บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษานี้ทำการโคลนยีน IL-13 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นยีน IL-13 จากพลาสมิด pORF5-hIL-13 แล้วเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs ตรวจสอบผลการโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเทคนิค PCR พบว่าทำการโคลนยีน IL-13 ได้เป็นผลสำเร็จ นำโคลนที่ได้ส่งตรวจลำดับเบสของ pSELECT-blasti-IL-13 จากนั้นเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีรายงานใน Gene Bank พบว่ามีความเหมือนกัน 100% จากนั้นนำ pSELECT-blasti-IL-13 และ pSELECT-blasti-mcs เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH โดยใช้ Nanofectin kit ทำการคัดเลือกเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ blasticidin s ทำการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ เซลล์ SK-N-SH (untransfected), SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs และ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 ทำการตรวจสอบการแสดงออกของ IL-13 ในระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และการแสดงออกของโปรตีน IL-13 ด้วยวิธี western blot พบว่ามีการแสดงออกของยีนและโปรตีน IL-13 ในกลุ่ม IL-13 transfected สูงกว่ากลุ่ม untransfected และ vector transfected แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.05) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร paraquat ต่อเซลล์ SK-N-SH ด้วยวิธี MTT assay พบว่าความเข้มข้นของสาร paraquat 500, 700 และ 1000 µM เซลล์ในกลุ่ม IL-13 transfected มีค่าการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ Untransfected และ vector transfected แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบในกลุ่มที่ได้รับสาร paraquat ความเข้มข้นเดียวกัน ($P \leq 0.01$) จากการศึกษาการแสดงออกของยีน APP และ α-syn ในเซลล์ SK-N-SH ต่อการได้รับสาร paraquat ความเข้มข้น 250 µM ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าทั้ง APP และ α-syn ของกลุ่มเซลล์ SK-N-SH (untransfected), SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs และ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร paraquat แต่ที่ 500 µM พบว่ากลุ่ม Untransfected มีการแสดงออกของ α-syn สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร paraquat ขณะที่การแสดงออกของ APP ของเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นนำเซลล์มาดูการแสดงออกด้วยเทคนิค qPCR พบว่าการแสดงออกของยีน α-syn มีการแสดงออกที่สูงขึ้นเมื่อได้รับสาร paraquat ที่ความเข้มข้น 250 µM ในกลุ่ม Untransfected

และ vector transfected แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่เซลล์ในกลุ่ม recombinant IL-13 transfected มีการแสดงออกของยีนα-syn เท่ากับกลุ่ม control ที่ไม่ได้รับสาร paraquat ไม่แตกต่างอย่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงว่าการแสดงออกของ IL-13 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์นอกจากช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตแล้วยังส่งผลในการลดแสดงออกของ α-syn จากฤทธิ์ของพาราควอตได้

อภิปรายผล

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า IL-13 เป็นไซโตไคน์ที่ช่วยลดการอักเสบ (Kim, H. D., et al., 2005) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อ macrophages, B-cells และ Th2-cells โดยกระตุ้น B-cell ให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจในการนำ IL-13 มาพัฒนาเพื่อใช้เป็น adjuvant ร่วมกับวัคซีนเพื่อลดปัญหาการอักเสบที่จะเกิดขึ้นจากการใช้วัคซีนในการรักษาโรคความเสื่อมของระบบประสาท (Pride, et al., 2008) หรือวัคซีนอื่นๆ อีกทั้ง IL-13 เป็น cytokine ที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายมนุษย์อยู่แล้ว จึงมีความเสี่ยงต่ำที่จะได้รับการต่อต้านจากร่างกาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถสร้าง IL-13 ในรูปพลาสมิดซึ่งสามารถผลิต IL-13 ภายในเซลล์ SK-N-SH ได้สำเร็จ งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา pSELECT-blasti-IL-13 เป็น adjuvant vaccineช่วยในการการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ลดปัญหาเกิดการอักเสบ เนื่องจากการตอบสนองต่อ Th2-cells (proinflammatory) ช่วยเพิ่มความปลอดภัยและพัฒนา vaccine ให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคความเสื่อมของระบบประสาทในอนาคต

การโคลนยีนอินเตอร์ลูคิน-13 (IL-13) และการนำ recombinant IL-13 plasmid เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH

ในการศึกษานี้ทำการโคลนยีน IL-13 ซึ่งเป็น human cytokine โดยการตัดชิ้นยีน IL-13 จาก pORF5-hIL-13 ย้ายเข้าสู่ pSELECT-blasti-mcs expression vector ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถูกออกแบบมาสำหรับให้มีการแสดงออกของยีนที่สนใจตลอดเวลา เนื่องจากมีส่วนของ strong promoter (hEF1-HTLV prom) (Kim, D. W., et al., 1990) สามารถประยุกต์ใช้ได้กับ cell lines หลายชนิด มีส่วนประกอบของ selectable marker ช่วยในการคัดเลือกเซลล์ที่ถูก tranfected ให้มีความเสถียร (stable transfectants) โดยสามารถคัดเลือกได้ทั้งใน *E. coli* และ mammalian cells โดยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า Blasticidin S สามารถเป็น antibiotic ใน mammalian cell lines (Kimura, M., et al., 1994) เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนมารวมกันเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่ ribosome กลไกการดื้อยา Blasticidin S เกิดจากเชื้อราบางชนิด *Aspergillus terreus* มีเอนไซม์ Blasticidin S deaminase (BSD) เป็นกลุ่ม hydrolases เปลี่ยน

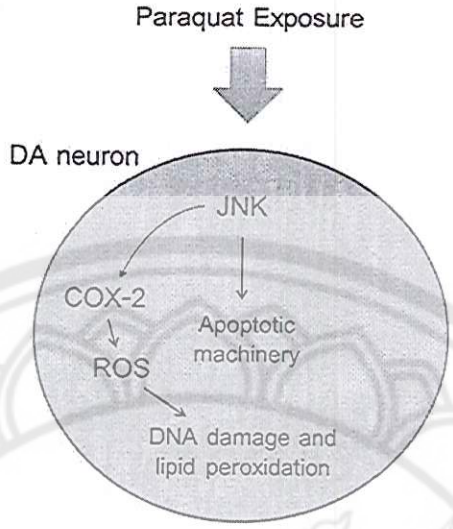
Blasticidin S ให้กลายเป็น non-toxic deamino-hydroxy derivative (Kimura, M., et al., 1994) ดังนั้นยีน BSD จึงถูกเลือกใช้เป็น selectable marker อยู่ใน expression vector คัดเลือกได้ทั้งใน bacterial และ mammalian cells การทดลองสามารถโคลนยีนได้สำเร็จและนำ pSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-IL-13 เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH โดยใช้ Nanofectin kit และทำการคัดเลือกเซลล์ SK-N-SH ที่มีpSELECT-blasti-mcs และ pSELECT-blasti-mcs-IL-13 โดยใช้อาหารที่มียาปฏิชีวนะ Blasticidin S ได้สำเร็จเพื่อนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

การแสดงออกของยีนและโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH

การแสดงออกของยีนและโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH ที่มี Recombinant IL-13 transfected พบยีนขนาด 396 bp และโปรตีนมีขนาดประมาณ 18 kDa ซึ่งคาดว่าเกิดจากขบวนการ post translation โดยเกิดขบวนการ glycosylation ได้ IL-13 ที่เหมือนในธรรมชาติ ต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบ hIL-13 โปรตีนขนาดประมาณ 10 kDa (McKenzie, et al., 1993) โดยการศึกษาของ McKenzie และคณะเป็น IL-13 ที่ไม่มีขบวนการ glycosylation

การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของ paraquat ต่อเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13

การทดสอบความเป็นพิษของสาร paraquat (PQ) ต่อเซลล์ SK-N-SH ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ประสาท เซลล์ประสาทสามารถตอบสนองต่อการได้รับสารพิษโดยตรงผ่าน signaling pathway ที่เกี่ยวข้อง มีหลายการวิจัยกล่าวไว้ว่า c-Jun N-terminal kinase (JNK) ซึ่งเป็น signaling molecule เป็นตัวกลางในการสร้าง cyclooxygenase-2 (COX-2) และกระตุ้น Apoptotic pathway ใน DA neuron เมื่อได้รับสาร PQ ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อภาวะ oxidative โดย JNK แปรผกผันโดยตรงกับ ROS ที่เกิดขึ้นใน DA neuron (Choi, et al., 2010; Hunot, et al., 2004; Peng, et al., 2004; Wang, et al., 2009) เอนไซม์ COX-2 ทำหน้าที่สร้าง prostaglandins (PGs) จาก arachidonic acid membrane ซึ่ง PGs เกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบภายในสมอง ยิ่งกว่านั้นพบว่าเมื่อเอนไซม์ COX-2 เพิ่มมากขึ้นจะสร้าง pro-inflammatory cytokines หลายชนิด รวมถึง ROS (Hirsch and Hunot, 2009; Litteljohn, et al., 2010) เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เมื่อเกิดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ SK-N-SH และ SH-SY5Y จากการได้รับสาร PQ สามารถกระตุ้น JNK (Yang, et al., 2009) เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน COX-2 ซึ่งเป็น pro-inflammatory gene มีการแสดงออกที่สูงกว่าปกติและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Kim, E.-H., et al., 2010; Yang, et al., 2010)



ภาพ 32 แสดงถึงกลไกความเป็นพิษของสาร PQ ต่อเซลล์ประสาท

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Litteljohn, et al., 2010

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร PQ ต่อเซลล์ SK-N-SH ที่ได้ พบว่ามีการตายของเซลล์ SK-N-SH เป็นไปแบบ dose dependent อย่างไรก็ตามในเซลล์ SK-N-SH ที่มี recombinant IL-13 กลับพบว่าสามารถทนต่อการได้รับสาร PQ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) กลไกการทำงานของ IL-13 ในเซลล์ประสาทนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด อาจเป็นไปได้ว่ากลไกการทำงานของ IL-13 ทั้งที่อยู่ในเซลล์และนอกเซลล์อาจมีผลยับยั้งการแสดงออกของ JNK และ COX-2 โดยได้มีหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า IL-13 มีคุณสมบัติเป็น anti-inflammatory effects สามารถยับยั้งการแสดงออกของ JNK (Manna and Aggarwal, 1998; Zhu, et al., 2010) และ COX-2 ผ่านทาง JAK1 และ STAT6 pathway ภายในเซลล์ (Cho, et al., 2011; Diaz-Cazorla, et al., 1999; Onoe, et al., 1996) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Manna และ Aggarwal (Manna and Aggarwal, 1998) พบว่า IL-13 นอกจากสามารถยับยั้ง JNK ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis แล้วยังสามรถยับยั้ง neuclear transcription factor (NF-*K*B) และ activation protein-1 (AP-1) ซึ่งเป็น transcription factor เกี่ยวข้องกับการสร้าง pro-inflammatory cytokine ในเซลล์ U937 (humanhistiocytic lymphoma), Jurkat (human T cell line), HeLa (human epithelial) และ H4 (human glioma) ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF, okadaic acid, ceramide และ H_2O_2 จากผลดังกล่าวทำให้ IL-13 มีคุณสมบัติเป็น

immunosuppressive effects ได้อีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ IL-13 จึงอาจมีคุณสมบัติเป็น anti-apoptosis ในเซลล์ SK-N-SH ช่วยในการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทต่อการได้รับสาร PQ

ผลการศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง Amyloid precursor protein (APP)

สารพิษจากสิ่งแวดล้อมจำพวกยาฆ่าแมลงเมื่อได้รับเป็นระยะเวลานานช่วยเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์ (Hayden, et al., 2010; Santibanez, et al., 2007) จากการศึกษากลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ส่วนหนึ่งพบว่าเกิดการสะสมของ Aβ ภายในสมองรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า ซีไนล์ พลาก (senile plaques) โดย Aβ ที่เกิดขึ้นเกิดจากกลไกการตัดของเอนไซม์บน APP ซึ่งเป็นทรานสเมมเบรนโปรตีนของเซลล์ประสาท ได้มีการศึกษาพบว่าสาร paraquat มีส่วนในการเพิ่มขึ้นของ Aβ42 และ Aβ40 ในหนูที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการกลายพันธุ์ของยีน human APP เมื่อเทียบกับกลุ่มของ control ที่ไม่ได้รับสาร paraquat (Chen, et al., 2012) จากการศึกษานี้ได้มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน APP ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), เซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ที่ได้รับสาร paraquat เทียบกับกลุ่มของ control ที่ไม่ได้รับสาร paraquat พบว่ามีการแสดงออกของยีน APP ไม่ต่างจากกลุ่มของ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทำ RT-PCR อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ APP ยีนเพียงอย่างเดียวยังบอกไม่ได้ว่าจะมีแนวโน้มบอกถึงการเพิ่มขึ้นของ Aβหรือไม่เพราะการเพิ่มขึ้นของ Aβ ส่วนใหญ่นั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนสำคัญ 3 ยีนด้วยกัน คือ APP, presenilin 1 และ presenilin 2 (Waring and Rosenberg, 2008) การทำการทดลองเพิ่มเติมในระดับโปรตีนเพื่อดูการเกิดขึ้นของ Aβ น่าจะบอกความชัดเจนได้มากกว่าในระดับยีน

การศึกษาของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง α-synuclein (α-syn)

ในการศึกษาที่ผ่านมา α-synuclein คือพยาธิสภาพที่สำคัญของการเกิดโรคพาร์กินสันในภาวะ oxidative stress สามารถเพิ่มการแสดงออกของ α-synuclein และเมื่อมีเส้นใย α-synuclein เพิ่มมากขึ้นผิดปกติก็จะมีแนวโน้มรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเส้นใยได้ง่าย (Dawson and Dawson, 2003a; Rideout, et al., 2001; Shavali, et al., 2006) เนื่องจากกลุ่มของเส้นใยที่เกิดขึ้นนั้นยากต่อการย่อยสลายตามปกติด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้เส้นใย α-synuclein ยังสามารถแทรกตัวเข้าสู่ microtubule รวมกลุ่มกันอยู่ใกล้นิวเคลียสเป็นลักษณะ Lewy body (Johnston, et al., 1998; McNaught, et al., 2002) กระตุ้นให้เกิดการตายของ DA neuron ต่อไป จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้สาร Paraquat ซึ่งมี

โครงสร้างคล้ายกับ active metabolite ของสาร MPTP สามารถเหนี่ยวนำให้ α-synuclein มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นใน DA neuron ในส่วนของ substantia nigra ภายในสมอง (Manning-Bog, et al., 2002; Vila, et al., 2000) และสาร PQ สามารถกระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มของเส้นใย α-synuclein ได้โดยตรงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Uversky, et al., 2001) จากผลการทดลองด้วยวิธีการ RT-PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน α-synuclein ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), เซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-mcs (vector transfected) และเซลล์ SK-N-SH ที่มี pSELECT-blasti-IL-13 (recombinant IL-13 transfected) ที่ได้รับสาร paraquat เทียบกับกลุ่มของ control พบว่ามีการแสดงของยีน α-syn ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้รับสาร paraquat ซึ่งแตกต่างจากการทดลอง qPCR พบว่าเมื่อเซลล์ SK-N-SH ได้รับสาร PQ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน α-synuclein เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Manning-Bog, et al., 2002) นอกจากนี้ในการทดลองด้วยวิธีการ qPCR พบว่าเซลล์ SK-N-SH ที่มี recombinant IL-13 เมื่อได้รับสาร PQ พบมีการแสดงออกของยีน α-synuclein ไม่มากนักไม่แตกต่างกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้รับสาร PQ อย่างมีนัยสำคัญซึ่งเป็นแนวโน้มที่ดีเนื่องจาก IL-13 ภายในเซลล์สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีน α-synuclein ที่เป็นพยาธิสภาพของโรคความเสื่อมของระบบประสาทได้อย่างไรก็ตามกลไกการตอบสนองของ α-synuclein ต่อสาร PQ ยังไม่เป็นที่แน่ชัด มีรายงานเกี่ยวกับสมมุติฐานการเกิด overexpression ของ α-synuclein อาจเป็นกลไกการต้านพิษอย่างเฉียบพลันของ PQ เพื่อยืดระยะเวลาการตายของเซลล์ออกไป (da Costa, et al., 2000; Manning-Bog, et al., 2003) งานวิจัยของ Forioni และคณะพบว่า α-synuclein เมื่อมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นจะนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท (Forloni, et al., 2000; Masliah, et al., 2000) ในส่วนของกลไกและหน้าที่การทำงานของ α-synuclein จนถึงปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ถึงแม้ว่าจะมีการแสดงออกที่เฉพาะเจาะจงภายในเซลล์ประสาท และพบในเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์ไขกระดูก (Miller, et al., 2004; Scherzer, et al., 2008) เส้นใย α-synuclein สามารถจับกับส่วนของ lipid บริเวณ plasma membrane ตรงส่วนของ lipid rafts (Fortin, et al., 2004) และในเซลล์ประสาทส่วนที่เกี่ยวข้องกับ presynaptic vesicle ทำให้การทำงานในส่วนนั้นเกิดความผิดปกติ (Jo, et al., 2000; Withers, et al., 1997) อย่างไรก็ตามเมื่อยีน α-synuclein ถูกยับยั้งการแสดงออกในหนู พบว่าส่งผลต่อการส่งสารสื่อประสาทโดปามีนให้มีการทำงานลดลงโดยเชื่อว่า α-synuclein ควบคุมการเคลื่อนที่ของ synaptic vesicle ตรงปลายประสาท (Abeliovich, et al., 2000; Cabin, et al., 2002)

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ pSELECT-blasti-IL-13 plasmid ที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตโปรตีน IL-13 ใน mammalian cells หรือการศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อพัฒนาเป็น adjuvant vaccineเพื่อใช้ร่วมกับวัคซีนซึ่งอาจช่วยยืดระยะเวลาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบอันเนื่องมาจากการตอบสนองต่อ Th2-cells (proinflammatory) จากการใช้วัคซีนในการรักษาโรคความเสื่อมของระบบประสาทอันเนื่องมาจากความผิดปกติของโปรตีนสะสมภายในสมอง เช่น Aβ และ α-synuclein เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคความเสื่อมของระบบประสาทในอนาคต