

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ส่วนประกอบตอนต้น	
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	V
สารบัญตาราง (List of Tables)	VII
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	VIII
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	X
บทที่ 1: บทนำ (Introduction)	1
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
ขอบเขตของโครงการวิจัย	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2: วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	10
ผังวิธีดำเนินการวิจัย	12
การทดลองที่ 1: การเตรียมสารสกัดพืช	13
การสกัดขิง (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	13
การสกัดจิงโจ้ (<i>Capparis micracantha</i> DC.)	15
การสกัดชันทองพญาบาท (<i>Suregada multiflorum</i> (A. Juss.) Baill.)	15
การสกัดห้วยยาข้าวเย็น (<i>Smilax micro-china</i>)	16
การสกัดหมากดิบน้ำค้าง (<i>Hedyotis biflora</i>)	17
การสกัดกระเจียน (<i>Polyalthia cerasoides</i>)	18
การสกัดไคร้นางนาค (<i>Phyllanthus taxodiifolius</i>)	18
การสกัดกระท่อมเลือด (<i>Stephania venosa</i>)	19
การสกัดมะคำไก่ (<i>Drypetes roxburghii</i>)	20

การทดลองที่ 2: การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสโดยวิธี Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay	21
การทดลองที่ 3: การผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกกระยะสั้น ของยีนเทโลเมอเรส ที่อยู่ในพลาสมิดเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเทโลเมอเรสโดยตรง	25
การทดลองที่ 4: การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่างต่อเซลล์ มะเร็งปอด โดยวิธี Sulforhodamine B colorimetric assay	32
การทดลองที่ 5: การศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR	34
การทดลองที่ 6: การศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าขิงต่อการแสดงออกของ โปรตีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Western blot	39
บทที่ 3: ผลและการอภิปรายผล (Result and Discussion)	40
ผลการทดลองที่ 1: การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสของ สารกลุ่ม Perylene โดยวิธี TRAP assay	40
ผลการทดลองที่ 2: การผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกกระยะสั้น เพื่อใช้ ในการทดสอบการยับยั้งเทโลเมอเรสโดยตรง	42
ผลการทดลองที่ 3: การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่าง ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Sulforhodamine B assay	48
ผลการทดลองที่ 4: การศึกษาผลของสารสกัดขิงต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR	60
ผลการทดลองที่ 5: การศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าขิงต่อการแสดงออกของโปรตีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Western blotting analysis	67
บทที่ 4: บทสรุป (Conclusion)	69
ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	70
ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยนี้	70
ส่วนประกอบตอนท้าย	
บรรณานุกรม (Bibliography)	71

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 2.1:	คุณสมบัติของสารละลายที่ใช้กันทั่วไป	13
ตารางที่ 2.2:	โพลิโนนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ใน TRAP assay	23
ตารางที่ 2.3:	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่อยู่ในพลาสมิด	28
ตารางที่ 2.4:	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนภายหลัง การทรานสเฟกชัน โดยวิธี RT-PCR	31
ตารางที่ 2.5:	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR	38
ตารางที่ 3.1:	ค่า IC_{50} จากสารสกัดชา ไพล และ กระเพราต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	59
ตารางที่ 3.2:	ค่า IC_{50} จากสารบริสุทธิ์ในชาต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	59
ตารางที่ 3.3:	ค่า IC_{50} จากสารสกัดพืชเจ็ดชนิดในสารละลายที่มีส่วนผสมต่างกันสี่ชนิด ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	59

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1.1: ส่วนของดีเอ็นเอที่เทโลเมีย	3
รูปที่ 1.2: กลุ่มโปรตีนเชลเตอร์นที่เทโลเมีย	3
รูปที่ 1.3: การต่อปลายเทโลเมียโดยเทโลเมอเรส	5
รูปที่ 2.1: TRAP Assay ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	22
รูปที่ 2.2: ขั้นตอนการผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกกระยะสั้น	25
รูปที่ 3.1: ผลการวิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส ของสารกลุ่ม Perylene โดยใช้วิธี TRAP assay	41
รูปที่ 3.2: ผลการวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดโดย Agarose gel electrophoresis	43
รูปที่ 3.3: ผลการตรวจสอบยีน hTERT และ ยีน hTR ในพลาสมิดที่สกัดแยกได้ โดยใช้วิธีพีซีอาร์	44
รูปที่ 3.4: ผลการวิเคราะห์ระดับของ hTERT mRNA และ hTR mRNA ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟกด้วยพลาสมิด	45
รูปที่ 3.5: ผลการวิเคราะห์โปรตีนเทโลเมอเรสของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟก ด้วยพลาสมิด	45
รูปที่ 3.6: ผลการวิเคราะห์ระดับของ hTERT mRNA ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟก ด้วยพลาสมิด โดยแคลเซียมฟอสเฟตเปรียบเทียบกับ Lipofectamine 2000	46
รูปที่ 3.7: ผลการวิเคราะห์ระดับของ hTERT protein ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟก ด้วยพลาสมิด โดยแคลเซียมฟอสเฟตเปรียบเทียบกับ Lipofectamine 2000 และ เปรียบเทียบระหว่างแอนติบอดีสองชนิด	47
รูปที่ 3.8: ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากชา ไพล หรือกระเพรา ต่อเซลล์มะเร็งปอด ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	50
รูปที่ 3.9: ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากชา (Camellia sinensis) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	51
รูปที่ 3.10: ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดขิง (Zingiber officinale) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	52
รูปที่ 3.11: ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจิงโจ้ (Capparis micracantha) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	53

รูปที่ 3.12:	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดชั้นทองพยับบาท (<i>Suregada multiflorum</i>) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	54
รูปที่ 3.13:	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดห้วยขาขาวเย็น (<i>Smilax micro-china</i>) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	55
รูปที่ 3.14:	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหมากดิบน้ำค้าง (<i>Hedyotis biflora</i>) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	56
รูปที่ 3.15:	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดกระเจียน (<i>Polalthia cerasoides</i>) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	57
รูปที่ 3.16:	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมะคำไก่ (<i>Drypetes roxburghii</i>) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549	58
รูปที่ 3.17:	ผลของการหา Annealing temperature ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน cDNA ของยีน hTERT (A) และยีน GAPDH (B) โดยวิธี PCR	61
รูปที่ 3.18:	ผลของการหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการทำ Semi-quantitative RT-PCR จากยีน hTERT (A) และยีน GAPDH (B) โดยวิธี PCR	62
รูปที่ 3.19:	ผลของสารสกัดขึ้นต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR	64
รูปที่ 3.20:	ผลของสารสกัดขึ้นในส่วน Acetone ต่อการแสดงออกของยีน cMyc, Mad, และ Max ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR	65
รูปที่ 3.21:	ผลของความเข้มข้นของสารสกัดขึ้นในส่วน Acetone ต่อการแสดงออกของ hTERT protein ในเซลล์มะเร็งปอด A549	67
รูปที่ 3.21:	ผลของเวลาในการบ่มสารสกัดขึ้นในส่วน Acetone ต่อการแสดงออกของ hTERT protein ในเซลล์มะเร็งปอด A549	68

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

%	Percent
°C	Degree Celsius
µg	Microgram
µM	Micromolar
µL	Microliter
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
cm ³	Cubic centimeter
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphates
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
hTR	Human telomeric RNA
mL	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
MgSO ₄	Magnesium sulfate
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse transcriptase- polymerase chain reaction
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate
SRB	Sulforhodamine B
TRAP	Telomerase repeat amplification protocol