

ผลกระทบของกรดเออร์โซลิกต่อการหลังไซโตไคน์ผ่านวิถี MAPK  
ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด JURKAT

นางสาวนราวัลลภ แก้วทวี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

THE EFFECTS OF URSOLIC ACID ON CYTOKINE PRODUCTION VIA MAPK PATHWAY  
IN LEUKEMIC T-CELLS; JURKAT CELL LINE

Miss Narawan Kaewthawee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Hematology Sciences

Department of Clinical Microscopy

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลกระทบของกรดเออร์โซลิกต่อการหลังไซโตไคน์ผ่านวิถี  
MAPK ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด JURKAT

โดย

นางสาวนราวัลลภ แก้วทวี

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา บริมสัน

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาพยาบาลศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ ดร. สุพนิตรา ชาญประเสริฐ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร. ศิริกัลยา บริมสัน)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ ดร. เนตรนภิส เขียวขำ)

นราวัลลภ แก้วทวี: ผลกระทบของกรดเออร์โซลิกต่อการหลั่งไซโตไคน์ผ่านวิถี MAPK ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด JURKAT. (THE EFFECTS OF URSOLIC ACID ON CYTOKINE PRODUCTION VIA MAPK PATHWAY IN LEUKEMIC T – CELLS; JURKAT CELL LINE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร. ศิริกัลยา บริมสัน, 101 หน้า.

มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นโรคมะเร็งที่มีการผลิตของเซลล์เม็ดเลือดขาวมากขึ้นเกินความต้องการของร่างกาย ทั้งยังมีคุณสมบัติและการทำงานผิดปกติไปจากเดิม ขณะที่การรักษาจะขึ้นอยู่กับชนิดของโรค โดยส่วนใหญ่จะใช้ยาเคมีบำบัด แต่มักจะเกิดผลข้างเคียงของยา ปัจจุบันนี้ได้มีทางเลือกใหม่ของการรักษาที่จะช่วยลดผลข้างเคียงของยาที่ใช้ให้น้อยลง โดยมีการค้นพบสารชนิดต่างๆ อาทิ สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด สามารถยับยั้งการแบ่งตัวและชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ กรดเออร์โซลิกจัดเป็นสารประกอบจำพวก Pentacyclic triterpenoid carboxylic acid และเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชหลายชนิด โดยมีคุณสมบัติหลากหลาย อาทิฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ปกป้องตับจากสารพิษ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาผลกระทบของกรดเออร์โซลิกต่อการหลั่งไซโตไคน์ผ่านวิถี MAPKs ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat พบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ รวมทั้งสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของเซลล์ Jurkat เมื่อถูกกระตุ้นจาก PMA/PHA ได้ตามระดับความเข้มข้นของกรดเออร์โซลิกและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของกรดเออร์โซลิกนั้นเกี่ยวข้องกับวิถี c-Jun N-terminal kinase (JNK) แต่ไม่เกี่ยวข้องกับวิถี extracellular-signal regulated protein kinase (ERK) ดังนั้น กรดเออร์โซลิกอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้

ภาควิชา...จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา...วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา...2554.....

# # 5277207037 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES

KEYWORDS : URSOLIC ACID / IL-2 / TNF- $\alpha$  / ERK / JNK / JURKAT CELLS

NARAWAN KAEWTHAWEE : THE EFFECTS OF URSOLIC ACID ON CYTOKINE PRODUCTION VIA MAPK PATHWAY IN LEUKEMIC T-CELLS; JURKAT CELL LINE. ADVISOR : SIRIKALAYA BRIMSON, Ph.D., 101 pp.

Leukemia is a malignancy of white blood cells characterized by their excessive production and abnormal functions. Treatments of leukemia depend on types of the disease. Since chemotherapy has adverse side effects in leukemic patients, combinations of complementary and alternative medicines with conventional treatments may reduce some of the side effects from conventional treatments. Studies have shown many chemopreventive agents, which can suppress cancer cell proliferation and induce apoptosis. Ursolic acid (UA), a natural plant and herbal component, is pentacyclic triterpenoid carboxylic acid. It processes various biological properties such anticancer, anti-inflammatory, antioxidative stress and hepatoprotective activity. We investigated the effect of UA on cytokine production via MAPKs pathways in Jurkat leukemic T-cell. Results showed that UA inhibited cell growth and proliferation and also suppressed PMA/PHA induced IL-2 and TNF- $\alpha$  production in concentration and time dependent manners. The inhibition of IL-2 and TNF- $\alpha$  production by UA was involved in c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway, but not extracellular-signal regulated protein kinase (ERK) pathway. Further, utilizing of UA as a chemopreventive or therapeutic agent may provides an alternative option for cancer treatments.

Department : Clinical Microscopy..... Student's Signature.....

Field of Study : Clinical Hematology Sciences..... Advisor's Signature.....

Academic Year : 2011.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. ศิริกัลยา บริมสัน ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมไปถึงการให้วิชาความรู้ เทคนิคการทำงาน มุมมอง คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงานวิจัย อีกทั้งได้ให้กำลังใจยามที่ท้อแท้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุพัตริตรา ชาญประเสริฐ ที่กรุณาได้รับเป็นประธาน กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และอาจารย์ ดร. เนตรนภิส เขียวขำ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 17 ครั้งที่ 1/2555 ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งหลักสูตรวิทยาศา สตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษา และ ทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณศูนย์พัฒนาและวิจัยทางโลหิตวิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาจุลทรรศน์ ศาสตร์คลินิก และห้องปฏิบัติการชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ ที่กรุณา เชื้อเพื่อให้ใช้เครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณทุกท่านที่กำลังใจจากอาจารย์ทุกท่าน พี่ และน้อง ในคณะสหเวชศาสตร์ และ เพื่อนๆ ต่างคณะในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่เป็นสิ่งที่ดีและสวยงามที่สุดในโลก เป็นความรักที่บริสุทธิ์และให้กำลังใจยามเหนื่อยล้าและท้อแท้สิ้นหวัง ทำให้แข็งแกร่งและ ผลักดันให้ก้าวไปตามเส้นทางฝันเพื่อบรรลุเป้าหมายในชีวิต

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มี พระคุณทุกท่าน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว.....	4
กรดเออร์โซติก.....	7
ไซโตไคน์.....	19
วิถีการส่งสัญญาณของ MAPKs.....	27
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ.....	31
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	31
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	32
วิธีการวิจัย.....	34
การเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง.....	34
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ด้วยวิธี XTT assay.....	35
การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ของเซลล์ ด้วยวิธี ELISA.....	36
- การทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซติกต่อการหลั่งไซโตไคน์.....	38

บทที่	หน้า
- การทดสอบฤทธิ์ของตัวกระตุ้น PMA/PHA ต่อการหลั่งไซโตไคน์.....	38
- การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์จากกรดเออร์โซลิกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA.....	38
- การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์จากตัวยับยั้งของวิถี MAPKs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA.....	39
การสกัดโปรตีนจากเซลล์และการตรวจวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford method	40
การทดสอบการแสดงออกระดับโปรตีนในวิถี MAPKs คือ ERK และ JNK ของเซลล์จากกรดเออร์โซลิก ด้วยวิธี Western blot.....	42
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	47
ผลการวิเคราะห์.....	47
ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ จากกรดเออร์โซลิก ด้วยวิธี XTT assay.....	47
ผลการทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิกต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ ด้วยวิธี ELISA..	49
ผลการทดสอบฤทธิ์ของตัวกระตุ้น PMA/PHA ต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ ด้วยวิธี ELISA.....	49
ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์จากกรดเออร์โซลิก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ด้วยวิธี ELISA.....	51
ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์จากตัวยับยั้งของวิถี MAPKs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ด้วยวิธี ELISA.....	55
ผลการทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิกต่อการแสดงออกระดับโปรตีนในวิถี MAPKs คือ ERK และ JNK ของเซลล์ ด้วยวิธี Western blot.....	59
ผลการทดสอบฤทธิ์ของตัวกระตุ้น PMA/PHA ต่อการแสดงออกระดับโปรตีนในวิถี MAPKs คือ ERK และ JNK ของเซลล์ ด้วยวิธี Western blot.....	62
ผลการทดสอบการแสดงออกระดับโปรตีนในวิถี MAPKs คือ ERK และ JNK ของเซลล์ จากกรดเออร์โซลิก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ด้วยวิธี Western blot.....	65
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	70
สรุปและอภิปรายผล.....	70
ข้อเสนอแนะ.....	76



บทที่	หน้า
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	101

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าการอยู่รอดของเซลล์ (% Cell viability) เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	91
2	ปริมาณของไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$ ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน.....	92
3	ปริมาณของไซโตไคน์ชนิด IL-2 ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน.....	93
4	ปริมาณของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน.....	94
5	ปริมาณของไซโตไคน์ชนิด IL-2 ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 และ SP600125 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน.....	95
6	ปริมาณของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 และ SP600125 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน.....	96

## สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	แหล่งที่พบของสารป้องกันมะเร็ง (chemopreventive agent)..... 6
2.2	โครงสร้างกรดเออร์โซลิค..... 7
2.3	กลไกการสร้างของกรดเออร์โซลิค..... 8
2.4	แหล่งที่พบของกรดเออร์โซลิค..... 9
2.5	ผลของกรดเออร์โซลิคต่อการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis..... 10
2.6	ผลของกรดเออร์โซลิคต่อวิถีของ pro- and anti-apoptotic signaling pathways.. 11
2.7	ผลของกรดเออร์โซลิคและกรดโกลีโนลิดต่อเซลล์มะเร็งระดับ HuH7 cells..... 12
2.8	แสดงการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของกรดเออร์โซลิค..... 13
2.9	การกระตุ้นของกรดเออร์โซลิคในเซลล์เม็ดเลือดแดง..... 14
2.10	บทบาทของกรดเออร์โซลิคต่อการป้องกันการอักเสบ..... 15
2.11	บทบาทของกรดเออร์โซลิคในด้าน anti- and pro-inflammatory activities..... 16
2.12	บทบาทของกรดเออร์โซลิคต่อกลไกของ hippocampus ทำให้มีผลต่อการแสดง ออกของพฤติกรรมของหนู mice..... 17
2.13	บทบาทของกรดเออร์โซลิคในด้าน anti-invasion..... 19
2.14	กลไกการสร้าง Interleukin 2 mRNA..... 21
2.15	บทบาทของ Interleukin 2 (IL-2)..... 22
2.16	บทบาทของ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )..... 24
2.17	กลไกการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ของเซลล์ macrophage เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ผ่านวิถี MAPKs..... 25
2.18	กลไกการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ในเซลล์ myocardial macrophages และ cardiac myotocytes ผ่านวิถี MAPKs และ NF- $\kappa$ B..... 25
2.19	กลไกการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ใน Mast cells โดยเกี่ยวข้องกับการทำงาน ของ PKC และวิถีของ NF- $\kappa$ B..... 26
2.20	กลไกการควบคุมของวิถี MAPKs กับไซโตไคน์..... 28
2.21	กลไกการกระตุ้น MAPK signaling pathway..... 28
2.22	บทบาทของกรดเออร์โซลิคต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 $\beta$ ผ่านวิถีของ MAPKs pathway ในเซลล์ macrophage ของหนู..... 30

ภาพที่	หน้า	
3.1	ลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat.....	31
3.2	ลักษณะตารางของ Hemocytometer.....	34
3.3	ปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี XTT assay.....	35
3.4	ขั้นตอนและการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธี ELISA.....	37
3.5	ปฏิกิริยาของวิธี Bradford assay.....	40
3.6	ขั้นตอนในการตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธี Western blot.....	42
4.1	กราฟแสดงผลของกรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat .....	48
4.2	กราฟแสดงผลของปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$ ของเซลล์ Jurkat ที่ระยะเวลาต่างๆ กันของตัวกระตุ้น PMA/PHA .....	50
4.3	กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน.....	52
4.4	กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน .....	54
4.5	กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 .....	56
4.6	กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 .....	58
4.7	กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 และ ERK1/2 ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิค.....	60
4.8	กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-JNK และ JNK ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิค.....	61
4.9	กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 และ ERK1/2 ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA.....	63
4.10	กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-JNK และ JNK ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA.....	64
4.11	กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 และ ERK1/2 ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิค และถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA.....	66

ภาพที่	หน้า
4.12	68

กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-JNK และ JNK ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยกรดเคอร์โซลิก และถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA.....

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็ง (cancer) จัดเป็นกลุ่มของโรคที่เกิดจากเซลล์ของร่างกายชนิดหนึ่งมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างผิดปกติ โดยเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงสภาพไปจากปกตินั้นจะไม่อยู่ในการควบคุมของ วัฏจักรการแบ่งตัว และยังสามารถรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง หรืออาจแพร่กระจายไปตำแหน่งอื่นๆ ของร่างกายได้ [1, 2] ส่วนมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) นั้นเป็นมะเร็งระบบโลหิต (hematologic malignancy) ที่มีความสำคัญ เนื่องจากพบได้บ่อย และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในคนไทย [3] โดยเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดชนิดใดชนิดหนึ่งมีการเพิ่มจำนวนอย่างไม่หยุดยั้ง จึงทำให้เกิดความผิดปกติของปริมาณและการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่นๆ ในร่างกายด้วย [4] มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีหลากหลายชนิด และมีความซับซ้อนมากขึ้นในการวินิจฉัยแยกย่อยชนิดต่างๆออกไป ส่วนการรักษา นั้นโดยทั่วไปจะใช้วิธีการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy)[5] เป็นหลัก ซึ่งจะมีผลไปฆ่าเซลล์มะเร็งและยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และมักจะมีผลต่อเซลล์ปกติที่กำลังแบ่งตัวได้ด้วย นอกจากนี้อาจใช้วิธีการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) [6] และรังสีรักษา (radiotherapy) [7] เพื่อเสริมการรักษา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว การตอบสนองต่อการรักษา และอายุของผู้ป่วยด้วย

ในระยะเวลาที่ผ่านมาที่มีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้นทำให้นำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านความรู้ความเข้าใจของพยาธิกำเนิดและกลไกการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว การแยกชนิดของโรคตามความผิดปกติระดับเซลล์และโมเลกุล และการพัฒนาแนวทางในการรักษาที่ดีขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เป็นยาเคมีบำบัด (chemotherapy) และมักเกิดผลข้างเคียงของยา ซึ่งในปัจจุบันนั้นได้มีทางเลือกใหม่ของการรักษาที่จะช่วยลดผลข้างเคียงของยาที่ใช้ให้น้อยลง โดยมีการค้นหาสารชนิดต่างๆ อาทิ สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ร่วมกันกับยาเคมีบำบัด ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียงและบรรเทาอาการของโรคได้

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของกรดเออร์โซลิคต่อการหลั่งไซโตไคน์ผ่านวิถี MAPKs ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Human Leukemic T-cell line (Jurkat cell) ซึ่งนับเป็น *In vitro* model ของโรค โดยที่กรดเออร์โซลิคมีผลต่อการแสดงออกของไซโตไคน์ที่สำคัญ เช่น Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) โดยผ่านการส่งสัญญาณ

ของวิถี MAPK signaling pathway และมีการแสดงออกของโปรตีนที่สำคัญ เช่น Extracellular signal-regulated protein (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) หากการวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ จะทำให้ทราบบทบาทของกรดเออร์โซลิคมากขึ้น และสามารถเป็นแนวทางในการรักษาอีกทางหนึ่งสำหรับผู้ป่วยต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของกรดเออร์โซลิคต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ในการแสดงออกของไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

2. เพื่อศึกษาว่าการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T- cell จากการกระตุ้นของกรดเออร์โซลิคนั้นผ่านวิถี MAPK โดยวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway คือ Extracellular signal-regulated protein (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ด้วยวิธี Western blot

### ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิคในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยจะประเมินจากการวัดระดับการแสดงออกของไซโตไคน์คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) และโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway คือ Extracellular signal-regulated protein (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงคือ Jurkat cell ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemic T-cell line) ของสายลิมโฟยด์ (lymphoid lineage) ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *in vitro* model

### ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาในลักษณะ *In vitro* model โดยทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจถึงบทบาทของกรดเออร์โซลิกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
2. ผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีแนวทางในการรักษาเพิ่มมากขึ้น
3. องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัยในอนาคตได้



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia)

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือ “ลิวคีเมีย” (leukemia) เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นจากความผิดปกติของกระบวนการและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) ในไขกระดูก ทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดขาวมากขึ้นเกินความต้องการของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีคุณสมบัติและการทำงานที่ผิดปกติไปจากเดิม และปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นนั้นจะส่งผลกระทบต่อการผลิตเม็ดเลือดประเภทอื่นๆ โดยพบว่าปริมาณและคุณภาพอาจมีความผิดปกติร่วมกันด้วย [3]

มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถเกิดได้กับเซลล์ในหลายระดับของการเจริญเติบโต (developmental stage) ตั้งแต่ระดับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (pluripotent hematopoietic stem cell) ระดับเซลล์ต้นกำเนิดเฉพาะสายมัยอีลอยด์ หรือลิมโฟยด์ (myeloid stem cell หรือ lymphoid stem cell) ระดับเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เฉพาะบางประเภท (committed progenitor) ระดับ precursor cell หรือแม้กระทั่งในเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature cell) โดยที่ความผิดปกติที่เกิดขึ้นนั้น ทำให้เซลล์มะเร็งมีความสามารถเหนือกว่าเซลล์ปกติ ทั้งในด้านการเจริญแบ่งตัว (proliferative advantage) และการไม่ตายตามกลไกธรรมชาติที่เรียกว่า programmed cell death หรือ apoptosis [8]

การแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งได้ตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีอาการทางคลินิก และการดำเนินไปของโรค แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) และนอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดตามลักษณะของเซลล์ต้นตอ (cell of origin) โดยใช้รูปร่างของเซลล์ ลักษณะนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม การแสดงออกของโมเลกุลต่างๆบนผิวเซลล์หรือในเซลล์ โดยแต่ละชนิดขึ้นกับว่าเซลล์ต้นตอเป็นเซลล์ประเภทใด เช่น เซลล์ต้นตอเป็นสายมัยอีลอยด์ (myeloid lineage) จะได้เป็น myeloid leukemia หรือถ้าเซลล์ต้นตอเป็นสายลิมโฟยด์ (lymphoid lineage)

จะได้เป็น lymphoid leukemia เป็นต้น [3] ดังนั้น จึงสามารถแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

- Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
- Acute myelogenous leukemia (AML)
- Chornic lymphocytic leukemia (CLL)
- Chornic myelogenous leukemia (CML)

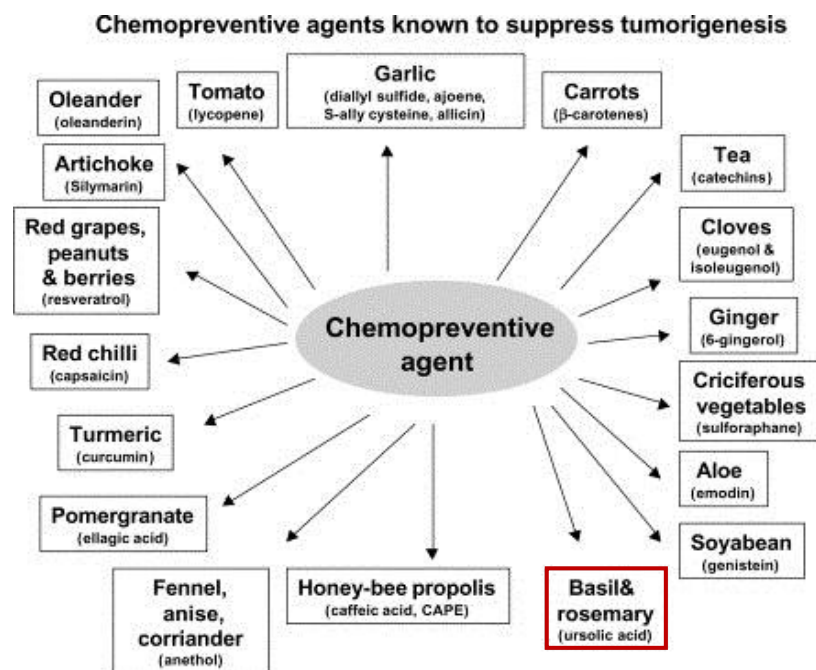
โดยที่ Acute lymphoblastic leukemia (ALL) พบได้บ่อยในเด็ก โดยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดขาวตัวอ่อน (Lymphoblast) มากเกินกว่าปกติ และพบว่ามีส่วนที่ผิดปกติด้วย นอกจากนี้ยังมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น กล่าวคือ ลดการสร้างเม็ดเลือดแดง และเกร็ดเลือดอีกด้วย ดังนั้น อาการของโรคจึงเกิดจากความผิดปกติของทั้งเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเกร็ดเลือด [9]

ส่วนการดูแลรักษานั้นต้องพิจารณาจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น สภาพร่างกายของผู้ป่วย ความรุนแรงของโรค เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ในแง่ของการรักษานั้น พบว่า จะมีผลข้างเคียงจากการรักษาในแต่ละวิธีนั้นแตกต่างกันตามวิธีที่ผู้ป่วยได้รับการรักษา และผลข้างเคียงอาจพบได้มากขึ้นหากผู้ป่วยได้รับการรักษาหลายวิธีร่วมกัน แต่การรักษาที่เหมาะสมนั้นจะช่วยให้อายุขัยของผู้ป่วยได้มากขึ้นโอกาสเข้าสู่ภาวะสงบของโรคได้มากกว่าผู้ใหญ่ ทั้งนี้ปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรค ยังขึ้นกับอายุของผู้ป่วย (อายุมากขึ้นความรุนแรงของโรคสูง) จำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกร็ดเลือดเมื่อแรกวินิจฉัย (ผิดปกติมากความรุนแรงของโรคสูง) และความผิดปกติทางพันธุกรรม (มีความผิดปกติความรุนแรงของโรคสูง) เป็นต้น

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Jurkat cell ถือว่าเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemic T-cell line) ของสายลิมโฟยด์ (lymphoid lineage) โดยเป็นกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับวิถีของ T-cell receptors (TCRs) signaling [10, 11] และพบว่าเซลล์ชนิดนี้สามารถหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด Interleukin-2 (IL-2) ได้ปริมาณมากเมื่อถูกกระตุ้น โดยที่การกระตุ้นนั้นเกิดได้ 2 ทาง คือ เกิดจากกลไกที่ต้องการโมเลกุล ligand ที่จำเพาะมาจับกับ T-cell receptors ส่วนทางที่สองนั้นเกิดจาก phorbol ester (TPA) เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับ ligand ที่จำเพาะนั้น [12] นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าเซลล์ Jurkat นั้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย phorbol esters เช่น phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) และมี co-

stimulator เช่น phytohaemagglutinin (PHA) จะสามารถหลังไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) ได้มากยิ่งขึ้น [13]

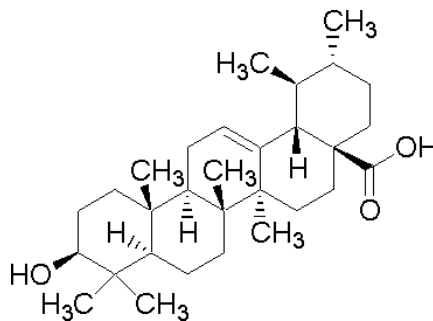
แนวทางการรักษาของโรคมะเร็งนั้น มักใช้เป็นยาเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นส่วนใหญ่ แต่จะเกิดผลข้างเคียงของยา ทำให้ผู้ป่วยมีพยาธิสภาพของโรคที่ลดลง ปัจจุบันได้มีทางเลือกใหม่ของการรักษา (alternative medicine) ที่จะช่วยลดผลข้างเคียงของยาที่ใช้ให้น้อยลง โดยมีการค้นหาสารชนิดต่างๆ อาทิ สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียงและบรรเทาอาการของโรคได้ และเป็นที่ยอมรับกันว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) เป็นแหล่งของยาที่สำคัญและพบว่าสารที่ได้มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นมีหลากหลายชนิด และมีการนำเอาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งมะเร็งด้วย โดยมีการรายงานของสารป้องกันมะเร็ง (chemopreventive agents) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์หรือสารเคมีที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยมีคุณสมบัติป้องกันหรือยับยั้งการเกิดมะเร็งได้นั้น สามารถพบได้ตามพืช ผักและผลไม้ชนิดต่างๆ มากมายหลายชนิด [14] ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงแหล่งที่พบของสารป้องกันมะเร็ง (Chemopreventive agent) [14]

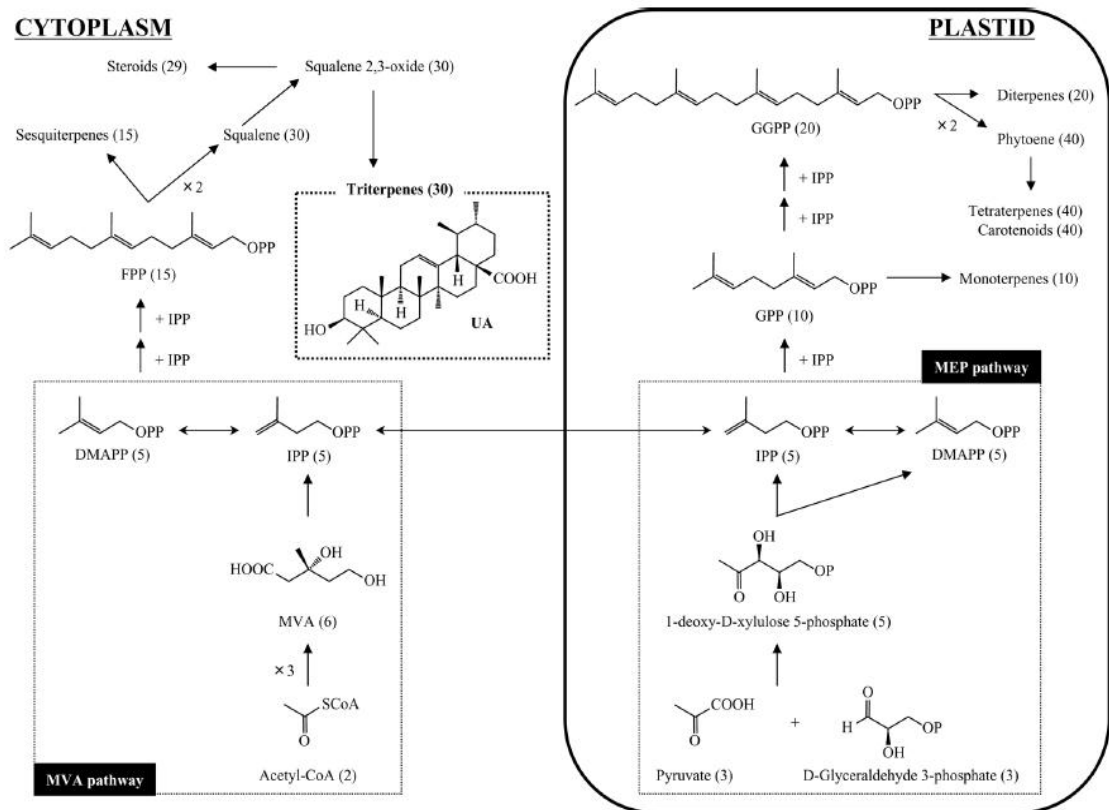
## กรดเออร์โซลิก (Ursolic acid)

กรดเออร์โซลิก (Ursolic acid:  $3\beta$ -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid, ภาพที่ 2.2) เป็นสารประกอบจำพวก Pentacyclic triterpenoid carboxylic acid จัดเป็นสารพฤกษเคมี (phytochemical) หรือ ไฟโตนิวเทรียนท์ (phytonutrients) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่พบในสมุนไพรหรือพืชชนิดอื่นๆ และมีฤทธิ์เป็นสารป้องกันมะเร็ง (chemopreventive agent) ได้อีกชนิดหนึ่งด้วย



ภาพที่ 2.2 กรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) [15]

กรดเออร์โซลิกจัดเป็นสารประกอบประเภทเทอร์ปีน (terpenes) หรือเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) โดยเทอร์ปีนอยด์นั้นจะถูกสังเคราะห์ขึ้นจากไอโซพรีน (isoprene) ซึ่งเกิดจากการรวมกันของ isopentenyl diphosphate (IPP) และไอโซเมอร์ของ IPP ซึ่งก็คือ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) และจำนวนหน่วยของไอโซพรีนที่แตกต่างกันนั้นทำให้เกิดเทอร์ปีนอยด์ชนิดต่างๆกันออกไป เช่น โมโนเทอร์ปีนอยด์ (monoterpenoids), ไดเทอร์ปีนอยด์ (diterpenoids, C<sub>20</sub>), ไตรเทอร์ปีนอยด์ (triterpenoids, C<sub>30</sub>) และเตตระเทอร์ปีนอยด์ (tetraterpenoids, C<sub>40</sub>) เป็นต้น ส่วนในพืชนั้นสามารถสร้างได้จากการผ่านวิถีที่แตกต่างกัน 2 วิถี กล่าวคือ วิถี Mevalonic acid (MVA) และวิถีของ Methylerythritol 4-phosphate (MEP) โดยใน MVA pathway นั้นเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในไซโทพลาซึม (cytoplasm) และใช้ acetyl-Co A เป็นสารตั้งต้น และพบว่าเทอร์ปีนอยด์ที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นสารจำพวก Sesquiterpenes (C<sub>15</sub>) และ Triterpenes (C<sub>30</sub>) ซึ่งกรดเออร์โซลิกก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นกัน ส่วนใน MEP pathway นั้นจะใช้สารตั้งต้นเป็น pyruvate และ D-glyceraldehyde 3-phosphate ซึ่งปฏิกิริยานั้นจะเกิดขึ้นใน plastid และพบว่าเทอร์ปีนอยด์ที่ได้มักเป็นพวกโมโนเทอร์ปีนอยด์ ไดเทอร์ปีนอยด์ และเตตระเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 แสดงกลไกการสร้างของกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) [16]

โดยที่กรดเออร์โซลิกนั้นเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชหลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล (apples), เบซิล (basil), บลูเบอร์รี่ (blueberry), แครนเบอร์รี่ (cranberry), สะระแหน่ (peppermint), โรสแมรี่ (rosemary), ลาเวนเดอร์ (lavender), ออริกาโน (oregano), ไธม์ (thyme), พรุน (prunes) และอื่นๆอีกหลายชนิด เป็นต้น ดังภาพที่ 2.4

กรดเออร์โซลิกเป็นสารที่ได้รับความสนใจและมีผู้ทำการศึกษากันเป็นจำนวนมาก เนื่องจากกรดเออร์โซลิกนั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative), ฤทธิ์ปกป้องตับจากสารพิษ (hepatoprotective), ฤทธิ์ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) [16] และฤทธิ์ต้านการสร้างเส้นเลือดใหม่ (antiangiogenic) [17] เป็นต้น

Plant name	Botanical name	Biological activity
Apple	<i>Malus pumila</i>	Anti-proliferation Anti-cancer
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	Antiviral
Blueberry	<i>Vaccinium</i> spp.	Anti-cancer
Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Anti-cancer
Ground ivy	<i>Glechoma hederacea</i> L.	Anti-cancer
Guava	<i>Psidium guajava</i>	Unknown
Heather flower	<i>Calluna vulgaris</i>	Anti-inflammatory
Japanese cherry	<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	Unknown
Labrador tea	<i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	Antioxidant Anti-inflammatory Anti-cancer
Loquat	<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	Anti-mutagenic
Olive	<i>Olea europaea</i>	Antioxidant Anti-atherosclerotic Anti-hypertensive
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Anti-leukemic Antioxidant
Persimmon	<i>Diospyros leucomelas</i>	Antioxidant Anti-inflammatory
Plantain	<i>Plantago major</i> L.	Antioxidant Anti-inflammatory
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Anti-inflammatory Anti-cancer
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	Anti-inflammatory
Thyme	<i>Thymus</i>	Anti-inflammatory

ภาพที่ 2.4 แสดงแหล่งที่พบของกรดเออร์โซลิก [16]

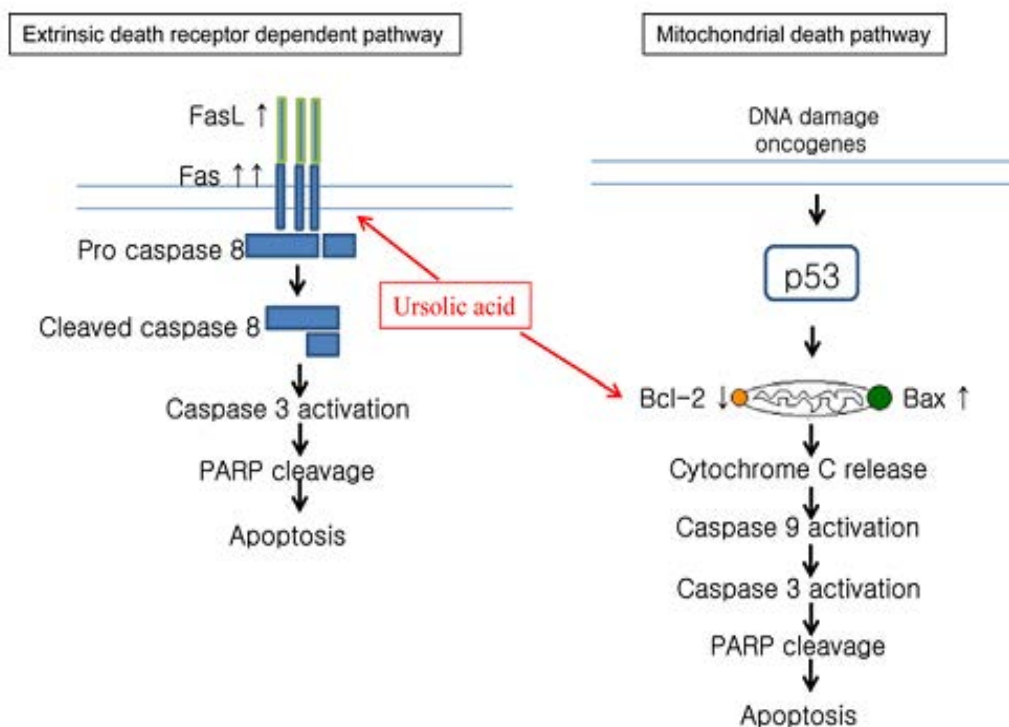
## คุณสมบัติของกรดเออร์โซลิก

### 1. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer)

ในกลุ่มฤทธิ์การต้านมะเร็งนั้น มีการรายงานว่ากรดเออร์โซลิกสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด, เซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งเต้านม, เซลล์มะเร็งปอด, เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก, เซลล์มะเร็งผิวหนัง และเซลล์มะเร็งตับ เป็นต้น [16]

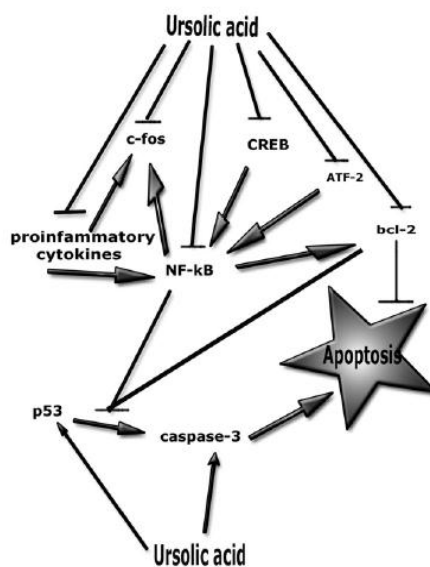
ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat T-cell ; Human leukemia cell) พบว่าฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิกสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ในกระบวนการของไมโทคอนเดรีย โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน caspase-3, 9 และ cytochrome c และยับยั้ง Akt phosphorylation ของเซลล์ได้อีกด้วย [18] และยังพบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถกระตุ้นวิถีของ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ในวิถี MAPKs ทำให้ชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ [19]

ขณะที่ในเซลล์มะเร็งเต้านม (Human MCF-7 breast cancer cell) พบว่ากรดเออร์โซลิกจะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน p53 ซึ่งเป็น Tumor suppressor และโปรตีน caspase-3 เพิ่มขึ้น [20, 21] และยังกระตุ้นให้เซลล์ MCF-7 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยทำให้เกิดการแยกออกของ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) และลดระดับโปรตีน bcl-2 โดยที่กรดเออร์โซลิกนั้นมีโครงสร้างคล้ายกับยา Dexamethasone ซึ่งเป็นยาในกลุ่มของ Glucocorticoids และสามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ [22] นอกจากนี้กรดเออร์โซลิกยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของ Forkhead box M1 (FoxM1) ซึ่งเป็น transcription factor ของยีนที่สำคัญในขบวนการ cell cycle และการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์ MCF-7 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ [23] ขณะที่กรดเออร์โซลิกนั้นสามารถกระตุ้นเซลล์ MDA-MB-231 (Human breast cell line) ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านวิถีของ Mitochondrial Death Pathway และวิถีของ Extrinsic Death Receptor Pathway ได้ โดยจะเพิ่มการแสดงออกของตัวรับ Fas receptor และเกิด cleavage ของ caspase-8, -3 และ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) นอกจากนี้ในวิถีของ Mitochondrial Death Pathway ยังพบว่ากรดเออร์โซลิกสามารถเพิ่มระดับโปรตีน bax ลดระดับของโปรตีน bcl2 และเกิดหลัง cytochrome c ออกมาจากไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นอีกด้วย [24] ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ผลของกรดเออร์โซลิกต่อการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis [24]

ส่วนเซลล์มะเร็งผิวหนัง (B16F-10 melanoma) กรดเออร์โซลิกสามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน p53 และ caspase-3 และลดการแสดงออกของยีน bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic gene ได้ โดยสามารถยับยั้งกลุ่มของ transcription factors ชนิดต่างๆ เช่น NF- $\kappa$ B, c-fos, ATF-2 และ CREB-1 เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (proinflammatory cytokines) และการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 และ GM-CSF ของเซลล์อีกด้วย ดังภาพที่ 2.6 [25] โดยที่ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ากรดเออร์โซลิกนั้นจะชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการยับยั้ง NF- $\kappa$ B ที่กระตุ้นโปรตีน bcl-2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตาย (anti-apoptotic pathway) และการกระตุ้นของ p53 และ TNF- $\alpha$  จะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งเป็นตัวที่ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (pro-apoptotic pathway) ได้

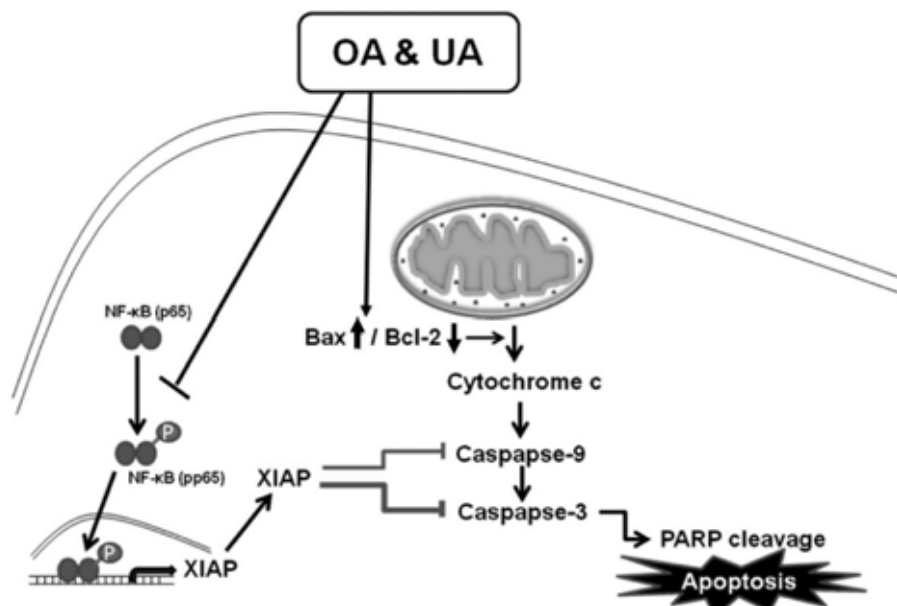


ภาพที่ 2.6 ผลของกรดเออร์โซลิกต่อวิถีของ pro- and anti-apoptotic signaling pathways [25]

ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ( Human DU145 prostate cancer cell) กรดเออร์โซลิกจะทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสผ่านทางวิถีของ c-Jun N-terminal kinase pathway (JNK) [26] และยังพบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทั้งใน Androgen-dependent prostate cancer cell line (LNCaP cells) และ Androgen-independent prostate cancer cell line (LNCaP-AI cells) โดยพบว่าจะไปต้านการแสดงออกของโปรตีน bcl-2 ในเซลล์ LNCaP-AI และยังกระตุ้นวิถีของ JNK ทำให้เกิดการกระตุ้นของโปรตีน caspase-9 ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้เช่นกัน [27]



เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 human hepatoblastoma cell) พบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ HepG2 ได้ โดยจะไปลดการแสดงออกของโปรตีน bcl-2 และ survivin นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของโปรตีน caspase-3 โดยผ่านวิถีของ PI3K/Akt pathway [28] และมีการรายงานพบว่าทั้งกรดโอลีโนลิก (Oleanolic acid) และกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) นั้นสามารถทำให้เซลล์มะเร็งตับ (HuH7 human hepatocellular carcinoma cell) เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยผ่านกลไกการทำงานของ Mitochondria-dependent pathway ซึ่งสารกลุ่มนี้จะไปควบคุมการทำงานของกลุ่ม bcl-2 family และการหลั่งของ cytochrome c จากไมโทคอนเดรียไปยังไซโทพลาซึม ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ caspase-9 และ caspase-3 เกิดการแยกออกของ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) และทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน XIAP (X-linked inhibitors of apoptosis protein) โดยไปกดการทำงานของ NF- $\kappa$ B (p65) ดังภาพที่ 2.7 [29] ส่วนในเซลล์ Human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 นั้นพบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ระยะ S เฟสของขบวนการ cell cycle และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ด้วย [30]



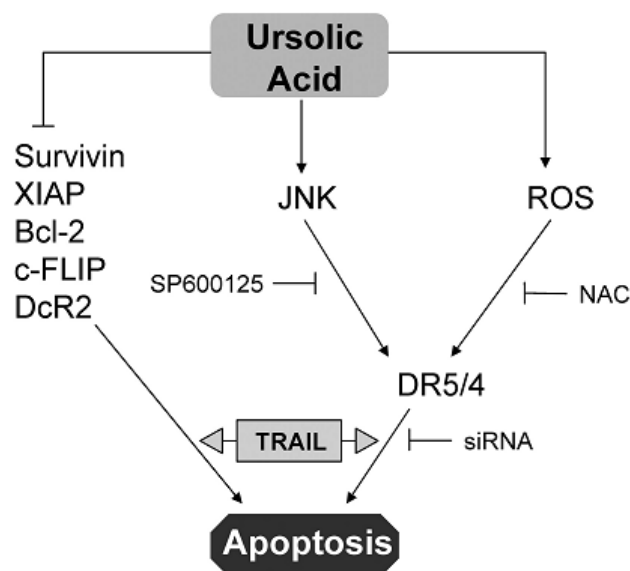
ภาพที่ 2.7 ผลของกรดเออร์โซลิกและกรดโอลีโนลิกต่อเซลล์มะเร็งตับ HuH7 cells [29]

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human HT-29 colon cancer cell) กรดเออร์โซลิกนั้นจะยับยั้งวิถีของ EGFR/MAPK และลดการแสดงออกโปรตีน bcl-2 และ bcl-xL นอกจากนี้ยังกระตุ้นการ

ทำงานของโปรตีน caspase-3 และ caspase-9 ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายมากขึ้น [31] และยังมีกรายงานอีกว่ากรดเออร์โซลิคนั้นสามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT-29 แต่การแสดงออกของ COX-2 ที่เพิ่มมากขึ้นจะสามารถยับยั้งการตายที่ถูกกระตุ้นจากกรดเออร์โซลิคได้ [32]

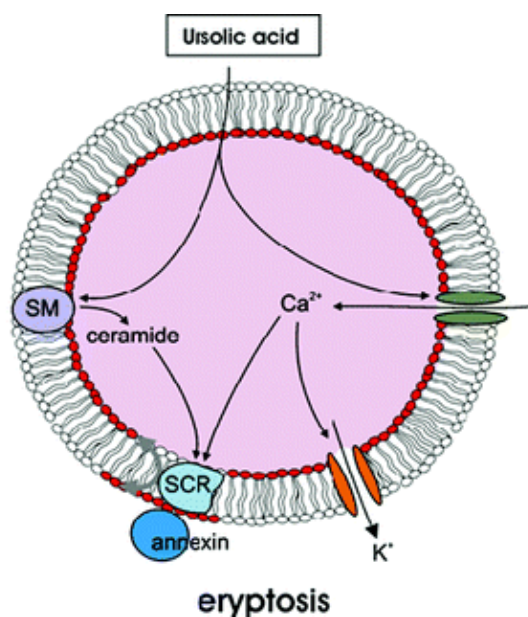
ส่วนในเซลล์มะเร็งรังไข่ (Human Ovarian cancer cell) พบว่ากรดเออร์โซลิคนั้นสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ CAOV3 ได้ โดยยับยั้งการทำงานของ ERK และการแสดงออกของ p-ERK1/2 นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยไปเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน bax แต่ลดการแสดงออกของโปรตีน bcl-2 [33]

นอกจากนี้กรดเออร์โซลิคยังสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ เช่น โปรตีน Survivin, XIAP, Bcl-2, c-FLIP และ decoy receptor 2 (DcR2) เป็นต้น และเพิ่มการแสดงออกของตัวรับ (receptor) ที่เรียกว่า TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) และตัวรับการตายของเซลล์ Death receptor 4 และ 5 (DR4 และ DR5) ซึ่งขึ้นกับชนิดของเซลล์ด้วย โดยผ่านการกระตุ้นวิถีของ JNK และ Reactive oxygen species (ROS) ดังภาพที่ 2.8 [34]



ภาพที่ 2.8 แสดงการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของกรดเออร์โซลิค [34]

กรดเออร์โซลิคไม่เพียงแต่ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ที่มีนิวเคลียส (nucleated cells) ได้เท่านั้น แต่ยังสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย (mitochondria) อย่างเช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงได้เหมือนกัน โดยที่เมื่อปี 2011 มีการรายงานของ Kashif Jilana และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิคมีฤทธิ์ทำให้แคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้  $\text{K}^+$  channel เปิดออก ทำให้  $\text{KCl}$  ออกนอกเซลล์มากขึ้น จึงเกิดการหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ส่งผลให้กระตุ้นผนังเซลล์ เกิดการแสดงออกของ phospholipid ชนิด phosphatidylserine (PS) ออกมาอยู่บนผิวเซลล์มากขึ้น (ปกติจะอยู่ภายในเซลล์) ทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นเข้ามาจับกินและเกิดการตายของเซลล์ได้ และกรดเออร์โซลิคนั้นยังสามารถกระตุ้นการ formation ของ ceramide ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการเกิด phospholipid scrambling บนผนังเซลล์ได้อีกด้วย โดยที่เซลล์เกิดการหดตัว ผนังเซลล์เกิด scrambling และมี PS ออกมาอยู่บนผิวเซลล์ ทั้งหมดนี้จะเป็นลักษณะของเซลล์ที่จะเกิดการตาย (suicidal death) หรือถ้าเป็นของเซลล์เม็ดเลือดแดงจะเรียกว่า Eryptosis [35] ดังภาพที่ 2.9

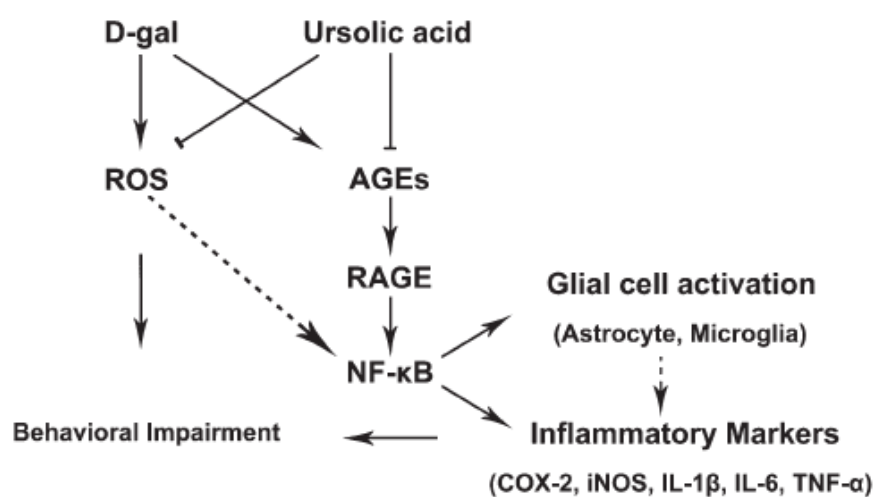


ภาพที่ 2.9 แสดงการกระตุ้นของกรดเออร์โซลิคในเซลล์เม็ดเลือดแดง [35]

## 2. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

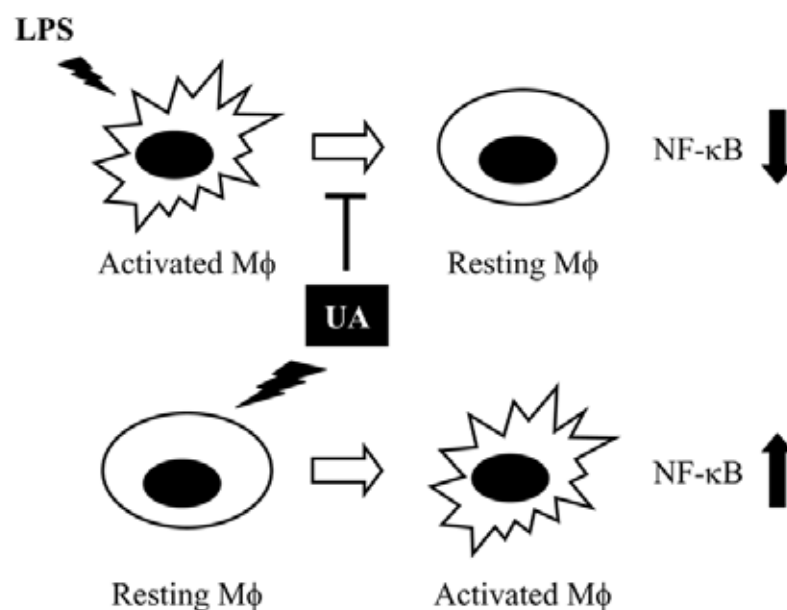
ส่วนในกลุ่มฤทธิ์การต้านการอักเสบ มีการรายงานของ Nanjoo Suh และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิคนั้นมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยจะไปยับยั้งการสร้าง inducible nitric oxide synthase

(iNOS) และเอ็นไซม์ cyclooxygenase (COX-2) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ของหนู (mouse) [36] นอกจากนี้ยังพบว่ากรดเออร์โซลิกยังสามารถยับยั้งโปรตีน COX-2 และการสังเคราะห์ prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ในเซลล์ epithelial ของคนเมื่อถูกกระตุ้นด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) โดยที่กรดเออร์โซลิกนั้นจะไปยับยั้งการทำงานของ protein kinase C (PKC), extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase1/2 (JNK1/2) และ p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) [37] และเมื่อปี 2003 Shishir Shishodia และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถยับยั้งการทำงานของ NF- $\kappa$ B โดยไปกด NF- $\kappa$ B และ p65 phosphorylation เป็นเหตุให้ลดการแสดงออกของยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง (oncogenes) และยังลดการแสดงออกของ cyclin D1, COX-2 และ matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) อีกด้วย [38] ต่อมาในปี 2010 ได้มีการรายงานของ Jun Lu และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิกสามารถลดการตอบสนองของการอักเสบในเยื่อหุ้มสมอง (prefrontal cortex) ของหนู mice จากการกระตุ้นของ D-galactose ผ่านการลดลงของระดับ Advanced glycation ends product (AGEs), Reactive oxygen species (ROS) และระดับโปรตีน carbonyl และยังไปยับยั้งการอักเสบผ่านทางวิถี AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B ทำให้มีการลดการแสดงออกของ inflammatory marker ต่างๆ เช่น COX-2, iNOS และกลุ่มของ cytokine เช่น IL-6, IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  เป็นต้น ภาพที่ 2.10 [39]



ภาพที่ 2.10 แสดงบทบาทของกรดเออร์โซลิกต่อการป้องกันการอักเสบ [39]

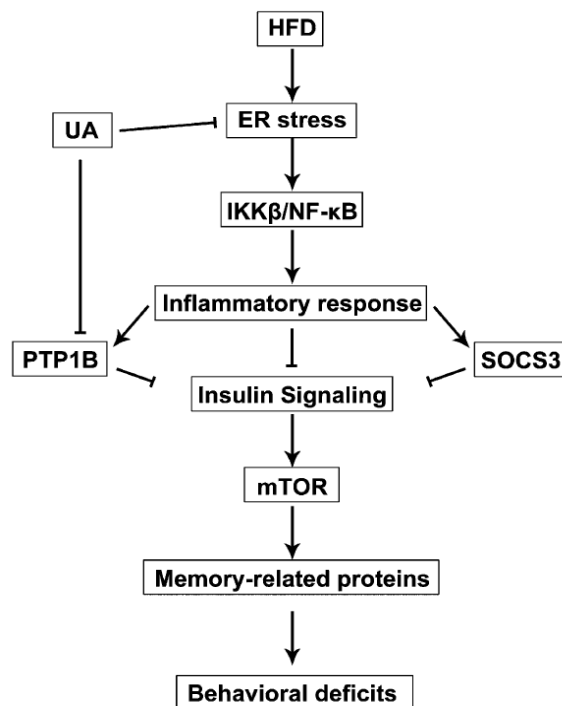
นอกจากนี้ยังพบว่ากรดเออร์โซลิกสามารถมีฤทธิ์เป็นได้ทั้งตัวต้านและตัวกระตุ้นการอักเสบ (anti- and pro-inflammatory) [16] กล่าวคือพบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory mediators ที่ถูกกระตุ้นจาก Lipopolysaccharides (LPS) ผ่านการยับยั้งการทำงานของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์ RAW264.7 mouse macrophage (M $\phi$ ) [36] อย่างไรก็ตาม กรดเออร์โซลิกยังสามารถกระตุ้นการหลั่ง pro-inflammatory mediators ในเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (resting M $\phi$ ) โดยกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B [40] ได้ ดังนั้น กรดเออร์โซลิกจึงสามารถเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง โดยขึ้นอยู่กับภาวะของเซลล์ (biological status of cells) ดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 แสดงบทบาทของกรดเออร์โซลิกในด้าน anti- and pro-inflammatory activities [16]

นอกจากนี้พบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของ Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) ที่ถูกกระตุ้นด้วย pro-inflammatory cytokine อย่างเช่น TNF- $\alpha$  ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง A549 โดยที่กรดเออร์โซลิกจะไปลดการแสดงออกของ ICAM-1 mRNA ในวิถีของ NF- $\kappa$ B signaling และพบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ได้อีกด้วย [41] และในปี 2011 คณะของ Jun Lu [42] ได้ทำการวิจัยต่อ โดยพบว่ากรดเออร์โซลิกมีความสำคัญในแง่ของการป้องกันและการรักษาของภาวะทางประสาทที่มีสาเหตุมาจากเบาหวานชนิด 2 โดยที่กรดเออร์โซลิกนั้นสามารถขัดขวางการเกิด Endoplasmic reticulum (ER) stress ทำให้เกิดการยับยั้งกลไกการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับ I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /nuclear

factor- $\kappa$ B ทำให้กระตุ้นวิถีของ PI3K/Akt/mTOR เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความจำในฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ของหนู mice นอกจากนี้กรดเออร์โซลิกยังสามารถลดการแสดงออกของตัวบ่งชี้การอักเสบในฮิปโปแคมปัสของหนู mice ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไขมันสูง (high-fat-diet; HFD) และกรดเออร์โซลิกสามารถทำหน้าที่ต้านเบาหวาน (anti-diabetic) โดยลดการแสดงออกของ protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) ทำให้ไปเพิ่มกลไกของอินซูลิน (insulin signaling) ดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 แสดงบทบาทของกรดเออร์โซลิกต่อกลไกของ hippocampus ทำให้มีผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมของหนู mice [42]

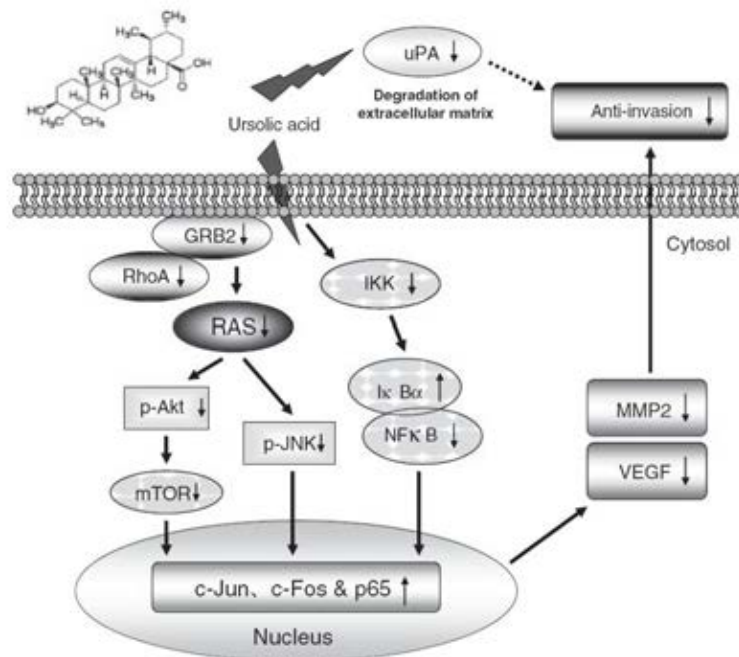
### 3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative)

ภาวะการเกิด Oxidative stress เกิดจาก reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งอาจจะเกิด oxidative ทำให้ไปทำลายชีวโมเลกุลใหญ่ๆ (macromolecules) เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน อาร์เอ็นเอ และลิพิด เป็นต้น ซึ่งมีส่วนในการกระตุ้นการตอบสนองในโรคต่างๆ ได้ ทำให้ผู้ป่วยมีพยาธิสภาพของโรคที่ไม่ดีขึ้น โดยที่กรดเออร์โซลิกนั้นมีการรายงานว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ โดย Rajendrasozhan Saravanan และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิกที่ให้ในหนู Rat (20 mg/kg) ที่ถูกกระตุ้นจาก เอทานอล (ethanol) ให้เกิด oxidative

stress ในเซลล์ตับและหัวใจ สามารถลดผลิตผลของปฏิกิริยา lipid peroxidation และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ antioxidant เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และ glutathione S-transferase เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มระดับของ non-enzymic antioxidants ได้อีกด้วย [43, 44] และยังมีรายงานว่ากรดเออร์โซลิกนั้นมีฤทธิ์เป็น neuroprotective โดยไปลดการเกิด oxidative stress ได้ [39, 45, 46] นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Zdenka Ovesna และคณะพบว่ากรดเออร์โซลิกและกรดโอดีโนอิคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการป้องกันการทำลายของดีเอ็นเอจากการกระตุ้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่างๆ เช่น Murine leukemia cell line (L1210), Human myelogenous leukemia cell line (K562) และ Human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) เป็นต้น [47]

#### 4. ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนย้ายและการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง (anti-migration and anti-invasion)

พบว่าเมื่อปี 2010 Chi-Tai Yeh และคณะได้รายงานว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถต้านการเคลื่อนย้าย (migration) และการบุกรุก (invasion) ของเซลล์มะเร็งเต้านม (human MDAMB231 breast cancer cell) ได้ ซึ่งผ่านวิถี phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) และ NF- $\kappa$ B โดยจะไปยับยั้ง metalloproteinase-2 (MMP-2) และ urokinase-type plasminogen activator (u-PA) นอกจากนี้กรดเออร์โซลิกจะไปลดระดับของ Rho-like GTPases (RhoA), growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), Ras, p-JNK, p-Akt และ p-mTOR ทำให้มีผลต่อ NF- $\kappa$ B เป็นผลให้ไปยับยั้งการแสดงออกของ vascular endothelial growth factor (VEGF), MMP-2 และ u-PA ซึ่งอาจจะไปเกี่ยวข้องกับกำเนิดโรคมะเร็งเต้านมได้ [48] ดังภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 แสดงบทบาทของกรดเออร์โซลิกในด้าน Anti-invasion [48]

### ไซโตไคน์ (Cytokine)

โดยปกติร่างกายของคนเราจะมีระบบภูมิคุ้มกันซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อและช่วยในการส่งสัญญาณให้เซลล์ชนิดอื่นได้ ขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte นั้นก็เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นได้เช่นกัน โดยจะมีไซโตไคน์ [49] ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทเพื่อกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นๆ ต่อไป โดยที่การส่งสัญญาณของไซโตไคน์จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ในการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ รวมไปถึงควบคุมการตอบสนองจากการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกันด้วย ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte จะสามารถหลั่งไซโตไคน์ได้หลายชนิด เช่น Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) หรือ CXCL8 และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ซึ่งจัดเป็น pro-inflammatory cytokine ชนิดหนึ่ง [50] โดยพบว่าเซลล์ชนิด Th1 จะสามารถหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2, TNF- $\alpha$  และ Interferon (IFN)- $\gamma$  ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ (cell-mediated immune response) ในการต่อต้านการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในเซลล์ (intracellular pathogens) ขณะที่เซลล์ชนิด Th2 หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 จะช่วยส่งเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้สารน้ำในร่างกาย (humoral-immune response) ในการต่อต้านการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมภายนอกเซลล์ (extracellular pathogens) [51] นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นของเซลล์เม็ดเลือด

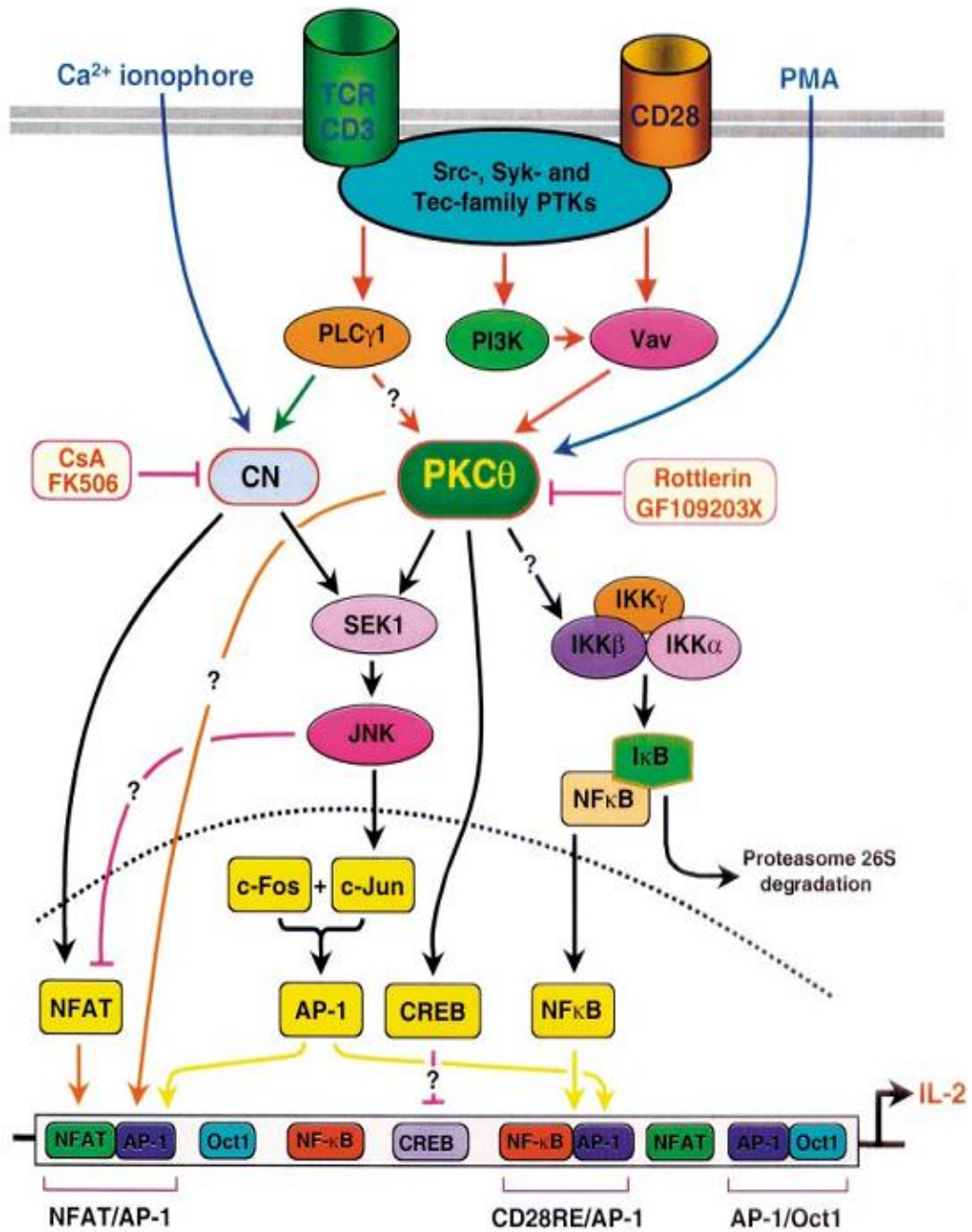


ชาว T-cell จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ PKC (Protein kinase C) ทำให้สามารถกระตุ้นกลไกการทำงานและ transcription factor ชนิดต่างๆ ได้หลายชนิด รวมไปถึงการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย [52]

Protein kinase C (PKC) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ protein kinase ที่เกี่ยวข้องกับระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ และทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของโปรตีนผ่านการเกิด Phosphorylation ตรงหมู่ hydroxyl group ของกรดอะมิโนชนิด serine และ threonine ของโปรตีน โดยที่ PKC จะถูกกระตุ้นได้จากการส่งสัญญาณของ second messenger คือ DAG (Diacylglycerol) ที่บริเวณผนังเซลล์ (membrane) หรือการส่งสัญญาณของแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) และมีการรายงานพบว่า PKC สามารถถูกกระตุ้นได้จากกลุ่มสารเคมีพวก phorbol ester เช่น Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น tumor promoter ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานและควบคุมการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 [52-54] ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า PMA นั้นจะมีโครงสร้างที่คล้ายกับ DAG จึงทำให้สามารถผ่านบริเวณผนังเซลล์เข้ามาและกระตุ้นการทำงานของ PKC ได้โดยตรง [55] และยังพบว่า PMA นั้นยังสามารถกระตุ้นการหลั่ง chemokine เช่น CXCL8 และกลุ่มของ proinflammatory cytokine อย่างเช่น IL-6 ผ่านการควบคุมของ transcription factor คือ AP-1 (activation protein -1) และ NF- $\kappa$ B ในเซลล์ Jurkat ได้ [50]

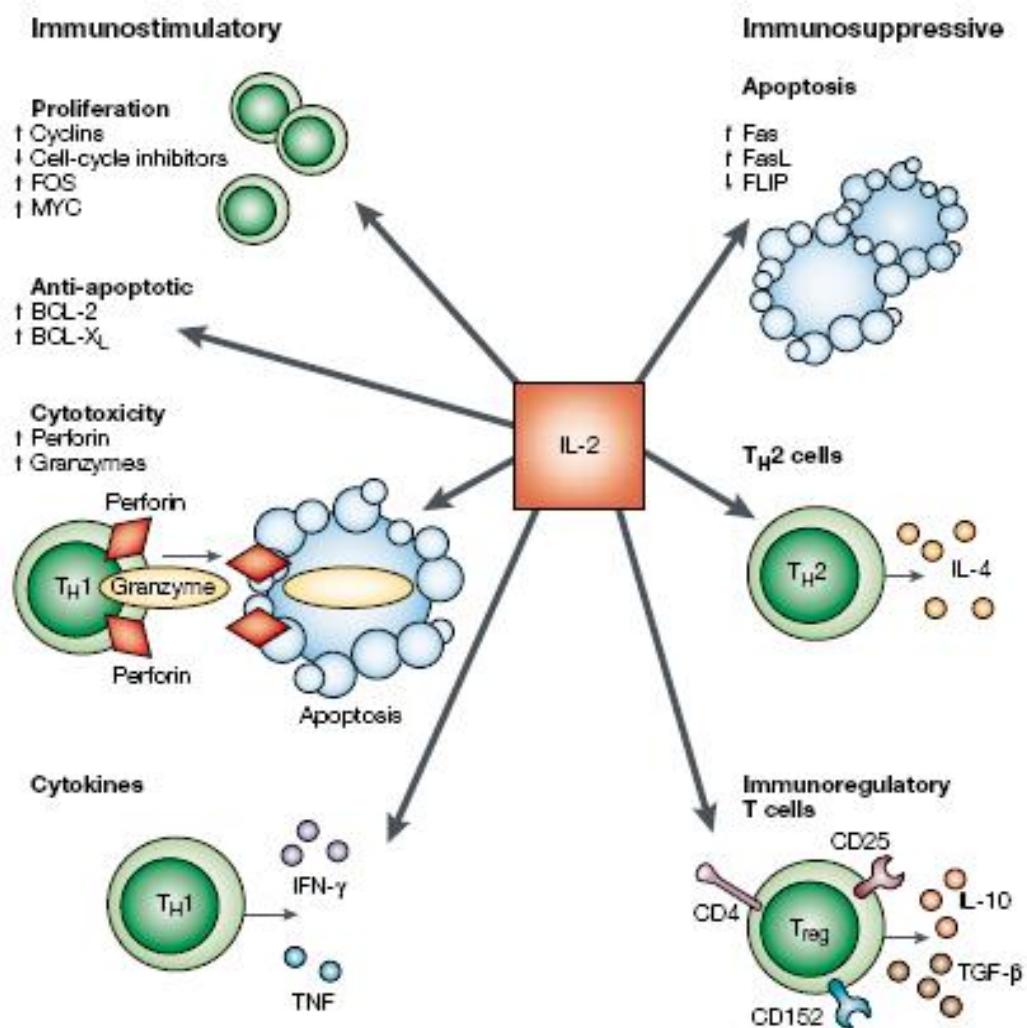
### Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 (IL-2) เป็นโปรตีนมีน้ำหนักประมาณ 15.5 kDa เดิมเรียกว่า T-cell growth factor (TCGF) [56] และเป็นไซโตไคน์หลักที่หลั่งมาจาก  $CD4^+$  T cell,  $CD8^+$  T cell [57] แต่สามารถหลั่งได้จาก activated dendritic cells (DCs) [58], natural killer (NK) cells และ natural killer T cells [59] เป็นต้น โดยจะควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเมื่อร่างกายถูกกระตุ้นจากแอนติเจนจะตอบสนองต่อวิถีทางของ T-cell receptor (TCR) หรือการกระตุ้นของ phorbol ester อย่างเช่น PMA กระตุ้นผ่าน PKC ทำให้กระตุ้นการส่งสัญญาณผ่านหลายวิถี เช่น ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) และ NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) ทำให้มีการกระตุ้น IL-2 promoter region และเกิดการแสดงออกของยีน IL-2 และหลั่ง IL-2 ออกมาได้ [53] ดังภาพที่ 2.14 โดยที่การหลั่ง IL-2 นั้นจะขึ้นอยู่กับกระบวนการกระตุ้นการถอดรหัส (transcriptional induction) โดยการส่งสัญญาณของ T-cell receptor, การรักษาสีเขียวของ IL-2 mRNA โดยสัญญาณร่วมที่กระตุ้น, การกดการถอดรหัส (transcriptional silencing) ของยีน IL-2 และการย่อยสลายอย่างรวดเร็วของ IL-2 mRNA เป็นต้น [57]



ภาพที่ 2.14 แสดงกลไกการสร้าง Interleukin 2 mRNA [53]

บทบาทของ IL-2 พบว่ามีได้หลากหลายซึ่งเป็นทั้งตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory), ตัวกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) และตัวควบคุมภูมิคุ้มกัน (immunoregulatory) ของระบบในร่างกาย [60, 61] ดังภาพที่ 2.15 โดยหน้าที่หลักนั้นจะช่วยในการเพิ่มจำนวนแบ่งตัว (proliferation), ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (anti-apoptosis) และกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิดอื่น โดยไปกระตุ้นเซลล์ชนิด Th1 ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF และ IFN- $\gamma$  เป็นต้น นอกจากนี้ IL-2 ยังมีความสำคัญในการพัฒนาการเจริญเติบโตของ T-helper ( $T_H$ ) 2 cells และสามารถเพิ่มความจดจำต่อสิ่งแปลกปลอมและตอบสนองอย่างจำเพาะของเซลล์  $CD4^+CD25^+$  regulatory T cells ได้อีกด้วย



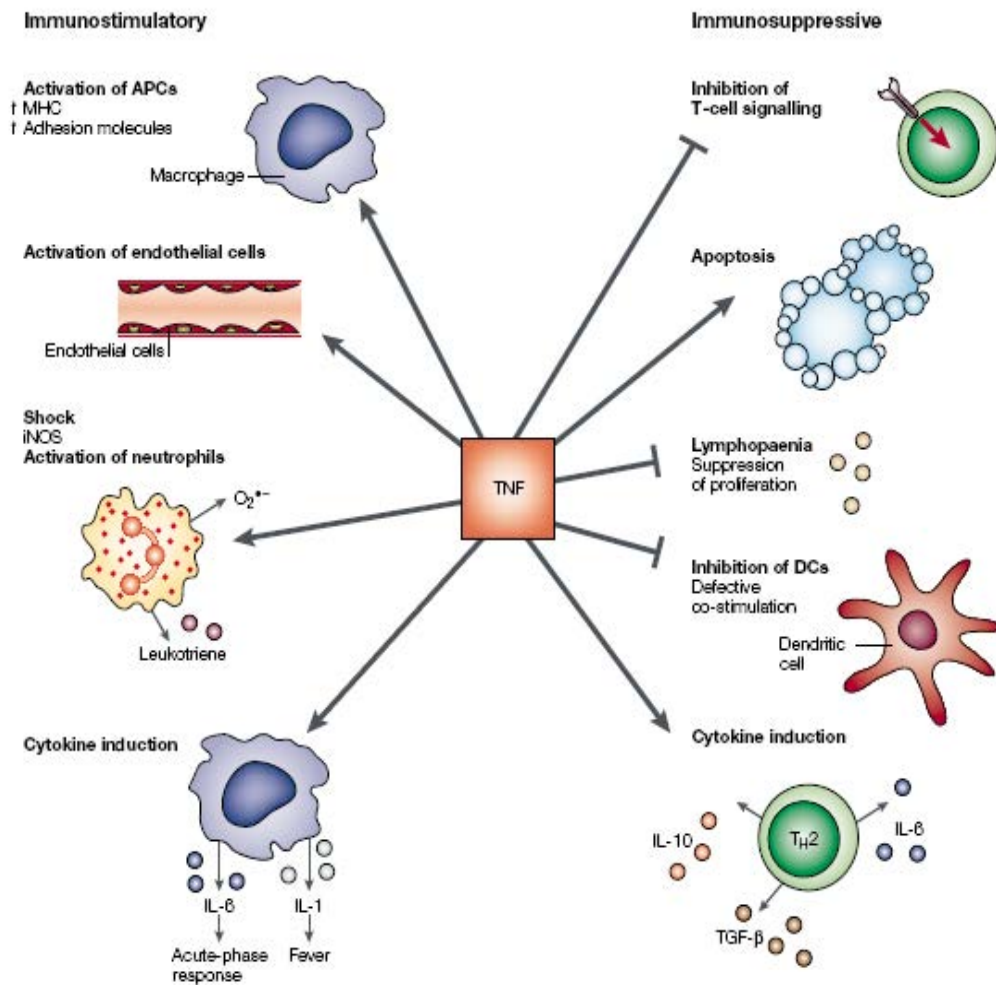
ภาพที่ 2.15 แสดงบทบาทของ Interleukin 2 (IL-2) [60]

### Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) เป็นโปรตีนมีน้ำหนักประมาณ 26 kDa [62] โดยที่ TNF- $\alpha$  นั้นสามารถหลั่งมาจากเซลล์ macrophage และ monocyte เป็นส่วนใหญ่ และยัง สามารถหลั่งได้จากเซลล์ชนิดอื่น เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cells, proliferating B cells, natural killer (NK) cells, mast cells และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils ที่ถูกกระตุ้น เป็นต้น [63] โดยที่จัดเป็น pro-inflammatory cytokine ชนิดหนึ่งที่สามารถควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน ของร่างกาย และสามารถชักจูงให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammation) และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (tumorigenesis) และ ไวรัส (viral replication) ได้อีกด้วย

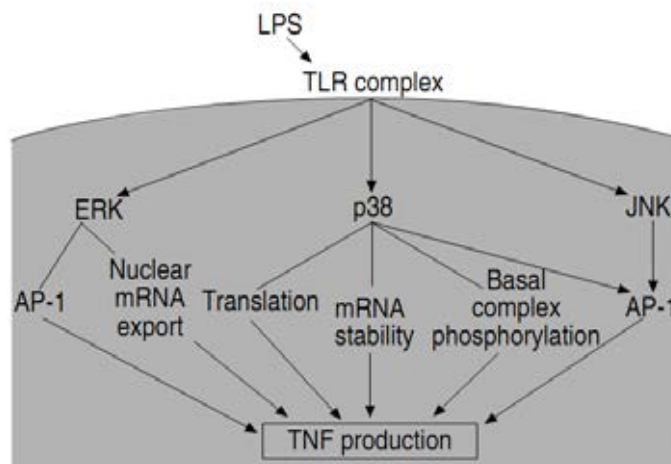
ส่วนระดับปริมาณของ TNF- $\alpha$  นั้น พบว่าถ้ามีน้อยจะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecule ของ endothelial cells และ neutrophil และยังกระตุ้นเซลล์ monocyte และ macrophage ให้หลั่ง Interleukin-1(IL-1), Interleukin-6(IL-6), chemokines และ TNF- $\alpha$  อีกด้วย แต่ถ้ามี TNF- $\alpha$  ในระดับปริมาณสูง จะสามารถชักจูงให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ เกิด อากาศไข้(fever) เกิดภาวะช็อค(shock) และตายได้ เกิดภาวะลิ่มเลือดกระจายทั่วไปในหลอดเลือด (disseminated intravascular coagulation, DIC) สามารถเกิด acute phase protein synthesis ในเซลล์ตับ และยังทำให้ร่างกายไม่แข็งแรง (cachexia) เป็นต้น [56, 64]

นอกจากนี้พบว่า TNF- $\alpha$  มีบทบาทเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory) และตัวกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) [60] ดังภาพที่ 2.16 โดยทางด้าน immunostimulatory นั้นสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้หลายชนิด และยังกระตุ้นการ หลั่งไซโตไคน์เช่น IL-1 และ IL-6 ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกาย ส่วน immunosuppressive นั้น TNF- $\alpha$  จะลดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลง โดยการ ยับยั้งสัญญาณ T-cell receptor, ส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์สาย lymphoid T - cell, ยับยั้งการกระตุ้นร่วมของ dendritic cell (DC) และกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ ชนิดต่างๆ เช่น IL-6, IL-10 และ TGF- $\beta$  ที่สามารถยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย



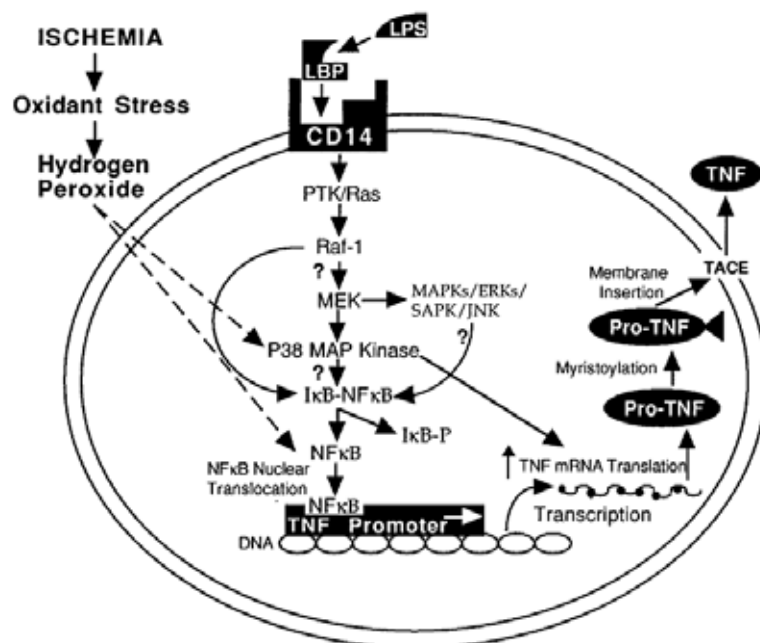
ภาพที่ 2.16 แสดงบทบาทของ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) [60]

ขณะที่กลไกการหลั่งไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) นั้น พบว่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีของ Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway ด้วย [65] ซึ่งมีการรายงานของ M.M. Monick และคณะ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งจะไปจับกับ Toll-like receptors (TLRs) ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์และเกิดการกระตุ้นการทำงานของวิถี MAPKs ทั้ง 3 วิถี กล่าวคือ Extracellular-signal regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) และ p38 MAPK ดังภาพที่ 2.17 โดยที่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ AP-1 ผ่านวิถีของ JNK ทำให้เกิดการสร้าง transcription factor ของ TNF ออกมา ส่วนวิถีของ ERK จะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ TNF mRNAs ออกมาจากนิวเคลียส และกลไกวิถีของ p38 MAPK จะเกี่ยวข้องกับการรักษาเสถียรภาพของ TNF mRNAs ในขบวนการ translation เป็นต้น



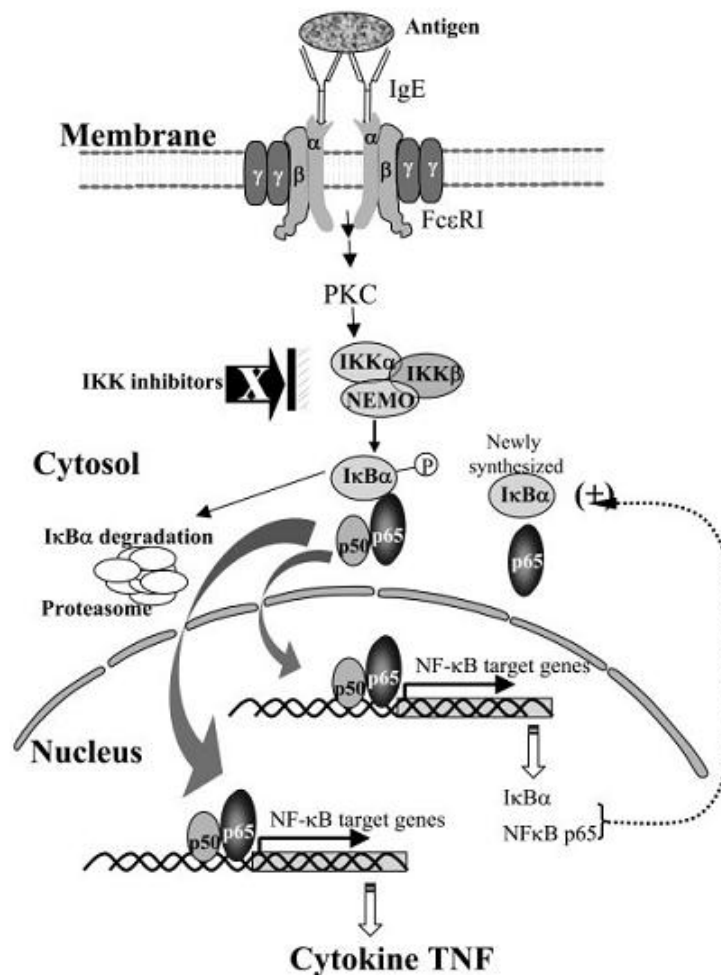
ภาพที่ 2.17 แสดงกลไกการสร้างไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ macrophage เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ผ่านวิถี MAPKs [65]

นอกจากนี้ยังพบว่ากลไกการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF นั้น ยังเกี่ยวข้องกับวิถีของ NF- $\kappa$ B ด้วย โดยที่เมื่อเซลล์ myocardial macrophage ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ทำให้เกิดการกระตุ้นของ phosphotyrosine kinase (PTK) ภายในเซลล์ โดยที่เริ่มจากการส่งสัญญาณของ Ras ทำให้เกิดการกระตุ้นของ Raf-1 และกระตุ้นกลไกการทำงานของวิถี MAPKs ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน TNF ออกมา นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF ออกมาจากเซลล์ได้ [66] ดังภาพที่ 2.18



ภาพที่ 2.18 แสดงกลไกการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ในเซลล์ myocardial macrophages และ cardiac myocytes ผ่านวิถี MAPKs และ NF- $\kappa$ B [66]

แต่อย่างไรก็ตาม มีการรายงานพบว่าในเซลล์ชนิด Mast cells ในไขกระดูกของหนู (mouse bone marrow-derived mast cells; BMMC) นั้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน (antigen) ทำให้เกิดการจับกันของ IgE และ FcεRI และเกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านการกระตุ้นการทำงานของ PKC และวิถีของ NF-κB โดยเฉพาะ IKK (Inhibitor of κB kinase) ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น inhibitor ของ κB โดยจะคอยควบคุมการทำงานของ NF-κB และเมื่อ IKK ถูกกระตุ้น จะทำให้เกิดการ phosphorylation และ degradation ของ IκBα เป็นผลให้ NF-κB ถูกส่งผ่านเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ เพื่อจับกับ DNA และเกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ให้เกิดการสร้างและแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ชนิด TNF ได้ [67] ดังภาพที่ 2.19



ภาพที่ 2.19 แสดงกลไกการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF-α ใน Mast cells โดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของ PKC และวิถีของ NF-κB [67]

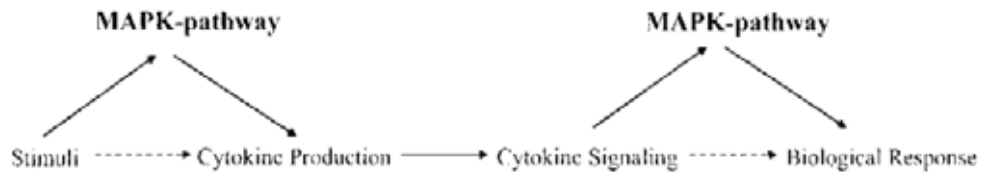
ไซโตไคน์ในกลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น จะมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยที่การเพิ่มจำนวนของไซโตไคน์ที่มากเกินไปนั้นอาจทำให้เกิดการตอบสนองที่รุนแรงได้ จนทำให้ผู้ป่วยบางโรคอาจมีพยาธิสภาพที่แตกต่างกันออกไป จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารบางชนิดสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์บางชนิดได้ โดย Sun-Mi Jang และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิคินั้นสามารถเพิ่มการสร้าง IL-2 และ IFN- $\gamma$  ในเซลล์ splenocytes ของหนูร่วมกับ การกระตุ้นด้วย Concanavalin A (Con A) แต่จะยับยั้งการสร้าง TNF- $\alpha$  ร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS โดยหนูถูกกระตุ้นจาก streptozotocin ให้เป็นเบาหวานและกินอาหารพวกไขมันสูง (high-fat diet mice) [68] และการรายงานของ Yasutaka Ikeda และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิคินั้น สามารถเพิ่มการหลั่ง migration inhibitory factor (MIF) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นได้ และยังสามารถชักนำให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ peritoneal macrophages (pM $\phi$ ) ของหนู murine ได้หลายชนิด เช่น Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 เป็นต้น [69] นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Ho Jin You และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิคินั้นสามารถกระตุ้นการหลั่ง NO และ TNF- $\alpha$  ผ่านวิถีของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์ RAW264.7 macrophage ที่ภาวะปกติของหนู mouse ได้อีกเช่นกัน [40]

### 3.4 วิถีทาง Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway

วิถีทางการส่งสัญญาณแบบ Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) เป็น serine-threonine kinase [70, 71] ที่ใช้ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ได้หลากหลาย เช่น การเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation), การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation), การมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ (survival), การควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์ [72] และการเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์ (transformation) [71] นอกจากนี้ MAPKs ยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์และการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย [73, 74] โดยพบว่าวิถี MAPKs นั้นสามารถควบคุมการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ได้อีกด้วย ซึ่งเมื่อมีการกระตุ้นของเซลล์ทำให้เกิดการกระตุ้นผ่านวิถี MAPKs เกิดการหลั่งไซโตไคน์ออกมา และส่วนของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมานั้นสามารถมีผลไปกระตุ้นวิถีของ MAPKs ได้อีก จึงทำให้เกิดการตอบสนองต่อไป [75] ดังภาพที่ 2.20 และมีการรายงานว่าวิถี MAPKs เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านกลไก post-transcriptional โดย JNK มีส่วนร่วมในการรักษา

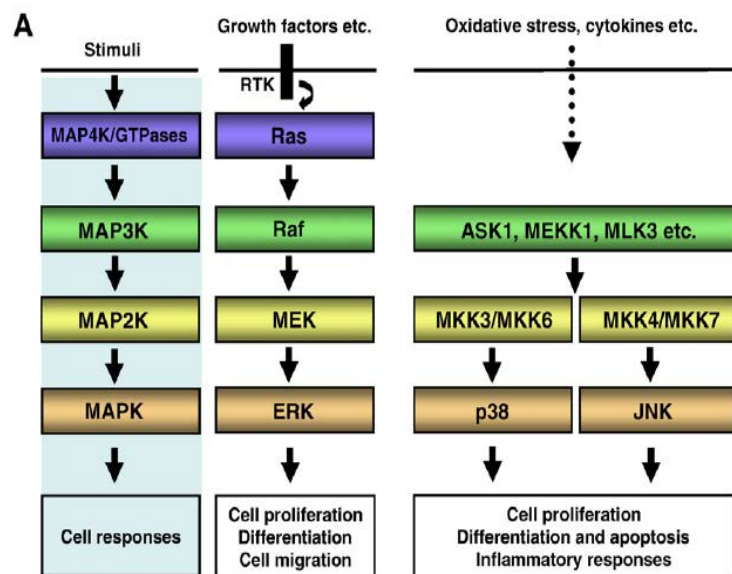


เสถียรภาพของ IL-2 mRNA [76] และยังพบว่า p38 MAPK จะควบคุมการรักษาเสถียรภาพของ TNF- $\alpha$  mRNA ได้อีกเช่นกัน [77]



ภาพที่ 2.20 แสดงกลไกการควบคุมของวิถี MAPKs กับไซโตไคน์ [75]

โดยที่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นั้น MAPKs family แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักๆ ซึ่งประกอบด้วย Extracellular-signal regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK)/Stress activated protein kinase (SAPK) และ p38 MAPK [76] โดยที่แต่ละสายนั้นจะประกอบด้วย MAPK kinase kinase (MAP3K) หรือ MEKK, MAPK kinase (MAP2K) หรือ MEK และ MAPK [70] ดังนั้นเมื่อมีการส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้นจากภายนอกและภายในเซลล์ อย่างเช่น ปัจจัยการเจริญเติบโตของเซลล์(growth factor), ไซโตไคน์(cytokine), ฮอริโมน (hormones) และภาวะ stress ของเซลล์ เช่น oxidative stress เป็นต้น ทำให้เกิดการกระตุ้น MAP3Ks ให้เกิดการ phosphorylation เพื่อที่จะกระตุ้น MAP2Ks และกระตุ้น MAPKs ต่อไปตามลำดับ และเมื่อ MAPK ถูกกระตุ้นทำให้ไปกระตุ้นการสร้าง protein ซึ่งรวมถึง transcription factors เป็นผลให้มีการควบคุมการทำงานต่างๆของเซลล์ต่อไป [71] ภาพที่ 2.2



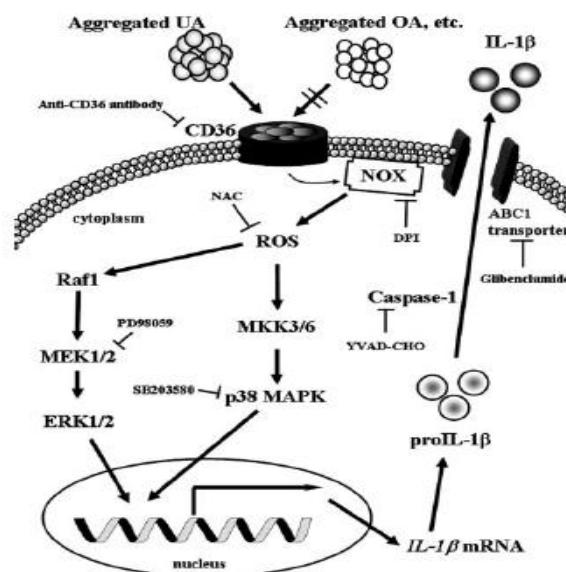
ภาพที่ 2.21 แสดงกลไกการกระตุ้น MAPK signaling pathway [71]

จากการศึกษามีการรายงานว่ ERK จะเกี่ยวข้องกับการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ ผ่านการควบคุมการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 [78] จึงทำให้มีการกระตุ้นการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ได้ แต่การกระตุ้นของ JNK/SAPK และ p38 MAPK จะทำให้มีการตายของเซลล์จากภาวะ oxidative stress โดยที่การกระตุ้นของ JNK/SAPK จะมีการแสดงออกของตัวรับ Fas บนผิวเซลล์ทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ [79] และพบว่าวิถีของ JNK นั้นจะเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสทั้งแบบ Intrinsic และ Extrinsic apoptosis pathway [80] แต่อย่างไรก็ตาม การทำงานของ ERK นั้นจะเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตอยู่รอดและการแบ่งตัวของเซลล์ได้ ขึ้นกับสิ่งที่มากระตุ้นและชนิดของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย แต่กลไกของ ERK ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์นั้นยังไม่ชัดเจน [81] แต่แล้วก็พบว่าวิถีของ ERK สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้เช่นกัน โดยพบว่ากลไกของวิถี Ras/Raf/ERK นั้นเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์จากภาวะความเครียด (stress) ได้ [82] ส่วนวิถีของ JNK พบว่าเมื่อเกิดการกระตุ้นของ TCR และตัวร่วม (co-stimulation) จะทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน JNK และเกิดการ phosphorylation ของ JNK ทำให้กระตุ้น transcription factor c-Jun ในนิวเคลียสให้เกิดการ phosphorylation และยังกระตุ้นการทำงานของ AP-1 ซึ่งเป็น transcription factor เป็นผลให้เกิดการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ชนิด IL-2 ทั้งนี้ยังสามารถกระตุ้นการทำงานและการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ได้เช่นกัน [53, 83] ขณะที่กลุ่มโปรตีนของ JNK จะมียีน *Jnk* เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย 3 isoform ได้แก่ JNK1, JNK2 และ JNK3 ส่วนใหญ่มักพบ JNK1 และ JNK2 ตามเซลล์ทั่วไป ขณะที่ JNK3 มักจะแสดงออกในเซลล์สมอง หัวใจและอวัยวะเป็นส่วนใหญ่ [84, 85] ซึ่งมีการรายงานพบว่า ในหนูที่ขาดการแสดงออกของทั้ง *Jnk1* หรือ *Jnk2* จะมีผลทำให้ลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ (cell-mediated immune response) ของ T-cell ได้เช่นกัน [86] ดังนั้นแล้ว การทำงานของวิถี MAPKs นั้นสามารถเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ได้หลากหลายชนิด ขึ้นอยู่กับว่าสิ่งที่มากระตุ้นและชนิดของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น จึงทำให้มีการแสดงออกและมีหน้าที่ในการทำงานที่แตกต่างกันออกไป

จากการรายงานพบว่ากรดเออร์โซลิกสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสทั้งในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K562 cell) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU145 cell) โดยผ่านวิถีของ JNK pathway เช่นกัน [19, 26] นอกจากนี้มีการรายงานของ Bin Wu และคณะพบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 (human chronic myelogenous leukemia cell line) ผ่านวิถีของ

phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) ซึ่งเป็น protein/lipid phosphatase ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าเป็นตัวยับยั้ง (antagonist) ของ phosphatidylinositol-OH kinase (PI3K) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ Akt kinase และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase และเพิ่มการผลิต cytochrom c มากขึ้น เป็นผลทำให้เกิดการตายของเซลล์มากขึ้นด้วยเช่นกัน [87] ส่วนในเซลล์มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูกเพาะเลี้ยง SNG-II (human endometrial cancer cell line) เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิกจะพบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวและชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยผ่านวิถีของ PI3K-Akt และวิถี MAPKs ได้ กล่าวคือ กรดเออร์โซลิกจะไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน PI3K, phospho-Akt, phospho-P42/44 ตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น [88]

โดยที่มีการรายงานของ Ting Zhang และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) ของเซลล์ HL60 (Human promyelocytic leukemia cells) เป็น monocytic lineage ได้ โดยผ่านวิถีของ ERK pathway [89] นอกจากนี้เมื่อปี 2007 มีการรายงานของ Yasutaka Ikeda และคณะ พบว่ากรดเออร์โซลิกนั้นสามารถเกิดการเกาะกลุ่ม (aggregation) และจับกับ CD36 บนเซลล์ macrophage ของหนู ทำให้มีการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 $\beta$  โดยผ่านวิถี p38 MAPK, ERK1/2 และ caspase-1 ได้ [69] ดังภาพที่ 2.22



ภาพที่ 2.22 แสดงบทบาทของกรดเออร์โซลิกต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 $\beta$  ผ่านวิถีของ MAPKs pathway ในเซลล์ macrophage ของหนู [69]

### บทที่ 3

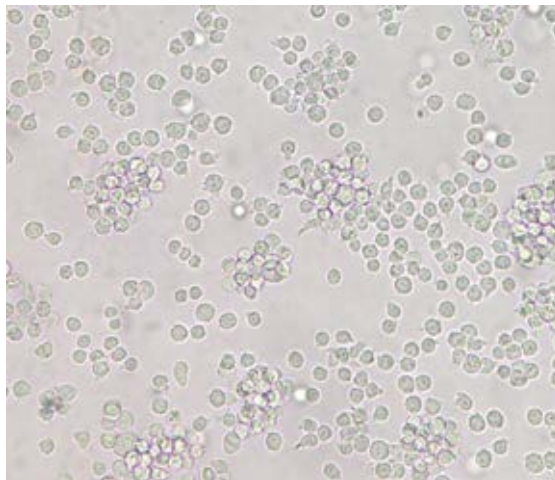
#### วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการทดสอบ

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ในการทดสอบคือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

Jurkat (human acute T cell leukemia) ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat (200x)

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20°C Freezer	Sanyo, แคนาดา
-80°C Freezer	Ilshin Lab, เกาหลี
4°C Refrigerator	Mitsubishi, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Autoclave	Hirayama, ญี่ปุ่น
Autopipette	Gilson, ฝรั่งเศส
Cell culture flask (25, 75 cm <sup>2</sup> )	Corning, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Kokusan, ญี่ปุ่น

Centrifuge tube	Falcon, สหรัฐอเมริกา
CO <sub>2</sub> incubator	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Differential counter	Modulus, สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette (10 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Boeco, เยอรมนี
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, สหรัฐอเมริกา
Gel electrophoresis apparatus	Cleaverscientific, สหรัฐอเมริกา
Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Microcentrifuge	Eppendorf, แคนาดา
Microcentrifuge tube 0.6 ml	Axgen scientific, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube 1.5 ml	Greenlab, สหรัฐอเมริกา
Microplate reader	Bio-Tek, สหรัฐอเมริกา
pH meter	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Waterbath	Mgw Lauda, สหรัฐอเมริกา
Western transblot system	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
UV/VIS spectrophotometer	Shimadzu, ญี่ปุ่น

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Ammonium persulfate	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
β-actin Antibody	Cell signaling, สหรัฐอเมริกา
Bio-Rad protein assay reagent	Bio-Rad, แคนาดา
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Cell culture lysis reagent	Promega, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Disodium hydrogen phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, เยอรมนี
Enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting substrate	Pierce, สหรัฐอเมริกา
Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Glycine	Organic research, สหรัฐอเมริกา
High performance chemiluminescence films	GE healthcare, อังกฤษ

Horseradish peroxidase (HRP)-conjugate goat anti-rabbit IgG Antibody	Cell signaling, สหรัฐอเมริกา
Human IL-2 ELISA kit	R&D systems, สหรัฐอเมริกา
Human TNF- $\alpha$ ELISA kit	R&D systems, สหรัฐอเมริกา
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	R&D systems, สหรัฐอเมริกา
<i>In vitro</i> toxicology assay kit (TOX2)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Kodak <sup>®</sup> processing chemicals for autoradiography films	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Lectin from <i>Phaseolus vulgaris</i> / Leucoagglutinin (PHA-L)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Merch, เยอรมนี
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
p44/42 MAPK (ERK) Antibody	Cell signaling, สหรัฐอเมริกา
PD98059	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) Antibody	Cell signaling, สหรัฐอเมริกา
Phospho-SAPK/JNK Antibody	Cell signaling, สหรัฐอเมริกา
Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane	Millipore, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride (KCl)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Mallinckrodt, สหรัฐอเมริกา
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
RPMI-1640 media	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
SAPK/JNK Antibody	Cell signaling, สหรัฐอเมริกา
Spectra <sup>™</sup> multicolor broad range protein ladder	Fermentas, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride (NaCl)	Merch, เยอรมนี
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
SP 600125	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Mallinckrodt, สหรัฐอเมริกา
Tetramethylbenzidine	R&D systems, สหรัฐอเมริกา

Trizma base	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Trypan blue	British Drug Houses, อังกฤษ
Ursolic acid	Sigma-Aldrich, สวิตเซอร์แลนด์

## วิธีการวิจัย

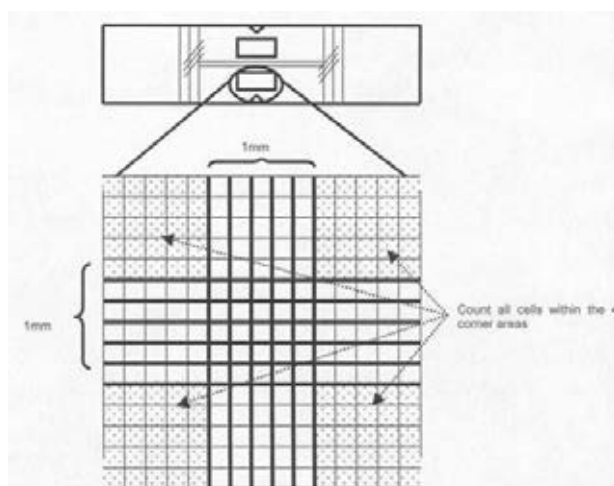
### 1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) เพื่อใช้ในการศึกษา

#### 1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 with L-Glutamine medium และเติม 10% fetal bovine serum (FBS) หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

#### 1.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์เพาะเลี้ยง Jurkat มาทำการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ hemocytometer ในการนับ ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะตารางของ Hemocytometer [90]

ทำการตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี Trypan blue ซึ่งใช้คุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โดยเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่จะไม่ติดสีของ trypan blue ทำให้เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ลักษณะวาวใส แต่ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วเยื่อหุ้มเซลล์จะขาดคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน จึงทำให้สี trypan blue สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์

ได้ ดังนั้นเมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ติดสีน้ำเงิน ในการนำเซลล์มาใช้ทดสอบ จะต้องได้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดมากกว่า 90% โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดจากสูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Viable cells}}{\text{Total cells}} \times 100$$

เมื่อได้เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดมากกว่า 90% แล้วจึงทำการคำนวณหาจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์ตามที่ต้องการเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

## 2. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cell) จากกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ด้วยวิธี XTT assay

วิธี XTT assay [91] เป็นเทคนิคการวัด metabolic activity ภายในเซลล์และใช้หลักการของการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assay) โดยสารสีเหลืองของ XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenases ในเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยเปลี่ยน tetrazolium ring ของ XTT ให้เป็นตะกอนของ formazan ซึ่งมีสีส้มและสามารถละลายน้ำได้ [92] ดังภาพที่ 3.3 หลังจากนั้นทำวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 และ 690 นาโนเมตร โดยที่ปฏิกิริยาการเกิดนั้นจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารจำพวก electron coupling เช่น phenazine methosulfate (PMS) หรือ menadione (MEN) และปริมาณของสีส้มจะขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต



ภาพที่ 3.3 แสดงปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี XTT assay [93]

### 2.1 เตรียมสารละลายก่อนการทดสอบ ดังนี้

- เตรียมสารละลาย XTT ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/ml ที่มี phenazinemethosulfate (PMS) 1 % โดยใช้ทดสอบ 20 % ของสารละลายทั้งหมด



- เตรียมสารละลายกรดเออร์โซลิก โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย

## 2.2 เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 well plate) โดยใช้ปริมาณเซลล์เท่ากับ  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่ออิมิลิลิตร

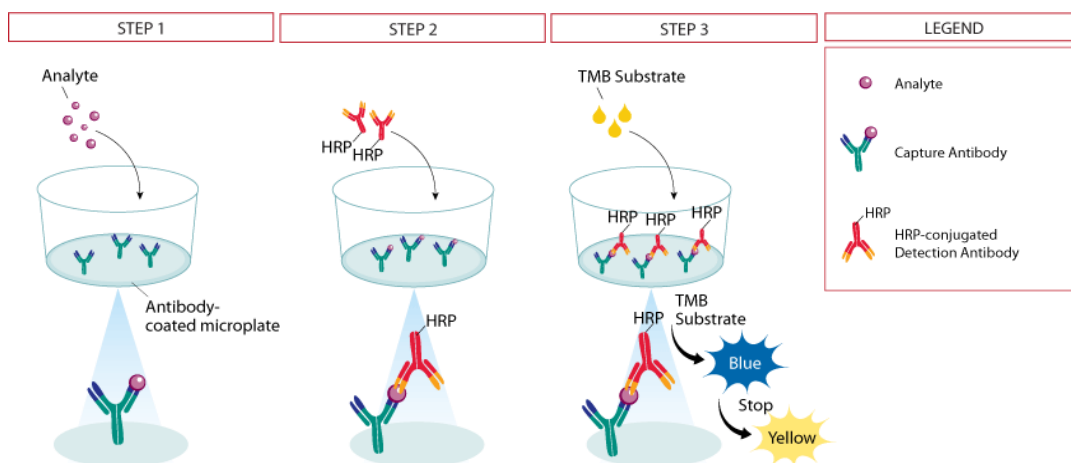
## 2.3 ทดสอบสารละลายกรดเออร์โซลิกกับเซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการเติมสารละลายกรดเออร์โซลิกโดยให้มีระดับความเข้มข้นแต่ละหลุมต่างกัน (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100  $\mu\text{M}$ ) ลงไปในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา จะเติมสารละลาย XTT ลงไปเท่ากับ 20 % ของปริมาตรทั้งหมดต่อหลุม และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 690 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader และนำค่า OD ที่ได้มาทำการคำนวณหาค่า % Cell viability จากสูตร และหาค่า  $\text{IC}_{50}$  (half maximal inhibitory concentration) จากกราฟ โดยที่จะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Viable cells (OD sample - OD blank)} \times 100}{\text{Total cells (OD control - OD)}}$$

## 3. การทดสอบการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคการตรวจวัดโดยใช้หลักการการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Antigen-Antibody) ซึ่งจะทำให้การ coat plate ด้วย Capture antibody ที่จำเพาะสำหรับการตรวจวัด หลังจากนั้นเมื่อใส่สิ่งส่งตรวจซึ่งเป็น antigen จะเข้าไปจับกับ antibody ที่ coat ไว้กันหลุมของ plate และเมื่อใส่ Detection antibody ที่ติดฉลากด้วย biotin ซึ่งแอนติบอดีชนิดนี้จะเข้าไปจับกับ antigen ที่จับอยู่กับแอนติบอดีชนิดแรก ดังนั้นเมื่อเติม Streptavidin ที่จับอยู่กับ Horseradish peroxidase (HRP) เพื่อให้ Streptavidin เข้าไปจับกับ biotin ดังนั้นเมื่อใส่ substrate ลงไป เอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จะทำปฏิกิริยากับ substrate ทำให้เกิดสีขึ้น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 แสดงขั้นตอนและการเกิดปฏิกิริยาดำรงวิธี ELISA [94]

### 3.1 เตรียมสารละลายก่อนการทดสอบ ดังนี้

- เตรียมสารละลายกรดเออร์โซลิก (stock solution) ที่ระดับความเข้มข้น 25 mM โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลาย ERK inhibitor (PD98059) และ JNK inhibitor (SP600125) ในตัวทำละลาย DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลาย Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) ในตัวทำละลาย DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml และ Lectin from *Phaseolus vulgaris* (red kidney bean)/Phytohaemagglutinin (PHA) ในตัวทำละลาย filter-sterilized PBS (Phosphate-buffered saline) ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu$ g/ml เพื่อใช้เป็น Positive control โดยกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ส่วน stock solution ของ Positive control เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2 เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและทำการทดสอบ

ทำการเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม (6 well plate) โดยใช้ปริมาณเซลล์เท่ากับ  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้ในตู้บเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ หลังจากนั้นทำการทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยงกับสารละลายชนิดต่างๆ เช่น กรดเออร์โซลิก (Ursolic acid), สารละลาย PD98059 (ERK inhibitor), สารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) และสารละลาย PMA/PHA เป็นต้น เมื่อครบกำหนดเวลาทำการทดสอบ จะทำการเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) เพื่อนำไป

ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอด จะใช้ในการตรวจวัดหาระดับโปรตีนของเซลล์ โดยจะนำเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอดมาทำการปั่นล้างด้วย PBS (Phosphate-buffered saline) ที่เย็นและมีค่า pH 7.4 ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เป็นจำนวน 3 ครั้ง และใส่สารละลาย lysis buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l แล้วจึงนำไปตรวจวัดระดับโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธี Bradford method โดยจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ถ้ายังไม่ทำการทดสอบจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส

### 3.3 ทำการทดสอบสารกับเซลล์เพาะเลี้ยง

#### 3.3.1 ทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ต่อการหลั่งไซโตไคน์ IL-2 และ TNF- $\alpha$ ของ Jurkat cells

ทำการทดสอบสารละลายกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC<sub>50</sub>) กับเซลล์ Jurkat ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (1, 3, 6, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง) และใช้ตัวควบคุมเป็น DMSO ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 % (< 0.1%) โดยเฉพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เมื่อครบกำหนดเวลา จะทำการเก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส โดยจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

#### 3.3.2 ทดสอบฤทธิ์ของตัวกระตุ้น PMA/PHA (Positive control) ต่อการหลั่งไซโตไคน์ IL-2 และ TNF- $\alpha$ ของ Jurkat cells

ทำการทดสอบตัวกระตุ้น PMA/PHA กับเซลล์ Jurkat ที่ระยะเวลา 1, 3, 6, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุมเป็น DMSO ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 % (< 0.1%) และเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เมื่อครบกำหนดเวลา จะทำการเก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส โดยจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

#### 3.3.3 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ คือ IL-2 และ TNF- $\alpha$ ของ Jurkat cell จากกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA

ทำการทดสอบสารละลายกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 30  $\mu$ M (ค่าความเข้มข้นต่ำกว่า IC<sub>50</sub>) ในระยะเวลาต่างๆ กัน (0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง) โดยใช้ตัวควบคุม

(control) เป็น DMSO ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 % (< 0.1%) โดยเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เมื่อครบกำหนดเวลา จะเติมตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml และ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 µg/ml และนำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้อบเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา จะทำการเก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส โดยจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

**3.3.4 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ คือ IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของ Jurkat cell จากตัวยับยั้งของวิถี MAPKs คือ สารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และ สารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA**

ทำการทดสอบสารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และสารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) ที่ระดับความเข้มข้น 20 µM ในระยะเวลาต่างๆ กัน (0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง) โดยใช้ตัวควบคุม (control) เป็น DMSO ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 % (< 0.1%) โดยเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เมื่อครบกำหนดเวลา จะเติมตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml และ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 µg/ml และนำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้อบเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา จะทำการเก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส โดยจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

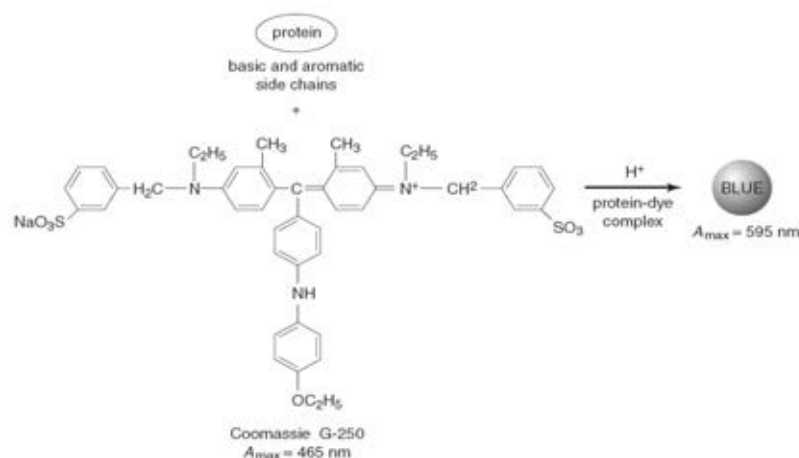
### **3.4 การตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$ ด้วยวิธี ELISA**

ทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  โดยจะ coat plate ด้วย capture antibody ที่จำเพาะกับไซโตไคน์ลงบนจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 µl เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา นำจานเพาะเลี้ยงมาล้างด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้ง และนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) จากเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารต่างๆ ที่กล่าวมาในเบื้องต้น และสิ่งส่งตรวจมาตรฐาน (standard) มาใส่ลงในหลุม ปริมาตร 100 µl และนำไปวางบน plate shaker ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา กำหนด ทำการล้างด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติม detection antibody ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 µl และ

วางลงบน plate shaker ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด จะล้างด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้ง และเติม streptavidin-HRP ลงไปในหลุม ปริมาตร 100  $\mu$ l วางบน plate shaker ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบเวลา นำจานเพาะเลี้ยง มาล้างด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้ง และเติม substrate ปริมาตร 100  $\mu$ l นำไปวางบน plate shaker ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบกำหนดเวลาให้เติม stop solution (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 50  $\mu$ l และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วย เครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร และนำค่า OD ที่ได้มา คำนวณหาค่าปริมาณไซโตไคน์จากกราฟมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าทางสถิติ

#### 4. การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง Jurkat และหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford method

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้นั้นสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์เทียบสี (Colorimetric assay) [95] โดยที่สีของโลหะหนักและสีจะจับกับโปรตีนในอัตราส่วนที่ค่อนข้างจะจำเพาะ ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของโปรตีนในสารละลายต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร วิธีที่ใช้มีหลายชนิดแต่ในการทดลองนี้ใช้ Bradford assay โดยอาศัยหลักการของสี Coomassie brilliant blue G-250 ที่จะจับกับโปรตีนแบบจำเพาะ โดยที่ Coomassie brilliant blue G-250 หรือที่เรียกกันว่า Bradford' reagent ภายใต้อสภาวะกรดเข้มข้น จะให้สีแดงออกน้ำตาล เมื่อมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน โดยความเข้มของสีน้ำเงินจะขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดอะมิโนโดยตรง ซึ่งเราสามารถวัดการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร [96] ดังภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 แสดงปฏิกิริยาของวิธี Bradford assay [95]

#### 4.1 เตรียมสารละลายและทดสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธี

##### Bradford method

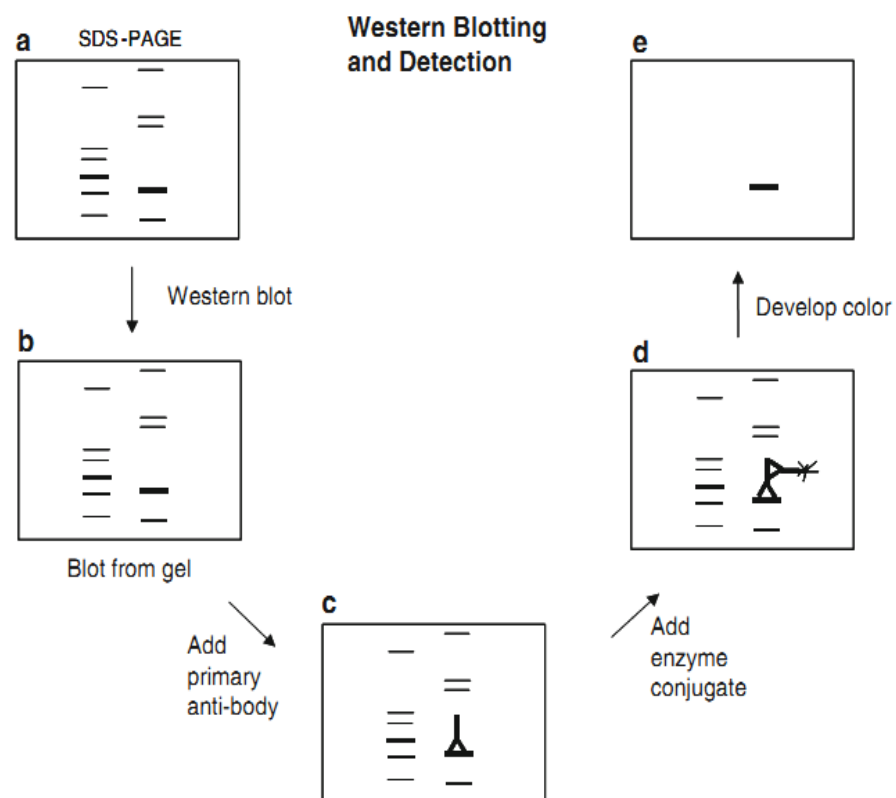
เตรียมสารละลาย lysis buffer ประกอบด้วยสารละลาย Tris-phosphate (pH7.8) ที่ระดับความเข้มข้น 25 mM, สารละลาย DTT ที่ระดับความเข้มข้น 2 mM, สารละลาย 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid ที่ระดับความเข้มข้น 2 mM, สารละลาย glycerol 10 %, สารละลาย Triton<sup>®</sup> X-100 ที่ระดับความเข้มข้น 1 % และเติมสารละลาย protease inhibitor cocktail ในอัตราส่วน 1:200 เพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำการทดสอบ โดยจะนำเซลล์ที่ทำการทดสอบแล้วมาปั่นล้างด้วย PBS (Phosphate-buffered saline) ที่เย็นและมีค่า pH 7.4 ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เป็นจำนวน 3 ครั้ง และใส่สารละลาย lysis buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l แล้วจึงนำไปตรวจวัดระดับโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธี Bradford method ถ้ายังไม่ทำการทดสอบจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส

ทำการทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐาน (Standard) คือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10  $\mu$ g/ml ปริมาตร 800  $\mu$ l ผสมกับชุดน้ำยาตรวจวัดโปรตีนบริษัท Bio-Rad (Bio-Rad protein assay) ปริมาตร 200  $\mu$ l ที่ใส่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และนำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐาน BSA (0 – 10  $\mu$ g/ml)

ทำการทดสอบโดยใช้โปรตีนที่จะทดสอบ ปริมาตร 3  $\mu$ l ผสมกับน้ำ MilliQ ปริมาตร 797  $\mu$ l แล้วจึงผสมกับชุดน้ำยาตรวจวัดโปรตีนบริษัท Bio-Rad (Bio-Rad protein assay) ปริมาตร 200  $\mu$ l ที่ใส่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน BSA แล้วคูณกลับด้วย Dilution factor เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีนทั้งหมด

5. การทดสอบการแสดงผลของระดับโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway คือ Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Western blot

วิธี Western blot เรียกอีกอย่างว่า protein blotting หรือ immunoblotting [97] เป็นเทคนิคการวิเคราะห์การแสดงผลของโปรตีนที่จำเพาะที่ต้องการศึกษา โดยใช้หลักการของ Gel electrophoresis ในการแยกโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล และทำการถ่ายโอนโปรตีน (transfer) จากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (membrane) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการศึกษาโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ ดังภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.6 แสดงขั้นตอนในการตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธี Western blot [98] (a): การแยกโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล โดยใช้วิธี SDS-PAGE, (b): การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Transfer protein), (c,d): การตรวจวัดการแสดงผลของโปรตีน (Detection) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน, (e): การวิเคราะห์ผล (Analysis) โดยใช้วิธี Chemiluminescent detection ซึ่ง substrate จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ติดอยู่กับ secondary antibody ทำให้เกิดการเปล่งแสงของตำแหน่งโปรตีนที่ทำการตรวจวัด

### 5.1 การแยกโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล โดยใช้วิธี Gel Electrophoresis

วิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นวิธีการแยกโปรตีน โดยอาศัยหลักการพื้นฐานคือ โมเลกุลที่มีประจุจะเคลื่อนที่ในสนามที่มีแม่เหล็กซึ่งอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นกับขนาดของโมเลกุลและประจุ ส่วนโปรตีนที่ใช้ในการ Run Gel Electrophoresis นั้นต้องทำให้เสียสภาพก่อน โดยผสมโปรตีนที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 5  $\mu\text{g}$  กับสารละลาย 10X Laemmli sample buffer ซึ่งมีส่วนผสมของ สาร 2-mercaptoethanol ที่จะทำให้พันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนถูกทำลาย แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที โดยโปรตีนทั้งหมดนั้นจะถูกสาร Sodium dodecyl sulfate (SDS) ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ เพราะสาร SDS มีคุณสมบัติเป็นสาร ionic detergent จะเข้าไปจับกับโปรตีนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพจากรูปร่างกลมกลายเป็นสภาพเหยียดตรงและเป็นประจุลบ ทำให้เมื่อมีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านไปยังแผ่น polyacrylamide gel ที่ทำหน้าที่เหมือนตัวส่งผ่าน (barrier) ต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุล โปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุบวก และในสภาพ denature ของโปรตีนเกือบทั้งหมดนั้นจะจับกับ SDS ด้วยอัตราของน้ำหนักที่คงที่ ทำให้มีความหนาแน่นของประจุที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นอัตราการเคลื่อนตัวของโปรตีนจึงขึ้นกับขนาดของโมเลกุล (molecular weight) เพียงอย่างเดียว ทำให้โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้น้อยกว่าโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งส่วนบนของเจลนั้นจะต่อเข้ากับขั้วลบ ส่วนล่างของเจลจะต่อเข้ากับขั้วบวก

ดังนั้นเมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าแล้วโปรตีนจะเคลื่อนไปยังส่วนล่างของเจล โดยที่ในการเตรียม polyacrylamide gel นั้นจะใช้ 5% สำหรับ Stacking gel และ 10 % สำหรับ Separating gel ของโปรตีน ERK และ JNK และใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 80 Volt เป็นเวลา 20 นาที ก่อน และที่ 120 Volt เป็นเวลา 110 นาที

### 5.3 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Transfer protein)

ทำการถ่ายโอนโปรตีนจาก Gel electrophoresis มาสู่แผ่นเมมเบรน ที่มีประจุบวก เช่น nitrocellulose membrane หรือ polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane ซึ่งในที่นี้จะใช้ PVDF membrane ในการทดสอบ และใช้วิธีการถ่ายโอนแบบ wet tank transfer ซึ่งต้องอาศัย buffer เป็นตัวช่วย โดยเริ่มจากกระตุ้นแผ่น PVDF membrane ให้มีขั้วด้วยการแช่ absolute methanol นาน 5 นาที และนำไปแช่ต่อที่ Transfer buffer ที่เย็นเพื่อรอประกบกับเจล จากนั้นจะนำเจลที่ Run electrophoresis แล้วมาแช่ด้วย Transfer buffer ที่เย็นเช่นกัน แล้วจึงนำมาประกบกับแผ่นเมมเบรนด้วยตลับประกบ เริ่มจากเปิดตลับประกบและวางวัสดุโดยเรียงลำดับ จากขั้วลบ



ไปชั่วคราว ตามลำดับ ดังนี้ เริ่มจากแผ่นฟองน้ำ -> กระดาษกรอง -> แผ่นเจล -> แผ่น PVDF membrane -> กระดาษกรอง -> แผ่นฟองน้ำ และปิดตลับประกบ โดยทุกชั้นตอนระวางอย่าให้เกิดฟองอากาศ หลังจากนั้น นำไปใส่แท็งก์ และเติม Transfer buffer ให้ท่วมตลับประกบ ปิดฝาให้เรียบร้อย โดยที่ต้องวางแท็งก์ในภาชนะที่ล่อด้วยน้ำแข็งโดยรอบ แล้วจึงเริ่มทำการถ่ายโอนโปรตีน ใช้กระแสไฟฟ้าที่คงที่ที่ 150 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

#### 5.4 การป้องกันการจับของโปรตีนที่ไม่จำเพาะบนแผ่นเมมเบรน (Blocking)

การป้องกันการจับของโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จำเพาะบนแผ่นเมมเบรนนั้น จะใช้ตัว Blocking buffer เป็น 5 % non-fat dry milk ละลายในสารละลาย Tris buffer saline-Tween 20 (TBS-T) โดยที่ตัว blocking buffer นั้นจะไปจับอยู่บนพื้นผิวที่ว่างของแผ่นเมมเบรนที่ไม่มีโปรตีนที่จำเพาะจับอยู่ ดังนั้นการทำ blocking จึงมีความสำคัญ เพราะจะลดการเกิด false positives ได้ด้วย ส่วนขั้นตอนการดำเนินการนั้นเริ่มจาก หลังทำการถ่ายโอนโปรตีนเสร็จแล้ว นำแผ่นเมมเบรน PVDF มาแช่ใน blocking buffer แล้วเขย่าเบาๆ ด้วย rotator เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา จึงนำแผ่นเมมเบรน PVDF มาล้างด้วย Tris buffer saline-Tween 20 (TBS-T) เป็นจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

#### 5.5 การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน (Detection)

ขั้นตอนการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนนั้น จะใช้วิธี Two-steps detection โดยใช้ primary antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเข้าไปจับก่อน โดยที่แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนแต่ละชนิด กล่าวคือ แอนติบอดี (primary antibody) ของ phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:4000), p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:4000), phospho-SAPK/JNK (1:1000), SAPK/JNK (1:4000),  $\beta$ -actin (1:4000) และใช้ secondary antibody ของ horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG ที่อัตราส่วนความเข้มข้นเท่ากับ 1:4000 ในสารละลายผสมของ 5% BSA, 1X Tris buffer saline (TBS) และ 0.1% Tween 20 โดยจะนำแผ่นเมมเบรน PVDF มาแช่ไว้ แล้วเขย่าเบาๆ ด้วย rotator เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา นำแผ่นเมมเบรน PVDF มาล้างด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นแล้ว จะนำแผ่นเมมเบรน PVDF มาแช่ร่วมกับ secondary antibody ที่จำเพาะกับ primary antibody ซึ่งจะติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเท่ากับ 1:4000 ในสารละลาย TBS-T แล้วเขย่าเบาๆ ด้วย Rotator เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาที่

กำหนด นำแผ่นเมมเบรน PVDF มาล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย TBS-T โดยการแช่ไว้และเขย่าเบาๆ เป็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

### 5.6 การวิเคราะห์ผล (Analysis)

หลังจากนำแผ่นเมมเบรน PVDF มาบ่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะแล้ว ต่อมาจะทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Chemiluminescent detection ซึ่งจะแช่แผ่นเมมเบรน PVDF ด้วย substrate ชนิด SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate ซึ่งจะถูกลอยด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ที่ติดฉลากอยู่กับ secondary antibody ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปล่งแสง โดยแช่ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำไปประกบกับแผ่นฟิล์ม เมื่อประกบแล้วนำแผ่นฟิล์มไปล้างด้วยน้ำยา Develop ที่เจือจางด้วยน้ำ ประมาณ 2 นาที และล้างแผ่นฟิล์มต่อในน้ำประมาณ 1 นาที ต่อมาแช่แผ่นฟิล์มลงในน้ำยา Fixer ที่เจือจางด้วยน้ำ ประมาณ 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำต่ออีกประมาณ 1 นาที สุดท้ายทำการตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง โดยขั้นตอนการประกบฟิล์มจนถึงล้างแผ่นฟิล์มเสร็จนั้น จะต้องทำในห้องที่มีมืด และห้ามโดนแสงโดยเด็ดขาด เนื่องจากแสงอาจจะทำปฏิกิริยากับแผ่นฟิล์มได้ เมื่อได้แผ่นฟิล์มแล้วจะนำไปวัดความหนาของ band โปรตีนที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม NIH image J และนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้ band ของโปรตีนชนิด  $\beta$ -actin มา Normalized โดยใช้ค่าของกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1%) มาเทียบให้เป็น 1 และคำนวณหาค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ของโปรตีน

## การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cell) จากกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ด้วยวิธี XTT assay จะแสดงผลเป็นค่า % Viability เฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SEM) และคำนวณหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน กับกลุ่มควบคุมโดยใช้ค่าสถิติ One-way ANOVA

2. การทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) หรือ PMA/PHA (Positive control) ต่อการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SEM) และคำนวณหาความแตกต่างระหว่างค่าระดับไซโตไคน์ของกลุ่มที่ทดสอบกับสารแต่ละชนิดที่ระยะเวลาต่างๆกัน กับกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1%) โดยใช้ค่าสถิติ One-way ANOVA

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell จากกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SEM) และคำนวณหาความแตกต่างระหว่างค่าระดับไซโตไคน์ของกลุ่มที่ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกัน กับกลุ่มควบคุมที่ถูกระตุ้นเพียงอย่างเดียว (Positive control) โดยใช้ค่าสถิติ One-way ANOVA

4. การทดสอบการแสดงออกของระดับโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway คือ Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ของ Jurkat cell ต่อกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ด้วยวิธี Western blot จะแสดงผลเป็นผลของแผ่นฟิล์มที่ประกบได้ โดยแสดงเป็นค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ของโปรตีน

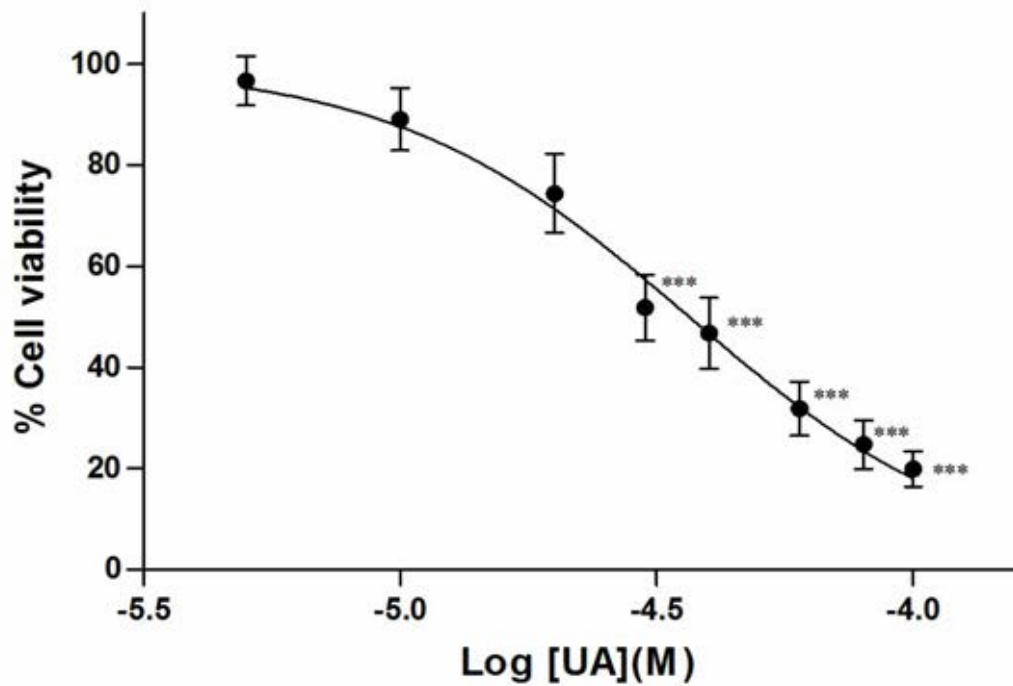
## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### ผลการวิเคราะห์

1. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat จากกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ด้วยวิธี XTT assay (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 ภาคผนวก ก)

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat กับกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทำการทดสอบด้วยวิธี XTT assay โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกรดเออร์โซลิกที่มากขึ้น จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat มากยิ่งขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ กรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 100, 80, 60, 40 และ 30  $\mu\text{M}$  จะมีค่า % Viability ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ) โดยจะแสดง % Viability (ค่าการอยู่รอดของเซลล์) ของเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 1 ในภาคผนวก ก และเมื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง ( $\text{IC}_{50}$ ) จากกราฟ ดังภาพที่ 4.1 จะได้เท่ากับ 35.5  $\mu\text{M}$



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงผลของกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ % Viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยวิธี XTT assay (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย % Cell viability = เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

Log [UA](M) = ค่าลอการิทึมของกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น  
เป็น Molar

UA = Ursolic acid (กรดเออร์โซลิก)

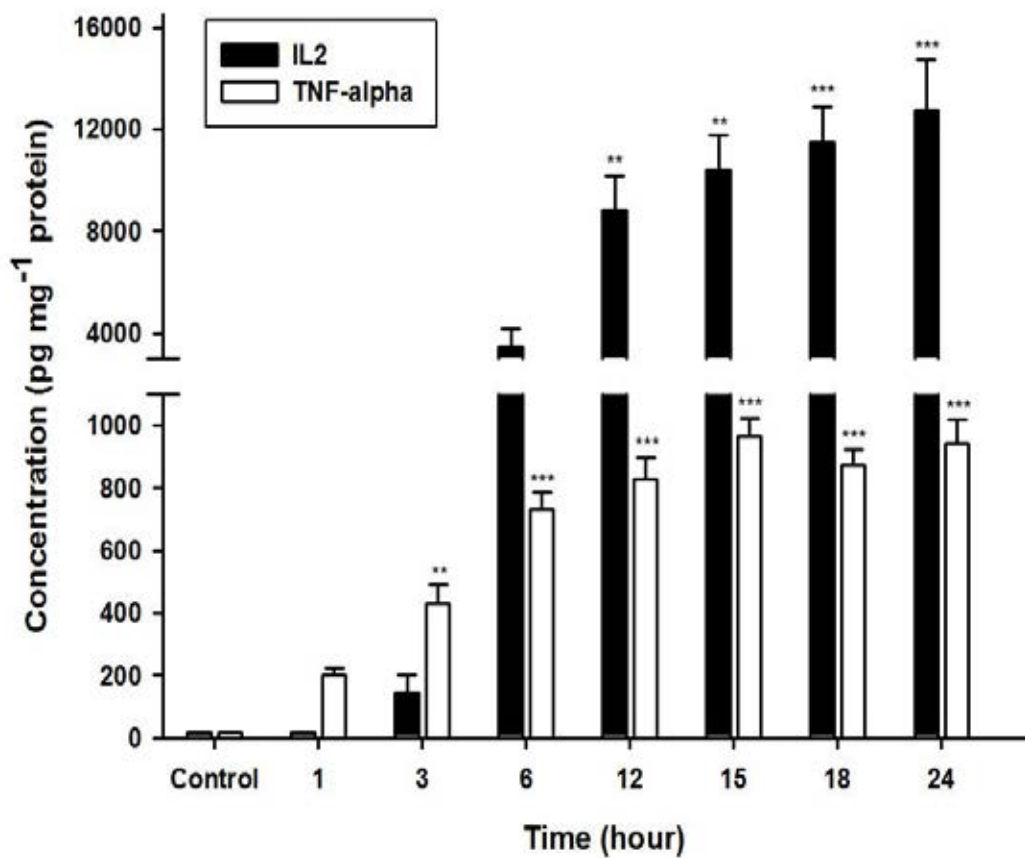
\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

2. การทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ต่อการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M (ระดับต่ำกว่า IC<sub>50</sub>) เป็นระยะเวลา 1, 3, 6, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ด้วยวิธี ELISA โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1 %) พบว่าสารละลายกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M ไม่มีผลต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ เมื่อตรวจวัดด้วย ELISA แล้วพบว่ากรดเออร์โซลิกไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ Jurkat ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1%) ได้

3. การทดสอบฤทธิ์ของตัวกระตุ้น PMA/PHA (Positive control) ต่อการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 ภาคผนวก ก)

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml ร่วมกับ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu$ g/ml เป็นระยะเวลา 1, 3, 6, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ด้วยวิธี ELISA โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1 %) พบว่าตัวกระตุ้น PMA/PHA สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 4.2 กล่าวคือ เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA จะทำให้มีปริมาณของไซโตไคน์ชนิด IL-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 12 ชั่วโมง ( $p < 0.01$ ) เป็นต้นไป ส่วนปริมาณของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  พบว่า ตัวกระตุ้น PMA/PHA สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 3 ชั่วโมง ( $p < 0.01$ ) เป็นต้นไปเช่นกัน จากการทดสอบในเซลล์ Jurkat จะพบว่าระดับปริมาณการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  นั้นจะมีค่าต่างกันมาก ซึ่งระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 จะหลั่งออกมามากกว่าไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  โดยจะแสดงปริมาณการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  เมื่อถูกกระตุ้นจากตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 2 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงผลของปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ Jurkat ที่ระยะเวลาต่างๆ กันของตัวกระตุ้น PMA/PHA ด้วยวิธี ELISA (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย \*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

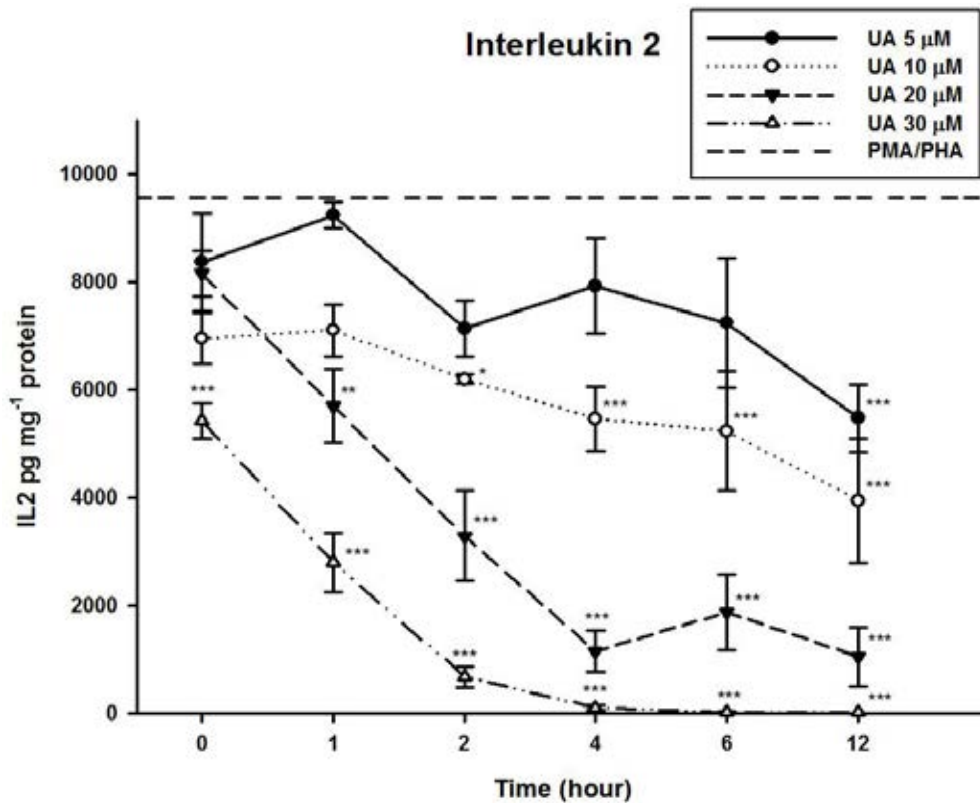
\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ),

4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell จากกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ภาคผนวก ก)

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 30  $\mu$ M (ระดับต่ำกว่า  $IC_{50}$ ) เป็นเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วยตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml ร่วมกับ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu$ g/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยกลุ่มควบคุม (control) จะใช้ DMSO < 0.1 % และทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ด้วยวิธี ELISA โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มที่กระตุ้นด้วย PMA/PHA อย่างเดียว (Positive control) พบว่ากรดเออร์โซลิกจะยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของเซลล์ Jurkat เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ตามระดับความเข้มข้นของกรดเออร์โซลิกและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (Positive control) ดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 กล่าวคือ

เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 5  $\mu$ M จะลดระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ( $p < 0.001$ ) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10  $\mu$ M จะลดปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลาดั้งแต่ 2 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) เป็นต้นไป ขณะที่กรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M จะลดระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 อย่างมีนัยสำคัญ เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ชั่วโมง ( $p < 0.01$ ) และที่ระดับความเข้มข้น 30  $\mu$ M จะลดปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 0 ชั่วโมง ( $p < 0.001$ ) และที่เวลา 12 ชั่วโมงนั้นระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 น้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธี ELISA ขณะที่ตัวกระตุ้น PMA/PHA สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ได้เท่ากับ  $9,551.48 \pm 935.90$  pg/mg protein ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยจะแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิก เมื่อถูกกระตุ้นจากตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 3 ในภาคผนวก ก





ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกัน โดยตรวจสอบด้วยวิธี ELISA (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย IL-2 = ไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2

UA = Ursolic acid (กรดเออร์โซลิก) ที่ระดับความเข้มข้นไมโครโมลาร์ ( $\mu\text{M}$ )

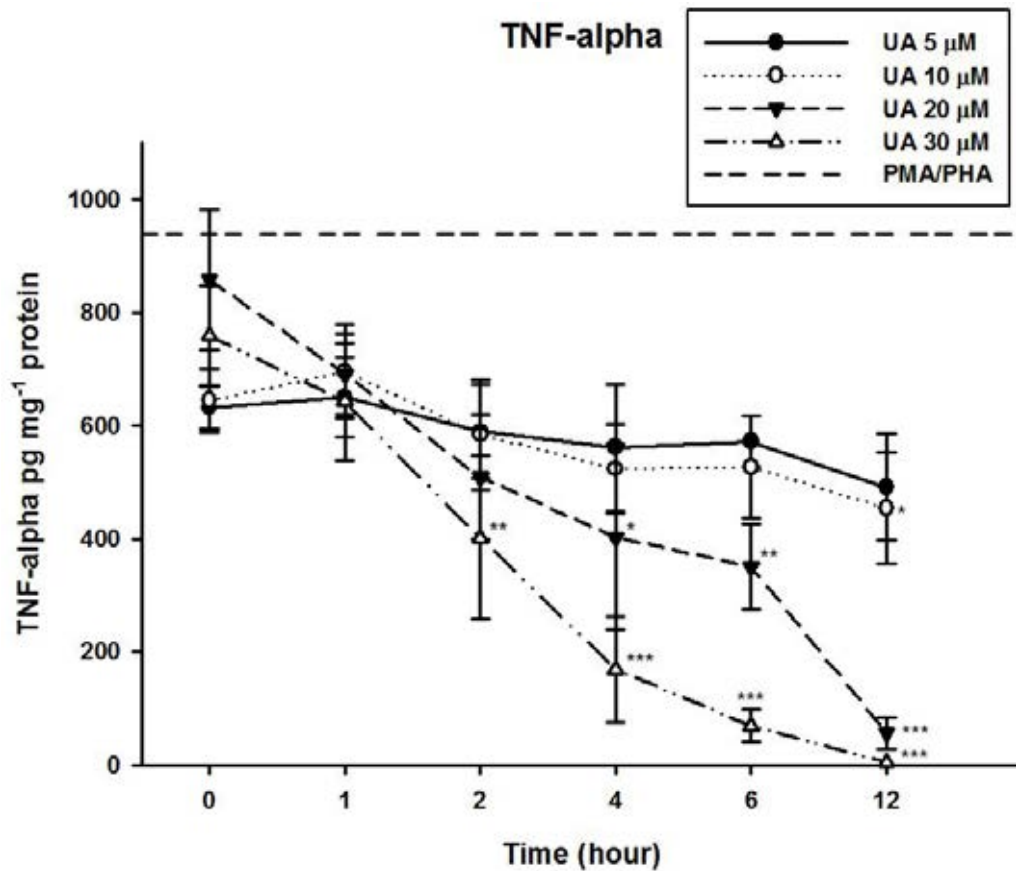
PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น

\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA อย่างเดียว จะทำให้มีปริมาณของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  เท่ากับ  $938.04 \pm 85.03$  pg/mg protein ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (Positive control) จากผลของกรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 10  $\mu$ M จะลดระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M จะลดปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  อย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่เวลา 4 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) ขึ้นไป ขณะที่กรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 30  $\mu$ M จะลดปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 2 ชั่วโมง ( $p < 0.01$ ) และที่เวลา 12 ชั่วโมงนั้น ปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  น้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธี ELISA โดยจะแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิก เมื่อถูกกระตุ้นจากตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 4 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกัน โดยตรวจสอบด้วยวิธี ELISA (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย TNF-alpha = ไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )  
 UA = Ursolic acid (กรดเออร์โซลิก) ที่ระดับความเข้มข้นไมโครโมลาร์ ( $\mu\text{M}$ )  
 PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
 Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น

\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

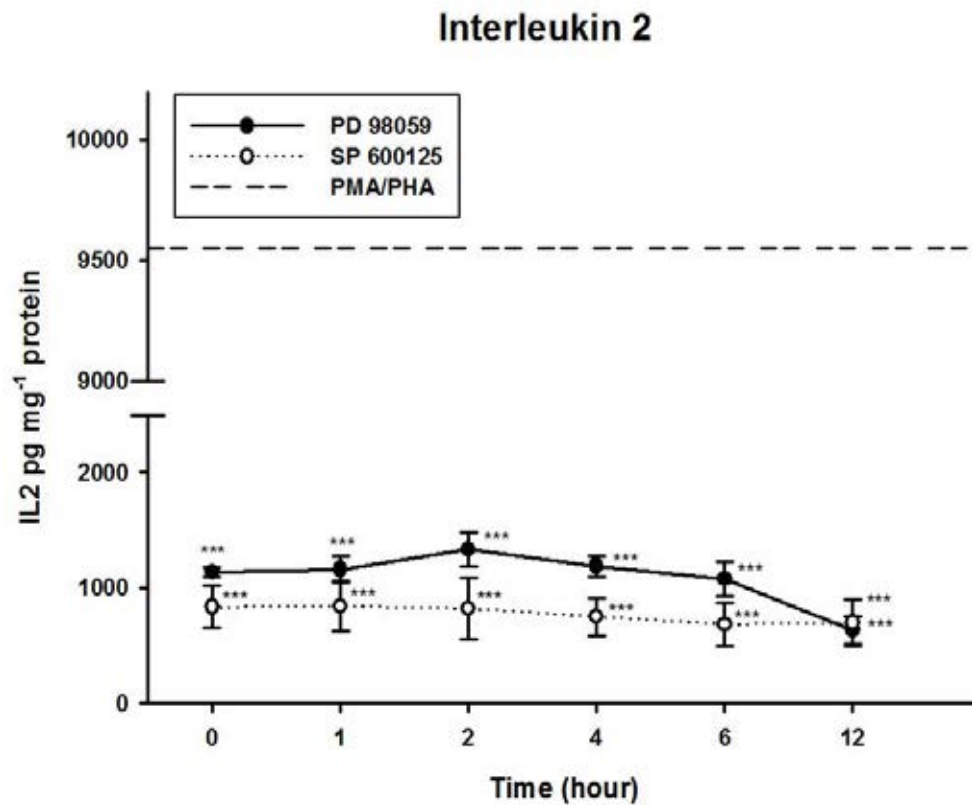
\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ คือ Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของ Jurkat cell จากตัวยับยั้งของวิถี MAPKs คือ สารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และสารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 และ 6 ภาคผนวก ก)

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml ร่วมกับ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu$ g/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยกลุ่มควบคุม (control) จะใช้ DMSO < 0.1 % และทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ด้วยวิธี ELISA โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มที่กระตุ้นด้วย PMA/PHA อย่างเดียว (Positive control) พบว่า ทั้งสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ทันทันโดยไม่ต้องใส่สาร PD98059 และ SP600125 ไว้ก่อนใส่ตัวกระตุ้น เพราะที่เวลา 0 ชั่วโมงนั้น จะทำการเติมสารละลายยับยั้งของวิถี MAPKs พร้อมกับใส่ตัวกระตุ้น PMA/PHA ต่ออีก 12 ชั่วโมง พบว่าระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  นั้นจะลดลงทันที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใส่ตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control) ดังภาพที่ 4.5 และ 4.6 กล่าวคือ

เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 ความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง จะมีระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ลดลงทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Positive control) ซึ่งกลุ่มควบคุมนั้นจะใช้ตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว และสามารถวัดระดับปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เท่ากับ  $9,551.48 \pm 935.90$  pg/mg protein โดยจะแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-2 ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 เมื่อถูกกระตุ้นจากตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังตารางที่ 5 ในภาคผนวก ก

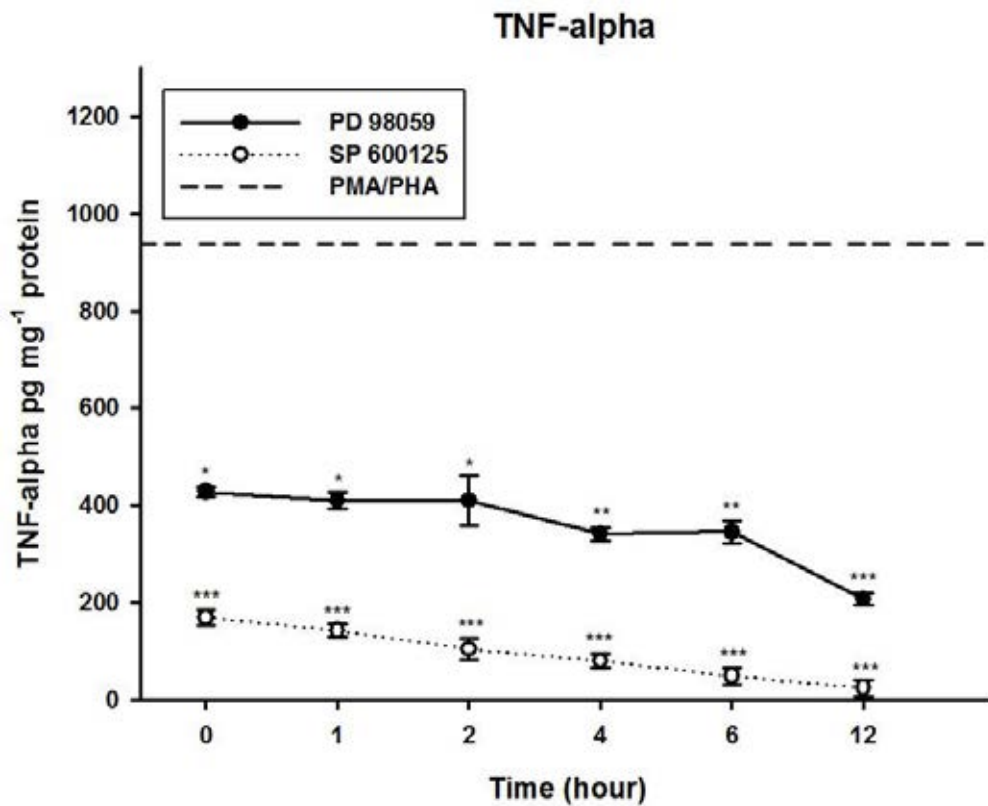


ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และสารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี ELISA (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย IL-2 = ไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2  
 PD98059 = สารละลาย ERK inhibitor ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M  
 SP600125 = สารละลาย JNK inhibitor ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M  
 PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
 Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น  
 \*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย PD98059 ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  จะยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ได้ทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Positive control) โดยที่สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ตั้งแต่เวลา 0 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) เป็นต้นไป

ส่วนสารละลาย SP600125 ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  นั้นสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง ได้ทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Positive control) และกลุ่มควบคุมที่ได้ตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control) นั้นสามารถวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  เท่ากับ  $938.04 \pm 85.03$  pg/mg protein ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยจะแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 เมื่อถูกกระตุ้นจากตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ดังตารางที่ 6 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และสารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี ELISA (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย TNF-alpha = ไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )  
 PD98059 = สารละลาย ERK inhibitor ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M  
 SP600125 = สารละลาย JNK inhibitor ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M  
 PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
 Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น

\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

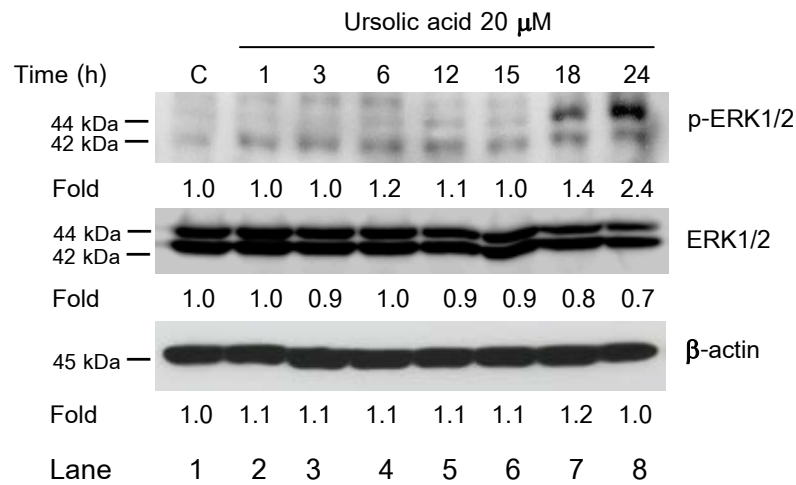
\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

6. การทดสอบฤทธิ์ของกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ต่อการการแสดงออกของระดับโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway คือ Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Western blot

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น  $20\mu\text{M}$  (ระดับต่ำกว่า  $\text{IC}_{50}$ ) เป็นระยะเวลา 1, 3, 6, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุม (control) เป็น DMSO  $< 0.1\%$  และทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนของ p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK และ JNK ด้วยวิธี Western blot โดยที่ตำแหน่งของโปรตีนชนิด ERK1/2 อยู่ที่ 42 และ 44 kDa และโปรตีน JNK อยู่ที่ตำแหน่ง 46 และ 54 kDa ทำการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) จากความหนาของ band โปรตีน และใช้ band ของโปรตีนชนิด  $\beta$ -actin มา Normalized โดยใช้ค่าของกลุ่มควบคุม (DMSO  $< 0.1\%$ ) มาเทียบให้เป็น 1 พบว่า กรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น  $20\mu\text{M}$  นั้นจะค่อยๆ ชักนำไปเกิดการ phosphorylation ของโปรตีน ERK1/2 ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยที่จะเพิ่มสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) แล้ว พบว่าสอดคล้องกัน โดยตำแหน่งของโปรตีน p-ERK1/2 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงจะมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 2.4 เท่า เมื่อเทียบกับ p-ERK1/2 ใน control cells ขณะที่การแสดงออกของโปรตีน ERK1/2 นั้น พบว่า band ที่พบจะลดระดับลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของโปรตีน ERK1/2 ลดลงต่ำสุด ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) เท่ากับ 0.7 อาจเป็นไปได้ที่ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น กรดเออร์โซลิกสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน ERK1/2 ให้เปลี่ยนเป็น p-ERK1/2 มากยิ่งขึ้น ดังภาพที่ 4.7

ส่วนการแสดงออกของระดับโปรตีนชนิด JNK พบว่า ค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ของกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น  $20\mu\text{M}$  นั้นจะชักนำไปเกิดการเพิ่มการแสดงออกของ phosphorylation ของโปรตีน JNK โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงจะมีค่ามากที่สุด เท่ากับ 1.2 เท่า ส่วนการแสดงออกของโปรตีน JNK นั้นพบว่าจะลดระดับลงเรื่อยๆ เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิกที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยจะมีค่าสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมง (Fold = 1.4) และหลังจากนั้นจะลดระดับลงมาเรื่อยๆ จนต่ำที่สุดที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง กล่าวคือ มีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) เท่ากับ 0.5 ดังภาพที่ 4.8





ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 และ ERK1/2 ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย p - ERK1/2 = Phosphorylation ของ Extracellular signal-regulated protein Kinase 1/2

ERK1/2 = Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2

C = Control (DMSO < 0.1 %)

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO < 0.1% เป็นกลุ่มควบคุม

Lane ที่ 2 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane ที่ 3 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

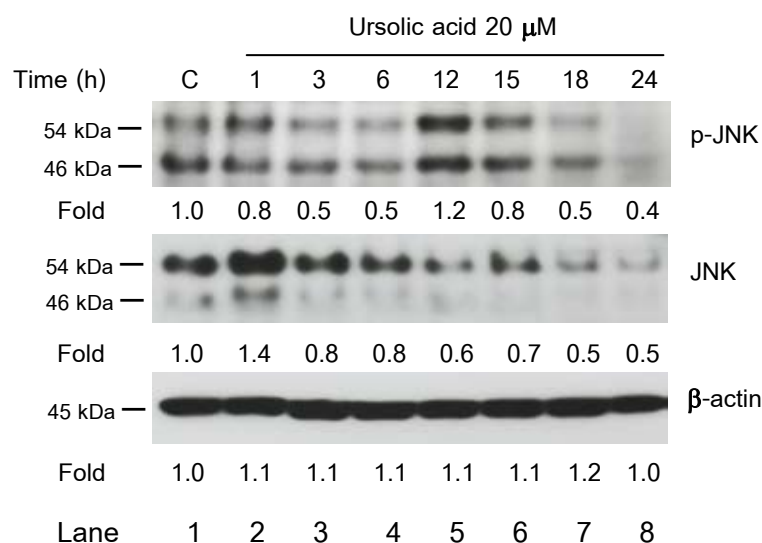
Lane ที่ 4 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Lane ที่ 5 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 6 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

Lane ที่ 7 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

Lane ที่ 8 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-JNK และ JNK ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย p – JNK = Phosphorylation ของ c-Jun N-terminal kinase  
 JNK = c-Jun N-terminal kinase  
 C = Control (DMSO < 0.1 %)

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO < 0.1% เป็นกลุ่มควบคุม

Lane ที่ 2 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane ที่ 3 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Lane ที่ 4 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Lane ที่ 5 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 6 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

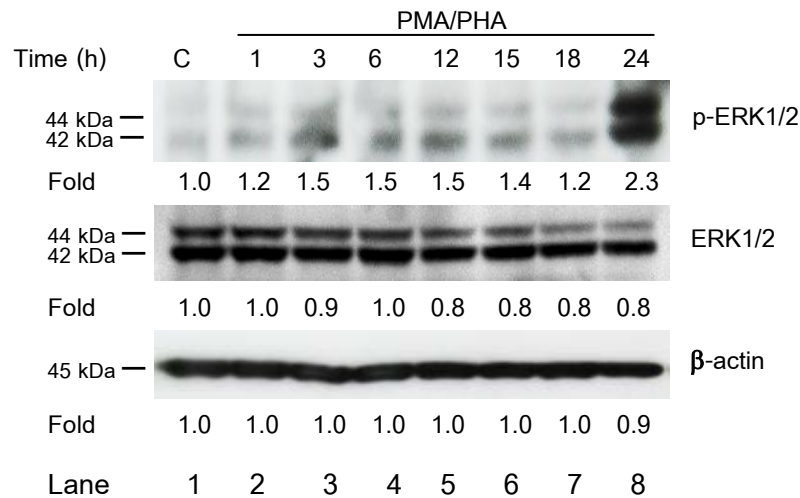
Lane ที่ 7 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

Lane ที่ 8 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. การทดสอบฤทธิ์ของตัวกระตุ้น PMA/PHA ต่อการการแสดงออกของระดับโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway คือ Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ของ Jurkat cell ด้วยวิธี Western blot

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml ร่วมกับ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu$ g/ml เป็นระยะเวลา 1, 3, 6, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุม (control) เป็น DMSO < 0.1 % และทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนของ p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK และ JNK ด้วยวิธี Western blot โดยทำการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) จากความหนาของ band โปรตีน และใช้ band ของโปรตีนชนิด  $\beta$ -actin มา Normalized โดยใช้ค่าของกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1%) มาเทียบให้เป็น 1 พบว่า ตัวกระตุ้น PMA/PHA นั้นจะชักนำให้เกิดการ phosphorylation ของโปรตีน ERK1/2 โดยที่เพิ่มสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ของโปรตีน p-ERK1/2 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงจะมีค่าสูงสุด เท่ากับ 2.3 เท่า เมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ ขณะที่การแสดงออกของโปรตีน ERK1/2 นั้น พบว่าในแต่ละช่วงเวลาไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมาก ดังภาพที่ 4.9

การแสดงออกของระดับโปรตีนชนิด JNK พบว่า ค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ของตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml ร่วมกับ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu$ g/ml นั้นจะชักนำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ phosphorylation ของโปรตีน JNK ในช่วงระยะเวลาแรกๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมงจะมีค่ามากที่สุด เท่ากับ 1.3 และหลังจากนั้นจะลดระดับลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งจะต่ำที่สุดที่ระยะเวลา 15 ชั่วโมง (fold = 0.3) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มเวลามากขึ้นต่อไป จะพบว่าการแสดงออกของโปรตีน p-JNK นั้นจะค่อยๆเพิ่มขึ้นอีก นอกจากนี้ยังพบว่าตัวกระตุ้น PMA/PHA นั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของโปรตีน JNK เพราะในแต่ละช่วงเวลาที่ทดสอบ พบว่าค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ของโปรตีน JNK ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมาก ดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 และ ERK1/2 ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้งจากเซลล์ 3 ชุด)

โดย p - ERK1/2 = Phosphorylation ของ Extracellular signal-regulated protein Kinase 1/2

ERK1/2 = Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2

C = Control (DMSO < 0.1 %)

PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO < 0.1% เป็นกลุ่มควบคุม

Lane ที่ 2 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Lane ที่ 3 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

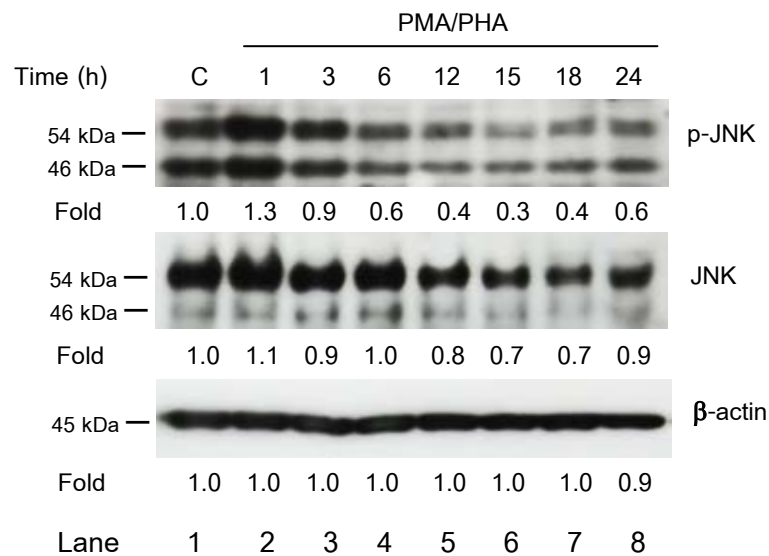
Lane ที่ 4 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Lane ที่ 5 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 6 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

Lane ที่ 7 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

Lane ที่ 8 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-JNK และ JNK ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

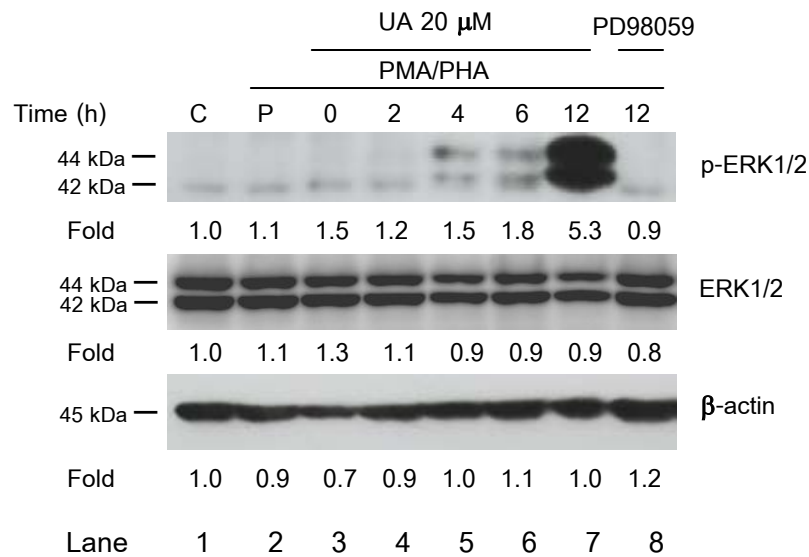
โดย p – JNK = Phosphorylation ของ c-Jun N-terminal kinase  
 JNK = c-Jun N-terminal kinase  
 C = Control (DMSO < 0.1 %)  
 PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
 Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO < 0.1% เป็นกลุ่มควบคุม  
 Lane ที่ 2 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง  
 Lane ที่ 3 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง  
 Lane ที่ 4 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 6 ชั่วโมง  
 Lane ที่ 5 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง  
 Lane ที่ 6 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 15 ชั่วโมง  
 Lane ที่ 7 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง  
 Lane ที่ 8 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8. การทดสอบการแสดงออกของระดับโปรตีนใน Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway คือ Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ของ Jurkat cell เมื่อถูกทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) และ PMA/PHA ด้วยวิธี Western blot

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  (ระดับต่ำกว่า  $\text{IC}_{50}$ ) เป็นเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง และสารละลาย PD98059 ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PMA ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 ng/ml ร่วมกับ PHA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยกลุ่มควบคุม (control) จะใช้ DMSO < 0.1 % และมีกลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย PMA/PHA อย่างเดียว (Positive control) ทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนของ p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK และ JNK ด้วยวิธี Western blot โดยที่ตำแหน่งของโปรตีนชนิด ERK1/2 อยู่ที่ 42 และ 44 kDa และโปรตีน JNK อยู่ที่ตำแหน่ง 46 และ 54 kDa ทำการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) จากความหนาของ band โปรตีน และใช้ band ของโปรตีนชนิด  $\beta$ -actin มา Normalized โดยใช้ค่าของกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1%) มาเทียบให้เป็น 1 พบว่า เมื่อทดสอบเซลล์ Jurkat ด้วยกรดเออร์โซลิก ระดับความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ที่เวลา 12 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA อีก 12 ชั่วโมง จะเกิดการ phosphorylation ของโปรตีน ERK1/2 เพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเทียบกับเวลาอื่นๆ กล่าวคือ จะพบการแสดงออกของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 เพิ่มขึ้น ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) ที่ตำแหน่งของโปรตีน p-ERK1/2 ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เท่ากับ 5.3 ส่วนเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย PD98059 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าจะยับยั้งการแสดงออกของ p-ERK1/2 ได้อย่างชัดเจน และค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) นั้น พบว่าได้ค่าเท่ากับ 0.9 ซึ่งใกล้เคียงกลุ่มควบคุม (control) ขณะที่การแสดงออกของโปรตีน ERK1/2 นั้น พบว่าในแต่ละช่วงเวลาไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมาก ดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-ERK1/2 และ ERK1/2 ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย UA = Ursolic acid (กรดเออร์โซลิก) ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M

C = Control (DMSO < 0.1 %)

PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น

PD98059 = สารละลาย PD98059 ความเข้มข้น 20  $\mu$ M

p - ERK1/2 = Phosphorylation ของ Extracellular signal-regulated  
protein Kinase 1/2

ERK1/2 = Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO < 0.1% เป็นกลุ่มควบคุม

Lane ที่ 2 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว(Positive control)

Lane ที่ 3 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu$ M เป็นเวลา 0 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 4 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu$ M เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 5 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu$ M เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

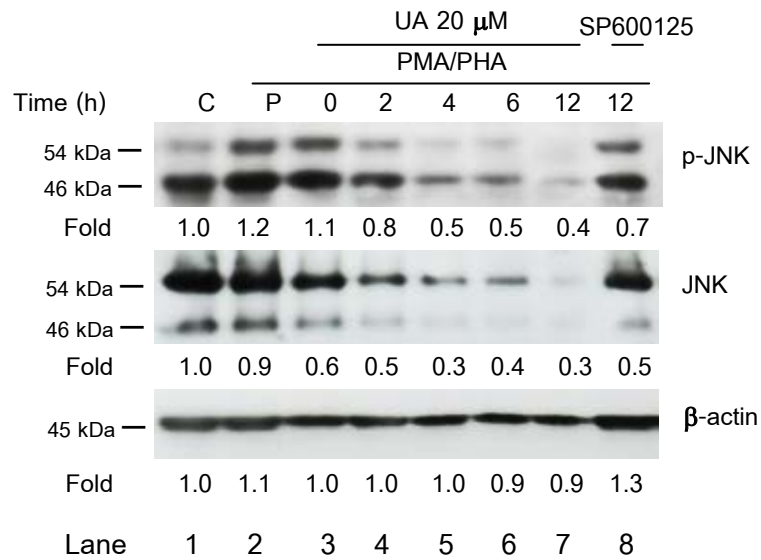
Lane ที่ 6 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu$ M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 7 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu$ M เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 8 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย PD98059 20  $\mu$ M เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ส่วนการแสดงผลของระดับโปรตีนชนิด JNK พบว่า เมื่อทดสอบเซลล์ด้วยกรดเออร์โซลิก ความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการแสดงผลของ phosphorylation ของโปรตีน JNK เมื่อมีระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงก่อน แล้วกระตุ้นต่อด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงผลของโปรตีน p-JNK ได้มากที่สุด โดยมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) เท่ากับ 0.4 ส่วนเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย SP600125 ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าจะยับยั้งการแสดงผลของ p-JNK ได้ไม่ดีมากนั้น ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) เท่ากับ 0.7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ขณะที่การแสดงผลของโปรตีน JNK นั้น พบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถลดระดับการแสดงผลของโปรตีนชนิด JNK ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยที่ จะยับยั้งการแสดงผลของโปรตีน JNK ได้สูงสุดที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงเช่นกัน และมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) เท่ากับ 0.3 ขณะที่สารละลาย SP600125 นั้นยังสามารถลดการแสดงผลของโปรตีน JNK ได้เช่นกัน โดยมีค่าความสัมพันธ์ที่แสดงเป็นจำนวนเท่า (fold) เท่ากับ 0.5 อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบ อาจเป็นไปได้ว่า ที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการแสดงผลของโปรตีน JNK เป็นผลให้การแสดงผลของโปรตีน p-JNK นั้นไม่เกิดขึ้น ดังภาพที่ 4.12





ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีนชนิด p-JNK และ JNK ในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก (Ursolic acid) ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และกระตุ้นด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด)

โดย UA = Ursolic acid (กรดเออร์โซลิก) ที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M  
 C = Control (DMSO < 0.1 %)  
 PMA/PHA = Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) และ  
 Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นตัวกระตุ้น  
 SP600125 = สารละลาย SP600125 ความเข้มข้น 20  $\mu$ M  
 p – JNK = Phosphorylation ของ c-Jun N-terminal kinase  
 JNK = c-Jun N-terminal kinase

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO < 0.1% เป็นกลุ่มควบคุม  
 Lane ที่ 2 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว(Positive control)  
 Lane ที่ 3 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu$ M เป็นเวลา 0 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 4 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อ  
ด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 5 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อ  
ด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 6 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และกระตุ้นต่อ  
ด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 7 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยกรดเออร์โซลิก 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกระตุ้น  
ต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Lane ที่ 8 = เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย SP600125 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ  
กระตุ้นต่อด้วย PMA/PHA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) เป็นโรคมะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด ทำให้มีการผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาวมากขึ้นเกินความต้องการของร่างกาย ทั้งนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่สร้างได้นั้น จะมีคุณสมบัติและการทำงานที่ผิดปกติไปจากเดิมอีกด้วย ส่วนในแง่ของการรักษานั้นขึ้นอยู่กับชนิดของโรค ส่วนใหญ่จะใช้เป็นยาเคมีบำบัด (chemotherapy) และมักจะเกิดผลข้างเคียงของยา ซึ่งในปัจจุบันนี้ ได้มีทางเลือกใหม่ของการรักษาที่จะช่วยลดผลข้างเคียงของยาที่ใช้ให้น้อยลง โดยมีการค้นหาสารชนิดต่างๆ เช่น สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ร่วมกับกับยาเคมีบำบัด ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียงและบรรเทาอาการของโรคได้ โดยที่มีการศึกษาพบว่า สารป้องกันมะเร็ง (chemopreventive agent) ชนิดต่างๆ สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ในเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด กรดเออร์โซลิกเป็นสารประกอบจำพวก Pentacyclic triterpenoid carboxylic acid เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีฤทธิ์เป็นสารป้องกันมะเร็ง (chemopreventive agent) ได้อีกชนิดหนึ่งด้วย [14] โดยที่เป็นสารที่ได้รับ ความสนใจและมีผู้ทำการศึกษากันเป็นจำนวนมาก เนื่องจากกรดเออร์โซลิกนั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติได้หลากหลาย [16]

จากผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat จากกรดเออร์โซลิก ด้วยวิธี XTT assay นั้นพบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ Jurkat ตามระดับความเข้มข้นที่มากขึ้น ดังภาพที่ 4.1 เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม ซึ่งไม่ได้รับสารใดๆ ดังนั้น กรดเออร์โซลิกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งผลการทดสอบนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยหลายๆ แห่ง ที่กล่าวว่า กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการแบ่งตัว และสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด, เซลล์มะเร็งเต้านม, เซลล์มะเร็งผิวหนัง, เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก, เซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น [18, 23, 25, 26, 28, 32] และนอกจากนี้ มีการรายงานว่าการเออร์โซลิกและยาเคมีบำบัด (chemotherapeutic agents) คือ ยาธาซอล (Taxol)

และยาซิสแพลทิน (Cisplatin) นั้น มีฤทธิ์เสริมกันทำให้สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้ โดยที่จะไปยับยั้งการทำงานของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์มะเร็ง [99]

ผลการศึกษากิจกรรมของกรดเออร์โซลิกต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat ด้วยวิธี ELISA พบว่า กรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า กรดเออร์โซลิก อย่างเดียวนั้น ไม่สามารถชักนำให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2, IL-4, IL-6 และ IFN- $\gamma$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู (murine splenic lymphocytes) ได้ [100] แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีการรายงานที่พบว่า กรดเออร์โซลิกที่เกาะกลุ่มกันสามารถจับกับตัวรับ CD36 ของผนังเซลล์ ทำให้กระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 $\beta$  ของเซลล์ RAW264.7 macrophage ในหนู ผ่านวิถีของ ERK และ p38 MAPK ได้ และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ caspase-1 ได้ อีกด้วย [69] เนื่องจากไซโตไคน์ชนิด IL-2 นั้น สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ได้ สามารถยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆในเซลล์หลายชนิด โดยที่ไซโตไคน์ชนิด IL-2 นั้น ยังควบคุมหน้าที่การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ได้อีกด้วย ขณะที่ไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  จัดเป็น pro-inflammatory cytokine ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น กระตุ้นเซลล์ macrophage และเซลล์ชนิดอื่นๆ อีกด้วย [60] ดังนั้น จากการที่กรดเออร์โซลิกไม่มีผลต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ Jurkat อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เช่นกัน การศึกษาในครั้งนี้พบว่ากรดเออร์โซลิกยังมีผลยับยั้งการหลั่ง IL-2 และ TNF- $\alpha$  ที่เกิดจากการกระตุ้นของ PMA/PHA ได้อีกด้วย โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ตัวกระตุ้น PMA สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ในเซลล์ T-Lymphocyte ได้ [53] และการทดสอบในครั้งนี้พบว่าตัวกระตุ้น PMA/PHA (positive control) สามารถชักนำให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 12 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1 %) ดังภาพที่ 4.2 นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆที่สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ได้อีก เช่น Concanavalin A และ anti-CD3/anti-CD28 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) สามารถกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2, IL-4, IL-6 และ IFN- $\gamma$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ได้เช่นกัน [100]

จากผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ Jurkat จากกรดเออร์โซลิก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA พบว่า กรดเออร์โซลิกจะยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ

TNF- $\alpha$  ของเซลล์ Jurkat เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ตามระดับความเข้มข้นของกรดเออร์โซลิคและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control) ดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 โดยที่ผลการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์จากกรดเออร์โซลิคนั้น ต้องใช้เวลาในการทดสอบกรดเออร์โซลิคกับเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นด้วย PMA/PHA จึงสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดเออร์โซลิคที่น้อยลงในระยะเวลาเท่ากัน การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์มีประสิทธิภาพน้อยลงเช่นกัน ดังนั้น การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์จากกรดเออร์โซลิคต้องใช้ระดับความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม จึงจะสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่มีการรายงานพบว่ากรดเออร์โซลิคนั้นสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ในเซลล์ได้หลายชนิด โดยพบว่าสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2, IL-4, IL-6 และ IFN- $\gamma$  ในเซลล์ splenic lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย Concanavalin A (Con A) หรือ anti-CD3/CD28 mAb และยังพบว่ากรดเออร์โซลิคสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  และ IL-6 ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นจาก LPS (lipopolysaccharides) ได้อีกด้วย [100] นอกจากนี้กรดเออร์โซลิคยังสามารถมีฤทธิ์ด้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งได้ โดยจะไปยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-6 ในหนู C57BL6 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) [17] นอกจากนี้กรดเออร์โซลิคสามารถเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive agent) ได้ด้วย ทำให้ไปยับยั้งการแบ่งตัวและการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cells โดยการไปกดกลไกการทำงานของ NF- $\kappa$ B ทำให้ไปยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ใน T-cells ของหนู ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/ionomycin [101]

ส่วนผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ จากตัวยับยั้งของวิถี MAPKs คือ สารละลาย PD98059 และสารละลาย SP600125 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ด้วยวิธี ELISA นั้น พบว่า ตัวยับยั้งของวิถี MAPKs ทั้งสองชนิดนี้ สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ได้ทันทีโดยไม่ขึ้นกับระยะเวลาที่ทดสอบ กล่าวคือ สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่ตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (positive control) ตั้งแต่ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง คือการทดสอบสารทั้งสองชนิดพร้อมกับตัวกระตุ้น PMA/PHA ดังภาพที่ 4.5 และ 4.6 เนื่องจากวิถี MAPKs นั้นเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) และไซโตไคน์อีกหลายชนิด รวมไปถึง IL-2 และ TNF- $\alpha$  ด้วย ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน [75] นอกจากนี้

วิธีของ ERK นั้นจะควบคุมการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ได้ โดยที่มีการใช้การกลายพันธุ์ของ ERK ทำให้ไม่มี ERK ในเซลล์ (dominant negative mutation ของ ERK) โดยนำเข้าไปในเซลล์ Jurkat (infected cells) ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง IL-2 ได้ [78] ส่วนสารละลาย SP600125 นั้นสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-10, IFN- $\gamma$  และ TNF- $\alpha$  ได้ ใน Th1 และ Th2 cells จาก PBMCs (human peripheral blood mononuclear cells) [102] จากการทดลองที่พบว่าการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของตัวยับยั้งของวิธี MAPKs นั้น ไม่ขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ แต่ขณะที่กรดเออร์โซลิกนั้นจะต้องใช้เวลาในการทดสอบสักระยะเวลาที่จะกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PMA/PHA จึงจะสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ได้ อย่างไรก็ตามทั้งกรดเออร์โซลิกและตัวยับยั้งวิธีของ MAPKs สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ Jurkat เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ได้เช่นกัน ดังนั้น การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของกรดเออร์โซลิกนั้น อาจจะเกี่ยวข้องกับวิธีของ MAPKs เป็นได้

จากผลการทดสอบที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารละลาย PD98059 และ SP600125 สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ จึงได้มีการศึกษาต่อว่า กรดเออร์โซลิกที่สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  จากการกระตุ้นของ PMA/PHA จะมีส่วนยับยั้งในการ phosphorylation ของ ERK และ JNK ด้วยหรือไม่ จากการทดสอบกรดเออร์โซลิกและตัวกระตุ้น PMA/PHA แยกกันแต่ละครั้งและทดสอบสารทั้งสองชนิดร่วมกันพบว่า สารทั้งสองสามารถกระตุ้นการ phosphorylate โปรตีน ERK1/2 ได้ในช่วงเวลา 18 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของกรดเออร์โซลิกที่เกิดจากการกระตุ้นของ PMA/PHA ไม่ได้ผ่านการยับยั้งการ phosphorylate โปรตีน ERK1/2 เหมือนกับสารละลาย PD98059 และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าการ phosphorylation ของโปรตีน JNK ในช่วงเวลาที่ต่างกันอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ T-cell เปลี่ยนขบวนการจาก proliferation เป็น apoptosis [103] เมื่อทำการทดสอบในครั้งนี้พบว่า PMA/PHA จะกระตุ้นให้เซลล์สร้างไซโตไคน์ออกมาอย่างมีนัยสำคัญในเวลาดังแต่ 12 ชั่วโมงขึ้นไป และช่วยในการ phosphorylate โปรตีน JNK ในช่วง 1 ชั่วโมงแรก ต่อจากนั้นระดับของ phosphorylate โปรตีน JNK จะลดลง ซึ่งเวลาที่เกิดการ phosphorylation จะสั้นกว่าการกระตุ้นด้วยกรดเออร์โซลิก ซึ่งจะใช้เวลา 12 ชั่วโมงในการกระตุ้นการ phosphorylation โปรตีน JNK ภายในเซลล์และปริมาณของ phosphorylate โปรตีน JNK จะลดลงตามลำดับ โดยมีปริมาณน้อยที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากการรายงานพบว่า PMA สามารถกระตุ้น Protein kinase C (PKC) ได้โดยตรง และทำให้เกิดการ phosphorylation ของโปรตีน JNK โดยที่ phosphorylate โปรตีน JNK จะกระตุ้น transcription factor c-Jun ในนิวเคลียส ให้เกิดการ phosphorylation และกระตุ้นการทำงานของ AP-1 ซึ่งเป็น transcription factor เป็นผลให้มีการแสดงออกของยีนชนิด IL-2 เพิ่มขึ้น [53, 83, 104] และพบว่าในเซลล์ fibroblasts ที่ขาดการแสดงออกของโปรตีน JNK (*Jnk-null*) ทุกๆ isoform จะทำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน Jun และการทำงานของ AP-1 ผิดปกติไปด้วย [105] และในการศึกษาครั้งนี้การ Co-incubation ระหว่างกรดเออร์โซลิกและ PMA/PHA นั้น จะยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเซลล์ถูกบ่มด้วยกรดเออร์โซลิกก่อน 12 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย PMA/PHA ต่ออีก 12 ชั่วโมง โดยที่กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งฤทธิ์ของ PMA/PHA ในการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ได้ ขณะที่การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์จะไม่มีประสิทธิภาพเมื่อมีการ co-incubation ของกรดเออร์โซลิกกับ PMA/PHA พร้อมกัน อาจมีผลเนื่องมาจากการ phosphorylation โปรตีน JNK ในช่วงเวลาที่ต่างกันของกรดเออร์โซลิกและ PMA/PHA แต่อย่างไรก็ตามการ phosphorylation ของ JNK ในช่วงเวลาที่ต่างกันจากการกระตุ้นของกรดเออร์โซลิกและ PMA/PHA อาจไม่ใช่เหตุผลเดียวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการหลั่งไซโตไคน์ เนื่องจากการ pre-incubation ของกรดเออร์โซลิกกับเซลล์ก่อน ทำให้ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน JNK ลดลงจำนวนหนึ่ง ถึงแม้ว่า PMA/PHA จะกระตุ้นการ phosphorylation ของ JNK ก็อาจจะมีระดับไม่เพียงพอในการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ได้ ส่วนการลดลงในการแสดงออกของโปรตีน JNK จากกรดเออร์โซลิก คาดว่าอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น JNK mRNA ไม่มีความเสถียรเมื่อมีกรดเออร์โซลิกอยู่ด้วย หรือการที่กรดเออร์โซลิกไปยับยั้ง Transcription factor บางตัวที่ทำให้ JNK mRNA สร้างได้น้อยลง เป็นต้น และเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีน JNK และการกระตุ้นการทำงานโดยการเกิด phosphorylation ของ JNK นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  [85, 106] จึงอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่กรดเออร์โซลิกสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  เพราะมีการแสดงออกของโปรตีน JNK และ p-JNK ลดลง

จากผลการทดสอบ จึงพบว่า กรดเออร์โซลิกมีผลต่อวิถีของ MAPKs แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ระยะเวลา และชนิดของเซลล์ โดยมีการรายงานพบว่า การเกาะกลุ่มกันของกรดเออร์โซลิกสามารถเพิ่มการแสดงออกของ phosphorylation ทั้ง ERK และ p-38 MAPK แต่ไม่มีผลกับการแสดงออกของ JNK ซึ่งชักนำให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 $\beta$  ในเซลล์ RAW264.7 macrophage [69] นอกจากนี้ยังพบว่า กรดเออร์โซลิกสามารถชักนำให้เกิด phosphorylation

ของ JNK แต่ไม่มีผลกับ p-ERK และ p-38 MAPK ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง K562, เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเพาะเลี้ยง DU145 และ LNCaP และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น [19, 26, 27, 34] นอกจากกรดเออร์โซลิคแล้วยังมีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ รวมไปถึง IL-2 ผ่านวิถีของ JNK อย่างเช่น มีการรายงานว่ามีสาร Compound C ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะกับ AMPK (AMP-activated protein kinase) สามารถยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ JNK และ p-38 MAPK แต่จะไปเพิ่มการเกิด phosphorylation ของ ERK จากการกระตุ้นของ PMA/ionomycin ขณะที่สาร Compound C นั้นจะไปยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ในเซลล์ Jurkat ผ่านการกระตุ้นของ NF-AT และ AP-1 ได้อีกด้วย [107] ส่วนสาร TAT-JIP peptide ซึ่งเป็นสารยับยั้งของ JNK (JNK inhibitor) สามารถยับยั้งการหลั่งสาร Lymphotoxin, IL-2, IFN- $\gamma$  และ IL-10 จากการกระตุ้นของ PMA/PHA ใน purified human T-cells โดยที่สาร TAT-JIP peptide จะไปลดการเกิด phosphorylation ของโปรตีน *Jun* เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการแบ่งตัวและการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ด้วย [108] ขณะที่พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน JNK จาก antisense oligonucleotides complementary เป็นผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และเกิดการอะพอพโทซิส (apoptosis) ในเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย โดยโปรตีน JNK มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานต่างๆภายในเซลล์ เช่น การเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation), การกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (tumorigenesis), การเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) และการควบคุมให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นต้น [109] ดังนั้น การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน JNK อาจจะเป็นผลดีในการใช้ในการรักษาพยาธิสภาพของโรคได้

จากการศึกษาในครั้งนี้นี้พบว่า กรดเออร์โซลิคสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์และเกิดการอักเสบของเซลล์ได้ ทั้งนี้การยับยั้งนั้นยังเกี่ยวข้องกับกลไกของวิถี MAPK โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิถี JNK เพราะกลไกการหลั่งไซโตไคน์ข้างต้นนั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน JNK การที่กรดเออร์โซลิคยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ที่ถูกกระตุ้นโดย PMA/PHA ผ่านวิถี JNK ใน Jurkat cells อาจเกิดขึ้นจากสองสาเหตุ คือ 1. กรดเออร์โซลิคมีช่วงเวลาการกระตุ้นการเกิด phosphorylation ของโปรตีน JNK ที่แตกต่างจากการกระตุ้นของ PMA/PHA และ/หรือ 2. กรดเออร์โซลิคสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน JNK ซึ่งส่งผลทำให้มีปริมาณโปรตีน JNK ที่ถูก phosphorylate ลดลง



หรือไม่เพียงพอต่อการกระตุ้น การหลั่งไซโตไคน์จึงไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น กรดเออร์โซลิคอาจเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาที่อาจจะใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดเพื่อช่วยลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและลดผลข้างเคียงของยาที่ใช้รักษาได้ ทำให้ลดพยาธิสภาพของโรคและยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันของโรคได้อีกด้วย

### ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลกระทบของกรดเออร์โซลิคต่อการหลั่งไซโตไคน์ผ่านวิถี MAPKs ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat พบว่า กรดเออร์โซลิคสามารถยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ได้ ตามความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อทดสอบโดยใช้กรดเออร์โซลิคเพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีผลต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ ส่วนการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ของกรดเออร์โซลิคนั้นเกี่ยวข้องกับวิถีของ JNK แต่ไม่เกี่ยวข้องกับวิถีของ ERK โดยที่กรดเออร์โซลิคสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน JNK และ p-JNK เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ได้ด้วย แต่จะไปเพิ่มการแสดงออกของ ERK phosphorylation ขณะที่การทำงานของ PKC จะถูกกระตุ้นจาก PMA สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง IL-2 transcription factor โดยผ่านวิถีของ JNK ดังนั้น การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน JNK เป็นผลให้ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน p-JNK เกิดขึ้น และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ได้ อย่างไรก็ตาม การที่กรดเออร์โซลิคยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PMA/PHA ในเซลล์ Jurkat ผ่านวิถีของ JNK นั้นอาจไม่ได้เกิดจาก JNK วิถีเดียวหรือโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง กรดเออร์โซลิคอาจยับยั้งส่วนอื่นๆบนเส้นทางของกลไกการส่งสัญญาณหรืออาจเกี่ยวข้องกับวิถีกลไกการส่งสัญญาณอื่นๆ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ Jurkat ได้เช่นกัน ดังนั้นสามารถนำความรู้ที่ได้ไปต่อยอดการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อจะได้ทราบกลไกการทำงานของกรดเออร์โซลิคในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ Jurkat ว่าเกิดจากวิถีกลไกใด เพื่อที่ว่าจะได้องค์ความรู้ใหม่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาและป้องกันพยาธิสภาพของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ต่อไปในอนาคต

## รายการอ้างอิง

- [1] Visvader, J.E. Cells of origin in cancer. Nature 469, 7330 (2011): 314-322.
- [2] Pardal, R., Clarke, M. F., and Morrison, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nature Reviews Cancer 3, 12 (2003): 895-902.
- [3] จิรายุ เอื้อวรากุล. มะเร็งเม็ดเลือดขาว การวินิจฉัยระดับเซลล์และโมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: อ.รุ่งเรืองการพิมพ์, 2552.
- [4] พรเทพ เทียนสิวกุล. โโลหิตวิทยาคลินิกขั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
- [5] Burchenal, J.H. The treatment of leukemia. Bull N Y Acad Med 30, 6 (1954): 429-447.
- [6] Thomas, E. D., and Epstein, R. B. Bone marrow transplantation in acute leukemia. Cancer Res 25, 9 (1965): 1521-1524.
- [7] King, D. Radiotherapy in the management of leukemia. Can Med Assoc J 96, 25 (1967): 1621-1625.
- [8] Passegue, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E., and Weissman, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci USA 100 Suppl 1 (2003): 11842-11849.
- [9] Pui, C. H., Robison, L. L., and Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 371, 9617 (2008): 1030-1043.
- [10] Lin, J., and Weiss, A. T cell receptor signalling. J Cell Sci 14, Pt 2 (2001): 243-244.
- [11] Abraham, R. T., and Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. Nat Rev Immunol 4, 4 (2004): 301-308.

- [12] Weiss, A., Wiskocil, R. L., and Stobo, J. D. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J Immunol 133, 1 (1984): 123-128.
- [13] Manger, B., Hardy, K. J., Weiss, A., and Stobo, J. D. Differential effect of cyclosporin A on activation signaling in human T cell lines. J Clin Invest 77, 5 (1986): 1501-1506.
- [14] Dorai, T., and Aggarwal, B. B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. Cancer Lett 215, 2 (2004): 129-140.
- [15] Sigma-Aldrich Co. Ursolic acid [Online]. 2011. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/u6753> [2011, March 4]
- [16] Ikeda, Y., Murakami, A., and Ohigashi, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. Mol Nutr Food Res 52, 1 (2008): 26-42.
- [17] Kanjoormana, M., and Kuttan, G. Antiangiogenic Activity of Ursolic Acid. Integrative Cancer Therapies 9, 2 (2010): 224-235.
- [18] Wu, B., et al. Apoptosis of jurkat cells induced by ursolic Acid and its mechanison. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 18, 1 (2010): 61-66.
- [19] Liu, X. S., and Jiang, J. Induction of apoptosis and regulation of the MAPK pathway by ursolic acid in human leukemia K562 cells. Planta Med 73, 11 (2007): 1192-1194.
- [20] Zhang, W., Li, Y., Zhang, G., Lu, J., and Ou, H. Experimental study on MCF-7 cell apoptosis induced by ursolic acid. Zhong Yao Cai 28, 4 (2005): 297-301.

- [21] Zhang, G. P., Lu, Y. Y., Lv, J. C., and Ou, H. J. Effect of ursolic acid on caspase-3 and PARP expression of human MCF-7 cells. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 31, 2 (2006): 141-144.
- [22] Kassi, E., et al. Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Invest 27, 7 (2009): 723-733.
- [23] Wang, J. S., Ren, T. N., and Xi, T. Ursolic acid induces apoptosis by suppressing the expression of FoxM1 in MCF-7 human breast cancer cells. Med Oncol 29, 1 (2010): 10-15.
- [24] Kim, K. H., Seo, H. S., Choi, H. S., Choi, I., Shin, Y. C., and Ko, S. G. Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. Arch Pharm Res 34, 8 (2011): 1363-1372.
- [25] Manu, K. A., and Kuttan, G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kappaB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. Int Immunopharmacol 8, 7 (2008): 974-981.
- [26] Zhang, Y. X., Kong, C. Z., Wang, H. Q., Wang, L. H., Xu, C. L., and Sun, Y. H. Phosphorylation of Bcl-2 and activation of caspase-3 via the c-Jun N-terminal kinase pathway in ursolic acid-induced DU145 cells apoptosis. Biochimie 91, 9 (2009): 1173-1179.
- [27] Zhang, Y.X., et al. Ursolic acid overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis in prostate cancer cells involving activation of JNK-induced Bcl-2 phosphorylation and degradation. J Cell Biochem 109, 4 (2010): 764-773.
- [28] Tang, C., et al. Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis. Anticancer Drugs 20, 4 (2009): 249-258.

- [29] Yen, G. C., Shyu, M. H., and Kao, T. C. Oleanolic Acid and Ursolic Acid Induce Apoptosis in HuH7 Human Hepatocellular Carcinoma Cells through a Mitochondrial-Dependent Pathway and Downregulation of XIAP. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 10 (2010): 6110-6118.
- [30] Yu, Y.X., et al. Ursolic acid induces human hepatoma cell line SMMC-7721 apoptosis via p53-dependent pathway. Chin Med J (Engl) 123, 14 (2010): 1915-1923.
- [31] Shan, J. Z., Xuan, Y. Y., Zheng, S., Dong, Q., and Zhang, S. Z. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. J Zhejiang Univ Sci B 10, 9 (2009): 668-674.
- [32] Limami, Y., et al. HT-29 colorectal cancer cells undergoing apoptosis overexpress COX-2 to delay ursolic acid-induced cell death. Biochimie 93, 4 (2011): 749-757.
- [33] Wang, X., Li, L., Wang, B., and Xiang, J. Effects of ursolic acid on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 29, 6 (2009): 761-764.
- [34] Prasad, S., Yadav, V. R., Kannappan, R., and Aggarwal, B. B. Ursolic acid, a pentacyclin triterpene, potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors: evidence for the role of reactive oxygen species and JNK. J Biol Chem 286, 7 (2010): 5546-5557.
- [35] Jilani, K., Abed, M., Zelenak, C., Lang, E., Qadri, S. M., and Lang, F. Triggering of erythrocyte cell membrane scrambling by ursolic acid. J Nat Prod 74, 10 (2011): 2181-2186.

- [36] Suh, N., et al. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. Cancer Res 58, 4 (1998): 717-723.
- [37] Subbaramaiah, K., Michaluart, P., Sporn, M. B., and Dannenberg, A. J. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. Cancer Res 60, 9 (2000): 2399-2404.
- [38] Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., and Aggarwal, B. B. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclinD1. Cancer Res 63, 15 (2003): 4375-4383.
- [39] Lu, J., et al. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF-kappaB pathway activation. Cereb Cortex 20, 11 (2010): 2540-2548.
- [40] You, H. J., Choi, C. Y., Kim, J. Y., Park, S. J., Hahm, K. S., and Jeong, H. G. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production via nuclear factor-kappaB activation in the resting macrophages. FEBS Lett 509, 2 (2001): 156-160.
- [41] Yokomichi, T., et al. Ursolic Acid Inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity and Prevents TNF- $\alpha$ -Induced Gene Expression by Blocking Amino Acid Transport and Cellular Protein Synthesis. Biomolecules 1, 1 (2012): 32-47.
- [42] Lu, J., et al. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I kappa B kinase beta/nuclear factor-kappa B-mediated inflammatory pathways in mice. Brain Behavior and Immunity 25, 8 (2011): 1658-1667.

- [43] Saravanan, R., Viswanathan, P., and Pugalendi, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. Life Sci 78, 7 (2006): 713-718.
- [44] Saravanan, R., and Pugalendi, V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. Pharmacol Rep 58, 1 (2006): 41-47.
- [45] Shih, Y. H., Chein, Y. C., Wang, J. Y., and Fu, Y. S. Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. Neurosci Lett 362, 2 (2004): 136-140.
- [46] Lu, J., Zheng, Y. L., Wu, D. M., Luo, L., Sun, D. X., and Shan, Q. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. Biochemical Pharmacology 74, 7 (2007): 1078-1090.
- [47] Ovesna, Z., Kozics, K., and Slamenova, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 600, 1-2 (2006): 131-137.
- [48] Yeh, C.T. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. Molecular Nutrition & Food Research 54, 9 (2010): 1285-1295.
- [49] Tovey, M. G., and Lallemand, C. Adjuvant activity of cytokines. Methods Mol Biol 626 (2010): 287-309.
- [50] Khalaf, H., Jass, J., and Olsson, P. E. Differential cytokine regulation by NF-kappaB and AP-1 in Jurkat T-cells. BMC Immunol 11, 26 (2010): 1-12.
- [51] Opal, S. M., and DePalo, V. A. Anti-inflammatory cytokines. Chest 117, 4 (2000): 1162-1172.

- [52] Altman, A., Isakov, N., and Baier, G. Protein kinase C $\theta$ : a new essential superstar on the T-cell stage. Immunol Today 21, 11 (2000): 567-573.
- [53] Isakov, N., and Altman, A. Protein kinase C (theta) in T cell activation. Annu Rev Immunol 20 (2002): 761-794.
- [54] Altman, A., and Villalba, M. Protein kinase C-theta (PKC theta): a key enzyme in T cell life and death. J Biochem 132, 6 (2002): 841-846.
- [55] Ebinu, J.O., et al. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. Blood 95, 10 (2000): 3199-3203.
- [56] Klaus D. Elgert. Cytokines, In Immunology Understanding The Immune System, pp.285-319, 2009.
- [57] Malek, T.R. The biology of interleukin-2. Annu Rev Immunol 26 (2008): 453-479.
- [58] Granucci, F., et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. Nature Immunology 2, 9 (2001): 882-888.
- [59] Jiang, S., Game, D. S., Davies, D., Lombardi, G., and Lechler, R. I. Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? Eur J Immunol 35, 4 (2005): 1193-1200.
- [60] O'Shea, J. J., Ma, A., and Lipsky, P. Cytokines and autoimmunity. Nature Reviews Immunology 2, 1 (2002): 37-45.
- [61] Bachmann, M. F., and Oxenius, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. EMBO Rep 8, 12 (2007): 1142-1148.
- [62] Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A., and Moldawer, L. L. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. Nat Rev Drug Discov 2, 9 (2003): 736-746.



- [63] Waterston, A., Bower, M. TNF and cancer: good or bad. Cancer Therapy 2 (2004): 131-148.
- [64] M. Liz-Graña, and J. J. Gómez-Reino. Tumour Necrosis Factor. Genetics, cell action mechanism and involvement in inflammation. Alergol Inmunol Clin 16 (2001): 140-149.
- [65] Monick, M. M., and Hunninghake, G. W. Activation of second messenger pathways in alveolar macrophages by endotoxin. Eur Respir J 20, 1 (2002): 210-222.
- [66] Meldrum, D.R. Tumor necrosis factor in the heart. Am J Physiol 274, 3 Pt 2 (1998): R577-595.
- [67] Peng, Y., Power, M. R., Li, B., and Lin, T. J. Inhibition of IKK down-regulates antigen + IgE-induced TNF production by mast cells: a role for the IKK-IkappaB-NF-kappaB pathway in IgE-dependent mast cell activation. J Leukoc Biol 77, 6 (2005): 975-983.
- [68] Jang, S.M., et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. Int Immunopharmacol 9, 1 (2009): 113-119.
- [69] Ikeda, Y., et al. Aggregated ursolic acid, a natural triterpenoid, induces IL-1beta release from murine peritoneal macrophages: role of CD36. J Immunol 178, 8 (2007): 4854-4864.
- [70] Geest, C. R., and Coffey, P. J. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. J Leukoc Biol 86, 2 (2009): 237-250.
- [71] Kim, E.K., and Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. Biochim Biophys Acta 1802, 4 (2010): 396-405.

- [72] Wada, T. and Penninger, J.M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 23, 16 (2004): 2838-2849.
- [73] Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol 20 (2002): 55-72.
- [74] Krzyzowska, M., Swiatek, W., Fijalkowska, B., Niemialtowski, M., and Scollenberger, A. The Role of Map Kinases in Immune Response. Postepy Biologii Komorki 36, 2 (2009): 295-308.
- [75] Plataniias, L.C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. Blood 101, 12 (2003): 4667-4679.
- [76] Chang, L. and Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410, 6824 (2001): 37-40.
- [77] Brook, M., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J. Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. FEBS Lett 483, 1 (2000): 57-61.
- [78] Li, Y. Q., Hii, C. S., Der, C. J., and Ferrante, A. Direct evidence that ERK regulates the production/secretion of interleukin-2 in PHA/PMA-stimulated T lymphocytes. Immunology 96, 4 (1999): 524-528.
- [79] Kuwabara, M., Asanuma, T., Niwa, K., and Inanami, O. Regulation of cell survival and death signals induced by oxidative stress. J Clin Biochem Nutr 43, 2 (2008): 51-57.
- [80] Dhanasekaran, D.N. and Reddy, E.P. JNK signaling in apoptosis. Oncogene 27, 48 (2008): 6245-6251.

- [81] Mebratu, Y. and Tesfaigzi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? Cell Cycle 8, 8 (2009): 1168-1175.
- [82] Cagnol, S. and Chambard, J.C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. FEBS J 277, 1 (2009): 2-21.
- [83] Karin, M. and Gallagher, E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. IUBMB Life 57, 4-5 (2005): 283-295.
- [84] Chen, F., Beezhold, K., and Castranova, V. JNK1, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. Biochim Biophys Acta 1796, 2 (2009): 242-251.
- [85] Wagner, E.F. and Nebreda, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat Rev Cancer 9, 8 (2009): 537-549.
- [86] Weiss, L., Whitmarsh, A. J., Yang, D. D., Rincon, M., Davis, R. J., and Flavell, R. A. Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation. J Exp Med 191, 1(2000): 139-146.
- [87] Wu, B., et al. Ursolic acid-induced apoptosis in K562 cells involving upregulation of PTEN gene expression and inactivation of the PI3K/Akt pathway. Arch Pharm Res 35, 3 (2012): 543-548.
- [88] Achiwa, Y., Hasegawa, K., and Udagawa, Y. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and the mitogen-activated protein kinase pathways by ursolic acid in human endometrial cancer cells. Biosci Biotechnol Biochem 71, 1 (2007): 31-37.
- [89] Zhang, T., He, Y. M., Wang, J. S., Shen, J., Xing, Y. Y., and Xi, T. Ursolic acid induces HL60 monocytic differentiation and upregulates C/EBPbeta expression by ERK pathway activation. Anticancer Drugs 22, 2 (2011): 158-165.

- [90] World Health Organization. Cell culture procedures [Online]. 2006. Available from: [http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter04/4\\_2\\_Cell\\_culture\\_procedures.htm](http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter04/4_2_Cell_culture_procedures.htm) [2006, July 10]
- [91] Scudiero, D.A., et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res 48, 17 (1988): 4827-4833.
- [92] Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., and Glasebrook, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods 142, 2 (1991): 257-265.
- [93] ATCC. XTT Cell Proliferation Assay Kit [Online]. 2011. Available from: <http://www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/KitsPanels/XTTCellProliferationAssayKit/tabid/182/Default.aspx> [2011, February 25]
- [94] Systems, R.D. Quantikine® ELISA Assay Principle [Online]. 2012. Available from: [http://www.rndsystems.com//product\\_detail\\_objectname\\_quantikineelisaassayprinciple.aspx](http://www.rndsystems.com//product_detail_objectname_quantikineelisaassayprinciple.aspx) [2012, April 5]
- [95] Krohn, R.I. The colorimetric detection and quantitation of total protein. Curr Protoc Cell Biol 3 (2002): 3H.
- [96] Bio-Rad. Bio-Rad Protein Assay [Online]. 2011. Available from: [www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9004.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf) [2011, November 14]
- [97] Kurien, B.T. and Scofield, R.H. Western blotting. Methods 38, 4 (2006): 283-293.
- [98] Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., and Scofield, R. H. An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. Methods Mol Biol 717 (2011): 55-67.

- [99] Li, Y., Xing, D., Chen, Q., and Chen, W. R. Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB using ursolic acid. Int J Cancer 127, 2 (2009): 462-473.
- [100] Checker, R., et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-kappaB, AP-1 and NF-AT. PLoS One 7, 2 (2012): e31318.
- [101] Zeng, G., Chen, J., Liang, Q. H., You, W. H., Wu, H. J., and Xiong, X. G. Ursolic acid inhibits T-cell activation through modulating nuclear factor-kappa B signaling. Chin J Integr Med 18, 1 (2011): 34-39.
- [102] Bennett, B.L., et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 24 (2001): 13681-13686.
- [103] Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J., and Tan, T. H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. J Biol Chem 1996. 271, 50 (1996): 31929-31936.
- [104] Gaffen, S.L. and Liu, K.D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. Cytokine 28, 3 (2004): 109-123.
- [105] Kennedy, N.J. and Davis, R.J. Role of JNK in tumor development. Cell Cycle 2,3 (2003): 199-201.
- [106] Manning, A.M. and Davis, R.J. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? Nat Rev Drug Discov 2, 7 (2003): 554-565.
- [107] Jhun, B.S., et al. Inhibition of AMP-activated protein kinase suppresses IL-2 expression through down-regulation of NF-AT and AP-1 activation in Jurkat T cells. Biochem Biophys Res Commun 351, 4 (2006): 986-992.

[108] Melino, M., Hii, C. S., McColl, S. R., and Ferrante, A. The effect of the JNK inhibitor, JIP peptide, on human T lymphocyte proliferation and cytokine production. J Immunol 181, 10 (2008): 7300-7306.

[109] Ennis, B.W., et al. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and tumor cell proliferation by a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. Pharmacol Exp Ther 313, 1(2005): 325-332.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก.

## ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 1: แสดง % Viability (ค่าการอยู่รอดของเซลล์) ของเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับกรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยวิธี XTT assay

Cells treatment	% Viability (Mean±SEM) (control = ไม่ได้รับสารใดๆ)
ไม่ได้รับสารใดๆ	100
ตัวทำละลาย DMSO (< 0.1 %)	110.25 ± 6.79
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 5 µM	96.67 ± 4.90
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 10 µM	89.08 ± 6.15
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 20 µM	74.38 ± 7.76
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 30 µM	51.84 ± 6.52***
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 40 µM	46.77 ± 7.03***
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 60 µM	31.85 ± 5.29***
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 80 µM	24.78 ± 4.80***
กรดเออร์โซลิคที่ระดับความเข้มข้น 100 µM	19.95 ± 3.51***
IC <sub>50</sub>	35.5 %

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด

\*\*\* = % Viability มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (control)



ตารางที่ 2: แสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกตัวกระตุ้นด้วย PMA/PHA ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน และตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

Cells treatment	ปริมาณไซโตไคน์ (Mean $\pm$ SEM) (pg/mg protein)	
	IL-2	TNF- $\alpha$
ตัวทำละลาย DMSO (< 0.1 %)	0	0
PMA/PHA ที่เวลา 1 ชั่วโมง	0	202.78 $\pm$ 20.26
PMA/PHA ที่เวลา 3 ชั่วโมง	145.85 $\pm$ 56.34	430.49 $\pm$ 60.97**
PMA/PHA ที่เวลา 6 ชั่วโมง	3,445.47 $\pm$ 712.92	731.84 $\pm$ 53.13***
PMA/PHA ที่เวลา 12 ชั่วโมง	8,826.85 $\pm$ 1,355.61**	830.25 $\pm$ 65.64***
PMA/PHA ที่เวลา 15 ชั่วโมง	10,385.48 $\pm$ 1,377.67**	966.84 $\pm$ 54.91***
PMA/PHA ที่เวลา 18 ชั่วโมง	11,501.33 $\pm$ 1,409.40***	872.26 $\pm$ 50.03***
PMA/PHA ที่เวลา 24 ชั่วโมง	12,725.11 $\pm$ 1,990.44***	941.86 $\pm$ 76.96***

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด

\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO < 0.1 %)

ตารางที่ 3: แสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

Cells treatment	ปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (Mean±SEM) (pg/mg protein)					
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
กรดเออร์โซลิก	8,369.86 ±	9,238.85 ±	7,131.25 ±	7,923.10 ±	7,238.01 ±	5,476.04 ±
5 μM	740.82	203.27	423.26	717.23	982.64	508.06***
กรดเออร์โซลิก	6,950.59 ±	7,101.59 ±	6,197.50 ±	5,461.94 ±	5,233.10 ±	3,943.85 ±
10 μM	378.59	394.49	77.30*	482.53***	898.77***	944.21***
กรดเออร์โซลิก	8,156.59 ±	5,698.88 ±	3,287.35 ±	1,147.11 ±	1,876.30 ±	1,049.01 ±
20 μM	344.21	562.09**	684.73***	312.10***	573.30***	445.25***
กรดเออร์โซลิก	5,422.31 ±	2,799.22 ±	674.76 ±	101.68 ±	15.15 ±	0
30 μM	270.51***	445.29***	158.85***	36.77***	12.37***	
ตัวกระตุ้น PMA/PHA			9,551.48 ±	935.90		
ตัวทำลาย DMSO<0.1%				0		

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด

- \* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )
- \*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )
- \*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control)

ตารางที่ 4: แสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดเออร์โซลิกที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

Cells treatment	ปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ (Mean $\pm$ SEM) (pg/mg protein)					
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
กรดเออร์โซลิก	631.53 $\pm$	649.79	590.37 $\pm$	561.70	572.23 $\pm$	491.64 $\pm$
5 $\mu$ M	37.78	$\pm$ 70.70	82.96	$\pm$ 111.42	44.37	93.68
กรดเออร์โซลิก	644.50 $\pm$	695.70	584.09 $\pm$	523.63 $\pm$	527.44 $\pm$	453.84 $\pm$
10 $\mu$ M	55.55	$\pm$ 83.16	96.91	78.64	90.40	98.42*
กรดเออร์โซลิก	857.70	691.40	509.06	403.08 $\pm$	350.32 $\pm$	56.84 $\pm$
20 $\mu$ M	$\pm$ 124.27	$\pm$ 71.97	$\pm$ 109.34	163.98*	75.74**	27.66***
กรดเออร์โซลิก	759.25	642.37 $\pm$	401.72 $\pm$	169.50 $\pm$	69.48 $\pm$	0
30 $\mu$ M	$\pm$ 87.82	103.53	144.18**	93.83***	28.83***	
ตัวกระตุ้น PMA/PHA	938.04 $\pm$ 85.03					
ตัวทำลาย DMSO<0.1%	0					

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด

\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control)

ตารางที่ 5: แสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และสารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) ระดับความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

Cells treatment	ปริมาณไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (Mean $\pm$ SEM) (pg/mg protein)					
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
PD98059	1,138.39 $\pm$	1,160 $\pm$	1,333.63 $\pm$	1,189.90 $\pm$	1,076.31 $\pm$	639.16 $\pm$
20 $\mu\text{M}$	30.35***	93.28***	117.30***	72.72***	121.84***	96.76***
SP600125	834.03 $\pm$	841.74 $\pm$	822.77 $\pm$	749.88 $\pm$	684.51 $\pm$	697.66 $\pm$
20 $\mu\text{M}$	147.94***	177.49***	216.67***	134.41***	152.68***	165.99***
ตัวกระตุ้น PMA/PHA	9,551.48 $\pm$ 935.90					
ตัวทำลาย	0					
DMSO	<0.1%					

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด

\*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control)

ตารางที่ 6: แสดงปริมาณไซโตไคน์ชนิด Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ของเซลล์ Jurkat ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลาย PD98059 (ERK inhibitor) และสารละลาย SP600125 (JNK inhibitor) ระดับความเข้มข้น 20  $\mu$ M ที่ระยะเวลาต่างๆกัน และตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

Cells treatment	ปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ (Mean $\pm$ SEM) (pg/mg protein)					
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
PD98059	427.55 $\pm$	410.97 $\pm$	409.58 $\pm$	340.95 $\pm$	345.15 $\pm$	206.31 $\pm$
20 $\mu$ M	10.35*	16.97*	50.83*	13.79**	23.69**	11.69***
SP600125	168.44 $\pm$	141.28 $\pm$	103.79 $\pm$	79.62 $\pm$	48.39 $\pm$	23.49 $\pm$
20 $\mu$ M	15.19***	13.32***	21.75***	15.46***	17.08***	17.36***
ตัวกระตุ้น PMA/PHA	938.04 $\pm$ 85.03					
ตัวทำลาย	0					
DMSO	<0.1%					

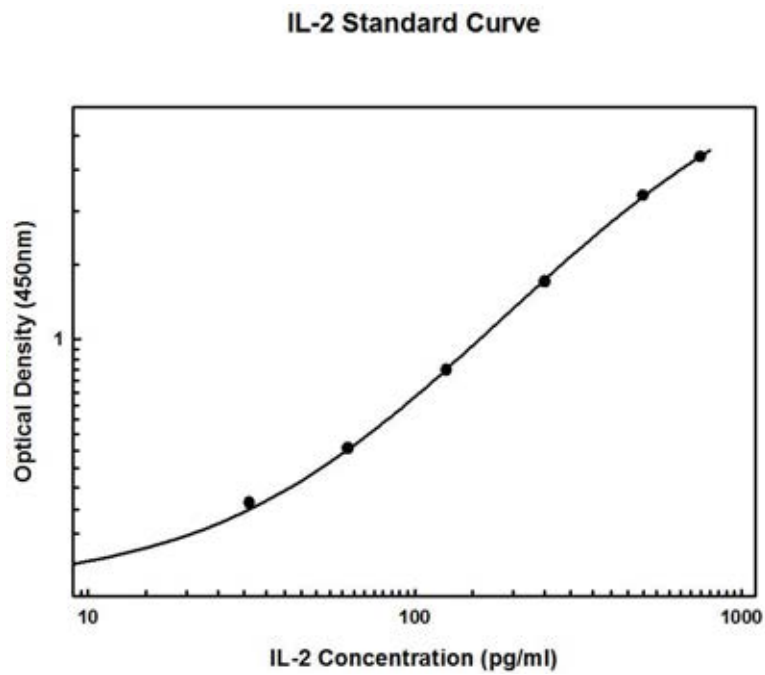
ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์ 3 ชุด

- \* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )
- \*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )
- \*\*\* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

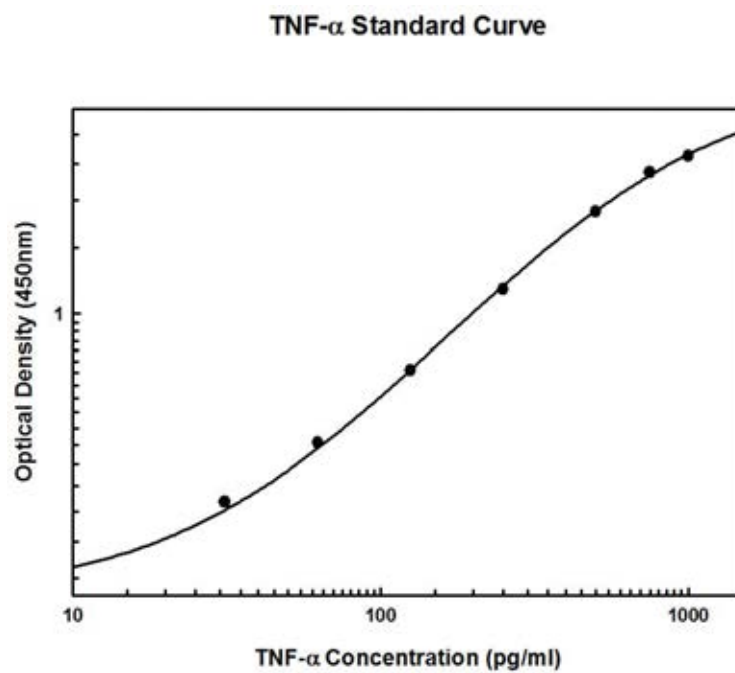
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวกระตุ้น PMA/PHA เพียงอย่างเดียว (Positive control)

## กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณ

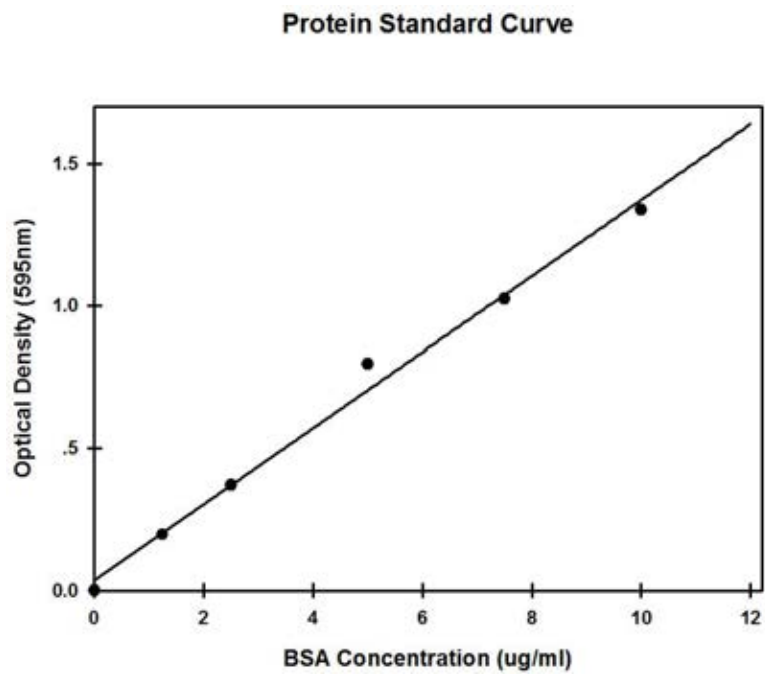
กราฟมาตรฐานของ Interleukin-2 วิธี ELISA



กราฟมาตรฐานของ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) วิธี ELISA



กราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine serum albumin วิธี Bradford method



## ภาคผนวก ข.

## น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง 200 ml

- RPMI-1640 180 ml
- Fetal bovine serum 20 ml

สารละลาย XTT 1mg/ml

- XTT 5 mg
- PMS 0.5 mg
- RPMI-1640 5 ml

สารละลาย Phosphate buffer saline 10X ปริมาตร 500 ml

- NaCl 40 g
- KCl 1 g
- NaHPO<sub>4</sub> 5.75 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g

เติมน้ำ Milli-Q ปรับ pH 7.4 (7.2 - 7.4) แล้วค่อยเติมน้ำจนครบ 500 ml

สารละลาย Laemmli loading buffer 10X ปริมาตร 5 ml

- 2 M Tris-HCl pH 6.8 0.3 ml
- Glycerol 2.5 ml
- 20 % SDS 1 ml
- $\beta$ -mercaptoethanol 0.5 ml
- Bromophenol blue 0.01 g
- Milli-Q water 0.7 ml

สารละลาย SDS electrophoresis buffer 10X ปริมาตร 1,000 ml

- Tris-base 30.25 g
- Glycine 144.1 g
- SDS 10 g

เติมน้ำ Milli-Q ปรับ pH 8.8 แล้วค่อยเติมน้ำจนครบ 1,000 ml



## การเตรียม 10 % Separating Gel

- Milli-Q water	2.66	ml
- 30 % Acrylamide mix	2.38	ml
- 1.5 M Tris pH 8.8	1.82	ml
- 10 % SDS	0.07	ml
- 10 % APS (ammonium persulfate)*	0.07	ml
- TEMED*	0.0028	ml

\*เตรียม และใส่ชั้นตอนสุดท้ายพร้อมกัน เนื่องจากเป็นตัวที่ทำให้เจลแข็ง

## การเตรียม 5 % Stacking Gel

- Milli-Q water	2.1	ml
- 30 % Acrylamide mix	0.5	ml
- 0.5 M Tris pH 6.8	0.38	ml
- 10 % SDS	0.03	ml
- 10 % APS (ammonium persulfate)*	0.03	ml
- TEMED*	0.003	ml

\*เตรียม และใส่ชั้นตอนสุดท้ายพร้อมกัน เนื่องจากเป็นตัวที่ทำให้เจลแข็ง

## สารละลาย Transfer buffer 1X ปริมาตร 1,000 ml

- 25 mM Tris-base	3.03	g
- 0.2 M Glycine	15.01	g
- 20 % Methanol	200	ml

เติมน้ำ Milli-Q ปรับ pH 8.5 แล้วค่อยเติมน้ำจนครบ 1,000 ml เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## สารละลาย TBS-Tween 20 หรือ TBS-T 1X ปริมาตร 1,000 ml

- Tris-base pH 7.5	2.42	g
- NaCl	8	g
- 0.1 % Tween-20	1	ml

เติมน้ำ Milli-Q จนครบ 1,000 ml

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนราวัลภ์ แก้วทวี เกิดเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ.2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรโลहितวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์ คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 โดยได้รับทุนอุดหนุน การวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 17 ครั้งที่ 1/2555 และทุนค่าลงทะเบียน ทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ “ผู้ช่วยสอน” ของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดระยะเวลาในการศึกษา