

การศึกษาอิทธิพลของอนุภาคโลหะทองคำระดับนาโนเมตรต่อโปรตีน Foxhead Box O
และเส้นทางการควบคุม

นายธีระเดช ชมหวาน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของลิขสิทธิ์ของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านกองนิตยสารวิทยานิพนธ์
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

STUDY OF METAL NANOPARTICLES INFLUENCE ON FOXO PROTEIN
AND ITS RELATED PATHWAYS

MR. TEERADET KHOMVARN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2012
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษากิจกรรมของอนุภาคโลหะทองคำระดับนาโนเมตรต่อ
โปรตีน Foxhead Box O และเส้นทางในการควบคุม

โดย

นายธีระเดช ชมหวาน

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกศชกรหญิง วรวงคณา วารีสน้อยเจริญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกศชกร วิไลฐู ตั้งเคียงศิริสิน)

ธีระเดช ชมหวาน : การศึกษาอิทธิพลของอนุภาคโลหะทองคำระดับนาโนเมตรต่อโปรตีน Foxhead Box O และเส้นทางการควบคุม. (STUDY OF METAL NANOPARTICLES INFLUENCE ON FOXO PROTEIN AND ITS RELATED PATHWAYS) อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร. นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, 87 หน้า.

ปัจจุบันมีการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางการแพทย์ทั้งในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามความเป็นพิษและกลไกสัญญาณภายในเซลล์หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรยังไม่มีรายงานอย่างแน่ชัด

งานวิจัยนี้จึงศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ และกลไกสัญญาณ AKT/FOXO3a ภายในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (<20 nm) ผลการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 โดยขึ้นกับขนาด ปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยอนุภาคทองคำที่ความเข้มข้น 20, 40 µg/ml มีฤทธิ์ทำให้การคงรูปร่างของเซลล์ถูกทำลายไปจึงส่งผลให้เซลล์เกิดการหดตัวที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และมีค่าความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ลดลง รวมทั้งอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นภายในเซลล์ และลดการทำงานของโปรตีน AKT แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่โปรตีน FOXO3a

สรุปผลการวิจัยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร(<20 nm) มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น และมีผลลดการทำงานของโปรตีน AKT ซึ่งการทำงานของโปรตีน AKT เกี่ยวข้องกับการควบคุมอนุมูลอิสระและความอยู่รอดของเซลล์ และอาจเป็นกลไกในการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์เพื่อให้เกิดความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5374685830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : GOLD NANOPARTICAL/ FOXO PROTEIN / AKT PROTEIN

TEERADET KHOMVARN : STUDY OF METAL NANOPARTICLES INFLUENCE ON FOXO PROTEIN AND ITS RELATED PATHWAYS . ADVISOR : AMORNPUN SEREEMASPUN , M.D, Ph.D., 87 pp.

Nowadays, gold nanoparticles (AuNPs) are widely used in medical research, both in cellular and animal model. However, cytotoxicity and cell signaling pathway after AuNPs treatment are still not well-understood.

Thus, this research studied in cell viability and AKT/FOXO3a cell signaling pathway in HepG2 cell line treated by AuNPs (<20 nm). The result showed that AuNPs had cytotoxicity effect on HepG2 in accordance with size, concentration and exposure time of AuNPs treatment. AuNPs at the concentrations of 20 and 40 µg/ml affected disruption of cell shape maintenance, causing cell shrinkage and decreased cell viability after 24 and 48 hours of AuNPs treatment. In addition, AuNPs treatment resulted in increased reactive oxygen species (ROS) generation and reduced AKT protein function, but there was no any change in FOXO3a protein.

In conclusion, AuNPs (<20 nm) affected decrease of AKT function, which was involved in ROS generation and cell viability, suggesting as a mechanism used by cell in response to intracellular xenogen for cancer cell viability.

Field of Study :Medical Science..... Student's Signature

Academic Year :2012..... Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อ.ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นเพื่อปรับปรุงแก้ไขการทำวิจัยให้มีความสมบูรณ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ยิ่ง รวมทั้งคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา

งานวิจัยเรื่อง "การศึกษาอิทธิพลของอนุภาคโลหะทองคำระดับนาโนเมตรต่อโปรตีน Foxhead Box O และเส้นทางในการควบคุม" สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับการสนับสนุนจากโครงการทุนรัชดาภิเษกสมโภช 2555 ที่สนับสนุนทุนวิจัยตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ. ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. จินตนา จิรถาวร ผศ.ดร.ภญ.วรางคณา วารีน้อยเจริญ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.ภก. วิสิฐ ตั้งเคียงศิริสินกรรมการจากภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณารับเชิญเป็นกรรมการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะและความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์

ขอขอบคุณบุคลากรในคณะแพทยศาสตร์ทุกท่านที่ได้กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่าง ๆ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในแลปนาโน ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา รวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่านที่อยู่เบื้องหลังที่ได้ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และการสนับสนุนด้านต่างๆ เสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.1.1 โปรตีน AKT การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์.....	1
1.1.2 นาโนเทคโนโลยี และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	3
1.1.3 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว และการนำไปใช้ในงานวิจัยต่างๆ.....	4
1.2 คำถามของการวิจัย.....	6
1.3 วัตถุประสงค์.....	6
1.4 สมมติฐาน.....	6
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการทำวิจัย.....	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 โปรตีน AKT การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์.....	8
2.2 โปรตีน FOXO การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์.....	10
2.3 หน้าที่กระบวนเมทอบอลิซึมต่างๆ ที่ FOXO ควบคุมภายในเซลล์.....	11
2.4 โปรตีน VEGF การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์.....	12
2.5 นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology).....	13
2.6 งานวิจัยทางวิชาการที่นำ AuNPs ไปใช้ในการทดลองภายในเซลล์.....	15
2.7 งานวิจัยทางวิชาการที่นำ AuNPs ไปใช้ในการทดลองภายในเซลล์ โดยศึกษาผ่านกลไกต่างๆที่เกี่ยวกับงานวิจัยนี้.....	16

บทที่		หน้า
2	2.8 งานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับโปรตีน FOXO ที่มีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ..	17
	2.9 งานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับการเข้าสู่เซลล์แบบ endocytosis ที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน AKT.....	
3	อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทำวิจัย.....	18
	3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	18
	3.2 สารเคมี.....	19
	3.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาด 5 นาโนเมตร.....	21
	3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	22
	3.5 การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์.....	23
	3.6 การศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์.....	24
	3.7 การศึกษาเพื่อหาปริมาณการเกิดของสารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	25
	3.8 การศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot.....	26
	3.9 ลำดับขั้นตอนการวิจัย.....	27
	3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	28
4	ผลการทดลอง.....	29
	4.1 การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	29
	4.1.1 UV-vis spectroscopy ที่ 520 นาโนเมตร : ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงผลที่ได้จากการสังเคราะห์และตรวจสอบลักษณะ.....	29
	4.1.2 Zetasizer : หาค่า Zeta potential เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ.....	30
	4.2 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	31
	4.2.1 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	31
	4.2.2 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	38

บทที่		หน้า
4	4.3 การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	45
	4.3.1 การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	45
	4.3.2 การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	46
	4.4 การศึกษาเพื่อหาปริมาณการเกิดของสารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	48
	4.5 การศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน AKT/FOXO3a ด้วยเทคนิค Western blot.....	49
	4.5.1 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ AuNPs ในเซลล์ HepG2 เพื่อดูผลการทำงานของโปรตีน AKT.....	49
	4.5.2 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ AuNPs ในเซลล์ HepG2 เพื่อดูผลของโปรตีน AKT.....	50
	4.5.3 กราฟความสัมพันธ์ของโปรตีน p-AKT ต่อโปรตีน AKT ต่อ AuNPs ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	51
	4.5.4 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ AuNPs ขนาด 5 nm ในเซลล์ HepG2 เพื่อดูผลของโปรตีน p-FOXO3a.....	52
	4.5.5 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ AuNPs ขนาด 5 nm ในเซลล์ HepG2 เพื่อดูผลของโปรตีน FOXO3a.....	53
	4.5.6 กราฟความสัมพันธ์ของโปรตีน p-FOXO3a ต่อโปรตีน FOXO3a ต่อ AuNPs ที่ความเข้มข้นแตกต่าง.....	54
5	อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย.....	55
	5.1 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อโครงสร้างของเซลล์เมื่อเข้าสู่เซลล์ HepG2.....	56
	5.2 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อความอยู่รอดของเซลล์ HepG2...	57
	5.3 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2.....	60
	5.4 บทบาทการทำงานของโปรตีน AKT ที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์..	62

บทที่		หน้า
5	5.5 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT ภายในเซลล์ HepG2.....	63
	5.6 บทบาทการทำงานของโปรตีน FOXO3a เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนา โนเมตรภายในเซลล์ HepG2.....	64
	5.7 สรุปผลงานวิจัย.....	66
	5.8 ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	66
	5.9 แนวทางการศึกษาต่อในอนาคต.....	67
	รายการอ้างอิง.....	68
	ภาคผนวก.....	74
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	สมาชิกของ FOXO ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่พบในเซลล์ต่างๆ.....	2
1.2	แสดงบทความวิจัยทางวิชาการที่มีการกล่าวถึงอนุภาคของคาร์บอนนาโนเมตรที่สามารถนำไป.....	4
2.1	แสดงการควบคุมการทำงานของ FOXO ต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์..	11
2.2	แสดงถึงวัสดุนาโน (nanomaterial) ที่นำมาประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาและด้านการแพทย์ ที่บริษัทต่างๆผลิตขึ้นและจำหน่าย.....	14
3.1	แสดงแอนติบอดีแต่ละตัวที่บอกลักษณะ และการเจือจางกับ 1 % BSA ในบัฟเฟอร์ TBST	26
4.1	แสดงเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับอนุภาคของคาร์บอนนาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	47

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl ₄ และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม.....	3
2.1	กลไกที่เซลล์ตอบสนองต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากอนุภาคลิธิสระภายในเซลล์.....	9
2.2	แสดงโปรตีน VEGF ชนิดต่างๆที่ทำงานในการกระตุ้นที่ตัวรับที่แตกต่างกัน.....	12
2.3	แผนภาพแสดงการนำ NPs ชนิดต่างๆในการนำเข้าสู่เซลล์.....	15
3.1	แสดงเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer.....	21
3.2	แสดงอุปกรณ์และเครื่องที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	22
3.3	แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์.....	23
3.4	แสดงเครื่อง Microplate reader ที่ใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์.....	24
4.1	การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่ความยาวคลื่น 520 nm.....	29
4.2	การวัดค่า Zeta potential เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคของค้ำ.....	30
4.3	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	31
4.4	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร DMSO ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	32
4.5	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร citrate ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	33
4.6	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคของค้ำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 5 µg/ml (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	34
4.7	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคของค้ำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 10 µg/ml (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	35
4.8	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคของค้ำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 20 µg/ml (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	36
4.9	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคของค้ำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 40 µg/ml (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	37
4.10	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	38
4.11	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร DMSO ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	39
4.12	แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร citrate ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	40

รูปที่	หน้า
4.13	41
4.14	42
4.15	43
4.16	44
4.17	45
4.18	46
4.19	48
4.20	49
4.21	50
4.22	51
4.23	52
4.24	53
4.25	54
5.1	61
5.2	65

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rational)

1.1.1 โปรตีน AKT การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์

ความชราและโรคมะเร็งมีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้งกัน วิธีการที่ทำให้ชีวิตอยู่ได้ยืนยาวนั้นมีหลายวิธี เช่น การควบคุมอาหาร การลดความเสี่ยงในการทำให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็ง การลดอนุมูลอิสระ เป็นต้น^[1,2] ความเชื่อมโยงกันระหว่างความชรากับโรคมะเร็งอาจมีความเป็นไปได้สูงที่เกี่ยวข้องกัน โดยที่ยืนไปมีผลในการทำให้ชีวิตอยู่ได้ยืนยาวขึ้นนั้น อาจมีความสัมพันธ์ต่อการยับยั้งการเกิดเนื้องอกขึ้น ยกตัวอย่างเช่น AKT และ FOXO เป็นต้น

จากการกล่าวของ Zhang X และคณะ (2011)^[3] โปรตีน AKT มีความสำคัญในการรักษาความอยู่รอดของเซลล์ โดยควบคุมผ่านทางกลไกต่อต้านการตายแบบ apoptosis การทำงานที่เกิดขึ้นของโปรตีน AKT ผ่านทางการควบคุมด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ถ้าหากโปรตีน AKT ในรูปแบบการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการอยู่รอดของเซลล์

จากการศึกษาของ Nogueira และคณะ ในปี 2008^[4] กล่าวว่ากลไกสัญญาณ AKT มีผลต่อการควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระและความอยู่รอดภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งการควบคุมดังกล่าวมีผลต่อโปรตีน FOXO และการทำงานของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ การทำงานที่มากขึ้นของโปรตีน AKT มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่สูงขึ้นจึงส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้น อีกทั้งยังไปลดการทำงานของโปรตีน FOXO ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ ผลดังกล่าวทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายขึ้น แต่ในทางกลับกันถ้าหากโปรตีน AKT ลดการทำงานลง จะไม่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระลดลง และยังส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน FOXO ทำให้โปรตีน FOXO เข้าไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆที่ต่อต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นกลไกที่เซลล์ตอบสนองต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์

โปรตีนกลุ่ม Fork head พบได้ในทุกเซลล์ของยูคาริโอต เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและควบคุมกระบวนการหลายๆ กลไกที่สำคัญภายในเซลล์ โดยมีตำแหน่งที่จับกับดีเอ็นเอที่จำเพาะ (conserved DNA-binding domains) เรียกตำแหน่งนั้นว่า "Forkhead box (FOX)"^[5] มีโปรตีนในกลุ่มนี้ทั้งหมด 39 โปรตีน ซึ่งสามารถแบ่งได้ 19 กลุ่ม เช่น FOXA, FOXS, FOXO เป็นต้น^[6] ในกลุ่มของ FOXO เป็นกลุ่มที่ผู้วิจัยสนใจ ซึ่งแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ดังนี้ FOXO1, FOXO3,

FOXO4 และ FOXO6 โปรตีน FOXO แต่ละกลุ่มมีความสำคัญในมนุษย์ ตัวอย่างเช่น FOXO มีผลทำให้เกิดการพัฒนาของเนื้องอกขึ้น แล้วยังมีผลควบคุมการทำงานของระบบเมตาบอลิซึมต่างๆ ที่สำคัญภายในเซลล์ รวมถึงการดูแลซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย เป็นต้น^[7,8,9] โดยเฉพาะโปรตีนชนิด FOXO1, FOXO3, FOXO4 จะพบการแสดงออกของระดับ mRNA ที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม^[10,11,12] สังเกตได้จากตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 สมาชิกของ FOXO ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่พบในเซลล์ต่างๆ^[13]

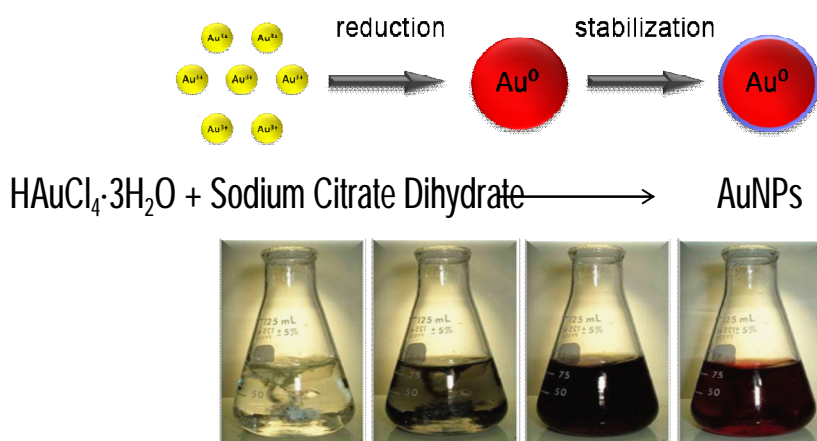
Gene name	Alternate names	Mouse name	Human chromosomal location	Chromosomal translocation	Cancer type associated with translocation	Expression pattern	Knockout phenotype
FOXO1a	FKHR	fkhr1, Foxo1a	13q14.1	t(2;13)(q35;q14) PAX3:FOXO1 and t(1;13)(p36;q14) PAX7:FOXO1	Alveolar rhabdomyosarcomas	Ubiquitous. Highest in He, Sp, Ad, Ki, Br	E10.5 lethality angiogenesis defects
FOXO1b	FKHR pseudogene 1 (FKHRP1)		5q35.2-35.3				
FOXO3a	FKHRL1, AF6q21, FOXO2	fkhr2, Foxo3a	6q21	t(6;11)(q21;q23) MLL:FOXO3	Secondary acute myeloblastic leukemia	Ubiquitous. Highest in He, Br, Sp, Lu, Ki, Ad, Ov	Female sterility, anemia, glucose uptake defects, overproliferation of helper T cells, increased neutrophil apoptosis
FOXO3b	FKHRL1 pseudogene 1 (FKHRL1P1)		17p11				
FOXO4	AFX, AFX1, MLLT7	afx, Afxh, Foxo4, Mllt7	Xq13.1	t(X;11)(q13;q23) MLL:FOXO4	Acute leukemias	Ubiquitous. Highest in He, Br, Sp, Lu	Viable, no defects reported yet
FOXO5	zFKHR		Fish ortholog of FOXO3a				
FOXO6	FOXO6	Foxo6	1p34.1	None identified		Br, Th, Ki	Not done

He, heart; Sp, spleen; Ad, adipose tissue; Ki, kidney; Br, brain; Lu, lung; Ov, ovaries; Th, thymus

1.1.2 นาโนเทคโนโลยี และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้างการวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมากๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ที่มีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพ ต่างไปจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพและทางการแพทย์^[14] เป็นต้น

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโนที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์สีแดง ในการสังเคราะห์ AuNPs นั้นสามารถทำได้โดยการนำสารละลายของ HAuCl_4 ที่มีทองคำประจุ 3^+ (Au^{3+}) ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ได้ AuNPs ที่มีทองคำประจุเป็น 0 (Au^0) สารที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์ และช่วยทำให้อนุภาคทองคำเกิดความเสถียรและคงรูปร่าง ได้แก่ sodium citrate^[15] ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl_4 และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม^[16]

1.1.3 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว และการนำไปใช้ในงานวิจัยต่างๆ

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เฉพาะตัว เช่น **Surface topography, Surface chemistry, Surface energy** มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่ายและหลากหลาย อีกทั้งสามารถเตรียมในห้องปฏิบัติการได้^[15] ในบทความวิจัยทางวิชาการมีการกล่าวถึงอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเซลล์ได้หลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในขนาดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีงานวิจัยส่วนน้อยที่จะกล่าวถึงการเกิดความเป็นพิษในเซลล์ แต่ก็มีบางงานวิจัยที่กล่าวว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเป็นพิษทั้งในเซลล์และในสัตว์ทดลอง^[17] แสดงดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 แสดงบทความวิจัยทางวิชาการมีการกล่าวถึงอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สามารถนำไป

Nano particle	Concentration	stabilizer	Cell	size	Effects	Ref.
AuNPs	1 nM	Sodium citrate	MRC-5	20 nm	AuNP induced upregulation of antioxidants, stress response genes and protein expression	J.J. Li et al, 2010 ^[18]
	100 μ M	NaBH ₄	HeLa	1.4 nm	Au1.4MS nanoparticle cytotoxicity is associated with oxidative stress, endogenous ROS production, and depletion of the intracellular antioxidant pool.	U. Simon, W. et al. 2009 ^[19]
	10 mg/ml	TPP	HaCaT	1.5 nm	surface charge of 1.5 nm Au NPs induced changes in cellular morphology, mitochondrial function, mitochondrial membrane potential, intracellular calcium levels, DNA damage-related gene expression, and of p53 and caspase-3 expression	Nicole M. Schaeublin et al. 2011 ^[20]
	7x 10 ⁹ NPs/ml	sodium citrate	MCF-7	14,50, 74 nm	The cellular uptake of gold NPs is dependent on their size and surface properties.	B.D. Chithrani et al. 2009 ^[21]
	2 μ M, 140 μ M, 110 μ M	TPPMS	HeLa, SK-Mel-28,L929 ,J774A1	0.8-15 nm	The cellular response is size dependent, in that 1.4 nm particle cause predominantly rapid cell death by necrosis within 12 h but 1.2 nm cell death by apoptosis.	U. Simon, W. Jahn-Dechent, et al. 2007 ^[47]

งานวิจัยของ Ma JS. ^[22] พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใส่ร่วมกับ lipopolysaccharide มีผลต่อโปรตีน AKT โดยผ่านกลไกของการเกิดสภาวะอนุมูลอิสระ (oxidative stress) จึงเป็นมูลเหตุและที่มาของความสนใจศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ถูกส่งเข้าไปในเซลล์ HepG2 มีผลอย่างไรต่อโปรตีน AKT/FOXO3a ที่เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอนุมูลอิสระภายในเซลล์

จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดการศึกษาผลของความเป็นพิษในเซลล์ต่ออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร รวมถึงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงกลไกสัญญาณภายในเซลล์ ยังไม่มีการรายงานที่แน่ชัดนัก งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อความเป็นพิษภายในเซลล์ HepG2 และผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของกลไกสัญญาณ AKT/FOXO3a ภายในเซลล์ HepG2 เพื่อเป็นการทราบถึงกลไกที่เซลล์มะเร็งอยู่รอดหลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

1.2. คำถามของการวิจัย (Research Questions)

1.2.1 ความเข้มข้นและระยะที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อรูปร่างเซลล์ HepG2 หรือไม่

1.2.2 อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 หรือไม่ และเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์หรือไม่

1.2.3 อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT ในเซลล์ HepG2 หรือไม่

อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของโปรตีน Foxo3a ในเซลล์ HepG2 หรือไม่

1.3. วัตถุประสงค์ (Objectives)

1.3.1 เพื่อศึกษาปัจจัยของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อรูปร่างเซลล์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2

1.3.2 เพื่อศึกษาอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ HepG2

1.3.3 เพื่อศึกษาอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT และ Foxo3a ในเซลล์ HepG2

1.4. สมมติฐาน (Hypothesis)

1.4.1 อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีผลต่อความเป็นพิษในเซลล์ HepG2

1.4.2 อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT/FOXO3a ในเซลล์ HepG2

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการทำวิจัย

- Nanobiotechnology : เทคโนโลยีนาโนชีวภาพ
- Gold Nanoparticles : อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- AKT : โปรตีน AKT
- FOXO3a : โปรตีน FOX head Box 3a
- Toxicity : ความเป็นพิษ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้รับความรู้และมีความเข้าใจเกี่ยวกับการนาอนุภาคของระดับนาโนเมตรมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยหรือด้านอื่นๆ มากขึ้น

1.6.2 ผลที่ได้จากการทดลองเพื่อเป็นการทราบถึงกลไกของอนุภาคของค้ำระดับนาโนเมตรที่ส่งผลภายในเซลล์ อีกทั้งยังเป็นการเปิดมุมมองใหม่ในการศึกษาการประยุกต์ใช้อนุภาคของค้ำระดับนาโนเมตรภายในเซลล์ได้อย่างปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2

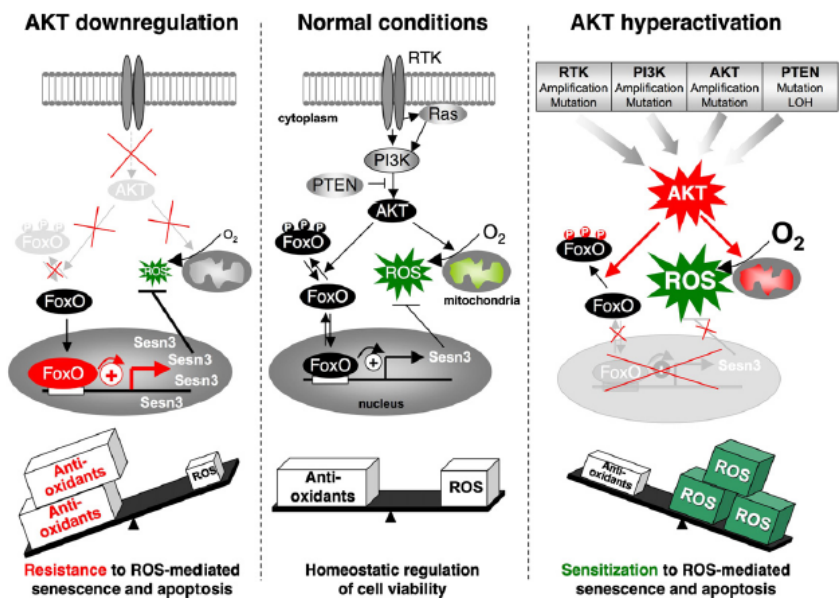
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีน AKT การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์

จากการกล่าวของ Zhang X และคณะ (2011)^[3] โปรตีน AKT มีความสำคัญในการรักษาความอยู่รอดของเซลล์ โดยควบคุมผ่านทางกลไกต่อต้านการตายแบบ apoptosis การทำงานที่เกิดขึ้นของโปรตีน AKT ผ่านทางการควบคุมด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ถ้าหากโปรตีน AKT ในรูปแบบการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการอยู่รอดของเซลล์

การทำงานของโปรตีน p-AKT มีการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องเมทาบอลิซึมอยู่ 2 กลุ่ม คือ FOXO และ mTOR กล่าวโดย Huang และคณะ (2007)^[23] และ Hay และคณะ(2005)^[24] กลุ่มแรกคือโปรตีน FOXO ที่เป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับความอยู่รอดของเซลล์ กล่าวโดย Puig และคณะ(2003)^[25] และอีกกลุ่มหนึ่งคือ โปรตีน mTOR ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ กล่าวโดย Porstmann และคณะ (2008)^[26]

จากการศึกษาของ Nogueira และคณะ ในปี 2008^[4] กล่าวว่ากลไกสัญญาณ AKT มีผลต่อการควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระและความอยู่รอดภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งการควบคุมดังกล่าวมีผลต่อโปรตีน FOXO และการทำงานของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ การทำงานที่มากขึ้นของโปรตีน AKT มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่สูงขึ้นจึงส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้น อีกทั้งยังไปลดการทำงานของโปรตีน FOXO ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ ผลดังกล่าวทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายขึ้น แต่ในทางกลับกันถ้าหากโปรตีน AKT ลดการทำงานลง จะไม่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่งทำให้การเกิดอนุมูลอิสระลดลง และยังส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน FOXO ทำให้โปรตีน FOXO เข้าไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆที่ต่อต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นกลไกที่เซลล์ตอบสนองต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 กลไกที่เซลล์ตอบสนองต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์

2.2 โปรตีน FOXO การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์

ความชราและโรคเมะเร็งมีความเกี่ยวข้องกัน โรคเมะเร็งหลายประเภทมีผลของอาการตามการแปรผันของอายุ วิธีการที่ทำให้ชีวิตอยู่ได้ยืนยาวขึ้น เช่น การควบคุมอาหาร การลดความเสี่ยงในการทำให้เกิดเนื้องอกหรือเมะเร็ง เป็นต้น^[1,2] ความเชื่อมโยงกันระหว่างความชรากับโรคเมะเร็งอาจมีความเป็นไปได้สูงที่เกี่ยวข้องกัน โดยที่ยืนไปมีผลในการทำให้ชีวิตอยู่ได้ยืนยาวขึ้นนั้น อาจจะมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการเกิดเนื้องอกขึ้น ยกตัวอย่างเช่น FOXO โดยมีรายงานว่า FOXO มีส่วนสำคัญในการทำให้ชีวิตอยู่ได้ยืนยาวขึ้น และยับยั้งการเกิดเนื้องอกขึ้น^[13] ตั้งแต่หนอนตัวแบบจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีกลไกในการควบคุม FOXO ผ่านทางกลไกอินซูลินในเซลล์เหมือนกัน^[13]

โปรตีนกลุ่ม Fork head พบได้ในทุกเซลล์ของยูคาริโอต เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและควบคุมกระบวนการหลายๆกลไกที่สำคัญภายในเซลล์ โดยมีตำแหน่งที่จับกับดีเอ็นเอที่จำเพาะ (conserved DNA-binding domains) จับบริเวณปลาย N-terminal ของโปรตีน และตำแหน่งที่กระตุ้นการทำงานอยู่ที่บริเวณ C-terminal ที่ควบคุมกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ เรียกตำแหน่งนั้นว่า "Forkhead box (FOX)"^[5] มีโปรตีนในกลุ่มนี้ทั้งหมด 39 โปรตีน ซึ่งสามารถแบ่งได้ 19 กลุ่ม เช่น FOXA, FOXS, FOXO เป็นต้น^[6] ในกลุ่มของ FOXO เป็นกลุ่มที่ผู้วิจัยสนใจ ซึ่งแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ดังนี้ FOXO1, FOXO3, FOXO4 และ FOXO6 โปรตีน FOXO พบว่าตั้งแต่หนอนตัวแบบจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน FOXO เป็นกลุ่มโปรตีนที่ถูกควบคุมด้วยกลไก PI3K-AKT pathway ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย growth factors หรือตอบสนองมาจาก oxidative stress ผลที่เกิดขึ้นทำให้โปรตีน FOXO เดินทางเข้าสู่เซลล์และควบคุมการแสดงออกในกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ^[27,28,29]

การควบคุมการทำงานของ FOXO นั้น ถูกควบคุมด้วยกระบวนการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลิน และปัจจัยที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth factor) โดยผ่านทาง PI3k-AKT /SGK pathway ถ้าหากมีฮอร์โมนอินซูลิน หรือปัจจัยในการเจริญเติบโตมากระตุ้นที่เซลล์ เซลล์จะตอบสนองต่อฮอร์โมนหรือปัจจัยร่วมเหล่านั้น และการตอบสนองที่เกิดขึ้นมีผลยับยั้งการทำงานของ FOXO โดยเกิดกระบวนการการเติมหมู่ฟอสเฟตขึ้นที่โปรตีน FOXO แต่ในทางกลับกัน ถ้าหากไม่มีฮอร์โมนหรือปัจจัยร่วมเหล่านั้น เซลล์จะไม่ทำการยับยั้งการทำงานของโปรตีน FOXO ลักษณะดังกล่าวที่เกิดขึ้นพบได้ในสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่หนอนตัวแบบจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน^[30] ดังรูปที่ 1 การทำงานของ โปรตีน FOXO มีหน้าที่ไปกระตุ้นการทำงานของยีนต่างๆ ที่สำคัญภายในเซลล์ โดยทำการควบคุมหลายๆ pathway ให้เกิดการ ทำงานขึ้น เช่น กระตุ้นการเกิด differentiation ผ่านยีน BTG1, p27 กระตุ้น glucose metabolism ผ่านยีน G6Pase / PEPck หรือไปมีผลต่อยีน p53 ที่ควบคุมการเกิด apoptosis ในเซลล์และทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ในเซลล์เมะเร็งอีกด้วย^[13,31]

2.3 หน้าที่กระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ ที่ FOXO ควบคุมภายในเซลล์

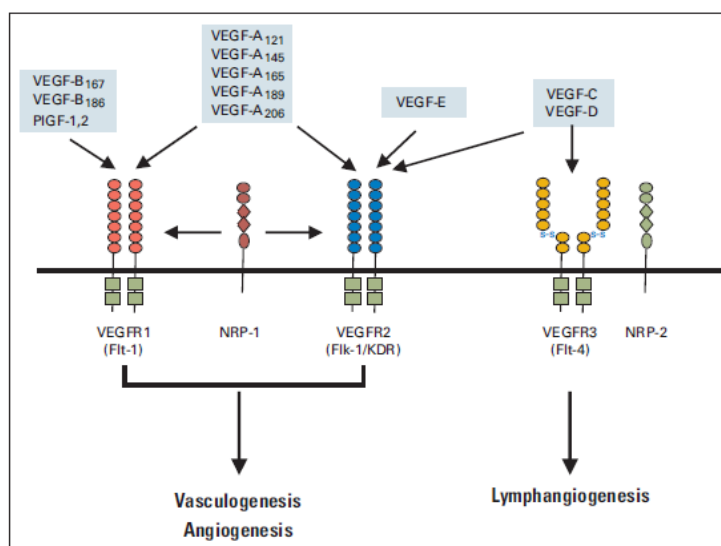
FOXO สามารถควบคุมการทำงานของกระบวนการเมทาบอลิซึมได้หลากหลาย เช่น กระบวนการแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เป็นต้น และมีรายงานทางการวิจัยที่ระบุการควบคุมการทำงานของ FOXO ต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ไว้มากมาย ดังตัวอย่างตามตารางที่ 2.1^[13]

ตารางที่ 2.1 แสดงการควบคุมการทำงานของ FOXO ต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์

Target gene	Cellular process	Reference
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)	Cell cycle (G1/S transition)	Medema <i>et al.</i> (2000)
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Cell cycle (G1/S transition)/differentiation (adipocyte)	Seoane <i>et al.</i> (2004), Nakae <i>et al.</i> (2003)
Cyclin D1	Cell cycle (G1/S transition)	Ramaswamy <i>et al.</i> (2002)
Cyclin D2 (<i>ccnd2</i>)	Cell cycle (G1/S transition)	Ramaswamy <i>et al.</i> (2002)
Cyclin G2	Cell cycle (G0/G1-S transition)	Martinez-Gac <i>et al.</i> (2004)
Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45	Cell cycle (G2 arrest)/DNA repair	Tran <i>et al.</i> (2002)
DNA damage-binding protein 1	DNA repair	Tran <i>et al.</i> (2002)
Manganese superoxide dismutase	ROS detoxification	Kops <i>et al.</i> (2002)
Catalase	ROS detoxification	Nemoto & Finkel (2002)
Trail	Cell death	Modur <i>et al.</i> (2002)
Fas ligand	Cell death	Brunet <i>et al.</i> (1999)
Bcl-6	Cell death	Ramaswamy <i>et al.</i> (2002)
Bcl-2 interacting mediator of cell death	Cell death	Dijkers <i>et al.</i> (2000)
B-cell translocation gene 1	Differentiation (erythrocytes)	Bakker <i>et al.</i> (2004)
Atrogenin-1 (MAFbx)	Muscle atrophy	Sandri <i>et al.</i> (2004)
Glucose-6-phosphatase	Metabolism	Nakae <i>et al.</i> (2001)
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Metabolism	Nakae <i>et al.</i> (2001)
Apolipoprotein CIII	Metabolism	Altomonte <i>et al.</i> (2004)
Pyruvate dehydrogenase kinase 4	Metabolism	Furuyama <i>et al.</i> (2003)

2.4 โปรตีน VEGF การควบคุมและหน้าที่ภายในเซลล์

โปรตีน VEGF หรือย่อมาจาก vascular endothelial growth factor เป็นตัวกระตุ้นตัวหนึ่งให้เกิดกลไกการพัฒนาของมะเร็งในชั้น angiogenic หน้าที่ของ VEGF หากเกิดการกระตุ้นผ่าน VEGF และตัวรับของ VEGF จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณไปในหลายกลไกภายในเซลล์ เช่น กลไกการอยู่รอด กลไกการกระจายตัว กลไกการเปลี่ยนแปลงเซลล์ เป็นต้น จากการรายงานของ Daniel J. และคณะ ในปี 2005[32] โปรตีน VEGF มีหลายชนิด เช่น VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E แต่ละตัวทำหน้าที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนที่สำคัญและมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งคือ VEGF-A ถูกค้นพบโดย Dvorak และคณะในปี 1983[33] ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 45 กิโลดาลตัน โปรตีน VEGF-A สามารถแบ่งย่อยออกได้อีก 4 ชนิดย่อย ได้แก่ ชนิด 121, 165, 189 และ 206 กรดอะมิโน เนื่องจากการถูกตัดด้วยกลไก alternative splicing ภายในเซลล์ จึงทำให้มีหลายชนิดย่อยและโปรตีนทั้ง 4 ชนิดย่อยของ VEGF-A มีการกระตุ้นที่ตัวรับแตกต่างกันดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงโปรตีน VEGF ชนิดต่างๆที่ทำงานในการกระตุ้นที่ตัวรับที่แตกต่างกัน

โดยโปรตีนที่มีการทำงานร่วมกันกับโปรตีน VEGF คือ โปรตีน Akt และโปรตีน MAPKs เป็นต้น ซึ่งโปรตีนที่กล่าวมาจะทำงานได้เมื่อมีการกระตุ้นเป็นขั้นๆ จากโปรตีน VEGF การทำงานเกิดขึ้นโดยโปรตีน VEGF ไปกระตุ้นที่ตัวรับที่จำเพาะ หลังจากนั้นจึงเกิดการกระตุ้นต่อกันไปเป็นทอดๆ จากการรายงานของ Irbay RB และคณะ (1999)[34] กรณีการทำงานของโปรตีน VEGF ที่มากขึ้นหรือลดลงอาจมีผลต่อตัวรับนั้นๆ และส่งผลต่อกลไกสัญญาณในชั้นถัดไป

2.5 นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีประยุกต์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการการสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตรเทียบเท่ากับระดับอนุภาคของโมเลกุลหรืออะตอม การออกแบบหรือการใช้เครื่องมือสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมากรวมถึงการจัดเรียงอะตอมและโมเลกุลในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ^[35] ซึ่งการใช้นาโนเทคโนโลยีทำให้สามารถผลิตวัสดุนาโนได้หลากหลายชนิดและวัสดุนาโนเหล่านี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ดังนี้

- Fluorescent biological labels
- Drug and gene delivery
- การตรวจหาเชื้อโรค
- การตรวจหาโปรตีน
- การตรวจหา DNA
- Tissue engineering
- การทำลายเซลล์มะเร็งโดยอาศัยความร้อน (hyperthermia)
- Separation and purification of biological molecules and cells
- MRI contrast enhancement

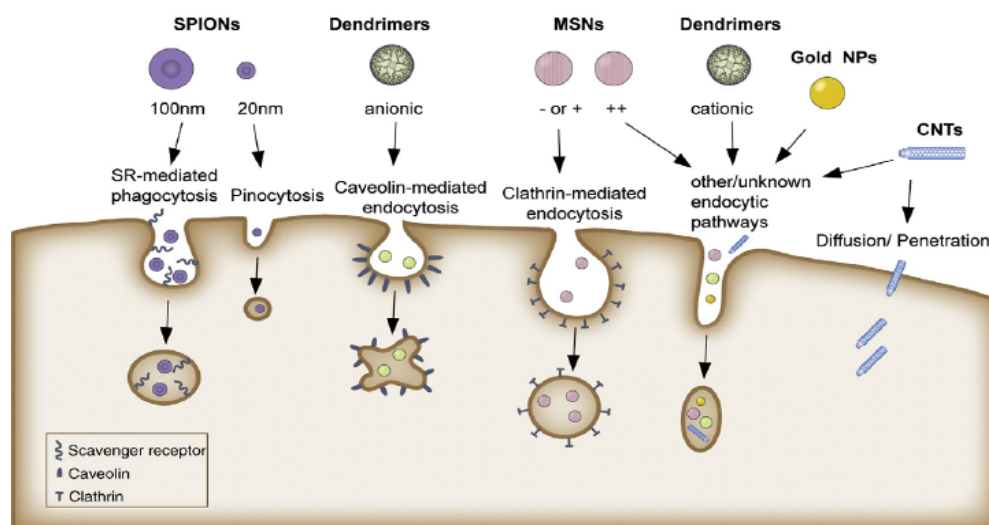
ในปัจจุบันพบว่าบริษัทหลายแห่งได้ผลิตและจำหน่ายวัสดุนาโนที่สามารถนำมาใช้ทางการแพทย์ได้ ดังตารางที่ 2.2^[36]

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงวัสดุนาโน (nanomaterial) ที่นำมาประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาและด้านการแพทย์ ที่บริษัทต่างๆผลิตขึ้นและจำหน่าย

Company	Major area of activity	Technology
Advectus Life Sciences Inc.	Drug delivery	Polymeric nanoparticles engineered to carry anti-tumour drug across the blood-brain barrier
Alnis Biosciences, Inc.	Bio-pharmaceutical	Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery
Argonide	Membrane filtration	Nanoporous ceramic materials for endotoxin filtration, orthopaedic and dental implants, DNA and protein separation
BASF	Toothpaste	Hydroxyapatite nanoparticles seems to improve dental surface
Biophan Technologies, Inc.	MRI shielding	Nanomagnetic/carbon composite materials to shield medical devices from RF fields
Capsulation NanoScience AG	Pharmaceutical coatings to improve solubility of drugs	Layer-by-layer poly-electrolyte coatings, 8–50 nm
Dynal Biotech		Magnetic beads
Eiffel Technologies	Drug delivery	Reducing size of the drug particles to 50–100 nm
EnviroSystems, Inc.	Surface desinfectant	Nanoemulsions
Evident Technologies	Luminescent biomarkers	Semiconductor quantum dots with amine or carboxyl groups on the surface, emission from 350 to 2500 nm
Immunicon	Tarcking and separation of different cell types	magnetic core surrounded by a polymeric layer coated with antibodies for capturing cells
KES Science and Technology, Inc.	AiroCide filters	Nano-TiO ₂ to destroy airborne pathogens
NanoBio Corporation	Pharmaceutical	Antimicrobial nano-emulsions
NanoCarrier Co., Ltd	Drug delivery	Micellar nanoparticles for encapsulation of drugs, proteins, DNA
NanoPharm AG	Drug delivery	Polybutylcyanoacrylate nanoparticles are coated with drugs and then with surfactant, can go across the blood-brain barrier
Nanoplex Technologies, Inc	Nanobarcodes for bioanalysis	
Nanoprobes, Inc.	Gold nanoparticles for biological markers	Gold nanoparticles bio-conjugates for TEM and/or fluorescent microscopy
Nanoshpere, Inc.	Gold biomarkers	DNA barcode attached to each nanoprobe for identification purposes, PCR is used to amplify the signal; also catalytic silver deposition to amplify the signal using surface plasmon resonance
NanoMed Pharmaceutical, Inc.	Drug delivery	Nanoparticles for drug delivery
Oxonica Ltd	Sunscreens	Doped transparent nanoparticles to effectively absorb harmful UV and convert it into heat
PSiVida Ltd	Tissue engineering, implants, drugs and gene delivery, bio-filtration	Exploiting material properties of nanostructured porous silicone
Smith & Nephew	Acticoat bandages	Nanocrystal silver is highly toxic to pathogenes
QuantumDot Corporation	Luminescent biomarkers	Bioconjugated semiconductor quantum dots

AuNPs มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เฉพาะตัว เช่น Surface topography, Surface chemistry, Surface energy มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่ายและหลากหลาย อีกทั้งสามารถเตรียมในห้องปฏิบัติการได้^[15] ในบทความวิจัยทางวิชาการมีการกล่าวถึง AuNPs ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเซลล์ได้หลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะใช้ AuNPs ในขนาดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

2.6 งานวิจัยทางวิชาการที่นำ AuNPs ไปใช้ในการทดลองภายในเซลล์



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงการนำ NPs ชนิดต่างๆในการนำเข้าสู่เซลล์

ปี ค.ศ.2010 Kunzmann A. และคณะได้ศึกษาการนำ Nanoparticle (NPs) เข้าเซลล์ในแต่ ละชนิดมีการนำเข้าสู่เซลล์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของ NPs โดยมีหลายกลไกในการนำ NPs เข้าสู่เซลล์ดูได้ดังภาพ และจากภาพจะเห็นได้ว่า Gold NPs จะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยกลไก endocytosis แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดนัก^[37]

ปี ค.ศ.2009 Simon U. และคณะได้ศึกษาผลของ AuNPs ขนาด 1.4 nm ที่ก่อให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงของรูปร่างของเซลล์ หน้าที่ของ mitochondria รวมถึงศักย์ไฟฟ้าภายใน mitochondria อีกทั้งความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอที่ถูกทำลายกับยีน p53 และ caspase 3 ของการแสดงออกใน ระดับอาร์เอ็นเอ ในเซลล์ HUVEC โดยที่ความพิษขึ้นอยู่กับขนาดและความเข้มข้นของ AuNPs^[19]

ปี ค.ศ.1998 Koide T และคณะได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ AuNPs ในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งกระเพาะและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่า AuNPs สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยเป็นตัวที่ไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในช่วง S phase, G2 to M phase, และ M phase^[38]

ปี ค.ศ.2007 Hirak K. Patra และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ AuNPs ในการฆ่าเซลล์ มะเร็งปอด พบว่า AuNPs สามารถเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์มะเร็ง^[39]

2.7 งานวิจัยทางวิชาการที่นำ AuNPs ไปใช้ในการทดลองภายในเซลล์ โดยศึกษาผ่านกลไกต่างๆที่เกี่ยวกับงานวิจัยนี้

ปี ค.ศ.2004 Bhattacharya R. และคณะได้ทำการศึกษา AuNPs ซึ่งมีผลยับยั้ง VEGF 165 ในเซลล์ HUVEC ซึ่ง VEGF 165 เป็นโปรตีนในกลุ่มของ VEGF ซึ่งผลของการถูกยับยั้งของ VEGF 165 ทำให้เซลล์เกิดการ Proliferation ลดลง^[40]

ปี ค.ศ.2011 Kalimuthu K. และคณะได้ทำการศึกษา AuNPs ที่ปริมาณ 500 nM ยับยั้ง VEGF ในเซลล์ BRECs ส่งผลให้เกิดการ Proliferation migration และ tube formation ลดลง ผลจากการที่ VEGF ถูกยับยั้งมีผลทำให้ Src ถูกกระตุ้นซึ่งมีผลต่อการต้านทานการเกิดมะเร็งในชั้น angiogenic^[41]

กลไก JNK มีความสัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย NPs โดยมีงานวิจัยของ kang และคณะปี ค.ศ. 2009 พบว่า TiO₂ NPs เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ lymphocyte และ Lao และคณะปี ค.ศ. 2009 พบว่า Follerene NPs ยับยั้ง JNK ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ในเซลล์ cerebral microvasculartum endothelial cells^[42,43]

ปี ค.ศ.2010 Ma J.S. และคณะได้ทำการศึกษา AuNPs ที่ใส่ร่วมกับ LPS มีผลในการยับยั้งโปรตีน AKT โดยที่เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ AuNPs และใส่ปริมาณของ LPS เท่าเดิมผลที่ได้คือโปรตีน AKT ลดลงเมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารใดๆเลย ความเข้มข้นที่ใช้มีดังนี้ 10, 20, 40 µg/ml อีกทั้งยังพบอีกว่า AuNPs ที่ใส่ร่วมกับ LPS ยังไปมีผลในโปรตีนที่ควบคุมการเกิดสภาวะต้านอนุมูลอิสระ และการอักเสบภายในเซลล์อีกด้วย พบว่าโปรตีน JNK และ P38 มีการเพิ่มปริมาณขึ้นเมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม^[22]

ปี ค.ศ.2007 Unfried K และคณะได้ทำการศึกษา NPs สามารถกระตุ้นกลไกตอบสนองต่อเซลล์ผ่านทางตัวรับ EGF ได้ โดยผลที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เกิดการอักเสบ หรือเกิดการ Proliferation ของเซลล์ และผลที่ NPs เข้าเซลล์นั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ ROS ภายในเซลล์^[44]

2.8 งานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับโปรตีน **FOXO** ที่มีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ

ปี ค.ศ.2006 Kato M และคณะได้ทำการศึกษาโรค **Diabetic nephropathy (DN)** คือ โรคที่มีลักษณะ **mesangial cell (MC)** ขยายขนาดขึ้น และเกิดการรวมตัวของ **extracellular matrix proteins** ในสภาวะที่มี **TGF- β** สูงและเป็นโรคเบาหวานจะมีผลเหนี่ยวนำการเพิ่มขึ้นของ **FoxO3a** และยับยั้งการทำงานของกลไก **PI3K/Akt** โดยทำการศึกษาในหนูทดลอง ผลที่สูงขึ้นของ **TGF- β** และ **FoxO3a** ทำให้ **MC** เกิดความอยู่รอดขึ้น และเกิดสภาวะ **oxidative stress** สูงขึ้น [45]

ปี ค.ศ.2004 Sandri M และคณะได้ทำการศึกษาผลของการทำงานของกลไก **PI3K/AKT** ที่ลดลง มีผลไปกระตุ้นการทำงานของ **Foxo** และผลที่เกิดขึ้นของการลดลงของ **Foxo** เกี่ยวข้องกับ **atrogin-1** และเป็นสาเหตุที่ทำให้กล้ามเนื้อลีบ [46]

2.9 งานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับการเข้าสู่เซลล์แบบ **endocytosis** ที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน **AKT**

กลไกของตัวรับของการเข้าสู่เซลล์แบบ **endocytosis** มีหลายสัญญาณที่กระตุ้นโดยถูกกระตุ้นผ่านทางลิแกนด์ ตัวรับหลายสัญญาณ เช่น **GPCRs, RTKs, TGF β , Wnt** และ **Notch** ต่างมีความเกี่ยวข้องกับ **clathrin-independent endocytosis (CIE)** 3-5[47]

การกระตุ้นกลไกสัญญาณ **PI3K-Akt** โดยทั่วไปเกิดการกระตุ้นที่บริเวณผิวของเซลล์ ถูกกระตุ้นด้วยกลุ่มโปรตีน **GPCR** ผ่านทางโปรตีน **G** โดยที่โปรตีน **G** ชนิดย่อยที่ **G β 1 γ 2** ส่งผลต่อโปรตีน **GTPase** มีผลทำให้เกิดการกระตุ้น **PI3K** และ **Akt** จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และต่อต้านการเกิดการตายในรูปแบบ **Apoptosis**[48]

การกระตุ้นกลไกสัญญาณ **AKT** ผ่านทางกลไก **RTKs** มีความสัมพันธ์กับโปรตีน **AP** และโปรตีน **NTRK1** โดยที่โปรตีนทั้งสองจะมีผลกระตุ้นการทำงานของโปรตีน **AKT** และโปรตีน **ERK** ทำให้เกิดการต่อต้านการตายในรูปแบบ **Apoptosis** เช่น การศึกษาใน **zebrafish** แต่กลไกการกระตุ้นการทำงานยังไม่มีใครอธิบายได้แน่ชัดนัก[49]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทำวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- Hot plate (IKA® C-MAG HS 7)
- Condenser column
- Cylinder (Nikko, Duran)
- Micropipette (Transferpette® S)
- Microtip (Axygen, Corning)
- Microtube (Axygen, Corning)
- Transmission electron microscope (TEM) (Hitachi Model H-7650)
- เครื่องวัดขนาดอนุภาคซีต้าและน้ำหนักริมเลกุล (Zetasizer ZS Malvern)
- UV-Vis spectrophotometer (Beckman coulter DU 800)
- Nanodrop (Thermo scientific 1000)
- Vortex mixer (LioLab)
- Spin down (Tomos)
- Orbital shaker (Heidolph)
- Centrifuge tube (Corning)
- pH meter (*Ultra*BASIC: Denver Instrument)
- Light microscope (Olympus)
- PVDF (Millipore)
- GS Gene Linker™ UV chamber (Bio-Rad)
- DSLR camera (Canon 500D)
- Thermocycle 2720 (Applied Biosystem)
- UV transilluminator (Bio-Rad)

3.2 สารเคมี

- Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
- Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Milli Q water (Labconco Water Pro PS)
- Ultrapure water (Gibco)
- Hydrochloric acid (HCl) (Merck)
- Nitric acid (HNO_3) (J.T.Baker)
- Detection probe (Thiolated probe) (Sigma)
- Test and control line probe (BioDesign)
- Synthetic target (BioDesign)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Merck)
- Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Sigma)
- Sodium phosphate (NaH_2PO_4) (Sigma)
- Sodium chloride (NaCl) (Sigma)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck)
- Potassium chloride (KCl)
- Potassium phosphate (KHPO_4) (Sigma)
- Tris-base (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- Boric acid (Sigma)
- Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Sigma)
- 20x saline-sodium citrate (SSC) buffer (Abbott Molecular Inc.)
- Medium 199 powder (Gibco™)
- Fetal bovine serum (HyClone)
- GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentus)
- PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma)
- HotStar *Taq* DNA polymerase (Qiagen)
- *Taq* DNA polymerase (Invitrogen)

- dNTP Mix, PCR grade 10 mM each (Qiagen)
- UltraPure™ agarose (Invitrogen)
- GeneRuler 25 bp Low range DNA Ladder # SM1191 (Fermentus)
- GeneRuler 100 bp Low range DNA Ladder #SM1191 (Fermentus)
- 96-well plate (Corning)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, USA)
- Fetal Bovine serum (Hyclone, USA)
- Pen-Strep (Hyclone, USA)
- PrestoBlue™ Cell viability Reagent (MolecularProbes: Invitrogen, USA)
- H2DCFDA (H2-DCF, DCF) (MolecularProbes: Invitrogen, USA)

3.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาด 5 นาโนเมตร

ล้างเครื่องแก้วทุกชิ้นและ magnetic bar ด้วย aqua regia ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$) หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ DI และทำให้แห้ง ปิเปตสารละลาย 1% hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ใส่ใน flask ที่มี Milli Q water อยู่ ต้มสารละลายบน hot plate stirrer โดยใช้ magnetic bar ช่วยกวนตลอดเวลา เมื่อสารละลายเดือด เติม 1% trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) อย่างรวดเร็ว สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงิน ต้มต่ออีกประมาณ 20 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงทึบไว้ให้เย็น เก็บ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C

การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ (Characterization of AuNPs) นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

- UV-vis spectroscopy ที่ 520 นาโนเมตร : ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง
- Zetasizer : หาค่า Zeta potential เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ

แต่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาด 5 นาโนเมตร ที่ใช้ในการทดลองได้สั่งซื้อมาจากบริษัท sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

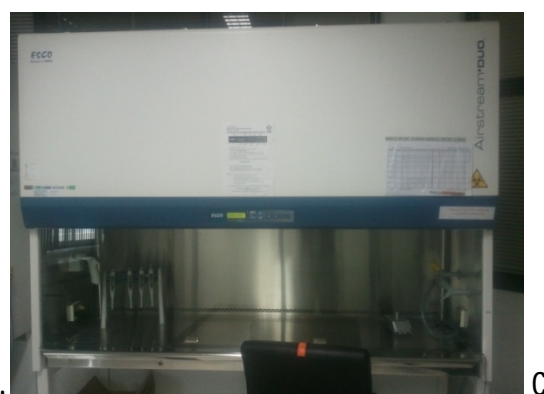


รูปที่ 3.1 แสดงเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (HepG2 cells culture)

ทำการเพาะเลี้ยง HepG2 cells ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม NaHCO_3 (3.7 g), 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 โดยแต่ละการทดลองใช้เซลล์จำนวน 10^5 cells ต่อหลุม (24 well-plate) ในอาหารปริมาตร 500 μL และแต่ละการทดลองทำซ้ำ 4 หลุม หลังจาก seed cells แล้ว incubate ตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีหลุม control ที่ไม่มีการเติมสารอื่น ๆ ส่วนกลุ่มทดลองทำการใส่สารละลายอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ทั้งนี้ยังศึกษาที่เวลาต่างกัน คือ 24 และ 48 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 cells จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม NaHCO_3 (3.7 กรัม), 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C องศาเซลเซียส และ 5% CO_2



รูปที่ 3.2 แสดงอุปกรณ์และเครื่องที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

- (a) ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
- (b) ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์
- (c) ตู้บ่มเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

3.5 การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์

การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์นั้นจะศึกษาโดยการนำเซลล์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเซลล์ปกติ (เซลล์ในกลุ่มควบคุม) กับเซลล์ที่ได้รับอนุภาคของคาร์บอนนาโนเมตร ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์ HepG2 cells จะมีรูปร่างเป็นทรงกระสวยยืดยาวเกาะเป็นชั้นกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น เซลล์จะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีรูปร่างดิบแบน หรือเปลี่ยนเป็นทรงกลม และเมื่อเซลล์เกิดการตายเซลล์จะหลุดจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์และลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 3.3 แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์

3.6 การศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์ (Study effect of AuNPs on cell toxicity)

ศึกษาโดยใช้ PrestoBlue™ Reagent (Molecular Probes, Invitrogen) ซึ่งเป็นสารที่ใช้วัดความสามารถในการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่ง PrestoBlue™ Reagent เป็นน้ำยาที่มีหลักการตัดแปลงมาจากสารที่มีชื่อว่า Resazurin solution ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการตรวจวัดเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ที่พบเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วไม่สามารถที่จะสร้างเอนไซม์นี้ออกมาได้

หลักการของ PrestoBlue™ Reagent คือ PrestoBlue™ Reagent เป็นสารที่มีสีน้ำเงินเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและสามารถถูกรีดักชันด้วย Mitochondrial dehydrogenase ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีชมพู และนำไปวัดค่า excitation และ emission แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 560 และ 590 ตามลำดับด้วยเครื่อง Microplate reader จึงนำไปคำนวณหาเพื่อหาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability)

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Fluorescence treatment} \times 100}{\text{Fluorescence control}}$$

Fluorescence treatment = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับสาร
Fluorescence control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 3.4 แสดงเครื่อง Microplate reader ที่ใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์

3.7 การศึกษาเพื่อหาปริมาณการเกิดของสารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การศึกษาโดย Reactive oxygen species (ROS) assay เป็นวิธีตรวจวัดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้น โดยมีวิธีการคือ ย้อมเซลล์ด้วยสาร 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (H₂DCFDA)(Molecular Probes, Invitrogen, USA) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี และ non-fluorescent เมื่อ H₂DCFDA ผ่านเข้าสู่เซลล์หุ้ม acetate จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ esterases ที่อยู่ภายในเซลล์ได้สารประกอบ non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (H₂DCF) และจะถูกเปลี่ยน 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ตามปริมาณที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ซึ่งจะนำไปวัดปริมาณการเกิดที่ 520 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ในการทดลองนั้นจะย้อมเซลล์ด้วยสี H₂DCFDA (0.1 uM) 100 ul incubate 30 นาที ล้างด้วย PBS 2 รอบ และใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป เพื่อกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยวัดปริมาณสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ 520 nm ทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

$$\% \text{ ROS Generation} = \frac{\text{Fluorescence treatment} \times 100}{\text{Fluorescence control}}$$

Fluorescence treatment	=	ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับสาร
Fluorescence control	=	ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์

3.8 การศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

ขั้นตอนในการทดลองอธิบายอย่างละเอียดในภาคผนวก

โปรตีนที่สกัดได้จาก polyacrylamide gels จะเคลื่อนย้ายต่อไปยัง PVDF membrane โดยใช้ SemiDry (Ge Healthcare, UK.) ที่ความต่างศักย์ 10 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที membrane จะถูกป้องกันโดยใช้ 10 % BSA ในบัฟเฟอร์ TBS-Tween เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องต่อมาแอนติบอดี (ที่ถูกเจือจางใน 1 % BSA ในบัฟเฟอร์ TBST ในอัตราส่วนต่างๆ) ถูกเติมเข้าไปและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBST ทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 5 นาที แล้วนำ membrane ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กับแอนติบอดี anti-rabbit (ที่ถูกเจือจางใน 1 % BSA ในบัฟเฟอร์ TBST ในอัตราส่วน 1:10,000, KPL, U.S.A.) หลังจากนั้นทำการล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBST ทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 5 นาที เหมือนเดิม จากนั้น blot ที่ได้จะถูกเติมสาร Phosphatase substrate (KPL, U.S.A.) ต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงแอนติบอดีแต่ละตัวที่บอกถึงขนาด และการเจือจางกับ 1 % BSA ในบัฟเฟอร์ TBST

Antibody	Dilution (1 % BSA ใน TBST)	Molecular weight
Foxo3 (cell signaling, U.S.A)	1:1000	80 kDa
p-Foxo3 (cell signaling, U.S.A)	1:1000	80 kDa
Akt (cell signaling, U.S.A.)	1:2000	60 kDa
p-Akt (cell signaling, U.S.A.)	1:3000	60 kDa
Beta actin	1:10,000	47 kDa

3.9 ลำดับขั้นตอนการวิจัย

3.9.1 สำหรับการทดลองเพื่อดูผลความเป็นพิษต่อเซลล์

เลี้ยงเซลล์จำนวน 10^4 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 45 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.2 สำหรับการทดลองเพื่อดูผลต่อการเกิดของสารอนุมูลอิสระของเซลล์

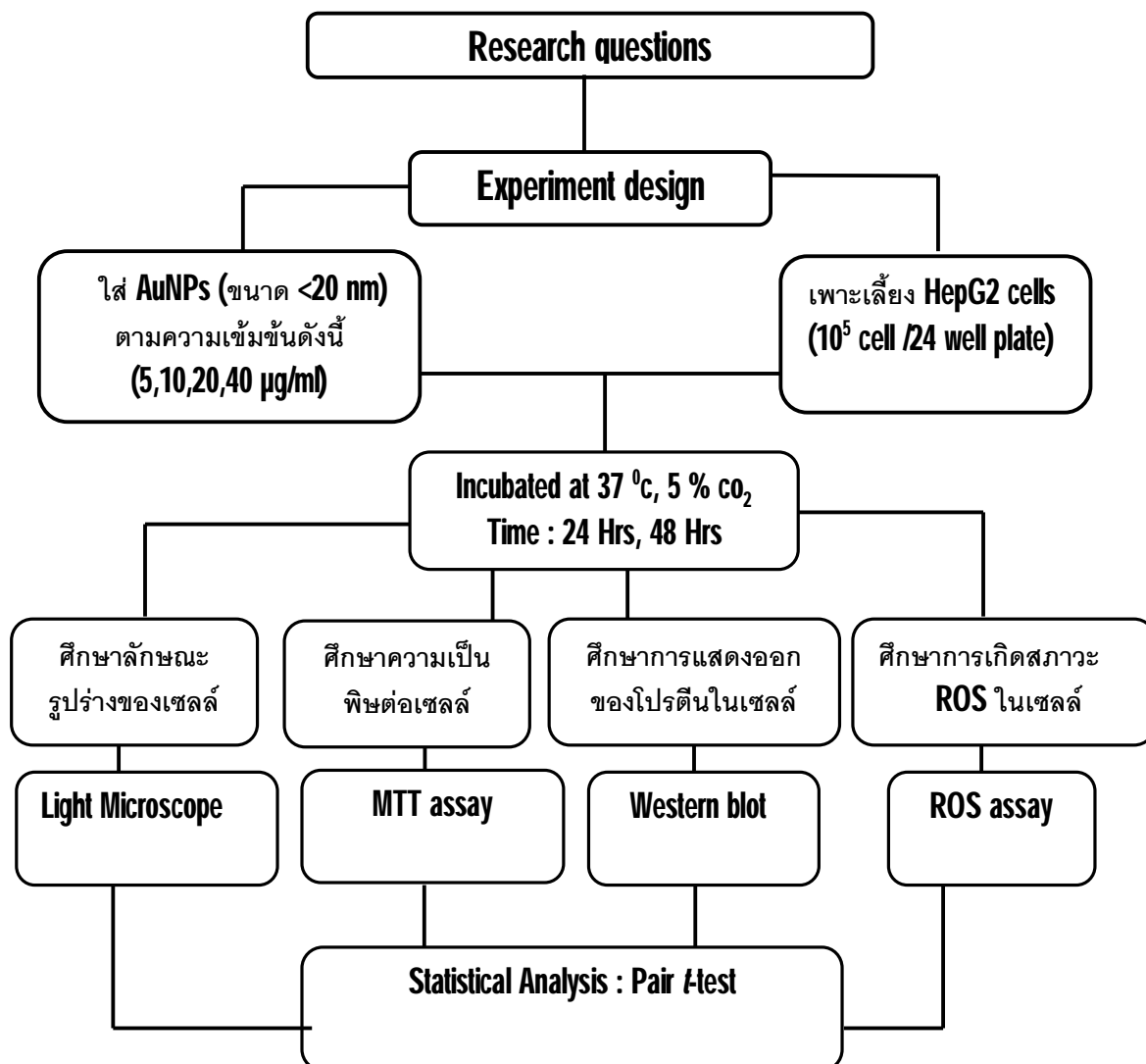
เลี้ยงเซลล์จำนวน $5 \times 10^3 - 10^4$ เซลล์ ในอาหารปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.3 สำหรับการศึกษาลักษณะของคาร์บอนนาโนเมตรต่อการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

เลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจาน ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

แบ่งชุดการทดลองเป็น 3 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุมผลลบ คือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ
2. กลุ่มควบคุมผลบวก คือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสาร DMSO เพื่อทำให้เซลล์เกิดความผิดปกติ สำหรับการทดลองเพื่อดูผลความเป็นพิษต่อเซลล์ และ H₂O₂ ความเข้มข้น 50 μ M สำหรับการทดลองเพื่อดูการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์
3. กลุ่มเซลล์ที่ได้รับอนุภาคของคาร์บอนนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นค่า Mean \pm SD โดยใช้ Repeated Measured ANOVA เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทดลอง กับกลุ่มควบคุม โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ p value น้อยกว่า 0.05

บทที่ 4

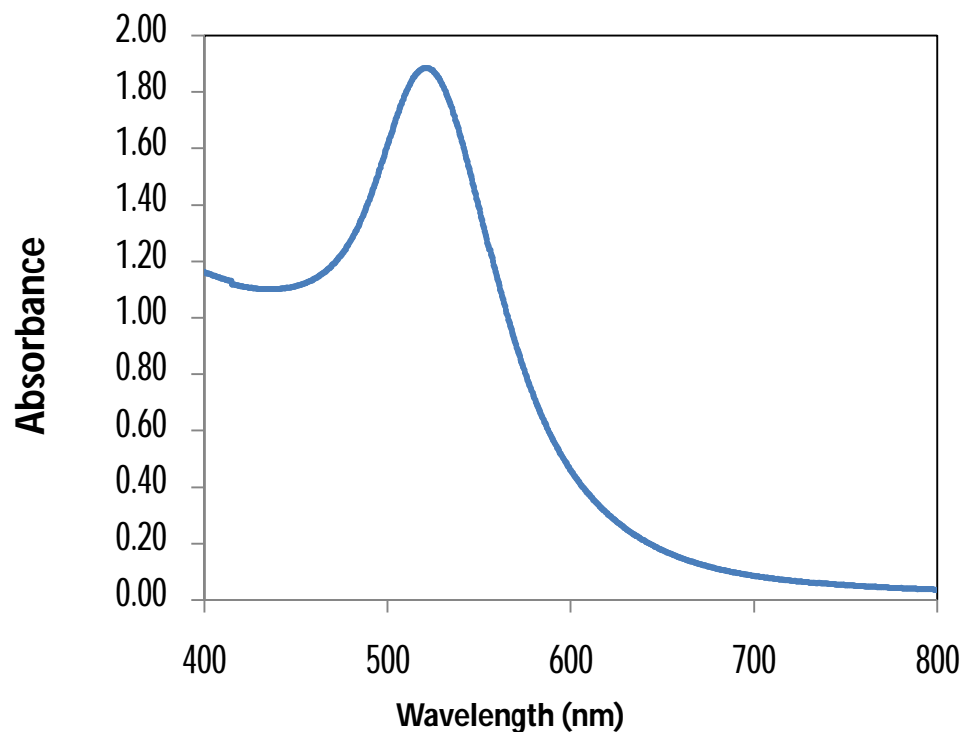
ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Characterization of AuNPs)

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาด 5 นาโนเมตร (AuNPs 5 nm)

เราได้ใช้ AuNPs ขนาด 5 nm จากบริษัท sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีรูปร่างกลมและมีขนาดอยู่ประมาณ 20 nm

4.1.1 UV-vis spectroscopy ที่ 520 นาโนเมตร : ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง
ผลที่ได้จากการสังเคราะห์และตรวจสอบลักษณะ



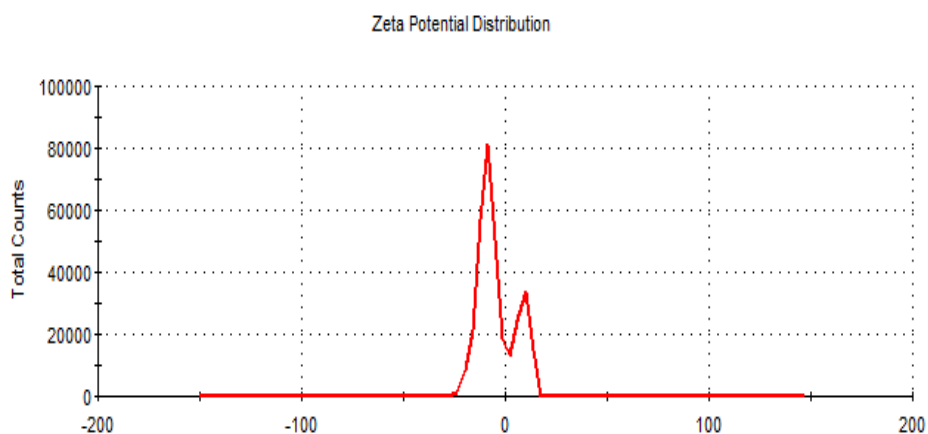
รูปที่ 4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่ความยาวคลื่น 520 nm

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV spectrum ผลที่ได้นั้นพบว่ามี การดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 nm ซึ่งแสดงตรงกับการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

4.1.2. Zetasizer : หาค่า *Zeta potential* เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -4.78	Peak 1: -8.82	74.7	5.16
Zeta Deviation (mV): 8.90	Peak 2: 8.26	25.3	3.51
Conductivity (mS/cm): 0.171	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : **Good**



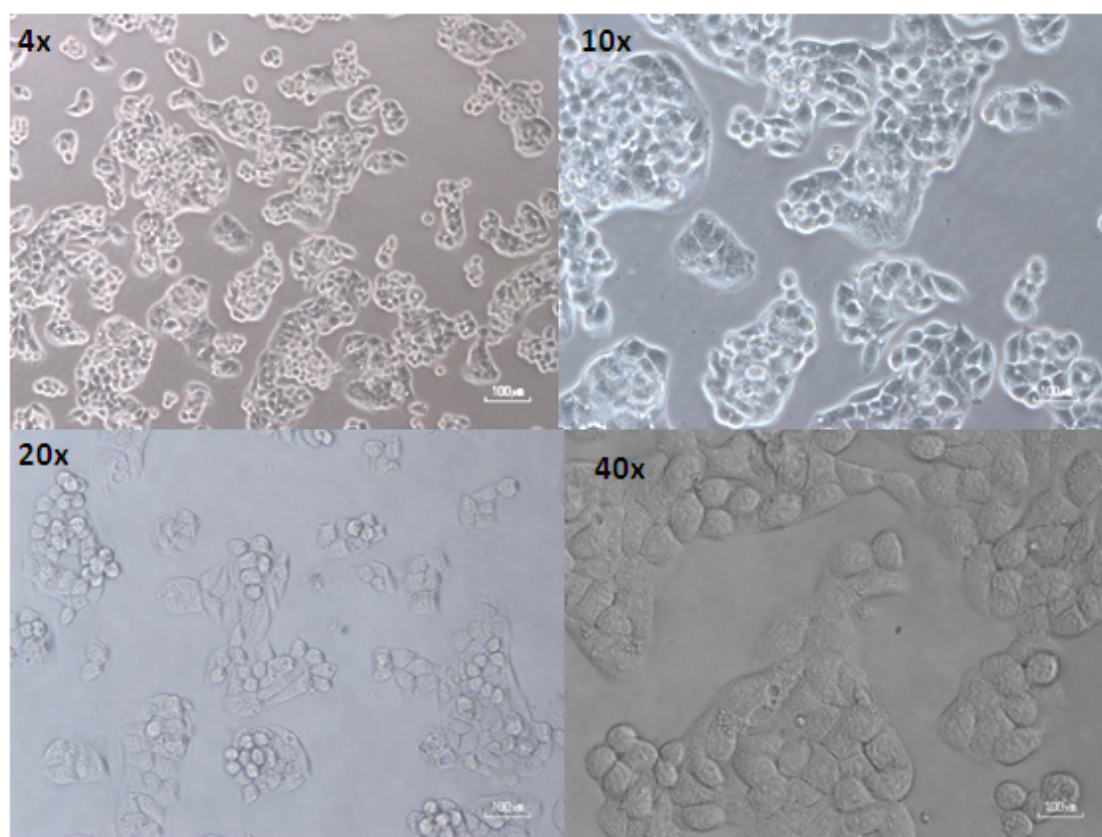
รูปที่ 4.2 การวัดค่า *Zeta potential* เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ

จากการทำ *Zeta potential* เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ พบว่าประจุรอบผิวของอนุภาคมีค่า -8.8 mV ซึ่งแสดงว่าประจุของอนุภาคเป็นประจุลบ ซึ่งแสดงว่าอนุภาคมีความเสถียร

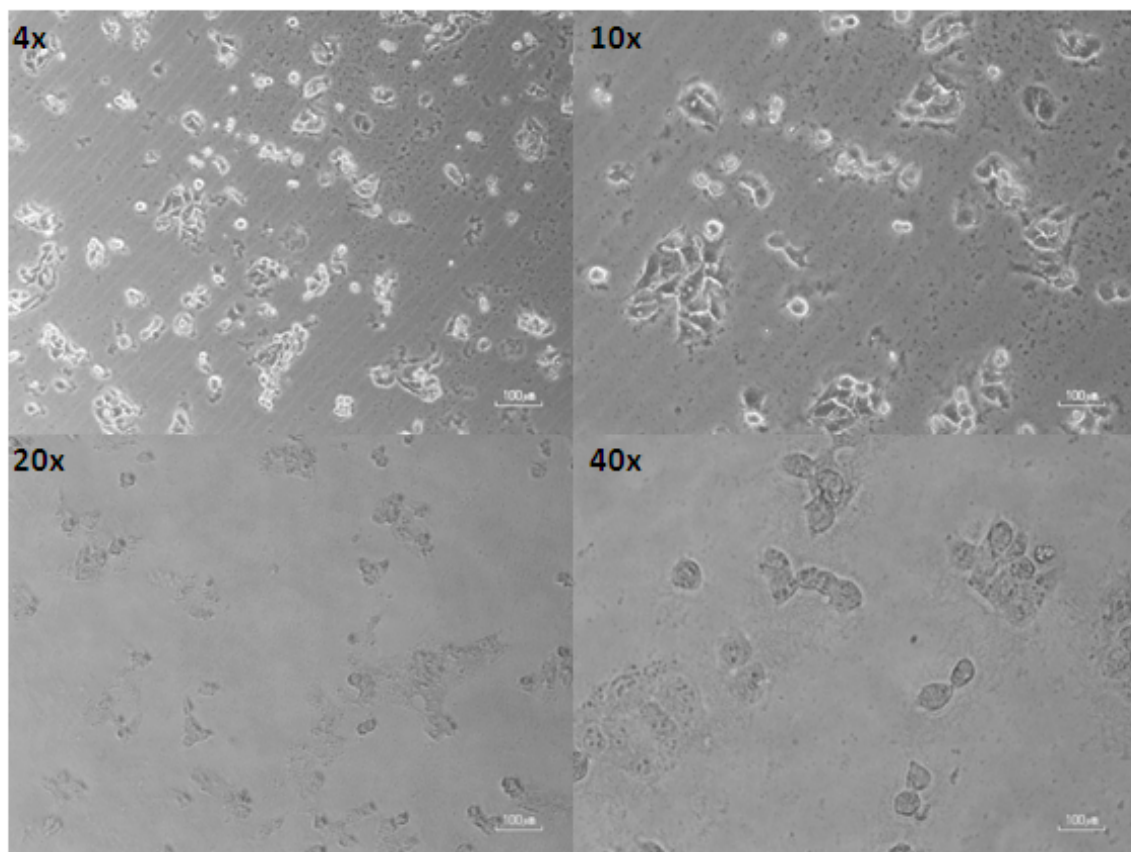
4.2 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Study effect of AuNPs on cell morphology)

4.2.1 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 24 ชั่วโมง

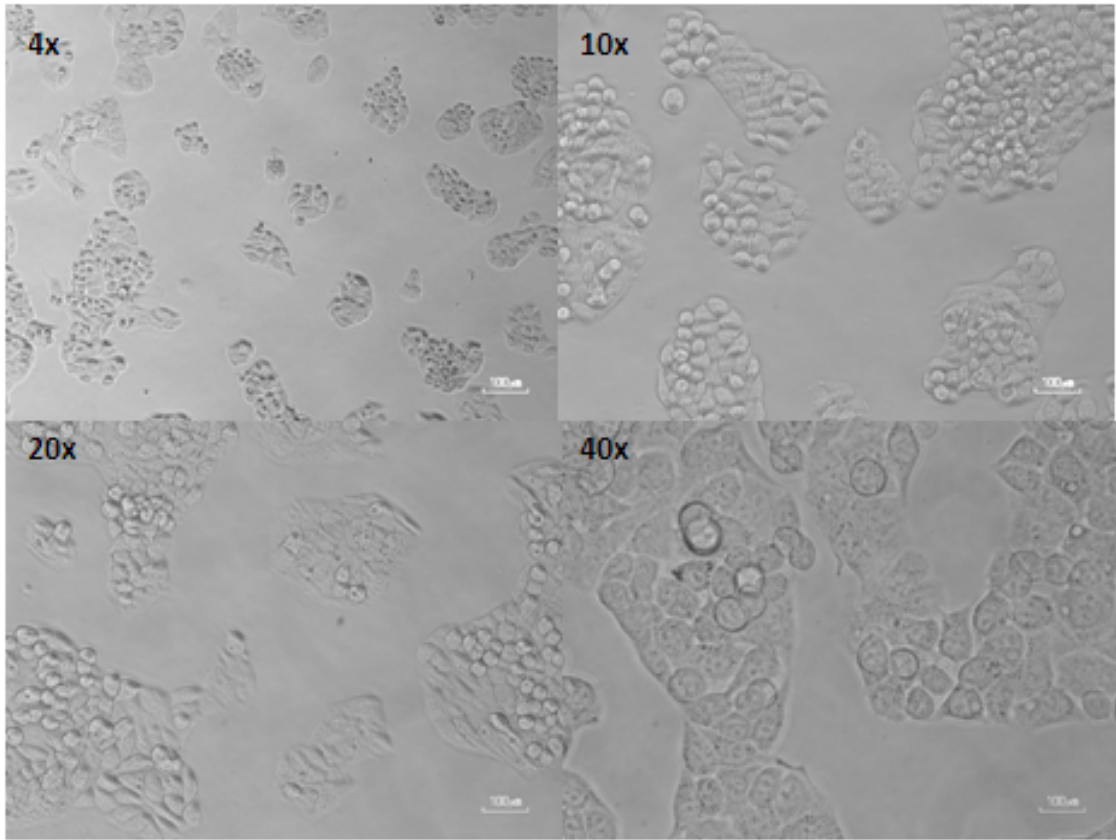
ศึกษาโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ โดยนำเซลล์ไปส่องดูด้วย Light microscope เพื่อเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของเซลล์ปกติ (control cells) กับเซลล์ที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง



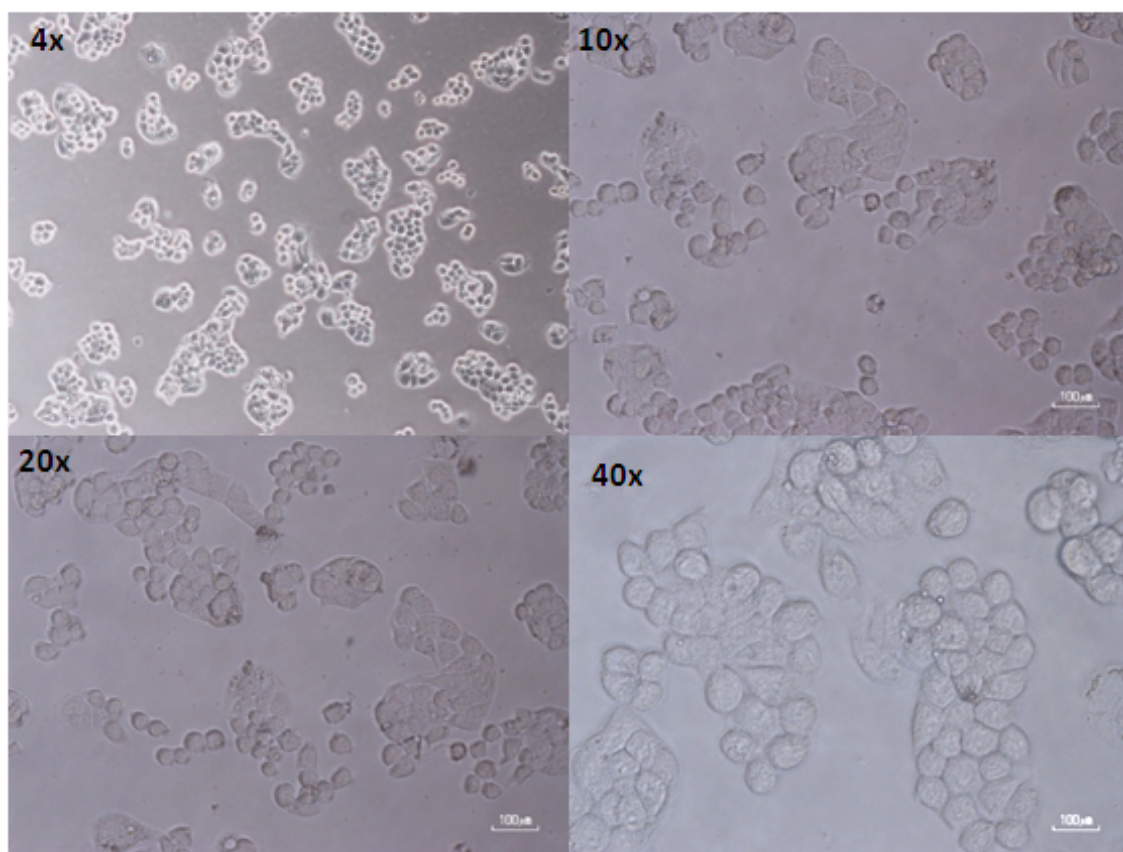
รูปที่ 4.3 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง



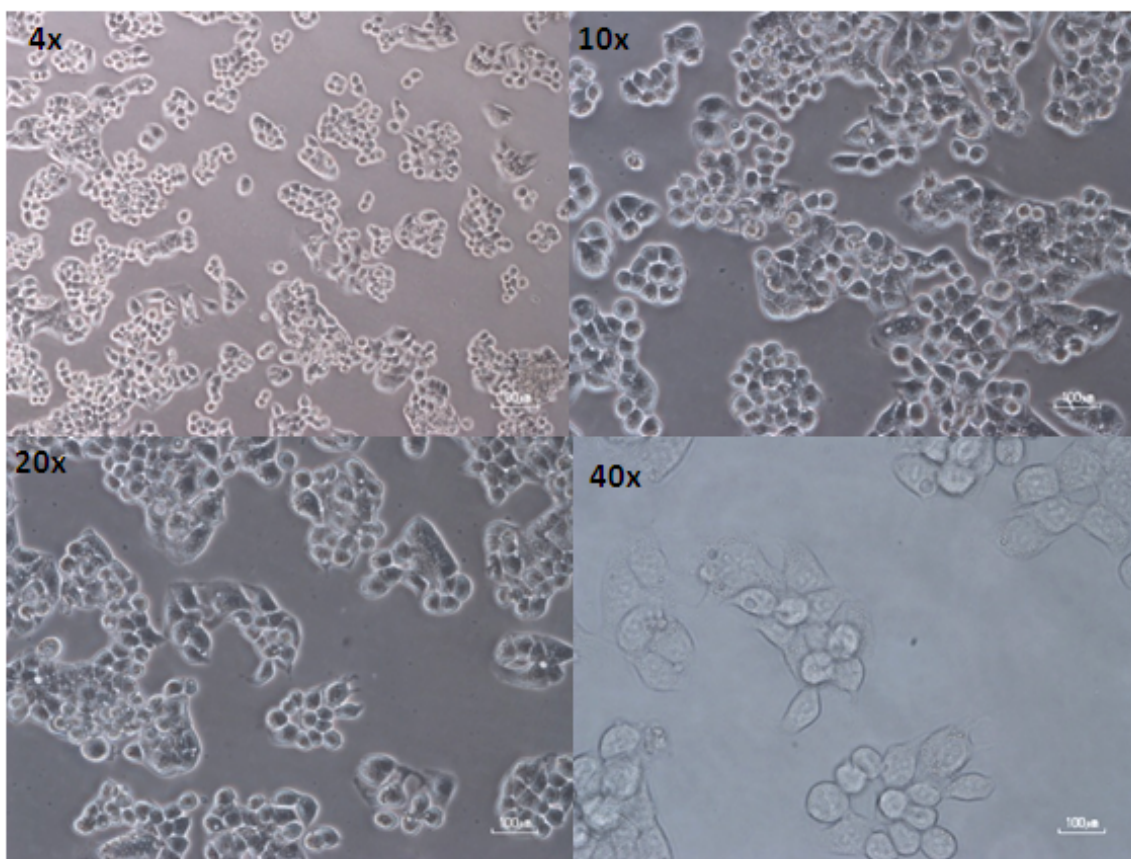
รูปที่ 4.4 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร DMSO ที่เวลา 24 ชั่วโมง



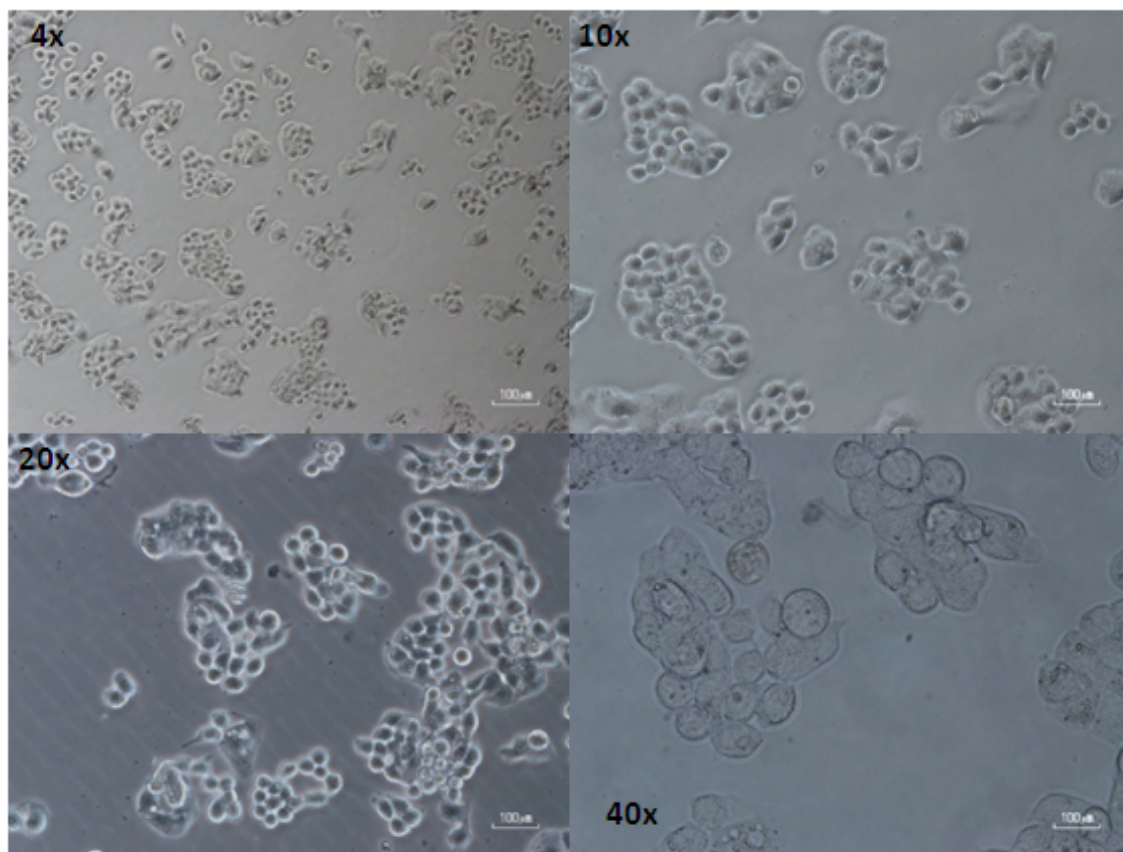
รูปที่ 4.5 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร citrate ที่เวลา 24 ชั่วโมง



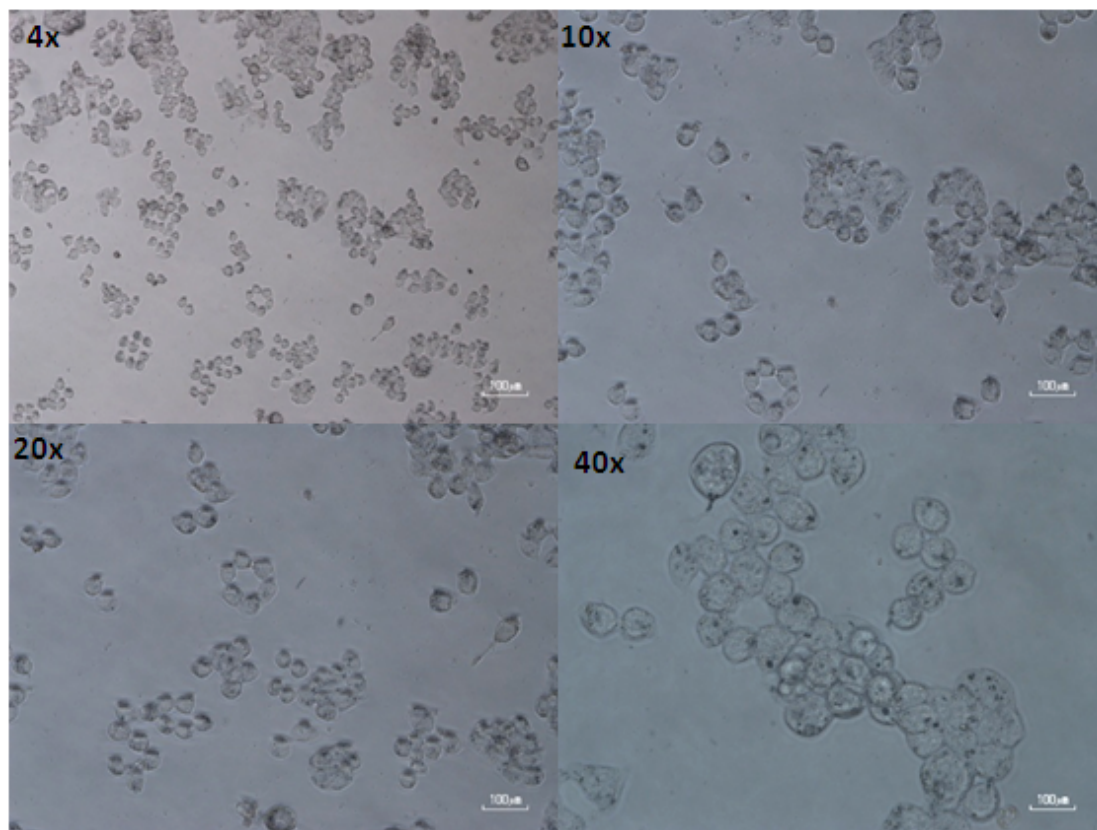
รูปที่ 4.6 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.7 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.8 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

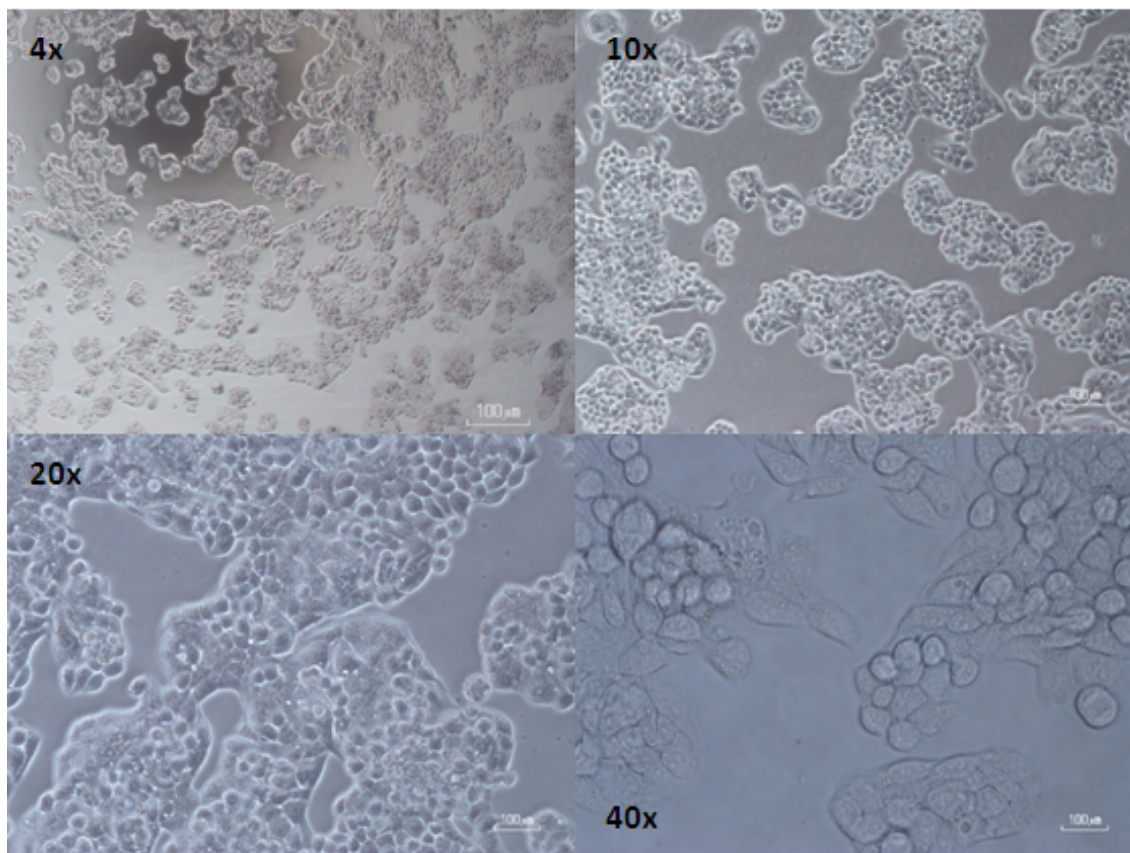


รูปที่ 4.9 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

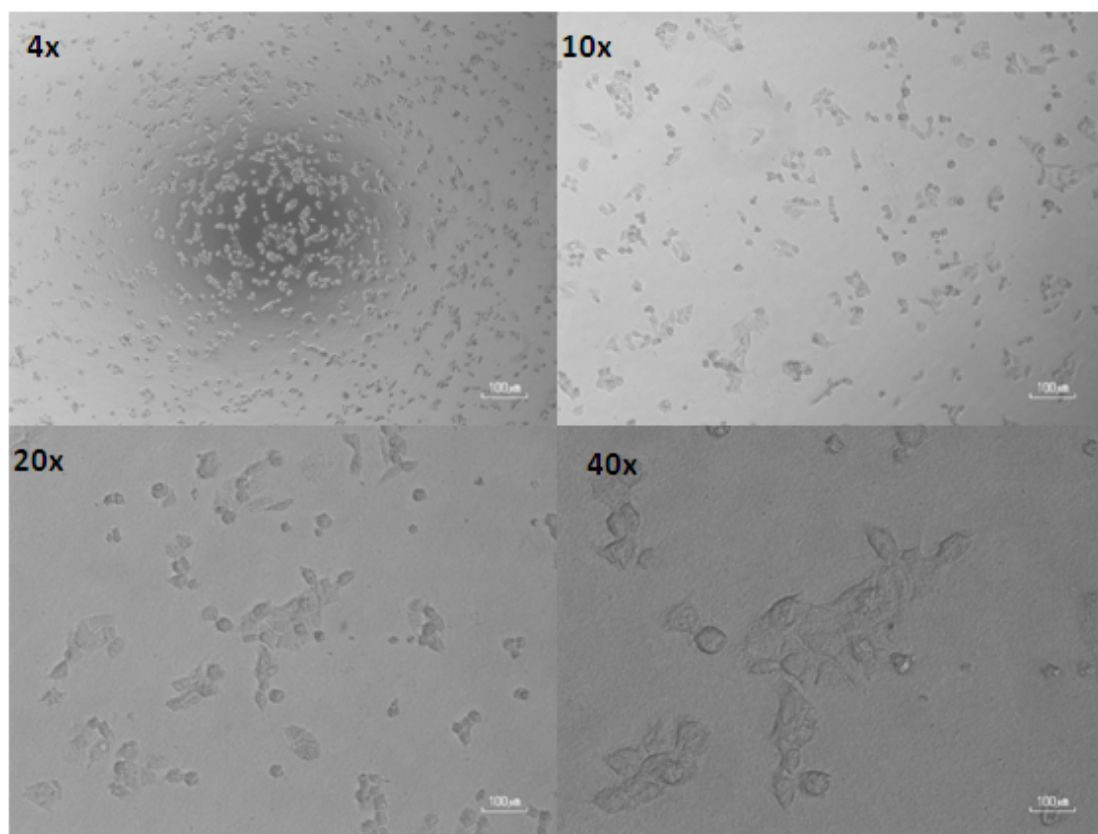
จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AuNPs 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง รูปร่างของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจากรูปร่างที่ยืดยาว เมื่อทำการเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่กลุ่มที่ใส่สาร AuNPs ความเข้มข้น 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด พบรูปร่างเซลล์หดเล็กลงและเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น รวมถึงภายในเซลล์เห็นการรวมกลุ่มกันของสาร AuNPs อีกด้วย

4.2.2 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 48 ชั่วโมง

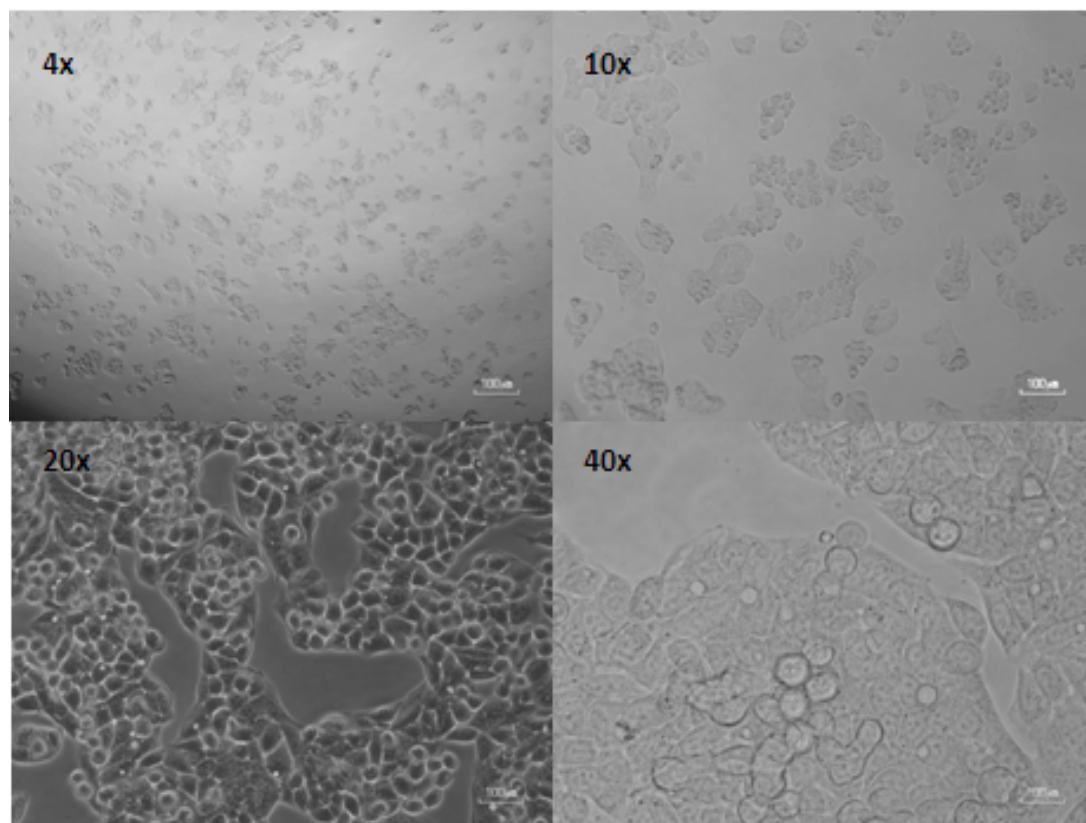
ศึกษาโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ โดยนำเซลล์ไปส่องดูด้วย Light microscope เพื่อเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของเซลล์ปกติ (control cells) กับเซลล์ที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (treated cells) ที่เวลา 48 ชั่วโมง



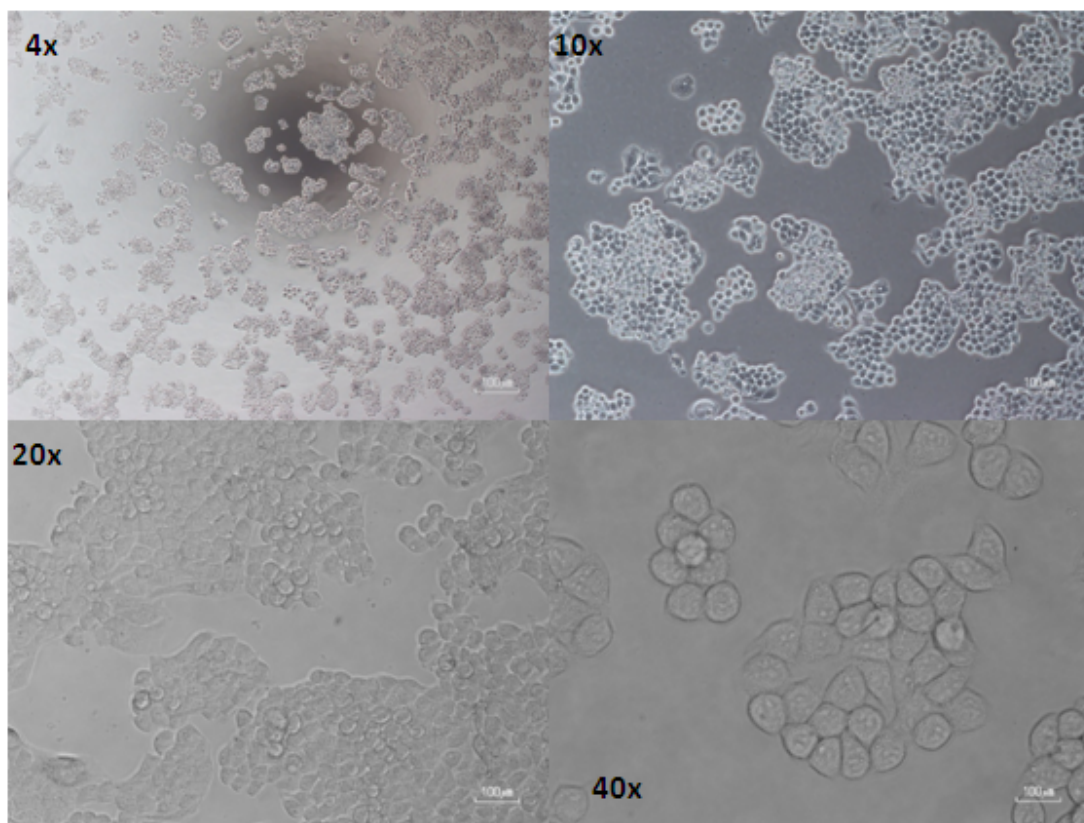
รูปที่ 4.10 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เวลา 48 ชั่วโมง



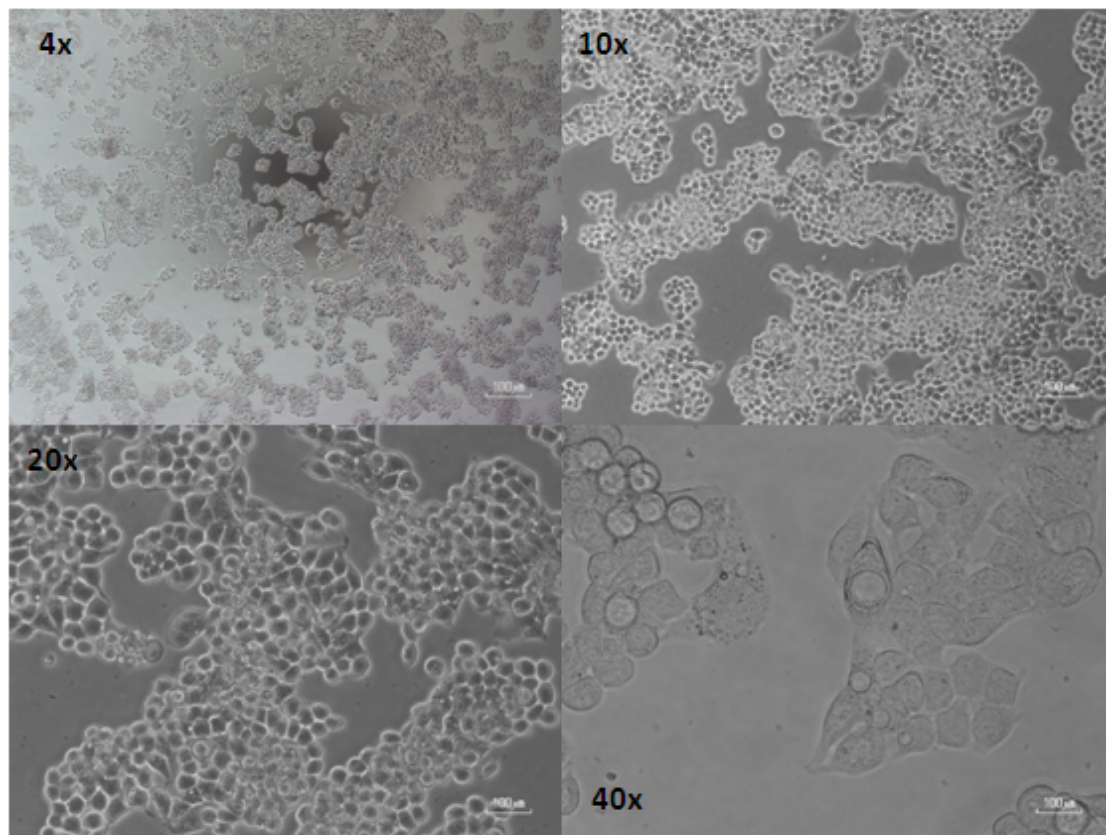
รูปที่ 4.11 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร DMSO ที่เวลา 48 ชั่วโมง



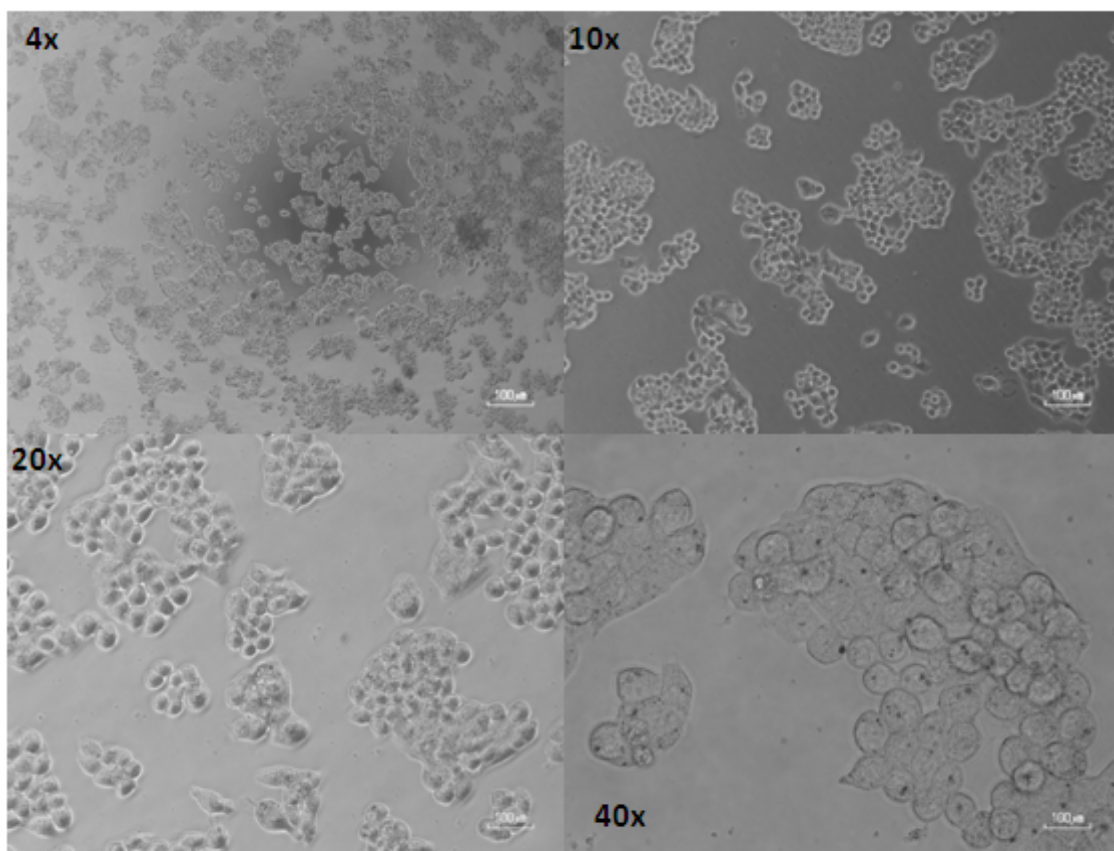
รูปที่ 4.12 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่สาร citrate ที่เวลา 48 ชั่วโมง



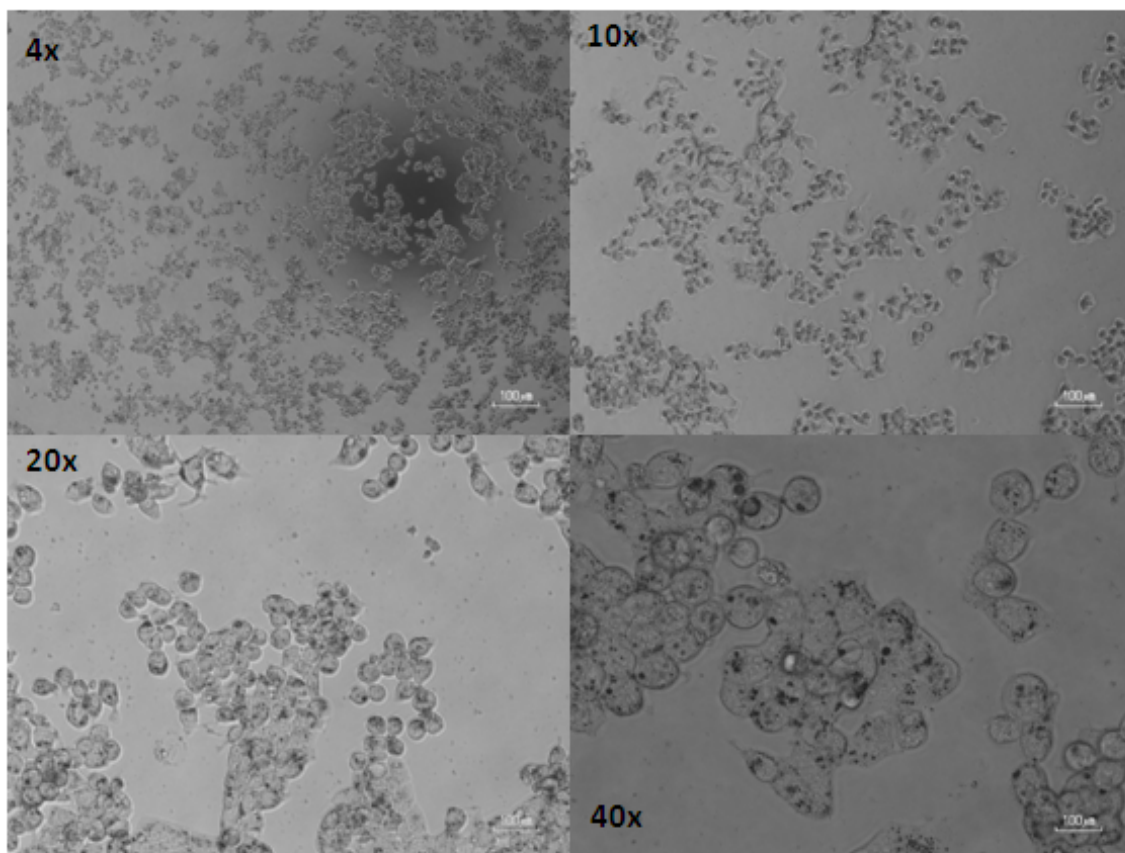
รูปที่ 4.13 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.14 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.15 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 48 ชั่วโมง



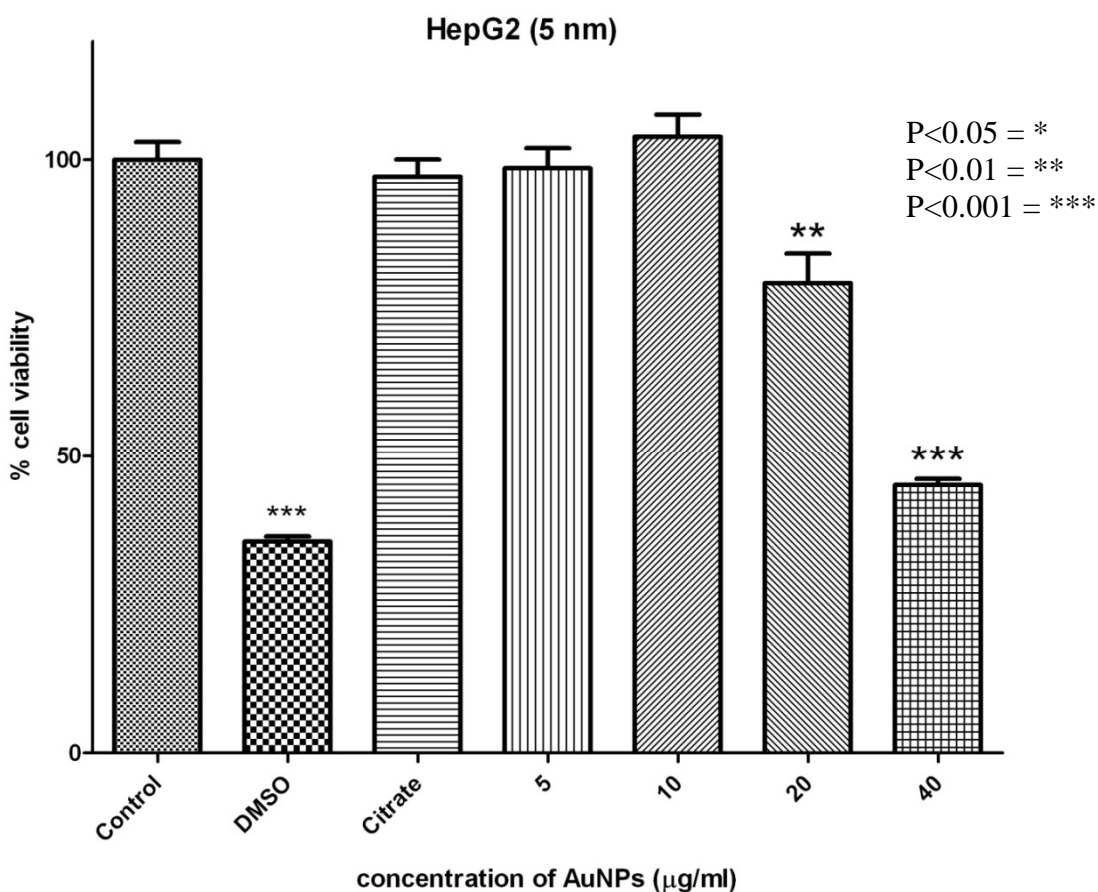
รูปที่ 4.16 แสดงผลของรูปร่างของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ (treated cells) ที่เวลา 48 ชั่วโมง

พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AuNPs 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง รูปร่างของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจากรูปร่างที่ยืดยาว เมื่อทำการเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่กลุ่มที่ใส่สาร AuNPs ความเข้มข้น 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด พบรูปร่างเซลล์หดเล็กลงและเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น รวมถึงภายในเซลล์เห็นการรวมกลุ่มกันของสาร AuNPs ในปริมาณมากอีกด้วย

4.3 การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Cell viability study HepG2 cell after AuNPs exposure)

โดยแต่ละการทดลองใช้เซลล์จำนวน 10^4 cells ต่อหลุม (96 well-plate) ในอาหารปริมาตร 45 μL และแต่ละการทดลองทำซ้ำ 4 หลุม หลังจาก seed cells แล้ว incubate ตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีหลุม control ที่ไม่มีการเติมสารอื่น ๆ ส่วนกลุ่มทดลองทำการใส่สารละลายอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ทั้งนี้ยังศึกษาที่เวลาต่างกัน คือ 24 และ 48 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 4.17

4.3.1 การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 24 ชั่วโมง

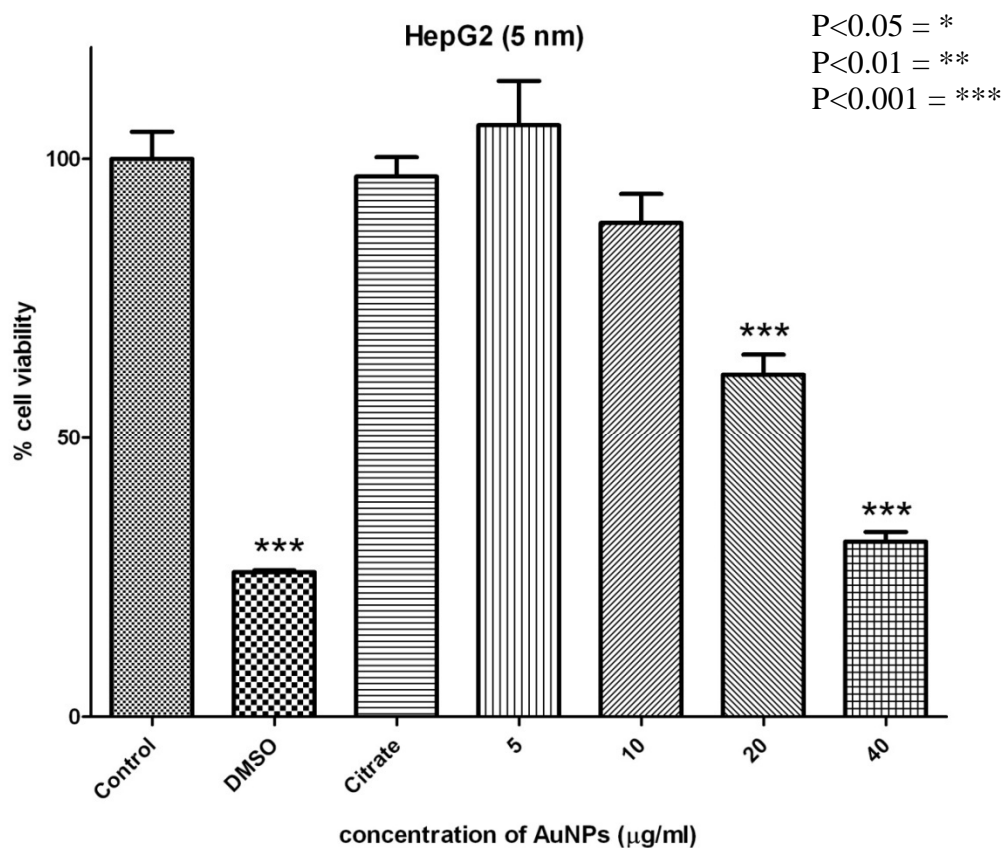


รูปที่ 4.17 ผลที่ได้จากการทดลองเมื่อทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ AuNPs ที่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ที่เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง โดยที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

จากกราฟรูปที่ 4.17 แกนตั้งแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของความอยู่รอด ส่วนแกนนอนแสดงถึงค่าความเข้มข้นต่างๆของกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ AuNPs พบว่าการอยู่รอดของเซลล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มที่ใส่สาร AuNPs ตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ กลุ่มที่ทำการใส่สาร AuNPs ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ความอยู่รอดของเซลล์ 79 ± 10.03 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่เปลี่ยนแปลงนัก ในกลุ่มที่ใส่สาร AuNPs ที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ พบความอยู่รอดของเซลล์ 45 ± 2.05 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลที่ได้จากการทดลอง ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของสาร AuNPs ไปตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ จะทำให้ความอยู่รอดของเซลล์น้อยลงที่ความเข้มข้น 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ ในเวลาที่บ่มสารกับเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ที่ความเชื่อมั่น 95 %

4.3.2 การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.18 ผลที่ได้จากการทดลองเมื่อทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ AuNPs ที่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ที่เวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง โดยที่มีความสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

จากกราฟรูปที่ 4.18 แกนตั้งแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของความอยู่รอด ส่วนแกนนอนแสดงถึงค่าความเข้มข้นต่างๆของกลุ่มทดลอง และกลุ่มที่ทำการควบคุม กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ AuNPs พบว่าการอยู่รอดของเซลล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มที่ใส่สาร AuNPs ตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 µg/ml กลุ่มที่ทำการใส่สาร AuNPs ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ความอยู่รอดของเซลล์ 61 ± 7.19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ 5 และ 10 µg/ml ไม่เปลี่ยนแปลงนัก ในกลุ่มที่ใส่สาร AuNPs ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml พบความอยู่รอดของเซลล์ 31 ± 3.49 เปอร์เซ็นต์

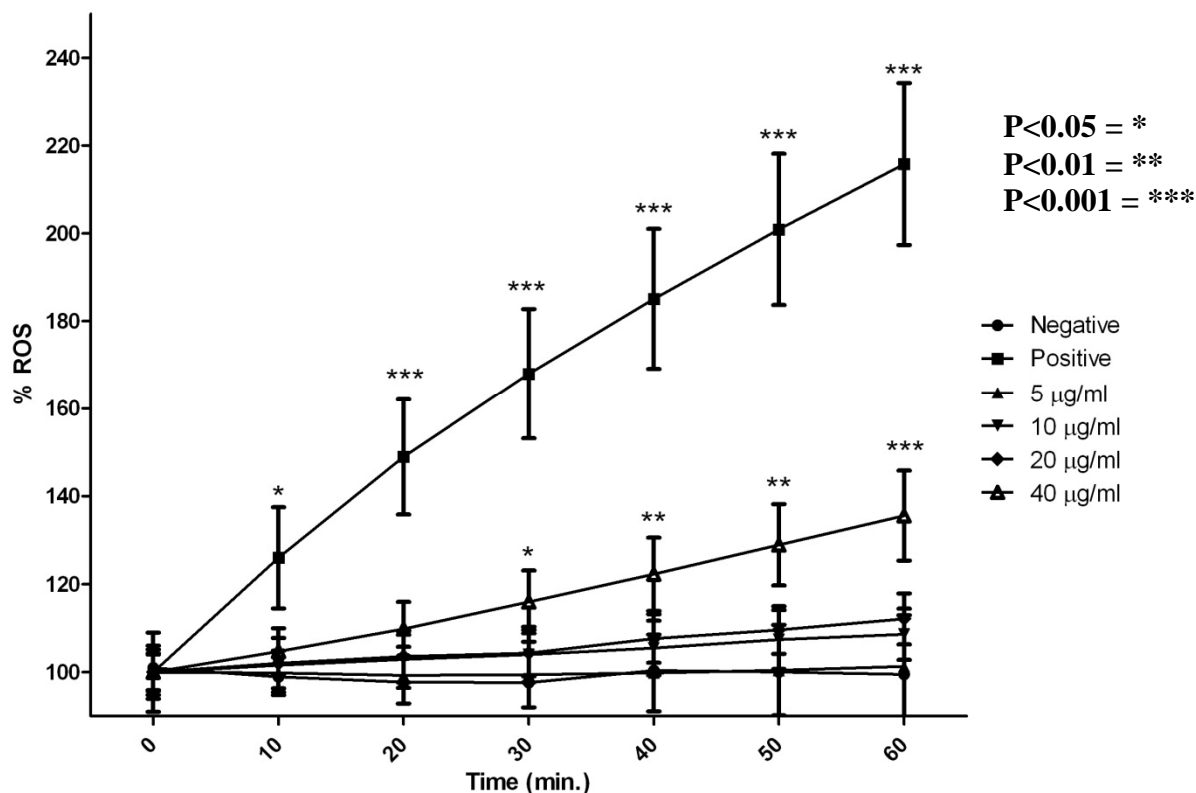
สรุปผลที่ได้จากการทดลอง ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของสาร AuNPs ไปตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 µg/ml จะทำให้ความอยู่รอดของเซลล์น้อยลงที่ความเข้มข้น 20 และ 40 µg/ml ในเวลาที่บ่มสารกับเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีความสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ที่ความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

Groups	24 hrs		48 hrs	
	Mean	SD	Mean	SD
Control	100.00	6.01	100.00	9.68
DMSO	35.58	1.67	25.90	0.61
Citrate	97.15	5.85	96.88	6.88
5 µg/ml	98.60	6.77	106.00	15.89
10 µg/ml	103.90	7.45	88.55	10.40
20 µg/ml	79.23	10.03	61.43	7.19
40 µg/ml	45.10	2.05	31.35	3.49

4.4 การศึกษาเพื่อหาปริมาณการเกิดของสารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

ผลจากการทดลอง

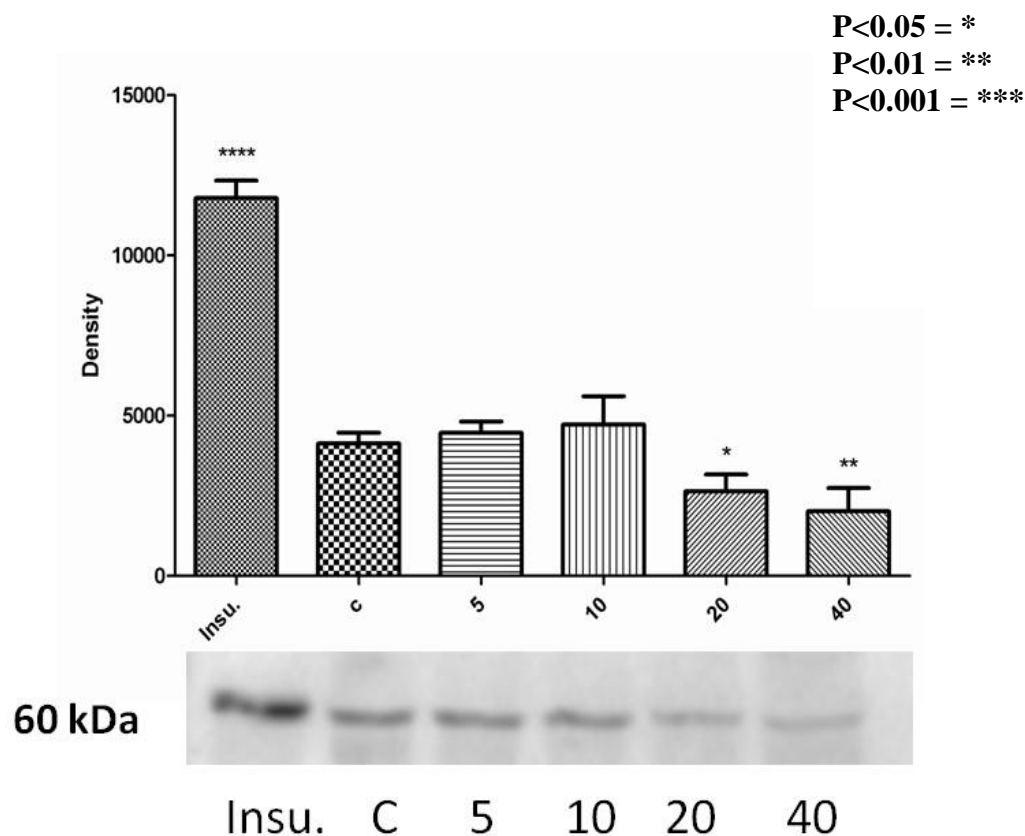


รูปที่ 4.19 แสดงผลของอนุภาคนิวเคลียสภายในเซลล์ HepG2 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ AuNPs ที่เวลา 0 ถึง 60 นาที โดยที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

โดยผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ AuNPs ไปยังทำให้เปอร์เซ็นต์ของการเกิดสภาวะอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆเลย และมีตัวแปรควบคุมที่ใส่สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้การเกิดสภาวะอนุมูลอิสระเป็นตัวเปรียบเทียบ จากกราฟจะเห็นว่าเวลา 60 นาที เห็นได้ว่าปริมาณความเข้มข้นที่ 40 µg/ml มีผลในการเกิดสภาวะอนุมูลอิสระมีปริมาณการเกิดสภาวะอนุมูลอิสระในเปอร์เซ็นต์ 135.5 ± 10.23 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

4.5 การศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน AKT/FOXO3a ด้วยเทคนิค Western blot

4.5.1 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ AuNPs ในเซลล์ HepG2 เพื่อดูผลการทำงานของโปรตีน AKT

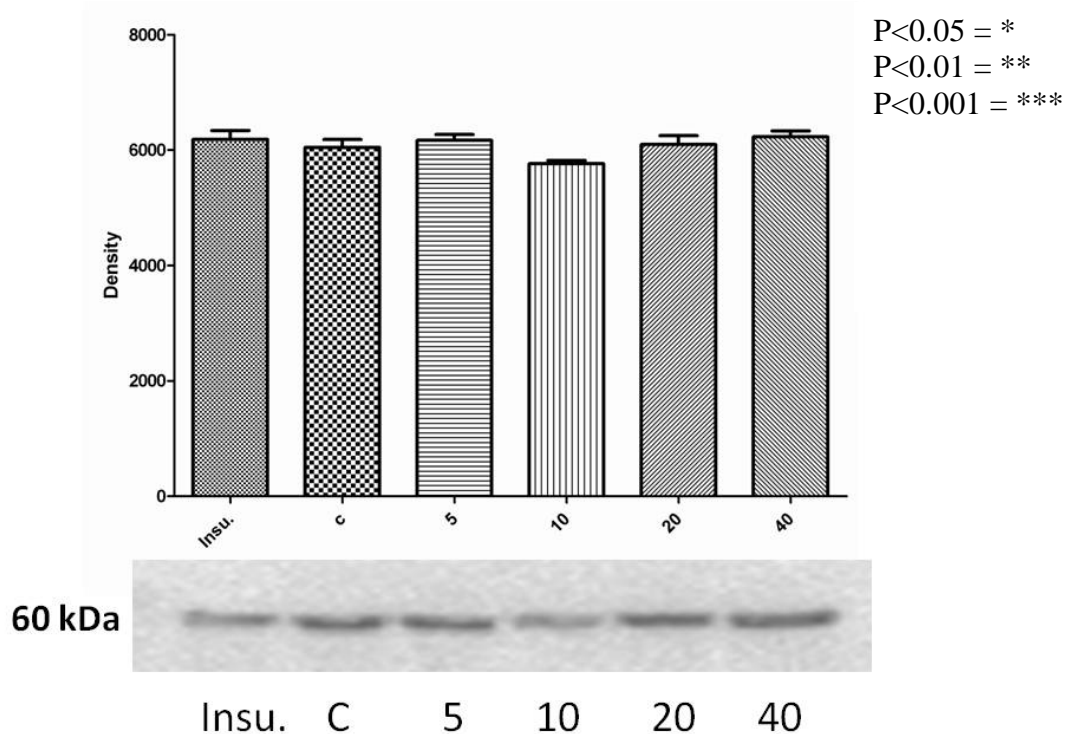


รูปที่ 4.20 แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน AKT

สรุปผลการทดลองที่ได้

ผลจากการทำการศึกษาของโปรตีน phospho- AKT (p-AKT) ที่ทำการใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ตามความเข้มข้นต่างๆ โดยมีฮอร์โมนอินซูลินเป็นตัวกระตุ้นการเกิดโปรตีน p-AKT ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 µg/ml พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 µg/ml พบว่าโปรตีน p-AKT มีการแสดงออกลดลงตามความเข้มข้นของ AuNPs และที่ความเข้มข้น 20, 40 µg/ml พบการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด

4.5.2 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ AuNPs ในเซลล์ HepG2 เพื่อดูผลของโปรตีน AKT

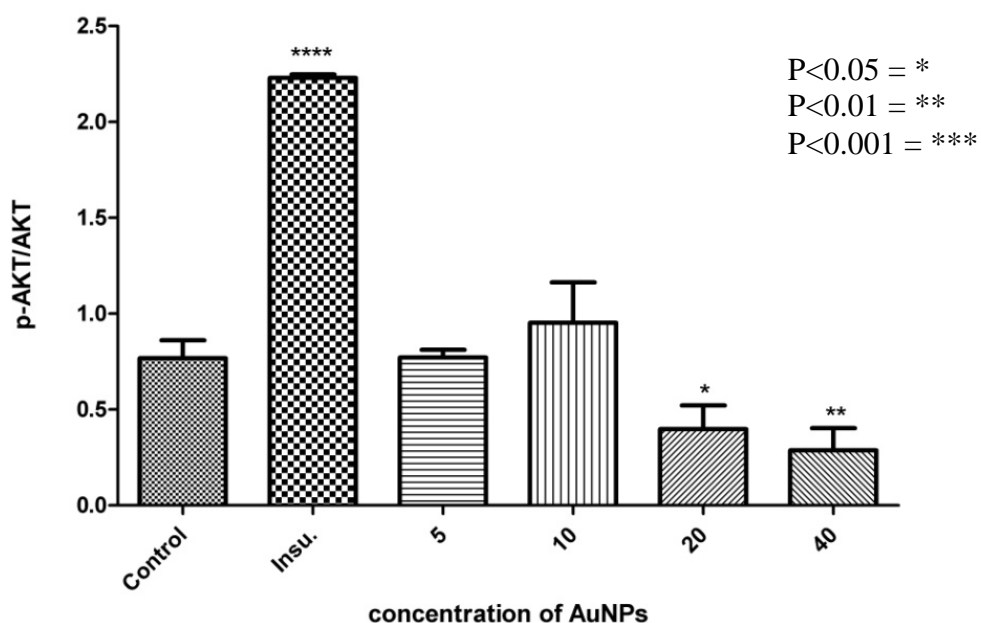


รูปที่ 4.21 แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน AKT

สรุปผลการทดลองที่ได้

ผลจากการทำการศึกษาของโปรตีน AKT ที่ทำการใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ตามความเข้มข้นต่างๆ โดยมีฮอร์โมนอินซูลินเป็นตัวกระตุ้นการเกิดโปรตีน p-AKT ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าโปรตีน AKT ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4.5.3 กราฟความสัมพันธ์ของโปรตีน **p-AKT** ต่อโปรตีน **AKT** ต่อ **AuNPs** ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

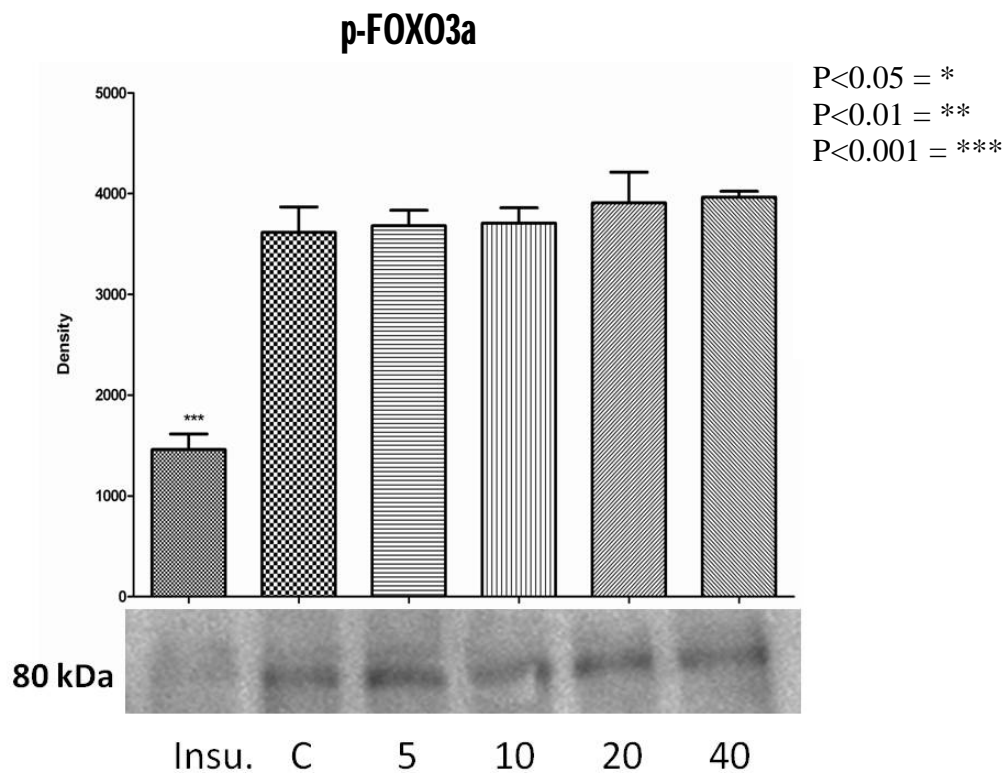


รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p-AKT และ AKT ต่อ AuNPs ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

สรุปผลการทดลองที่ได้กราฟ

พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างโปรตีน p-AKT และโปรตีน AKT โดยการใส่สาร AuNPs ตามความเข้มข้นต่างๆได้ผลคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AuNPs 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นของ AuNPs 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้จำนวนเท่าของโปรตีน p-AKT ต่อโปรตีน AKT ลดลงตามลำดับ ซึ่งมีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ที่ความเชื่อมั่น 95 %

4.5.4 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ **AuNPs** ขนาด **5 nm** ในเซลล์ **HepG2** เพื่อดูผลของโปรตีน

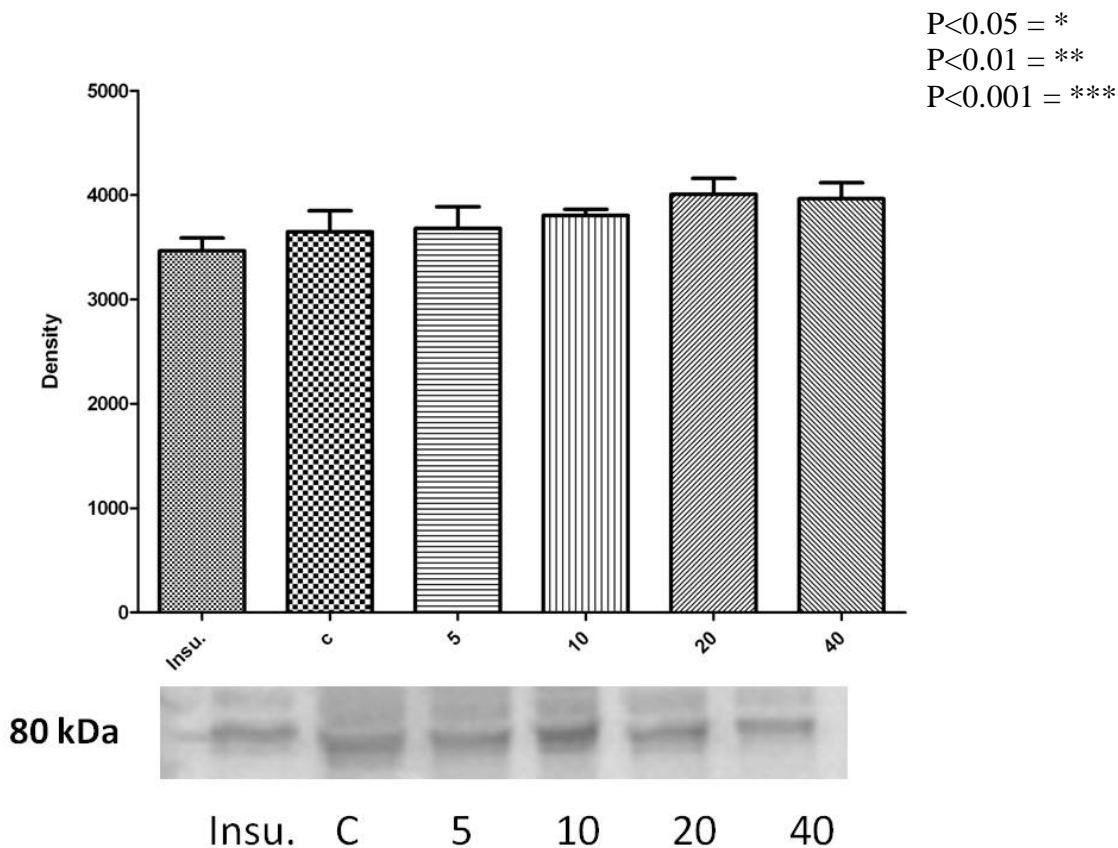


รูปที่ 4.23 แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน FOXO3a

สรุปผลการทดลองที่ได้

ผลจากการทำการศึกษาของโปรตีน FOXO3a ที่ทำการใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 µg/ml พบว่าโปรตีน FOXO3a มีการแสดงออกตามความเข้มข้นของ AuNPs ที่เท่ากันในแต่ละความเข้มข้น

4.5.5 ศึกษาผลที่ได้จากการทดลองใส่ **AuNPs** ขนาด **5 nm** ในเซลล์ **HepG2** เพื่อดูผลของโปรตีน **FOXO3a**

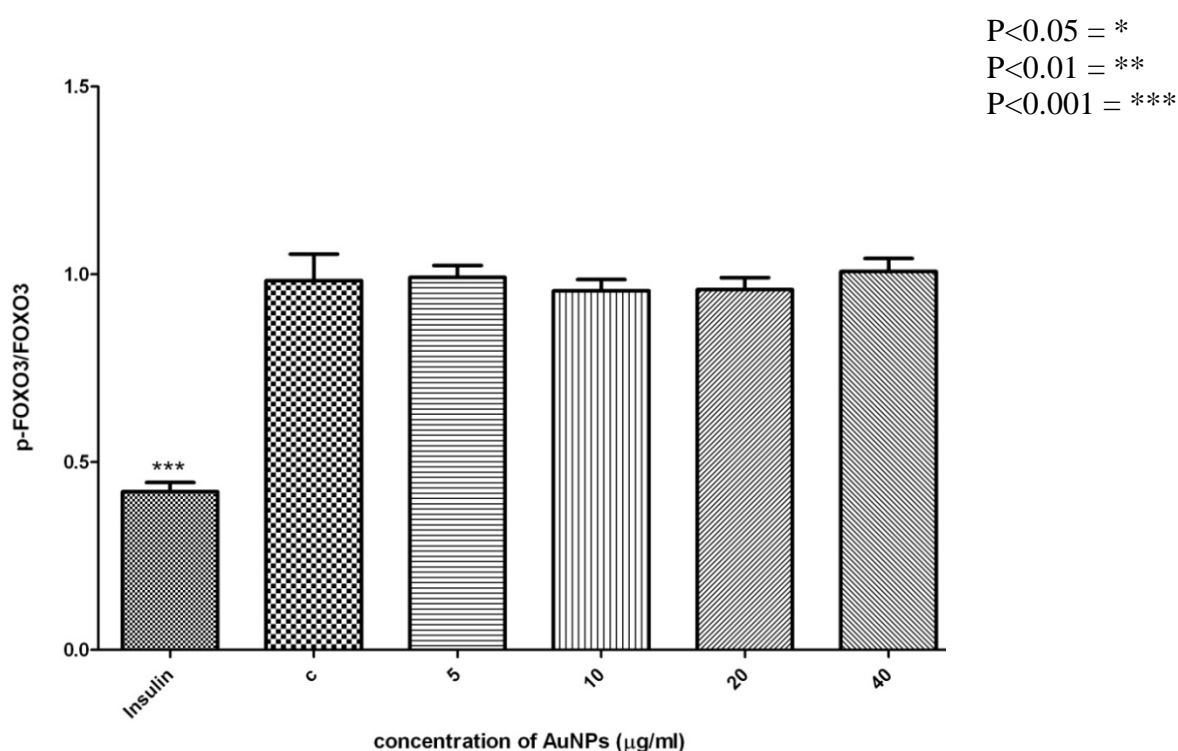


รูปที่ 4.24 แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน FOXO3a

สรุปผลการทดลองที่ได้

ผลจากการทำการศึกษาของโปรตีน FOXO3a ที่ทำการใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรตามความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าโปรตีน FOXO3a มีการแสดงออกตามความเข้มข้นของ AuNPs ที่เท่ากันทุกความเข้มข้น

4.5.6 กราฟความสัมพันธ์ของโปรตีน p-FOXO3a ต่อโปรตีน FOXO3a ต่อ AuNPs ที่ความเข้มข้นแตกต่าง



รูปที่ 4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p- FOXO3a และ FOXO3a ต่อ AuNPs ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

สรุปผลการทดลองที่ได้กราฟ

พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างโปรตีน p-FOXO3a และโปรตีน FOXO3a โดยการใส่สาร AuNPs ตามความเข้มข้นต่างๆได้ผลคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AuNPs 5, 10, 20, 40 µg/ml ตามลำดับ พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p-FOXO3a และโปรตีน FOXO3a ซึ่งไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ที่ความเชื่อมั่น 95 %

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

ปัจจุบันมีการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางการแพทย์ทั้งในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยได้กล่าวถึงความเป็นพิษภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เวลาที่ใช้ในการทดลองหรือขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร^[21, 50] กลไกสัญญาณภายในเซลล์หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรยังไม่มีรายงานอย่างแน่ชัด

งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในเซลล์ตับ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรอาจมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ตับ

การศึกษานี้จึงมีสมมุติฐานว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาดเล็ก (<20 nm) เมื่อเข้าสู่เซลล์มีผลทำให้เกิดความพิษเกิดขึ้นในเซลล์ HepG2 และไปมีผลในสัญญาณภายในเซลล์ HepG2 ผ่านกลไกของโปรตีน AKT/FOXO3a

5.1 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อโครงสร้างของเซลล์เมื่อเข้าสู่เซลล์ HepG2

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ HepG2 โดยนำเซลล์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของเซลล์กลุ่มควบคุมกับเซลล์ที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เป็นกลุ่มทดลอง ที่เวลา 24, 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเติมอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 24, 48 ชั่วโมง รูปร่างของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน พบรูปร่างเซลล์หดเล็กลงและภายในเซลล์เห็นการรวมกลุ่มกันของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร รวมถึงพบจำนวนเซลล์ลดลงอีกด้วย โดยการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอย่างชัดเจนที่เวลา 48 ชั่วโมง

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Cytoskeleton ภายในเซลล์ โปรตีนในกลุ่มของ Cytoskeleton มีหน้าที่ในการค้ำจุนเซลล์ ถ้าหากโปรตีนกลุ่มนี้ลดลงอาจเป็นสาเหตุให้เซลล์มีการหดตัวลง

จากการทบทวนวรรณกรรม Rejman และคณะ (2004)^[51] กล่าวว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยกลไก endocytosis โดยใช้ตัวรับที่จำเพาะคือ caveolin โดยอนุภาคขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าขนาดใหญ่

จากการศึกษาของ Nicole และคณะ (2011)^[20] พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ HaCaT ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาวิจัยของ Mironava และคณะ (2010)^[52] ที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 13 และ 45 nm พบว่า Cytoskeletal filament ของเซลล์ถูกทำลายไป และเมื่อศึกษาด้วยวิธี Western blot พบว่ามีระดับของ Extracellular matrix protein, Collagen และ Fibronectin ลดลง จนทำให้เซลล์มีการหดตัวของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ลดลง ในขณะที่ระดับโปรตีนของ Actin และ Beta-tubulin ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เข้าไปในเซลล์อาจจะถูกเก็บอยู่ในถุง Vacuoles และรอการกำจัดออกจากเซลล์ รายงานการวิจัยที่สอดคล้องของ Nicole และคณะ (2011)^[20] พบว่าอนุภาคทองคำรวมกลุ่มกันอยู่ใน Vacuoles ขนาดใหญ่ ภายหลังจากได้รับอนุภาคทองคำที่เวลา 48 ชั่วโมง

งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาดเล็ก (<20 nm) ในเซลล์ HepG2 พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยเซลล์ที่ศึกษาพบการหดตัวลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวมา

5.2 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 (Cell viability)

ความอยู่รอดของเซลล์ที่ลดลงอาจเกิดจากความเสียหายในเซลล์ซึ่งความเป็นพิษที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรและอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์มีจำนวนลดลง ผลการศึกษาเพื่อหาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการมีชีวิตของเซลล์ HepG2 ที่ 24 ชั่วโมงพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลงเหลือ 79 ± 10.03 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ และที่ความเข้มข้น $40 \mu\text{g/ml}$ พบความอยู่รอดของเซลล์เหลือ 45 ± 2.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับที่เวลา 48 ชั่วโมงอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรทำให้เซลล์มีการอยู่รอดลดลงเหลือ 61 ± 7.19 และ 31 ± 3.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ที่ความเชื่อมั่น 95 % ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ขึ้นกับ (1) ระยะเวลาที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (2) ปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับ รวมทั้ง (3) ขนาดและ (4) รูปร่างของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้

งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อความอยู่รอดของเซลล์ดังนี้ (1) อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ถูกสังเคราะห์ด้วย sodium citrate ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์และช่วยทำให้อนุภาคทองคำเกิดความเสถียรและคงรูปร่างในระดับนาโนเมตร จึงทำให้ประจุของอนุภาคที่สังเคราะห์มีประจุเป็นลบ (2) รูปร่างกลมของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (3) ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาดประมาณ 20 nm (4) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองคือ 24 และ 48 ชั่วโมง และ (5) ความเข้มข้นที่ทดลองมีค่า 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ จากการทดลองนี้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ศึกษาก่อให้เกิดความเป็นพิษขึ้นในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีข้างต้น อาจมีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในการทดลองนี้ทำการสังเคราะห์ด้วยสาร Sodium citrate ซึ่งทำให้อนุภาคเป็นประจุลบ อาจส่งผลต่อความเป็นพิษภายในเซลล์น้อยกว่าประจุบวก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Connor และคณะ (2005)^[53] พบว่าอนุภาคทองคำที่ทำการสังเคราะห์ด้วยสาร Sodium citrate ไม่ได้มีผลในการทำให้เซลล์เกิดความเป็นพิษ ซึ่งประจุลบรอบผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนั้นไม่ได้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์เมื่อเทียบกับประจุที่ผิวเป็นบวก^[54]

รูปร่างของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ต่างกันอาจส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ งานวิจัยที่ศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chithrani และคณะ (2006)^[21] พบว่ารูปร่างของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีลักษณะกลมเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีลักษณะเป็นวงรี (Rod shape) เนื่องจากการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะอาศัยกลไกเข้าสู่เซลล์แบบ endocytosis แบบที่มีตัวรับจำเพาะ ซึ่งข้อจำกัดของการขนส่งแบบนี้คือ ขนาดของอนุภาค ค่าประมาณขนาดในการขนส่งอยู่

ที่ขนาดไม่เกิน 100 nm หากอนุภาคมีขนาดใหญ่กว่า 100 nm อนุภาคอาจเข้าสู่เซลล์ด้วยกลไกอื่น อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรแบบวงรี(Rod shape) มีขนาดในแนวระนาบมากกว่า 100 nm ทำให้ การเข้าสู่เซลล์และจับกับตัวรับที่จำเพาะได้ไม่ดี จึงมีการนำเข้าสู่เซลล์ช้ากว่าแบบกลมที่มีขนาดเล็ก กว่า การเข้าสู่เซลล์ที่ดีกว่าในปริมาณมากกว่าเนื่องจากรูปร่างของอนุภาคที่ใช้ในงานนี้นั้นอาจจะมีผล ต่อความเป็นพิษภายในเซลล์

การเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ไม่ได้ขึ้นกับรูปร่างของอนุภาคเพียง อย่างเดียวแต่อาจขึ้นกับขนาดของอนุภาคด้วย งานวิจัยที่สอดคล้อง Pan และคณะ (2007)^[50] กล่าวว่าขนาดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 0.8-15 nm มีผลต่อความเป็นพิษ มากกว่าขนาดอื่น เนื่องจากขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าขนาดใหญ่ เพราะมีการจับกับตัวรับที่จำเพาะ ได้ดีกว่าและอนุภาคอาจจะไปทำลายออร์แกเนลล์ที่สำคัญต่างๆภายในเซลล์ และจากงานวิจัยของ Pan และคณะ (2009)^[55] พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 1.4 nm มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษขึ้น ภายในเซลล์ และยังไปมีผลในการทำลายไมโทคอนเดรียให้เสียหายอีกด้วย ซึ่งงานวิจัยนี้ศึกษาอนุภาค ทองคำระดับนาโนเมตรขนาดเล็ก (<20 nm) รูปร่างอนุภาคกลม จึงน่าจะมีสาเหตุทำให้เกิดความเป็น พิษภายในเซลล์

นอกจากนั้นระยะเวลาที่ทำการทดลองและความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ ใช้ อาจมีผลต่อความเป็นพิษภายในเซลล์ เนื่องจากระยะเวลาที่นานในการทดลองอาจจะทำให้ความ เป็นพิษยิ่งสูงขึ้นภายในเซลล์ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองศึกษาความเป็นพิษภายในเซลล์จากอนุภาค ทองคำระดับนาโนเมตร งานวิจัยก่อนหน้านี้ทำการศึกษาที่ 24, 48 ชั่วโมง จากงานวิจัยของ Sabella และคณะ (2011)^[56] และ Paino และคณะ (2012)^[57] รวมถึงมีการศึกษาด้วยระยะเวลาที่นานขึ้นใน งานของ Kamnerdsin และคณะ (2009)^[58] ทดสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรด้วยวิธี MTT พบว่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ลดลงหลังได้รับอนุภาคทองคำ ระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 3 วัน ในเซลล์ HeLa ความเข้มข้นของอนุภาคที่ใช้ อาจจะมีผลต่อความเป็น พิษภายในเซลล์ งานวิจัยชิ้นนี้พบว่าความเข้มข้นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้เกิดความเป็น พิษต่อเซลล์มากกว่า 20 µg/ml แสดงให้เห็นว่าของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในเซลล์ HepG2 มี ความเป็นพิษสูงแม้ได้รับความเข้มข้นต่ำ

จากงานวิจัยที่สอดคล้องกับของ Pan และคณะ (2007)^[50] พบว่าเมื่อใส่สารอนุภาคทองคำ ระดับนาโนเมตรแล้วเกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 225 µg/ml ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง และงานวิจัยของ Patra และคณะ (2007)^[39] พบว่าเซลล์ต่างชนิดกันอาจตอบสนองต่อความเป็นพิษในเซลล์จากอนุภาคทองคำระดับนา โนเมตรที่ไม่เท่ากัน

โดยสรุปของการทดลองนี้ความเป็นพิษภายในเซลล์ HepG2 ที่เกิดขึ้นจากผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรอาจเกิดจากผลของอนุภาคที่มีรูปร่างกลมและมีขนาดเล็ก (<20 nm) รวมถึงความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีค่ามากกว่า 20 µg/ml และระยะเวลาที่ใช้มากกว่า 24 ชั่วโมง

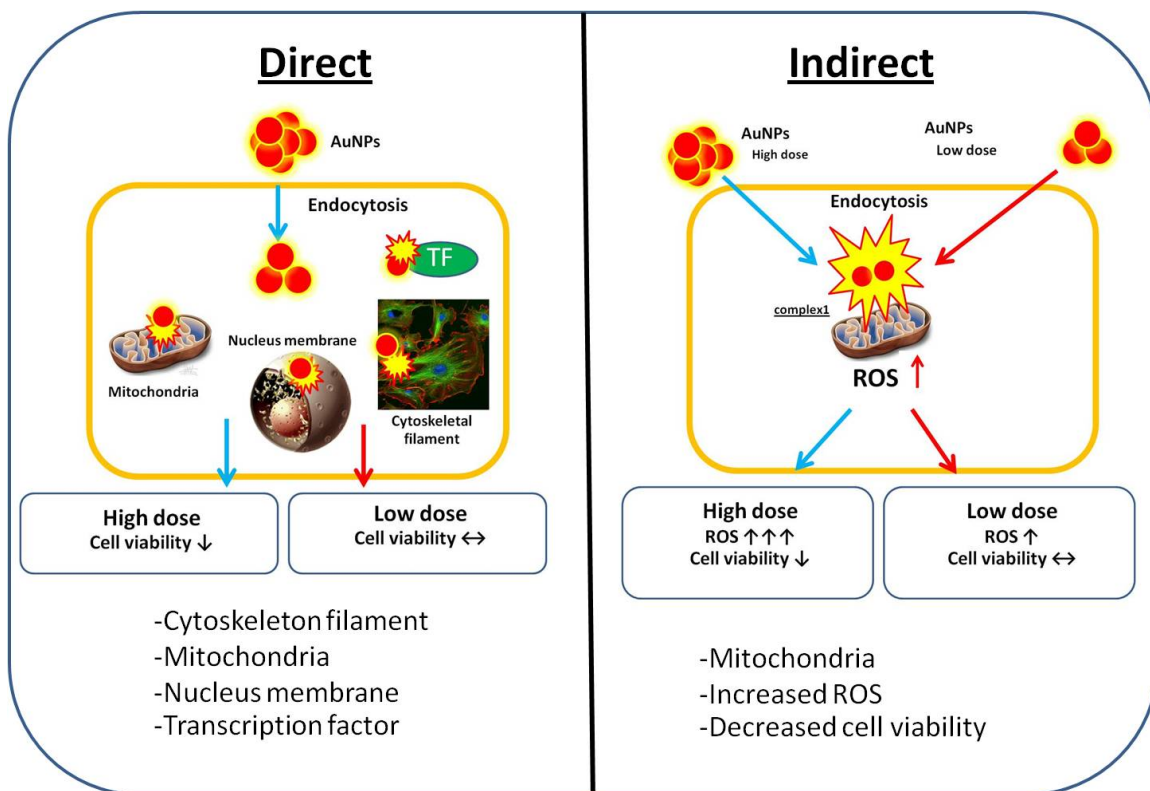
5.3 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 (ROS generation)

ความเป็นพิษที่เกิดขึ้นมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นนั้นอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ โดยที่ผลจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เข้าสู่เซลล์ อาจมีผลก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรงหรือมีผลต่อตัวควบคุมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ทำให้อนุมูลอิสระสูงขึ้นและอาจไปมีผลความเป็นพิษภายในเซลล์

จากผลทดลองพบว่าเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ทำให้เปอร์เซ็นต์ของการเกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้นในเซลล์ HepG2 เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมที่ไม่ใส่สารใดๆเลย อนุภาคทองคำที่มีปริมาณความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ มีผลในการเกิดอนุมูลอิสระในเปอร์เซ็นต์ที่สูงขึ้นโดยลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ มีปริมาณการเกิดอนุมูลอิสระเปอร์เซ็นต์ที่สูงที่สุด

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ Paino และคณะ (2012)^[57] แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HeLa สูงขึ้นและมีรายงานการวิจัยของ Pan และคณะ (2009)^[50] พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้นและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้เกิดความเสียหายในไมโทคอนเดรียอีกด้วย แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียหรืออาจมีผลต่อโปรตีนที่ควบคุมเกี่ยวกับอนุมูลอิสระในเซลล์ มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Li และคณะ (2011)^[17] ทดลองใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ด้วย Na-citrate ขนาด 20 nm ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของปอด พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการเพิ่มขึ้นโปรตีน NDUFS1 ที่ควบคุมเอนไซม์ NADH dehydrogenase ภายในเยื่อผนังไมโทคอนเดรียหรือเรียกว่าโปรตีน complex1 ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมสมดุล superoxide O_2^- กับการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ งานวิจัยของ Thakor และคณะ (2011)^[59] พบการเกิดปริมาณของอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาด 60 nm ในเซลล์ HeLa และ HepG2 ผลของอนุมูลอิสระอาจมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์หรือเป็นสาเหตุทำให้เซลล์หรือสารชีวโมเลกุลต่างๆเกิดความเสียหายได้

จากทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นอาจอธิบายความเป็นไปได้ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ดังนี้



รูปที่ 5.1 แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ HepG2

1. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อเข้าสู่เซลล์มีผลโดยตรงต่อออร์แกเนลล์ที่สำคัญภายในเซลล์ จึงส่งผลให้ความเป็นพิษภายในเซลล์สูงขึ้น และเซลล์ลดจำนวนลงในที่สุด

2. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อเข้าสู่เซลล์มีผลโดยอ้อมต่อทำให้เพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระสูงขึ้น และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีผลต่อความเป็นพิษภายในเซลล์และเซลล์ลดจำนวนลง

สรุปจากผลงานวิจัยนี้พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปร่างกลมขนาดเล็ก (<20 nm) ที่ความเข้มข้น 20, 40 µg/ml มีผลต่อความเป็นพิษภายในเซลล์ โดยพบการเกิดอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น และรูปร่างของเซลล์มีการหดตัวลงผลดังกล่าวขึ้นกับเวลาและปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เซลล์ได้รับ

5.4 บทบาทการทำงานของโปรตีน AKT ที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์

จากการศึกษาของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้นภายในเซลล์ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาผลของกลไกสัญญาณภายในเซลล์ HepG2 ว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือไม่หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยที่กลไกสัญญาณที่สนใจคือ กลไกการทำงานของโปรตีน AKT ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญภายในเซลล์ตัวหนึ่ง

จากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2011)^[3] โปรตีน AKT มีความสำคัญในการรักษาความอยู่รอดของเซลล์ โดยควบคุมผ่านทางกลไกต่อต้านการตายแบบ apoptosis การทำงานที่เกิดขึ้นของโปรตีน AKT ผ่านทางการควบคุมด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ถ้าหากโปรตีน AKT มีการทำงานเพิ่มขึ้นหรือลดลงอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการอยู่รอดของเซลล์

จากการศึกษาของ Nogueira และคณะ ในปี 2008^[4] กล่าวว่ากลไกสัญญาณ AKT มีผลต่อการควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระและความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ซึ่งการควบคุมดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ การทำงานที่มากขึ้นของโปรตีน AKT มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่สูงขึ้นจึงส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้น ผลดังกล่าวทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายขึ้น แต่เซลล์ปกติไม่เกิดการตาย ในทางกลับกันถ้าหากโปรตีน AKT ลดการทำงานลง จะไม่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระลดลง ซึ่งเป็นกลไกที่เซลล์ตอบสนองต่อความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดังแสดงแล้วในรูปที่ 2.1

งานวิจัยนี้จึงมีสมมติฐานว่า อนุมูลอิสระที่ถูกสร้างภายในเซลล์ HepG2 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT

5.5 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT ภายในเซลล์ HepG2

ในการทดลองนี้ศึกษาโปรตีน Phosphorelated AKT (p-AKT) ในเซลล์ภายหลังได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (<20 nm) ตามความเข้มข้นต่างๆ โดยมีฮอร์โมนอินซูลินเป็นตัวกระตุ้นการเกิดโปรตีน p-AKT พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โปรตีน p-AKT มีการแสดงออกลดลงที่ความเข้มข้น 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ อย่างมีค่านัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่โปรตีน Non-Phospho AKT (AKT) ไม่พบการเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลไปลดการทำงานของโปรตีน AKT ลง ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานของงานวิจัยชิ้นนี้

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับ AKT Ma และคณะ (2010)^[22] ที่ทำการศึกษาในเซลล์ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู พบว่า lipopolysaccharide (LPS) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน p-AKT แต่เมื่อใส่ร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน p-AKT ให้ลดลง อีกทั้งจากงานวิจัยของ Comfort และคณะ (2010)^[60] พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 10 nm มีผลไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน p-AKT, p-ERK และลดการทำงานของโปรตีน AKT ในเซลล์ A-431 อย่างไรก็ตามก็มีการรายงานของ Wang และคณะ (2011)^[61] ที่กล่าวว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลเพิ่มการทำงานของโปรตีน AKT โดยทีมผู้วิจัยนี้ทำการทดลองใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในสัตว์ทดลองที่เป็นตัวอ่อนแมลงหิวพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลเกี่ยวข้องกับกลไกสัญญาณ PI3K/AKT ภายในเซลล์ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นจากการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรแบบ endocytosis และเกิดการกระตุ้นที่บริเวณเซลล์ไมโทคอนเดรียซึ่งมีผลต่อกลไกสัญญาณ PI3K/AKT ที่บริเวณนั้น ดังนั้นผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน AKT จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ที่ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีน AKT

อย่างไรก็ตามงานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาด (<20 nm) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์ HepG2 พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลไปลดการทำงานของโปรตีน AKT ลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.6 บทบาทการทำงานของโปรตีน FOXO3a เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรภายในเซลล์ HepG2

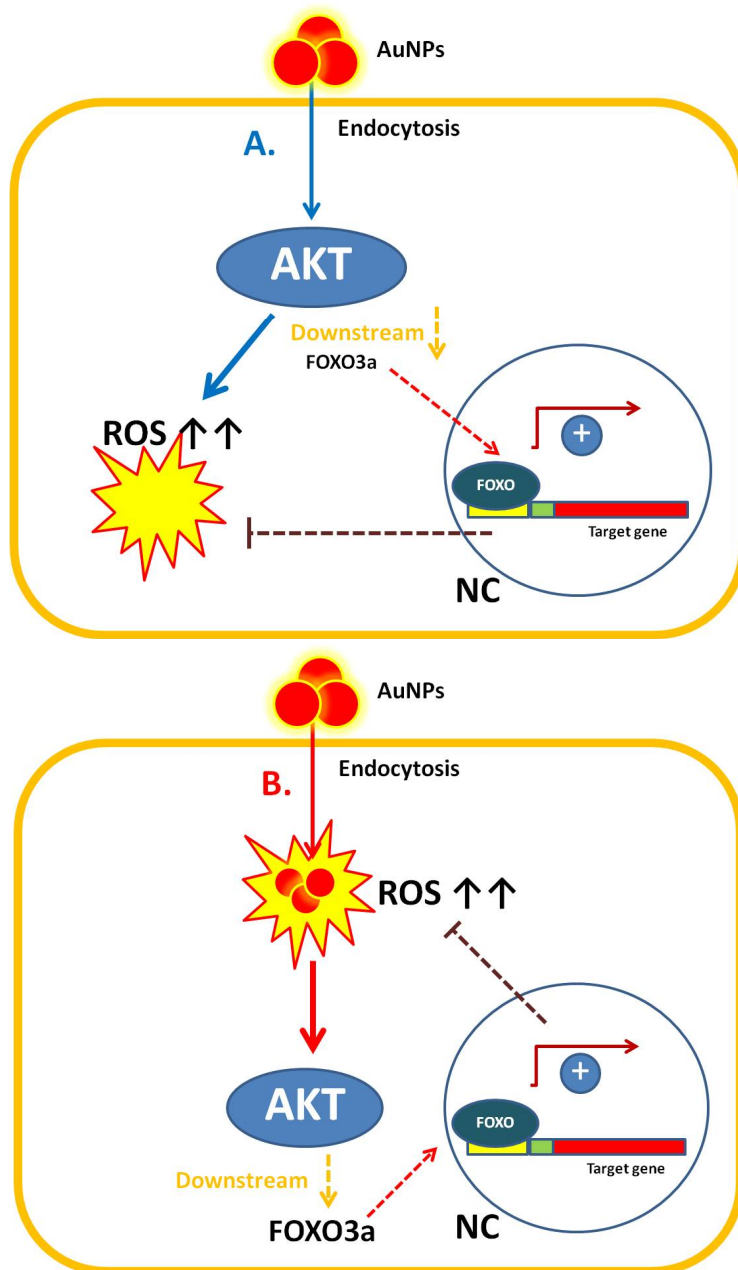
ผลการทดลองของงานวิจัยนี้พบว่าอาจเป็นไปได้ที่ผลของอนุมูลอิสระน่าจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT กลไกสัญญาณ AKT มีผลต่อการควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระและความอยู่รอดภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งการควบคุมดังกล่าวมีผลต่อโปรตีน FOXO การทำงานที่มากขึ้นของโปรตีน AKT มีผลลดการทำงานของโปรตีน FOXO ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ ผลดังกล่าวทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายขึ้น แต่ในทางกลับกันถ้าหากโปรตีน AKT ลดการทำงานของ ส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน FOXO ทำให้โปรตีน FOXO เข้าไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆภายในนิวเคลียส เพื่อต่อต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

โปรตีนกลุ่ม Fork head พบได้ในทุกเซลล์ของยูคาริโอต เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและควบคุมกระบวนการหลายๆ กลไกที่สำคัญภายในเซลล์ โดยมีตำแหน่งที่จับกับดีเอ็นเอที่จำเพาะ (conserved DNA-binding domains) เรียกตำแหน่งนั้นว่า "Forkhead box (FOX)" [5] มีโปรตีนในกลุ่มนี้ทั้งหมด 39 โปรตีน ซึ่งสามารถแบ่งได้ 19 กลุ่ม เช่น FOXA, FOXS, FOXO เป็นต้น [6] ในกลุ่มของ FOXO เป็นกลุ่มที่ผู้วิจัยสนใจ ซึ่งแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ดังนี้ FOXO1, FOXO3, FOXO4 และ FOXO6 โปรตีน FOXO แต่ละกลุ่มมีความสำคัญในมนุษย์ ตัวอย่างเช่น FOXO มีผลทำให้เกิดการพัฒนาของเนื้องอกขึ้น แล้วยังมีผลควบคุมการทำงานของระบบเมตาบอลิซึมต่างๆ ที่สำคัญภายในเซลล์ รวมถึงการดูแลซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย [7,8,9] เป็นต้น

การทำงานของโปรตีน FOXO3a เป็นโปรตีนที่ทำงานภายในเซลล์เป็นลำดับถัดจากโปรตีน AKT ถ้าหากโปรตีน AKT ลดการทำงานของ อาจส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน FOXO3a

จากผลการศึกษาของโปรตีน FOXO3a และโปรตีน p-FOXO3a ที่ทำการใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด (<20 nm) ตามความเข้มข้นต่างๆ ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 5, 10, 20, 40 µg/ml พบว่าโปรตีน FOXO3a และโปรตีน p-FOXO3a ไม่พบการเปลี่ยนแปลง ซึ่งไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ที่ความเชื่อมั่น 95 %

ผลการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าระยะเวลาในการศึกษายังไม่เพียงพอในการสังเกตผลอาจจะต้องเพิ่มเวลาในการศึกษาหรืออาจจะเกิดจากแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาของโปรตีน FOXO3a ในรูปแบบ (phosphorylation) ยังไม่ควบคุมทุกตำแหน่งที่เกิด (phosphorylation) จึงส่งผลให้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น



รูปที่ 5.2 แสดงผลของกลไกความเป็นไปได้ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อกลไกสัญญาณภายในเซลล์ HepG2 ผ่านทางกลไก AKT/FOXO3a

โดยสรุปการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อกลไกสัญญาณ AKT/FOXO3a ภายในเซลล์ HepG2 อาจมีผลที่เป็นไปได้ด้วยกลไกดังนี้

1. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อเข้าสู่เซลล์มีผลต่อการทำงานของโปรตีน AKT ซึ่งทำให้โปรตีน AKT ลดการทำงานลง เพื่อไปตอบสนองต่ออนุมูลอิสระที่สูงขึ้นภายในเซลล์

2. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อเข้าสู่เซลล์มีผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระสูงขึ้น จึงส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน AKT เพื่อที่จะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน FOXO3a เพื่อให้เซลล์มะเร็งเกิดความอยู่รอดได้

5.7 สรุปผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาดเล็ก (<20 nm) เมื่อเข้าสู่เซลล์มีผลทำให้การคงรูปร่างของเซลล์ถูกทำลายไปจึงมีผลทำให้เซลล์มีรูปร่างที่หดตัวลง และยังทำให้ลดความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 โดยความพิษต่อเซลล์ที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นและเวลาที่เซลล์ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร อีกทั้งความเป็นพิษมีสาเหตุมาจากที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้อนุมูลอิสระสูงขึ้น ต่อมางานวิจัยนี้ได้ศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาดเล็ก (<20 nm) ต่อสัญญาณภายในเซลล์ HepG2 ผ่านกลไกของโปรตีน AKT/FOXO3a ที่ควบคุมอนุมูลอิสระและความอยู่รอดของเซลล์ พบว่าโปรตีน AKT ลดการทำงานลง และไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่โปรตีน FOXO3a ซึ่งกลไกดังกล่าวอาจเป็นกลไกในการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์เพื่อให้เกิดความอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

5.8 ข้อจำกัดของงานวิจัย

5.8.1 การศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาผลของการยับยั้งไม่ให้เกิดอนุมูลอิสระต่อการทำงานของโปรตีน AKT

5.8.2 การศึกษาความเป็นพิษภายในเซลล์จากผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรยังไม่ได้ศึกษารูปแบบการตายของเซลล์

5.8.3 งานวิจัยนี้ยังไม่ได้ศึกษาการทำงานของไมโทคอนเดรียหลังได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

5.8.4 งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาการตอบสนองของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในระยะสั้น ซึ่งในการทดลองครั้งต่อไปควรจะมีระยะเวลาในการทดสอบเพื่อดูผลในระยะยาว

5.8.5 งานวิจัยนี้ใช้แอนติบอดีในการศึกษาการทำงานของโปรตีน FOXO3a ยังไม่ครอบคลุมทุกตำแหน่ง ซึ่งการทดลองต่อไปควรจะมีแอนติบอดีให้ครอบคลุมทุกตำแหน่งหรืออาจจะเปลี่ยนเทคนิคในการศึกษา

5.9 แนวทางการศึกษาต่อในอนาคต

5.9.1 ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

5.9.2 ศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระ

5.9.2.1 ศึกษาปัจจัยภายในของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่แตกต่าง รูปร่างของอนุภาคที่แตกต่างกัน เป็นต้น

5.9.2.2 ศึกษาปัจจัยภายนอกของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เช่น ปริมาณที่ได้รับ ระยะเวลาที่ได้รับ เซลล์ที่แตกต่างกัน

5.9.3 ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระยะนาโนเมตรเป็นระยะเวลานาน

5.9.4 ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการทำงานของโปรตีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน AKT

5.9.5 ศึกษาผลของการยับยั้งไม่ให้เกิดอนุมูลอิสระต่อการทำงานของโปรตีน AKT

รายการอ้างอิง

1. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. Annual Rev Med. 54 (2003):131-152.
2. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev. 126(2005):913-922.
3. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. Biochim Biophys Acta. (11)(2011):1978-86.
4. Dolado I, Nebreda AR. AKT and Oxidative Stress Team Up to Kill Cancer Cells. Cancer Cell. 14(2008):427-429.
5. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. Genes Dev. 15(2000):142-146.
6. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. Trends Genet. 19(2003):339-344.
7. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. Nat Genet. 5(1993):230-235.
8. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Cancer Res. 54(1994):2869-2872.
9. Parry P, Wei Y, Evans G. Genes Chromosomes Cancer. 11(1994):79-84.
10. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden K.C. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. Genomics. 47(1998):187-199.
11. Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. Biochem. 349(2000):629-634.
12. Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP. Journal Biol. Chem. 278(2003):35959-35967.
13. Brunet A, Greer EL. FOXO transcription factors at the interface between longevity.

- and tumor suppression. Oncogene. 24(2005):7410–7425.
14. Zhou J, Ralston J, Sedev R, David A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. Journal of Colloid and Interface Science. 331(2009): 251– 62.
 15. Baptista P, Pereira E, Eaton P, Doria G, Miranda A, Gomes I, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 391(3)(2008):943-50.
 16. Taylor BW. Colloidal Gold as an Anti-Aging Skin Care Product [Online]. (n.d.). Available from: <http://ezinearticles.com/?Colloidal-Gold-as-an-Anti-Aging-Skin-Care-Product&id=900743> [2011, April 3]
 17. Li JJ, Lo S-L, Ng C-T, Gurung RL, Hartono D, Hande MP, et al. Genomic instability of gold nanoparticle treated human lung fibroblast cells. Biomaterials. 32(2011):5515-5523.
 18. Li JJ, Hartono D, Ong C-N, Bay B-H, Yung L-YL. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. Biomaterials. 31(2010):5596-6003.
 19. Simon U and Jahnen-Dechent W. Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. Small. 5(18)(2009):2067–2076.
 20. Nicole M, Schaeublin A, Laura K, Braydich-Stolle A, Amanda M, Schrand A, John M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. Nanoscale. 3(2011):410
 21. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. Nano Lett. 6(2006):662–668.
 22. Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. Nitric Oxide. 23(2010):214–219.
 23. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. Journal of Cell Science. 120(2007):2479–2487.

24. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. Cancer Cell. 8(2005):179-183.
25. Puig O, Marr MT, Ruhf ML, Tjian R. Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. Genes & Development. 17(2003):2006-2020.
26. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. Cell Metabolism. 8(2008):224-236.
27. Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. EMBO. 23(2004):4802-4812
28. Matsumoto M, Accili D. All roads lead to FoxO. Cell Metabolism. 1(2005):215-216.
29. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, Dibacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, et al. A conserved MSTFOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. Cell. 125(2006):987-1001.
30. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Science. 296(2002):1655-1657.
31. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. Cell. 96(1999):857-868.
32. Daniel JH, Lee ME. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. Journal of clinical oncology. 5(2005):1011-1027.
33. Dvorak AM, Senger DR, Galli SJ. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science. 219(1983):983-985.
34. Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. Nature Genetic. 21(1999):187-190.
35. ASTM E. Terminology for Nanotechnology. ASTM International. (2006):2456-06.

36. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Journal Nanobiotechnology. 30(2004):3.
37. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. Biochimica et Biophysica Acta. 1810(3)(2010):361-73.
38. Koide T, Kojima T, Kamei H. Antitumor effect of gold as revealed by growth suppression of cultured cancer cells. Cancer Biother Radiopharm. 13(3)(1998):189-92.
39. Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P, Dasgupta AK. Cell selective response to gold nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 3(2)(2007):111-9.
40. Bhattacharya R, Mukherjee P, Xiong Z, Atala A, Soker S, and Mukhopadhyay D. Gold Nanoparticles Inhibit VEGF165-Induced Proliferation of HUVEC Cells. Nano Letter. 4(2004):12.
41. Kalimuthu K, Sardarpasha S, Selvaraj B, et al. Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. Angiogenesis. 14(2011):29-45.
42. Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Hong SH, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38- caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun. 386(2009):682-687.
43. Lao F, Chen L, Li W, Ge C, Qu Y, Sun Q, Zhao Y, Han D, Chen C. Fullerene nanoparticles selectively enter oxidation-damaged cerebral microvessel endothelial cells and inhibit JNK-related apoptosis. ACS Nano. 3(2009):3358-3368.
44. Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, Mikecz AV, Grether-Beck S, Schins R.P.F. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. Nanotoxicology. 1(2007):52-71.
45. Kato M, Yuan H, Xu ZG, Lanting L, et al. Role of the Akt/FoxO3a Pathway in TGF-1 Mediated Mesangial Cell Dysfunction: A Novel Mechanism Related to Diabetic

- Kidney Disease. Journal of the American Society of Nephrology. 17(2006):3325-3335.
46. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. Cell. 117(2004):399-412.
 47. Conner, s. D. & schmid, s. L. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 422(2003):37-44.
 48. Garcia-Regalado, A. et al. G protein-coupled receptorpromoted trafficking of G β 1 γ 2 leads to AKT activation at endosomes via a mechanism mediated by G β 1 γ 2-Rab11a interaction. Molecular Biology Cell. 19(2008):4188-4200.
 49. Varsano, T. *et al.* GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. Molecular Biology Cell. **26**(2006):8942-8952.
 50. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahn-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. Small. 3(11)(2007):1941-1949.
 51. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Biochem Journal. 377(2004):159-169.
 52. Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V, Rafailovich MH. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology. 4(1)(2010):120-37.
 53. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. Small. 1(2005): 325-327.
 54. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. Bioconjugate Chem. 15(4) (2004):897-900.

55. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahn-Dechent W. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm Trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. Small. 5(2009):2067-2076 .
56. Sabella S, Brunetti V, Vecchio G, Galeone A, Maiorano G, Cingolani R, et al. Toxicity of citrate-capped AuNPs: an in vitro and in vivo assessment. Journal of Nanoparticle Research. 13(12)(2011):6821-35.
57. Paino IMM, Marangoni VS, de Oliveira RdCS, Antunes LMG, Zucolotto V. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. Toxicology Letters. 215(2012):119- 125.
58. Kamnerdsin O, Korkiatsakul V, Rakphetmanee K, Rojanathanes R, Chirathaworn C, Sereemaspun A. Influence of Gold Nanoparticles on Intracellular Organelles and Cell Viability in Hela Cells. Drug Metabolism Reviews. 41(2009):95-6.
59. Thakor AS, Paulmurugan R, Kempen P, Zavaleta C, Sinclair R, Massoud TF, et al. Oxidative Stress Mediates the Effects of Raman-Active Gold Nanoparticles in Human Cells. Small. 7(1)(2011):126-36.
60. Comfort KK, Maurer EL, Braydich-Stolle LK, et al. Interference of Silver, Gold, and Iron Oxide Nanoparticles on Epidermal Growth Factor Signal Transduction in Epithelial Cells. American Chemical Society. 5(12)(2011):10000-8.
61. Wang B, Chen N, Wei Y, et al. Akt signaling-associated metabolic effects of dietary gold nanoparticles in *Drosophila*. Scientific reports. 2(2012):563.

ภาคผนวก

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AuNPs	Gold Nanoparticles
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMC	Extracellular Matrix
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Real-time RT-PCR	<i>Real-time Reverse transcription</i> polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
H2DCFDA	2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate
H2DCF	non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein
PBS	Phosphate buffered saline
TEM	Transmission electron microscopy
HepG2	Human hepatocellular liver carcinoma cell
FOXO3	Forkhead box O3
p-FOXO3	phospho Forkhead box O3
VEGF	vascular endothelial growth factor
JNK	c-Jun N-terminal kinases
p-JNK	phospho c-Jun N-terminal kinases
AKT	Protein Kinase B
p-AKT	phospho Protein Kinase B

ขั้นตอนในการทำการสกัดโปรตีน

1. ดูด media ออกจาก culture plate จนหมดหลังจากนั้นทำการล้างด้วย PBS แบบเป็นจัด 2 รอบ
2. ทำการใส่ RIPA buffer (protease inhibitor +EDTA 50 mM) ปริมาตรประมาณ 200-300 ul.
3. ทำการขูดเซลล์โดยใช้ scaper หลังจากนั้นทำการเก็บโปรตีนที่ได้
- 4.ปั่นตกโปรตีนที่ 12000 rpm ใช้เวลาประมาณ 15 นาที
- 5.นำไป sonicate 1 ครั้ง ด้วยเครื่อง sonicator ที่ 32% Amplitude * ขณะ sonicate ควรนำ sample ใส่กระบอกน้ำแข็งไว้ระวังเรื่องความร้อน*
- 6.เก็บส่วนของเหลวมาใช้ในการศึกษาต่อไปโดยทำการเก็บที่ -80 °C

ขั้นตอนในการทำ western blot

1. -เช็ดโต๊ะที่ใช้ในการเตรียม gel ด้วย 70% Alcohol ทุกครั้งก่อนทำ lab เช็ดอุปกรณ์ เครื่องมือทุกอย่างให้เรียบร้อย
 - วัดระดับของ separating gel แล้ว mark levelไว้
 - เตรียม running gel (โดยยังไม่ใส่ Ammonium Persulfate และ TEMED) แล้ว mix
 - เมื่อ set เครื่องมือเรียบร้อยแล้วจึงค่อยใส่ 10% Ammonium Persulfate และ TEMED แล้ว mix
 - ดูด running gel solution ลงใน cassette จนถึงระดับที่ mark ไว้ ** ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ **
 - จากนั้นรีบ overlay gel ด้วยน้ำโดยใช้ปลาย tip ตะบองนกระจกแผ่นใหญ่
 - รอให้ gel แข็งประมาณ 30 นาที (ดูจาก running gel ที่เหลือใน tube ว่าแข็งหรือยัง)
 - เตรียม stacking gel (โดยยังไม่ใส่ Ammonium Persulfate และ TEMED) แล้ว mix
 - เทน้ำที่ overlay อยู่ออกให้หมด แล้วซับให้แห้ง จากนั้นจึงค่อยใส่ 10% Ammonium Persulfate และ TEMED แล้ว mix
 - รีบใส่ stacking gel solution ลงใน cassette ตามด้วยการใส่ teflon comb ลงใน cassette อย่างค่อยๆ ** ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ **
 - ทิ้งให้ gel แข็งตัวประมาณ 30 นาที (ดูจาก stacking gel ที่เหลือใน tube ว่าแข็งหรือยัง)
 - ระหว่างที่รอ gel แข็งตัว ให้อุ่น sample โดยใช้เครื่อง Heat Block ที่ 95°C 5 นาที และนำไป spin down เพื่อให้ฟองใน sample หายไป
 - นำ gel cassette ไปติดตั้งยัง electrode chamber ให้เรียบร้อย
 - ใส่ SDS-PAGE running buffer ลงใน chamber ทั้ง upper (ให้ล้น) และ lower chamber จนถึงระดับ 2 gels
 - จากนั้นค่อยๆดึง teflon comb ออกจาก cassette แล้ว
 - ทำการ load protein marker ~ 5-6 µl

- ทำการ load sample (ที่ผสม dye เรียบร้อยแล้ว) 20-30 μ l
- เปิด power supply โดย set constant voltage ไว้ที่ 100 volt, time ~ 120 นาที
- สังเกตสีของ dye ถ้าใกล้ถึงขอบ gel ให้ปิดเครื่อง แล้วค่อยๆแกะ gel ออกจาก cassette
- นำ gel ที่ได้ส่วนหนึ่งมา stain ใน Coomassie Blue และอีกส่วนหนึ่งมา transfer protein สู่ PVDF membrane

การย้อมสี Coomassie Blue

- นำ gel ที่ได้ส่วนหนึ่งมา stain ใน Coomassie Blue stain solution ~24 hr (ใส่ solution ให้ท่วม gel)
- ดูดเอา Coomassie Blue stain solution ออกแล้ว destain gel ด้วย destaining solution I ~ 1 hr
- จากนั้นล้างด้วย destaining solution II 2-3 ครั้ง จนกว่าสี Coomassie Blue จะออกหมด
- สังเกต band ที่เกิดขึ้น

Transfer membrane (wet tank)

หลังจากได้ทำการ run protein ด้วย SDS-PAGE แล้วนำ gel ที่ได้มา transfer protein สู่ PVDF membrane ดังนี้

- Shake PVDF membrane 2-3 นาที ใน 100 % methanol แล้วนำไปแช่ใน 1x transfer buffer แทนทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที
- นำฟองน้ำ 2 อัน, filter paper 6 อัน(ตัดให้มีขนาดเท่ากับ PVDF membrane)มาแช่ไว้ใน 1x transfer buffer ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที
- เท 1x transfer buffer ลงในกระบะใหญ่ แล้วนำ transfer cassette มาวาง เอาด้านสีดำเป็นด้านล่าง (ซ้ายลง)โดยวางฟองน้ำ 1 อัน, filter paper 3 อัน และ gel ตามลำดับ ** ถ้ากลัวมีฟองอากาศให้ใช้แท่งแก้วรูดก่อนวาง gel โดยรูดจากตรงกลางออกไปด้านข้างทั้ง 2 ข้าง
- จากนั้นวาง PVDF membrane ทับ gel ให้พอดีกับ gel และวาง filter paper 3 อัน และฟองน้ำ 1 อัน ตามลำดับ ปิดทับด้วย transfer cassette ด้านสีใส(ซ้ายลง) แช่ไว้ใน 1x transfer buffer
- วาง chamber ลงในกระบะรองที่มีน้ำแข็ง ใส่ transfer unit ลงใน chamber และนำ cool gel pack มาใส่ไว้ที่ด้านข้าง chamber
- นำ transfer cassette มาใส่ใน transfer unit (โดยให้ transfer cassette ด้านสีดำติดกับ transfer unit ด้านสีดำ) และใส่ 1x Transfer buffer ลงใน chamber ให้ถึงระดับ blotting
- เปิด power supply และทำการ run โดย set constant voltage ไว้ที่ 100 volt, time ~180 min เอา น้ำแข็งมาใส่กระบะรองรอบๆ chamber ให้เต็มขณะ run ถ้าน้ำแข็งละลายให้ใช้น้ำที่หกและคอยเติมน้ำแข็งอยู่เรื่อยๆ
- ครบ 180 นาที ให้ปิดเครื่อง นำ transfer cassette มาแช่ในกระบะที่มี 1x transfer buffer อยู่

-เปิด transfer cassette เอา PVDF membrane ออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในกระบะเล็กที่มี 1x TBS buffer

Transfer membrane (semi dry)

-วาง PVDF membrane ทับ gel ให้พอดีกับ gel โดยมีแผ่นกระดาษคอยรองรับอยู่ จากนั้นทำการประกบซ้ำให้เหมือนกันทั้ง 2 ด้าน

-นำไปเข้าเครื่อง semi dry ทำการปิดเครื่อง หลังจากนั้นนำไปต่อกับ power supply ใช้ไฟประมาณ 100 V. เวลาประมาณ 35 นาที

-เสร็จแล้วนำแผ่นเจล Coomassie Blue ต่อไป ส่วนแผ่น PVDF membrane ที่ได้นำไป blocking ด้วยโปรตีน 5% BSA ที่เวลา 1 ชั่วโมงต่อไป

การทำ blocking ด้วย antibody

-overlay membrane ด้วย 1°Ab mouse monoclonal (dilution 1:1000) ใน 5% BSA in TBST (ปริมาตร 10 ml/1 membrane) ที่ 4°C overnight

-วันถัดมาให้ นำ membrane ออกจากตู้เย็นมาทิ้งไว้ที่ room temperature ก่อน แล้ว orbital shake (shake เบาๆ) ที่ room temperature เป็นเวลา 2 hr.

-ดูด 1°Ab เกือบ แล้ว rinse ด้วย TBS และ wash membrane 3 ครั้ง ด้วย TBS ครั้งละ 5 นาที

-overlay membrane ด้วย 2°Ab anti-mouse (dilution 1:5000) ใน 5% BSA (ปริมาตร 10 ml/1 membrane) แล้ว orbital shake (shake เบาๆ) ที่ room temperature เป็นเวลา 2 hr.

-ดูด 2°Ab เกือบ แล้ว rinse ด้วย TBS และ wash membrane 3 ครั้ง ด้วย TBS ครั้งละ 5 นาที

-จากนั้นแช่ membrane ใน TBS แล้วนำไป expose film X-ray

Protocol

-เช็ดโต๊ะที่ใช้ในการเตรียม Expose film X-rays ด้วย 70% alcohol ทุกครั้งก่อนทำ lab

-นำ Chemiluminescent (ECL) kit มาทิ้งไว้ที่ room temperature เตรียม reagent A: reagent B อัตราส่วน 1:1 โดยใช้ pipette ดูด reagent A 300 µl และ reagent B 300 µl (สำหรับ membrane 1 แผ่น) มาใส่ eppendorf และ mix

-ใช้ forcep คีบ PVDF membrane ที่แช่ใน TBS buffer มาวางบน plastic wrap

-ใช้ pipette ขนาด 1000 µl ดูด working reagent มาเทใส่ PVDF membrane**โดยระวังถ้าเทบริเวณ PVDF membrane โดยตรงให้เทเป็นหยดๆ** ห่อ PVDF membrane ด้วย plastic และ incubate ไว้ 5 นาที

-รีด working reagent ออกจาก plastic โดยใช้กระดาษทิชชูซับ

-ใช้ forcep คีบนำ PVDF membrane มาวางลงบน X-rays film cassette และนำแผ่น X-rays film มาประกบทับบน PVDF membrane ปิด X-rays film cassette ใ้เวลานาน 5 นาที *(เวลาขึ้นกับ signal ของสิ่งที่ต้องการ detect)*

-ล้าง X-rays film ด้วย developer -->น้ำ --> fixer --> น้ำ ตามลำดับ แล้วทิ้ง X-rays film ให้แห้ง

การใช้เครื่อง gel doc mode chemiluminescent

-นำ Chemiluminescent (ECL) kit มาทิ้งไว้ที่ room temperature เตรียม reagent A: reagent B อัตราส่วน 1:1 โดยใช้ pipette ดูด reagent A 250 μ l และ reagent B 250 μ l (สำหรับ membrane 1 แผ่น) มาใส่ eppendorf และ mix

-ใช้ forcep คีบ PVDF membrane ที่ช้ใน TBS buffer มาวางบน plastic wrap

-ใช้ pipette ขนาด 1000 μ l ดูด working reagent มาเทใส่ PVDF membrane**โดยระวังถ้าเทบริเวณ PVDF membrane โดยตรงให้เทเป็นหยดๆ** ห่อ PVDF membrane ด้วย plastic และ incubate ไว้ 5 นาที

-รีด working reagent ออกจาก plastic โดยใช้กระดาษทิชชูซับ

-นำเข้าเครื่อง gel doc จากนั้นเข้าสู่โหมด High chemiluminescent ทำการถ่ายรูป

-ทำการเก็บข้อมูลรูปภาพ

Stock Solutions

10x SDS-PAGE running buffer volume 1 liter : [250 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine, 1% SDS)

- Tris-HCl (MW 121.14) 30.28 g --> final conc. 25 mM
- Glycine (MW 75.07) 144.13 g --> final conc. 192 mM
- Sodium dodecylsulfate (SDS) 10 g --> final conc. 0.1%

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at 4°C

10x Transfer buffer volume 800 ml : [250 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine]

- Tris-base (MW 121.14) 30.28 g
- Glycine (MW 75.07) 144.13 g

Add ddH₂O 800 ml

Store at 4°C

10x Tris-buffer Saline (TBS) volume 1 liter : [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl]

- Tris-HCl (MW 121.14) 121.1 g

Add dH₂O almost ~ 900 ml --> adjust pH to 7.5 by HCl

- NaCl (MW 58.4) 90 g

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

10x TBS buffer volume 1 liter : [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl]

- Tris-HCl (MW 121.14) 60.57 g

- NaCl (MW 58.4) 87.6 g

Add dH₂O almost ~800 ml --> adjust pH to 7.6 by HCl

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at 4°C

10% SDS (w/v) volume 100 ml :

- weight out sodium dodecylsulfate (SDS) 10 g

Add dH₂O up to 100 ml

Store at room temperature

4x Running Gel buffer volume 200 ml : [1.5 M Tris-HCl, pH 8.8]

- Tris-HCl (MW 121.14) 36.3 g

Add dH₂O almost ~ 150 ml - -> adjust pH to 8.8 by HCl

Add dH₂O up to 200 ml

Store at 4°C

4x Stacking Gel buffer volume 50 ml : [0.5 M Tris-HCl, pH 6.8]

- Tris-HCl (MW 121.14) 3 g

Add dH₂O almost ~ 40 ml - -> adjust pH to 6.8 by HCl

Add dH₂O up to 50 ml

Store at 4°C

Coomassie blue staining volume 1 liter : [0.1%(w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 40% methanol, 10% glacial acetic acid]

- Coomassie Brilliant Blue R250 1 g

- Methanol 400 ml

Stirr ~3 hr until dissolved. Then add:

- Glacial acetic acid 100 ml

Add dH₂O up to 1000 ml * filter before store*

Store at room temperature

Destaining solution I volume 1 liter : [40 % methanol, 10 % acetic acid]

- Methanol 400 ml

-Acetic acid 100 ml

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

*ใช้สำหรับกวาด destain ในตอนแรกเพื่อให้สีออกเร็ว มัก destain เพียง 2-3 ครั้งแรก

Destaining solution II volume 1 liter : [10 % Methanol, 5 % Acetic acid]

- Methanol 100 ml

-Acetic acid 50 ml

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

*ใช้สำหรับการ destain ในตอนหลัง สามารถแช่ gel ทั้งใน destain นี้ได้เลยจะทำให้สีค่อยๆ โดนล้าง
ออกแบบ gentle

Working Solutions

Ice-cold Tris buffer (5mM Tris-HCl, pH 7.4 autoclave) volume 500 ml :

-Tris- base (MW 121.14) 0.3 g

Add dH₂O almost ~ 400 ml --> adjust pH to 7.4 by HCl

Add dH₂O up to 500 ml

Store at 4°C

1x buffer M volume 100 ml : [100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.2% Triton x-100, 1x cocktail protease inhibitor]

-Tris- base (MW 121.14) 242 mg (0.242 g)

- NaCl (MW 58.4) 584 mg (0.584 g)

- MgCl₂ 6H₂O (MW 203.3) 40.7 mg (0.040 g)

- EDTA (FW 372.24) 37.2 mg (0.037 g)

Add dH₂O almost ~ 80 ml --> adjust pH to 8 by HCl

-Triton x-100 200 µl --> final conc. 0.2%

Add dH₂O up to 100 ml

Store at 4°C

*100x Protease inhibitor --> final conc. 1x add before use (add 1 µl/1 ml)

****modified buffer M** (แต่เป็น 0.003 % Triton x-100) เตรียมจาก 0.2 % Triton of buffer M โดย add Triton x-100 เพิ่มไป 1 µl/total volume 1 ml

RIPA buffer volume 100 ml : [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Sodium deoxycholate, 1% Triton x-100]

- 0.5 M Tris-HCl (MW 121.14) 10 ml

- 0.5 M NaCl (MW 58.4) 30 ml

- 0.5 M EDTA (FW 372.24) 2 ml

- 0.1 % SDS 0.1 g

- 1% Sodium deoxycholate 1 g

- Triton x-100 1 ml

Store at 4°C

* Protease inhibitor cocktail freshly add before use !!!

4X SDS Protein Sample Buffer (4X Loading dye) volume 10 ml : [240 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% Glycerol, 8% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol]

-1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.4 ml
-100 % Glycerol	4 ml
-SDS	0.8 g
-1% Bromophenol blue	0.4 ml
- β -mercaptoethanol	0.5 ml
Add dH ₂ O	3.1 ml

Stable for week in the refrigerator or for months at -20°C

1x SDS-PAGE running buffer volume 1 liter : [final conc. 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 0.1% SDS]

- 10x SDS-PAGE running buffer	100 ml
Add dH ₂ O up to 1000 ml	

Store at 4°C

1x Transfer buffer volume 1 liter :

- 10x Transfer buffer	80 ml
- 100% methanol	200 ml
-Add dH ₂ O	720 ml

Store at 4°C

5% Skim milk in TBS volume 25 ml :

- Skim milk powder	1.25 g
- TBS	25 ml

**Prepare freshly before use

5% Skim milk in TBS volume 50 ml :

- Skim milk powder	2.5 g
- TBS	50 ml

**Prepare freshly before use

5% BSA in TBST volume 5 ml : (สำหรับ membrane ½ แผ่น)

- *Bovine serum albumin* (BSA) 0.25 g
- TBST 5 ml

**Prepare freshly before use

5% BSA in TBST volume 10 ml : (สำหรับ membrane 1 แผ่น)

- *Bovine serum albumin* (BSA) 0.5 g
- TBST 10 ml

**Prepare freshly before use

Tris-buffer Saline (TBS) volume 1 liter : [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl]

- Tris-HCl (MW 121.14) 12.11 g
- Add dH₂O almost ~ 900 ml - -> adjust pH to 7.5 by HCl
- NaCl (MW 58.4) 9 g

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

TBS with 0.1% Tween-20 (TBST) volume 1 liter :

- TBS 1000 ml
- Tween-20 1 ml

Store at room temperature

Stripping Membrane Solution

volume :	50 ml	1 liter	
-14.3 M β -mercaptoethanol		0.35 ml	6.993 ml
-10% SDS		10 ml	200 ml
-stacking 0.5 M Tris-Cl, pH 6.7		6.25 ml	125 ml
add dH ₂ O to		50 ml	1,000 ml

Developer volume 3.8 liter :

- **Developer** 415 g

Add dH₂O almost ~ 800 ml

Boil at 56°C

Add dH₂O up to 3800 ml

Fixer volume 1 liter :

- Fixer 250 ml

Add dH₂O up to 1000 ml

Reagent Preparation

RIPA buffer volume 100 ml : [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Sodium deoxycholate, 1% Triton x-100]

- 0.5 M Tris-HCl (MW 121.14) 10 ml

- 0.5 M NaCl (MW 58.4) 30 ml

- 0.5 M EDTA (FW 372.24) 2 ml

- 0.1 % SDS 0.1 g

- 1% Sodium deoxycholate 1 g

- Triton x-100 1 ml

0.5 M Tris-HCl pH 7.5 volume 50 ml :

- Tris-HCl 0.3 g

Add dH₂O almost ~ 80 ml - -> adjust pH to 7.5 by HCl

Add dH₂O up to 50 ml

0.5 M NaCl volume 100 ml :

- NaCl 2.92 g

Add dH₂O up to 100 ml

Reagent Preparation

4X SDS Protein Sample Buffer (4X Loading dye) volume 10 ml : [240 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% Glycerol, 8% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol]

-1 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.4 ml

-100 % Glycerol 4 ml

-SDS 0.8 g

-1% Bromophenol blue 0.4 ml

- β-mercaptoethanol 0.5 ml

Add dH₂O 3.1 ml

Stable for week in the refrigerator or for months at -20°C

Stock solutions

1 M Tris-HCl (pH 6.8) volume 100 ml :

-Tris-base (MW 121.14) 12.11 g

Add dH₂O almost ~ 50 ml - -> adjust pH to 6.8 by HCl

Add dH₂O up to 100 ml Store at 4°C

1% Bromophenol blue (w/v) volume 10 ml :

-Bromophenol blue 0.1 g

Add dH₂O up to 10 ml

Stir until dissolved

*Filtration will remove aggregated dye

Store at room temperature

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธีระเดช ชมหวานเกิดวันที่ 11 สิงหาคม 2530 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาอณูพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553