

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

แมคโครฟาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตมากเกินไปนี้จะส่งผลร้ายต่อร่างกาย และนำไปสู่การเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้จะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ ในการวิจัยนี้ ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ให้ผลิตสารสื่อกลางการอักเสบรวมทั้งไนตริกออกไซด์ จึงเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในหลอดทดลองจากการศึกษาพบว่าสาร BMC41 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ ferulic acid ที่สังเคราะห์ใหม่และมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยสารที่สังเคราะห์ใหม่จำนวน 43 ชนิด (Karnkla, 2008) โดยพบว่าสาร BMC41 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ซึ่งการลดการผลิตไนตริกออกไซด์นี้ไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 4-1) แต่เกิดจากสาร BMC41 ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้ในระดับโปรตีน และ mRNA 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 ถูกฟอสโฟรีเลชัน ส่งผลให้ IKB ถูกสลายโดย 26S proteasome ดังนั้น NF-KB จึงเป็นอิสระและสามารถเคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสได้ เมื่อเข้าสู่ นิวเคลียส NF-KB จะไปจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนสำหรับโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ รวมทั้ง iNOS และเกิดการแสดงออกของยีนเหล่านั้น (Baeuerle และ Baltimore, 1996; Nishikori, 2005) ดังนั้นเพื่อศึกษากลไกการลดการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการ transfection เซลล์ด้วย piNOS-luciferase reporter plasmid ซึ่งบรรจุชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ iNOS promoter เชื่อมต่อกับยีนสำหรับเอนไซม์ luciferase ดังนั้น luciferase activity จึงเป็นดัชนี บ่งบอกกิจกรรมของ iNOS promoter ผลการทดลองในรูปที่ 4-5 พบว่า LPS สามารถกระตุ้นกิจกรรมของ iNOS promoter แต่สาร BMC41 ยับยั้งกิจกรรมของ iNOS promoter ดังนั้นการที่สาร BMC41 ยับยั้ง กิจกรรมของ iNOS promoter นี้ อาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการจับของ transcription factor ชนิดต่างๆ กับ บริเวณโปรโมเตอร์ของ iNOS หรืออาจเกิดจากมี transcription factor เข้ามาในนิวเคลียสน้อยลง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงทำการยืนยันผลโดยการทดสอบปริมาณ NF-KB p65 subunit ในโปรตีนจากนิวเคลียส

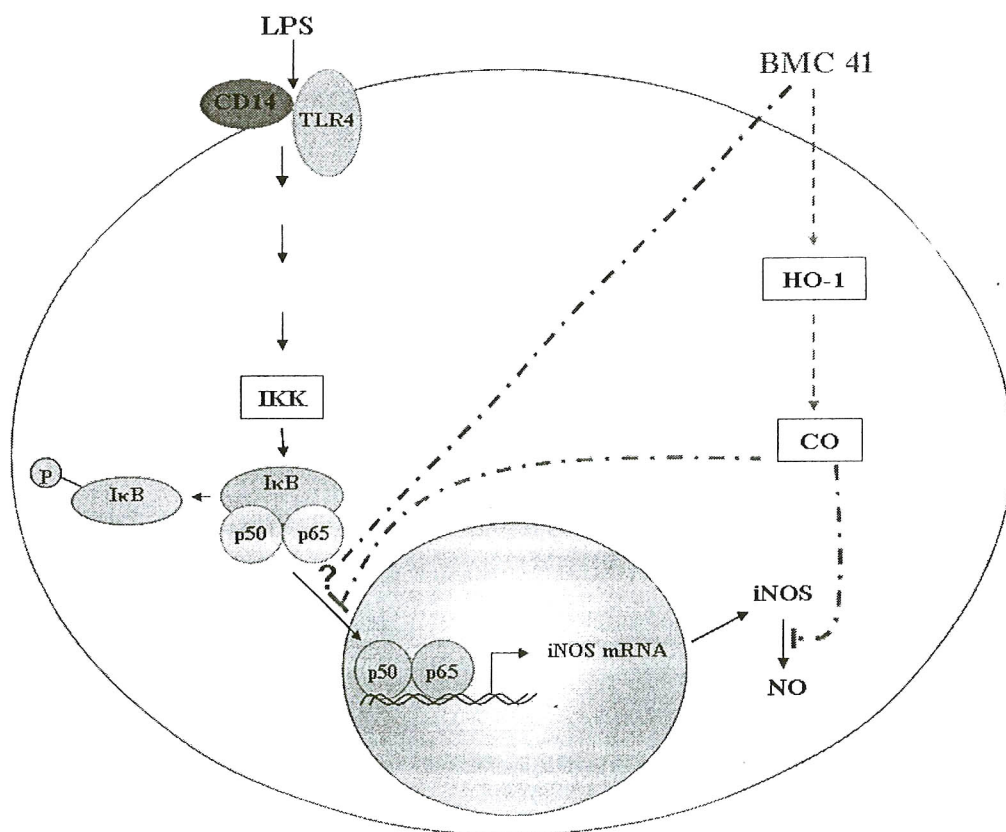
เนื่องจาก NF-KB เป็น transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และรูปของ NF-KB ที่พบมักจะอยู่ในรูป heterodimer ของ p65 กับ p50 จากผลการทดลองในรูปที่ 4-4 พบว่าโปรตีน NF-KB p65 subunit จากนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีปริมาณสูง แต่เมื่อเซลล์ได้รับสาร BMC 41 จะทำให้ปริมาณโปรตีน NF-KB p65 subunit ในนิวเคลียสมีปริมาณลดลงในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น สาเหตุที่ทำให้ปริมาณ NF-KB p65 subunit ในนิวเคลียสน้อยลงน่าจะเป็นผลมาจากการที่ NF-KB ถูกกระตุ้นน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอน upstream ที่แท้จริงในวิถี NF-KB ที่สาร BMC 41 มีผลยังไม่ทราบแน่ชัด จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่ากลไกหนึ่ง ที่สาร 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 BH₄ ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ iNOS

เอนไซม์ HO-1 ถูกจัดเป็นเอนไซม์ที่ช่วยด้านการออกซิเดชัน และด้านการอักเสบ (Sarady-Andrews และคณะ, 2005) มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของ HO-1 และผลผลิตของปฏิกิริยาของ HO-1 มีส่วนร่วมในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยการเพิ่มกิจกรรมของ HO-1 ทำให้ปริมาณกลุ่มฮีม ลดลง ส่งผลให้โปรตีน iNOS ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ขาดกลุ่มฮีมที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (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 และ โปรตีน (รูปที่ 4-6 และ 4-7) ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าการกระตุ้น HO-1 ของสาร BMC 41 เกี่ยวข้อง

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

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสาร BMC41 สามารถลดปริมาณโปรตีน และ mRNA ของ iNOS และการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยการยับยั้ง iNOS promoter activity และการลดการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส และสาร BMC41 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน และ mRNA 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