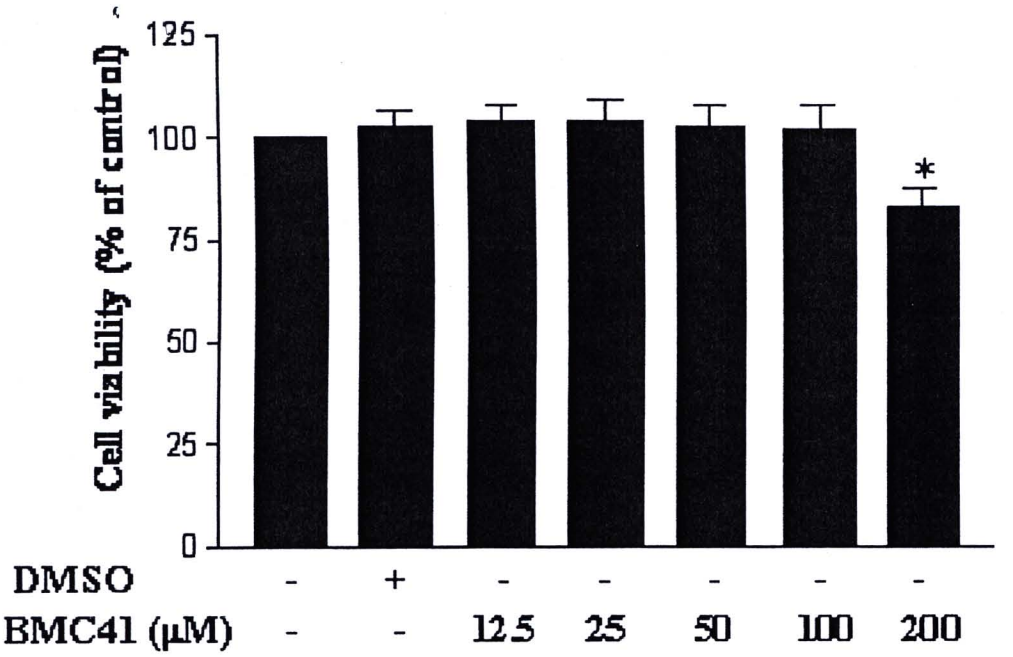
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลของสาร BMC 41 ต่อความมีชีวิตรอด

ได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ ferulic acid ชนิด BMC 41 ที่ใช้ในการทดสอบโดยปรับวิธีการสังเคราะห์ให้ได้ปริมาณสารมากขึ้นในระดับ 60 % yield จากเดิมได้เพียง 1 % yield ขั้นต่อมานำสาร BMC 41 มาทดสอบต่อโดยศึกษาผลของสาร BMC 41 ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 พบว่าสารที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 μM ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในขณะที่สารที่ความเข้มข้น 200 μM ลดความมีชีวิตรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4-1)



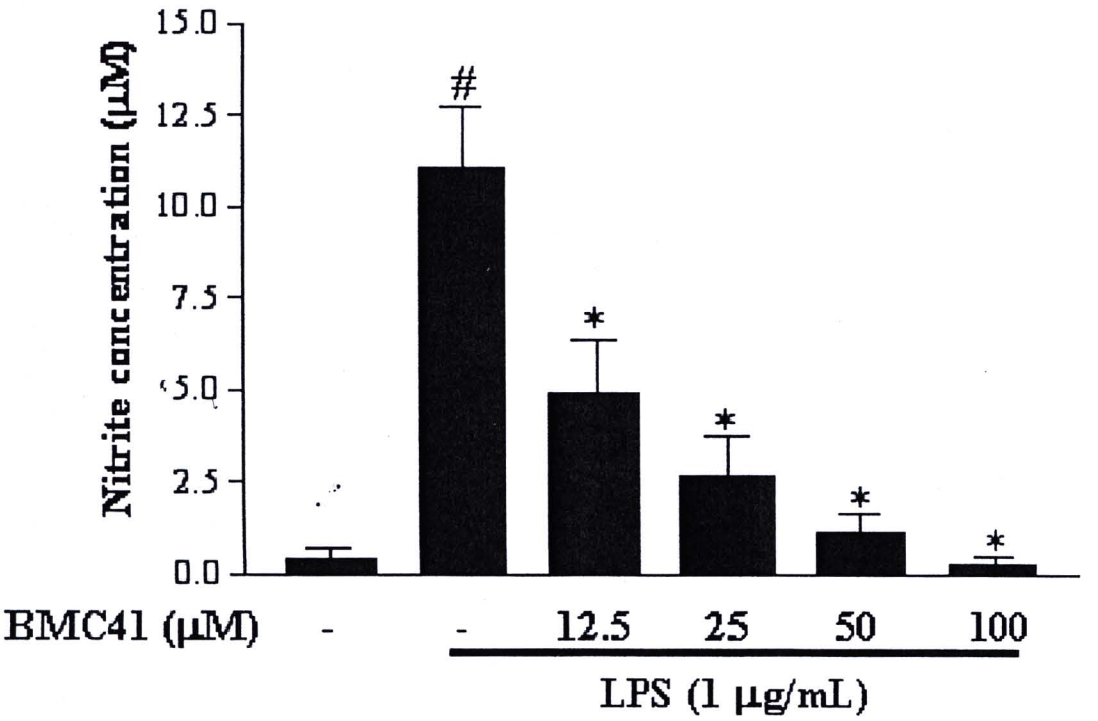
รูปที่ 4-1 ผลการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์โดย MTT assay ให้เซลล์สัมผัสกับสารBMC 41 ที่ความเข้มข้น 12.5 -200 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีที่อธิบายในวิธีทำ

* $P<0.05$ vs เซลล์ที่ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ

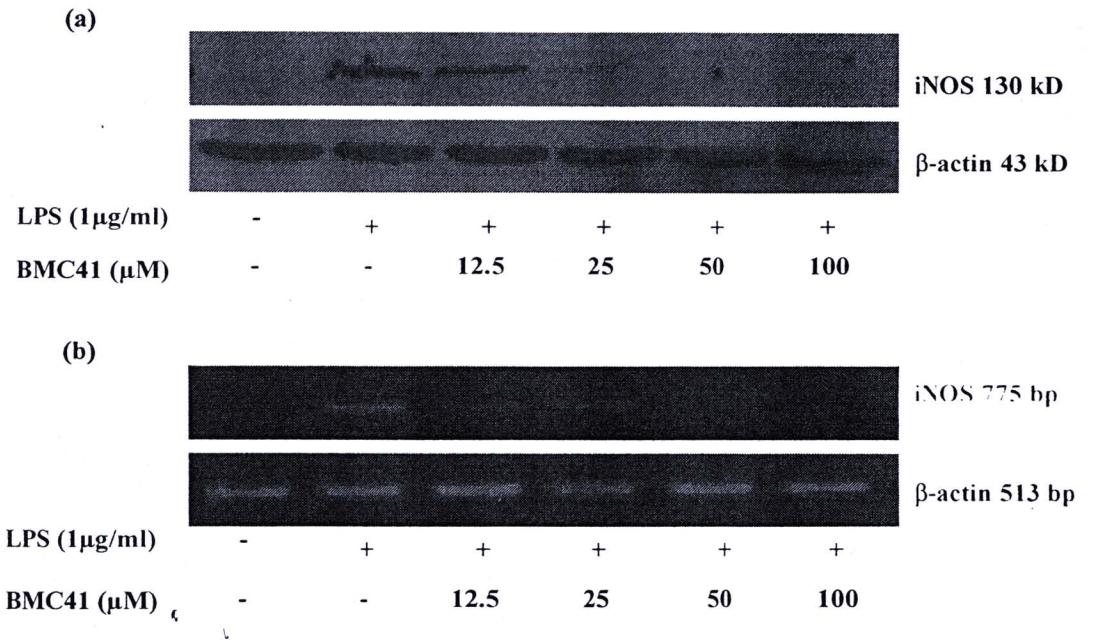
4.2 ผลของสาร BMC 41 ต่อการแสดงออกของยีน iNOS

สาร BMC 41 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.1 μM (รูปที่ 4-2) เพื่อที่จะศึกษากลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ของสาร BMC 41 จึงบ่มเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS และสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสาร BMC 41 สามารถยัง

ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ดังแสดงในรูปที่ 4-3



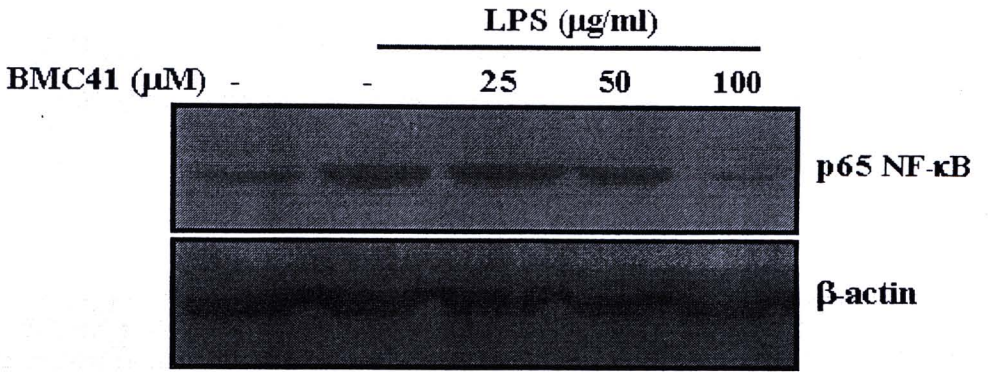
รูปที่ 4-2 ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 สัมผัสกับ LPS และสารทดสอบที่ความเข้มข้น 0 -100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีที่อธิบายในวิธีทำ $^{\#}P<0.001$ vs เซลล์ที่ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ $^{*}P<0.05$ vs เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS



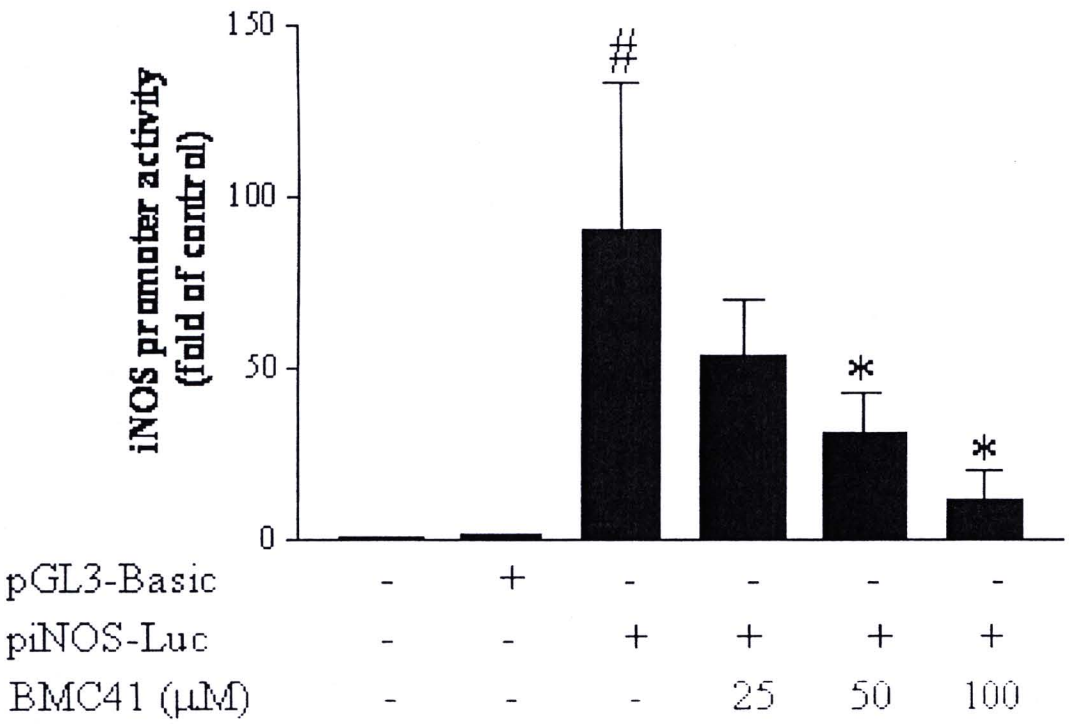
รูปที่ 4-3 ผลการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อการแสดงออกของยีน iNOS ที่ระดับโปรตีน (a) และ mRNA (b) โดยทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS และสารทดสอบที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 24 และ 12 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ mRNA ตามลำดับ

4.3 ผลของสาร BMC 41 ต่อการกระตุ้น NF-KB และ iNOS promoter activity

การศึกษากลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร BMC 41 ในขั้นต่อมา พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีปริมาณ NF-KB p65 subunit ในนิวเคลียสน้อยลงในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4-4) และเมื่อนำเซลล์ไปทดสอบผลของสาร BMC 41 ต่อ iNOS promoter activity โดยการ transfection เซลล์ด้วย piNOS-luciferase reporter plasmid และ pRSV-β-galactosidase plasmid ก่อนให้เซลล์สัมผัสกับ LPS และสาร BMC 41 ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสาร BMC 41 ลดกิจกรรมของ iNOS promoter ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4-5)



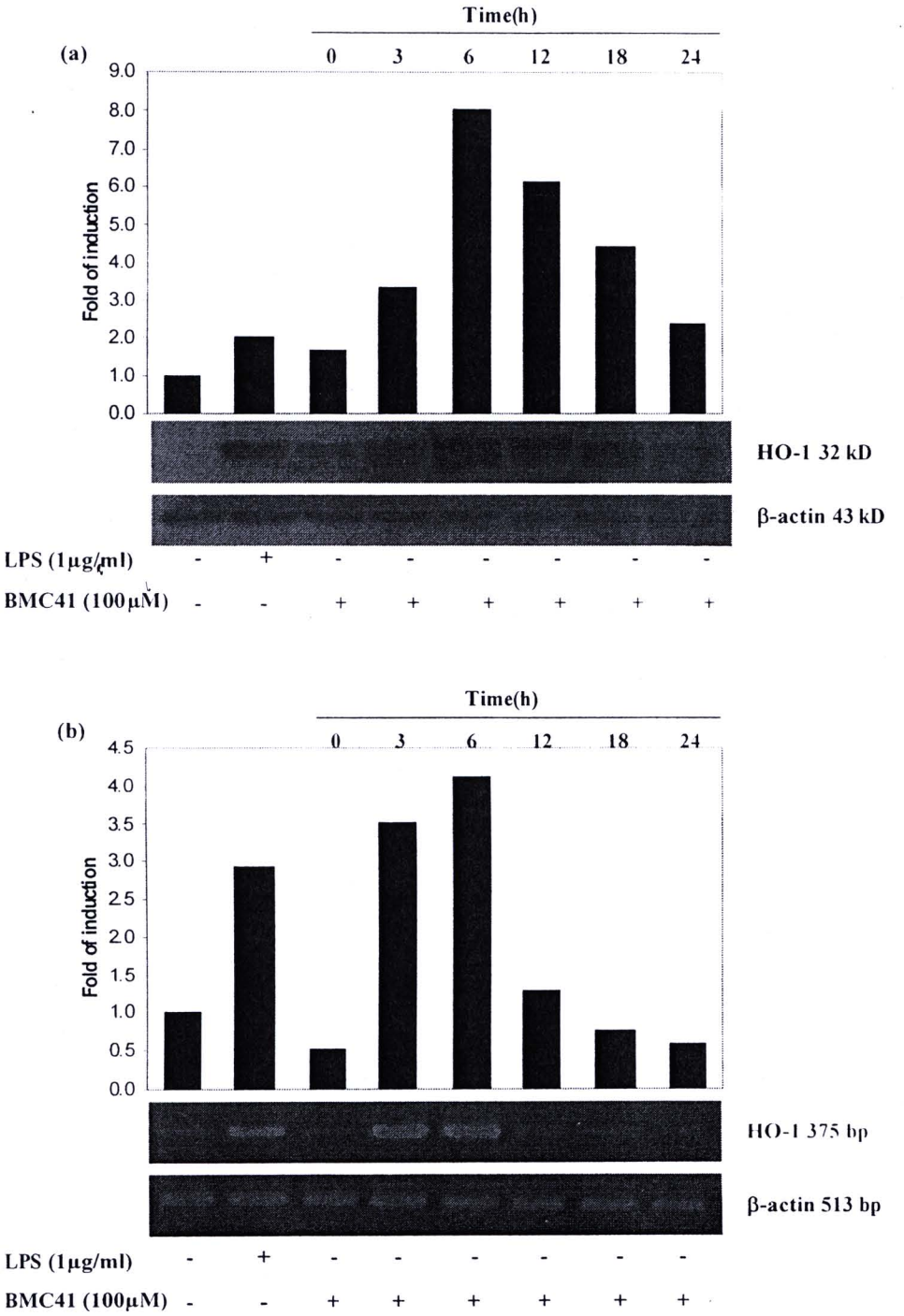
รูปที่ 4-4 ผลการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อปริมาณโปรตีน NF-KB p65 subunit ในนิวเคลียส โดยทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS และสารทดสอบที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย Western blot analysis



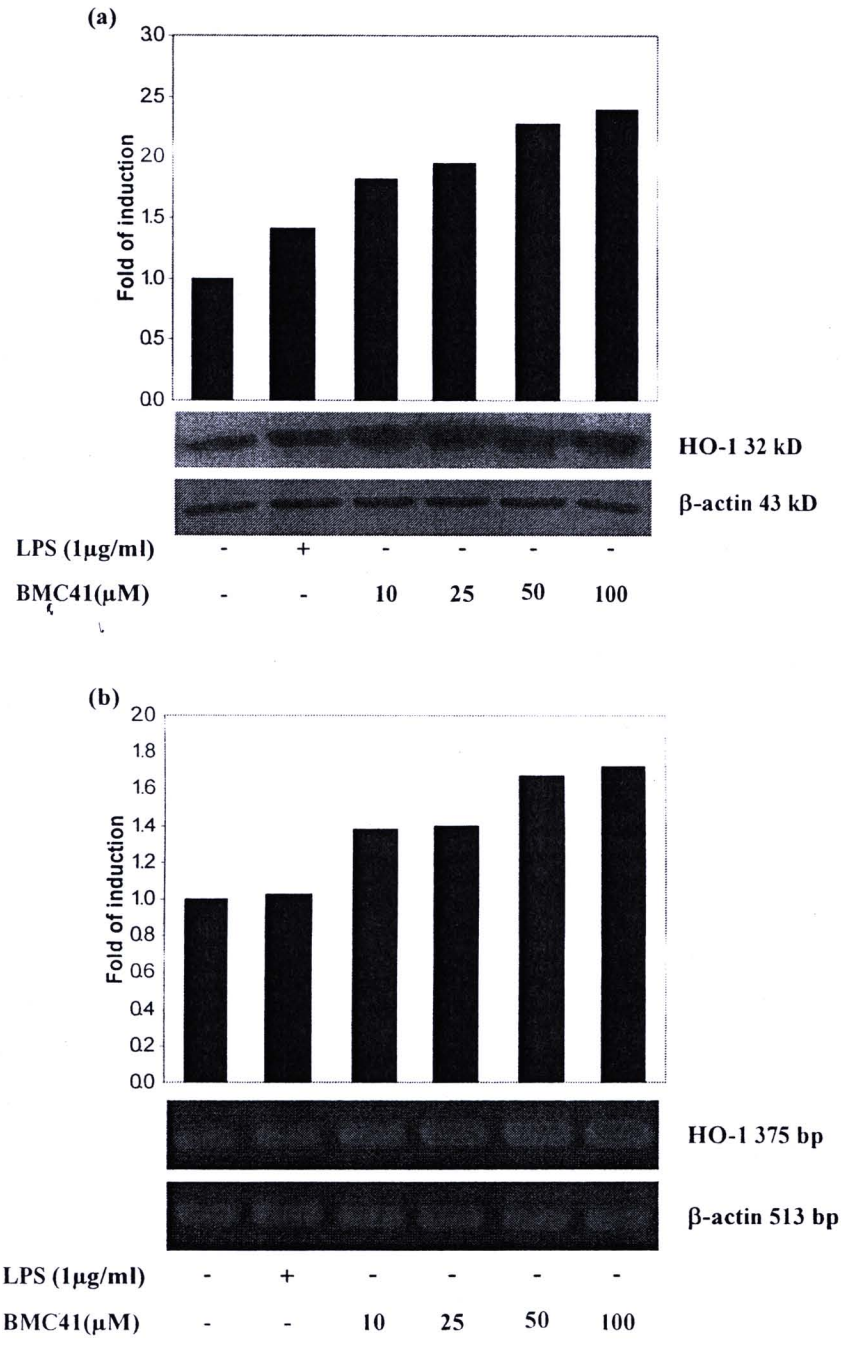
รูปที่ 4-5 ผลการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อ iNOS promoter activity โดยทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่ถูก transfection เซลล์ด้วย piNOS-luciferase reporter plasmid หรือ pGL3-Basic vector และ pRSV-β-galactosidase plasmid ก่อนให้เซลล์สัมผัสสัมผัสกับ LPS และสารทดสอบที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตามวิธีที่อธิบายในวิธีทำ $^{\#}P<0.01$ vs เซลล์ที่ถูก transfection เซลล์ด้วย pGL3-Basic vector แต่ไม่มี LPS $^{*}P<0.05$ vs เซลล์ที่ถูก transfection เซลล์ด้วย piNOS-luciferase reporter plasmid และLPS แต่ไม่มี BMC41

4.4 ผลของสาร BMC 41 ต่อการแสดงออกของยีน HO-1

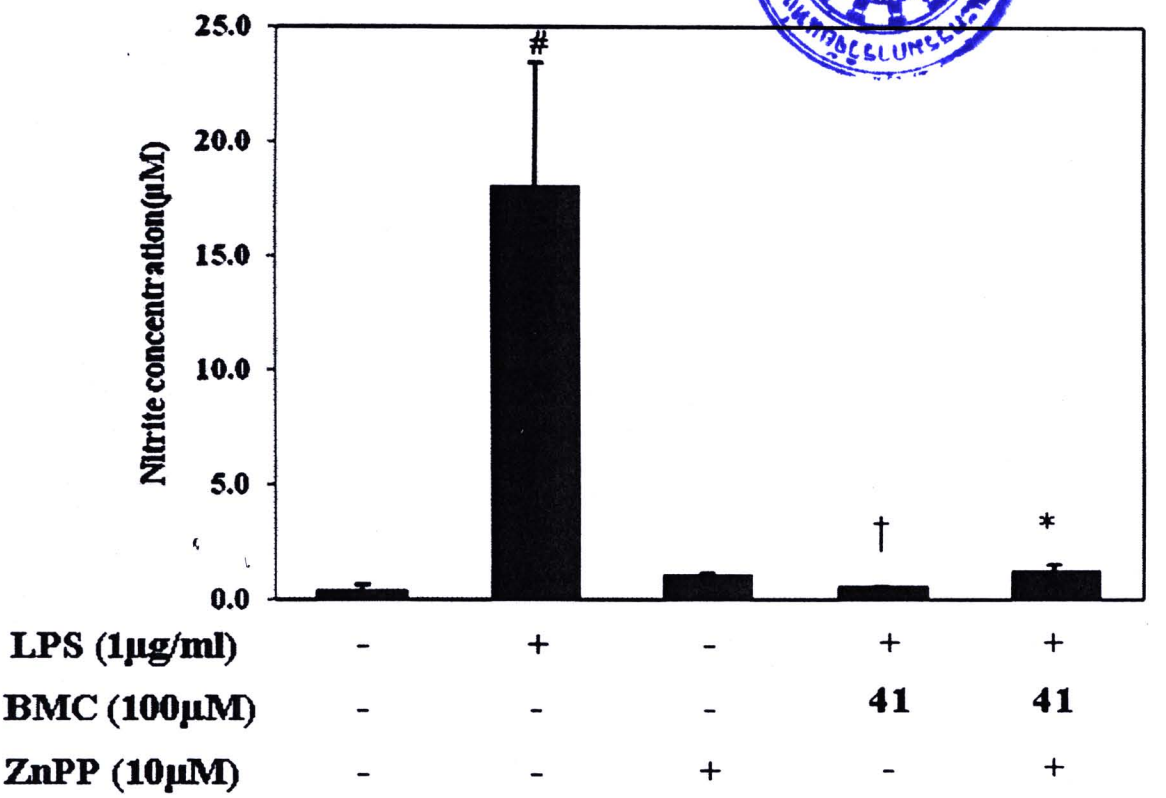
สาร BMC 41 เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ HO-1 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบและเวลาของการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ดังแสดงในรูปที่ 4-6 และรูปที่ 4-7 ขั้นต่อมาทำการตรวจสอบ iNOS activity.ในสภาวะที่มีสารยับยั้งการทำงานของ HO-1 (Zinc protoporphyrin IX, ZnPP) หรือสารที่สามารถจับกับคาร์บอนมอนอกไซด์ (hemoglobin) วิธีการในการทดสอบ iNOS activity คือวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์จะหลั่งไนตริกออกไซด์ออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และเกิดการออกซิเดชั่นเป็นไนไตรท์สะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าสาร BMC 41 สามารถลดการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4-8และรูปที่ 4-9)



รูปที่ 4-6 ผลการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อการแสดงออกของยีน HO-1 ที่ระดับ mRNA (a) และโปรตีน (b) ในระยะเวลาต่างๆ

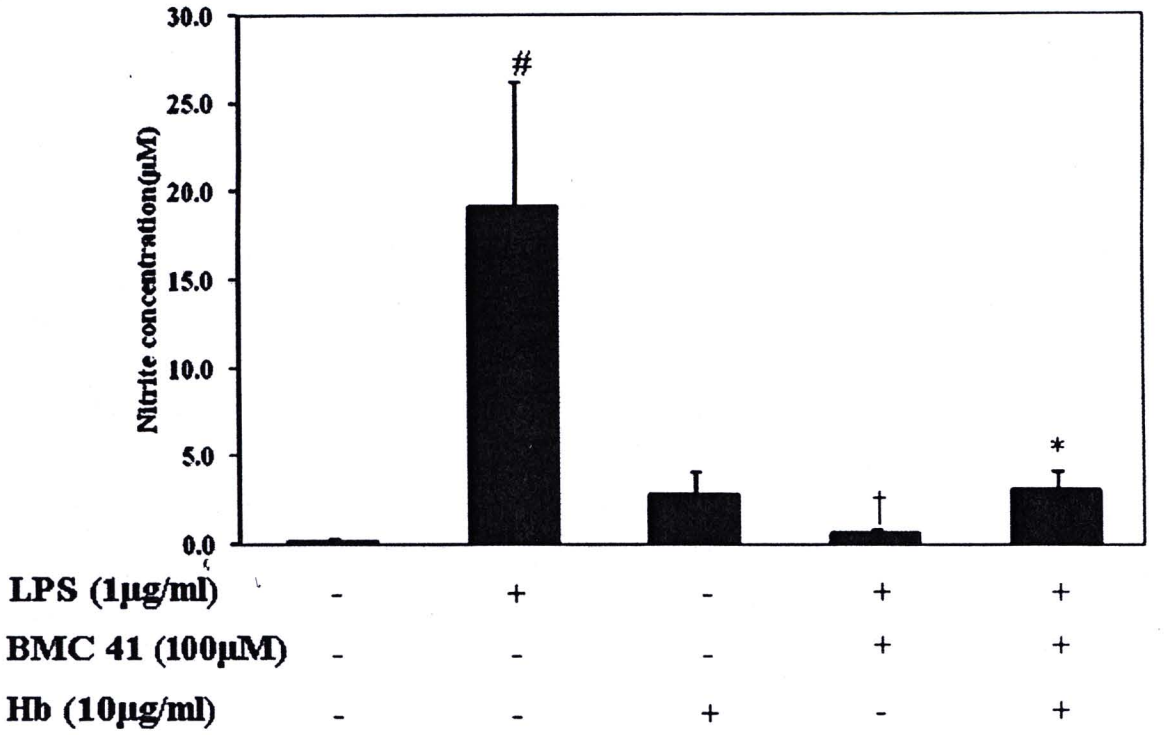


รูปที่ 4-7 ผลการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ BMC41 ต่อการแสดงออกของยีน HO-1 ที่ระดับ mRNA (a) และโปรตีน (b) โดยทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 บ่มกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 μM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และโปรตีน



รูปที่ 4-8 ผลของ ZnPP ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์สาร BMC 41 ต่อการ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 โดยบ่มสาร ZnPP เป็นเวลา6 ชั่วโมงก่อนให้เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100 μM และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์

$^{\#}P<0.01$ vs เซลล์ที่ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ $^{\dagger}P<0.05$ vs เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS $^{*}P<0.05$ vs เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS และ BMC41



รูปที่ 4-9 ผลของ hemoglobin (Hb) ต่อการลดการผลิตไนตริกออกไซด์สาร BMC 41 ต่อการ ทำการทดสอบในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 โดยบ่มสาร Hb เป็นเวลา6 ชั่วโมงก่อนให้เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100 μM และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนไตรท์ $^{\#}P<0.01$ vs เซลล์ที่ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ $^{\dagger}P<0.05$ vs เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS $^{*}P<0.05$ vs เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS และ BMC41