APPENDIX

Reagents and buffers preparation

Synovial fibroblast SW982 cell line and Synovial fibroblast cell

1. **L-15 medium for synovial fibroblast SW982 cell line**

L-15	1 package (13.7 g)
Penicillin/ Streptomycin	10 ml
Gentamycin	1 ml

All chemicals were dissolved in 800 ml of deionized distilled water, adjusted pH 7.6 and made up to volume 1,000 ml. The media was steriled by suction through a filter (membrane pore size 0.2µm) and stored at 4 ^{o}C.

2. **DMEM medium for synovial fibroblast cell**

DMEM	1 package (13.5 g)
HEPES	4.8 g
$NaHCO_3$	3.7 g
Penicillin/ Streptomycin	10 ml
Gentamycin	1 ml

All chemicals were dissolved in 800 ml of deionized distilled water, adjusted pH 7.2 and made up to volume 1,000 ml. The media was steriled by suction through a filter (membrane pore size 0.2µm) and stored at 4 ^{o}C.

3. **Phosphate buffer saline (PBS)**

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.24 g

All chemicals were dissolved in 800 ml of distilled water, adjusted pH 7.4 and then added with distilled water to adjust to volume 1,000 ml and stored at room temperature.

4. **0.05% Trypsin-EDTA**

0.05% Trypsin-EDTA	10 ml
PBS pH 7.4	90 ml

5. **Hank's balanced salt solution (HBSS)**

HBSS without sodium bicarbonate	9.8 g
$NaHCO_3$	0.35 g

All chemicals were dissolved in 800 ml of deionized distilled water, adjusted pH 7.2 and made up to volume 1,000 ml, steriled by suction through a filter (membrane pore size 0.2µm) and stored the reagent at 4 ^{o}C.

Enzyme-linked immunosorbent assay

1. **Phosphate buffer saline (PBS)**

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g

$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.24 g

All chemicals were dissolved in 800 ml of distilled water, adjusted pH 7.4 and then added with distilled water to adjust to volume 1,000 ml and stored at room temperature.

2. **Tris-Incubating buffer**

Tris-HCl	1.21 g
NaCl	8.77 g

All chemicals were dissolved in 900 ml of distilled water, adjust to pH 7.4 and then added distilled water to adjust to the volume 1000 ml. Added 0.5 g BSA and 1 ml Tween-20. Stored the reagent at 4°C.

3. **Coating buffer**

$NaHCO_3$	8.4 g

The chemicals was dissolved in 900 ml of distilled water, adjust to pH 7.4 and then added with distilled water to adjust to volume 1,000 ml. Stored the reagent at room temperature.

4. **1% Bovine serum albumin (BSA)**

BSA	0.1 g
PBS	10 ml

5. **Citrate phosphate buffer**

Citric acid monohydrate	10.30 g
$Na_2HPO_4.3H_2O$	18.16 g

All chemicals were dissolved in 900 ml of distilled water, adjust to pH 5.0 and made up to the volume 1000 ml. Stored the reagent at 4°C.

6. Substrate solution

o-phenylene-diamine	8 mg
Citrate phosphate buffer	12 ml
30% H_2O_2	7 µl

Prepared the reagent fresh for 1 plate; kept in the dark before used.

RT-PCR

1. 10X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer

Tris-base	107.78 g
Boric acid	55 g
Na_2-EDTA	7.44 g

All chemicals were dissolved in distilled water and made up to the volume 1000 ml. Stored the reagent at room temperature.

2. 1X TBE buffer

10x TBE buffer	100 ml
Deionized distilled water	900 ml

The buffer was filtered through a membrane filter pore size 0.45 µm and stored at room temperature.

