

การศึกษารูปแบบการหลังโปรตีนของไมโครเกลียเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีธาตุเหล็ก



นางสาว สลีลา เตียวตระกูลศรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Profiling of secretory proteins from LPS-stimulated microglia in iron-enriched cultures



Miss Saleela Teawtrakoolsri

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษารูปแบบการหลังโปรตีนของไมโครเกลียเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีธาตุเหล็ก

โดย

นางสาวสลิลา เตียวตระกูลศรี

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

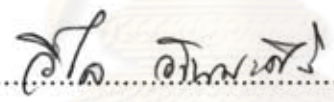
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

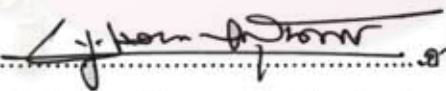
รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

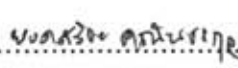

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราคูสัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร)


..... กรรมการ
(ดร. ธันัญญา ทองตัน)

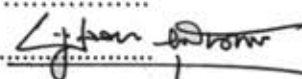

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ยอดสร้อย คณินทรกุล)

สถิตา เตียวตระกูลศรี : การศึกษารูปแบบการหลังโปรตีนของไมโครเกลียเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีธาตุเหล็ก. (PROFILING OF SECRETORY PROTEINS FROM LPS-STIMULATED MICROGLIA IN IRON-ENRICHED CULTURES) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, 63 หน้า.

การสะสมของธาตุเหล็กอย่างผิดปกติในเนื้อสมองมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคทางระบบประสาทหลายชนิด พยาธิวิทยาในระดับเซลล์พบ microglia ที่ถูกกระตุ้นมีธาตุเหล็กมาสะสมอย่างผิดปกติ ในปัจจุบันโมเลกุลที่ควบคุมการทำงานของ microglia ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับภาวะการถูกกระตุ้นของ microglia เป็นไปได้ว่าธาตุเหล็กอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถควบคุมการทำงานของ microglia ได้ ดังนั้นเพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กที่มีต่อรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งจาก microglia ที่ถูกกระตุ้น เซลล์เพาะเลี้ยง microglia ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีและไม่มีธาตุเหล็ก จากนั้นโปรตีนที่เซลล์หลั่งออกมาได้ถูกนำมาแยกตามประจุและมวลโมเลกุลโดยอาศัยเทคนิค 2D-PAGE จุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างน้อย 2 เท่าและมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI ผลการศึกษาพบว่าธาตุเหล็กเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนที่หลั่งมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้น และสามารถแบ่งโปรตีนที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นโปรตีนที่มีการหลังเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีธาตุเหล็ก ได้แก่ transaldolase1 และกลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีนที่มีการหลังลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีธาตุเหล็ก ได้แก่ dUTPase และ actin-related protein ผลการศึกษาที่ได้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กสามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก microglia ได้ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนแต่ละชนิดตามที่ได้ระบุไว้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเหล่านี้ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองต่อไป

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนิสิิต.....สถิตา เตียวตระกูลศรี.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5074837630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : ACTIVATED MICROGLIA / IRON / IRON INDICIBLE PROTEINS /
PROTEOMICS

SALEELA TEAWTRAKOOLSRI: PROFILING OF SECRETORY PROTEINS
FROM LPS-STIMULATED MICROGLIA IN IRON-ENRICHED CULTURES.

ADVISOR: ASSOC. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 63 pp.

Abnormal iron accumulation in specific brain regions has been associated with the pathogenesis of many neurodegenerative diseases. At cellular level, unusual iron accumulation is observed in activated microglia. At present, little is known about molecules that control microglial activation. Regarding the relationship between iron and microglial activation, it is possible that iron may have an essential role in regulating microglial activation. Therefore, to study the effect of iron on secretory profile of activated microglia, microglia cell cultures were stimulated with LPS for 6 hours in the presence or absence of iron. Then, secreted proteins were separated by charges and molecular weights using 2D-PAGE technique. Protein spots that were altered at least two- folds with statistic significance between groups were analyzed by LC-MS/MS and the NCBI database search were performed. The results demonstrated that iron altered secretory profiles of activated microglia. These candidate proteins were divided into two groups. The first group was proteins that were significantly increased in the presence of iron. It was identified as transaldolase1. The second group was proteins that were significantly decreased in the presence of iron. They were identified as dUTPase and actin-related protein. These preliminary results demonstrated that the presence of iron altered secretory profile of LPS-activated microglia. However, the alteration in expression of each protein described requires further study in both cell culture, as well as an *in vivo* systems.

Field of Study : Medical Science

Academic Year : 2010

Student's Signature *Saleela Teawtrakoolsri*

Advisor's Signature *Poonlarp Cheepsunthorn*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำความรู้ ใฝ่ใจ ติดตามและช่วยเหลือผลการวิจัยมาโดยตลอดรวมทั้งช่วยแก้ไขในจุดบกพร่องของการเขียนงานวิจัยฉบับนี้

อาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ศูนย์วิจัย Medical Research Center (MRC) และบุคลากรทุกท่านในศูนย์วิจัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่อุปกรณ์ วัสดุ ในการทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการโปรตีโอมิกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

อาจารย์ ดร. ธนัญญา ทองตัน อาจารย์ ดร. นุชนาถ ไหมหรือ นางสาว วรวิสา ชัยวรกุล รุ่นพี่-รุ่นน้องในห้องปฏิบัติการ Alzheimer ทุกคน ที่ได้ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจให้เสมอมา พ่อ-แม่ และครอบครัว ที่ได้ให้ผู้วิจัยมีความรู้ คำแนะนำ ช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง และเป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐาน.....	2
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
1.6 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
1.8 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ชีววิทยาของธาตุเหล็ก.....	6
2.2 เมทาบอลิซึมของธาตุเหล็ก.....	6
2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับการทำงานของเซลล์ในระบบประสาท.....	8
2.4 ไมโครเกลียเซลล์.....	10
2.5 ธาตุเหล็กกับไมโครเกลียเซลล์.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง.....	13
3.2 การตกตะกอนโปรตีน.....	13
3.3 วัดความเข้มข้นโปรตีน.....	13

	หน้า
3.4 การแยกโปรตีนด้วย 2D-PAGE.....	14
3.5 การย้อมเจลเพื่อตรวจสอบโปรตีน.....	15
3.6 การวิเคราะห์และรวบรวมข้อมูล.....	15
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	16
4.1 ธาตุเหล็กเปลี่ยนแปลงรูปแบบการหลั่งโปรตีนใน microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS	16
4.1.1 รูปแบบของจุดโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น.....	19
4.1.2 รูปแบบของจุดโปรตีนที่หลั่งออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น.....	20
4.1.3 รูปแบบของจุดโปรตีนที่หลั่งออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ไม่มีธาตุเหล็ก.....	21
4.2 ธาตุเหล็กเปลี่ยนแปลงการหลั่งโปรตีนของ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS.....	23
4.2.1 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละจุดโปรตีนจาก 2D-PAGE.....	23
4.2.2 จุดโปรตีนและชนิดโปรตีนที่ได้ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของแต่ละจุดโปรตีนที่คัดเลือก.....	24
4.2.3 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนที่ได้จาก LC-MS/MS.....	35
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	36
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	36
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	38
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	39
รายการอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	46
ภาคผนวก ก.....	47
ภาคผนวก ข.....	56
ภาคผนวก ค.....	60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	63

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณธาตุเหล็กที่มีอยู่ในร่างกาย.....	6
ตารางที่ 2.2 สรุปรายการกระจายของธาตุเหล็กที่เข้าไปเซลล์ในสมอง.....	10
ตารางที่ 2.3 โรคทาง neurodegenerative disease และบริเวณที่พบการสะสมธาตุเหล็ก...	12
ตารางที่ 3.1 ปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน สารละลาย lysis buffer และ Bradford reagent.....	14
ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างจำนวนจุดโปรตีนที่พบอย่างน้อย 2 ใน 3 เจล กับจำนวนจุดโปรตีนที่ได้ทั้งหมดจากแต่ละกลุ่ม.....	18
ตารางที่ 4.2 แสดงจุดโปรตีนที่ส่งไปวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีน	23
ตารางที่ 4.3 แสดงจุดโปรตีนเทียบกับชนิดโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล	35



 ศูนย์วิจัยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 ปฏิกริยา fenton reaction.....	7
รูปที่ 2.2 การขนส่งธาตุเหล็กผ่าน blood brain barrier.....	8
รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอนของการสังเคราะห์สารสื่อประสาท และการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียโดยใช้ธาตุเหล็กเป็น co-factor.....	9
รูปที่ 4.1 ตัวแทนเจลและกราฟแสดงจำนวนจุดโปรตีน ที่ได้จากการทำ 2D PAGE.....	17
รูปที่ 4.2 แผนภาพเวนและกราฟวงกลมที่แสดงการจำแนกจุดโปรตีนระหว่าง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น.....	19
รูปที่ 4.3 แผนภาพเวนและกราฟวงกลมที่แสดงการจำแนกจุดโปรตีนระหว่าง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีธาตุเหล็กและเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น.....	20
รูปที่ 4.4 แผนภาพเวนและกราฟวงกลมที่แสดงการจำแนกจุดโปรตีนระหว่าง microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีและไม่มีธาตุเหล็ก.....	22
รูปที่ 4.5 ตัวแทนเจลที่ระบุจุดโปรตีนที่ตัดส่งไปวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS.....	24
รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 6 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของจุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	25
รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 55 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของจุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	26
รูปที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 56 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของจุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	27
รูปที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 58 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของจุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	28

	หน้า
รูปที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 105 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของ จุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	30
รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 109 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของ จุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	31
รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 127 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของ จุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	32
รูปที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 232 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของ จุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	33
รูปที่ 4.14 แสดงการเปรียบเทียบของ spot ID 371 ที่ประกอบด้วย ภาพแสดงตำแหน่งของ จุดโปรตีนบนเจล, ภาพ 3 มิติ และกราฟ %volume ในสภาวะ untreated, LPS, LPS/Fe.....	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2D-PAGE	=	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
IEF	=	Isoelectric focusing
IPG	=	Immobilized pH gradient
kDa	=	Kilodaltons
M	=	Molar
ml	=	milliliter
mg	=	milligram
μ l	=	microliter
μ g	=	microgram
w/v	=	Weight by volume
v/v	=	Volume by volume
xg	=	Gravity centrifugal force
LC-MS/MS	=	Liquid chromatography –Mass Spectrometry/Mass spectrometry
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อพัฒนาการและการทำงานของระบบประสาท เนื่องจากธาตุเหล็กทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น fatty acid desaturase^[1] ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันและโคเลสเตอรอลที่เป็นองค์ประกอบของไมอีลิน (myelin sheath) หรือ tryptophan hydroxylase และ tyrosine hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารสื่อประสาท serotonin และ dopamine ตามลำดับ รวมถึงเอนไซม์ ribonucleotide reductase ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA และเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome oxidase, NADH dehydrogenase และ succinic dehydrogenase^[2, 3] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การขาดธาตุเหล็ก จะทำให้เกิดความผิดปกติต่อพัฒนาการทางสมองและการทำงานของระบบประสาท ในเด็กแรกเกิดและวัยรุ่น^[4-6] เป็นต้น

ในระยะแรกของพัฒนาการทางระบบประสาท พบว่าธาตุเหล็กจะ สะสมอยู่ใน ไมโครเกลีย (microglia) ก่อนที่โอลิโกเดนโดรไซต์ (oligodendrocyte) จะมีการเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่สร้างไมอีลิน จากการศึกษาพบว่าการหายไปของธาตุเหล็กใน microglia จะมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการของ oligodendrocyte และการสร้าง ไมอีลินในระบบประสาท^[7-10] และยังพบว่าเมื่อ มีการตายของเซลล์ในระบบประสาท ทำให้สมดุลของธาตุเหล็กเสียไปจนเกิดการสะสมของธาตุเหล็กอย่างผิดปกติในเนื้อสมอง โดยที่ ธาตุเหล็กเหล่านี้จะพบอยู่ใน microglia ในสภาวะ ที่ถูกกระตุ้น และยังสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของ โรคทางระบบประสาทหลายชนิด เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, Hallervorden-spatz syndrome, Friedreich's ataxia, multiple sclerosis และ ischemia-reperfusion^[11, 12]

microglia มีประมาณ 12% ของเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางทั้งหมด^[13] ทำหน้าที่คล้ายกับแมคโครฟาจ (macrophage) ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยจะตรวจจับและเก็บกิน (phagocytosis) สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ระบบประสาท เมื่อเกิดพยาธิสภาพ microglia จะตอบสนองต่อสิ่งมากระตุ้นโดยเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น และจะมีการผลิต pro-inflammatory cytokines (interleukins (IL) เช่น IL -1, -6, -12, -17, -18), tumor necrosis factor (TNF) - α , interferons (IFN)), anti-inflammatory cytokines (IL-2, -3, -4, -10 และ -15), reactive oxygen species (ROS) , chemokines (monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)) และ

growth factor (transforming growth factor (TGF) - β , colony-stimulating factors (CSF), nerve growth factor (NGF), neurotrophins (NT) -3, -4, brain-derived neurotrophic factor (BDNF)) เป็นต้น^[14, 15] ซึ่งการหลั่งโมเลกุลเหล่านี้จาก microglia ที่ถูกกระตุ้นอาจจะช่วยให้มีการฟื้นตัวของเซลล์ในระบบประสาทหรืออาจทำให้เกิด chronic inflammation ที่เกิดความเสียหายต่อระบบประสาทมากขึ้นกว่าเดิมก็ได้ ในปัจจุบันโมเลกุลที่ควบคุมการทำงานของ microglia ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับภาวะการอักเสบที่ถูกกระตุ้นของ microglia ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงเป็นไปได้ว่าธาตุเหล็กอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการทำงานของ microglia ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็ก ที่มีต่อการหลั่งโปรตีนของ microglia ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์

คำถามของการวิจัย (Research Question)

ธาตุเหล็ก มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการ หลั่งโปรตีนของ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนที่หลั่งมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
2. เพื่อหาชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไป อันเนื่องมาจากผลของธาตุเหล็กต่อการหลั่งโปรตีนของ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์

สมมติฐาน (Hypothesis)

ธาตุเหล็กจะเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่สร้างโดย microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

คำสำคัญ (Key words)

Activated microglia

Iron

Iron inducible proteins

Proteomics

รูปแบบการวิจัย (Research design)

การทดลอง (Experimental study)

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

BV₂ cell คือ microglial cell line ได้มาจากสมองของ primary mouse microglia cell มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวได้ไม่จำกัดหรือเป็น immortalized cell ^[16]

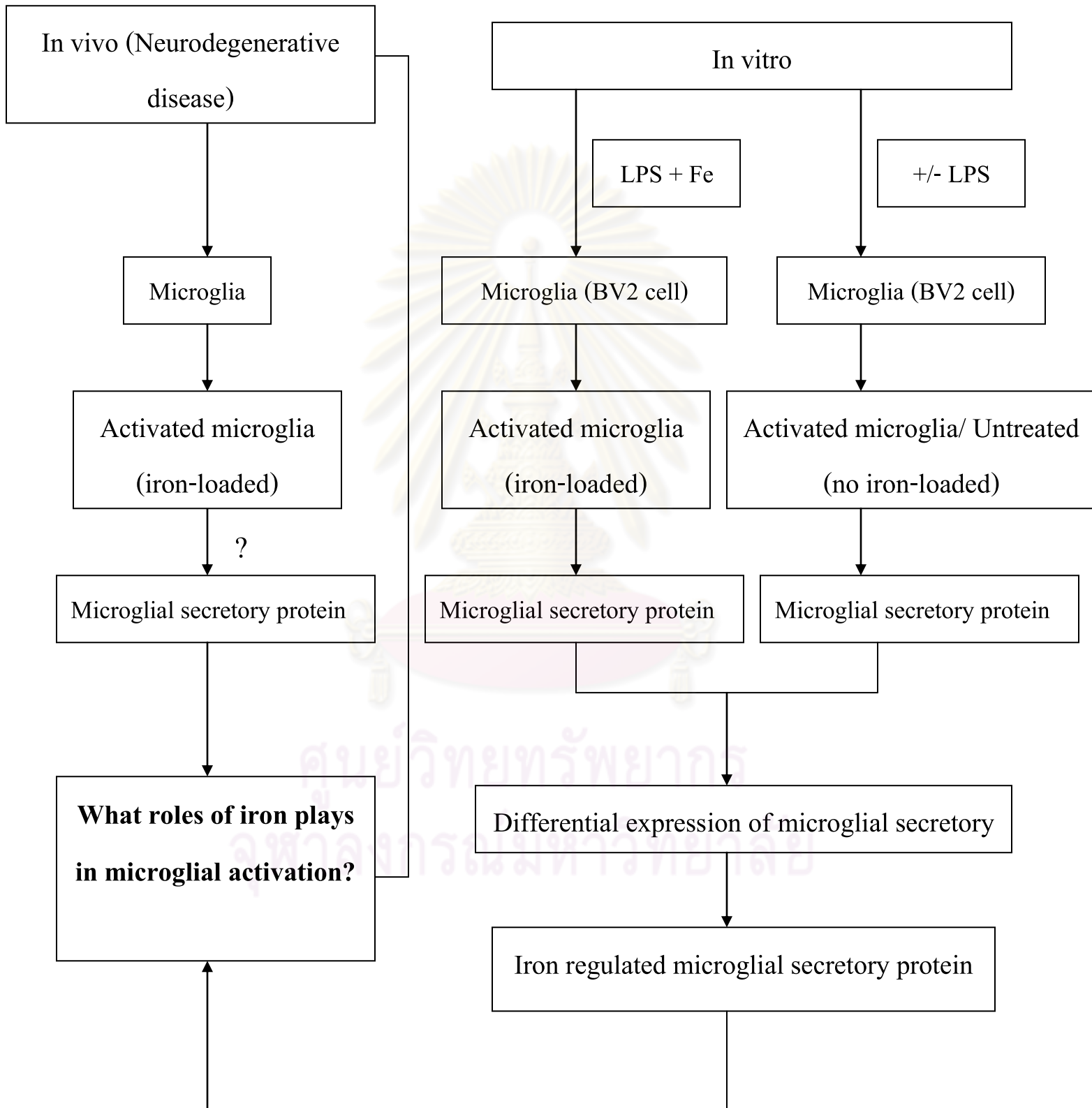
LPS (Lipopolysaccharide) คือ ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมลบที่มีศักยภาพในการใช้เป็นตัวกระตุ้น microglia เนื่องจาก microglia มี toll like receptor (TLR)-4 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ของ microglia ที่จำเพาะกับ LPS ^[17]

2D PAGE (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis) เป็นการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยแยกโปรตีนตามประจุ isoelectric point (pI) ด้วยเครื่อง isoelectric focusing (IEF) จากนั้นนำโปรตีนมาแยกต่อตามมวลโมเลกุล molecular weight (MW) บน SDS-PAGE

LC-MS/MS (Liquid chromatography mass spectrometry/ tandem mass spectrometry) คือ การวิเคราะห์โปรตีนจากมวลโมเลกุล ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น high-performance 2-dimensional ion trap mass spectrometer ซึ่งมี sensitivity สูง จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงในการวิเคราะห์หากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน

Ion score เป็นผลที่ได้จาก MS/MS ที่คำนวณจาก probability ระหว่างการ match ของ experimental data และ database sequence อย่าง random โดยสูตรการคำนวณ คือ $-10 \log (P)$ อ้างอิงจาก <http://www.matrixscience.com>

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบผลของธาตุเหล็กต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนที่หลั่งมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
2. โปรตีนที่หาได้อาจนำไปใช้เป็นเครื่องมือบ่งชี้หรือช่วยวินิจฉัยการดำเนินไปของโรคทางระบบประสาทหลายชนิดในกลุ่ม neurodegenerative diseases ที่มี microglia ที่ถูกกระตุ้นในสถานะที่มีธาตุเหล็กสะสมอยู่ในเนื้อสมอง

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

1. การปนเปื้อนของเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งสามารถป้องกันและแก้ไขได้โดยใช้ aseptic technique การรักษาความสะอาดของตู้ CO₂ incubator และอุปกรณ์ต่างๆในการเพาะเลี้ยงเซลล์
2. ปัญหาที่เกิดจากการทำซ้ำ (unreproducibility) ไม่สามารถทำซ้ำให้เหมือนเดิมได้แก้ไขโดยมีการทำด้วยความระมัดระวัง เช่น การเตรียมสาร , เทคนิคในการดูด (pipette) สารปริมาณน้อยๆและมีความคงที่ในการทำทุกครั้ง การละลายของตะกอนโปรตีนซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการใช้ lysis buffer ที่ได้ปรับแต่งให้มีความสามารถในการละลายตะกอนโปรตีนได้ดีขึ้น
3. spot โปรตีนที่ได้อาจแยกไม่ชัดเจนเนื่องจากการมีเกลือปนเปื้อนในตัวอย่างที่นำมาใช้ แก้ไขโดยการทำ clean up ตัวอย่างเพื่อกำจัดหรือลดเกลือที่ปนเปื้อนก่อนทำการแยกโปรตีนตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของธาตุเหล็ก

ธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต โดยเป็นส่วนประกอบของ ฮีโมโกลบิน ในเม็ดเลือดแดง และเป็นส่วนประกอบของไมโอโกลบินในกล้ามเนื้อกับเอนไซม์ต่างๆ ในร่างกายคนปกติมีธาตุเหล็กประมาณ 2-4 กรัม ซึ่งความต้องการธาตุเหล็กขึ้นอยู่กับเพศ (ดังตารางที่ 2.1) ในแต่ละช่วงวัยมีความต้องการธาตุเหล็กแตกต่างกันไป โดยเฉพาะวัยที่มีการเจริญเติบโตสูง เช่น ในเด็กทารกต้องการธาตุเหล็กมากที่สุด ช่วง 8-15 เดือนแรก วัยรุ่นต้องการธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในการพัฒนาระบบประสาท^[3] เป็นต้น ในภาวะปกติร่างกาย ดูดซึมธาตุเหล็กได้วันละ 1-2 มิลลิกรัม^[18] ร่างกายสูญเสียธาตุเหล็กทาง ผิวน้ำ เล็บ การหลุดลอกของเซลล์ ที่เคลือบผิว ทางเดินอาหาร และ จากบาดแผล เป็นต้น^[19]

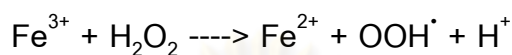
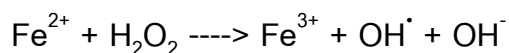
ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณของธาตุเหล็กที่มีอยู่ในร่างกาย (Harmening และคณะ, 1997)

ธาตุเหล็กในรูปแบบต่างๆ	เพศชาย (g)(%)	เพศหญิง (g)(%)
Hemoglobin	2.4 (60%)	1.7 (85%)
Myoglobin	0.14 (3.5%)	0.12 (6%)
Heme Enzymes	0.01 (0.25%)	0.01 (0.5%)
Intercellular Transport (Tf)	0.003 (0.075%)	0.003 (0.15%)
Intracellular Storage (Ft)	0.7-1.5 (17.5-37.5%)	0.7-1.5 (35-75%)
Total iron	4 (100%)	2 (100%)

เมแทบอลิซึมของธาตุเหล็ก

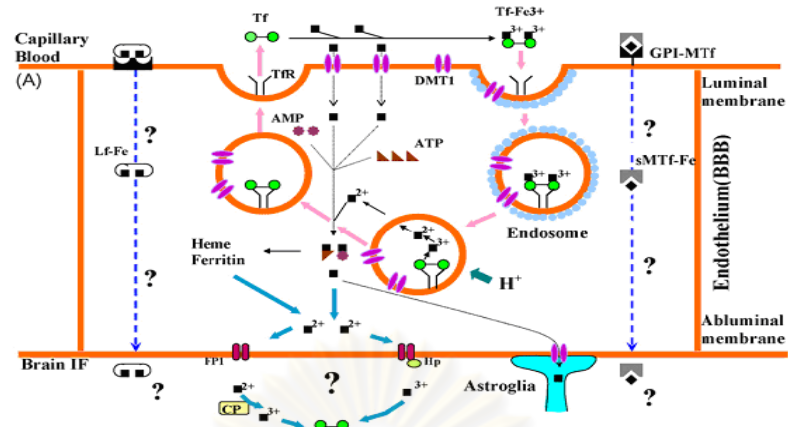
ธาตุเหล็กที่ได้ จากอาหารที่ย่อยแล้วภายในลำไส้เล็กจะถูก ดูดซึมที่ผิวเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก บริเวณดูโอดีนัม^[20] เพื่อส่งเข้าสู่กระแสโลหิต แต่เนื่องจากธาตุเหล็ก มีความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ ตามปฏิกิริยา fenton reaction ทำให้เกิด hydroxyl radical (OH[•]) (รูปที่ 2.1)^[21] ซึ่งจะไปทำลายสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ในเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน และสารพันธุกรรม^[22-24] ธาตุเหล็ก

จึงไม่สามารถอยู่ ในกระแสเลือดได้อย่างอิสระแต่จะพบอยู่กับโปรตีน อย่างเช่น transferrin (Tf) lactoferrin (Lf) และ ferritin (Ft) เป็นต้น^[25]



รูปที่ 2.1 แสดงปฏิกิริยาของ fenton reaction ซึ่งทำให้เกิด OH^\cdot สืบค้นจาก : www.lenntech.com (4-04-11)

ธาตุเหล็กในกระแสเลือดจะเข้าสู่สมอง ได้ 2 วิธีคือ ผ่านทาง blood- brain barrier (BBB) (รูปที่ 2.2) ร้อยละ 80 เป็น transferrin bound iron (TBI) อาศัยโปรตีน Tf โดยธาตุเหล็กสองอะตอม ในกระแสเลือดจับกับ Tf และ Tf สองโมเลกุลจะจับกับ transferrin receptor (TfR) ในสัดส่วนสองต่อหนึ่ง ที่เยื่อผนังหลอดเลือดสมอง Tf-Fe เข้าสู่เซลล์โดย กระบวนการ endocytosis ซึ่งภายใน endosomes มีค่า pH เป็นกรด คือประมาณ 5.5 ทำให้ธาตุเหล็กหลุดออกจาก Tf และถูกส่งออกจาก endosomes ไปที่ไซโทพลาสซึม สำหรับ Tf-TfR complex จะถูกนำกลับไปที่ยื่อหุ้มเซลล์ด้าน luminal surface ซึ่งมีค่า pH สูงกว่าใน endosomes คือประมาณ 7.2 ทำให้ Tf หลุดออกจาก TfR และถูกนำไปใช้ในการขนส่งธาตุเหล็กในครั้งต่อไป^[26, 27] ธาตุเหล็กจะถูกส่งออกจากเซลล์ผนังหลอดเลือดเข้าสู่สมองโดยโปรตีน ferroportin1 และ hephaestin^[28] ธาตุเหล็ก ที่ผ่านเข้ามาในสมองจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ที่เลือดจะเก็บไว้ใน เซลล์ในรูปของ Ft^[26, 29] นอกจากนั้นการขนส่งธาตุเหล็กเข้าสู่สมองยังสามารถผ่านทางโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่ Tf ได้ เช่น Ft, Lf, albumin, ascorbate, citrate, melanotransferrin (MTf)/ p 97, DMT1 และ trivalent cation-specific transporter (TCT)^[30-33] เรียกการขนส่งแบบนี้ว่า non- transferrin bound iron (NTBI)^[34, 35] ธาตุเหล็กในกระแสเลือดสามารถจะเข้าสู่สมองโดยผ่านทาง blood- cerebrospinal fluid barrier (B-CSF) โดยพบทั้งแบบ TBI และ NTBI โดยจะนำธาตุเหล็กผ่านมา ทาง epithelial ของ choroid plexus พบว่าการขนส่งธาตุเหล็กเข้าสู่สมองส่วนใหญ่จะผ่านทาง BBB มากกว่าทาง B-CSF^[36]



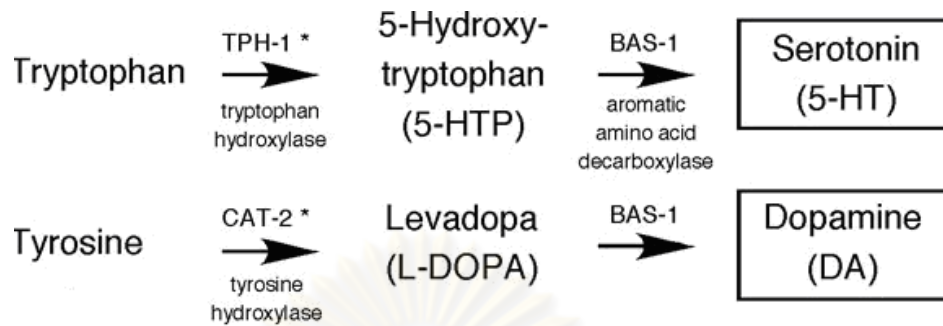
รูปที่ 2.2 แสดงแบบจำลองของการขนส่งธาตุเหล็กที่ผ่านทาง BBB โดยที่แสดงทั้งแบบอาศัยโปรตีน Tf (TBI) และ แบบที่ไม่อาศัยโปรตีน Tf (NTBI) โดยผ่าน DMT1 ซึ่งธาตุเหล็กจะเคลื่อนที่จากด้าน luminal membrane มาทางด้าน abluminal membrane และเข้ามาใน interstitial fluid (IF) (Ke และคณะ, 2007)

หลังจากธาตุเหล็กผ่านเข้ามาในสมองแล้วธาตุเหล็กที่อยู่ในสมองจะถูกขนส่งด้วยกลไก TBI และ NTBI ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น^[26, 37] ซึ่งธาตุเหล็กจะไป ยังเซลล์ที่มีความต้องการใช้ธาตุเหล็ก เช่น เซลล์ประสาท และเซลล์อื่น ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2.2

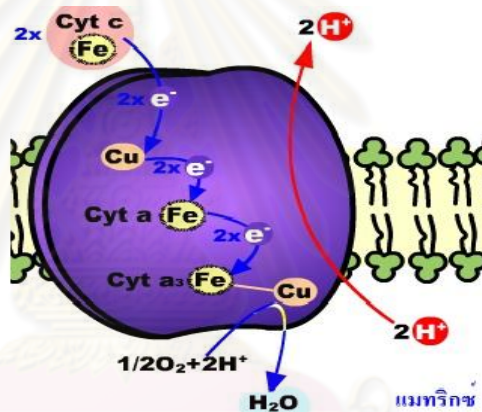
ความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับการทำงานของเซลล์ในระบบประสาท

จากรายงานที่พบว่าเอนไซม์ในระบบประสาทหลายตัวใช้ธาตุเหล็กเป็น โคแฟกเตอร์ (co-factor) สามารถจำแนกเอนไซม์เหล่านี้ออกเป็นกลุ่มตามหน้าที่การทำงาน ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันและโคเลสเตอรอลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และไมอีลิน เช่น fatty acid desaturase, glucose-6-phosphate dehydrogenase^[1, 38] เป็นต้น กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารสื่อประสาท เช่น เอนไซม์ glutamate dehydrogenase (gamma-aminobutyric acid หรือ GABA), tryptophan hydroxylase (serotonin) และ tyrosine hydroxylase (dopamine) (รูปที่ 2.3 A)^[39] เป็นต้น กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย เพื่อสร้าง ATP เช่น, NADH dehydrogenase succinic dehydrogenase และ cytochrome oxidase (รูปที่ 2.3 B)^[40] เป็นต้น และ กลุ่มที่ 4 ได้แก่เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA เช่น ribonucleotide reductase^[3] เป็นต้น

A.



B.



รูปที่ 2.3 แสดงเอนไซม์ที่ใช้ธาตุเหล็กเป็น co-factor A. แสดงลำดับขั้นของการสังเคราะห์สารสื่อประสาท serotonin และ dopamine โดยเอนไซม์ tryptophan hydroxylase และ tyrosine hydroxylase ตามลำดับซึ่งต้องอาศัยธาตุเหล็กเป็น co-factor (Chase และคณะ, 2007) B. แสดง complex IV คือ cytochrome oxidase complex หรือ cytochrome a_3 ในเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียอยู่ในการหายใจระดับเซลล์ เพื่อสร้างพลังงาน ซึ่งต้องใช้ธาตุเหล็กเป็น co-factor ของการสังเคราะห์ cytochrome oxidase สืบค้นจาก: www.bs.ac.th (3-04-11)

ตารางที่ 2.2 ตารางสรุปการกระจายตัวของธาตุเหล็กและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของธาตุเหล็กที่เข้าไปเซลล์ในสมอง (Domingo และคณะ, 2000)

ธาตุเหล็กและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็ก		เซลล์ที่พบ
ธาตุเหล็ก	(Fe)	oligodendrocyte, neuron, astrocyte, microglia
Transferrin	(Tf)	oligodendrocyte, blood vessel, choroid plexus, ependymal cell
Transferrin receptors	(TfR)	neuron, blood vessel
H ferritin	(H-Ftr)	oligodendrocyte, neuron
L ferritin	(L-Ftr)	oligodendrocyte, microglia
Ferritin receptors	(FtrR)	oligodendrocyte
Divalent metal transporter 1 (DMT 1)		neuron, astrocyte, ependymal cell, blood vessel, purkinje cells
Metal transporter protein 1 (MTP 1)		oligodendrocyte, neuron

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อการทำงานในระบบประสาท การขาดธาตุเหล็กจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อพัฒนาการทางสมองและการทำงานของระบบประสาท มีรายงานว่าในเด็กก่อนคลอดและทารกหลังคลอด ส่งผลให้การสร้างเยื่อหุ้มไมอีลินลดลงเกิดการนำกระแสประสาทช้าลงจึงส่งผลต่อพัฒนาการลดลง อย่างเช่น การรับรู้ เรียนรู้ ใช้ภาษา และการพัฒนาทักษะต่างๆนอกจากนี้ยังมีผลต่อความบกพร่องในการจำ และทางสมาธิ ในวัยหนุ่มสาว มีผลต่อการเรียนรู้และการแก้ปัญหาในชีวิตประจำวัน^[41] ทำให้เกิดภาวะหดหู่ (depression) และวิตกกังวล (anxiety)^[5, 6, 42, 43] ในสัตว์ทดลองถ้าขาดธาตุเหล็กทำให้มีการสร้างสารสื่อประสาทลดลง เช่น dopamine^[44]

ไมโครเกลีย (microglia)

microglia เป็นเซลล์ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลางทำหน้าที่ตรวจจับ เก็บกินสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อโรค และตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน microglia มีต้นกำเนิดที่แตกต่างจากเซลล์อื่นๆในระบบประสาทเนื่องจาก microglia มีต้นกำเนิดมาจาก เซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อชั้น มีโซเดิร์ม และเข้ามาตามกระแสเลือดมาเจริญเติบโตในชั้น เอกโตเดิร์ม ช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งครรภ์^[45] แต่เมื่อมีพยาธิสภาพเกิดขึ้นกับระบบประสาท หรือมีการติดเชื้อทางระบบประสาท microglia จะเคลื่อนที่ไปยัง

บริเวณที่เกิดพยาธิสภาพจะมีการเพิ่มจำนวนและจะหลั่งสารที่ตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันซึ่งอาจปกป้องระบบประสาทหรืออาจทำให้ระบบประสาทเสียหายไปมากกว่าเดิมก็ได้ โดยจะหลั่ง proinflammatory cytokines, chemokines, nitric oxide, ROS และ growth factor หลายชนิด เป็นต้น^[14, 46] ลักษณะดังกล่าวอาจเป็นผลดีในการป้องกันและฟื้นตัวของระบบประสาทหรืออาจทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบประสาทมากไปกว่าเดิมก็เป็นได้

ในระยะเริ่มแรกของพัฒนาการทางระบบประสาท ธาตุเหล็กจะพบสะสมอยู่มากใน microglia ใน white matter บริเวณที่ oligodendrocytes มีการเจริญ ปริมาณธาตุเหล็กใน microglia จะค่อยๆ ลดลงเป็นลำดับจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ในขณะที่ oligodendrocytes เริ่มมีการสะสมธาตุเหล็กในเซลล์มากขึ้นและสร้าง myelin sheath^[7-9] จากลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้เกิดสมมุติฐานว่า microglia อาจทำหน้าที่เก็บสะสมธาตุเหล็กให้ oligodendrocyte ใช้ในการสร้าง myelin sheath และจากการศึกษาพบว่า microglia สามารถปล่อยธาตุเหล็กให้ oligodendrocyte นำไปใช้ได้^[10] ในปัจจุบันโมเลกุลที่ควบคุมการทำงานของ microglia ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับภาวะการถูกกระตุ้นของ microglia จึงเป็นไปได้ว่าธาตุเหล็กอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการทำงานของ microglia จากการศึกษในช่วงอายุที่แตกต่างกันจะมีการสะสมของธาตุเหล็กในบริเวณของสมองและเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้ เริ่มตั้งแต่ ช่วงอายุ 30-35 ปี พบธาตุเหล็กสะสมมากในบริเวณ cerebrum, midbrain, cerebellum^[43, 47] ช่วงอายุ 60-90 ปี พบธาตุเหล็กสะสมบริเวณ cerebrum, cerebellum, hippocampus, basal ganglia, substantia nigra, globus pallidus และ amygdala^[48, 49] อายุ 80 ปีขึ้นไป มีธาตุเหล็กสะสมเพิ่มมากขึ้นในบริเวณ substantia nigra ในระดับเซลล์พบธาตุเหล็กใน oligodendrocyte และ microglia มากที่สุด จะเห็นได้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กในช่วงที่สมองมีการเจริญเติบโต รวมถึงช่วงที่มีการสร้าง myelin sheath และดำเนินต่อไปตลอดชีวิต อย่างไรก็ตามในภาวะที่ทำให้มีการสะสมของธาตุเหล็กมากเกินไปพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางระบบประสาทได้ ตัวอย่างของโรคทางระบบประสาทที่พบว่ามี การสะสมของธาตุเหล็กมากในบริเวณที่มีการตายของเซลล์ประสาทเช่น Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, friedreich's ataxia^[9, 50] ซึ่งจากรายงานที่พบธาตุเหล็กสะสมอย่างผิดปกติ เช่น Parkinson's disease พบธาตุเหล็กสะสมที่ microglia บริเวณสมองส่วน substantia nigra และ Alzheimer's disease พบว่าในเซลล์ประสาท มีธาตุเหล็ก สะสมเพิ่มขึ้นในบริเวณ รอบๆ plaque ซึ่งมีประมาณ 52.4 µg/g หรือ 200 µg/ml^[51] และพบในสมองส่วน cerebrum และ hippocampus^[49] จากรายงานที่พบการสะสมของธาตุเหล็กและโปรตีนที่เก็บธาตุเหล็กใน

บริเวณส่วนต่างๆของสมองมีความสอดคล้องกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับโรคทาง neurodegenerative disease^[12] ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดง neurodegenerative disease และบริเวณที่พบการสะสมธาตุเหล็กที่แตกต่างกันของสมอง (Burdo และ Cornor, 2003)

Neurodegenerative disease	บริเวณที่พบธาตุเหล็ก
Hereditary hemochromatosis	ธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นในบริเวณ choroid plexus, pituitary และ basal ganglia และเป็นการมิวเทชันที่ทำให้เกิดโรค Alzheimer
Aceruloplasminemia	ธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นในบริเวณ basal ganglia และ CSF
Restless legs syndrome	- Ft ลดลงใน plasma และ CSF แต่ Tf เพิ่มขึ้นใน CSF - ธาตุเหล็กลดลงในบริเวณ substantia nigra and putamen
Huntington's disease	ธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นในบริเวณ striatum
Freidreich's ataxia	- ธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นในไมโทคอนเดรียของ striatum และ cerebellum - เกิดจากการมิวเทชันของยีน frataxin
Hallervorden-Spatz	ธาตุเหล็กสะสมในบริเวณ globus pallidus, substantia nigra
Multiple sclerosis	- FtR หายไปใน periplaque บริเวณ white matter - Ft พบมากขึ้นใน CSF - ธาตุเหล็กพบมากใน oligodendrocyte
Parkinson's disease	- ธาตุเหล็กสะสมในบริเวณ substantia nigra, striatum - ระดับของ Ft ลดลงในบริเวณ substantia nigra, caudate, putamen
Alzheimer's disease	- การสะสมของธาตุเหล็กในสมอง - ระดับของ Ft ลดลง, ธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นใน amyloid plaques - IRP และ TfR ลดลงใน hippocampus

อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของธาตุเหล็กกับการทำงานของ microglia ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น ยังไม่เป็นที่ชัดเจนแต่จากพยาธิสภาพที่พบว่าธาตุเหล็กสะสมอยู่ใน microglia ที่ถูกกระตุ้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าธาตุเหล็กเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการทำงานของ microglia ได้ ในปัจจุบันยังไม่มีทางรักษาโรค neurodegenerative disease ให้หายขาดได้ แต่จากงานวิจัยนี้ทำให้เรา ทราบโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นในสภาวะที่มีธาตุเหล็กซึ่งสอดคล้องกับภาวะการเกิดโรคที่แท้จริงในสมองของคนที่ เป็นโรค neurodegenerative disease ซึ่งอาจจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายในการบ่งชี้โรค (biomarker) ที่สำคัญต่อการวินิจฉัยและในอนาคตอาจป้องกันโรคที่เกิดขึ้นได้ตั้งแต่วัยแรก

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

microglia (BV₂) microglial cell line ได้มาจาก Professor James R. Conner., The Pennstate university เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (Hyclone, USA) ที่มี 5% Fetal Bovine Serum (Gibco, USA) ในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ incubator 37°C 5% CO₂ การทดลองครั้งนี้ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (untreated) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ด้วย 1µg/ml Lipopolysaccharide (LPS) กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มเป็นกลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ด้วย 1µg/ml LPS และมี 200 µg/ml ferric ammonium citrate (Fac) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) มาทำการตกตะกอนโปรตีน

3.2 การตกตะกอนโปรตีน

หลังจากเก็บ media ทำการตกตะกอนโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ทั้ง 3 กลุ่ม นำมาปั่นด้วยความเร็วสูง 12000 x g 2 นาที 4°C เพื่อทำการแยกเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) มาใส่ TCA-Acetone แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง 15000x g 10 นาที 25°C จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนด้วย Lysis buffer 10-30 µl (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) IPG buffer 3-10, 2% (w/v) DTT)

3.3 วัดความเข้มข้นโปรตีน

โปรตีนที่ได้ จากการตกตะกอน นำไป วัดความเข้มข้นโปรตีน ด้วย Bradford assay ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับสารละลาย lysis buffer ตามปริมาณที่แสดงในตารางด้านล่าง และนำโปรตีนตัวอย่างมาเติม สารละลาย Bradford (Bio Rad, USA) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีเวลานาน 10 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/µl)	สารละลายโปรตีน มาตรฐาน (µl)	สารละลาย lysis buffer (µl)	Bradford reagent
Blank	0	1	499
1	1	0	499
2	2	0	498
4	3	0	497
8	4	0	496

ตารางที่ 3.1 ปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน สารละลาย lysis buffer และ Bradford reagent

3.4 การแยกโปรตีน two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

ปีเปตสารละลายโปรตีน 150 µg ผสมกับสารละลาย rehydration buffer (8 M Urea, 2% (w/v) CHAPS, 0.24 % (w/v) DTT, 0.5% (w/v) IPG buffer pH 3-10 NL และ 0.002 % (w/v) bromophenol Blue) จนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 125 µl เติมน้ำให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ load ลงใน strip holder ตามด้วย IPG strip pH 3-10 NL และ cover oil ปริมาตร 2 ml ตามลำดับ และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง IPGphor IEF system 20 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ใช้กระแสไฟฟ้า 55 µA และความต่างศักย์ 6,500 v จากนั้นนำ IPG strip ไปปรับสมดุลในสารละลาย 1%(w/v) DTT ใน equilibrium buffer [100 mg ใน 10 ml ของ 50 mM Tris-Cl pH 6.8, 6M Urea, 30% (w/v) Glycerol, 1% (w/v) SDS] โดยการเขย่าเบาๆนาน 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เติมน้ำสารละลาย 2.5%(w/v) IAA ใน equilibrium buffer [250 mg ใน 10 ml ของ 50 mM Tris-Cl pH 6.8, 6M Urea, 30% (w/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS] นำไปเขย่าเบาๆนาน 15 นาที ก่อนวาง IPG strip ลงบน 12.5% SDS-PAGE และ แยกโปรตีนโดยใช้ กระแสไฟฟ้า 10 mA/เจล 15 นาที และ 20 mA/เจล 1.30 ชั่วโมงโดยใช้ความต่างศักย์ 1000 โวลต์ และกระแสไฟฟ้านี้ จนกว่าสีย้อม bromophenol blue จะถึงขอบล่างของกระจก

3.5 การย้อมเจลเพื่อตรวจสอบโปรตีนหลังจากการทำ 2D-PAGE

นำเจลที่ได้มาทำการย้อมโดยใช้ 0.5% comassie brilliant blue R-250 (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) และเอาสีย้อมออก (destain) โดยใช้ 40% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid 2 ชั่วโมง และ 10% (v/v) methanol, 5% (v/v) acetic acid 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการสแกนแผ่นเจลโดยโปรแกรม 2D platinum software version 7.0 และทำการวิเคราะห์จุดโปรตีนที่มีความแตกต่าง

3.6 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

จุดโปรตีนที่ปรากฏบน 2D-PAGE จะถูกนำไปวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม Image master™ 2D platinum Version 7.0 (GE Healthcare) ตามขั้นตอน คือ ทำการจับคู่ (match) เพื่อวิเคราะห์หาจุดโปรตีนที่มีความแตกต่าง ตามเกณฑ์ที่กำหนดคือ จุดโปรตีนที่สนใจต้องพบอย่างน้อย 2 ใน 3 เจลของแต่ละกลุ่ม จุดโปรตีนที่เลือกต้องมีความแตกต่างของ % volume อย่างน้อย 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม จะถือว่าความแตกต่างนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ สถิติที่โปรแกรมใช้เปรียบเทียบเป็น unpair t-test และ analysis of variance (ANOVA) โดยใช้ bonferoni ทดสอบ จากนั้นจุดโปรตีนที่คัดเลือกจะถูกส่งไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ข้อมูลที่ได้กลับมาจะถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของโปรตีนที่อยู่ในจุดโปรตีนที่คัดเลือก โดยวิเคราะห์โปรตีนจาก Mw, pI และ ion score โดยถือว่า ion score ที่มากกว่า 40 จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

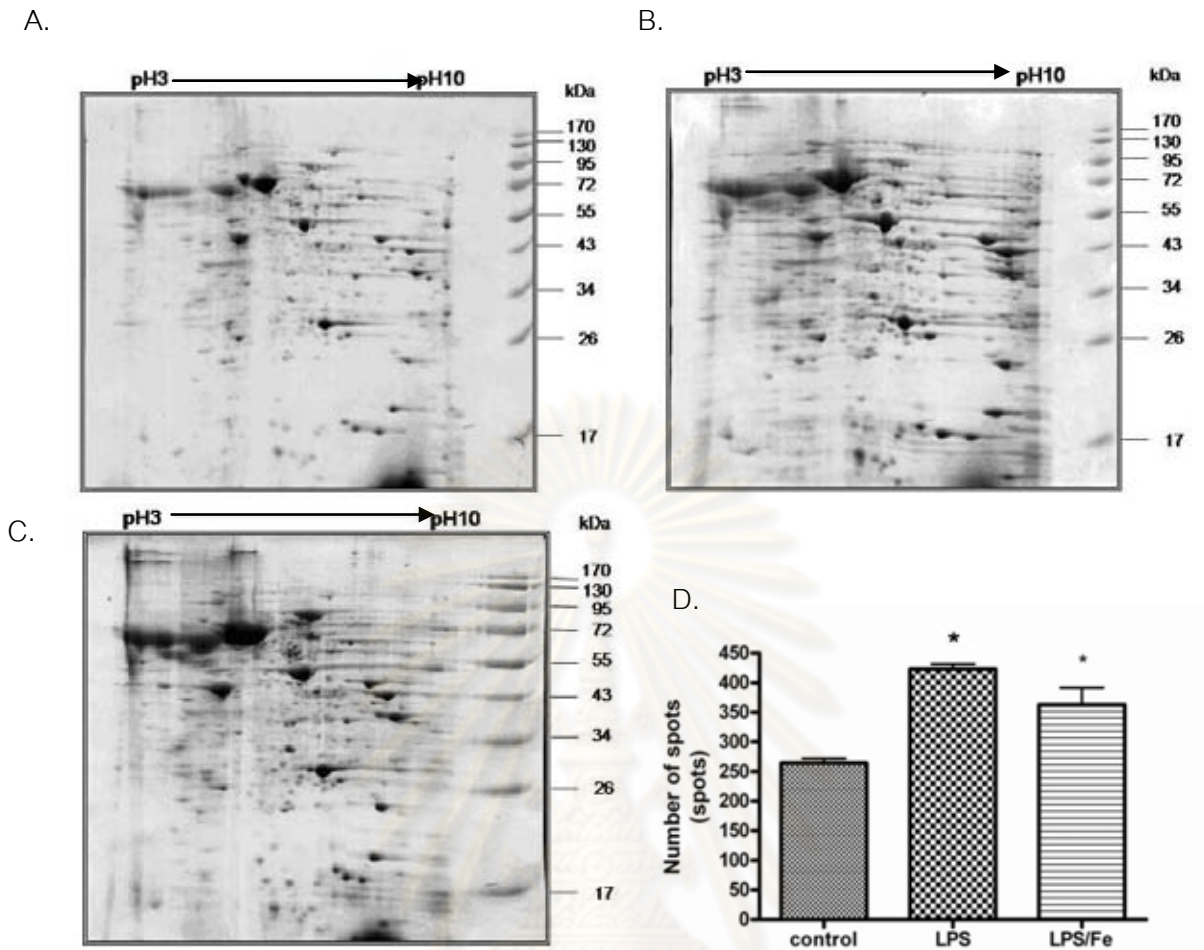
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

microglia ที่ถูกกระตุ้น อาจเป็นสัญญาณที่บอถึงสภาวะการณที่ระบบประสาทถูกรบกวน microglia ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและมีการสะสมของธาตุเหล็กเป็นสภาวะที่พบได้ในโรคทางระบบประสาท แต่เราไม่ทราบว่าธาตุเหล็กที่มาสะสมแล้วไปเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่หลั่งมาจาก microglia อย่างไร เราจึงสนใจที่จะศึกษาโปรตีนที่หลั่งจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นและมีธาตุเหล็กโดยใช้โมเดลเป็นเซลล์เพาะเลี้ยง microglia (BV-2) โดยนำโปรตีนมาจาก media ที่เลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์ แยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค 2D-PAGE เพื่อแยกโปรตีนตามประจุ (pI) และมวลโมเลกุล (MW) ดังแสดงในรูป 4.1 แล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโปรตีนด้วย LC-MS/MS จากผลการทดลองได้ผลดังนี้

4.1 ธาตุเหล็กเปลี่ยนแปลงรูปแบบการหลั่งโปรตีนใน microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

4.1.1 จากการแยกโปรตีนที่หลั่งมาจาก microglia ด้วย 2D-PAGE พบว่า microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1ug/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และใช้โปรแกรม Image master ในการคำนวณจุดโปรตีนในแต่ละเจล จะมีจำนวนจุดโปรตีนที่นับจำนวนได้จากการทำการทดลอง 3 ครั้ง ดังนี้ 406 (ครั้งที่ 1) 427 (ครั้งที่ 2) และ 435 (ครั้งที่ 3) ได้ ค่าเฉลี่ยประมาณ 422 ± 14.97 จุดโปรตีน เมื่อมีธาตุเหล็กที่ความเข้มข้น 200 ug/ml ในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่ามีจำนวนจุดโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ดังนี้ 306 (ครั้งที่ 1) 385 (ครั้งที่ 2) และ 397 (ครั้งที่ 3) ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 362 ± 49.44 จุดโปรตีน สำหรับใน microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นจะตรวจพบจำนวนจุดโปรตีนดังนี้ 255 (ครั้งที่ 1) 257 (ครั้งที่ 2) และ 280 (ครั้งที่ 3) ได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุดโปรตีนทั้งหมดอยู่ที่ 264 ± 13.89 จุดโปรตีน (รูปที่ 4.1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (B.) มีการหลั่งโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (A.) เมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS (C.) พบว่าหลังโปรตีนลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็ยังถือว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น



รูปที่ 4.1 แสดงภาพตัวแทน 2D-PAGE ของโปรตีนที่หลังจาก A. microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น B. microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1ug/ml) และ C. microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1ug/ml) ในขณะที่มีธาตุเหล็ก (200 ug/ml) ที่เวลา 6 ชั่วโมง D. กราฟแสดงจำนวนจุดโปรตีนของ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เปรียบเทียบกับจุดโปรตีนที่ได้จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อมีธาตุเหล็กและจากเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (* คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการเปรียบเทียบจุดโปรตีนบนทุกเจลในแต่ละกลุ่ม (n=3) จุดโปรตีนที่พบได้อย่างน้อย 2 ใน 3 เจล ของแต่ละกลุ่มเป็นดังนี้ จำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะมี 309 จุดโปรตีน จากจุดโปรตีนทั้งหมด 422 จุด เมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะมี 226 จุดโปรตีน จากจุดโปรตีนทั้งหมด 362 จุด สำหรับใน microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นจะมี 166 จุดโปรตีน จากจุดโปรตีนทั้งหมด 264 จุด (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนจุดโปรตีน ที่พบได้อย่างน้อย 2 ใน 3 เจล ของแต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบกับจำนวนจุดที่ได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

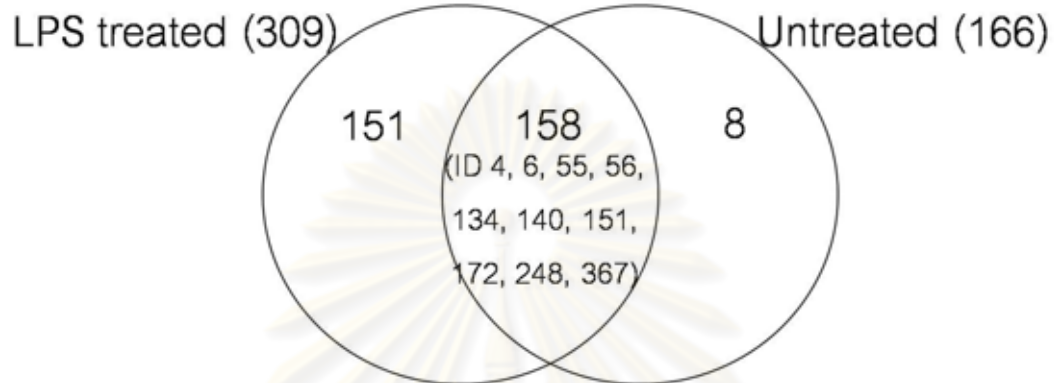
กลุ่ม (สภาวะ)	จำนวนจุด โปรตีนทั้งหมดที่พบ ในแต่ละกลุ่ม	จำนวนจุด โปรตีน ที่พบ 2 ใน 3 เจล ของแต่ละกลุ่ม
กลุ่มที่ 1 microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น	264	166
กลุ่มที่ 2 microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS	422	309
กลุ่มที่ 3 microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในขณะที่มีธาตุเหล็ก	362	226

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนและ วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีนด้วยโปรแกรม Image master TM 2D platinum Version 7.0 เพื่อหาจุดโปรตีนที่สนใจ หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุดโปรตีนที่พบร่วมกัน นอกจากพบจุดโปรตีนอย่างน้อย 2 ใน 3 เจล แล้วยังต้องมี % volume ที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ระหว่าง คู่ที่ 1 จำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น คู่ที่ 2 จำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น คู่ที่ 3 จำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ไม่มีธาตุเหล็ก ดังนี้

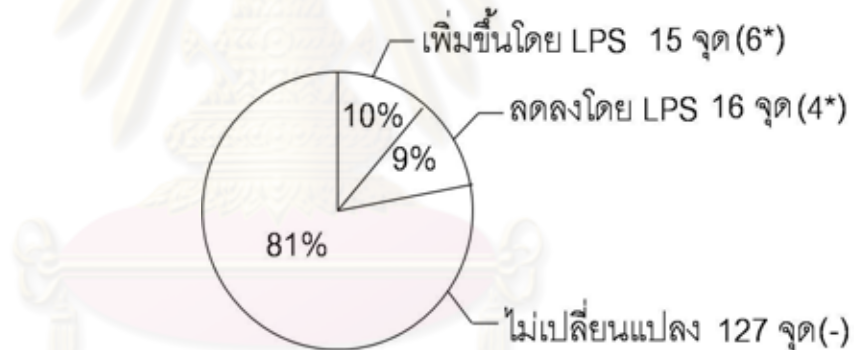
เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นพบว่าจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 309 จุด และจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น 166 จุด ซึ่งพบร่วมกันทั้งสองกลุ่ม 158 จุดโปรตีน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 10 จุดโปรตีน ได้แก่ จุดโปรตีน

ID 4, 6, 55, 56, 134, 140, 151, 172, 248 และ 367 (รูปที่ 4.2) สำหรับจุดโปรตีนที่พบใน microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 151 จุด และจุดโปรตีนที่พบใน microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น 8 จุด

A.



B.

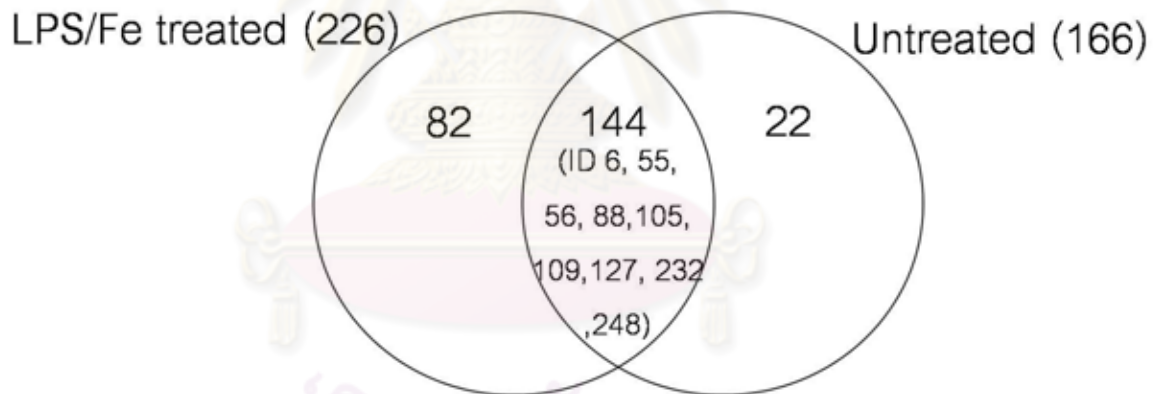


รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1ug/ml) และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น เป็นเวลา 6 ชั่วโมง A. แผนภาพเวน ที่แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น B. กราฟวงกลมที่แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่พบร่วมกัน 158 จุดโปรตีน ซึ่งแบ่งเป็นเพิ่มขึ้นโดย LPS 15 จุดโปรตีน ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 6 จุดโปรตีน ลดลงโดย LPS 16 จุดโปรตีน ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 4 จุดโปรตีน และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง 127 จุดโปรตีน ซึ่งไม่พบจุดโปรตีนที่แตกต่างอย่าง

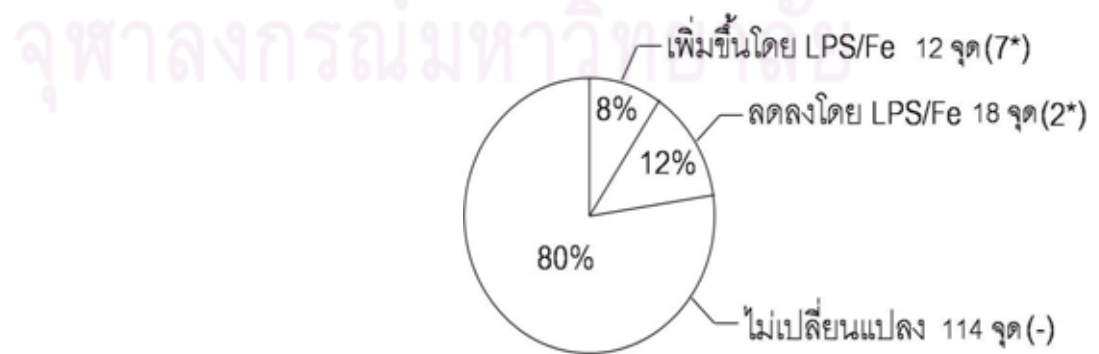
มีนัยสำคัญ หมายเหตุ * คือ จุดโปรตีนที่มี % volume แตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยพบว่ามีจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS 226 จุด และจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น 166 จุด ซึ่งพบร่วมกันทั้งสองกลุ่ม 144 จุดโปรตีน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 9 จุดโปรตีน ได้แก่ จุดโปรตีน ID 6, 55, 56, 88, 105, 109, 127, 232 และ 248 (รูปที่ 4.3) สำหรับจุดโปรตีนที่พบเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS 82 จุด และจุดโปรตีนที่พบใน microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น 22 จุด

A.



B.



รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็ก (200 ug/ml) ในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1ug/ml) และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (A) แผนภาพเวน ที่แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (B) กราฟวงกลมที่แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่พบร่วมกัน 144 จุดโปรตีน ซึ่งแบ่งเป็นเพิ่มขึ้นโดย LPS/Fe 12 จุดโปรตีน ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 7 จุดโปรตีน ลดลงโดย LPS/Fe 18 จุดโปรตีน ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 2 จุดโปรตีน และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง 114 จุดโปรตีน ซึ่งไม่พบจุดโปรตีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ หมายเหตุ * คือ จุดโปรตีนที่มี % volume แตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น

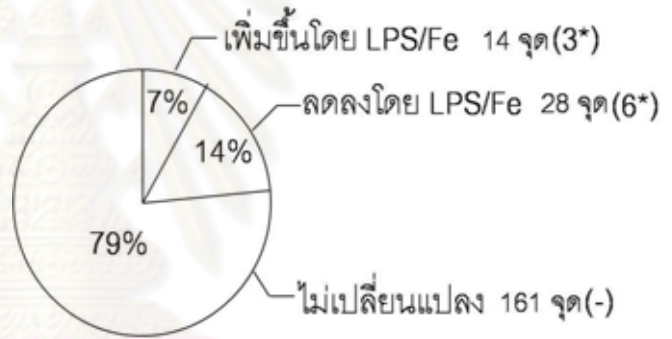
การเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ไม่มีธาตุเหล็กโดยพบว่ามีจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS 226 จุด และจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาจาก microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS 309 จุด ซึ่งพบร่วมกันทั้งสองกลุ่ม 203 จุดโปรตีน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 9 จุดโปรตีน ได้แก่ จุดโปรตีน ID 4, 58, 62, 122, 127, 133, 140, 232 และ 248 (รูปที่ 4.4) สำหรับจุดโปรตีนที่พบเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS 23 จุด และจุดโปรตีนที่พบใน microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 106 จุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A.



B.



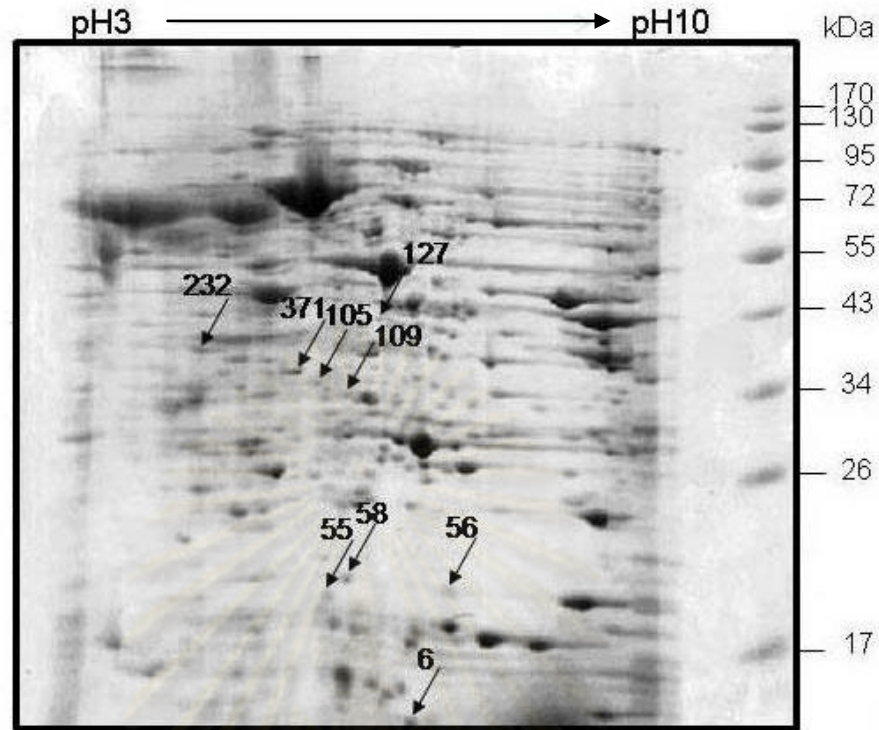
รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็ก (200 ug/ml) ในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1ug/ml) และ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ไม่มีธาตุเหล็ก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง A. แผนภาพเวน ที่แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่หลังออกมาเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะที่ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS B. กราฟวงกลมที่แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่พบร่วมกัน 203 จุดโปรตีน ซึ่งแบ่งเป็นเพิ่มขึ้นโดย LPS/Fe 14 จุดโปรตีน ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 3 จุดโปรตีน ลดลงโดย LPS/Fe 28 จุดโปรตีน ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 6 จุดโปรตีน และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง 161 จุดโปรตีน ซึ่งไม่พบจุดโปรตีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
หมายเหตุ * คือ จุดโปรตีนที่มี % volume แตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

4.2 ธาตุเหล็กเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีนของ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

ผลการวิเคราะห์จุดโปรตีนจาก 2D-PAGE 9 จุดโปรตีน และมวลโมเลกุล (MW) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงจุดโปรตีนที่ส่งไปวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนซึ่งระบุตำแหน่งของช่วง MW ที่พบในเจลดังนี้ ID 6, 55, 56, 58, 105, 109, 127, 232, 371

2D -PAGE	
Spot ID	MW (KDa)
6	10-17
55	17-26
56	17-26
58	17-26
105	26-34
109	34-43
127	34-43
232	34-43
371	34-43

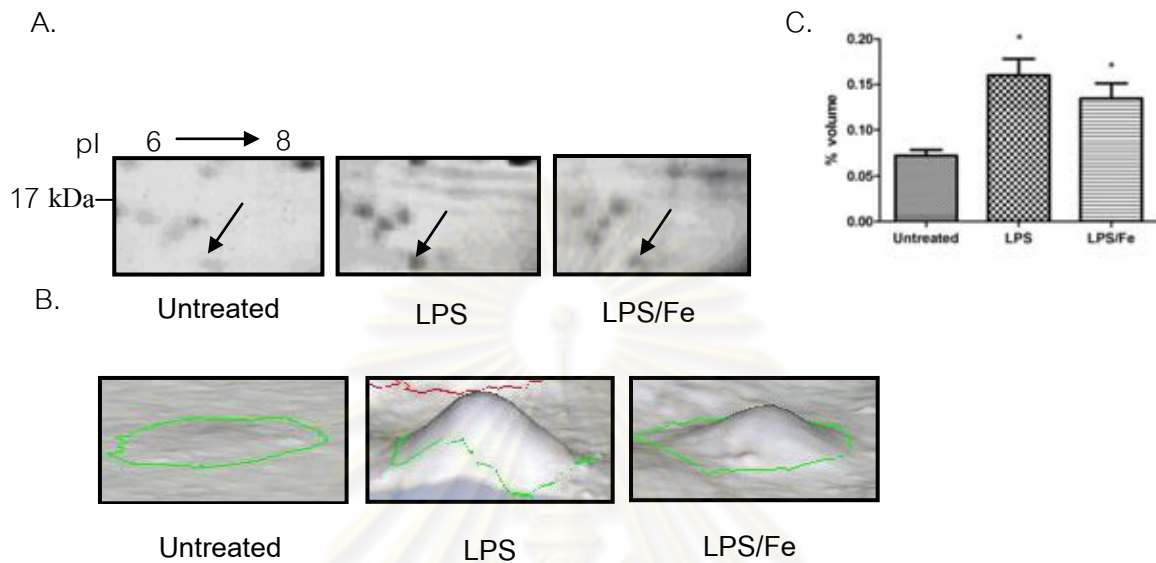


รูปที่ 4.5 แสดงภาพตัวแทนเจลจากการทำ 2D-PAGE ที่ได้จากการหลังของ microglia ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ระบุจุดโปรตีนในตำแหน่งที่มีลูกศรชี้และตัดจุดโปรตีนนั้นส่งไปวิเคราะห์หาเอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC MS/MS

จากการส่งจุดโปรตีนที่คัดเลือกเพื่อไปวิเคราะห์หาเอกลักษณ์โปรตีนซึ่งจะนำเสนอตำแหน่งของจุดโปรตีนและชนิดของโปรตีนที่ได้พร้อมกัน ดังนี้

จุดโปรตีนที่ 1 ID 6 ซึ่งพบบนเจล ในตำแหน่ง MW = 10-17 kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มีและมีธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.6 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน hemoglobin ซึ่งมี MW = 15.94 kDa, pI = 7.12 จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน hemoglobin ลดลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็ยังพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน hemoglobin เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

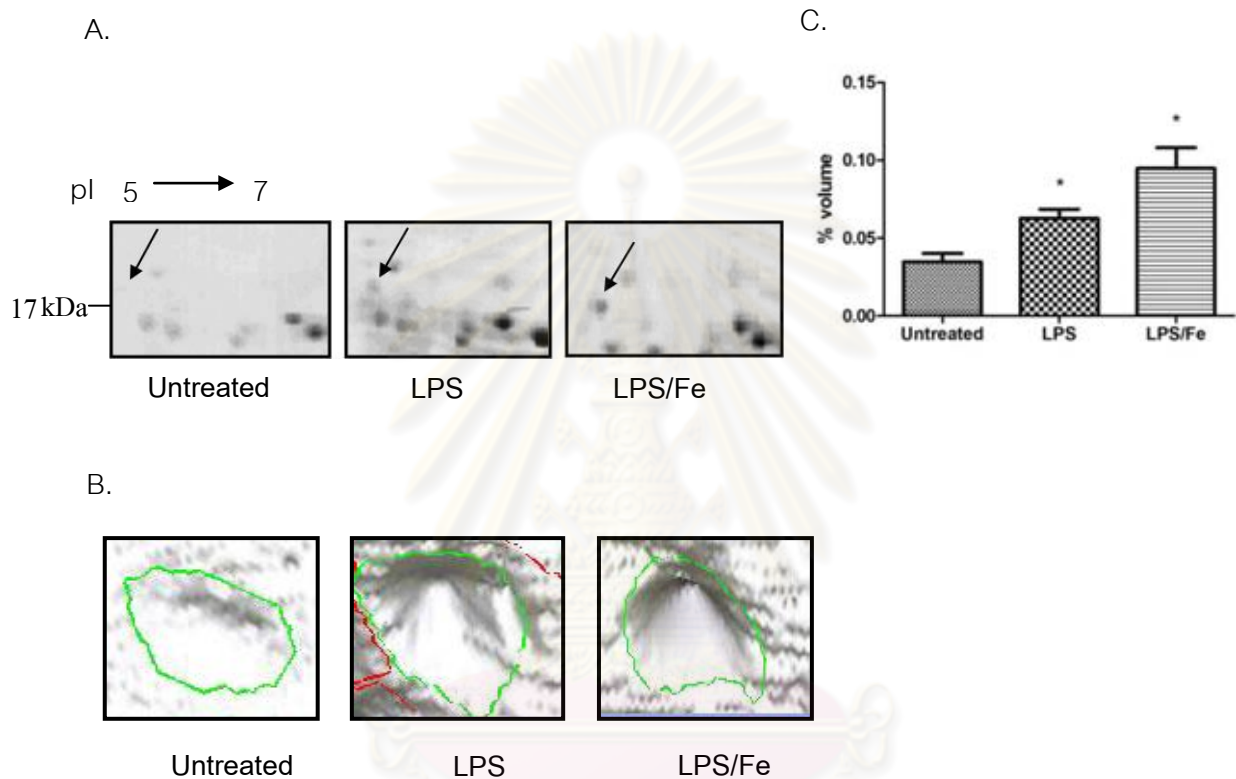
($P < 0.05$) สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน hemoglobin เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูป 4.6 C)



รูปที่ 4.6 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 6 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D-PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำผลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ LPS/Fe ลดลงจาก LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated

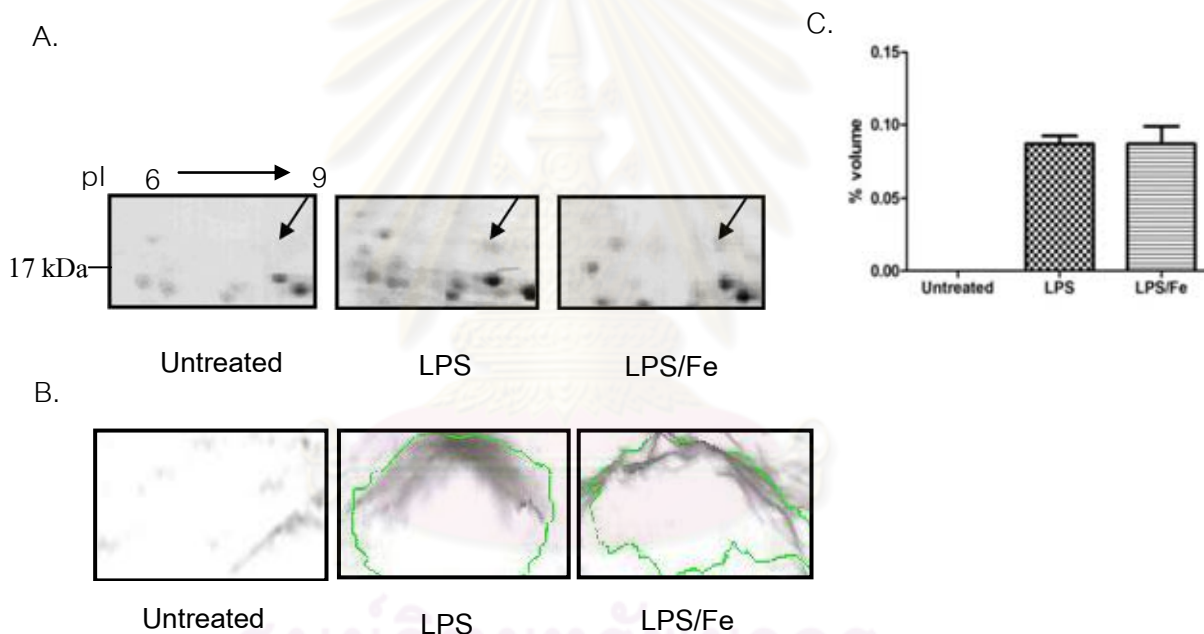
จุดโปรตีนที่ 2 ID 55 ซึ่งพบในตำแหน่ง MW = 17-26 kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มีและมีธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.7 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน stathmin1 ซึ่งมี MW = 17.26 kDa, pI = 5.76 จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน stathmin1 เพิ่มขึ้นจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างไม่มี

นัยสำคัญทางสถิติ แต่ธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้ microglia หลังโปรตีน stathmin1 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน stathmin1 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูป 4.7 C)



รูปที่ 4.7 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 55 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D -PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated

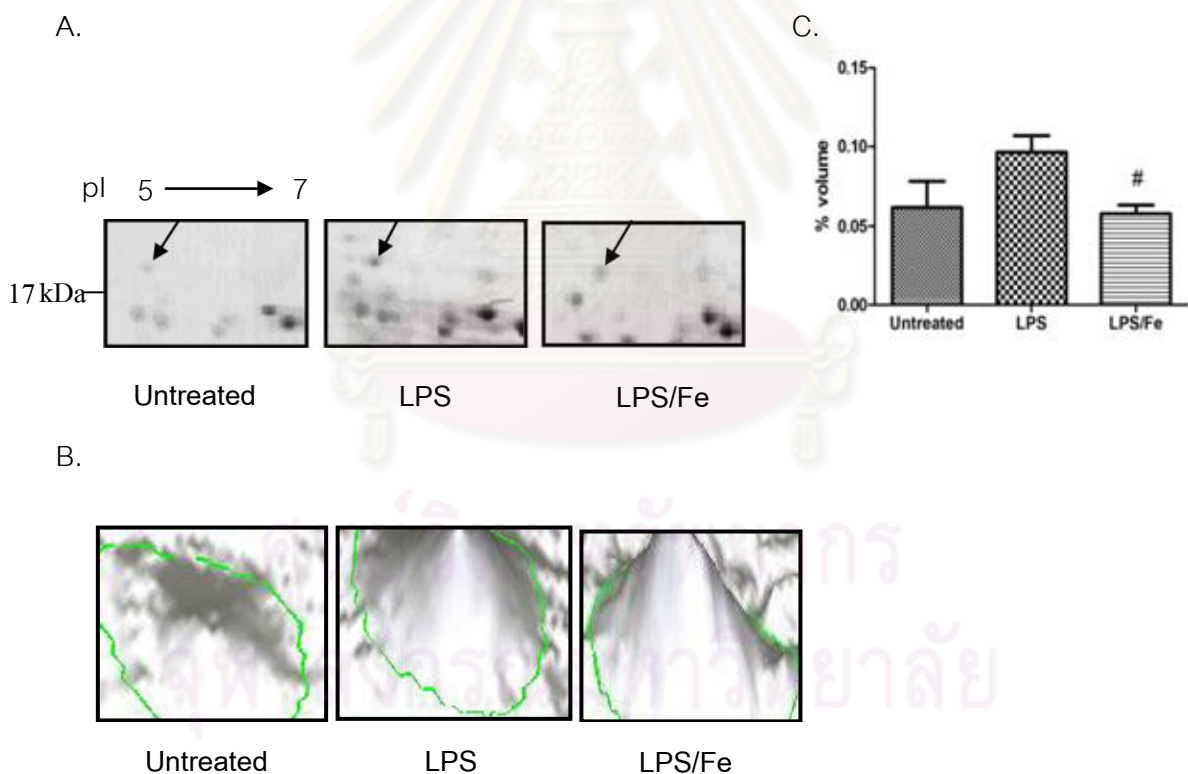
จุดโปรตีนที่ 3 ID 56 ซึ่งพบในตำแหน่ง MW = 17-26 kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มีและมีธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.8 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน cofilin-1 ซึ่งมี MW = 18.77 kDa, pI = 8.22 และ actin binding protein encoded by gene cofilin-1[clf1] ซึ่งมี MW = 25.29 kDa, pI = 8.63 จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไม่ทำให้โปรตีน cofilin-1 เปลี่ยนแปลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน cofilin-1 จากที่ไม่พบใน microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน cofilin-1 จากที่ไม่พบใน microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นเช่นกัน (รูป 4.8 C)



รูปที่ 4.8 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 56 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D -PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เกิดขึ้นใหม่จาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe

เกิดขึ้นใหม่จาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

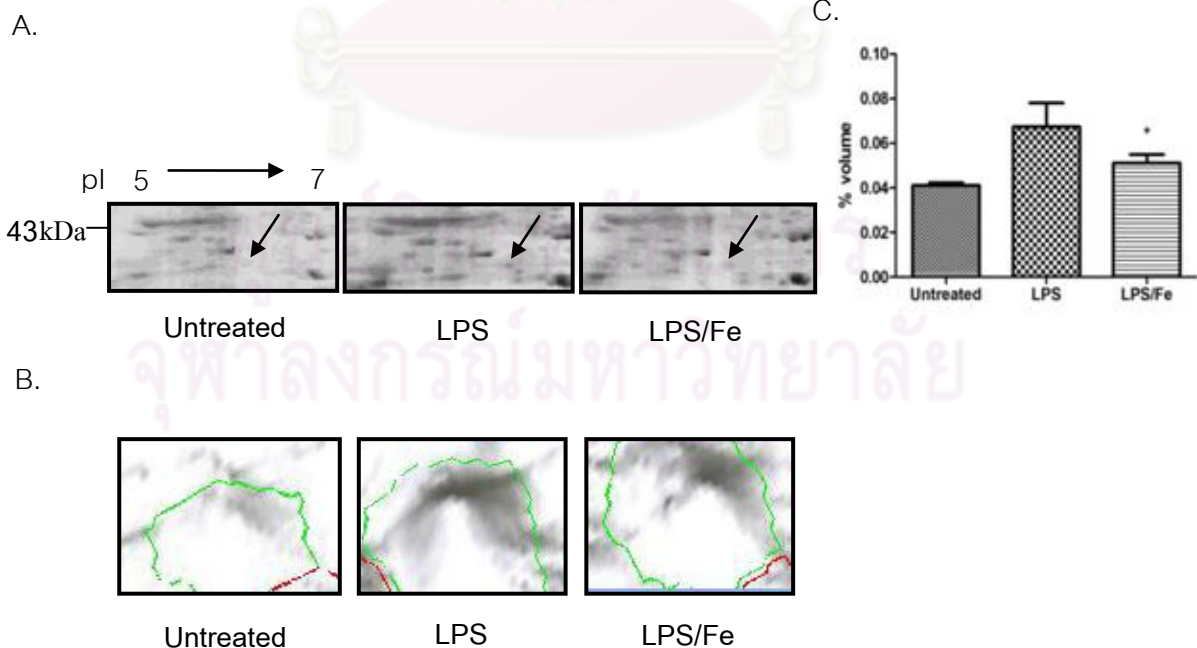
จุดโปรตีนที่ 4 ID 58 ซึ่งพบในตำแหน่ง MW = 17-26 kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่ได้มีและมีความผิดปกติ ตามลำดับ (รูป 4.9 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน dUTPase ซึ่งมี MW = 17.57 kDa, pI = 5.74 จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน dUTPase ลดลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และธาตุเหล็กไม่ทำให้ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน dUTPase เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน dUTPase เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 4.9 C)



รูปที่ 4.9 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 58 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่ได้มี (LPS) และมีความผิดปกติ (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D-PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุด

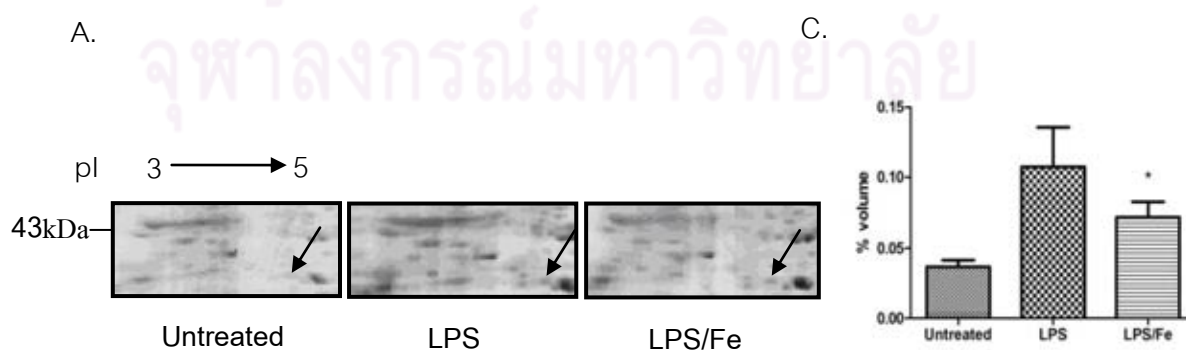
โปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe ไม่แตกต่างจาก Untreated แต่ LPS/Fe ลดลงจาก LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ # คือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม LPS treated

จุดโปรตีนที่ 5 ID 105 ซึ่งพบในตำแหน่ง MW = 26-34 kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มีและมีธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.10 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือโปรตีน germ cell specific gene 3 protein ซึ่งมี MW = 33.51 kDa, pI = 6.46 จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน germ cell specific gene 3 protein ลดลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน germ cell specific gene 3 protein เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน germ cell specific gene 3 protein เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 4.10 C)

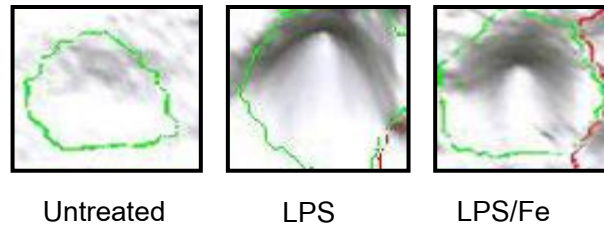


รูปที่ 4.10 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 105 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D-PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ LPS/Fe ลดลงจาก LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated

จุดโปรตีนที่ 6 ID 109 ซึ่งพบในตำแหน่ง $MW = 34-43$ kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มีและธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.11 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน F-actin capping protein beta subunit ซึ่งมี $MW = 30.95$ kDa, $pI = 5.69$ จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน F-actin capping protein beta subunit ลดลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ ธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน F-actin capping protein beta subunit เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน F-actin capping protein beta subunit เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 4.11 C)

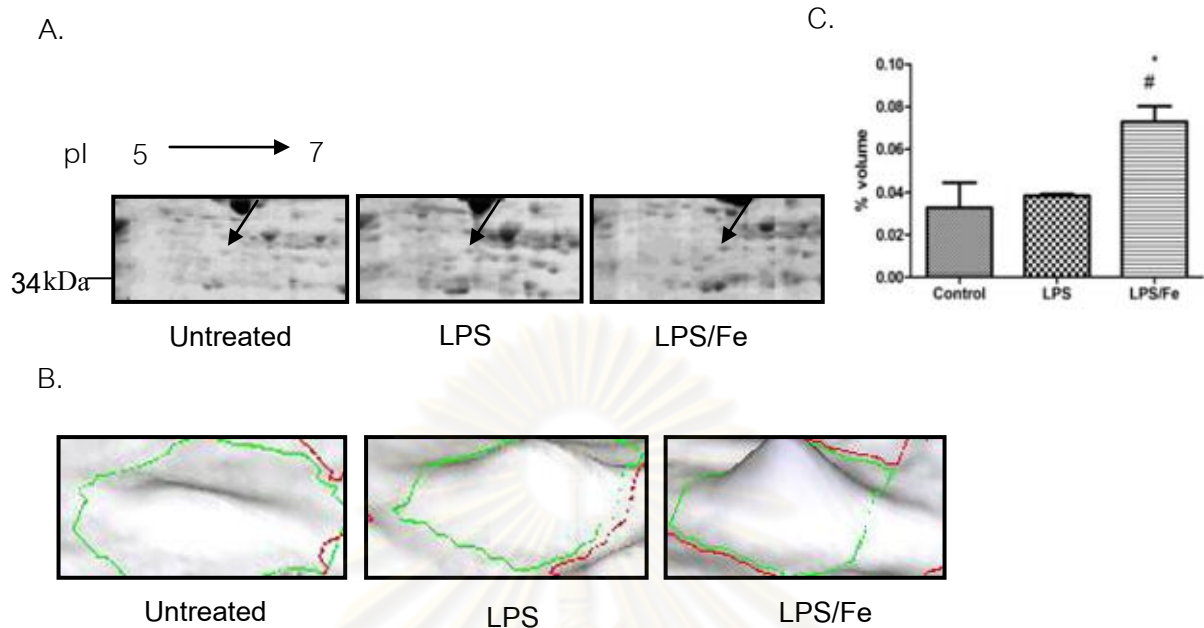


B.



รูปที่ 4.11 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 109 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D-PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ LPS/Fe ลดลงจาก LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated

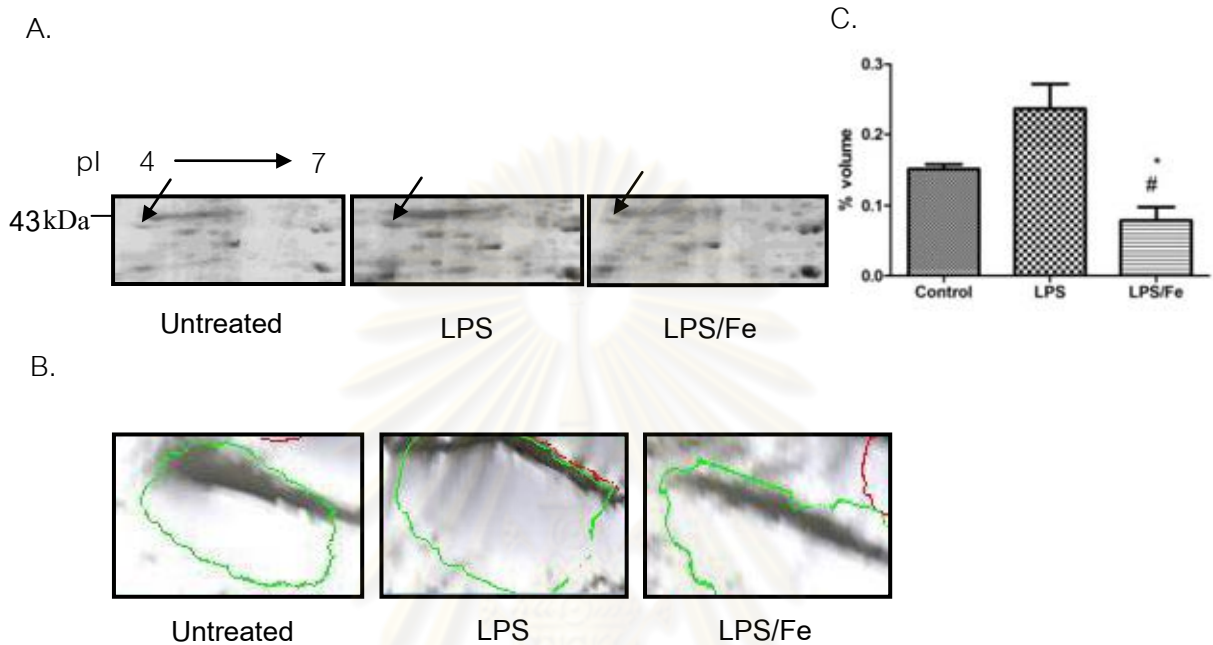
จุดโปรตีนที่ 7 ID 127 ซึ่งพบในตำแหน่ง $MW = 34-43$ kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มีและธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.12 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน transaldolase1 ซึ่งมี $MW = 37.53$ kDa, $pI = 6.57$ จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน transaldolase 1 เพิ่มขึ้นจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน transaldolase1 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ไม่ทำให้การหลังโปรตีน transaldolase1 เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (รูป 4.12 C)



รูปที่ 4.12 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 127 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่ได้มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D -PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS ไม่มีความแตกต่างกับ Untreated และ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก Untreated, LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated, # คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม LPS treated

จุดโปรตีนที่ 8 ID 232 ซึ่งพบในตำแหน่ง $MW = 34-43$ kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่ได้มีและธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.13 A และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน actin-related protein ซึ่งมี $MW = 42.04$ kDa, $pI = 5$ จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน actin-related protein ลดลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน actin-related protein ลดลงเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$) สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หลังโปรตีน actin-related protein เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 4.13 C)

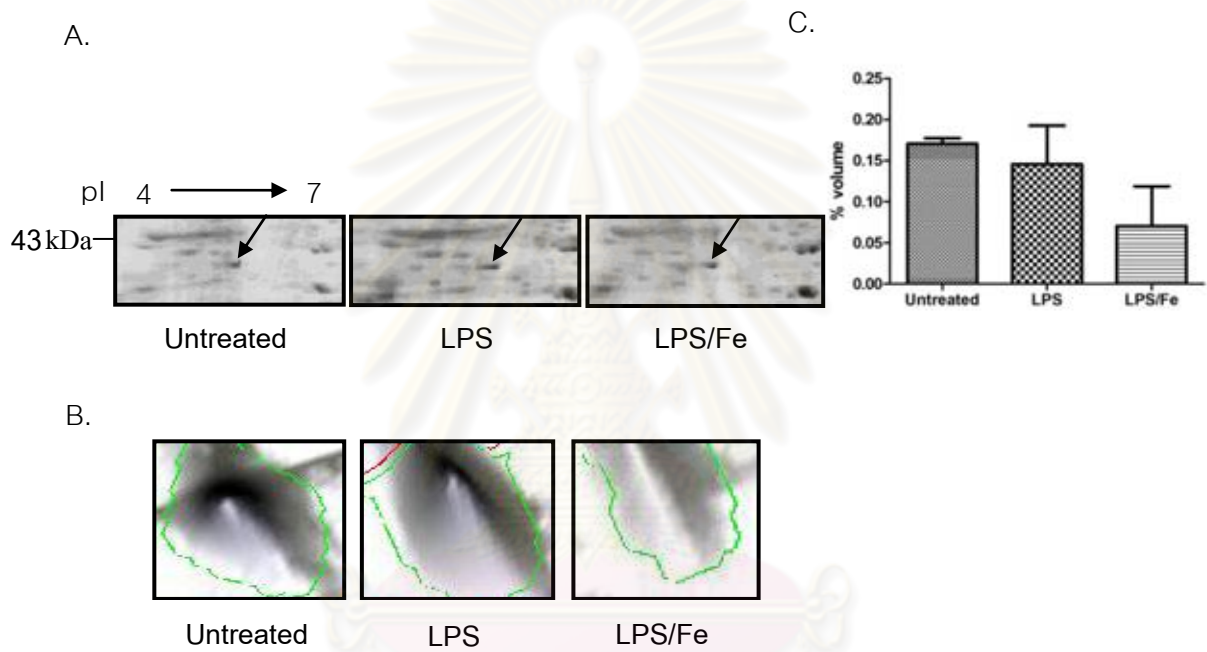


รูปที่ 4.13 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 232 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่ได้มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D -PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS เพิ่มขึ้นจาก Untreated อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ LPS/Fe เพิ่มขึ้นจาก Untreated, LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายเหตุ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Untreated, # คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม LPS treated

อย่างไรก็ตามมีจุดโปรตีนที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีความแตกต่างด้วยตา

จุดโปรตีนที่ 9 ID 371 ซึ่งพบในตำแหน่ง MW = 34-43 kDa บนเจลที่แสดงจุดโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น microglia ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่ได้มีและธาตุเหล็ก ตามลำดับ (รูป 4.14 A

และ B) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS ที่มีความเป็นไปได้สูงสุด คือ โปรตีน apolipoprotein E (apo E) ซึ่งมี MW = 33.20 kDa, pI = 5.82 จากผลการทดลองพบว่าธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลงการหลังโปรตีน apoE ลดลงจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้หลังโปรตีน apoE ลดลงเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ไม่ทำให้การหลังโปรตีน apoE เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (รูป 4.14 C)



รูปที่ 4.14 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีน ID 371 ซึ่งได้มาจากการหลังโปรตีนของ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Untreated) microglia ที่ถูกกระตุ้นในขณะที่ไม่มี (LPS) และมีธาตุเหล็ก (LPS/Fe) A. ภาพตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ได้จากการทำ 2D -PAGE B. ภาพ 3D ที่แสดงตัวแทนจุดโปรตีนจากแต่ละ condition ซึ่งพื้นที่ที่เป็นสีเขียวล้อมรอบคือจุดโปรตีน ได้มาจากการนำเจลเข้าโปรแกรม image analysis C. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ % volume แสดงให้เห็นว่า LPS ไม่แตกต่างจาก Untreated และ LPS/Fe ลดลงจาก Untreated, LPS

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนด้วย LC-MS/MS

แสดงผลที่ได้จากการส่งไปวิเคราะห์เอกลักษณ์โปรตีนในแต่ละจุดโปรตีน โดยโปรตีนที่เป็นไปได้ในแต่ละจุดโปรตีนแสดงไว้ในภาคผนวก ก

ตารางที่ 4.3 แสดงจุดโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์โดย LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล NCBI nr

Id ^a	Sequence ^b	Accession number ^c	Protein name	MW ^d (KDa)	pI ^e	Score ^f
6	R.LLVYPWTQR.Y	gi 122513	Hemoglobin	15.94	7.12	37
55	K.DLSLEEIQK.K R.ASGQAFELILSPR.S	gi 9789995	Stathmin1	17.26	5.76	99
56	K.HELQANCYEEVK.D K.EILVGDVGGTVDDPYTTFVK.M	gi 6680924	Cofilin- 1, non-muscle	18.77	8.22	175
58	R.RDLPVTR.T	gi 8347092	dUTPase	17.57	5.74	113
105	R.RDLPVTR.T	gi 7448800	Germ cell specific gene 3 protein	33.51	6.46	15
109	K.TKDIVNGLR.S	gi 4826659	F-actin capping protein	30.95	5.69	46
127	K.ALAGCDFLTISPK.L K.AAQTSDSEKIHLDEK.A	gi 33859640	Transaldolase1	37.53	6.57	110
232	K.AGLSGEIGPR.H	gi 13386316	Actin-related protein	42.04	5	22
371	R.TANLGAGAAQPLR.D R.NEVHTMLGQSTEEIR.A K.IQASVATNPIITPVAQENQ	gi 192005	Apolipoprotein E	33.2	5.82	182

^a เลขประจำตัว (id) ของจุดโปรตีนที่ตัดส่ง LC-MS/MS

^d มวลโมเลกุล

^b sequence ที่ match กับฐานข้อมูล mascot

^e ประจุสุทธิ

^c ลำดับที่ของฐานข้อมูล NCBI nr ซึ่งเป็นข้อมูลทาง bioinformatics ของโปรตีนได้จาก

ion score

MS/MS

LC-

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจาก microglia เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ควบคุมและตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในระบบประสาทและมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคทางระบบประสาทในกลุ่ม neurodegenerative disorders หลายชนิด เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease และ Huntington's disease ในระดับเซลล์พบว่ามีการกระตุ้นของ microglia ที่ถูกกระตุ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้จำลองสภาวะการกระตุ้นของ microglia เมื่อมีธาตุเหล็กโดยใช้ระบบเซลล์เพาะเลี้ยง การกระตุ้นของ microglia เกิดขึ้นโดยใช้ LPS ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่รู้จักดี LPS จะไปกระตุ้น toll like receptor (TLR) - 4 ซึ่งเป็น receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ microglia ผลของธาตุเหล็กที่มีต่อการกระตุ้นของ microglia ด้วย LPS สามารถตรวจวัดได้จากรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก microglia ที่ถูกกระตุ้นเมื่อมีเหล็กเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแต่ไม่มีเหล็ก โปรตีนที่เซลล์หลั่งออกมาจะถูกแยกตามประจุและมวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิค 2D-PAGE โปรตีนที่ปรากฏบนเจลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หลังจากที่นำไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ NCBI

ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า การใช้ LPS กระตุ้น microglia ทำให้ microglia หลั่งโปรตีนออกมามากกว่าเมื่อไม่ถูกกระตุ้น (LPS vs untreated control) ในจำนวนนี้โปรตีนที่มีการหลังเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น มี 7 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นโปรตีนที่มีการหลังเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมี 3 ชนิด ได้แก่ stathmin 1, cofilin-1 และ hemoglobin และกลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มว่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติมี 4 ชนิด ได้แก่ F-actin capping protein, actin-related protein, dUTPase และ germ cell specific gene 3 protein ในจำนวน candidate proteins นี้ ไม่พบโปรตีนในกลุ่ม cytokines และ chemokines ตามที่มีรายงานไว้ใน literature ซึ่งอาจจะเป็นเพราะระยะเวลาในการกระตุ้นสั้น หรือจุดโปรตีนอาจไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่าแบบมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงไม่ได้ถูกเลือกเพื่อที่จะนำมาศึกษาเอกลักษณ์ของจุดโปรตีนนั้นๆ จากจำนวน candidate proteins ที่สืบค้นได้ F-actin capping protein เป็นโปรตีนที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าสามารถหลั่งออกมาได้จาก macrophages^[52] ซึ่งเป็นเซลล์ใน lineage เดียวกับ microglia เท่าที่ทราบในปัจจุบัน F-actin capping protein ทำหน้าที่ช่วยในการ

polymerized ของ actin ทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นเคลื่อนที่ได้มากขึ้นแต่หน้าที่ภายนอกเซลล์ของโปรตีนตัวนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ถึงแม้ว่า stathmin1 และ cofilin-1 ยังไม่มีรายงานว่าสามารถหลั่งออกมาจาก microglia ได้ แต่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า cofilin-1 ซึ่งเป็น actin binding protein สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ได้โดยผ่านทาง ER/Golgi independent pathway^[53, 54] จึงเป็นไปได้ว่า stathmin1 ซึ่งเป็น tubulin binding protein อาจจะถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ได้โดยวิธีเดียวกัน มีรายงานว่า cofilin-1 สามารถจับกับโปรตีนได้หลายตัว รวมถึง $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase channel ซึ่งแสดงให้เห็นว่า microglia ที่ถูกกระตุ้นอาจมีบทบาทใน การรักษาสมดุล ไอออนในระบบประสาท^[55] การที่พบว่า microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS สามารถหลั่ง hemoglobin มีความเป็นไปได้เล็กน้อยเนื่องจาก hemoglobin ไม่เคยมีรายงานว่าถูกสร้างได้จากเซลล์ในระบบประสาท ยิ่งไปกว่านั้นค่า ion score ที่ได้จากการสืบค้น amino acid sequences จากจุดโปรตีนกับฐานข้อมูลมีค่าต่ำ แม้ว่า hemoglobin จะมีค่าประจุและมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับตำแหน่งของจุดโปรตีนที่ตัดไปวิเคราะห์

เมื่อมีธาตุเหล็กในขณะ that microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างน้อย 2 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแต่ไม่มีธาตุเหล็ก (LPS/Fe vs LPS) มี 8 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีธาตุเหล็ก ได้แก่ transaldolase1 ซึ่งเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ stathmin1 ที่เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีนที่ลดลงเมื่อมีธาตุเหล็ก มีอยู่ 6 ชนิด คือ dUTPase และ actin-related protein ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เหลืออีก 4 ชนิด คือ hemoglobin, F-actin capping protein, apoE และ germ cell specific gene 3 protein พบว่าลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากจำนวน candidate proteins ที่สืบค้นได้ transaldolase1 เป็นโปรตีนที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าหลั่งออกมาจากเซลล์ได้ โดยผ่านทาง ER/Golgi independent pathway เช่นเดียวกับ cofilin-1^[54] กลไกที่ธาตุเหล็กไปทำให้ microglia ที่ถูกกระตุ้นหลัง transaldolase1 เพิ่มมากขึ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ที่น่าสนใจ คือ การที่เหล็กไปลดการหลั่ง apoE จากเซลล์ microglia สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Courtois และคณะในปี 2000 ที่รายงานไว้ว่าเหล็กไปเปลี่ยนแปลง lipoprotein metabolism ใน epithelial colorectal carcinoma cells^[56] และมีหลักฐานที่พบว่า microglia สามารถหลั่ง apoE ได้ ซึ่งเป็นการสนับสนุนการทดลองนี้^[57] และโปรตีน stathmin1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบเพิ่มขึ้นเมื่อมีธาตุเหล็กในขณะ that microglia ถูกกระตุ้น ซึ่งจากรายงานที่พบว่าระดับของ stathmin1 ลดลงในสมองส่วน cortex ของคนที่เป็นโรค Alzheimer's disease^[58] แต่ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาในระยะ 6 ชั่วโมงแรกซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าในตอนแรกเพิ่มขึ้นแต่พอเป็นโรค Alzheimer's disease แล้ว stathmin1 อาจลดลงแต่ต้องมีการ

ทดสอบเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามจากรายชื่อโปรตีนที่เสนอมาพบว่ายังขาดหลักฐานที่สนับสนุนว่ามีการแสดงออกของ microglia ได้แก่ dUTPase, actin-related protein และ germ cell specific gene 3 protein

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า

1. microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีการหลั่งโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ microglia ที่ไม่ถูกกระตุ้น ซึ่งโปรตีนที่มีการหลั่งเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า มี 7 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นโปรตีนที่มีการหลั่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 3 ชนิด ได้แก่ stathmin 1, cofilin-1 และ hemoglobin และกลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มว่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ 4 ชนิด ได้แก่ F-actin capping protein, actin-related protein, dUTPase และ germ cell specific gene 3 protein

2. microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และมีธาตุเหล็ก เทียบกับ microglia ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ไม่มีธาตุเหล็ก หลังโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปที่มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่า มี 8 ชนิด สามารถแบ่งโปรตีนเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีธาตุเหล็กมี 2 ชนิด ซึ่งชนิดที่ 1 คือ transaldolase1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชนิดที่ 2 คือ stathmin1 มีแนวโน้มว่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่ลดลงเมื่อมีธาตุเหล็กมี 6 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นโปรตีนที่มีการหลั่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 2 ชนิด ได้แก่ dUTPase และ actin-related protein และ กลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มว่าลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ 4 ชนิด ได้แก่ hemoglobin, F-actin capping protein, apoE และ germ cell specific gene 3 protein

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยที่ได้นี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของการศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อหารูปแบบโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูก modify ด้วยธาตุเหล็ก จากการหลั่งของ microglia ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดที่ได้ด้วย real time RT-PCR หรือ Western Blot ซึ่งโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถอธิบายสภาวะที่มีธาตุเหล็กในขณะ microglia ถูกกระตุ้นใน 6 ชั่วโมงแรกได้ และอาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ต่อไป ซึ่งอาจใช้เป็น marker ในการติดตามโรคที่มีพยาธิสภาพที่มีธาตุเหล็กในขณะ microglia ถูกกระตุ้น เพื่อวินิจฉัยและหาแนวทางป้องกันได้ในอนาคตโดยใช้เป็นยา หรือ วัคซีนป้องกันโรคที่ยังป้องกันไม่ได้หรือได้ผลไม่ดีพอซึ่งทั้งหมดดังกล่าวจะนำมาสู่การวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วแม่นยำมากขึ้น และการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เป็นต้น



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1]. Bourre, J.M., et al., *Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids.* J Neurochem, 1984. 43(2): p. 342-8.
- [2]. Wigglesworth JM, B.H., *Iron dependent enzymes in the brain. In Brain Iron. Neurochemical and Behavioural Aspects*, ed. MBH Youdim, 1988: p. 25-66.
- [3]. Beard, J.L. and J.R. Connor, *Iron status and neural functioning.* Annu Rev Nutr, 2003. 23: p. 41-58.
- [4]. Dallman, P.R., M.A. Siimes, and E.C. Manies, *Brain iron: persistent deficiency following short-term iron deprivation in the young rat.* Br J Haematol, 1975. 31(2): p. 209-15.
- [5]. B., L., *Behavioural aspects of iron deficiency in infancy.* Am. J. Clin. Nutr., 1989. 50: p. 641-55.
- [6]. LJ., F., *Dietary iron: Birth to two years.* Raven Press, 1989.
- [7]. Connor, J.R., et al., *A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain.* J Comp Neurol, 1995. 355(1): p. 111-23.
- [8]. Cheepsunthorn, P., C. Palmer, and J.R. Connor, *Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain.* J Comp Neurol, 1998. 400(1): p. 73-86.
- [9]. Cheepsunthorn, P., et al., *Hypoxic/ischemic insult alters ferritin expression and myelination in neonatal rat brains.* J Comp Neurol, 2001. 431(4): p. 382-96.
- [10]. Zhang, X., et al., *Cellular iron status influences the functional relationship between microglia and oligodendrocytes.* Glia, 2006. 54(8): p. 795-804.
- [11]. Liu, B. and J.S. Hong, *Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. 304(1): p. 1-7.
- [12]. Burdo, J.R. and J.R. Connor, *Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview.* Biometals, 2003. 16(1): p. 63-75.

- [13]. Gonzalez-Scarano, F. and G. Baltuch, *Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases*. Annu Rev Neurosci, 1999. 22: p. 219-40.
- [14]. Kim, S.U. and J. de Vellis, *Microglia in health and disease*. J Neurosci Res, 2005. 81(3): p. 302-13.
- [15]. Hanisch, U.K., *Microglia as a source and target of cytokines*. Glia, 2002. 40(2): p. 140-55.
- [16]. Kaomongkolgit, R., et al., *Iron increases MMP-9 expression through activation of AP-1 via ERK/Akt pathway in human head and neck squamous carcinoma cells*. Oral Oncol, 2008. 44(6): p. 587-94.
- [17]. Buchanan, M.M., et al., *Toll-like receptor 4 in CNS pathologies*. J Neurochem, 2010. 114(1): p. 13-27.
- [18]. Wessling-Resnick, M., *Iron homeostasis and the inflammatory response*. Annu Rev Nutr. 30: p. 105-22.
- [19]. Pantopoulos, K., *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1012: p. 1-13.
- [20]. De Domenico, I., D. McVey Ward, and J. Kaplan, *Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(1): p. 72-81.
- [21]. Shinobu, L.A. and M.F. Beal, *The role of oxidative processes and metal ions in aging and Alzheimer disease*. In: *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. Ed: Connor J R, Plenum Press, NY, 1997.
- [22]. Siah, C.W., et al., *Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders*. Clin Biochem Rev, 2006. 27(1): p. 5-16.
- [23]. Zaleska, M.M. and R.A. Floyd, *Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron*. Neurochem Res, 1985. 10(3): p. 397-410.
- [24]. Schipper, H.M., *Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing*. Ageing Res Rev, 2004. 3(3): p. 265-301.
- [25]. Munoz, M., I. Villar, and J.A. Garcia-Erce, *An update on iron physiology*. World J Gastroenterol, 2009. 15(37): p. 4617-26.

- [26]. Ke, Y. and Z.M. Qian, *Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry*. Prog Neurobiol, 2007. 83(3): p. 149-73.
- [27]. Connor, J.R. and S.L. Menzies, *Cellular management of iron in the brain*. J Neurol Sci, 1995. 134 Suppl: p. 33-44.
- [28]. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. 403(6771): p. 776-81.
- [29]. Levenson, C.W. and N.M. Tassabehji, *Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms*. Ageing Res Rev, 2004. 3(3): p. 251-63.
- [30]. Qian, Z.M., et al., *Cerebellar granule cells acquire transferrin-free iron by a carrier-mediated process*. Neuroscience, 1999. 92(2): p. 577-82.
- [31]. Erikson, K.M. and M. Aschner, *Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter*. Neurotoxicology, 2006. 27(1): p. 125-30.
- [32]. Malecki, E.A., et al., *Existing and emerging mechanisms for transport of iron and manganese to the brain*. J Neurosci Res, 1999. 56(2): p. 113-22.
- [33]. Qian, Z.M. and X. Shen, *Brain iron transport and neurodegeneration*. Trends Mol Med, 2001. 7(3): p. 103-8.
- [34]. Bradbury, M.W., *Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system*. J Neurochem, 1997. 69(2): p. 443-54.
- [35]. Moos, T. and E.H. Morgan, *Evidence for low molecular weight, non-transferrin-bound iron in rat brain and cerebrospinal fluid*. J Neurosci Res, 1998. 54(4): p. 486-94.
- [36]. Moos, T. and E.H. Morgan, *A morphological study of the developmentally regulated transport of iron into the brain*. Dev Neurosci, 2002. 24(2-3): p. 99-105.
- [37]. Moos, T., et al., *Iron trafficking inside the brain*. J Neurochem, 2007. 103(5): p. 1730-40.
- [38]. Cammer, W., *Carbonic anhydrase in oligodendrocytes and myelin in the central nervous system*. Ann N Y Acad Sci, 1984. 429: p. 494-7.

- [39]. Beard, J.L., *Iron deficiency and neural development: an update*. *Arch Latinoam Nutr*, 1999. 49(3 Suppl 2): p. 34S-39S.
- [40]. Beal, M.F., *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1366(1-2): p. 211-23.
- [41]. Bruner, A.B., et al., *Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescent girls*. *Lancet*, 1996. 348(9033): p. 992-6.
- [42]. Beard, J.L., *Neuroendocrine alterations in iron deficiency*. *Prog Food Nutr Sci*, 1990. 14(1): p. 45-82.
- [43]. Beard, J.L., J.D. Connor, and B.C. Jones, *Brain iron: location and function*. *Prog Food Nutr Sci*, 1993. 17(3): p. 183-221.
- [44]. Erikson, K.M., B.C. Jones, and J.L. Beard, *Iron deficiency alters dopamine transporter functioning in rat striatum*. *J Nutr*, 2000. 130(11): p. 2831-7.
- [45]. Chan, W.Y., S. Kohsaka, and P. Rezaie, *The origin and cell lineage of microglia: new concepts*. *Brain Res Rev*, 2007. 53(2): p. 344-54.
- [46]. Suzumura, A., et al., *Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1088: p. 219-29.
- [47]. Hallgren, B. and P. Sourander, *The effect of age on the non-haemin iron in the human brain*. *J Neurochem*, 1958. 3(1): p. 41-51.
- [48]. Connor, J.R., et al., *A quantitative analysis of iso-ferritins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains*. *J Neurochem*, 1995. 65(2): p. 717-24.
- [49]. Zecca, L., et al., *Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes*. *J Neurochem*, 2001. 76(6): p. 1766-73.
- [50]. Epstein, D.K. and J.R. Connor, *The Role of Iron In Neurodegenerative Disease*. . *Chemicals and Neurodegenerative Disease*. , 1999: p. 28-50.
- [51]. Lovell, M.A., et al., *Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques*. *J Neurol Sci*, 1998. 158(1): p. 47-52.

- [52]. Dupont, A., et al., *Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome*. Proteomics, 2004. 4(6): p. 1761-78.
- [53]. Wang, P., et al., *Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(18): p. 2405-17.
- [54]. Yamashita, R., et al., *Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Mol Cell Biochem, 2007. 298(1-2): p. 83-92.
- [55]. Lee, K., et al., *Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin*. Biochem J, 2001. 353(Pt 2): p. 377-85.
- [56]. Courtois, F., et al., *Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. 279(1): p. G12-9.
- [57]. Mori, K., et al., *L-serine-mediated release of apolipoprotein E and lipids from microglial cells*. Exp Neurol, 2004. 185(2): p. 220-31.
- [58]. Finehout, E.J., et al., *Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval*. Clin Chem, 2006. 52(10): p. 1906-13.
- [59]. Meyer, G. and E.L. Feldman, *Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system*. J Neurochem, 2002. 83(3): p. 490-503.
- [60]. Morii, H., Y. Shiraishi-Yamaguchi, and N. Mori, *SCG10, a microtubule destabilizing factor, stimulates the neurite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons*. J Neurobiol, 2006. 66(10): p. 1101-14.
- [61]. Nolen, B.J., R.S. Littlefield, and T.D. Pollard, *Crystal structures of actin-related protein 2/3 complex with bound ATP or ADP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(44): p. 15627-32.
- [62]. Czyzewski, K., A. Pfeffer, and M. Barcikowska, *[Apolipoprotein E function in the nervous system]*. Neurol Neurochir Pol, 1998. 32(1): p. 125-32.
- [63]. Bilger, A. and A. Nehlig, *Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. II. Glucose-6-*

phosphate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. Int J Dev Neurosci, 1992. 10(2): p. 143-52.

- [64]. Lu, B. and C.E. Bishop, *Mouse GGN1 and GGN3, two germ cell-specific proteins from the single gene Ggn, interact with mouse POG and play a role in spermatogenesis. J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 16289-96.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

โปรตีนที่ได้จาก LC-MS/MS เรียงตามลำดับคะแนน (score) จากสูงสุดไปต่ำสุด ซึ่งคำนวณมาจากลำดับของกรดอะมิโนที่ได้มาจากฐานข้อมูล NCBI nr คะแนนที่สูงสุดแปลผลว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็นโปรตีนชนิดนั้นมากที่สุดเนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับฐานข้อมูลสูงสุด และดูจากค่าประจุสุทธิ (pI), มวลโมเลกุล (MW)

จุดโปรตีนที่ 1 (ID 6) Mw = 10-17 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
R.LLVYPWTQR.Y	gi 122513	Hemoglobin subunit beta-1	15.944	7.12	37
K.VKTVISPR.G R.LSRSGSSPEMK.D	gi 26354955 (Q8BT18)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	31
R.KVPESLAR.S	gi 31044436	Hypothetical proteinLOC52829	23.942	4.96	29
R.RDISHTK.L	gi 56238091	Novel protein	33.537	10.43	24
K.LLSNTVGPR.F	gi 21730675	Chain A, Alpha-Catenin Fragment, Residues 385-651	29.927	4.45	24
R.LFNLTATFSR.H	gi 12851655 (Q8BHC9)	Unnamed protein product (Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 11)	56.324	5.96	23
K.LLAESLPR.R	gi 122889948	Vacuolar protein sorting 13D	493.809	6.1	22
R.LGEHNINVLEGNEQFIDAAK.I	gi 16716569	Protease, serine, 1	26.802	4.75	21
R.RGDVGLLAR.E	gi 150378650	TPA: TPA_exp: G protein-coupled receptor 39-1b	35.605	9.28	21
K.MDPHAVEISR.E	gi 479113	Net	44.675	8.71	20

จุดโปรตีนที่ 2 (ID 55) Mw = 17-26 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
K.DLSLEEIQK.K R.ASGQAFELILSPR.S	gij9789995	Stathmin 1	17.264	5.76	99
K.VKTVISPR.G	gij26354955 (Q8BTI8)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	26
K.EPQPVK.K	gij2501986	TAFII250 transcription factor	51.156	8.49	25
R.VESIGQWQK.V	gij37590590	Ano8 protein	71.679	5.25	24
K.NLSLNSQAVK.E	gij37360328	mKIAA1333 protein	85.237	7.96	23
K.EADENGALKK.E	gij81877259	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 8	23.526	6.9	22
K.ELDAEELQK.E	gij26006147	mKIAA0336 protein	190.042	5.04	21
K.ILKPVK.K	gij1094400	Protein kinase CK2:SUBUNIT=alpha	45.185	6.98	20
R.TWQEHVKSRA	gij51874043	Predicted gene, EG382106	54.333	8.05	19
R.LFNLTATFSR.H	gij12851655 (Q8BHC9)	Unnamed protein product (Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 11)	56.324	5.96	19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 3 (ID 56) Mw = 17-26 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
K.HELQANCYEEVK.D K.EILVGDVGGQTVDDPYTTFVK.M	gij6680924	Cofilin 1, non-muscle	18.776	8.22	175
K.HELQANCYEVK.D K.EILVGDVGGQTVDDPYTTFVK.M	gij12861068 (Q9CX22)	Unnamed protein product (Actin binding protein encoded by gene cofilin-1[clf1])	25.293	8.63	111
K.TVISPR.G K.VKTVISPR.G K.VKTVISPR.G	gij26354955 (Q8BTI8)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	41
K.TLNGAEMAPIK.I	gij22095027	Sex comb on midleg 1 isoform 1	74.598	9.42	29
R.LQLPAPPAPIK.A	gij74147754	Unnamed protein product	55.746	6.54	29
R.SGIVVKDVSIIK.V	gij26334641	Unnamed protein product	121.18	5.42	28
R.GEMSGRLGPLK.L	gij50510447	mKIAA0302 protein	223.807	5.51	27
R.GAAEEAPRR.I	gij22122845	Solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7	60.694	5.7	26
R.RGDVGLLAR.E	gij150378650	G protein-coupled receptor 39-1b	35.605	9.28	26
R.KVTPAWVR.Q	gij26330127	Unnamed protein product	24.941	11.63	15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 4 (ID 58) Mw = 17-26 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
K.TDIQIAVPSGCYGR.V R.AAGYDLFSAYDYTISPMEK.A	gij8347092	dUTPase	17.575	5.74	113
R.LGEHNINVLLEGNEQFIDAAK.I	gij16716569	Protease, serine, 1	26.802	4.75	32
K.VKTVISPR.G	gij26354955	Unnamed protein product	284.043	12.09	31
R.TENLGLLELAHVLR.A	gij23272995	Rpusd3 protein	36.876	9.44	22
K.LLAESLPR.R	gij122889948	Vacuolar protein sorting 13D	493.809	6.1	17
R.LGRTSLPR.G	gij74181730	Unnamed protein product	99.466	5.58	17
R.KVPESLAR.S	gij31044436	Hypothetical protein LOC52829	23.942	4.96	20
R.LNVTIALR.V	gij46430530	MAS-related GPR, member B3	36.341	8.72	16
K.NLVQRNR.Q	gij420232	Transcription factor DRTF1 chain 1	47.847	9.4	15
R.QVRPEDR.G	gij26330127	Unnamed protein product	24.941	11.63	15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 5 (ID 105) Mw = 26-34 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
K.VKTVISPR.G	gi 26354955 (Q8BT18)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	24
R.KVPESLAR.S	gi 31044436	Hypothetical protein LOC52829	23.942	4.96	22
R.LGRTSLPR.G	gi 74181730	Unnamed protein product	99.466	5.58	17
R.LNVTIALR.V	gi 46430530	MAS-related GPR, member B3	36.341	8.72	16
R.LGAETLPR.A	gi 9910314	Cardiotrophin-like cytokine factor 1 precursor	25.473	8.7	16
R.RDLPVTR.T	gi 7448800	Germ cell specific gene 3 protein	33.516	6.46	15
R.ALQGALMIYFYR.E	gi 793931	Tryptophan-2,3-dioxygenase	47.924	6.66	15
K.AQRHELGANMYR.G	gi 24657693	Choline dehydrogenase	67.031	8.83	15
R.VEVAALAR.A	gi 26337463 (Q60952)	Unnamed protein product (Centrosome-associated protein)	80.694	5.02	15
R.DQIFR.Y	gi 10181216	F-box only protein 3 isoform 2	48.221	6.28	14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 6 (ID 109) Mw = 34-43 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
K.TKDIVNGLR.S	gij4826659	F-actin capping protein beta subunit	30.952	5.69	46
R.LFNLTATFSR.H	gij12851655 (Q8BHC9)	Unnamed protein product (Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 11)	56.324	5.81	33
R.RLNTVPNLSR.V	gij18204153	BC021381 protein	48.291	9.49	30
K.VKTVISPR.G	gij26354955 (Q8BTI8)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	24
K.VLEPKNLNSR.W	gij148682875	Exosome component 10, isoform CRA_a	104.535	7.16	22
R.LGRTSLPR.G	gij74181730	Unnamed protein product	99.466	5.58	22
K.DLPMVRGVK.S	gij148681214	mCG6218	192.468	6.21	22
R.LFPPLDSL.R.Q	gij124486907	Coiled-coil domain containing 142	80.964	8.04	21
R.SPTPTTPR.A	gij7259242 (Q99ML4)	Unnamed protein product (Pancreatitis-induced protein 49)	49.016	8.49	20
R.LNVTIALR.V	gij46430530	MAS-related GPR, member B3	36.341	8.72	18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 7 (ID 127) Mw = 34-43 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pI	scores
K.ALAGCDFLTISPK.L K.AAQTSDSEKIHLDEK.A	gij33859640	Transaldolase 1	37.534	6.57	110
R.LGEHNINVLEGNEQFIDAAK.I	gij16716569	Protease, serine, 1	26.802	4.75	30
K.VKTVISPR.G	gij26354955 (Q8BTI8)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	27
R.KVPESLAR.S	gij31044436	Hypothetical protein LOC52829	23.942	4.96	20
R.SWGITDLFDPLK.A	gij82954336	Hypothetical protein LOC319433	44.336	8.73	18
R.LIHYSYGDGNEQIGDVPDGYK.A	gij4204509	T cell receptor beta V-D-J region	13.119	6.3	17
R.WGGSSLYFDYWGQGTTLQTG.-	gij6625046	Immunoglobulin heavy chain variable region (CDR3)	12.435	6.75	16
K.LLAESLPR.R	gij122889948	Vacuolar protein sorting 13D	493.809	6.1	16
R.QVRPEDR.G	gij26330127	Unnamed protein product	24.941	11.63	16
K.KVEVEPAK.V	gij27817830	Connectin/titin N2A-PEVK	130.647	5.57	15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 8 (ID 232) Mw = 34-43 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pl	scores
R.RGDVGLLAR.E	gi 150378650	G protein-coupled receptor 39-1b	35.605	9.28	25
K.VKTVISPR.G	gi 26354955 (Q8BT18)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	26
K.KAQGSGRPR.C	gi 60223081	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 6	37.677	10.55	24
R.KVPESLAR.S	gi 31044436	Hypothetical protein LOC52829	23.942	4.96	23
K.AGLSGEIGPR.H	gi 13386316	Actin-related protein T2	42.045	5	22
R.LGRTSLPR.G	gi 74181730	Unnamed protein product	99.466	5.58	20
K.LLSNTVGPR.F	gi 21730675	Chain A, Alpha-Catenin Fragment	29.927	4.45	19
K.QWLDQSGVVK.F	gi 26324774 (Q8C176)	Unnamed protein product (Transcription initiation factor subunit 2)	70.714	7.86	18
K.LPKGMLPR.I	gi 94406004	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA	164.686	5.57	18
R.KVTPAWVR.Q	gi 26338143	Unnamed protein product	59.268	6.1	16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดโปรตีนที่ 9 (ID 371) Mw = 34-43 kDa

Sequences	Accessions	Proteins name	Mw (kDa)	pl	scores
R.TANLGAGAAQPLR.D R.NEVHTMLGQSTEEIR.A K.IQASVATNPIITPVAQENQ.-	gi 192005	Apolipoprotein E	33.206	5.82	182
R.RLNTVPNLSR.V	gi 18204153	BC021381 protein	48.291	9.49	34
R.LFNLTATFSR.H	gi 12851655 (Q8BHC9)	Unnamed protein product (Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 11)	56.324	5.81	33
R.ASKDGPLNSR.A	gi 17266280	Interleukin 17E precursor	18.072	7.7	30
K.VKTVISPR.G	gi 26354955 (Q8BTI8)	Unnamed protein product (Serine/arginine repetitive matrix protein 2)	284.043	12.09	26
K.VLEPKNLNSR.W	gi 148682875	Exosome component 10, isoform CRA_a	104.535	7.16	23
R.GFWDYIR.L	gi 7949125	RUN domain containing 3A	50.443	5.38	22
R.KVIVVSR.H	gi 4092077	Toll-like receptor 4 mutant	96.638	6.14	20
R.QVRPEDR.G	gi 148686106	EPS8-like 2, isoform CRA_b	21.673	5.51	19
R.QVRPEDR.G	gi 26330127	Unnamed protein product	24.728	11.63	19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

อุปกรณ์

1. เครื่อง miniVE สำหรับ SDS-PAGE (GE Healthcare)
2. เครื่อง Ettan™ IPGphor II™ (GE Healthcare)
3. กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS)
4. เครื่อง CO₂- Incubator (REVCOULTIMA)
5. เครื่อง Autoclave (HICLAVE)
6. เครื่อง Freezer – 20 °C (SANYO)
7. เครื่อง Freezer – 80 °C (SANYO)
8. ตู้เย็น 4 °C (SANYO)
9. สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) (BOECO)
10. เครื่อง Hot Plate Stirrer (HL Instrument)
11. เครื่อง Spectrophotometer (BIO-RAD)
12. เครื่อง Vortex (LABNET)
13. เครื่อง Incubator (HERAEUS)
14. เครื่อง pH meter (ECOMET)
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำ (Low- speed centrifuge) (BECKMAN)
16. เครื่องนับเซลล์ (Differential counter)
17. เครื่องนับเวลา (Timer)

วัสดุ

1. ปีกเกอร์ขนาด 20 , 50 , 500 , 1,000 ml (Pyrex)
2. ขวดเตรียมสารขนาด 250, 500 , 1000 ml (DURAN[®])
3. ที่คนสาร (Cylinders) (PYREX[®])
4. ปิเปตแก้วขนาด 5, 10 ml (WITEG)
5. ทิปขนาด 10, 200, 1000 μ l (OXYGEN)
6. ฟรอยด์ Aluminum (3M FOIL[®])
7. เหม Autoclave (3M)
8. ถุงมือยาง (Disposable gloves) (LATEX)
9. พาราฟิล์ม (Parafilm) (American National Can)
10. ปิเปต (Pipette boy) (FALCON[®])
11. กล่องเก็บ cover slips (APOPTAG[®])
12. สไลด์ (Slide) (SOILLBRAND)
13. กล่องเก็บสไลด์ (Slide box)
14. แผ่น Microscope glass cover slips (CHANCE)
15. หลอด Cryotube (SORENSEN)
16. กระจกกรอง (Sterile millipore 0.22 μ M) (MILLEX[®]-GP)
17. T 25 Tissue Culture flasks (Corning[®])
18. T 75 Tissue Culture flasks (Corning[®])
19. หลอด Eppendorf
20. ที่วางหลอดทดลอง (Tube rack)

สารเคมี

1. Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO)
2. DMSO (Dimethyl sulfoxide) (SIGMA)
3. Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO)
4. Penicillin-Streptomycin solution (HyClone)
5. HEPES, Free acid (HyClone)
6. Sodium Pyruvate powder (SIGMA)
7. Acrylamide (BIORAD)
8. SeaKem LE Agarose (CamBrex)
9. COOMASIE BRILLIANT BLUE R 250 (BIO BASIC Inc.)
10. Urea Ultrapure (GE Healthcare)
11. Thiourea (SIGMA)
12. CHAPS (USB Corporation)
13. Iodoacetamide (IAA) (GE Healthcare)
14. SERVALYT 40% w/v (ampholine) (SERVA)
15. Dithiothreitol (DTT) (USB Corporation)
16. Trichloroacetic acid (TCA) (MERCK)
17. Sodium Dodecyl Sulfate-Lauryl (SDS) (SIGMA)
18. Phosphate Buffered Saline (PBS) (SIGMA)
19. Trypan Blue dye (SIGMA)
20. IPG Buffer pH 3-10 NL (GE Healthcare)
21. Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 7 cm (GE Healthcare)
22. Ettan™ IPGphor™ II IEF Unit (GE Healthcare)
23. Prestain Protein marker (FERMENTAS)

- | | |
|-------------------------|----------|
| 24. Acetone | (MERCK) |
| 25. Methanol | (MERCK) |
| 26. Ethanol | (MERCK) |
| 27. Glacial acetic acid | (MERCK) |
| 28. Bradford | (BIORAD) |



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

DMEM

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	1	L
- L-Glutamine	22	ml
- Sodium pyruvate	110	mg
- HEPES buffer	11	ml
- Penicillin	11	ml

2% Na Deoxycholate (DOC)

- DOC	0.2	g
- dH ₂ O	to 10	ml

100% Trichloroacetic acid (TCA)

- TCA	10	g
- dH ₂ O	to 10	ml

Lysis solution

- 7 M Urea	4.2	g
- 2M Thiourea	1.5	g
- 4% w/v CHAPS	0.4	g
- dH ₂ O	to 10	ml

Rehydration buffer

- 8 M Urea	2.4	g
- 4% w/v CHAPS	0.2	g
- 0.002% w/v Bromophenol blue solution)	10µl (of 1% Bromophenol blue stock solution)	
- dH ₂ O	to 5	ml

SDS equilibration buffer

- 5% Tris-HCl pH 8.8	10	ml
- 36.035% w/v Urea	72	g
- 34.5% Glycerol	69	ml
- 2% w/v SDS	4	g
- 0.002% w/v Bromophenol blue 400 μ l (of 1% Bromophenol blue stock solution)		
- dH ₂ O	to 200	ml

SDS equilibration buffer 1

- SDS equilibration buffer	5	ml/gel
- Dithiothreitol (DTT)	50	mg/ml

SDS equilibration buffer 2

- SDS equilibration buffer	5	ml/gel
- Iodoacetamide (IAA)	125	mg/ml

1.5 Tris-HCl pH 8.8

- Tris-base	18.17	g
- dH ₂ O	adjust to pH 8.8	
- HCl	75	ml
- dH ₂ O	to 100	ml

12.5% SDS-PAGE gel

- Acrylamide Bis	4.17	ml
- 1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5	ml
- 10% SDS	0.1	ml
- 10% APS	50	μ l
- TEMED(Tetramethylethylenediamine)	3.3	μ l

- dH₂O 3.18 ml

SDS electrophoresis buffer (1x running buffer)

- 0.303% w/v Tris-base 9.09 g
- 1.44% w/v Glycine 43.2 g
- 0.1% w/v SDS 3 g
- dH₂O to 3 L

Colloidal coomasie (1 gel)

- 34% w/v Ammonium sulfate 34 g
- 0.1% w/v Coomasie brillion blue G-250 0.1 g
- 3% Phosphoric acid 3 ml
- 34% Methanol 34 ml
- dH₂O to 100 ml

Fixative solution

- 50% Methanol 50 ml
- 10% Acetic acid 10 ml
- dH₂O to 100 ml

Destain solution

- 10% Acetic acid 10 ml
- dH₂O to 100 ml

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	สลีลา เตียวตระกูลศรี
วันเกิด	29 ธันวาคม 2527
ที่อยู่	477/26 ซอย คำคุณ 1 ถนน พหลโยธิน 56 เขต สายไหม แขวง สายไหม กรุงเทพฯ 10220
อีเมลล์	get_pm@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	2546-2549 ปริญญาตรี วิชาเอก ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย