บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

แมคโครฝาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตมากเกินไปนี้จะส่งผลร้ายต่อร่างกาย และนำไปสู่การเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้น่าจะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ ในการวิจัยนี้ ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฝาจหนูสายพันธ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ให้ผลิตสารสื่อกลางการอักเสบรวมทั้งไนตริกออกไซด์ จึงเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในหลอดทดลอง จากการศึกษาพบว่าสาร BMC41 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ ferulic acid ที่สังเคราะห์ใหม่และมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยสารที่สังเคราะห์ใหม่จำนวน 43 ชนิด (Karnkla, 2008) โดยพบว่าสาร BMC41 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ซึ่งการลดการผลิตไนตริกออกไซด์นี้ไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 4-1) แต่เกิดจากสาร BMC41 ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้ในระดับโปรตีน และmRNA ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (รูปที่ 4-3) การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร BMC41 เกิดขึ้นโดยการยับยั้ง iNOS promoter activity และการลดการเคลื่อนที่ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส และโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก ของเอนไซม์ HO-1

เป็นที่ทราบกันดีว่า LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ NF-KB ทำให้เกิดการแสดงออกของ iNOS (Lowenstein และคณะ, 1993) ในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้นพบว่า NF-KB จะถูกจับโดย IKB และอยู่ในไซโทซอล หลังจากที่เซลล์สัมผัสกับสิ่งกระตุ้น เช่น LPS จะทำให้ IKB ถูกฟอสโฟรีเลชั่น ส่งผลให้ IKB ถูกสลายโดย 26S proteasome ดังนั้น NF-KB จึงเป็นอิสระและสามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ เมื่อเข้าสู่นิวเคลียส NF-KB จะไปจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนสำหรับโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ รวมทั้ง iNOS และเกิดการแสดงออกของยีนเหล่านั้น (Baeuerle และ Baltimore, 1996; Nishikori, 2005) ดังนั้นเพื่อศึกษากลไกการลดการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการ transfection เซลล์ด้วย piNOS-luciferase reporter plasmid ซึ่งบรรจุชิ้นส่วนดีเอ็นเอ iNOS promoter เชื่อมต่อกับยีนสำหรับเอนไซม์ luciferase ดังนั้น luciferase activity จึงเป็นดัชนีบ่งบอกกิจกรรมของ iNOS promoter ผลการทดลองในรูปที่ 4-5 พบว่า LPS สามารถกระตุ้นกิจกรรมของ iNOS promoter แต่สาร BMC41 ยับยั้งกิจกรรมของ iNOS promoter ดังนั้นการที่สาร BMC41 ยับยั้งกิจกรรมของ iNOS promoter นี้อาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการจับของ transcription factor ชนิดต่างๆ กับบริเวณโปรโมเตอร์ของ iNOS หรืออาจเกิดจากมี transcription factor เข้ามาในนิวเคลียสน้อยลง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการยืนยันผลโดยการทดสอบปริมาณ NF-KB p65 subunit ในโปรตีนจากนิวเคลียส

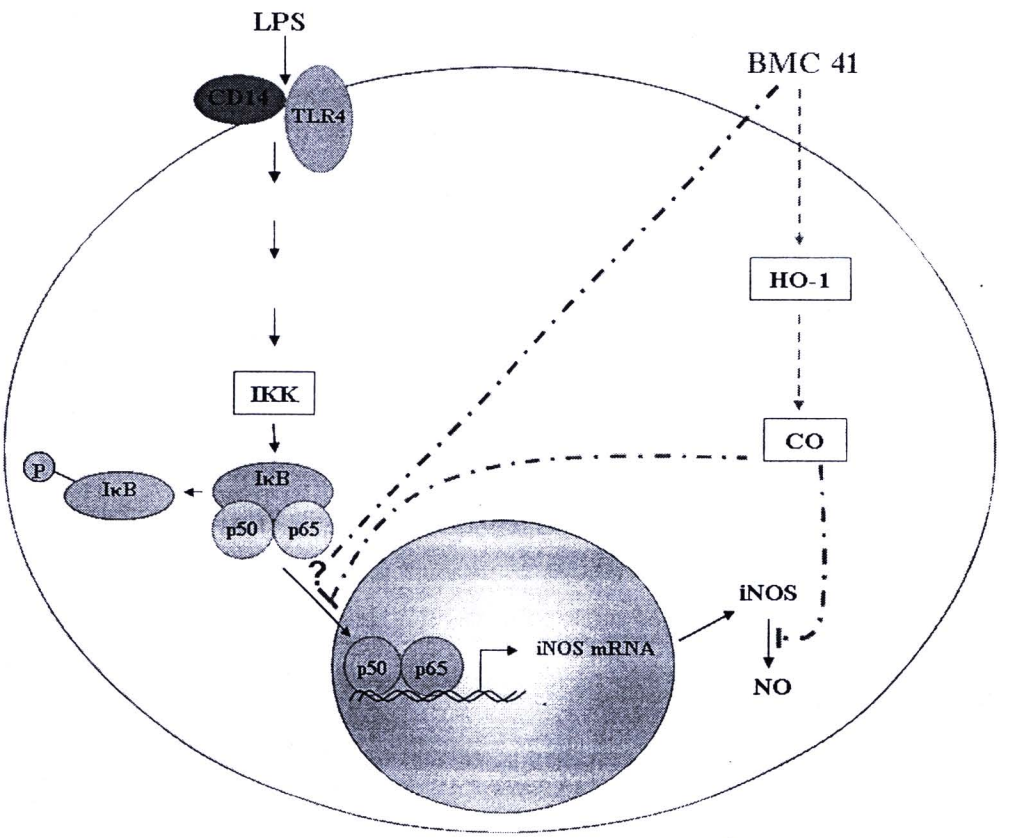
เนื่องจาก NF-KB เป็น transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และรูปของ NF-KB ที่พบมักจะอยู่ในรูป heterodimer ของ p65 กับ p50 จากผลการทดลองในรูปที่ 4-4 พบว่าโปรตีน NF-KB p65 subunit จากนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีปริมาณสูง แต่เมื่อเซลล์ได้รับสาร BMC 41 จะทำให้ปริมาณโปรตีน NF-KB p65 subunitในนิวเคลียสมีปริมาณลดลงในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น สาเหตุที่ทำให้ปริมาณ NF-KB p65 subunit ในนิวเคลียสน้อยลงน่าจะเป็นผลมาจากการที่ NF-KB ถูกกระตุ้นน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอน upstream ที่แท้จริงในวิถี NF-KB ที่สาร BMC 41 มีผลยังไม่ทราบแน่ชัด จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่ากลไกหนึ่งที่สาร BMC 41 สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ คือลดการกระตุ้น NF-KB และทำให้กิจกรรมของ iNOS promoter ลดลงจึงเกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS ลดลงเป็นผลให้ปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS ลดลงตามลำดับ และส่งผลให้มีการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์น้อยลง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าสารสังเคราะห์หลายชนิดที่มีผลลดปริมาณไนตริกออกไซด์เกิดผ่านการลดการกระตุ้นวิถี NF-KB (Tsao และคณะ, 2002; Kim และคณะ, 2004; Shin และคณะ, 2005; Kim และคณะ, 2007) แต่อย่างไรก็ตามกลไกที่สาร BMC 41 ลดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้นี้มีความแตกต่างจากที่ Seo และ คณะ (2005, 2008) รายงานถึงอนุพันธ์ NAMDA สังเคราะห์สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ โดยผ่านกลไกการลดการสังเคราะห์ BH_4 ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ iNOS

เอนไซม์ HO-1 ถูกจัดเป็นเอนไซม์ที่ช่วยต้านการออกซิเดชัน และต้านการอักเสบ (Sarady-Andrews และคณะ, 2005) มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของ HO-1 และผลผลิตของปฏิกิริยาของ HO-1 มีส่วนร่วมในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยการเพิ่มกิจกรรมของ HO-1 ทำให้ปริมาณกลุ่มฮีม ลดลง ส่งผลให้โปรตีน iNOS ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ขาดกลุ่มฮีมที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ (Xie และคณะ, 1996) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าบิลิรูบินสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และในหนูที่มีระดับบิลิรูบินในเลือดสูง (hyperbilirubinemia rats) และหนูที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด (endotoxemic rats) (Wang และคณะ, 2004; Lanone และคณะ, 2005) ส่วน CO ซึ่งเป็นผลผลิตอีกตัวหนึ่งของเอนไซม์ HO-1 สามารถจับกับกลุ่มฮีมของเอนไซม์ iNOS ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน arginine เป็น citrulline และไนตริกออกไซด์ จึงยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ และลดการอักเสบได้ในสัตว์ทดลอง (Srisook และคณะ, 2006; Lanone และคณะ, 2005; Ashino และคณะ, 2008) นอกจากนี้ CO สามารถลดการกระตุ้น NF-KB และการจับกับดีเอ็นเอของ NF-KB ในเซลล์แมคโครฟาจ (Sarady และคณะ, 2002) จึงส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน iNOS น้อยลง

คณะผู้วิจัยยังพบว่าสาร BMC 41 สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน HO-1 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน (รูปที่ 4-6 และ4-7) ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าการกระตุ้น HO-1 ของสาร BMC 41 เกี่ยวข้อง

กับการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ จึงให้เซลล์สัมผัสกับ ZnPP ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ HO-1 พบว่าเมื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ HO-1 ทำให้การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์น้อยลง เมื่อเทียบกับสภาวะที่เซลล์สัมผัสสาร BMC 41 และ LPS (รูปที่ 4-8) เมื่อให้ฮีโมโกลบินซึ่งเป็นสารที่สามารถจับกับคาร์บอนมอนอกไซด์ ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ ZnPP

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสาร BMC41 สามารถลดปริมาณโปรตีน และ mRNA ของ iNOS และการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยการยับยั้ง iNOS promoter activity และการลดการเคลื่อนที่ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส และสาร BMC41 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน และmRNA ของ HO-1 ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ากลไกหนึ่งที่สาร BMC 41 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS คือผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 โดยรูปที่ 5-1 แสดงกลไกที่เป็นไปได้ที่สาร BMC 41 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS



รูปที่ 5-1 แสดงกลไกที่เป็นไปได้ที่สาร BMC 41 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS