

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
สมมุติฐานของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
โรคความเสื่อมของระบบประสาท.....	5
โรคอัลไซเมอร์.....	5
โรคพาร์กินสัน.....	11
การตอบสนองด้านการอักเสบ.....	19
สารพาราควอต (Paraquat)	20
สรุปปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาท.....	22
แนวทางการรักษาโรคความเสื่อมของระบบประสาท.....	23
ภูมิคุ้มกันบำบัดกับการรักษาโรคสมองเสื่อม	23
ดีเอ็นเอวัคซีน.....	25
IL-13 (Interleukin (IL) -13)	27
Human neuroblastoma cells	30
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	31
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	31
วัสดุที่ใช้ในการวิจัย	31
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pORF5-hIL-13 และ pSELECT-blasti-mcs	32
การโคลนยีนอินเตอร์ลูคิน-13 (IL-13)	33
การตรวจสอบ pSELECT-blasti-IL-13	33
หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IL-13	34
การเลี้ยงเซลล์ SK-N-SH	34
การนำ recombinant IL-13 plasmid เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH	34
ตรวจสอบการแสดงออกของยีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH ที่ระดับ mRNA ...	34
ตรวจสอบการแสดงออกของ IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH ที่ระดับโปรตีน	35
ทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของ paraquat ต่อเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13	35
การศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti- mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง APP และ α -syn ด้วยวิธี RT-PCR.....	36
การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real time PCR	37
การวิเคราะห์ข้อมูล	39
4 ผลการวิจัย.....	40
การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pORF5-hIL-13 และ pSELECT-blasti-mcs.....	40
การโคลนยีนอินเตอร์ลูคิน-13 (IL-13)	40
หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IL-13	42
ผลการนำ Recombinant IL-13 plasmid เข้าสู่เซลล์ SK-N-SH.....	43
ผลการแสดงออกของยีนและโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH.....	44
ทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของ paraquat ต่อเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13	46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ผลการศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง Amyloid precursor protein (APP) ด้วยวิธีการ RT-PCR.....	48
ผลการศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง α -synuclein (α -syn) ด้วยวิธีการ RT-PCR	49
ผลการศึกษาของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfect ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการสร้าง α -synuclein (α -syn) ด้วยวิธีการ qPCR.....	50
ยืนยันความจำเพาะของปฏิกิริยา qPCR.....	50
ผลศึกษาการแสดงออกของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH ต่อการได้รับสาร paraquat จากปฏิกิริยา qPCR.....	53
5 บทสรุป	55
สรุปผลการวิจัย.....	55
อภิปรายผล.....	56
ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม.....	63
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้วิจัย.....	87

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 อัตราอุบัติการณ์ของโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุมากกว่า 65 ปี.....	7
2 แสดงไพรเมอร์ GAPDH, และ IL-13 ที่ได้ทำการออกแบบไว้	35
3 แสดงไพรเมอร์ GAPDH, APP และ α -syn ที่ได้ทำการออกแบบไว้	37
4 แสดงไพรเมอร์ GAPDH, และ α -syn ที่ได้ทำการออกแบบไว้	39
5 แสดงค่า Cq ของ primer ที่จำเพาะต่อยีน α -synuclein และ GAPDH จากการศึกษา Annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมกับ primer	50



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงกระบวนการตัดบน transmembrane domain APP ด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เกิดเป็น A β	9
2 แสดงผลของ A β ภายในเซลล์ประสาท.....	10
3 แผนภาพแสดงการส่งกระแสประสาทในส่วนของ basal ganglia.....	13
4 แผนผังการทำงานภายในสมองส่วน basal ganglia เปรียบเทียบระหว่าง คนปกติ กับผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน.....	14
5 แผนภาพแสดงส่วนของ substantia nigra ในสมอง.....	15
6 แสดงโครงสร้างของ α -synuclein และตำแหน่ง mutations.....	17
7 แสดงความเป็นพิษของ α -synuclein ต่อเซลล์ประสาท.....	19
8 แสดงเซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นด้วยสารพิษต่างๆ.....	20
9 แสดงปฏิกิริยา Oxidoreductase ของสารพาราควอตเกิดเป็น free radical.....	21
10 กลไกระดับโมเลกุลของสาร paraquat ต่อความเป็นพิษและกระตุ้น การตาย เซลล์ประสาท.....	22
11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม ต่อการเกิดโรคความเสื่อม ของระบบประสาท.....	23
12 แสดงการกำจัด A β หลังจากได้รับภูมิคุ้มกันแบบ passive และ active.....	24
13 แสดงกลไกการทำงานของ DNA vaccines ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน.....	26
14 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ DNA-based plasmid vaccine ชนิด p (A β ₃₋₁₀) 10-IL-4.....	27
15 แสดง signal pathways ของ IL-13.....	29
16 Human neuroblastoma cell line (SK-N-SH).....	30
17 แผนภาพแสดงการโคลนยีน IL-13 เข้าสู่เวกเตอร์ pSELECT-blasti-mcs.....	33
18 แสดงผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pORF5-hIL-13 และ pSELECT-blasti-mcs lane M: 1kb DNA ladder, lane 1: pSELECT-blasti-mcs, lane 2: pORF5-hIL-13.....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
19 แสดงผลการการตัดIL-13 recombinant plasmid ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ NcoI	41
20 แสดงผลของ PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน IL-13 ตรวจสอบ Lane M: 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA), Lane 1: Negative control, Lane 2: pSELECT-blasti-IL-13 และ Lane 3: pSELECT-blasti-mcs vector.....	41
21 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน Recombinant IL-13, pORF5-hIL-13 และ accession no. x69079.1 ซึ่งได้จากฐานข้อมูล NCBI.....	42
22 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IL-13 ในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง signal peptide	43
23 แสดงผลการคัดเลือก recombinant IL-13 และ expression vector เข้าสู่ เซลล์ SK-N-SH	44
24 ผลการแสดงออกของยีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (Recombinant IL-13) ในแต่ละช่วงเวลา	45
25 ผลการแสดงออกของโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (Recombinant IL-13) ในแต่ละช่วงเวลา	46
26 ผลของของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ตรวจสอบวัดค่าความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบการตายของเซลล์เป็นไปแบบ dose-dependent แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (* $P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ (** $P \leq 0.01$) เมื่อเทียบ ในกลุ่มเดียวกัน (mean \pm SD)	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ

หน้า

27 การแสดงออกของยีน APP ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (IL-13 transfected) ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μ M และ 500 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (mean \pm SD).....	48
28 การแสดงออกของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs-IL-13 (IL-13 transfected) ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μ M และ 500 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง* คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เทียบกับกลุ่ม control (mean \pm SD).....	49
29 แสดง melting curve analysis ของ PCR product (A) α -syn PCR product และ (B) GAPDH PCR product ตามลำดับ	51
30 แสดง Standard Curve ค่า Efficiency correction หรือ E ของปฏิกิริยา qPCR โดยที่ (A) เป็นของ α -syn และ (B) เป็นของ GAPDH.....	53
31 แสดงกราฟ Normalized Fold Expression ของยีน α -syn ในเซลล์ SK-N-SH (Untransfected), SK-N-SH ที่มี พลาสมิด pSELECT-blasti-mcs (Vector transfected) และ SK-N-SH ที่มีพลาสมิด pSELECT-blasti-mcs- IL-13 (Recombinant IL-13) ต่อการได้รับสาร paraquat 250 μ M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	54
32 แสดงถึงกลไกความเป็นพิษของสาร PQ ต่อเซลล์ประสาท.....	58

อักษรย่อ

AD	=	Alzheimer's disease
APP	=	Amyloid Precursor Protein
A β	=	Amyloid beta
bp	=	base pair
BSA	=	Bovine serum albumin
CNS	=	Central Nervous System
CTF	=	C-terminal fragment
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
FBS	=	fetal bovine serum
IL-1	=	Interleukin-1
IL-10	=	Interleukin-10
IL-13	=	Interleukin-13
IL-13 R α 1	=	IL-13 receptor α 1 chain
IL-1R α	=	Interleukin-1 α receptor
TNF- α	=	Tumor necrosis factor- α
IL-4R α	=	interleukin-4 receptor α chain
JAK	=	Janus-family kinase
kDa	=	Kilo Dalton
LB	=	Luria-Bertani
M-CSF	=	macrophage colony-stimulating factor
MEM	=	Eagle's Minimum Essential Medium
MHC-II	=	Major histocompatibility complex class II
ml	=	Milliliter
MTT	=	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
NFTs	=	neurofibrillary tangles
OD	=	Optical density

อักษรย่อ (ต่อ)

ROS	=	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SK-N-SH	=	Human neuroblastoma cell line
STAT6	=	Signal transducer and activation of transcription 6

