



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล
ในการลดการอักเสบของอนุพันธ์ของ NAMDA

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ

สิงหาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล ในการลดการอักเสบของอนุพันธ์ของ NAMDA

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา
2. ผศ.ดร. เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ไนตริกออกไซด์ในปริมาณมากที่ถูกผลิตขึ้นจากเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคจากการอักเสบต่างๆ สาร N-acetyl-O-methyldopamine (NAMDA) และอนุพันธ์สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ในการวิจัยนี้ ทำการศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ที่ถูกเลือกมาศึกษา คือ BMC3 BMC12 BMC34 และ BMC41 อนุพันธ์ NAMDA เหล่านี้ ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลของ Western-blot และ RT-PCR แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ NAMDA ลดการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ของ iNOS ซึ่งสอดคล้องกับการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ อนุพันธ์ NAMDA เหล่านี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ของ heme oxygenase-1 (HO-1) ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา สาร BMC41 เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง iNOS สามารถลดการแสดงออกของ iNOS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น เป็นผลให้มีการลดไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นจากเอนไซม์ iNOS สาร BMC41 ยังยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสของ nuclear factor-KB (NF-KB) หน่วยย่อย p65 และลดแอกติวิตีของ iNOS promoter นอกจากนี้ยังพบว่า tin protoporphyrin IX (SnPP) ที่เป็นสารยับยั้ง HO-1 สามารถลดความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของ BMC41 ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร BMC41 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และการผลิตไนตริกออกไซด์ เกิดโดยกลไกการยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสของ NF-KB และการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 ดังนั้นสาร BMC41 จึงมีศักยภาพในการเป็นสารต้านอักเสบชนิดใหม่ที่ใช้รักษาโรคจากการอักเสบที่ไนตริกออกไซด์มีส่วนรวม

คำสำคัญ : แมคโครฟาจ, ไนตริกออกไซด์, inducible nitric oxide synthase, heme oxygenase-1, NAMDA

Abstract

High amount of nitric oxide (NO) produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) appears to be involved in pathogenesis of various inflammatory diseases. *N*-acetyl-*O*-methyldopamine (NAMDA) and its derivatives have been shown to inhibit iNOS activity. In this study, we evaluated the molecular mechanism underlying the inhibition of NO production of BMC3, BMC12, BMC34 and BMC41, selected newly synthesized NAMDA derivatives. All of selected NAMDA derivatives suppressed strikingly NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. Western-blot and RT-PCR data showed that down-regulation of iNOS protein and mRNA expression was coincident with inhibition of NO production. Interestingly, all of selected NAMDA derivatives induced the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA and protein in a concentration- and a time-dependent manner. One of selected NAMDA derivatives, BMC41, the most potent iNOS inhibitor, suppressed the expression of iNOS in a dose-dependent manner resulting in the reduction of iNOS-derived NO formation. BMC41 also inhibited nuclear translocation of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B) and decreased LPS-stimulated iNOS promoter activity. Furthermore, the inhibitory effect on NO production of BMC41 was significantly reversed by a HO-1 inhibitor, tin protoporphyrin IX (SnPP). Taken together, these results suggest that BMC41 compound has anti-inflammatory effect in LPS-treated macrophages by inhibition of iNOS expression and NO production via mechanisms involving suppression of the NF- κ B nuclear translocation and the activation of HO-1. Thus, BMC41 compound has potential to be used as a novel agent for the treatment of NO-related inflammatory diseases.

Keywords: inducible nitric oxide synthase, heme oxygenase-1, macrophage, NAMDA, nitric oxide.

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) ในปัจจุบันพบว่า NOS มี 3 isoform ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) โดยที่ nNOS และ eNOS เป็น constitutive form ในขณะที่ iNOS เป็น inducible form การเร่งปฏิกิริยาของ NOS ต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH₄) และฮีม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF- κ B ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะถูกจับโดย I κ B และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณให้มีการสลาย I κ B ส่งผลให้ NF- κ B เกิด translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS

ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Coleman, 2001) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็น inflammatory mediator ที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปน่าจะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีหลาย

วิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS หรือยีนสำหรับสร้างโคแฟกเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบต่อไป

HO-1 (EC 1.14.99.3) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกลุ่มฮีมได้ผลผลิตเป็นเหล็ก (Fe^{2+}) คาร์บอน มอนอกไซด์ (CO) และ biliverdin ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อเป็น bilirubin โดยเอนไซม์ biliverdin reductase ทั้ง biliverdin และ bilirubin หน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ส่วน คาร์บอนมอนอกไซด์ถูกรายงานว่าสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และลดการแสดงออกของ ยีน iNOS (Sarady-Andrews, 2005; Sawles, 2005; Srisook K., 2006) ดังนั้นการกระตุ้น เอนไซม์ HO-1 นอกจากที่จะลดการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว ยังสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระ อื่นๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการตอบสนองการอักเสบ (immune response) ได้อีกด้วย จึงทำให้การ ต้านการอักเสบมีประสิทธิภาพมากขึ้นและไม่ทำให้สมดุลของ oxidative stress เสียไป

N-acetyl-3-O-methyldopamine (NAMDA) เป็นสารเมตาบอไลต์ของ dopamine ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) สาร NAMDA แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ microglia ของหนู (BV-2) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยผ่านการยับยั้งการผลิต BH_4 นอกจากนี้ NAMDA ยังมีผลในการปกป้องเซลล์สมองชนิด CA1 hippocampus จากการถูก ทำลายด้วยไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไป (Cho, 1999) ถึงแม้ว่า NAMDA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อ เซลล์ แต่ระดับความเข้มข้นที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้อยู่ที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 1-3 mM นอกจากนี้ Seo และคณะ (2005, 2008) ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของ NAMDA และพบว่าอนุพันธ์ NAMDA ที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถลดการผลิตไนตริก ออกไซด์ในเซลล์ BV-2 ลงประมาณ 60% นอกจากนี้กลุ่มวิจัยของเราได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ จำนวน 43 สาร เมื่อศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูก กระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับ in vitro โดยพบว่าอนุพันธ์ NAMDA จำนวน 10 สารจากทั้งหมด 43 สาร ที่ความเข้มข้น 100 μM แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับ ต่ำ และสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ได้มากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (Srisook E., 2006 และ Mongkol, 2008) จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า อนุพันธ์ NAMDA ทั้ง 10 สารนี้ สามารถลด ปริมาณโปรตีนของ iNOS แต่มีสารกลุ่มหนึ่งนอกจากจะมีฤทธิ์ลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้มาก แล้วยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน HO-1 ได้ ในขณะที่อนุพันธ์ NAMDA อีกกลุ่ม หนึ่งไม่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน HO-1 ได้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดง ให้เห็นว่าอนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่เหล่านี้มีศักยภาพที่จะถูกพัฒนาไปเป็นยาต้านการอักเสบได้

เนื่องจากมีความสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม กลไกในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA เหล่านี้ยังไม่ได้ทำการศึกษา โดยกลไกหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือการลดการผลิตไนตริกออกไซด์โดยผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ HO-1 ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของอนุพันธ์ NAMDA เหล่านี้ เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ iNOS และ HO-1 ที่จะนำไปสู่แนวทางใหม่ในการยับยั้งการอักเสบต่อไป

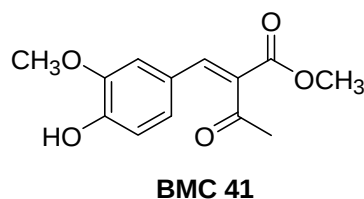
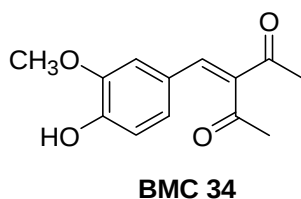
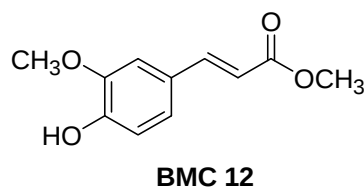
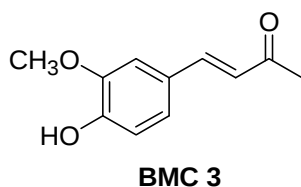
2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ HO-1 ในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS
2. เพื่อตรวจสอบผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อการกระตุ้น NF-B และ iNOS promoter activity ของ เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS
3. เพื่อศึกษาถึงโมเลกุลในการส่งสัญญาณชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ที่ใช้ในการทดสอบ

สังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ที่มีโครงสร้างคล้าย ferulic acid ที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 4 โครงสร้าง เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอกับการทดสอบ กลุ่มแรกเป็นอนุพันธ์ที่ลดการผลิตไนตริกออกไซด์และลดปริมาณ iNOS และเหนี่ยวนำปริมาณโปรตีน HO-1 (BMC 3 และ BMC 34) ในขณะที่กลุ่มที่สองเป็นอนุพันธ์ที่ลดการผลิตไนตริกออกไซด์และลดปริมาณ iNOS แต่ไม่เหนี่ยวนำปริมาณโปรตีน HO-1 (BMC 12 และ BMC 41) ดังแสดงในรูปข้างล่าง



3.2 การทดสอบปริมาณไนไตรท์

ไนไตรท์เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารที่ทดสอบละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งใส่ LPS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 $\mu\text{g/ml}$ และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 100 μl ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μl จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite

3.3 นำอนุพันธ์ NAMDA ทั้ง 4 โครงสร้างมาทำการทดสอบปริมาณ mRNA ของยีน HO-1 และ iNOS โดยเทคนิค Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) สร้าง cDNA จาก RNA ทั้งหมดโดยเอนไซม์ reverse transcriptase และ oligo(dT) primer ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย dNTPs และ RNase Inhibitor โดยทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของ HO-1, iNOS และ β -actin ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 1 วิเคราะห์ผลผลิต RT-PCR ที่ได้บน agarose gel electrophoresis ซึ่งย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพ gel ที่ได้ภายใต้แสง uv เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้หลังจากที่ standadize กับความเข้มของแถบ β -actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของยีนต่างๆ

Target	Primer sequences	Product size (bp)	Accession no.
iNOS	5'-CTAAGAGTCACCAAAATGGCTCCC-3'(sense) 5'-ACCAGAGGCAGCACATCAAAGC-3' (antisense)	775	NM010927.2
HO-1	5'-TGAAGGAGGCCACCAAGGAGG-3'(sense) 5'-AGAGGTCACCCAGGTAGCGGG-3'(antisense)	375	NM010442.1
β -actin	5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAAGGAC-3'(sense)	513	NM007393.2

	5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTC-3'(antisense)		
--	--	--	--

3.4 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ โดยเทคนิค Western Blotting

นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ มาทำให้เซลล์แตกโดยการเติม lysis buffer และทำการ sonication บนน้ำแข็งโดย Vibracell ultrasonic processor จะได้ whole cell protein extract วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A.) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ก่อนย้ายโปรตีนไปที่ PVDF membrane และบ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ ตามด้วย goat anti-mouse หรือ goat anti-rabbit IgG:horseradish peroxidase secondary antibodies และตรวจวิเคราะห์ผลโดย chemiluminescence โดยใช้ SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้บนแผ่น X-ray film หลังจากที่ได้ standadize กับความเข้มของแถบ β -actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

ในการทดสอบผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อการกระตุ้นและเคลื่อนที่ของ NF-B จะใช้ nuclear protein extract ในการทำ Western Blotting แทน whole cell protein extract

3.5 การทดสอบ iNOS promoter activity

ทำการโคลนชิ้นโปรโมเตอร์ของ iNOS ที่ตำแหน่งที่ -1588 ถึง +165 โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ 5'-GGTACCGACTTTGATATGCTGAAATCCATA-3' และ 5'-GATCTAGTTGACTAGG CTACTCCGTG-3' ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นโปรโมเตอร์ดังกล่าวจาก gDNA ด้วยวิธี PCR ก่อนนำ PCR product เข้าสู่ พลาสมิด pGEM-T easy vector ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้น inserted DNA ก่อน subclone เข้าสู่ pGL3-basic vector ที่บริเวณ KpnI/BglII จากนั้นนำไป transfection เข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ก่อนให้สัมผัสกับ LPS และ/หรืออนุพันธ์ NAMDA และตรวจสอบ luciferase activity โดยเครื่อง luminometer ในการทดสอบใช้ pSV- β -galactosidase control vector เป็นตัวควบคุม

3.6 การวิเคราะห์ผล

3.6.1 การวิเคราะห์ผลจาก agarose gel electrophoresis และแถบโปรตีนโดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้โดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

3.6.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบ

ปริมาณไนโตรท์ ปริมาณ luminescence หรือความเข้มของแถบโปรตีนหรือ PCR product โดย
ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากแต่ละสภาวะ โดยเปรียบเทียบแบบ Student 's *t*-test หรือ one way
ANOVA ($P < 0.05$)

1. แผนการดำเนินการวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรมหลัก	เดือนที่				ผู้รับผิดชอบ
	1-6	7-12	13-18	19-24	
การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ ของ NAMDA					เอกรัฐ
การตรวจสอบผลของ อนุพันธ์ NAMDA ต่อการ แสดงออกของยีน iNOS และ HO-1					กล่าวขวัญ
การตรวจสอบ iNOS activity. ในสภาวะที่มีการ กระตุ้น HO-1 และ/หรือ ในสภาวะที่มีตัวยับยั้ง HO-1					กล่าวขวัญ
การสร้าง iNOS promoter containing vector					กล่าวขวัญ
ตรวจสอบผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อการกระตุ้น NF- B และ iNOS promoter activity					กล่าวขวัญ
การทดสอบโมเลกุลใน การส่งสัญญาณชีวภาพที่ เกี่ยวข้องกับการลดการ ผลิตไนตริกออกไซด์ อนุพันธ์ NAMDA					กล่าวขวัญ

การวิเคราะห์ สรุปผล และการตีพิมพ์ผลงานใน วารสาร					กล่าวขวัญ, เอก รัฐ
---	--	--	--	--	-----------------------

2. ผลงาน/หัวเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1 : ไม่มี

ปีที่ 2 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Suppressive effects of nitric oxide
production and inducible nitric oxide
synthase by NAMDA derivatives in LPS-
stimulated macrophages

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Biochemical Pharmacology
impact factor : 3.581

3. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน)

รายการ	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000.-	120,000.-	240,000.-
2. หมวดค่าวัสดุ			
- ค่าสารเคมีและอุปกรณ์	120,000.-	120,000.-	240,000.-
3. หมวดค่าใช้สอย	-	-	-
รวมงบประมาณทั้งโครงการ	240,000.-	240,000.-	480,000.-

รายละเอียดโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลในการลดการอักเสบของอนุพันธ์

NAMDA

(ภาษาอังกฤษ) : Study on molecular mechanism underlying the inhibitory effect of

NAMDA derivatives

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) : นางกล่าวขวัญ ศรีสุข

(ภาษาอังกฤษ) : KLAOKWAN SRISOOK

(ตำแหน่งวิชาการ) : ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ระยะเวลาดำเนินงาน : 2 ปี - เดือน

เวลาทำงานวิจัยในโครงการประมาณสัปดาห์ละ 20 ชั่วโมง

สถานที่ติดต่อ :

ที่ทำงาน

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

โทรศัพท์

0-3810-3058

โทรสาร

0-3839-3495

e-mail

klaokwan@buu.ac.th

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา (ภาษาไทย) : นาย ศราวุฒิ จิตรภักดี

(ภาษาอังกฤษ) : SARAWUT JITRAPAKDEE

(ตำแหน่งวิชาการ) : รองศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ :

ที่ทำงาน

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระรามหก พญาไท กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์

0-2201-5460

โทรสาร

0-2354-7174

e-mail

scsji@mahidol.ac.th

ชื่ออธิการบดี หรือ ผู้รับมอบอำนาจให้ลงนามแทนอธิการบดี

นาย สุชาติ อุปถัมภ์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) ในปัจจุบันพบว่า NOS มี 3 isoform ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) โดยที่ nNOS และ eNOS เป็น constitutive form ในขณะที่ iNOS เป็น inducible form การเร่งปฏิกิริยาของ NOS ต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH₄) และฮีม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF- κ B ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะถูกจับโดย I κ B และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณให้มีการสลาย I κ B ส่งผลให้ NF- κ B เกิด translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS

ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Coleman, 2001) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham,

1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็น inflammatory mediator ที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้จะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS หรือ ยีนสำหรับสร้างโคแฟกเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบต่อไป

HO-1 (EC 1.14.99.3) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกลุ่มฮีโมได้ผลิตเป็นเหล็ก (Fe^{2+}) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และ biliverdin ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อเป็น bilirubin โดยเอนไซม์ biliverdin reductase ทั้ง biliverdin และ bilirubin หน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ส่วน คาร์บอนมอนอกไซด์ถูกรายงานว่าสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS (Sarady-Andrews, 2005; Sawles, 2005; Srisook K., 2006) ดังนั้นการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 นอกจากที่จะลดการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว ยังสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระอื่นๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการตอบสนองการอักเสบ (immune response) ได้อีกด้วย จึงทำให้การต้านการอักเสบมีประสิทธิภาพมากขึ้นและไม่ทำให้สมดุลของ oxidative stress เสียไป

N-acetyl-3-*O*-methyldopamine (NAMDA) เป็นสารเมตาบอไลต์ของ dopamine ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) สาร NAMDA แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ microglia ของหนู (BV-2) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยผ่านการยับยั้งการผลิต BH_4 นอกจากนี้ NAMDA ยังมีผลในการปกป้องเซลล์สมองชนิด CA1 hippocampus จากการถูกทำลายด้วยไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไป (Cho, 1999) ถึงแม้ว่า NAMDA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ระดับความเข้มข้นที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้อยู่ที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 1-3 mM นอกจากนี้ Seo และคณะ (2005, 2008) ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของ NAMDA และพบว่าอนุพันธ์ NAMDA ที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดที่มีความเข้มข้น 100 μM สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ BV-2 ลงประมาณ 60% นอกจากนี้กลุ่มวิจัยของเราได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ จำนวน 43 สาร เมื่อศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับ in vitro โดยพบว่าอนุพันธ์ NAMDA จำนวน 10 สารจากทั้งหมด 43 สาร ที่ความเข้มข้น 100 μM แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ และสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW

264.7 ได้มากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (Srisook E., 2006 และ Mongkol, 2008) จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า อนุพันธ์ NAMDA ทั้ง 10 สารนี้ สามารถลดปริมาณ mRNA ของ iNOS และยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ mRNA ของ HO-1 ได้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่เหล่านี้มีศักยภาพที่จะถูกพัฒนาไปเป็นยาต้านการอักเสบได้ เนื่องจากมีความสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA เหล่านี้ยังไม่ได้ทำการศึกษาโดยกลไกหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือการลดการผลิตไนตริกออกไซด์โดยผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ HO-1 ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของอนุพันธ์ NAMDA เหล่านี้เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ iNOS และ HO-1 ที่จะนำไปสู่แนวทางใหม่ในการยับยั้งการอักเสบต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อตรวจสอบผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ HO-1 ในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS
2. เพื่อศึกษาถึงโมเลกุลในการส่งสัญญาณชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS

1.3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

สาร NAMDA และอนุพันธ์ NAMDA บางชนิด จำนวน 33 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ BV-2 microglial ได้ โดยมีกลไกในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ คือ ยับยั้งการผลิต tetrahydrobiopterin (BH_4) ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของ iNOS (Cho และคณะ, 1999; Seo และคณะ, 2005 และ 2008)

มีรายงานการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยผ่านการยับยั้งวิถี NF- κ B

Tsao และคณะ (2002) ทำการสังเคราะห์สาร LCY-2-CHO [9-(2-chlorobenzyl)-9H-caebazole-3-carbaldehyde] และพบว่า LCY-2-CHO สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น และยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับ transcription โดยที่สารไม่ไปเร่งการสลายตัวของ mRNA ของ iNOS นอกจากนี้ สาร LCY-2-CHO สามารถการเหนี่ยวนำ iNOS

promotor activity ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS แต่ไม่มีผลต่อการสลายตัวของ $\text{IKB}\alpha$ หรือ $\text{IKB}\beta$ และแอกติวิตีของ NF- KB ในการจับกับดีเอ็นเอ ต่อมาภายหลังสาร LCY-2-CHO ได้ถูกรายงานว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งเป็นโปรตีนในขบวนการส่งสัญญาณชีวภาพของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS แต่ไม่ผลต่อการกระตุ้น ERK และ JNK ของ MAPKs (Ho, 2004)

สาร chroman KL-1156 หรือ 6-Hydroxy-7-methoxychroman-2-carboxylic acid phenylamide สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS และยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS กลไกในการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของ chroman KL-1156 คือ การยับยั้งการ translocation ของ NF- KB เข้าสู่นิวเคลียส และลดแอกติวิตีของ NF- KB ในการจับกับดีเอ็นเอ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในขณะที่สาร chroman KL-1156 ไม่มีผลต่อการสลายตัวของ $\text{IKB}\alpha$ (Kim, 2004).

ในปี 2005, Shin และคณะได้รายงานฤทธิ์ต้านอักเสบโดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของ N^1 -benzyl-4-methylbenzene-1,2-diamine (BMD) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับ transcription และลด iNOS promotor activity นอกจากนี้ยังลดการ translocation ของ NF- KB เข้าสู่นิวเคลียส และลดแอกติวิตีของ NF- KB ในการจับกับดีเอ็นเอ แต่สาร BMD ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้น p38, ERK-1/2 หรือ JNK ของ MAPKs ได้

อนุพันธ์ของ chalcone ทั้งหมด 41 ชนิด ถูกสังเคราะห์และทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกสัมผัสกับ LPS พบว่า อนุพันธ์ของ chalcone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 7.1 ถึง 23.1 μM โดยที่อนุพันธ์บางตัวสามารถลดการกระตุ้น NF- KB และลดปริมาณ mRNA กับโปรตีนของ iNOS ในขณะที่อนุพันธ์บางตัวไม่สามารถลดปริมาณ mRNA กับโปรตีนของ iNOS รวมทั้งไม่สามารถลดการกระตุ้น NF- KB (Kim, 2007)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Jin และคณะได้รายงานว่อนุพันธ์ของสาร phenylisothiurea สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยที่อนุพันธ์บางตัวสามารถลดปริมาณ mRNA กับโปรตีนของ iNOS และยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของหน่วยย่อย p65 ของ NF- KB

นอกจากกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยผ่านการยับยั้งการกระตุ้น NF- B แล้วยังมี รายงานที่แสดงถึงกลไกอีกทางหนึ่งคือ การยับยั้งเกิดโดยผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ HO-1 โดยผ่านการ กระตุ้นการแสดงออกของ HO-1

Kwak และคณะ (2005) รายงานผลการศึกษากลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ ปริมาณไนตริกออกไซด์รวมทั้ง TNF- α โดย roflumilast เป็นตัวยับยั้งของ phosphodiesterase 4 (PDE4) ซึ่งใช้เป็นยาในการรักษาผู้ป่วยโรคหืด พบว่า roflumilast นี้กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน HO-1 ซึ่งผลของการกระตุ้นนี้ทำให้ลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ กระตุ้นด้วย LPS เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นตัวที่ เกี่ยวข้องกับการลดไนตริกออกไซด์

การศึกษาของ Lee และคณะ (2006) พบว่า 2',4',6' tris (methoxymethoxy) chalcone (TMMC)สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และลดการแสดงออกของยีน iNOS โดยลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS และลดการสลายตัว ของ I κ B สาร TMMC สารกระตุ้นการแสดงออกของ HO-1 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนฤทธิ์การ ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ลดลงเมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ zinc protoporphyrin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ HO-1 หรือสัมผัสกับฮีมโกลบินซึ่งเป็นสารที่กำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร TMMC กระตุ้นการแสดงออกของ HO-1 โดยการกระตุ้น p42/44 MAPK ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Park และคณะ ได้รายงานการค้นคว้าอีกเส้นของอนุพันธ์ chalcone ชนิดใหม่ คือ KB-34 (3-Phenyl-1-(2,4,6- tris (methoxymethoxy)phenyl)prop-2-yn-1-one) ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ใน เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS และยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS กลไก ในการออกฤทธิ์ด้านอีกเส้นของ chroman KL-1156 คือ ยับยั้งการกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) แต่ไม่มีผลต่อเอกติวิตีของวิถี NF- B นอกจากนี้ยังพบว่าอีกกลไกหนึ่งที่สาร KB-34 สามารถลดการผลิต ไนตริกออกไซด์คือเกิดผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1

