

## บทที่ 5

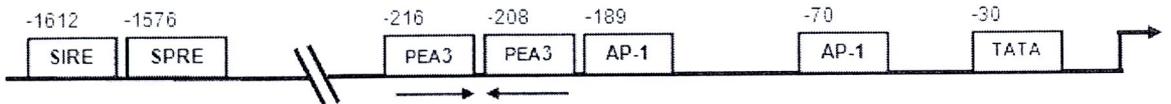
### อภิปรายผลการวิจัย

#### 5.1 การโคลนและโครงสร้างของดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 สกัดจากเซลล์ human lung fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ ด้วยวิธี PCR ได้ผลิต PCR ขนาด 2,127 bp และนำส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีลำดับดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับเป็นตำแหน่งจับกับ transcription factor (transcription factor binding sites/DNA binding sites) หลายตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้จะมีบทบาทที่สำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนนี้อย่างมาก และจะตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ เช่น cytokines และ growth factor รวมถึงอาจจะเป็นปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ แรงเชิงกล เป็นต้น จะส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยอาศัยกระบวนการ phosphorylation กันเป็นลำดับต่อกันของโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณ ซึ่งเป้าหมายสุดท้ายของการกระตุ้นคือ transcription factor ซึ่ง transcription factor เหล่านี้จะเข้าไปเกาะตำแหน่งดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนนั้น ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน หรือในทางตรงกันข้ามอาจจะส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นก็ได้ ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ช่วง -1,691 ถึง +437 ของคน จะมีตำแหน่งของ DNA binding site ต่างๆ ที่มีการศึกษาแล้ว ดังนี้ SIRE; stromelysin IL-1 $\beta$  responsive element, ZBP-89 site; 89-kDa zinc finger protein site, SPRE; stromelysin PDGF responsive element, activator protein-1 sites; AP-1 sites, polyomavirus enhancer A-binding protein 3 sites; PEA-3 sites.

ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 จะพบตำแหน่ง TATA box ตั้งอยู่ในช่วง -30 ถึง -24 bp (รูป 5.1) TATA box เป็นส่วนที่สำคัญต่อการเข้าเกาะของ RNA polymerase II ในยูคาริโอตเพื่อเกิดกระบวนการ transcription (Goodbourn, 1996) และยังพบ activator protein-1 sites (AP-1) ในช่วง -70 ถึง -64 bp (รูป 5.1) ซึ่ง AP-1 site มีความสำคัญต่อการแสดงออกในระดับพื้นฐานของยีน MMP-3 แต่ไม่มีจำเป็นต่อการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย TPA (12-O-

tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) และ IL-1 และพบว่า AP-1 เป็นตำแหน่งที่จับกับโปรตีน transcription factor ในกลุ่ม c-fos และ c-jun (Buttice *et al.*, 1991 และ Quinones *et al.*, 1994) ซึ่งโปรตีนทั้งสองนี้จะถูกกระตุ้นจากวิถีการส่งสัญญาณของ c-Jun N-terminal kinases (JNK) และวิถีการส่งสัญญาณนี้สามารถถูกกระตุ้นด้วย cytokines เช่น IL-1 และ TNF- $\alpha$



**รูป 5.1** โครงสร้างของดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่แสดงตำแหน่งของ *cis*-acting element ที่มีการศึกษาแล้วว่าตำแหน่งเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (activator protein-1 sites; AP-1 sites, polyomavirus enhancer A-binding protein 3 sites; PEA-3 sites, stromelysin PDGF-responsive element; SPRE, stromelysin IL-1 responsive element; SIRE) (Benbow *et al.*, 1997)

นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง PEA-3 ซึ่งเป็น transcription factor binding site ที่ปรากฏในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ในช่วง -216 ถึง -209 และ -208 ถึง -201 (รูป 5.1) จะเห็นว่ามีตำแหน่งของ PEA-3 อยู่ 2 ตำแหน่งซึ่งการเรียงตัวของ PEA-3 จะเป็นแบบที่เรียกว่า head to head และเป็นตำแหน่งสำหรับเกาะของโปรตีน transcription factor ในกลุ่ม EST จากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยสาร TPA พบว่าโปรตีน est-2 เป็น transcription factor หลัก ที่จะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย TPA โดยจะเข้าเกาะที่ตำแหน่ง PEA-3 ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (Buttice และ Kurkinen, 1993) และจากการศึกษาของ Baillat และคณะ (2006) ศึกษาการแสดงออกของ ets-1 ร่วมกับการแสดงออกของ MMP-3 ใน synovial fibroblast พบว่า ets-1 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ผ่านการจับกับดีเอ็นเอตำแหน่ง PEA-3 ได้ และจากการศึกษาหลายงานพบว่าตำแหน่ง PEA-3 นอกจากจะมีความสำคัญต่อการแสดงออกในระดับพื้นฐานแล้วยังมีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 จากการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ เช่น phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Buttice และ Kurkinen, 1993) platelet-derived growth factor (PDGF) (Kirstein *et al.*, 1996) และ interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Quinones *et al.*, 1994) egr เป็น transcription factor ตัวหนึ่งในกลุ่มของ Ets family egr สามารถยับยั้งการทำงานของ ets-2 ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 โดยการเข้าจับกับดีเอ็นเอตำแหน่ง PEA-3 แต่สำหรับการแสดงออกของยีน MMP-1 กลับพบว่า egr นั้นจะมีผลต่อการกระตุ้นการ

แสดงออกของยีน MMP-1 เหมือนกับ ets-2 แต่พบว่า *egr* นั้นจะไม่ได้จับตำแหน่ง PEA-3 ในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-1 แต่พบว่าจะจับกับโปรตีน Fos/Jun complex ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า *egr* มีส่วนเกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอตำแหน่ง AP-1 แล้วทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-1 ซึ่งเหตุการณ์นี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-1 และ MMP-3 (Buttice *et al.*, 1996) Stromelysin PDGF responsive element (SPRE) พบได้ในลำดับเบสที่ -1,584 ถึง -1,551 ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (รูป 5.1) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบว่าจะมีการตอบสนองต่อ PDGF (platelet derived growth factor) ซึ่งเป็นสาร growth factor สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเฉพาะในระบบหมุนเวียนโลหิต (Sanz *et al.*, 1994 และ Kirstein *et al.*, 1996) จากการศึกษาของ Kirstein และคณะ (1996) พบว่าการกระตุ้นของ PDGF จะมีผลต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ผ่านการกระตุ้นด้วย 2 วิธีคือ ผ่านโปรตีน raf -1 และ gamma protein kinase C (PKC) ซึ่งทั้งสองวิธีจะมีส่วนของดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ตอบสนองแตกต่างกัน ซึ่ง SPRE นั้นจะตอบสนองต่อการกระตุ้นของ PDGF ผ่านวิถีของ PKC แต่สำหรับการกระตุ้นด้วย PDGF ที่ผ่านทางวิถีของ raf-1 นั้นจะมีดีเอ็นเอตำแหน่ง PEA-3 ทำหน้าที่รับผิชอบ เนื่องจากการกระตุ้นผ่าน raf-1 สุดท้ายแล้วจะนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ในกลุ่ม ets ซึ่งจะสามารถจับกับส่วนของ PEA-3 ได้ (McCarthy *et al.*, 1997)

IL-1 เป็น cytokine ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง และตำแหน่งของดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นจาก IL-1 อยู่ในช่วง -1,630 ถึง -1,593 เรียกว่า stromelysin IL-1 responsive element (SIRE) SIRE นอกจากนี้จะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย IL-1 แล้วยังพบว่าสามารถตอบสนองต่อ TNF- $\alpha$  ด้วย แต่พบว่าดีเอ็นเอตำแหน่งนี้จะไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PDGF และ IL-4 จากการศึกษาด้วย reporter gene technology พบว่า SIRE นั้นจะเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 (repressor element) (Borghaei *et al.*, 1999) ดีเอ็นเอตำแหน่ง SIRE นั้นเป็นตำแหน่งเกาะของ transcription factor NF- $\kappa$ B (Borghaei *et al.*, 1999) และ ZBP-89 (Ye *et al.*, 1999 และ Borghaei *et al.*, 2004) ลำดับเบสที่ตำแหน่ง SIRE ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 จะมีความผันแปรเกิดขึ้น 2 แบบ ได้แก่ 5T และ 6T (5'-ATCAGGACAAGACATGGTTTTT(T)CCCCCATCAAAGGA-3') โดยในการศึกษานี้พบว่า MMP-3 promoter ในตำแหน่ง SIRE นั้นเป็น allele แบบ 6T แต่ถึงอย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเป็น allele แบบ 6T หรือ 5T จะไม่มีผลต่อการนำมาศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากการสร้างเวกเตอร์นั้นจะได้รับ MMP-3 promoter เพียงแบบเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งเป็นการควบคุมว่าทุกการทดลองจะได้รับ

เวกเตอร์ที่เหมือนกันหมด จึงทำให้สามารถนำผลมาเปรียบเทียบกันได้ แต่จากการศึกษาผลของ allele พบว่า allele แต่ละแบบจะมีผลต่อการจับกับ transcription factor ซึ่ง allele แบบ 6T นั้นสามารถจับกับ NF- $\kappa$ B ได้ดีกว่า allele แบบ 5T แต่ในทางตรงกันข้าม ZBP-89 สามารถจับกับ allele แบบ 5T ได้ดีกว่า allele แบบ 6T (Borghaei *et al.*, 2009 และ Borghaei *et al.*, 2004) จากการศึกษาหลายงานวิจัยพบว่า NF- $\kappa$ B ที่จับกับตำแหน่ง SIRE นั้นมีผลต่อการลดการแสดงออกของยีน MMP-3 แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานถึงการพบตำแหน่งดีเอ็นเอที่เป็น NF- $\kappa$ B binding site ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อ NF- $\kappa$ B โดยตรงในช่วง -2 kb ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP3 ซึ่งอาจจะมีลำดับดีเอ็นเอที่เป็น NF- $\kappa$ B binding site ในส่วนที่อยู่ไกลออกไปอีกก็เป็นได้ที่ทำหน้าที่ตอบสนอง NF- $\kappa$ B (Borghaei *et al.*, 2004 และ Borghaei 2009) เนื่องจากการศึกษาต่างๆ ก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า cytokine เช่น IL-1 และ TNF- $\alpha$  นั้นมีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 (Borghaei *et al.*, 1999) ซึ่ง cytokine เหล่านี้จะส่งผลการกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B นั้นแสดงให้เห็นว่าน่าจะมีส่วนของดีเอ็นเอตำแหน่งอื่นที่อาจจะทำหน้าที่ตอบสนองต่อ NF- $\kappa$ B อยู่ อีกแล้วส่งผลการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 แต่สำหรับตำแหน่งดีเอ็นเอ SIRE นั้นถูกยืนยันแล้วว่า NF- $\kappa$ B มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่า การเข้าจับของ ZBP-89 ที่ตำแหน่งนี้มีผลทำให้กระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ซึ่งเคยมีการรายงานไว้ว่า ZBP-89 นั้นจะทำงานเป็นตัวกระตุ้นหรือยับยั้งนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (Borghaei *et al.*, 2004 และ Borghaei 2009) จากการศึกษาของ Borghaei และคณะ (2009) ได้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอตำแหน่ง SIRE อาจจะมีหน้าที่เป็นส่วนยับยั้ง (repressor element) การแสดงออกของยีน MMP-3 เมื่อในเซลล์มีระดับของ NF- $\kappa$ B สูง แต่จะทำหน้าที่เป็นส่วนกระตุ้น (enhancer element) การแสดงออกของยีน MMP-3 เมื่อในเซลล์มีระดับของ ZBP-89 สูง นอกจากนี้ยังพบว่าความผันแปรของดีเอ็นเอตำแหน่งนี้ยังส่งผลกระทบต่อความอ่อนไหวต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบางชนิดได้ เช่น จีโนไทป์ 5T/5T จะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน MMP-3 สูงกว่าปกติ ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดโป่งพองและโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Terashima *et al.*, 1999 และ Lamblin *et al.*, 2002) และในขณะที่จีโนไทป์ 6T/6T นั้นจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิดโรค atherosclerosis เนื่องจากจีโนไทป์แบบนี้จะส่งผลให้มีการสังเคราะห์ MMP-3 น้อยกว่าปกติทำให้เกิดการสะสมของส่วน extracellular matrix (ECM) จึงทำให้ความรุนแรงของโรคนี้เพิ่มขึ้นได้ (Ye *et al.*, 1995)

Transcription factor binding sites เหล่านี้ทั้งหมดจะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 จากการศึกษาการตอบสนองต่อภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำให้การสังเคราะห์ของ MMP-3 นั้นเป็นไปอย่างเหมาะสมตามสภาวะของร่างกาย ณ ขณะนั้น

เพื่อรักษาสมดุลของกระบวนการ ECM remodeling ในเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อใดก็ตามที่การควบคุมการแสดงออกของยีนมีความผิดปกติแล้วส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนมากเกินไปจะนำไปซึ่งการเกิดโรค ดังนั้นการรักษาที่มีสาเหตุจากการที่เกิดการสูญเสียความสมดุลนั้น เป้าหมายที่สำคัญคือการทำให้การแสดงออกของยีนนั้นกลับสภาวะปกติ ในกรณีที่มีการแสดงออกของยีนมากเกินไปก็อาจจะต้องลดการส่งสัญญาณที่ไปกระตุ้น transcription factor ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนเพื่อทำให้ลดการแสดงออกของยีนที่มากเกินไป ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทราบถึงโครงสร้างของดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อให้ทราบถึง transcription factors ที่มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกของยีนนั้น เมื่อนั้นก็จะทราบถึงวิธีการส่งสัญญาณของการกระตุ้นการแสดงออกของยีนทำให้เห็นแนวทางในการรักษาหรือป้องกันการเกิดโรคได้

นอกจากนี้เวกเตอร์ pMMP3-SEAP ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้ยังประกอบด้วยดีเอ็นเอส่วน 5' untranslated region (5' UTR) และบางส่วนของ exon-1 ของยีน MMP-3 ซึ่งในส่วน 5' UTR ของยีนหลายยีน นั้นสามารถทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนได้อีกด้วย เช่น ยีน aggrecan ในคน (Valhmu et al., 1998) เป็นต้น และการมีส่วน exon-1 นั้นไม่น่าจะมีผลต่อการอ่าน codon สำหรับการแปลรหัสของ SEAP เนื่องจากการอ่าน codon ยังคงถูกต้องอยู่และยังพบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ในตัวอย่างที่ได้รับ pMMP3-SEAP ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีน SEAP ได้อยู่และไม่มีผลต่อการแปลรหัสของ SEAP

## 5.2 การทดสอบระบบเซลล์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วย IL-1 $\beta$ และ LPS

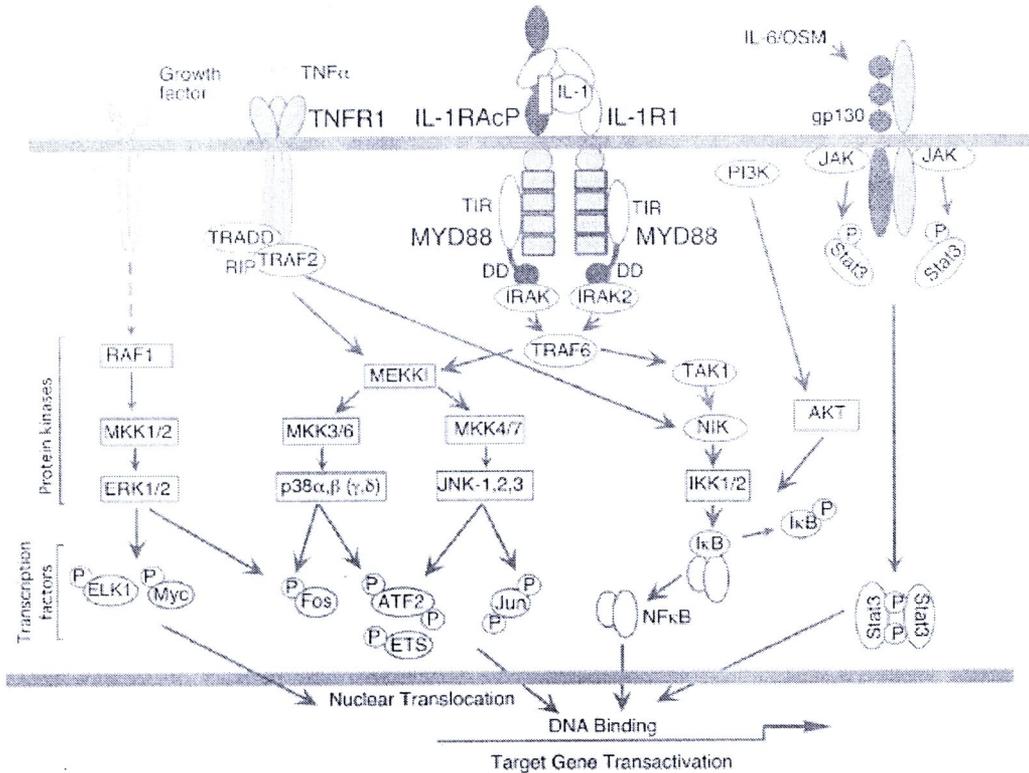
การสร้างเวกเตอร์สำหรับการรายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 นั้นด้วยการโคลนส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ในช่วง -1,761 ถึง +438 เชื่อมต่อกับ pSEAP2-control ที่ถูกกำจัดส่วน strong promoter SV40 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) ที่ใช้เป็นยีนรายงานผลในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเรียกว่าเวกเตอร์ลูกผสมนี้ว่า pMMP3-SEAP หลังจากนั้น pMMP3-SEAP ถูกนำมาหาอัตราส่วนระหว่าง X-treamHP ( $\mu$ l) และปริมาณดีเอ็นเอของ pMMP3-SEAP ( $\mu$ g) ที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอแบบชั่วคราวเข้าสู่เซลล์ SW1353 พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 3:2 ตามลำดับ ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่พบว่ามีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ในอาหารเลี้ยงเซลล์มากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของ X-treamHP พบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353 ลดลงเนื่องจาก X-treamHP เป็นสารที่เป็นประจุบวก ซึ่งจะจับกับประจุลบของหมู่ phosphate บนดีเอ็นเอของ pMMP3-SEAP ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มและตกลงที่บนผิวเซลล์ทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ

endocytosis รับ pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของ X-treamHP อาจจะทำให้มีสาร X-treamHP มากเกินพอดี ดังนั้นสาร X-treamHP ที่เกินมากไปอาจจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเกิด endocytosis ของเซลล์ในการนำ complex ระหว่างติเอ็นเอกับ X-treamHP เข้าสู่เซลล์ โดยเกิดจากการแข่งขันของการเข้านำ complex ที่มีติเอ็นเอ กับตัว X-treamHP ที่ไม่มีติเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์ แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการใช้โปรตีนสำหรับกระบวนการ endocytosis จึงทำให้เซลล์ได้รับ pMMP3-SEAP น้อยลง ส่งผลต่อการสังเคราะห์ SEAP น้อยลงด้วยเช่นกัน

### 5.2.1 การทดสอบด้วย IL-1 $\beta$

เซลล์ SW1353 ที่ถูกส่งถ่ายติเอ็นเอ pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 นั้นจะถูกทดสอบด้วยสาร proinflammatory agents คือ IL-1 $\beta$  และ LPS จากการทดสอบด้วย IL-1 $\beta$  พบว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อ IL-1 $\beta$  เนื่องจากมีการหลั่งเอนไซม์ SEAP ออกมาสู่อาหารเลี้ยงเซลล์มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่เชื่อมต่อกับยีน SEAP นั้นมีการตอบสนองกับการกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  จึงส่งผลให้มีการสังเคราะห์ SEAP ออกมานอกเซลล์มากขึ้นตามความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  IL-1 $\beta$  เป็นสาร proinflammatory cytokine ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ การตอบสนองต่อการอักเสบ รวมถึงกระบวนการ matrix remodeling โดยอาศัยการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ protease หลายชนิด จากการศึกษา IL-1 $\beta$  ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง พบว่า IL-1 $\beta$  สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ (Tetlow *et al.*, 2001 และ Shi *et al.*, 2004) เมื่อ IL-1 $\beta$  จับกับตัวรับโปรตีนจะทำให้เกิดการส่งสัญญาณในเซลล์ผ่านโปรตีนหลายๆตัว ตามลำดับซึ่งการส่งสัญญาณนี้จะส่งผลต่อ transcription factor โดยวิธีการส่งสัญญาณที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ได้แก่ NF- $\kappa$ B และ MAPK (ERK, JNK และ p38) ซึ่งวิธีการส่งสัญญาณเหล่านี้จะร่วมกันทำงานทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 (รูป 5.2) จากการศึกษาของ Vincenti และคณะ (2001) แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของเซลล์ SW1353 ต่อการกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ในช่วงแรกเริ่ม (2 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น) พบว่ามียีนจำนวนมากที่มีการตอบสนองต่อ IL-1 $\beta$  โดยเฉพาะยีนในกลุ่ม transcription factor ที่มีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในกลุ่ม NF- $\kappa$ B และ AP-1 family ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระยะท้ายของการตอบสนองต่อ IL-1 $\beta$  เช่น MMP-13 พบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้นเรื่อยๆหลังจากการกระตุ้นและการแสดงออกของยีนจะคงที่หลังจากผ่านกระตุ้นไป 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ETS ได้แก่ *egr-1* ด้วย ซึ่ง

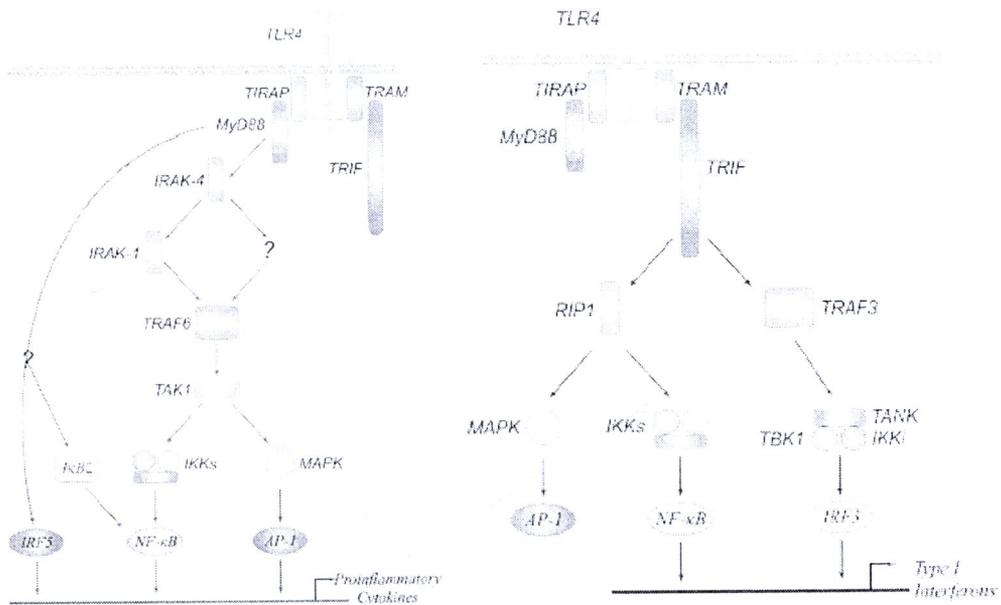
เป็น transcription factor ที่จะจับกับตำแหน่ง PEA-3 หรือ จับกับโปรตีนในกลุ่ม AP-1 และส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน MMPs ทั้งสิ้น (รูป 5.2)



