

Effects of 7-Octenoic acid and 1-Phenyl-2-pentanol from *Moringa oleifera* Lam. Leaves Extract on the Hepatic Stellate Cells in an *In Vitro* Model of Liver Fibrosis

Jutathip Chaiprathed¹, Thanutchaporn Chantamai¹, Thamonwan Chujorhor¹,
Kanchana Usuwanthim¹ and Watunyoo Buakaew^{2*}

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University,
Phitsanulok Province, Thailand

²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

Abstract

Liver fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins in the liver. Common causes include fatty liver disease and hepatitis C virus infection. Delayed or inaccurate diagnosis of liver fibrosis may elevate the risk of developing cirrhosis and liver cancer. Currently, there are no definitive pharmacological therapies for the treatment of liver fibrosis. Several studies have shown the anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* Lam. (MO) leaf extracts. In this study, we aimed to investigate the anti-fibrotic effect of two bioactive compounds identified in MO leaf crude extracts: 7-octenoic acid and 1-phenyl-2-pentanol. Hepatic stellate cells (HSCs) were treated with the active compounds, and cytokine levels were measured by using sandwich ELISA. In addition, protein expression in HSCs was analyzed by using proteomic technique. Proteomic analysis showed that 440 and 98 proteins were significantly upregulated and downregulated, respectively, in the 7-octenoic acid and 1-phenyl-2-pentanol-treated cells ($p < 0.05$). Additionally, there were decreases in expression of casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*), guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*), and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*), which are proteins related to the NF- κ B, PI3K/Akt, and mTOR signaling pathways. TNF- α secretion was also suppressed by treatments with 7-octenoic acid and 1-phenyl-2-pentanol. In conclusion, these active compounds showed potent inhibitory activity on TGF- β 1-induced HSCs and are promising candidates for anti-hepatic fibrosis drug research.

Keywords: Liver fibrosis, *Moringa oleifera* Lam., 7-Octenoic acid, 1-Phenyl-2-pentanol

*Corresponding author E-mail address: watunyoo@g.swu.ac.th

Received: 5 February 2024

Revised: 3 June 2024

Accepted: 16 July 2024

ผลของสารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol จากไบเมอรุม ต่อเซลล์ตับชนิด hepatic stellate cells ในโมเดล การเกิดพังผืดในตับในหลอดทดลอง

จุฑาทิพย์ ไชยประเทศ¹ ธนัษพร จันตาใหม่¹ ธมนวรรณ ชูจอหอ¹ กาญจนา อุสุวรรณทิม¹
และ วรัญญู บัวแก้ว^{2*}

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ภาวะพังผืดในตับ (liver fibrosis) คือภาวะที่มีการสะสมของ extracellular matrix protein ในตับที่มากเกินไป ซึ่งสาเหตุที่พบบ่อย ได้แก่ ภาวะไขมันพอกตับและโรคไวรัสตับอักเสบซี หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง จะทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะตับแข็งและมะเร็งตับ ปัจจุบันภาวะพังผืดในตับยังไม่มียารักษาที่เป็นมาตรฐาน มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากมะรุมนี้ออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในตับได้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการต้านการเกิดพังผืดในตับของสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากไบเมอรุม 2 ชนิด ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ในเซลล์ตับชนิด hepatic stellate cells (HSCs) โดยวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich ELISA และวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ HSCs ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ HSCs ที่ได้รับ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นและลดลงจำนวน 440 และ 98 ชนิด ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งพบการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*), guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*) และ low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ NF-KB pathway, PI3K/Akt signaling pathway และ mTOR signaling pathway นอกจากนี้ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ยังสามารถลดการหลั่งของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยผลการศึกษาพบว่า สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติลดการกระตุ้นสัญญาณ TGF- β 1 ต่อเซลล์ตับชนิด HSCs ได้ ซึ่งมีความน่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นยาต้านการเกิดพังผืดในตับในอนาคต

คำสำคัญ: พังผืดในตับ มะรุมน กรดออกทานอิก 1-ฟีนิล-2-เพนทานอล

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: watunyoo@g.swu.ac.th

รับบทความ: 5 กุมภาพันธ์ 2567

แก้ไขบทความ: 3 มิถุนายน 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 16 กรกฎาคม 2567

บทนำ

ภาวะพังผืดในตับ (liver fibrosis) เป็นกระบวนการทางพยาธิวิทยาที่มีการสะสมของ extracellular matrix (ECM) protein เช่น คอลลาเจน ที่มากเกินไปในตับ กระบวนการนี้เกิดขึ้นระหว่างการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือการเกิดการอักเสบของตับ การสะสมของ ECM นี้ทำให้โครงสร้างของตับมีการเปลี่ยนแปลงจนนำไปสู่การเกิดความผิดปกติต่อการทำงานของตับและเพิ่มความต้านทานภายในตับ (intrahepatic resistance) ส่งผลให้เกิดหลอดเลือดไปที่ตับไม่เพียงพอและยังทำให้ความดันหลอดเลือดพอร์ทัลตับสูงขึ้น (portal hypertension)^(1, 2)

หากภาวะพังผืดในตับไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่ถูกต้อง จะทำให้เพิ่มโอกาสในการพัฒนาไปเป็นโรคตับแข็ง ปัจจุบันพบประชากรที่มีภาวะพังผืดในตับมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น โดยพบภาวะพังผืดในตับในชาวเอเชียร้อยละ 15 ของประชากร และพบมากขึ้นในผู้ป่วยกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases, NCDs) ได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะพังผืดในตับ ได้แก่ ภาวะไขมันพอกตับ (ร้อยละ 66) ภาวะไขมันพอกตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 13) ภาวะไขมันพอกตับที่เกิดจากแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 9) โรคไวรัสตับอักเสบบี (ร้อยละ 6) และสาเหตุอื่น ๆ (ร้อยละ 6) ($p < 0.003$)^(3, 4)

กลไกการเกิดภาวะพังผืดในตับเริ่มจากขนาดเจ็บของตับเรื้อรังไปสู่การพัฒนาเป็นภาวะพังผืดในตับ โดยเซลล์ตับที่ได้รับบาดเจ็บจะมีการตายแบบ apoptosis ส่วนแมคโครฟาจและ Kupffer cell จะถูกกระตุ้นให้หลั่งสาร chemokine และไซโตไคน์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6),

transforming growth factor-beta (TGF- β) โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จะสร้าง TGF- β 1 ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดวิถีสัญญาณภายในเซลล์แบบ canonical และ non-canonical และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น เกิดการสะสมของโปรตีนและเกิดการอักเสบ การอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องส่งผลให้มีการกระตุ้นเซลล์ตับ ชนิด hepatic stellate cells (HSCs) ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblast) ซึ่งจะผลิต ECM ออกมาจนเกิดการสะสมในตับในปริมาณสูงและนำไปสู่การเกิดพังผืดในตับได้ ดังนั้นการลดกระบวนการกระตุ้นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จะทำให้การสะสมของ ECM ลดลงและตับสามารถกลับคืนสู่สภาวะปกติได้⁽⁵⁻⁷⁾

ในปัจจุบัน การรักษาภาวะพังผืดในตับมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งสาเหตุที่ก่อให้เกิดการอักเสบของตับ เช่น การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยยาต้านไวรัส การลดน้ำหนัก และการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ในผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันพอกตับ นอกจากนี้ยังมีการใช้ยา pentoxifylline เพื่อยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ตับ แต่ยังไม่มีความชัดเจนในการรักษาที่เป็นมาตรฐานในการต้านพังผืดในตับโดยตรง อีกทั้งยังมีการรักษาทางเลือกที่มีการใช้แพร่หลายในผู้ป่วยโรคตับเรื้อรัง รวมถึง การใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพร วิตามิน หรืออาหารเสริมอื่น ๆ⁽⁸⁾

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) อยู่ในวงศ์ของ Moringaceae ซึ่งเป็นไม้ยืนต้น ความสูงประมาณ 3-6 เมตร เปลือกของต้นมะรุมจะมีสีขาว รูปทรงของใบมะรุมเป็นใบรูปไข่ มีการจัดเรียงตัวสลับแบบขนนก 2-3 ชั้น โดยจะมีความยาวประมาณ 20-60 เซนติเมตร ส่วนใบอ่อนของมะรุมจะมีขนสีเทาลักษณะเด่นของช่อดอกมะรุม จะมีรูปร่างเป็นแบบช่อแยกแขนง มีกลีบดอก 5 กลีบ บริเวณฐานด้านนอก ยาวประมาณ 1.4-1.9 เซนติเมตร มีสีขาวอมเหลืองแต่มีสีแดง

ลักษณะปลายกลีบดอกจะกว้างกว่าตรงโคนดอก ภายใน เกสรตัวผู้ของดอกมะรุุมจะมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่แยก จากกันโดยสมบูรณ์ 5 อัน และชนิดที่แยกจากกันแบบ ไม่สมบูรณ์ 5 อัน โดยผลมะรุุมจะมีลักษณะเป็นฝัก ตามเหลี่ยม ภายในผลมีเมล็ด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 1 เซนติเมตร⁽⁹⁾ มีคุณค่าทางเภสัชกรรมสูง โดยเฉพาะใบที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด ซึ่งอุดม ด้วยวิตามินซี วิตามินเอ โฟแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก และโปรตีน อีกทั้งยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น carotenoid, alkaloid และ flavonoid ที่มี คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ลดความดันโลหิต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และต้านมะเร็ง⁽¹⁰⁾

ผลงานวิจัยของ Wisitpongpun และคณะ ในปี 2020 ซึ่งทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของ สารสกัดหยาบจากใบมะรุุมและสารออกฤทธิ์ 2 ชนิดที่ แยกได้จากสารสกัดหยาบใบมะรุุม ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol พบว่าทั้งสารสกัด หยาบและสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถกระตุ้น กระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MDA-MB 231 ได้ในหลอดทดลอง⁽¹¹⁾ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมของสาร ออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol และยังไม่มีการศึกษาการต้านพังผืดในตับของใบมะรุุม รวมถึงสารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ในหลอดทดลองโดยใช้ เซลล์ HSCs ชนิด LX-2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์การต้านพังผืด ในตับและกลไกการออกฤทธิ์ของสาร 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol จากใบมะรุุม เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปศึกษาวิจัย เพิ่มเติมเพื่อค้นหาสารต้านการเกิดพังผืดในตับ ในอนาคตต่อไป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และ กลไกการต้านพังผืดในตับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด ที่แยกได้จากใบมะรุุม ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ในเซลล์ตับ HSCs ที่ถูก กระตุ้นด้วย TGF- β 1 ในหลอดทดลอง โดยอาศัย การวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF- α ด้วยเทคนิค sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง ของโปรตีนภายในเซลล์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

วัสดุและวิธีการ

1. สารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol

สาร 7-octenoic acid (Cat. No. 715751-1G) และ 1-phenyl-2-pentanol (Cat. No. R425753-250MG) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการสั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) โดยมีร้อยละ ความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์อยู่ที่ร้อยละ 97 และ 99 ตามลำดับ ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดถูกเตรียมให้อยู่ใน ความเข้มข้นสูงสุด 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัว ทำละลายชนิด dimethyl sulfoxide (DMSO) ผสมกับ polysorbate 80 (Tween 80) ในอัตราส่วน 1:1 โดยที่ร้อยละของตัวทำละลายคงเหลือในสาร ออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสูงสุด ที่ใช้ในการทดสอบกับเซลล์ จะมีค่าไม่เกินร้อยละ 1

2. การเลี้ยงเซลล์ hepatic stellate cells (HSCs) ชนิด LX-2

นำเซลล์ไลน์ชนิด LX-2 ซึ่งเป็นเซลล์ HSCs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อตับของมนุษย์ (Merck Millipore, USA) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Dulbecco's modified eagle medium

(D-MEM) (Gibco life technologies, USA) ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum (FBS) (Biocrom GmbH, Germany) ร้อยละ 2 และ antibiotic-antimycotic (Gibco life technologies, USA) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ CO₂ ร้อยละ 5 โดยงานวิจัยนี้ ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (COA No. 422/2022)

3. การทดสอบความเป็นพิษของสาร 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ต่อเซลล์ LX-2

เป็นการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์จากใบมะรุมต่อเซลล์ LX-2 โดยคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ (Inhibitory concentration, IC) ที่ร้อยละ 5 (IC₅), 10 (IC₁₀) และ 50 (IC₅₀) ตามลำดับด้วยวิธี Resazurin assay ทำการทดสอบใน 96-well cell culture plate โดยใช้เซลล์ LX-2 จำนวน 5 × 10⁴ เซลล์/หลุม จากนั้นนำสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์มาเจือจางใน D-MEM แบบ two-fold dilution ที่ความเข้มข้น 0-1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมน้ำลงใน cell culture plate ที่มีเซลล์ LX-2 อยู่ และบ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม Resazurin working solution (HiMedia Laboratories Pvt., USA) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 4 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสง fluorescence โดยตั้งค่าความยาวคลื่น excitation/emission ไว้ที่ 560/590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (PerkinElmer, USA)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดพังผืดในตับในเซลล์ LX-2

กระตุ้นเซลล์ LX-2 ให้มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ด้วย TGF-β1 (STEMCELL Technologies, USA) ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ใน 24-well plate เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยอ้างอิงขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ LX-2 จากการศึกษาท่อนหน้า⁽¹²⁻¹⁶⁾ ในการทดสอบใช้เซลล์จำนวน 2 × 10⁵ เซลล์/หลุม แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 1) กลุ่มควบคุม (Control) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว 2) กลุ่มควบคุมแบบลบ (Model) ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 เพียงอย่างเดียว และ 3) กลุ่มทดสอบ (Treatment) ซึ่งจะมีการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF-β1 พร้อมกับใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณไฮโดไลน และเก็บเซลล์เพื่อการสกัดโปรตีนในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

5. ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA)

ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF-α) ทำการ coat plate ด้วย capture antibody โดยเติม mouse anti-TNF-α antibody (Sino Biological, USA) ที่เจือจางด้วย phosphate buffered saline (PBS) ลงใน 96-well plate นำไปบ่มข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย wash buffer และ block plate โดยเติม blocking buffer (2% BSA ใน wash buffer) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer

จากนั้นเติม supernatant และ TNF- α ที่เจือจาง
ใน dilution buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา
2 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer เติม rabbit or
goat anti-mouse HRP-conjugated antibody
นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น
ล้างด้วย wash buffer ตามด้วยเติม substrate
solution (Tetramethylbenzidine, TMB) นำไปบ่ม
ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที และเติม stop
solution (2N H₂SO₄) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วย
เครื่อง Microplate reader (PerkinElmer, USA)
ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

6. การสกัดโปรตีนเพื่อการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์

นำเซลล์ HSCs ของกลุ่ม Model กลุ่มที่ได้รับ
7-octenoic acid และกลุ่มที่ได้รับ 1-phenyl-2-
pentanol ไปสกัดโปรตีนเพื่อทำการวิเคราะห์ทางโปรตี-
โอมิกส์ โดยหลักการในการเลือกความเข้มข้นของสาร
ทั้งสองชนิด มีดังนี้ 1) 7-octenoic acid ที่ความเข้มข้น
100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยอ้างอิงจากผลในการลด
ระดับของ matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)
จากผลการศึกษาก่อนหน้า⁽¹⁷⁾ และ 2) 1-phenyl-
2-pentanol ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
จากความสามารถในการลดระดับของ TNF- α
ได้ดีที่สุดในการทดลองนี้ ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS
จากนั้นเติม RIPA buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร/
หลุม บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นขูดเซลล์
ด้วย cell scraper และ sonicate นำไปปั่น
เป็นเวลา 10 นาที ที่ 14,000 × g ที่อุณหภูมิ
4 องศาเซลเซียส และเก็บ supernatant ที่ -80
องศาเซลเซียส

7. การเตรียมโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์แบบ label-free proteomic analysis

เตรียมตัวอย่างโปรตีนให้มีความเข้มข้นโดย
ให้มีมวลโมเลกุลที่ cut-off 3 kDa จากนั้นตกตะกอน
โปรตีนด้วย acetone (1:5 v/v) และคืนสภาพตะกอน
โปรตีนด้วย RapidGest SF ร้อยละ 0.3 (Waters Co.)
ในแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต 2.5 mM (Sigma
Aldrich Co., Germany) จากนั้นเติม trypsin เพื่อ
ย่อยโปรตีนทั้งหมด (30 ไมโครกรัม) และทำการลด
พันธะซัลไฟไฮดริล โดยใช้ 1 mM TECP (Sigma
Aldrich Co., Germany) ในแอมโมเนียมไบ-
คาร์บอเนต 2.5 mM บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการ sulfhydryl alkylation
โดยใช้ 5 mM IAA (Sigma Aldrich Co.,
Germany) ในแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต 2.5 mM
บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50 นาทีในที่มืด จากนั้น
ล้างสารละลายโปรตีนโดยใช้ Zeba Spin Desalting
Column (Thermo Scientific Co., USA) เติม
trypsin เพื่อย่อยสารละลายโปรตีน (Promega
Co., Madison, WI, USA) ในอัตราส่วน 1:40
(เอนไซม์:โปรตีน) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สารละลายโปรตีนที่ย่อยแล้วจะ
ถูกทำให้แห้งด้วยกรดฟอร์มิกร้อยละ 0.1 ก่อนนำไป
ทดสอบด้วยวิธี LC-MS/MS

8. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ข้อมูลสเปกตรัม LC-MS/MS จะถูก
รวบรวมใน positive mode ด้วย HF-X hybrid
Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer ที่
รวมกับระบบ EASY-nLC1000 nano-LC system
ที่ใช้ nano C18 column (Thermo Fisher

Scientific, USA) ซึ่งมี mobile phase A ประกอบด้วยกรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.1 ที่ละลายในน้ำ และ mobile phase B ประกอบด้วยอะซิโตนไนไตรล์ ร้อยละ 90 และกรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.1 การแยก LC จะใช้ linear gradient ที่ร้อยละ 3-60 ของ mobile phase B ที่อัตราการไหลคงที่ 300 นาโนลิตร/นาที เป็นเวลา 135 นาที ทำการ regenerate คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ด้วย mobile phase B ร้อยละ 90 เป็นเวลา 10 นาที และปรับสมดุลใหม่ด้วย mobile phase B ร้อยละ 3 เป็นเวลา 35 นาที จากนั้นวิเคราะห์เปปไทด์โดยใช้ data-dependent (TopN15) acquisition

ไฟล์ Raw mass spectra (.raw file) ถูกวิเคราะห์โดยซอฟต์แวร์ Proteome Discoverer™ 2.4 (Thermo Fisher Scientific, USA) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน UniProt โดยการระบุและการหาปริมาณโปรตีนจะใช้พารามิเตอร์ต่อไปนี้

- MS tolerance: 20 ppm
- MS/MS tolerance: 0.05 Da
- Enzyme: trypsin
- Fixed modification: cysteine carbamidomethylation
- Variable modification: methionine oxidation

ค่า false discovery rate (FDR) ถูกตั้งค่าไว้ที่ร้อยละ 1 สำหรับการระบุโปรตีนและเปปไทด์ จากนั้น normalized โปรตีนสัมพัทธ์ให้ได้เป็นจำนวนเปปไทด์ทั้งหมดสำหรับใช้ทดสอบ LC โดยใช้ normalization algorithm (total intensity count) ของ software และใช้ความเข้มของโปรตีนในการวิเคราะห์ pathway ด้วย PADOG algorithm ใน Reactome version 84

9. การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

ทำการคัดกรองโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงในกลุ่มที่ได้รับ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ในการวิเคราะห์จะใช้ค่า \log_2 fold-change ของโปรตีนในกลุ่มที่ได้รับ 7-octenoic acid หรือ 1-phenyl-2-pentanol เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยโปรตีนที่มีค่า \log_2 fold-change ≥ 1.5 ถือว่าเป็น upregulated และ \log_2 fold-change ≤ -1.5 จัดเป็น downregulated โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารออกฤทธิ์ ต้องมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นนำ UniProt ID ของโปรตีนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ protein-protein interaction ใน STRING database⁽¹⁸⁾ วิเคราะห์ gene ontology ใน Enrichr database⁽¹⁹⁻²¹⁾ และวิเคราะห์ pathway ด้วย Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) mapper⁽²²⁻²⁴⁾

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (mean) ที่ได้จากการทดลองแต่ละกลุ่มจะถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) และ *post hoc* analysis ด้วย Tukey's multiple comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ LX-2

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับชนิด LX-2 ต่อสารสกัดหยาบจากใบมะรุม พบว่าค่า IC_{50} , IC_{10} และค่า IC_5 เท่ากับ 357, 65.86 และ 37.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับสำหรับผลทดสอบในสารออกฤทธิ์ชนิด 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol พบว่าค่า IC_{50} เท่ากับ 324.6 และ 397.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า IC_{10} เท่ากับ 153.42 และ 173.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า IC_5 เท่ากับ 118.91 และ 130.44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังใน Table 1 ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์ โดยที่ความเข้มข้นต้องมีค่าน้อยกว่าค่า IC_{10} ของแต่ละสารในการทดสอบฤทธิ์ต้านพังผืดในตับ เพื่อลดผลข้างเคียงจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารแต่ละชนิด แสดงดังใน Fig. 1

2. ผลการวัดระดับไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich ELISA

เซลล์ LX-2 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีการหลั่ง TNF- α ออกมาปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มของเซลล์ที่ได้รับสาร 7-octenoic acid ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าการลดลงของปริมาณ TNF- α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ขณะที่ 7-octenoic acid ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการหลั่ง TNF- α ในเซลล์ LX-2 เพิ่มขึ้น ในกลุ่มของสาร 1-phenyl-2-pentanol ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สามารถลดปริมาณของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ส่วนสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดปริมาณของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ดังแสดงใน Fig. 2

3. ผลการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์

ผลการทดสอบจากการกระตุ้นเซลล์ LX-2 ที่ถูกกระตุ้นเกิดพังผืดด้วย TGF- β 1 ร่วมกับสาร 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ที่ความเข้มข้น 100 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ ที่ได้รับ TGF- β 1 เพียงอย่างเดียว พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับ 7-octenoic acid มีโปรตีนจำนวน 224 ชนิดที่มี downregulation และโปรตีนจำนวน 216 ชนิดที่มี upregulation ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับ 1-phenyl-2-pentanol พบว่า มีโปรตีนจำนวน 30 ชนิดที่มี downregulation และมีโปรตีน 68 ชนิดที่มี upregulation

4. ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ โดยนำผลการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ มาทำการวิเคราะห์ protein-protein interaction (PPI) ด้วย STRING database พบว่า จำนวนโปรตีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความเชื่อมโยงเกี่ยวข้องกันทางชีววิทยาอย่างน้อยบางส่วนหรือหลายส่วน ดังแสดงใน Fig. 3 จึงต้องมีการนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

Table 1 The IC_{50} , IC_{10} and IC_{50} values for treatments of LX-2 cells with 7-octenoic acid, 1-phenyl-2-pentanol, and crude extract (MO).

Compound	IC_5 ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{10} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
7-octenoic acid	118.91	153.42	324.60
1-phenyl-2-pentanol	130.44	173.05	397.40
Crude extract (MO)	37.07	65.86	357.00

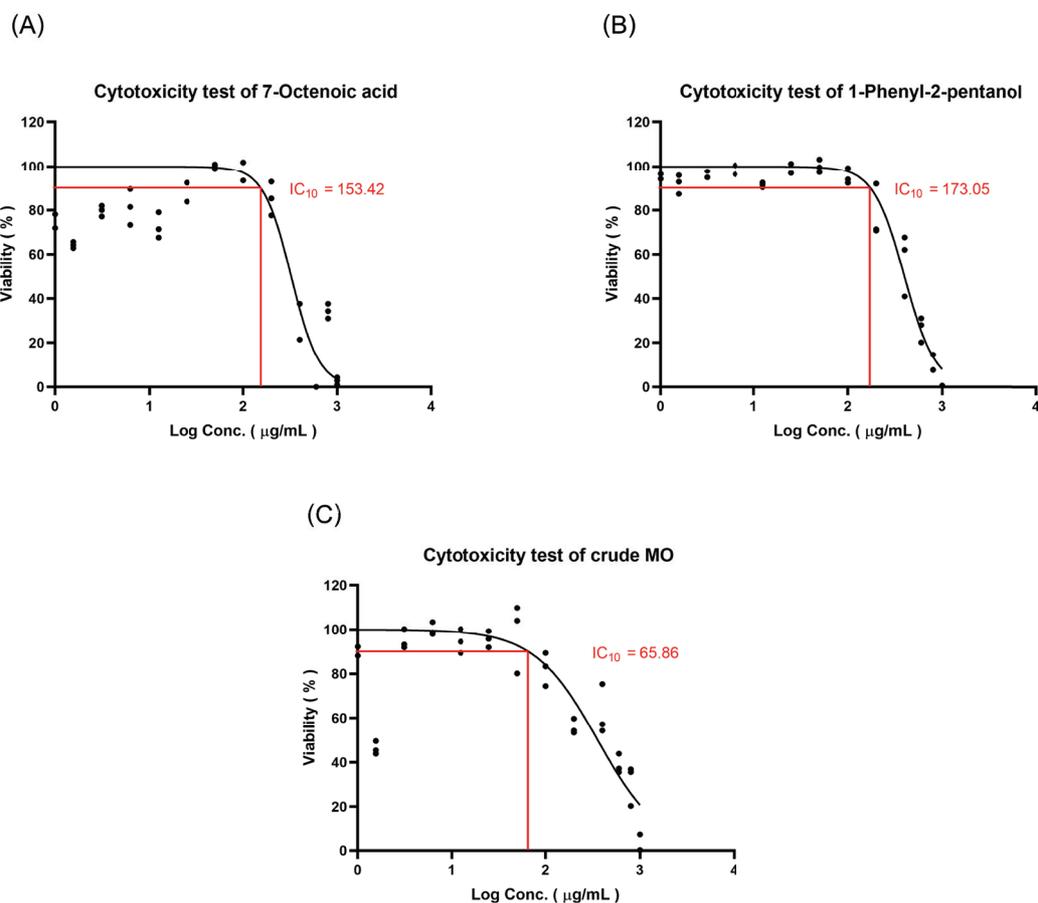


Fig. 1 The dose-response curve and IC_{10} value for treatment of the LX-2 cells with 7-octenoic acid (A), 1-phenyl-2-pentanol (B), and crude extract (MO) (C).

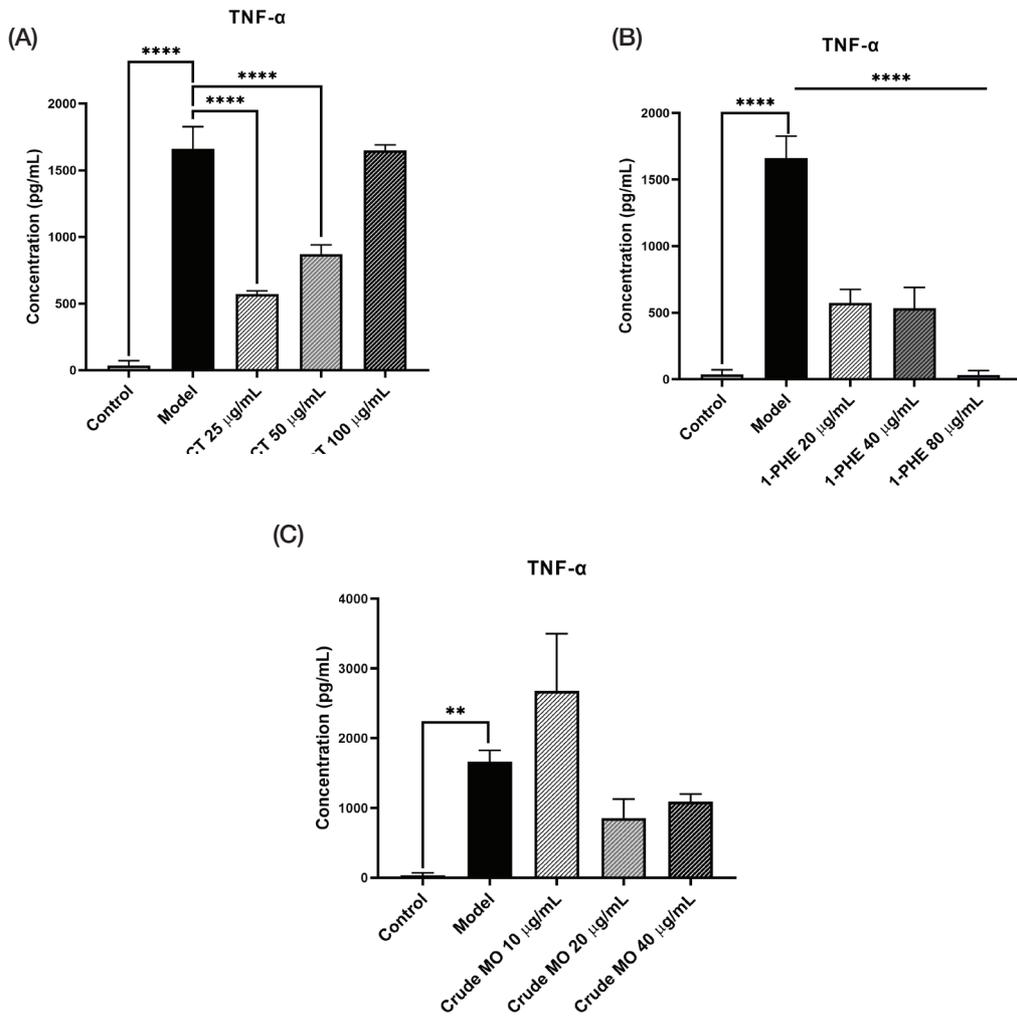


Fig. 2 Effects of 7-octenoic acid (7-OCT), 1-phenyl-2-pentanol (1-PHE), and crude MO extracts on TNF- α levels in the LX-2 cells. Cells were cultured in complete D-MEM medium (Control), stimulated with TGF- β 1 (10 ng/mL; Model), or treated with TGF- β 1 plus 7-OCT, 1-PHE, or crude MO extracts. TNF- α levels were quantified. Data are presented as mean \pm SEM. ** p < 0.0021, **** p < 0.0001 compared to the Model group.

การวิเคราะห์ gene ontology ด้วย Enrichr database ของกลุ่มที่ได้รับสาร 7-octenoic acid พบว่า ผลการวิเคราะห์ด้านกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) โปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ cytoplasmic translation, mRNA processing และ gene expression ในด้านส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ focal adhesion, cell-substrate junction และ intracellular membrane-bounded organelle ส่วนด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (molecular function) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ RNA binding, cadherin binding และ mRNA binding ในส่วนของโปรตีนในเซลล์ LX-2 ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับสาร 1-phenyl-2-pentanol พบว่า ผลการวิเคราะห์ด้านกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) โปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ gene expression, cytoplasmic translation และ chaperone cofactor-dependent protein refolding ด้านส่วนประกอบของเซลล์ (cellular component) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับ focal adhesion, cell-substrate junction และ ribosome ส่วนด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (molecular function) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ RNA binding, cadherin binding และ mRNA binding

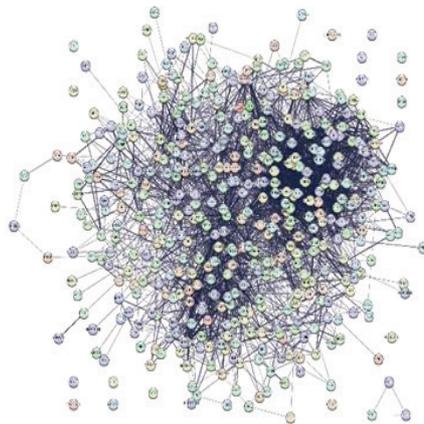
การวิเคราะห์ signaling pathway ด้วย KEGG Mapper คณะผู้วิจัยได้คัดกรองและมุ่งเน้น signaling pathway ที่มีความเกี่ยวข้องกับพังผืดในตับและเป็นโมเลกุลเป้าหมายของ anti-liver fibrosis drugs ได้แก่ PI3K-Akt, NF-KB และ mTOR signaling pathways อีกทั้งคณะผู้วิจัยได้ศึกษาใน pathway เหล่านี้ที่มีความสอดคล้องกับผล

โปรตีนโอมิคส์ร่วมกับผลของระดับ TNF- α ดังนั้นจึงต้องศึกษา signaling pathway ของแต่ละสารออกฤทธิ์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ LX-2 ที่ได้รับ 7-octenoic acid มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่มีบทบาทในวิถีสัญญาณภายในเซลล์ทั้งสิ้น 284 signaling pathways โดยมี 2 signaling pathways ที่มีความสำคัญในการเกิดพังผืดในตับหรือการลดลงของ TNF- α ได้แก่ PI3K-Akt signaling pathway ซึ่งพบโปรตีนจำนวน 5 ชนิดสำคัญที่มี downregulation เช่น guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (*GNB2*) และ NF-KB signaling pathway พบโปรตีนจำนวน 1 ชนิดที่สำคัญที่มี downregulation คือ casein kinase II subunit alpha (*CSNK2A1*) ดังแสดงใน Fig. 4 ในส่วนของเซลล์ตับที่ได้รับ 1-phenyl-2-pentanol พบทั้งหมด 183 pathways โดย mTOR signaling pathway ซึ่งพบโปรตีนจำนวน 1 ชนิดที่มี downregulation คือ low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) ดังแสดงใน Fig. 5 ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของระดับ TNF- α ได้

หลังจากได้โปรตีนเป้าหมายที่น่าสนใจแล้วจึงทำการวิเคราะห์ PPI ด้วย STRING database เพื่อตรวจสอบการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนอื่น ๆ อีกครั้ง โดยในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 7-octenoic acid พบว่า *GNB2* ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ *GNAS* (GNAS complex locus) และ *CSNK2A1* ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ *TP53* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ในส่วนของ 1-phenyl-2-pentanol พบว่า *LRP5* ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ *PPP2R5E* (protein phosphatase 2 regulatory subunit B epsilon) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสะสม ECM deposition จึงสามารถสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์

LX-2 หลังจากได้รับสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ส่งผล กับการเกิดมะเร็งและ ECM deposition ดังแสดง
ให้ลดการแสดงออกของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง ใน Fig. 6
โปรตีนที่สนใจและโปรตีนอื่น ๆ ซึ่งมีความเกี่ยวข้อง

(A)



(B)

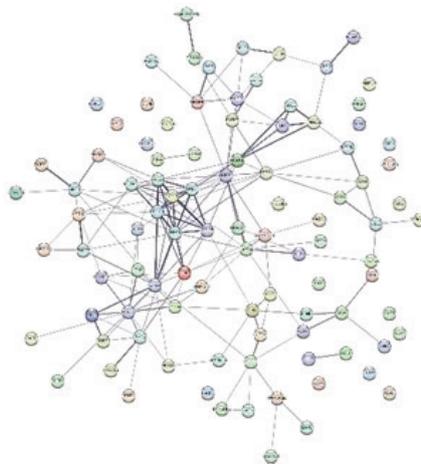
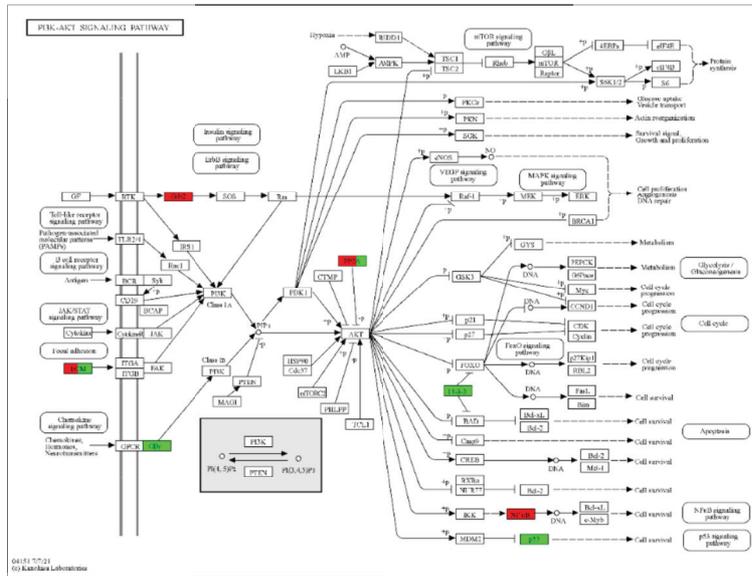


Fig. 3 The protein-protein interaction (PPI) network analysis of the LX-2 cells from both 7-octenoic acid (A) and 1-phenyl-2-pentanol (B) treatment groups by using STRING database.

(A)



(B)

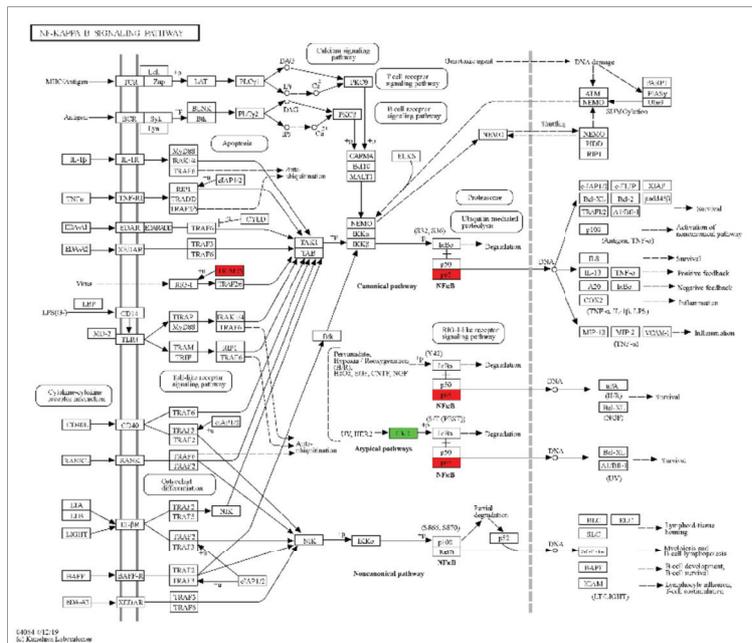


Fig. 4 The signaling pathway analysis of the proteomics profiling in 7-octenoic acid-treated LX-2 cells by using KEGG Mapper tool. The majority of proteins were categorized in PI3K-Akt (A) and NF-KB signaling pathways (B). Proteins exhibiting upregulation are depicted in red, while those exhibiting downregulation are depicted in green. Abbreviations: *TRIM25*, tripartite motif containing 25; *P65*, transcription factor p65; *LAMC3*, laminin subunit gamma 3; *GRB2*, growth factor receptor bound protein 2; *GNB5*, G protein subunit beta 5; *YWHAQ*, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta; *NFKB1*, nuclear factor kappa B subunit 1.

วิจารณ์

คณะผู้วิจัยศึกษากลไกการต้านพังผืดในตับด้วยสารออกฤทธิ์จากโสมมะรุ่ม ได้แก่ 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol ต่อเซลล์ LX-2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 โดยวัดระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์ วัดระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ TNF- α วิเคราะห์ผลโปรตีนโอมิกส์ และวิเคราะห์ผลทางชีวสารสนเทศ

จากผลการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละชนิดด้วยวิธี Resazurin assay พบว่าช่วงความเข้มข้นที่เลือกใช้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ LX-2 (Fig. 1) แต่อย่างไรก็ตาม จากกราฟพบการตายของเซลล์ LX-2 เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไปจนถึงระดับหนึ่ง เช่น สารออกฤทธิ์ 7-octenoic acid จากโสมมะรุ่ม พบการตายของเซลล์ LX-2 ที่ค่า IC_{10} คือ 153.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป

จากการวัดระดับไซโตไคน์ด้วยเทคนิค sandwich ELISA พบว่า สารออกฤทธิ์ 1-phenyl-2-pentanol สามารถลดการหลั่งของ TNF- α ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่กลุ่มของเซลล์ที่ได้รับ 7-octenoic acid ที่ 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีระดับของ TNF- α ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ แต่พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของระดับ TNF- α เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ 7-octenoic acid จนถึง 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า น่าจะเกิดจาก biphasic effect⁽²⁵⁾ ของสาร 7-octenoic acid ต่อเซลล์ LX-2 ในสถานะที่มี TGF- β 1 โดยที่ 7-octenoic acid สามารถออกฤทธิ์ทั้งยับยั้งและ

กระตุ้นการสร้าง TNF- α ในเซลล์ LX-2 ผ่านการกระตุ้นหรือยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยฤทธิ์ทางชีวภาพจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อมูลของ 7-octenoic acid ต่อการสร้าง TNF- α ยังมีไม่เพียงพอ จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงผล biphasic effect ของสาร 7-octenoic acid ต่อการสังเคราะห์ TNF- α ในเซลล์ HSCs ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เพื่อพิสูจน์สมมติฐานเพิ่มเติม

สารสกัดหยาบจากโสมมะรุ่มสามารถลดการหลั่งของ TNF- α ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Armando และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 พบว่าสารสกัดหยาบจากโสมมะรุ่มสามารถลดการอักเสบและลด acetylcholine ในลำไส้หนูทดลองได้⁽²⁶⁾ งานวิจัยของ Jimenez และคณะ ในปี ค.ศ. 2017 สามารถลดการอักเสบและยับยั้งการทำงานของ NF-KB pathway⁽²⁷⁾ งานวิจัยของ Sharifudin และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 จากการศึกษาเนื้อเยื่อตับจากหนูที่ได้รับสารสกัดจากโสมมะรุ่ม พบว่าความรุนแรงและการเกิดความเสียหายในตับหนูมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁸⁾ แต่สามารถกระตุ้นการหลั่งของ TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ pathway ด้วย KEGG Mapper พบว่าในเซลล์ตับที่ได้รับ 7-octenoic acid เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ มี *CSNK2A1* เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ NF-KB pathway และมี *GNB2* เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ PI3K-Akt signaling pathway ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mittal และยังคงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang Yang และคณะ ในปี 2023 พบว่าสารสกัดจาก *Macleaya*

cordata สามารถลดการแสดงออกของ *GNB2* ใน NF-KB และ PI3K/Akt signaling pathways ได้ อีกทั้งพบว่าระดับของ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใน C57BL/6 mice⁽²⁹⁾ บ่งชี้การมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ anti-liver fibrosis ดังนั้นจึงคาดว่า 7-octenoic acid ที่สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน *GNB2* ได้ จึงมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ anti-liver fibrosis นอกจากนี้เนื่องจากยังไม่พบงานวิจัยใดที่รายงานผลการศึกษาของสาร 7-octenoic acid ในใบมะรุมที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *CSNK2A1* และส่งผลให้ระดับไซโตไคน์ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดพังผืดในตับลดลงได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการค้นพบว่ายีน *CSNK2A1* อาจเป็นเป้าหมายใหม่ของสาร 7-octenoic acid จากใบมะรุมในการต้านพังผืดในตับ และในส่วนของเซลล์ตับที่ได้รับ 1-phenyl-2-pentanol เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบ มี LRP5/6 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mTOR signaling pathway ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ ในปี ค.ศ. 2023 พบว่าสารไซเดียมซาโลโนไมซินลดการแสดงออกของยีน *LRP6* ผ่านการทำงานของ mTOR signaling pathway โดยทำให้ระดับ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน germinal center B-cell (GCB) บ่งชี้การมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง⁽³⁰⁾ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ ในปี ค.ศ. 2023 พบว่า *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants สามารถยับยั้งการทำงานของ mTOR signaling pathway ได้ใน SMMC-7721 cell⁽³¹⁾ บ่งชี้การมีฤทธิ์เป็น anti-liver cancer อีกทั้งยัง

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ ในปี ค.ศ. 2019 พบว่าการแสดงออกของยีน *LRP6* ลดลง ส่งผลให้การทำงานของ mTOR signaling pathway ลดลงเช่นเดียวกัน⁽³²⁾ ดังนั้นจึงคาดว่า 1-phenyl-2-pentanol ที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *LRP5* จึงมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ anti-liver fibrosis ทั้งนี้ควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลของสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดในเซลล์ LX-2 ต่อการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิคอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น western blot เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาคืบต่อไป

สรุป

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า 7-octenoic acid จากใบมะรุม อาจสามารถต้านพังผืดในตับ โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์จากยีน *CSNK2A1* และ *GNB2* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ NF-KB และ PI3K/Akt signaling pathways ขณะที่ 1-phenyl-2-pentanol จากใบมะรุม อาจสามารถต้านพังผืดในตับโดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์จากยีน *LRP5* ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ mTOR signaling pathway โดยทั้ง 3 pathways มีความเกี่ยวข้องกับพังผืดในตับ อีกทั้งยังพบว่า 7-octenoic acid และ 1-phenyl-2-pentanol สามารถลดการหลั่งของ TNF- α ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด เป็นสารที่น่าสนใจเพื่อศึกษาต่อในโมเดลการเกิดพังผืดในตับอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น สัตว์ทดลอง เพื่อช่วยในการศึกษาค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ที่อาจพัฒนาไปเป็นยาในการรักษาพังผืดในตับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา อุ่สุวรรณทิม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำการวิจัยมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงศรัณยภิญ โปธิกานนท์ จากภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ LX-2 ที่ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงงบประมาณสนับสนุนการทำวิจัยจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-18.
2. Menggensilimu, Yuan H, Zhao C, *et al.* Anti-liver fibrosis effect of total flavonoids from *Scabiosa comosa* Fisch. ex Roem. et Schult. on liver fibrosis in rat models and its proteomics analysis. *Ann Palliat Med* 2020; 9: 272-85.
3. Sarin SK, Kumar M, Eslam M, *et al.* Liver diseases in the Asia-Pacific region: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5: 167-228.
4. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, *et al.* Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 1-13.
5. Khanam A, Saleeb PG, Kottilil S. Pathophysiology and treatment options for hepatic fibrosis: can it be completely cured? *Cells* 2021; 10: 1097.
6. Yang YM, Seki E. TNFoc in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 2015; 3: 253-61.
7. Zelova H, Hosek J. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 2013; 62: 641-51.
8. Tan Z, Sun H, Xue T, *et al.* Liver fibrosis: therapeutic targets and advances in drug therapy. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 730176.
9. Camellia Seed Oil and Other Plant Oil Product Research and Development Center. (MOR-INGA) Chiang Rai, Thailand: [Available from: <https://www.camelliaoilcenter.com/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%A3%E0%B8%B8%E0%B8%A1-moringa/>].
10. Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients* 2018; 10: 343.
11. Wisitpongpun P, Suphrom N, Potup P, *et al.* *In vitro* bioassay-guided identification of anticancer properties from *Moringa oleifera* Lam. leaf against the MDA-MB-231 cell line. *Pharmaceuticals* 2020; 13: 464.

12. Yu J, Hu Y, Gao Y, *et al.* Kindlin-2 regulates hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. *Cell Death Discovery* 2018; 4: 93.
13. Xu Z, Li T, Li M, *et al.* eRF3b-37 inhibits the TGF- β 1-induced activation of hepatic stellate cells by regulating cell proliferation, G0/G1 arrest, apoptosis and migration. *Int J Mol Med* 2018; 42: 3602-12.
14. Wei S, Wang Q, Zhou H, *et al.* miR-455-3p alleviates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by suppressing HSF1 expression. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 16: 758-69.
15. Wang Y, Wu C, Zhou J, Fang H, Wang J. Overexpression of estrogen receptor β inhibits cellular functions of human hepatic stellate cells and promotes the anti-fibrosis effect of calycosin via inhibiting STAT3 phosphorylation. *BMC Pharmacol Toxicol* 2022; 23: 77.
16. Kang H, Seo E, Oh YS, Jun H-S. TGF- β activates NLRP3 inflammasome by an autocrine production of TGF- β in LX-2 human hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 2022; 477: 1329-38.
17. Buakaew W, Krobthong S, Yingchutrakul Y, *et al.* Investigating the antifibrotic effects of β -Citronellol on a TGF- β 1-stimulated LX-2 hepatic stellate cell Model. *Biomolecules* 2024; 14: 800.
18. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* STRING v10: protein—protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: 447-52.
19. Chen EY, Tan CM, Kou Y, *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; 14: 128.
20. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 90-7.
21. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, *et al.* Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current Protocols* 2021; 1: 90.
22. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 27-30.
23. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science* 2019; 28: 1947-51.
24. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res* 2023; 51: 587-92.
25. Jodynis-Liebert J, Kujawska M. Biphasic dose-response induced by phytochemicals: experimental evidence. *J Clin Med* 2020; 9: 718.

26. Armando Ciiceresab AS, Sofia Rizzoa, Lorena Zabala, Edy De Leonb and Federico Naveb. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2 : screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. *J Ethnopharmacol* 1992; 36: 233-7.
27. Vergara-Jimenez M, Almatrafi MM, Fernandez ML. Bioactive components in *Moringa Oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants (Basel)*. 2017; 6: 91.
28. Sharifudin SA, Fakurazi S, Hidayat MT, *et al*. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* extracts against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol* 2013; 51: 279-88.
29. Yang Y, Ding T, Xiao G, *et al*. Anti-Inflammatory Effects of allocryptopine via the target on the CX3CL1-CX3CR1 axis/GNB5/AKT/NF-kappaB/apoptosis in dextran sulfate-induced mice. *Biomedicines* 2023; 11: 464.
30. Li L, Zeng P, Yu L, *et al*. Salinomycin sodium exerts anti diffuse large B-cell lymphoma activity through inhibition of LRP6-mediated Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling. *Leukemia & Lymphoma* 2023; 64: 1151-60.
31. Huang J, Hao J, Nie J, *et al*. Possible Mechanism of Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants Seed Extract Suppresses the Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells SMMC-7721. *Chem Biodivers* 2023; 20: e202200768.
32. Li L, Xue J, Wan J, *et al*. LRP6 Knock-down ameliorates insulin resistance via modulation of autophagy by regulating GSK3beta signaling in human LO2 hepatocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10: 73.