Cell line designation: SW982 (ATCC® catalog NO. HTB-93™)

Organism: *Homo sapiens* (human)

Tissue: synovial sarcoma; synovium

Age: 25 years

Gender: female

Ethnicity: Caucasian

Morphology: mixed

Growth properties: adherent

DNA profile (STR analysis)

Amelogenin:X

CSF1PO:11, 12

D13S317:12, 13

D16S539:11, 12

D5S818:11, 13

D7S820:9, 11

TH01:9.3

TPOX:9, 11

vWA:19, 20

.Depositors: A. Leibovitz

Comments: The SW982 cell line was initiated by A. Leibovitz in 1974 at the Scott and White Clinic, Temple, Texas from a surgical specimen of a biphasic synovial sarcoma removed from a 25 year old female Caucasian. The

histopathology evaluation reported an undifferentiated malignant tumor consistent with liposarcoma

Karyotype: hyperdiploid; modal number = 48; range = 42 to 58. The rate of higher ploidies was 1.6%. Nine markers were common to all cells. These were: t(1q4p), del(5) (q31;q33), der(9) t(4;9) (q11;p24), t(8q12p), t(9q13p) and four others. Double minutes (DM) were seen in some cells (usually only one copy). Normal N9 was absent, N4, N8, and N13 were consistently single-copied and the X was double-copied.

Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.

Table 1. Primers used for RT-PCR

Denature temperature 95 ^{o}C, 45 seconds

Extension temperature 72 ^{o}C, 1.15 minutes

Gene	Sequence 5'→3'	Annealing Temperature (^{o}C), (min)	Base pair	Cycle	Genbank Assession No.
HAS2	F:CACAGCTGCTTATATTGTTG R:AGTGGCTGATTTGTCTCTGC	51, 1.00	358	35	NM_005328
HAS3	F:CAGCCTCCTCCAGCAGTTCC R:TAACCGTGGCAATGAGGAA	55, 1.00	317	35	NM_005329
TLR-4	F:TGGATACGTTTCCTTATAA R:GAAATGGAGGCACCCCTT	55, 1.15	548	35	NM_138554
IL-1β	F:ATGGCAGAAGTACCTGAGCTC R:GGAAGACACAAATTGCATGGTGAA	52, 1.15	807	35	NM_000576
ICE	F:TCCCCACTAAAAATTTCTCCCAT R:TTGATGTCTGTGGCACTTCCTAA	58, 1.15	127	30	NM_001223
GAPDH	F:TGGTATCGTGGAAGGACTCAT R:GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC	53, 1.15	370	35	NM_002046

CURRICULUM VITAE

Name	Miss Siriprapa Khuajan
Date of birth	29 November, 1984

Education

1999-2003	High School at Phadungpanya School, TAK, Thailand
2003-2006	B.Sc. (Biology), Faculty of Science, Nareasuan University, Phitsanulok, Thailand

Presentation

2009	**สิริประภา เครือจันทร์**, นวรัตน์ วิริยะเขษม, รุจิเรข ไชยวงษา, ปรัชญา คงทวีเลิศ, วิชัย ริ้วตระกูล, ศิริวรรณ องค์ไชย "การแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 ในเซลล์เชื้อสายของเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อที่ถูกชักนำด้วยไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ถูกยับยั้งโดยสาร *cis*-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-{(E)- 2''', 4''', 5'''-trimethoxylstyryl}-

cyclohex-1-ene" การนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3 ประจำปี 2552 ณ อาคาร 70 ปี แม่โจ้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่, 2552 (นำเสนอผลงานแบบบรรยาย)

2009 **Siriprapa Khuajan**, Nawarat Viriyakhasem, Rujirek Chaiwongsa, Phorani Boonsing, Prachya Kongtawelert, Vichai Reutrakul and Siriwan Ong-chai. "Lipopolysaccharide-induced hyaluronan synthase 2 gene expression in a Human Synovial fibroblasts Cell line was inhibited by *cis*-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-{(E)- 2''', 4''', 5'''-trimethoxylstyryl}-cyclohex-1-ene." The 9th Annual Biochemical Research meeting. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand, October 8-9, 2009. (oral presentation)

2009 **Siriprapa Khuajan**, Prachya Kongtawelert, Vichai Reutrakul and Siriwan Ong-chai. "Effect of Lipopolysaccharide on Gene Expression of Hyaluronan Synthase and Hyaluronidase in SW982 Synovial Sarcoma and Primary Human Synovial Fibroblasts" PERCH-CIC Congress VI. Thailand, May 3-6, 2009 (poster presentation)

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นางสาวสิริประภา เครือจันทร์

ได้เข้าร่วมการประชุมเชิงวิชาการ

เสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ ๓

ขอให้มีความสุข ความเจริญ และประสบความสำเร็จในหน้าที่การงานสืบไป

ให้ไว้ ณ วันพุธที่ ๑๙ สิงหาคม ๒๕๕๒

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

Figure 34. Oral presentation at Maejo University. **สิริประภา เครือจันทร์**, นวรัตน์ วิริยะเขษม, รุจิเรข ไชยวงษา, ปรัชญา คงทวีเลิศ, วิชัย ริ้วตระกูล, ศิริวรรณ องค์ไชย "การแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 ในเซลล์เชื้อสายของเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อที่ถูกชักนำด้วยไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ถูกยับยั้งโดยสาร *cis*-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-{(E)- 2''', 4''', 5'''-trimethoxylstyryl}-cyclohex-1-ene" การนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3 ประจำปี 2552 ณ อาคาร 70 ปี แม่โจ้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่, 19 สิงหาคม พ.ศ. 2552

ที่ ศธ 0523.21/ 7264

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย
จังหวัดเชียงใหม่ 50290

26 ตุลาคม 2552

เรื่อง ตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัย

เรียน นางสาวสิริประภา เครือจันทร์

ตามที่สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ (ชื่อเดิม สำนักงานบัณฑิตศึกษา) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้จัดให้มีการประชุมวิชาการ "การเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3" ในวันพุธที่ 19 สิงหาคม 2552 ณ ห้อง 201/1 อาคาร 70 ปี แม่โจ้ สร้างปัญญาเพื่อแผ่นดิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งท่านได้นำเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อเรื่อง "การแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 ในเซลล์เชื้อสายของเซลล์สร้างเส้นไยในไขข้อที่ถูกชักนำด้วยไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ถูกยับยั้งโดยสาร cis-3-(2', 4', 5'-Trimethoxyphenyl)-4-{(E) -2"";4"",5""-trimethoxystyryl}-cyclohex-1-ene" นั้น

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ ขอแจ้งตอบรับการเสนอผลงานวิจัยของท่านในหัวข้อดังกล่าว โดยนำเสนอในรูปแบบบรรยาย ทั้งนี้ สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการจะดำเนินการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในรายงานการประชุม (Proceeding) ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรินทร์ ทองวิทยา)
กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการบัณฑิตศึกษา ปฏิบัติราชการแทน
ประธานคณะกรรมการบัณฑิตศึกษา

โทรศัพท์ 0 5387 3557
โทรสาร 0 5349 8133

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มอบเกียรติบัตรนี้ เพื่อประกาศเกียรติคุณ

นางสาวสิริประภา เครือจันทร์

เป็นผู้นำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า (Oral Presentation)

ในการประชุมวิชาการสัมมนาการวิจัยทางชีวเคมีประจำปี ครั้งที่ 9 ปี 2552

Lipopolysaccharide-induced hyaluronan synthase 2 gene expression in human synovial fibroblast cell line was inhibited by cis-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-{(E)-2'".4'",5'"-trimethoxystyryl}-cyclohex-1-ene

ให้ไว้ ณ วันที่ 9 ตุลาคม 2552

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล)
หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี

Figure 35. Oral presentation at Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. **Siriprapa Khuajan**, Nawarat Viriyakhasem, Rujirek Chaiwongsa, Phorani Boonsing, Prachya Kongtawelert, Vichai Reutrakul and Siriwan Ong-chai. "Lipopolysaccharide-induced hyaluronan synthase 2 gene expression in a Human Synovial fibroblasts Cell line was inhibited by *cis*-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-{(E)- 2'", 4'", 5'"-trimethoxylstyryl}-cyclohex-1-ene." The 9th Annual Biochemical Research meeting. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand, October 8-9, 2009.

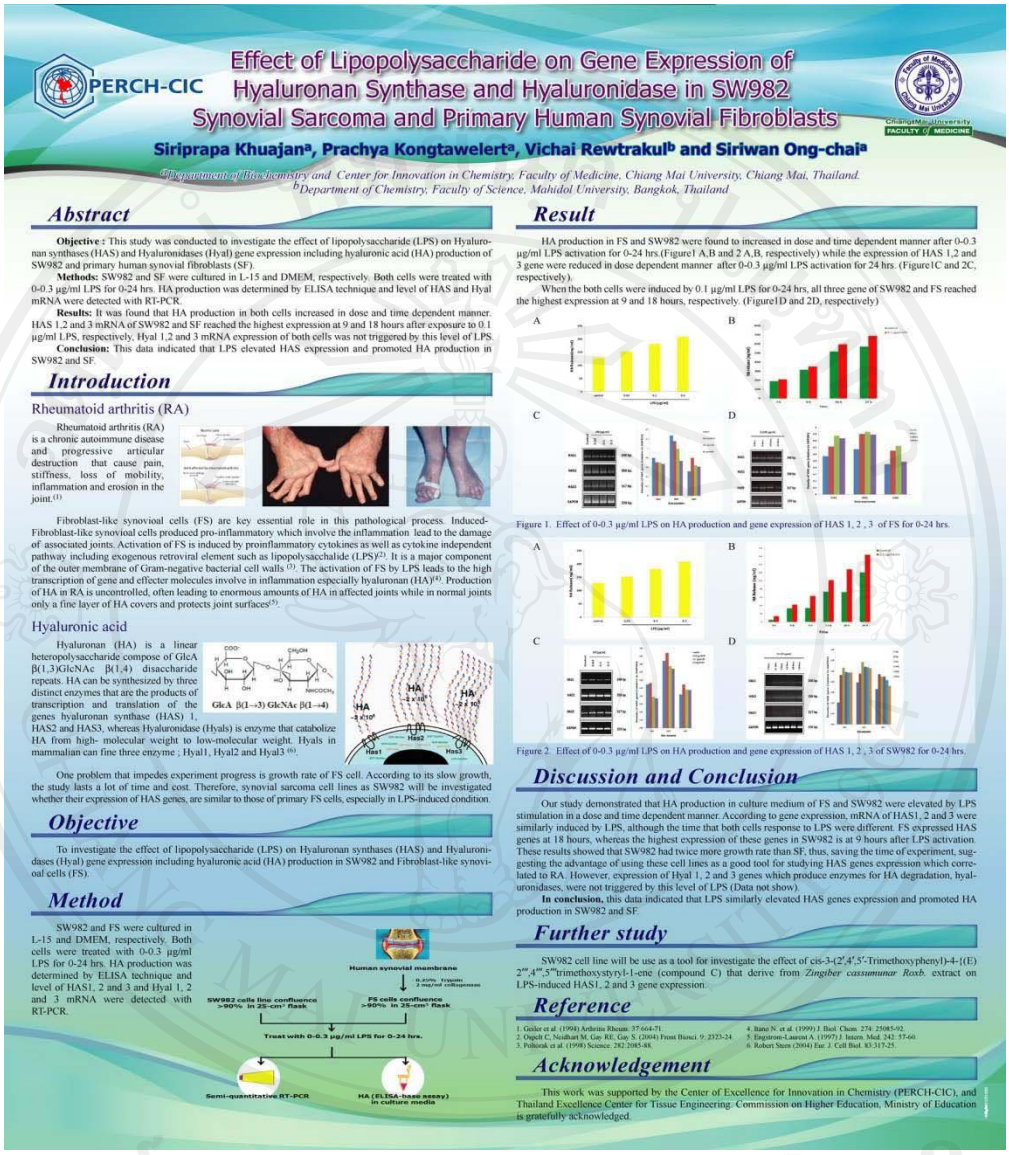

Figure 36. Poster presentation at PERCH-CIC. Siriprapa Khuajan, Prachya Kongtawelert, Vichai Reutrakul and Siriwan Ong-chai. "Effect of Lipopolysaccharide on Gene Expression of Hyaluronan Synthase and Hyaluronidase in SW982 Synovial Sarcoma and Primary Human Synovial fibroblasts" PERCH-CIC Congress VI. Thailand, May 3-6, 2009.