

การประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยอนุภาคนาโนโคโรซานผสมพอลิเอทิลีนอิมิน  
เพื่อการนำส่ง ยีนสังเคราะห์ BONE MORPHOGENETIC PROTEIN



นางสาววราพร รักชิตะวัฒนา

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF GENE TRANSFERRING EFFICACY THROUGH NANO-POLYPLEX  
CONSISTING CHITOSAN AND POLY(ETHYLENEIMINE) FOR GENE  
DELIVERY OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

Miss Varaporn Rakkhitawatthana



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยอนุภาคนาโน  
โคโคซานผสมพอลิเอทิลีนอิมิน เพื่อการนำส่งยีนสังเคราะห์  
BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

โดย

นางสาววราพร รักชิตะวัฒนา

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. ณัฏฐิกา แสงกฤษ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คนบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ณัฏฐิกา แสงกฤษ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนาไพศาล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
( ดร.รุจิภาญจน์ นาสนิท)

วราพร รักชิตะวัฒนา : การประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยอนุภาคนาโนไคโตซานผสมพอลิเอทิลีนอิมินเพื่อการนำส่ง ยีนสังเคราะห์ BONE MORPHOGENETIC PROTEIN(EVALUATION OF GENE TRANSFERRING EFFICACY THROUGH NANO-POLYPLEX CONSISTING CHITOSAN AND POLY (ETHYLENEIMINE) FOR GENE DELIVERY OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.ณัฐริกา แสงกฤษ, 76 หน้า.

ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการประเมินการนำส่งยีนโดยใช้ polyplex ที่มีขนาดนาโนเมตร เป็นตัวนำส่งยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์หลายชนิด ตัวพำนำส่งยีนได้เตรียมขึ้นโดยใช้พอลิเมอร์ประจุบวก methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride (MPyMeChC) และ/หรือ poly(ethylenimine) (PEI) โดยใช้แรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) เป็นแรงยึดเหนี่ยวให้เกิดอนุภาคนาโน polyplex ของพอลิเมอร์ทั้งสองถูกเตรียมขึ้นโดยใช้พลาสมิด pGL-3 basic containing CMV promoter/enhancer 1 ไมโครกรัม ที่อัตราส่วนของน้ำหนักของพอลิเมอร์และดีเอ็นเอแตกต่างกัน ความสามารถในการจับดีเอ็นเอของ polyplex ที่เตรียมขึ้นได้ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค gel retardation assay polyplex ที่มี PEI เป็นองค์ประกอบจะมีขนาดใหญ่และค่าประจุบวกสูงกว่า polyplex ที่มีเพียง MPyMeChC ผลการนำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งทดสอบในเซลล์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งประสาท (SH-SY5Y) พบว่าผลการนำส่งมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ และ พบผลการเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนและการลดความเป็นพิษต่อเซลล์ของ polyplex จากพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC และ PEI ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ระบบการนำส่งยีนนี้ในการนำส่งยีนบำบัดเข้าสู่เซลล์ osteoblastic-like cell (MG-63) โดยเบื้องต้นได้ประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ polyplex นอกจากนี้ยังได้ยืนยันการเข้าเซลล์ของ polyplex ด้วยกล้อง confocal laser scanning microscope ท้ายที่สุดจึงได้นำส่งยีนบำบัด bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนบำบัด BMP-2 ด้วยเทคนิค reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) เปรียบเทียบกับตัวพา Lipofectamine™ 2000 พบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่ถูกนำส่งด้วยพอลิเมอร์ผสมจะมีการแสดงออกคงที่และยาวนาน งานวิจัยครั้งนี้ได้นำเสนอตัวพาทางเลือกจากระบบพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC และ PEI สำหรับการนำส่งยีนแบบ non-viral vector

ภาควิชา เคมีคลินิก .....ลายมือชื่อ นิสิต วราพร รักชิตะวัฒนา  
สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ .....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ปีการศึกษา 2553 .....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
.....



## 5177218837 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEY WORDS: BMP-2 / Gene delivery / Transfection / Osteoblast / Expression

VARAPORN RAKKHITAWATTHANA : EVALUATION OF GENE TRANSFERRING EFFICACY THROUGH NANO-POLYPLEX CONSISTING CHITOSAN AND POLY (ETHYLENIMINE) FOR GENE DELIVERY OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN.  
 ADVISOR : ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., CO-ADVISOR : NATTIKA SAENGKRIT, Ph.D., 76 pp.

In this study, the evaluation of gene transfection efficiency of nano-polyplex was performed in a variety of human cell lines. Gene carriers were prepared using cationic polymers, methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride (MPyMeChC) and/or poly(ethylenimine) (PEI) to form polyplex via electrostatic interaction with 1 µg of plasmid pGL-3-basic containing CMV promoter/enhancer at different weight ratios. The results revealed that transfection profiles were different among the three cell lines which indicated that transfection efficiency through MPyMeChC/PEI polyplex was cell-type dependent. A synergistic effect of MPyMeChC/PEI polyplex was found with the high transfection efficiency and low cell cytotoxicity. Therefore, this system was applied for therapeutic gene delivery into the osteoblastic-like cell line, MG-63. The transfection efficiency and cytotoxicity in MG-63 were initially investigated. Intracellular uptake of nano-polyplex was confirmed through confocal laser scanning microscope. Finally, bone morphogenesis protein-2 (BMP-2) gene delivery was performed using the developed transfection system. The expression level of BMP-2 therapeutic gene was measured via reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR). Comparing with commercial available system, Lipofectamine™ 2000, the expression of BMP were prolonged. This study proposes the alternative non-viral gene delivery system which is promising to apply as the non-viral gene carrier for gene therapy.

Department : Clinical Chemistry..... Student's Signature Varaporn Rakkhitawattana  
 Field of Study : Clinical Biochemistry..... Advisor's Signature Tewin Tencomnao  
and Molecular Medicine..... Co- advisor's Signature Nattika Saengkrit  
 Academic Year : 2010.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวัลย์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร. ณัฐริกา แสงกฤษ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงานด้วยดีตลอดมา ดิฉันขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.รุจิภาญจน์ นาสนิท ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยโดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เลขที่โครงการ TG-55-09-51-046M ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 11 (1/2553) ปีงบประมาณ 2553 เลขที่สัญญา 65453370110005 และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย ของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี (Center for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project) และ โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Innovation center for Research and Development of Medical Diagnostic Technology) ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออุปการะในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ ภาควิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด รวมถึงบุคลากรที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยี ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาตลอด

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ยีนบำบัดและระบบนำส่งยีน.....	4
2.2 กลไกการเข้าเซลล์ (Endocytosis).....	7
2.3 การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยพอลิเมอร์ประจุบวก.....	9
2.4 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอ (DNA packaging) กับพอลิเมอร์ประจุบวก.....	10
2.5 Bone morphogenetic protein (BMP).....	13
2.5.1 ประวัติการค้นพบโปรตีน BMP.....	14
2.5.2 การจัดจำแนกและโครงสร้างของโปรตีน BMP.....	14
2.5.3 Bone morphogenetic protein signaling pathway.....	15
2.5.4 โปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของ BMP.....	16
2.5.5 หน้าที่ของ BMP และการประยุกต์ใช้ BMP ในทางการแพทย์.....	17

	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	20
3.2 การเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของ polyplex จาก พอลิเมอร์ประจุบวก MPyMeChC และ/หรือ PEI จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	26
3.2.1 การเตรียม polyplex .....	26
3.2.1.1 การเตรียม polyplex ของ MPyMeChC/DNA และ PEI/DNA.....	26
3.2.1.2. การเตรียม polyplex ของ MPyMeChC/PEI/DNA และ PEI/MPyMeChC/DNA.....	26
3.2.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างพอลิเมอร์และ ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค gel retardation assay.....	27
3.2.3 ตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของ polyplex โดยการวัดขนาด ค่าประจุ ด้วยเครื่อง zetasizer ตามหลักการ dynamic light scattering.....	27
3.2.4 ตรวจสอบรูปร่างของพอลิเมอร์ผสมที่เกิดขึ้นด้วย atomic force microscope (AFM) .....	27
3.3 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep).....	28
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549, SH-SY5Y และ MG-63.....	29
3.4.1 การนำส่ง polyplex ในเซลล์เพาะเลี้ยง.....	29
3.4.2 ประเมินความเป็นพิษของพอลิเมอร์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง.....	30
3.4.3 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค.....	31
3.5 การประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีนใน osteoblastic cell; MG-63.....	31
3.6 การนำส่งยีน BMP-2 ใน MG-63.....	32
3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง.....	33
3.8 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR (reverse transcriptase PCR).....	34
3.9 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล.....	35



4 ผลการทดลอง.....	36
4.1 การเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของ polyplex ที่เกิดจากพอลิเมอร์ประจุบวก MPyMeChC และ MPyMeChC/PEI จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	36
4.1.1 เทคนิค gel retardation assay.....	36
4.1.2 วัดขนาดและประจุบนผิวของ polyplex ด้วย zetasizer .....	37
4.1.3 การตรวจสอบรูปร่างของ polyplex ด้วยเครื่อง Atomic force microscope (AFM).....	42
4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีนและการทดสอบความเป็นพิษของ polyplex ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549 และ SH-SY5Y .....	43
4.2.1 การประเมินประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน.....	43
4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของระบบ (Cell viability testing).....	46
4.3 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ประจุบวกนาส่งยีนสู่เซลล์มะเร็งกระดูกเพาะเลี้ยง MG-63.....	50
4.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีน .....	50
4.3.2 การทดสอบความเป็นพิษของ polyplex ต่อเซลล์ MG-63.....	51
4.4 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค.....	52
4.5 ผลการนำส่งยีน BMP-2 ใน MG-63 ด้วยเทคนิค RT-PCR.....	55
5 สรุป อภิปราย และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	57
รายการอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	76

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	การทำยีนบำบัด clinical trial เพื่อการรักษาโรคด้วย non viral vector.....	7
ตารางที่ 3.1	ลำดับเบสของ primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	35



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	จำนวนการทดลองทำยีนบำบัดตั้งแต่ปี ค.ศ.1989-2010..... 4
ภาพที่ 2.2	ตัวอย่างโครงสร้างของพอลิเมอร์ซึ่งใช้เป็นตัวพาดีเอ็นเอ ประกอบด้วยกลุ่มพอลิเมอร์ ประจุบวก (cationic polymers) และพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable polymers)..... 6
ภาพที่ 2.3	กลไกการเข้าเซลล์ของโมเลกุลแบบจำเพาะ (targeting uptake) และ ไม่จำเพาะ (non-specific uptake)..... 7
ภาพที่ 2.4	กลไกการนำส่งยีนโดย polyplex..... 10
ภาพที่ 2.5	รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับพอลิเมอร์ทั้งแบบ electrostatic interaction, encapsulation และ adsorption..... 11
ภาพที่ 2.6	โครงสร้างของไคโตซาน และการสร้างอนุพันธ์ไคโตซาน methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride (MPyMeChC)..... 12
ภาพที่ 2.7	ภาพจาก scanning force microscope สายของดีเอ็นเอ และสายดีเอ็นเอที่ ถูกขาดแน่นโดย PEI..... 13
ภาพที่ 2.8	โครงสร้างของ BMP..... 15
ภาพที่ 2.9	กลไกการตอบสนองของการกระตุ้นของ BMP ผ่าน Smads pathway..... 16
ภาพที่ 2.10	Ex vivo gene delivery (ซ้าย) และ in vivo gene delivery..... 18
ภาพที่ 2.11	พัฒนาการของเซลล์ใน osteogenic lineage..... 19
ภาพที่ 3.2	พลาสมิด pGL3-basic ที่บรรจุ CMV enhance/promoter region..... 28
ภาพที่ 3.3	ปฏิกิริยาของ MTT..... 30
ภาพที่ 3.4	ขั้นตอนการย้อมสีพลาสมิดด้วยชุดน้ำยา Label IT® Nucleic Acid Labeling Kit, TM-Rhodamine..... 31
ภาพที่ 3.5	โครงสร้างของเวกเตอร์ที่มีส่วนประกอบของ Bone morphogenetic protein... 33
ภาพที่ 4.1	การจับกันของพอลิเมอร์และพลาสมิดดีเอ็นเอที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยเทคนิค gel retardation assay..... 37
ภาพที่ 4.2	ผลจากการวัดขนาดและประจุของ MpyMeChC/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ MpyMeChC ต่อดีเอ็นเอ เป็น 0.5/1, 1/1, 5/1, 10/1, 20/1, 40/1..... 38

ภาพที่ 4.3	ผลจากการวัดขนาดและประจุของ PEI/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI ต่อดีเอ็นเอ เป็น 0.5/1, 1/1, 5/1, 10/1, 20/1, 40/1.....	39
ภาพที่ 4.4	ผลจากการวัดขนาดและประจุของ MpyMeChC/PEI/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ MpyMeChC ต่อ PEI ต่อดีเอ็นเอ เป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 5/1/1, 10/1/1, 20/1/1, 40/1/1.....	40
ภาพที่ 4.5	ผลจากการวัดขนาดและประจุของ PEI/MpyMeChC/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI ต่อ MpyMeChC ต่อดีเอ็นเอ เป็น 1/0.5/1, 1/1/1, 1/5/1, 1/10/1, 1/20/1, 1/40/1.....	41
ภาพที่ 4.6	ภาพ AFM แสดงลักษณะของ polyplex ที่มีรูปร่างกลม ที่ w/w ต่าง ๆ ซึ่งแสดงทั้งภาพ topology และ phase constrast.....	42
ภาพที่ 4.7	ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่ weight ratio ต่าง ๆ.....	44
ภาพที่ 4.8	ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง A549 ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่ weight ratio ต่าง ๆ .....	45
ภาพที่ 4.9	ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่ weight ratio ต่าง ๆ .....	46
ภาพที่ 4.10	ความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ด้วยวิธี MTT.....	47
ภาพที่ 4.11	ความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง A549 ด้วยวิธี MTT.....	48
ภาพที่ 4.12	ความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT.....	48
ภาพที่ 4.13	ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง MG-63 ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่ weight ratio ต่าง ๆ .....	50
ภาพที่ 4.14	ความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง MG-63 ด้วยวิธี MTT.....	51
ภาพที่ 4.15	การเข้าสู่เซลล์ MG-63 ของพลาสมิดที่ย้อมด้วยสี TM-Rhodamine (สีแดง) และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Acridine orange (สีเขียว) ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง.....	52

ภาพที่ 4.16	ผลการวิเคราะห์ Z-stack จากการนำส่งพลาสมิดที่ย้อมด้วยสี TM-Rhodamine (สีแดง) ในเซลล์ MG-63 ซึ่งย้อมด้วย Acridine orange (สีเขียว) ที่เวลา 6 ชั่วโมงโดยให้PEI/MPyMeCh/DNA 0.5/1/1 เป็นตัวพา.....	53
ภาพที่ 4.17	ผลการวิเคราะห์ Z-stack จากการนำส่งพลาสมิดที่ย้อมด้วยสี TM-Rhodamine (สีแดง) ในเซลล์ MG-63 ซึ่งย้อมด้วย Acridine orange (สีเขียว) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยให้PEI/MPyMeCh/DNA 0.5/1/1 เป็นตัวพา.....	54
ภาพที่ 4.18	เปรียบเทียบผลการนำส่งยีน BMP-2 โดยใช้พอลิเมอร์ผสมที่มีอัตราส่วน PEI/MPyMeChC/DNA 0.5/1/1 จากการวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่เวลา 1, 3, 7, 10 และ 14 วันหลังการนำส่ง.....	56
ภาพที่ 5.1	โครงสร้างของ MPyMeChC.....	57
ภาพที่ 5.2	ภาพจำลองการจับกันระหว่างพอลิเมอร์และดีเอ็นเอในระบบพอลิเมอร์ผสมเพื่อเตรียมMPyMeChC/DNA polyplex.....	58



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยีนบำบัด (gene therapy) เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางพันธุกรรม อันเกิดจากความผิดปกติของยีนหรือดีเอ็นเอ เป็นผลทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุล หรือมีการสร้างสารดังกล่าวที่ผิดไป มีผลให้เกิดความผิดปกติในระดับเซลล์และอวัยวะ [1] อย่างไรก็ตาม การทำยีนบำบัดในมนุษย์ ยังคงมีปัญหาและข้อจำกัดหลายประการ โดยในส่วนของที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งยีนสู่เซลล์เป้าหมาย การปลดปล่อยยีนจากตัวพา(vector) การแสดงออกของยีน และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน [2] ดังนั้นระบบนำส่งที่สามารถลดปัญหาข้างต้นได้จึงเป็นที่ต้องการสำหรับการทำยีนบำบัด ตัวพาสำหรับการนำส่งยีนมีทั้ง viral และ non-viral vector โดย viral vector นั้นมีประสิทธิภาพการนำส่งยีนสูง สามารถบุกรุกเข้าเซลล์ได้ทั้งที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัว แต่ก็มีข้อเสีย กล่าวคือ เมื่อมีการบุกรุกเข้าเซลล์ ไวรัสจะเป็นสาเหตุให้เกิดความไม่สมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากระบบมีการตอบสนองต่อการบุกรุกของไวรัส [3] ทำให้การทำยีนบำบัดยังมีข้อสงสัยและเป็นเรื่องที่น่าตื่นกลัว โดยเฉพาะเมื่อต้องการนำมาใช้จริงกับมนุษย์ ด้วยปัญหาดังกล่าว คณะผู้วิจัยจะได้ศึกษาระบบนำส่งยีนแบบ non-viral สำหรับนำส่งยีนซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสมิดดีเอ็นเอร่วมกับตัวพาที่เป็นอนุภาคนาโนประเภทพอลิเมอร์ประจุบวก ซึ่ง non-viral vector นี้ได้ถูกการพัฒนาเป็นตัวพาทางเลือกสำหรับการทำยีนบำบัด

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ใช้พอลิเมอร์อนุพันธ์ไคโตซาน MPyMeChC (Methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไคโตซานที่ละลายน้ำได้ดีและมีความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอได้แน่น นอกจากนี้ยังไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ ได้มีรายงานการศึกษาพบว่า MPyMeChC มีประสิทธิภาพดีในการนำส่งยีนสู่เซลล์ Huh7 [4] อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการทดลองใช้ MPyMeChC เป็นตัวพานำส่งยีนสู่กับเซลล์ HeLa พบว่า MPyMeChC เป็นตัวพาที่มีประสิทธิภาพต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับหลายการทดลองที่พบว่าประสิทธิภาพการนำส่งของ non-viral vector ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ [5, 6] เนื่องจากประสิทธิภาพในการนำส่งยีนขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน [7] ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีเป้าหมายในการพัฒนาระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพและใช้ได้ดีกับเซลล์หลากหลายชนิด รวมทั้งเป็นระบบที่มีราคาถูกลง เตรียมง่าย และสะดวก เป็นตัวพาทางเลือกใหม่สำหรับการนำส่งยีน โดยเลือก MPyMeChC เป็นพอลิเมอร์ตัวพาหลักในสร้างอนุภาคกับพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่ง MPyMeChC มีคุณสมบัติเด่นคือ ไม่เป็นพิษกับเซลล์ และใช้พอลิเมอร์ polyethyleneimine (PEI) ซึ่งเป็นสารเคมีสำหรับนำส่งยีนทางการค้าผสมเข้าไป

ในระบบ เนื่องจาก PEI เป็นพอลิเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูง เพราะเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกสูง แต่การมีประจุบวกสูงนี้เอง จึงเป็นผลทำให้ PEI มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงเช่นกัน ดังนั้นจึงคาดว่า การใช้พอลิเมอร์ผสม MPyMeChC และ PEI จะช่วยเสริมข้อดีของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด กล่าวคือ ได้ตัวพาที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงและมีความเป็นพิษต่ำ

การศึกษา non-viral vector นั้นมีจุดประสงค์หลักคือลดความเสี่ยงจากการก่อโรคและลดโอกาสการชักนำการกลายพันธุ์โดยไวรัส อีกทั้งตัวพาที่ใช้ยังมีราคาถูก และง่ายต่อการผลิตอีกด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้ โดยในเบื้องต้นผู้วิจัยจะประเมินประสิทธิภาพของระบบนำส่งอนุภาคนาโน MPyMeChC และ/หรือ PEI ในการนำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยงหลากหลายชนิด ได้แก่ A549, HeLa, SH-SY5Y และ MG-63 เพื่อตรวจสอบศักยภาพของระบบนำส่งระดับ in vitro และทดสอบความพิษของตัวพาต่อเซลล์ จากนั้นผู้วิจัยจะได้นำยีน bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) [8] เป็นต้นแบบศึกษาผลการนำส่งยีนสู่เซลล์กระดูก MG-63 แล้วตรวจสอบผลการนำส่งจากการวัดปริมาณการแสดงออกของยีน BMP-2 หลังจากการนำส่ง การทดลองนี้สามารถต่อยอดงานวิจัยในด้าน bone engineering ได้ โดยการนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติใน tissue scaffold โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์กระดูกใน scaffold (ex vivo) เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกของตนเองต่อไปได้ (autologous transplantation)

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เตรียมตัวพาจากพอลิเมอร์ประจุบวกผสมระหว่าง MPyMeChC และ/หรือ PEI เพื่อจับกับพลาสมิดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมีของ polyplex ที่เตรียมได้
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษของพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC และ/หรือ PEI เมื่อใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549, SH-SY5Y และ MG-63
3. ทดสอบระบบนำส่งเมื่อนำมาใช้ในการส่งยีนบำบัด BMP-2 เพื่อกระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูก และตรวจสอบผลการนำส่งด้วยการวัดการแสดงออกของ BMP-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR

### ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการประเมินผลการนำส่งยีนด้วยอนุภาคนาโนในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทดสอบระบบนำส่งที่เตรียมขึ้นกับเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เพื่อหาตัวพาที่ใช้ได้ดีกับเซลล์หลากหลาย โดยตัวพาที่เหมาะสมสำหรับการนำส่งยีนจะถูกระเมินควบคู่ไปกับผลการทดสอบ

ความเป็นพิษของระบบต่อเซลล์ ทั้งนี้ระบบที่เหมาะสมที่สุดจะได้ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการนำส่งยีน bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) เป็นต้นแบบศึกษาผลการนำส่งยีนสู่เซลล์กระดูก MG-63

### ข้อจำกัดของการวิจัย

1. เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เซลล์ที่เหมาะสมในการศึกษาคือ Mesenchymal stem cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ osteoblast หรือเซลล์ชนิดอื่น ๆ โดยขึ้นอยู่กับสารที่มากกระตุ้นเซลล์ แต่เนื่องจาก stem cell นั้นเพาะเลี้ยงนั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน รวมถึงเจริญเติบโตช้า ดังนั้นจึงใช้เซลล์ MG-63 ซึ่งเป็น osteoblastic – like cell แทนในการศึกษาการนำส่งยีน BMP-2
2. โปรโมเตอร์ของพลาสมิดที่ใช้ในการนำส่งยีน BMP-2 นั้น เป็นโปรโมเตอร์ polyhedrin ซึ่งไม่เป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกสูงในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cell) เมื่อเทียบกับเซลล์แมลง (dipteran cell) [9]

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่พัฒนาระบบการนำส่งยีนโดยที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และมีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงซึ่งอาจพัฒนาไปใช้ในการนำส่งยีนหรือ RNAi (RNA interference) ที่มีความปลอดภัยได้ต่อไป
2. เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อต่อยอดงานวิจัยในระดับที่สูงขึ้นในอนาคตเพื่อสามารถประยุกต์ในการรักษาโรคหลายชนิดโดยมีความปลอดภัยมากขึ้นจากการใช้ non-viral vector

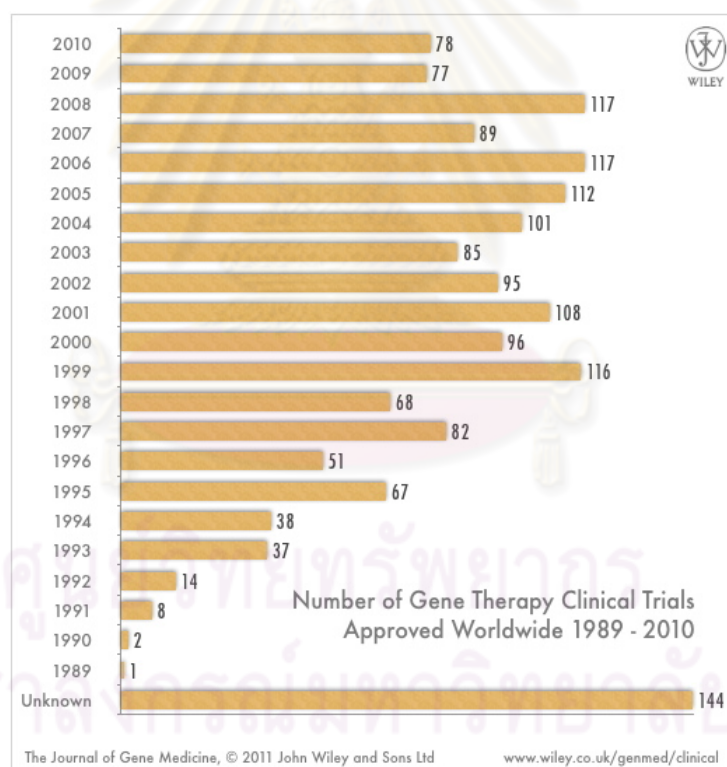
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ยีนบำบัดและระบบนำส่งยีน

การทำยีนบำบัดมีเป้าหมายที่จะแก้ปัญหาของโรคที่มีสาเหตุจากความบกพร่องทางพันธุกรรม โดยการทดแทนหรือลดการแสดงออกของยีนที่เป็นสาเหตุของความผิดปกติ นักวิจัยและแพทย์จำนวนมากเชื่อว่า อนาคตของยีนบำบัดจะกลายเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้รักษาโรคทางพันธุกรรม เช่น มะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคติดต่อ โรคทางระบบประสาท เป็นต้น แม้ว่าจะยังมีปัญหาและอุปสรรคมากมายเกี่ยวกับการทำยีนบำบัด แต่ยังคงมีความพยายามศึกษาและพัฒนาเทคนิคการทำยีนบำบัดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง รวมถึงได้มีการทดลองใน clinical trial ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 จำนวนการทดลองทำยีนบำบัดตั้งแต่ปี ค.ศ.1989-2010 [10]

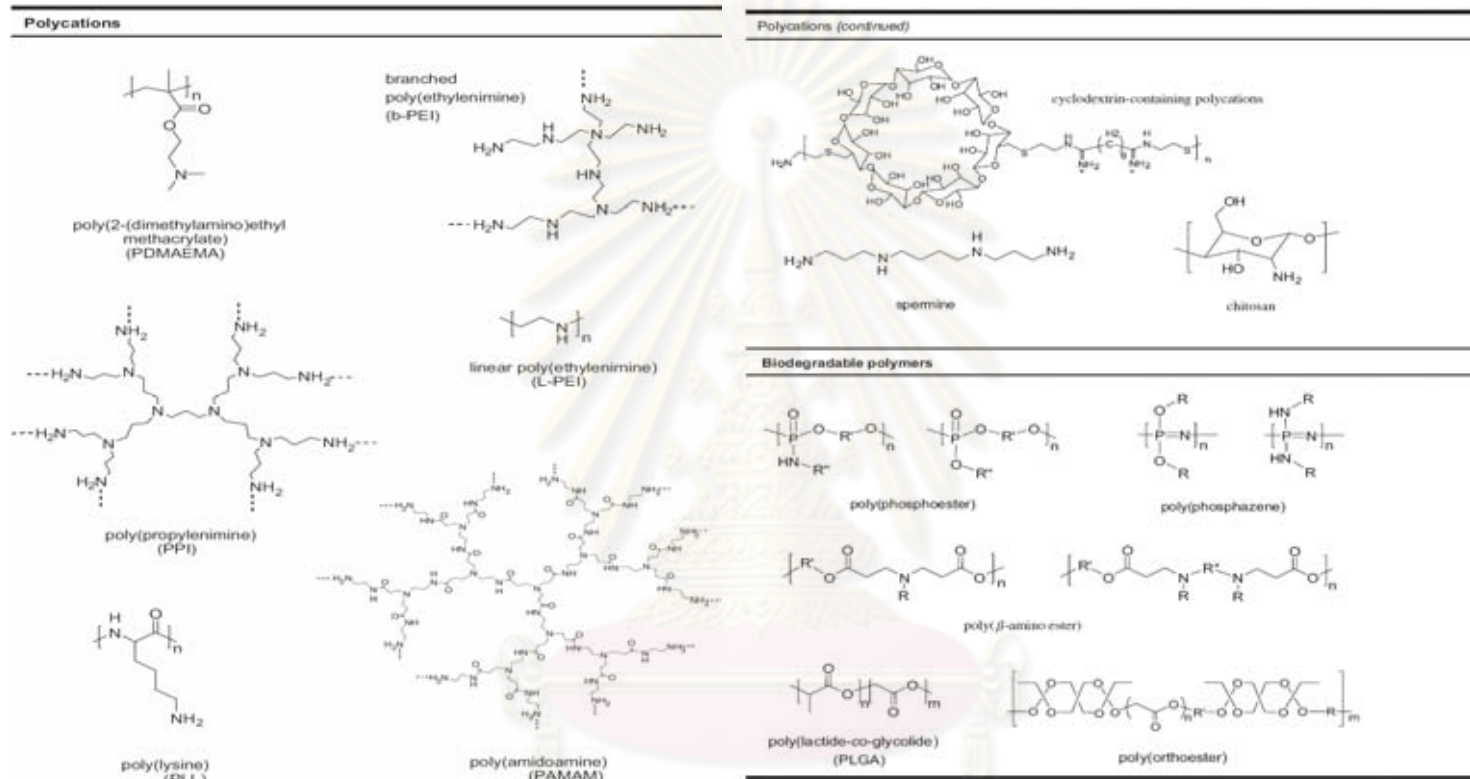
ระบบนำส่งยีนสำหรับการทำยีนบำบัด แบ่งออกเป็น 2 ระบบ ได้แก่ [11] วิธีทางกายภาพ (Physical methods) ได้แก่ gene gun, electroporation, ultrasound และ hydrodynamic delivery [12] วิธีทางเคมี (Chemical methods) ได้แก่ calcium phosphate, พอลิเมอร์ประจุบวก และไขมันประจุบวก เป็นต้น [13] อย่างไรก็ตามวิธีการที่กล่าวมาในข้างต้นสำหรับการนำส่ง

ยีนที่ต่ำ การนำส่งยีนอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้ในการทดลองมากคือ การนำส่งที่ใช้ไวรัส เป็นตัวพาพายังมีปัญหาสำคัญในด้านความปลอดภัยอยู่ เนื่องจากไวรัสสามารถแทรกยีนของ ตัวเองกับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน จึงทำให้มีโอกาสเป็นโรคจากไวรัสได้ อีกทั้งยังมีหลักฐานว่า ระบบนี้ส่งผลทำให้เกิดตอบสนองของภูมิคุ้มกันในทางลบ ทำให้เกิดความเสียหายที่จะเป็นมะเร็งได้ นอกจากนี้การผลิตไวรัสจำนวนมากยังเป็นเรื่องที่ทำได้ยากและมีราคาแพง [14]

ตัวพาที่ดีนั้นต้องสามารถปกป้องดีเอ็นเอจากการถูกทำลายได้ มีความสามารถในการ นำส่งดีเอ็นเอขนาดใหญ่ สามารถบริหารการนำส่งได้ง่าย เช่น นำส่งได้โดยการสูดดม ทางปาก หรือฉีดเข้าไปโดยมีระยะเวลาที่อยู่ในร่างกายนาน มีความจำเพาะต่อเซลล์ที่นำส่งไม่ว่าจะเป็นการ ใช้ receptor หรือ promoter ที่จำเพาะต่อเซลล์นั้น ๆ มีประสิทธิภาพสูงในการนำส่งเข้าสู่เซลล์ไม่ ว่าจะเป็นการขึ้นต้นของการผ่านเข้าสู่เซลล์ การปลดปล่อยดีเอ็นเอจาก endosomal การนำส่งยีน เข้าสู่นิวเคลียส มีความสามารถในการควบคุมการแสดงออกได้ โดยแสดงออกในระดับที่สม่ำเสมอ หรือสามารถถูกกระตุ้นการแสดงออกได้ด้วยยา สามารถนำส่งได้ในเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัว มีความ ปลอดภัย ไม่เป็นพิษ ไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันและไม่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้ยังควรมีความง่ายและ ความคงตัวในการผลิตรวมถึงมีกระบวนการผลิตที่มีราคาไม่แพงอีกด้วย [15]

หากคำนึงถึงความปลอดภัย ตัวพาแบบ non-viral vector จึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่า แม้ว่า การนำส่งยีนโดยใช้ตัวพาที่เป็น viral vector นั้นจะมีประสิทธิภาพเหนือกว่าก็ตาม ปัจจุบัน non-viral vector ได้รับความสนใจอย่างมาก โดยได้มีการพัฒนาระบบนี้ให้มีประสิทธิภาพในการนำส่ง ยีนให้ดีขึ้น รวมทั้งได้มีการออกแบบวิธีการนำส่งให้มีความหลากหลาย เช่น การเพิ่มความจำเพาะ ในการนำส่งสู่เป้าหมายอย่างแม่นยำ [16, 17] เป็นต้น ระบบดังกล่าวนี้มีตัวพาหลากหลายรูปแบบ เช่น cationic lipids, cationic polymers, polysaccharides, dendrimers หรือแม้แต่ gold nanoparticles เป็นต้น [18, 19] ซึ่งตัวพาเหล่านี้จัดว่ามีความปลอดภัยสูง ราคาไม่แพง เตรียม ง่ายและสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก [20, 21] ตัวอย่างของตัวพากลุ่มพอลิเมอร์ที่สามารถจับ กับดีเอ็นเอแสดงใน ภาพที่ 2.2





ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้างของพอลิเมอร์ซึ่งใช้เป็นตัวพาดีเอ็นเอ ประกอบด้วยกลุ่มพอลิเมอร์ ประจุบวก (cationic polymers) และพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable polymers) [22]

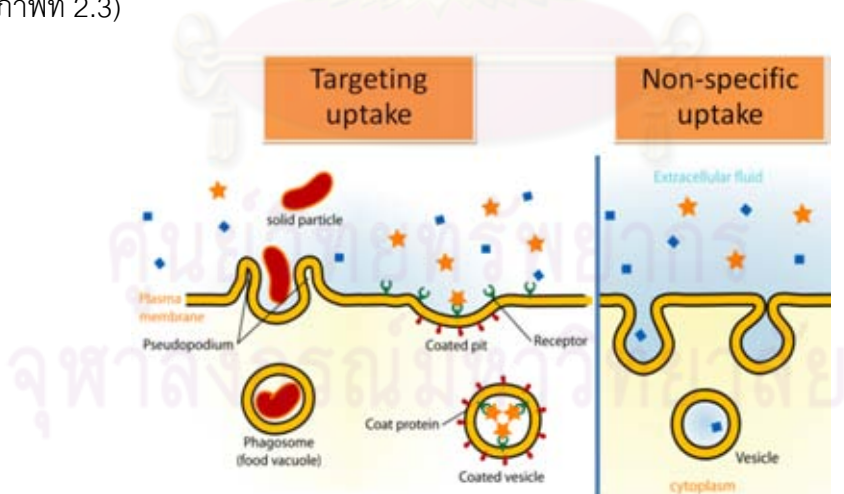
จะเห็นได้ว่า non-viral vector ได้รับการพัฒนาจนเป็นที่ยอมรับให้มีการทดลองระดับ clinical trial ผ่านการทดลองในช่วง phase ต่าง ๆ เพื่อดูผลการรักษา โรคมะเร็ง และโรคติดเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การทำยีนบำบัด clinical trial เพื่อการรักษาโรคด้วย non-viral vector [23]

construct	delivery vector	disease	status
Allovectin-7	DMRIE/DOPE (1:1)	melanoma	phase 3
Allovectin-7	DMRIE/DOPE (1:1)	melanoma and renal cell cancer	phase 2
	DOSPA/DOPE (3:1)	solid tumors	phase 1
tgDCC-E1A	DC-Chol/DOPE (1.5:1)	head and neck cancers	phase 2
tgDCC-E1A	DC-Chol/DOPE (1.5:1)	ovarian cancer	phase 1
LIPO-HSV-1-tk	DC-Chol/DOPE (3.7)	glioblastoma multiform	phase 2
	DC-Chol/DOPE (1.5:1)	cystic fibrosis	phase 1
	DOTAP	cystic fibrosis	phase 1
GL-67:DOPE-pCF1-CFTR	GL-67/DOPE (1:2)	cystic fibrosis	phase 1
BC-819	in vivo jetPEI	bladder cancer	phase 2b
EGEN-001	PEG-PEI-Chol	ovarian cancer	phase 1
DermaVir	PEI mannose and dextrose	HIV	phase 2
	PEGylated 30mer PLL	cystic Fibrosis	phase 2
CALAA-01	cyclodextrin-based polymer	solid tumors	phase 1

## 2.2 กลไกการเข้าเซลล์ (Endocytosis)

การเข้าเซลล์ของโมเลกุล สามารถเกิดได้ผ่านทั้งกลไกที่เป็นแบบจำเพาะ และไม่จำเพาะ [22] (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 กลไกการเข้าเซลล์ของโมเลกุลแบบจำเพาะ (targeting uptake) และ ไม่จำเพาะ (non-specific uptake) [24]

1. การเข้าสู่เซลล์แบบจำเพาะ (Targeting uptake) สามารถแบ่งออกได้เป็นการนำเข้าสู่เซลล์ผ่าน receptor ที่จำเพาะกับเซลล์เป้าหมาย และ การเลือกผ่านเนื่องจากขนาดโดยเซลล์บางชนิด [22]

1.1 Receptor-mediated targeting and endocytosis คือ การใช้ ligand ที่จับอย่างจำเพาะกับ receptor บนผิวเซลล์ ซึ่ง ligand นั้นมีตั้งแต่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต สารชีวโมเลกุลอื่น ๆ เช่น แอนติบอดี นอกจากนี้ โมเลกุลที่ใช้กันมากเป็นเป้าหมายในการนำส่งยีน ได้แก่ folate และ transferrin อย่างไรก็ตาม ligand เหล่านี้ก็สามารถที่จะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันได้

1.2 Size exclusion and phagocytosis ขนาดหรือเส้นผ่าศูนย์กลางโมเลกุลมีขนาดระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร จะสามารถเข้าไปในเซลล์ที่มีกลไก phagocytosis ได้ เช่น APCs (Antigen-presenting cells) ของระบบภูมิคุ้มกัน กลไกนี้ได้มีการนำมาใช้ในเรื่องของการนำส่ง DNA vaccine

2. การเข้าสู่เซลล์แบบไม่จำเพาะ (non-specific uptake)

2.1 Ionic interaction with membrane-bound proteoglycans and endocytosis เป็นการเข้าเซลล์ที่ไม่มีความจำเพาะ โดยการใช้แรงระหว่างประจุของโมเลกุลกับ proteoglycans ที่อยู่บนผิวของเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีนอยู่บนเมมเบรนที่เชื่อมกันด้วย sulfate หรือ carboxylated glycoaminoglycans (GAGs) โดย GAGs นั้นมีความเป็นประจุลบที่สูงมากบนผิวเซลล์ กลไกนี้ได้นำมาใช้สำหรับนำส่งสารสังเคราะห์ที่เป็นตัวพาให้มีความเป็นประจุบวกสูง เพื่อที่จะสามารถจับกับโมเลกุลนี้บนผิวเซลล์ได้ แม้ว่ากลไกการพาเข้าเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังไม่ชัดเจน แต่วิธีนี้เป็นประโยชน์สำหรับการนำส่งยีน

2.2 Lipophilic interaction with phospholipid membrane and endocytosis อีกวิธีหนึ่งที่จะนำยีนเข้าสู่เซลล์ได้ โดยใช้ตัวพาที่เป็นไขมันผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็น phospholipid bilayer

2.3 Cell penetrating peptide-mediated uptake มักเป็นโปรตีนสายสั้นขนาด 5-40 หน่วยอะมิโน ได้มาจากไวรัส ช่วยให้เกิดกระบวนการ penetrating ผ่านเข้าเซลล์ได้ดี โดยกระบวนการนี้มีกลไกดังนี้

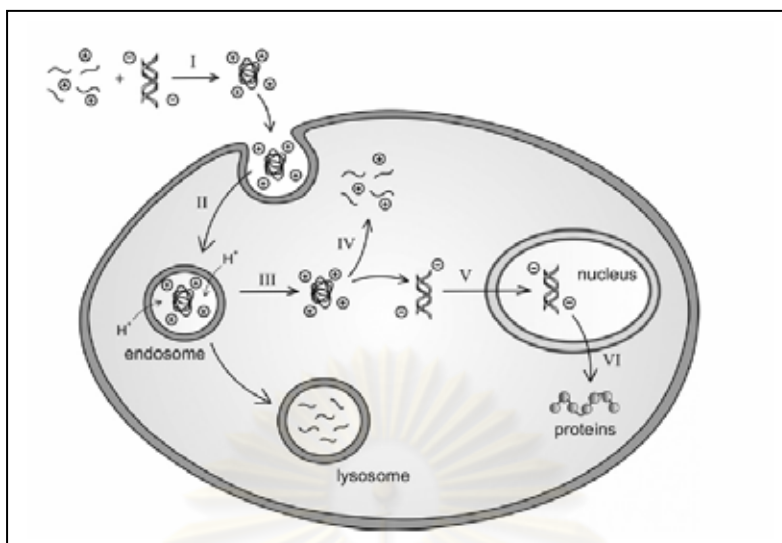
- Direct penetration กลไกนี้นำส่งสารได้โดยผ่าน electrostatic ของประจุบวกในเปปไทด์กับประจุลบของ phospholipid ซึ่งจะรบกวนผิว

เซลล์ทำให้สายเปปไทด์รวมกับผิวเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องอาศัยพลังงาน

- Endocytosis mediated Translocation เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการกินของเซลล์ แล้วส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ วิธีนี้อาศัยพลังงาน เช่น เปปไทด์ Trans-activating transcriptional activator จาก Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) ให้ผลในการส่งสารเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงได้หลายชนิด [25] โดยจะใช้ส่วน polyarginine จับกับ heparin sulphates ซึ่งจะช่วยให้การเข้าเซลล์ผ่านโดย macropinocytosis
- Translocation through the formation of a transitory structures เปปไทด์จำพวกนี้จะจับกับประจุลบของ phospholipid บนผิวเซลล์ ทำให้เกิดเป็น micelle ภายในเมมเบรน หรือเกิดรูที่มีลักษณะเป็น b-barrel บนผิวเซลล์โดยที่ตัวพาเข้าไปนั้นจะต้องมีความเป็น hydrophobic ด้วย [26, 27]

### 2.3 การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์โดยพอลิเมอร์ประจุบวก

จากตัวพาที่ได้กล่าวข้างต้น พอลิเมอร์ประจุบวกเป็นกลุ่มที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากพอลิเมอร์เหล่านี้ มีประจุบวกที่ใช้จับกับประจุลบของดีเอ็นเอ ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอ ทั้งก้อนหดแน่นอยู่ในขนาดที่เหมาะสมที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์ โดยเฉพาะที่เกิดเป็นอนุภาค เรียกว่า “polyplex” โดย polyplex ขนาดนาโนเมตรสามารถผ่าน receptor-mediated endocytosis หรือไมโครเมตตราสามารถผ่าน macropinocytosis หรือ phagocytosis ได้ นอกจากนี้แล้วการนำส่งดีเอ็นเอที่บรรจุอยู่ในอนุภาคยังสามารถป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์จากทั้งในและนอกเซลล์อีกด้วย [28] ทั้งนี้ polyplex มีขั้นตอนการผ่านเข้าเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 2.4



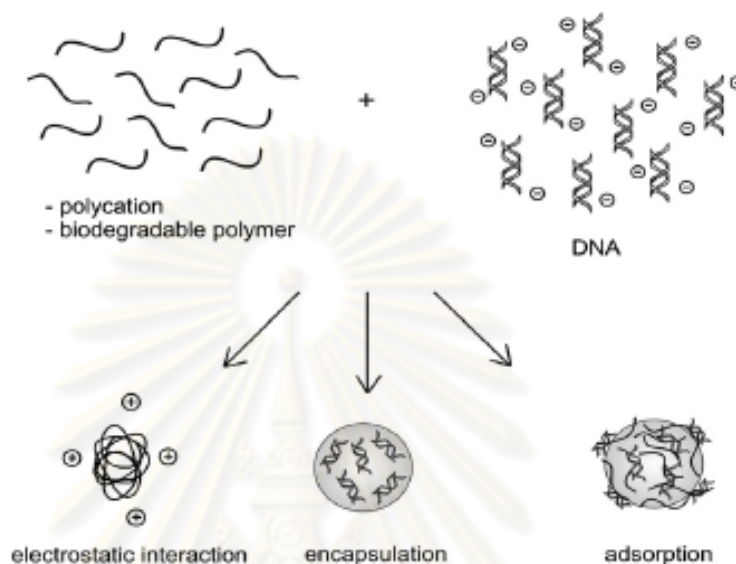
ภาพที่ 2.4 กลไกการนำส่งยีนโดย polyplex มีขั้นตอนดังนี้ (I) การเกิดการรวมตัวของยีนและพอลิเมอร์เกิดเป็นอนุภาค polyplex, (II) อนุภาคถูกนำเข้าสู่เซลล์ผ่านกลไกซึ่งมีหลายรูปแบบ, (III) อนุภาคถูกปลดปล่อยออกจาก endosome, (IV) ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาค, (V) ดีเอ็นเอเคลื่อนตัวในไซโตพลาสซึมผ่านเข้าสู่นิวเคลียส, (VI) ยีนมีการแสดงออก เพื่อผลิตโปรตีน [22]

## 2.4 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอ (DNA packaging) กับพอลิเมอร์ประจุบวก

1. Electrostatic interaction วิธีนี้จะใช้ความเป็นประจุลบโดยธรรมชาติของดีเอ็นเอ เพื่อที่จะก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มโดยผ่านแรงกระทำทางประจุ (electrostatic interaction) จับกับพอลิเมอร์ส่วนใหญ่จะมีประจุบวกจาก amino group ซึ่งดีเอ็นเอและพอลิเมอร์นี้ประจุบวกสามารถเกิดปฏิกิริยากันได้เอง เมื่อประจุระหว่างไนโตรเจนและฟอสเฟตมีอัตราส่วนที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม การที่อนุภาคมีประจุบวกในระดับสูงจะมีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ การมีประจุบวกมากยังทำให้การปลดปล่อยดีเอ็นเอเข้าไปถึงเป้าหมายที่จะทำงานได้ยากขึ้น
2. Encapsulation เป็นอีกหนึ่งทางเลือกนอกจากการใช้ electrostatic interaction polymer โดยใช้พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ห่อหุ้มดีเอ็นเอ แล้วให้มีการปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ในเซลล์ อย่างไรก็ตาม วิธีการห่อหุ้มอาจต้องใช้การสังเคราะห์ที่มีการใช้แรงดันมาก สารอินทรีย์หรืออุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายได้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาอย่างไม่สมบูรณ์อีกด้วย

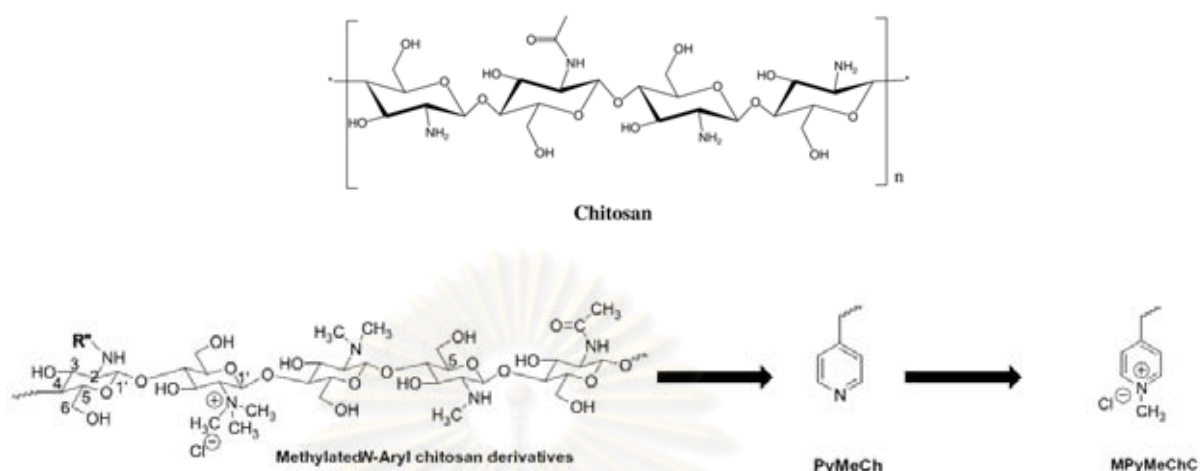


3. Adsorption เป็นวิธีสร้างอนุภาคขึ้น โดยให้ผิวของอนุภาคมีประจุซึ่งสามารถให้ดีเอ็นเอมาเกาะได้ และเมื่อพอลิเมอร์ถูกทำลาย ก็จะสามารถปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ ข้อเสียของวิธีนี้ไม่สามารถปกป้องดีเอ็นเอจากการย่อยสลายได้ดี เมื่อเทียบกับ 2 วิธีข้างต้น



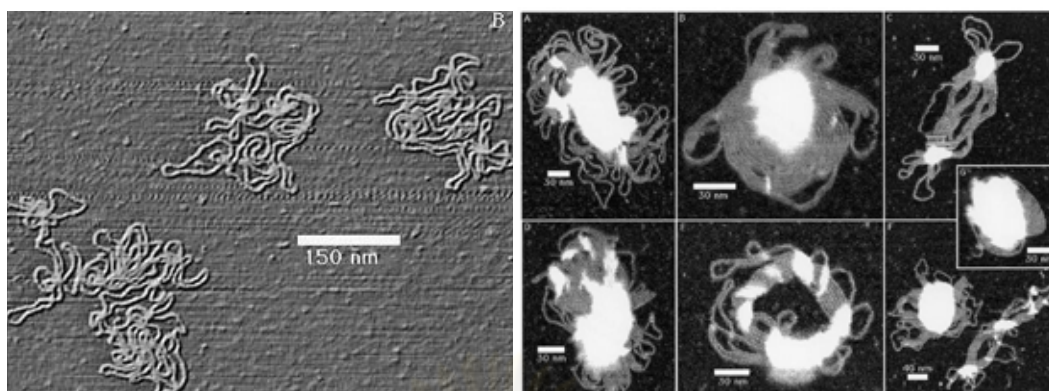
ภาพที่ 2.5 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับพอลิเมอร์ทั้งแบบ electrostatic interaction, encapsulation และ adsorption [22]

ในการทดลองครั้งนี้เราเลือกใช้พอลิเมอร์กลุ่มไคโตซาน เป็นตัวพาในการนำส่งยีน ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ตามธรรมชาติ มีประจุบวก ย่อยสลายได้และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงมีได้การสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซานขึ้น โดยมีการเติมหมู่ methyl เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ (hydrophilicity) อีกทั้งยังได้เพิ่มหมู่ aromatic ring เพื่อเสริมการจับกันของพอลิเมอร์และดีเอ็นเอ เนื่องจากความเป็นประจุบวกของ pyridine ring อาจจะสามารถเปลี่ยนตำแหน่งได้จากการ resonance ซึ่งอาจจะทำให้ดีเอ็นเอจับกับพอลิเมอร์แน่นขึ้น [4] อนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ขึ้นนี้คือ methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride (MPyMeChC) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของไคโตซาน [29] (บน) และการสร้างอนุพันธ์ไคโตซาน methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride (MPyMeChC) [4] (ล่าง)

จากการทดลองของ Sajomsang และคณะ 2009 พบว่า MPyMeChC มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง Huh7 แต่พอลิเมอร์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพต่ำเมื่อต้องการนำส่งยีนสู่เซลล์ HeLa ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ MPyMeChC เป็นตัวพายังมีข้อจำกัด เมื่อต้องการนำไปใช้กับเซลล์ชนิดอื่น ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัย จึงต้องการเสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนของ MPyMeChC โดยได้เลือกใช้ระบบพอลิเมอร์ผสม พอลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวเสริมประสิทธิภาพการนำส่ง คือ PEI ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกที่นิยมใช้ในระบบนำส่งยีนมากที่สุด [29] การใช้ PEI สำหรับการนำส่งยีนยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) เนื่องจาก PEI มีประสิทธิภาพประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* รวมถึงประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูง [30] การมีประจุบวกสูงของ PEI ทำให้สามารถจับดีเอ็นเอและเกิดการขดแน่น (ภาพที่ 22) นอกจากนี้ PEI ยังมีคุณสมบัติเฉพาะ ที่เรียกว่า “proton sponge effect” ช่วยในการหลบหนีการย่อยสลายของเอนไซม์ใน endosome [31] ป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายเมื่ออนุภาคถูกนำส่งเข้าเซลล์ เนื่องจาก PEI มีความเป็นเบสอ่อนจึงมีความสามารถในการรับโปรตอนได้มาก ทำให้  $\text{Cl}^-$  เข้าไปสะสมใน endosome และพาน้ำเข้าไปด้วยทำให้เกิดการบวมแตกของ endosome ขึ้นจากแรงดันออสโมติก ทำให้อนุภาคถูกปลดปล่อยมาจาก endosome รอดพ้นจากการย่อยโดยเอนไซม์ ช่วยให้การนำส่งดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตาม PEI ก็มีข้อเสียในเรื่องของการมีค่าประจุบวกสูง ทำให้ PEI มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง เมื่อใช้เป็นตัวพานำส่งยีน



ภาพที่ 2.7 แสดงภาพจาก scanning force microscope สายของดีเอ็นเอ (ซ้าย) และสายดีเอ็นเอที่ถูกขดแน่นโดย PEI (ขวา) [32]

ในการทดลองนี้จะใช้ PEI เสริมประสิทธิภาพการนำส่งยีนของ MPyMeChC โดยคาดว่า จะสร้างระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพดีและใช้นำส่งยีนสู่เซลล์ได้หลากหลายประเภท ระบบพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC และ PEI นี้ มีข้อดีจาก PEI คือมีประสิทธิภาพการนำส่งยีนสูง และในขณะเดียวกันความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวพาจะต่ำลงเนื่องจากระบบนำส่งมี MPyMeChC การทดลองเริ่มต้นตั้งแต่การหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ในการผสมพอลิเมอร์ MPyMeChC และ/หรือ PEI กับดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของ polyplex ที่เกิดขึ้น ศึกษาผลการนำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549, SH-SY5Y และ MG-63 โดยเบื้องต้นได้นำส่งยีนสังเคราะห์ luciferase ซึ่งสามารถวัดปริมาณได้และง่ายในการตรวจตามผลการนำส่ง ทำได้ดีที่สุด ตัวพาที่มีอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการนำส่งได้ถูกนำมาใช้นำส่งยีนสังเคราะห์ Bone morphogenetic protein เพื่อเป็นต้นแบบของการนำส่งยีนบำบัด ซึ่งอาจพัฒนาไปสู่ cell-based gene therapy สำหรับการสร้างกระดูกต่อไป

## 2.5 Bone morphogenetic protein (BMP)

BMP เป็น growth factor ตามธรรมชาติ หลังจากการค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1965 [33] จนถึงปัจจุบัน BMP จัดเป็นโปรตีนประเภทเดียวที่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ BMP สร้างจากเซลล์ osteoblast ซึ่งมีต้นกำเนิดจาก mesenchymal stem cell ที่เป็น osteoprogenitor โปรตีนชนิดนี้ทำงานโดยการจับกับเซลล์เป้าหมายบน bone morphogenetic protein receptor (BMPR) แล้วส่งสัญญาณต่อไปยัง nucleus โดยผ่าน intracellular protein ที่เรียกว่า SMADs [34] ซึ่งจะชักนำให้เกิดการแปลรหัสของ osteogenic genes ต่อไป [35, 36] กลไกนี้ใช้ในการสร้างและซ่อมแซมกระดูก รวมทั้งเนื้อเยื่อหลายชนิด ซึ่งถือเป็นกระบวนการสร้างกระดูกภายหลัง

การกำเนิด (Post-natal bone development) นอกจาก BMP จะมีความสำคัญในกระบวนการสร้างกระดูกและกระดูกอ่อนแล้ว โปรตีนนี้ยังจัดเป็นโปรตีนบำบัด (Therapeutic protein) ซึ่งมีการนำไปใช้ในทางการแพทย์มากมาย

### 2.5.1 ประวัติการค้นพบโปรตีน BMP

ในปี 1965 Urist [33] ค้นพบว่า bone matrix ความสามารถเหนียวนำไปสร้างกระดูกได้ Urist แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระดูกสามารถเหนียวนำไปเกิดกระดูกใหม่ได้ในบริเวณกล้ามเนื้อในหนูทดลอง เป็นการค้นพบ “Bone morphogenetic protein” หรือ “osteogenic protein” ซึ่งเป็นสารที่อยู่ใน demineralized bone ทำหน้าที่การเหนียวนำไปสร้างกระดูกใหม่

ในปี 1981 Reddi และ Sampath [37] ได้ยืนยันผลการทดลองของ Urist โดยได้แยกสกัดโปรตีนออกจาก Bone matrix และพบว่า Bone matrix ไม่สามารถทำให้เกิดสร้างกระดูกใหม่ได้ แต่ถ้าโปรตีนยังคงอยู่ พบว่า Bone matrix สามารถเหนียวนำไปสร้างกระดูกได้

ในปี 1988 Johnson [38] มีการแยกและทำการหาลำดับเบสของโปรตีน BMP ของมนุษย์ สำเร็จ

### 2.5.2 การจัดจำแนกและโครงสร้างของโปรตีน BMP

BMP เป็นสมาชิกของ Transforming growth factor  $\beta$  superfamily (TGF- $\beta$ ) ซึ่งเป็น growth factor กลุ่มใหญ่ที่มีสมาชิกมากกว่า 40 กลุ่ม TGF- $\beta$  ได้ชื่อมาจากความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเซลล์เพาะเลี้ยง fibroblasts โดยที่ BMP-1 ซึ่งเป็น pro-collagen C-protease ไม่ได้ถือเป็นสมาชิกอยู่ใน TGF- $\beta$

BMP แบ่งได้อย่างกว้างเป็น 4 subfamily โดยดูจากกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันคือ

1. BMP-2 และ BMP-4
2. BMP-3 และ BMP-3b (growth/differentiation factor; GDF10)
3. BMP-5, 6, 7 และ 8
4. GDF-5, 6 และ 7 (BMP-14, 13 และ 12) มักรู้จักในชื่อ cartilage-derived morphogenetic protein 1, 2 และ 3

BMP ได้ถูกผลิตออกในรูปแบบ precursor protein ซึ่งประกอบด้วย signal peptide ยาวประมาณ 15-25 หน่วยอะมิโน pro-domain (poorly conserved) ขนาด 50-375 หน่วยอะมิโน

และ mature carboxy terminal region ขนาด 100-125 หน่วยอะมิโน (ภาพที่ 2.8) ซึ่งมี cysteine 6 หน่วย เป็น cysteine knot เชื่อมกันด้วย disulphide bond เป็นโครงสร้างที่แข็งแรงภายในสาย (intrachain) และมี cysteine อีกหนึ่งหน่วยทำหน้าที่ในการ dimerization กับ BMP monomer อีกสายหนึ่งด้วย (interchain) [39, 40] โดยก่อนที่จะมีการหลั่ง BMP ออกมา signal peptide และ pro-domain จะถูกตัดโดย proteolytic processing เผยให้เห็นส่วนที่เป็นปลายด้าน carboxy ที่ active ออกมา โปรตีนที่เป็น precursor จะผ่านการ glycosylation ที่ N-terminal และ dimerization [40, 41]



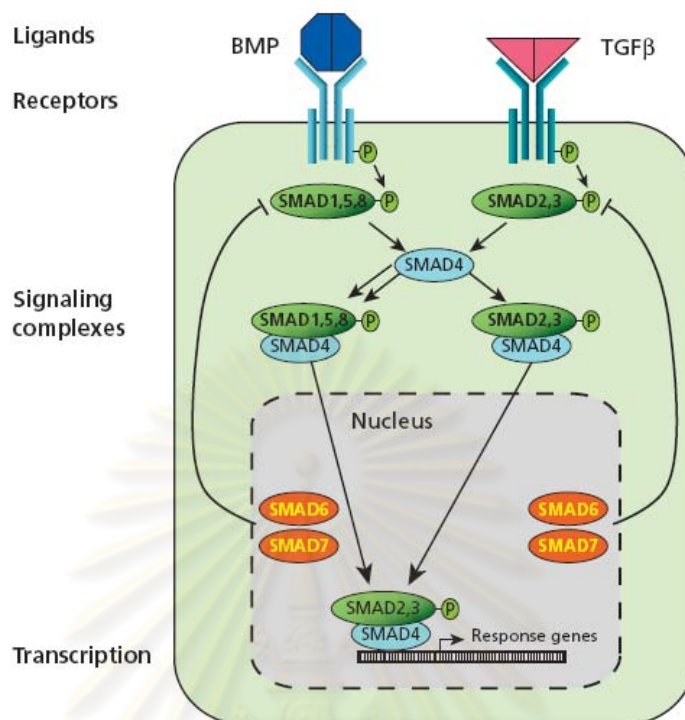
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของ BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2) [42]

ในบริเวณ mature carboxy terminal region มี cysteine 7 หน่วย เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของโปรตีน ซึ่งคาดว่าจะมีความเก่าแก่ถึงประมาณ 600 ล้านปี ทำให้ BMP มีความอนุรักษ์สูงมาก ดังนั้นการใช้ human recombinant BMP จึงค่อนข้างมีประสิทธิภาพสูง เมื่อใช้เห็นยวนำการสร้างกระดูกในต่างสปีชีส์ [40]

### 2.5.3 Bone morphogenetic protein signaling pathway

Receptor ของ BMP เป็น serine-threonine kinase โดย receptor จะจับกับ BMP เป็น heteromeric complex และก่อให้เกิดการกระตุ้นต่อไปผ่านทาง Smads pathway (small mothers against decapentaplagic) [39] ดังแสดงในภาพที่ 2.9





ภาพที่ 2.9 กลไกการตอบสนองของการกระตุ้นของ BMP ผ่าน Smads pathway [43]

เมื่อ BMP จับกับ BMP receptor แล้ว จะเกิดกระบวนการ phosphorylation ที่โปรตีน SMAD 1, 5 หรือ 8 แล้วไปจับกับโปรตีน SMAD4 ใน cytoplasm แล้วเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแปลรหัสของ BMP-response gene (runx2) มีผลให้เกิดการกระตุ้นยีนอื่น ๆ เช่น COX-2 และ type X collagen (Col-x) เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกต่อไป กระบวนการ phosphorylation ใน SMAD1, 5 หรือ 8 นั้นสามารถถูกยับยั้งได้โดย SMAD 6 และ 7 นอกจากนี้ ยังมี SMAD 1 ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ osteopontin gene ทำให้เกิดการ differentiation ของ osteoblast ได้ด้วย [43]

#### 2.5.4 โปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของ BMP

1. BMP binding protein: noggin และ chordin ซึ่งป้องกันการจับกันของ BMP2, BMP4, BMP7 กับ receptor ของมัน ซึ่งมีผลทำให้ osteoblast ไม่เกิดการ differentiation คาดหวังกันว่า การยับยั้งการทำงานของโปรตีนนี้น่าจะเป็นวิธีการที่ช่วยรักษาโรคกระดูกพรุนได้ [44]

2. Ubiquitin-proteasome degradation of BMP signaling proteins ซึ่งกลไกนี้มีความสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพมากมายรวมทั้ง cell-cycle progression, gene transcription และ signal transduction มี enzyme มาเกี่ยวข้อง 3 ชนิด E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) และ E3 (ubiquitin ligase) ซึ่งความจำเพาะของโปรตีนที่ถูกทำลายจะถูกกำหนดโดย E3 (ubiquitin ligase) และโดยส่วนมากโปรตีนจะถูกทำลายโดย 26S proteasome

3. Smad ubiquitin regulatory factor 1: *Smurf1* เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ Smads 6 และ 7 ซึ่ง *Smurf1* เป็นโปรตีนที่อาศัยอยู่ในนิวเคลียสและมีบริเวณที่ E3 สามารถจดจำได้เมื่อมันถูกส่งออกมาถึง cytoplasm มันจะจับกับ Smads 6 และ 7 ส่งผลให้เกิดการทำลายของ type I TGF  $\beta$ , BMP receptor และ Smad 1 และ 5 [45]

4. Smad autocrine switch-off signal: Smad6 ที่เป็นสมาชิกของ Smad family มันจะไปจับกับ type I BMP receptor โดย Smads 6 จะยับยั้งการ phosphorylate ของ Smads 1 และ 5 ยับยั้งการเกิด heteromerization กับ Smads 4

5. Tob anti-proliferative protein ซึ่งจะเลือกจับกับ Smad 1 และ 5 มีผลยับยั้ง BMP signaling

### 2.5.5 หน้าที่ของ BMP และ การประยุกต์ ใช้ BMP ในทางการแพทย์

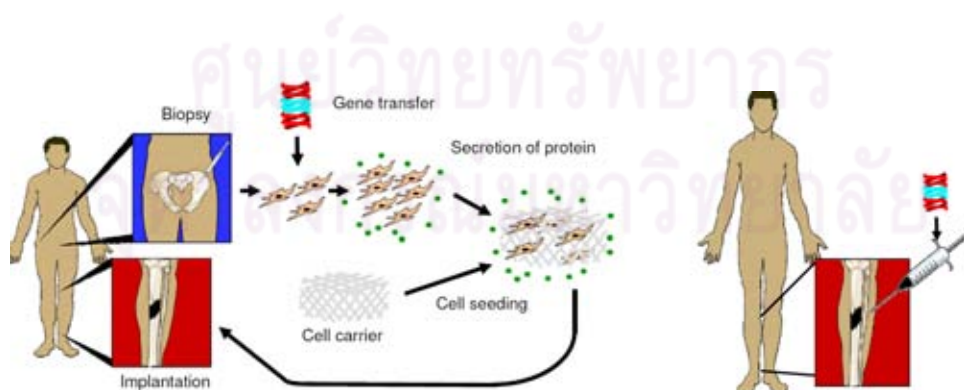
BMP มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต (growth) พัฒนาการ (differentiation) และการตาย (apoptosis) ของเซลล์ มีบทบาทสำคัญในหลายอวัยวะและเนื้อเยื่อ รวมทั้งระบบกล้ามเนื้อและโครงร่าง ระบบประสาท ฟัน ปอด ไต ต่อมลูกหมาก ระบบสืบพันธุ์ ผสมและขน การสร้างร่างกายระยะ embryo เช่น การตายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณระหว่างนิ้วก็ควบคุมด้วย BMP ผ่าน program cell death

แม้ว่า BMP จะมีหลายชนิด แต่ชนิดที่ได้รับการยอมรับจาก Food and Drug Administration (FDA) ให้นำมาใช้กับมนุษย์ได้มีเพียง 2 ชนิด คือ BMP-2 และ BMP-7 ซึ่ง BMP-2 เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต มีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันให้พัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูก และกระตุ้นยีนหลายชนิดที่จำเป็นต่อการพัฒนาเซลล์สร้างกระดูกเพื่อให้เกิดเป็นเซลล์กระดูกที่สมบูรณ์ ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองหลายชนิดแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ

BMP-2 ทั้งในรูปแบบโปรตีนและโปรตีนสายผสม (recombinant protein) ในการสมานกระดูกที่หักทั้งกระดูกกระโหลกศีรษะและกระดูกระยะยาวโดยรวมไปถึงภาวะกระดูกพรุน

ปัจจุบันมีการทำใช้เทคนิคการสร้างโปรตีนสายผสมเพื่อผลิตโปรตีน BMP ในเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการยอมรับจาก FDA ทำให้มีความปลอดภัยมากขึ้น ลดโอกาสการเกิดอาการแพ้หรือโรคต่าง ๆ แต่ทั้งนี้โปรตีนยังมีราคาแพง และสลายตัวได้ง่าย เนื่องจากถูกทำลายได้ในตับ จึงอยู่ในซีรัมได้ในระยะสั้น ดังนั้นการรักษาโรคเกี่ยวกับกระดูก จึงมักจะนำส่งยีนบำบัดเข้าเซลล์ก่อน (ex vivo gene delivery) แล้วชักนำให้เซลล์พัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูกในวัสดุที่เป็น scaffold หรือ carrier matrix ซึ่งมีหลากหลายแบบ และมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น titanium, collagen, non-collagenous protein, hydrogel หรือ hydroxyapatite เป็นต้น [39] การใช้ carrier matrix ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะเป็นเสมือนการจำลองสภาพของเนื้อเยื่อภายในร่างกายที่มีการเรียงตัวเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยจะส่งเสริมให้เกิดการส่งสัญญาณของเซลล์อย่างเหมาะสม ทำให้เกิด migration, proliferation และ differentiation ของเซลล์ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในการทำ tissue engineering ได้แก่ poly( $\alpha$ -hydroxy acids) [e.g., polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA)], poly(ortho esters) และ polyurethanes เป็นต้น แต่มีเพียง PLA และ PGA เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์เพียงไม่กี่ชนิดที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในงานด้านคลินิกกับมนุษย์

นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวข้างต้น ยังมีความพยายามในการใช้เทคนิค gene therapy นำส่งยีนโดยตรง (in vivo gene therapy) เพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับโรคกระดูกพรุน หรือแม้กระทั่งการยับยั้ง inhibitor ของ BMP โดยใช้ siRNA ก็เป็นอีกหนทางหนึ่งที่น่าสนใจในการนำไปใช้รักษาจริงได้ [44]



ภาพที่ 2.10 Ex vivo gene delivery (ซ้าย) และ in vivo gene delivery (ขวา) [46]

ทั้งนี้ ในการทดลอง ผู้วิจัยจะได้นำส่งยีนบำบัด BMP-2 เข้าสู่เซลล์ osteoblast ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) ซึ่งพัฒนาจาก mesenchymal stem cell (ภาพที่ 2.11) ขณะที่ใน osteogenic lineage มีพัฒนาการไปนั้น จะมีการสร้างสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการสร้างกระดูกและบริเวณโครงสร้างที่จะสร้างเส้นเลือดมาเลี้ยง โดย BMP-2 มีบทบาทมากในการกระตุ้นให้เกิดพัฒนาการของเซลล์ โดยการทำงานผ่าน transcription factor runx2 (Runt-related transcription factor 2) ซึ่งเป็น marker ตัวแรกของ osteoblastic lineage cell โดย runx2 ยังทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นได้จากหลายกลไก และมีผลควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด ได้แก่ osteocalcin, VEGF, RANKL, sclerostin และ dentin matrix protein 1 (DMP1) เป็นต้น นอกจากนี้ เมื่อ osteoblast เกิดการ mineralization จะมีการแสดงออกของยีน alkaline phosphatase และ type I collagen อีกด้วย โปรตีนที่ผลิตจากการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ถือเป็น biochemical marker ที่สามารถใช้ตรวจตามกระบวนการสร้างกระดูกได้ [47]



ภาพที่ 2.11 พัฒนาการของเซลล์ใน osteogenic lineage [48]

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**บทที่ 3**  
**วิธีดำเนินการวิจัย**

**3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**  
**เครื่องมือ**

	<b>บริษัทผู้ผลิต</b>	<b>ประเทศ</b>
1. กล้อง Confocal laser scanning microscope (LSM-700)	Carl zeiss	เยอรมัน
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น
3. เครื่อง Cryocentrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products	เยอรมนี
4. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd	เกาหลีใต้
5. เครื่อง Suction รุ่น Pumpe 4010	Boehringer Mannheim	เยอรมนี
6. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
7. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PTC-200	MJ Research, Inc.	สหรัฐอเมริกา
8. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PX2	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
9. เครื่อง Vacuum Concentrator (DNA speedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
10. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น FINE VORTEX ใต้	FINEPCR	เกาหลี
11. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOLEDO	สวิสเซอร์แลนด์
12. เครื่องถ่ายภาพเจล (GEL DOC 1000)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา



13.	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop 1000	Thermo Scientific, Inc	สหรัฐอเมริกา
14.	เครื่องวัดแสง luminescence (Luminometer) รุ่น VICTOR <sup>3</sup>	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
15.	ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ Doc-Print)	VILBER LOURMAT	ฝรั่งเศส
16.	ตู้แช่แข็ง -20 °C (Top Open Chest Freezer)	SANYO Electric Co.,Ltd	ญี่ปุ่น
17.	ตู้แช่แข็ง -80 °C (ULT Deep Freezer) รุ่น DF8524	ilShin Lab Co.,Ltd.	เกาหลีใต้
18.	ตู้ปลอดเชื้อ (Class II Biosafety Cabinet) รุ่น NapFLOW (Napco)	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
19.	ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)	E.S.I. FLUFRANCE	ฝรั่งเศส
20.	ตู้อบ (Incubator Shaker) Minitron	Appropriate Technical Resources, Inc.	สหรัฐอเมริกา
21.	ตู้อบ (Incubator)	Memmert	เยอรมนี
22.	ตู้อบเพาะเลี้ยง CO <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> Incubator)	Sheldon Manufacturing Inc	สหรัฐอเมริกา
23.	ถัง Liquid Nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON	สหรัฐอเมริกา
24.	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Memmert	เยอรมนี
	<b>อุปกรณ์</b>	<b>บริษัทผู้ผลิต</b>	<b>ประเทศ</b>
1.	96 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom with Lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
2.	Auto pipette (ขนาด 20 µl)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา

3.	Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 $\mu$ l)	GILSON	ฝรั่งเศส
4.	BARRIERTIPS (ขนาด 20, 200, 1000 $\mu$ l)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
5.	Cell Culture Dish (ขนาด 100mm X 20mm)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
6.	Cell Culture Flask (ขนาด 25 cm <sup>2</sup> และ 75 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
7.	Centrifuge tube (ขนาด 15 ml และ 50 ml)	BioLogix Research	สหรัฐอเมริกา
8.	Centrifuge tube (ขนาด 50 ml)	Corning, Inc.	สหรัฐอเมริกา
9.	Cryovial tube (ขนาด 2 ml)	Simport plastics	แคนาดา
10.	Disposable Serological pipette (ขนาด 5 ml และ 10 ml)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
11.	Luminometer Plate	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
12.	Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml) และ PCR tube	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
13.	Pasteur pipette	COPAN innovation	สหรัฐอเมริกา
14.	Pipette Aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
15.	Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 $\mu$ l)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
16.	SUB CELL รุ่น Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
17.	SUB CELL รุ่น Wide Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
18.	เครื่อง Power Supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
19.	เครื่อง Power Supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hoefer, Inc.	สหรัฐอเมริกา

20.	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri Dishes)	Bibby Sterilin Ltd.	อังกฤษ
	<b>สารเคมี</b>	<b>บริษัทผู้ผลิต</b>	<b>ประเทศ</b>
1.	100X Antibiotic-Antimycotic Solution 10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin Amphotericin B 250 µg/ml	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
2.	25KDa branch Polyethyleneimine(PEI)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
3.	2-Propanol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
4.	Absolute Ethanol	MERCK	เยอรมนี
5.	AMPICILIN	Biobasic	แคนาดา
6.	BACTO-AGAR	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
7.	Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
8.	Chloroform	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
9.	Dexamethasone-Water Soluble Cell Culture	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
10.	Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
11.	Dimethyl Sulfoxide	MERCK	เยอรมนี
12.	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
13.	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS Modified) without Calcium, Magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
14.	Eagle's Minimun Essential Medium (EMEM) with 2.00 mM/L Glutamine, non-essential amino acid	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
15.	Earle's balanced salt solution (EBSS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
16.	Ethidium Bromide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
17.	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	อังกฤษ
18.	Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา

19.	Gene ruler 100-3000 bp DNA ladder	Fermentas	แคนาดา
20.	GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
21.	Glycerol 2-phosphate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
22.	Ham's F12 nutrient mixture	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
23.	HyQ Trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g Porcine Trypsin without Calcium, Magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
24.	L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
25.	Magnesium chloride	APS Finechem	ออสเตรเลีย
26.	Orthoboric acid	Biobasic	แคนาดา
27.	Potassium acetate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
28.	RIBONUCLEASE A	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
29.	RNase AWAY (for RNase Decontamination)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
30.	Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) Medium with 2.05 mM L-Glutamine	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
31.	Sodium acetate	MERCK	เยอรมนี
32.	Sodium chloride	MERCK	เยอรมนี
33.	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
34.	Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagenti	อิตาลี
35.	Tris Base	Biobasic	แคนาดา
36.	Tryptone Peptone	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
37.	เอนไซม์ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Promega	สหรัฐอเมริกา

- |     |  |                              |              |
|-----|--|------------------------------|--------------|
| 38. | ชุดน้ำยา Impromt™ II reverse transcriptase                 | Promega                      | สหรัฐอเมริกา |
| 39. | ชุดน้ำยา Label IT® Nucleic Acid Labeling Kit, TM-Rhodamine | Mirus                        | สหรัฐอเมริกา |
| 40. | ชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000                               | Invitrogen                   | สหรัฐอเมริกา |
| 41. | ชุดน้ำยา Luciferase Assay system                           | Promega                      | สหรัฐอเมริกา |
| 42. | ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase                                | New England<br>biolab(NEB)   | อังกฤษ       |
| 43. | ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits     | Invitrogen                   | สหรัฐอเมริกา |
| 44. | น้ำยา TRI-Reagent  | Molecular<br>research center | สหรัฐอเมริกา |



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.2 การเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของ polyplex จากพอลิเมอร์ประจุบวก MPyMeChC และ/หรือ PEI จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ

#### 3.2.1 การเตรียม polyplex

##### 3.2.1.1 การเตรียม polyplex ของ MPyMeChC/DNA และ PEI/DNA

เตรียม stock solution ของ MPyMeChC และ PEI โดยละลายในน้ำ ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 mg/ml เพื่อเตรียม polyplex กำหนดให้ น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) ของพอลิเมอร์ MPyMeChC/DNA เป็น 1/1, 5/1, 10/1 และ 20/1 และให้ w/w ของ PEI/DNA เป็น 0.5/1, 1/1, 5/1 and 10/1 โดยเตรียม polyplex ด้วยการผสม MPyMeChC หรือ PEI กับดีเอ็นเอ แล้วเปิดด้วยไมโครปิเปต polyplex จะเกิดขึ้นได้โดย self-assembly mechanism จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ polyplex เกิดอย่างสมบูรณ์

##### 3.2.1.2. การเตรียม polyplex ของ MPyMeChC/PEI/DNA และ PEI/MPyMeChC/DNA

สำหรับ polyplex ซึ่งมีส่วนของพอลิเมอร์แบบผสมทั้ง MPyMeChC และ PEI นั้น การทดลองนี้ได้เตรียมตัวอย่างแยกออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเตรียมโดยใช้ PEI ปริมาณคงที่ 1  $\mu\text{g}$  เพื่อสร้าง polyplex ที่มี weight ratio ของ MPyMeChC/PEI/DNA เป็น 1/1/1, 5/1/1, 10/1/1 และ 20/1/1 กลุ่มที่สองเตรียมโดยใช้ MPyMeChC ปริมาณคงที่ 1  $\mu\text{g}$  เพื่อสร้าง polyplex ที่มี weight ratio ของ PEI/MPyMeChC/DNA เป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 5/1/1 and 10/1/1 โดยในการเตรียม polyplex ทั้งหมดนั้น จะเริ่มด้วยการผสม MPyMeChC และดีเอ็นเอก่อน แล้วทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นจึงเติม PEI แล้วบ่มต่ออีก 15 นาที เพื่อให้เกิดการเคลือบของ PEI บน polyplex ของ MPyMeChC/DNA อย่างสมบูรณ์

### 3.2.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างพอลิเมอร์และดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค gel retardation assay

นำ polyplex ที่เตรียมด้วยอัตราส่วน w/w ที่แตกต่างกันผสมกับ 10x loading dye นำไปทำ gel electrophoresis ด้วยอะกาโรสเจล 1.0 % ที่ 100 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide เพื่อให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เมื่อเกิดการหน่วงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดโดยพอลิเมอร์ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าลง ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้กับแถบพลาสมิดควบคุม (control plasmid) โดยเมื่อพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอเกิดการจับกัน จะทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น หนักขึ้นและเคลื่อนที่ได้ช้าลง ซึ่งสามารถมองเห็นได้จากการทำ gel electrophoresis

### 3.2.3 ตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของ polyplex โดยการวัดขนาดค่าประจุ ด้วยเครื่อง zetasizer ตามหลักการ dynamic light scattering

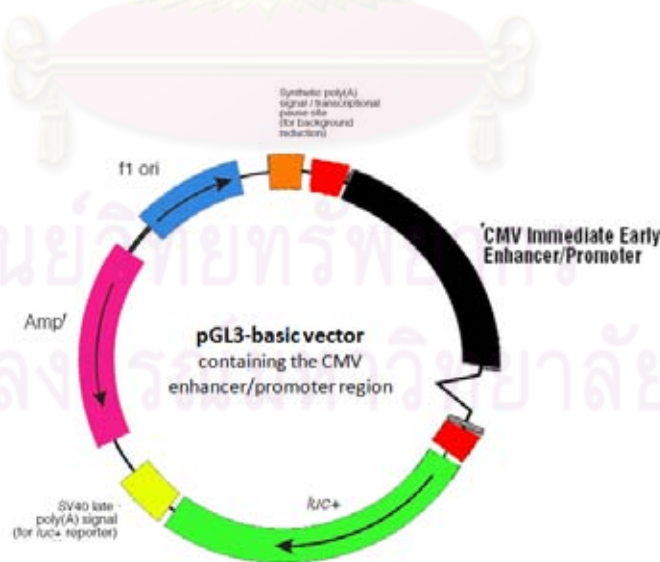
วัดขนาดอนุภาคโดยหลักการใช้ Dynamic Light Scattering (DLS) และศักย์ซีต้า (Zeta Potential) ซึ่งแสดงถึงค่าประจุบนผิวของอนุภาคของสารแขวนลอยขนาดเล็ก โดยเตรียมตัวอย่างตามอัตราส่วนที่ต้องการวัด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร และวัดขนาดของอนุภาคและประจุบนผิวด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) ที่อุณหภูมิ 25 °C

### 3.2.4 ตรวจสอบรูปร่างของพอลิเมอร์ผสมที่เกิดขึ้นด้วย atomic force microscope (AFM)

เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของ polyplex ที่อัตราส่วนต่าง ๆ โดยเตรียม polyplex โดยใช้ดีเอ็นเอ 1 µg แล้วปรับปริมาตรเป็น 20 µl ด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสารแขวนลอยอนุภาคลงบนแผ่นไมกา จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที เพื่อให้อนุภาคจับเกาะง่าย โดยนำระเหยออกบางส่วนภาพ AFM วิเคราะห์ด้วย Dynamic Force Microscope (DFM), Scan area 2x2 µm<sup>2</sup>, scan speed 1 Hz เข็มรุ่น NSG01 (NT-MDT โดยเครื่อง Atomic Force Microscope (AFM) รุ่น SPA4000 ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

### 3.3 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้พลาสมิดนำส่ง คือ pGL3-basic vector containing CMV enhancer promoter (ภาพที่ 3.2) มียีน luciferase เป็นยีนรายงานผลซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ CMV (Cytomegalovirus) [49] พลาสมิดดีเอ็นเอถูกสกัดจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) ซึ่งใช้หลักการ alkaline lysis เริ่มจากเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน LB Broth ปริมาตร 200 ml นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,000 g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย resuspension buffer (R3), lysis buffer (L7) และ precipitation buffer (N3) อย่างละปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสเติมลงใน column ที่ทำการ equilibrated แล้ว ภายใน column จะมี anion-exchange resin ซึ่งจะจับกับประจุลบของดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใส ขณะที่สารอื่น ๆ จะถูกชะออกไปด้วย wash buffer 60 ml จากนั้นดีเอ็นเอที่อยู่ใน column จะถูกชะออกมาพร้อมกับ elution buffer 15 ml แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วย 100 % isopropanol ปริมาตร 10.5 ml โดยปั่นที่ความเร็วมากกว่า 15,000 g อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 5 ml ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 200-500 µl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C



ภาพที่ 3.2 พลาสมิด pGL3-basic ที่บรรจุ CMV enhance/promoter region [49]

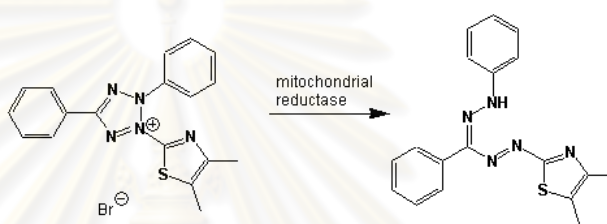
### 3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549, SH-SY5Y และ MG-63

#### 3.4.1 การนำส่ง polyplex ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ถ่าย เซลล์เพาะเลี้ยงที่ต้องการทดสอบลง 96-well plate โดยใช้เซลล์ A549, HeLa และ SH-SY5Y จำนวน  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100  $\mu$ l โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ A549 คือ 10% RPMI-1640 (Rosewell Park Memorial Institute medium-1640, Hyclone, สหรัฐอเมริกา) เซลล์ HeLa คือ 10% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Hyclone, สหรัฐอเมริกา) และเซลล์ SH-SY5Y คือ EBSS (Earle's balanced salt solution, Hyclone, สหรัฐอเมริกา) ผสมกับ Ham's F12 nutrient mixture (Hyclone, สหรัฐอเมริกา) ในอัตราส่วน 1:1 ที่มี 20% Fetal bovine serum และ 1% non-essential amino acid จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะติดผนังจานเลี้ยง จึงเข้าสู่กระบวนการนำส่งยีนด้วย polyplex ตามอัตราส่วนที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.2.1) แต่ละอัตราส่วนทำการทดลองจำนวนสามซ้ำ (triplicate) ด้วยอาหารที่ปราศจากซีรัม (serum free medium) ผลการถ่ายโอนยีนโดย polyplex จากพอลิเมอร์ผสมจะถูกเปรียบเทียบกับการถ่ายโอนเมื่อโดย MPyMeCh หรือ PEI เป็นตัวพา นอกจากนี้ในการทดลองยังใช้ naked plasmid และ Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) เป็น control เพื่อยืนยันและเปรียบเทียบผลการนำส่งด้วยการตรวจวัดผลสัญญาณของ luciferase โดยใช้ Luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA) ผลที่ได้ถูกนำมาทำ normalization โดยใช้ Bradford assay ใช้ในการวัด total protein ที่ความยาวคลื่น 595 nm เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่า (Relative Light unit) RLU ที่วัดได้จากเครื่อง VICTOR<sup>3</sup> (PerkinElmer, สหรัฐอเมริกา) ให้มีความถูกต้องมากขึ้น

### 3.4.2 ประเมินความเป็นพิษของพอลิเมอร์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

ตรวจสอบความเป็นพิษของการใช้ polyplex ในการนำส่งยีนโดยใช้วิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งสามารถเปลี่ยน MTT เป็นตะกอน formazan ที่ให้สีม่วงซึ่งไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่สามารถละลายได้ใน DMSO (Dimethyl sulfoxide) และวัดสีจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร MTT สามารถใช้วัดความเป็นพิษของเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงไปของเมแทบอลิซึมของเซลล์ได้



ภาพที่ 3.3 ปฏิกิริยาของ MTT

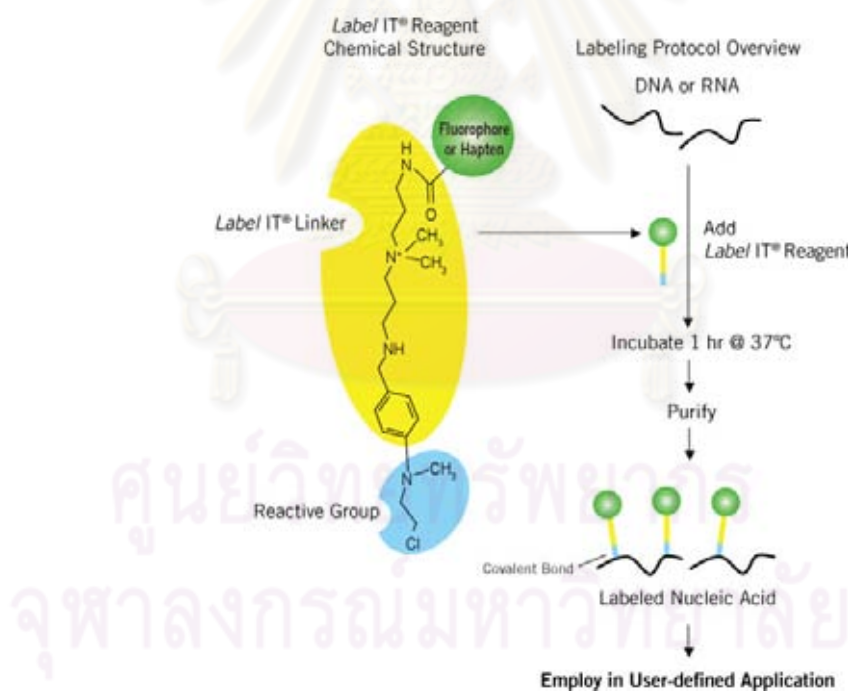
เตรียมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5 นำมากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการถ่ายโอนยีนในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้อาหารที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารที่มีซีรัมแล้วเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่น้ำยา MTT ลงไปในแต่ละหลุมให้มีความเข้มข้น 0.5 mg/ml แล้วนำไปไว้ในตู้ incubator ต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น ดูดอาหารทั้งหมดออกแล้วละลายตะกอนสีม่วงที่เกิดขึ้นด้วย DMSO 150 ไมโครลิตร ของบ้นกรดแล็กติกที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใส 100 ไมโครลิตร มาทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 nm แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ดังสมการ

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{ความเข้มสีที่วัดจากตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มสีจากกลุ่มควบคุม}} \times 100$$



### 3.4.3 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค

ติดฉลาก fluorescence โดยใช้ชุดน้ำยา *Label IT*<sup>®</sup> Nucleic Acid Labeling Kit, TM-Rhodamine (Mirus Bio LLC, สหรัฐอเมริกา) ดีเอ็นเอที่ติดสีจะถูกนำมาส่งเข้าสู่เซลล์โดยจับกับ polyplex ที่เวลา 6 ชั่วโมงจากนั้นนำมาดูเลยหรือรอเวลาถึง 24 ชั่วโมง โดยนับจากการนำส่งยีน ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน จากนั้นนำมาย้อมสีทับด้วย acridine orange ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อดูโครงร่างของเซลล์ โดยใช้กล้อง confocal laser scanning microscope LSM-700 (Carl zeiss, เยอรมัน) โดยที่สี TM-Rhodamine มี excitation ที่ 546 nm และ emission ที่ 576 nm ส่วนสี acridine orange มี excitation ที่ 405 nm และ emission ที่ 525 nm



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการย้อมสีฟลาสมิดด้วยชุดน้ำยา *Label IT*<sup>®</sup> Nucleic Acid Labeling Kit, TM-Rhodamine

### 3.5 การประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีนใน osteoblastic cell; MG-63

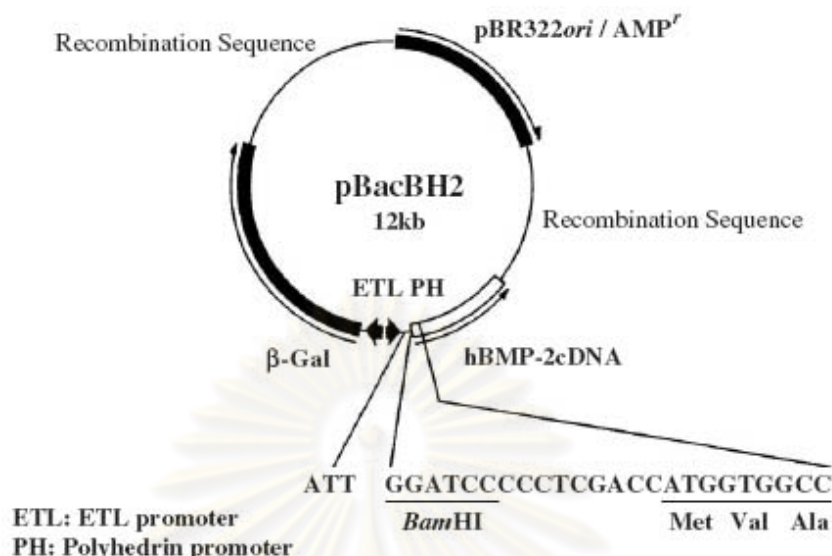
เซลล์ MG-63 ถูกเลี้ยงในอาหาร ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum ใน EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Hyclone, สหรัฐอเมริกา) หลังจากการนำส่งยีนแล้วจึง

เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็น differentiation medium ซึ่งประกอบด้วย 10% EMEM ที่มี 0.2 mM L-ascorbic acid 2-phosphate, 0.1 uM dexamethasone และ 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate เพื่อชักนำให้เซลล์เกิด differentiation และ mineralization [50, 51]

ในขั้นแรกของการประเมินการนำส่งยีนในเซลล์ MG-63 จะใช้ยีน luciferase เพื่อติดตามการนำส่งยีนในเซลล์ MG-63 เพื่อหาอัตราส่วนของระบบพอลิเมอร์ผสมที่เหมาะสมในการนำส่งยีน BMP-2 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate โดยใช้เซลล์จำนวนเริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100  $\mu$ l จากนั้นทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงให้เซลล์เกาะ แล้วนำส่งพลาสมิด pGL-CMV เข้าสู่เซลล์ด้วย MPyMeChC ผสมกับ PEI ในอัตราส่วนน้ำหนักของ MPyMeChC ต่อ PEI ที่แตกต่างกัน ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ MPyMeChC, Lipofectamine™ 2000 และ naked DNA ซึ่งในขั้นตอนการนำส่งยีนนี้จะบ่มตัวพาต่าง ๆ ในอาหารที่ปราศจาก fetal bovine serum เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็น differentiation media เลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมงจึงนำเซลล์ไปประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีน โดยการวัดสัญญาณของยีน luciferase ที่ถูกสร้างขึ้น การนำส่งด้วยตัวพาข้างต้นได้รับการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ควบคู่ด้วย

### 3.6 การนำส่งยีน BMP-2 ใน MG-63

Polyplex ที่มีอัตราส่วนคือน้ำหนัก MPyMeChC ต่อ PEI ที่ให้ผลการนำส่งประสิทธิภาพดีและเป็นพิษต่ำจะถูกใช้สำหรับการนำส่งยีน Bone morphogenetic protein ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสมิด pBacBH2 [8] (ภาพที่ 3.5) การนำส่งเริ่มจากการเพาะเลี้ยง MG-63 ใน 6 well plate โดยใช้เซลล์จำนวน 100,000 เซลล์ต่อหลุม ในปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร และนำส่งยีนด้วย polyplex, Lipofectamine™ 2000/DNA, naked DNA เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยบ่มตัวพาในอาหารที่ปราศจาก fetal bovine serum เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็น differentiation media เลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน จึงนำเซลล์ไปประเมินประสิทธิภาพในการนำส่งยีน โดยการวัดสัญญาณของยีน BMP-2



ภาพที่ 3.5 โครงสร้างของเวกเตอร์ที่มีส่วนประกอบของ Bone morphogenetic protein [8]

### 3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงเซลล์ MG-63 จำนวน 100,000 cell ต่อหลุม ในจานเพาะ 6 well plate ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (HyClone, สหรัฐอเมริกา) ที่เย็น แล้วรีบเติม น้ำยา TRI-Reagent (MRC technology, สหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 1 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์ให้หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง ปิเปตต์สารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดและเติม chloroform ที่เย็นลงไป 200 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRI-Reagent 1 ml เขย่าให้เข้ากันอย่างแรง แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2-8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 g นาน 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็นชั้น โดยชั้นล่างสุดของหลอดคือชั้นที่มีสีแดงซึ่งเป็นชั้นของ organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำที่ไม่มีสีเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุดมาทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 500 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRI-Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2-8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 g นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 75 % Ethanol ปริมาตร 1 ml โดยปั่นที่อุณหภูมิ 2-8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 g นาน 5 นาที สุดท้ายตกตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 55-65 °C นาน 10 นาที ซึ่งสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

### 3.8 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR (reverse transcriptase PCR)

ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน BMP-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง MG-63 เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง ด้วยเทคนิค Reverse-Transcriptase (RT) PCR ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ยีน  $\beta$ -actin เป็นยีนควบคุมและใช้ชุดน้ำยา Imprompt II™ reverse transcription (Promega, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดแยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบ (template) ปฏิบัติ RT-PCR เริ่มจากการ treat อาร์เอ็นเอด้วย Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Promega, Madison, WI, USA) เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนจากการสกัดโดยผสมอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 200 ng กับ 1x DNase I Reaction buffer และ 1 U DNase I Amp Grade (Promega, Madison, WI, USA) แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาจึง inactivate เอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการ treat มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกริยา RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Imprompt™ II reverse transcriptase และใช้ Oligo dT(T<sub>17</sub>) 0.4  $\mu$ M เป็น primer ในการทำปฏิกริยา เริ่มจากการผสมอาร์เอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 200 ng กับน้ำยาในการทำปฏิกริยา RT-PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x Reaction Buffer Imprompt™ II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), 0.5 mM dNTP mix (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, WI, USA), 20 U Ribolock™ Ribonuclease inhibitor (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), Imprompt™ II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา คือ 25 °C 5 นาที, 42 °C 65 นาที และ 70 °C 15 นาที ในขั้นตอนการสร้างสาย complementary DNA (cDNA) จากนั้นจึงนำ cDNA ที่เป็นต้นแบบมาทำปฏิกริยาต่อในขั้น PCR ซึ่ง ในปฏิกริยาประกอบด้วย 5  $\mu$ L ของ cDNA template ด้านบน 0.65X standard buffer (NEB, Ipswich, MA), 0.1 mM dNTP mix (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), 0.05  $\mu$ M primer และ 0.0375 U Taq polymerase (NEB, Ipswich, MA) โดยมีสภาวะในการทำปฏิกริยา 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ); 95.0 °C 30 วินาที; 58.0 °C/65 °C 30 วินาที; 72.0 °C 45 วินาที (35 รอบ); 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) โดย annealing temperature ที่ 58.0 °C และ 65 °C ของ  $\beta$ -actin และ BMP-2 gene ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 % ย้อมเจลด้วยสาร ethidium

bromide และถ่ายภาพเจลที่ได้ด้วยจากเครื่องถ่ายภาพเจล (G:box chemi) เพื่อวิเคราะห์การ แสดงออกโดยใช้โปรแกรม GeneTools (SYNGENE, อังกฤษ)

**ตารางที่ 3.1** ลำดับเบสของ primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Primer	Sequence	Product (bp)
h $\beta$ -actin Sense	5'-ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC-3'	656
h $\beta$ -actin Anti-sense	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'	
BMP-2 Sense	5'- TTC CTG CAG TTG TAC GTG GAC TTC AGT GAC -3'	334
BMP-2 Anti-sense	5'- AAC AGG ATC CCT AGC GAC ACC CAC AAC C -3'	

### 3.9 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จาก luciferase activity กับ total protein (Bradford) จะถูกนำมาเทียบเป็น อัตราส่วนในแต่ละการทดลอง นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเซลล์ที่นำส่งโดย naked DNA และกลุ่มเซลล์ที่ถูกนำส่งยีนด้วยตัวพาทดสอบอื่น ๆ เพื่อประเมินผลการถ่ายโอนยีน แต่ละ การทดลองทำทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าเฉลี่ย (standard error of mean) ค่าความแตกต่างทางสถิติได้ถูกคำนวณโดย One-way Anova ตามด้วย Tukey's HSD multiple comparison test

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของ polyplex ที่เกิดจากพอลิเมอร์ประจุบวก MPyMeChC และ MPyMeChC/PEI จับกับพลาสมิดดีเอ็นเอ

##### 4.1.1 เทคนิค gel retardation assay

จากการใช้เทคนิค gel retardation assay เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับดีเอ็นเอของ MPyMeChC และ MPyMeChC/PEI โดยกำหนดปริมาณพลาสมิดไว้ที่ 1  $\mu\text{g}$  เพื่อตรวจสอบการจับกันของพอลิเมอร์และดีเอ็นเอ โดยเตรียม polyplex ของ MPyMeChC/DNA ที่ อัตราส่วนน้ำหนัก เป็น 0.25/1, 1/1, 2.5/1, 5/1, 10/1, 20/1 และ 40/1 และ polyplex ของ MPyMeChC/PEI/DNA ที่ อัตราส่วนน้ำหนักของ MPyMeChC/PEI/DNA เป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 2.5/1/1, 5/1/1, 10/1/1, 20/1/1 และ 40/1/1

ผลการทดลองพบว่าพอลิเมอร์ประจุบวกทั้งสองชนิดสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 4.1.1) ในกรณีของ MPyMeChC พบการหน่วงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอแปรผันตามปริมาณของพอลิเมอร์ โดยจะพบความสามารถในการจับดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเมื่อใช้พอลิเมอร์ปริมาณมากขึ้น เนื่องการพบร่องรอยการหน่วงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอ (Lane ที่ 2-8) โดยผลการทดสอบพบว่าที่อัตราส่วนน้ำหนักของ MPyMeChC/DNA เป็น 20/1 การจับพลาสมิดดีเอ็นเอของพอลิเมอร์ MPyMeChC จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ไม่พบการเคลื่อนที่ของพลาสมิดปรากฏบนเจล

สำหรับ polyplex ของพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI/DNA ผลการทดลองพบว่า การเติม PEI ในระบบหลังจากการเตรียม MPyMeChC/DNA ทำให้ดีเอ็นเอหดตัวเก็บแน่นมากขึ้นใน polyplex เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ ทำให้ดีเอ็นเอถูกหน่วงไว้ในอนุภาคทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ลงมาได้ (Lane ที่ 9-15) เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้ MPyMeChC เป็นตัวพาโดยลำพัง จะเกิดรบกวนโครงสร้างของดีเอ็นเอ เนื่องจากมีรอยลากของแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นเป็นทางยาวบนเจล ในขณะที่ไม่พบร่องรอยดังกล่าวเมื่อมีการเติม PEI แม้ใช้ความเข้มข้นต่ำก็ตาม ซึ่งเป็นไปได้ว่า PEI ซึ่งมีประจุบวกสูงสามารถปิดล้อม MPyMeChC/DNA โดยจับกับประจุลบของดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอหดแน่นอยู่ในอนุภาค ดังนั้น ethidium bromide ไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอได้



ภาพที่ 4.1 การจับกันของพอลิเมอร์และพลาสมิดดีเอ็นเอที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยเทคนิค gel retardation assay

Lane ที่ 1 = Free DNA (Plasmid pGL3-basic vector containing CMV promoter/enhancer)

Lane ที่ 2-8 = MPyMeChC/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักเป็น 0.5/1, 1/1, 2.5/1, 5/1, 10/1, 20/1 และ 40/1 ตามลำดับ

Lane ที่ 9-15 = MPyMeChC/PEI/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักเป็น เป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 2.5/1/1, 5/1/1, 10/1/1, 20/1/1 และ 40/1/1 ตามลำดับ

#### 4.1.2 วัดขนาดและประจุบนผิวของ polyplex ด้วยเครื่อง Dynamic light scattering (DLS) หรือ zetasizer

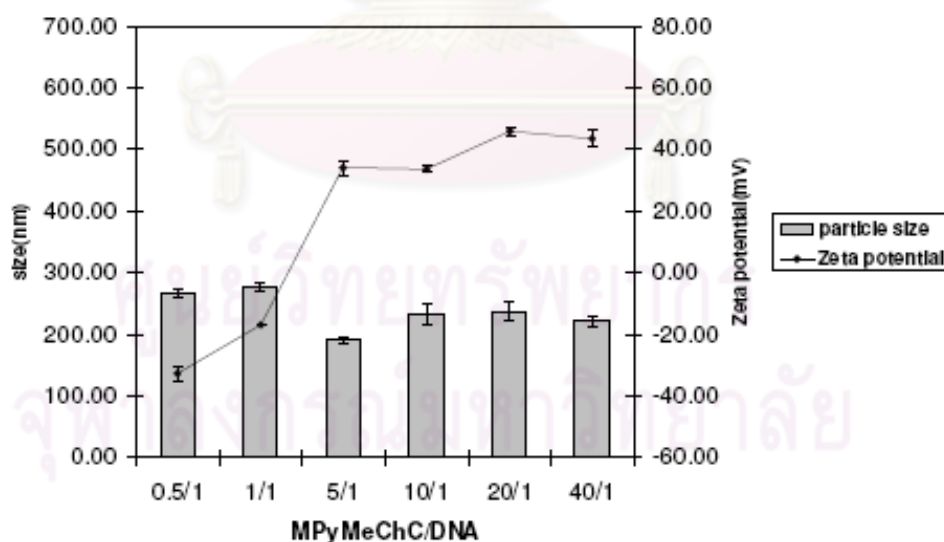
การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ (physicochemical property) ของ polyplex โดยการทดลองนี้ได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มย่อยด้วยกันโดยที่ทั้ง 4 กลุ่ม การทดลองมีปริมาณดีเอ็นเอ 1  $\mu\text{g}$  เท่ากันทุกกลุ่มการทดลองและเปลี่ยนปริมาณ polymer ที่น้ำหนักต่าง ๆ กัน กลุ่มที่ 1 MPyMeChC/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ MpyMeChC ต่อดีเอ็นเอเป็น 0.5/1, 1/1, 5/1, 10/1, 20/1 และ 40/1

กลุ่มที่ 2 PEI/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI ต่อดีเอ็นเอเป็น 0.5/1, 1/1, 5/1, 10/1, 20/1 และ 40/1

กลุ่มที่ 3 MPyMeChC/PEI/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ MpyMeChC ต่อ PEI ต่อดีเอ็นเอเป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 5/1/1, 10/1/1, 20/1/1 และ 40/1/1

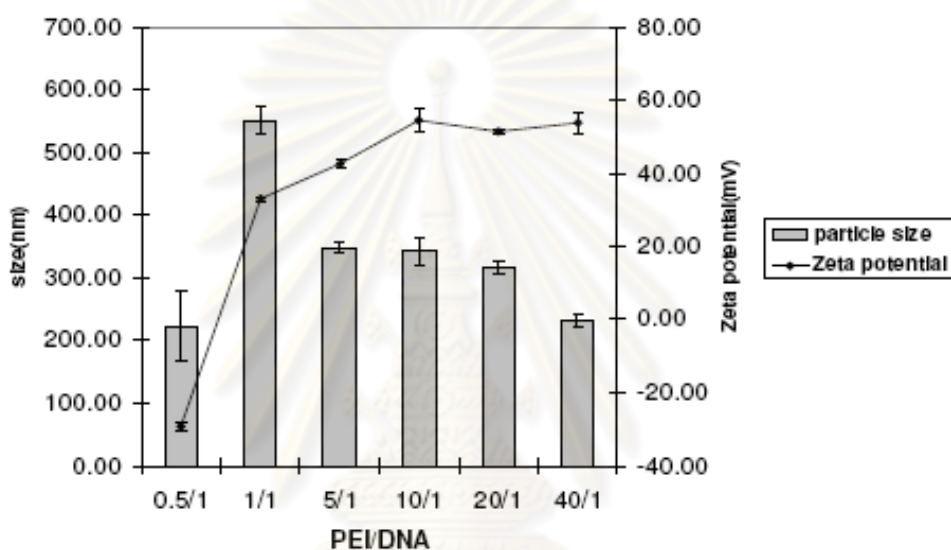
กลุ่มที่ 4 PEI/MPyMeChC/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI ต่อ MPyMeChC ต่อดีเอ็นเอเป็น 1/0.5/1, 1/1/1, 1/5/1, 1/10/1, 1/20/1 และ 1/40/1

จากการวัดขนาดและประจุบนผิวของ polyplex ด้วยเครื่อง Dynamic light scattering (DLS; Malvern Instruments Ltd., ประเทศอังกฤษ) หรือ zetasizer เพื่อวัดอนุภาคที่แขวนลอยในน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร polyplex ถูกเตรียมด้วยอัตราส่วนน้ำหนักของ MPyMeChC, PEI และดีเอ็นเอแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.2-4.5 polyplex ที่มีขนาดเล็กที่สุด คือ MPyMeChC/DNA ที่ w/w ratio of 5/1 ซึ่งมีขนาด 191 nm (ภาพที่ 4.2) แต่โดยทั่วไปแล้วพบว่าขนาดของ polyplex ที่มีส่วนประกอบของ PEI อยู่จะมีขนาดใหญ่กว่า MPyMeChC (ภาพที่ 4.2-4.3) ผลการวัดค่าประจุที่ผิวของอนุภาค (zeta potential) พบว่า polyplex ที่ทดสอบทั้งหมดค่าประจุในช่วง -30 ถึง +60 mV โดย MPyMeChC/DNA ที่อัตราส่วนน้ำหนักเป็น 0.5/1 และ 1/1 จะยังมีประจุที่ผิวเป็นลบ แสดงถึงผลการจับดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ และยังมีสายดีเอ็นเอปรากฏรอบ ๆ ผิวอนุภาค สอดคล้องกับผล AFM (ภาพที่ 4.6) นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ PEI ในการเพิ่มประจุบวกให้กับ polyplex โดยเมื่อเติม PEI ปริมาณเพิ่มขึ้น ประจุบวกที่ผิวก็มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างสอดคล้องกัน



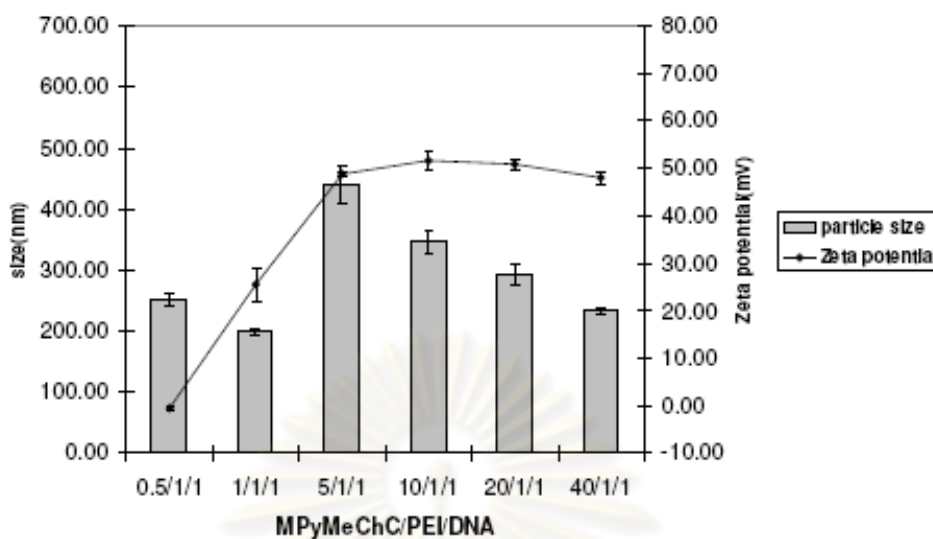
ภาพที่ 4.2 ผลการวัดขนาดและประจุของ MpyMeChC/DNA ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ MpyMeChC/DNA เป็น 0.5/1, 1/1, 5/1, 10/1, 20/1 และ 40/1

ในภาพที่ 4.2 เราจะเห็นได้ว่าการเพิ่ม MPyMeChC เข้าไปมากขึ้นในระบบจะทำให้ตัว polyplex ที่เกิดขึ้นนั้นมีประจุบวกมากขึ้น ซึ่งเมื่อ MPyMeChC/DNA เป็น 5/1 จึงจะทำให้ polyplex ที่เกิดขึ้นมีประจุบวกขึ้นโดยที่มีค่า zeta potential ประมาณ +40 mv ในขณะที่ อัตราส่วน 0.5/1 และ 1/1 นั้นยังทำให้ polyplex ที่เกิดขึ้นมีประจุเป็นลบมีค่า zeta potential น้อยกว่า -20 mv อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของ MPyMeChC ไม่ได้มีผลต่อขนาดมากนักโดยขนาดโดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 200-300 nm



ภาพที่ 4.3 ผลการวัดขนาดและประจุของ PEI/DNA ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI/DNA เป็น 0.5/1, 1/1, 5/1, 10/1, 20/1 และ 40/1

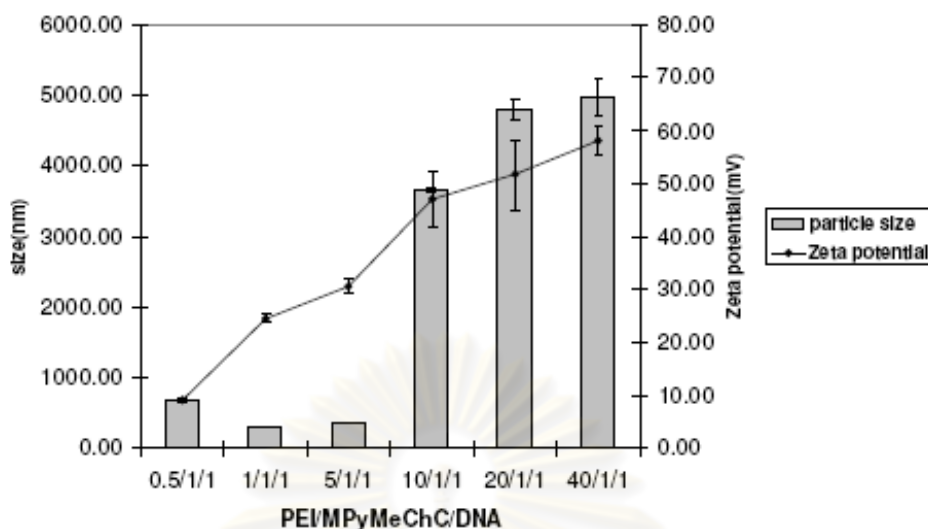
ในภาพที่ 4.3 ในการเพิ่มพอลิเมอร์ประจุบวก PEI เข้าไปจะเห็นได้ว่าเมื่อใส่ PEI เพิ่มเข้าไปที่อัตราส่วน PEI/DNA 1/1 ขึ้นทำให้ค่า zeta potential เป็นบวกสูงขึ้นมากจากที่อัตราส่วน 0.5/1 ที่มีค่า zeta potential ประมาณ -30 mv และมีขนาดประมาณ 200 nm อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดอยู่ที่อัตราส่วน 1/1 ขนาดประมาณ 550 nm และนอกนั้นมีขนาดอยู่ที่ราว ๆ 200-400 nm โดยที่ค่า zeta potential อยู่ที่ประมาณ 40-60 mv ซึ่งเราจะเห็นได้ว่ามีขนาดใหญ่กว่าการใช้ MPyMeChC รวมถึงมีค่า zeta potential ที่เป็นบวกสูงกว่าเมื่อเทียบในอัตราส่วนที่เท่ากัน



ภาพที่ 4.4 ผลการวัดขนาดและประจุของ MPyMeChC/PEI/DNA ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ MPyMeChC/PEI/DNA เป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 5/1/1, 10/1/1, 20/1/1 และ 40/1/1

ในภาพที่ 4.4 เป็นผลจากการวัดขนาดของ polyplex ที่เกิดจากการใช้อัตราส่วนของ MPyMeChC ที่แตกต่างกันและผสม PEI ที่ 1  $\mu\text{g}$  เท่ากันพบว่าที่อัตราส่วน MPyMeChC/PEI/DNA 0.5/1/1 และ 1/1/1 นั้นทำให้ขนาดของ polyplex ที่เป็นพอลิเมอร์ผสมนั้นมีขนาดแตกต่างจากเดิมไม่มากนักโดยที่เมื่อเพิ่ม PEI ลงไปที่อัตราส่วน 0.5/1/1 และ 1/1/1 ทำให้ polyplex ที่ได้มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับ MPyMeChC/DNA ที่อัตราส่วน 0.5/1 และ 1/1 แต่หลังจากนั้น ขนาดของ polyplex มีการเพิ่มเล็กน้อย โดยที่ขนาดของ polyplex ของ MPyMeChC/PEI/DNA ที่ 5/1/1 มีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 450 nm และเล็กลงมาเรื่อยๆ เมื่อ MPyMeChC มีปริมาณมากขึ้นใน ขณะที่ค่า zeta potential หลังจากที่มีอัตราส่วน 5/1/1 ก็มีค่าประมาณ +50 mv ซึ่งเพิ่มจากการใช้ MPyMeChC/DNA เพียงอย่างเดียวที่มีค่า zeta potential ประมาณ +40 mv ส่วน polymer ที่อัตราส่วน 0.5/1/1 และ 1/1/1 นั้น ค่า zeta potential ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน คือประมาณ 0 และ 25 mv ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเพิ่ม PEI ลงไป 1  $\mu\text{g}$  ในทุกอัตราส่วนของ polyplex ที่เกิดขึ้นส่งผลให้ภาพโดยรวมมีประจุบวกเพิ่มขึ้นจากค่า zeta potential ที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ขนาดถ้าหากเป็นอัตราส่วนที่มี MPyMeChC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1  $\mu\text{g}$  จะทำให้ขนาดของ พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กลงได้ในขณะที่การเพิ่ม PEI หลังจาก MPyMeChC มากกว่า 1  $\mu\text{g}$  ขนาดของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นกลับมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งขนาดของ polyplex ที่เล็กที่สุดคือ 1/1/1 ขนาด ประมาณ 200 nm



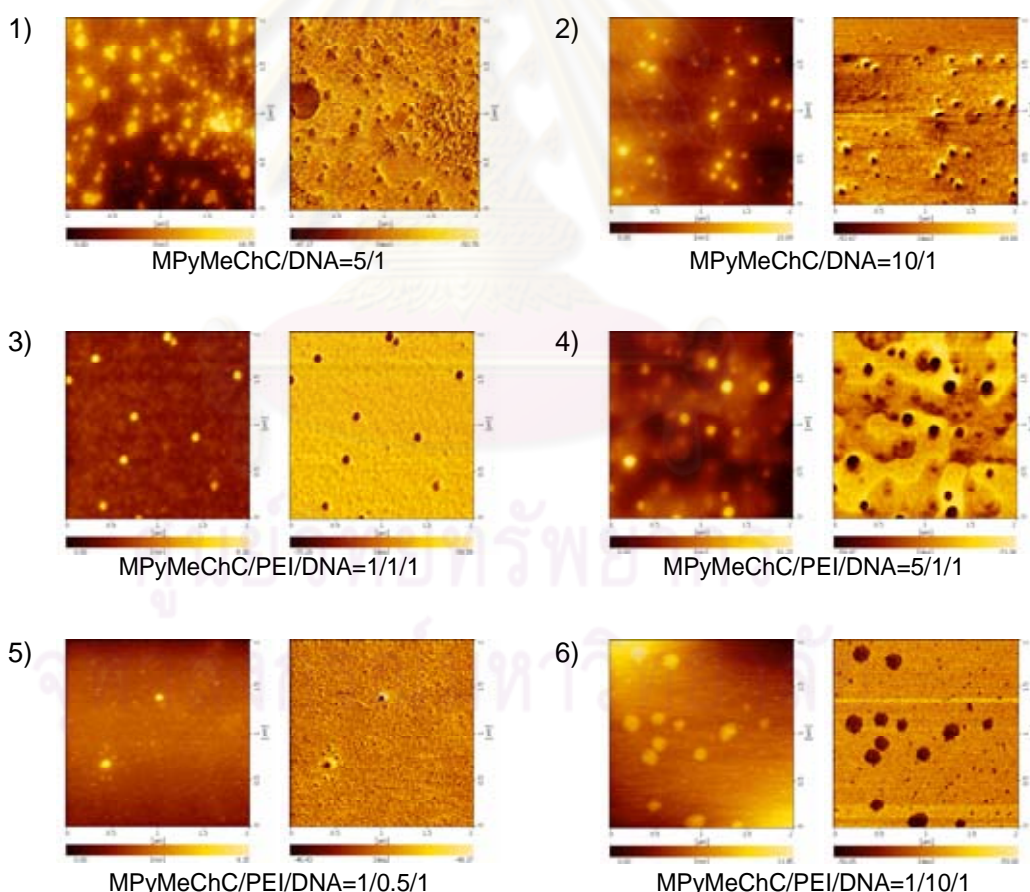


ภาพที่ 4.5 ผลการวัดขนาดและประจุของ PEI/MPyMeChC/DNA polyplex ที่มีอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI/MPyMeChC/DNA เป็น 0.5/1/1, 1/1/1, 5/1/1, 10/1/1, 20/1/1 และ 40/1/1

ในภาพที่ 4.5 ผลจากการวัดขนาดและประจุของ PEI/MPyMeChC/DNA ในการทดลองนี้ เราได้ใช้ PEI/DNA ที่อัตราส่วน 1/1 เป็นหลักและเพิ่มจำนวน weight ratio ของ MPyMeChC ที่อัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าการเพิ่ม PEI มากขึ้นทำให้ประจุบวกมากขึ้นและขนาดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยที่เมื่อเติม PEI จนถึง 40  $\mu\text{g}$  พบว่า ค่า zeta potential เพิ่มขึ้นถึงเกือบ +60 mv และมีขนาดเกือบ 5  $\mu\text{m}$  ซึ่งถ้าเทียบผลการทดลองนี้กับการวัด ค่าของ MPyMeChC ก็จะได้เห็นว่าขนาดใหญ่ขึ้นมากเมื่อเพิ่ม PEI และ ความมีประจุบวกก็สูงขึ้นมากจากเดิมที่ MPyMeChC นั้นมีค่า zeta potential ประมาณ -20 mv แม้จะเพิ่ม PEI เพียง 0.5  $\mu\text{g}$  ก็ทำให้ค่า zeta potential เพิ่มขึ้นเป็น +10 mv ในขณะที่ขนาดของ polyplex ที่เกิดขึ้นในขนาดพอ ๆ กับ PEI/DNA ที่อัตราส่วน 1/1 คือไม่เกิน 1  $\mu\text{m}$  แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของ PEI ไปจนถึง 10  $\mu\text{g}$  ปรากฏว่าขนาดของ polyplex ที่เกิดขึ้นมีขนาดใหญ่มากจนถึงประมาณเกือบ 4  $\mu\text{m}$  ซึ่งขนาดที่ใหญ่ขึ้นนี้อาจเกิดจากปริมาณ PEI ที่มากเกินไป และเมื่อเทียบค่า zeta potential กับ PEI/DNA ที่อัตราส่วน 1/1 นั้นพบว่าประจุบวกของ PEI/MPyMeChC ที่ อัตราส่วน 0.5/1/1, 1/1/1 และ 5/1/1 ที่มีประจุบวกลดลง นั้นอาจจะหมายถึงการที่ polyplex จับกับ PEI อย่างหลวม ๆ ซึ่งอาจจะมีประโยชน์ในเรื่องของการปลดปล่อยดีเอ็นเอให้เป็นอิสระได้

#### 4.1.3 การตรวจสอบรูปร่างของ polyplex ด้วย AFM

ภาพจาก AFM ใช้เพื่อตรวจสอบการเกิด polyplex ของกลุ่มพอลิเมอร์ประจุบวกและดีเอ็นเอ จากภาพที่ได้พบว่า polyplex เกิดขึ้นจริง โดยมีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลม อย่างไรก็ตามผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า MPyMeChC มีความสามารถในการจับดีเอ็นเอต่ำ โดยจากวิเคราะห์ภาพ AFM ที่อัตราส่วนน้ำหนักของ MPyMeChC/DNA เป็น 5/1 และ 10/1 พบสายของดีเอ็นเอปรากฏเป็นกลุ่มอยู่รอบ ๆ อนุภาค (ภาพที่ 4.6-1 และ 4.6-2) และเมื่อเติม PEI อนุภาคมีลักษณะกลมขึ้นและไม่พบสายของดีเอ็นเอเหลืออยู่ ซึ่งเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอได้ถูกจัดเก็บและขดแน่นอยู่ในอนุภาค (ภาพที่ 4.6-3 และ 4.6-4) เมื่อวิเคราะห์ภาพจากอนุภาคผสม MPyMeChC/DNA polyplex ที่เติม PEI 0.5, 1 และ 10  $\mu\text{g}$  พบว่า ขนาดของ polyplex มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ PEI ที่เติม (ภาพที่ 4.6-5 และ 4.6-6) ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้สอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์ด้วย nanosizer (ภาพที่ 4.2-4.5)



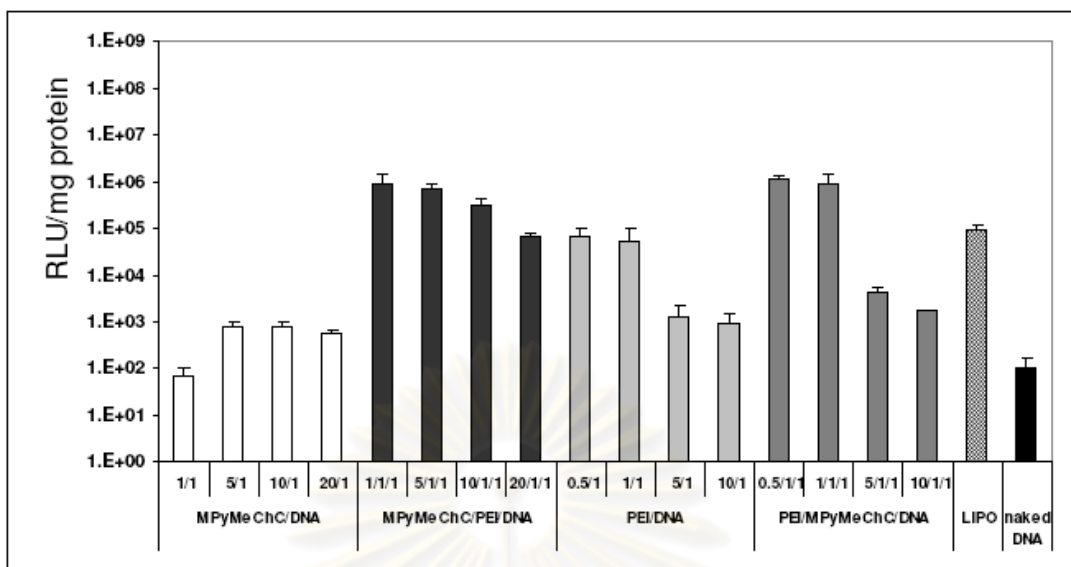
ภาพที่ 4.6 ภาพ AFM แสดงลักษณะของ polyplex ที่มีรูปร่างกลม ที่ w/w ต่าง ๆ ซึ่งแสดงทั้งภาพ topology (ซ้าย) phase contrast (ขวา)

## 4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีนและการทดสอบความเป็นพิษของ polyplex ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549 และ SH-SY5Y

### 4.2.1 การประเมินประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน

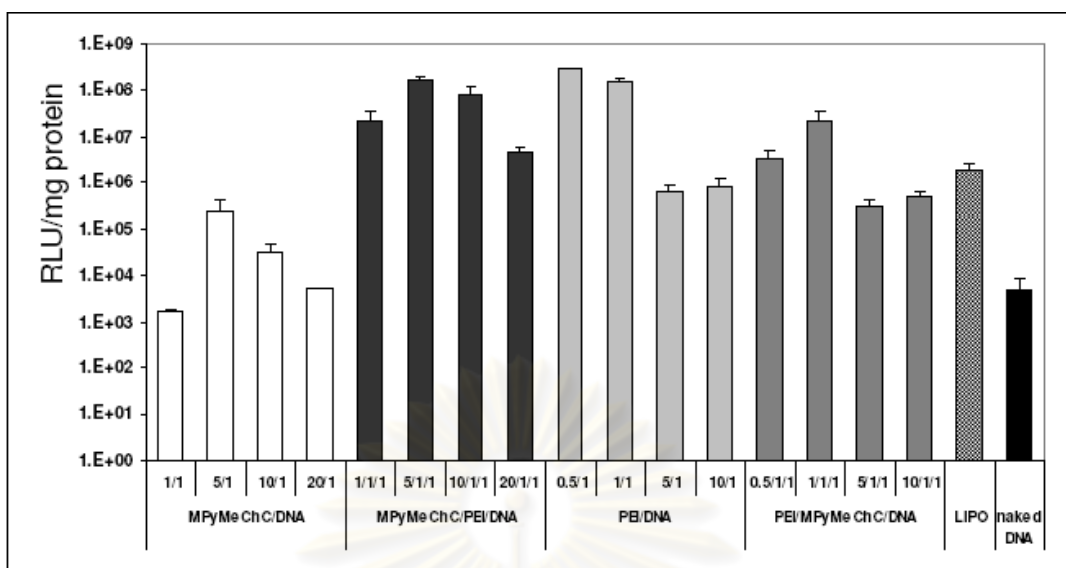
การทดลองนี้ต้องการศึกษาประสิทธิภาพของพอลิเมอร์ MPyMeChC และ/หรือ PEI เพื่อใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยงให้ได้หลากหลายชนิด ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ได้แก่ human cervical cancer cell line (HeLa), human lung adenocarcinoma epithelial cell line (A549) และ human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) จึงได้ถูกนำมาใช้ทดสอบผลการนำส่งด้วยระบบพอลิเมอร์ประจุบวกทั้งสองชนิดดังกล่าว โดยการทดลองนี้ได้ใช้พลาสมิด pGL3-basic ซึ่งโคลน promoter CMV promoter/enhancer เข้าไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย luciferase ในยูคาริโอต [49] ซึ่งสามารถวัดผลการถ่ายโอนยีนได้ในเชิงปริมาณ ในการถ่ายโอนยีนเข้าเซลล์แต่ละชนิดจะใช้ naked DNA และ Lipofectamine™ 2000 เป็นกลุ่มควบคุม ผลการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์ HeLa, A549 และ SH-SY5Y เป็นดังแสดงในภาพที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa การนำส่งยีนโดยตัวพา MPyMeChC/DNA นั้น มีประสิทธิภาพต่ำ (ภาพที่ 4.7) กล่าวคือตรวจพบสัญญาณ luciferase แสดงออกน้อยกว่า  $10^3$  RLU/mg protein ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sajomsang และคณะ (2009) จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า MPyMeChC ไม่ใช่ตัวพาที่ดีในการนำส่งยีนสู่เซลล์ HeLa เนื่องจากตรวจพบสัญญาณ luciferase ในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มที่นำส่งด้วย naked DNA แม้มีการเพิ่มปริมาณ MPyMeChC ก็ไม่มีผลกระตุ้นการนำส่ง อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเติม PEI เข้าไปเพื่อห่อหุ้ม MPyMeChC/DNA เมื่อตรวจสอบผลการนำส่งพบว่าประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงขึ้น  $10^2$ - $10^3$  เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ PEI โดย MPyMeChC/PEI/DNA ที่อัตราส่วน 1/1/1 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งสูงที่สุด และพบว่าเมื่อเพิ่ม MPyMeChC มากขึ้นไป ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนจะค่อย ๆ ลดลง เช่นเดียวกับผลการทดลองเมื่อใช้ตัวพากลุ่ม PEI/MPyMeChC/DNA การเพิ่ม PEI มากเกินไป ก็ทำให้ประสิทธิภาพการนำส่งยีนลดลง อีกทั้งยังทำให้เซลล์เป็นพิษอีกด้วย โดยปริมาณ PEI ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการถ่ายโอนในระบบพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI จะอยู่ที่ 0.5 และ 1  $\mu$ g ซึ่งระบบพอลิเมอร์ผสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยีนได้ประมาณ  $10^3$  เท่าเทียบกับการไม่เติม PEI เมื่อทำการทดลองในเซลล์ HeLa



ภาพที่ 4.7 ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่อัตราส่วนของน้ำหนักพอลิเมอร์และดีเอ็นเอต่าง ๆ กันดังระบุในภาพ

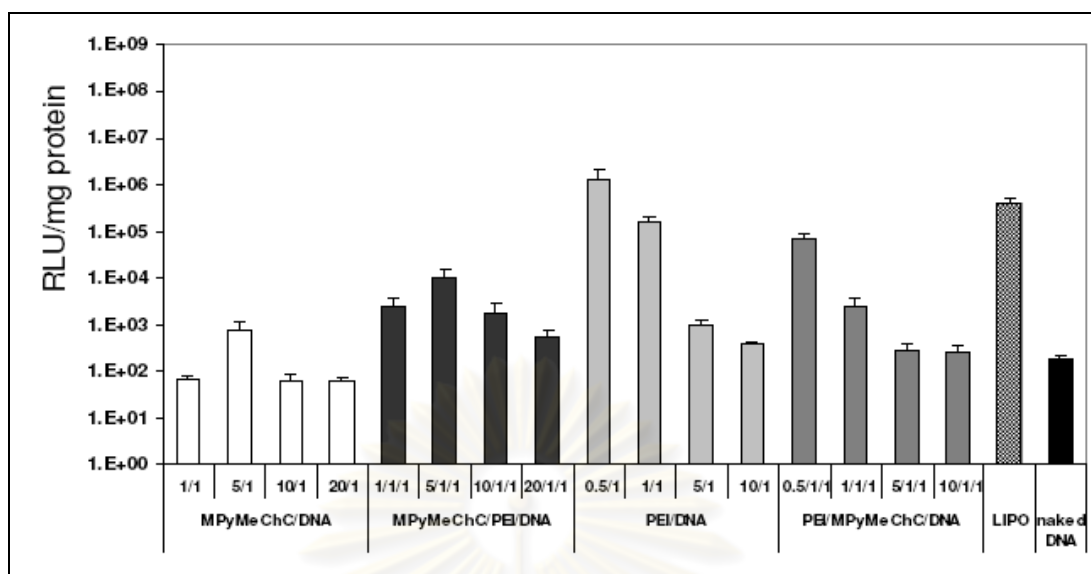
สำหรับการทดสอบระบบนำส่งด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกในเซลล์ A549 นั้น ผลการทดลองพบว่า การนำส่งยีนด้วย MPyMeChC ที่อัตราส่วนน้ำหนักเป็น MPyMeChC/DNA เป็น 5/1 ให้ผลการแสดงออกของ luciferase สูงกว่า naked DNA ประมาณ  $10^2$  ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นในกลุ่มพอลิเมอร์เดียวกัน ประสิทธิภาพการนำส่งยังต่ำมาก และเมื่อเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ก็ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพแต่อย่างใด เช่นเดียวกับเหตุการณ์ในเซลล์ HeLa การเติม PEI  $\mu\text{g}$  ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งให้สูงขึ้นได้ถึง  $10^2$ - $10^4$  เท่า และแม้ว่าการจะเพิ่ม PEI ถึง 5 และ 10  $\mu\text{g}$  จะทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงขึ้นกว่า MPyMeChC/DNA แต่ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนน้อยกว่า MPyMeChC/PEI/DNA 1/0.5/1 และ 1/1/1



ภาพที่ 4.8 ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง A549 ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่อัตราส่วนของน้ำหนักพอลิเมอร์และดีเอ็นเอต่าง ๆ กันดังระบุในภาพ

ในส่วนของการนำระบบพอลิเมอร์ประจุบวกแบบผสมใช้ในการนำส่งยีนสู่ SH-SY5Y นั้น ให้ผลที่แตกต่างไปจากเซลล์ทั้งสองชนิดข้างต้น แม้ว่าพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI ให้ผลการนำส่งสูงกว่าการนำส่งด้วย MPyMeChC แต่ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การใช้พอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนให้สูงกว่าการใช้ PEI นำส่งยีนโดยลำพังในและปริมาณ PEI 0.5-1  $\mu\text{g}$  ให้ผลการนำส่งได้สูงกว่าการนำส่ง naked DNA ถึง  $10^3$  เท่า

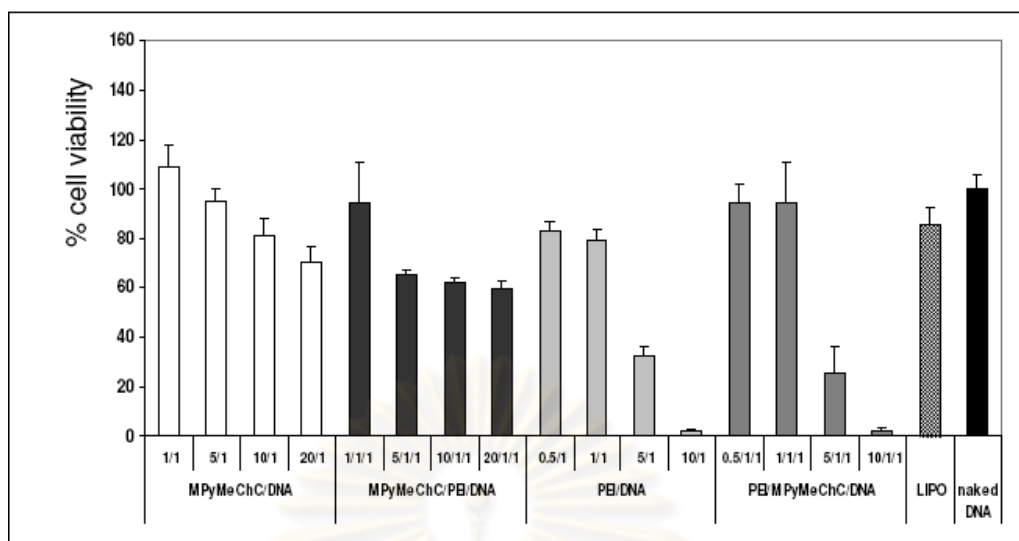




ภาพที่ 4.9 ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่อัตราส่วนของน้ำหนักพอลิเมอร์และดีเอ็นเอต่าง ๆ กันดังระบุในภาพ

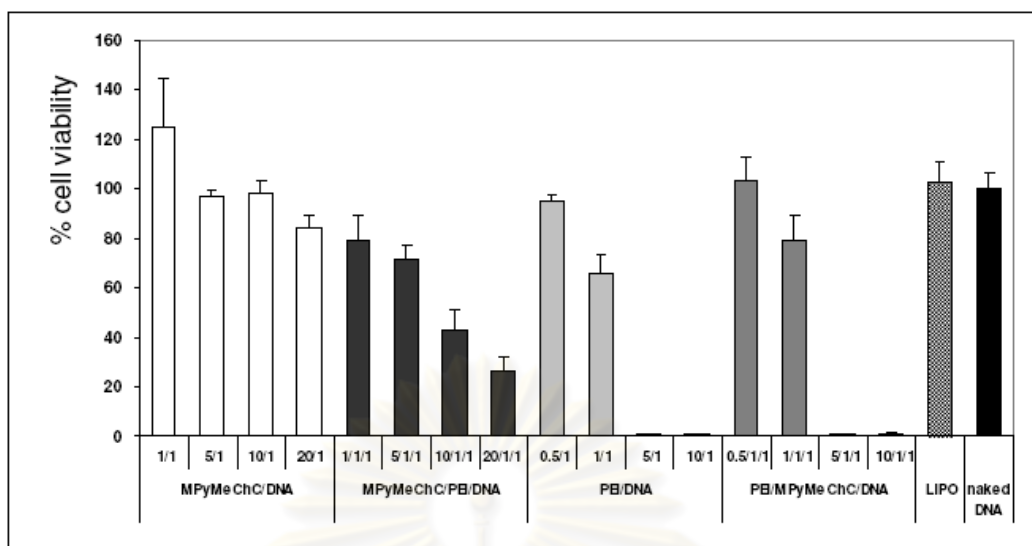
#### 4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของระบบ (Cell viability testing)

เทคนิค MTT assay ได้ถูกนำมาใช้เพื่อหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ซึ่งสามารถประเมินความเป็นพิษของการใช้พอลิเมอร์นำส่งยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, A549 และ SH-SY5Y ได้ โดยการทดสอบได้ใช้สภาวะเดียวกับการทดสอบการนำส่งยีน และใช้กลุ่มเซลล์ที่ถูกนำส่งด้วย Lipofectamine™ 2000 และ naked DNA เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองสำหรับเซลล์ HeLa, A549 และ SH-SY5Y แสดงในภาพที่ 4.10, 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ



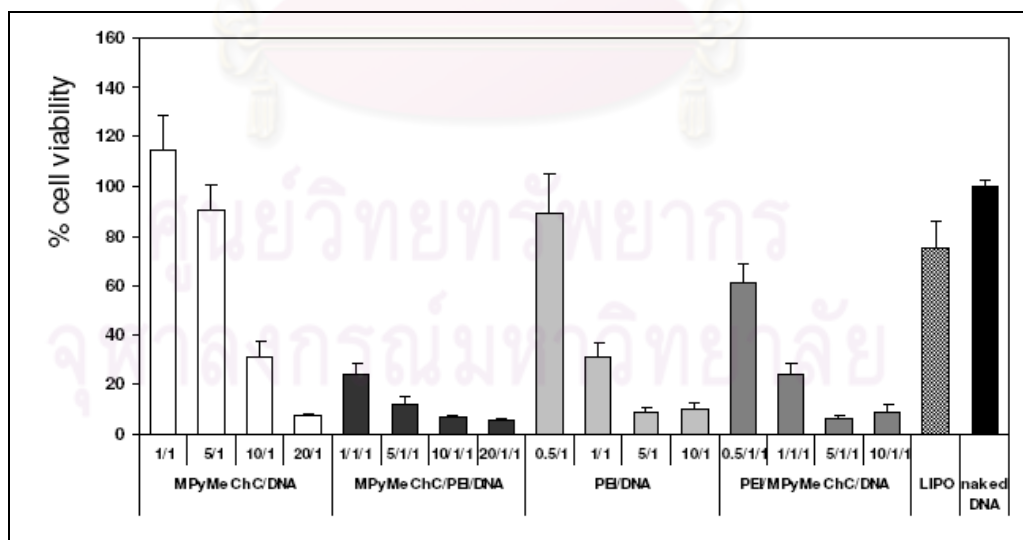
ภาพที่ 4.10 ผลการทดสอบความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ด้วยวิธี MTT

ผลการทดลองเมื่อทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ทำการถ่ายโอนด้วย MPyMeChC/DNA และ PEI/DNA จะแปรผันตามปริมาณพอลิเมอร์ที่ใช้ทำ polyplex พบว่าการถ่ายโอนยีนด้วย MPyMeChC มีผลกระทบต่ออาการเจริญของเซลล์น้อยกว่าการใช้ PEI หรือ MPyMeChC ผสม PEI จากสถานะที่ใช้ในการถ่ายโอนยีนด้วย polyplex MPyMeChC/DNA นอกจากนี้ยังพบว่าการผสม PEI 1  $\mu\text{g}$  ลงใน MPyMeChC/DNA เพื่อสร้าง MPyMeChC/PEI/DNA polyplex นั้นมีผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงเล็กน้อย ผลการทดลองยังยืนยันว่าการผสม PEI 5 และ 10  $\mu\text{g}$  ใน MPyMeChC/DNA (PEI/MPyMeChC/DNA) เป็นสาเหตุทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำมากโดยมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 40 %



ภาพที่ 4.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง A549 ด้วยวิธี MTT

ผลการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง A549 เป็นไปในทางเดียวกับ HeLa จากสภาวะที่ใช้ในการถ่ายโอนนี้ในเซลล์ชนิดนี้พบว่า เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80% เมื่อใช้ระบบ MPyMeChC ในการถ่ายโอนยีน และการเติม PEI มีผลเป็นพิษกับเซลล์



ภาพที่ 4.12 ผลการทดสอบความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT

ในส่วนของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้ทดสอบข้างต้น อนุพันธ์โคโคซาน MPyMeChC และ PEI มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ชนิดนี้ค่อนข้างชัด และเป็นที่น่าสังเกตว่าการผสมพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดเพื่อใช้เป็นตัวพาก็มีผลยับยั้งการเจริญที่สูงมากกว่าการใช้ MPyMeChC หรือ PEI อย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนั้นจึงมีข้อควรระวังในการใช้พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้เป็นตัวพาสำหรับเซลล์ SH-SY5Y เนื่องจากเซลล์มีความไวในการตอบสนองต่อการรับพอลิเมอร์ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ เป็นผลให้การนำส่งยีนมีประสิทธิภาพต่ำในที่สุด อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่าการใช้ PEI เป็นตัวพาในอัตราส่วนน้ำหนักของ PEI/DNA เป็น 0.5/1 ให้ผลการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ คือมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 90%

ทั้งนี้ในเซลล์ทั้งสามชนิดพบว่าในกลุ่มที่ใช้ MPyMeChC ที่อัตราส่วน 1/1 นำส่งยีนนั้น มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ที่บ่มกับ naked DNA ทำให้อัตราการรอดชีวิตที่ได้สูงกว่า 100 % จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์ที่บ่มกับ MPyMeChC ในระดับความเข้มข้นต่ำมีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง แต่หากใช้พอลิเมอร์ชนิดนี้ที่ความเข้มข้นสูงชันจะมีผลให้เซลล์ตาย เนื่องจากประจุบวกจะเหนี่ยวนำให้ผนังเซลล์เกิดการรั่ว ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

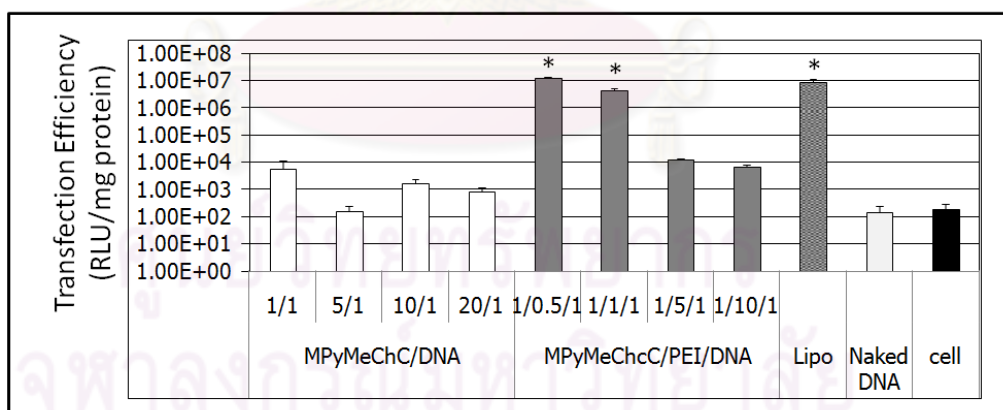
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 4.3 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ประจุบวกนำส่งยีนสู่เซลล์มะเร็งกระดูกเพาะเลี้ยง MG63

#### 4.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีน

เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและความเป็นพิษของระบบในการนำส่งยีนสู่เซลล์มะเร็งกระดูก MG-63 ผู้วิจัยได้ใช้พลาสมิด pGL-3 basic vector containing CMV promoter/enhancer [49] ซึ่งมีการแสดงออกของ firefly luciferase enzyme ดังเช่นในการประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษในเซลล์ HeLa, A549 และ SH-SY5Y เพื่อเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการนำส่งยีน BMP-2 ต่อไป

ผลการทดลองการนำส่งยีนแสดงในภาพที่ 4.13 พบว่าการผสม PEI ใน MPyMeChC/DNA polyplex นั้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนได้ประมาณ  $10^3$ - $10^4$  เท่า เมื่อเทียบกับการนำส่งโดย MPyMeChC/DNA โดยผลการทดลองในกลุ่ม MPyMeChC/PEI/DNA แสดงให้เห็นว่าการใช้ PEI ในปริมาณ 0.5-1  $\mu$ g ให้ผลการนำส่งในระดับที่ใกล้เคียงกับสารนำส่งทางการค้า Lipofectamine™ 2000 การทดลองนี้แสดงถึงประสิทธิภาพของการใช้ MPyMeChC ร่วมกับ PEI ในการนำส่งยีน อย่างไรก็ตามการใช้ PEI เป็นตัวพาเพียงอย่างเดียวก็ให้ผลการนำส่งดีเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงความเป็นพิษตามภาพที่ 4.14 PEI จึงไม่ใช่ตัวพาที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้กับ MG-63 ต่อไป

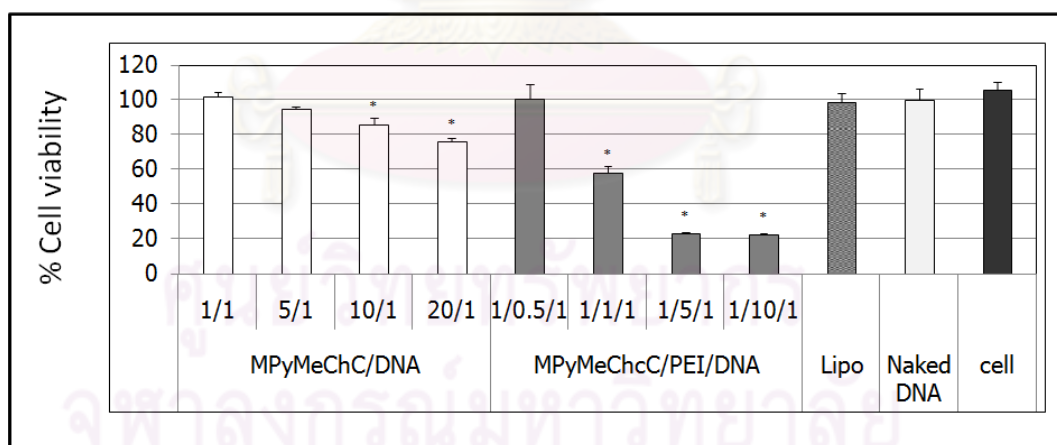


ภาพที่ 4.13 แสดงประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนสู่เซลล์เพาะเลี้ยง MG-63 ด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกที่อัตราส่วนน้ำหนักพอลิเมอร์และดีเอ็นเอต่าง ๆ กันดังระบุในภาพ จากนั้นทดสอบด้วย One-way Anova ตามด้วย Tukey'HSD Test (\* =แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ Naked DNA ค่า p-value < 0.05)



#### 4.3.2 การทดสอบความเป็นพิษของ polyplex ต่อเซลล์ MG-63

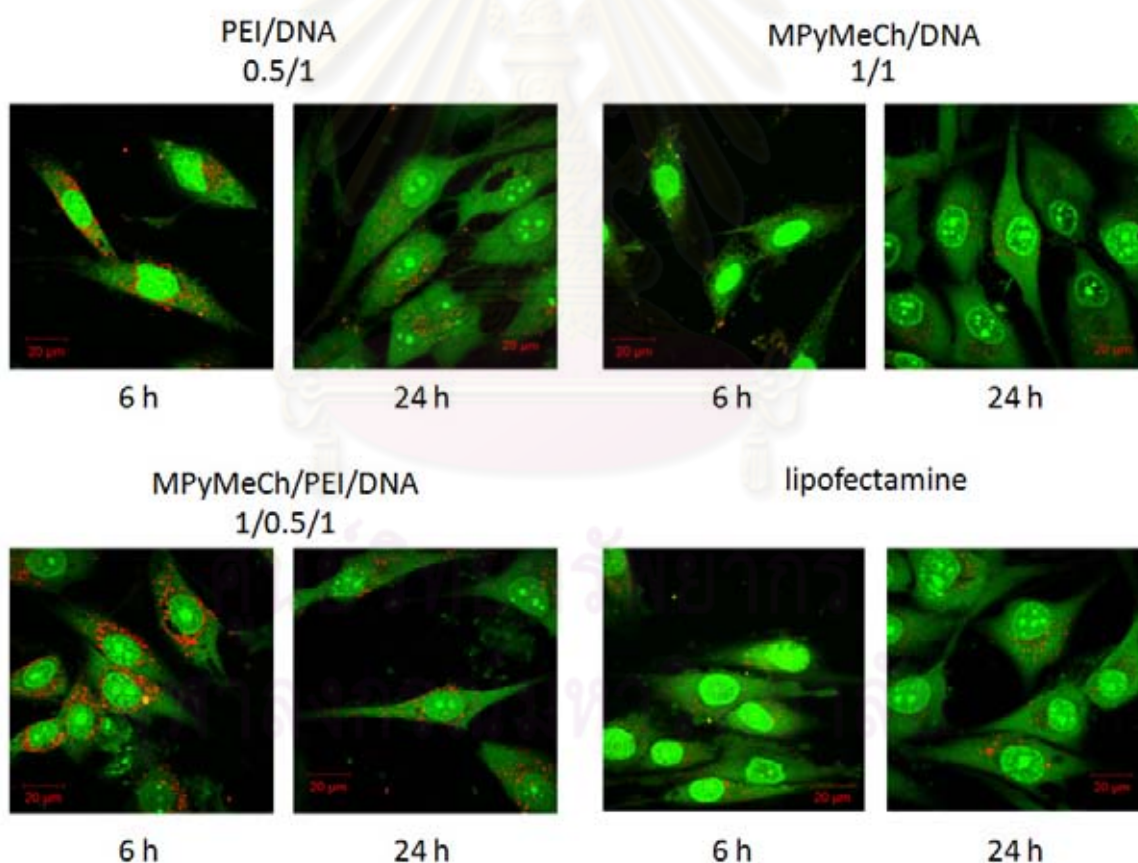
ผลการหาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT แสดงในภาพที่ 4.14 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในกลุ่ม MPyMeChC/DNA อยู่ในระดับที่ดีมาก ด้วยปริมาณพอลิเมอร์ที่ใช้ในการทดลองเซลล์มีการรอดมากกว่า 80% อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองยังได้ชี้ให้เห็นว่าอัตราการรอดชีวิตจะแปรผันตรงข้ามกับปริมาณพอลิเมอร์ MPyMeChC ที่ใช้ สำหรับในกลุ่มพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI/DNA อัตราการรอดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณพอลิเมอร์ PEI ที่ใส่ร่วมกับ MPyMeChC/DNA polyplex โดยพบว่าการใช้ PEI 0.5  $\mu\text{g}$  จะให้เซลล์อยู่รอดเกือบ 100 % และ การใช้ PEI 1  $\mu\text{g}$  เซลล์จะอยู่รอด 60 % และเมื่อใส่ PEI 5  $\mu\text{g}$  เซลล์จะอยู่รอดเพียง 20 % เท่านั้น แสดงให้เห็นถึงความไวต่อประจุบวกจาก PEI ของเซลล์ MG-63 อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้พอลิเมอร์ผสมในปริมาณที่เหมาะสมนั้นสามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ MG-63 ได้ และเมื่อประเมินจากประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้พอลิเมอร์ที่อัตราส่วน 0.5/1/1 โดยได้ศึกษายืนยันในการนำส่งยีน Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ในขั้นต่อไป เพื่อดูระยะเวลาที่ยีนนี้แสดงออกด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในเวลาต่าง ๆ ที่วันที่ 1, 3, 7, 10 และ 14



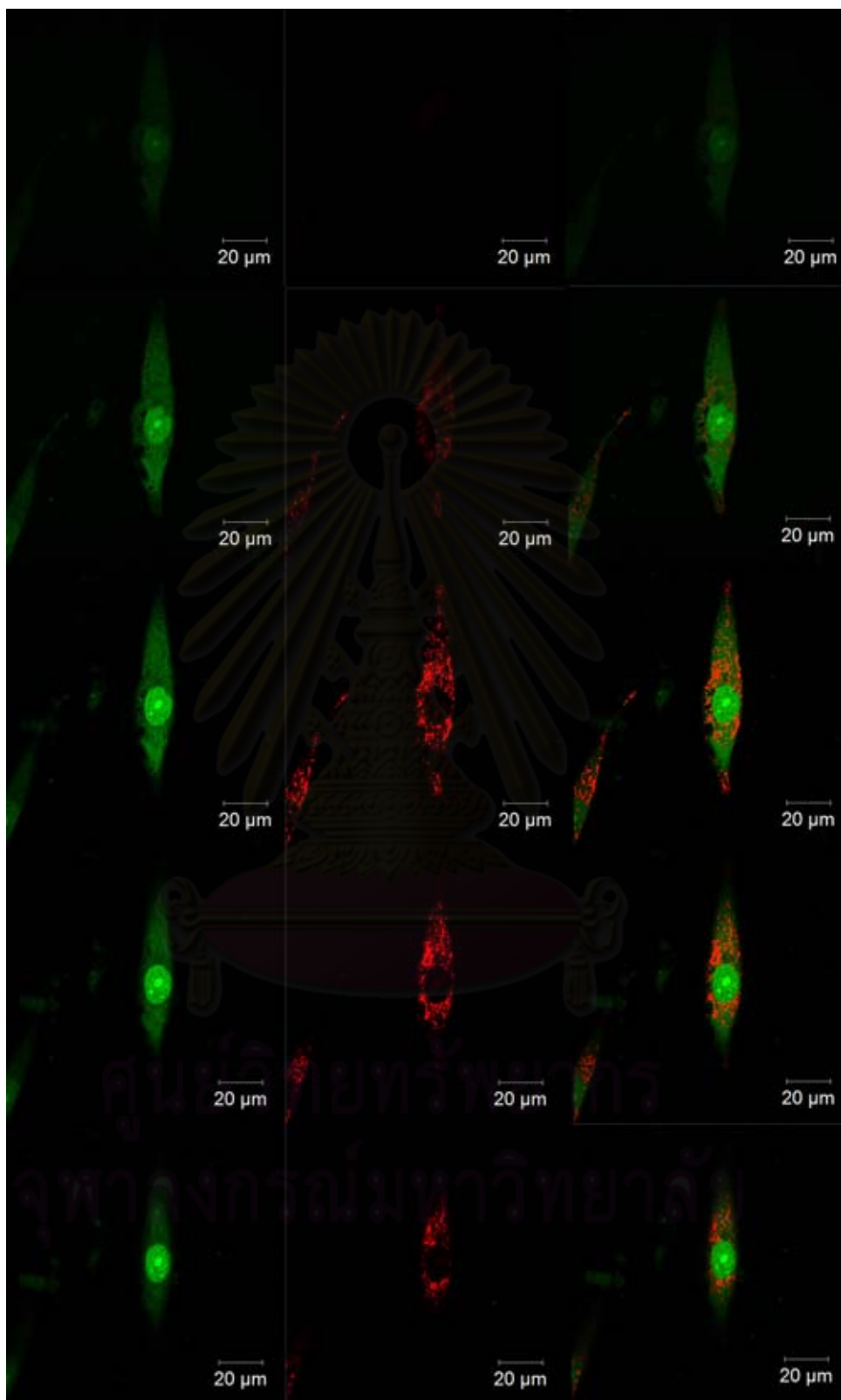
ภาพที่ 4.14 แสดงความเป็นพิษในการถ่ายโอนยีนด้วยพอลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง MG-63 ด้วยวิธี MTT จากนั้นทดสอบด้วย One-way Anova ตามด้วย Tukey'HSD Test (\* =แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ Naked DNA ค่า p-value < 0.05)

#### 4.4 การตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของ PEI/MPyMeChC/DNA polyplex

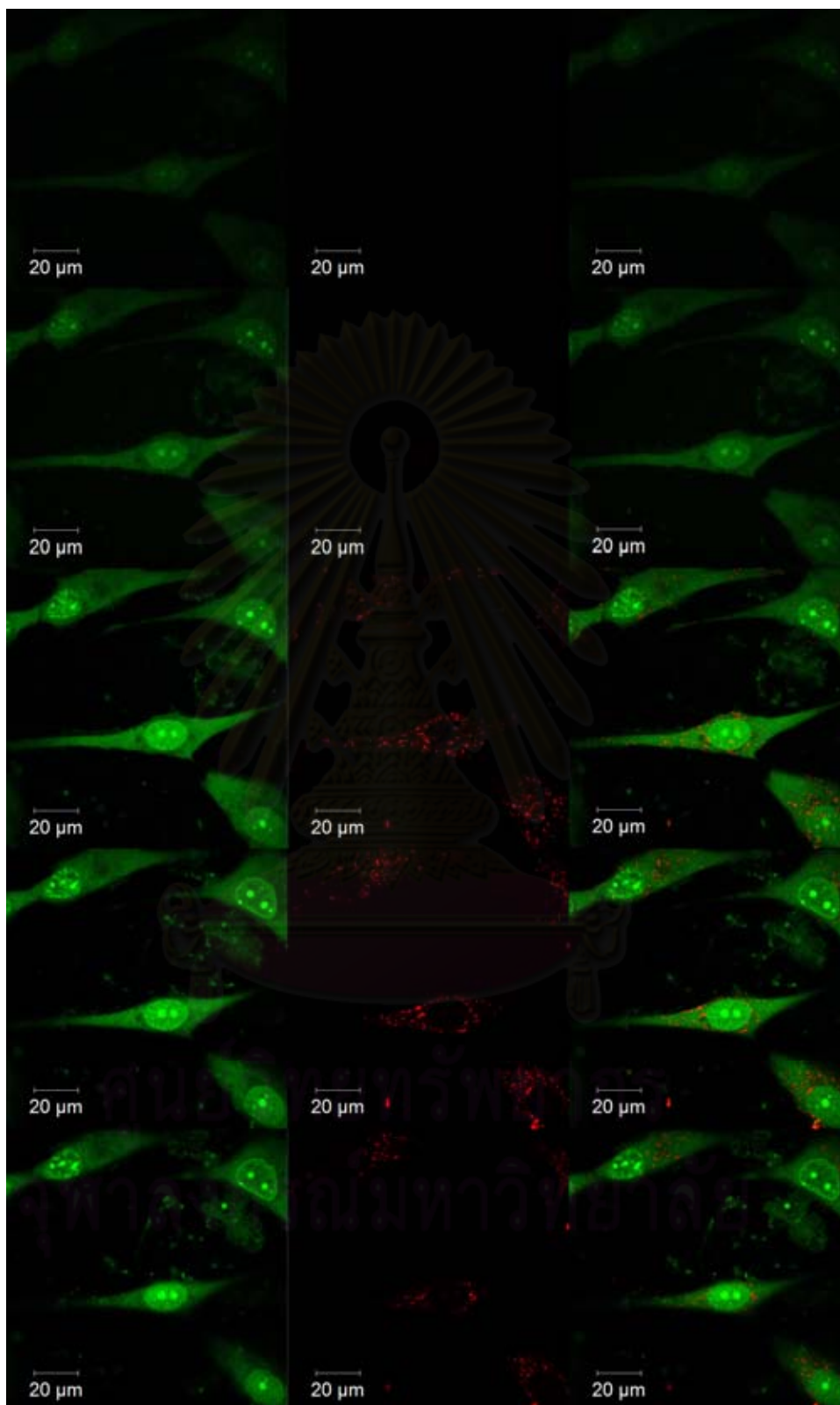
จากการตรวจการนำส่งยีนโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ TM-Rhodamine (สีแดง) และย้อมเซลล์ด้วย Acridine orange (สีเขียว) (ภาพที่ 4.15) ผลการตรวจสอบภายใต้ confocal laser scanning microscope พบว่าการใช้ระบบ polyplex ของ PEI/DNA, MPyMeChC/DNA และ MPyMeCh/PEI/DNA มีประสิทธิภาพสูงในการนำส่งยีนเมื่อเปรียบเทียบกับ Lipofectamine™ 2000 ซึ่งเป็นตัวนำส่งยีนทางการค้า โดยสามารถตรวจพบพลาสมิดในเซลล์เมื่อทำการนำส่งยีนที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ผลการนำส่งพลาสมิดด้วย MPyMeCh/PEI/DNA ที่เวลา 6 ชั่วโมงยังได้ถูกนำไปวิเคราะห์ Z-stack เพื่อแสดงให้เห็นการปรากฏของ polyplex ในเซลล์ (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.15 การเข้าสู่เซลล์ MG-63 ของพลาสมิดที่ย้อมด้วยสี TM-Rhodamine (สีแดง) โดยเซลล์ย้อมด้วยสี Acridine orange (สีเขียว) ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ Z-stack จากการนำส่งพลาสมิดที่ย้อมด้วยสี TM-Rhodamine (สีแดง) ในเซลล์ MG-63 ซึ่งย้อมด้วย Acridine orange (สีเขียว) ที่เวลา 6 ชั่วโมงโดยให้ PEI/MPyMeCh/DNA 0.5/1/1 เป็นตัวพา



ภาพที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ Z-stack จากการนำส่งพลาสมิดที่ย้อมด้วยสี TM-Rhodamine (สีแดง) ในเซลล์ MG-63 ซึ่งย้อมด้วย Acridine orange (สีเขียว) ที่เวลา 24 ชั่วโมงโดยให้ PEI/MPyMeCh/DNA 0.5/1/1 เป็นตัวพา

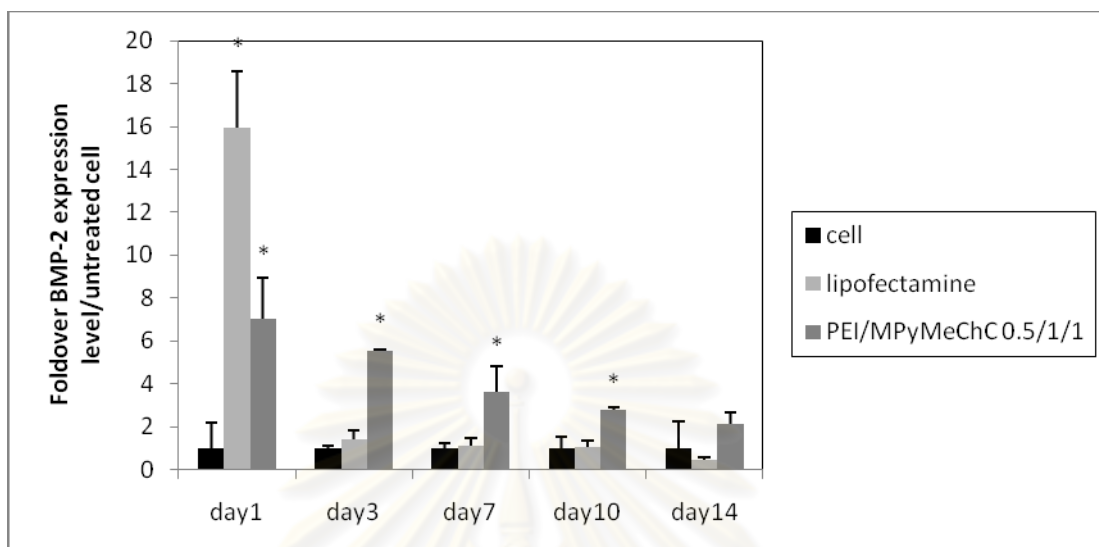
จากภาพที่ 4.16 จะเห็นได้ว่าการนำส่งยีนด้วยพอลิเมอร์ผสม PEI/MPyMeChC/DNA 0.5/1/1 ที่เวลา 6 ชั่วโมง นั้นส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์และดีเอ็นเอจะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ ในขณะที่เมื่อทำการนำส่งเป็นเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงนั้นดีเอ็นเอจะมีการกระจายและมีบางส่วนเข้าไปอยู่ที่นิวเคลียสของเซลล์และทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในขั้นต่อไป (ภาพที่ 4.17)

#### 4.5 ผลการนำส่งยีน BMP-2 ใน MG-63 ด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของระบบนำส่งพอลิเมอร์ประจุบวกแบบผสมที่สามารถใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนนอกเหนือไปจากการใช้ระบบอาศัยไวรัส เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของระบบนำส่งนี้ การทดลองลำดับต่อไปจึงได้เลือกใช้ระบบนำส่งที่ได้ศึกษามาใช้กับการนำส่งยีน BMP-2 ซึ่งยีนดังกล่าวนี้เป็นยีนบำบัดสำหรับรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูก เป็นการแสดงให้เห็นถึงแนวทางการประยุกต์ใช้ระบบนำส่งดังกล่าวกับการรักษาโรคหรือการทำยีนบำบัดนั่นเอง

จากการทดสอบระบบนำส่งแบบผสม MPyMeChC และ PEI ในการถ่ายโอนยีนข้างต้น เมื่อทดสอบด้วยยีน luciferase ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย พบว่าอัตราส่วนของ MPyMeChC/PEI/DNA ที่เหมาะสมในการนำส่งยีน BMP-2 คือ 1/0.5/1 เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่ให้ผลการนำส่งที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ผลจากการนำส่งยีน BMP-2 เข้าสู่เซลล์โดยการวัดปริมาณการแสดงออกของยีนเทียบผลที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (ภาพที่ 4.18) พบว่าเซลล์ที่ได้รับยีนด้วย Lipofectamine™ 2000 นั้นมีปริมาณการแสดงออกของยีนสูงกว่าเซลล์ปกติถึงประมาณ 16 เท่าในหนึ่งวันภายหลังจากการนำส่ง แต่ปริมาณการแสดงออกดังกล่าวจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในวันต่อ ซึ่งแตกต่างกับเซลล์ที่ถูกนำส่งด้วยพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI/DNA แม้ว่าในวันแรกจะให้ผลการแสดงออกของยีนสูงกว่าเซลล์ปกติเพียง 6 เท่า แต่ยังคงให้ผลการแสดงที่ดีกว่า Lipofectamine™ 2000 และเซลล์ปกติในวันต่อ ๆ มาจนถึงวันที่ 14 โดยจะมีการแสดงออกลดลงตามเวลา ซึ่งการใช้พอลิเมอร์ผสมนั้นอาจมีข้อดีในเรื่องของการค่อย ๆ ปลดปล่อย DNA ออกจากพอลิเมอร์ PEI และ MPyMeChC จึงให้ผลการแสดงออกของยีนยาวนาน โดยที่ระดับการแสดงออกของยีน BMP-2 เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 10 ในขณะที่การนำส่งยีนด้วย Lipofectamine™ 2000 แม้ว่าจะมีความแตกต่างในการนำส่งยีนในวันแรกแต่ในวันต่อ ๆ มากลับไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ





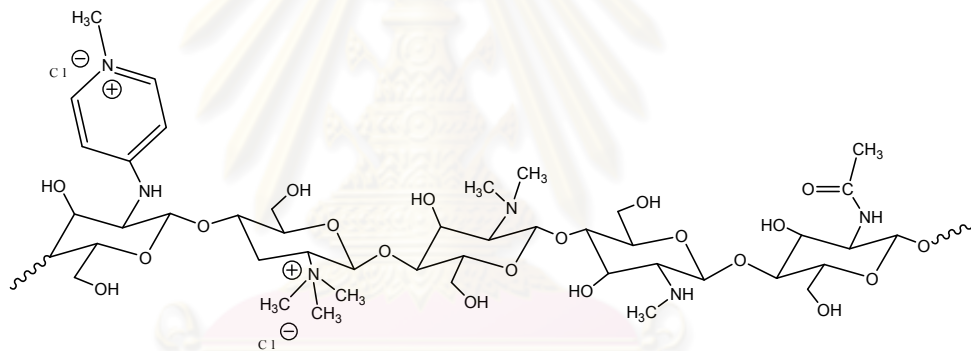
ภาพที่ 4.18 เปรียบเทียบผลการนำส่งยีน BMP-2 โดยใช้พอลิเมอร์ผสมที่มีอัตราส่วน PEI/MPyMeChC/DNA 0.5/1/1 จากการวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่เวลา 1, 3, 7, 10 และ 14 วันหลังการนำส่งจากนั้นทดสอบด้วย One-way Anova ตามด้วย Tukey'HSD Test ( \* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติในแต่ละวัน ค่า p-value < 0.05)

## บทที่ 5

### สรุป อภิปราย และวิจารณ์ผลการทดลอง

#### สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาตัวพา non-viral vector โดยเลือกใช้พอลิเมอร์หลักเป็น MPyMeChC [methylated *N*-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride] (ภาพที่ 5.1) ซึ่งเป็นไคโตซานละลายน้ำได้ที่ได้รับการพัฒนาจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เนื่องจากเดิมไคโตซานนั้นเป็นพอลิเมอร์ที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมีการเติมหมู่ methyl เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ อีกทั้งยังได้เพิ่มหมู่อะโรมาติกเพื่อเพิ่มความสามารถในการจับกันของพอลิเมอร์และดีเอ็นเอ เนื่องจากประจุบวกของ pyridine ring จะสามารถเปลี่ยนตำแหน่งได้จากการ resonance ซึ่งอาจจะทำให้ดีเอ็นเอจับกับพอลิเมอร์แน่นขึ้น [4]

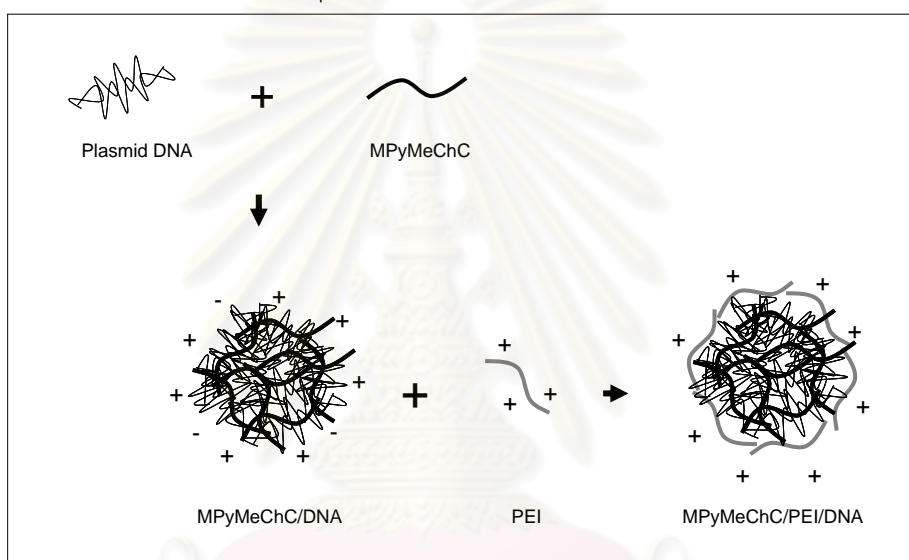


ภาพที่ 5.1 โครงสร้างของ MPyMeChC

จากผลการทำ gel retardation assay พบว่า MPyMeChC มีความสามารถในการจับดีเอ็นเอได้ดี โดยความสามารถนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของพอลิเมอร์ที่ใช้ ผลการวัดขนาดของอนุภาคที่เกิดขึ้นยืนยันว่า polyplex ของ MPyMeChC/DNA มีขนาดไม่เกิน 300 nm และเมื่อวัดประจุที่ผิวพบว่ามีความค่าศักย์ซีต้าเป็นบวกแปรผันตามปริมาณพอลิเมอร์ (ภาพที่ 4.2) เช่นเดียวกันกับ PEI/DNA polyplex (ภาพที่ 4.3) เป็นที่น่าสังเกตว่า PEI/DNA polyplex ที่อัตราส่วน 1/1 จะมีขนาดใหญ่ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการจับตัวกันของดีเอ็นเอและ PEI ที่จับกันอย่างหลวม ๆ เกิดการจับกันอย่างไม่สมบูรณ์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของ PEI ทำให้เกิดการจับกันแน่นขึ้น ทำให้ดีเอ็นเอขดแน่นมากขึ้น (ภาพที่ 4.3)

ภาพจาก AFM พบว่า MPyMeChC ยังจับดีเอ็นเอได้ไม่แน่นนัก อนุภาคที่ได้ไม่เป็นทรงกลมและยังพบเส้นดีเอ็นเอปรากฏรอบ ๆ อนุภาค (ภาพที่ 4.6-1) การเติม PEI ใน MPyMeChC/DNA polyplex ในปริมาณ 0.5, 1 และ 10  $\mu\text{g}$  (ภาพที่ 4.6-3 ถึง 4.6-6) ทำให้

polyplex มีลักษณะเป็นทรงกลมมากขึ้น ตามหลักการแล้ว PEI สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่า MPyMeChC เนื่องจาก PEI มีหมู่เอมีนมากกว่าใน MPyMeChC ถึงสองเท่าที่ปริมาณสารเท่ากัน การใช้ PEI เป็นพอลิเมอร์เสริมนี้สอดคล้องกับ Kim, T.H., et al. และคณะ (2005) [52] PEI สามารถจับกับดีเอ็นเอที่เหลือที่ผิวของ MPyMeChC/DNA polyplex ผ่าน ionic interaction ระหว่างหมู่เอมีนและฟอสเฟต (ภาพที่ 5.2) ผลการวัดขนาดของพอลิเมอร์พบว่า polyplex ของพอลิเมอร์ผสมมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจาก PEI สามารถจับกับ polyplex ในลักษณะการเคลือบผิวชั้นนอก และทำให้ประจุที่ผิวของพอลิเมอร์มีค่าสูงขึ้นด้วย ซึ่งการมีค่าประจุที่ผิวเป็นบวกในระดับสูงนี้พบได้เสมอใน polyplex ทุกชนิดที่มี PEI เป็นส่วนประกอบ



**ภาพที่ 5.2** ภาพจำลองการจับกันระหว่างพอลิเมอร์และดีเอ็นเอในระบบพอลิเมอร์ผสมเพื่อเตรียม MPyMeChC/PEI/DNA polyplex

เมื่อทดลองเติม PEI ใน MPyMeChC/PEI/DNA polyplex พบว่าเมื่อเติม PEI ในปริมาณ 0.5-5  $\mu\text{g}$  อนุภาคที่ได้ยังมีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตร (ภาพที่ 4.5) แต่หากเติม PEI ตั้งแต่ 10  $\mu\text{g}$  ขนาดของ polyplex ใหญ่เป็นขนาดในระดับไมโครเมตร และมีอนุภาคหลายขนาดปะปนกัน ในจุดนี้คาดว่า การใส่ PEI มากเกินไปจะทำให้อนุภาคเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน อย่างไรก็ตามเหตุการณ์นี้ไม่เกิดขึ้นในกรณีที่เพิ่ม MPyMeChC เพียงอย่างเดียวและจำกัด PEI เพียง 1  $\mu\text{g}$  แม้ว่าจะเพิ่ม MPyMeChC ถึง 40  $\mu\text{g}$  ขนาดของ MPyMeChC/PEI/DNA ก็ยังคงอยู่ที่ระดับนาโนเมตร และเมื่อตรวจสอบขนาดของ polyplex ที่ MPyMeChC ผสมอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.4) พบว่า เมื่อเติม MPyMeChC ปริมาณต่ำคือ 0.5 และ 1  $\mu\text{g}$  พอลิเมอร์และดีเอ็นเอจะเริ่มมีการจับกันอย่างหลวม ๆ คาดว่าขนาดของอนุภาคที่วัดได้นั้นไม่ได้แสดง ขนาดของ polyplex ที่ต้องการ

โดยเมื่อมีการเติม MPyMeChC มากขึ้น (5, 10, 20 และ 40  $\mu\text{g}$ ) นั้น polyplex ได้เริ่มก่อตัวได้โดยเกิดการจับตัวกันอย่างหลวม ๆ และเมื่อปริมาณ MPyMeChC มากขึ้นไปก็จะเกิดการขดตัวแน่นของอนุภาคทำให้ให้ขนาดค่อย ๆ เล็กลง

ภาพ AFM แสดงถึงความสามารถของ PEI ที่ช่วยในกระบวนการเตรียม polyplex โดยจากรูปร่างของ polyplex ที่ไม่มีความชัดเจน (undefined shape) จะมีลักษณะกลมขึ้นเมื่อมีการเติม PEI แม้เพียงเล็กน้อยและเมื่อเพิ่มปริมาณของ PEI เพิ่มมากขึ้นก็จะได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ผลจาก AFM ยังสอดคล้องกับผลการทำ gel retardation เนื่องจากภาพ polyplex ที่เกิดจาก MPyMeCh/DNA แสดงผลการหน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ซึ่งน่าจะเกิดจาก polyplex ห่อหุ้มดีเอ็นเอไว้อย่างหลวม ๆ ดีเอ็นเอบางส่วนปรากฏอยู่บนผิวของอนุภาคทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏเป็นรอยทางยาว ในขณะที่ polyplex ที่มี PEI เป็นส่วนประกอบ พบว่า การห่อหุ้มดีเอ็นเอเกิดอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นดีเอ็นเอที่ห่อหุ้มอยู่ในอนุภาคที่มี PEI จึงถูกปกป้องจากการย่อยสลายของเอนไซม์จากสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า ถือเป็นข้อดีอย่างหนึ่งของการใช้ PEI ผลสมในตัวพา

ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนและความเป็นพิษของตัวพาต่อเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญที่จำเป็นจะต้องคำนึงถึงในระบบการส่งถ่ายยีน [53] การทดลองก่อนหน้านี้ได้รายงานความสำเร็จในการสังเคราะห์อนุพันธ์โคโคซาน MPyMeChC เพื่อเป็นตัวพาทางเลือกใหม่ในการนำส่งยีนโดยไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา ซึ่งที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ Huh7 โดยมีความเป็นพิษต่ำ อย่างไรก็ตาม ดูเหมือนว่าพอลิเมอร์นี้จะไม่มีประสิทธิภาพเมื่อนำมาใช้กับเซลล์ HeLa ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดของ MPyMeChC ดังนั้นเพื่อให้การนำ MPyMeChC ไปใช้ในวงกว้างและให้สามารถนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ได้หลากหลายชนิด จึงได้มีแนวคิดในการผสม PEI เข้าไปในระบบ เนื่องจาก PEI มีประจุบวกสูง และมีกระบวนการหลบหลีกออกจาก endosome เรียกว่า “proton sponge effect” ช่วยให้ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยแล้วเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนด้วย PEI สูง นอกจากนี้การใช้ PEI เป็นตัวพายังมีประโยชน์ในเรื่องของการนำส่งยีนเข้าสู่นิวเคลียสเมื่อเทียบกับการใช้ naked plasmid DNA โดยมีการทดลองแสดงให้เห็นว่า PEI และ พลาสมิดดีเอ็นเอยังคงจับตัวกันเป็น polyplex ในการเข้าสู่นิวเคลียส และมีการปลดปล่อยดีเอ็นเอในนิวเคลียสเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่นิวเคลียสนั้นสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อใช้ PEI ร่วมกับ nuclear localization signals (NLS) [30] โดยที่การใช้โคโคซานจะช่วยให้ตัว polyplex ที่เกิดขึ้นมีแรงจับกันที่ไม่มากเท่ากับการใช้ PEI เพียงอย่างเดียวจึงทำให้เกิดการปลดปล่อยดีเอ็นเอออกได้ง่าย ทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงขึ้น ดังนั้นการใช้พอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI จึงเป็นการนำข้อดีของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดมารวมกัน เพื่อให้ได้ผลการถ่ายโอนยีนที่สูง และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำใน

ขณะเดียวกัน อีกทั้งยังเป็นการลดข้อจำกัดอันเกิดจากข้อเสียของทั้งสองพอลิเมอร์ด้วย จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้พอลิเมอร์ผสมยังช่วยเสริมประสิทธิภาพให้การถ่ายโอนยีนให้สูงขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้ MPyMeChC หรือ PEI เป็นตัวพาโดยลำพัง ผลการทำงานเสริมกัน (synergistic effect) ของพอลิเมอร์ต่างชนิดนี้ ได้มีปรากฏให้เห็นจากรายงานการใช้ PEI ร่วมกับ chitosan [54-56] หรือ cationic liposome [57, 58] อย่างไรก็ตาม การผสมพอลิเมอร์อาจมีผลเสริมประสิทธิภาพกับเซลล์บางชนิด ดังนั้น ผลการถ่ายโอนยีนจึงขึ้นอยู่กับทำให้เกิดความสมดุลระหว่างความเป็นพิษของตัวพาที่ใช้นำส่ง ประสิทธิภาพการนำส่งและชนิดของเซลล์

การศึกษานี้พบว่าการใช้พอลิเมอร์ผสมระหว่าง PEI และ MPyMeChC นั้นสามารถช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEI ได้ในเซลล์ HeLa, A549 และ MG-63 อย่างไรก็ตามในเซลล์ SH-SY5Y นั้นพบว่ายังคงมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงเมื่อใช้ PEI มากกว่า 5  $\mu\text{g}$  ก็เป็นพิษต่อเซลล์มาก ผลการทดลองพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์จาก PEI ในเซลล์ HeLa, A549 และ MG-63 สามารถลดลงได้เมื่อมีการใช้ร่วมกับ MPyMeChC แต่ในกรณีของเซลล์ SH-SY5Y นั้น กลับพบว่าการใช้พอลิเมอร์ผสมระหว่าง MPyMeChC และ PEI กลับมีความเป็นพิษสูงขึ้น เป็นเหตุให้ polyplex ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนก็น้อยกว่าการใช้ PEI นำส่งเพียงอย่างเดียว ดังนั้นระบบการนำส่งยีนแบบ MPyMeChC ร่วมกับ PEI จึงไม่ใช่ระบบที่เหมาะสมในการนำส่งยีนในเซลล์ SH-SY5Y การใช้เพียง PEI อย่างเดียวอาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมแล้วสำหรับการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สมอง [59] นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวกับการนำส่งยีนโดยใช้ PEI ในการนำส่งยีนของเซลล์ประสาทอีกมากมาย [60-63]

จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์แต่ละชนิดมีการตอบสนองของการนำส่งยีนที่แตกต่างกัน นอกจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวพาแล้ว อาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดที่มีส่วนประกอบแตกต่างกันก็ทำให้พอลิเมอร์ตัวพามีโอกาสทำปฏิกิริยากับสารที่แตกต่างกันหรือไอออนที่ต่างกัน ส่งผลให้ขนาดและรูปร่างที่เกิดขึ้นในพอลิเมอร์เปลี่ยนไป ส่งผลต่อประสิทธิภาพการนำส่งยีน นอกจากนี้สภาพของเซลล์ที่แตกต่างกันเองทั้งในเรื่องของ cell membrane, endosome-lysosome, cytoplasm และ nuclear envelope [64] ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการนำส่งยีนแตกต่างกันด้วย จากการทดลองที่ผ่านมาหลาย ๆ การทดลองมักมุ่งเน้นไปที่การลดขนาดของพอลิเมอร์ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อที่จะทำให้การเข้าสู่เซลล์นั้นเกิดขึ้นได้ง่ายและไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าขนาดไม่ได้เป็นปัจจัยหลักปัจจัยเดียวที่ทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเพิ่มขึ้น การปลดปล่อยดีเอ็นเอก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมหมู่เอทิลลงไป PEI ทดแทนหมู่เอมีนกลับทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเพิ่มขึ้น [65, 66] แทนที่จะลดลงเพราะการลดของเอมีน



(ประจวบ) ที่จะไปจับกับฟอสเฟสบนดีเอ็นเอ การทดลองดังกล่าวอธิบายได้ว่าดีเอ็นเอมีการจับกันอย่างหลวม ๆ กับพอลิเมอร์ทำให้เกิดการปลดปล่อยได้ง่ายขึ้น มีผลให้เกิดการแสดงออกของยีนสูง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระบบพอลิเมอร์ผสม MPyMeChC/PEI/DNA นั้นสามารถใช้นำส่งยีน BMP-2 เซลล์ MG-63 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าในวันแรกที่มีการนำส่งยีนจะมีการแสดงออกของยีนต่ำกว่าการนำส่งยีนด้วย Lipofectamine™ 2000 ก็ตาม เนื่องจากการนำส่งด้วย Lipofectamine™ 2000 กระตุ้นให้ยีนมีการแสดงออกได้สูงถึง 16 เท่าในวันแรกนั้น แต่ต่อมาในวันที่ 3, 7, 10 และ 14 จะมีการแสดงออกของยีนที่ต่ำลงจนไม่มีความแตกต่างจากเซลล์ปกติ แต่ในกรณีของการนำส่งด้วยพอลิเมอร์ผสม MPYMeChC/PEI/DNA จะกระตุ้นให้การแสดงออกของ BMP-2 เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและยาวนานกว่าด้วยระดับการแสดงออกที่ 7, 6, 4, 3 และ 2 เท่าของเซลล์ปกติตามลำดับ การแสดงออกของยีน BMP-2 นั้นหากสามารถทำให้เกิดการแสดงออกที่ยาวนานจะมีข้อดีสำหรับการนำส่งยีนกระตุ้นการสร้างกระดูก เป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีน BMP-2 นั้นถูกย่อยสลายได้ง่าย ในการทดลองกับสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อส่ง BMP-2 ผ่านทางกระแสเลือดพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีค่า Half life เพียง 7-16 นาทีเท่านั้น แต่หากนำส่งเข้าไปในบริเวณเฉพาะที่ร่วมกับ collagen สามารถอยู่ได้นานประมาณ 8 วัน อย่างไรก็ตามหากมีการให้โปรตีน rhBMP-2 มากเกินไปก็อาจจะทำให้เกิดการสร้างกระดูกในบริเวณอื่น (ectopic bone formation) เกิดการสลายของกระดูกสันหลัง (vertebral osteolysis) หรือการอักเสบของกระดูก (radiculitis and cervical soft tissue swelling) [67] ในการทดลองในสัตว์หรือแม้แต่การทดลองในมนุษย์เองพบว่าการใช้ recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) สามารถช่วยเสริมสร้างกระดูกได้ โดยปัจจัยที่มีผลอย่างมากคือตัวนำพา ซึ่งมีผลโดยตรงกับอัตราการสร้างกระดูก [68] ดังนั้นการใช้ระบบพอลิเมอร์ผสมจึงอาจเป็นทางเลือกนำสำหรับการในการนำส่งยีน BMP-2 เข้าสู่เซลล์กระดูกเพื่อช่วยในการซ่อมแซมกระดูก (bone fracture) ได้ นอกจากนี้เนื่องจากโคโคซานเองเป็นพอลิเมอร์ที่หาง่ายและมีราคาถูกจึงเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งในการนำมาใช้นำส่ง แทนการใช้ Lipofectamine™ 2000 ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง รวมถึงการใช้ระบบ polyplex ยังสามารถสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีได้ง่ายกว่าการใช้ Lipoplex ซึ่งในอนาคตการใช้ระบบพอลิเมอร์ผสมในการนำส่งยีนนี้สามารถพัฒนาให้เกิดความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายมากขึ้นโดยใช้เปปไทด์ หรือ receptor ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ติดกับพอลิเมอร์นำส่ง เป็นต้น

### ผลงานตีพิมพ์ที่เกิดจากงานวิจัยนี้

Rakkhithawatthana V, Sanitrum P, Sajomsang W, Na Ubon P, Tencomnao T, Saengkrit N. Investigation of gene transferring efficacy through nano-polyplex consisting of methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride and poly(ethylenimine) in human cell lines. *Carbohydrate Polymers* 2010; 80(1):276-84.

Saengkrit N, Sajomsang W, Rakkhithawatthana V, Tencomnao T. Nano-polyplex as a non-viral gene carrier for the expression of bone morphogenetic protein in osteoblastic cells. *Carbohydrate Polymers*; In Press, Accepted Manuscript. Available online 7 May 2011.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- [1.] Tatum, E. L., Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. Perspectives in Biology and Medicine, 10. (1966): 19-32.
- [2.] Verma, I. M. and Somia, N., Gene therapy-promises, problems and prospects. Nature, 389. (1997): 239-242.
- [3.] Douglas J. T., Adenoviral vectors for gene therapy. Molecular Biotechnology, 36. (2007): 71-80.
- [4.] Sajomsang, W., Ruktanonchai, U., Gonil, P., Mayen, V., and Opanasopit, P., Methylated N-aryl chitosan derivative/DNA complex nanoparticles for gene delivery: Synthesis and structure-activity relationships. Carbohydrate Polymers, 78(4). (2009): 743-752.
- [5.] Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., and Fernandes, J. C., Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. Biomaterials, 24(7). (2003): 1255-1264.
- [6.] Mao, H.-Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., et al., Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. Journal of Controlled Release, 70(3). (2001): 399-421.
- [7.] Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., and Remy, J. S., Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. Pharmaceutical Research, 15(9). (1998): 1332-1339.
- [8.] Hosseinkhani, H., Azzam, T., Kobayashi, H., Hiraoka, Y., Shimokawa, H., Domb, A. J., et al., Combination of 3D tissue engineered scaffold and non-viral gene carrier enhance in vitro DNA expression of mesenchymal stem cells. Biomaterials, 27(23). (2006): 4269-4278.
- [9.] Carbonell, L. F., Klowden, M. J., and Miller, L. K., Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. Journal of Virology, 56(1). (1985): 153-160.

- [10.] Edelstein, M. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Journal of Gene Medicine [Online] 2011. Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>
- [11.] Xiang, G., Keun-Sik, K., and Dexi, L., Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. The AAPS Journal, 9(1). (2007).
- [12.] Luo, D. and Saltzman, W. M., Synthetic DNA delivery systems. Nature Biotechnology, 18(1). (2000): 33-37.
- [13.] Heiser, W. C., Liu, D., Chia, E. F., and Tian, H., Chemical Methods for DNA Delivery. Gene Delivery to Mammalian Cells, 245. (2004): 3-23.
- [14.] Glover, D. J., Lipps, H. J., and Jans, D. A., Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. Nature Reviews Genetics, 6(4). (2005): 299-310.
- [15.] Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., and Stayton, P. S., Design and development of polymers for gene delivery. Nature Reviews Drug Discovery, 4(7). (2005): 581-593.
- [16.] Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M., and de Lima, M. C. P., Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. Pharmaceuticals, 3(4). (2010): 961-993.
- [17.] Lee, D., Lockey, R., and Mohapatra, S., Folate receptor-mediated cancer cell specific gene delivery using folic acid-conjugated oligochitosans. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 6(9). (2006): 2860.
- [18.] Ozsolak, F. and Milos, P. M., RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. Nature Reviews Genetics, 12(2). (2010): 87-98.
- [19.] Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M., and Langer, R., Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. The Journal of Gene Medicine, 7(5). (2005): 657-663.
- [20.] Anderson, W. F., Human gene therapy. Nature, 392. (1998): 25-30.
- [21.] Li, S. and Huang, L., Nonviral gene therapy: promises and challenges. Gene therapy, 7(1). (2000): 31-34.

- [22.] Wong, S. Y., Pelet, J. M., and Putnam, D., Polymer systems for gene delivery-- Past, present, and future. Progress in Polymer Science, 32(8-9). (2007): 799-837.
- [23.] Mintzer, M. A. and Simanek, E. E., Nonviral vectors for gene delivery. Chemical Reviews, 109(2). (2009): 259-302.
- [24.] Hill, M. Cell Importation. [Online] 2008. Available from: <http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/lecture0806.htm>;
- [25.] Wagstaff, K. M. and Jans, D. A., Protein Transduction: Cell Penetrating Peptides and Their Therapeutic Applications. Current Medicinal Chemistry, 13. (2006): 1371-1387.
- [26.] Deshayes, S., Plenat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimellec, C., and Heitz, F., Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides: Structural Requirements and Interactions with Model Membranes. Biochemistry, 43(24). (2004): 7698-7706.
- [27.] Magzoub, M., Kilk, K., Eriksson, L. E., Langel, U., and Graslund, A., Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles. Biochimica et biophysica acta, 1512(1). (2001): 77-89.
- [28.] Zheng, F., Shi, X.-W., Yang, G.-F., Gong, L.-L., Yuan, H.-Y., Cui, Y.-J., et al., Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: Results of an in vitro and in vivo study. Life Sciences, 80(4). (2007): 388-396.
- [29.] Park, T. G., Jeong, J. H., and Kim, S. W., Current status of polymeric gene delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, 58(4). (2006): 467-486.
- [30.] Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K. M., et al., Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. Gene therapy, 8(14). (2001): 1108-1121.
- [31.] Yang, S. and May, S., Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. The Journal of Chemical Physics, 129(18). (2008): 185105.



- [32.] Dunlap, D. D., Maggi, A., Soria, M. R., and Monaco, L., Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. Nucleic Acids Research, 25(15). (1997): 3095-3101.
- [33.] Urist, M. R., Bone: formation by autoinduction. Science, 150. (1965): 893-899.
- [34.] Heldin C.H., Miyazono K., and Dijke, P., F-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature, 390. (1997): 465-471.
- [35.] Sakou T, Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone, 22. (1998): 591-603.
- [36.] Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R., and Hollinger, J. O., Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. Journal of Orthopaedic Research, 17. (1999): 269-278.
- [37.] Sampath, T. K. and Reddi, A. H., Dissociative extraction and reconstitution of bone matrix components involved in local bone differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 78. (1981): 7599-7603.
- [38.] Johnson, E., Urist, M., and Finerman, G. A., Resistant Nonunions and Partial or Complete Segmental Defects of Long Bones: Treatment With Implants of a Composite of Human Bone Morphogenetic Protein (BMP) and Autolyzed, Antigen-Extracted, Allogeneic (AAA) Bone. SECTION II. Clinical Orthopaedics & Related Research, 277. (1992): 229-237.
- [39.] Kirker-Head, C. A., Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. Advanced Drug Delivery Reviews, 43(1). (2000): 65-92.
- [40.] Rengachary, S. S., Bone morphogenetic proteins: basic concepts. Neurosurgical Focus, 13(6). (2002): e2.
- [41.] Xiao, Y.-T., Xiang, L.-X., and Shao, J.-Z., Bone morphogenetic protein. Biochemical and Biophysical Research Communications, 362(3). (2007): 550-553.
- [42.] Scheufler, C., Sebald, W., and Hulsmeyer, M., Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 287(1). (1999): 103-115.

- [43.] Nakashima, M. and Reddi, A. H., The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. Nature Biotechnology, 21(9). (2003): 1025-1032.
- [44.] Heliotis, M. and Tsiridis, E., Suppression of bone morphogenetic protein inhibitors promotes osteogenic differentiation: therapeutic implications. Arthritis Research & Therapy, 10(4). (2008): 115.
- [45.] Cao, X. and Chen, D., The BMP signaling and in vivo bone formation. Gene, 357(1). (2005): 1-8.
- [46.] Hacker M. and Mikos A.G. Tissue engineering gene transfer. [Online] 2007. Available from : [http://www.owl.net.rice.edu/~hacker/files/BIOE620\\_Gene\\_Transfer.pdf](http://www.owl.net.rice.edu/~hacker/files/BIOE620_Gene_Transfer.pdf);
- [47.] Khosla, S., Westendorf, J. J., and Oursler, M. J., Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. The Journal of Clinical Investigation, 118(2). (2008): 421.
- [48.] Children's Hospital Boston. Osteoblasts and Osteoclasts. [Online] 2007. Available from : [http://www.childrenshospital.org/cfapps/research/data\\_admin/Site31/mainpageS31P1sublevel2.html](http://www.childrenshospital.org/cfapps/research/data_admin/Site31/mainpageS31P1sublevel2.html)
- [49.] Tencomnao, T., Rakkhitawatthana, V., and Sukhontasing, K., Evaluation of a novel luciferase reporter construct: A positive control plasmid for reporter gene assay. African Journal of Biotechnology, 7(13). (2008): 2124-2127.
- [50.] Anderson, J. M., Vines, J. B., Patterson, J. L., Chen, H., Javed, A., and Jun, H.-W., Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells synergistically enhanced by biomimetic peptide amphiphiles combined with conditioned medium. Acta Biomaterialia, In Press, Uncorrected Proof. (2010).
- [51.] Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Bruder, S. P., Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. Journal of Cellular Biochemistry, 64(2). (1997): 295-312.
- [52.] Kim, T. H., Kim, S. I., Akaike, T., and Cho, C. S., Synergistic effect of poly(ethylenimine) on the transfection efficiency of galactosylated chitosan/DNA complexes. Journal of Controlled Release, 105(3). (2005): 354-366.

- [53.] Shea, L. D., Smiley, E., Bonadio, J., and Mooney, D. J., DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. Nature Biotechnology, 17(6). (1999): 551-554.
- [54.] Jiang, H. L., Kim, T. H., Kim, Y. K., Park, I. Y., Cho, M. H., and Cho, C. S., Efficient gene delivery using chitosan–polyethylenimine hybrid systems. Biomedical Materials, 3. (2008): 025013.
- [55.] Zhao, Q. Q., Chen, J. L., Lv, T. F., He, C. X., Tang, G. P., Liang, W. Q., et al., N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. Biological & pharmaceutical bulletin, 32(4). (2009): 706-710.
- [56.] Zhao, Q. Q., Chen, J. L., Han, M., Liang, W. Q., Tabata, Y., and Gao, J. Q., Combination of poly(ethylenimine) and chitosan induces high gene transfection efficiency and low cytotoxicity. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105(1). (2008): 65-68.
- [57.] Yamazaki, Y., Nango, M., Matsuura, M., Hasegawa, Y., Hasegawa, M., and Oku, N., Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine. Gene therapy, 7(13). (2000): 1148-1155.
- [58.] Sato, A., Kawakami, S., Yamada, M., Yamashita, F., and Hashida, M., Enhanced gene transfection in macrophages using mannosylated cationic liposome-polyethylenimine-plasmid DNA complexes. Journal of Drug Targeting, 9(3). (2001): 201-207.
- [59.] Wu, K., Meyers, C. A., Bennett, J. A., King, M. A., Meyer, E. M., and Hughes, J. A., Polyethylenimine-mediated NGF gene delivery protects transected septal cholinergic neurons. Brain Research, 1008(2). (2004): 284-287.
- [60.] Bergen, J. M., Park, I. K., Horner, P. J., and Pun, S. H., Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. Pharmaceutical Research, 25(5). (2008): 983-998.
- [61.] Suk, J. S., Suh, J., Choy, K., Lai, S. K., Fu, J., and Hanes, J., Gene delivery to differentiated neurotypic cells with RGD and HIV Tat peptide functionalized polymeric nanoparticles. Biomaterials, 27(29). (2006): 5143-5150.

- [62.] Bassima, A., Ahmed, H., Corinne, B., Daniel, G., Jean, P. B., and Barbara, A. D., A Powerful Nonviral Vector for *In Vivo* Gene Transfer into the Adult Mammalian Brain: Polyethylenimine. Human Gene Therapy, 7(16). (1996): 1947-1954.
- [63.] Wang, S., Ma, N., Gao, S. J., Yu, H., and Leong, K. W., Transgene expression in the brain stem effected by intramuscular injection of polyethylenimine/DNA complexes. Molecular Therapy, 3(5 Pt 1). (2001): 658-664.
- [64.] Guillem, V. M. and Aliño, S. F., Transfection pathways of nonspecific and targeted PEI-polyplexes. Gene Therapy and Molecular Biology, 8. (2004): 369-384.
- [65.] Gabrielson, N. P. and Pack, D. W., Acetylation of Polyethylenimine Enhances Gene Delivery via Weakened Polymer/DNA Interactions. Biomacromolecules, 7(8). (2006): 2427-2435.
- [66.] Forrest, M. L., Meister, G., Koerber, J., and Pack, D., Partial Acetylation of Polyethylenimine Enhances In Vitro Gene Delivery. Pharmaceutical Research, 21(2). (2004): 365-371.
- [67.] Wegman, F., Bijenhof, A., Schuijff, L., Oner, F. C., Dhert, W. J., and Alblas, J., Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. European Cells & Materials Journal, 21. (2011): 230-242.
- [68.] Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C., and Taga, R., Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38(10). (2005): 1463-1473.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

LB broth	ประกอบด้วย	Bacto-tryptone	5 g
		Bacto-yeast extract	2.5 g
		NaCl	5 g
		เติมน้ำกลั่น (DW) จนครบ 500 ml	
LB agar	ประกอบด้วย	LB broth	500 ml
		Bacto agar	7.5 g
LB agar/Amp+	ผสม Ampicilin 100 µg ต่อ LB agar 1 ml		
Bradford Stock Solution	ประกอบด้วย	95% Ethanol	100 ml
		88% phosphoric acid	200 ml
		Commasie brilliant blue G250	350 mg
Bradford Working Buffer	ประกอบด้วย	Distilled water	425 ml
		95% Ethanol	15 ml
		88% phosphoric acid	30 ml
		Bradford Stock Solution	30 ml

Filter through Whatman No.1 paper, store at room temperature in brown glass bottle. Usable for several weeks, but may need to be refiltered.

Tris-borate (TBE) Buffer ประกอบด้วย 0.045 M Tris-borate  
0.001 M EDTA, pH 8.0

DEPC-treated Water ประกอบด้วย 0.01 % (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC)  
ผสมกับน้ำในภาชนะที่ปราศจาก RNase ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนและนำไปอบฆ่าเชื้อ  
(autoclave)

## ภาคผนวก ข

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ Luciferase activity และ MTT assay ด้วยสถิติ

One-way Anova ตามด้วย Turkey's HSD ของเซลล์ MG-63

## Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Luciferase	MPyMeChC/DNA 1/1	3	6013.2879	5825.76237	3363.505	-8458.7081	20485.2839	2489.09	12737.70
	MPyMeChC/DNA 5/1	3	154.5583	91.56825	52.86696	-72.9098	382.0265	84.94	258.28
	MPyMeChC/DNA 10/1	3	1652.8425	711.98439	411.06438	-115.8248	3421.5098	842.06	2176.09
	MPyMeChC/DNA 20/1	3	839.5224	329.64244	190.31915	20.6452	1658.3996	522.40	1180.40
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/0.5/1	3	1E+007	1765334.252	1019216	7846178.115	16616844.89	10274886	13704917
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/1/1	3	4540100	674830.26538	389613.4	2863728.846	6216471.468	3975962	5287687
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/5/1	3	12766.85	1379.47085	796.43787	9340.0581	16193.6493	11503.66	14238.81
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/10/1	3	6884.3457	1150.81483	664.42325	4025.5631	9743.1282	6120.56	8207.96
	Lipofectamine	3	8754602	2874297.804	1659477	1614450.203	15894753.34	6583227	12014096
	Naked DNA	3	154.0926	92.94296	53.66064	-76.7905	384.9757	48.18	222.07
cell	3	195.6514	102.86555	59.38945	-59.8808	451.1836	96.54	301.90	
Total	33	2323170	4279890.927	745033.4	805587.0824	3840753.751	48.18	13704917	
MTT	MPyMeChC/DNA 1/1	3	101.7745	2.87009	1.65705	94.6448	108.9042	99.27	104.91
	MPyMeChC/DNA 5/1	3	94.7808	.95670	.55235	92.4042	97.1574	93.95	95.82
	MPyMeChC/DNA 10/1	3	85.9081	3.73602	2.15699	76.6274	95.1889	81.73	88.94
	MPyMeChC/DNA 20/1	3	75.6785	2.43240	1.40434	69.6361	81.7209	72.96	77.66
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/0.5/1	3	100.4175	8.48599	4.89939	79.3372	121.4979	92.38	109.29
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/1/1	3	57.9332	3.69201	2.13158	48.7617	67.1047	54.80	62.00
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/5/1	3	22.7557	.90399	.52192	20.5101	25.0014	22.23	23.80
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/10/1	3	22.2338	.82852	.47835	20.1757	24.2920	21.29	22.86
	Lipofectamine	3	98.6430	5.21189	3.00909	85.6959	111.5901	92.69	102.40
	Naked DNA	3	100.0000	6.10714	3.52596	84.8290	115.1710	93.95	106.16
cell	3	105.7411	4.53080	2.61586	94.4860	116.9963	100.52	108.66	
Total	33	78.7151	30.29535	5.27374	67.9729	89.4574	21.29	109.29	

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Luciferase	Between Groups	6E+014	10	5.625E+013	52.288	.000
	Within Groups	2E+013	22	1.076E+012		
	Total	6E+014	32			
MTT	Between Groups	28967.542	10	2896.754	158.401	.000
	Within Groups	402.326	22	18.288		
	Total	29369.868	32			

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luciferase

Tukey HSD

Naked DNA	MPyMeChC/DNA 1/1	-5859.1953	846863.3	1.000	-3033236.76	3021518.366
	MPyMeChC/DNA 5/1	-.46573	846863.3	1.000	-3027378.03	3027377.096
	MPyMeChC/DNA 10/1	-1498.7499	846863.3	1.000	-3028876.31	3025878.811
	MPyMeChC/DNA 20/1	-685.42980	846863.3	1.000	-3028062.99	3026692.131
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/0.5/1	-12231357*	846863.3	.000	-15258735.0	-9203979.85
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/1/1	-4539946.1*	846863.3	.001	-7567323.63	-1512568.50
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/5/1	-12612.761	846863.3	1.000	-3039990.32	3014764.800
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/10/1	-6730.2531	846863.3	1.000	-3034107.81	3020647.308
	Lipofectamine cell	-8754447.7*	846863.3	.000	-11781825.2	-5727070.12
		-41.55877	846863.3	1.000	-3027419.12	3027336.003

\* The mean difference is significant at the .05 level.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: MTT

Tukey HSD

Naked DNA	MPyMeChC/DNA 1/1	-1.77453	3.49166	1.000	-14.2566	10.7075
	MPyMeChC/DNA 5/1	5.21921	3.49166	.907	-7.2628	17.7012
	MPyMeChC/DNA 10/1	14.09186*	3.49166	.018	1.6098	26.5739
	MPyMeChC/DNA 20/1	24.32150*	3.49166	.000	11.8395	36.8035
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/0.5/1	-4.1754	3.49166	1.000	-12.8996	12.0645
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/1/1	42.06681*	3.49166	.000	29.5848	54.5488
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/5/1	77.24426*	3.49166	.000	64.7622	89.7263
	MPyMeChC/PEI/DNA 1/10/1	77.76618*	3.49166	.000	65.2842	90.2482
	Lipofectamine cell	1.35699	3.49166	1.000	-11.1250	13.8390
		-5.74113	3.49166	.847	-18.2232	6.7409

\* The mean difference is significant at the .05 level.

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงผลของยีน BMP-2 ตั้งแต่วันที่ 1-14 ด้วยสถิติ One-way Anova ตามด้วย Turkey's HSD

## Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
day1 cell	3	1.0000	1.19050	.68734	-1.9574	3.9574	.22	2.37
lipofectamine	2	15.9239	2.63658	1.86434	-7.7648	39.6126	14.06	17.79
PEI/MPyMeCh	2	7.0508	1.88026	1.32955	-9.8427	23.9443	5.72	8.38
C/DNA 0.5/1/1	2	7.0508	1.88026	1.32955	-9.8427	23.9443	5.72	8.38
Total	7	6.9928	6.83860	2.58475	.6681	13.3174	.22	17.79
day3 cell	2	1.0000	.12495	.08835	-.1226	2.1226	.91	1.09
lipofectamine	3	1.3947	.42377	.24466	.3420	2.4474	.91	1.66
PEI/MPyMeCh	2	5.5301	.06111	.04321	4.9811	6.0792	5.49	5.57
C/DNA 0.5/1/1	2	5.5301	.06111	.04321	4.9811	6.0792	5.49	5.57
Total	7	2.4635	2.11730	.80026	.5053	4.4217	.91	5.57
day7 cell	3	1.0000	.22531	.13008	.4403	1.5597	.84	1.26
lipofectamine	3	1.1237	.33575	.19384	.2897	1.9578	.83	1.49
PEI/MPyMeCh	3	3.6066	1.22863	.70935	.5546	6.6587	2.63	4.99
C/DNA 0.5/1/1	3	3.6066	1.22863	.70935	.5546	6.6587	2.63	4.99
Total	9	1.9101	1.42832	.47611	.8122	3.0080	.83	4.99
day10 cell	2	1.0000	.52534	.37147	-3.7200	5.7200	.63	1.37
lipofectamine	3	1.0293	.33576	.19385	.1953	1.8634	.65	1.28
PEI/MPyMeCh	3	2.7630	.16752	.09672	2.3469	3.1792	2.58	2.92
C/DNA 0.5/1/1	3	2.7630	.16752	.09672	2.3469	3.1792	2.58	2.92
Total	8	1.6721	.94647	.33463	.8809	2.4634	.63	2.92
day14 cell	3	1.0000	1.22729	.70858	-2.0488	4.0488	.13	2.40
lipofectamine	3	.4447	.11399	.06581	.1616	.7279	.36	.58
PEI/MPyMeCh	3	2.1239	.52520	.30322	.8193	3.4286	1.56	2.60
C/DNA 0.5/1/1	3	2.1239	.52520	.30322	.8193	3.4286	1.56	2.60
Total	9	1.1896	.99883	.33294	.4218	1.9573	.13	2.60

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
day1	Between Groups	267.277	2	133.638	40.127	.002
	Within Groups	13.322	4	3.330		
	Total	280.598	6			
day3	Between Groups	26.519	2	13.260	140.126	.000
	Within Groups	.379	4	.095		
	Total	26.898	6			
day7	Between Groups	12.975	2	6.487	11.633	.009
	Within Groups	3.346	6	.558		
	Total	16.321	8			
day10	Between Groups	5.713	2	2.857	25.616	.002
	Within Groups	.558	5	.112		
	Total	6.271	7			
day14	Between Groups	4.391	2	2.196	3.669	.091
	Within Groups	3.590	6	.598		
	Total	7.981	8			

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) type	(J) type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
day1	cell	lipofectamine	-14.92390*	1.66593	.002	-20.8612	-8.9866
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	-6.05082*	1.66593	.047	-11.9882	-.1135
		lipofectamine	14.92390*	1.66593	.002	8.9866	20.8612
	lipofectamine	cell	8.87308*	1.82493	.018	2.3690	15.3771
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	6.05082*	1.66593	.047	.1135	11.9882
		lipofectamine	-8.87308*	1.82493	.018	-15.3771	-2.3690
day3	cell	lipofectamine	-.39470	.28081	.420	-1.3955	.6061
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	-4.53014*	.30761	.000	-5.6265	-3.4338
		lipofectamine	.39470	.28081	.420	-.6061	1.3955
	lipofectamine	cell	-4.13544*	.28081	.000	-5.1363	-3.1346
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	4.53014*	.30761	.000	3.4338	5.6265
		lipofectamine	4.13544*	.28081	.000	3.1346	5.1363
day7	cell	lipofectamine	-.12375	.60974	.978	-1.9946	1.7471
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	-2.60665*	.60974	.012	-4.4775	-.7358
		lipofectamine	.12375	.60974	.978	-1.7471	1.9946
	lipofectamine	cell	-2.48290*	.60974	.015	-4.3537	-.6121
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	2.60665*	.60974	.012	.7358	4.4775
		lipofectamine	2.48290*	.60974	.015	.6121	4.3537
day10	cell	lipofectamine	-.02934	.30484	.995	-1.0213	.9626
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	-1.76301*	.30484	.005	-2.7549	-.7711
		lipofectamine	.02934	.30484	.995	-.9626	1.0213
	lipofectamine	cell	-1.73367*	.27266	.003	-2.6209	-.8465
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	1.76301*	.30484	.005	.7711	2.7549
		lipofectamine	1.73367*	.27266	.003	.8465	2.6209
day14	cell	lipofectamine	.55525	.63159	.672	-1.3826	2.4931
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	-1.12393	.63159	.254	-3.0618	.8140
		lipofectamine	-.55525	.63159	.672	-2.4931	1.3826
	lipofectamine	cell	-1.67918	.63159	.083	-3.6171	.2587
		PEI/MPyMeCh C/DNA 0.5/1/1	1.12393	.63159	.254	-.8140	3.0618
		lipofectamine	1.67918	.63159	.083	-.2587	3.6171

\* The mean difference is significant at the .05 level.



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วราพร รักชิตะวัฒนา เกิดเมื่อวันที่ 1 มกราคม พ.ศ.2529 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2550 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิก และอณูทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 โดยได้รับทุนค่าลงทะเบียน และทุนอุดหนุนการศึกษาจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สัญญาเลขที่ TG-55-09-51-046M



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย