

การโคลนยีน soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) และการศึกษา
ผลกระทบของการแสดงออกของยีนที่มีต่อเซลล์มะเร็งตับ

นาย ชีรพงษ์ เลิศวิทยาพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชา
ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING OF SOLUBLE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS
(sRAGE) GENE AND STUDY THE EFFECT OF ITS EXPRESSED PRODUCT ON LIVER
CANCER CELL

Mr. Teerapong Lertwittayapon

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การโคลนยีน soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) และการศึกษาผลกระทบของการแสดงออกของยีนที่มีต่อเซลล์มะเร็งตับ

โดย

นาย ธีรพงษ์ เลิศวิทยาพนธ์

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็น
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา นพพรพันธ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุพนัธิตรา ชาญประเสริฐ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. ณัฐริกา แสงกฤษ)

ธีรพงษ์ เลิศวิทยาพนธ์ : การโคลนยีน soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) และการศึกษาผลกระทบของการแสดงออกของยีนที่มีต่อเซลล์มะเร็งตับ. (CLONING OF SOLUBLE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (SRAGE) GENE AND STUDY THE EFFECT OF ITS EXPRESSED PRODUCT ON LIVER CANCER CELL) อ. ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา สานติยานนท์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 ร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนา, 66 หน้า.

Receptor for advanced glycation end products (RAGE) เป็นโมเลกุลที่อยู่ผิวเซลล์สามารถจับกับ ligands ได้หลายชนิด การแสดงออกเพิ่มขึ้นของ RAGE เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพหลายอย่าง เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง การส่งสัญญาณของ RAGE เข้าสู่เซลล์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์มะเร็งในหลายรูปแบบ เช่น mRNA ของ RAGE นั้นเกิด alternative splicing ทำให้มี mRNA RAGE หลากหลายรูปแบบซึ่ง มีรูปแบบหนึ่งที่มีชื่อว่า soluble RAGE คาดว่าสามารถแย่งจับ ligand และลดกลไกการเกิดมะเร็งได้ เราสนใจจะแยก RAGEv1 ด้วย RT-PCR และโอนถ่ายยีน RAGEv1 เข้าไปยัง HepG2 เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของ NF-kB และ TNF-alpha ผลที่ได้คือเซลล์มะเร็ง HepG2 มีค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของ NF-kB และ TNF-alpha ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้ถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าไป เมื่อถ่ายโอนยีน RAGEv1 4 ความเข้มข้นพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 8 $\mu\text{g/mL}$ แสดงผลการยับยั้งการแสดงออกของ NF-kB และ TNF-alpha อย่างมีนัยสำคัญ

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา...ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์...ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม.....

#5177209137 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY
 KEYWORDS : ALTERNATIVE SPLICING / CANCER RAGE / RAGE / SOLUBLE RAGE/

TEERAPONG LERTWITTAPON : CLONING OF SOLUBLE RECEPTOR FOR
 ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (SRAGE) GENE AND STUDY
 THE EFFECT OF ITS EXPRESSED PRODUCT ON LIVER CANCER CELL.

ADVISOR : ASSOC.PROF. RACHANASANTIYANONT, Ph.D.,

CO-ADVISOR : ASST.PROF.TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 66 pp.

Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a member of the immunoglobulin superfamily of cell surface molecules and engages diverse ligands. RAGE up-regulation is implicated in numerous pathological states including vascular disease, diabetes, and cancer. The expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) has an impact on the mechanisms giving rise to characteristic features of various cancer cells. mRNA of RAGE have a alternative splicing result in all variant of RAGE that soluble RAGE variant 1 (RAGEv1) is a one of isoform of RAGE may neutralize the ligand and decline mechanism promoting cancer. We are interested in purified RAGEv1 by RT-PCR and cloning, Then transfected RAGEv1 into HepG2, Screening expression of NF- κ B and TNF. Moreover, checked the transfection by analyzing the expression of RAGE gene and RAGEv1 protein with western blot. Result of the transfection, we found significantly decreased expression of NF- κ B and TNF- α .

Department :.....Clinical chemistry.....Student's Signature.....

Field of Study :....Clinical Biochemistry & Molecular Medicine Advisor's Signature.....

Academic Year :..2010.....Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จได้เนื่องจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและ คณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและทุนอุดหนุนการศึกษา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ได้เคยช่วยเหลือในด้านการวิจัยทุกรูปแบบ การวิเคราะห์และวิจัยด้วยตนเองรวมถึงการเกิดปัญหา การเกิดอุปสรรค การแก้ปัญหา และการพุ่งชนอุปสรรคเพราะอุปสรรคมีไว้พุ่งชน ประสบการณ์ที่ได้ นั้นเป็นการเรียนรู้ที่ดียิ่งในการดำเนินชีวิตกับสังคมโลกภายนอกรั้วมหาวิทยาลัยที่มีปัญหาอีก หลากหลายที่ข้าพเจ้าต้องไปแก้ไขด้วยตนเอง ทำให้ข้าพเจ้าได้รู้ว่าการพึ่งตนเองเป็นสิ่งสำคัญตาม คำสอนพระพุทธเจ้า(อตฺตา หิ อตฺตโน นา โถ)

ขอขอบคุณพี่น้องเพื่อน ที่คอยสั่งสอนวิทยาการในการทำวิจัยด้วยวิธีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการเลี้ยงเซลล์ การโคลน การเตรียมสารเคมี การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ และอื่นๆ ค่อยช่วยเหลือในยามไร้สิ้นหนทางไปต่อ หากงานวิจัยนี้ได้ก่อประโยชน์ต่อสังคมโดยตรงหรือ ทางอ้อมก็ดีข้าพเจ้าก็จะดีใจยิ่งและขอส่วนดีนี้จงตกแก่ผู้มีส่วนในการทำวิจัยทั้งหมดแต่หาก งานวิจัยนี้ส่งผลเสียต่อสังคมทั้งโดยตรงหรือทางอ้อม ขอให้สังคมได้โปรดให้อโหสิกรรมแก่ ข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้สิ่งที่ข้าพเจ้าเคยล่วงเกินแก่อาจารย์พี่น้องเพื่อน ขอให้ผลกรรมนั้น จงหมดสิ้นกันไปในชาตินี้ สิ่งในที่ข้าพเจ้าก่อประโยชน์สุขแก่อาจารย์พี่น้องเพื่อนขอให้ผล กรรมนี้จึงมีแก่ทุกคน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
RAGE.....	5
Structure and Biology of Receptor for Advanced Glycation End Products.....	6
RAGE ligands.....	7
กลไกการก่อพยาธิสภาพของ RAGE.....	8
Soluble RAGE (sRAGE) & endogenous secretory RAGE (esRAGE).....	8
ความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับมะเร็ง.....	13
ความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับ NF-kB และ TNF-alpha.....	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	16
การแยกยีน soluble RAGE ด้วยการโคลน.....	18
การเชื่อมต่อ RAGEv1 กับ expression vector แสดงออกใน HepG2.....	24
การนำยีนเข้าสู่ HepG2 (Transfection).....	28

บทที่	หน้า
การตรวจสอบผลจากการโคลน sRAGE_V ₁ ต่อการแสดงออกของ NF-κB และ TNF-alpha ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2.....	36
การทดสอบ MTT assay.....	39
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	41
ผลจากการเพิ่มจำนวน RAGE variant จาก HeLa cell line.....	41
ผลการตรวจสอบ electroporation ด้วยวิธี colony PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อ pGEM.....	41
ผลการตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียด้วยวิธี colony PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน RAGE.....	42
ผลการตรวจสอบโคลนใน colony bacteria ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Pst</i> I.....	43
ผลการตรวจลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีน RAGE ที่เชื่อมต่อกับ pGEM vector.....	43
การโคลน RAGEv1 ด้วย expression vector.....	44
ผลการพิสูจน์การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2.....	46
ผลการตรวจการแสดงออกของยีน NF-κB ₂	49
ผลการตรวจการแสดงออกของยีน TNF-alpha.....	50
ผลการวัด % cell viability.....	52
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	53
สรุปผลการวิจัย.....	53
อภิปรายผลการวิจัย.....	54
ข้อเสนอแนะ.....	57
รายการอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก.....	64
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	66

บทที่

ณ
หน้า

บทที่

ญ
หน้า

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของโปรตีน RAGE	7
2	แสดงส่วนประกอบ mRNA ทั้ง 11 exon ของยีน RAGE ที่เปลี่ยนเป็นส่วนประกอบย่อยของโปรตีน RAGE.....	7
3	แสดงรูปแบบทั้ง 19 แบบของ RAGE (variant of RAGE).....	11
4	แสดงผลจาก ligand ต่อการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ของ RAGE และ ผลจากการหายไปของ ligand ต่อการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ของ RAGE.....	12
5	แสดงความแตกต่างของการเกิด RAGE และ RAGEv1	12
6	แสดงการใช้ RAGEv1 ในการแย่งจับ ligand ของ RAGE และการลดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์.....	13
7	แสดงกลไกการก่อพยาธิสภาพของ RAGE ผ่าน NF-KB.....	14
8	แสดงรูปแบบและขนาดจากการตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>HindIII</i> & <i>PstI</i> บน ยีน RAGE	24
9	แสดงภาพ neubauer chamber.....	29
10	แสดงช่องขนาด 1X1 มิลลิเมตรในการนับจำนวนเซลล์.....	29
11	แสดงผลจากการเพิ่มจำนวน RAGE จาก HeLa cell line.....	41
12	แสดงผลการตรวจการโคลนด้วยวิธี colony PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อ pGEM.....	42
13	แสดงผลการตรวจการทำ colony PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อ RAGE.....	42
14	แสดงผลการทดสอบการตรวจสอบ RAGEv1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำขนาด band เทียบกับรูปด้านขวาของ.....	43
15	แสดงผลที่ได้จากการตรวจสอบโคลน ที่เชื่อมต่อกับ expression vector.....	44
16	แสดงผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> & <i>EcoRV</i>	45
17	แสดงผลการตรวจการแสดงออกของยีน RAGE.....	46
18	แสดงกราฟค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกของยีน RAGE ลำดับตามความเข้มข้นในการถ่ายโอนยีน RAGEv1.....	47
19	แสดงผลการตรวจการแสดงออกของยีน beta-actin.....	48

ภาพที่		หน้า
20	แสดงผลการตรวจโปรตีน RAGEv1 ด้วย Western blot.....	48
21	แสดงผลการตรวจการแสดงออกของ NF-KB ₂	49
22	แสดงกราฟค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกของยีน NF-KB ₂ ลำดับตามความ เข้มข้นในการถ่ายโอนยีน RAGEv1.....	50
23	แสดงผลการตรวจการแสดงออกของ TNF-alpha.....	51
24	แสดงกราฟค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกของยีน TNF-alpha ลำดับตามความ เข้มข้นในการถ่ายโอนยีน RAGEv1.....	51
25	แสดงกลไกการส่งสัญญาณของ RAGE กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ NF-KB และ TNF- alpha.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงส่วนผสมในการ โคลนยีนด้วยน้ำยา lipofectamine เพื่อตรวจการแสดงออกของยีน RAGE.....	30
2	แสดงส่วนผสมในการ โคลนยีนด้วยน้ำยา lipofectamine เพื่อใช้ในการตรวจ Western blot.....	34
3	แสดงสิ่งตัวอย่างที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย Western blot.....	34
4	แสดงส่วนผสมในการทำ separate gel.....	35
5	แสดงส่วนผสมในการทำ stacking gel.....	36
6	แสดงส่วนผสมในการ โคลนยีนเพื่อตรวจการแสดงออกของ TNF-alpha และ NF-KB.....	37
7	แสดงส่วนผสมในการ โคลนยีนเพื่อการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability).....	40
8	แสดงผล % cell viability จากการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ HepG2.....	52

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ DNA หรือสารพันธุกรรมส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์รวดเร็วและมากกว่าปกติ ดังนั้นจึงทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติและในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้นเนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง ถ้าเซลล์พวกนี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ เป็นต้น เท่าที่มีรายงานไว้ในขณะนี้ มะเร็งที่พบในร่างกายมนุษย์มีมากกว่า 100 ชนิด มะเร็งแต่ละชนิดจะมีการดำเนินของโรคไม่เหมือนกัน เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง จะมีการดำเนินชนิดของโรคที่รุนแรง ผู้ป่วยจะมีชีวิตการอยู่รอดสั้นกว่าผู้ป่วยมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น ดังนั้น การรักษามะเร็งแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกัน มีวิธีการรักษาที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เป็นมะเร็ง ระยะของมะเร็ง สภาพร่างกาย และความเหมาะสม ของผู้ป่วยมะเร็ง การรักษาจะยากหรือง่ายนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็งและการดำเนินโรคของมะเร็งด้วย เช่น มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งผิวหนัง รักษาดีกว่ามะเร็งปอด มะเร็งสมอง เป็นต้น มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบบ่อยใน 5 อันดับแรกในประเทศไทยและเป็นมะเร็งที่มีการดำเนินโรคเร็วมาก ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตในเวลา 3-6 เดือน

จากการศึกษากลไกการเกิดโรคมะเร็งพบว่า Receptor for advanced glycation end products (RAGE) มีการศึกษากันมากทั้งในเรื่องความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานโรคหัวใจ รวมถึงโรคมะเร็งด้วย มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับความสามารถในการลุกลามและการแพร่กระจายของมะเร็งในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kuniyasu et al., 2001) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Hirata et al., 2003) มะเร็งตับอ่อน (Takada et al., 2001) มีการศึกษาว่าการส่งสัญญาณผ่าน RAGE สนับสนุนการเจริญของมะเร็ง (tumor development) (Gebhardt et al., 2007) รวมถึงมีการศึกษาการแสดงออกของ RAGE ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับเมื่อเทียบกับคนปกติ (Hiwatashi et al., 2007) หากสามารถหยุดยั้งกลไกการส่งสัญญาณของ RAGE ก็น่าจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

Soluble RAGE (sRAGE) เกิดจาก RAGE ในรูปแบบเต็ม (full length receptor) ถูกตัดส่วนที่อยู่ภายในเซลล์และระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane and cytosolic domain) ไปเหลือแต่ส่วนของ receptor ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular domain) ซึ่งการตัดนั้นขึ้นกับสภาพแวดล้อมภายในเซลล์แต่ละชนิด ส่วน endogenous secretory RAGE (esRAGE) หรือ RAGE variant 1 (RAGEv1) เกิดจากขั้นตอนของการตัด intron ของ mRNA ของ RAGE โดยการขาดหายไปของ exon 10 และถอดรหัสบางส่วนของด้าน 5' ของ intron 9 (alternative splicing) (Yonekura et al., 2005)

นอกจากนี้ยังพบรูปแบบที่มีการหายไปของ exon 8 และมี stop codon เกิดที่ exon 10 เป็นผลจาก frameshift mutation (Park et al., 2004) ซึ่งพบได้ในเลือด (plasma) ของคนปกติ

ทั้ง sRAGE และ esRAGE อาศัย V-domain ในการจับ ligand เพราะฉะนั้นการที่มีระดับ sRAGE และ esRAGE ที่เพิ่มสูงขึ้นน่าจะสามารถป้องกันการจับกันของ ligand กับ cell surface receptor RAGE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทางกลับกันการที่มีระดับ sRAGE และ esRAGE ลดลงก็น่าจะเป็นการเพิ่มผลของ RAGE ligand ได้ อย่างไรก็ตาม อาจจะมีกลไกอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับ RAGE (RAGE-independent mechanism) ร่วมด้วยก็ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการโคลนยีน RAGEv1 เข้าไปยังเซลล์มะเร็งระดับ
2. เพื่อศึกษาผลการแสดงออกของยีน TNF-alpha และ NF-KB ของเซลล์มะเร็งระดับเมื่อมีการโคลนยีน RAGEv1 ในเซลล์มะเร็งระดับเพาะเลี้ยง

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะตรวจการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน NF-KB และ TNF-alpha ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของมะเร็ง ในเซลล์มะเร็งระดับเพาะเลี้ยงเมื่อมีการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่เซลล์มะเร็งระดับเพาะเลี้ยงด้วยชุดน้ำยา lipofectamine 2000 และตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์มะเร็งระดับเพาะเลี้ยง ด้วยวิธี RT-PCR และ Western blot

ข้อจำกัดของการวิจัย

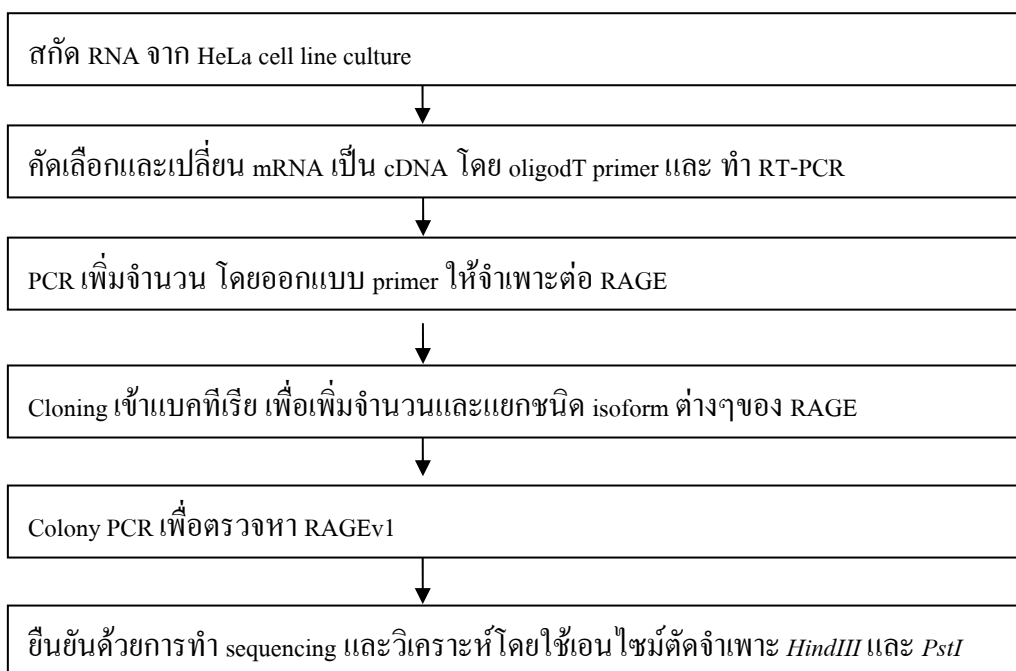
งานวิจัยนี้ได้ทำการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่เซลล์มะเร็งระดับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 เท่านั้นและการทดลองเป็นเพียงแบบจำลองเบื้องต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

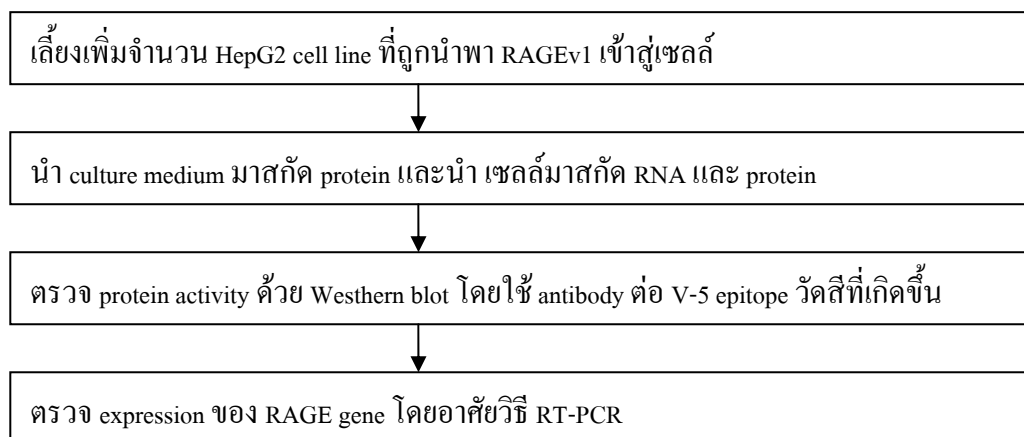
1. ทราบถึงผลของ RAGEv1 ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งระดับ
2. ทราบถึงผลของ RAGEv1 ในการยับยั้งการแสดงออกของ TNF-alpha และ NF - KB
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยและพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งระดับ

