



การสำรวจกลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากหัวหอม โดยการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนบนพื้นฐานโมดูล

Exploring Anti-Inflammatory Mechanisms of Onion Bioactive Compounds with Module-Based Protein Interaction Network Analysis

จิตาภา สอนศิริ และ พิทักษ์ สูตรอนันต์

Jidapa Sornsiri and Pitak Sootanan*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biochemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 28 June 2019

Revised : 21 August 2019

Accepted : 9 October 2019

บทคัดย่อ

หัวหอมเป็นพืชที่นิยมนำมาใช้ในการประกอบอาหารที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติหลากหลายชนิด โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีปริมาณสูงในหัวหอมและมีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาในการต้านการอักเสบ การตรวจสอบเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ทางชีวภาพบนพื้นฐานโมดูลจะเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ค้นพบกลไกการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในหัวหอม ในงานวิจัยนี้จึงอาศัยกระบวนการทางชีวสารสนเทศในการสืบค้นข้อมูลโปรตีนเป้าหมายข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนและข้อมูลโปรตีนการอักเสบ การวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล และการแปลผลทางชีวภาพ จากการศึกษาพบว่าสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมทั้งหมดเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณ MAPK และ NF- κ B ซึ่งเป็นวิถีที่ควบคุมกระบวนการภายในเซลล์และการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ ผ่านการออกฤทธิ์ที่โปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ MAPK14, NFKB1, NOS2, PTGS2 และ TNF ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกนำมาพิจารณาสำหรับการเป็นโปรตีนเป้าหมายเพื่อยืนยันผลในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

คำสำคัญ : เครือข่ายทางชีวภาพ, การวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล, การยับยั้งการอักเสบ, หัวหอม

*Corresponding author. E-mail : pitak@buu.ac.th



Abstract

Onion (*Allium cepa* L.) is a popular plant used as an ingredient in many dishes. This plant is a rich source of several natural active compounds, especially, flavonoids are enriched in onion and has pharmacological effects on the anti-inflammation. Biological network and module-based analysis can be employed to find a role and molecular mechanisms involving the anti-inflammation of flavonoid in onion. In this study, we aimed to use bioinformatic tools to search for potential target proteins, protein-protein interactions, and the proteins involving anti-inflammatory pathways. The module-based network analysis and biological interpretation were performed. From the analyses, we have found five active compounds in onions, relating to the MAPK and NF- κ B signaling pathways, which may relate to the control processes within cell and inflammatory mediator production, through the action of five target inflammatory proteins, namely MAPK14, NFKB1, NOS2, PTGS2 and TNF. These proteins will be further verified experimentally and presented in the future.

Keywords : biological network, module-based network analysis, anti-inflammation, onion

บทนำ

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Oliveira *et al.*, 2014) เช่น หหัวหอม (*Allium cepa* L.) ซึ่งเป็นพืชผักสมุนไพรชนิดหนึ่งที่เป็นพืชล้มลุกตระกูล *Liliaceae* ที่มีการผลิตทั่วโลก โดยส่วนหัวที่เกิดจากกาบใบ (Bulb) เป็นส่วนที่สามารถรับประทานได้และมีกลิ่นฉุน จึงนิยมนำมาใช้ในการประกอบอาหารประเภทต่าง ๆ นอกจากนี้หัวหอมยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิด เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) โคปาอีโน (Copaenes) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids), แร่ธาตุ สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) วิตามิน แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และ กรดอะมิโน (Kwak *et al.*, 2017) เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้หัวหอมมีส่วนสำคัญต่อความต้องการทางโภชนาการของมนุษย์และยังมีคุณค่าทางยา ที่มีความสามารถในการรักษาหรือป้องกันโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดและหัวใจ, โรคเบาหวาน และต่อ กระเจก เป็นต้น (Gebretsadik and Dechassa, 2018) โดยสารฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีปริมาณสูงในหัวหอม เช่น quercetin มีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Nair *et al.*, 2006) ซึ่งการอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ เช่น ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ในเชื้อโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเสียหายทางกายภาพ โดยการอักเสบจะมีเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญอย่างเซลล์แมคโครฟาจที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองการอักเสบผ่านการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ (Kim *et al.*, 2018) ซึ่งการตอบสนองต่อการอักเสบที่เกิดขึ้นเป็นเวลานานและมีการแสดงออกของสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดโรคทางพยาธิวิทยา เช่น โรคเบาหวาน, โรคหัวใจ, โรคไขข้ออักเสบ และโรคความเสื่อมของระบบประสาท เป็นต้น ดังนั้นการยับยั้งการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบสามารถลดการตอบสนองการอักเสบและฟื้นฟูการทำงานของร่างกายให้อยู่ในสภาวะปกติซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการรักษาโรคทางการอักเสบ (Wang *et al.*, 2017) จึงนำสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมมาใช้ในการทำนายกลไกระดับโมเลกุลจาก



การวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพเพื่อทำนายบทบาทของสารออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันและรักษาโรคทาง การอักเสบได้

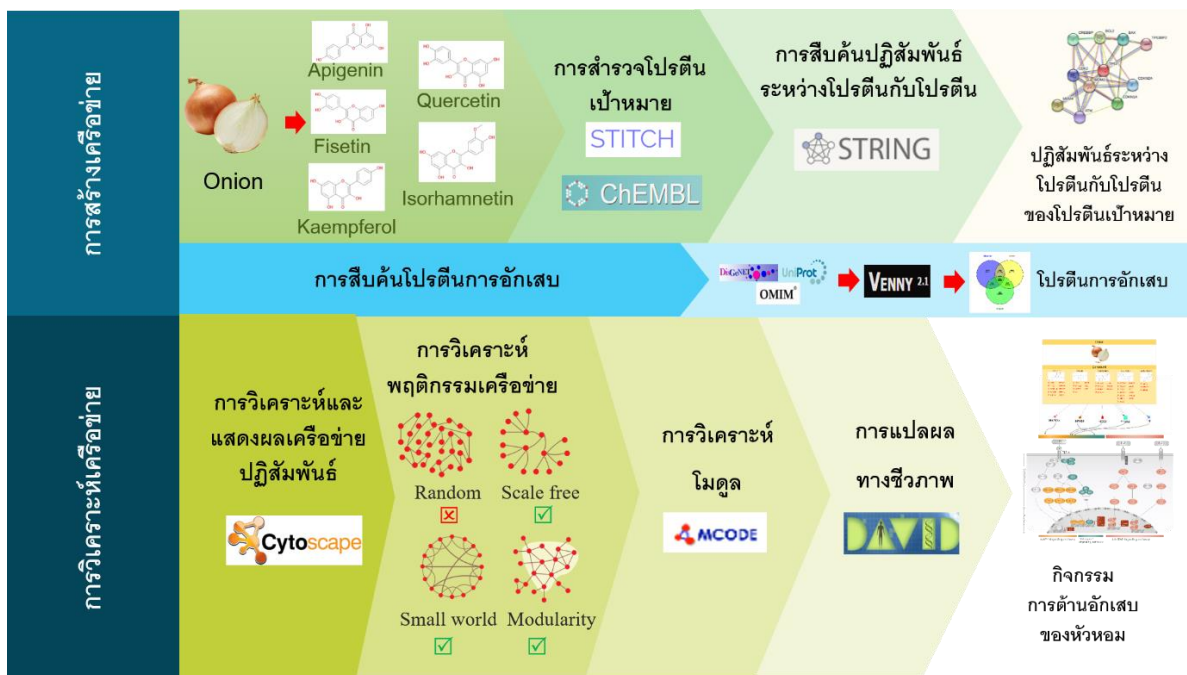
กระบวนการระดับโมเลกุลภายในเซลล์ถูกควบคุมโดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Protein-protein interactions) ภายใต้อาชีพชีวภาพ ซึ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนมีส่วนช่วยให้เกิดการทำงานที่หลากหลาย เช่น การเร่งปฏิกิริยา, การควบคุม, การรวมกลุ่ม, ระบบภูมิคุ้มกัน และการยับยั้งในเซลล์ ดังนั้นการเข้าใจหลักการของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนจึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาการถอดรหัสของสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการอักเสบ (Sowmya and Ranganathan, 2014) ซึ่งสามารถทำได้โดยอาศัยข้อมูลทางชีวภาพที่มีการเก็บรวบรวมในฐานข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ ฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับโปรตีน ChEMBL (Davies *et al.*, 2015) และ STITCH (Szklarczyk *et al.* 2016) ฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017) และอาศัยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศในการวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพ ได้แก่ โปรแกรม Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) ที่ใช้สำหรับแสดงผลและวิเคราะห์การเป็นเครือข่ายทางชีวภาพ ซึ่งมีโปรแกรมปลั๊กอินที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์โมดูล (Module) จากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ เช่น MCODE (Bader and Hogue, 2003), FAG-EC (Li *et al.*, 2008), MCL (Wittkop *et al.*, 2011) และ RNSC (King *et al.*, 2004) เป็นต้น และการวิเคราะห์ความหมายทางชีวภาพจากข้อมูลยีนหรือโปรตีนโดยอาศัยข้อมูลจากโปรแกรมและฐานข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ฟังก์ชัน ได้แก่ โปรแกรม Bingo (Maere, *et al.*, 2005), GOlorize (Garcia *et al.*, 2006), ClueGO (Bindea *et al.*, 2009), PiNGO (Smoot *et al.*, 2011) และฐานข้อมูล DAVID (Huang *et al.*, 2009) เป็นต้น โดยมีตัวอย่างการศึกษาวิจัยในสาร Salviaolic acid B ที่เป็นหนึ่งในส่วนผสมหลักของสมุนไพรตั้งเซียม (*Radix salvia miltiorrhiza*) ซึ่งมีการวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล เพื่อการค้นหากลไกการออกฤทธิ์ของ Salviaolic acid B (Ren *et al.*, 2014) และยังมีการทดสอบสารที่เป็นส่วนผสมของสมุนไพรตั้งเซียมอีกชนิดหนึ่งอย่างสาร Tanshinon IIA (Zheng *et al.*, 2014) รวมถึงการทดสอบสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารผสมที่พบในพืชสมุนไพรทั้งหมดจากตำหรับยาจีน Qishen Yiqi (Zheng *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างการศึกษาในสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่พบได้ในสาหร่ายสีน้ำตาลอย่างสาร Fucoxanthin และสาร Sargachromenol (Sornsiri *et al.*, 2018) โดยงานวิจัยเหล่านี้เป็นการอธิบายบทบาทของโมดูลซึ่งน่าจะสามารถนำวิธีการเหล่านี้มาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการอธิบายกลไกระดับโมเลกุลของการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากหัวหอมได้

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยใช้ข้อมูลสารออกฤทธิ์กลุ่ม Flavonoids ที่พบในหัวหอมจากข้อมูลบทความวิจัยเป็นแหล่งข้อมูลเบื้องต้น ซึ่งพบสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin และนำมาหาโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ด้วยฐานข้อมูลสาธารณะ ChEMBL (Davies *et al.*, 2015) และ STITCH (Szklarczyk *et al.*, 2016) แล้วนำมาสำรวจกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมโดยอาศัยฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ ได้แก่ ฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017) และฐานข้อมูลยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค 3 ฐานข้อมูลเพื่อนำมาค้นหาโปรตีนการอักเสบ ได้แก่ DisGeNET (Piñero *et al.*, 2015), OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler *et al.*, 2004) เป็นต้น แล้วนำข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนและข้อมูลโปรตีนการอักเสบมาสร้างเครือข่ายและวิเคราะห์การเป็นเครือข่ายทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) ทำการวิเคราะห์โมดูลและคัดเลือกโมดูลการอักเสบไปแปลผลทางชีวภาพด้วยฐานข้อมูล DAVID ซึ่งเป็นฐานความรู้ทางชีวภาพที่มีเครื่องมือ

คำอธิบายแบบครบถ้วนสำหรับการตรวจสอบความหมายทางชีวภาพที่อยู่เบื้องหลังรายการยีนจำนวนมาก ได้แก่ การแสดงภาพของยีนหรือโปรตีนในวิถีทางชีวภาพบน KEGG pathway (Huang et al., 2009) เป็นต้น เพื่อใช้สำหรับการอธิบายกลไกและหน้าที่ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทและกลไกระดับโมเลกุลการอักเสบที่มีความสอดคล้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอม และอาจนำข้อมูลอ้างอิงเบื้องต้นของบทบาทสารออกฤทธิ์ที่ได้ใช้เป็นแนวทางการตัดสินใจเพื่อนำไปศึกษาต่อในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของสารออกฤทธิ์กลุ่ม Flavonoids ในหัวหอม เพื่อนำมาค้นหากลไกการยับยั้งการอักเสบโดยการวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูลมีภาพรวมขั้นตอนของวิธีการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 และรายละเอียดของวิธีการทดลองในแต่ละขั้นตอนจะถูกแสดงในเนื้อหาต่อไป



ภาพที่ 1 ภาพรวมแสดงขั้นตอนของวิธีการทดลองในงานวิจัยนี้

1. การสำรวจโปรตีนเป้าหมาย

การสำรวจข้อมูลสารออกฤทธิ์จากหัวหอมเพื่อนำไปใช้ในการสืบค้นโปรตีนเป้าหมายจะสืบค้นจากจากบทความวิจัย ซึ่งจะคัดเลือกสารกลุ่ม Flavonoids ในการนำมาศึกษา ได้แก่ สาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin จึงนำมาใช้ในการสืบค้นโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ด้วยฐานข้อมูลสารณะปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและสารออกฤทธิ์ ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>, Davies et al., 2015) และ STITCH (<http://stitch.embl.de/>,



Szklarczyk *et al.*, 2016) โดยคัดเลือกเฉพาะโปรตีนเป้าหมายในมนุษย์ (*Homo sapiens*) แล้วจัดเก็บข้อมูล Protein symbol และลำดับกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้ในการสืบค้นปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายในขั้นต่อไป

2. การสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

จากข้อมูลโปรตีนเป้าหมายจะนำมาสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนด้วยฐานข้อมูลสาธารณะ STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017) ซึ่งจะทำการคัดเลือกข้อมูลปฏิสัมพันธ์ในทุกรูปแบบภายในฐานข้อมูลอันประกอบไปด้วย ข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่ได้จากการตรวจสอบระดับจีโนม ข้อมูลจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบปฏิสัมพันธ์เชิงกายภาพ และข้อมูลจากการทำเหมืองข้อมูลของบทความวิจัย เป็นต้น โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมายในการสืบค้น แล้วกำหนดสิ่งมีชีวิตภายใต้การสืบค้นเป็น *Homo sapiens* พร้อมทั้งกำหนดค่าความเชื่อมั่น (Required confidence score) ที่ระดับ 0.7 ซึ่งเป็นค่า High confidence จากค่าความเชื่อมั่นที่ได้มีการกำหนดไว้เบื้องต้น 4 ระดับ ได้แก่ Highest confidence (0.9), High confidence (0.7), Medium confidence (0.4) และ Low confidence (0.15) เพื่อกำหนดค่าความเชื่อมั่นไม่ให้มากหรือน้อยเกินไปเนื่องจากหากมากเกินไปก็อาจจะไม่พบข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่ต้องการ แต่ถ้าหากน้อยเกินไปก็จะได้ข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่มีปริมาณมากเนื่องจากความเชื่อมั่นของปฏิสัมพันธ์ต่ำ ทำการจัดเก็บข้อมูลปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิด ก่อนจะนำมารวบรวมปฏิสัมพันธ์ที่พบในโปรตีนเป้าหมายทั้งหมดในसारออกฤทธิ์แต่ละชนิดด้วยโปรแกรมไมโครซอฟท์เอกซ์เซล (Microsoft excel) และบันทึกข้อมูลเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์และแสดงผลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ในขั้นตอนต่อไป

3. การสืบค้นโปรตีนการอักเสบ

การสืบค้นโปรตีนการอักเสบจะเริ่มต้นจากการสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค 3 ฐานข้อมูล ได้แก่ ฐานข้อมูล DisGeNET (Piñero *et al.*, 2015) OMIM (McKusick, 2007) และ UniProt (Apweiler *et al.*, 2004) โดยระบุคำค้นเป็น inflammation (การอักเสบ) และกำหนดออร์แกนนิซึมที่ต้องการศึกษาเป็น *Homo sapiens* ทำการจัดเก็บข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่ได้ในแต่ละฐานข้อมูล จากนั้นนำรายชื่อโปรตีนการอักเสบที่พบในแต่ละฐานข้อมูลมาเปรียบเทียบโปรตีนการอักเสบที่มีร่วมกันด้วยการทำเวนนไดอะแกรม (Venn diagram) ภายใต้โปรแกรม VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, Oliveros, 2007) แล้วคัดเลือกโปรตีนการอักเสบที่เหมือนกันตั้งแต่สองฐานข้อมูลขึ้นไป และจัดเก็บไฟล์เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายต่อไป

4. การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์และการวิเคราะห์โมดูล

จากข้อมูลปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายทั้งหมดที่ค้นพบในसारออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอมจะนำมาแสดงผลด้วยโปรแกรม Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) แล้วทำการ Import ข้อมูลโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย และข้อมูลโปรตีนการอักเสบเพื่อเป็นการระบุข้อมูลลงในเครือข่าย ก่อนจะนำมาทำการคัดเลือกปฏิสัมพันธ์ที่เหมือนกันออกจากเครือข่ายด้วย Advanced network merge แล้วทำการวิเคราะห์พฤติกรรมเครือข่ายด้วย Network analyzer ที่มีอยู่ในโปรแกรม Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเครือข่าย จากนั้นวิเคราะห์โมดูลด้วยโปรแกรม MCODE (Bader and Hogue, 2003) โดยจะกำหนดค่าดีกรี (Degree) เท่ากับ 3 ซึ่งเป็นค่า Cutoff สำหรับใช้เป็นค่าต่ำสุดของจำนวนการเชื่อมต่อของโหนด (Node) ในเครือข่าย โดยค่าดีกรีนี้ควบคุมระดับค่าต่ำสุดของ



จำนวนการเชื่อมต่อที่จำเป็นเพื่อให้สามารถตรวจวัดระดับคะแนนโหนดและปฏิสัมพันธ์ที่ต้องการคัดเลือกได้ และทำการคัดเลือกโมดูลการอักเสบนำไปแปลผลทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

5. การแปลผลทางชีวภาพ

การแปลผลทางชีวภาพจะนำโมดูลการอักเสบทั้งหมดไปคัดเลือกโปรตีนการอักเสบไปแปลผลทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลพาทเวย์ (Pathway) จากฐานข้อมูลสาธารณะ DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) (Huang *et al.*, 2009) โดยเลือกสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาเป็น *Homo sapiens* แล้วเลือกเครื่องมือสำหรับอธิบายหน้าที่ทางชีวภาพเป็น Functional annotation tool จากนั้นเลือกการแปลผลทางชีวภาพเป็น KEGG pathway ซึ่งผลข้อมูลพาทเวย์ที่ได้จะนำมาคัดเลือกพาทเวย์ของการอักเสบเบื้องต้นด้วยบทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง จะทำให้ได้พาทเวย์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่จะสามารถใช้อธิบายบทบาทของสารออกฤทธิ์กลุ่ม Flavonoids ที่พบในหัวหอมในการตอบสนองต่อการอักเสบในระดับโมเลกุลและกลไกการออกฤทธิ์ได้

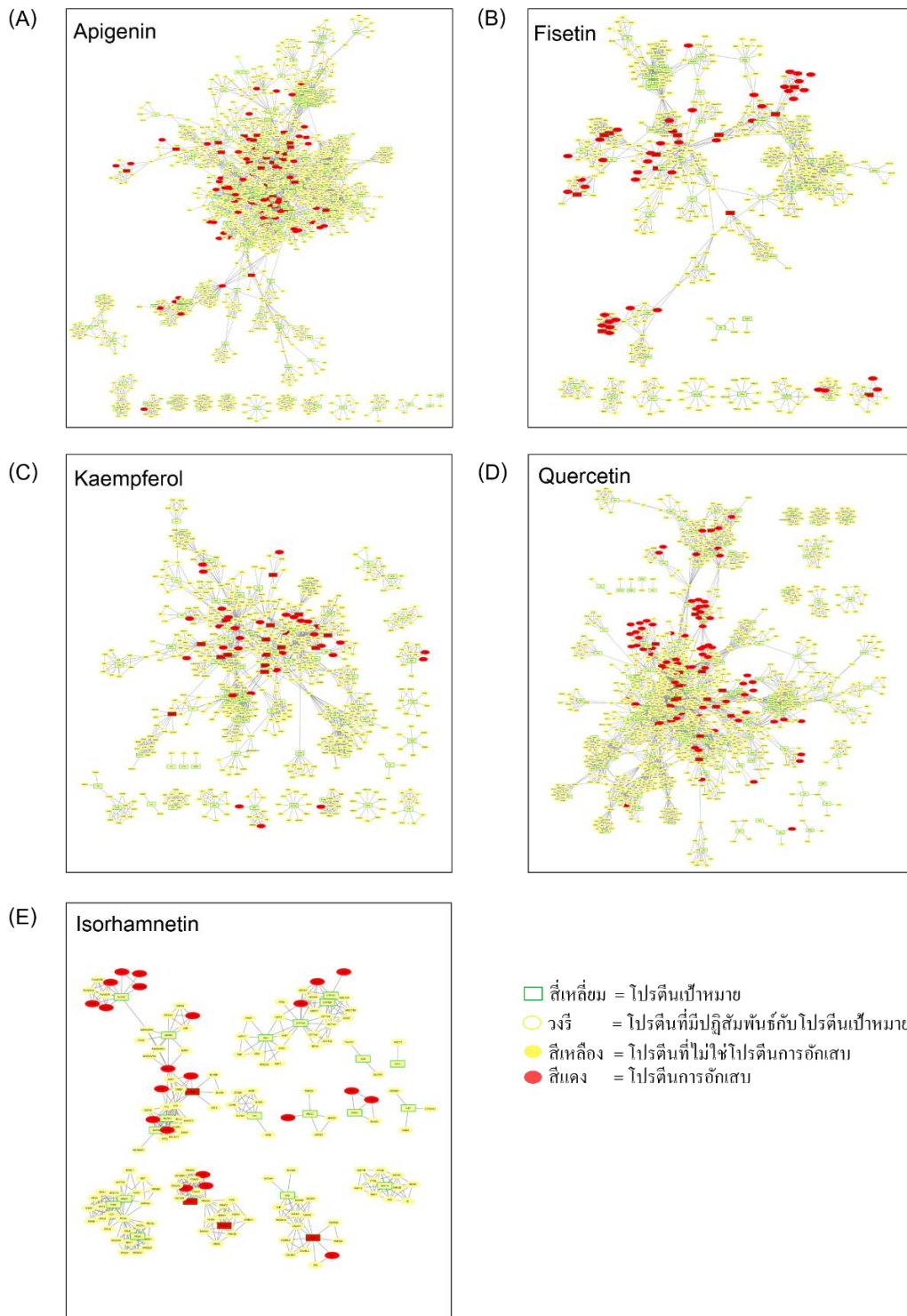
ผลการวิจัย

จากการสำรวจกลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์จากหัวหอม ซึ่งประกอบไปด้วยสารกลุ่ม Flavonoids ที่สำคัญ คือ สารกลุ่ม Flavones ได้แก่ Apigenin สารกลุ่ม Flavonols ได้แก่ Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin (Nasri *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2010) จะถูกนำมาการสร้างและวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในการหากลไกการยับยั้งการอักเสบ โดยอาศัยข้อมูลโปรตีนเป้าหมายที่พบในมนุษย์ของสารออกฤทธิ์กลุ่ม Flavonoids แต่ละชนิดที่พบในหัวหอม และข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Davies *et al.*, 2015; Szklarczyk *et al.*, 2016; Szklarczyk *et al.*, 2017) ซึ่งจะได้จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอมและจำนวนโปรตีนเป้าหมายที่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนได้แสดงดังตารางที่ 1 เมื่อสืบค้นข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่มีร่วมกัน 2 ใน 3 ของฐานข้อมูลสาธารณะ ยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคในมนุษย์ 3 ฐานข้อมูล (Piñero *et al.*, 2015; McKusick, 2007; Apweiler *et al.*, 2004) พบว่ามีจำนวนโปรตีนการอักเสบทั้งสิ้น 403 ชนิด ก่อนนำข้อมูลข้างต้นมาใช้ในการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด (Shannon *et al.*, 2003) ที่มีการระบุข้อมูลโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมายรวมถึงข้อมูลของโปรตีนการอักเสบ (ภาพที่ 2) และขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และจำนวนโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่ายแต่ละชนิดปรากฏดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนโปรตีนเป้าหมาย โปรตีนเป้าหมายที่สามารถสืบค้นในฐานข้อมูล STRING ขนาดของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ และจำนวนโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่าย

กลุ่มสาร	สาร	จำนวนโปรตีนเป้าหมาย จากฐานข้อมูล ChEMBL และ STITCH	จำนวนโปรตีนเป้าหมายที่สืบค้นในฐานข้อมูล STRING	ขนาดเครือข่ายปฏิสัมพันธ์		จำนวนโปรตีนการอักเสบที่พบในเครือข่าย
				โปรตีน	ปฏิสัมพันธ์	
Flavones	Apigenin	196	193	1,153	5,013	91
Favonols	Fisetin	69	69	498	1,859	54
	Kaempferol	90	90	641	2,200	47
	Quercetin	164	159	1,076	4,523	97
	Isorhamnetin	23	23	174	520	26

เมื่อนำเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอมมาวิเคราะห์พฤติกรรมเครือข่ายด้วยปลั๊กอิน Network analyzer ภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) จะทำให้ได้ผลคุณสมบัติ Topological ที่จะทำให้อ่านใจลักษณะโครงสร้างของเครือข่ายทางชีวภาพของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่จะแสดงผลกราฟ Node degree distribution ภายในเครือข่าย และ ค่า R-squared ที่เป็นค่าแสดงความแปรปรวนที่ได้จากกราฟ Node degree distribution ดังแสดงในตารางที่ 2 ที่แสดงให้เห็นว่าเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทั้งห้าชนิดมีคุณสมบัติเป็นเครือข่ายทางชีวภาพตามคุณสมบัติ Scale-free เพราะค่ายกกำลังในสมการ (Equation) มีค่าติดลบที่น้อยกว่า 3 และมีค่า R-squared ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 และจากผลกราฟ Shortest path length distribution ซึ่งแสดงถึงความยาวของเส้นทางเครือข่ายที่มีความถี่มากในระยะทางต่าง ๆ และ ค่า Average shortest path length ซึ่งเป็นความยาวเส้นทางที่สั้นที่สุดระหว่างสองโปรตีนแสดงในตารางที่ 3 ก็แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเป็นเครือข่าย Small-world ที่มีค่าสูงกว่าเครือข่ายแบบสุ่ม (Random network) ยกเว้นเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ Isorhamnetin ที่มีค่าน้อยกว่าเครือข่ายแบบสุ่มอันเนื่องมาจากเป็นเครือข่ายขนาดเล็กที่แยกตัวกันไม่รวมเป็นเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ขนาดใหญ่เหมือนกับเครือข่ายของสารออกฤทธิ์ประเภทอื่น (ภาพที่ 2) และค่า Clustering coefficient ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนของปฏิสัมพันธ์ที่มีอยู่ระหว่างโหนดเพื่อนบ้านที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนปฏิสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ทั้งหมดระหว่างเพื่อนบ้าน ดังแสดงในตารางที่ 4 (Zheng *et al.*, 2015) ที่เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทั้งห้าชนิดแสดงคุณสมบัติของความเป็นเครือข่ายทางชีวภาพที่มีค่า Clustering coefficient มากกว่าของเครือข่ายแบบสุ่มจึงแสดงคุณสมบัติของ Modularity จากคุณสมบัติ Topological ที่แสดงคุณสมบัติของเครือข่ายทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โมดูลเพื่อค้นหาบทบาทที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบผ่านการแปลผลทางชีวภาพของโมดูลการอักเสบต่อไปได้



ภาพที่ 2 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอม (A) Apigenin (B) Fisetin (C) Kaempferol (D) Quercetin และ (E) Isorhamnetin



ตารางที่ 2 สมการ (Equation) และค่า R-squared ที่ได้จากผลกราฟ Degree distribution ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอม

กลุ่มสาร	สารออกฤทธิ์	Equation	R-squared
Flavones	Apigenin	$y=795.33X^{-1.1616}$	0.773
Favonols	Fisetin	$y=244.67X^{-1.428}$	0.722
	Kaempferol	$y=443.52X^{-1.638}$	0.790
	Quercetin	$y=634.70X^{-1.541}$	0.740
	Isorhamnetin	$y=60.404X^{-1.235}$	0.569

ตารางที่ 3 ความยาวของเส้นทางเครือข่ายที่ได้ผลกราฟ Shortest path length distribution และค่า Average shortest path length ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอม

กลุ่มสาร	สารออกฤทธิ์	Shortest path length distribution	Average shortest path length	
			Protein interaction network	Random network
Flavones	Apigenin	4-5	4.962	3.501
Favonols	Fisetin	4-7	5.753	3.307
	Kaempferol	4-6	4.857	3.572
	Quercetin	4-6	5.359	3.521
	Isorhamnetin	1-2	2.430	3.069

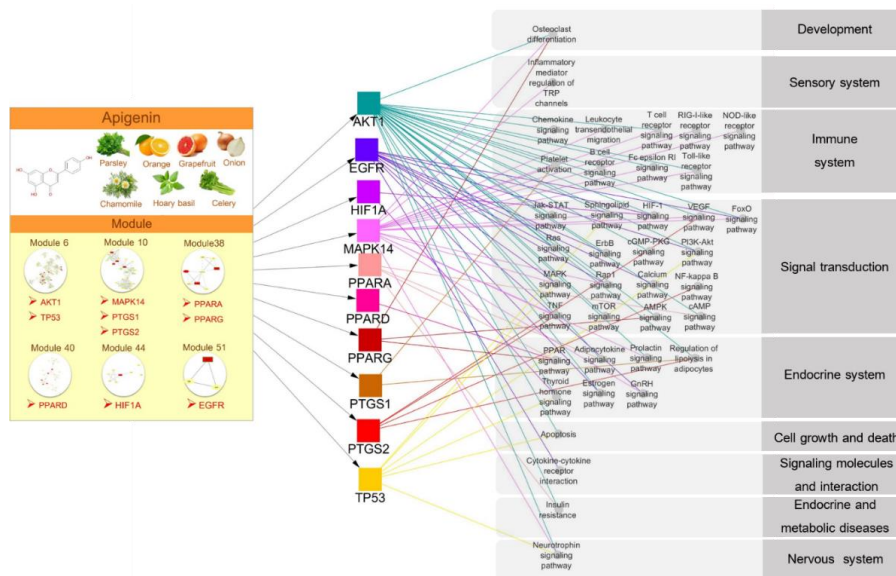
ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ Clustering coefficient ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอม

กลุ่มสาร	สารออกฤทธิ์	Clustering coefficient	
		Protein interaction network	Random network
Flavones	Apigenin	0.683	0.007
Favonols	Fisetin	0.713	0.012
	Kaempferol	0.693	0.010
	Quercetin	0.705	0.009
	Isorhamnetin	0.733	0.037

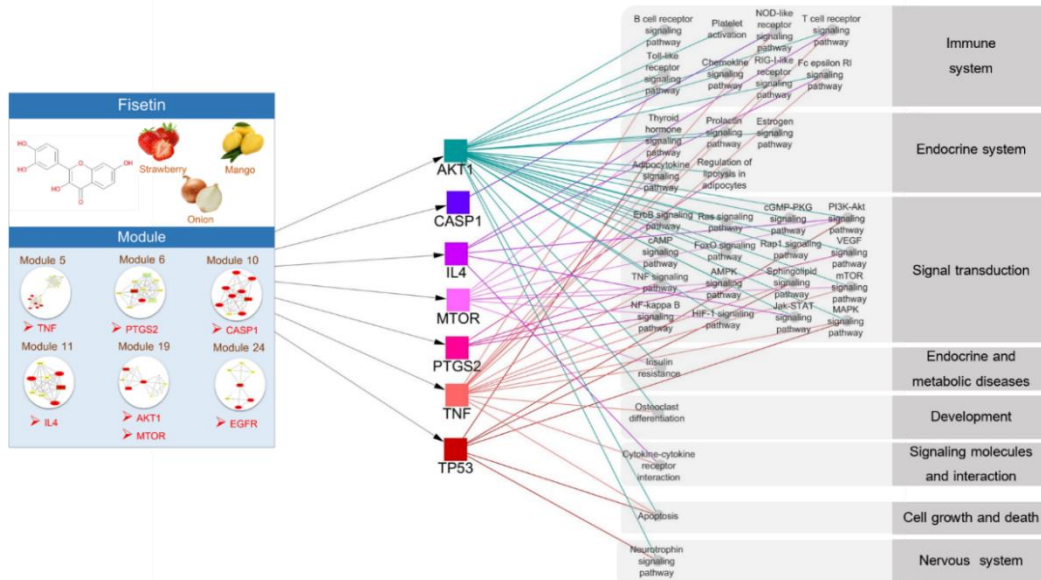
จากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทั้ง 5 ชนิด เมื่อนำไปวิเคราะห์โมดูลด้วยโปรแกรม MCODE (Bader and Hogue, 2003) ซึ่งจะพบจำนวนโมดูลที่พบในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสาร ดังตารางที่ 5 โดยจะคัดเลือกเฉพาะโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย ก่อนนำไปตีความการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายไปแปลผลทางชีวภาพด้วยฐานข้อมูลสาธารณะ DAVID (Huang *et al.*, 2009) พบว่า โปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายในโมดูลการอักเสบ ได้แก่ IL8, PARP1 และ NR1H4 ไม่มีผลของวิถีทางชีวภาพเนื่องจากโปรตีนการอักเสบเหล่านี้อาจจะยังไม่มีข้อมูลวิถีทางชีวภาพในฐานข้อมูลสาธารณะ DAVID ที่ใช้ในการแปลผลทางชีวภาพ จากผลข้อมูลพารเวย์ที่ได้จะนำมาคัดเลือกให้เหลือเฉพาะพารเวย์ของการอักเสบเบื้องต้น ซึ่งจะทำให้ผลของพารเวย์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่พบในสารออกฤทธิ์ในหัวหอมแต่ละชนิด ได้แก่ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin แสดงดังภาพที่ 3 ถึง 7 ตามลำดับ โดยเส้นลูกศรจากโมดูลจะชี้ไปยังโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งรายชื่อของโปรตีนเป้าหมายเหล่านี้จะแสดงไว้ด้านล่างของแต่ละโมดูล และโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิดจะมีสีแตกต่างกันซึ่งจะมีเส้นเชื่อมโยงไปยังการแปลผลทางชีวภาพในสีเดียวกัน

ตารางที่ 5 จำนวนโมดูลที่พบในเครือข่ายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายในสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่พบในหัวหอม

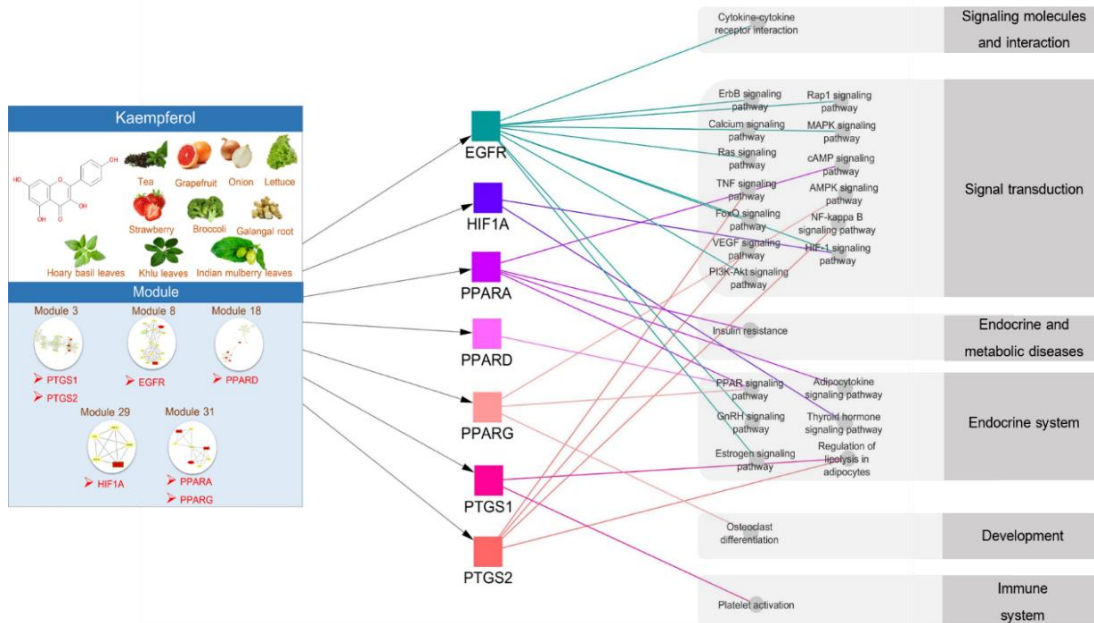
กลุ่มสาร	สารออกฤทธิ์	จำนวนโมดูล	จำนวนโมดูลการอักเสบ	จำนวนโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย
Flavones	Apigenin	65	23	12
Favonols	Fisetin	41	15	9
	Kaempferol	52	15	9
	Quercetin	68	21	11
	Isorhamnetin	17	7	3



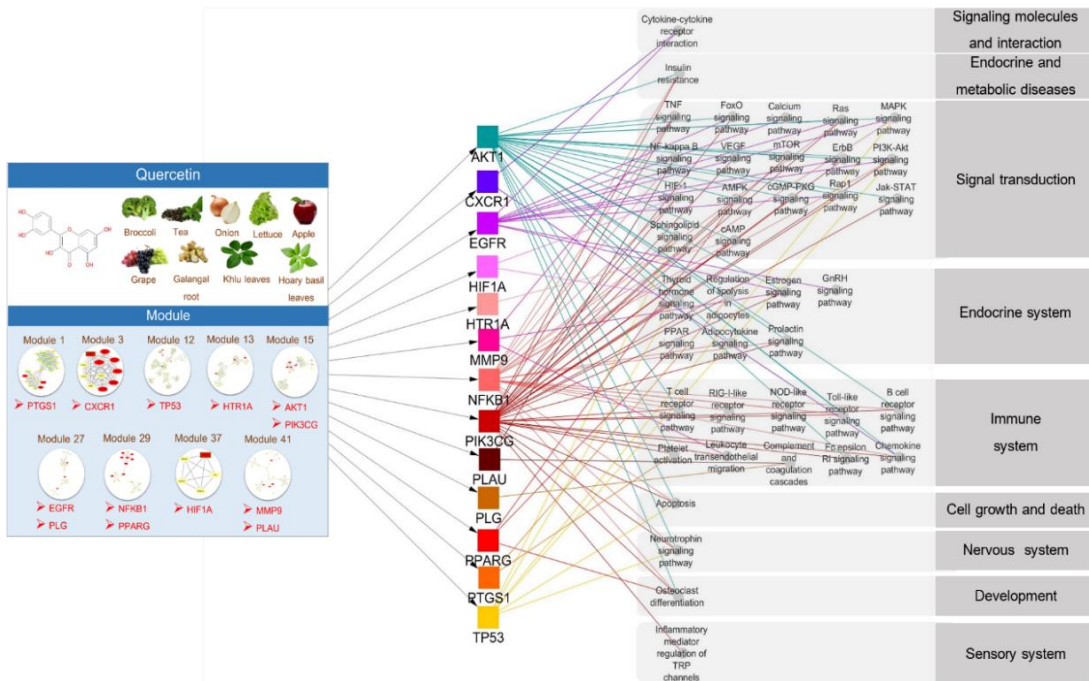
ภาพที่ 3 พารเวย์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสาร Apigenin



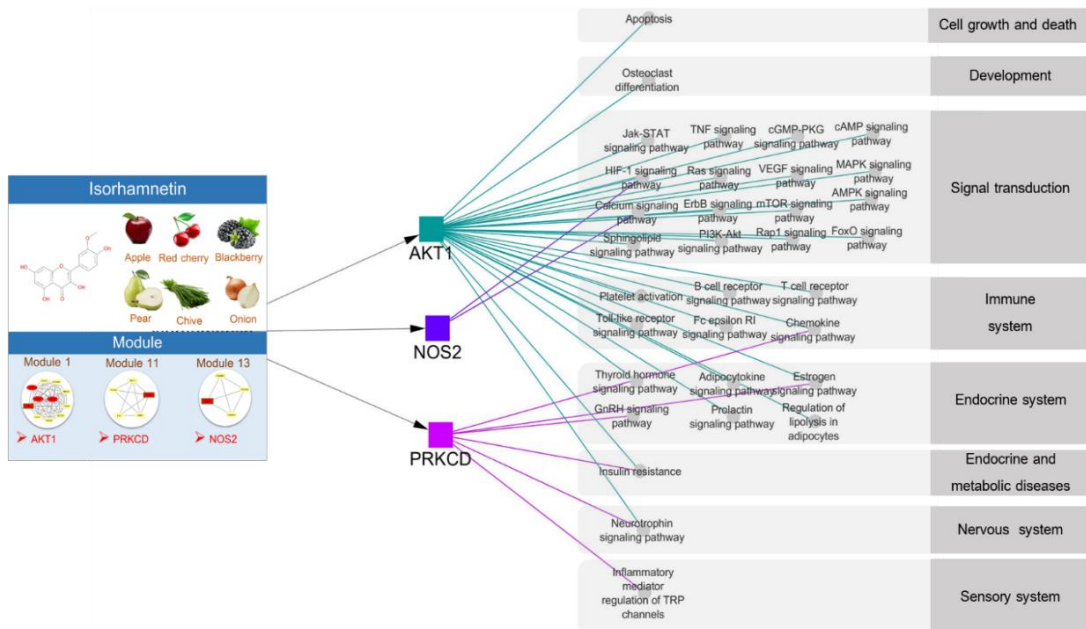
ภาพที่ 4 พารเวย์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสาร Fisetin



ภาพที่ 5 พารเวย์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสาร Kaempferol



ภาพที่ 6 พาธเวย์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสาร Quercetin



ภาพที่ 7 พาธเวย์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสาร Isorhamnetin



วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการสำรวจโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์จากหัวหอม พบว่าสาร Fisetin, Kaempferol และ Isorhamnetin มีจำนวนโปรตีนเป้าหมายที่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนครบตามโปรตีนเป้าหมาย สำหรับสาร Apigenin และ Quercetin มีจำนวนโปรตีนเป้าหมาย 196 และ 164 ชนิด ตามลำดับ และมีจำนวนโปรตีนเป้าหมายที่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน 193 และ 159 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งการที่มีจำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ที่สามารถสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนไม่ครบตามจำนวนโปรตีนเป้าหมาย เนื่องจากโปรตีนเป้าหมาย STK10, STK17A และ CDKL1 ของสาร Apigenin และโปรตีนเป้าหมาย CA5B, CA14, CDKL1, STK17A และ SLCO2B1 ของสาร Quercetin มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่มีค่า Confidence score ต่ำกว่าค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด คือ 0.7 โดยค่า Confidence score เป็นค่าที่เป็นการให้คะแนนจากค่าน้ำหนักของเส้นปฏิสัมพันธ์ทั้งหมดในเครือข่าย ซึ่งจะให้คะแนนจากปฏิสัมพันธ์ที่มีแหล่งข้อมูลที่เป็นหลักฐานสนับสนุน ได้แก่ ข้อมูลปฏิสัมพันธ์ที่ทราบอยู่แล้ว (Curated databases และ Experimentally determined) ข้อมูลปฏิสัมพันธ์จากการทำนาย (Gene neighborhood, Gene fusions และ Gene co-occurrence) และข้อมูลปฏิสัมพันธ์จากแหล่งอื่น (Text mining, Co-expression, และ Protein homology) (Szkarczyk *et al.*, 2017)

โดยผลกราฟ Node degree distribution ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin มีสมการและค่า R-squared แสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งสมการของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดมี Node degree distribution เป็นไปตามกฎของการกระจายแบบกำลัง (Power law distribution) คือ $P(k) \sim k^{-\gamma}$ ($\gamma < 3$) (Zheng *et al.*, 2015) และพบว่าเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดมีค่า R-squared สูงกว่า 0.5 จึงแสดงคุณสมบัติการเป็นเครือข่ายแบบ Scale-free เนื่องจากการที่ค่า R-squared มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงการมีความสอดคล้องกับข้อมูล Power law distribution ซึ่งหมายถึงการกระจายตัวของโหนดที่มีจำนวนน้อยจะมีดีกรีมากที่แสดงถึงความเป็นฮับ (Hub) โดยฮับเป็นโหนดที่มีปฏิสัมพันธ์จำนวนมากกับโหนดอื่น ๆ (Forlim *et al.*, 2019)

จากผลกราฟ Shortest path length distribution ของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin พบว่ามีความยาวของเส้นทางเครือข่ายที่ส่วนใหญ่มีความถี่มากในระยะทางที่ 4-5, 4-7, 4-6, 4-6 และ 1-2 ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะความยาวของเส้นทางเครือข่ายที่มีความถี่มากในระยะทางที่ใกล้เคียงกัน และจากค่า Average shortest path length ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์สารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 3 โดยค่า Average shortest path length ที่มีระยะทางสั้นจะส่งสัญญาณได้ดีกว่าค่าที่มีระยะทางที่ยาว และจากค่า Small-world coefficient ซึ่งเป็นค่าแสดงคุณสมบัติการเป็นเครือข่ายแบบ Small-world ที่คำนวณจากค่า Clustering coefficient และค่า Average shortest path length ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และเครือข่ายแบบ Random network พบว่าเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin มีค่าเท่ากับ 68.843, 34.155, 50.966, 51.467 และ 25.020 ตามลำดับ ถ้าค่า Small-world coefficient มีค่ามากกว่า 1 จะแสดงคุณสมบัติการเป็นเครือข่าย Small-world ดังนั้นเครือข่ายปฏิสัมพันธ์สารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมแต่ละชนิดจึงมีคุณสมบัติการเป็น Small-world (Telesford *et al.*, 2011)

และจากค่าพารามิเตอร์ Clustering coefficient ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin และของ Random network มีค่าดังตารางที่ 4 ถ้าค่า Clustering coefficient ในเครือข่าย



สูงกว่า Random network แสดงว่ามีคุณสมบัติของ Modularity ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติการเป็นเครือข่ายทางชีวภาพเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น Scale-free, Small world และ Modularity (Gan *et al.*, 2015) ที่แสดงคุณสมบัติของเครือข่ายทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โมเดลต่อไปได้

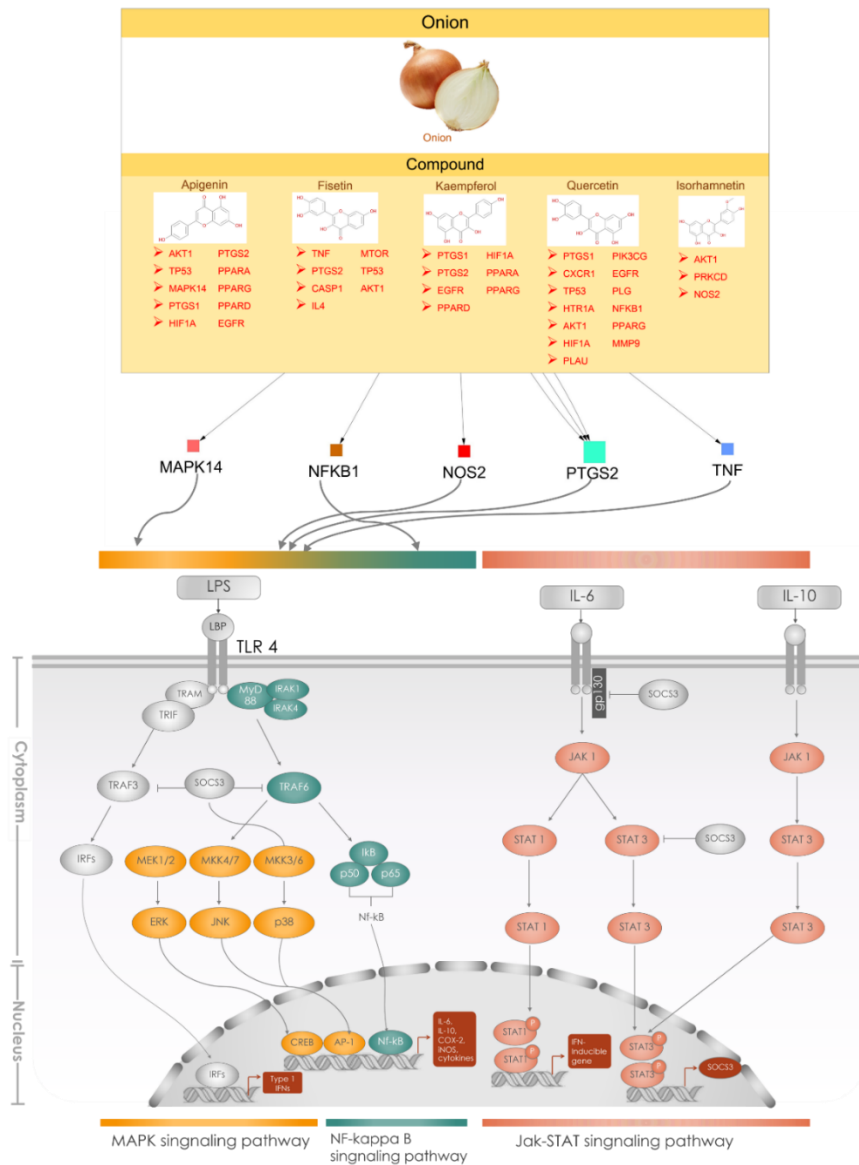
ในที่นี้จะยกตัวอย่างการแปลผลทางชีวภาพของสาร Fisetin และ Quercetin ซึ่งสาร Fisetin มีโมดูลการอักเสบที่ประกอบด้วยโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย ได้แก่ TNF, PTGS2, CASP1, IL4, AKT1, MTOR และ EGRF และพบพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจำนวน 34 พยาธิวิทยา (ภาพที่ 4) สาร Fisetin สามารถลดการส่งสัญญาณผ่านวิถี NF- κ B ที่ถูกควบคุมโดยวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ซึ่งในสภาวะปกติ NF- κ B ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย p65 และ p50 จะจับกับโปรตีนยับยั้ง I κ B (Inhibitor of κ B) ในไซโตพลาสซึม เมื่อมีสิ่งเร้ามากระตุ้นผ่านวิถีการส่งสัญญาณจะทำให้เอนไซม์ IKK (IKK kinase) ไปเติมฟอสเฟตให้กับ I κ B จึงทำให้ I κ B ถูกย่อยสลายออกจาก NF- κ B ทำให้ NF- κ B เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายแล้วเกิดการแปลรหัสไปเป็นสารสื่อกลางการอักเสบ (Reber *et al.*, 2009) โดยสาร Fisetin สามารถลดระดับการฟอสโฟรีเลชันของ I κ B α ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีน p65 จึงทำให้ลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ (Kim, Kim *et al.*, 2015)

สำหรับสาร Quercetin มีโมดูลการอักเสบ ที่ประกอบด้วยโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย ได้แก่ PTGS2, CXCR1, TP53, HTR1A, AKT1, PIK3CG, EGFR, PLG, NFKB1, PPARG, HIF1A, MMP9 และ PLA2 และพบพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจำนวน 40 พยาธิวิทยา (ภาพที่ 6) สาร Quercetin ช่วยลดการส่งสัญญาณผ่านวิถีการส่งสัญญาณ NF- κ B ที่มีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ นอกจากนี้ Quercetin ยังสามารถช่วยลดการส่งสัญญาณผ่านวิถีการส่งสัญญาณ MAPKs ที่ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยคือ signal-regulated kinase (ERK), p38 และ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ซึ่งเป็นสื่อกลางในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์ การตายของเซลล์ และการอักเสบ เป็นต้น โดยสาร Quercetin ช่วยลดการฟอสโฟรีเลชันของ ERK และ JNK ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (Transcription factor) NF- κ B และ activator protein 1 (AP-1) ที่มีบทบาทสำคัญการตอบสนองการอักเสบ (Lee *et al.*, 2018)

จากการแปลผลทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมที่ประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin จะมีโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายหลัก ได้แก่ โปรตีน MAPK14, NFKB1, NOS2, PTGS2 และ TNF ที่สามารถพบในพยาธิวิทยาพื้นฐานที่นิยมนำมาศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ คือ วิถีการส่งสัญญาณ MAPK NF- κ B และ Jak-STAT ที่แสดงสีของโปรตีนในแต่ละพยาธิวิทยาแตกต่างกัน (ภาพที่ 8) โดยโปรตีน MAPK14, NOS2, PTGS2 และ TNF สามารถพบในวิถีการส่งสัญญาณ MAPKs เมื่อมีสิ่งเร้ามากระตุ้นการทำงานก็จะเกิดการฟอสโฟรีเลชัน (Phosphorylation) ของ MAPKs แล้วส่งผลให้ ERK, JNK และ p38 ให้อยู่ในรูปที่มีการเติมฟอสเฟต ซึ่งเป็นรูปที่สามารถทำงานได้ จึงทำให้สามารถเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปเติมฟอสเฟตที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ แล้วส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนและโปรตีนการอักเสบ เช่น NOS2, PTGS2 และ TNF (Morrison, 2012) โดย MAPK14 หรือ p38 α เป็นไอโซไซม์หนึ่งของโปรตีน p38 ที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ (Yang *et al.*, 2016) สำหรับโปรตีน NFKB1, NOS2, PTGS2 และ TNF สามารถพบในวิถีการส่งสัญญาณ NF- κ B โดย NF- κ B1 หรือ p50 เป็นหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ NF- κ B และยังมีโปรตีน RELA ซึ่งเป็นหน่วยย่อยอีกชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบของ



ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ NF- κ B (Reber *et al.*, 2009) เมื่อมีสิ่งเร้ามากระตุ้นจะทำให้ NF- κ B อยู่ในรูปที่พร้อมทำงานและสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปจับกับโปรโมเตอร์ของยีนแล้วทำให้เกิดการถอดรหัสและแปลรหัสของสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น NOS2, PTGS2 และ TNF (Liang *et al.*, 1999) ซึ่งยกตัวอย่างการทดสอบในห้องปฏิบัติการของโปรตีน MAKP14 โดยนิยมนำมาทดสอบการฟอสโฟริเลชันของ p38 (Kim, Park *et al.*, 2015) ซึ่งจะเห็นว่าโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมมีบทบาทสำคัญในวิถีการส่งสัญญาณการอักเสบซึ่งเป็นกลไกระดับโมเลกุลที่ทำให้ทราบถึงบทบาทของสารออกฤทธิ์ ดังนั้นผู้วิจัยสามารถใช้ข้อมูลโปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายของสารออกฤทธิ์เป็นแหล่งข้อมูลเบื้องต้นที่นำมาเป็นตัวทดสอบในการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมในระดับห้องปฏิบัติการได้ และสามารถนำข้อมูลเครือข่ายทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์นี้ไปใช้สำหรับการวิเคราะห์และแปลผลทางชีวภาพของพืชสมุนไพรประเภทอื่นที่มีสารออกฤทธิ์ชนิดเดียวกันนี้ได้ เพื่อเป็นการทำนายกลไกการออกฤทธิ์เพื่อค้นหาโปรตีนเป้าหมายและกลไกที่เหมาะสมสำหรับทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป



ภาพที่ 8 ผลการทำนายกลไกการยับยั้งการอักเสบของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอม (Sornsiri, 2019)

สรุปผลการวิจัย

จากการสำรวจกลไกการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากหัวหอมด้วยการวิเคราะห์เครือข่ายบนพื้นฐานโมดูล โดยอาศัยกระบวนการทางชีวสารสนเทศในการสำรวจโปรตีนเป้าหมาย การสืบค้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของโปรตีนเป้าหมาย การสืบค้นโปรตีนการอักเสบ การวิเคราะห์คุณสมบัติของเครือข่าย การวิเคราะห์โมดูล และการแปลผลทางชีวภาพ ทำให้ได้เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอม ได้แก่ สาร Apigenin, Fisetin, Kaempferol, Quercetin และ Isorhamnetin ที่มีคุณสมบัติเป็นเครือข่ายทางชีวภาพ คือ Scale-free, Small world และ Modularity ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์โมดูลได้ และมีโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย เมื่อแปลผลทางชีวภาพทำให้ได้ผล



โปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมาย และพาร์เวียร์การอักเสบที่เกี่ยวข้องของสารออกฤทธิ์ ซึ่งงานวิจัยนี้จะยกตัวอย่างการแปลผลทางชีวภาพของโมดูลการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายในเครือข่ายของสาร Fisetin, Quercetin และโมดูลของสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมทั้งหมด โดยโมดูลของสาร Fisetin พบพาร์เวียร์การอักเสบจำนวน 34 พาร์เวียร์ สาร Quercetin พบพาร์เวียร์การอักเสบจำนวน 40 พาร์เวียร์ และสารออกฤทธิ์ที่พบในหัวหอมทั้งหมดสามารถพบในพาร์เวียร์ที่นิยมนำมาศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ คือ วิธีการส่งสัญญาณ MAPK และ NF- κ B ซึ่งเป็นวิถีเส้นทางการส่งสัญญาณที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ ผ่านการออกฤทธิ์ที่โปรตีนการอักเสบที่เป็นโปรตีนเป้าหมายจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ MAPK14, NFKB1, NOS2, PTGS2 และ TNF ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยในการนำไปพิจารณาสำหรับการเป็นโปรตีนเป้าหมายเพื่อยืนยันผลในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป เช่น เป็น candidate genes ในการศึกษาผลการยับยั้งการอักเสบเมื่อใช้สารสกัดจากหัวหอมเมื่อนำไปใช้กับ cell lines และทดสอบการแสดงออกทางพันธุกรรมของยีนและโปรตีนเป้าหมายเหล่านี้ด้วย RT-qPCR หรือ western blotting เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำเครือข่ายทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ที่ได้ไปใช้สำหรับการแปลผลทางชีวภาพเพื่อนำไปประยุกต์การใช้งานกับโรคหรืออาการทางคลินิกประเภทอื่นที่สนใจนอกจากการอักเสบได้ และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการทำนายบทบาทการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรที่สนใจ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาฐานข้อมูลการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาประยุกต์สำหรับนักวิจัยและประชาชนที่สนใจทั่วไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ 137/2561

เอกสารอ้างอิง

Apweiler, R., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alam-Faruque, Y., Antunes, R., Barrell, D., Bely, B., Bingley, M., Binns, D., Bower, L., Browne, P., Chan, W. M., Dimmer, E., Eberhardt, R., Fazzini, F., Fedotov, A., Foulger, R., Garavelli, J., Castro, L. G., Huntley, R., Jacobsen, J., Kleen, M., Laiho, K., Legge, D., Lin, Q., Liu, W., Luo, J., Orchard, S., Patient, S., Pichler, K., Poggioli, D., Pontikos, N., Pruess, M., Rosanoff, S., Sawford, T., Sehra, H., Turner, E., Corbett, M., Donnelly, M., van Rensburg, P., Xenarios, I., Bougueleret, L., Auchincloss, A., Argoud-Puy, G., Axelsen, K., Bairoch, A., Baratin, D., Blatter, M. C., Boeckmann, B., Bolleman, J., Bollondi, L., Boutet, E., Quintaje, S. B., Breuza, L., Bridge, A., deCastro, E., Coudert, E., Cusin, I., Doche, M., Dornevil, D., Duvaud, S., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gehant, S., Ferro, S., Gasteiger, E., Gateau, A., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Hulo, N., James, J., Jimenez, S., Jungo, F., Kappler, T., Keller, G., Lara, V., Lemercier, P., Lieberherr, D., Martin, X., Masson, P., Moinat, M., Morgat, A., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Poux, S., Pozzato, M., Redaschi, N., Rivoire, C., Roechert, B., Schneider, M., Sigrist, C., Sonesson, K., Staehli, S., Stanley, E., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Verbregue, L., Veuthey, A. L., Wu, C. H., Arighi, C. N., Arminski, L.,



- Barker, W. C., Chen, C., Chen, Y., Dubey, P., Huang, H., Mazumder, R., McGarvey, P., Natale, D. A., Natarajan, T. G., Nchoutmboube, J., Roberts, N. V., Suzek, B. E., Ugochukwu, U., Vinayaka, C. R., Wang, Q., Wang, Y., Yeh, L. S. and Zhang, J. (2010). Ongoing and future developments at the universal protein resource. *Nucleic Acids Research*, 39, D214–D219.
- Bader, G. D. and Hogue C. W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4, 2.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pagès, F. and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091-1093.
- Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L. and Overington, J. P. (2015). ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Research*, 43, W612–W620.
- Forlim, C. G., Haghiri, S., Düzel, S. and Kühn, S. (2019). Efficient small-world and scale-free functional brain networks at rest using k-nearest neighbors thresholding. *Biorxiv*, 628453.
- Gan, Y., Zheng, S., Baak, J.P., Zhao, S., Zheng, Y., Luo, N., Liao, W. and Fu, C. (2015). Prediction of the anti-inflammatory mechanisms of curcumin by module-based protein interaction network analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(6), 590-595.
- Garcia, O., Saveanu, C., Cline, M., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Schwikowski, B. and Aittokallio, T. (2006). GOLORize: a Cytoscape plug-in for network visualization with Gene Ontology-based layout and coloring. *Bioinformatics*, 23(3), 394-396.
- Gebretsadik, K. and Dechassa, N. (2018). Response of Onion (*Allium cepa* L.) to nitrogen fertilizer rates and spacing under rain fed condition at Tahtay Koraro, Ethiopia. *Scientific Reports*, 8(1), 1-8.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44.
- Kim, J. H., Kim, M. Y., Kim, J. H. and Cho, J. Y. (2015). Fisetin suppresses macrophage-mediated inflammatory responses by blockade of Src and Syk. *Biomolecules & Therapeutics*, 23(5), 414.
- Kim, S. H., Park, J. G., Lee, J., Yang, W. S., Park, G. W., Kim, H. G., Yi, Y. S., Baek, K. S., Sung, N. Y., Hossen, M. J., Lee, M. N., Kim, J. H. and Cho, J. Y. (2015). The dietary flavonoid Kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-15.



- Kim, S. J., Ko, W. K., Jo, M. J., Arai, Y., Choi, H., Kumar, H., Han, I. B. and Sohn, S. (2018). Anti-inflammatory effect of tauroursodeoxycholic acid in RAW 264.7 macrophages, bone marrow-derived macrophages, BV2 microglial cells, and spinal cord injury. *Scientific Reports*, 8(1), 3176.
- King, A. D., Pržulj, N. and Jurisica, I. (2004). Protein complex prediction via cost-based clustering. *Bioinformatics*, 20(17), 3013-3020.
- Kwak, J. H., Seo, J. M., Kim, N. H., Arasu, M. V., Kim, S., Yoon, M. K. and Kim, S. J. (2017). Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1387-1391.
- Lee, H. N., Shin, S. A., Choo, G. S., Kim, H. J., Park, Y. S., Kim, B. S., Kim, S. K., Cho, S. D., Nam, J. S., Choi, C. S., Che, J. H., Park, B. K. and Jung, J. Y. (2018). Anti-inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages and DNCB-induced atopic dermatitis animal models. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(2), 888-898.
- Li, M., Wang, J. and Chen, J. E. (2008). A Fast Agglomerate Algorithm for Mining Functional Modules in Protein Interaction Networks. *BioMedical Engineering and Informatics*, 121(2008), 3-7.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F. and Lin, J. K. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20(10), 1945-1952.
- Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448-3449.
- McKusick, V. A. (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 588-604.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a011254.
- Nair, M. P., Mahajan, S., Reynolds, J. L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S. A. and Kandaswami, C. (2006). The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(3), 319-328.
- Nasri, S., Anoush, M. and Khatami, N. (2012). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effects of fresh onion juice in experimental animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(23), 1679-1684.
- Oliveira, T., Figueiredo, C. A., Brito, C., Stavroullakis, A., Prakki, A., Da Silva Velozo, E. and Nogueira-Filho, G. (2014). Effect of *Allium cepa* L. on lipopolysaccharide-stimulated osteoclast precursor cell viability, count, and morphology using 4', 6-diamidino-2-phenylindole-staining. *International Journal of Cell Biology*, 2014.
- Oliveros, J.C. (2007). Venny diagram: VENNY 2.1.0. Retrieved from <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>



- Pan, M. H., Lai, C. S. and Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, 1(1), 15-31.
- Piñero, J., Queralt-Rosinach, N., Bravo, À., Deu-Pons, J., Bauer-Mehren, A., Baron, M., Sanz, F. and Furlong, L. I. (2015). DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2015, bav028.
- Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G. and Frossard, N. (2009). Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One*, 4(2), e4393.
- Ren, Z., Wang, X., Wang, S., Zhai, C., He, Y., Zhang, Y. and Qiao, Y. (2014). Mechanism of action of salvianolic acid B by module-based network analysis. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24(1), 1333-1340.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Smoot, M., Ono, K., Ideker, T. and Maere, S. (2011). PINGO: a Cytoscape plugin to find candidate genes in biological networks. *Bioinformatics*, 27(7), 1030-1031.
- Sornsiri, J. (2019). Prediction of anti-inflammatory mechanisms of natural active compounds by biological network analysis. *Master's thesis*, Biological Sciences, Faculty of Science, Burapha University, p. 219.
- Sornsiri, J., Srisook, K., Pornngam, P. and Sootanan, P. (2018). Prediction of biochemical mechanism of anti-inflammation explained from two marine-derived bioactive compounds. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 588-595.
- Sowmya, G. and Ranganathan, S. (2014). Protein-protein interactions and prediction: a comprehensive overview. *Protein and Peptide Letters*, 21(8), 779-789.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J. and von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362-D368.
- Szklarczyk, D., Santos, A., von Mering, C., Jensen, L. J., Bork, P. and Kuhn, M. (2016). STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D380–D384.
- Telesford, Q. K., Joyce, K. E., Hayasaka, S., Burdette, J. H. and Laurienti, P. J. (2011). The ubiquity of small-world networks. *Brain Connectivity*, 1(5), 367-375.
- Wang, S., Cao, M., Xu, S., Zhang, J., Wang, Z., Mao, X., Yao, X. and Liu, C. (2017). Effect of luteolin on inflammatory responses in RAW264. 7 macrophages activated with LPS and IFN- γ . *Journal of Functional Foods*, 32, 123-130.



- Wittkop, T., Emig, D., Truss, A., Albrecht, M., Böcker, S. and Baumbach, J. (2011). Comprehensive *cluster analysis with Transitivity Clustering*. *Nature Protocols*, 6(3), 285-295.
- Yang, C., Cao, P., Gao, Y., Wu, M., Lin, Y., Tian, Y. and Yuan, W. (2016). Differential expression of p38 MAPK α , β , γ , δ isoforms in nucleus pulposus modulates macrophage polarization in intervertebral disc degeneration. *Scientific Reports*, 6, 22182.
- Zheng, S., Ren, Z., Zhang, Y. and Qiao, Y. (2014). Anti-inflammatory mechanism research of tanshinone II A by module-based network analysis. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24(6), 3815-3824.
- Zheng, S., Zhang, Y. and Qiao, Y. (2015). The Mechanism Research of Qishen Yiqi Formula by Module-Network Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(497314), 1-12.