Propyl gallate (PG, 3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid propylester) เป็นสารต้านออกซิเดชัน สังเคราะห์ที่ถูกรายงานว่า สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และลดการแสดงออกของยีน iNOSใน เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS รวมทั้งลด iNOS promotor activity สาร PG ถก ะตุ้นการแสดงออกของ HO-1 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน จากผลการทดลองเมื่อทำการลดเอกติวิตี ของ HO-1โดยให้เซลล์สัมผัสกับ zinc protoporphyrin หรือทำการ knockdown การแสดงออกของ HO-

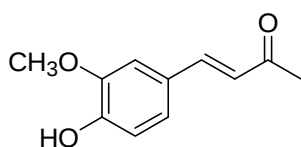
1 โดยเทคนิค siRNA พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ลดลง ดังนั้นฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของ PG เกิดขึ้นโดยผ่านกลไกการกระตุ้น HO-1 (Jeon and Kim, 2007)

บทที่ 2

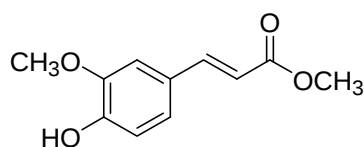
วิธีการทดลอง

2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ที่ใช้ในการทดสอบ

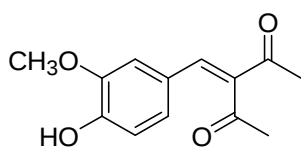
สังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 4 โครงสร้าง เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอกับการทดสอบ กลุ่มแรกเป็นอนุพันธ์ที่ลดการผลิตไนตริกออกไซด์และลดปริมาณ iNOS และเหนี่ยวนำปริมาณโปรตีน HO-1 (BMC 3 และ BMC 34) ในขณะที่กลุ่มที่สองเป็นอนุพันธ์ที่ลดการผลิตไนตริกออกไซด์และลดปริมาณ iNOS แต่ไม่เหนี่ยวนำปริมาณโปรตีน HO-1 (BMC 12 และ BMC 41) ดังแสดงในรูปข้างล่าง



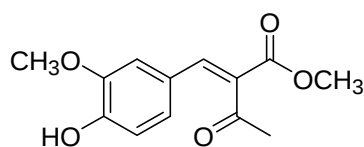
BMC 3



BMC 12



BMC 34



BMC 41

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO₂ 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

2.3 การทดสอบปริมาณไนไตรท์

ไนไตรท์เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ แบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (5×10^4 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง นำสารที่ทดสอบละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งใส่ LPS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $1\ \mu\text{g/mL}$ และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 37°C องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน $100\ \mu\text{L}$ ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน $100\ \mu\text{L}$ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น 0-50 μM (Srisook & Cha, 2004).

2.4 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) จำนวน $10\ \mu\text{L}$ แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จำนวน $500\ \mu\text{L}$ และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Srisook & Cha, 2004) ซึ่ง MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์ตรงกับจำนวนเซลล์

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}}$$

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1×10^6 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12-16 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการขูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (Molecular Research Center, USA.) จากนั้นสร้าง cDNA จาก RNA ทั้งหมดจำนวน 2 μ g โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 3U AMV reverse transcriptase, 5X buffer [250 Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 50mM $MgCl_2$, 2.5mM spermidine และ 50mM DTT], 0.083 mM oligo (dT)₁₅ primer, 0.67 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor และเติมน้ำปราศจาก RNase และ DNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 μ L สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 42°C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของ HO-1, iNOS และ β -actin ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของยีนต่างๆ

Target	Primer sequences	Product size (bp)	Accession no.
iNOS	5'-CTAAGAGTCACCAAAATGGCTCCC-3'(sense) 5'-ACCAGAGGCAGCACATCAAAGC-3' (antisense)	775	NM010927.2
HO-1	5'-TGAAGGAGGCCACCAAGGAGG-3'(sense) 5'-AGAGGTCACCCAGGTAGCGGG-3'(antisense)	375	NM010442.1
β -actin	5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAAGGAC-3'(sense) 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'(antisense)	513	NM007393.2

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA จำนวน 3 μ l, 1U Taq DNA polymerase, 1x NEB buffer (10mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_4$ and 0.1% Triton X-100 pH 8.8), 0.2 mM dNTPs, ไพรเมอร์แต่ละสายสำหรับ iNOS ใช้ความเข้มข้น 0.25 μ M, HO-1 ใช้ความเข้มข้น 0.15 μ M และ β -actin ใช้ความเข้มข้น 0.02 μ M, และปรับปริมาตรให้เป็น 30 μ l ด้วยน้ำปราศจาก

RNase, DNase สามารถในการทำ PCR มีดังนี้ denaturation ที่ 94 °C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 55 °C นาน 30 วินาที, extension ที่ 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 32 รอบ สำหรับ iNOS และจำนวน 27 รอบ สำหรับ β -actin สามารถในการทำ PCR สำหรับ HO-1 มีดังนี้ denaturation ที่ 94 °C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 58 °C นาน 30 วินาที, extension ที่ 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 25 รอบ วิเคราะห์ผลผลิต RT-PCR ที่ได้นับ 1.5% agarose gel electrophoresis ซึ่งย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพ gel ที่ได้ภายใต้แสง uv เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้หลังจากที่ standadize กับความเข้มของแถบ β -actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

2.6 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ โดยเทคนิค Western Blotting

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1×10^6 เซลล์/จาน) ปั่นเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12-16 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบ และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาต่างๆกัน ก่อนเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 2 ครั้ง ก่อนนำมาทำให้เซลล์แตกโดยการเติม lysis buffer [100 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100 และ protease inhibitors (Complete mini, Roche, Germany)] จำนวน 150 μL และใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 mL ทำการ sonication บนน้ำแข็งโดย Vibracell ultrasonic processor จะได้สารสกัดโปรตีนรวม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A.) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดย 10% SDS-PAGE ก่อนย้ายโปรตีนไปที่ PVDF membrane และปั่น membrane ด้วยสารละลาย blocking [5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) nonfat dry milk ในบัฟเฟอร์ TBS-T] ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ ดังนี้ สารละลาย mouse anti-iNOS antibody (1:500) (BD Transduction Laboratories™, U.S.A) และ สารละลาย mouse anti-HO-1 antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.) ที่ละลายในตัวทำละลาย [1X PBS, 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) BSA, 0.05% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง หรือสารละลาย mouse anti β -actin (1:5,000) (Sigma, U.S.A.) ที่ละลาย

ในสารละลาย blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated (Promega, U.S.A.) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:5,000 สำหรับ iNOS, และ 1:10,000 สำหรับ β -actin ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการวิเคราะห์ HO-1 ให้บ่มแผ่น membrane ด้วยสารละลาย goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated (Promega, U.S.A.) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:1,000 ก่อนล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane บ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ chemiluminescence โดยใช้ SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้บนแผ่น X-ray film หลังจากที่ได้ standadize กับความเข้มของแถบ β -actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

ในการทดสอบผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อการกระตุ้นและเคลื่อนที่ของ NF- κ B จะใช้โปรตีนจากนิวเคลียส (nuclear protein extract) ในการทำ Western Blotting แทนสารสกัดโปรตีนรวม การสกัด nuclear protein extract ทำตามวิธีที่รายงานโดย Srisook และคณะ (2010). วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย Bradford protein assay kit (Biorad, U.S.A.) จากนั้นแยกโปรตีนโดย 10% SDS-PAGE ก่อนย้ายโปรตีนไปที่ PVDF membrane และบ่ม membrane ด้วยสารละลาย mouse anti- NF- κ B antibody (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.) ที่ละลายในตัวทำละลาย [1X PBS, 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) BSA, 0.05% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated (Promega, U.S.A.) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:5,000 จากนั้นนำไปตรวจจสอบแถบโปรตีนโดยน้ำยา enhance chemiluminescence

2.7 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นโปรโมเตอร์ของ iNOS

ทำการโคลนชิ้นโปรโมเตอร์ของ iNOS ที่ตำแหน่งที่ -1595 ถึง +169 โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ 5'-TAAGGTACCGAGGTTGACTTTGATATGCTG-3' และ 5'-TAAAAGCTTTTGCAGTTGACTAGGCTACTC-3' ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นโปรโมเตอร์ดังกล่าวจาก gDNA ด้วยวิธี PCR ก่อนนำ PCR

product (1,778 bp) เข้าสู่พลาสมิด pGEM-T easy vector ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้น inserted DNA ก่อน subclone เข้าสู่ pGL3-basic vector ที่บริเวณ KpnI/HindIII

2.8 การทดสอบ iNOS promoter activity

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (2×10^5 เซลล์/หลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มียาปฏิชีวนะ บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ จากนั้นทำการถ่ายฝากยีน (transfection) piNOS-luc plasmids จำนวน 0.5 µg และ pRSV-β-galactosidase plasmids จำนวน 1 µg ด้วย Lipo-Fectamine 2000 reagent (Invitrogen) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM I (Invitrogen, USA.) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 6 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยง DMEM ที่มียาปฏิชีวนะ และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS ที่เย็น ก่อนนำมาทำให้เซลล์แตกโดยการเติม cell culture lysis buffer (Promega, USA.) และตรวจสอบ luciferase activity โดย luciferase assay system (Promega, USA.) ด้วยเครื่อง luminometer ในการทดสอบใช้ pSV-β-galactosidase control vector เป็นตัวควบคุม

2.9 การวิเคราะห์ผล

2.9.1 การวิเคราะห์ผลจาก agarose gel electrophoresis และแถบโปรตีนโดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้โดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

2.9.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบปริมาณไนโตรัส ปริมาณ luminescence หรือความเข้มของแถบโปรตีนหรือ PCR product โดยค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากแต่ละสภาวะ โดยเปรียบเทียบแบบ Student's *t*-test หรือ one way ANOVA ($P < 0.05$)

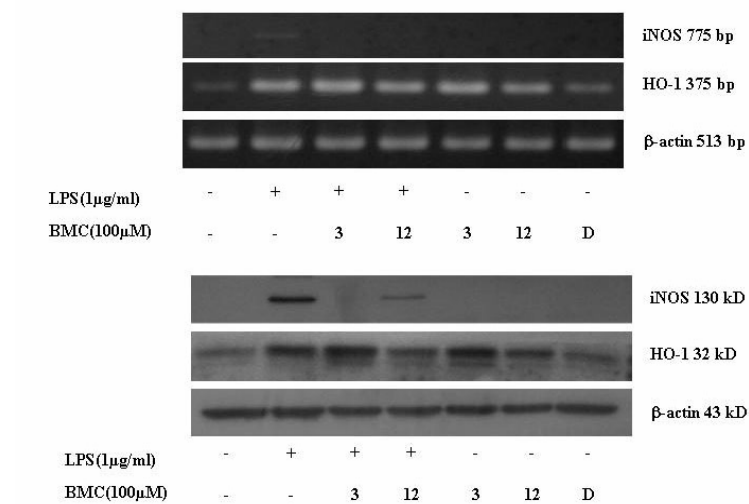
บทที่ 3

ผลการทดลอง

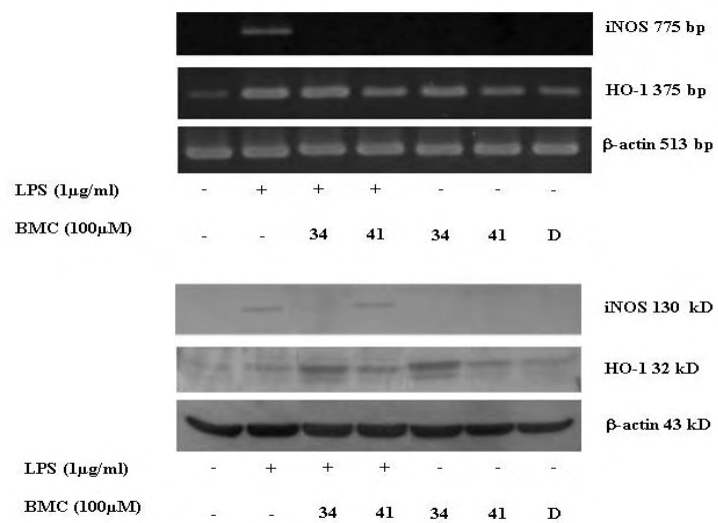
ทำการสังเคราะห์สารทดสอบ และนำสารทดสอบซึ่งมีฤทธิ์ลดการผลิตไนตริกออกไซด์มาทดสอบการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ heme oxygenase-1 (HO-1) โดยทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ป่มกับสารทดสอบ (BMC 3, BMC 12, BMC 34 และ BMC 41) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และโปรตีน ตามลำดับผลการทดสอบพบว่าสารทั้งสี่ลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของยีน iNOS ได้ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยที่สารอนุพันธ์ NAMDA เพียงอย่างเดียวไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS นอกจากนี้พบว่าสาร BMC 3, BMC 12 และ BMC 34 กระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 ในขณะที่สาร BMC 41 ไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 ดังแสดงในรูปที่ 1

ขั้นถัดมาทำการยืนยันผลของสาร BMC เหล่านี้ต่อการแสดงออกของยีน HO-1 ในช่วงเวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าสารทั้งสี่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 ในระดับ mRNA และโปรตีน ได้ แต่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2-4

(a)

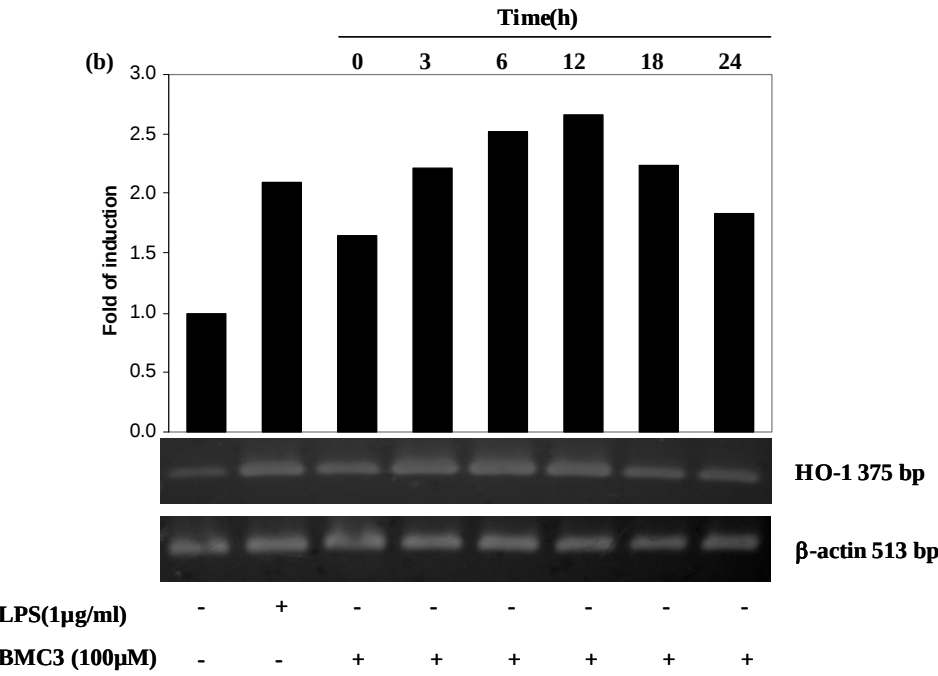
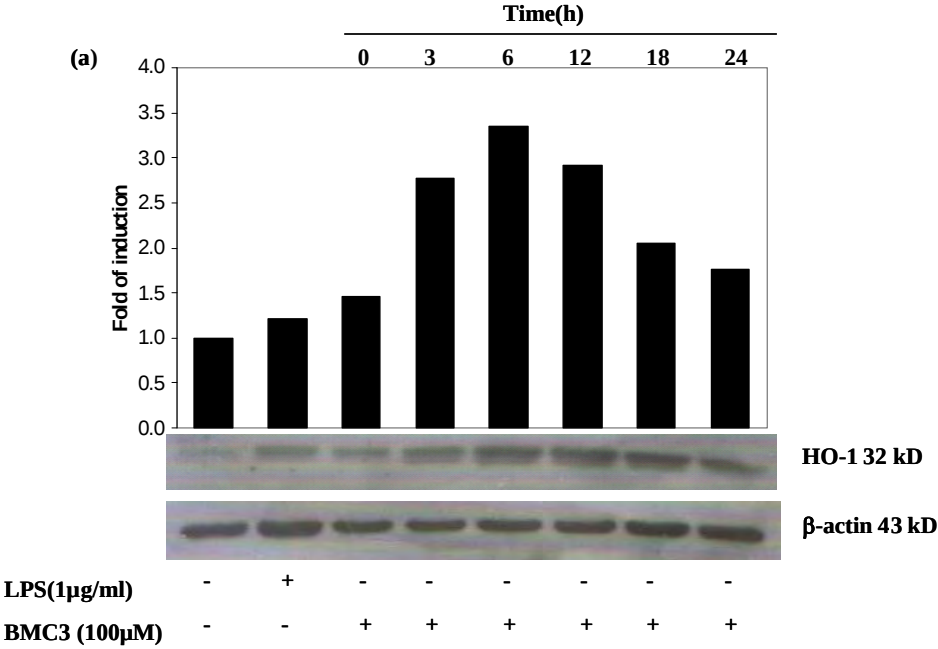


(b)

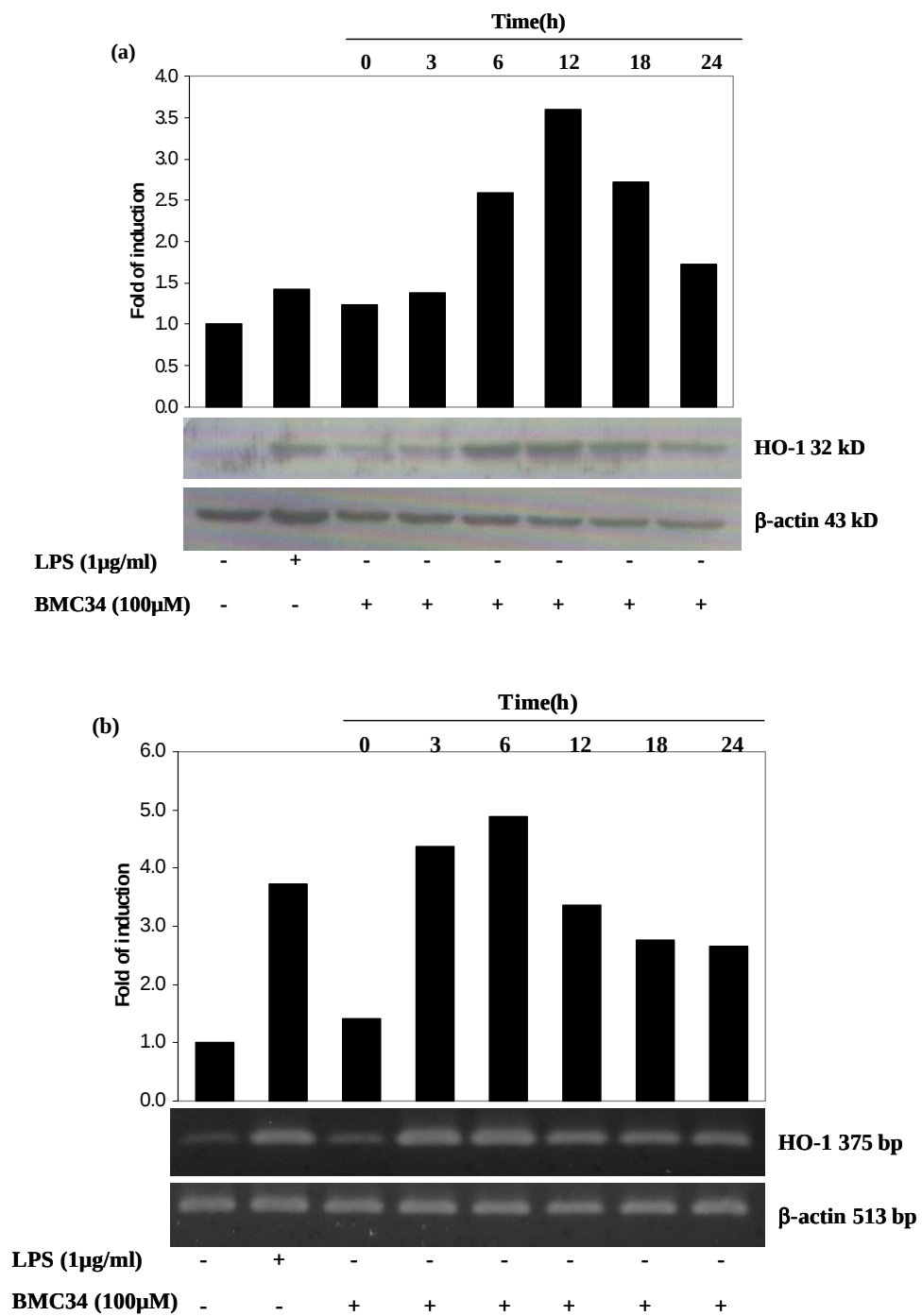


รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน iNOS และยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ NAMDA

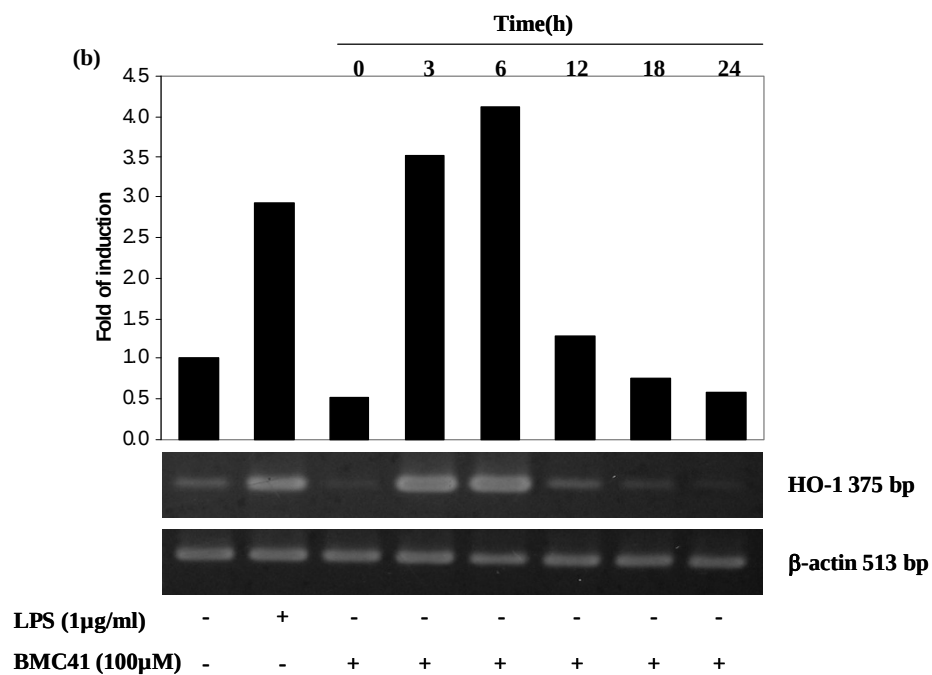
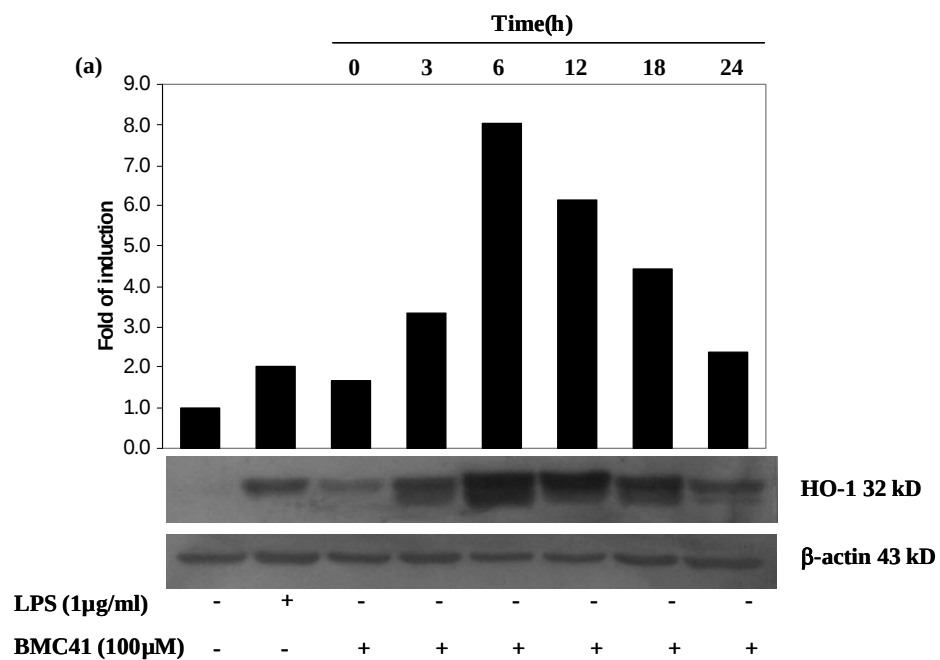
(a) BMC3 และ BMC12 (b) BMC34 และ BMC41 ที่ระดับ mRNA และโปรตีน



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ BMC3 ที่ระดับ mRNA (a) และ โปรตีน (b)



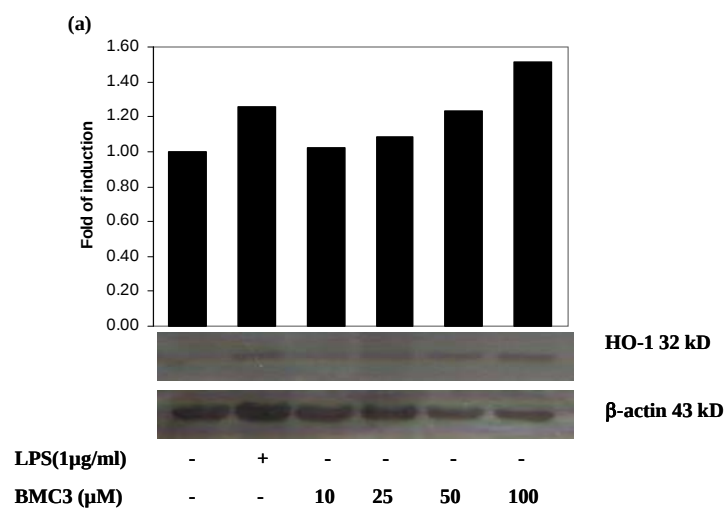
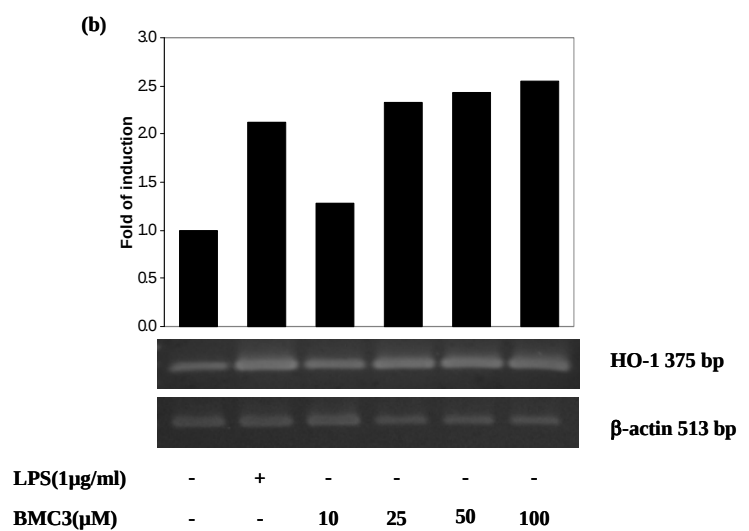
รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ BMC34 ที่ระดับ mRNA (a) และโปรตีน (b)



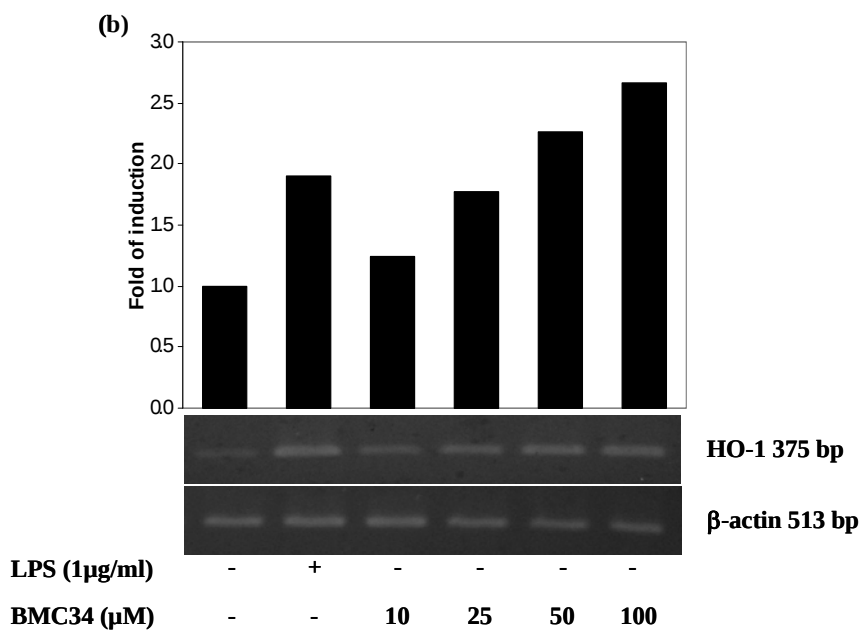
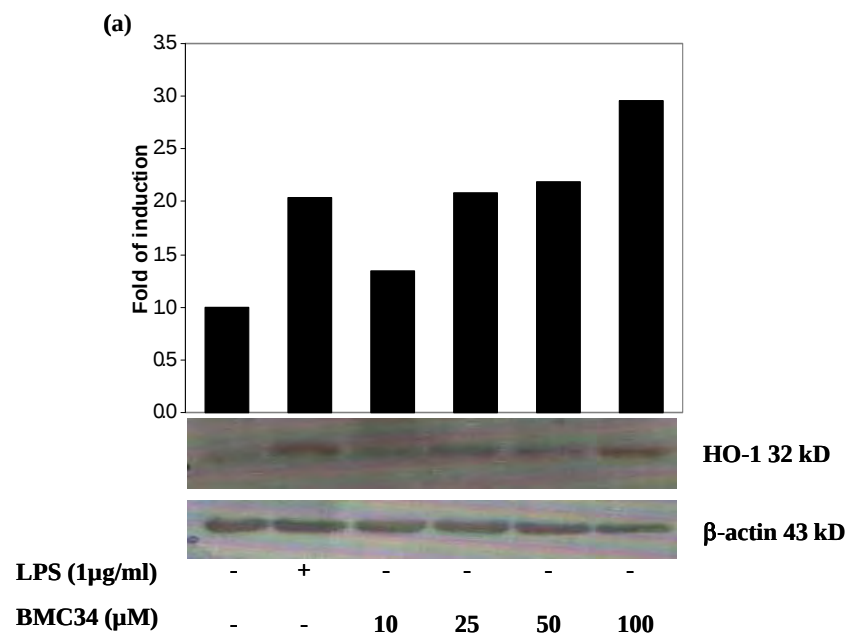
รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ BMC41 ที่ระดับ mRNA (a) และโปรตีน (b)

จากผลจะพบว่าสาร BMC 41 ที่ทำการทดสอบในขั้นแรกทีกระทำในช่วงเวลาเดียวคือ 12 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และ 24 ชั่วโมง สำหรับวิเคราะห์โปรตีน พบว่าระดับ HO-1 ไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุม แต่เมื่อทดสอบในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 ได้เร็วกว่าสาร BMC 3 และ BMC 34 คือพบตั้งแต่เวลา 3 ชั่วโมง และลดลงสู่ระดับปกติภายในเวลา 12 ชั่วโมงสำหรับ mRNA และ 18 ชั่วโมง สำหรับวิเคราะห์โปรตีน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารทดสอบทั้งหมดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้และสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ HO-1 ได้ทั้งหมดแต่ที่ช่วงเวลาต่างกัน

จากนั้นนำสาร BMC 3, BMC 34 และ BMC 41 มาทดสอบการแสดงออกของยีน HO-1 โดยทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 บ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 μM ผลการทดสอบพบว่าสาร BMC 3, BMC 34 และ BMC 41 กระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 ในระดับ mRNA และโปรตีน ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 5-7

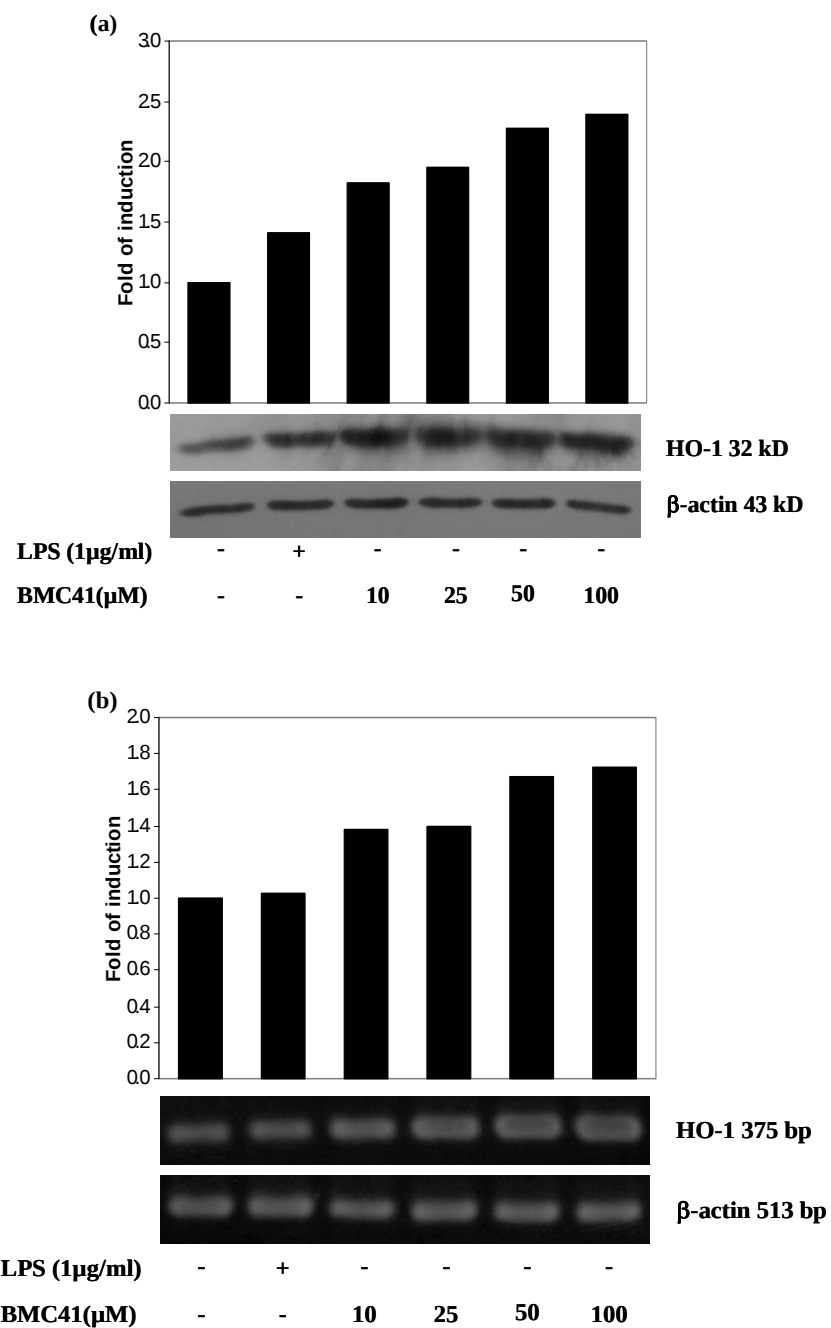


รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ BMC3 ที่ระดับ mRNA (a) และโปรตีน (b) ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 บ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 μM เป็น เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และโปรตีน ตามลำดับ



รูปที่ 6 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ BMC34 ที่ระดับ mRNA (a) และโปรตีน (b) ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 บ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10,

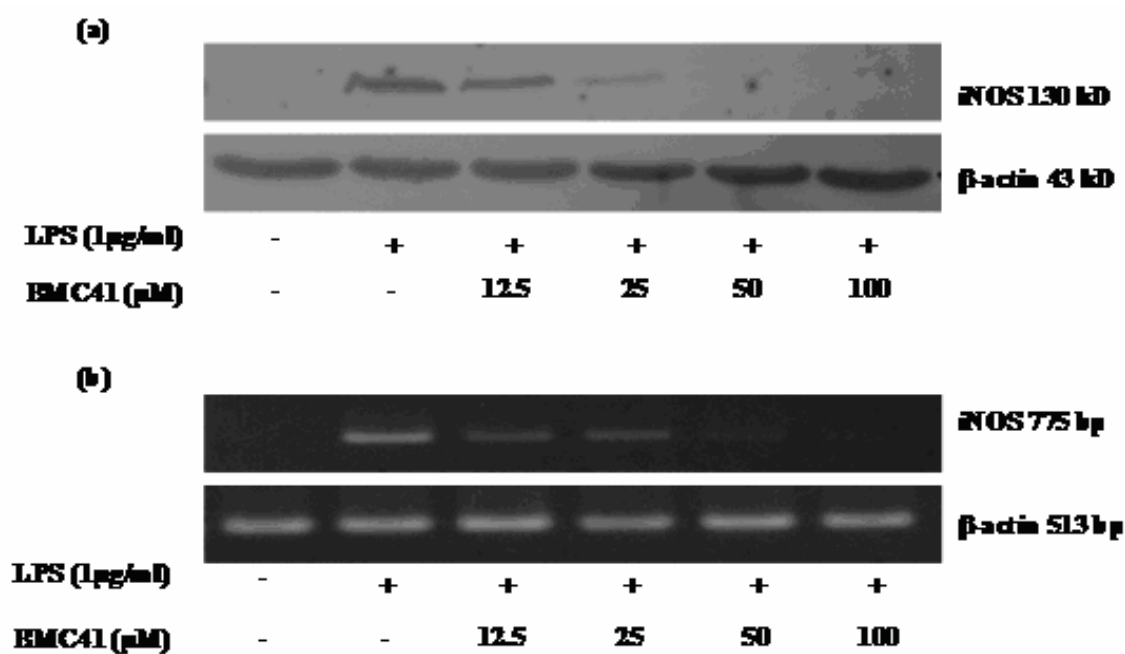
25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และโปรตีนตามลำดับ



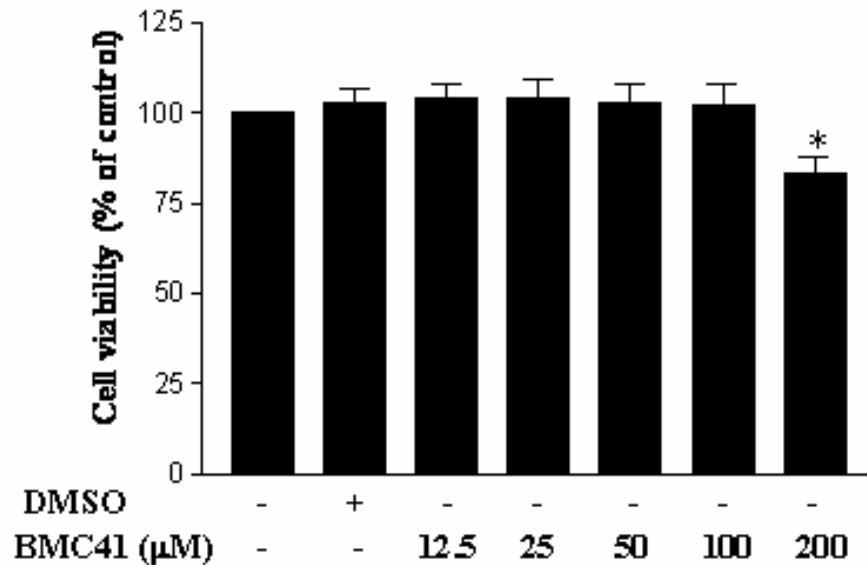
รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน HO-1 ของอนุพันธ์ของ BMC41 ที่ระดับ mRNA

(a) และโปรตีน (b) ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 บ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และโปรตีน

ขั้นต่อมาจึงเลือกสาร BMC 41 มาศึกษากลไกในระดับโมเลกุลในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.1 μM จากการทดลองพบว่าสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้น 12.5-100 μM ลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ในระดับโปรตีนและ mRNA ดังแสดงผลในรูปที่ 8 โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 200 μM (รูปที่ 9)



รูปที่ 8 ผลการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน iNOS ของอนุพันธ์ของ BMC41 ที่ระดับโปรตีน (a) และ mRNA (b) ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 บ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 24 และ 12 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และ mRNA ตามลำดับ

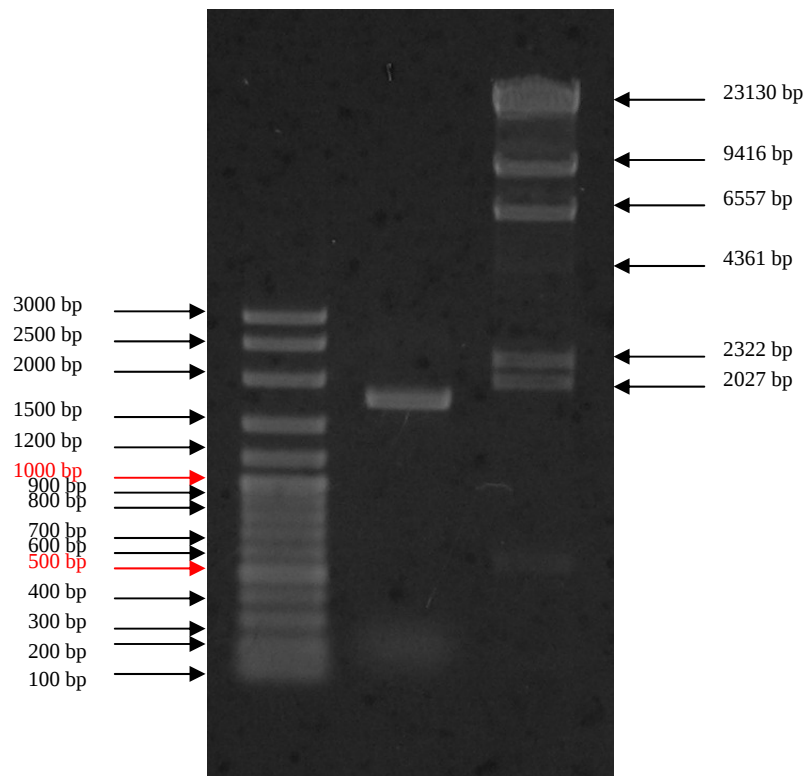


รูปที่ 9 ค่าการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้น 12.5-100 μM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับความมีชีวิตของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารใด

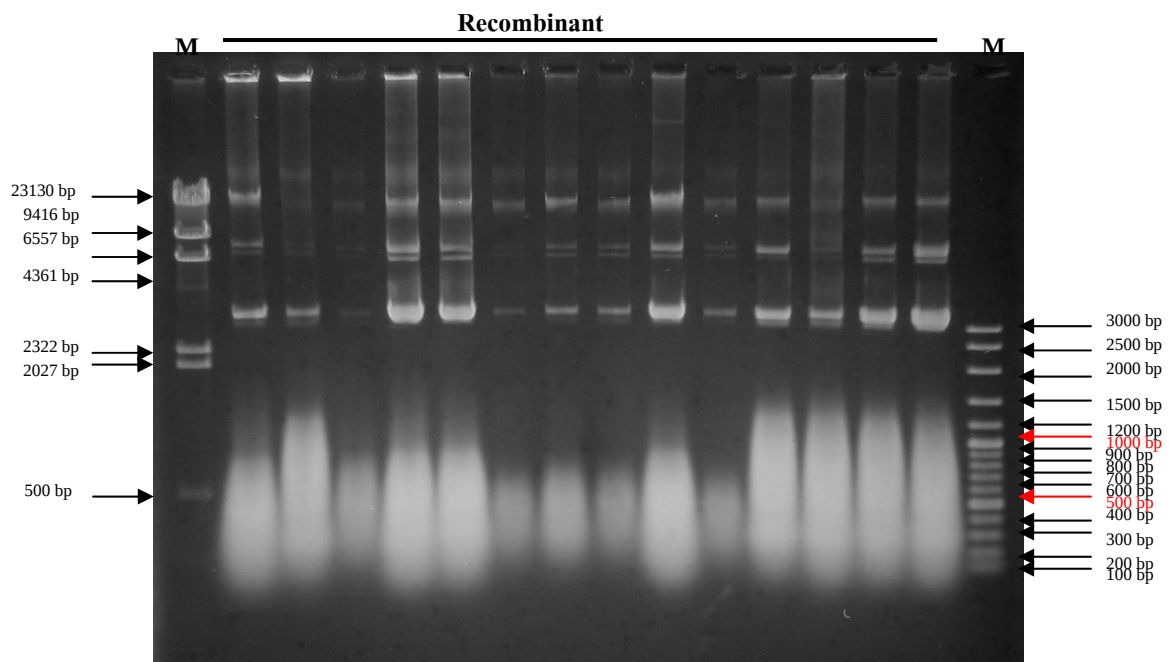
* $p < 0.05$ vs CON

นอกจากนี้ทำการตรวจสอบผลของสาร สาร BMC 41 ต่อ iNOS promoter ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS จึงได้ทำการสร้าง iNOS promoter containing vector ที่เชื่อมระหว่างขึ้นดีเอ็นเอของ iNOS promoter กับยีนสำหรับเอนไซม์ luciferase เพื่อใช้ในการ transfection เข้าสู่เซลล์ทดสอบ โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอบริเวณ iNOS promoter ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 kb จาก gDNA ของหนู โดยเทคนิค PCR (รูปที่ 10) ก่อนนำขึ้นดีเอ็นเอนี้เข้าสู่ pGEM-T easy vector จากนั้นคัดเลือก recombinant clone ที่คาดว่าจะมีขึ้น iNOS promoter (รูปที่ 11) และทำการหาลำดับเบสของขึ้น iNOS promoter ในพลาสมิดลูกผสม pGEM-T easy vector เปรียบเทียบกับลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าขึ้นดีเอ็นเอที่ได้เป็น promoter ของยีน iNOS ของหนู จึงทำการตัดขึ้นดีเอ็นเอ iNOS promoter ออกมาจาก recombinant DNA ด้วยเอนไซม์ Hind III และ KpnI และตัด pGL3-basic vector ด้วยเอนไซม์ Hind III และ KpnI แยกดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดย agarose gel

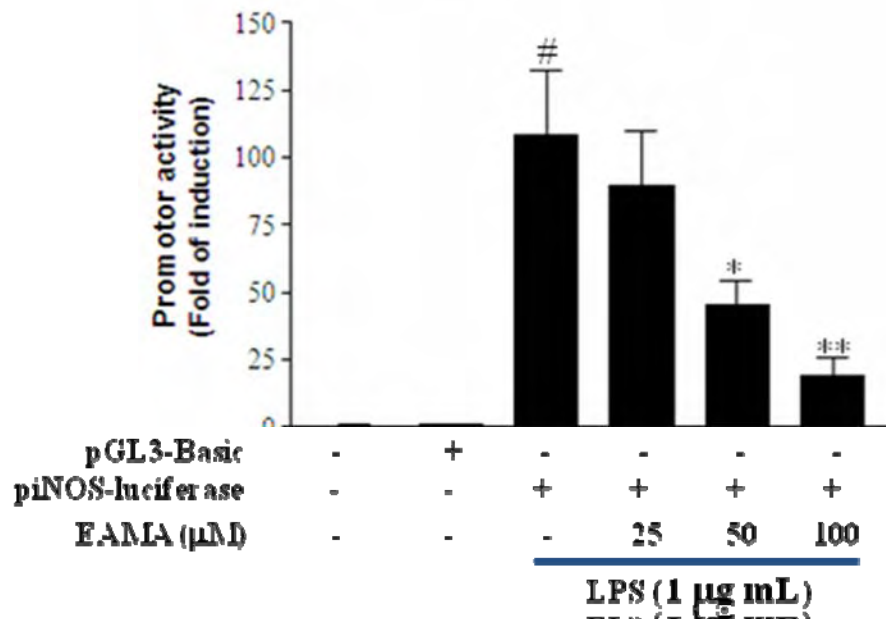
electrophoresis จากนั้นทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจากเซลล์ และทำการเชื่อมระหว่างชิ้น iNOS promoter และ pGL3- basic vector และคัดเลือกโคลนที่มี iNOS promoter (piNOS-luciferase) มาเพิ่มปริมาณใน *E.coli* เพื่อนำ piNOS-luciferase ทำการ transfection เข้าสู่ เซลล์ RAW264.7 macrophage เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นให้เซลล์สัมผัสกับสาร BMC41 ในสถานะที่มี และไม่มี LPS โดยมีพลาสมิดที่มียีน β -galactosidase (pSV- β -galactosidase control vector) เป็นตัวควบคุมภายใน จากนั้นวิเคราะห์ luciferase activity โดยใช้สับสเตรทที่จำเพาะ และวัดการเรืองแสงโดยเครื่อง luminometer พบว่า LPS กระตุ้น iNOS promoter activity แต่สาร BMC41 ลดการทำงานของ iNOS promoter ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร BMC41 (รูปที่ 12) ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับ pGL3- basic vector เพียงอย่างเดียวมี luciferase activity ในปริมาณต่ำ



