บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

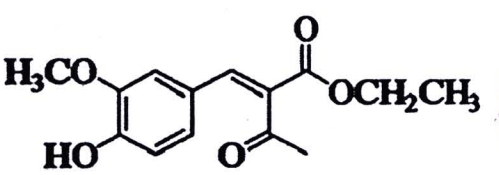
3.1 สารเคมี

Lipopolysaccharide หรือ LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) และ anti-mouse β-actin antibody ซื้อจาก Sigma Chemical (St.Louis, MO, USA), Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse และ anti-rabbit IgG (H+L), pGL3 Basic vector, pGEM-T easy vector, pRSV-β-galactosidase และ cell culture lysis buffer ซื้อจาก Promega (Madison, WI, USA), Fetal bovine serum (FBS), Penicillin-Streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM และ Lipofectamine 2000 ซื้อจาก Invitrogen/Gibco (Grans Island, NY, USA), Antibodies for p65 NF-KB ซื้อจาก Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Antibody for iNOS ซื้อจาก BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Taq DNA polymerase ซื้อจาก NEB (UK), Oligonucleotide primers ซื้อจาก Operon Biotechnologies (Germany), Zinc protoporphyrin IX (ZnPP) ซื้อจาก Porphyrin Products (Logan,. UT, U.S.A.), TRI reagent ซื้อจาก Molecular Research Center (Cincinnati, OH, USA), Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate ซื้อจาก Pierce (Rockford, IL, USA) และ Quick Start Bradford protein assay kit ซื้อจาก (Bio-Rad, U.S.A.)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ ferulic acid ที่ใช้ในการทดสอบ

สังเคราะห์อนุพันธ์ ferulic acid หรือสาร ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate (BMC 41) ที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอกับการทดสอบ ดังแสดงโครงสร้างในรูปข้างล่าง



สาร BMC 41

3.2.2 การทดสอบการมีชีวิตรอดโดยวิธี MTT assay (Srisook และคณะ , 2006)

การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT คือการ ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตจะรีดิวซ์ tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึก formazan สีน้ำเงิน ซึ่งแปรตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเซลล์ก้นแบนแบบ 24 หลุม (24-well flat bottom tissue culture plate) หลุมละ 1.5×10^5 เซลล์ และปล่อยให้เซลล์ลงเกาะผิวภาชนะประมาณ 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเซลล์บ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมสารละลาย MTT (5 mg/mL) ปริมาตร 10 µL แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO ดูดสารละลาย formaza ปริมาตร 200 µL ใส่ในไมโครเพลท แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader (Versamax, U.S.A.) จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่ส่วนสกัด/ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่ส่วนสกัด)x100 ซึ่งปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

3.2.3 การทดสอบปริมาณไนไตรท์

ไนไตรท์เกิดจากการออกซิเดชั่นไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารที่ทดสอบละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งใส่ LPS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายปืน 1 µg/ml และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 100 µl ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 µl จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite

3.2.4 นำ BMC 41 มาทำการทดสอบปริมาณ mRNA ของยีน HO-1 และ iNOS โดยเทคนิค Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

สกัด RNA ของเซลล์โดยการใช้ TRI reagent โดยวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (Molecular Research Center, U.S.A.) ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA จำนวน 2 µg ด้วยเอนไซม์ AMV reverse transcriptase ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 3U AMV reverse transcriptase, 1x RT บัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM spermidine และ 1 mM DTT), 0.083 mM oligo $(dT)_{15}$ primer, 0.67 mM dNTPs, 20U RNase inhibitor และน้ำที่ปราศจาก RNase, DNaes เพื่อใช้ในการปรับปริมาตรให้เป็น 30 µL นำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้โดยเติม 1x NEB buffer buffer (10mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_4$ and 0.1% Triton X-100 pH 8.8), dNTPs ตัวละ 0.2 mM, เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1U และไพร์เมอร์ที่จำเพาะสำหรับ mRNA ของ iNOS (0.25 µM), HO-1 (0.15 µM) และ β-actin (0.02 µM) โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ในตารางที่ 1 วิเคราะห์ผลผลิต RT-PCR ที่ได้

บน agarose gel electrophoresis ซึ่งย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพ gel ที่ได้ภายใต้แสง uv เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้หลังจากที่ standadize กับความเข้มของแถบ β-actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNAของยีนต่างๆ

Target	Primer sequences	Product size (bp)	Accession no.
iNOS	5'-CTAAGAGTCACCAAAATGGCTCCC-3'(sense) 5'-ACCAGAGGCAGCACATCAAAGC-3' (antisense)	775	NM010927.2
HO-1	5'-TGAAGGAGGCCACCAAGGAGG-3'(sense) 5'-AGAGGTCACCCAGGTAGCGGG-3'(antisense)	375	NM010442.1
β-actin	5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAAGGAC-3'(sense) 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'(antisense)	513	NM007393.2

3.2.5 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ โดยเทคนิค Western Blotting

นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ มาทำให้เซลล์แตกโดยการเติม lysis buffer (100 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100 และ protease inhibitors mixture (Complete mini, Roche, Germany) และทำการ sonication บนน้ำแข็งโดย Vibracell ultrasonic processor จะได้ whole cell protein extract วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A.) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดย 10% SDS-PAGE ก่อนย้ายโปรตีนไปที่ PVDF membrane และบ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ ตามด้วย goat anti-mouse หรือ goat anti-rabbit IgG:horseradish peroxidase secondary antibodies และตรวจวิเคราะห์ผลโดย chemiluminescence โดยใช้ SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้บนแผ่น X-ray film หลังจากที่ standadize กับความเข้มของแถบ β-actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

ในการทดสอบผลของอนุพันธ์ ferulic acid ต่อการกระตุ้นและเคลื่อนที่ของ NF-KB จะใช้ nuclear protein extract ในการทำ Western Blotting โดย nuclear protein extract สกัดโดยวิธีที่รายงานใน Srisook et al. (2010)

3.2.6 การทดสอบ iNOS promoter activity

ทำการโคลนชิ้นโปรโมเตอร์ของ iNOS ที่ตำแหน่งที่ -1595 ถึง +169 โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ

5'-TAAGGTACCGAGGTTGACTTTGATATGCTG-3 และ 5'-TAAAAGCTTTTGCAGTTGACTAG GCTACTC-3'ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นโปรโมเตอร์ดังกล่าวจาก gDNA ของหนู mouse ด้วยวิธี PCR ก่อนนำ PCR product เข้าสู่ พลาสมิด pGEM-T easy vector ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้น inserted DNA โดยเครื่อง automated DNA sequencing ก่อน subclone เข้าสู่ pGL3-basic vector ที่บริเวณ KpnI/ *HindIII* เกิดเป็น piNOS-luciferase reporter plasmid จากนั้นนำ piNOS-luciferase reporter plasmid จำนวน 1 μg ไป transfection เข้าสู่เซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 โดยน้ำยา Lipofectamine 2000 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM พร้อมด้วย pRSV-β-galactosidase plasmid จำนวน 0.5 μg เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ 10%FBS-DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นให้เซลล์สัมผัสกับ LPS และ/หรือสาร BMC41 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 6 ชั่วโมง ก่อนการทำให้เซลล์แตกด้วย cell culture lysis buffer (Promega, USA) และตรวจสอบ luciferase activity โดย การเติม luciferase substrate (Promega, USA) และเครื่อง' luminometer และ β-galactosidase activity โดยการเติม galactosidase substrate (Promega, USA) และเครื่อง spectrophotometer ในการทดสอบใช้ pSV-β-galactosidase control vector เป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพการ transfection

3.2.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ ทดสอบปริมาณไนไตรท์ ปริมาณ luminescence หรือความเข้มของแถบโปรตีนหรือ PCR product โดยค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากแต่ละสภาวะ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's *t*-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$