



การพัฒนา Cell-based model สำหรับการศึกษ

NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) nuclear-cytoplasm translocation

และการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น

ระบบภูมิคุ้มกันจากสารสกัดพืชสมุนไพร

เอกชัย เครือแก่นแก้ว และณัฐฉิ แซ่ลิ่ม*

Development of cell-based model for NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells)

nuclear-cytoplasm translocation and its application for herbal bioactive

immunomodulator screening

Akachai Khuekankaew and Nuttawut Saelim*

ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก, 65000

Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

*Corresponding author. E-mail: nut456zz@hotmail.com

บทคัดย่อ

กลุ่มโปรตีน Nuclear factor of activated T-cells family (NFATs) ประกอบด้วยสมาชิกอย่างน้อย 5 ชนิด คือ NFAT1 (NFATp), NFAT2 (NFATc), NFAT3, NFAT4 (NFATx) และ NFAT5 โดยโปรตีน NFATs มีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันใน T-cells ซึ่งโปรตีน NFATs จะควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยจะจับกับสาย DNA ใน nucleus และเปิดยีน Interleukin 2 (IL-2) วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อการสร้าง cell-based model สำหรับการศึกษ NFAT nuclear-cytoplasm translocation ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

ในการศึกษานี้ ได้ทำการสร้าง vector (plasmid) ที่มียีน GFP-NFAT3(N) (dominant negative) และ GFP-NFAT4(N) (dominant positive) โดยการใส่ยีน Green Fluorescent Protein(GFP) เข้าเชื่อมส่วนหน้าของยีน NFAT4(N) และ NFAT3(N) และตัดต่อยีน GFP-NFAT3(N) และ GFP-NFAT4(N) เข้าไปใน pcDNA 3.1 vector จากนั้นนำ vector ที่มียีนต่างๆ ที่เตรียมไว้นำส่งเข้าไปในเซลล์ของ HEK293 cells โดยใช้ระบบนำส่ง Lipofectamine 2000 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงใน modified Eagle's medium ที่มี 5% fetal bovine serum (FBS) ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ จากนั้นทำการศึกษารูปแบบการเคลื่อนที่เข้า-ออกระหว่าง nucleus และ cytoplasm ของโปรตีน GFP, GFP-NFAT3(N) และ GFP-NFAT4(N) ภายในเซลล์โดยการเติมสารกระตุ้น calcium ionophore (A23187) และ/หรือ สารยับยั้ง cyclosporine A (CsA) จากนั้นทำการติดตามรูปแบบการเคลื่อนที่ของโปรตีน NFAT โดยอาศัยสัญญาณจากการเรืองแสงของโปรตีน GFP โดยกล้อง inverted fluorescent microscope

จากการศึกษาโดยติดตามสัญญาณจากการเรืองแสงของโปรตีน GFP พบว่าในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยีน GFP (กลุ่มควบคุม) มีสัญญาณจากการเรืองแสงของโปรตีน GFP ทั้งในส่วน nucleus และ cytoplasm ในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยีน GFP-NFAT4(N) (กลุ่ม positive) จะมีสัญญาณจากการเรืองแสงของโปรตีน GFP เข้าไปสะสมในส่วน nucleus อย่างชัดเจนเมื่อเติมสารกระตุ้น A23187 และสัญญาณจากการเรืองแสงของโปรตีน GFP ใน nucleus จะลดลงอย่างมากเมื่อเติมสาร A23187 ร่วมกับสารยับยั้ง CsA ในส่วนกลุ่มเซลล์ที่ได้รับยีน GFP-NFAT3(N) (กลุ่ม negative) สัญญาณจากการเรืองแสงของโปรตีน GFP ยังคงสะสมในส่วน cytoplasm อย่างชัดเจนถึงแม้มีการเติมสารกระตุ้น A23187 แล้วก็ตาม

A23187 เป็นสารที่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณความเข้มข้นของ calcium ion ใน cytoplasm และส่งผลกระตุ้นให้ NFAT4(N) เคลื่อนเข้าสู่ nucleus (โดยผ่านการกระตุ้นเอ็นไซม์ calcineurin) ในขณะที่สาร CsA มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ calcineurin ได้ ซึ่งส่งผลในทางตรงกันข้ามคือ ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้าง cell-based model สำหรับการศึกษ NFAT nuclear-cytoplasm translocation เพื่อใช้ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

คำสำคัญ: NFAT Transcription factor Calcineurin CsA A23187



Abstract

The NFAT family (NFATs) at least encodes five distinct members of protein including NFAT1 (NFATp), NFAT2 (NFATc), NFAT3, NFAT4 (NFATx) and NFAT5. NFATs protein is expressed in most immune system cells and regulates the immune response by binding to the interleukin-2 (IL-2) promoter in activated T-cells. The objective of this study is to develop and validate the cell-based model for investigation NFAT4 and NFAT3 nuclear-cytoplasm translocation for using as a tool for bioactive immune-modulator screening.

The pcDNA3.1 vector containing GFP as an internal control, GFP-NFAT3(N) as a dominant negative and GFP-NFAT4(N) as a dominant positive were transiently transfected into HEK293T cells and primary porcine fibroblasts using Lipofectamine 2000 method. The transfected cells afterwards were cultured in modified Eagle's medium containing (DMEM) 5% fetal bovine serum (FBS) supplemented with antibiotics. The nuclear-cytoplasm translocation patterns of GFP and NFAT fusion proteins were studied after adding calcium ionophore (A23187, a calcineurin enzyme stimulator), and/or cyclosporine A (CsA, a calcineurin enzyme inhibitor). The translocation patterns could be traced and analyzed by GFP signals via fluorescent microscope.

From the study, in the GFP transfected cells, the fluorescent signals were diffused all over the cells both with and without cytosolic calcium induction by A23187. Interestingly, the GFP-NFAT4(N) transfected cells significantly showed the translocation of the signal from cytoplasm to nucleus after the increase of cytosolic calcium ion induced by A23187, this effect was effectively inhibited by CsA. As a dominant negative, the fluorescent signal from the GFP-NFAT3(N) transfected cells remained predominantly in the cytoplasm even after A23187 stimulation.

A23187 is a strong cytosolic calcium enhancer, which stimulates NFAT4(N) nuclear translocation, whereas CsA is a strong calcineurin inhibitor, which effectively inhibits NFAT4(N) nuclear translocation. Therefore, this cell-based model could be applied as a tool for bioactive immune-modulator screening.

Keywords: NFAT, Transcription factor, Calcineurin, CsA, A23187

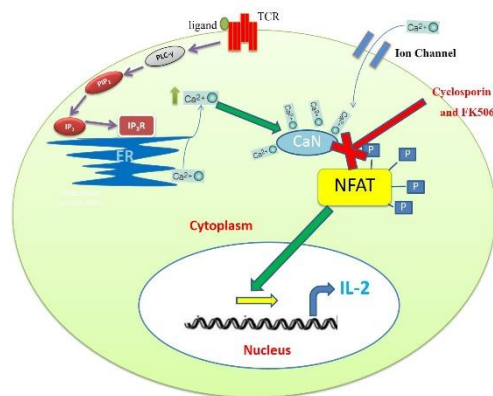
บทนำ

กลุ่มโปรตีน Nuclear Factor of Activated T cells หรือ NFATs จัดเป็นกลุ่มโปรตีนเปิดยีนที่สำคัญ (transcription factor) สำหรับการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผ่าน T cells ซึ่งจะประกอบ NFAT1, NFAT2, NFAT3 (ซึ่งเป็น dominant negative NFAT), NFAT4, และ NFAT5 โมเลกุลของโปรตีน NFAT สามารถแบ่งเป็นส่วนหลัก ๆ (domain, region) เป็น 3 ส่วนหลัก คือ ส่วน regulatory domain หรือที่เรียกว่า NFAT homology region (NHR), ส่วน highly conserved DNA binding domain หรือ Rel-homology region (RHR) และส่วน carboxy-terminal domain ในส่วนของ NFAT homology region (NHR) จะมี N-terminal transactivation domain (TAD), ตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนเซอรีนมาก (multiple serine-rich region-SRR และ SP motif) ซึ่งเป็นจุดเกิด phosphorylation (โดย kinase enzymes) และ dephosphorylation (โดย phosphatase enzymes), และ nuclear localization sequence (NLS), ซึ่งควบคุมการเข้าออกของโปรตีน NFAT ระหว่าง nucleus กับ cytoplasm ของเซลล์ (Macian., 2005; Muller MR. and Rao A., 2010)

กลไกการกระตุ้น T cells (รูปที่ 1) เมื่อโปรตีน NFAT ถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่ภายหลัง T-cell receptor (TCR) ถูกกระตุ้นด้วย ligand ("signal") ที่จำเพาะกับ receptor ตามด้วยการเพิ่มปริมาณของ cytoplasmic calcium ion ซึ่งปริมาณ calcium ion ที่เพิ่มขึ้นนี้จะกระตุ้นโปรตีน calcineurin ใน cytoplasm ให้ทำงานโดยทำให้เกิดสภาวะโปรตีน NFAT dephosphorylation ส่งผลให้โปรตีน NFAT สามารถเคลื่อนผ่านจาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus (NFAT import) และจับกับสาย DNA ได้ โดยโปรตีน NFAT สามารถเปิดยีนเพื่อสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น interleukin-2 (IL-2) ตามชนิดของเซลล์และรูปแบบการกระตุ้นได้

ในการกระทำเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน NFAT สามารถกระทำโดยใช้ตัวยับยั้ง NFAT (inhibitors) ซึ่งตัวยับยั้งส่วนใหญ่มีผลต่อเอ็นไซม์ calcineurin เพื่อลดระดับการเกิด dephosphorylating activity ในส่วนของ NFAT small molecule inhibitors ที่ใช้เป็นยาในปัจจุบัน ได้แก่ cyclosporine A (CsA) และ FK506 โดยที่สาร CsA และ FK506 จะ

กตการทำงานของโปรตีน NFAT โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calcineurin เนื่องจากสารเหล่านี้มีความจำเพาะต่อ NFAT pathway สูง (Trevillyan JM. et al. 2001)



รูปที่ 1 ภาพจำลองแสดงการทำงานและการยับยั้งการทำงานของกลุ่มโปรตีน NFAT โดยโปรตีน NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) จะถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่ภายใน T-cell receptor (TCR) ถูกกระตุ้นด้วย ligand (signaling molecules) ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของ calcium ion ใน cytoplasm ซึ่งประมาณ calcium ion ที่เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นโปรตีน calcineurin (ซึ่งเป็น phosphatase enzyme) ให้ทำงานโดยทำให้เกิด NFAT dephosphorylation ส่งผลให้โปรตีน NFAT สามารถผ่านเข้าสู่ nucleus (NFAT Import) จับกับสาย DNA และเปิดยีน เช่น Interleukin-2 เป็นต้น ยา Cyclosporine A (CsA) และยา Tacrolimus (FK506) ทำให้การทำงานของเอนไซม์ Calcineurin (CaN) ลดลงจึงทำให้สามารถลด phosphatase activity ได้ส่งผลให้ NFAT ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ nucleus ได้

การพัฒนาโมเดล cell-based model สำหรับ NFAT nuclear-cytoplasm translocation ของงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ต่อการ screening สารสกัดจากธรรมชาติหรือสารที่ต้องการทดสอบ เพื่อศึกษาผลการยับยั้งหรือกระตุ้น NFAT nuclear-cytoplasm translocation โดยโมเดลนี้ใช้ primary fibroblast จากผิวหนังสุกรซึ่งแยกได้ง่าย เพาะเลี้ยงง่าย มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ของมนุษย์มาก และทำการทดลองใน HEK293 cell line (Human Embryonic Kidney 293 cell line) เพื่อการเปรียบเทียบผลการทดลอง อีกทั้งในการวิจัยนี้ได้ทำการตัดส่วน RHR (Rel homology region) ของโปรตีน NFAT ออกไปเพื่อจำกัดผลการเปิดยีนซึ่งอาจก่อผลเสียต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ยังคงความสามารถในการ cytoplasm-nucleus transport ของโปรตีน NFAT ไว้ได้ นอกจากนี้ยังเชื่อมต่อยีนโปรตีนเรืองแสง (green fluorescent protein-GFP) เข้ากับโปรตีน NFAT เพื่อสะดวกต่อการติดตาม cytoplasm-nucleus transport ของโปรตีน NFAT ได้ง่ายโดยกล้อง fluorescent microscope ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้มีความสะดวกและง่ายในการติดตามการเคลื่อนที่เข้า-ออกของโปรตีน NFAT cytoplasm-nucleus transport กว่าวิธีการอื่น ๆ ในการตรวจสอบฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีสารสำคัญต่อการกระตุ้นหรือการยับยั้งของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น Luciferase assay (Zhisong., et al., 2008; Barbara L.F. Kaplan., et al., 2008) หรือ ELISA method (Khanitha Punturee., et al., 2005) เพราะวิธีการดังกล่าวนี้จะต้องอาศัยอาศัยระยะเวลา วิธีการที่ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งวิธีการทั้ง 2 วิธีไม่สามารถยืนยันกระบวนการในระดับโมเลกุลของเซลล์ได้ว่าการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากสมุนไพรมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันผ่าน pathway หรือกลไกใดภายในเซลล์

การประยุกต์ใช้โมเดลนี้ในการตรวจสอบ (screening) สารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น NFAT Nuclear-cytoplasm translocation (immunomodulator) ของสารสกัดสมุนไพรที่พบหรือหาได้ง่ายในประเทศไทยหรือสารที่ต้องการทดสอบ ซึ่งสามารถพัฒนาค้นหา lead compound เพื่อไปพัฒนาเป็นยาในอนาคต และสามารถใช้ในการศึกษายืนยันกระบวนการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพรที่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันที่ชัดเจน



การทดลอง

ส่วนที่ การโคลนและตัดต่อยีน 1NFAT และเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการตัดส่วน RHR ออกจาก NFAT4(full length gene) และ NFAT3(full length gene) ให้ได้ เฉพาะส่วน NHR (เรียกว่า “NFAT4(N)” และ “NFAT3(N)” ตามลำดับ) โดยใช้วิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยมีการใช้ specific primers ต่อชิ้นส่วนยีนที่ต้องการของโปรตีน NFAT4 และ NFAT3 จากนั้นทำการตัดต่อยีน NFAT4(N) และ NFAT3(N) เข้าสู่ plasmid pcDNA3.1 ที่มียีนของ green fluorescent protein (GFP) ทำการเพิ่มจำนวน GFP-NFAT plasmid ชนิดต่าง ๆ ใน *E. Coli* และตรวจสอบความถูกต้องของผลการตัดต่อยีน จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 cell line ซึ่งไม่มีการแสดงออกของโปรตีน NFAT และเซลล์ primary fibroblasts (จากผิวหนังสุกร) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับ immortalized cell line (HEK293) ซึ่งอาจมีปัจจัยที่อาจส่งผลจากการทดลองเนื่องจากความไม่มั่นคงทางยีน (genetic instability)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 cell line (Sigma Aldrich) และ primary porcine skin fibroblasts (โรงฆ่าสัตว์ ในจังหวัดพิษณุโลก) ใน modified Eagle's medium (Gibco) โดยเพิ่ม 10% FBS (Gibco) และมี penicillin 100U/ml และ streptomycin 100µg/ml (Gibco) ปริมาตร 500 µl ต่อหลุมใน 24-well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 15,000 cells/cm² ทำการเพาะเลี้ยงประมาณ 18-24 ชั่วโมง ที่ 37 °C ปริมาณ CO₂ ที่ 5% จากนั้นทำการนำส่ง plasmid เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธี transient transfection ด้วยชุด Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen).

ส่วนที่ การศึกษาผลของ 2NFAT ชนิดต่าง ๆ ที่โคลนและตัดต่อ ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อสภาวะต่าง ๆ

นำ plasmid จากการทดลองในส่วนที่ 1 เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ โดยวิธี transient transfection และทำการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณ calcium ion ใน cytoplasm โดยการเติมสาร A23187 (Sigma Aldrich) ซึ่งจะเกิดการกระตุ้นเอ็นไซม์ calcineurin ให้อยู่ในรูป active ที่สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา dephosphorylation ของโปรตีน NFAT และเหนี่ยวนำให้โปรตีน NFAT เคลื่อนเข้าสู่ nucleus ได้ (nuclear import translocation) จากนั้นสังเกตการเกิด NFAT nuclear translocation ได้โดยผ่านการติดตามเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP, GFP-NFAT3(N), GFP-NFAT4(N) และทำการถ่ายภาพและ นับจำนวน positive cells (มีการสะสมปริมาณสัญญาณของ GFP ใน nucleus) หรือ negative cells (มีการสะสมปริมาณสัญญาณของ GFP ใน cytoplasm) ทั้งนี้ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับการใช้สาร A23187 และกลุ่ม CsA + A23187

ในแต่ละกลุ่มการทดลอง คือ กลุ่ม GFP (internal control), กลุ่ม GFP-NFAT4(N) และ กลุ่ม GFP-NFAT3(N) จะได้รับการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณ calcium ion ใน cytoplasm โดยการเติมสาร A23187 1µM เป็นเวลา 30 นาที จะกระตุ้นโปรตีน calcineurin ใน cytoplasm ให้ทำหน้าที่เปลี่ยนโปรตีน NFAT ให้อยู่ในรูป dephosphorylation ทำให้มีการเปิด domain ส่วน NLS (nuclear localization signal) ที่ทำให้โปรตีน activated NFAT สามารถเคลื่อนตัวจาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus ได้ (nuclear-cytoplasm translocation) และเพื่อพิสูจน์ว่าการกระตุ้น nuclear translocation ของ NFAT ผ่านการทำงานของโปรตีน calcineurin ในการทดลองจึงเพิ่มสาร CsA (Sigma Aldrich) ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ (1 และ 5µM) เป็นเวลา 45 นาที ซึ่ง CsA นี้เป็นสารยับยั้งการทำงานของโปรตีน calcineurin ซึ่งเป็น phosphatase enzyme ภายในเซลล์ที่ช่วยในการนำเข้าไปรตีน NFAT จาก cytoplasm สู่ nucleus จากนั้นในแต่ละการทดลองจะใช้กล้อง Fluorescent microscope (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss) สำหรับการสังเกตและถ่ายภาพเพื่อการวิเคราะห์ผล

ส่วนที่ 3 การนำ cell-based model ของ NFAT nuclear-cytoplasm translocation ไปใช้สำหรับการค้นหา (screening) สารสกัดสมุนไพรจากธรรมชาติ โดยการตรวจสอบฤทธิ์การเพิ่มหรือยับยั้ง NFAT nuclear translocation (immunomodulators)

การทดลองนี้ได้คัดเลือกสมุนไพรที่มีรายงานทางเอกสารวิชาการว่ามีฤทธิ์ในการกีดขวางการสร้าง interleukin 2 (IL-2) และมีผลต่อ T-cell signalling ซึ่งอาจมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้ง calcium signaling และ NFAT activation ซึ่งได้แก่ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) และ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่พบ

หรือหาได้ง่ายในประเทศไทย และมีเอกสารทางวิชาการยืนยันหรือสนับสนุนผลทางเภสัชวิทยาในแง่ immunomodulators (Prasitpuriprecha C., et al., 2005) นำสารสกัดสมุนไพรข้างต้นมาตรวจสอบฤทธิ์การเพิ่มหรือยับยั้ง NFAT nuclear translocation กับ cell-based model นี้

Statistical analysis

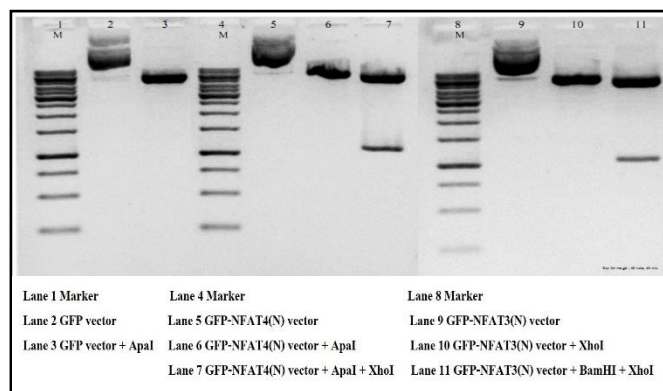
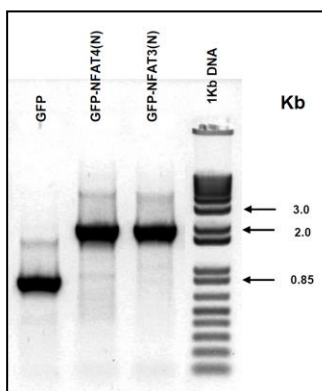
จำนวนของเซลล์ที่มีสัญญาณเรืองแสงของโปรตีน GFP ที่อยู่ใน nucleus (nucleus-GFP positive cells) และจำนวนของเซลล์ที่มีสัญญาณเรืองแสงของโปรตีน GFP ใน cytoplasm (cytoplasm-GFP positive cells) จะถูกสุ่มนับอย่างละเอียด (4 fields ต่อ 1 coverslip รวม 8 fields) ผลการทดลองจะระบุเป็น % Mean \pm SD การทดลองจะเป็นการทดลองแบบทำสองซ้ำ (duplicate) ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยวิธีวิเคราะห์แบบ repeated measurements of one-way analysis of variance - ANOVA ที่ค่านัยสำคัญ (significant level) ที่ $p \leq 0.05$.

ผลการศึกษา

ส่วนที่ การโคลนและตัดต่อ 1 และตรวจสอบความถูกต้องการตัดต่อยีน GFP, GFP-NFAT3(N), และ GFP-NFAT4(N) เข้าสู่ pcDNA3.1

จากยีน NFAT4(full length) และ NFAT3(full length) โดยการใช้วิธี PCR ทำการตัดลอกเฉพาะส่วน regulatory domain (NHR) ซึ่งจะเฉพาะส่วนที่มี nuclear localization signal domain และ calcineurin docking domain อยู่ของยีน NFAT4(full length) และ NFAT3(full length) ซึ่งให้ชื่อว่า NFAT4(N) และ NFAT3(N) จากนั้นแล้วทำการตัดต่อยีน NFAT4(N) และ NFAT3(N) เข้าสู่ plasmid pcDNA3.1 ที่มีใส่ยีนของ GFP ไว้แล้ว จากรูปที่ 2A พบว่าขนาดของ GFP plasmid มีขนาด 0.8 Kb, GFP-NFAT3(N) plasmid มีขนาด 2 Kb, และ GFP-NFAT4(N) plasmid มีขนาด 2 Kb ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของ pcDNA3.1 plasmid บวกกับของ GFP, GFP-NFAT3(N), และ GFP-NFAT4(N) ตามลำดับ

ตรวจสอบความถูกต้องการตัดต่อยีน GFP, GFP-NFAT3(N), และ GFP-NFAT4(N) เข้าสู่ pcDNA3.1 plasmid มีความถูกต้อง โดยวิธีการตัดสาย DNA ของ pcDNA3.1_GFP, pcDNA3.1_GFP-NFAT3(N), pcDNA3.1_GFP-NFAT4(N) ด้วยเอนไซม์ restriction endonucleases ซึ่งจะตัด DNA ที่เฉพาะของแต่ละ plasmid และตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน DNA (DNA fragment) โดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งพบว่ามีความยาวที่ถูกต้อง (รูป 2B)



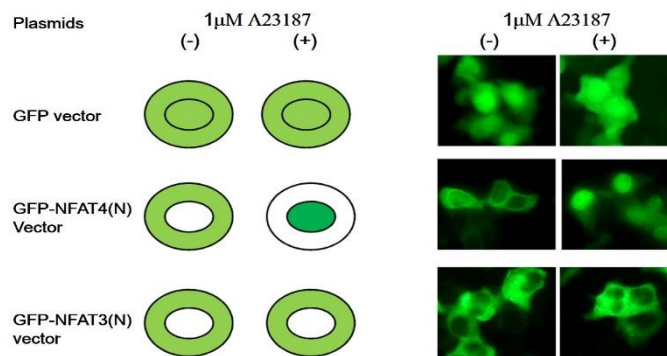
รูปที่ 2A Agarose gel electrophoresis แสดงขนาดของขนาดของยีน (gene fragments)
 GFP ~ 0.8 Kb (ลู่วัที่ 1)
 GFP-NFAT4(N) ~ 2 Kb (ลู่วัที่ 2)
 GFP-NFAT3(N) ~ 2 Kb (ลู่วัที่ 3)

รูปที่ 2B Agarose gel electrophoresis แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของขนาดยีน NFAT4(N) ซึ่งมีขนาด 1,053 bps และ NFAT3(N) ซึ่งมีขนาด 1,023 bps ที่ clone เข้าสู่ plasmid pcDNA3.1 ที่มีใส่ยีนของgreen fluorescent protein (GFP) ไว้แล้วระหว่างตำแหน่ง XhoI กับApaI สำหรับ NFAT4(N) และตำแหน่ง BamHI กับ XbaI สำหรับ NFAT3(N)



ส่วนที่ การศึกษาผลของ 2NFAT ชนิดต่างๆที่โคลนและตัดต่อ ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อสภาวะต่างๆ

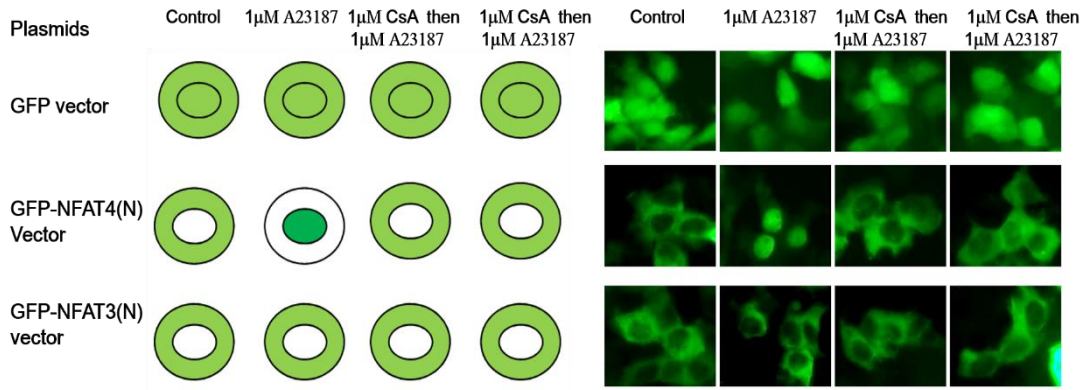
1. ทดสอบผลของสาร A23187 ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของโปรตีน NFAT4(N), NFAT3(N) และ GFP ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 เป็นการแสดงสอดคล้องระหว่างผลจากการทดลองและผลตามทฤษฎี สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าผลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามทิศทางเดียวกันกับผลทดลองตามทฤษฎี กล่าวคือ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะทำให้โปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus ในขณะที่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ NFAT3(N) จะไม่ตอบสนองต่อ A23187 (เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะไม่มีการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน NFAT3(N)) ส่วนโปรตีนเรืองแสง GFP ใช้เป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน GFP-NFAT fusion (NFAT3(N) และ NFAT4(N)) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GFP จะกระจายได้ทั่วทั้งเซลล์ (fuzzy signal) ทั้งภาวะถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 แสดงว่า GFP ไม่มีผลต่อการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน GFP-NFAT fusion (NFAT3(N) และ NFAT4(N)) นอกจากนี้พบว่าผลการทดลองใน HEK293 cell line (รูปที่ 3) และ primary fibroblasts (ไม่แสดงผลการทดลอง) ให้ผลที่เหมือนกัน



รูปที่ 3 แสดง NFAT nuclear translocation ทางทฤษฎี (ภาพทางซ้ายมือ) และจากการทดลอง (ภาพทางขวามือ) ของโปรตีน GFP-NFAT4(N), GFP-NFAT3(N) และ GFP ในเซลล์ HEK293 cell line จากการทำให้ transient transfection ของ plasmid ที่มีขึ้นดังกล่าว การแสดงออกของ NFAT4(N) ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในเซลล์ส่วน cytoplasm เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะทำให้โปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus ในขณะที่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ NFAT3(N) ซึ่งเป็น dominant negative จะไม่ตอบสนองต่อ A23187 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะไม่มีการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน NFAT3(N) ส่วนโปรตีนเรืองแสง GFP ใช้เป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของ GFP-NFAT fusion (NFAT3(N) และ NFAT4(N)) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GFP จะกระจายได้ทั่วทั้งเซลล์ทั้งภาวะถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 (20X, HEK293 cell line with/without 1µM A23187 30 min.)

2. ทดสอบผลของสาร CsA ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของโปรตีน NFAT4(N), NFAT3(N) และ GFP

รูปที่ 4 แสดงผลของทดสอบผลของสาร CsA ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของโปรตีน NFAT4(N), NFAT3(N) และ GFP ที่ โดยแสดง NFAT nuclear translocation ทั้งทางทฤษฎีและจากผลการทดลองของโปรตีน GFP-NFAT4(N), GFP-NFAT3(N) และ GFP ในเซลล์ การแสดงออกของ NFAT4(N) ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในเซลล์ส่วน cytoplasm เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะทำให้โปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus หากมีการให้สาร CsA ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ calcineurin การเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus จะถูกยับยั้ง ในขณะที่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ NFAT3(N) จะไม่ตอบสนองต่อ A23187 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะไม่มีการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน NFAT3(N) ส่วนโปรตีนเรืองแสง GFP ใช้เป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของ GFP-NFAT fusion (NFAT3(N) และ NFAT4(N)) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GFP จะกระจายได้ทั่วทั้งเซลล์ทั้งภาวะถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 ส่วนการให้ CsA ไม่มีผลต่อการเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT3(N) และ GFP ทั้ง 2 ความเข้มข้น (1 และ 5µM)



รูปที่ 4 แสดง NFAT nuclear translocation ทางทฤษฎี (กลุ่มภาพ)ซ้าย ของโปรตีน (กลุ่มภาพขวา) และจากการทดลอง (GFP-NFAT4(N), GFP-NFAT3(N) และ GFP ในเซลล์ การแสดงออกของ NFAT4(N) ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในเซลล์ส่วน cytoplasm เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะทำให้โปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus หากมีการให้สาร CsA ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ calcineurin การเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus จะถูกยับยั้ง ในขณะที่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ NFAT3(N) จะไม่ตอบสนองต่อ A23187 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะไม่มีการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน NFAT3(N) ส่วนโปรตีนเรืองแสง GFP ใช้เป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของ GFP-NFAT fusion (NFAT3(N) และ NFAT4(N)) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GFP จะกระจายได้ทั่วทั้งเซลล์ทั้งภาวะถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 ส่วนการให้ CsA ไม่มีผลต่อการเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT3(N) และ GFP ทั้ง ความเข้มข้น 2 20)X, HEK293 cell line treated with/without 1 or 5µM CsA 45 min. Then followed by 1µM A23187 30 min. treatment)

ตารางที่ 1 แสดงผลสรุปและการวิเคราะห์สถิติจากการสุ่มนับจำนวน positive cells (nuclear translocation) ภายหลังการให้เซลล์ได้รับ/ไม่ได้รับสารยับยั้ง calcineurin inhibitor (CsA) ขนาด 1 หรือ 5 µM และทำการกระตุ้นด้วยสาร A23187 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการ fixed slide และสุ่มนับจำนวน positive cells (N = 8, 2X4 fields) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ positive nuclear NFAT-localized cells แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารกระตุ้น calcineurin โดย A23187 ในขนาด 1µM เป็นเวลา 30 นาทีสามารถกระตุ้นให้โปรตีน NFAT4(N) สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ nucleus ได้มากกว่า 80% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, p <0.01) และสภาวะดังกล่าวสามารถยับยั้งได้โดยสารยับยั้งการทำงานของ calcineurin โดย CsA ทั้ง 2 ขนาดความเข้มข้นที่ใช้ 1 หรือ 5µM CsA เวลา 45 นาทีก่อนการได้รับ 1µM A23187 30 นาที

ตารางที่ 1 แสดงผลสรุปและการวิเคราะห์สถิติจากการสุ่มนับจำนวน positive cells (nuclear translocation) ภายหลังการให้เซลล์ได้รับ/ไม่ได้รับสารยับยั้ง CsA ขนาด 1 หรือ 5 µM และทำการกระตุ้นด้วยสาร A23187 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการ fixed slide และสุ่มนับจำนวน positive cells (N = 8, 2X4 fields) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ positive nuclear NFAT-localized cells (20X, HEK293 cell line treated with/without 1 or 5µM CsA 45 min., ตามด้วย 1µM A23187 30 min., ** p <0.01 ANOVA)

Treatments	Percentage of positive cells for nuclear translocation (%Mean±SD, N = 8 fields randomized)		
	GFP vector	NFAT4(N)	NFAT3(N)
Control	2.98±2.74	2.82±0.75	2.35±1.46
A23187 1µM	2.05±2.59	84.97±2.63**	2.95±1.63
CsA 1µM then A23187	2.24±7.20	1.57±0.97	1.37±0.51
CsA 5µM then A23187	1.63±8.47	2.39±2.13	1.48±0.89



จึงสามารถสรุปได้ว่า การโคลน NFAT4(N) และ NFAT3(N) gene ประสบความสำเร็จเป็นไปตามทฤษฎี และสอดคล้องกับการทดลองที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ สามารถนำ plasmids เหล่านี้ไปใช้ในการทดสอบคุณลักษณะของ ยีนเหล่านี้ และสามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ใช้โมเดลนี้ในการตรวจสอบ (screening) สารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น NFAT Nuclear-cytoplasm translocation (immunomodulator) ของสารสกัดสมุนไพรที่พบหรือหาได้ง่ายในประเทศไทย ซึ่งสามารถพัฒนาค้นหา lead compound เพื่อไปพัฒนาเป็นยาในอนาคต

ส่วนที่ 3 การนำ cell-based model ของ NFAT nuclear-cytoplasm translocation ไปใช้สำหรับการค้นหา (screening) สารสกัดสมุนไพรจากธรรมชาติ โดยการตรวจสอบฤทธิ์การเพิ่มหรือยับยั้ง NFAT nuclear translocation (immunomodulators)

การทดลองนี้ได้คัดเลือกสมุนไพรที่มีรายงานทางเอกสารวิชาการว่ามีฤทธิ์ในการกดการสร้าง interleukin 2 (IL-2) และมีผลต่อ T-cell signalling โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้ง calcium signaling และ NFAT activation ซึ่งได้แก่ สารสกัด curcumin จากพืชขมิ้นชัน (Kliem, et al., 2012) และ สารสกัด andrographolide จากพืชฟ้าทะลายโจร (Carretta, et al., 2009) เพื่อนำสารสกัดสมุนไพรข้างต้น มาตรวจสอบฤทธิ์การเพิ่ม หรือยับยั้ง NFAT nuclear translocation กับ cell-based for NFAT nuclear translocation model นี้

1. ทดสอบผลของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (partial purified) curcumin ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของ NFAT4(N)

ตารางที่ 2 แสดงผลสรุปและการวิเคราะห์สถิติจากการสุ่มนับจำนวน positive cells (nuclear translocation) ภายหลังจากให้เซลล์ได้รับสารสกัด curcumin (ความบริสุทธิ์มากกว่า 65%, Sigma Aldrich) ในระดับความเข้มข้นที่ แตกต่างกันคือ 1, 5, และ 10 μM เพื่อทดสอบผลการยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงกระตุ้น NFAT4(N) nuclear translocation ด้วยสาร A23187 ในความเข้มข้นที่ 1 μM เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการ fixed slide และสุ่มนับจำนวน positive cells (N = 8, 2X4 fields) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ positive nuclear NFAT-localized cells พบว่าสารสกัด curcumin ที่เตรียมทุกความเข้มข้น (1 - 10 μM) นั้น ไม่มีผลยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation โดยการกระตุ้น NFAT4(N) nuclear translocation ด้วยสาร A23187 ในความเข้มข้นที่ 1 μM เป็นเวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ CsA ที่ความเข้มข้น 1 μM

ตารางที่ 2 แสดงผลสรุปและการวิเคราะห์สถิติจากการสุ่มนับจำนวน positive cells (nuclear translocation) ภายหลังจากให้เซลล์ได้รับสาร สกัด curcumin ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 1, 5, และ 10 μM เพื่อทดสอบผลการยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงกระตุ้น NFAT4(N) nuclear translocation ด้วยสาร A23187 ในความเข้มข้นที่ 1 μM เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการ fixed slide และสุ่มนับจำนวน positive cells (N = 8, 2X4 fields) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ ของ positive nuclear NFAT-localized cells. (20X, HEK293 cell line, ** p < 0.01 ANOVA)

Treatments	Percentage of nuclear translocation of GFP-NFAT4(N) signal in HEK293 cell (% Mean \pm S.D.)
1 μM CsA then 1 μM A23187	0.75 \pm 0.69**
1 μM A23187	79.74 \pm 4.18
0.05% DMSO then 1 μM A23187	83.62 \pm 3.00
1 μM Curcumin then 1 μM A23187	82.91 \pm 4.13
5 μM Curcumin then 1 μM A23187	86.87 \pm 4.97
10 μM Curcumin then 1 μM A23187	82.24 \pm 4.24



2. ทดสอบผลของสารบริสุทธิ์ (purified) andrographolide ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของ NFAT4(N)

ตารางที่ 3 แสดงผลสรุปและการวิเคราะห์สถิติจากการสุ่มนับจำนวน positive cells (nuclear translocation) ภายหลังจากให้เซลล์ได้รับสารสกัด andrographolide (ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%, Sigma Aldrich) ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 1, 5, 10, และ 100µM เพื่อทดสอบผลการยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงกระตุ้น NFAT4(N) nuclear translocation ด้วยสาร A23187 ในความเข้มข้นที่ 1µM เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการ fixed slide และสุ่มนับจำนวน positive cells (N = 8, 2X4 fields) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ positive nuclear NFAT-localized cells พบว่าสาร andrographolide ที่เตรียมทุกความเข้มข้น (1-100µM) ไม่มีผลยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation โดยการกระตุ้น NFAT4(N) nuclear translocation ด้วยสาร A23187 ในความเข้มข้นที่ 1µM เป็นเวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ CsA ที่ความเข้มข้น 1µM

ตารางที่ 3 แสดงผลสรุปและการวิเคราะห์สถิติจากการสุ่มนับจำนวน positive cells (nuclear translocation) ภายหลังจากให้เซลล์ได้รับสารสกัด andrographolide ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 1, 5, 10, และ 100µM เพื่อทดสอบผลการยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นจึงกระตุ้น NFAT4(N) nuclear translocation ด้วยสาร A23187 ในความเข้มข้นที่ 1µM เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการ fixed slide และสุ่มนับจำนวน positive cells (N = 8, 2X4 fields) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ positive nuclear NFAT-localized cells (20X, HEK293 cell line, ** p <0.01 ANOVA)

Treatments	Percentage of nuclear translocation of GFP-NFAT4(N) signal in HEK293 cell (% Mean ± S.D.)
1µM CsA then 1µM A23187	0.89 ± 0.72**
1µM A23187	79.14 ± 4.04
0.05% DMSO then 1µM A23187	78.03 ± 8.77
1µM Andrographolide then 1µM A23187	83.74 ± 3.96
10µM Andrographolide then 1µM A23187	81.66 ± 6.36
50µM Andrographolide then 1µM A23187	77.94 ± 4.46
100µM Andrographolide then 1µM A23187	72.81 ± 8.41

อภิปรายผลการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้จะมุ่งเน้นการสร้าง cell-based model สำหรับ NFAT nuclear-cytoplasm translocation และนำโมเดลนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ (screening) สารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น NFAT nuclear-cytoplasm translocation (immunomodulator) ของสารสกัดสมุนไพรหรือสารที่อาจให้ผลทางเภสัชวิทยา (ไม่ว่าจะกระตุ้นหรือยับยั้ง NFAT nuclear-cytoplasm translocation) ก็จะสามารถพัฒนาต่อจนได้ lead compound เพื่อไปใช้เป็นยาในอนาคต

ในการทดลองส่วนที่ 1 การโคลนและตัดต่อยีน NFAT และเพาะเลี้ยงเซลล์ (เพื่อการพัฒนา Cell-based model of NFAT nuclear-cytoplasm translocation) ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการดำเนินการโคลนและตัดต่อยีน NFAT4(N) และ NFAT3(N) ซึ่งวัตถุประสงค์สำคัญในการตัดต่อยีนครั้งนี้เพื่อป้องกันผลไม่พึงประสงค์จากการเปิดหรือปิดยีนของโปรตีน NFAT4 และ NFAT3 โดยการกำจัดส่วน Rel-homology region (RHR) ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยโปรตีน NFAT4(N) และ NFAT3(N) ยังคงมีส่วนของ N-terminal domain ที่สามารถจับกับโปรตีน calcineurin ได้ (ซึ่งเป็น screening targeted protein ของโมเดลนี้) และยังคงมีส่วนของ nuclear localization signal domain (NLS) ซึ่งจะตอบสนองเมื่อการกระตุ้นของการทำงานของโปรตีน calcineurin การสร้างเป็นโปรตีนผสม GFP-NFAT4(N) และ GFP-NFAT3(N) ก็เพื่อให้สามารถศึกษาติดตามการเคลื่อนที่เข้า-ออก ระหว่าง cytoplasm กับ



nucleus ของโปรตีน NFAT4(N) และ NFAT3(N) ได้อย่างชัดเจนโดยอาศัยการเรืองแสงของโปรตีน GFP ผู้วิจัยยังได้ปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง HEK293 cell lines และ primary fibroblasts จากสุกร ให้มีความเหมาะสมในการศึกษานี้

ในการศึกษาส่วนที่ 2 การศึกษาผลของ NFAT ชนิดต่าง ๆ ที่โคลนและตัดต่อ ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อสภาวะต่าง ๆ (เพื่อทดสอบ Cell-based model of NFAT nuclear-cytoplasm translocation) ทดสอบผลของสาร Calcium ionophore (A23187) ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของโปรตีน NFAT4(N), NFAT3(N) และ GFP ได้ผลการทดลองเป็นตามทฤษฎี กล่าวคือเมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะทำให้โปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus ในขณะที่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ NFAT3(N) จะไม่ตอบสนองต่อ A23187 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะไม่มีการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน NFAT3(N) ส่วนโปรตีนเรืองแสง GFP พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GFP จะกระจายได้ทั่วทั้งเซลล์ (fuzzy signal) ทั้งภาวะถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 นอกจากนั้นพบว่าผลการทดลองจะให้ผลที่เหมือนกันเมื่อมีการใช้เซลล์ HEK293 cell line หรือ primary porcine fibroblasts มาใช้ในการทดลอง

ทดสอบผลของสาร cyclosporine A (CsA) ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของ NFAT4(N), NFAT3(N) และ GFP (control plasmid) ที่จัดเตรียมขึ้น จากการทดลอง GFP-NFAT4(N), GFP-NFAT3(N) และ GFP ในเซลล์ที่มียีนดังกล่าว การแสดงออกของ NFAT4(N) ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในเซลล์ส่วน cytoplasm เมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะทำให้โปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus แต่หากมีการให้สาร CsA ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ calcineurin การเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT4(N) เข้าสู่ nucleus จะถูกยับยั้งทั้งความเข้มข้น 1 และ 5 μ M ในขณะที่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ NFAT3(N) (ซึ่งไม่มี NLS) จะไม่ตอบสนองต่อ A23187 โดยเมื่อมีการกระตุ้นด้วย A23187 จะไม่มีการเข้าสู่ nucleus ของโปรตีน NFAT3(N) ส่วนโปรตีนเรืองแสง GFP พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GFP จะกระจายได้ทั่วทั้งเซลล์ทั้งภาวะถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 ส่วนการให้ CsA จะไม่มีผลต่อการเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT3(N) และ GFP ทั้งความเข้มข้น 1 และ 5 μ M ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน GFP ไม่มีผลต่อการเคลื่อนตัวของโปรตีน NFAT เข้า-ออก ระหว่าง nucleus และ cytoplasm

ในการศึกษาส่วนที่ 3 การนำ cell-based model ของ NFAT nuclear-cytoplasm translocation ไปใช้สำหรับการค้นหาสารสกัดสมุนไพรจากธรรมชาติหรือสารที่ต้องการทดสอบโดยการตรวจสอบฤทธิ์การเพิ่มหรือยับยั้ง NFAT nuclear translocation ผลการทดสอบผลของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ curcumin ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของ NFAT4(N) พบว่าสารสกัด curcumin ที่เตรียมทุกความเข้มข้น (1-10 μ M) ไม่มีผลยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ CsA ที่ความเข้มข้น 1 μ M อย่างไรก็ตาม curcumin อาจออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งผ่านเส้นทาง NF- κ B activation (Kliem, et al., 2012) และผลการทดสอบผลของสารบริสุทธิ์ andrographolide ต่อ cytoplasm-nuclear translocation ของ NFAT4(N) พบว่าสาร andrographolide ที่เตรียมทุกความเข้มข้น (1-100 μ M) ไม่มีผลยับยั้ง NFAT4(N) nuclear translocation อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ CsA ที่ความเข้มข้น 1 μ M ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Carretta MD. และคณะ (2009) โดยคาดว่า andrographolide น่าจะออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้ง NF- κ B และ mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway (Carretta, et al., 2009) ดังนั้นแล้วแม้สารสกัด curcumin และ andrographolide จะมีการศึกษาที่ยืนยันว่าสามารถยับยั้งการเกิด NFAT activation ได้ก็ตาม ในการศึกษาที่ผู้วิจัยสามารถยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งดังกล่าวไม่น่าจะเกิดขึ้นผ่านทาง calcineurin inhibition แต่ น่าจะเป็นผลจากการยับยั้งในส่วนอื่น ๆ ของ pathway หรือกลไกอื่น ๆ ที่ไม่ผ่านทาง NFAT เช่น c-jun transcription factor หรือ NF- κ B activation เป็นต้น

การพัฒนา cell-based model ของ NFAT nuclear-cytoplasm translocation นี้จึงอาจกล่าวได้ว่ามีจุดแข็งในด้านของการตรวจสอบ (screening) สารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น NFAT nuclear-cytoplasm translocation ที่มีความสะดวกและค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าวิธีการอื่น ๆ โดยอาศัยการติดตามสัญญาณของโปรตีนเรืองแสง (green fluorescent protein) ภายใต้อุปกรณ์ Fluorescent microscope แต่อย่างไรก็ตาม cell-based model ของ NFAT nuclear-cytoplasm translocation ก็ยังมีข้อจำกัดในการตรวจสอบ คือ เซลล์ที่จะนำมาใช้กับการทดลองใน cell-based model นี้จะต้องมีการแสดงออกของโปรตีน calcineurin (ซึ่งเป็น phosphatase enzyme) ทำหน้าที่กระตุ้น NFAT dephosphorylation ส่งให้โปรตีน NFAT



สามารถผ่านเข้าสู่ nucleus ได้ และ cell-based model นี้เป็นการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น ในระดับ in vitro เท่านั้น หากต้องการยืนยันฤทธิ์ของสารที่นำมาทดสอบต้องมีการทดสอบในระดับของสัตว์ทดลองและมนุษย์ต่อไป

สรุปผลการศึกษา

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนา cell-based model สำหรับการศึกษานิวเคลียร์ (Nuclear Factor of Activated T cells) nuclear-cytoplasm translocation และได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และการทำงานของโมเดลดังกล่าวจนเป็นที่น่าพอใจว่าผลการทดลองเป็นไปตามทฤษฎีและสอดคล้องกับการทดลองที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยอาศัยการชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณความเข้มข้นของ calcium ion ใน cytoplasm ของสาร A23187 และการใช้สาร CsA ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calcineurin phosphatase ซึ่งผลประสบความสำเร็จของโมเดลนี้ สามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ (screening) สารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้น NFAT Nuclear-cytoplasm translocation (immunomodulator) ของสารสกัดสมุนไพรหรือสารที่ต้องการทดสอบซึ่งสามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นยาได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่าง ๆ ที่ให้ความสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดี เช่น คณะเภสัชศาสตร์ และมหาวิทยาลัยนเรศวร ฐานะต้นสังกัด หน่วยปฏิบัติการวิจัย Biotechnology and Molecular Biology Research Unit (BMBR) คณะเภสัชศาสตร์ในเรื่องเครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผู้สนับสนุนทุนวิจัย และศูนย์ความเป็นเลิศนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

- Barbara L.F. Kaplan, Alison E.B. Springs, Norbert E. Kaminski. (2008). The profile of immune modulation by cannabidiol (CBD) involves deregulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT). *Biochemical Pharmacology* 76. (2008), 726-737
- Carretta MD, Alarcon P, Jara E, Solis L, Hancke JL, Concha II, Hidalgo MA, Burgos RA. (2009). Andrographolide reduce IL-2 production in T-cells by interfering with NFAT and MAPK activation. *Eur J Pharmacol*, 602(2-3), 413-21.
- Khanittha Punturee, Christopher P Wild, Watchara Kasinrer, Usanee Vinitketkumnuen. (2005). Immunomodulatory Activities of Centella asiatica and Rhinacanthus nasutus Extracts. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 6, (2005), 396-400
- Kliem C, Merling A, Giaisi M, Köhler R, Krammer PH, Li-Weber M. (2012). Curcumin suppresses T cell activation by blocking Ca²⁺ mobilization and nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation. *J Biol Chem*, 23; 287(13), 10200-9.
- Macian F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 5, 472-484.
- Masuda ES, Imamura R, Amasaki Y, Arai K, Arai N. (1998). Signalling into the T-Cell Nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal*. 10(9), 599-611.
- Muller MR. and Rao A. (2010). NFAT, immunity and cancer : A transcription factor comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 10, 645-655.
- Prasitpuriprecha C, Sripanidkulchai B, Lulitanond V, Saguansermisri J. (2005). Studies on the utilization of medicinal plants as immunomodulators in Ubon Ratchathani province, Thailand. *KKU Res J*, 10(1), 31-41.



- Spelman K, Burns JJ, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, and Tenborg M. (2006). Modulation of cytokine expression by Traditional medicine: A review of herbal immunomodulators. *Alternative medicine Review*, 11 no.2 128-150.
- Trevillyan JM, Chiou XG, Chen YW, Ballarom SJ, Sheets MP, Smith ML, Wiedeman PE, Warrior U, Wilkins J, Gubbins EJ, Gagne GD, Fagerland J, Carter GW, Jay RL, Mollison KW, Djuric SW. (2001). Potent Inhibition of NFAT activation and T Cell Cytokine Production by Novel Low Molecular Weight Pyrazole Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48118-48126.
- Zhisong Chen, Benny Kwong Huat Tan, Soh Ha Chan. (2008). Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *International Immunopharmacology*. 8(2008), 1663-1671