

สารทำบริสุทธิ์บางส่วนจากต้นสาละลังกา (*Couroupita guianensis*) ที่มีแอกทิวิตี
กอดอินฟลามมาโชมส์ในเซลล์ไลน์มอโนไฮต์ของมนุษย์ THP-1



นางสาวศิรดา อารมณ்சีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PARTIALLY PURIFIED COMPOUNDS FROM CANNON BALL TREE
(*Couroupita guianensis*) WITH SUPPRESSING ACTIVITY AGAINST
INFLAMMASOMES IN HUMAN MONOCYTIC CELL LINE THP-1



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial
Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

ศิรดา อารมณีน : สารทำปฏิกิริยาบางส่วนจากต้นสาละลังกา (*Couroupita guianensis*) ที่มีแอกทิวิติกตินฟลามมาโซมส์ในเซลล์ไลน์มอโนอไซด์ของมนุษย์ THP-1 (PARTIALLY PURIFIED COMPOUNDS FROM CANNON BALL TREE (*Couroupita guianensis*) WITH SUPPRESSING ACTIVITY AGAINST INFLAMMASOMES IN HUMAN MONOCYTIC CELL LINE THP-1) อ.ที่ปริกษาวิทยาลัยพนธ์หลัก: รศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, 64 หน้า.

โรคเก๊าท์ (gout) เป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบด้วยตนเอง (autoinflammatory diseases) ซึ่งมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและ/หรือความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมในร่างกาย ทำให้มีกรดยูริกในเลือดสูงกว่าปกติและเกิดการตกตะกอนเป็นผลึกยูเรต (monosodium urate; MSU) สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ทำให้เกิดอาการอักเสบจากการหลังไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะอินเตอร์ลิวคิน 1 บีต้า (interleukin 1 β ; IL-1 β) และอินเตอร์ลิวคิน 18 (IL-18) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่า การกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ (Inflammasomes) เป็นกลไกหลักในการนำไปสู่การหลังไซโตไคน์เหล่านี้ โดยอินฟลามมาโซมส์เป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ 1) โปรตีนในกลุ่ม NOD-like receptors (NLR) 2) โปรตีนตัวเชื่อม (adaptor protein) ASC และ 3) pro-caspase-1 ซึ่งเป็นโปรตีเอสรูปแบบที่ยังไม่มีแอกทิวิตี เมื่อมีสิ่งเร้า เช่น โมเลกุลที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ เช่น กรดยูริก เป็นต้น อินฟลามมาโซมส์จะประกอบตัวขึ้น ส่งผลให้มีการย่อยตนเองของ pro-caspase-1 กลายเป็น caspase-1 ซึ่งเป็นโปรตีเอสที่สมบูรณ์และสามารถย่อยยับสเตรท คือ pro-IL-1 β ได้ ทำให้เกิดการผลิต IL-1 β ที่พร้อมจะหลั่งออกภายนอกเซลล์เพื่อกระตุ้นการอักเสบได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดกรองสารจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ในเซลล์ไลน์มอโนอไซด์ของมนุษย์ เพื่อจะหาสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบแบบจำเพาะที่ยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ได้ต่อไป ในงานวิจัยนี้ใช้สารสกัดหยาบและสารทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากดอก ใบ กิ่ง เปลือกและเนื้อในผลของสาละลังกาหรือต้นลูกปิ่นใหญ่ (*Couroupita guianensis*) กับส่วนรากของย่านาง (*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels) รวมทั้งสิ้น 77 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้มาทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ THP-1 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์มอโนอไซด์ของมนุษย์โดยวิธี MTT และนำความเข้มข้นที่ให้ค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ 20 เปอร์เซ็นต์มาทดสอบฤทธิ์ในการลดการหลัง IL-1 β โดยวิธี ELISA ผลแสดงว่า สารสกัดหยาบและสารทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากกิ่ง ดอกและใบของสาละลังกาจำนวน 14 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งการหลัง IL-1 β ได้ โดยเฉพาะสารทดสอบรหัส F173 และ F174 ซึ่งแยกได้จากดอกสาละลังกา มีฤทธิ์ยับยั้งการหลัง IL-1 β ดีที่สุด คิดเป็น 12.27 และ 10.97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของตัวอย่างทดสอบต่อการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ จึงนำตัวอย่างทดสอบไปศึกษาผลที่มีต่อระดับการถอดรหัสของยีน *IL1B* โดยวิธี quantitative RT-PCR พบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไม่ทำให้การแสดงออกของยีน *IL1B* ลดลง และเมื่อนำไปวัดฤทธิ์ของสารสกัดตัวอย่างต่อแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้แอกทิวิตีของอินฟลามมาโซมส์พบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 มีฤทธิ์กดแอกทิวิตีของ caspase-1 ได้ ดังนั้น ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการหลัง IL-1 β ผ่านการลดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ได้ ซึ่งต้องทำการแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นยาที่ลดการอักเสบแบบจำเพาะต่ออินฟลามมาโซมส์ต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5672104423 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: CANNON BALL TREE / INFLAMMASOMES / INTERLEUKIN 1 BETA

SIRADA AROMCHUEN: PARTIALLY PURIFIED COMPOUNDS FROM CANNON BALL TREE (*Couroupita guianensis*) WITH SUPPRESSING ACTIVITY AGAINST INFLAMMASOMES IN HUMAN MONOCYTIC CELL LINE THP-1. ADVISOR: ASSOC. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 64 pp.

Gout is an autoinflammatory disease and both genetics and abnormalities in metabolism are the main cause. Gout is a representative condition which is caused by high concentration of blood uric acid resulting in precipitation of monosodium urate (MSU) in tissues such as joints and kidney. The main causes of inflammation in gout are hyper production of pro-inflammatory cytokines, mainly interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-18. Previously, it was reported that inflammasome activation play important role in secretion of those cytokines. Inflammasome is multiprotein complex of at least 3 proteins, *i.e.* Nod-like receptor (NLR), adaptor protein ASC and pro-caspase-1. Upon exposure to stimuli such as molecules related to tissue injuries such as uric acid, inflammasome is formed. Inflammasome activation leads to autocatalytic cleavage of pro-caspase-1. Caspase-1 is a protease responsible for cleavage of pro-IL-1 β . This cleavage results in secretion of IL-1 β . This study aimed to screen for compounds with activity of suppressing inflammasome in human monocytic cell line. The samples used in this study are crude or partially purified extracts from flowers, leaves, twigs, barks and pulps of cannon ball tree (*Couroupita guianensis*) and roots of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. Seventy seven samples were screened in this study. Tested samples were screened by MTT assay to determine cellular toxicity in human monocytic cell line THP-1. The 20% of viability inhibitory concentrations were used for testing activity against of IL-1 β secretion. The results showed that 14 samples from twigs, flowers and leaves of cannon ball trees suppressed IL-1 β secretion by ELISA. In particular, sample No. F173 and F174 showed the lowest IL-1 β secretion with 12.27% and 10.97%, respectively. To study the effect of both samples on *IL1B* transcription, quantitative real-time RT-PCR were performed and sample No. F173 and F174 did not decreased the transcription level of *IL1B*, suggesting that they may act downstream of *IL1B* transcription. To test the effect of these samples on inflammasome activation, the activity of caspase-1 was monitored using Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay. The results showed that sample No. F173 and F174 suppressed caspase-1 activity. Therefore, sample No. F173 and F174 from flowers of cannon ball tree inhibited IL-1 β secretion and suppressed caspase-1 activation. Further purification is needed to identify the compound and to investigate the extract made of action. The purification of compounds have potentials to be therapeutic drugs for autoinflammatory diseases.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial
Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี ที่กรุณาเป็นประธาน ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ และอาจารย์ ดร.จอมขวัญ มีรักษ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ผู้ให้ความอนุเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืชที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความรู้และประสบการณ์ ต่างๆที่เป็นประโยชน์อย่างมาก และขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 2015 ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญ และคอยสนับสนุนในด้านต่างๆ จนทำงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญภาพ	2
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม	3
2.1 ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและสิ่งกระตุ้น.....	3
2.2 กระบวนการอักเสบ.....	4
2.3 อินฟลามมาไซม์และกลไกการกระตุ้น	5
2.3.1 NOD-like receptors (NLRs).....	5
2.3.2 องค์ประกอบของอินฟลามมาไซม์.....	6
2.3.3 กลไกการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์.....	7
2.3.4 โรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ	8
2.4 โรคเก๊าท์	9
2.5 ยาที่ใช้ในการรักษาโรคเก๊าท์.....	10
2.6 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอินฟลามมาไซม์	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	13
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์	13
3.1.1 การเหนี่ยวนำเซลล์ไลน์ THP-1.....	13
3.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1	13

3.1.3 การเก็บรักษาเซลล์	13
3.1.4 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง	13
3.2 สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืช	14
3.3 การทดสอบความเป็นพิษของสาร โดยวิธี MTT	15
3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์และการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1	15
3.4.1 การวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA.....	16
3.4.2 การตรวจวัดระดับของ pro-caspase-1 และ pro-IL-1 β ด้วยวิธี Western blot.....	17
3.4.2.1 การสกัดและการวัดโปรตีน.....	17
3.4.2.2 การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	17
3.4.2.3 วัดระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot.....	18
3.4.2.4 การตรวจสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence และ autoradiography ..	18
3.5 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดจากพืชที่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β	19
3.6 ศึกษากลไกต่อการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ของสารสกัดจากพืช	20
3.6.1 การตรวจวัดการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS assay).....	20
3.6.2 การตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo 1 Inflammasome Assay	20
3.6.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>IL1B</i> โดยวิธี quantitative RT-PCR	21
3.6.3.1 การสกัด total RNA.....	21
3.6.3.2 การทำ Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)	22
3.6.3.3 การตรวจหาการแสดงออกของยีน <i>IL1B</i> ด้วยวิธี Real-time PCR.....	22
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	23

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	24
4.1 การทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบต่อเซลล์ไลน์ THP-1.....	24
4.2 การกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β ใน THP-1 โดย MSU.....	30
4.3 การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ของตัวอย่างทดสอบ	32
4.4 กลไกในการยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ของตัวอย่างทดสอบ.....	37
4.4.1 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน <i>IL1B</i>	38
4.4.2 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS assay).....	39
4.4.3 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อแอกทิวิตีของ caspase-1.....	40
4.4.4 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1 ด้วยวิธี Western blot.....	41
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	42
รายการอ้างอิง	45
ภาคผนวก.....	51
ภาคผนวก ก.....	52
ภาคผนวก ข.....	60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	64

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงรายละเอียดของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืช	14
ตารางที่ 2	แสดงแอนติบอดีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง	19
ตารางที่ 3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer.....	23
ตารางที่ 4	ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบต่อเซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT	25
ตารางที่ 5	ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบที่แยกให้บริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์ต่อ เซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT.....	26
ตารางที่ 6	แสดงข้อมูลการหลั่ง IL-1 β ของสารตัวอย่างทดสอบ	60



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอินฟลามาโซมส์	6
ภาพที่ 2 แสดงกลไกการกระตุ้นอินฟลามาโซมส์	8
ภาพที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี MTT	28
ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี MTT	29
ภาพที่ 5 ผลของ MSU ต่อการหลั่ง IL-1 β ด้วยวิธี ELISA	31
ภาพที่ 6 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA.....	33
ภาพที่ 7 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA.....	34
ภาพที่ 8 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA.....	35
ภาพที่ 9 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA.....	36
ภาพที่ 10 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA ..	37
ภาพที่ 11 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน <i>IL1B</i> ด้วยวิธี Real-time PCR	38
ภาพที่ 12 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการเกิดอนุคลิอัสระด้วยวิธี flow cytometer.....	39
ภาพที่ 13 ผลการตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo [®] 1 Inflammasome Assay.....	40
ภาพที่ 14 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อระดับโปรตีนของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1 ด้วยวิธี Western blot.....	41
ภาพที่ 15 กลไกที่คาดว่า สารทดสอบมีแอกทิวิตีต่อการผลิต IL-1 β	44

คำย่อ

Abs	Absorbance
APS	Ammonium persulfate
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
HRP	Horseradish peroxidase
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molarity
MSU	Monosodium urate
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MW	Molecular weight
N	Normality
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline-Tween
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
PVDF	Polyvinylidene fluoride membrane
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TEMED	Tetramethylethylenediamine
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbezidine
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume



บทที่ 1 บทนำ

อินฟลามมาโซมส์ (inflammasomes) คือ กลุ่มโปรตีนในไซโตพลาซึมทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) อินฟลามมาโซมส์ประกอบด้วย NOD-like receptor (NLR) โดย NLRP3 เป็นหนึ่งในสมาชิกของโปรตีน NLR ที่สามารถกระตุ้นผ่านตัวกระตุ้นที่บ่งชี้อันตรายหรือที่เรียกว่า danger-associated molecular patterns (DAMPs) เช่น อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ไนเจอร์ิซิน และผลึกอินนินทรีย์ เป็นต้น เมื่ออินฟลามมาโซมส์ที่มี NLRP3 เป็นองค์ประกอบถูกกระตุ้นจะส่งผลให้เปลี่ยนเอนไซม์ pro-caspase-1 เป็น caspase-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่สามารถย่อยยับสเตรท คือ pro-IL-1 β ซึ่งอยู่ในรูปไม่มีแอกทิวิตีและไม่มีการหลั่งออกภายนอกเซลล์ นำไปสู่การผลิต IL-1 β ซึ่งเป็นรูปแบบที่พร้อมจะมีการหลั่งออกภายนอกเซลล์ และทำหน้าที่กระตุ้นการอักเสบ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไซโตไคน์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยผ่าน NLRP3 เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดจากการอักเสบจำนวนมาก ตัวอย่างโรคที่สำคัญ เช่น โรคเก๊าท์ ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบด้วยตัวเอง (auto-inflammatory disease) และมีลักษณะการอักเสบบริเวณข้อที่รุนแรงที่เกิดจากการสะสมของผลึกกรดยูริก (monosodium urate; MSU) ซึ่งเป็น DAMPs ประเภทหนึ่งที่บริเวณข้อต่อ โดย MSU เป็นตัวกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ของ NLRP3 โดยผ่าน reactive oxygen species (ROS) จากไมโทคอนเดรียร่วมกับสัญญาณอื่นๆ ทำให้มีการรวมตัวของโปรตีนองค์ประกอบของอินฟลามมาโซมส์และนำไปสู่กระบวนการย่อยและหลั่งของ IL-1 β ปัจจุบันนี้มียาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคเก๊าท์หรือรักษาอาการที่เกี่ยวข้อง แต่ยาเหล่านี้ก็มีผลข้างเคียงและยังไม่มียาที่มีฤทธิ์กดอินฟลามมาโซมส์โดยตรง ดังนั้นจึงยังต้องการยาชนิดใหม่ที่จะนำมาใช้รักษาโรค ในงานวิจัยนี้คัดกรองสารที่มีฤทธิ์กดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์จากพืชสมุนไพร โดยใช้เซลล์ไลน์มอโนไซต์ THP-1 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยลิพโพลีแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ร่วมกับ MSU และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่คัดกรองได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สามารถลดการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ในเซลล์ไลน์มอนอไซต์ของมนุษย์ (THP-1)
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์กดอินฟลามมาไซม์ของสารทดสอบที่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้สารสกัดจากพืชที่สามารถลดการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์และ/หรือการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ไลน์มอนอไซต์ของมนุษย์



บทที่ 2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและสิ่งกระตุ้น

ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) เป็นหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีมาตั้งแต่เกิด ระบบภูมิคุ้มกันจะทำงานทันทีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Netea และคณะ, 2009) ลักษณะของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดจะจดจำเชื้อจุลินทรีย์ได้ในบริเวณกว้าง เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และรา โดยอาศัยตัวรับที่ใช้จับกับส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่า pattern-recognition receptors (PRRs) (Medzhitov และ Janeway, 1997) PRRs มีการแสดงออกได้ในเซลล์หลายชนิด เช่น แมโครฟาจ มอนอไซต์ เซลล์เดนไดรติกส์ (DCs) และนิวโทรฟิล โดย PRRs จะใช้เพื่อตรวจจับกับจุลินทรีย์ได้ทันทีในบริเวณที่มีการติดเชื้อ (Medzhitov และ Janeway, 2002) PRRs จะจับกับส่วนที่มีลักษณะเฉพาะเหมือนกันในจุลินทรีย์ เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ซึ่ง PAMPs มาจากหลายแหล่งที่แตกต่างกัน เช่น เพปทิโดไกลแคน พอลิแซ็กคาไรด์ bacterial DNA และ double stranded viral RNA (Latz และคณะ, 2013) ในกลุ่มของ PRRs ที่มีความสำคัญมากคือ Toll-like receptor (TLR) ซึ่งสามารถจับกับเชื้อได้อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต โดย TLR ในมนุษย์ ได้แก่ TLR 1, 2, 4, 5 และ 6 จะอยู่ที่ผิวน้ำเซลล์และจับกับแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ส่วน TLR 3, 7, 8 และ 9 จะอยู่ในเซลล์และจับกับไวรัสและกรดนิวคลีอิกเป็นส่วนใหญ่ (Beutler, 2009) การกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดไม่ได้อาศัยการจดจำของ PAMPs เพียงอย่างเดียว แต่ยังอาศัยลักษณะความจำเพาะของ danger-associated molecular patterns (DAMPs) หรือ alarmins ได้แก่ สารพันธุกรรมของเซลล์ที่ตาย โปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรตที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์เมื่อเกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ เป็นต้น (Nace และคณะ, 2012) ซึ่ง DAMPs รับรู้ต่อรูปแบบโมเลกุลของเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการเนโครซิส (necrosis) ทำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบที่ไม่ใช่การติดเชื้อ โดย DAMPs แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ ตัวอย่างของ DAMPs เช่น โปรตีน High mobility group box-1 (HMGB1)

ซึ่งเป็นนิวเคลียร์โปรตีนที่จะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์เมื่อเกิดภาวะอักเสบ (Pisetsky และคณะ, 2008) โปรตีน serum amyloid A (SAA) เป็นโปรตีนในช่วงเฉียบพลันผลิตขึ้นโดยเซลล์ตับเพื่อตอบสนองต่อการบาดเจ็บ (He และคณะ, 2009) การติดเชื้อและการอักเสบ นอกจากนี้ยังมี DAMPs ที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น adenine triphosphate (ATP) ไนเจอร์ิซิน หรือผลึกกรดยูริก เป็นต้น (Yamasaki และคณะ, 2009) ซึ่งสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้มีการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ได้

2.2 กระบวนการอักเสบ

เมื่อแมโครฟาจรับรู้การมี DAMP ที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์หรืออวัยวะ แมโครฟาจจะผลิตและหลั่งกลุ่มโปรตีนไซโตไคน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบ เช่น Tumor Necrosis Factor α (TNF α) Interleukin (IL)-18 IL-1 β เป็นต้น (Latz, 2010) ซึ่ง IL-1 β และ IL-18 เป็นไซโตไคน์หลักที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะ IL-1 β ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยจะเกิดบริเวณที่มีการอักเสบของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Mitroulis และคณะ, 2013) ซึ่งหากไม่มีการควบคุมการผลิตและหลั่งของไซโตไคน์กลุ่มนี้ อาจนำไปสู่ภาวะการอักเสบมากเกินไปและทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อได้ ดังนั้น การผลิต IL-1 β จึงอยู่ภายใต้การควบคุม 2 ระดับ ได้แก่ 1) การควบคุมระดับการถอดรหัสของยีน *IL1B* ซึ่งจะมีการถอดรหัสเมื่อแมโครฟาจถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณผ่าน PRR และมีการแปลรหัสเป็นโปรตีน pro-IL-1 β ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีแอกทิวิตีและยังไม่มีหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ และ 2) การควบคุมการย่อย pro-IL-1 β โดยเอนไซม์โปรตีเอส caspase-1 เพื่อผลิต mature IL-1 β ซึ่งเป็นรูปแบบที่พร้อมที่จะมีการหลั่งออกภายนอกเซลล์ ทำหน้าที่กระตุ้นการอักเสบ กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวและระบบภูมิคุ้มกันอื่นให้ทำงานร่วมกัน (Pétrilli และคณะ, 2007; Liu-Bryan, 2010)

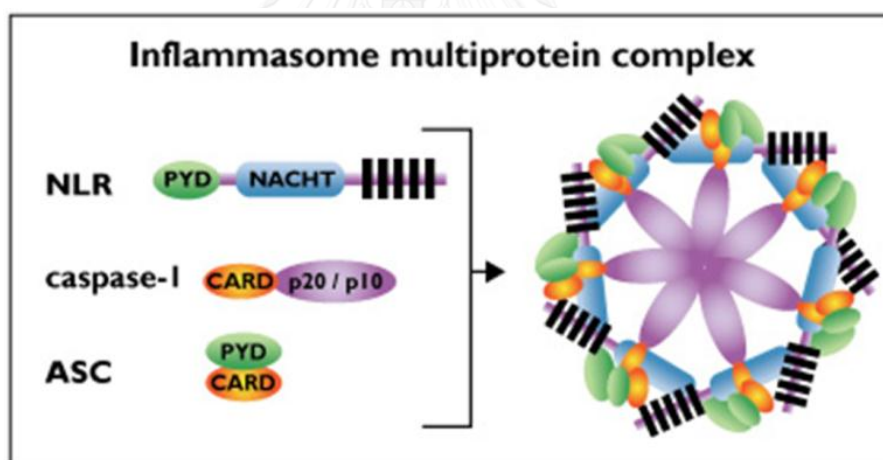
2.3 อินฟลามมาโซมส์และกลไกการกระตุ้น

2.3.1 NOD-like receptors (NLRs)

ปัจจุบันมีการระบุว่า nucleotide binding oligomerization domain หรือ NOD-like receptors (NLRs) เป็นโปรตีนในกลุ่มของ PRRs ซึ่งมีรูปแบบโมเลกุลที่สำคัญในการรับรู้ DAMPs และเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนขนาดใหญ่ในไซโตพลาซึม เรียกว่า อินฟลามมาโซมส์ (inflammasomes) (Benko และคณะ, 2008; Walsh และคณะ, 2014) NLRs เป็นโปรตีนที่มีหลายโดเมนเป็นองค์ประกอบ (Rathinam และคณะ, 2012) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ 1) leucine-rich repeats (LRRs) ที่บริเวณ C-terminal 2) Nucleotide-binding oligomerization domain (NACHT domain) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า NOD domain เป็นบริเวณตรงกลางของนิวคลีโอไทด์ และ 3) Caspase-recruitment domain (CARD domain) หรือ pyrin (PYD) domain ซึ่งเป็นโดเมนบริเวณ N-terminal (Martinon และคณะ, 2009) โดยหน้าที่หลักของ NLRs คือ การควบคุมแอกทิวิตีของ caspase-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีเอสหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบหรือการตายของเซลล์ ซึ่ง caspases ที่มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการอักเสบ ได้แก่ caspase-1, caspase-11 และ caspase-12 ในหนู ส่วนในมนุษย์ประกอบด้วย caspase-1, caspase-4 และ caspase-5 (Martinon และ Tschopp, 2007) โดย caspase-1 มีบทบาทสำคัญในภูมิคุ้มกันและโรคที่เกิดจากการอักเสบ เริ่มแรกนั้น caspase-1 ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเป็น proenzyme ก่อน เรียกว่า pro-caspase-1 ซึ่งจำเป็นต้องมีขบวนการสลายโมเลกุลของโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (proteolysis) เพื่อจะได้เป็นเอนไซม์ที่สมบูรณ์พร้อมที่จะทำงาน (mature) เรียกว่า caspase-1 (Sollberger และคณะ, 2014) โดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการย่อยสับสเตรท เช่น pro-IL-1 β ทำให้ได้ IL-1 β และมีการหลั่งออกมาภายนอกเซลล์

2.3.2 องค์ประกอบของอินฟลามมาโซมส์

อินฟลามมาโซมส์ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิด ได้แก่ 1) โปรตีนในกลุ่ม NLR ซึ่งมีสมาชิกในกลุ่ม คือ NATCH domain, LRR domain และ CARD/PYD domain 2) โปรตีนตัวเชื่อม (adaptor protein) ASC ซึ่งมี PYD domain และ CARD domain เป็นส่วนประกอบ และ 3) pro-caspase-1 ซึ่งเป็นโปรตีนเอนไซม์ที่ยังไม่มีแอกทิวิตี และมี CARD domain เป็นส่วนประกอบ (Netea และคณะ, 2009) โปรตีนทั้งสามชนิดนี้จะประกอบเป็นสารประกอบโปรตีนขนาดใหญ่เรียกว่า อินฟลามมาโซมส์ แสดงส่วนประกอบของอินฟลามมาโซมส์ ดังภาพที่ 1 และนำไปสู่การย่อยตัวเองของ pro-caspase-1 ทำให้กลายเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์และสามารถย่อยยับสเตรทได้ ซึ่งยับสเตรทของ caspase-1 คือ pro-IL-1 β เมื่อโปรตีนเอนไซม์ย่อยยับสเตรทแล้วจึงทำให้เกิดการสร้าง IL-1 β ที่พร้อมจะหลั่งออกภายนอกเซลล์ได้ (Schroder และ Tschopp, 2010)

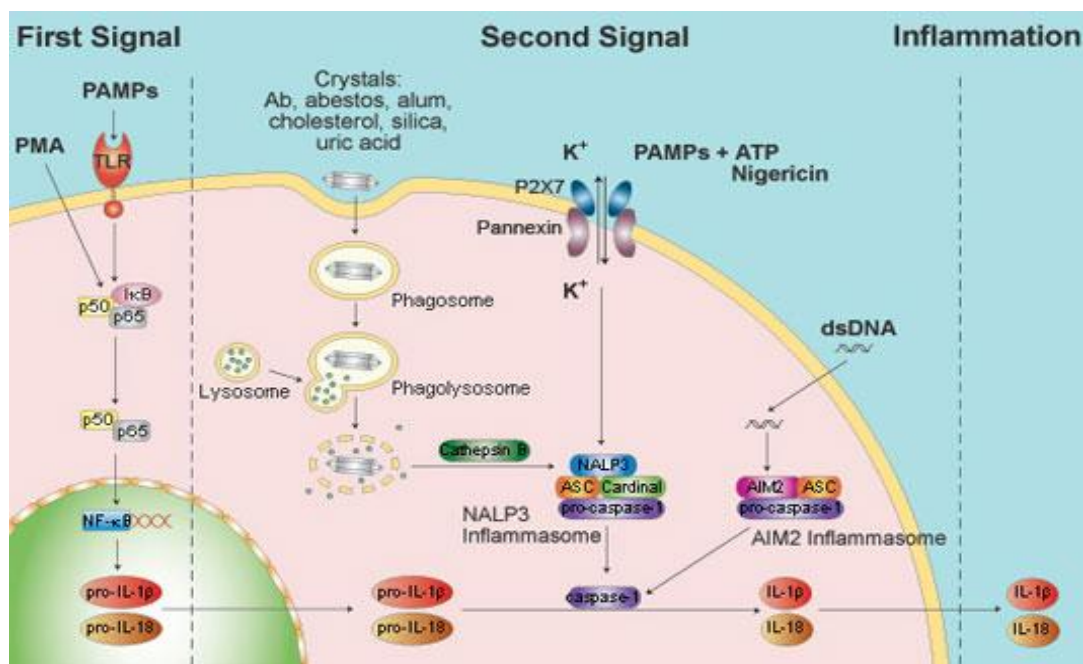


ภาพที่ 1 แสดงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอินฟลามมาโซมส์ (Latz และคณะ, 2013)

อินฟลามมาโซมส์ประกอบด้วยโปรตีนสามชนิด ได้แก่ โปรตีนในกลุ่ม NLR โปรตีนตัวเชื่อม ASC และ pro-caspase-1 โดยโปรตีนทั้งสามชนิดนี้จะประกอบกันเป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดใหญ่ในไซโตพลาซึม

2.3.3 กลไกการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์

สำหรับโปรตีนในกลุ่ม NLR ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง IL-1 β คือ NLRP3 (Martinon และคณะ, 2006) หรือเรียกว่า NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ ซึ่งจะถูกระตุ้นเมื่อมีการรับรู้โมเลกุลของ จุลินทรีย์ กล่าวคือ จุลินทรีย์เป็นตัวกระตุ้น NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ เช่น *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Gross และคณะ, 2009) แบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* (Mariathasan และคณะ, 2006) และไวรัส เช่น ไวรัสเซนไต ไวรัสอะดีโน และไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Kanneganti และคณะ, 2006) นอกจากนี้ในการ กระตุ้นให้เกิดการประกอบเป็นอินฟลามมาโซมส์นั้น ยังมีรายงานที่สัณฐานในการรับรู้ DAMP ชนิดต่างๆ เช่น monosodium urate crystals (MSU) silica และ cholesterol จะกระตุ้น การเกิดอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species หรือ ROS) จากไมโทคอนเดรีย (Jo และคณะ, 2016) ทำให้มีการรวมตัวของโปรตีนองค์ประกอบอินฟลามมาโซมส์ในไซโตพลาซึม โดยผลึกจะเข้าสู่ เซลล์ด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส จากนั้นจะรวมกับไลโซโซมซึ่งภายในไลโซโซมมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย สลายโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต ผลึกเหล่านี้มีรูปร่างแหลมคมทำให้เยื่อหุ้มเกิดการฉีกขาด เอนไซม์ที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มจึงไหลออกมา เช่น cathepsin B เป็นเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งส่งผลให้มีการ กระตุ้น NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ นอกจากนี้ ATP และไนเจอร์ิซินยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง องค์ประกอบของไอออนภายในเซลล์โดยทำให้มีการหลั่งโพแทสเซียมออกนอกเซลล์ นำไปสู่การ กระตุ้นของ NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ (Franchi และคณะ, 2007) แสดงกลไกการกระตุ้น อินฟลามมาโซมส์ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการกระตุ้นอินฟลามาโซมส์ (Guo และคณะ, 2015)

อินฟลามาโซมส์จะถูกกระตุ้นเมื่อมีการรับรู้เชื้อก่อโรคหลายชนิดรวมถึง DAMP ชนิดต่างๆ เมื่ออินฟลามาโซมส์ถูกกระตุ้นจะส่งผลให้เกิดการย่อยตัวของเอนไซม์ pro-caspase-1 กลายเป็น caspase-1 นำไปสู่การย่อย pro-IL-1 β และ pro-IL-18 และหลังไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β และ IL-18 เป็นต้น

2.3.4 โรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

กลุ่มโรคที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรม เป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากการอักเสบด้วยตนเอง (autoinflammatory diseases) ตัวอย่างเช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) เป็นโรคข้ออักเสบที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันทำลายข้อตัวเอง ทำให้เกิดการอักเสบของข้อเนื้อเยื่อรอบข้อ จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดของโรคนี้ ได้แก่ พันธุกรรม ฮอร์โมน และสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (Smolen และคณะ, 2016) โรค CAPS หรือ Cryopyrin-associated periodic syndrome เป็นโรคไขกักลับซ้ำที่มีความสัมพันธ์กับ cryopyrin ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ มีผื่นขึ้นบนผิวหนังมีลักษณะคล้ายลมพิษ และมีอาการอักเสบของข้อ โดยสาเหตุของโรคเกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของความผิดปกติของยีน *CIAS1* หรือ *NLRP3* ที่เป็นส่วนหนึ่งในการ

สร้างโปรตีน cryopyrin ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีบทบาทในการเกิดการอักเสบในร่างกาย หากมีความผิดปกติของยีน โปรตีนนี้จะมีการทำงานเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มขึ้นในร่างกาย (Neven และคณะ, 2008) นอกจากนี้โรคเก๊าท์ยังเป็นโรคหนึ่งที่เกิดจากการอักเสบด้วยตนเอง ทำให้มีอาการปวด บวม แดงและร้อนตามบริเวณข้อต่างๆ โดยมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย (McGill, 2000) เช่น มีภาวะกรดยูริกในเลือดสูง เกิดจากไตขับกรดยูริกได้น้อยลง การรับประทานอาหารที่ให้กรดยูริก (สารพิวรีน) สูงอย่างต่อเนื่องเป็นประจำ รวมถึงสาเหตุทางพันธุกรรมด้วย โดยเกิดจากความแปรปรวนของยีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับโรคเก๊าท์ คือ *SLC2A9* *SLC22A12* และ *ABCG2* และการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการสูญเสียฟังก์ชันของโปรตีนในยีนเหล่านี้ทำให้เกิดภาวะกรดยูริกในเลือดสูง (Merriman และ Dalbeth, 2011; Reginato และคณะ, 2012) โดยความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ทำให้ร่างกายสร้างกรดยูริกออกมาในปริมาณที่มากเกินไป เช่น โรคไตในเด็กที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากภาวะกรดยูริกในเลือดสูง โรคถุงน้ำในไต เป็นต้น

2.4 โรคเก๊าท์

โรคเก๊าท์จัดเป็นโรคข้ออักเสบที่พบได้บ่อยในมนุษย์ เป็นโรคของผู้ใหญ่ในวัยตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป โดยอายุ 40-60 ปี จะพบโรคนี้ได้ประมาณ 2% และอายุ 60 ปีขึ้นไป จะพบได้ประมาณ 4% สังเกตได้ว่ายิ่งอายุมากขึ้นโอกาสที่จะเป็นโรคนี้ก็มากขึ้นตามไปด้วย มักพบได้ในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงประมาณ 9-10 เท่า ส่วนในผู้หญิงจะพบได้น้อย หรือถ้าพบก็มักจะเป็นผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนไปแล้ว มักเริ่มเป็นเมื่ออายุ 55 ปีขึ้นไป (นิลกาญจวงศ์, 2553)

การทำงานของอินฟลามมาโซมส์โดยการกระตุ้นด้วย DAMPs มีบทบาทสำคัญในหลายๆ โรค เช่น โรคเก๊าท์ (Martinon และคณะ, 2006) โรคเก๊าท์เป็นโรคที่มีการอักเสบด้วยตนเองเกิดจากความผิดปกติในขบวนการเมแทบอลิซึมของกรดยูริกในร่างกาย ทำให้ในเลือดมีกรดยูริกสูงกว่าปกติ และเกิดการตกตะกอนเป็นผลึกยูเรต (monosodium urate; MSU) สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะบริเวณข้อ (Shi และคณะ, 2010) ผู้ป่วยที่เป็นโรคเก๊าท์แบบเรื้อรังจะมีผลึกยูเรตสะสมเป็นก้อน เรียกว่า โทฟัส (tophus) ทำให้เกิดอาการอักเสบของข้อและทำให้ข้อผิดรูปร่างไปได้ สาเหตุของ

โรคเก๊าท์ นอกจากเกิดจากการที่มีกรดยูริกในเลือดสูงแล้วยังเกิดจากการขับกรดยูริกออกจากร่างกายได้ลดลง ซึ่งปกติกรดยูริกจะถูกขับออกทางไต แต่ถ้าผู้ป่วยโรคเก๊าท์จะมีการขับกรดยูริกออกทางไตได้น้อยกว่าคนปกติทำให้เกิดการสะสมของกรดยูริกที่ไตได้ กลไกของโรคเก๊าท์เกิดจากผลึก MSU ไปกระตุ้น NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ (Busso และ So, 2010) ซึ่งจะชักนำให้เกิดการหลั่งของ IL-1 β และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่มี MSU เป็นตัวกลางจะเกิดขึ้นระหว่างที่มีการติดเชื้อหรือเกิดบริเวณที่มีอัตราการตายของเซลล์ที่สูง (Landis และคณะ, 2002; Martinon, 2010)

2.5 ยาที่ใช้ในการรักษาโรคเก๊าท์

ปัจจุบันนี้มียาหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบ เช่น โคซิจิน ถูกสกัดมาจาก *Colchicum autumnale* ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่ง นำมาใช้เป็นยาที่มีความจำเพาะในการรักษาข้ออักเสบจากโรคเก๊าท์ โดยกลไกการออกฤทธิ์คือ โคซิจินจะเข้าไปจับกับทูบูลิน ทำให้ไม่เกิดโพลีเมอร์ของไมโครทูบูล จึงเกิดการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบและลดกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาวอีกด้วย ซึ่งกลไกนี้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเก๊าท์ (Ben-Chetrit และ Levy, 1998) แต่อาจมีอาการข้างเคียงได้ เช่น ท้องเสีย ปวดท้อง คลื่นไส้ และอาเจียน (Dalbeth และคณะ, 2014) ยาในกลุ่มต้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (NSAID) ใช้กันแพร่หลายในทางการแพทย์ เป็นยาที่ไม่มีความจำเพาะสามารถรักษาโรคข้ออักเสบได้หลายชนิดรวมทั้งโรคเก๊าท์ด้วย เช่น ไดโคลฟีแนค ไอบูโพรเฟน พิริออคซิแคม เป็นต้น กลไกการออกฤทธิ์คือ เมื่อเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บจะเกิดการสร้างกรดอะราคิโดนิกขึ้นมาจากฟอสโฟลิพิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอ2 (phospholipase A2) จากนั้นกรดอะราคิโดนิกจะถูกเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนสเปลี่ยนไปเป็นพรอสตาแกลนดิน เนื่องจากพรอสตาแกลนดินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ทำให้เกิดอาการปวดและไข้ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญของยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ จึงเป็นผลให้การสร้างพรอสตาแกลนดินลดลง ทำให้ยาในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการลดไข้ แก่ปวด และยับยั้งการอักเสบได้ (Crofford และคณะ, 2000) ผลข้างเคียงอาจทำให้เกิด

แผลในกระเพาะอาหาร ความดันโลหิตสูง ไตวายเฉียบพลันได้ (Collier และ Pain, 1985) นอกจากนี้ คานาคินูแมบยังเป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้รักษาอาการอักเสบของข้อ โดยเป็นยาประเภทแอนติบอดี ต้านการหลั่งของ IL-1 β ที่มนุษย์สร้างขึ้น กลไกการออกฤทธิ์ของยาจะเกิดขึ้นโดยตัวยาคจะเข้าร่วมตัว กับสารโปรตีนประเภทหนึ่งในร่างกายที่เรียกว่า ไซโตไคน์ ทำให้สารโปรตีนดังกล่าวไม่สามารถเข้าร่วมตัวกับตัวรับ (Receptor) ภายในเซลล์ต่างๆ ได้ ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหยุดด้านหรือหยุดทำลายเซลล์ของร่างกายจึงทำให้อาการป่วยดีขึ้น ปัจจุบันคานาคินูแมบเป็นที่ยอมรับของผู้ป่วย มากที่สุดและไม่มีผลข้างเคียงที่ร้ายแรง (Church และ McDermott, 2009)

2.6 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอินฟลามมาโซมส์

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการรายงานว่ามีสารหลายชนิดที่มีฤทธิ์กีดการทำงานของ อินฟลามมาโซมส์ ได้แก่ 1) สาร MCC950 ซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กและมีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการทำงานของ NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ ทำให้การหลั่งของ IL-1 β ลดลง (Coll และคณะ, 2015) 2) Parthenolide และ Bay 11-7082 เป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของ NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ โดยทำให้แอกทิวิตีของ ATPase ลดลง และยังพบว่า Parthenolide สามารถยับยั้งการกระตุ้น caspase-1 ได้อีกด้วย (Juliana และคณะ, 2010) 3) Isoliquiritigenin (ILG) เป็นสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากชะเอมเทศ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้าน การอักเสบ โดย ILG สามารถยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B และ NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ได้ (Honda และคณะ, 2014) และ 4) Glybenclamide หรือ glyburide สามารถยับยั้งการกระตุ้น NLRP3 อินฟลามมาโซมส์ ที่ถูกกระตุ้นผ่านทาง PAMPs DAMPs หรือผลึกอินทรีย์ โดย Glybenclamide จะขัดขวางการตัดของ caspase-1 และ pro-IL-1 β โดยยับยั้งผ่านทาง K⁺ efflux (Lamkanfi และ คณะ, 2009) นอกจากสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบแล้ว พืชสมุนไพรยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้รักษาอาการอักเสบได้ ปัจจุบันมีสมุนไพรหลายชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาอาการอักเสบ เช่น สมุนไพรรักษาโรคเก๊าท์ จากข้อมูลของสถาบันการแพทย์แผนไทย (2556) ระบุว่า สมุนไพรที่ช่วย บำรุงไตให้แข็งแรง เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไตให้ดีขึ้นจนสามารถขับกรดยูริกออกจากร่างกาย

ได้เป็นปกติ เช่น เห็ดหลินจือ เหง้าหนวดแมว มีสรรพคุณในการขับกรดยูริก ช่วยในการขับปัสสาวะ และขยายหลอดเลือดให้กว้างทำให้มีการขับกรดยูริกออกมาทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น กรดยูริกจึงตกตะกอนน้อยลง สมุนไพรที่ช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดหรือการอักเสบ เช่น ขมิ้นชัน ช่วยลดอาการปวดข้อ เถาวัลย์เปรียง เป็นสมุนไพรที่มีประโยชน์ในด้านแก้อาการปวดเมื่อยต่างๆ นอกจากนี้สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (2554) ระบุว่า ย่านาง มีสรรพคุณในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ ลดกรดในกระเพาะอาหาร ลดความดันโลหิต บรรเทาอาการกระเพาะปัสสาวะอักเสบ อาการปวดข้อ รากของย่านางสามารถแก้ไข้ได้ทุกชนิด เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ต้นสาละมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ เช่น ใช้ส่วนของต้นในการรักษาโรคหวัดและอาการปวดท้อง ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อรา เช่น น้ำที่ได้จากใบถูกนำมาใช้เพื่อรักษาโรคผิวหนัง ใช้เป็นยาแก้พิษและยาแก้ปวด เช่น ใบอ่อนช่วยบรรเทาอาการปวดฟัน (Kumar และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบสาละ (Pinheiro และคณะ, 2013) แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกจำเพาะต่ออินฟลามมาไซมส์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืชสมุนไพรที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและสามารถลดการกระตุ้นอินฟลามมาไซมส์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหลั่งของ IL-1 β เพื่อพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ที่สามารถลดการกระตุ้นอินฟลามมาไซมส์ได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1.1 การเหนี่ยวนำเซลล์ไลน์ THP-1

นำเซลล์ THP-1 (มอนอไซต์เซลล์ไลน์จากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว) มากระตุ้นด้วย phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์มอนอไซต์ให้เป็นแมโครฟาจ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้ง และย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ ทิ้งไว้ 1 คืน วันถัดมาจึงนำเซลล์ไปทำการทดลองต่อไป

3.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1

เพาะเลี้ยง THP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Hyclone, USA) ที่เติม fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) 10 % (V/V) และยาปฏิชีวนะ (Penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Hyclone, USA) เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Thermo Scientific, TC 230, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95 %

3.1.3 การเก็บรักษาเซลล์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% DMSO (v/v) (Sigma-Aldrich, USA) ใส่ลงในเซลล์ โดยเก็บเซลล์ลงในหลอด cryogenic vial (SPL life sciences, Korea) และนำเซลล์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงย้ายไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

3.1.4 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่เก็บรักษาไว้มาทำละลายอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำเซลล์ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนที่เหนือ

ตะกอนเซลล์ออกและเติมอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

3.2 สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืช

สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืชได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยสารทดสอบที่ใช้มีทั้งหมด 77 ตัวอย่าง มาจากพืช 2 ชนิด คือ สาละลังกา (*Couroupita guianensis*) และย่านาง (*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืช

ที่มา	Fraction ที่ 1	Fraction ที่ 2	Fraction ที่ 3	Fraction ที่ 4
ใบสาละ (Leaf)	L1-L3	L11-L17	L121-L122, L131-L132, L171-L172	N/A
ดอกสาละ (Flower)	F1-F3	F11-F18	F171-F1711	F1761-F1764, F1781-F1785
กิ่งสาละ (Twig)	T1-T3	T11-T113	T181-T182	N/A
เปลือกผลสาละ (Shell)	S1-S3	N/A	N/A	N/A
เนื้อในผลสาละ (Pulp)	P1-P3	N/A	N/A	N/A
รากย่านาง (Root)	R1-R3	N/A	N/A	N/A
สารบริสุทธิ์	088-091	N/A	N/A	N/A

N/A: ไม่มีสารทดสอบ

3.3 การทดสอบความเป็นพิษของสาร โดยวิธี MTT

นำเซลล์ THP-1 จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในภาดหลุมชนิด 96 หลุม (Thermo Scientific, USA) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์และกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ระบุ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.04N HCl in isopropanol และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) (Biochrom, Anthos 2010, USA) โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ได้จากสมการด้านล่างนี้

$$\% \text{ cell viability} = (\text{Abs test} - \text{Abs blank}) \times 100 / \text{Abs control} - \text{Abs blank}$$

Abs test: ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารสกัดตัวอย่าง

Abs blank: ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์

Abs control: ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารสกัดตัวอย่าง

3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นอินฟลามมาทอซมส์และการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์

THP-1

นำเซลล์ THP-1 จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในภาดหลุมชนิด 12 หลุม (Thermo Scientific, USA) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ และกระตุ้นด้วย phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้งและล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง และย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM (Gibco, USA) และกระตุ้นเซลล์ด้วย lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ monosodium urate (MSU) (InvivoGen, USA) ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Martinon และคณะ,

2006) โดยกระตุ้นเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตามข้อที่ 3.4.1 และเก็บโปรตีนไปตรวจวัดระดับ caspase-1 และ IL-1 β ด้วยวิธี Western blot ตามข้อที่ 3.4.2

3.4.1 การวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA

ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Human IL-1 β ELISA kit (R&D Systems, USA) โดยทำตามคู่มือของชุดทดสอบดังนี้ เจือจางแอนติบอดีจับ (Capture Antibody) ให้ได้ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นปิเปตใส่ลงในภาชนะหลุมชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมา ล้างด้วย washing buffer (1xPBS + 0.05% Tween 20) 6 ครั้ง ปิเปตสารละลาย 1% Bovine serum albumin (BSA) ใน PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง และเติมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พอครบเวลาล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง และเติมแอนติบอดีตรวจวัด (Detection Antibody) ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง เติมสารละลาย Streptavidin-HRP หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หลีกเลี้ยงไม่ให้โดนแสง หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง และเติมสารละลายตั้งต้น 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด ประมาณ 5 นาที จากนั้นเติม 2N H₂SO₄ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader)

3.4.2 การตรวจวัดระดับของ pro-caspase-1 และ pro-IL-1 β ด้วยวิธี Western blot

3.4.2.1 การสกัดและการวัดโปรตีน

หลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นตามที่ระบุระยะเวลาแล้ว ดูดส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างด้วย PBS ที่เย็น จากนั้นเติม RIPA buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใส (โปรตีน) ไปทำการทดลองต่อไป

เมื่อได้โปรตีนมาแล้ว ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA) ซึ่งใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 และ 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางโปรตีนด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:10 ลงในหลอดหลุมชนิด 96 หลุม จากนั้นนำสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 50:1 ผสมให้เข้ากัน เติมนลงในแต่ละหลุม นำไปปั่นที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader)

3.4.2.2 การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมเจล SDS-PAGE 12% และ 15% (ภาคผนวก ก.4) และเตรียมตัวอย่างที่จะโหลดเจล ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีย้อม (2x loading dye) และน้ำกลั่น (Double - distilled water) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงในเจล โดยใช้ Color Plus Prestained Protein Ladder (New England BioLabs, USA) เป็น protein marker ตัวอย่างจะถูกแยกโดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

3.4.2.3 วัตรระดับการแสดงผลของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

หลังจากที่แยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้วให้แช่เจลใน transfer buffer ประมาณ 5 นาที ตัด Polyvinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon-P, Millipore Corporation, USA) และแช่ในเมทานอล 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปแช่ใน transfer buffer และตัดกระดาษกรอง 6 แผ่น นำไปแช่ใน transfer buffer สำหรับการย้ายโปรตีน จากเจลสู่แผ่นเมมเบรนนั้น นำกระดาษกรอง 3 แผ่นวางก่อน ตามด้วย PVDF เมมเบรน ตามด้วยเจล และกระดาษกรองอีก 3 แผ่น จากนั้นไล่ฟองอากาศออกและเติม transfer buffer ลงบนกระดาษกรองเล็กน้อย โดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ 1 เจลและใช้กระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ 2 เจล เป็นเวลา 90 นาที

3.4.2.4 การตรวจสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence และ autoradiography

หลังจากที่ย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้วให้ปิดที่ว่างบนเมมเบรนด้วย blocking solution (ภาคผนวก ก.4) 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยวางบนเครื่องเขย่าขึ้น-ลง พอครบเวลาเท blocking solution ทิ้งและเติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (แอนติบอดีที่ใช้แสดงดังตารางที่ 2) เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมา นำเมมเบรนมาเขย่าบนเครื่องเขย่าขึ้น-ลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเทแอนติบอดีทิ้งและล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline-Tween (PBST) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้งและ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง ก่อนที่จะเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) และนำเมมเบรนมาเขย่าบนเครื่องเขย่าขึ้น-ลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้งและ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปตรวจสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence เป็นการติดตามผลโดยการเรืองแสงและ autoradiography เป็นการติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์ (Amersham Biosciences, UK) ซึ่งซัสเตรทที่ใช้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วจะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นมาและซัสเตรท

ที่จะใช้ในการตรวจสอบนั้นจะต้องเตรียมใหม่เสมอ โดยขั้นตอนประกอบด้วยสารละลาย A และ สารละลาย B (ภาคผนวก ก.4) ผสมให้เข้ากัน และเทลงบนเมมเบรน บ่มเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวาง เมมเบรนลงบนแผ่นพลาสติกและวางบน Hypercassette (Amersham Biosciences, UK) และนำ แผ่นฟิล์มเอกซเรย์วางประกบบนเมมเบรน ขั้นตอนนี้ต้องทำในที่มืดเพื่อไม่ให้แผ่นฟิล์มเอกซเรย์โดน แสง ซึ่งเวลาที่ใช้ในการประกบฟิล์มนั้นขึ้นอยู่กับแต่ละโปรตีนที่ทำการทดลอง

ตารางที่ 2 แสดงแอนติบอดีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

แอนติบอดี	อัตราส่วนเจือจางที่ใช้
IL-1 β ¹	1:1000
caspase-1 ¹	1:1000
β -actin ²	1:10000
Sheep Anti-Mouse (HRP) ³	1:4000
Donkey Anti-Rabbit (HRP) ³	1:4000

¹ แอนติบอดีจากบริษัท Cell signaling Technology, USA

² แอนติบอดีจากบริษัท Chemicon International, USA

³ แอนติบอดีจากบริษัท GE Healthcare, USA

3.5 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดจากพืชที่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β

วิธีการคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพกดการกระตุ้นอินฟลามมาโทซิส จะทำการทดลองตามวิธี ทดลองของ Uratsuji และคณะ (2012) โดยนำเซลล์ THP-1 จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงใน ภาดหลุมชนิด 12 หลุม และกระตุ้นด้วย PMA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร เพื่อเปลี่ยนเซลล์ จากมอนอไซต์ให้เป็นแมโครฟาจ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 1 ครั้งและนำสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ 20 เปอร์เซ็นต์ (IC₂₀) มาบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (จาก *Escherichia coli*) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และกระตุ้นเซลล์ด้วย MSU ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดอินฟลามมาโทซิส และเก็บอาหาร เลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA ตามข้อที่ 3.4.1

3.6 ศึกษากลไกต่อการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ของสารสกัดจากพืช

สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กด IL-1 β จากการทดลองในข้อ 3.5 นำมาตรวจสอบผลกระทบวิธีการกระตุ้นของอินฟลามมาไซม์ ซึ่งมี 3 วิธี คือ

3.6.1 การตรวจวัดการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS assay)

นำเซลล์ THP-1 จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในสภาพหลุมชนิด 12 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ และกระตุ้นด้วย PMA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้งและย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง กระตุ้นเซลล์ด้วยสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และกระตุ้นเซลล์ด้วย MSU ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พอครบเวลาล้างด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง และเติมสารละลาย MitoSOX-Red (Invitrogen, USA) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อสารละลาย HBSS (Hyclone, USA) 1 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ลอกเซลล์ออกมาและนำไปวัดผลด้วย flow cytometer วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม FlowJo เวอร์ชัน 7 (TreeStar, USA)

3.6.2 การตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo 1 Inflammasome Assay

นำเซลล์ THP-1 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในสภาพหลุมสีขาว ทึบแสง ชนิด 96 หลุม กระตุ้นด้วย PMA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้งและย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมาล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง กระตุ้นด้วยสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและกระตุ้นด้วย MSU ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเอาออกจากตู้บ่ม วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5

นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 50 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย caspase-glo (Promega, UK) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม และนำไปวัดค่าการเรืองแสง (luminescence) ที่ 20 30 และ 40 นาที ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Thermo Scientific, Varioskan Flash, USA)

3.6.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IL1B* โดยวิธี quantitative RT-PCR

3.6.3.1 การสกัด total RNA

นำตัวอย่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากพีชมาทำการสกัด RNA โดยใช้ TRIzol[®] (Life Technologies, USA) ซึ่งวิธีการสกัด คือ ใส่ TRIzol[®] ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ปิดฝาทิ้งและลง 7-8 รอบ จากนั้นเปิดใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม (Lab-Scan, Ireland) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อ TRIzol[®] ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าขึ้นและลงแรงๆ เป็นเวลา 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสก็คือ โปรตีน ใสลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol (Merck, Germany) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ TRIzol[®] ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 75% เอทานอลใน DEPC water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ TRIzol[®] ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนโดยคว่ำลงบนกระดาษทิชชูจนตะกอนแห้ง หลังจากนั้นเติม DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดฝาทิ้งและลงหลายๆ ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างไปวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, UK) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.3.2 การทำ Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ complementary

DNA (cDNA)

เตรียมตัวอย่างโดยใช้ RNA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้เท่ากับ 12 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Random hexamers (Qiagen, Germany) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และนำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 5xRT buffer (Thermo Scientific, USA), Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Thermo Scientific, USA), RNase inhibitor (Thermo Scientific, USA) และ Reverse transcriptase (Thermo Scientific, USA) ลงในแต่ละปฏิกิริยา ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR Bioer Life Express (Bioer technology, China) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.3.3 การตรวจหาการแสดงออกของยีน *IL1B* ด้วยวิธี Real-time PCR

นำตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้ 200 นาโนกรัม มาใช้เป็นต้นแบบ และเติม iQ™ SYBR® Green (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA USA), Forward primer, Reverse primer และ Hypure water ลงในแต่ละปฏิกิริยา ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากัน และนำไปใส่ในเครื่อง CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาทีและอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดย primer ที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3 และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak และ Schmittgen, 2001)

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer

ยีน	Primer sequence	Annealing Temperature (°C)
<i>IL1B</i>	Forward 5'-AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG-3'	55
	Reverse 5'-TGGAGAACACCACTTGTGCTCCA-3'	
β -actin	Forward 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAG-3'	55
	Reverse 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'	

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลในงานวิจัยนี้วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ (t-test) ซึ่ง * แสดงถึงค่า p -value น้อยกว่า 0.05 ** แสดงถึงค่า p -value น้อยกว่า 0.01 และ *** แสดงถึงค่า p -value น้อยกว่า 0.001 ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.03 (GraphPad Software, Incorporation, USA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบต่อเซลล์ไลน์ THP-1

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของต้นสาละลังกาและย่านางที่ใช้ในการศึกษาเพื่อคัดกรองสารออกฤทธิ์ จิงบ่มเซลล์ THP-1 ร่วมกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่า มีตัวอย่างทดสอบ 67 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 77 ตัวอย่างที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบโดยให้ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ 20 เปอร์เซ็นต์ (IC_{20}) มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นตัวอย่างทดสอบรหัส R4, T14-T16, T19-T110, L11, L13-L14 และ F15 ซึ่งแสดงความเป็นพิษระดับหนึ่ง ดังนั้น สำหรับตัวอย่างทดสอบที่มีค่า IC_{20} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป สำหรับตัวอย่างทดสอบรหัส R4, T14-T16, T19-T110, L11, L13-L14 และ F15 ใช้ความเข้มข้น 4.57 ± 0.31 , 0.32 ± 0.07 , 0.43 ± 0.05 , 2.35 ± 0.21 , 0.43 ± 0.03 , 0.72 ± 0.13 , 0.43 ± 0.04 , 6.49 ± 0.3 , 0.45 ± 0.12 และ 0.72 ± 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทั้งหมดในตารางที่ 4 และตารางที่ 5 และกราฟของตัวอย่างทดสอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบต่อเซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT

ชื่อวิทยาศาสตร์ (ชื่อสามัญ)	ส่วนของพืช	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	รหัส ตัวอย่าง	ค่า IC ₂₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)
<i>Couroupita guianensis</i> (สาละลังกา)	ใบ	MeOH	L1	>100
		EtOAc	L2	>100
		Hexane	L3	>100
	ดอก	MeOH	F1	>100
		EtOAc	F2	>100
		Hexane	F3	>100
	กิ่ง	MeOH	T1	>100
		EtOAc	T2	>100
		Hexane	T3	>100
	เปลือกผล	Hexane	S1	>100
		EtOAc	S2	>100
		MeOH	S3	>100
เนื้อผล	Hexane	P1	>100	
	EtOAc	P2	>100	
	MeOH	P3	>100	
<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels (ย่านาง)	ราก	Hexane	R1	>100
		EtOAc	R2	>100
		MeOH	R3	>100
		CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH	R4	4.57

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบที่แยกให้บริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT

ชื่อวิทยาศาสตร์ (ชื่อสามัญ)	ส่วนของพืช	รหัสตัวอย่าง	ค่า IC ₂₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)
<i>Couroupita guianensis</i> (สาละลังกา)	ใบ	L11	0.43
		L12	>100
		L13	6.49
		L14	0.45
		L15	>100
		L16	>100
		L17	>100
	ดอก	F11	>100
		F12	>100
		F13	>100
		F14	>100
		F15	0.72
		F16	>100
		F17	>100
		F18	>100
	กิ่ง	T11	>100
		T12	>100
		T13	>100
		T14	0.32
		T15	0.43
		T16	2.35
T17	>100		
T18	>100		
T19	0.43		
T110	0.72		
T111	>100		

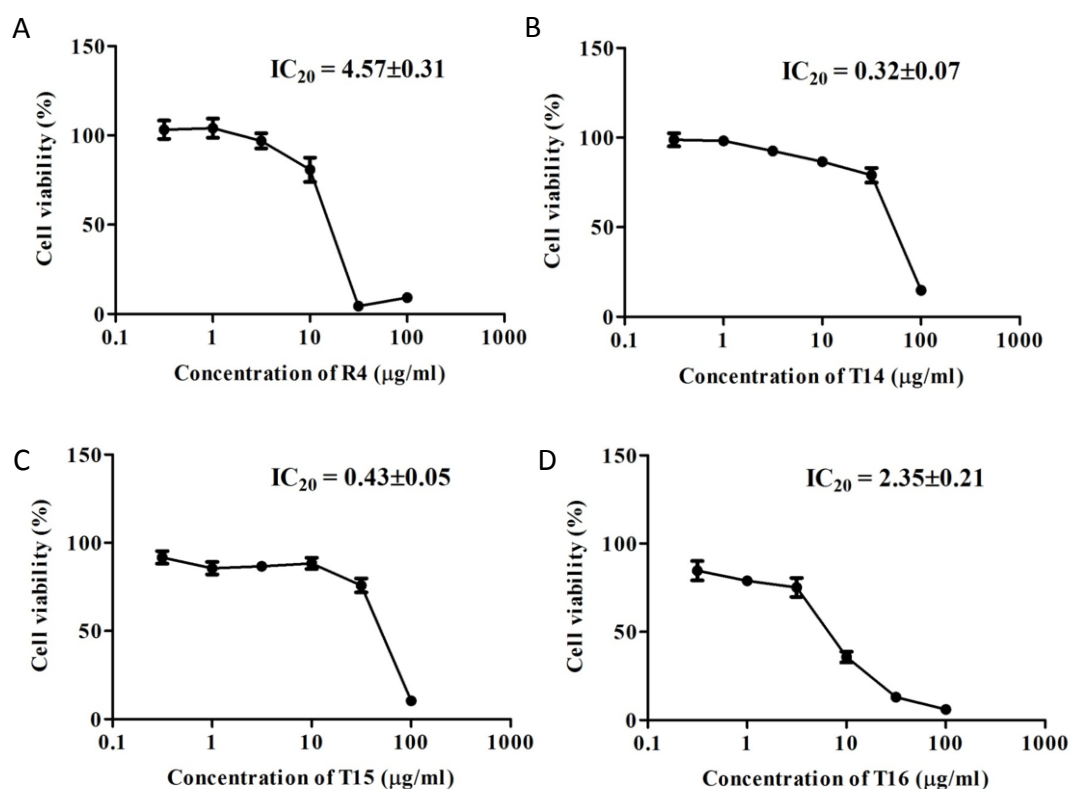
ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบที่แยกให้บริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์ต่อ เซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT

ชื่อวิทยาศาสตร์ (ชื่อสามัญ)	ส่วนของพืช	รหัสตัวอย่าง	ค่า IC ₂₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)
<i>Couroupita guianensis</i> (สาละลังกา)	กิ่ง	T112	>100
		T113	>100
	ใบ	L121	>100
		L122	>100
		L131	>100
		L132	>100
		L171	>100
		ดอก	F171
	F172		>100
	F173		>100
	F174		>100
	F175		>100
	F176		>100
	F177		>100
	F178		>100
	F179		>100
	F1710		>100
	F1711		>100
	กิ่ง	T181	>100
		T182	>100
	ดอก	F1761	>100
		F1762	>100
		F1763	>100
		F1781	>100
		F1782	>100
		F1783	>100

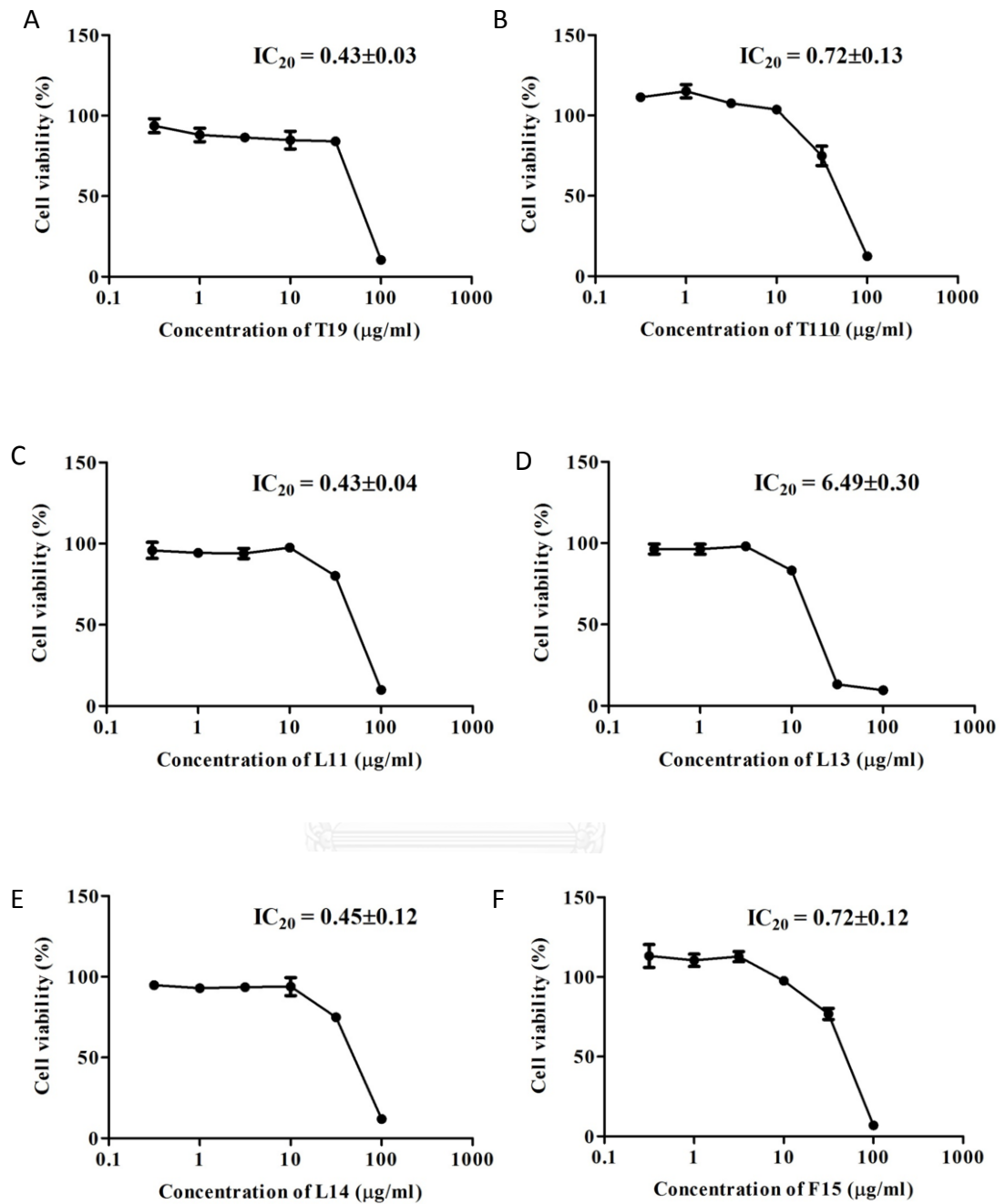
ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างทดสอบที่แยกให้บริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT

ชื่อวิทยาศาสตร์ (ชื่อสามัญ)	ส่วนของพืช	รหัสตัวอย่าง	ค่า IC ₂₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Couroupita guianensis</i> (สาละลังกา)	ดอก	F1784	>100
	ใบ	087*	>100
	ดอก	088*	>100
		089*	>100
		090*	>100
		091*	>100

* สารบริสุทธิ์



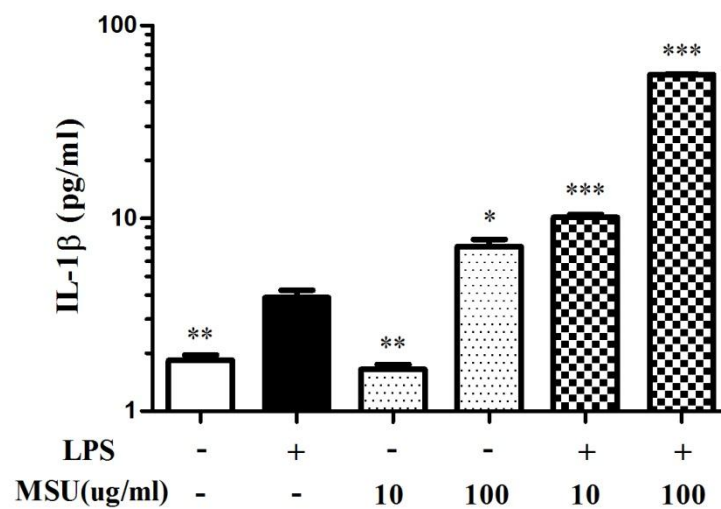
ภาพที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี MTT (A) ตัวอย่างทดสอบรหัส R4 (รากย่านาง) (B)-(D) ตัวอย่างทดสอบรหัส T14-T16 (กิ่งสาละลังกา) ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้งและแสดงค่าเฉลี่ย ± SD



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี MTT (A) และ (B) ตัวอย่างทดสอบบรหส์ T19 และ T110 (กิ่งสาละลังกา) (C)-(E) ตัวอย่างทดสอบบรหส์ L11, L13 และ L14 (ใบสาละลังกา) (F) ตัวอย่างทดสอบบรหส์ F15 (ดอกสาละลังกา) ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้งและแสดงค่าเฉลี่ย \pm SD

4.2 การกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β ใน THP-1 โดย MSU

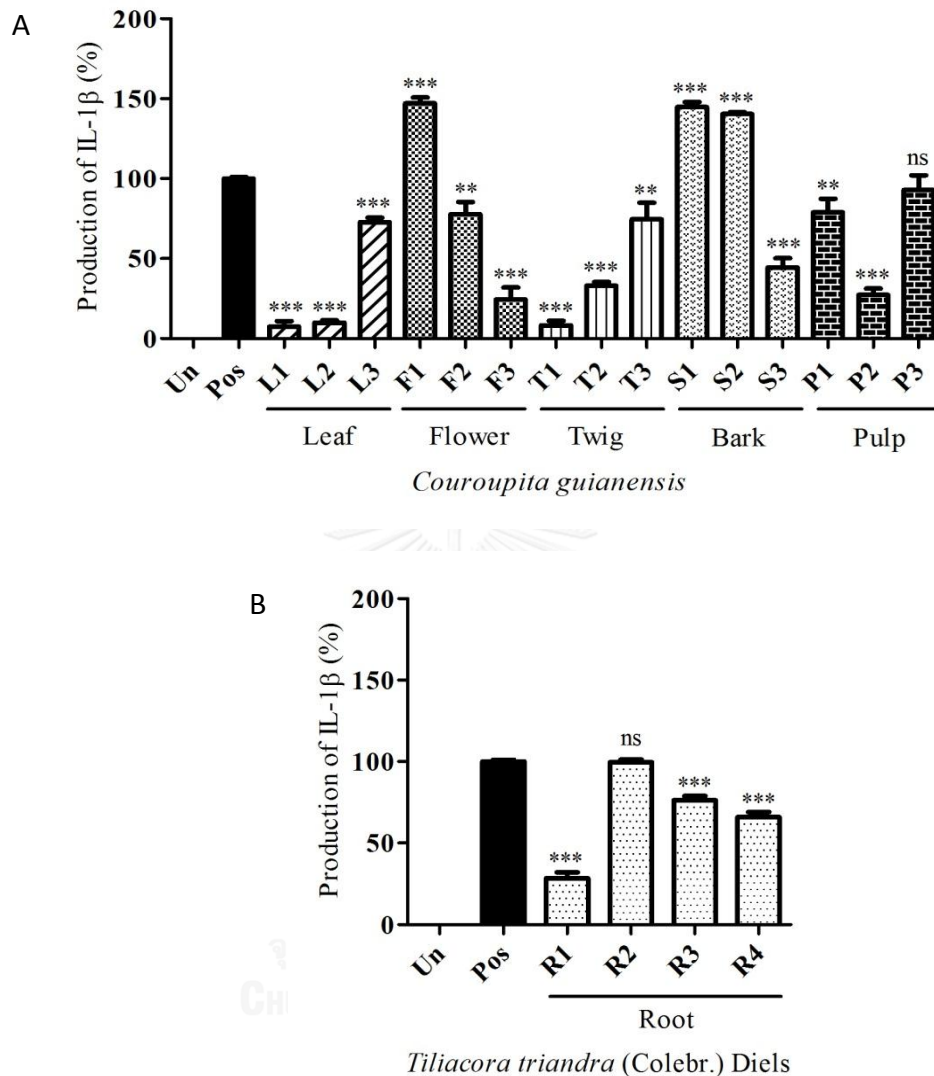
เพื่อศึกษาผลต่อการหลั่ง IL-1 β ระหว่างการมี MSU เป็นตัวกระตุ้นเพียงอย่างเดียวกับการมี LPS ร่วมกับ MSU เป็นตัวกระตุ้น โดยเซลล์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย LPS/MSU หรือ MSU และตรวจวัดปริมาณการหลั่ง IL-1 β ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี ELISA แสดงผลดังภาพที่ 5 พบว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ร่วมกับ MSU ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทำให้มีการหลั่ง IL-1 β เท่ากับ 10.15 ± 0.61 และ 55.79 ± 0.29 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการหลั่ง IL-1 β ได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ MSU เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ โดยเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีการหลั่ง IL-1 β เท่ากับ 3.89 ± 0.61 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตรและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการหลั่ง IL-1 β เท่ากับ 1.65 ± 0.17 และ 7.15 ± 1.11 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ผลที่ได้บ่งชี้ว่า สารทั้งสองชนิดทำงานเสริมกันและสามารถกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β ได้สูงขึ้นจากการใช้ LPS ร่วมกับ MSU ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและนำไปสู่การหลั่ง IL-1 β ที่อยู่ในรูปที่ถูกตัดแล้วในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงใช้ตัวอย่างทดสอบกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ MSU และวัดการหลั่ง IL-1 β



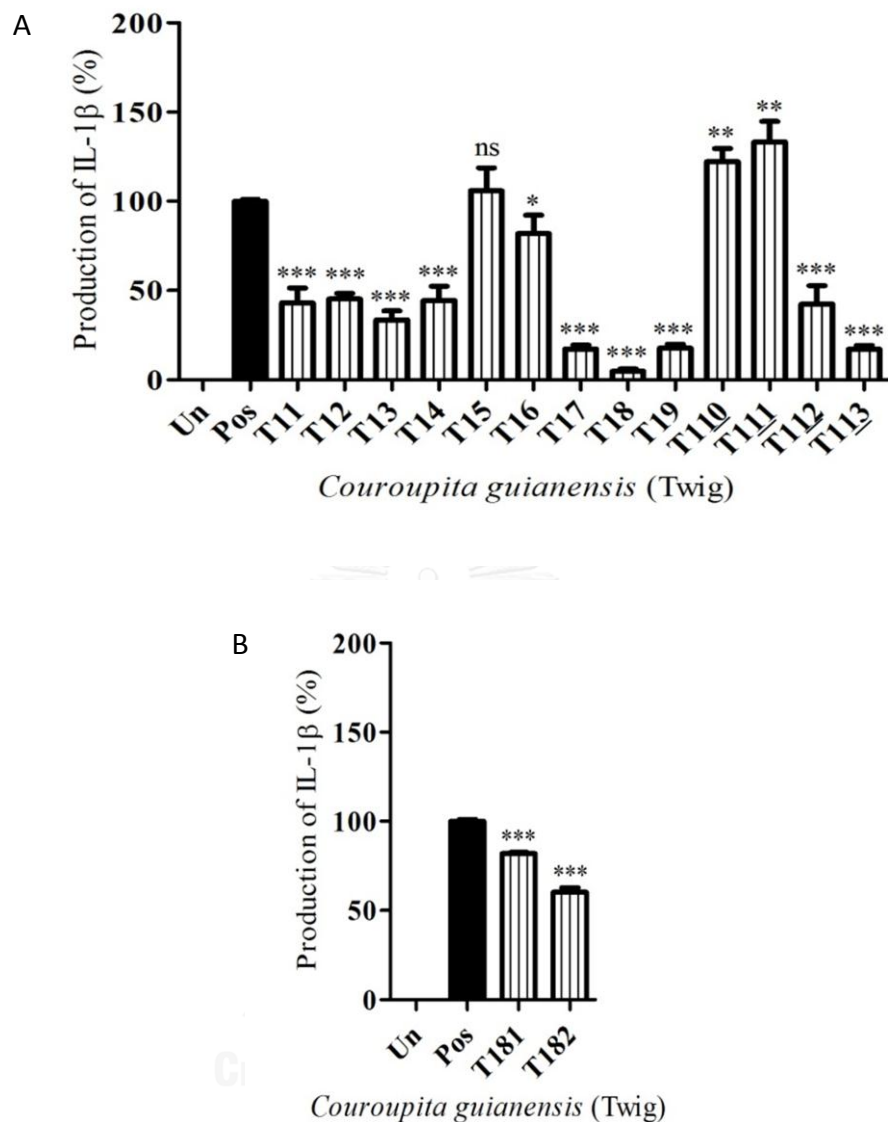
ภาพที่ 5 ผลของ MSU ต่อการหลั่ง IL-1 β ด้วยวิธี ELISA โดยชุดควบคุมลบคือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวกคือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้งและแสดงค่าเฉลี่ย \pm SD * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก

4.3 การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ของตัวอย่างทดสอบ

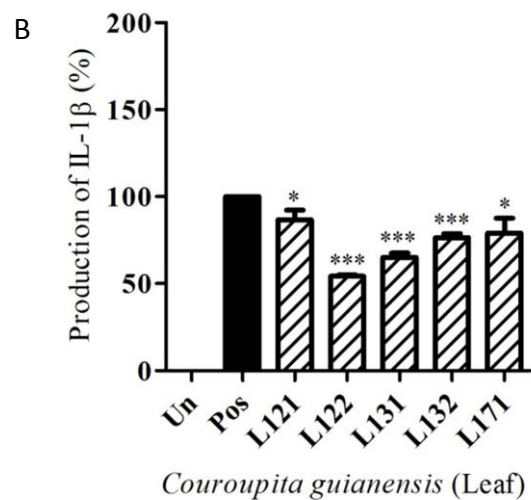
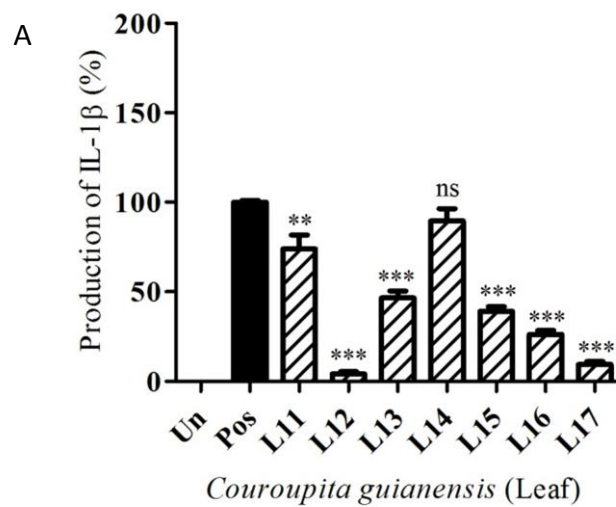
เพื่อศึกษาผลการหลั่ง IL-1 β ของตัวอย่างทดสอบ จึงนำตัวอย่างทดสอบที่ทดสอบความเป็นพิษแล้ว มาป่มกับเซลล์ THP-1 ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (IC₂₀) และกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β โดยใช้ LPS ร่วมกับ MSU จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA แสดงผลดังภาพที่ 6 ถึงภาพที่ 10 จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างทดสอบบรหส์ L1, L2 (ใบสาละลังกา) และ T1 (กิ่งสาละลังกา) จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 ตัวอย่างทดสอบบรหส์ T17-T19, T113 (กิ่งสาละลังกา), L12, L17 (ใบสาละลังกา) และ F17 (ดอกสาละลังกา) จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 และตัวอย่างทดสอบบรหส์ F173 และ F174 (ดอกสาละลังกา) จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 3 ตัวอย่างทั้งหมดสามารถลดการหลั่ง IL-1 β เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีเกณฑ์ในการเปรียบเทียบคือ เซลล์ที่ได้รับตัวอย่างที่ถือว่ามียุทธียับยั้งมีการหลั่ง IL-1 β น้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งตัวอย่างทดสอบบรหส์ F173 และ F174 จึงเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจ เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองชนิดยังมีฤทธิ์ในการลดการหลั่ง IL-1 β เมื่อทำการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 3 และตัวอย่างทดสอบบรหส์ 090 (Quercetin) และ 091 (Kaempferol) แสดงผลในภาพที่ 10 ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β มาก่อนหน้านี้ ก็ให้ผลในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β เช่นเดียวกัน ดังนั้นตัวอย่างทดสอบบรหส์ F173 และ F174 จะถูกนำไปทดสอบวิธีสัณญาณการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในการทดลองต่อไป



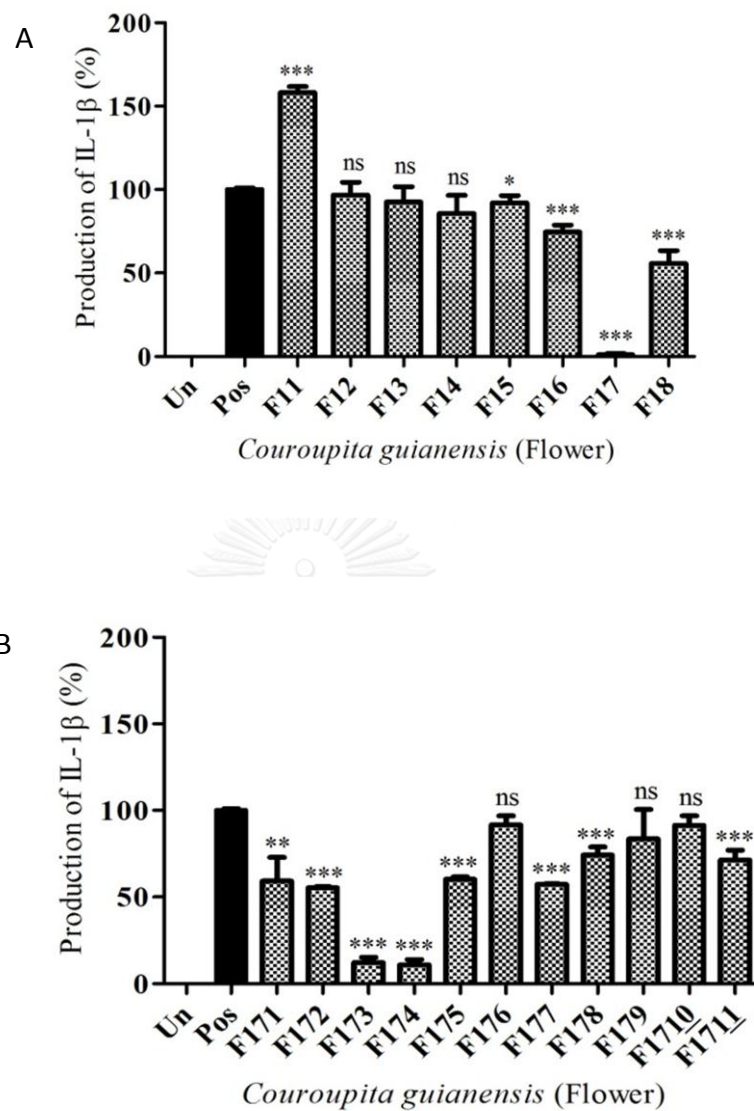
ภาพที่ 6 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA (A) ตัวอย่างทดสอบรหัส L1-L3, F1-F3, T1-T3, S1-S3 และ P1-P3 ของสาละลังกา (B) ตัวอย่างทดสอบรหัส R1-R4 ของย่านางโดยชุดควบคุมลบ (Un) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก ns : ถือว่าข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก



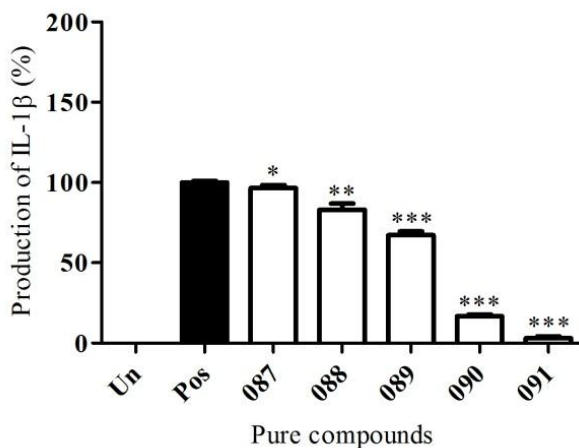
ภาพที่ 7 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA (A) ตัวอย่างทดสอบรหัส T11-T113 (B) ตัวอย่างทดสอบรหัส T181-T182 โดยชุดควบคุมลบ (Un) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก ns : ถือว่าข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก



ภาพที่ 8 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA (A) ตัวอย่างทดสอบรหัส L11-L17 (B) ตัวอย่างทดสอบรหัส L121-L122, L131-L132 และ L171 โดยชุดควบคุมลบ (Un) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก ns : ถือว่าข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก



ภาพที่ 9 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA (A) ตัวอย่างทดสอบรหัส F11-F18 (B) ตัวอย่างทดสอบรหัส F171-F1711 โดยชุดควบคุมลบ (Un) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก ns : ถือว่าข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก



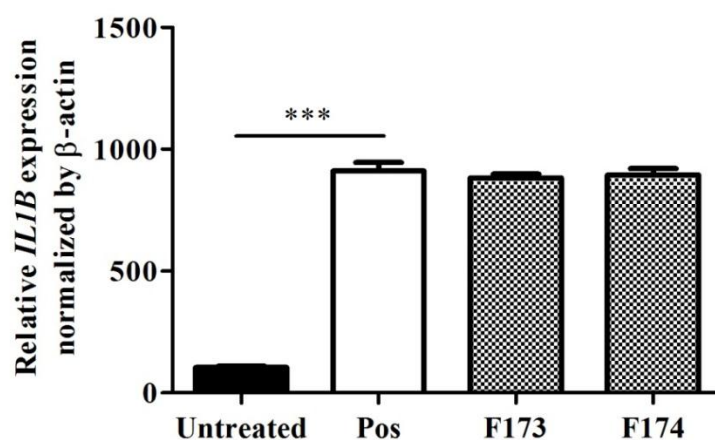
ภาพที่ 10 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA ตัวอย่างทดสอบรหัส 087-091 โดยชุดควบคุมลบ (Un) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก

4.4 กลไกในการยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ของตัวอย่างทดสอบ

นำตัวอย่างทดสอบที่มีฤทธิ์กีดการหลั่ง IL-1 β ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3. คือ F173 และ F174 มาศึกษากลไกในการกีดการหลั่ง IL-1 β เนื่องจากตัวอย่างทดสอบทั้งสองชนิดนี้ยังมีฤทธิ์ในการกีดการหลั่ง IL-1 β จากการทำให้บริสุทธ์ครั้งที่ 3 ซึ่งการลดการหลั่งของ IL-1 β เกิดขึ้นได้โดยผ่านการควบคุมสองระดับ ได้แก่ 1.การควบคุมการถอดรหัสของยีน *IL1B* และ/หรือ 2. การควบคุมการย่อย pro-IL-1 β โดยเอนไซม์ caspase-1 ผ่านการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์

4.4.1 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน *IL1B*

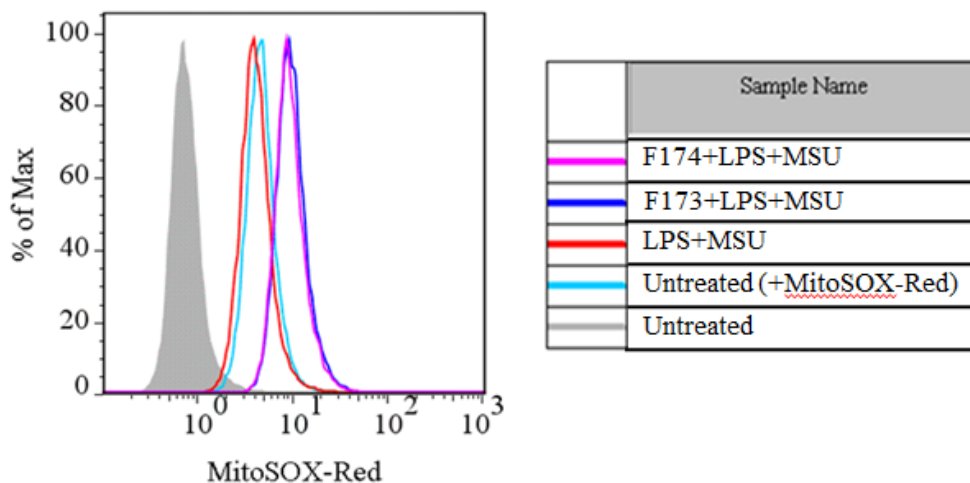
นำตัวอย่าง RNA ของเซลล์ THP-1 ที่ได้สกัดจากเซลล์ที่ได้รับตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β มาวัดเชิงปริมาณของระดับ mRNA จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไม่ทำให้มีการแสดงออกของยีน *IL1B* ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวกเมื่อกระตุ้นเซลล์ THP-1 ด้วย LPS แสดงว่า ตัวอย่างทดสอบดังกล่าวนี้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการถอดรหัสของ *IL1B* แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 11 ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ ซึ่งเป็นเป้าหมายของการคัดกรองสารในงานวิจัยนี้ ดังนั้น จึงนำตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไปทำการศึกษากลไกการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ผ่านการเกิดอนุมูลอิสระต่อไป



ภาพที่ 11 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน *IL1B* ด้วยวิธี Real-time PCR เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมลบ (Untreated) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง
*** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก

4.4.2 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS assay)

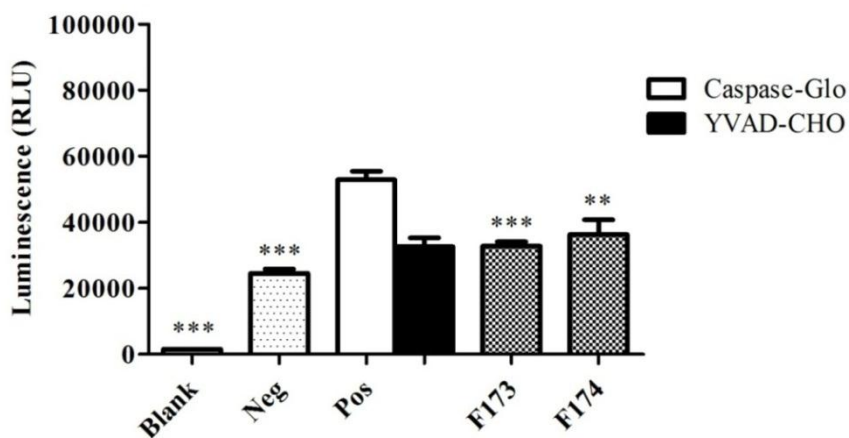
เพื่อศึกษาผลต่อการยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ผ่านการเกิดอนุมูลอิสระ จึงนำตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาบ่มกับเซลล์ THP-1 และกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระโดยใช้ LPS ร่วมกับ MSU จากนั้นลอกเซลล์เพื่อนำไปวัดผลด้วย flow cytometer จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไม่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวก แสดงว่า ตัวอย่างทดสอบไม่ได้ทำให้การเกิดอนุมูลอิสระลดลง แต่กลับเพิ่มขึ้น แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 12 ดังนั้นเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ จึงเกิดการรวมตัวของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอินฟลามมาไซม์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างทดสอบอาจมีฤทธิ์ในการกดอินฟลามมาไซม์ จึงนำตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไปทำการทดลองต่อไป โดยศึกษากลไกการกดอินฟลามมาไซม์ผ่านการตรวจวัดเอกทิวิตีของ caspase-1



ภาพที่ 12 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี flow cytometer โดยชุดควบคุมลบ (Untreated) คือ เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น และชุดควบคุมบวก คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของผลที่ทำซ้ำ 2 ครั้ง

4.4.3 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อแอกทิวิตีของ caspase-1

เพื่อศึกษากลไกการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์โดยการตรวจวัดฤทธิ์ของตัวอย่างทดสอบที่มีต่อแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay จึงนำเซลล์ THP-1 มากระตุ้นด้วยตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นกลุ่มสารทดสอบที่ไม่มีผลต่อการถอดรหัสของ *IL1B* จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 มีฤทธิ์กดแอกทิวิตีของ caspase-1 เทียบเท่ากับชุดควบคุมบวกที่ใช้ YVAD-CHO ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบเฉพาะของเอนไซม์ที่กระตุ้นให้ pro-IL-1 β เปลี่ยนเป็น IL-1 β (interleukin-1 β converting enzyme; ICE) ที่สามารถยับยั้งแอกทิวิตีของ caspase-1 ได้ แสดงว่า ตัวอย่างทดสอบนี้มีประสิทธิภาพในการกีดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ทำให้ caspase-1 ลดแอกทิวิตีลงหรืออาจมีฤทธิ์กีดการทำงานของ caspase-1 โดยตรง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 13

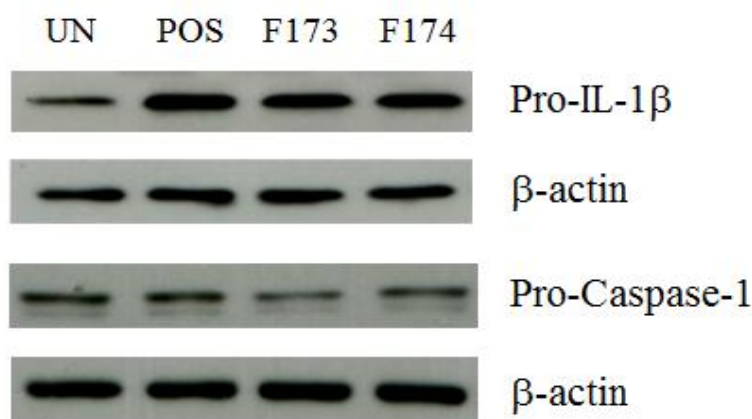


ภาพที่ 13 ผลการตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay โดยชุดควบคุมลบ (Neg) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ชุดควบคุมบวก (Pos) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ YVAD-CHO คือตัวยับยั้งแบบเฉพาะของเอนไซม์ที่ยับยั้งแอกทิวิตีของ caspase-1 ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง
 ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก

4.4.4 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1 ด้วยวิธี

Western blot

เพื่อศึกษาการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ จึงตรวจหาระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1 ซึ่งเป็นรูปแบบของโปรตีนตั้งต้น โดยนำตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาป้อนกับเซลล์ THP-1 จากนั้นกระตุ้นด้วย LPS และ MSU เก็บโปรตีนไปวัดระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1 จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 มีระดับของ pro-IL-1 β โดยปรากฏแถบที่ประมาณ 35 กิโลดัลตัน ซึ่งตัวอย่างทดสอบนี้ไม่ทำให้ระดับของ pro-IL-1 β ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวก (POS) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ MSU แต่ทำให้ระดับของ pro-caspase-1 ลดลง ซึ่งปรากฏแถบที่ประมาณ 48 กิโลดัลตัน แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 14 ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า pro-caspase-1 ถูกตัดและกลายเป็น caspase-1 ซึ่งสามารถตรวจวัดเอกทิวิตีของ caspase-1 ได้จากการทดลองก่อนหน้า



ภาพที่ 14 ผลของตัวอย่างทดสอบต่อระดับโปรตีนของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1 ด้วยวิธี

Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ IL-1 β และ caspase-1 ใช้ β -actin เป็นชุดควบคุม ผลที่แสดงเป็นตัวอย่างของผลที่ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยชุดควบคุมลบ (UN) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น และชุดควบคุมบวก (POS) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คัดกรองตัวอย่างทดสอบที่สกัดจากพืชสองชนิด ได้แก่ สาละลังกาหรือต้นลูกปืนใหญ่และย่านาง เพื่อค้นหาตัวอย่างทดสอบที่มีฤทธิ์กดการทำงานของอินฟลามมาโซมส์ ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีแอกทิวิตีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า เช่น MSU เป็นต้น ซึ่งพืชทั้งสองชนิดได้มีการใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาอาการอักเสบ (Kumar และคณะ, 2011) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงตัวอย่างทดสอบที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่ออินฟลามมาโซมส์ จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์นั้น ใช้หลักการของ MTT assay ซึ่งสาร MTT จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีม่วง formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ที่ยังสามารถทำงานเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต (Mosmann, 1983) จากการทดลองพบว่า มีตัวอย่างทดสอบสกัดหยาบ 67 ตัวอย่างจากทั้งหมด 77 ตัวอย่างที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ยกเว้นบางตัวอย่างทดสอบที่แสดงความเป็นพิษระดับหนึ่ง โดยสารทดสอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ส่วนใหญ่มาจากส่วนของใบและกิ่งของสาละลังกา ซึ่งความเป็นพิษต่อเซลล์อาจมาจากสารตกค้างของตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมหรือจากสารพิษอื่นๆ ที่มีอยู่ในส่วนของพืช ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Pinheiro และคณะ (2013) ที่ใช้ส่วนใบของสาละลังกามาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจากใบสาละลังกาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองนี้คือ เมทานอล อาจแยกสกัดสารที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในบางส่วนของสาละลังกา

เพื่อศึกษาการทำงานของอินฟลามมาโซมส์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า LPS และ MSU โดยการตรวจวัดปริมาณการหลั่ง IL-1 β ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA พบว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ร่วมกับ MSU ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการหลั่ง IL-1 β ได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ MSU เพียงอย่างเดียว ซึ่งบ่งชี้ว่า สารทั้งสองชนิดทำงานเสริมกันทำให้เกิดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์และนำไปสู่การหลั่ง IL-1 β ที่อยู่ในรูปที่ถูกตัดแล้วได้สูงขึ้น ซึ่งได้ผลคล้ายกับรายงานการวิจัยของ Giamarellos-Bourboulis และคณะ (2009) ที่รายงานว่า ผลึก MSU เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-1 β ได้ในระดับหนึ่ง แต่เมื่อผลึก MSU ทำงานร่วมกับ LPS จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-1 β ใน

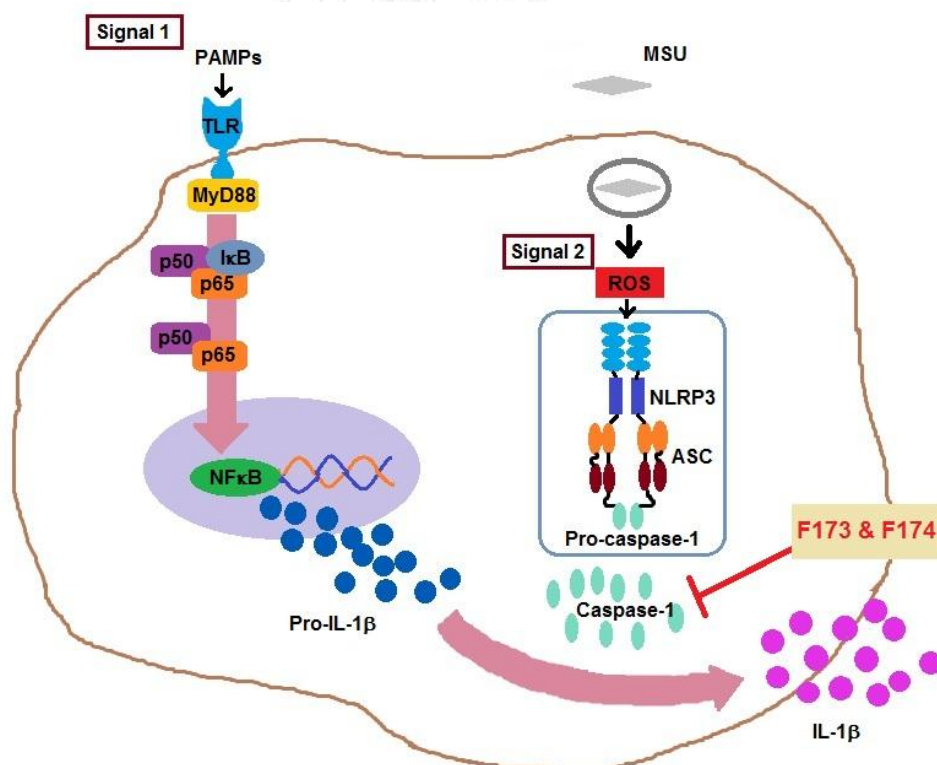
ปริมาณสูงขึ้น โดย pro-IL-1 β จะถูกย่อยให้เป็น IL-1 β ด้วยเอนไซม์ caspase-1 ผ่านการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงนำตัวอย่างทดสอบที่ได้ทดสอบความเป็นพิษแล้วมาบ่มกับเซลล์และกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β โดยใช้ LPS ร่วมกับ MSU จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากกิ่ง ดอกและใบของสาละลังกามีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ไลน์ THP-1 เมื่อนำส่วนแยกย่อยไปทำให้บริสุทธิ์และติดตามฤทธิ์ด้านการหลั่งพบว่า สารสกัดจากดอกมีฤทธิ์สูง นั่นคือตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 จึงสันนิษฐานว่า ตัวอย่างทดสอบทั้งสองชนิดน่าจะมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Pinheiro และคณะ (2013) พบว่า สารสกัดจากใบสาละลังกาสามารถลดการอักเสบได้ โดยทำให้การหลั่งไซโตไคน์ TNF- α และ IL-1 β ลดลง แต่ไม่สามารถระบุได้ว่า การลดการอักเสบนั้นเกิดจากการทำงานของอินฟลามมาโซมส์ ดังนั้นตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 จากดอกสาละลังกาจึงเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจ เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับการลดการอักเสบที่มีฤทธิ์ลดการทำงานของอินฟลามมาโซมส์มาก่อน

เพื่อศึกษากลไกในการลดการหลั่ง IL-1 β ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยผ่านการควบคุมสองระดับ ได้แก่ การควบคุมการถอดรหัสของยีน *IL1B* และ/หรือการควบคุมการย่อย pro-IL-1 β โดยเอนไซม์ caspase-1 ผ่านการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ จากผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการถอดรหัสของยีน *IL1B* พบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการถอดรหัสของยีน *IL1B* ซึ่งบ่งชี้ว่า สารเหล่านี้ไม่มีกลไกในการออกฤทธิ์ระยะต้นของการกระตุ้นแมโครฟาจให้มีการแสดงออกของยีน จึงสันนิษฐานว่า ตัวอย่างทดสอบอาจมีฤทธิ์ต่อกระบวนการปลายน้ำ เช่น การกระตุ้นแอกทีวิตีต่ออินฟลามมาโซมส์หรือการทำงานของ caspase-1 ดังนั้นจึงนำตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 มาตรวจวัดผลต่อการยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ผ่านการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS) ด้วย Flow cytometer จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ไม่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากตัวอย่างทดสอบดังกล่าวไม่ได้ทำให้การเกิดอนุมูลอิสระลดลง แต่กลับเพิ่มขึ้น ซึ่งได้ผลคล้ายกับรายงานการวิจัยของ Carta และคณะ (2011) ที่รายงานว่า เซลล์ THP-1 สามารถทำให้มีการผลิต ROS ได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้า นอกจากนี้รายงานการวิจัยของ Cipollina และคณะ (2016) รายงานว่า เมื่อเซลล์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า LPS/ในเจอร์ซิน ส่งผลให้เกิด

การผลิต ROS มากขึ้น ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงบอกได้ว่า ตัวอย่างทดสอบทั้งสองชนิดไม่ได้ไปยับยั้งการผลิต ROS

เพื่อตรวจวัดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์โดยตรง จึงตรวจหาระดับของ caspase-1 และ IL-1 β ซึ่งเป็นรูปแบบโปรตีนที่มีการย่อยจากโปรตีนตั้งต้น ได้แก่ pro-caspase-1 และ pro-IL-1 β จากการทดลองพบว่า ไม่สามารถตรวจพบรูปแบบของ IL-1 β ที่ถูกตัดด้วยอินฟลามมาโซมส์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 17 กิโลดัลตัน เนื่องจากอาจเป็นเพราะแอนติบอดีที่ใช้ไม่สามารถตรวจหาโปรตีนที่ถูกย่อยแล้วได้ แต่จากข้อมูลของบริษัทผู้ผลิตสามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์ IL-1 β ได้ ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Carta และคณะ (2011) รายงานว่า เซลล์ THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PAMPs สามารถตรวจพบแถบของ pro-IL-1 β ได้ แต่ไม่สามารถตรวจพบรูปแบบของ IL-1 β ที่ถูกตัดแล้ว และจากรายงานการวิจัยของ Chung และคณะ (2016) มีรายงานว่าจะสามารถตรวจพบแถบของ pro-IL-1 β ได้ เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยผลึก MSU แต่ไม่สามารถตรวจพบแบนของ IL-1 β เช่นเดียวกันหรืออาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน IL-1 β มีการหลั่งออกภายนอกเซลล์เป็นส่วนใหญ่ จึงไม่สามารถตรวจพบได้ และไม่สามารถตรวจพบแถบที่มีขนาดตรงกับ caspase-1 ที่ถูกตัดแล้วได้ ดังนั้นเพื่อทดแทนการวิเคราะห์โปรตีนโดย Western blot ที่ไม่สามารถประเมินได้นี้ จึงเลือกใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปเพื่อตรวจหาแอกทิวิตีของ caspase-1 จากการทดลองพบว่า เซลล์ THP-1 ให้ผล background ที่สูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก caspases อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น caspase-4 และ caspase-5 เมื่อเซลล์ THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ MSU ทำให้ caspase-1 มีแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นและเมื่อใช้ YVAD-CHO ที่เป็นตัวยับยั้งแบบเฉพาะของเอนไซม์ที่กระตุ้นให้ pro-IL-1 β เปลี่ยนเป็น IL-1 β (interleukin-1 β converting enzyme; ICE) หรือเรียก ICE อีกชื่อหนึ่งว่า caspase-1 จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase-1 ได้ ทำให้ caspase-1 มีแอกทิวิตีลดลง ซึ่งได้ผลคล้ายกับรายงานการวิจัยของ Schumann และคณะ (1998) ที่รายงานว่าจะเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ทำให้ caspase-1 มีแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นและเมื่อใช้ YVAD-CHO เป็นตัวยับยั้งทำให้ caspase-1 มีแอกทิวิตีลดลง ซึ่งตัวอย่างทดสอบรหัส F173 และ F174 ก็ทำให้แอกทิวิตีของ caspase-1 ลดลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นตัวอย่างทดสอบนี้จึงมีประสิทธิภาพในการกวดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมส์ได้

งานวิจัยนี้ได้คัดกรองสารสกัดจากพืชสองชนิด พบว่า มีสารสกัดจากสาละลังกาหรือต้นลูกปืนใหญ่ จากดอกที่มีการแยกให้บริสุทธิ์ มีฤทธิ์กดการหลั่ง IL-1 β และมีฤทธิ์กดแอกทิวิตีของ caspase-1/อินฟลามาไซมส์ แสดงดังภาพที่ 15 แต่สารนี้ก็ยังไม่สามารถทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้ เนื่องจากเนื้อสารมีปริมาณน้อยทำให้ไม่สามารถแยกสกัดทางเคมีต่อไปได้อีก ที่ผ่านมามีการรายงานเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์กดการทำงานของอินฟลามาไซมส์ เช่น จากรายงานการวิจัยของ Coll และคณะ (2015) รายงานว่า สาร MCC950 ซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กและมีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งการทำงานของ NLRP3 อินฟลามาไซมส์ ทำให้การหลั่งของ IL-1 β ลดลง ซึ่งจะเป็นสารที่มีประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยาบำบัดโรคอักเสบด้วยตนเอง สำหรับสารสกัดที่แยกได้จากสาละลังกานั้น ปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการกดอินฟลามาไซมส์ ดังนั้น ตัวอย่างทดสอบที่ศึกษาในงานวิจัยนี้อาจเป็นสารใหม่ ซึ่งมีฤทธิ์จำเพาะในการกดการทำงานของอินฟลามาไซมส์และอาจใช้เป็นยารักษาอาการของโรคเก๊าท์ได้



ภาพที่ 15 กลไกที่คาดว่า สารทดสอบมีแอกทิวิตีต่อการผลิต IL-1 β

รายการอ้างอิง

- Ben-Chetrit E & Levy M (1998) Colchicine: 1998 update. *Elsevier* 28: 48-59.
- Benko S, Philpott DJ & Girardin SE (2008) The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine* 43: 368-373.
- Beutler BA (2009) TLRs and innate immunity. *Blood* 113: 1399-1407.
- Busso N & So A (2010) Gout. Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Research & Therapy* 12: 206.
- Carta S, Tassi S, Pettinati I, Delfino L, Dinarello CA & Rubartelli A (2011) The rate of interleukin-1 β secretion in different myeloid cells varies with the extent of redox response to Toll-like receptor triggering. *Journal of Biological Chemistry* 286: 27069-27080.
- Chung Y-H, Kim D-H & Lee W-W (2016) Monosodium urate crystal-induced pro-interleukin-1 β production is post-transcriptionally regulated via the p38 signaling pathway in human monocytes. *Scientific Reports* 6.
- Church LD & McDermott MF (2009) Canakinumab, a fully-human mAb against IL-1beta for the potential treatment of inflammatory disorders. *Elsevier* 11: 81-89.
- Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Di Sano C, Gjomarkaj M & Pace E (2016) 17-oxo-DHA displays additive anti-inflammatory effects with fluticasone propionate and inhibits the NLRP3 inflammasome. *Scientific Reports* 6.
- Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inerra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG & Stutz A (2015) A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine* 21: 248-255.
- Collier DS & Pain J (1985) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer perforation. *Gut* 26: 359-363.
- Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS & Van De Putte L (2000) Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis & Rheumatology* 43: 4-13.

- Dalbeth N, Lauterio TJ & Wolfe HR (2014) Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clinical Therapeutics* 36: 1465-1479.
- Franchi L, Kanneganti T-D, Dubyak GR & Núñez G (2007) Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 282: 18810-18818.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Bodar E, van der Ven J, Kullberg B-J, Netea MG & van der Meer JW (2009) Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1 β by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 273-278.
- Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E & Tybulewicz V (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459: 433-436.
- Guo H, Callaway JB & Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine* 21: 677-687.
- He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N & Richard DY (2009) Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* 113: 429-437.
- Herbal Information Office, Faculty of Pharmacy, Mahidol University (2554) Yanang is medicine. Available from: <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th>. [2017, June 10]
- Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, Hayashi H, Fujii I, Ikutani M & Hirai Y (2014) Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 96: 1087-1100.
- Jo E-K, Kim JK, Shin D-M & Sasakawa C (2016) Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Nature Immunology* 13: 148-159.
- Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu J-W, Meng R, Quong AA, Latz E & Scott CP (2010) Anti-inflammatory compounds parthenolide and

- Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *Journal of Biological Chemistry* 285: 9792-9802.
- Kanneganti T-D, Body-Malapel M, Amer A, Park J-H, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT & Inohara N (2006) Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36560-36568.
- Kumar CS, Naresh G, Sudheer V, Veldi N & Anurag A (2011) A short review on therapeutic uses of *Couroupita guianensis* Aubl. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* 1: 105-108.
- Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM & Dixit VM (2009) Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *The Journal of Cell Biology* 187: 61-70.
- Landis RC, Yagnik DR, Florey O, Philippidis P, Emons V, Mason JC & Haskard DO (2002) Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. *Arthritis & Rheumatology* 46: 3026-3033.
- Latz E (2010) The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Elsevier* 22: 28-33.
- Latz E, Xiao TS & Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology* 13: 397-411.
- Liu-Bryan R (2010) Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome. *Immunology and Cell Biology* 88: 20-23.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM & Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232.
- Martinon F (2010) Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunological Reviews* 233: 218-232.
- Martinon F & Tschopp J (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death & Differentiation* 14: 10-22.

- Martinon F, Mayor A & Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology* 27: 229-265.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241.
- McGill NW (2000) Gout and other crystal-associated arthropathies. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 14: 445-460.
- Traditional Thai medicine (2556) Herbal treatment for gout. Available from: <http://www.medthai.com>. [2017, June 10]
- Medzhitov R & Janeway CA (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Elsevier* 9: 4-9.
- Medzhitov R & Janeway CA (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300.
- Merriman TR & Dalbeth N (2011) The genetic basis of hyperuricaemia and gout. *Joint Bone Spine* 78: 35-40.
- Mitroulis I, Kambas K & Ritis K (2013) Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link? *Seminars in Immunopathology* 35: 501-512.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Nace G, Evankovich J, Eid R & Tsung A (2012) Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *Journal of Innate Immunity* 4: 6-15.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B & Devesa I (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 113: 2324-2335.
- Neven B, Prieur A-M & dit Maire PQ (2008) Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 4: 481-489.
- Nilkanuwong S (2553) Gout disease. Available from: <http://www.si.mahidol.ac.th>. [2017, June 7]

- Petrilli V, Dostert C, Muruve DA & Tschopp J (2007) The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Elsevier* 19: 615-622.
- Pinheiro MM, Fernandes SB, Fingolo CE, Boylan F & Fernandes PD (2013) Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. *Journal of Ethnopharmacol* 146: 324-330.
- Pinheiro MM, Fernandes SB, Fingolo CE, Boylan F & Fernandes PD (2013) Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 146: 324-330.
- Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H & Andersson U (2008) High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Research & Therapy* 10: 209.
- Rathinam VA, Vanaja SK & Fitzgerald KA (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* 13: 333-342.
- Reginato AM, Mount DB, Yang I & Choi HK (2012) The genetics of hyperuricaemia and gout. *Nature Reviews Rheumatology* 8: 610-621.
- Schroder K & Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
- Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, Weber JR & Pfeil D (1998) Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* 91: 577-584.
- Shi Y, Mucci AD & Ng G (2010) Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunological Reviews* 233: 203-217.
- Smolen J, Aletaha D & McInnes I (2016) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 388: 1984-1984.
- Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J & Beer H-D (2014) Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immunity* 20: 115-125.
- Uratsuji H, Tada Y, Kawashima T, Kamata M, Hau CS, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Asahina A & Sato S (2012) P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *The Journal of Immunology* 188: 436-444.
- Walsh JG, Muruve DA & Power C (2014) Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 84-97.

Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A & Hoffman HM (2009) NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *Journal of Biological Chemistry* 284: 12762-12771.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1. Complete RPMI 1640

RPMI 1640	100	มิลลิลิตร
FBS	10	มิลลิลิตร
Penicillin Streptomycin	1	มิลลิลิตร
β -mercaptoethanol	0.091	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บเซลล์ระยะยาว (Freezing media) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

Complete RPMI 1640	0.900	มิลลิลิตร
DMSO	0.100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ก.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ MTT

1. สารละลาย MTT

ชั่ง MTT 7.5 มิลลิกรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไปกรองด้วยตัวกรอง 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลาย 0.04N in isopropanol (ปริมาตร 300 มิลลิลิตร)

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (12M) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน isopropanol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ก.3 การเตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้สำหรับ ELISA

1. สารละลาย 10x Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น (Double Distilled water; DDW) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 1x Phosphate buffer saline (PBS) (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

10x Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4	100	มิลลิลิตร
DDW	900	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Washing buffer (PBS + 0.05% Tween 20) (PBST) (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

1x Phosphate buffer saline (PBS)	1,000	มิลลิลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 0.2M TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) buffer, pH 4 (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

Tri-potassium citrate monohydrate ($C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$)	0.0665	กรัม
Citric acid	39.38	กรัม

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น (DDW) จากนั้นทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 4.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้มีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

5. สารละลายซัสเตรท (TMB) (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	0.0025	กรัม
Dimethylsulfoxide (DMSO)	0.250	มิลลิลิตร
0.2M TMB buffer, pH 4	10	มิลลิลิตร
30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)	0.0025	มิลลิลิตร

ละลาย TMB 2.5 กรัม ใน DMSO 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมนลงใน 0.2M TMB buffer, pH 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด เมื่อใช้งานจึงเติม 30% H_2O_2 ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร

6. Stop solution (1M H_2SO_4) (1,000 มิลลิลิตร)

96% H_2SO_4	56	มิลลิลิตร
DDW	944	มิลลิลิตร

เท 96% H_2SO_4 ปริมาตร 56 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 944 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ก.4

การเตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ SDS-PAGE และ Western blot

1. สารละลาย 1.5M Tris-HCl, pH 8.8 (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris (MW. 121.14 g/mol) 90.855 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 8.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 1M Tris-HCl, pH 6.8 (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris (MW. 121.14 g/mol) 60.57 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 6.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลาย 10% (w/v) Ammonium Persulfate (APS) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

ชั่ง Ammonium Persulfate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย 10% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

ชั่ง Sodium Dodecyl Sulfate 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.2 และปรับปริมาตรจนเป็น 50 มิลลิลิตร

5. 12% Separating Gel (ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

DDW	3.436	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution	2.400	มิลลิลิตร
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.000	มิลลิลิตร
10% APS	0.080	มิลลิลิตร
10% SDS	0.080	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากันแล้วจึงใส่ TEMED เพื่อให้เจลแข็งตัว

6. 15% Separating Gel (ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

DDW	2.836	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution	3.000	มิลลิลิตร
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.000	มิลลิลิตร
10% APS	0.080	มิลลิลิตร
10% SDS	0.080	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากันแล้วจึงใส่ TEMED เพื่อให้เจลแข็งตัว

7. 5% Stacking Gel (ปริมาตร 2 มิลลิลิตร)

DDW	1.204	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution	0.250	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl, pH 6.8	0.504	มิลลิลิตร
10% APS	0.020	มิลลิลิตร

10% SDS	0.020	มิลลิลิตร
---------	-------	-----------

TEMED	0.002	มิลลิลิตร
-------	-------	-----------

ผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากันแล้วจึงใส่ TEMED เพื่อให้เจลแข็งตัว

8. สารละลาย 2x Loading buffer (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

10% SDS	4	มิลลิลิตร
---------	---	-----------

87% Glycerol	2.29	มิลลิลิตร
--------------	------	-----------

1.0M Tris-HCl, pH 6.8	1	มิลลิลิตร
-----------------------	---	-----------

DDW	2.71	มิลลิลิตร
-----	------	-----------

Bromophenol Blue	0.001	กรัม
------------------	-------	------

9. สารละลาย SDS Staining Dye (2x Dye) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

β -mercaptoethanol	0.100	มิลลิลิตร
--------------------------	-------	-----------

2x Loading buffer	0.900	มิลลิลิตร
-------------------	-------	-----------

10. สารละลาย Transfer buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

Glycine	2.9	กรัม
---------	-----	------

Trisma-base	5.08	กรัม
-------------	------	------

SDS	0.37	กรัม
-----	------	------

Absolute methanol	200	มิลลิลิตร
-------------------	-----	-----------

ซึ่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร เติม absolute methanol ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

11. สารละลาย 5x running buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

Trisma-base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม

ซึ่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

12. Blocking solution (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

Skim milk	1.5	กรัม
1XPBST	50	มิลลิลิตร

13. สารละลายซึบสเตรท

Solution A

100 mM Tris-HCL, pH8.5	2.5	มิลลิลิตร
90 mM coumaric acid	0.011	มิลลิลิตร
250 mM luminol	0.023	มิลลิลิตร

Solution B

100 mM Tris-HCL, pH 8.5	2.5	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	0.0015	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ก.5 การเตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้สำหรับการสกัด RNA

1. สารละลาย 0.01% DEPC water (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile Double Distilled water) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม DEPC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (0.01% v/v) ผสมให้เข้ากัน บ่มสารละลายข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 75% Ethanol in DEPC (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

เติม Ethanol ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย 0.01% DEPC water ปริมาตร 25 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน



ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบ

การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ของสารตัวอย่างทดสอบ

นำข้อมูลดิบของสารตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 77 ตัวอย่าง ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ มา
คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การหลั่ง IL-1 β โดยมีวิธีคำนวณดังนี้

$$\% \text{ การหลั่ง IL-1}\beta = \frac{\text{ค่าการหลั่ง IL-1}\beta \text{ ของสารตัวอย่างทดสอบ}}{\text{ค่าของชุดควบคุมบวก}} \times 100$$

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลการหลั่ง IL-1 β ของสารตัวอย่างทดสอบ

รหัสสาร ทดสอบ	ซ้ำที่ 1	% การหลั่ง IL-1 β	ซ้ำที่ 2	% การหลั่ง IL-1 β	ซ้ำที่ 3	% การหลั่ง IL-1 β
L1	18.923	3.947	36.923	7.702	51.462	10.735
L2	39.923	8.328	50.308	10.494	53.538	11.168
L3	333.692	69.608	358.385	74.759	354.231	73.893
F1	701.308	146.293	724.385	151.107	689.538	143.838
F2	406.154	84.724	379.154	79.092	333.000	69.464
F3	97.615	20.363	94.154	19.641	158.538	33.071
T1	55.154	11.505	32.769	6.836	29.538	6.162
T2	145.846	30.424	164.077	34.227	165.692	34.564
T3	300.231	62.628	379.846	79.236	392.077	81.788
R1	128.538	26.813	123.000	25.658	156.462	32.638
R2	318.000	66.335	300.462	62.677	330.000	68.838
R3	380.538	79.381	355.846	74.230	359.769	75.048
R4	467.538	97.529	483.692	100.899	480.231	100.177
S1	677.769	141.383	699.692	145.956	705.231	147.112
S2	679.846	141.816	669.462	139.650	669.462	139.650
S3	181.615	37.885	225.692	47.080	232.615	48.524
P1	333.692	69.608	390.462	81.451	411.462	85.831
P2	109.154	22.770	139.385	29.076	144.462	30.135
P3	415.385	86.650	496.385	103.546	423.692	88.383

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงข้อมูลการหลั่ง IL-1 β ของสารตัวอย่างทดสอบ

รหัสสาร ทดสอบ	ซ้ำที่ 1	% การหลั่ง IL-1 β	ซ้ำที่ 2	% การหลั่ง IL-1 β	ซ้ำที่ 3	% การหลั่ง IL-1 β
T11	160.615	33.504	235.615	49.150	222.923	46.502
T12	198.231	41.351	227.308	47.417	224.077	46.743
T13	141.692	29.557	152.769	31.868	188.308	39.281
T14	256.385	53.482	199.385	41.592	183.231	38.222
T15	597.833	120.625	480.500	96.951	495.833	100.045
T16	395.500	79.800	462.167	93.252	361.500	72.940
T17	74.167	14.965	95.500	19.269	87.833	17.722
T18	18.833	3.800	21.167	4.271	30.833	6.221
T19	77.167	15.570	99.833	20.143	85.833	17.319
T110	639.500	129.033	566.833	114.371	610.167	123.114
T111	725.500	146.385	634.167	127.957	620.500	125.199
T112	164.833	33.259	264.833	53.436	201.833	40.724
T113	83.167	16.781	75.500	15.234	95.833	19.336
L11	355.167	71.662	409.500	82.625	334.833	67.560
L12	12.833	2.589	25.167	5.078	22.833	4.607
L13	225.167	45.432	216.167	43.616	252.500	50.947
L14	406.833	82.087	472.500	95.337	453.167	91.436
L15	187.167	37.765	209.167	42.204	185.833	37.496
L16	131.833	26.600	117.833	23.775	140.167	28.282
L17	38.167	7.701	55.167	11.131	46.167	9.315
F11	770.833	155.532	774.167	156.204	804.500	162.325
F12	518.167	104.551	479.167	96.682	441.833	89.149
F13	502.833	101.457	462.500	93.319	412.167	83.163
F14	480.167	96.884	371.500	74.958	422.500	85.248
F15	432.167	87.199	466.833	94.193	471.167	95.068
F16	362.833	73.209	354.167	71.461	392.833	79.262
F17	4.833	0.975	2.833	0.572	9.500	1.917
F18	295.763	55.014	342.773	63.758	261.433	48.628
T181	437.412	81.361	443.289	82.454	441.124	82.051
T182	313.701	58.350	318.649	59.271	339.371	63.125
L121	485.660	90.335	433.701	80.671	481.021	89.472

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงข้อมูลการหลัง IL-1 β ของสารตัวอย่างทดสอบ

รหัสสาร ทดสอบ	ซ้ำที่ 1	% การหลัง IL-1 β	ซ้ำที่ 2	% การหลัง IL-1 β	ซ้ำที่ 3	% การหลัง IL-1 β
L122	296.691	55.186	288.031	53.575	289.577	53.863
L131	365.660	68.015	340.299	63.297	343.392	63.873
L132	424.423	78.945	399.680	74.343	409.577	76.184
L171	392.258	72.962	406.794	75.666	477.000	88.725
F171	243.495	45.291	390.711	72.674	320.814	59.673
F172	297.000	55.244	296.691	55.186	300.711	55.934
F173	53.907	10.027	60.093	11.178	83.907	15.607
F174	43.392	8.071	75.247	13.996	58.237	10.832
F175	317.722	59.098	321.433	59.788	331.948	61.744
F176	472.979	87.977	481.948	89.645	524.938	97.641
F177	308.134	57.315	309.371	57.545	308.134	57.315
F178	370.299	68.878	419.784	78.082	406.175	75.551
F179	352.361	65.541	463.392	86.193	533.598	99.252
F1710	464.938	86.481	522.773	97.239	487.206	90.623
F1711	355.454	66.116	415.763	77.334	381.124	70.891
F1761	346.794	64.506	415.144	77.219	489.680	91.083
F1762	445.454	82.857	448.237	83.375	531.124	98.792
F1763	325.454	60.536	296.381	55.129	409.268	76.126
F1781	626.381	116.510	661.948	123.126	611.536	113.749
F1782	283.059	52.650	278.773	51.853	272.218	50.634
F1783	261.126	48.571	248.773	46.273	246.000	45.757
F1784	256.840	47.774	266.924	49.649	265.916	49.462
87	460.882	96.140	458.824	95.711	475.588	99.208
88	208.941	78.898	225.328	85.086	226.336	85.467
89	171.378	64.714	183.983	69.474	178.689	67.475
90	41.042	15.498	46.336	17.497	45.832	17.307
91	10.538	3.979	9.529	3.598	4.992	1.885

ค่าเฉลี่ยชุดควบคุมบวก (ชุดที่ 1) $414.231+525.231+498.692=479.385$

ใช้สำหรับสารตัวอย่างทดสอบรหัส L1-T14

ค่าเฉลี่ยชุดควบคุมบวก (ชุดที่ 2) $424.167+566.833+495.833=495.611$

ใช้สำหรับสารตัวอย่างทดสอบรหัส T15-F17

ค่าเฉลี่ยชุดควบคุมบวก (ชุดที่ 3) $545.660+478.546+588.649=537.619$

ใช้สำหรับสารตัวอย่างทดสอบรหัส F18-F1784

ค่าเฉลี่ยชุดควบคุมบวก (ชุดที่ 4) $265.664+265.664+263.143=264.824$

ใช้สำหรับสารตัวอย่างทดสอบรหัส 087-091



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวศิรดา อารมณ்சีน

วันเกิด วันเสาร์ที่ 23 มิถุนายน 2533

ที่อยู่ 26/35 ม.5 ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี 22000

การศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2555

ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางจุลินทรีย์ คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

การนำเสนอผลงาน โปสเตอร์ เรื่อง Screening for bioactive compounds
from Thai medicinal plants with suppressing activity against inflammasomes for
treatment of Gout. การประชุม The 27th Annual Meeting of the Thai Society for
Biotechnology and International Conference วันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558