

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



209147

การตั้งแบบจำลองเบย์สำหรับเครือข่ายการขนส่ง
ของเมืองมาดริดบนเทคโนโลยีปัญญาประดิษฐ์-3 ในเขต
อิมเมทคอนโทรลโรบอติกส์ (SW1353)

กิตติศักดิ์ พุระชาติ

จิตศาสตร์มหาวิทยาลัย
สาขาวิชาชีววิทยา

พิมพ์ครั้งที่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีพ.ศ. 2554



209147

การสร้างเซลล์เบสรีพอร์ตเตอร์ยีนสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออก
ของยีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-3 ในเซลล์
อิวแมนคอนโคซาร์โคมา (SW1353)



กิตติศักดิ์ พุทธรชาติ

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

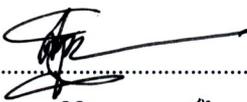
บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กันยายน 2554

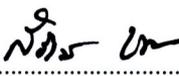
การสร้างเซลล์เบสรีพอร์เตอร์ยีนสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออก
ของยีนแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-3 ในเซลล์
อิวแมนคอนโคโรซาร์โคมา (SW1353)

กิตติศักดิ์ พุทธรชาติ

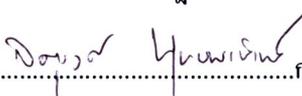
วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

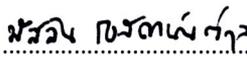
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย


.....กรรมการ
ผศ. ดร. สิริวดี ชมเดช


.....กรรมการ
ผศ. นสพ. ดร. กรกฏ งานวงศ์พานิชย์


.....กรรมการ
รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์


.....กรรมการ
อ. ดร. มัสลิน โอสถานันต์กุล

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. สิริวดี ชมเดช


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. นสพ. ดร. กรกฏ งานวงศ์พานิชย์

12 กันยายน 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สิริวดี ชมเดช และ ผศ. นสพ. ดร. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ ที่แนะนำแนวทางในการค้นคว้าข้อมูล ขั้นตอนในการทดลอง รวมทั้งเอาใจใส่ อบรม ตักเตือน ช่วยเหลือ และชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น และให้กำลังใจมาโดยตลอด ตลอดจนช่วยตรวจสอบข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์กรไชย รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ และอาจารย์ ดร. มัสลิน โอสถานันต์กุล ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการทำการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้เซลล์เพาะเลี้ยง human lung fibroblast

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในงานวิจัย และเครื่องมือในการทดลอง รวมถึงการให้สารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์กรไชย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้เซลล์เพาะเลี้ยง SW1353 รวมทั้งขอบคุณผู้ร่วมงานในหน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง ให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ผลการทดลองในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. มัสลิน โอสถานันต์กุล ที่ให้คำแนะนำและการปรึกษาต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ปัญหาให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยที่ให้ทุนการศึกษา

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ครอบครัวอันเป็นที่รัก ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น ความเข้าใจ และให้การศึกษารอบมด้วยความรักที่ไม่สามารถได้รับจากการเรียนที่สถาบันใดหรือจากใคร

ขอบคุณบุคลากรทุกท่านและเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึงในที่นี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย คอยเป็นห่วงและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การสร้างเซลล์เบสไฟเบอร์เตอร์ยื่นสำหรับการวิเคราะห์การ
แสดงออกของยีนแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-3 ในเซลล์
อิวแมนคอน โคโรซาร์โคมา (SW1353)

ผู้เขียน

นายกิตติศักดิ์ พุทธรชาติ

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. สิริวดี ชมเดช อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. นสพ. ดร. กรกฏ งานวงศ์พานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

209147

ยีน matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) ถอดรหัสได้เอนไซม์ MMP-3 ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของ extracellular matrix (ECM) การแสดงออกของยีน MMP-3 นั้นจะมีผลต่อระบบสรีรวิทยาของเซลล์ในสภาวะปกติและการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง โรคหลอดเลือดอุดตัน รวมถึงรูมาตอยด์และข้อเสื่อม ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ในเซลล์ human chondrosarcoma (SW1353) ด้วย reporter gene technology โดยใช้ secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) เป็น reporter gene เพื่อค้นหาสารเคมีหรือสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 จะถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR แล้วนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pSEAP2-control ที่กำจัดส่วนโปรโมเตอร์ SV40 ออกแล้วแทนที่ด้วยส่วนควบคุมการแสดงออก (promoter) ของยีน MMP-3 เพื่อให้การแสดงออกของยีน SEAP อยู่ภายใต้การควบคุมของส่วนควบคุมการแสดงออก (promoter) ของยีน MMP-3 เรียกเวกเตอร์นี้ว่า pMMP3-SEAP จากนั้นทำการส่งถ่ายเวกเตอร์ pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353 แบบชั่วคราว และทดสอบการทำงานของระบบเซลล์รายงานผลด้วยสาร inflammatory agents 2 ชนิด คือ interleukin-1 β (IL-1 β) และ lipopolysaccharide (LPS) พบว่า สารทั้งสองนี้สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ด้วยวิธีเซลล์รายงานผลของเวกเตอร์ pMMP3-SEAP และหาความสัมพันธ์ของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MMP-3 ระหว่างวิธี real-time PCR และเซลล์รายงานผลที่ถูกกระตุ้นของสาร

IL-1 β พบว่าการตรวจสอบด้วยทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.723$) โดยค่าการ
แสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยวิธี real-time PCR จะอยู่ในเทอมของ logarithm นอกจากนี้ยัง
ทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 β ด้วยสาร doxycycline
และสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิดด้วยวิธีเซลล์รายงานผล พบว่า doxycycline สารสกัดด้วยเอทา
นอลของลูกใต้ใบ สารสกัดด้วยน้ำของหญ้าดอกขาว และสารสกัดด้วยเอทานอลของไพลนั้นมี
แนวโน้มสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ได้ จากผลการทดลอง
ทั้งหมดนั้นแสดงให้เห็นเวกเตอร์ pMMP3-SEAP สามารถนำไปใช้เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน
MMP-3 ในเซลล์ SW1353 ด้วยวิธีเซลล์รายงานผลได้

คำสำคัญ: matrix metalloproteinase-3, reporter gene, interleukin-1 β , lipopolysaccharide,
doxycycline

Thesis Title	Establishing Cell-based Reporter Gene for Matrix Metalloproteinase-3 Expression Analysis in Human Chondrosarcoma (SW1353) Cells		
Author	Mr. Kittisak Buddhachat		
Degree	Master of Science (Biology)		
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Siriwadee Chomdej	Advisor	
	Asst. Prof. Dr. Korakot Nganvongpanit	Co-advisor	

ABSTRACT

209147

Matrix metalloproteinase-3 plays crucial roles in extracellular matrix remodeling that respond in physiological and pathological condition such as cancer, atherosclerosis, rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Thus, its promoter was constructed to determine MMP-3 expression at mRNA level using a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) as a reporter gene, namely pMMP3-SEAP. To examine this construct, pMMP3-SEAP plasmid transfected human chondrosarcoma (SW1353) cells, were exposed with interleukine (IL)-1 β or lipopolysaccharide (LPS) at different concentrations resulting in raising SEAP activity in dose-dependent manner on concentrations of IL-1 β and LPS. These results implied that MMP-3 expression was also up-regulated after IL-1 β and LPS stimulation. Besides, MMP-3 expression determination by SEAP assay was correlated to real-time PCR method in term of logarithm (normalized value). Inhibitory IL-1 β -induced MMP-3 assay with this construct, the transfectant cells were treated with various concentrations of doxycycline and six Thai herb extracts with 10 ng/ml IL-1 β . These results indicated that doxycycline, ethanolic extract of *Phyllanthus niruri*, aqueous extract of *Vernonia cinerea* and ethanolic extract of *Zingiber cassumunar* were able to reduce the expression of MMP-3 induced by IL-1 β . Therefore, this research suggested the SEAP reporter plasmid

(pMMP3-SEAP) provide a new ideal system for screening numerous pharmacological agents on MMP-3 expression at transcription level for high throughput screening.

keywords; matrix metalloproteinase-3, reporter gene, interleukin-1 β , lipopolysaccharide, doxycycline

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ณ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 matrix metalloproteinases (MMPs)	3
2.1.1 โครงสร้างของ MMPs	4
2.1.2 การควบคุมของการสังเคราะห์ MMPs	6
2.1.3 การควบคุมการทำงานของ MMPs	14
2.1.4 บทบาทของ MMPs กับการเกิดโรคต่างๆ	16
2.2 reporter gene technology	20
2.2.1 Reporter gene	21
2.2.2 การประยุกต์ใช้ reporter gene technology	24
2.3 หลักการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay	28
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	
3.1 อุปกรณ์	29
3.1.1 อุปกรณ์ที่ปลอดภัย	29
3.1.2 อุปกรณ์ที่ไม่ปลอดภัย	30
3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	30
3.2 สารเคมี	31
3.2.1 สารเคมี	31

3.2.2 เอนไซม์	33
3.2.3 ชุดทดลอง	33
3.3 วิธีการทดลอง	34
การทดลองที่ 1 การโคลนดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน matrix metalloproteinase 3 (MMP-3 promoter)	34
การทดลองที่ 2 การสร้างเวกเตอร์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3	38
การทดลองที่ 3 การทดสอบเวกเตอร์รายงานการแสดงออกของยีน MMP-3 ในเซลล์ SW1353	48
การทดลองที่ 4 การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ด้วยสมุนไพรไทยบางชนิด	54
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง fibroblast	57
4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter amplification)	57
4.3 การสร้างเวกเตอร์ลูกผสมระหว่าง TA cloning vector กับผลผลิต PCR ของ MMP-3 promoter	58
4.4 การตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของดีเอ็นเอในเวกเตอร์ pMMP3-TA (orientation of inserted DNA)	59
4.5 การตัดเวกเตอร์ pMMP3-TA และ pSEAP2-control ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>KpnI</i> และ <i>BglII</i>	61
4.6 การสร้างเวกเตอร์ลูกผสมระหว่าง pSEAP2-control กับ MMP-3 promoter ที่ตัดจากเวกเตอร์ pMMP3-TA	61
4.7 การตัดชิ้นดีเอ็นเอส่วน P _{sv40} ออกจาก pMMP3-SEAP-control ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BglII</i> และ <i>NruI</i>	62
4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (sequence of MMP-3 promoter)	64
4.9 อัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอและปริมาตรของ X-treamerHP ที่เหมาะสมต่อการส่งถ่าย pMMP3-SEAP เข้าสู่เซลล์ SW1353	66

4.10 การทดสอบสารอักเสบ IL-1 β และ LPS ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3	67
4.11 ผลการยับยั้งของ doxycycline ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ด้วยระบบเซลล์รายงานผล ในเซลล์ SW1353	70
4.12 ผลการยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ด้วยระบบเซลล์รายงานผลโดยใช้เซลล์ SW1353	71
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	
5.1 การโคลนและโครงสร้างของดีเอ็นเอในส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3	76
5.2 การทดสอบระบบเซลล์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วย IL-1 β และ lipopolysaccharide (LPS)	80
5.3 การทดสอบระบบเซลล์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยการยับยั้งการกระตุ้น IL-1 β ด้วย doxycycline และสมุนไพรไทยบางชนิด	85
5.4 งานที่จะสามารถศึกษาต่อไปในอนาคต	90
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	91
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	109
ภาคผนวก ข เทคนิคในการทดลองและการคำนวณ	113
ภาคผนวก ค เวกเตอร์ที่ในงานวิจัย	117
ประวัติผู้เขียน	119

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 สรุปเปรียบเทียบการใช้งาน reporter gene แต่ละชนิด	24
3.1 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)	34
3.2 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ในส่วนการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)	36
3.3 โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงการควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วยเครื่อง thermocycle	37
3.4 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่างผลผลิต PCR ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter) กับ TA cloning vector	38
3.5 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการทำ colony PCR เพื่อคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการด้วย M13 universal primer	40
3.6 โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิของการทำ colony PCR ด้วย M13 universal primer	40
3.7 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	41
3.8 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>KpnI</i> และ <i>BgIII</i>	42
3.9 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่าง pSEAP-control และ MMP-3 promoter	43
3.10 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียเพื่อตรวจหาโคโลนีแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ที่ต้องการ ด้วย pSEAP primer	44
3.11 โปรแกรมการควบคุมอุณหภูมิสำหรับการตรวจหาโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ที่ต้องการด้วย pSEAP primer	44
3.12 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ <i>BgIII</i> และ <i>NruI</i>	45
3.13 ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการสร้าง blunt end ด้วยเอนไซม์ <i>Pfu</i> DNA polymerase	46
3.14 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอแบบ self ligation	46
3.15 อัตราส่วนระหว่าง X-treameHP และ pMMP3-SEAP สำหรับการเตรียมสารสำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ SW1353 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี FBS	49

3.16 ส่วนประกอบสารเคมีสำหรับการทำ real-time PCR	51
3.17 ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับ real-time PCR	52
3.18 โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ใช้สำหรับ real-time PCR	52
3.19 ซอสุมุนไพรรที่ใช้สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ สำหรับการทดสอบการ แสดงออกยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 β ด้วยระบบเซลล์รายงานผล	54
5.1 แสดงค่า IC ₅₀ ของสมุนไพรรไทยบางชนิดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูก กระตุ้นด้วย IL-1 β	87
5.2 การเปรียบเทียบระยะเวลา ขึ้นตอน ค่าใช้จ่าย และความไว ของการตรวจการแสดงออก ของยีน MMP-3 ระหว่างวิธี real-time PCR และระบบเซลล์รายงานผล	90

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้าง domains ต่างๆ ที่ประกอบเป็นโปรตีน matrix metalloproteinases	5
2.2 วิธีการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ของ nuclear factor-κB (NF-κB)	8
2.3 วิธีการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ของ mitogen activated protein kinase (MAPK)	10
2.4 วิธีการส่งสัญญาณของ STAT (signal transducers and activators of transcription)	11
2.5 กลไกการกระตุ้นการทำงานของ matrix metalloproteinases	14
2.6 กลไกการเกิดโรคข้อเสื่อม	17
2.7 บทบาทของ MMPs ในโรคมะเร็ง MMPs จะมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง	19
2.8 หลักการทำงานของ reporter gene technology โดยใช้ secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) เป็น reporter gene	20
2.9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการวัดการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay	28
3.1 แผนภาพแสดงการสร้างเวกเตอร์รายงานผลการแสดงออกของยีน MMP-3 โดยย่อ	47
4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (MMP-3 promoter)	58
4.2 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-TA ด้วยวิธี colony PCR	59
4.3 การตัดเวกเตอร์ลูกผสม pMMP3-TA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	60
4.4 การตรวจสอบทิศทางการเรียงตัวของซิงดีเอ็นเอ MMP-3 promoter ที่อยู่ใน pMMP3-TA แสดงส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 (ก) ทิศทางการเรียงตัวของซิงดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ใน pMMP3-TA ที่เป็นไปได้ 2 แบบ คือ ข และ ค	60
4.5 การตัดเวกเตอร์ลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>KpnI</i> และ <i>BglII</i>	61
4.6 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-SEAP-control ด้วยวิธี colony PCR	62
4.7 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pMMP3-SEAP ด้วยวิธี colony PCR	63

- 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ช่วง -1,691/+437
ในคนที่แสดงโครงสร้างและตำแหน่งของ DNA binding site ต่างๆ 65
- 4.9 การหาความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอ (pMMP3-SEAP) และปริมาณของ
X-treamerHP สำหรับการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ SW1353 66
- 4.10 การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย
วิธีเซลล์รายงานผล 68
- 4.11 การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธีเซลล์
รายงานผล 68
- 4.12 การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1 β ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย
วิธี real-time PCR 69
- 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMP-3 ด้วย
วิธี real-time PCR กับ วิธีเซลล์รายงานผล pMMP3-SEAP ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร IL-1 β
ในเซลล์ SW1353 70
- 4.14 ผลของ doxycyclin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่
ถูกกระตุ้น ด้วย 10 ng/ml IL-1 β ด้วยวิธีเซลล์รายงานผล 71
- 4.15 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ SW1353 หลังจากที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดจากหัวด้วย
ตัวทำละลายเอทานอล นาน 72 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นต่างๆ 73
- 4.16 การทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำจากสมุนไพรไทยบางชนิดต่อ
การแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 β ด้วยระบบเซลล์รายงานผล
และการทดสอบการเป็นพิษของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อเซลล์ SW1353;
PN (*Phyllanthus niruri* L) VC (*Vernonia cinerea* Less.) PI (*Pluchea indica* Less) 74
- 4.17 การทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำจากสมุนไพรไทยบางชนิด
ต่อการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10 ng/ml IL-1 β ด้วยระบบเซลล์
รายงานผล และการทดสอบการเป็นพิษของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อเซลล์ SW1353; RN
(*Rhinocanthus nasutus* Karz.) ZC (*Zingiber cassumunar* Roxb.) CQ
(*Cissus quadrangularis* Linn.) 75
- 5.1 โครงสร้างของดีเอ็นเอส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน MMP-3 ที่แสดงตำแหน่งของ
cis-acting element ที่มีการศึกษาแล้วว่าตำแหน่งเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมการ
แสดงออกของยีน 77

- 5.2 การส่งสัญญาณจากการกระตุ้นจาก cytokines และ growth factor ต่อการแสดงออกของยีน
 ต่างๆ ในเซลล์กระดูกอ่อน 82
- 5.3 วิธีการส่งสัญญาณจากการถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่จับกับ TLR-4
 (toll like receptor 4) 2 ทิศทาง คือ การกระตุ้นแบบที่ต้องอาศัยโปรตีน MyD88 (myeloid
 differentiation primary response gene 88) และแบบไม่ต้องอาศัยโปรตีน MyD88
 (อาศัย TRIF แทน) 84
- 5.4 โปรตีนเป้าหมายของ curcumin 89

อักษรย่อและสัญลักษณ์

μl	micro liters
ng	nanogram
bp	Base pair
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Carbon dioxide
C _T	Threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	Distilled water
DMEM	Dulbecco's Modification Eagle's MEM
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxynucleoside 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
FBS	Fetal bovine serum
HCl	Hydrochloric acid
KCl	Potassium chloride
MMP-3	matrix metalloproteinase 3
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
OD	optical density
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
pNPP	para-nitrophenyl phosphate
RE	Relative expression
RNA	Ribonucleic acid

rt-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SD	Standard deviation
TAE	Tris-Acetate-EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
UV	Ultraviolet
p	Level of significant
×g	Time gravity force