บทที่ 2 วิธีวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Liquid Syntillation Counter Model 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Sweden)
2. Carbondioxide incubator
3. Micro-pipette
4. Analytical balance
5. Circulating water bath
6. Microscope
7. 24 well plate

สารเคมี

[^{3}H] – tetraethylammonium (TEA) 54 Ci/mmol (Amersham Biosciences)

ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Stephen H. Wright, Department of Physiology, University of Arizona.

Testosterone (Sigma Aldrich)

Actinomycin D (Sigma Aldrich)

Testosterone BSA (Sigma Aldrich)

เซลล์เพาะเลี้ยง

Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells ที่มีการแสดงออกของ rabbit OCT2 (rbOCT2) อย่างถาวร ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. วรนุช ฉัตรสุทธิพงศ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์เฉียบพลัน ของเทสโทสเตอโรนต่อ OCT2 (Non-genomic action/acute effect)

ทำการศึกษาใน CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 8 x 10^4 /ml ใน 24 well plate ภายใต้อุณหภูมิและความชื้น 5% CO_2-95% air ที่ 37^0 C เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองโดยนำเซลล์มาล้างด้วย Waymount buffer 3 ครั้งและทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นล้าง buffer ออก และใส่ Waymouth buffer ที่มีเทสโทสเตอโรนตามความเข้มข้นต่าง ๆ (testosterone 1,10,100 μM) เป็นเวลา 10 หรือ 20 นาทีเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใช้เทสโทสเตอโรน เมื่อครบเวลาล้าง buffer ออก และใส่ Waymouth buffer ที่มี ^{3}H-TEA (uptake buffer) โดย TEA เป็นสารประจุบวกที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการ transport ของ organic cation เป็นเวลา 1 นาที ล้างออก ย่อยสลายเซลล์ด้วย 20 % SDS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation Counter Model 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Sweden)

2.ทดสอบยืนยันฤทธิ์เฉียบพลัน ของเทสโทสเตอโรนต่อ OCT2 (Non-genomic action/acute effect)

2.1 ผลของ Actinomycin D

ทำการศึกษาใน CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 8 x 10^4 /ml ใน 24 well plate ภายใต้อุณหภูมิและความชื้น 5% CO_2-95% air ที่ 37^0 C เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองโดยนำเซลล์มาล้างด้วย Waymount buffer 3 ครั้งและทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นล้าง buffer ออก และใส่ Waymouth buffer ที่มีเทสโทสเตอโรน 1,10,100 μM และสาร actinomycin D 0.1 μM ซึ่งมีผลยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีน เป็นเวลา 10 นาที ล้างออก และใส่ uptake buffer ที่มี ^{3}H-TEA เป็นเวลา 1 นาที

ล้างออก ย่อยสลายเซลล์ด้วย 20 % SDS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation Counter Model 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Sweden)

2.2 ผลของ Testosterone BSA

ทำการศึกษาใน CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 8 x 10^4 /ml ใน 24 well plate ภายใต้อุณหภูมิและความชื้น 5% CO_2-95% air ที่ 37° C เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองโดยนำเซลล์มาล้างด้วย Waymount buffer 3 ครั้งและทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นล้าง buffer ออก และใส่ Waymount buffer ที่มี testosterone BSA ซึ่งเป็นเทสโทสเตอโรนที่ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ ตามความเข้มข้น 1,10,100 μM เป็นเวลา 10 นาที ล้างออก และใส่ uptake buffer ที่มี ^{3}H-TEA เป็นเวลา 1 นาที ล้างออก ย่อยสลายเซลล์ด้วย 20 % SDS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation Counter Model 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Sweden)

3. ศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ (kinetic characteristics) ของ OCT2 ภายใต้การควบคุมของเทสโทสเตอโรน

ทำการศึกษาใน CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 8 x 10^4 /ml ใน 24 well plate ภายใต้อุณหภูมิและความชื้น 5% CO_2-95% air ที่ 37° C เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองโดยนำเซลล์มาล้างด้วย Waymount buffer 3 ครั้งและทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นล้าง buffer ออก และใส่ Waymount buffer ที่มีเทสโทสเตอโรน เป็นเวลา 10 นาที หรือ Waymount buffer เพียงอย่างเพียว ล้างออก และใส่ uptake buffer ที่มี ^{3}H-TEA รวมทั้งมี TEA ในความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 1 นาที ล้างออก ย่อยสลายเซลล์ด้วย 20 % SDS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation Counter Model 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Sweden)

ค่า kinetic parameter ของ TEA คำนวณหาจาก Michaelis- Menten equation ดังแสดง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 7 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 190914
เลขเรียกหนังสือ

$$J = \frac{J\,max(\,*T)}{Kt + (*T) + (T)} + C$$

J คือ อัตราการขนส่ง ของ ^{3}H-TEA เมื่อใช้ความเข้มข้นสารรังสีเท่ากับ *T

J max คืออัตราการขนส่ง สูงสุด

Kt คือ ค่าความเข้มข้นของ TEA ที่ให้อัตราการขนส่งเป็นครึ่งหนึ่งของค่าอัตราการขนส่งสูงสุด

(T) คือ ความเข้มข้นของ TEA

C คือ ค่าคงที่แสดงถึงการ diffusion

โดยที่ค่า Kt ที่ได้จะบอกถึง affinity ของ OCT2 และ Jmax จะบ่งบอกถึงจำนวน OCT2

4. ศึกษาถึง signaling pathway เบื้องต้นของการควบคุมของเทสโทสเตอโรนอย่างเฉียบพลัน

ทำการศึกษาใน CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 8 x 10^{4} /ml ใน 24 well plate ภายใต้อุณหภูมิและความชื้น 5% CO_2-95% air ที่ 37^{o} C เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองโดยนำเซลล์มาล้างด้วย Waymount buffer 3 ครั้งและทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นล้าง buffer ออก และใส่ Waymount buffer ที่มี wortmanin 10nM (PI3K inhibitor) และเทสโทสเตอโรน 10 μM เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกและใส่ uptake buffer ที่มี ^{3}H-TEA รวมทั้งมี TEA ในความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 1 นาที ล้างออก ย่อยสลายเซลล์ด้วย 20 % SDS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation Counter Model 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Sweden)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองจะนำเสนอในรูป means ± SE โดยมีค่า n = จำนวนชุดของการทดลองใน CHO-K1 cells โดยในแต่ละชุด(n)ของการทดลองจะใช้อย่างน้อย 3 wells แสดงค่าผลการทดลองและคำนวณค่าทางสถิติโดย t-test หรือ one-way ANOVA โดยมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$