

รายงานการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) สารกีดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมเพื่อบำบัดโรคอักเสบด้วยตนเอง
(ภาษาอังกฤษ) Inhibitors of Inflammasome Activation for Treatment of Auto-inflammatory Diseases

ผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในการอนุเคราะห์สารสกัดที่แยกจากพืชทั้งหมดที่ใช้ทดสอบและศึกษาในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทศนาขจร ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งอนุเคราะห์เครื่องวัดลูมิโนมิเตอร์ งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

กลุ่มโรคที่เกิดจากการอักเสบด้วยตนเอง (autoinflammatory diseases) เป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบที่ไม่เกิดร่วมกับการติดเชื้อมีหลากหลายรูปแบบ โดยเป็นกลุ่มโรคที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและ/หรือจากความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม โรคเก๊าท์ (gout) จัดเป็นโรคหนึ่งในกลุ่มโรคนี้ ซึ่งมีการตกตะกอนเป็นผลึกของเกลือยูเรต (monosodium urate) ที่เป็นผลมาจากการมีปริมาณกรดยูริกในเลือดสูงเกินปกติ สาเหตุหลักของอาการอักเสบเกิดจากการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะอินเตอร์ลิวคิน 1 บีต้า (interleukin 1 β ; IL-1 β) และอินเตอร์ลิวคิน 18 (IL-18) ผ่านการกระตุ้นอินฟลามมาโซม (Inflammasome) อินฟลามมาโซมเป็นสารประกอบโปรตีนขนาดใหญ่ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิดรวมถึงเอนไซม์โปรตีเอสโปรคาสเปส (pro-caspase) ในภาวะปกติที่มีสิ่งเร้า เช่น ผลึกของกรดยูริก เป็นต้น อินฟลามมาโซมจะประกอบตัวขึ้น ส่งผลให้มีการย่อยตนเองของ pro-caspase-1 และกลายเป็น caspase-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ซิสตีอินโปรตีเอสที่สามารถย่อยยับยั้งการกระตุ้นการประกอบเป็นอินฟลามมาโซมจึงมีศักยภาพในการลดการอักเสบจากภาวะดังกล่าวแบบจำเพาะได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาโซมในเซลล์ไลน์แมโครฟาจของมนุษย์ THP-1 จากกลุ่มสารสกัดจากพืช ในงานวิจัยนี้ใช้สารสกัดหยาบและสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากดอก ใบ กิ่ง และผลของต้นสาละหรือลูกปืนใหญ่ (*Couroupita guianensis*) กับส่วนของรากย่านาง *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels รวมทั้งสิ้น 73 ตัวอย่าง โดยติดตามแอกทิวิตีการกดยูเรต IL-1 β ขนานไปกับการทำให้สารบริสุทธิ์ คัดกรองเบื้องต้นโดยนำสารที่ได้มาทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ THP-1 โดยวิธี MTT และนำความเข้มข้นที่ให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ 80% ขึ้นไปมาทดสอบฤทธิ์ในการกดยูเรต IL-1 β โดยวิธี ELISA ผลแสดงว่าสารสกัดหยาบและสารทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากกิ่ง ดอกและใบของต้นสาละ 19 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งการหลั่งได้สูง โดยเฉพาะสารทดสอบรหัส AS-TP 1007 และ AS-TP 2027 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อการหลั่ง IL-1 β จึงผลของสารที่มีฤทธิ์ต่อการถอดรหัสของยีน *IL-1 β* โดยวิธี quantitative RT-PCR พบว่า 4 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ทดสอบรวมถึงสารทดสอบ AS-TP 1007 มีฤทธิ์การถอดรหัสของ *IL-1 β* mRNA และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแอกทิวิตีของ caspase-1 ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การกดยูเรตอินฟลามมาโซมพบว่าสารทดสอบจากดอกรหัส AS-TP 2027 มีฤทธิ์กดยูเรตการกดยูเรตของ caspase-1 ได้ ในขณะที่สารทดสอบอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์หรือให้ผลกระตุ้นแอกทิวิตีของ caspase-1 ดังนั้น สารทดสอบ AS-TP 2027 ซึ่งยังคงเป็นสารทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจึงมีความน่าสนใจที่มีสารที่มีฤทธิ์กดยูเรตอินฟลามมาโซมได้ โดยสารที่แยกย่อยต่อจาก AS-TP 2027 คือ AS-TP 2038, AS-TP 2039 ก็มีฤทธิ์กดยูเรต IL-1 ที่สูงด้วย โดยต้องทำการศึกษาโดยแยกเป็นสารบริสุทธิ์และทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

Abstract

Autoinflammatory diseases exhibit chronic and severe inflammation without infection. Both genetics and abnormalities in metabolism are the main cause. Gout is a representative condition which cause by precipitation of monosodium urate in tissues as the concentration of blood uric acid is higher than normal. The common main causes of these diseases are hyperproduction of inflammatory cytokines, mainly interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-18 via inflammasome activation. Inflammasome is a multisubunit protein complex of at least 3 proteins including zymogen of caspase-1 (pro-caspase-1). Upon exposure to stimuli such as uric acid crystals, inflammasome is formed, leading to autocatalytic cleavage of pro-caspase-1. Caspase-1 is a cysteine protease responsible for cleavage of pro-IL-1 β . This cleavage results in secretion of IL-1 β . Therefore, compounds with the ability to suppress activity of inflammasome have potentials to be therapeutic drugs for autoinflammatory diseases. This study aimed to screen for compounds with such activity of inflammasome suppression in human monocytic cell line. The samples used in this study are crude or partially purified extracts from flowers, leaves, branch and fruits of the cannonball tree (*Couroupita guianensis*) and roots of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. The total numbers of samples screened were 73 and the purification and activity screening were done in parallel by following the secretion of IL-1 β . Cellular toxicity was screened through MTT assay. The inhibitory concentration 80 or higher were used for the assay of IL-1 β secretion by ELISA. The results showed that 19 samples of crude extracts and partially purified compounds from branch, flower and leaves of cannon ball trees suppressed IL-1 β secretion. In particular, sample No. AS-TP 1007 and AS-TP 2027 from branches and flowers showed strong inhibitory activity. To study the mechanism of action, quantitative realtime RT-PCR were conducted and 4 out of 9 samples decreased the transcription level of *IL-1 β* , suggesting that they may act upstream of inflammasome, including ASTP-1007. To monitor inflammasome activation, the activity of caspase 1 was monitored using reporter assay. The results showed that most samples did not decrease the activity of caspase 1, but only AS-TP2027 from flowers suppressed caspase 1 activity. Therefore, partially purified ASTP-2017 is promising to contain pure compound(s) that can suppress inflammasome activation. Two samples purified from AS-TP 2027, i.e. AS-TP 2038 and AS-TP 2039 also showed strong inhibitory activity. The purification and mode of action of these compounds needs further investigation.

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
บทคัดย่อภาษาไทย	2
Abstract	3
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	7
บทนำ	8
วิธีการดำเนินการวิจัย	10
ผลการวิจัย	18
อภิปรายและวิจารณ์ผล	28
สรุปและขอเสนอแนะการวิจัยขั้นต่อไป	29
บรรณานุกรม	30
ประวัติผู้วิจัย	31

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แอนติบอดีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้	15
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ที่ใช้ในการทดลองนี้	17
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT	18

สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 1	แผนภูมิที่มาและความสัมพันธ์ของสารสกัดจากต้นสาละที่ใช้ในการคัดกรอง	12
ภาพที่ 2	ผลของ MSU ไนเจอร์ซิน และ ATP ต่อการหลั่ง IL-1 β	21
ภาพที่ 3	ผลของไนเจอร์ซินต่อระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1	22
ภาพที่ 4	ผลของ MSU ต่อระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1	23
ภาพที่ 5	การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA	24
ภาพที่ 6	ผลของสารต่อการแสดงออกของ Pro-IL-1 β ด้วยวิธี Western blot	25
ภาพที่ 7	ผลของสารทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน <i>IL-1β</i> ด้วยวิธี Real-time PCR	26
ภาพที่ 8	ผลการตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo®1 Inflammasome Assay	26

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Adenine triphosphate (ATP)

Danger-associated molecular pattern (DAMP)

Monosodium urate crystals (MSU)

Pattern recognition receptor (PRR)

Reactive oxygen species (ROS)

Tumor necrosis factor α (TNF α)

บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกันที่มาจากกำเนิด (innate immunity) ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการรับรู้และจำแนกระหว่างโมเลกุลที่เป็น “ตนเอง” และ “ไม่ใช่ตนเอง” เช่น โมเลกุลที่เป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อก่อโรค เป็นต้น ในขณะที่เดียวกันเซลล์ของภูมิคุ้มกันที่มีมาจากกำเนิด (innate immune cell) ก็สามารถรับรู้สัญญาณที่บ่งชี้ถึงอันตรายหรือภาวะเครียด (stress) ของร่างกาย เช่น โมเลกุลที่เป็นสัญญาณของความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม โมเลกุลที่เป็นสัญญาณบ่งชี้ถึงการเกิดความเสียหายต่อเซลล์ เป็นต้น (1) รวมเรียกรูปแบบโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับอันตรายต่อร่างกายเหล่านี้ว่า Danger-associated Molecular Pattern (DAMP) เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มาจากกำเนิด โดยเฉพาะแมโครฟาจรับรู้ DAMP ผ่านโปรตีนตัวรับหลากหลายชนิดซึ่งรวมเรียกโมเลกุลตัวรับเหล่านี้ว่า Pattern Recognition Receptor (PRR) เมื่อมีการกระตุ้น PRR โดย DAMP แล้ว แมโครฟาจจะผลิตและหลั่งกลุ่มโปรตีนไซโตไคน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบ เช่น Tumor Necrosis Factor α (TNF α) Interleukin (IL)-6 IL-1 β เป็นต้น ซึ่งนำไปสู่ภาวะของการอักเสบของบริเวณที่มีความผิดปกติ (2)

เมื่อแมโครฟาจรับรู้การมี DAMP ที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์หรืออวัยวะ เช่น adenine triphosphate (ATP) บีตาอะไมลอยด์ (beta-amyloid) หรือฟลิกรดยูริก เป็นต้น จะนำไปสู่การกระตุ้นให้แมโครฟาจหลั่ง IL-1 β และ IL-18 ซึ่งเป็นไซโตไคน์หลักที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะ IL-1 β ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเหนี่ยวนำภาวะอักเสบ โดยจะนำไปสู่การเหนี่ยวนำการเข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบของเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิลล์ และยังคงควบคุมความอยากอาหาร อุณหภูมิของร่างกายอีกด้วย ซึ่งหากไม่มีการควบคุมการผลิตและหลั่งของไซโตไคน์กลุ่มนี้ที่เข้มงวด อาจนำไปสู่ภาวะอักเสบมากเกินไปและทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อของเจ้าบ้านได้ ดังนั้น การผลิต IL-1 β จึงอยู่ภายใต้การควบคุมอย่างน้อยสองระดับ ได้แก่ 1) การควบคุมในระดับการถอดรหัสของยีน *Il-1b* ซึ่งจะมีการถอดรหัสเมื่อแมโครฟาจถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณผ่าน PRR โดยมีการแปลรหัสเป็นโปรตีน pro-IL-1 β ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีแอกทิวิตีชีวภาพและยังไม่มีสารหลั่งออกภายนอกเซลล์ และ 2) การควบคุมการย่อย pro-IL-1 β โดยเอนไซม์โปรตีเอส caspase-1 เพื่อผลิต mature IL-1 β ซึ่งเป็นรูปแบบที่พร้อมที่จะมีการหลั่งออกภายนอกเซลล์และทำหน้าที่กระตุ้นการอักเสบ โรคที่มีสาเหตุของพยาธิสภาพที่มาจากอาการอักเสบหลายชนิดมีความเกี่ยวข้องกับการผลิต IL-1 β มากเกินไปประกอบด้วยกลุ่มโรคที่เกิดจากการอักเสบด้วยตนเอง (auto-inflammatory disease) ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อมีหลากหลายรูปแบบ โดยโรคเหล่านี้มีลักษณะเด่นร่วมกันในการเกิดการอักเสบเป็นระยะๆ และมีอาการเป็นไข้โดยปราศจากการติดเชื้อหรือสาเหตุของภาวะภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmune condition) ซึ่งมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและ/หรือจากความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม เช่น โรคเก๊าท์ (Gout) เป็นต้น (3)

วิถีสัญญาณที่นำไปสู่การย่อย pro-IL-1 β เพื่อให้อยู่ในรูป IL-1 β นั้น มีการรายงานว่าผ่านการกระตุ้นสารประกอบโปรตีนขนาดใหญ่ภายในไซโตพลาสซึม เรียกว่า อินฟลามมาโซม (Inflammasome) (4) อินฟลามมาโซมประกอบด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิด ได้แก่ 1) โปรตีนในกลุ่ม NLR (NOD-like receptors) ซึ่งมีโมทีฟ (motif) ร่วมกันของสมาชิกในกลุ่ม คือ NATCH domain, LRR domain และ CARD/PYD domain ซึ่งโมทีฟเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันเพื่อประกอบเป็นโอลิโกเมอร์ของโปรตีนในกลุ่มสมาชิกเดียวกันและโปรตีนนอกกลุ่มที่มีโมทีฟเดียวกัน (homotypic protein-protein interaction) 2) โปรตีนตัวต่อ (adaptor protein) ASC ซึ่งมีโมทีฟ PYD domain และ CARD domain 3) pro-caspase-1 ซึ่งเป็นไซโมเจน (zymogen) ของซีสติอินโปรตีเอส caspase-1 ซึ่งมี CARD domain โปรตีนทั้งสามชนิดนี้จะประกอบเป็นสารประกอบโปรตีนขนาดใหญ่และนำไปสู่การย่อยตัวเอง (autocatalytic) ของ pro-caspase-1 ทำให้กลายเป็นโปรตีเอสที่สมบูรณ์ในรูปเฮเทอโรไดเมอร์ สามารถย่อยซับสเตรทได้ หนึ่งในซับสเตรทของ caspase-1 คือ pro-IL-1 β นำไปสู่การสร้าง IL-1 β ที่พร้อมจะมีการหลั่งออกภายนอกเซลล์ได้ (1)

อินฟลามมาโซมที่ประกอบขึ้น สามารถจำแนกได้ตามชนิดของสมาชิกของ NLR ที่เป็นองค์ประกอบของอินฟลามมาโซม ซึ่งในปัจจุบันในจีโนมของมนุษย์พบว่ามากกว่า 22 ชนิด สำหรับโปรตีน NLR ที่เกี่ยวข้องกับ การหลั่ง IL-1 β เมื่อแมโครฟาจรับรู้ผลึกของกรดยูริกและ extracellular ATP คือ NLRP3 (NALP3) (3) ซึ่งเรียกว่า NRLP3 อินฟลามมาโซมในการกระตุ้นการประกอบเป็นอินฟลามมาโซมนั้น มีรายงานว่าสัญญาณในการรับรู้ DAMP ชนิดต่างๆ จะกระตุ้นการผลิต reactive oxygen species (ROS) จากไมโทคอนเดรีย ทำให้มีการรวมตัวของโปรตีนองค์ประกอบอินฟลามมาโซมในไซโตพลาสซึม ผ่านโมทีฟที่เหมือนกันของโปรตีนต่างๆ ได้แก่ NATCH domain, PYD domain และ CARD domain (5)

NRLP3 อินฟลามมาโซมเป็นอินฟลามมาโซมที่มีการศึกษาลักษณะสมบัติในรายละเอียดค่อนข้างมาก โดยอินฟลามมาโซมนี้ประกอบเป็นสารประกอบ NLRP3/ASC/pro-caspase-1 ซึ่งจะมีการกระตุ้นเมื่อรับรู้เชื้อก่อโรคหลายชนิด รวมถึง DAMP และสิ่งระคายเคืองในสภาพแวดล้อม เช่น muramyl dipeptide, monosodium urate crystals (MSU), silica, *Bacillus anthracis* lethal toxin เป็นต้น (1)

โรคเก๊าท์เป็นโรคที่มีการอักเสบด้วยตนเองซึ่งมีอาการเด่นที่มีการอักเสบรุนแรงบริเวณข้อต่อซึ่งทำให้มีความเจ็บปวดมาก โรคเก๊าท์มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของเมแทบอลิซึมของร่างกาย ทำให้มีปริมาณกรดยูริกในเลือดสูง (hyperuricemia) และมีการสะสมของผลึก MSU ที่บริเวณข้อต่อ (6) โดยในปัจจุบันมีรายงานว่า MSU เป็น DAMP ที่สามารถกระตุ้นการประกอบเป็น NRLP3 อินฟลามมาโซมได้ โดยการให้ยา colchicine ซึ่งเป็นยาสำคัญตัวหนึ่งในการบำบัดอาการเก๊าท์ในปัจจุบัน ในการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งการประกอบเป็น NRLP3 อินฟลามมาโซมได้ (7) อีกทั้ง การทดลองใช้แอนตาโกนิสต์ต่อ IL-1 β (IL-1 β antagonist) ในการบำบัดผู้ป่วยโรคเก๊าท์และโรคลักษณะเดียวกันที่มีสาเหตุมาจากการอักเสบด้วยตนเองนั้น ได้ผลสอดคล้องกับบทบาทของ MSU และอินฟลามมาโซมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่ง IL-1 β (8, 9)

ถึงแม้ว่าการบำบัดอาการของโรคเก๊าท์จะค่อนข้างทำได้ดีโดยใช้ยาที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น ยาลดการอักเสบในกลุ่ม NSAIDs ก็ยังไม่เป็นการรักษาเพื่อลดสาเหตุของการเกิดอาการอักเสบอย่างแท้จริง อีกทั้ง กลไกการนำไปสู่การประกอบเป็นอินฟลามมาไซม์เมื่อมีการรับรู้ DAMP เช่น MSU ก็ยังส่วนที่ไม่ชัดเจนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนซึ่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จะทำให้เข้าใจถึงกลไกการกระตุ้นอิน ฟลามมาไซม์ได้ดียิ่งขึ้น อีกทั้ง ยังอาจประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากการการทำงานของอินฟลามมาไซม์ต่อไปได้ โดยในงานวิจัยได้ทำการศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นสาละลังกาหรือต้นสาละ (cannonball tree; *Couroupita guianensis*) ซึ่งเป็นพืชที่มีการรายงานฤทธิ์ชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านความดันโลหิตสูง เป็นต้น โดยเฉพาะมีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากใบ (10) แต่ยังไม่มีการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกจำเพาะต่ออินฟลามมาไซม์และการทำให้สารสกัดที่มีฤทธิ์บริสุทธิ์แต่อย่างใด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ THP-1

เพาะเลี้ยง THP-1 (ATCC no.TIB-202) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 10 % (V/V) และยาปฏิชีวนะ (Penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95 %

1.2 การเก็บรักษาเซลล์

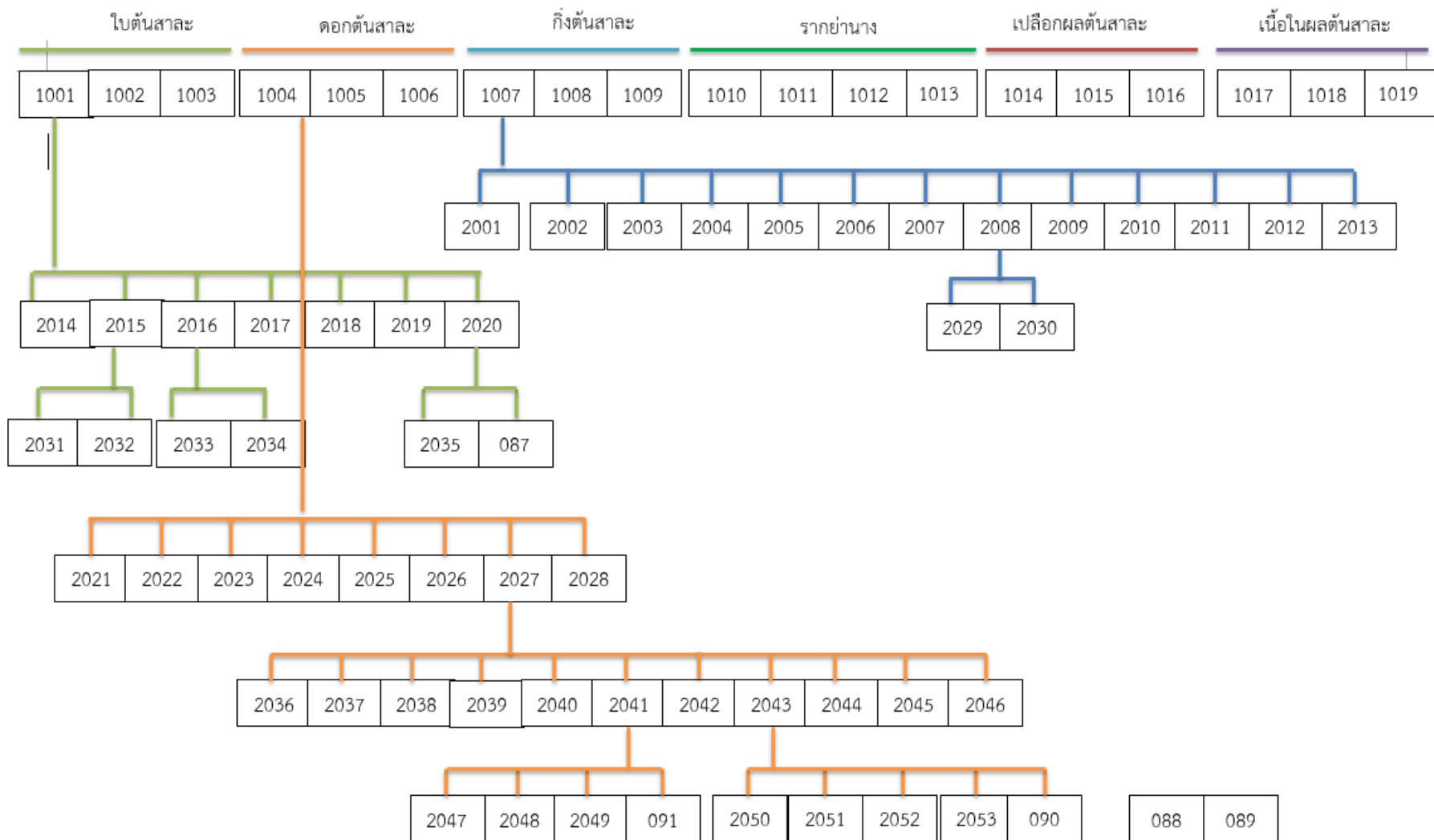
นำอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% DMSO ใส่ลงในเซลล์ที่เก็บมาแล้ว โดยเก็บเซลล์ลงในหลอดสำหรับเก็บรักษาเซลล์และนำเซลล์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บในระยะสั้น ส่วนการเก็บในระยะยาวให้เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 คืนแล้วจึงย้ายไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

1.3 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่เก็บรักษาไว้มาทำละลายอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำเซลล์ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่ไม่มีซีรัม ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนที่เหนือตะกอนเซลล์ออกและเติมอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

2. สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืชสมุนไพรไทย

สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืชสมุนไพรไทยได้รับมาจาก ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยสารทดสอบที่ใช้มีทั้งหมด 73 ตัวอย่าง มาจากพืชสมุนไพรไทย 2
ชนิด คือ สาละและย่านาง โดยแสดงรายละเอียดความสัมพันธ์ของสารทดสอบทั้งหมดรวมทั้งรหัสสารดังนี้



ภาพที่ 1 แผนภูมิที่มาและความสัมพันธ์ของสารสกัดจากพืชที่ใช้ในการคัดกรอง (ที่มา: ศิราดา อารมณ்சีน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม)

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบโดยวิธี MTT

นำเซลล์ THP-1 (2×10^4 เซลล์ต่อหลุม) มาเลี้ยงในสภาพหลุมชนิด 96 หลุมและกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดจากพืชที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ระบุเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 10 ไมโครลิตรและบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ได้จากสมการด้านล่างนี้

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

Abs test: ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารสกัดตัวอย่าง

Abs blank: ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์เปล่า

4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นอินฟลามมาโทซิสในเซลล์ THP-1

นำเซลล์ THP-1 (5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) มาเลี้ยงในสภาพหลุมชนิด 12 หลุม กระตุ้นเซลล์ด้วย phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้งและล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง และย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้งและล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM และกระตุ้นเซลล์ด้วย monosodium urate (MSU) ที่มีความเข้มข้น 0, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Martinon และคณะ (3) กระตุ้นเป็นระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 30, 60, 180 และ 360 นาที จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตาม 4.1 และเก็บโปรตีนจากเซลล์ไปตรวจวัดระดับ caspase-1 และ IL-1 β ด้วยวิธี Western blot ตาม 4.2

4.1 การวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA

ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Human IL-1 β ELISA kit (R&D Systems) โดยทำตามคู่มือของชุดทดสอบ ดังนี้ เจือจางแอนติบอดี (Capture Antibody) ให้ได้ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นดูดใส่ลงในสภาพหลุมชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมา ล้างด้วย washing buffer (1xPBS + 0.05% Tween 20) 6 ครั้ง ดูดสารละลาย 1% BSA ใน PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง และเติมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พอลบเวลาล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง และเติม Detection Antibody ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง เติมสารละลาย Streptavidin-HRP หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หลีกเลี้ยงไม่ให้โดนแสง หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer 6 ครั้ง และเติมสารละลายตั้งต้น TMB หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด ประมาณ 5 นาที จากนั้นเติม 2N H₂SO₄ หลุมละ 100

ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)

4.2 การตรวจวัดระดับของ caspase-1 และ IL-1 β ด้วยวิธี Western blot

4.2.1 การสกัดและการวัดโปรตีน

หลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นตามที่ระบุครบเวลาแล้ว ดูดส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างด้วย PBS ที่เย็น จากนั้นเติม RIPA buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใส (โปรตีน) ไปทำการทดลองต่อไป เมื่อได้โปรตีนมาแล้ว ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay kit (PIERCE, USA) ซึ่งใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 และ 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางโปรตีนด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:10 ลงในภาชนะหลอดชนิด 96 หลุม จากนั้นนำสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 50:1 ผสมให้เข้ากัน เติมนลงในแต่ละหลุม นำไปปั่นที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader)

4.2.2 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Western blot

เตรียมเจล SDS-PAGE 12% และ 15% (ภาคผนวก) และเตรียมตัวอย่างที่จะโหลดเจล ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีย้อม (2x loading dye) และน้ำกลั่น (Double – distilled water) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงในเจล โดยใช้ Prestained Protein Ladder เป็น protein marker ตัวอย่างจะถูกแยกโดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที หลังจากแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้วให้แช่เจลใน transfer buffer ประมาณ 5 นาที ตัด Polyvinylidene fluoride (PVDF) และแช่ในเมทานอล 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปแช่ใน transfer buffer และตัดกระดาษกรอง 6 แผ่น นำไปแช่ใน transfer buffer สำหรับการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนนั้น นำกระดาษกรอง 3 แผ่นวางก่อน ตามด้วย PVDF เมมเบรน ตามด้วยเจล และกระดาษกรองอีก 3 แผ่น จากนั้นไล่ฟองอากาศออกและเติม transfer buffer ลงบนกระดาษกรองเล็กน้อย โดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 mA สำหรับ 1 เจลและใช้กระแสไฟฟ้า 150 mA สำหรับ 2 เจล เป็นเวลา 90 นาที หลังจากที่ย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้วให้ปิดที่ว่างบนเมมเบรนด้วย blocking solution (ภาคผนวก) 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยวางบนเครื่องเขย่าขึ้น-ลง พอครบเวลาเท blocking solution ทิ้งและเติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (แอนติบอดีที่ใช้แสดงดังตารางที่ 1) เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมานำเมมเบรนมาเขย่าบนเครื่องเขย่าขึ้น-ลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเทแอนติบอดีทิ้งและล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง ก่อนที่จะเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งติดฉลากด้วย horseradish

peroxidase (HRP) และนำเมมเบรนมาเขย่าบนเครื่องเขย่าขึ้น-ลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรน ด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้งและ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปตรวจสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence

ตารางที่ 1 แอนติบอดีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้

แอนติบอดี	อัตราส่วนเจือจาง	บริษัทผู้ผลิต
Mouse anti-IL-1 β	1:1000	Cell signaling Technology, USA
Rabbit anti-caspase-1	1:1000	Cell signaling Technology, USA
Mouse anti- β -actin	1:10000	Chemicon International, USA
Sheep Anti-Mouse IgG (HRP)	1:4000	GE Healthcare, USA
Donkey Anti-Rabbit IgG (HRP)	1:4000	GE Healthcare, USA

5. การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β

วิธีการคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพกวดการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ส์ ทำตามวิธีของ Uratsuji และคณะ (11) โดยนำเซลล์ THP-1 (5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) เลี้ยงในถาดหลุมชนิด 12 หลุม และกระตุ้นด้วย PMA ความเข้มข้นที่อธิบายข้างต้น เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 1 ครั้ง ย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง วันต่อมาล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ค่าการอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 80% ขึ้นไป มาบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (จาก *Escherichia coli*) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และกระตุ้นเซลล์ด้วย MSU เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดอินฟลามมาไซม์ส์ และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA ตามข้อที่ 4.1

6. ศึกษากลไกต่อการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ส์ของสารสกัดจากพืช

สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กด IL-1 β จากการทดลองในข้อ 5. นำมาตรวจสอบผลกระทบบทวิถีการกระตุ้นของอินฟลามมาไซม์ส์ด้วย 3 วิธีต่อไปนี้

6.1 การตรวจวัดผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS assay)

นำเซลล์ THP-1 (5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) มาเลี้ยงในถาดหลุมชนิด 12 หลุมและกระตุ้นด้วย PMA ดังข้างต้นเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้งและย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในหลุมใหม่ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วยสารออกฤทธิ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พอครบเวลาล้างด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้งและเติมสารละลาย MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อสารละลาย HBSS 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งและลอกเซลล์เพื่อนำไปวัดผลด้วย flow cytometer วิเคราะห์ผลด้วยซอฟต์แวร์ CXP

6.2 การตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay

ทำการทดลองตามวิธีของผู้ผลิต Caspase-Glo 1® Inflammasome Assay (Promega) โดยนำเซลล์แมคโฟฟาจปฐมภูมิของหนูไม่ซ (1x10⁴ เซลล์ต่อหลุม) มาเลี้ยงในสภาพหลุมสี่ขาที่บัสแสง ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมากระตุ้นด้วยสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและกระตุ้นด้วย ATP ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเอาออกจากตู้บ่ม วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 50 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย Caspase-Glo ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม และนำไปวัดค่าการเรืองแสง (luminescence) ที่ 10, 20 และ 30 นาที ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

6.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IL-1β* โดยวิธี quantitative RT-PCR

6.3.1 การสกัด total RNA

นำตัวอย่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยมาทำการสกัด RNA โดยใช้ TRIzol ซึ่งวิธีการสกัด คือ ใส่ TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ดูดขึ้นลง จากนั้นดูดใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อ TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าขึ้นและลงแรงๆ เป็นเวลา 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสก็คือ โปรตีน ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ จากนั้นเติม iso-propanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ใน DEPC water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และตากตะกอนจนแห้ง หลังจากนั้นเติม DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดูดขึ้นและลงหลายๆ ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างไปวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Nanodrop แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

6.3.2 การทำ Reverse transcription

เตรียมตัวอย่างโดยใช้ RNA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้เท่ากับ 12 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Random hexamers ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และนำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 5xRT buffer, Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), RNase inhibitor และ Reverse transcriptase ลงในแต่ละปฏิกิริยา ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR Bioer Life Express โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที,

อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.3.3 การตรวจหาการแสดงออกของยีน *IL-1 β* ด้วยวิธี Real-time PCR

นำตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้ 200 นาโนกรัม มาใช้เป็นต้นแบบ และเติม iQ™ SYBR® Green, Forward primer, Reverse primer และ Hypure water ลงในแต่ละปฏิกิริยาผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง MJ mini personal thermal cycler (BioRad Laboratories) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาทีและอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดย primer ที่ใช้แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ที่ใช้ในการทดลองนี้

ยีน	Primer sequence	Annealing Temperature (°C)
<i>IL-1β</i>	Forward 5'-AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG-3'	55
	Reverse 5'-TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3'	
<i>β-actin</i>	Forward 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAG-3'	55
	Reverse 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'	

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลในงานวิจัยนี้วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ (t-test) ซึ่งค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ไลน์ THP-1

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารทดสอบที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของต้นสาละและย่านาง (ตามภาพที่ 1) ที่นำมาคัดกรอง จึงบ่มเซลล์ THP-1 ร่วมกับสารสกัดจากพืชยาบและสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่า สารทดสอบส่วนใหญ่ (62 ตัวอย่าง) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยให้ค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50%) มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารทดสอบรหัส AS-TP 1013, 2004, 2005, 2006, 2009, 2010, 2014, 2016, 2017 และ 2025 ดังนั้น สำหรับสารทดสอบที่มีค่า IC₅₀ มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป สำหรับสารทดสอบรหัส AS-TP 1013, 2004, 2005, 2006, 2009, 2010, 2014, 2016, 2017 และ 2025 จะใช้ความเข้มข้น 10.87, 0.41, 0.38, 2.3, 0.36, 0.32, 0.38, 5.53, 0.44 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป รวบรวมผลการทดสอบความเป็นพิษของสารแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ THP-1 โดยวิธี MTT

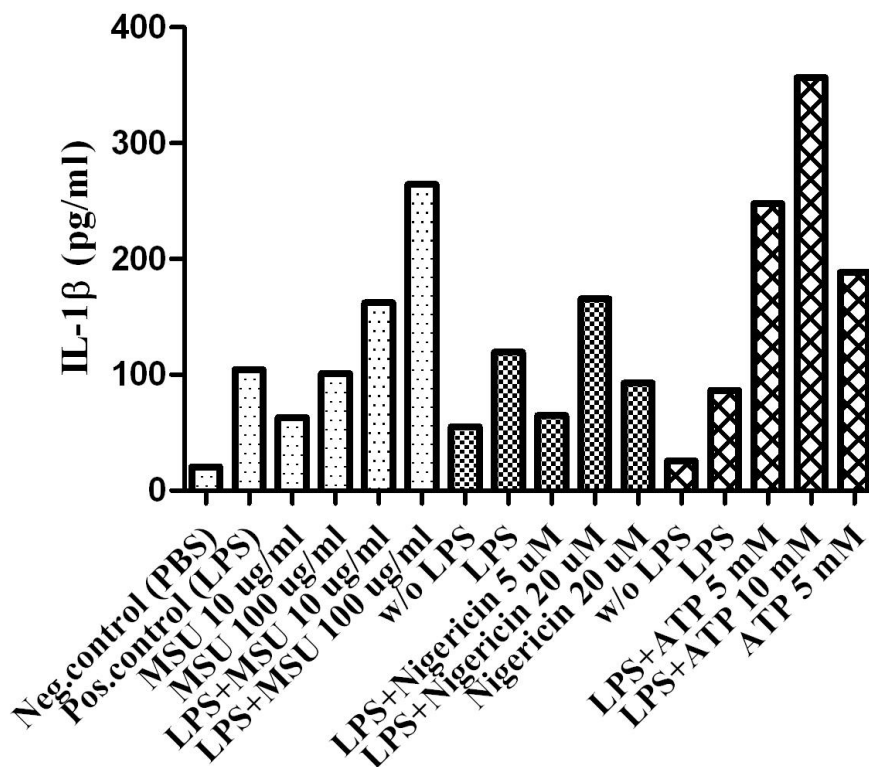
รหัสตัวอย่าง	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ชื่อวิทยาศาสตร์ (ชื่อสามัญ)	ค่า IC ₂₀ (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่า IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	หมายเหตุ (ส่วนที่ใช้ สกัด)
AS-TP 1004	MeOH Extract	<i>Couropita guianensis</i> (สาละหรือลูกป็น ใหญ่)	>100	>100	ดอก
AS-TP 1005	EtOAc Extract		>100	>100	
AS-TP 1006	Hexane Extract		>100	>100	
AS-TP 1007	MeOH Extract		>100	>100	กิ่ง
AS-TP 1008	EtOAc Extract	>100	>100		
AS-TP 1010	Hexane Extract	<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels (ย่านาง)	>100	>100	ราก
AS-TP 1011	EtOAc Extract		>100	>100	
AS-TP 1012	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 1013	CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH Extract		10.87	18.36	
AS-TP 1014	Hexane Extract	<i>Couropita guianensis</i> (สาละหรือลูกป็น ใหญ่)	>100	>100	เปลือกผล
AS-TP 1015	EtOAc Extract		>100	>100	
AS-TP 1016	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 1017	Hexane Extract		>100	>100	เนื้อผล
AS-TP 1018	EtOAc Extract	>100	>100		
AS-TP 1019	MeOH Extract	>100	>100		
AS-TP 2001	MeOH Extract		>100	>100	กิ่ง

AS-TP 2002	MeOH Extract	<i>Couroupita guianensis</i> (สาละหรือลูกปืนใหญ่)	>100	>100	
AS-TP 2003	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2004	MeOH Extract		0.41	1.62	
AS-TP 2005	MeOH Extract		0.38	1.51	
AS-TP 2006	MeOH Extract		2.30	9.20	
AS-TP 2007	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2008	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2009	MeOH Extract		0.36	1.42	
AS-TP 2010	MeOH Extract		0.32	1.28	
AS-TP 2011	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2012	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2013	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2014	MeOH Extract		0.38	1.52	
AS-TP 2015	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2016	MeOH Extract		5.53	22.10	
AS-TP 2017	MeOH Extract		0.44	1.76	
AS-TP 2018	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2019	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2020	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2021	MeOH Extract		>100	>100	ดอก
AS-TP 2022	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2023	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2024	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2025	MeOH Extract		0.32	1.27	
AS-TP 2026	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2027	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2028	MeOH Extract		>100	>100	กิ่ง
AS-TP 2029	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2030	MeOH Extract		>100	>100	ใบ
AS-TP 2031	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2032	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2033	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2034	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2035	MeOH Extract		>100	>100	ดอก
AS-TP 2036	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2037	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2038	MeOH Extract		>100	>100	

AS-TP 2039	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2040	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2041	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2042	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2043	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2044	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2045	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2046	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2047	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2048	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2049	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2050	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2051	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2052	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 2053	MeOH Extract		>100	>100	
AS-TP 087	MeOH Extract		>100	>100	ใบ
AS-TP 088	N/A	N/A	>100	>100	Unknown
AS-TP 089	N/A	β -Sitosterol	>100	>100	
AS-TP 090	N/A	Quercetin	>100	>100	
AS-TP 091	N/A	Kaempferol	>100	>100	

2. การกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β ในแมโครฟาจโดยไนเจอร์ิซิน ATP หรือ MSU

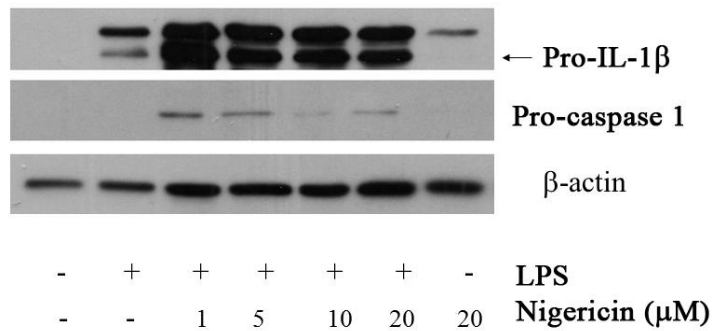
ใช้เซลล์ไลน์มอโนไซต์ของมนุษย์ THP-1 เป็นเซลล์ต้นแบบในการสร้างระบบการคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการกระตุ้นอินฟลามมาโซม นำเซลล์ดังกล่าวมากระตุ้นด้วย phorbol myristate acetate (PMA) เพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นแมโครฟาจ วันถัดไปเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารที่ปราศจาก fetal bovine serum (Optimem) จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS จาก *Escherichia coli* (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ mRNA ของ IL-1 β นาน 3 ชั่วโมงและกระตุ้นตามด้วยไนเจอร์ิซิน (nigericin) หรือ ATP ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นอินฟลามมาโซมได้ หรือผลึกกรดยูริก (MSU) นาน 6 ชั่วโมง ตรวจวัดเชิงปริมาณของการหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ข้างต้นในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยวิธี ELISA แสดงผลในภาพที่ 2 พบว่า MSU ไนเจอร์ิซินและ ATP สามารถเหนี่ยวนำการหลั่ง IL-1 β ได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่เพียงอย่างเดียว ผลที่ได้บ่งชี้ว่าสารทั้งสาม สามารถกระตุ้นเอกทิวติของอินฟลามมาโซมและนำไปสู่การหลั่ง IL-1 β ที่อยู่ในรูปที่ถูกย่อยโดย caspase 1 แล้วในน้ำเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 2 ผลของ MSU ไนเจอร์ริซิน และ ATP ต่อการหลั่ง IL-1 β

กระตุ้นเซลล์ THP-1 ด้วย LPS ร่วมกับสิ่งเร้าต่างๆ ตามความเข้มข้นที่ระบุและเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณของ IL-1 β ที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์โดยวิธี ELISA ผลที่แสดงเป็นผลของค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เพื่อตรวจวัดการกระตุ้นอิมพลาสมาโซมโดยตรง จึงตรวจหาระดับของ caspase 1 และ IL-1 β ซึ่งเป็นรูปแบบที่โปรตีนทั้งสองมีการย่อยจากโปรตีนตั้งต้น ได้แก่ Pro-caspase 1 และ Pro-IL-1 β โดยวิธี Western blot แสดงผลที่ได้ในภาพที่ 3 พบว่าไนเจอร์ริซินร่วมกับ LPS สามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มขึ้นของระดับของ Pro-IL-1 β ได้ โดยปรากฏแถบที่ประมาณ 35 kDa (ลูกศร) แต่ไม่สามารถตรวจพบรูปแบบของ IL-1 β ที่ถูกตัดด้วยอิมพลาสมาโซมซึ่งมีขนาดประมาณ 17 kDa ได้ อีกทั้ง ระดับของ Pro-caspase-1 มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ร่วมกับไนเจอร์ริซิน โดยไม่สามารถตรวจพบแถบที่มีขนาดตรงกับ caspase-1 ที่ถูกตัดแล้วได้ แต่พบว่าระดับของ Pro-caspase-1 ลดลงตามความเข้มข้นของไนเจอร์ริซินที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจติดตามโปรตีนทั้งสองไม่สามารถรับรู้รูปแบบที่มีการย่อยด้วยโปรตีเอสแล้วได้ อีกทั้งจากการที่ระดับของ Pro-caspase-1 ลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนเจอร์ริซิน อาจเป็นไปได้ว่า Pro-caspase-1 ถูกตัดและกลายเป็น caspase-1

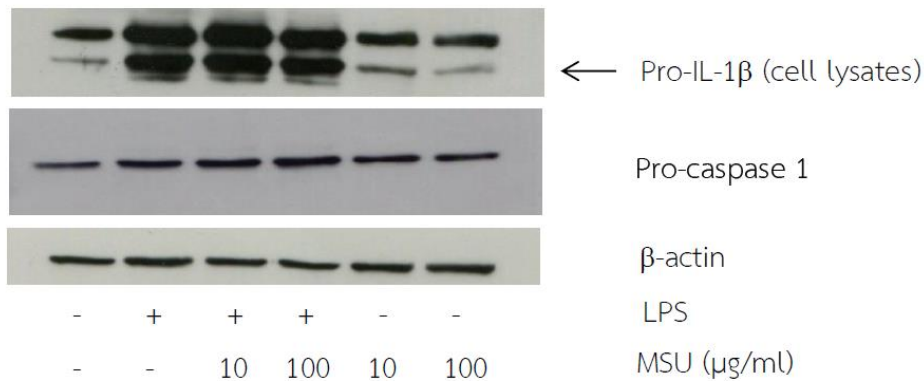


ภาพที่ 3 ผลของไนเจอร์ซินต่อระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1

วิเคราะห์ระดับโปรตีนของ Pro-IL-1 β และ Caspase-1 ใน THP-1 ที่เหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจและได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับไนเจอร์ซินที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 ชั่วโมง นำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ IL-1 β และ caspase 1 ใช้ β -actin เป็นชุดควบคุม

เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยใช้ MSU ที่ความเข้มข้น 10, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อกระตุ้นอินฟลามมาโซม ก็ได้ผลคล้ายกับเมื่อในกรณีของไนเจอร์ซิน คือ มีการเพิ่มขึ้นของระดับของ Pro-IL-1 β แต่ไม่สามารถตรวจหาสัญญาณของ IL-1 β ได้ สำหรับ caspase-1 ก็เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4) แต่ในกรณีของ MSU ไม่มีการลดต่ำลงของ pro-caspase 1 เหมือนกับที่พบในกรณีของ Nigericin การที่ไม่สามารถตรวจพบ IL-1 β และ cleaved Caspase-1 นั้น อาจเป็นเพราะแอนติบอดีที่ใช้ไม่สามารถรับรู้รูปแบบของโปรตีนที่ถูกย่อยแล้วได้ แต่จากข้อมูลของบริษัทผู้ผลิตสามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์ IL-1 β ได้ แต่ไม่มีข้อมูลของ IL-1 β ที่เซลล์ผลิต (endogeneous) หรืออาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน IL-1 β มีการหลั่งออกภายนอกเซลล์เป็นส่วนใหญ่ จึงไม่สามารถตรวจพบได้

เนื่องจากงานวิจัยนี้สนใจค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β เพื่อบำบัดโรคเก๊าท์ ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากผลึกของกรดยูริกที่สะสมตามเนื้อเยื่อ ในการทดลองต่อจากนี้ไปจึงใช้ภาวะการกระตุ้นอินฟลามมาโซมด้วย MSU ที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจะใช้การวัดปริมาณ IL-1 β ที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์โดยวิธี ELISA เพื่อคัดกรองสารออกฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นอินฟลามมาโซมต่อไป

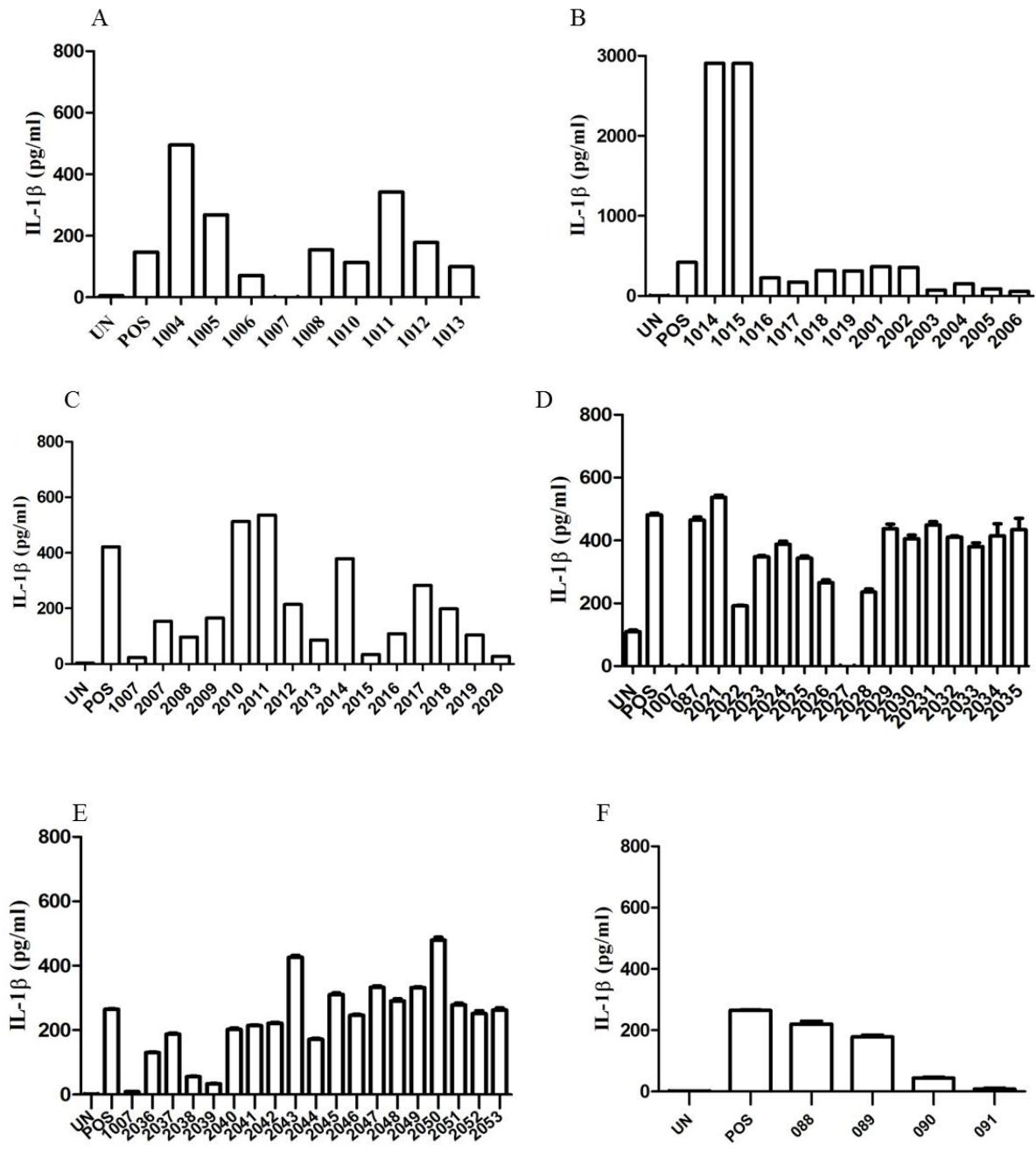


ภาพที่ 4 ผลของ MSU ต่อระดับของ pro-IL-1 β และ pro-caspase-1

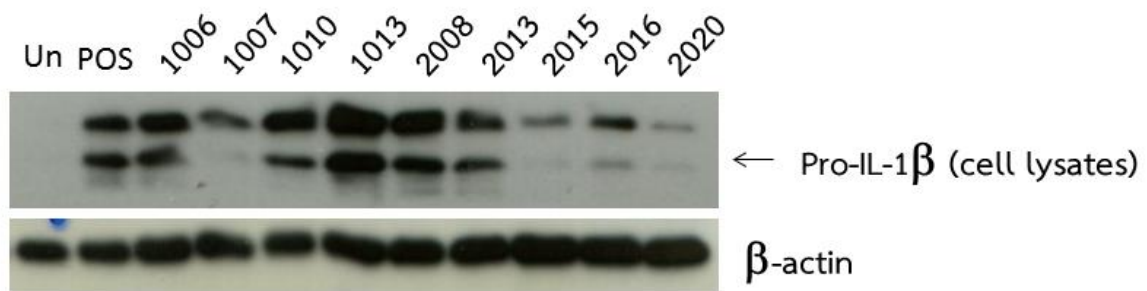
วิเคราะห์ระดับโปรตีนของ Pro-IL-1 β และ Caspase-1 ใน THP-1 ที่เหนี่ยวนำเป็นแมโครฟาจและได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ MSU ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 ชั่วโมง นำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ IL-1 β และ caspase 1 ใช้ β -actin เป็นชุดควบคุม

3. การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ของสารทดสอบ

นำสารทดสอบที่ทดสอบความเป็นพิษแล้วมาบ่มกับเซลล์ THP-1 ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตั้งระยะข้างต้น และกระตุ้นการหลั่ง IL-1 β โดยใช้ LPS ร่วมกับ MSU โดยภาวะตามผลการทดสอบในภาพที่ 2-4 ที่ระบุข้างต้น จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ IL-1 β ด้วยวิธี ELISA แสดงผลในภาพที่ 5 A-F จากผลการทดลองพบว่าสารทดสอบรหัส AS-TP 1006 (ดอก), 1007 (กิ่ง), 1010, 1013 (รากย่านาง), 1016 (เปลือกผล), 1017 (เนื้อผล), 2003, 2005-2009, 2012, 2013 (กิ่งทำให้บริสุทธิ์จาก 1007), 2015, 2016, 2019, 2020 (ใบทำให้บริสุทธิ์จาก 1001), 2027 (ดอกทำให้บริสุทธิ์จากรหัส 1004), 2038 และ 2039 (ดอกทำให้บริสุทธิ์จากรหัส 2027) สารทั้งหมดสามารถลดการหลั่ง IL-1 β เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก ซึ่งสารทดสอบรหัส AS-TP 1007 และ 2027 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β สูงที่สุดและสารทดสอบรหัส AS-TP 090 (β -Sitosterol) และ 091 (Quecetin) ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β มาก่อนหน้านี้ ก็ให้ผลในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β เช่นเดียวกัน จากนั้นเก็บโปรตีนไปตรวจวัดระดับ IL-1 β ภายในเซลล์ด้วยวิธี Western blot จากผลการทดลองพบว่า สารทดสอบรหัส AS-TP 1007 AS-TP 2015, 2016 และ 2020 แสดงผลดังภาพที่ 6 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ Pro-IL-1 β



ภาพที่ 5 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์ THP-1 ด้วยวิธี ELISA บ่มเซลล์ THP-1 ร่วมกับสารทดสอบต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ IL-1 β โดยชุดควบคุมลบ (UN) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นและชุดควบคุมบวก (POS) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/MSU (A) สารทดสอบรหัส AS-TP 1004-1008 และ 1010-1013 (B) สารทดสอบรหัส AS-TP 1014-1019 และ 2001-2006 (C) สารทดสอบรหัส AS-TP 2007-2020 (D) สารทดสอบรหัส AS-TP 2021-2035 (E) สารทดสอบรหัส AS-TP 2036-2053 (F) สารทดสอบรหัส AS-TP 088-091 *หมายเหตุ AS-TP 1014 และ 1015 ค่าที่ได้เกินเส้นกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 6 ผลของสารต่อการแสดงออกของ Pro-IL-1 β ด้วยวิธี Western blot

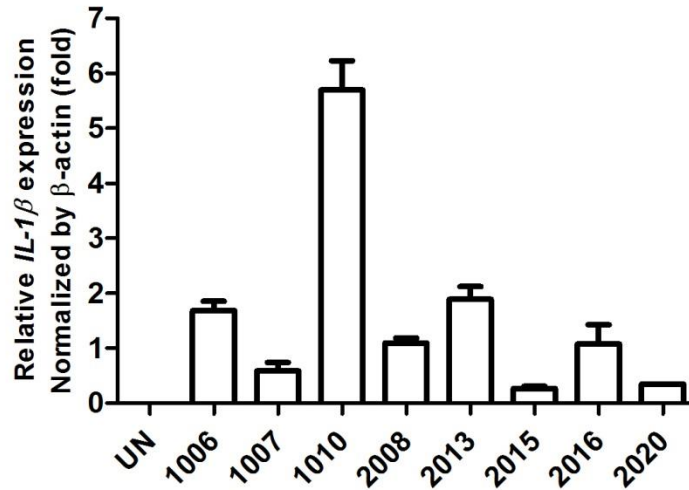
นำสารทดสอบมาบ่มกับเซลล์ THP-1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ MSU ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บโปรตีนไปตรวจวัดการแสดงออกของ Pro-IL-1 β โดยชุดควบคุมลบ (Un) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น และชุดควบคุมบวก (POS) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ MSU

4. ศึกษากลไกต่อการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ของสารทดสอบ

นำสารทดสอบที่มีฤทธิ์กดการหลั่ง IL-1 β ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3. มาศึกษากลไกในการกดการหลั่ง IL-1 β

4.1 ผลของสารทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน *IL-1 β*

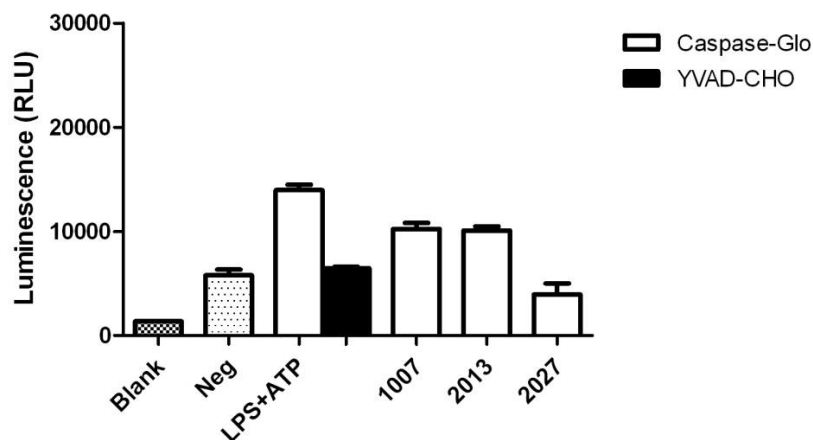
นำตัวอย่าง RNA ของเซลล์ THP-1 ที่ได้สกัดจากเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบรหัส AS-TP 1006, 1007, 1010, 2008, 2013, 2015, 2016 และ 2020 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β สูงที่สุดมาวัดระดับ mRNA ของยีน *IL-1 β* เปรียบปริมาณ จากผลการทดลองพบว่า สารทดสอบรหัส AS-TP 1006, 1010, 2008, 2013 และ 2016 ทำให้มีการแสดงออกของยีน *IL-1 β* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวก ในขณะที่สารทดสอบรหัส AS-TP 1007, 2015 และ 2020 มีผลในการลดการแสดงออกของยีน *IL-1 β* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวก และสอดคล้องกับผลที่ได้ใน Western blot (ภาพที่ 6) แสดงว่าสารทดสอบสามตัวนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการถอดรหัสของ mRNA ซึ่งกลไกการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β อาจไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ซึ่งเป็นเป้าหมายของการคัดกรองสารในงานวิจัยนี้ ดังนั้น สารทดสอบรหัส AS-TP 1006, 1010, 2008, 2013 และ 2016 จึงมีศักยภาพในการศึกษาถึงกลไกเชิงลึกเกี่ยวกับการกดการกระตุ้นอินฟลามมาไซม์ต่อไป



ภาพที่ 7 ผลของสารทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน *IL-1 β* ด้วยวิธี Real-time PCR บ่มเซลล์ THP-1 กับสารทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมบวก คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ส่วนชุดควบคุมลบ (UN) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น

4.2 การตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo®1 Inflammasome Assay

นำเซลล์แมโครฟาจปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์มากระตุ้นด้วยสารทดสอบรหัส AS-TP 1007, 2013 และ 2027 ซึ่งเป็นกลุ่มสารทดสอบที่มีฤทธิ์กดการหลั่ง IL-1 สูงที่สุด เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ที่มีต่อแอกทิวิตีของ caspase-1 จากผลการทดลองพบว่า สารทดสอบรหัส AS-TP 2027 (สารสกัดจากดอกที่ทำให้บริสุทธิ์จากรหัส 1004) มีฤทธิ์กดแอกทิวิตีของ caspase-1 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวกที่ใช้ YVAD-CHO เป็นสารยับยั้งการทำงานของ caspase-1 แสดงว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการกวดการกระตุ้นอินฟลามมาโซมทำให้ caspase-1 ลดแอกทิวิตีลงหรืออาจมีฤทธิ์กดการทำงานของ caspase-1 โดยตรง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ผลการตรวจวัดแอกทิวิตีของ caspase-1 โดยใช้ Caspase-Glo®1 Inflammasome Assay

บ่มเซลล์แมโครฟาจกับสารทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและกระตุ้นด้วย ATP ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย caspase-glo และนำไปวัดค่าการเรืองแสง (luminescence) ที่ 30 นาที โดยชุดควบคุมลบ (Neg) คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ชุดควบคุมบวก (POS) คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ ATP และ YVAD-CHO คือสารละลายที่ยับยั้งแอกทิวิตีของ caspase-1

อภิปรายและวิจารณ์

ในงานวิจัยได้คัดกรองสารทดสอบที่สกัดจากพืช ได้แก่ สาละหรือต้นสาละและย่านาง เพื่อค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการทำงานของอินฟลามาโซมซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีแอกทิวิตีเมื่อเซลล์แมโครฟาจถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า เช่น MSU เป็นต้น โดยพืชทั้งสองชนิดนี้ยังไม่มีรายงานถึงสารออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่ออินฟลามาโซมแต่มีการใช้เป็นยาสมุนไพรในการบำบัดอาการอักเสบ ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากกิ่ง ดอก และใบของต้นสาละมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ไลน์ THP-1 เมื่อนำส่วนแยกย่อยไปทำให้บริสุทธิ์และติดตามฤทธิ์ต้านการหลั่ง พบว่าสารสกัดจากดอกและกิ่งมีฤทธิ์สูง จึงนำสารสกัดหยาบที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต่อการถอดรหัสของยีน *IL-1 β* พบว่าสารส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถอดรหัสของยีน *IL-1 β* ซึ่งบ่งชี้ว่าสารเหล่านี้มีกลไกในการออกฤทธิ์ระยะต้นของการกระตุ้นแมโครฟาจให้มีการแสดงออกของยีน โดยไม่มีฤทธิ์ต่อการกระตุ้นแอกทิวิตีต่ออินฟลามาโซมแต่อย่างใด

สำหรับสารกลุ่มที่ให้ผลสูงในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β และมีผลยับยั้งแอกทิวิตีของ caspase-1 คือ สารที่สกัดได้จากดอก (ในกลุ่มรหัส 2027) ซึ่งจากการนำสารทดสอบรหัสนี้ไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมได้ส่วนแยกย่อยจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ 2036-2046 โดยสารทดสอบรหัส 2038, 2039 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งที่แรงมาก ซึ่งสารสกัดดังกล่าวยังไม่ใช่สารบริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปและนำมาติดตามทดสอบฤทธิ์

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารทดสอบ จึงทำการตรวจวัดฤทธิ์ของสารทดสอบต่อการถอดรหัสของยีน *IL-1 β* แต่ไม่สามารถตรวจหาการย่อยของโปรตีน Pro-caspase-1 และ Pro-IL-1 β ได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากแอนติบอดีไม่สามารถตรวจวิเคราะห์รูปแบบที่โปรตีนถูกตัดแล้วได้ เพื่อทดแทนการวิเคราะห์โดย Western blot ที่ไม่สามารถประเมินได้นี้ จึงเลือกใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปเพื่อตรวจหาแอกทิวิตีของ caspase-1 ซึ่งในการทดสอบเบื้องต้นไม่สามารถใช้เซลล์ไลน์ THP-1 ได้เนื่องจากให้ผล background ที่สูงมาก ซึ่งอาจเป็นจากการใช้ PMA ในการกระตุ้นเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นแมโครฟาจ จึงหันไปใช้เซลล์แมโครฟาจปฐมภูมิซึ่งให้ผลตามที่คาดไว้ ซึ่ง ATP ทำให้ caspase-1 มีแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นและเมื่อใช้ YVAD-CHO เป็นสารยับยั้ง ทำให้แอกทิวิตีของ caspase-1 ลดลง สำหรับกลไกสุดท้ายที่วางแผนจะทดสอบ คือ การทดสอบหาผลต่อการผลิต ROS ซึ่งในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด ROS โดยวิธี Flow cytometry ได้

ที่ผ่านมามีการรายงานเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์กีดการทำงานของอินฟลามาโซม เช่น สาร MCC950 ซึ่งมีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งอินฟลามาโซมของ NLRP3 ซึ่งจะเป็นสารที่มีประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยาบำบัดโรคอักเสบด้วยตนเอง หรือ โรคภูมิคุ้มกันทำลายเนื้อเยื่อตนเอง และยังมีความสำคัญในการใช้เป็นเครื่องมือศึกษาบทบาทของอินฟลามาโซมในโรคต่างๆ ได้อีกด้วย (12) สำหรับสารสกัดที่แยกได้จากต้นสาละนั้น ปัจจุบันมีเพียงรายงานฉบับเดียวที่ระบุถึงฤทธิ์กีดการอักเสบโดยเป็นสารที่แยกอย่างหยาบได้จากใบและมีฤทธิ์กีดการหลั่ง IL-1 β แต่ไม่มีกลไกระบุถึงอินฟลามาโซมแต่อย่างใด (10) ดังนั้น สารทดสอบที่ศึกษาในงานวิจัยนี้อาจเป็นสารใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนซึ่งมีฤทธิ์จำเพาะในการกีดการทำงานของอินฟลามาโซมและอาจใช้เป็นยาบำบัดอาการของโรคเก๊าท์ได้

สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

งานวิจัยนี้คัดกรองสารสกัดจากพืชสองชนิด พบว่ามีสารสกัดจากต้นสาละจากกิ่งและดอกที่มีฤทธิ์กดการหลั่ง IL-1 β และมีสารทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากดอกที่มีฤทธิ์กดแอกทิวิตีของ caspase-1/อินฟลามาโซม ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ขนานไปกับการทำให้สารบริสุทธิ์ซึ่งยังไม่สามารถได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ได้ ดังนั้น ในขั้นต่อไปต้องทำให้สารบริสุทธิ์และศึกษากลไกการออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการประเมินศักยภาพของสารเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นยาหรือสารที่ใช้ในการศึกษากลไกต่างๆ ของการมีแอกทิวิตีของอินฟลามาโซมต่อไป

บรรณานุกรม

1. **Schroder K, Tschopp J.** 2010. The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
2. **Latz E.** 2010. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 22:28-33.
3. **Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J.** 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
4. **Lamkanfi M, Dixit VM.** 2012. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:137-161.
5. **Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J.** 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221-225.
6. **Talbott JH.** 1940. Serum Urate in Relatives of Gouty Patients. *J Clin Invest* 19:645-648.
7. **Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S.** 2013. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 14:454-460.
8. **McGonagle D, Tan AL, Madden J, Emery P, McDermott MF.** 2008. Successful treatment of resistant pseudogout with anakinra. *Arthritis Rheum* 58:631-633.
9. **McGonagle D, Tan AL, Shankaranarayana S, Madden J, Emery P, McDermott MF.** 2007. Management of treatment resistant inflammation of acute on chronic tophaceous gout with anakinra. *Ann Rheum Dis* 66:1683-1684.
10. **Pinheiro MM, Fernandes SB, Fingolo CE, Boylan F, Fernandes PD.** 2013. Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. *J Ethnopharmacol* 146:324-330.
11. **Uratsuji H, Tada Y, Kawashima T, Kamata M, Hau CS, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Asahina A, Sato S, Tamaki K.** 2012. P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J Immunol* 188:436-444.
12. **Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inerra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Nunez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LA.** 2015. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 21:248-255.

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธนาภัทร ปาลกะ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Tanapat Palaga
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่
เขตปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 02-218-5070 โทรศัพท์มือถือ 081-454-9295
โทรสาร 02-252-7576 และ e-mail: tanapat.p@chula.ac.th
- ประวัติการศึกษาต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Tokyo Institute of Technology	B. Eng.	Bioengineering	2534
Tokyo Institute of Technology	M. Eng.	Biotechnology	2536
University of Massachusetts at Amherst	Ph.D.	Microbiology/ Immunology	2545

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลและจุลชีววิทยา

แหล่งเผยแพร่ผลงานวิจัย

Screening for bioactive compounds from medicinal plants with suppressing activity against inflammasomes for treatment of Gout

Aromcheun, S., Sornkaew, N., Chokchaisiri, R., Suksamrarn, A. and Palaga, T.

Proceedings The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Nov 17-20, 2015, Bangkok, Thailand