



การวิเคราะห์การแสดงผลของยีนจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของเซลล์  
แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซกคาไรด์

เหมือนฝัน โวหารกล้า




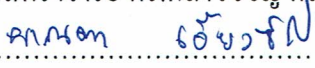

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
มีนาคม 2561  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ เหมือนฝัน โวหารกล้า ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สุตรอนันต์)  
  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกียรติทวี ชวงศ์โกมล)  
  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สุตรอนันต์)  
  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)  
  
.....กรรมการ  
(ดร.ผาณา เอี้ยวชีโป)  
  
.....กรรมการ  
(ดร.สลิล ชื่นโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา

  
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่... 8 ...เดือน... มีนาคม ... พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สุทรอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาวสกุลรัตน์ มั่นคง ร่วมทั้งสมาชิกทั้งระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และปริญญาเอกห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้ช่วยเหลือพร้อมทั้งให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในขั้นตอนของการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ งบประมาณปี 2557 และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์และคุณิพนธ์จากมหาวิทยาลัยบูรพา ปีงบประมาณ 2558 จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ครอบครัว และทุกคนที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ และช่วยเหลือผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้ที่มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

เหมือนฝัน โวหารกล้า

56910050: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: ข้อมูลไมโครอาร์เรย์/ การคัดเลือกยีน/การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์/ การอักเสบ

เหมือนฝัน โวหารกล้า: การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซกคาไรด์ (GENE EXPRESSION ANALYSIS OF MICROARRAY DATA FROM LPS-STIMULATED RAW264.7 MACROPHAGE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พัทธ์ชัย สุตรอนันต์, Ph.D., กล่าวขวัญ ศรีสุข, Ph.D. 99 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

ดีเอ็นเอ ไมโครอาร์เรย์เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนจำนวนหลายหมื่นยีนในเวลาเดียวกัน ซึ่งจะมีเพียงกลุ่มยีนจำนวนหนึ่งที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างเด่นชัดจนภายใต้สภาวะหนึ่ง ขั้นตอนการคัดเลือกยีนจึงมีความสำคัญในการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ สำหรับการค้นหายีนที่สำคัญ ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากดีเอ็นเอ ไมโครอาร์เรย์เพื่อคัดเลือกยีนที่ตอบสนองการอักเสบ จากการใช้ชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ด้วย LPS การคัดเลือกกลุ่มยีนจะอาศัยการบูรณาการหลากหลายวิธีการอันประกอบไปด้วย การคัดเลือกยีนด้วยวิธี Feature selection การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูลเอกสาร การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน การบูรณาการร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และการยืนยันผลการคัดเลือกยีนด้วยเทคนิค Real time PCR จากผลการทดลองพบว่า ยีน *SOC3* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการตอบสนองเชิงลบในการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ ซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันไม่ให้เกิดความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของการแสดงออกของยีนช่วยให้เข้าใจกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบ และอาจจะทำให้เกิดการค้นพบยีนเป้าหมายที่เป็นสาเหตุของการอักเสบและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่อไป

56910050: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)

KEYWORDS: MICROARRAY DATA/ GENE SELECTION/ MICRARRAY DATA ANALYSIS/  
INFLAMMATION

MUANFAN WOHANKLA: GENE EXPRESSION ANALYSIS OF MICROARRAY  
DATA FROM LPS-STIMULATED RAW264.7 MACROPHAGE. ADVISORY COMMITTEE:  
PITAK SOOTANAN, Ph.D., KLAOKWAN SRISOOK, Ph.D. 99 P. 2018.

DNA microarray is a technique used to study gene expression of thousands of genes simultaneously. There are only a few responsive genes that have related functions under studied condition. The gene selection process is important to analyze microarray data for finding the truly interested condition-responsive genes. In this study, microarray analysis of gene expression datasets was performed to select genes that are important for inflammatory response which was occurred in LPS-stimulated macrophage cell RAW264.7 by using microarray data obtained from public database. The responsive genes were identified by using the integration of several methods includes feature selection, searching for list genes associated of inflammation from online database, gene co-expression network approach, clustering of gene expression profiles and protein-protein interaction networks. The results from the microarray data analysis were finally confirmed by real-time PCR. We found that *SOCS3* is important critical negative role in the regulation cytokine signaling. It helps to protect activities in the immune and inflammatory system. The microarray gene expressions data analysis may be help to understand the mechanism of inflammation process and might help for discovery of candidate genes caused of inflammation. This result can be applied to prevent and treatment of inflammatory disease in the future.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
อภิธานศัพท์.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ทฤษฎี.....	4
2.1.1 การอักเสบ.....	4
2.1.2 การตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจต่อ LPS.....	6
2.1.3 เทคโนโลยีดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์.....	8
2.1.4 ฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	11
2.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	15
2.1.6 การค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสาร.....	17
2.1.7 เครื่องมือการแสดงผลของยีน.....	19
2.1.8 เครื่องมือปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	20
2.1.9 เทคนิค Real time PCR.....	22
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	29

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	34
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	34
3.1.1 เครื่องมือและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ.....	34
3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการ.....	34
3.2 สารเคมี.....	35
3.3 วิธีการ.....	36
3.3.1 การศึกษาเบื้องต้นในการคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกยีน.....	37
3.3.2 การรวบรวมข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	38
3.3.3 การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยวิธีการคัดเลือกพีเจอร์.....	39
3.3.4 การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบจากฐานข้อมูลเอกสาร.....	40
3.3.5 การวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน.....	41
3.3.6 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	41
3.3.7 การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่มีแนวโน้มการแสดงออกร่วมกัน.....	43
3.3.8 การวิเคราะห์และการแปรผลทางชีวภาพ.....	44
3.3.9 การตรวจสอบและยืนยันผลยีนที่ถูกคัดเลือกที่มีการตอบสนองต่อ.....	46
การอักเสบเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา ในระดับอาร์เอ็นเอ.....	46
3.3.9.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture).....	46
3.3.9.2 การ sub culture.....	46
3.3.9.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	47
3.3.9.4 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA).....	48
3.3.9.5 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน.....	48
3.3.9.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดเทคนิค.....	49
Real- time RT-PCR.....	49
3.3.9.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	50

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง.....	51
4.1 การศึกษาเบื้องต้น.....	51
4.2 การเตรียมข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	53
4.3 การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ โดย Feature selection.....	54
4.4 การวิเคราะห์เครือข่ายแสดงออกร่วมของยีน.....	56
4.5 การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่มีแบบแผนการแสดงออกร่วมกัน.....	58
4.6 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	60
4.7 การวิเคราะห์และการแปลผลทางชีวภาพ.....	61
4.8 การคัดเลือกยีนเพื่อนำไปตรวจสอบยืนยันผลในห้องปฏิบัติการ.....	63
4.9 การตรวจวัดปริมาณ mRNA โดยใช้เทคนิค Real time PCR.....	65
5 อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	70
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	70
5.2 สรุปผลการทดลอง.....	76
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	76
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก.....	88
ภาคผนวก ข.....	94
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	97



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	รายละเอียดของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	39
3-2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์.....	49
3-3	สารและปริมาณที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR.....	50
3-4	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR.....	50
4-1	จำนวนโพรบที่ถูกคัดเลือกโดยวิธี SAM, eBayes , PLS-CV และ โพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี.....	54
4-2	การจัดกลุ่มยีนที่มีแบบแผนการแสดงออกร่วมกันเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง โดยวิธี SOM.....	59
4-3	การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้ยีนออนโทโลยี ในกระบวนการทางชีววิทยา (Biological process).....	62
4-4	การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้ยีนออนโทโลยี ในหน้าที่ของโมเลกุลในเซลล์ (Molecular functions).....	62
4-5	การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้ยีนออนโทโลยี ในองค์ประกอบของเซลล์ (Cellular component).....	63
4-6	การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้ฐานข้อมูล KEGG.....	63
ก-1	รายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch.....	90
ก-2	ยีนที่พบในแต่ละชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี....	93
ก-3	รายละเอียดของยีนในแต่ละเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่าย.....	94

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	กลไกการเกิดกระบวนการอักเสบและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ.....	6
2-2	กลไกการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS.....	7
2-3	ขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์.....	10
2-4	ค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากแผ่นชิป.....	11
2-5	ตัวอย่างฐานข้อมูลสาธารณะไมโครอาร์เรย์.....	13
2-6	ตัวอย่างชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่บรรจุอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะ.....	14
2-7	การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	16
2-8	วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่อยู่ในโปรแกรมประยุกต์บนเว็บ..... ArrayMining.net.....	17
2-9	การค้นหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างโรคและยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch.....	18
2-10	ขั้นตอนการสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน.....	19
2-11	ตัวอย่างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน.....	20
2-12	ตัวอย่างฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	21
2-13	ตัวอย่างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	22
2-14	เฟสต่าง ๆ ใน Real time PCR.....	23
2-15	การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดย SYBR Green I dye.....	24
2-16	การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการใช้ Hybridization probe.....	25
2-17	การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการใช้ TaqMan probe.....	26
2-18	การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดย Molecular beacon probes.....	27
2-19	ตัวอย่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR และการสร้างกราฟมาตรฐานโดยการ plot ระหว่างค่า log ของ template DNA ที่ทราบความเข้มข้นกับค่า $C_T$ .....	28
2-20	โครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน SOCS3.....	31
3-1	แผนภาพแสดงภาพรวมการทดลอง.....	37
3-2	รูปแบบข้อมูลและการกำหนดการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆในโปรแกรมออนไลน์..... ArrayMining.....	40

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-3	การกำหนดชนิดของการค้นหาและการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรม..... PolySearch.....	41
3-4	ขั้นตอนการทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการตั้งค่าพารามิเตอร์..... ต่างๆในฐานข้อมูล STRING.....	42
3-5	ขั้นตอนการจัดกลุ่มแบบแผนการแสดงออกของยีนและการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรมMEV.....	43
3-6	ขั้นตอนการค้นหาหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายใน โปรแกรม DAVID โดยการใช้การแปลผลของ Gene Ontology และฐานข้อมูล KEGG..	45
4-1	การคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบที่มีระดับการแสดงออกต่ำในข้อมูล ที่มีการกระตุ้นด้วย LPS.....	52
4-2	ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ทั้ง 3 ชุดข้อมูลก่อนและหลังผ่านกระบวนการปรับ..... มาตรฐานข้อมูล.....	53
4-3	โปรแกรมแสดงจำนวนโพรบที่ถูกคัดเลือกโดยวิธี SAM, eBayes , PLS-CV และ โพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี.....	55
4-4	เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนที่ได้จากการคัดเลือกจากโปรแกรม..... ArrayMining และยีนที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch.....	57
4-5	เครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่ถูกคัดเลือกจากเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน...	58
4-6	Heat map แบบแผนการแสดงออกของยีนทั้งสามกลุ่มและกราฟแสดงแนวโน้ม..... แบบแผนการแสดงออกของยีน.....	59
4-7	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายในฐานข้อมูล.... STRING.....	60
4-8	กลไกการตอบสนองต่อการอักเสบของยีน <i>SOCS3</i> และยีน <i>IL-11</i> ในเซลล์แมค..... โครฟาจ.....	65
4-9	การวิเคราะห์ Melting curve analysis ของยีน <i>iNOS</i> , <i>EF2</i> และ <i>SOCS3</i> .....	66
4-10	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน <i>iNOS</i> .....	68
4-11	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน <i>SOCS3</i> .....	69

## อภิธานศัพท์

คำศัพท์	ภาษาอังกฤษ	ความหมาย
การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยการคัดเลือกพีเจอร์	Feature selection	การคัดเลือกยีนโดยใช้วิธีการทางสถิติ เช่น SAM, eBayes และ PLS-CV
การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูลเอกสาร	Text Mining	การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในการค้นหาความรู้ในฐานข้อมูลประเภทข้อความ เช่น ฐานข้อมูล PolySearch ที่ฐานข้อมูลประยุกต์ออนไลน์ (Web based) ในการทำเหมืองข้อความทางด้านชีวการแพทย์ (Biomedical text mining) ที่ถูกออกแบบมาใช้ในการค้นหาความรู้จากข้อความ (Text mining) ด้านชีวการแพทย์ในการค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคนิย การกลายพันธุ์ ยา และกระบวนการเมตาบอลิซึมในมนุษย์ที่ถูกรวบรวมจากฐานข้อมูลทางการแพทย์ต่างๆไว้
เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน	Gene co-expression network	การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนจากข้อมูลการแสดงออกของยีน โดย การตรวจวัดความสัมพันธ์ระหว่างคู่ยีน และอาศัยหลักการการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ในทางสถิติมาหาความสัมพันธ์ระหว่างคู่ยีนแต่ละคู่ ซึ่งค่าความสัมพันธ์ระหว่างคู่ยีนที่ได้ นั้นจะแสดงเป็นค่า Pearson correlation coefficient หรือ r-value

## อภิธานศัพท์ (ต่อ)

คำศัพท์	ภาษาอังกฤษ	ความหมาย
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน	Protein-protein interaction network	เครือข่ายทางชีวภาพที่มีการบรรจุไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์สาธารณะที่ประกอบด้วยข้อมูลรายละเอียดต่างๆ เช่น ฐานข้อมูล STRING ซึ่งเป็นฐานข้อมูลทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนโดยฐานข้อมูล STRING จะรวบรวมข้อมูลจากแหล่งต่างๆ ไว้ ประกอบด้วยข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (Experiment) ข้อมูลจากฐานข้อมูล (Database) ข้อมูลจากการแสดงออกร่วม (Co-expression) ข้อมูลจากการค้นหาความรู้จากข้อความ (Text mining)
กระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชัน	Normalization	กระบวนการเตรียมข้อมูลให้อยู่ในหน่วยมาตรฐานเดียวกัน เนื่องจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เป็นข้อมูลดิบ (Raw data) เป็นข้อมูลจากการทดลองโดยตรง ซึ่งหน่วยของข้อมูลที่ใช้ในแต่ละตัวแปรอาจมีหน่วยที่ใช้วัดต่างกัน ในกระบวนการวิเคราะห์ จำเป็นต้องให้ข้อมูลเป็นมาตรฐานเดียวกัน เพื่อให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ
ยีนออนโทโลยี	Gene Ontology (GO)	ฐานข้อมูลสำหรับค้นหาหน้าที่และการแปลผลทางชีวภาพของยีนที่ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ Biological processes, Cellular components และ Molecular function

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AP-1	=	Activator protein 1
AREG	=	Amphiregulin
BIRC5	=	Baculoviral IAP repeat-containing 5
BLCAP	=	Bladder cancer associated protein homolog (human)
CD36	=	CD36 antigen
cIAP1	=	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2
cIAP2	=	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
CSF2RB	=	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
Csf2rb2	=	Colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)
CSF2RB2	=	Colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)
Ct	=	Cycle threshold
eBayes	=	Empirical Bayes moderated t-statistic
EF2	=	Elongation factor 2
ERCC6L	=	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 – like
FGED	=	The Functional Genomics Data Society
GBP1	=	Guanylate binding protein 1
GEO	=	Gene Expression Omnibus
gp130	=	Glycoprotein 130
GPR35	=	G protein-coupled receptor 35
IFNs	=	Type-I interferons
IL11	=	Interleukin 11
IL7R	=	Interleukin 7 receptor
iNOS	=	Nitric oxide synthases

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

IL7	=	Interleukin 7
JAK2	=	Janus kinase 2
K48-linked	=	K48-linked ubiquitin chain
K63-linked	=	K63-linked ubiquitin chain
LGALS9	=	Lectin, galactose binding, soluble 9
LPS	=	Lipopolysaccharide
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinases
MIAME	=	Minimum information about a microarray experiment
MKI67	=	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
MS4A6D	=	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D
MyD88	=	Myeloid differentiation primary response 88
NFIL3	=	Nuclear factor, interleukin 3, regulated
NFKBIZ	=	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
NF-KB	=	Nuclear factor of kappa-light-chain enhancer of activated B cells
NUF2	=	NUF2, NDC80 kinetochore complex component
NUSAP1	=	Nucleolar and spindle associated protein 1
PLA2G4A	=	Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
PLAU	=	Plasminogen activator, urokinase
PLS-CV	=	Partial Least Squares Cross-Validation
PRUNE	=	Prune homolog (Drosophila)
SAM	=	Significance Analysis for Microarray
SLC6A4	=	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4
SOCS3	=	Suppressor of cytokine signaling 3
TAK1	=	TGF-beta activated kinase 1
TBK1	=	TANK Binding Kinase 1
THBD	=	Thrombomodulin

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

TLR4	=	Toll-like receptor 4
T <sub>m</sub>	=	Melting temperature
TRAF3	=	TNF Receptor Associated Factor 3
TRAF6	=	TNF Receptor Associated Factor 6
TRF	=	Transferrin
TRIF	=	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TSPO	=	Translocator protein
VEGFA	=	Vascular endothelial growth factor A
VEGFC	=	Vascular endothelial growth factor C
WDR62	=	WD repeat domain 62



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยื่นทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมที่ใช้สำหรับสร้างโปรตีนผ่านกระบวนการถอดรหัส (Transcription) และกระบวนการแปลรหัส (Translation) โรคหลายชนิดมีสาเหตุมาจากการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติไป ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนจะช่วยให้ทราบสาเหตุและแนวทางการรักษาโรคได้ ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาเพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจำนวนมากในเวลาเดียวกัน โดยการตรวจวัดระดับเอ็มอาร์เอ็นเอภายใต้สถานะที่สนใจศึกษา ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตได้อย่างเป็นระบบ (Watson, Mazumder, Stewart, & Balasubramanian, 1998; Macgregor & Squire, 2002) ข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากหลากหลายกลุ่มงานวิจัยถูกรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะ เช่น Gene Expression Omnibus (GEO) ในฐานข้อมูล NCBI (Edgar, Domrachev, & Lash, 2002; Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) โดยเฉพาะข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษากลไกการอักเสบ เมื่อเซลล์แมคโครฟาจถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ จะทำให้มีการตอบสนองผ่านทางทอลล์ไลค์รีเซปเตอร์ 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) และส่งสัญญาณผ่านวิถีต่าง ๆ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมากมาย (Pro-inflammatory gene) (Comer et al., 2006; Hammer et al., 2010; Lee, Kim, & Han, 2013) ดังนั้นการค้นหากลุ่มยีนเป้าหมายที่มีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเกิดการอักเสบ จึงมีส่วนสำคัญที่ทำให้สามารถทำความเข้าใจกลไกการตอบสนองการอักเสบที่เกิดขึ้นได้

ในการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์นั้น ขั้นตอนการคัดเลือกยีนเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ เนื่องจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์จะประกอบด้วยยีนจำนวนมาก ทำให้การวิเคราะห์มีความซับซ้อนและอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดได้สูง จึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเฉพาะกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อสถานะที่สนใจศึกษา (Selvaraj & Natarajan, 2011) โดยอาศัยวิธี Feature selection ในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining (Glaab, Garibaldi, & Krasnogor, 2009) การคัดเลือกยีนด้วยวิธีนี้อาจไม่สามารถคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อ LPS ตามช่วงเวลาได้อย่างครอบคลุม ทำให้มีการสูญเสียกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อกลไกการอักเสบได้ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการวิเคราะห์เพื่อที่จะ

อธิบายกลไกการตอบสนองต่อ LPS ตามช่วงเวลาของเซลล์แมคโครฟาจ หากมีการคัดเลือกกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบร่วมกับการใช้วิธีการค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสาร (Text mining) ในฐานข้อมูล PolySearch ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโรค ยีน การกลายพันธุ์ ยา และกระบวนการเมแทบอลิซึมในมนุษย์จากฐานข้อมูลทางการแพทย์ต่างๆ (Cheng, Yang, Lan, & Chuang, 2008) จะทำให้การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลามีความเกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบเพิ่มมากยิ่งขึ้น และนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างยีนโดยการสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network) (Stuart, Segal, Koller, & Kim, 2003) การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน (Gene expression profile) และนำมาวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network) จากฐานข้อมูลสาธารณะ (Szklarczyk et al., 2015) เพื่อช่วยในการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อ LPS ตามช่วงเวลา สำหรับนำไปตรวจสอบในห้องปฏิบัติการต่อไป ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และอาจจะทำให้เกิดการค้นพบยีนเป้าหมายใหม่ที่เป็นสาเหตุของการอักเสบและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกยีนที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง ในเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ
2. เพื่อยืนยันผลการแสดงออกของยีนที่ถูกคัดเลือกว่ามีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ จากเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยใช้เทคนิค Real time PCR

## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา ในเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ โดยวิธี Feature selection ร่วมกับการค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสาร (Text mining) ร่วมกับการสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network) และการบูรณาการร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network) จะทำให้การคัดเลือกกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อ LPS มีความน่าเชื่อถือ

สามารถนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Real time PCR ได้ และมีความเข้าใจกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบมากยิ่งขึ้น

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้พัฒนากระบวนการค้นหากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยอาศัยเทคนิคการคัดเลือกฟีเจอร์ การค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสาร การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การวิเคราะห์ผลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ และการแปลผลทางชีวภาพ

2. สามารถอธิบายกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบที่เปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาด้วยกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือก

#### 1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้รวบรวมข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการแสดงออกของยีน เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 จากฐานข้อมูลสาธารณะ จำนวน 3 ชุดข้อมูล (GSE21841; Hammer et al., 2010; GSE4712; Comer et al., 2006; GSE2002; Shell et al., 2005) และนำมาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง โดยวิธีการคัดเลือกฟีเจอร์ (Feature selection) การค้นหาโดยใช้ฐานข้อมูลเอกสาร (Text mining) ร่วมกับการสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network) และการบูรณาการร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ก่อนนำยีนที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบเพื่อยืนยันผลด้วยเทคนิค Real time PCR

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ทฤษฎี

##### 2.1.1 การอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการบาดเจ็บจากการที่เนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายหรือตายลง เช่น การติดเชื้อ การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือออกซิเจน โดยกลไกการตอบสนองของการอักเสบประกอบด้วยปฏิกิริยาที่สำคัญ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลกระทบที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลายระบบของร่างกาย การอักเสบเป็นกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายรวมทั้งเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลงด้วย หากไม่มีกระบวนการอักเสบเนื้อเยื่อที่เกิดการบาดเจ็บจะไม่มีกระบวนการซ่อมแซม (Repair) ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อนั้นผิดปกติได้ โดยปกติร่างกายจะมีกลไกยับยั้งเพื่อไม่ให้เกิดการอักเสบที่มากเกินไปที่อาจจะทำให้เกิดอันตรายกับเนื้อเยื่อได้

กระบวนการอักเสบสามารถแบ่งตามลักษณะการเกิดโรคทางคลินิก และระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบได้เป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (Acute inflammation) จะมีการอักเสบเกิดขึ้นต่อเนื่องภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือนาทีหลังจากที่ได้รับสิ่งกระตุ้นและยังคงอยู่ประมาณ 2-3 วัน แต่ไม่เกินสัปดาห์และยังมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และการอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammation) จะมีการอักเสบที่เกิดขึ้นยาวนานหลายสัปดาห์อาจจะเกิดตามหลังการอักเสบเฉียบพลัน การอักเสบเรื้อรังจะส่งผลทำให้เนื้อเยื่อเสียหายหรืออาจจะทำให้เกิดโรคได้ เช่น โรคระบบหัวใจและระบบหลอดเลือด ลักษณะทางคลินิกของการอักเสบจะประกอบด้วยอาการหลัก 4 อาการ คือ บวม แดง ร้อน กลไกการเกิดการอักเสบประกอบด้วยกลไกการเปลี่ยนแปลงตามขั้นตอนต่างๆดังนี้ (ภาพที่ 2-1) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547; พีรยุทธ ลิทธิไชยากุล, 2552)

1) เมื่อเนื้อเยื่อของร่างกายเกิดการบาดเจ็บจะทำให้สิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เกิดการไหลเวียนของเลือดมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บมากขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นมีสีแดง และมีอุณหภูมิสูงขึ้น

2) เกล็ดเลือด (Platelet) มีบทบาทในการทำให้เลือดหยุดไหลและสร้างสารสื่อกลางการอักเสบให้มายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ

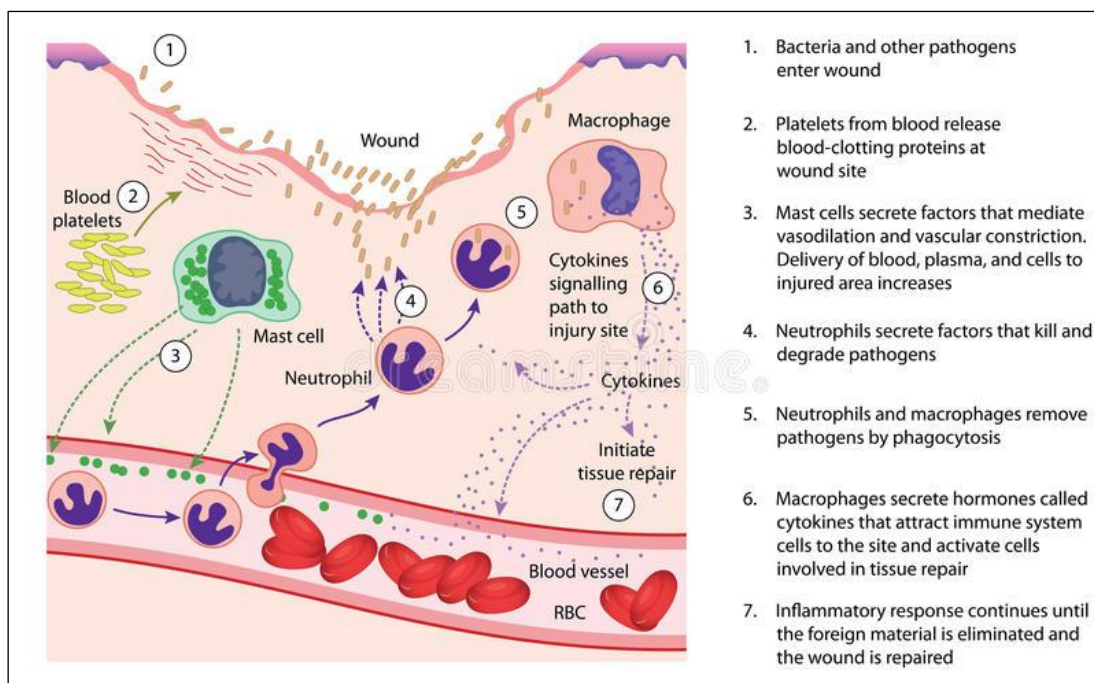
3) Mast cell พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่บริเวณรอบหลอดเลือด basophil และเกล็ดเลือด (platelet) จะสร้างสาร Vasoactive amine ได้แก่ Histamine ซึ่งมีบทบาทสำคัญที่มีฤทธิ์เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (Increased vascular permeability) ทำให้สารน้ำ โปรตีน และเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการรั่วไหลออกมาภายนอกหลอดเลือด

4) การเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวออกนอกหลอดเลือดมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บและได้รับการกระตุ้นให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ได้แก่ นิวโทรฟิล จะเข้ามาบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อในช่วงเวลา 6 ถึง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะถูกแทนที่ด้วยโมโนไซต์และเซลล์แมคโครฟาจ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลมีจำนวนมากในกระแสเลือดจึงเข้ามาในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บได้รวดเร็วกว่าโมโนไซต์และแมคโครฟาจ แต่เนื่องจากนิวโทรฟิลมีอายุค่อนข้างสั้นหลังจากเข้ามายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บแล้วจะเกิดการตายภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง

5) หลังจากที่มีการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ เซลล์นิวโทรฟิลและเซลล์แมคโครฟาจจะจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ Phagocytosis

6) เซลล์แมคโครฟาจจะเกิดการส่งสัญญาณทำให้เกิดการชักนำให้สารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ เพื่อให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมบริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ

7) การตอบสนองต่อการอักเสบจะเกิดขึ้นต่อเนื่องจนกระทั่งเกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและซ่อมแซมเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ เมื่อสิ้นสุดการอักเสบผลที่จะเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อนั้นๆ ประกอบด้วย เนื้อเยื่อจะกลับมาเป็นปกติ การสร้างสารสื่อกลางการอักเสบจะหยุดลง หลอดเลือดกลับคืนสู่สภาพปกติ และของเหลวที่รั่วไหลออกมาบริเวณเนื้อเยื่อจะถูกดูดซึมกลับคืน หากร่างกายไม่สามารถกำจัดออกไปได้หมดจะเกิดการอักเสบเรื้อรัง



ภาพที่ 2-1 กลไกการเกิดกระบวนการอักเสบและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ

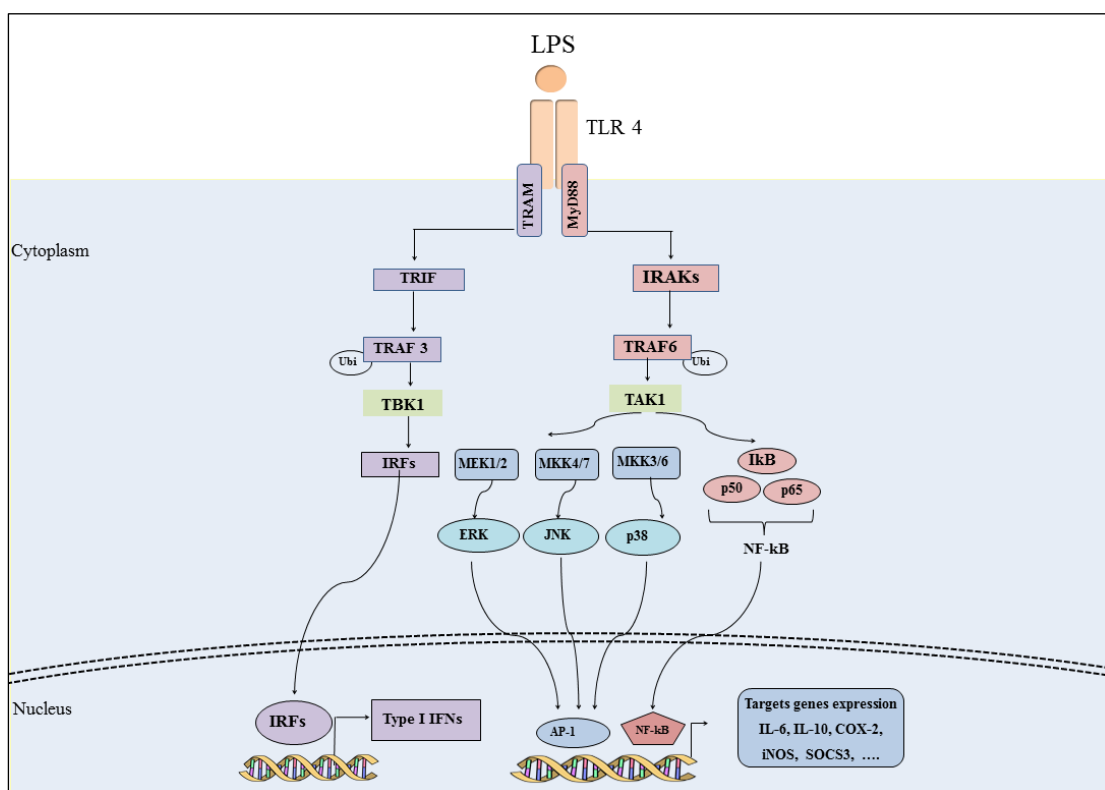
(ที่ ม 1 : <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-inflammation-tissue-repair-chemical-cellular-factors-involved-inflammatory-response-to-damage-created-adobe-image-62002173> สืบค้นเมื่อวันที่ 15 กันยายน 2560)

### 2.1.2 การตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจต่อ LPS

เซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันชนิดหนึ่งที่เกิดมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (Monocyte) เมื่อเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อทำให้สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายจะมีการเคลื่อนตัวผ่านผนังหลอดเลือดมายังบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการบาดเจ็บ เพื่อทำหน้าที่กำจัดจุลชีพ สารพิษ และสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย ได้แก่ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกสุดของแบคทีเรียแกรมลบ และเป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ โดยการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จะมีกลไกการตอบสนองและการส่งสัญญาณไปยังวิธีต่าง ๆ ผ่านทาง TLR4 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ขึ้นสองแบบ ดังภาพที่ 2-2 (Fujihara et al., 2003; Vandenabeele & Bertrand, 2012; Ahmed, Williams, & Hannigan, 2015)

แบบที่ 1 วิธีการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88 dependent pathway) ที่เกาะอยู่กับ TLR4 ที่จับอยู่กับ MYD88, TRAF6, cIAP1, cIAP2 และ TRAF3 โดย cIAP1 และ cIAP2 จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Ubiquitination ของ TRAF6 ส่งผลให้เกิดกระตุ้น TAK1 และนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ในกลุ่ม NF- $\kappa$ B และ AP-1 ผ่านวิธีการส่งสัญญาณของ MAPK ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมายการอักเสบ (Inflammatory cytokines) และทิศทางการที่สอง cIAP1 และ cIAP2 จะไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Ubiquitination ของโปรตีน TRAF3 โดย K48-linked ubiquitination ซึ่งจะนำไปสู่การสลายของ TRAF3 (ภาพที่ 2-2A)

แบบที่ 2 วิธีการส่งสัญญาณที่ไม่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88 independent pathway) แต่จะอาศัยโปรตีน TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) โดยที่ TRIF จะไปกระตุ้น TRAF3 และโปรตีน TRAF3 จะกระตุ้นกระบวนการ Ubiquitination ด้วยตัวมันเองผ่านทาง K63-linked ubiquitination ซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของ IFNs (Type-I interferons) (ภาพที่ 2-2B)



ภาพที่ 2-2 กลไกการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS

(ดัดแปลงจาก Vandenabeele & Bertrand, 2012)

### 2.1.3 เทคโนโลยีดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ (DNA Microarray Technology)

การศึกษาในระดับโมเลกุลของยีนจะศึกษาเพียงยีนชนิดเดียวต่อหนึ่งการทดลอง จึงทำให้ไม่สามารถทราบถึงความสัมพันธ์ของยีน โดยยีนและผลผลิตของยีนในสิ่งมีชีวิตนั้นมีหน้าที่ซับซ้อนและมีการทำงานประสานกัน จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคไมโครอาร์เรย์ขึ้นมาเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนหลายยีนในเวลาเดียวกัน หลักการของเทคนิคไมโครอาร์เรย์จะอาศัยการจับอย่างจำเพาะเจาะจงของสายดีเอ็นเอสองสายที่เป็นคู่กัน (Complementary strands of DNA) จะบรรจุนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะเรียงกันบนแผ่นแก้วสไลด์หรือแผ่นชิปโดยจะเรียกนิวคลีโอไทด์เหล่านั้นว่าโพรบ (Probe) ดังนั้นดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์สามารถแบ่งตามชนิดของโพรบได้เป็น 2 ประเภทคือ cDNA microarray และ Oligonucleotide microarray โดยแผ่นแก้วสไลด์หรือแผ่นชิปนั้นจะสามารถบรรจุลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนได้นับหมื่นยีน ซึ่งจะไปจับกับลำดับเบสคู่สมของสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงหรือสารกัมมันตรังสี ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้จากโพรบที่เป็นนิวคลีโอไทด์ของบริษัท Affymetrix เช่นเดียวกับ oligonucleotide microarray ทั่วไป แต่มีข้อแตกต่าง คือ สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นโพรบนี้เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นบนแผ่นชิปโดยตรง (In situ synthesis) ด้วยวิธี Photolithography ซึ่งทำให้แผ่นชิปมีความหนาแน่นของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ได้สูง โดยในแผ่นชิปนั้นจะสามารถบรรจุลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนได้นับหมื่นยีน จึงทำให้มีการนำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์จะประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (แสดงในภาพที่ 2-3)

1. การสกัดอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างที่สนใจศึกษา
2. การสร้าง cDNA (Complementary DNA) อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยปฏิกิริยา Reverse transcription
3. ขั้นตอนการทำ in vitro transcription (IVT) เพื่อสังเคราะห์ cRNA (Complementary RNA) จาก cDNA ต้นแบบพร้อมกับติดฉลาก cRNA ด้วยสารไปโอติน
4. การทำ cRNA ให้เป็นสายสั้น ๆ (Fragmentation)
5. การทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน (Hybridization)
6. การตรวจสอบสัญญาณและการวิเคราะห์ผล ในขั้นตอนตอนสุดท้ายนี้เป็นการวัดปริมาณการเรืองแสงและประมวลผลโดยคอมพิวเตอร์ จากนั้นจะเก็บข้อมูลการแสดงออกของยีนเพื่อนำไปวิเคราะห์

ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเตรียมตัวอย่างกรณีคลิสิกเป้าหมายในการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันจะแตกต่างจากดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ทั่วไป คือ การเตรียมให้อยู่ในรูปของ cRNA แต่ก็สามารถ



เตรียมในรูปแบบ cDNA ได้เช่นกัน ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเป้าหมายให้อยู่ในรูปแบบของ cRNA นอกจากจะเป็นการติดฉลากแล้วยังเป็นการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเป้าหมาย ซึ่งจะส่งผลให้เทคนิคนี้มีความไวมากยิ่งขึ้นทำให้สามารถใช้ในการตรวจสอบยีนที่มีการแสดงออกในปริมาณน้อย ๆ ได้ และการติดฉลากด้วยสารไบโอดีน การติดฉลากด้วยสารไบโอดีนหลังจากการทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันสามารถตรวจสอบโดยการย้อมด้วยโมเลกุลเรืองแสงที่สามารถจับกับไบโอดีนได้อย่างจำเพาะ โดยแผ่นชิปที่ผ่านขั้นตอนการย้อมแล้วสามารถตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องสแกนและแปลสัญญาณความเข้มของสารเรืองแสงตามปริมาณของ cRNA เป้าหมายที่จับกับโพรบบนแผ่นชิป เนื่องจากการติดฉลากด้วยโมเลกุลเรืองแสงชนิดเดียวจึงทำให้การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนได้มากกว่าครั้งละสองตัวอย่างและสามารถเปรียบเทียบต่างการทดลองได้ด้วย เนื่องจากการวิเคราะห์แบบแยกแผ่นชิปโดยการวิเคราะห์สัญญาณของแต่ละชุดโพรบเป็นค่าสัมบูรณ์ (Absolute) ของแต่ละแผ่นก่อนแล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกัน ซึ่งจะแตกต่างจากดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ทั่วไปที่ติดฉลากเป้าหมายระหว่างสองตัวอย่างด้วยสารเรืองแสงสองชนิดที่มีสีแตกต่างกันและนำมาทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันแบบแข่งขันบนแผ่นชิปเดียวกัน ซึ่งมีข้อจำกัดในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนได้เพียงครั้งละสองตัวอย่างเท่านั้น ค่าสัญญาณที่ได้จากแผ่นชิปแต่ละแผ่นจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปที่มีความจำเพาะ เช่น โปรแกรม MAS5 และ GCOS ของบริษัท Affymetrix เป็นต้น ซึ่งข้อมูลนั้นจะประกอบด้วย

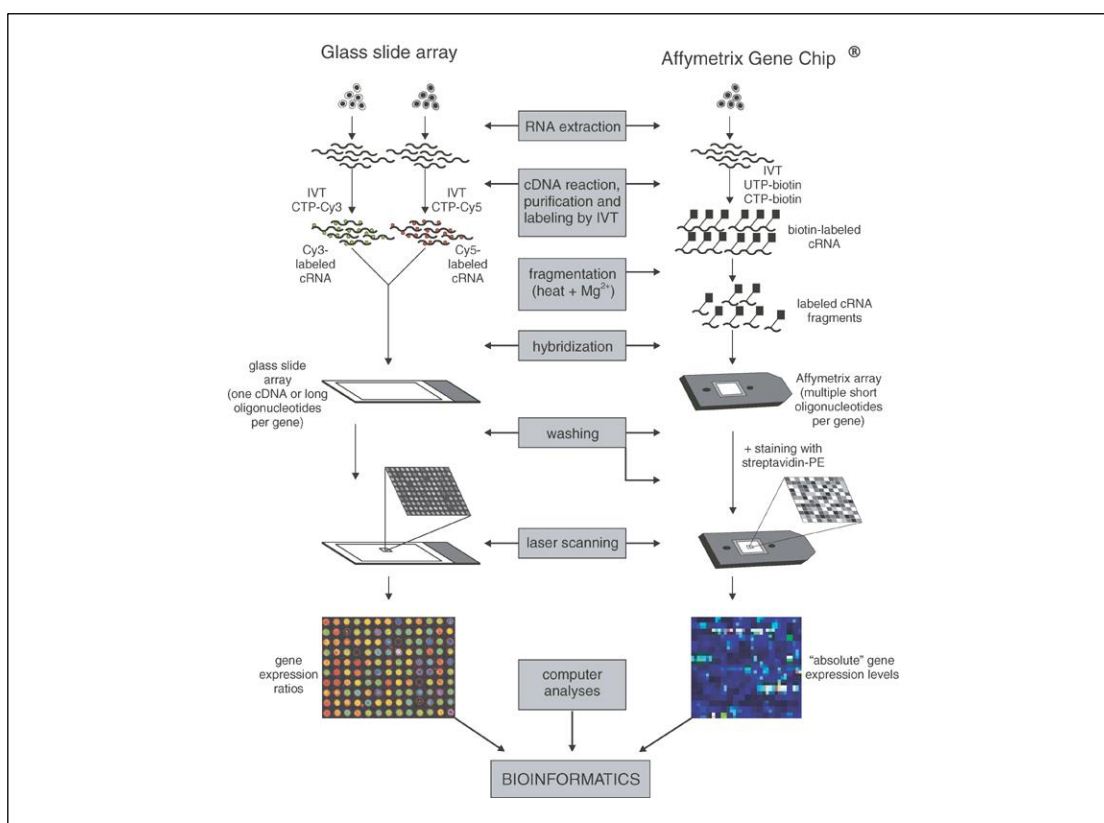
1. ระดับสัญญาณ (Signal value) ที่แสดงถึงปริมาณการแสดงออกของยีน โดยค่าระดับสัญญาณของแต่ละชุดโพรบนั้นเป็นค่าที่ได้จากการประเมินสัญญาณของคู่โพรบภายใน 1 ชุดโพรบในการใช้โพรบหลายโพรบในการตรวจสอบอาร์เอ็นเอ 1 ตำแหน่ง (Probe redundancy) ร่วมกับการใช้โพรบบน MM เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบในการเพิ่มความจำเพาะและความถูกต้องในการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอ สามารถจัดสัญญาณที่เกิดจากไฮบริดเซชันข้าม (Cross-hybridization) ระหว่างยีนที่มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะยีนที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกัน

2. ค่า Detection call เป็นค่าที่บอกว่ายีนนั้น ๆ มีการแสดงออกหรือไม่ โดยเป็นค่าที่ได้จากการประเมินสัญญาณของชุดโพรบ โดยการเปรียบเทียบระดับสัญญาณระหว่างโพรบบน PM และ MM ซึ่งจะเป็นค่าแสดงให้เห็นว่ายีนนั้นมีการแสดงออก (Present: PM>MM) หรือไม่แสดงออก (absent: PM< MM) ถ้าให้สัญญาณไม่ชัดเจนหรือกำกวม (Marginal: PM=MM) จะไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์นั้น

3. ค่า Detection call p value เป็นค่าที่บ่งชี้ความเชื่อมั่นทางสถิติของชุดโพรบที่ได้จากการประเมินสัญญาณของแต่ละคู่โพรบ ซึ่งค่า  $p$  ที่ใช้ในการคัดเลือกโพรบนั้นจะขึ้นอยู่กับข้อกำหนด

ของนักวิจัย การคัดกรองข้อมูลหรือโพรบที่คืนนั้นจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือและสามารถทำซ้ำได้ (ดังแสดงในภาพที่ 2-4)

ปัจจุบันเทคนิคไมโครอาร์เรย์มีบทบาทสำคัญต่องานวิจัยด้านชีวภาพในการวิเคราะห์ระดับจีโนม เพื่อมองภาพรวมของการทำงานร่วมกันของยีนทั้งหมดในกระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีน การกลายพันธุ์ของยีน และการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคไมโครอาร์เรย์มาใช้ในการแพทย์เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคและศึกษาการทำงานของยีนที่ก่อโรค ซึ่งจะช่วยในการคาดการณ์ความรุนแรงของโรคได้ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนมะเร็งและการตอบสนองในวิธีการรักษาต่างๆ หรืออาจนำไปใช้ในการศึกษาการทำงานของยีนในเชื้อโรคที่ดื้อยา เพื่อพัฒนาและปรับปรุงยาให้ดีขึ้น เป็นต้น (จิรรัตน์ มงคลศิริวัฒนา, 2552)



ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์

(ที่มา: [https://www.researchgate.net/figure/10682398\\_fig7\\_Figure-1-Comparison-of-glass-slide-and-Affymetrix-microarray-procedures-For-glass-slide](https://www.researchgate.net/figure/10682398_fig7_Figure-1-Comparison-of-glass-slide-and-Affymetrix-microarray-procedures-For-glass-slide) สืบค้นเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2560)

ID_REF	VALUE	ABS_CALL	DETECTION P-VALUE
AFFX-MurIL2_at	21.3	A	0.843268
AFFX-MurIL10_at	55.4	A	0.574038
AFFX-MurIL4_at	8.5	A	0.804734
AFFX-MurFAS_at	21.7	A	0.51489
AFFX-BioB-5_at	844.9	P	0.004998
AFFX-BioB-M_at	1713.6	P	0.00011
AFFX-BioB-3_at	894.1	P	0.00039
AFFX-BioC-5_at	2502.7	P	0.000147

ภาพที่ 2-4 ค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากแผ่นชิป

(ที่มา: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/depguide.html> สืบค้นเมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2560)

#### 2.1.4 ฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ (Microarray databases)

ฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์เป็นฐานข้อมูลสาธารณะที่รวบรวมข้อมูลการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะที่สนใจศึกษาที่ได้จากการตรวจวัดในระดับห้องปฏิบัติการจากหลากหลายกลุ่มผู้วิจัย ซึ่งผู้ที่สนใจสามารถที่จะเข้าไปดาวน์โหลดมาใช้ในการศึกษาได้ ตัวอย่างฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ เช่น Gene Expression Omnibus (GEO) ในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI (Edgar et al., 2002; Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (ภาพที่ 2-5A) และฐานข้อมูล ArrayExpress (Parkinson et al., 2005; <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) (ภาพที่ 2-5B) เป็นต้น ซึ่งฐานข้อมูล GEO และ ArrayExpress นั้นประกอบด้วยข้อมูลการแสดงออกของยีนจากการทดลองจำนวนมากกว่า 1,000 การทดลอง

ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ผู้วิจัยจะทำการบรรจุลงในฐานข้อมูลนั้นจะต้องประกอบด้วยรายละเอียดของข้อมูลที่ได้ทำการศึกษามาตามมาตรฐานของ Minimum information about a microarray experiment (MIAME) ที่ถูกกำหนดขึ้นโดย The Functional Genomics Data Society (FGED) มีวัตถุประสงค์เพื่อกำหนดมาตรฐานข้อมูลหรือรายละเอียดที่สำคัญที่ได้ทำการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการลงในฐานข้อมูล เพื่อไม่ให้เกิดข้อสงสัยและการทำซ้ำการทดลองต่อผู้ที่สนใจจะนำข้อมูลนั้นไปศึกษาต่อ โดยรายละเอียดของข้อมูลที่ต้องบรรจุลงไปพร้อมกับข้อมูลไมโครอาร์เรย์

ตามมาตรฐานของ MIAME (Brazma et al., 2003) ดังภาพที่ 2-6 ซึ่งเป็นตัวอย่างของชุดข้อมูล การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยไมโครอาร์เรย์ที่บรรจุอยู่ในฐานข้อมูล GEO ประกอบด้วย รายละเอียดดังนี้

- 1) ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง เช่น ข้อมูลภาพที่ได้จากการสแกน (CEL File)
- 2) ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ผ่านการปรับมาตรฐานแล้ว (Normalization) เช่น ข้อมูลการแสดงออกของยีนในรูปแบบ Gene expression data matrix
- 3) รายละเอียดสำคัญและปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง เช่น ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง หรือจะเป็นสารและปริมาณสารที่ใช้ทดลอง เป็นต้น
- 4) รายละเอียดในการออกแบบการทดลอง เช่น ข้อมูลจำนวนซ้ำของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา
- 5) คำอธิบายของอาร์เรย์ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละโพรบ เลขอ้างอิงในแต่ละโพรบ (Gene ID) ชื่อยีนในแต่ละโพรบ (Gene symbol)
- 6) ชื่อคณะผู้วิจัยที่ทำการทดลองและกระบวนการใช้ในการเตรียมข้อมูล เช่น วิธีการที่ใช้ในการปรับมาตรฐานข้อมูลในการประมวลผลขั้นสุดท้าย

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

GEO DataSets GEO DataSets Search Help

**GEO DataSets**

This database stores curated gene expression DataSets, as well as original Series and Platform records in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository. Enter search terms to locate experiments of interest. DataSet records contain additional resources including cluster tools and differential expression queries.

**Getting Started**

- GEO Documentation
- GEO FAQ
- About GEO DataSets
- Construct a Query
- Download Options

**GEO Tools**

- Submit to GEO
- Advanced Search
- DataSet Browser
- Programmatic Access
- GEO2R

**More Resources**

- GEO Home
- GEO Profiles
- Epigenomics
- SRA

**Example Searches**

Keywords and species [\(smok\\* OR diet\) AND \(mammals\[organism\] NOT human\[organism\]\)](#)

Study type ["expression profiling by high throughput sequencing"\[DataSet Type\]](#)

Studies with CEL files [cell\[Supplementary Files\]](#)

DataSets that have 'age' as an experimental variable [age\[Subset Variable Type\]](#)

Studies with between 100 and 500 samples [100:500\[Number of Samples\]](#)

A

EMBL-EBI Services Research Training About us EMBL-EBI Hinxton

**ArrayExpress** Search

Examples: E-MEXP-31\_cancer\_p53\_Geuvadis advanced search

Home Browse Submit Help About ArrayExpress Contact Us Login

**ArrayExpress – functional genomics data** **Data Content**

ArrayExpress Archive of Functional Genomics Data stores data from high-throughput functional genomics experiments, and provides these data for reuse to the research community.

Updated today at 03:00

- 70378 experiments
- 2227860 assays
- 45.73 TB of archived data

[Browse ArrayExpress](#)

**Latest News**

31 August 2017 - **Did you know about Expression Atlas?**

Found a really interesting experiment, but no time or skill to do the analysis yourself? It might be worth checking if the experiment has been included in [Expression Atlas](#).

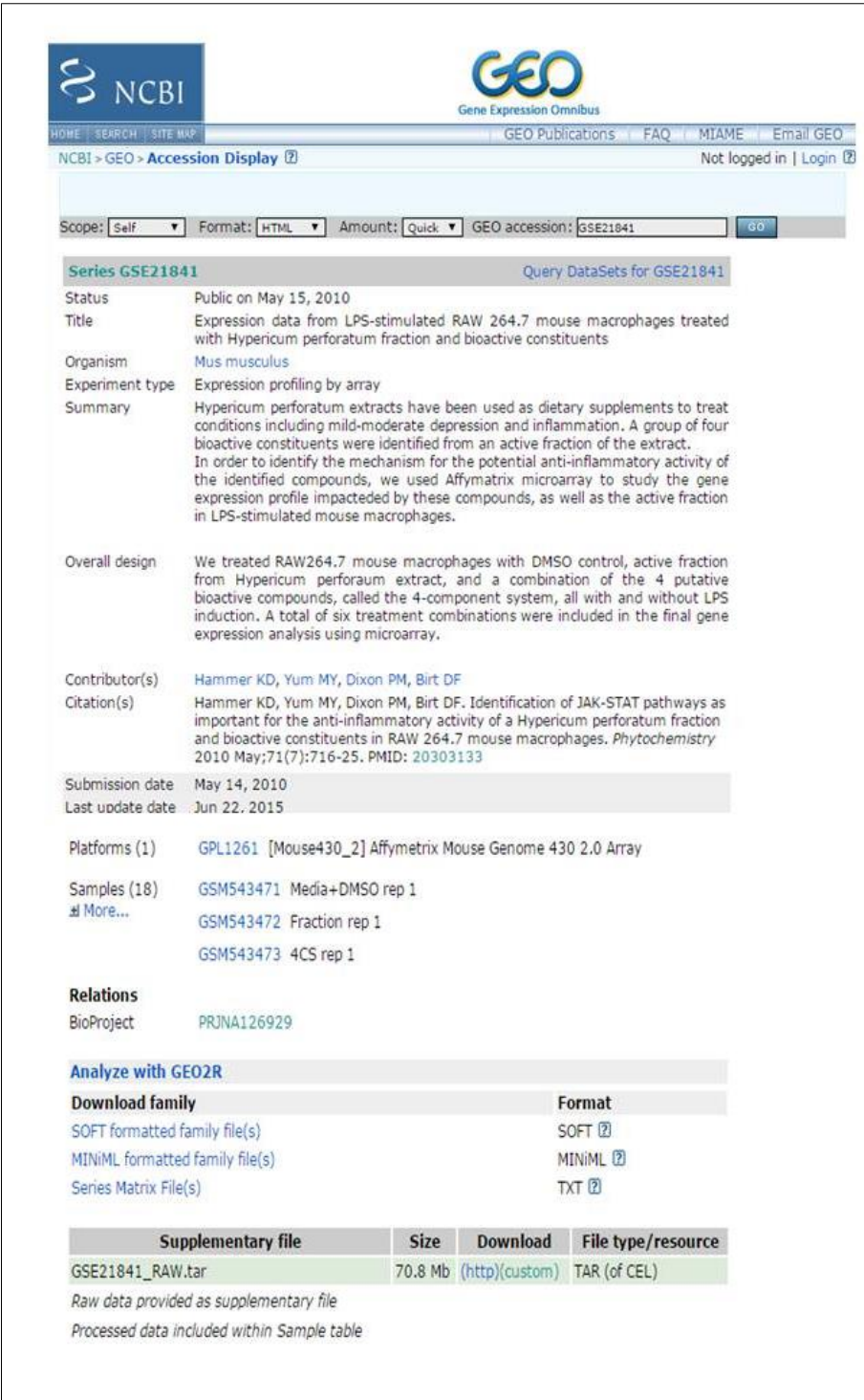
More than 3000 transcriptomic experiments in ArrayExpress have already been re-analysed in Expression Atlas. A link in the right column of the search results or at the bottom of the experiment page shows you if the experiment you are looking at is included in Expression Atlas, and brings you directly to the experiment page in Expression Atlas (e.g. [E-GEOD-1297](#)).

Expression Atlas contains transcription profiling data generated by RNA-seq or microarray technology. Users can directly query differentially expressed genes in various biological conditions, or baseline expression in normal tissues and cell lines. All experiments have been filtered for high quality (e.g. with minimum 3 biological replicates per condition) and manually curated by skilled biologists. Processing is done via standardised analysis pipelines. More details can be found [here](#).

Why not start browsing baseline expression in one of 31 species or searching for your favourite gene?

B

ภาพที่ 2-5 ตัวอย่างฐานข้อมูลสาธารณะไมโครอาร์เรย์ Gene Expression Omnibus (GEO) ใน NCBI (A) และฐานข้อมูล ArrayExpress (B)



NCBI > GEO > Accession Display [?](#) Not logged in | Login [?](#)

Scope:  Format:  Amount:  GEO accession:

**Series GSE21841** [Query DataSets for GSE21841](#)

Status Public on May 15, 2010  
 Title Expression data from LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages treated with Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents  
 Organism *Mus musculus*  
 Experiment type Expression profiling by array  
 Summary Hypericum perforatum extracts have been used as dietary supplements to treat conditions including mild-moderate depression and inflammation. A group of four bioactive constituents were identified from an active fraction of the extract. In order to identify the mechanism for the potential anti-inflammatory activity of the identified compounds, we used Affymatrix microarray to study the gene expression profile impacted by these compounds, as well as the active fraction in LPS-stimulated mouse macrophages.  
 Overall design We treated RAW264.7 mouse macrophages with DMSO control, active fraction from Hypericum perforatum extract, and a combination of the 4 putative bioactive compounds, called the 4-component system, all with and without LPS induction. A total of six treatment combinations were included in the final gene expression analysis using microarray.  
 Contributor(s) Hammer KD, Yum MY, Dixon PM, Birt DF  
 Citation(s) Hammer KD, Yum MY, Dixon PM, Birt DF. Identification of JAK-STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry* 2010 May;71(7):716-25. PMID: 20303133  
 Submission date May 14, 2010  
 Last update date Jun 22, 2015  
 Platforms (1) GPL1261 [Mouse430\_2] Affymatrix Mouse Genome 430 2.0 Array  
 Samples (18) GSM543471 Media+DMSO rep 1  
 # More... GSM543472 Fraction rep 1  
 GSM543473 4CS rep 1  
 Relations  
 BioProject PRJNA126929  
 Analyze with GEO2R  
 Download family 

Download family	Format
SOFT formatted family file(s)	SOFT <a href="#">?</a>
MINiML formatted family file(s)	MINiML <a href="#">?</a>
Series Matrix File(s)	TXT <a href="#">?</a>

 Supplementary file 

Supplementary file	Size	Download	File type/resource
GSE21841_RAW.tar	70.8 Mb	<a href="#">(http)(custom)</a>	TAR (of CEL)

 Raw data provided as supplementary file  
 Processed data included within Sample table

ภาพที่ 2-6 ตัวอย่างชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่บรรจุอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะ Gene Expression Omnibus (GEO) ประกอบด้วยรายละเอียดของชุดข้อมูลและรูปแบบของข้อมูลที่ถูกรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลและสามารถดาวน์โหลดมาศึกษาได้

### 2.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ (Microarray data analysis)

การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้จากการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน จะอาศัยหลักการด้านคณิตศาสตร์ สถิติ คอมพิวเตอร์ และชีววิทยามาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อค้นหาข้อสรุปทางกระบวนการชีวภาพที่เกิดขึ้น ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์จะประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (ดังแสดงในภาพที่ 2-7) (Babu, 2004)

1. กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลภาพ (Image processing analysis) ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้หลังจากจากการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันจะอ่านค่าไมโครอาร์เรย์โดยใช้เครื่องสแกนและทำการถ่ายภาพของอาร์เรย์เก็บไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ ในการนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เป็นรูปภาพ (Raw data) จะต้องมีการแปลงข้อมูลที่เป็นภาพ ให้เป็นข้อมูลรูปแบบค่าระดับการแสดงออกที่เป็นตัวเลข (Gene expression matrix) ก่อนนำไปวิเคราะห์

2. การแปลงและการปรับมาตรฐานข้อมูล (Transformation and normalization) ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เป็นข้อมูลดิบ (Raw data) เป็นข้อมูลจากการทดลองโดยตรง ซึ่งหน่วยของข้อมูลที่ใช้ในแต่ละตัวแปรอาจมีหน่วยที่ใช้วัดต่างกัน ในกระบวนการวิเคราะห์จำเป็นต้องให้ข้อมูลเป็นมาตรฐานเดียวกัน เพื่อให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ

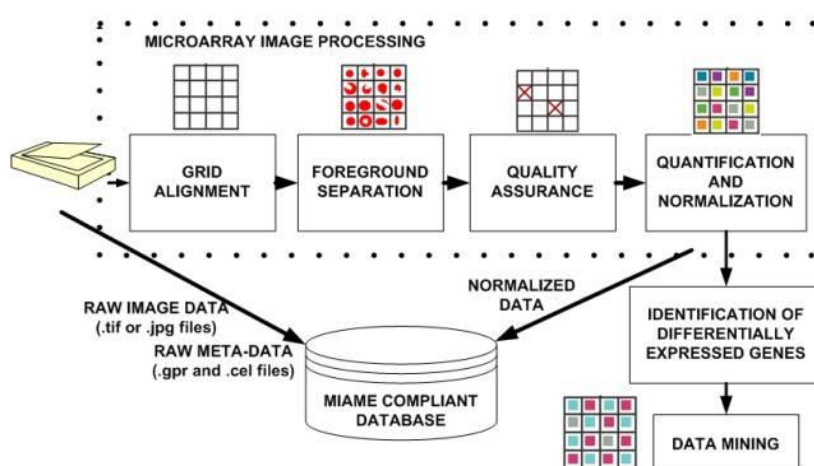
3. การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน เพื่อคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด (Differentially expressed genes) และการแปลผลเพื่อค้นหาหน้าที่ทางชีวภาพ

การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดภายใต้สภาวะที่ศึกษาเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ เนื่องจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์ประกอบด้วยยีนจำนวนมาก อาจส่งผลทำให้การวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดได้สูงจึงจำเป็นต้องคัดเลือกเฉพาะกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อสภาวะที่สนใจศึกษาอย่างแท้จริง เพื่อเป็นการเปรียบเทียบว่ายีนใดบ้างที่มีการทำงานแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ โดยวิธีการที่นิยมใช้ในการคัดเลือกยีน คือ การทำเหมืองข้อมูลโดยอาศัยวิธีการทางสถิติมาใช้ในการจัดการกับข้อมูลเพื่อคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด ตัวอย่างเช่น

- Significance Analysis for Microarray (SAM) เป็นวิธีการทางสถิติที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการค้นหายีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ได้จากการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนจากการทดลองไมโครอาร์เรย์ โดยใช้สถิตินอนพารามेटริก (Nonparametric statistics) ในการวิเคราะห์ เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ข้อมูลข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่มีจำนวนตัวอย่างที่น้อยแต่มียีนอยู่เป็นจำนวนมาก (Tusher, Tibshirani, & Chu, 2001)

- Empirical Bayes moderated t-statistic (eBayes) เป็นวิธีการที่ใช้ t-test เป็นค่าสถิติในการทดสอบ โดยวิธี eBayes จะทำการปรับค่าความแปรปรวนระหว่างโพรบกับตัวอย่างไปสู่ค่าปกติ เพื่อเพิ่มค่า degree of freedom สำหรับความแปรปรวนของแต่ละตัวอย่าง (Smyth, 2004)

- Partial Least Squares Cross-Validation (PLS-CV) เป็นการคัดเลือกยีนโดยอาศัยสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการทดสอบ (Training) ข้อมูลโดย Partial Least Squares classifier ซึ่งจำนวนของตัวอย่างที่ถูกสุ่มขึ้นมาทดสอบจะขึ้นอยู่กับ cross-validation accuracies โดยอาศัยจำนวนการสุ่มตัวอย่าง 20 ครั้ง ในการคัดเลือกตัวอย่างจำนวน 2 ใน 3 เพื่อนำมาสร้างโมเดลสำหรับการทดสอบฟิเจอร์ที่คัดเลือกได้ (Hall, 2000)

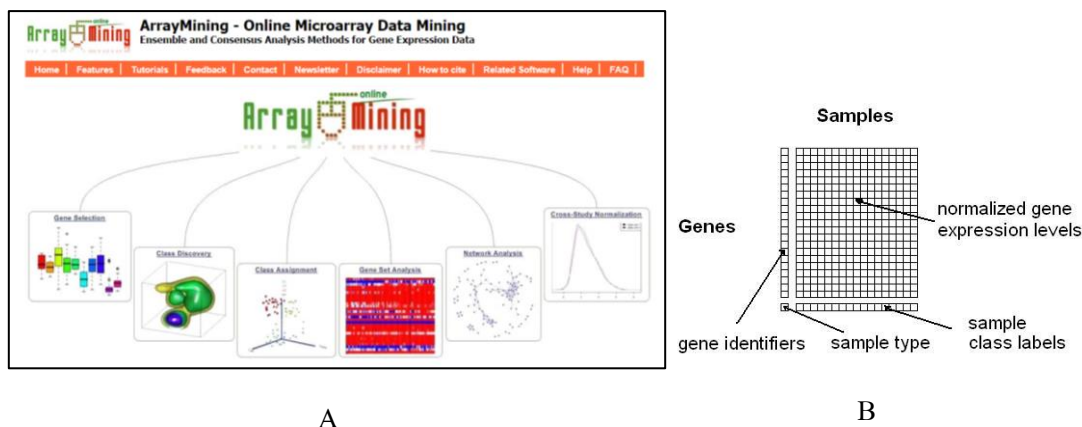


ภาพที่ 2-7 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์

(ที่มา: <http://isda.ncsa.uiuc.edu/Microarrays/> สืบค้นเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2560)

ในปัจจุบันได้มีการสร้าง โปรแกรมประยุกต์บนเว็บออนไลน์ ArrayMining.net (Glaab, 2009; <http://www.arraymining.net/R-php-1/ASAP/microarrayinfobiotic.php>) (ภาพที่ 2-8A) ที่เป็นเว็บแอปพลิเคชันออนไลน์สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่สามารถใช้งานได้ง่าย ซึ่งจะประกอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่หลากหลาย ได้แก่ การคัดเลือกยีน (Feature Selection), การจัดกลุ่ม (Clustering), การทำนาย (Prediction), การวิเคราะห์กลุ่มยีน (Gene set analysis), การวิเคราะห์เครือข่าย (Network analysis) และ การปรับมาตรฐานข้อมูล (Cross-study normalization) โดยสามารถอัปโหลดข้อมูลเพื่อที่เข้าไปใช้งานได้ทั้งในรูปแบบ Affymetrix CEL-files หรือจะเป็นรูปแบบ Tab-delimited matrix file โดยปรับให้อยู่ในรูปแบบที่โปรแกรมกำหนด ดังภาพที่ 2-8B






ภาพที่ 2-8 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่อยู่ในโปรแกรมประยุกต์บนเว็บ ArrayMining.net (A) และตัวอย่างรูปแบบข้อมูลที่โปรแกรม ArrayMing กำหนด (B)

### 2.1.6 การค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสาร (Text mining)

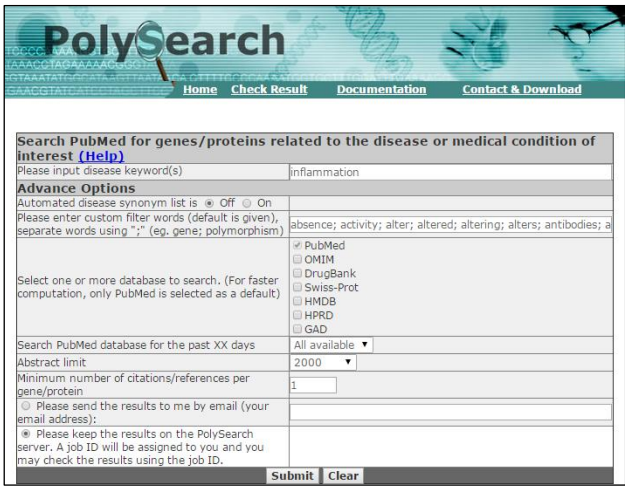
การค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสารเป็นเทคนิคที่ใช้ในการค้นหาความรู้ในฐานข้อมูลประเภทข้อความ (Knowledge discovery in document databases) ที่มีปริมาณ เพื่อค้นหารูปแบบความสัมพันธ์ที่ซ่อนอยู่ในชุดข้อความเอกสารโดยอาศัยหลักการด้านสถิติ การเรียนรู้ของเครื่องจักร หลักคณิตศาสตร์ หลักการประมวลเอกสาร (Document processing) หลักการประมวลผลข้อความ (Text processing) และหลักการประมวลผลภาษาธรรมชาติ (Natural language processing) (วรรณวิภา วงศ์วิไลสกุล, 2556)

ฐานข้อมูล PolySearch (Cheng, 2008) เป็นการพัฒนาโปรแกรมประยุกต์ออนไลน์ (Web based) ในการทำเหมืองข้อความทางด้านชีวการแพทย์ (Biomedical text mining) ที่ถูกออกแบบมาใช้ในการค้นหาความรู้จากข้อความ (Text mining) ด้านชีวการแพทย์ในการค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างโรค ยีน การกลายพันธุ์ ยา และกระบวนการเมตาบอลิซึมในมนุษย์ที่ถูกรวบรวมจากฐานข้อมูลทางการแพทย์ต่างๆ ได้แก่ PubMed, OMIM, DrugBank, SwissProt, Human Metabolome Database (HMDB), Human Protein Reference Database (HPRD) และ Genetic Association Database (GAD) (Cheng et al., 2008; <http://wishart.biology.ualberta.ca/polysearch/>) เพื่อการสืบค้นหาข้อมูลด้านชีวการแพทย์ให้มีความสะดวก ดังตัวอย่างการค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคและยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (ภาพที่ 2-9A) จากฐานข้อมูล PolySearch โดยใช้คำสำคัญในการค้นหาว่า “inflammation” (ภาพที่ 2-9B) ซึ่งจะปรากฏรายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และมีงานวิจัยที่มีการศึกษาอ้างอิง (ภาพที่ 2-9C)

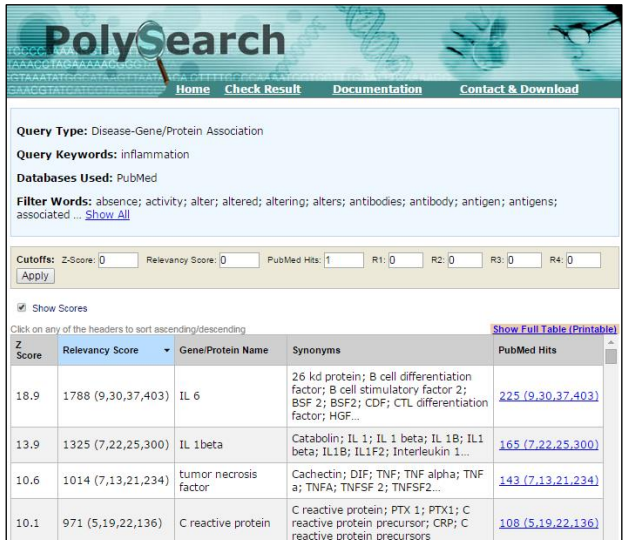
A



B



C



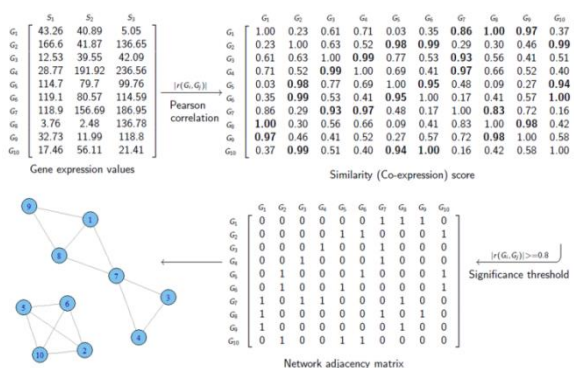
Z Score	Relevancy Score	Gene/Protein Name	Synonyms	PubMed Hits
18.9	1788 (9,30,37,403)	IL 6	26 kd protein; B cell differentiation factor; B cell stimulatory factor 2; BSF 2; BSF2; CDF; CTL differentiation factor; HGF...	<a href="#">225 (9,30,37,403)</a>
13.9	1325 (7,22,25,300)	IL 1beta	Catabolin; IL 1; IL 1 beta; IL 1B; IL1 beta; IL1B; IL1F2; Interleukin 1...	<a href="#">165 (7,22,25,300)</a>
10.6	1014 (7,13,21,234)	tumor necrosis factor	Cachectin; DIF; TNF; TNF alpha; TNF a; TNFA; TNFSF 2; TNFSF2...	<a href="#">143 (7,13,21,234)</a>
10.1	971 (5,19,22,136)	C reactive protein	C reactive protein; PTX 1; PTX1; C reactive protein precursor; CRP; C reactive protein precursors	<a href="#">108 (5,19,22,136)</a>

ภาพที่ 2-9 การค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคและยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch (A) การใช้คำสำคัญในการค้นหาความสัมพันธ์ของโรคและยีนที่เกี่ยวข้อง (B) และ (C) ตารางแสดงผลรายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ได้จากบทความวิจัยต่าง ๆ

### 2.1.7 เครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีน (Co-expression network)

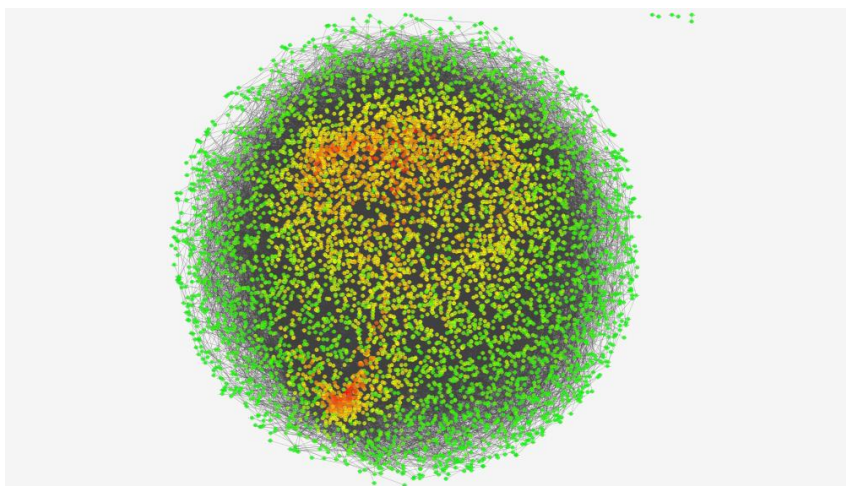
ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับเซลล์ โดยส่วนใหญ่การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์นั้น มักจะทำการทดสอบทางสถิติ เช่น t-test หรือ การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) มาใช้ในการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดหรือใช้อัลกอริทึมในการจัดกลุ่มยีนตามแบบแผนการแสดงออกของยีนที่มีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เหมือนกัน (Clustering algorithms) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะทำให้ได้เฉพาะกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันเท่านั้น อาจจะทำให้เกิดการสูญเสียข้อมูลและการตีความหมายด้านชีวภาพไปได้ เนื่องจากในกระบวนการทางชีวภาพยีนบางยีนอาจจะมีการแสดงออกที่น้อยแต่อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการทำงานภายในเซลล์ได้ หรือยีนบางยีนอาจมีการทำงานร่วมกันแบบเสริมสร้างซึ่งกันและกัน (Merico, Gfeller, & Bader, 2009; Watson, 2006)

เครือข่ายการแสดงออกของยีนถูกสร้างขึ้นจากข้อมูลการแสดงออกของยีน ซึ่งจะเรียกค่านี้ว่า expression matrix ซึ่งจะนำมาตรวจวัดความสัมพันธ์ระหว่างยีนโดยอาศัยหลักการการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ในทางสถิติมาหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนแต่ละคู่ ซึ่งค่าความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่ได้นั้นจะแสดงเป็นค่า Pearson correlation coefficient หรือ r-value โดยค่า r จะมีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง 1 ค่า r เป็นบวกแสดงถึงมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน และค่า r เป็นลบแสดงถึงมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงข้ามกัน (ภาพที่ 2-10) จะเห็นได้ว่าการสร้างเครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีนจะทำให้เห็นความสัมพันธ์ของยีนทั้งหมด ซึ่งจะทำให้สามารถเข้าใจภาพรวมของกลไกที่เกิดขึ้นได้ ดังตัวอย่างเครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีน (ภาพที่ 2-11)



ภาพที่ 2-10 ขั้นตอนการสร้างเครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีน

(ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/Gene\\_co-expression\\_network#/media/File:Gene\\_co-expression\\_network\\_construction\\_steps.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_co-expression_network#/media/File:Gene_co-expression_network_construction_steps.png) สืบค้นเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2560)



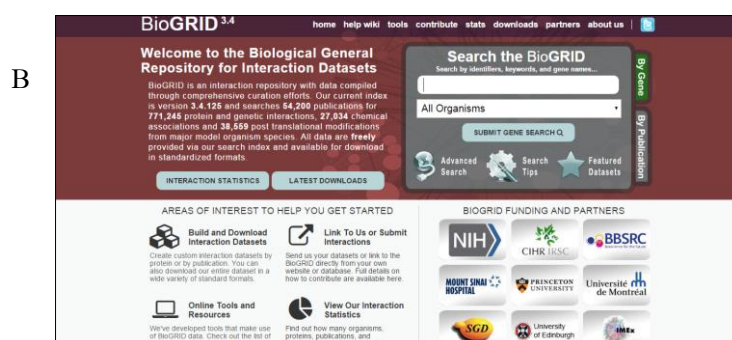
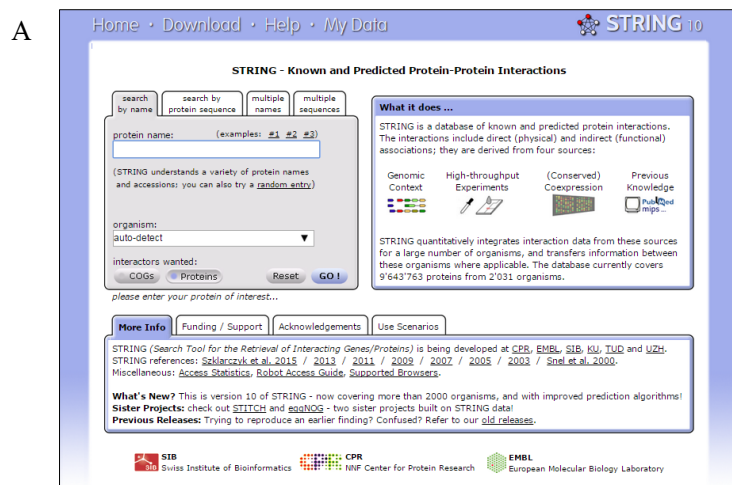
ภาพที่ 2-11 ตัวอย่างเครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีนจำนวนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะ จำนวน 18 ราย (ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/Gene\\_co-expression\\_network#/media/File:Gene\\_co-expression\\_network\\_with\\_7221\\_genes\\_for\\_18\\_gastric\\_cancer\\_patients.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_co-expression_network#/media/File:Gene_co-expression_network_with_7221_genes_for_18_gastric_cancer_patients.png) สืบค้นเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2560)

### 2.1.8 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network)

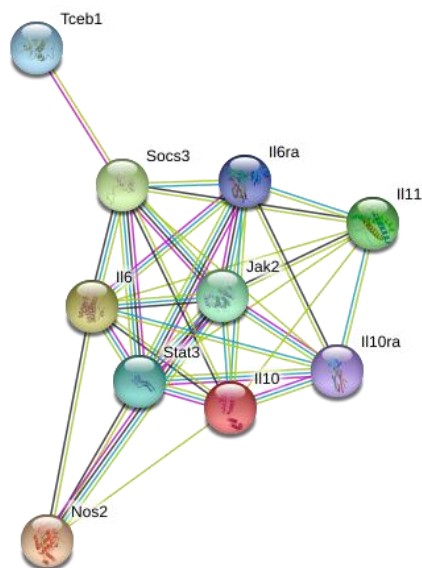
กลไกการทำงานของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตจะถูกควบคุมด้วยสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ ประกอบด้วยดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน และไขมัน เป็นต้น โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลพื้นฐานที่มีปฏิสัมพันธ์ในการทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบในกระบวนการทำงานต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction), กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Cell metabolism) และการเคลื่อนไหวภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ (Muscle contraction) ความผิดปกติของโปรตีนอาจส่งผลให้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในระดับโมเลกุล ปัจจุบันการสร้างเครือข่ายทางชีวภาพเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาหลายอย่าง เพื่อให้เกิดความเข้าใจและการค้นหาวิธีการรักษาโรคของมนุษย์ เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนถูกนำมาประยุกต์ใช้ด้านชีวภาพและชีวการแพทย์ขึ้นอยู่กับบทบาทหลักของหน้าที่การทำงานของโปรตีน จะทำให้เห็นการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ในการส่งสัญญาณผ่านวิถีต่าง ๆ ได้อย่างเป็นระบบ เพื่อให้เกิดความเข้าใจการทำงานที่ซับซ้อนภายในเซลล์ (Chen, Ho, Huang, Juan, & Huang, 2014)

ในปัจจุบันเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมีการบรรจุไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์สาธารณะที่ประกอบด้วยข้อมูลรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างโปรตีนซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจการทำงานร่วมกันของโปรตีนของหน้าที่ที่หลากหลายในกระบวนการทางชีวภาพ ตัวอย่างฐานข้อมูลโปรตีน (ภาพที่ 2-12A และภาพที่ 2-12B) ได้แก่ DIP, Biomolecular Interaction Network

Database (BIND), Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID), Human Protein Reference Database (HPRD), IntAct Molecular Interaction Database และ Known and Predicted Protein–Protein Interactions (STRING) เป็นต้น ฐานข้อมูล STRING (<http://string-db.org>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนโดยฐานข้อมูล STRING จะรวบรวมข้อมูลจากแหล่งต่าง ๆ ไว้ ประกอบด้วยข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (Experiment) ข้อมูลจากฐานข้อมูล (Database) ข้อมูลจากการแสดงออกร่วม (Co-expression) ข้อมูลจากการค้นหาความรู้จากข้อความ (Text mining) เป็นต้น ดังตัวอย่างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของโปรตีน SOCS3 ที่ได้จากฐานข้อมูล String (Szklarczyk et al., 2014) (ภาพที่ 2-13)



ภาพที่ 2-12 ตัวอย่างฐานข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน Known and Predicted Protein–Protein Interactions (STRING) (A) และฐานข้อมูล Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) (B)



ภาพที่ 2-13 ตัวอย่างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน SOCS3 จากฐานข้อมูล STRING

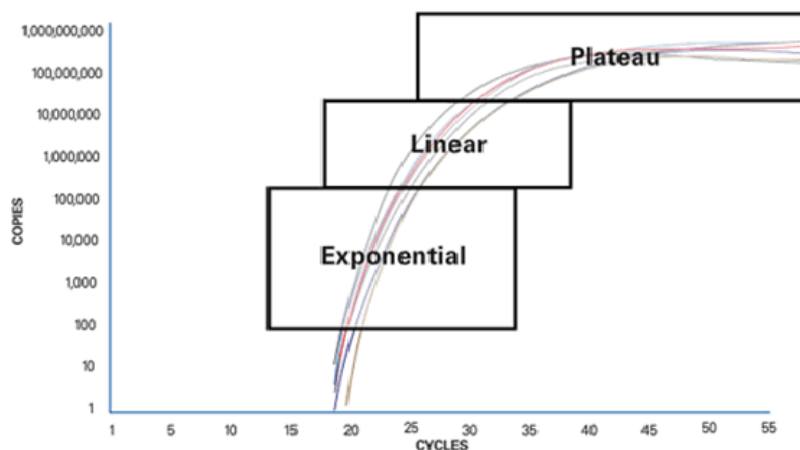
### 2.1.9 เทคนิค Real Time Polymerase Chain Reaction (Real time PCR) (กนกวรรณ จารุกัจฉา, 2549)

Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ต่าง ๆ ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยาตั้งแต่ปฏิกิริยาเริ่มต้นและขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนิน เทคนิคการ Real-time PCR เป็นวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบ ทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ Exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย

เฟสต่าง ๆ ในปฏิกิริยา Real-time PCR จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นทั้งหมด 3 เฟส (ดังภาพที่ 2-14) ได้แก่

1. Exponential phase เป็นเฟสที่ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มเป็นสองเท่า ทำให้เกิด PCR products เป็นจำนวนมาก โดยการเพิ่มจำนวนแบบ Exponential ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงและมีความแม่นยำสูงถือเป็นเฟสที่ใช้ในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอในเทคนิค Real-time PCR
2. Linear phase เป็น High variability phase นั้น จะมีการนำ Reagents มาใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาลดลง และ PCR products ที่เกิดขึ้นจะเริ่มมีการเสื่อมสลายไปในแต่ละรอบของปฏิกิริยา

3. Plateau phase ปฏิบัติการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจะหยุดลง และไม่มี PCR products เกิดขึ้นอีก โดยเป็นเฟสที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอในเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม เรียกว่า end-point detection

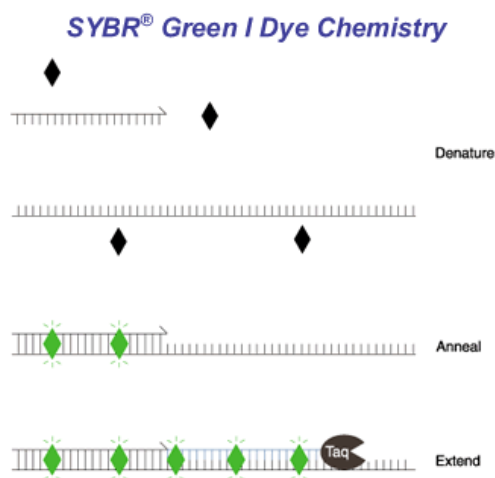


ภาพที่ 2-14 เฟสต่าง ๆ ใน Real time PCR

(ที่มา: <http://www.lifetechnologies.com/th/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html> สืบค้นเมื่อ 20 มิถุนายน 2560)

การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. DNA-binding dye เป็นการใช้สารเรืองแสงประเภท Fluorochrome ชนิดหนึ่ง คือ SYBR Green I dye ซึ่งเรืองแสงได้ ที่สามารถจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ โดย SYBR Green I dye จะแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ และเมื่อถูกการกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต แล้ว SYBR Green I dye จะเกิดการคายพลังงานออกมาในรูปของแสง Fluorescence และเมื่อรอบของปฏิกิริยาลับมาถึงช่วง denature อีกครั้ง จากนั้น SYBR Green I dye ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง การวัดการเรืองแสงนั้นจะทำเมื่อสิ้นสุด Elongation step ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา โดยการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นจะบ่งบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยโมเลกุลของ SYBR Green I dye จะจับได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ ความยาวของ PCR product ดังแสดงในภาพที่ 2-15 ในกรณีที่มีดีเอ็นเอหลายชนิดปนกันอยู่ในตัวอย่างสามารถแยกสัญญาณการเรืองแสง (Fluorescence signal) ได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า  $T_m$  (Melting temperature) โดยค่า  $T_m$  เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย ซึ่งจะแปรผันตรงกับเปอร์เซ็นต์ของเบส G และ C ที่อยู่ในสายดีเอ็นเอ (% GC content)



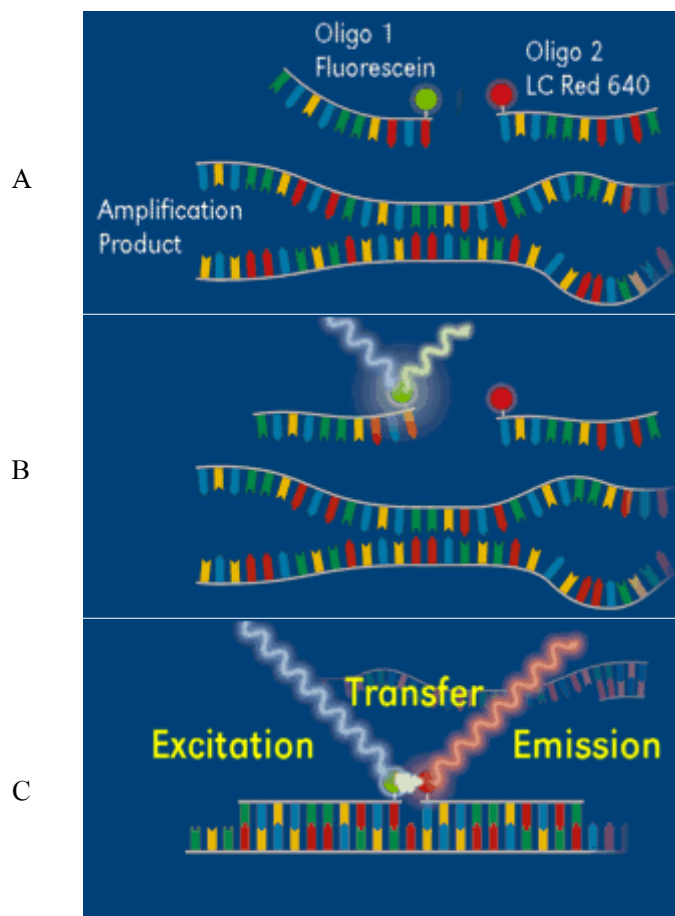
ภาพที่ 2-15 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดย SYBR Green I dye

(ที่มา: [http://www.gibthai.com/services/technical\\_detail.php?ID=12](http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12) สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กันยายน 2560)

2. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยวิธี FRET วิธีนี้将有ความจำเพาะสูง โดยวิธีนี้จะเป็นการถ่ายทอดพลังงานจาก Dye ที่มีพลังงานสูงไปสู่ Dye ใกล้เคียงที่มีพลังงานต่ำกว่า ซึ่งมีอยู่หลายแบบ ได้แก่

2.1 Hybridization Probe วิธีนี้เป็นการใช้โพรบ (Probe) สายสั้น 2 สาย โดยสายแรกติดฉลากที่ปลาย 3' ด้วย fluorescein ทำหน้าที่เป็น Donor หรือ Quencher และสายที่สองติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วย Red 640 หรือ Red 705 (เป็น Acceptor หรือ Reporter dye) โดยที่ปลาย 3' จะถูกปิดเพื่อไม่ให้สามารถทำหน้าที่เป็น PCR primer ได้ โดย probe ทั้ง 2 สายจะมีลำดับเบสต่อเนื่องกันโดยเว้นช่องว่างระหว่างปลาย 3' ของเส้นแรก กับปลาย 5' ของ Probe อีกเส้นหนึ่งประมาณ 1-5 คู่เบส เมื่อ Probe ทั้งสองสายทำการ Hybridization กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (PCR products) จะทำให้เกิด FRET สามารถวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ ดังภาพที่ 2-14

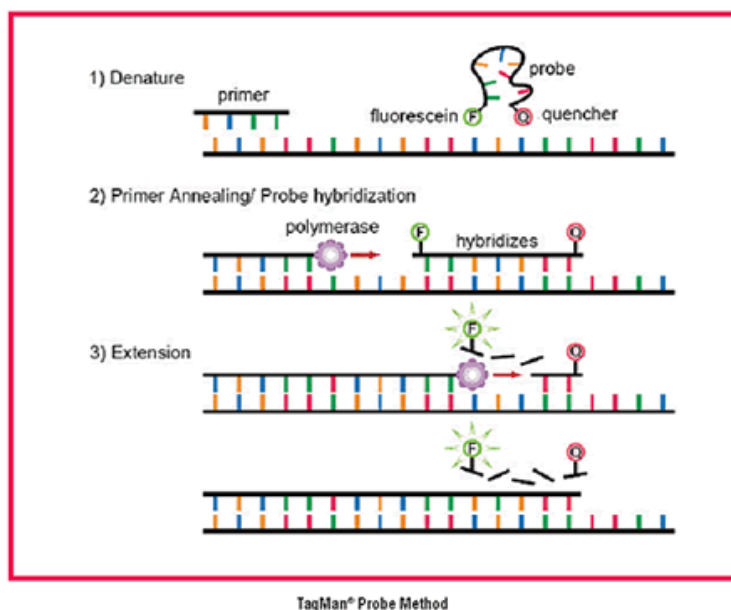




ภาพที่ 2-16 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ Hybridization Probe

(ที่มา: <http://dyes.gene-quantification.info/> สืบค้นเมื่อวันที่ 21 กันยายน 2560)

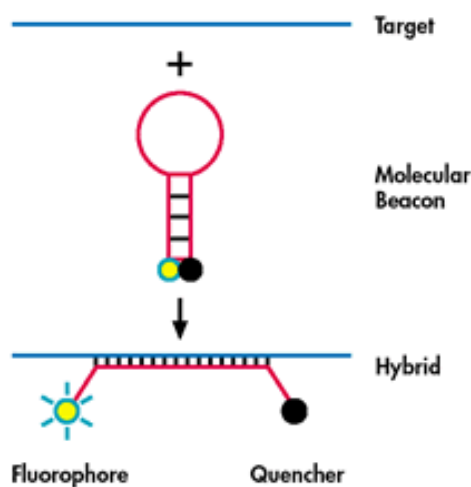
2.2 TaqMan Probe เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งโดยปลาย 5' ของ TaqMan probe ติดฉลากด้วย Fluorescent reporter dye และปลาย 3' ติดฉลากด้วย Quencher dye เมื่อเกิดการ Hybridization แล้ว Reporter dye ถูกกระตุ้นด้วยแสงแล้ว จะถ่ายเทพลังงานไปให้ Quencher dye เมื่อปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เข้าสู่การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (Elongation) มาจนถึงบริเวณที่ TaqMan probe เกาะอยู่โดยปลาย 5' ของ Tag DNA polymerase จะทำการย่อย Probe ทำให้ Reporter dye หลุดเป็นอิสระและห่างจาก Quencher ทำให้สามารถคายพลังงานในรูปแสงได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง ดังภาพที่ 2-17



ภาพที่ 2-17 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ TaqMan Probe

(ที่มา: [http://www.gibthai.com/services/technical\\_detail.php?ID=12](http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12) สืบค้นเมื่อวันที่ 21 กันยายน 2560)

2.3 Molecular Beacons เป็น oligonucleotide probe ที่มีรูปร่างโค้งงอเป็น Hair-pin loop โดยมีส่วนที่ยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนประมาณ 5-7 นิวคลีโอไทด์ เป็นส่วนที่มีคู่เบส G และ C มาก ทำให้ปลาย 5' และ 3' ที่ติดคลากด้วย Reporter และ Quencher dye เข้ามาอยู่ใกล้กัน ทำให้ Quencher dye สามารถดูดพลังงานจาก Reporter dye ได้ บริเวณ Loop ประมาณ 5-30 นิวคลีโอไทด์ จะถูกสร้างให้มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการหา เมื่อ Molecular beacon เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย Hairpin structure จะถูกสลายไป ทำให้ Reporter dye ที่ 5' อยู่ห่างจาก Quencher dye ที่ 3' end สามารถเปล่งสัญญาณแสงออกมาได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงสูง ดังภาพที่ 2-18



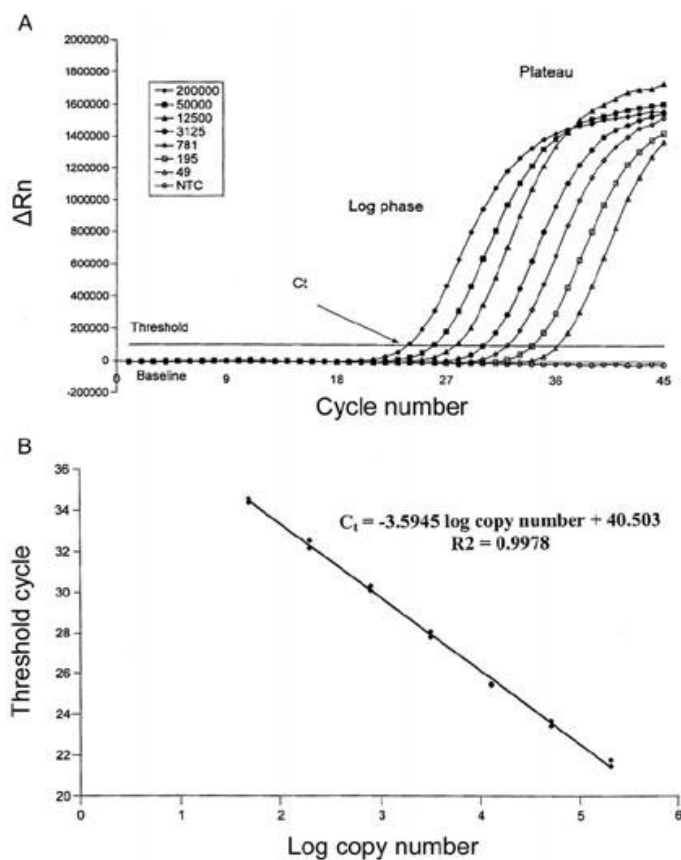
ภาพที่ 2-18 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมาย โดย Molecular beacon probes

(ที่มา: [http://www.gibthai.com/services/technical\\_detail.php?ID=12](http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12) สืบค้นเมื่อวันที่ 21 กันยายน 2560)

**การวัดปริมาณของ Real time PCR** (คะเน็งนิจ คงพวง, พงษ์วิทย์ บัวล้อมไพบ, อำไพ ดารกะพงษ์ และเขาวเรศ กังใช้จ้วน, 2550)

การวัดปริมาณของ Real time PCR มีสองวิธี คือ

1. Absolute quantitation เป็นการวัดจำนวนกรดนิวคลีอิกเป้าหมายในตัวอย่างที่มีอยู่จริงตามหน่วยวัดที่กำหนด การวัดปริมาณแบบ Absolute quantitation สามารถทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานโดยการ plot ระหว่างค่า log ของ template DNA ที่ทราบความเข้มข้นกับค่า Threshold cycle ( $C_T$ ) ของค่าความเข้มข้นและทำการสร้างสมการเส้นตรงโดยใช้การวิเคราะห์ Linear regression ดังตัวอย่างในภาพที่ 19 จากนั้นนำค่า  $C_T$  ของตัวอย่างที่ยังไม่ทราบค่าความเข้มข้นมาคำนวณจากสมการที่ได้ (ค่า  $C_T$  คือ จำนวนรอบของ PCR ที่กราฟของสัญญาณตัดกับ Threshold ความลาดของเส้นกราฟ (Slope) หรือสมการสัมพันธ์กับค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR (PCR efficiency) การวัดปริมาณจะมีความถูกต้องเมื่อประสิทธิภาพของ PCR เมื่อใช้วัดตัวอย่างและสารมาตรฐานเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด การหาค่า PCR efficiency ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างหรือสารมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR (ดังภาพที่ 2-19)



ภาพที่ 2-19 แสดงตัวอย่างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR (A) และการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการ plot ระหว่างค่า log ของ template DNA ที่ทราบความเข้มข้นกับค่า Threshold cycle ( $C_T$ ) (B) (ที่มา: <http://www.cgj-journal.com/2005%20issue%206/Quantitative%20Real-time.html> สืบค้นเมื่อ 2 กันยายน 2560)

2. Relative quantitation (การวัดปริมาณแบบสัมพัทธ์) เป็นการตรวจวัดปริมาณของเป้าหมายเทียบกับสารที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบที่อยู่ในตัวอย่างเดียวกัน วิธีนี้ใช้มากในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (Gene expression) เช่น เปรียบเทียบ Gene expression ในตัวอย่างต่างๆ ปริมาณของโมเลกุลเป้าหมายจะถูก Normalized ด้วยยีนอ้างอิง (Reference gene)

การเปรียบเทียบด้วยวิธี  $\Delta\Delta C_T$  จะใช้ได้เมื่อประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนของยีนอ้างอิงเหมือนกับประสิทธิภาพของยีนเป้าหมาย ข้อมูลของตัวอย่างและ Calibrator เริ่มต้นต้องทำ Normalization เพื่อลดความแปรปรวนของตัวอย่างทั้งด้านคุณภาพและปริมาณค่า Normalized value คือ  $\Delta C_T$  คำนวณจากสมการต่อไปนี้

$$\Delta C_T \text{ sample} = C_T \text{ target} - C_T \text{ reference} \quad (1)$$

$$\Delta C_T \text{ calibrator} = C_T \text{ target} - C_T \text{ reference} \quad (2)$$

จากนั้นคำนวณหาค่า  $\Delta\Delta C_T$  ด้วยสูตร

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ sample} - \Delta C_T \text{ calibrator} \quad (3)$$

จำนวน target gene expression ที่ได้ normalized ด้วย reference gene และเทียบกับ calibrator จะเท่ากับ  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.2.1 การศึกษาและการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์

ในปัจจุบันงานวิจัยด้านชีวภาพได้มุ่งเน้นถึงการวิเคราะห์ในระดับจีโนม เพื่อมองภาพรวมของการทำงานร่วมกันของยีนทั้งหมดของกระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเทคโนโลยีดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนหลายยีนในเวลาเดียวกัน ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ เพื่อการวินิจฉัยคาดการณ์การตอบสนองต่อการรักษาโรค การทำนายหน้าที่ของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของโรค การพัฒนาหาวิธีการรักษาโรคแบบใหม่ และการพัฒนาฐานข้อมูลสาธารณะที่จะช่วยให้เข้าใจการทำงานของระบบชีววิทยาที่ซับซ้อน (Macgregor and Squire, 2002; Argyris, George & Demosthenes, 2004) ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีการตอบสนองต่อกลไกการอักเสบ เนื่องจากการอักเสบบทบาทสำคัญเป็นจุดเริ่มต้นอันเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) เป็นต้น (Nguyen et al., 2002) ดังนั้นการศึกษากการแสดงออกของยีนที่มีการตอบสนองต่อกลไกการอักเสบจะช่วยให้สามารถเข้าใจและค้นพบยีนเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อการอักเสบ เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคที่มีสาเหตุมาจากการอักเสบได้ ในการศึกษากลไกการตอบสนองต่อการอักเสบนั้นจะนิยมใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นต้นแบบในการศึกษา ตัวอย่างการใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ในการศึกษาการตอบสนองต่อการอักเสบ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีน CstF-64 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS (Shell et al., 2005) การศึกษาการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบและค้นหาเป้าหมายสำคัญสารสกัดธรรมชาติ (Comer, 2006; Hammer, 2010)

### 2.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์และการคัดเลือกยีน

ข้อมูลไมโครอาร์เรย์เป็นข้อมูลการแสดงออกของยีนที่มีขนาดใหญ่และมีอิทธิพลมาจากหลายตัวแปร มีค่าการกระจายของข้อมูลสูงส่งผลให้การวิเคราะห์มีความซับซ้อนและอาจทำให้เกิด

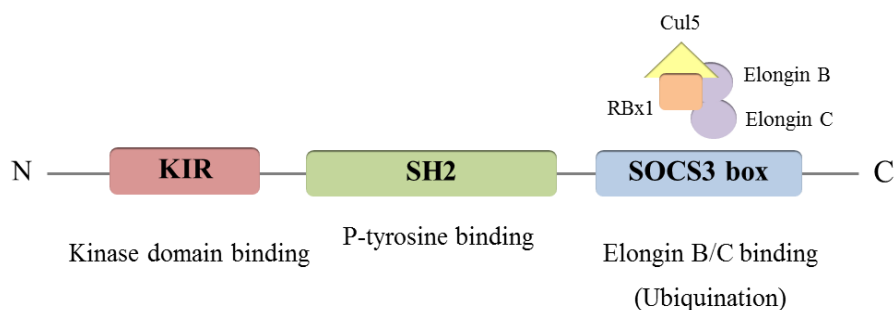
ความผิดพลาดได้สูง ดังนั้นการลดขนาดของข้อมูลโดยการคัดเลือกเฉพาะกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสถานะที่สนใจศึกษา จะทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์และส่งผลให้การวิเคราะห์มีแม่นยำ (Selvaraj & Natarajan, 2011) การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ประกอบด้วยหลายวิธี ได้แก่ การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างเด่นชัด (Identification of differentially expressed gene) วิธีที่นิยมใช้ในการคัดเลือก คือ การคัดเลือกโดยวิธี Feature selection เป็นวิธีการทำเหมืองข้อมูล (Data Mining) ซึ่งอาศัยหลักการทางสถิติและคณิตศาสตร์มาใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ วิธี Support vector machine (SVM) ที่ใช้หลักการสร้างสมการเส้นตรง เพื่อแบ่งกลุ่มของข้อมูลออกเป็นสองกลุ่ม, การคัดเลือกข้อมูลโดยอาศัยการเปรียบเทียบโพลด์เซนจ์ (Fold change) เป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนค่าระดับการแสดงออกของยีนระหว่างสองกลุ่ม โดยค่าที่ได้จะอยู่ในรูปแบบจำนวนเท่า เช่น เหมือนผืน โวหารกล้า และพิทักษ์ สุทรอนันต์ (2557) ได้ใช้วิธี SVM ร่วมกับการเลือกข้อมูลโดยอาศัยการเปรียบเทียบโพลด์เซนจ์ (Fold change) ในการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ พบว่ามียีนทั้งหมด 18 ยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของร่างกายในระบบภูมิคุ้มกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของวันเฉลิม จินอู๋ และพิทักษ์ สุทรอนันต์ (2557) ที่ได้ใช้การคัดเลือกยีนโดยวิธี Feature selection ที่เป็นเครื่องมือที่บรรจุภายในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMinig (<http://www.arraymining.net>) (Glaab et al., 2009) มาคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในการตอบสนองต่อ LPS เป็นต้น

ข้อมูลไมโครอาร์เรย์นั้นเป็นข้อมูลที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยยีนจำนวนมาก แสดงให้เห็นถึงการทำงานร่วมกันของยีน ในสิ่งมีชีวิตจะมีกลไกการทำงานและการควบคุมในหลายระดับ ได้แก่ ระดับยีน โปรตีน และในแต่ละระดับก็มีการทำงานที่สัมพันธ์กัน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางชีววิทยาของสิ่งต่าง ๆ ที่เชื่อมโยงกันในระดับโมเลกุล เพื่อให้เข้าใจเครือข่ายปฏิสัมพันธ์และเห็นภาพกลไกการทำงานของกระบวนการทางชีววิทยาได้อย่างเป็นระบบ เครือข่ายทางชีวภาพจะประกอบด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน, เครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ได้มีการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Co-expression network) มาใช้ในค้นหายีนที่คาดว่าเป็นสาเหตุการเกิดโรค (Candidate gene) เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น จะช่วยให้เข้าใจการทำงานภาพรวมของยีนทั้งหมดภายในเซลล์ (เทพพนม อารัญญาณู และคณะ, 2558; กิตติพันธ์ ธาระเชษฐ์ และคณะ, 2559 ; Albright et al., 2014) และหากมีการนำเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีนจะช่วยให้เข้าใจกลไกการควบคุมระบบของชีวิต เช่น งานวิจัยของพิศกา ไบยา และคณะ (2557) ได้นำข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจมาสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน พบว่าสามารถทำความเข้าใจกลไกการอักเสบใน

ระดับโมเลกุลได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008) ได้ใช้การสร้างเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory network) มาศึกษากลไกการตอบสนองต่อ LPS ซึ่งสามารถช่วยให้พวกเขาเข้าใจกลไกการตอบสนองของความไวต่อการรับเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น และหากมีการนำวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจะช่วยให้กลไกภาพรวมของกระบวนการทำงานและควบคุมที่เกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิตดียิ่งขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Nair et al. (2014) ได้ใช้วิธีการค้นหาความรู้จากฐานข้อมูล PolySearch และฐานข้อมูล CADgene ร่วมกับการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีนมากขึ้นหาพื้นที่ที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในโรคหลอดเลือดหัวใจ

### 2.2.3 บทบาทหน้าที่ของยีน *SOCS3* ในการตอบสนองต่อการอักเสบ

โปรตีน SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) เป็นโปรตีนที่สร้างจากยีน *SOCS3* อยู่ในกลุ่ม STAT-induced STAT inhibitor (SSI) หรือที่รู้จักกันในชื่อโปรตีน Suppressor of cytokine signaling (SOCS) ทำหน้าที่ควบคุมเชิงลบในการส่งสัญญาณของกลุ่มไซโตไคน์ (Cytokine-inducible negative regulators of cytokine signaling) (Yoshimura et al., 2005) โครงสร้างของโปรตีน SOCS3 ประกอบด้วย 3 โดเมน คือ SH2 domain และ SOCS box ที่ด้านปลายด้าน C-terminal และ KIR domain ที่ด้านปลาย N-terminal โดยที่ SOCS3 จะสามารถเกิดกระบวนการเติมฟอสเฟสให้กับไทโรซีนผ่านทาง SH2 domain และ Elongin BC ผ่านทาง SOCS box โดยที่ SOCS box จะมีปฏิสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ubiquitination ได้แก่ Elongin B, Elongin C, Cullin-5 (Cul5), Ring-box 2 (Rbx2) และ E2 ubiquitin transferase (ดังภาพที่ 2-20) โดย SOCS box จะทำหน้าที่ E3 ubiquitin ligases (Inagaki, Kondo, Ito, & Yoshimura, 2013)



ภาพที่ 2-20 โครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน SOCS3 (ดัดแปลงจาก Rico-Bautista, Flores-Morales & Fernández-Pérez, 2006; Yoshimura, Naka, & Kubo, 2007)

SOCS3 เป็นโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ IL-6 และ IL-10 ผ่านทางการส่งสัญญาณของ Toll like receptor (TLR) ในเซลล์แมคโครฟาจที่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS (Yasukawa et al., 2003; El Kasmi et al., 2006) โดย IL-6 เป็นสารสื่อกลางการอักเสบ (Pro-inflammatory cytokine) ที่มีบทบาทความสำคัญในโรคการอักเสบหลายชนิด ขณะที่ IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ควบคุมในระบบภูมิคุ้มกัน (Immunoregulatory cytokine) ที่มีทำหน้าที่ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) โดย IL-6 และ IL-10 จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกโดยทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (Transcription factor) STAT3 ผ่านทางวิถีการส่งสัญญาณ JAK-STAT pathway (Murray, 2007) ยีน *SOCS3* จะมีความเสถียรเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกโดย IL-6 และ IL-10 ในสถานะที่มี LPS แต่การส่งสัญญาณของ IL-6 จะถูกยับยั้งโดย *SOCS3* เนื่องจาก *SOCS3* สามารถไปจับกับ IL-6R subunit gp130 (Tyr759) ได้ที่เป็นรีเซพเตอร์ชนิดเดียวกัน แต่ไม่เกิดกับ IL-10R เนื่องจากมีรีเซพเตอร์ต่างชนิดกัน (Yasukawa et al., 2003; El Kasmi et al., 2006) ดังนั้นในการกระตุ้นการทำงาน STAT3 ที่ทำให้เกิดการตอบสนองของ IL-6 นั้นจะเป็นแบบชั่วคราว เพื่อเพิ่มความเสถียรกับการตอบสนองของ IL-10 ให้เกิดในระยะยาว ดังนั้นการตอบสนองต้านการอักเสบเกี่ยวกับพวกวิถีการส่งสัญญาณไซโตไคน์ที่ขึ้นอยู่กับ STAT3 แต่ไม่จำเพาะกับ IL-10 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น STAT3 ที่เพียงพอสามารถลดการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ TNF และ IL-6 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ (Williams et al., 2007; Nishinakamura et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการทำงาน STAT3 มีความสำคัญต่อการต้านอักเสบ โดยการกระตุ้นการทำงานของ STAT3 แบบชั่วคราวจะส่งเสริมการอักเสบ (Yasukawa et al., 2003)

การกระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ STAT3 ที่ไม่ขึ้นกับไซโตไคน์ (cytokine-independent activation) อาจจะเป็นกระบวนการของจุลชีพที่จะหลบหนีในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ผ่านการกระตุ้นโดยตรงของ STAT3 โดยการติดเชื้อทอกโซพลาสมาคอนดิไอ (*Toxoplasma gondii*) สามารถยับยั้งการสร้าง TNF และ IL-12 ในเซลล์แมคโครฟาจ (Butcher et al., 2005) และมีการศึกษา putative protein kinase ROP16 (rhopty protein 16) ของแบคทีเรีย *T. gondii* แสดงให้เห็น ROP16 สามารถยับยั้งการกระตุ้นโปรตีน SOCS ที่มีผลต่อการกระตุ้น STAT3 (Saeij et al., 2007)

ผลของ *SOCS3* ในการส่งสัญญาณ TLR ทางอ้อมโดยการกระตุ้นการทำงานทรานสคริปชันแฟกเตอร์ STAT3 อย่างไรก็ตามมีความที่จะเป็นไปได้ที่ตัวของ *SOCS3* เองที่เป็นตัวกลางในการตอบสนองต่อการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) เพราะว่าจะระดัับการแสดงออกของโปรตีน *SOCS3* ขึ้นกับ IL-10 รวมถึง PGE2 ผ่านทาง cAMP pathway (Cheon et al., 2006) โปรตีน *SOCS3*



อาจจะมีผลต่อการส่งสัญญาณ TLR อย่างไรก็ตามยังมีรายงานที่ขัดแย้งกันอยู่ บางการศึกษาแสดงให้เห็นว่า SOCS3 มีผลต่อการตอบสนองต่อ TLR เพียงเล็กน้อย (Prele, Keith-Magee, Yerkovic, Murcha, & Hart, 2006) ขณะที่การแสดงออกของ SOCS3 ในเซลล์แมคโครฟาจในระดับสรีรวิทยาแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งหรือขัดขวาง การแสดงออกของ TNF และ CD40 เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS (Qin et al., 2006; Qasimi et al., 2006) รายงานล่าสุดระบุว่า SOCS3 สามารถยับยั้งการทำงานของ TRAF6 และ TAK1 ซึ่งทั้งสองมีความสำคัญกับการตอบสนองของ TLR และ IL-1 ดังนั้น SOCS3 อาจมีบทบาทสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมเชิงลบในการส่งสัญญาณ TLR (Froböse et al., 2006) โดย SOCS3 จะไปลดความสัมพันธ์ระหว่าง TRAF6 และ TAK1 และยับยั้ง IL-1 โดยจะไปยับยั้งในขั้นตอนการกระตุ้น TAK1 โดย TRAF6 ในกระบวนการ ubiquitination ของ TRAF6 เนื่องจาก SOCS3 สามารถจับกับ Elongin B และ C ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ cullin-RING E3 ubiquitin ligases (Lehmann et al., 2003; Froböse et al., 2006; Ajibade, Wang, & Wang, 2013) โดย SOCS3 จะไปยับยั้งในขั้นตอนการกระตุ้น TBK1 โดย TRAF3 ในกระบวนการ ubiquitination ของ TRAF3 ดังเช่นเดียวกันกับในวิถีการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัย MyD88 (Kayagaki et al., 2007)

## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

##### 3.1.1 เครื่องมือและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ

1. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal Computer)  
Processor: Inter(R) core(TM) 2Duo P7450 @2.13 GHz, 2.13 GHz  
Installed memory: 4.00 GB (3.50 GB usable)  
System type: 32-bit Operating System
2. โปรแกรมระบบปฏิบัติการ ไมโครซอฟวินโดวส์เซเวน (Windows 7)
3. โปรแกรมไมโครซอฟท์เอกซ์เซล (Microsoft Excel 2010)
4. โปรแกรม David (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, version 6.7; Huang, Sherman, & Lempicki, 2009)
5. โปรแกรม Cytoscape version 2.6.3 (<http://www.cytoscape.org>; Cline et al., 2007)
6. โปรแกรม Arraymining (<http://www.arraymining.net/R-php-1/ASAP/microarrayinfo/fobiotic.php>; Glaab et al., 2009)
7. โปรแกรม String (<http://string-db.org/>; Szklarczyk et al., 2015)
8. ฐานข้อมูล GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Edgar, Domrachev, & Lash, 2002)
9. ฐานข้อมูล KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>; Kanehisa, 2010)
10. ฐานข้อมูล Polysearch (<http://wishart.biology.ualberta.ca/polysearch/>; Cheng et al., 2008)
11. โปรแกรม MEV (Multi Experiment Viewer, version 4.8.1 Howe et al., 2011)
12. โปรแกรม WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis, version 3.6.2; Hall et al., 2009)

##### 3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการ

1. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow class II) (NU-440, NUAIRE, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2. ตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> incubator) (CB210, Binder, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverted microscope) (OLYMPUS IX70, ประเทศญี่ปุ่น)

4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (K240R, Centurion Scientific, ประเทศสหราชอาณาจักร)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Precsia, ประเทศสมาพันธรัฐสวิส)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (VERSA MAX, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
7. เครื่อง PCR (T-gradient, Biometra<sup>®</sup>, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
8. เครื่อง Real-time PCR (iCycler, Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
9. เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer (GVC CINTRA 40, ประเทศแคนาดา)
10. จานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
12. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มม. (Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
13. ชุดกรองปลอดเชื้อสำหรับติดกับขวดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.22 ไมครอน (Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. ไมโครเพลทแบบ 96 หลุม (Sterilin, ประเทศสหราชอาณาจักร)

### 3.2 สารเคมี

1. Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2. Di-Sodium hydrogen phosphate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
3. D-Glucose (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
4. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม phenol red (Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6. Forward และ Reverse primers ((Integrated DNA Technologies, ประเทศสิงคโปร์)
7. illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, ประเทศสหราชอาณาจักร)
8. iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
9. Lipopolysaccharide (LPS) จาก *Escherichia coli* 0111: B4 (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
10. Penicillin/Steptomycin (Gibco-Invitogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. Potassium chloride, KCl (Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
12. Potassium dihydrogen orthophosphate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Analar, ประเทศสหราชอาณาจักร)

13. Sodium bicarbonate, NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. Sodium chloride (Carlo ERBA reagenti, ประเทศสาธารณรัฐฝรั่งเศส)
15. Thizoly Blue Tetrazolium Bromide, approx. (MTT) (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
16. Sodium bicarbonate, NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
17. Sodium chloride, NaCl (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
18. Tris-base (USB Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
19. 2x iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
20. 6x DNA Loading Dye (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

### 3.3 วิธีการ

ภาพรวมของงานวิจัยนี้ประกอบด้วยสองขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ เพื่อคัดเลือกยีนที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ ประกอบด้วยวิธีการดังนี้

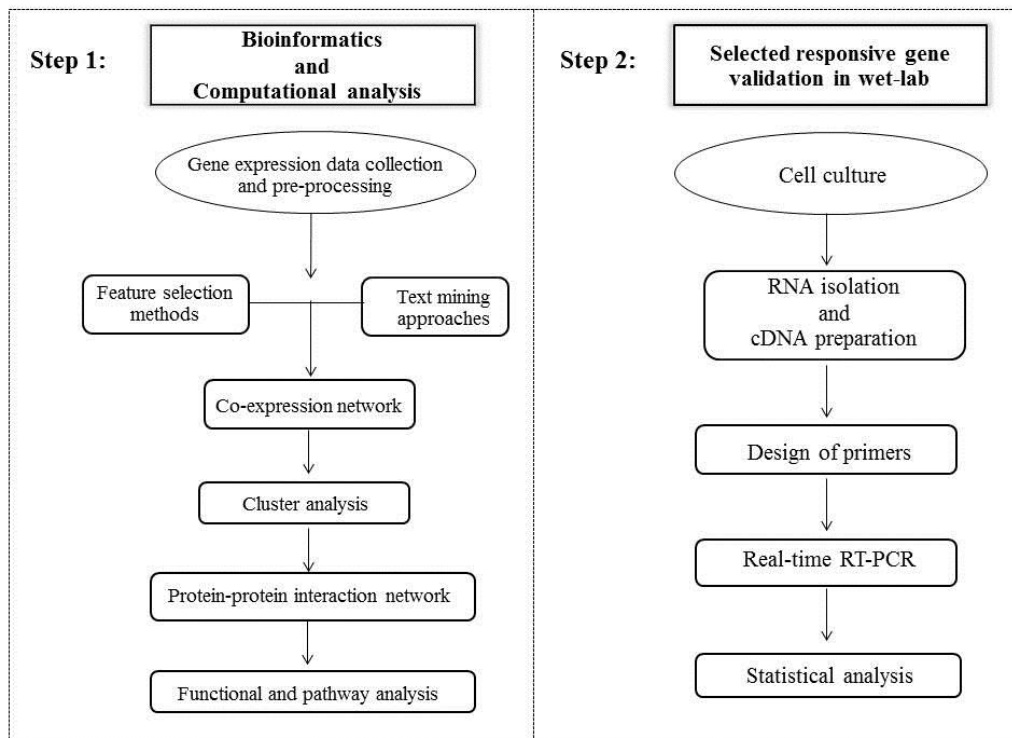
1. การรวบรวมข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8, และ 18 ชั่วโมง จากฐานข้อมูลสาธารณะ และทำการปรับมาตรฐานค่าการแสดงออกของยีนในแต่ละชุดข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบเดียวกันนั้น โดยใช้ค่ามาตรฐาน z score

2. การ คัดเลือกยีน โดยวิธี Feature selection ที่บรรจุในโปรแกรม ArrayMining ทั้งหมดสามวิธี คือ SAM, eBayes และ PLS-CV โดยจะคัดเลือกโพรบที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดใน 100 โพรบแรก และคัดเลือกเฉพาะ โพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี

3. นำกลุ่มยีนที่คัดเลือกโดยวิธี Feature selection มาวิเคราะห์ร่วมกับกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งได้จากการสืบค้น โดยใช้ฐานข้อมูลเอกสาร (Text mining) และนำมาสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network) โดยใช้ปลั๊กอิน Expression Correlation Network ที่ถูกบรรจุภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Cline et al., 2007) และทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยที่น่าสนใจ

4. นำกลุ่มยีนที่อยู่ในเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกมาวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน จากนั้นนำมาบูรณาการร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในฐานข้อมูล STRING และนำกลุ่มยีนในเครือข่ายย่อยไปวิเคราะห์และแปลผลทางชีวภาพโดยฐานข้อมูล KEGG pathway

ขั้นตอนที่ 2 การยืนยันผลการแสดงออกของยีนที่ถูกคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ โดยยีนที่ถูกคัดเลือกจะนำมาตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการแสดงออกของยีนในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิค Real time PCR (ดังแสดงในภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 ภาพรวมการทดลอง

### 3.3.1 การศึกษาเบื้องต้นในการคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อกลไกการอักเสบ

ในการค้นหาวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกยีนที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยเริ่มจากดาวน์โหลดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลาที่แตกต่างกันจากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO ทั้งหมดสามชุดข้อมูล ได้แก่ GSE2002, GSE4712 และ GSE21841 ทำการปรับมาตรฐานค่าการแสดงออกของยีนในแต่ละชุดข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบเดียวกัน โดยใช้ค่ามาตรฐาน  $z$  score จากนั้นทำการคัดเลือกโพรบด้วยกลุ่มเครื่องมือ Gene selection ที่อยู่ในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining โดยการเลือกใช้เครื่องมือคัดเลือกสามวิธี คือ SAM, eBayes และ PLS-CV โดยจะทำการคัดเลือกเฉพาะโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี ซึ่งโพรบที่ถูกคัดเลือกได้จะมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่าง

เด่นชัด ก่อนที่จะนำโพรบที่ถูกคัดเลือกไปแปลงเป็นยีนแล้วนำไปวิเคราะห์ร่วมกับกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูลเอกสาร PolySearch แล้วนำไปสร้างเครือข่ายการแสดงผลการรวมของยีนโดยใช้ปลั๊กอิน ExpressionCorrelationViewer ที่บรรจุอยู่ในโปรแกรม Cytoscape (Cline et al., 2007) จากนั้นทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยที่น่าสนใจและนำไปวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพโดยใช้ปลั๊กอิน GOlorize (Garcia et al., 2007) ที่บรรจุอยู่ในโปรแกรม Cytoscape (Cline et al., 2007) เช่นเดียวกัน

### 3.2.2 การรวบรวมและการเตรียมข้อมูลไมโครอาร์เรย์

ดาวน์โหลดชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO (Edgar et al., 2002, Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ซึ่งเป็นค่าการแสดงออกของยีนที่อยู่ในรูปแบบไฟล์ series expression matrix ทั้งหมดสามชุดข้อมูล ได้แก่ GSE4712, GSE21841 และ GSE2002 โดยชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้นำมาวิเคราะห์นั้น จะคัดเลือกมา 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา ในเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ของหนู ดังที่ได้แสดงรายละเอียดของชุดข้อมูลในตารางที่ 3-1 งานวิจัยนี้ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาทั้งสามชุดข้อมูลนั้นอยู่ภายใต้แพลตฟอร์มที่ต่างกัน จึงต้องมีการนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์ไปผ่านกระบวนการจัดเตรียมข้อมูล (Data preprocessing) และกระบวนการนอร์มอไลซ์เซชัน (normalization) เพื่อปรับมาตรฐานค่าของตัวเลขให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งเป็นการช่วยลดผลกระทบและความผิดพลาดต่อการวิเคราะห์อันเนื่องมาจากหน่วย การปรับมาตรฐานค่าการแสดงออกของยีนในแต่ละชุดข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบเดียวกันนั้น โดยการใช้ค่ามาตรฐาน z score ซึ่งค่าที่ถูกลนอร์มอไลซ์จะมีค่า mean เท่ากับ 0 และ SD เท่ากับ 1 โดยสามารถคำนวณค่า z score ได้จากสมการที่ 1 เพื่อนำข้อมูลการแสดงออกของยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

$$z \text{ score} = \frac{(x - \text{mean})}{SD} \quad (1)$$

โดยที่	x	คือ ค่าการแสดงออกของโพรบแต่ละตัวอย่างในชุดข้อมูล
	Mean	คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการแสดงออกของโพรบแต่ละโพรบ
	SD	คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการแสดงออกของโพรบแต่ละโพรบ

ตารางที่ 3-1 แสดงรายละเอียดของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์

GSE ID	Title	References	Platforms	Samples	Sources of LPS
GSE4712	Edema Toxin-treated Macrophage Study.	Comer <i>et al.</i> , 2006	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (GPL1261)	9 samples untreated=3 3hr. LPS=3 6hr. LPS=3	LPS (0.01ng/ml; Sigma Aldrich)
GSE21841	Expression data from LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages treated with Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents	Hammer <i>et al.</i> , 2010	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (GPL1261)	6 samples untreated=3 8hr. LPS=3	LPS (1ug/ml; Sigma Aldrich)
GSE2002	CstF-64 Influenced Gene Expression	Shell <i>et al.</i> , 2005	Affymetrix Mouse Expression 430A Array (GPL339)	6 samples Untreated = 3 18 hr_LPS = 3	LPS (100 ng/ml; Sigma Aldrich)

### 3.3.3 การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยวิธี Feature selection

นำข้อมูลการแสดงออกของยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ได้ผ่านการเตรียมและปรับมาตรฐานข้อมูลแล้ว มาทำการคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้นต่อ LPS ตามช่วงเวลา โดยวิธีการคัดเลือกทางสถิติที่บรรจุอยู่ในโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (Glaab *et al.*, 2009) โดยเริ่มจากการนำข้อมูลมาปรับรูปแบบให้อยู่ในรูปแบบที่โปรแกรมกำหนด (ดังในภาพที่ 3-2A) แล้วทำการอัปโหลดไฟล์ข้อมูลลงในโปรแกรม โดยรูปแบบไฟล์จะอยู่ในรูปแบบ tab-delimited matrix file หรือ zip file ก็ได้ จากนั้นทำการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรมโดยเลือกวิธีที่จะใช้ในการคัดเลือกยีน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ 3 วิธี ได้แก่ Significance analysis of microarrays (SAM) (Tusher, Tibshirani, & Chu, 2001), Empirical Bayes moderated t-test (eBayes) (Smyth, 2004) และ PLS-CV-Partial Least Squares Cross-Validation (PLS-CV) (Hall, 2000) และกำหนดขนาดของข้อมูลการคัดเลือกโดยในงานวิจัย

นี้จะกำหนดการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดใน 100 โพรบแรก แล้วทำการส่งข้อมูลให้โปรแกรมดำเนินการคัดเลือกข้อมูลด้วยอีเมล (ดังภาพที่ 3-2B) และทำการดาวน์โหลดผลการคัดเลือกยีนซึ่งจะอยู่ในรูปแบบ tab-delimited matrix file เมื่อได้ผลการคัดเลือกยีนทั้งหมดสามวิธีแล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบและเลือกเฉพาะโพรบที่ถูกคัดเลือกโดยสองวิธีจากทั้งหมดสามวิธี และนำโพรบที่คัดเลือกได้ไปแปลงให้อยู่ในรูปแบบที่เป็นชื่อยีน (Gene symbol) เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

**Figure 3-2: Data format and ArrayMining interface.**

**A: Data Format**

The diagram shows a grid representing normalized gene expression levels. The vertical axis is labeled "Genes" and the horizontal axis is labeled "Samples". The grid is divided into four sections: "gene identifiers" (rows), "sample type" (columns), "sample class labels" (rows), and "normalized gene expression levels" (the main grid area).

**B: ArrayMining Interface**

The interface is titled "Gene Selection Analysis (Supervised Feature Selection)". It includes the following sections:

- 1) Data Set:** Options to "UPLOAD your own data" (with "Get help" and "See example input" links) or "use an EXAMPLE data set". The "EXAMPLE data set" section includes radio buttons for "Group", "Age", "Sex", "Smoking", "Disease", and "Amongst".
- 2) Feature Selection Method:** Radio buttons for "t-Test", "SAM", "PLS-DA", "CFS", "RFACK", and "ENSEMBLE".
- 3) Parameters:** A text input field for "Maximum feature subset size" with a value of 200.
- 4) E-Mail Notification (optional):** A text input field for "Your e-mail address".

A "Submit" button is located at the bottom right of the interface.

ภาพที่ 3-2 รูปแบบข้อมูล (A) และการกำหนดการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining (B)

### 3.3.4 การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล Text mining

ทำการสืบค้นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory genes) จากฐานข้อมูล PolySearch (Cheng, 2008) โดยใช้การค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสาร (Text mining) เมื่อเข้าสู่โปรแกรมแล้วให้เลือกชนิดของการสืบค้น โดยที่จะเลือกโรค (Disease) แล้วเลือกการค้นหาที่เกี่ยวข้องกับยีนและโปรตีน (Genes/Proteins) ดังภาพที่ 3-3A จากนั้นทำการกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรกดังภาพที่ 3-3B ในการค้นหาจะใช้คำสำคัญในการค้นหาว่า “inflammation” จากนั้นนำผลการค้นหารายชื่อยีนที่สืบค้นได้ทั้งหมด 312 ยีน มาเปรียบเทียบกับรายชื่อยีนในข้อมูล



ไมโครอาร์เรย์ทั้งสามชุด พบว่ามีรายชื่อยีนที่เหมือนกันทั้งหมด 189 ยีน แล้วนำมาวิเคราะห์ร่วมกับยีนที่ถูกคัดเลือกโดย Feature selection จากโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining ที่มีจำนวน 174 ยีน โดยมียีนที่พบได้ทั้ง PolySearch และ ArrayMining เป็นจำนวน 11 ยีน ซึ่งจะนำข้อมูลการแสดงผลของยีนทั้ง 352 ยีน ไปใช้ในการสร้างเครือข่ายการแสดงผลออกจํวมของยีนต่อไป



A

The screenshot shows the search form of the PolySearch web interface. The title is 'Search PubMed for genes/proteins related to the disease or medical condition of interest (Help)'. The 'Please input disease keyword(s)' field contains the word 'inflammation'. Below this, there are 'Advance Options' including a radio button for 'Automated disease synonym list is' (set to 'Off'), a text input for 'Please enter custom filter words', and a list of checkboxes for databases to search (PubMed, OMIM, DrugBank, Swiss-Prot, HMDB, HPRD, GAD). There are also dropdown menus for 'Search PubMed database for the past XX days' (set to 'All available') and 'Abstract limit' (set to 'No Limit'). At the bottom, there are checkboxes for 'Please send the results to me by email' and 'Please keep the results on the PolySearch server'. 'Submit' and 'Clear' buttons are at the bottom right.

B

ภาพที่ 3-3 การกำหนดชนิดของการค้นหา (A) และการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรม PolySearch (B)

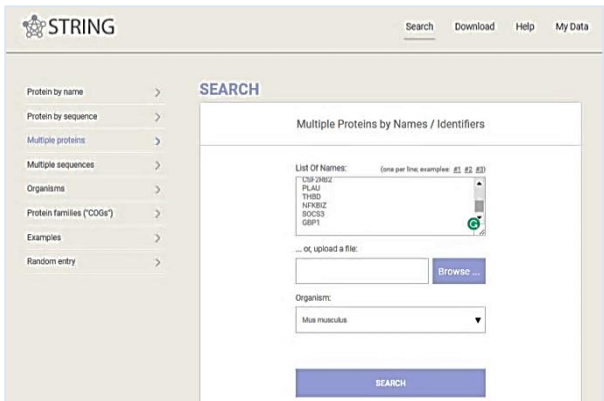
### 3.3.5 การสร้างเครือข่ายการแสดงผลออกจํวมของยีน (Co-expression network)

นำข้อมูลค่าการแสดงผลออกของยีนที่ถูกคัดเลือกจากการคัดเลือกโดยวิธี Feature selection ข้อมูลโดยโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล PolySearch จำนวนทั้งหมด 352 ยีน มาสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงผลออกจํวมของยีน โดยใช้ปลั๊กอิน Expression Correlation Network ที่ถูกบรรจุภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Cline et al., 2007) โดยกำหนดค่า cut-off ที่ระดับ  $\pm 0.95$  จากนั้นทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยที่น่าสนใจโดยใช้ยีนที่ถูกคัดเลือกได้จากฐานข้อมูล PolySearch เป็นหลัก และนำเครือข่ายย่อยที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

### 3.3.6 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network)

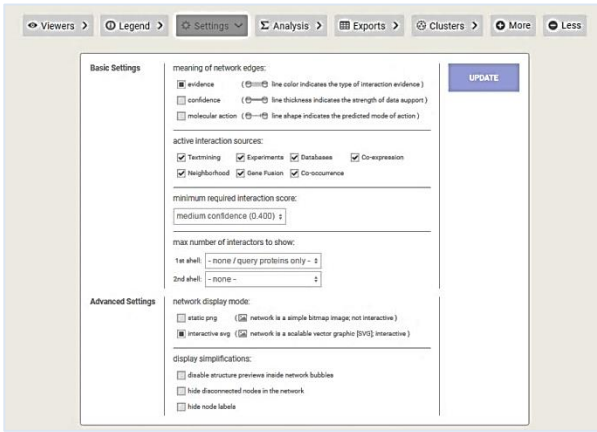
นำกลุ่มยีนในเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกมาทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน จากฐานข้อมูล String (<http://string-db.org/>; Szklarczyk et al., 2015) เมื่อเข้าสู่ฐานข้อมูลแล้วเลือกเมนูการค้นหาในรูปแบบ Multiple Protein จากนั้นใส่ชื่อยีนหรือโปรตีนที่ต้องการทำนายเครือข่าย

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในช่อง List of Names หรืออพโทลคไพล์รายชื่อยีนหรือโปรตีนที่ต้องการค้นหาเครือข่ายความสัมพันธ์ โดยกำหนดรูปแบบของข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบ text file และกำหนดชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการสืบค้นในช่อง Organism จากนั้นทำการค้นหาเพื่อทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ที่จะเกิดขึ้น โดยกำหนดการตั้งค่าพารามิเตอร์ (ดังภาพที่ 3-4) ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในระดับโปรตีนของยีนที่ต้องการทำนาย เพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกยีนที่น่าจะมีความสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ



1.ทำการค้นหาในรูปแบบ Multiple Protein จากนั้นใส่รายชื่อยีนที่ต้องการทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา

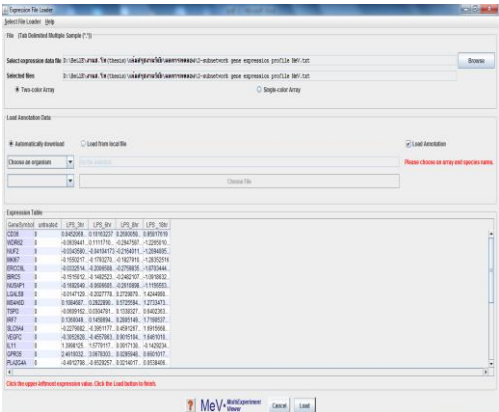
2.ทำการตั้งค่าพารามิเตอร์ตามที่ต้องการ กำหนดค่า interaction score ที่ระดับ 0.4



ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล STRING

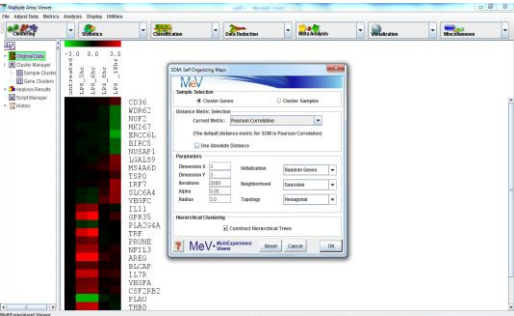
### 3.3.7 การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน (Gene expression profile)

นำข้อมูลการแสดงออกของยีนที่อยู่ในเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกมาทำการจัดรูปแบบไฟล์ให้อยู่ในรูปแบบ tab-delimited matrix file แล้วนำไปจัดกลุ่มรูปแบบการแสดงออกของยีนที่บรรจุอยู่ในฟังก์ชันการจัดกลุ่มข้อมูลของโปรแกรม MEV (Multi Experiment Viewer, Howe et al., 2011) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลและทำเหมืองข้อมูลของข้อมูลไมโครอาร์เรย์ มีอัลกอริทึมที่ใช้สำหรับการจัดกลุ่มข้อมูล การจำแนกข้อมูล และการวิเคราะห์ทางสถิติ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้การจัดกลุ่มการแสดงออกของยีนด้วยวิธี SOM (Self-organizing map; Nikkilä, 2002) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มข้อมูลที่มีรูปแบบข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน และเลือกการวัดความสัมพันธ์ของตัวแปรด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังภาพที่ 3-5 แล้ววิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มที่จัดกลุ่มได้



1. เปิดข้อมูลการแสดงออกของยีนในรูปแบบไฟล์ tab-delimited matrix ในโปรแกรม MEV แล้วเลือก Two-color array

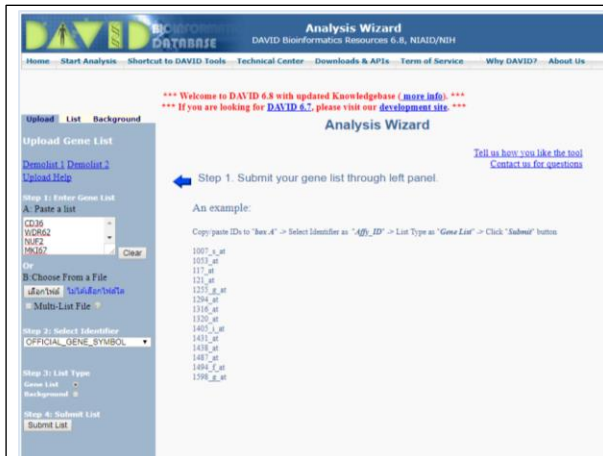
2. เลือกวิธีการที่จะใช้ในการจัดกลุ่ม (clustering) โดยในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีการแบ่งกลุ่มการแสดงออกของยีนด้วยวิธี SOM (self-organizing map) และตั้งค่าพารามิเตอร์ดังรูป



ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการจัดกลุ่มแบบแผนการแสดงออกของยีนและการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในโปรแกรม MEV

### 3.3.8 การวิเคราะห์และการแปลผลทางชีวภาพ

นำกลุ่มยีนที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์และแปลผลทางชีวภาพ โดยการหาหน้าที่และความสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพภายใต้ฐานข้อมูลสาธารณะ DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Huang et al., 2009) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบหรือค้นหาหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่ได้รวบรวมจากฐานข้อมูลต่าง ๆ โดยกำหนดการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังภาพที่ 3-6 เลือกรูปการแปลผลโดยใช้ยีนออนโทโลยี (Gene ontology) ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ กระบวนการทางชีวภาพ (Biological processes) องค์ประกอบของเซลล์ (Cellular components) และหน้าที่ระดับโมเลกุล (Molecular function) และแปลผลด้วยฐานข้อมูลพาธเวย์ KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) เพื่อช่วยในการตัดสินใจในการคัดเลือกยีนที่คาดว่าจะมีความสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ ร่วมกับการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่มีแนวโน้มการแสดงออกร่วมกัน เพื่อนำยีนที่ถูกคัดเลือกได้ไปตรวจสอบยืนยันผลในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป



1. เมื่อเข้าสู่โปรแกรม DAVID เลือก Start Analysis แล้วทำการตั้งค่าทั้งหมด 4 ขั้นตอน ดังนี้

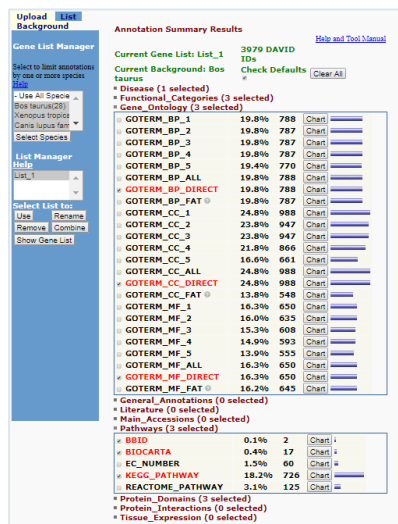
Step 1: ใส่ชื่อกลุ่มยีนที่ต้องการค้นหา

Step 2: ระบุรูปแบบ OFFICIAL\_GENE\_SYMBOL

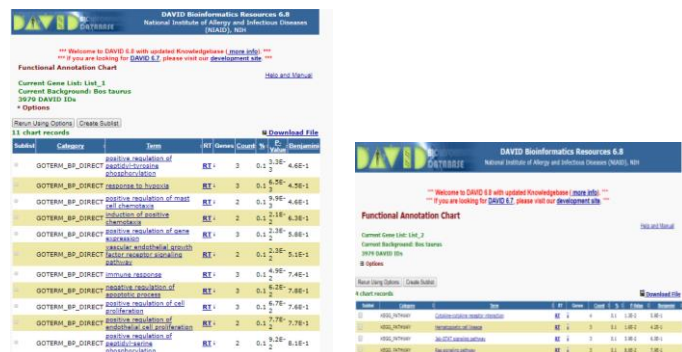
Step 3: เลือกประเภทของรายชื่อยีน (List Type) Gene List

Step 4: ทำการ Submit เพื่อให้โปรแกรม

2. เลือกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาและเครื่องมือที่จะใช้ในการอธิบายหน้าที่ทางชีวภาพ (Functional Annotation Tool)



3. เลือกการแปลผลโดยใช้ Gene Ontology ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ Biological processes, Cellular components และ Molecular function ร่วมกับการแปลผลด้วยฐานข้อมูลพาธเวย์ KEGG pathway



ภาพที่ 3-6 ขั้นตอนการค้นหาหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายในโปรแกรม DAVID โดยใช้การแปลผลของ Gene Ontology และฐานข้อมูล KEGG pathway

### 3.3.9 การตรวจสอบและยืนยันผลยืนยันที่ถูกคัดเลือกที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลาในระดับอาร์เอ็นเอ

จากการคัดเลือกยีนเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ร่วมกับการคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยวิธี Feature selection การสืบค้นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน และนำมาวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โดยจะทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถูกคัดเลือกมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ทำวิเคราะห์ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นด้วย LPS และมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดการตอบสนองที่เกิดขึ้นโดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอโดยใช้วิธี Real time PCR ของยีนที่ถูกคัดเลือกมาจำนวน 4 ยีน คือ *iNOS*, *EF-2*, *SOCS3* และ *IL-11* เพื่อเป็นการยืนยันผลภายใต้การวิเคราะห์การทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดของวิธีการ ดังนี้

#### 3.3.9.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีสารละลายยาเพนิซิลลิน (10,000 ยูนิต/มิลลิลิตร) สเตรปโตไมซิน (10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ Fetal bovine serum (FBS) (10%) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5 % อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์มีการเจริญเติบโตเกือบเต็มพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วทำการขูดเก็บเซลล์ ในการตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการซัปลเซลล์ ได้รับความกรุณาจากนางสาวสกุลรัตน์ มั่นคง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์และเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลองสำหรับงานวิจัยนี้

#### 3.3.9.2 การซัปลเซลล์ (Subculture)

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเซลล์ทิ้ง เดิมสารละลายบัฟเฟอร์ HBSS ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมที่เย็นจำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำงานเพาะเซลล์ออกจากตู้และนำไปเข้าตู้ปลอดเชื้อเพื่อขูดเซลล์ให้หลุดออกจากงานเพาะเซลล์ โดยขูดเซลล์เบา ๆ ใช้ปิเปตพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง แล้วใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ HBSS ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% FBS ลงในหลอดพลาสติกที่ได้ปั่นเหวี่ยงแล้วทำการ

กระจายเซลล์โดยใช้ปิเปตต์ขึ้นลงประมาณ 20 ครั้ง แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและกระจายเซลล์ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ตามอัตราส่วนที่ต้องการ

### 3.3.9.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 มาเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตรที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เสริมด้วย 10% FBS โดยมีความหนาแน่นเท่ากับ  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อจาน เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส งดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมดและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุมและเติมอาหารที่มี LPS ความเข้มข้น  $1 \mu\text{g/ml}$  แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3, 6, 8, 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์และสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป illustra RNeasy Spin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, ประเทศสหราชอาณาจักร) โดยทำตามคู่มือการสกัดจากบริษัทโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. งดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด เติม lysis buffer RA1 350  $\mu\text{l}$  และ  $\beta$ -mercaptoethanol 3.5  $\mu\text{l}$  ผสมสารละลายขึ้นเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ลงในหลอดขนาด 1.5 ml แล้ววางในโตรเจนเหลวเพื่อยับยั้งการทำงานของ RNase และ DNase โดยสามารถเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
2. นำสารละลายตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้มาละลาย และ vortex แรง ๆ แล้วนำสารละลายไปโหลกลงในคอลัมน์ที่มีวงแหวนสีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว  $11,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3. เติม 70% ethanol จำนวน 350  $\mu\text{l}$  โดยดูดขึ้นลงประมาณ 5 ครั้ง เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4. เตรียมคอลัมน์ที่มีวงแหวนสีฟ้าใส่ในหลอดขนาด 2 ml แล้วนำสารละลายในข้อ 3 มาโหลกลงในคอลัมน์จำนวน 750  $\mu\text{l}$  นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว  $8,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และนำคอลัมน์ที่มีวงแหวนสีฟ้าใส่ในหลอดขนาด 2 ml (หลอดใหม่)
5. เติม MDB (Membrane Desalting Buffer) 350  $\mu\text{l}$  ลงในคอลัมน์ที่มีวงแหวนสีฟ้าเพื่อล้างเกลือออก นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว  $10,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์ที่มีวงแหวนสีฟ้าใส่หลอดขนาด 2 ml (หลอดใหม่)
6. เติม DNase reaction mixture 95  $\mu\text{l}$  (reconstituted DNase I 10  $\mu\text{l}$  + DNase reaction buffer 90  $\mu\text{l}$ ) ลงบริเวณตรงกลางของคอลัมน์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
7. เติม buffer RA2 จำนวน 200  $\mu\text{l}$  นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว  $11,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

8. เติม buffer RA3 จำนวน 600  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

9. เติม buffer RA3 จำนวน 250  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml (หลอดใหม่)

10. เติม RNase-free H<sub>2</sub>O จำนวน 50  $\mu$ l (ครึ่งละ 25  $\mu$ l) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และเก็บสารละลาย RNA

หลังจากที่ทำการสกัดอาร์เอ็นเอเสร็จแล้วจะนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ โดยนำ RNA จำนวน 5  $\mu$ l เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผสม 0.1% (v/v) DEPC จำนวน 495  $\mu$ l และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer และคำนวณความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอโดยค่าควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 จะแสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ เพื่อที่จะนำไปสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

#### 3.3.9.4 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ 5X iScript™ Reverse Transcription Supermix จำนวน 4  $\mu$ l Total RNA ความเข้มข้น 2  $\mu$ g และเติมน้ำที่ปราศจาก Nuclease ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20  $\mu$ l ลงในหลอด PCR สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ดังนี้

Priming	25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
Reverse transcription	42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
RT inactivation	85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยใช้ agarose gel electrophoresis และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time RT-PCR ต่อไป

#### 3.3.9.5 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน

ค้นหาลำดับเบสของยีน *iNOS* (NM\_010927.3), *EF-2* (NM\_007907.2), *SOCS3* (NM\_007707.3) และ *IL-11* (NM\_008350.4) จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information online Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ โดยกำหนดขนาดของไพรเมอร์ให้มีความยาว 18–26 นิวคลีโอไทด์ ปริมาณ GC 40-60% ความยาวของ PCR product 150-200 bp จากนั้นนำลำดับเบสไพรเมอร์ที่ได้ไปออกแบบไปตรวจสอบความจำเพาะต่อยีน โดยใช้โปรแกรม Primer blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ในฐานข้อมูล NCBI



ตารางที่ 3-2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

Gene	Accession Number	Sequence	Melting Temp. (°C)	Product Length (bp)
iNOS	NM_010927.3	5' -GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC-3' (F) 5' -AGCCAGCGTACCGGATGAGC- 3' (R)	68.55 65.54	156
EF-2	NM_007907.2	5' -CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA- 3' (F) 5' -GGGTCAGATTTCTTGATGGGGATG- 3' (R)	65.83 65.49	155
SOCS3	NM 007707.3	5' -GCACAGCCTTTCAGTGCAGAGTA- 3' (F) 5' -GAGACAGCGGTCGTAAGAGCAG- 3' (R)	64.20 63.60	169
IL-11	NM 008350.4	5' -CACACTCACAAACCTCCCTCC- 3' (F) 5' -CAGGACCAGGCGACAAACAC- 3' (R)	65.90 64.70	164

### 3.3.9.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยเทคนิค real time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

นำ cDNA ที่สังเคราะห์เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาด้วย 2X iTag™ Universal SYBR® Green supermix และไพรเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละยีนตามปริมาณที่ใช้ดังตารางที่ 3-3 และเมื่อผสมกันเสร็จจะนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง real time PCR โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของยีน *iNOS*, *EF-2*, *SOCS3* และ *IL-11* ดังตารางที่ 3-4 จากนั้นทำการวิเคราะห์ Melting curve ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 องศาเซลเซียส ถึง 95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มทีละ 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที นำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณเพื่อหา Relative expression ratio (Livak & Schmittgen, 2001) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{sample}) - \Delta Ct (\text{calibrator})$$

$$\text{และ } \Delta Ct = Ct \text{ of target gene} - Ct \text{ of housekeeping gene}$$

จำนวน target gene expression ที่ได้ normalized ด้วย reference gene และเทียบกับ calibrator จะเท่ากับ  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\text{เมื่อ } Ct \text{ of target gene} = \text{ค่า Ct ของยีนเป้าหมาย}$$

$$Ct \text{ of housekeeping gene} = \text{ค่า Ct ของยีนอ้างอิง}$$

ตารางที่ 3-3 แสดงสารและปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

สาร	ปริมาตรที่ใช้ (μl)
iTaq™ Universal SYBR® Green supermix	10
Forward primer (10 μM)	0.5
Reward primer (10 μM)	0.5
distilled water	7
cDNA	2
Total reaction mix volume	20

ตารางที่ 3-4 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Step 1 Pre denature (1รอบ)	95.0	3
Step 1 Denature	95.0	0.10
Step 2 annealing/extension	63.0	0.20
Step 1 (1 รอบ)	95.0	0.10
Melting curve (อุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 0.5 องศาเซลเซียส)	65.0-95.0	0.05

### 3.3.9.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลจากผลการทดลองทุกอย่างในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบด้วย LPS จะทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ และจะแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบด้วย LPS แต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกันโดยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) โดยใช้โปรแกรมสถิติ Minitab

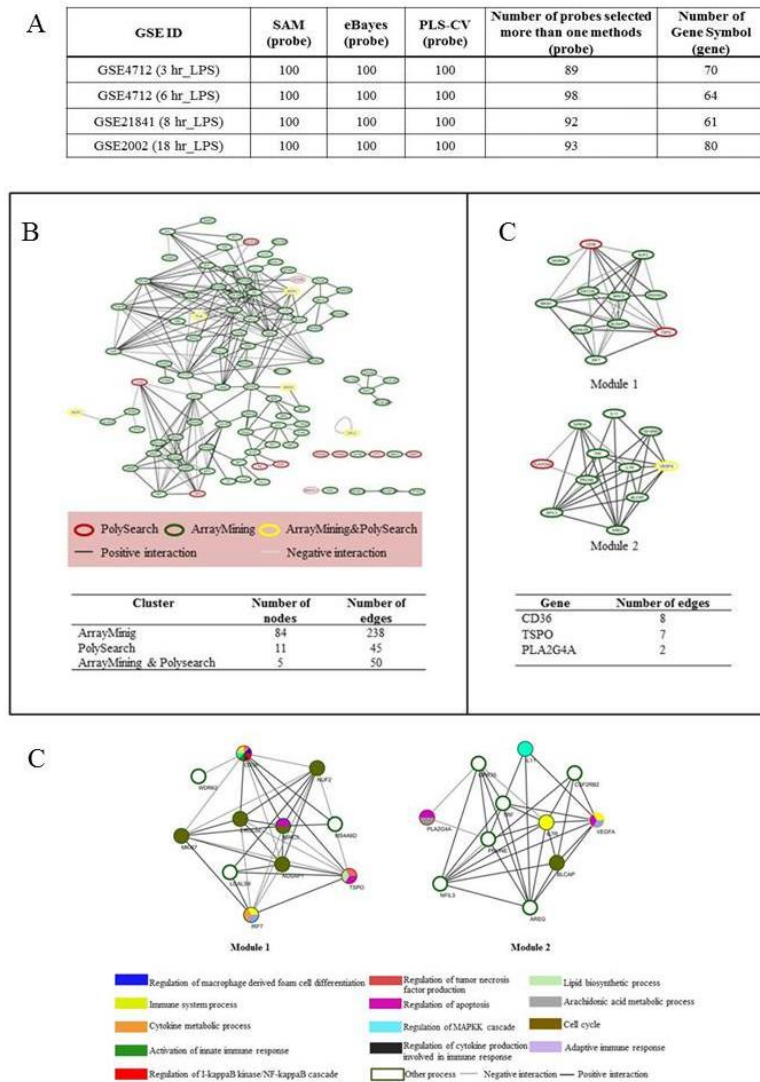
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาเบื้องต้น

ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อค้นหาวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อ LPS ตามช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง จากการศึกษาโดยนำยีนที่มีการศึกษาว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในฐานข้อมูล PolySearch ซึ่งยีนในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีระดับการแสดงออกที่ไม่เด่นชัด เข้ามาวิเคราะห์ร่วมกับการคัดเลือกยีนโดยวิธี Feature selection ที่ถูกบรรจุอยู่ในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining โดยใช้การคัดเลือกยีนทั้งหมดสามวิธี คือ SAM, eBayes และ PLS-CV โดยแต่ละวิธีจะมีวิธีการคำนวณและหลักการที่แตกต่างกัน และเลือกเฉพาะยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี เพื่อยืนยันว่ายีนที่คัดเลือกเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจริง ซึ่งกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกโดยวิธี Feature selection จะมีระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด และนำยีนที่ถูกคัดเลือกได้ทั้งสองวิธีมาสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนเพื่อวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของระหว่างยีน และทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยโดยพิจารณาจากยีนที่คัดเลือกมาจากรฐานข้อมูล PolySearch เป็นหลัก จากนั้นนำยีนจากเครือข่ายย่อยมาวิเคราะห์และแปลผลทางชีวภาพ จะพบว่าสามารถคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อ LPS ทั้งหมดสามยีน คือ ยีน *CD36*, *TSPO* และ *PLA2G4A* ซึ่งเป็นยีนที่มาจากฐานข้อมูล PolySearch โดยทั้งสามยีนมีปฏิสัมพันธ์กับยีนที่ถูกคัดเลือกโดยวิธี Feature selection ซึ่งจะเป็นยีนที่มีระดับการแสดงออกที่เด่นชัด ทั้งหมด 19 ปฏิสัมพันธ์ และเมื่อนำไปแปลผลทางชีวภาพทั้งสามยีนนี้มีความสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ (ดังภาพที่ 4-1)

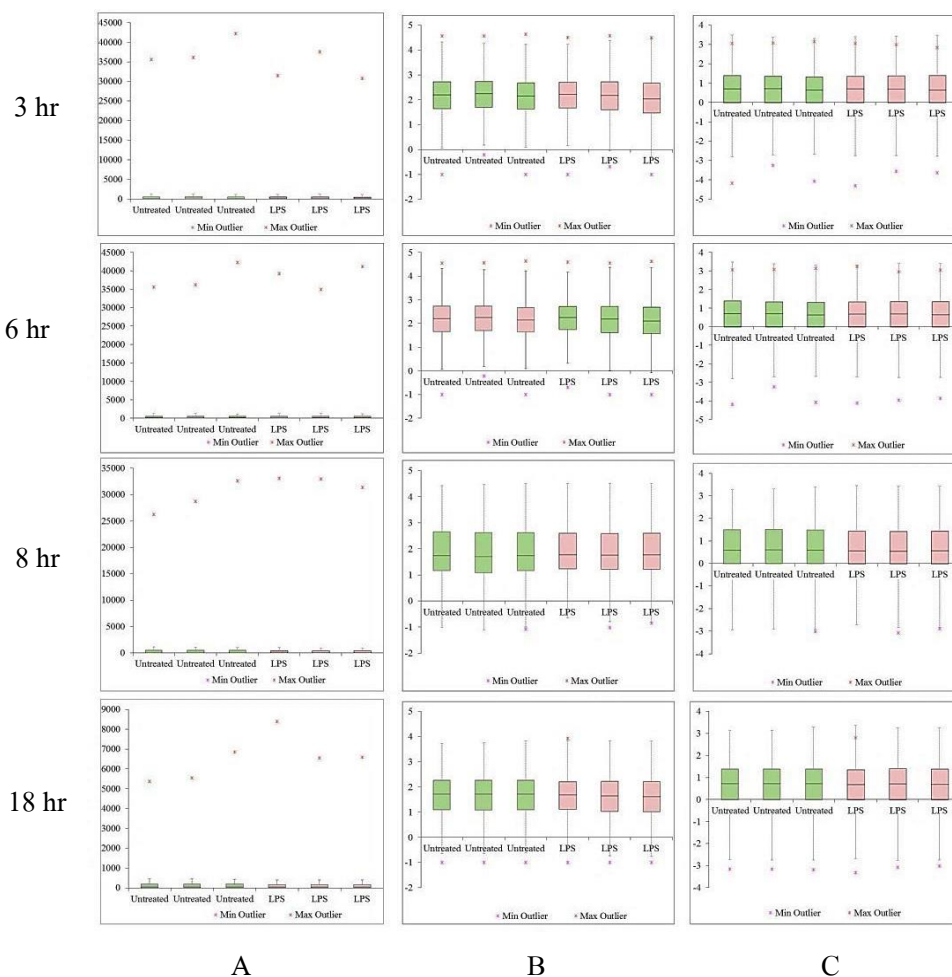
จากงานวิจัยที่ได้ศึกษาในเบื้องต้นจึงได้นำวิธีการคัดเลือกยีนวิธีต่างๆ มาประยุกต์และบูรณาการเข้ากับงานวิจัยนี้ เพื่อคัดเลือกยีนที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อการอักเสบโดยใช้วิธีการคัดเลือกยีน โดยวิธี Feature selection การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน และบูรณาการร่วมกับการวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจากฐานข้อมูล STRING เพื่อคัดเลือกยีนที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ให้มีความครอบคลุมและความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น เพื่อนำไปตรวจสอบยืนยันในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิค Real time PCR ต่อไป



ภาพที่ 4-1 การคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบที่มีระดับการแสดงออกต่ำในข้อมูลที่มีการกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมโครฟาจ RAW264.7 (A) ตารางผลของโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อย 2 วิธีจาก 3 วิธี ได้แก่ SAM, eBayes และ PLS-CV (B) เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนที่ถูกคัดเลือกจากโปรแกรม ArrayMining และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch โดยโหนดสีแดงแสดงถึงยีนที่มาจากฐานข้อมูล Polysearch โหนดสีเขียวแสดงถึงยีนที่คัดเลือกจากโปรแกรม ArrayMining โหนดสีเหลืองแสดงถึงยีนที่คัดเลือกจากโปรแกรม ArrayMining และฐานข้อมูล PolySearch และ(C) กระบวนการทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) ในยีนออนโทโลยี (Wohankla et al., 2016)

## 4.2 การเตรียมข้อมูลไมโครอาร์เรย์ (Data preprocessing and normalization)

การเตรียมข้อมูลและปรับมาตรฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ทั้งสามชุดข้อมูล เพื่อลดผลกระทบและความผิดพลาดต่อการวิเคราะห์ห้านเนื่องมาจากหน่วย เนื่องจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์มีข้อมูลการแสดงผลออกของยีนจำนวนมากและมาจากแหล่งข้อมูลที่แตกต่างกัน โดยการปรับมาตรฐานข้อมูลให้อยู่มาตรฐานเดียวกันด้วยค่ามาตรฐาน Z score ซึ่งค่าที่ถูกนอร์มอไลซ์จะมีค่า mean เท่ากับ 0 และ SD เท่ากับ 1 จะพบว่าข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการจัดเตรียมข้อมูลและกระบวนการนอร์มอไลซ์เซชันค่าตัวเลขของข้อมูลจะมีการกระจาย (ดังภาพที่ 4-2A) แต่เมื่อข้อมูลได้ผ่านกระบวนการนอร์มอไลซ์เซชันแล้วจะพบว่าค่าตัวเลขของข้อมูลจะอยู่ในมาตรฐานเดียวกัน (ดังภาพที่ 4-2B – 4-2C)



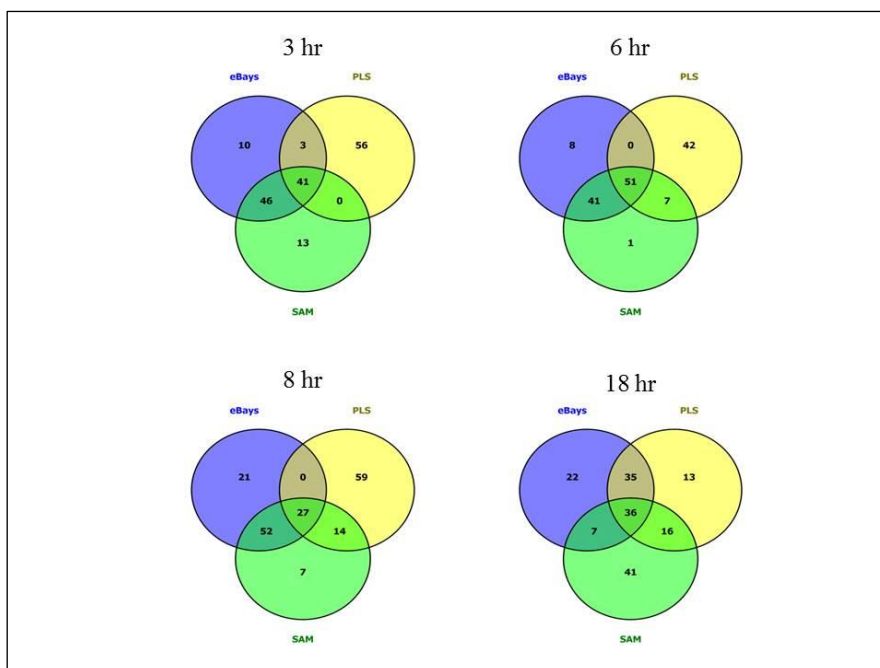
ภาพที่ 4-2 ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ทั้ง 3 ชุดข้อมูลก่อนและหลังผ่านกระบวนการปรับมาตรฐานข้อมูล  
Box plot raw data (A), log<sub>10</sub>-transformed data (B) และ normalized data (C)

#### 4.3 การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยวิธี Feature selection

การคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อมีการกระตุ้นต่อ LPS ที่เวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติที่แตกต่างกันสามวิธี คือ SAM, eBayes และ PLS-CV โดยทั้งสามวิธีนี้จะบรรจุอยู่ในโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining โดยจะคัดเลือกโพรบที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัด 100 โพรบแรก และเพื่อยืนยันผลการคัดเลือกโพรบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจึงทำการคัดเลือกเฉพาะโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี จะพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 ชั่วโมง จะมีจำนวนโพรบที่คัดเลือกทั้งหมด 90 โพรบ เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 6 ชั่วโมง จำนวน 99 โพรบ เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 8 ชั่วโมง จำนวน 93 โพรบ และเมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 18 ชั่วโมง จำนวน 94 โพรบ (ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-3) จากนั้นนำโพรบที่ถูกคัดเลือกในแต่ละช่วงเวลาที่มีการกระตุ้นด้วย LPS ไปค้นหาชื่อยีนในชุดข้อมูล ไมโครอาร์เรย์จะพบว่าเมื่อการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 ชั่วโมง จะมีจำนวน 70 ยีน เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 6 ชั่วโมง จำนวน 65 ยีน เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 8 ชั่วโมง จำนวน 61 ยีน และเมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 18 ชั่วโมง จำนวน 80 ยีน ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 จำนวนโพรบที่ถูกคัดเลือกโดยวิธี SAM, eBayes , PLS-CV และโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี

ชุดข้อมูล	SAM (โพรบ)	eBayes (โพรบ)	PLS-CV (โพรบ)	จำนวนโพรบที่ถูก คัดเลือกสองในสามวิธี (โพรบ)	จำนวนยีน (ยีน)
GSE4712 (3 hr_LPS)	100	100	100	90	70
GSE4712 (6 hr_LPS)	100	100	100	99	65
GSE21841 (8 hr_LPS)	100	100	100	93	61
GSE2002 (18 hr_LPS)	100	100	100	94	80



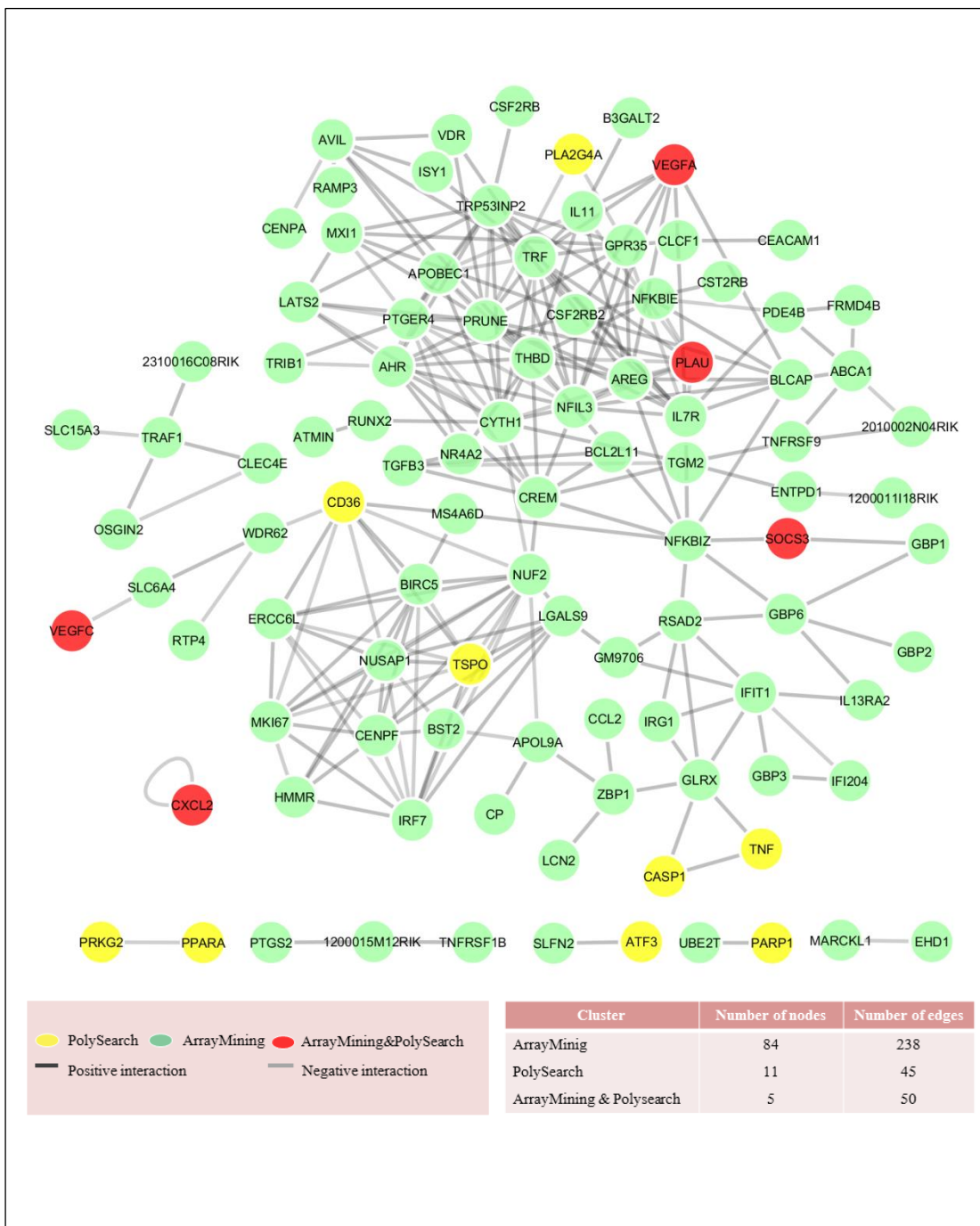
ภาพที่ 4-3 ไดอะแกรมแสดงจำนวน โพรบที่ถูกคัดเลือกโดยวิธี SAM, eBays , PLS-CV และโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี

#### 4.4 การวิเคราะห์เครือข่ายแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network)

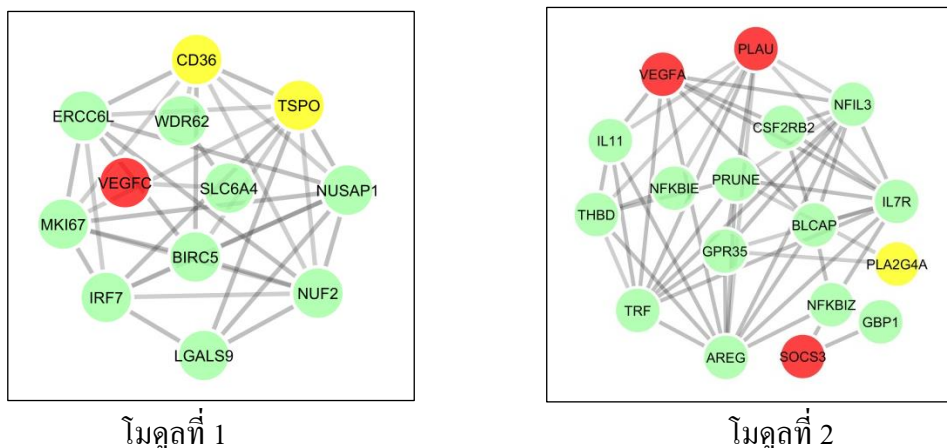
จากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ได้จากการสืบค้นในฐานข้อมูล PolySearch และยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีจากวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันที่บรรจุภายในโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining จำนวนทั้งหมด 312 ยีน จะถูกนำมาสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกร่วมของยีน โดยใช้ปลั๊กอิน Expression Correlation Network ที่บรรจุอยู่ในโปรแกรม Cytoscape โดยจะเลือกความสัมพันธ์ที่มีค่า r-value เท่ากับ 0.95 จะมียีนทั้งหมด 100 ยีน (โหนด) และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 333 ปฏิสัมพันธ์ ซึ่งจะเป็นยีนที่ถูกคัดเลือกด้วยวิธีการทำเหมืองข้อมูลในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining จำนวน 84 ยีน 238 ปฏิสัมพันธ์ ยีนที่ได้จากการสืบค้นฐานข้อมูล PolySearch จำนวน 11 ยีน 45 ปฏิสัมพันธ์ และยีนที่ถูกคัดเลือกจากการทำเหมืองข้อมูลในโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining และจากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch จำนวน 5 ยีน 50 ปฏิสัมพันธ์ (ดังแสดงในภาพที่ 4-4) โดยสีของโหนดจะบ่งบอกถึงแหล่งที่มาจากการคัดเลือกยีน โหนดสีเหลือง คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล PolySearch โหนดสีเขียว คือ ยีนที่มีการแสดงออกเด่นชัดที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีจากโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining และ โหนดสีแดง คือ ยีนที่คัดเลือกได้จากทั้งในฐานข้อมูล PolySearch และจากยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีจากโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining และสีของเส้นปฏิสัมพันธ์จะบ่งบอกถึงทิศทางของปฏิสัมพันธ์โดยเส้นปฏิสัมพันธ์สีดำ คือ ทิศทางของปฏิสัมพันธ์ที่ไปในทิศทางเดียวกัน และเส้นปฏิสัมพันธ์สีเทา คือ ทิศทางของปฏิสัมพันธ์ที่ไปในทิศทางตรงข้ามกัน

จากนั้นทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยจากเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกร่วมของยีน เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์และการแปลผล โดยคัดเลือกจากยีนที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch เป็นหลักว่ามีความสัมพันธ์กับยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีจากโปรแกรมออนไลน์ ArrayMining เนื่องจากเป็นกลุ่มยีนที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch ได้มีการศึกษาแล้วว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยจะคัดเลือกเครือข่ายย่อยได้ทั้งหมด 2 เครือข่าย ในเครือข่ายย่อยโมดูลที่ 1 จะมียีนจำนวน 12 ยีน (โหนด) และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 34 ปฏิสัมพันธ์ และเครือข่ายย่อยโมดูลที่ 2 จะมียีนจำนวน 17 ยีน (โหนด) และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 50 ปฏิสัมพันธ์ ดังแสดงในภาพที่ 4-5





ภาพที่ 4-4 เครื่องข่ายการแสดงผลการร่วมกันของยีนที่ได้จากการคัดเลือกรหัสจากโปรแกรม ArrayMining และยีนที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch



ภาพที่ 4-5 เครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่ถูกคัดเลือกจากเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน

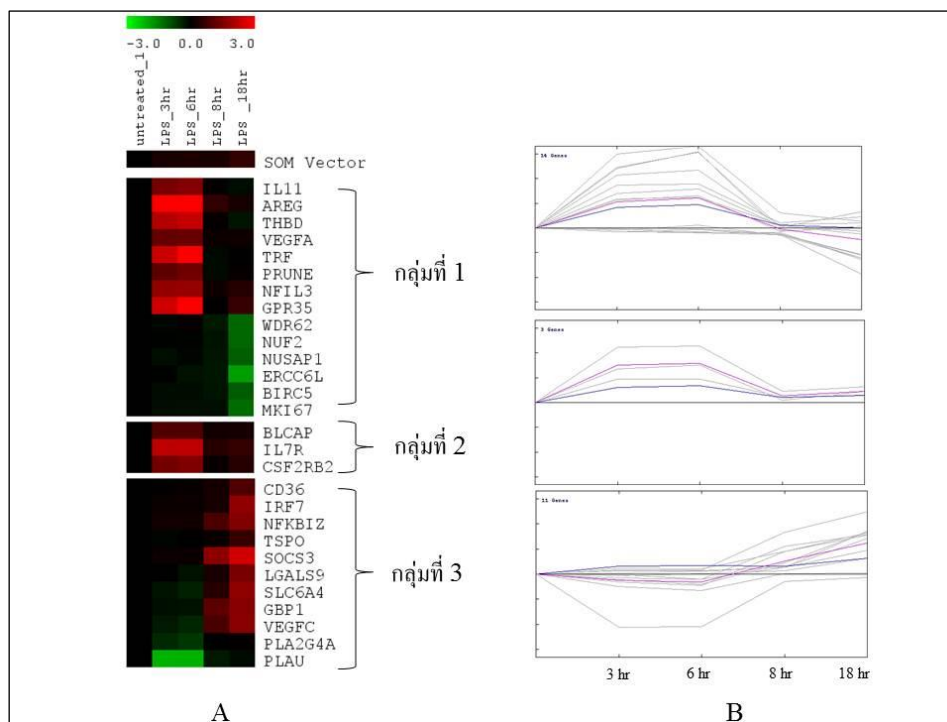
#### 4.5 การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่มีแบบแผนการแสดงออกร่วมกัน (Gene expression profile)

จากผลการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนและการคัดเลือกเครือข่ายย่อยจากนั้นนำมาจัดกลุ่มยีนที่มีตามแบบแผนการแสดงออกโดยวิธี Self-organizing map (SOM) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยการแบ่งกลุ่มข้อมูล และอาศัยความเหมือนหรือความใกล้ชิดกันของข้อมูลโดยการวัดระยะห่างระหว่างเวกเตอร์ของข้อมูล โดยวิธี SOM มีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์ข้อมูลขนาดใหญ่ เพราะช่วยให้การมองภาพ (Visualization) และการตีความหรือแปลผลได้ง่าย จะพบว่าสามารถจัดกลุ่มยีนตามแบบแผนการแสดงออกแบ่งออกได้จำนวนสามกลุ่ม (ดังแสดงในภาพที่ 4-6 และตารางที่ 4-2) คือ

กลุ่มที่ 1 จะมีแบบแผนของการแสดงออกที่มีระดับการแสดงออกสูงเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกที่ลดลง เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 8 และ 18 ชั่วโมง ประกอบด้วยยีนจำนวน 14 ยีน คือ *IL11*, *AREG*, *THBD*, *VEGFA*, *TRF*, *PRUNE*, *NFIL3*, *GPR35*, *WDR62*, *NUF2*, *NUSAP1*, *ERCC6L*, *BIRC5*, *MKI67*

กลุ่มที่ 2 จะมีแบบแผนของการแสดงออกที่มีระดับการแสดงออกสูง เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกลดลง เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 8 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีก เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 18 ชั่วโมง ประกอบด้วยยีนจำนวน 3 ยีน คือ *BLCAP*, *IL7R*, *CSF2RB2*

กลุ่มที่ 3 จะมีแบบแผนของการแสดงออกที่มีระดับการแสดงออกที่สูง เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 8 และ 18 ชั่วโมง ประกอบด้วยยีนจำนวน 11 ยีน คือ *CD36*, *IRF7*, *NFKBIZ*, *TSPO*, *SOCS3*, *LGALS9*, *SLC6A4*, *GBP1*, *VEGFC*, *PLA2G4A*, *PLAU*



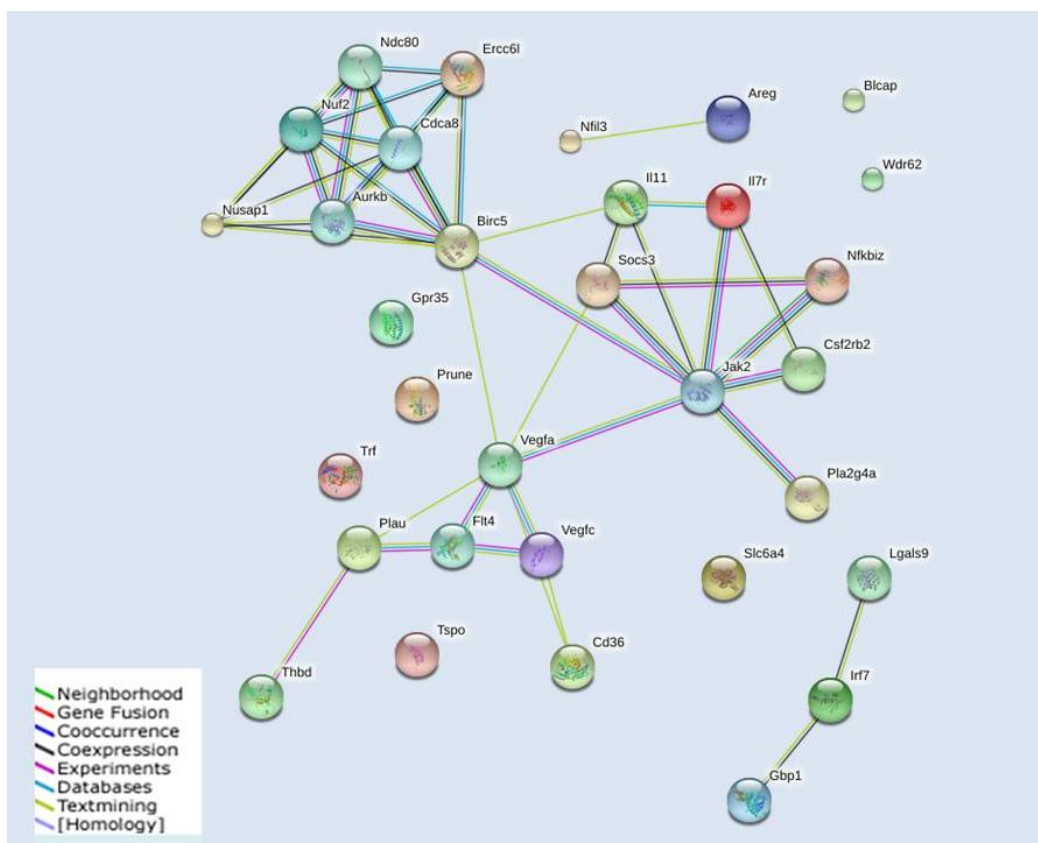
ภาพที่ 4-6 Heat map แบบแผนการแสดงออกของยีนทั้งสามกลุ่ม (A) และกราฟแสดงแนวโน้มแบบแผนการแสดงออกของยีน (B) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง จากการจัดกลุ่มตามแบบแผนการแสดงออกของยีนโดยวิธี SOM

ตารางที่ 4-2 การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกร่วมกันเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง โดยวิธี SOM (self-organizing map)

กลุ่มที่	จำนวนยีน (ยีน)	ยีน
1	14	<i>IL11, AREG, THBD, VEGFA, TRF, PRUNE, NFIL3, GPR35, WDR62, NUF2, NUSAP1, ERCC6L, BIRC5, MKI67</i>
2	3	<i>BLCAP, IL7R, CSF2RB2</i>
3	11	<i>CD36, IRF7, NFKBIZ, TSPO, SOCS3, LGALS9, SLC6A4, GBP1, VEGFC, PLA2G4A, PLAU</i>

#### 4.6 การวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network)

จากการคัดเลือกเครือข่ายย่อยการแสดงออกพร้อมของยีน โดยคัดเลือกเครือข่ายย่อยได้ทั้งหมด 2 เครือข่าย ซึ่งมียีนจำนวนทั้งหมด 29 ยีน จะถูกนำไปค้นหาเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (<http://string-db.org/>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โดยฐานข้อมูล STRING จะรวบรวมข้อมูลจากแหล่งต่างๆไว้ประกอบด้วยข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (Experiment) ข้อมูลจากฐานข้อมูล (Database) ข้อมูลจากการแสดงออกพร้อม (Co-expression) ข้อมูลจากการค้นหาคำรู้จากข้อความ (Text mining) เป็นต้น จะพบว่ามีจำนวนปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งหมด 33 โปรตีน (โหนด) และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 58 ปฏิสัมพันธ์ ดังแสดงในภาพที่ 4-7



ภาพที่ 4-7 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายในฐานข้อมูล STRING

#### 4.7 การวิเคราะห์และการแปลผลทางชีวภาพ

จากการคัดเลือกเครือข่ายย่อยการแสดงออกร่วมของยีน โดยคัดเลือกเครือข่ายย่อยได้ทั้งหมดสองเครือข่าย ซึ่งมียีนจำนวนทั้งหมด 29 ยีน จะถูกนำมาค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนในกระบวนการทางชีวภาพจากฐานข้อมูลสาธารณะ DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Huang et al., 2009) แปลผลโดยใช้ยีนออนโทโลยี (Gene ontology) และฐานข้อมูล KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ซึ่งจะคัดเลือกเฉพาะกระบวนการที่มีค่า p-value < 0.05 โดยการแปลผลของยีนออนโทโลยีจะประกอบด้วยสามกลุ่ม คือ

1) กระบวนการทางชีวภาพ (Biological processes) จะพบว่ากลุ่มยีนจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาทั้งหมด 19 กระบวนการ โดยยีนส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ ดังตารางที่ 4-3

2) หน้าที่ระดับโมเลกุล (Molecular functions) จะพบว่ากลุ่มยีนจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับของไซโตไคน์และการกระตุ้น Growth factor ดังตารางที่ 4-4

3) องค์ประกอบของเซลล์ (Cellular components) จะพบว่ายีนส่วนใหญ่จะมีการทำงานบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกและโครโมโซม ดังตารางที่ 4-5

และในการค้นหาหน้าที่ของกลุ่มยีนโดยใช้การแปลผลในฐานข้อมูล KEGG pathway ทั้งหมด 3 วิธี คือ วิธี Cytokine-cytokine receptor interaction วิธีการส่งสัญญาณ Jak-STAT signaling pathway และวิธี Hematopoietic cell lineage โดยยีนส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณ Jak-STAT signaling pathway และปฏิสัมพันธ์ระหว่างไซโตไคน์ (Cytokine-cytokine receptor interaction ดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-3 การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้  
ยีนออนโทโลยี (Gene ontology) ในกลุ่มกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process)

GO term ID	Go term description	P-value	Genes
GO:0000279	M phase	1.4E-3	<i>MKI67, BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0045597	Positive regulation of cell differentiation	3.5E-3	<i>CD36, IL7R, SOCS3, VEGFC</i>
GO:0007049	Cell cycle	3.8E-3	<i>MKI67, BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, BLCAP, NUF2</i>
GO:0007067	Mitosis	4.4E-3	<i>BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0000280	Nuclear division	4.4E-3	<i>BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	4.7E-3	<i>BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0048285	Organelle fission	4.9E-3	<i>BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0007059	Chromosome segregation	5.6E-3	<i>BIRC5, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0001666	Response to hypoxia	5.6E-3	<i>PLAU, TRF, VEGFA</i>
GO:0070482	Response to oxygen levels	5.8E-3	<i>PLAU, TRF, VEGFA</i>
GO:0051094	Positive regulation of developmental process	6.1E-3	<i>CD36, IL7R, SOCS3, VEGFC</i>
GO:0008283	Cell proliferation	9.1E-3	<i>AREG, MKI67, IL7R, VEGFA</i>
GO:0051301	Cell division	1.3E-2	<i>BIRC5, ERCC6L, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0000226	Microtubule cytoskeleton organization	1.6E-2	<i>BIRC5, NUSAP1, NUF2</i>
GO:0001763	Morphogenesis of a branching structure	2.0E-2	<i>AREG, SOCS3, VEGFA</i>
GO:0048010	Vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	2.4E-2	<i>VEGFA, VEGFC</i>
GO:0060749	Mammary gland alveolus	2.6E-2	<i>AREG, VEGFA</i>
GO:0000910	Cytokinesis	4.7E-2	<i>BIRC5, NUSP1</i>
GO:0006955	Immune response	4.9E-2	<i>IRF7, IL7R, GBP1, VEGFA</i>

ตารางที่ 4-4 การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้  
ยีนออนโทโลยี (Gene ontology) ในกลุ่มหน้าที่ระดับโมเลกุล (Molecular functions)

GO term ID	Go term description	P-value	Genes
GO:0008083	Growth factor activity	1.2E-3	<i>AREG, IL11, VEGFA, VEGFC</i>
GO:0004896	Cytokine receptor activity	3.0E-3	<i>CSF2RB2, IL7R</i>
GO:0019955	Cytokine binding	7.6E-3	<i>CSF2RB2, IL7R</i>

ตารางที่ 4-5 การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้ ยีนออนโทโลยี (Gene ontology) ในกลุ่มองค์ประกอบของเซลล์ (Cellular component)

GO term ID	Go term description	P-value	Genes
GO:0000775	Chromosome centromeric region	1.2E-3	<i>NUF2, BIRC5, MKI67, ERCC6L</i>
GO:0005615	Extracellular space	2.5E-3	<i>IL11, AREG, THBD, TRF, VEGFA, VEGFC</i>
GO:0044421	Extracellular region part	1.4E-2	<i>AREG, IL11, THBD, TRF, VEGFA, VEGFC</i>
GO:0000793	Condensed chromosome	1.8E-2	<i>MKI67, ERCC6L, NUF2</i>
GO:0044427	Chromosomal part	2.2E-2	<i>MKI67, BIRC5, NUF2, ERCC6L</i>
GO:0005876	Spindle microtubule	3.2E-2	<i>BIRC5, NUSAP1</i>
GO:0005576	Extracellular region	3.4E-2	<i>AREG, IL11, LGALS9, PLAU, THBD, TRF, VEGFA, VEGFC</i>
GO:0005694	Chromosome	3.5E-2	<i>MKI67, BIRC5, NUF2, ERCC6L</i>

ตารางที่ 4-6 การวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของยีนในเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่ายที่แปลผลโดยใช้ ฐานข้อมูลพาธเวย์ Kyoto Encyclopedia of Genomes pathway enrichment analysis (KEGG)

Term	P-value	Genes
mmu04060 Cytokine-cytokine receptor interaction	4.0E-4	<i>CSF2RB2, IL11, VEGFA, VEGFC</i>
mmu04630 Jak-STAT signaling pathway	6.7E-4	<i>CSF2RB2, IL11, IL7R, SOCS3</i>
mmu04640 Hematopoietic cell lineage	2.2E-2	<i>CD36, IL11, IL7R</i>

#### 4.8 การคัดเลือกยีนเพื่อนำไปตรวจสอบยืนยันผลในห้องปฏิบัติการ

จากการวิเคราะห์หาหน้าที่และความสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพของยีนในทั้งสองเครือข่ายย่อยจากฐานข้อมูล KEGG pathway จะพบว่ายีนส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณ Jak-STAT signaling pathway (ดังตารางที่ 4-6) ซึ่งเป็นวิถีที่ส่งสัญญาณจากสารเคมีที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular chemical signals) เข้าไปยังภายในนิวเคลียสทำให้เกิดการถอดรหัสและเกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation) และการตายของเซลล์ (Apoptosis) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิถีการส่งสัญญาณ Jak-STAT signaling pathway นั้นมีความสำคัญ โดยยีนที่ได้จากการคัดเลือกที่เกี่ยวข้องกับวิถีนี้ประกอบด้วย 4 ยีน คือ *CSF2RB2, IL11, IL7R* และ *SOCS3* (ดังตารางที่ 4-6) ยีน *SOCS3* และ *IL11* เป็นยีนที่มีความน่าสนใจที่นำไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในห้องปฏิบัติการต่อไป เนื่องจากยีน *SOCS3* เป็นยีนที่ถูก

คัดเลือกได้จากทั้งวิธีการคัดเลือกยีนโดยวิธี Feature selection และการสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch และมีแบบแผนการแสดงออกสูงในช่วงเวลา 8 และ 18 ชั่วโมง (ช่วงท้าย) (ดังภาพที่ 4-6) ส่วนยีน *IL11* เป็นยีนที่ถูกคัดเลือกได้จากวิธีการคัดเลือกยีนโดยวิธี Feature selection และมีแบบแผนการแสดงออกสูงในช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และลดการแสดงออกลงตลอดในช่วงเวลา 8 และ 18 ชั่วโมง (ช่วงต้น) (ดังภาพที่ 4-6) และจากผลการทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนนั้นจะพบว่ายีน *IL-11* และ *SOCS3* นั้นมีความสัมพันธ์กันในระดับโปรตีนและทั้งสองยีนนี้มีความสัมพันธ์กับ JAK2 (ดังภาพที่ 4-7) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในวิถี JAK-STAT pathway โดย JAK2 จะมีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กรดอะมิโนไทโรซีนเพื่อให้เกิดการส่งสัญญาณไปควบคุมการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ และมีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *iNOS* ร่วมด้วยเพื่อยืนยันการอักเสบว่ามีการเกิดขึ้นจริง เนื่องจากยีน *iNOS* เป็นยีนที่ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายว่ามีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ แต่ในการตรวจวัดระดับการแสดงออกเบื้องต้นของยีน *IL-11* ไม่สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกได้ด้วยวิธี real time PCR เนื่องจากยีน *IL-11* มีระดับการแสดงออกที่ต่ำเช่นเดียวกับที่แสดงในข้อมูลไมโครอาร์เรย์

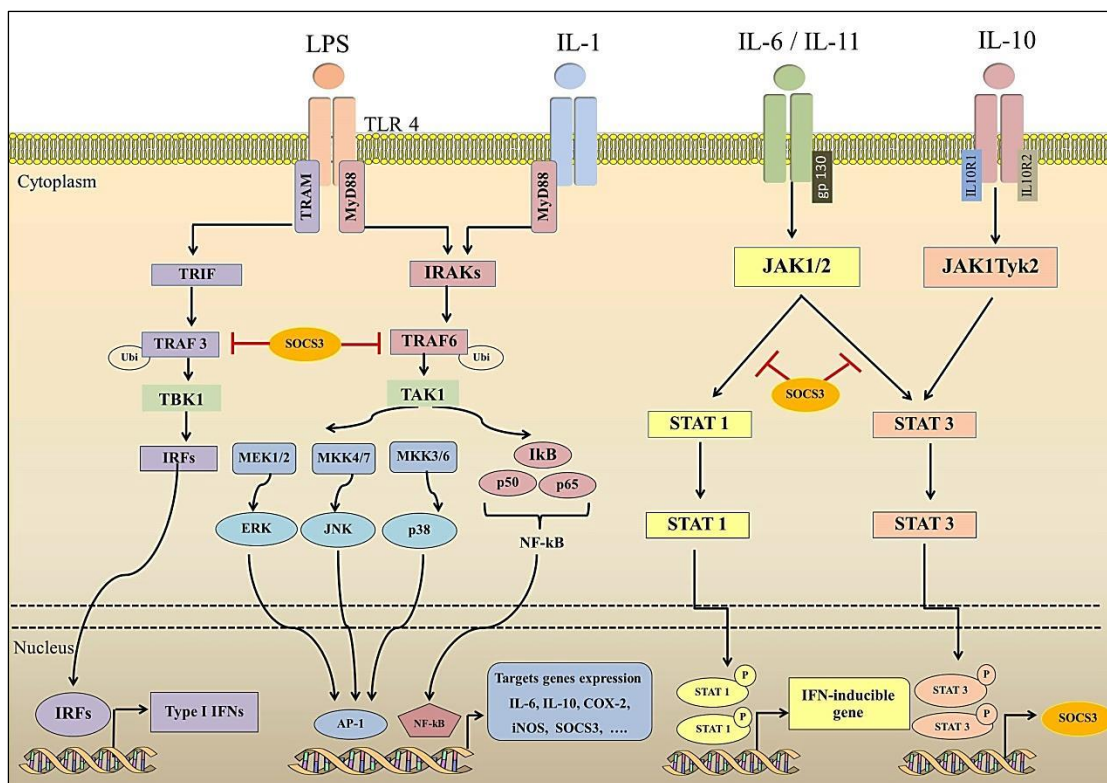
และนอกจากนี้ยังมีการค้นคว้าหาข้อมูลหน้าที่สำคัญของกลไกการตอบสนองของยีน *SOCS3* จากบทความงานวิจัยต่าง ๆ จะพบว่ายีน *SOCS3* จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย *LPS*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-11* และ *IL-10* เป็นต้น (Inagaki, Kondo, Ito, & Yoshimura, 2013) โดยสามารถอธิบายและสรุปกลไกควบคุมการตอบสนองของยีน *SOCS3* และยีน *IL-11* ในเซลล์แมคโครฟาจ ดังนี้ (ภาพที่ 4-8)

1. *SOCS3* จะไปยับยั้งในขั้นตอนการกระตุ้น TAK1 โดย TRAF6 และ การกระตุ้น TBK1 โดย TRAF3 ในกระบวนการ ubiquitination ของ TRAF6 และ TRAF3 เนื่องจาก *SOCS3* สามารถจับกับ Elongin B และ C ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ cullin-RING E3 ubiquitin ligases โดยที่ TAK1 มีความสำคัญที่จะไปกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B และ MAPK pathway และ TBK1 จะไปกระตุ้นการทำงานของ transcription factor IRFs (Lehmann et al., 2003; Frobøse et al., 2006; Kayagaki et al., 2007; Ajibade, Wang, & Wang, 2013)

2. *SOCS3* จะทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของ Janus kinase (JAK) activation โดย *SOCS3* จะไปจับกับบริเวณ JAK-proximal sites บน cytokine receptor เนื่องจาก *SOCS3* มีตัวรับสัญญาณ (receptor) ชนิดเดียวกันกับ *IL-6* และ *IL-11* คือ gp130 receptor จึงสามารถเข้าจับได้ แต่ไม่สามารถจับกับ *IL-10* ได้ และยับยั้งการทำงานของ JAK ผ่านทาง KIR domain ซึ่งจะถูกย่อยสลายผ่านทางกระบวนการ ubiquitination และถูกนำไปสลายที่ proteasome ผ่านทาง SOCS box domain



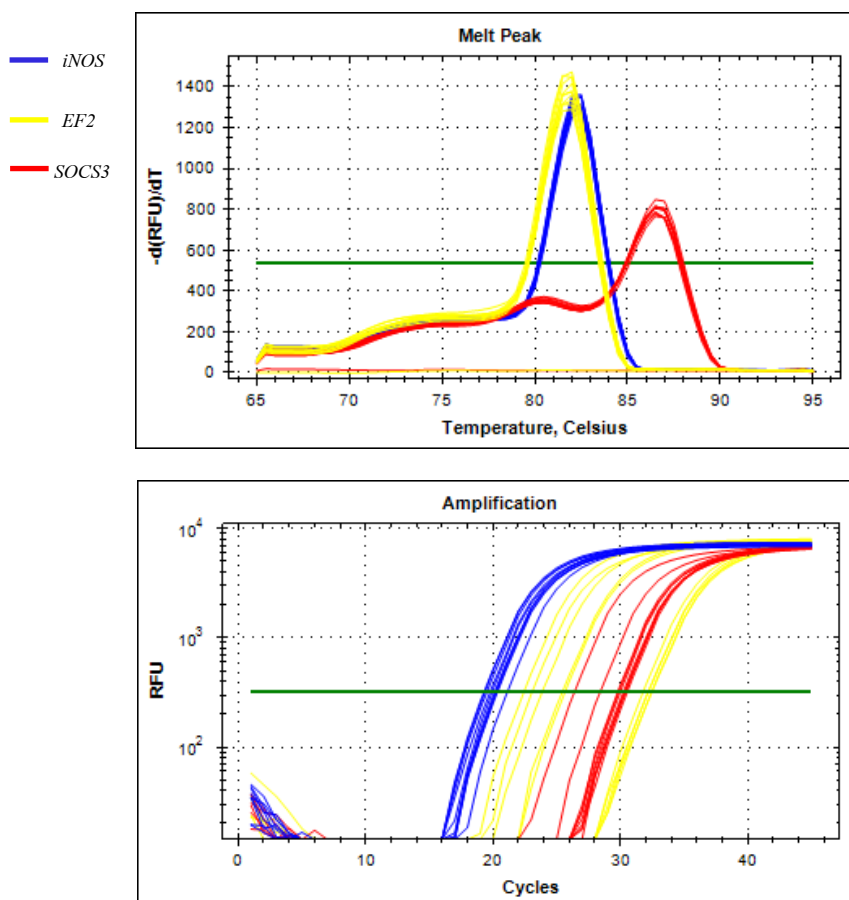
(Yasukawa et al., 2003; Niemand et al., 2003; Wormald et al., 2006; Yoshimura, Naka, & Kubo, 2013)



ภาพที่ 4-8 กลไกการตอบสนองต่อการอักเสบของยีน *SOCS3* และยีน *IL-11* ในเซลล์แมคโครฟาจ (ดัดแปลงภาพจาก Yoshimura, Naka, & Kubo, 2007; Wilson, 2014; McCormick & Heller, 2015; Achek, Yesudhas, & Choi, 2016)

#### 4.9 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยใช้เทคนิค Real time PCR

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน *iNOS*, *EF2* และ *SOCS3* โดยใช้เทคนิค Real time PCR ในการหาค่า Cycle threshold (Ct) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยค่า Ct คือ จำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ที่สามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (ดังแสดงในภาพที่ 4-9) และทำการวิเคราะห์ Melting curve analysis เพื่อแยก PCR product ที่แตกต่างกันออกจากกันได้ เนื่องจาก PCR product ต่างชนิดกันจะมีค่า Melting temperature (Tm) ที่แตกต่างกัน โดยค่า Tm ของยีน *iNOS* เท่ากับ 82 องศาเซลเซียส ค่า Tm ของยีน *EF2* เท่ากับ 82.5 องศาเซลเซียส และ Tm ของยีน *SOCS3* เท่ากับ 86.5 องศาเซลเซียส (ดังแสดงในภาพที่ 4-9)

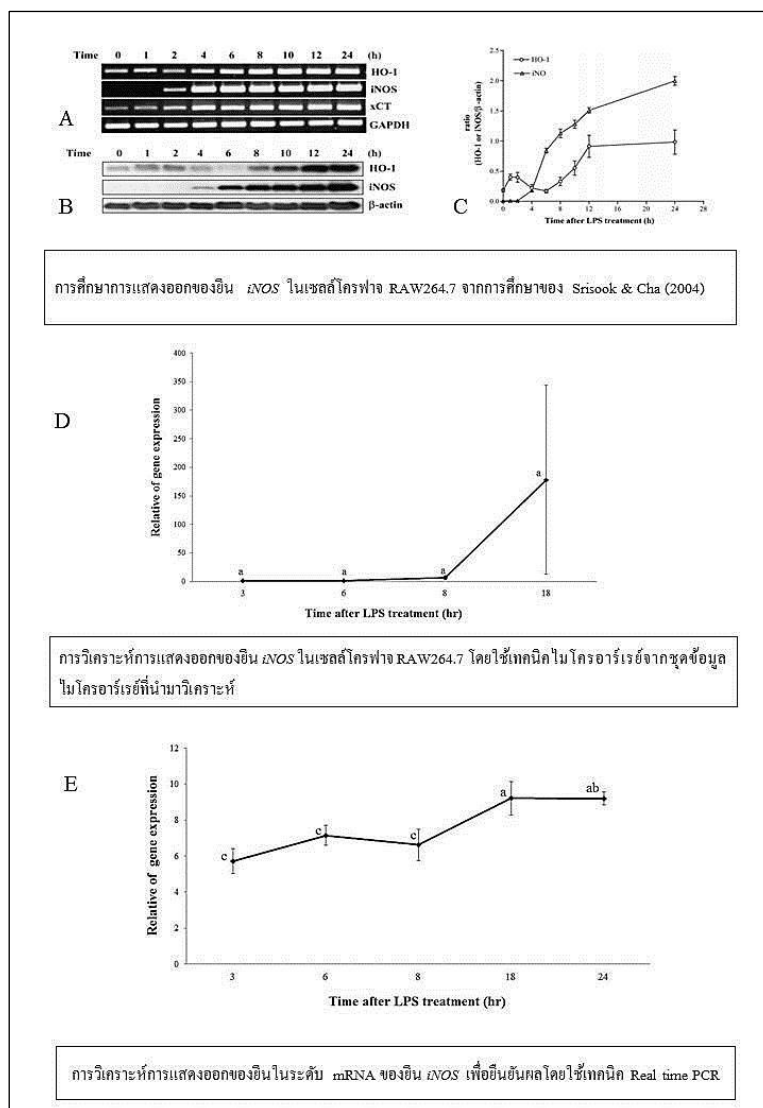


ภาพที่ 4-9 การวิเคราะห์ Melting curve analysis ของยีน *iNOS*, *EF2* และ *SOCS3* จากการวัด Fluorescence จาก PCR product เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 0.5 องศาเซลเซียสจาก 65 องศาเซลเซียสจนถึง 95 องศาเซลเซียส (A) และเมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น  $dF/dT$  ซึ่งจะแสดงอุณหภูมิที่เป็น Melting temperature ของแต่ละยีน (B)

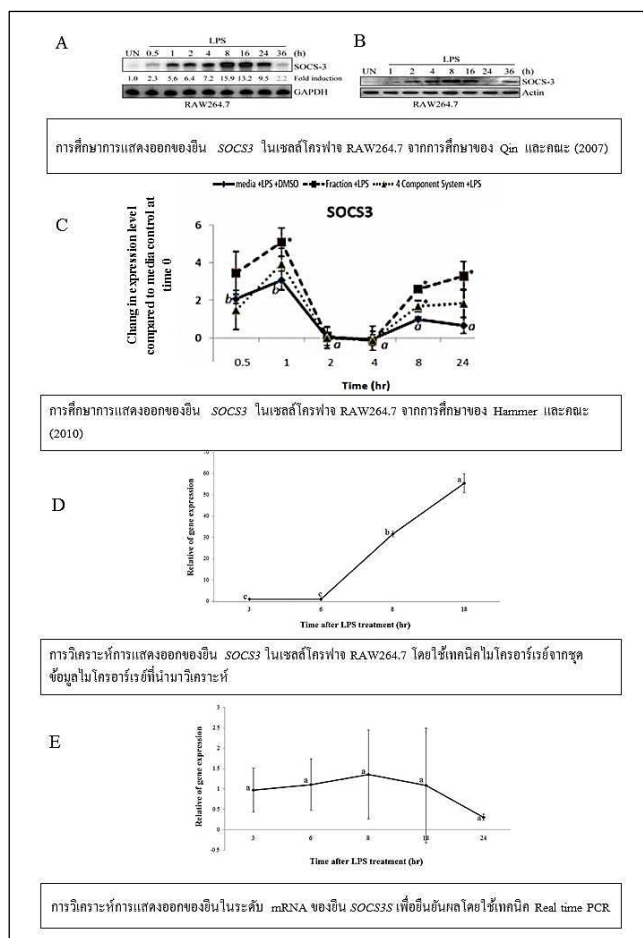
จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 3, 6, 8, 18 และ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ยีน *EF-2* เป็นยีนอ้างอิงหรือ housekeeping gene จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง และยังคงมีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-10E) โดยการแสดงออกของยีน *iNOS* จะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 ชั่วโมง (ช่วงต้น) จนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ช่วงท้าย) ตามลำดับ ซึ่งมีแบบแผนการแสดงออกที่คล้ายกันกับงานวิจัยของ Srisook และ Cha ในปี 2004 ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *HO-1*

ในระดับ mRNA และ โปรตีน เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยจะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* ในระดับ mRNA เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 2 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง และยังคงมีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-10A และ 4-10C) และการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* ในระดับโปรตีนสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 4 ชั่วโมง และมีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-10B) แต่แบบแผนการแสดงออกของยีน *iNOS* จะแตกต่างจากแบบแผนการแสดงออกในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 18 ชั่วโมง (ช่วงท้าย) (ภาพที่ 4-10D)

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน *SOCS3* โดยใช้เทคนิค Real time PCR จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกได้ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกสูงสุดที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง มีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 18 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีระดับการแสดงออกที่ต่ำสุด (ภาพที่ 4-10E) โดยจะมีแบบแผนการแสดงออกที่คล้ายกับงานวิจัยของ Hammer et al. ในปี 2010 ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ 0.5 ชั่วโมงจนถึงที่ 1 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมง จะมีระดับการแสดงออกลดลงที่ช่วงเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง และระดับการแสดงออกจะสูงขึ้นอีกที่เวลา 8 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกที่ลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11C) และงานวิจัยของ Qin et al. ในปี 2007 ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SOCS3* ในระดับ mRNA และ โปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* ในระดับ mRNA เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 0.5 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง มีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกลดลงที่ช่วงเวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11A) และการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* ในระดับโปรตีน จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 1 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง และระดับการแสดงออกลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11B) แต่ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* ในข้อมูลไมโครอาร์เรย์ จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงจนถึง 18 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11D)



ภาพที่ 4-10 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน *iNOS* โดยใช้เทคนิค RT-PCR (A) และการตรวจวัดในระดับโปรตีนในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 (B) จากการศึกษา ของ Srisook and Cha (2004) การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *iNOS* ในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 โดยใช้เทคนิคไมโครอาร์เรย์จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่นำมาวิเคราะห์ (D) และการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *iNOS* โดยใช้เทคนิค real time PCR (E) ในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS และมีการเหนี่ยวนำด้วย LPS ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  ที่เวลา 3, 6, 8, 18 และ 24 ชั่วโมง (E) ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อยสามครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนกราฟในช่วงเวลาที่กระตุ้นด้วย LPS ที่แตกต่างกัน) โดยที่  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS



ภาพที่ 4-11 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน *SOCS3* โดยใช้เทคนิค RT-PCR (A) และการตรวจวัดในระดับโปรตีนในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 (B) จากการศึกษาของ Qin et al. (2007) และการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน *SOCS3* ในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 โดยใช้เทคนิค real time PCR (D) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย (Hammer et al., 2010) การตรวจวัดปริมาณ mRNA ของยีน *SOCS3* ในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 โดยใช้เทคนิคไมโครอาร์เรย์จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่นำมาวิเคราะห์ (D) และการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *SOCS3* โดยใช้เทคนิค Real time PCR (E) ในเซลล์โครฟาจ RAW264.7 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS และมีการเหนี่ยวนำด้วย LPS ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  ที่เวลา 3, 6, 8, 18 และ 24 ชั่วโมง (E) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อยสามครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนกราฟในช่วงเวลาที่กระตุ้นด้วย LPS ที่แตกต่างกัน) โดยที่  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย LPS

## บทที่ 5

### อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง ในเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ เพื่อค้นหาวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ จากการศึกษาเบื้องต้นในการค้นหายีนที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อการอักเสบในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 (ภาพที่ 4-1) (Wohankla et al., 2016) โดยสามารถเลือกวิธีการที่เหมาะสมมาบูรณาการเข้าด้วยกันเพื่อใช้ในการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ ที่ประกอบไปด้วยการคัดเลือกยีนด้วยวิธี Feature selection การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch การสร้างเครือข่ายการแสดงผลออกพร้อมของยีน การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงผลออกของยีน และการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk et al., 2015)

จากการคัดเลือกยีนด้วยวิธี Feature selection ในโปรแกรม ArrayMining ทั้งสามวิธี คือ SAM, eBayes และ PLS-CV โดยจะคัดเลือกโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี เพื่อยืนยันว่าโพรบที่ถูกคัดเลือกเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจริง เนื่องจากทั้งสามวิธีนั้นมีกระบวนการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยที่ SAM เป็นวิธีการทางสถิติที่ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการค้นหายีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ได้จากการตรวจวัดระดับ การแสดงออกของยีนจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยใช้สถิติอนพารามेटริก (Nonparametric statistics) ในการวิเคราะห์ เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่มีจำนวนตัวอย่างน้อย แต่มียีนอยู่เป็นจำนวนมาก (Tusher, Tibshirani, & Chu, 2001) eBayes เป็นวิธีการที่ใช้ t-test เป็นค่าสถิติในการทดสอบ โดยวิธี eBayes จะทำการปรับค่าความแปรปรวนระหว่างโพรบกับตัวอย่างไปสู่ค่าปกติ เพื่อเพิ่มค่า degree of freedom สำหรับความแปรปรวนของแต่ละตัวอย่าง (Smyth, 2004) และ PLS-CV เป็นการคัดเลือกยีนโดยอาศัยสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการทดสอบข้อมูล (Training) โดย Partial Least Squares classifier ซึ่งจำนวนของตัวอย่างที่ถูกสุ่มขึ้นมาทดสอบจะขึ้นอยู่กับ cross-validation accuracies โดยอาศัยจำนวนการสุ่มตัวอย่าง 20 ครั้ง ในการคัดเลือกตัวอย่างจำนวน 2 ใน 3 เพื่อนำมาสร้างโมเดลสำหรับการทดสอบพีเจอร์ที่คัดเลือกได้ (Hall, 2000) ตัวอย่างของการคัดเลือกยีนโดยวิธี Feature selection ทั้งสามวิธีในโปรแกรม ArrayMining ได้แสดงไว้ในงานวิจัยของวันเฉลิม

จินอู และพิทักษ์ สุตรอนันต์ ในปี 2557 ที่ได้มีการใช้เครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (<http://www.arraymining.net>) (Glaab et al., 2009) มาคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในการตอบสนองต่อ LPS ของเซลล์แมคโครฟาจ พบว่าสามารถนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์และโปรแกรมออนไลน์บนเครือข่ายสาธารณะมาช่วยในงานวิจัยทางชีววิทยาเชิงระบบ เพื่อทำความเข้าใจกลไกการตอบสนองการอักเสบและประยุกต์ใช้กับกลไกอื่นที่เกี่ยวข้องได้

จากกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี วิธี Feature selection ในโปรแกรมทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining ที่มีกระบวนการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันด้วยกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี ร่วมกับการสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch (Cheng et al., 2008) จำนวนทั้งหมด 312 ยีน จะถูกนำมาสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกร่วมของยีน โดยใช้ปลั๊กอิน Expression Correlation Network ที่ถูกบรรจุภายใต้โปรแกรม Cytoscape (Cline et al., 2007) จะมียีนทั้งหมด 100 ยีน (โหนด) และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 333 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-4) จากนั้นทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยจากเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกร่วมของยีน เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์และการแปลผลโดยคัดเลือกจากยีนที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch เป็นหลักว่ามีความสัมพันธ์กับยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีจากการคัดเลือกยีนโดยวิธี Feature selection เนื่องจากเป็นกลุ่มยีนที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch ซึ่งได้มีการตรวจสอบจากการวิเคราะห์เนื้อหาในบทความวิจัยแล้วว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยสามารถคัดเลือกเครือข่ายย่อยได้ทั้งหมดสองเครือข่าย และนำกลุ่มยีนที่อยู่ในเครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกไปจัดกลุ่มแบบแผนการแสดงออกตามช่วงเวลา โดยวิธี SOM (Self-organizing map) จะพบว่าสามารถจัดกลุ่มยีนตามแบบแผนการแสดงออกได้เป็นจำนวนสามกลุ่ม และนำยีนจากสองเครือข่ายย่อยไปทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในฐานข้อมูล STRING (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2015) โดยพบว่ามีจำนวนโปรตีนเป้าหมายทั้งหมด 33 โปรตีน (โหนด) และจำนวนปฏิสัมพันธ์ทั้งหมด 58 ปฏิสัมพันธ์ โดยการใช้เครือข่ายในการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนแสดงไว้ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Chen et al. (2008) ที่ได้ศึกษากลไกการตอบสนองต่อ LPS ที่มีต่อการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำผ่านวิถีการส่งสัญญาณ NF-kappaB (NF-kB) ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้วิธีการทำเหมืองข้อมูล (Data mining) และการสร้างเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene regulatory network) สามารถช่วยทำให้พวกเขาเข้าใจกลไกการตอบสนองของความไวต่อการรับเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น และการศึกษาของ Nair et al. ในปี 2014 ที่ได้ใช้วิธีการค้นหาความรู้จากฐานข้อมูลเอกสารจากฐานข้อมูล PolySearch และฐานข้อมูล CADgene ร่วมกับการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน มาค้นหายีนที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการ

อักเสบในโรคหลอดเลือดหัวใจ พบว่ามียีนทั้งหมด 124 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโรคหลอดเลือดหัวใจ พบว่ามี 5 ยีน ที่เป็นศูนย์กลางที่สำคัญของเครือข่าย จากการแปลผลทางชีวภาพเพื่อค้นหาหน้าที่และความสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพของยีนในทั้งสองเครือข่ายย่อยจากฐานข้อมูลพาธเวย์ KEGG (ตารางที่ 4-6) พบว่ายีนส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณ Jak-STAT ซึ่งเป็นวิถีที่ส่งสัญญาณจากสารเคมีที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular chemical signals) เข้าไปยังภายในนิวเคลียสทำให้เกิดการถอดรหัสและเกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation) และการตายของเซลล์ (Apoptosis) ในการกระตุ้น cytokine receptors ส่วนใหญ่จะผ่านวิถี Jak-STAT pathway โดย JAKs เป็น tyrosine kinases ที่จับอยู่กับ cytokine receptors และ STAT เป็น transcription factor ซึ่งการจับของไซโตไคน์กับ cytokine receptor จะส่งผลให้เกิด dimerization ของ cytokine receptors และเกิดการกระตุ้น JAKs ให้มีการเติมฟอสเฟตให้กับตัว JAKs และ receptor ทำให้ STATs สามารถมาจับกับ receptor และถูกเติมฟอสเฟตโดย JAKs ทำให้ STAT ที่ถูกเติมฟอสเฟตเกิด dimerization กลายเป็น STAT ที่อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (active form) ของ transcription factor ที่ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อไซโตไคน์นั้น ๆ (Jatiani et al., 2010) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิถีการส่งสัญญาณ Jak-STAT นั้นมีความสำคัญ โดยยีนที่ได้จากการคัดเลือกที่เกี่ยวข้องกับวิถีนี้ประกอบด้วย 4 ยีน คือ *CSF2RB2*, *IL11*, *IL7R* และ *SOCS3*

ยีน *SOCS3* และ *IL11* เป็นยีนที่มีความน่าสนใจที่จะนำไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในห้องปฏิบัติการต่อไป เนื่องจากยีน *SOCS3* เป็นยีนที่ถูกคัดเลือกได้จากทั้งวิธีการคัดเลือกพีเจอร์และการสืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch และมีแบบแผนการแสดงออกสูงในช่วงเวลา 8 และ 18 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 4-6) ส่วนยีน *IL11* เป็นยีนที่ถูกคัดเลือกได้จากวิธีการคัดเลือกพีเจอร์ และมีแบบแผนการแสดงออกสูงในช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และลดการแสดงออกลงที่ช่วงเวลา 8 และ 18 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 4-6) และจากผลการทำนายเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนนั้นจะพบว่ายีน *SOCS3* และ *IL-11* นั้นมีความสัมพันธ์กันในระดับโปรตีนและทั้งสองยีนนี้มีความสัมพันธ์กับ JAK2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในวิถี JAK-STAT pathway โดย JAK2 จะมีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กรดอะมิโนไทโรซีน เพื่อให้เกิดการส่งสัญญาณไปควบคุมการทำงานของเซลล์ต่างๆ และมีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *iNOS* ร่วมด้วยเพื่อยืนยันการอักเสบที่มีการเกิดขึ้นจริง เนื่องจากยีน *iNOS* เป็นยีนที่ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายว่ามีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบ

นอกจากนี้ยังมีการค้นคว้าหาข้อมูลหน้าที่ความสำคัญของกลไกการตอบสนองของยีน *SOCS3* จากบทความงานวิจัยต่าง ๆ สามารถอธิบายกลไกควบคุมการตอบสนองของยีน *SOCS3*



และยีน *IL-11* ในเซลล์แมคโครฟาจ ดังแสดงในภาพที่ 4-8 โปรตีน SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) เป็นโปรตีนที่สร้างจากยีน *SOCS3* อยู่ในกลุ่ม STAT-induced STAT inhibitor (SSI) หรือที่รู้จักกันในชื่อโปรตีน suppressor of cytokine signaling (SOCS) ทำหน้าที่ควบคุมเชิงลบในการส่งสัญญาณของกลุ่มไซโตไคน์ (cytokine-inducible negative regulators of cytokine signaling) (Akihiko et al., 2005) โครงสร้างของโปรตีน SOCS3 ประกอบด้วย 3 โดเมน คือ SH2 domain และ SOCS box domain ที่ด้านปลาย C-terminal และ KIR domain ที่ด้านปลาย N-terminal โดย SOCS3 จะสามารถเกิดกระบวนการเติมฟอสเฟสให้กับไทโรซีนผ่านทาง SH2 domain และ Elongin BC ผ่านทาง SOCS box domain ซึ่งที่บริเวณ SOCS box domain จะมีปฏิสัมพันธ์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ubiquitination ได้แก่ Elongin B, Elongin C, Cullin-5 (Cul5), Ring-box 2 (Rbx2) และ E2 ubiquitin transferase ยีน *SOCS3* จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย *LPS*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-11*, interferon (IFN)-gamma และ *IL-10* เป็นต้น (Inagaki, Kondo, Ito, & Yoshimura, 2013)

เมื่อมีการกระตุ้นด้วย *LPS* ในเซลล์แมคโครฟาจ จะมีกลไกการตอบสนองและการส่งสัญญาณ ไปยังวิถีต่างๆผ่านทาง Toll like receptor 4 (TLR4) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ขึ้น 2 แบบ คือ **แบบที่ 1** วิถีการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัย MyD88 (MyD88 dependent pathway) ที่เกาะอยู่กับ TLR4 โดยที่ MyD88 จะจับอยู่กับ IRAK4, IRAK1 และ IRAK2 ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้น IRAK4, IRAK1 และ TRAF6 จะเกิดกระบวนการ auto phosphorylation ของ MyD88/IRAK4/ IRAK1 complex จากนั้น IRAK1 และ TRAF6 จะแยกออกจาก receptor complex ไปจับกับ E2 ubiquitin-conjugating enzyme complex กระบวนการ ubiquitination ของ TRAF6 จะไปกระตุ้นการทำงานของ TAK1 และนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ในกลุ่ม NF- $\kappa$ B (ประกอบด้วย I $\kappa$ B, p60 และ p50) และ AP-1 ผ่านวิถีการส่งสัญญาณของ MAPK kinase (ประกอบด้วย ERK, JNK และ p38) ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เช่น ยีน *IL-6*, *IL-11*, *IL-10* และ *SOCS3* เป็นต้น จะเห็นได้ว่า TRAF6 และ TAK1 มีความสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B และ MAPK pathway โดย *SOCS3* จะไปลดความสัมพันธ์ระหว่าง TRAF6 และ TAK1 และยับยั้ง *IL-1* โดยจะไปยับยั้งในขั้นตอนการกระตุ้น TAK1 โดย TRAF6 ในกระบวนการ ubiquitination ของ TRAF6 เนื่องจาก *SOCS3* สามารถจับกับ Elongin B และ C ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ cullin-RING E3 ubiquitin ligases (Lehmann et al., 2003; Froböse et al., 2006; Ajibade, Wang, & Wang, 2013) **แบบที่ 2** วิถีการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัย TRIF (TRIF dependent pathway) จะอาศัยโปรตีน TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) โดยที่ TRIF จะไปกระตุ้นโปรตีน TRAF3 จากนั้น TRAF3 จะไปกระตุ้น TBK1 ผ่านทางกระบวนการ

ubiquitination นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ transcription factor IRFs และทำให้เกิดการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ type I interferon โดย SOCS3 จะไปยับยั้งในขั้นตอนการกระตุ้น TBK1 โดย TRAF3 ในกระบวนการ ubiquitination ของ TRAF3 เช่นเดียวกันกับในวิธีการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัย MyD88 (Kayagaki et al., 2007; Liu et al., 2015) ดังภาพที่ 4-8

โปรตีน IL-6, IL-11 และ IL-10 จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *SOCS3* ผ่านวิถีสัญญาณ JAK-STAT pathway โดยโปรตีน IL-6 และ IL-11 จะมีการส่งสัญญาณผ่านทางวิถี Jak2/STAT3 เนื่องจากโปรตีนทั้งสองจับกับ receptor ชนิดเดียวกัน คือ gp130 receptor ส่วนในโปรตีน IL-10 จะมีการส่งสัญญาณผ่านทาง Jak1Tyk2/STAT3 โดยโปรตีนทั้งสามชนิด จะส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้น transcription factor ชนิดเดียวกัน คือ STAT3 ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *SOCS3* โดย IL-6 ทำหน้าที่สำคัญอย่างหลากหลายในกระบวนการอักเสบ สามารถทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) และทำหน้าที่เป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokine) ในสถานะที่ภายในเซลล์มีการแสดงออกของ *SOCS3* น้อยหรือไม่มีการแสดงออกของ *SOCS3* โดยที่ IL-6 จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง *SOCS3* ผ่านทาง Jak2/STAT3 จากนั้น *SOCS3* จะทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของ Janus kinase (JAK) activation โดย *SOCS3* จะไปจับกับบริเวณ JAK-proximal sites บน cytokine receptor เนื่องจาก *SOCS3* มี receptor ชนิดเดียวกันกับ IL-6 และ IL-11 คือ gp130 receptor จึงสามารถเข้าจับได้ แต่ไม่สามารถจับกับ IL-10 ได้ และยับยั้งการทำงานของ JAK ผ่านทาง KIR domain ซึ่งจะถูกย่อยสลายผ่านทางกระบวนการ ubiquitination และถูกนำไปสลายที่ proteasome ผ่านทาง SOCS box domain (Yasukawa et al., 2003; Niemand et al., 2003; Wormald et al., 2006; Yoshimura, Naka, & Kubo, 2013) แสดงดังภาพที่ 4-8

จากการตรวจวัดปริมาณ mRNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา เวลา 3, 6, 8, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อยืนยันผลการคัดเลือกยีนที่คัดเลือกได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ยีน *EF-2* เป็นยีนอ้างอิงหรือ housekeeping gene จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง และยังคงมีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-10E) โดยการแสดงออกของยีน *iNOS* จะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 3 ชั่วโมง จนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีแบบแผนการแสดงออกที่เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Srisook และ Cha ในปี 2004 ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *HO-1* ในระดับ mRNA และ โปรตีน (ภาพที่ 4-10A ถึง 4-10C) แต่แบบแผนการแสดงออกของยีน *iNOS* จะแตกต่างจากแบบแผนการแสดงออกในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่นำมา

วิเคราะห์ ที่พบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *iNOS* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 18 ชั่วโมง และมีค่าความแปรปรวนของข้อมูลสูง ซึ่งผลจากการทำ Real time PCR ของยีน *iNOS* ของการวิจัยนี้มีระดับการแสดงออกในแต่ละช่วงเวลามีความน่าเชื่อถือมากกว่า (ภาพที่ 4-10D) และในการตรวจวัดระดับการแสดงออกเบื้องต้นของยีน *IL-11* โดยเทคนิค Real time PCR ไม่สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกได้ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากยีน *IL-11* มีระดับการแสดงออกที่ต่ำ โดยเมื่อระดับการแสดงออกเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง โดยการเปรียบเทียบโพลด์เซนจ์ที่ระดับ 0.8-1.4 เมื่อตรวจสอบจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในงานวิจัย และ *IL-11* เป็นยีนที่มีการศึกษาเป็นจำนวนน้อยทำให้ไม่พบข้อมูลที่จะมาอธิบายเหตุผลหรือพฤติกรรมการแสดงออกที่เกิดขึ้นของยีน *IL-11* นี้ได้

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของยีน *SOCS3* โดยใช้เทคนิค Real time PCR จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกได้ เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกสูงสุดที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง มีการแสดงออกจนถึงที่เวลา 18 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีระดับการแสดงออกที่ต่ำสุด (ภาพที่ 4-10E) โดยจะมีแบบแผนการแสดงออกที่มีลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Hammer และคณะ ในปี 2010 ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SOCS3* ด้วยเทคนิค Real-time PCR เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ช่วงเวลา 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11C) และงานวิจัยของ Qin et al. (2007) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SOCS3* ในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 (ภาพที่ 4-11A และ 4-11B) แต่ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* ในข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ จะพบว่าสามารถเริ่มตรวจวัดการแสดงออกของยีน *SOCS3* เมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง จนถึง 18 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11D) เนื่องจากยีน *SOCS3* สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยตัวกระตุ้นที่หลากหลาย เช่น LPS, IL-6, IL-11, interferon (IFN)-gamma และ IL-10 เป็นต้น จึงอาจจะทำให้ผลการตรวจวัดการแสดงออกไม่สม่ำเสมอและมีระดับการแสดงออกที่ต่ำ และการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *SOCS3* อาจจะต้องมีการเหนี่ยวนำร่วมกันของตัวกระตุ้นเพื่อเพิ่มความเสถียรในการแสดงออก ยกตัวอย่างเช่น การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *SOCS3* ด้วย LPS ร่วมกับ IL-10 (LPS+IL-10) จะพบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *SOCS3* สูงกว่าเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (Qasimi et al., 2006) หรืออาจจะเนื่องมาจากการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *SOCS3* ด้วย LPS ร่วมกับ IFN- $\gamma$  (LPS+IFN- $\gamma$ ) ซึ่งมีระดับการแสดงออกของยีน *SOCS3* สูงกว่าเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียวเช่นกัน จะเห็นได้ว่ากลไกการตอบสนองของ *SOCS3*

นั้นมีความสำคัญต่อการควบคุมตอบสนองเชิงลบ ซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันไม่ให้เกิดความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันและโรคการอักเสบ (Qin et al., 2012)

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกยีนที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง ในเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ โดยวิธีการคัดเลือกพีเจอร์ การค้นหายีนการอักเสบโดยใช้ฐานข้อมูล polysearch การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การวิเคราะห์แบบแผนการแสดงออกของยีน และบูรณาการร่วมกับเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ทำให้ได้ยีนที่มีบทบาทสำคัญที่ตอบสนองการอักเสบ คือ ยีน *SOCS3* และ *IL-11* สำหรับนำไปตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

2. จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการคัดเลือกยีนบางยีนที่มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันในช่วงเวลาที่มีการตอบสนองต่อ LPS ในเซลล์แมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ด้วยวิธี Real time PCR พบว่าไม่สามารถตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *IL-11* ได้ ส่วนยีน *SOCS3* มีความแปรปรวนของระดับการแสดงออกที่สูง ทำให้แบบแผนการแสดงออกตามเวลา ยังไม่มีความชัดเจน แต่แบบแผนการแสดงออกดังกล่าวมีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่มีการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *SOCS3* ที่มีความไม่แน่นอน

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้จำนวนชุดข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์มีจำนวนตัวอย่างน้อย ซึ่งอาจทำให้การคัดเลือกมีข้อจำกัดเฉพาะกลุ่มยีนทำให้การคัดเลือกเกิดความผิดพลาดได้ จึงควรเพิ่มจำนวนชุดข้อมูล ไมโครอาร์เรย์สำหรับการวิเคราะห์

2. ในขั้นตอนการเตรียมข้อมูลและปรับมาตรฐานของข้อมูล ควรมีการเพิ่มวิธีการปรับมาตรฐานข้อมูล เพื่อให้ข้อมูลแต่ละชุดข้อมูลอยู่ในมาตรฐานเดียวกัน เช่น การใช้ยีนอ้างอิง (Housekeeping gene) ในการปรับมาตรฐานข้อมูลในแต่ละชุดข้อมูล

3. ควรเพิ่มฐานข้อมูลที่ใช้ในการสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

4. ในขั้นตอนการตรวจสอบยืนยันผลในห้องปฏิบัติการควรเพิ่มช่วงเวลาในการกระตุ้นด้วย LPS ให้มีหลายช่วงเวลาโดยเฉพาะในช่วงเวลาสองชั่วโมงแรกของการตอบสนองการอักเสบ

5. ควรเพิ่มเทคนิคในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SOCS3* นอกเหนือจากเทคนิค Real time PCR เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบว่าเป็นจริง เช่น เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

## บรรณานุกรม

- กนกวรรณ จารุกัจฉ. (2549). ปฏิกริยาถูกโซ่พอลิเมอร์แบบดั้งเดิมและแบบเวลาจริง. *วารสารไทยเกษตรศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*, 1(3), 254-262.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). *การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์*. กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์.
- กิตติพันธ์ ชาระเขตร์, จูติรัตน์ นุชศิลา, เหมือนฝัน โวหารกล้า และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2559). การค้นหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยการคัดเลือกยีนและการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วม. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8"* (หน้า 235-240). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
- คะเนิงนิจ คงพวง, พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, อำไพ คารกะพงษ์ และเยาวเรศ กังใช้ง้วน. (2550). *ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมใน 10 จังหวัดชายแดนที่มีไข้มาลาเรียสูง*. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2550. กรุงเทพฯ: สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลงกรมควบคุมโรค.
- จีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา. (2552). เทคโนโลยียีนชิป. *วารสารของสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย (Thai Journal of Genetics)*, 2(2), 84-102.
- เทพพนม อารัญญาณ, จรรย์ รุ่งเรือง, เหมือนฝัน โวหารกล้า และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2558). เครือข่ายความสัมพันธ์การแสดงออกร่วมของกลุ่มยีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 7"* (หน้า 1-6). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. กรุงเทพฯ: โนเบิลปริน.
- พศิกา ไบยา, วิไลพร ศรีตะบุตร และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2557). เครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19 (ฉบับพิเศษ), 173-184.
- พิรยุทธ สิทธิไชยากุล. (2552). *เอกสารประกอบการสอนรายวิชาหลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์*. พิษณุโลก: ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- วรรณวิภา วงศ์วิไลสกุล. (2556). เหมือนข้อความและการประยุกต์. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*, 4, 157-165.

- วันเฉลิม จินอู่ และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2557). กลไกการตอบสนองการอักเสบจากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ "การศึกษาทางพันธุศาสตร์และจีโนมิกส์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ยุคใหม่"* (หน้า 25-31). กรุงเทพฯ: โรงแรมวินเซอร์ สวีทส์.
- เหมือนฝัน ไหวหารกล้า และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2557). การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6"* (หน้า 189-194). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อรอนงค์ จันทุมมี, ปราณี พรหมคล้าย, จิดาภา สอนศิริ, เหมือนฝัน ไหวหารกล้า และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2559). การคัดเลือกกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบด้วยการจัดกลุ่มยีนและการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกของยีน. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8"* (หน้า 241-246). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
- Achek, A., Yesudhas, D., & Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of Pharmacal Research*, 39(8), 1032-1049.
- Ahmed, AU., Williams, BR., & Hannigan, GE. (2015). Transcriptional Activation of Inflammatory Genes: Mechanistic Insight into Selectivity and Diversity. *Biomolecules*, 5(4), 3087-111.
- Ajibade, A.A., Wang, H.Y., & Wang, R.F. (2013). Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends in Immunology*, 34(7), 307-316.
- Albright, J., Quizon, P.M., Lusic, A.J., & Bennett, B.J. (2014). Genetic network identifies novel pathways contributing to atherosclerosis susceptibility in the innominate artery. *BMC Med Genomics*, 7. doi: 10.1186/1755-8794-7-51.
- Argyris, T., George, P., & Demosthenes, B. (2004). Application of microarray technology in pulmonary diseases. *Respiratory Research*, 5(1), 1-18.
- Babu, M.M. (2004). Introduction to microarray data analysis. In P. Richard (Ed.), *Computational Genomics: Theory and Application* (pp.225-249). United Kingdom: Horizon Press.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F.C., Kim, I.F., Markowitz, V., Matese, J.C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., & Vingron, M. (2001). Minimum information about

- a microarray experiment (MIAME)-toward standard for microarray data. *Nature Genetics*, 29(4), 365-371.
- Butcher, B.A., Greene, R.I., Henry, S.C., Annecharico, K.L., Weinberg, J.B., Denkers, E.Y., Sher, A., & Taylor, G.A. (2005). p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. *Infection and immunity*, 73, 3278–3286.
- Chen, B.S., Yang, S.K., Lan, C.Y., & Chuang, Y.J. (2008). A systems biology approach to construct the gene regulatory network of systemic inflammation via microarray and databases mining. *BMC Med Genomics*, 1. doi: 10.1186/1755-8794-1-46.
- Chen, C.Y., Ho, A., Huang, H.Y., Juan, H.F., & Huang, H.C. (2014). Dissecting the human protein-protein interaction network via phylogenetic decomposition. *Scientific Reports*, 4. doi: 10.1038/srep07153.
- Cheng, D., Knox, C., Young, N., Stothard, P., Damaraju, S., & Wishart, D.S. (2008). PolySearch: a web-based text mining system for extracting relationships between human diseases, genes, mutations, drugs and metabolites. *Nucleic Acids Research*, 36. doi:10.1093/nar/gkn296.
- Cheon, H., Rho, Y.H., Choi, S.J., Lee, Y.H., Song, G.G., Sohn, J., Won, N.H., & Ji, J.D. (2006). Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. *Journal of Immunology*, 177(2), 1092-1100.
- Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., Hanspers, K., Isserlin, R., Kelley, R., Killcoyne, S., Lotia, S., Maere, S., Morris, J., Ono, K., Pavlovic, V., Pico, A.R., Vailaya, A., Wang, P.L., Adler, A., Conklin, B.R., Hood, L., Kuiper, M., Sander, C., Schmulevich, I., Schwikowski, B., Warner, G.J., Ideker, T., & Bader, G.D. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using cytoscape. *Nature Protocols*, 2(10), 2366-2382.
- Comer, J.E., Galindo, C.L., Zhang, F., Wenglikowski, A.M., Bush, K.L., Garner, H.R., Peterson, J.W., & Chopra, A.K. (2006). Murine macrophage transcriptional and functional responses to *Bacillus anthracis* edema toxin. *Microb Pathog*, 41(2-3), 96-110.
- Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 207-210.



- El Kasmi, K.C., Holst, J., Coffre, M., Mielke, L., de Pauw, A., Lhocine, N., Smith, A.M., Rutschman, R., Kaushal, D., Shen, Y., Suda, T., Donnelly, R.P., Myers, M.G., Jr., Alexander, W., Vignali, D.A., Watowich, S.S., Ernst, M., Hilton, D.J., & Murray, P.J. (2006). General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *Journal of Immunology*, *177*(11), 7880–7888.
- Frobøse, H., Rønn, S.G., Heding, P.E., Mendoza, H., Cohen, P., Mandrup-Poulsen, T., & Billestrup, N. (2006). Suppressor of cytokine signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex. *Molecular Endocrinology*, *20*(7), 1587-1596.
- Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H., & Ikeda, H. (2003). Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther*, *100*(2), 171-194.
- Garcia, O., Saveanu, C., Cline, M., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Schwikowski, B., & Aittokallio, T. (2007). Golorize: a Cytoscape plug-in for network visualization with Gene Ontology-based layout and coloring. *Bioinformatics*, *23*(3), 394-396.
- Glaab, E., Garibaldi, J.M., & Krasnogor, N. (2009). Array Mining: a modular web-application for microarray analysis combining ensemble and consensus methods with cross-study normalization. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 358.
- Hall, M., Frank, E., Holmes, G., Pfahringer, B., Reutemann, P., & Witten, H. (2009). The WEKA data mining software: An update. *SIGKDD Explorations*, *11*(1), 10–18.
- Hall, M.A. (2000). Correlation-based feature selection for discrete and numeric class machine learning In *Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning* (pp. 359-366). United States of America : Stanford University, Stanford.
- Hammer, K.D.P., Yum, M.Y., Dixon, P.M., & Birt, D.F. (2010). Identification of JAK–STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a *Hypericum perforatum* fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*, *71*(7), 716-725.
- Howe, E.A., Sinha, R., Schlauch, D., & Quackenbush, J. (2011). RNA-Seq analysis in MeV. *Bioinformatics*, *27*(22), 3209-3210.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., & Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, *4*(1), 44–57.

- Ideker, T., Ozier, O., Schwikowski, B., & Siegel, A.F. (2002). Discovering regulatory and signaling circuits in molecular interaction networks. *Bioinformatic*, *1*, S233-S240.
- Inagaki-Ohara, K., Kondo, T., Ito, M., & Yoshimura, A. (2013). SOCS, inflammation, and cancer. *JAKSTAT*, *2*(3), e24053-1 - e24053-10.
- Jatiani, SS., Baker, S.J., Silverman, L.R., & Reddy, EP. (2010). JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for targeted therapies. *Genes Cancer*, *1*, 979–993.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M., & Hirakawa, M. (2003). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, *31*, D355-D360.
- Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K.M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J.F., Zhang, Z., Arnott, D., & Dixit, V.M. (2007). DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, *318*(5856), 1628-1632.
- Lee, S.Y., Kim, H.J., & Han, J.S. (2013). Anti-inflammatory Effect of Oyster Shell Extract in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, *18*(1), 23-29.
- Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R.M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B.G., Heinrich, P.C., & Schaper, F. (2003). SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(1), 661-671.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
- Macgregor, P.F., & Squire, J.A. (2002). Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem*, *48*(8), 1170-1177.
- McCormick, S.M., & Heller, N.M. (2015). Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. *Frontiers in Immunology*, *6*. doi: 10.3389/fimmu.2015.00549.
- Merico, D., Gfeller, D., & Bader, GD. (2009). How to visually interpret biological data using networks. *Nature Biotechnology*, *27*(10), 921-923.

- Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of Immunology*, *178*(5), 2623–2629.
- Nair, J., Ghatge, M., Kakkar, V.V., & Shanker, J. (2014). Network analysis of inflammatory genes and their transcriptional regulators in coronary artery disease. *PLoS One*, *9*(4), e94328. doi: 10.1371/journal.pone.0094328.
- Nguyen, M.D., Julien, J.P., & Rivest, S. (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*, 216–227.
- Niemand, C., Nimmesgern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., & Müller-Newen, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *Journal of Immunology*, *170*(6), 3263–3272.
- Nikkilä, J., Törönen, P., Kaski, S., Venna, J., Castrén, E., & Wong, G. (2002). Analysis and visualization of gene expression data using self-organizing maps. *Neural Networks*, *15*(8-9), 953–966.
- Nishinakamura, H., Minoda, Y., Saeki, K., Koga, K., Takaesu, G., Onodera, M., Yoshimura, A., & Kobayashi, T. (2007). An RNA-binding protein alphaCP-1 is involved in the STAT3-mediated suppression of NF-kappaB transcriptional activity. *International Immunology*, *19*(5), 609–619.
- Parkinson, H., Sarkans, U., Shojatalab, M., Abeygunawardena, N., Contrino, S., Coulson, R., Farne, A., Lara, G.G., Holloway, E., Kapushesky, M., Lilja, P., Mukherjee, G., Oezcimen, A., Rayner, T., Rocca-Serra, P., Sharma, A., Sansone, S., & Brazma, A. (2005). ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Research*, *33*, D553–D555.
- Prele, C.M., Keith-Magee, A.L., Yerkovich, S.T., Murcha, M., & Hart, P.H. (2006). Suppressor of cytokine signalling-3 at pathological levels does not regulate lipopolysaccharide or interleukin-10 control of tumour necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Immunology*, *119*(1), 8–17.
- Qasimi, P., Ming-Lum, A., Ghanipour, A., Ong, C.J., Cox, M.E., Ihle, J., Cacalano, N., Yoshimura, A., & Mui, A.L. (2006). Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to

- mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6316-6324.
- Qin, H., Wilson, C.A., Roberts, K.L., Baker, B.J., Zhao, X., & Benveniste, E.N. (2006). IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced CD40 gene expression through induction of suppressor of cytokine signaling-3. *Journal of Immunology*, 177, 7761-7771.
- Qin, H., Roberts, K.L., Niyongere, S.A., Cong, Y., Elson, C.O., & Benveniste, E.N. (2007). Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophage and microglia. *Journal of Immunology*, 179(9), 5966-5976.
- Qin, H., Yeh, W.I., De Sarno, P., Holdbrooks, A.T., Liu, Y., Muldowney, M.T., Reynolds, S.L., Yanagisawa, L.L., Fox, T.H., Park, K., Harrington, L.E., Raman, C., & Benveniste, E.N. (2012). Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 5004-5009.
- Rico-Bautista, E., Flores-Morales, A., & Fernández-Pérez, L. (2006). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 17(6), 431-439.
- Saeij, J.P., Coller, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., & Boothroyd, J.C. (2007). Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*, 445, 324-327.
- Selvaraj, S., & Natarajan, J. (2011). Microarray Data Analysis and Mining Tools. *Bioinformatics*, 6(3), 95-99.
- Shell, S.A., Hesse, C., Morris, S.M. Jr., & Milcarek, C. (2005). Elevated levels of the 64-kDa cleavage stimulatory factor (CstF-64) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages influence gene expression and induce alternative poly(A) site selection. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 39950-39961.
- Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Application in Genetics and Molecular Biology*, (3), 1027-1030.
- Srisook, K., & Cha, Y.N. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophage stimulated with lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol*, 68(9), 1709-1720.

- Stuart, J.M., Segal, E., Koller, D., & Kim, S.K. (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science*, *302*(5643), 249-255.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J., & von Mering, C. (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, *43* (Database issue), D447-452. doi: 10.1093/nar/gku1003.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(9), 5116–5121.
- Vandenabeele, P., & Bertrand, M.J. (2012). The role of the IAP E3 ubiquitin ligases in regulating pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, *12*(12), 833-844.
- Watson, A., Mazumder, A., Stewart, M., & Balasubramanian, S. (1998). Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, *9*(6), 609-614.
- Watson, M. (2006). CoXpress: differential co-expression in gene expression data. *BMC Bioinformatics*, *7*, 509. doi:10.1186/1471-2105-7-509.
- Williams, L.M, Sarma, U., Willets, K., Smallie, T., Brennan, F., & Foxwell, B.M. (2007). Expression of constitutively active STAT3 can replicate the cytokine-suppressive activity of interleukin-10 in human primary macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(10), 6965–6975.
- Wilson, H.M. (2014). SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Frontiers in Immunology*, *5*(357). doi: 10.3389/fimmu.2014.00357.
- Wohankla, M., Srisook, K., & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. In *Proceedings of The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2015)* (pp.752-757). Bangkok: Chulalongkorn University.
- Wormald, S., Zhang, J.G., Krebs, D.L., Mielke, L.A., Silver, J., Alexander, W.S., Speed, T.P., Nicola, N.A., & Hilton, D.J. (2006). The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 11135-11143.

- Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., Hirano, T., Chien, K.R., & Yoshimura, A. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature Immunology*, 4(6), 551–556.
- Yoshimura, A., Naka, T., & Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, 7(6), 454-465.
- Yoshimura, A., Nishinakamura, H., Matsumura, Y., & Hanada, T. (2005). Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Research & Therapy*, 7(3), 100-110.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

การค้นหาค่าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch  
การคัดเลือกขึ้นที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยวิธี Feature selection



## 1. ผลของการค้นหาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากฐานข้อมูล PolySearch

การค้นหาในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory genes) จากฐานข้อมูล PolySearch (Cheng, 2008) ในการค้นหาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจะใช้คำสำคัญในการค้นหาว่า “inflammation” ซึ่งจะปรากฏรายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งหมด 329 ยีน และนำรายชื่อยีนที่สืบค้นได้ไปเปรียบเทียบกับยีนที่พบในชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ทั้งสามชุดข้อมูลจะมียีนทั้งหมด 187 ยีน (ดังตารางภาคผนวก ก-1)

ตารางภาคผนวก ก-1 รายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สืบค้นจากฐานข้อมูล PolySearch

Gene/Protein Name	Gene Symbol	Gene/Protein Name	Gene Symbol
IL 1beta	IL1B	HSD17B4	HSD17B4
tumor necrosis factor	TNF	ICAM 1	ICAM1
C reactive protein	CRP	leptin	LEP
chemokines	CXCL12	CB2	CNR2
IL 10	IL10	visfatin	NAMPT
High mobility group box 1	HMGB1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2	TREM2
VEGF	VEGFA	PD L1	CD274
IL 17	IL17A	Annexin A1	ANXA1
hepcidin	HAMP	ApoA I	APOA1BP
p38	AIMP2	Na K ATPase	ATP1A1
PPARalpha	PPARA	CPEB	CPEB1
PPARGamma	PPARG	endocan	ESM1
HO 1	HMOX1	Ki 67	MKI67IP
STAT 3	STAT3	metalloproteinases	MMP20
Toll like receptor 4	TLR4	MT1	MTNR1A
CD4	CD4	brains	PGAM1
pentraxin 3	PTX3	TRAF3	TRAF3
CCL2	CCL22	X receptor	XPR1
interleukin 33	IL33	CD40	CD40
caspase 8	CASP8	IFNalpha	IFNA1
IL 13	IL13	angiopoietin 2	ANG2
GAL3	LGALS2	BACE2	BACE2
urokinase plasminogen activator	PLAU	CD74	CD74
FPR2	FPR2	RP3	DYNLT3
CD8	CD8A	GAD	GAD1
Aldehyde Dehydrogenase 2	ALDH2	glutamic acid decarboxylase	GAD2
CD14	CD14	SIDS	IDS
S1P	MBTSP1	p62	IGF2BP2
PRMT6	PRMT6	IKKbeta	IKBKB
Proteinase Activated Receptor 2	F2RL1	IL 12B	IL12B

## ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

Gene/Protein Name	Gene Symbol	Gene/Protein Name	Gene Symbol
IL4R	IL4RA	ADAM28	ADAM28
insulin receptor	INSR	ADAM33	ADAM33
mark 1	MARK1	B2R	BDKRB2
MIB1	MIB1	Biglycan	BGN
PENK	PENK	Cav3.2	CACNA1H
PIK3CD	PIK3CD	caveolin 3	CAV3
PLA2G12B	PLA2G12B	CCL3	CCL3
ZIP14	SLC39A14	cyclin D1	CCND1
SMAD3	SMAD3	CCR4	CCR4
TGFbeta	TGFB1	CFTR	CFTR
zonula occludens 1	TJP1	CHRFAM7A	CHRNA7
serine threonine kinase	TLK2	Dab 2	DAB2
TLR3	TLR3	beta defensin 2	DEFB2
TLR7	TLR7	Pref 1	DLK1
TLR8	TLR8	EAPP	EAPP
VAV3	VAV3	FADD	FADD
VCAM 1	VCAM1	Fms Like Tyrosine Kinase 1	FLT1
Bcl xl	BCL2L1	macrophage migration inhibitory factor	GIF
caspase 1	CASP1	G Protein	GNG2
CD36	CD36	TIM 1	HAVCR1
cryptochrome 1	CRY1	serotonin transporter	HTT
nuclear factor erythroid 2 related factor 2	HEBP1	IL4I1	IL4I1
IGF1	IGF1	IRAK 4	IRAK4
TLR2	TLR2	KRAS	KRAS
IL 23	IL23A	MMP8	MMP8
c Jun	JUN	Notch3	NOTCH3
ubiquitin	RPS27A	occludin	OCLN
Bcl 2	BCL2	prohibitin 2	PHB2
neurotrophin	BDNF	tissue plasminogen activator	PLAT
catalase	CAT	cGKII	PRKG2
CCR2	CCR2	receptor interacting serine threonine kinase 3	RIPK3
LAP3	LAP3	RXRalpha	RXRA
MEF2C	MEF2C	osteopontin	SPP1
PARP1	PARP1	STAT 6	STAT6
receptor interacting protein	RIPK1	STIM1	STIM1
S100A8	S100A8	TIMP 1	TIMP1
TLR9	TLR9	TRADD	TRADD
TREM 1	TREM1	TRAM	TRAM1
CXCL2	CXCL2	TXNIP	TXNIP
VEGF C	VEGFC	CCL5	CCL5
c Myc	MYC		

## ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

Gene/Protein Name	Gene Symbol	Gene/Protein Name	Gene Symbol
ACC1	ACACA	GSTO1	GSTO1
CD166	ALCAM	hand 1	HAND1
ankyrin G	ANK3	Hepatocyte growth factor	HGF
p73	ARHGAP24	Homer 2	HOMER2
ATF3	ATF3	IFNgamma	IFNG
cytoplasmic protein	BLZF1	IL 25	IL25
caspase recruitment domain containing protein 14	CARD14	MCM2	MCM2
CCL11	CCL11	B27	MRAP
CCL7	CCL7	Pregnane X Receptor	NR1I2
CD44	CD44	receptor interacting protein 140	NRIP1
IKK	CHUK	purinergic receptors	P2RX1
CXCL10	CXCL10	P2X7	P2RX7
DKK3	DKK3	PLA2G4A	PLA2G4A
DUOXA2	DUOXA2	SUDD	RIOK3
DUSP 1	DUSP12	SAA	SAA4
FABP4	FABP4	SH3BP2	SH3BP2
FAM3C	FAM3C	SNCA	SNCA
FOXP3	FOXP3	osteoprotegerin	TNFRSF11B
glucagon like peptide 1	GCG	Thymic stromal lymphopoietin	TSLP
ghrelin	GHRL	TSPO	TSPO
GRLF1	GRLF1	thioredoxin domain containing 5	TXNDC5
Interleukin 18	IL18	xanthine oxidase	XDH
IL 2 receptor	IL2RB	Socs3	Socs3

## 2. การคัดเลือกยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบโดยวิธี Feature selection

ตารางภาคผนวก ก-2 ยีนที่พบในแต่ละชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากโพรบที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธี

ชุดข้อมูล	จำนวนยีน	ยีน
GSE4712 (3 hr_LPS)	70	<i>CD83, TGFB3, TGM2, 1190002H23RIK, CYTH1, CREM, NFIL3, TERF2IP, CLEC4E, SERPINA1A, BLCAP, SLC15A3, VEGFA, 2310016C08RIK, AREG, CSF2RB, THBS1, ABCA1, PLAU, PDE4B, AHR, B3GALT2, 2010002N04RIK, TRAF1, PTGER4, RUNX2, TRIB1, TNFRSF9, NUA2, 9530003J23RIK, 4122401K19RIK, 4931439C15RIK, NFKBIE, MAST1, ATMIN, FNBP1L, CSRNPI, BCL2L11, 1110003E01RIK, CYTIP, DUSP5, FOSL2, GPR85, NR4A3, H2-EB2, D5ERTD163E, CD93, PEX19, LRIT2, E230029C05RIK, NR4A2, THBD, IL7R, HOXB2, IL11, CXCL2, MXI1, ENTPD1, APOBEC1, TRP53INP2, DZIP1, MPP7, CD302, AGPAT9, TSC22D1, 1200011I18RIK, SPTY2D1, FGD4, NAA11</i>
GSE4712 (6 hr_LPS)	65	<i>CD83, TGM2, VDR, CYTH1, CREM, NFIL3, AVIL, ISY1, CLEC10A, CLEC4E, RAMP3, PROCR, SLC15A3, 2310016C08RIK, AREG, CSF2RB, THBS1, ABCA1, PDE4B, AHR, SRC, 2010002N04RIK, TRAF1, PTGER4, OSGIN2, RUNX2, TRF, EDIL3, MXI1, TSC22D1, BCL2L11, EGR2, TNFRSF9, CHST11, 1110002L01RIK, NFKBIE, PRUNE, CSRNPI, 1110003E01RIK, CYTIP, EGR3, LATS2, DUSP5, FOSL2, CLCF1, FRMD4B, TMEM56, CD93, E230029C05RIK, PTCHD1, ZMYM3, NR4A2, THBD, IL7R, CSF2RB2, 1200011I18RIK, GPR35, CXCL2, CSF2RB, ENTPD1, ACSL4, TRP53INP2, ANKRD33B, GALNT13</i>
GSE21841 (8 hr_LPS)	61	<i>MARCKS, CD83, TNFAIP2, TNC, SOCS3, PTGS2, F8A, NFKBIZ, CCL22, CCL5, PHLDA1, ST3GAL1, CSF3, HOXB13, CCL2, ACCN5, RSAD2, LIF, IL1A, IFNB1, PDE4B, RAB3A, TPBG, TRAF1, ARHGEF3, TSC22D1, UNG, CSF2, CEACAM1, CCRL2, 1200003I10RIK, MIR155, PPFLA4, CDC42EP2, EXO1, 4921515G04RIK, 4930526H09RIK, RSPH3A, WDR37, 2610021J01RIK, PLSCR4, TNFAIP3, GBP6, 1200015M12RIK, PIMI, NEURL1B, A130040M12RIK, GBP2, E2F2, DUSP5, PRTG, CD40, RALGPSI, VEGFC, PRRG1, C130050O18RIK, PPP1R3E, KBTBD11, SDC4, CSF1, IL1B, CXCL2, IL6, DUSP2, IFIT1, GADD45B, EDN1, 1200016E24RIK, 3930401B19RIK, HHAT, MAF, SHISA3, FAS</i>
GSE2002 (18 hr_LPS)	80	<i>MARCKSL1, MARCKS, EHD1, NUSAPI, SOCS3, GLRX, SLC6A4, IRF7, PTGS2, C2 /// CFB, NFKBIZ, CP, CCL22, TNFRSF1B, CCL5, GBP2, GBP3, RTP4, SLFN1, MAFF, PDPN, VEGFC, MS4A6D, IFI204, ZBP1, CLEC4N, CD274, CCL2, GBP1, SLC15A3, LGALS9, IGFBP4, IL13RA2, UBE2T, IL1RN, TRAF1, BIRC5, APOL9A, ERCC6L, WDR62, BST2, MYC, HMMR, SLC7A2, MKI67, PTPN23, CENPF, ZC3H12A, IRG1, LCN2, 1200003I10RIK, MIR155, NUF2, GM9706, PLK3, SEMA5A, KIF11, KIF2C, ERI2, MPA2L, CDC20, C78513, MMP9, POLE, KIF20A, IL1B, DGKG, SLFN2, H28, SAA3, CENPA, CCNB2, KIF22, CYTIP, BRCA1, HDC, 1200016E24RIK, UBE2C, OASL2, 3930401B19RIK, GM9706</i>

ตารางภาคผนวก ก-3 รายละเอียดของยีนในแต่ละเครือข่ายย่อยทั้งสองเครือข่าย

Gene Symbol	Gene name	RefSeq Transcript ID
<b>Module1</b>		
<i>CD36</i>	CD36 antigen	NM_001159555 /// NM_001159556 /// NM_001159557 /// NM_001159558 /// NM_007643
<i>WDR62</i>	WD repeat domain 62	NM_146186
<i>NUF2</i>	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	NM_023284
<i>MKI67</i>	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	NM_001081117
<i>ERCC6L</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 - like	NM_146235
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5	NM_001012273 /// NM_009689
<i>NUSAP1</i>	nucleolar and spindle associated protein 1	NM_001042652 /// NM_133851
<i>LGALS9</i>	lectin, galactose binding, soluble 9	NM_001159301 /// NM_010708
<i>TSPO</i>	translocator protein	NM_009775
<i>IRF7</i>	interferon regulatory factor 7	NM_016850
<i>SLC6A4</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	NM_010484
<i>VEGFC</i>	vascular endothelial growth factor C	NM_009506
<b>Module2</b>		
<i>IL11</i>	interleukin 11	NM_008350
<i>GPR35</i>	G protein-coupled receptor 35	NM_001104529 /// NM_022320
<i>PLA2G4A</i>	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	NM_008869
<i>TRF</i>	transferrin	NM_133977
<i>PRUNE</i>	prune homolog (Drosophila)	NM_173347
<i>NFIL3</i>	nuclear factor, interleukin 3, regulated	NM_017373
<i>AREG</i>	amphiregulin	NM_009704
<i>BLCAP</i>	bladder cancer associated protein homolog (human)	NM_016916
<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	NM_008372
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A	NM_001025250 /// NM_001025257 /// NM_001110266 /// NM_001110267 /// NM_001110268 /// NM_009505
<i>CSF2RB2</i>	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	NM_007781
<i>PLAU</i>	plasminogen activator, urokinase	NM_008873
<i>THBD</i>	thrombomodulin	NM_009378
<i>NFKBIZ</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	NM_001159394 /// NM_001159 NM_030612
<i>SOCS3</i>	suppressor of cytokine signaling 3	NM_007707
<i>GBP1</i>	guanylate binding protein 1	NM_010259

ภาคผนวก ข  
การเตรียมสารเคมี

**1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**  
(กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2550)

**สารเคมี**

- DMEM	13.5	กรัม		
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	900	มิลลิลิตร		
- NaHCO <sub>3</sub>	3.7	กรัม		
- Penicillin-Streptomycin	10	มิลลิลิตร (10,000	ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ	10,000

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

**วิธีการเตรียม**

1. เทอาหารผง DMEM ใส่ในขวดแก้วไร้เชื้อขนาด 1 ลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 900 มิลลิลิตร ผสมอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. เติม NaHCO<sub>3</sub> จำนวน 3.7 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.1-7.2 ด้วย HCL

4. เติมสารละลาย Penicillin-Streptomycin จำนวน 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

5. นำอาหารไปทำให้ไร้เชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูขนาด 0.22 ไมครอนในตู้ปลอดเชื้อ

6. เติม fetal bovine serum (FBS) จำนวน 100 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

**2. การให้ความร้อนกับซีรัม (heat-inactivation)**

นำขวดซีรัม FBS ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 °C มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน เพื่อให้ซีรัมละลาย จากนั้นนำซีรัมที่ละลายแล้วไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 °C นานประมาณ 30 นาที และทำการเขย่าขวดซีรัมทุก 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำขวดซีรัมมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการแบ่งใส่หลอดพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

**3. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ HBSS ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียม**

**สารเคมี**

- NaCl	8	กรัม	- NaHCO <sub>3</sub>	0.35	กรัม
- KCl	0.4	กรัม			
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06	กรัม			
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.048	กรัม			
- D-Glu	1	กรัม			

### วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารต่าง ๆ NaCl 8 กรัม KCl 0.4 กรัม  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06 กรัม  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.048 กรัม D-Glu 1 กรัม และ  $\text{NaHCO}_3$  0.35 กรัม

2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.1-7.2 ด้วย NaOH

3. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำสารละลายบัฟเฟอร์ไปทำการไรเซอด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูขนาด 0.22 ไมครอนในตู้ปลอดเชื้อ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 4. การเตรียมสารละลาย 10X TBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Tris-base 54 กรัม

Boric acid 27.5 กรัม

EDTA 4.65 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่

อุณหภูมิห้อง