รูปที่ 10 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ iNOS promoter จาก gDNA ของหนู โดยเทคนิค PCR (94°C 1 นาที จำนวน 1 รอบ 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 2 นาที จำนวน 30 รอบและ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ)

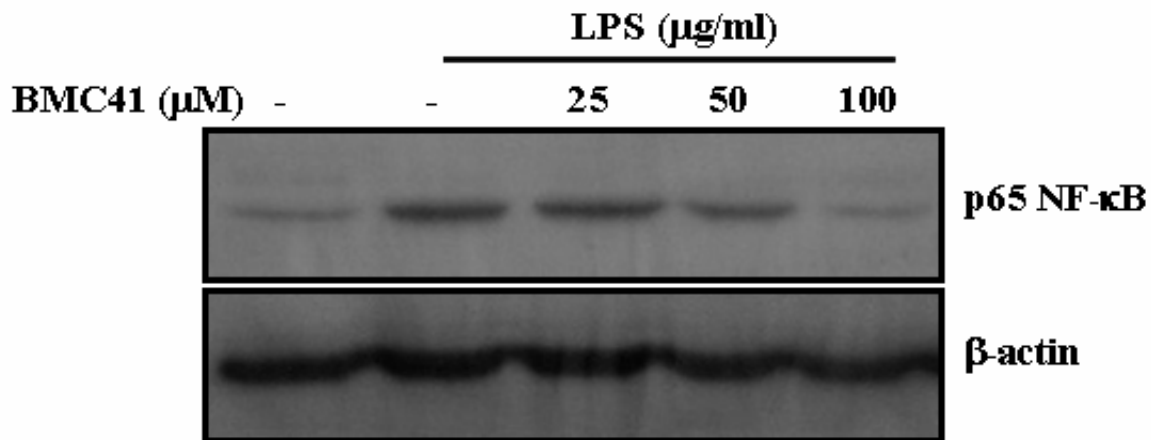


รูปที่ 11 recombinant plasmid ที่สกัดได้จากโคลนีสีขาวบางส่วน (14 โคลน) ที่คาดว่าจะมี iNOS promoter



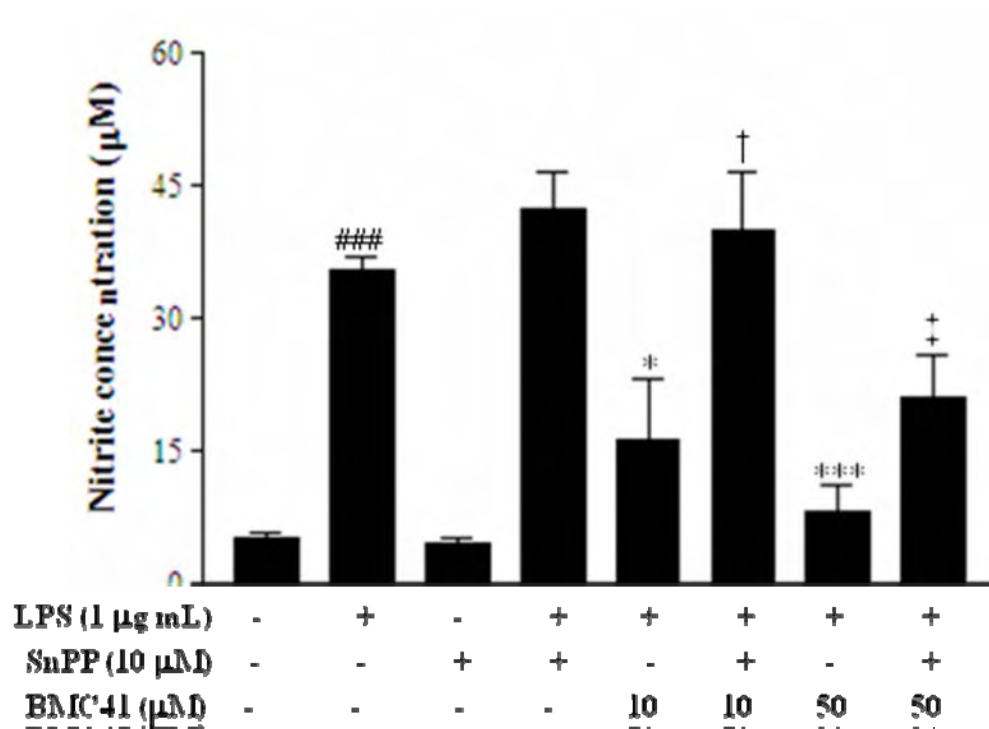
รูปที่ 12 ผลของสาร BMC41 ต่อ iNOS promoter activity ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และตัวยับยั้งสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g/mL}$ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 5 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ # $P < 0.05$ vs control; * และ** $P < 0.05$ และ $P < 0.01$ vs LPS

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสาร BMC41 ต่อ transcription factor NF- κ B ซึ่งในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะจับอยู่กับโปรตีน I- κ B ทำให้อยู่ในไซโทซอล แต่เมื่อมีการกระตุ้นโดย LPS จะทำให้ I- κ B ถูกสลายตัว และ NF- κ B เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีน NF- κ B จากนิวเคลียส โดยเทคนิค Western blotting ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน p65 ที่เป็นหน่วยย่อยของ NF- κ B พบว่า LPS ทำให้มีการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส และสาร BMC41 สามารถลดปริมาณโปรตีน p65 NF- κ B ในนิวเคลียสในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร BMC41 (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 ผลการวิเคราะห์ผลของ BMC41 ต่อการเคลื่อนที่สู่นิวเคลียสของโปรตีน p65 NF- κ B บ่มเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 กับสาร BMC41 ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 100 μ M ในสถานะที่มี LPS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากนิวเคลียสมาวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blotting

ขั้นต่อมาทำการตรวจสอบ iNOS activity. ในสถานะที่มีสารยับยั้งการทำงานของ HO-1 (Tin protoporphyrin IX, SnPP) วิธีการในการทดสอบ iNOS activity คือวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่อยู่ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์จะหลั่งไนตริกออกไซด์ออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และเกิดการออกซิเดชันเป็นไนโตรที่สะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าสาร BMC 41 สามารถลดการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μ M (รูปที่ 13) แต่เมื่อมีการยับยั้งแอกติวิตีของ HO-1 พบว่าปริมาณไนโตรที่กลับสูงขึ้น ผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่ากลไกของการลดการผลิตไนตริกออกไซด์โดยสาร BMC 41 ที่อาจเป็นไปได้คือ เกิดผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 และผ่านการยับยั้งวิถีสัญญาณ NF- κ B



รูปที่ 13 ผลของ SnPP ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์สาร BMC 41 ต่อการ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยบ่มสาร SnPP เป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนให้เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10 และ 50 µM และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์ ### $P < 0.01$ vs control; * และ*** $P < 0.05$ และ $P < 0.001$ vs LPS, † $P < 0.05$ vs LPS + BMC 41 (10 µM) และ ‡ $P < 0.05$ vs LPS + BMC 41 (50 µM)

บทที่ 4

อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA การศึกษาทำในเซลล์ไลน์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นการจำลองการติดเชื้อจุลินทรีย์ในเซลล์แมคโครฟาจ ทำให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ออกมาในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าอนุพันธ์ NAMDA ที่ทดสอบทั้ง 4 สาร คือ BMC 3, BMC 12, BMC 34 และ BMC 41 ที่ความเข้มข้น 100 μM มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ และสามารถลดการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับโปรตีนและ mRNA มีการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ iNOS มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอักเสบต่างๆ เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่าย อวัยวะ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ และโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคจากการอักเสบเหล่านี้

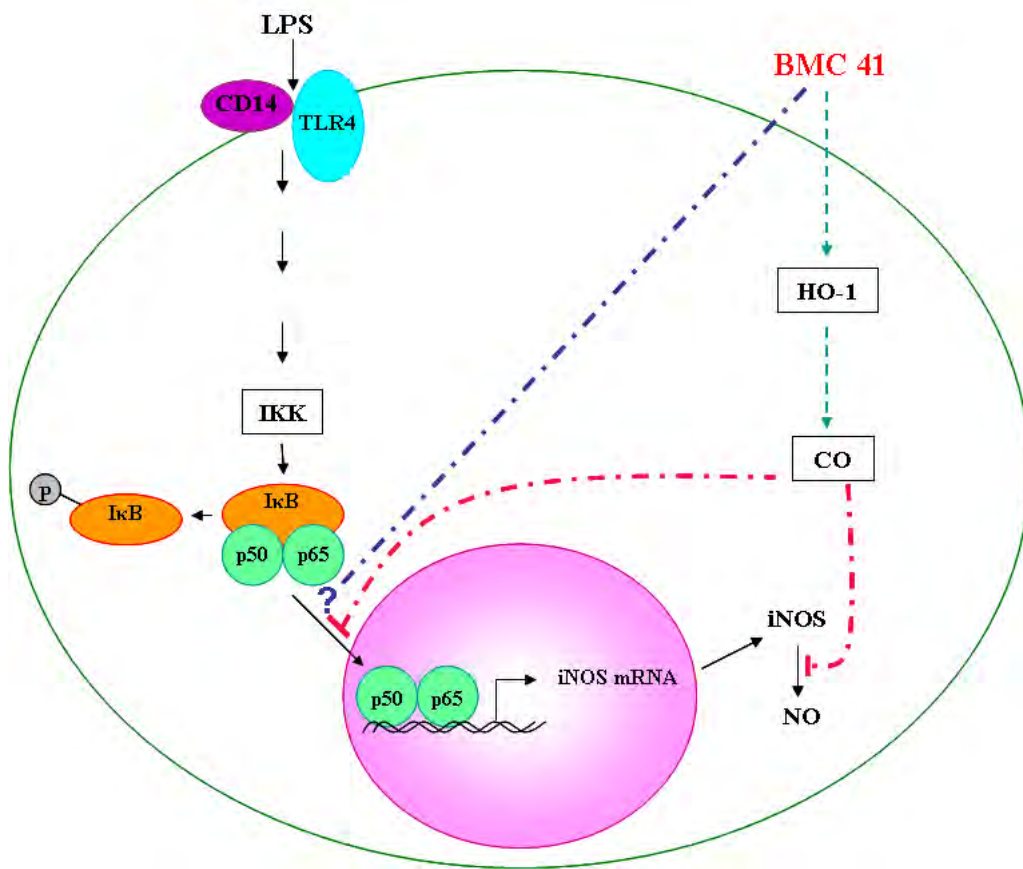
สาร BMC 41 ถูกเลือกมาศึกษาในระดับโมเลกุลในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.1 μM จากการทดลองพบว่าสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (12.5-100 μM) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการลดปริมาณของไนตริกออกไซด์ไม่ได้เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ อาจะมาจากการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เอง ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจอยู่ที่ระดับการถอดรหัสพันธุกรรม (Aktan, 2004) และระดับของไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นจากการผลิตโดย iNOS ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของ iNOS ในแมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS (Buttery et al., 1994) ดังนั้นจึงศึกษาผลของสาร BMC 41 ต่อการปริมาณ mRNA ของ iNOS พบว่าสาร BMC 41 สามารถยับยั้งการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน iNOS ได้ ลดปริมาณ mRNA ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (รูปที่ 8) นอกจากนี้ยัง พบว่าสาร BMC 41

สามารถลดปริมาณโปรตีน iNOS ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร BMC 41 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้โดยยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ทั้งในระดับ mRNA และนำไปสู่การลดลงของโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

NF- κ B เป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน NF- κ B อยู่ในกลุ่มโปรตีน Rel มีลักษณะเป็น homodimer หรือ heterodimer ที่เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) และ p52 (NF- κ B2) โดยที่การจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูปที่พบบ่อย (Luqman and Pezzuto, 2010) NF- κ B ที่พบในแมคโครฟาจในสภาวะปกติเซลล์จะจับกับโปรตีน inhibitory-kappaB (IKB) ทำให้ NF- κ B คงอยู่ในไซโทซอล (Bauerle and Baltimore, 1996) แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน IKB จะถูกฟอสโฟรีเลชันโดยเอนไซม์ IKB kinase (IKK) เป็นผลให้ IKB สลายตัว (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้น NF- κ B จึงเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและจับกับโปรโมเตอร์ของยีน iNOS และเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมของ iNOS นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของ ไนตริกออกไซด์ (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้นเราจึงทดสอบผลของสาร BMC 41 ต่อ iNOS promoter activity พบว่า LPS สามารถกระตุ้น iNOS promoter activity ได้ และสาร BMC 41 สามารถ ลด iNOS promoter activity ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น นอกจากนี้สาร BMC 41 ยังสามารถลดปริมาณ p65 NF- κ B ในนิวเคลียสอีกด้วย ดังนั้นผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลไกหนึ่งที่สาร BMC 41 ลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้คือสามารถ ลด iNOS promoter activity และลดปริมาณ p65 NF- κ B นำไปสู่การลดลงของระดับ mRNA ของ iNOS และระดับโปรตีนของ iNOS ตามลำดับ และสุดท้ายเกิดการลดการผลิตไนตริกออกไซด์

HO-1 เป็นโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยความเครียด (Pae and Chung, 2009) โดยพบว่า HO-1 สามารถลดการอักเสบ (Kim et al., 2010) แม้ว่ากลไกที่ใช้ในการต้านอักเสบของเอนไซม์ HO-1 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าผลผลิตที่เกิดจากแอคทิวิตีของ HO-1 คือ สาร biliverdin และ bilirubin หน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย (Stocker et al., 1987) และลด iNOS activity และลดการแสดงออกของ iNOS ในระดับหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (Lanone et al., 2005; Wang et al. 2004) นอกจากนี้คาร์บอนมอนอกไซด์สามารถจับกับเหล็กในกลุ่มฮีมของเอนไซม์ iNOS ทำให้ขัดขวางปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอนที่เร่งปฏิกิริยาโดยกลุ่มเหล็กเป็นผลให้ยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Srisook and Cha, 2005) คาร์บอนมอนอกไซด์ยังถูกรายงานว่าสามารถลดการแสดงออกของ

ยีน iNOS (Sarady-Andrews, 2005; Sawles, 2005; Srisook K., 2006) คาร์บอนมอนอกไซด์ยับยั้งการ
แสดงออกของยีน iNOS ในแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β โดยการยับยั้งการเกิดไคเมอร์ของ iNOS
อันนำไปสู่การลดจำนวนโมเลกุล iNOS ที่ทำหน้าที่ได้ (Kim et al., 2008) นอกจากนี้คาร์บอนมอนอกไซด์
ลดการกระตุ้น NF- κ B โดย LPS (Sarady et al. 2002) อีกทางหนึ่งที่ HO-1 ทำให้เกิดการยับยั้งการ
สังเคราะห์ คือ การเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ HO-1 เป็นผลให้มีการกำจัดกลุ่มฮีมอิสระ ซึ่งทำหน้าที่
เป็นตัวยึดจับแต่ละหน่วยย่อยของไคเมอร์ของ iNOS จึงทำให้ลดการสังเคราะห์ iNOS ที่ทำหน้าที่ได้
(Srisook and Cha, 2005) การกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 นอกจากที่จะลดการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว ยัง
สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระอื่นๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการตอบสนองการอักเสบ (immune response)
ได้อีกด้วย จึงทำให้การต้านการอักเสบมีประสิทธิภาพมากขึ้นและไม่ทำให้สมดุลของ oxidative stress
เสียไป ดังนั้นเพื่อจะทดสอบว่ากลไกอีกทางหนึ่งของการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS โดยสาร BMC
41 เกิดผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 หรือไม่ เราจึงให้เซลล์แมคโครฟาจสัมผัสกับสาร BMC 41 เพียง
อย่างเดียว พบว่าสาร BMC 41 สามารถกระตุ้น HO-1 ได้ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน (รูปที่ 4 และ 7)
เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ SnPP ก่อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HO-1 หลังจากนั้นจึงเติม LPS และ
สาร BMC 41 พบว่าเมื่อยับยั้งเอนไซม์ HO-1 ด้วย SnPP ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์สูงขึ้นกว่าในเซลล์
ที่สัมผัสกับ LPS และสาร BMC 41 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดผลผลิตของ HO-1 ทำให้การ
ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ลดลง (รูปที่ 13) ดังนั้นกลไกของการลดการอักเสบของสาร BMC 41 กลไก
หนึ่ง คือเกิดผ่านการกระตุ้น HO-1 และการกระตุ้น HO-1 อาจทำให้เกิดการยับยั้งวิถี NF- κ B และ iNOS
promotor activity ส่งผลให้มีการแสดงออกของ iNOS ลดลง และนำไปสู่การลดการผลิตไนตริกออกไซด์
ในที่สุด (ดังแสดงในรูปที่ 14) สาร BMC 41 นี้มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่ที่ใช้
ในการรักษาโรคจากการอักเสบต่างๆ



รูปที่ 14 กลไกที่อาจเป็นไปได้ในการต้านอักเสบของสาร BMC 41 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS

เอกสารอ้างอิง

- Alderton, W.K., Cooper, C.E., & Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357,593-615.
- Bauerle, P.A., Baltimore, D. (1996). NF-**KB**: ten years after, *Cell*. 87 13-20.
- Cho, S.H., Volpe, B.T., Bae, Y.M., Hwang, O.Y., Choi, H.J., Gal, J., et.al. (1999). Blockade of Tetrahydrobiopterin Synthesis Protects Neurons after Transient Forebrain Ischemia in Rat: A Novel Role for the Cofactor. *Journal of Neuroscience*, 19, 878 - 889
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Inter Immunopharm*. 1: 1397-1406.
- Cross, R. K, Wilson, K. T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 9: 179-189.
- Dorheim, M.A., Tracey, W.R., Pollock, J.S., Grammas, P. (1994). Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochemical Biophysical Research and Communications*, 205, 659-665.
- Grisham, M. B, Jour'd'Heuil, D., Wink, D. A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites:implications in inflammation. *Am J Physiol*. 276: G315-321.
- Guzik, T.J., Korbout, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469-487.
- Jeon, W.K., & Kim, B.C.. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of propyl gallate in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (In press).
- Kim, B.H., Reddy, A.M., Lee, K.H., Chung, E.Y., Cho, S.M., Lee, H., Min, K.R., &Kim, Y. (2004). Inhibitory mechanism of chroman compound on LPS-induced nitric oxide production and nuclear factor-**KB** activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 223-228.

- Kim, H.S., Loughran, P.A., Billiar, T.R. (2008). Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1 β -stimulated hepatocytes, Nitric Oxide: Biology and Chemistry. 18 256-265.
- Kim, J.Y., Cha, Y.N., Surh, Y.J. A. (2010). protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders, Mutation Research. 690,12-23.
- Kim, Y.H., Kim, J., & Kim, H.P. (2007). Anti-inflammatory activity of the synthetic chalcone derivatives: Inhibition of inducible nitric oxide synthase-catalyzed nitric oxide production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7cells. Biol.Pharm.Bull., 30(8), 1450-1455.
- Kwak, H.J., Song, J.S., No, Z.S., Song, J.H., Yang, S.D., & Cheon, H.G. (2005). The inhibitory effects of rofl umilast on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 cells are mediated by heme oxygenase-1 and its product carbon monoxide. Inflammation Research, 54, 508-513.
- Lanone, S., Bloc, S., Foresti, R., et al. (2005). Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats, The FASEB Journal. 19 :1890-1892.
- Latham, K.A., Whittington, K.B., Zhou, R., Qian, Z., Rosloniec, E.F. (2005). Ex vivo characterization of the autoimmune T cell response in the HLA-DR1 mouse model of collagen-induced arthritis reveals long-term activation of type II collagen-specific cells and their presence in arthritic joints. Journal of Immunology, 174, 3978-3985.
- Lee, S.H., Seo, G.S., Kim, J.Y., Jin, X.Y., Kim, H.D., & Sohn, D.H. (2006). Heme oxygenase 1 mediates anti-inflammatory effects of 2',4',6'-tris (methoxymethoxy) chalcone. European Journal of Pharmacology, 532, 178- 186.
- Luqman, S., Pezzuto, J.M. (2010). NF κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention, Phytotherapy Research. 24: 949-963.
- Mongkol N., Srisook K. Srisook E. and Karnkla S. (2008). Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-

- stimulated macrophages. The 9th National Symposium on Graduate Research, Chonburi, Thailand.
- Pae, O.H., Chung, H.T. (2009). Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases, *Immune Network*. 9 : 12-19.
- Sarady-Andrews JK., Liu F., Gallo D., Nakao A., Overhaus M., Ollinger R., Choi A.M., Otterbein L.E. (2005). Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L1131-L1137.
- Sarady, J.K., Otterbein, S.L., Liu, F., Otterbein, L.E., Choi, A.M. (2002) Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 27: 739-745.
- Sawle P., Foresti R., Mann B.E., Johnson T.R., Green C.J., Motterlini R. (2005). Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol*, 145, 800-810.
- Seo, J.W., Srisook, E., Son, H.J., Hwang, O.Y., Cha, Y.N., Chi, D.Y. (2005). Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3369–3373.
- Seo, J.W., Srisook, E., Son, H.J., Hwang, O.Y., Cha, Y.N., Chi, D.Y. (2008). Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells. *Eur J Med Chem*, 43, 1160-1170.
- Shin, H.M., Kim, B.H., Chung, E.Y., Jung, S.H., Kim, Y.S., Min, K.R., & Kim, Y. (2005). Suppressive effect of novel aromatic diamine compound on nuclear factor- κ B-dependent expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 521, 1-8.

- Srisook, K. and Cha, Y.N. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.
- Srisook, K, Cha, Y.N. (2005). Superinduction of heme oxygenase-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 12: 70-79.
- Srisook, E., Karnkla, S., Srisook, K. (2006). Syntheses of NAMDA derivatives as nitric oxide reducing agents. *Proceedings of the 6th National Symposium on Graduate Research*, Bangkok, Thailand.
- Srisook, K., Han, S.S., Choi, H.S., Li, M.H., Ueda, H., Kim, C.K., Cha, Y.N. (2006). CO from enhanced HO activity or from CO-donor inhibits both O_2^- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 71, 307-318.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*. 235: 1043-1046.
- Tsao, L.T., Lee, C.Y., Huang, L.J., Kuo, S.C., & Wang, J.P. (2002). Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by a synthetic carbazole, LCY-2-CHO. *Biochemical Pharmacology*, 63, 1961-1968.
- Wang, W.W., Smith, D.L., Zucker, S.D. (2004). Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats, *Hepatology*. 40: 424-433.
- Wright, C. E., Rees, D.D., Moncada, S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*, 26, 48-57.
- Yates, L.L. Górecki, D.C. (2006). The nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): from a versatile transcription factor to a ubiquitous therapeutic target, *Acta Biochimica Polonica*. 53: 651-662.

Outputs :

- 1) Mongkol N, Srisook K*. Srisook E. The inhibitory effects of NAMDA derivatives on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophage RAW 264.7 are mediated by heme oxygenase-1. Proceeding of the 4th BUU Graduate Research, Chonburi, Thailand, 2009. (Fulltext, CD version).
- 2) Srisook K*, Mongkol N, Srisook E, Jitrapakdee S. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Archives of Biochemistry and Biophysics 2011; (Submitted).