



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียว
ร่วมกับยีน LC3B

(Establishment of LLC-MK₂ stable cell expressing LC3B-GFP gene)

โดย

นสภ. ณิชนันท์

นุ่นสังข์

รหัส 57210176

นสภ. ธณัฐฐา

แรกเจริญ

รหัส 57210179

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียว
ร่วมกับยีน LC3B

(Establishment of LLC-MK₂ stable cell expressing LC3B-GFP gene)

โดย

นสภ. ณิชนันท์	นุ่นสังข์	รหัส	57210176
นสภ. ธณัฐฐา	แรกเจริญ	รหัส	57210179

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

กระบวนการ autophagy พบได้ในเซลล์ eukaryote ทุกชนิด เป็นกระบวนการการกลืนกินตัวเองของเซลล์เมื่อเกิดสภาวะอดอาหาร ภาวะเครียด การติดเชื้อไวรัส การติดเชื้อแบคทีเรีย ออแกเนลเสียหาย รวมถึงการเกิดโรคมะเร็งและโรคต่างๆ สามารถเกิดได้ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง กระบวนการ autophagy มีส่วนสำคัญในการควบคุมระบบภายในร่างกาย เมื่อเกิดกระบวนการดังกล่าว เซลล์จะถูกย่อยสลายหรือถูกทำลายไป จะเห็นได้ว่ากระบวนการ autophagy มีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ในสภาวะต่างๆ ในโรคมะเร็ง

จากความสำคัญของกระบวนการ autophagy ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะสร้างเซลล์ต้นแบบที่สามารถนำไปทดสอบหายาด้านมะเร็งที่เป็น autophagy modulator ทั้ง autophagy inducer และ inhibitor โดยใช้ยีน LC3B ที่ติดร่วมกับสารเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein; GFP) เป็น marker ในการติดตาม การใช้ยีน LC3B เป็น marker ในการติดตามกระบวนการ autophagy เนื่องจาก LC3B เป็นโปรตีนที่พบได้ในเยื่อหุ้มของ autophagosome โดยจะพบ LC3B กระจายทั่วไปใน cytoplasm และ nucleolus พบว่า LC3B สร้างจาก proLC3B โดยมีเอนไซม์ Atg4 ช่วยในการเปลี่ยนเป็น LC3B-I ซึ่งอยู่ในรูป free form เมื่อเกิดการสร้าง autophagosome จะมีเอนไซม์ Atg7 และ Atg3 กระตุ้นให้ LC3B-I เกิดการ conjugated รวมกับ phosphatidylethanolamin (PE) ได้เป็น LC3B-II สามารถพบได้ทั้งในและนอกเยื่อหุ้มเซลล์ของ autophagosome ดังนั้นการพบ LC3B-II จึงใช้เป็น marker ในการบ่งบอกการเกิดกระบวนการ autophagy ได้

ผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับ ยีน LC3B

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | | |
|------------------|-----------|------|----------|
| 1. นสภ. ณิชนันท์ | นุ่นสังข์ | รหัส | 57210176 |
| 2. นสภ. ธณัฐฐา | แรกเจริญ | รหัส | 57210179 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.ดร.วิภาวรรณ ศิริกุลพาณิชย์ (ที่ปรึกษาหลัก)

บทคัดย่อ

กระบวนการ autophagy มีความสำคัญในโรคหลายชนิด รวมถึงโรคมะเร็ง ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับ ยีน LC3B โดยทำการคัดเลือกเซลล์ด้วย G418 โดยพบการแสดงออกของเซลล์ถึงร้อยละ 100 ภายใต้การสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และผลการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B พบว่าทั้งจำนวนเซลล์ ระดับความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียว และปริมาณของ RNA copy ของ LC3B เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง autophagy marker คือการหาอัตราส่วนของ LC3B-II/LC3B-I พบว่ามีอัตราส่วนที่สูงในสภาวะปกติ และมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 5 และ 7 นอกจากนี้ยังพบ GFP/LC3B puncta ในเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์เป็น autophagy modulator ได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2018

: Establishment of LLC-MK₂ stable cell expressing LC3B-GFP gene

By

1.Miss. Nichanan Nunsung ID 57210176

2.Miss.Tanutta Rakjaroen ID 57210179

Advisor:

1. Assoc. Prof. Dr. Wipawan Sirigulpanit

Abstract

Autophagy is a key process in many diseases including cancer. This study aimed to generate a stable cell line containing a green fluorescent and microtubule-associated protein light chain 3 gene (GFP/LC3B) for a cell-based model. Stably transfected clones were selected by G418 screening. Fluorescent microscopy demonstrated the expression rates of GFP reached to 100%. Results indicate that a stable of LLC-MK₂ (GFP/LC3B) cell line has significantly increased cell number, GFP intensity and RNA copy of LC3B at 24, 48 and 72 hours. Autophagy marker is measured as a ratio of LC3B-II/LC3B-I which are active in basal conditions and potential increased after 5 and 7 days and GFP/LC3B puncta also has been found in a stable of LLC-MK₂ (GFP/LC3B) cell line. This study indicated that this LLC-MK₂ (GFP/LC3B) cell line is available and can be applied as a screening test for autophagy modulator

Major Advisor.....

สารบัญ

คำนำ.....	๗
บทคัดย่อ.....	๘
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์	2
กรอบแนวคิดงานวิจัย	2
สมมติฐาน	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. กระบวนการ Autophagy	4
2. LC3B และสารเรืองแสงสีเขียว (GFP).....	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	10
1. การสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK ₂	10
2. การทดสอบคุณลักษณะของ LLC-MK ₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B.....	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
1. การคัดเลือกเซลล์ LLC-MK ₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP ร่วมกับยีน LC3B	13
2. การทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ LLC-MK ₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP ร่วมกับ LC3B ...	14
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	24

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงตำแหน่งของ LC3s แต่ละชนิด	7
2	แสดงการเกิดกระบวนการของ LC3	7
3	เซลล์ LLC-MK ₂ ที่มีการแสดงออกของยีน LC3B ร่วมกับ GFP ที่ถูกคัดเลือกด้วย G418 (neomycin)	13
4A	A1) แสดงจำนวนเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง; A2) แสดงจำนวนเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง; และ A3) แสดงจำนวนเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง	14
4B	กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ LLC-MK ₂ ที่มีการแสดงออกของยีน LC3B ร่วมกับ GFP ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	14
4C	กราฟแสดงความเข้มของ GFP ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	14
5	แสดง DNA ของ LC3B ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Gel electrophoresis	15
6	กราฟแสดงปริมาณของ DNA ของ LC3B ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี RT-PCR	15
7	แสดงโปรตีน LC3B ด้วยวิธี Western blot	16
8	กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่าง LC3B-II ต่อ LC3B-I ที่เกิดขึ้นของเซลล์ LLC-MK ₂ ที่มีการแสดงออกของยีน LC3B ร่วมกับ GFP ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 72	16
9	แสดงตำแหน่งของยีน LC3B ในเซลล์ LLC-MK ₂	17

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กระบวนการ autophagy พบได้ในเซลล์ eukaryote ทุกชนิด เป็นกระบวนการการกลืนกินตัวเองของเซลล์เมื่อเกิดสภาวะอดอาหาร, ภาวะเครียด, การติดเชื้อไวรัส, การติดเชื้อแบคทีเรีย, ออร์กาเนลเสียหาย รวมถึงการเกิดโรคเมะเร็งและโรคต่างๆ สามารถเกิดได้ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง กระบวนการ autophagy มีส่วนสำคัญในการควบคุมระบบภายในร่างกาย โดยมีขั้นตอน ดังนี้ 1. initiation 2. nucleation 3. elongation และ completion 4. docking และ fusion 5. degradation และ recycling โดยเมื่อเกิดกระบวนการดังกล่าว เซลล์จะถูกย่อยสลายหรือถูกทำลายไป โดย pathway ที่เกี่ยวข้อง คือ PI3K/Akt pa, MAPK และ p53 pathway ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการ autophagy มีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ในสภาวะต่างๆ

กระบวนการ autophagy มีความเกี่ยวข้องกับโรคเมะเร็งผ่าน Beclin 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ autophagy และทำหน้าที่เป็น tumor suppressor protein และ ส่วน tumor suppressor protein อื่นๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ autophagy คือ p53, Bcl2 และ PTEN ดังนั้นถ้าการเกิด autophagy ลดลงจะทำให้เกิด tumor progression และมีหลายการศึกษาที่บ่งบอกว่า autophagy เป็นทั้งการปกป้องตัวเองของเซลล์ (cell protective) และเกี่ยวกับการตายของเซลล์ (apoptosis)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะสร้างเซลล์ต้นแบบที่สามารถนำไปทดสอบหายาด้านมะเร็งที่ควบคุม autophagy (autophagy modulator) ทั้ง autophagy inducer และ inhibitor โดยใช้ยีน LC3B ที่ติดร่วมนับสารเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein; GFP) เป็น marker ในการติดตามกระบวนการ autophagy โดย LC3B เป็นโปรตีนที่พบได้ในเยื่อหุ้มของ autophagosome โดยจะพบ LC3B กระจายทั่วไปใน cytoplasm และ nucleolus โดยพบว่า LC3B สร้างจาก proLC3B โดยมีเอนไซม์ Atg4 ช่วยในการเปลี่ยนเป็น LC3B-I ซึ่งอยู่ในรูป free form เมื่อเกิดการสร้าง autophagosome จะมีเอนไซม์ Atg7 และ Atg3 กระตุ้นให้ LC3B-I เกิดการ conjugated รวมกับ

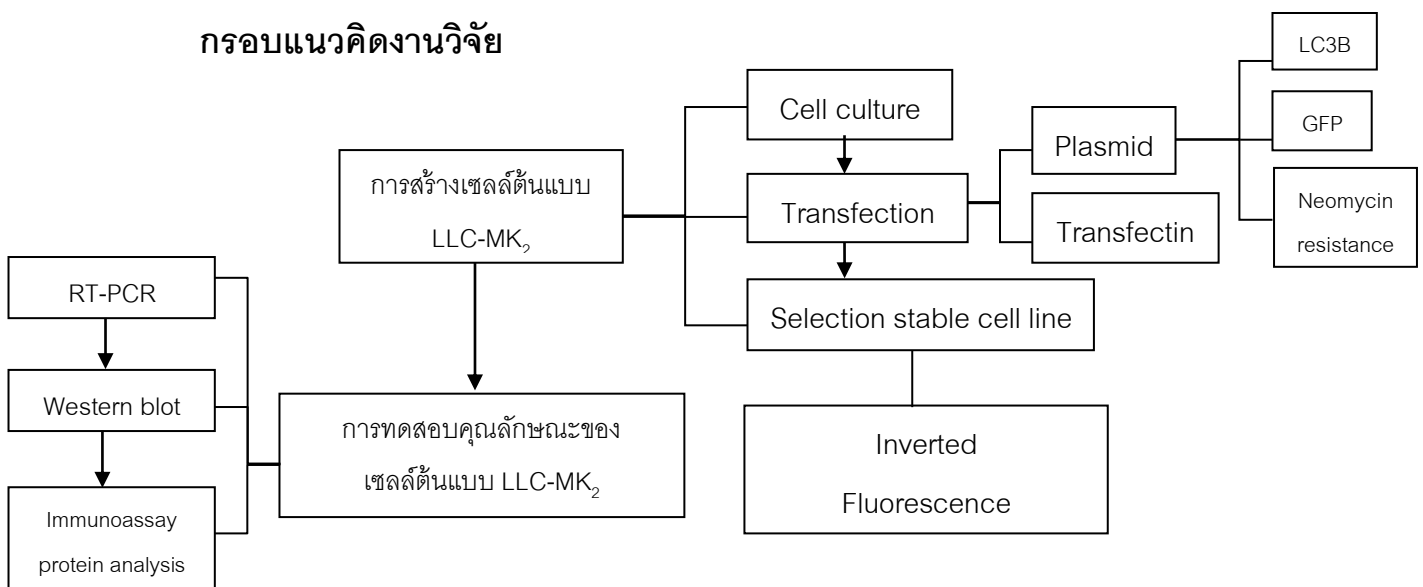
phosphatidylethanolamine (PE) ได้เป็น LC3B-II ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในและนอกเยื่อหุ้มเซลล์ของ autophagosome ดังนั้นการพบ LC3B-II จึงใช้เป็น marker ในการบ่งบอกการเกิดกระบวนการ autophagy ได้

โดยเซลล์ที่นำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B คือ เซลล์ LLC-MK₂ เป็นเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไตของลิง *Macaca mulatta* โดยเป็นเซลล์ปกติ ไม่มีภาวะหรือโรคต่างๆ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ โดยจะนำยีน LC3B มาติดร่วมกับสารเรืองแสงสีเขียว (GFP) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ LLC-MK₂ โดยใช้วิธี transfection แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของยีน LC3B-GFP โดยใช้ neomycin (G418) เป็นตัวคัดเลือก จากนั้นจะทำการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของยีน LC3B-GFP ที่สร้างขึ้นมาได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B
2. ทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B

กรอบแนวคิดงานวิจัย



สมมติฐาน

สามารถสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B ได้และมีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B อย่างถาวร (stable cell line)

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. LC3B คือ โปรตีนที่พบได้ในเยื่อหุ้มของ autophagosome ในกระบวนการ autophagy
2. GFP คือ สารเรืองแสงสีเขียว ใช้ในการติดตามผลการทดลอง โดยดูจาก fluorescence microscopy
3. Autophagy คือ กระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์เมื่อเกิดสภาวะขาดอาหาร, ภาวะเครียดการติดเชื้อ, ออกแกนเสียหาย รวมถึงโรคมะเร็ง
4. Transfection คือ การถ่ายโอนสารพันธุกรรมรูปแบบหนึ่งจากภายนอกเข้าสู่เซลล์
5. Neomycin resistance คือ ยีนที่ใส่ลงไปในพลาสมิดเพื่อสามารถต้านทานฤทธิ์ neomycin ได้
6. G418 คือ อนุพันธ์ของ neomycin ที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ต้นแบบ
7. Reverse transcription คือ กระบวนการย้อนการถอดรหัสจาก mRNA เป็น cDNA
8. PCR (polymerase chain reaction) คือ กระบวนการเพิ่มจำนวนของ DNA
9. Immunoassay protein analysis คือ การวิเคราะห์โปรตีนที่ตรวจสอบจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B ได้
2. สามารถทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวร่วมกับยีน LC3B ได้

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. กระบวนการ Autophagy

เป็นกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์เมื่อเกิดสภาวะขาดอาหาร ภาวะเครียด การติดเชื้อออร์กาเนลเสียหาย รวมถึงมะเร็ง autophagy สามารถเกิดได้ในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งโดยกระบวนการมีดังนี้

Initiation และ Nucleation ของ autophagy คือ มีการสร้างของ phagophore ประกอบด้วย protein complex 2 แบบได้แก่ class III PI3K/Vps34, Atg6/Beclin1, Atg14 และ Vps15/p150.73 และ serine/threonine kinase Atg1/ULK1 เป็นตัวควบคุมสำคัญในการเกิด autophagosome ในขั้น Elongation และ Completion มีการสร้าง double membrane autophagosome ขั้นตอนนี้ต้องการ two ubiquitin และ Atg7 เมื่อสร้าง autophagosome ให้สมบูรณ์ ในขั้นเกิดการ Fusion จะมีการรวมตัวระหว่าง autophagosome และ lysosome ได้เป็น autolysosome หลัง Fusion มีการย่อยสลายโดย acid hydrolases เรียกว่ากระบวนการ degradation ได้โมเลกุลเล็กๆที่เกิดจากการย่อย โดยเฉพาะกรดอะมิโนจะถูกส่งกลับไปที่ cytosol เพื่อสังเคราะห์โปรตีนและควบคุม cellular function ภายใต้สภาวะอดอาหาร เรียกว่ากระบวนการ Recycling (1)

1.1. Pathway ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ Autophagy

1.1.1. PI3K/Akt Pathway (2)

PI3K/Akt จะส่งสัญญาณไปกระตุ้น mTOR เกิดเป็น PI3K-Akt-mTOR pathway พบมากในมะเร็งเต้านม มะเร็งปอดและมะเร็งต่อมลูกหมาก การกระตุ้น pathway นี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของหนึ่งในสามส่วนประกอบที่สำคัญ คือ PI3K, Akt และ mTOR

การกระตุ้น pathway นี้ให้เพิ่มขึ้นมักเกี่ยวข้องกับ tumor progression และการต่อต้านในการรักษาโรคมะเร็ง PI3K แบ่งเป็น 3 ประเภท ซึ่งแต่ละตัวมีความจำเพาะเจาะจงในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดและจำเพาะต่อกลไกการทำงาน class I_APIK3 เป็นประเภทที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งมากที่สุด ใน 3 ประเภท class I_API3K ยังมี isoform อีก 4 แบบ คือ PI3K-alpha, PI3K-beta, PI3K-gamma และ PI3K-delta มีหน้าที่แตกต่างกัน การเกิด mutation ของ PIK3-alpha ได้รับการวินิจฉัยว่าทำให้เกิด

โรคมะเร็งได้หลากหลาย การเกิด mutation นี้ทำให้มีการเพิ่มของ Kinase การเกิด mutation ใน PI3KCA (gene coding for PI3K-alpha) สามารถพบในมะเร็งหลายรูปแบบ ซึ่ง PI3KCA ทำให้เกิดเนื้องอกมากที่สุด

การยับยั้ง PI3K อาจขัดขวางการเจริญของเนื้องอก โดยกระตุ้นจาก RTKs ทำให้ PTEN สูญเสียการทำงาน ซึ่งการยับยั้งอาจจะใช้ adenosine 5'-triphosphate (ATP)-competitive pan-PI3K selective inhibitor และ isoform-specific PI3K inhibitors

Akt เป็นตัวกระตุ้น protein kinase พบได้บ่อยที่สุดในคนที่เป็นโรคมะเร็ง โดยการกระตุ้น Akt มากไปอาจทำให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตผิดปกติและมีการต่อต้าน apoptosis

1.1.2. MAPK Pathway (3)

MAPK pathway มีการส่งสัญญาณที่สำคัญและเกิด phosphorylation ที่มีส่วนทำให้เกิดการสร้างเนื้องอกมะเร็ง การกระตุ้น kinase จะส่งสัญญาณให้ภายนอกเซลล์ที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK (RAS-MAPK) pathway ซึ่งมีรายงานว่า จากการกระตุ้นที่ผิดปกติของ receptor tyrosine kinase หรือ mutation ใน RAS หรือ RAF gene พบในคนที่เป็นโรคมะเร็ง

1.1.3. p53 Pathway (4)

p53 มีบทบาทสำคัญในการตรวจจับ genotoxic แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้น p53 สามารถยับยั้งการทำงานของ mTOR ได้และควบคุม downstream target ได้แก่ autophagy และการยับยั้งการเกิดเนื้องอก

1.2. Autophagy ในเซลล์มะเร็ง (5),(6)

autophagy ในมะเร็งมีความซับซ้อนและอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและภาวะของเนื้องอก กระบวนการ autophagy ป้องกันการเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยกระบวนการ clearing reactive oxygen species (ROS) ซึ่งช่วยกำจัดความผิดปกติของออร์แกเนลล์และช่วยลด DNA damage อย่างไรก็ตามเซลล์มะเร็งใช้ประโยชน์จากกระบวนการเกิด autophagy เพื่อเอาตัวรอดจากสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดและสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยได้ ดังนั้นกระบวนการ autophagy สามารถส่งเสริมกระบวนการการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การสร้างสารอาหาร และการปรับตัวเพื่อตอบสนองของกระบวนการอักเสบใน

เซลล์มะเร็งได้ โดยการศึกษาพบว่า ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งตับอ่อนและมะเร็งปอด ใช้กระบวนการ autophagy ในการเจริญเติบโต ซึ่งเซลล์มะเร็ง มีความต้องการกระบวนการเผาผลาญอาหารเพื่อนำมาใช้ในการเจริญเติบโตโดยการกระตุ้นการเกิด autophagy และยับยั้งการเกิด apoptosis ที่เกิดจาก mitochondrial malfunction และการสร้าง reactive oxygen species (ROS)

การศึกษาค้นคว้าความต้านทานของเซลล์มะเร็งต่อการรักษาด้วย radiotherapy และ chemotherapy มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิด autophagy ยิ่งกว่านั้นพบว่าการศึกษาที่ใช้ animal model ที่เกี่ยวกับเนื้องอก การยับยั้งการเกิด autophagy มีผลทำให้เพิ่ม chemosensitivity และเป็น tumor suppression

จากการศึกษานี้ทำให้มีการพัฒนายาที่สามารถยับยั้งการเกิด autophagy อย่างเช่น chloroquine และอนุพันธ์ต่างๆ โดยสรุปกระบวนการเกิด autophagy สามารถเป็นได้ทั้ง tumor suppression และ tumor promotion

1.2.1. บทบาทของ Autophagy ในการเป็น tumor suppressor (7)

Autophagy ในการเป็น tumor suppressor มีความเกี่ยวข้องกับยีนสำคัญ คือ ATG6/Beclin 1 ซึ่งพบได้ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม และมะเร็งรังไข่ โดยการก่การทำงานของกระบวนการ autophagy, กระตุ้นเซลล์มะเร็งให้เจริญเติบโต, การเกิด mutation ของ Beclin 1 ในหนู จะมีแนวโน้มพัฒนาเป็นมะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง

1.2.2. บทบาทของ Autophagy ในการเป็น tumor promotion (3)

เซลล์มะเร็งพึ่งพากระบวนการ autophagy ในหลายๆกรณี มากกว่าเซลล์ปกติและเนื้อเยื่อปกติในสภาวะทั่วไป autophagy จะเพิ่มขึ้นในภาวะ starvation, stress, hypoxia และภาวะอื่นๆ จึงมีความจำเป็นในการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง ทั้งการเจริญเติบโต การมีชีวิตรอด ขบวนการเกิดเนื้องอก การลุกลาม (invasive) และการแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น (metastasis)

2. LC3B และสารเรืองแสงสีเขียว (GFP)

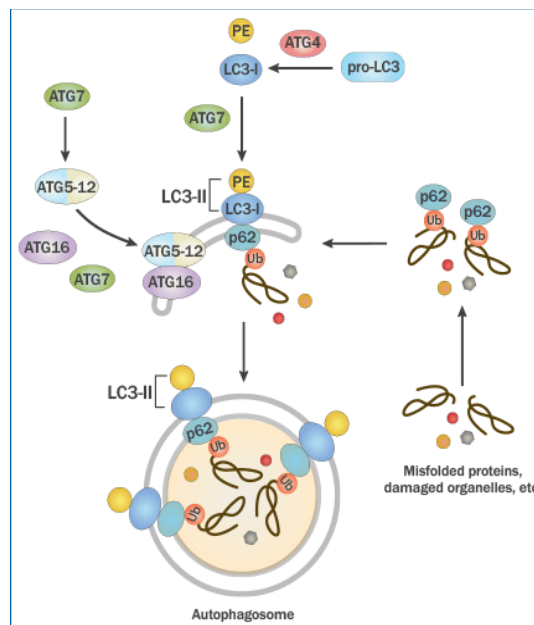
2.1. LC3s (8)

Microtubule-associated protein light chain 3 (MAP1-LC3 หรือ LC3) ในมนุษย์พบใน LC3 อยู่ 3 ชนิด ได้แก่ LC3A, LC3B และ LC3C โดยตำแหน่งที่พบของแต่ละชนิดมีดังนี้

	Cytoplasmic		Nuclear	
	Homogeneous	Perinuclear	Nuclear	Nucleolar
LC3A		+	+	
LC3B	+			+
LC3C	+		+	

รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของ LC3s แต่ละชนิด (8)

จากการศึกษาของ Koukourakis MI และคณะ (8) พบว่า LC3A และ LC3B มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ autophagy ซึ่งสามารถพบได้ในทุกเซลล์เมื่อเกิดสภาวะเครียด ทำให้สามารถใช้ประเมิน autophagic flux ได้ LC3B สร้างจาก proLC3B โดยมีเอนไซม์ Atg4 ช่วยในการเปลี่ยนเป็น LC3B-I ซึ่งอยู่ในรูป free form เมื่อเกิดการสร้าง autophagosome จะมีเอนไซม์ Atg7 และ Atg3 กระตุ้นให้ LC3B-I เกิดการ conjugated รวมกับ PE ได้เป็น LC3B-II สามารถพบได้ทั้งในและนอกเยื่อหุ้มเซลล์ของ autophagosome ดังนั้นการพบ LC3B-II จึงใช้เป็น marker ในการบ่งบอกการเกิดกระบวนการ autophagy



รูปที่ 2 แสดงการเกิดกระบวนการของ LC3 (9)

นอกจาก LC3B ที่ใช้เป็น autophagy marker แล้ว โปรตีน p62 ที่ เป็น autophagy substrate ก็ใช้เป็นตัวบอก autophagy activity ได้เช่นกัน โดย p62 เป็นตัวขนส่ง ubiquitinated protein เช่น proteasome สำหรับกระบวนการ degradation นอกจากนี้ยังสามารถเป็นตัวขนส่งระหว่าง nucleus และ cytoplasm เพื่อไปจับกับ ubiquitinated cargoes (6) สำหรับ autophagy degradation ผ่านทาง c-terminal UBA domain หรือ LIR domain และ PB1 domain ดังนั้นการกระตุ้นการเกิด autophagy ทำให้ลดการแสดงออกของ p62 และการยับยั้งการเกิด autophagy ทำให้เพิ่มระดับของ p62 แม้ว่า p62 ไม่มีความจำเป็นในกระบวนการของ autophagosome formation ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะอดอาหาร แต่บางเซลล์ที่มีการแสดงออกของ p62 มากเกินไป ทำให้เกิด protein aggregation และมีผลในการมีชีวิตรอดของเซลล์ นอกจากนี้การเกิด deletion p62 มีผลให้การสร้างของ LC3B-II, aggresome และ autophagosome ในสภาวะปกติและสภาวะเครียดนั้นไม่สมบูรณ์ มีผลทำให้เซลล์ตาย ในทางกลับกันการเกิด silencing p62 มีผลกระตุ้นการเกิด autophagy โดยการเพิ่มอัตราของการเปลี่ยน LC3B-I เป็น LC3B-II (10)

2.2. Green fluorescent protein (GFP)

Green fluorescent protein (GFP) เป็นโปรตีนของสารเรืองแสงสีเขียวที่ได้มาจากแมงกะพรุน มีลักษณะเป็น polypeptide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 ตัว เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า beta can ซึ่งสามารถเรืองแสงได้และยังสามารถเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นแสงที่ปล่อยออกมาได้ โดย GFP ดูดแสงจากรังสี UV และแสงสีฟ้าจะปลดปล่อยแสงสีเขียวออกมา หนึ่งในคุณสมบัติที่น่าสนใจของ GFP คือไม่จำเป็นต้องมีปัจจัยเพิ่มเติม อธิบายได้ว่ารูปแบบ fluorophore เกิดจากการปรับเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่า GFP จากแมงกะพรุนจะเรืองแสงเมื่อแสดงออกในสิ่งมีชีวิตอื่น ดังนั้นจึงไม่ต้องมีองค์ประกอบอื่นเพิ่มเติมคุณสมบัติหลายอย่างของ GFP ทำให้ใช้เป็น marker ทางชีวภาพ เนื่องจากการเรืองแสงอาศัยการแสดงออกของยีนโดยใช้ GFP ค่อนข้างไม่เป็นอันตราย (11) GFP มีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวติดตามหรือตรวจสอบกระบวนการต่างๆ ทั้ง physiological processes, visualizing protein localization และ detecting transgenic expression *in vivo* (12) นอกจากนี้ GFP ยังมีประโยชน์ในการหาตำแหน่งย่อยของ subcellular ของโปรตีนที่น่าสนใจ และ GFP ยังสามารถระบุถึงการมีไวรัสและจุลินทรีย์ได้อีก

ด้วย ปัจจุบันได้มีการผลิตโปรตีนที่ผสม GFP ซึ่งทำให้เกิดการเรืองแสงของ GFP เพื่อใช้ทางชีวภาพที่เจาะจง (11)

3. เซลล์ LLC-MK₂ (13)

LLC-MK₂ เป็นเยื่อปฐพีที่พบเมื่อปี ค.ศ. 1950 จากการเตรียมเนื้อเยื่อไตที่ผ่าตัดออกมาจากลิง *Macaca mulatta* จำนวน 6 ตัว LLC-MK₂ ประกอบด้วย protease plasminogen ที่เกี่ยวข้องกับไต ที่ปกติจะเริ่มกระบวนการ fibrinolysis โดยการแปลง plasminogen เป็น plasmin โดยที่เซลล์ LLC-MK₂ มีความอ่อนแอต่อ poliovirus และให้ผล negative สำหรับการทำ reverse transcription แสดงให้เห็นว่ามีจีโนมของ retrovirus ที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงนิยมนำเซลล์ LLC-MK₂ มาทดสอบโดยวิธี transfection มีการใช้นำเซลล์ LLC-MK₂ ในการผลิตวัคซีนคางทูม, ใช้ในการแยก para-influenza virus และได้มีการนำมาใช้ทางวิทยาศาสตร์หลายด้าน (14)

4. Stable cell line models

มีหลายวิธีในการสร้าง stable cell line ขึ้นอยู่กับประเภทของการแสดงออกของยีน (Expression) ที่เราสนใจว่าเป็นแบบ ยีนถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นบางสภาวะ (inducible) หรือ ยีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นตลอดเวลา (constitutive) โดยมี protocol ดังนี้ นำโปรตีนที่สนใจไปโคลนกับสารเรืองแสงชนิดต่างๆ เช่น EGFP, EFYP และ ECFP เป็นต้น การแสดงออกของโปรตีนที่อยู่ในเซลล์จะใช้วิธี transfection ที่แตกต่างกันแต่ละ model ในขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์จะใช้ antibiotic ที่แตกต่างกัน เช่น neomycin, puromycin เป็นต้น โดยปัจจุบันพบการสร้าง stable cell line model ที่มีการแสดงออกของ LC3B ร่วมกับโปรตีนเรืองแสงชนิดต่างๆ (15)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂

1.1 Cell culture

การเพาะเลี้ยงเซลล์ LLC-MK₂ ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM(sigma-Aldrich,USA), 10% FBS (sigma-Aldrich,USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ เปลี่ยน medium ทุก 3-4 วัน (16)

1.2 Transfection

นำเซลล์ LLC-MK₂ ใน 24-well plate มีการกระจายเซลล์ (confluent) ที่ 80-90% มาใช้ในการ transfection โดยนำพลาสมิด GFP-LC3B ที่ได้มา นำเข้าสู่เซลล์ LLC-MK₂ (transfect) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำพลาสมิด GFP-LC3B มาผสมกับ serum-free medium นำไป incubate 15 นาที ณ อุณหภูมิห้อง (ห้าม vortex) โดยสารบรรจุอยู่ใน eppendorf tube (A) และ eppendorf tube (B) มีส่วนผสมของ serum-free medium กับ lipofectamine (sigma-Aldrich, USA) ซึ่งเป็น transfectin นำ eppendorf tube (A) ผสมลงใน eppendorf tube (B) แล้วนำไป vortex นำสารที่ผสมแล้วใน eppendorf tube ใส่ลงใน LLC-MK₂ ใน 24-well plate หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบ plate โดยใช้ fluorescence microscopy ทุก 24 ชั่วโมง (18)

1.3 การคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B

1.3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B นำเซลล์ที่มีการ transfect แล้ว จาก 1.2 มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม 10% FBS และ G418 (0.15-1.5 mg/ml) (sigma-Aldrich, USA) ใน 24-well plated โดยมีการสังเกตสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทุกวัน นานประมาณ 1-2 สัปดาห์ (ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือเซลล์ที่ไม่มี GFP ต้องตายขณะที่เซลล์ที่มี GFP ต้องสามารถเพิ่มจำนวนได้และพบมากกว่า 95-100 %)

1.3.2 นำเซลล์ที่มีการ transfect แล้ว จาก 1.2 เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ opti-MEM(sigma-Aldrich,USA) ที่มีการเติม 20% FBS และ G418 (ความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบ 1.3.1) ใน 24-well plated โดยมีการสังเกตสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรส

เซนต์ทุกๆ วัน นานประมาณ 4-5 สัปดาห์ และต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน และเมื่อพบว่าเซลล์มีการแสดงสารเรืองแสงสีเขียวมากกว่า 90% จะทำการ trypsinized เซลล์นั้นและย้ายมาเลี้ยงใน 24-well plated โดยมีการสังเกตสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทุกๆ วัน เมื่อพบว่าเซลล์มีการแสดงสารเรืองแสงสีเขียวมากกว่า 95% จะทำการ trypsinized เซลล์นั้นและย้ายมาเลี้ยงใน 96-well plated โดยมีการสังเกตสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทุกๆ วัน เมื่อพบว่าเซลล์มีการแสดงสารเรืองแสงสีเขียวมากกว่า 100% จะทำการ trypsinized เซลล์นั้นและทำการแช่แข็งเซลล์ด้วย 5% DMSO highly purity grade (sigma-Aldrich,USA)

2. การทดสอบคุณลักษณะของ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B

2.1 วิเคราะห์จำนวน LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B และความเข้มของ GFP

นำเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B จาก 1.3.2. มาเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม 10% FBS ที่ 37 °C ในตู้ 5% CO₂ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และใช้โปรแกรม NIS-Elements D 4.50.00 64 bit Nikon Instrument inc., USA เพื่อวิเคราะห์จำนวน LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B และความเข้มของ GFP

2.2 การหาปริมาณ LC3B ด้วยวิธี two step RT-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

นำเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B จาก 1.3.2. มาเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีการเติม 10% FBS ที่ 37 °C ในตู้ 5% CO₂ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการสกัด RNA ด้วย RNA extraction kit (Qiagen, USA) และหาปริมาณ RNA ด้วย RT-PCR โดยมีวิธีพอสังเขปดังนี้ ใช้ total RNA 10 ng, 2x Reaction buffer, RT enzyme mater mix, dNTP Mix 10 μM, Primer LC3B reverse 5 μM (1:1000) incubate reaction ที่ 42°C, 60 นาที และ 70 °C, 10 นาที แล้วนำ RT reaction (cDNA) ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยมีวิธีพอสังเขปดังนี้ ใช้ RT reaction (Dilute 1:50), Primer LC3B-Bgl II (Forward) 10 μM/μL, Primer LC3B-Sal II (Reverse) 10 μM/μL ,dNTP mix 2 μM, 10x Tag Buffer , Tag PCR enzyme , MgCl₂ 25 μM และ Diethyl pyrocarbonate incubate reaction ที่ 95 °C, 30 วินาที จำนวน 1 รอบ และ 95 °C, 30 วินาที, 55 °C, 30 วินาที, 68 °C, 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 68 °C, 5 นาที จำนวน 1 รอบ

นำ PCR product ที่ได้มาทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose gel และรันใน TBE buffer ที่ 100 volts เป็นเวลา 60 นาที ด้วยเครื่อง gel electrophoresis แล้วย้อม DNA เจล ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 20 นาที ทำการถ่ายภาพและนำภาพถ่ายของเจลที่ได้ ไปวิเคราะห์ ปริมาณ DNA ด้วยโปรแกรม ImageJ

2.3 ทดสอบการสร้างโปรตีน LC3B ด้วย Western Blot และวิเคราะห์อัตราส่วนของโปรตีน LC3B-II ต่อ LC3B-I โดย ImageJ

นำเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B จาก 1.3.2. มาเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี การเติม FBS 10% ที่ 37 °C ในตู้ 5% CO₂ ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน ทำการสกัด โปรตีนด้วย complete cell extraction buffer นำส่วนสกัดมาแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE gel แล้วทำการย้อมโปรตีนด้วย primary rabbit anti-mouse monoclonal antibody (Abcam,USA) ต่อ LC3B (1:1000) และ secondary goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody(Abcam,USA) (1:2000) และวิเคราะห์อัตราส่วนของ โปรตีน LC3B-II ต่อ LC3B-I โดยโปรแกรม ImageJ

2.4 การระบุตำแหน่งของโปรตีน LC3B ในเซลล์ LLCMK₂ (GFP/LC3B) และ GFP/LC3B puncta โดยวิธี immunoassay

นำเซลล์ LLC-MK₂ (GFP/LC3B) มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี การเติม FBS 10% ใน 96-well plate แล้วนำไปวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน LC3B ในเซลล์ ด้วยการ ย้อม โปรตีนด้วย primary rabbit anti-mouse monoclonal antibody(Abcam,USA) ต่อ LC3B (1:1000) และ secondary goat anti-rabbit IgG-FICT conjugated antibody(Abcam,USA) (1:2000) และย้อมส่วนนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI(sigma-Aldrich, USA) แล้วสังเกตและ บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD เป็นการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย สถิติ one way ANOVA โดยใช้โปรแกรม GraphPad prism software version 8 และมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP ร่วมกับยีน LC3B

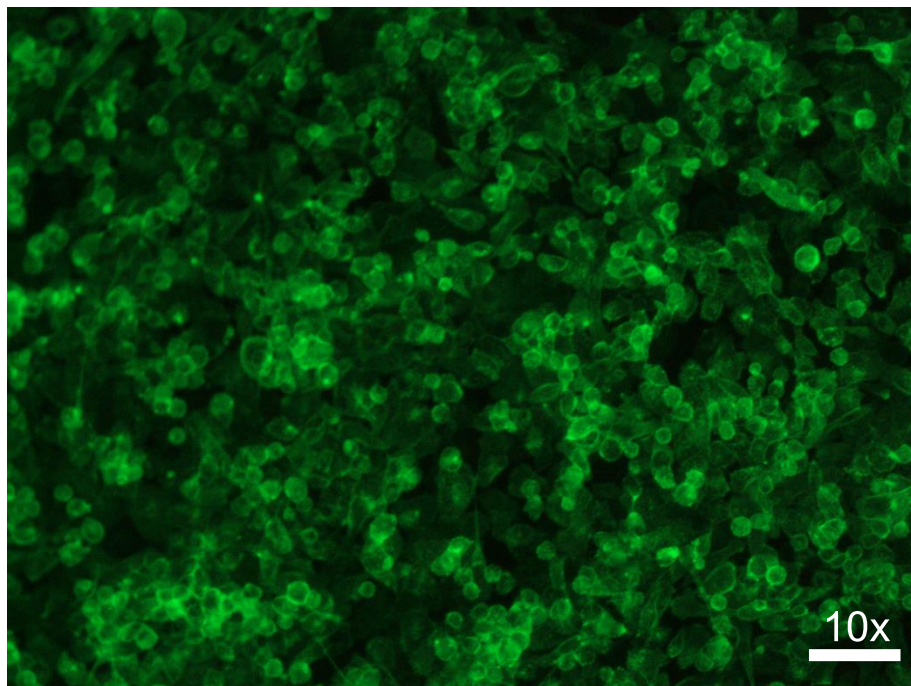
1.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G418 ในการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B

ผลการดำเนินงานและสรุปผล ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G418 ในการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ คือ 0.35 mg/ml

1.2 การคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B

โดยนำเซลล์ที่มีการ transfect แล้ว มาเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ opti-MEM ที่มีการเติม FBS 20% และ ความเข้มข้นของ G418 ในเซลล์ LLC-MK₂ คือ 0.35 mg/ml

ผลการดำเนินงานและสรุปผล สามารถคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ ได้โดยพบการแสดงออกของ GFP/LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ ได้ร้อยละ 100 (รูปที่ 3)

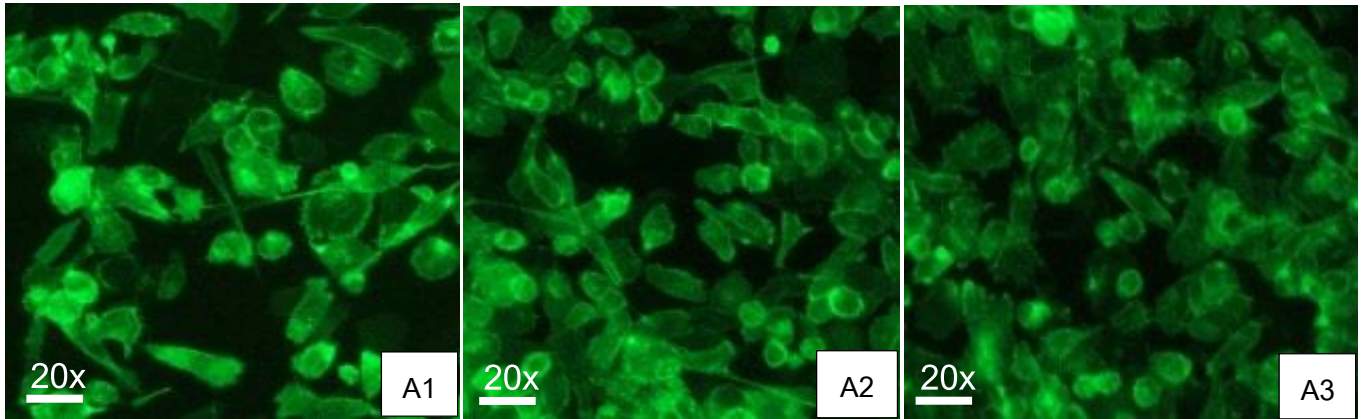


รูปที่ 3. เซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ที่ถูกคัดเลือกด้วย G418 (neomycin)

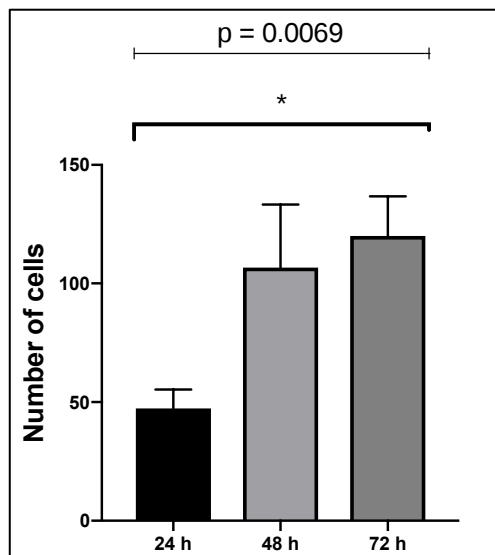
2. การทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP ร่วมกับ LC3B

2.1 จำนวนเซลล์ และความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียว (GFP)

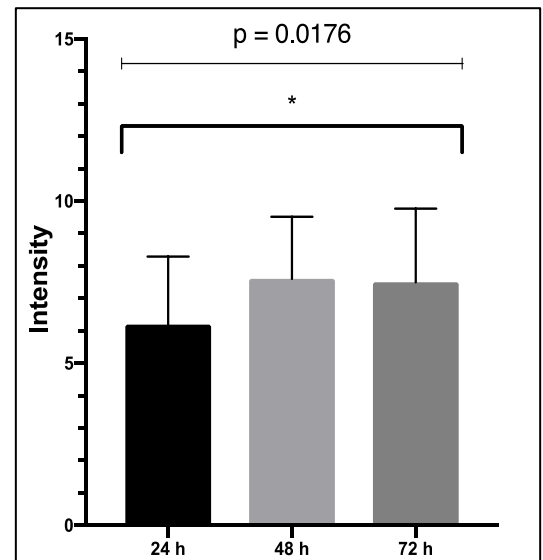
4A



4B



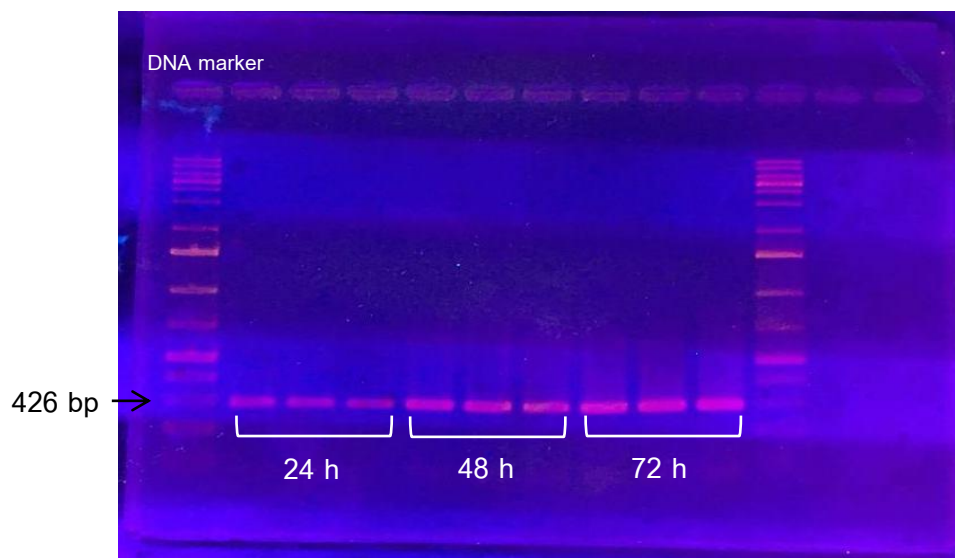
4C



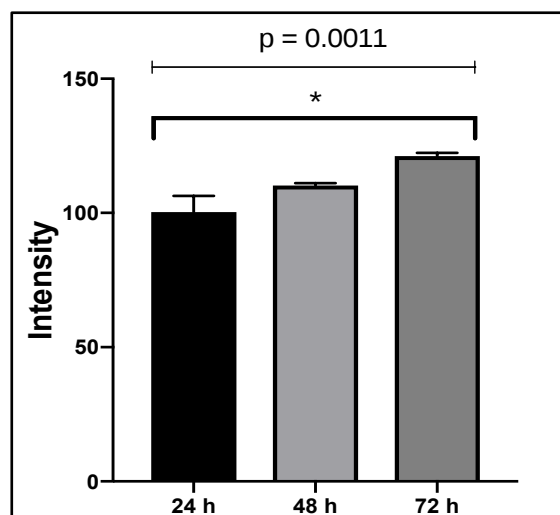
รูปที่ 4A. ภาพแสดงฟลูออเรสเซนซ์ GFP/LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ A1) ที่ 24 ชั่วโมง A2) ที่ 48 ชั่วโมง และ A3) ที่ 72 ชั่วโมง 4B. กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง 4C. กราฟแสดงความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียว (GFP) ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ข้อมูลได้จากการทำการทดลองซ้ำสามครั้ง, แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD และ * มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$)

ผลการดำเนินงานและสรุปผล ที่เวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.0069$ และเซลล์มีความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียว (GFP) เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.0176$ ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น

2.2 การหาขึ้น LC3B ด้วยวิธี RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

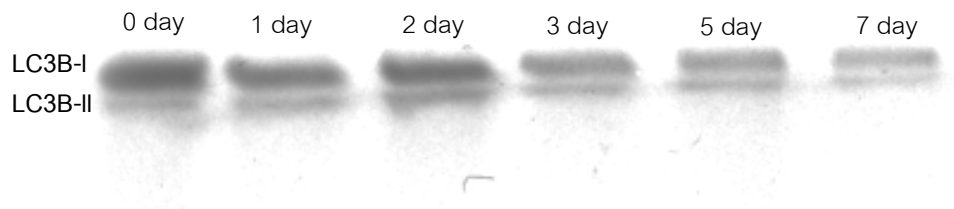


รูปที่ 5. ภาพแสดง DNA ของ LC3B ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Gel electrophoresis (ขนาด DNA ของ LC3B ประมาณ 426 base pairs)

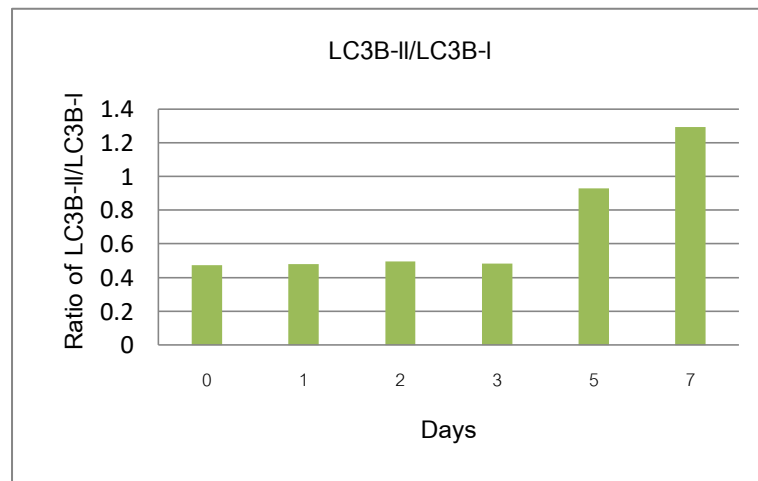


รูปที่ 6. กราฟแสดงปริมาณของ DNA ของ LC3B ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี RT-PCR ผลการดำเนินงานและสรุปผล ปริมาณ DNA copy ของยีน LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.0011$

2.3 การทดสอบการสร้างโปรตีน LC3B ด้วยวิธี Western blot

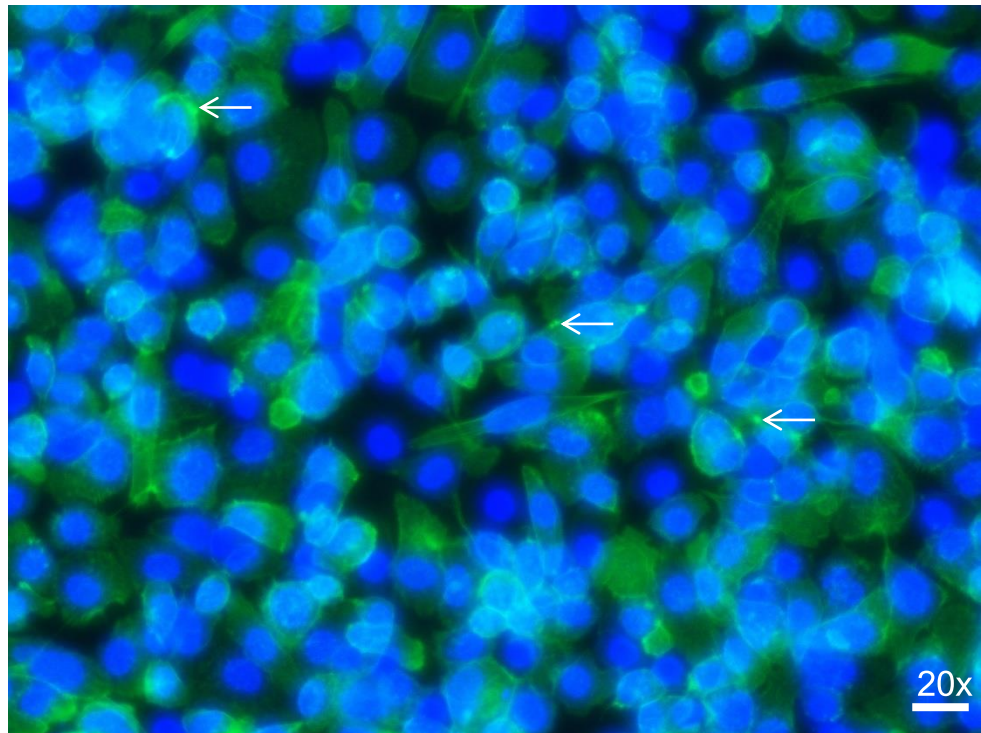


รูปที่ 7. แสดงภาพโปรตีน LC3B ด้วยวิธี Western blot (LC3B-I มีขนาดโปรตีนประมาณ 19 kDa และ LC3B-II มีขนาดโปรตีนประมาณ 17 kDa)



รูปที่ 8. กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่าง LC3B-II ต่อ LC3B-I ที่เกิดขึ้นของเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ผลการดำเนินงานและสรุปผล ในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 อัตราส่วนของยีน LC3B-II ต่อ LC3B-I ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในวันที่ 5 และ 7 อัตราส่วนของยีน LC3B-II ต่อ LC3B-I มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

2.4 การระบุตำแหน่งของโปรตีน LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ (GFP/LC3B)



รูปที่ 9. แสดงตำแหน่งของยีน LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂

ผลการดำเนินงานและสรุปผล พบการกระจายตัวของยีน LC3B ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ LLC-MK₂ และพบ GFP/LC3B puncta

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการสร้างเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP ร่วมกับยีน LC3B เริ่มจากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G418 เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของยีน LC3B ร่วมกับ GFP ได้อย่างถาวร โดยมีหลักการ คือ เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้นั้น จะเป็นเซลล์ที่ทนต่อฤทธิ์ของ G418 ได้ เนื่องจากเซลล์จะมียีนต้านทานฤทธิ์ของ G418 ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มียีนต้านทานฤทธิ์ของ G418 จะไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ เมื่อทำการเติม G418 ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.35 mg/ml ใน 6-well plated และทำการสังเกตสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทุกวัน จนเซลล์มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียวมากกว่า 90% ผลจากการทดลองพบว่าเซลล์ LLC-MK₂ มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ได้ 100%

เมื่อได้เซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B ได้อย่างถาวรแล้วนั้น ขั้นตอนต่อมาจะทำการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B เริ่มจากการดูจำนวนเซลล์และความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเซลล์ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของ GFP/LC3B มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเมื่อดูความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียว (GFP) ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์แบบหัวกลับ และวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม NIS-Elements D 4.50.00 64 bit Nikon Instrument inc., USA พบว่าเซลล์มีความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวเพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น

ต่อมาทำการทดลองหาปริมาณ RNA ของยีน LC3B ด้วยวิธี RT-PCR โดยวิเคราะห์ความเข้มของแบนด้วยโปรแกรม ImageJ ผลการทดลองพบว่าปริมาณ RNA copy ของยีน LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับจำนวนเซลล์และระดับความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวที่เพิ่มขึ้น ทำให้แน่ใจได้ว่าเซลล์ LLC-MK₂ นั้นมีการแสดงออกของ GFP/LC3B อย่างแท้จริง

ต่อมาทำการวิเคราะห์การสร้างโปรตีน LC3B ด้วยวิธี Western blot เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีน LC3B-I และ LC3B-II ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน โดยดูจากอัตราส่วนของ LC3B-II ต่อ LC3B-I วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปยีน LC3B-I และ LC3B-II มีแนวโน้มของจำนวนที่เพิ่มมากขึ้น โดยปริมาณของยีน LC3B-II มากกว่ายีน LC3B-I

อย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 5 และวันที่ 7 เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้สารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะอดอาหาร เมื่อเซลล์เกิดสภาวะอดอาหารขึ้น จึงเกิดกระบวนการ autophagy ทำให้โปรตีน LC3B-I ที่อยู่ในรูปอิสระเกิดการ conjugated กับ phosphatidylethanolamine (PE) ทำให้เกิดเป็นโปรตีน LC3B-II ขึ้นที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ autophagosome และเกิดกระบวนการ autophagy ขึ้น จึงทำให้เซลล์สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาวะอดอาหาร แต่ในสภาวะปกติอัตราส่วนระหว่าง LC3B-II ต่อ LC3B-I มีการเพิ่มจำนวนเช่นเดียวกัน แต่อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าสภาวะอดอาหาร สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (16)

ต่อมาเป็นการทดสอบระบุตำแหน่งของยีน LC3B ในเซลล์ LLC-MK₂ ด้วยวิธี Immunoassay โดยทำการย้อมเซลล์ด้วย monoclonal antibody-FITC ที่ไปจับกับโปรตีน LC3B และย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI และใช้เทคนิคการรวมภาพ (merged) ของ FITC และ DAPI ดัง **รูปที่ 9**. ผลการทดลองพบการกระจายตัวของยีน LC3B ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ LLC-MK₂ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่บอกว่าจะพบ LC3B ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง (8) โดย LC3B สร้างจาก proLC3B โดยจะมีเอนไซม์ Atg4 ช่วยในการเปลี่ยนเป็น LC3B-I ซึ่งอยู่ในรูป free form เมื่อเกิดสภาวะเครียด อดอาหาร ติดเชื้อ รวมทั้งการเกิดมะเร็ง จะเกิดการกระตุ้นกระบวนการ autophagy ซึ่งจะมีเอนไซม์ Atg7 และ Atg3 กระตุ้นให้ LC3B-I เกิดการ conjugated รวมกับ phosphatidylethanolamine (PE) ได้เป็น LC3B-II ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในและนอกเยื่อหุ้มเซลล์ของ autophagosome ดังนั้นการพบ LC3B-II จึงใช้เป็น marker ในการบ่งบอกการเกิดกระบวนการ autophagy ได้ นอกจากนี้ยังพบการรวมตัวกันของ LC3B-II ในบริเวณที่มีการสร้าง autophagosome เรียกว่า LC3B-GFP puncta หรือ autophagic puncta ในการทดลองนี้ด้วย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถสร้างเซลล์ต้นแบบ LLC-MK₂ ที่มีการแสดงออกของสารเรืองแสงสีเขียว (GFP) ร่วมกับยีน LC3B ได้ และมีคุณลักษณะที่เหมาะสม โดยอาจใช้เซลล์ LLC-MK₂ (GFP/LC3B) เพื่อการทดสอบเบื้องต้น (screening test) กับสารที่อาจมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยมีคุณสมบัติเป็น autophagy modulator โดยประยุกต์ใช้กับสารหลายๆ ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ซึ่ง จะทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ช่วยประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการทดสอบ นอกจากนี้ก็นำ cell-based model ตลอดจนพลาสมิด pCMV-EGFP/LC3B ที่ถูกสร้างในการศึกษานี้ ไปดัดแปลงเพื่อใช้ในการศึกษากลไก และหน้าที่ของกระบวนการ autophagy ภายในเซลล์ ได้อย่างหลากหลายต่อไปด้วย

ในงานวิจัยครั้งนี้มีข้อบกพร่องในเรื่องของระยะเวลาที่จำกัด ทำให้การทดลองไม่เป็นไปตามที่ตั้งไว้ เนื่องจากบางการทดลองต้องใช้ระยะเวลานาน ซึ่งทำให้ต้องยกเลิกไป และความพร้อมของเครื่องมือ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่ไม่ได้ถูกใช้งานมานาน หรือไม่เคยถูกใช้งานมาก่อน ทำให้เครื่องมือไม่สามารถพร้อมใช้งานได้ทันทีรวมไปถึงสภาวะของห้องทำการทดลองที่ควบคุมค่อนข้างยากอาจทำให้ผลคลาดเคลื่อนได้ง่าย ในงานวิจัยครั้งนี้มีหนึ่งการทดลองที่ไม่มีข้อมูลทางสถิติ เนื่องจากทำการทดลองเพียงครั้งเดียว และไม่ได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเหมือนการทดลองอื่นๆ ซึ่งแม้ว่าผลการทดลองที่ได้จะเป็นไปตามทฤษฎี แต่ไม่ได้มีการยืนยันข้อมูลที่ได้ด้วยสถิติ อาจทำให้ความน่าเชื่อถือของข้อมูลลดลงได้ ดังนั้นหากมีงานวิจัยนี้ต่อไป อาจจะต้องพิจารณาทำการทดลองซ้ำเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้และเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. Molecular Mechanisms of Autophagy | Abcam [Internet]. Abcam.com. 2018 [cited 30 November 2018]. Available from: https://www.abcam.com/cancer/molecular-mechanisms-of-autophagy?fbclid=IwAR312TbFhVMisScNKcuGrHxwSgf7WkA50CkUv7r_z26HErwr4qIYqeA2H9U
2. Explore PI3K-Akt-mTOR [Internet]. Explore PI3K-Akt-mTOR Cancer Pathway | BioOncology. Available from: <https://www.biooncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/pi3k.html>
3. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. [Internet]. Expert opinion on therapeutic targets. U.S. National Library of Medicine; 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239440>
4. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(23):8204–9.
5. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140(3):313-26.
6. Autophagy tool of cell death series 2 [Internet]. Abcam 2017. Available from : http://docs.abcam.com/ebooks/autophagy_guide.pdf
7. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*. 2015;125(1):42-6.
8. Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *Plos One*. 2015;10(9).

9. FAQs - Autophagy and LC3 [Internet]. FAQs - Autophagy and LC3: Novus Biologicals. Available from: <https://www.novusbio.com/support/faqs-autophagy-and-lc3>
10. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology*
11. Green Fluorescent Protein (GFP) [Internet]. Thermo Fisher Scientific. Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.html>
12. Green Fluorescent Protein (GFP) [Internet]. Thermo Fisher Scientific. Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.html>
13. Green Fluorescent Protein (GFP) [Internet]. Thermo Fisher Scientific. Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.html>
14. Olympus FluoView Resource Center: Confocal Gallery - Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells. Available from: <http://fluoview.magnet.fsu.edu/gallery/cells/lcmk2/lcmk2cells.html>
15. Provost JJ, Wallert MA. Inside Out: Targeting NHE1 as an Intracellular and Extracellular Regulator of Cancer Progression. *Chemical Biology & Drug Design*. 2012;81(1):85–101.
16. Cell culture guidelines Available from: https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_culture.pdf
17. TurboFect Transfection Reagents [Internet]. Thermo Fisher Scientific. Available from: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/brands/thermo->

scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/turbofect.html

18. Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. The EMBO Journal. 2000Jan;19(21):5720–8.

ภาคผนวก

เอกสารการตรวจสอบการคัดลอกของจุลินพันธ์โดยใช้โปรแกรมอักขราวิสุทธิ ใน
การตรวจสอบ

Plagiarism Checking Report

Created on Dec 14, 2018 at 22:54 PM

[Print Report](#)

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
1075909	Dec 14, 2018 at 22:54 PM	57210176@my.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	LLC3B176179.docx	Completed	0.00 %