

## บทที่ 4

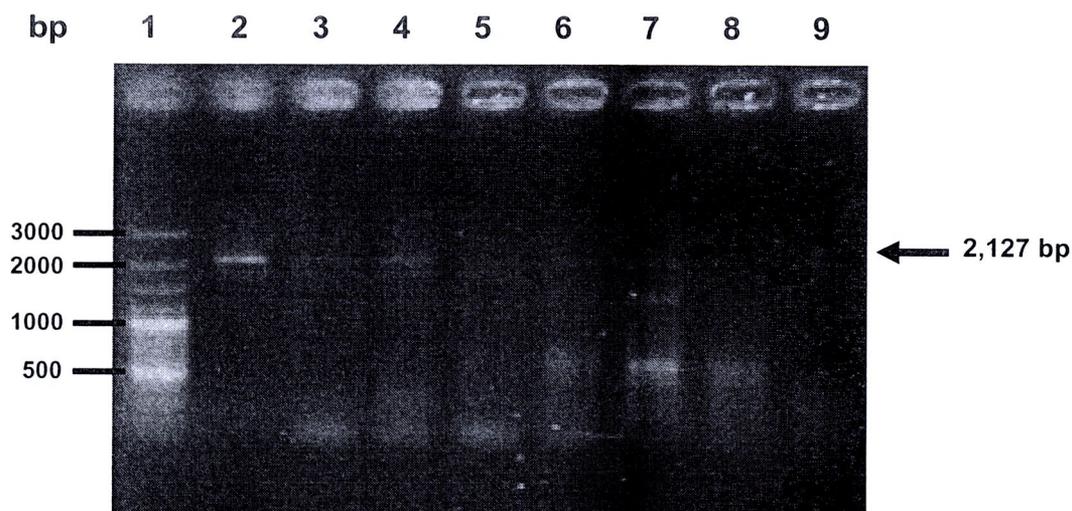
### ผลการวิจัย

#### 4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง fibroblast

ดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเซลล์เพาะเลี้ยง fibroblast วัดค่า A260/A280 ได้ 1.6 ซึ่งถือว่ามีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในระดับปานกลาง จึงนำดีเอ็นเอนี้มาเป็นต้นแบบสำหรับการนำไปใช้โคลนดีเอ็นเอในช่วงที่ควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)

#### 4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)

การหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี gradient temperature ในช่วง annealing temperature ( $T_a$ ) ของกระบวนการ PCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเข้าเกาะของ MMP-3 promoter primer โดยใช้ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 63-53°C เนื่องจากค่าเฉลี่ย  $T_m$  ของ MMP-3 promoter primer อยู่ที่ประมาณ 67.05°C (ตาราง 3.1) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมควรมีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ย  $T_m$  5°C และจากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทดลองนี้ คือ 63°C (รูป 4.1) เนื่องจากที่อุณหภูมิ  $T_a$  นี้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับที่คาดการณ์จากการออกแบบ MMP-3 promoter primer คือ ประมาณ 2,127 bp

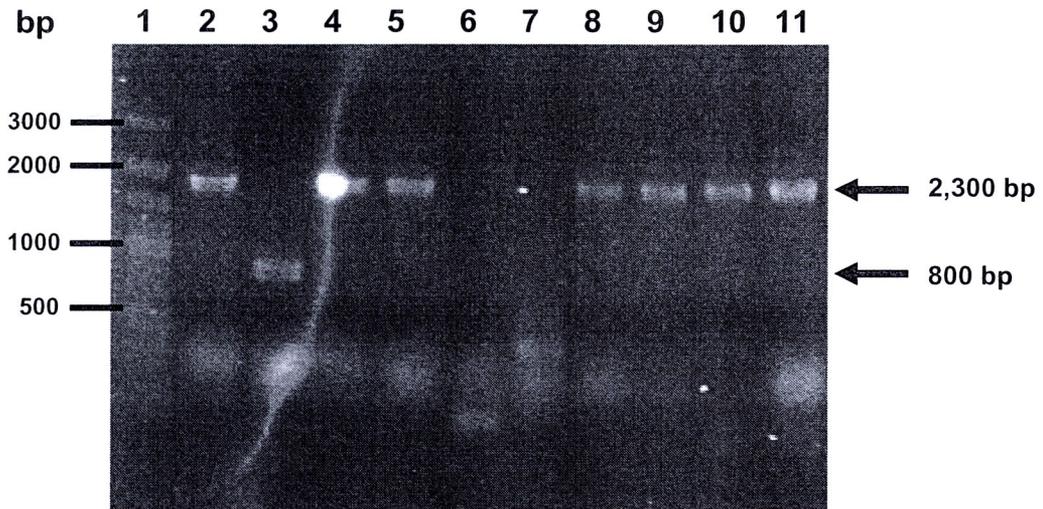


รูป 4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter) ช่อง 1 คือ marker 100 bp ช่อง 2 คือ annealing temperature ( $T_a$ ) 63°C ช่อง 3 คือ 62.2°C ช่อง 4 คือ 61°C ช่อง 5 คือ 59.1°C ช่อง 6 คือ 56.7°C ช่อง 7 คือ 54.9°C ช่อง 8 คือ 53.7°C ช่อง 9 คือ 53°C

#### 4.3 การสร้างเวกเตอร์ลูกผสมระหว่าง TA cloning vector กับผลผลิต PCR ของ MMP-3 promoter

จากการส่งถ่ายเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย แล้วได้คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียสีขาวอย่างสุ่มเนื่องจากโคโลนีสีขาวเป็นโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับเวกเตอร์ลูกผสม จำนวน 10 โคโลนี และทำการตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกเข้าไปใน TA cloning vector เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่ โดยการดูขนาดของแถบดีเอ็นเอจากการทำ colony PCR ด้วย M13 universal primer ซึ่งตำแหน่งเกาะของ primer นี้อยู่บนเวกเตอร์ โดยผลผลิตที่ได้จากการทำ colony PCR ของโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ลูกผสมที่ต้องการควรมีขนาดผลผลิต PCR 2,301 bp ซึ่งเป็นผลรวมของขนาด MMP-3 promoter 2,127 bp รวมกับช่วงของเวกเตอร์ที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วย M13 universal primer ขนาด 174 bp ดังรูป 4.2 พบว่ามี 7 โคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ลูกผสมที่ต้องการ และมี 1 โคโลนีแบคทีเรียที่มีขนาดของผลผลิตอยู่ในช่วงประมาณ 800 ในช่องที่ 3 (รูป 4.2) เนื่องจากชิ้นที่เข้าไปแทรกในเวกเตอร์อาจจะเป็นชิ้นที่เกิดจากแตกหักของดีเอ็นเอส่วน MMP-3 promoter และมี 2 โคโลนีที่ไม่พบผลผลิต PCR แล้วนำโคโลนีแบคทีเรียที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไปเพาะเลี้ยง

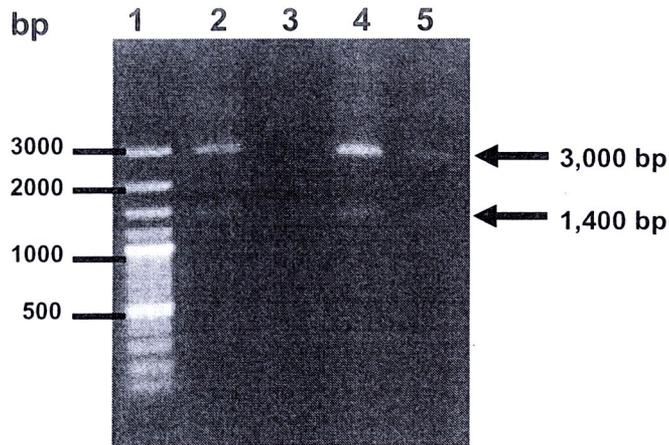
จนได้ปริมาณที่ต้องการแล้วนำไปสกัดเวกเตอร์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป เรียกเวกเตอร์ที่สกัดได้ว่า pMMP3-TA



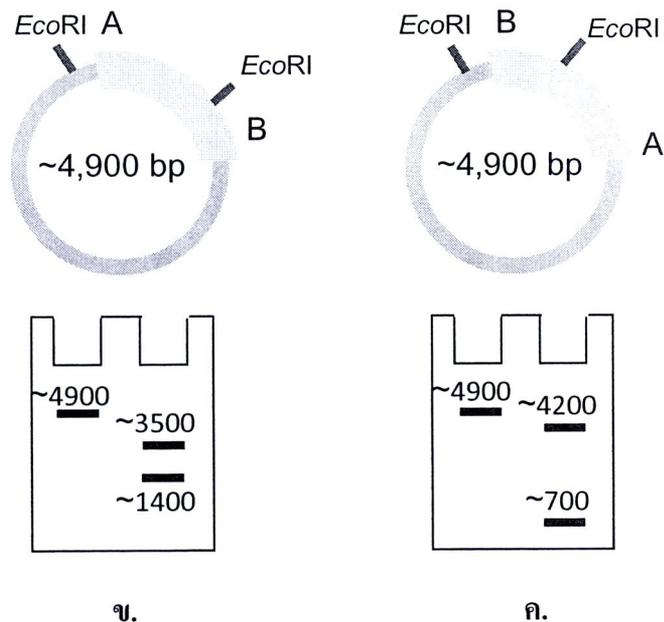
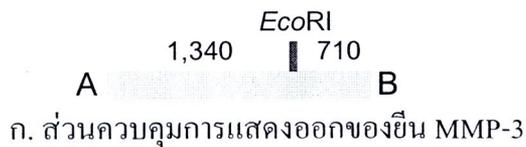
**รูป 4.2** การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-TA ด้วยวิธี colony PCR ช่อง 1 คือ 100bp marker ช่อง 2-11 คือ โคโลนีแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกเพื่อหาแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-TA

#### 4.4 การตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของดีเอ็นเอในเวกเตอร์ pMMP3-TA (orientation of inserted DNA)

นำเวกเตอร์ที่ถูกผสม pMMP3-TA มาตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อหาเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมสำหรับการนำชิ้นดีเอ็นเอ MMP-3 promoter ออกจาก TA cloning vector เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับ pSEAP2-control เมื่อทดลองตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 3,000 bp และ 1,400 bp (รูป 4.3) ซึ่งแสดงว่าทิศทางการวางตัวของดีเอ็นเอเป็นแบบ 4.4ข ซึ่งตามหลักการแล้วการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอมีโอกาสเป็นไปได้ 2 แบบ ดังรูป 4.4 โดยทิศทางนั้นจะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ใน pMMP3-TA ที่มีส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 กรณีที่ทิศทางการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอแบบ ก จะมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,340 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แต่ถ้าทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอเรียงกลับด้านแบบ ข จะปรากฏชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 710 คู่เบส



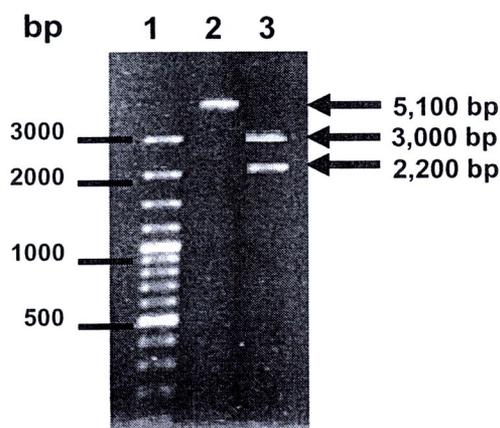
รูป 4.3 การตัดเวกเตอร์ลูกผสม pMMP3-TA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ช่อง 1 คือ 100 bp marker ช่อง 2-4 คือ pMMP3-TA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*



รูป 4.4 การตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอ MMP-3 promoter ที่อยู่ใน pMMP3-TA (ก) แสดงส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (ข) และ (ค) ภาพแสดงตำแหน่ง *EcoRI* ในเวกเตอร์ pMMP3-TA และภาพเจลที่แสดงทิศทางการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ใน pMMP3-TA ที่เป็นไปได้ 2 แบบ หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

#### 4.5 การตัดเวกเตอร์ pMMP3-TA และ pSEAP2-control ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BgIII*

หลังจากตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของ MMP-3 promoter จึงพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมต่อการตัดเอา MMP-3 promoter ออกจาก pMMP3-TA เพื่อนำมาเชื่อมต่อกับ pSEAP2-control คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BgIII* จากการตัด pMMP3-TA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BgIII* จะพบแถบดีเอ็นเอสองแถบ ซึ่งมีขนาด ประมาณ 3,000 bp และ 2,200 bp ซึ่งแถบดีเอ็นเอขนาด 3,000 bp จะเป็นส่วนหลักของตัวเวกเตอร์ TA cloning และ แถบดีเอ็นเอขนาด 2,200 bp เป็นชิ้นดีเอ็นเอของ MMP-3 promoter จากนั้นแถบดีเอ็นเอขนาด 2,200 bp จึงถูกตัดออกออกจากเจลเพื่อสกัดเอาชิ้นดีเอ็นเอนี้ไปเชื่อมต่อกับ pSEAP2-control ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BgIII* ซึ่ง pSEAP2-control ที่ถูกตัดแล้วจะพบแถบดีเอ็นเอหนึ่งแถบขนาดประมาณ 5,100 bp ส่วนอีกหนึ่งแถบจะมีขนาดประมาณ 40 bp อาจมองไม่เห็นในเจลเนื่องจากมีขนาดเล็ก และแถบดีเอ็นเอขนาด 5,100 นี้จะถูกตัดออกแล้วนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (รูป 4.5) เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับ MMP-3 promoter ที่กล่าวมาข้างต้น

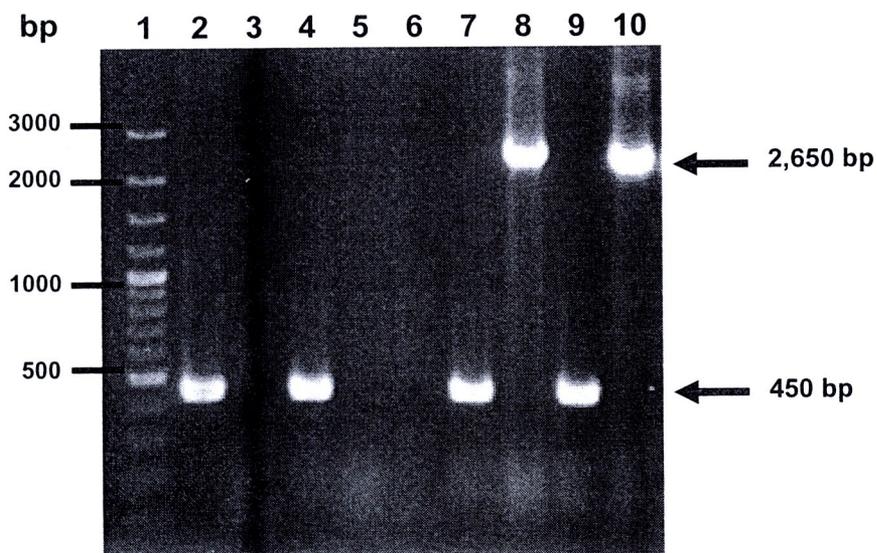


รูป 4.5 การตัดเวกเตอร์ที่ถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BgIII* ช่อง 1 คือ 100 bp marker ช่อง 2 คือ pSEAP2-control ขนาดประมาณ 5,100 bp ช่อง 3 คือ pMMP3-TA

#### 4.6 การสร้างเวกเตอร์ที่ถูกผสมระหว่าง pSEAP2-control กับ MMP-3 promoter ที่ตัดจากเวกเตอร์ pMMP3-TA

เชื่อมต่อกับ MMP-3 promoter กับ pSEAP2-control ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BgIII* และส่งถ่ายเวกเตอร์ที่ถูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียอย่าง

สุ่มจากโคลนทั้งหมดเพื่อทำการตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกเข้าไปใน pSEAP2-control เป็นชิ้นดีเอ็นเอของ MMP-3 promoter หรือไม่ โดยการดูจากขนาดของแถบดีเอ็นเอจากการทำ colony PCR ด้วย pSEAP primer ซึ่งตำแหน่งเกาะอยู่บนเวกเตอร์ พบว่ามี 2 โคลนที่เรียกว่าได้รับเวกเตอร์ ถูกผสมที่ต้องการคือมีขนาดผลผลิต PCR ประมาณ 2,650 bp ซึ่งเกิดจากผลรวมของ MMP-3 promoter ขนาด 2,200 bp รวมกับช่วงของเวกเตอร์ที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วย pSEAP primer ขนาด 450 bp (รูป 4.6) และมี 4 โคลนที่เรียกว่าได้ผลผลิตขนาด 450 bp คือ แถบที่เรียกว่าได้รับเวกเตอร์ pSEAP-control ที่ไม่มีส่วนชิ้นดีเอ็นเอแทรกเข้าไปแทรกภายในตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงได้ขนาด 450 bp (รูป 4.6) แล้วนำโคลนที่เรียกนี้ไปเพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณที่ต้องการแล้วนำไปสกัดเวกเตอร์ เรียก เวกเตอร์นี้ว่า pMMP3-SEAP2-control

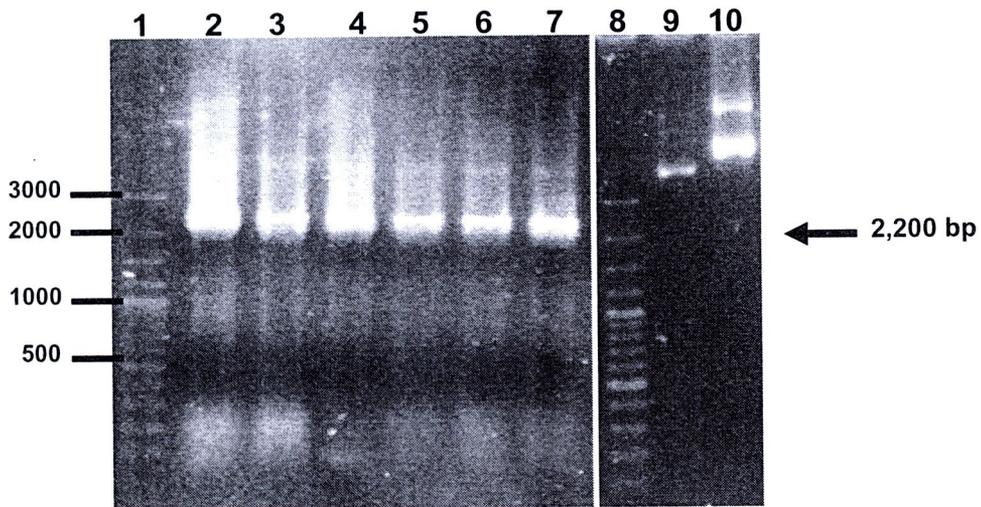


**รูป 4.6** การคัดเลือกโคลนที่เรียกว่าได้รับเวกเตอร์ pMMP3-SEAP-control ด้วยวิธี colony PCR ช่อง 1 คือ 100bp marker ช่อง 2 คือ pSEAP2 เป็นตัวอย่างควบคุมบวก ช่อง 3-10 คือ โคลนที่เรียกว่าถูกนำมาคัดเลือกเพื่อหาแถบที่เรียกว่าได้รับเวกเตอร์ pMMP3-SEAP

#### 4.7 การตัดชิ้นดีเอ็นเอส่วน $P_{sv40}$ ออกจาก pMMP3-SEAP-control ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Nru*I

pMMP3-SEAP-control ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีส่วนของ strong promoter คือ  $P_{sv40}$  ซึ่งจำเป็นต้องกำจัดออกเพื่อให้การแสดงออกของ SEAP นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ MMP-3 promoter เท่านั้น การกำจัดดีเอ็นเอส่วน  $P_{sv40}$  นั้นจะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Nru*I และการตัดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ *NruI* จะได้ซันดีเอ็นเอที่เป็นปลายทู่ (blunt end) ส่วนปลายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII* จะได้ซันดีเอ็นเอที่ปลายเป็น 5' ยื่น (5' protruding) ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase เติมส่วนที่หายไปของปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII* ทำให้ได้เป็นปลายทู่ (blunt end) หลังจากจึงนำซันดีเอ็นเอนี้มาเชื่อมตัวเอง (self ligation) และส่งถ่ายเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย และทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียอย่างสุ่มจากโคโลนีทั้งหมดเพื่อทำการตรวจสอบว่าแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ลูกผสมนี้ ด้วยวิธี colony PCR โดยใช้ pSEAP primer ซึ่งตำแหน่งเกาะอยู่บนเวกเตอร์ และดูขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากการทำ colony PCR พบว่าทุกโคโลนีที่คัดเลือกมา ได้รับเวกเตอร์ลูกผสมนี้เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,200 bp (รูป 4.7) โคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ลูกผสมที่ต้องการจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณที่ต้องการแล้วนำไปสกัดเวกเตอร์ด้วย midi-prep เรียกเวกเตอร์นี้ว่า **pMMP3-SEAP** (รูป 4.7) และนำไปส่งหาลำดับนิวคลีโอไทป์เพื่อทำการตรวจสอบยืนยัน (1) ใน pMMP3-SEAP นั้นมีลำดับเบสที่เป็นส่วนของ MMP-3 promoter หรือไม่ (2) ตรวจสอบว่าไม่มีซันดีเอ็นเอ  $P_{sv40}$  ใน pMMP3-SEAP



รูป 4.7 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-SEAP ด้วยวิธี colony PCR ช่อง 1,8 คือ 100bp marker ช่อง 2-7 คือ โคโลนีแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกเพื่อหาแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-SEAP ช่อง 9 คือ pSEAP2-control ช่อง 10 คือ pMMP3-SEAP

#### 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (sequence of MMP-3 promoter)

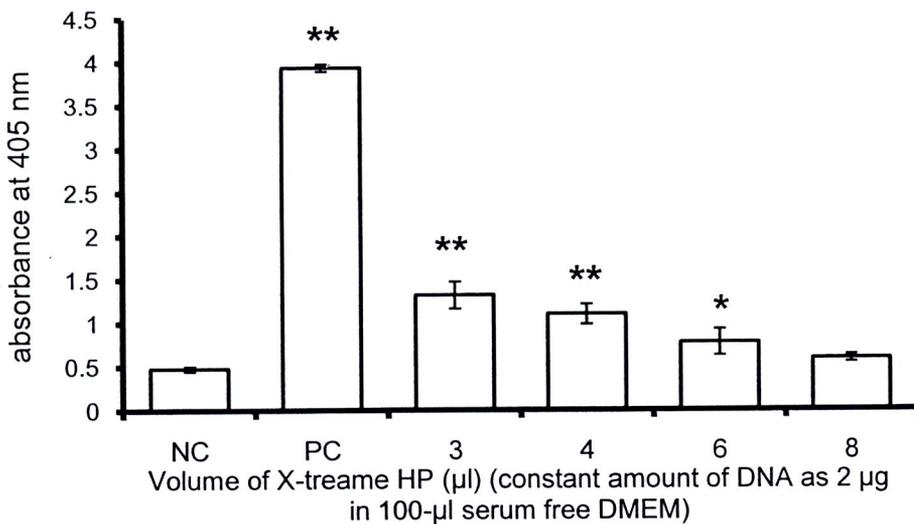
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter) มีขนาด 2,128 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 99% ในช่วง -1,639 ถึง +437 ของยีน MMP-3 (NT\_033899) ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 ของคน และไม่พบช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในส่วน promoter SV40 แสดงว่าซันดีเอ็นเอ promoter SV40 ได้ถูกกำจัดออกจาก pMMP3-SEAP แล้ว โดยลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีลำดับเบสเกินมา 1 เบสจากขนาดที่คาดไว้คือ 2,127 โดยตำแหน่งที่พบว่าการเกินของเบสนี้คือ -1,620 และในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 นี้พบตำแหน่ง DNA binding site หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 เช่น ZBP binding site (-1,630/-1,593), SRPE (-1,584/-1,551), PEA-3 (-217/-209, -208/-200) และ AP-1 (-70/-64) และยังพบว่าโครงสร้างดีเอ็นเอของส่วนควบคุมการแสดงออกของ MMP-3 เป็นแบบ TATA box promoter เนื่องจากมีตำแหน่งของ TATA box ที่ -30/-24 ดังรูป 4.8

GCCACCACTCTGTTCTCCTTGCTCATATCAATGTGGCCAAATATTTCCCTGTATTTCATCAGGACAAGACATGGTTT  
**ZBP-89 or SIRE**  
 TTCCCCCATCAAAGGAATGGAGAAACCATAGAATACTAGTTTTAAATGTCTTAGGCCAGGTGCCGTGACCCATGTCT  
**SPRE**  
 GTAATCCTAGCACTTTGAGAGGTTGAGGCAGGAGAATCACTTGAGCCCAGAGCTCGAAACCAGCCTGGGCAACATAGTGAA  
 ACCTCTGTCTCTATTTTTTAAATAAAATTTGAAAAAGTCTTTAGACATAATCTAGTCTAAAAATGAAGGCTTAAATGTGAT  
 GTATAGCCCCCTGCCAAGTGGCTATCACCTGTGTGGGCATCTTCAGTCACAGGGATCTTATTGCCACAGAGAAATCCCTTT  
 AAACTTATTGGGTAATAATCTCCTCAATGTTTATTAAGAAACACACAAAAATAAAGCAAAGAAGAAAATGCAAAAAGATTA  
 TAAATGAGAGGAAGCAAATGGGCACCTATTAAGGTCTAATAATGCACATTTGTATCCATCATTTCTACTGAGTCTTAC  
 TCCAAGATGTTCTCCCTTTAGCAAACAAATAAGCAAGTCAGCAAAGAAAGAAAGAACAAACAAATGTGGTGATCAGGG  
 AAGCATTGAGGAGATGGATGGTGGCAGGTGGCAAGAGGACTATAAAAGTTTTACAAAATGTCTTCCCTCTGAATATGTTTAG  
 AGTCTTGCATCAAGCATTTATTATACACCAATAATGTGAGCAACACTTTACTTGACAAAGAAACAGAAAAGAAAGGAAAG  
 GAAGAAAACAGAAGAGCATGAAGAGAAAATTTAGGATGGATTCTGTTCTTCAACTTCAAAGCATCTGCTAATTTGAAATTA  
 GGGAGGAGGGGAAAAGGTTGAAAAAACAAGGACAGAAAAATTTTCAGTCCGGTAAGCAATG  
 TAATTCATTTCAATTTCAACTATTTATGGGGCAGCTACGTGGGCCATCACCCATTAATAAATGGTTACAGAATTA  
 ACCAACCCAAAGGGAATATACTTCTTTTACAGACCTCTTTGTTCTATTCTGCCATGAGGTTTTCTCTCTCAAG  
 AACCAGCAAATCCAACGACAGTCATTAGCAGGCATTACAAATCAGATTCAGAAAAATAAATCACCCCTTCTAAATTTCTTC  
 TAGATATTATCTTTTATGTTTGTAGTATAATGTATATAGTATAGACTATAGCTATGTATGTACACTTCCACTTACATCT  
 TTTATTGCTTTTATAATGTCTTTCTTAAATAAAACTGCTCTTAGAAGTTCTGCACAATTTCTGATTTTTACCAAGTCAAC  
 CTACTTCTTCTCATAAAGGACAAACATAAATGTCTAGTGAATTCAGTCAATTTTTCCAGAAGAAAAAATGCTCCAG  
 TTTTCTCTCTACCAAGACAGGAAGCACTTCTGGAGATTAATCACTGTGTTGCCTTGCAAAATGGGAAGGTTGAGAGAA  
**PEA-3 PEA-3**  
 ATTAGTAAAGTAGGTTGTATCATCTACTTTGAATTTGGAATTTGGAAATGGTCTGCTGCCATTTGGATGAAAGCAAG  
**+1**  
 GATGAGTCAAGCTGCGGGTGATCCAACAAACACTGTCACTCTTAAAAAGCTGCGCTCCCGAGGTTGGACCTACAAGGAG  
**AP-1 TATA box**  
 GCAGGCAAGACAGCAAGGCATAGAGACAACATAGAGCTAAGTAAAGCCAGTGGAAATGAAGAGTCTTCCAATCTACTGTT  
**5' untranslated region**  
 GCTGTGCGTGGCAGTTTGTCTCAGCCTATCCATTGGATGGAGCTGCAAGGGGTGAGGACACCAGCATGAACCTTGTTCAGGT  
 AATTAACACTAACTGACCTGGCCAGGTGGGAGCTTCCAGAGTAAGCTGAAACCATTCTGTGTCTTAAAACCCACATAG  
 AATGCTTGAGCTTACTGTGTAGGAACAGTTCAGAATAGAGAGTTATAGAGTGTGGAAGTGGAAAAGGTTCTCATTATCAC  
 ACCATTTGGGCTTCTCTCTTATGTAGGAAGAAACAAAGGCCAGAAATATTAGGTGTTTTCTTAAGATCACACAACCCAT  
 AGCAGTAGCAGCACTGGGGCTTAA

รูป 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ช่วง -1,691 ถึง +437 ในคน แสดงโครงสร้างและตำแหน่งของ DNA binding site ต่างๆ SIRE; stromelysin IL-1 $\beta$  responsive element, ZBP-89 site; 89-kDa zinc finger protein site, SPRE; stromelysin PDGF responsive element, activator protein-1 sites; AP-1 sites, polyomavirus enhancer A-binding protein 3 sites; PEA-3 sites.

#### 4.9 อัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอและปริมาตรของ X-treamerHP ที่เหมาะสมต่อการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353 แบบชั่วคราว

จากการทดลองส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353 แบบชั่วคราว เพื่อหาอัตราส่วนของดีเอ็นเอ pMMP3-SEAP และ X-treamerHP ที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของ pMMP3-SEAP มากขึ้น การแสดงออกของ SEAP จะลดลงเนื่องจากการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ SEAP น้อยลง และอัตราส่วนที่พบว่าเหมาะสมต่อการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353 มากที่สุด มากที่สุดคือ 3  $\mu\text{g}$  pMMP3-SEAP ต่อ 2  $\mu\text{l}$  X-treamerHP (รูป 4.9) เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่พบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP สูงที่สุด และอัตราส่วนนี้จะถูกใช้ในการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353 ในการทดสอบสารต่างๆ ต่อไป

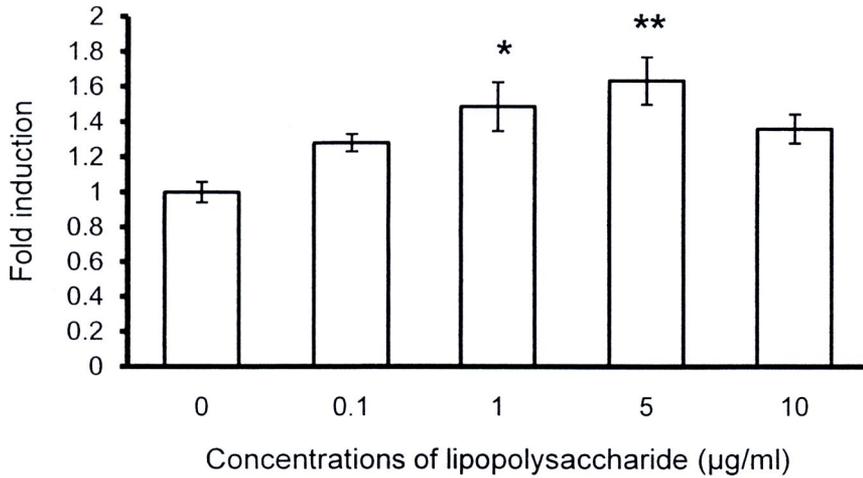


**รูป 4.9** การหาความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอ (pMMP3-SEAP) และปริมาตรของ X-treamerHP สำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ SW1353 แบบชั่วคราว โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอคงที่ (2  $\mu\text{g}$ ) negative control (NC); กลุ่มควบคุมลบ เป็นกลุ่มที่ใส่เฉพาะ serum free DMEM, positive control (PC); กลุ่มควบคุมบวก เป็นกลุ่มที่ได้รับการส่งถ่ายเวกเตอร์ pSEAP2-control เข้าสู่เซลล์ SW1353 หลังจากที่ยังดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ SW1353 แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ด้วยวิธี colorimetric method (\* $p < 0.05$  และ \*\* $p < 0.01$ )

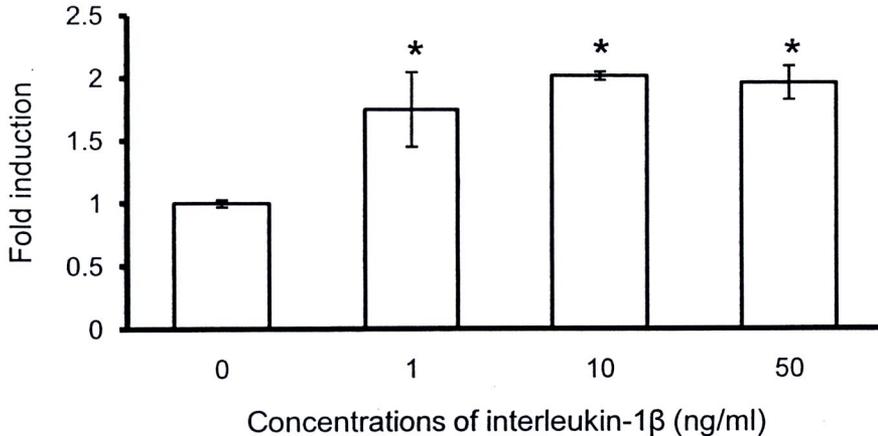
#### 4.10 การทดสอบสารอักเสบ IL-1 $\beta$ และ LPS ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3

##### 1. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 $\beta$ และ LPS ในเซลล์ SW1353 ด้วยวิธีเซลล์รายงานผล

เซลล์ SW1353 ที่ถูกการส่งถ่าย pMMP3-SEAP ด้วยอัตราส่วน 3:2 (X-treamHP:pMMP3-SEAP) จะถูกทดสอบด้วยสาร IL-1 $\beta$  และ LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1, 10 หรือ 50 ng/ml และ 0, 0.1, 1, 5 หรือ 10  $\mu$ g/ml ตามลำดับ และเลี้ยงต่ออีก 48 ชั่วโมงในตู้ CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้งสอง เซลล์มีแนวโน้มที่จะมีการแสดงออกของยีน SEAP เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP มากขึ้น แสดงว่ามีการแสดงออกของยีน MMP-3 สูงขึ้นเช่นกัน เซลล์ SW1353 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ที่ความเข้มข้นมากกว่า 5  $\mu$ g/ml นั้นมีแนวโน้มที่จะมีการลดการแสดงออกของยีน MMP-3 แต่อย่างไรก็ตามอาจจะเกิดจากสภาวะที่สาร LPS เข้มข้นสูงจึงทำให้เซลล์ได้รับพิษจากตัวสารจึงทำให้เซลล์มีการตายเกิดขึ้นจึงส่งผลให้มีการแสดงออกลดลง (รูป 4.10) และสาร IL-1  $\beta$  ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml และ 50 ng/ml (2.02 และ 1.97 เท่าของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) ของสาร IL-1  $\beta$  (รูป 4.11) ไม่พบความแตกต่างของกิจกรรมการทำงานของ SEAP ดังนั้นความเข้มข้นของสาร IL-1  $\beta$  ที่นำไปใช้ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 เพื่อใช้ในการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 หลังจากถูกกระตุ้นด้วยสารอักเสบ (IL-1 $\beta$ ) คือ 10 ng/ml เนื่องจากสาร IL-1 $\beta$  เป็นสารกระตุ้นการอักเสบที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่การกระตุ้นเซลล์ SW1353 ด้วยสารนี้เพื่อเป็นการเลียนแบบสภาวะของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้มีความใกล้เคียงกับการเกิดโรคข้อเสื่อมมากที่สุด



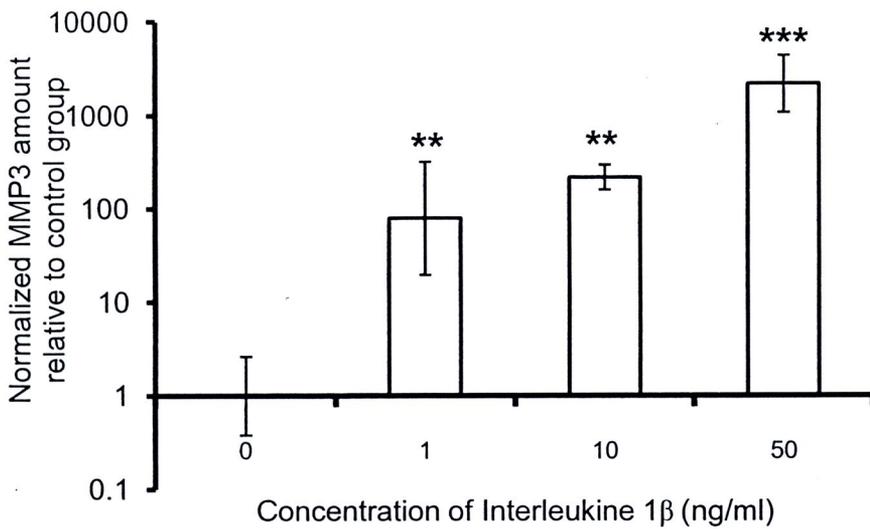
รูป 4.10 การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 5 และ 10 µg/ml ด้วยวิธีเซลล์รายงานผลโดยการใช้ transfectant SW1353 ทดสอบด้วย LPS แล้วบ่มที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ด้วยวิธี colorimetric method (\* $p < 0.05$  และ \*\* $p < 0.01$ )



รูป 4.11 การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ความเข้มข้น 0, 1, 10, และ 50 ng/ml ด้วยวิธีเซลล์รายงานผลโดยการใช้ transfectant SW1353 ทดสอบด้วย IL-1β แล้วบ่มที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ด้วยวิธี colorimetric method (\* $p < 0.05$ )

## 2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 $\beta$ ในเซลล์ SW1353 ด้วยวิธี real-time PCR

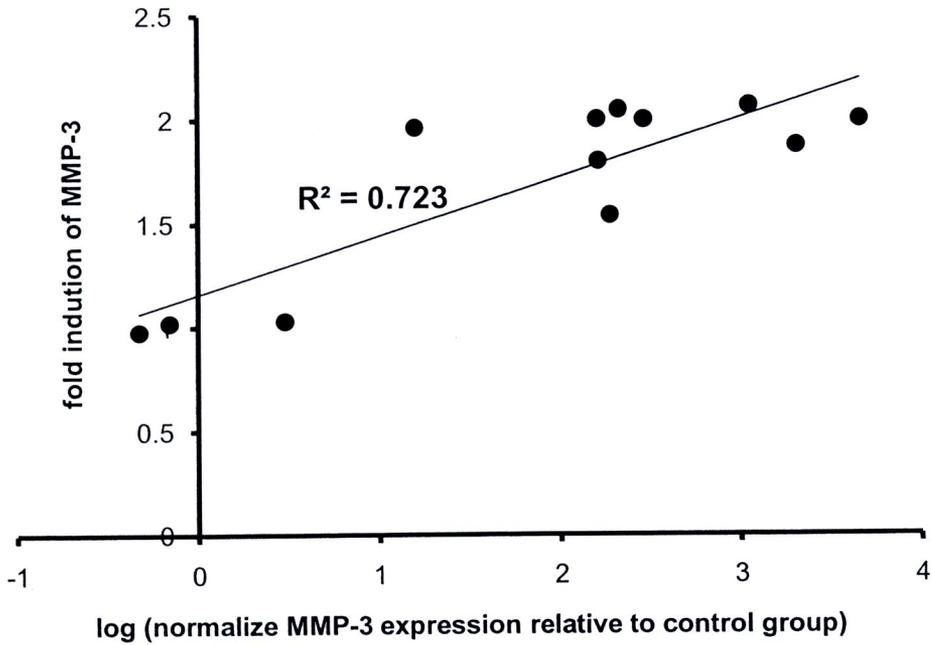
การแสดงออกของยีน MMP-3 ในระดับ mRNA มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสาร IL-1 $\beta$  ดังรูป 4.12 ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ตรวจสอบด้วยวิธีเซลล์รายงานผล



รูป 4.12 การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10 และ 50 ng/ml โดยใช้เซลล์ SW1353 หลังจากทดสอบแล้วบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C นาน 48 ชั่วโมง และตรวจสอบการแสดงออกด้วยวิธี real-time PCR (\*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001)

## 3. ความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี real-time PCR กับ วิธีเซลล์รายงานผล pMMP3-SEAP ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 $\beta$ ในเซลล์ SW1353

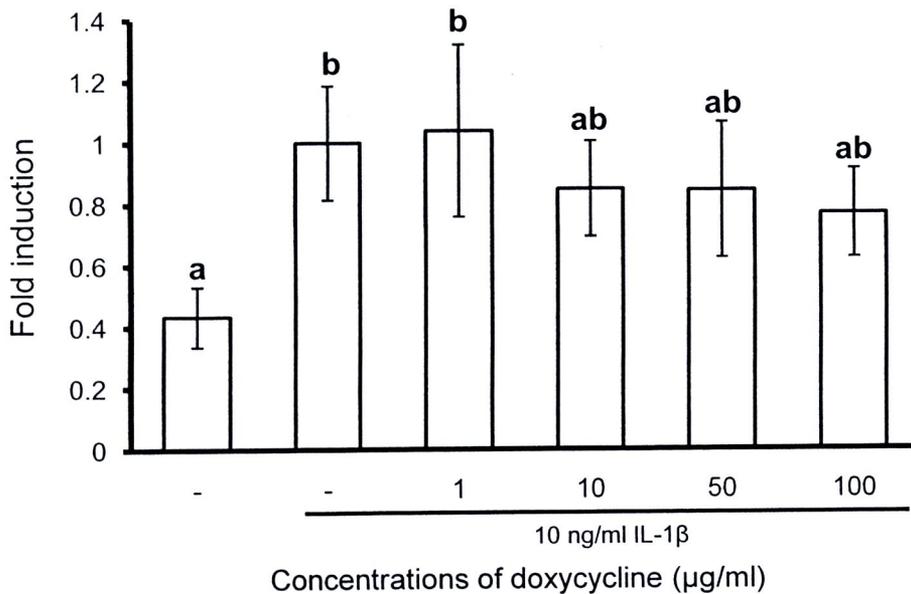
ความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี real-time PCR กับ วิธีเซลล์รายงานผล pMMP3-SEAP พบว่ามีแนวโน้มเป็นเชิงเส้นตรง เมื่อค่าการแสดงออกของยีน MMP-3 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR เพิ่มขึ้นค่าการแสดงออกของยีน MMP-3 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเซลล์รายงานผล pMMP3-SEAP ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.723 แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีให้ข้อมูลที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน (รูป 4.13)



รูป 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี real-time PCR กับ วิธีเซลล์รายงานผล pMMP3-SEAP ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 $\beta$  ในเซลล์ SW1353

#### 4.11 ผลการยับยั้งของ doxycycline ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$ ด้วยระบบเซลล์รายงานผล ในเซลล์ SW1353

เซลล์ SW1353 ที่ถูกส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์จะถูกทดสอบด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  พร้อมกับ doxycycline ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1, 10, 50 หรือ 100  $\mu$ g/ml พบว่ามีการแสดงออกของยีน MMP-3 เป็น 1.04, 0.85, 0.85 และ 0.77 เท่าของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  เพียงอย่างเดียว ซึ่งทำให้เห็นว่า doxycycline มีแนวโน้มสามารถลดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 จากสาร IL-1 $\beta$  แต่ถึงอย่างไรก็ยังคงมีการแสดงออกที่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  ที่เป็นสภาวะปกติของเซลล์โดยการแสดงออกเพียง 0.43 เท่าของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (รูป 4.14)

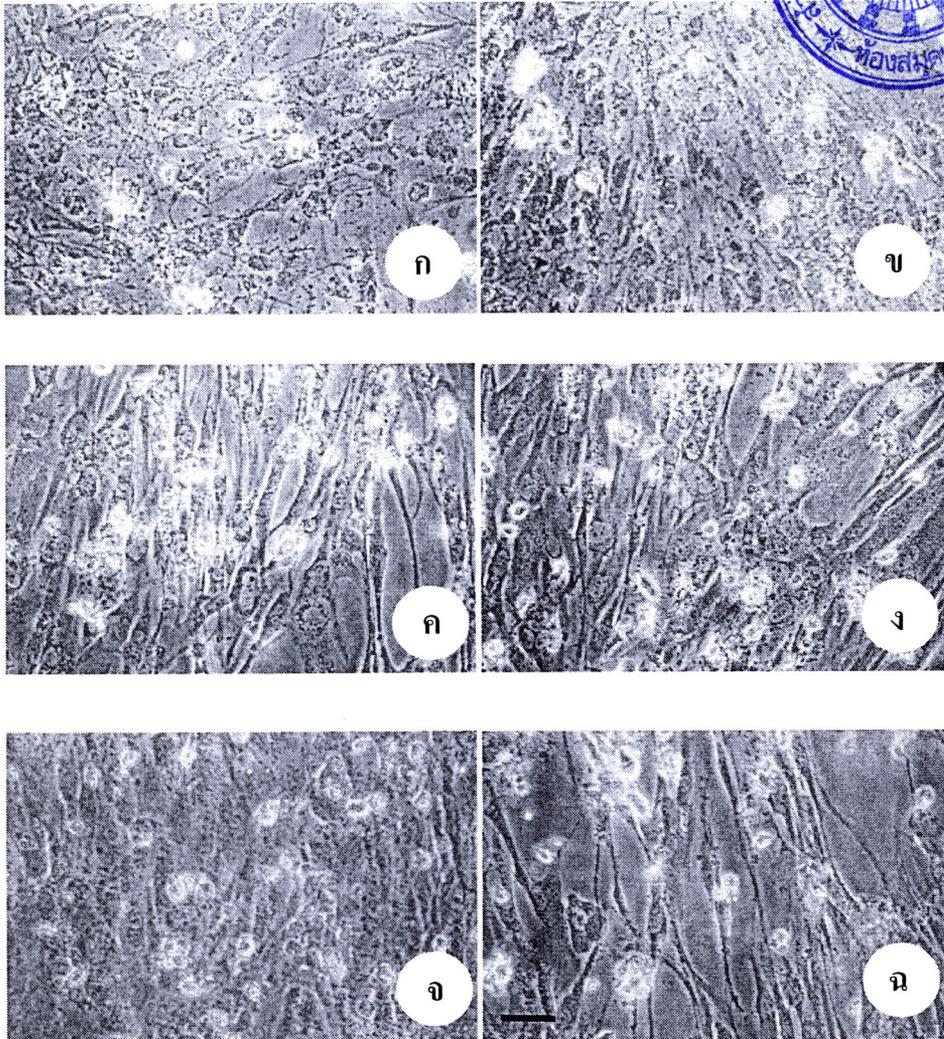


**รูป 4.14** ผลของ doxycyclin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการแสดงของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  ด้วยวิธีเซลล์รายงานผล โดยใช้ transfectant SW1353 แบบชั่วคราว ทดสอบด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  ร่วมกับ doxycyclin ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1, 10, 50 และ 100  $\mu$ g/ml หลังจากทดสอบแล้วจะเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 48 ชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP โดยมีกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสาร IL-1 $\beta$  เป็นกลุ่มควบคุม ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสถิติจะมีระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  (a และ b แสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลอง)

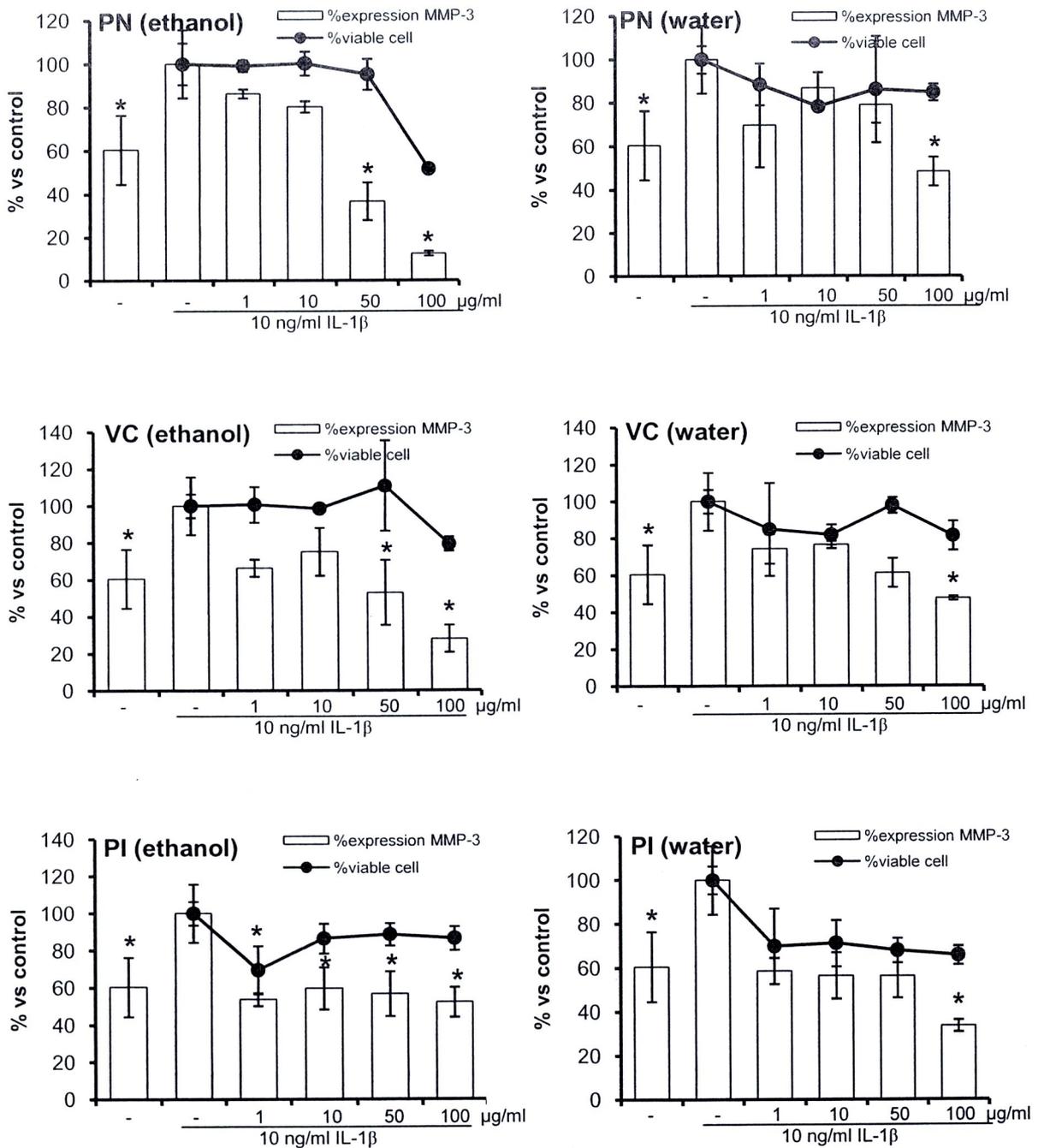
#### 4.12 ผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$ ด้วยระบบเซลล์รายงานผลโดยใช้เซลล์ SW1353

จากการทดสอบการยับยั้งการกระตุ้นของสาร IL-1 $\beta$  ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยสมุนไพรไทยบางชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิด คือ น้ำ และเอทานอล ในเซลล์ SW1353 ด้วยระบบเซลล์รายงานผลนั้น พบว่า สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นจาก IL-1 $\beta$  โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ SW1353 ได้แก่ ลูกใต้ใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล หนุ่ดอกขาวที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล ไพล่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ซึ่งนอกจากนี้แล้วยังมีสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดที่ส่งผลกระทบต่อรูปร่างของเซลล์ SW1353 ได้แก่ ขลุ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย

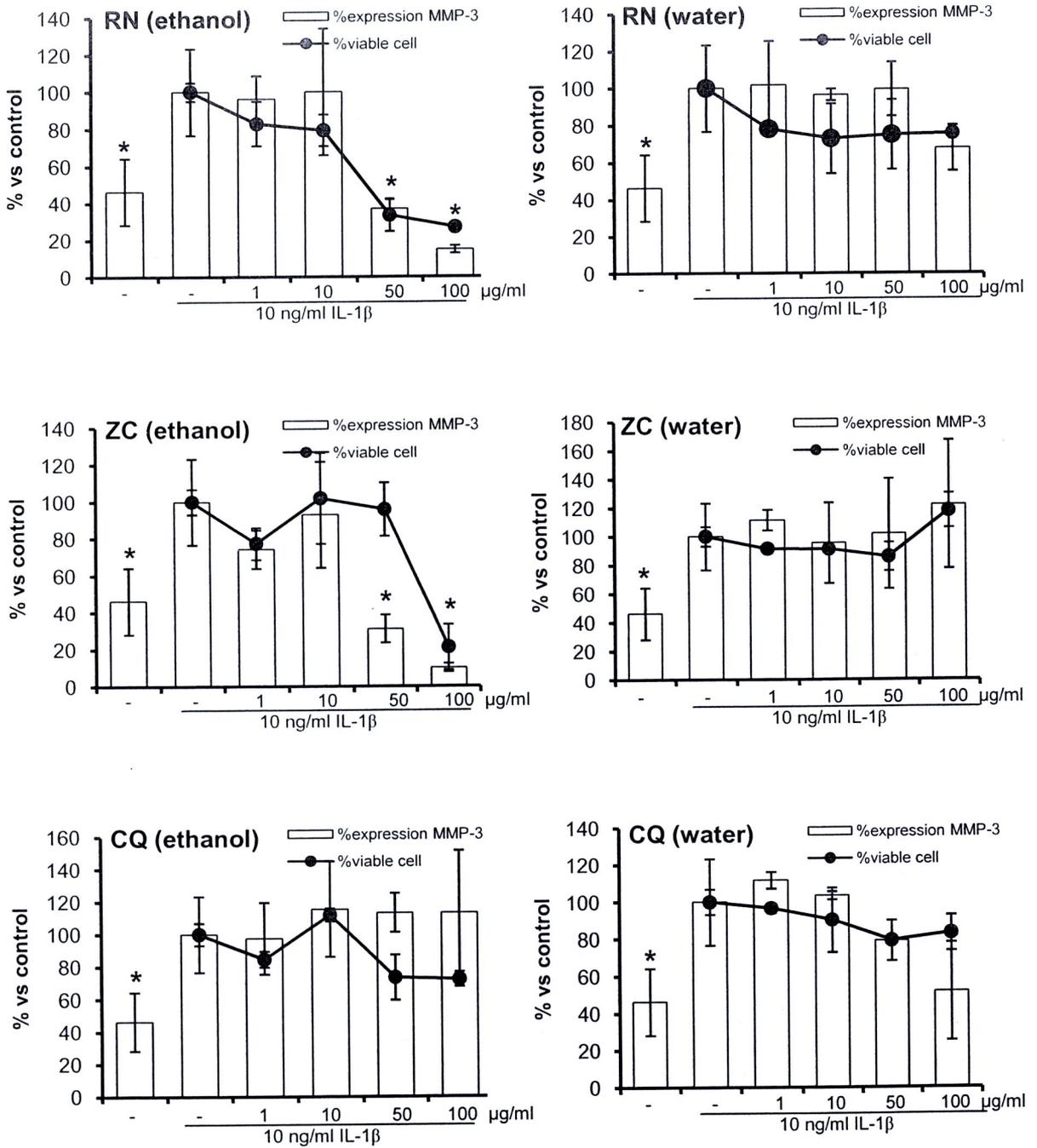
เอทานอล ถึงแม้ว่าสารนี้มีแนวโน้มสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ แต่สารสกัดนี้ค่อนข้างที่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ถึงจะไม่มาก แต่กลับพบว่า เซลล์มีลักษณะรูปร่างที่เปลี่ยนไปจากเดิม โดยเซลล์จะมีลักษณะของปลายที่ยื่นเริ่มหดตัวเล็กลง และลักษณะของผิวเซลล์ไม่เรียบเหมือนในเซลล์ปกติ ซึ่งต่างจากสมุนไพรตัวอื่นที่ถึงแม้จะเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าแต่ก็ไม่ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป (รูป 4.15) โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงคือ 100  $\mu\text{g/ml}$  และ 50  $\mu\text{g/ml}$  แต่ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  และ 1  $\mu\text{g/ml}$  ลักษณะของเซลล์ยังคงเหมือนในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ดูได้จากใบไม้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 แต่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นถึง 100  $\mu\text{g/ml}$  นั้นทำให้เซลล์รอดชีวิต 51.60% เช่นกัน และทองพันชั่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงขึ้น โดยสารสกัดทองพันชั่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะมีความเป็นพิษที่สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และยังพบว่าสารสกัดจากทองพันชั่งนั้นไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 รวมถึงสารสกัดด้วยไฟที่สกัดด้วยน้ำและสารสกัดเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยเอทานอลนั้นพบว่าไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 $\beta$  และจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์พบว่าสารสกัดที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีแนวโน้มที่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ดังรูป 4.16 และ 4.17



**รูป 4.15** ลักษณะรูปร่างของเซลล์ SW1353 หลังจากที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดขี้ผึ้งด้วยตัวทำละลายเอทานอล นาน 72 ชั่วโมง พบว่าลักษณะของเซลล์ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  (ก) 50  $\mu\text{g/ml}$  (ข) ลักษณะเซลล์จะมีเริ่มมีการหดตัวและผิวเซลล์ไม่เรียบเหมือนในกลุ่มควบคุม ซึ่งจะมีความแตกต่างจากความเข้มข้นที่ 10  $\mu\text{g/ml}$  (ค) และ 1  $\mu\text{g/ml}$  ร่วมกับ 10  $\text{ng/ml}$  IL-1 $\beta$  (ง) กลุ่มเซลล์ที่ได้เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ serum free DMEM (จ) กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 10  $\text{ng/ml}$  IL-1 $\beta$  อย่างเดียว (ฉ) ซึ่งการทดลองทั้งหมดจะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมงและนำมาตรวจสอบด้วยกล้อง inverted microscopy กำลังขยาย 200 เท่า scale bar 30  $\mu\text{m}$



**รูป 4.16** การทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำจากสมุนไพรไทยบางชนิดที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 50 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 $\beta$  ด้วยระบบเซลล์รายงานผล โดยการใช้ transfectant SW1353 มาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ 10 ng/ml IL-1 $\beta$  หลังจากนั้นบ่มที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ด้วยวิธี colorimetric ส่วนเซลล์จะถูกนำมาทดสอบการเป็นพิษของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อเซลล์ SW1353 ด้วยวิธี MTT assay; ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ได้แก่ PN (*Phyllanthus niruri* L) VC (*Vernonia cinerea* Less.) PI (*Pluchea indica* Less.) (\* $p < 0.05$ )



รูป 4.17 การทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำจากสมุนไพรไทยบางชนิดที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 50 และ 100 µg/ml ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1β ด้วยระบบเซลล์รายงานผล โดยการใช้ transfectant SW1533 มาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ 10 ng/ml IL-1β หลังจากนั้นบ่มที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SEAP ด้วยวิธี colorimetric ส่วนเซลล์จะถูกนำมาทดสอบการเป็นพิษของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อเซลล์ SW1533 ด้วยวิธี MTT assay; ซึ่งสมุนไพรที่ใช้ได้แก่ RN (*Rhinocanthus nasutus* Karz.) ZC (*Zingiber cassumunar* Roxb.) CQ (*Cissus quadrangularis* Linn.) (\* $p < 0.05$ )