

ผลของการเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจต่อการแสดงออกของยีนในซิโนไวโอไซต์

จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

Effects of Multiple Passage Cultivation on Gene Expression in Synoviocytes from Knee

Osteoarthritis Patients

โสธยา กัลยาณมนตรี (Soraya Kalayanamontri)* รัชนิกร ธรรมโชติ (Rachaneekorn Tammachote)**

บทคัดย่อ

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) เป็นโรคที่พบบ่อยในข้อกระดูก โดยปกติแล้วจะพบในผู้สูงอายุ พบว่ามี การสูญเสียกระดูกอ่อน และมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่เปลี่ยนไปของน้ำไขข้อ โดยภายในน้ำไขข้อมีเซลล์ซิโนไวโอไซต์ (synoviocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์สารจำพวกไฮโดรไลนและเอนไซม์ที่ไปย่อยสลาย กระดูกอ่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจต่อการแสดงออกของยีน จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ซิโนไวโอไซต์หลายแพสเสจ (จากจำนวนผู้ป่วย 18 คน) จากนั้น นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ACAN* *IL6* *FN1* *MMP1* และ *MMP3* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยวิธี Real - time PCR จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซิโนไวโอไซต์หลายแพสเสจทำให้ยีน *ACAN* มีการแสดงออกที่ลดลงในแพสเสจที่ 3 4 5 และแพสเสจที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในยีนอื่น ๆ ที่ทดสอบไม่พบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจ

ABSTRACT

Knee osteoarthritis (OA) is a common disorder of the joints and is usually found in the elderly people. In OA patients, the cartilage and subchondral bone are lost. Synoviocytes are a type of fibroblasts found between the cartilages in synovial membrane of knee joints. They synthesize molecules such as cytokines and enzymes that can degrade cartilage. Therefore, this research aims to study effects of multiple passage cultivation on gene expression. Synoviocytes from OA patients (N = 14) were cultured for multiple passages, then RNA was extracted. Expressions of genes associated with OA pathogenesis *ACAN*, *IL6*, *FN1*, *MMP1* and *MMP3* were detected by real-time PCR. The results showed that multiple passage cultured synoviocytes statistically decrease *ACAN* gene expression in passage 3, 4, 5 and passage 6 while no significant changes were observed in other genes.

คำสำคัญ: เซลล์ซิโนไวโอไซต์ การเลี้ยงเซลล์ การแสดงออกของยีน

Key Words: Synoviocytes, Cell culture, Gene expression

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) เป็นโรคที่พบบ่อยในข้อกระดูก (synovial joint) โดยปกติแล้วจะพบในผู้สูงอายุได้ตั้งแต่ 40 ปี ขึ้นไป จากหลักฐานภาพรังสีพบว่าข้อที่อักเสบมีช่องระหว่างข้อเข่าที่แคบลง มีการสูญเสียกระดูกอ่อนร่วมกับการหนาตัวของเนื้อกระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone) และมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่เปลี่ยนไปของน้ำไขข้อ (synovial fluid) (Petersson, 1996)

น้ำไขข้อจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เป็นตัวอย่างที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ง่ายกว่าการใช้ตัวอย่างจากเยื่อหุ้มข้อ เนื่องจากเยื่อหุ้มข้อที่ได้มาจะปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่นเนื้อเยื่อส่วนบริเวณผิวของกระดูกอ่อนทำให้ต้องแยกเนื้อเยื่ออื่นออกก่อนด้วยการบ่มเอนไซม์ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์ที่ต้องการไปได้ นอกจากนั้นการตัดชิ้นส่วนของเยื่อหุ้มข้อเพื่อใช้ในการศึกษาจะทำให้เกิดอาการบาดเจ็บและเพิ่มความรุนแรงในการอักเสบของบริเวณรอบข้อขึ้นได้ในอนาคต (Stebulis et al., 2005)

จึงได้มีการศึกษาการเลี้ยงเซลล์ซินโอไวโอไซด์จากตัวอย่างของน้ำไขข้อซึ่งจะต้องคัดออกมาระหว่างการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าของผู้ป่วยอยู่แล้วซึ่งได้มีการพิสูจน์แล้วว่าภายในน้ำไขข้อนั้นมีเซลล์ซินโอไวโอไซด์ซึ่งคาดว่าเซลล์ที่พบในน้ำไขข้อนั้นเป็นเซลล์ซินโอไวโอไซด์ที่เกิดจากการแบ่งตัวที่เนื้อเยื่อหุ้มข้อและหลุดออกมาจากชั้นเนื้อเยื่อดังกล่าวทำให้สามารถลดขั้นตอนการบ่มเอนไซม์เพื่อที่จะย่อยเนื้อเยื่อส่วนอื่น ซึ่งจะนำไปสู่การสูญเสียเซลล์ซินโอไวโอไซด์ที่ต้องการศึกษาไปได้และไม่ทำให้ผู้ป่วยบาดเจ็บเพิ่ม โดยพบเซลล์ซินโอไวโอไซด์ในน้ำไขข้อ 2 ชนิด คือ ชนิด A เป็น macrophage – like synoviocytes และ ชนิด B เป็น fibroblast – like synoviocytes (Stebulis et al., 2005) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการอักเสบและทำลายของบริเวณผิวของกระดูกอ่อน(Nair et al., 2012) และเป็นเซลล์ที่สนใจศึกษาในงานวิจัยชิ้นนี้

เซลล์ซินโอไวโอไซด์ (synoviocytes) เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิดหนึ่งที่พบอยู่ระหว่างกระดูกอ่อนในเยื่อหุ้มข้อ เซลล์ซินโอไวโอไซด์ทำหน้าที่ผลิตน้ำไขข้อที่ช่วยในการหล่อลื่นในขณะเคลื่อนไหว งอหรือเหยียดข้อ อีกทั้งยังช่วยในการรองรับและกระจายน้ำหนักของร่างกาย และสังเคราะห์สารจำพวกไซโตไคน์ ที่มีส่วนช่วยเร่งกระบวนการสร้างเอนไซม์ที่ไปย่อยสลายกระดูกอ่อน (Sellam and Berenbaum, 2010) แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเซลล์ซินโอไวโอไซด์ที่มีอัตราการเจริญค่อนข้างช้าและมีจำนวนเซลล์ของตัวอย่างที่ได้รับจากการผ่าตัดน้อย จึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจเพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ซินโอไวโอไซด์จากผู้ป่วย

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีผู้ศึกษาเซลล์ซินโอไวโอไซด์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งในโรคข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) และโรคข้อเข่าเสื่อมซึ่งทั้งสองโรคนี้มีสาเหตุที่แตกต่างกันโดยในโรคข้ออักเสบเป็นโรคที่เกิดจากการที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อต้านและทำลายที่เยื่อหุ้มข้อเข่าตัวเองทำให้เกิดการอักเสบในขณะที่โรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเกิดจากการที่มีการย่อยสลายของกระดูกอ่อนและการสร้างกระดูกอ่อนที่ไม่มีความสมดุลกัน จึงมีการศึกษาในด้านของการแสดงออกของยีน หน้าที่ของเซลล์ และสารที่เซลล์ซินโอไวโอไซด์สังเคราะห์ (Ah Kioon et al., 2010; Uzan et al., 2006; Waldburger et al., 2008) ว่ามีผลกระทบและกระบวนการอย่างไรต่อการอักเสบและการย่อยสลายของกระดูกอ่อนเพื่อนำไปใช้ในการผลิตยาต้านการอักเสบของโรคดังกล่าว (Madsen et al., 2012) และยังได้มีการศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจในเซลล์ซินโอไวโอไซด์ที่ได้รับจากตัวอย่างของเยื่อหุ้มข้อในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) ด้วยวิธี cDNA array (Neumann et al., 2010) โดยการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจำนวนหลายแพสเสจซึ่งต้องมีการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในภาชนะใหม่เมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนั้นมีการเจริญ

เต็มพื้นที่หน้าตัดของภาชนะเป็นชั้นเดียว จากการทดลองดังกล่าวได้ผลว่าในแพสเสจที่ 2 - 3 รูปแบบการแสดงออกของยีนยังไม่มีมีการแสดงออกที่เปลี่ยนไปอย่างมีนัยสำคัญ และรูปแบบการแสดงออกของยีนเริ่มเปลี่ยนแปลงไป 7 - 10 % ในแพสเสจที่ 5 - 6 และในแพสเสจที่ 7 - 8 มีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปมากกว่า 10% จึงยังเป็นที่สงสัยเกี่ยวกับผลกระทบที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน (Hirth et al., 2002; Lin et al., 2008; Neumann et al., 2010) ที่อาจนำไปสู่การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป และอาจทำให้เกิดผลการแสดงออกที่เป็นผลบวกหรือผลลบที่เป็นเท็จได้

ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *interleukin 6 (IL6)* ที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสารสื่อกลางในการตอบสนองอาการอักเสบ (Guerné et al., 1988) ยีน *aggreccan (ACAN)* และ ยีน *fibronectin 1(FN1)* ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการโปรตีนสร้างสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (extracellular matrix) (Hynes et al., 1982) ยีน *matrix metalloproteinase 1 (MMP1)* และ ยีน *matrix metalloproteinase 3 (MMP3)* เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สร้างสารเนื้อพื้นนอกเซลล์ (Dean et al., 1989) ซึ่งยีนดังกล่าวพบว่ามีมีการแสดงออกมากในเซลล์ชิโนไวรัส (Tolboom et al., 2002; Guerné et al., 1988; Hynes and Yamada, 1982) และการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป และพหุสัณฐาน (polymorphism) ในยีนเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Tammachote, 2011)

จากเหตุผลดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาในตัวอย่างที่มาจากน้ำไขข้อในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จึงมีแนวความคิดในการนำตัวอย่างน้ำไขข้อมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์และศึกษาผลของการเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจต่อการแสดงออกของยีนและอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ชิโนไวรัสจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เซลล์ชิโนไวรัสในการวิจัยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจต่อการแสดงออกของยีนของเซลล์ชิโนไวรัสจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วิธีการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างน้ำไขข้อและเลี้ยงเซลล์ชิโนไวรัส

เก็บตัวอย่างน้ำไขข้อจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า (อยู่ในระดับที่รุนแรง) ซึ่งได้รับวินิจฉัยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านศัลยกรรมกระดูกจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ซึ่งได้รับการอนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการแพทย์ในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติแล้วจำนวน 16 คน แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม (แพสเสจที่ 2) จำนวน 8 คน และจากกลุ่มตัวอย่าง (แพสเสจที่ 3 - 7) จำนวน 8 คน อายุระหว่าง 53 - 79 ปี

น้ำไขข้อที่ได้รับจากผู้ป่วยแต่ละคนจะมีปริมาณที่ไม่เท่ากัน ในการเพาะเลี้ยงให้ใช้ตัวอย่างน้ำไขข้อทั้งหมดที่ได้รับ เพาะเลี้ยงเซลล์ตามวิธีของ Scanu (Scanu et al., 2007) โดยน้ำไขข้อที่เก็บได้มีความเหนียวหนืดจึงต้องเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน PBS 1 ส่วน ต่อ น้ำไขข้อ 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวใส่ทิ้ง ใส่อาหาร DMEM/F12 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (มีส่วนประกอบของ 10 เปอร์เซ็นต์ Fetal Bovine Serum (FBS) 1 เปอร์เซ็นต์ของ Antibiotic - Antimycotic และ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร Basic Fibroblast Growth Factor (FGF) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันในหลอดเดิมแล้วใช้ปิเปตดูดไปใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 1 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 2 มิลลิลิตรให้เป็นแพสเสจที่ 0 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน เมื่อเซลล์มีการเจริญเต็มพื้นที่หน้าตัดของ

ภาชนะเป็นชั้นเดียว (monolayer) แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ (subculture) โดยใช้เอนไซม์ทริปซินเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะ (Trypsinize) และนับเป็นแพสเสจที่ 1 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงซ้ำเช่นเดียวกันจนถึงแพสเสจที่ 7 ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ในแพสเสจที่ 0 และ 1 ยังมีจำนวนของเซลล์ที่น้อย อีกทั้งยังได้มีการรายงานจากการศึกษาที่ผ่านมาว่าในแพสเสจที่ 1 - 3 รูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ชิโนไวรัสยังไม่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนไปอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษาจากเซลล์ชิโนไวรัสจากเชื้อรอกวนในโรคข้ออักเสบ (Neumann et al., 2012) เนื่องจากการที่เซลล์นั้นยังไม่ได้ผ่านการย้ายไปเลี้ยงในภาชนะใหม่เป็นจำนวนหลายครั้ง (subculture) จึงเริ่มทำการศึกษาในแพสเสจที่ 2 เป็นต้นไป

2. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แสดงออกในเซลล์ชิโนไวรัสแต่ละแพสเสจของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อตำแหน่งเอ็กซอนของ *ACAN* (NM_013227.3) *IL6* (NM_000600.3) *FN1* (NM_212474.1) *MMP1* (NM_001145938.1) *MMP3* (NM_002422.3) และใช้ยีน *GAPDH* (NM_001256799.1) เป็น internal control โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) และตรวจสอบความจำเพาะต่อยีนด้วยโปรแกรม Primer - BLAST จากฐานข้อมูล NCBI ในการออกแบบไพรเมอร์

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real - time PCR

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'→3')
<i>ACAN</i>	Forward	agactgtcagatacccccac
	Reverse	aaagacctcaccctccatctc
<i>IL6</i>	Forward	tcaatgaggagacttgctggt
	Reverse	agcaggctggcatttgtggt
<i>FN1</i>	Forward	gccttttagatgtacaggctgac
	Reverse	acttcctccagagcaagggt
<i>MMP1</i>	Forward	gggagatcatcgggacaactc
	Reverse	caagagaatggccgagttcat
<i>MMP3</i>	Forward	aaagacaggcactttggcgca
	Reverse	acctagggtgtgatgcctc
<i>GAPDH</i>	Forward	gaagggtgaagtcggagtc
	Reverse	gaagatggatggggatttc

สกัดอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์ในแพสเสจที่ 2 - 7 โดยใช้ชุดสกัด RNeasy®Mini Kit (Qiagen, USA) วัดปริมาณ RNA ที่ได้และเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription โดยใช้ SuperScriptIII Reverse Transcription Kit (Invitrogen, USA) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี real - time PCR ด้วยเครื่อง CFX96 Real - time PCR system (BioRad, USA) และน้ำยา EvaGreen (BioRad, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมที่ใช้ในการทำ real - time PCR ด้วยชุดสกัด RNeasy®Mini Kit (Qiagen, USA)

ชนิดสาร	ปริมาตร (μl)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	10
5 μM F,R primer (<i>ACAN</i>)	1.2
5 μM F,R primer (<i>IL6</i>)	1.6
5 μM F,R primer (<i>FNI</i>)	2.0
5 μM F,R primer (<i>MMP1</i>)	2.0
5 μM F,R primer (<i>MMP3</i>)	2.0
5 μM F,R primer (<i>GAPDH</i>)	1.0
50 ng cDNA (ต่อ 1 ปฏิกริยา)	1.0
Distilled water	ปรับ ปริมาตร เป็น 20

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะในการทำ real - time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)
Pre -denaturation	95	30
Denaturation	95	5
Annealing	40	5
Extention	รอบ	
Melting curve	65-95	15
(เพิ่มขึ้นอุณหภูมิละ 0.5 องศาเซลเซียส)		

3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แสดงออกในเซลล์ชิโนไวรัสโดยเปรียบเทียบค่า Ct (รอบของการเริ่มเพิ่มผลิตภัณฑ์

PCR) ระหว่างเซลล์ชิโนไวรัสในแพสเสจที่ 2 (กลุ่มควบคุม) และเซลล์ชิโนไวรัสในแต่ละแพสเสจตั้งแต่แพสเสจที่ 3 - 7 โดยเปรียบเทียบการแสดงผลของยีนแบบ comparative quantification ซึ่งเปรียบเทียบการแสดงผลที่แตกต่างเป็นเท่าด้วยสมการ $2^{-\Delta\Delta C_t}$

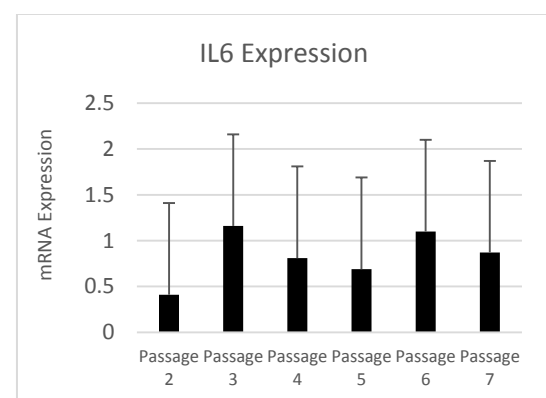
4. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยที่ได้จากสมการ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ของแต่ละยีนมาสร้างเป็นกราฟแผนภูมิแท่งเพื่อให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของยีนเป็นเท่าในแต่ละยีน

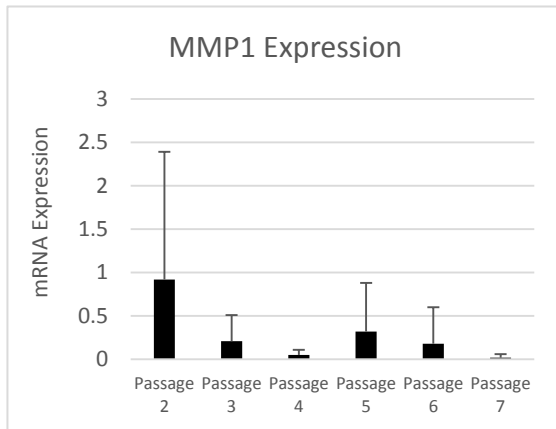
จากนั้น นำค่าเฉลี่ยจากสมการ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ เช่นเดียวกันไปคำนวณหาความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้สถิติที่ทดสอบ ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS (ver.22.0)

ผลการวิจัย

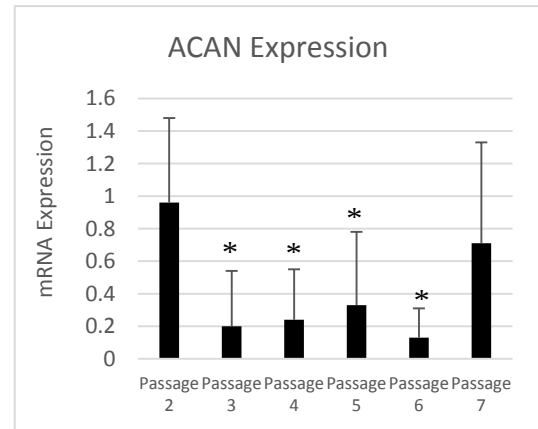
เมื่อศึกษาผลการแสดงออกของยีน *IL6* *MMP1* *MMP3* *FNI* และ *ACAN* ระหว่างแพสเสจที่ 2 (กลุ่มควบคุม) กับแพสเสจที่ 3 - 7 พบการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปในยีน *ACAN* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และไม่พบการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปในยีนอื่นที่ทดสอบ



รูปที่ 1 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *IL6* จากเซลล์ชิโนไวรัสในแพสเสจที่ 2 - 7

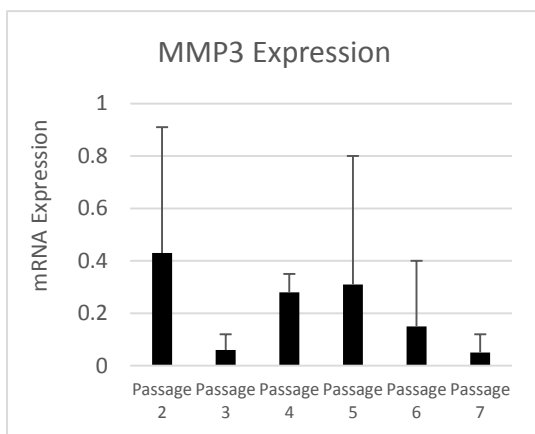


รูปที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *MMP1* จากเซลล์ชิโนไวรัสในแพสเสจที่ 2 - 7

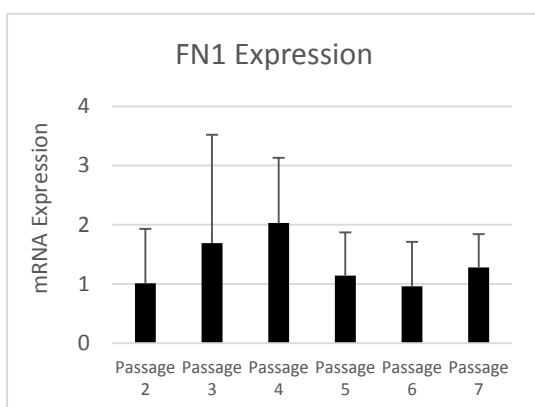


รูปที่ 5 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *ACAN* จากเซลล์ชิโนไวรัสในแพสเสจที่ 2 - 7

*แสดงถึงแพสเสจที่มีค่าการแสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 3 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *MMP3* จากเซลล์ชิโนไวรัสในแพสเสจที่ 2 - 7



รูปที่ 4 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *FN1* จากเซลล์ชิโนไวรัสในแพสเสจที่ 2 - 7

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในยีน *IL6*, *MMP1*, *MMP3*, *FN1* และ *ACAN* นั้นพบว่าแพสเสจที่ 3 (p value = 0.002) แพสเสจที่ 4 (p value = 0.003) แพสเสจที่ 5 (p value = 0.008) และแพสเสจที่ 6 (p value = 0.003) ในยีน *ACAN* นั้นมีการแสดงออกแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับแพสเสจที่ 2 (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจมีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *ACAN* แม้ว่าในระดับการแสดงออกของแพสเสจที่ 7 (ถ้า p value = 0.285) นั้นพบว่ามีค่าเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นมาเกือบเท่ากับในแพสเสจที่ 2 ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าค่าการแสดงออกของยีน *ACAN* ในผู้ป่วยบางรายมีค่าที่สูงมากทำให้ดึงค่าเฉลี่ยโดยรวมของยีนนี้ไปด้วย

ทั้งนี้การแสดงออกของยีนมีความแตกต่างในแต่ละบุคคลซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุกรรม ความรุนแรงของโรค อายุ และเพศ ทำให้ค่าการแสดงออกที่ได้นั้นมีความแปรปรวนสูงในแต่ละยีน

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าควรเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดโนโวไฮโดรที่นำไปใช้ศึกษาในยีน *ACAN* ไม่ควรเกินในแพสเสจที่ 2 แต่อย่างไรก็ตามในยีน *IL6* *MMP1* *MMP3* และ *FN1* ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนนั้นไม่พบการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเลี้ยงไปในหลายแพสเสจแสดงว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์หลายแพสเสจไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าว

ข้อเสนอแนะ

1. ผลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลักเลี้ยงการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดโนโวไฮโดรในหลายแพสเสจ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องของโรคข้อเข่าเสื่อม
2. ในการศึกษาครั้งต่อไป เนื่องจากการศึกษาในการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนั้น มีความแปรผันสูงจึงควรศึกษาในระดับของโปรตีนเพิ่มเติม เพื่อที่จะได้ทราบว่าการแสดงออกที่พบในระดับอาร์เอ็นเอนั้น จะมีผลเป็นทิศทางเดียวกันในระดับโปรตีนหรือไม่ ซึ่งจะทำให้สามารถตัดสินใจได้ว่าในแพสเสจของแต่ละยีนนั้นมีการเปลี่ยนแปลงและส่งผลกระทบต่อโรคข้อเข่าเสื่อมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ประจำภาควิชาและนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและคำแนะนำในวิทยานิพนธ์นี้

เอกสารอ้างอิง

Ah Kioon, M.D., et. 2010. Adrenomedullin increases fibroblast-like synoviocyte adhesion to extracellular matrix proteins by upregulating integrin activation. *Arthritis research & therapy*. 12: R190.

- Dean, D., Martel, J., Pelletier, J., Howell, D. and Woessner, J. 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*. 8: 678 - 685.
- Guerne, P., Zuraw, B., Vaughan, J., Carson, D. and Lotz, M. 1988. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*. 83: 585 - 592.
- Hirth, A., et al. 2002. Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. 4: 117 - 125.
- Hynes, R.O. and Yamada, K.M. 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*. 95: 369 - 377.
- Lin, Z., et al. 2008. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 26: 1230-1237.
- Madsen, R. S., et al. 2012. A synoviocyte model for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: response to ibuprofen, betamethasone, and ginger extract - a cross-sectional in vitro study. *Arthritis*. 2012: 1 - 9.
- Nair, A., et al. 2012. Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast - like synoviocyte responses to toll-like receptor 4 and toll - like receptor 2 ligands via soluble CD14. *Arthritis and rheumatism*. 64: 2268-2277.

- Neumann, E., et. 2010. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 12: R83.
- Petersson, I.F. 1996. Occurrence of osteoarthritis of the peripheral joints in European populations. *Annals of the rheumatic diseases*. 55: 659 - 661.
- Scanu, M., et al. 2007. Synoviocyte cultures from synovial fluid. *Reumatismo*. 59: 66 - 70.
- Sellam, J., and Berenbaum, F. 2010. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 6: 625-635.
- Stebulis, J.A., Rossetti, R.G., Atez, F.J., and Zurier, R.B. 2005. Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *The Journal of rheumatology*. 32: 301-306.
- Tammachote, R. 2011. The genetics behind osteoarthritis: Asian focus. *Asian Biomedicine*. 5: 23 - 36.
- Tolboom, T.C., et al. 2002. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Annals of Rheumatic Diseases*. 61: 975 - 980.
- Uzan, B., et al. 2006. A critical role for adrenomedullin-calcitonin receptor-like receptor in regulating rheumatoid fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Journal of immunology*. 176: 5548 - 5558.
- Waldburger, J.M., Boyle, D.L., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., and Firestein, G.S. 2008. Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. *Arthritis and rheumatism*. 58: 3439-3449.