บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยเพื่อสร้างเวคเตอร์รายงานผลการแสดงออกของยีน matrix metalloproteinase-3 ด้วยระบบเซลล์รายงานผล ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เซลล์ human chondrosarcoma (SW1353) เป็นต้นแบบ และส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 นั้นถูกโคลนด้วยวิธี PCR แล้วนำมาเชื่อมต่อกับ pSEAP2-control ที่ถูกำจัดส่วน strong promoter ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน SEAP ซึ่งเป็น reporter gene ในการศึกษาครั้งนี้แล้วนำดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ใส่แทนได้เป็น pMMP3-SEAP แล้วนำส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ SW1353 แบบชั่วคราวโดยใช้สาร X-treameHP ซึ่งอัตราส่วนระหว่าง pMMP3-SEAP และสาร X-treameHP คือ 2 μg : 3 μl ที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอนี้ และทำการทดสอบเซลล์ SW1353 ด้วยสาร proinflammatory agents 2 ชนิด คือ interleukine-1β (IL-1β) และ lippopolysaccharide (LPS) ซึ่งพบว่า สารทั้งสองสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ SEAP ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้มากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น นั้นแสดงให้เห็นว่า IL-1β และ LPS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ และนอกจากนี้ยังทำการทดสอบการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วย IL-1β ด้วยวิธี real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน MMP-3 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และพบว่าการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี SEAP assay มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับค่า logarithm ของการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR นั้นแสดงให้เห็นว่าวิธี real-time PCR มีความไวในการตรวจสอบสูงกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี colorimetric SEAP assay แต่อย่างไรก็ตามเราสามารถพัฒนาความไวของการตรวจสอบด้วย SEAP assay ให้มีความไวสูงขึ้นได้ด้วยการใช้สาร chemiluminescent เป็นสารตั้งต้นแทน pNPP แต่อย่างไรข้อดีที่สำคัญของการใช้วิธี reporter gene technology นั้นคือสามารถนำมาใช้กับตัวอย่างของสารที่ต้องการทดสอบจำนวนมากมายได้มากกว่าวิธี real-time PCR ในเวลาที่เท่ากัน

นอกจากนี้แล้วเซลล์ SW1353 ที่ถูกส่งถ่าย pMMP3-SEAP แบบชั่วคราวยังถูกทดสอบการยับยั้งการกระตุ้นของสาร IL-1 β ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยสาร doxycycline และสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิด ได้แก่ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* L.; PN) หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.; VC) ขลู่ (*Pluchea indica* Less.; PI) ทองพันชั่ง (*Rhinocanthus nasutus* Karz.; RN) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.; ZC) และเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* Linn.; CQ) ที่สกัดด้วยตัวละลาย 2 ชนิดคือ น้ำ และเอทานอล พบว่า doxycycline มีแนวโน้มในการยับยั้ง

การกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 โดยสาร IL-1β ได้ และพบว่ามีสมุนไพรบางชนิดที่มีแนวโน้มยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ คือ สารสกัดด้วยเอทานอลของลูกใต้ใบ สารสกัดด้วยน้ำของหญ้าดอกขาว และสารสกัดด้วยเอทานอลของไพล ซึ่งสารทั้งสามนี้มีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.9, 74.26, และ 27.82 μg/ml

จากผลการวิจัยทั้งหมดทำให้ยืนยันได้ว่า pMMP3-SEAP นั้นสามารถนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ด้วยวิธี reporter gene technology ซึ่งจะทำให้สามารถใช้ในตรวจหาสารเคมีหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกหลายชนิดที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้