วิธีดำเนินการวิจัย

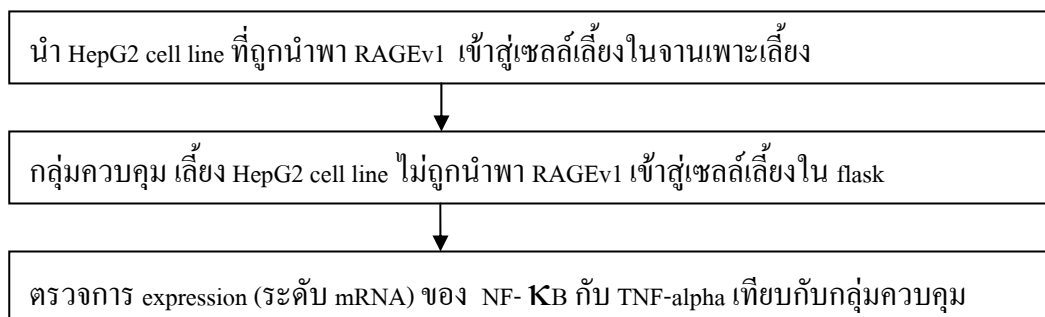
1. การแยกและการบ่งชี้ soluble RAGE



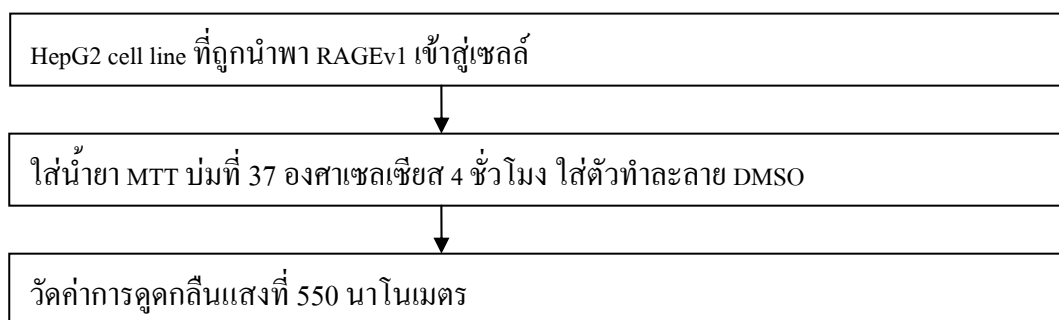
2. การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2 (liver cancer cell)



3. การวัดการแสดงออกของยีน RAGE, NF- κ B และ TNF- α ,



4. MTT assay



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Receptor for advanced glycation end products (RAGE)

จากการศึกษากลไกการเกิดโรคมะเร็งนั้นพบว่า Receptor for advanced glycation end products (RAGE) มีการศึกษากันมากทั้งในเรื่องความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน โรคหัวใจรวมถึงโรคมะเร็ง มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับความสามารถในการลุกลามและการแพร่กระจายของมะเร็งในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kuniyasu et al., 2001) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Hirata et al., 2003) มะเร็งตับอ่อน (Takada et al., 2001) มีการศึกษาว่าการส่งสัญญาณผ่าน RAGE สนับสนุนการเจริญของมะเร็ง (tumor development) (Gebhardt et al., 2007) รวมถึงมีการศึกษาการแสดงออกของ RAGE ที่สูงขึ้นในเซลล์ที่เป็นโรคมะเร็งตับเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ (Hiwatashi et al., 2007)

Soluble RAGE (sRAGE) เกิดจาก RAGE ในรูปแบบเต็ม (full length RAGE) ถูกตัดส่วนที่อยู่ภายในเซลล์และระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane and cytosolic domain) ไปเหลือแต่ส่วนของ receptor ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular domain) ซึ่งการตัดนั้นขึ้นกับสภาพแวดล้อมภายในเซลล์แต่ละชนิด ส่วน endogenous secretory RAGE (esRAGE) เกิดจากขั้นตอนของการตัด intron ของ mRNA ของ RAGE โดยการขาดหายไปของ exon10 และถอดรหัสบางส่วนของด้าน 5' intron9 (alternative splicing) (Yonekura et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบรูปแบบที่มีการหายไปของ exon8 และมี stop codon เกิดที่ exon10 เป็นผลจาก frameshift mutation (Park et al., 2004) ซึ่งพบได้ในเลือด (plasma) ของคนปกติ

ทั้ง sRAGE และ esRAGE อาศัย V-domain ในการจับ ligand เพราะฉะนั้นการที่มีระดับ sRAGE และ esRAGE ที่เพิ่มสูงขึ้นน่าจะสามารถป้องกันการจับกันของ ligand กับ cell surface receptor RAGE ได้อย่างมีประสิทธิภาพในทางกลับกันการที่มีระดับ sRAGE และ esRAGE ลดลงก็น่าจะเป็นการเพิ่มผลของ RAGE ligand ได้ อย่างไรก็ตาม อาจจะมียกลไกอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับ RAGE (RAGE-independent mechanism) ร่วมด้วยก็ได้

Receptor ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ (soluble form) ในกลุ่ม immunoglobulin superfamily เกิดจากการขาดหายไปในส่วนที่ฝังในเยื่อหุ้มเซลล์และส่วนที่ยื่นเข้าไปภายในเซลล์ (transmembrane and cytosolic domain) receptor ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้เกิดจากการสลายโปรตีนของ receptor ที่มีส่วนประกอบครบ (full length RAGE) และเกิดจากการตัด mRNA ในส่วนไม่แสดงออกยีน (intron) แบบ alternative splicing การตัดนั้นก็ขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่ receptor นั้นอยู่

การส่งสัญญาณ (signaling) ของ receptor อาศัยส่วน ligand binding domain ในการจับกับ ligand ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cytosolic domain และเกิดการส่งสัญญาณต่อไปยังภายในเซลล์ (signaling transduction) จนเกิดการตอบสนองต่อสัญญาณนั้น หาก receptor ขาดส่วน cytosolic domain ไปก็จะไม่เกิดการส่งสัญญาณขึ้น นอกจากนี้ ความสามารถของ soluble form นั้นจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด receptor นั้นๆ เช่น soluble E-selectin และ soluble VCAM-1 จะเกี่ยวข้องกับการเกิดเส้นเลือดใหม่ (angiogenic properties) การออกฤทธิ์ขึ้นกับสารเคมีที่ endothelial cell มากกระตุ้น (chemotactic activity) (Koch et al., 1995)

มีการศึกษาวิจัยความสำคัญเกี่ยวกับระดับของ soluble form ในเลือดโดยเฉพาะโมเลกุลในกลุ่ม Immunoglobulin superfamily -1 มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของโรคหลายชนิด เช่น proliferative retinopathy ในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานพบว่า sVCAM-1 สูงกว่าคนที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน (Olson et al., 1997) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (breast cancer) sVCAM-1 ใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเกิดเส้นเลือดใหม่ (index of angiogenic activity) พบมากในมะเร็งเต้านมระยะแรก (early stage) การเพิ่มสูงขึ้นของ sVCAM-1 มีผลให้ความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยที่เลี้ยงก้อนมะเร็งมากขึ้น (Olson et al., 1997) sICAM-1 มีเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วย acute stroke (Blum et al., 2006)

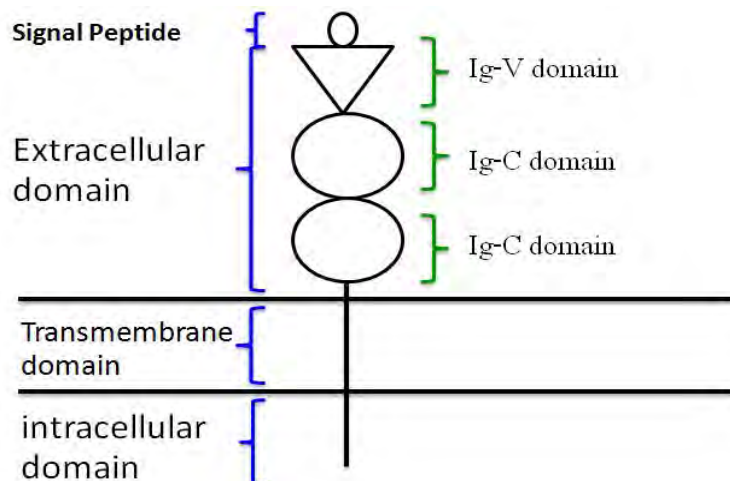
Structure and Biology of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGEs)

RAGE เป็นส่วนหนึ่งของ Immunoglobulin superfamily ของโมเลกุลที่ผิวเซลล์เป็น receptor จับได้กับหลาย ligand (multiligand receptor) (Schmidt et al., 2001) เมื่อถอดรหัส RNA จะให้ RNA ขนาด 1400 base pair เมื่อถอดรหัสเป็น โปรตีนจะได้ 404 amino acids มีมวลโมเลกุล 55 kD โปรตีน RAGE ประกอบด้วย 3 ส่วนใหญ่ ดังนี้

1. ส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular domain) มี amino acids 332 ตัว แบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ V-type 1 ส่วน ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับ ligand และ C-type 2 ส่วน ซึ่งเป็นส่วนของ immunoglobulin

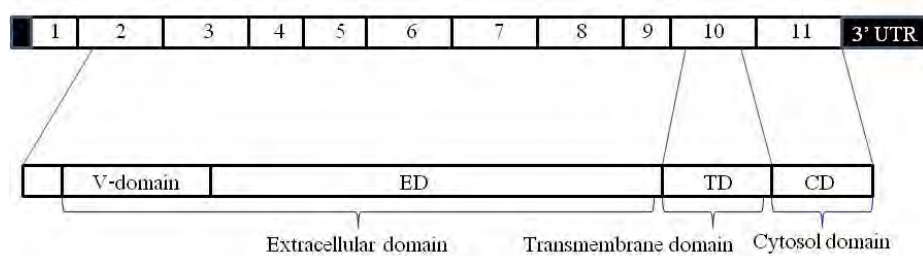
2. ส่วนที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) เป็น hydrophobic transmembrane ซึ่งเป็นส่วนส่งสัญญาณไปยัง cytosolic domain ผ่าน receptor (Huttunen et al., 2004)

3. ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (cytosolic domain) ส่วนที่ส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และ กระตุ้นให้เกิดกลไกต่างๆ ภายในเซลล์ RAGE พบได้ในเซลล์หลายชนิด เช่น endothelial cell, smooth muscle cells, lymphocyte, monocyte, astrocytes (Brett et al., 1993)



รูปที่ 1 โครงสร้างของโปรตีน RAGE (ดัดแปลงจาก Hudson et al., 2007)

ยีน RAGE อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ระหว่างยีน major histocompatibility complex (MHC) class-2 และ class-3 (Sugaya et al., 1994) จึงทำนายได้ว่า RAGE น่าจะเป็นโมเลกุลเกาะจับ (adherence molecule) พบว่า RAGE มีปริมาณน้อยในเซลล์ทั่วไป แต่ในระหว่างการเกิดพยาธิสภาพนั้นพบว่ามีการแสดงออกของ RAGE เพิ่มขึ้น



V-domain 76 amino acid

ED: Extracellular domain 322 amino acid

TD: Transmembrane domain 19 amino acid

CD: Cytosol domain 41 amino acid

รูปที่ 2 ส่วนประกอบ mRNA ทั้ง 11 exon ของยีน RAGE ที่เปลี่ยนเป็นส่วนประกอบย่อยของโปรตีน RAGE (Sterenczak et al., 2009)

RAGE ligands

RAGE จับกับ ligand ได้หลากหลาย ได้แก่ Advanced Glycation End Products (AGEs), High-mobility group box 1 (HMGB1) หรืออีกชื่อหนึ่ง Amphoterin (Hori et al., 1995), S100/calgranulin (Hofmann et al., 1999), Amyloid- β -protein (Du yan et al., 1997), Mac-1 (Chavakis et al., 2003)

กลไกการก่อพยาธิสภาพของ RAGE (Mechanism of RAGE in triggering pathogenesis)

เมื่อ ligand ที่กล่าวในข้างต้นเข้าจับกับ RAGE จะเริ่มกระตุ้นเซลล์ส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับ ได้แก่ ทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่าน mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway กระตุ้น nuclear factor kappa B (NF- κ B) เปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์ RNA ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของเซลล์ (cell survival) การเกาะติดของเซลล์ (cell adhesion) ระบบภูมิคุ้มกัน การอักเสบ เช่น tissue factor, thrombomodulin, endothelin-1, VCAM-1/ICAM-1, IL-6, IL-1, TNF-alpha การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์หนึ่งไปเป็นอีกเซลล์หนึ่ง (differentiation) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (Dorai and Aggarwal, 2004) NF- κ B ประกอบด้วย p50, p52, p65, RelB และ c-Rel (Karin et al., 2002) ในภาวะปกติ NF- κ B อยู่ในรูปไม่ทำงาน (inactive) โดยจับอยู่กับโปรตีน I κ B alpha (Barnes and Karin., 1997) ซึ่งขัดขวาง NF- κ B ไม่ให้เข้าสู่นิวเคลียส เมื่อ NF- κ B ถูกกระตุ้น เช่น สารก่อมะเร็งการอักเสบ จะทำให้ NF- κ B แยกตัวออกมาทำให้อยู่ในรูป Active และเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสและไปจับอย่างจำเพาะกับส่วน κ B ในตำแหน่ง promoter ของยีน (Barnes and Karin, 1997; Shimizu and Weinstein, 2005) มีผลกระตุ้นการถอดรหัสยีนเป้าหมาย เช่น ยีนโมเลกุลเกาะติด ยีนการแข็งตัวของเลือด ยีนต้านการตายโดยอัตโนมัติ (Bcl-2, Bcl-X_L) ยีนเพิ่มจำนวนเซลล์ (COX-2, cyclinD1) ยีน RAGE และ ยีน I κ B (Barnes and Karin, 1997; Bierhaus et al. 2000; Dorai and Aggarwal, 2004; Li and Schmidt, 1997) เมื่อเกิดจากการจับกันระหว่าง RAGE กับ ligand ก็ทำให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณเป็นลำดับขั้นหลายทาง เช่น การกระตุ้น ERK1/2 (p44/p42) MAP kinase พบได้ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Lander et al., 1997) Myoblast (Soric et al., 2004), osteoblast (Cortizo et al., 2003) และ monocyte (Shanmugam et al., 2003) การกระตุ้นของ p38 และ SAPK/JNK MAP kinase สามารถพบได้ในเซลล์โมโนไซต์และเซลล์มะเร็ง (Sorci et al., 2004; Yeh et al., 2001) และพบว่า การส่งสัญญาณของ RAGE เกี่ยวข้องกับ rho-GTPase, phosphoinosital-3-kinase และ janus kinase signaling pathway (JAK/STAT) (Huang et al., 2001) การส่งสัญญาณของ RAGE ก่อให้เกิดการกระตุ้น NF- κ B และความหลากหลายในการส่งสัญญาณนั้นบ่งชี้ว่า ligand ของ RAGE ที่ต่างกันอาจเหนี่ยวนำวิถีที่ต่างกันในเซลล์ต่างชนิดกัน

Soluble RAGE (sRAGE) & endogenous secretory RAGE (esRAGE)

Soluble RAGE (sRAGE) เกิดจาก RAGE ในรูปแบบเต็ม (full length receptor) ถูกตัดส่วนที่อยู่ภายในเซลล์และระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane and cytosolic domain) ไป เหลือแต่ส่วนของ receptor ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular domain) ซึ่งการตัดนั้นขึ้นกับสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ แต่ละชนิด ส่วน endogenous secretory RAGE (esRAGE) เกิดจากขั้นตอนของการตัด intron ของ mRNA ของ RAGE โดยการขาดหายไปของ exon 10 และถอดรหัสบางส่วนของด้าน 5' intron 9 (alternative splicing) (Yonekura et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบรูปแบบที่มีการหายไปของ

exon 8 และมี stop codon เกิดที่ exon 10 เป็นผลจาก frameshift mutation (Park et al., 2006) ในมนุษย์มี RAGE อยู่ 19 แบบ (variant) เป็นผลจากการเกิด alternative splicing ของยีน RAGE ซึ่งแต่ละรูปแบบมีโครงสร้างแตกต่างกันไปดังนี้

RAGE variant 1 (RAGEv1) มีการขาดหายไป (deletion) ของ exon 10 และมีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 9

RAGE variant 2 (RAGEv2) มีการถอดรหัส RNA ของ intron 1

RAGE variant 3 (RAGEv3) มีการขาดหายไป (deletion) ของ exon 8

RAGE variant 4 (RAGEv4) มีการขาดหายไปบางส่วนของ exon 3

RAGE variant 5 (RAGEv5) มีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 4

RAGE variant 6 (RAGEv6) มีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 4 มีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 9 และ การขาดหายไปของ exon 10

RAGE variant 7 (RAGEv7) มีการขาดหายไปบางส่วนของ exon 8

RAGE variant 8 (RAGEv8) มีการขาดหายไปของ exon 10 ขาดบางส่วนของ exon 8 และมีการถอดรหัส RNA ของ intron 9

RAGE variant 9 (RAGEv9) มีการขาดหายไปของ exon 10 กับ exon 8 และมีการถอดรหัส RNA ของ intron 9

RAGE variant 10 (RAGEv10) มีการขาดหายไปของ exon 10 กับ exon 11 และมีการถอดรหัส RNA ของ intron 9

RAGE variant 11 (RAGEv11) มีการขาดหายไปของ exon 2 exon 3 exon 4 exon 5 และ exon 6

RAGE variant 12 (RAGEv12) มีการขาดหายไปของ exon 4 exon 5 และ exon 6

RAGE variant 13 (RAGEv13) มีการขาดหายไปของ exon 4 exon 5 exon 6 exon 7 exon 8 และ exon 9

RAGE variant 14 (RAGEv14) มีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 6

RAGE variant 15 (RAGEv15) มีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 6 กับ intron 9 และ มีการขาดหายไปของ exon 10

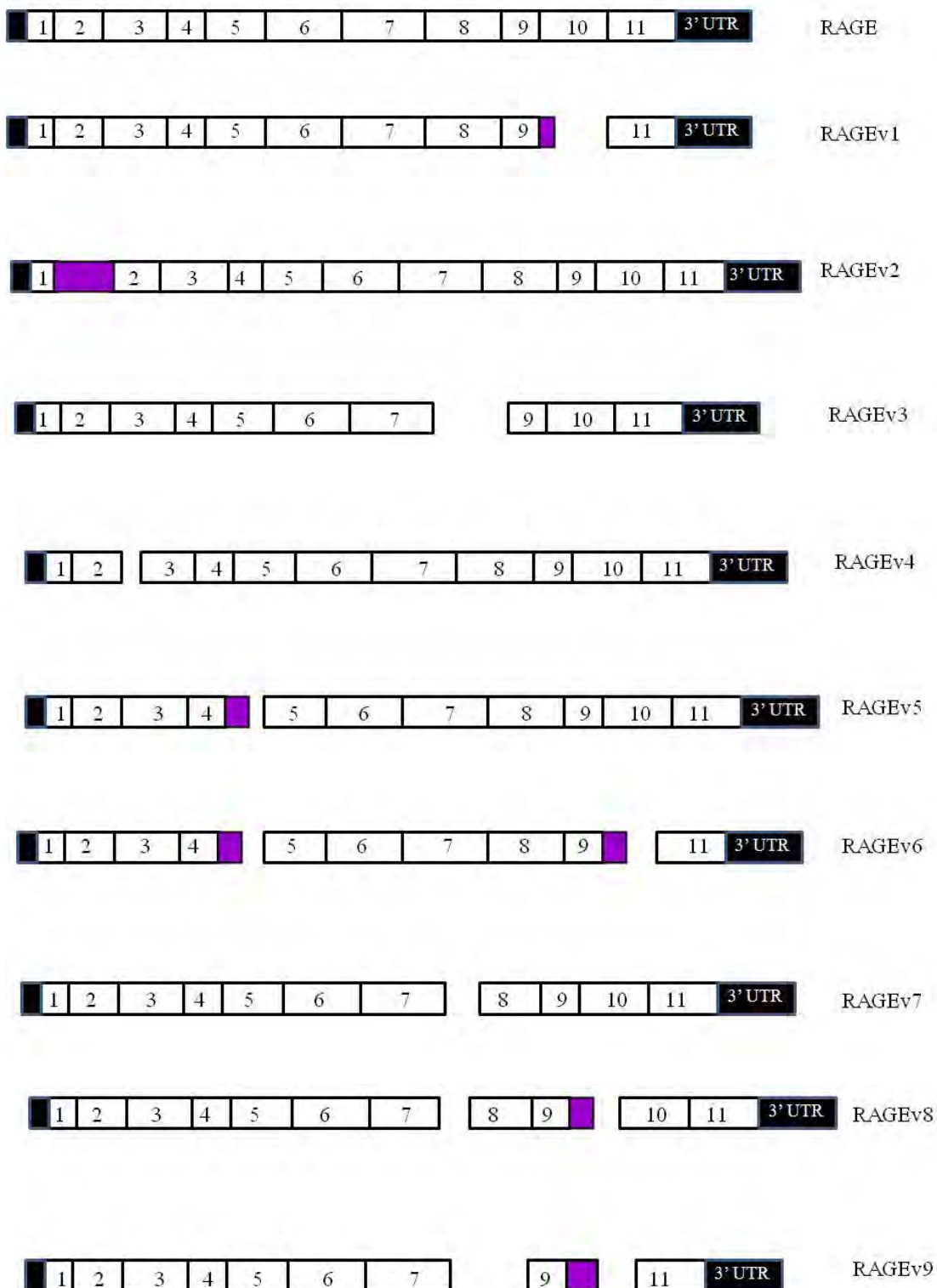
RAGE variant 16 (RAGEv16) มีการขาดหายไปของ exon 8 กับบางส่วนของ exon 3 และมีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 7

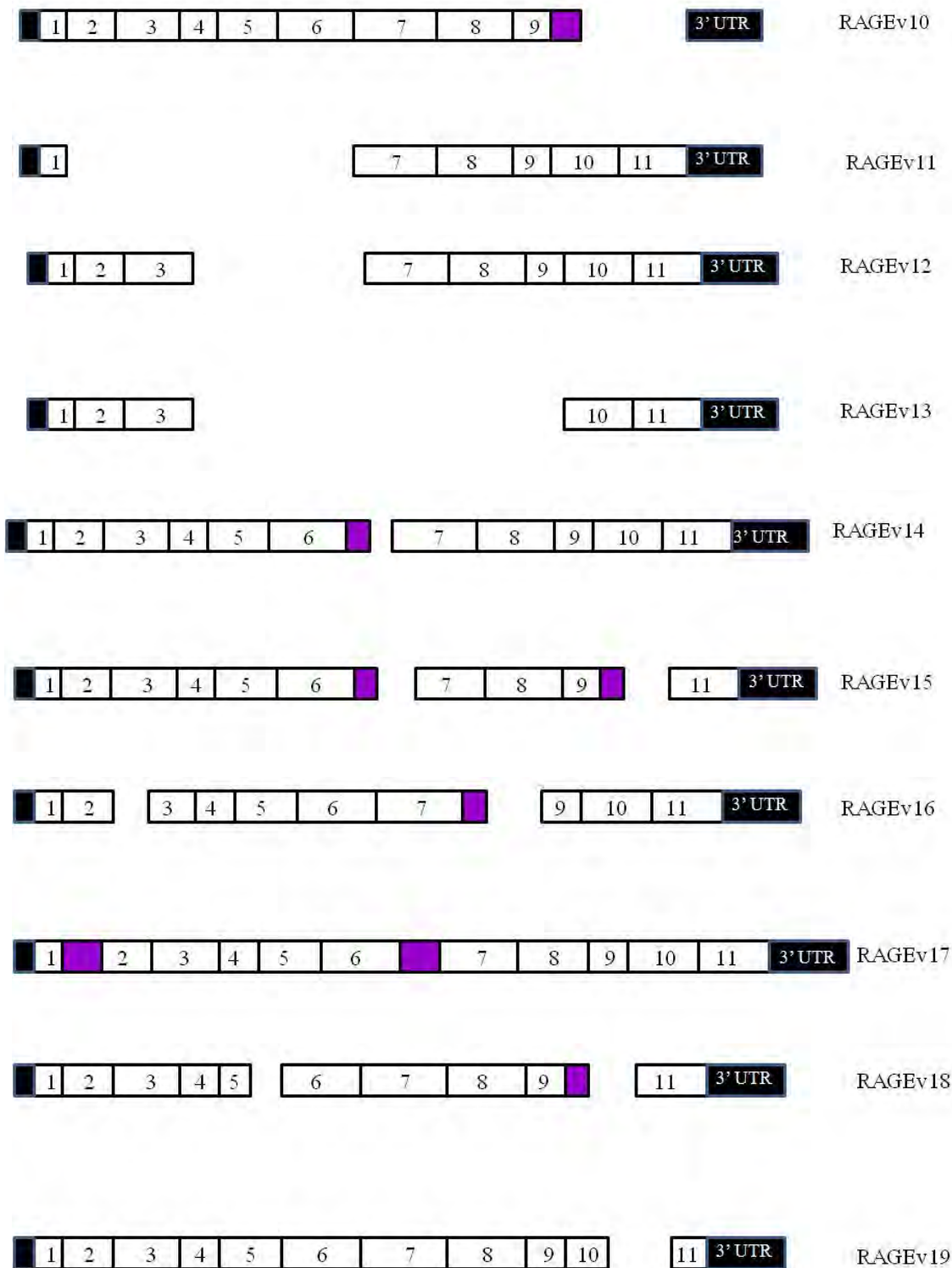
RAGE variant 17 (RAGEv17) มีการถอดรหัสของ intron 1 กับ intron 6

RAGE variant 18 (RAGEv18) มีการขาดหายไปของ exon 10 กับการขาดหายไปบางส่วนของ exon 5 กับ exon 6 และมีการถอดรหัส RNA บางส่วนของ intron 9

RAGE variant 19 (RAGEv19) มีการขาดหายไปบางส่วนของ exon 10 และ exon 11 (Hudson et al. 2007)

 = Exon  = Intron

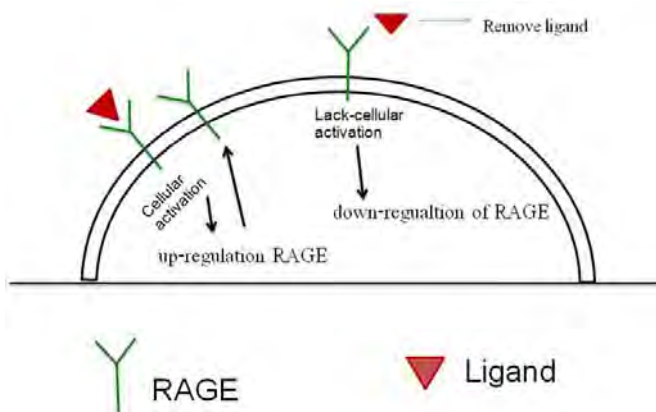




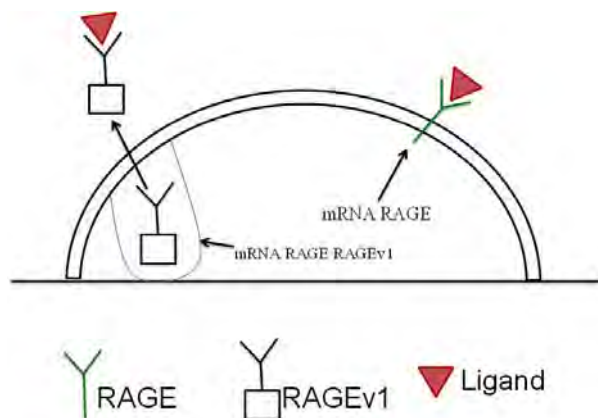
รูปที่ 3 รูปแบบทั้ง 19 แบบของ RAGE (variant of RAGE) (ดัดแปลงจาก Hudson et al., 2007)

การตรวจหา RAGE ในรูปแบบเต็ม (full length receptor) และ esRAGE อาศัย specific antibody การแสดงออกของ esRAGE พบได้ในเนื้อเยื่อทั่วไปเหมือนกับ RAGE (Cheng C. et al., 2005) ระดับของ esRAGE ในพลาสมา มีน้อยกว่า sRAGE 4 เท่า (Humpert P. et al, 2007) ในขณะที่

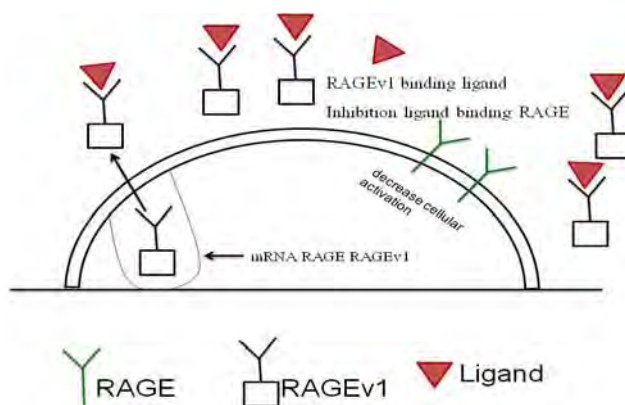
esRAGE มีระดับเพิ่มขึ้นตามการ transcrption ของ RAGE gene แต่ sRAGE เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายในเซลล์ในการตัด RAGE ภายหลังจากการสร้างโปรตีนเสร็จแล้ว อย่างไรก็ตาม esRAGE ก็น่าจะมีผลต่อการแสดงออกของ sRAGE ทั้ง sRAGE และ esRAGE อาศัย V-domain ในการจับ ligand ดังนั้นการที่มีระดับ sRAGE และ esRAGE เพิ่มสูงขึ้นน่าจะสามารถป้องกันการจับกันของ ligand กับ cell surface receptor RAGE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทางกลับกัน การที่มีระดับ sRAGE และ esRAGE ลดลงก็น่าจะเป็นการเพิ่มผลของ RAGE ligand ได้ อย่างไรก็ตามอาจมีกลไกอื่นในการแสดงผลของ ligandที่ไม่ขึ้นอยู่กับ RAGE (RAGE-independent mechanism)



รูปที่ 4 ผลของ ligand ต่อการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ผ่าน RAGE และผลจากการหายไปของ ligand ต่อการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ของ RAGE (Peter and David 2007)



รูปที่ 5 ความแตกต่างของการเกิด RAGE และ RAGEv1 (Peter and David 2007)



รูปที่ 6 การใช้ RAGEv1 ในการแย่งจับ ligand ของ RAGE และการลดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (ดัดแปลงจาก Peter and David, 2007)

ความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับมะเร็ง

มีการศึกษาหลายรายงานที่ยืนยันได้ว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับ RAGE ligand ทำให้เกิดการกระตุ้น signaling pathway เช่น p38, p44/42, MAPkinase, NF- κ B, cdc42/rac, การสร้าง Reactive oxygen species (ROS), ทำให้เกิดการสร้าง proinflammatory cytokines เช่น interleukin-1 alpha (IL-1 α), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปของโรค (progression) หลายชนิด เช่น neuropathy, nephropathy, macrovascular disease และการเปลี่ยนแปลงลักษณะหน้าที่ของเซลล์มะเร็ง (characteristic modulation of cancer cell functions) เช่น เพิ่มการเกิด metastasis และ invasion นอกจากนี้ การแสดงออกของ RAGE ยังมีอิทธิพลต่อโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Hirata et al., 2003) มะเร็งตับอ่อน (Takada et al., 2001) เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ RAGE ด้วย RAGE anti-sense พบว่าความสามารถในการลุกลามลดลง (Kuniyasu et al., 2001)

มีรายงานว่า การส่งสัญญาณผ่าน RAGE ส่งเสริมการเจริญของมะเร็ง (tumor development) (Gebhardt et al., 2007) จากการศึกษา C6 glioma ของหนูซึ่งมีการแสดงออกของ RAGE ทำการทดลองถ่ายยีนของ sRAGE ลงในเซลล์มะเร็ง แล้วนำโคลนไปปลูกถ่ายในหนูทดลอง พบว่าเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ full-length RAGE มากเกินพอจะมีปริมาณเนื้องอกเพิ่มขึ้น 5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและปริมาณเนื้องอกลดลง 6.5 เท่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ sRAGE (Taguchi et al., 2000)

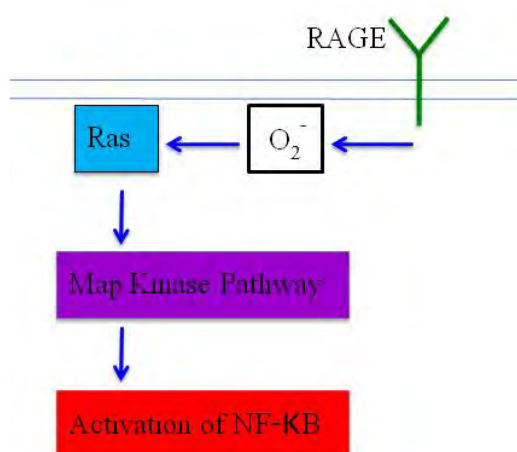
การแสดงออกของ RAGE ยังมีอิทธิพลต่อโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งตับอ่อน มะเร็งต่อมลูกหมาก และมีผลต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (HCC) (Hiwatashi et al., 2007)

ความสัมพันธ์ระหว่าง RAGE กับ NF- κ B และ TNF- α

โปรตีน NF- κ B เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และเป็นกลไกหลักในการตอบสนองต่อการติดเชื้อและการบาดเจ็บ อย่างไรก็ตามการตอบสนองโดยเกิดการอักเสบนั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด NF- κ B proteins เป็นสัญญาณสำคัญภายในเซลล์เมื่อเกิดจากการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ มี cytokines 2 ชนิด ที่มีความจำเพาะอย่างยิ่งในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ คือ tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1) ทั้งสองตัวนี้มีความสำคัญ ในระบบภูมิคุ้มกัน

NF- κ B เป็นตัวกระตุ้นการสร้าง mRNA ของยีนมากกว่า 60 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในสัตว์มีกระดูกสันหลังพบโปรตีน NF- κ B 5 ชนิด RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B₁ และ NF- κ B₂ มีความหลากหลาย โดยการจับคู่กันเป็น homodimers และ heterodimers ตัวยับยั้ง NF- κ B เรียกว่า I κ B เมื่อ I κ B จับกับ dimer ของ NF- κ B ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถทำงานได้ การส่งสัญญาณขึ้นกับการควบคุมของโปรตีนที่จะมาตัด I κ B เมื่อถูกตัดจะกระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต การเติม ubiquitine บน I κ B ทำให้ I κ B เปลี่ยนรูปร่างและหลุดออกจาก NF- κ B และเปิดเผยส่วน nuclear localization signal ออกมา เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติม ubiquitine บน I κ B คือ I κ B kinase (IKK)

Rel หรือ NF- κ B (NF- κ B) เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ eukaryotic transcription factors ควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบ การเติบโตของเซลล์ การตายของเซลล์ หาก transcription factor ทำหน้าที่มากเกินไปจะเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น cancer, arthritis, chronic inflammation, asthma, neurodegenerative diseases และ heart disease



รูปที่ 7 กลไกการก่อพยาธิสภาพของ RAGE ผ่าน NF- κ B (Huttunen et.al., 1999)

Rel/ NF- κ B proteins มีส่วนที่จับกับ DNA เรียกว่า Rel domain แบ่งออกเป็น 2 class ตาม ลักษณะsequences ส่วน C-terminal

1. Class 1 มี ankyrin repeats หลาย copies ที่ C-terminal ได้แก่ NF- κ B₁ p105 to p50, NF- κ B₂ p100 to p52

2. Class 2 ไม่มี multiple copies of ankyrin repeats ที่ C-terminal ได้แก่ RelB, RelA, c-Rel (p65) ตำแหน่งที่ Rel/ NF- κ B transcription factors ไปจับ เรียกว่า kB sites มีขนาด 9-10 bp

จากที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนั้น จึงตั้งสมมุติฐานว่าหากสามารถหยุดยั้งกลไกการส่งสัญญาณของ RAGE ผ่าน NF- κ B ได้ น่าจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

HeLa cell line เป็น cervical cancer cells ใช้เป็นแม่แบบในการแยก RAGEv1 และ Human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2) เป็นเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงใช้เป็นแม่แบบในการทดลองแทนเซลล์มะเร็งตับ

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์

-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80 °C ULT Deep Freezer	IIShin Lab, เกาหลีใต้
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
Analytical Balances	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autopipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Block heater	Wealtec, สหรัฐอเมริกา
Bio safety carbinet	Labcanco, สหรัฐอเมริกา
Cell Culture Flask (25 cm ²)	Nunc, เดนมาร์ก
Centrifuge tube 15, 50 ml	Corning, สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning, สหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Gel Documentation (Gel Doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Glasswares	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge	Denver Instrument, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1 .5 ml)	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Microwave	Sharp, ญี่ปุ่น
Nano Drop	Bioactive, สหรัฐอเมริกา
PCR tube	Bioscience, สหรัฐอเมริกา
Thermal cycler	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVac)	Thermo Electron, สหรัฐอเมริกา

Vortex mixer	Finepcr, เกาหลีใต้
Water Bath	Memmert, เยอรมนี
Western blot kit	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
สารเคมี	
GenePure LE Agarose	ISC BioExpress, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dulbecco's modified Eagle's medium	HyClone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-trypsin 0.25% (1X)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
2-Propanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck, เยอรมนี
N-Butanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ethidium bromide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Taq DNA polymerase kit	Fermentas, แคนาดา
Takara LA Taq kit	Takara, ญี่ปุ่น
Pfu DNA polymerase kit	Fermentas, แคนาดา
pGEM-T easy vector kit	Promega, สหรัฐอเมริกา
Enzyme <i>HindIII</i> , <i>PstI</i>	Fermentas, แคนาดา
Enzyme <i>BamHI</i> , <i>EcoRV</i>	NEB, สหรัฐอเมริกา
Fetal bovine serum (FBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phosphate buffered saline (PBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
DMEM	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Deoxyribonuclease I	Biobasic, แคนาดา
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
T4 DNA ligase	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
DNA Ladder 100 bp	Fermentas, แคนาดา
QIAprep Spin miniprep kit	Qaigen, เยอรมันนี
pcDNA3.1/V5-His TOPO TA expression kit	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Improm II RT	Promega, สหรัฐอเมริกา
Bacto tryptone	Biobasic, แคนาดา
Yeast extract	Biobasic, แคนาดา

Ampicillin	Atlantic Laboratories, ไทย
Oligo-dT 17-mer	Fermentas, แคนาดา
Primers	Pacific Science, ฝรั่งเศส
RNAse Inhibitor	Fermentas, แคนาดา
Trizol reagent	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

3.2 การแยกยีน soluble RAGE ด้วยการโคลน

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HeLa cell line เพื่อใช้แยกยีน soluble RAGE

ทำการเพาะเลี้ยง HeLa cell line บนจานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm โดยใช้ 10% FBS working DMEM เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C จนได้ปริมาณประมาณ 80-90 % ของจานเพาะเลี้ยง โดยประมาณการจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.2 การสกัด RNA จากเซลล์มะเร็ง HeLa cell line

เมื่อ HeLa cell line มีปริมาณประมาณ 80-90 % ของจานเพาะเลี้ยง ทำการล้างเซลล์มะเร็ง HeLa cell line ด้วยน้ำยา 1X PBS จำนวน 1 mL แล้วเทน้ำยา 1X PBS ที่ จากนั้นเติมน้ำยา Trizol reagent (Invitrogen) ลงไป 1 mL จนเซลล์หลุดออกหมด ถ่ายเทสารละลายจากจานเพาะเลี้ยงมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL เขย่าจนเซลล์และน้ำยาเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งที่ไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมคลอโรฟอร์มที่เข้มข้นปริมาตร 200 μ L ลงไป เขย่าด้วยการกลับหลอดไปมา 30-50 ครั้งจนสารละลายเข้ากันดี ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่ 4 °C นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนประมาณ 500 μ L ลงไปในหลอด 1.5 mL อีกหลอด นำ 100% isopropanol 500 μ L เติมลงไป เขย่าด้วยการกลับหลอดไปมา 30-50 ครั้งจนสารละลายเข้ากันดี เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g 4 °C 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 75% ethanol 500 μ L เขย่าให้ตะกอนหลุดจากกันหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g 4 °C 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูที่จืดด้วยน้ำยา RNase away ที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ 30 นาทีจนตะกอนแห้ง เติม DEPC-H₂O ลงไป 50 μ L อุณหภูมิ 65 °C 5 นาที เพื่อให้ตะกอนละลาย นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nano Drop

3.2.3 การทำลาย DNA ด้วย DNase

ดูด RNA ที่มีความเข้มข้น 1 μ g ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 mL ผสมกับ 10X DNase buffer 1 μ L ใช้เอนไซม์ DNase ที่มีความเข้มข้น 1 U/ μ L จำนวน 1 μ L ต่อ 1 ปฏิกริยา เติม DEPC-

water จนมีปริมาตร 10 μL เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 นาที เมื่อครบเวลาเติม 25 nM EDTA 1 μL นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 นาที

3.2.4 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี Reverse transcription

ใช้ชุดน้ำยา ImProm-II Reverse transcriptase (Promega) นำหลอดทดลองขนาด 0.2 mL ที่ผ่านการทำลาย DNA แล้ว มาเติมส่วนผสม ดังนี้

50 μM Oligo dT primer (dT ₁₇)	0.8 μL
ImProm-II 5X buffer	4 μL
25 nM MgCl ₂	1.2 μL
10 mM dNTP	1 μL
ImProm-II Reverse transcriptase	1 μL
DEPC-water	2 μL

นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันของ RNA และ primers

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 40 $^{\circ}\text{C}$ 65 นาที ให้ Reverse transcriptase ทำหน้าที่สร้างสาย cDNA

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 65 $^{\circ}\text{C}$ 15 นาที หยุดการทำงานของ Reverse transcriptase

3.2.5 การเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยาถูโกโซโพลีเมอเรส (PCR)

ใช้ Proof reading polymerase และ Taq polymerase (Fermentas) เติมส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกิริยามีดังนี้

cDNA	5 μL
10X buffer	5 μL
10mM dNTP	1 μL
25 nM MgCl ₂	2 μL
Forward-primer	0.25 μL
Reverse-primer	0.25 μL
DMSO	2.5 μL
Taq polymerase	0.25 μL
Proof reading polymerase	0.125 μL
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	50 μL

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอน

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 50 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 15 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลา จนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิบัติการออกจากเครื่อง

ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน RAGE เพื่อการโคลนยีน

Forward-primer 5'- GAAGGAAGCAGGATGGCA -3'

Reverse-primer 5'-GATGGGATCTGTCTGTGGG - 3'

3.2.6 การวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำผงวุ้นอะกาโรส 2 g ผสมกับ 1X TBE buffer 100 μ L นำไปละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำกลั่น 100 mL ร่อนด้วยตาข่าย นำผลผลิตในแต่ละหลอด 10 μ L ผสมกับ 6x loading dye (Fermentas) 2 μ L ปิเปตส่วนผสมลงไปในหลุมวุ้นอะกาโรส เดินเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 100 Volts 30 นาที

3.2.7 การตกตะกอน DNA (DNA precipitation)

นำ DNA ที่ผ่านปฏิกิริยา PCR 100 μ L เติมน้ำกลั่น 100 μ L เหย้าให้เข้ากัน อุ่นที่อุณหภูมิ -20 °C 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 g 4 °C 15 นาที เติมน้ำกลั่น 500 μ L เหย้าให้ตกตะกอนหลอดจากกันหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 g 4 °C 5 นาที เติมน้ำกลั่นและคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู ตากจนตะกอนแห้ง เติมน้ำกลั่นลงไป 50 μ L อุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C 5 นาทีเพื่อให้ตะกอนละลาย นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nano Drop

3.2.8 การทำการเชื่อมต่อกับตัวนำ (Vector ligation)

ใช้ pGEM -T Easy Vector System (Promega) ใส่วัสดุผสมในหลอดทดลอง 1.5 mL โดย 1 ปฏิกริยามีดังนี้

DNA ที่ผ่านการตกตะกอน	3.5 μ L
Ligase 2X buffer	5 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
pGEM vector	0.5 μ L

นำส่วนผสมเขย่าให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงให้ทั้งหมดตกลงมาที่ก้นหลอด เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม N-butanol 200 µL เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 g 4 °C 15 นาที เทส่วนใสทิ้งรอให้ตะกอนแห้ง เติมน้ำกลั่นลงไป 50 µL อุณหภูมิ 65 °C 5 นาทีเพื่อให้ตะกอนละลาย เพื่อเตรียมนำเข้าสู่ขั้นตอนถ่ายโอนยีน (transformation)

3.2.9 การถ่ายโอนยีน (Transformation)

นำยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 alpha ที่เตรียมไว้เป็น competent cell โดยอาศัยหลักการ electroporation เตรียมอุปกรณ์ดังนี้ cuvette สำหรับ electroporator แช่ที่ -20 °C เติม LB broth เลี้ยงแบคทีเรียจำนวน 5 mL ลงในหลอดทดลองขนาด 15 mL แช่ที่ 4 °C นำเครื่อง electroporator ปรับ voltage ไปที่ 1800 Volts เตรียม pipette ปรับปริมาตรไว้ที่ 1000 µL และ pipette ปรับปริมาตรไว้ที่ 80 µL นำ competent cell จากที่เก็บไว้ที่ -80 °C มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 37 °C จนเหลว กลายเป็นน้ำ ใช้ pipette ที่ปรับปริมาตรไว้ที่ 80 µL ดูด competent cell ผสมลงใน DNA ที่ได้เชื่อมต่อกับ vector ไว้ ดูดทั้งหมดใส่ cuvette สำหรับ electroporator ในขณะที่ยังเย็นอยู่ เสียบ cuvette ลงใน electroporator ปิดฝา cuvette ปิดฝา electroporator กดปุ่ม shock นำ pipette ปรับปริมาตรไว้ที่ 1000 µL ดูด LB broth ที่เตรียมไว้ 1 mL นำมาใส่ใน cuvette สำหรับ electroporator เมื่อเครื่องแสดงไฟสัญญาณสีเขียว ใช้ pipette ดูดขึ้นลงอย่างรวดเร็ว และดูดทั้งหมดมาใส่ในหลอดทดลอง 1.5 mL อุณหภูมิ 37 °C 60 นาที นำ plate LB broth ผสมยา Ampicillin มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เตรียม spreader และ บีกเกอร์ ใส่ 100% ethanol ไว้ จุ่ม spreader ลงใน 100% ethanol เผลาไฟและทิ้งไว้ เมื่อครบเวลา 60 นาที นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ ดูดมา 80 µL ใส่ใน plate แล้ว spread ให้กระจายตัวทั่ว plate หรือจนกว่าจะแห้ง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมาตรวจหา ยีนที่ต้องการ ด้วยวิธี colony PCR

3.2.10 การตรวจสอบโคลนด้วยวิธี colony PCR

colony PCR ใช้หลักการเดียวกับ PCR แต่แม่แบบเป็นโคโลนีจากแบคทีเรีย โดยใช้ Taq polymerase (Fermentas) ใส่ส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกริยามีดังนี้

Bacteria 1 colony ผสมน้ำกลั่น	5 µL
10X buffer	2.5 µL
10mM dNTP	0.5 µL
25 nM MgCl ₂	1 µL
T 7 promotor Forward-primer	0.125 µL
SP6 Reverse-primer	0.125 µL
DMSO	1 µL
Taq polymerase	0.125 µL

เติมน้ำกลั่นจนครบ 25 μ L

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 58 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 1 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลา จนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่อง

ลำดับเบส primer ที่ใช้

T 7 promotor Forward-primer 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

SP6 Reverse-primer 5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'

วิเคราะห์ผลการถ่ายโอนยีน (transformation) ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสตามขั้นตอน 3.2.6

3.2.11 การตรวจสอบโคลนในแบคทีเรียด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน RAGE

ใช้ Taq polymerase (Fermentas) ใส่ส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกริยามีดังนี้

Bacteria 1 colony ผสมน้ำกลั่น	5 μ L
10X buffer	2.5 μ L
10mM dNTP	0.5 μ L
25 nM MgCl ₂	1.5 μ L
Forward-primer	0.125 μ L
Reverse-primer	0.125 μ L
DMSO	1 μ L
Taq polymerase	0.125 μ L

เติมน้ำกลั่นจนครบ 25 μ L

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 50 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 1 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลา จนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิบัติการออกจากเครื่อง

ลำดับเบส primer ที่ใช้

Forward-primer 5'- GAAGGAAGCAGGATGGCA -3'

Reverse-primer 5'-GATGGGATCTGTCTGTGGG - 3'

วิเคราะห์ผลจากการตรวจสอบโคลน ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสตามขั้นตอน 3.2.6

3.2.12 การตรวจสอบโคลนในแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme digestion)

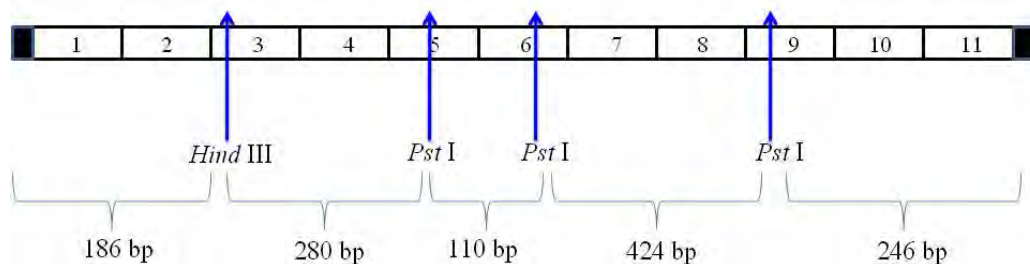
ก่อนที่จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะต้องนำโคลนที่โคลนได้มาสกัด plasmid ออกมาก่อนด้วย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) มีวิธีทำดังนี้

นำโคลนที่คาดว่าจะมี RAGE อยู่มาเลี้ยงกับ LB broth 5 mL ในหลอดทดลอง 15 mL บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรีย 5 mL แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 mL ปั่น 11,000 g 30 วินาที เทส่วนใส ออก เติม 250 µL buffer A1 คนขึ้นลงและเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 250 µL buffer A2 เขย่า หลอดกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง (จนกว่าส่วนใสเข้ากันดี) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 300 µL buffer A3 เขย่าหลอดกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง (จนกว่าส่วนใสเข้ากันดี) ปั่น 11,000 g 5 นาที ให้ ตะกอนตกไปกองที่ก้นทั้งหมด ถ่ายเปลี่ยนส่วนใสไปยัง column ซึ่งเสียบอยู่บน collection tube ปั่น 11,000 g 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ออก นำมาสวมกับ column เติม 600 µL buffer A4 ปั่น 11,000 g 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ออก นำมาสวมกับ column อันเดิม ปั่น 11,000 g 2 นาที ทิ้ง collection tube นำ column ไปเสียบบนหลอด 1.5 mL เติม 50 µL buffer AE ที่ร้อน 65 °C วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่น 11,000 g 1 นาที ได้ plasmid vector

นำ plasmid vector มาผสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ใช้เอนไซม์ *HindIII* & *PstI* (Fermentas) โดยมีส่วนผสมต่อ 1 ปฏิกริยาดังนี้

<i>HindIII</i>	1 µL
<i>PstI</i>	1 µL
10X Tango buffer	8 µL
Plasmid vector	30 µL

อุ่นที่ 37 °C 24 ชั่วโมง เป้าหมายจะได้รูปแบบ DNA แสดงไว้ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 รูปแบบและขนาดของแถบ DNA จากการตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Hind*III & *Pst*I บน ยีน RAGE (Hudson et al., 2008)

3.2.13 ตรวจหาลำดับเบส (Sequencing)

นำ plasmid ที่สกัดด้วย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) ส่งไปยังบริษัท Ward Medic ซึ่งเป็นตัวแทนส่งไปบริษัท First Base Laboratories Sdn. Bhd. เพื่อหาลำดับเบส DNA

3.3 การเชื่อมต่อ RAGEv1 กับ expression vector

3.3.1 การเชื่อมต่อกับตัวนำที่สามารถแสดงออกในยูคาริโอต

เมื่อได้โคลนที่มี RAGEv1 นำมาสกัด plasmid ด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) โดยวิธีการดังนี้

นำโคโลนีที่คาดว่าจะมี RAGE อยู่มาเลี้ยงกับ LB broth 5 mL ในหลอดทดลอง 15 mL บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรีย 5 mL แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 mL ปั่น 11,000 g 30 วินาที เทส่วนใส ออก เติม 250 µL buffer A1 คนขึ้นลงและเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 250 µL buffer A2 เขย่าโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 300 µL buffer A3 เขย่าหลอดกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง จนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่น 11,000 g 5 นาที ให้ตะกอนตกไป ตกที่ก้นหลอดทั้งหมด ถ่ายเปลี่ยนส่วนใสไปยัง column ซึ่งวางอยู่บน collection tube ปั่น 11,000 g 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ออก นำมาสวมกับ column เติม 600 µL buffer A4 ปั่น 11,000 g 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ออก นำมาสวมกับ column อันเดิม ปั่น 11,000 g 2 นาที ทิ้ง collection tube นำ column ไปวางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 mL เติม 50 µL buffer AE ที่อุณหภูมิ 65 °C ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่น 11,000 g 1 นาที ได้ plasmid vector

3.3.2 การเพิ่มจำนวน RAGEv1

เพิ่มจำนวน plasmid vector ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Proof reading polymerase และ Taq polymerase (Fermentas) ใส่ส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกริยามีดังนี้

Plasmid vector	2 μ L
10X buffer	5 μ L
10mM dNTP	1 μ L
25 nM MgCl ₂	3 μ L
RAGE cut stop Forward-primer	0.25 μ L
RAGE cut stop Reverse-primer	0.25 μ L
DMSO	2.5 μ L
Taq polymerase	0.25 μ L
Proof reading polymerase	0.125 μ L

เติมน้ำกลั่นจนครบ 50 μ L

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94°C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 58 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 15 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลา จนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่อง

ลำดับเบส primers ที่ใช้โคลนยีนเพื่อเชื่อมต่อกับ expression vector

RAGE cut stop Forward-primer 5'- AGAGAATTCGAAGCAAGATGGCA -3'

RAGE cut stop Reverse-primer 5'- AGGTCTAGAGCAAGGCCCTCCAGTA - 3'

วิเคราะห์ผลจากเพิ่มจำนวน RAGEv1 ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสตามขั้นตอน 3.2.6

นำ PCR product ที่ได้ตกตะกอน DNA โดยนำ DNA RAGE variant 1 ที่ผ่านปฏิกิริยา ลูคโซโพลีเมอเรส (PCR) 100 μ L เติมน้ำ 100% isopropanol 100 μ L เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 g 4 °C 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ 75% ethanol 500 μ L เขย่าให้ตะกอนหลุดจากกันหมด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 g 4 °C 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู ตากจนตะกอนแห้งเติมน้ำกลั่นลงไป 50 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C 5 นาทีเพื่อให้ตะกอนละลาย นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่อง Nano Drop

3.3.3 การทำการเชื่อมต่อกับ expression vector

ใช้ pcDNA3.1/V5-His TOPO TA expression kit (Invitrogen) ใส่ส่วนผสมลงในหลอดทดลอง 0.2 mL ต่อ 1 ปฏิกริยา ดังนี้

PCR product 4 μ L

Salt solution 1 μ L

TOPO vector 1 μ L

เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงมาที่ก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 22 °C 24 ชั่วโมง ด้วย Thermal cycler เมื่อครบเวลา นำมาผสมกับ One shot TOPO competent *E.coli* บ่มที่ 42 °C 30 วินาทีบนเครื่องทำความร้อน คูด SOC medium 250 μ L เติมน้ำใส่หลอดทดลอง 1.5 mL บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา คูด 100 μ L ใส่ลงบน plate แล้ว spread บน plate LB broth ที่มี Ampicillin ผสมอยู่ บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง นำมาตรวจหา ยีนที่ต้องการด้วยวิธี colony PCR

3.3.4 การตรวจสอบโคลน (Colony PCR)

colony PCR ใช้หลักการเดียวกับ PCR แต่แม่แบบเป็นโคลนนี้จากแบคทีเรีย โดยใช้ Taq polymerase (Fermentas) ใส่ส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกริยา มีดังนี้

Bacteria 1 โคลนนี้ ผสมน้ำกลั่น	5 μ L
10X buffer	2.5 μ L
10mM dNTP	0.5 μ L
25 nM MgCl ₂	1 μ L
T 7 promotor Forward-primer	0.125 μ L
BGH Reverse-primer	0.125 μ L
DMSO	1 μ L
Taq polymerase	0.125 μ L

เติมน้ำกลั่นจนครบ 25 μ L

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 60 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 1 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาจนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิบัติการออกจากเครื่อง

ลำดับเบส primers ที่ใช้ในการตรวจโคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อกับ expression vector

T 7 promotor Forward-primer 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

BGH Reverse-primer 5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG - 3'

วิเคราะห์ผลจากการตรวจสอบโคลนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสตามขั้นตอน 3.2.6

3.3.5 การตรวจสอบโคลนในโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme digestion)

ก่อนที่จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะต้องนำโคลนที่โคลนได้มาสกัด plasmid ออกมาก่อนด้วย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) วิธีการสกัดทำตามขั้นตอน 3.3.1

นำ plasmid vector ที่สกัดได้มาผสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะใช้เอนไซม์ *BamHI* และ *EcoRV* (NEB) โดยมีส่วนผสมต่อ 1 ปฏิกริยาดังนี้

<i>BamHI</i>	2 µL
<i>EcoRV</i>	2 µL
10X buffer3	4 µL
Plasmid vector	28 µL
1X BSA	4 µL

บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง

วิเคราะห์ผลจากการตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามขั้นตอน 3.2.6

3.3.6 ตรวจสอบลำดับเบส (Sequencing)

นำ plasmid ที่สกัดด้วย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) ส่งไปยังบริษัท Ward Medic ซึ่งเป็นตัวแทนส่งไปบริษัท First Base Laboratories Sdn. Bhd.

3.4 การนำยีนเข้าสู่ HepG2 (Transfection)

3.4.1 การสกัด plasmid

นำโคโลนีที่มี RAGEv1-expression vector มาเลี้ยงใน LB broth 5 mL ในหลอดทดลอง 15 mL บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง นำเบคทีเรีย 5 mL เทลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ซึ่งมี LB broth 495 mL บ่มที่ 37 °C 48 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มปั่นเหวี่ยง (shaking incubator) นำทั้งหมดมาสกัด plasmid ด้วยชุดสกัด PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep kit (invitrogen) มีขั้นตอนดังนี้

นำ bacteria ที่เลี้ยงไว้เทลงในหลอดทดลองขนาด 50 mL ปั่นเหวี่ยง 4,000 g 10 นาที 4 °C เทส่วนใสทิ้ง เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยง 4,000 g 5 นาที 4 °C เทส่วนใสทิ้งซ้ำให้แห้ง ใส่ Resuspension buffer (R3) 5 mL ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ใส 5 mL Lysis buffer (L7) เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวด้วยการกลับหลอดไปมาหลายๆครั้ง บ่ม 5 นาที 37 °C เติม 5 mL Precipitation buffer (R3) เขย่าให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวด้วยการกลับหลอดไปมาหลายๆครั้ง นำหลอดทดลองปั่นเหวี่ยง 4,000 g 10 นาที 4 °C เตรียม column และ หลอด waste ให้ติดกันแล้วเติม Equilibration buffer (EQ1) ปล่อยให้ไหลตามแรงโน้มถ่วง รอจน Equilibration buffer (EQ1) ไหลออกจนเกือบหมด ดูส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ใสลงใน column ปล่อยให้ไหลตามแรงโน้มถ่วงจนของเหลวไหลจนหมด เติม 30 mL Wash buffer (W8) ปล่อยให้ไหลตามแรงโน้มถ่วงจนของเหลวไหลจนหมด ทำซ้ำ 2 ครั้ง ทิ้งหลอด waste นำหลอด 50 mL ใหม่ ใช้เตรียมรองรับส่วนใสที่ไหลออกมาหลังจากใส่ Elution buffer นำ Elution buffer อุณหภูมิ 65 °C เติมลงใน column 15 mL ปล่อยให้ไหลตามแรงโน้มถ่วงจนของเหลวไหลจนหมด นำของเหลวที่รองรับได้ผสม Isopropanol 15 mL บ่ม -20 °C 30 นาที นำมาใส่หลอดทดลอง 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 g 15 นาที 4 °C เทส่วนใสออก ตากตะกอนให้แห้ง เติมน้ำกลั่นเพื่อละลาย DNA วัดปริมาณด้วย Nano Drop และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1000 ng/μL

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HepG2

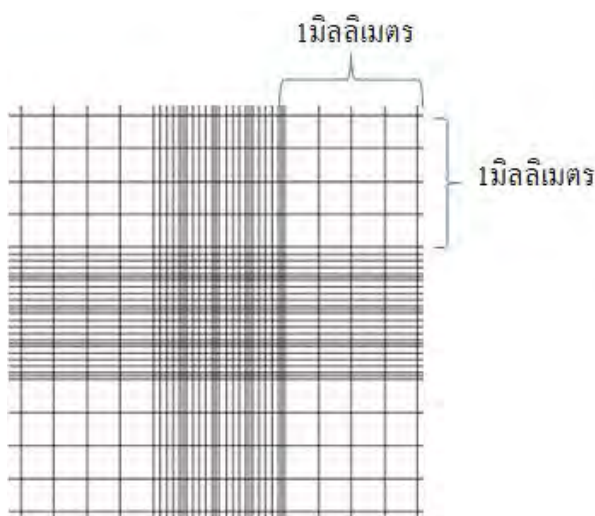
ทำการเพาะเลี้ยง HepG2 cell line บนจานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm โดยใช้ 10% FBS working DMEM (10% DMEM) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C จนได้ปริมาณ 80%-90% ของพื้นที่โดยประมาณการจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.3 การนับจำนวนเซลล์มะเร็ง HepG₂

นำเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในขั้นตอน 3.4.2 เทอาหารเลี้ยงของเก่าทิ้ง เติมน้ำยา 1X PBS ลงไป 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเติมน้ำยา 1X PBS ที่ใส่ trypsin reagent 1 mL บ่ม 3 นาที ในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C ล้าง trypsin reagent ที่ใส่ไป ใส่ 10% DMEM 1 mL ให้เซลล์ที่ติดที่ก้นหลอดหลุดออกให้มากที่สุดแล้วลวกใส่หลอดทดลอง 1.5 mL เจือจางเซลล์ด้วยสีย trypan blue อัตราส่วน 1:10 (dilution factor) เขย่าให้เข้ากัน เซลล์ที่ตายแล้วสีจะซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ล้าง 10 μ L ใส่ Neubauer chamber ที่มี cover slip ปิดอยู่ด้านบน นับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนเซลล์บริเวณช่องขนาด 1X1 mm 4 ช่อง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 9 แสดงภาพ Neubauer chamber



รูปที่ 10 ช่องขนาด 1 X 1 mm ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์

คำนวณเป็นปริมาณเซลล์ต่อ mL เท่ากับนำจำนวนเซลล์ที่นับได้หารปริมาตรของ Neubauer chamber (10^{-4} mm^3) คูณ dilution factor

นำเซลล์ที่นับได้แบ่งใส่จานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mL 4 ถาดเซลล์ โดยใช้ 10% FBS working DMEM (10% DMEM) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะที่ก้นภาชนะให้มีปริมาณ 50%-60% ของพื้นที่โดยประมาณจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

3.4.4 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2

นำเซลล์ที่นับไว้จากขั้นตอน 3.4.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมน้ำยา 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

ผสมสารใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL ดัง ตารางที่ 1

Label TUBE	SERUM-FREE DMEM (μ L)	Plasmid (μ g)
1	500	0
2	495	5 (Control Vector*)
3	498	2
4	496	4
5	494	6
6.	492	8
Lable TUBE	SERUM-FREE DMEM (μ L)	Lipofectamine (μ L)
1	500	0
2	495	5
3	498	2
4	496	4
5	494	6
6	492	8

ตารางที่ 1 ส่วนผสมในการโคลนยีนด้วยน้ำยา lipofectamine เพื่อตรวจการแสดงออกของยีน

RAGE * Control VECTOR คือ ยีน RAGE ที่โคลนได้แต่ยีน RAGE กลับหัวโดยที่ start codon อยู่ด้านท้ายของ vector

บ่มที่ 37 °C 5 นาที นำสารจากหลอดทดลองขนาด 1.5 mL ที่ผสมกันดังตาราง ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ดูดมา 1 mL ใส่ในงานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm อุณหภูมิ 37 °C 5% CO₂ เทส่วนใส่ทิ้งแล้วล้างด้วย 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ใส่ 10% DMEM 4 mL ลงไปทุกงานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm บ่ม 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C 5% CO₂ นำไปสกัด mRNA โดยชุดสกัด Quick prep micro mRNA isolation kit

3.4.5 การสกัด Quick prep micro mRNA isolation kit มีวิธีดังนี้

นำเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงขนาด 100 X 20 mm ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งที่ 4 °C เติมน้ำยา 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมน้ำยา extraction buffer 0.4 mL ลงในงานเพาะเลี้ยง เขย่าจนเซลล์แตกทั้งหมดและสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ 0.8 mL elution buffer เขย่า

จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 1 นาที ดูดส่วนใส่ผสมกับ oligodT-cellulose เขย่าโดยการกลับหลอดไปมา 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 30 วินาที ดูดส่วนใส่ออก เติม 1 mL high salt buffer เขย่าโดยการกลับหลอดไปมาจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 30 วินาที ดูดส่วนใส่ออก ล้างด้วย high salt buffer อีก 3 ครั้ง เติม 1 mL low salt buffer เขย่าโดยการกลับหลอดไปมาจนเป็นเนื้อเดียวกันปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g 30 วินาที ดูดส่วนใส่ออกล้างด้วย low salt buffer อีก 1 ครั้ง เติม low salt buffer 0.3 mL เขย่าโดยการกลับหลอดไปมาจนเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ทั้งหมดลงใน column นำ tube waste มารองใต้ column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 10 วินาที เติม low salt buffer 0.5 mL ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 10 วินาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เติม elution buffer ที่อุณหภูมิ 65 °C ลงใน column 0.1 mL เก็บที่ -20 °C

3.4.6 การตรวจสอบการสกัด mRNA

ใช้ Taq polymerase (Fermentas) เติมส่วนผสมลงในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกริยามีดังนี้

cDNA จำนวน	5 μ L
10X buffer	5 μ L
10mM dNTP	1 μ L
25 nM MgCl ₂	2 μ L
Forward-primer	0.25 μ L
Reverse-primer	0.25 μ L
DMSO	2.5 μ L
Taq polymerase	0.25 μ L

เติมน้ำกลั่นจนครบ 50 μ L

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 58 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 45 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาจนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิบัติการออกจากเครื่อง

เป็นการตรวจสอบการสกัด mRNA โดยวัดปริมาณของ beta-actin gene

ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ โดย Beta actin จะมีขนาด 658 bp

Forward-primer 5'- ACGGGTCACCCACACTGTGC-3'

Reverse-primer 5'- CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG-3'

ทำการวิเคราะห์ผลจากการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนตามขั้นตอน 3.2.6

3.4.7 การตรวจสอบการถ่ายโอนยีน

หลังจากการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์นำมาตรวจสอบการถ่ายโอนยีน 2 ระดับคือ

1. ระดับ RNA โดยตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ RAGE gene
2. ระดับโปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยอาศัย antibody ที่จำเพาะต่อ V5-epitope ของ

vector

3.4.7.1 การตรวจสอบในระดับ mRNA โดยการวัดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ RAGE

สังเคราะห์ cDNA ด้วย Reverse transcription

ใน 1 ปฏิกริยา มีส่วนผสมดังนี้

50 μ M Oligo dT primer (dT ₁₇)	0.8 μ L
ImProm-II 5X buffer	4 μ L
25 nM MgCl ₂	1.2 μ L
10 mM dNTP	1 μ L
ImProm-II Reverse transcriptase	1 μ L
DEPC-water	2 μ L
mRNA	10 μ L

นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 25 °C 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันของ RNA และ primer

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 40 °C 60 นาที ให้ Reverse transcriptase ทำหน้าที่สร้างสาย cDNA

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 65 °C 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ Reverse transcriptase

การเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยาอูทโซโพลีเมอเรส (PCR)

ใช้ Taq polymerase (Fermentas) ใส่ส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกริยามีดังนี้

cDNA	5 μ L
10X buffer	5 μ L

10mM dNTP	1 μ L
25 nM MgCl ₂	2 μ L
Forward-primer	0.25 μ L
Reverse-primer	0.25 μ L
DMSO	2.5 μ L
Taq polymerase	0.25 μ L
เติมน้ำกลั่นจนครบ	50 μ L

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 55 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาจนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิบัติการออกจากเครื่อง

ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ สำหรับ RAGE gene จะมีขนาด 332 bp

Forward-primer 5'- AGCAGTTGGAGCCTGGGTG -3'

Reverse-primer 5'- GGACTCGGTAGTTGGACTTGG -3'

การวิเคราะห์ผลจากการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนในระดับ RNA ตามขั้นตอน 3.2.6

3.4.7.2 การตรวจโปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยอาศัย antibody ที่จำเพาะต่อ V5-epitope ของ vector

นำเซลล์ที่นับได้แบ่งใส่จานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm 4 ลานเซลล์ โดยใช้ 10% FBS working DMEM (10% DMEM) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะที่ก้นภาชนะให้มีปริมาณ 50%-60% ของพื้นที่โดยประมาณจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

3.4.7.2.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2 เพื่อตรวจวิเคราะห์โปรตีน

นำเซลล์ที่ได้จากขั้นตอน 3.4.3 เทอาหารเลี้ยงเต็มทิ้ง ใส่น้ำยา 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเทน้ำยา 1X PBS ออก ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ผสมสารตั้ง ตารางที่ 2 ใส่น้ำยาหลอดทดลอง 1.5 mL

Lable TUBE	SERUM-FREE DMEM (μL)	Plasmid (μg)
1	500	0
2	499	1
3	499	1
4	499	1
Lable TUBE	SERUM-FREE DMEM (μL)	lipofectamine (μL)
1	500	0
2	499	1
3	498	2
4	497	3

ตารางที่ 2 ส่วนผสมในการโคลนยีนด้วยน้ำยา lipofectamine เพื่อใช้ในการตรวจ Western blot วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำสารผสมจากตารางที่ 2 ผสมกันเรียงตามหมายเลขหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำส่วนผสมที่ได้ 1 mL ใส่ในงานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm บ่ม 4 ชั่วโมง ที่ 37 °C 5% CO₂ เทส่วนใส่เดิมทิ้ง เติม 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ที่ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ใส่ 10% DMEM 4 mL ลงไปทุก งานเพาะเลี้ยงบ่ม 24 ชั่วโมง 37 °C 5% CO₂ เมื่อครบเวลา ดูอาหารเลี้ยงมาเก็บไว้ และนำเซลล์ไปสกัดโปรตีน โดยการตกตะกอนด้วย trichloroacetic acid (TCA) จะได้สิ่งตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ดัง ตารางที่3

Label TUBE
1.Negative cell
2. Vector 1 μg : 1 μL lipofectamine
3. Vector 1 μg : 2 μL lipofectamine
4. Vector 1 μg : 3 μL lipofectamine
5. อาหารเลี้ยงของเซลล์ที่ไม่ได้มีการถ่ายโอนยีน
6. อาหารเลี้ยงของเซลล์ที่มีการถ่ายโอนยีน

ตารางที่ 3 สิ่งตัวอย่างที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย Western blot

วิธีเตรียม SDS polyacrylamide gel electrophoresis

ประกบกระจกแล้วหนีบกับแท่นวางกระจกให้เสมอกัน ผสม separate gel 10% gel โดยใส่ ส่วนผสมดัง ตารางที่ 4

1. DW	1.6 mL
-------	--------

2. 30% acrylamide	2.0 mL
3. 1.5M Tris (pH8.8)	1.3 mL
4. 10% SDS	50 mL
5. 10% ammonium persulfate	50 mL
6. TEMED	2 mL

ตารางที่ 4 ส่วนผสมในการทำ separate gel

ผสม stacking gel โดยมีส่วนผสมดัง ตารางที่ 5

1. DW	2.1 mL
2. 30% acrylamide	500 μ L
3. 1.5M Tris (pH8.8)	380 μ L
4. 10% SDS	30 μ L
5. 10% ammonium persulfate	30 μ L
6. TEMED	3 μ L

ตารางที่ 5 ส่วนผสมในการทำ stacking gel

หยอดส่วนผสม separate gel ลงในแผ่นกระจกประกบ โดยหยอดที่ด้านใดด้านหนึ่งตลอดจนมี ปริมาตร 80 % ของกระจก ค่อยๆหยอดน้ำกลั่นลงไปให้เต็มมาถึงขอบกระจกด้านบน เพื่อไล่ฟอง ออกและทำให้น้ำเจลเรียบ รอให้เจลแข็งประมาณ 20 นาที ทำการ denature protein โดยน้ำยาแลม ลี (Laemml buffer) ควบโปรตีนใส่หลอดทดลองขนาด 500 μ L ผสม Laemml buffer กับโปรตีนใน อัตราส่วน 1 ต่อ 1 อุณหภูมิ 95 °C 5-10 นาที นำเจลที่แข็งมาเทน้ำออกเอากระดาษกรองเช็ดและซับน้ำที่ อยู่ในแผ่นกระจก เติมส่วนผสมผสม stacking gel ในส่วนที่เหลือของแผ่นกระจกประกบจนเกือบ เต็มนำแม่พิมพ์สำหรับใส่สิ่งตัวอย่างเสียบลงไประหว่างกระจก 2 แผ่น รอให้เจลแข็งตัว 20 นาที เตรียมเครื่อง run gel นำเจลที่แข็งแล้ว ดึงแม่พิมพ์ออก เช็ดส่วนเกินและส่วนน้ำออก ควบ running buffer ใส่ลงในช่องแผ่นกระจกเพื่อล้างส่วน load sample นำแผ่นกระจกไปวางในถังรันเจล (tank) ปิดตัว lock เท running buffer จนเต็มถึงรันเจล หยอด sample ลงในหลุม เดินเครื่องรันเจลที่ 70 Volts 30 นาที ให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่าน stacking gel เปลี่ยน แล้วจึงเปลี่ยนเป็น 100 Volts แล้ว เดินเครื่อง run gel 150 นาที ประกบ gel กับ membrane โดยเรียงตามลำดับดังนี้ 1. Fiber patch, 2. ฟองน้ำ, 3. กระดาษกรองเบอร์ 1, 4. gel นำส่วนประกอบทั้ง 4 ส่วน แช่ใน transfer buffer และ 5. membrane แช่ใน Methanol 100% 5 นาที เมื่อครบเวลา 120 นาทีดึงแผ่นกระจกออก ล้าง running buffer ออกด้วยน้ำกลั่น แกะกระจกและตัด gel ส่วน stacking gel ออก นำ fiber patch 1 แผ่นวางบน ด้านสีดำของแผ่นประกบ วางกระดาษกรองเบอร์ 1 ซ้อนกัน 3 แผ่น วางเจลทับลงไป วาง membrane ในตำแหน่งที่ protein อยู่ วางกระดาษกรองเบอร์ 1 ซ้อนกัน 3 แผ่นอีก 1 ชั้น วาง fiber patch แผ่น 2

ลงอีกทีและปิดแผ่นประกบเจล แช่ไว้ใน transfer buffer นำไปใส่เครื่อง run gel 150 mA ในระบบที่มีความเย็นตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง 30 นาที ถอด membrane ออกมาแช่ใน TBST buffer (Wash buffer) เติม blocking buffer 5% non fat dry milk แช่ไว้ 1 ชั่วโมง ล้างโดยจุ่ม wash buffer เททิ้ง ทำ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เจือจาง antibody ด้วย 5% BSA ใน TBS-T เทลงในกล่องพลาสติก เอา membrane จุ่มลงไปตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทั้ง primary และ secondary antibody นำ gel มาแช่สี Commassie blue นาน 1 ชั่วโมง นำถาดใหญ่ 2 ถาดใส่ น้ำเกือบครึ่งถาด ถาดเล็ก 2 ถาดใส่ น้ำ 65 mL ผสม developer buffer 15 mL อีกถาดผสม fixer buffer 15 mL เตรียม substrate โดยนำ luminal ผสม peroxide ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 วางในที่มืด เตรียมตามความกว้างของ membrane โดย membrane กว้าง 7 x 1 cm เตรียม substrate 0.7 mL ผสม 0.35 mL luminal และ 0.35 mL peroxide นำ membrane มาวางบนพลาสติกใส นำฟิล์มมาวางทับ จับเวลา 5-30 วินาที นำมาแช่ในน้ำยา developer buffer 1 นาที จุ่มในถาดใส่น้ำเพื่อล้าง นำมาแช่ในน้ำยา fixer buffer 1 นาที จุ่มในถาดใส่น้ำเพื่อล้าง เปิดไฟแล้วดูขนาด band จากฟิล์ม ตากให้แห้ง นำฟิล์มไปถ่ายรูปด้วย Gel Doc

3.5 การตรวจสอบผลจากการโคลน RAGEv1 ต่อการแสดงออกของ NF-KB และ TNF-alpha ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2

3.5.1 การนำยีนเข้าสู่ HepG2 (Transfection)

นำ plasmid ที่สกัดไว้ในขั้นตอน 3.4.1 มาใช้ผสมกับน้ำยา lipofectamine 2000 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HepG2 ตามขั้นตอน 3.4.2 และนับจำนวนเซลล์มะเร็ง HepG2 เทอาหารเลี้ยงของเก่าทิ้ง เติมน้ำยา 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเทน้ำยา 1X PBS ออก ใส่ trypsin reagent 1 mL แช่ไว้ 3 นาที ดู trypsin reagent ทิ้งไป ใส่ 10% DMEM 1 mL เซลล์ที่ติดที่ก้นหลอดออกให้มากที่สุด แล้วดูใส่หลอดทดลอง 1.5 mL เจือจางเซลล์ด้วยสี Trypan blue อัตราส่วน 1:10 (dilution factor) เขย่าให้เข้ากัน เซลล์ที่ตายแล้วสีจะซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ดูด 10 μ L ใส่ Neubauer chamber ที่มี cover slip ปิดอยู่ด้านบน นับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนเซลล์บริเวณช่องขนาด 1X1 mm 4 ช่อง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย คำนวณเป็นปริมาณเซลล์ต่อ mL โดยนำจำนวนเซลล์ที่นับได้หารปริมาตรของ Neubauer chamber (10^{-4} mm^3) คูณ dilution factor

นำเซลล์ที่นับได้แบ่งใส่จานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm 4 ล้วนเซลล์ โดยใช้ 10% FBS working DMEM (10% DMEM) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะที่ก้นภาชนะให้มีปริมาณ 50%-60% ของพื้นที่ โดยประมาณจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

3.5.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2

นำเซลล์ที่นับไว้จากขั้นตอน 3.4.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติมน้ำยา 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ผสมสารดัง ตารางที่ 6 ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL

Lable TUBE	SERUM-FREE DMEM (μL)	Plasmid (μg)
1	500	0
2	495	5 (Control Vector)
3	498	2
4	496	4
5	494	6
6	492	8
Lable TUBE	SERUM-FREE DMEM (μL)	Lipofactamine (μL)
1	500	0
2	495	5
3	498	2
4	496	4
5	494	6
6	492	8

ตารางที่ 6 ส่วนผสมในการโคลนยีนเพื่อตรวจการแสดงออกของ TNF-alpha และ NF-KB

วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำสารผสมจากตารางผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำสารผสม 1 mL ใส่ในงานเพาะเลี้ยง ขนาด 100 X 20 mm นำงานเพาะเลี้ยง ไปป่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C 4 ชั่วโมง 5% CO₂ เทสารผสมเดิมทิ้ง เติมน้ำยา 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ใส่ 10% DMEM 4 mL ลงไปทุกงาน นำงานเพาะเลี้ยง ไปป่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C 4 ชั่วโมง

สกัด mRNA โดยชุดสกัด Quick prep micro mRNA isolation kit ตามขั้นตอน 3.3.5

3.5.3 การสังเคราะห์ cDNA ด้วย Reverse transcription

ใช้ชุดน้ำยา ImProm-II Reverse transcriptase (Promega) นำหลอดทดลองขนาด 0.2 mL ที่ผ่านการทำลาย DNase มาเติมส่วนผสมต่อ 1 ปฏิกริยา ดังนี้

50 μM Oligo dT primer(dT ₁₇)	0.8 μL
ImProm-II 5X buffer	4 μL

25 nM MgCl ₂	1.2 μL
10 mM dNTP	1 μL
ImProm-II Reverse transcriptase	1 μL
DEPC-water	2 μL

นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 25 °C 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันของ RNA และ primer

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 40 °C 65 นาที ให้ Reverse transcriptase ทำหน้าที่สร้างสาย cDNA

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 65 °C 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ Reverse transcriptase

3.5.4 การเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยาอูทโกซโพลีเมอเรส (PCR)

ใช้ Proof reading polymerase และ Taq polymerase (Fermentas) ใส่ส่วนผสมในหลอดทดลอง 0.2 mL โดย 1 ปฏิกิริยามีดังนี้

cDNA	5 μL
10X buffer	5 μL
10 mM dNTP	1 μL
25 nM MgCl ₂	2 μL
Forward-primer	0.25 μL
Reverse-primer	0.25 μL
DMSO	2.5 μL
Taq polymerase	0.25 μL
Proof reading polymerase	0.125 μL

เติมน้ำกลั่นจนครบ 50 μL

ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 55 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 15 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาจนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่อง

ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ สำหรับ ยีน NF-KB

Forward-primer 5'- CAGTGAGAAGGGCCGAAAGAC -3'

Reverse-primer 5'- CAGGGGCAGGGAGAAGGAG -3'

ได้ PCR Product ขนาด NF-KB 2 421 bp

สำหรับ TNF-alpha นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ติดตั้ง 6 ขั้นตอน

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 60 °C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที 30 วินาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C 15 นาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาจนกว่าจะมาถึงหลอดปฏิบัติการออกจากเครื่อง

ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ สำหรับ ยีน TNF-alpha

Forward-primer 5'- GGCTCCAGGCGGTGCTTGTT -3'

Reverse-primer 5'- GGCTTGTCACCTCGGGGTTTCG -3'

ได้ PCR Product ขนาด 188 bp

การตรวจวัดการแสดงออกของ TNF-alpha, RAGE และ NF-KB จะทำการตรวจการ
แสดงออกของ house keeping gene คือ β -actin ด้วยเพื่อนำมาหารเป็นสัดส่วนในขั้นตอนวิเคราะห์
ผลข้อ 3.2.6

3.6 การทดสอบ MTT assay

MTT assay เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity สิ่งที่มีชีวิตจะมีวัฏจักรเครป (Krebs cycle) ซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน โดยมีขั้นตอนหนึ่งที่เปลี่ยน succinate ไปเป็น fumarate โดยอาศัย succinic dehydrogenase (SDH) แสดงถึงการมี mitochondrial function ในเซลล์ ผลจาก metabolism นี้ทำให้เกิด $FADH_2$ ซึ่งสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็นตะกอน formazan ซึ่งมีสีม่วงและตกตะกอนใน mitochondria เมื่อละลายด้วยสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ความเข้มข้นของสีจะแปรผันตรงกับ mitochondrial activity หรือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

วิธีการทดลอง

เลี้ยงเซลล์จำนวน 400,000 เซลล์/well ใน six well plate นำจานเพาะเลี้ยงไปป่มในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C 4 ชั่วโมง เติม 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเทน้ำยา 1X PBS ที่ทิ้งซ้ำอีก 1 ครั้ง ผสมสารดัง ตารางที่ 7

หลอดทดลอง ขนาด 1.5 mL	SERUM-FREE DMEM (μL)	Lipofectamine 2000 (μL)
1	500	0
2	500	5
3	500	2
4	500	4
5	500	6
6	500	8
หลอดทดลอง ขนาด 1.5 mL	SERUM-FREE DMEM (μL)	RAGEv1-pcDNA3.1 (μL)
1	500	0
2	500	5 (RAGEv1 ที่กลับหัว)
3	500	2
4	500	4
5	500	6
6	500	8

ตารางที่ 7 ส่วนผสมในการโคลนยีนเพื่อการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นตก นำสารผสมจากตารางมาผสมกันตามหมายเลขหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ใส่ลงใน six well plate ที่ 2 นำ six well plate ทั้งสอง อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง 5% CO₂ เติม 1X PBS 1 mL เขย่าเบาๆ แล้วเท น้ำยา 1X PBS ที่ทิ้งซ้ำอีก 1 ครั้ง เติม 10% DMEM อุณหภูมิ 5% CO₂ 37 °C 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติม MTT reagent 100 μL อุณหภูมิ 5% CO₂ 37 °C 4 ชั่วโมง ดูดส่วนน้ำทิ้งเหลือตะกอนไว้ เติม DMSO 2 mL เขย่าให้เข้ากันจนตะกอนสีละลายดี ดูดทั้งหมดมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL 2 หลอดๆละ 1 mL ปั่นที่ 5,000 g 5 นาที ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nM

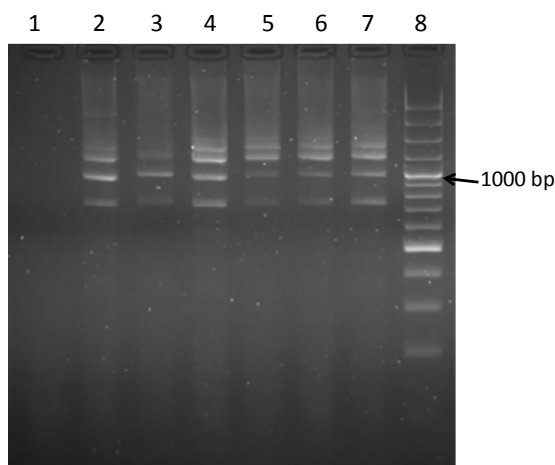
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

4.1 การเพิ่มจำนวน RAGE variant จาก HeLa cell line

RNA ที่สกัดจาก HeLa cell แล้วถูกเปลี่ยนเป็น cDNA และเพิ่มจำนวน RAGE gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers จำเพาะจะสามารถจับ RAGE และเพิ่มจำนวน RAGE ทุกรูปแบบที่มีใน HeLa cell ผลจากการเพิ่มจำนวนยีน RAGE เมื่อนำไปแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงไว้ในรูปที่ 11



รูปที่ 11 ผลจากการเพิ่มจำนวน

RAGE จาก HeLa cell line

No.1 Negative control

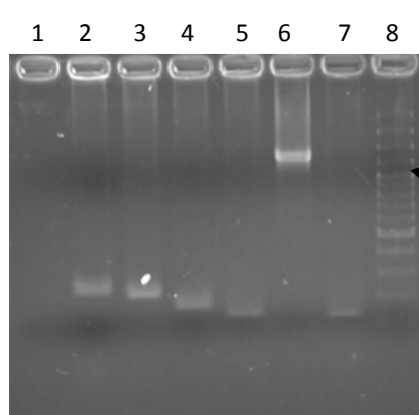
No.2-7 RAGE variant

No.8 100 bp DNA ladder

จากผลที่ได้ พบแถบ DNA ของยีน RAGE หลาย variants ใน HeLa cell line ซึ่งจะต้องนำไปโคลนเพื่อแยกหา RAGEv1 จาก RAGE รูปแบบอื่นๆ

4.2 การตรวจสอบ electroporation ด้วยวิธี colony PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อ pGEM

หลังจากเพิ่มจำนวนได้แล้วก็นำ PCR product ที่เหลือจากการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสนำมาตกตะกอน DNA (DNA precipitation) ตามขั้นตอน 3.2.7 เพื่อกำจัดส่วนของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR ให้เหลือเพียงส่วนของ DNA RAGE เท่านั้น จากนั้นทำการเชื่อมต่อกับตัวนำ pGEM vector และนำเข้าสู่ competent cell ด้วยวิธี electroporation ตรวจสอบผลการโคลนด้วย วิธี Colony PCR ผลจากการตรวจสอบแสดงไว้ในรูปที่ 12

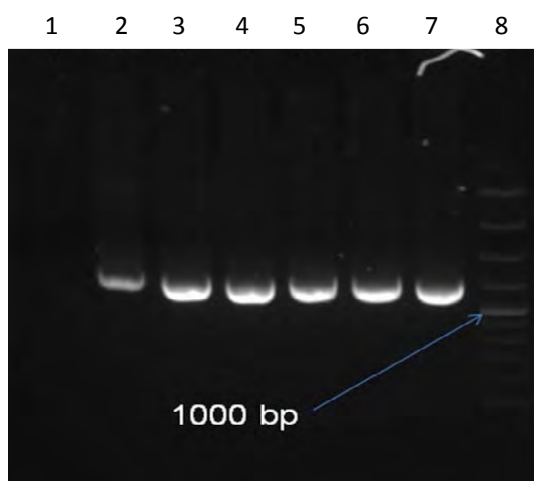


รูปที่ 12 ผลจากการใช้วิธี Colony PCR ตรวจสอบการโคลน โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ pGEM

No.1	Negative control
No.2-5	ไม่สามารถระบุได้
No.6	คาดว่าจะเป็น RAGE
No.7	ไม่สามารถระบุได้
No.8	100 bp DNA ladder

พบ DNA band จากโคลนในช่องหมายเลขที่ 6 ซึ่งคาดว่าจะเป็น variant ของยีน RAGE รูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง เนื่องจากมีขนาดประมาณ 1250 bp นำโคลนที่คาดว่าจะเป็น RAGE variant นั้นมาทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี colony PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน RAGE นำไปวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสได้ผลดังแสดงในรูปที่ 13

4.3 การตรวจสอบโคลนที่เรียด้วยวิธี Colony PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีน RAGE



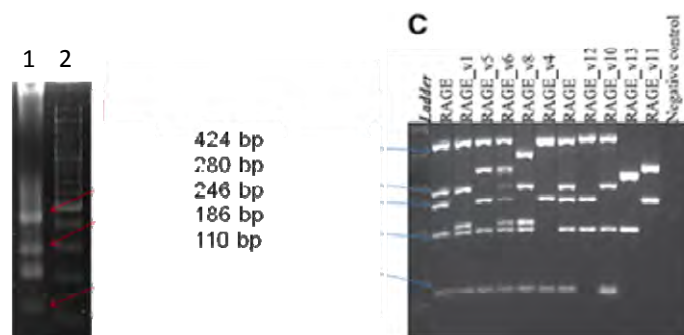
รูปที่ 13 ผลการตรวจการทำ colony PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อ RAGE

No.1	Negative control
No.2-7	PCR Product RAGE
No.8	100 bp ladder

พบ DNA band จากโคลนมีขนาดประมาณ 1250 bp ใกล้เคียงกับ RAGEv1

นำโคลนดังกล่าวมาสกัด plasmid แล้วนำ plasmid ที่ได้ไปผสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *PstI* วิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14

4.4 ผลการตรวจสอบโคลนในโคลนนิ่งแบคทีเรียที่เรียดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *PstI*



รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบ RAGEv1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำขนาด band เทียบกับรูปด้านขวาของ Hudson et al., 2007

No.1 RAGE gene ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

No.2 100 bp ladder

ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น RAGE variant ใดต้องนำไปส่งตรวจลำดับเบส DNA (DNA sequencing) ผลการตรวจลำดับเบส DNA ได้แสดงไว้ในข้อ 4.5

4.5 ผลการตรวจลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีน RAGE ที่เชื่อมต่อกับ pGEM

vector

Forward primer GAAGGAAGCAGGATGGCA

GCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTA
 GGTGCTCAAACATCACAGCCCGATTGGCGAGCCACTGGTGCTGAAGTGTAAGGG
 GGCCCCAAGAAACCACCCAGCGGCTGGAATGGAACTGAACACAGGCCGGACAG
 AAGCTTGAAGGTCCTGTCTCCCCAGGGAGGAGGCCCTGGGACAGTGTGGCTCGTG
 TCCTTCCAACGGCTCCCTCTTCCCTTCCGGCTGTCCGGGATCCAGGATGAGGGGATTTT
 CCGGTGCCAGGCAATGAACAGGAATGGAAAGGAGACCAAGTCCAACACTACCGAGTCC
 GTGTCTACCCTTATTGGGAACACCAGCCGTGAGTTCAGAGGCAGAATCTACAATTTC
 TGGCTTCCAGGAATCTCCTTCTCATTAGGCACCAGGGGCTTCCCATCCAAGTGCCAG
 CTAAGAGTCCCTGCAGGGTAGCTTCCCTCTGACACACATGTCCCCACCCAGACACG
 GGGCTGGATGGGGGCTGTGCGCAAGGCCCGGTGTCGGGGAAGGCCTGGGCTGAAGC
 TACAGGAGAAGGTGGGACGGGGATCTCCTCCCCGGGCTGGGGTCACCATTAGCTCCG
 ACTGCAGTGTGAAGAGCCCTGTCTCAGGGTGTCTCCTGGTCTGTTCCCTCACAGATAC
 TCATCCTTCATCCAGTGGATTTGAGGAGAGGGCTGGGCAGGGACTTCACAGGTCAGG
 GTTACGGTTCACCAGGAGCTACTGCTCCACCTTCTGGCTCCACCACCAATTGGACCT

CCTCCAGAGGCACAGGCTCGATGATGCTGATGCTGACAGCACGGCTTTCCTGGGGCC
 CGTGGCTGGAATGGGTGGCCACACAGCTGTAGGTTCCCTGGTCCTGAGGCCCTATCT
 CAGGGAGGATCAGCACAGGGCTGGGGGGAAGGGGCAAGGGCACACCCATTCCTTTC
 TTGTTGACCATCCCCCAGTCACATGTGTTGGGGGCTATCTTCTGCTTCCCTGACTTTA
 TCAAACCCCTCACCTGCAGTTGGCCCTCCTCGCCTGGTTCCTCAAGGCCCTCCAG
 TACTACTCTCGCCTGCCTCAGGTTCCCTCCGACTGATTTCAGTTCTGCACGCTCCTCCTCT
 TCCTCCTGGTTTTCTGGGGCCTTC

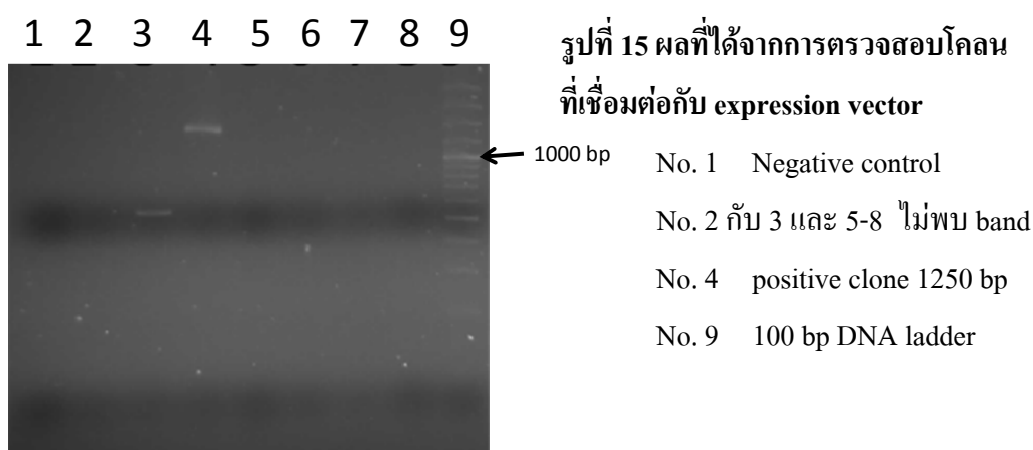
GATGGGATCTGTCTGTGGG Reverse primer

ลำดับเบสของ RAGE gene ที่ได้เหมือนกับ RAGEv1 100 % เมื่อเปรียบเทียบกับ exon บน DNA ของยีน RAGE ในคน (NM_001136)

4.6 การโคลน RAGEv1 ด้วย expression vector

เมื่อได้โคลนนิ่งแบคทีเรียที่มี RAGEv1 ที่เชื่อมต่อกับ pGEM vector แล้ว นำโคลนนิ่งนั้น มาทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียชนิดเหลว แล้วนำมาสกัด plasmid ทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปตกตะกอนและเชื่อมต่อกับ expression vector ตัวนำ pcDNA3.1 V5-His แล้ว ทำการบ่มที่ 42 องศาเซลเซียสเพื่อให้ยีนและตัวนำเข้าไปอยู่ในแบคทีเรีย แล้วนำโคลนนิ่งใหม่ที่ได้มาตรวจสอบการโคลนด้วยวิธี colony PCR ผลแสดงดังรูปที่ 15

4.6.1 การตรวจสอบโคลนในโคลนนิ่งแบคทีเรีย (Colony PCR)



พบว่า No. 4 มี band ในขนาด 1250 bp ที่อาจจะเป็น RAGEv1 ที่ต้องการ จึงนำโคลนนิ่งนี้มาสกัด plasmid แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RV ผลแสดงไว้ดังรูปที่ 16

4.6.2 ผลการตรวจสอบโคลนในโคลนนี้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RV



รูปที่ 16 ผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RV

No.1 Negative control

No.2 คาดว่าจะเป็น RAGE variant 1

No.3 100 bp DNA ladder

มีแถบ DNA ขนาดใกล้เคียง 1000 bp คาดว่าจะเป็น RAGEv1 จะต้องนำส่ง sequencing เพื่อตรวจลำดับเบสเป็นการตัดสินใจว่าเป็น RAGEv1 หรือไม่ ผลการตรวจลำดับเบส DNA (DNA sequencing) แสดงไว้ในข้อ 4.9

4.6.3 ผลการตรวจลำดับเบส DNA (DNA sequencing)

Forward primer AGAGAATTCGAAGAAGCAGGATG

GCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTA
GTAGGTGCTCAAACATCACAGCCCGGATTGGCGAGCCACTGGTGCTGAAGTGTAAG
GGGGCCCCAAGAAACCACCCAGCGGCTGGAATGGAAACTGAACACAGGCCGGAC
AGAAGCTTGGAAGTCCCGTCTCCCCAGGGAGGAGGCCCTGGGACAGTGTGGCTCG
TGTCCCTTCCCAACGGCTCCCTCTTCCCTCCGGCTGTCGGGATCCAGGATGAGGGGATT
TTCCGGTGCCAGGCAATGAACAGGAATGGAAAGGAGACCAAGTCCAACACTACCGAGT
CCGTGTCTACCAGATTCTGGGAAGCCAGAAATTGTAGATTCTGCCTCTGAACTCAC
GGCTGGTGTTCCTAATAAGGTGGGGACATGTGTGTCAGAGGGAAGCTGCCCTGCAGG
GACTCTTAGCTGGCACTTGGATGGGAAGCCCCTGGTGCCTAATGAGAAGGGAGTATC
TGTGAAGGAACAGACCAGGAGACACCCTGAGACAGGGCTCTTCACACTGCAGTCGG
AGCTAATGGTGACCCAGCCCGGGGAGGAGATCCCCGTCCCACCTTCTCCTGTAGCT
TCAGCCCAGGCCTTCCCCGACACCGGGCCTTGCACACAGCCCCATCCAGCCCCGTG
TCTGGG

Reverse primer

AGGTCTAGAGCAAGGCCCTCCAGTACTACTCTCGCCTGCCTCAGGTTCCCTCCGACT
GATTCAGTTCTGCACGTCCTCCTCTTCCCTCCTGGTTTTTCTGGGGCCTTCCATTCCTTT
CTTGTTGACCATCCCCCAGTCACATGTGTTGGGGGCTATCTTCTGCTTCCCTGACTTT
ATCAAACCCCTCACCTGCAGTTGGCCCCCTCCTCGCCTGGTTCGATGATGCTGATGCTG
ACAGCACGGCTTTCCTGGGGCCCCTGGCTGGAATGGGTGGCCACACAGCTGTAGGTT

CCCTGGTCCTGAGGCCCTATCTCAGGGAGGATCAGCACAGGGCTGGGGGGAAGGGG
 CAAGGGCACACCATCCTTCATCCAGTGGATTTGAGGAGAGGGCTGGGCAGGGACTTC
 ACAGGTCAGGGTTACGGTTCCACCAGGAGCTACTGCTCCACCTTCTGGCTCCACCAC
 CAATTGGACCTCCTCCAGAGGCACAGGCT

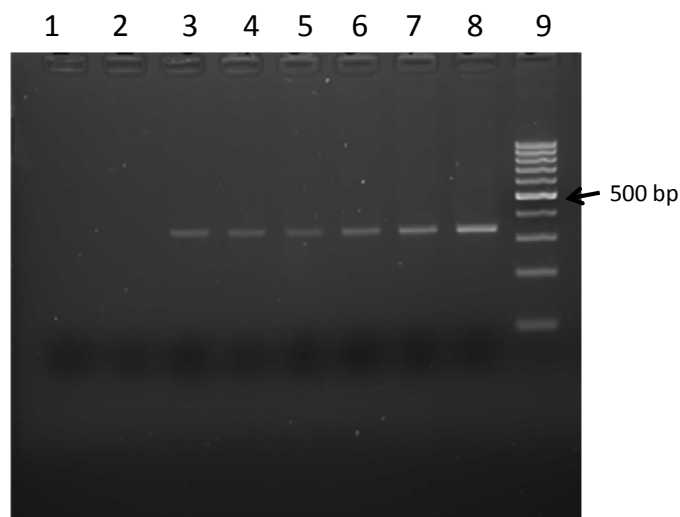
ลำดับเบสที่ได้จากการทำ sequencing แสดงว่าเป็น RAGEv1 สรุปว่าสามารถเชื่อมต่อกับ RAGEv1 กับ expression vector ได้และจะนำโคลนนี้ไปเลี้ยงต่อแล้วทำการสกัด plasmid และเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

4.7 การพิสูจน์การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2

เมื่อทำการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 โดยใช้รีเอเจนต์ lipofactamine หลังจากบ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมงแล้วนำมาตรวจพิสูจน์การถ่ายโอนยีนโดยนำมาสกัด mRNA ด้วยชุดสกัด Quick prep micro mRNA isolation ในขั้นตอน 3.4.5 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน RAGE ผลที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 17

4.7.1 การตรวจปริมาณการแสดงออกของยีน RAGE

ทำการทดลอง 3 ครั้งในการตรวจปริมาณการแสดงออกของยีน RAGE ได้ผลดังในรูป



No.1 Negative control PCR

No.2 Negative control RT

No.3 Non-transfected cell

No.4 Transfected control vector

No.5 Transfected Vector 2 μg

No.6 Transfected Vector 4 μg

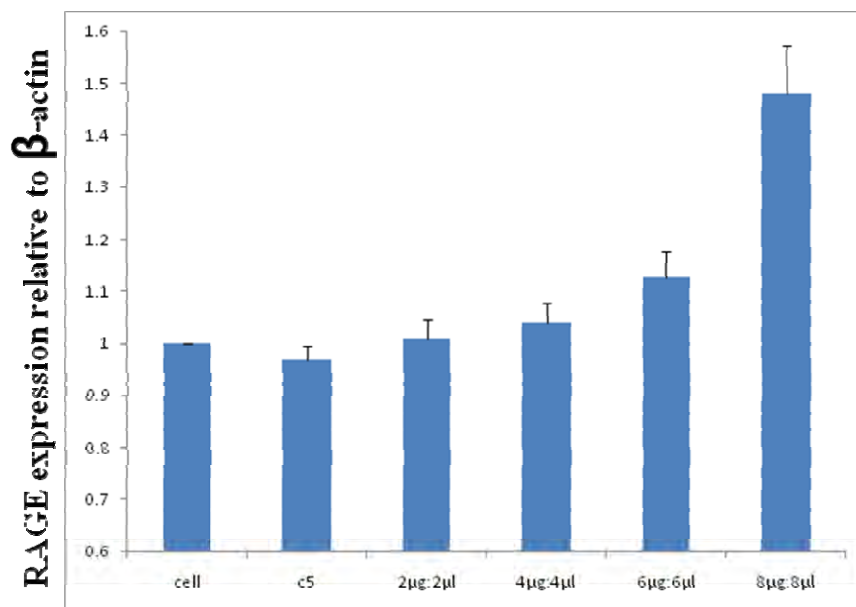
No.7 Transfected Vector 6 μg

No.8 Transfected Vector 8 μg

No.9 100 bp DNA ladder

รูปที่ 17 ผลของการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 ต่อการแสดงออกของยีน RAGE

นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetool ของ Syngene ซึ่งจะเปลี่ยนความเข้มของ band เป็นตัวเลข นำตัวเลขที่ได้สร้างเป็นกราฟแสดงไว้ในรูป 18

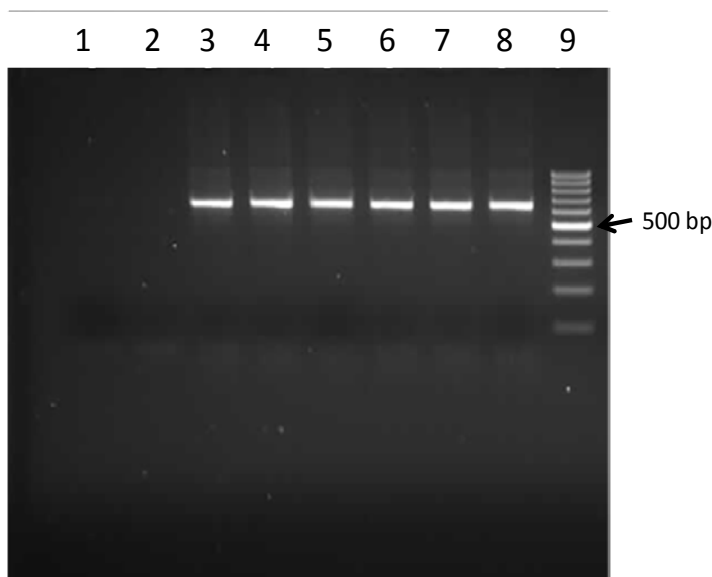


รูปที่ 18 ค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกของยีน RAGE ลำดับตามความเข้มข้นในการถ่ายโอนยีน RAGEv1

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย One way ANOVA พบว่าการแสดงออกของ RAGE ในกลุ่มที่มีการถ่ายโอนยีน RAGEv1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม transfected control vector ในระดับความเข้มข้น RAGEv1 ที่ 8 μ g

4.7.2 การตรวจปริมาณการแสดงออกของยีน β -actin

ทำการทดลอง 3 ครั้งในการตรวจปริมาณการแสดงออกของยีน β -actin เพื่อตรวจสอบการสกัด RNA และใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน RAGE, ยีน NF- KB_2 และ ยีน TNF- α ผลจากการวิเคราะห์ด้วยอเล็กโตรโฟริซิสแสดงในรูปที่ 19



No.1 Negative control PCR

No.2 Negative control RT

No.3 Non-transfected cell

No.4 Transfected control vector

No.5 Transfected Vector 2 μg

No.6 Transfected Vector 4 μg

No.7 Transfected Vector 6 μg

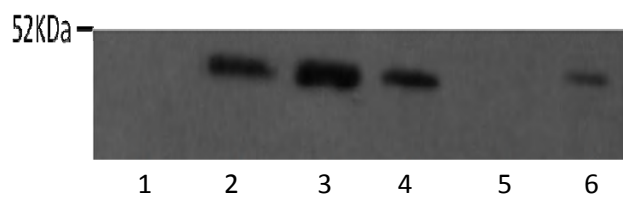
No.8 Transfected Vector 8 μg

No.9 100 bp DNA ladder

รูปที่ 19 ผลการตรวจการแสดงออกของยีน β -actin

เมื่อทำการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 โดยใช้ยาน้ำ lipofactamine ด้วยอัตราส่วน RAGEv1 1 μg ต่อ lipofactamine 1, 2, และ 3 μL หลังจากบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมงแล้ว นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายโอนยีน และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ผ่านการถ่ายโอนยีน มาสกัดโปรตีน แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ผลที่ได้แสดงไว้ในรูป 20

4.7.3 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนด้วย Western blot



No.1 Negative cell

No.2 RAGEv1:lipofectamine 1:1 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

No.3 RAGEv1:lipofectamine 1:2 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

No.4 RAGEv1:lipofectamine 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

No.5 อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ถ่ายโอนยีน

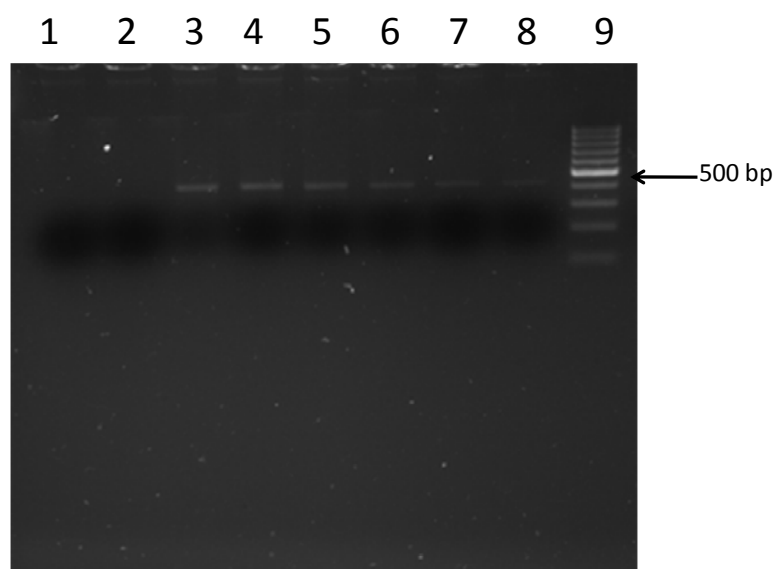
No.6 อาหารเลี้ยงที่ถ่ายโอนยีน

รูปที่ 20 ผลการตรวจโปรตีน RAGEv1 ด้วยวิธี Western blot

พบ band ขนาดประมาณ 48 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดโปรตีนของ RAGEv1

4.8 การตรวจการแสดงออกของยีน NF- κ B₂

เมื่อทำการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 โดยใช้ยา lipofactamine ด้วยอัตราส่วน RAGEv1: lipofactamine 2:2, 4:4, 6:6, และ 8:8 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมงแล้วนำมาสกัด mRNA ด้วยชุดสกัด Quick prep micro mRNA isolation ในขั้นตอน 3.4.5 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน NF- κ B ผลที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 21 โดยทำการทดลอง 3 ครั้งในการตรวจปริมาณการแสดงออกของยีน NF- κ B₂



รูปที่ 21 ผลของการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 ต่อการแสดงออกของ NF- κ B₂

No.1 Negative control PCR

No.2 Negative control RT

No.3 Non-transfected cell

No.4 Transfected control vector (C5)

No.5 Transfected Vector 2 μg

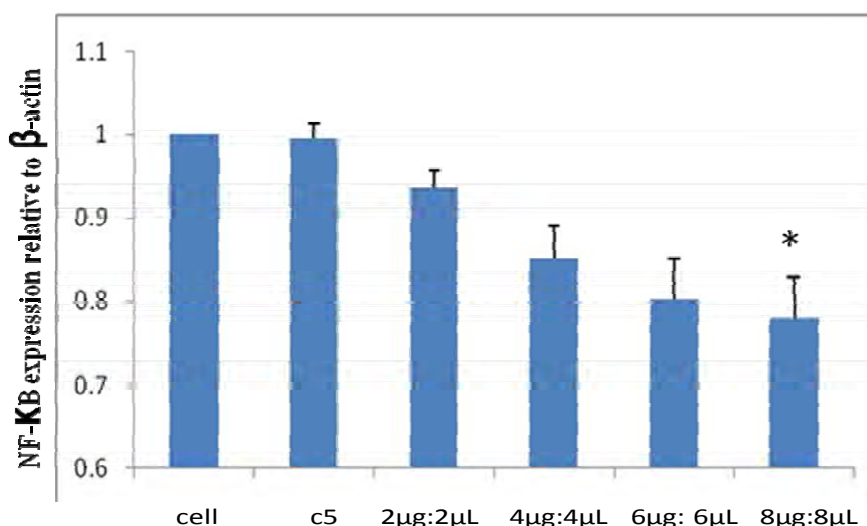
No.6 Transfected Vector 4 μg

No.7 Transfected Vector 6 μg

No.8 Transfected Vector 8 μg

No.9 100 bp DNA ladder

นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetool ของ Syngene ซึ่งจะเปลี่ยนความเข้มของ band เป็นตัวเลข นำตัวเลขที่ได้สร้างเป็นกราฟแสดงไว้ในรูปที่ 22

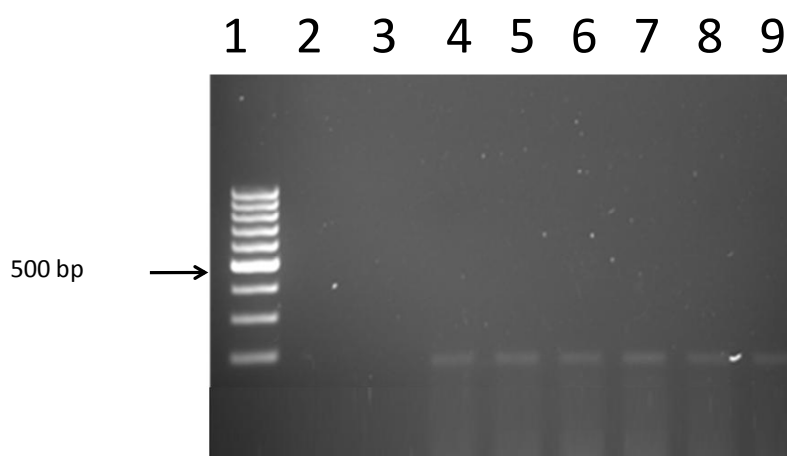


รูปที่ 22 ค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกของยีน NF-KB₂ ลำดับตามความเข้มข้นในการถ่ายโอนยีน RAGEv1

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย One way ANOVA พบว่าการแสดงออกของ NF-KB₂ ในกลุ่มที่มีการถ่ายโอนยีน RAGEv1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม transfected control vector ในระดับความเข้มข้น RAGEv1 ที่ 8 μ g

4.9 ผลการตรวจการแสดงออกของยีน TNF- α

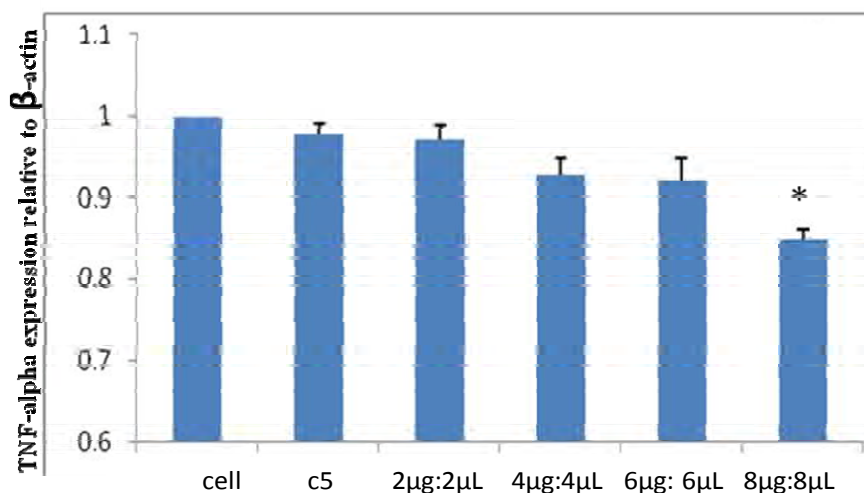
เมื่อทำการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 โดยใช้ยาน้ำ lipofactamine ด้วยอัตราส่วน RAGEv1: lipofactamine 2:2, 4:4, 6:6, และ 8:8 (μ g/ μ L) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมงแล้ว นำมาสกัด mRNA ด้วยชุดสกัด Quick prep micro mRNA isolation ในขั้นตอน 3.4.5 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน TNF- α ผลที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 23 โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 23 ผลของการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 ต่อการแสดงออกของ TNF- α

- No.1 100 bp DNA ladder
 No.2 Negative control PCR
 No.3 Negative control RT
 No.4 Non-transfected cell
 No.5 Transfected control vector
 No.6 Transfected Vector 2 μg
 No.7 Transfected Vector 4 μg
 No.8 Transfected Vector 6 μg
 No.9 Transfected Vector 8 μg

นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetool ของ Syngene ซึ่งจะเปลี่ยนความเข้มของ band เป็นตัวเลข นำตัวเลขที่ได้สร้างเป็นกราฟแสดงไว้ในรูปที่ 24



รูปที่ 24 ค่าเฉลี่ยของปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α ลำดับตามความเข้มข้นในการถ่ายโอนยีน RAGEv1

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย One way ANOVA พบว่าการแสดงออกของ TNF- α ในกลุ่มที่มีการถ่ายโอนยีน RAGEv1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม transfected control vector ในระดับความเข้มข้นที่ 8 μg

4.10 ผลการวัด % cell viability

เมื่อทำการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ HepG2 โดยใช้ยา lipofactamine ด้วยอัตราส่วน RAGEv1: lipofactamine 2:2, 4:4, 6:6, และ 8:8 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง เติมน้ำ DMSO 1 mL บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง นำส่วนน้ำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ผลการทดลองเฉลี่ย 3 ครั้งได้ค่า % viability ดังแสดงในตารางที่ 8

	Cell viability (%)	SD
1.Negative	100	0
2.Control Vector 5 μg	74.15	7.72

3. Vector 2 μg	95.75	2.23
4. Vector 4 μg	87.23	5.41
5. Vector 6 μg	70.90	7.37
6. Vector 8 μg	66.57	10.40

ตารางที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อมีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ HepG2 โดยใช้ตัวนำความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การแยก RAGEv1 ออกจาก RAGE variant อื่นอาศัย pGEM T easy vector เป็นตัวนำเข้าสู่ *E.coli* DH5 alpha ตั้งอยู่ในสมมติฐานที่ว่า 1 โคโลนี จะรับ plasmid เข้าไป 1 แบบ หรือคือ 1 variant ของยีน RAGE ในการศึกษาสามารถแยก RAGEv1 ออกมาได้ และสามารถเชื่อมต่อกับ RAGEv1 เข้ากับ expression vector ได้

การตรวจพิสูจน์การถ่ายโอนยีน ยืนยันได้ว่าสามารถ ถ่ายโอนยีน (transfection) เข้าสู่ HepG2 โดยอาศัย 2 วิธี คือ 1.ตรวจวัดการแสดงออกระดับ RNA โดยการตรวจการแสดงออกของยีน RAGE ที่เพิ่มขึ้น 2.ตรวจวัดระดับการแสดงออกระดับโปรตีน โดยอาศัย antibody จำเพาะต่อ V5 epitope ซึ่งเป็นโปรตีนที่ติดอยู่ที่ปลายตัวนำ ทั้งสองวิธียืนยันตรงกันว่าสามารถถ่ายโอนยีนเข้าสู่ HepG2 ได้สำเร็จ

การวัดผลของ RAGEv1 ต่อการแสดงออกของ TNF- α และ NF- KB_2 โดยเพิ่มระดับ RAGEv1 ให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 4 ลำดับ พบว่าเมื่อโคลนยีน RAGEv1 ในปริมาณ 2, 4, และ 6 μg ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 8 μg พบการแสดงออกของทั้งยีน NF- KB_2 และ TNF- α ของเซลล์ HepG2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม transfected control vector ($p < 0.05$)

ผลจาก MTT assay เมื่อถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าสู่ เซลล์ HepG2 พบว่าเซลล์ HepG2 มีการตายมากขึ้นเป็นลำดับเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งอาจเป็นผลจากน้ำยา lipofectamine 2000 ที่เพิ่มขึ้น หรืออาจจะเกิดจากการยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเอง

อภิปรายผลการวิจัย

RAGE variant 1 (RAGEv1) หรือ endogenous secretory RAGE (esRAGE) เป็นรูปแบบหนึ่งของยีน RAGE ที่เกิดกระบวนการ alternative splicing และเป็นรูปแบบที่แสดงออกมากที่สุดรองจาก full length RAGE การแยกและการบ่งชี้ยีน RAGEv1 อาศัยผลยืนยันจากการสังเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งมีความแม่นยำสูง การตรวจสอบหน้าที่การทำงานของโปรตีน RAGEv1 ที่ถ่ายโอนเข้าไบนั้นไม่สามารถทำได้โดยตรง เนื่องจากบริเวณ Ig-V domain ของ RAGE protein เป็นตัวจับกับ ligand ซึ่งเป็นส่วนแสดงหน้าที่ ต้องใช้ antibody จำเพาะต่อบริเวณ Ig-

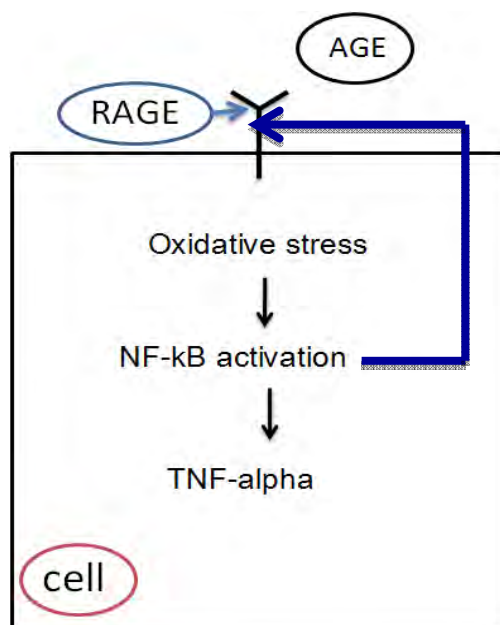
V domain ซึ่งเซลล์โดยทั่วไปสามารถแสดงออก RAGE ได้อยู่แล้ว จึงไม่สามารถแยกการแสดงออกของ RAGEv1 ที่ถ่ายโอนเข้าไปกับ RAGE ที่แสดงออกอยู่แล้วโดยปกติของเซลล์ออกจากกันได้ การโคลนยีนจึงต้องออกแบบ primer ให้เกิด mutation เพื่อลบ stop codon ของยีนออกแล้วเชื่อมต่อกับตัวนำ (vector) ซึ่งมีโครงสร้างลำดับเบสที่สามารถสร้างโปรตีนที่ต่อเพิ่มจากโปรตีน RAGEv1 ของเดิม แล้วตรวจสอบโดยใช้ antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ติดฉลากไว้ โดย vector pcDNA3.1/V5-His ที่ใช้มี V-5 epitope เชื่อมต่อมาด้วย ในการศึกษานี้จึงตรวจการสร้างโปรตีนผ่าน V-5 epitope ของโปรตีนนี้ โปรตีน V-5 epitope ที่ต่อเพิ่มเข้าไปนั้นอาจจะมีผลต่อรูปแบบการพับตัวและการทำงานของโปรตีน RAGEv1 ที่นำมาทำการทดลองได้

มีการศึกษารายงานว่า NF- κ B เกี่ยวข้องกับ RAGE โดยตรง (รูปที่ 22) promoter ของยีน RAGE นั้นยังมี binding site ของ NF- κ B อยู่ถึง 2 ตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่านอกจาก RAGE จะเป็นตัวเพิ่มการแสดงออกของ NF- κ B แล้ว NF- κ B ก็ยังเพิ่มการแสดงออกของ RAGE ด้วย (Rojasa and Morales, 2004) นอกจากนี้ ยังมีการแสดงออกของ RAGE มากขึ้นเท่าไร มะเร็งนั้นยังมีความสามารถในการรุกรานสูงมากขึ้นเท่านั้น (Hirata et al., 2003) จากการศึกษาที่เป็นที่ยืนยันได้ว่าการยับยั้ง RAGE อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษามะเร็ง

NF- κ B เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนมากกว่า 200 ยีน ยีนที่ NF- κ B ควบคุมนั้นเกี่ยวข้องกับการลดลงของการเกิด apoptosis, การเหนี่ยวนำให้เกิด cellular transformation, invasion metastasis, chemo-resistance, radio-resistance หากยีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นจะก่อให้เกิดการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งที่มีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นการแสดงออกของ cyclin D1, apoptosis suppressor protein เช่น Bcl-2 Bcl-XL ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด metastasis และ angiogenesis (Aggarwal and Shishodia, 2006)

จากผลการทดลองด้วยวิธี Quantitative RAGE mRNA expression ในเซลล์ที่ไม่ได้เป็น HCC กับเซลล์ที่เป็น HCC พบว่า เซลล์ที่เป็น HCC มี RAGE expression สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้เป็น HCC ($p < 0.01$) และ เมื่อวัดระดับ RAGE expression ของกลุ่มการทดลองสามกลุ่ม 1.เซลล์ตับปกติ 2.เซลล์ตับที่เป็น non-cancerous lesion (CH – cirrhosis) 3.เซลล์ตับที่เป็น HCC เปรียบเทียบกัน พบว่ากลุ่มเซลล์ที่เป็น HCC มี RAGE expression สูงขึ้นในระดับมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับอีก 2 กลุ่มที่เหลือ (Hiwatashi et al., 2007) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเกิดมะเร็งตับนั้นมีความเกี่ยวเนื่องกับการแสดงออกของ RAGE มีการทดลองในเซลล์มะเร็งสมองหนู (C6 glioma cells) โดยการวัดการแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์ที่มีการถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าไป พบว่าการแสดงออกของ TNF- α ลดลงกว่าเซลล์ที่ไม่มีการถ่ายโอนยีน RAGEv1 (Klea et al., 2010)

เมื่อมี ligand เช่น AGE มาจับ RAGE จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress (Yan, S. D. et al., 1994) แล้วเพิ่มการแสดงออกของ NF-KB ซึ่ง NF-KB นั้นเป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน interleukin-1 alpha, interleukin-6 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Neumann, A. et al., 1999) หากเราสามารถยับยั้งการจับกันของ ligand กับ RAGE โดยอาศัย RAGEv1 ในการแย่งจับกับ ligand ก็จะสามารถลดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ยังผลให้มีการลดการแสดงออกของ NF-KB และ TNF- α



รูปที่ 25 กลไกการส่งสัญญาณของ RAGE กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ NF-KB และ TNF- α (ดัดแปลงจาก Ahmed, 2005)

การตรวจพิสูจน์การถ่ายโอนยีนทำด้วยวิธีการสองวิธี คือ 1.ระดับ RNA 2.ระดับโปรตีน ทั้งสองวิธีเป็นการตรวจยืนยันกัน การตรวจในระดับ RNA นั้นเป็นการวัดปริมาณการแสดงออกของ RAGE ที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้ตรวจการเพิ่มขึ้นของ RAGEv1 โดยตรง ส่วนการตรวจสอบในระดับโปรตีนอาศัย antibody จำเพาะต่อส่วน V5 epitope เป็นส่วนต่อท้ายจากยีน RAGEv1 เป็นองค์ประกอบหนึ่งในตัวนำที่เราใช้จึงไม่เป็นการยืนยันว่ามีการทำงานของโปรตีน RAGEv1 เกิดขึ้นจริง บอกเพียงแต่ว่ามีโครงสร้างโปรตีนขึ้นตามลำดับเบสที่ได้ทำการโคลนไว้ก่อนหน้า ในการตรวจทั้งสองวิธีไม่ได้ทำการตรวจการทำงานของโปรตีน RAGE โดยตรง (protein function)

ผลจากการโคลนยีน RAGEv1 ต่อการแสดงออกของยีน NF-KB ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นั้น อาจจะมีบางส่วนเกิดจากการตายเพิ่มขึ้นของเซลล์จากความเป็นพิษของชุดน้ำยา lipofectamine 2000

การตรวจวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตของเซลล์ พบว่ามีการตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของชุดน้ำยา lipofectamine 2000 ที่เพิ่มขึ้น จึงอาจเป็นผลจากความเป็นพิษของน้ำยาเอง หรืออาจจะเกิดการยับยั้งกระบวนการ apoptosis เนื่องจากเมื่อมี RAGEv1 สูงขึ้นก็เป็นผลให้เกิดการกระตุ้น NF-KB น้อยลงแล้วทำให้ apoptosis suppressor protein เช่น Bcl-2 Bcl-XL ลดจำนวนลง สำหรับผลจากการโคลนยีน RAGEv1 ต่อการแสดงออกของยีน TNF- α การลดลงของการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ก็เช่นเดียวกัน หากต้องการตรวจสอบผลกระทบจากการนำโคลนยีน RAGEv1 เข้าสู่เซลล์ ต่อการแสดงออกของยีน NF-KB กับ TNF- α ให้ชัดเจนขึ้น อาจทำได้โดยการตรวจวัดการแสดงออกของยีนทั้งสองโดยเพิ่มเวลาให้ RAGEv1 ได้แสดงออกนานขึ้นมากกว่า 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มเวลาให้เกิดการแสดงออกของ RAGEv1 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งมากขึ้น

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน NF-KB กับ TNF- α ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 4 ลำดับ พบว่าเมื่อโคลนยีน RAGEv1 ความเข้มข้นระดับ 8 μg มีการลดลงของการแสดงออกของยีน NF-KB กับ TNF- α ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เราไม่สามารถเพิ่มระดับความเข้มข้นไปได้มากกว่านี้เพราะผลจากชุดน้ำยา lipofectamine 2000 นั้นทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงตายเพิ่มขึ้นเกินกว่าครึ่งหนึ่งของชุดทดลองเปรียบเทียบ การเพิ่มความเข้มข้นของ RAGEv1 ให้มากกว่า 8 μg เป็นที่น่าสนใจหากทำได้ในระบบการทดลองอื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงกับคน เพราะจะเป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่จะนำไปสู่การศึกษาหาระดับความเข้มข้นของโปรตีน RAGEv1 ในระดับที่สามารถเกิดการยับยั้งหรือลดการเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งได้และยังเป็นแก่นสำคัญในการวิจัยยาในการรักษา มะเร็งต่อไป เนื่องจากโปรตีน RAGEv1 เป็นโมเลกุลหนึ่งที่มีอยู่แล้วในเลือดมนุษย์และมีการศึกษาว่าระดับ soluble RAGE ในกระแสเลือดมีความสัมพันธ์กับระดับการเกิดพยาธิสภาพในหลายโรค เช่น หลอดเลือดหัวใจ (Falcone, C. et al., 2005) เบาหวาน (Katakami, N. et al., 2005) ความดันโลหิตสูง (Geroldi, D. et al., 2005) โรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) (Emanuele, E. et al., 2005) นอกจากนี้คาดว่าผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่เป็น โมเลกุล RAGEv1 อาจจะมีน้อยมากหรือไม่มีเลย

ข้อเสนอแนะ

การแยก RAGEv1 ออกจาก RAGE variant อื่นอาศัย pGEM T easy vector เป็นตัวนำเข้าสู่ *E.coli* DH5 alpha ตั้งอยู่ในสมมติฐานที่ว่า 1 โคลนี จะรับ plasmid เข้าไป 1 แบบ หรือคือ 1 variant ของยีน RAGE การโคลนยีน RAGEv1 อาศัยผลยืนยันจากการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งอาจจะไม่ถูกต้องสมบูรณ์ และอาจจะมีผลต่อการสร้างโปรตีนที่ผิดแบบไปจากธรรมชาติ นอกจากนี้การโคลนยีนยังมีการออกแบบ primer เพื่อลบ stop codon ของยีนแล้วเชื่อมต่อกับตัวนำ (vector) ซึ่งมีโครงสร้างลำดับเบสที่สามารถสร้างโปรตีนที่ต่อเพิ่มจากโปรตีน

RAGEv1 เดิมซึ่งอาจจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีน RAGEv1 ที่นำมาทดลอง จึงควรวางวิธีอื่นที่ทำให้การสร้างโปรตีนที่ไม่ผิดปกติไปจากธรรมชาติ

การตรวจพิสูจน์การถ่ายโอนยีนทำด้วยวิธีการสองวิธี คือ 1.ระดับ RNA 2.ระดับโปรตีนทั้งสองเป็นการตรวจยืนยันกัน การตรวจในระดับ RNA นั้นเป็นการวัดปริมาณการแสดงออกของ RAGE ที่เพิ่มขึ้นจึงไม่ได้ตรวจการเพิ่มขึ้นของ RAGEv1 โดยตรง การตรวจสอบในระดับโปรตีนอาศัย antibody จำเพาะต่อส่วน V5 epitope เป็นส่วนต่อท้ายจากยีน RAGEv1 เป็นองค์ประกอบหนึ่งในตัวนำที่เราใช้จึงไม่เป็นการยืนยันว่ามีการทำงานของโปรตีน RAGEv1 เกิดขึ้นจริง บอกเพียงแต่ว่าการสร้างโปรตีนขึ้นตามลำดับเบสที่ได้ทำการโคลนไว้ก่อนหน้าเท่านั้น ในการตรวจทั้งสองวิธีไม่ได้ทำการตรวจการทำงานของโปรตีน (protein function) ควรวางวิธีอื่นที่สามารถตรวจการทำงานของ RAGEv1 ที่ได้ถ่ายโอนเข้าไปในเซลล์

งานวิจัยนี้อาจจะประยุกต์ใช้กับเซลล์มะเร็งเฉพาะเล็ยชนิดอื่นๆได้เพื่อเป็นการตรวจการแสดงที่ผิดปกติไปเมื่อได้ถ่ายโอนยีน RAGEv1 เข้าไปในเซลล์มะเร็งชนิดนั้นแล้ว ทั้งยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับ NF- κ B ได้อีกหลายยีน เช่น IL-6, VCAM-1, IL-1 โมเลกุลของ RAGEv1 นั้นเป็นที่น่าสนใจยิ่งในการนำไปพัฒนารักษา มะเร็งเนื่องจาก RAGEv1 เป็นโปรตีนที่พบได้ในระบบไหลเวียนโลหิตของคน ผลข้างเคียงจากการใช้โมเลกุลนี้เป็นยาน่าจะมีน้อยหรืออาจจะไม่มีเลย

รายการอ้างอิง (References)

- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappa B: the enemy within. *Cancer Cell* 6; 203-8.
- Aggarwal, B. B., and Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* 71; 1397-1421.
- Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts- role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67; 3-21.
- Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kB- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 336; 1066-1071.
- Bierhaus, A., Chen, J., Liliensiek, B., and Nawroth, P.P. (2000). LPS and cytokine activated endothelium. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 26; 571-588.
- Blum, A., Khazim, K., Merei, M., Peleg, A., Blum, N., and Vaispapir, V. (2006). The Stroke Trial- can we predict clinical outcome of patients with ischemic stroke by measuring soluble cell adhesion molecules. *Eur. Cytokine Netw.* 17; 295-298.
- Brett, J., et al. (1993). Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissue . *Am.J.Pathol.* 143; 1699-1712.
- Chavakis, T., et al. (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counter receptor for leukocyte integrin: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J.Exp.Med.* 198; 1507-1515.
- Cheng, C., et al. (2005). Expression profiling of esRAGE in human organs. *Mod. Pathol.* 18; 1385-1396.

- Cortizo, A.M., et al. (2003). Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). *Mol.Cell.Biochem.* 250; 1-10.
- Dorai, T., and Aggarwal, B.B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer letters* 215; 129-140.
- Du yan, S., et al. (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Natl.Acad.Sci.USA* 94; 5296-5301.
- Emanuele, E., et al. (2005) Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch. Neurol.* 62; 1734–1736
- Falcone, C., et al. (2005). Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25; 1032–1037
- Gebhardt, C., et al. (2007). RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J. Exp. Med.* 205; 275 – 285.
- Geroldi, D., et al. (2005). Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.* 23; 1725–1729
- Huttunen H.J, Fages C, and Rauvala H. (1999). Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF- κ B Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 274; 19919–19924.

- Hirata, K., Takada, M., Suzuki, Y., and Kuroda, Y. (2003). Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human biliary cancer cells. *Hepatogastroenterology* 50; 1205-1207.
- Hiwatashi, K., et al. (2008). A Novel Function of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) in Association with Tumorigenesis and Tumor Differentiation of HCC. *Ann Surg Oncol* 15(3); 923–933.
- Hofmann, M., et al. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: the cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptide. *Cell* 97, 889-901.
- Hori, O., et al. (1995). RAGE is a cellular binding site for amphotrin : mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphoterin in the developing nervous system. *J.Biol. Chem* 270; 25752-61.
- Huang, J.S., et al. (2001). Role of receptor for advanced glycation end product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J.Cell.Biochem.* 81; 102-113.
- Humpert, P., Djuric, Z., Kopf, S., Rudofsky, G., Morcos, M., Nawroth, P., and Bierhaus, A. (2007). sRAGE but not esRAGE is associated with albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 6; 9–13.
- Huttunen, H.J., and Rauvala, H. (2004). Amphoterin as an extracellular regulatory of cell motility; from discovery to disease. *Journal of Internal Medicine* 255; 351-366.
- Katakami, N., et al. (2005). Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients: its possible association with diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 28; 2716–2721
- Kalea, A. Z., et al. (2010). Alternatively spliced RAGEv1 inhibits tumorigenesis through suppression of JNK signaling. *Cancer Res* 70; 5628-5638.

- Koch, A., Halloran, M., Haskell, C., Shah, M., and Polverini, P. (1995). Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 376; 517–519.
- Kuniyasu, H., Chihara, Y., and Kondo, H. (2003). Differential effects between amphoterin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Int J Cancer* 104; 722–727.
- Kuniyasu, H., Chihara, Y., and Takahashi, T. (2003). Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 10; 445–448.
- Lander, H.M., et al. (1997). Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21 (ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidative stress. *J.Biol.Chem.* 272; 17810-17814.
- Li, J., and Schmidt, A.M. (1997). Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end product. *Journal of biological Chemistry* 272; 215-223
- Neumann, A., Schinzel, R., Palm, D., Riederer, P. and Munch, G. (1999). High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Lett* 453; 283-287.
- Olson, J., Whitelaw, C., McHardy, K., Pearson, D., and Forrester, J. (1997). Soluble leucocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy stimulate retinal capillary endothelial cell migration. *Diabetologia* 40; 1166–1171.
- Park, I., et al. (2004). Expression of a novel secreted splice variant of RAGE in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol. Immunol.* 40; 1203–1211.

- Rojasa, A., and Morales, M.A. (2004). Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci.* 76; 715-30.
- Shanmugam, N., Kim, Y.S., Lanting, L., and Natarajan R. (2003). Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression in monocyte by ligation of the Receptor for advanced glycation end product. *Journal of biological Chemistry* 278; 34834-34844.
- Shimizu, M., and Weinstein, I.B. (2005). Modulation of signal transduction by tea catechin and related Phytochemicals. *Mutation Research* 591; 147-160.
- Soric, G., Riuzzi, F., Agneletti, A.L., Marchetti, C., and Donato, R. (2004). S100B causes apoptosis in a myoblast cell line in RAGE-independent manner. *J.Cell.Physiol.* 199; 274-283.
- Sterenczak, K. A., et al. (2009). Cloning, characterisation, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (RAGE) transcript forms. *Gene* 434; 35-42.
- Taguchi, A., et al., (2000). Blockade of amphoterin/RAGE signaling suppresses tumor growth and metastases. *Nature* 405; 354-360.
- Takada, M., Ku Y., Tiyama, H., Susuki, Y., and Kuroda, Y. (2001). Differential expression of RAGE in human pancreatic carcinoma cells. *Hepatogastroenterology* 48; 1577-1578
- Yan, S. D., et al. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269; 9889-97.
- Yeh, C.H., et al. (2001). Requirement for p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcription activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50; 1495-1504.

Yonekura, H., et al., (2003). Novel splice variants of RAGE expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem. J.* 370; 1097–1109.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การเตรียม *E. coli* Competence cell

1. นำ stock *E. coli* DH5 alpha จาก -80 องศาเซลเซียส มา streak บน plate LB agar (ต้องการ isolated colony) บ่ม 37 องศาเซลเซียส 16-24 ชั่วโมง
2. เลือก 1 isolated colony โดยใช้ปลายทริป จิ้ม แล้วใส่ลงในหลอดทดลอง 15 mL ที่มี LB broth 5mL บ่ม 37 องศาเซลเซียส 16-24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะขุ่น
3. นำที่เลี้ยงไว้ในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 5 mL เทลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มี LB broth 370 mL (1:75) บ่ม 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 ชั่วโมง (หรือวัดการดูดกลืนแสง 590 นาโนเมตร ทุกๆ 30 นาทีจนกว่าจะมีค่าการดูดกลืนแสง = 0.375 แต่ไม่เกิน 0.6 เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ในช่วง early log phase
4. นำมาเทใส่หลอดทดลองขนาด 50 mL จำนวน 40 mL บ่ม 4,000 g 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนใสออก
5. เติมน้ำเย็นลงไป 5 – 10 mL แล้วเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำเย็นลงไปจนเป็น 40 mL บ่ม 4,000 g 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนใสออก (ทำซ้ำ 3 รอบ)
6. นำ 10% glycerol ในน้ำใส่ลงไป 5 – 10 mL แล้วเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำ 10% glycerol จนครบ 40 mL บ่ม 4,000 g 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนใส
7. คุบแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 mL 50 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ที่อยู่ในความเย็น (dry ice แช่ใน 100% alcohol) หากเซลล์เข้มข้นเกินไปก็ให้ใส่ 10% glycerol ลงไป 1 mL เพื่อให้เจือจางก่อนได้

2. การเตรียม 10% DMEM (50mL)

DMEM	45	mL
Fetal Bovine Serum	5	mL

ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง 50 mL เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม 100 bp DNA ladder

0.5ug/ul ladder	50	ไมโครกรัม
Bromphenol Blue	500	ไมโครลิตร
DW	100	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง 1.5 mL เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม 2.0 agarose gel (100 mL)

ชั่งผง agarose 2 กรัมจากนั้นใส่ 0.5X TBE จนมีปริมาตรเป็น 100 mL ผสมให้เข้ากัน นำเข้า microwave จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงแม่พิมพ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยการแช่ 0.5X TBE ไว้

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ข้าพเจ้า นาย ชีรพงษ์ เลิศวิทยาพนธ์ เกิดวันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ณ ร.พ.กรุงเทพคริสเตียน สำเร็จการศึกษาอนุบาล ร.ร.อนุบาลแสงอรุณพระนคร ประถมและมัธยม ร.ร.กรุงเทพคริสเตียนวิทยาลัย ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย