

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กลไกของคริบานีนต่อกระบวนการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในเซลล์แมคโครฟาจ	
ผู้เขียน	นางสาว พิษานันท์ อินตาขวง	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ดร.ศุภชัย ยอดคศิริ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

คริบานีนคือสารอะพอร์ฟีนอัลคาลอยด์ (aporphine alkaloid) ที่สกัดได้จากต้นสบู่เลือดหรือบอระเพ็ด พุงช้าง (*Stephania venosa*) คริบานีนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ในการต้านการเต้นของหัวใจผิดปกติ หงุดหงิด และฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านจุลชีพ เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า คริบานีนส่งผลต่อการลดการแบ่งตัวและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของนิวเคลียร์แฟกเตอร์-แคปปาบี (NF- κ B) ที่ถูกกระตุ้นด้วยทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- α) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบของคริบานีน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบของคริบานีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ

คริบานีนแสดงค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 20 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 15 μ g/mL ในเวลา 24 ชั่วโมง การศึกษาผลของคริบานีนต่อการสังเคราะห์ไซโตไคน์และสารสื่อกลางที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบพบว่า คริบานีนมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์อินเตอร์ลิวคิน 6 (IL-6) และ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS นอกจากนี้คริบานีนยังลดการแสดงออกของเอนไซม์อินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (iNOS) และไซโคลออกซีจีเนสสอง (COX-2) จึงส่งผลต่อการลดการสังเคราะห์สารไนตริกออกไซด์ (NO) และพรอสตาแกลนดินสอง (PGE₂) ตามลำดับ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบของคริบานีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบด้วย LPS ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคร

ฟาจ โดยทำการศึกษาผลของครีบาโนต่อระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ด้วยวิธีไมโทเจนแอกติเวเตดโปรตีนไคเนส (MAPKs) และ PI3-K/Akt ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่าครีบาโนมีผลลดการทำงานของโปรตีนเจเอ็นเค (JNK) อีอาร์เค1/2 (ERK1/2) พีสามสิบแปดแมฟไคเนส (p38 MAPK) และโปรตีนเอเคที (Akt) ซึ่งน่าจะส่งผลต่อการยับยั้งกระบวนการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยผลการศึกษาถูกยืนยันอีกครั้งด้วยการใช้ตัวยับยั้งที่จำเพาะของโปรตีน JNK ERK1/2 p38 MAPK และ Akt พบว่าตัวยับยั้งที่จำเพาะของโปรตีนในวิถี MAPKs และ PI3-K/Akt สามารถควบคุมการยับยั้งการสังเคราะห์ IL-6 และ NO จากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS นอกจากนี้ครีบาโนสามารถยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยการขัดขวางปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตของ p65 ที่ตำแหน่งเซอริน536 แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ p65 เข้าสู่นิวเคลียสและการสลายตัวยับยั้งแฟกเตอร์แคปปาบี-แอลฟา (IKB- α) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ตัวยับยั้งที่จำเพาะของโปรตีนในวิถี MAPKs และ PI3-K/Akt พบว่าสามารถขัดขวางปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตของ p65 ที่ตำแหน่งเซอริน536 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า LPS เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตของ p65 ที่ตำแหน่งเซอริน536 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจผ่านระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ด้วยวิถี JNK ERK1/2 p38 MAPK และ Akt นอกจากนี้ครีบาโนยังสามารถยับยั้งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตและการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของแอกติเวเตอร์โปรตีน 1 (AP-1) ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ได้อีกด้วย

ซึ่งสรุปได้ว่าฤทธิ์ด้านกระบวนการอักเสบของครีบาโนน่าจะเป็นผลมาจากการยับยั้งการสังเคราะห์ไซโตไคน์ได้แก่ IL-6 และ TNF- α และสารตัวกลางที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบได้แก่ COX-2 iNOS PGE₂ และ NO ตามการลดลงของระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์วิถี MAPKs และ PI3-K/Akt ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ด้านกระบวนการอักเสบของครีบาโนในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจนี้มีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับการขัดขวางการทำงานของ NF- κ B และ AP-1 โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของโปรตีนในระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ด้วยวิถี MAPKs และ PI3-K/Akt ดังนั้นครีบาโนจึงน่าจะเป็นสารที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาวิธีการป้องกัน และ/หรือการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแต่อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงความปลอดภัยและเภสัชจลนศาสตร์ของครีบาโนในสัตว์ทดลองและงานวิจัยเชิงคลินิกยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

Thesis Title	Mechanisms of Crebanine on Lipopolysaccharide-induced Inflammation Process in Macrophage Cells	
Author	Miss Pichanan Intayoung	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Advisory Committee	Dr. Supachai Yodkeeree	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul	Co-advisor

ABSTRACT

Crebanine is an aporphine alkaloid that has been isolated from the tube of *Stephania venosa*. Crebanine presents a various pharmacological activities including anti-arrhythmia, anti-cancer and anti-microbial. Previous studies found that crebanine reduced TNF- α -induced lung cancer cells proliferation and invasion via inhibiting NF- κ B activation. However, the anti-inflammatory properties of crebanine have not been reported yet. Therefore, this study purposed to determine the anti-inflammatory activity and molecular mechanism of crebanine on LPS-induced inflammation process in RAW 264.7 macrophages.

Crebanine exhibited inhibitory concentration of growth by 20% (IC₂₀) at 15 μ g/mL, in a 24 h-treatment. The effect of crebanine on LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators and cytokines were examined and found that crebanine significantly inhibited the level of IL-6 and TNF- α released in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Moreover, crebanine decreased the expression of iNOS and COX-2 which subsequently reduced the production of NO and PGE₂. To investigate the underlying anti-inflammatory mechanisms of crebanine in LPS-induced RAW 264.7 macrophages, the effects of crebanine on LPS-induced MAPKs and PI3-K/Akt signaling pathway were examined. It was found that crebanine dramatically attenuated JNK, ERK1/2, p38 MAPK and Akt activations which might lead to the inhibition of LPS-induced inflammation. These effects were further confirmed using specific inhibitor of JNK, ERK1/2, p38 MAPK and Akt and found that the specific inhibitor of MAPKs and PI3-K/Akt could mediate the

suppression of IL-6 and NO productions from the LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Furthermore, crebanine inhibited LPS-induced NF- κ B activation by suppressing the phosphorylation of p65 at serine536 but not the p65 translocation to the nucleus and inhibitory factor kappa B alpha (I κ B- α) degradation. Accordingly, the specific inhibitors of MAPKs and PI3-K/Akt could block LPS-induced phosphorylation of p65 at serine536. This finding demonstrated that LPS-induced phosphorylation of p65 on serine536 in RAW 264.7 cells via ERK1/2, JNK, p38 MAPK and Akt signaling pathways. In addition, crebanine also suppressed phosphorylation and nucleus translocation of AP-1 transcription factor.

In conclusion, the anti-inflammatory activity of crebanine may stem from the inhibition of pro-inflammatory cytokines production including IL-6, TNF- α and inflammatory mediators production including COX-2, iNOS, PGE₂ and NO according to the reduction of MAPKs and PI3-K/Akt signaling pathways. Taken together, the anti-inflammatory mechanism of crebanine on LPS-induced inflammation process in RAW 264.7 macrophages is closely associated with the suppression of NF- κ B and AP-1 activations through the blockade of downstream signaling molecules in MAPKs and PI3-K/Akt signaling pathways. Therefore crebanine might be a candidate agent for the development of prevention and/or treatment of inflammation-associated diseases. However, the safety and pharmacokinetic studies of crebanine in animal and clinical models would be needed to be further investigated.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved