

การพัฒนาเซลล์โมเดลเพื่อการศึกษาการทำงานของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคสะเก็ดเงิน

นางสาวสุทธิรัตน์ อุดมเมธาภรณ์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF A CELL MODEL TO ASSESS ANTI-PSORIASIS ACTIVITIES IN THAI
HERBAL EXTRACTS

Miss Sutthirat Udommethaporn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเซลล์โมเดลเพื่อการศึกษาการทำงานของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคสะเก็ดเงิน
โดย	นางสาวสุทธิรัตน์ อุดมเมธาภรณ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวนรรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์)

สุทธิรัตน์ อุดมเมธาภรณ์ : การพัฒนาเซลล์โมเดลเพื่อการศึกษาการทำงานของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคสะเก็ดเงิน (DEVELOPMENT OF A CELL MODEL TO ASSESS ANTI-PSORIASIS ACTIVITIES IN THAI HERBAL EXTRACTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนา, 130 หน้า.

Tumor necrosis factor alpha หรือ TNF- α เป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่มีความสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพในภาวะปกติ และเมื่อเกิดพยาธิสภาพภายในเซลล์ การสังเคราะห์ใหม่ของ TNF- α จะถูกนำเสนออยู่บนพลาสมาเมมเบรน และถูกตัดย่อยแล้วหลังโปรตีน TNF- α ออกมาในรูปแบบของสารละลาย ทั้งสองรูปแบบ มีหน้าที่การทำงานทางชีวภาพภายในเซลล์ TNF- α ที่ถูกหลั่งออกมาในรูปแบบของสารละลาย จะส่งสัญญาณผ่านตัวรับ TNF- α และ TNF- α ในรูปแบบที่อยู่บนเมมเบรนมีการส่งสัญญาณสื่อสารระหว่างเซลล์ แอนติบอดีที่ต่อต้าน TNF- α ถูกนำมาใช้รักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามก็ยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้น จึงยังมีความต้องการที่จะหาสารประกอบ โมเลกุลขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ต่อต้าน TNF- α ซึ่งวิธีการทำงานของสารต่อต้าน TNF- α จะเกี่ยวข้องกับการรักษาของเคอราติโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α จากภายนอกก่อน หรือหลังการบ่มด้วยสารต่อต้าน TNF- α อย่างไรก็ตาม เซลล์โมเดลนี้ยังมีความล้มเหลวในการส่งสัญญาณของ TNF- α แบบทั้งสองทาง ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงนำระบบของดอกซีไซคลินเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ TNF- α ในเคอราติโนไซต์ มาใช้เป็นเซลล์โมเดล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์และสารบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ IL-1 β , IL-8, NF- κ B1, และ KRT-16 เช่นเดียวกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α จากภายนอก TNF- α ที่ถูกหลั่งออกมาพอเพียงสำหรับการแสดงออกของ IL-1 β และ IL-8 ในเซลล์ HaCaT ปกติ ที่สำคัญเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ IL-1 β และ IL-8 ในเซลล์ HaCaT-TNF- α การแสดงออกของไซโตไคน์ทั้งสองถูกยับยั้งด้วย Quercetin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์เป็นสารต่อต้าน TNF- α ซึ่งเซลล์โมเดลนี้เป็นเซลล์โมเดลที่ใหม่ และมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการส่งสัญญาณทั้งสองทางของ TNF- α และที่สำคัญเซลล์โมเดลนี้ยังให้ผลการทดลองที่ดี รวดเร็ว และง่ายต่อการคัดเลือกหาสารที่มีฤทธิ์ต่อต้าน TNF- α สำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

ภาควิชา	เคมีคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5576669337 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: HACAT / QUERCETIN / INFLAMMATORY / TNF-ALPHA

SUTTHIRAT UDOMMETHAPORN: DEVELOPMENT OF A CELL MODEL TO ASSESS ANTI-PSORIASIS ACTIVITIES IN THAI HERBAL EXTRACTS. ADVISOR: ASST. PROF. VIROJ BOONYARATANAKORNKIT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 130 pp.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine important in normal and pathological biological processes. Newly synthesized pro-TNF- α is expressed on the plasma membrane and cleaved to release soluble TNF- α protein: both are biologically active. Secreted TNF- α signals through TNF receptors and the membrane-bound TNF- α acts by cell contact dependent signaling. Anti-TNF- α antibodies have been used effectively for treatment of chronic inflammation, however with adverse side-effects. Thus, there is a need for new anti-TNF- α small molecule compounds. Anti-TNF- α activity assays involve treatment of keratinocytes with exogenous TNF- α before or after anti-TNF- α incubation. However, this model fails to address the dual signaling of TNF- α . Here we describe a Doxycycline (Dox)-inducible TNF- α (HaCaT-TNF- α) expression system in keratinocytes. Using this *in-vitro* model, we showed cell inhibition and induced expression of pro-inflammatory cytokines and markers, including IL-1 β , IL-8, NF- κ B1, and KRT-16, similar to cells treated with exogenous TNF- α . Sufficient secreted TNF- α produced also activated IL-1 β and IL-8 expression in wt HaCaT cells. Importantly, stimulated expression of IL-1 β and IL-8 in HaCaT-TNF- α were blocked by Quercetin, a flavanol shown to possess anti-TNF- α activities. This novel *in vitro* cell model provides an efficient tool to investigate the dual signaling of TNF- α . Importantly, this model provides an effective, fast, and simple screening for compounds with anti-TNF- α activities for chronic inflammatory disease therapies.

Department: Clinical Chemistry Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Advisor's Signature

Molecular Medicine Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว่า ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่เป็นผู้ให้คำปรึกษาต่างๆ รวมไปถึงชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา และแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆในการทำงานวิจัย ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ทั้งยังให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุกๆด้าน จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ศิษย์ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว่า และอาจารย์ ดร. เทวฤทธิ์ สระระชนะ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณเงินทุน 90ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 26 ครั้งที่ 1 /2558 รหัสทุน GCUGR1125572132M

ขอบคุณ พี่น้อง สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ที่คอยให้กำลังใจ มิตรภาพ และให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความรักและกำลังใจ ส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ฑ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
โรคสะเก็ดเงิน	5
ความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน	5
ประเภทของโรคสะเก็ดเงิน.....	6
ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	9
กลไกการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	11
Tumor necrosis factor alpha (TNF- α).....	14
โครงสร้างและตำแหน่งจับของ TNF- α	14
การทำงานของ TNF- α	15

ไซโตไคน์ที่สำคัญตัวอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน	16
แนวทางการรักษาโรคสะเก็ดเงิน	18
สมุนไพรกับโรคสะเก็ดเงิน	19
Quercetin	21
บทที่ 3	23
วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	23
3.1.1 กลุ่มเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยง	23
3.1.1.1 Human Embryonic Kidney 293T cell (HEK293T)	23
3.1.1.2 Immortalized human epidermal keratinocyte cell line (HaCaT cell)	24
3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	24
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	24
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	26
3.3 วิธีการวิจัย	30
3.3.1 กรอบแนวคิด	30
3.3.2 การเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation) ที่ใช้ในการสร้างอนุภาคของ retro-lentiviral	34
3.3.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างอนุภาคของ retro-lentiviral ให้บริสุทธิ์ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ	35
3.3.3.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAprep Spin miniprep kit	35
3.3.3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAGEN plasmid maxi kit.....	36
3.3.4 การโคลนนิ่ง Human TNF- α เข้าไปใน pHAGE ที่เหนี่ยวนำโดย Tetracycline	36
3.3.4.1 การตรวจสอบ Human TNF- α cDNA บริสุทธิ์ที่ได้มาจากบริษัทผู้ผลิต	37

3.3.4.2 การสังเคราะห์ hTNF- α cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction	39
3.3.4.3 การเตรียม pENTR/TOPO vector และ hTNF- α (insert) เพื่อปฏิกิริยา ligation.....	41
3.3.4.4 การ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (hTNF- α cDNA).....	41
3.4 การผลิตอนุภาค lenti-viral โดยใช้เซลล์ HEK293T.....	45
3.4.1 วิธีการผลิตอนุภาค Lentivirus ในเซลล์ HEK293T.....	45
3.5 การถ่ายโอนพลาสมิดด้วย lenti-virus เข้าสู่ HaCaT cells.....	46
3.5.1 การคัดเลือกเซลล์ HaCaT ที่มี lentiviral DNA construct (pHAGE-TNF- α).....	46
3.5.1.2 ขั้นตอนถ่ายโอนพลาสมิดด้วย lenti-virus เข้าสู่เซลล์ HaCaT	48
3.6 การเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline (Dox) ให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α	49
3.6.2 ศึกษาหาระยะเวลาในการใช้ Doxycycline เหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด	50
3.6.3 ตรวจสอบการเหนี่ยวนำของ Doxycycline ที่มีการผลิตโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT.....	51
3.6.3.1 ศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT โดยวิธี Western blot.....	51
3.6.3.1.1 วัดความเข้มข้นของโปรตีนในเซลล์ lysate ด้วยวิธี Bradford	51
3.6.3.1.2 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	52

3.6.3.1.3 การย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ polyvinylidene fluoride (PVDF) เมมเบรน (protein transfer)	53
3.6.3.1.5 การติดตามผลแบบ Two-step detection.....	53
3.6.3.1.6 การวิเคราะห์ผล	54
3.6.3.2 ศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยง เซลล์ HaCaT โดยใช้ Human TNF- α ELISA development kit	54
3.6.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างในการศึกษาปริมาณโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี ELISA.....	55
3.6.3.2.2 ขั้นตอนการศึกษาปริมาณโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี ELISA.....	55
3.7 ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่เหนี่ยวนำด้วย Doxycycline ให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α เปรียบเทียบกับ HaCaT เซลล์ โมเดลที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน	56
3.7.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT กับ ปริมาณของโปรตีน TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline โดยใช้วิธี MTT assay	56
3.7.1.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT กับปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาในการกระตุ้น Doxycycline ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α	57
3.7.2 ศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการหลั่งของ pro-inflammatory cytokines อาทิเช่น IL-1 β , IL-6, IL-8, KRT16, FOSL-1, MMP-9 และ NF- κ B1 โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR.....	59

3.7.2.1	ศึกษาผลของ Doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT โดยตรวจสอบการ หลังของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β และ IL- 8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR.....	60
3.7.2.2	ศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้น ด้วย Doxycycline ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ HaCaT เกิด การอักเสบ และหลังของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR.....	62
3.7.2.3	ศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดย การหลังของ pro-inflammatory ไซโตไคน์ และยีนที่มีความ เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่ IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B1, KRT16, FOSL-1, และ MMP-9	63
3.7.3	เปรียบเทียบเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ TNF- α ด้วย Doxycycline กับ recombinant TNF- α โดยการทดสอบ ด้วย Quercetin	65
3.7.3.1	ศึกษาผลของ Quercetin ที่ยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ที่ เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการหลังของ pro- inflammatory cytokines โดยวัดการแสดงออกของยีน IL-8 และ IL-1 β ด้วยวิธี RT-PCR	66
บทที่ 4	68
ผลการวิจัย	68
4.1	ผลการโคลนยีน Human TNF- α เข้าไปในพลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH.....	68
4.1.1	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ hTNF- α cDNA ที่ได้มาจากบริษัทผู้ผลิต.....	68
4.1.2	ผลการสังเคราะห์ hTNF- α cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR).....	69

4.1.3 ผลการสังเคราะห์ Enhanced Green Fluorescent Protein (GFP) โดยใช้ ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)	70
4.1.4 ผลของการเตรียม pENTR-Scr/TOPO (vector), hTNF- α (insert) และ eGFP (insert) เพื่อปฏิกิริยา ligation	71
4.1.4.1 ผลการเตรียมเวกเตอร์ pENTR-Scr/TOPO	71
4.1.4.2 ผลการเตรียม hTNF- α (insert) และ GFP (insert)	72
4.1.5 ผลของการ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (hTNF- α cDNA)	73
4.1.6 ผลของการ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (GFP) ..	74
4.1.7 ผลการโคลนนิ่งด้วยวิธี Gateway Cloning	75
4.1.8 ผลของการตรวจสอบการโคลนนิ่งของ pHAGE-TNF- α และ pHAGE-GFP ด้วยวิธี direct DNA sequencing	77
4.2 ผลการคัดเลือกเซลล์ที่มี lentiviral DNA construct (pHAGE-hTNF- α /pHAEGE-GFP) ..	78
4.2.1 ผลของความเข้มข้นของยา Geneticin (G418) ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด	78
4.3 ผลของการเหนี่ยวนำด้วย Tetracycline (Doxycycline) ทำให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α	79
4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT-TNF- α โดยวิธี Western blot แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ	79
4.3.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Doxycycline (Dox) ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ ให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่เหมาะสมที่สุด	79
4.3.1.2 ผลการศึกษาหาระยะเวลาในการกระตุ้นด้วย Doxycycline ในการ เหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่เหมาะสมที่สุด	80
4.3.2 ผลการศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ HaCaT โดยวิธี ELISA	82

4.4 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำ โดย Doxycycline ในด้านการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT-TNF- α เปรียบเทียบกับ เซลล์โมเดลในปัจจุบัน: โดยวิธี MTT colorimetric assay	83
4.5 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT ในด้านการกระตุ้น pro- inflammatory cytokines ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับเซลล์ โมเดลในปัจจุบัน โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR).....	85
4.6 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำ โดย Doxycycline ในด้านการกระตุ้น pro-inflammatory cytokines ที่มีความ เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับเซลล์โมเดลในปัจจุบัน โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR).....	87
4.7 ผลการศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้นด้วย Doxycycline ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และมีการแสดงออกของ pro- inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)	91
4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ของ Quercetin ที่ยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิด การอักเสบ โดยการวัดการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี RT-qPCR.....	93
บทที่ 5	96
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	96
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	96
รายการอ้างอิง	103
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	130

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะรอยโรคและบริเวณที่เกิดโรคสะเก็ดเงิน	8
ภาพที่ 2 การออกฤทธิ์หลักพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน	11
ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของระบบ innate และ adaptive immunity ในโรคสะเก็ดเงิน	13
ภาพที่ 4 แสดงการทำงานของ TNF- α ที่กระตุ้นผ่านการส่งสัญญาณของ NF- κ B	16
ภาพที่ 5 แสดงฤทธิ์ของ Quercetin	21
ภาพที่ 6 แสดงการออกฤทธิ์ของ Quercetin	22
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของเซลล์ Human Embryonic Kidney 293T cell (HEK293T)	23
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์ (HaCaT cell)	24
ภาพที่ 9 การควบคุมการแสดงออกของยีนโดย Doxycycline	31
ภาพที่ 10 แสดง plasmid map ของ pENTR-Src/D-TOPO (ภาพ A) และ pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH (ภาพ B)	32
ภาพที่ 11 แสดง plasmid map	33
ภาพที่ 12 แสดงขั้นตอนของการโคลน hTNF- α cDNA เข้าใน pHAGE vector	37
ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของ TNF- α cDNA บนกระดาดยกรอง	38
ภาพที่ 14 แสดง plasmid map ของ pMD18-T vector	39
ภาพที่ 15 แสดงปฏิกิริยาการ ligation ระหว่าง pENTR-TOPO vector และ hTNF-	42
ภาพที่ 16 แสดงปฏิกิริยาการ ligation ระหว่าง pENTR-TOPO vector และ hTNF- α	42
ภาพที่ 17 แสดงหลักการทำงานของระบบ Gateway cloning	43
ภาพที่ 18 แสดงขั้นตอนการผลิตอนุภาค lentivirus ภายในเซลล์ HEK293T	45
ภาพที่ 19 แสดงตำแหน่งในการนับเซลล์	47
ภาพที่ 20 แสดงการศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม Doxycycline ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT	51

ภาพที่ 21 แสดงหลักการของ sandwich ELISA.....	55
ภาพที่ 22 แสดงถึงปฏิกิริยารีดักชันภายในเซลล์ (reduction reaction) ของเทคนิค MTT assay..	57
ภาพที่ 23 แสดงการทำงานของ SYBR-Green I Dye.....	60
ภาพที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ pMD18-T-hTNF- α cDNA โดยตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>TaqI</i>	68
ภาพที่ 25 แสดงผลของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของ hTNF- α cDNA จากรูปจะพบ PCR product มีขนาด 0.7 Kb.....	69
ภาพที่ 26 แสดงผลจากการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของ GFP cDNA ใช้เป็น internal control จากรูปจะพบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 0.8 Kb.....	70
ภาพที่ 27 (A) แสดงผลของ pENTR-Scr/TOPO ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NotI</i> และ <i>Ascl</i> ...	72
ภาพที่ 28 (A) แสดงผลการรันเจลของ hTNF- α cDNA ขนาด 0.7 Kb (B) แสดงผลการรันเจลของ GFP ขนาด 0.8 Kb หลังจากการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบขนาดที่ถูกต้อง.....	73
ภาพที่ 29 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>NotI</i> และชนิด <i>Ascl</i> หลังจากปฏิกิริยา ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ hTNF- α 0.7 Kb ผ่านการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	74
ภาพที่ 30 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>NotI</i> และชนิด <i>Ascl</i> ภายหลังปฏิกิริยา ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP 0.8 bp ผ่านการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	75
ภาพที่ 31 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>NotI</i> และชนิด <i>Ascl</i> ของพลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 4 แถบ มีขนาด 6.0, 1.5, 1.6, และ 0.9 Kb.....	76
ภาพที่ 32 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>NotI</i> และ <i>Ascl</i>	77
ภาพที่ 33 แสดงผลของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยา G418 ที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด....	78
ภาพที่ 34 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ Doxycycline ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT-TNF- α และ -GFP.....	80
ภาพที่ 35 แสดงผลการศึกษาหาระยะเวลาในการกระตุ้นด้วย Doxycycline ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี Western blot	81
ภาพที่ 36 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TNF- α (pg/mL) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (แกน Y) และระยะเวลาในการบ่มเซลล์ด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (แกน X)	83

ภาพที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่มีชีวิต (% cell viability) (แกน Y) และระยะเวลาในการกระตุ้น Dox และ recombinant TNF- α (แกน X)..... 84

ภาพที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ HaCaT-GFP ที่มีชีวิต (% cell viability) (แกน Y) และระยะเวลาในการกระตุ้น Dox และ recombinant TNF- α (แกน X)..... 85

ภาพที่ 39 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 β (A) และ IL-8 (B) 86

ภาพที่ 40 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C), NF- κ B1 (D), KRT16 (E), FOSL1 (F) และ MMP9 (G)..... 90

ภาพที่ 41 แสดงผลการแสดงออกของ mRNA ของยีน IL-1 β (A) และ IL-8 (B) 92

ภาพที่ 42 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 β (A-B) และ IL-8 (C-D)..... 95



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน.....	17
ตารางที่ 2	chemokines ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน.....	17
ตารางที่ 3	แสดงส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR ของ hTNF- α	40
ตารางที่ 4	แสดงการทำปฏิกิริยา dephosphorylation	41
ตารางที่ 5	แสดงปฏิกิริยาการ ligation ระหว่าง pENTR-TOPO vector และ hTNF- α	42
ตารางที่ 6	แสดงปฏิกิริยา Gateway LR Clonase II	44
ตารางที่ 7	แสดงส่วนผสมในวิธีการผลิตอนุภาค lenti-virus	46
ตารางที่ 8	แสดงความเข้มข้นของ Geneticin (G418) ใน 6-well plates.....	48
ตารางที่ 9	แสดงการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำ Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT ใน 6-well plate.....	50
ตารางที่ 10	แสดงการทดลองบน 96-well plate	58
ตารางที่ 11	แสดงการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำ doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL	61
ตารางที่ 12	แสดงการศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้นด้วย doxycycline ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และเกิดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR.....	63
ตารางที่ 13	แสดงการศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ เกิดการหลั่งของไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ	64
ตารางที่ 14	Specific Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา qPCR.....	65
ตารางที่ 15	แสดงการทดสอบด้วย Quercetin	66

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) ซึ่งเป็นโรคผิวหนังอักเสบแบบเรื้อรัง พบประมาณ 1-3 % ของประชากรทั่วโลก (1) และ พบในประเทศไทย ร้อยละ 2 หรือประมาณ 1 ล้านคน (2) โรคสะเก็ดเงิน ปัจจุบันเป็นโรคที่ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดโรคที่แน่ชัด มีหลายปัจจัยร่วมกันทำให้เกิดโรค ซึ่งได้แก่ พันธุกรรม ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน (3) และปัจจัยกระตุ้นภายนอก เช่น ความเครียด (4) และการสูบบุหรี่ (5) เป็นต้น ลักษณะอาการของโรคสะเก็ดเงิน มีผิวหนังอักเสบเป็นปื้นแดง (Erythematous plaque) ขุยฝ้านี้มีลักษณะเหมือนแผ่นกระจกแตก ร้าว ขุยสีขาวคล้ายเงิน (silvery-white scales) และเมื่อลอกขุยออกจะมีจุดเลือดออก (Auspitz's sign) มีผื่นหลายรูปแบบ และสำหรับงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ไซโตไคน์หลักที่สำคัญที่มีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคสะเก็ดเงิน ก็คือ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (6) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่หลายงานวิจัยให้ความสนใจ และพยายามหาทางยับยั้งการทำงาน เพื่อบรรเทาการเกิดโรคของสะเก็ดเงิน

TNF- α ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokines หลังจากเซลล์ได้หลายชนิด adipocytes, activated monocytes, macrophages, B cells, T cells, keratinocytes และ fibroblasts (7) มีบทบาทต่อโรคสะเก็ดเงิน โดย TNF- α สามารถกระตุ้นอิมมูนเซลล์ให้ส่งสัญญาณหลัง cytokines ตัวอื่นๆ ตัวอย่างเช่น IL-1 β , IL-6, IFN- γ ทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์ผิวหนัง และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังมากกว่าปกติ (8) และ TNF- α ยังสามารถส่งสัญญาณผ่านตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่าน NF- κ B pathway ผลลัพธ์คือทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น เซลล์มีชีวิตรอดมากขึ้น มีการแสดงออกของไซโตไคน์ (IL-1 β , IL-6) chemokines (IL-8) และ Transcription factor NF- κ B1 (9, 10) ทำให้ลักษณะของโรคมีผิวหนังหนาตัว ผิวหนังเป็นสะเก็ดหลุดลอก อาจเป็นตุ่มกลมขนาดเล็กเท่าหยดน้ำ หรือผื่นกลมเท่าขนาดเหรียญหรือปื้นขนาดใหญ่กว่าฝ่ามือ เกิดได้ที่ผิวหนังของทุกส่วนแต่มักจะพบที่หนังศีรษะ และผิวหนังส่วนที่เป็นปุ่มนูนของกระดูก เช่น ข้อศอก ข้อเข่า ก้นกบ หน้าแข้ง เป็นต้น ลักษณะผิวหนังที่ผิดปกติจากผู้อื่น ทำให้ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินอยู่ร่วมกับสังคมได้อย่างยากลำบาก ไม่เป็นที่ยอมรับของคนในสังคม เริ่มเก็บตัว

วิตกกังวล ส่งผลกระทบต่อจิตใจและการทำงานร่วมกับคนอื่นเป็นอย่างมาก สำหรับการรักษาที่มีในปัจจุบัน มีการให้ยาทาภายนอก อย่างเช่น ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ ยากลุ่มนี้จะลดการอักเสบของผิวหนัง ยับยั้งได้เฉพาะที่เท่านั้น หากใช้ในปริมาณมากอาจเกิดผลเสียต่อร่างกายได้ ยาที่ใช้รับประทาน อาทิเช่น ไซโคลสปอริน ซึ่งเป็นยากดภูมิคุ้มกันของร่างกาย หากใช้เป็นเวลานานจะทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อได้ง่าย เกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่าย (2) ยาที่ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบันนั้นมีราคาสูง และผลข้างเคียงของยาต่อผู้ใช้มีมาก อาจจะทำให้เกิดการติดยาเมื่อใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้การรักษาไม่สามารถทำให้โรคนี้หายขาดจากผู้ป่วยไปได้ เพียงแค่บรรเทาอาการที่เกิดขึ้นเท่านั้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่า สารสกัดจากสมุนไพรไทยอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยาบรรเทาอาการ อาจจะช่วยรักษาโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบัน มีสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นยา ที่เรียกว่า ยาแผนโบราณ โดยสมุนไพรแต่ละชนิดก็มีสรรพคุณในการรักษาโรคแตกต่างกันออกไป สมุนไพรโดยส่วนใหญ่แล้วจะมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งในขณะนี้สมุนไพรบางประเภทที่สามารถต้านและบรรเทาอาการ ช่วยลดรอยแดง ขุยที่เกิดจากโรคสะเก็ดเงินได้ ตัวอย่างเช่น ทองพันชั่ง น้ำมันมะพร้าว ขมิ้นชัน (11-13) แต่ประสิทธิภาพในการรักษายังไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องแสวงหาสมุนไพรที่ใช้ต้านโรคสะเก็ดเงินที่มีสรรพคุณที่ดีกว่าที่ใช้ในปัจจุบัน ทั้งนี้ในปัจจุบันยังขาดเซลล์โมเดลที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกสมุนไพรใหม่ๆ ที่อาจจะมีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงิน สำหรับการศึกษานี้ในปัจจุบันมีเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินโดยใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ (Human keratinocytes หรือเซลล์ HaCaT) ที่กระตุ้นด้วย recombinant TNF- α ที่บริสุทธิ์เพื่อทำให้เซลล์ผิวหนังเกิดการอักเสบ ให้มีลักษณะคล้ายโรคสะเก็ดเงิน (14-16) แต่เซลล์โมเดลดังกล่าวนี้ยังมีข้อเสีย และมีความยุ่งยากในการสร้างเซลล์โมเดล เนื่องจากจะต้องมีการกระตุ้นเซลล์ด้วย recombinant TNF- α ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง และผลของการกระตุ้นเซลล์ด้วย recombinant TNF- α ในแต่ละครั้งให้ผลไม่สม่ำเสมอ นอกจากนั้น recombinant TNF- α ที่ใช้มีราคาแพง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หากต้องทำการทดลองซ้ำๆ จะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายอย่างมาก และสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี recombinant TNF- α ในปริมาณมากเกินไปหรือเป็นเวลานานๆ อาจทำให้เซลล์ตายหรือมีการทำลายของเซลล์ ก่อนที่นำไปใช้ในการทดลอง ดังนั้นเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบันนี้จึงยังไม่เหมาะสมในการเลือกหาสารสกัดจากสมุนไพรจำนวนมากๆ และไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้งานในระยะยาวได้

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีความประสงค์ที่จะพัฒนาโมเดลของโรคสะเก็ดเงิน เพื่อลดหย่อนเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำการทดลอง และต้องการที่จะพัฒนาเซลล์โมเดลที่มีความเหมาะสม และง่ายต่อการนำมาใช้ในการคัดหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน TNF- α โดยทำให้เซลล์ผิวหนังสามารถที่จะหลั่ง TNF- α ได้เอง โดยใช้ lentivirus ในการถ่ายโอน human TNF- α cDNA (hTNF- α) เข้าสู่เซลล์ผิวหนัง

HaCaT ให้มีการแสดงออกของ hTNF- α แบบเหนี่ยวนำได้ จากนั้นทำการเหนี่ยวนำทำให้มีการแสดงออกของ hTNF- α โดยใช้ tetracycline กระตุ้นเซลล์ผิวหนังให้มีการหลั่ง hTNF- α เพื่อไปกระตุ้นเซลล์ผิวหนังข้างเคียงให้เกิดการอักเสบ มีการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ กระตุ้นการส่งสัญญาณของ NF- κ B กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนัง เลียนแบบการเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งเซลล์โมเดลที่พัฒนาขึ้นมาจะสามารถช่วยลดค่าใช้จ่าย ลดความยุ่งยากในการใช้เซลล์โมเดลที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ลดความเสี่ยงเปลืองในการใช้สารเคมีในการทดลอง และมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการคัดเลือกหาสารสกัดสมุนไพรใหม่ๆ และหรือยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ TNF- α เพื่อนำไปใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินและหรือรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เนื่องมาจาก TNF- α ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสร้าง HaCaT เซลล์โมเดลที่มีการผลิต hTNF- α แบบเหนี่ยวนำได้ โดยใช้ tetracycline (Tet-inducible TNF- α HaCaT cell model)
2. เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ HaCaT ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการผลิต hTNF- α และเปรียบเทียบกับ HaCaT เซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ และศึกษาผลของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการส่งสัญญาณของ NF- κ B โดยตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-6, IL-8 และ NF- κ B1 และยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่ FOSL1, KRT16 และ MMP9
3. เพื่อเปรียบเทียบ HaCaT เซลล์โมเดลที่มีการผลิต hTNF- α แบบเหนี่ยวนำได้กับ HaCaT เซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยทดสอบกับ Quercetin ที่ผ่านการทดสอบโดยวิธีอื่นแล้วว่าที่มีฤทธิ์ต่อต้าน TNF- α และหรือโรคสะเก็ดเงิน

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงิน โดยใช้ lentivirus ส่งถ่ายพลาสมิดที่มี hTNF- α cDNA และเหนี่ยวนำโดย tetracycline ให้มีการผลิต hTNF- α ใน HaCaT cells เปรียบเทียบกับเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินที่ใช้ในปัจจุบัน โดยศึกษาจากการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังด้วยวิธี MTT และศึกษาผลของ TNF- α ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ และกระตุ้นการส่งสัญญาณของ NF- κ B ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real Time PCR โดยศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β , IL-6, IL-8 และ NF- κ B1 และยืนยันที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่ FOSL1, KRT16 และ MMP9 และมีการทดสอบเปรียบเทียบเซลล์โมเดลทั้งสองด้วย Quercetin บริสุทธิ์จากงานวิจัยก่อนหน้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงิน ที่เหนี่ยวนำโดยใช้ tetracycline ทำให้ได้โมเดลที่สามารถใช้งานในระยะยาว และสามารถลดต้นทุนในการคัดเลือกยาโดยใช้เซลล์โมเดล
2. เซลล์โมเดลที่พัฒนาขึ้นมานี้ จะเป็นแนวทางในการพัฒนาเซลล์โมเดลของโรคที่เกิดจากการอักเสบอื่นๆ ได้ต่อไปในอนาคต
3. โมเดลที่พัฒนาขึ้นมานี้ จะช่วยในการคัดเลือกสมุนไพรใหม่ๆ และ/หรือยาในการรักษาโรคสะเก็ดเงินและ/หรือโรคผิวหนังที่เกิดจากการอักเสบเนื่องจาก TNF- α

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคสะเก็ดเงิน

โรคสะเก็ดเงิน เป็นโรคผิวหนังอักเสบแบบเรื้อรัง พบประมาณ 1-3% ของประชากรโลก (17) และจากการสำรวจของสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ.2555 พบร้อยละ 2 ของประชากรไทย หรือประมาณ 1 ล้านคนที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน (2) อัตราการเกิดโรคสะเก็ดเงินเท่ากันทั้งเพศชายและเพศหญิง (18) พบความถี่ในการเกิดโรคมะเร็ง 2 ช่วง คือ ช่วงอายุน้อยในเพศหญิง 16 ปี เพศชาย 22 ปี และอายุมากในเพศหญิง 60 ปี และเพศชาย 57 ปี (19) ลักษณะการแสดงอาการทางคลินิกของโรคสะเก็ดเงินมีความเกี่ยวข้องกับอายุที่เริ่มแสดงอาการ ซึ่งผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่แสดงอาการของโรคตั้งแต่อายุน้อยจะพบมีความรุนแรงของโรคมามากกว่ากลุ่มผู้ป่วยอายุมาก และพบว่าในครอบครัวที่มีประวัติเป็นโรคสะเก็ดเงิน มีโอกาสที่คนในครอบครัวจะเป็นโรคสะเก็ดเงินมากกว่าในครอบครัวที่ไม่มีประวัติ (20)

ความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน

การประเมินความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน จะมีประโยชน์ในการเลือกการรักษา การประเมินความรุนแรง จะอาศัยปริมาณพื้นที่ของรอยโรค โดยเทียบกับหนึ่งฝ่ามือเท่ากับหนึ่งเปอร์เซ็นต์ นอกจากปริมาณพื้นที่แล้วยังดูตำแหน่งที่เป็นโรค คือถ้าเป็นที่มือและเท้าจะจัดว่าโรคนั้นอยู่ในขั้นรุนแรง โดยทั่วไปจะแบ่งความรุนแรงออกเป็น 3 ระดับ คือ **ระดับความรุนแรงน้อย (Mild Psoriasis)** พบรอยโรคเป็นพื้นที่น้อยกว่า 2% ของสัดส่วนพื้นที่ของร่างกาย **ระดับความรุนแรงปานกลาง (Moderate Psoriasis)** พบรอยโรคเป็นพื้นที่อยู่ระหว่าง 2-10% ของสัดส่วนพื้นที่ของร่างกาย ผื่นโดยมากอยู่ที่แขน ขา ลำตัว หนังศีรษะ **ระดับความรุนแรงมาก (Severe Psoriasis)** พบรอยโรคเป็นพื้นที่มากกว่า 10% ของสัดส่วนพื้นที่ของร่างกาย ผื่นส่วนใหญ่จะแดง หรือเป็นตุ่มหนอง ทำให้มีการหลุดลอกของผิวหนังผู้ป่วยมักจะมีข้ออักเสบร่วมด้วย (2, 21)

ประเภทของโรคสะเก็ดเงิน

ชนิดผื่นหนา (Plaque psoriasis) เป็นลักษณะผื่นผิวหนังที่พบบ่อยที่สุด ประมาณร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยทั้งหมด รอยโรคมีลักษณะเป็นผื่นแดงหนา ขอบเขตชัด สะเก็ดหนา ขุยมาก ขนาดตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป พบบ่อยบริเวณหนังศีรษะ ลำตัว ก้นและแขนขาทั้งสองข้าง โดยเฉพาะบริเวณ extensor เช่น ข้อศอก เข่า เป็นต้น ประมาณร้อยละ 80 ของผู้ป่วยมีความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง เพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่มีความรุนแรงปานกลางถึงมาก คือมีรอยโรคทั่วร่างกายมากกว่าร้อยละ 10 ของพื้นที่ผิวร่างกายทั้งหมด หรือมีรอยโรคในตำแหน่งที่สำคัญ เช่น มือ เท้า หน้า และอวัยวะเพศ เป็นต้น

ชนิดผื่นขนาดเล็ก (Guttate psoriasis) เป็นสะเก็ดเงินที่มีรอยโรคเป็นตุ่มแดง มีขุย (fine scale) ตุ่มมีขนาดเล็กไม่เกิน 1 เซนติเมตร บริเวณลำตัว ต้นแขน ต้นขา พบได้น้อยกว่าร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยทั้งหมด ผู้ป่วยมักมีอายุน้อยกว่า 30 ปี และอาจมีประวัติการติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบน โดยเฉพาะ group A beta-hemolytic streptococci นำมาก่อนประมาณ 2-3 สัปดาห์ อาจเป็นอาการครั้งแรกของผู้ป่วย หรือเป็นการกำเริบในผู้ป่วย plaque psoriasis ที่มีอาการมานานก็ได้

ชนิดตุ่มหนอง (Pustular psoriasis) รอยโรคมีลักษณะเป็นตุ่มหนอง แบ่งได้เป็น Generalized pustular หรือ acute generalized variant (von Zumbusch variant) เป็นโรคสะเก็ดเงินชนิดรุนแรงที่มีตุ่มหนอง กระจายทั่วผิวหนังที่มีการอักเสบแดง และ Localized pustular variant มักพบบริเวณ ฝ่ามือ ฝ่าเท้า โดยอาจมี plaque psoriasis ร่วมด้วย

ชนิดผื่นแดงลอกทั่วตัว (Erythrodermic psoriasis) เป็นผื่นรอยโรคที่มีลักษณะแดงเกือบทั่วพื้นที่ผิวทั้งหมดของร่างกาย มีปริมาณขุยที่แตกต่างกันไป อาจพัฒนาจาก plaque psoriasis หรือเกิดได้ทันที นอกจากนี้อาจพบ ไข้สูง อ่อนเพลีย หนาวสั่น และการสูญเสียน้ำและโปรตีนในร่างกาย (dehydration and hypoalbuminemia) ร่วมด้วย

สะเก็ดเงินบริเวณซอกพับ (Inverse psoriasis) คือสะเก็ดเงินที่ผื่นรอยโรคในบริเวณซอกพับของร่างกาย ได้แก่ รักแร้ บริเวณอวัยวะเพศ ขาหนีบ และใต้ราวนม เป็นต้น เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีความชุ่มชื้นอยู่แล้ว จึงพบมีขุยหรือสะเก็ดไม่มาก

สะเก็ดเงินบริเวณเล็บ (Psoriatic nails) ความผิดปกติของเล็บสามารถพบร่วมด้วยในโรคสะเก็ดเงินทุกประเภท พบที่นิ้วมือได้ร้อยละ 50 ในขณะที่นิ้วเท้าพบได้ร้อยละ 35 ของผู้ป่วยทั้งหมด ความผิดปกติได้แก่ pitting, onycholysis, subungual hyperkeratosis และ oil-drop sign สำหรับกลุ่มข้ออักเสบที่เกิดจากโรคสะเก็ดเงิน (psoriatic arthritis) มักมีความผิดปกติที่เล็บร่วมด้วยได้ถึงร้อยละ 90-96

ข้ออักเสบที่เกิดจากสะเก็ดเงิน(Psoriatic arthritis) คือ การอักเสบของข้อที่เกิดจากโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งมีความสำคัญเนื่องจากการอักเสบของข้อในโรคสะเก็ดเงินมักทำให้เกิดการพิการผิดรูปได้บ่อย อุบัติการณ์แตกต่างกันมากตามกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษาข้อมูลพบได้ร้อยละ 1-40 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (21)



ลักษณะของรอยโรคของโรคสะเก็ดเงินทั้งหมด แสดงภาพรวม ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะรอยโรคและบริเวณที่เกิดโรคสะเก็ดเงิน

Schön MP and Boehncke W-H., 2005 (22)

ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคนั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด ซึ่งจากหลักฐานในปัจจุบันทราบว่าอาจเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ พันธุกรรม สิ่งกระตุ้นภายนอก สภาพแวดล้อมภายนอก และระบบภูมิคุ้มกัน (21) ซึ่งมีบทบาทหลักในการก่อโรค ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงินสามารถจำแนกได้ ดังนี้

1. พันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนทั้งหมด พบว่าตำแหน่งของโครโมโซมอย่างน้อย 9 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับโรคสะเก็ดเงิน ดังนี้ psoriasis susceptibility 1-9 (PSORS1-9) (23) ซึ่งยีนหลักที่ใช้ในการตัดสินว่าเป็นโรคสะเก็ดเงิน คือ PSORS1 ซึ่งพบได้ 35-50% ของโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม PSORS1 อยู่ใน major histocompatibility complex (MHC) บนโครโมโซมคู่ที่ 6p21.3 โดยจะมียีนของ HLA มีช่วงความยาว ประมาณ 300 Kb และอีกกว่า 200 ยีนอื่นๆ (23, 24) ซึ่งยีนส่วนอยู่ในตำแหน่ง class I telomeric region ของ HLA-B ในปัจจุบันมีเทคนิคการตรวจ HLA typing ซึ่ง MHC จะเป็เป้าหมายแรกๆ ในการศึกษาความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรม โดยในปี ค.ศ. 1972 มีการรายงานว่า HLA มีความสัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงิน (25) ซึ่งมีตำแหน่งของ HLA และ alleles หลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกัโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่ HLA-B13, HLA-B37, HLA-B46, HLAB57, HLA-Cw1, HLA-Cw6, HLA-DR7, and HLADQ9 (26, 27) HLA-Cw6 ได้แสดงให้เห็นว่ามีความเสี่ยงสูงที่สุดสำหรับโรคสะเก็ดเงินในประชากรผิวขาว และหลาย alleles ที่ตำแหน่งอื่น ๆ มีการเชื่อมโยงอย่างสมดุล (LD) กับ HLA-Cw6 (23) นอกจาก HLA-Cw6 และ alleles ที่อยู่ใน LD เหล่านี้ ยังมี haplotype ที่มี HLA-CW1 และ HLA-B46 ที่เกี่ยวข้องกัโรคสะเก็ดเงินในประเทศไทยและญี่ปุ่นอย่างมาก (26, 28) haplotype นี้จำเพาะสำหรับประชากรชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จากการศึกษาในประเทศไทย ประมาณหนึ่งในสามของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน จะมี HLA-Cw6 ที่เกี่ยวข้อง จำนวนหนึ่งในสามมี HLA-Cw1-B46 ที่เกี่ยวข้อง และหนึ่งในสามไม่ได้เกี่ยวข้องกั HLA (26)

2. การสูบบุหรี่

การสูบบุหรี่มีความสัมพันธ์กับสถานะเริ่มมีอาการของโรคสะเก็ดเงิน (29) และการสูบบุหรี่อย่างหนัก มากกว่า 20 ม้วนต่อวันมีความเสี่ยงเป็นโรครุนแรงเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า (5)

3. การดื่มแอลกอฮอล์

การดื่มแอลกอฮอล์พบมีผลการเกิดโรคสะเก็ดเงินในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ในการศึกษาหนึ่งพบว่า การดื่มแอลกอฮอล์อย่างหนักส่งผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาลดลงในเพศชาย และในการศึกษาอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าเพศชายที่ดื่มเป็นโรคสะเก็ดเงินมากกว่าเพศชายที่ไม่ดื่ม พบว่าอุบัติการณ์ของโรคสะเก็ดเงินสูงขึ้นในคนที่ดื่มแอลกอฮอล์ และสามารถพัฒนาความรุนแรงของโรคได้ (30)

4. ยาบางชนิด

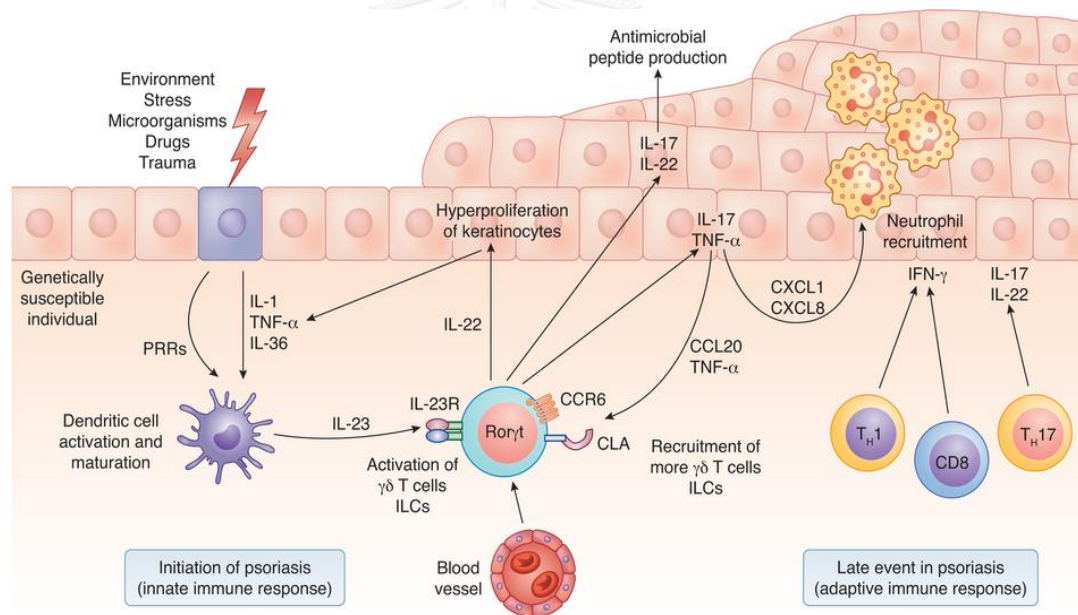
ยาบางชนิด เช่น antimalarials, β -blockers, lithium, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, angiotensin converting enzyme inhibitors และ gemfibrozil, (Aldara). (31) โดยกลไกของยาเหล่านี้สามารถกระตุ้นให้เกิดโรคสะเก็ดเงินที่รุนแรงแตกต่างกัน แต่สำหรับ interferon- α และ γ และ imiquimod เป็นยาที่ทราบว่าจะสามารถกระตุ้นการทำงานของ TH1 ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (32)

5. การติดเชื้อ

เชื้อที่เป็นตัวแทนที่เป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ดีที่สุดในการเกิดโรคสะเก็ดเงิน คือการติดเชื้อในลำคอ (Streptococcal throat) การติดเชื้ออย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดโรคได้ เว้นแต่จะมีการเป็นโรคสะเก็ดเงินเรื้อรังรุนแรงมาก่อนหน้าแล้ว (33) หรือเป็นโรคติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น HIV สามารถกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินร่วมด้วย (34)

กลไกการเกิดโรคสะเก็ดเงิน

จากปัจจัยต่างๆ ที่เหนี่ยวนำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงิน ทำให้เกิดการทำงานร่วมกันภายในร่างกายระหว่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immune cells) และไซโตไคน์ที่เกิดจากการอักเสบ (Inflammatory cytokines) นำไปสู่ความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่าง keratinocytes และเซลล์ประเภทต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น T cells, neutrophils, dendritic cells and macrophages ซึ่งภายในของรอยโรคจะพบการแสดงออกของไซโตไคน์จำนวนมาก รวมไปถึงเซลล์ Th1 และ Th17 (1, 35) เป็นที่น่าสนใจ ที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญในตำแหน่งของยีนที่จำเพาะเจาะจงกับกระบวนการเกิดการอักเสบ คือ กระบวนการส่งสัญญาณของ Interferon-23 (IL-23A, IL-12B, IL-23R) , การเปลี่ยนแปลง (modulation) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ Th2 (IL-4, IL-13) และ การส่งสัญญาณของ nuclear factor NF- κ B (19, 36, 37)



ภาพที่ 2 การออกฤทธิ์หลักพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน

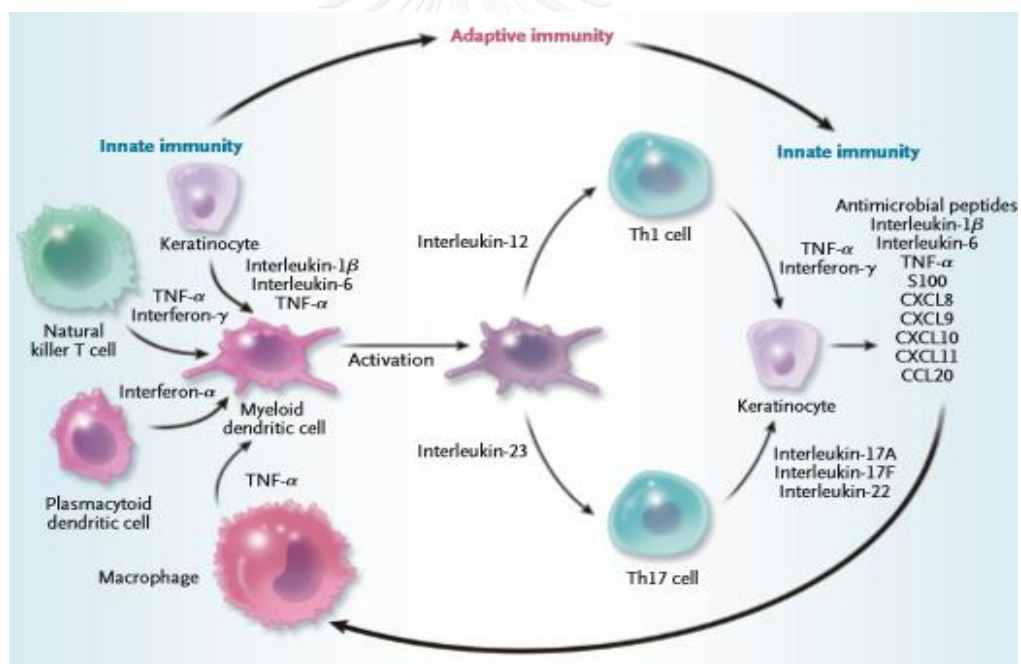
Becher B and Pantelyushin S., 2012 (38)

การแสดงออกของกระบวนการ IL-23/Th17 ในโรคสะเก็ดเงินสามารถอธิบายการสร้างของ Psoriasin (S100A7) และโมเลกุลที่เกิดจากการตอบสนองแบบ innate ที่มากเกินไปในโรคสะเก็ดเงิน (39) ปฏิกริยาของระบบภูมิคุ้มกันในรอยโรคสะเก็ดเงิน เกิดขึ้นโดย antigen-presenting cells (APCs) สร้าง IL-23 กระตุ้นโดยตรงที่เซลล์ Th17, Th22 และ Tc17 ซึ่งมีการหลั่ง pro-inflammatory เช่น IL-17 และ IL-22 ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้ keratinocytes มีการแสดงออกของ

antimicrobials β -defensin 2 และ 3, lipocalin และโปรตีน S100 (40, 41) โดย IL-17 มีหน้าที่เป็น pro-inflammatory ไชโตไคน์ที่สามารถกระตุ้นให้ keratinocytes ตอบสนองโดยการก่อให้เกิด neutrophil มีการดึงดูดเข้าหากันมีการหลั่ง CXC chemokines ได้แก่ CXCL1, CXCL5 และ CXCL8/IL-8 และ CCL20 ที่ดึงดูดเซลล์ CCR6+ เข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบ (41) และสุดท้าย IL-17 สามารถกระตุ้น fibroblasts ในการสร้าง IL-6 (42) ส่วนของ IL-22 ที่เพิ่มมากขึ้นในโรคสะเก็ดเงินส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับของ IL-23 และ IL-6 (43, 44) IL-22 ทำงานร่วมกับ IL-17 กระตุ้นการแสดงออกของ antimicrobial peptides ปริมาณสูงขึ้นในโรคสะเก็ดเงิน สารตัวกลางเหล่านี้ทำให้เกิด epidermal acanthosis และการเปลี่ยนแปลงของ keratinocytes ที่ผิดปกติ ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญในโรคสะเก็ดเงิน (40, 41, 45)

รอยโรคสะเก็ดเงินจะพบปริมาณของ Th1 T cells ที่เพิ่มขึ้น และมีการทำงานและผลิต interferon (IFN) γ ซึ่ง IFN- γ กระตุ้นให้โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเกิดขึ้นจำนวนมากใน keratinocytes และก่อตัวเป็นการอักเสบในโรคสะเก็ดเงิน (41) และยังมีเพิ่มระดับของ pro-inflammatory cytokines อย่างเช่น Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ , interleukin-1, interleukin-15 และ interleukin-20 ซึ่ง pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ไม่ได้เป็นสาเหตุเริ่มแรกที่ทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน แต่ไซโตไคน์เหล่านี้มีบทบาทหลักในขั้นตอนการดำเนินของโรคโดยทำให้เกิดการอักเสบของผิวหนัง ดังนั้นถ้าสามารถที่จะยับยั้งหรือลดระดับของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหนึ่ง หรือหลายๆ ไซโตไคน์ ที่ก่อให้เกิดโรคได้จะสามารถรักษาโรคสะเก็ดเงินได้ (1) โดยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะเป็นการทำงานระหว่าง innate และ adaptive immunity โดย innate immune cells ซึ่งได้แก่ Natural killer cells (NK-cells), Macrophage, plasmacytoid dendritic cells จะหลั่ง cytokines ที่เป็นตัวการหลัก คือ tumor necrosis factor (TNF- α), interferon- α , γ , interleukin-1 β , และ interleukin-6 ที่จะกระตุ้น myeloid dendritic cells ให้อยู่ในรูป active จากนั้น myeloid dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นจะนำเสนอแอนติเจนและหลั่งสารสื่อกลาง (mediators) อย่างเช่น interleukin-12 และ interleukin-23 ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงาน (differentiation) ของ Th17 และ Th1 cells เมื่อ Th1 cell ที่ถูกกระตุ้นเพิ่มจำนวนขึ้นจะมีการหลั่ง type 1 cytokine เช่น IFN- γ , TNF- α และหลั่ง pro-inflammatory cytokines และ chemokines อื่นๆ เช่น TGF- α , IL-6, IL-8 ดึงเซลล์เม็ดเลือดขาวต่างๆ ออกมาจากเส้นเลือด และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในผิวหนัง เช่น ทำให้เกิดการอักเสบและมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดบริเวณผิวหนังที่เกิดโรค ซึ่งจะให้เซลล์หลอดเลือดแสดงออกของ adhesion molecules ต่างๆ เช่น ICAM-1, VCAM-1 VEGF ก่อให้เกิดการแบ่งตัวของผนังหลอดเลือด (angiogenesis) ในขณะเดียวกันนั้น ไซโตไคน์บาง ชนิด เช่น IL-1, IL-6, IL-8,

TGF- α และ IFN- γ ก็ยังมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์ผิวหนังให้แบ่งตัวเพิ่มขึ้น (hyperproliferation) ทำให้เกิดการหนาตัวของเซลล์ผิวหนังบริเวณรอยโรคและมีการเหนี่ยวนำการสร้าง antimicrobial peptides (LL-37 cathelicidin และ β -defensins), proinflammatory cytokines (TNF- α , interleukin-1 β , และ interleukin-6), chemokines (CXCL8 – CXCL 11 และ CCL20) และโปรตีน S100 ซึ่งสารสื่อกลางเหล่านี้จะส่งผลกลับไปภายในวัฏจักรของโรคที่เกิดจากการอักเสบ และมีการแทรกซึมไปตามตำแหน่งของรอยโรคที่เกิดการอักเสบ (8, 17) ดังแสดงใน **ภาพที่ 3** เมื่อเริ่มกระบวนการการอักเสบ การควบคุมการทำงานของกระบวนการ IL-23 ผลิตปกติ นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ Th17 และ Th22 T cells ผลผลิตของไซโตไคน์ คือ TNF- α และ IFN- γ ใน keratinocytes กระตุ้นให้มีการรวมกลุ่มของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และกระตุ้นให้ keratinocytes มีการเจริญเติบโตมากขึ้น เกิดการสร้างของเส้นเลือด และการรวมกลุ่มกันของเม็ดเลือดขาว และทำงานในบริเวณรอยโรคของสะเก็ดเงินในที่สุด (46)



ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของระบบ innate และ adaptive immunity ในโรคสะเก็ดเงิน

Nestle FO et al., 2009 (47)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มี cytokines หลักที่พบว่า มีบทบาทสำคัญในการดำเนินของโรคสะเก็ดเงิน คือ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (1, 16, 48, 49)

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

TNF- α เป็น multifunctional cytokine ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Carswell et al. ในปี ค.ศ. 1975 ในขณะที่พยายามจะวินิจฉัยการตอบสนองของ tumor necrosis factors กับการตายแบบ necrosis ของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน sarcoma Meth A (50) ซึ่ง TNF- α ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ adipocytes, activated monocytes, macrophages, NK-cells, T-cells และ neutrophil (51) โดยอวัยวะทุกส่วนของร่างกายจะพบการทำงานของ TNF- α และเป็นไซโตไคน์ที่มีหลากหลายหน้าที่การทำงาน เป็นสารตัวกลางของการเกิดการอักเสบ และ TNF- α เป็น cytotoxic ของเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด และเป็นปัจจัยสำคัญ เป็นตัวกลางในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นไซโตไคน์หลักสำหรับการต่อต้านการติดเชื้อและโรคมะเร็ง นอกจากนี้ TNF- α ยังมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิด septic shock, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, โรคเบาหวาน (52) และโรคที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง เช่น โรคสะเก็ดเงิน (1)

โครงสร้างและตำแหน่งจับของ TNF- α

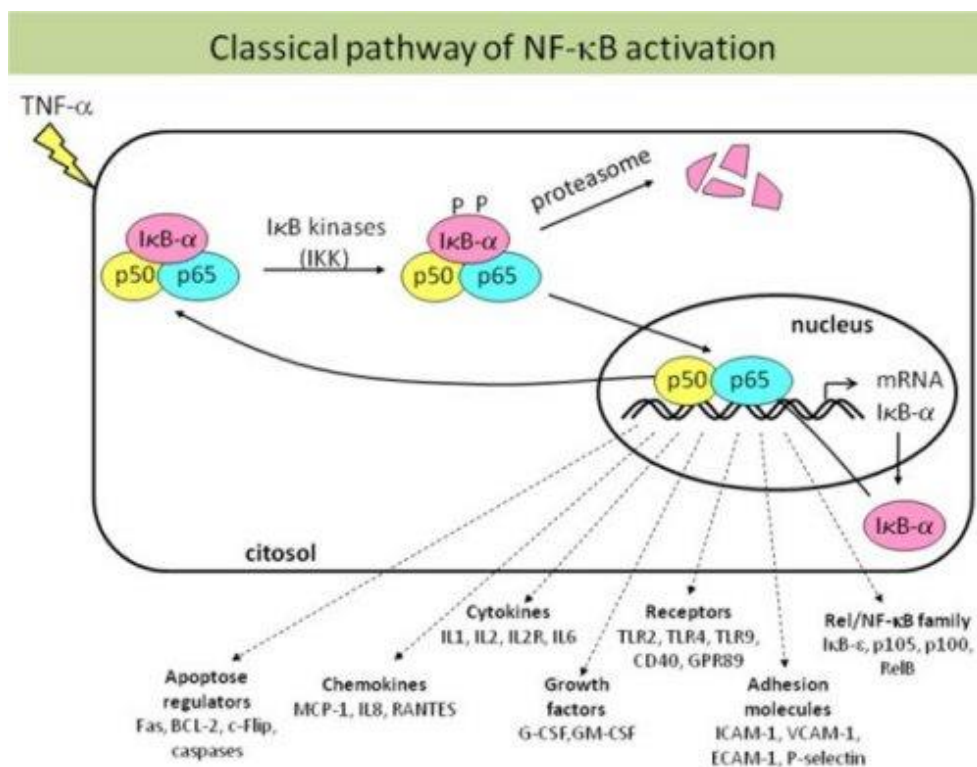
ยีนของ TNF- α มีตำแหน่งอยู่ภายใน major histocompatibility complex (MHC) บนโครโมโซม 6p21.3 (53) TNF- α เป็นโปรตีน trimeric อยู่ในรูปของสารละลายขนาด 17 กิโลดาลตัน (54) แต่การวิจัยต่อมาพบรูปแบบ non-cleaved 25 กิโลดาลตัน เป็นรูปแบบเริ่มต้นที่เป็น transmembrane protein (55) ถูกกระตุ้นโดย macrophage ผลิต TNF- α ขนาด 25 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถจับได้โดยตรงกับตัวรับ (receptor) ซึ่งตัวรับมี 2 ชนิด คือ TNFR1 ขนาด 55 กิโลดาลตัน ซึ่งพบได้ทั่วไปในเซลล์ของร่างกาย โดยส่วนใหญ่ตัวรับ TNFR1 จะถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ในรูปของสารละลาย และ TNFR2 ขนาด 75 กิโลดาลตัน ซึ่งส่วนใหญ่พบอยู่บน haemopoietic cells จะกระตุ้นด้วยโปรตีนในรูปของ transmembrane โดยการทำงานของตัวรับสัญญาณ TNF- α จะมีการส่งสัญญาณไปสู่โปรตีนอีกหลายชนิดภายในเซลล์ ทำให้มีการกระตุ้นการส่งสัญญาณได้หลากหลาย (56, 57) TNF- α มีความสำคัญต่อการสื่อสารระหว่างเซลล์ในการป้องกันเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อเกิดการอักเสบขึ้น TNF- α จะถูกหลั่งไปกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ neutrophil แต่เมื่อมีการตายของเซลล์แบบ apoptosis กลไกการทำงานของ TNF- α เป็นสารสื่อกลางของสองตัวรับบนผิวเซลล์แตกต่างกัน คือ TNFR1 (p55) และ TNFR2 (p75) การศึกษาในหนูซึ่งเป็นสัตว์ทดลอง ที่ขาด TNFR1 หรือ TNFR2 อย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่า TNFR1 มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้ผิวหนังเกิดการ

อักเสบโดยผ่าน TNF- α (58) การฉีด TNF- α เข้าสู่ผิวหนัง ผลทำให้เกิดการอักเสบของผิวหนัง และมีการผลิต IL-6 เพิ่มมากขึ้น และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ICAM-1 โดย keratinocytes (58) TNF- α สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง antimicrobial peptide เช่น BD-2 และ BD-3 (59)

การทำงานของ TNF- α

TNF- α เป็นไซโตไคน์ที่มีหน้าที่หลากหลายที่เชื่อกันว่าเป็นสารตัวกลางในการเกิดการอักเสบ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน nuclear factor **KB** (NF-**KB**), mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt (54, 60) การกระตุ้นของ TNF- α จะนำไปสู่การเพิ่มจำนวนการผลิตของไซโตไคน์ตัวอื่นๆ เช่น interleukin (IL) -1 α , -1 β , -6, -8 IFN- γ , CXCL1, CCL17 และรวมไปถึง TNF- α เองด้วย (47) ยังสามารถเพิ่ม reactive oxygen species ภายในเซลล์ซึ่งอาจจะมีเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (61) ในที่นี้จะกล่าวถึงการทำงานของ TNF- α ที่กระตุ้นผ่านการส่งสัญญาณของ NF-**KB**

Nuclear factor **KB** (NF-**KB**) เป็น eukaryotic transcription factor ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบ (62-64) โดย mammalian NF-**KB** ประกอบด้วย homo- และ hetero- dimers ของ Rel family protein เช่น RelA (p65), RelB, cRel, NF-**KB1**(p50), และ NF-**KB2**(p52) (15, 62, 65) ในสภาวะปกติของเซลล์ NF-**KB** จะอยู่ภายในเซลล์ ส่วนของไซโตพลาสซึม และจะจับอยู่กับ inhibition protein ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ NF-**KB** คือ inhibitors ของ NF-**KB** (IKB) เมื่อมี TNF- α เข้ามาจับกับตัวรับ (TNF receptor) ที่บนผิวเซลล์ จะถูกส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ เกิด phosphorylation ของ IKK α / β subunit จากนั้น IKK α / β subunit จะมีการส่งถ่าย phosphate ให้กับ IKB α ส่งผลให้เกิด degradation ของ IKB α ทำให้ปล่อย NF-**KB** ที่จับอยู่ ออก จากนั้น NF-**KB** ก็จะเคลื่อนตัวเข้าสู่ นิวเคลียส ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (64) ดังแสดงใน **ภาพที่ 4** โดยจะไปจับตรงตำแหน่ง promoter ของยีนนั้นๆ เริ่มกระบวนการผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกัน (62, 65, 66)



ภาพที่ 4 แสดงการทำงานของ TNF- α ที่กระตุ้นผ่านการส่งสัญญาณของ NF- κ B

(ภาพจาก <http://flipper.diff.org/app/items/5103>)

ไซโตไคน์ที่สำคัญตัวอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน

เซลล์ผิวหนังมีการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines และ chemokines มากมายในบริเวณของเคอราติโนไซต์ที่เป็นโรคสะเก็ดเงินจะสามารถสร้างและหลั่ง IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-18 และ IL-20 ซึ่งไซโตไคน์ทั้งหมดนี้มีความเกี่ยวข้องในการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งประกอบด้วยกลไกที่ซับซ้อนที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน ดังแสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 บริเวณของรอยโรคสะเก็ดเงินจะมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแทรกซึมในบริเวณที่เกิดขึ้น และทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่มากกว่าปกติ และพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินจะพบกับการทำงานของไซโตไคน์เหล่านี้ (67)

ไซโตไคน์ (cytokines)	บทบาทในโรคสะเก็ดเงิน
IL-1	Stimulation of IL-2 and IFN- γ production through activated T cells and of TNF- α , IL- 6, IL-8 by macrophages, and in autocrine fashion, of IL-1 synthesis
IL-6	Regulation of growth and differentiation of epidermal cells and stimulation of Th17 cells differentiation.
IL-15	Anti-apoptotic effects on lymphocytes and keratinocytes; stimulation of IL-17 expression, promotion of T cell and monocyte activation, production of cytokines implicated in the pathogenesis of psoriasis, including IFN- γ and TNF- α
IL-18	Induction of several chemokines in fibroblasts and neutrophils increased Tcell adhesion to extracellular matrix ligands, induction of angiogenesis, induction of chemotaxis in plasmacytoid dendritic cells.
IL-20	Inhibition of normal terminal differentiation of keratinocytes, induction of anti-bacterial proteins.

ตารางที่ 1 ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน

Chemokines ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน (68-70)

Chemokines	Roles
IL-8 (CXCL8)	Intra-epidermal recruitment of neutrophils
CCL-2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) CXCL10 (IP-10)	Recruitment of monocytes and Th1 cells
CCL20 (MIP-3 α)	Recruitment of dendritic cells, CLA+ T cells and immature Langherans cells

ตารางที่ 2 chemokines ที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน

แนวทางการรักษาโรคสะเก็ดเงิน

เนื่องจากโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่ไม่ทราบสาเหตุการเกิดโรคที่แน่นอน การรักษาของโรคสะเก็ดเงินจึงขึ้นอยู่กับอาการและความรุนแรงของโรค โดยยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยจะมีกลไกในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) ที่ผิดปกติ ให้เซลล์ผิวหนังกลับคืนสู่สภาวะปกติ ลดการอักเสบ โดยการรักษาในปัจจุบันมี 4 วิธี ดังนี้

1. ยาทาภายนอก เป็นยาทาเฉพาะที่ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังที่ผิดปกติ ยาในกลุ่มนี้มีหลายชนิด ซึ่งได้แก่ **ยาทาาคอติโคสเตียรอยด์** (topical corticosteroids) ใช้ง่าย มีการตอบสนองต่อการรักษาดีหากใช้ยาที่แรงเกินไปร่วมกับใช้เป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดผิวหนังบาง และเกิดรอยแตกของผิวหนังได้ รวมถึงอาจเกิดการตี้อยา และอาจกดการทำงานของต่อมหมวกไตได้ **น้ำมันดิน** (tar) ประสิทธิภาพดี แต่น้ำมันดิน มีสีน้ำตาล กลิ่นเหม็น เวลาทาอาจทำให้เปรอะเปื้อนเสื้อผ้า อาจพบผลข้างเคียงคือเกิดรูขุมขนอักเสบ หรือระคายเคืองผิวหนังบริเวณที่ทายาได้ **แอนทราลิน** (anthralin, dithranol) มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังที่ผิดปกติ แต่อาจทำให้ระคายเคืองผิวหนัง รวมถึงผิวหนังบริเวณที่ทายามีสีคล้ำขึ้นได้ **อนุพันธ์วิตามินดี** (calipotriol) ข้อเสียของยานี้คือหากทาบริเวณผิวหนังที่บาง อาจมีการระคายเคืองได้ และยามีราคาแพง ปัจจุบันมียาที่ผสมระหว่างอนุพันธ์วิตามินดีและยาทาาคอติโคสเตียรอยด์เข้าด้วยกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดผลข้างเคียง, **ยาทาากลุ่ม calcineurin inhibitor** (tacrolimus, pimecrolimus) เป็นยาในกลุ่มใหม่ แพทย์บางรายนำมาใช้ในการรักษาผื่นโรคสะเก็ดเงินบริเวณหน้า หรือตามซอกพับเพื่อต้องการหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงจากยาทาาคอติโคสเตียรอยด์ แต่ยังไม่แพร่หลายเนื่องจากยามีราคาแพง

2. ยารับประทาน เป็นยาที่ออกฤทธิ์ไปทั่วร่างกาย ซึ่งยาในกลุ่มนี้นำมาใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินที่รุนแรงปานกลางถึงมาก ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังที่ผิดปกติ รวมถึงมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันของร่างกาย และลดการอักเสบตัวอย่างยาที่ใช้บ่อยในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ **เมทโทเทรกเสท** (methotrexate) เป็นยาที่ได้ผลดีกับสะเก็ดเงินเกือบทุกชนิด มีผลข้างเคียงของเมทโทเทรกเสทที่อาจพบ ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน หากรับประทานยาติดต่อกันนานหลายปีจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดตับแข็งได้ แพทย์จึงต้องทำการตรวจเลือดผู้ป่วยเพื่อดูการทำงานของเม็ดเลือด ดับและไตเป็นระยะ **อาซิเทรติน** (acitretin) เป็นยารับประทานในกลุ่ม vitamin A ได้ผลดีมากสำหรับสะเก็ดเงินชนิดตุ่มหนอง ผลข้างเคียงที่อาจพบ ได้แก่ ปากแห้งลอก ผิวแห้ง มือเท้าตึงลอก รอบเล็บอักเสบ ระดับไขมันในเลือดสูง และอาจทำให้เกิดตับอักเสบได้ ข้อควรระวังสำหรับผู้ป่วยที่ได้รับยานี้คือ ห้ามตั้งครรภ์เนื่องจากทารกในครรภ์อาจพิการได้ โดยต้องคุมกำเนิดขณะรับประทานและต้องคุมกำเนิดต่อไปอีกอย่างน้อย 3 ปีหลังหยุดยา **ไซโคลสปอริน** (cyclosporin) ประสิทธิภาพในการรักษาดี มี

ผลข้างเคียง ได้แก่ ขนยาว เหงือกบวม เป็นพิษต่อไต และความดันโลหิตสูง ดังนั้นจึงต้องเจาะเลือดติดตามการทำงานของไตและวัดความดันโลหิตเป็นระยะ (2)

3. การฉายแสงอาทิตย์เทียม (Phototherapy) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้ผลดีในการรักษาสะเก็ดเงิน โดยจะใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งปัจจุบันที่ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ รังสีอัลตราไวโอเล็ต A และรังสีอัลตราไวโอเล็ต B ซึ่งผู้ป่วยต้องมารับการรักษา 2 - 3 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือนติดต่อกัน โดยจะให้ผลดีประมาณ 70 - 80% ขึ้นไป พบผลข้างเคียงน้อย ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการคันและแดงบริเวณผิวหนังที่ฉายแสงหลังทำการรักษา ข้อดี คือ ส่วนใหญ่การกลับเป็นซ้ำของโรคจะน้อยกว่าการรักษาโดยใช้ยาทาหรือยารับประทาน (2)

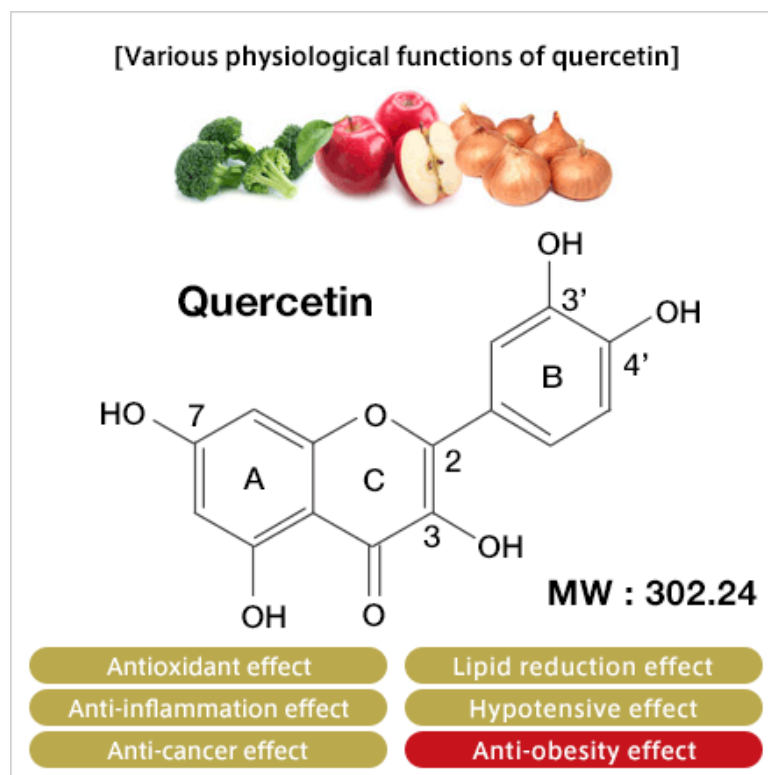
4. ยาฉีดกลุ่มชีวภาพ (Biological agents) เป็นยาที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อยู่ในรูปยาฉีดเข้าเส้นเลือดดำหรือเข้าใต้ชั้นไขมัน โดยตัวยาคือแอนติบอดีที่จำเพาะกับ TNF- α โดยตรง เช่น infliximab และ adalimumab หรือ soluble receptor constructs ของ TNF- α เช่น ยา etanercept (6) ใช้ในการรักษา Crohn's disease และ Rheumatoid arthritis ตลอดจนโรคที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังอื่นๆ เช่น โรคสะเก็ดเงิน และ psoriasis arthritis (71) ซึ่งยาบางชนิดฉีดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง บางชนิดอาจฉีดห่างกันทุก 3 เดือน ข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ยาเหล่านี้จะออกฤทธิ์ไปยังส่วนต่างๆของร่างกายไม่จำเพาะเจาะจงกับส่วนใดส่วนหนึ่ง จึงทำให้ผู้ป่วยบางรายอาจพบโรคแทรกซ้อนหลังการได้รับยาเหล่านี้ก็เป็นได้ โดยมีรายงานอุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสโรคเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในผู้ที่ได้รับยา และเป็นที่น่าสนใจว่าได้มีรายงานการเกิดมะเร็งต่อมน้ำเหลืองเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยาด้าน TNF- α (1, 72) ซึ่งยาในกลุ่มนี้เป็นยาใหม่ จึงต้องติดตามผลข้างเคียงระยะยาว

สมุนไพรกับโรคสะเก็ดเงิน

สำหรับแนวการรักษาโรคสะเก็ดเงินที่กล่าวไว้ข้างต้นนั้น ในแต่ละวิธีก็มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ที่แตกต่างกัน ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นว่า สารสกัดจากสมุนไพรไทยอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยาบรรเทาอาการ อาจจะช่วยรักษาโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบัน ซึ่งสมุนไพรไทยมีมากมายหลายชนิด ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และเกิดจากการเพาะปลูกของมนุษย์ มีสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นยา ที่เรียกว่า ยาแผนโบราณ โดยสมุนไพรแต่ละชนิดก็มีสรรพคุณในการรักษาโรคแตกต่างกันออกไป สมุนไพรโดยส่วนใหญ่แล้วจะมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากห้องปฏิบัติการ ตำรับยารักษาโรคสะเก็ดเงินที่ใช้ในปัจจุบันอย่างเช่น สมุนไพรกลุ่มที่ช่วยในการแก้แพ้ น้ำเหลืองเสีย ข้าวเย็นเหนือ ใช้หัวแก้แพ้ น้ำเหลืองเสีย กามโรค ผีเปื่อยพุพอง ข้าวเย็นใต้ ใช้หัว แก้ประดง คุณทะราด แก้แพ้ น้ำเหลืองเสีย แก้เส้นเอ็นพิการ เม็ดผื่นคัน ดับพิษในกระดุก ทองพันชั่ง ใช้ใบรักษาโรคผิวหนัง

กลากเกลื่อน ผื่นคันเรื้อรัง หัวร้อยรุ ใช้หัว บำรุงหัวใจ แก้พิษในกระดุก แก้พิษประดง แก้ปวดเข่า รักษาเบาหวาน บำรุงน้ำมัน เหงือกปลาหมอ ใช้ใบเป็นยาประคบแก้ไขข้ออักเสบ แก้ปวดต่าง ๆ รักษาโรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย หล้าปากกึ่ง ใช้ทั้งต้น แก้ไข้ร้อนใน แก้น้ำเหลืองเสีย เพิ่มภูมิคุ้มกัน ต้านการอักเสบ รักษาเมเร็ง สำหรับ กรณี ผื่นที่แห้ง คัน ลอกเป็นขุย ควรใช้น้ำมันแก้คัน เป็นยาตำรับกลุ่มแก้คัน แก้น้ำเหลืองเสีย อาทิ ทองพันชั่ง ขมิ้นชัน เหงือกปลาหมอ ฯลฯ เกี่ยวกับน้ำมันมะพร้าว ใช้ทาบนผิวที่เป็นผื่นประจำ จะช่วยลดอาการคัน และทำให้ผิวชุ่มชื้นขึ้น ซึ่งช่วยให้ผู้ป่วยสะเก็ดเงินคลายจากความทุกข์ทรมานของอาการคัน (12, 13) สำหรับประสิทธิภาพเป็นเพียงยาบรรเทาอาการที่เกิดขึ้นจากโรคสะเก็ดเงินเท่านั้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องแสวงหาสมุนไพรที่ใช้ต้านโรคสะเก็ดเงินที่มีสรรพคุณที่ดีกว่าที่ใช้ในปัจจุบัน จากงานวิจัยของ Thongrakard V. ในปี ค.ศ. 2009 ได้มีการศึกษาค้นคว้าหาสมุนไพรไทยจำนวน 11 ชนิด พบว่ามีสมุนไพรเพียง 3 ชนิดที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง และลดการแสดงออกของ cytokines ที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงินได้ ประกอบด้วย น้อยหน่า (*Annona squamosa*) ข่า (*Alpinia galanga*) และขมิ้น (*Curcuma longa*) (73) ในปี ค.ศ. 2013 มีการนำใบของดอกกุหลาบพันปี (*Rhododendron brachycarpum*) มาศึกษากลไกที่สามารถยับยั้งการอักเสบ โดยยับยั้งผ่านการส่งสัญญาณของ NF- κ B, MAPKs, PI3K/Akt และยังสามารถลดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines (74) และจากการค้นพบของ Vijayalakshmi A. และคณะในปี 2012 พบว่า Quercetin ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำ Quercetin มาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินต่อไป (75) สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้จะเลือก Quercetin มาใช้เป็นตัวอย่างของสารสกัดสมุนไพรที่มีหลักฐานว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (hyperproliferation) ของเซลล์ผิวหนัง ซึ่งมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

Quercetin



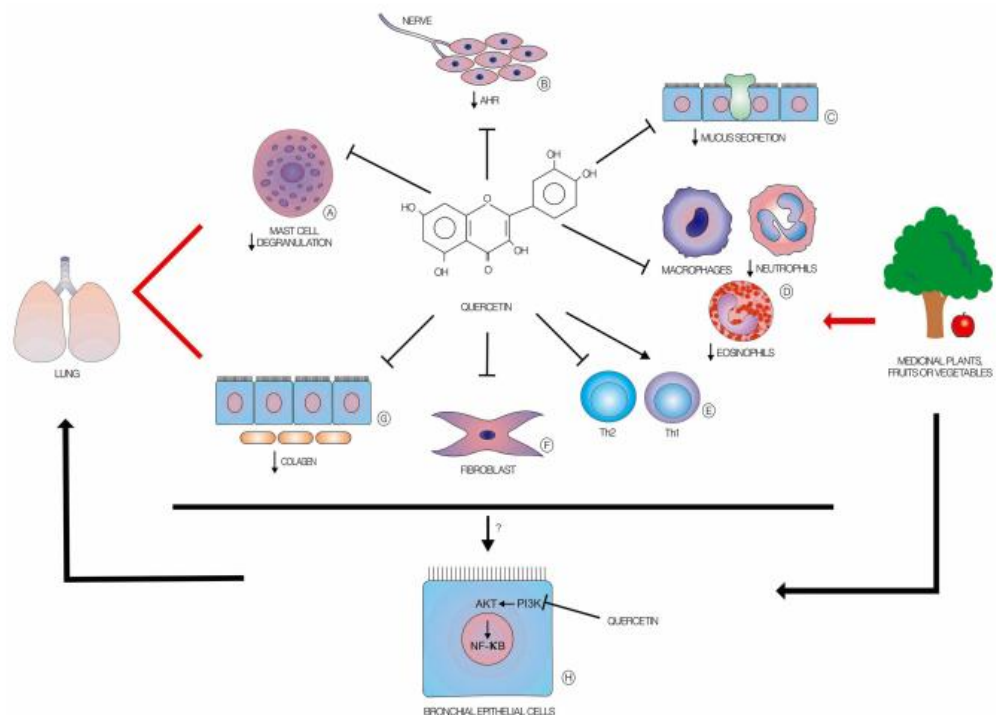
ภาพที่ 5 แสดงฤทธิ์ของ Quercetin

(ภาพจาก http://www.suntory.com/sic/research/h_quercetin/)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Quercetin เป็น ไบโอฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นหนึ่งในประเภทของฟลาโวนอยด์ ที่พบในอาหารที่รับประทานในชีวิตประจำวัน ซึ่งพบในปริมาณที่สูงใน ไวน์แดง แอปเปิ้ล หัวหอม ชาดำ เบอร์รี่ และพบได้น้อยใน ผักใบเขียวอื่นๆ และถั่ว (76, 77) จากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในหลอดทดลอง (*In vitro*) และทดลองในสิ่งมีชีวิต (*In vivo*) พบว่ามีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ทำหน้าที่ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นที่รู้จักกันดีสำหรับ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (78) ยับยั้งกระบวนการการอักเสบ (77, 79) ในปี 2007 นักวิจัยชาวเกาหลีแสดงให้เห็นว่า Quercetin สามารถยับยั้งการผลิตของ inflammatory cytokines โดยการขัดขวางการทำงานของ NF- κ B ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเมเร็งและการอักเสบแบบเรื้อรัง (80) และยับยั้งการสะสมของเซลล์ไขมันสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอ้วน (81) ป้องกันเมเร็ง Quercetin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เมเร็งได้ภายในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังแสดงคุณสมบัติต้านเมเร็ง Quercetin เป็นสารประกอบจากธรรมชาติที่สามารถป้องกันสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดภูมิแพ้ได้ และสามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการหลั่งของ mast

cell ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ การหลั่งของ tryptase, MCP-1 และ IL-6 ลดลง และลดการแสดงออกของ histidine decarboxylase (HDC) mRNA จาก mast cell (82) สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มและการส่งสัญญาณของ platelet ในหลอดทดลอง Quercetin ในรูปแบบของ quercetin-4'-O-beta-D-glucoside ที่พบในการบริโภคอาหารพบว่าสามารถช่วงยับยั้งการส่งสัญญาณของ platelet cell และการแข็งตัวของเลือด (thrombus formation) (82) ป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ และป้องกันเซลล์ประสาท (77, 83) Quercetin มีความปลอดภัย เป็นธรรมชาติบำบัด อาจใช้เป็นยารักษาเบื้องต้น หรือใช้ร่วมกับรักษาแบบดั้งเดิม (76)



ภาพที่ 6 แสดงการออกฤทธิ์ของ Quercetin

Fortunato LR et al. 2012 (84)

ซึ่งในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะพัฒนาเซลล์โมเดลใหม่เพื่อใช้ในการคัดเลือกสมุนไพรใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงิน และหรือหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ $TNF-\alpha$ ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคสะเก็ดเงิน เพื่อลดหย่อนเวลา ลดค่าใช้จ่าย ลดความยุ่งยากในการเตรียมเซลล์โมเดลที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เพื่อนำสมุนไพรใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาดีกว่าสมุนไพรที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ที่มีฤทธิ์ช่วยลดการอักเสบของเซลล์ผิวหนัง ใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินและหรือรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เนื่องมาจาก $TNF-\alpha$ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต

บทที่ 3

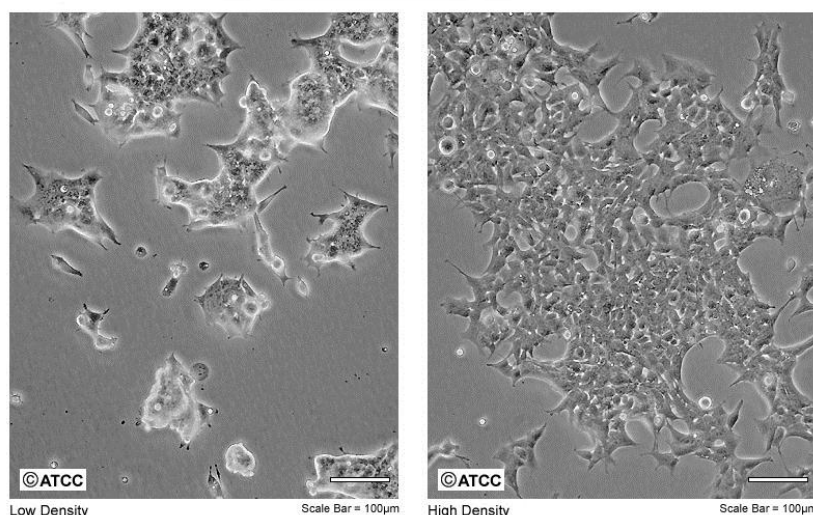
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

3.1.1 กลุ่มเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยง

3.1.1.1 Human Embryonic Kidney 293T cell (HEK293T)

เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการทรานส์เฟกชันสูง เนื่องจากเป็นเซลล์ที่โตง่ายและรวดเร็ว และเป็นเซลล์ที่มี Large T-antigen ที่สามารถจับกับ DNA polymerase ชักนำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน virus genome แล้วประกอบตัวเป็นไวรัสซึ่งมีส่วนของยีนที่ต้องการศึกษา เพื่อนำไป transduce เข้าสู่เซลล์อื่นต่อไป จึงนิยมนำเซลล์ HEK293T มาใช้ในการผลิต retroviral (85) และสำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ HEK293T คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (บริษัท Hyclone) ที่มีส่วนประกอบของ Sodium pyruvate (บริษัท Hyclone) อยู่ 1 เปอร์เซ็นต์ Fetal Bovine Serum (FBS) (บริษัท Merck Millipore) อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (บริษัท Hyclone) และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์



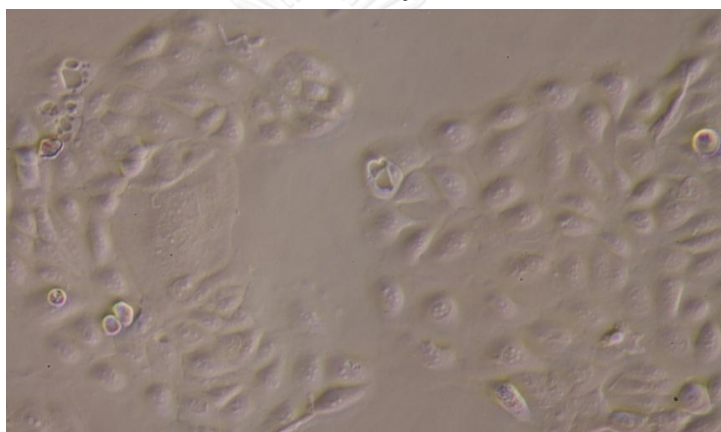
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของเซลล์ Human Embryonic Kidney 293T cell (HEK293T)

ภาพจาก <http://www.atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx>

ATCC (CRL-1573)

3.1.1.2 Immortalized human epidermal keratinocyte cell line (HaCaT cell)

เป็นเซลล์ผิวหนังเคอราติโนไซต์ของมนุษย์ โดยส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษาทางด้านชีววิทยา และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของผิวหนัง (86) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เป็นโมเดลของผิวหนังที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย TNF- α คล้ายกับโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งโรคสะเก็ดเงินจะมีความผิดปกติในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เคอราติโนไซต์ (15) และได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนา สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ HaCaT คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ของบริษัท Hyclone ที่มีส่วนประกอบของ Fetal Bovine Serum (FBS) ของบริษัท Merck Millipore อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของบริษัท Hyclone และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์ (HaCaT cell) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Invert Microscopy, 40X)

Kawjit N., 2003 (87)

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

12 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
-20 °C freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
24 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
4°C refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
-80°C deep freezer	Ilshin Lab, เนเธอร์แลนด์


96 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autoclave	Hirayama, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 μ l	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 200-1000 μ l	GILSON, ฝรั่งเศส
Autopipette 20-200 μ l	GILSON, ฝรั่งเศส
Autopipette 2-20 μ l	GILSON, ฝรั่งเศส
Beaker (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
Cell culture flask (25, 75 cm ³)	Nunc, เดนมาร์ก
Centrifuge	Beckman Coulter, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Nunc, เดนมาร์ก
CO ₂ incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Confocal microscope รุ่น LSM700	Carl Ziess, เยอรมนี
Cryovial tube 1.5 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Disposable serological pipette (2, 5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Exicycler 96	Schott Duran, เยอรมนี
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Glass bottles (250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
High speed grinder	Rong Tsong Precision Tech. Co., จีน
Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Incubator shaker	INFORS HT, สวิตเซอร์แลนด์
Inverted microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น

Liquid nitrogen tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้
Micro Refrigerated Centrifuge	Vision Scientific, เกาหลีใต้
Microcentrifuge tube (0.5, 1.5 ml)	Extragene, ไต้หวัน
Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
Multichannel pipette 20-200 μ l	Gilson, ฝรั่งเศส
Multilabel reader	Perkin Elmer Inc., ฟินแลนด์
pH meter	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Pipette tips (10, 20, 200, 1000 μ l)	BIORAD, สหรัฐอเมริกา
Plate shaker	Desaga, เยอรมนี
Serological pipette (1, 5, 10, 25 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Sterile syringes filter	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Thermal Cycler	MJ Research Inc., สหรัฐอเมริกา
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Volumetric flask (100, 250, 500 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	FinePCR, เกาหลีใต้
Waterbath	Memmert, เยอรมนี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอ และโคลนนิ่งพลาสมิดดีเอ็นเอ

Agar	Oxiod, สหราชอาณาจักร
Agarose powder	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Alkaline phosphatase	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Ampicillin	Applichem, เยอรมนี
Competent cells E.coli สายพันธุ์ DH5 α	Real biotechnology, สหรัฐอเมริกา
DNA ladder 100, 1000 bp	Gene direx, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck Millipore, เยอรมนี
Isopropanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Kanamycin	Applichem, เยอรมนี

LR Clonase II enzyme	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
NaCl	Merck Millipore, เยอรมนี
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Proteinase K	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
QIAGEN Plasmid Maxi kits	Qiagen, เยอรมนี
QIAprep Spin miniprep kits	Qiagen, เยอรมนี
QIAquick Gel extraction kit	Qiagen, เยอรมนี
Restriction enzyme: Ascl, EcoRI และ NotI	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Restriction enzyme: TaqI	New England Biolabs, สหราชอาณาจักร
SOC medium	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Sterile Filtered Water	Calbiochem, สหรัฐอเมริกา
T4 ligase	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Tryptone	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Yeast extract	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
	
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CHULALONGKORN UNIVERSITY	
สารเคมีที่ใช้ในการสร้างเซลล์โมเดล และคัดเลือกเซลล์โมเดล	
Doxycycline	Merck Millipore, เยอรมนี
Genecetin (G418)	Merck Millipore, เยอรมนี
HEPES buffer	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Opti-MEM I medium	Gibco/Life Technologies, สหรัฐอเมริกา
Polybrene transfection reagent	Merck Millipore, เยอรมนี
Poly-D-lysine	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Trypan blue	Gibco/Life Technologies, สหรัฐอเมริกา
X-tremeGENE HP DNA transfection reagent	Roche, Mannheim, เยอรมนี

สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T และ HaCaT

DMEM	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Fetal bovine serum (FBS)	Merck Millipore, เยอรมนี
Penicillin Streptomycin	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS)	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Sodium Pyruvate	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Trypan Blue	Gibco, สหรัฐอเมริกา

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี ELISA

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))	Merck Millipore, เยอรมนี
Avidin-HRP Conjugate	Peprtech, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	Merck Millipore, เยอรมนี
Capture Antibody: 100 μ g of antigen-affinity purified rabbit anti-TNF- α + 2.5mg D-mannitol	Peprtech, สหรัฐอเมริกา
Detection Antibody: 50 μ g of biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-TNF- α + 2.5mg D-mannitol	Peprtech, สหรัฐอเมริกา
Human TNF- α Standard: 1 μ g of recombinant hTNF- α + 2.2mg BSA + 11mg D-mannitol	Peprtech, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS)	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Tween 20	Merck Millipore, เยอรมนี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck Millipore, เยอรมนี
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	Applichem, เยอรมนี
Recombinant human TNF- α	R&D systems, สหรัฐอเมริกา

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี Western blot

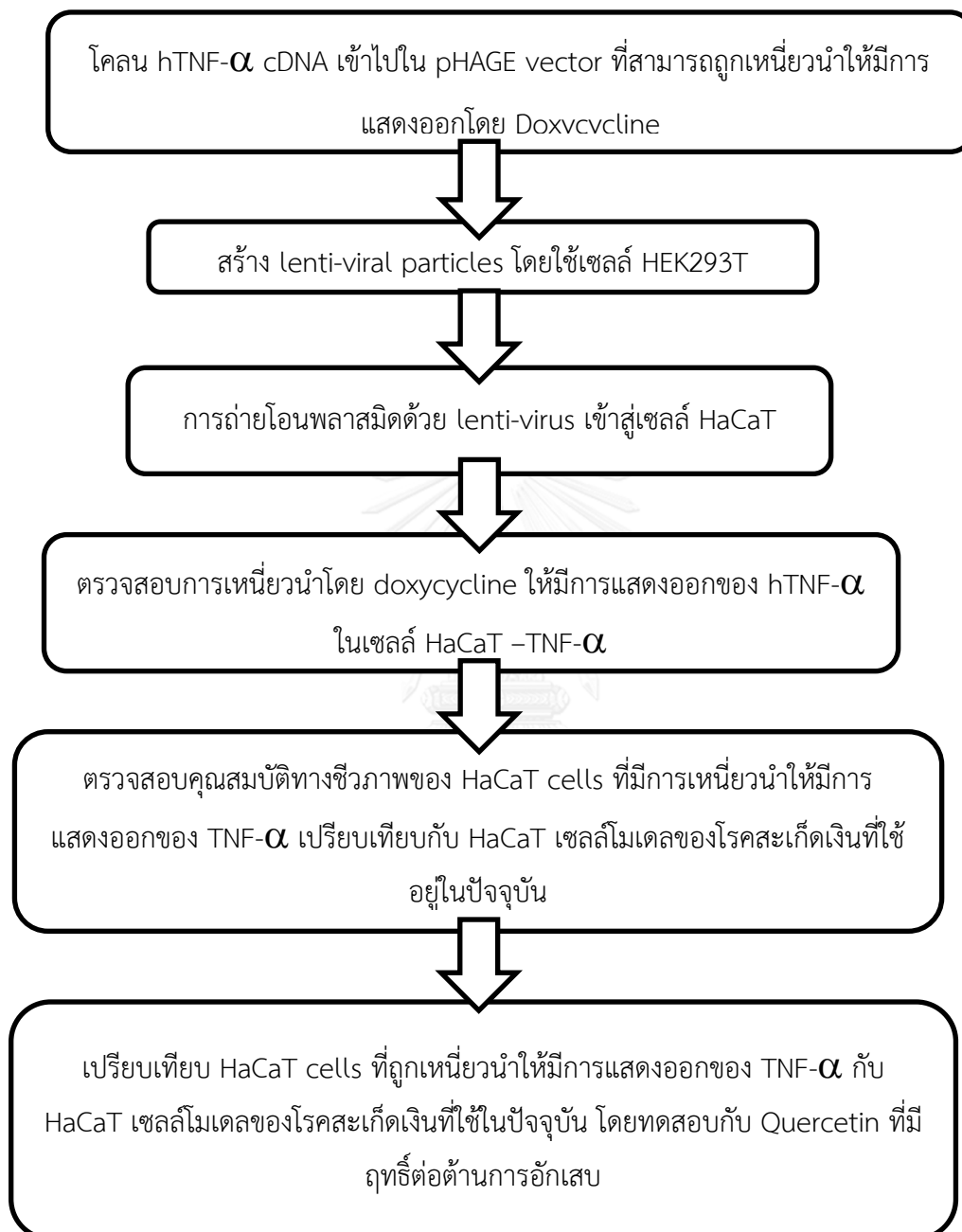
Anti-rabbit IgG, HRP linked Ab	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Bradford dye reagent	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Precision Plus Protein Standards ladders	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Proteinase inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, Germany
RIPA lysis buffer	Merck Millipore, สหรัฐอเมริกา
Standard protein Bovine serum albumin (BSA)	Merck Millipore, สหรัฐอเมริกา
TNF- α Antibody 7124	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของไซโตไคน์ ที่เกิดจากการอักเสบ ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

2X Green Star mastermix	Bioneer, Korea
Accupower RT Premix	Bioneer, Korea
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Genezol reagent	Geneaid, Taiwan

3.3 วิธีการวิจัย

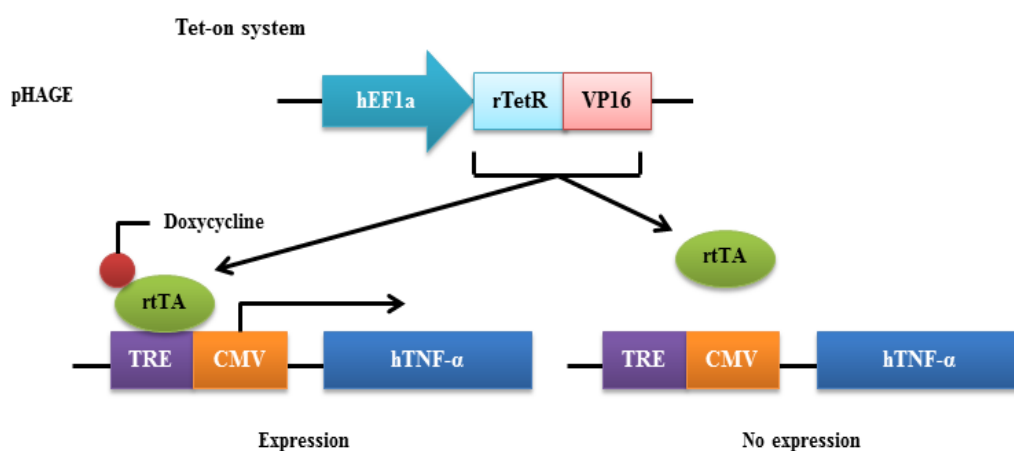
3.3.1 กรอบแนวคิด



การสร้างระบบ retro-lentiviral สำหรับ Tetracycline-inducible TNF- α

การควบคุมการแสดงออกของยีนโดย Antibiotic tetracycline analog เช่น Doxycycline ในระบบ Tet-on

Human TNF- α cDNA (hTNF- α) จะถูกโคลนเข้าไปในพลาสมิด pHAGE โดยบน pHAGE จะมี reverse tetracycline-regulated transactivator (rtTA) ที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน ในสถานะที่ไม่มี Doxycycline มาจับ rtTA จะทำให้ rtTA ไปจับตรงตำแหน่ง TRE-CMV promoter ไม่ได้ จะไม่เกิดการแสดงออกของ hTNF- α ที่อยู่บน pHAGE และในทางตรงกันข้าม สถานะที่มี Doxycycline มาจับกับ rtTA จะกระตุ้นให้ rtTA ไปจับบนตำแหน่ง TRE-CMV promoter ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน hTNF- α บนพลาสมิด pHAGE ทำให้มีการผลิตโปรตีน hTNF- α ในที่สุด (ภาพที่ 9) ดังนั้นปริมาณ hTNF- α ที่ผลิตออกมาจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Doxycycline โดยตรง ทำให้สามารถควบคุมการแสดงออกของ hTNF- α ให้เหมาะสมได้

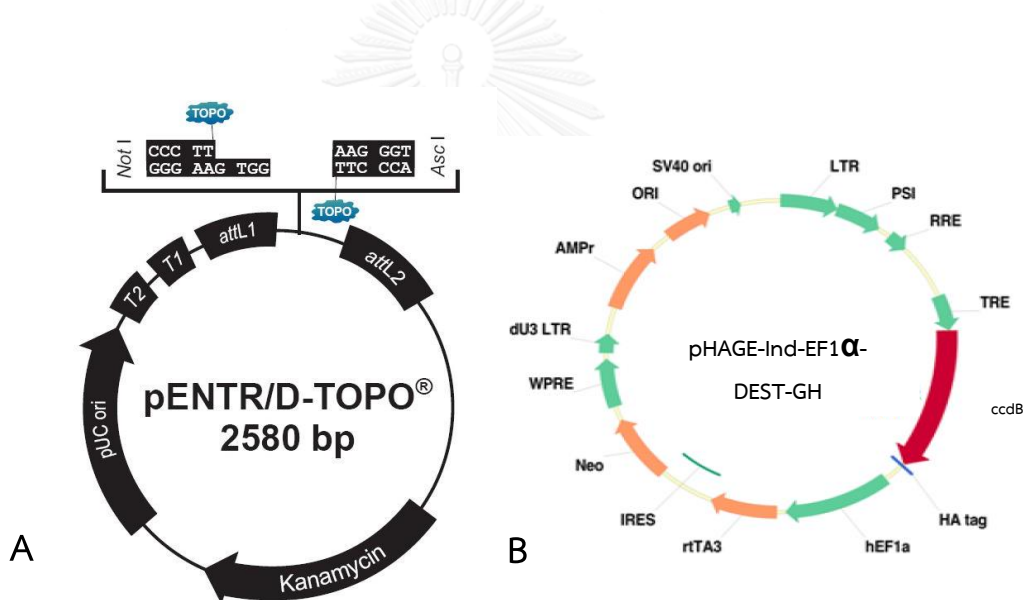


ภาพที่ 9 การควบคุมการแสดงออกของยีนโดย Doxycycline

ดัดแปลงจาก Kohan DE., 2008 (88)

การสร้างระบบ retro-lentiviral จะประกอบด้วยพลาสมิดหลัก 4 ชนิด คือ

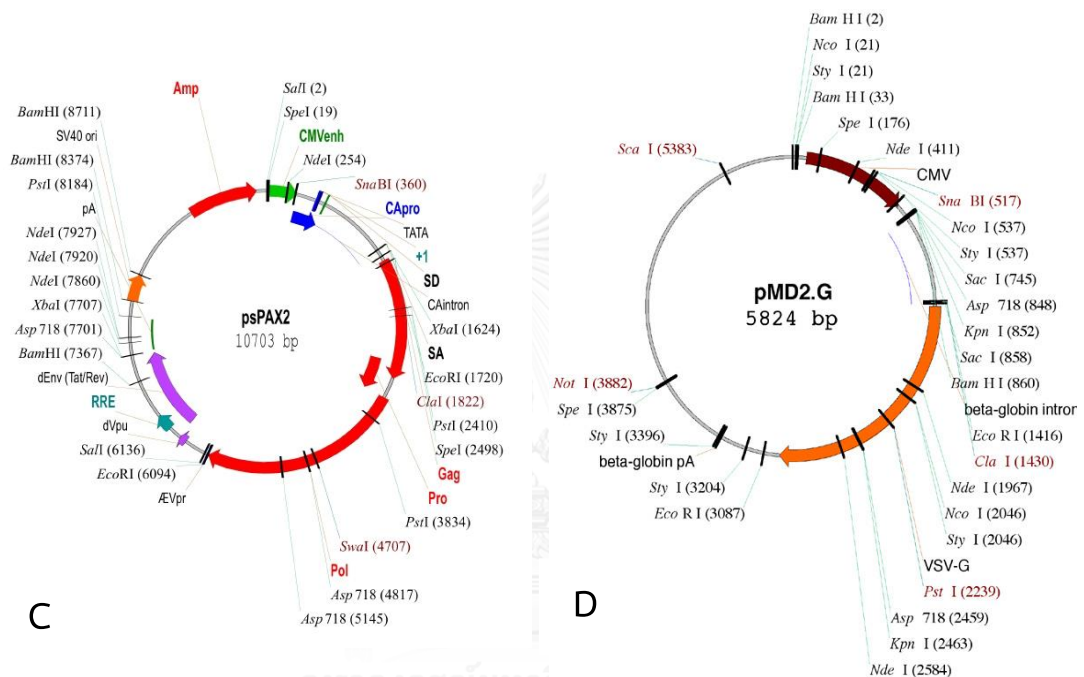
1. **pENTR/D-TOPO** เป็นพลาสมิดขนาด 2580 bp ภายในพลาสมิดมีตำแหน่งของ *attL1* และ *attL2* ใช้สำหรับโคลนนิ่ง และมียีนดื้อยา Kanamycin ในเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 10A
2. **pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH** เป็นพลาสมิดขนาดประมาณ 11939 bp มีตำแหน่งของ hEF1a promotor ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน Reverse tetracycline-regulated transactivator (rtTA), มีตำแหน่งของ tetracycline response element (TRE) และ *attR1* และ *attR2* ใช้สำหรับการโคลนนิ่ง ภายในพลาสมิดมียีนดื้อยาในกลุ่ม Neomycin (G418) ในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 10B



ภาพที่ 10 แสดง plasmid map ของ pENTR-Src/D-TOPO (ภาพ A) และ pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH (ภาพ B)

(ดัดแปลงจาก Dean P. Edwards Lab Baylor College of medicine)

3. **psPAX2** เป็น lentiviral packing vector มีขนาด 10703 bp มีการแสดงออกของยีน Gag, Pro, และ Pol ภายในพลาสมิดมียีนดื้อยา ampicillin ในเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 11C
4. **pMD2.G** เป็น Envelope plasmid มีขนาด 5824 bp มีการแสดงออกของยีน VSV-G โดยพลาสมิดนี้จะมียีนดื้อยา Ampicillin ในเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 11D



ภาพที่ 11 แสดง plasmid map

psPAX2 มีการแสดงออกของยีน Gag, Pro, และ Pol เป็น 2nd generation packaging vector (ภาพ C) และ pMD2.G มีการแสดงออกของยีน VSV-G เป็น envelop construct (ภาพ D) มี selectable marker คือ ampicillin resistance ในเชื้อแบคทีเรียทั้งสอง plasmids (ภาพจาก <https://www.addgene.org/>)

3.3.2 การเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation) ที่ใช้ในการสร้างอนุภาคของ retro-lentiviral

การทรานส์ฟอร์มเมชัน เป็นวิธีที่นำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (competent cell) เพื่อให้แบคทีเรียทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอที่ส่งผ่านเข้าสู่แบคทีเรีย โดยการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอจะคัดเลือกจากยีนดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยจะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาผสมอยู่ หากแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แสดงว่ามีพลาสมิดดื้อยาอยู่ในแบคทีเรียกลุ่มนั้น ซึ่งพลาสมิดในงานวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ pENTR-Src/D-TOPO, psPAX2 และ pMD2.G จะถูกทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5 α มีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้ นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ออกจาก -80° องศาเซลเซียส ปล่อยให้ละลายในน้ำแข็ง ประมาณ 20-30 นาที โดยใช้เชื้อ *E. coli* ครั้งละ 50 μ L ใส่ในหลอด 1.5 mL นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pENTR-Src/D-TOPO, psPAX2 และ pMD2.G ปริมาณ 100 ng ค่อยๆ ใส่ลงในหลอดที่มีเชื้อ *E. coli* ผสมให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดเบาๆ ที่ข้างหลอด วางหลอดที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอผสมกับเชื้อ *E. coli* บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำมาบ่มในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม S.O.C medium 500 μ L เพื่อรักษาชีวิตของ competent cell DH5 α นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปั่นตกตะกอนเชื้อ *E. coli* ที่ 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อทิ้งประมาณ 300 μ L ผสมตะกอนที่เหลือให้เข้ากัน นำเซลล์แบคทีเรีย spread เลี้ยงบน LB agar ที่มียา Ampicillin (พลาสมิด psPAX2 และ pMD2.G มียีนดื้อยา Ampicillin) หรือ Kanamycin (พลาสมิด pENTR-Src/D-TOPO มียีนดื้อยา Kanamycin) ความเข้มข้น 100 μ g/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง เฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดื้อยา Ampicillin หรือ Kanamycin จะขึ้นเป็นโคโลนีบน LB agar เท่านั้น คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบน LB agar เชื้อลงใน LB broth ที่มี Ampicillin หรือ Kanamycin นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อที่มีพลาสมิดดื้อยาเพิ่มจำนวน

3.3.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างอนุภาคของ retro-lentiviral ให้บริสุทธิ์ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

3.3.3.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAprep Spin miniprep kit

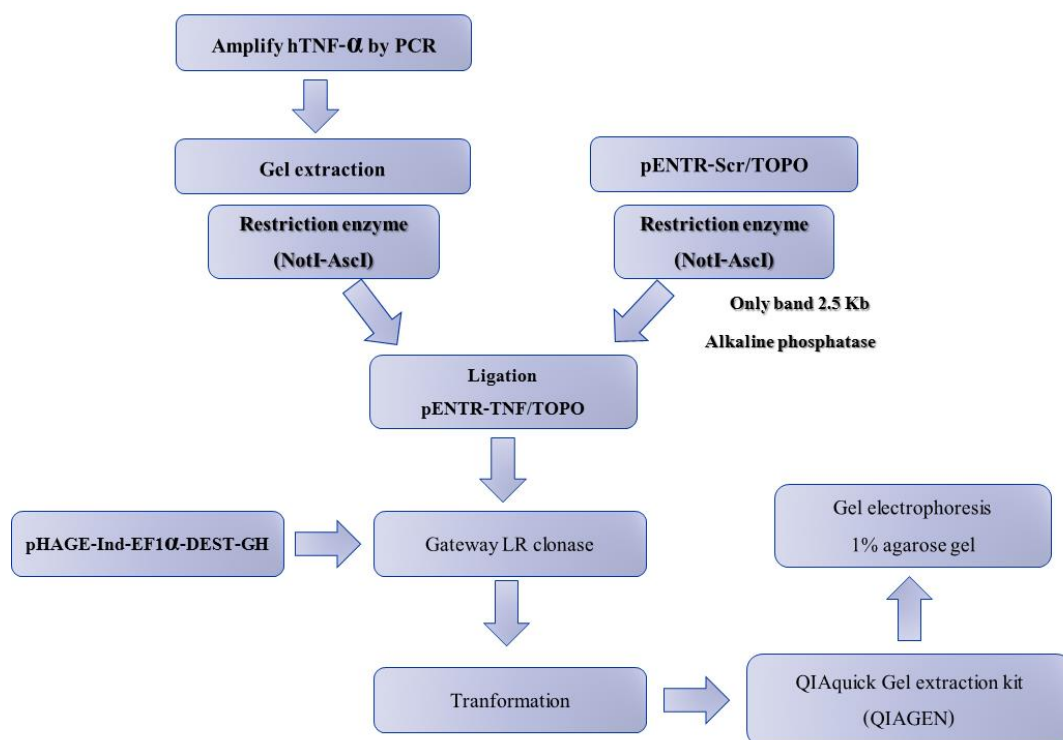
การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เป็นวิธีการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเชื้อแบคทีเรีย (competent cell) ออกมา โดยใช้ QIAprep Spin miniprep kit ซึ่งในชุดสกัดจะใช้หลักการ Alkaline lysis อธิบายขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้ นำตะกอนเชื้อ 1-3 mL มาปั่นที่อุณหภูมิห้อง 11000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ใช้หลักการ Alkaline lysis โดยเติม Buffer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100ug/mL RNase A) 250 μ L เพื่อละลายตะกอนเชื้อให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) 250 μ L เขย่าหลอดกลับไปมา 4-6 ครั้ง จนกระทั่งสารสีเปลี่ยนเป็นสารสีฟ้า ใช้สำหรับทำให้ cell lysis ผงเซลล์ถูกทำให้แตก จากนั้นเติม Buffer N3 (3.0M potassium acetate, pH 5.5) 350 μ L เขย่าหลอดกลับไปมา 4-6 ครั้ง จนกระทั่งสารสีฟ้าเปลี่ยนเป็นสารสีใสอีกครั้ง เพื่อใช้ในการ neutralization ปั่น 13000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปลงในคอลัมน์ (column) เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอจับกับคอลัมน์ ปั่น 13500 rpm เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วย wash buffer (PB) 500 μ L ปั่น 13500 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer (PE) 750 μ L ปั่น 13500 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์ ไปปั่นแห้ง 13500 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะ wash buffer ออกให้หมด นำคอลัมน์ ใส่ลงไปในหลอดใหม่ สกัดโดยใช้น้ำบริสุทธิ์ 50 μ L วางหลอดทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่น 13500 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกาะอยู่บนคอลัมน์หลุดลงมาใส่หลอดใหม่ สุกถ่ายนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดปริมาณที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ O.D. 260 nm จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการสกัดมาตรวจสอบความถูกต้อง ซึ่งจะใช้การตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย pENTR/D-TOPO ใช้ *NotI* และ *Ascl*, psPAX2 และ pMD2.G ใช้ *EcoRI* วิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส บนความเข้มข้น อะกาโรส เจล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ซึ่งเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิด โดยใช้ 100bp และ 1kp DNA Ladder เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดแล้ว เก็บเป็น stock culture โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดใน LB Broth ผสมใน 20 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล (glycerol) เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAGEN plasmid maxi kit

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี QIAGEN plasmid maxi kit ใช้หลักการ Alkaline lysis อธิบายขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (competent cell) ใน flask เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่ 4000 rpm เป็นเวลา 60 นาที เทส่วนใสที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อออก จะเห็นตะกอนเชื้อ อยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นเติม buffer P1 10 mL ในการละลายตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นเปลี่ยนใส่ หลอดใหม่ แล้วเติม buffer P2 10 mL ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อ ทำลายผนังเซลล์, buffer P3 10 mL ใช้สำหรับทำให้ค่า pH เป็นกลาง บ่มไว้ที่บนน้ำแข็ง 20 นาที นำไปปั่นเย็นที่ 15000 rpm เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเทส่วนใสในคอลัมน์ ปล่อยให้สารไหลตาม แรงโน้มถ่วง เติม QC buffer 30 mL เพื่อล้างคอลัมน์ จากนั้นชะพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ ด้วย QF buffer 15 mL จากนั้นตกตะกอนโดยใช้ isopropanol 10.5 mL ปั่นเย็นที่ 15000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 5 mL แล้วปั่นเย็นที่ 15000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทิ้งไว้จนตะกอนแห้ง จากนั้นทำการละลายตะกอนพลาสมิดดี เอ็นเอใสในหลอด 1.5 mL สุดท้ายนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ O.D. 260 nm ซึ่ง QIAprep Spin miniprep kit และ QIAGEN plasmid maxi kit ใช้หลักการ เดียวกันแต่ต่างกันที่คอลัมน์ในการสกัดดีเอ็นเอของ QIAGEN plasmid maxi kit จะมีขนาดใหญ่กว่า ทำให้ได้ปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มากกว่าอยู่ในระดับ μg

3.3.4 การโคลนนิ่ง Human TNF- α เข้าไปใน pHAGE ที่เหนี่ยวนำโดย Tetracycline

นำ hTNF- α จากผู้ผลิตมาเพื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นจะนำ PCR product (hTNF- α) ที่ได้ นำไปเชื่อมต่อกับ pENTR/TOPO (vector) เพื่อให้ เป็นพลาสมิดสายเดียวกัน (ligation reaction) จากนั้นทำการโคลนนิ่งด้วยวิธี Gateway LR Clonase โดยใช้เอนไซม์ LR Clonase กับพลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH เพื่อเคลื่อนย้าย ชิ้นส่วนของ hTNF- α บน pENTR/TOPO ให้ย้ายไปอยู่บน pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH จากนั้นก็ เพิ่มจำนวนในเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้วิธีทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation) แล้วสกัดพลาสมิดจาก เชื้อแบคทีเรีย นำไปตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ วิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ดังแสดงขั้นตอนโดยรวมในภาพที่ 12



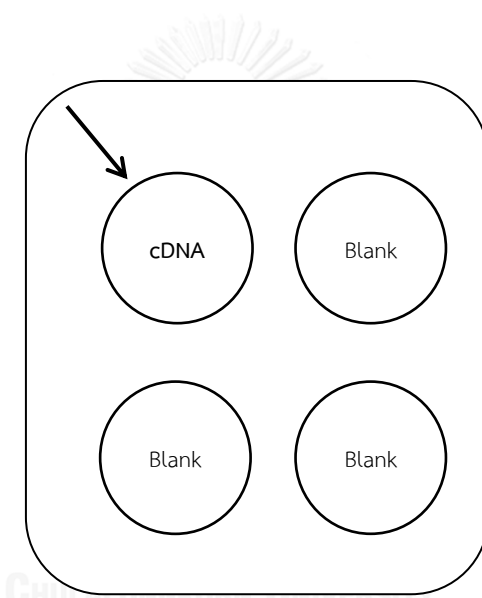
ภาพที่ 12 แสดงขั้นตอนของการโคลน hTNF- α cDNA เข้าใน pHAGE vector

(3.3.4.2 การสังเคราะห์ hTNF- α cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction, 3.3.4.3 การเตรียม pENTR-Scr/TOPO vector และ hTNF- α (insert) เพื่อปฏิกิริยา ligation, 3.3.4.4 การ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (hTNF- α cDNA), 3.3.4.5 การโคลนนิ่งด้วยวิธี Gateway LR clonase ระหว่าง vector (pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH) กับ insert (pENTR-hTNF- α cDNA))

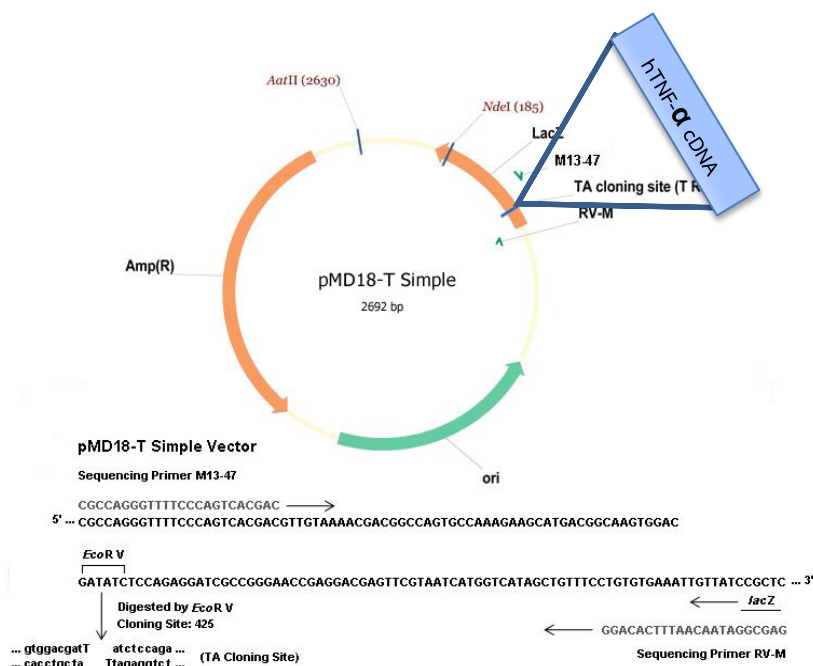
3.3.4.1 การตรวจสอบ Human TNF- α cDNA บริสุทธิ์ที่ได้มาจากบริษัทผู้ผลิต

pMD18-T-hTNF- α ซื้อมาจาก Sino Biological Inc., Beijing, China โดย hTNF- α cDNA ถูกแทรกเข้าไปอยู่ในตำแหน่ง TA cloning site บน pMD18-T vector ซึ่งบน vector นี้จะมี ยีนดีออกยา Ampicillin สำหรับบนเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 14 ทางบริษัทได้เคลือบพลาสติกดีเอ็นเอไว้บนกระดาษกรอง ดังแสดงในภาพที่ 13 ทำการแยกพลาสติกดีเอ็นเอออกจากกระดาษกรอง โดยการตัดกระดาษกรองเป็นรูปวงกลมตามเส้นที่บสีดำ นำกระดาษกรองส่วนที่ตัดได้ไปใส่ในหลอด 1.5 mL เติมน้ำบริสุทธิ์เป็นตัวทำละลาย (eluent) 175 μ L จากนั้นนำหลอดที่มีกระดาษกรองไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าหลอดทุกๆ 10 นาทีจนครบเวลา จากนั้นนำมาวัดปริมาณของพลาสติกดีเอ็นเอที่แยกออกมาได้โดยใช้เครื่องวัด nanodrop ที่ O.D 260 nm นำพลาสติกดีเอ็นเอ

เอทีได้ไปเพิ่มจำนวน โดยวิธีทรานฟอร์มเมชัน ตามการทดลองที่ 3.3.1 และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย ตามการทดลองที่ 3.3.2 เช่นเดียวกับกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างอนุภาคของ retro-lentiviral แต่แตกต่างกันที่การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่ง pMD18-T-hTNF- α จะใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด TaqI จากลำดับเบสสายดีเอ็นเอของ pMD18-T-hTNF- α ขนาดที่ควรจะได้ คือ 410, 536, 1005, และ 1,444 วิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส บนความเข้มข้นของ อะกาโรส เจล 1 เปอร์เซ็นต์ (อะกาโรส 1 กรัม ใน TAE buffer 100 mL) รั้นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลา นำเจลไปดูขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation (gel doc) systems ซึ่งเปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิด โดยใช้ 100bp และ 1kb DNA Ladder เป็นตัวบ่งชี้



ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของ TNF- α cDNA บนกระดาดาชกรอง



ภาพที่ 14 แสดง plasmid map ของ pMD18-T vector

(ดัดแปลงจาก <http://www.sinobiological.com/Vector-pMD18-T-Simple-a-1635.html>)

3.3.4.2 การสังเคราะห์ hTNF- α cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

เพื่อเพิ่มจำนวนของ hTNF- α cDNA ให้มากขึ้น และมีการเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปลาย 5' และ 3' ของชิ้นส่วน hTNF- α cDNA ให้เหมาะสมกับการโคลนเข้าไปใน pENTR/TOPO ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Platinum® Pfx DNA Polymerase ดังแสดงในตารางที่ 3 ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ ประกอบด้วย pre-denaturation 98 องศาเซลเซียส 3 นาที, denaturation 98 องศาเซลเซียส 30 วินาที, annealing 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที, และ post-extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที โดยใช้ TNF-Rev-Ascl primer (5'-GAT CGG CGC GCC AGG GCA ATG ATC CCA AAG T-3') และ TNF-Fwd-NotI-KZ primer (5'-GAT CGC GGC CGC GAC ACC ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC-3') โดยจะเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะไว้ที่ปลายทั้งสองด้านของ hTNF- α cDNA ซึ่งปลาย 5' เป็น NotI (GC GGC CGC) และปลาย 3' เป็น Ascl (GG CGC GCC) โดยตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองนี้ถูกเติมไว้เพื่อใช้ในการ ligation เข้ากับ pENTR/TOPO vector ตรงตำแหน่งตัดที่จำเพาะต่อกัน และมีตำแหน่งของ Kozak sequence ตรงปลาย 5' (GAC ACC) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเริ่มการ translation หลังจากทำปฏิกิริยา PCR เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะนำ PCR product หรือ hTNF- α cDNA มาวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโพรเซชัน บนความเข้มข้นของ อะกาโรส เจล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100

โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ DNA ladder 100bp เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ สำหรับ hTNF- α cDNA จะมี DNA sequence ขนาด 702 bp จะทำการตัด อะกาโรส เจล ที่มีแถบ hTNF- α cDNA เกิดขึ้น โดยการส่องผ่านด้วยแสง UV นำเจลที่ตัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) ซึ่งทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต อธิบายขั้นตอนการทำได้ ดังนี้ ตัดเจลเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอด จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก (100 mg ของเจล เติม QG Buffer 300 μ L) เติม QC Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล เพื่อชะล้างทุกอย่างออกจากอะกาโรส เจล จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เขย่าหลอดทุกๆ 3 นาที เพื่อช่วยให้เจลละลายได้ดีขึ้น เมื่อเจลละลายดี สารละลายจะเหมือนกับสีของ QG Buffer เติม isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล (ถ้าเจลหนัก 100mg เติม isopropanol 100 μ L) และผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นนำ column วางบนหลอด ปริมาตร 2 mL ทำการ bind DNA โดยการดูดสารตัวอย่างใส่ลงใน column 800 μ L แล้วนำไปปั่น 13500 rpm 1 นาที นำส่วนใสในหลอดเททิ้งไป แล้วเติม QG buffer ลงใน column และปั่น 13500 rpm 1 นาที ล้างดีเอ็นเอด้วย PE buffer 750 μ L นำไปปั่น 13500 rpm 1 นาที แล้วนำไปปั่นแห้งที่ 13500 rpm 1 นาที จากนั้นเปลี่ยนหลอดที่อยู่ใต้ column เป็นหลอดใหม่ และทำการแยกดีเอ็นเอออกจาก column ย้ายไปในหลอดใหม่โดยใช้น้ำบริสุทธิ์เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำมาวัดปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกออกมาได้โดยใช้เครื่องวัด nanodrop ที่ O.D 260 nm แล้วนำ hTNF- α cDNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้งเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ hTNF- α cDNA (ปฏิกิริยา PCR สำหรับการสังเคราะห์ GFP cDNA มีวิธีการทำที่คล้ายคลึงกับการทำปฏิกิริยา PCR ของ TNF- α)

ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR ของ hTNF- α

Total volume (50 μ L)	Primer 1 μ M
Template (50 ng)	1 μ L
Forward primer (10mM)	2 μ L
Reverse primer (10mM)	2 μ L
10 mM dNTP	1.5 μ L
10X Amp	10 μ L
50 mM MgSO ₄	1 μ L
10X Enhance buffer	5 μ L
Platinum® Pfx DNA Polymerase	1 μ L
dH ₂ O	26.5 μ L

3.3.4.3 การเตรียม pENTR/TOPO vector และ hTNF- α (insert) เพื่อปฏิกิริยา ligation

pENTR-Scr/TOPO ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl* 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จะพบแถบเกิดขึ้นสองขนาดคือ 2500 bp และ 1800 bp จากนั้นตัดเจลเฉพาะที่ขนาด 2500 bp ทำให้บริสุทธิ์ ด้วย QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) และเพื่อป้องกันการตัดแบบไม่สมบูรณ์ของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้เกิด self-ligation ระหว่างเวกเตอร์ กับเวกเตอร์ โดยจะนำ pENTR/TOPO ขนาด 2500 bp และ hTNF- α cDNA ขนาด 702 bp ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl* 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเฉพาะ pENTR/TOPO vector ขนาด 2500 bp มา dephosphorylation ด้วย Thermo sensitive fast Alkaline phosphatase (Thermo scientific) ดังแสดงในตารางที่ 4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำ pENTR/TOPO ขนาด 2500 bp ที่ ภายหลังการ dephosphorylated และ hTNF- α cDNA หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปทำให้บริสุทธิ์ ด้วย QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) จากนั้นก็นำไปตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เพื่อตรวจสอบขนาดของ insert (TNF- α PCR product, 702 bp) และ vector (pENTR/TOPO, 2500 bp) โดยใช้ 1kb และ 100bp DNA Ladder เป็นตัวบ่งชี้

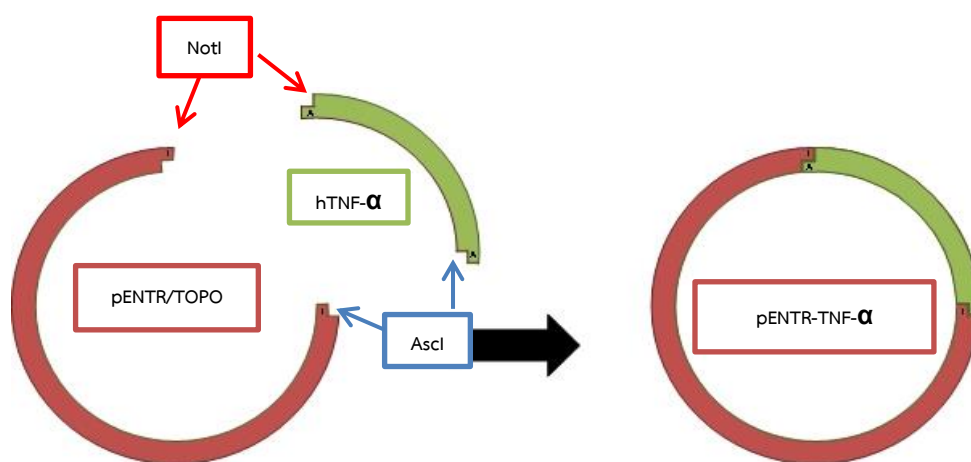
ตารางที่ 4 แสดงการทำปฏิกิริยา dephosphorylation

Total volume	50 μ L
Alkaline phosphatase	1 μ L
10X Alkaline phosphatase buffer	5 μ L
pENTR/TOPO ขนาด 2.5 Kb ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>NotI</i> และ <i>Ascl</i> (1 μ g)	30 μ L
dH ₂ O	14 μ L

3.3.4.4 การ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (hTNF- α cDNA)

เพื่อให้ pENTR/TOPO, 2.5 Kb กับ hTNF- α cDNA เชื่อมกันเป็นพลาสมิดเส้นสายเดียวกัน ทำได้โดยการเชื่อมตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะระหว่างชนิด *NotI* บน pENTR/TOPO, 2.5 Kb กับชนิด *NotI* บน hTNF- α cDNA และชนิด *Ascl* บน pENTR/TOPO, 2.5 Kb กับชนิด *Ascl* บน hTNF- α cDNA ดังแสดงในภาพที่ 15 โดยใช้ T4 ligase แสดงดัง

ตารางที่ 5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทรานฟอร์มเมชันในเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ HIT DH5 α จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน LB agar plate ที่มียา Kanamycin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เพื่อทำการเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดคือยา Kanamycin ขึ้นบน LB agar เท่านั้น ทำการเลือกโคโลนีที่ขึ้นบน plate ลงใน LB broth ที่มี Kanamycin บ่มเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดคือยาเพิ่มจำนวนมากพอ



ภาพที่ 16 แสดงปฏิกิริยาการ ligation ระหว่าง pENTR-TOPO vector และ hTNF- α

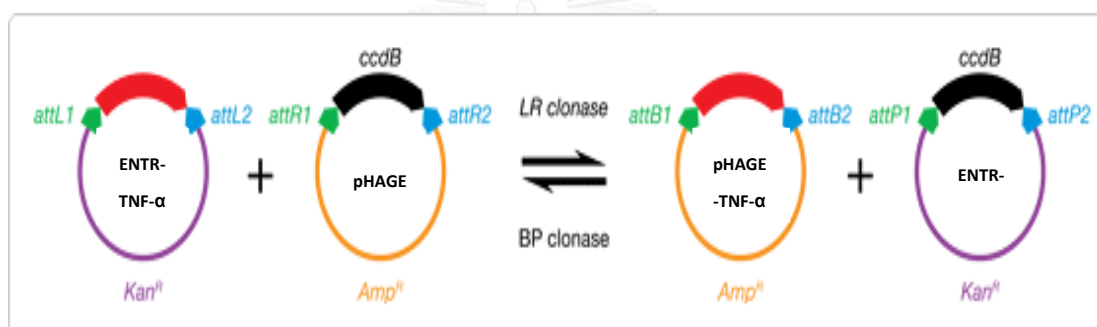
(ดัดแปลงจาก <http://www.di.uq.edu.au/sparqligation>)

ตารางที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการ ligation ระหว่าง pENTR-TOPO vector และ hTNF- α

Total volume (10 μL)	A (1:1)	B (1:1.5)	C (negative control)
Vector (pENTR-TOPO) (20 - 100 ng)	3	3	3
Insert (hTNF- α)	3	4.5	-
5X buffer	2	2	2
T4 ligase	1	1	1
dH ₂ O	1	-	4

จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ QIAprep Spin miniprep kit (QIAGEN) ทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต แล้วนำพลาสมิดที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *AscI* สุดท้ายวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ 1kb DNA ladder เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่ต้องการแล้ว เก็บเป็น stock culture โดยนำเชื้อแบคทีเรีย (competent cells) ที่มีพลาสมิดใน LB Broth ผสมใน 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส และนำเชื้อแบคทีเรียที่เหลือไปสกัดด้วย QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN) ทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต เรียกชื่อพลาสมิดที่ได้จากการโคลนนิ่งนี้ว่า “pENTR-TNF- α ”

3.3.4.5 วิธีการโคลนนิ่งด้วย Gateway Technology



ภาพที่ 17 แสดงหลักการทำงานของระบบ Gateway cloning (ดัดแปลงภาพจาก <https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/clonase-enzyme.html>)

Gateway Technology ออกแบบมาให้มีความง่ายในการโคลนนิ่ง โดยทำการโคลนดีเอ็นเอที่สนใจ คือ hTNF- α เข้าสู่ Gateway entry vector คือ pENTR/TOPO และทำการย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก entry vector นี้ไปสู่ Destination vector คือ pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH โดยอาศัย bacteriophage lamda-based site-specific recombinant ที่เรียกว่า att LR site ดังแสดงในภาพที่ 16

โดยจะใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ LR clonase ที่เคลื่อนย้ายชิ้นส่วนของ hTNF- α บน pENTR/TOPO-hTNF- α ให้ย้ายเข้าสู่ pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH ตามขั้นตอนของ Invitrogen ผู้ผลิต ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นนำไปทรานฟอร์มเมชันในเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ HIT DH5 α

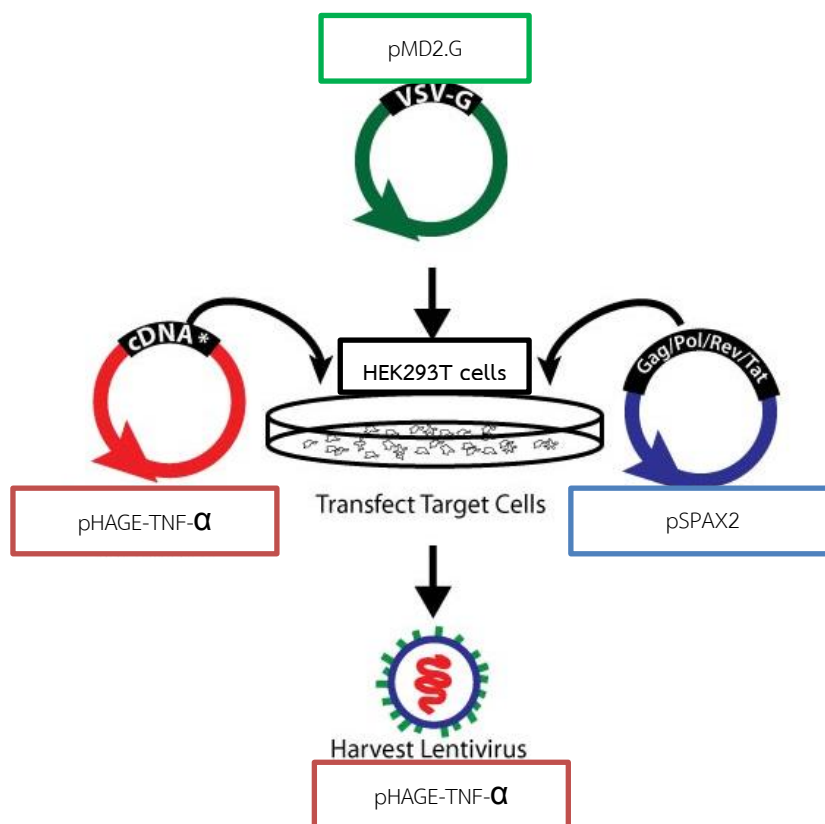
เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน LB agar plate ที่มียา Ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/mL เพื่อทำการเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิด คือยา Ampicillin ขึ้นบน LB agar เท่านั้น เลือกโคโลนีที่ขึ้นบน plate ลงใน LB broth ที่มี Ampicillin บ่มเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดคือยาเพิ่มจำนวนมากพอ จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ QIAprep Spin miniprep kit (QIAGEN) ทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต แล้วนำพลาสมิดที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ชนิด NotI และชนิด Ascl บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโพรเซส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ 1kb DNA ladder เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ และสุดท้ายนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธี direct DNA sequencing เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสของ insert ที่อยู่ใน vector เป็น hTNF- α cDNA ที่ถูกต้อง โดยใช้ pHAGE sequence primer 5' – CTG GGA CGT CGT ATG GGTA-3' และเมื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่ต้องการแล้ว เก็บเป็น Stock culture โดยนำเชื้อแบคทีเรีย (competent cell) ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอใน LB Broth ผสมใน 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส และนำเชื้อแบคทีเรียที่เหลือไปสกัดด้วย QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN) ทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต เรียกชื่อพลาสมิดที่ได้จากการโคลนนิ่งนี้ว่า “pHAGE-TNF- α ”

ตารางที่ 6 แสดงปฏิกิริยา Gateway LR Clonase II

Total volume 6 µL	A (75 ng)	B (100 ng)
ENTR (75, 100 ng)	1 µL	1 µL
DEST (150 ng)	1 µL	1 µL
DW	4 µL	4 µL
5X LR-ClonaseII enzyme mix	1 µL	1 µL
บ่มที่ อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง		
Proteinase K	0.5 µL	0.5 µL
บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที		

3.4 การผลิตอนุภาค lenti-viral โดยใช้เซลล์ HEK293T

หลักการของการผลิตอนุภาคไวรัส second generation โดยใส่ packaging vector (pSPAX2) ร่วมกับ envelope vector (pMD2.G) และ transfer vector ในการประกอบตัวเป็นไวรัสที่มียีนที่ต้องการ คือ pHAGE-hTNF- α โดยพลาสมิดเหล่านี้จะถูกประกอบเป็นอนุภาคไวรัสในเซลล์ HEK293T (Human embryonic kidney cell line 293T) ดังแสดงในภาพที่ 17 โดยจะใช้ X-Treme gene HP transfection ซึ่งมีประสิทธิภาพเป็นตัวช่วยในการถ่ายโอน พลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย



ภาพที่ 18 แสดงขั้นตอนการผลิตอนุภาค lentivirus ภายในเซลล์ HEK293T

(ดัดแปลงจาก Addgene, <https://www.addgene.org/viral-vectors/lentivirus/lenti-guide/>)

3.4.1 วิธีการผลิตอนุภาค Lentivirus ในเซลล์ HEK293T

เพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T 1×10^5 เซลล์ต่อหลุมใน 6-well plates บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณที่ 50-70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใส่ lentiviral construct DNA : psPAX2 : pMD2.G ในอัตราส่วน = 1:2:2 ผสมลงใน Opti-MEM1 reduced serum medium จากนั้นทำการเติม X-TremeGENE HP transfection reagent : DNA construct ในอัตราส่วน

3.5:1 ดังแสดงในตารางที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อเป็นตัวช่วยในการส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293T ระหว่างรอเวลาให้นำ 6-well plates ที่เลี้ยงเซลล์ HEK293T มาทำการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อน จากนั้นเมื่อครบเวลานำส่วนผสมค่อยๆ หยดลงในหลุมที่มีเซลล์ HEK293T หลุมละ 205 μL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วบ่มไว้จนครบ 48 ชั่วโมง จึงเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ครั้งแรกที่มีอนุภาค lentivirus อยู่ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ลงใน 6-wells plate บ่มไว้อีกจนครบ 72 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์รอบที่สอง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ทั้งสองครั้งมากรองด้วย syringe sterile filter PVDF membrane ขนาด 0.45 μM (89) และนำมาแบ่งใส่หลอดหลอดละ 1 mL เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมในวิธีการผลิตอนุภาค lenti-virus

DNA construct	DNA (μg)	pHAGE-TNF- α (μL)	pHAGE-GFP (μL)
Lenti-viral construct		1.11	0.69
pSPAX2	1.00	0.54	0.54
pMD2.G	0.55	0.5	0.5
DMEM-SF		200	200
X-treme Gene HP		3.5	3.5

3.5 การถ่ายโอนพลาสมิดด้วย lenti-virus เข้าสู่ HaCaT cells

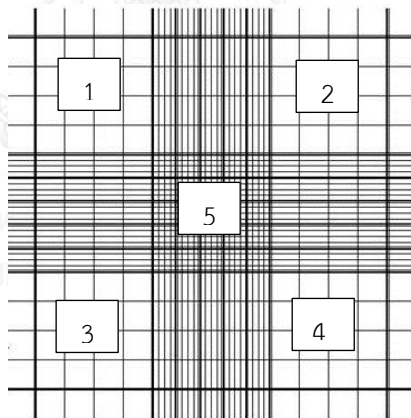
เพื่อนำอนุภาค lentivirus ที่ผลิตขึ้นมา ถ่ายโอนพลาสมิดที่ต้องการ คือ pHAGE-hTNF- α เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย คือเซลล์ HaCaT จากนั้นจะทำการคัดเลือกเซลล์ HaCaT ที่มีพลาสมิดที่ต้องการ จะทำการคัดเลือกโดยใช้ความเข้มข้นของยา Geneticin (G418) ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด เนื่องจากใน พลาสมิดของ pHAGE-hTNF- α จะมียีนดื้อยา Geneticin (G418) อยู่ ดังนั้นเซลล์ HaCaT ที่มีชีวิตและเจริญเติบโตต่อไปได้นั้นภายในเซลล์จะต้องมีพลาสมิด pHAGE-hTNF- α

3.5.1 การคัดเลือกเซลล์ HaCaT ที่มี lentiviral DNA construct (pHAGE-TNF- α)

เพื่อทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ HaCaT ที่มี lentiviral DNA construct ซึ่งยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Geneticin หรือ G418 เป็นยาปฏิชีวนะ aminoglycoside ที่โครงสร้างคล้ายกับ Gentamicin G418 ยับยั้งการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ โดยยับยั้งในขั้นตอนการต่อเป็นสายยาว

(elongation) ทั้งในโปรคาริโอติก และยูคาริโอติกเซลล์ เซลล์ที่มีการติดยาของ G418 จะต้องมีพลาสมิดที่มียีนดื้อยาในกลุ่มของ Neomycin อยู่ภายในเซลล์ (90, 91)

3.5.1.1 การหาความเข้มข้นของยา Geneticin (G418) ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด ความเข้มข้นเริ่มต้นของยา Geneticin (G418) เท่ากับ 50 mg/mL ละลายใน HEPES buffer 100 mM (pH 7.4) โดยเซลล์เพาะเลี้ยงทั่วไปจะมีความไวต่อความเข้มข้นของยา Geneticin (G418) ระหว่าง 400-1000 $\mu\text{g/ml}$ (ข้อมูลจากบริษัท invitrogen) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ จะปรับเลือกความเข้มข้นของยา G418 ตามความเหมาะสมกับเซลล์ HaCaT ที่ใช้ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT 1×10^5 เซลล์ต่อหลุมใน 6-well plates ปกติวันที่ 37 องศาเซลเซียส, คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 50-70% วันต่อมาทำการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยา G418 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในแต่ละหลุม 100, 300, 500, 700 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 8 และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน ต่อหนึ่งครั้ง ใช้เวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นเมื่อครบเวลาตามกำหนด นำเซลล์ HaCaT ในแต่ละหลุมมานับเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ trypan blue ในการย้อมเซลล์ นับตามตำแหน่งที่แสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 19 แสดงตำแหน่งในการนับเซลล์

(ภาพจาก <http://www.nexcelom.com/Products/Disposable-Hemocytometer.html>)

คำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

จำนวนเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่นับ 10 ช่อง/5 x dilution factor x 10^4

จำนวนเซลล์ทั้งหมด = จำนวนเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร x ปริมาณทั้งหมด

เมื่อนับจำนวนเซลล์ทุกหลุมเสร็จเรียบร้อยแล้ว จะเลือกความเข้มข้นของยา G418 ที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด เพื่อที่จะนำความเข้มข้นของยา G418 ไปใช้ในการคัดเลือกเซลล์ HaCaT-TNF- α ในการศึกษาต่อไป

เซลล์ HaCaT

Untreated	G418 100 $\mu\text{g/ml}$	G418 300 $\mu\text{g/ml}$
G418 500 $\mu\text{g/ml}$	G418 700 $\mu\text{g/ml}$	G418 1000 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 8 แสดงความเข้มข้นของ Geneticin (G418) ใน 6-well plates

3.5.1.2 ขั้นตอนถ่ายโอนพลาสมิดด้วย lenti-virus เข้าสู่เซลล์ HaCaT

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT 1×10^5 เซลล์ใน cell culture dish 35x10 มิลลิเมตร บ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 50 -70% จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออก นำอนุภาค lentivirus ที่มีพลาสมิด pHAGE-hTNF- α ที่เก็บได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ (การทดลองที่ 4.1) ออกจาก -80 องศาเซลเซียส ละลายน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาค lentivirus จนกลายเป็นของเหลว ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นวางบ่มไว้ในถังน้ำแข็งจนกว่าจะนำมาใช้งาน จะใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาค lentivirus ปริมาตร 1 mL ต่อ 1 cell culture dish 35x10 mm ผสมกับ polybrene 8 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 0.8 μL จากนั้นบ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (89) แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ DMEM เพิ่มอีก 1 mL บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ DMEM + 10% FBS อีกครั้งและบ่มไว้ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยา Geneticin (G418) ที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด หลุมละ 2 mL และใช้น้ำเลี้ยงเซลล์นี้เลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α หมั่นเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนครบ 14 วัน เมื่อครบเวลาทำการย้ายเซลล์จาก cell culture dish ไปใส่ใน flask แล้วเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นยา G418 เหลือครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตาย เพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโต จะได้เซลล์ HaCaT-TNF- α เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.6 การเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline (Dox) ให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α

เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำของ Doxycycline ที่ทำให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α โดยการแสดงออกของโปรตีน TNF- α จะขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำของ Doxycycline ซึ่งสามารถควบคุมได้

3.6.1 ศึกษาความเข้มข้นของ Doxycycline ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่เหมาะสมที่สุด

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α หลุมละ 2×10^5 เซลล์ต่อหลุมใน 6-well plate บ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำโดยใช้ Doxycycline ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 1000, 2000, และ 3000 ng/mL) (92) และมีเซลล์ HaCaT-GFP เหนี่ยวนำด้วย doxycycline 0, 3000 ng/mL ใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) บ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการ lyse เซลล์ ด้วย RIPA lysis buffer (ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1.0% Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) 70 μ L ผสมกับ 7X Proteinase inhibitor Cocktail I (หรือ PIs ประกอบด้วย serine proteases, esterases, cysteine proteases, metalloproteases, trypsin-like proteases ในอัตราส่วน PIs : RIPA buffer เท่ากับ 1 : 10 เพื่อการป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์ หลุมละ 100 μ L ใน 6-well plate แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาใช้ cell scraper ขูดเซลล์ในแต่ละหลุมเก็บใส่ในหลอด 1.5 mL บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ lysate บั่นที่ 8000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสในหลอดใหม่ เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ต่อไป

เซลล์ HaCaT-GFP

Control -Dox	+ Dox 3000 ng/mL
-----------------	---------------------

เซลล์ HaCaT-TNF- α

Control -Dox	+ Dox 2000 ng/mL
+ Dox 500 ng/mL	+ Dox 3000 ng/mL
+ Dox 1000 ng/mL	

ตารางที่ 9 แสดงการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำ Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT ใน 6-well plate

3.6.2 ศึกษาหาระยะเวลาในการใช้ Doxycycline เหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α และ HaCaT-GFP หลุมละ 2×10^5 เซลล์ใน cell culture dish 35x10 มิลลิเมตร ทั้งหมด 6 plate บ่มไว้ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเหนี่ยวนำโดยใช้ Doxycycline ที่ความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ TNF- α มากที่สุด จากการทดลองที่ 3.6.1 และบ่มเซลล์ไว้เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ใช้เซลล์ HaCaT-GFP เป็นกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 19 กระตุ้นด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับเซลล์ HaCaT-TNF- α บ่มไว้ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตามที่กำหนดไว้ เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ lysate ตามการทดลองที่ 3.6.1 เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ต่อไป

เซลล์ HaCaT-GFP



เซลล์ HaCaT-TNF- α



ภาพที่ 20 แสดงการศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม Doxycycline ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT

3.6.3 ตรวจสอบการเหนี่ยวนำของ Doxycycline ที่มีการผลิตโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT

เพื่อศึกษาปริมาณของโปรตีน TNF- α ที่ผลิตออกมา หลังจากมีการเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำที่เหมาะสม โดยการศึกษาปริมาณโปรตีน TNF- α จะแบ่งเป็นสองแบบ คือ 3.6.3.1 ศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT โดยวิธี western blot และ 3.6.3.2 ศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ HaCaT โดยจะใช้วิธี ELISA

3.6.3.1 ศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT โดยวิธี Western blot

หลักการของ Western blot เป็นเทคนิคที่ใช้บอกได้ทั้งคุณลักษณะและชนิดของโปรตีน (characterization and identification) เป็นวิธีการแยกโปรตีนในเจลและถ่ายโอนไปยังเมมเบรน โดยโปรตีนจะถูกจับและยึดติดอยู่บนเมมเบรน และสามารถตรวจสอบโปรตีนโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ งานวิจัยในครั้งนี้สนใจโปรตีน TNF- α

3.6.3.1.1 วัดความเข้มข้นของโปรตีนในเซลล์ lysate ด้วยวิธี Bradford

นำเซลล์ lysate จากการทดลองที่ 3.6.1 และ 3.6.2 ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford บน 96-well plate โดยมีโปรตีน standard คือ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้นระหว่าง 0.05 -0.5 mg/mL และมีน้ำกลั่น เป็น blank และ lysis buffer อัตราส่วน 1:15 (RIPA buffer + Pis) เป็น sample blank หยอด standard, สารตัวอย่าง (เซลล์ lysate) และ blank หลุมละ 10 μ L ทำสองซ้ำ (duplicate) จากนั้นเติมน้ำยา Bradford dye (ประกอบด้วย

Bradford dye, phosphoric acid, methanol) 200 μ L บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-30 นาที นำไปวัดโปรตีนด้วย microplate reader ที่ O.D. 595 nm เมื่อได้ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจะนำไปคำนวณ เพื่อกำหนดความเข้มข้นที่จะนำไปใช้โหลดใน SDS-PAGE ให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนในทุกตัวอย่างเท่ากัน คือจะใช้ที่ความเข้มข้น 15 μ g ปริมาตร 15 μ L จากนั้นเติมสี่ 4X Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 1% LPS, 0.005% Bromophenolblue) ผสมกับ β -mercaptoethanol ในอัตราส่วน 10 : 1 ปริมาตร 5 μ L และอัตราส่วนระหว่าง โปรตีน ตัวอย่าง : 4X Laemmli เท่ากับ 4 :1 ก่อนที่จะนำสารตัวอย่างไปโหลดในเจลจะต้องนำไป heat ที่ 95 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้โปรตีนในสารตัวอย่างเสียสภาพเป็น secondary structure

3.6.3.1.2 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างโดย SDS เป็นสาร ionic detergent ที่จะเข้าไปจับกับโปรตีนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและกลายเป็นประจุลบ จึงทำให้การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จะเป็นการแยกตามขนาดโมเลกุล ในที่นี้ขนาดของ hTNF- α เท่ากับ 17 kDa (93) โดยจะใช้ 12 เปอร์เซ็นต์ separating gel ประกอบด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel, H₂O, 1.5 M Tris pH 8.8, 10 เปอร์เซ็นต์ SDS, 10 เปอร์เซ็นต์ Ammonium persulfate และ Tetramethylethylenediamine (TEMED) ตามลำดับ และ 6 เปอร์เซ็นต์ stacking gel ประกอบด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel, H₂O, 0.5 M Tris pH 6.8, 10 เปอร์เซ็นต์ SDS, 10 เปอร์เซ็นต์ Ammonium persulfate และ TEMED ตามลำดับ ทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ด้วย 1X Running buffer มีส่วนผสมของ Tris 1.5 g, Glycine 7.2 g, 20 เปอร์เซ็นต์ SDS 5 mL ปริมาตรรวม 1000 mL การรัน stacking gel ใช้ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และ separating gel ใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที มีกลุ่มควบคุมภายในการทดลอง (internal control) คือ GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene ขนาดเท่ากับ 37 kDa ใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน (94, 95) และกลุ่มควบคุมบวก (positive control) คือ standard TNF- α 5 ng/ μ L โดยเทียบขนาดโปรตีนกับ Spectra® Multicolor broad range protein ladder เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของโปรตีน (10-260 kDa)

3.6.3.1.3 การย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ polyvinylidene fluoride (PVDF) เมมเบรน (protein transfer)

เป็นการย้ายโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย SDS-PAGE แล้วย้ายมาสู่ PVDF เมมเบรน โดย PVDF เมมเบรนจะต้องทำการ activated โดยแช่ลงใน methanol 5 นาที ก่อนจะนำไปใช้ย้ายโปรตีนจากเจล ใช้ Transfer buffer ผสมจาก 10X running buffer 100 mL, 10 เปอร์เซ็นต์ methanol 100 mL, 20 เปอร์เซ็นต์ SDS 0.5 mL ปริมาตรรวม 1000 mL เป็นบัฟเฟอร์ใช้ในการเคลื่อนย้ายโปรตีน จะต้องแช่เย็น จากนั้นประกอบอุปกรณ์การย้ายโปรตีน โดยวางฟองน้ำ, กระดาษกรอง, แผ่นเจล, เมมเบรน, กระดาษกรอง, ฟองน้ำ ตามลำดับ ใช้เวลาในการย้ายโปรตีน 1.30 – 2 ชั่วโมง ที่ 150 mAmp ระหว่างที่ทำการย้ายโปรตีนควรอยู่ในที่เย็น

3.6.3.1.4 Blocking

เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific โปรตีนอื่นๆ เข้ามาจับกับเมมเบรน จะช่วยลดการเกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ เนื่องจากโปรตีนที่ถูกเคลื่อนย้ายจากเจลแล้วจะจับอยู่บนเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ว่างของเมมเบรนที่โปรตีนไม่ได้เข้าไปจับ ดังนั้นเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนตัวอื่นหรือแอนติบอดีกับเมมเบรน จึงต้องทำการ blocking ด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ blotting grade blocker ใน Tris buffer saline tween-20 (TBS-T) (5 M NaCl, 1 M Tris HCl pH 7.4, 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของเมมเบรน ยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว ใช้เวลาในการ block 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย Tris buffer saline tween-20 (TBS-T) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3.6.3.1.5 การติดตามผลแบบ Two-step detection

เป็นการใช้แอนติบอดีเข้าจับโปรตีนที่มีความจำเพาะ โดยจะใช้ TNF- α Rabbit monoclonal antibody อัตราส่วน 1:1000 จับกับโปรตีน TNF- α และ Anti-GAPDH antibody อัตราส่วน 1:10000 เป็น loading control จับกับ GAPDH โดยละลายแอนติบอดีทั้งสองชนิดใน 5 เปอร์เซ็นต์ BSA+ TBS-T บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำการล้างเพื่อชะ non-specific binding ออกไป โดยใช้ TBS-T ล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นใช้ Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody อัตราส่วน 1:10000 เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งขั้นตอนนี้ Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody จะเข้าจับกับ TNF- α Rabbit monoclonal antibody หรือ Anti-GAPDH antibody อย่างจำเพาะ สามารถติดตามการเรืองแสงได้

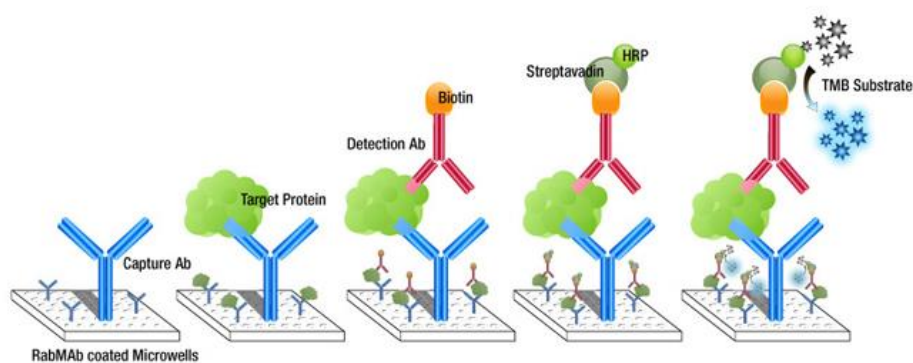
3.6.3.1.6 การวิเคราะห์ผล

เมื่อครบเวลา ล้างเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เตรียมสารละลาย developer 15 mL และสารละลาย fixer 15 mL ผสมน้ำบริสุทธิ์อย่างละ 65 mL ขึ้นตอนต่อจากนี้ จะทำการทดลองในห้องมืด โดยวิธี Immuno chemiluminescence detection เตรียม substrate working solution Pierce® ECL Western Blotting ในอัตราส่วน peroxide : luminal (1:1) ใช้ติดตามผลการเรืองแสง จะนำเมมเบรนจุ่มลงไป substrate จากนั้นนำเมมเบรนวางบนแผ่นฟิล์มใส นำแผ่นฟิล์ม X-ray มาประกบลงบนแผ่นเมมเบรนที่เตรียมไว้ ซึ่งเวลาในการประกบจะขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีน ถ้าปริมาณน้อยจะใช้เวลาการประกบนานขึ้น แต่ไม่ควรเกิน 15 นาที เนื่องจาก substrate จะเริ่มหมด ทำให้ภาพจางลง หลังจากประกบแผ่นฟิล์มแล้วต้องล้างฟิล์ม โดยนำฟิล์มไปแช่ในสารละลาย developer เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายแผ่นฟิล์มมาล้างน้ำในภาตล้าง 1 นาที แล้วแช่แผ่นฟิล์มลงในสารละลาย fixer เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายแผ่นฟิล์มมาล้างน้ำสุดท้าย 1 นาที แล้วตากฟิล์มให้แห้ง สำหรับการทำให้ western blot จะทำการทดลองทั้งหมดสามครั้ง และใช้ GAPDH เป็น loading control จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณผลแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น (Quantitate band) โดยใช้เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย GeneTools (Image Analysis Software) เพื่อคำนวณหาความเข้มของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น สำหรับการวิเคราะห์ผลของปริมาณโปรตีน เริ่มจากการคำนวณปริมาณแถบโปรตีน แต่ละแถบของ loading control (GAPDH) ว่ามีปริมาณเท่ากันหรือไม่ หากมีปริมาณเท่ากันจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณแถบโปรตีนของ TNF- α ที่ทำการทดลองทั้งสามครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น

3.6.3.2 ศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ HaCaT โดยใช้ Human TNF- α ELISA development kit

ใช้หลักการ sandwich ELISA โดยจะทำการเคลือบแอนติบอดีต่อ hTNF- α ไว้ที่ก้นหลุมของ 96 well plate จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการจะตรวจหาโปรตีน hTNF- α (แอนติเจน) ใส่ลงไป ในหลุม หากในน้ำเลี้ยงเซลล์มีโปรตีน hTNF- α ที่จำเพาะกับแอนติบอดีต่อ hTNF- α ที่เคลือบไว้ที่ก้นหลุม ก็จะถูกจับ และยึดไว้ที่ก้นหลุม จากนั้นทำการตรวจสอบโดยใช้แอนติบอดีอีกตัวที่จำเพาะกับโปรตีน hTNF- α คล้ายกับแอนติบอดีตัวแรก เพียงแต่ส่วน Fc ของแอนติบอดีอีกตัวจะมีเอนไซม์ peroxidase เพื่อใช้ในการย่อย substrate หากในหลุมมีการจับกันเป็น complex ดังกล่าวจะทำให้

เกิดการเปลี่ยนสีของ substrate เกิดขึ้น ดังแสดงใน ภาพที่ 20 ทำให้สามารถตรวจสอบปริมาณการ แสดงออกของโปรตีนได้ ตามวิธีการทดลองดังต่อไปนี้



ภาพที่ 21 แสดงหลักการของ sandwich ELISA

(ZAP-70 Total ELISA Kit antibody RabMAb® ภาพจาก Epitomics, Inc.)

3.6.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างในการศึกษาปริมาณโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี ELISA

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α และ HaCaT-GFP หลุมละ 1×10^5 เซลล์ต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ DMEM 700 μ L ใน 24-well plate บ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำโดยใช้ doxycycline ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 0, 1000, 2000 และ 3000 ng/mL และ เซลล์ HaCaT-GFP เหนี่ยวนำด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้น 0 และ 3000 ng/mL ใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบ บ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ตามเวลาที่กำหนด หลุมละ 700 μ L นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ต่อไป

3.6.3.2.2 ขั้นตอนการศึกษาปริมาณโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี ELISA

เคลือบ 96-well ELISA plate ด้วย 1 μ g/mL capture antibody (antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α + 2.5mg D-mannitol) หลุมละ 100 μ L บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้าง ELISA plate ด้วย wash buffer (Tween-20 0.05 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS)

300 μ L ล้างทั้งหมด 4 ครั้ง จากนั้นเติม block buffer (BSA 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS) 300 μ L นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง ELISA plate ด้วย wash buffer จากนั้นละลาย Human TNF- α standard ที่ความเข้มข้น 0-2 ng/mL ใน diluent (Tween-20 0.05 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS ที่มี BSA 0.1 เปอร์เซ็นต์) และ สารตัวอย่าง (น้ำเลี้ยงเซลล์ที่กระตุ้นด้วยความเข้มข้นของ Doxycycline และระยะเวลาต่างๆ กัน) ใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline เป็น sample blank โดยจะหยอดสารตัวอย่าง, standard และ blank หลุมละ 100 μ L โดยจะทำสามซ้ำ (triplicate) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วย wash buffer 4 ครั้ง จากนั้นเติม 0.5 μ g/mL detection antibody (biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α + 2.5mg D-mannitol) หลุมละ 100 μ L นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วย wash buffer 4 ครั้ง จากนั้นเติม avidin-HRP conjugate 1:2000 ละลายใน diluent และเติมในแต่ละหลุม หลุมละ 100 μ L นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นล้าง plate ด้วย wash buffer อีก 4 ครั้งสุดท้าย จากนั้นเติม ABTS substrate หลุมละ 100 μ L บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสี ด้วย ELISA plate reader ที่ O.D. 405 nm ต้องวัดสีที่เปลี่ยนภายใน 30 นาที และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

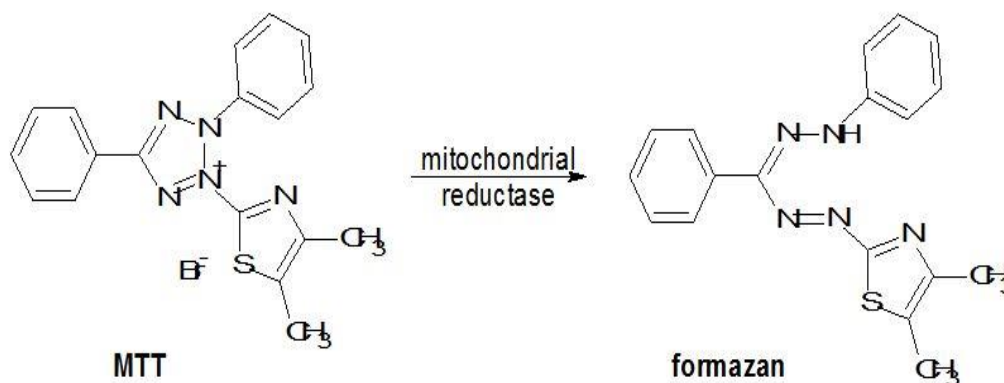
3.7 ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่เหนี่ยวนำด้วย Doxycycline ให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α เปรียบเทียบกับ HaCaT เซลล์โมเดลที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

เนื่องจากเซลล์โมเดลที่พัฒนาขึ้นมาจะนำมาใช้ทดแทนเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินที่ใช้ในปัจจุบัน จึงนำทั้งสองโมเดลมาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวภาพว่ามีความใกล้เคียงกันหรือไม่ โดยศึกษาจากการเจริญเติบโตของเซลล์ และศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยมีการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines และเกิดการส่งสัญญาณของ NF- κ B

3.7.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT กับปริมาณของโปรตีน TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline โดยใช้วิธี MTT assay

MTT assay เป็นวิธีตรวจวัดจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) และการศึกษาความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxicity) โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของสี (colorimetric assays) จากสารสีเหลืองของ MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ โดยเอนไซม์ NADPH ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan ซึ่งมีสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 21

และจำนวนของตะกอน formazan ที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต สามารถละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (96)



ภาพที่ 22 แสดงถึงปฏิกิริยารีดักชันภายในเซลล์ (reduction reaction) ของเทคนิค MTT assay

Kronek J et al., 2013 (97)

3.7.1.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT กับปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาในการกระตุ้น Doxycycline ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α

เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาในการบ่มเซลล์ HaCaT-TNF- α ด้วย Doxycycline ที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตของเซลล์แบบ hyperproliferation

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α ลงบน 96-well plate จำนวน 2×10^3 เซลล์ต่อหลุม ทำทั้งหมด 4 plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่ Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0, 1000, 2000, และ 3000 ng/mL) ให้มีการแสดงออกของ TNF- α ที่แตกต่างกันตามความเข้มข้นของ Doxycycline ทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ มีกลุ่มควบคุมลบ คือ เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย Doxycycline และกลุ่มควบคุมบวก คือเซลล์ HaCaT-TNF- α ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL บ่มไว้เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบเวลา ทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20 μ L ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบเวลา ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT ออก แล้วเติม DMSO 200 μ L เพื่อละลายผลึก formazan สีม่วงที่อยู่ในรูปสารละลาย จากนั้นนำไปปั่นที่ 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสมาใส่ 96-well plate 100 μ L แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ O.D. 550 nm และ reference filter 620 nm

จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % เซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) การทดลองดังกล่าวจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำ (triplicate)

$$\% \text{ cell viability} = 100 \times [(Abs_{(\text{treated cells})} - Abs_{(\text{blank})}) / (Abs_{(\text{untreated cells})} - Abs_{(\text{blank})})]$$

เซลล์ HaCaT (pHAGE-TNF- α)					เซลล์ HaCaT (pHAGE-GFP)				
Neg ctr.	Pos ctr.		Test		Neg ctr.	Pos ctr.		Test	
No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL	No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL
No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL	No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL
No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL	No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL
No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL	No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL
No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL	No treatment	TNF α 10 ng/mL	Dox 1000 ng/mL	Dox 2000 ng/mL	Dox 3000 ng/mL

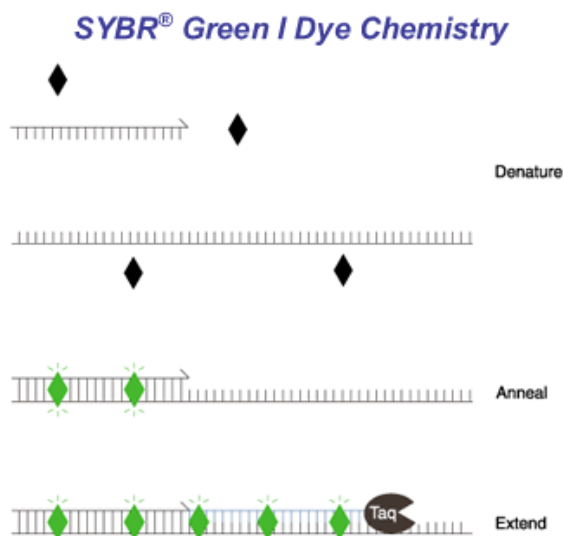
ตารางที่ 10 แสดงการทดลองบน 96-well plate

เซลล์โมเดลที่พัฒนาขึ้นมา คือเซลล์ HaCaT-TNF- α และ HaCaT-GFP ถูกเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับโมเดลที่ใช้ในปัจจุบัน คือเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL

3.7.2 ศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการหลั่งของ pro-inflammatory cytokines อาทิเช่น IL-1 β , IL-6, IL-8, KRT16, FOSL-1, MMP-9 และ NF- κ B1 โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR

Reverse transcriptase เป็นเอนไซม์สำหรับการเปลี่ยนสาย RNA ให้เป็นสาย cDNA (complementary DNA) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR (98)

Real-time PCR หรือ Quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน วิธีการ real-time PCR เป็นวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (99) สีที่ใช้ คือ SYBR-Green I Dye ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนต์ ในช่วงการ denature เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยวนั้น SYBR Green I จะยังไม่สามารถเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SYBR Green I จะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอเส้นคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แต่เมื่อรอบของ PCR กลับมาถึงช่วงการ denature อีกครั้ง SYBR Green I ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง โมเลกุลของสีจะจับได้มากขึ้นกับความยาวของ PCR product (100) ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 23 แสดงการทำงานของ SYBR-Green I Dye

(http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12)

3.7.2.1 ศึกษาผลของ Doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT โดยตรวจสอบการหลั่งของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR

เพื่อศึกษาผลของ Doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT ว่ามีผลทำให้เซลล์ HaCaT มีการอักเสบและมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของไซโตไคน์ได้หรือไม่

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ใน 6 well plate หลุมละ 3×10^5 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก คือ กระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF- α 10 ng/mL บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมลบ คือ เซลล์ HaCaT ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยสารใดๆ จากนั้นกระตุ้นด้วย IFN- γ 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 23 เมื่อครบเวลาทำการสกัด RNA ทั้งหมดจากเซลล์โดยใช้สารละลาย Genezol 1 mL ต่อหลุมใน 6-well plate คูดใส่หลอดใหม่ เติม chloroform ปริมาตร 200 μ L นำไปปั่นที่ 15000xg เป็นเวลา 15 นาที คูดส่วนใสที่มีส่วนของ RNA อยู่ ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 1 เท่าของส่วนใสที่คูดได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่น 15000xg เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนของ RNA อยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 1 mL ปั่นล้างที่ 15000xg เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 1 mL ทั้งหมดสามรอบ รอบสุดท้ายเทส่วนใสออกแล้ว ตากให้ตะกอน RNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำบริสุทธิ์ 30 μ L นำ RNA ที่ได้มาวัด

ปริมาณของ RNA ทั้งหมดที่สกัดได้ ที่ O.D. 260 nm ด้วยเครื่อง nanodrop และ นำ RNA ที่ได้จากการสกัด 1µg ทำปฏิกิริยากับ oligo d18T (100 µM) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ reverse transcriptase เป็นชุด RTpremix kit ของบริษัท U2bio และเติมน้ำบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 µL ทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เป็นขั้นตอนการสร้างสาย cDNA (cDNA synthesis) และ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เป็นการยับยั้งการทำงานของ RTnase (RTnase inactivation) จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณ cDNA โดยใช้ Specific primer ที่สังเคราะห์จาก <https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/> ตามตารางที่ 14 และปฏิกิริยา qPCR ที่เกิดขึ้นจะทำทั้งหมด 35 รอบ แต่ละรอบจะประกอบด้วย pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, annealing 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับ IL-1B, 57 องศาเซลเซียส สำหรับ GAPDH และอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับ IL-8 ติดตามผลของ PCR product โดยใช้ SYBR Green dye ในตัวอย่างที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนมาก SYBR Green dye จะเปล่งแสงออกมาในรอบสั้นๆ ค่า CT จะต่ำ หากในสารตัวอย่างมีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อย SYBR GREEN จะเปล่งแสงออกมาในรอบยาวๆ ค่า CT จะสูง โดยจะใช้การคำนวณจากสูตร $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ในการวิเคราะห์ผล โดยจะทำการทดลองทั้งหมดสามครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะทำซ้ำสองครั้ง

เซลล์ HaCaT

No treated	+ Dox 1000 ng/mL	+ Dox 1000 ng/mL + IFN- γ 10 ng/mL
+ TNF- α 10 ng/mL	+ TNF- α 10 ng/mL + IFN- γ 10 ng/mL	+ IFN- γ 10 ng/mL

ตารางที่ 11 แสดงการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำ doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL ต่อเซลล์ HaCaT ใน 6-well plate

3.7.2.2 ศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้นด้วย Doxycycline ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และหลังของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR

เพื่อต้องการทราบว่า TNF- α ที่เป็นผลผลิตในน้ำเลี้ยงเซลล์ จากการเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline สามารถนำมากระตุ้นให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของไซโตไคน์ เช่น IL-1 β และ IL-8 ได้หรือไม่

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α ใน 6 well plate หลุมละ 3×10^5 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วย Doxycycline ความเข้มข้น 1000 ng/mL ได้ประมาณ 24 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ใน 6 well plate หลุมละ 3×10^5 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α ภายหลังการกระตุ้นด้วย Doxycycline ครบเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นเจือจางน้ำเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:1.5, 1:2, 1:3, และ 1:4 ใส่ในแต่ละหลุม ดังแสดงตารางที่ 12 ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก คือ กระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF- α 10 ng/mL บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมลบ คือ เซลล์ HaCaT ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยสารใดๆ จากนั้นกระตุ้นด้วย IFN- γ 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการสกัด RNA ทั้งหมดจากเซลล์โดยใช้สารละลาย Genezol 1 mL ต่อหลุมใน 6-well plate ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 7.2.1

เซลล์ HaCaT-TNF- α

+ DOX 1000 ng/mL	+ DOX 1000 ng/mL	+ DOX 1000 ng/mL
+ DOX 1000 ng/mL	+ DOX 1000 ng/mL	+ DOX 1000 ng/mL

เซลล์ HaCaT

No treated	+ TNF- α 10 ng/mL + IFN- γ 10 ng/mL	+ media (TNF- α) 1000 μ L + media 500 μ L + IFN- γ 10 ng/mL (1:1.5)
+ media (TNF- α) 750 μ L + media 750 μ L + IFN- γ 10 ng/mL (1:2)	+ media (TNF- α) 500 μ L + media 1000 μ L + IFN- γ 10 ng/mL (1:3)	+ media (TNF- α) 325 μ L + media 1125 μ L + IFN- γ 10 ng/mL (1:4)

ตารางที่ 12 แสดงการศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้นด้วย doxycycline ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และเกิดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR

3.7.2.3 ศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการหลั่งของ pro-inflammatory ไซโตไคน์ และยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่ IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B1, KRT16, FOSL-1, และ MMP-9

เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการหลั่งของ pro-inflammatory ไซโตไคน์ และการส่งสัญญาณของ NF- κ B pathway ได้

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT-TNF- α หลุมละ 3×10^5 เซลล์ ใน 6 well plate กระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังมากกว่าปกติ (hyperproliferation) โดยใช้เซลล์ HaCaT-TNF- α กระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL และ TNF- α 10 ng/mL กับ IFN- γ 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นกลุ่มควบคุมบวก และใช้เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ เป็นกลุ่มควบคุมลบ ดังแสดงในตารางที่ 13

เซลล์ HaCaT-TNF- α

No treated	+ Dox 1000 ng/mL	+ Dox 1000 ng/mL + IFN- γ 10 ng/mL
+ TNF- α 10 ng/mL	+ TNF- α 10 ng/mL + IFN- γ 10 ng/mL	+ IFN- γ 10 ng/mL

ตารางที่ 13 แสดงการศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ เกิดการหลั่งของไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ

เมื่อครบเวลาดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออก นำ plate ล้างด้วย PBS เย็น และสกัด RNA ทั้งหมดจากเซลล์โดยใช้สารละลาย Genzol 1 mL ต่อหลุมใน 6-well plate ดูดใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform ปริมาตร 200 μ L นำไปปั่นที่ 15000xg เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่มีส่วนของ RNA อยู่ ใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ isopropanol 1 เท่าของส่วนใสที่ดูดได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่น 15000g เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนของ RNA อยู่ที่ยก้นหลอด จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 1 mL ปั่นล้างที่ 15000xg เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 1 mL ทั้งหมดสามรอบ รอบสุดท้ายเทส่วนใสออกแล้ว ตากให้ตะกอน RNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำบริสุทธิ์ 30 μ L นำ RNA ที่ได้มาวัดปริมาณของ RNA ทั้งหมดที่สกัดได้ ที่ O.D. 260 nm ด้วยเครื่อง nanodrop และ นำ RNA ที่ได้จากการสกัด 1 μ g ทำปฏิกิริยากับ oligo d18T (100 μ M) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ reverse transcriptase เป็นชุด RTpremix kit ของบริษัท U2bio และเติมน้ำบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 μ L ทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เป็นขั้นตอนการสร้างสาย cDNA (cDNA synthesis) และ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เป็นการยับยั้งการทำงานของ RTnase (RTnase inactivation) จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณ cDNA โดยใช้ Specific primer ที่สังเคราะห์จาก <https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/> ตามตารางที่ 14 และปฏิกิริยา qPCR ที่เกิดขึ้นจะทำทั้งหมด 35 รอบ แต่ละรอบจะประกอบด้วย pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, annealing 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส สำหรับ KRT16, 55 องศาเซลเซียส สำหรับ FOSL1, IL-1B, 57 องศาเซลเซียส สำหรับ GAPDH, MMP9 และอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับ NF- κ B1, IL-8 และ IL-6 ติดตามผลของ PCR product โดยใช้ SYBR Green dye ในตัวอย่างที่มีปริมาณการแสดงผลออกของยีนมาก SYBR Green dye จะเปล่งแสงออกมาในรอบสั้นๆ ค่า CT จะต่ำ หากในสารตัวอย่างมีปริมาณการ

แสดงออกของยีนน้อย SYBR GREEN จะเปล่งแสงออกมาในรอบยาวๆ ค่า CT จะสูง โดยจะใช้การคำนวณจากสูตร $2^{-\Delta\Delta CT}$ ในการวิเคราะห์ผล โดยจะทำการทดลองทั้งหมดสามครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะทำซ้ำสองครั้ง

ตารางที่ 14 Specific Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา qPCR

Gene name	Sequences	PCR product size
GAPDH (internal control)	Forward 5' ACATCGCTCAGACACCATG 3'	143 bp
	Reverse 5' TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG 3'	
IL-8 (15, 101)	Forward 5' CTG CGC CAA CAC AGA AAT TA 3'	238 bp
	Reverse 5' ATT GCA TCT GGC AAC CCT AC 3'	
NF- κ B1	Forward 5' GAA CCA CAC CCC TGC ATA TAG 3'	133 bp
	Reverse 5' GCA TTT TCC CAA GAG TCA TCC 3'	
IL-6	Forward 5' CCACTCACCTCTTCAGAACG 3'	150 bp
	Reverse 5' CATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG 3'	
IL-1 β	Forward 5' ATGCACCTGTACGATCACTG 3'	142 bp
	Reverse 5' ACAAAGGACATGGAGAACACC 3'	
MMP9	Forward 5' CAG TTT CCA TTC ATC TTC CAA GG 3'	150 bp
	Reverse 5' CAT CAC CGT CGA GTC AGC 3'	
KRT16	Forward 5' TGA ATG AGA TGC GTG ACC AG 3'	126 bp
	Reverse 5' TCT GTA CCA GTT CGC TGT TG 3'	
FOSL1	Forward 5' GGG CAT GTT CCG AGA CTTC 3'	138 bp
	Reverse 5' CTC ATG GTG TTG ATG CTT GG 3'	

3.7.3 เปรียบเทียบเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ TNF- α ด้วย Doxycycline กับ recombinant TNF- α โดยการทดสอบด้วย Quercetin

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของโมเดลที่พัฒนาขึ้นมาว่าจะสามารถนำมาทดแทนเซลล์โมเดลที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้หรือไม่ โดยจะนำสารสกัดสมุนไพรที่ทดสอบมาแล้วว่าสามารถต้านโรคสะเก็ดเงินได้อย่างเช่น Quercetin ที่ความเข้มข้น 10 (102) และ 20 μ M ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory)

ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (103) ดังนั้น จึงเลือกนำไปใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของ inflammatory ไซโตไคน์ของทั้งสองโมเดลเปรียบเทียบกัน

3.7.3.1 ศึกษาผลของ Quercetin ที่ยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการหลั่งของ pro-inflammatory cytokines โดยวัดการแสดงออกของยีน IL-8 และ IL-1 β ด้วยวิธี RT-PCR

เซลล์ HaCaT-TNF- α และกระตุ้นด้วย doxycycline ความเข้มข้น 1000 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ มีกลุ่มควบคุมบวกเป็นเซลล์ HaCaT-TNF- α ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์เก่าออก เปลี่ยนเป็น Quercetin 10 และ 20 μ M บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมลบเป็นเซลล์ HaCaT-TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ ดังแสดงในตารางที่ 15 จากนั้นสกัด RNA ตามขั้นตอนที่ 7.2.1 และปฏิกิริยา qPCR ที่เกิดขึ้นทั้งหมด 35 รอบ แต่ละรอบจะประกอบด้วย pre-denaturation 95 °C 10 นาที, denaturation 95 °C 15 วินาที, annealing 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 °C สำหรับ IL-1 β , 57 °C สำหรับ GAPDH และอุณหภูมิ 58 °C สำหรับ IL-8 ติดตามผลของ PCR product โดยใช้ SYBR GREEN ในตัวอย่างที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนมาก SYBR GREEN จะเปล่งแสงออกมาในรอบสั้นๆ ค่า CT จะต่ำ หากในสารตัวอย่างมีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อย SYBR GREEN จะเปล่งแสงออกมาในรอบยาวๆ ค่า CT จะสูง โดยจะใช้การคำนวณจากสูตร $2^{-\Delta\Delta CT}$ ในการวิเคราะห์ผล โดยจะทำการทดลองซ้ำทั้งหมดสามครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะทำซ้ำสองครั้ง

เซลล์ HaCaT-TNF- α

No treated	+ Dox 1000 ng/mL + Quercetin 10 μ M	+ TNF- α 10 ng/mL + Quercetin 10 μ M
+ TNF- α 10 ng/mL หรือ + Dox 1000 ng/mL	+ Dox 1000 ng/mL + Quercetin 20 μ M	+ TNF- α 10 ng/mL + Quercetin 20 μ M

ตารางที่ 15 แสดงการทดสอบด้วย Quercetin

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบปริมาณโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ และในน้ำเลี้ยงเซลล์ การทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในด้านอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี MTT จะถูกทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง และนำมาหาค่าเฉลี่ย สำหรับการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ/หรือ Doxycycline จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดย student pair t-test และ one-way ANOVA และ post hoc Turkey test ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 ซึ่งค่า p-value ที่ระดับน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 และ 0.01 จะถือว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



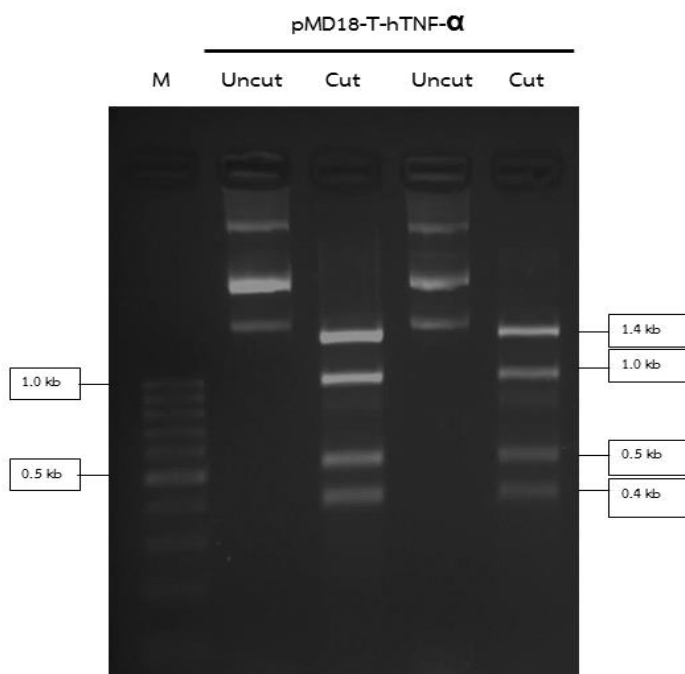
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการโคลนยีน Human TNF- α เข้าไปในพลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH

4.1.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ hTNF- α cDNA ที่ได้มาจากบริษัทผู้ผลิต

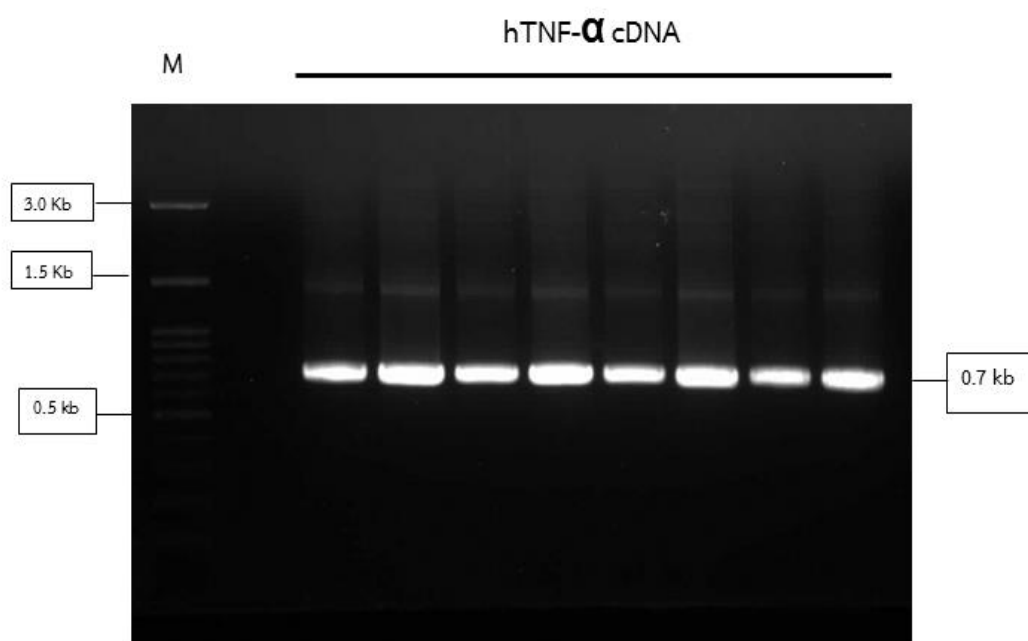
pMD18-T-hTNF- α cDNA ที่ได้มาจากผู้ผลิต จะถูกทรานฟอร์มเมชันเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย และตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *TaqI* จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 23 โดยแถวที่ 1 คือ ตัวยับยั้งขนาดของดีเอ็นเอ (M:DNA ladder) ขนาด 100 bp แถวที่ 2,4 คือ pMD18-T-hTNF- α cDNA ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และแถวที่ 3,5 คือ pMD18-T-hTNF- α cDNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *TaqI* ผลพบว่าภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *TaqI* ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ คือ 0.4, 0.5, 1.0 และ 1.4 Kb



ภาพที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ pMD18-T-hTNF- α cDNA โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *TaqI*

4.1.2 ผลการสังเคราะห์ hTNF- α cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

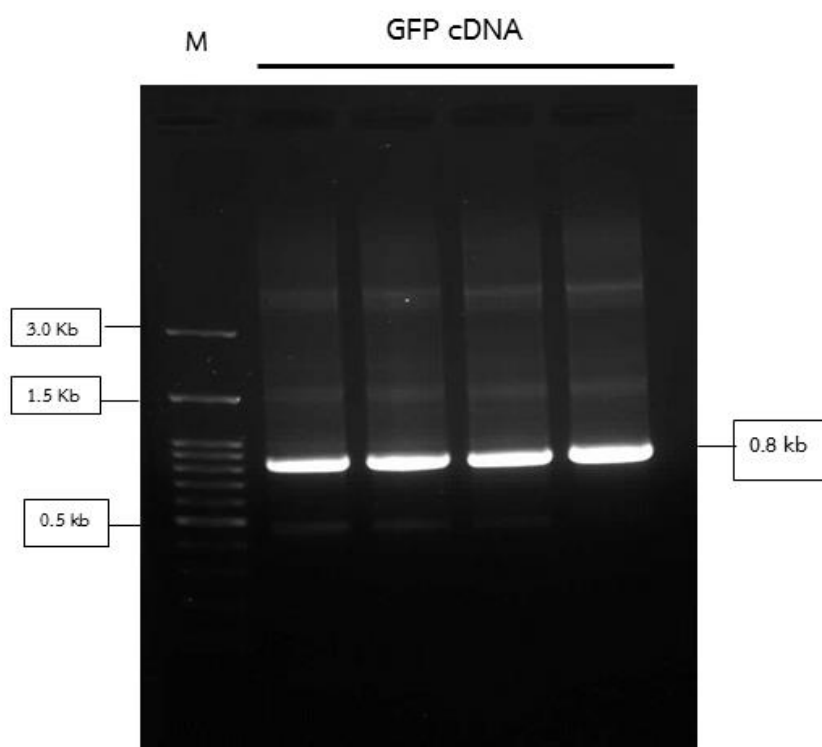
นำ pMD18-T-hTNF- α มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของ hTNF- α cDNA ให้มากขึ้น หลังจากทำปฏิกิริยา PCR เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะนำ PCR product หรือ hTNF- α cDNA มาวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล โดยแฉกที่ 1 คือ ตัวยับยั้งขนาดของดีเอ็นเอ (M:DNA ladder) ขนาด 100 bp และแฉกที่ 3-10 คือ hTNF- α cDNA ที่ได้จากการทำ PCR จะได้ดีเอ็นเอขนาด 0.7 Kb ผลดังแสดงในภาพที่ 24



ภาพที่ 25 แสดงผลของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของ hTNF- α cDNA จากรูปจะพบ PCR product มีขนาด 0.7 Kb

4.1.3 ผลการสังเคราะห์ Enhanced Green Fluorescent Protein (GFP) โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

GFP จะใช้เป็นตัวควบคุมภายในการทดลอง (internal control) ในทุกๆ การทดลองที่มีการกระตุ้นด้วย Doxycycline เพื่อให้แน่ใจว่าการทดลองที่ทำไปถูกต้อง ไม่มีผลในการกระตุ้นให้เกิดโปรตีนชนิดอื่นรบกวนการทดลองได้ โดย GFP จะถูกนำมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น หลังจากทำปฏิกิริยา PCR เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะนำ PCR product หรือ GFP มาวิเคราะห์ผลด้วย ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล โดยแถวที่ 1 คือ ตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ (DNA ladder) ขนาด 100 bp และ แถวที่ 2-5 คือ ขนาดของ GFP ที่ได้จากการทำ PCR จะมีขนาดประมาณ 0.8 Kb ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 25

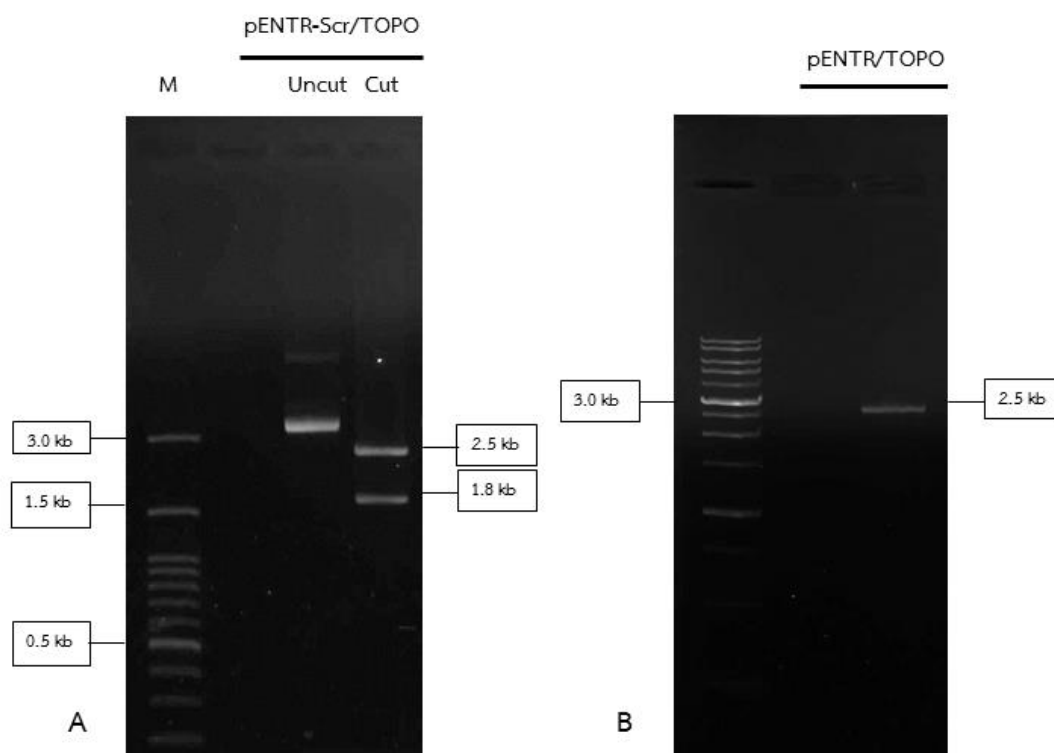


ภาพที่ 26 แสดงผลจากการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของ GFP cDNA ใช้เป็น internal control จากรูปจะพบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 0.8 Kb

4.1.4 ผลของการเตรียม pENTR-Scr/TOPO (vector), hTNF- α (insert) และ eGFP (insert) เพื่อ
ปฏิกิริยา ligation

4.1.4.1 ผลการเตรียมเวกเตอร์ pENTR-Scr/TOPO

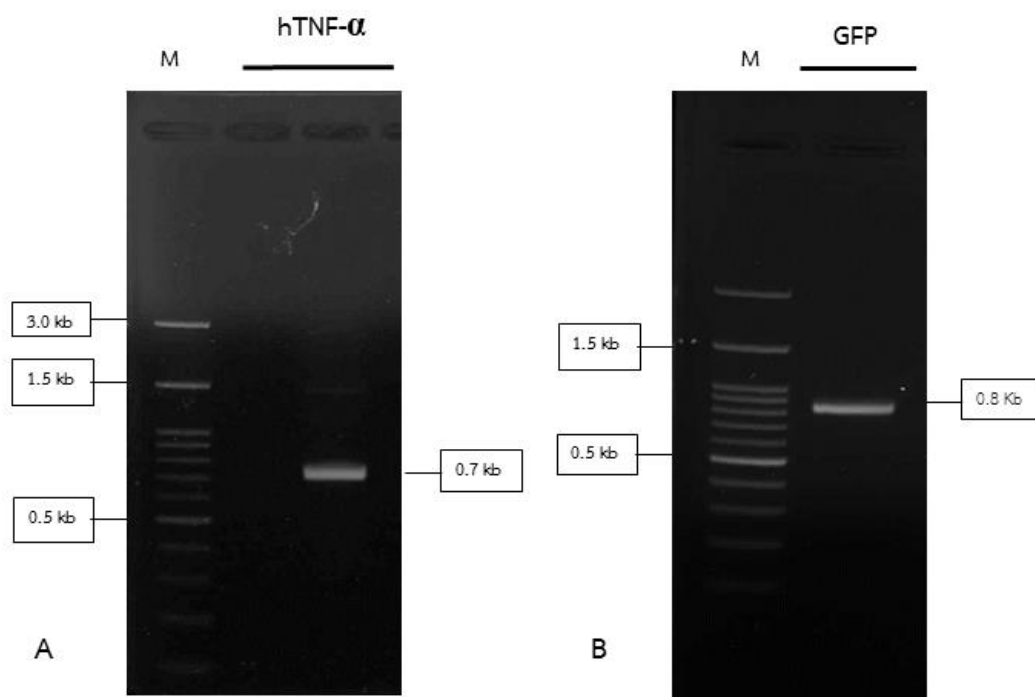
เวกเตอร์ pENTR-Scr/TOPO จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* และจะนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรเรซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล ซึ่งแสดงดังภาพที่ **26(A)** แถวที่ 1 คือตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ ขนาด 100 bp แถวที่ 3 คือ pENTR-Scr/TOPO ที่ไม่
โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ แถวที่ 4 คือ pENTR-Scr/TOPO ที่โดนตัดด้วยเอนไซม์ตัด
จำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* จะพบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 ขนาดคือ 1.8 Kb และ 2.5 Kb
จากนั้นจะทำการตัดเจลเฉพาะที่ขนาด 2.5 Kb เนื่องจากเป็นส่วนของ pENTR/TOPO นำไปทำให้
บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel extraction kit และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรเรซิส อีกครั้งหนึ่ง
เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ **26(B)** แถวที่ 1 คือตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ
ขนาด 1.0 Kb และแถวที่ 3 คือ pENTR/TOPO ขนาด 2.5 Kb และจะนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ไปใช้
เป็นเวกเตอร์ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 27 (A) แสดงผลของ pENTR-Scr/TOPO ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *AscI* จะได้ขนาดดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 1.8 Kb และ 2.5 Kb (B) แสดงผลของ pENTR/TOPO ขนาด 2.5 Kb ภายหลังจากการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบขนาดที่ถูกต้อง ทำการตรวจสอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

4.1.4.2 ผลการเตรียม hTNF- α (insert) และ GFP (insert)

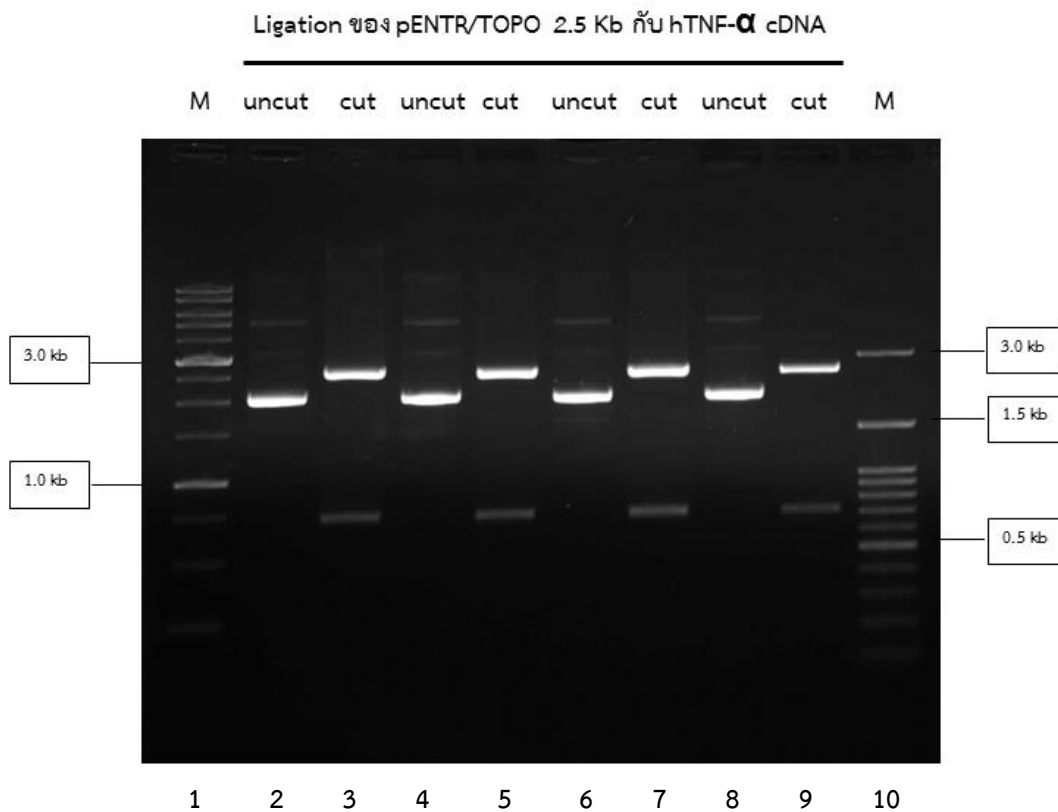
สำหรับ hTNF- α และ GFP cDNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ภายหลังจากการรัน เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในเจลส่วนที่มีแถบของ PCR product จะถูกตัดและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel extraction kit จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส อีกครั้ง โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล เพื่อตรวจสอบขนาดของ insert (TNF- α PCR product, 0.7 Kb (A) และ GFP PCR product, 0.8 Kb (B)) ผลแสดงดังภาพที่ 27



ภาพที่ 28 (A) แสดงผลการรันเจลของ hTNF- α cDNA ขนาด 0.7 Kb (B) แสดงผลการรันเจลของ GFP ขนาด 0.8 Kb หลังจากการทำดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบขนาดที่ถูกต้อง

4.1.5 ผลของการ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (hTNF- α cDNA)

การ ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ hTNF- α cDNA เพื่อเชื่อมกันเป็นพลาสมิดเส้นสายเดียวกัน ภายหลังจากการ ligation จะนำไปทรานฟอร์มเมชันเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย แล้วนำพลาสมิดที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *AscI* สุดท้ายวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล โดยแถวที่ 1 คือ ตัวยับซึ่งขนาดของสายดีเอ็นเอขนาด 1 kb แถวที่ 2,4,6,8 คือ ผล ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ hTNF- α cDNA ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถวที่ 3,5,7,9 คือ ผล ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ hTNF- α cDNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *AscI* ขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด คือ 0.7 Kb และ 2.5 Kb และแถวที่ 10 คือ ตัวยับซึ่งขนาดของสายดีเอ็นเอขนาด 100 bp ดังแสดงในภาพที่ 28

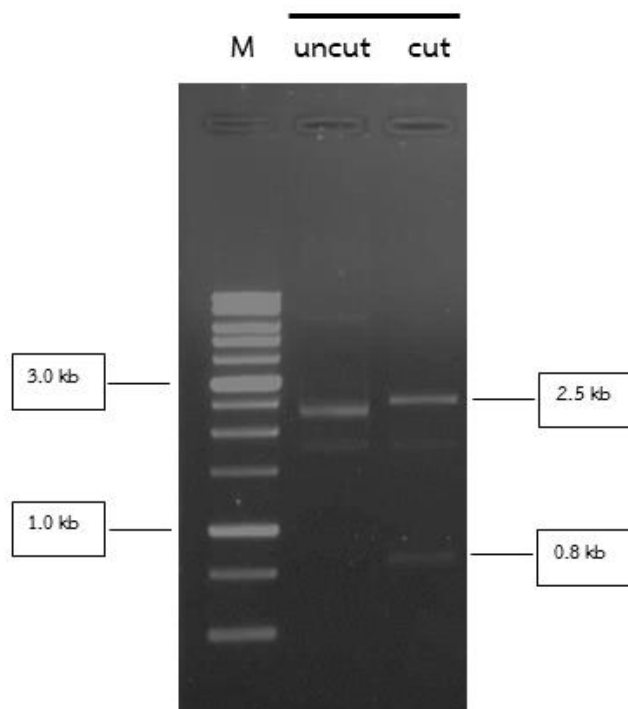


ภาพที่ 29 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* หลังจากปฏิกิริยา ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ hTNF- α 0.7 Kb ผ่านการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.1.6 ผลของการ ligation ระหว่าง vector (pENTR/TOPO, 2.5 Kb) กับ insert (GFP)

การ ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP cDNA เพื่อเชื่อมกันเป็นพลาสมิดสายเดียวกัน ภายหลังจากการ ligation จะนำไปทรานฟอร์มเมชันเข้าสู่ในเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำพลาสมิดที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* สดทำยวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล โดยแถวที่ 1 คือ ตัวบ่งชี้ขนาดของสายดีเอ็นเอขนาด 1 kb แถวที่ 2 คือ ผล ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP ที่ยังไม่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถวที่ 3 คือ ผล ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl* ขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด คือ 0.8 Kb และ 2.5 Kb ดังแสดงในภาพที่ 29

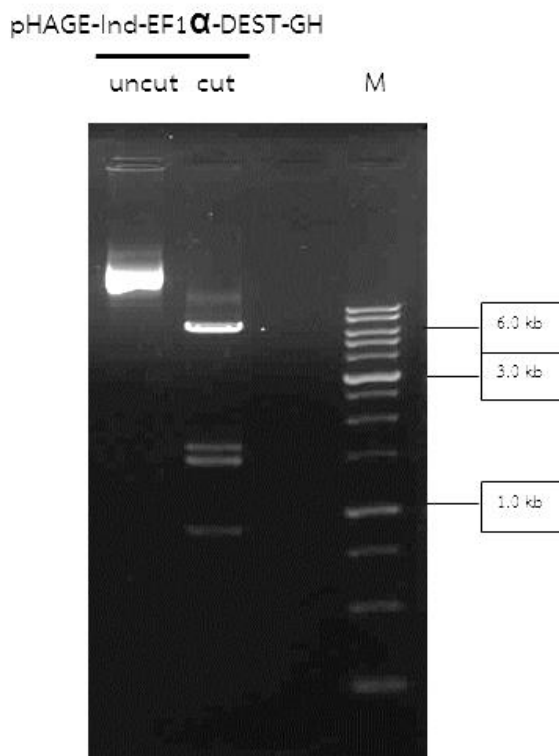
Ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP cDNA



ภาพที่ 30 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* ภายหลังปฏิกิริยา ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP 0.8 bp ผ่านการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

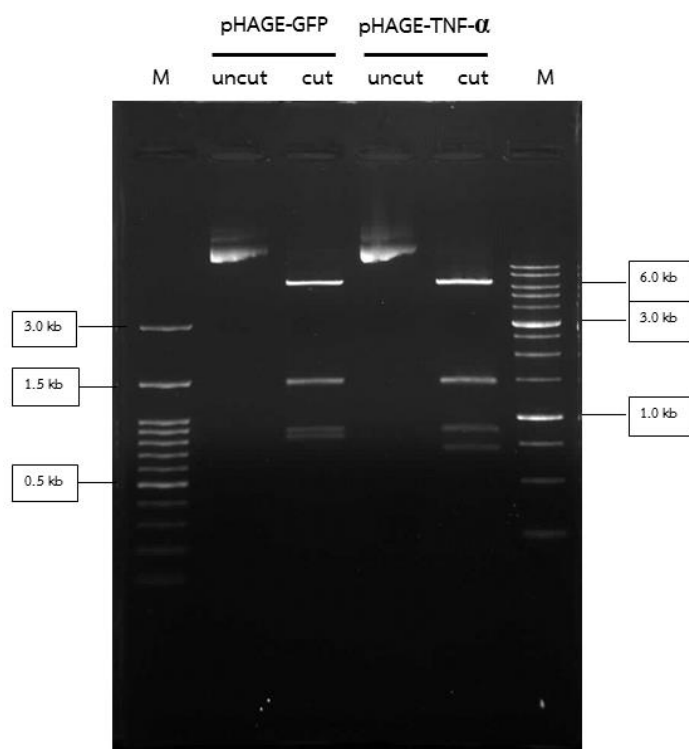
4.1.7 ผลการโคลนนิ่งด้วยวิธี Gateway Cloning

พลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* เพื่อตรวจสอบขนาดของ DNA ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 30 พบว่าแถวที่ 1 คือ พลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH ที่ไม่ได้โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถวที่ 2 คือ พลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl* พบว่ามีดีเอ็นเอเกิดขึ้น 4 แถบที่ขนาด 6.0, 1.5, 1.6, และ 0.9 Kb และแถวที่ 4 คือ ตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอขนาด 1 Kb



ภาพที่ 31 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และชนิด *Ascl* ของพลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 4 แถบ มีขนาด 6.0, 1.5, 1.6, และ 0.9 Kb

จากนั้นนำ pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH และ Ligation ของ pENTR/TOPO 2.5 Kb กับ GFP และ/หรือ hTNF- α cDNA ไปทำโคลนนิ่งด้วยวิธี Gateway cloning ผลแสดงในภาพที่ 31 จะพบว่าแถบที่ 1 คือ ตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอขนาด 100 bp แถบที่ 2 คือ pHAGE-GFP ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถบที่ 3 คือ pHAGE-GFP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl* พบขนาด 6.0, 1.5, 0.9 และ 0.8 Kb แถบที่ 4 คือ pHAGE-hTNF- α ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถบที่ 5 คือ pHAGE-hTNF- α ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl* พบขนาด 6.0, 1.5, 0.9 และ 0.7 Kb และแถบที่ 6 คือ ตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอขนาด 1 Kb ซึ่งผลที่ได้มีชิ้นส่วนของพลาสมิด pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH หลุดออกไปบางส่วน และมีชิ้นส่วนของ hTNF- α cDNA 0.7 kb หรือ GFP 0.8 kb เข้ามาแทนที่



ภาพที่ 32 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดเพาะชนิด *NotI* และ *Ascl*

ผลเจลอิลเล็กโตรโฟรีซิสของ pHAGE-TNF- α ขนาดดีเอ็นเอที่ได้ คือ 6.0, 1.5, 0.9 และ 0.7 Kb และผลจากเจลอิลเล็กโตรโฟรีซิสของ pHAGE-GFP ขนาดดีเอ็นเอที่ได้ คือ 6.0, 1.5, 0.9 และ 0.8 Kb ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายในการทดลอง (internal control)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

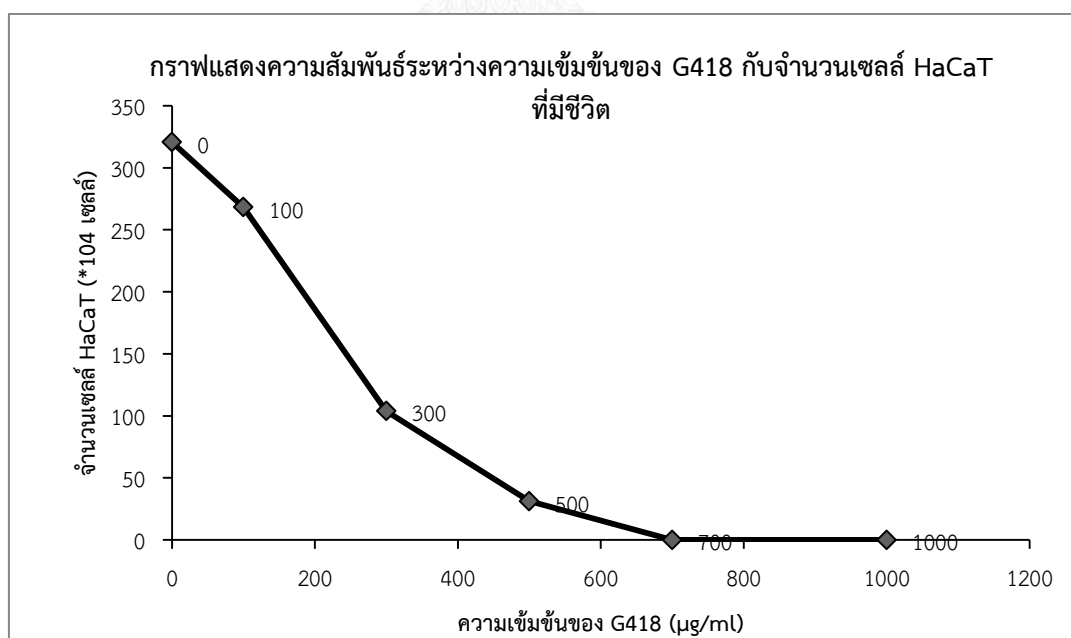
4.1.8 ผลของการตรวจสอบการโคลนนิ่งของ pHAGE-TNF- α และ pHAGE-GFP ด้วยวิธี direct DNA sequencing

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการโคลนนิ่งพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว อีกสิ่งหนึ่งที่ต้องทำคือการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่เราสนใจ คือ hTNF- α และ GFP อยู่ในพลาสมิดนั้นจริงหรือไม่ โดยจะใช้วิธี direct DNA sequencing ในการตรวจสอบการโคลนนิ่งของ pHAGE-TNF- α และ pHAGE-GFP โดยใช้ pHAGE sequence primer 5' – CTG GGA CGT CGT ATG GGTA-3' เป็น primer ในการตรวจสอบลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ พบว่าเมื่อนำลำดับเบสของ TNF- α cDNA เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้จากการ sequencing ด้วยโปรแกรม Blast มีส่วนของลำดับเบสตรงกัน เท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของ TNF- α ที่เราสนใจอยู่ในพลาสมิดนั้นจริงๆ ในขณะที่ GFP ได้ผลเช่นเดียวกัน และสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้

4.2 ผลการคัดเลือกเซลล์ที่มี lentiviral DNA construct (pHAGE-hTNF- α /pHAEGE-GFP)

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของยา Geneticin (G418) ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT แล้วใส่ยา G418 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 100, 300, 500, 700 และ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน จึงทำการนับเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าที่ความเข้มข้น 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ของ G418 สามารถฆ่าเซลล์ HaCaT ตายได้ทั้งหมด 100% ดังแสดงในกราฟที่ 1 จึงเลือกใช้ยา G418 ที่ความเข้มข้น 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สำหรับการคัดเลือกเซลล์ HaCaT ที่มี pHAGE-hTNF- α และ pHAGE-GFP เนื่องจากในพลาสมิดของ pHAGE-Ind-EF1 α -DEST-GH มียีนดื้อยาในกลุ่ม Neomycin ดังแสดงในภาพที่ 10 (B) จึงทำให้เซลล์ HaCaT ที่มีพลาสมิด pHAGE-hTNF- α หรือ pHAGE-GFP สามารถเจริญเติบโต และมีชีวิตอยู่ได้เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี G418 เข้มข้น 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เรียกเซลล์ HaCaT ที่มี pHAGE-TNF- α ว่า HaCaT-TNF- α และเซลล์ HaCaT ที่มี pHAGE-GFP ว่า HaCaT-GFP ส่วนในเซลล์ HaCaT ที่ไม่มีพลาสมิด pHAGE-hTNF- α หรือ pHAGE-GFP เซลล์ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่มี G418 เข้มข้น 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ จึงทำให้เซลล์ HaCaT ตายในที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 32



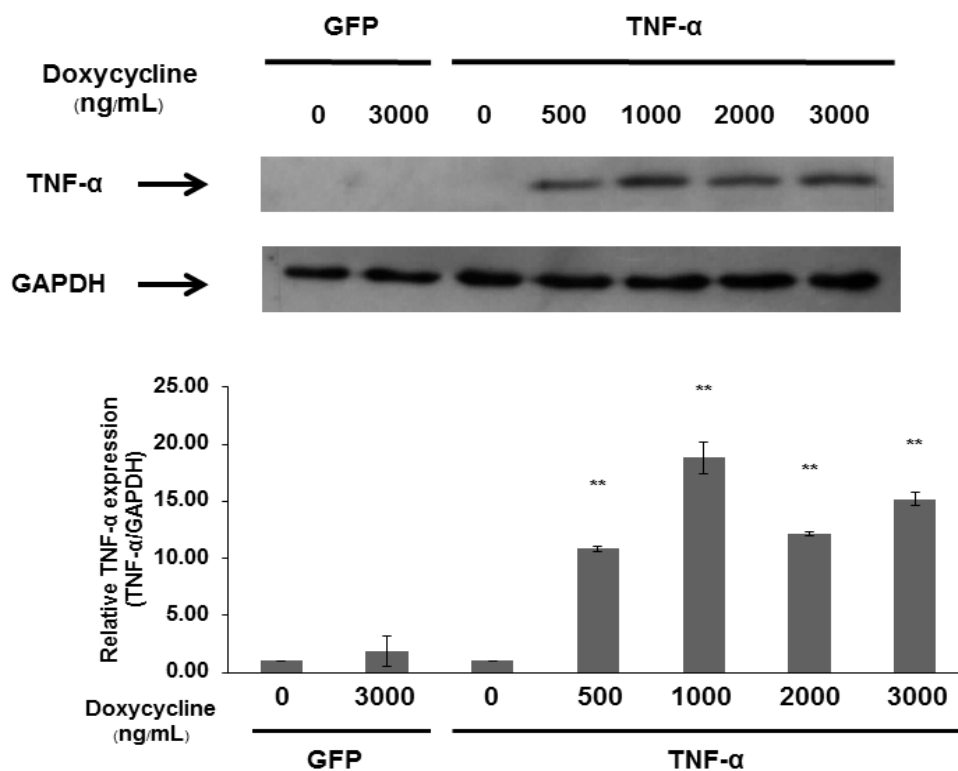
ภาพที่ 33 แสดงผลของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยา G418 ที่ทำให้เซลล์ HaCaT ตายทั้งหมด

4.3 ผลของการเหนี่ยวนำด้วย Tetracycline (Doxycycline) ทำให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α

4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT-TNF- α โดยวิธี Western blot แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ

4.3.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Doxycycline (Dox) ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่เหมาะสมที่สุด

จากการทดสอบกระตุ้นเซลล์ HaCaT-TNF- α และ -GFP ด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 1000, 2000 และ 3000 ng/mL บ่มไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาทำการทดสอบปริมาณโปรตีน TNF- α ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี Western blot ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าเซลล์ HaCaT-TNF- α หรือ -GFP เมื่อไม่มีการกระตุ้นด้วย doxycycline ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน TNF- α จากนั้นนำเซลล์ HaCaT-GFP กระตุ้นด้วย doxycycline ความเข้มข้น 3000 ng/mL พบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีน TNF- α เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า ก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย doxycycline ในเซลล์ HaCaT-GFP จะไม่พบการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งเซลล์ HaCaT-GFP ใช้เป็นเซลล์ควบคุมภายในการทดลอง สำหรับเซลล์ HaCaT-TNF- α เมื่อถูกกระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000-3000 ng/mL พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน TNF- α เกิดขึ้น และพบว่าการแสดงออกของ TNF- α ที่มากที่สุดที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2000 และ 3000 ng/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 33 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของโปรตีน TNF- α ต่อ GAPDH ที่กระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $** (P < 0.01)$ ระหว่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย doxycycline กับเซลล์กลุ่มควบคุม โดยการทดลองนี้จะทำ 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 2 ชุด

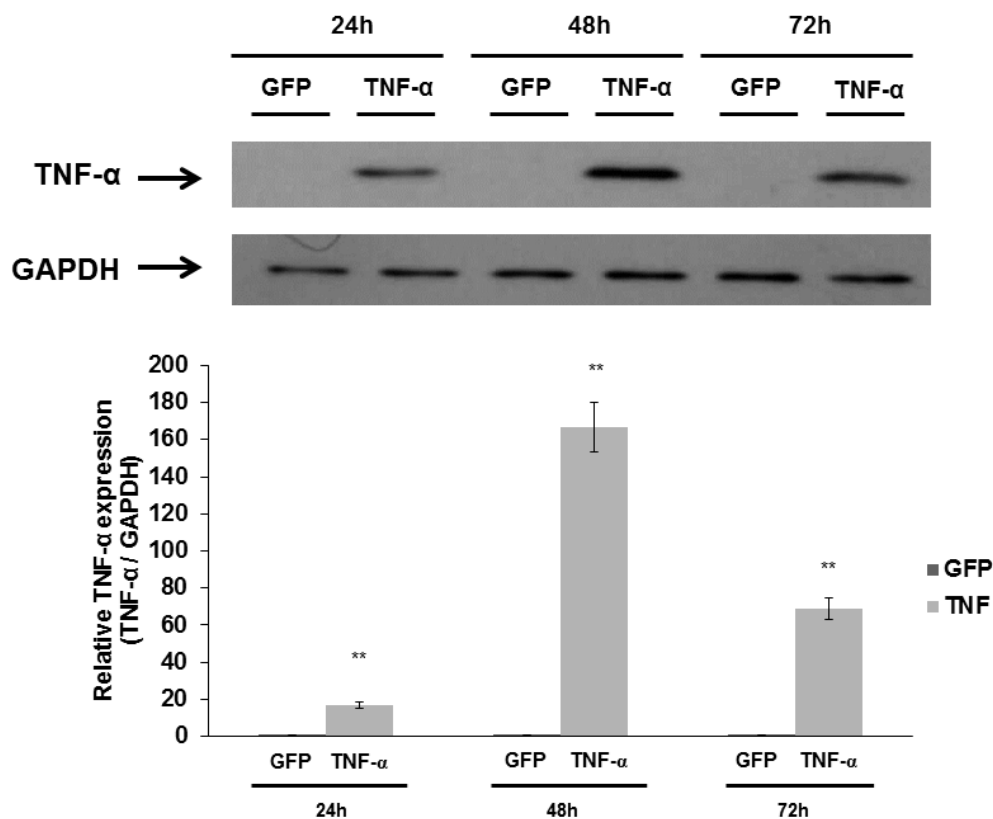


ภาพที่ 34 แสดงผลการศึกษาค่าความเข้มข้นของ Doxycycline ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ในเซลล์ HaCaT-TNF- α และ -GFP เมื่อมีการให้ยา Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 1000, 2000 และ 3000 ng/mL ด้วยวิธี Western blot และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ TNF- α /GAPDH ที่กระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดย GAPDH ใช้เป็น loading control

4.3.1.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการกระตุ้นด้วย Doxycycline ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ที่เหมาะสมที่สุด

จากการทดสอบการกระตุ้นเซลล์ HaCaT-TNF- α ด้วย doxycycline พบว่าความเข้มข้นที่มีการแสดงออกของ TNF- α มากที่สุด คือ ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL ซึ่งใช้ความเข้มข้นนี้ บ่มเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาทดสอบปริมาณโปรตีน TNF- α ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ด้วยวิธี western blot ซึ่งมีเซลล์ HaCaT-GFP เป็นตัวควบคุมภายในการทดลอง (internal control) จากผลการทดลองพบว่าในเซลล์ HaCaT-GFP ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ที่

ระยะเวลาต่างๆแสดงว่าในเซลล์ที่ไม่มียีนของ TNF- α อยู่ เมื่อทำการกระตุ้นด้วย Dox แล้วจะไม่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน TNF- α สำหรับเซลล์ HaCaT-TNF- α เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Dox ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL ในเวลาต่างๆ กัน พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน TNF- α เกิดขึ้น และพบว่าการแสดงออกของโปรตีน TNF- α มากที่สุดที่เวลา 48 ชั่วโมง รองลงมาคือที่ 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 34 ซึ่งพบว่าผลการผลิตโปรตีน TNF- α ระหว่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย doxycycline ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน กับเซลล์กลุ่มควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัย



ความสำคัญทางสถิติ **($P < 0.01$) โดยการทดลองนี้จะทำ 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 2 ชุด

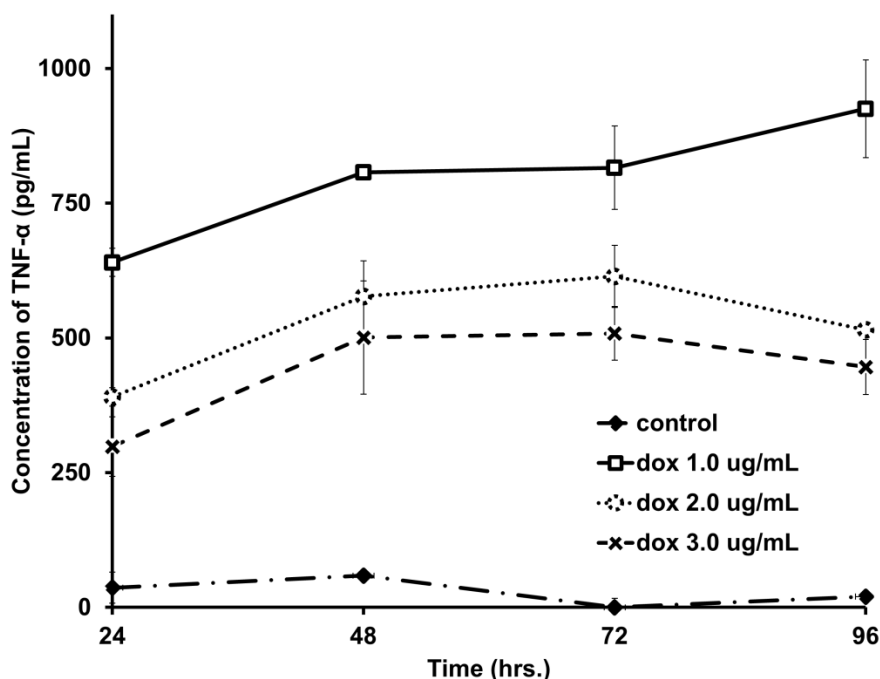
ภาพที่ 35 แสดงผลการศึกษาระยะเวลาในการกระตุ้นด้วย Doxycycline ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี Western blot

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของโปรตีน TNF- α /GAPDH ในระยะเวลาต่างๆ กัน ของการกระตุ้นด้วย doxycycline โดย GAPDH ใช้เป็น loading control

จากผลการทดลองหาความเข้มข้นของ doxycycline และหาระยะเวลาในการกระตุ้น doxycycline ให้ผลิตปริมาณโปรตีน TNF- α ที่เหมาะสม พบว่า doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้มีการผลิตโปรตีน TNF- α มากที่สุด แสดงให้เห็นว่าเซลล์โมเดลที่ทางผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมา โดยใช้ระบบ Tet-inducible สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT-TNF- α ได้ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย doxycycline ทำให้เซลล์ชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีน TNF- α ได้โดยใช้ doxycycline เป็นตัวเหนี่ยวนำในการส่งสัญญาณในกระบวนการการ แสดงออกระดับยีนจนไปสู่การผลิตโปรตีน TNF- α ภายในเซลล์ HaCaT-TNF- α

4.3.2 ผลการศึกษาปริมาณการผลิตโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ HaCaT โดยวิธี ELISA

นำเซลล์ HaCaT-TNF- α กระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้น 0, 1000, 2000, และ 3000 ng/mL บ่มที่อุณหภูมิ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (supernatant) แล้วนำมาตรวจวัดปริมาณของโปรตีน TNF- α ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลอง พบว่า ในเซลล์ HaCaT-TNF- α จะมีโปรตีน TNF- α หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังจากกระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL มีการหลั่งของโปรตีน TNF- α มากที่สุด รองลงมาคือ 2000, 3000 ng/mL ตามลำดับ และภายหลังการกระตุ้นด้วย Dox แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ คือ เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย Dox มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $** (P < 0.01)$ ดังแสดงภาพที่ 35 โดยการทดลองนี้จะทำ 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำซ้ำ 3 ซ้ำ

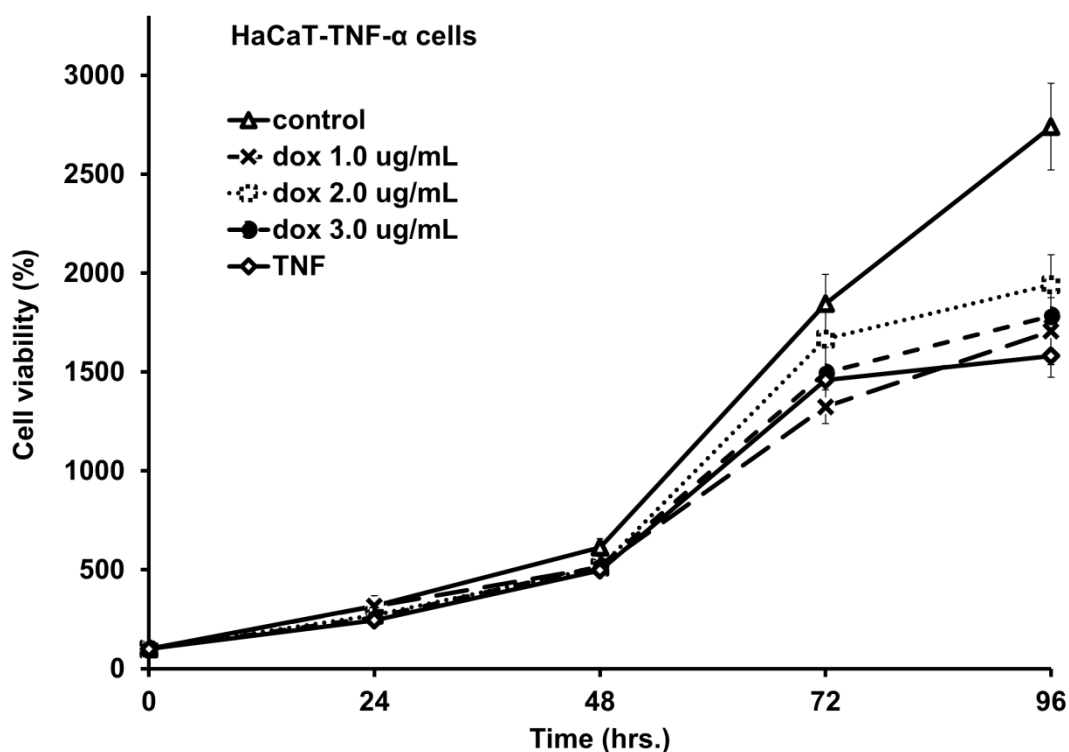


ภาพที่ 36 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TNF- α (pg/mL) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (แกน Y) และระยะเวลาในการบ่มเซลล์ด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (แกน X)

4.4 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Doxycycline ในด้านการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT-TNF- α เปรียบเทียบกับเซลล์โมเดลในปัจจุบัน: โดยวิธี MTT colorimetric assay

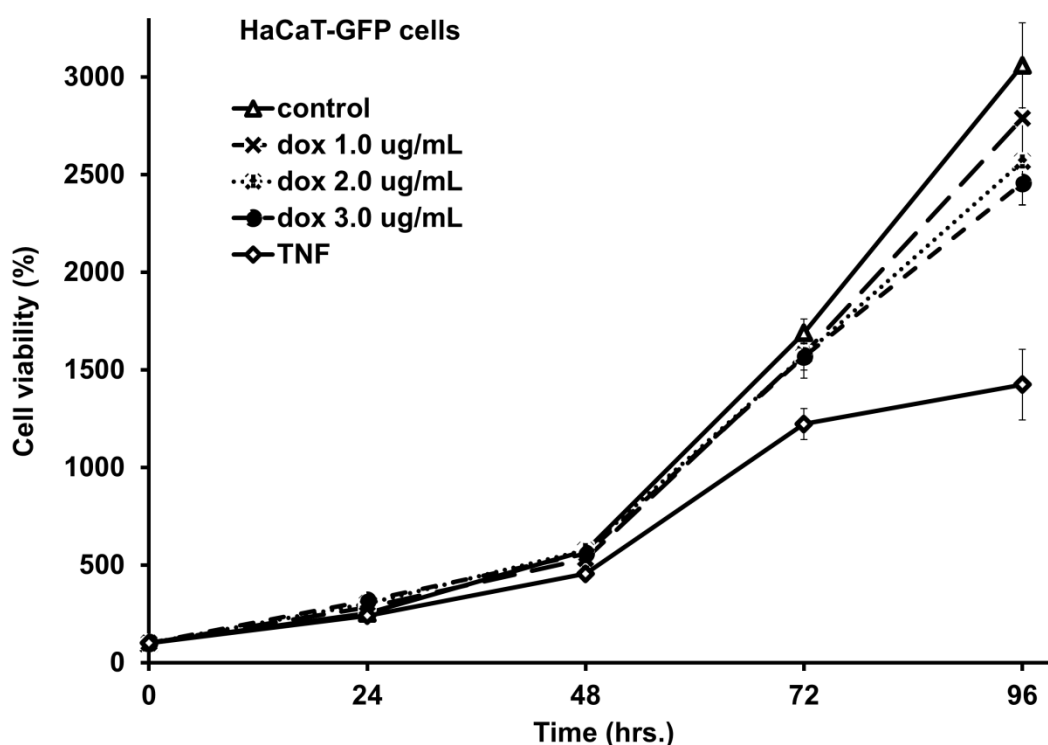
นำเซลล์ HaCaT-TNF- α และ -GFP กระตุ้นด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 500, 1000, 2000, และ 3000 ng/mL ให้มีการแสดงออกของ TNF- α ที่แตกต่างกันตามความเข้มข้นของ Doxycycline มีกลุ่มควบคุมลบ คือ เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย Doxycycline และกลุ่มควบคุมบวก คือเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α 10 ng/mL บ่มไว้เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบเวลา ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยเติมสารละลาย MTT ผลจากการศึกษาปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาในการบ่มเซลล์ของ Doxycycline จากผลการทดลองพบว่าในเซลล์ HaCaT-TNF- α เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์ด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เมื่อระยะเวลาผ่านไปมีผลทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่มีการกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α ไม่ได้มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิต

ของเซลล์ HaCaT-TNF- α เพิ่มมากขึ้น แต่ในทางกลับกัน กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่โดยกระตุ้นด้วย doxycycline ดังแสดงในภาพที่ 36



ภาพที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่มีชีวิต (% cell viability) (แกน Y) และระยะเวลาในการกระตุ้น Dox และ recombinant TNF- α (แกน X)

ในขณะที่ เซลล์ HaCaT-GFP ซึ่งเป็นเซลล์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายในการทดลอง (internal control) กระตุ้นด้วย Doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 0, 1000, 2000, และ 3000 ng/mL พบว่าการกระตุ้นเซลล์ HaCaT-GFP ด้วย doxycycline ไม่มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT-GFP เพิ่มขึ้นหรือลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ คือ เซลล์ HaCaT-GFP ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย Doxycycline แต่ในทางกลับกัน ตัวควบคุมบวก คือ HaCaT-GFP ที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α 10 ng/mL ทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ HaCaT-GFP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $** (P < 0.01)$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT-GFP ที่ไม่กระตุ้นด้วย doxycycline ดังแสดงในภาพที่ 37 สรุปได้ว่าโปรตีน GFP ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT-GFP เมื่อกระตุ้นด้วย doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน สามารถใช้เป็นตัวควบคุมภายในการทดลองได้

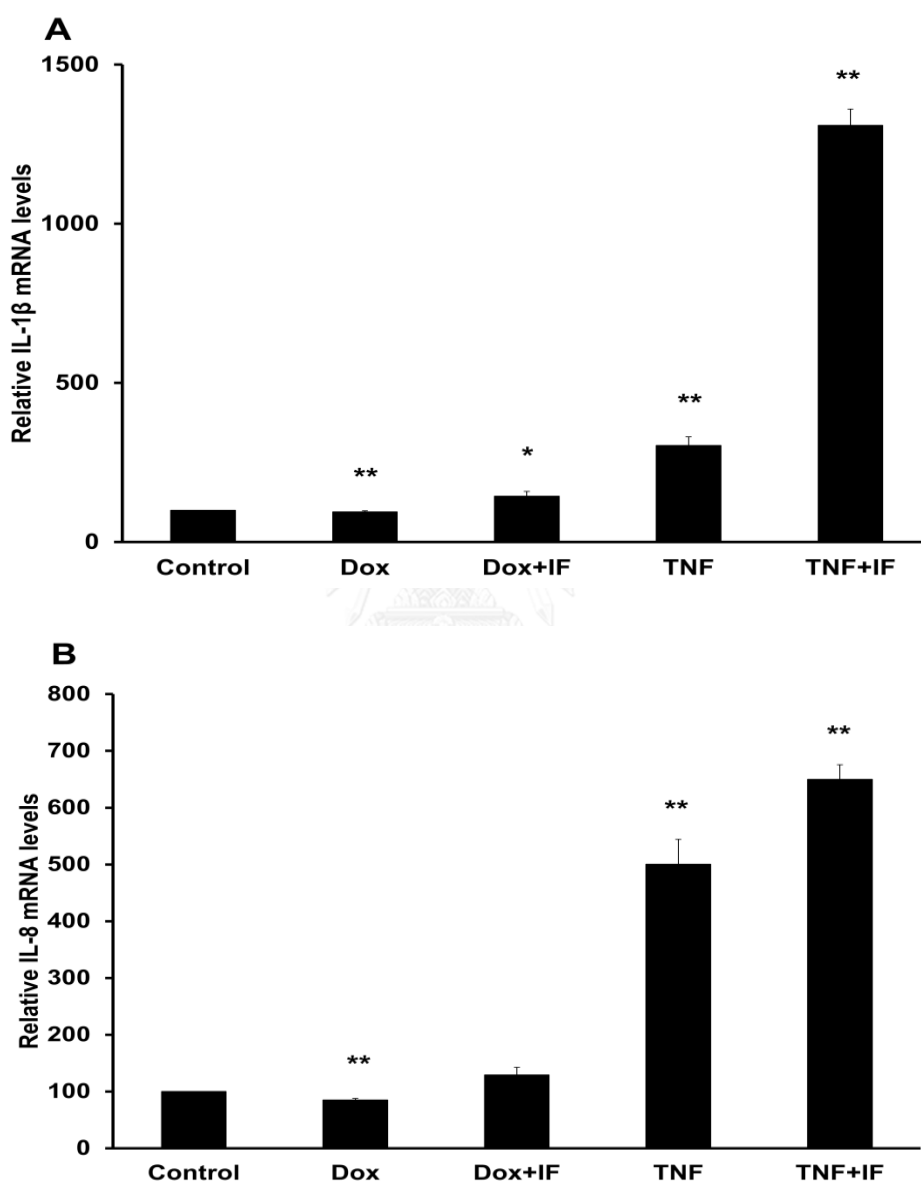


ภาพที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ HaCaT-GFP ที่มีชีวิต (% cell viability) (แกน Y) และระยะเวลาในการกระตุ้น Dox และ recombinant TNF- α (แกน X)

4.5 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT ในด้านการกระตุ้น pro-inflammatory cytokines ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับเซลล์โมเดลในปัจจุบัน โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)

ศึกษาผลของ Doxycycline ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL เปรียบเทียบกับผลของ recombinant TNF- α 10 ng/mL ที่กระตุ้นเซลล์ HaCaT เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ/หรือ IFN- γ 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เซลล์โมเดลในปัจจุบัน) เพื่อต้องการพิสูจน์ว่า Doxycycline ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์ อาทิเช่น IL-8 และ IL-1 β ในเซลล์ HaCaT จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย recombinant TNF- α พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA ของยีน IL-1 β และ IL-8 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ (control) และยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการกระตุ้น recombinant TNF- α ร่วมกับ IFN- γ พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA ของยีน IL-1 β และ IL-8 เพิ่มขึ้นไปอีกเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ (control) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $** (P < 0.01)$ ดังแสดง

ในภาพที่ 38 สำหรับการกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย Dox พบว่าการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 β และ IL-8 ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ (control) และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย Dox ร่วมกับ IFN- γ พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ (control)

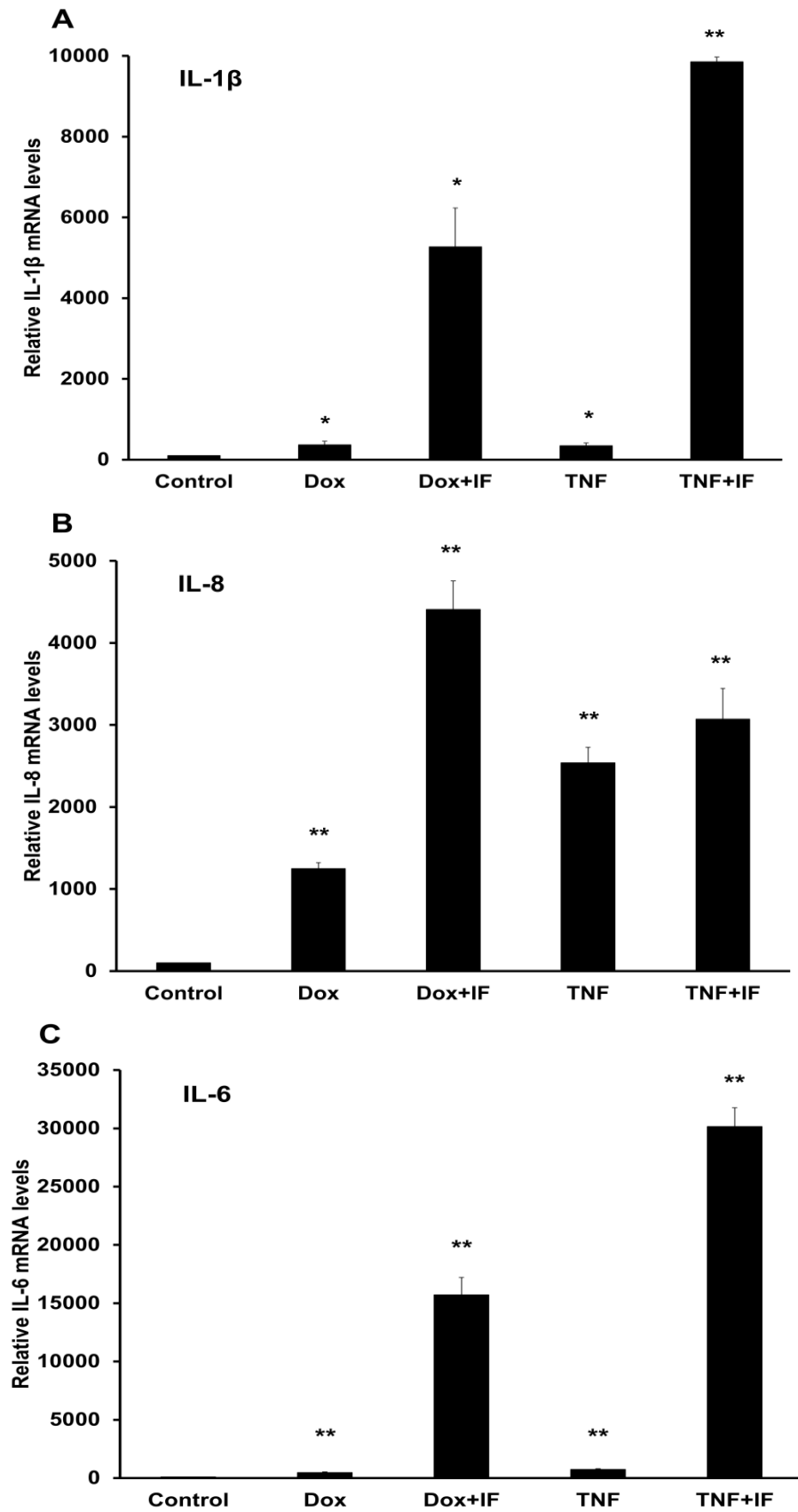


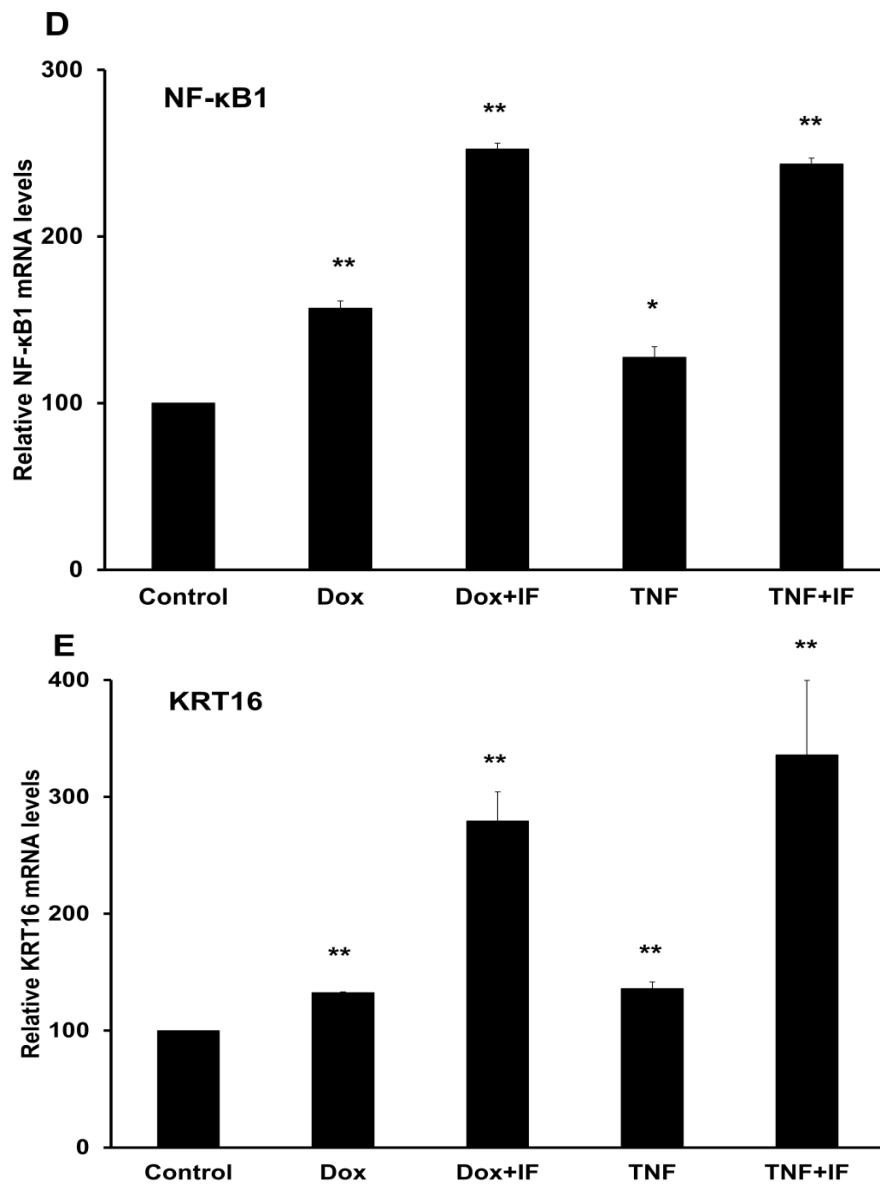
ภาพที่ 39 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 β (A) และ IL-8 (B) โดยศึกษาผลของ doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α และ/หรือกระตุ้นด้วย IFN- γ โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)
*($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

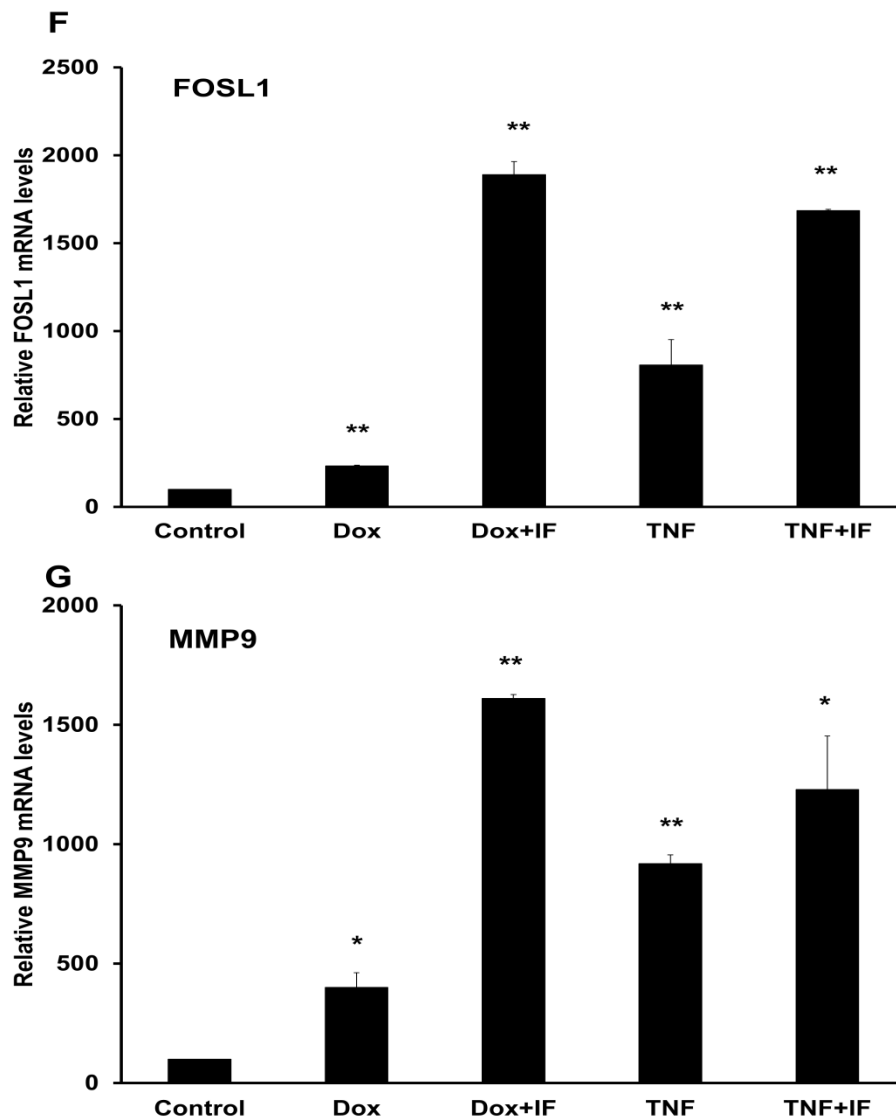
จากการทดลอง สรุปได้ว่า Doxycycline ไม่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA ของ IL-8 และ IL-1 β ในเซลล์ HaCaT แสดงให้เห็นว่า ระบบ Tet-inducible ที่พัฒนาขึ้นมาสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α จำเพาะต่อเซลล์ HaCaT-TNF- α เท่านั้น

4.6 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Doxycycline ในด้านการกระตุ้น pro-inflammatory cytokines ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับเซลล์โมเดลในปัจจุบัน โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)

เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Dox และส่งผลให้เซลล์เกิดการอักเสบ โดยเซลล์จะมีการแสดงออกของไซโตไคน์เกี่ยวข้องกับการอักเสบเกิดขึ้น ทำการทดสอบโดยการนำเซลล์ HaCaT-TNF- α กระตุ้นด้วย Dox ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีการกระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/mL และ TNF- α 10 ng/mL/IFN- γ 10 ng/mL เป็นกลุ่มควบคุมบวก และให้เซลล์ HaCaT-pHA-TNF- α ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสารใดๆ เป็นตัวควบคุมลบ ตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของ cDNA ของยีนดังต่อไปนี้ คือ IL-1 β , IL-8, IL-6, NF- κ B1, KRT16, FOSL, MMP9 และ GAPDH (internal control) ติดตามผลของ PCR product โดยใช้ SYBR Green dye ค่า CT ที่ได้จะใช้คำนวณตามสูตร $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ ในการวิเคราะห์ผล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยให้เซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่มีการกระตุ้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองภายหลังการกระตุ้นด้วย Dox และ TNF- α พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-8, IL-6, NF- κ B1, KRT16, FOSL และ MMP9 เพิ่มขึ้น และการแสดงออกของไซโตไคน์เหล่านี้เพิ่มสูงขึ้นไปอีกเมื่อมีการกระตุ้นร่วมกับ IFN- γ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) โดยจะทำการทดลองทั้งหมดสามครั้ง ครั้งละสองซ้ำ แสดงให้เห็นดังภาพที่ 39(A-G)







ภาพที่ 40 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 β (A), IL-8 (B), IL-6 (C), NF- κ B1 (D), KRT16 (E), FOSL1 (F) และ MMP9 (G)

โดยศึกษาผลของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำด้วย doxycycline ต่อเซลล์ HaCaT-TNF- α เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α และ/หรือกระตุ้นด้วย IFN- γ โดยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR) *($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

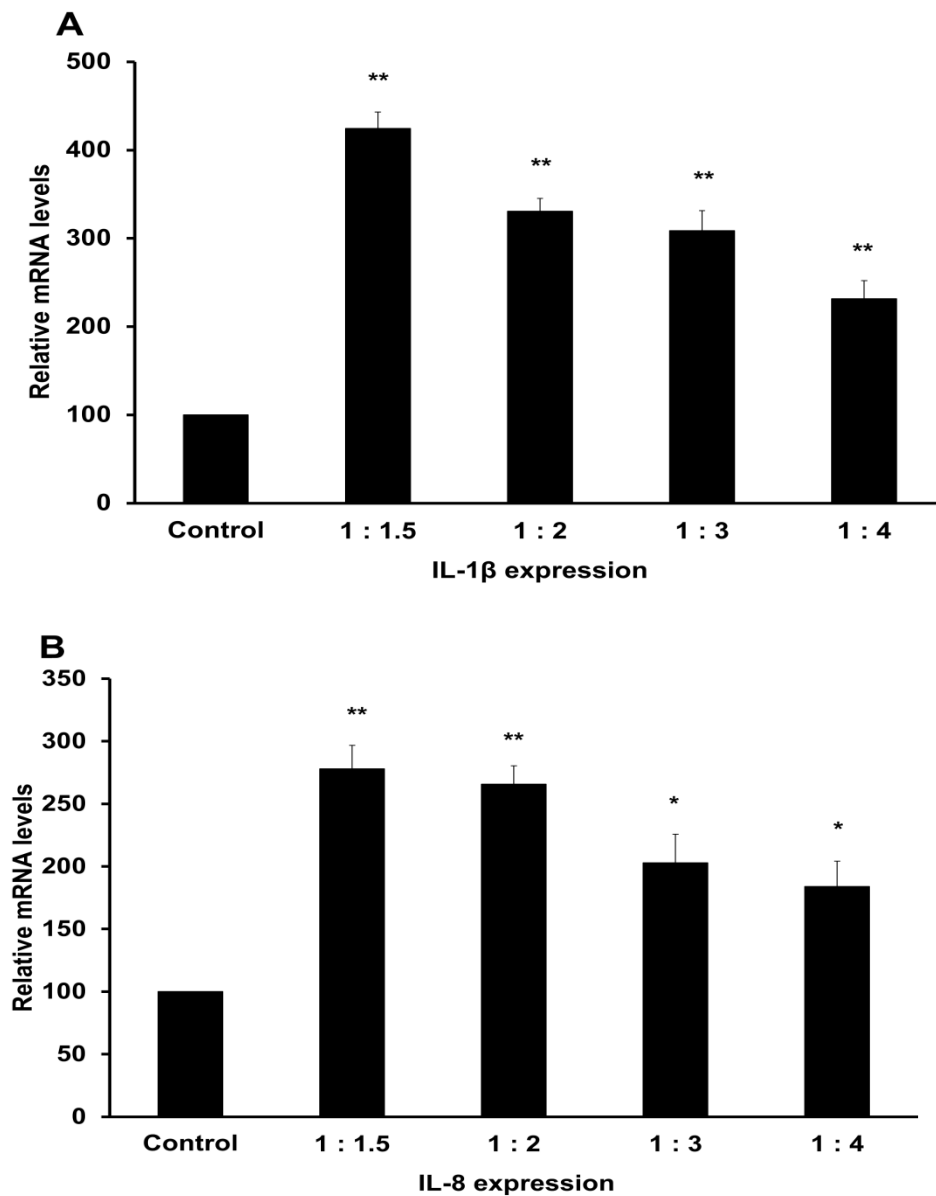
ผลการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จากการเปรียบเทียบ TNF- α ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline กับ การกระตุ้นเซลล์โดยตรงด้วย recombinant TNF- α จากภาพที่ 39 พบว่าการเหนี่ยวนำด้วย Dox มีการแสดงออกของยีน IL-1 β (A) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย TNF- α และการแสดงออกของยีน IL-1 β จะเพิ่ม

สูงขึ้นอีกเมื่อมีการกระตุ้นร่วมกับ IFN- γ ทั้งในการเหนี่ยวนำด้วย Dox และการกระตุ้นด้วย TNF- α ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้งในยีน IL-8 (B), IL-6 (C) และ NF- κ B1 (D) สำหรับยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่ KRT16 (E), FOSL1 (F) และ MMP9 (G) จากการเปรียบเทียบ TNF- α ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย Doxycycline กับ การกระตุ้นเซลล์โดยตรงด้วย recombinant TNF- α พบว่าการเหนี่ยวนำด้วย Dox มีการแสดงออกของยีน KRT16 (E) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย TNF- α และการแสดงออกของยีน KRT16 จะเพิ่มสูงขึ้นอีกเมื่อมีการกระตุ้นร่วมกับ IFN- γ ทั้งในการเหนี่ยวนำด้วย Dox และการกระตุ้นด้วย TNF- α ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้งในยีน FOSL1 (F) และ MMP9 (G)

แสดงให้เห็นว่า TNF- α ที่เหนี่ยวนำโดย Dox สามารถกระตุ้นให้เกิดมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดการอักเสบในโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งได้แก่ คือ IL-1 β , IL-8, IL-6, NF- κ B1, KRT16, FOSL, และ MMP9 เมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นเซลล์ด้วย recombinant TNF- α พบว่าระบบ Tet inducible system สามารถนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีน TNF- α ได้ และโปรตีน TNF- α ยังสามารถกระตุ้นเซลล์ HaCaT ให้เกิดการอักเสบ และมีการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมาอีกด้วย

4.7 ผลการศึกษาผลของโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้นด้วย Doxycycline ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และมีการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)

เพื่อต้องการทราบว่า TNF- α ที่เป็นผลผลิต ภายหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย Dox ในน้ำเลี้ยงเซลล์สามารถนำมากระตุ้นให้เซลล์ HaCaT เกิดการอักเสบ และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของไซโตไคน์ เช่น IL-1 β และ IL-8 ได้หรือไม่ ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าภายหลังจากการกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF- α ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ตามอัตราส่วนต่างๆ กัน จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 เพิ่มขึ้น สูงที่สุดในอัตราส่วน 1:1.5 และลดลงเรื่อยๆ ตามอัตราส่วนที่มากขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยสารใดๆ (control) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 40



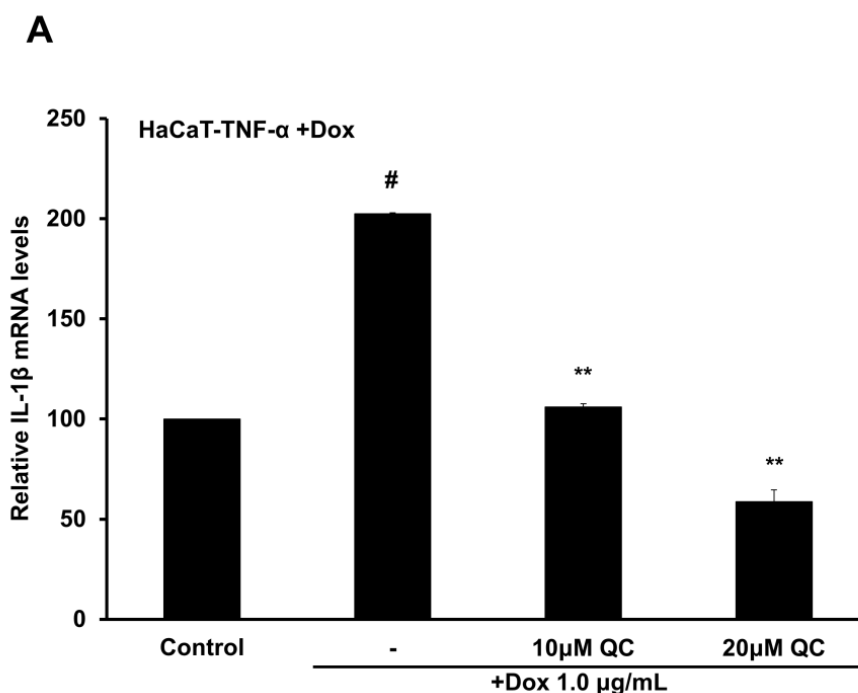
ภาพที่ 41 แสดงผลการแสดงออกของ mRNA ของยีน IL-1 β (A) และ IL-8 (B)

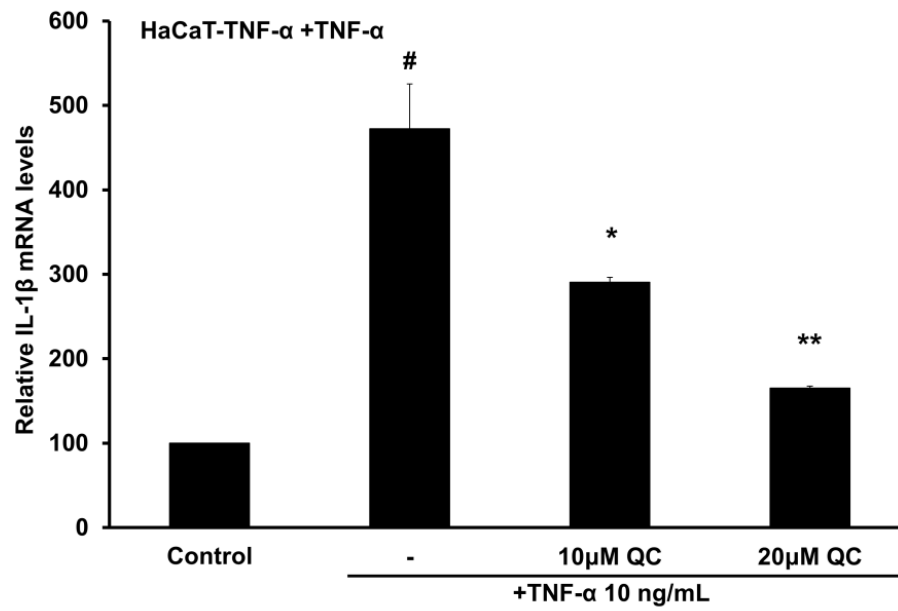
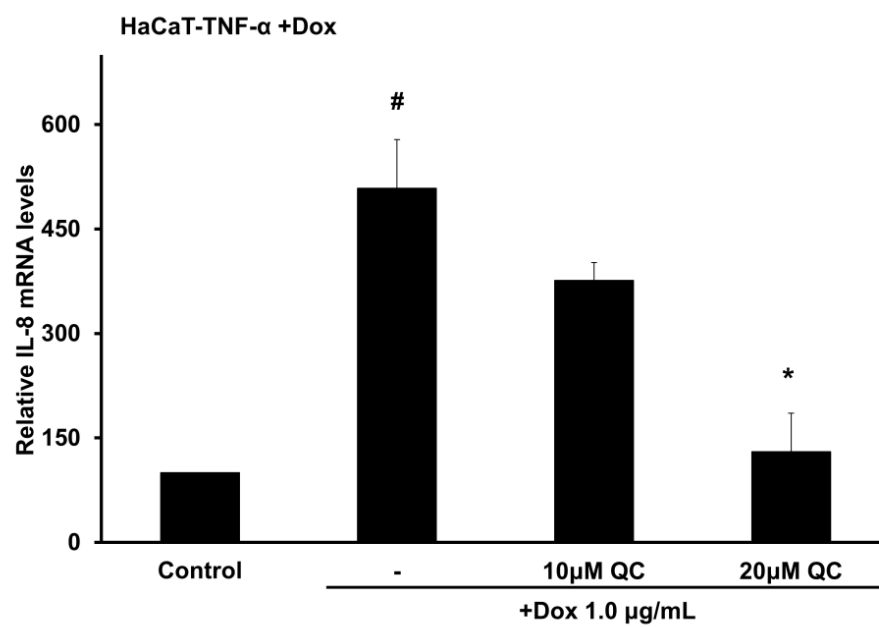
ภายหลังจากการกระตุ้นเซลล์ HaCaT โดยใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี TNF- α ที่ได้จากการเหนี่ยวนำโดยใช้ doxycycline เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งทำการกระตุ้นโดยทำเป็นอัตราส่วนในการกระตุ้น ระหว่าง น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี TNF- α (supernatant) ต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ (fresh media) ในอัตราส่วน 1:1.5, 1:2, 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย IFN- γ 10 ng/mL บ่มอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)

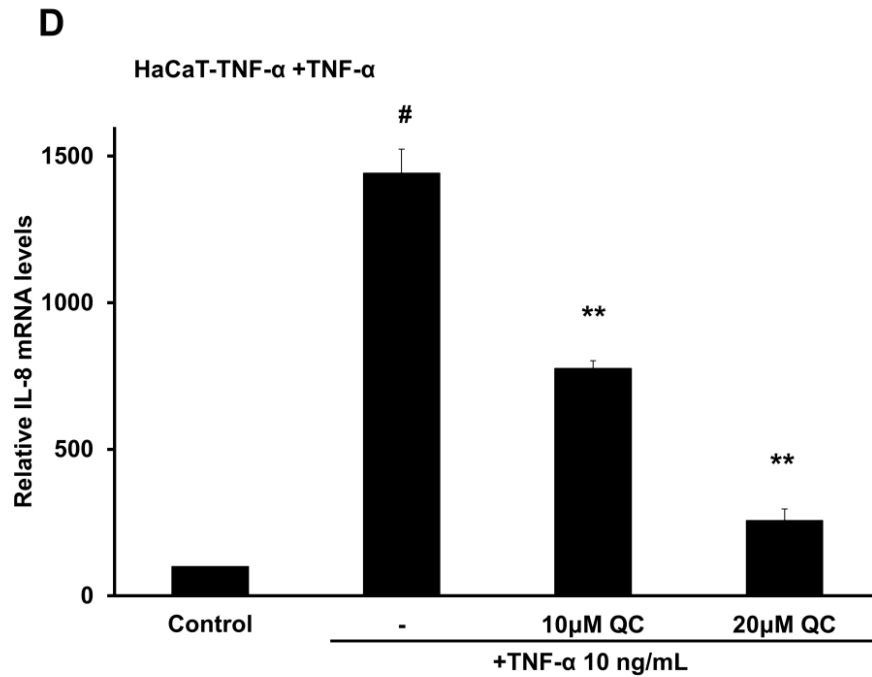
*($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ของ Quercetin ที่ยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยการวัดการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ด้วยวิธี RT-qPCR

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของ Quercetin บริสุทธิ์ พบว่าเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่กระตุ้นด้วย Dox หรือ recombinant TNF- α มีการแสดงออกของยีน IL-1 β เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ (control) จากนั้นทดสอบด้วย Quercetin ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M จากผลการทดลองพบว่า Quercetin สามารถลดการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 41A และ B พบว่าเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่กระตุ้นด้วย Dox หรือ recombinant TNF- α มีการแสดงออกของยีน IL-8 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ (control) จากนั้นทดสอบด้วย Quercetin ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M จากผลการทดลองพบว่า Quercetin สามารถลดการแสดงออกของยีน IL-8 ได้ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 41C และ D



B**C**



ภาพที่ 42 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 β (A-B) และ IL-8 (C-D) ภายหลังการกระตุ้นด้วย doxycycline 1000 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถูกยับยั้งด้วย Quercetin ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M เป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง และเปรียบเทียบกับผลการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ภายหลังการกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α 10 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถูกยับยั้งด้วย Quercetin ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M เป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง (QC=Quercetin) *($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคสะเก็ดเงิน เป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่งที่ถูกพบว่าเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลก (104) เนื่องจากเป็นโรคที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ มีปัจจัยมากมายที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงิน อาทิเช่น พันธุกรรม ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (22) รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมภายนอก (105) แม้โรคสะเก็ดเงินจะไม่ใช้โรคที่ติดต่อจากคนสู่คน ผ่านการสัมผัสจากผู้ป่วยโดยตรง แต่ลักษณะอาการปรากฏของโรคยังทำให้ผู้ป่วยไม่เป็นที่ยอมรับของสังคมเท่าที่ควร และในปัจจุบันยังไม่มียาที่สามารถรักษาโรคสะเก็ดเงินได้หายขาด มีเพียงยาที่ใช้รักษาตามอาการของผู้ป่วยเท่านั้น ทำให้ปัจจุบันยังมีการศึกษาแสวงหายาที่จะใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน ในอดีตมีงานวิจัยหลากหลายงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงินได้มีการพัฒนาเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินขึ้นมามากมายเพื่อที่จะใช้ในการจำลองสภาพผิวหนังของผู้ป่วยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน เพื่อนำไปศึกษาพยาธิสภาพ การดำเนินของโรคสะเก็ดเงิน (106) ศึกษาความแตกต่างของเซลล์ผิวหนังของคนปกติ และคนที่เป็นโรค (107) รวมไปถึงการทดสอบยา สมุนไพร หรือโมเลกุลที่สามารถยับยั้งสาเหตุบางประการที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินได้ (15, 73, 74) จุดประสงค์เพียงเพื่อนำมาพัฒนาให้เกิดเป็นยาที่สามารถบรรเทาอาการได้ในปัจจุบัน และนำไปพัฒนาต่อไปในอนาคตได้ ซึ่งในปี 2010 ได้มีการรวบรวมวิธีการพัฒนาเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงินขึ้นมา จากงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ผ่านมา โดยพบว่ามีกรทดลองหลายรูปแบบทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง และในสัตว์ทดลอง เช่น หนู เป็นต้น (108) ซึ่งในงานวิจัยที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะมีการศึกษากระบวนการอักเสบที่ทำให้เกิดโรค และศึกษาหาชนิดใหม่ๆ โดยผ่านการยับยั้งไซโตไคน์หลายชนิดในกระบวนการการอักเสบ เช่น IL-1, IL-6, TNF- α ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นภายใต้เซลล์ผิวหนังที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน และไซโตไคน์ที่หลายๆงานวิจัยให้ความสำคัญ และให้เป็นไซโตไคน์หลักที่มีบทบาทในการดำเนินของโรคสะเก็ดเงิน คือ Tumor necrosis factor alpha หรือ TNF- α (109) ซึ่งในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะมีการหลั่งของ TNF- α ออกมาบริเวณรอยโรคเป็นจำนวนมาก รวมไปถึงโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (16, 110) ปัจจุบันมียาที่สามารถต้านการทำงานของ TNF- α ซึ่งพัฒนาขึ้นมาเพื่อลดปริมาณของ TNF- α และไซโตไคน์ที่มีเกี่ยวข้องที่ทำให้เกิดการอักเสบเนื่องจาก TNF- α อาทิเช่น Infliximab Adalimumab และ Etanercept ยาจำพวกนี้มีความจำเพาะต่อ TNF- α มาก เนื่องจากโครงสร้าง

ของยาเป็นแอนติบอดีต่อ TNF- α ซึ่งยาทั้งสามชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันออกเป็นเล็กน้อย ปัจจุบันยาทั้งสามชนิดใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินข้ออักเสบ โรคระบบทางเดินอาหารอักเสบ และ Crohn's disease เป็นต้น (111-113) ยากลุ่มนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ายามีประสิทธิภาพในการรักษา มีความปลอดภัยสำหรับผู้ป่วยในระยะแรกเริ่มมีอาการ และช่วยพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดีขึ้น (112) เนื่องจากยังเป็นกลุ่มยาตัวใหม่ที่น่ามาใช้ในการรักษา ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง การให้ยา จำเป็นต้องให้ติดต่อกันเป็นระยะๆ แต่การรักษาด้วยยากลุ่มนี้เป็นระยะเวลานาน จะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ เช่น tuberculosis (114, 115) และมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็ง โดยเฉพาะ lymphoma (116) และในปัจจุบัน ยังไม่มียากลุ่มไหนที่สามารถรักษาให้โรคสะเก็ดเงินหายขาดได้ ทำได้เพียงบรรเทาอาการการอักเสบของผิวหนังที่เกิดขึ้น ซึ่งเซลล์โมเดลส่วนใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของ TNF- α และ สารที่มีฤทธิ์ต่อต้าน TNF- α จะมีการกระตุ้นเซลล์โดยใช้ recombinant TNF- α จากภายนอก ทำให้เซลล์เกิดการอักเสบ และทดสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วย TNF- α จากภายนอก (117-120) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการพัฒนาเซลล์โมเดลที่สามารถทำให้เซลล์หลั่ง TNF- α ได้เองโดยไม่ต้องกระตุ้นเซลล์ด้วย recombinant TNF- α จากภายนอก แต่จะควบคุมให้เซลล์มีการผลิต TNF- α ได้โดยใช้ Doxycycline ทั้งนี้ก็เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลองด้วยการกระตุ้นโดยใช้ recombinant TNF- α ซึ่งมีราคาแพงในประเทศไทย ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เซลล์โมเดลในอดีตยังไม่เหมาะที่จะนำมาคัดกรองหาสมุนไพร หรือยาจำนวนมาก ได้ สำหรับเซลล์ที่นำมาใช้เป็นโมเดล คือ เซลล์ HaCaT (121) เป็น Immortalized human keratinocyte ถูกนำมาใช้เป็นเซลล์โมเดลในการศึกษาเกี่ยวกับโรคสะเก็ดเงิน ในร่างกายของคนปกติชั้นผิวหนัง epidermis มีเคอราติโนไซค์เป็นส่วนประกอบหลักอยู่ประมาณร้อยละ 90 ของชั้นผิวหนัง เคอราติโนไซค์มีบทบาทสำคัญของโรคผิวหนังอักเสบ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยปกป้องการทำลายผิวหนังจากสิ่งเร้าภายนอกในร่างกายได้ เพราะจะคงทนต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก (122) เซลล์ HaCaT เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงง่ายมาก ไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เพิ่มเติม และไม่ได้เป็นเซลล์มะเร็ง (48) และสำหรับ primary epidermal keratinocytes เป็นเซลล์ผิวหนังที่ได้มาจากคนปกติ นำมาใช้ในการศึกษาของโรคผิวหนังอักเสบ หรือโรคสะเก็ดเงินเช่นเดียวกับเซลล์ HaCaT ข้อแตกต่างระหว่างเซลล์สองชนิดนี้คือ primary epidermal keratinocytes เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างยาก และต้องการสารอาหารเพิ่มเติมจำนวนมากในการเจริญเติบโตของเซลล์ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกนำเซลล์ HaCaT มาใช้ในการศึกษา เพื่อพัฒนาและปรับปรุงเซลล์โมเดลใหม่เพื่อตรวจสอบการทำงานของ TNF- α และสารที่มีฤทธิ์ต่อต้าน TNF- α ที่สามารถตรวจวิเคราะห์จากการส่งสัญญาณของ TNF- α ทางผู้วิจัยใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีของ lentiviral และถูกสร้างในเซลล์ผิวหนังเคอราติโนไซค์ (เซลล์ HaCaT) (123) กระตุ้นให้มีการ

แสดงออกของ TNF- α (หรือเรียกว่า HaCaT-TNF- α) ใช้วิธี western blot ในการวิเคราะห์ ทางผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่าเซลล์ HaCaT-TNF- α มีการแสดงออกของ TNF- α โดยผ่านการควบคุมด้วย Doxycycline (Dox) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (1000-3000 ng/mL) ซึ่งการแสดงออกของ TNF- α ที่มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุด จากการเหนี่ยวนำด้วย Dox ที่ความเข้มข้น 1000 ng/mL และเวลาในการบ่มเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 33 และ 34) ภายหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย Dox ปริมาณของ TNF- α ถูกผลิตและหลั่งออกมาภายในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทำการตรวจหาปริมาณของ TNF- α ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Dox ในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยใช้วิธี ELISA เพื่อยืนยันการการแสดงออกของระดับ TNF- α ที่หลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ พบอยู่ในช่วงระหว่าง 0.3-0.9 ng/mL (ภาพที่ 35) คล้ายกับงานวิจัยที่ผ่านมาในปี ค.ศ. 1994 ของ P. Etlehadi และคณะที่ตรวจวัดปริมาณของ TNF- α ในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน ด้วยวิธี ELISA พบว่า ในซีรัมผู้ป่วยมีระดับของ TNF- α ที่สกัดได้จากรอยโรคสะเก็ดเงิน บริเวณชั้น stratum corneum (124) ซึ่งระดับของ TNF- α จากรอยโรคสะเก็ดเงินและระดับของ TNF- α ที่หลั่งออกมาจากเซลล์โมเดล (0.3-0.9 ng/mL) ซึ่งระดับของ TNF- α จากทั้งสองงานวิจัยพบว่าต่ำกว่า 10 เท่าของความเข้มข้นของ TNF- α ที่ใช้ในการกระตุ้นจากภายนอก (10 ng/mL) สำหรับเซลล์โมเดลในปัจจุบัน (117-120) การเปรียบเทียบผลระหว่างการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α จากภายนอก และการเหนี่ยวนำด้วย Dox ให้มีการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นการตอบสนองต่อ TNF- α ที่คล้ายคลึงกัน ในส่วนของการยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ และกระตุ้นการผลิตของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของเซลล์ต่อ TNF- α นี้มีความสำเร็จมาก ที่ความเข้มข้นของ TNF- α ในระดับต่างๆ ใน HaCaT-TNF- α เซลล์โมเดล ถูกเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α จากภายนอก ซึ่งข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Dox ให้มีการแสดงออกของ TNF- α มีความไวต่อการหลั่งของ TNF- α มากกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α จากภายนอก

ในการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นเพิ่มเติมเกี่ยวกับ TNF- α ว่า TNF- α สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ HaCaT (120) ในการศึกษาครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่า Dox สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ TNF- α และที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ Dox ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT-TNF- α อีกด้วย (ภาพที่ 36 และ 37) โดยใช้วิธี MTT ในการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัด metabolic activity ของเซลล์ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก โดยในการทดลองจะเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำด้วย Dox ให้มีการแสดงออกของ TNF- α กับการกระตุ้นเซลล์โดยตรงด้วย recombinant TNF- α จากภายนอก ทั้งในเซลล์ HaCaT-TNF- α และ HaCaT-GFP ผลจากการ

ทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของ Dox ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของ HaCaT-GFP เนื่องจาก GFP ที่หลั่งออกมาไม่มีผลต่อการทดลอง ใช้เป็นตัวควบคุมลบในการทดลอง (ภาพที่ 37) และสำหรับเซลล์ HaCaT-TNF- α ความเข้มข้นของ Dox หรือ ปริมาณการแสดงออกของ TNF- α มีผลยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ HaCaT-TNF- α เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α จากภายนอก ในเซลล์ HaCaT-TNF- α (ภาพที่ 36) แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ TNF- α มีผลยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ ชัดแย้งกับทฤษฎีในการเกิดโรคสะเก็ดเงิน ที่ซึ่งเมื่อเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน จะมีการกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังเกิดการอักเสบ โดยเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน (Th1 cell, Th17 cell) จะมีการส่งสัญญาณภายในรอยโรค จากนั้นไซโตไคน์ อย่างเช่น TNF- α , IL-1 β , IL-6 และ IFN- γ จะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ Th1 ซึ่งสารสื่อกลางเหล่านี้มีผลกับเคอราติโนไซต์ ซึ่งนำไปสู่การทำงาน การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มมากกว่าปกติ และมีการผลิต pro-inflammatory cytokines, chemokines และ anti-microbial peptides (8) ทำให้ลักษณะของโรคสะเก็ดเงินจึงมีลักษณะของผิวหนังที่หลุดลอกออกมาอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากเซลล์ผิวหนังมีการสร้าง และแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา (125) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ (48) ที่พบว่า การกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย IL-17 หรือ TNF- α ร่วมกับ IFN- γ ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT แบบมากกว่าปกติได้ ทำให้ทางคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าเซลล์ HaCaT อาจจะมีข้อจำกัดที่ไม่เหมาะสมเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นโมเดลของโรคสะเก็ดเงิน นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของโรคสะเก็ดเงิน โดยวิธี reverse transcriptase qPCR โดยเริ่มจากการทดสอบผลของ Dox ในการเหนี่ยวนำเซลล์ HaCaT สายพันธุ์ปกติ พบว่า Dox ไม่มีผลต่อการแสดงออก และการหลั่งของ TNF- α ในเซลล์ HaCaT สายพันธุ์ปกติ ไม่มีการกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β และ IL-8 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α และ/หรือ IFN- γ จากภายนอก พบว่ามีการแสดงออกของ IL-1 β และ IL-8 ในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่มีการกระตุ้น (ภาพที่ 38) แสดงให้เห็นว่าระบบ Tet-inducible ที่ใช้ Dox เป็นตัวเหนี่ยวนำควบคุมให้เกิดการแสดงออกของยีนจะมีผลกับเซลล์ HaCaT-TNF- α และ HaCaT-GFP เท่านั้น จึงจะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน เช่น TNF- α และ GFP ได้ การใช้การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์โมเดลนี้ ผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่า Dox สามารถกระตุ้นการทำงานของ TNF- α และสามารถกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดที่มีสารสื่อกลาง คือ TNF- α ซึ่งได้แก่ IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B1, FOSL1, MMP9 และ KRT16 (ภาพที่ 39A-G) โดยในการทดลองจะใช้เซลล์ HaCaT-TNF- α เหนี่ยวนำด้วย

Dox ให้มีการแสดงออกของ TNF- α จากนั้น TNF- α จะมีการส่งสัญญาณผ่านกลไกต่างๆ นำไปสู่การเกิดการอักเสบของเคอราติโนไซต์ (126) ทำให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเกิดขึ้น ซึ่งผลพบว่าภายหลังการกระตุ้นเซลล์ HaCaT-TNF- α ด้วย Dox เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้มีการแสดงออกของ IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B1 เพิ่มสูงขึ้น ในงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีระดับของ TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 และ IL-12 เพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (127) ซึ่งภายในรอยโรคของสะเก็ดเงินมีการทำงานระหว่างเซลล์และสารสื่อกลางในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ innate และ adaptive เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเนื้อเยื่อบุผิว (22) ซึ่งเซลล์ในระบบ innate จะมีการหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญ เช่น TNF- α , IFN- α , IFN- γ , IL-1 β และ IL-6 ที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ myeloid dendritic (128) ซึ่งการแสดงออกของไซโตไคน์เหล่านี้เป็นสารตัวกลางหลักในการนำไปสู่การส่งสัญญาณผ่าน NF- κ B (129, 130) และในการวิจัยของ Soboleva et al. 2014 (48) พบว่ายีนที่มีการทำงาน และมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน เช่น KRT1, MK167, KRT16, FOSL1 และ MMP9 ซึ่งยีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องในการเมตาบอลิซึมของเคอราติโนไซต์ (131) เพื่อยืนยันผลของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของผิวหนัง จึงมีการตรวจวัดการแสดงออกของยีน KRT16, MMP9 และ FOSL1 และพบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ HaCaT-TNF- α ที่ไม่มีการกระตุ้นใดๆ (ภาพที่ 39A-G) และเมื่อทดลอง กระตุ้นเซลล์ HaCaT-TNF- α ด้วย Dox ร่วมกับ IFN- γ พบว่าทำให้มีการแสดงออกของ IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B1, KRT16, MMP9 และ FOSL1 มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอีก ดังนั้น IFN- γ อาจเป็นตัวเสริมฤทธิ์ในการทำให้เกิดการอักเสบได้ และผลการแสดงออกของ ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากการกระตุ้นด้วย Dox สอดคล้องกับการกระตุ้นเซลล์ HaCaT-TNF- α ด้วย recombinant TNF- α และ/หรือ IFN- γ ซึ่งในอนาคตอาจนำเซลล์โมเดลที่พัฒนาขึ้นมาใช้นี้มาใช้ทดแทนการกระตุ้นเซลล์ด้วย recombinant TNF- α เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดสอบ และสามารถควบคุมการแสดงออกตามความต้องการได้ สิ่งที่น่าสนใจที่แสดงให้เห็นเซลล์ที่เหนี่ยวนำด้วย Dox มีการแสดงออกของ TNF- α หรือการกระตุ้นด้วย TNF- α จากภายนอกให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน แต่ไม่มีการวิเคราะห์ความแตกต่างของการทำงานของแต่ละยีนเป็นอัตราส่วน ซึ่งความแตกต่างในอัตราส่วนของการทำงานของยีนเหล่านี้ อาจเกิดเนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นของ TNF- α ที่หลั่งออกมาและพบในน้ำเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่การเหนี่ยวนำด้วย Dox ทำให้มีการหลั่งของ TNF- α พบในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งปริมาณของ TNF- α ที่หลั่งออกมามีประสิทธิภาพในการทำงาน และสามารถถ่ายโอนไปกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β และ IL-8 ในเซลล์ HaCaT สายพันธุ์ปกติได้อีกด้วย โดยได้นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย Dox เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไป

กระตุ้นเซลล์ HaCaT สายพันธุ์ปกติร่วมกับ IFN- γ ในอัตราส่วนของน้ำเลี้ยงที่เหนียวนำด้วย Dox ต่อ น้ำเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่แตกต่างกันออกไป (1:1.5, 1:2, 1:3 และ 1:4) และทำการตรวจวัดปริมาณ การแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 ซึ่งพบว่าในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เหนียวนำด้วย Dox สามารถ กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน IL-1 β และ IL-8 เพิ่มมากขึ้น และมีปริมาณการแสดงออกของยีน ลดลงเรื่อยๆ แปรผกผันกับอัตราส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เหนียวนำด้วย Dox ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 40A และ B) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HaCaT ที่ไม่มีการกระตุ้น แสดงว่าเซลล์โมเดล HaCaT-TNF- α ใช้ ผลิต TNF- α ในรูปแบบของสารละลาย ซึ่งสามารถพบได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ภายหลังจากการกระตุ้นด้วย Dox และ TNF- α มีการทำงานกระตุ้นเซลล์ให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ IL-8) โดยผลการทดลองการทำงานของ TNF- α สามารถยับยั้งได้ด้วยสารที่มีฤทธิ์ ต่อต้าน TNF- α คือ Quercetin ซึ่งเป็น ไบโอฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นหนึ่งในฟลาโวนอยด์ที่ พบได้ ปริมาณสูงใน ไวน์แดง แอปเปิ้ล หัวหอม ชาดำ และพบได้น้อยใน ผักใบเขียวอื่นๆ และถั่ว (76, 77) ใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบการคัดเลือกหาสารสกัด ซึ่ง Quercetin เคยมีการรายงานที่ผ่านมามี คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ทำหน้าที่ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ยับยั้ง มะเร็ง และภูมิแพ้ (82) Quercetin สามารถลดการตอบสนองต่อการอักเสบได้ ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่า Quercetin มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการอักเสบ ซึ่งสามารถยับยั้งไซโตไคน์ และลดการ สร้าง nitric oxide ผ่านการยับยั้งการส่งสัญญาณของ NF- κ B (132, 133) ครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้นำเซลล์ โมเดล HaCaT-TNF- α กระตุ้นการอักเสบด้วยการเหนียวนำด้วย Dox ให้เซลล์มีการผลิตโปรตีน TNF- α ภายหลังจากการกระตุ้นการอักเสบของเซลล์มีการเติม Quercetin ที่ความเข้มข้น 10 μ M และ 20 μ M ซึ่งได้รับการวิจัยมาแล้วว่ามีผลการอักเสบของเซลล์ HaCaT (102) จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า Quercetin สามารถลดการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 β และ IL-8 ที่เกิดจากการกระตุ้นของ TNF- α ซึ่งผลมีความสอดคล้องกับ HaCaT-TNF- α ที่ถูกกระตุ้นด้วย recombinant TNF- α จาก ภายนอก พบว่าผลการทดลองมีการลดการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 β และ IL-8 ซึ่งไซโตไคน์ทั้ง สองชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน (ภาพที่ 41A-D) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเราได้พัฒนาเซลล์โมเดล HaCaT-TNF- α ที่ใช้ในการตรวจสอบการทำงานของสารต่อต้าน ฤทธิ์ของ TNF- α และใช้ในการคัดเลือกหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านการทำงานของ TNF- α ชนิด อื่นๆ ต่อไปได้อีกในอนาคต

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการพัฒนาเซลล์โมเดลโดยใช้ระบบ Tet-inducible สามารถ นำมาใช้ทดแทน HaCaT เซลล์โมเดลที่กระตุ้นด้วย recombinant TNF- α ได้ และผลจากการ กระตุ้นด้วย Dox ทำให้มีการผลิต TNF- α ขึ้นมา ซึ่ง TNF- α สามารถออกฤทธิ์ทำให้เซลล์ HaCaT

เกิดการอักเสบคล้ายกับรอยโรคของโรคสะเก็ดเงินได้ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการเมตาบอลิซึมของผิวหนัง อาทิเช่น IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B1, KRT16, MMP9 และ FOSL1 ให้เพิ่มสูงขึ้น แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการของเซลล์ HaCaT ที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์โมเดลของโรคสะเก็ดเงิน นั่นคือ เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์ HaCaT ด้วย TNF- α กลับไม่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งยังขัดแย้งกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน เซลล์ HaCaT จึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นโมเดลของโรคสะเก็ดเงินได้ สำหรับงานวิจัยนี้ พบว่ามีความสำเร็จในการพัฒนาเซลล์โมเดลโดยใช้การถ่ายโอนยีนด้วยไวรัส และควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยระบบ Tet-inducible ซึ่งในอนาคตอาจมีการนำไปประยุกต์ใช้ในเซลล์ชนิดอื่นต่อไปได้ สำหรับเซลล์โมเดลที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ อาจจะใช้เป็นตัวแทนของโรคผิวหนังอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย TNF- α และนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกรักษาโรคนิวโรส หรือยาบางชนิดที่ช่วยในการต้านฤทธิ์ของ TNF- α ได้ต่อไป หากต้องการคัดเลือกรักษาโรคนิวโรส หรือยาเป็นจำนวนมาก ต้องการความรวดเร็ว การใช้เซลล์โมเดลที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

รายการอ้างอิง

1. Jakobsen M, Stenderup K, Rosada C, Moldt B, Kamp S, Dam TN, et al. Amelioration of psoriasis by anti-TNF-alpha RNAi in the xenograft transplantation model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(10):1743-53.
2. Psoriasis 2012 [cited 2015 16/8]. Available from: <http://www.dst.or.th/html/index.php?op=article-detail&id=153&csid=8&cid=23#.Vpp4uPmLRdg>.
3. Boehncke WH. Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2015;41(4):665-75.
4. Schwartz J, Evers AWM, Bundy C, Kimball AB. Getting under the Skin: Report from the International Psoriasis Council Workshop on the Role of Stress in Psoriasis. *Frontiers in Psychology*. 2016;7:87.
5. Fortes C, Mastroeni S, Leffondre K, Sampogna F, Melchi F, Mazzotti E, et al. Relationship between smoking and the clinical severity of psoriasis. *Archives of dermatology*. 2005;141(12):1580-4.
6. Chong BF, Wong HK. Immunobiologics in the treatment of psoriasis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2007;123(2):129-38.
7. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(6):539-52.
8. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(5):496-509.
9. Li H, Gao L, Shen Z, Li CY, Li K, Li M, et al. Association study of NFKB1 and SUMO4 polymorphisms in Chinese patients with psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res*. 2008;300(8):425-33.
10. Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *The Journal of investigative dermatology*. 1992;99(3):294-8.

11. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutation research*. 2001;480-481:243-68.
12. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี [cited 2014 24 3]. Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_02_2.htm.
13. น้ำมันมะพร้าวป้องกันและรักษาโรคสะเก็ดเงินได้อย่างไร ? [cited 2015 4 6]. Available from: <http://www.coconut-virgin.com/th/psoriasis.html>.
14. Sun J, Han J, Zhao Y, Zhu Q, Hu J. Curcumin induces apoptosis in tumor necrosis factor-alpha-treated HaCaT cells. *International immunopharmacology*. 2012;13(2):170-4.
15. Saelee C, Thongrakard V, Tencomnao T. Effects of Thai medicinal herb extracts with anti-psoriatic activity on the expression on NF-kappaB signaling biomarkers in HaCaT keratinocytes. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2011;16(5):3908-32.
16. Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *International journal of molecular medicine*. 2007;19(3):469-74.
17. Weger W. Current status and new developments in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis with biological agents. *British journal of pharmacology*. 2010;160(4):810-20.
18. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol*. 2007;25(6):535-46.
19. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985;13(3):450-6.
20. Ferrandiz C, Pujol RM, Garcia-Patos V, Bordas X, Smandia JA. Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002;46(6):867-73.

21. นภดล นพคุณ ธร, ป่วน สุทธิพิณีจธรรม, พรทิพย์ ภูวบัณฑิตสิน, รัตนี อัครพันธุ์, ชนิษฐา ตู้อินดา, เปรมจิต ไวยาวัจฉัย, สุธินี รัตนิน, และ พูลเกียรติ สุขนวนณิช. แนวทางการดูแลผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) Clinical Practice Guideline for Psoriasis 2010 [cited 2013 12/11]:[93-126 pp.]. Available from: http://dst.or.th/files_news/Psoriasis_2010.pdf.
22. Schön MP, Boehncke W-H. Psoriasis. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(18):1899-912.
23. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American journal of human genetics*. 2006;78(5):827-51.
24. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(12):889-99.
25. Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ. Histocompatibility (HL-A) Antigens Associated with Psoriasis. *New England Journal of Medicine*. 1972;287(15):738-40.
26. Choonhakarn C, Romphruk A, Puapairoj C, Jirarattanapochai K, Romphruk A, Leelayuwat C. Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *International journal of dermatology*. 2002;41(6):330-4.
27. Elder JT, Nair RP, Guo S, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ. The genetics of psoriasis. *Archives of dermatology*. 1994;130(2):216-24.
28. Ozawa A, Miyahara M, Sugai J, Iizuka M, Kawakubo Y, Matsuo I, et al. HLA class I and II alleles and susceptibility to generalized pustular psoriasis: significant associations with HLA-Cw1 and HLA-DQB1*0303. *The Journal of dermatology*. 1998;25(9):573-81.
29. Herron MD, Hinckley M, Hoffman MS, Papenfuss J, Hansen CB, Callis KP, et al. Impact of obesity and smoking on psoriasis presentation and management. *Archives of dermatology*. 2005;141(12):1527-34.
30. How Cigarettes and Alcohol Affect Psoriasis 2015 [cited 2016 10 1]. Available from: <https://www.psoriasis.org/advance/how-cigarettes-and-alcohol-affect-psoriasis>.
31. O'Brien M, Koo J. The mechanism of lithium and beta-blocking agents in inducing and exacerbating psoriasis. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2006;5(5):426-32.

32. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(1):135-43.
33. Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *The British journal of dermatology*. 2003;149(3):530-4.
34. Mallon E, Young D, Bunce M, Gotch FM, Easterbrook PJ, Newson R, et al. HLA-Cw*0602 and HIV-associated psoriasis. *The British journal of dermatology*. 1998;139(3):527-33.
35. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;101(5):701-5.
36. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, et al. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(7):1653-61.
37. Cargill M, Schrodi Steven J, Chang M, Garcia Veronica E, Brandon R, Callis Kristina P, et al. A Large-Scale Genetic Association Study Confirms IL12B and Leads to the Identification of IL23R as Psoriasis-Risk Genes. *American journal of human genetics*. 2007;80(2):273-390.
38. Becher B, Pantelyushin S. Hiding under the skin: Interleukin-17-producing [gamma][delta] T cells go under the skin? *Nat Med*. 2012;18(12):1748-50.
39. Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1995;32(6):982-6.
40. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(10):2271-9.
41. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *The British journal of dermatology*. 2008;159(5):1092-102.

42. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1995;155(12):5483-6.
43. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007;150(3):407-15.
44. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007;445(7128):648-51.
45. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2007;178(4):2229-40.
46. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2010;29(1):3-9.
47. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *The New England journal of medicine*. 2009;361(5):496-509.
48. Soboleva AG, Zolotarev AD, Sobolev VV, Bruskin SA, Piruzian ES, Mezentsev AV. [Genetically predetermined limitation in the use of HaCaT cells that affects their ability to serve as an experimental model of psoriasis]. *Genetika*. 2014;50(10):1222-31.
49. Park K, Lee J-H, Cho H-C, Cho S-Y, Cho J-W. Down-regulation of IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β by glucosamine in HaCaT cells, but not in the presence of TNF- α . *Oncology letters*. 2010;1(2):289-92.
50. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3666-70.
51. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*. 2000;50(3):184-95.

52. Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *The Indian Journal of Medical Research*. 2012;135(1):127-30.
53. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microscopy research and technique*. 2000;50(3):216-28.
54. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
55. Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell*. 1990;63(2):251-8.
56. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1-20.
57. Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*. 2004;116(4):491-7.
58. Kondo S, Sauder DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *European journal of immunology*. 1997;27(7):1713-8.
59. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(8):5707-13.
60. Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;313(2):443-6.
61. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(7):1126-67.
62. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development*. 2012;26(3):203-34.
63. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a001651.

64. Verstrepen L, Carpentier I, Verhelst K, Beyaert R. ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappa B and apoptosis signaling. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(2):105-14.
65. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development.* 2004;18(18):2195-224.
66. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews Cancer.* 2002;2(4):301-10.
67. Wojas-Pelc A, Ciszek M, Kurnyta M, Marcinkiewicz J. Cytokine network in psoriasis. Cross-talk between keratinocytes and cells of the skin immune system. *Central European Journal of Immunology.* 2006;31(3/4):111.
68. Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *The Journal of experimental medicine.* 2000;192(5):705-18.
69. Gillitzer R, Wolff K, Tong D, Muller C, Yoshimura T, Hartmann AA, et al. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *The Journal of investigative dermatology.* 1993;101(2):127-31.
70. Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology today.* 1994;15(10):464-9.
71. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England).* 2010;49(7):1215-28.
72. โรคข้ออักเสบสะเก็ดเงิน (Psoriatic Arthritis) [cited 2013 23 2]. Available from: <http://www.thairheumatology.org/people02.php?id=94>
73. Thongrakard V. Screening of Thai medicinal plant extracts for in vitro anti-psoriatic activity: Chulalongkron University; 2009.
74. Jeon Y-J, Kim B-H, Kim S, Oh I, Lee S, Shin J, et al. Rhododendrin ameliorates skin inflammation through inhibition of NF- κ B, MAPK, and PI3K/Akt signaling. *European journal of pharmacology.* 2013;714(1-3):7-14.

75. Vijayalakshmi A, Ravichandiran V, Malarkodi V, Nirmala S, Jayakumari S. Screening of flavonoid “quercetin” from the rhizome of *Smilax china* Linn. for anti-psoriatic activity. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012;2(4):269-75.
76. Shaik YB, Castellani ML, Perrella A, Conti F, Salini V, Tete S, et al. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2006;20(3-4):47-52.
77. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*. 2008;585(2-3):325-37.
78. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20(7):933-56.
79. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Current sports medicine reports*. 2009;8(4):206-13.
80. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, et al. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2007;56(5):210-5.
81. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2008;19(11):717-26.
82. Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004;2(12):2138-45.
83. Kelly GS. Quercetin. Monograph. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2011;16(2):172-94.
84. Fortunato LR, Alves CdF, Teixeira MM, Rogerio AP. Quercetin: a flavonoid with the potential to treat asthma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;48:589-99.

85. Gavrilesco LC, Van Etten RA. Production of Replication-Defective Retrovirus by Transient Transfection of 293T cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2007(10):550.
86. Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2014;1195:33-41.
87. Kawjit N. Effects of thai herbal extracts with anti-psoriatic activity on expression of proteins in human keratinocytes: a proteomics study: Chulalongkorn University; 2013.
88. Kohan DE. Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney international*. 2008;74(4):427-37.
89. Alexeyev MF, Fayzulin R, Shokolenko IN, Pastukh V. A retro-lentiviral system for doxycycline-inducible gene expression and gene knockdown in cells with limited proliferative capacity. *Molecular Biology Reports*. 2009;37(4):1987-91.
90. Davies J, Jimenez A. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1980;29(5 Suppl):1089-92.
91. Bar-Nun S, Shneyour Y, Beckmann JS. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochimica et biophysica acta*. 1983;741(1):123-7.
92. Krishnapuram R, Dhurandhar EJ, Dubuisson O, Hegde V, Dhurandhar NV. Doxycycline-regulated 3T3-L1 preadipocyte cell line with inducible, stable expression of adenoviral E4orf1 gene: a cell model to study insulin-independent glucose disposal. *PloS one*. 2013;8(3):e60651.
93. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(4):1111-6.
94. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*. 2005;21(3):389-95.
95. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*. 2002;57(9):765-70.

96. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2011;716:157-68.
97. Kronek J, Paulovičová E, Luston J, Paulovičová L, Kroneková Z. *Biocompatibility and Immunocompatibility Assessment of Poly(2-Oxazolines)*: INTECH Open Access Publisher; 2013.
98. Telesnitsky A GS. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA Coffin JM HS, Varmus HE, editors. *Retroviruses.*, editor1997.
99. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996;6(10):986-94.
100. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of fluorescence*. 2012;22(4):1189-99.
101. Vogel CF, Sciallo E, Li W, Wong P, Lazennec G, Matsumura F. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Molecular Endocrinology*. 2007;21(12):2941-55.
102. Yoon JS, Lee HJ, Choi SH, Chang E-J, Lee SY, Lee EJ. Quercetin Inhibits IL-1 β -Induced Inflammation, Hyaluronan Production and Adipogenesis in Orbital Fibroblasts from Graves' Orbitopathy. *PloS one*. 2011;6(10):e26261.
103. Abengozar-Vela A, Calonge M, Stern ME, Gonzalez-Garcia MJ, Enriquez-De-Salamanca A. Quercetin and Resveratrol Decrease the Inflammatory and Oxidative Responses in Human Ocular Surface Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(4):2709-19.
104. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(2):377-85.
105. Dika E, Bardazzi F, Balestri R, Maibach HI. Environmental factors and psoriasis. *Current problems in dermatology*. 2007;35:118-35.
106. Das RP, Jain AK, Ramesh V. Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Indian Journal of Dermatology*. 2009;54(1):7-12.

107. Chen SH, Arany I, Apisarnthanarax N, Rajaraman S, Tying SK, Horikoshi T, et al. Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon-gamma differs in the expression of zinc-alpha(2)-glycoprotein and cathepsin D. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(3):565-71.
108. Pouliot JJaR. In Vivo and In Vitro Models of Psoriasis, Daniel Eberli (Ed.): InTech; 2010 [Available from: <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/in-vivo-and-in-vitro-models-of-psoriasis>.
109. Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2002;1(3):264-75.
110. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological research*. 1999;39(1):41-7.
111. De Simone C, Amerio P, Amoruso G, Bardazzi F, Campanati A, Conti A, et al. Immunogenicity of anti-TNFalpha therapy in psoriasis: a clinical issue? *Expert opinion on biological therapy*. 2013;13(12):1673-82.
112. Toussirot É, Wendling D. The use of TNF- α blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2007;8(13):2089-107.
113. Tobin AM, Kirby B. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2005;19(1):47-57.
114. Ellerin T, Rubin RH, Weinblatt ME. Infections and anti-tumor necrosis factor α therapy. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(11):3013-22.
115. Rychly DJ, DiPiro JT. Infections Associated with Tumor Necrosis Factor- α Antagonists. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2005;25(9):1181-92.
116. Brown SL, Greene MH, Gershon SK, Edwards ET, Braun MM. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(12):3151-8.

117. Saelee C, Thongrakard V, Tencomnao T. Effects of Thai medicinal herb extracts with anti-psoriatic activity on the expression on NF- κ B signaling biomarkers in HaCaT keratinocytes. *Molecules*. 2011;16(5):3908-32.
118. Cho J-W, Lee K-S, Kim C-W. Curcumin attenuates the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α as well as cyclin E in TNF- α -treated HaCaT cells; NF- κ B and MAPKs as potential upstream targets. *International journal of molecular medicine*. 2007;19(3):469-74.
119. Barroso E, Eyre E, Palomer X, Vázquez-Carrera M. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) agonist GW501516 prevents TNF- α -induced NF- κ B activation in human HaCaT cells by reducing p65 acetylation through AMPK and SIRT1. *Biochemical pharmacology*. 2011;81(4):534-43.
120. Reinartz J, Bechtel MJ, Kramer MD. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is counteracted by transforming growth factor- α . *Experimental cell research*. 1996;228(2):334-40.
121. Hollywood KA, Winder CL, Dunn WB, Xu Y, Broadhurst D, Griffiths CE, et al. Exploring the mode of action of dithranol therapy for psoriasis: a metabolomic analysis using HaCaT cells. *Molecular bioSystems*. 2015;11(8):2198-209.
122. Jeon YJ, Kim BH, Kim S, Oh I, Lee S, Shin J, et al. Rhododendrin ameliorates skin inflammation through inhibition of NF-kappaB, MAPK, and PI3K/Akt signaling. *European journal of pharmacology*. 2013;714(1-3):7-14.
123. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*. 1988;106(3):761-71.
124. Ettehadi P, Greaves MW, Wallach D, Aderka D, Camp RD. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clinical and Experimental Immunology*. 1994;96(1):146-51.
125. Azfar RS, Gelfand JM. Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(4):416-22.
126. Bernard FX, Morel F, Camus M, Pedretti N, Barrault C, Garnier J, et al. Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune

Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Journal of allergy*. 2012;2012:718725.

127. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8. *Mediators of Inflammation*. 2005;2005(5):273-9.

128. Dunphy S, Gardiner CM. NK cells and psoriasis. *BioMed Research International*. 2011;2011.

129. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 0000;10(1):45-65.

130. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Jackson-Bernitsas D, Ahn KS, Sethi G, et al. TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Research Foundation workshop*. 2006(56):161-86.

131. Starodubtseva NL, Sobolev VV, Soboleva AG, Nikolaev AA, Bruskin SA. [Expression of genes for metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-9, and MMP-12) associated with psoriasis]. *Genetika*. 2011;47(9):1254-61.

132. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *European journal of immunology*. 2005;35(2):584-92.

133. Nair HK, Rao KV, Aalinkeel R, Mahajan S, Chawda R, Schwartz SA. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(1):63-9.



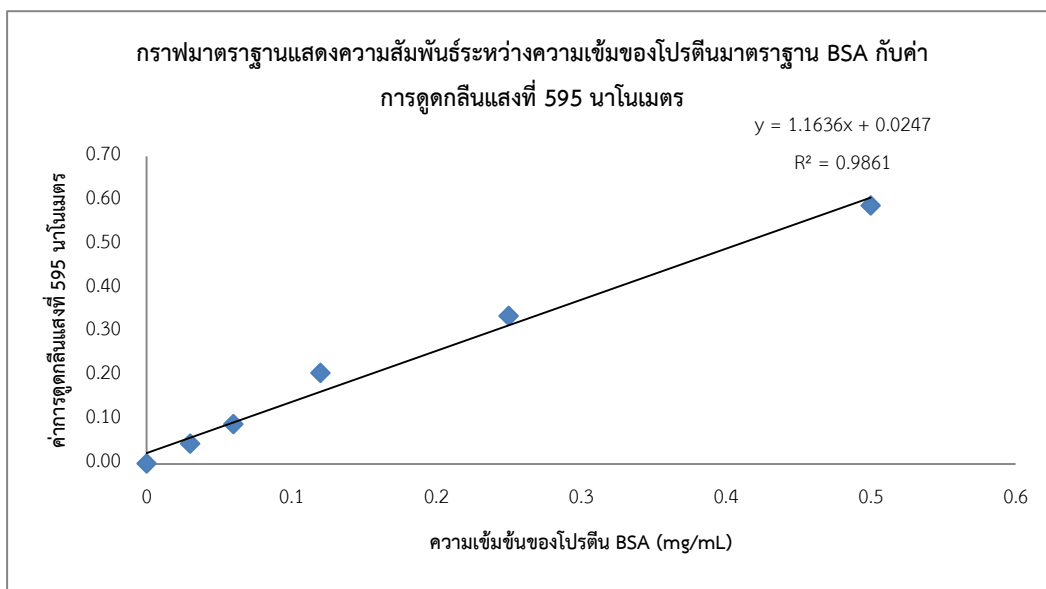
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

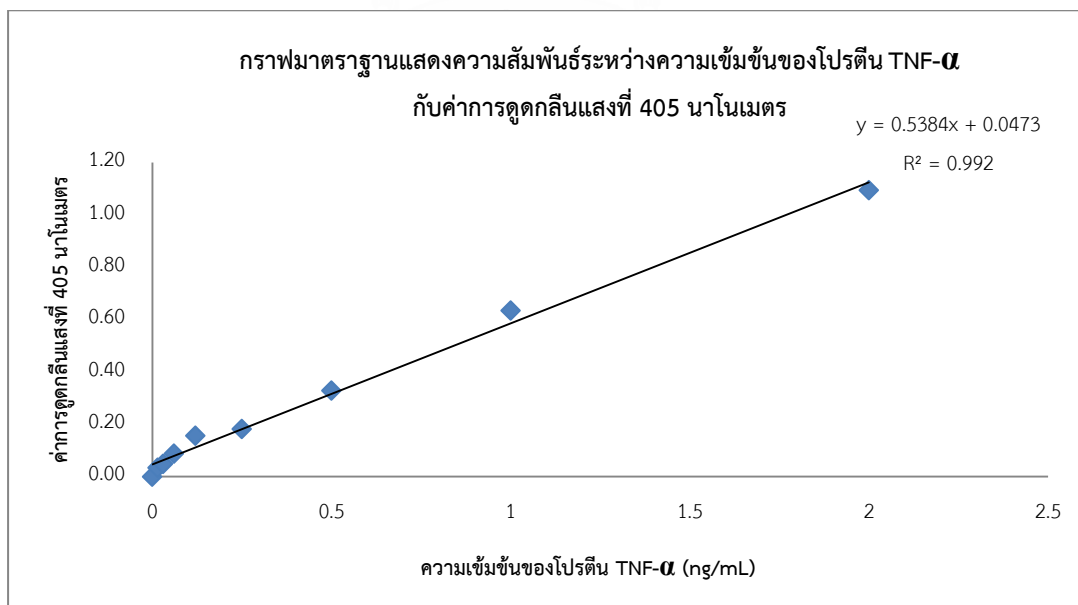
ภาคผนวก ก

ข้อมูลจากการทดลอง

1. กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวมภายในเซลล์ HaCaT



2. กราฟมาตรฐานของโปรตีน TNF- α ใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณโปรตีน TNF- α ในน้ำเลี้ยงเซลล์ HaCaT



3. ตารางแสดงจำนวนเซลล์ HaCaT ที่มีชีวิต กับความเข้มข้นของ G418 ($\mu\text{g/mL}$)

ความเข้มข้นของ G418 ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ HaCaT ที่มีชีวิต ($\times 10^4$ เซลล์)
0	320.6
100	268.2
300	103.8
500	31.2
700	0.0
1000	0.0

4. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ HaCaT-GFP เมื่อทดสอบกับ doxycycline ที่ความเข้มข้น และเวลาบ่มต่างๆ ด้วยวิธี MTT

Cell Treatment	Doxycycline (ng/mL)				TNF- α (10 ng/mL)	TNF- α (10 ng/mL) & IFN- γ (10 ng/mL)
	0	1000	2000	3000		
HaCaT cell pHA-GFP						
0 ชั่วโมง	100	100	100	100	100	100
24 ชั่วโมง	100	112 \pm 4.14	120 \pm 1.93	126 \pm 1.85	95 \pm 5.47	68 \pm 1.13
48 ชั่วโมง	100	93 \pm 2.99	99 \pm 2.25	97 \pm 4.92	80 \pm 0.94	21 \pm 1.13
72 ชั่วโมง	100	77 \pm 1.55	93 \pm 1.44	93 \pm 2.02	72 \pm 3.37	13 \pm 0.91
96 ชั่วโมง	100	82 \pm 7.77	76 \pm 5.97	70 \pm 2.89	47 \pm 3.42	4 \pm 0.25
Pair T Test		p=0.29	p=0.74	p=0.76	p=0.05*	p=0.01**

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$

** จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.01$

5. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ HaCaT-TNF- α เมื่อทดสอบกับ doxycycline ที่ความเข้มข้น และเวลา บ่มต่างๆ กัน ด้วยวิธี MTT

Cell Treatment	Doxycycline (ng/mL)				TNF- α (10 ng/mL)	TNF- α (10 ng/mL) & IFN- γ (10 ng/mL)
	0	1000	2000	3000		
HaCaT cell pHA-TNF-α						
0 ชั่วโมง	100	100	100	100	100	100
24 ชั่วโมง	100	96 \pm 0.76	94 \pm 2.25	126 \pm 1.85	96 \pm 4.92	71 \pm 1.13
48 ชั่วโมง	100	87 \pm 1.94	88 \pm 1.61	97 \pm 4.92	83 \pm 3.71	22 \pm 0.17
72 ชั่วโมง	100	67 \pm 0.71	87 \pm 1.20	93 \pm 2.02	75 \pm 5.72	14 \pm 0.64
96 ชั่วโมง	100	60 \pm 1.05	73 \pm 0.99	70 \pm 2.89	67 \pm 5.71	5 \pm 0.38
Pair T Test		p=0.05*	p=0.04*	p=0.05*	p=0.03*	p=0.01**

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$

** จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.01$

6. ภาพแสดงผลจากการ Blast ระหว่าง hTNF- α cDNA และพลาสมิด pHAGE-hTNF- α ที่ได้จากการทำ sequencing

Sequence ID: lc Query_135445 Length: 1455 Number of Matches: 1				
Range 1: 77 to 775 Graphics				Next Match ▲
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1291 bits(699)	0.0	699/699(100%)	0/699(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAG	60		
Sbjct 775	ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAG	716		
Query 61	ACAGGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATC	120		
Sbjct 715	ACAGGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATC	656		
Query 121	GTGGCAGGCGCCACCCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGG	180		
Sbjct 655	GTGGCAGGCGCCACCCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGG	596		
Query 181	GAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGATCATCT	240		
Sbjct 595	GAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGATCATCT	536		
Query 241	TCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCCAAGCTGAGGGG	300		
Sbjct 535	TCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCCAAGCTGAGGGG	476		
Query 301	CAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGA	360		
Sbjct 475	CAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGA	416		
Query 361	GATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTC	420		
Sbjct 415	GATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTC	356		
Query 421	AAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCC	480		
Sbjct 355	AAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCC	296		
Query 481	GTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCTGCCAGAGGGAG	540		
Sbjct 295	GTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCTGCCAGAGGGAG	236		
Query 541	ACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTC	600		
Sbjct 235	ACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTC	176		
Query 601	CAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTT	660		
Sbjct 175	CAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTT	116		
Query 661	GCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTG	699		
Sbjct 115	GCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTG	77		

ข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

7. ภาพแสดงผลจากการ Blast ระหว่าง GFP cDNA และ pHAGE-GFP ที่ได้จากการทำ sequencing

Cloning vector pSAT7-EGFP-C1, complete sequence
Sequence ID: [gb|AY818384.1](#) Length: 4599 Number of Matches: 1

Range 1: 1322 to 2109 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1456 bits(788)	0.0	788/788(100%)	0/788(0%)	Plus/Minus
Query 86	GGTGGATCCCGGGCCCGCGGTACCGTCGACTGCAGAATTCGAAGCTTGAGCTCGAGATCT	145		
Sbjct 2109	GGTGGATCCCGGGCCCGCGGTACCGTCGACTGCAGAATTCGAAGCTTGAGCTCGAGATCT	2050		
Query 146	GAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGGCGGCGGTACGAACTC	205		
Sbjct 2049	GAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGGCGGCGGTACGAACTC	1990		
Query 206	CAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCT	265		
Sbjct 1989	CAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCT	1930		
Query 266	CAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTA	325		
Sbjct 1929	CAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTA	1870		
Query 326	GTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTT	385		
Sbjct 1869	GTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTT	1810		
Query 386	GATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA	445		
Sbjct 1809	GATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA	1750		
Query 446	CAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCG	505		
Sbjct 1749	CAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCG	1690		
Query 506	GTTACACAGGGTGTGCGCCCTCGAACTTCACCTCGGGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTC	565		
Sbjct 1689	GTTACACAGGGTGTGCGCCCTCGAACTTCACCTCGGGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTC	1630		
Query 566	CTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTC	625		
Sbjct 1629	CTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTC	1570		
Query 626	GTGCTGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGT	685		
Sbjct 1569	GTGCTGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGT	1510		
Query 686	CACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAG	745		
Sbjct 1509	CACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAG	1450		
Query 746	CTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTAC	805		
Sbjct 1449	CTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTAC	1390		
Query 806	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCAACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGT	865		
Sbjct 1389	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCAACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGT	1330		
Query 866	CACCATGG	873		
Sbjct 1329	CACCATGG	1322		

ข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบผลการโคลนนิ่งพลาสมิดในเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียม LB broth และ LB agar

เตรียมโดยการชั่ง Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม และ NaCl 10 กรัม เติม Tris HCl 10 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย NaOH ให้ค่า pH อยู่ระหว่าง 7.5-8.0 แล้วแบ่ง LB broth มา 500 มิลลิลิตร ผสมกับ agar A 7.5 กรัม และ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร สำหรับเตรียมเป็น LB agar

2. การเตรียม Agarose gel

เตรียมโดยการชั่ง Agarose 1 กรัม ละลายใน TAE buffer 100 มิลลิลิตร โดยนำไปอบในไมโครเวฟเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม Ethidium bromide 3 ไมโครลิตร อบอุ่นอีก 1 นาทีรอให้อุ่นๆ เทลงถาดเตรียมเจลใช้สำหรับรันเจลอิเล็กโตรโพรเรซิส

2. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของ Doxycycline

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM

DMEM/High glucose ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมกับ fetal bovine serum (inactivated serum) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ PS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/ml) เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมยา Geneticin (G418) 20 mg/mL

เตรียมโดยละลาย G418 ขนาด 1 กรัม มี potency 788.9 มิลลิกรัม ในสารละลาย HEPES buffer 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 39.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เขย่าทุกๆ 3 นาที จากนั้นกรองด้วย 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย MTT 5 mg/ml

เตรียมโดยการชั่ง MTT 250 มิลลิกรัม ละลายใน PBS 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์ ห้ามให้โดนแสง

3. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

1. การเตรียม 10x PBS

เตรียมโดยชั่งสาร KCl 0.2 กรัม ชั่ง KH_2PO_4 0.2 กรัม NaCl 8 กรัม Na_2HPO_4 1.14 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์ ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.2 แบ่งใช้ครั้งละ 1x PBS โดยนำ 10x PBS ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมในน้ำบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi

2. การเตรียม block buffer

เตรียม BSA 1 เปอร์เซ็นต์ใน PBS ทำได้โดยชั่ง BSA 300 มิลลิกรัมละลายใน PBS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

3. การเตรียม wash buffer

เตรียม Tween 0.05 เปอร์เซ็นต์ใน PBS ทำได้โดยปิเปต Tween-20 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรละลายใน PBS ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4. การเตรียม diluent

เตรียม BSA 0.05 เปอร์เซ็นต์ใน wash buffer ทำได้โดยชั่ง BSA 50 มิลลิกรัม ละลายใน wash buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

5. การเตรียม recombinant TNF- α 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

เตรียม stock recombinant TNF- α ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของ BSA ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมกับ TNF- α หนัก 5 ไมโครกรัม ตั้งให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จำนวน 10 หลอด เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

6. การเตรียม ABTS

เตรียมโดยละลาย ABTS 1 เม็ด ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ใน 0.1 โมลาร์ sodium citrate buffer pH 4.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ท่อพอยด์เก็บให้พ้นแสง เตรียมก่อนใช้งานทันที

4. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

1. การเตรียม RIPA buffer

เตรียมโดย 10x RIPA buffer (จาก บริษัท Merck millipore) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ milliQ 50 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม PI inhibitors

เตรียมโดย PI inhibitors 1 เม็ดละลายใน 1x RIPA buffer 1.5 มิลลิลิตร เป็น stock 7X PI inhibitors แบ่งใส่หลอด หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการวัดโปรตีนด้วยวิธี Bradford

1. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียม stock โปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง BSA หนัก 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นลำดับที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นจึงแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลาย Bradford

เจือจาง stock สารละลาย Bradford 1 ส่วน ด้วยน้ำบริสุทธิ์ 4 ส่วน จากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษ Whatman filter NO.1 เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี western blot

1. การเตรียมสี 4 เฮอร์เซ็นต์ Leamli กับ 10 เฮอร์เซ็นต์ BME

เตรียมโดยการตวง 0.5 โมลาร์ Tris pH 6.8 ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ตวง Glycerol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตวง 2-Mercaptoethanol (BME) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ชั่ง SDS 2 กรัม ชั่ง Bromphenol Blue 5 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม 10 เฮอร์เซ็นต์ SDS

เตรียมโดยชั่ง SDS หนัก 5 กรัม ละลายด้วยน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ Ammonium persulfate

เตรียมโดยชั่ง Ammonium persulfate หนัก 50 มิลลิกรัม จากนั้นจึงเติมน้ำ Milli Q ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น

4. การเตรียม Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE gel) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

4.1 Stacking gel 6 เปอร์เซ็นต์ เตรียมดังต่อไปนี้

เตรียมโดยตวงน้ำ MilliQ ปริมาตร 5.2 มิลลิตร ผสมกับ 30 เปอร์เซ็นต์ acrylamide ปริมาตร 2 มิลลิตร ผสมกับ 0.5 โมลาร์ Tris pH 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิตร ผสมกับ 10 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 10 เปอร์เซ็นต์ APS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร* และเติม TEMED 10 ไมโครลิตร*

4.2 Separation gel 12 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยตวงน้ำ MilliQ ปริมาตร 2.65 มิลลิตร ผสมกับ 30 เปอร์เซ็นต์ acrylamide ปริมาตร 3.2 มิลลิตร ผสมกับ 1.5 โมลาร์ Tris pH 8.8 ปริมาตร 2 มิลลิตร ผสมกับ 10 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมกับ 10 เปอร์เซ็นต์ APS ปริมาตร 80 ไมโครลิตร* และเติม TEMED 8 ไมโครลิตร*

* เติม 10 เปอร์เซ็นต์ APS, TEMED ท้ายสุด เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นประกบแผ่นกระจก 2 แผ่นแล้วใส่ในเครื่องประกอบเจล หยอด separation gel ลงไประหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง ให้มีปริมาตรสูง 2 ใน 3 ของแผ่นกระจก แล้วเติมน้ำให้เต็มแผ่นกระจกเพื่อไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ให้เจลส่วน separation gel แข็ง แล้วเทน้ำทิ้ง จากนั้นหยอด stacking gel ลงไปให้เต็มแผ่นกระจกแล้วใส่หวี ทิ้งไว้ให้เจลแข็ง แล้วจึงนำหวีออก จากนั้นนำแผ่นเจลที่มีกระจกประกบอยู่ไปแช่ใน 1x Running buffer (10x running buffer ปริมาตร 100 มิลลิตร, 20 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 5 มิลลิตร, น้ำ milliQ ปริมาตร 900 มิลลิตร) สำหรับเตรียมรันโปรตีนต่อไป

5. การเตรียม 10x Running buffer

เตรียมโดยชั่ง Tris-base 30 กรัม และ Glycine 144 กรัม เติมน้ำ MilliQ ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะใช้จึงเจือจางเป็น 1x Running buffer

6. การเตรียม 1x Running buffer

เตรียมโดยตวง 10x Running buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 20 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำ MilliQ ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. การเตรียม Transfer buffer

เตรียมโดยตวง 10x Running buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 20 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การเตรียม TBST buffer

เตรียมโดยตวง 1 โมลาร์ Tris pH 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับ 5 โมลาร์ NaCl ปริมาตร 30 มิลลิลิตร Tween 20 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำ MilliQ ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม BSA 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเตรียม primary antibody และ secondary antibody

เตรียมโดยการชั่ง BSA 0.5 กรัม ละลายใน TBST 10 มิลลิลิตร ผสมให้ BSA ละลายให้หมดใช้สำหรับเตรียม primary antibody และ secondary antibody เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย	ความหมาย
%	Percentage
/	per
X	fold or time
α	Alpha
β	Beta
κ	Kappa
μ	Micro
μ l	Microlitre
μ g	Microgram
μ M	Micromolar
$^{\circ}$ C	degree celcius
ABTS	2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
Ab	Antibody
APS	Ammonium persulfate
bp	Base pairs
BME	2-Mercaptoethanol
BSA	Bovine serum albumin
CO ₂	Carbon dioxide
cm ³	Cubic centimeter
Dox	Doxycycline
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DW	Distilled water
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Green fluorescent protein

ETH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug Administration
FOSL1	FOS like antigen 1
g	Gram
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate
dehydrogenase	
HaCaT	Human Keratinocyte Cell Line
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 cells
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid)
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JAK/STAT	Janus kinase/ signal transducers and activator of transcription
kDa	Kilo Dalton
Kb	Kilo base
KRT16	Keratin 16
KCl	Potassium chloride
KH ₂ PO ₄	Potassium phosphate monobasic
M	Molar
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mg	Milligram
MgSO ₄	Magnesium sulfate
ml	Millilitre
mM	Millimolar
MMP9	Matrix metalloproteinase 9

MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Sodium chloride
Na ₂ HPO ₄	Sodium phosphate dibasic
n	Nano
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optical density
p	<i>P</i> value
PBS	Phosphate buffer saline
Penstrep	Penicillin Streptomycin
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3-kinase/AKT PR
	Progesterone receptor
PIs	Proteinase inhibitor cocktail
pH	Potential of Hydrogen ion
PS	Penicillin- streptomycin
Psi	Pound per Square Inch
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RNA	ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
rtTA	Reverse tetracycline-controlled
transactivator	
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S.E.M	Standard Error of Mean
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF- α	tumor necrosis factor alpha

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุทธธีรัตน์ อุดมเมธาภรณ์ เกิดเมื่อวันที่ 10 กันยายน พ.ศ.2533 ที่จังหวัดภูเก็ต จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 1 จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ปี 2555 และได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุน 90 ปี จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