**รูป 5.2** การส่งสัญญาณจากการกระตุ้นจาก cytokines และ growth factor ต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์กระดูกอ่อน AKT; protein kinase B, ATF-2; activating transcription factor-1, DD; death domain, ELF; E74-like factor, ERK; extracellular signal-related kinase, ETS; E Twenty Six, Fos; v-Fos homologue osteosarcoma oncogene, gp 130; glycoprotein 130, I $\kappa$ B; inhibitor of kappa B IL; interleukin, IL-1RI; type I IL-1 receptor, IL-1RAcP; IL-1 receptor accessory protein, IRAK; IL-1 receptor associated kinase, JAK; Janus activating kinase, JNK; c-Jun N-terminal kinase, MAPK; mitogen-activated protein kinase, MEKK1; mitogen-activated ERK kinase kinase, MKK; MAP kinase kinase, Myc; myogenic transcription factor, MYD88; myeloid differentiation primary response gene 88, NF- $\kappa$ B; nuclear factor kappa B, OSM; oncostatin M, P; phosphate, PI3K; phosphoinositol-kinase, RAF; receptor associated factor, RIP; receptor-interacting protein, Stat3; signal transducer and activator of transcription, TIR; Toll/IL-1 receptor domain, TNF $\alpha$ ; tumour necrosis factor alpha, TNFR1; tumor necrosis factor receptor, TRADD; TNF receptor-associated death domain receptor (TRADD), TRAF2; TNF receptor associated factor 2. (Goldring, 2006)

## 5.2.2 การทดสอบด้วย LPS

การทดสอบ LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ SW1353 ที่ถูกส่งถ่าย pMMP3-SEAP แบบชั่วคราว พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP สูงขึ้นตามความเข้มข้นของ LPS ที่เพิ่มขึ้นแต่จะเริ่มลดกิจกรรมของเอนไซม์ SEAP ลงที่ความเข้มข้นของ LPS 10  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งอาจจะเกิดจากความเป็นพิษของ LPS ที่ความเข้มข้นสูงจึงทำให้เกิดการตายของเซลล์จึงมีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเซลล์ LPS เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไขมันและคาร์โบไฮเดรตพบได้ที่ cell wall ของแบคทีเรีย ชนิด gram negative หลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ของ LPS จะสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารพวก proinflammatory cytokines ได้ เช่น IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  และ IL-6 (Kolyarov *et al.*, 1999) LPS นั้นจะจับกับตัวรับโปรตีน TLR-4 (toll like receptor-4) โดย LPS จะจับกับโปรตีน MD-2 ก่อนจึงจะสามารถจับกับ TLR-4 ได้ เมื่อ LPS จับกับ TLR-4 แล้วจะเกิดการส่งสัญญาณผ่านโปรตีนต่างๆ ดังวิธีการส่งสัญญาณในรูป 5.2 (อ้างใน Lu *et al.*, 2008) ซึ่งจะเห็นว่า LPS จะกระตุ้นการส่งสัญญาณได้ 2 ทิศทาง คือ (1) ผ่านวิธีการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88 dependent pathway) ซึ่งวิธีนี้จะส่งเสริมการสังเคราะห์ proinflammatory cytokines (2) วิธีการส่งสัญญาณที่ไม่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88 independent pathway) แต่วิธีการส่งสัญญาณจะอาศัยโปรตีน TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) และวิธีนี้จะช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์ type 1 IFN (interferon) แต่อย่างไรก็ตามจากการส่งสัญญาณของทั้งสองวิธีจะนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ในกลุ่ม NF- $\kappa\text{B}$  และ AP-1 ผ่านวิธีการส่งสัญญาณของ MAPK จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า LPS นอกจากจะกระตุ้นการสังเคราะห์ MMP-3 โดยการกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ของ MMP-3 แล้ว LPS ยังคงกระตุ้นการสังเคราะห์ catabolic cytokines เช่น IL-1 และ TNF- $\alpha$  อีกด้วย ซึ่งจะทำให้การสังเคราะห์ของ MMPs ต่างๆ เพิ่มขึ้นอีกด้วย



**รูป 5.3** วิธีการส่งสัญญาณจากการถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่จับกับ TLR-4 (toll like receptor 4) 2 ทิศทาง คือ การกระตุ้นแบบที่ต้องอาศัยโปรตีน MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) และแบบไม่ต้องอาศัยโปรตีน MyD88 (อาศัย TRIF แทน) (TIRAP; TIR (Toll-interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein, also known as Mal (MyD88-adaptor-like), TRIF; TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ , TRAM; TRIF-related adaptor molecule, IL-1 receptor-associated kinase; IRAK, TAK1; transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1, MAPK; mitogen-activated protein kinase, TANK; TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator, TBK1; TANK binding kinase 1, IRF; interferon regulatory factor, RIP1; receptor-interacting protein) (Lu *et al.*, 2008)

### 5.2.3 ความสัมพันธ์ของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี real-time PCR และเซลล์รายงานผลที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 $\beta$  ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี real-time PCR และวิธีเซลล์รายงานผล พบว่าการแสดงออกของยีนจากทั้งสองนั้นมีแนวโน้มกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ สาร IL-1 $\beta$  และหาความสัมพันธ์ของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ของทั้งสองวิธีด้วย linear regression model พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ( $R^2 = 0.723$ ) นั้นแสดงให้เห็นว่า

วิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยเวกเตอร์ pMMP3-SEAP ในระบบเซลล์ของ SW1353 นั้นสามารถใช้ออกการแสดงผลของยีน MMP-3 ได้แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์การแสดงผลด้วยยีน MMP-3 สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR พบว่าต้องอยู่ในเทอมของค่า logarithm (normalize MMP-3 expression relative to control group) แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time จะให้ข้อมูลที่มีความละเอียดสูงกว่า หรือมีความไวของการตรวจที่มากกว่าในระบบเซลล์รายงานผลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะเนื่องด้วยในระบบ real-time PCR ใช้การตรวจด้วยสาร SYBR ซึ่งเป็นสาร fluorescence ซึ่งเป็นสารที่มีความไวสูงในการตรวจหา แต่ระบบเซลล์รายงานผลที่ใช้ตรวจด้วยวิธี colorimetric ซึ่งจะมีความไวที่ต่ำกว่า fluorescence แต่อย่างไรก็ตามการตรวจการแสดงผลของยีน MMP-3 ด้วยวิธีเซลล์รายงานผลนั้นจะใช้ค่าใช้ง่ายที่น้อย วิธีการง่าย ได้ผลรวดเร็ว ชับซ้อนน้อย และเหมาะสมต่อการทำในระดับ high throughput screening (HTS) คือ การตรวจสอบกับสารตัวอย่างจำนวนมากๆ ได้ในเวลาอันสั้น เมื่อเทียบกับวิธี real-time PCR ในกรณีที่ต้องการปรับปรุงวิธีการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ให้มีความไวสูงขึ้นนั้นอาจจะใช้สารตั้งต้นที่เป็นสาร chemiluminescent ได้ซึ่งจะทำให้มีความไวสูงกว่าการตรวจกิจกรรมการทำงานของ SEAP ด้วยวิธี colorimetric method แต่อาจจะต้องเพิ่มค่าใช้ง่ายมากขึ้น

### 5.3 การทดสอบการยับยั้งของ doxycycline และสมุนไพรไทยบางชนิด ต่อการแสดงผลของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$ ด้วยระบบเซลล์รายงานผลในเซลล์ SW1353

จากการทดลองยับยั้งการกระตุ้นของ IL-1 $\beta$  ต่อการแสดงผลของยีน MMP-3 ด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ doxycycline มากขึ้นมีแนวโน้มทำให้ระดับการแสดงผลของยีน MMP-3 ลดลง doxycycline เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และยับยั้งการสังเคราะห์ MMP-1, -3, -9 และ -13 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ conical epithelial ของคน (Sobrin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001 และ Li *et al.*, 2003) และจากการทดลองของ Li และคณะ (2006) ทดสอบการยับยั้งการเกิด hyperosmolar stress ใน human limbal epithelial cell ด้วย doxycycline ซึ่งพบว่า doxycycline จะมีผลต่อการยับยั้งการแสดงผลและการสังเคราะห์ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  และ IL-8 ด้วยการยับยั้งการกระตุ้นของวิถีการส่งสัญญาณ JNK และ ERK MAPK นอกจากนี้การศึกษาของ Li และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษการยับยั้งการกระตุ้นของ TGF- $\beta$ 1 ด้วย doxycycline ในเซลล์ limbal epithelial ของคน ก็พบว่า doxycyclin จะยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของ JNK, ERK และ p38 MAPK ด้วยเช่นกัน จากข้อมูล

ทั้งหมดสันนิษฐานได้ว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ในเซลล์ SW1353 ด้วย doxycycline นั้นน่าจะเกิดวิถีการส่งสัญญาณของ JNK, ERK และ p38 MAPK ที่ถูกกระตุ้นจาก IL-1 $\beta$  นั้นถูกยับยั้งจึงทำให้การกระตุ้น transcription factor เช่น AP-1 หรือ PEA-3 เป็นต้น ซึ่งจะทำให้หน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 นั้นลดน้อยลงจึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  มีระดับลดลง นอกจากนี้ยังมีการนำ doxycycline และ CMTs (chemically modified tetracyclines) เพื่อนำมารักษาโรคมะเร็ง เช่น metastat (COL-3, CMT-3) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 (Sefior *et al.*, 1998) รวมถึงการใช้ doxycycline เพื่อรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัข (Nganvongpanit *et al.*, 2009)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำสมุนไพรไทยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* L.; PN) หนุ่ยดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.; VC) ขลุ้ (*Pluchea indica* Less.; PI) ทองพันชั่ง (*Rhinocanthus nasutus* Karz.; RN) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.; ZC) และเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* Linn.; CQ) ที่สกัดด้วยตัวละลาย 2 ชนิดคือ น้ำ และเอทานอล และนำสารสกัดของสมุนไพรไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ในเซลล์ SW1353 ด้วยระบบเซลล์รายงานผล พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของลูกใต้ใบ (EEPN) สารสกัดด้วยน้ำของหนุ่ยดอกขาว (AEVC) และสารสกัดด้วยเอทานอลของไพล (EEZC) นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 $\beta$  ได้ดีซึ่งสารทั้งสามนี้มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 26.9, 74.26, และ 27.82  $\mu$ g/ml ถึงแม้ว่าจะมีสมุนไพรบางชนิดที่มีค่า IC<sub>50</sub> น้อยกว่า AEVC เช่น AEPI, EEPI และ EERN (ตาราง 5.1) แต่พบว่าสารสกัดเหล่านี้มีผลทำให้เซลล์มีการตายเมื่อมีความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งทำให้มีการแสดงออกของยีน MMP-3 ลดลงได้ ทั้งที่ไม่ได้มาจากผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน โดยตรง แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป และจากศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีต่างๆ ในสมุนไพรทั้งสามชนิด คือ ลูกใต้ใบ หนุ่ยดอกขาว และไพล พบว่ามีสารออกฤทธิ์หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการอักเสบ ป้องกันการทำลายของตับ ต่อด้านเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย รักษาอาการปวด ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น

ตาราง 5.1 แสดงค่า  $IC_{50}$  ของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$

สมุนไพร (ชื่อวิทยาศาสตร์)	$IC_{50}$ ของการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	เอทานอล	น้ำ
	(ethanolic extract; EE)	(aqueous extract; AE)
ลูกใต้ใบ ( <i>Phyllanthus niruri</i> L.; PN)	26.94*	>100
หญ้าดอกขาว ( <i>Vernonia cinerea</i> Less.; VC)	>100	74.26*
ขลุ่ย ( <i>Pluchea indica</i> Less.; PI)	60.54	36.78
ทองพันชั่ง ( <i>Rhinocanthus nasutus</i> Karz.; RN)	36.49	>100
ไพล ( <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.; ZC)	27.82*	ND
เพชรสังฆาต <i>Cissus quadrangularis</i> Linn. (CQ)	ND	>100

ND = not determine

\*สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ SW1353

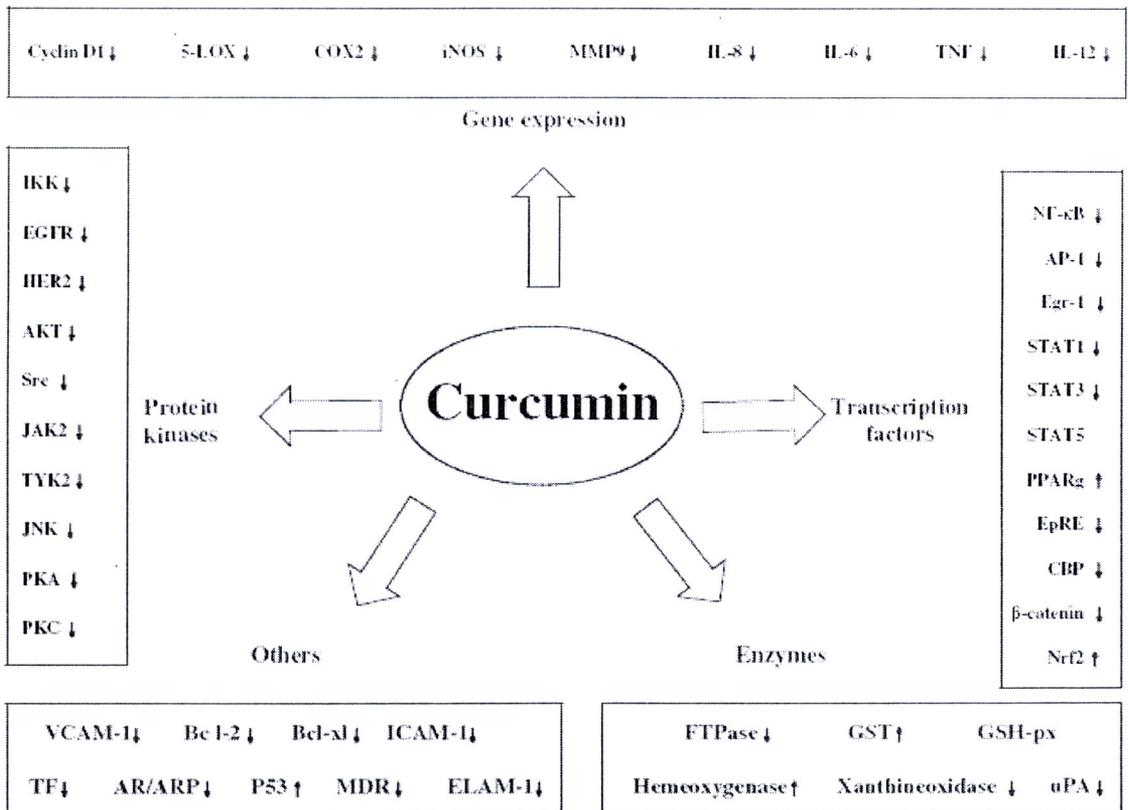
ลูกใต้ใบเป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้เพื่อป้องกันการเกิดความเป็นพิษของตับ (antihepatotoxic) ต่อด้านเกิดมะเร็ง ด้านการอักเสบ ต่อด้านการเกิดเบาหวาน และลดปริมาณของเชื้อไวรัส hepatitis B ในกระแสเลือด เป็นต้น องค์ประกอบทางพฤกษเคมีหลักของลูกใต้ใบประกอบด้วยสารจำพวก lignans (phyllanthin, hypophyllanthin, nirantin) geraniin, alkaloid และ flavanoid 5 ชนิด คือ quercetin, astraglin, quercertrin, isoquercitin และ rutin (Joseph and Raj, 2011) การศึกษาฤทธิ์ของ quercetin ซึ่งเป็นสารตัวหนึ่งที่พบได้ในสารสกัดจากลูกใต้ใบ พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 ทั้งยังสามารถยับยั้งการทำงานของ MMP-3 แต่ไม่พบว่ามีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ MMP-3 (Phromnoi *et al.*, 2009) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจจะมีสารตัวอื่นๆ ในสารสกัดของ EEPN ที่ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ MMP-3 ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไป และนอกจากนี้ยังพบว่าสารพฤกษเคมี phyllanthin สามารถป้องกันการทำลายของตับด้วยการชักนำของ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ( $\text{CCl}_4$ ) ในเซลล์ Hep2 ได้ และสารตัวนี้สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระได้ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH ( $IC_{50} = 7.4 \mu\text{M}$ ) (Krihika *et al.*, 2009) แต่ยังไม่มีการศึกษาต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMPs ด้วยสารนี้

หญ้าดอกขาว เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลายชนิด ได้แก่ antimalaria, ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน, ป้องกันโรคมะเร็ง, antiarthritis, ด้านการอักเสบ และลดอาการปวด ซึ่งในสารสกัดหญ้า

ดอกขาวจะพบสารเคมีหลายตัว เช่น (-)-clove-2,9-diol, caryolane-1,9 $\beta$ -diol, apigenin, chrysoeriol, luteolin, thermopsoside, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucoside, quercetin, apigenin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside, hyperin,  $\beta$ -amyrin acetate, lupeol acetate (Hua *et al.*, 2009) รวมถึงสารในกลุ่ม sesquiterpene lactones ได้แก่ vernolide-A และ B (Kuo *et al.*, 2003) มีการศึกษาฤทธิ์ของ apigenin (2.5-10  $\mu$ g/ml) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันการกระจายของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 และสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-9 ที่ถูกกระตุ้นด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Lindenmeyer *et al.*, 2001) และนอกจากนี้มีการนำสารสกัดของหลอดดอกขาวมาทดสอบต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด B16F-10 melanoma ในหนูสายพันธุ์ C57BL/6 mice พบว่ามีการกระจายของเซลล์มะเร็งน้อยลงและมีการสังเคราะห์ MMP-2 และ -9 ลดลง รวมถึงสารสกัดจากหลอดดอกขาวสามารถยับยั้งการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณ ERK1/2 ได้ (Pratheeshkumar และ Kuttan, 2010) ซึ่งอาจจะทำให้มีผลต่อการลดระดับการแสดงออกของยีน MMP-2 และ -9 และคาดว่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 เช่นกันเนื่องจากในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 มีส่วนที่ตอบสนองต่อวิถีการส่งสัญญาณของ ERK1/2 คือ PEA-3 นอกจากนี้สาร vernolide-A เป็นสารที่สามารถชักนำการตายของเซลล์ B16F-10 melanoma แบบ apoptosis และยังพบว่าสามารถยับยั้งการเคลื่อนของ NF- $\kappa$ B จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส และยับยั้ง transcription factor ได้แก่ c-fos, activated transcription factor-2 และ cyclic adenosine monophosphate response-element-binding protein (CREB) (Pratheeshkumar และ Kuttan, 2011) ซึ่งผลของ vernolide-A นี้จะมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ก็เป็นไปได้ ยังไม่พบรายงานที่ศึกษาผลของสารสกัดหลอดดอกขาวต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 โดยตรง

ไพล สมุนไพรที่มีสรรพคุณต่อต้านการอักเสบสารเคมีที่อยู่ในไพลที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายก็คือ curcumin ซึ่งมีสรรพคุณมากมายและผลต่อกิจกรรมต่าง ดังรูป 5.3 รวมถึงยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 (Hartert *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการออกฤทธิ์ของ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) ที่เป็นสารประกอบที่สกัดได้จากชั้น n-hexane ของไพล พบว่ามีความสามารถยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากกระตุ้นด้วย ethyl phenylpropionate (EPP), arachidonic acid (AA) และ 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) ที่หูของหนูโดยยับยั้งกระบวนการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase และ lipoxigenase (Jeenapongsa *et al.*, 2003) และสารออกฤทธิ์จากไพลหลายตัวสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง HT-1080 ได้แก่ phlain I and III, (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)buta-1,3-diene, (E)-1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)buta-1,3-diene, (-)-b-sesquiphellandrene, และ (E)-1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)buta-1,3-diene (Matsuda *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังพบสารที่มีโครงสร้างบางส่วนที่คล้ายคลึงกับ

curcumin คือ cassumunarin A, B และ C ซึ่งพบในส่วน rhizome ของไพล และพบว่าทั้งสามนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสาร antioxidant และ antinflammation ที่สามารถยับยั้งการเกิด edema ที่บริเวณหูของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร TPA ซึ่ง cassumunarin A นั้นมีประสิทธิภาพดีกว่า B และ C (Masuda *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีสารตัวอื่นๆ อีกหลายชนิดในไพลที่ยังไม่มีการศึกษาการออกฤทธิ์ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต



รูป 5.4 โพรตีนเป้าหมายของ curcumin

แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธีระบบเซลล์รายงานนั้นยังคงต้องมีการปรับปรุงในระบบบางส่วนเพื่อให้ข้อมูลได้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้นเนื่องจากการใช้ระบบเซลล์รายงานผลนั้นทุกครั้งที่ต้องตรวจสอบต้องทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ทุกครั้งดังนั้นการได้รับตัวเวกเตอร์ที่ไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่างจะส่งต่อการวิเคราะห์ผลที่ผิดพลาดหรือทำให้ข้อมูลมีความแปรปรวนมากเกินไป ซึ่งวิธีการปรับปรุง (1) อาจจะต้องใช้เวกเตอร์ที่เป็นตัวรายงานผลอีกชนิดหนึ่งมาทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมว่าในแต่ละตัวอย่างมีการเปอร์เซ็นต์การได้รับเวกเตอร์เท่ากันหรือไม่ (2) การหาค่าความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเนื่องการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์และดูค่าความแปรปรวนที่เกิดขึ้นกับตัวอย่างจำนวนมากว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

หรือไม่ (3) การใช้ตัวอย่างเดิมในการเป็นตัวควบคุมโดยการดูจากการแสดงออกของโปรตีนรายงานผลในวันที่แตกต่างกันว่ามีการแสดงออกมากขึ้นหรือน้อยลง เช่น การเก็บตัวอย่างวันที่ 3 เป็นครั้งที่ 1 และวันที่ 5 อีกเป็นครั้งที่ 2 และทำการเปรียบเทียบกันว่ามีการแสดงออกของโปรตีนรายงานผลที่ต่างกันอย่างไร แต่นำค่านี้มาเปรียบเทียบกันในแต่ละการทดลองได้ซึ่งจะทำให้ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น (4) อาจจะมีการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบบถาวร เพื่อสร้าง stable cell line สำหรับ reporter gene plasmid นี้ ซึ่งจะทำให้ทุกเซลล์นั้นได้รับดีเอ็นเอของ reporter gene plasmid เท่าเทียมกัน และทุกครั้งที่ต้องการทดสอบสามารถนำเซลล์มาทดสอบได้ทันที ไม่จำเป็นต้องทำการส่งถ่ายยีนทุกครั้งที่ต้องการทดสอบ

#### 5.4 งานที่จะสามารถศึกษาต่อไปในอนาคต

จากการวิจัยทำให้ได้เครื่องมือที่จะสามารถนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ ดังนั้นจะทำให้เราสามารถนำมาใช้เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ในสถานะต่างๆ ได้ซึ่งนำไปสู่การค้นพบตัวยาที่มีประสิทธิภาพที่ดีต่อไปในอนาคต รวมถึงยังสามารถนำเวกเตอร์นี้มาศึกษากลไกการพัฒนาของตัวอ่อนของยีน MMP-3 ทั้งแบบ spatial และ temporal expression ทำให้เข้าใจหน้าที่ของยีน MMP-3 มากขึ้น และยังสามารถนำมาศึกษากลไกการเกิดโรคต่างๆ ที่ยีน MMP-3 มีส่วนเกี่ยวข้อง เช่น โรคมะเร็ง โรคข้อเสื่อม และอื่นๆ ซึ่งนำไปสู่การรักษาโรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น