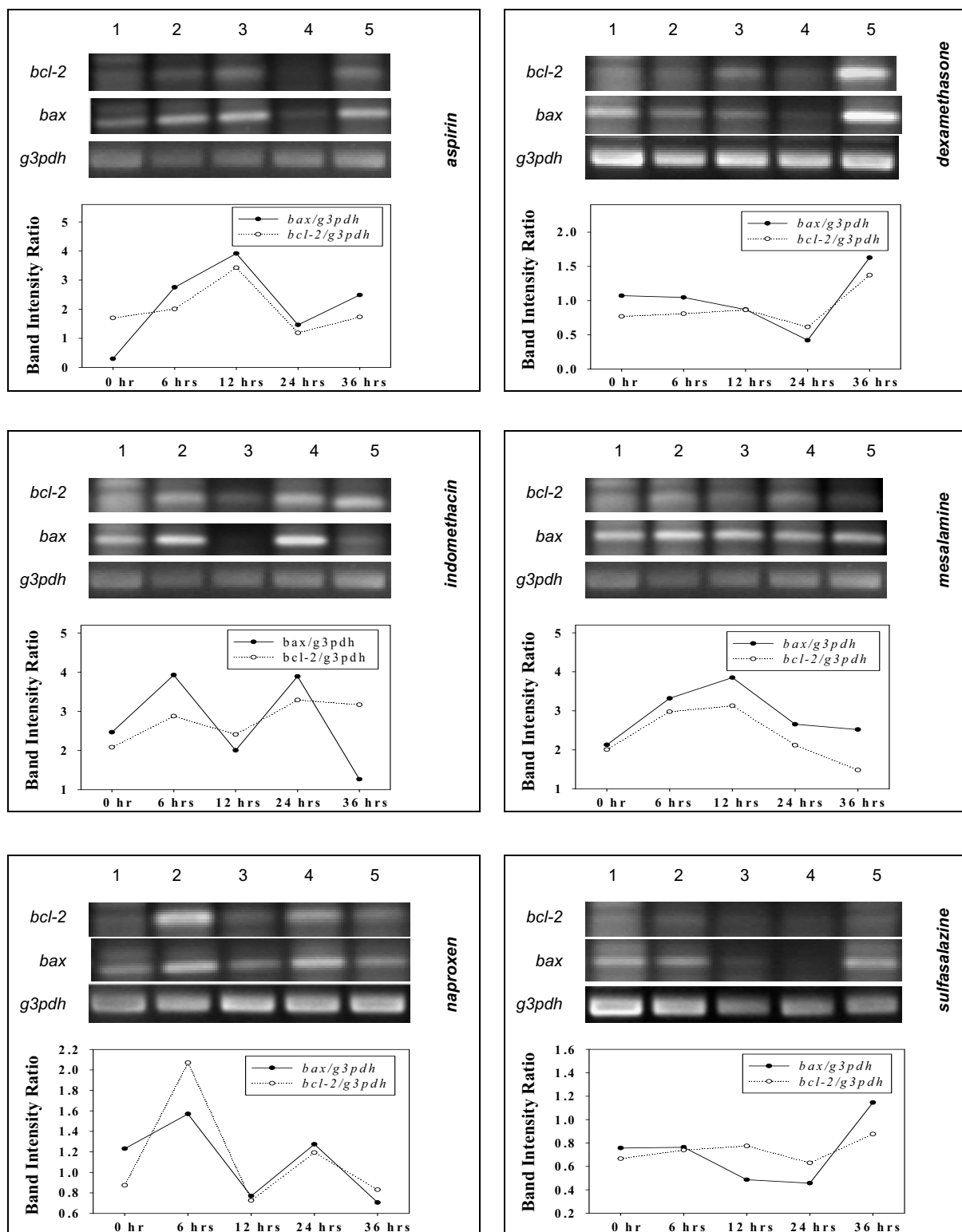
เมื่อเซลล์ได้รับยา indomethacin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 15% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกกระตุ้นถึง 59% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา mesalamine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 62% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกกระตุ้นถึง 156% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา naproxen ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 21% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกยับยั้งถึง 31% ในเวลา 36 ชั่วโมงและเมื่อเซลล์ได้รับยา sulfasalazine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 40% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกยับยั้งถึง 60% ในเวลา 36 ชั่วโมง

จากการศึกษาในเซลล์ JAR ดังในรูปที่ 29 พบว่ายา aspirin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 730% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 52% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกกระตุ้นถึง 78% ในเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเซลล์ได้รับยา indomethacin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 49% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกกระตุ้นถึง 52% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา mesalamine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 18% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกยับยั้งถึง 26% ในเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับยา naproxen ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 42% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกยับยั้งถึง 4% ในเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์ได้รับยา sulfasalazine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้าง *bax* ได้ถึง 51% ในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ส่วน *bcl-2* ถูกกระตุ้นถึง 31% ในเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 28 ผลของยาต้านอักเสบต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายในเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์จำนวน 350,000 เซลล์/หลุมใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 0 (lane 1), 6 (lane 2), 12 (lane 3), 24 (lane 4) และ 36 (lane 5) ชั่วโมง แล้วทำการสกัด RNA จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ แล้วเพิ่มจำนวนต่อด้วยวิธี PCR

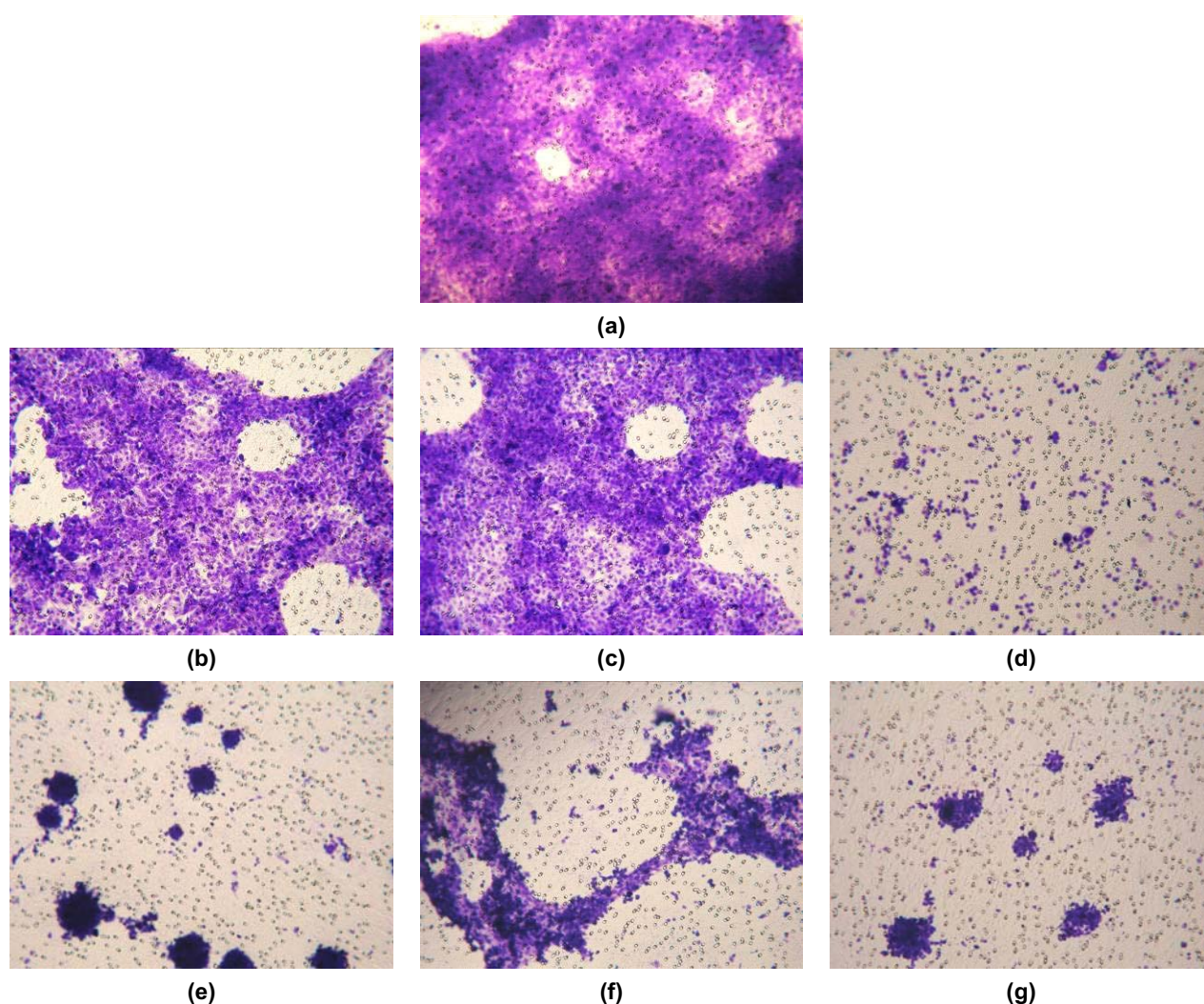


รูปที่ 29 ผลของยาด้านอักเสบต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายในเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์จำนวน 350,000 เซลล์/หลุมใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาด้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 0 (lane 1), 6 (lane 2), 12 (lane 3), 24 (lane 4) และ 36 (lane 5) ชั่วโมง แล้วทำการสกัด RNA จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ แล้วเพิ่มจำนวนต่อด้วยวิธี PCR

๘. การศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการรุกรานของเซลล์ทรานสเฟอโรพลาสต์

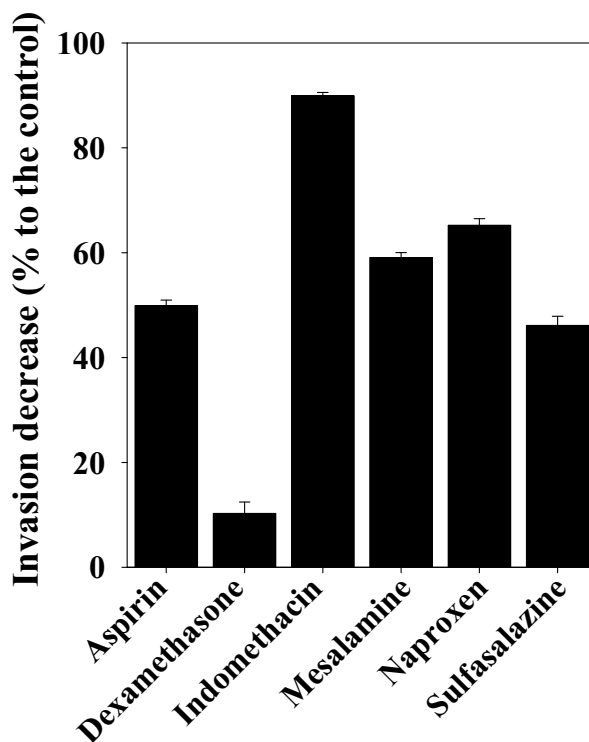
นอกจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเกาะติดของเซลล์ การพัฒนาการของเซลล์ทรานสเฟอโรพลาสต์ ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการตั้งครรภ์ให้ประสบความสำเร็จนั้น สมบัติการรุกราน (invasion) ของเซลล์ยังนับว่ามีความสำคัญเช่นกัน การรุกรานของเซลล์เข้าไปในเนื้อเยื่อผนังมดลูกในระดับหนึ่งนั้นมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการฝังตัว และรักษาภาพโครงสร้างของรกให้คงที่ได้ สมบัติดังกล่าวนี้เหมือนกับสมบัติของเซลล์มะเร็งที่สามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ แต่ในสภาวะการตั้งครรภ์ปกติการรุกรานของเซลล์ทรานสเฟอโรพลาสต์เข้าสู่ผนังมดลูกมีการควบคุมอย่างรัดกุมด้วยระบบภูมิคุ้มกันของมารดา

ดังนั้นการศึกษาผลของยาต้านอักเสบต่อการรุกรานของเซลล์ทรานสเฟอโรพลาสต์นั้น จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่สามารถอธิบายฤทธิ์ของยา ในการทดลองนี้อาศัยสมบัติของเซลล์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนที่เคลือบอยู่บนเมมเบรนที่มีรูให้เซลล์แทรกผ่านไปได้ จากการศึกษาพบว่ายาต้านอักเสบทุกชนิดสามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)



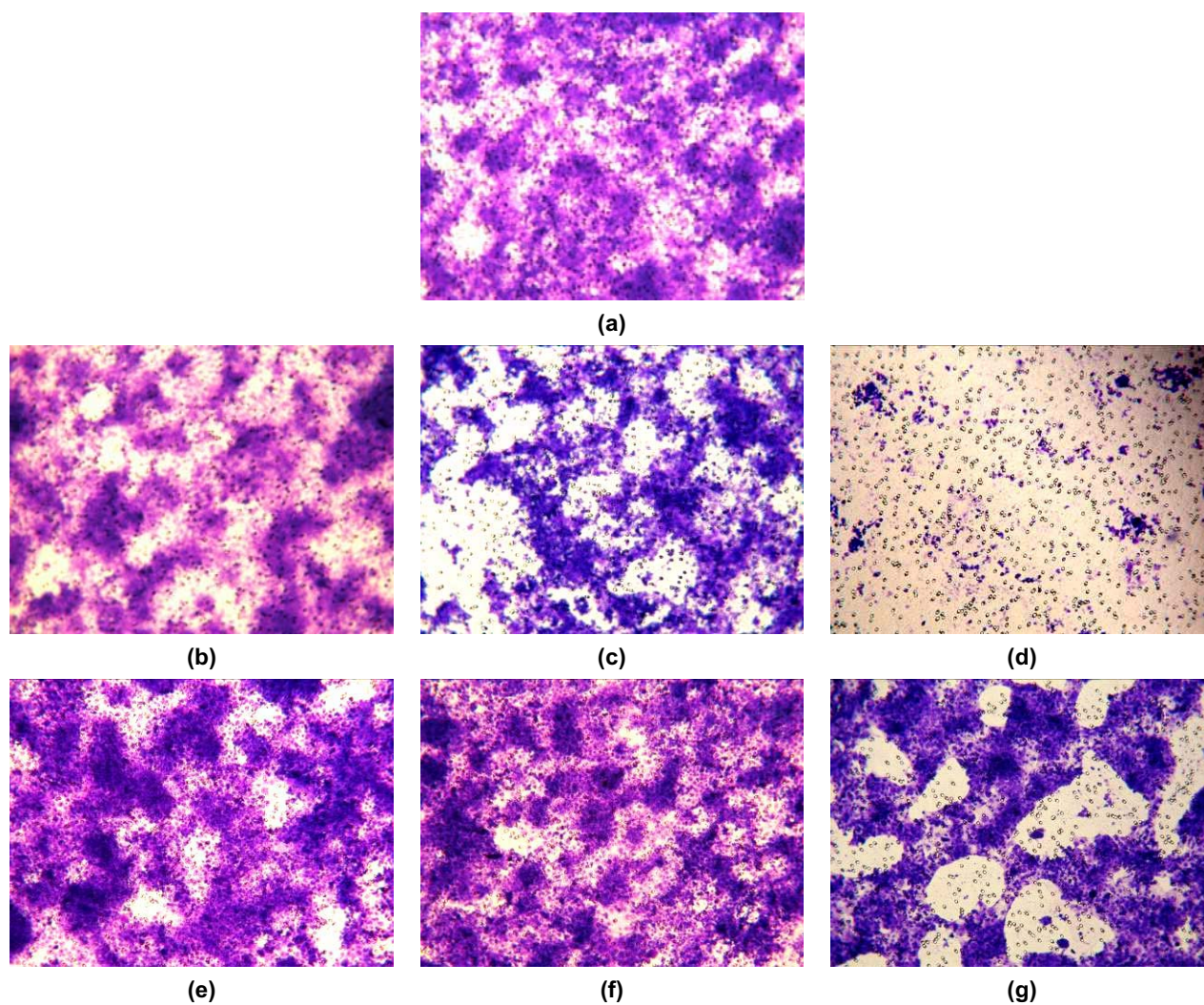
รูปที่ 30 ผลของยาต้านอักเสบต่อการรุกรานของเซลล์ BeWo เลี้ยงเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์/ transwell insert ใน 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ที่รุกรานเมมเบรนออกมาด้านนอกด้วยคริสตัลไวโอเล็ต A: เซลล์ควบคุม, B: เซลล์ที่บำบัดด้วย aspirin, C: เซลล์ที่บำบัดด้วย dexamethasone, D: เซลล์ที่บำบัดด้วย indomethacin, E: เซลล์ที่บำบัดด้วย mesalamine, F: เซลล์ที่บำบัดด้วย naproxen, G: เซลล์ที่บำบัดด้วย sulfasalazine

ในการศึกษาในเซลล์ BeWo พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC_{50} เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่รุกรานแผ่นเมมเบรนมีน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาดังรูปที่ 30 ซึ่งสามารถนับจำนวนเซลล์ในเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยวิธี MTT แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของการรุกรานเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา ดังรูปที่ 31 พบว่ายา aspirin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 49.9% ยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 10.3% ยา indomethacin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 89.9% ยา mesalamine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 59.1% ยา naproxen ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 65.2% และยา sulfasalazine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 46.1%

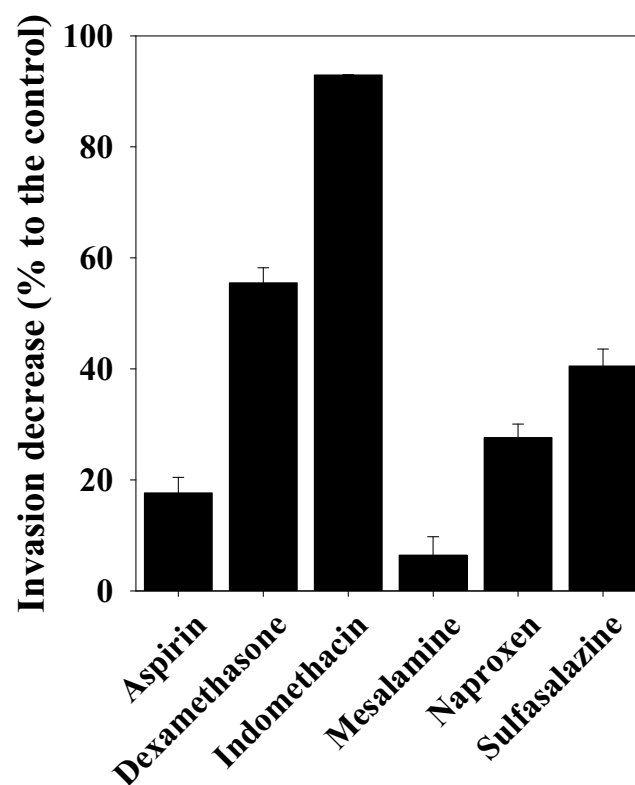


รูปที่ 31 การยับยั้งการรุกรานของเซลล์ BeWo โดยยาต้านอักเสบ เลี้ยงเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์/ transwell insert ใน 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC_{50} เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนับเซลล์ที่รุกรานแผ่นเมมเบรนออกมาด้านนอกด้วยวิธี MTT แล้วคำนวณ % การรุกรานที่ลดลงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาในเซลล์ JAR พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC_{50} เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่รุกรานแผ่นเมมเบรนมีน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาดังรูปที่ 32 ซึ่งสามารถนับจำนวนเซลล์ในเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยวิธี MTT แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของการรุกรานเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาดังรูปที่ 33 พบว่ายา aspirin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 17.7% ยา dexamethasone ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 55.5% ยา indomethacin ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 93% ยา mesalamine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 6.5% ยา naproxen ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 27.6% และยา sulfasalazine ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการรุกรานได้ 40.5%



รูปที่ 32 ผลของยาต้านอักเสบต่อการรุกรานของเซลล์ JAR เลี้ยงเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์/ transwell insert ใน 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ที่รุกรานเมมเบรนออกมาด้านนอกด้วยคริสตัลไวโอเล็ต A: เซลล์ควบคุม, B: เซลล์ที่บำบัดด้วย aspirin, C: เซลล์ที่บำบัดด้วย dexamethasone, D: เซลล์ที่บำบัดด้วย indomethacin, E: เซลล์ที่บำบัดด้วย mesalamine, F: เซลล์ที่บำบัดด้วย naproxen, G: เซลล์ที่บำบัดด้วย sulfasalazine



รูปที่ 33 การยับยั้งการรุกรานของเซลล์ JAR โดยยาด้านอักเสบ เลี้ยงเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์/ transwell insert ใน 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 0.5% ที่มีระดับความเข้มข้นของยาด้านอักเสบที่ความเข้มข้น IC50 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนับเซลล์ที่รุกราน แพร่เมมเบรนออกมาด้านนอกด้วยวิธี MTT แล้วคำนวณ % การรุกรานที่ลดลงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

จุดประสงค์หลักของการดำเนินโครงการวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยาด้านอักเสบต่อเซลล์รกไซโตโทรโบลาสต์ของคน โดยทำการศึกษาในยาสามกลุ่มใหญ่คือ กลุ่มยาด้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ได้แก่ยา aspirin, indomethacin, mesalamine, และ naproxen กลุ่มยาด้านอักเสบที่เป็นสเตียรอยด์ ได้แก่ยา dexamethasone และกลุ่มยาด้านอักเสบที่ออกฤทธิ์ช้า ได้แก่ยา sulfasalazine รวมทั้งหมด 5 ยา ในเซลล์รกโทรโบลาสต์ที่มีต้นกำเนิดมาจากมะเร็งรก (choriocarcinoma) สองเซลล์ไลน์คือ JAR และ BeWo ผลของยาด้านอักเสบต่อเซลล์รกในแง่การเพิ่มจำนวน การเกาะติด ความเป็นพิษ การดำเนินของวงจรเซลล์ การกระตุ้นการตายของเซลล์ได้นำมารวบรวมในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของยาด้านอักเสบต่อเซลล์รก BeWo และ JAR

Anti-inflammatory Drugs	BeWo cell line					JAR cell line				
	IC50 (µg/mL)	Effect on adhesion 3hrs	Increased LDH release	Cell cycle arrest	Induction of apoptotic cell death	IC50 (µg/mL)	Effect on adhesion 3hrs	Increased LDH release	Cell cycle arrest	Induction of apoptotic cell death
Aspirin	116.57	NO	YES	G0/G1	YES	69.35	YES	YES	G2/M	YES
Dexamethasone	80.48	NO	YES	G0/G1	YES	68.43	YES	NO	S	YES
Indomethacin	17.58	NO	YES	S	YES	10.96	YES	YES	S	YES
Mesalamine	192.54	NO	YES	G0/G1	NO	59.92	YES	YES	G2/M	YES
Naproxen	81.13	NO	YES	G0/G1	YES	17.31	YES	YES	G0/G1	YES
Sulfasalazine	79.04	NO	YES	G0/G1	YES	69.35	YES	YES	G2/M	YES

จากการทดลองพบว่ายาทุกชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์รกในระดับที่ต่างกัน ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากยาเหล่านี้มีโครงสร้างที่ต่างกันนั่นเอง อย่างไรก็ตามยาทุกชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์สารสื่อกลางการอักเสบ prostaglandins เช่นเดียวกันแม้ว่าจะมีโมเลกุลเป้าหมายที่ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่า IC50 ในเซลล์ทั้งสองชนิดพบว่า ยา indomethacin มีความเป็นพิษต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์รกมากที่สุดและยา mesalamine มีความเป็นพิษน้อยที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบค่า IC50 และค่าช่วงความเข้มข้นของยาเหล่านี้กับค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารก ดังตารางที่ 2 พบว่าค่า IC50 ของยา aspirin มีค่าต่ำกว่าค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารกประมาณ 25-40 เท่า ส่วน IC50 ของยา naproxen นั้นมีค่าเป็น 0.25-1.2 เท่าของค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารก จากค่าดังกล่าวนี้เองน่าจะแสดงให้เห็นว่าการใช้ยาทั้งสองชนิดนี้นั้นควรต้องเป็นไปอย่างระมัดระวัง ส่วน IC50 ของยาที่เหลือในการทดลองนี้นั้นมีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของทารก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายา dexamethasone, indomethacin, mesalamine และ sulfasalazine น่าจะปลอดภัยต่อการตั้งครรภ์มากกว่ายา aspirin และ naproxen อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มักก่อให้เกิดผลร้ายแรงต่อการตั้งครรภ์ถ้าใช้ในไตรมาสสุดท้ายหรือใกล้คลอดบุตร

ผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้ยังชี้ให้เห็นชัดเจนว่าการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์รกเริ่มต้นตั้งแต่ 3 ชั่วโมงแรกของการได้รับยาและทำให้เซลล์มีการเกาะติดกับภาชนะได้น้อยลง จากผลการทดลองนี้น่าจะกล่าวได้ว่ายาด้านอักเสบมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเกาะติดของเซลล์โทรโบลาสต์กับผนังมดลูกได้เช่นกันในระดับ *in vivo* นอกจากนี้ยาด้านอักเสบยังยับยั้งการรุกรานของเซลล์รกโทรโบลาสต์

นอกจากนี้ยังเกิดจากการกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์โดยแสดงได้จากเซลล์มีการปล่อย LDH ออกนอกเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการแตกหักของ DNA และมีการยับยั้งการแสดงออกของจีนที่ควบคุมกระบวนการตายได้อีกด้วย นอกจากนี้ยาทุกชนิดยังส่งผลให้การดำเนินของวงจรเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาก็คือ ยาทุกชนิดทำให้วงจรเซลล์มีการดำเนินไปช้าลง ยาต้านอักเสบทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบในโครงการวิจัยนี้ยังยับยั้งการสร้างจีนที่สร้างฮอร์โมน hCG อีกด้วย ปรากฏการณ์เหล่านี้เป็นเช่นเดียวกับผลการทดลองของนักวิจัยกลุ่มอื่นเช่น

ตารางที่ 2 ค่า IC50 ของยาด้านอักเสบต่อเซลล์รกโทรโปลาสต์ และความเข้มข้นของยาในพลาสมา

Anti-inflammatory Drugs	<u>BeWo cell line</u>		<u>JAR cell line</u>		<u>Drug plasma (cord blood) concentration</u> (µg/mL)
	Effective Drug range (µg/mL)	IC50 (µg/mL)	Effective Drug range (µg/mL)	IC50 (µg/mL)	
Aspirin	31.25-250	116.57	25-400	69.35	3000
Dexamethasone	31.25-250	80.48	12.5-200	68.43	No report
Indomethacin	6.25-50	17.58	1.56-25	10.96	0.2
Mesalamine	31.25-250	192.54	18.75-300	59.92	1.8
Naproxen	18.75-150	81.13	6.25-100	17.31	68
Sulfasalazine	018.75-150	79.04	6.25-100	69.35	4.6

ในการทดลองผลของยา indomethacin ใน Lewis lung carcinoma cell (Eli et al. 2001) พบว่ายานี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมทำให้เซลล์ที่มีชีวิตเหลือน้อยลง ซึ่งศึกษาโดยวิธี ^3H thymidine assay และ MTT assay นอกจากนี้ยังพบว่ายานี้สามารถยับยั้งการดำเนินของวงจรเซลล์โดยการกระตุ้นให้เซลล์ในระยะ S และ G2/M มีจำนวนลดลงในขณะที่เซลล์ในระยะ G0/G1 มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้พบว่ายานี้สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือดโดย endothelial cells (Pai et al. 2000) ได้โดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังกล่าว ลดการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1 แต่เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p21 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายานี้สามารถเปลี่ยนแปลงการดำเนินวงจรของเซลล์ได้ สำหรับผลของยานี้ในแง่อื่นพบว่ายานี้ indomethacin สามารถเพิ่มกระบวนการนำ leptin เข้าสู่เซลล์ใน BeWo cells (Duttaroy et al. 2002) ได้ แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการสร้างฮอร์โมน hCG ที่ถูกกระตุ้นโดย interleukin-1 ในเซลล์ JAR (Yagel et al. 1989)

การศึกษาวิจัยโดยนักวิจัยหลายกลุ่มพบว่ายานี้ aspirin ที่ทดสอบกับเซลล์ Caco-2 (Ricchi et al. 1997) ที่เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากมะเร็งลำไส้มีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ดังกล่าว และสามารถกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และยังพบว่ายานี้สามารถเพิ่มกระบวนการ differentiation ของเซลล์นี้ได้ นอกจากนี้การศึกษาผลของยา aspirin ในเซลล์ SW620 และ HT-29 ที่มีต้นกำเนิดมาจากลำไส้พบว่ายานี้สามารถยับยั้งกระบวนการดำเนินของวงจรเซลล์ได้และกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ necrosis (Subbegowda and Frommel 1998)

ในเซลล์กลุ่ม vascular endothelial cells (Sharon et al. 1992) โดยพบว่ายานี้ sulfasalazine สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ ซึ่งกลไกนี้น่าจะเกิดจากการลดการสังเคราะห์ thymidine โดยเอ็นไซม์ที่ต้องอาศัยสาร folate และนอกจากนี้พบว่ายานี้ sulfasalazine สามารถชะลอการดำเนินของวงจรเซลล์จากระยะ G0/G1 ไปสู่ระยะ S

ในการศึกษาระดับ in vitro ในเซลล์ A172, T98G และ 86HG39 (Kaup et al. 2001) ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้องอกของสมอง พบว่ายานี้ dexamethasone ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการรักษาเนื้องอกของสมองต่อไป นอกจากนี้ในการศึกษาตัวอย่างอื่นได้แก่ ยา dexamethasone มีผลในการยับยั้งการเพิ่ม

จำนวนของ human aortic smooth muscle cells (Reil et al. 2000) ยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณของ DNA ยับยั้งการดำเนินของวงจรเซลล์ในระยะ G1 เป็นระยะ S ซึ่งเกิดจากการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีน Rb ส่วนผลของยา dexamethasone ต่อ human corneal epithelial cells (Bourcier et al. 2000) มีผลในทางตรงข้าม กล่าวคือ ยาดังกล่าวกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ชนิดนี้อย่างไรก็ตามยา dexamethasone สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ด้วย

สำหรับกลไกระดับโมเลกุลของการชะลอวงจรเซลล์โดยยาต้านอักเสบในเซลล์รกโทรโฟบลาสต์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่ยาส่งผลให้มีการรบกวนกระบวนการของโปรตีนที่ควบคุมวงจรเซลล์ และอาจจะรบกวนการสร้าง DNA ด้วย อย่างไรก็ตามกลไกระดับโมเลกุลของการชะลอวงจรเซลล์อื่นๆ นั้นมีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วเช่น ในสภาวะขาดอากาศพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีการชะลอวงจรเซลล์ในระยะ S ซึ่งเกิดจากการลดลงของโปรตีน cyclin A (Seim et al. 2003) ส่วนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่ามีการชะลอวงจรเซลล์ในระยะ S ในขณะที่มีชีรัมน้อยนั้นเกิดจากการลดลงของโปรตีน cyclin A, cyclin B, และ cdc2 (Kerkhoff and Ziff 1995)

นอกเหนือจากการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์รียังเกิดจากการที่ส่งผลให้การสร้างฮอร์โมน hCG ได้ลดลงดังที่แสดงในผลการทดลองที่ผ่านมา เนื่องจากฮอร์โมนดังกล่าวยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของเซลล์รกด้วย และสมมติฐานอย่างหนึ่งที่เป็นไปได้คือยาต้านอักเสบเหล่านี้ยับยั้ง cyclooxygenase ที่คาดว่าน่าจะมีส่วนสำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์ได้ตั้งในเซลล์อื่นๆ (Tsuji et al. 1996; Tsujii et al. 1997; Tucker et al. 1999; Ding et al. 2000; Lim et al. 2001; Yu et al. 2002; Seeram et al. 2003; Park et al. 2004)

เอกสารอ้างอิง

- Bourcier, T., Forgez, P., Borderie, V., Scheer, S., Rostene, W. and Laroche, L. 2000. Regulation of human corneal epithelial cell proliferation and apoptosis by dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 4133-4141.
- Ding, X.Z., Tong, W.G. and Adrian, T.E. 2000. Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 20: 2625-2631.
- Duttaroy, A.K., Taylor, J., Gordon, M.J., Hoggard, N. and Campbell, F.M. 2002. Arachidonic acid stimulates internalisation of leptin by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 299: 432-437.
- Eli, Y., Przedecki, F., Levin, G., Kariv, N. and Raz, A. 2001. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.* 61: 565-571.
- Kaup, B., Schindler, I., Knupfer, H., Schlenzka, A., Preiss, R. and Knupfer, M.M. 2001. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol.* 51: 105-110.
- Kerkhoff, E. and Ziff, E.B. 1995. Cyclin D2 and Ha-Ras transformed rat embryo fibroblasts exhibit a novel deregulation of cell size control and early S phase arrest in low serum. *Embo J.* 14: 1892-1903.
- Lim, J.W., Kim, H. and Kim, K.H. 2001. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab Invest.* 81: 349-360.
- Pai, R., Szabo, I.L., Kawanaka, H., Soreghan, B.A., Jones, M.K. and Tarnawski, A.S. 2000. Indomethacin inhibits endothelial cell proliferation by suppressing cell cycle proteins and PRB phosphorylation: a key to its antiangiogenic action? *Mol Cell Biol Res Commun.* 4: 111-116.

- Park, D.I., Choi, H.Y., Kam, C.W., Park, C., Choi, T.H., Lee, W.H. and Choi, Y.H. 2004. Wikyungtang inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells via inducing apoptosis and suppressing cyclooxygenase-2 activity. *Oncol Rep.* 11: 853-856.
- Reil, T.D., Kashyap, V.S., Sarkar, R., Freishlag, J. and Gelabert, H.A. 2000. Dexamethasone inhibits the phosphorylation of retinoblastoma protein in the suppression of human vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res.* 92: 108-113.
- Ricchi, P., Pignata, S., Di Popolo, A., Memoli, A., Apicella, A., Zarrilli, R. and Acquaviva, A.M. 1997. Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Int J Cancer.* 73: 880-884.
- Seeram, N.P., Zhang, Y. and Nair, M.G. 2003. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr Cancer.* 46: 101-106.
- Seim, J., Graff, P., Amellem, O., Landsverk, K.S., Stokke, T. and Pettersen, E.O. 2003. Hypoxia-induced irreversible S-phase arrest involves down-regulation of cyclin sp. *Cell Proliferation.* 36: 321-332.
- Sharon, P., Drab, E.A., Linder, J.S., Weidman, S.W., Sabesin, S.M. and Rubin, D.B. 1992. The effect of sulfasalazine on bovine endothelial cell proliferation and cell cycle phase distribution. Comparison with olsalazine, 5-aminosalicylic acid, and sulfapyridine. *J Lab Clin Med.* 119: 99-107.
- Subbegowda, R. and Frommel, T.O. 1998. Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest. *Cancer Res.* 58: 2772-2776.
- Tsuji, S., Kawano, S., Sawaoka, H., Takei, Y., Kobayashi, I., Nagano, K., Fusamoto, H. and Kamada, T. 1996. Evidence for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 55: 179-183.
- Tsujii, M., Kawano, S. and DuBois, R.N. 1997. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *PNAS.* 94: 3336-3340.
- Tucker, O.N., Dannenberg, A.J., Yang, E.K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J.M., Soslow, R.A., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Koki, A.T. and Fahey, T.J., III 1999. Cyclooxygenase-2 Expression Is Up-Regulated in Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 59: 987-990.
- Yagel, S., Lala, P.K., Powell, W.A. and Casper, R.F. 1989. Interleukin-1 stimulates human chorionic gonadotropin secretion by first trimester human trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab.* 68: 992-995.
- Yu, H.G., Huang, J.A., Yang, Y.N., Huang, H., Luo, H.S., Yu, J.P., Meier, J.J., Schrader, H., Bastian, A., Schmidt, W.E. and Schmitz, F. 2002. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *Eur J Clin Invest.* 32: 838-846.

Output ที่ได้จากโครงการ

๑. ส่งผลงานวิจัยบางส่วนเพื่อเข้าร่วมประชุมนานาชาติ ประชุมเชิงวิชาการเพื่อไปเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ ในสาขาภูมิคุ้มกันวิทยา ณ 7th World Congress on Inflammation ที่ Melbourne ประเทศออสเตรเลีย ระยะเวลา 5 วัน ระหว่างวันที่ 20-24 สิงหาคม 2548 และตีพิมพ์บทความในวารสารของการประชุม

Nilkaeo, A., Bhuvanath, S., Motae, J., and Karnchanapin, W. (2005) Cytotoxic effect of NSAIDs on human choriocarcinoma cell line. *Inflamm Res* 54 (supplement 2): S162. (Journal impact factor = 1.21)

๒. ส่งผลงานวิจัยบางส่วนเพื่อเข้าร่วมประชุมนานาชาติ ประชุมเชิงวิชาการเพื่อไปเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ ในสาขาชีววิทยาของเซลล์รก ณ The 12th International Federation of Placenta Associations Meeting ที่เมือง Kobe ประเทศญี่ปุ่น ระยะเวลา 4 วัน ระหว่างวันที่ 6- 9 กันยายน 2549 และตีพิมพ์บทความในวารสารของการประชุม

Bhuvanath, S, **Nilkaeo, A.** and Motae, J. (2006). Anti-inflammatory drugs modulation of cell cycle progression and induction of apoptosis in human choriocarcinoma JAR cells. *PLACENTA* 27(9-10): A25. (Journal impact factor = 2.883)

๓. ส่งผลงานวิจัยบางส่วนของการศึกษาในเซลล์รก BeWo เพื่อเข้าร่วมประชุมวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 12-14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมรีเจนท์ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง *Induction of cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis in human placental trophoblast by anti-inflammatory drugs.*

๔. เตรียมต้นฉบับตีพิมพ์