



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เทคโนโลยีแทรกแซงอาร์เอ็นเอยับยั้งการทำงานของ
เอนไซม์แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส 3 (MMP-3) ในเซลล์กระดูกอ่อน

**Suppression of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)
using RNA interference in chondrocyte**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ และคณะ

มิถุนายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้เทคโนโลยีแทรกแซงอาร์เอ็นเอยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แมทริกซ์
เมทัลโลโปรทีเนส 3 (MMP-3) ในเซลล์กระดูกอ่อน

ผู้วิจัย

1. ผศ. นสพ. ดร. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์
2. ผศ.ดร. สิริวดี ชมเดช
3. รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

สังกัด

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	1
สารบัญภาพ	2
สารบัญตาราง	3
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	6
บทที่ 2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
บทที่ 3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 4 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย	15
บทที่ 5 ผลการศึกษา	29
บทที่ 6 สรุปและวิจารณ์ผล	36
บทที่ 7 เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	46

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดกระบวนการแทรกแซงอาร์เอ็นเอภายในเซลล์	14
รูปที่ 5.1 แสดงการเรืองแสงของ siRNA -3 เมื่อมองภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า ด้วยความยาวคลื่นแสง 330-385 นาโนเมตร	30
รูปที่ 5.2 เซลล์ที่ย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue เพื่อตรวจสอบการตายของเซลล์	31
รูปที่ 5.3 เซลล์กระดูกอ่อนย้อมสีเซลล์ด้วยสี Hoechst dyes No.33342 เพื่อ ตรวจสอบการตายแบบ apoptosis	32
รูปที่ 5.4 เซลล์กระดูกอ่อนย้อมสีเซลล์ด้วยสี aceto-orcein เพื่อตรวจสอบการแบ่ง เซลล์	32
รูปที่ 5.5 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ร้อยละการตาย และร้อยละการแบ่งเซลล์ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง	33
รูปที่ 5.6 การสร้างสาร hyalururonan และสาร glycosaminoglycan ในแต่ละ กลุ่มการทดลอง	34
รูปที่ 5.7 การแสดงออกของยีน MMP-3 , TIMP-3 , HAS-1 , HAS-2 , AGG และ COL2A1 ในกลุ่มต่างๆ	35

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ	11
ตารางที่ 4.1 สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	27
ตารางที่ 4.2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ในกระบวนการ real-time PCR	27
ตารางที่ 4.3 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	28
ตารางที่ 5.1 ผลการกระตุ้นเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนด้วยสาร IL-1 β	29

บทคัดย่อ

แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-3 (MMP-3) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเซลล์เนื้อเยื่อผูกพัน โดยพบว่าเอนไซม์นี้จะไปสลายโครงสร้างโปรตีโอกลัยแคนที่อยู่ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยพบระดับเอนไซม์นี้สูงในกระดูกอ่อนผิวข้อภาวะข้อเสื่อม ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาผลการกวดการทำงานของยีน MMP-3 แบ่งเซลล์เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มควบคุม (G.1) กลุ่มได้รับ transfection solution (G.2) กลุ่มได้รับ siRNA ที่ไม่จำเพาะต่อยีนของ ยูแคริโอต (G.3) และกลุ่มที่ได้รับ MMP-3 siRNA (G.4) โดยทั้ง 4 กลุ่มทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ชุดที่ได้รับสารอินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้า (IL-1 β) และชุดที่ไม่ได้รับสาร โดยทำการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ การสร้างสารโปรตีโอกลัยแคน และการแสดงออกของยีน ผลจากการศึกษาพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองในเซลล์ที่ได้รับ IL-1 β โดยพบการตายของเซลล์กลุ่ม G.4 ต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ อัตราการมีชีวิตและอัตราการแบ่งเซลล์สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนการผลิตโปรตีโอกลัยแคนของกลุ่ม G.4 สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระดับการแสดงออกของยีน MMP-3 ในกลุ่ม G.4 ลดลงถึงร้อยละ 80 ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า siRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้

คำสำคัญ siRNA แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-3 โรคข้อเสื่อม เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน

Abstract

Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) synthesized and secreted from connective tissue cells have been thought to participate in degradation of the extracellular matrix. Increased MMP-3 activities that degrade proteoglycans have been measured in osteoarthritis cartilage. This study aims to suppress the expression of the MMP-3 gene in in vitro human chondrosarcoma using siRNA. Cells were categorized into four groups: control (G.1); transfection solution treated (G.2); negative control siRNA treated (G.3); and MMP-3 siRNA treated (G.4). All four groups were further subdivided into two groups – treated and non-treated with IL-1 β – following culture for 48 and 72 h. We observed the effects of gene suppression according to cell morphology, glycosaminoglycan (GAG) and hyaluronan (HA) production, and gene expression by using real-time polymerase chain reaction (PCR). In IL-1 β treated cells the apoptosis rate in G.4 was found to be lower than in all other groups, while viability and mitotic rate were higher than in all other groups ($p < 0.05$). The production of GAG and HA in G.4 was significantly higher than the control group ($p < 0.05$). MMP-3 gene expression was downregulated significantly ($p < 0.05$). MMP-3 specific siRNA can inhibit the expression of MMP-3 in chondrosarcoma. This suggests that MMP-3 siRNA has the potential to be a useful preventive and therapeutic agent for osteoarthritis.

Keywords: siRNA, matrix metalloproteinase-3, osteoarthritis, chondrosarcoma

บทที่ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคข้อเสื่อม เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุดของปัญหาข้อ สามารถเกิดทั้งในคนและสัตว์ที่สูงอายุ อุบัติการณ์ของโรค ขึ้นอยู่กับหลักเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรค ในผู้ป่วยที่เป็นมนุษย์พบว่า ถ้าการวินิจฉัยโรคอ้างอิงจากการเปลี่ยนแปลงทางภาพถ่ายทางรังสีโดยไม่คำนึงถึงอาการของข้อ จะพบอุบัติการณ์ของโรคข้อเสื่อมในผู้ที่มีอายุมากกว่า 60 ปี ถึงร้อยละ 70 ซึ่งจะสูงกว่าการวินิจฉัยโรคที่คำนึงว่าต้องมีอาการร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของภาพถ่ายทางรังสีด้วย ในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 60 ปี พบได้ทั้งร้อยละ 50 โดยมีองค์ประกอบที่มีผลต่อการพบโรคข้อเสื่อมคือ

- อายุ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของการเกิดโรค โดยพบอุบัติการณ์ของโรคข้อเสื่อมเพิ่มขึ้นตามอายุ สามารถเริ่มพบโรคข้อเสื่อมได้ตั้งแต่อายุ 20 ปี เป็นต้นไป คนที่มีอายุเกิน 60 ปีขึ้นไปจะพบโรคนี้ตามอาการทางคลินิก ประมาณร้อยละ 50
- เพศ พบอุบัติการณ์ใกล้เคียงกันทั้งเพศหญิงและชาย แต่ถ้าเปรียบเทียบอายุ ในอายุที่ต่ำกว่า 45 ปี เพศชายจะพบได้มากกว่าในเพศหญิง ในช่วงอายุ 45-54 ปี ทั้งสองเพศจะพบในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ในช่วงอายุมากกว่า 54 ปีขึ้นไปจะพบได้ในเพศหญิงสูงกว่าเพศชาย อาจเป็นผลเนื่องจากวัยทองทำให้การสึกกร่อนของกระดูกอ่อนผิวข้อมีมากกว่าในช่วงวัยหมดประจำเดือน
- พันธุกรรม ประเพณี อาชีพ ในแต่ละประเทศพบอุบัติการณ์ข้อเสื่อมในแต่ละข้อไม่เท่ากัน เป็นผลจากพันธุกรรม ขนบธรรมเนียม และอาชีพ ในประเทศไทยพบโรคข้อเสื่อมของข้อเข่ามาก ในขณะที่ประเทศทางด้านซีกตะวันตกจะพบโรคข้อเสื่อมของข้อสะโพกมาก หากพิจารณาตามอาชีพ จะพบว่าอาชีพทำนา ก็จะเป็นโรคข้อเสื่อมของข้อกระดูกสันหลังบั้นเอวมาก ในแม่ม้านักจะเป็นโรคข้อเสื่อมของข้อนิ้วมือ ในอาชีพแม่ค้าที่ต้องเดินมากก็จะพบโรคข้อเสื่อมของข้อเข่ามาก เป็นต้น

สำหรับในสุนัขก็พบว่า โรคข้อเสื่อมก็เป็นโรคเกี่ยวกับข้อที่สำคัญมากโรคหนึ่งในสุนัขพบว่าร้อยละ 20 ของประชากรสุนัขที่มีอายุมากกว่า 1 ปี จะป่วยด้วยโรคนี้ จนถึงปัจจุบันสาเหตุการเกิดโรคข้อเสื่อมนี้ยังไม่เป็นที่กระจ่าง แต่เชื่อว่าเกิดจากการที่มีปัจจัยต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอายุ สายพันธุ์และพันธุกรรม ฮอร์โมนในร่างกาย อาหาร ความอ้วน การเปลี่ยนแปลงทางกลศาสตร์ของข้อ การได้รับบาดเจ็บ หรือสารเคมี การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วนมีผลทำให้สมดุลของข้อ (homeostasis of joint) เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งโดยปกติแล้วสมดุลของกระบวนการสร้าง (anabolism) และกระบวนการทำลาย (catabolism) ของสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในข้อจะต้องสมดุลกัน แต่พบว่าเมื่อปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นเข้ามารบกวนสมดุลนี้จะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น คือ มีการสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายโครงสร้างทางชีวเคมีต่างๆ ในเนื้อกระดูกอ่อน เช่น คอลลาเจน (collagen) หรือโปรติโอไกลแคน (proteoglycan) เพิ่มมากขึ้น เมื่อ

โครงสร้างเหล่านี้โดนทำลายในปริมาณหนึ่ง เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ก็จะมีกระบวนการสร้างสารชีวเคมีเหล่านี้ขึ้นมาทดแทน หากกระบวนการสร้างสามารถผลิตสารต่างๆ ขึ้นมาทดแทนได้เพียงพอ กระดูกอ่อนผิวข้อก็才不会เกิดความเสียหาย แต่กรณีที่มีกระบวนการสร้างสารที่เป็นโครงสร้างของเนื้อกระดูกมีไม่เพียงพอ โดยเกิดกระบวนการทำลายมากกว่ากระบวนการสร้าง จะส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้อเกิดการเสื่อมสลายและพัฒนาต่อไปเป็นโรคข้อเสื่อม เนื่องจากไม่เฉพาะโครงสร้างทางชีวเคมีเท่านั้นที่ถูกทำลายแต่เซลล์กระดูกอ่อนเองก็โดนทำลายด้วยเช่นกัน

จะเห็นได้ว่าโรคข้อเสื่อมเป็นโรคเกี่ยวกับข้อที่สำคัญโรคหนึ่งทั้งในมนุษย์และสัตว์ แม้ว่าโรคนี้ไม่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต แต่ความทุกข์ทรมาน ที่เกิดจากโรคนี้มีมหาศาล เช่น ความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นทั้งในระหว่างที่มีการเคลื่อนไหว และไม่มี การเคลื่อนไหวของข้อ ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนไหวร่างกายได้อย่างปกติ รวมทั้งต้องสูญเสียเงินจำนวนมากในการรักษา ซึ่งการรักษาที่ได้ในปัจจุบันก็เป็นเพียงการยับยั้งความรุนแรงของโรคเท่านั้นปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้มีความพยายามหาวิธีการรักษาโรคข้อเสื่อมโดยมีเป้าหมายคือ รักษาโรคให้หายขาด ซึ่งการพัฒนาเทคนิคการรักษา เริ่มตั้งแต่ การใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ (nonsteroidal antiinflammation drugs) การใช้สมุนไพร และการใช้ยาปกป้องกระดูกอ่อน (chondroprotective drugs) เป็นต้น แม้ว่าสารหรือยาเหล่านี้จะให้ผลการรักษาดี แต่ก็ยังไม่สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ จนมาถึงปัจจุบันพบว่าเทคนิคการรักษาโรคทางยีน (gene therapy) เป็นการรักษาโรคที่ในอดีตไม่สามารถรักษาให้หายขาด ให้หายได้ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงนำเสนอการศึกษาเพื่อพัฒนารักษาโรคข้อเสื่อมทางยีน โดยการประยุกต์เอาเทคนิคใหม่ทางอณูชีววิทยาที่มีชื่อว่า กระบวนการแทรกแซงอาร์เอ็นเอ (RNA interference) มายับยั้งการทำงานของยีนที่มีหน้าที่สร้างเอนไซม์แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส 3 (matrix metalloproteinase 3; MMP-3) ที่เป็นสาเหตุหลักของกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อในภาวะโรคข้อเสื่อม โดยการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีนดังกล่าวในเซลล์กระดูกอ่อน เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่สำคัญสำหรับการพัฒนาไปใช้จริงในร่างกายสัตว์ ซึ่งถือเป็นเป้าหมายสูงสุดของคณะผู้วิจัย

บทที่ 2

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีน MMP-3 เมื่อใช้เทคนิคแทรกแซงอาร์เอ็นเอ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของอาร์เอ็นเอนำรหัส
2. เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีน MMP-3 เมื่อใช้เทคนิคแทรกแซงอาร์เอ็นเอ ที่มีต่อการสร้างสารกลัยโคซามิโนกลัยแคนของเซลล์มะเร็งกระดูก
3. เพื่อศึกษาผลของ siRNA ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์มะเร็งกระดูก
4. เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับใช้พัฒนาเทคโนโลยีแทรกแซงอาร์เอ็นเอสำหรับการรักษาโรคข้อเสื่อมในมนุษย์และสัตว์

บทที่ 3

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การค้นพบเทคนิคในการรักษาโรคด้วยยีน หรือที่เรียกว่ายีนบำบัด นั้นนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมหาศาล เนื่องจากมีโรคจำนวนมากที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติจากการทำงานของยีน ซึ่งไม่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาทั่วไป แต่พบว่าการไปเหนี่ยวนำให้ยีนทำงานเพิ่มขึ้น หรือลดลง (ส่งผลให้ยีนเพิ่ม หรือลดการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค) เกิดเป็นผลดีกับการรักษา ทำให้โรคหายเร็วขึ้นหรือลดความรุนแรงของโรคลงได้ แม้ว่าในปัจจุบันจะมีความเข้าใจต่อพยาธิกำเนิดของโรคข้อเสื่อมเพิ่มมากขึ้น แต่โรคข้อเสื้อมก็ยังคงเป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ มีการนำสารชีวภาพต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับยับยั้งกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ หรือกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูกมาใช้ในการรักษาโรค แต่ทว่าผลการศึกษาเหล่านี้ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จในการรักษาทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการในการนำสารเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายในทางคลินิกยังทำได้ยาก ตัวอย่างเช่น การใช้ยาในรูปฉีดหรือรับประทานจำเป็นต้องใช้ยาในขนาดสูงมาก และต้องให้บ่อยครั้งเพื่อเป็นการรักษาให้ระดับยาอยู่ในร่างกายได้นาน ซึ่งการใช้ยาในขนาดสูงนี้อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ หรือการบริหารยาด้วยวิธีรับประทานก็ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของยาเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในทางเดินอาหารก่อนที่จะสามารถไปถึงตำแหน่งที่เกิดโรคได้ ปัจจุบันมีการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาที่มุ่งเน้นวิธีการปลูกถ่ายยีนที่สามารถสร้างสารไซโตไคน์ (cytokine) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine inhibitors) เข้าไปภายในเซลล์กระดูกอ่อน หรือเซลล์เยื่อข้อต่อ (synovocyte) ทำให้เซลล์เหล่านี้สามารถสร้างสารไซโตไคน์เหล่านี้ออกมาได้เอง การพัฒนาวิธีการปลูกถ่ายยีนนี้ นอกเหนือจากจะมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการรักษาโรคแล้วยังสามารถใช้ในการศึกษาถึงกระบวนการทำงานของยีนต่างๆ (gene function) ได้อีกด้วย ปัจจุบันการศึกษาเทคนิคการปลูกถ่ายยีนเพื่อใช้ในการรักษาโรคข้อเสื้อมีความก้าวหน้าอย่างมาก การศึกษามีทั้งที่ทำในเซลล์เพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) [1-3] และการศึกษาในสัตว์ (*in vivo*) เช่น หนู [4-6] กระต่าย [7, 8] สุนัข [9-11] และม้า [12, 13]

ค่อนข้างเป็นที่แน่ชัดแล้วว่า สารที่มีบทบาทเด่นชัดในการเริ่มต้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในข้อและทำให้ข้อพัฒนาต่อไปเป็นโรคข้อเสื่อม คือ อินเตอร์ลิวคิน 1 (interleukin 1) [14, 15] โดยพบว่า อินเตอร์ลิวคิน 1 มีบทบาทต่อกระบวนการเสื่อมสลาย (degradation) ของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า อินเตอร์ลิวคิน 1 และไซโตไคน์อื่นๆ มีผลกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนผลิตเอนไซม์แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส (matrix metalloproteinases) และเอนไซม์อื่นเพิ่มขึ้น [16, 17] มีผลให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อเพิ่มขึ้นอีก

การศึกษาในระยะแรกพบว่า เซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์เยื่อข้อในข้อที่เป็นโรคข้อเสื่อมจะมีการสร้างสารที่เรียกว่า IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) ลดลง [1] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาต่อมาของ Caron และคณะ (1996) ที่พบว่าเมื่อยีน IL-1Ra ของเซลล์กระดูกอ่อนทำงานเพิ่มขึ้นจะสามารถลดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ และชะลอการพัฒนาของโรคข้อเสื่อม [9] รวมทั้งในการศึกษาของ Pelletier และคณะ (1997) ที่ใช้ retrovirus เป็นตัวนำยีน IL-1Ra เข้าสู่เซลล์เยื่อข้อในสัตว์ทดลองและมนุษย์พบว่า เซลล์เยื่อข้อสามารถสร้าง IL-1Ra ได้ในปริมาณมากและนานขึ้น รวมทั้งจะสามารถช่วยชะลอกระบวนการดำเนินของโรคข้อเสื่อมได้เช่นกัน [10] ในปี 2002 ได้มีการศึกษาผลของการปลูกถ่ายยีน IL-1Ra ให้แก่ม้าที่เป็นโรคข้อเสื่อม โดย Frisbie และคณะ พบว่าอาการเจ็บปวดของม้าอันเนื่องมาจากการเสื่อมของข้อลดลง ม้ามมีอาการทางคลินิกที่ดีขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่า ลักษณะทางพยาธิกายวิภาค (gross pathology) และพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อ (pathohistology) ของกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยีนจะมีความรุนแรงน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาหลอก [12] นอกเหนือจากการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งหรือลดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 1 โดยตรงแล้ว ยังมีการศึกษาเพื่อทำการปลูกถ่ายยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของสารไซโตไคน์ชนิดอื่น ที่มีคุณสมบัติไปยับยั้งการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน 1 ทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น การศึกษาของ Apparailly และคณะ ในปี 1998 ที่พบว่าการปลูกถ่ายยีนที่ควบคุมการผลิต สารอินเตอร์ลิวคิน 10 สามารถลดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อในหนูที่ป่วยด้วยโรคข้อเสื่อม เนื่องจากอินเตอร์ลิวคิน 10 สามารถไปยับยั้งการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน 1 ได้ [4] รวมทั้งในการศึกษาของ Lubberts และคณะ (1999) ที่แสดงให้เห็นว่าการปลูกถ่ายยีนที่ทำหน้าที่สร้างสารอินเตอร์ลิวคิน 4 เข้าสู่เซลล์เยื่อข้อ ทำให้เซลล์เยื่อข้อนั้นสร้างสารอินเตอร์ลิวคิน 4 เพิ่มขึ้น ส่งผลไปยับยั้งการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน 1 ทำให้การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อลดลง [5] จากการศึกษาต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นแล้วว่า อินเตอร์ลิวคิน 1 มีบทบาทสำคัญในการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ เนื่องจากเป็นสารไซโตไคน์ที่มีบทบาทไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ทำให้มีการหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยสลายโครงสร้างทางชีวเคมีที่สำคัญในกระดูกอ่อนผิวข้อ ได้แก่ โปรตีโอไกลแคน และคอลลาเจน เป็นต้น ที่เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อคือ เอนไซม์แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส ซึ่งมีมากมายหลายชนิด (แสดงในตารางที่ 1)

ตารางที่ 3.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ [18]

Enzyme	Source	Substrate	Inhibitor
Aspartic proteinases			
Cathepsin D	Lysosomes	Aggrecan, Denatured type II collagen	α 2-macroglobulin
Cysteine proteinases			
Calpain	Cytosol	Proteoglycan	Calpastatins
Cathepsin B	Lysosomes	Procollagen, Type II collagen	Cystatins
Cathepsin L	Lysosomes	Link proteins, Elastin, Type I collagen	Cystatins
Metalloproteinases (MMPs)			
Gelatinases 72 kDa (MMP-2)	Synovium	Type XI, X collagens	TIMP, TIMP-2
Gelatinases 92 kDa (MMP-9)	Chondrocytes, PMNs, Synovium	Type VI, V collagens	TIMP, TIMP-2
Neutrophil collagenase (MMP-8)	PMNs	Activates procollagen	TIMP
Tissue collagenase (MMP-1)	Synoviocytes, Macrophage, Fibroblasts, Chondrocytes, Osteoblasts, Epithelial cells	Type I, II, III, VII, X collagens	TIMP, TIMP-2
Stromelysin 1 (MMP-3)	Chondrocytes, Synovium	Aggrecan, Fibronectin, Type IX, XI collagens, procollagen, Link protein, Decorin, Elastin	TIMP, TIMP-2
Stromelysin 2 (MMP-10)	Cytokine	Fibronectin, Activates procollagen	TIMP

ตารางที่ 3.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ (ต่อ)

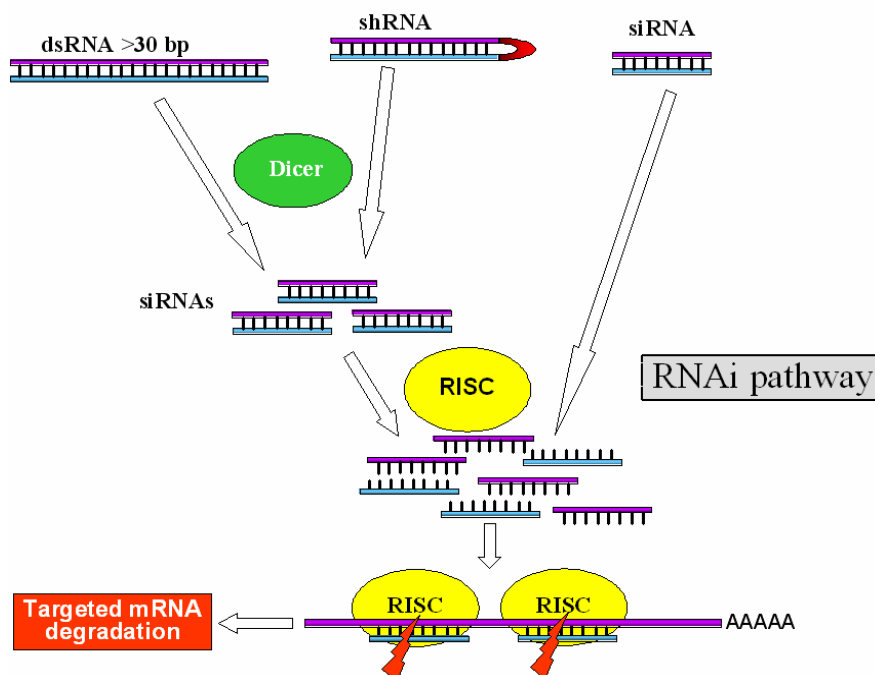
Enzyme	Source	Substrate	Inhibitor
Serine proteinases			
Cahepsin G	PMNs	TIMP, Aggrecan, Elastin, Type II collagen	α 1-PI
Neutrophil elastase	PMNs	Type I, II, IX, X, XI collagen, Aggrecan	α 1-PI
Plasma kallikrein	Plasma	Procollagen, Prostromelysin	α 1-PI
Plasmin	Plasma	MMPs	α 2-antiplasmin
Tissue plasminogen activator (tPA)	Chondrocytes, Synovium	Plasminogen	Protease nexin, PA-1, -2
Urokinase plasminogen activator (uPA)	Chondrocytes, Synovium	Plasminogen	Protease nexin, PA-1, -2, -3

PA=plasminogen activator, PI=proteinases inhibitor, PMNs=polymorphonuclear leukocytes, TIMP=tissue inhibitor of metalloproteinase, ?=question

การศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายในการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MMP-3 หรือที่รู้จักในชื่อ stromelysin 1 ในเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการศึกษาที่แสดงให้เห็นแล้วว่า MMP-3 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ [19-22] ซึ่งพบว่า MMP-3 จะไปย่อยสารชีวเคมีที่สำคัญของเนื้อกระดูกอ่อน ได้แก่ โปรตีโอไกลแคน gelatins laminin fibronectin และ คอลลาเจน (ชนิดที่ 3 4 และ 9) [20, 21, 23] นอกจากนี้ยังพบว่า MMP-3 ยังมีหน้าที่ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนสชนิดอื่นๆ เช่น MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9 และ MMP-13 [24] การกระตุ้นในเอนไซม์เหล่านี้ทำงาน จะส่งผลให้มีการเสื่อมสลายสารชีวเคมีต่างๆ เพิ่มมากขึ้น รวมถึงคอลลาเจนชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นคอลลาเจนชนิดที่พบมากที่สุดเนื้อกระดูกอ่อนผิวข้อ และนอกจากในภาวะโรคข้อเสื่อมแล้ว โรคเกี่ยวกับข้ออื่นๆ ก็พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ MMP-3 อย่างมีนัยสำคัญ เช่น psoriatic arthritis [25, 26], ankylosing spondylitis [26] และ crystal arthritis [25, 27] ซึ่งจากข้อมูลต่างๆ ที่ได้กล่าวมาทำให้เชื่อได้ว่า หากสามารถยับยั้งการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ MMP-3 ได้ ก็จะทำให้กระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อลดลง โดยที่การยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้าง MMP-3 นี้ น่าจะส่งผลดีกว่าการไปยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างสารอินเตอร์ลิวคิน 1 แม้ว่าจะเป็นที่แน่ชัดว่าสารอินเตอร์ลิวคิน 1 มีบทบาทเด่นชัดในการเริ่มต้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในข้อและทำให้ข้อพัฒนาต่อไปเป็นโรคข้อเสื่อม เนื่องจากสารอินเตอร์ลิวคิน 1 เป็นสารไซโตไคน์ที่มีบทบาท

สำคัญมากมาย ดังนั้นการไปยับยั้งการสร้างสารอินเทอร์ลิวคิน 1 แม้ว่าจะสามารถไปยับยั้งกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนได้จริง แต่ก็อาจส่งผลข้างเคียง (side effect) ที่ไม่พึงประสงค์ขึ้นกับร่างกายได้เช่นกัน เพราะสารนี้มีทั้งประโยชน์และโทษ ดังนั้นเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดจากการยับยั้งการทำงานของสารอินเทอร์ลิวคิน 1 ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-3 มากกว่า

ในปี 1998 Fire และคณะได้ค้นพบเทคนิคที่เรียกว่าการแทรกแซงอาร์เอ็นเอ (RNA interference; RNAi) หรือการยับยั้งการทำงานของหลังกระบวนการสร้างอาร์เอ็นเอ (post-transcriptional gene silencing; PTGS) [28] หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเพิ่มขึ้นมากมายในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เช่น ในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) [29, 30] และนอกจากนั้นก็มีการศึกษาในร่างกายสัตว์ (*in vivo*) โดยตรง เช่น ไส้เดือนดิน (*Caenorhabditis elegans*) [28] หนอนแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) [31, 32] ปรสิต (Trypanosome) [33] รวมทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู [34] และโค [35-37] ซึ่งจากการศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนได้เป็นอย่างดี มีความจำเพาะสูง (high specific) สามารถศึกษาได้โดยใช้ระยะเวลาสั้น ค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม รวมทั้งสามารถประยุกต์ไปใช้ในการรักษาโรคด้วยยีนได้อีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวได้แสดงให้เห็นแล้วว่าให้ผลดีในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อไวรัส [38, 39] โรคติดเชื้อปรสิต [40, 41] หรือโรคมะเร็ง [29, 30, 42] กระบวนการแทรกแซงอาร์เอ็นเอเริ่มจากการตัดอาร์เอ็นเอเกลียวคู่ที่มีความยาวมากกว่า 30 คู่เบส ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 21 ถึง 23 คู่เบส เรียกว่า small interfering RNA (siRNA) โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (ribonuclease) ที่อยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ที่มีชื่อเฉพาะว่า dicer จากนั้นกลุ่มโปรตีนที่มีชื่อว่า RNA induced silencing complex (RISC) จะมาจับกับอาร์เอ็นเอสายคู่สั้นๆ เหล่านี้ แล้วทำการแยกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 2 สายคือ sense (ss) RNA และ anti-sense (as) RNA สายอาร์เอ็นเอที่เป็น asRNA (มีลำดับเบสตรงกับลำดับเบสบนสายอาร์เอ็นเอนำรหัส) จะถูกนำไปจับกับสายอาร์เอ็นเอนำรหัส ตามด้วยการตัดสายอาร์เอ็นเอนำรหัสทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้อีก นั่นหมายความว่ายีนเป้าหมายจะถูกยับยั้งหรือไม่สามารถทำงานได้ [34]



รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดกระบวนการแทรกแซงอาร์เอ็นเอภายในเซลล์

ในส่วนของการเชื่อมโยงพบว่า เทคนิคนี้ได้เริ่มนำมาใช้เพื่อยับยั้งสารชีวเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นในภาวะข้อเสื่อม โดยมุ่งหวังให้กระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อนั้นลดลง มีการศึกษาพบว่า การแทรกแซงอาร์เอ็นเอสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ cathepsin B [43] จากเซลล์กระดูกอ่อนได้ร้อยละ 80 นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้ siRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน cyclooxygenase-2 (COX-2), nitric oxide synthase-2 (NOS-2) และเอนไซม์แมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-9 (MMP-9) ของเซลล์กระดูกอ่อนได้ [44] ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นแนวโน้มที่ดีในการใช้เทคโนโลยีแทรกแซงอาร์เอ็นเอในเซลล์กระดูกอ่อน โดยในการศึกษาที่เสนอขอครั้งนี้เป็นการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MMP-3 ในเซลล์กระดูกอ่อน โดยเป็นการศึกษากับเซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผู้วิจัยจะนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปทำการพัฒนาเพื่อจะนำเอาเทคโนโลยีแทรกแซงอาร์เอ็นเอไปใช้ในร่างกายสัตว์ เพื่อให้บรรลุเป้าหมายคือ การพัฒนาเป็นยาสำหรับใช้รักษาโรคข้อเสื่อมทั้งในสัตว์และมนุษย์

บทที่ 4

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย

4.1 อุปกรณ์และสารเคมี

4.1.1 อุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อ (sterile)

1. PCR tube
2. Petri dish
3. Cover slip
4. ลูกยางดูด
5. Pasteur pipette
6. ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
7. Centrifuge tubes
8. 8-strip PCR tube
9. cryotubes (Nunc, Denmark)
10. ปากคีบปลายแหลม (ปากคีบ)
11. อุปกรณ์ช่วยไปเปต (pipette aid)
12. Tips ขนาด 50, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
13. Volumetric pipette ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
14. Centrifuge tube ขนาด 10, 20 และ 50 มิลลิลิตร
15. Micro centrifuge tube ขนาด 0.5 และ 2 มิลลิลิตร
16. ขวด Duran ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
17. Autopipette ขนาด 2, 10, 20, 200 และ 1000 มิลลิลิตร
18. Syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
19. จานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (24 well plate) (Nunc, Denmark)
20. จานเพาะเลี้ยงขนาด 60x15 มิลลิเมตร (NuncTM Δ surface, Denmark)
21. กระจกปิดสไลด์ (cover slips) วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร
22. ขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาดพื้นที่เพาะเลี้ยง 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร

4.1.2 อุปกรณ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ (nonsterile)

1. ไฟแช็ค
2. ปีกเกอร์
3. ถังมือยาง
4. พาราฟิล์ม
5. Waste bottle
6. กระจกสไลด์
7. กระจกชามระ
8. ถังมือพลาสติก
9. Centrifuge rack
10. อลูมิเนียมฟลอย
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. เครื่องปั๊มสุญญากาศ
13. Haemocytometer และ cover slip
14. Stage micrometer และ ocular micrometer

4.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่งสารเคมี
2. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
4. ตู้ทำงานปลอดเชื้อ (Dwyer, USA)
5. เครื่องวัด pH (Toledo, Switzerland)
6. เครื่อง vortex (Shelton, USA รุ่น VSM-3)
7. Shaker ควนคุ่มอุณหภูมิ (Shellab, Canada)
8. Thermal cycler (Biorad, USA รุ่น MyRun)
9. Thermal cycler (Biorad, USA รุ่น MJmini)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, UK รุ่น Mikro 200)
11. Electrophoresis สำหรับเจล agarose (Cosmobio, Japan)
12. ถังไนโตรเจนเหลว (Biogenics, USA รุ่น MVE Lab 30)
13. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Songserm inter, Thailand)
14. เครื่องถ่ายภาพใต้ UV (UV transilluminator) (Biorad, USA)
15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettmert, Germany)

16. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) (Hirayama, Japan รุ่น HiclaveHV-110)
17. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV mini-1240)
18. เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Elga purelab option, UK รุ่น 03007BPM1)
19. ตู้บ่มอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส (Mettler, Germany รุ่น modell 600)
20. กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope) (Olympus, Japan รุ่น BH-2)
21. ตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (SLshellab, Canada)
22. ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Thermo, China รุ่น 8600 Electron corporation Series)
23. กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Zeiss, USA รุ่น Axioskop 2 plus, model: CCD-1300 DS)
24. กล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง (inverted microscope) (Nikon, Japan Type 108 รุ่น ECLIPSE TE 300)
25. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Hettich Zentrifugen, UK รุ่น Universal 320R) MJ Research DNA Engine Opticon[®] 2 (MJ Research PTC-200 Thermal cycler, USA)

4.1.4 สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. aceto-orcein
3. Tris (Vivantis, USA)
4. dNTP (Vivantis, USA)
5. KCl (Merck, Germany)
6. HCl (Merck, Germany)
7. NaCl (Merck, Germany)
8. Glutamine (Gibco, USA)
9. Agarose (Vivantis, USA)
10. Hoechst dyes No. 33342
11. Trypan blue (Gibco, USA)
12. Bromelain lyophilized powder (Sigma, USA) No. B5144
13. Gentamycin (Gibco, USA)
14. NaOH (Lab-scan, Ireland)
15. Ethanol (Lab-scan, Ireland)
16. KH₂PO₄ (Merck, Germany)
17. Methanol (Lab-scan, Ireland)

18. Na₂HPO₄ (Lab-scan, Ireland)
19. Oligo dT₁₂ (Fermentas, USA)
20. PBS (phosphate buffer saline)
21. Loading buffer (Fermentas, USA)
22. Glacial acetic acid (Merck, Germany)
23. Reverse primer (Bio basic Inc., USA)
24. Forward primer (Bio basic Inc., USA)
25. Penicillin – Streptomycin (Gibco, USA)
26. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)
27. Ethyidium bromide solution (Invitrogen, USA)
28. DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Merck, Germany)
29. BME (BME Amino acids Solution 50X) (Sigma, USA)
30. Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)
31. EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid) (Lab-scan, Ireland)
32. Gene RulerTM 100 base pair DNA ladder plus (Fermentas, USA)
33. Recombinant human IL-1 β (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

4.1.5 เอนไซม์

1. Trypsin (Gibco, USA)
2. RNase (Fermentas, USA)
3. Dnase I (Fermentas, USA)
4. Collagenase Tryp II (Sigma, USA)
5. *Taq* polymerase (Invitrogen, USA)
6. M-MuLV[®] Revertid Reverse Transcriptase (Vivantis, USA)

4.1.6 ชุดทดลอง

1. Neasy[®] Mini Kit (Qiagen, Germany)
2. Quantitect[®] SYBR[®] Green PCR (Qiagen, Germany)
3. HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Germany)
4. siRNA MMP-3 Reagent (Qiagen, Germany)

4.2 แผนการศึกษา

ในการศึกษานี้จะศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MMP-3 ด้วย siRNA โดยศึกษาผลที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ การสร้างสารกลัยโคโปรตีนจากเซลล์ และปริมาณอาร์เอ็นเอเข้ารหัสที่จำเพาะต่อยีน MMP-3 โดยวิธี real-time PCR

ในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 (G.1) เป็นกลุ่มควบคุม ไม่มีการใส่สารใดๆ
- กลุ่มที่ 2 (G.2) ได้รับสารละลาย HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Germany)
- กลุ่มที่ 3 (G.3) ได้รับ siRNA ที่ไม่จำเพาะต่อยีน eukaryote (Qiagen, Germany)
- กลุ่มที่ 4 (G.4) ได้รับ siRNA ที่มีความจำเพาะต่อยีน MMP-3

โดยทั้ง 4 กลุ่มทดลองถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน 2 แบบ แบบที่ 1 เป็นการเลี้ยงเซลล์ปกติ และแบบที่ 2 คือเซลล์จะได้รับ Recombinant human IL-1 β (R&D System, Minneapolis, MN, USA) ขนาด 10 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงจึงทำการศึกษาผลของ siRNA ศึกษาผลการยับยั้งจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ การสร้างสารกลุ่มโปรตีโกลัยแคน และการแสดงออกของยีน

4.3 เซลล์และการเตรียมเซลล์

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์ Human chondrosarcoma cell line (sw1353) จากหน่วยวิจัยที่มีความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเซลล์มะเร็งเหล่านี้จะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกับวิธีการเลี้ยงเซลล์ทั่วไป [45-48]

การเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณที่ต้องการเริ่มจาก ทำให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดเลี้ยง (trypsinization) ขั้นแรกดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS เพื่อให้ไม่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคลือบอยู่ เพราะโปรตีนจากน้ำยาเลี้ยงเซลล์จะรบกวนการทำงานของสารละลายทริปซิน/EDTA เติมสารละลายทริปซิน/EDTA ใช้ความเข้มข้นของ ทริปซิน/EDTA ที่ร้อยละ 0.25-0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยง จากนั้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ดูดเอนไซม์ออกทิ้ง แล้วนำขวดเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ บ่มไว้เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วตรวจดูการหลุดออกของเซลล์จากพื้นขวดเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง เมื่อเซลล์หลุดหมด (มากกว่าร้อยละ 80) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.5 มิลลิลิตร ใช้ไปเปิดดูดพื้นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวด และกระจายตัวออกจากกัน เมื่อพบว่าเซลล์หลุดดีแล้ว ดูดสารละลายเซลล์บางส่วนเพื่อทำการนับโดยใช้ hemocytometer และคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ ปรับปริมาตรของเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ตามความเข้มข้นของเซลล์ที่ต้องการใช้งาน

สำหรับเซลล์กลุ่มที่ต้องกระตุ้นเซลล์ด้วย Recombinant human IL-1 β นั้น ก่อนนำมาศึกษาจะใส่ IL-1 β ขนาด 10 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด จึงทำการเปิดตู้ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี IL-1 β ออก แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติไม่มีซีรัม เพื่อเตรียมนำไปใช้งาน

4.4 Small interfering RNA (siRNA) และการพาเข้าเซลล์

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ siRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของยีน MMP-3 ของมนุษย์ (NM_002422) เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการแทรกแซงอาร์เอ็นเอภายในเซลล์กระดูกอ่อน โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ siRNA ที่ผลิตขึ้นโดย บริษัท Qiagen, ประเทศ Germany ในขณะที่การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ ใช้วิธี transfection method ในการพา siRNA เข้าสู่เซลล์กระดูกอ่อน [49] โดยใช้ชุดสำเร็จ HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Germany)

ทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยง แล้วดูดเซลล์ใส่ centrifuge tubes พร้อมทั้งใช้ไปเปิด ดูดเป่าเซลล์ให้เซลล์กระจายและไม่ตกตะกอน นับจำนวนเซลล์ให้ได้ 2×10^6 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 14 มิลลิลิตร ดูดเซลล์ที่เตรียมไว้ ลงในจานเลี้ยงแบบ 4 หลุม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม โดยจะมีจำนวนเซลล์สุทธิคือ 1×10^6 เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติไม่มีซีรัม 400 ไมโครลิตร จากนั้นทำการทดสอบตามกลุ่มทดลอง (ข้อ 4.2) เริ่มจับเวลาเมื่อนำเซลล์ไปบ่มเพาะในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง

4.5 การศึกษาผลของ siRNA ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อน

การศึกษานี้จะทำการศึกษาผลของ siRNA ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพ โดยศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ อัตราการมีชีวิต และอัตราการตายแบบ apoptosis ของเซลล์

เมื่อครบเวลาที่เลี้ยง (48 และ 72 ชั่วโมง) ทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยง ดูดเซลล์ใส่ centrifuge tubes พร้อมทั้งใช้ไปเปิด ดูดเป่าเซลล์ให้เซลล์กระจาย และไม่ตกตะกอน โดยจะทำการทดสอบหลายชุดเพื่อเตรียมการตรวจสอบเซลล์ด้วยการย้อมสีทั้ง 3 ชนิด (ชุดการทดลองที่ต้องย้อมด้วยสี Hoechst dyes ทำการเลี้ยงเซลล์ให้เกาะบนกระจกปิดสไลด์เพื่อความ

สะดวกในการถ่ายภาพเซลล์) เมื่อครบตามระยะเวลาต่างๆ แล้วใช้ไปเปิดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ ออกทิ้ง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 2 รอบ ในทุกๆ หลุม ก่อนที่นำเซลล์มาย้อมสีด้วยวิธีการต่างๆ

4.5.1 การย้อมสี

4.5.1.1 การย้อมเซลล์ด้วยสี *trypan blue*

ใช้ไปเปิดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมของจานเพาะเลี้ยง ในแต่ละชุดการทดลอง ล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 2 รอบ หลังจากนั้นหยดสี *trypan blue* ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้ว หลังจากนั้นปิดหน้าเซลล์ด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปถ่ายภาพส้อมเก็บข้อมูลชุดการทดลองละ 30 ภาพในตำแหน่งที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด *phase contrast* กำลังขยาย 400 เท่า

4.5.1.2 การย้อมเซลล์ด้วยสี *Hoechst dyes No.33342 (HO)*

เจือจางสี HO อัตราส่วน 1 ต่อ 500 ใน DMEM ที่มี FBS ความเข้มข้นร้อยละ 20 (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อจะใช้งาน) ยกกระจกปิดสไลด์ที่มีเซลล์เกาะออกจากหลุมของจานเพาะเลี้ยงในแต่ละชุดการทดลองด้วยปากคีบปลายแหลม ล้างด้วย PBS ชั้บให้แห้งด้วยทิชชู หยดสี HO ลงบนผิวหน้ากระจกปิดสไลด์แล้วบ่มไว้ในที่มืด 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาของสีด้วยการนำไปแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นหยด mountant ที่มีสารป้องกันการจางของสีลงบนกระจกสไลด์ แล้วคว่ำหน้ากระจกปิดสไลด์ที่มีเซลล์เกาะลงไป สุ่มถ่ายภาพเก็บข้อมูลชุดการทดลองละ 20-30 ภาพในตำแหน่งที่แตกต่างกันภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า ด้วยความยาวคลื่นแสง 330-385 นาโนเมตร

4.5.1.3 การย้อมเซลล์ด้วยสี *aceto-orcein*

ใช้ไปเปิดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมของจานเพาะเลี้ยง ในแต่ละชุดการทดลอง ล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 2 รอบ หยดสี *aceto-orcein* ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นปิดหน้าเซลล์ด้วยกระจกปิดสไลด์ นำเซลล์ไปถ่ายภาพส้อมเก็บข้อมูลชุดการทดลองละ 30 ภาพในตำแหน่งที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด *phase contrast* กำลังขยาย 400 เท่า

4.5.2 การหาค่าร้อยละความมีชีวิต (%viability) ของเซลล์

หลังจากที่ย้อมเซลล์ด้วยสี *trypan blue* แล้วสุ่มถ่ายภาพเก็บข้อมูล ชุดการทดลองละ 20 ภาพในตำแหน่งที่แตกต่างกันแล้ว นำภาพถ่ายมานับจำนวนเซลล์ในแต่ละภาพ โดยแยกนับตาม

ลักษณะของเซลล์ที่มองเห็น คือเมื่อย้อมด้วย trypan blue พบเซลล์มีชีวิต (เซลล์เกาะ และเซลล์กลมไม่ติดสี) และเซลล์ไม่มีชีวิต (ติดสีน้ำเงิน) โดย

$$\text{ร้อยละความมีชีวิต (\%viability)} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดในพื้นที่ภาพ}}$$

4.5.3 การหาค่าร้อยละของการเกิด apoptosis ของเซลล์

หลังจากที่ย้อมเซลล์บนกระจกปิดสไลด์ด้วยสี HO แล้วสั่มถ่ายภาพเก็บข้อมูล ชุดการทดลองละ 20 ภาพในตำแหน่งที่แตกต่างกันแล้ว นำภาพถ่ายมานับจำนวนเซลล์ในแต่ละภาพ แยกนับตามลักษณะของเซลล์ที่มองเห็นเป็น 2 ชนิด คือเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis (นิวเคลียสของเซลล์ติดสีฟ้าสว่างจ้า) และเซลล์ที่มีชีวิต (นิวเคลียสของเซลล์ติดสีน้ำเงินของ HO) ทำการคำนวณค่าร้อยละความมีชีวิต โดย

$$\text{ร้อยละการเกิด apoptosis} = \frac{\text{ผลรวมของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดในพื้นที่ภาพ}}$$

4.5.4 การหาค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ของเซลล์

หลังจากที่ย้อมเซลล์บนกระจกปิดสไลด์ ด้วยสี aceto-orcein แล้วสั่มถ่ายภาพเก็บข้อมูล ชุดการทดลองละ 30 ภาพในตำแหน่งที่แตกต่างกันแล้ว นำภาพถ่ายมานับจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวโดยแยกนับตามระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ในแต่ละภาพ ทำการคำนวณหาค่าดัชนีการแบ่งเซลล์โดย

$$\text{ดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index)} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดในพื้นที่ภาพ}}$$

4.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารบ่งชี้ทางชีวภาพ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารบ่งชี้ทางชีวภาพจะใช้เทคนิค ELISA โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับกลัยโคซามิโนกลัยแคน (glycosaminoglycan; GAG) และไฮยาลูโรแนน (hyaluronan; HA) จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่สามารถใช้บ่งบอกการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกระดูกอ่อนผิวข้อ [50-55] โดยในการศึกษาครั้งนี้จะเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับสารบ่งชี้เหล่านี้จากเซลล์ในกลุ่มต่างๆ

ทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดเลี้ยง ดูดเซลล์ใส่ centrifuge tubes พร้อมทั้งใช้ไปเปิด ดูดเป้าเซลล์ให้เซลล์กระจาย และไม่ตกตะกอน นับจำนวนเซลล์ให้ได้ 2×10^5 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 14 มิลลิลิตร ดูดเซลล์ที่เตรียมไว้ ลงในจานเลี้ยงแบบ 24 หลุม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม โดยจะมีจำนวนเซลล์สุทธิคือ 1×10^5 เซลล์ ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ ทำการ transfect ด้วย siRNA เริ่มจับเวลาพร้อมทั้งนำเซลล์ไปบ่มเพาะในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจะแบ่งตามแถวของหลุมในงานเพาะเลี้ยงได้เป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 หลุม โดยกำหนดให้ 2 ชุดการทดลอง ได้รับเวลาในการเลี้ยงแตกต่างกันคือ 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ โดยจะทำการทดสอบสารลักษณะนี้หลายชุดเพื่อเตรียมการตรวจสอบเซลล์ด้วยการย้อมสีทั้ง 3 ชนิด (ชุดการทดลองที่ต้องย้อมด้วยสี Hoechst dyes ทำการเลี้ยงเซลล์ให้เกาะบนกระจกปิดสไลด์เพื่อความสะดวกในการถ่ายภาพเซลล์) เมื่อครบตามระยะเวลาต่างๆ แล้วใช้ไปเปิดดูดูเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังจากการได้รับสาร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ dye binding assay และ ELISA หลังจากครบเวลาและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เรียบร้อยแล้วล้างเซลล์ด้วย PBS ก่อนที่นำเซลล์มาย้อมสีด้วยวิธีการต่างๆ

4.6.1 การหาปริมาณไกลโคซามัยโนไกลัยแคนซัลเฟตด้วยวิธีการ dye binding assay

ปริมาณ GAG สามารถตรวจสอบโดยวิธีการ colorimetric dye binding assay ที่พัฒนาขึ้นมาโดยห้องปฏิบัติการวิจัยโรคกระดูกและข้อ (Bone and Joint Research Laboratories) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อาศัยหลักการ metachromatic shift absorption ในช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ถึง 535 นาโนเมตร ของส่วนผสมระหว่าง 1, 9-dimethylmethylen blue และ S-GAG ในตัวอย่าง หรือ ตัวมาตรฐาน ซึ่งส่วนผสมนี้จัดเตรียมจาก 16 มิลลิกรัม ของ 1, 9-dimethylmethylen blue ที่ละลายใน 5 มิลลิลิตร เอทานอล 2 กรัม ของ sodium formate และ 2 มิลลิลิตร ของ formic acid แล้วทำการปรับ pH ให้ได้ 3.5 ในการทดลองนี้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายสีที่ใช้คือ 590 นาโนเมตร สารละลายสีที่เตรียมได้จะถูกเก็บไว้ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณ GAG โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการตรวจ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (สำหรับตัวอย่างมาตรฐานใช้ chondroitin 6-sulfate (CS-C) เข้มข้น 0-30 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) ใส่ลงในไมโครเพลต หลังจากนั้นเติมสารละลายสีปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร สามารถคำนวณหาปริมาณ GAG จากกราฟมาตรฐาน (กราฟมาตรฐานสร้างจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาตรฐาน และความเข้มข้นของตัวอย่างมาตรฐาน)

4.6.2 การหาปริมาณไฮยาลูโรแนนในตัวอย่างโดยวิธี competitive inhibition based ELISA

เคลือบเพลตด้วย umbilical cord HA ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรใน coating buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้น

ล้างเพลตด้วย PBS-T (150 ไมโครลิตร ต่อหลุม) 3 ครั้งแล้วทำการ block บริเวณ uncoated ด้วยร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) BSA ใน PBS ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ต่อหลุม หลังจากนั้นอบเพลตไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เตรียม inhibition mixture ซึ่งก็คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน หรือ standard competitor (HA Healon® : ความเข้มข้นตั้งแต่ 3.9-1000 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตรใน ร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตรของ BSA) ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่จำเพาะต่อ HA คือ biotinylated hyaluronan binding proteins; bHABPs (1 ต่อ 100 ใน PBS) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 60 นาที เมื่อครบเวลาทำการล้างเพลต และเติม inhibition mixture ลงไป ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วล้างเพลต หลังจากนั้นเติม peroxidase-mouse monoclonal anti-biotin ที่ความเข้มข้น 1 ต่อ 1000 ใน PBS ลงไป ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม ปลอຍให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 60 นาที ล้างเอา conjugate ส่วนเกินออก จากนั้นเติม peroxidase substrate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม และนำเพลตไปไว้ในที่มีด่างไว้ให้เกิดสี ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4 โมลาร์ H₂SO₄ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม นำเพลตไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 492/690 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ HA ในซีรัมตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Delta Soft II

4.7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของยีน MMP-3

สกัดอาร์เอ็นเอเข้ารหัสจากเซลล์กระดูกอ่อน จากนั้นจึงศึกษาเปรียบเทียบระดับของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสที่มีความจำเพาะต่อยีน MMP-3 ด้วย real-time PCR ระหว่างกลุ่มทดลอง ตามวิธีที่ผู้เสนอขอรับทุนสนับสนุนเคยศึกษามาก่อนแล้ว [36, 56, 57] นอกจากทำการศึกษาการแสดงออกของยีนอื่น ที่มีความเกี่ยวข้องประกอบด้วย tissue inhibitor metalloproteinase 3 (TIMP-3), hyaluronan synthase 1 (HAS-1), HAS-2, aggrecan (AGG) และ collagen type 2 alpha 1 chain; (COL2A1) สำหรับยีนควบคุมภายใน (house keeping gene) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

เตรียมขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่เพาะเลี้ยง 25 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะเลี้ยง แล้วใช้ไปเปิดดูดเซลล์ใส่ใน centrifuge tubes พร้อมทั้งดูดเป่าเซลล์ให้เซลล์กระจายไม่ตกตะกอน นับจำนวนเซลล์ให้ได้ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 12 มิลลิลิตร แบ่งเซลล์ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่เพาะเลี้ยง 25 ตารางเซนติเมตร จำนวน 6 ขวด ขวดละ 2 มิลลิลิตร สุทธิแล้วจะมีเซลล์ 2×10^6 เซลล์ ต่อขวด เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด

อาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ ทำการทดสอบสาร โดยแบ่งเป็นกลุ่มทดลอง เริ่มจับเวลาพร้อมทั้งนำเซลล์ไปบ่มเพาะในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการย่อยเซลล์ให้หลุดจากพื้นขวด ล้างเซลล์ด้วย PBS บั่นเซลล์ตกตะกอนและแช่แข็งเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลว เพื่อเตรียมสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอต่อไป

4.7.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์ที่เตรียมไว้มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้เซลล์อย่างน้อยจำนวน 2×10^6 เซลล์ และทำการสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ อาร์เอ็นเอมีคุณสมบัติที่ไวต่อการถูกทำลายเนื่องจากมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลไรโบสสายเดี่ยว จึงต้องทำในที่อุณหภูมิเย็นและรวดเร็ว ในการทดลองนี้สกัดโดยใช้ Neasy® Mini Kit วิธีการตามคู่มือที่แนบมาพร้อมกับชุดทดลองซึ่ง สามารถอธิบายวิธีการพอสังเขปดังนี้

นำเซลล์ที่บั่นตกตะกอนและแช่แข็งมาละลาย เติมนัฟเฟอว์ RLT จำนวน 350 ไมโครลิตร ตูดเป่าเซลล์ด้วยหลอดฉีดยา และไซริงค์ จากนั้น เติมร้อยละ 75 เอทานอลที่เย็นปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันด้วยไปเปต ใช้ไปเปตดูดของเหลวทั้งหมดใส่ mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่มากกว่า $10,062 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เทของเหลวที่ตกลงมาในส่วนล่างของ column ทิ้งไป เติมนัฟเฟอว์ RW1 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่มากกว่า $10,062 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที หลังจากเทของเหลวในส่วนล่างของ column ทิ้งไป แล้วเติมนัฟเฟอว์ RPE 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่มากกว่า $10,062 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยเติมนัฟเฟอว์ RPE ซ้ำ 2 ครั้ง เมื่อครบแล้วเปลี่ยนส่วน column มาใส่ appendrop tube เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอทั้งหมดโดยเติม RNase-free water 20-50 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่มากกว่า $10,062 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที อาร์เอ็นเอที่ได้เก็บแช่ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยร้อยละ 2 agarose gel electrophoresis ใน 1 เท่า TAE บัฟเฟอว์ โดยใช้กำลังไฟ 75 วัตต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมเจลด้วยร้อยละ 0.5 ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำกลั่น 10 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบและถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV-transilluminator โดยใช้โปรแกรม Quantity One V. 4.4.1

4.7.2 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์กระตุกอ่อนจะทำให้กลายเป็นซีดีเอ็นเอสายคู่โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase สามารถอธิบายวิธีการพอสังเขปดังนี้

เตรียม PCR tube ใหม่ 2 หลอด โดยในหลอดแรกเติมสารดังนี้ oligo dT12 (500 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 2 ไมโครโมลลาร์ dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DEPC water ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของอาร์เอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา) และอาร์เอ็นเอต้นแบบปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากัน จากนั้นจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1-2 นาที หลังจากนั้นเตรียม PCR tube ใหม่ หลอดที่สอง โดยเติมสารดังนี้ 5 เท่า MuLV buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Ribolock® ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ M-MuLV® Revertid reverse transcriptase enzyme ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายจาก PCR tube หลอดที่ 2 ลงใน PCR tube หลอดที่ 1 (ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร) จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้ว เก็บตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.7.3 real-time PCR

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ชุดทดลอง Quantitect® SYBR® Green PCR เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR ตามวิธีการจากคู่มือที่แนบซึ่งสามารถอธิบายวิธีการพอสังเขปดังนี้

ผสมสารละลาย (2X QuantiTect® master mix) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ลงใน PCR tube ชนิด 8 หลอดต่อ 1 แถว โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ตามตาราง 4.1 โดยตั้งอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา real-time PCR จากเครื่อง ABI Prism® 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ตามที่แสดงใน ตาราง 4.2 และ ตาราง 4.3 เครื่อง real-time PCR จะแสดงผลการทดลองในรูปแบบของกราฟและค่า C_T ของแต่ละยีน จากนั้นจึงนำค่า C_T ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อคำนวณหาค่าระดับการแสดงออกของยีน (relative expression)

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีนนั้นอาศัยการคำนวณจากข้อมูลดิบที่ได้จากกราฟของปฏิกิริยาและนำมาคำนวณตามวิธีการของ Nganvongpanit, 2006 [36, 56] โดยใช้ ยีน GAPDH เป็นยีนฐานในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออก

ตารางที่ 4.1 สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

สารละลาย	ความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2X QuantiTect [®] master mix	1X	10
forward primer	0.75 ไมโครโมล	1.5
reverse primer	0.75 ไมโครโมล	1.5
RNase-free water	--	5.5
cDNA template	100 นาโนกรัม	1.5

ตารางที่ 4.2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ในกระบวนการ real-time PCR

Gene	Primer sequences	Ta* (°C)	Amplicon size (bp)
MMP-3 (NM_002422)	Forward: 5'-CTTTTGGCGAAAATCTCTCAG- 3' Reverse: 5'-AAAGAAACCCAAATGCTTCAA- 3'	55	404
TIMP-3 (NM_000362)	Forward: 5'-AACTCCGACATCGTGATCCG- 3' Reverse: 5'-GTAGTAGCAGGACTTG ATCT- 3'	59	347
COL2A1 (NM_001844)	Forward: 5'-CAACACTGCCAACGTCCAGAT- 3' Reverse: 5'-CTGCTTCGTCCAGATAGGCAAT- 3'	59	106
AGG (NM_013227)	Forward: 5'-ACTTCCGCTGGTCAGATGGA- 3' Reverse: 5'-TCTCGTGCCAGATCATCACC- 3'	59	110
HAS-1 (NM_001523)	Forward 5'-CGGCCTGTTCCCCTTCTTCGTG-3' Reward 5'-TCGTGTGCTACGCTGCGGACCA-3'	65	348
HAS-2 (NM_005328)	Forward 5'-CACAGCTGCTTATATTGTTG-3' Reward 5'-AGTGGCTGATTTGTCTCTGC-3'	51	358
GAPDH (NM_002046)	Forward: 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCAT- 3' Reverse: 5'-GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC- 3'	58	370

ตารางที่ 4.3 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	หมายเหตุ
ขั้นตอนที่ 1	95	15 นาที	
ขั้นตอนที่ 2 (45 รอบ)			
▪ Denature	94	15 วินาที	
▪ Annealing	50-60	30 วินาที	อุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing ตามตาราง 4.2
▪ Extension	72	30 วินาที	

4.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในแต่ละการทดลองมีการซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งมีการวิเคราะห์ซ้ำอีก 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่างๆ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ได้แก่ ค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ ค่าร้อยละความมีชีวิต ค่าร้อยละการตายแบบ apoptosis ระดับของสารในกลุ่ม กลัยโคซามิโนไกลแคน และระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี one – way analysis of variance (ANOVA) และ multiple pair wise comparison แบบ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 หรือ $p < 0.05$ โดยอาศัยโปรแกรม SPSS version 14

สำหรับการแสดงออกที่แท้จริงของยีนคำนวณได้โดยคิดจาก ระดับการแสดงออกของยีนควบคุมภายในสูตรที่ใช้คือ

$$\text{ระดับการแสดงออกที่แท้จริง} = \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมาย}}{\text{ระดับการแสดงออกของยีนควบคุมภายใน}}$$

จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาหาค่าสหสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลง (relative change) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม G.1 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

ผลการศึกษา

5.1 ผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β

ผลจากการศึกษาพบว่า การกระตุ้นเซลล์ IL-1 β ในขนาด 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลทำให้ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 5.1

เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ IL-1 β อัตราการมีชีวิตและอัตราการแบ่งเซลล์ลดลง ในขณะที่อัตราการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ในส่วนของการสร้างสารโปรตีโอไกลัยแคนพบว่า เซลล์ที่ได้รับ IL-1 β สร้าง HA และ GAG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) พบว่าเซลล์ที่ได้รับ IL-1 β มีการแสดงออกของยีน MMP-3 สูงกว่าเซลล์ปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ระดับการแสดงออกของยีนอื่นๆ ได้แก่ TIMP-3, HAS-2, HAS-2, AGG และ COL2A1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

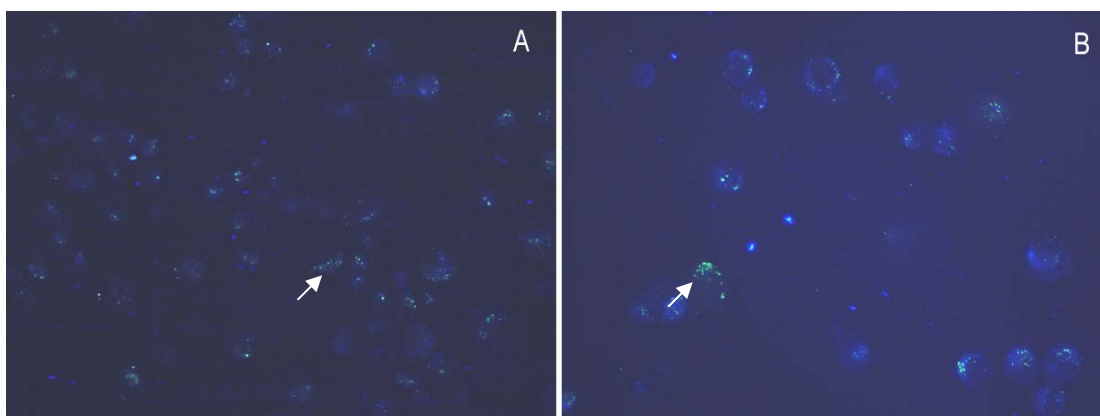
ตารางที่ 5.1 ผลการกระตุ้นเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนด้วยสาร IL-1 β

	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
Cell morphology				
Viability rate	93.05 $\pm$ 4.23	46.41 $\pm$ 6.04*	93.87 $\pm$ 3.44	26.52 $\pm$ 5.97*
Apoptosis rate	2.28 $\pm$ 1.71	63.39 $\pm$ 11.43*	4.62 $\pm$ 1.72	70.73 $\pm$ 5.02*
Mitotic rate	9.42 $\pm$ 2.43	1.36 $\pm$ 0.90*	16.22 $\pm$ 7.62	0.85 $\pm$ 0.30*
Proteoglycan production				
HA (ng/ml)	121.04 $\pm$ 23.03	48.54 $\pm$ 12.85*	146.04 $\pm$ 11.93	35.29 $\pm$ 8.54*
GAG (μ g/ml)	1.91 $\pm$ 0.88	0.56 $\pm$ 0.14*	1.72 $\pm$ 0.81	0.17 $\pm$ 0.07*
Relative gene expression				
MMP-3	0.98 $\pm$ 0.07	2.03 $\pm$ 0.23*	1.56 $\pm$ 0.18	2.94 $\pm$ 0.019*
TIMP-3	1.01 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.21*	1.35 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.06*
HAS-1	1.02 $\pm$ 0.13	0.37 $\pm$ 0.15*	1.35 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.07*
HAS-2	1.02 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.04*	1.18 $\pm$ 0.12	0.05 $\pm$ 0.04*
AGG	1.01 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.18*	1.35 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.03*
COL2A1	1.02 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.10*	1.48 $\pm$ 0.14	0.03 $\pm$ 0.08*

เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β ในเวลาเดียวกัน

5.2 การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์เร่งกระดูกอ่อน

ก่อนเริ่มการศึกษาผลของ MMP-3 siRNA ที่มีต่อเซลล์ ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ โดยจะสามารถเห็นสี ฟลูออเรสเซนซ์ของ siRNA ได้ในเซลล์ เมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 5.1)



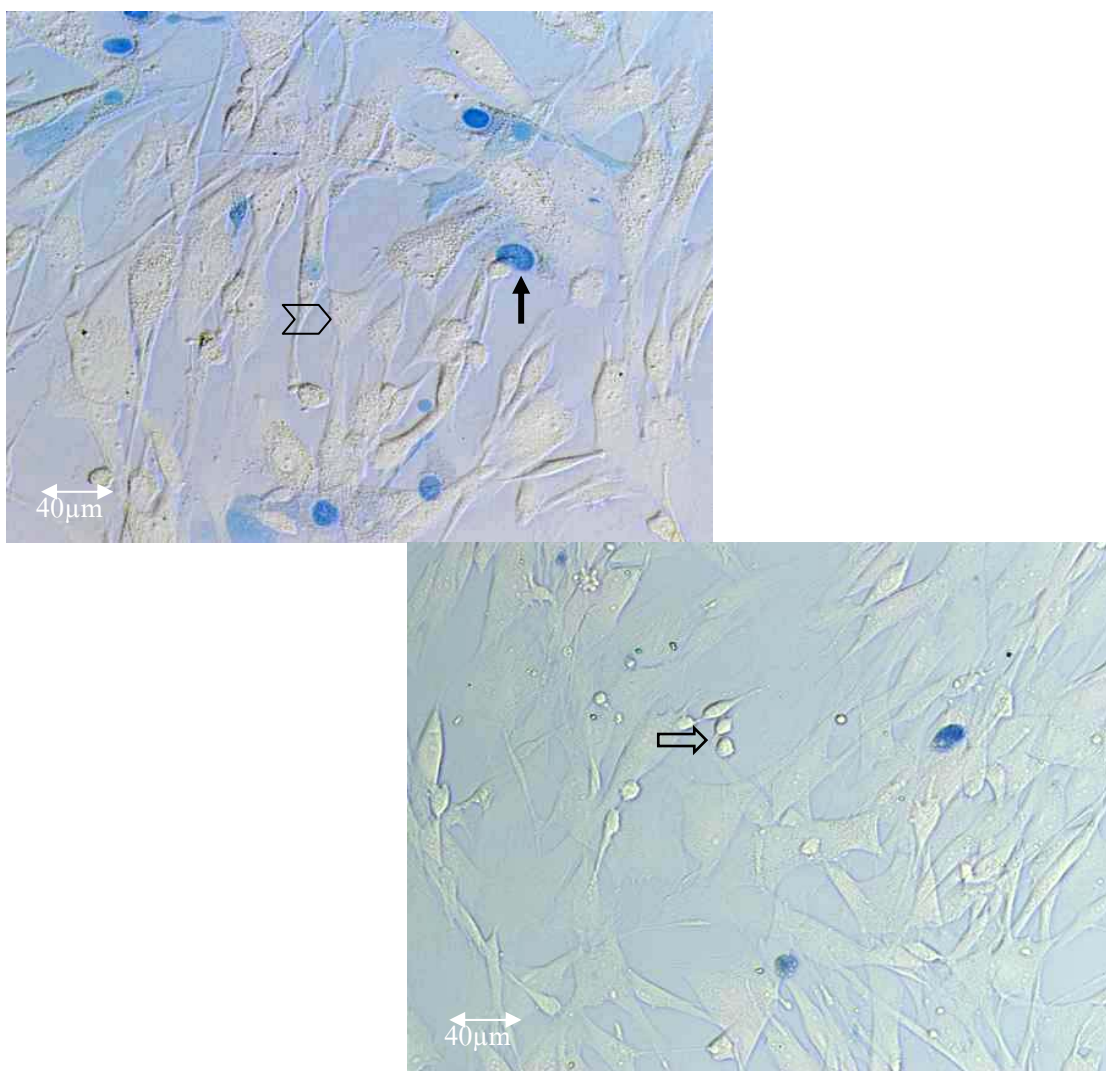
รูปที่ 5.1 แสดงการเรืองแสงของ siRNA (ลูกศรขาว) เมื่อมองภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า ด้วยความยาวคลื่นแสง 330-385 นาโนเมตร

5.3 ผลของ siRNA ของยีน MMP-3 ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์

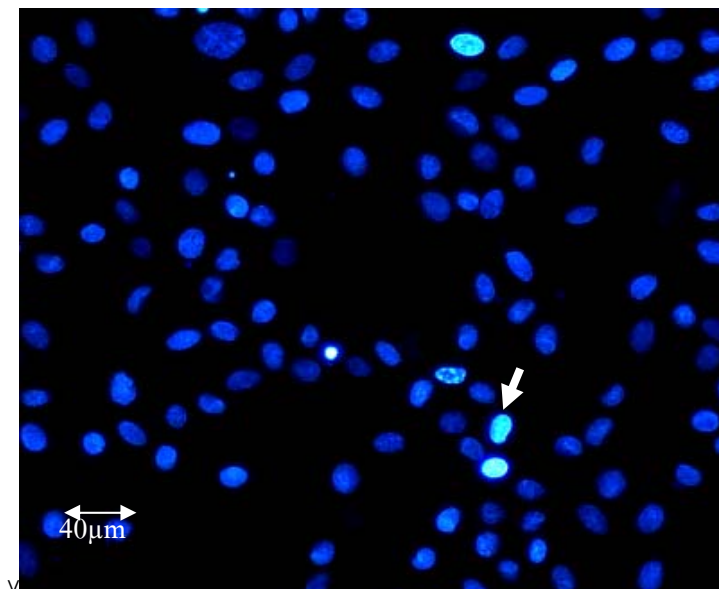
ในรูปที่ 5.2 แสดงลักษณะเซลล์ที่ย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue สำหรับตรวจสอบการตายของเซลล์ ในรูปแสดงเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินคือเซลล์ตาย (non-viable; NV) เซลล์เกาะไม่ติดสี (viable; V) และเซลล์กลมไม่ติดสี (globular viable; G) ในรูป 5.3 แสดงเซลล์ที่ย้อมสีเซลล์ด้วยสี Hoechst dyes No.33342 เพื่อตรวจสอบการตายแบบ apoptosis (AP) และรูป 5.4 แสดงเซลล์ที่ย้อมสีด้วย aceto-orcein เพื่อตรวจสอบการแบ่งเซลล์ แสดงเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก (interphase; I) และเซลล์ที่อยู่ในช่วงการแบ่งเซลล์ (mitotic phase; M)

ในเซลล์ปกติ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ของร้อยละความมีชีวิต ร้อยละการตายแบบ apoptosis และ ร้อยละการแบ่งเซลล์ ระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (รูปที่ 5.1)

เมื่อเซลล์ได้รับ IL-1 β พบว่า ในกลุ่ม G.4 มีร้อยละความมีชีวิตที่ 48 ชั่วโมง (74.89 ± 9.53) และ 72 ชั่วโมง (72.03 ± 7.56) และร้อยละการแบ่งเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง (7.37 ± 1.88) และ 72 ชั่วโมง (14.50 ± 4.52) สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ร้อยละการตายแบบ apoptosis ที่ 48 ชั่วโมง (18.18 ± 6.49) และ 72 ชั่วโมง (22.30 ± 8.89) ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 5.1



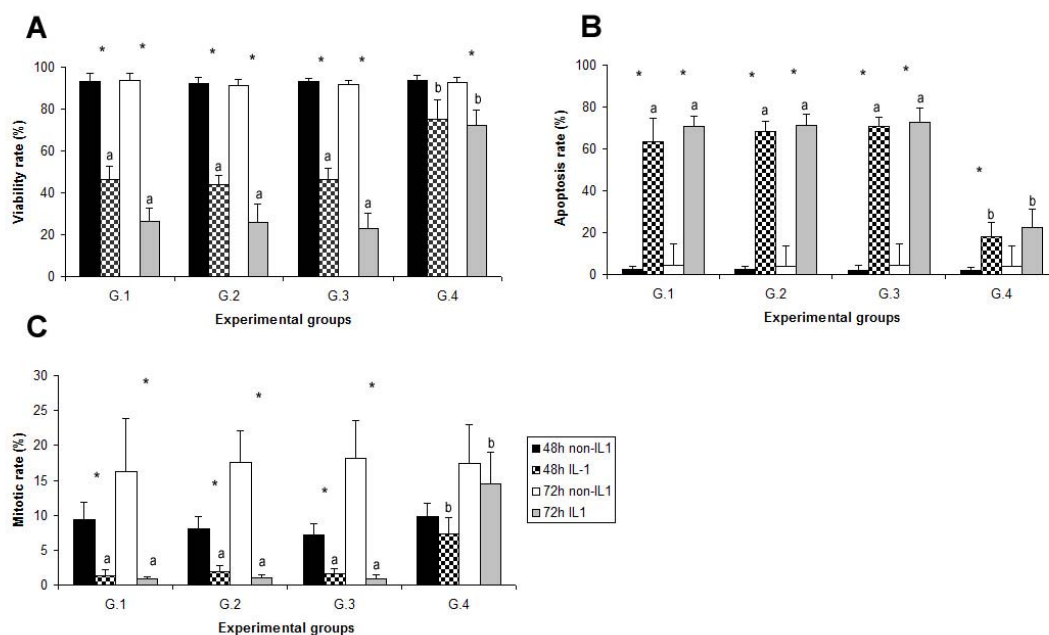
รูปที่ 5.2 เซลล์ที่ย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue เพื่อตรวจสอบการตายของเซลล์ เซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน คือเซลล์ตาย (ลูกศรสีดำ) เซลล์เกาะไม่ติดสี (หัวลูกศร) และเซลล์กลมไม่ติดสี (ลูกศรโปร่ง)



รูปที่ 5.3 เซลล์กระดูกอ่อนย้อมสีเซลล์ด้วยสี Hoechst dyes No.33342 เพื่อตรวจดูการตายแบบ apoptosis ในรูป แสดงลักษณะเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ (ลูกศรขาว)



รูปที่ 5.4 เซลล์กระดูกอ่อนย้อมสีเซลล์ด้วยสี aceto-orcein เพื่อตรวจดูการแบ่งเซลล์ แสดงเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก (interphase; I) (ลูกศรดำ) และเซลล์ที่อยู่ในช่วงการแบ่งเซลล์ (mitotic phase; M) (ลูกศรขาว)

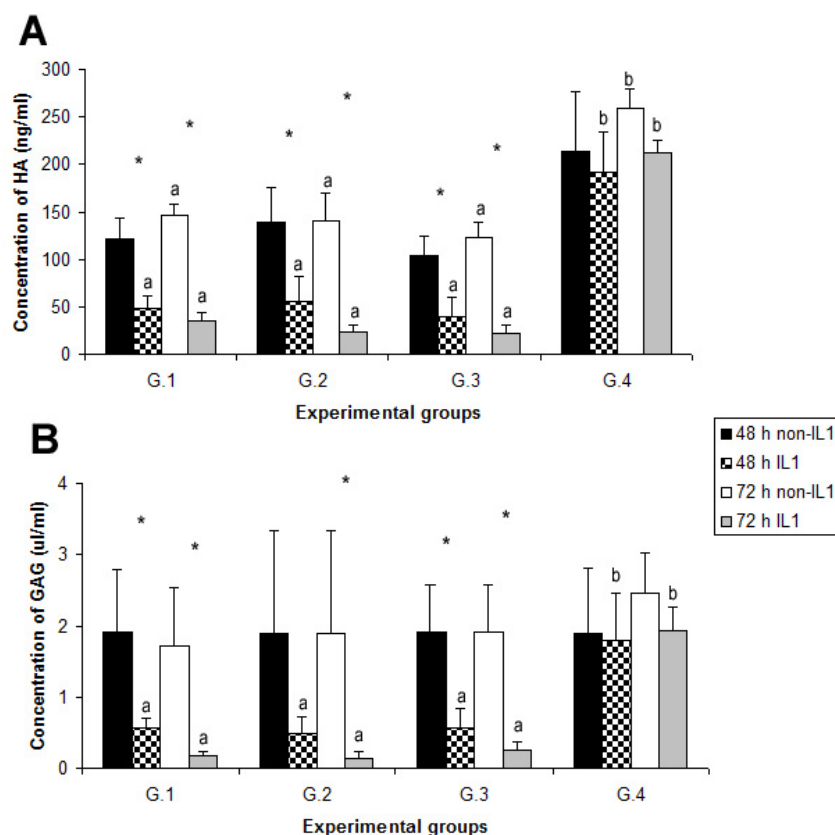


รูปที่ 5.5 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (A) ร้อยละการตาย (B) และร้อยละการแบ่งเซลล์ (C) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β ในเวลาเดียวกัน ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b) แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง (G1-G4) ที่เงื่อนไขเดียวกัน

5.4 ผลของ siRNA ของยีน MMP-3 ที่มีต่อการสร้างสารโปรตีโอกลัยแคน

ในเซลล์ปกติ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ของระดับ GAG ระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 5.6) แต่พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณการสร้างของ HA ในกลุ่ม G.4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ

ในเซลล์ที่ได้รับสาร IL-1 β พบว่าการสร้างสาร GAG และ HA ของกลุ่ม G.4 เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ทั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

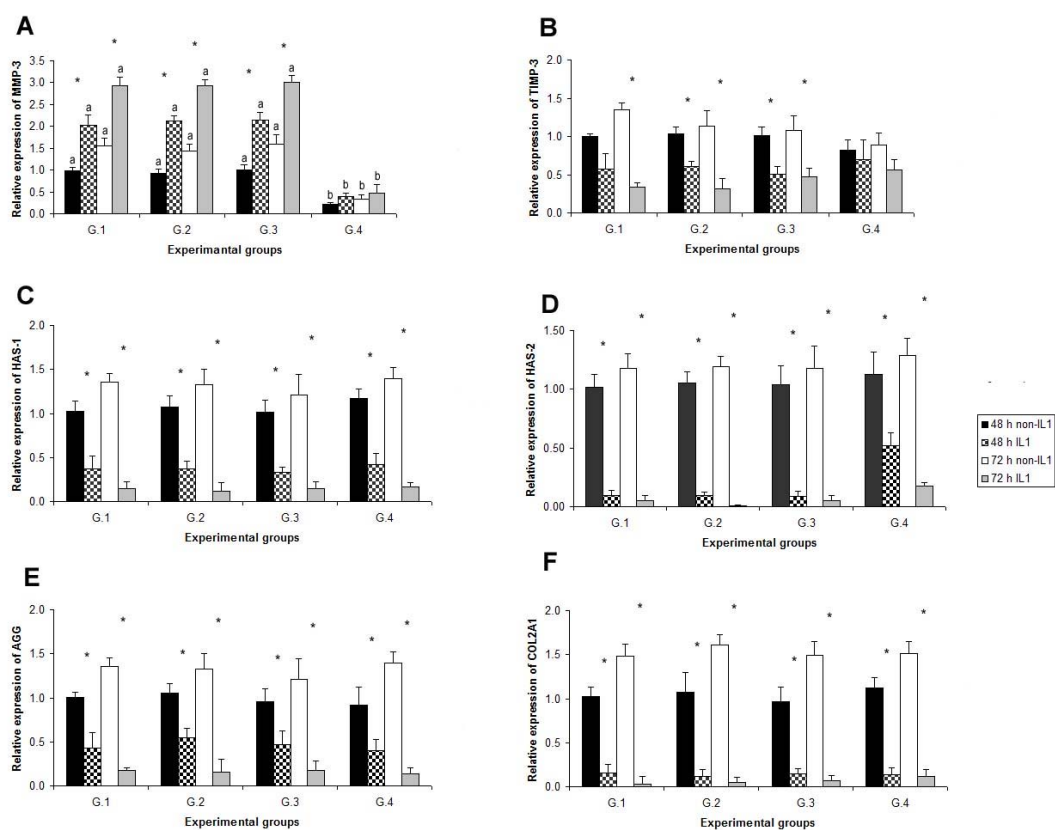


รูปที่ 5.6 การสร้างสาร hyalaruronan (A) และสาร glycosaminoglycan (B) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β ในเวลาเดียวกัน ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b) แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง (G1-G4) ที่เงื่อนไขเดียวกัน

5.5 ผลของ siRNA ของยีน MMP-3 ที่มีต่อการแสดงออกของยีน

การแสดงออกของยีน MMP-3 ในกลุ่ม G.4 ลดลงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ถึงร้อยละ 80 ทั้งที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับสาร IL-1 β แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่าง ระดับการแสดงออกของยีน MMP-3 ในกลุ่ม G.4 ที่ได้รับและไม่ได้รับสาร IL-1 β (รูปที่ 5.7)

การแสดงออกของยีน TIMP-3, HAS-1, HAS-2, AGG และ COL2A1 ของทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะต่ำ ($P < 0.05$) เมื่อเซลล์ได้รับ สาร IL-1 β (รูปที่ 5.7)



รูปที่ 5.7 การแสดงออกของยีน MMP-3 (A), TIMP-3 (B), HAS-1 (C), HAS-2 (D), AGG (E) และ COL2A1 (F) ในกลุ่มต่างๆ เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β ในเวลาเดียวกัน ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b) แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง (G1-G4) ที่เงื่อนไขเดียวกัน

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผล

สารตั้งต้นกระบวนการอักเสบ เช่น IL-1 β มีผลต่อเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อและเซลล์เยื่อ
บุผิวข้อ โดยสารเหล่านี้ไปมีผลทำให้เกิดการสลายโครงสร้างของเนื้อกระดูกอ่อนและไปเพิ่มการ
ตายของเซลล์กระดูกอ่อน [58] IL-1 β โดยสร้างมาจากเซลล์เยื่อบุผิวข้อ จากนั้น จึงเข้าสู่กระดูก
อ่อนผิวข้อ โดยผ่านทางน้ำไขข้อ พบว่า IL-1 β นี้ไปกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อผลิตสารที่
ทำหน้าที่ไปสลายเนื้อกระดูก เช่น MMP1 [59, 60] และ MMP-3 [61, 62] ดังในการศึกษาครั้งนี้
จึงใช้ IL-1 β ในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งกระดูก ให้มีสรีรวิทยาเหมือนเซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ใน
สภาวะข้อเสื่อม ผลจากการศึกษาพบว่าการใช้ IL-1 β ขนาด 10 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร สามารถ
เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งกระดูกมีพฤติกรรมเช่นเดียวกับเซลล์ที่อยู่ในภาวะข้อเสื่อมได้ พบว่า
อัตราการมีชีวิตและอัตราการแบ่งเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่อัตราการตายแบบ
apoptosis สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นยังพบว่า การสร้างสารโปรตีโอกลัยแคนลดลงร้อยละ
20-30 สำหรับการแสดงออกของยีนนั้นพบว่า ยีน MMP-3 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นร้อยละ
200 ยีน TIMP-3 มีการแสดงออกลดลงร้อยละ 50 ยีน HAS-1 มีการแสดงออกลดลงร้อยละ 60
ยีน HAS-2 มีการแสดงออกลดลงร้อยละ 90 ยีน AGG มีการแสดงออกลดลงร้อยละ 50 และยีน
COL2A1 มีการแสดงออกลดลงร้อยละ 90

ยีน MMP- 3 มีบทบาทสำคัญในกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยมีหน้าที่ในการสลายโครงสร้าง
ของเนื้อกระดูก เช่น โปรตีโอกลัยแคน และ คอลลาเจน [21] นอกจากนั้นยังพบว่า MMP-3
สามารถไปกระตุ้นเอนไซม์อื่นๆ เช่น MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9 และ MMP-13 ส่งผล
ไปเพิ่มกระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน ในการศึกษานี้พบว่า MMP-3 siRNA
สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-3 ได้ถึงร้อยละ 80 เมื่อพิจารณาถึงการสร้างสารโปรตี
โอกลัยแคนพบว่า ในกลุ่มที่ทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β แล้วได้รับ MMP-3 siRNA มีอัตรา
การสร้าง สาร GAG สูงกว่ากลุ่มควบคุม ร้อยละ 120 และ 143 เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไป 48 และ
72 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับการสร้าง HA นั้นพบว่า สูงกว่ากลุ่มควบคุม ร้อยละ 400 และ 600
เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไป 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ในส่วนของลักษณะทางกายภาพของ
เซลล์ พบว่า จะให้ผลแตกต่างเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย IL-1 β โดยพบว่า ร้อยละการมี
ชีวิตของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ MMP-3 siRNA สูงกว่ากลุ่มควบคุม ร้อยละ 20 และ 50 เมื่อทำการ
เลี้ยงเซลล์ไป 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ร้อยละการแบ่งเซลล์สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ร้อยละ
7 และ 14 เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไป 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับร้อยละการตายต่ำกว่า
กลุ่มควบคุม ร้อยละ 40 และ 50 เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไป 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ
สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า MMP-3 มีผลต่อการเจริญและการตายของเซลล์

กระดูกอ่อน [63, 64] ซึ่งจากผลต่างๆ แสดงให้เห็นว่า MMP-3 siRNA สามารถยับยั้งการทำงานของยีน MMP-3 ได้ ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญที่ดี และสร้างสารในกลุ่มโปรตีโอไกลัยแคนได้เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงยีนอื่นได้แก่ TIMP-3, AGG, HAS-1, HAS-2 และ COL2A1 พบว่า MMP-3 siRNA ไม่มีผลไปยับยั้งการทำงานของยีนอื่น แสดงให้เห็นว่า siRNA มีความจำเพาะต่อยีน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ที่รายงานไว้ว่า RNAi มีความจำเพาะต่อยีนของตัวเอง [65, 66]

บทที่ 7

เอกสารอ้างอิง

1. Firestein GS, Berger AE, Tracey DE, Chosay JG, Chapman DL, Paine MM, Yu C, Zvaifler NJ: **IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium.** *J Immunol* 1992, **149**:1054-1062.
2. Goto H, Shuler FD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH: **Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGFbeta(1) gene.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**:266-271.
3. Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, Tweats LM, Hawkins RE, Hardingham TE: **Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**:80-89.
4. Apparailly F, Verwaerde C, Jacquet C, Auriault C, Sany J, Jorgensen C: **Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis.** *J Immunol* 1998, **160**:5213-5220.
5. Lubberts E, Joosten LAB, Van-der-Bersselaar L, Helsen MMA, Bakker AC, Van-Meurs JBJ, Graham FL, Richards CD, Van-den-Berg WB: **Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction.** *J Immunol* 1999, **163**:4546-4556.
6. Whalen JD, Lechman EL, Carlos CA, Weiss K, Kovesdi I, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH: **Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws.** *J Immunol* 1999, **162**:3625-3632.
7. Guo WS, Ma L, Li ZR: **Suppression of articular cartilage breakdown in osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using ex vivo gene therapy.** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004, **84**:853-856.

8. Fernandes J, Tardif G, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Dupuis M, Moldovan F, Sheppard M, Krishnan R, Pelletier JP: **In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints.** *AJP* 1999, **154**:1159-1169.
9. Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier JP: **Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**:1535-1544.
10. Pelletier JP, Caron JP, Evans C, Robbins PD, Georgescu HI, Jovanovic D, Fernandes JC, Martel-Pelletier J: **In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**:1012-1019.
11. Campbell SE, Bennett D, Nasir L, Gault EA, Argyle DJ: **Disease- and cell-type-specific transcriptional targeting of vectors for osteoarthritis gene therapy: further development of a clinical canine model.** *Rheumatology* 2005, **44**:735-743.
12. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW: **Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene.** *Gene Ther* 2002, **9**:12-20.
13. Frisbie DD, McIlwraith DW: **Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis.** *Clin Orthop Relat Res* 2000, **379 Suppl**:S273-S287.
14. Diarello CA: **Biological basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* 1996, **87**:2095-2147.
15. Abramson SB, Amin A: **Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage.** *Rheumatology* 2002, **41**:972-980.
16. Rosenberg A: **Bones, joints and soft tissue tumors.** In *Robbins pathologic basis of disease*. 6 edition. Edited by Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pennsylvania: WB saunders; 1999: 1215-1268
17. Goldring MB: **The role of the chondrocyte in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**:1916-1926.

18. McIlwraith CW: **General pathobiology of the joint and response to injury.** In *Joint disease in the horse*. Edited by McIlwraith CW, Trotter GW. Philadelphia: WB saunders; 1996: 40-70
19. Okada Y: **Proteinases and matrix degradation.** In *Kelley's Textbook of rheumatology*. Edited by Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, Budd RC, Sargent JS. Philadelphia: WB sanders; 2001: 55-72
20. Nagase H, Okada Y: **Proteinases and matrix degradation.** In *Textbook of rheumatology*. Edited by Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. Philadelphia: WB saunders; 1997: 323-341
21. Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM: **The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**:388-397.
22. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**:455-461.
23. Singer II, Kawka DW, Bayne EK, Donatelli SA, Weidner JR, Williams HR, Ayala JM, Mumford RA, Lark MW, Glant TT: **VDIPEN, a metalloproteinase-generated neopeptide, is induced and immunolocalized in articular cartilage during inflammatory arthritis.** *J Clin Invest* 1995, **95**:2178-2186.
24. Nagase H: **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Bio Chem* 1997, **378**:151-160.
25. Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kaiser MJ, Jaspar JM, Damas P, Houssiau FA, Malaise MG: **Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment.** *Ann Rheum Dis* 2002, **61**:161-166.
26. Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, Keysser C, Keysser M, Gromnica-Ihle E, Franz J, Burmester GR, Jung K: **Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers.** *J Rheumatol* 1999, **26**:2281-2282.

27. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Greenwald RA, Gruber B, Tickle SP, Baker TS, Docherty AJ: **Elevated plasma stromelysin levels in arthritis.** *J Rheumatol* 1994, **21**:2329-2333.
28. Fire A: **RNA-triggered gene silencing.** *Trends Genet* 1999, **15**:358-363.
29. Kakar SS, Malik MT: **Suppression of lung cancer with siRNA targeting PTTG.** *Int J Oncol* 2006, **29**:387-395.
30. Leong CT, Ong CK, Tay SK, Huynh H: **Silencing expression of UO-44 (CUZD1) using small interfering RNA sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin in vitro.** *Oncogene* 2006, **Jul 24**: [Epub ahead of print]
31. Misquitta L, Paterson BM: **Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference: a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:1451-1456.
32. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS: **Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.** *Genes Dev* 2002, **16**:948-958.
33. Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT: **Inhibition of Trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters.** *J Biol Chem* 2000, **275**:40174-40179.
34. Svoboda P: **Long dsRNA and silent genes strike back: RNAi in mouse oocytes and early embryos.** *Cytogenet Genome Res* 2004, **105**:422-434.
35. **Nganvongpanit K, Tesfaye D, Müller H, Chomdej S, Gilles M, Schellander K: Targeted suppression of C-mos mRNA level during bovine oocyte maturation using RNA interference technology.** *Reproduction in Domestic Animal* 2005, **37**:40.
36. **Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Gilles M, Jennen D, Holker M, Tholen E, Schellander K, Tesfaye D: Targeted suppression of E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA.** *Mol Reprod Dev* 2006, **73**:153-163.
37. Tesfaye D, **Nganvongpanit K**, Rings F, Gilles M, Jennen D, Höelker M, Tholen E, Schellander K: **Targeted suppression of the expression of maternal and**

- embryonic genes during in vitro development of bovine embryos.** *Reproduction, Fertility and Development* 2006, **18**:241.
38. Morris KV, Rossi JJ: **Lentivirus-mediated RNA interference therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Hum Gene Ther* 2006, **17**:479-486.
 39. Morris KV, Rossi JJ: **Antiviral applications of RNAi.** *Curr Opin Mol Ther* 2006, **8**:115-121.
 40. Issa Z, Grant WN, Stasiuk S, Shoemaker CB: **Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*.** *Int J Parasitol* 2005, **35**:935-940.
 41. Simmons KJ, Nde PN, Kleshchenko YY, Lima MF, Villalta F: **Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks *Trypanosoma cruzi* infection.** *FEBS Lett* 2006, **580**:2365-2370.
 42. Takeshita F, Ochiya T: **Therapeutic potential of RNA interference against cancer.** *Cancer Sci* 2006, **97**:689-696.
 43. Zwicky R, Müntener K, Goldring MB, Baici A: **Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and antisense DNA in human chondrocytes.** *Biochem J* 2002, **367**:209-217.
 44. Lianxu C, Hongti J, Changlong Y: **NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**:367-376.
 45. Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P: **Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells.** *J Periodontal Res* 2003, **38**:115-121.
 46. Pavasant P, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Arksornnukit M: **The synergistic effect of TGF-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts** *Arch Oral Biol* 2003, **48**:717-722.
 47. Tiranathanagul S, Pattamapun K, Yongchaitrakul T, Pavasant P: **MMP-2 activation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* supernatant in human**

- PDL cells was corresponded with reduction of TIMP-2.** *Oral Dis* 2004, **10**:383-388.
48. Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, **Pattamapun K**, Pavasant P: **Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in human periodontal ligament cells.** *J Periodontol* 2004, **75**:1647-1654.
 49. Milhavet O, Gary DS, Mattson MP: **RNA interference in biology and medicine.** *Pharmacol Rev* 2003, **55**:629-648.
 50. **Nganvongpanit K**, Suwankong N, Jitpean S, **Ong-Chai S**: **The changes of serum chondroitin sulfate in the induced osteoarthritic dogs after chitosan polysulfate administration.** *J Thai Vet Pract* 2005, **17**:27-39.
 51. **Nganvongpanit K**, **Ong-Chai S**: **Biological marker for canine osteoarthritis diagnosis.** *Chiang Mai Vet J* 2004, **2**:39-49.
 52. **Nganvongpanit K**, **Ong-Chai S**: **Changes of serum chondroitin sulfate epitope in a canine cranial cruciate ligament transection model of osteoarthritis.** *Khon Khan Vet J* 2004, **14**:94-103.
 53. **Nganvongpanit K**, Itthiarbha A, **Kongtawelert P**, **Ong-Chai S**: **The Estimation of hip dysplasia in dogs using serum hyaluronan.** *J Thai Vet Pract* 2005, **17**:65-76.
 54. **Nganvongpanit K**, Itthiarbha A, **Kongtawelert P**, **Ong-Chai S**: **Comparative study of serum chondroitin sulfate WF6 and 3B3 epitope in serum of non and hip dysplastic dogs.** *J Thai Vet Med Assoc under Royal Patronage* 2005, **56**:1-12.
 55. **Nganvongpanit K**, Itthiarbha A, **Kongtawelert P**, **Ong-Chai S**: **Serum chondroitin sulfate of healthy dogs related to gender and weight.** *J Thai Vet Pract* 2004, **16**:37-49.
 56. **Nganvongpanit K**, Müller H, Rings F, Höelker M, Jennen D, Tholen E, Havlicek V, Bessenfelder U, Schellander K, Tesfaye D: **Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and**

- embryos using sequence specific double-stranded RNA.** *Reproduction in Domestic Animal* 2006, **131**:861-874.
57. Tesfaye D, Kadanga A, Rings F, Bauch F, Jennen D, **Nganvongpanit K**, Hölker M, Tholen E, Ponsuksili S, Wimmers K, et al: **The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and proteins of nitric oxide synthase gene during in vitro development of bovine pre-implantation embryos.** *Reproduction in Domestic Animal* 2006, **41**:501-509.
 58. van der Kraan PM, van den Berg WB: **Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000, **3**:205-211.
 59. Wolfe GC, MacNaul KL, Buechel FF, McDonnell J, Hoerrner LA, Lark MW, Moore VL, Hutchinson NI: **Differential in vivo expression of collagenase messenger RNA in synovium and cartilage. Quantitative comparison with stromelysin messenger RNA levels in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients and in two animal models of acute inflammatory arthritis.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**:1540-1547.
 60. Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA: **Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes.** *J Biol Chem* 1996, **271**:23577-23591.
 61. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, Sarfati M, Pelletier JP: **The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**:530-540.
 62. Mort JS, Dodge GR, Roughley PJ, Liu J, Finch SJ, DiPasquale G, Poole AR: **Direct evidence for active metalloproteinases mediating matrix degradation in interleukin 1-stimulated human articular cartilage.** *Matrix* 1993, **13**:95-102.
 63. Vu TH, Werb Z: **Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.** *Genes Dev* 2000, **14**:2123-2133.
 64. Boudreau N, Werb Z, Bissell M: **Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:3509-3513.

65. Nganvongpanit K, Müller H, Rings F, Hoelker M, Jennen D, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, Schellander K, Tesfaye D: **Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA.** *Reproduction* 2006, **131**:861-874.
66. Nganvongpanit K, Müller H, Rings F, Gilles M, Jennen D, Hölker M, Tholen E, Schellander K, Tesfaye D: **Targeted suppression of E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA.** *Mol Reprod Dev* 2006, **73**:153-163.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์

ตาราง ก.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของค่า ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	93.05±4.23	46.41±64.04	93.87±3.44	26.52±5.97
G.2	92.21±3.06	43.76±4.47	91.38±2.85	25.90±8.72
G.3	93.07±46.52	46.52±5.40	91.66±1.98	22.75±7.44
G.4	93.70±74.89	74.89±9.53	92.88±2.30	72.03±7.56

ตาราง ก.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของค่า การตายแบบ apoptosis ของเซลล์

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	2.28±1.71	63.39±11.43	4.62±1.72	70.73±5.02
G.2	2.20±1.78	68.13±4.97	3.81±1.73	71.25±5.27
G.3	2.16±2.02	70.82±4.36	4.50±1.90	72.70±6.79
G.4	2.00±1.41	18.18±6.49	3.89±1.67	22.30±8.89

ตาราง ก.3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของค่า การร้อยละการแบ่งเซลล์

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	9.42±2.43	1.36±0.90	16.22±7.62	0.85±0.30
G.2	7.98±1.90	1.84±1.01	17.61±4.52	0.99±0.45
G.3	7.12±1.72	1.57±0.73	18.19±5.33	0.93±0.49
G.4	9.87±1.88	7.37±2.25	17.38±5.56	14.50±4.52

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการสร้างโปรตีนโอกลัยแคน

ตาราง ข.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของระดับ HA (ng/ml)

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	121.04±23.03	48.54±12.85	146.04±11.93	35.29±8.54
G.2	138.55±37.00	56.05±26.07	141.05±28.63	22.80±7.44
G.3	104.38±20.61	39.88±20.72	122.63±15.99	21.63±8.65
G.4	213.40±62.52	191.15±42.96	258.40±20.94	212.90±11.76

ตาราง ข.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของระดับ GAG (µg/ml)

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	1.91±0.88	0.56±0.14	1.72±0.81	0.17±0.07
G.2	1.89±1.45	0.49±0.23	1.89±1.45	0.15±0.10
G.3	1.91±0.66	0.56±0.28	1.91±0.66	0.26±0.11
G.4	1.89±0.91	1.79±0.67	2.46±0.56	1.93±0.32

ภาคผนวก ค
ข้อมูลผลการแสดงออกของยีน

ตาราง ค.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของการแสดงออกของยีน MMP-3

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	0.98±0.07	2.03±0.23	1.56±0.18	2.94±0.19
G.2	0.92±0.10	2.12±0.12	1.44±0.15	2.93±0.13
G.3	1.01±0.12	2.14±0.18	1.60±0.21	3.00±0.17
G.4	0.22±0.05	0.40±0.08	0.33±0.10	0.47±0.20

ตาราง ค.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของการแสดงออกของยีน TIMP-3

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	1.01±0.03	0.57±0.21	1.35±0.09	0.34±0.06
G.2	1.03±0.09	0.60±0.08	1.13±0.21	0.32±0.13
G.3	1.01±0.12	0.50±0.11	1.08±0.19	0.47±0.11
G.4	0.82±0.14	0.70±0.26	0.89±0.15	0.56±0.14

ตาราง ค.3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของการแสดงออกของยีน AGG

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	1.01±0.06	0.43±0.18	1.35±0.10	0.17±0.03
G.2	1.06±0.10	0.55±0.10	1.32±0.18	0.16±0.14
G.3	0.96±0.15	0.47±0.16	1.21±0.23	0.18±0.11
G.4	0.92±0.21	0.40±0.12	1.40±0.13	0.14±0.07

ตาราง ค.4 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของการแสดงออกของยีน HAS-1

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	1.02±0.13	0.37±0.15	1.35±0.10	0.15±0.07
G.2	1.07±0.12	0.38±0.09	1.32±0.18	0.12±0.09
G.3	1.02±0.13	0.33±0.06	1.21±0.23	0.15±0.08
G.4	1.18±0.11	0.42±0.13	1.40±0.13	0.17±0.05

ตาราง ค.5 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของการแสดงออกของยีน HAS-2

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	1.02±0.11	0.10±0.04	1.18±0.12	0.05±0.04
G.2	1.05±0.10	0.10±0.03	1.19±0.09	0.01±0.01
G.3	1.04±0.16	0.09±0.05	1.18±0.19	0.05±0.05
G.4	1.13±0.19	0.52±0.11	1.29±0.14	0.17±0.03

ตาราง ค.6 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน ของการแสดงออกของยีน COL2A1

Group	48 h		72 h	
	Non-IL1	IL-1	Non-IL1	IL-1
G.1	1.02±0.11	0.15±0.10	1.48±0.14	0.03±0.08
G.2	1.08±0.22	0.11±0.08	1.61±0.12	0.05±0.05
G.3	0.97±0.16	0.15±0.06	1.49±0.16	0.07±0.05
G.4	1.13±0.11	0.14±0.07	1.51±0.14	0.12±0.07

ภาคผนวก ง

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

การนำเสนอภาคบรรยาย

1. “แนวทางการรักษาโรคข้อเสื่อมในอนาคต” สัมมนาโรคข้อในสุนัข เรื่อง ยาปกป้องกระดูกอ่อนผิวข้อกับโรคข้อเสื่อม วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2551 โดย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. “ผลการยับยั้งการทำงานของยีนแมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส 3 ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพและการสร้างสารกลัยโคซามิโนไกลแคนในเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ”. การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2551 โดย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 7-8 สิงหาคม 2551
3. “โรคข้อเสื่อม การวินิจฉัย และการจัดการ” ในงานประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เลี้ยง ครั้งที่ 14 โดยสมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย ในระหว่างวันที่ 27-30 เมษายน 2551 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

การนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์

1. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ ปฐมา เช้าเชิด ปณิตตา เสียงดี สิริวดี ชมเดช ปรัชญา คงทวีเลิศ. **ผลการยับยั้งการทำงานของยีนแมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส 3 ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพและการสร้างสารกลัยโคซามิโนไกลแคนในเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ**. การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ โดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 7-8 สิงหาคม 2551

การตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

1. Nganvongpanit K, Ashraf El-Sayed, Nguyen T. Ngu. **Microarray and RNA Interference: the Tools to Understand Gene Expression in Preimplantation Embryo Development**. Chiang Mai Journal of Science 2007;**34** (3) 367-388.
2. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ ปฐมา เช้าเชิด ปณิตตา เสียงดี สิริวดี ชมเดช ปรัชญา คงทวีเลิศ. **ผลการยับยั้งการทำงานของยีนแมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส 3 ที่มีต่อลักษณะทางกายภาพและการสร้างสารกลัยโคซามิโนไกลแคนในเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ**. เชียงใหม่ สัตวแพทยสาร 2551;6(1) 85-88

อยู่ในระหว่างการพิจารณา

1. Nganvongpanit K., Chaochird P., Siengdee P., Pothacharoen P., Chomdej S., Kongtaweelert P. In vitro suppressions MMP-3 gene in normal and cytokine-treated human chondrosarcoma using small interfering RNA. Submitted to Journal of Orthopaedic Surgery and Research