

ฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในเซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์: การศึกษา
ความเกี่ยวข้องของระดับโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B

นายชนะชัย แซ่ลี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTI-PSORIATIC ACTIVITY OF THAI MEDICINAL HERBAL EXTRACTS IN HUMAN
KERATINOCYTES: A STUDY OF MOLECULAR INVOLVEMENT OF
NF- κ B SIGNALING NETWORK BIOMARKERS

Mr. Chanachai Saelee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทยใน
เซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์: การศึกษาความเกี่ยวข้องของ
ระดับโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ
NF- κ B

โดย

นายชนะชัย แซ่ลี

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุพนิตรา ชาญประเสริฐ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ณัฐจิรา แสงกฤช)

นายชนะชัย แซ่ลี่ : ฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในเซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์: การศึกษาความเกี่ยวข้องของระดับโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B (Anti-psoriatic activity of Thai medicinal herbal extracts in human keratinocytes: a study of molecular involvement of NF- κ B signaling network biomarkers) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาว์, 94 หน้า.

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังซึ่งมีการเจริญของเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าที่เร็วกว่าปกติและมีการสร้างเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าที่ไม่สมบูรณ์ การค้นหายารักษาโรคสะเก็ดเงินเพื่อให้เกิดความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเป็นด้านที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน การศึกษาก่อนหน้านี้โดยใช้เซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์ (HaCaT) เป็น *in vitro* model และใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทย ข่า น้อยหน่า และขมิ้น ซึ่งสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่ามีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน และการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่ากลไกการต้านโรคสะเก็ดเงินในระดับโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพรไทยเหล่านี้มีการทำงานผ่านเครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B หรือไม่อย่างไร ผลของการศึกษาด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR และ report gene ทั้ง 10 ยีนในเครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B ในเซลล์ HaCaT พบว่า สารสกัดข่าเพิ่มการแสดงออกของ TNFAIP3 และลดการแสดงออกของ CSF-1 และ NF- κ B2 ส่วนสารสกัดขมิ้นลดการแสดงออกของ CSF-1, IL-8, NF- κ B2, NF- κ B1 และ RelA สำหรับสารสกัดน้อยหน่าลดการแสดงออกของ CD40 และ NF- κ B1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นผลของการศึกษา *in vitro* นี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่สามารถต้านโรคสะเก็ดเงินผ่านทางโมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B

ภาควิชา เคมีคลินิก

ลายมือชื่อผู้นิสิต.....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2553

5277202837 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : THAI MEDICINAL HERBS/ NF-**KB** SIGNALING BIOMARKERS/ KERATINOCYTES/ GENE EXPRESSION

CHANACHAI SAELEE: ANTI-PSORIATIC ACTIVITY OF THAI MEDICINAL HERBAL EXTRACTS IN HUMAN KERATINOCYTES: A STUDY OF MOLECULAR INVOLVEMENT OF NF-**KB** SIGNALING NETWORK BIOMARKERS. ADVISOR: ASST.PROF.TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 94 pp.

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disorder characterized by rapid proliferation of keratinocytes and incomplete keratinization. Discovery of safer and more effective anti-psoriatic drugs remains an area of active research in the present time. Using a HaCaT keratinocyte cell line as an *in vitro* model, we previously found that ethanolic extracts from three Thai medicinal herbs, *Alpinia galanga*, *Curcuma longa* and *Annona squamosa*, contained anti-psoriatic activity. In the current study, we aimed at investigating if these Thai medicinal herbal extracts played a molecular role in suppressing psoriasis via regulation of NF-**KB** signaling biomarkers. Using semi-quantitative RT-PCR and report gene assay, we analyzed the effects of these potential herbal extracts on 10 different genes of the NF-**KB** signaling network in HaCaT cells. In accordance with our hypothesis, we found that the extract derived from *Alpinia galanga* significantly increased the expression of TNFAIP3 and significantly reduced the expression CSF-1 and NF-**KB2**. *Curcuma longa* extract significantly decreased the expression of CSF-1, IL-8, NF-**KB2**, NF-**KB1** and RelA. For *Annona squamosa* extract, it significantly lowered the expression of CD40 and NF-**KB1**. Therefore, this *in vitro* study suggested that these herbal extracts capable of functioning against psoriasis might exert their activity via controlling the expression of NF-**KB** signaling biomarkers.

Department : ..Clinical Chemistry..... Student's Signature : ..
 Field of Study : ..Clinical Biochemistry..... Advisor's Signature : ..
 ..and Molecular Medicine.....
 Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงาน ด้วยดีตลอดมา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์, ดร.ณัฐจิภา แสงกฤษ และ อ.ดร.สุพันธ์ธรา ชาญประเสริฐ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Robert K. Yu และบริษัท SwitchGear Genomics ที่กรุณาเอื้อเฟื้อพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนผู้ช่วยสอนและทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเป็นทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2553 ระดับปริญญาโท กลุ่มเรื่อง 5 การเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิจัยและสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจในการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.5 ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน.....	4
2.2 ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	7
2.3 สมาชิกในกลุ่มของ NF- KB	9
2.4 กลไกการทำงานของ NF- KB	11
2.5 สารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- KB	13
2.6 ความสำคัญของ NF- KB ต่อโรคสะเก็ดเงิน.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 กลุ่มตัวอย่าง.....	17
3.2 เครื่องมือที่ใช้และวัสดุสารเคมีในการวิจัย.....	18
3.3 เตรียม Luciferase reporter gene constructs.....	23
3.4 การสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter ยีน NF- KB 1 และ RelA เพื่อการโคลน	
- ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ Promoter NF- KB 1 และ RelA.....	24

	หน้า
- โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA เข้าสู่พลาสมิด.....	26
pGEM [®] -T Easy vector (Promega) และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่	
เราต้องการใน pGEM [®] -T Easy vector ด้วยการทำให้โคลน PCR	
- การสกัดพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรียและการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อ.....	28
ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดออกจากเชื้อแบคทีเรีย	
- ตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วน ของ Promoter ยีน NF- κ B1 และ RelA.....	30
ด้วยการ Sequence	
- โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA เข้าสู่พลาสมิด.....	30
pSGG_prom vector (Switchgear genomics) และการตรวจสอบชิ้นส่วน	
ของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pSGG_prom vector ด้วยการทำให้โคลน PCR	
- การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิดที่มีการแทรกชิ้นส่วนของ promoter.....	32
จากขั้นตอนที่ 3.1 และ 3.2.5 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและหาลำดับเบส	
- การสกัดพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมาก และตรวจสอบพลาสมิด.....	33
ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนการนำไปใช้ในขั้นตอน Reporter gene	
3.5 การเตรียม Cell culture model เพื่อใช้ในการศึกษา.....	34
3.6 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการ	
แสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B	
- การสกัด Total RNA จากเซลล์ HaCaT.....	34
- การทดสอบการแสดงออกของยีนในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ด้วยวิธี.....	36
RT-PCR	
3.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการทำงาน	
ของ Promoter ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ด้วยวิธี Reporter gene	
- ถ่ายโอนพลาสมิด pSGG_prom ที่มีชิ้นส่วนของ Promoter ของยีนใน.....	41
เครือข่ายของสัญญาณของ NF- κ B เข้าสู่เซลล์ HaCaT	
- ตรวจวัดการทำงานของ Promoter ของยีนในเครือข่ายของสัญญาณของ.....	42
NF- κ B โดยการวัดสัญญาณ Luciferase	
3.8 วิเคราะห์ผล.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44

4.1 ผลการเตรียม Luciferase reporter gene constructs	
- ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ Promoter ของ NF- K B1 และ RelA.....	44
- ผลการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- K B1 และ RelA เข้าสู่ พลาสมิด pGEM [®] -T Easy vector และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pGEM [®] -T Easy vector ด้วยการทำให้ PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	45
- ผลการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- K B1 และ RelA เข้าสู่ พลาสมิด pSGG_prom vector และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pSGG_prom vector ด้วยการทำให้ PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	47
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- K B biomarkers	
- เมื่อกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ	50
(10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	
- เมื่อกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ	55
(10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	
- เซลล์ HaCaT ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็น.....	61
เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง	
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการ.....	65
ทำงานของ Promoter ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- K B biomarkers บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	76
5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	76
5.2 สรุป และข้อเสนอแนะ.....	79
รายการอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก.....	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	94

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการแทรกของ Promoter ในพลาสมิด pSGG_prom	24
3.2	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Ligation..... ระหว่าง Promoter ของยีน NF- KB 1 และ RelA กับพลาสมิด pGEM [®] -T Easy vector	26
3.3	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา PCR..... เพื่อตรวจสอบการแทรกของ Promoter ในพลาสมิด pGEM [®] -T Easy vector	27
3.4	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Restriction Fragment Length..... Polymorphism (RFLP)	29
3.5	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Ligation ระหว่าง Promoter ของ ยีน NF- KB 1 และ RelA กับพลาสมิด pSGG_prom	31
3.6	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาการกำจัดดีเอ็นเอ.....	36
3.7	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา RT-PCR.....	37
3.8	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบระดับ mRNA ของยีนในเครือข่ายสัญญาณ NF- KB	38
3.9	แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	39
3.10	แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Transfection.....	41
5.1	แสดงผลการทดสอบในแต่ละสภาวะของวิธี RT-PCR และ Reporter gene..... assay	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงกราฟข้อมูลผู้ป่วยนอก 10 อันดับของสถาบันโรคผิวหนังประจำปี 2551	6
2.2	แสดงปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	7
2.3	แสดงส่วนประกอบของ NF- K B/Rel proteins.....	10
2.4	แสดงการเคลื่อนที่ของ NF- K B เข้าสู่นิวเคลียส.....	11
2.5	แสดงกลไกทั้ง 3 กลไกในการเคลื่อนที่ของ NF- K B เข้าสู่นิวเคลียสผ่าน..... ตัวกระตุ้นต่างๆ	13
3.1	แสดง pGEM-T [®] easy vector.....	28
3.2	แสดง pSGG_prom vector.....	32
3.3	พลาสมิด pRL-CMV ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ในการ co-transfection โดยตัว pRL-CMV ซึ่งจะให้สัญญาณ <i>Renilla luciferase</i>	42
4.1	แสดงผลการทำ PCR ของ Promoter ของยีน NF- K B1 และ RelA โดย..... ใช้ดีเอ็นเอของเซลล์ HaCaT เป็นแม่แบบในการทำ PCR ขนาด PCR product มีความยาว 1,012 คู่เบสและ 1,243 คู่เบส ตามลำดับ	44
4.2	แสดงผลการทำโคลนนิ่ง PCR ของพลาสมิด pGEM [®] -T Easy vector ด้วย. ไพรเมอร์ Sp6 และ T7	45
4.3	แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ <i>MluI/BglII</i> สำหรับ NF- K B1 promoter และ <i>NheI/HindIII</i> สำหรับ RelA promoter	46
4.4	แสดงผลการทำโคลนนิ่ง PCR ของพลาสมิด pSGG_prom ด้วยไพรเมอร์ RV3 และ pSGG_prom	47
4.5	แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ <i>MluI/BglII</i> สำหรับ NF- K B1 promoter และ <i>NheI/HindIII</i> สำหรับ RelA promoter	48
4.6	แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับ RelB, CSF-1, IRF-1, CD40, NF- K B2, IL-8, TNFAIP3 และ VCAM1	49
4.7	แสดงผลของสารสกัดน้อยหน้า, ข่า และขมิ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อ การแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่าย สัญญาณของ NF- K B biomarkers เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF α (10 นาโนกรัม	

- ต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 51
- 4.8 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีน IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, CD40, IL-8, NF- κ B2, NF- κ B1 และ RelA ในเซลล์ HaCaT ที่กระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน้าและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสถานะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง..... 52
- 4.9 แสดงผลของสารสกัดน้อยหน้า, ข่า และขมิ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B biomarkers เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 57
- 4.10 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีน IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, CD40, IL-8, NF- κ B2, NF- κ B1 และ RelA ในเซลล์ HaCaT ที่กระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน้าและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสถานะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อ

	มิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูล que แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง.....	58
4.11	แสดงผลของสารสกัดน้อยหน้า, ข่า และขมิ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีน RelA, NF- κ B1 และ CD40 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง.....	63
4.12	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีน RelA, NF- κ B1 และ CD40 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน้าและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสภาวะที่เซลล์ HaCaT ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูล que แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง.....	64
4.13	แสดงกราฟ Luciferase activity ของ Promoter ของ IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, IL-8 and NF- κ B2 ในเซลล์ HaCaT ที่กระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน้าและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสภาวะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูล que แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง และในแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 การทดลอง.....	67

- 4.14 แสดงกราฟ Luciferase activity ของ Promoter ของ VCAM1, CD40, NF- κ B1 และ RelA ในเซลล์ HaCaT หลังการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน้าและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับการแสดงออกของ Empty vector โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง และในแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 การทดลอง.....

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) หรือโรคเรื้อนกวาง เป็นโรคผิวหนังที่มีการอักเสบเรื้อรังและที่บริเวณรอยโรคพบว่ามีความผิดปกติของการพัฒนาของเซลล์ผิวหนัง มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังมากกว่าปกติ และพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในบริเวณรอยโรค [1, 2] ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคที่แน่ชัด อาจเป็นผลของพันธุกรรม ระบบภูมิคุ้มกันและสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดโรค แต่อย่างไรก็ตามยังขาดกลไกที่แน่ชัด ทำให้ไม่สามารถรักษาให้หายขาดจากโรคได้อีกทั้งการรักษาในระยะยาวยังพบกับปัญหาเรื่องของการดื้อยา [3] อาการข้างเคียงต่างๆที่ตามมาซึ่งส่งผลต่อคุณภาพชีวิตและเศรษฐกิจ [4, 5] ของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก ในประเทศไทยสถิติของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินของสถาบันโรคผิวหนัง เฉพาะที่เป็นผู้ป่วยนอก ในปี 2551 มีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน 2,332 ราย เพิ่มมากขึ้นจากปี 2550 มา 41 ราย จัดเป็นลำดับ 6 ของโรคทางผิวหนังที่พบมาก 10 ชนิด [6] แนวโน้มในอนาคตจะมีผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทยและพบได้ในทุกเพศทุกวัย นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละ 40 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะสามารถพัฒนาไปเป็นโรคไขข้ออักเสบจากโรคสะเก็ดเงิน (psoriatic arthritis) โดยที่ร้อยละ 5 จะเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดรุนแรงจนนำไปสู่ความพิการในที่สุด [7] ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของประชากรไทยและก่อให้เกิดปัญหาทางด้านเศรษฐกิจที่ตามมา ในด้านการรักษา นอกจากการรักษาทางการแพทย์แผนปัจจุบันแล้วยังมีการใช้สมุนไพรไทยเข้ามาช่วยในการบรรเทาอาการร่วมด้วย เนื่องจากประเทศไทยมีสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคที่หลากหลาย แต่พบว่ายังมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรไทยในการรักษาโรคสะเก็ดเงินค่อนข้างน้อย จากที่กล่าวมา ทางคณะผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญของโรคสะเก็ดเงินทั้งด้านกลไกของการเกิดโรคและการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นกว่าในปัจจุบันโดยใช้สมุนไพรไทยเข้ามาช่วยในการรักษา จึงประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยในการต้านโรคสะเก็ดเงินโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Human keratinocyte cell line (HaCaT) ซึ่งนับเป็น *In vitro* model ของโรคสะเก็ดเงินในการศึกษากลไกในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยในเซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์ผ่านทางเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B โดยตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนในเครือข่ายสัญญาณ NF- κ B ทั้งระดับ mRNA และ promoter activity ใช้

เทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ reporter gene หากคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในโครงการวิจัยครั้งนี้ การใช้สมุนไพรรักษาจะเป็นการรักษาอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

สมมติฐานของการวิจัย

1. การทำงานที่ผิดปกติของกลไก NF- κ B มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน
2. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรักษาในการต้านโรคสะเก็ดเงินใน เซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์ ผ่านกลไกทางเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรรักษาที่ออกฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อระดับการแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรรักษาที่ออกฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินต่อการทำงานของ Promoter ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B

ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยจะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรรักษา 3 ชนิด คือ ขมิ้น, ข่า และน้อยหน่า ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง และสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล [8] ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารสกัดตามการทดลองของ วิสาข์ ทองระกาศ [9] โดยจะประเมินการแสดงออกของ Promoter ของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ซึ่งได้แก่ RelB, Vascular cell adhesion molecule - 1 (VCAM1), Tumor Necrosis Factor-Induced Protein - 3 (TNFAIP3), Interferon Regulatory Factor - 1 (IRF-1), Colony Stimulating Factor - 1 (CSF-1), Interleukin 8 (IL-8), CD40, RelA, Nuclear factor- κ B 1 (NF- κ B1) และ Nuclear factor- κ B 2 (NF- κ B2) แล้วทำวัดการแสดงออกระดับ mRNA ของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณ

ของ NF- κ B โดยศึกษาในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (HaCaT) ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *In vitro* model

ข้อจำกัดการวิจัย

การทดสอบการแสดงออกของ Promoter หลังจากการกระตุ้นเซลล์ด้วยไฮโดรโคโรนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าเซลล์ที่ใช้ทดสอบเกิดการตายทำให้ต้องปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการทดสอบแต่ยังคงทดสอบการแสดงออกทั้งในระดับ mRNA และ Promoter activity

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจถึงกลไกในการเกิดโรคสะเก็ดเงินอย่างแท้จริง
2. เข้าใจกลไกของการต้านโรคสะเก็ดเงินจากสารสกัดสมุนไพรไทยในระดับของโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B
3. เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการใช้สมุนไพรไทยเป็นยาในการรักษาโรคสะเก็ดเงินที่ให้ผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยารักษาในปัจจุบัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคสะเก็ดเงิน เป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่ง พยาธิสภาพของโรคเกิดจากเซลล์ผิวหนังมีอัตราการแบ่งตัวเร็วเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ (hyperproliferation) ซึ่งการผลิตเซลล์ผิวหนังปกติจะใช้เวลาประมาณ 13 วันต่อรอบ แต่ในผู้ป่วยสะเก็ดเงินจะมีการผลิตเซลล์ใหม่อย่างรวดเร็วด้วยเวลาเพียง 3-4 วันต่อรอบ [10] ในขณะที่อัตราการผลิตเซลล์ผิวหนังชั้นบนไม่เปลี่ยนแปลง เป็นสาเหตุให้เกิดเป็นผื่นหรือปื้นขึ้น ซึ่งมีลักษณะเป็นผื่นแดง บวมหนามีขอบเขตที่ชัดเจน มีขุยสีขาวหรือสะเก็ดสีเงินปกคลุมเซลล์ผิวหนังที่ตาย และบริเวณรอยโรคพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ [1, 2] ซึ่งลักษณะของรอยโรค ขึ้นอยู่กับชนิดของโรคสะเก็ดเงิน

ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน [11]

จากข้อมูลของมูลนิธิโรคสะเก็ดเงินแห่งชาติ (National Psoriasis Foundation, อเมริกา) สามารถแบ่งประเภทของโรคสะเก็ดเงินเป็น 5 ประเภท ดังต่อไปนี้

1. Plaque (plaque psoriasis หรือ psoriasis vulgaris) เป็นประเภทที่พบได้บ่อยที่สุด โดยคิดเป็นร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินทั้งหมด ลักษณะรอยโรคคือ มีผื่นสีแดงหนาเป็นบริเวณกว้างผลจากการอักเสบ ขอบเขตชัดเจน ส่วนบนของผื่นถูกปกคลุมด้วยสะเก็ดหนา พบบ่อยบริเวณหนังศีรษะ ลำตัว ข้อศอก หัวเข่า และแผ่นหลังส่วนล่าง ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 80 ที่มีความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง และร้อยละ 20 มีอาการรุนแรงปานกลางถึงมาก

2. Guttate (guttate psoriasis) เป็นประเภทที่พบบ่อยในวัยเด็กหรือวัยรุ่น ลักษณะรอยโรคคือ ตุ่มผื่นสีแดง รูปร่างคล้ายหยดน้ำเล็ก ๆ (drop) ลักษณะผื่นไม่หนาตัวเหมือนกับประเภท plaque มักพบที่บริเวณลำตัว ต้นแขนและต้นขา พบได้น้อยกว่าร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินทั้งหมด สิ่งกระตุ้นที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินประเภทนี้ เช่นการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory infections) พวก Group A beta-hemolytic streptococci การติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัสบริเวณคอ (streptococcal throat infections) ต่อมทอม

ซีสอักเสบ (tonsillitis) ความเครียด การได้รับบาดเจ็บที่บริเวณผิวหนังและการได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิด เช่น ยาด้านมาลาเรีย

3. Inverse (inverse psoriasis) เป็นประเภทที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่มีน้ำหนักตัวมาก ลักษณะรอยโรคคือ ผื่นสีแดงอ่อน ราบเรียบและวาวแสง ไม่เป็นขุยและไม่หนาตัวเหมือนประเภท plaque บริเวณข้อพับต่าง ๆ เช่น รักแร้ ขาหนีบ ใต้ราวนม รวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกและก้น และเนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีความชุ่มชื้นทำให้มีขุยไม่มาก

4. Pustular (pustular psoriasis) เป็นประเภทที่พบได้ในวัยผู้ใหญ่ ลักษณะรอยโรคคือ ผื่นสีแดงและบริเวณรอบ ๆ ผื่นจะพบตุ่มหนองพุพอง ภายในหนองประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ สาเหตุของโรคสะเก็ดเงินประเภทนี้ มาจากยาบางชนิดที่ใช้รักษาโรคสะเก็ดเงิน การใช้ยาประเภทสเตียรอยด์ การหยุดใช้ยารักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างกะทันหัน การได้รับสารก่อความระคายเคือง การสัมผัสรังสียูวีเป็นเวลานาน ภาวะตั้งครรภ์ ภาวะติดเชื้อ และความเครียด ลักษณะของตุ่มหนองแบ่งได้เป็น

4.1 Generalized pustular หรือ acute generalized variant (von Zumbusch variant) เป็นประเภทที่มีตุ่มหนองกระจายทั่วร่างกายที่มีการอักเสบ

4.2 Localized pustular variant เป็นประเภทที่มักพบบริเวณ ฝ่ามือ ฝ่าเท้า

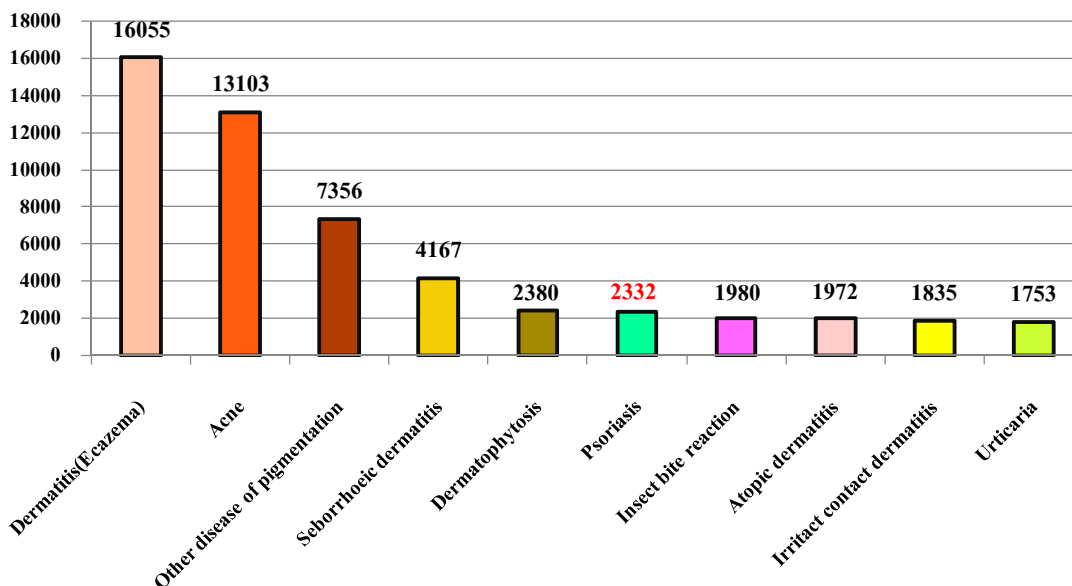
5. Erythrodermic (erythrodermic psoriasis) พบได้น้อยที่สุด ลักษณะรอยโรคคือ มีผื่นสะเก็ดเงินที่อักเสบ แดง ทั่วร่างกาย ลักษณะที่สำคัญคือ ผิวหนังอักเสบ ร้อนแดงและสะเก็ดเงินหลุดออกเป็นขุยได้ง่าย จะเจ็บและคันอย่างรุนแรง อาจพบว่ามีไข้สูง อ่อนเพลีย หนาวสั่น สิ่งกระตุ้นที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินประเภทนี้คือ การหยุดใช้ยารักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างกะทันหัน ภาวะแพ้ยา ภาวะแพ้แสงแดดอย่างรุนแรงและภาวะติดเชื้อ

ประชาชนทั่วโลกพบว่าเป็นโรคสะเก็ดเงินร้อยละ 3 โดยในสหรัฐอเมริกาพบประมาณ 7.5 ล้านคนเป็นโรคสะเก็ดเงิน และในแต่ละปีจะพบผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 150,000 คน และมียาวิจัยที่แสดงว่าเชื้อชาติ Caucasians จะเป็นโรคสะเก็ดเงินมากกว่าเชื้อชาติอื่นๆ [12]

ในประเทศไทยสถิติของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินของสถาบันโรคผิวหนัง เฉพาะที่เป็นผู้ป่วยนอก ในปี 2551 มีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน 2,332 ราย เพิ่มมากขึ้นจากปี 2550 มา 41 ราย จัดเป็นลำดับ 6 ของโรคทางผิวหนังที่พบมาก 10 ชนิด [6] แนวโน้มในอนาคตจะมีผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย และพบได้ในทุกเพศทุกวัย นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละ 40 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะสามารถ

พัฒนาไปเป็นโรคไขข้ออักเสบจากโรคสะเก็ดเงิน (psoriatic arthritis) โดยที่ร้อยละ 5 จะเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดรุนแรงจนนำไปสู่ความพิการในที่สุด [7] ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรไทยและก่อให้เกิดปัญหาทางด้านเศรษฐกิจที่ตามมา

กราฟแสดงข้อมูลผู้ป่วยนอก 10 อันดับของสถาบันโรคผิวหนัง 2551

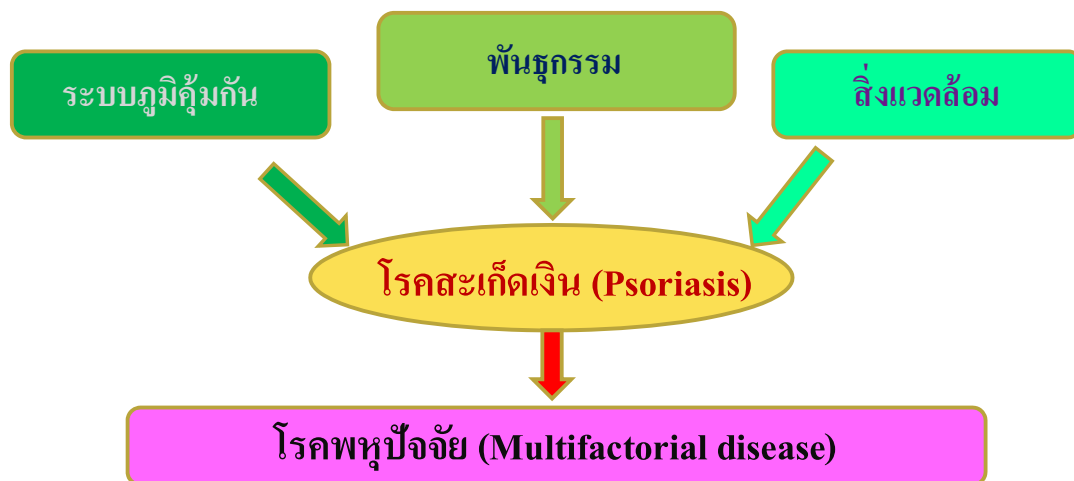


ภาพที่ 2.1 แสดงกราฟข้อมูลผู้ป่วยนอก 10 อันดับของสถาบันโรคผิวหนังประจำปี 2551 [6]

ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของการเกิดโรค อาจเป็นผลของพันธุกรรม ระบบภูมิคุ้มกันและสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดโรคแต่อย่างไรก็ตามยังขาดกลไกที่แน่ชัด และสามารถเรียกโรคสะเก็ดเงินได้ว่าเป็นโรคพหุปัจจัย (Multifactorial disease)

ด้านระบบภูมิคุ้มกันพบว่าบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงินที่ผิวหนังชั้น Stratum corneum มีเซลล์ Neutrophils อยู่เป็นจำนวนมาก และที่ชั้น Dermis มีการเคลื่อนที่เข้ามาของเซลล์ Mononuclear (T cells และ dendritic cells (DC)) โดยเซลล์พวก Dermal DC และ plasmacytoid DC จะหลั่งไซโตไคน์ Interleukin - 12 (IL-12) และ Interleukin - 23 (IL-23) ทำให้เกิดการกระตุ้น T cells ให้เปลี่ยนเป็น T_H1 หรือ T_H17 cells ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะหลั่งไซโตไคน์ IL-17, Interleukin - 22 (IL-22), Interferon gamma ($IFN\gamma$) และ Tumor Necrosis Factor alpha ($TNF\alpha$) มีผลต่อการกระตุ้น Transcription factor Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) และ Nuclear factor- κ B (NF- κ B) ภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ ส่งผลให้

เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและทำให้เกิดการสร้างยีน Transforming growth factor-alpha (TGF- α) เพิ่มมากขึ้น มีผลให้เกิดการสร้างเซลล์เพิ่มมากขึ้น [13]



ภาพที่ 2.2 แสดงปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน

แต่มีบางการศึกษาที่แสดงความสัมพันธ์ของโรคสะเก็ดเงินกับยีนบริเวณ Major histocompatibility complex (MHC) บนโครโมโซมคู่ที่ 6 [14, 15] เรียกยีน ณ ตำแหน่งนี้ว่า Psoriasis susceptibility 1 (PSORS1) [16] ส่วนยีน ณ ตำแหน่งอื่น ๆ ที่พบความสัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงิน เช่นโครโมโซมคู่ที่ 17q25 (PSORS2) [17] โครโมโซมคู่ที่ 4q34 (PSORS3) [18] โครโมโซมคู่ที่ 1q (PSORS4) [19] โครโมโซมคู่ที่ 3q21 (PSORS5) [20] โครโมโซมคู่ที่ 19p13 (PSORS6) [21] โครโมโซมคู่ที่ 1p (PSORS7) [22] โครโมโซมคู่ที่ 16q (PSORS8) [23] โครโมโซมคู่ที่ 4q31 (PSORS9) [24] และโครโมโซมคู่ที่ 18p11 (PSORS10) [25] อีกที่ยีนที่ไม่ได้อยู่ที่ MHC แต่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคสะเก็ดเงินเช่น IL-23R, IL-12B, Interleukin - 13 (IL-13), IL-23A, TNFAIP3 และ TNFAIP3 Interacting Protein 1 (TNIP1) [26] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีน ณ บริเวณรอยโรคพบว่ามากกว่า 1,300 ยีนที่พบบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงิน [27, 28, 29, 30]

ด้านภาวะทางอารมณ์และจิตใจ โดยเฉพาะภาวะเครียดพบถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน [31], ภาวะการติดเชื้อในร่างกายหรือผิวหนัง เช่น แบคทีเรียพวก *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ไวรัสพวก papillomaviruses, retroviruses, endogenous

retroviruses และราพวก *Malassezia*, *Candida albicans*, การเจ็บป่วย, โรคประจำตัว หรือการขาดเจ็บบริเวณผิวหนังและการได้รับสารอาหารหรือยาบางชนิด เช่น lithium β -blockers, ยาด้านมาลาเรีย, ยาลดการอักเสบในกลุ่ม non-steriod, ยารักษาโรคซึมเศร้า (angiotensin-converting enzymes inhibitor) [32, 33, 34] ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดโรคสะเก็ดเงินได้ ส่วนทางระบบภูมิคุ้มกันพบว่าที่บริเวณรอยโรคมีจำนวนของเซลล์ T-lymphocyte, myeloid และ plasmacytoid dendritic cells สูง ซึ่งทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน เช่น IL-23, TNF α , IFN γ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) เป็นต้น [35]

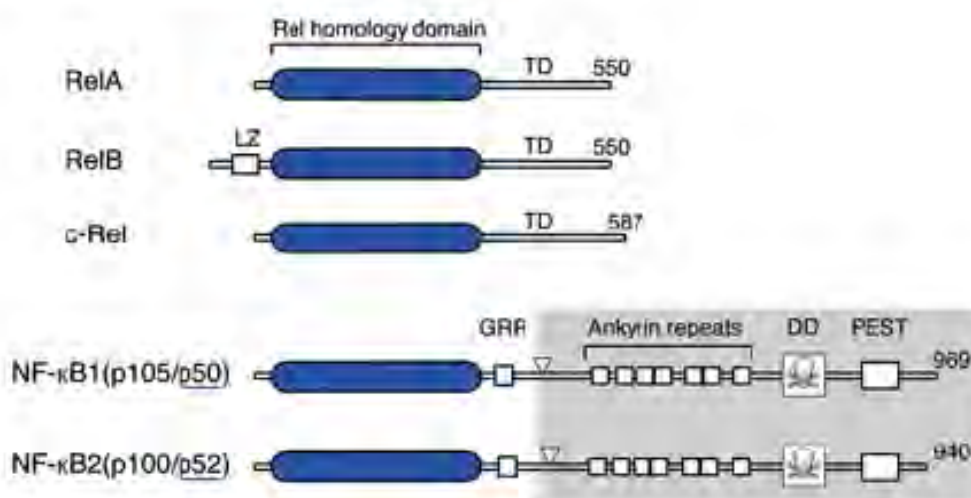
จากสาเหตุดังที่กล่าวมาข้างต้นก็ยังขาดกลไกที่ชัดเจนในการเกิดโรคสะเก็ดเงิน ทำให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จจะเป็นเพียงการรักษาเพื่อบรรเทาอาการ อีกทั้งการรักษาในระยะยาวยังพบกับปัญหาเรื่องของการดื้อยา [3] อาการข้างเคียงต่างๆที่ตามมา ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพชีวิตและเศรษฐกิจ [4, 5] ของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก ประเภทยาที่ใช้รักษาเฉพาะที่เช่น Emollients, Coal tar และ Dithranol ไม่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพที่ต่ำในการรักษา ส่วนยาที่รักษาทั้งระบบส่งผลข้างเคียงต่อการรักษาเป็นอย่างมาก ปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าหาตัวยาใหม่ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน เช่น ยาในกลุ่ม Vitamin A analogues, Vitamin D analogues, Immunosuppressive compounds, IMPDH inhibitors, DAB₃₈₉IL-2, CTLA4Ig, LFA3TIP และ Antibody therapies [36] นอกจากนี้ยังมีการใช้ Anti-TNF α [37] เนื่องจาก TNF α จะไปกระตุ้นไซโตไคน์ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokines) ประกอบด้วย Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), IL-8 และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NF-KB ได้อีกด้วย ส่วนการรักษาโดยการฉายแสง (phototherapy) โดยการใช้อัลตราไวโอเล็ต-เอ (ultraviolet A phototherapy) [38] พบว่า รูปร่างของเซลล์ผิวหนังเปลี่ยนแปลง, มีชีวิตและเจริญเติบโตลดน้อยลง แต่มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการรักษาโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบันจะให้ผลการรักษาในระยะเวลานั้นๆเท่านั้น และมีผลข้างเคียงตามมาหลังได้รับการรักษา จึงมีการเริ่มพัฒนาหาสารสกัดจากสมุนไพรและพืชมาช่วยในการรักษาโรคสะเก็ดเงินเพิ่มมากขึ้น มีการศึกษาในสมุนไพรของประเทศจีนโดยพบว่ามฤตทิ์ถ่าน การเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวิเคราะห์จากผล MTT assay [39] และยังมีการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินได้ [40] แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงของฤทธิ์สารสกัดสมุนไพร และเมื่อไม่นานมานี้มีการนำสารสกัดสมุนไพรไทยในกลุ่ม

ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังในงานสาธารณสุข จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระรัตนราชสุตาภยยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง 11 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (HaCaT) พบว่าสารสกัดของขมิ้น, ข่าและน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งเซลล์ผิวหนัง โดยมีการแสดงออกของยีน Transforming growth factor-alpha (TGF- α) ที่ลดลง [8] เนื่องจาก TGF- α มีความสำคัญเกี่ยวกับการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง [41] ซึ่งการแสดงออกของ TGF- α พบมากที่บริเวณรอยโรคสะเก็ดเงิน [42] แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิดอาจมีกลไกอื่นในการต้านโรคสะเก็ดเงิน เช่น การยับยั้งการกระตุ้น Transcription factors (activator protein 1(AP-1), NF- κ B และ STAT, การกระตุ้น pro-apoptotic protein และ pro-caspases ต่างๆ

NF- κ B เป็น Transcription factors ที่ค้นพบโดย Sen และ Baltimore [43] ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ K light chain ของ Immunoglobulins ใน B-lymphocyte และยังเป็นตัวกระตุ้นของยีนต่างๆมากมายและการตอบสนองทางชีววิทยาของเซลล์ ดังนั้นการที่ NF- κ B ทำหน้าที่มากหรือน้อยผิดปกตินำไปสู่การเกิดโรคได้ โดยกลไกของสัญญาณ NF- κ B (NF- κ B signaling pathway) ทำให้เกิดโรคอักเสบเรื้อรัง, โรคสะเก็ดเงินได้ ดังนั้นการมุ่งที่จะศึกษากลไกของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B จึงเป็นอีกทางหนึ่งในการที่จะเข้าถึงกลไกของการเกิดโรคสะเก็ดเงินได้มากยิ่งขึ้น

ในกลุ่มของ NF- κ B สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบไปด้วย 5 กลุ่มย่อย คือ p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB, C-Rel ซึ่งลักษณะของทั้ง 5 กลุ่มจะพบ Rel homology domain (RHD) เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วย nuclear localization sequence, ส่วนที่จับกับ DNA, ส่วนที่ทำให้เกิด Dimerization และ ส่วนที่จับกับ κ B-inhibitory proteins

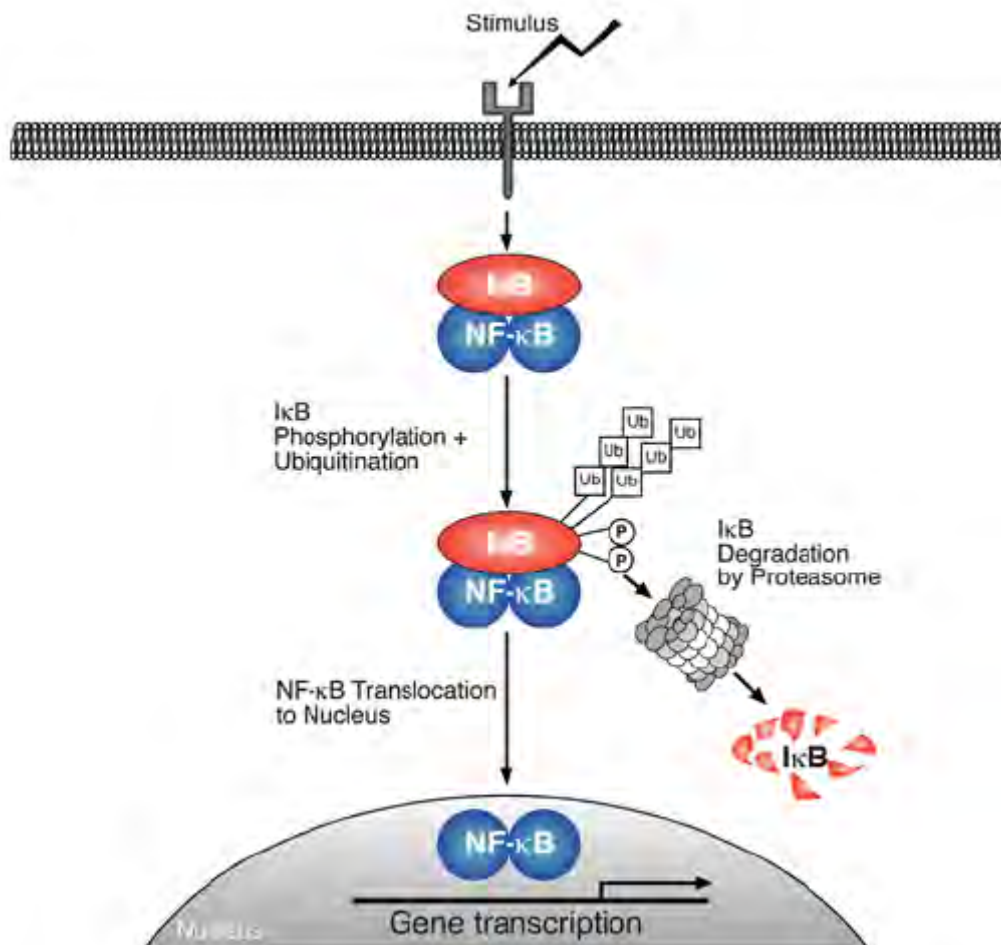
NF- κ B / Rel proteins



ภาพที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของ NF- κ B/Rel proteins [44]

ทั้ง 5 กลุ่มย่อยพบว่าจะจับกันเป็นรูปแบบ Homodimer หรือ Heterodimer ในการแสดงออก แต่หลายการศึกษาพบว่า p50 และ p65 จะพบรูปแบบ Heterodimer มากกว่า Homodimer [45] โดยจะเป็นรูปแบบไหนจะขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นที่จำเพาะ ส่งผลให้มีการแสดงออกต่อ ยีนที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่ารูปแบบ Heterodimer จะทำงานได้เร็วและสามารถไปจับกับยีนอื่น นอกจากยีนเป้าหมาย แต่ก็ยังพบว่า p52/RelB ทำงานได้ช้าและ RelB/p65 มีการทำงานแบบ ยับยั้ง [46] ส่วนรูปแบบ Homodimer เช่น p50/p50, p52/p52 จะทำงานในการกระตุ้นการ Transcription ได้ไม่ดี แต่อย่างไรก็ตามก็พบว่า p50/p50 สามารถกระตุ้นการ Transcription ได้ [47]

การแสดงออกของ p50 จะเกิดจาก p105 (I κ B-like molecules) ถูกย่อยโดย proteasome ทำให้ p50 เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสต่อไปได้ [44] ส่วนการแสดงออกของ p52 เกิดจากการที่ p100 ถูกควบคุมจากการกระตุ้นของ NF- κ B-inducing kinase (NIK) และ MAP kinase kinase kinase (MAP3-kinase) ซึ่งแสดงออกผ่านทาง (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-1) IKK-1 [48, 49] โดย IKK-1 จะเติมหมู่ฟอสเฟตไปที่ตำแหน่งของ serines 2 ตัวในตำแหน่ง C-terminal มีผลทำให้ p100 เกิดการเติมหมู่ ubiquitin (ubiquitination) โดย SCF ^{β TrCP} ubiquitin E3 ligase [50] และเกิดการย่อยอย่างไม่สมบูรณ์โดย Proteasome ทำให้เหลือเป็น p52 ซึ่งจะจับกับ RelB แล้วเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสต่อไป



ภาพที่ 2.4 แสดงการเคลื่อนที่ของ NF-κB เข้าสู่นิวเคลียส [44]

กลไกการทำงานของ NF-κB

ในภาวะไม่มีสิ่งกระตุ้น NF-κB dimer จะอยู่ในสภาวะไม่ตอบสนอง (inactive) เนื่องจากจับอยู่กับ κB inhibitors ตัวอย่างเช่น IκB-α, IκB-β, IκB-ε เป็นต้น โดย IκB proteins มีส่วนของ Ankyrin repeat region ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับ Nuclear localizing signal ของ RHD ช่วยป้องกันในการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส อีกทั้ง p105 และ p100 ซึ่งมี Ankyrin repeat region ในส่วน C-terminal ที่สามารถแสดงหน้าที่ได้เหมือนกับ IκBs มากกว่าไปนั้น Promoter ที่ใช้ NF-κB1 สามารถสร้าง mRNA ในส่วนของ C-terminal ของ p105 เรียกโปรตีนส่วนนั้นว่า IκBζ [51]

สิ่งกระตุ้นที่จำเพาะ เช่น Lipopolysaccharide (LPS), TNFα, IL-1 และสิ่งกระตุ้นที่ไม่จำเพาะ เช่น รังสี γ, UV และ oxidative stress สามารถกระตุ้นกลไกของ NF-κB ทำให้เกิดการ

แยกตัวของ NF- κ B ออกจาก I κ B proteins โดยการทำงานของ IKK ซึ่ง IKK มีส่วนประกอบอยู่ 2 ส่วนคือ

1. ส่วน catalytic คือ IKK-1 และ IKK-2
2. ส่วน regulatory คือ NF- κ B essential modulator (NEMO) หรือ IKK- γ

โดย IKK-2 เป็นตัวสำคัญในการเติมหมู่ฟอสเฟสให้กับ I κ B- α ที่ตำแหน่งของ serine 32 และ 36 ใน N-terminal ผ่านการกระตุ้นของ TNF α และ IL-1 [52] ทำให้เกิดตำแหน่งสำหรับ ubiquitin นำไปสู่การเกิด polyubiquitination ตามมาด้วยการถูกทำลายของ I κ B- α ใน 26s proteasome ซึ่งการสลายของ I κ B- β และ I κ B- ϵ พบว่าผ่านกระบวนการที่คล้ายกับ I κ B- α [53] การแยกกันระหว่าง I κ B proteins และ NF- κ B proteins ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ NF- κ B proteins เข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับ promoter ของยีนเป้าหมาย

สามารถแบ่งกลไกที่ NF- κ B proteins เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ 3 กลไก ดังนี้

1. Classical pathway หรือ Canonical pathway

สิ่งกระตุ้นคือ TNF- α , IL-1, CD40L, LPS ทำให้เกิดการสลายของ I κ B- α และเกิดการแยกตัวของ p50/p65 และ p50/C-Rel เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส พบว่ากลไกนี้มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน, การตอบสนองต่อการอักเสบ และการอยู่รอดของเซลล์

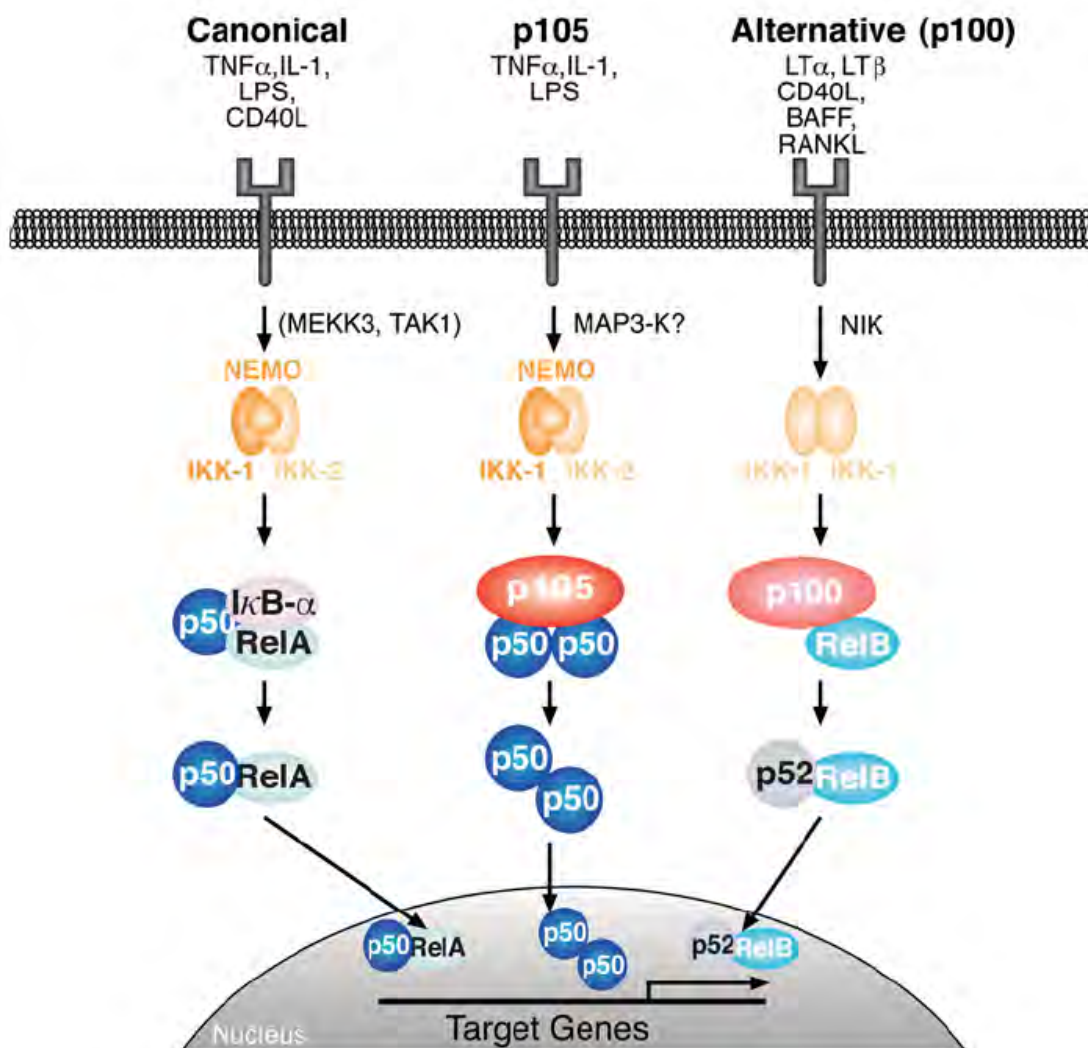
2. Alternative pathway หรือ non-canonical pathway

สิ่งกระตุ้นคือ LT α , LT β , CD40L, B-cell activating factor (BAFF) และ Receptor Activator of NF- κ B ligand (RANKL) อาศัยการทำงานของ NIK และ IKK-1 [48, 49] ในการกระตุ้นเปลี่ยน p100 ไปเป็น p52 และเกิดการรวมตัวของ p52 กับ RelB เพื่อเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส พบว่ากลไกนี้มีความเกี่ยวข้องกับ adaptive immunity, การสร้าง secondary lymphoid organs และการพัฒนาของ B cells

3. p105 pathway

สิ่งกระตุ้นคือ TNF α , IL-1 และ LPS ซึ่งกลไกนี้มีการย่อย p105 อย่างสมบูรณ์ เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟต ที่ลำดับของ proline-P, glutamate-E, serine-S, threonine-T (PEST) โดย IKK นำไปสู่กระบวนการ polyubiquitination และย่อยสลายอย่างสมบูรณ์เป็นผลทำให้มีการปล่อย

p50 homodimer [54] เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสต่อไป พบว่ากลไกนี้มีความจำเพาะกับระบบภูมิคุ้มกัน และการตอบสนองต่อการอักเสบ



ภาพที่ 2.5 แสดงกลไกทั้ง 3 กลไกในการเคลื่อนที่ของ NF- κ B

เข้าสู่นิวเคลียสผ่านตัวกระตุ้นต่างๆ [44]

สารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B

สารชีวโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B พบว่ามีอยู่หลายชนิด แต่ที่ใช้ในการศึกษานี้มีอยู่ 10 ชนิด คือ

1. IRF-1

สมาชิกในกลุ่มของ IRF มีบทบาทในการควบคุมยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย Interferon, การติดเชื้อของไวรัส, ระบบภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของเซลล์ [55, 56] มีการวิจัยที่พบว่า IRF1 มีความสัมพันธ์กับ NF- κ B โดยมีตำแหน่งในการจับกับ Promoter ที่คล้ายกันในหลายยีน เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับ Nitric oxide synthase, IL-15, Major histocompatibility complex class-1 (MHC class-1) และ VCAM1 [57, 58, 59, 60]

2. TNFAIP3

TNFAIP3 หรือ A20 เป็น โปรตีนในไซโตพลาสซึมมีโครงสร้างเป็นแบบ Zinc-finger protein ซึ่งจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ผ่านทาง Ubiquitin [61, 62, 63, 64] ผลของการยับยั้งช่วยป้องกันผลของการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยควบคุมการแสดงออกของยีน E-selectin, VCAM, IL-6 และ IL-8 แต่มีผลทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis เพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก NF- κ B ถูกยับยั้ง แต่บางการศึกษาพบว่าสามารถช่วยป้องกันเซลล์ตายแบบ Apoptosis เนื่องจากไปยับยั้งการทำงานของ caspase 8 [65]

3. CD40

เมื่อมีการจับกันระหว่าง CD40 และ CD40L มีผลต่อการกระตุ้นของ NF- κ B ทั้งในกลไก Classical pathway และ Alternative pathway ดังที่กล่าวมาข้างต้น

CD40 นอกจากพบว่าแสดงออกบน Lymphoid cells ยังพบบน Epidermal cells, Vascular endothelial cells, Epidermal langerhans cells และ Fibroblasts [66, 67, 68, 69]

4. CSF-1

CSF-1 เป็นยีนเป้าหมายที่ NF- κ B จะเข้าไปจับบริเวณ Promoter ซึ่งหน้าที่ของ CSF-1 คือการควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ Monocyte และ Macrophage [70, 71, 72, 73]

5. IL-8

IL-8 เป็นยีนเป้าหมายที่ NF- κ B จะเข้าไปจับบริเวณ Promoter โดยผ่านกลไก Classical pathway หน้าที่ของ IL-8 คือเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, ควบคุมการเกาะติดของเซลล์, การกระตุ้น Neutrophil และการหลั่ง Histamine

6. VCAM1

VCAM1 เป็นยีนเป้าหมายที่ NF- κ B จะเข้าไปจับบริเวณ Promoter โดยผ่านกลไก Classical pathway หน้าที่ VCAM1 คือ จะเป็นส่วนที่ทำให้เซลล์ที่มีตัวรับของ VCAM1 เข้าจับแล้ว เซลล์นั้นจะเคลื่อนที่ออกจากเซลล์ endothelial cells

7. NF- κ B1

เป็นสมาชิกในกลุ่มของ NF- κ B

8. NF- κ B2

เป็นสมาชิกในกลุ่มของ NF- κ B

9. RelA

เป็นสมาชิกในกลุ่มของ NF- κ B

10. RelB

เป็นสมาชิกในกลุ่มของ NF- κ B

ความสำคัญของ NF- κ B ต่อโรคสะเก็ดเงิน

NF- κ B มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและการทำหน้าที่ของเซลล์ผิวหนัง ซึ่งพบว่ามี การแสดงออกของระดับโปรตีน และ mRNA ของ p50, p65, RelB และ c-Rel ในไซโตพลาสซึม ของ Primary cultured keratinocytes เช่นเดียวกับ Keratinocyte cell lines [74] ในด้าน การศึกษา Immune histochemical แสดงถึงการหายไปอย่างมีนัยสำคัญของ p65 ในเซลล์ผิวหนัง ปกติ แต่มีการแสดงออกที่สูงในบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงิน [75] มากไปกว่านั้น การเปลี่ยนแปลง บางอย่างของ NF- κ B ในบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงินเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ปกติ โดยการนำสาร สกัดจากนิวเคลียสของเซลล์ของทั้ง 2 ประเภทมาศึกษาพบว่า ที่บริเวณรอยโรคสะเก็ดเงินมีการ แสดงออกของ IL-8 promoter (ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุหนึ่งในการดำเนินโรค) ที่สูงกว่าปกติซึ่งผลของ การแสดงออกนี้สอดคล้องกับระดับของ IL-8 mRNA และโปรตีน [76] ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงภาวะที่ มีการอักเสบอย่างเรื้อรังในโรคสะเก็ดเงิน และความไม่สมดุลกันระหว่างบทบาทในการต่อต้านการ ตายแบบ apoptosis และบทบาทในการยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์ จึงมีผลทำให้บริเวณรอยโรค สะเก็ดเงินมีการพัฒนาของเซลล์ผิวหนัง, การเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังมากกว่าปกติ [76] และ ในสัตว์ทดลองที่ถูกรบกวนการส่งสัญญาณของ NF- κ B พบว่ามีผิวหนังที่ไม่สมบูรณ์ เช่น เมื่อ Knockout I κ B- α มีผลทำให้เกิด Hyperplasia ของเซลล์ผิวหนังชั้น Epidermis และมีการแทรกตัว

ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากที่ผิวหนังชั้น Dermis ส่วนการแสดงออกที่มากของ p65 นำไปสู่การเกิด Hyperplasia ของเซลล์ผิวหนังชั้น Epidermis [77]

เมื่อไม่นานมานี้จากการศึกษา Genomewide scan จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจำนวน 1,409 คนเทียบกับกลุ่มปกติ พบว่าบริเวณ HLA-C มี 3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกของสัญญาณ IL-23 และ 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกของสัญญาณ NF- κ B [78] ซึ่งในประเทศไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงินจำนวน 206 ราย พบว่ามีความสัมพันธ์กับ IL-12B และ IL-23R [79]

นอกจากนี้ยังพบว่า CD40 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นที่บริเวณรอยโรคสะเก็ดเงินทำให้มีการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผิวหนัง [66, 67, 68, 69] ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดแต่อาจเป็นผลจากการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ผ่านกลไก Classical pathway และ Alternative pathway

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ากลไกของ NF- κ B เป็นอีกกลไกหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยถึงระดับโมเลกุลในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาโรคสะเก็ดเงินทั้งด้านกลไกของการเกิดโรคและการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นกว่าในปัจจุบันโดยใช้สมุนไพรไทยเข้ามาช่วยในการรักษาและเนื่องจากประเทศไทยมีสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคที่หลากหลาย แต่พบว่ายังมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรไทยในการรักษาโรคสะเก็ดเงินยังค่อนข้างน้อยดังนั้นผลของการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ จะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่เพื่อให้เข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคสะเก็ดเงินด้วยสารสกัดจากสมุนไพรไทยเพื่อเป็นความหวังใหม่ให้กับผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัยมีดังนี้

1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ผิวหนังมนุษย์ HaCaT ที่ซื้อจากบริษัท Cell line service

1.2 แบคทีเรีย

ใช้เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งไม่มียีนดื้อยา Ampicillin โดยเพาะเลี้ยงใน Terrific broth (TB) หรือ Lysogeny broth (LB) หรือ LB agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3 ตัวอย่างของสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงิน

สมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงินที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง มีทั้งหมด 3 ชนิด ซึ่งใช้เอทานอล ในการสกัด โดยมีสมุนไพรไทยดังนี้

- | | | |
|-----------------|--|-------|
| 1.3.1 ขมิ้นชัน | ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ | เหง้า |
| ชื่อสามัญ | Turmeric, Curcuma | |
| ชื่อวิทยาศาสตร์ | <i>Curcuma Longa</i> Linn., <i>Curcuma domestica</i> Valetton. | |
| ชื่อวงศ์ | Zingiberaceae | |
| ชื่อท้องถิ่น | ขมิ้นแกง ขมิ้นชัน ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขี้มิ้น ตายอ สะยอ หมิ้น | |
| 1.3.2 ข่า | ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ | เหง้า |
| ชื่อสามัญ | Galangal, Greater Galangal, Chinese Ginger | |
| ชื่อวิทยาศาสตร์ | <i>Alpinia galanga</i> (Linn.) Swartz., <i>Languas galanga</i> (Linn.) Stuntz. | |
| ชื่อวงศ์ | Zingiberaceae | |
| ชื่อท้องถิ่น | ข่า ข่าใหญ่ ข่าหลวง ข่าหยวก สะเออเคย สะเซย | |
| 1.3.3 น้อยหน่า | ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ | ใบ |
| ชื่อสามัญ | Custard apple, Sugar apple, Sweet sop | |

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Annona squamosa* L.
 ชื่อวงศ์ Annonaceae
 ชื่อท้องถิ่น หมักเขียบ ลาหนั่ง มะนอแน่น มะแน่น มะอ้อจ้ำ มะโอจ่า เตียบ
 ซึ่งสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดได้มาจาก วิสาหกิจ ทอกระภาค เป็นผู้สกัด [8]

2. เครื่องมือที่ใช้และวัสดุสารเคมีในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยสามารถแบ่งได้เป็น 3 หมวดคือ

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย

Dulbecco's Modified Eagle Medium/ High glucose (DMEM: with 4 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 units/ml Penicillin/ 10,000 µg/ml Streptomycin)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25เปอร์เซ็นต์ (1X)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS: without calcium without magnesium)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Recombinant Human TNF- α	PeptoTech, สหรัฐอเมริกา
Recombinant Human IFN- γ	PeptoTech, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
Trypan Blue Stain 0.4เปอร์เซ็นต์	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบต่อการแสดงออกของ ระดับโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลในเครือข่าย

สัญญาณของ NF- κ B ในระดับ mRNA

TRIzol Reagent®	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Isopropanol	Merck, เยอรมนี
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega, สหรัฐอเมริกา
Oligo-dT 17-mer	Biobasic, แคนาดา
Primer	Biobasic, แคนาดา
Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas, แคนาดา
RiboLock™	Fermentas, แคนาดา
Taq DNA polymerase	New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา และ Fermentas, แคนาดา
DNA Ladder 100 bp	Fermentas, แคนาดา
GenePure LE Agarose	ISE BioExpress, สเปน

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบต่อการแสดงออกของ Promoter activity ของสารชีวโมเลกุลใน

เครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B

FlexiGene DNA Kit	Qiagen, เยอรมนี
Ethidium Bromide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
2-Propanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Absolute Ethanol	Merck, เยอรมนี
n-butanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
GenePure LE Agarose	ISC BioExpress, สหรัฐอเมริกา

Pfu DNA polymerase	Fermentas, แคนาดา
Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Gel Extraction Spin Column	
pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega, สหรัฐอเมริกา
pSGG_prom vector	Swicthgear genomics,
NF- κ B biomarker set	สหรัฐอเมริกา
Restriction enzyme	NEB, สหรัฐอเมริกา
T4 DNA Ligase	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Tryptone Peptone	Becton Dickinson, สหรัฐอเมริกา
Bacto [™] Yeast Extract	Becton Dickinson, สหรัฐอเมริกา
Bacto-Agar	Becton Dickinson, สหรัฐอเมริกา
AMPILIN (Amplicilin,Ampicilin Sodium)	Atlantic Laboratories, ประเทศไทย
Sodium chloride	Merck, เยอรมนี
Calcium chloride dehydrate	Merck, เยอรมนี
Magnesium chloride	APSFinechem, ออสเตรเลีย
Sodium acetate	Merck, เยอรมนี
Potassium acetate	SigmaAldrich, สหรัฐอเมริกา
Tris Base	Promega, สหรัฐอเมริกา
PureLink [™] HiPure Plasmid	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
DNA Purification Kits	

NucleSpin[®] Plasmid Macherey-nasel, เยอรมนี

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Promega, สหรัฐอเมริกา

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

Thermal Cycler รุ่น PTC-200	MJ Research Inc., สหรัฐอเมริกา
Thermal Cycler รุ่น EP Gradient S	Eppendorf, เยอรมนี
Thermal Cycler รุ่น PX2	ThermoScientific, Inc, สหรัฐอเมริกา
Gel Electrophoresis Apparatus	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Laminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer (FINE VORTEX)	FINEPCR, เกาหลีใต้
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
Cell Culture Flask (25, 75 cm ²)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Microcentrifuge tube (0.2 และ 0.6 ml.)	Axgen scientific, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml.)	Biologix Research company, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (10, 200, 1000 µl.)	Sorenson [™] BioScience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Sterile aerosol pipette tip	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา

(10, 200, 1000 μ l.)	
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี
Water Bath	Memmert, เยอรมนี
-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80 °C ULT Deep Freezer	IIShin Lab, เกาหลีใต้
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้
Micro High Speed Refrigerated centrifuge รุ่น VS-15000 CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd , เกาหลีใต้
Luminescence (Luminometer)	PerkinElmer, สหรัฐอเมริกา
รุ่น VICTOR ³	
UV-Visible Spectrophotometer	ThermoScientific, Inc, สหรัฐอเมริกา
(NanoDrop รุ่น 1000)	

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เตรียม Luciferase reporter gene constructs

เพื่อเพิ่มจำนวนของ Luciferase reporter gene constructs (SwitchGear NF- κ B Biomarker Set) ให้มีปริมาณเพียงพอและทำการโคลนชิ้นส่วนของ Promoter ของ NF- κ B1 และ RelA แล้วจึงทำการสกัดแยกออกมาให้บริสุทธิ์ เพื่อที่ใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HaCaT ในขั้นตอนต่อไปได้

นำ Luciferase reporter gene constructs (ได้รับการสนับสนุนจาก SwitchGear Pathways Grant Program) ซึ่งมีการแทรกส่วน Promoter ความยาวประมาณ 1,000 คู่เบส ของ RelB, VCAM1, TNFAIP3, IRF-1, CSF-1, IL-8, CD40, NF- κ B2 และ pSGG_prom ที่ไม่มี insert มาเพิ่มจำนวนโดยการถ่ายโอน Plasmid constructs นี้เข้าสู่ แบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ด้วยการ Electroporation เพื่อเปิดรูบนผนังเซลล์ (Cell wall) ของ *E.coli* DH5 α ในขั้นแรกนำ *E.coli* DH5 α ที่เตรียมไว้เป็น Competent cell (เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส) ออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และผสมกับ Plasmid constructs (30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ใน Cuvette ที่มีขั้วไฟฟ้าที่มีช่องว่างระหว่างขั้วทั้งสอง 1 มิลลิเมตร ใช้กระแสไฟฟ้า 1,800 โวลต์ นาน 3 วินาที ในการถ่ายโอน ผลของการถ่ายโอนทำให้ Plasmid constructs เข้าสู่เซลล์ได้ หลังจากนั้นรีบเติม TB broth เข้าไป 1 มิลลิลิตรแล้วรีบนำแบคทีเรียไปเลี้ยง ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแบคทีเรียออกมา Spread ให้ทั่ว LB agar + Ampicillin นำแบคทีเรียไปเลี้ยง ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง หลัง 24 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบ Plasmid constructs ที่ถูกถ่ายโอนเข้าแบคทีเรียโดยการโคลน PCR โดยเตรียมส่วนผสมของสารในการทำ PCR ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา PCR

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10x Thermo บัฟเฟอร์	2
10 ไมโครโมล dNTP Mix	0.2
10 ไมโครโมล Forward primer (RV3)	0.125
10 ไมโครโมล Reward primer (pSGG_prom)	0.125
เอนไซม์ Taq-DNA polymerase	0.125
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	16.425
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร	
Forward primer (RV3) : 5' CTAGCAAATAGGCTGTCCC 3'	
Reward primer (pSGG_prom) : 5' CTTAATGTTTTGGCATCTCCA 3'	

หลังจากนั้นทำ PCR โดยปฏิกิริยาจะเริ่มด้วย Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 51.9 องศาเซลเซียส 30 วินาที และปฏิกิริยา Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ สิ้นสุดปฏิกิริยาด้วย Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที

3.2 การสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter ยีน NF- κ B1 และ RelA เพื่อการโคลน

3.2.1 ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA

ออกแบบ Primer ให้มีความจำเพาะต่อ Promoter ของยีน NF- κ B1 และ RelA โดยการใช้โปรแกรม Lasergene ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

NF- κ B1 (-979 to +15): เส้น Forward ซึ่งมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I: 5-
cttgACGCGIGCTAAGCTTTCAGTTGT-3 และเส้น Reverse primer ซึ่งมีตำแหน่งของเอนไซม์
ตัดจำเพาะ *Bgl*II: 5-ccAGATCICGCTCACTCTCTCACTTCCT-3

RelA (-1061 to +165): เส้น Forward primer ซึ่งมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI*: 5-acGCTAGCCGTTAGGAGCCTTCTCAC-3 และเส้น Reverse primer ซึ่งมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*: 5-cacAAGCTTTCCTTCTCAAGTGCC-3

หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR ปฏิบัติการจะเริ่มด้วย Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 58.1 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับ NF- κ B1 promoter และ 60.4 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับ RelA promoter และปฏิบัติการ Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ สิ้นสุดปฏิบัติการด้วย Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที โดยในการทำปฏิบัติการ PCR นี้จะใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (NEB) 2 ส่วนต่อ *Pfu* DNA polymerase 1 ส่วนซึ่ง *Pfu* polymerase (Fermentas) จะมีฤทธิ์ในการตรวจสอบเบสที่สร้างขึ้นมาโดยจะทำงานจากทางด้าน 3' ไปยังด้าน 5' เรียกคุณสมบัตินี้ว่า Proofreading เพื่อเพิ่มความถูกต้องของลำดับเบสที่สร้างขึ้นมา

นำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำการตัดแถบ PCR ที่มีขนาด 1,012 คู่เบสสำหรับ NF- κ B1 promoter และ 1,243 คู่เบสสำหรับ RelA promoter เพื่อแยกแถบ PCR ที่เราต้องการออกจากวุ้นอะกาโรส โดยใช้ชุด Quantum PerpTM Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Promega) และทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3M CH₃COONa (pH 5.5) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอและ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของดีเอ็นเอ แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที 4 องศาเซลเซียสตามด้วยการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 1 มิลลิลิตร ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยการปั่นแห้ง (Speed vac) นาน 10 นาที แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอหลังการตกตะกอนด้วยเครื่อง Nanodrop

3.2.2 โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA เข้าสู่พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector (Promega) และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pGEM[®]-T Easy vector ด้วยการทำให้โคลน PCR

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาเชื่อมกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector ด้วยน้ำยา LigaFast[™] Rapid DNA Ligation System (Promega) โดยเตรียมส่วนผสมของสาร ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Ligation

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
2x บัฟเฟอร์	5
เอนไซม์ T4 ligase	0.33
พลาสมิด pGEM [®] -T Easy vector (50 นาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร)	1
ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์	ปริมาตรตามการคำนวณ Molar ratio
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	เติมให้ปริมาตรของปฏิกริยา ครบ 10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	

สูตรการคำนวณ Molar ratio

$$\frac{\text{ความเข้มข้นของ Vector (ng)} \times \text{ความยาวของ Insert (Kbp)} \times 3}{\text{ความยาวของ Vector (Kbp)}} = \text{ความเข้มข้นของ Insert (ng)}$$

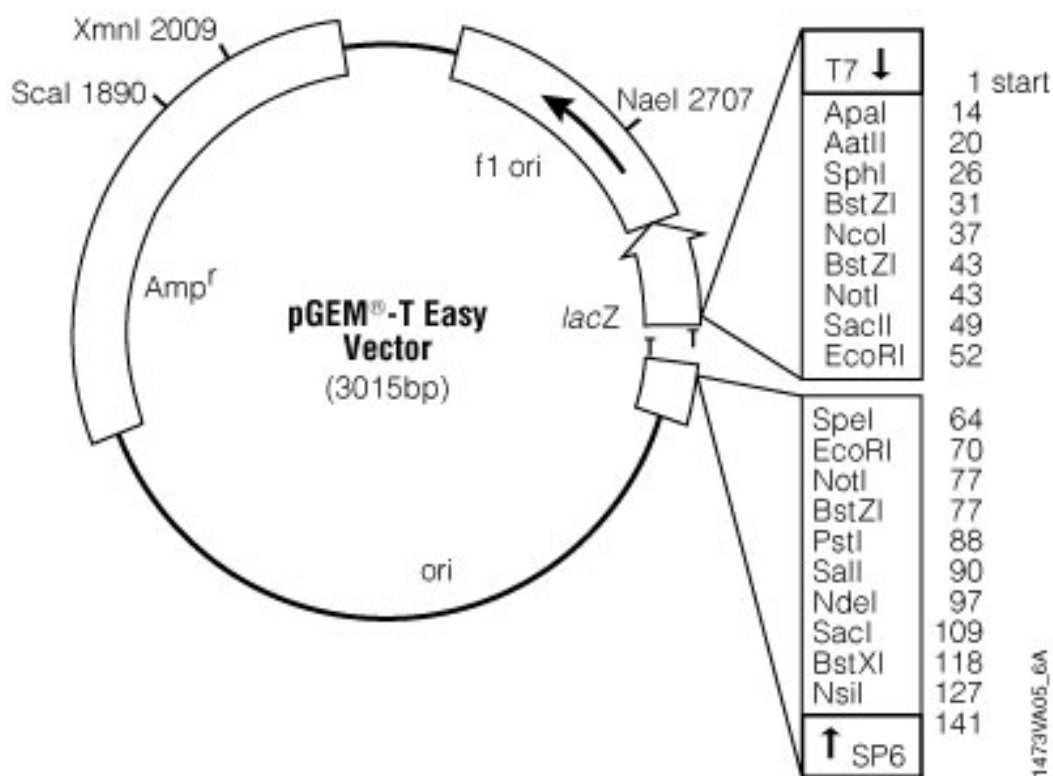
เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงนำมาล้างไอออนต่างๆโดยการใช้ n-butanol 200 ไมโครลิตร (ใช้อัตราส่วน 1:20) นำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที 4 องศาเซลเซียสแล้ว ตากตะกอนให้แห้งด้วยการปั่นแห้ง (Speed vac) นาน 10 นาที ตามด้วยการละลายตะกอนโดยใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาถ่ายโอนเข้าสู่ แบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ด้วยการ Electroporation (ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูก Spread ด้วย X-gal, IPTG อย่างละ 40 ไมโครลิตร) ทำ

การคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำโคโลนี PCR เพื่อตรวจสอบว่าในพลาสมิดมีการแทรกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการในบริเวณ Multiple cloning หรือไม่ โดยเตรียมส่วนผสมของสารในการทำ PCR ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา PCR

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10x บัฟเฟอร์ Pfu ที่ไม่มี Mg^{2+}	2
Mg^{2+}	0.925
10 ไมโครโมล dNTP Mix	0.2
10 ไมโครโมล Forward primer (T7)	0.125
10 ไมโครโมล Reward primer (SP6)	0.125
เอนไซม์ Taq-DNA polymerase	0.125
DMSO	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	16.75
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร	
Forward primer (T7) : 5' TAATACGACTCACTATAGG 3'	
Reward primer (SP6) : 5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'	

หลังจากนั้นทำ PCR โดยปฏิกิริยาจะเริ่มด้วย Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และปฏิกิริยา Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ สิ้นสุดปฏิกิริยาด้วย Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที



ภาพที่ 3.1 แสดง pGEM-T easy vector

ที่มา: http://www.promega.com/paguide/images/1473VA05_6A.jpg

3.2.3 การสกัดพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรียและการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดออกจากเชื้อแบคทีเรีย

คัดเลือกโคโลนีที่มีการแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เราต้องการในพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector มาเลี้ยงใน TB broth + Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการสกัดเอาพลาสมิดออกมาโดยใช้ชุด Nucleospin[®] plasmid (miniprep) (Macherey-Nagel) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ครบ 24 ชั่วโมง ไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 g นาน 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ตกตะกอนทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ A1 250 ไมโครลิตร แล้วผสมสารให้เข้ากันด้วยการใช้เครื่อง Vortex เมื่อสารเข้ากันแล้วเติม A2 250 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการกวนหลอดไปมาเพื่อป้องกันการปนของสารพันธุกรรมของแบคทีเรียเอง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาเติมน้ำบัฟเฟอร์ A3 300 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการกวนหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นที่ 11,000 g นาน 5 นาที ต่อจากนั้นนำ

หลอด 1.5 ไมโครลิตร (เป็นหลอด Collection) มารองหลอด column แล้วเติมบัฟเฟอร์ A4 600 ไมโครลิตรเพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนต่างๆบน Silica membrane แล้วนำไปปั่นที่ 11,000 g นาน 1 นาที แล้วเทส่วนใสที่อยู่ในหลอด Collection ออกแล้วทำให้ส่วนน้ำออกไปให้มากที่สุดโดยการปั่นที่ 11,000 g นาน 2 นาที เมื่อครบเวลานำหลอด 1.5 ไมโครลิตร (เป็นหลอด เก็บพลาสติก) มารองหลอด column เพื่อทำการชะพลาสติกออกมาโดยการเติมบัฟเฟอร์ AE 50 ไมโครลิตร แล้วตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปปั่นที่ 11,000 g นาน 1 นาที พลาสติกจะตกลงมาอยู่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตร แล้วนำพลาสติกมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI/BglII* สำหรับ NF- κ B1 promoter และ *NheI/HindIII* สำหรับ RelA promoter โดยเตรียมส่วนผสมของสารดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร) สำหรับ NF- κ B1 promoter	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร) สำหรับ RelA promoter
10x บัฟเฟอร์	2	2
<i>MluI</i>	1	
<i>BglII</i>	1	
<i>NheI</i>		1
<i>HindIII</i>		1
พลาสติก	2 (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม)	2 (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	14	14
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร นำไปวางที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง		

หลังจากครบ 24 ชั่วโมงนำแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดออกจากพลาสติกบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที

3.2.4 ตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนของ Promoter ยีน NF- κ B1 และ RelA ด้วยการ Sequence

นำพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วว่ามีแทรกด้วยชิ้นส่วนของ Promoter ยีน NF- κ B1 และ RelA มาตรวจสอบลำดับเบสด้วยการ Sequence (1st base, มาเลเซีย) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

3.2.5 โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA เข้าสู่พลาสมิด pSGG_prom vector (Switchgear genomics) และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pSGG_prom vector ด้วยการทำโคลน PCR

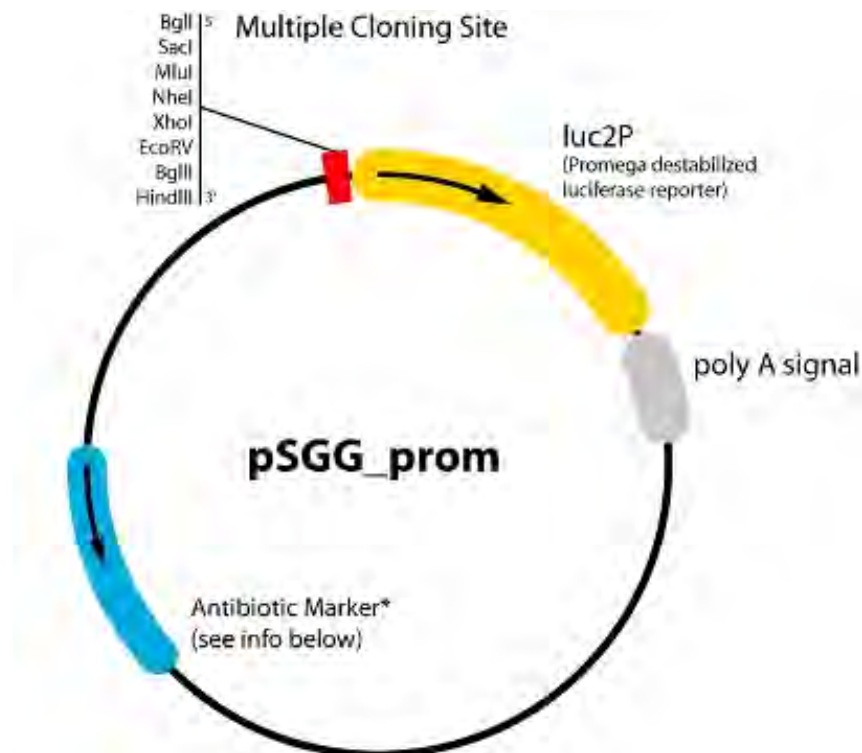
นำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบลำดับเบสและพลาสมิด pSGG_prom vector ที่ไม่มีการแทรกของดีเอ็นเอ มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามตารางที่ 3.4 หลังจากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดออกจากพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector บนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที เพื่อแยกแถบ PCR ที่เราต้องการออกจากวุ้นอะกาโรสโดยใช้ชุด Quantum Perp[™] Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns และ ตกตะกอนด้วย 3M CH₃COONa (pH 5.5) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของพลาสมิดและ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของพลาสมิด ส่วนพลาสมิด pSGG_prom vector ที่ไม่มีการแทรกของดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนำไปตกตะกอนเช่นเดียวกัน แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของพลาสมิดหลังการตกตะกอนด้วยเครื่อง Nanodrop

หลังจากนั้นนำพลาสมิดและชิ้นส่วนของ Promoter NF- κ B1 และ RelA ที่บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกัน ด้วยน้ำยา LigaFast[™] Rapid DNA Ligation System โดยเตรียมส่วนผสมของสารดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Ligation

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
10x บัฟเฟอร์	2
เอนไซม์ T4 ligase	0.33
พลาสมิด pSGG_prom ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	ปริมาตรตามการคำนวณ Molar ratio
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์	ปริมาตรตามการคำนวณ Molar ratio
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	เติมให้ปริมาตรของปฏิกริยา ครบ 10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงนำมาล้างไอออนต่างๆโดยการใช้ n-butanol 200 ไมโครลิตร (ใช้อัตราส่วน 1:20) นำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที 4 องศาเซลเซียสแล้วตากตะกอนให้แห้งด้วยการปั่นแห้ง (Speed vac) นาน 10 นาที ตามด้วยการละลายตะกอนโดยใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาถ่ายโอนเข้าสู่ แบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ด้วยการ Electroporation (ใช้อาหารเลี้ยง LB agar + Ampicillin) และทำโคลนนิ่ง PCR เพื่อตรวจสอบว่าในพลาสมิดมีการแทรกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการในบริเวณ Multiple cloning หรือไม่ โดยทำตามตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นทำ PCR โดยปฏิกริยาจะเริ่มด้วย Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 51.9 องศาเซลเซียส 30 วินาที และปฏิกริยา Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ สิ้นสุดปฏิกริยาด้วย Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที



ภาพที่ 3.2 แสดง pSGG_prom vector

ที่มา: <http://switchgeargenomics.com/products/control-constructs>

3.2.6 การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิดที่มีการแทรกชิ้นส่วนของ promoter จากขั้นตอนที่ 3.1 และ 3.2.5 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและหาลำดับเบส

หลังการตรวจสอบพลาสมิด pSGG_prom ที่มีการแทรกของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการด้วยการทำโคลน PCR แล้วนำมาสกัดเอาพลาสมิดออกมาโดยใช้ชุด Nucleospin® plasmid (miniprep) แล้วนำพลาสมิดมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังต่อไปนี้

CD40	ขนาด 1,081	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BglII</i>
CSF-1	ขนาด 914	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BglII</i>
IL-8	ขนาด 1,085	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BglII</i>
IRF-1	ขนาด 958	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BglII</i>
NF- κ B2	ขนาด 1,496	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>NheI/XhoI</i>
RelB	ขนาด 1,062	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>SacI/HindIII</i>
TNFAIP3	ขนาด 1,039	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BglII</i>

VCAM1	ขนาด 1,061	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BgIII</i>
NF- K B1	ขนาด 844	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>MluI/BgIII</i>
RelA	ขนาด 1,226	คู่เบส	ตัดด้วย	<i>NheI/HindIII</i>

หลังจากนั้นนำพลาสมิดทั้งหมดไปหาลำดับเบสโดยการ Sequence แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

3.2.7 การสกัดพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมาก และตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนการนำไปใช้ในขั้นตอน Reporter gene

เมื่อเราได้พลาสมิดที่ต้องการแล้ว นำมาทำการสกัดออกจากแบคทีเรียโดยชุดน้ำยา Purelink hipure plasmid maxiprep kit (Invitrogen) ซึ่งจะได้เฉพาะพลาสมิดที่เราต้องการออกมาเป็นจำนวนมากจากเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ไม่มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียปนเปื้อนมาด้วย ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

เริ่มจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่เราต้องการในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร LB broth 500 มิลลิลิตร + Ampicillin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทเชื้อแบคทีเรียลงในกระบอกปั่น 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่น โดยใช้เครื่อง Zonal Rotor Ultracentrifuge ปั่นนาน 10 นาที ที่ 4,000 g จนครบตามปริมาตรที่เราเลี้ยงแบคทีเรียไว้ ต่อมาเติมบัฟเฟอร์ Resuspend (R3) 10 มิลลิลิตร ในแต่ละกระบอก ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้เครื่อง Vortex แล้วดูดทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ Lysis (L7) 10 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้ห้าม ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้เครื่อง Vortex ให้ผสมแบบกลับหลอดปั่นไปมา 6-8 ครั้ง แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติมบัฟเฟอร์ Precipitation (N3) 10 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมสารโดยการให้ผสมแบบ Invert 6-8 ครั้ง หลอดปั่นไปมา 6-8 ครั้ง แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่อง High-Speed Refrigerated Centrifuge CF15R ด้วยความเร็ว 15,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องจนระอบปั่นเตรียม Equilibrate Column โดยนำ Column ออกมาตั้งบน หลอด 50 มิลลิลิตร แล้วเอาเทปใสพันให้แน่น เติมบัฟเฟอร์ Equilibration (EQ1) 30 มิลลิลิตร แล้วรอให้บัฟเฟอร์ไหลผ่าน column โดยใช้แรงโน้มถ่วงของโลก จนไหลถึงหยดสุดท้าย เมื่อปั่นครบเวลาปั่น นำส่วนใสมาใส่ใน Equilibrate Column แล้วรอให้ สารไหลลงมาตามแรงโน้มถ่วงของโลก เมื่อสารไหลจนถึงหยด

สุดท้าย ให้ใส่บัฟเฟอร์สำหรับล้าง (WB) 60 มิลลิลิตร และรอให้บัฟเฟอร์ไหลลงมาตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนถึงหยดสุดท้าย ต่อไปเป็นการชะตะกอนของพลาสติกที่ติดอยู่บนตัวกรองใน Column โดยนำหลอดปั่นมารองด้านล่าง Column แล้วใช้เทปใสติดให้ column ตั้งขึ้น และใส่บัฟเฟอร์ Elution (E4) 15 มิลลิลิตร ใน Column รอให้บัฟเฟอร์ไหลลงมาตามแรงโน้มถ่วงของจนถึงหยดสุดท้าย หลังจากนั้นตักตะกอนพลาสติกด้วย Isopropanol (ที่เย็น) 10.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการใช้เครื่อง Vortex แล้วนำไปปั่นที่ 15,000 g นาน 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาปั่น เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol (ที่เย็น) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 15,000 g นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วเทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นละลายพลาสติก โดยใช้บัฟเฟอร์ TE ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้ววัดความเข้มข้นของพลาสติกโดยใช้เครื่อง Nanodrop แล้วนำพลาสติกที่บริสุทธิ์ไปทำการตรวจสอบอีกครั้งโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามขั้นตอนที่ 3.2.6

3.3 การเตรียม Cell culture model เพื่อใช้ในการศึกษา

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) (Hyclone) ที่ผสมกับ Fetal bovine serum (Hyclone) 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 ยูนิต และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Hyclone) โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B

3.4.1 การสกัด Total RNA จากเซลล์ HaCaT

จากขั้นที่ 3.3 นำเซลล์ HaCaT มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุมโดยจำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ แล้วโดยนำเซลล์มาบ่มในตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ออกมากระตุ้นด้วย TNF α 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ IFN γ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการล้างแต่ละหลุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ก่อนนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรขมิ้น, ข่า และน้อยหน่า โดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดดังนี้

สารสกัดจากขมิ้น 6.700, 3.350 และ 1.675 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC_{50} = 6.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 10 เปอร์เซ็นต์ซีรัม DMEM/High glucose

สารสกัดจากข่าและน้อยหน่า 6.300, 3.150 และ 1.575 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC_{50} = 6.300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 10 เปอร์เซ็นต์ซีรัม DMEM/High glucose

ส่วนสารละลาย DMSO เตรียมความเข้มข้น 0.0067 เปอร์เซ็นต์ ใน 10 เปอร์เซ็นต์ซีรัม DMEM/High glucose สำหรับขมิ้น และ DMSO 0.0063 เปอร์เซ็นต์ ใน 10 เปอร์เซ็นต์ซีรัม DMEM/High glucose สำหรับข่าและน้อยหน่า

โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลุม แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

และในการศึกษาในครั้งนี้ได้กระตุ้นเซลล์ด้วย $TNF\alpha$ 10 ยูนิต และ $IFN\gamma$ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรตามความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และยังทำในสภาวะที่ไม่กระตุ้นเซลล์ แต่ทำการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรตามความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (สำหรับการแสดงออกของ mRNA และหน้าที่ promoter ของ RelA, NF- κ B1, CD40, VCAM1)

เมื่อครบเวลาการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรในแต่ละสภาวะนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกมาดูต่อน้ำออกจากหลุม และล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น 2 ครั้ง นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์วางบนแท่นน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำยา Trizol Reagent® (Invitrogen) 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเฮกซิลแอลกอฮอล์ที่เย็น 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นผสมสารให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อบั่นเสร็จให้ดูต่อน้ำชั้นบนสุด ซึ่งมีอาร์เอ็นเออยู่ในชั้นนี้ 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซโพรพานอลที่เย็นลงไป 500 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ซึ่งผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้งแล้วนำไปแช่เย็นที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอดให้เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งโดยใช้ 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลในน้ำ (DEPC-treated water) ที่ปราศจากเอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (RNase) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,500 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อบั่นเสร็จเทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ที่ปราศจาก RNase ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถเก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ได้นานหลายเดือน นำอาร์เอ็นเอที่สกัดออกมาวัดความเข้มข้นใช้เครื่อง NanoDrop

3.4.2 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ด้วยวิธี RT-PCR

ก่อนการทำ RT-PCR นำอาร์เอ็นเอที่สกัดมากำจัดดีเอ็นเอที่จะปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง อาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I) (Invitrogen) โดยใช้ความเข้มข้นของ อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม โดยเตรียมส่วนผสมดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยากำจัดดีเอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
10x บัฟเฟอร์ DNase I Reaction	1
DNase I	1
RNA	ขึ้นกับความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง
DEPC-treated water	เติมให้ปริมาตรของปฏิกริยาครบ 10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	

เมื่อครบเวลานำมาเติมสารหยุดปฏิกริยาของเอนไซม์ 25 มิลลิโมล EDTA, pH 8.0 ซึ่งเป็น Metal chelator แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

หลังกำจัดดีเอ็นเอนำอาร์เอ็นเอ 10 ไมโครลิตรมาเปลี่ยนเป็น Complementary DNA (cDNA) หรือดีเอ็นเอคู่สม ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase โดยใช้ชุด ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) แล้วทำการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกริยา PCR

3.4.2.1 ขั้นตอนเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น cDNA

ผสมสารดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
5X บัฟเฟอร์ ImProm-II™	4
1.5 มิลลิโมล MgCl ₂	1.2
10 นาโนโมล dNTP Mix	1
10 ไมโครโมล Oligo-dT 20 mer	1
40 ยูนิต RiboLock	0.5
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	1
อาร์เอ็นเอ	10
DEPC-treated water	1.3
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร	

แล้วนำไป Pre-extension ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ, Extension ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที 1 รอบ และ Inactivation ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 1 รอบ ในขั้นนี้จะทำให้ Oligo-dT เข้าจับกับปลาย poly-A ที่ด้าน 3' ของ mRNA ซึ่งจะเป็นการคัดเลือก mRNA ออกจากอาร์เอ็นเอชนิดอื่น

3.4.2.2 ขั้นตอนตรวจสอบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ที่ได้จากขั้นที่ 3.4.2.1 มาเป็นแม่แบบในการทำ PCR โดยผสมสารดังตารางที่

3.8

ตารางที่ 3.8 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา PCR

สารเคมี	สำหรับยีน TNFAIP3, IRF-1, RelB, IL-8, NF- κ B1, NF- κ B2 และ β -actin	สำหรับยีน CD40
	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10x Standard บัฟเฟอร์	3.25	2.5
10 ไมโครโมล dNTP Mix	0.5	0.5
100 ไมโครโมล Forward primer	0.125	0.125
100 ไมโครโมล Reward primer	0.125	0.125
เอนไซม์ Taq-DNA polymerase	0.19	0.19
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	1.25	1.25
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	16.56	17.31
cDNA แม่แบบ	3	3
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร		

สารเคมี	สำหรับยีน CSF-1	สำหรับยีน RelA
	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10x Standard บัฟเฟอร์	2.5	2.5
MgCl ₂	1	1
10 ไมโครโมล dNTP Mix	0.5	0.5
100 ไมโครโมล Forward primer	0.125	0.125
100 ไมโครโมล Reward primer	0.125	0.125
เอนไซม์ Taq-DNA polymerase	0.19	0.19
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	1.25	1.25
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	16.31	17.31
cDNA แม่แบบ	3	2
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร		

ซึ่งใช้ Primer ดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 แสดงลำดับเบสของ Primer ในการทำปฏิกิริยา PCR

ชนิดของ Primer	ลำดับเบส		ความยาวของท่อน PCR
β-actin [80]	forward	5' ACGGGTCACCCACACTGTGC 3'	656 คู่เบส
	reverse	5' CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT 3'	
IRF-1 [81]	forward	5' AACAAAGGGCAGCTCAGCTGT 3'	450 คู่เบส
	reverse	5' TGTTGGCTGCCACTCCGACT 3'	
VCAM1 [82]	forward	5' AGTCAGGAATTTCTGGAGGATGC 3'	229 คู่เบส
	reverse	5' GCAGCTTTGTGGATGGATTCA 3'	
RelB [83]	forward	5' TCCCAACCAGGATGTCTAGC 3'	160 คู่เบส
	reverse	5' AGCCATGTCCCTTTTCCTCT 3'	
TNFAIP3 [84]	forward	5' TTCAAGCAGATGTATGGCTAACC 3'	267 คู่เบส
	reverse	5' CCTTGGGCTGAATCTGACAT 3'	
CSF-1 [85]	forward	5' ATGACAGACAGGTGGAAGTCCAG 3'	438 คู่เบส
	reverse	5' TCACACAACCTTCAGTAGGTTT AGG 3'	
CD40 [86]	forward	5' AGAGTTCAGTAAACGGAATGCC 3'	461 คู่เบส
	reverse	5' ACAGGATCCCGAAGATGATGG 3'	
IL-8 [87]	forward	5' CTGCGCCAACACAGAAATTA 3'	238 คู่เบส
	reverse	5' ATTGCATCTGGCAACCCTAC 3'	

ชนิดของ Primer	ลำดับเบส		ความยาวของท่อน PCR
NF- K B2	forward	5' CAGTGAGAAGGGCCGAAAGAC 3'	277 คู่เบส
	reverse	5' CAGGGGCAGGGAGAAGGAG 3'	
NF- K B1 [74]	forward	5' AGCCCCCAATGCATCCAACCTT 3'	402 คู่เบส
	reverse	5' CAACCGCCGAAACTATCCGAAAAA 3'	
RelA [74]	forward	5' AGCGCATCCAGACCAACAACAACC 3'	419 คู่เบส
	reverse	5' CCGCCGCAGCTGCATGGAGACAC 3'	

หลังจากเตรียมสารแล้วนำมาทำการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR ปฏิบัติการจะเริ่มต้นด้วย Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 55 องศาเซลเซียส สำหรับ TNFAIP3, IRF-1, RelB, IL-8, NF-**K**B1, 60 องศาเซลเซียส สำหรับ β -actin, 58.4 องศาเซลเซียส สำหรับ NF-**K**B2, 55.9 องศาเซลเซียส สำหรับ CD40, 58 องศาเซลเซียส สำหรับ CSF1 และ 67.7 องศาเซลเซียส สำหรับ RelA และ ปฏิบัติการ Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ สิ้นสุดปฏิบัติการด้วย Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที โดยแยกยีนคู่ไปกับ β -actin เพื่อวิเคราะห์สัดส่วนของการแสดงของยีนที่เราสนใจต่อยีน β -actin ด้วยโปรแกรม GeneTools ของเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation (gel doc) systems)

สำหรับการทดสอบการแสดงออกของยีนในเครือข่ายสัญญาณของ NF-**K**B ด้วยวิธี RT-PCR ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งเพื่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ผล

3.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการทำงานของ Promoter ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B ด้วยวิธี Reporter gene

3.5.1 ถ่ายโอนพลาสมิด pSGG_prom ที่มีชิ้นส่วนของ Promoter ของยีนในเครือข่ายของสัญญาณของ NF- κ B เข้าสู่เซลล์ HaCaT

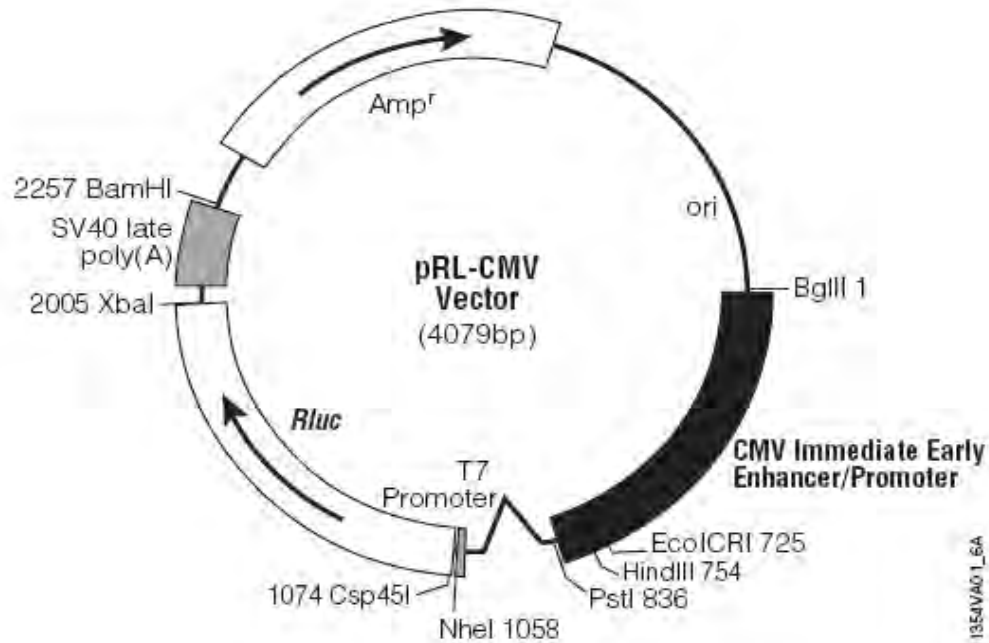
นำเซลล์ HaCaT จากขั้นตอนที่ 3.3 มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุมโดยจำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 6×10^5 เซลล์ แล้วโดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเซลล์เจริญหนาแน่น 60 – 70 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ในหลุมเลี้ยง แล้วนำเซลล์ HaCaT มาถ่ายโอนพลาสมิด pSGG_prom ที่มีชิ้นส่วนของ Promoter ของยีนในเครือข่ายของสัญญาณของ NF- κ B โดยใช้ชุดน้ำยา FuGeneHD (Roche) โดยก่อนการถ่ายโอนเซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง เตรียมสารในการถ่ายโอนดังตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 แสดงสัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Transfection

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
FuGeneHD	6
pSGG_prom ที่มีชิ้นส่วนของ Promoter แทรกอยู่ (ความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
pRL-CMV vector (ความเข้มข้น 600 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
DMEM/High glucose ที่ปราศจากซีรัม	91
รวมปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร	

ผสมสารทั้งหมดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการใช้อุปกรณ์ Vortex 2 วินาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาทีเพื่อให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างพลาสมิดและสารที่นำเข้าสู่เซลล์เป็น Complex เมื่อครบเวลา นำเซลล์ที่ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มาเติม DMEM/High glucose ที่ปราศจากซีรัม 500 ไมโครลิตรและเติม Complex ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการหมุนจานเลี้ยงเซลล์ไปมา แล้วนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

หลังจากดูดสารทั้งหมดออกจากหลุม แล้วล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง แล้วทำการกระตุ้นเซลล์และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรมตามขั้นที่ 3.4.1 โดยทำตามทุกสภาวะ



ภาพที่ 3.3 พลาสมิด pRL-CMV ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ในการ co-transfection โดยตัว pRL-CMV ซึ่งจะให้สัญญาณ *Renilla luciferase*

ที่มา: <http://www.promega.com.cn/files/cpxl/yingguangmei/ygsm2.htm>

3.5.2 ตรวจวัดการทำงานของ Promoter ของยีนในเครือข่ายของสัญญาณของ NF- κ B โดยการวัดสัญญาณ Luciferase

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน Firefly Luciferase หลังการทดสอบสารสกัดสมุนไพรมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ชุดน้ำยา Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) ซึ่งจะวัดทั้งปริมาณของสัญญาณ Firefly Luciferase จากพลาสมิด pSGG_prom vector ที่มีการแทรกของชิ้นส่วนของ Promoter ต่างๆที่เราศึกษา และสัญญาณ *Renilla luciferase* จาก pRL-CMV vector ที่จะถูก Co-transfected เข้าไปด้วยพร้อมกันเพื่อลดปัญหาจากจำนวนของเซลล์ที่ใช้ และประสิทธิภาพในการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ รวมถึงผลที่ไม่จำเพาะต่างๆ เป็นต้น นั่นก็คือ เป็นตัวควบคุมการถ่ายโอนในแต่ละครั้งให้เหมือนกันทุกครั้ง และนำค่ามาคำนวณ

อัตราส่วนของสัญญาณ Firefly ต่อ *Renilla luciferase* ซึ่งก่อนการวัดสัญญาณต้องนำเซลล์มาสกัดเอาเอนไซม์ Luciferase ด้วยน้ำยาสกัด Cell culture lysis buffer (CCLR) (Promega) โดยนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์มาวางบนแท่นน้ำแข็งและเติม CCLR 250 ไมโครลิตร ต่อหลุม ตั้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารทั้งหมดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,500 g นาน 2 นาที นำมาดูดส่วนใสไว้ในหลอดทดลองอันใหม่เพื่อเก็บเอนไซม์ที่สกัดออกมา หลังจากนั้นนำมาวัดสัญญาณ Luciferase ในจานวัด 96 หลุม โดยเติมน้ำยา Dual-Luciferase[®] reagent (บัฟเฟอร์และซับสเตรตของ Firefly luciferase) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมแล้วตั้งไว้นาน 10 นาที โดยเลี่ยงการโดนแสง จากนั้นวัดสัญญาณ Firefly luciferase โดยเครื่อง VICTOR³ Luminometer (PerkinElmer) เมื่อวัดเสร็จเติม น้ำยา Stop&Glo reagent (ซึ่งจะหยุดปฏิกิริยาของ Firefly luciferase และเป็นซับสเตรตให้กับ *Renilla luciferase*) 100 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาทีหลังจากนั้นนำไปวัดสัญญาณ *Renilla luciferase*

นำข้อมูลที่ได้จากการวัดสัญญาณ Luciferase มาคำนวณอัตราส่วนของ Firefly ต่อ *Renilla luciferase* การทดสอบนี้จะทำซ้ำในแต่ละครั้ง 3 ครั้งการทดลองและทำซ้ำอีก 3 ครั้งซึ่งจะได้ข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์หัยนละ 9 ค่า ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

4. วิเคราะห์ผล

ข้อมูลทั้งหมดจะโชว์เป็นค่า mean \pm standard error of the mean (SEM) ของค่าจากการทดสอบจากวิธี RT-PCR ซ้ำ 3 ครั้ง มีทั้งหมด 3 ค่าและค่าจากการทดสอบจากวิธี Reporter gene ซ้ำ 3 ครั้ง แต่ครั้งซ้ำ อีก 3 ครั้ง มีทั้งหมด 9 ค่า ซึ่งค่าทั้งหมดจะแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (สำหรับสถานะที่กระตุ้นและทดสอบสารสกัดสมุนไพร จะใช้ สถานะที่ถูกกระตุ้นเป็นสถานะควบคุม ส่วนสถานะที่ไม่มีการกระตุ้นเซลล์จะใช้สถานะเซลล์ปกติเป็นสถานะควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า *P*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 (ความมั่นใจ 95 เปอร์เซ็นต์) โดยหลักการวิเคราะห์ oneway analysis of variance (One-way ANOVA) โดยใช้ post hoc LSD ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ของโปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 17.0

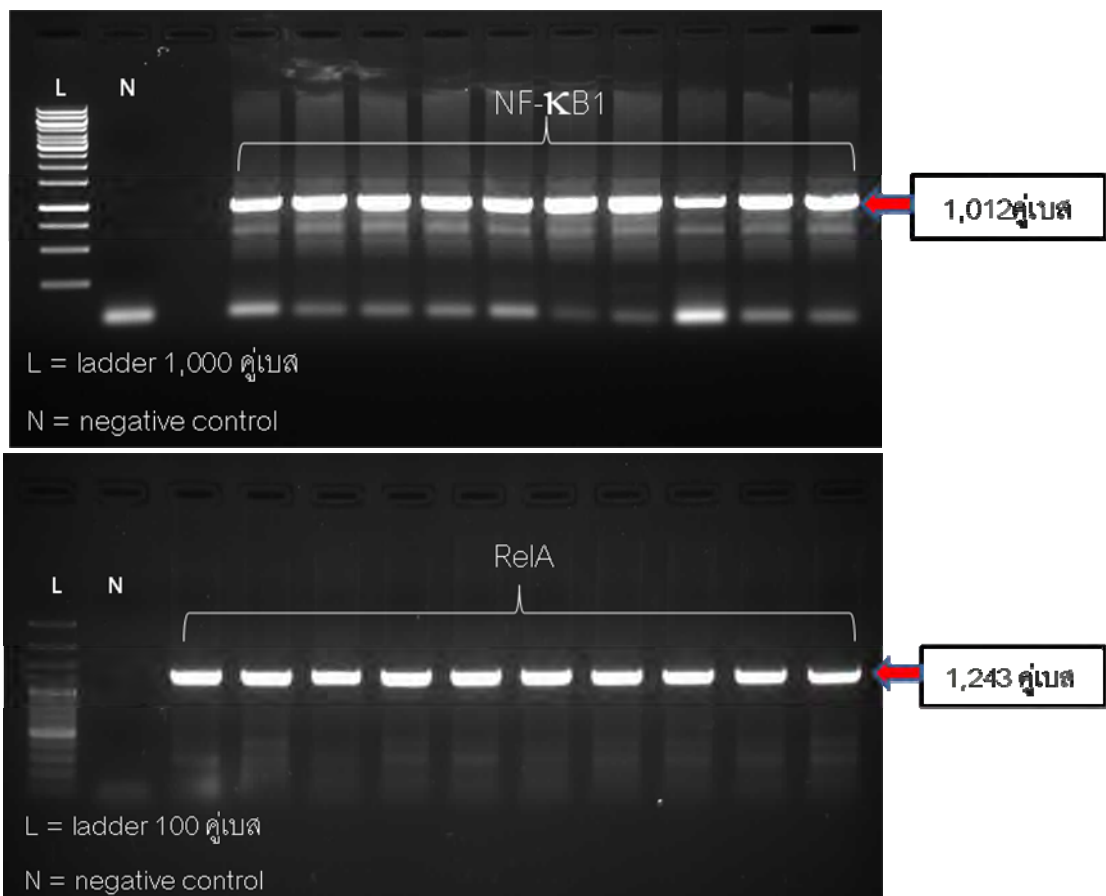
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียม Luciferase reporter gene constructs

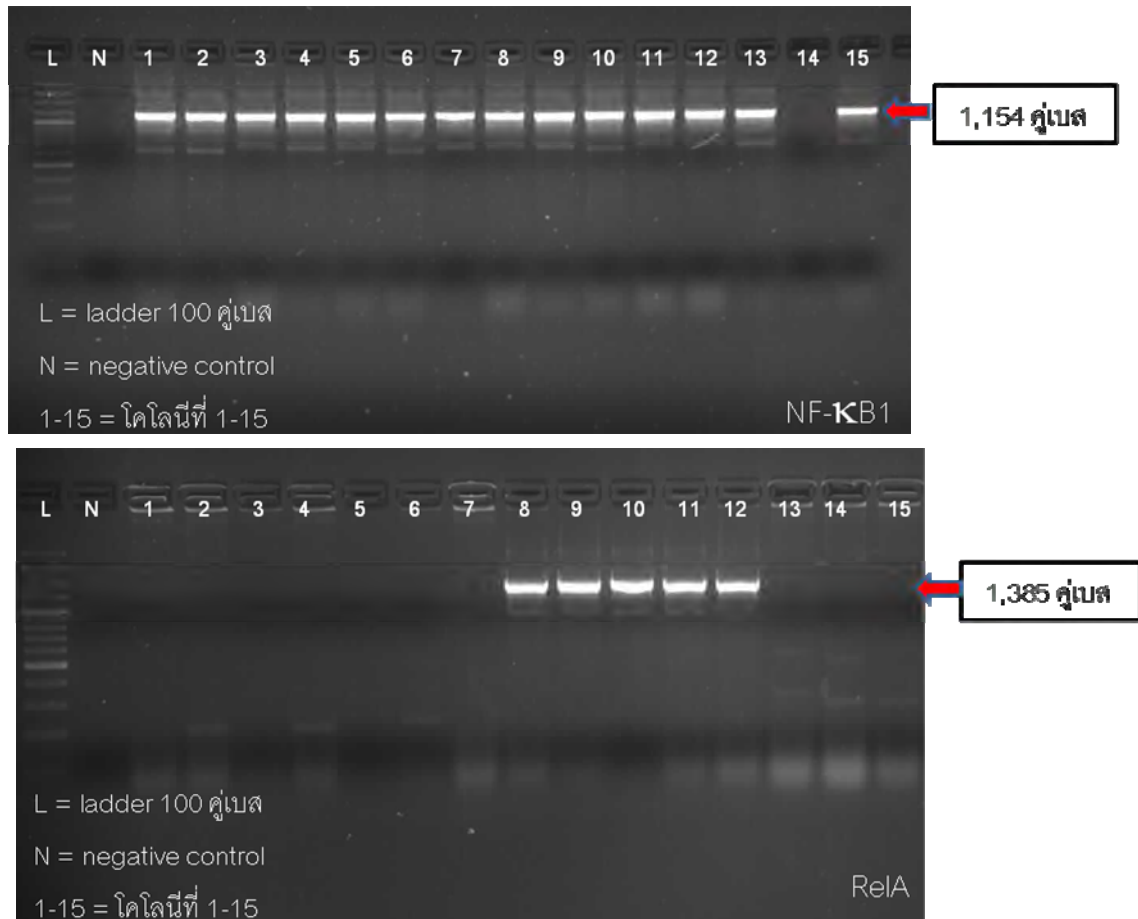
4.1.1 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ Promoter ของ NF- κ B1 และ RelA

จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ Promoter ของยีน NF- κ B1 และ RelA นำมาแยกบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ 90 โวลต์ นาน 45 นาที



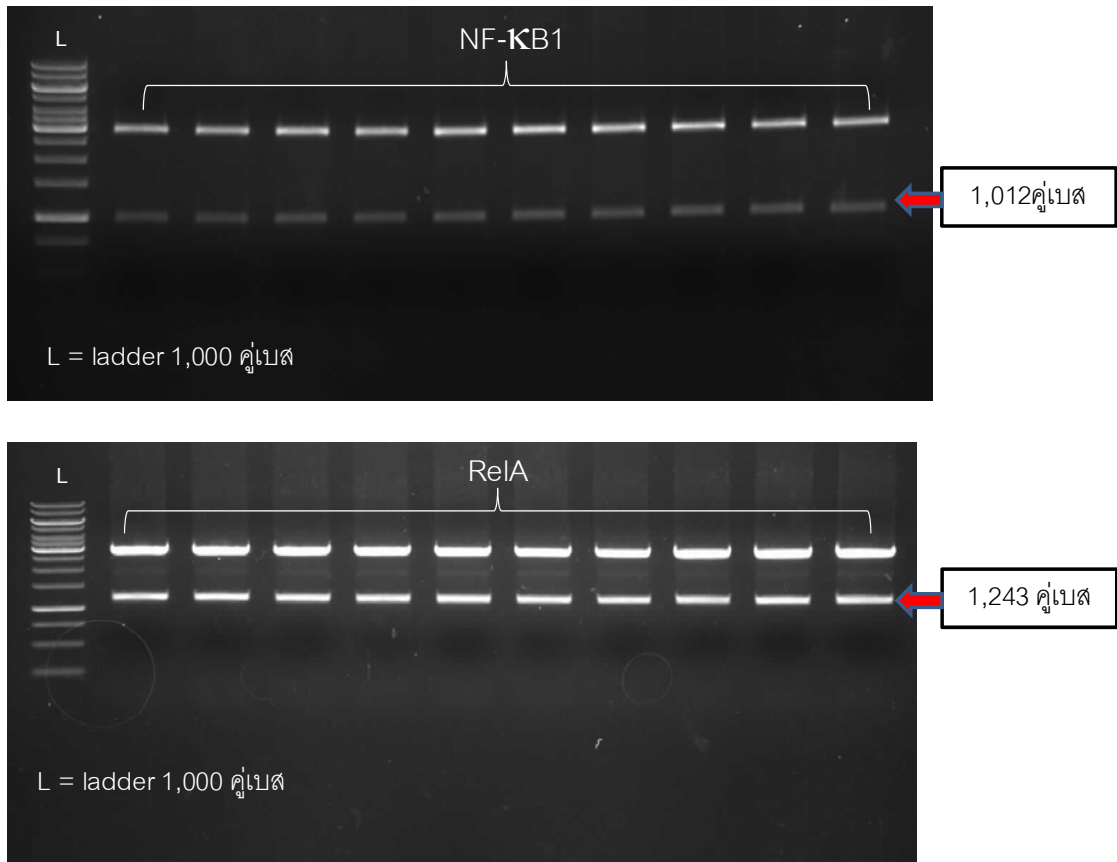
ภาพที่ 4.1 แสดงผลการทำ PCR ของ Promoter ของยีน NF- κ B1 และ RelA โดยใช้ดีเอ็นเอของเซลล์ HaCaT เป็นแม่แบบในการทำ PCR ขนาด PCR product มีความยาว 1,012 คู่เบสและ 1,243 คู่เบส ตามลำดับ

4.1.2 ผลการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA เข้าสู่พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pGEM[®]-T Easy vector ด้วยการทำให้โคลน PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการทำให้โคลน PCR ของพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector ด้วย primer Sp6 และ T7

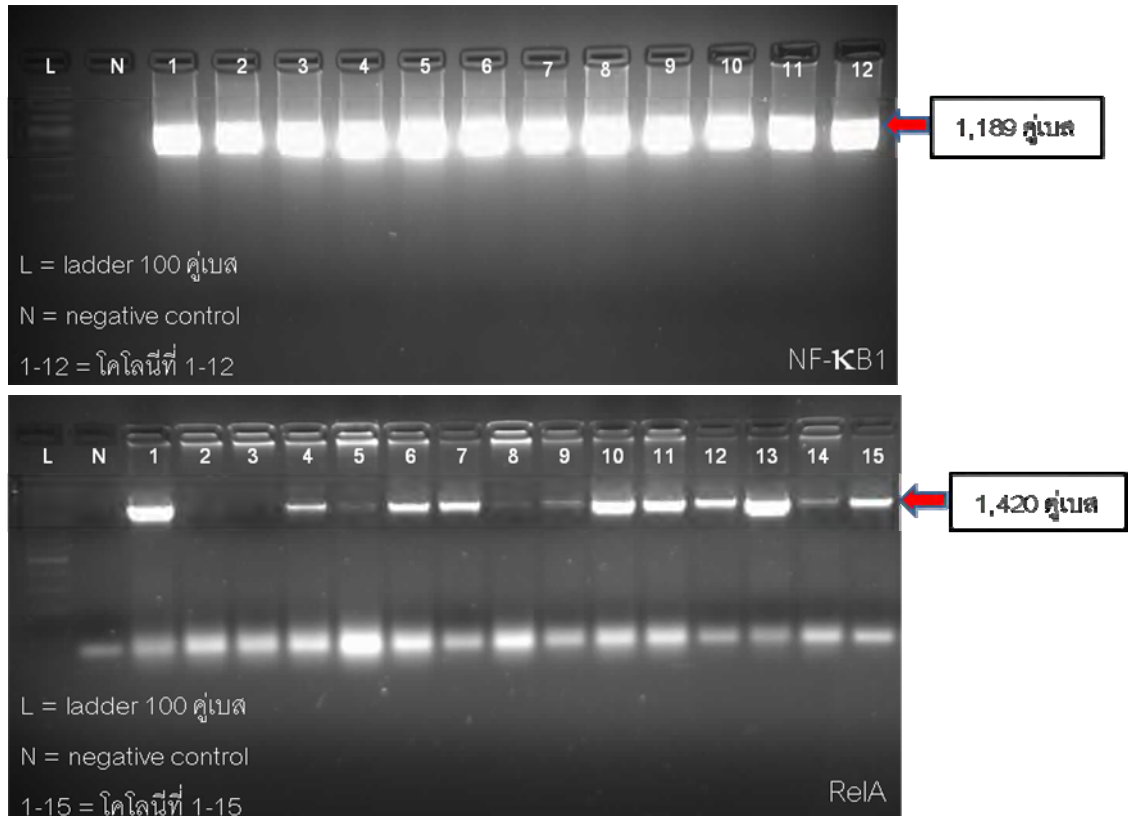
จากผลของการทำให้โคลน PCR แสดงว่าใน พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector มีการแทรกด้วยดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,012 คู่เบสและ 1,243 คู่เบส ดังนั้นนำโคลนนี้มาสกัดเอาพลาสมิดออกมาโดยการทำให้ Miniprep และนำพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ *MluI/BglII* สำหรับ NF-κB1 promoter และ *NheI/HindIII* สำหรับ RelA promoter

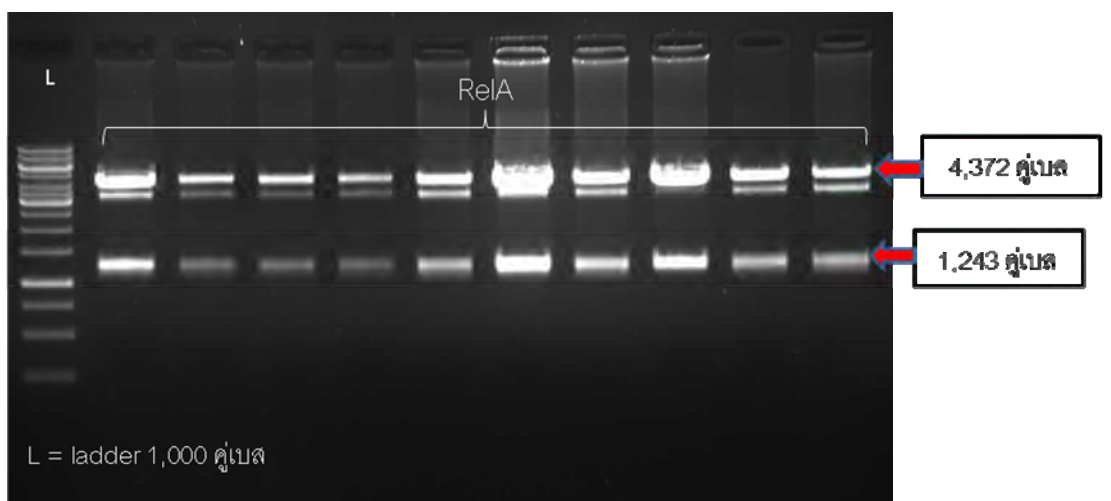
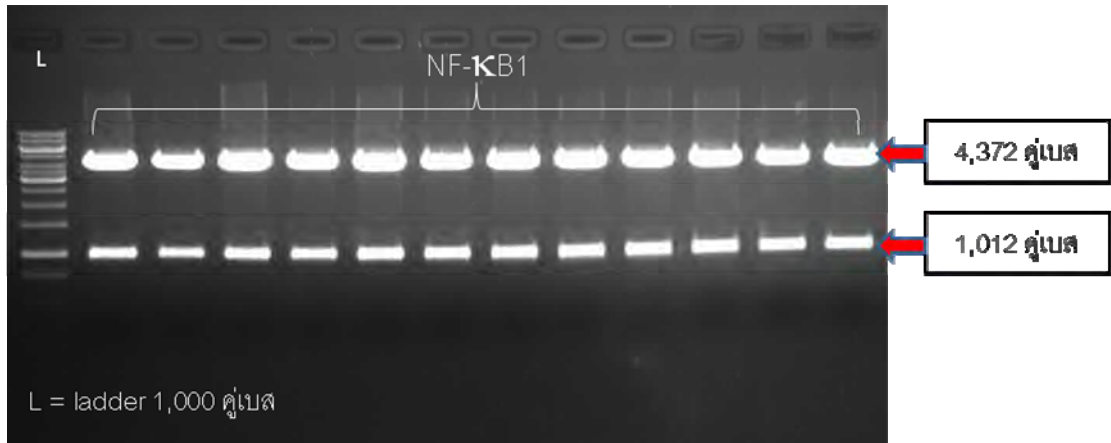
เลือกพลาสมิดที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยการ Sequence ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าพลาสมิดมีลำดับเบสของ Promoter ของยีน NF-κB1 และ RelA ถูกต้องตามที่เรากออกแบบไว้

4.1.3 ผลการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Promoter NF- κ B1 และ RelA เข้าสู่พลาสมิด pSGG_prom vector และการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการใน pSGG_prom vector ด้วยการทำโคลนนิ่ง PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ



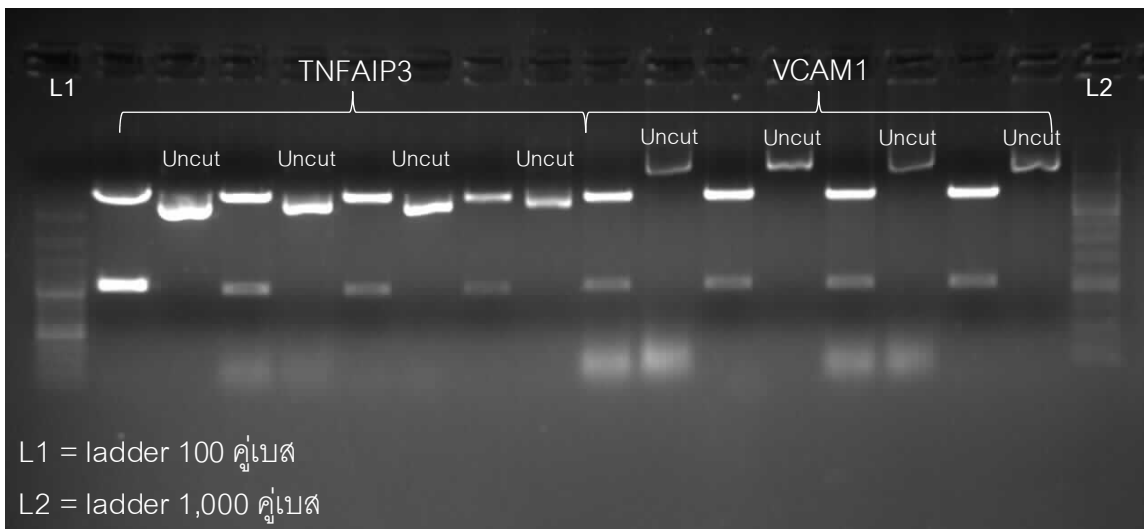
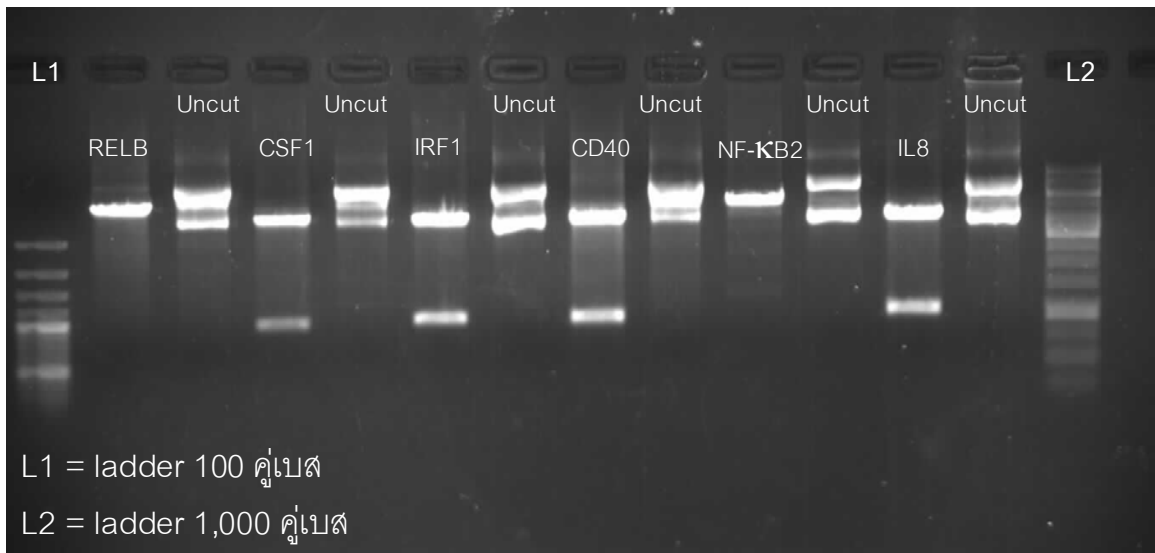
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทำโคลนนิ่ง PCR ของพลาสมิด pSGG_prom ด้วย primer RV3 และ pSGG_prom

จากผลของการทำโคลนนิ่ง PCR แสดงว่าใน พลาสมิด pSGG_prom มีการแทรกด้วยดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,012 คู่เบสและ 1,243 คู่เบส ดังนั้นนำโคลนนิ่งมาสกัดเอาพลาสมิดออกมาโดยการทำให้ Mini-prep และนำพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ



ภาพที่ 4.5 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ *MluI/BglII* สำหรับ NF- κ B1 promoter และ *NheI/HindIII* สำหรับ RelA promoter

และนำพลาสมิด pSGG_prom ทั้ง 8 constructs ที่สกัดออกจากแบคทีเรียมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเช่นเดียวกัน



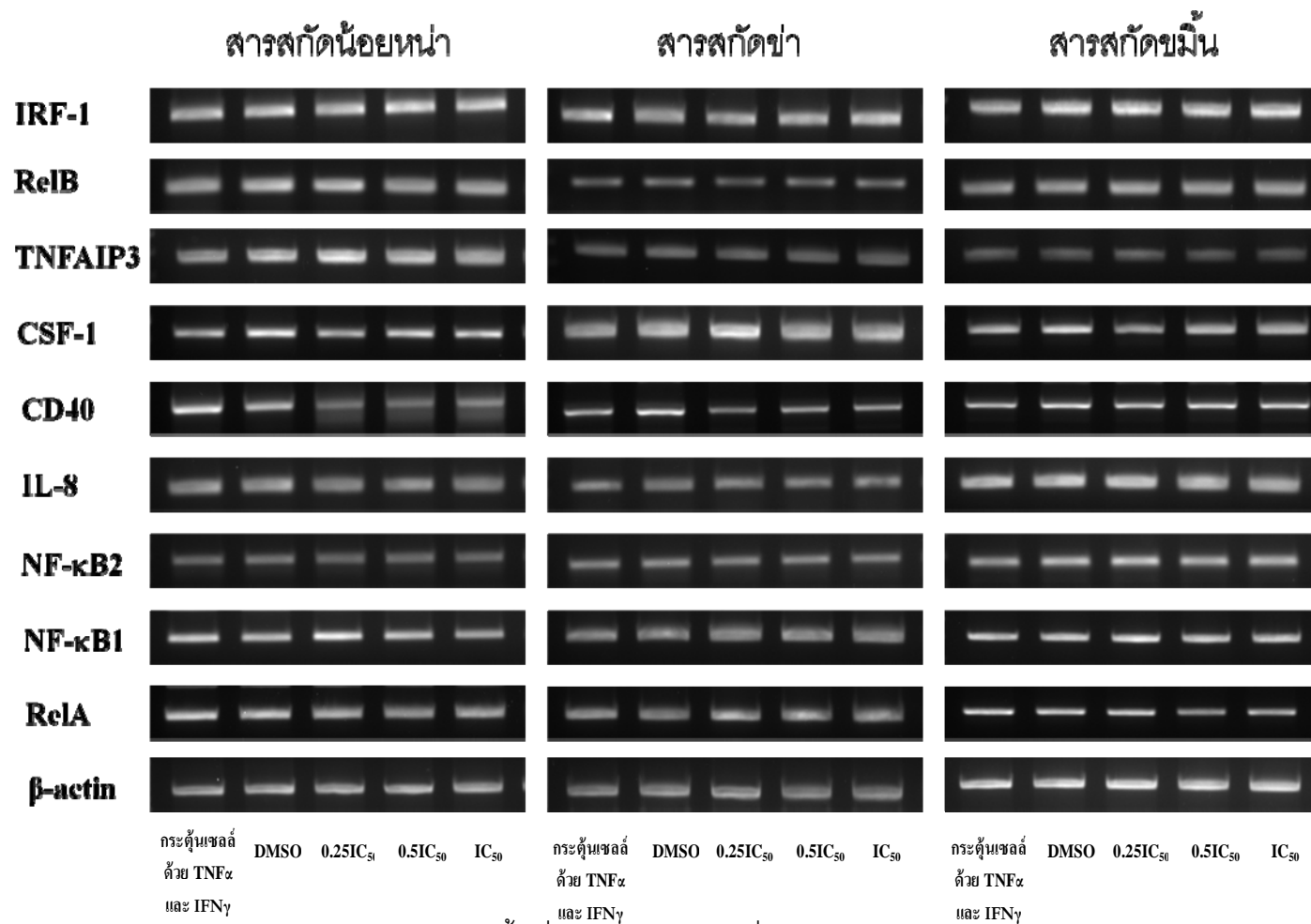
ภาพที่ 4.6 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับ RelB, CSF-1, IRF-1, CD40, NF- κ B2, IL-8, TNFAIP3 และ VCAM1

เลือกพลาสมิดที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยการ Sequence ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าพลาสมิดมีลำดับเบสของ Promoter ของยีน NF- κ B1 และ RelA ถูกต้องตามที่เราก่อแบบไว้ และลำดับเบสของ Promoter ของยีน RelB, CSF-1, IRF-1, CD40, NF- κ B2, IL-8, TNFAIP3 และ VCAM1 ถูกต้องจากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B biomarkers

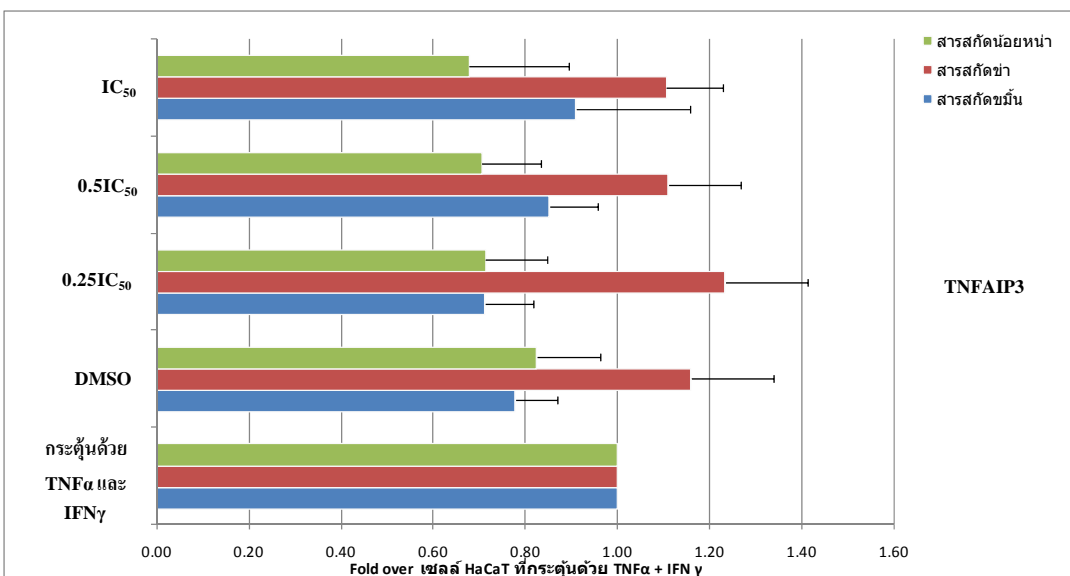
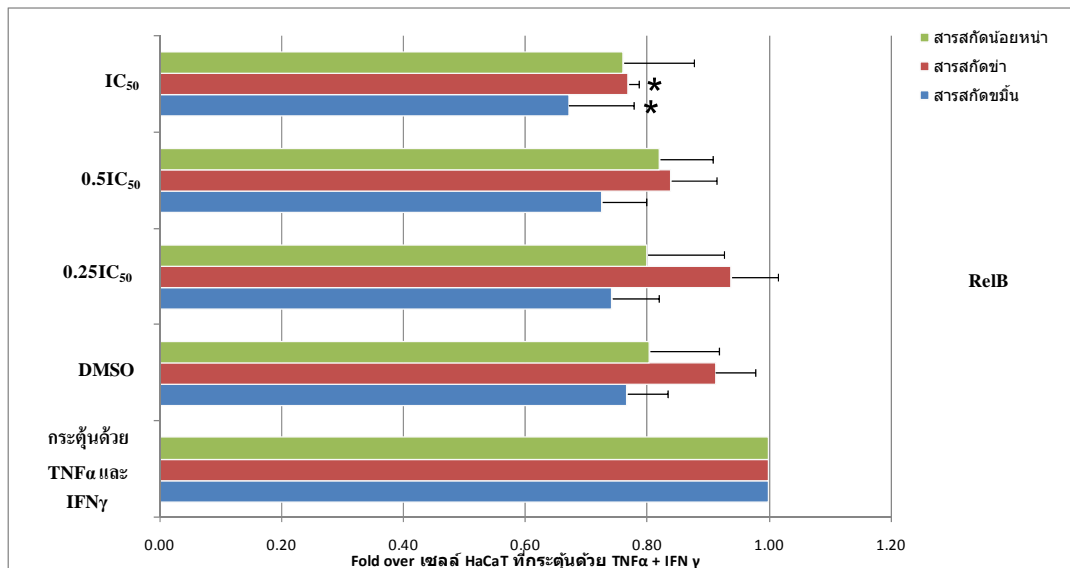
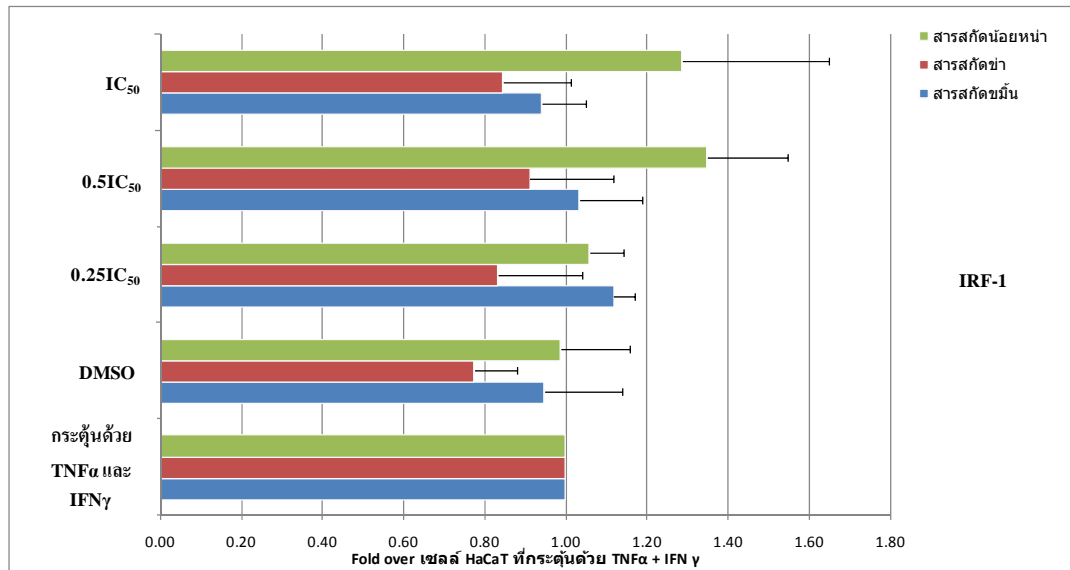
4.2.1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

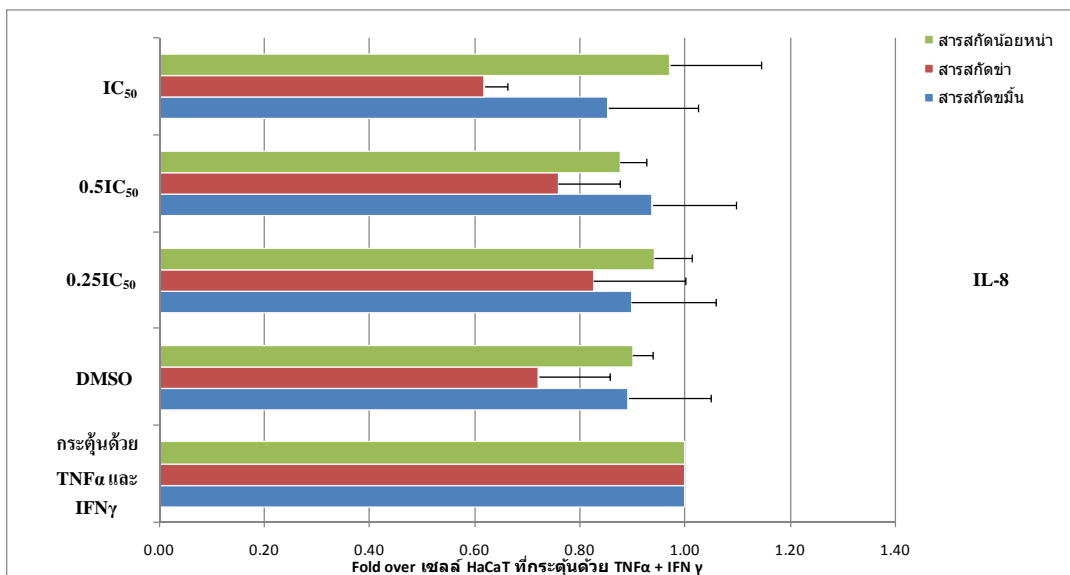
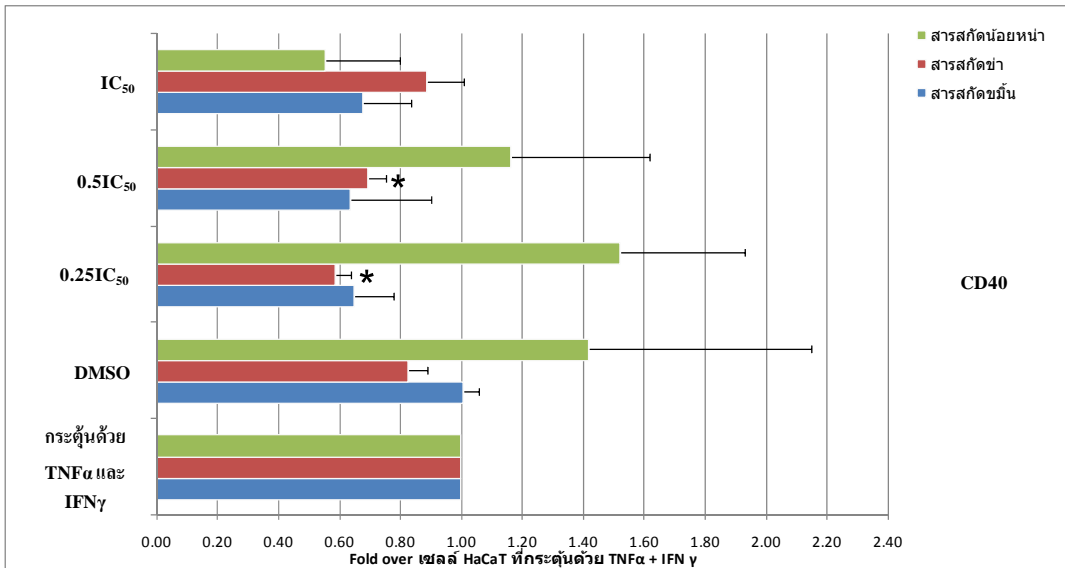
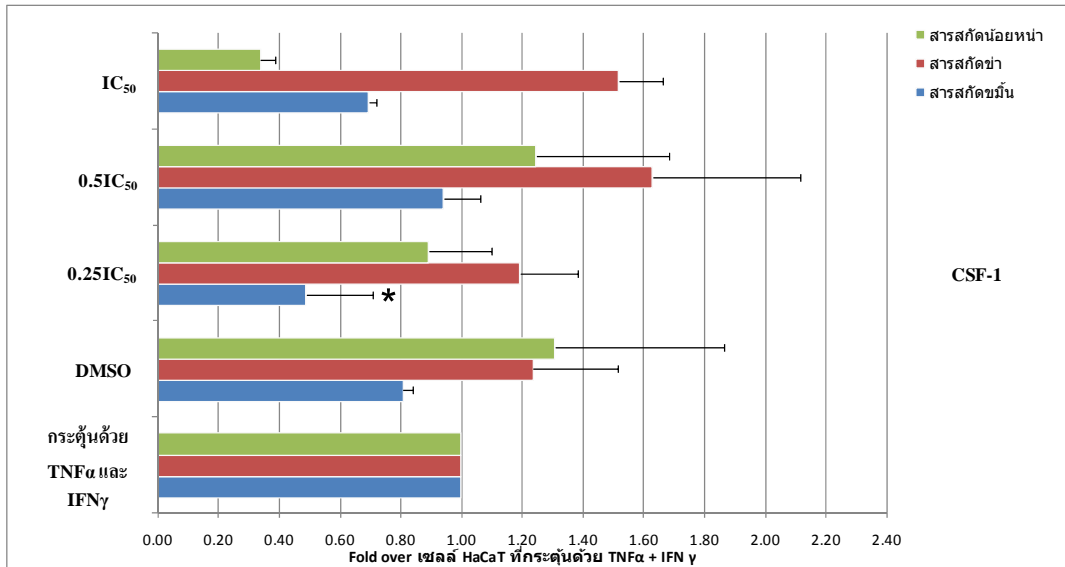
ใช้เทคนิค RT-PCR ในการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพร น้อยหน่า, ข่า และขมิ้น ที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงินต่อการแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B biomarkers เมื่อกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบแสดงในรูปภาพที่ 4.7 และ 4.8 โดยพบว่า ผลของสารสกัดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 3.150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$) ลดระดับของ NF- κ B1 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ส่วนสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) ลดระดับของ RelB mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และที่ความเข้มข้น 3.150 และ 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$ และ $0.25IC_{50}$) ลดระดับของ CD40 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และผลของสารสกัดขมิ้นให้ผลการลดระดับของ RelB และ CSF-1 mRNA transcripts อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ เมื่อใช้ทดสอบกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) และ 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$)

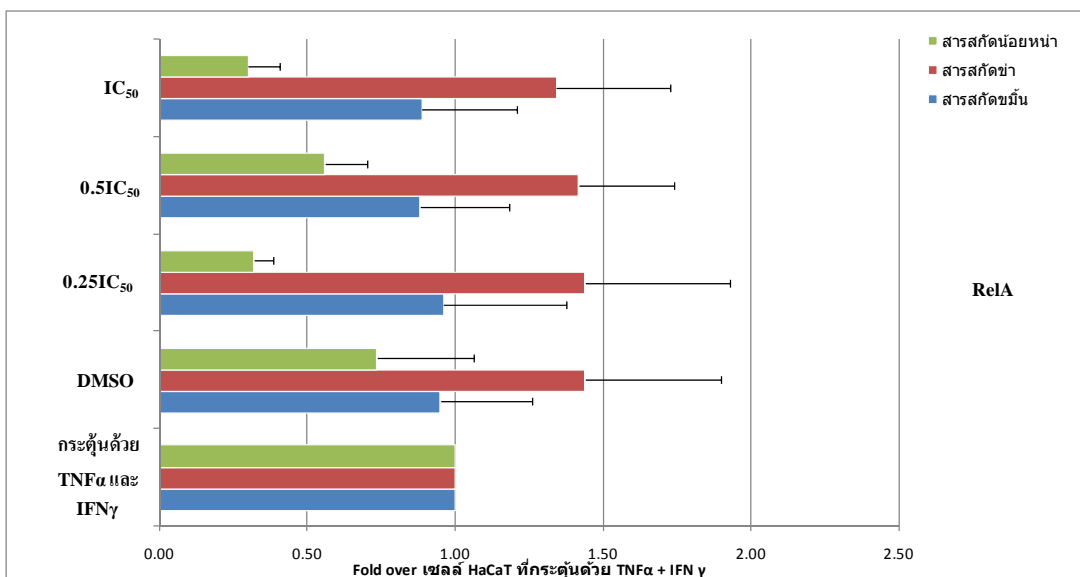
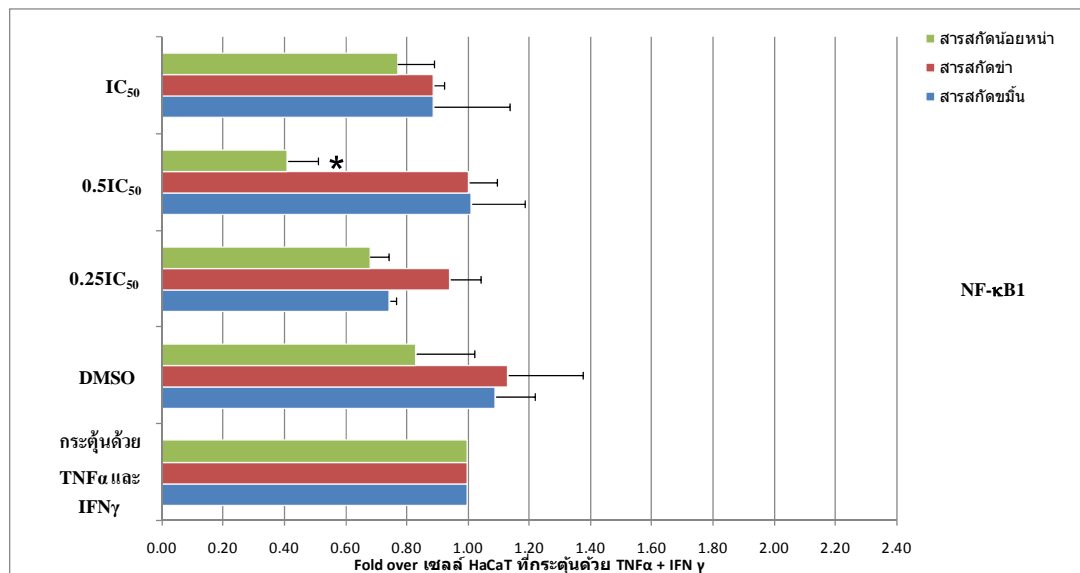
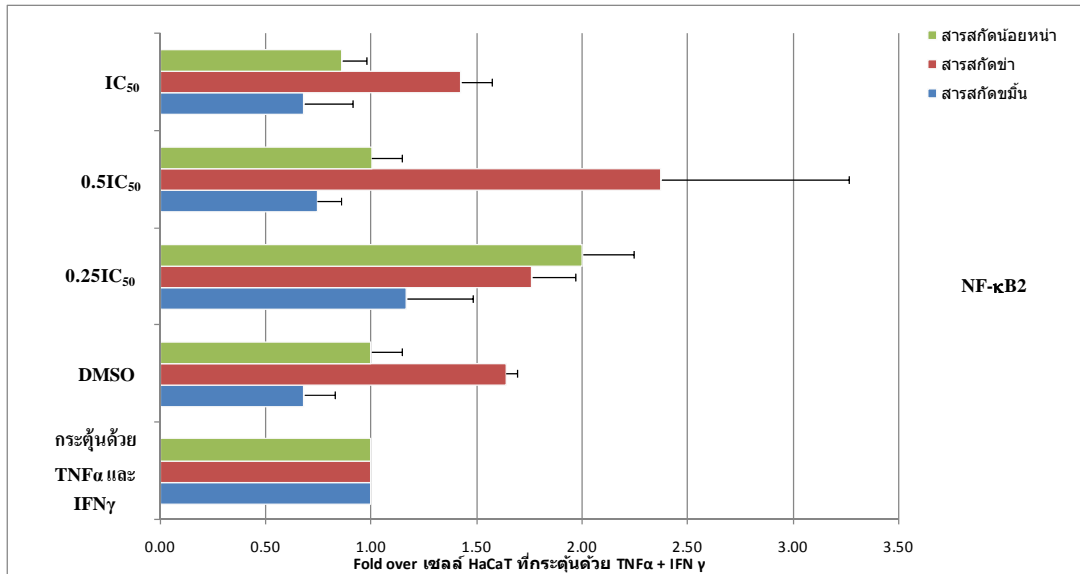


ภาพที่ 4.7 แสดงผลของสารสกัดน้อยหน่า, ข่า และขมิ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆใน

เครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B biomarkers เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง





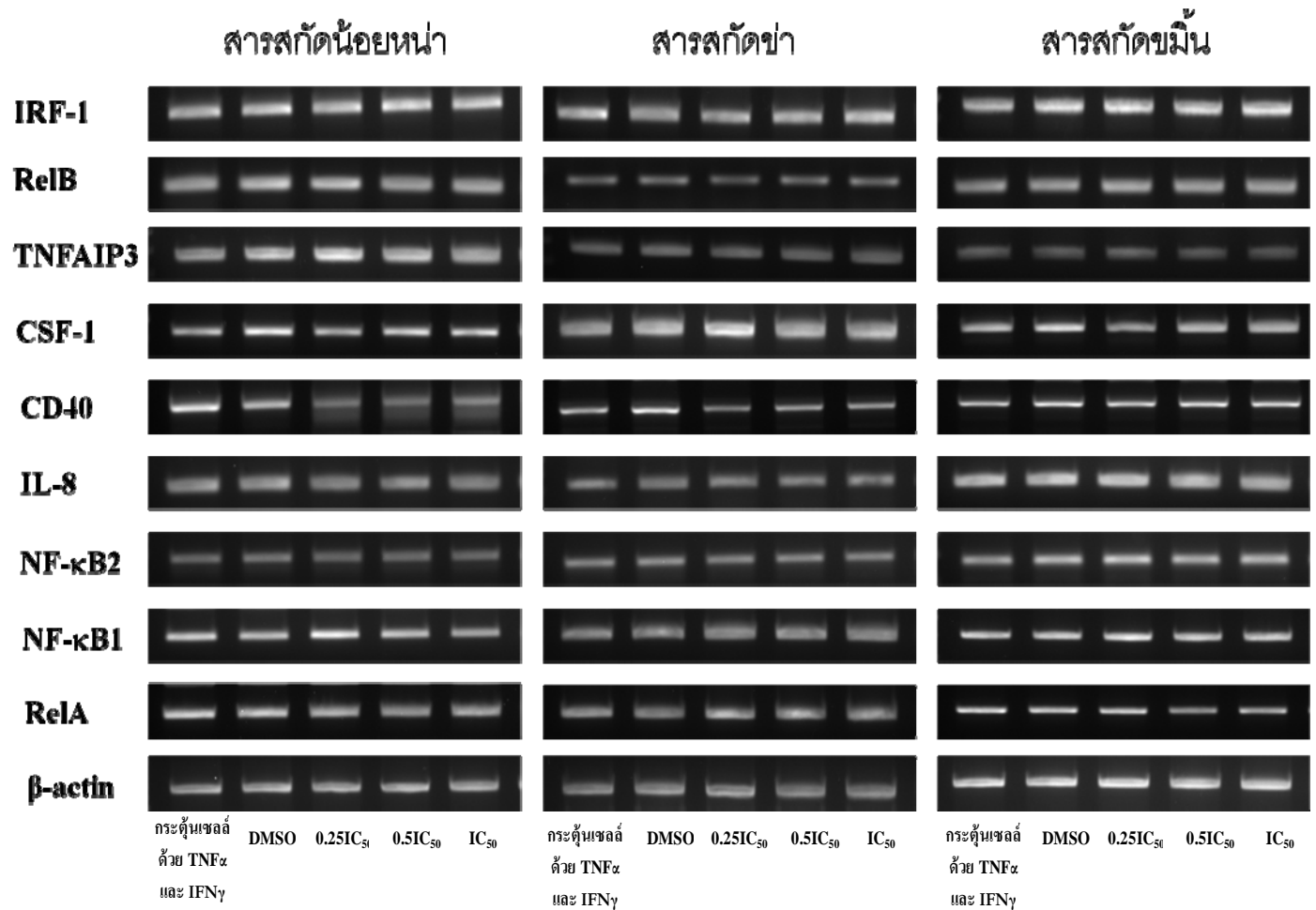


ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีน IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, CD40, IL-8, NF- κ B2, NF- κ B1 และ RelA ในเซลล์ HaCaT ที่กระตุ้นด้วย TNF α (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรร้อยหน้าและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสภาวะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง

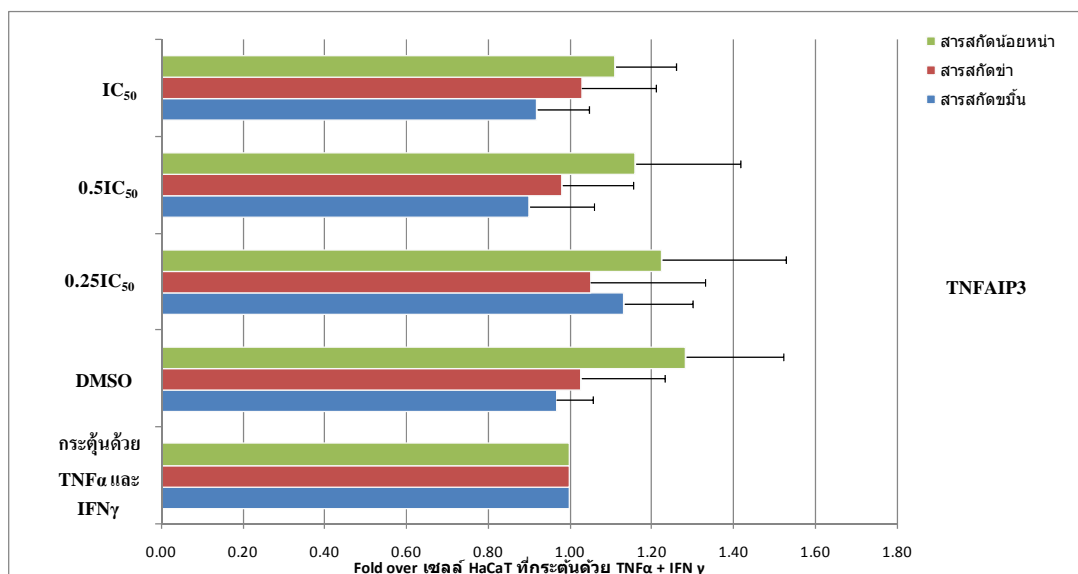
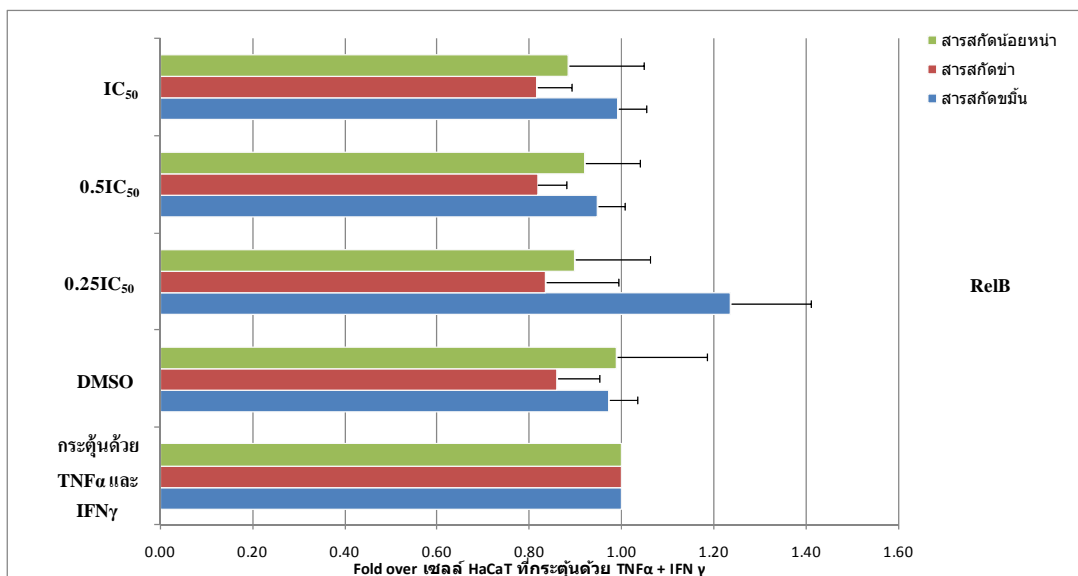
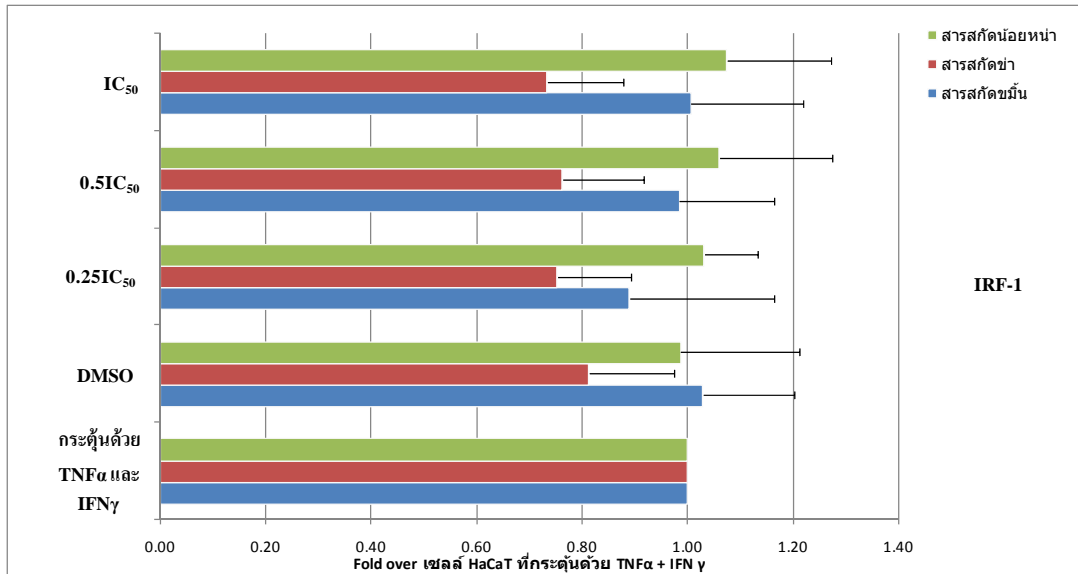
4.2.2 เมื่อกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรร้อยหน้าและข่าในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

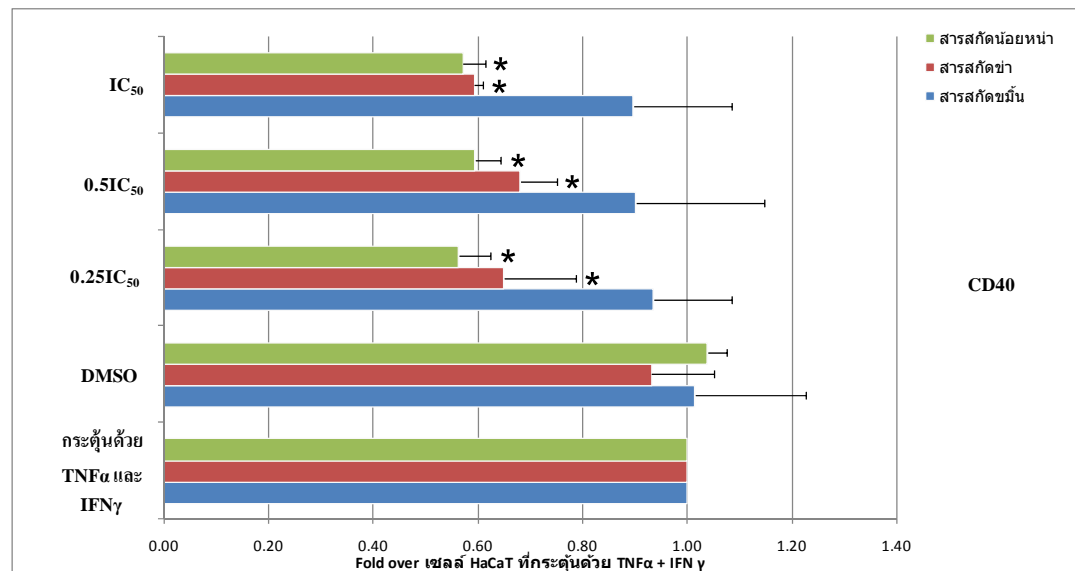
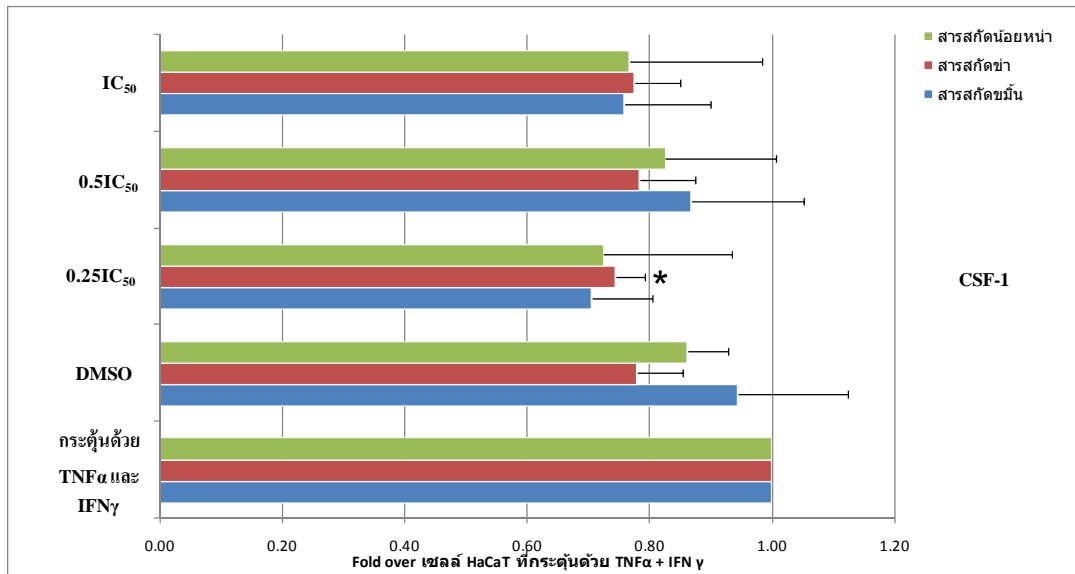
จากการไม่ประสบความสำเร็จในการทดสอบในขั้นต่อไปเมื่อใช้สภาวะที่ต้องกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF α (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรร้อยหน้าและข่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนสภาวะในการทดลองเป็นกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรร้อยหน้าและข่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบแสดงในรูปภาพที่ 4.9 และ 4.10 โดยสารสกัดร้อยหน้าที่ความเข้มข้น 1.575, 3.150 และ 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$, $0.5IC_{50}$ และ IC_{50}) ลดระดับของ CD40 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และที่ 3.150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$) ลดระดับของ NF- κ B2 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ส่วนสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 1.575, 3.150 และ 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$, $0.5IC_{50}$ และ IC_{50}) ลดระดับของ CD40 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และที่ 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$) ลดระดับของ CSF-1 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่

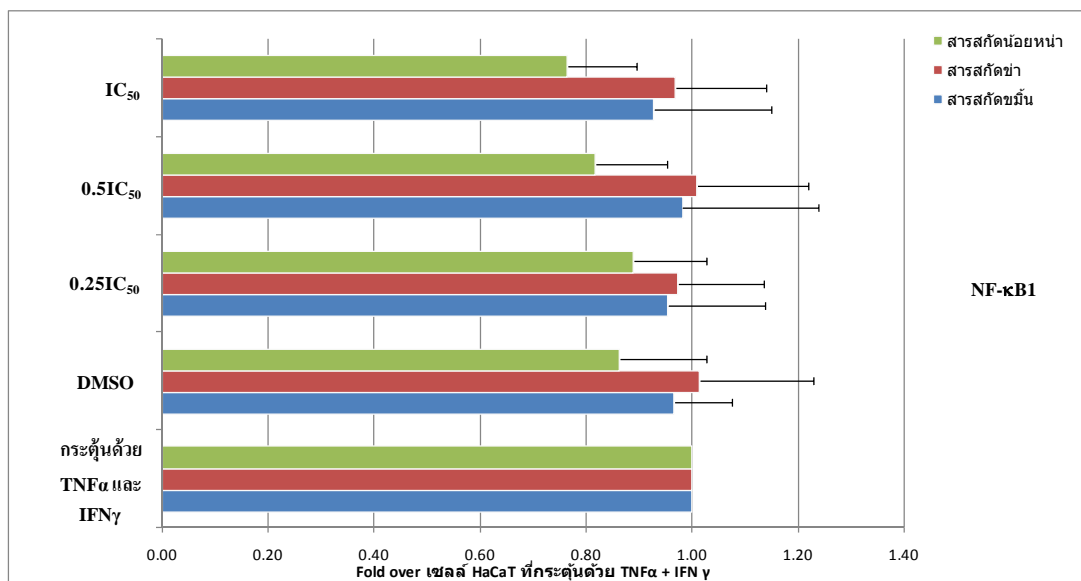
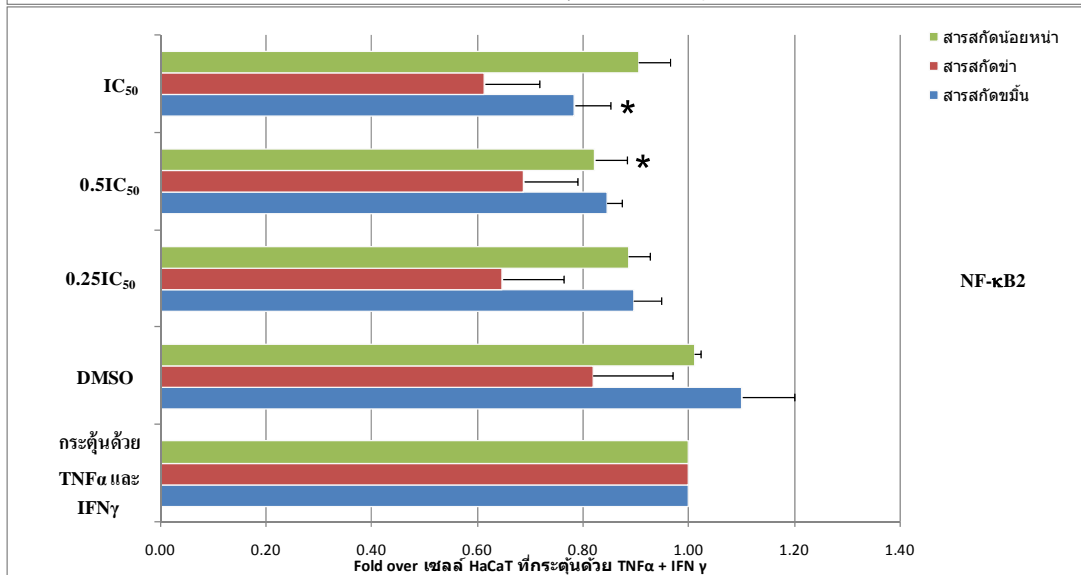
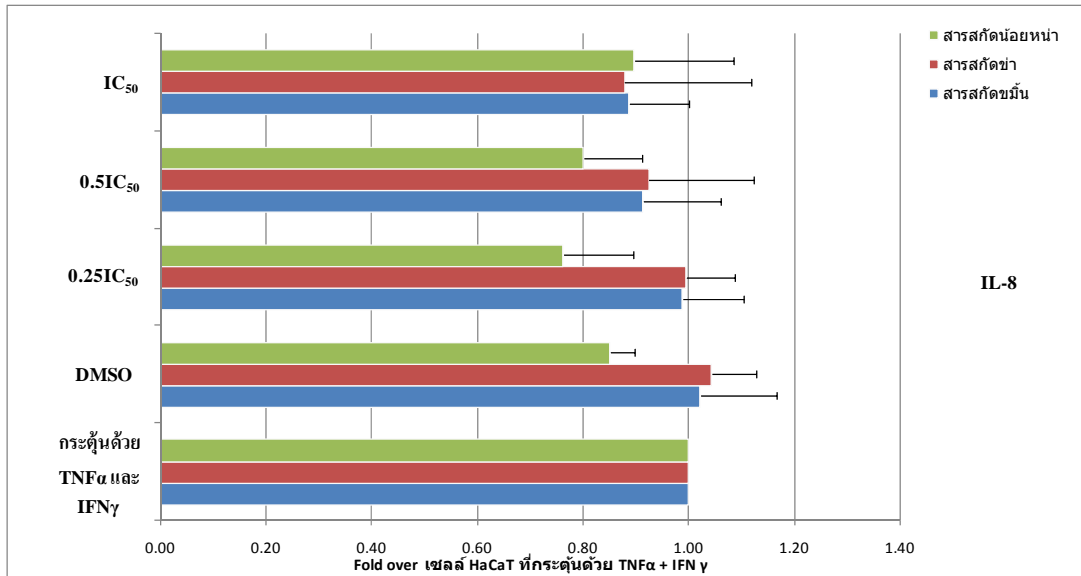
$P < 0.05$ และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 3.350 และ 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$ และ IC_{50}) ลดระดับของ NF- κ B2 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

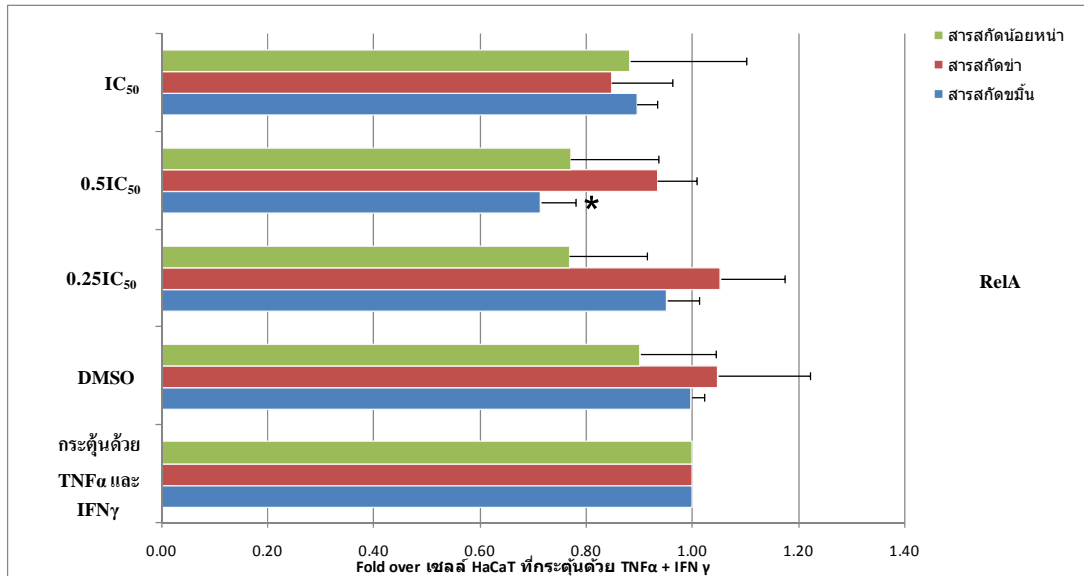


ภาพที่ 4.9 แสดงผลของสารสกัดน้อยหน่า, ข่า และขมิ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF-κB biomarkers เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TNFα (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFNγ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง









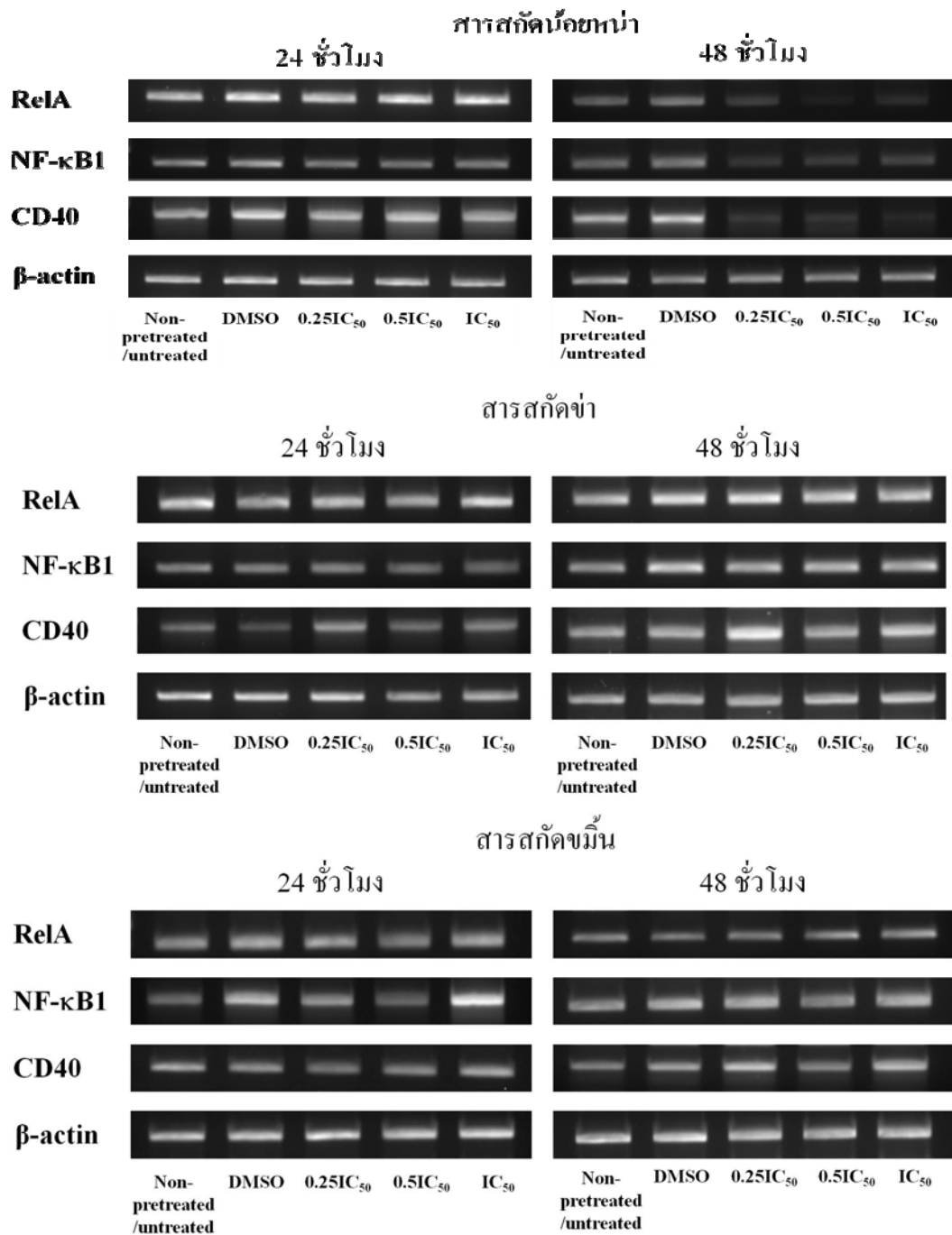
ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีน IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, CD40, IL-8, NF- κ B2, NF- κ B1 และ RelA ในเซลล์ HaCaT ที่กระตุ้นด้วย TNF α (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน่าและชาที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสภาวะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง

4.2.2 เซลล์ HaCaT ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

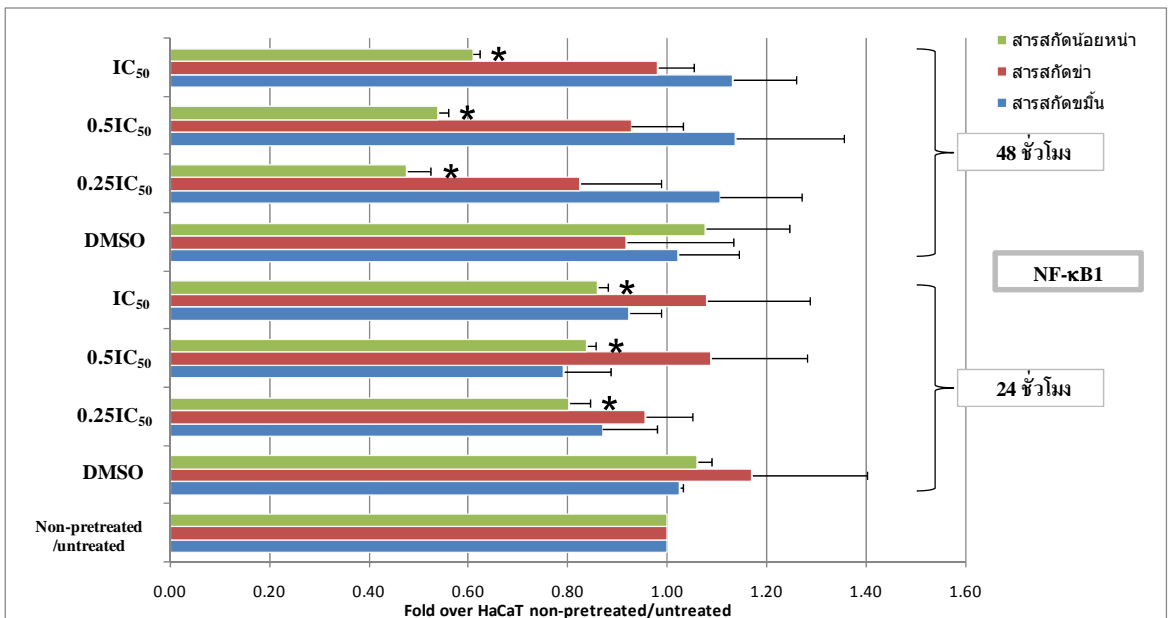
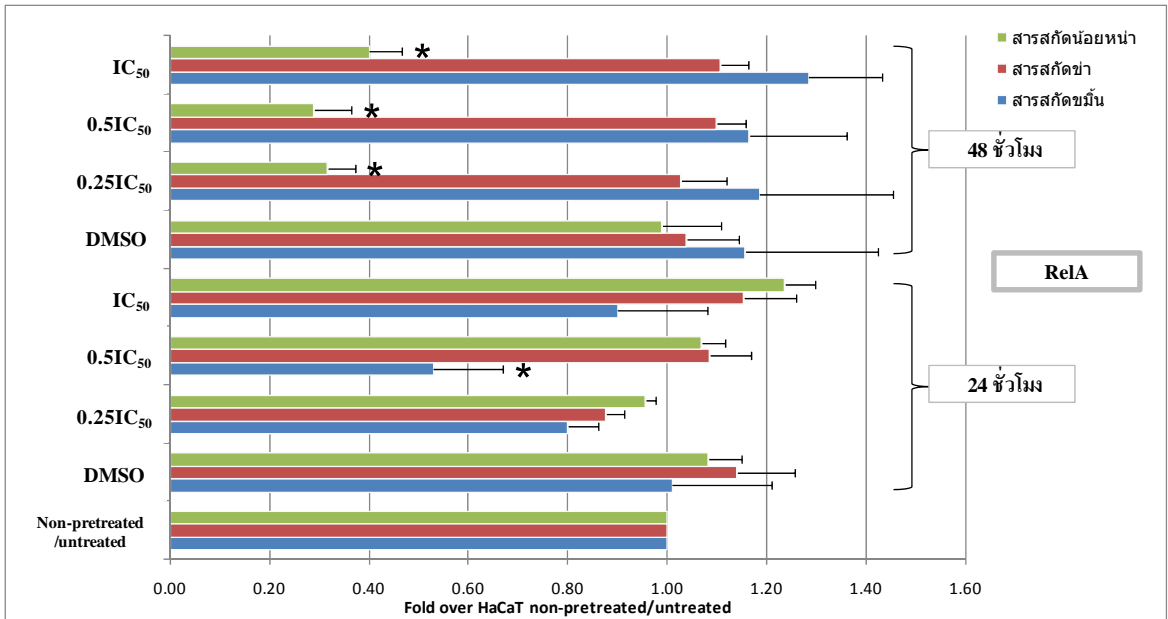
อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ VCAM1, RelA, NF- κ B1 และ CD40 promoter constructs เมื่อวัดสัญญาณของ Luciferase พบว่าสัญญาณของ Firefly และ *Renilla* luciferase มีค่าที่ต่ำ เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF α (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อ

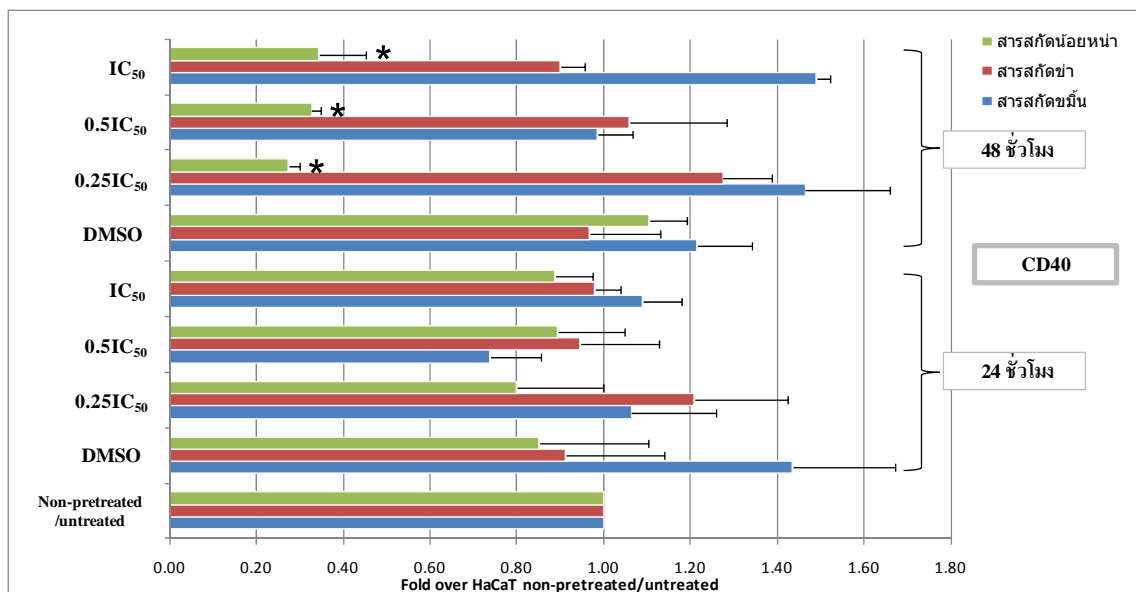
มิลลิลิตร) ดังนั้นสำหรับ 4 constructs นี้ทำการทดสอบโดยการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง โดยไม่มีการกระตุ้นเซลล์ ผลของการทดสอบแสดงในภาพที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าสารสกัดน้อยหน่าความเข้มข้น 1.575, 3.150 และ 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$, $0.5IC_{50}$ และ IC_{50}) ลดระดับของ NF- κ B1 mRNA transcripts ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ในขณะที่ RelA และ CD40 mRNA transcripts ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ที่ทุกความเข้มข้นของสารสกัดน้อยหน่าเมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับสารสกัดขมิ้นลดระดับ RelA mRNA transcripts อย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 3.350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$)

สำหรับการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีน VCAM1 พบว่าไม่มีการแสดงออกในเซลล์ HaCaT ทุกสภาวะที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 4.11 แสดงผลของสารสกัดน้อยหน่า, ข่า และขมิ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการแสดงออกของระดับ mRNA transcripts ของยีน RelA, NF-κB1 และ CD40 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง





ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA transcripts ของยีน RelA, NF- κ B1 และ CD40 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหนาและข่าที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดขมที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับสถานะที่เซลล์ HaCaT ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง

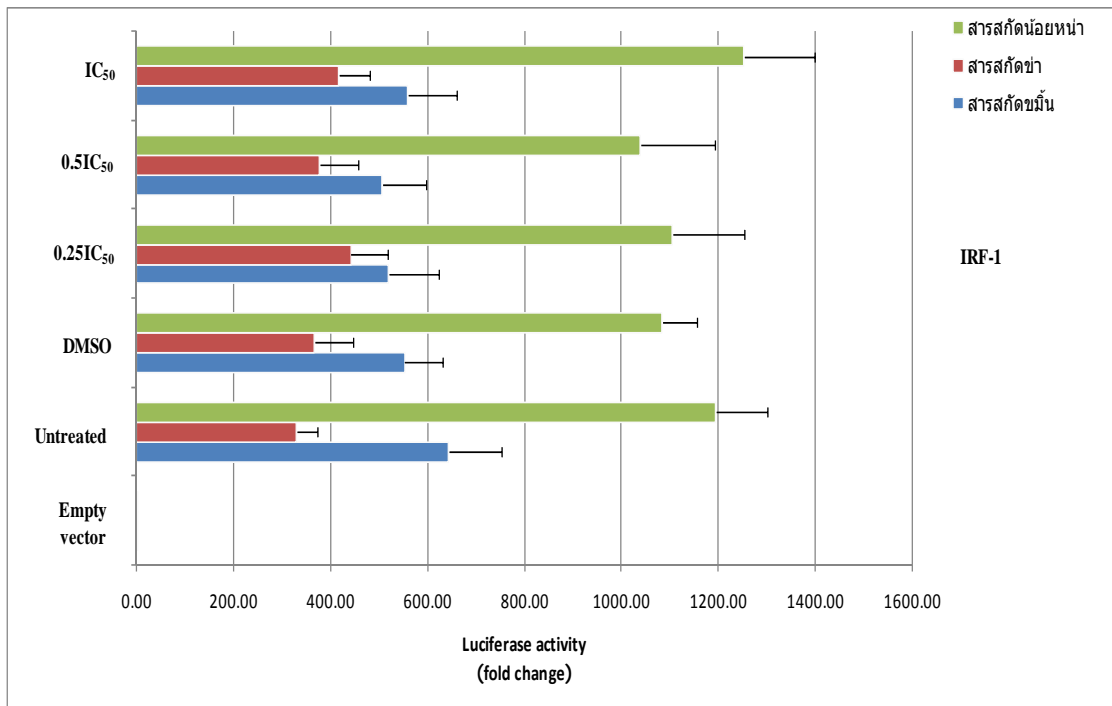
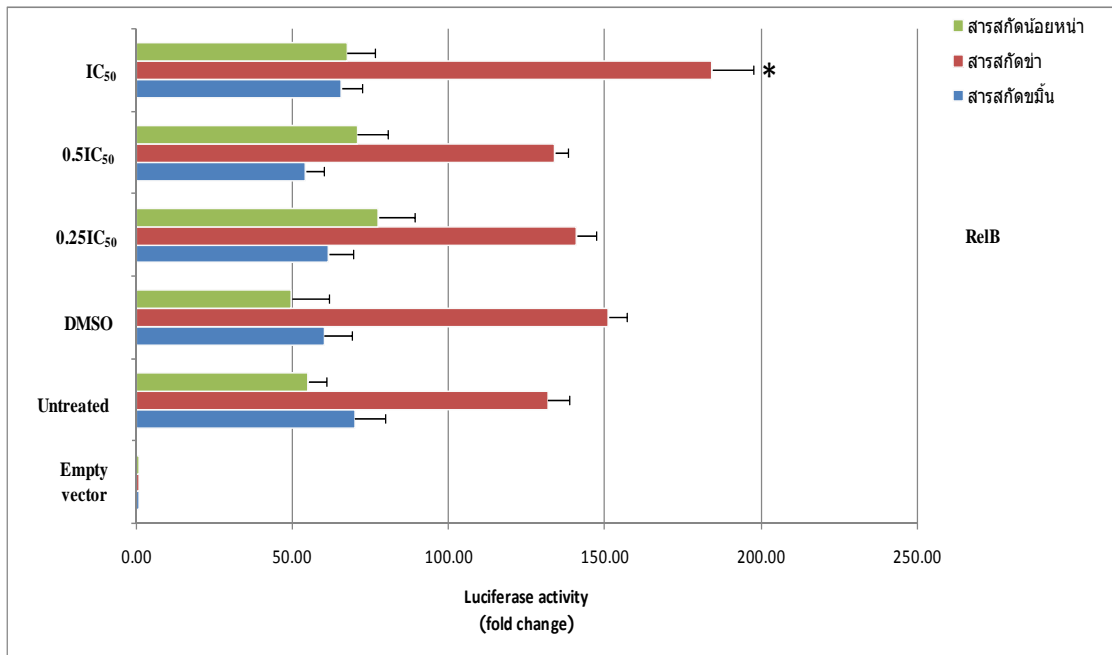
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน ต่อการทำงานของ Promoter ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B biomarkers

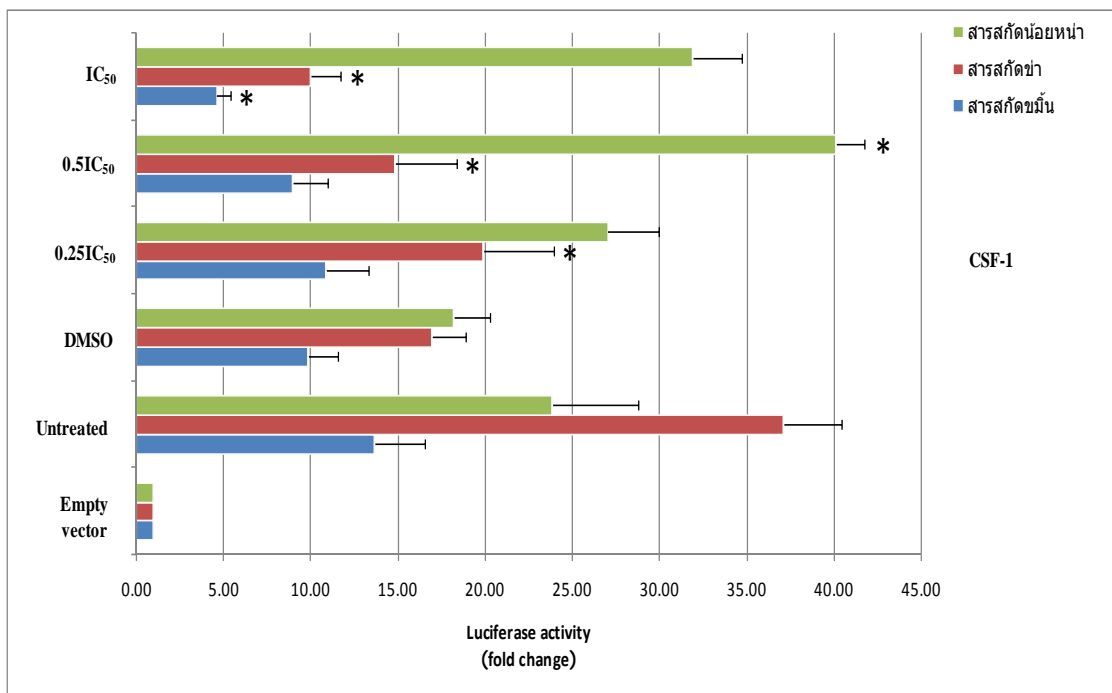
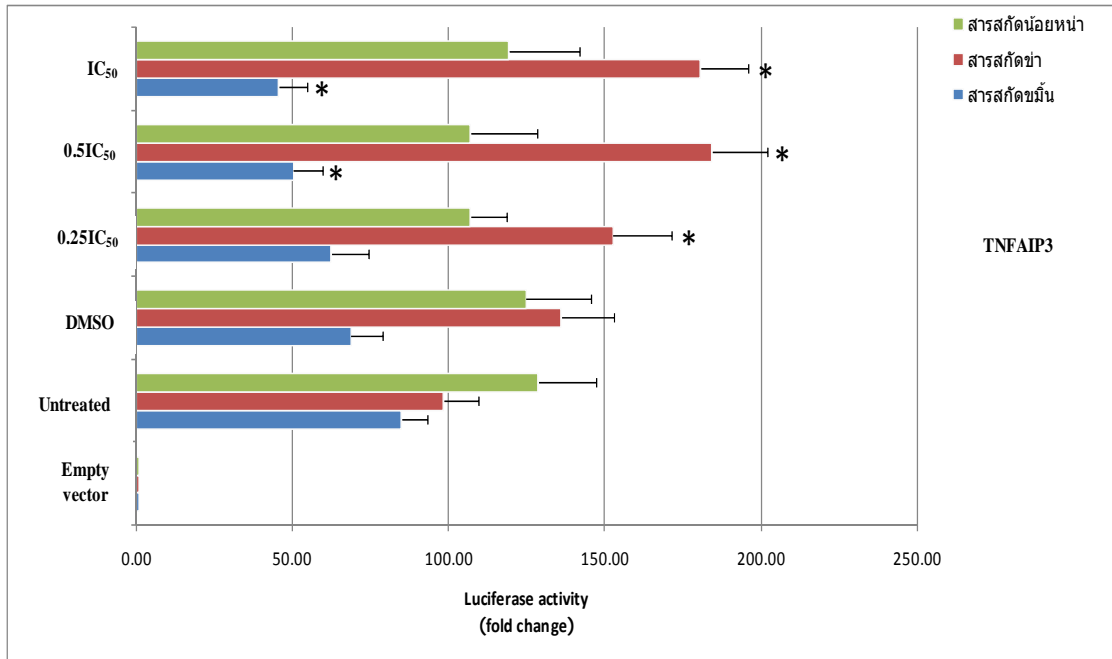
ใช้เทคนิค Reporter gene ในการวิเคราะห์การทำงานของ promoter ของยีนต่างๆ ในเครือข่ายสัญญาณของ NF- κ B biomarkers โดยวิเคราะห์ในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรในแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผลการวิเคราะห์แสดงในรูปภาพที่ 4.13 ซึ่งพบว่า สารสกัดน้อยหนาเพิ่ม IL-8 promoter activity ที่ความเข้มข้น 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$) อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$, ที่ความเข้มข้น 3.150

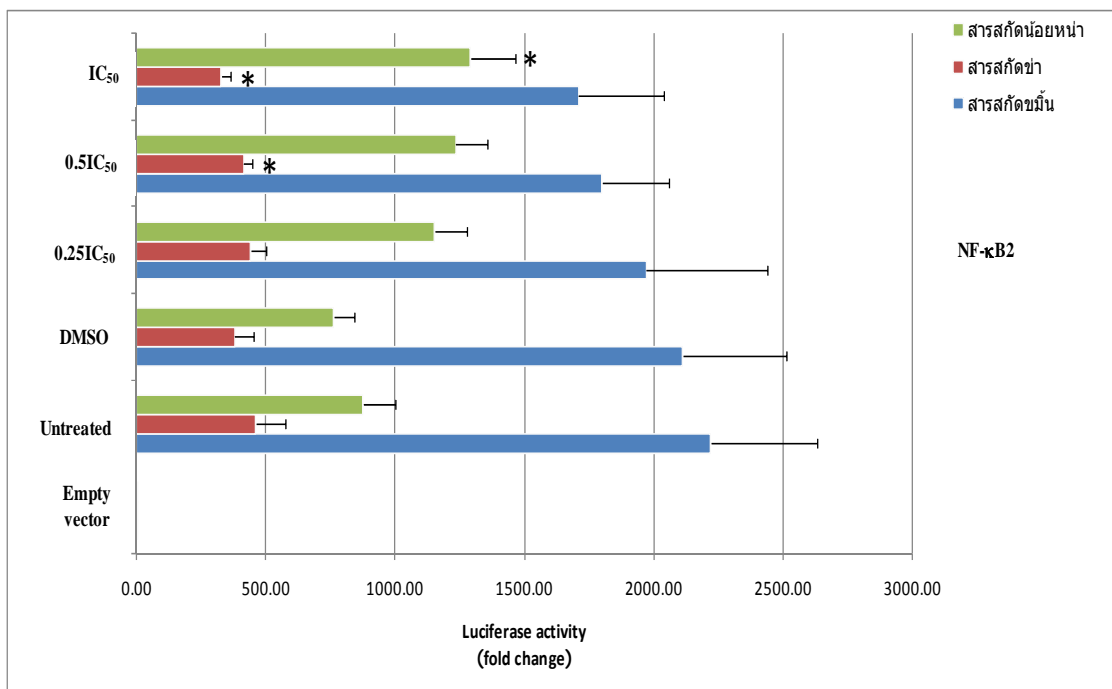
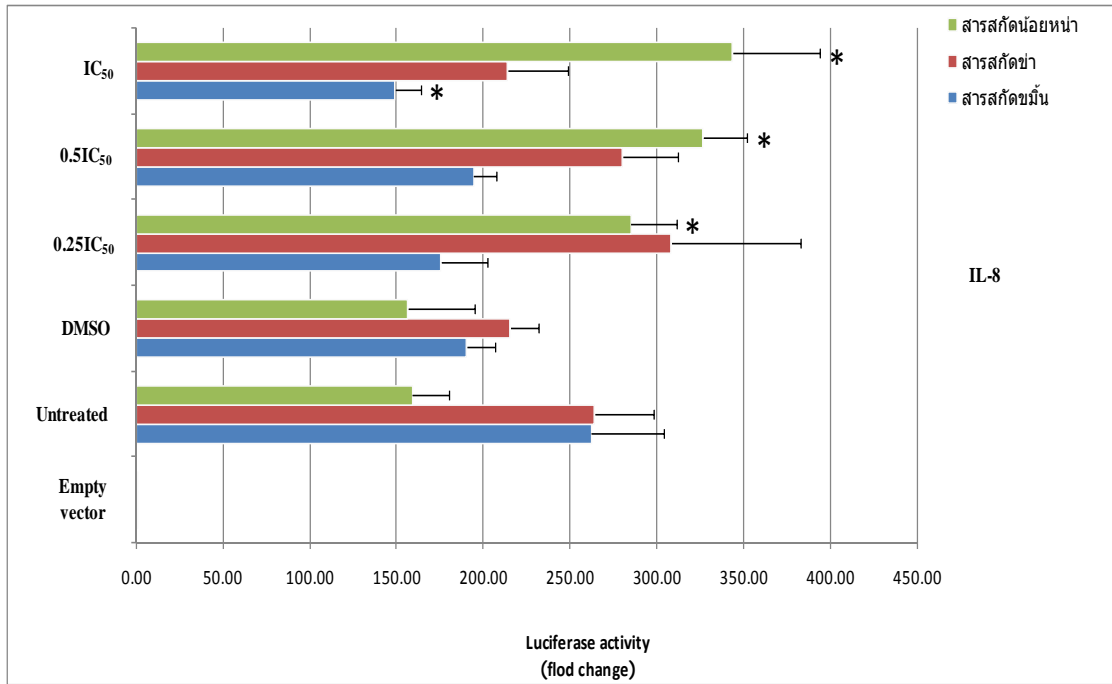
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$) เพิ่ม CSF-1 และ IL-8 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และที่ความเข้มข้น 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) เพิ่ม IL-8 และ NF- κ B2 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ส่วนสารสกัดชาที่ความเข้มข้น 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$) และ 3.150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5 IC_{50}$) ลด CSF1 และ NF- κ B2 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ แต่เพิ่ม TNFAIP3 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และที่ความเข้มข้น 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) เพิ่ม RelB และ TNFAIP3 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และผลของสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 3.350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5 IC_{50}$) ลด TNFAIP3 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ในขณะที่ความเข้มข้น 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) ลด TNFAIP3, CSF-1 และ IL-8 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

ส่วนการแสดงผลของ VCAM1, CD40, NF- κ B1 และ RelA reporter promoters ให้สัญญาณ Luciferase ที่ต่ำภายใต้สภาวะเดียวกับ Construct อื่นๆ ทำให้ต้องเปลี่ยนสภาวะการทดสอบเป็นไม่กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และทำการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ผลของการทดสอบแสดงในรูปภาพที่ 4.14 พบว่าหลังการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.25IC_{50}$) และ 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า CD40 และ VCAM1 promoter activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ส่วนการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง สัญญาณของ firefly และ *Renilla* luciferase ไม่สามารถตรวจวัดได้ทั้ง 4 reporter promoters ซึ่งอาจเกิดความเสียหายภายในเซลล์ HaCaT และผลของสารสกัดชา เพิ่ม VCAM1 promoter activity ทุกความเข้มข้นเมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ส่วนสารสกัดขมิ้นทุกความเข้มข้นลด VCAM1 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น 3.350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$) และ 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) ลด RelA promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และที่ความเข้มข้น 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) ลด CD40 และ NF- κ B1 promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบสารสกัดขมิ้น 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 3.350 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร ($0.5IC_{50}$) และ 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) เพิ่ม RelA promoter activity อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

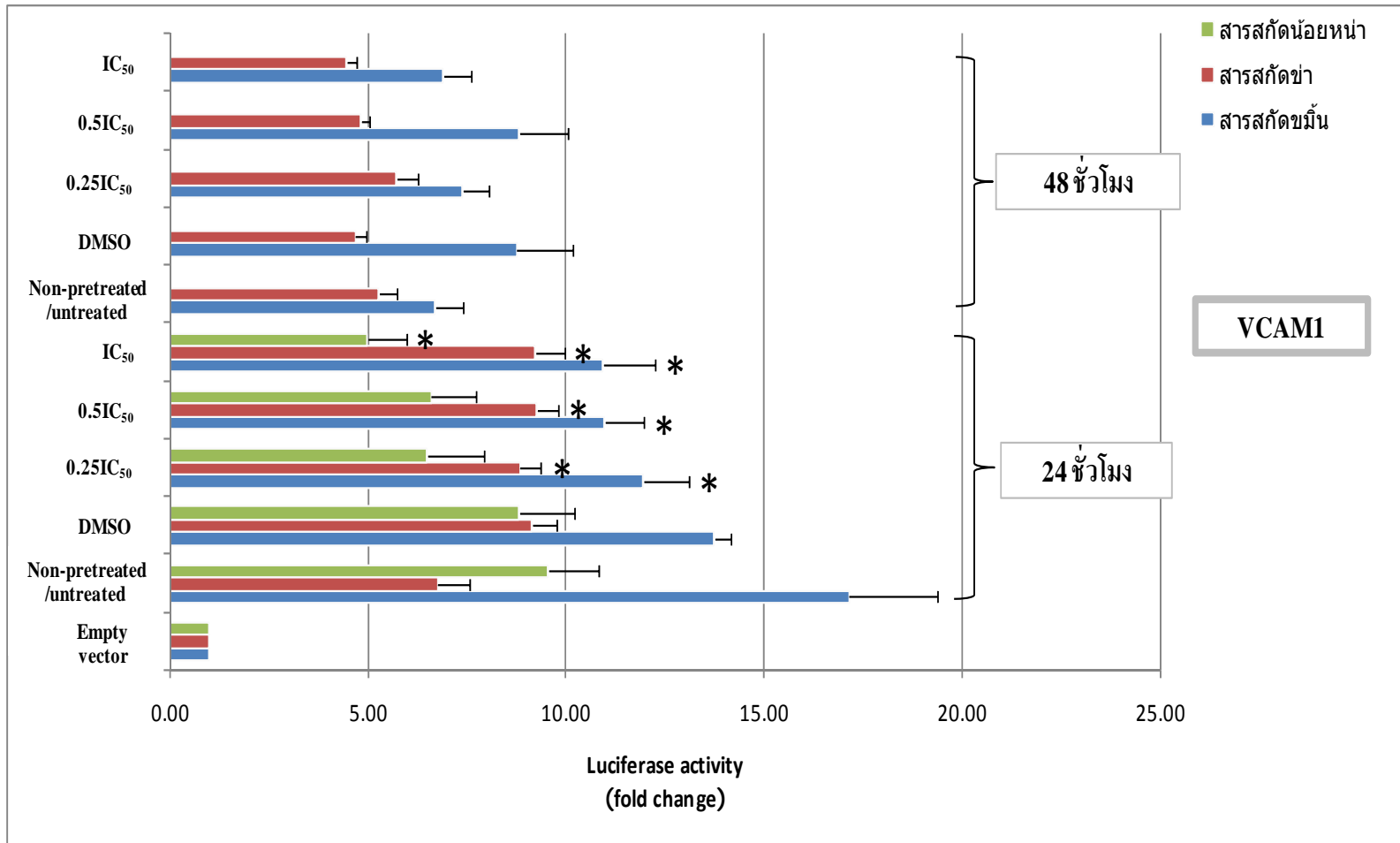


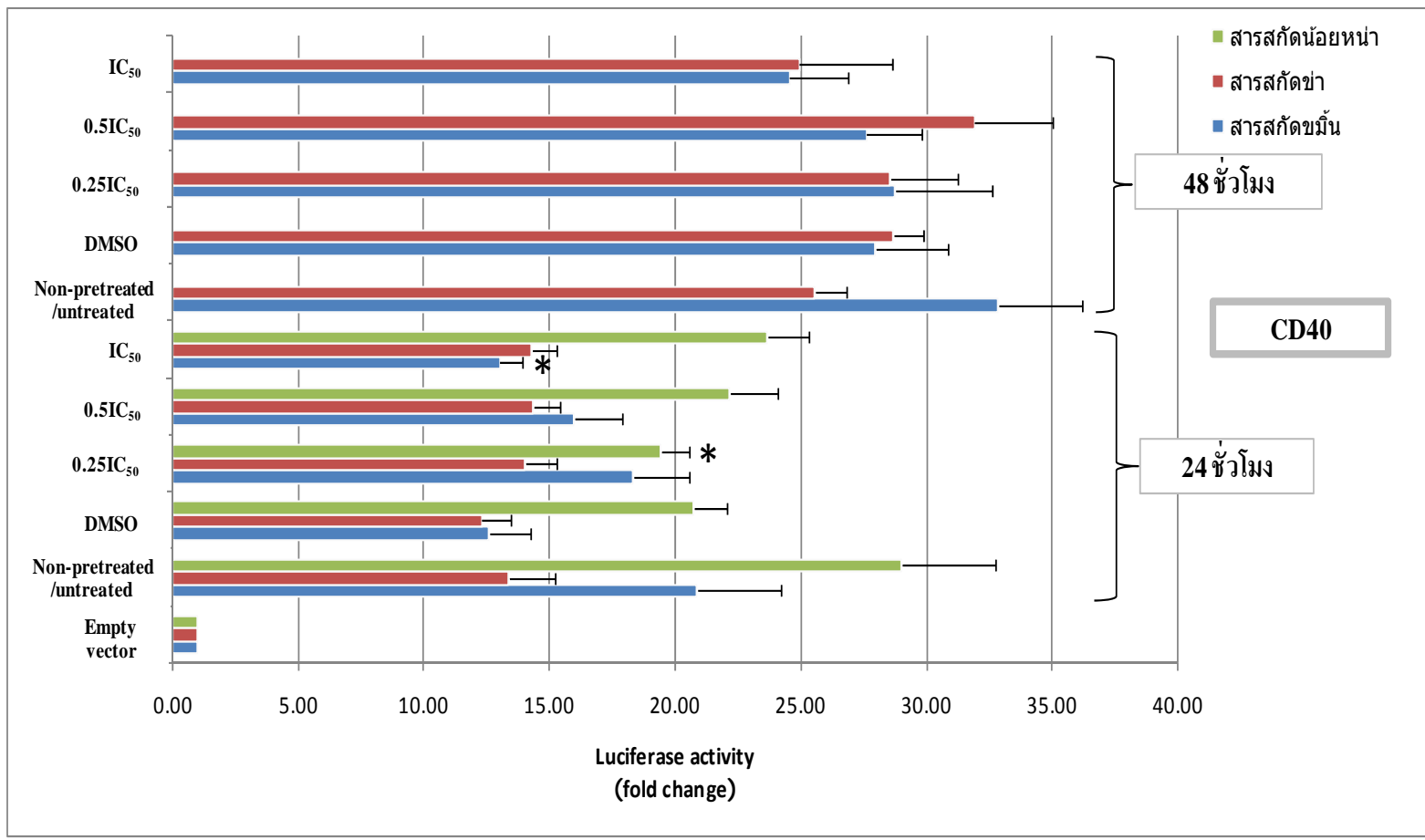


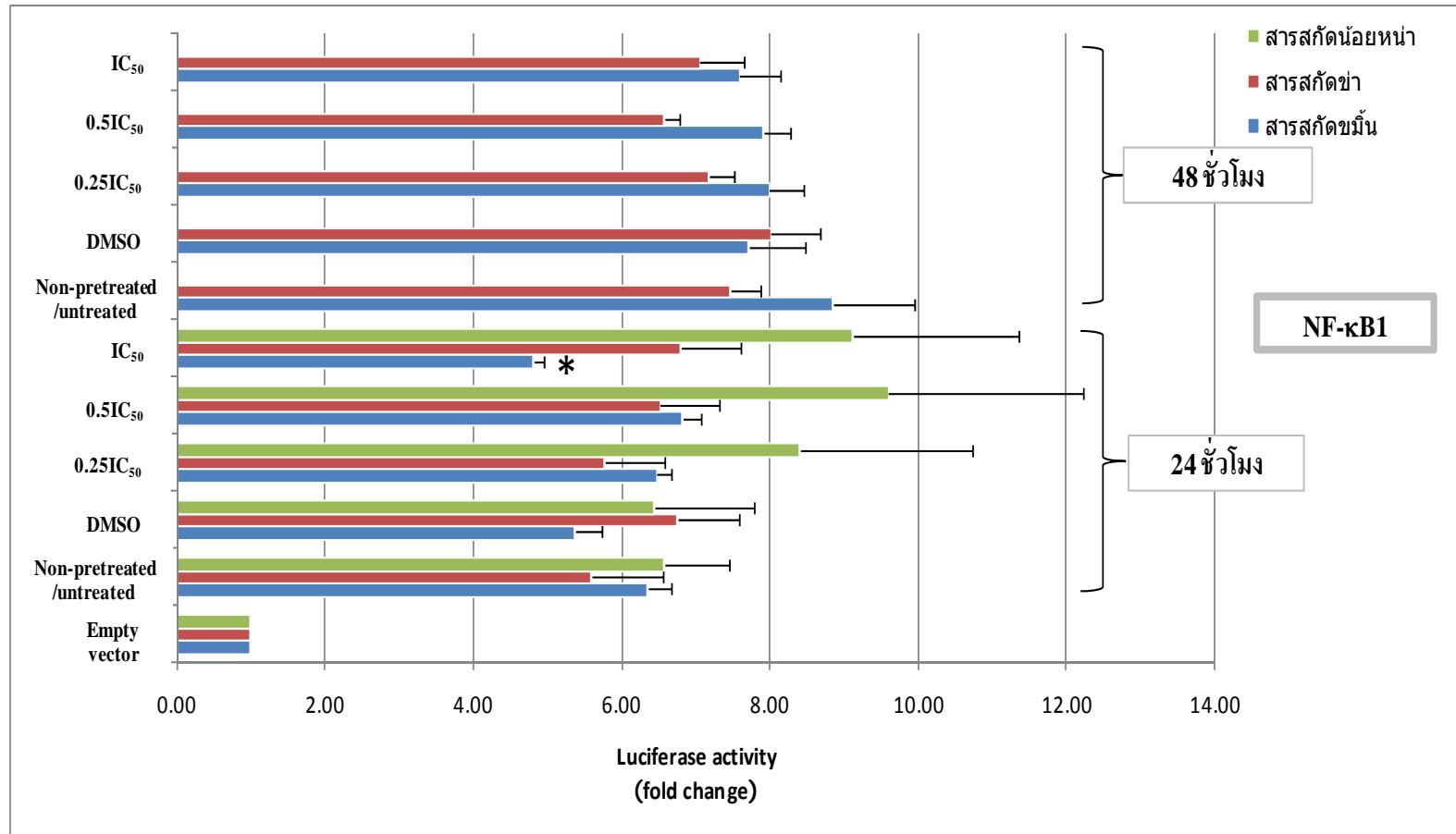


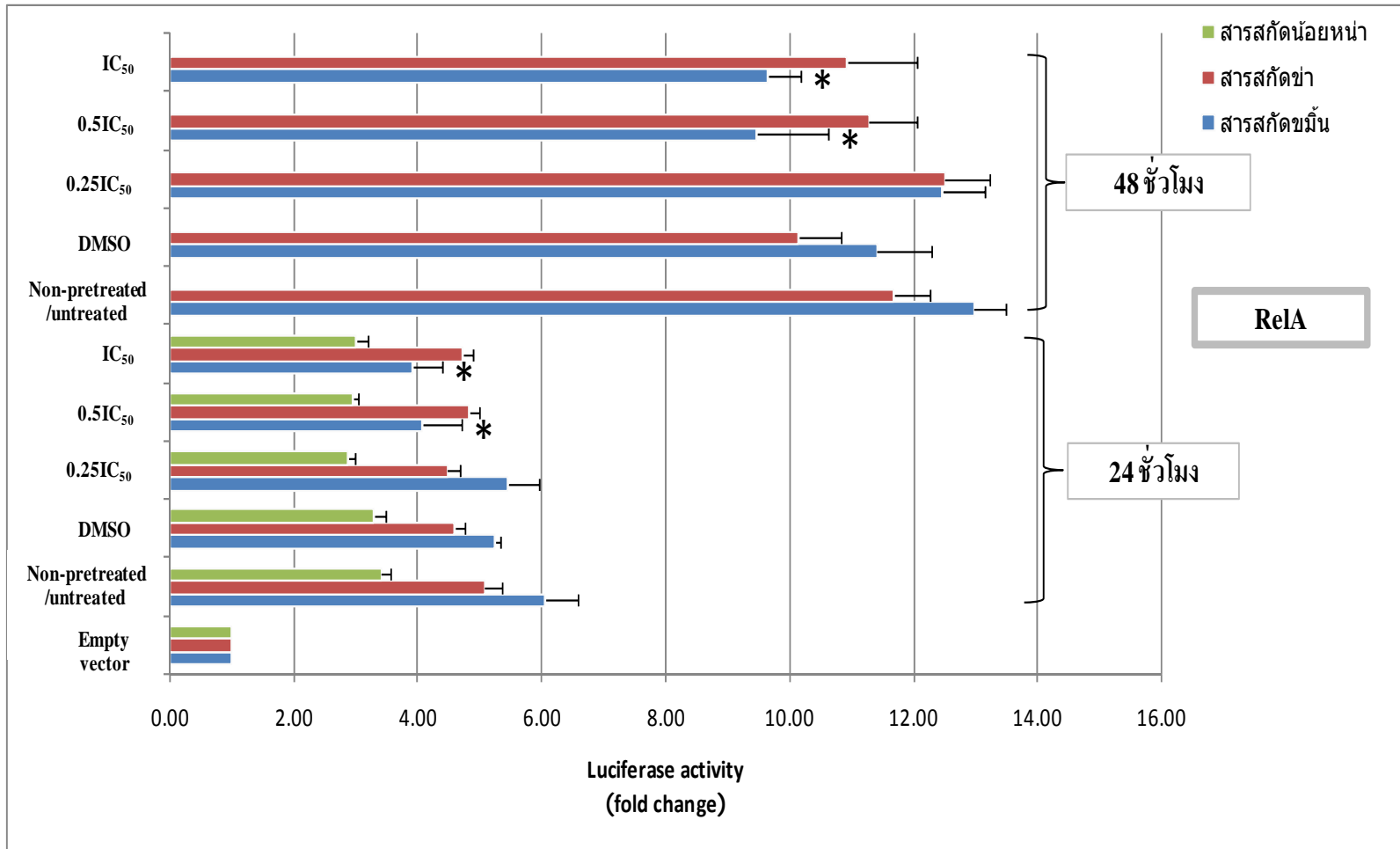
ภาพที่ 4.13 แสดงกราฟ Luciferase activity ของ Promoter ของ IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, IL-8 and NF-κB2 ในเซลล์ HaCaT ที่กระตุ้นด้วย TNF α (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหนาและขาที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC₅₀= 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดขมื่นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC₅₀= 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับ

สภาวะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF α (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN γ (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง และในแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 การทดลอง









ภาพที่ 4.14 แสดงกราฟ Luciferase activity ของ Promoter ของ VCAM1, CD40, NF- κ B1 และ RelA ในเซลล์ HaCaT หลังการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรน้อยหน่าและชำที่ความเข้มข้น 6.300, 3.150, 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 6.700, 3.350, 1.675 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50} = 6.700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบ fold over กับการแสดงออกของ Empty vector โดยสัญลักษณ์ * แทนค่าสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$ และข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SEM จากการทดลองที่แตกต่างกันจำนวน 3 การทดลอง และในแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 การทดลอง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คณะผู้วิจัย ได้ใช้สมุนไพรที่มีในท้องถิ่นที่มีฤทธิ์ในการต้านโรค
สะเก็ดเงิน โดยสารสกัดสมุนไพรน้อยหน่า, ข่า และขมิ้น ได้ใช้วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) และ
ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด [8]

โมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและการทำ
หน้าที่ของเซลล์ผิวหนัง ในควบคุมกระบวนการ apoptosis และกระบวนการอักเสบ รวมถึงการ
หลั่ง cytokines ต่างๆ [88, 89, 90] ดังนั้นการสูญเสียความสมดุลของการทำงานของ NF- κ B จะ
นำไปสู่การเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับ Proliferative และ Inflammatory เช่น โรคสะเก็ดเงิน เป็นต้น เมื่อ
ไม่นานมานี้ จากการศึกษา ของ Nair และคณะ [78] แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลไก
ของ NF- κ B กับ โรคสะเก็ดเงินที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทำให้ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจในกระบวนการ
การเปลี่ยนแปลงของ NF- κ B หลังการรักษาด้วยสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน โดยทาง
คณะผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ HaCaT ในการศึกษาเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติ immortalized
และมีหลายการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงินได้ใช้เซลล์ HaCaT ในการศึกษา [39, 91, 92]

จากผลการศึกษาการแสดงออกของระดับ mRNA และ promoter activity ของยีนใน
เครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B ซึ่งประกอบไปด้วย CD40, CSF-1, IL-8, IRF-1, NF- κ B2,
NF- κ B1, RelA, RelB, TNFAIP3 และ VCAM1 พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF α และ IFN γ เป็น
เวลา 24 ชั่วโมงและทำการทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรไทยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถตรวจวัด
การแสดงออกของระดับ mRNA ได้แต่ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกของ promoter activity
ได้เนื่องจากเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ทางคณะผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนระยะเวลาการกระตุ้นเซลล์
ด้วยไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จาก 24 ชั่วโมง เป็น 12 ชั่วโมง และลดระยะเวลาในการใช้
สารสกัดสมุนไพรในทดสอบจาก 48 ชั่วโมง เป็น 24 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ
promoter activity ของยีน CD40, NF- κ B1 และ RelA ไม่สามารถตรวจวัดระดับของสัญญาณ

luciferase ได้ คณะผู้วิจัยจึงไม่ใช้ ไฮโดรโคโรนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบและนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทยเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง

จากผลของการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทยพบว่า สารสกัดข่า ลดระดับการแสดงออกของโมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B ผ่านทางการเพิ่มการแสดงออกในระดับ mRNA และ Promoter activity ของ TNFAIP3 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B [93] โดยจะยับยั้งที่ Receptor interacting protein มีผลทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis เนื่องจากโมเลกุลของ Fas associated death domain และ Caspase 8 ถูกกระตุ้นให้ทำงาน [92] และผลของการยับยั้งนี้ ทำให้การแสดงออกในระดับ mRNA และ Promoter activity ของ CSF-1 และ NF- κ B2 ลดต่ำลง และมีการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีน CD40, IL8, RelB ที่ลดต่ำลงด้วย ส่วนสารสกัดขมิ้นลดการแสดงออกในระดับ mRNA และ Promoter activity ของ NF- κ B1, NF- κ B2 และ RelA ซึ่งโมเลกุลทั้ง 3 เป็น transcription factor ที่ส่งผลให้การแสดงออกในระดับ mRNA และ Promoter activity ของ CSF-1 และ IL-8 ลดต่ำลง ผลของสารสกัดน้อยหน่าลดการแสดงออกในระดับ mRNA และ Promoter activity ของ CD40 ซึ่ง CD40 เป็นตัวรับ CD40ligand ที่จะกระตุ้นกระบวนการทำงาน (classical pathway) ของ NF- κ B1 [94] ทำให้การแสดงออกในระดับ mRNA และ Promoter activity ของ NF- κ B1 ลดต่ำลง และลดระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน IL-8, NF- κ B2, RelA และ RelB ซึ่งในโรคสะเก็ดเงินการแสดงออกของยีน NF- κ B ในบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงินจากการ biopsies บริเวณรอยโรค และนำมาตรวจทางด้าน immunohistochemical พบว่ามีการแสดงออกของ NF- κ B ที่สูงกว่าเซลล์ปกติ [95] อีกทั้งบริเวณรอยโรคยังตรวจพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน IL-8 [96], CD40 [97] และ VCAM1 [98] ที่สูงกว่าเซลล์ปกติ ส่วนการแสดงออกของ CSF-1 ยังไม่มีการศึกษาในเซลล์ HaCaT แต่การสร้าง CSF-1 ออกมาจากเซลล์มะเร็ง แล้ว CSF-1 เคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือดทำให้เกิดการจับกันระหว่าง CSF-1 และ CSF-1 receptor ที่อยู่บนผิวของเซลล์ Monocyte ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ Monocyte ออกจากหลอดเลือดเคลื่อนเข้าสู่บริเวณเซลล์มะเร็งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ Monocyte เป็นเซลล์ Macrophages และเหนี่ยวนำการสร้างเซลล์เพิ่มมากขึ้น [99] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Keratinocyte มาจากการที่เซลล์

Macrophages สร้างโมเลกุลที่ทำให้เกิดการสร้างเซลล์เพิ่มมากขึ้นในบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงิน อย่างไรก็ตาม การใช้สารสกัดสมุนไพรชาและขมิ้น สามารถไปลดระดับการแสดงออกของยีนนี้ได้ และผลของการศึกษานี้ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน VCAM1 ได้ เนื่องจากในเซลล์ HaCaT น่าจะไม่มีการแสดงออกของยีน VCAM1 และไม่พบการศึกษาในดังกล่าวในเซลล์ HaCaT แต่มีบางการศึกษาที่พยายามศึกษา VCAM1 โดยศึกษาผลของการทดสอบ Indigo Naturalis เพื่อนำมารักษาโรคสะเก็ดเงิน โดยเลือกใช้เซลล์ Human Umbilical Vein Endothelial Cells ในการศึกษา [100] ส่วนยีน IRF-1 ซึ่งพบลดน้อยลงในบริเวณรอยโรคสะเก็ดเงิน โดยหน้าที่ของ IRF-1 เป็น Transcription factor ที่ควบคุมการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ทำให้เกิดความสมดุลของชั้นผิวหนังในภาวะปกติ [101] แต่ในการศึกษานี้ ระดับ mRNA ของ IRF-1 ลดลงเมื่อทดสอบกับสารสกัดชา แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผลของการแสดงออกที่ตรงข้ามกันระหว่างการแสดงออกของ mRNA และ promoter activity อาจเป็นเพราะของความยาว promoter ที่ใช้ในการศึกษามีความยาวประมาณ 1,000 เบส ซึ่งอาจยังไม่ครอบคลุมถึงตำแหน่งที่จะส่งผลการแสดงออกให้ promoter มี activity ที่สูงขึ้นหรือต่ำลง อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับโมเลกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของ Promoter เช่น Activator, coactivator, repressor, corepressor และ insulators รวมทั้งการใช้เพียง 1 housekeeping gene ในการวิเคราะห์ผลของระดับที่เปลี่ยนไปของ mRNA ทำให้ได้ผลที่ยังไม่แน่ชัด ควรทำหลาย housekeeping gene เพื่อยืนยันการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเทียบกับการแสดงออกของ housekeeping gene แต่ละ gene เพื่อความถูกต้องที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงินโดยผ่านกลไกการทำงานของ NF- κ B ดังนั้น การควบคุมการทำงานของโมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF- κ B จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาหาสารที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของโมเลกุลเหล่านั้น โดยมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสาร curcumin ในสารสกัดขมิ้น, สาร quercetin ในสารสกัดน้อยหน่าพบว่ามียุทธในการต้านการอักเสบ [102, 103] และสาร 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) ในสารสกัดชา มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B [104] ซึ่งในอนาคตน่าจะมีการศึกษาแยกสารประกอบดังกล่าวออกมาจากสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดเพื่อนำมาศึกษาถึงการออกฤทธิ์ว่าเป็นสารหลักในการแสดงผลต่อระดับ mRNA และ

activity ของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF-**KB** หรือไม่ และรวมสารออกฤทธิ์ เพื่อให้ส่งผลได้ครอบคลุมในการควบคุมการทำงานของสารชีวโมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF-**KB** เพื่อนำไปสู่การศึกษาในขั้นสูงในการพัฒนารักษาโรคสะเก็ดเงินจากสารสกัดสมุนไพร เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

สรุป และข้อเสนอแนะ

ผลของการศึกษานี้สรุปรวมอยู่ในตารางที่ 5.1 พบว่าสารสกัดสมุนไพรไทยจากตัวทำละลายเอทานอล สารสกัดฆ่า ควบคุมการทำงานของโมเลกุลในเครือข่ายของสัญญาณ NF-**KB** ผ่านการลดการแสดงออกของ CSF-1 และ NF-**KB2** ในขณะที่เพิ่มการแสดงออกของ TNFAIP3 ส่วนสารสกัดขมิ้น ลดการแสดงออกของ CSF-1, IL-8, NF-**KB2**, NF-**KB1** และ RelA สารสกัดน้อยหน้าลดการแสดงออกของ CD40 และ NF-**KB1** ดังนั้นผลของสารสกัดสมุนไพรแสดงให้เห็นถึงผลของการรักษาโรคที่มีการอักเสบและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ อย่างเช่นโรคสะเก็ดเงิน และทางคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลของการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มวิจัยอื่นๆที่จะคิดพัฒนาการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคสะเก็ดเงินให้มีประสิทธิภาพ ปลอดภัยและประหยัดค่าใช้จ่ายต่อไปในอนาคต

Reporter gene assay

RT-PCR

		IRF-1			RelB			TNFAIP3			CSF-1			CD40			IL-8			NF-κB2			NF-κB1			RelA		
		0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1
Pretreated 12 ชม. และ Treated 24 ชม.																												
RT-PCR	ฆ่า	↓↑	↓↑	↓↑	↓=	↓=	↓↑	A↑↑	A↑↑	A↑↑	A↓↓	A↓↓	A↓↓	↓	↓	↓	=↑	↓=	A↓↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	=	=	=	↑	↓	↓
	ขมื่น	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↓	=	↑↓	=	↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	↓	↓	↓	=	A↓↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	=	=	=	=	↓	↓
	น้อยหน้า	↑↓	↑↓	R↑↑	↓↑	↓↑	↓↑	↑↓	↑↓	↑=	↓↑	↓↑	↓↑	↓	↓	↓	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Treated 24 ชม.																												
ฆ่า													↑=	=	=							=	R↑↑	R↑↑	A↓↓	↑=	↑=	
ขมื่น													↑=	A↓↓	↑↓							↓=	↑↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	
น้อยหน้า													A↓↓	A↓↓	↓=							A↓↓	A↓↓	A↓↓	A↓↓	↑↓	↑↓	
Treated 48 ชม.																												
ฆ่า													↓↑	R↑↑	↑=							↓=	A↓↓	↓	=	↑=	↑=	
ขมื่น													↑↓	↑↓	↑↓							↑↓	↑↓	↑↓	↑=	↑↓	↑↓	

Reporter gene assay

RT-PCR	IRF-1			RelB			TNFAIP3			CSF-1			CD40			IL-8			NF- K B2			NF- K B1			RelA		
	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1
	Treated 48 ชม.																										
น้อยหน้า	[Black]									[Green] ↓			[Black]			[Green] ↓			[Green] ↓			[Green] ↓					

A= ยอมรับสมมติฐาน

R= ปฏิเสธสมมติฐาน

[Red] = ผลของทั้ง 2 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน

[Orange] = มี 1 วิธีผล ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน

[Pink] = ผลเป็นไปทางเดียวกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

[White] = ผลไม่ไปทางเดียวกัน

[Green] = วิเคราะห์ได้เพียง 1 วิธี

↑ ↓ = แสดงผลเพิ่ม/ลด ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

↑ ↓ = แสดงผลเพิ่ม/ลด ที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

[Black] = ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการทดสอบในแต่ละสถานะของวิธี RT-PCR และ Reporter gene assay

Pretreated 12 ชั่วโมง และ Treated 24 ชั่วโมง (สำหรับยีน IRF-1, RelB, TNFAIP3, CSF-1, IL-8 และ NF- κ B2)			
	ฆ่า	ขมิ้น	น้อยหน้า
ผลของทั้ง 2 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน	5.56%	5.56%	0%
มี 1 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน	38.89%	11.11%	0%
ผลเป็นไปทางเดียวกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ	11.11%	33.33%	5.56%
ผลไม่ไปทางเดียวกัน	44.44%	50.00%	94.44%
Treated 24 ชั่วโมง (สำหรับยีน CD40, NF- κ B1 และ RelA)			
ผลของทั้ง 2 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน	0%	11.11%	0%
มี 1 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน	0%	22.22%	44.44%
ผลเป็นไปทางเดียวกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ	66.67%	22.22%	22.22%
ผลไม่ไปทางเดียวกัน	33.33%	44.44%	33.33%
Treated 48 ชั่วโมง (สำหรับยีน CD40, NF- κ B1 และ RelA)			
ผลของทั้ง 2 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน	0%	0%	NA
มี 1 วิธี ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปทางเดียวกัน	0%	0%	NA
ผลเป็นไปทางเดียวกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ	33.33%	0%	NA
ผลไม่ไปทางเดียวกัน	66.67%	100%	NA

NA: ไม่สามารถวิเคราะห์ผลจาก Reporter gene assay

รายการอ้างอิง

- [1] Boehncke, W.H., Dressel, D., Zollner, T.M., and Kaufmann, R. Pulling the trigger on psoriasis. Nature 1996, 379, 777.
- [2] Ortonne, J.P. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. Br J Dermatol 1996, 135 Suppl 49, 1-5.
- [3] Saurat, J.H., et al. Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (CHAMPION). Br J Dermatol 2008, 158, 558-566.
- [4] Gelfand, J.M., et al. Determinants of quality of life in patients with psoriasis: a study from the US population. J Am Acad Dermatol 2004, 51, 704-708.
- [5] Horn, E.J., et al. Association of patient-reported psoriasis severity with income and employment. J Am Acad Dermatol 2007, 57, 963-971.
- [6] สาธารณสุข, กระทรวงสาธารณสุข กรมการแพทย์. สถิติโรคของสถาบันโรคผิวหนังประจำปี 2551
- [7] Gladman, D.D. Natural history of psoriatic arthritis. Baillieres Clin Rheumatol 1994, 8, 379-394.
- [8] วิสารท์ ทองระกาศ. การทดสอบหาฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.2553
- [9] Thongrakard, V., and Tencomnao, T. Modulatory effects of Thai medicinal plant extract on proinflammatory cytokines-induced apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. African Journal of Biotechnology 2010, 9, 4999-5003.
- [10] Champion, R.H. Psoriasis. Br Med J (Clin Res Ed) 1986, 292(6537), 1693–1696
- [11] National Psoriasis Foundation [Online]. 2009. Available from :
http://www.psoriasis.org/netcommunity/sublearn01_typesps. [2010,May,21]
- [12] Gelfand, J.M., et al. The prevalence of psoriasis in African Americans: results from a population-based study. J Am Acad Dermatol 2005, 52, 23-26.
- [13] Lowes, M.A., Bowcock, A.M., and Krueger, J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature 2007, 445, 866-873.

- [14] Burden, A., et al. Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. J Invest Dermatol 1998, 110, 958-960.
- [15] Trembath, R., et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. Human molecular genetics 1997, 6, 813.
- [16] Bowcock, A., and Krueger, J. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. Nature Reviews Immunology 2005, 5, 699-711.
- [17] Tomfohrde, J., et al. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. Science 1994, 264, 1141.
- [18] Matthews, D., et al. Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. Nature genetics 1996, 14, 231-233.
- [19] Capon, F., et al. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. J Invest Dermatol 1999, 112, 32-35.
- [20] Enlund, F., et al. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. European journal of human genetics: 1999, 7, 783.
- [21] Lee, Y., et al. Genomewide scan in German families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. The American Journal of Human Genetics 2000, 67, 1020-1024.
- [22] Veal, C., et al. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. Journal of medical genetics 2001, 38, 7.
- [23] Karason, A., et al. A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps to chromosome 16q: evidence for imprinting. Am J Hum Genet 2003, 72, 125-131.
- [24] Zhang, X.J., et al. Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. J Invest Dermatol 2007, 127, 2544-2551.
- [25] Asumalahti, K., et al. Psoriasis susceptibility locus on 18p revealed by genome scan in Finnish families not associated with PSORS1. J Invest Dermatol 2003, 121, 735-740.

- [26] Duffin, K.C., Woodcock, J., and Krueger, G.G. Genetic variations associated with psoriasis and psoriatic arthritis found by genome wide association. Dermatologic Therapy 2010, 23, 101-113.
- [27] Bowcock, A., et al. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. Human molecular genetics 2001,10, 1793.
- [28] Oestreicher, J., et al. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. The pharmacogenomics journal 2001, 1, 272.
- [29] Quekenborn-Trinquet, V., et al. Gene expression profiles in psoriasis: analysis of impact of body site location and clinical severity. British Journal of Dermatology 2005, 152, 489-504.
- [30] Zhou, X., et al. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. Physiological genomics 2003, 13, 69.
- [31] Biljan, D., et al. Psoriasis, Mental Disorders and Stress. Collegium antropologicum 2009, 33.
- [32] Mallon, E. Retroviruses and psoriasis. Current Opinion in Infectious Diseases 2000, 13, 103.
- [33] Owen, C., Chalmers, R., O'sullivan, T., and Griffiths, C. Antistreptococcal interventions for guttate and chronic plaque psoriasis. Cochrane database syst 2000, 1.
- [34] Tsankov, N., Angelova, I., and Kazandjieva, J. Drug-induced psoriasis: recognition and management. American journal of clinical dermatology 2000, 1, 159-165.
- [35] R cz, E., and Prens, E. Molecular pathophysiology of psoriasis and molecular targets of antipsoriatic therapy. Expert Reviews in Molecular Medicine 2009, 11.
- [36] DiSepio, D., and Chandraratna, R.A.S. New drugs in the treatment of psoriasis. Expert Opinion on Investigational Drugs 2000, 9, 79-93.
- [37] Cho, J., Lee, K., and Kim, C. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-

- kappaB and MAPKs as potential upstream targets. International journal of molecular medicine 2007, 19, 469.
- [38] Stan, C., C Mpean, A., and Iordachescu, D. Cellular and molecular changes of psoriatic keratinocytes in response to UVA in vitro treatment. Rom. J. Biophys 2004, 14, 99-108.
- [39] Tse, W.P., Che, C.T., Liu, K., and Lin, Z.X. Evaluation of the anti-proliferative properties of selected psoriasis-treating Chinese medicines on cultured HaCaT cells. J Ethnopharmacol 2006, 108, 133-141.
- [40] Zhang, H., and Gu, J. Progress of experimental study on treatment of psoriasis by Chinese medicinal monomer and single or compound recipe in Chinese materia medica. Chinese Journal of Integrative Medicine 2007, 13, 312-316.
- [41] Sung, K., Chang, S., Paik, E., Lee, M., and Choi, J. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF-[alpha]. Neuropeptides 1999, 33, 435-446.
- [42] Nickoloff, B., et al. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. The American journal of pathology 1991, 138, 129.
- [43] Sen, R., and Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986, 46, 705-716.
- [44] Beinke, S., and Ley, S. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. Biochemical Journal 2004, 382, 393.
- [45] Chen, F., and Ghosh, G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. Oncogene 1999, 18, 6845.
- [46] Marienfeld, R., et al. RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. Journal of Biological Chemistry 2003, 278, 19852.
- [47] Zhang, X., Wang, H., Claudio, E., Brown, K., and Siebenlist, U. A role for the I [kappa] B family member Bcl-3 in the control of central immunologic tolerance. Immunity 2007, 27, 438-452.
- [48] Senftleben, U., et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. Science 2001, 293, 1495.

- [49] Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. Mol Cell 2001, 7, 401-409.
- [50] Sun, S., and Ley, S. New insights into NF-[kappa] B regulation and function. Trends in immunology 2008, 29, 469-478.
- [51] Wegener, E., and Krappmann, D. Dynamic protein complexes regulate NF-kappaB signaling. Handb Exp Pharmacol 2008, 237-259.
- [52] Lee, D., and Hung, M. Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. Clinical cancer research 2008, 14, 5656.
- [53] Li, Q., and Verma, I. NF-**KB** regulation in the immune system. Nature Reviews Immunology 2002, 2, 725-734.
- [54] Rice, N., MacKichan, M., and Isra I, A. The precursor of NF-[kappa] B p50 has I [kappa] B-like functions. Cell 1992, 71, 243-253.
- [55] Honda, K., Takaoka, A., and Taniguchi, T. Type I inteferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. Immunity 2006, 25, 349-360.
- [56] Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. Annual Review of Immunology 2001, 19, 623-655.
- [57] Azimi, N., Tagaya, Y., Mariner, J., and Waldmann, T. Viral activation of interleukin-15 (IL-15): characterization of a virus-inducible element in the IL-15 promoter region. Journal of Virology 2000, 74, 7338.
- [58] Drew, P., et al. NFkappaB and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression. Journal of Interferon & Cytokine Research 1995, 15, 1037-1045.
- [59] Neish, A., et al. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappaB as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. Molecular and cellular biology 1995, 15, 2558.
- [60] Saura, M., Zaragoza, C., Bao, C., McMillan, A., and Lowenstein, C. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor [kappa] B during activation of inducible nitric oxide synthase transcription1. Journal of molecular biology 1999, 289, 459-471.

- [61] Beyaert, H. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. Trends in Biochemical Sciences 2005, 30, 1-4.
- [62] Boone, D., et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. Nature immunology 2004, 5, 1052-1060.
- [63] Opipari, A., Boguski, M., and Dixit, V. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. Journal of Biological Chemistry 1990, 265, 14705.
- [64] Wertz, I., et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. Nature 2004, 430, 694-699.
- [65] Daniel, S., et al. A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. Blood 2004, 104, 2376.
- [66] Denfeld, R., et al. CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. European journal of immunology 2005, 26, 2329-2334.
- [67] Fries, K., et al. CD40 expression by human fibroblasts. Clinical immunology and immunopathology 1995, 77, 42-51.
- [68] Grousson, J., Concha, M., Schmitt, D., and Peguet-Navarro, J. Effects of CD40 ligation on human keratinocyte accessory function. Archives of dermatological research 1998, 290, 325-330.
- [69] Hollenbaugh, D., et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. Journal of Experimental Medicine 1995, 182, 33.
- [70] Cecchini, M., et al. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. Development 1994, 120, 1357.
- [71] Stanley, E. Colony-stimulating factor (CSF) radioimmunoassay: detection of a CSF subclass stimulating macrophage production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979, 76, 2969.
- [72] Stanley, E., Chen, D., and Lin, H. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. Nature 1978, 274, 168-170.
- [73] Tushinski, R., et al. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. Cell 1982, 28, 71-81.

- [74] Takao, J., et al. Expression of NF-kappaB in epidermis and the relationship between NF-kappaB activation and inhibition of keratinocyte growth. British Journal of Dermatology 2003, 148, 680-688.
- [75] Lizzul, P., et al. Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. Journal of Investigative Dermatology 2005, 124, 1275-1283.
- [76] Johansen, C., et al. Inverse regulation of the nuclear factor- κ B binding to the p53 and interleukin-8 κ B response elements in lesional psoriatic skin. Journal of Investigative Dermatology 2005, 124, 1284-1292.
- [77] Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., and Grumont, R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. Oncogene 1999, 18, 6888.
- [78] Nair, R., et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- κ B pathways. Nature genetics 2009, 41, 199-204.
- [79] Nair, R. et al. Genetic evidence for involvement of the IL23 pathway in Thai psoriatics. Archives of dermatological research 2010, 302, 139-143.
- [80] Fisker, S., et al. Gene expression of the GH receptor in subcutaneous and intraabdominal fat in healthy females: relationship to GH-binding protein. European Journal of Endocrinology 2004, 150, 773.
- [81] Sun, Q., Peng, J., Xia, H., and Yang, Y. IFN- promotes apoptosis of the uterus and placenta in pregnant rat and human cytotrophoblast cells. Journal of Interferon & Cytokine Research 2007, 27, 567-578.
- [82] Schaumann, D., Tuischer, J., Ebell, W., Manz, R., and Lauster, R. VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF. Molecular immunology 2007, 44, 1606-1612.
- [83] Braam, B., et al. Nitric oxide donor induces temporal and dose-dependent reduction of gene expression in human endothelial cells. American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology 2004, 287, H1977.

- [84] Zhang, D., et al. Sodium ferulate modified gene expression profile of oxidized low-density lipoproteins-treated endothelial cells. The FASEB Journal 2009, 23.
- [85] Gill, K., et al. Regulation of colony stimulating factor-1 (CSF-1) in endometrial cells: glucocorticoids and oxidative stress regulate the expression of CSF-1 and its receptor c-fms in endometrial cells. Fertility and sterility 2001, 76, 1005.
- [86] Basok, A., Shnaider, A., Man, L., Chaimovitz, C., and Doudevani, A. CD40 is expressed on human peritoneal mesothelial cells and upregulates the production of interleukin-15 and RANTES. Journal of the American Society of Nephrology 2001, 12, 695.
- [87] Vogel, C., et al. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. Molecular Endocrinology 2007, 21, 2941.
- [88] Li, Q., and Verma, I.M. NF- κ B regulation in the immune system. Nature Reviews Immunology 2002, 2, 725-734.
- [89] Qin, J.Z., et al. Role of NF- κ B in the apoptotic-resistant phenotype of keratinocytes. Journal of Biological Chemistry 1999, 274, 37957.
- [90] Tak, P.P., and Firestein, G.S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. Journal of Clinical Investigation 2001, 107, 7-12.
- [91] Boukamp, P., et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J Cell Biol 1988, 106, 761-771.
- [92] Tencomnao, T., Ronpirin, C., Prasansuklab, A., and Poovorawan, Y. Decreased EGFR mRNA expression in response to antipsoriatic drug dithranol in vitro. African Journal of Biotechnology 2009, 8, 3141-3146.
- [93] Heyninck, K., and Beyaert, R. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. Trends Biochem Sci 2005, 30, 1-4.
- [94] Beinke, S., and Ley, S.C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. Biochem J 2004, 382, 393-409.
- [95] Abdou, A.G., and Hanout, H.M. Evaluation of survivin and NF-kappaB in psoriasis, an immunohistochemical study. J Cutan Pathol 2008, 35, 445-451.
- [96] Beljaards, R.C., Van Beek, P., Nieboer, C., Stoof, T.J., and Boorsma, D.M. The expression of interleukin-8 receptor in untreated and treated psoriasis. Arch Dermatol Res 1997, 289, 440-443.

- [97] Ohta, Y., and Hamada, Y. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. Dermatology 2004, 209, 21-28.
- [98] Cabrijan, L., Lipozencic, J., Batinac, T., Lenkovic, M., and Stanic Zgombic, Z. Influence of PUVA and UVB radiation on expression of ICAM-1 and VCAM-1 molecules in psoriasis vulgaris. Coll Antropol 2008, 32 Suppl 2, 53-56.
- [99] Karin, M., and Greten, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nature Reviews Immunology 2005, 5, 749-759.
- [100] Chang, H.N., et al. Inhibitory Effect of Indigo Naturalis on Tumor Necrosis Factor- α -Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Molecules 2010, 15, 6423-6435.
- [101] Jackson, M., et al. Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1 activation in response to α -IFN. The FASEB Journal 1999, 13, 495.
- [102] Boots, A.W., et al. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. Nutrition 2008, 24, 703-710.
- [103] Satoskar, R.R., Shah, S.J., and Shenoy, S.G. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1986, 24, 651-654.
- [104] Ohata, T., et al. Inhibition by 1'-acetoxychavicol acetate of lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced nitric oxide production through suppression of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW264 cells. Carcinogenesis 1998, 19, 1007.

ภาคผนวก

LB broth ประกอบด้วย Bacto-tryptone 5 กรัม
 Bacto-yeast extract 2.5 กรัม
 NaCl 5 กรัม
 เติมน้ำกลั่น (DW) จนครบ 500 มิลลิลิตร

LB agar ประกอบด้วย LB broth 500 มิลลิลิตร
 Bacto agar 7.5 กรัม

LB agar/Amp⁺ ผสม Ampicilin 100 ไมโครกรัม ต่อ LB agar 1 มิลลิลิตร

DEPC-treated Water ประกอบด้วย 0.01 % (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC)
 ผสมกับน้ำในภาชนะที่ปราศจาก RNase
 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนและนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชนะชัย แซ่ลี เลขรหัสประจำตัวนิสิต 5277202837 เกิดเมื่อวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2529 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจากโรงเรียนวัดราชโอรส เมื่อปี การศึกษา 2547 และวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ (เกียรติคุณอันดับ 1) จาก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อใน หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวช ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 โดยได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนผู้ช่วยสอนจาก บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนวิจัยจากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย