



บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ของ *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการคัดแยก *Streptomyces* spp. จำนวน 178 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดิน ที่เก็บจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และได้ทำการจัดกลุ่มด้วยการจัดจำแนกส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S-ITS โดยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี และได้ทำการคัดกรองเบื้องต้นถึงความสามารถของสารสกัดจาก *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ต่อการต้านการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบในเซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW 246.7 โดยพบ 2 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบ ได้แก่ *Streptomyces* sp. D230704 และ *Streptomyces* sp. O245704 นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* spp. สองไอโซเลตนี้ยังสร้างสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ เมื่อทดสอบกับ *Candida albican* (Punkum, 2007) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงการพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับชีววิทยาโมเลกุลของ *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลต จึงทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ของ *Streptomyces* sp. D230704 และ *Streptomyces* sp. O245704 ซึ่งได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ดังแสดงในรูป 4.1 และ 4.2 หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลออนไลน์ (GenBank) เพื่อระบุสปีชีส์ของไอโซเลต *Streptomyces* sp. D230704 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวประมาณ 1200 bp เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูลพบว่ามีคล้ายคลึงกับ *Streptomyces lanatus* NBRC 12787 Accession Number AB184845 โดยมีค่า Query coverage เท่ากับ 99% และค่า Max identity เท่ากับ 99% สำหรับ *Streptomyces* sp. O245704 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวประมาณ 1000 bp เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูลพบว่ามีคล้ายคลึงกับ *Streptomyces yokosukanensis* strain NRRL B-3353 Accession Number มีค่า Query coverage เท่ากับ 99% และค่า Max identity เท่ากับ 100%

> *Streptomyces* sp. D230704

CTTTCCAACCCGGGAGATGCCTCCCAGGCTCGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAG
 GGCTTGTCCCAGAGTGAAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTA
 ATCCACCCCGAAGGGCTTCATCTCGACTGCTTTTGGATCGCCTGCGATCGACTGCAGAC
 CCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTT
 ACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
 GTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTGCTGAAA
 GAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTC
 GCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAG
 TCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCA
 TTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTTACCGCCGGAGCTTTTCA
 CTCGGTTCACTTCGTCCTCGCCAGTCCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTT
 GGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
 GCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGA

รูป 4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Streptomyces* sp. D230704

ลำดับนิวคลีโอไทด์วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ChromasPro 1.5

> *Streptomyces* sp. O245704

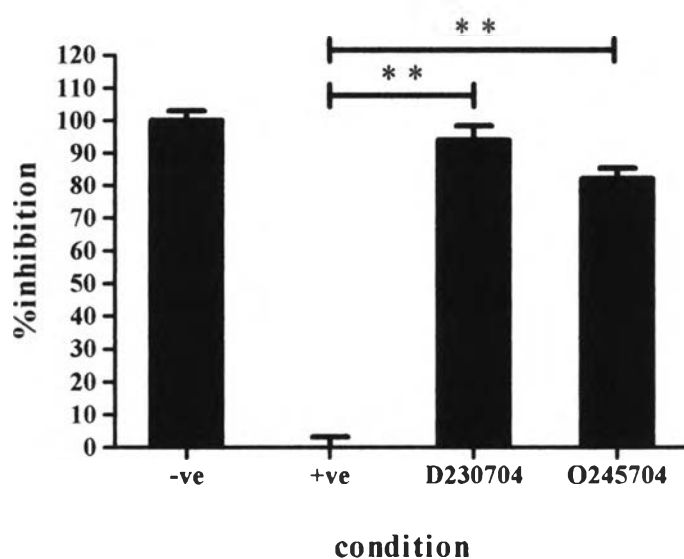
CGTTCGCCACTAATCCACCCCGAAGGGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTCCATTTTCAG
 CAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 AGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTTCGATTGTGAAAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCT
 GCAGTCGATACGCAGGTGAGTCGTCCACCTTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTC
 CTGTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCT
 CGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCAC
 CTGTACACCGACCACAAGGGGGACCCTGTCTCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGC
 CTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGGCGGG
 CCCCCGTCCATTCCTTGAGTTTTAGCACTTGCCTTCGCCAGTCCCACCTTCGACA
 GCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGT
 GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTTTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGA
 TTACTAGCGACTCCGACTTCTTGGGGTCTGTTGCAGACCCCC

รูป 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Streptomyces* sp. O245704

ลำดับนิวคลีโอไทด์วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ChromasPro 1.5

4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดจากเมแทบอลิต์จาก *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ของแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ

เตรียมสารเมแทบอลิต์จาก *Streptomyces* spp. D230704 และ O245704 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด C4 แล้วปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสมาสกัดด้วย acetone ในอัตราส่วน 1: 1 นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบด้วยการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์จากแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ และนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (หัวข้อ 3.4.3) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแมโครฟาจที่ชุดควบคุม สารสกัดจาก *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลตมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เนื่องจากสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมโครฟาจอย่างมีนัยสำคัญ (รูป 4.3) อีกทั้งสารเมแทบอลิต์ยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์นี้ (ไม่แสดงข้อมูล)

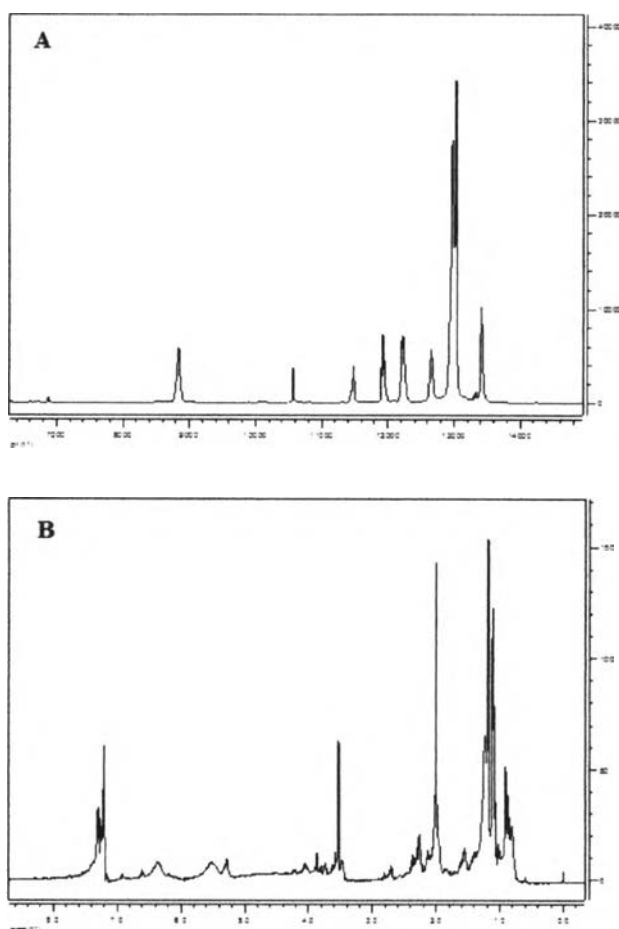


รูป 4.3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ แมโครฟาจที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเมแทบอลิต์และได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (-ve คือ DMSO, +ve คือ DMSO+LPS+IFN- γ และ ** คือ ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$)

4.3 การทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบของเมแทบอลิไท์ให้บริสุทธิ์

4.3.1 *Streptomyces* sp. D230704

หลังจากเพิ่มปริมาณของสารเมแทบอลิไท์จาก *Streptomyces* spp. D230704 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในปริมาตร 20 ลิตร และคัดแยกส่วนย่อยตามแผนภูมิ 1 และ 2 ตามลำดับ ได้นำสารสกัดทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะสารเบื้องต้นด้วยการวิเคราะห์โดย NMR (รูป 4.4)

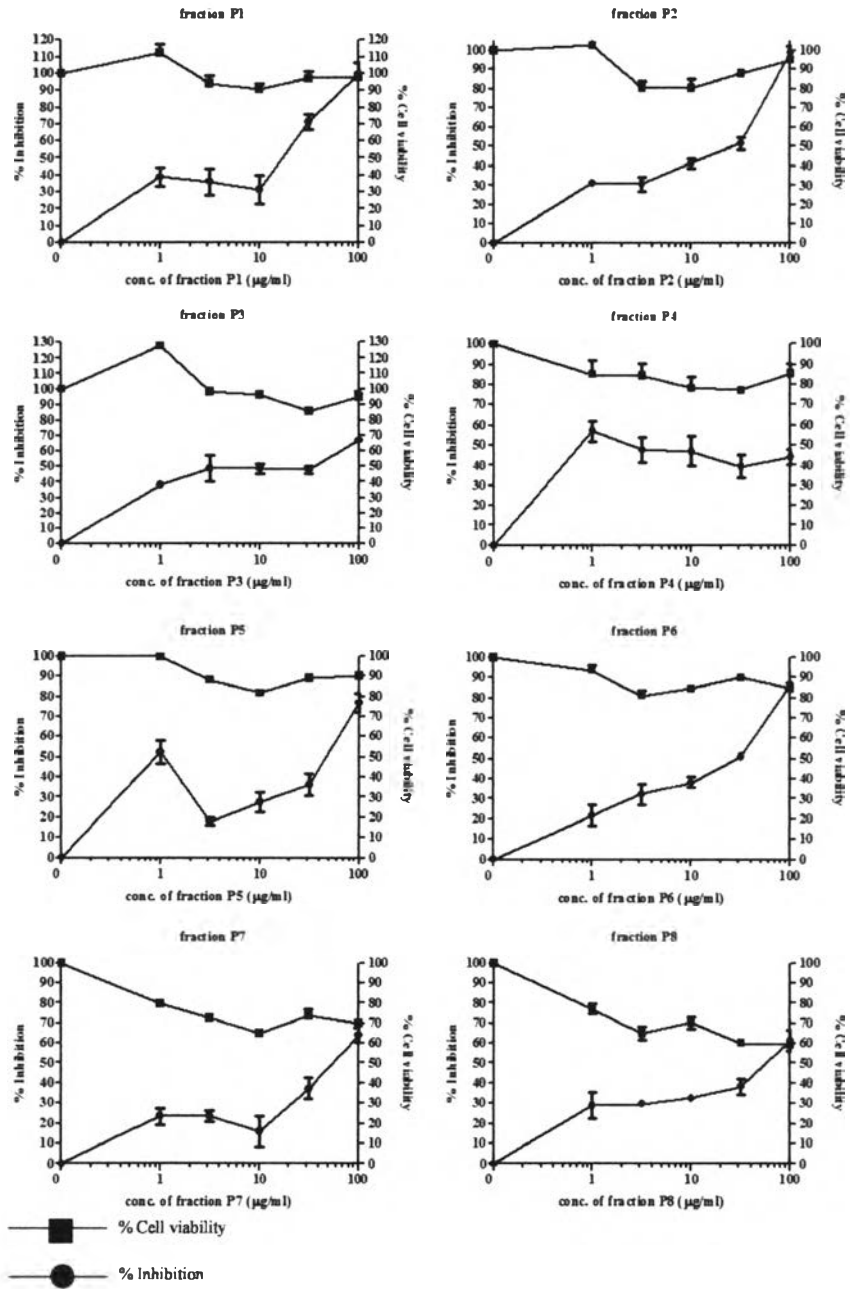


รูป 4.4 NMR สเปกตรัมของ Crude ethyl acetate ของ *Streptomyces* sp. D230704 (4.6A) และ *Streptomyces* sp. O245704 (4.6B) NMR สเปกตรัมได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker AV400 spectrometer ที่ 400 MHz สำหรับการศึกษานำไปวิเคราะห์ด้วย NMR สารสกัดที่นำไปวิเคราะห์ถูกละลายใน $CDCl_3$

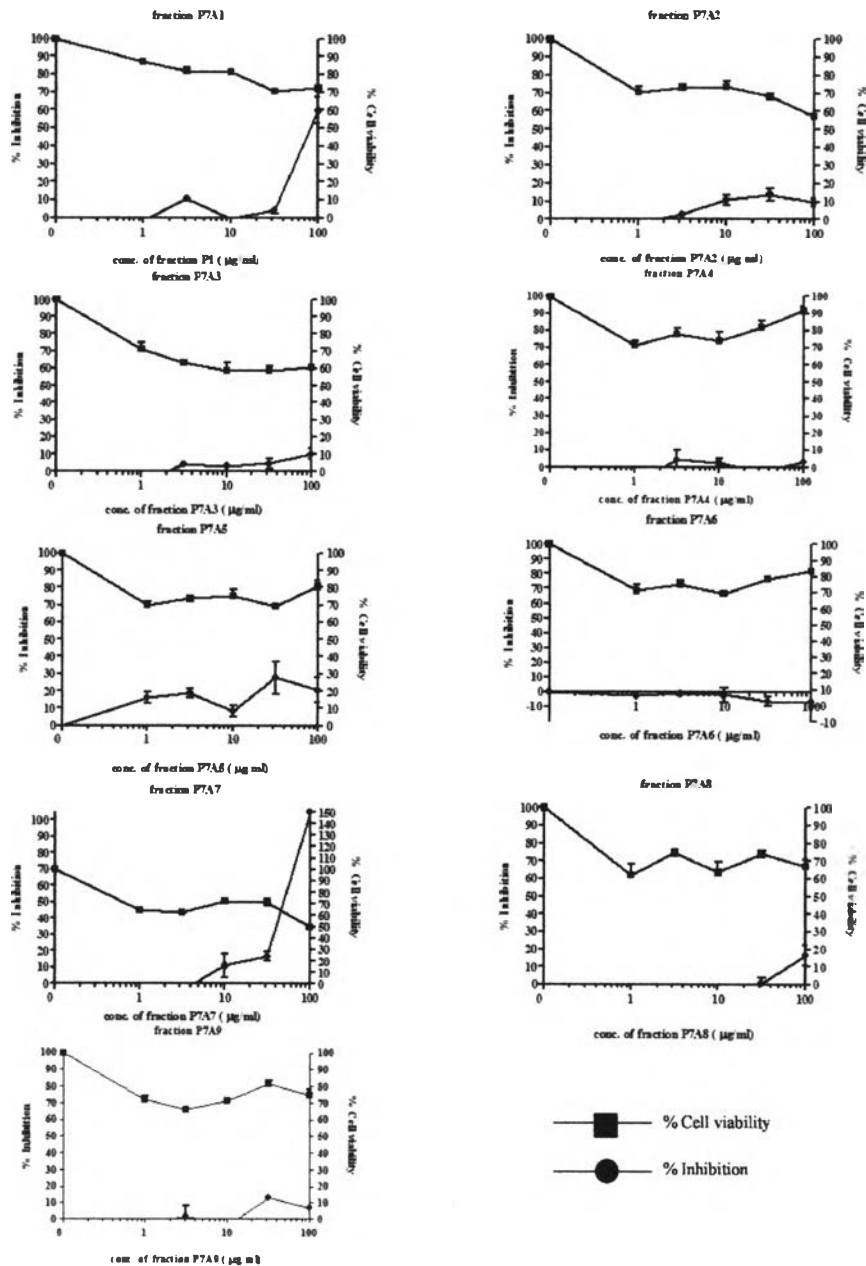
นำสารสกัดที่สกัดได้โดยการสกัดด้วย ethyl acetate (crude ethyl acetate) ไปผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 column ขนาด 3.8×5 เซนติเมตร ใช้ methanol เป็นสารละลายในการชะผ่านคอลัมน์ จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 8 ส่วน (ส่วนย่อย) คือ ส่วนย่อย P1 ถึง ส่วนย่อย P8 นำสารสกัดที่คัดแยกได้ทั้ง 8 ส่วนย่อยไปวิเคราะห์ด้วย NMR (ภาคผนวก ค) และทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบ (หัวข้อ 3.4.3) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (หัวข้อ 3.4.2) พบว่าทุกส่วนย่อยมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมาก โดยให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์อยู่ในช่วง 70-90 เปอร์เซ็นต์ที่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ได้แก่ P1, P2, P5, P6, P7 และ P8 (รูป 4.5)

จากนั้นเลือก ส่วนย่อย P7 มาทำการคัดแยกสารต่อ เนื่องจาก ส่วนย่อย P7 เมื่อนำมาทดสอบ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อย และมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ทดสอบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ส่วนย่อย P7 มีปริมาณของสารเพียงพอในการจะทำการคัดแยกสารต่อไป จึงนำส่วนย่อย P7 มาผ่านคอลัมน์ชนิด silica gel column chromatography จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 8 ส่วน คือ ส่วนย่อย P7A1 ถึง ส่วนย่อย P7A8 พบว่าทุกส่วนย่อย มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมากเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์จะอยู่ในช่วง 70-90 เปอร์เซ็นต์ที่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (0-100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนย่อย ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ มีเพียงส่วนย่อย P7A7 ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (รูป 4.6) แต่เนื่องจากทุกส่วนย่อย มีปริมาณสารไม่เพียงพอกับการนำไปแยกต่อไป จึงศึกษาในสารสกัดส่วนอื่น ได้แก่ crude hexane extract และ crude water extract

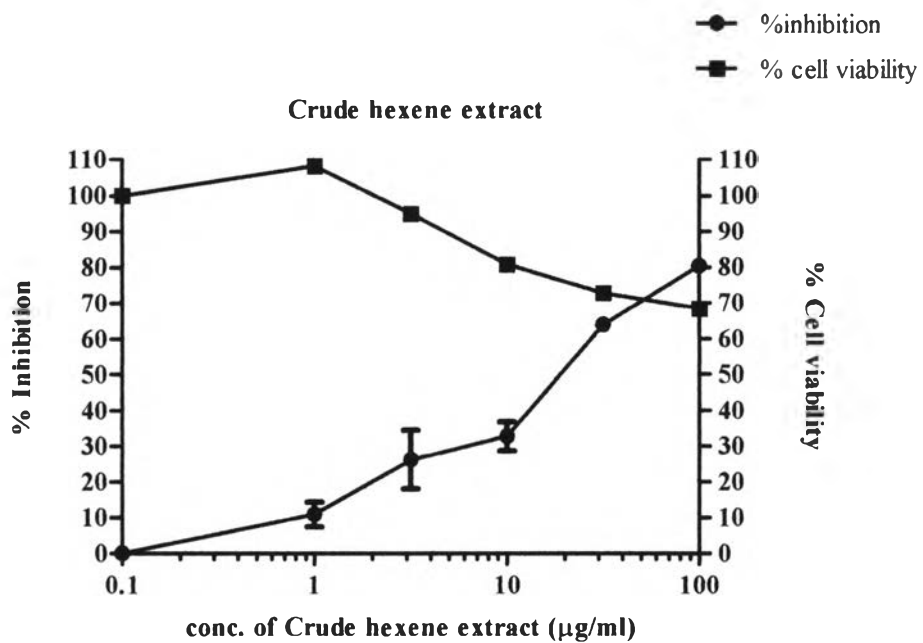
นำส่วนของ crude hexane extract ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า crude hexane extract มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ทดสอบประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 31.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ทดสอบสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูป 4.7)



รูป 4.5 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัดส่วนย่อย P1-P8 โดยเติมสารสกัดแก่แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด ส่วนย่อย P1 ถึง ส่วนย่อย P8 ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ กราฟ ● คือ เปรอ์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์)



รูป 4.6 เพลอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัดส่วนย่อย P7A1-P7A9 โดยเติมสารสกัดแก่แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด ส่วนย่อย P7A1 ถึงส่วนย่อย P7A9 ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เพลอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ กราฟ ● คือ เพลอร์เซนต์ความอยู่รอดของเซลล์)

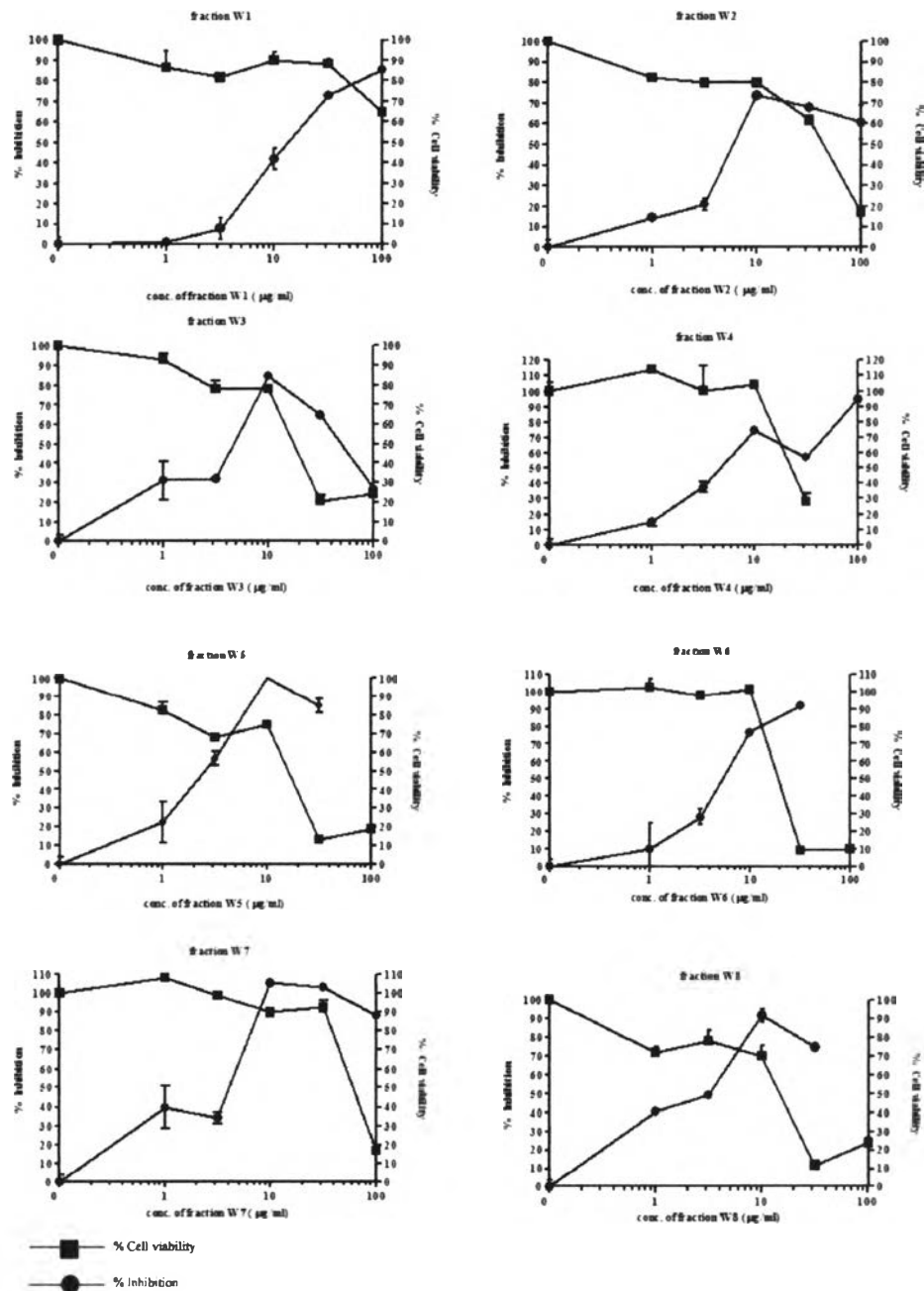


รูป 4.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 cell line ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัด Crude hexane extract โดยสารสกัดแก่แมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด Crude hexane extract ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และกราฟ ● คือ เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์)

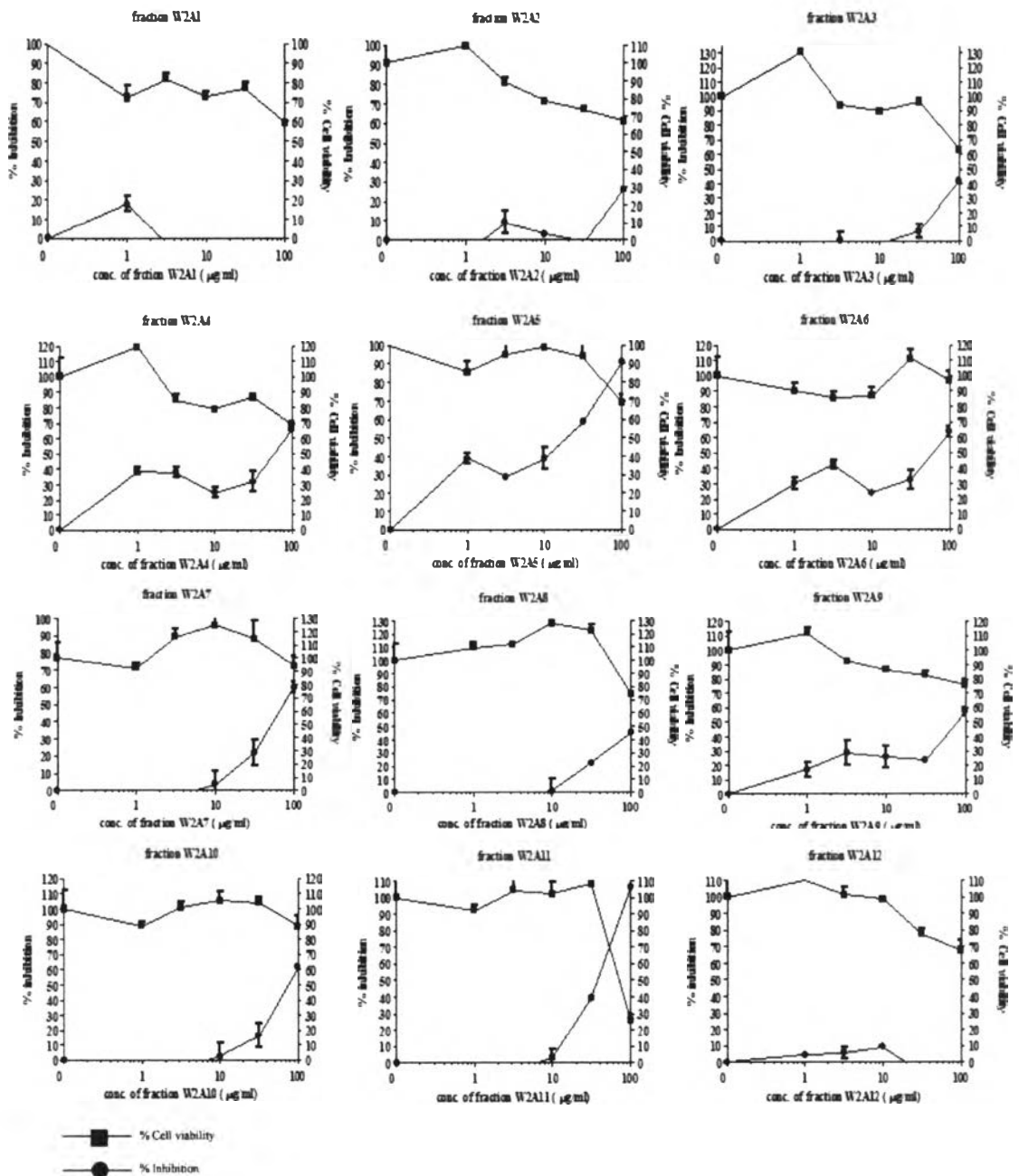
จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากการสกัดด้วย ethyl acetate และ hexane (crude water extract) มาผ่านคอลัมน์ชนิด reverse phase silica gel จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 8 ส่วน คือ W1 ถึง W8 แล้วนำทุกส่วนย่อยมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านการอักเสบ พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ยกเว้น ส่วนย่อย W2 และส่วนย่อย W7 ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อย และมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (รูป 4.8)

จึงเลือกส่วนย่อย W2 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อ เนื่องจากส่วนย่อย W2 เมื่อนำมาทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อย และมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และปริมาณของส่วนย่อย W2 มีสารเพียงพอในการจะทำการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป จึงนำส่วนย่อย W2 ผ่านคอลัมน์ชนิด reverse phase silica gel จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 12 ส่วน คือ ส่วนย่อย W2A1 ถึง ส่วนย่อย W2A12 นำทุกส่วนย่อย ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า ส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อย ได้แก่ ส่วนย่อย W2A5 และ ส่วนย่อย W2A11 (รูป 4.9)

จากการคัดแยกสารจาก *Streptomyces* sp. D230704 สารสกัดในแต่ละส่วนที่แยกได้ไม่สามารถแยกต่อได้เนื่องจากปริมาณสารน้อยเกินกว่าจะดำเนินการต่อไปได้ และจากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H NMR}$ พบว่าสารส่วนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบมีลักษณะของสเปกตรัมในส่วนของคาร์บอนสายยาว (carbon long chain) เป็นส่วนใหญ่ จะเห็นได้ว่าส่วนของ crude hexane extract มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ จึงคาดว่าสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบน่าจะอยู่ในส่วนของคาร์บอนสายยาวหรือในส่วนของน้ำมัน ทำให้ไม่สามารถการแยกได้โดยการใช้ column chromatography



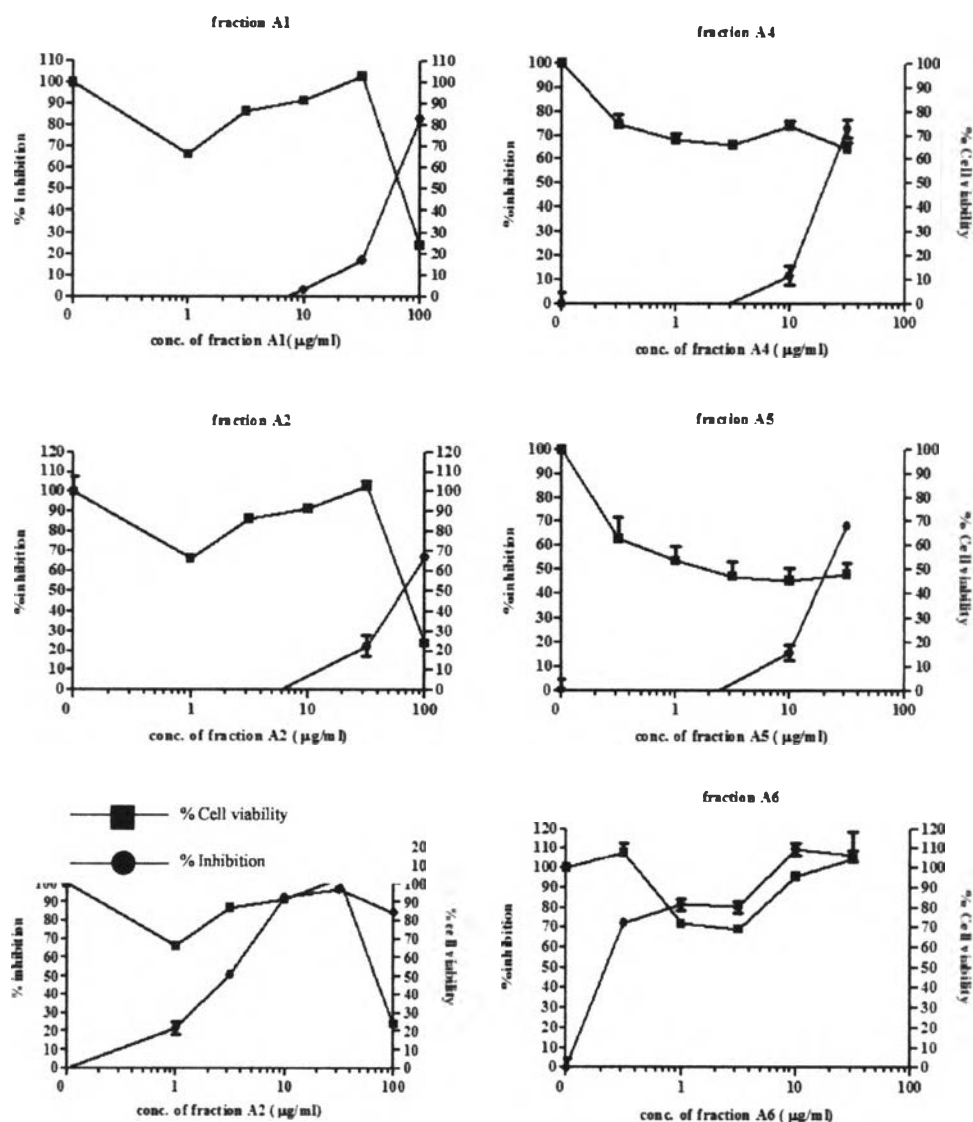
รูป 4.8 เปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัดส่วนย่อย W1-W8 โดยเติมสารสกัดในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด ส่วนย่อย W1 ถึงส่วนย่อย W8 ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และ กราฟ ● คือ เปอร์เซนต์ความอยู่รอดของเซลล์)



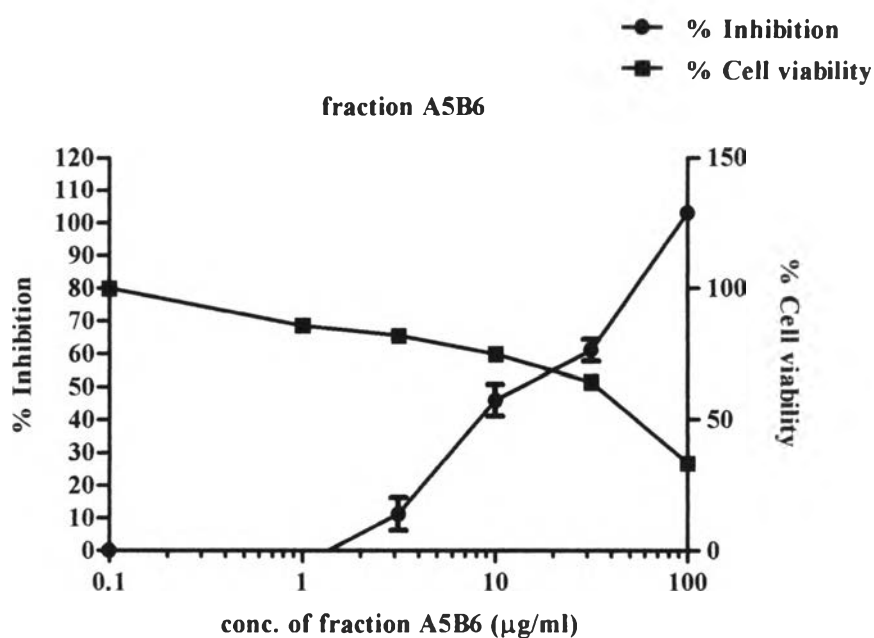
รูป 4.9 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัดส่วนย่อย W2A1-W2A12 โดยเติมสารสกัดในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด ส่วนย่อย W1A1 ถึง ส่วนย่อย W1A12 ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ กราฟ ● คือ เปรอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์)

4.3.1 *Streptomyces* sp. O245704

นำ *Streptomyces* sp. O230704 มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว C4 ปริมาตร 20 ลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บเฉพาะส่วนใสมาสกัดตามขั้นตอนของแผนภูมิ 3.2 สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate นำสารสกัดที่สกัดส่วนของ crude ethyl acetate ผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 ขนาด 3.8×5 เซนติเมตร ใช้ methanol เป็นสารละลายในการชะผ่านคอลัมน์ จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 5 ส่วนย่อย คือ ส่วนย่อย A1 ถึง ส่วนย่อย A5 แล้วนำทุกส่วนย่อยไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ พบว่าส่วนย่อย A4 และ ส่วนย่อย A5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยและมีฤทธิ์ในการลดการต้านการอักเสบที่ความเข้มข้น 31.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูป 4.10) แต่เลือกส่วนย่อย A5 มาแยกต่อเนื่องจากสารมีปริมาณมากกว่า นำส่วนย่อย A5 ผ่านคอลัมน์ชนิด Sephadex LH-20 ขนาด 3.8 × 5 เซนติเมตร ใช้ methanol เป็นสารละลายในการชะผ่านคอลัมน์ อีกครั้ง จากการผ่านคอลัมน์ของสารสกัดได้แบ่งสารสกัดออกเป็น 6 ส่วนย่อย คือ ส่วนย่อย A5B1 ถึง ส่วนย่อย A5B6 นำทุกส่วนย่อยที่แยกได้ไปทดสอบ พบว่าส่วนย่อย A5B6 มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (รูป 4.11) จึงนำสารไปตกผลึกซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้สารมีความบริสุทธิ์มากขึ้น นำสารที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR และวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารด้วยเครื่อง Mass spectrometer (MS) ชนิด MOLDI-TOF mass spectrometer

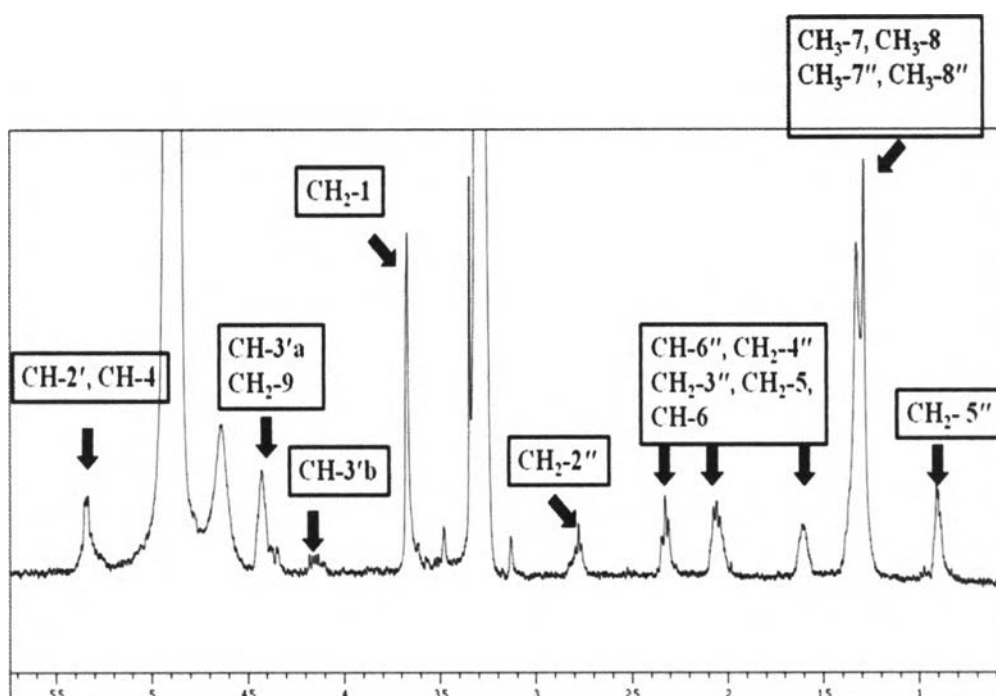


รูป 4.10 เปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัดส่วนย่อย A1-A6 โดยเคมิสาร์สกัดในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด ส่วนย่อย A1 ถึง ส่วนย่อย A6 ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ กราฟ ● คือ เปอร์เซนต์ความอยู่รอดของเซลล์)



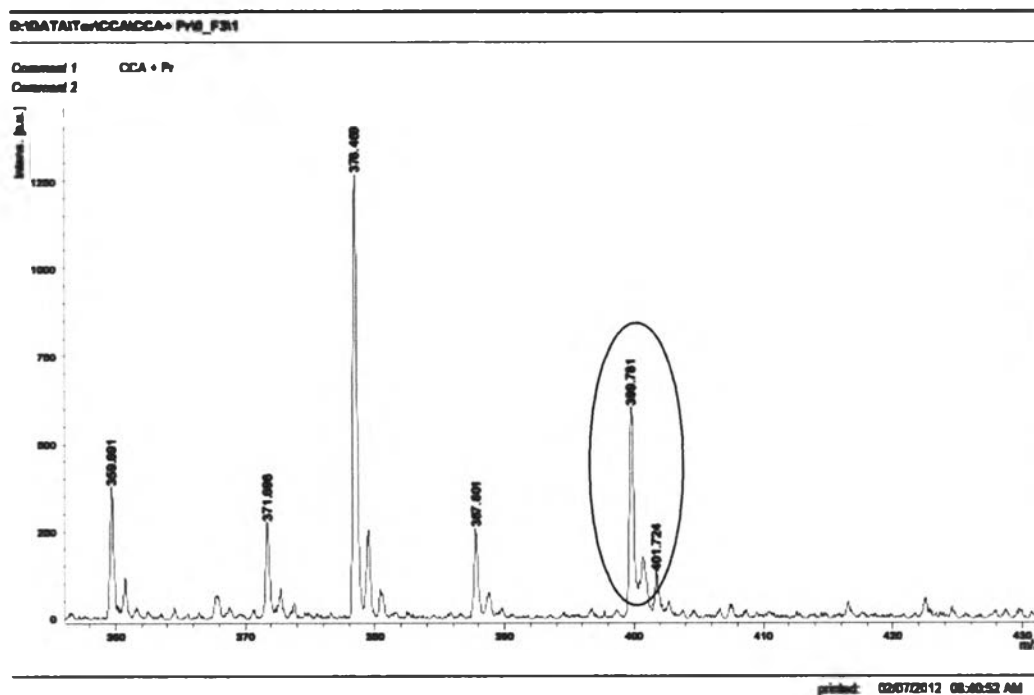
รูป 4.11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และการอยู่รอดของแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ของสารสกัดส่วนย่อย A5B6 โดยเติมสารสกัดในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสารสกัด ส่วนย่อย A6B6 ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และ กราฟ ● คือ เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์)

ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^1H NMR (รูป 4.12) และวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารด้วย เครื่อง Mass spectrometer (MS) ชนิด MOLDI-TOF mass spectrometer (รูป 4.13) ของสารสกัด ส่วนย่อย A6B5 สามารถหาโครงสร้างของสารและน้ำหนักโมเลกุลของสารประมาณช่วง 399.781-401.724 m/z และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Bennacer และคณะ ที่ศึกษาการสังเคราะห์สาร dihydroeponemycin (Bennacer et al., 2003) พบว่ามีความใกล้เคียงกับโครงสร้างสารที่วิเคราะห์ได้จาก สเปกตรัมของ ^1H NMR spectra และการวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย MOLDI-TOF mass spectrometer ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าส่วนย่อยนี้ คือ dihydroeponemycin (รูป 4.14)



รูป 4.12 NMR สเปกตรัมของสารสกัดส่วนย่อย A6B5 ในการวิเคราะห์ตำแหน่งของ C อะตอม จากการศึกษาโดย ^1H NMR

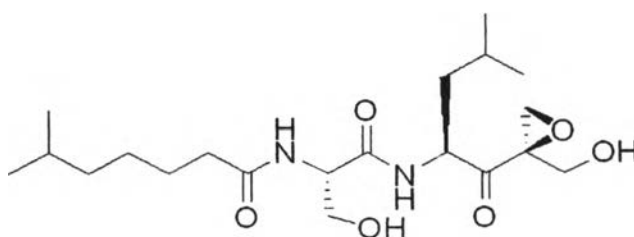
NMR สเปกตรัมวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker AV400 spectrometer ที่ 400 MHz สำหรับการศึกษาด้วย ^1H NMR สารสกัดที่นำไปวิเคราะห์ละลายสารใน CDCl_3



รูป 4.13 สเปกตรัม MALDI-TOF mass spectrometry ของสารสกัดส่วนย่อย A6B5 จากการคัดแยกจาก *Streptomyces* spp. O245704 สเปกตรัม HRESIMS แสดงการวิเคราะห์ molecular weight สารสกัดส่วนย่อย A6B5 จาก *Streptomyces* sp. O245704 วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง MALDI-TOF mass spectrometry ช่วงของ molecular weight ของสารอยู่ในช่วง 399.781-401.724 m/z เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมชุดควบคุม (ภาคผนวก ค)

ลักษณะทั่วไปของสาร dihydroeponemycin

| | |
|-----------------------------------|----------------------|
| น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) | 400.51 |
| ลักษณะ (Form) | ผง (powder) |
| สี | แดงเข้ม (dark red) |
| สูตร โครงสร้าง (Formula) | $C_{20}H_{36}N_2O_6$ |
| การละลาย (Solubility) | ละลายได้ดีใน DMSO |

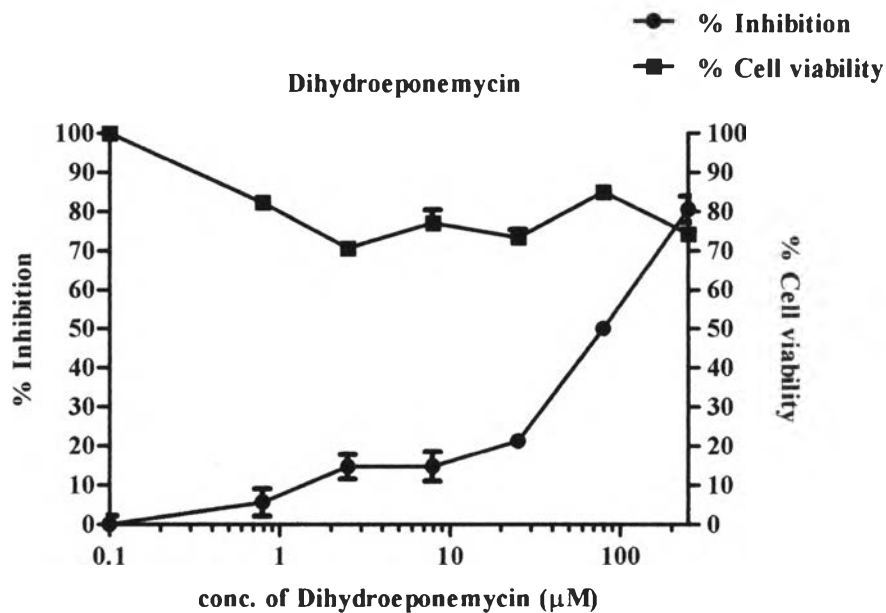


รูป 4.14 โครงสร้างทางเคมีของ dihydroeponemycin

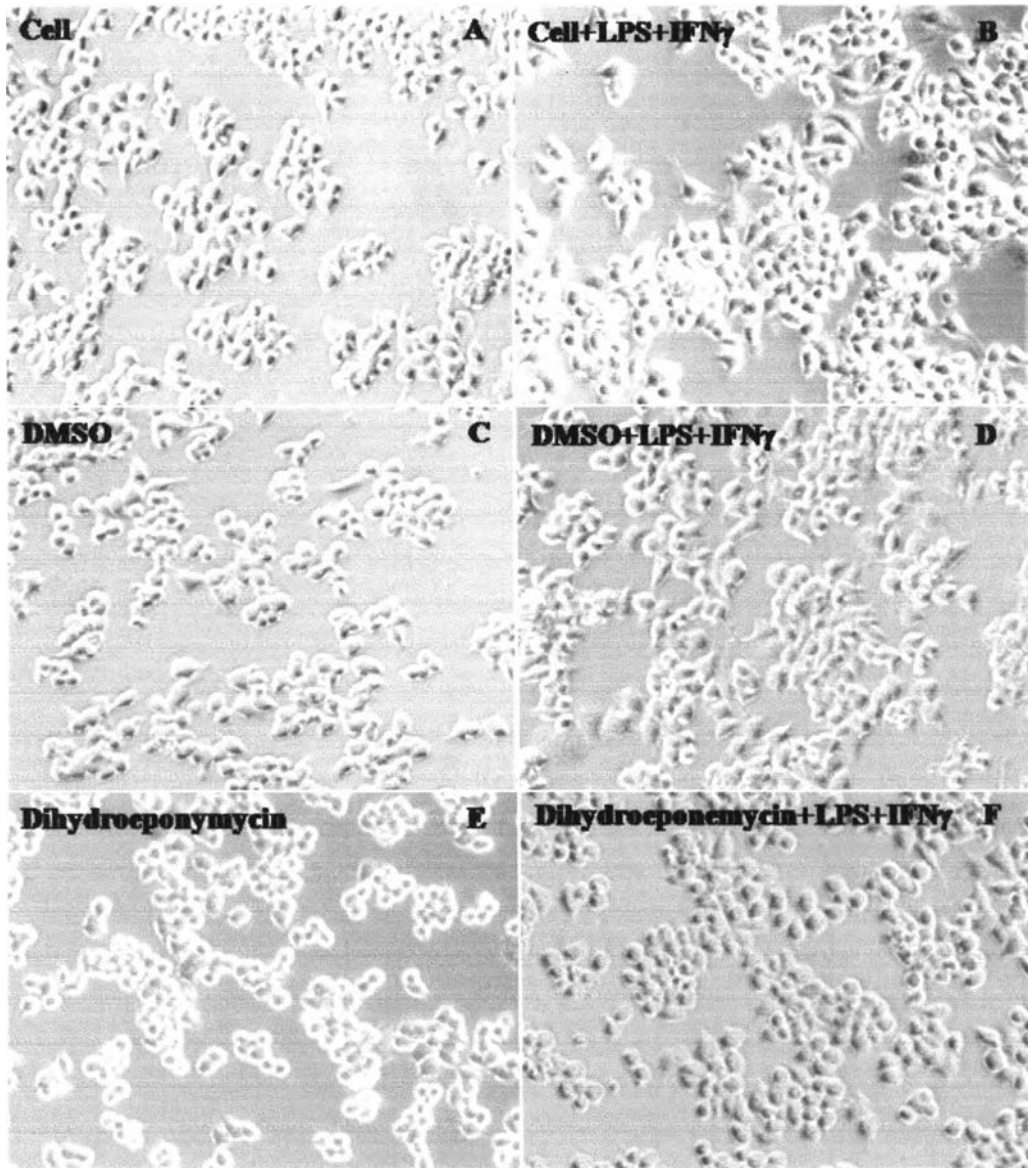
โครงสร้างของ dihydroeponemycin วิเคราะห์ข้อมูลของ NMR สเปกตรัม เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล

4.4 ผลของ dihydroeponemycin ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และการอักเสบในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมโครฟาจ RAW 264.7 ซึ่งทดสอบด้วยสารละลาย dihydroeponemycin ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ พบว่าลักษณะของเซลล์ทดสอบมีลักษณะปกติ (รูป 4.16F) เช่นเดียวกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (รูป 4.16A) และเพื่อเป็นการยืนยันความสามารถของสารต่อการต้านการอักเสบจึงทดสอบโดยวัดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของแมโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ (หัวข้อ 3.4.3) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT (หัวข้อ 3.4.2) จากการทดสอบพบว่าสาร dihydroeponemycin สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์โดยมีค่า IC₅₀ ที่ 79.40 \pm 4.5 ไมโครโมลาร์ (รูป 4.14) และมีค่า IC₅₀ ต่อความเป็นพิษของเซลล์ที่ >100 ไมโครโมลาร์



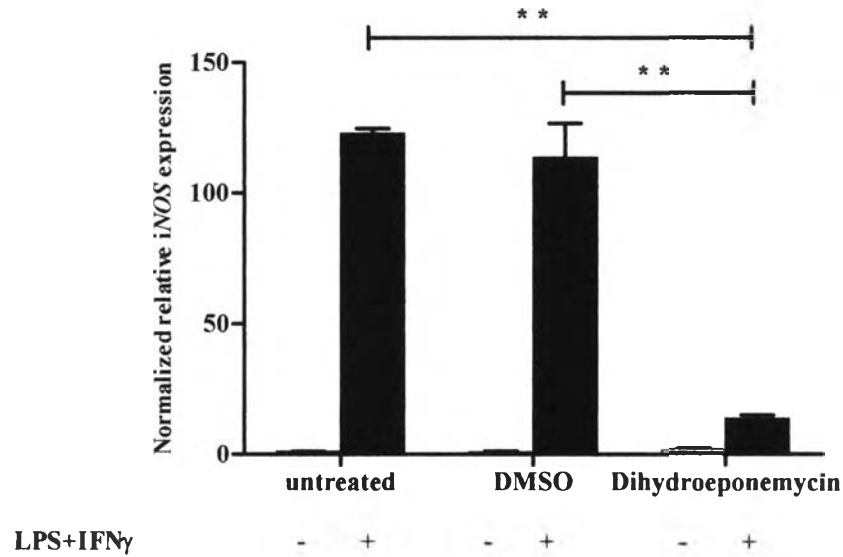
รูป 4.15 ผลของสาร dihydroeponemycin ในการต้านการอักเสบในแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ โดยเติมสารสกัดในแมโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 24 ชั่วโมง และวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยปฏิกิริยา Griess และศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ของสาร dihydroeponemycin ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (กราฟ ■ คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และ กราฟ ● คือ เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์)



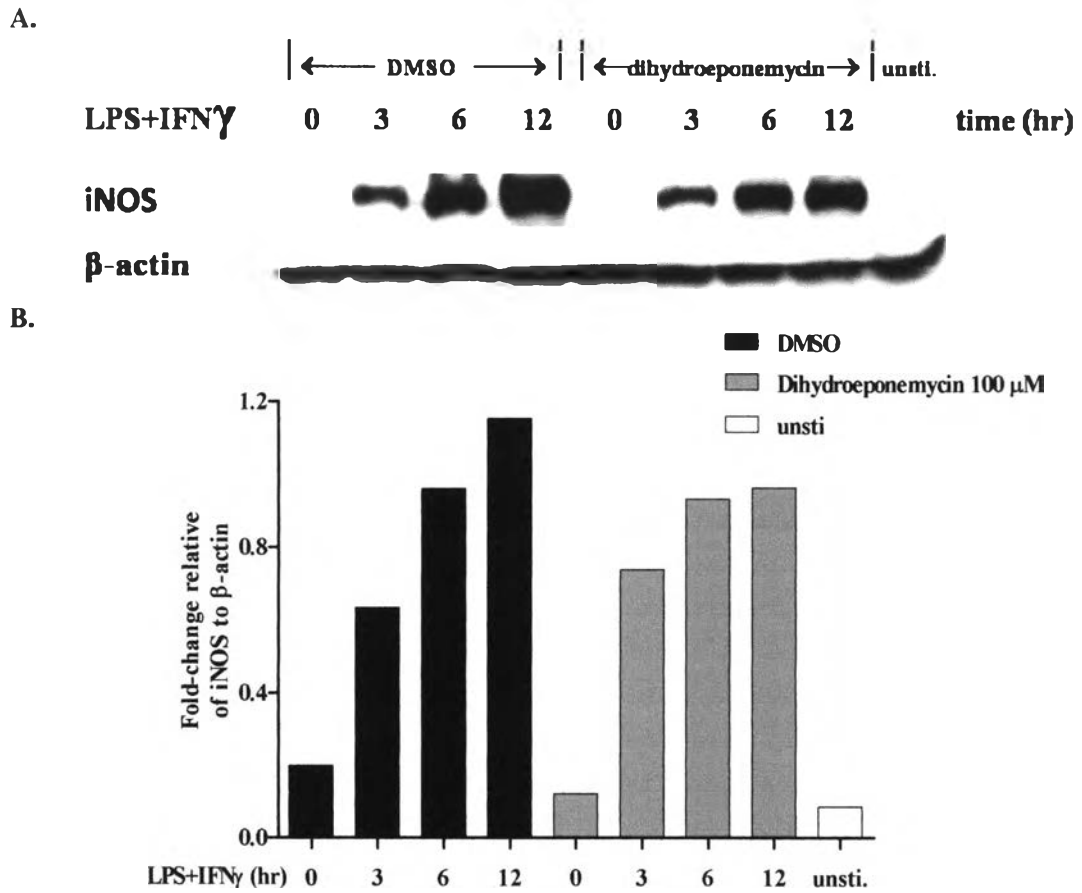
รูป 4.16 ผลของ dihydroeponemycin ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมโครฟาจ RAW 264.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมโครฟาจภายใต้กล้อง inverted microscope (OLYMPUS, Japan) กำลังขยาย 40X (A) แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่ไม่ถูกกระตุ้น, (B) แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS and IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง, (C) แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่ไม่ถูกกระตุ้นและเติม DMSO, (D) แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติม DMSO และกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง, (E) แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่ไม่ถูกกระตุ้นและเติม dihydroeponemycin ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์, (F) แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติม dihydroeponemycin ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์และกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง

4.5 ผลของ dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของยีน *iNOS* ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ

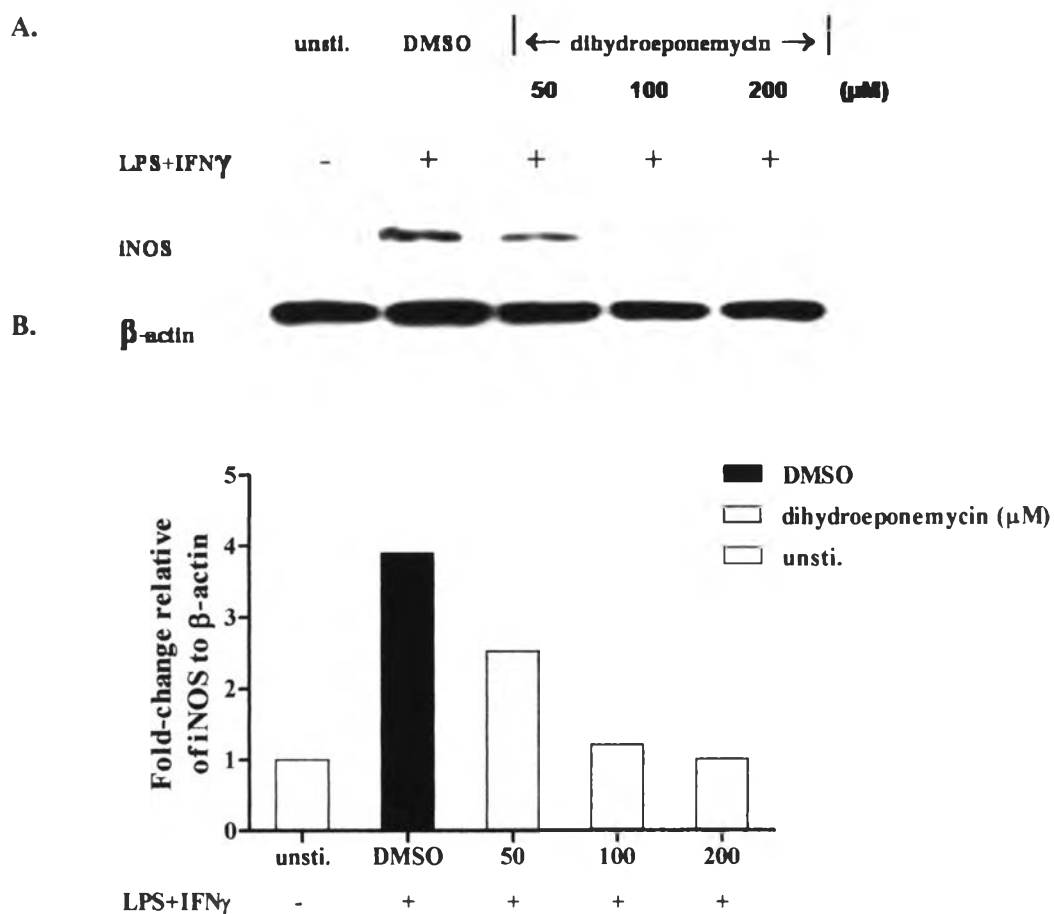
เพื่อศึกษากลไกในการกดการผลิตไนตริกออกไซด์ จึงทดสอบผลของสาร dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของยีน *iNOS* ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัสเอ็นไซม์ NOS ที่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในกระบวนการอักเสบ โดยทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA จากแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่ได้รับสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ก่อน 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง และศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS* ด้วยวิธี quantitative Real-time PCR ผลจากการศึกษาพบว่าสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ในการกดการแสดงออกของยีน *iNOS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม (DMSO) (รูป 4.17) นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *iNOS* ด้วยวิธี Western blot โดยทำการทดสอบสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในแมโครฟาจ RAW 246.7 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ แล้วทำการเก็บโปรตีนทุกๆ 0, 3, 6, และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถกดการแสดงออกของโปรตีน *iNOS* ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม (DMSO) (รูป 4.18) และเพื่อเป็นการยืนยันความสามารถของสาร dihydroeponemycin ในการกดการแสดงออกของโปรตีน *iNOS* จึงทำการทดลองโดยทำการเจือจางสาร dihydroeponemycin ความเข้มข้นต่างๆ (50, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์) นาน 12 ชั่วโมง พบว่าสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ กดการแสดงออกของโปรตีน *iNOS* ได้มากกว่า สาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 50 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) (รูป 4.19)



รูป 4.17 ผลของสาร dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *iNOS* ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นำแมโครฟาจมาทดสอบด้วยสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *iNOS* ด้วยวิธี quantitative Real-time PCR ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ (** คือ ค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$)



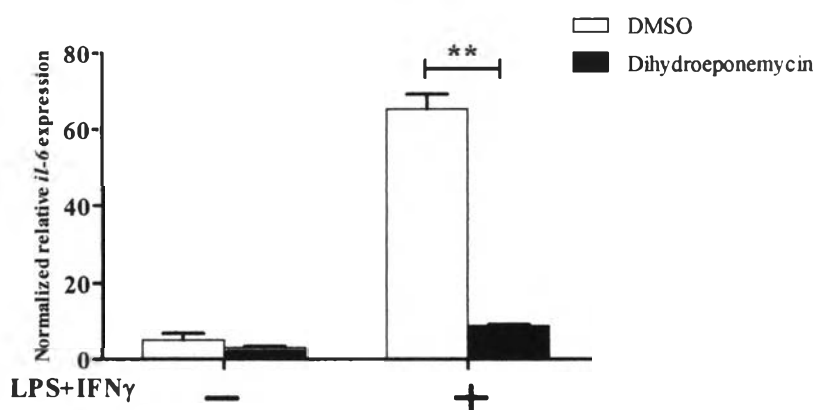
รูป 4.18 ผลของสาร dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นำแมโครฟาจมาทดสอบด้วยสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) (A คือ การแสดงออกของโปรตีนด้วย Western blot , B คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบ iNOS เมื่อเปรียบเทียบกับ β -actin, unsti. คือ การแสดงออกของโปรตีนของแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น)



รูป 4.19 ผลของสาร dihydroeponemycin ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นำแมโครฟาจมาทดสอบด้วยสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) (A คือ การแสดงออกของโปรตีน ด้วย Western blot , B คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบ, unsti. คือ การแสดงออกของโปรตีนของแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น, - คือ ไม่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ , + คือ กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ)

4.6 ผลของ dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของยีน *IL-6* และ *TNF α* ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ

เพื่อทำการศึกษาผลของสารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ pro-inflammatory cytokine ได้แก่ ยีน *IL-6* และยีน *TNF α* โดยทำการศึกษาการแสดงออกของ mRNA จากแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่ได้รับ dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ก่อน 1 ชั่วโมงและกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง และศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-6* และยีน *TNF α* ด้วยวิธี quantitative Real-time PCR ผลจากการศึกษาพบว่า dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *IL-6* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม (DMSO) (รูป 4.20) แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อการแสดงออกของยีน *TNF α* (ไม่แสดงผล)

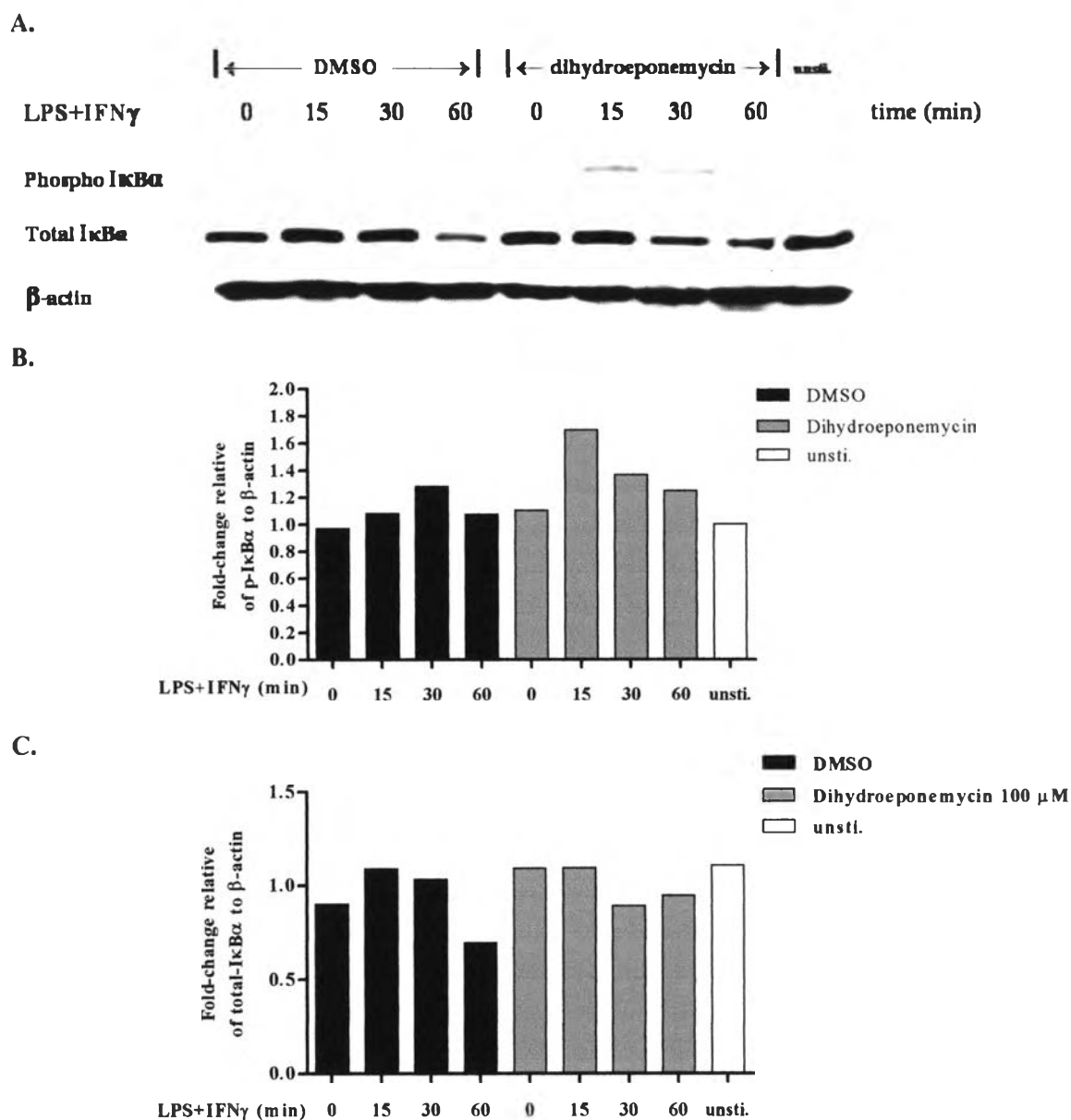


รูป 4.20 ผลของสาร dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *IL-6* ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ

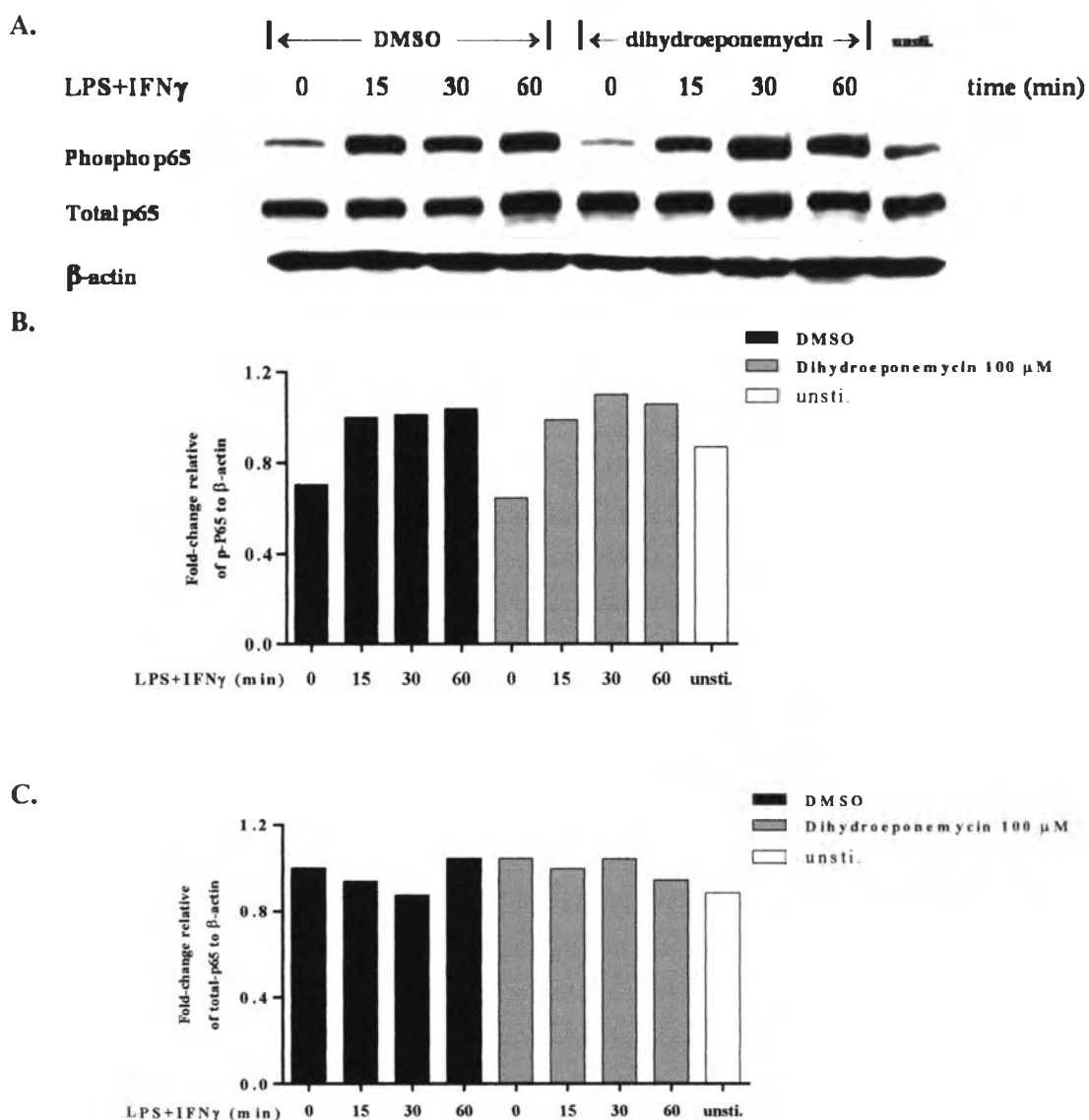
ใช้ RNA จากแมโครฟาจทดสอบด้วยสาร dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ นาน 6 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์ระดับ mRNA ของ *IL-6* โดยวิธี quantitative Real-time PCR ข้อมูลของผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ (- คือ ไม่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ , + คือ กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ , ** คือ ค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$)

4.7 ผลของ dihydroeponemycin ต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของวิถีสัญญาณต่างๆ ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ

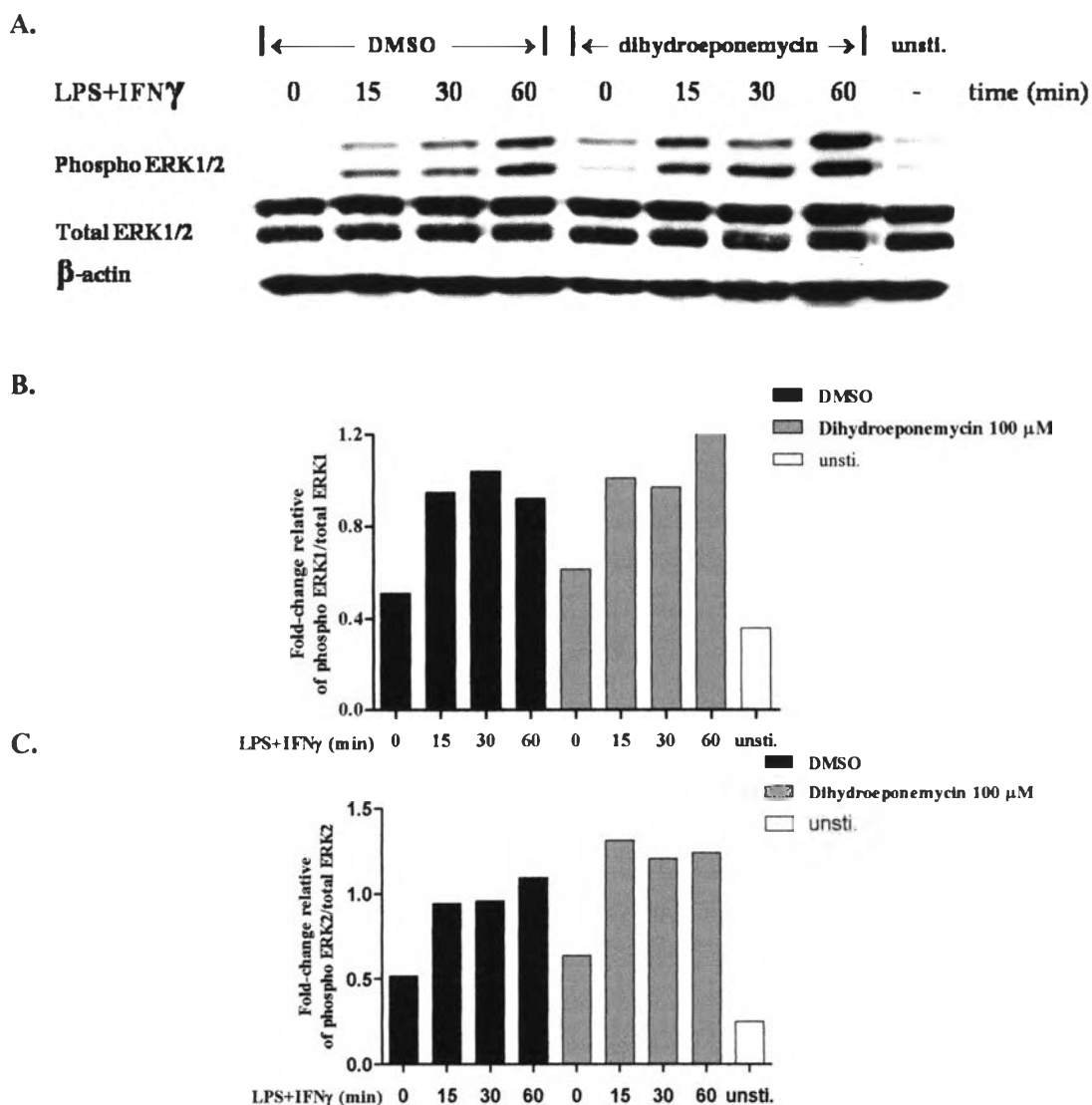
เพื่อศึกษาผลของ dihydroeponemycin ต่อวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPK ผ่านทางตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR4) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการถอดรหัสของยีน *iNOS* โดยศึกษาผลของ dihydroeponemycin ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีนในวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPK โดย Western blot ในแมโครฟาจที่ได้รับ dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ แล้วทำการเก็บโปรตีนจากแมโครฟาจทุกๆ 0, 15, 30, และ 60 นาที ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ได้รับ dihydroeponemycin เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ทดลองชุดควบคุม (DMSO) มีการเหนี่ยวนำการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน I κ B α มากขึ้นในวิถีสัญญาณ NF- κ B ที่เวลา 15 นาที (รูป 4.21) นอกจากนี้ dihydroeponemycin ยังมีฤทธิ์ลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน SAPK/JNK ที่เวลา 60 นาที (รูป 4.24) และเหนี่ยวนำการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน ERK1/2 ในวิถีสัญญาณ MAPK ที่เวลา 60 นาที (รูป 4.23) แต่ไม่มีผลกับ p65 ในวิถีสัญญาณ NF- κ B (รูป 4.22)



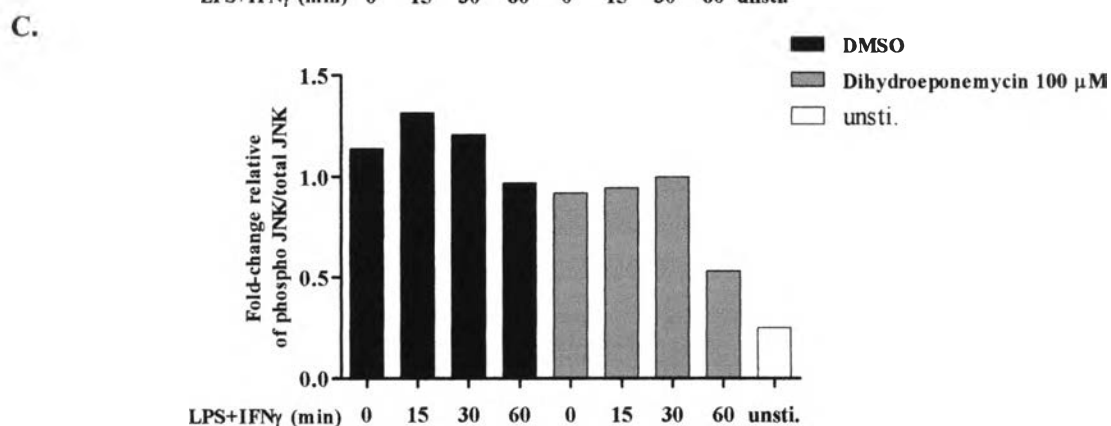
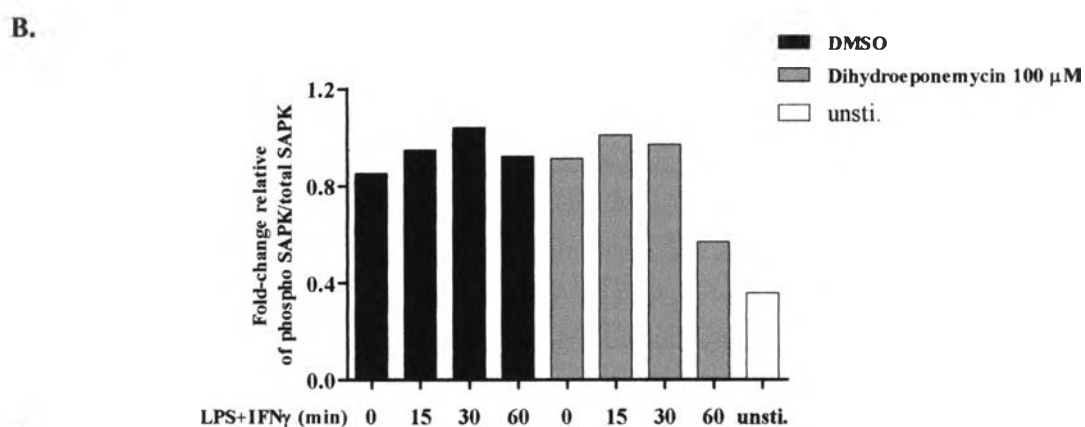
รูป 4.21 ผลของ dihydroeponepmycin ต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน IκBα ของวิถีสัญญาณ NF-κB ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ แมโครฟาจได้รับ dihydroeponepmycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ เป็นเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) โดยวิธี Western blot (A คือการแสดงผลของโปรตีนด้วย Western blot , B คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ Phospho IκBα, C คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ Total IκBα , unsti. คือ การแสดงผลของโปรตีนของแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น)



รูป 4.22 ผลของ dihydroepone mycin ต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน p65 ของวิถีสัญญาณ MAPK ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ แมโครฟาจได้รับ dihydroepone mycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เป็นเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) เพื่อใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของ โปรตีน p65 ของวิถีสัญญาณ NF- κ B ด้วย Western blot (A คือการแสดงออกของโปรตีน ด้วย Western blot , B คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ Phospho p65, C คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ Total p65 , unsti.คือ การแสดงออกของโปรตีนของแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น)



รูป 4.23 ผลของ dihydroeponemycin ต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน ERK1/2 ของวิถีสัญญาณ MAPK ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ แมโครฟาจได้รับ dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมงแล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เป็นเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) ด้วยวิธี Western blot (A คือการแสดงผลของโปรตีน ด้วย Western blot , B คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ ERK1, C คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ ERK2 , unsti. คือ การแสดงผลของโปรตีนของแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น)



รูป 4.24 ผลของ dihydroeponemycin ต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน SAPK/JNK ของวิธีสัญญาณ MAPK ในแมโครฟาจ RAW 246.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ แมโครฟาจได้รับ dihydroeponemycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เป็นเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (DMSO) ด้วยวิธี Western blot (A คือการแสดงผลของโปรตีน ด้วย Western blot , B คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ SAPK, C คือ กราฟแสดงความเข้มของแถบของ JNK , unsti. คือ การแสดงผลของโปรตีนของแมโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้น)