รหัสโครงการ SUT1-104-51-36-27

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดวิธีใหม่ เพื่อการรักษามะเร็งเต้านม

(Development a New Gene Therapy Technology for Breast Cancer Treatment)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-51-36-27

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดวิธีใหม่ เพื่อการรักษามะเร็งเต้านม

(Development a New Gene Therapy Technology for Breast Cancer Treatment)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม

นางดวงนภา เดชจุ้ย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้จากความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้ร่วมวิจัย 2 ท่านคือ อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม และ นางดวงนภา เดชจุ้ย ซึ่งหัวหน้าโครงการขอขอบคุณท่านทั้งสองไว้ ณ โอกาสนี้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยส่วนรวม และ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกต่างๆทั้ง น้ำ ไฟ สถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการประเมินงานวิจัยและบุคคลอื่นๆซึ่งไม่อาจกล่าวได้หมดในโอกาสนี้ สำหรับการสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ
หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

วิมส์ทูเมอร์วัน หรือ เรียกโดยย่อว่า ดับบลิวทีวันยีน เป็นยีนที่พบว่ามีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งยีนดังกล่าวมีบทบาทเป็นยีนก่อมะเร็งในเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นหาวิธีเพื่อลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวและการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเต้านมตายแบบ apoptosis ด้วยการใช้เทคนิคเอสไออาร์เอ็นเอ โดยการแยกโคลนเอสไออาร์เอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนดับบลิวทีวัน และเอสไอาร์เอ็นเอควบคุม เข้าสู่พาหะชนิดเลนติไวรัสซึ่งมียีนเรืองแสง GFP จากนั้นทำการสร้างอนุภาคเลนติไวรัสเพื่อนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ขั้นถัดไปเซลล์ที่เรืองแสงทั้ง 2 กลุ่มคือ MCF-7/siRNA-WT1cells and MCF-7/siRNA จะถูกคัดแยกออกจากเซลล์ที่ไม่เรืองแสงด้วยเครื่อง flow cytometry and cell sorter จากนั้นเซลล์ที่เรืองแสงจะถูกนำไปวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนและโปรตีนของ ดับบลิวทีวัน การเจริญเติบและการตายของเซลล์รวมทั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนอื่นๆ จากการทดลองพบว่าโครงการนี้ประสบความสำเร็จในการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนบลิวทีวัน นอกจากนี้ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมสามารถถูกยับยั้งได้โดยดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นเอ โดยถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ถึง 60% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และ ประมาณ 90% เมื่อเวลาการทดสอบผ่านไป 72 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้รับดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นเอหรือกลุ่มควบคุม ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ จากนั้นนี้ดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis โดยการกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ caspase 3/7 สูงขึ้นประมาณ 6 เท่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้ได้รับการยืนยันจากการศึกษา apoptosis ด้วยกาย้อมสีเซลล์ MCF-7/siRNA-WT1cells and MCF-7/siRNA ด้วย annxin V และ propidium iodide (PI) เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry ซ่งพบว่า ดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นเอ สามารถกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จริงโดยพบการตายช่วงแรกของการตายแบบ apoptosis ประมาณ 51%, 69% และ 78% ที่เวลา 24, 48, and 72 ชั่งโมงหลังได้รับดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็น นอกจากนี้ยังพบการตายระยะท้ายของการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการทดสอบเพิ่มขึ้นอีกด้วย การทดลองเป็นผลไปในทางเดียวกับการทดลองถัดไปที่พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้รับดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นเอจะมีการแสดงออกของโปรตีนบีซีแอล 2 ลดลง โดยลดลงประมาณ 9 เท่าหลังได้รับ ดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นเอ จากผลการทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าดับบลิวทีวันเอสไอาร์เอ็นเอมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ คุณค่าและประโยชน์ของการวิจัยนี้ได้แก่การได้ค้นพบองค์ความรู้ใหม่ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและคุณค่าในการนำองค์ความรู้นี้สู่การพัฒนาเป็นวิธีการรักษาโรคมะเร็งเต้านมด้วยเทคโนโลยียีนบำบัดต่อไปในอนาคต

Abstract

Wilms' tumor 1 (WT1) has been found to overexpress in breast cancer cells. It plays a critical role as an oncogene in several types of cancers. Therefore, down regulation of *WT1* mRNA transcripts and induction of apoptosis in breast cancer cells are major objects of our work. The siRNA-WT1 was cloned into the backbone of lentiviral vector containing GFP reporter gene. Lentiviral particles were produced by calcium chloride precipitation method. Viral particles were then infected into MCF-7 breast cancer cell line. The MCF-7/siRNA-WT1cells and MCF-7/siRNA control cells were then separately sorted and harvested at specific time points. The GFP^+ sorted cells were then subjected for the expression of *WT1* gene and WT1 protein determination. In addition, the sorted cells were further applied to growth/dead, apoptosis and other genes and proteins analysis. The resulted demonstrated the achievement of down regulation of WT1 expression both mRNA and protein levels. In addition, our findings revealed that siRNA-WT1 could inhibit cancer cell growth more than 60% at 24 hours and nearly 90% at 72 hours and 96 hours post infection. Moreover, siRNA-WT1 could accelerate apoptosis of MCF-7 cells by activation of caspase-3/7 enzymes approximately 5 folds at 24 hours post-infection when compared with the control cells. To confirm the apoptosis induction effect of siRNA- WT1, the MCF-7/siRNA-WT1- GFP^+ cells and MCF-7/siRNA-GFP^+ control cells stained with annexin V and Propidium iodide (PI) prior to analyze by flow cytometry. The data revealed that siRNA-WT1 could induce early apoptosis around 51%, 69%, and 78% at 24, 48, and 72 hours post-infection, respectively. The late apoptosis was also increased as time depend manner also. Consistently with down-regulation of anti-apoptotic protein, BCL-2 in MCF-7/siRNA-WT1- GFP^+ cells which was inhibited around 9 folds at 96 hours post-infection. Altogether, these results suggested that the siRNA-WT1 has inhibitory effect on MCF-7 cells and activation effect of apoptosis on these cancer cells. The implications of these work are revealing the new knowledge and therapeutic value in breast cancer research and treatment using gene therapy technology in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ …….	ก
บทคัดย่อภาษาไทย ……..……	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ……..…….	ค
สารบัญ …….	ง
สารบัญภาพที่ …….	จ
คำอธิบายสัญลักษณ์……..……...	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ……..…….	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ……..……..	3
ขอบเขตของการวิจัย ……..…….	3
ข้อตกลงเบื้องต้น ……...……..……..	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย ……..……..……..…….	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีการทดลองเก็บข้อมูล ……..	4
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล ……..…….	8
บทที่ 3 ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล…….	9
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์ …….	19
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย …….	22
ข้อเสนอแนะ ……..	22
บรรณานุกรม ……..	23
ภาคผนวก ……..……..	25
ประวัติผู้วิจัย …….	26

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์ ……..	9
ภาพที่ 2 ผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *WT1* ……..……	11
ภาพที่ 3 ผลของ siRNA-WT1 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7..	13
ภาพที่ 4 ผลการกระตุ้นเซลล์ให้ตายแบบ apoptosis ของ siRNA-WT1 ต่อ MCF-7..	14
ภาพที่ 5 ผลการกระตุ้นการทำงานของ caspase 3/7 โดย siRNA-WT1 ใน MCF-7..	16
ภาพที่ 6 การแสดงออกของโปรตีน WT1, procaspase 7 และ BCL-2 ……..	18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์

BSA	=	bovine serum albumin
º C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary DNA
CO_2	=	carbon dioxide
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	=	fetal bovine serum
GFP	=	green fluorescence protein
g	=	gram
h	=	hour
mRNA	=	messenger RNA
PBS	=	phosphate buffer saline
PI	=	propidium iodide
RNA	=	ribonucleic acid
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
siRNA	=	small interference RNA
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
WT1	=	*Wilms' tumor* 1

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคมะเร็งเต้านม ถือเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับประเทศและระดับโลก มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในผู้ป่วยมะเร็งหญิง และเป็นสาเหตุการตายมากที่สุดอีกด้วย อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งพบผู้ป่วยหญิง 1 ใน 9 รายของผู้ป่วยหญิงทั้งหมด ซึ่งถือว่าเป็นอัตราส่วนที่มากพอสมควร โรคมะเร็งเต้านมที่เกิดขึ้นนี้มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น ความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งมียีนที่ก่อโรคมะเร็งเป็นตัวการสำคัญ หรือเกิดจากการที่ผู้ป่วยได้รับอาหารประจำวันประเภทไขมันมากจนเกินไป หรือเกิดจากฮอร์โมนผิดปกติ หรือน้ำหนักเกินมาตรฐาน โดยเฉพาะในผู้หญิงสูงวัยเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน ซึ่งจะทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคนี้สูงขึ้นอีก 1.5-2 เท่า จากการสำรวจพบว่า ผู้ป่วยหญิงที่มีอายุมากกว่า 30 ปีที่ยังไม่มีบุตร ป่วยเป็นโรคมะเร็งเต้านมประมาณ 30-70% แต่อย่างไรก็ตาม ในผู้หญิงที่มีอายุน้อยและมีบุตรจะมีอัตราเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งเต้านมน้อยกว่าผู้หญิงที่มีอายุมาก อีกประการหนึ่งการได้รับรังสี หรือผู้ที่เป็นโรคมะเร็งที่อวัยวะอื่นๆ อยู่ก่อนแล้วก็จะมีอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งเต้านมสูงขึ้นเช่นกัน (Pourpornpong, 2000) จากรายงานสรุปผลการสำรวจผู้ป่วยรายใหม่ที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและเข้ารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยสำรวจตั้งแต่ 1 มกราคม 2553-31 ธันวาคม 2553 พบผู้ป่วยรายใหม่เพศหญิง จำนวน 816 ราย และผู้ป่วยชาย จำนวน 5 ราย (Attasara & Buasom, 2011) ซึ่งถือว่าเพิ่มจำนวนขึ้นมากจากอดีต มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่เกิดจากการเจริญของเซลล์บริเวณเต้านมที่มากผิดปกติแบบไม่สามารถควบคุมได้ และพัฒนาจากการที่เซลล์ที่มีลักษณะเป็นลอน (lobule) ที่เป็นต่อมผลิตน้ำนม หรือท่อที่ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของน้ำนมจากเซลล์ lobules ไปยังหัวนม ในการค้นพบล่าสุด มะเร็งเต้านมสามารถมีจุดเริ่มต้นเกิดจากเนื้อเยื่อ stromal เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด fatty connective tissue และ fibrous connective tissue ในมะเร็งเต้านม และในปี 2009 ในสหรัฐอเมริกา พบผู้ป่วยหญิงที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเต้านมจำนวน 192370 ราย ในขณะที่พบในเพศชายน้อยกว่า 1% และอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ลดลงจากปี 1990 อันเนื่องมาจากมีการพัฒนาวิธีการรักษา และการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ตรวจพบในระยะเริ่มแรก มีการตรวจคัดกรอง และมีการเพิ่มการดูแลรักษาสุขภาพกันมากขึ้น อย่างไรก็ตาม มีผู้ป่วยหญิงที่ตายด้วยโรคมะเร็งเต้านมในปี 2009 ประมาณ 40,000 ราย ("What is breast cancer?," 2009)

มีการศึกษาพบว่ายีน *WT1* เป็นยีนที่สามารถก่อมะเร็งได้และพบในปริมาณสูงในเซลล์มะเร็งหลายชนิด โปรตีน WT1 เป็น transcription factor มีลักษณะโครงสร้างเป็น zing finger

จำนวน 4 ลูป เพื่อเกาะกับ DNA ที่เกี่ยวข้อง ในปัจจุบันมีการใช้ การแสดงออกของยีน *WT1* เป็นตัวชี้วัดการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งเต้านมด้วย โปรตีน WT1 ในบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และการตายของเซลล์ (Lee & Haber, 2001) มีการค้นพบว่ามีการแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับสูงกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 30-90 ของมะเร็งเต้านม ในขณะที่เซลล์ปกติมีการแสดงออกของยีน *WT1* น้อยมาก ดังนั้นจึงมีการใช้การแสดงออกของยีน *WT1* เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคมะเร็งเต้านม (Loeb et al., 2001; Miyoshi et al., 2002; Nakatsuka et al., 2006) นอกจากนี้โปรตีน WT1 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *c-myc* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และพบว่า *WT1* มีหลาย isoform แต่มีรายงานว่า *WT1(-KTS)* และ *WT1(+KTS)* สามารถกระตุ้น *c-myc* ได้ (Han, San-Marina, Liu, & Minden, 2004) ทำให้ *WT1* มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคมะเร็งได้ (Han et al., 2004; Oji et al., 1999; Zapata-Benavides, Tuna, Lopez-Berestein, & Tari, 2002) นอกจากนี้มีการศึกษาการลดการแสดงออกของยีน *WT1* สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหยุดการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ดังกล่าวได้ ซึ่งการทดสอบนี้ให้ผลแบบเดียวกันทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* (Algar et al., 1996; Smith, Down, Boyd, & Li, 2000; Yamagami et al., 1996)

ปัญหาการรักษามะเร็งเต้านมที่สำคัญในปัจจุบัน ได้แก่ การที่ต้องใช้ยาเคมีบำบัด เป็นหลักในการรักษาผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์มะเร็งในร่างกายผู้ป่วยเหลือน้อยที่สุดในขณะที่เซลล์อื่นๆสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งการให้ยาเคมีบำบัดก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมากมาย โดยเฉพาะในรายที่โรคมีความรุนแรงและผู้ป่วยมีอายุน้อยมากๆ ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยาเคมีบำบัดที่ใช้ยังมีราคาแพงและสามารถเกิดปัญหาการดื้อยาได้บ่อยและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด จากความรุนแรงของปัญหาดังกล่าว ทำให้มีความพยายามคิดค้นหาวิธีการรักษาใหม่ๆเพื่อลดผล ข้างเคียงของการรักษาและเพิ่มโอกาสในการหายขาดจากโรคมะเร็งดังกล่าว ซึ่งนอกจากการพัฒนาหายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ ทีมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูง (สามารถทำลายเฉพาะเซลล์มะเร็งโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ) ยังรวมถึงการนำเอาวิธีการรักษาใหม่ๆ เข้ามาร่วมในการรักษา โดยวิธีการรักษาแบบใหม่ ที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน ได้แก่ gene therapy และ immunotherapy เป็นต้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1* โดยใช้ siRNA technology และ lentiviral system ซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและจะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญในการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งเต้านมโดยเทคโนโลยียีนบำบัดต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ลายมะเร็งเต้านมโดยการลดการแสดงออกของยีน *WT1* ด้วย siRNA technology ทั้งในระดับเซลล์และระดับอณู ได้แก่ การแบ่งตัว และการเกิด apoptosis ของเซลล์

3. ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้จะลดการแสดงออกของยีน *WT1* โดยการใช้ siRNA technology และ Lentiviral vector system โดยการโคลน siRNA เข้าสู่ lentiviral vector จากนั้นนำ recombinant lentiviral vector ที่ได้ไปสร้างเป็นตัวไวรัสและนำเข้าสู่เซลล์ลายมะเร็งเต้านชนิด MCF-7 เพื่อทำการศึกษาผลของ siRNA-WT1 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมนี้ จากนั้นดูผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งทั้งในระดับเซลล์ เช่น apoptosis และระดับอณูของเซลล์เพื่อศึกษากลไก การทำงานของ siRNA-WT1 ในการยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม

4. ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์จากงานวิจัยนี้คือได้วิธีการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมวิธีใหม่คือวิธีการยับยั้งแสดงออกของยีน *WT1* โดยใช้ siRNA technology ร่วมกับ lentiviral vector system

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด complete DMEM (cDMEM) ซึ่งประกอบด้วย DMEM (Gibco: BRL) ที่เติม newborn calf serum ปริมาณ 10% (BIOCHROM AG) ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ penicillin (100U/ml) และ streptomycin (100 μg /ml) และทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 5% CO_2 ทำการเลี้ยงเซลล์ไว้จนกว่าจะใช้งาน จากนั้นเลี้ยงเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตไวรัส ซึ่งได้แก่เซลล์ 293T/17 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด cDMEM โดยในกระบวนการผลิตไวรัสนั้น อาหารเลี้ยงเซลล์จะต้องไม่เติมยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการรบกวนกระบวนการสร้างตัวไวรัส

2. การผลิตไวรัส การวัดปริมาณไวรัส และการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

ทำการผลิตเลนติไวรัส ด้วยวิธีการตกตะกอน plasmid ด้วยสารเคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำเอาพลาสมิดที่จะประกอบเป็นตัวไวรัสเข้าสู่เซลล์ผลิตไวรัส 293T/17 โดยสรุปอย่างย่อได้ดังนี้คือ ทำการเลี้ยงเซลล์ผลิตไวรัส 293T/17 ให้ได้ความหนาแนนประมาณ 90% ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm (CellStar: greiner bio-one) และจากนั้น ทำการ transfection พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ผลิตไวรัส โดยใช้ปริมาณพลาสมิด ดังนี้ พลาสมิดที่เป็น backbone ซึ่งเป็น siRNA control ปริมาณ 10 μg ซึ่งได้แก่ p201 (pPRIME-CMV-GFP-FFs) หรือพลาสมิดที่เป็น siRNA-WT1 ซึ่งมีความจำเพาะกับบริเวณ exon ที่ 8 ของยีน *WT1* จากนั้นเติมพลาสมิดที่ทำหน้าที่ประกอบเป็นอนุภาคไวรัส มี 3 ชนิด ได้แก่ pLP1 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถอดรหัสเป็นยีน gag และ polymerase ใช้ปริมาณ 6.5μg พลาสมิดชนิดที่ 2 ได้แก่ pLP2 ทำหน้าที่ถอดรหัสเป็น Rev ซึ่งเป็นตัวนำเอา siRNA ออกจากนิวเคลียส ใช้ปริมาณ 2.5 μg ส่วนพลาสมิดชนิดที่ 3 ได้แก่ pLPv ทำหน้าที่ถอดรหัสเป็น envelope เพื่อห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ใช้ปริมาณ 3.5 μg จากนั้นนำเอาเซลล์ 293T/17 ที่เติม plasmid mixed แล้วไปเข้าตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3% CO_2 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เข้าไป โดยไม่เติมยาปฏิชีวนะ เพื่อให้เซลล์ผลิตไวรัสออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการบ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส 10% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคไวรัสอยู่ แล้วกรองสิ่งปนเปื้อนด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นเติมสาร polybrene (Sigma: H9268) เข้าไปในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคไวรัสเพื่อให้มีความเข้มข้นของ polybrene สุดท้ายเป็น 16 μg/ml จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์นี้ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม เพื่อให้ไวรัส

infect เข้าไปในเซลล์มะเร็ง ทำการ transfection อนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มะเร็งที่ได้เลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ เป็นเวลา 2 วัน นำเอาเซลล์มะเร็งเต้านมที่ผ่านการ transduction แล้วมาตรวจหาปริมาณเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีเขียวของ GFP เพื่อคัดเลือกเซลล์มาทำการทดลองต่อไป

3. การคัดเลือกเซลล์

หลังจากการทำ viral transduction เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดแยกเซลล์ (sorting) มะเร็ง MCF-7 ที่ได้รับไวรัสเข้าไปภายในเซลล์ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียวของ green fluorescent protein (MCF-7-GFP^{+} cells) ด้วยการใช้เครื่อง FACs Vantage (BD bioscience) วิธีการ sorting ทำได้ดังนี้ คือ ทำการ trypsinization เซลล์ MCF-7 ที่มีการเรืองแสงด้วย 0.1% Trypsin-EDTA จากนั้นบ่มเป็นเวลา 5 นาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 10 ml และปั่นล้างเซลล์ที่ 1200 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไปและเติม PBS ก่อนนำเซลล์เข้าเครื่อง FACs Vantage เพื่อทำการแยกเอาเฉพาะ MCF-7-GFP^{+} cells ออกมาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับ MCF-7-GFP^{+-}cells ที่ได้รับ siRNA control เข้าเซลล์ จะเรียกว่า MCF-7-GFP^{+-}/siRNA control cells ส่วน MCF-7-GFP^{+} cells ที่ได้รับ siRNA-WT1 เข้าเซลล์ จะเรียกว่า MCF-7-GFP^{+-}/siRNA-WT1 cells

4. การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์

นำ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells หลังจาก sorting มาเลี้ยงต่อตามระยะเวลาที่กำหนดในการทดลอง ได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ตามระยะเวลา เพื่อนำมาทดสอบหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยการ trypsinize เซลล์ขึ้นมาด้วย 0.1% Trypsin-EDTA จากนั้นบ่มเป็นเวลา 5 นาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 10 ml และปั่นล้างเซลล์ที่ 1200 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต และเซลล์ที่ตายด้วย trypan blue exclusion method เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่นั้นจะไม่ติดสี ทำการนับจำนวน และคำนวณออกมาเป็นปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร จะได้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตและเซลล์ที่ตายจากการได้รับไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วย siRNA-WT1 จากนั้นทำการตรวจสอบการเจริญของเซลล์ด้วยการใช้ชุดทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือ MTS assay (CellTiter 96 Aqueous One solution reagent (Promega) ซึ่งจะเติมสารดังกล่าวลงไป ปริมาณ 20 µl ในสารละลายเซลล์ที่มีเซลล์อยู่ 10000 cells ใน 100 µl อาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำเอาเซลล์ดังกล่าวไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเซลล์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 10% SDS ลงไป 25 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำเอาเซลล์ไปวัดค่า

การดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490/620 nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและวิเคราะห์เป็นอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

5. การตรวจสอบการตายของเซลล์ โดยวัดจากการทำงานของเอนไซม์ caspase 3/7

นำ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่เลี้ยงเป็นเวลาต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดการตาย แบบ apoptosis ของเซลล์ ด้วยการใช้หลักการตรวจหา caspase 3/7 activity โดยการใช้ชุดทดสอบ Caspase-Glo 3/7 reagent (Promega) โดยมีวิธีการแบบย่อ ๆ ดังนี้ เตรียม cell suspension ปริมาณ 100 µl ที่มีเซลล์ 10000 cells ใน 96 well plate จากนั้นเติมสาร Caspase-Glo 3/7 reagent ปริมาณ 100 µl และทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเซลล์ จากนั้นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง luminometer ที่ความยาวคลื่น $485_{Ex}/527_{Em}$ nm และบันทึกค่าดังกล่าวไว้เพื่อนำมาวิเคราะห์ caspase 3/7 activity ต่อไป

6. การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย Annexin V-FITC/Propidium iodide (PI) เพื่อวิเคราะห์ด้วย วิธี Flow cytometry

ตรวจสอบ apoptosis ของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่เลี้ยงเป็นเวลาต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ด้วยการย้อมติดแอนติบอดี annexin V-FITC โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) โดยปั่นล้างเซลล์ MCF-7-GFP^{+} จำนวน 100,000 cells ด้วย PBS และทำการเติม 1X buffer ลงไป 100 µl จากนั้นเติม annexin V-FITC ลงไป 5 µl และเติม Propidium iodide อีก 5 µl ลงไปในหลอดทดลองขนาด 5 ml จากนั้นทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสง เมื่อครบเวลาก็นำหลอดทดลองมาเติม 1X buffer อีก 400 µl และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry เซลล์ที่ย้อมติดแอนติบอดี annexin V-FITC จะถูกบ่งชี้ว่าเป็น apoptotic cells

7. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *WT1* ด้วยวิธี RT-PCR

นำเซลล์ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่เลี้ยงเป็นเวลาระยะต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง มาสกัด total RNA ด้วย Total RNA mini kit (geneaid) จากนั้นตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ด้วยกระบวนการ reverses transcription โดยใช้ reaction mixed ดังนี้ 1 X RT buffer, 0.83 mM dNTPs mix, 2.08 pmole reverse primer, 100 unit of reverse transcriptase, 700 ng of RNA template และปรับปริมาตรสุดท้ายของสารเป็น 24 µl ด้วยน้ำ

diethylpyrocarbonate- treated (DEPC) จากนั้นทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 95 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ใช้ใน PCR โดย PCR reaction mixed ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs mix, 2 mM MgCl2, 0.2 pmole reverse primer (WT1 R: 5'-TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTT-3' or GAPDH R: 5'GTACTCAGC GGCCAGCATCG-3'), 0.4 pmole forword primer (WT1 F: 5'-AGACATACAGGTGT GAAACC-3' or GAPDH F: 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'), 1 unit of Taq DNA polymerase, 10.0 µl cDNA from reverse transcription step and RNase/DNase free water ปรับให้เป็น 25 µl/reaction จากนั้นเซตค่าอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ทำปฏิกริยา ดังนี้ 95°C for 5 minutes จากนั้น 40 cycles ที่ 95°C for 1 minute, 51°C for 30 second สำหรับ WT1 และ 60°C สำหรับ GAPDH , 72°C for 45 second ตามด้วย 72°C for 5 minutes จากนั้นเก็บ PCR Product ไว้และนำไปแยกขนาดด้วยวิธีกระแสไฟฟ้า บน agarose gel เข้มข้น 1.5% และตรวจดู PCR Product ด้วยการย้อมด้วย ethidium bromide

8. การวิเคราะห์การแสดงอองของโปรตีน ด้วยวิธี Western blot analysis

นำเซลล์ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่เลี้ยงเป็นเวลาระยะต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง มาสกัดโปรตีนด้วยชุดสกัดโปรตีน CelLytic M cell lysis reagent (Sigma) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นที่ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนตามที่ต้องการ และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (Sigma) และใช้เครื่อง nanodrop เป็นเครื่องตรวจวัด โปรตีนปริมาณ 20 µg ถูกแบ่งออกมาเพื่อนำมาต้มในน้ำเดือดร่วมกัน sample buffer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการหยดสารละลายโปรตีนลงใน SDS-PAGE และทำการแยกขนาดของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V, 70 mAmp เป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้ายโมเลกุลของโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF (Whatman) ด้วยสารละลาย blotting buffer ที่ประกอบด้วย 25 mM Trizma base, 192 mM glycine และ 20% Methanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ block แผ่นเมมเบรนด้วย 5% skim milk ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วย 1% skim milk จำนวน 3 ครั้ง และนำเอาแผ่นเมมเบรนไปแช่ใน primary antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่เราต้องการจะตรวจสอบ (anti-WT1: C19, anti-BCL2: sc-509, anti-Caspase 7: C7724, anti-actin: H-196) ที่อุณหภูมิห้องโดยการเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย 1% skim milk และนำปฏิกิริยากับ secondary antibody ที่มีความจำเพาะกับ primary antibody อีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแอนติบอดีที่เหลือด้วย TPBS จากนั้นนำเอาเมมเบรนที่เตรียมได้ไปทำปฏิกริยากับ Super Signal Pico-chemiluminescent เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารดังกล่าวออก และนำแผ่นเมมเบรนที่ได้ไป

ประกบกับฟิล์มในห้องมืด แสง chemiluminescence จะทำให้เห็นโปรตีนที่เราศึกษาบนแผ่นฟิล์มนั้น ๆ

9. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

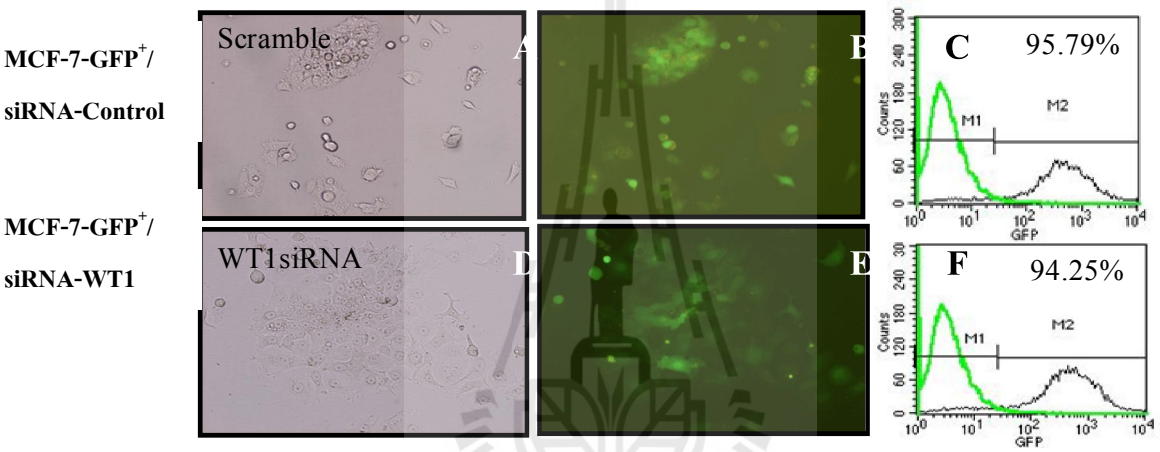
ในการศึกษานี้ได้ใช้ Student's t-test ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดย statistical software SPSS17.0 ซึ่งถือว่าข้อมูลใดๆมีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และทุกข้อมูลถูกแสดงผลเป็น mean ± standard deviation

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. **การลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วย siRNA-WT1** จากการ sorting เพื่อคัดแยก MCF-7-GFP^{+} พบว่าได้ปริมาณ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells เท่ากับ 95.79% และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells เท่ากับ 94.25% (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่า วิธีการ sorting ด้วยเครื่อง flow cyt0meter FACs vantage เป็นวิธีการคัดแยกเซลล์ที่มีประสิทธิภาพ



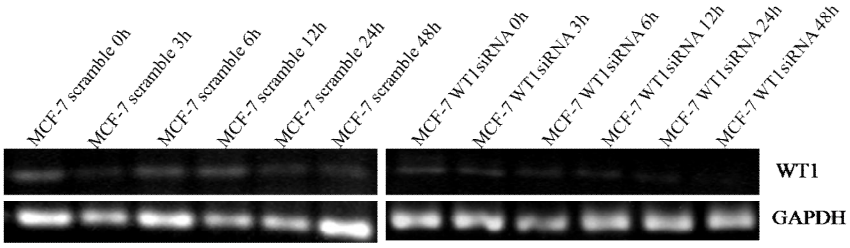
ภาพที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control หลังจากผ่านการคัดเลือกด้วยวิธีการ cell sorting (A-B) แสดงภาพ phase contranst และ fluorescence ของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ตามลำดับ (C) แสดง histogram ของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells จากการนำเอาเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ GFP positive cells ด้วยเครื่อง flow cytometry (D-E) แสดงภาพ phase contranst และ fluorescence ของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells ตามลำดับ (F) แสดง histogram ของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-control cells จากการนำเอาเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ GFP positive cells ด้วยเครื่อง flow cytometry

2. การลดการแสดงออกของยีน *WT1* หลังจากทดสอบด้วย siRNA-WT1

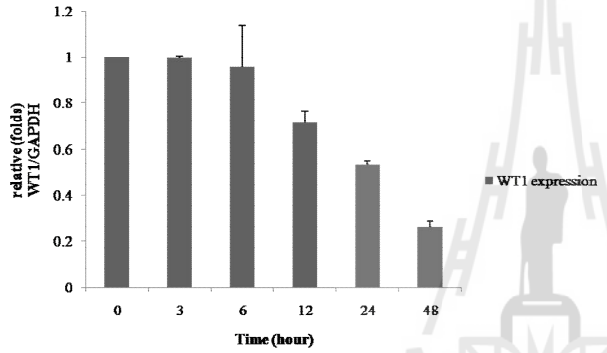
จากที่ได้ทราบมาแล้วว่า siRNA มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับของ siRNA นั้น ๆ เพราะฉะนั้นในการใช้ siRNA-WT1 จึงต้องพิสูจน์ว่ายีน WT1 ถูกลดการแสดงออกลงด้วยจริง ในการทดลอง ใช้ siRNA-WT1เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม และศึกษาผลของ siRNA-WT1 นั้น ๆ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ต่อไปเรื่อย ๆ พบว่า ยีน *WT1* ถูกลดการแสดงออกลงประมาณ 20% , 40%, และ 70% เมื่อเวลาผ่านไป 12, 24, และ 48 ชั่วโมงของการทดสอบ (ภาพที่ 2A และ 2B) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ siRNA-WT1นั้นมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุมนั้นยังคงมีการแสดงออกของยีน *WT1* อยู่ แม้ว่าเวลาจะเพิ่มขึ้นก็ตาม จากผลที่ปรากฏขึ้นนี้ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมถูกยับยั้งการเจริญเติบโต และพร้อมกันนั้นเซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis ด้วย เพราะฉะนั้นบทบาทหน้าที่ของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งก็คือการควบคุมการเจริญของเซลล์เป็นหลัก และ siRNA-WT1นี้มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับยีน *WT1* ตรงตำแหน่ง exon ที่ 8 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ zing fingers จึงได้ส่งผลโดยตรงต่อการยับยั้ง หน้าที่ในการเกาะกับ DNA เพื่อการ transcription ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้อง ซึ่งส่วนใหญ่ก็คือยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตนั่นเอง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโครงการนี้ประสบความสำเร็จในการลดการแสดงออกของยีน *WT1* ด้วย siRNA-WT1 โดยใช้ lentiviral system

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A



B

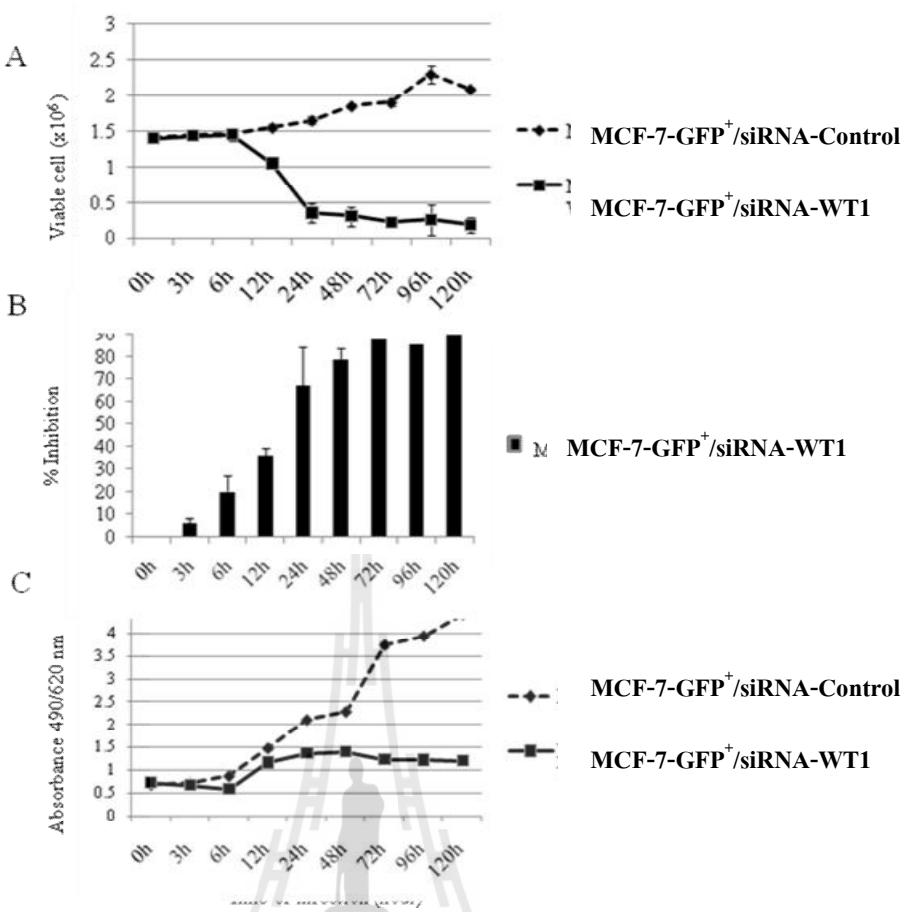


ภาพที่ 2 ผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *WT1* โดยใช้ siRNA-WT1ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งก็คือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการทำ lentiviral transduction ด้วย control siRNA และ กลุ่มทดสอบที่ใช้ SiRNA-WT1ในการ transduction หลังจากการทดสอบเซลล์ถูกเลี้ยงต่อเป็นเวลาตามที่กำหนด 0, 3, 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง เซลล์ถูกเก็บเกี่ยวและปั่นล้างตกตะกอนเซลล์ จากนั้นก็ทำการสกัดเอา total mRNA ออกมา และทำการเปลี่ยนให้เป็น cDNA และใช้ cDNA เป็น template ในการทำ RT-PCR และ (ภาพ A) ยีน *WT1* ที่เพิ่มจำนวนขึ้นถูกแยกบน agarose ที่ความเข้มข้น 1% ในการทดลองนี้ใช้ยีน *GAPDH* เป็นตัวควบคุมภายใน (ภาพ B) กราฟแสดงความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน *WT1* ต่อการแสดงออกของยีนควบคุม *GAPDH*

3. ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วย siRNA-WT1

เมื่อได้ MCF-7-GFP^{+-}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ตามต้องการแล้ว นำเอาเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงเป็นเวลาระยะต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจสอบหาการรอดชีวิตของเซลล์พบว่า MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells มีอัตราการตายมากขึ้นหรือรอดชีวิตน้อยลงเมื่อเลี้ยงเซลล์นานขึ้น (ภาพที่ 3) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดสอบเป็นต้นไป เซลล์รอดชีวิตลดจำนวนลงมากกว่า 3 เท่าจากเวลาเริ่มต้น ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับการ transduce ด้วย siRNA control ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 3A) แสดงให้เห็นว่า siRNA-WT1 มีผลลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ใช้ในการทดสอบได้ และจากการคำนวณหาร้อยละของอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโต พบว่าค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วย siRNA-WT1 มีค่าสูงขึ้นตามลำดับเวลา และสูงเกือบ 90% เมื่อเวลา 72 ชั่วโมงเป็นต้นไป ดังภาพที่ 3B และเพื่อเป็นการยืนยันผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงได้ทำการทดลองตรวจสอบค่าการเจริญเติบโตด้วยชุดทดสอบการเจริญ เติบโตและวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 490/620 nmพบว่า ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในกลุ่ม MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells มีความคงที่ ซึ่งเป็นผลมาจากการถูกยับยั้งการเจริญเติบโต ในขณะที่ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณเซลล์ที่เจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อย ๆ (ภาพที่ 3C) แสดงให้เห็นว่า siRNA-WT1 มีผลต่อการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้จริงเมื่อเทียบกับ control

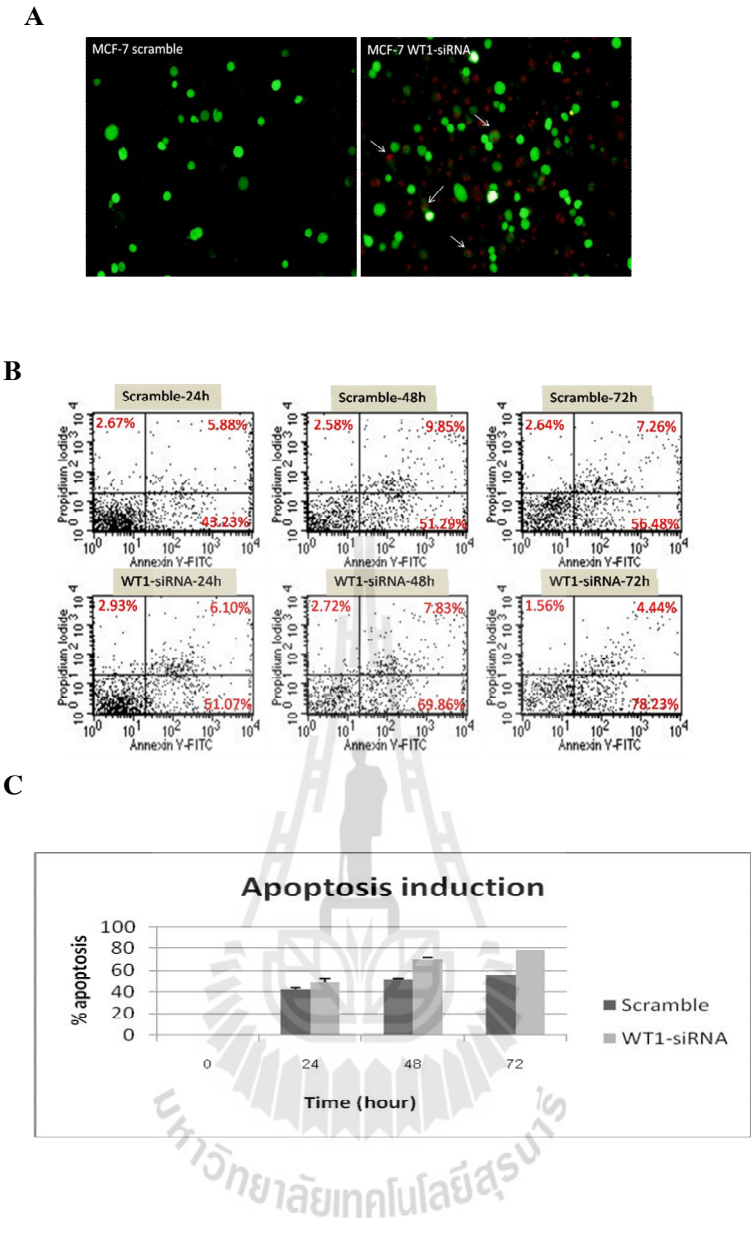
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 3 ผลของ siRNA-WT1 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เซลล์ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่เลี้ยงเป็นเวลาระยะต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง (A) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่นับด้วย trypan blue exclusion method (B) ค่าร้อยละของการถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ซึ่งคำนวณได้จากร้อยละของเซลล์ตั้งต้น และเซลล์รอดชีวิตคงเหลือในแต่ละช่วงเวลา (C) เป็นค่าการดูดกลืนแสงซึ่งได้จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่านการผลิต formasarn ในกระบวนการของเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอด จากชุดตรวจสอบการเจริญของเซลล์ (MTS assay)

4. การกระตุ้นการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านมด้วย siRNA-WT1

กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis นั้น เกิดขึ้นจากการถูกกระตุ้นด้วยสารบางชนิด ที่สามารถจับกับตัวรับ และกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่านโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องมาเป็นลำดับ โดยแบ่งเส้นทางการกระตุ้นเป็น 2 เส้นทาง คือ intrinsic และ extrinsic pathway ขึ้นกับตัวกระตุ้น เซลล์จะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิด apoptosis เช่น มีการเหี่ยวลง ขนาดเล็กลง เกิด DNA condensation เกิดการพลิกกลับของผนังเซลล์จากด้านในออกมาด้านนอก ทำให้สามารถใช้หลักการนี้ในการตรวจหาเซลล์ apoptosis ได้ โดยจะมีโมเลกุลบนผนังเซลล์ที่เรียกว่า phosphatidylserine ซึ่งปกติจะอยู่ที่ผนังเซลล์ด้านใน จะถูกย้ายออกมาอยู่ที่ผนังเซลล์ด้านนอก ให้เพื่อทำการตรวจเช็คผลของ siRNA-WT1ต่อการกระตุ้นการตายของเซลล์ และให้เห็นระยะของเซลล์ที่ตายว่าเซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis ในระยะใด เราได้ทำการทดสอบด้วยการย้อมสี แอนติบอดี annexin V-FITC และ propidium iodide โดยที่ annexin V จะทำปฏิกิริยาเกาะกับ โมเลกุลของ phosphatidylserine และ propidium iodide จะแทรกเข้าไปในเซลล์และไปติดสี DNA ที่เมื่อเกิด apoptosis แล้วจะเกิด DNA fragmentation ด้วย โดยการแบ่งแยกเซลล์ที่ติดสีเขียวของ anexin จะเป็นเซลล์ในกลุ่ม early apoptosis ส่วนเซลล์ที่ติดทั้งสองสี ทั้ง สีเขียวของ annexin V และ สีแดงของ Propidium iodide ก็จัดให้เป็นเซลล์กลุ่ม late apoptosis จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีทั้งสองตัวแล้ว นำเอาเซลล์ที่ผ่านการย้อมไปส่องด้วยกล้อง fluorescence จะพบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วย siRNA-WT1ที่ติดสีทั้งเขียวและแดง ซึ่งก็คือเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis นั่นเอง (รูปภาพ 4) จากนั้นเมื่อนำเซลล์ที่ย้อมเสร็จไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้ตายเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มที่ทดสอบด้วย siRNA-WT1โดยเพิ่มจาก 51% เป็น 69% และเป็น 78% ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุม (scramble control) ก็พบการตายของเซลล์ แต่ไม่มากเท่ากลุ่มทดสอบ คือมีการตายของเซลล์จากเริ่มแรก 43% เป็น 51% และเป็น 56% เมื่อเวลาในการเลือกเซลล์มาทดสอบเป็น 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองใช้ siRNA-WT1ในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ให้ตายแบบ apoptosis นั่นก็พอจะสรุปได้ว่า กระบวนการกระตุ้นด้วย siRNA-WT1ทำให้เซลล์เกิด apoptosis ซึ่งตรวจพบทั้งทางด้านกายภาพคือการที่เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง และคุณสมบัติของผิวเซลล์ และในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่เอนไซม์ caspase เป็นต้น

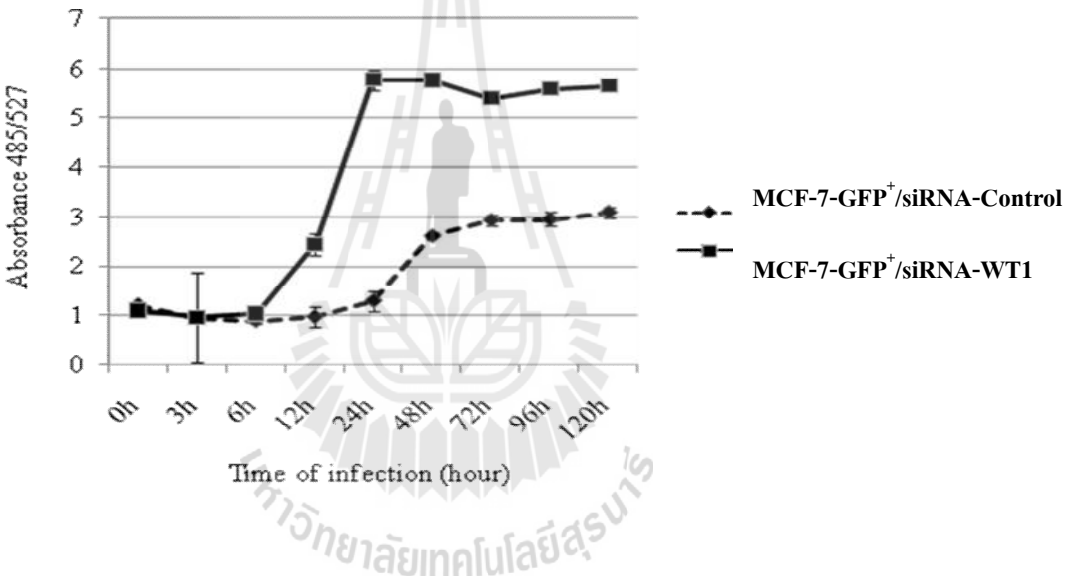


ภาพที่ 4 การวิเคราะห์การตายแบบ Apoptosis ของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วย วิธี Flow Cytometry

(ภาพ A) แสดงให้เห็นภาพของเซลล์หลังจากย้อมด้วย anexin V-FITC และ PI ซึ่งถ่ายด้วยกล้อง fluorescence ที่กำลังขยาย 40 เท่า ภาพด้านซ้ายมือจะเป็นภาพของเซลล์ MCF-7 ในกลุ่มควบคุม และภาพด้านขวามือจะเป็นภาพของ MCF-7 ในกลุ่มที่ทดสอบด้วย siRNA-WT1ซึ่งจะพบว่าในกลุ่มทดสอบมีการติดสีของ PI อยู่ด้วย แสดงให้เห็นภาวะที่ถูกกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (ภาพ B) แสดงภาพ dot plot หลังจากเซลล์ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry แกนทั้งสองถูกแทนด้วยปริมาณเซลล์ที่ย้อมติดสีของ anexin V และ PI แต่ละจุดแทนเซลล์ 1 เซลล์ จะพบว่า ปริมาณเซลล์ที่เป็น apoptotic cells จะเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มทดสอบ (ภาพ C) แสดงให้เห็นถึงการแปรผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF-7 ที่ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis ด้วย SiRNA-WT1 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม พบว่า SiRNA-WT1 กระตุ้นให้เซลล์ตายได้ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

5. ผลการกระตุ้นการทำงานของ caspase 3/7 โดย siRNA-WT1 ใน MCF-7

เอนไซม์ caspase 3 และ 7 เป็นเอนไซม์ในกระบวนการเกิด apoptosis ของเซลล์ ซึ่งหากพบการแสดงออกของเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้นแสดงว่าเซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis นั่นเอง จากผลการศึกษาการตายแบบ apoptosis ของ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ด้วยการตรวจวัด caspase 3/7 activity เมื่อมี caspase 3/7 activity มากก็จะให้ผลการปลดปล่อยแสง luminescence สูง ซึ่งหมายถึงมีการตายของเซลล์แบบ apoptosis สูงนั่นเอง จากการทดลองพบว่า MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells มีค่าการเพิ่มขึ้นของ caspase 3/7 activity เกือบ 6 เท่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells ก็มีการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มข้น luminescence แต่ก็น้อยกว่า MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 5)

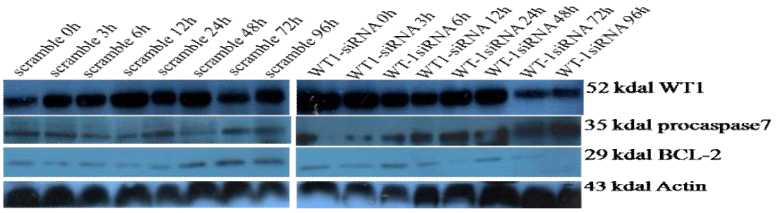


ภาพที่ 5 ผลการกระตุ้นการทำงานของ caspase 3/7 โดย siRNA-WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์ MCF-7-GFP^{+}/siRNA control cells และ MCF-7-GFP^{+}/siRNA-WT1 cells ที่เลี้ยงเป็นเวลาระยะต่างๆได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ถูกนำมาทดสอบวัดปริมาณเอนไซม์ caspase 3/7 ซึ่งจะทำปฏิกริยากับสารในชุดทดสอบ Caspase 3/7 glow apoptosis kit เกิดการเปล่งแสง luminescence ออกมา จากนั้นก็นำปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไปวัดหาค่าการปลดปล่อย luminescence ที่ความยาวคลื่น 485/527 nm บันทึกค่าที่ได้และนำไปวิเคราะห์หา activity ของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งจะแปรผันตรงกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis

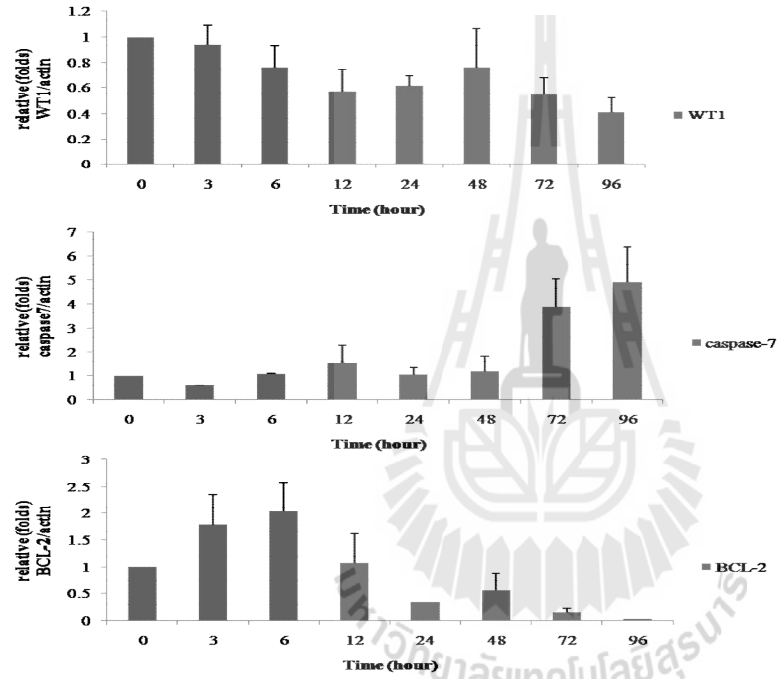
6. การแสดงออกของโปรตีน หลังจากทดสอบเซลล์ด้วย siRNA-WT1

หลังจากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ถูกทดสอบด้วย siRNA-WT1 ที่มีความจำเพาะกับยีน *WT1* ในตำแหน่ง exon ที่ 8 และทราบผลการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis แล้ว ว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวตายได้ นอกจากนั้นผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งก็แสดงให้เห็นว่า siRNA-WT1 ที่ใช้นี้ มีผลโดยตรงต่อการลดการรอดชีวิตของเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้น ยีน *WT1* ก็ถูกลดการแสดงออกลงด้วยเพียงในเวลา 48 ชั่วโมงการแสดงออกก็ถูกยับยั้งได้ เพราะฉะนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการทราบผลในระดับโปรตีนว่า หลังจากใช้ siRNA-WT1 ยับยั้งยีน *WT1* แล้ว การแสดงออกในระดับโปรตีนจะมีผลอย่างไร โดยหลังจากที่เซลล์ถูกคัดเลือกมาแล้ว เอาเฉพาะเซลล์ที่ถูก transduction จากนั้นปั่นล้างเซลล์ และเก็บตะกอนเซลล์ โดยกระทำทุกช่วงเวลาตามที่กำหนดในการทดสอบ จากนั้นสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เตรียมได้ และนำไปทำ western blot เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการศึกษา พบว่า โปรตีน WT1 ที่แสดงออกมาถูกลดการแสดงออกลง ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงของการทดสอบ ในขณะที่โปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ก็ได้รับการศึกษาเช่นเดียวกัน โดยในที่นี้ตรวจสอบโปรตีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเอนไซม์casepase7 และกลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นตัวต่อต้านการเกิด apoptosis พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับการทดสอบด้วย siRNA-WT1แล้ว ในทางกายภาพของเซลล์ จะพบว่าเซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของโปรตีนcasepase7 ที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น และในทางกลับกัน โปรตีน BCL-2 ซึ่งทำหน้าที่ด้านการต่อต้าน apoptosis ก็ลดการแสดงออกลงไป ในระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงของการทดสอบ ซึ่งจากการสังเกตพบว่า ในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกของ BCL-2 เพิ่มมากขึ้นในเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เซลล์ปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดมากขึ้นโดยการกระตุ้นให้มีการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่อต้านการตายแบบ apoptosis นั่นเอง และในที่นี้ใช้ actin เป็นโปรตีนควบคุมภายใน (ภาพที่ 6A) ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนที่ตรวจสอบกับโปรตีนควบคุมได้แสดงในกราฟความสัมพันธ์ (ภาพที่ 6B) ผลการทดลองนี้เป็นผลเนื่องมาจากการที่เริ่มแรกที่ยีน *WT1* ถูกทำลาย จึงส่งผลต่อการ translation ของยีนไปเป็นโปรตีน WT1 ก็ถูกลดการแสดงออกลงไปด้วย จึงเกิดกลไกการกระตุ้นเอนไซม์casepase7 ที่แสดงออกมากขึ้นเกิดผลในการเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมให้มากขึ้น และก็ยังมีผลในการยับยั้งโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่อต้านการตายแบบ apoptosis เช่น BCL-2 จึงเป็นผลให้เซลล์ MCF-7 ตายได้ ในขณะเซลล์ที่ในกลุ่มควบคุมยังคงมีระดับของการแสดงออกของโปรตีนค่อนข้างจะคงที่ ไม่แตกต่างกันแต่อย่างใด ทั้งหมดทั้งมวลก็เป็นผลจาการทดสอบเซลล์ด้วย siRNA-WT1 นั่นเอง

A



B



ภาพที่ 6 การแสดงออกของโปรตีน WT1, procaspase-7, BCL-2 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ผ่านการทดสอบด้วย siRNA-WT1 ในระยะเวลาของการทดสอบเลี้ยงเซลล์ต่อจากการทำ lentiviral transduction ที่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เซลล์ถูกเก็บเกี่ยว ปั่นล้าง ตกตะกอน และสกัดเอาโปรตีนออกมา และโปรตีนความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ถูกนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี western blot (ภาพ A) แสดงภาพการแสดงออกของโปรตีน 4 ชนิด ได้แก่ WT1, procaspase7, BCL2 และ Actin โดยโปรตีนที่ได้ออกมามีขนาดที่แตกต่างกัน คือ 52, 35, 29, และ 43 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพ B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดกับโปรตีนควบคุม (Actin)

บทที่ 4
ข้อวิจารณ์

โปรตีน WT1 ทำหน้าที่เป็น transcription factor ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การตายของเซลล์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงเซลล์ด้วย การที่ WT1 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้นั้น เป็นเพราะ WT1 สามารถควบคุมยีนเป้าหมายที่เป็น growth factor หลายชนิด เช่น *insulin-like growth factor II, colony-stimulating factor-1, transforming growth factor beta-1, c-myc, amphireculin* เป็นต้น (Graidist, 2009; Weisser, Kern, S., & et.al., 2005) โมเลกุลของยีน *WT1* สามารถเกิดการตัดต่อส่วนของกรดอมิโนได้ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณ exon ที่ 5 ที่เกิดการแทรกเข้าไปของกรดอมิโน 17 ตัว ในระหว่างตำแหน่ง proline-glutamine rich ทำให้เกิดไอโซฟอร์มที่เรียกว่า (+17AA และ -17AA) และอีกบริเวณเกิดขึ้นตรงตำแหน่ง exon ที่ 9 หรือตรงบริเวณระหว่าง zing finger ที่ 3 และ 4 โดยการแทรกเข้าไปของกรดอมิโน 3 ชนิด ได้แก่ lysine, threonine และ serine (KTS) ทำให้เกิดไอโซฟอร์มอีก 2 แบบ คือ (+KTS และ –KTS) จากการเกิดปรากฏการณ์นี้ ทำให้มีการแบ่งชนิด WT1 เป็น 4 ไอโซฟอร์มหลัก ๆ ดังนี้ คือ WT1 (+17AA,+KTS), WT1(+17AA,-KTS), WT1(-17AA,+KTS) และ WT1(-17AA,-KTS) และนอกจากนี้ยังมีไอโซฟอร์มย่อยอีก 36 ไอโซฟอร์ม (Graidist, 2009; Yang, Han, Suaurez, & Minden, 2007) และสัดส่วนของการแสดงออกของแต่ละไอโซฟอร์มหลักในเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นดังนี้ คือ 7.0:1.3:1.4:0.3 ตามลำดับ (Caldon et al., 2008) ซึ่งแต่ละไอโซฟอร์มมีบทบาทต่างกันไป ขึ้นกับชนิดของเซลล์ เพราะฉะนั้นแล้ว การลดการแสดงออกของยีน *WT1* จึงเป็นเป้าหมายในการควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็ง ผลของการใช้ siRNA-WT1 ในการควบคุมการเจริญของเซลล์และกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเกิดขึ้นหลังจากเซลล์ถูกนำ siRNA ผ่านเข้าไปโดยใช้วิธีการ lentiviral transduction ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจาก คุณสมบัตของ lentivirus นั่นสามารถ transducer เข้าสู่เซลล์หลายประเภทได้ ทั้งเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว เซลล์ที่กำลังเปลี่ยนแปลง differentiated cells และเซลล์ที่ไม่แบ่งตัว non-dividing cells อีกทั้งคุณสมบัติอีกอย่างที่จำเป็นในการนำ lentivirus เข้ามาใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นตัวพาในการนำเอายีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ก็คือ lentivirus ไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อไวรัสไปยังเซลล์อื่น ๆ เนื่องจาก lentiviral vector ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มีการตัดเอาส่วนของยีนที่สามารถก่อเป็นตัวไวรัสใหม่โดยตัวมันเองออกไปแล้ว (Blesch, 2004) การใช้ lentiviral vector system ในการนำ siRNA-WT1 เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน ดังนั้นองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่มีคุณประ

โยชน์ต่อการวิจัยด้านเทคโนโลยียีนบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม และยังสามารถประยุกต์ต่อไปในการศึกษาการรักษามะเร็งชนิดอื่นๆที่มีการแสดงออกของ WT1 สูงต่อไปได้

การศึกษาผลของ siRNA-WT1 ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในโครงการนี้ซึ่งใช้ lentiviral vector เป็นพาหะ พบว่า เซลล์มะเร็งสามารถถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 75% ภายในเวลา 48 ชั่วโมงของการทดสอบ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าที่เคยมีการศึกษามาได้แก่ การใช้ antisense oligonucleotide ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, T-47D และ MDA-MB-453 (Zapata-Benavides et al., 2002) และ การใช้ synthetic siRNA ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Navakanit, 2007) เป็นต้น ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า การใช้ lentiviral vector system ในการการทดลองของโครงการนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ และความแตกต่างของบริเวณตำแหน่งที่ siRNA เข้าไปทำงานมีความจำเพาะมากกว่า จึงส่งผลให้สามารถยับยั้งการ transcription ของ WT1 mRNA ได้ดีกว่านั่นเอง นอกจากนี้การทดลองในโครงการนี้ยังแสดงให้เป็นว่า siRNA-WT1 ที่ใช้สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมได้โดยการวัดอัตราการเจริญเติบโตซึ่งวัดจากกิจกรรมภายในเซลล์ที่รอดชีวิต วิธี MTT assay เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของกลุ่มนักวิจัยของคุณ Mooney ซึ่งรายงานว่าการลดการแสดงออกของ WT1 โดยใช้ siRNA นั่นส่งผลต่อการยับยั้งวงจรการแบ่งตัวของเซลล์ โดยมีรายงานว่าระยะ S phase ของเซลล์จะถูกยับยั้งให้หยุด และตรวจพบการยับยั้งการแสดงออกของ cyclin D1 ในขณะที่ไม่มีผลต่อ cyclin E, p21 และ p27 โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real time RT-PCR (Mooney, Al-Sakkaf, Brown, & Dobson, 2002)

การศึกษาในโครงการวิจัยนี้นอกจากจะแสดงให้เป็นว่า siRNA-WT1 สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ยังแสดงให้เป็นว่า siRNA-WT1 ยังส่งผลในการกระตุ้นการตายของเซลล์ แบบ apoptosis อีกด้วย โดยการกระตุ้นการทำงานของ caspase 3 และ caspase 7 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์สำคัญในกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ โดยเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็น executioner caspase ทำหน้าที่ในการตัดโปรตีนต่าง ๆ ตรงตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนที่จำเพาะ และทำให้กระตุ้นการเกิด DNA fragmentation หรือส่งสัญญาณการเกิด apoptosis ทำให้เซลล์เหี่ยว แตกเป็น apoptotic body และทำให้เกิดการสลับกลับด้านของผนังเซลล์ และโมโลกุลบนผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งโครงการนี้ได้ทำการศึกษาการตายเพิ่มเติมโดยวิธีการย้อมเซลล์ด้วย annexin V และ PI ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย เครื่อง flow cytometer ซึ่งพบว่า เซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ได้รับ siRNA-WT1 เกิด apoptosis จริง โดยมี early apoptosis สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทดสอบ ส่งผลให้มี late apoptosis มากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งผลของการวิเคราะห์ด้วย flow cytometry ได้ยืนยันผลของการกระตุ้นการตายของเซลล์โดยการกระตุ้นการทำงานของ caspase 3 และ caspase 7 และได้ยืนยันผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้นเกี่ยวกับผลของ siRNA-WT1 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของ

เซลล์มะเร็ง จากการทดลองการยับยั้งการแสดงออกของยีน WT1 ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 และยังส่งผลต่อโปรตีนในกระบวนการ apoptosis โดยเพิ่มการแสดงออกของ procaspase7 ซึ่งจะถูกกระตุ้นให้กลายเป็น active form และทำหน้าที่ในการตัดทำลายโปรตีนอื่น ๆ เพื่อกระตุ้น apoptosis ในการควบคุมเอนไซม์ caspase 7 นี้เกิดจากการที่ไอโซฟอร์มส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง โดยหน้าที่หลักคือการต้านการเกิด apoptosis โดยการยับยั้ง apoptotic enzyme เช่น caspase3, caspase9, caspase7 ฉะนั้นในการลดบทบาทของ WT1 ด้วย siRNA-WT1 จึงส่งผลกระตุ้น caspase7 ขึ้นได้ จากผลการทดลองที่ปรากฏ สอดคล้องกับการสรุปของคุณ Graidist ในปี 2009 แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ระบุว่าไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของเอนไซม์casepase3 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 หลังจากที่พวกเขาทำการกระตุ้นการตายของเซลล์ด้วยสารชนิด staurosporine แต่กลับพบการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด T47D หลังจากกระตุ้นแล้ว (Mooney et al., 2002) และเนื่องจากในเซลล์มะเร็งเต้านม

นอกจากนี้การทดลองในโครงการนี้ได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่ได้รับ siRNA-WT1 มีการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 ลดลง ซึ่ง BCL-2 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่อต้านการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ อันเป็นกลไกตามธรรมชาติของเซลล์เพื่อการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมและเพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ จากการทดลองพบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการลดการแสดงออกของ BCL-2 ลงในระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากได้รับ siRNA-WT1 ผลการทดลองที่พบนี้สามารถอธิบายได้จากกลไกการทำงานของ siRNA-WT1 ต่อการควบคุมการแสดงออกของ BCL-2 โดยเป็นไปได้ว่า เมื่อใช้ siRNA-WT1เข้าไปยับยั้งยีน *WT1* ทำให้ siRNA ดังกล่าวไปยับยั้ง WT1 isoform หลายชนิดโดยไปยับยั้ง *WT1(+17AA,-KTS)* isoform ทำให้โปรตีน WT1(+17AA,-KTS) ลดลง ซึ่ง WT1(+17AA,-KTS) ทำหน้าที่ในการต้านการเกิด apoptosis ของเซลล์ผ่านทาง intrinsic pathway ในไมโตคอนเดรีย โดยจะเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีน *BCL-2* และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ *BCL-2* มากขึ้น เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เกิด apoptosis แต่เมื่อมีการใช้ siRNA-WT1 เข้าไปยับยั้งยีน *WT1* ไอโซฟอร์มดังกล่าว จึงมีผลทำให้การเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของ BCL-2 ลดลง ส่งผลให้จับกับ Par-4 และจากนั้น Par-4 จะจับกับตัวยับยั้ง ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีน *BCL-2* ส่งผลต่อการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ขึ้นนั่นเอง (Ito et al., 2006)

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า siRNA-WT1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้และสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งนี้ตายโดยวิธี apoptosis องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมด้วยวิธีการใช้ siRNA-WT1 ต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุป

โครงการนี้ประสบความสำเร็จในการลดการสดแงออกของยีนและโปรตีน WT1 โดย siRNA-WT1 และ lentiviral vector system ซึ่งเป็นการพัฒนาวิธีการใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม และกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งนี้ตายแบบ apoptosis ได้ โดยโคลน siRNA-WT1 ลงใน lentiviral vector ซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อน ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดโดยวิธีนี้นับเป็นวิธีใหม่ที่มีประโยชน์สูงมาก ผลการทดลองในโครงการนี้นับเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยทางการแพทย์ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังช่วยส่งเสริมการผลิตบุคลากรที่มีความรู้ความ สามารถทางด้านยีนบำบัดให้กับประเทศไทย องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดต่อไปได้อีกมากมายไม่ว่าจะเป็นการวิจัยหรือเป็นพื้นฐานในการพัฒนาสู่การรักษาโรคมะเร็งเต้านมด้วยเทคโนโลยียีนบำบัดต่อไป ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนเป็นประโยชน์ต่อส่วนรวมทั้งสิ้น

2. ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ควรมีการต่อยอดในการศึกษาการนำ siRNA-WT1 นี้ไปทดสอบการรักษาโรคในสัตว์ทดลองที่เป็นโรคมะเร็งเต้านม นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้สามารถศึกษาต่อในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกหรือ mechanism ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ตอบสนองต่อ siRNA-WT1 ในระดับจีโนม ยีนและโปรตีนต่างๆ เช่น กลุ่ม signaling pathway และอื่นๆต่อไปได้อีกมาก

บรรณานุกรม

Algar, E. M., Khromykh, T., Smith, S. I., Blackburn, D. M., Bryson, G. J., & Smith, P. J. (1996). A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukemic cell lines. *Oncogene, 12*, 1005-1014.

Attasara, P., & Buasom, R. (Eds.). (2011). *Hospital-based cancer regustry 2010*. Bangkok.

Blesch, A. (2004). Lentivirua and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods, 33*, 164-172.

Caldon, C. E., Lee, C. S. L., Sutherland, R. L., & Musgrove, E. A. (2008). Wilms' tumor protein 1: an early target of progestin regulation in T-47D breast cancer cells that modulates proliferation and differentiation. *Oncogene, 27*, 126-138.

Graidist, P. (2009). The role of WT1 in breast and other cancers: oncogene or tumor suppressor gene? *songkla Med J, 27*, 435-449.

Han, Y., San-Marina, S., Liu, J., & Minden, M. D. (2004). Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene, 23*, 6933-3941.

Ito, K., Oji, Y., Tatsumi, N., Shimizu, S., Kanai, Y., Nakazawa, T., et al. (2006). Antiapoptotic function of 17AA(+) WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene, 25*, 4217-4229.

Lee, S. B., & Haber, D. A. (2001). Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res, 264*, 74-99.

Loeb, D. M., Evron, E., Patel, C. B., Sharma, P. M., Niranjan, B., & Buluwela, L. (2001). Wilm's tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor specific promoter methylation. *Cancer Res, 61*, 921-925.

Miyoshi, Y., Ando, A., Egawa, C., Taguchi, T., Tamaki, Y., & Tamaki, H. (2002). High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res, 8*, 1167-1171.

Mooney, L. M., Al-Sakkaf, K. A., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. (2002). Apoptotic mechamisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *British Journal of Cancer, 87*, 909-917.

Nakatsuka, S., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., & Takeuchi, T. (2006). Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol, 19*, 804-814.

Navakanit, R., Graidist, P., Leeanansaksiri, W. and Dechsukum, C. (2007). Growth inhibition of breast cancer cell line MCF-7 by siRNA silencing of Wilm tumor 1 gene. . *Journal of medical association, 90*(11), 2416-2421.

Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., & Kim, E. H. (1999). Expression of the Wilm's tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res, 90*, 194-204.

Pourpornpong, T. (2000). Breast cancer. from http://www.thaiclinic.com/cabreast2.html

Smith, S. I., Down, M., Boyd, A. W., & Li, C. L. (2000). Expression of the Wilms' tumorsuppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice. *Cancer Res, 60*, 808-814.

Weisser, M., Kern, W., S., R., & et.al. (2005). Prognostic impact of RT-PCR based quantification of WT1 gene expression during MRD mornitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*(19), 1416-1423.

What is breast cancer? (2009). *symptoms and diagnose*, from http://breastcancer.org

Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., & Hirata, M. (1996). Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms' tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood, 87*, 2878-2884.

Yang, L., Han, Y., Suaurez, F., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia, 21*, 868-876.

Zapata-Benavides, P., Tuna, M., Lopez-Berestein, G., & Tari, A. M. (2002). Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochem Biophys Res Commun, 295*, 784-790.

ภาคผนวก

1. การเตรียม complete DMEM (cDMEM)

ชั่งตวงและผสมสารต่างๆเหล่านี้เข้าด้วยกัน

- DMEM (low glucose)	10.00	g
- FBS	100.00	ml
- $NaHCO_3$	3.70	g
- 1000 U/ml Penicillin/1000 μg/ml Streptomycin	10.00	ml
- 2 mg/ml Amphotericin B	0.20	ml

เติมน้ำ sterile ultra-pure water เพื่อให้ได้ปริมาตร 1000 ml จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ pH 7.4 และนำไปกรองเพื่อ sterile

2. การเตรียม PBS

ชั่งตวงและผสมสารต่างๆเหล่านี้เข้าด้วยกัน

- NaCl	8.00	g
- Na_2HPO_4	1.44	g
- KCl	0.20	g
- KH_2PO_4	0.24	g

เติมน้ำ sterile ultra-pure water เพื่อให้ได้ปริมาตร 1000 ml จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ pH 7.4 และนำไป autoclave เพื่อ sterile ที่ 121°C นาน 15 นาที

3. การเตรียม 0.25% Trypsin/EDTA

ชั่งตวงและผสมสารต่างๆเหล่านี้เข้าด้วยกัน

- **Trypsin**	0.25	g
- EDTA	0.04	g

เติมสาร sterile PBS เพื่อให้ได้ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปกรองเพื่อ sterile

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2513 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการแพทย์ (พ.ศ. 2535) และ ปริญญาโท วท.ม. ชีวเคมีทางการแพทย์ (พ.ศ. 2539) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับ ปริญญาเอก สาขา Microbiology and Immunology โดยเน้นทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์และ เซลล์ต้นกำเนิด ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2544 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน stem cell transplantation and stem cell regulation ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ National Institute of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2545-2546) ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ทำงานในตำแหน่งอาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย อาจารย์วิไลรัตน์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล Excellent Research Award (Stem cell), USA, Key Stone Symposium (พ.ศ. 2550), American Society of Hematology Traveling Award, USA (พ.ศ. 2546), Traveling Award, International Society for Stem Cell Research, Australia (พ.ศ.2547) / USA (พ.ศ. 2551), รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล พ.ศ. 2551-2554 และ รางวัลศิษย์เก่าดีเด่นด้านวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่นในปี พ.ศ. 2554 ปัจจุบันอาจารย์วิไลรัตน์ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 30 ผลงาน สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

e-mail : wilairat@g.sut.ac.th

ประวัติผู้วิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2509 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. แพทยศาสตร์ (พ.ศ. 2533) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ Diploma Thai Board สาขา Anatomical Pathology จาก ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับ ปริญญาเอก สาขา Pathology ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2543 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน Molecular Pathology ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2544) ปัจจุบัน อาจารย์ นายแพทย์. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม ทำงานในตำแหน่งหัวหน้าสาขาวิชาพยาธิวิทยา และเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชา พยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทยอาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิ เช่น รางวัล King Scholarship award, Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research (พ.ศ. 2551) และ รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล ปัจจุบัน อาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 15 ผลงาน และผลงานจดสิทธิบัตร 1 เรื่อง “A nucleic acid marker of cancer” Serial No.09/434,620, filed Nov.5, 1999 Joy L Ware, ChavaboonDechsukhum, Carleton T Garrett (Detection of novel WT1 transcript in human malignancy, including prostate, breast cancer and acute leukemia) สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 _ e-mail : chavaboon@sut.ac.th

ประวัติผู้วิจัย

นาง ดวงนภา เดชจุ้ย เกิดวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2521 สถานที่เกิด จ. นครราชสีมา สำเร็จวุฒิการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาจุลชีววิทยา จากมหาวิทยาลัย ขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2542 ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาเอก สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี