

รหัสโครงการ SUT1-104-50-36-50



## รายงานการวิจัย

**การลดการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว  
เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคในระดับยีน  
(Down regulation of *WT1* gene expression  
in leukemic cells for potential of gene therapy)**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การลดการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว  
เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคในระดับยีน  
(Down regulation of *WT1* gene expression  
in leukemic cells for potential of gene therapy)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวนบูลย์ เศรษฐชุม

นางดวงนภา เศรษฐชุม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2557

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้จากความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้ร่วมวิจัย 2 ท่านคือ อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เศรษฐุม และ นางดวงภา เศรษฐีย์ ซึ่งหัวหน้าโครงการขอขอบคุณท่านทั้งสองไว้ ณ โอกาสนี้เช่นเดียวกัน ขอขอบคุณหน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อ งานวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลืองานวิจัยใน ส่วนขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ (Cell sorting) และขอขอบคุณโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จังหวัด นครราชสีมาในการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยส่วนรวม และ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกต่างๆทั้ง น้ำ ไฟ สถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการประเมิน งานวิจัยและบุคคลอื่นๆซึ่งไม่อาจกล่าวได้หมดในโอกาสนี้ สำหรับการสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆ ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

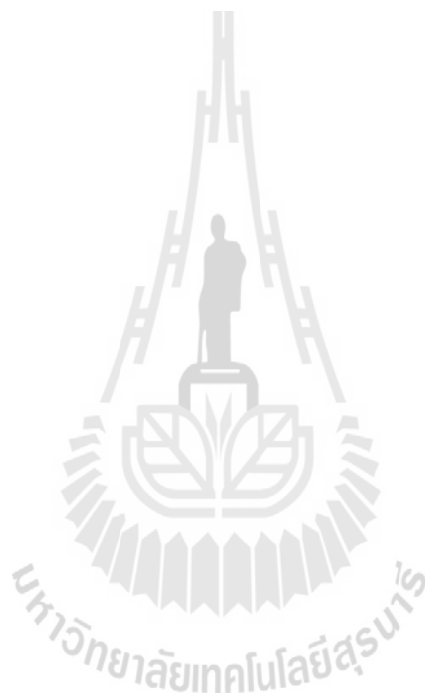


## บทคัดย่อ

ยีน *Wilms' tumor 1 (WT1)* ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน WT1 ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโต และการมีชีวิตรอดของเซลล์ มีการตรวจพบการแสดงออกอย่างมากของยีนดังกล่าวในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ชนิด chronic myeloid leukemia (CML) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วย acute lymphoblastic leukemia (ALL) ในการวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ในการควบคุมอัตราการเจริญเติบโต และการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดังกล่าวตายแบบ apoptosis โดยการใช้เทคโนโลยี RNA interference โดยทำการออกแบบ siRNA ที่จำเพาะต่อ WT1 mRNA ขึ้นมาใหม่และ clone เข้าสู่ lentiviral vector ที่มี GFP เป็น reporter gene จากนั้น ทำการผลิต lentivirus ด้วยเทคนิคตกตะกอนด้วยแคลเซียม จากนั้นนำไวรัสที่ผลิตได้เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML โดยใช้ K562 cell line และ ALL ชนิด ALL-L1 จากผู้ป่วย จากนั้นนำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับ WT1-siRNA ไปผ่านการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP reporter และนำไปทำการทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโต และการตายแบบ apoptosis จากการทดลองพบว่า WT1-siRNA สามารถลดการแสดงออกของ *WT1 mRNA* และโปรตีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดทั้งชนิด K562 และ ALL-L1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบการแสดงออกของ WT1 ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงสำหรับ เซลล์ชนิด K562 และตั้งแต่วันที่ 48 ชั่วโมง สำหรับ ALL-L1 นอกจากนี้ยังพบว่า WT1-siRNA ยังส่งผลในการลดการแสดงออกของ mRNA ของ *Interleukin-2 (IL-2)* และ *IL-2 receptor* ได้แก่ *IL-2RB* และ *IL-2RG* ผลจากการลดการแสดงออกของ *WT1 mRNA* ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 ถูกยับยั้งด้วยอัตรา 10% 12% 16% 25% 40% 44% และ 88% ที่เวลาการทดลอง 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และ ALL-L1 ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตลงประมาณ 79±14% ที่เวลา 48 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้น จากการศึกษากการตายแบบ apoptosis โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย Annexin-V FITC และ Propidium Iodide ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry พบว่า WT1-siRNA สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ K562 ได้โดยพบการตายในระยะ early apoptosis ประมาณ 70% เมื่อเวลาการทดสอบผ่านไปเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้นและการตายแบบ late apoptosis ก็สูงขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น ในทางเดียวกันพบว่า WT1-siRNA สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ ALL-L1 ได้โดยพบการตายในระยะ early apoptosis ประมาณ 36.63% และการตายแบบ late apoptosis ก็สูงขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น จากการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า WT1-siRNA กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกลไกการกระตุ้นการทำงานของ เอ็นไซม์ Caspase 3/7 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ มีอัตราการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ Caspase 3/7 ประมาณ 3 เท่า และประมาณ 3.5 เท่าในเซลล์ K562 และเซลล์ ALL-L1 ในเวลา 48 ชั่วโมงหลังได้รับ siRNA ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีน caspase 7 ในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า WT1-siRNA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดยผ่านกลไกแบบ intrinsic apoptosis pathway ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด K562 cell line และ ALL-L1 จากผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง องค์กรความรู้ใหม่ที่ได้จากโครงการ

ก

นับว่าเป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดชนิด CML และ ALL-L1 ด้วยเทคโนโลยียีนบำบัดที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป



## Abstract

*Wilms' tumor 1 (WT1)* gene encodes a transcription factor WT1 which crucial for cellular proliferation and survival. WT1 was overexpressed in several types of leukemia including chronic myeloid leukemia (CML) and acute lymphoblastic leukemia type (ALL). Our research focused on studying the effect of new designed WT1-siRNA on inhibition of leukemic cells proliferation and activation of the cells apoptosis. To this end, the new designed WT1-siRNA was cloned into GFP lentiviral vector. Lentivirus particles containing WT1-siRNA were then generated using calcium chloride precipitation approach prito to delivered into CML K562 cell line and primary ALL subtype L1 cells corrected from ALL-L1 patients. The GFP<sup>+</sup> cells were then sorted and subjected to cell proliferation and apoptotic analysis. The results demonstrated that WT1-siRNA lentivirus could downregulate WT1 expression both mRNA and protein levels beginning at 72 hours post-transduction for K562 and at 48 hours for ALL-L1 cells. In addition, WT1-siRNA could suppress mRNA expression of *interleukin-2* and its receptors (*IL-2RB* and *IL-2RG*). The data also demonstrated that downregulation of WT1 expression showed potent inhibitory effect on cell proliferation of transduced K562 cells approximately 10%, 12%, 16%, 25%, 40%, 44%, and 88% at 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours post-transduction, respectively. Growth inhibition was also found about 79±14% in WT1-siRNA tranduced ALL-L1 cells. Moreover, WT1-siRNA could induce apoptosis of K562 cells and ALL-L1 as analyzed by flow cytometry using Annexin-V FITC and Propidium Iodide staining. Interestingly, early apoptosis was detected more than 70% at 12 hours and late apoptosis was increased in time dependent manner. In the same phenomenon, early was detected around 36.63 % and late apoptosis was increased in time dependent manner in transduced ALL-L1 cells. The apoptosis results were confirmed by increasing of caspase 3/7 activity by 3 folds and 3.5 folds at 48 hours post-transduction in K562 cells and All-L1, respectively. These data also supported by the increase of caspase 7 protein level in both leukemic cell types. Altogether, WT1-siRNA demonstrated high efficiency of inhibitory effect on cellular proliferation and activation effect on apoptosis via intrinsic apoptosis pathway of both K562 and primary ALL-L1 cells. The implications of new insight from this projet are research value and therapeutic value in gene therapy technology of myeloid and lymphoid leukemias.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญเรื่อง.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ .....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ทบทวนวรรณกรรม.....	4
<b>บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	
การเลี้ยงเซลล์.....	14
การสร้างไวรัส และตรวจวัดปริมาณไวรัส.....	14
การนำไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย.....	15
การตรวจวัดการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หลังได้รับ WT1-siRNA.....	15
การวัดการตาย แบบ apoptosis ของเซลล์ด้วยวิธีวัดกิจกรรมของ apoptotic enzyme; Caspase-3/7 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA.....	15

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

การวัดการตาย แบบ apoptosis ของเซลล์ด้วยวิธีย้อม antibody บนผิวเซลล์	
หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA.....	16
การวัดระดับการแสดงออกของ mRNA.....	16
การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์ K562 หลังจากทดสอบ ด้วย WT1-siRNA .....	17

### บทที่ 3 ผลการทดลอง

#### ผลการทดลองตอนที่ 1

การทดสอบผลของ WT1-siRNA ต่อเซลล์สายพันธุ์เม็ดเลือดขาว	
Chronic myeloid leukemic cell line: K562 .....	19
ประสิทธิภาพการ transduction ของ lentivirus เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว	
ชนิด K562.....	19
ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ K562 โดย WT1-siRNA.....	21
ผลการทดสอบการกระตุ้นการตายของเซลล์ K562 ด้วย WT1-siRNA.....	24
ผลการกระตุ้น apoptosis ของเซลล์ k562 โดย WT1-siRNA.....	26
ผลของ mRNA expression หลังจากการทำ WT1-siRNA transduction.....	27
การแสดงออกของโปรตีน หลังจาก WT1-siRNA transduction .....	29

#### ผลการทดลองตอนที่ 2

การทดสอบผลของ WT1-siRNA ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย	
acute lymphoblastic leukemic cells: ALL-L1.....	31
WT1-siRNA ยับยั้งอัตราการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis	
ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย.....	31



## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
ระดับการแสดงออกของ mRNA หลังจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ได้รับ WT1-siRNA ..	32
ระดับการแสดงออกของ โปรตีนหลังจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ได้รับ WT1-siRNA..	33
การกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ด้วย WT1-siRNA.....	35
<b>บทที่ 4 ข้อวิจารณ์</b> .....	<b>37</b>
<b>บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ</b>	
สรุป.....	45
ข้อเสนอแนะ.....	45
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้วิจัย.....	57



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของ primers.....	17
---	----



## สารบัญภาพ

หน้า

รูปภาพที่ 1	แสดงปริมาณ GFP+ cells หลังจากกระบวนการ lentiviral transduction.....	20
รูปภาพที่ 2	การแสดงออกของ GFP หลังจากนำ C-siRNA และ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์ K562.....	21
รูปภาพที่ 3	ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ K562 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA .....	23
รูปภาพที่ 4	ผลของ WT1-siRNA ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562..	24
รูปภาพที่ 5	การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และ -7 ของเซลล์ K562 หลังจาก ที่ถูกทดสอบด้วย WT1-siRNA.....	25
รูปภาพที่ 6	ผลของ WT1-siRNA ต่อการกระตุ้นให้ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis.....	27
รูปภาพที่ 7	การแสดงออกของ mRNA ชนิดต่าง ๆ ของ K562 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA.....	29
รูปภาพที่ 8	การวัดการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลังจากการทำ WT1-siRNA transduction.....	30
รูปภาพที่ 9	WT1-siRNA แสดงผลการยับยั้งและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาว ALL subtype L1.....	32
รูปภาพที่ 10	ระดับการแสดงออกของ mRNA ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL จากผู้ป่วยที่ได้รับ WT1-siRNA.....	33
รูปภาพที่ 11	การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน WT1 และ caspase-7 ในตัวอย่าง เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ที่ได้รับ WT1-siRNA.....	34
รูปภาพที่ 12	WT1-siRNA กระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL.....	36

รูปภาพที่ 13 แสดงกลไกการเกิด apoptosis โดยผ่านกระบวนการทำงานของเอนไซม์ caspase-7..... 41



## คำอธิบายสัญลักษณ์

BSA	=	bovine serum albumin
° C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	=	carbon dioxide
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	=	fetal bovine serum
GFP	=	green fluorescence protein
g	=	gram
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	=	<i>Wilms' tumor 1</i>

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความสำคัญและที่มาปัญหาการวิจัย

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นมะเร็งของเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คนทั่วโลกมีปัญหาสุขภาพอย่างมาก ในปี 1993-1997 อุบัติการณ์การเกิดโรคโดยเฉลี่ยของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นมีรายงานว่าพบผู้ป่วยชาย 8.5 และผู้ป่วยหญิง 5.2 ต่อแสนประชากร (Parkin et al., 2002) ส่วนในประเทศไทย อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยในผู้ป่วยชายเท่ากับ 4.1 และผู้ป่วยหญิงเท่ากับ 3.5 ต่อแสนประชากร (Sriplang et al., 2003) และจากรายงานผลสำรวจของสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี 2011 พบว่า มีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวรายใหม่ ที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและเข้ารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยแยกเป็น ชาย 17 ราย และผู้ป่วยหญิง 13 ราย (Attasara & Buasom, 2011) ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่า อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในประชาชนไทยมีการเพิ่มมากขึ้นจากอดีต และอัตราการเกิดโรค มะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็กมีประมาณ 38.7% ในจำนวนผู้ป่วยเด็กทั้งหมดที่มีอายุเท่า ๆ กัน (Mendessohn, Howley, Israel, & Liotta, 2001)

การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นส่วนมากจะใช้วิธีเคมีบำบัด ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานในการให้การรักษาและทำลายเซลล์มะเร็ง โดยการลดปริมาณเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด และเหนือสิ่งอื่นใดก็ต้องพยายามป้องกันเซลล์ปกติไม่ให้ได้รับผลกระทบจากการรักษาด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการรักษาแบบเคมีบำบัดนี้ก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา เช่น 1) มีความหลากหลายอย่างมาก ทางรูปร่างและทางกายภาพของเซลล์มะเร็งทำให้ยากต่อการรักษา 2) ยังคงพบความหลากหลายทาง genetic และ heterogeneity ในโมเลกุลของ malignant tumors 3) พบว่าการรักษายังไม่เข้าถึงเซลล์หรือบริเวณที่เกิดโรค 4) มีความขาดแคลนวิธีการคัดเลือกผลจากการเกิดการต่อต้านมะเร็ง และมีความเป็นพิษที่มากเกินไปสำหรับเนื้อเยื่อปกติ 5) เกิดความไม่เสถียรของ Genome 6) เกิดการพัฒนาเป็นการดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant) (Biedler, 1994; Rowley, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่นำไปสู่ความยุ่งยากในการให้การรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ การรักษาแบบเคมีบำบัดแบบดั้งเดิมจะลดคุณภาพ

ชีวิตของผู้ป่วยอีกด้วย ดังนั้น นักวิจัยทางการแพทย์จึงพยายามที่จะหาวิธีใหม่ ๆ ที่ลดผลข้างเคียงในการรักษาและลดการดื้อยา ซึ่งนักวิจัยหวังว่าจะเพิ่มโอกาสให้ผู้ป่วยฟื้นตัวหลังการเข้ารับการรักษา และวิธีการหนึ่งที่ได้ความสนใจมากคือ การใช้เทคโนโลยียับยั้งและภูมิคุ้มกันบำบัด ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่นักวิทยาศาสตร์พยายามคิดค้น และให้ความพยายามเป็นอย่างมากเพื่อพัฒนาให้เป็นวิธีที่สามารถควบคุมและทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถพัฒนาเพื่อใช้งานในการรักษาได้จริงอย่างปลอดภัยแก่ผู้ป่วย ซึ่งการวิจัยเทคโนโลยีเหล่านี้อยู่บนพื้นฐานของหลักการต่างๆ ได้แก่ การพัฒนาต้านมะเร็งชนิดใหม่ การควบคุมการแสดงออกของยีนก่อโรคมะเร็ง และการสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะกับมะเร็งซึ่งจะทำให้ร่างกายทนทานต่อการเกิดโรคมะเร็งได้ ดังนั้นการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งจึงเป็นสิ่งสำคัญ และหนึ่งในยีนดังกล่าวคือ WT1 ซึ่งเป็น transcription factor ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม (D. Loeb, Evron, Patel, & Sharma, 2001) มะเร็งปอด (Oji, Miyoshi, & Maeda, 2002) มะเร็งรังไข่ (Barbolina, Adlay, & Shea, 2008) มะเร็งตับอ่อน (Wolfgang, Luise, & Johannes, 2009) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Koesters et al., 2004) มะเร็งสมอง (Oji et al., 2004) เนื่องจาก มีการตรวจพบ WT1 ที่ไม่กลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า *WT1* ทำหน้าที่เปรียบเสมือน ยีนก่อมะเร็ง (Yang, Han, Suarez Saiz, & Minden, 2007) อีกประการหนึ่ง มีการค้นพบการแสดงออกอย่างมากของยีน *WT1* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Bergmann, Miething, & Maurer, 1997 ; Wolfgang, et al., 2009) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก แม้ว่าจะมีงานวิจัยหลายชิ้นที่พยายามลดการแสดงออกของยีน *WT1* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL โดยวิธี siRNA เพื่อพัฒนาเป็น gene therapy ยังไม่มีผู้ใดศึกษา ดังนั้นผู้วิจัยในโครงการวิจัยนี้จึงมีความตั้งใจที่จะศึกษาการนำ siRNA technology ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ซึ่งผู้วิจัยได้ออกแบบ siRNA ต่อยีน *WT1* ใหม่ (WT1-siRNA) ซึ่งเป็น siRNA ใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้ใดศึกษามาก่อน นอกจากนี้ยังใช้ lentiviral vector พาหะ และ ใช้ lentiviral system ในการสร้างอนุภาคไวรัสเพื่อนำ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งก็ยังไม่เคยมีผู้ใดศึกษามาก่อน เนื่องจากการศึกษาในโครงการนี้มีการใช้ทั้ง WT1-siRNA sequence ใหม่และใช้ lentivirus เป็นพาหะ (WT1-siRNA-lentivirus) ซึ่งยังไม่เคยมี

ผู้ใดศึกษามาก่อนดังกล่าว ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของ WT1-siRNA-lentivirus ในเซลล์มะเร็งสายพันธุ์เดียวกัน คือ K562 ซึ่งเป็นเซลล์ที่หาง่ายและเลี้ยงง่ายในห้องทดลอง เมื่อได้ผลที่ดีแล้วจึงได้นำมาใช้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ได้รับบริจาคจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดจากโรงพยาบาล เพื่อให้สามารถใช้เซลล์จากผู้ป่วยจริงให้คุ้มค่าที่สุดที่สุด เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญและพัฒนาเป็น gene therapy เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนี้ในผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบผลของ WT1-siRNA ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 cell line และ primary acute Lymphoblastic leukemic cells (ALL-L1) จากผู้ป่วยจริง
2. เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของ WT1, IL2, IL2RB, IL2RG mRNA หลังจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 และ ALL-L1 ได้รับ WT1-siRNA
3. เพื่อตรวจวัดการแสดงออกในระดับโปรตีน ของ WT1 และ apoptotic protein Caspase-3/7 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลังจากได้รับ WT1-siRNA
4. เพื่อตรวจหาอัตราการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หลังจากได้รับ WT1-siRNA ด้วยวิธีย้อมสี Annexin V-FITC/PI และการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7



### 3. ทบทวนวรรณกรรม

ในอดีตที่ผ่านมา ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวสาย myeloid ชนิดเรื้อรัง จะได้รับการรักษาด้วยยาต้านมะเร็งชนิด imatinib และยาชนิดนี้ก็ส่งผลต่อการดื้อยาในระยะยาวของการรักษา ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มจึงสนใจในการค้นหาวิธีการใหม่ ๆ ในการรักษาผู้ป่วย CML หนึ่งในหลายกลุ่มวิจัยได้พยายามในการใช้ siRNA ในการต่อต้านการแสดงออกของยีน bcr-abl ซึ่งผู้ป่วยมะเร็ง CML ที่มีภาวะดื้อต่อยา imatinib โดยพวกเขาพบว่าหลังจากฉีด siRNA ที่จำเพาะต่อ bcr-abl ปริมาณ 10 µg/kg น้ำหนักตัวของผู้ป่วยหญิงมะเร็งเม็ดเลือดขาวอายุ 47 ปีที่ให้ผลบวก Philadelphia CML ด้วยเทคนิคการนำเข้าผ่าน lipid solution (DLS with anionic lipoplex) (Koldehoff, Steckel, Beelen, & Elmaagacli, 2007) ผลการทดสอบพบว่า มีผลข้างเคียงเล็กน้อย เมื่อทดสอบด้วย dizziness หลังจากนั้นพวกเขาก็เพิ่ม และลดปริมาณ siRNA เป็น 30µg/kg น้ำหนักตัวใน DSL 60 ml และ ลดเป็น 10 µg/kg น้ำหนักตัว ใน DSL 20 ml ตามลำดับ ในกระแสเลือดของผู้ป่วยพบว่าเป็นเซลล์ตัวอ่อน หลังจากฉีด siRNA ที่จำเพาะต่อ bcr-abl ลงไป อย่างไรก็ตามผู้ป่วยได้เสียชีวิตในเวลาต่อมา โดยคณะวิจัยได้สรุปว่าอาจเกิดจากการที่มีภาวะดื้อต่อ siRNA ที่ฉีดเข้าไป หรือเกิดความล้มเหลวจากการ transfection เนื่องจากเกิดการกระตุ้น serum RNase ในการทดลองใช้เซลล์ไลน์ K562 และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML จากผู้ป่วยและนำมาทดสอบด้วยการใช้ bcr-abl siRNA พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการลดอัตราการเกิด apoptosis ลงเป็น 16.1% และ 18.5% นอกจากนี้แล้วยังมีการเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญเติบโตเป็น 14.6% และ 28.3% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ใช้ siRNA ยิ่งไปกว่านั้น การสังเกตพบว่าการแสดงออกของยีน bcr-abl ยังลดลงภายในวันเดียวหลังจากการ transfection และยังคงลดลงมากกว่าค่า log scale ภายใน 7 วัน และเพื่อเป็นการยืนยันงานวิจัยนี้ ก็ยังมีกลุ่มนักวิจัย Wilda และคณะ ในปี 2002 ได้ทำการใช้ bcr-abl hybrid siRNA ในการทดสอบกับเซลล์ K562 และพบว่าเซลล์ดังกล่าวได้ถูกทำลายลงและเกิดการกระตุ้น apoptosis ของเซลล์อย่างรุนแรง(Wilda, Fuchs, Wossemann, & Borkhardt, 2002) อย่างไรก็ตามในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด เช่น K562, Kasumi-1 ; acute myeloid leukemia FAB M2 with t(8;21), MV-4-11 ; acute monocytic leukemia FAB M5 with t(4;11) (q21,q23) and NB-4 ; acute promyelocytic leukemia (FAB M3) with t(15;17) ก็ได้มีการค้นพบว่ามี การแสดงออกของยีน bcr-abl เป็นอย่างมากเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์ K562 ถูกลดการแสดงออกของยีนได้มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ โดยพบ 43% โดยการ ใช้ realtime RT-PCR และใช้ GAPDH เป็นตัวควบคุม

และยิ่งไปกว่านั้น การ co-transfection ของยีน *bcr-abl* และ *WT1* โดยใช้หลักการ siRNA ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวอย่างมีประสิทธิภาพ และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ได้ถึง 15.3% และ 24.8% ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML พบว่าเกิดการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ได้ 8.6% และ 24.8% ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามได้พบผลข้างเคียงเล็กน้อยเกี่ยวกับอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อย ๆ ลดลงหลังจากการ transfection WT1-siRNA ลงใน normal CD34<sup>+</sup> cell ในขณะที่อัตราการเกิด apoptosis ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากการทดสอบด้วย WT1-siRNA (A. Elmaagacli et al., 2005) ซึ่งในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว CML ด้วย siRNA และมุ่งเน้นยับยั้งการแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่งอาจจะไม่เพียงพอให้วิธีการนี้มีประสิทธิภาพมากนัก เพราะฉะนั้นจึงมีกลุ่มนักวิจัย Merkerova และคณะ ในปี 2006 ได้มีความสนใจในการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งได้แก่ *PCNA* gene (proliferating cell nuclear antigen) ซึ่งเป็นหนึ่งในบรรดาชิ้นเป้าหมายที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค CML โดยการใช้เทคโนโลยี siRNA โดยได้กล่าวมาแล้ว ความสำคัญของยีน *PCNA* คือ ยีนนี้เกิดจากการสังเคราะห์สาย DNA ที่เป็น leading strands และ lagging strand ของยีน *SV40* เหมือนกับเป็น cofactor ของเอนไซม์ polymerase  $\delta$  (Bravo, Frank, Blundell, & MacDonald-Bravo, 1987) และการยับยั้งการทำงานของยีน *PCNA* นี้ นำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ CML ประเภท bcr-abl positive cells เช่น K562 KU-812 (b3a2 BCR/ABL fusion type) และ MOLM-7 (b2a2) ยิ่งไปกว่านั้น ยีนที่ทำหน้าที่หลักในกระบวนการของเซลล์ เช่น cell cycle factor (cyclin dependent kinase: *CDK1 CDK4 PLK1 ERK3* และ *JNK1*) ยีนที่ทำหน้าที่เป็น replication transcription และเซลล์ที่ทำหน้าที่ repair factors (*RFC transcription factor gene STAT5*), และยีนที่ทำหน้าที่ด้าน cell signaling เช่น (*MAP kinase and GTPases*) และยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis และการเกาะติดของเซลล์ ซึ่งยีนเหล่านี้จะถูกยับยั้งการแสดงออกเมื่อ *PCNA* ถูกยับยั้ง ในการทดลองนี้พบว่า เมื่อยีนเป้าหมายถูกควบคุมการแสดงออก จะพบการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมากเมื่อถูกทดสอบด้วย siRNA nucleofaction โดยจะพบในผู้ป่วย CML จำนวน 35 รายใน 588 ราย หลังจากรักษาด้วยวิธี gene expression array อย่างไรก็ตามในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการมุ่งเน้นไปถึงการศึกษาวิธีการรักษาแบบยีนบำบัดแบบใหม่ ๆ เพื่อที่จะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ชนิด K562 และทำการตรวจเช็คผลกระทบต่อเซลล์ทั้งหลอดทดลองและในตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วย

### ***WT1* gene และ CML**

งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งทำให้เกิดการลดการเจริญของเซลล์ และส่งผลให้เกิด G0/G1 arrest ในวงจรชีวิตของเซลล์ (Gunter Kerst & Marketa Kalinova, 2008) และยังส่งผลกระทบต่อ cell cycle ด้วยการวัดค่าการติดสี PI ด้วย flow cytometry อีกด้วย (Nunez., 2001) และอีกงานวิจัยหนึ่งที่ระบุว่าสามารถตรวจสอบพบยีนหลายชนิดทั้งที่เป็น ยีนก่อโรคมะเร็ง และยีนที่ต้านการเกิดมะเร็ง ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและหนึ่งในนั้นก็ถือเป็นการพบการแสดงออกอย่างมาของยีน *WT1* ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกว่าเป็น tumor suppressor gene โดยยีน *WT1* นี้จะถูกถอดรหัสเป็น transcription factor ซึ่งประกอบด้วย Cys2-His2 zinc-finger ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การตายของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเซลล์ ยกตัวอย่างของการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์เม็ดเลือดแล้วเกิดการกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนไปเป็น myeloblastic leukemia M1 cell monocytic differentiation ซึ่งสรุปได้ว่า *WT1* มีบทบาทสำคัญในด้านการควบคุมโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์เม็ดเลือด (Shirley, Dominique, Gregory, Andrew, & Chung, 1998) และอย่างไรก็ตามการแปลรหัสของ *WT1* ก็ทำให้เกิดโปรตีนรูปแบบต่าง ๆ กันขึ้น โดยยีน *WT1* จะมีการแสดงออกอย่างมาในเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย ซึ่งยีนดังกล่าวนี้จะอยู่บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 11 ซึ่งประกอบไปด้วย exon จำนวน 10 exon และมี zinc-fingers อยู่ 4 คู่ในบริเวณ exon ที่ 7-10 ที่ปลายด้าน carboxyl group ซึ่งทำหน้าที่ในการ promote การเข้าจับของ DNA (DNA binding region) (Rosenfeld, Cheever, & Gaiger, 2003) ไอโซฟอร์มทั้งสี่แบบของยีน *WT1* เกิดจากกระบวนการ alternatively spliced ใน 2 บริเวณ ได้แก่ การสอดแทรก หรือไม่สอดแทรกของ กรดอะมิโน 17 ตัวยังบริเวณตำแหน่ง exon ที่ 5 และการมีหรือไม่มีการสอดแทรกของกรดอะมิโน 3 ตัว ได้แก่ lysine, threonine และ serine: KTS ระหว่างบริเวณ zinc-fingers ที่ 3 และที่ 4 (Gessler, Konig, & Bruns, 1992; Harber et al., 1991) การแสดงออกอย่างมาของ *WT1(+17AA)* จะทำให้เกิดภาวะการต่อต้านการเกิด apoptosis ซึ่งวัดผลจากการปกป้องเซลล์จากการเกิดความเสียหายของผนังของไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นสัญญาณของการตายแบบ apoptosis (Ito et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ไม่พบผล

เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นใน WT1(+17AA) กล่าวคือ WT1(-17AA) ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั่นเอง ในการศึกษาผลของ WT1-siRNA ที่จำเพาะกับ WT1(+17AA) นั้นพบว่ามีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis โดยผลการทดลองพบว่าเกิดกระบวนการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-9 ใน intrinsic apoptotic pathway ในทางกลับกันผลการทดลองนี้ไม่กระทบกับ caspase-8 ของ extrinsic apoptotic pathway (Ito, et al., 2006) การเกิด alternative splice II ซึ่งมีการแทรก KTS เข้าไปในโครโมโซมทำให้เกิดอีก 2 ไอโซฟอร์ม ที่ทำหน้าที่ในการเกาะกับดีเอ็นเอของยีน early growth factor1 (*EGF1*) (Rauscher, Morris, Tournay, Cook, & Curran, 1990) และส่งผลในการยับยั้งตรงบริเวณตำแหน่ง zinc-fingers ทำให้ส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการเกาะกับดีเอ็นเอ (Englert et al., 1995) โดยที่ยีน *WT1* จะถูกถอดรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 52-54 กิโลดัลตัน ซึ่งประกอบไปด้วย บริเวณที่มี glutamine proline อยู่มากในตำแหน่ง transregulatory domain และ zinc-finger อีก 4 ลูปที่อยู่ด้าน คาร์บอกซีกรุป (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990) โดยที่ WT1 จะทำหน้าที่ควบคุมยีนในลำดับต่อไปนี้ *EGR-1 IGF-2 IGF-1-R C-MYC* และ *C-MYB* ด้วยกระบวนการที่ร่วมกันกระตุ้นหรือกระตุ้นด้วยตัวเองของยีนที่ทำหน้าที่ช่วยเหลือในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ (Rauscher, et al., 1990; Scharnhorst, Van der Eb, & Jochemsen, 2001) อีกประการหนึ่ง การแสดงออกอย่างมากของยีน *WT1* นำไปสู่ผลการเพิ่มจำนวนของ *BCL-2* ภายในเซลล์ชนิด rhabdoid tumor cell line G401 (Mayo et al., 1999) ในขณะที่มีรายงานแสดงให้เห็นว่าในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพบว่า WT1 ไม่สามารถควบคุม *bcl-2* promoter ได้ (Cheema et al., 2003) การเกิดปฏิกิริยาของ WT1 และ ยีนเป้าหมาย เกิดขึ้นจากการที่โมเลกุลของ WT1 มีบริเวณ zinc-fingers ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีนเป้าหมาย เช่น WT1(-KTS) มี zinc-fingers domain ที่มีความใกล้เคียงกับ early growth response-1 (*EGR-1*) (CGCCCCGC) และเนื่องจากโปรตีน *EGR-1* ก็มี zinc-fingers ที่เกิดจาก Cys2-His2 เช่นกันประมาณ 60% ที่มีความคล้ายคลึงกับ zinc-fingers ที่ 2, 3, และ 4 ของโปรตีน WT1 (Rauscher, 1993) แต่อย่างไรก็ตาม โปรตีน *EGR-1* ก็ไม่ได้ทำหน้าที่ในการเกาะกับ RNA ซึ่งไม่เหมือนกัน WT1 ที่สามารถเกาะกับ RNA ได้ ในขณะที่ศึกษาระหว่างกระบวนการพัฒนาของไต ได้แก่ การแสดงออกของ WT1 แต่ละไอโซฟอร์ม ดังนี้ WT1(+17AA/+KTS) : WT1(-17AA/+KTS) : WT1(+17AA,-KTS) : WT1(-17AA/-KTS) เท่ากับ 8.3:3.8:2.5:1.0 ตามลำดับ (Harber, et al., 1991) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีสัดส่วนการแสดงออก

ของ WT1 แต่ละไอโซฟอร์มดังนี้ สัดส่วนระหว่าง WT1(+KTS) : WT1(-KTS) ประมาณ 1.6:1.0 เท่า (Harber, et al., 1991) และได้มีรายงานเกี่ยวกับ WT1(-KTS) ที่สามารถยับยั้งผลของ WT1(+KTS) ได้ตามปริมาณที่ทดสอบโดยการวัดค่าการแสดงออกของ alkaline phosphatase ที่หลั่งออกมาหลังจากเซลล์ถูก transfection ด้วยพลาสมิด pCMVgagpol สำหรับการวิเคราะห์หา CTE (Bor, Swartz, & Aorrison, 2006) โดยทุก ไอโซฟอร์มได้มีการแสดงให้เห็นว่าเกิดการยับยั้งและในขณะเดียวกันก็สามารถกระตุ้นโปรโมเตอร์หลาย ๆ ชนิดของเซลล์ผ่านทาง การเกาะกับ โมเลกุลของดีเอ็นเอ และเพียงเฉพาะไอโซฟอร์ม WT1(+17AA/-KTS) เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นโดยต้องใช้ exon 5 เพื่อควบคุมแฟลคเตอร์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Moorwood et al., 1999) และยังมี การทดลองที่สรุปได้ว่าหน้าที่หลักของ WT1(+KTS) นั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลังการ transcription ในระดับ RNA processing ดังนั้นพวกเขาจึงแสดงให้เห็นว่า WT1(+KTS) นั้นมีความจำเพาะที่สามารถช่วยให้เกิดกระบวนการ splicing factor (U2AF65) และเกี่ยวข้องกับ putative splicing factor (WTAP) (Davies et al., 1998; Larsson et al., 1995; Ortiga et al., 2003) ยิ่งไปกว่านั้น WT1(+KTS) ยังสามารถทำหน้าที่ในการเชื่อมโยงกับ cis-acting ของ constitutive transport element (CTE) เพื่อนำส่ง RNA ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการ splicing ที่ยังคงมีส่วนของ intron อยู่จากนิวเคลียสออกไปยังไซโตพลาสซึม และส่งเสริมกระบวนการ translation ของ mRNA เป้าหมายของ WT1 อีกด้วย (Bor, et al., 2006) อีกประการหนึ่ง การแสดงออกของ WT1 พบน้อยมากในเซลล์เม็ดเลือดปกติ และ เซลล์เม็ดเลือดที่เป็น CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (Gaiger, Reese, Disis, & Cheever, 2000) แต่ที่พบว่า WT1 สามารถแสดงออกได้อย่างมากในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็นมะเร็ง เช่น K562 และ HeLa60 ซึ่งอย่างไรก็ตามในการลดการแสดงออกของยีน *WT1* และไอโซฟอร์ม WT1(+17AA) และมีการเพิ่มการแสดงออกของ CD11b ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการบวนการเปลี่ยนแปลงเป็น NB4 cells (Gu et al., 2005) อัตราส่วนของแต่ละไอโซฟอร์มของ WT1 ได้รับความสนใจในการศึกษาในเซลล์ปกติ และในเซลล์ที่เกิดโรค เช่น คณะวิจัย Lui และคณะ (Liu, Wang, Deuel, & Xu, 1999) ได้พยายามในการบ่งชี้และแยกแยะว่า ผู้ป่วยโรค wilms' tumor เกิดความผิดปกติของใด โดยที่พวกเขาทำการศึกษาอัตราส่วน ของ WT1 ต่อไอโซฟอร์มของมัน ที่ไม่มี exon 5 ได้แก่ (WT1+17AA ต่อ WT1-17AA) ในเซลล์ของผู้ป่วยโรค wilms' tumor พบว่าความแตกต่างของอัตราการแสดงออกของยีนทั้งสองอย่างดังกล่าวในเซลล์ปกติคือ 2:1 และเซลล์ของผู้ป่วยคือ 1:1 หรือ 1:5 ตามลำดับ ซึ่งจากผลอันนี้สามารถสรุปได้ถึงถึงความแตกต่างที่เกี่ยวข้องกันระหว่างทั้งสองไอโซฟอร์ม และสามารถระบุ

ได้ว่าเป็นการแยกย่อยของ sporadic unilateral wilms'tmors และยังไปกว่านั้น การศึกษาถึงการแสดงออกของ WT1 ได้ถูกวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการ RQ-RT-PCR โดยนักวิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 226 คนที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในสาย myeloid ที่ได้รับการรักษาและได้รับการวินิจฉัยว่ากลับมาเป็นซ้ำ พบว่า สัดส่วนของการแสดงออกของ WT1(+17AA) และ WT1 ทั้งหมด ได้เท่ากับ 0.5 และพบสูงกว่าในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ มากกว่าในผู้ป่วยที่เพิ่งจะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดดังกล่าว (Gu et al., 2010)

รายงานหลายฉบับยืนยันว่าการแสดงออกอย่างมากของ WT1 มีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับการวินิจฉัยผู้ป่วยรายใหม่ และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ด้วยวิธีการหาปริมาณของยีนผ่านการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR โดยพบว่าประมาณ 60-100% ของผู้ป่วย AML และ ALL ที่มีการแสดงออกของ WT1 แต่อย่างไรก็ตาม ระดับของการแสดงออกของ WT1 พบใน ALL น้อยกว่า AML (Inoue et al., 1994) ยิ่งไปกว่านั้น การลดการแสดงออกของ endogenous WT1 ในเซลล์ไลน์ AML และเซลล์ของผู้ป่วย AML นำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย (Ito, et al., 2006; Yamagami et al., 1996) และในสัตว์ทดลองที่มี WT1(-KTS) น้อย หรือการขาด WT1(-KTS) มีบทบาทสำคัญในการคงรักษาความมีชีวิต และเนื้อเยื่อของตัวอ่อนของสัตว์ทดลองได้เป็นอย่างดีในขณะที่การแสดงออกของ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ sex-determining region Y(Sry) ถูกลดระดับลง และเป็นสาเหตุให้ได้โครโมโซมเป็น XY อย่างสมบูรณ์ เหล่านี้ถูกพบในหนูทดสอบที่ขาดการแสดงออกของ WT1(+KTS) (Hammes et al., 2001).

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด เช่น human promyelocytic leukemia (KL-60) human leukemia (K562) murine erythroleukemia (MEL) และ lymphocytoc leukemia (U937) ถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาระบบของการเปลี่ยนแปลงในสายของเม็ดเลือด (Tsiftoglou, Pappas, & Vizirianakis, 2003) ซึ่งผลของการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ชนิด MEL คือการจำกัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้เกิดปรากฏการณ์ G1 arrest ยิ่งไปกว่านั้น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวยังทำให้เกิดผลตามมาหลายอย่าง ในระดับเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงบนผิวเซลล์ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงระบบการเผาผลาญของเซลล์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส ดังที่เกิดขึ้นใน HL-60 cell และใน

ส่วนของเซลล์ K562 ที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็น megakaryocytic และ macrophage-monocytic cells โดยผ่าน phorbol esters-activating MAPK pathway ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์ K562 ที่ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปเป็น erythropoiesis ผ่านสารกระตุ้น hemin ก็มีการแสดงคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasticity เพื่อการเปลี่ยนสายของเม็ดเลือดได้ (Whalen, Galasinski, Shapiro, Nahreini, & Ahn, 1997)

โปรตีน WT1 มีหน้าที่หลายอย่างในกระบวนการภายในเซลล์ เช่น ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ และควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ การแสดงออกอย่างมากของ WT1 ถูกพบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ยังไม่แก่ตัว รวมไปถึง มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และชนิดเรื้อรัง ในสายตัวอ่อน myeloid (Miwa, Beran, & Saunders, 1992) การลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ถูกพบในเซลล์ K562 ในระหว่างที่ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น erythrocyte และ megakaryocytic cells (Phelan, Lindberg, & Call, 1994) นอกจากนี้ยังพบในเซลล์ชนิด HL-60 ซึ่งถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ในสาย myelomonocytic cells อีกด้วย (Sekiya, Adachi, Hinoda, Imai, & Yachi, 1994) ในทางกลับกัน การเพิ่มการแสดงออกของ WT1 ในเซลล์ไขกระดูก นำไปสู่การยับยั้งไม่ให้เซลล์ดังกล่าวเปลี่ยนแปลงไปเป็น myeloid progenitor cells (Tsuboi et al., 1999) โดยรายงานวิจัยของ Svedberg และคณะ ได้สรุปไว้ว่าการคงรักษาให้มีการแสดงออกอย่างมากของ WT1 ไม่ได้เป็นเหตุให้เกิดการกระตุ้นเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate (TPA) (Svedberg, Chylicki, & Gullberg, 1999)

### WT1 and CML differentiation

การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีหลากหลายกลไก ได้แก่ กลไกที่ 1 ผ่านทางผนังเซลล์ และสัญญาณการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง โดยเริ่มต้นจากปฏิกิริยาของ growth factors และตัวรับบนผิวเซลล์ โดยสัญญาณถูกสร้างขึ้นจาก plasma membrane เข้าไปภายในนิวเคลียสเพื่อสั่งให้ กระตุ้นหรือลดการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง (Ghysdele et al., 2000) ไม่เพียงแต่ signal transduction pathway เท่านั้น แต่ยังหมายรวมถึงสารเคมีที่มีและไม่มีชีวิตที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ระดับของ plasma membrane การเกิดปฏิกิริยาขึ้นที่ผิวเซลล์ การลดขนาดของเซลล์ การกระตุ้นการขนส่ง  $Ca^{2+}$  และการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีอื่น ๆ ขึ้นระหว่างการเกิดและกระตุ้นให้ระยะการแบ่งเซลล์ในช่วง G1 สิ้นลง (Tsiftoglou & Robinson,

1985) กลไกที่ 2 เกิดจากกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับตัวรับต่าง ๆ ซึ่งเป็นพื้นฐานของการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์ ผ่านองค์ประกอบที่คล้ายกับตัวรับบนผิวเซลล์ ซึ่งสารเคมีบางชนิด เช่น bisacetamides, hydroxamic acid และ ureidopyridine derivatives ซึ่งมีการใช้เพื่อสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นภายในเซลล์ เพื่อสร้างreceptor-like cellular components (review of Tsiftoglou et al,2003) กลไกที่ 3 คือการทำต้นแบบขึ้นมาใหม่ของโครงสร้างของโครมาติน ซึ่งพบในกระบวนการเกิด nuclear condensation และ การจำลองดีเอ็นเอ ของเซลล์ MEL ที่เกิดการ differentiation การเปลี่ยนแปลงนี้มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของalpha and beta-globin genes ผ่านการเพิ่มขึ้นของ DNase I hypersensitivity ที่ลำดับเบสของยีนทั้งสอง กลไกที่ 4 การเกิดปฏิกิริยา transmethylation ของ ดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ โดยในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด MEL ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO ที่พบว่าเกิดจากกระบวนการ methylation ของ RNA โดยสารเคมีนี้จะกระตุ้นกระบวนการ methylation ของไซโตพลาสซึมทั้งหมด และ polyA+RNA ซึ่งอย่างไรก็ตาม การเพิ่ม RNA methylation อาจส่งผลต่อพฤติกรรมทางเคมีกายภาพ และกระบวนการขนส่งจากนิวเคลียสไปสู่ไซโตพลาสซึม อีกประการ การเปลี่ยน RNA methylation อาจส่งผลต่อกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างและรูปร่างของเซลล์ซึ่งมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของ trans-acting factors ได้อีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้น ความเสถียรของ RNA และระดับของ RNA transcription ก็ส่งผลหลังจากเกิด RNA methylation กลไกที่ 5 เซลล์ที่จำเพาะกับ transcription factor ทำหน้าที่ในการควบคุม reprogramming ของ hematopoietic cell fate ภายใต้เซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเม็ดเลือดรวมไปถึงโปรตีนที่ควบคุมจุดเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลง วงจรชีวิตของเซลล์ และ apoptosis เช่น GATA-1, GATA-2, p53, c-myc ซึ่งโปรตีนเหล่านี้สามารถควบคุมกระบวนการ reprogramming ของ HSCs ภายในสายของเซลล์อย่างจำเพาะ ตัวอย่างเช่น GATA-1 จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงในสาย erythroid GATA-2 จะควบคุม progenitors cell ส่งผลให้เซลล์ยังคงมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ ส่วน P53 ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ทั้ง progeniter cells และ erythroid cells นำไปสู่การควบคุมการเจริญเติบโต และการตายของเซลล์ และสุดท้าย c-myc กระตุ้นเซลล์หลายชนิด รวมทั้ง การเปลี่ยนแปลงเซลล์เม็ดเลือด และยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลง และการตายของเซลล์ transcription factor บางตัวแสดงผลทั้งสองแบบ ได้แก่ การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงที่มีความจำเพาะกับลักษณะที่แสดงออกของเซลล์ หรือยับยั้งการทำงานของ transcription



factor อื่น ๆ เช่น การแสดงออกอย่างมากของ PU.1 ถูกควบคุมการพัฒนาของเม็ดเลือดสาย erythroid progenitor โดยผ่านการทำงานของ GATA-1 ในขณะที่การแสดงออกของ GATA-1 มีผลต่อการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PU.1 และกลไกที่ 6 ประสิทธิภาพของ protooncogenes ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และการตายของเซลล์ c-myc ซึ่งเป็น transcription factor ตัวหนึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และการตายของเซลล์ รวมไปถึงการ reprogramming ของ hematopoietic progenitor cells ความไวของเซลล์ผ่านทาง c-myc ถูกพบว่าเกิดการปลดปล่อย cytochrom c ออกจาก ไมโทคอนเดรีย ไปยังไซโตพลาซึม ซึ่งเหตุการณ์นี้สร้าง CD95/Fas ligand ซึ่งจำเป็นต่อการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ผ่านทาง caspases pathway

### WT1 and cytokine expression

Interleukin-2 (IL-2) เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญสำหรับการกระตุ้นการเจริญของ T-cells กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และกระตุ้นกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ T-cells ทำหน้าที่โดยการส่งสัญญาณผ่าน IL-2 โดยมีตัวรับสัญญาณ IL-2 receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ซึ่งประกอบด้วย 3 subunit ได้แก่ subunit alpha (IL-2RA) subunit beta (IL-2RB) และ subunit gamma (IL-2RG) โดยทั้งสาม subunit ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ผ่านทาง IL-2 pathway โดยทั้งสามโมเลกุลถูกแบ่งแยกโดยใช้ความสามารถในการเกาะกับโมเลกุลของ IL-2 แยกได้เป็น ความสามารถในการเกาะสูง กลาง และต่ำ (K. A. smith, 1988) IL-2RA ประกอบไปด้วย exon จำนวน 8 exon ซึ่งอยู่บริเวณโครโมโซมที่ 10p14-15 อย่างไรก็ตาม IL-2RA ไม่สามารถทำหน้าที่ส่งสัญญาณได้ด้วยตัวเองเพียงลำพัง เพราะโครงสร้าง cytoplasmic domain ของ IL-2RA ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนเพียง 13 ตัวเท่านั้น ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยจนเกินไป (Ishida et al., 1985; Leonard et al., 1985) ดังนั้นจึงต้องการ subunit อื่น ๆ เข้ามาช่วย ได้แก่ IL-2RB ซึ่งประกอบไปด้วย exon จำนวน 10 exons ที่อยู่บริเวณโครโมโซมที่ 22q11.2-12 และประกอบไปด้วยกรดอะมิโนถึง 525 ตัว และมันยังถูกบ่งชี้ลักษณะว่าเป็นไซโตไคน์ที่เป็น super family ซึ่งมีความสามารถในการเกาะกับโมเลกุลของ IL-2 ได้ดีมาก ส่วน IL-2RG ซึ่งมีขนาด 64 กิโลดัลตัน และประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 347 ตัว โดย IL-2RG ถูกตรวจสอบครั้งแรกว่าทำหน้าที่เป็น coimmunoprecipitation กับ IL-2RB (Takeshita et al., 1992) โครงสร้างของ cytoplasmic domain ของ IL-2RG ประกอบด้วย Src homology region ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณต่อ ๆ กันไปผ่านทางการทำงานปฏิกิริยากับ phosphotyrosine ของตัวส่ง

สัญญาณที่มีประสิทธิภาพ เช่น IL-2, IL-4, IL-9, และ IL-15 ทั้งสามหน่วยย่อยของ IL-2 receptor จะทำงานได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความร่วมมือกันและค่าจำเพาะของ dissociation rate constants และความสามารถในการเกาะของ IL-2 ด้วย (Matsuoka et al., 1993) โดยการเกาะกันเป็น complex ของทั้งสามหน่วยย่อย (heterotrimer) จะทำให้เกิด high-affinity IL-2 binding และในทางกลับกันถ้าเกิด (heterodimer) ระหว่าง IL-2RA และ IL-2RB จะไม่แสดงสัญญาณในการเกิด transduction สำหรับการเจริญของเซลล์ อีกประการหนึ่ง heterodimer ระหว่าง IL-2RB และ IL-2RG จะแสดงความสามารถในการเกาะกับ IL-2 ได้ปานกลาง ทั้งสอง subunit ไม่สามารถแยกกันออกไปทำงานเดี่ยว ๆ จึงต้องทำหน้าที่แบบเป็น complex ซึ่งจะสนับสนุนการเพิ่มสัญญาณการเกาะกับ IL-2 ได้เป็นอย่างดี IL-2 receptor จะตอบสนองต่อ IL-2 ได้ด้วยกระบวนการ tyrosine phosphorylation ของ IL-2RB และจะกระตุ้น protooncogene เช่น c-myc, c-fos, and c-jun (Asao et al., 1993) ทั้งหมดทั้งหมดสามารถบ่งชี้ได้ว่า IL-2RB และ IL-2RG มีความสำคัญสำหรับหน้าที่เป็น IL-2 receptor complexes ส่วน IL-2RA ทำหน้าที่เพียงแค่การเพิ่มประสิทธิภาพของ complex ที่เป็น heterodimer ระหว่าง IL-2RB และ IL-2RG ยิ่งไปกว่านั้น IL-2RG ยังสามารถตอบสนองต่อไซโตไคน์ต่าง ๆ ชนิด เช่น IL-4, IL-7, IL9, IL-15 ซึ่งนำไปสู่การทำหน้าที่เป็น multi-receptor subunit

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด chronic myeloid leukemia (K562) ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด PRMI1640(Gibco: Cat.No: 31800-014)ที่มีส่วนผสมของ Fetal bovine serum 10% (Hyclone: Cat.No: CH30160.03)ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin (100U/ml) และ streptomycin (100 ug/ml) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในตู้บ่มเซลล์ ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนเซลล์ที่ใช้เพื่อสร้างไวรัส (packaging cells) ได้แก่ 293T/17 cells ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Gibco: Cat. No. 31600-026) ที่เตรียมโดยเติมส่วนผสม Fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะชนิด penicillin (10U/ml) และ streptomycin (100 ug/ml) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในตู้บ่มเซลล์ ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อาหารเลี้ยงเซลล์ในกระบวนการสร้างไวรัสจะไม่เติมยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการยับยั้งการสร้างตัวไวรัส

#### 2. การสร้างไวรัสและตรวจวัดปริมาณไวรัส

อนุภาค Lentivirus ถูกสร้างขึ้นจาก lentiviral vectors ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแคลเซียม คลอไรด์ ในpackaging cells สรุปวิธีย่อ ๆ ได้ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ 293T/17 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 90% ใน tissue culture dish จากนั้น ทำการเติม packaging plasmids mixed (6.5 ug of pLP1, 2.5 ug of pLP2 and 3.5 ug of pLPv) และ core plasmid (10 ug of p201 หรือ WT1-siRNA) ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการบ่มเซลล์ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคไวรัส และกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  และนำไปตกตะกอนไวรัสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 28,000 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้ง supernatant และละลายตะกอนไวรัสด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ เก็บไวรัสไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

### 3. การนำไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

เลี้ยงเซลล์ K562 ใไว้ให้มีความแข็งแรงก่อนที่จะนำมาทำ viral transduction โดยการนำไวรัสที่ผ่านการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง เติมสารละลาย polybrene ด้วยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 8  $\mu\text{g/ml}$  ทำการ transducer ไวรัสเข้าสู่เซลล์ K562 ด้วยวิธี spin ด้วยความเร็วรอบ 1,800 rpm เป็นเวลา 45 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำ viral transduction 3 ครั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย 48 ชั่วโมงหลังจากทำการ transduction แล้ว เซลล์ที่ติดไวรัสจะเกิดการเรืองแสงสีเขียวของ green fluorescence protein และสามารถคัดเลือกเอาเฉพาะ positive cells เท่านั้น โดยใช้เครื่อง FACs vantage หลังจากนั้น เซลล์ที่ได้ถูกนำไปใช้เพื่อการทดลองต่อ ๆ ไป

### 4. การตรวจวัดการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หลังได้รับ WT1-siRNA

หลังจากที่ GFP positive cells ถูกคัดเลือกแล้ว เซลล์ทั้งหมดที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงต่อเป็น เวลาตามที่กำหนดในการทดลองคือ 0 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมงจากนั้นเมื่อถึงเวลาดังกล่าว เซลล์จะถูกเก็บและนับจำนวนด้วยการย้อม trypan blue จากนั้นนับจำนวนเซลล์ให้ได้  $1 \times 10^4$  cells และนำไปทำการทดสอบการเจริญของเซลล์ด้วย MTT assay โดยเติม cell suspension 100  $\mu\text{l}$  และเติม CellTiter 96 aqueous one solution ปริมาณ 20  $\mu\text{l}$  ลงไปใน 96 well plate ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 490/620 nm ด้วย ELISA plate reader

### 5. การวัดการตาย แบบ apoptosis ของเซลล์ด้วยวิธีวัดการทำงานของ apoptotic enzyme; Caspase-3/7 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA

หลังจากที่ GFP<sup>+</sup> cells ถูกคัดเลือกแล้ว เซลล์ทั้งหมดที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงต่อเป็น เวลาตามที่กำหนดในการทดลองคือ 0 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อถึงเวลาดังกล่าว เซลล์จะถูกเก็บและนับจำนวนด้วยการย้อม trypan blue จากนั้นนับจำนวนเซลล์ให้ได้  $1 \times 10^4$  cells และนำไปทำการทดสอบวัดการทำงานของเอนไซม์แคสเปส โดยเติม cell suspension 100  $\mu\text{l}$  และเติม Apo-One Homogeneous Caspase-3/7 reagent (Promega: Cat.No. G778A) ปริมาณ 100  $\mu\text{l}$  ลงไปใน 96 well plate ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 499/521 nm ด้วย Fluorescence spectrometer

## 6. การวัดการตาย แบบ apoptosis ของเซลล์ด้วยวิธีย้อม antibody บนผิวเซลล์หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA

เพื่อยืนยันว่า WT1-siRNA มีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์ K562 ตายแบบ apoptosis เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย WT1-siRNA ตามเวลาต่าง ๆ จำนวน  $1 \times 10^5$  cells ถูกนำมาย้อม antibody บนผิวเซลล์ด้วย 5  $\mu$ l Annexin V-FITC และ 5  $\mu$ l Propidium Iodide (BD Pharmingen: Cat.No. 556547) จากนั้นบ่มเซลล์ไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ตายด้วยเครื่อง Flow cytometry

## 7. การวัดระดับการแสดงออกของ mRNA

เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ของเซลล์ K562 หลังจากถูก transduction ด้วย WT1-siRNA เมื่อ GFP positive cells ถูกคัดเลือกและทำการเลี้ยงต่อจนกระทั่งถึงเวลาที่กำหนดในการทดลอง เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยว แล้วนำมาตกตะกอน จากนั้นทำการล้างตะกอนของเซลล์ด้วย PBS และตกตะกอนอีกครั้ง จากนั้น นำเอาตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัด total RNA extraction kit (geneaid) หลังจากนั้นทำการเปลี่ยน RNA กลับไปเป็น cDNA ด้วยชุด kit ซึ่งประกอบด้วย 1 X RT buffer 0.83 mM dNTPs mix 2.08 pmole reverse primer 100 unit of reverse transcriptase 700-1000 ng of RNA template และ diethylpyrocarbonate- treated water. หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เพื่อให้เอนไซม์ reverse transcriptase ทำงาน จากนั้น cDNA template ถูกใช้เพื่อทำการเพิ่มจำนวนยีน โดยการเติม reaction mixed ดังต่อไปนี้ 1X PCR buffer 0.2 mM dNTPs mix 2 mM  $MgCl_2$  0.2 pmole reverse primer 0.4 pmole forward primer 1 unit of Taq DNA polymerase 10.0  $\mu$ l cDNA จาก การทำ reverse transcription and RNase/DNase free water ปรับปริมาณสุดท้ายของปฏิกิริยาดังนี้ให้ได้ 25  $\mu$ l/reaction นำเอาหลอดใส่เข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 95°C 5 นาที จากนั้น 40 cycles ที่ 95°C 1 นาที 51°C หรือ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแต่ละ primer (ตารางที่ 1) 30 วินาที 72°C 45 วินาทีและตามด้วย 72°C 5 นาที และคงไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งานต่อไป จากนั้นนำเอา PCR product ไปทำ gel electrophoresis ที่ 1.5% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide

### ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของ primers

mRNA	Primer sequences	Annealing temp.	Product size	References
WT1 Exon 8-10	R:5'-TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTT-3' F: 5'-AGACATACAGGTGTGAAACC-3'	51	225	Damon et al., 2000
IL2	R:5'- TGGGAAGCACTTAATTATCAAGTC-3' F:5'-CGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGG -3'	60	150	Kim et al., 2006
IL-2RB	R:5'-CGGTGTTCTCAGATTG-3' F:5'-CAGTATGAGTTTCAGGTGCG-3'	50	205	Kim et al., 2006
IL-2RG	R:5'-CCAACAGAGATAACCACGG-3' F:5'-CGCTACACGTTTCGTGTTTC-3'	60	152	Kim et al., 2006
GAPDH	R: 5'GTAATCAGCGCCAGCATCG-3' F: 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'	60	310	Yao et al., 2006

### 8. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน WT1 และ caspase 7 ของเซลล์ K562 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA

ทำการสกัดโปรตีนของเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ด้วย CelLytic M cell lysis reagent (Sigma, C2978) เป็นเวลา 15 นาทีตามวิธีการ และปั่นเศษตะกอนด้วยความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford protein assay (Sigma, B6916) จากนั้นนำ 50 ug ของโปรตีนที่ได้รวมทั้ง sample buffer ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำลายโครงสร้างของโปรตีน (denaturation) จากนั้นโปรตีนที่เตรียมพร้อมแล้วถูกนำไปแยกขนาดด้วย SDS-PAGE gel ด้วยสภาวะ 200 V 70 mA เป็นเวลา 80 นาที โปรตีนบนแผ่นเจลถูกเคลื่อนย้ายไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF โดยใช้ blotting buffer (25 mM Trizma base 192 mM glycine และ 20% Methanol) ที่สภาวะ 400 mA 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ blocking แผ่นเมมเบรนเพื่อป้องกันการเกิด non specific ด้วย blocking buffer ข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1% skim milk จากนั้นนำ primary antibody ความเข้มข้นตามที่ระบุไว้ด้านล่างเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนบนแผ่นเมมเบรน เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยการเขย่าภาชนะตลอดเวลา จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1% skim milk เป็นเวลา 10 นาที และเติม secondary antibody ความเข้มข้นตามที่ระบุด้านล่าง เพื่อจับกับ



### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### ผลการทดลองตอนที่ 1

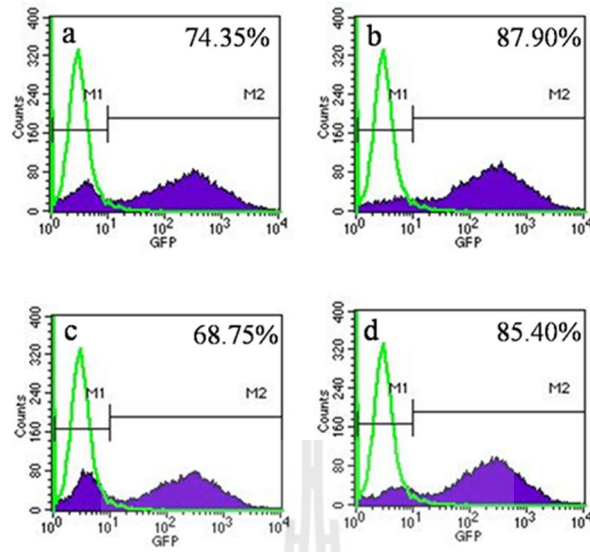
#### การทดสอบผลของ WT1-siRNA ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

#### ชนิด Chronic myeloid leukemia : K 562

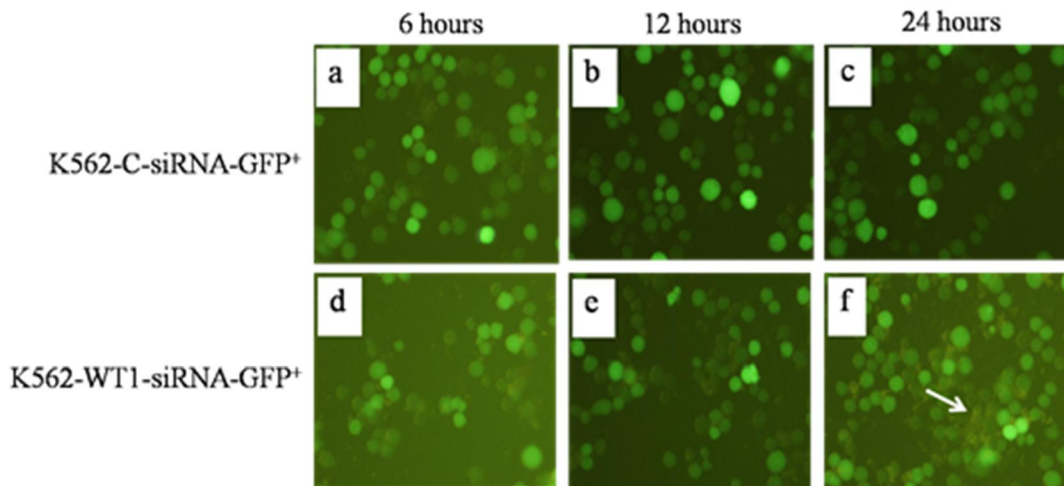
##### 1. ประสิทธิภาพการ transduction ของ lentivirus เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562

หลังจากเซลล์ K562 จำนวน  $2 \times 10^6$  cells ถูก transduce ด้วย Lentivirus ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงแล้ว นั้น เมื่อถึงระยะเวลาบ่มครบ 48 ชั่วโมง ก็ทำการตรวจหาปริมาณเซลล์ที่ถูก transducer โดยการวัดปริมาณเซลล์ที่มีการแสดงออกของ green fluorescence protein (GFP) และเซลล์ที่ถูก transduce จะผ่านกระบวนการคัดเลือก (sorting) เพื่อคัดเอาเฉพาะเซลล์ที่เป็น GFP positive เท่านั้น ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ที่คัดเลือกได้นั้นเพิ่มประชากรได้ จากเดิมประมาณ 68% เป็น 85% (รูปภาพที่ 1) และลักษณะเซลล์ที่มีการแสดงของ GFP นั้น จากภาพจะสังเกตเห็นว่า เมื่อระยะเวลาของการบ่มนานยิ่งขึ้น ในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ WT1-siRNA จะพบการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นดู ในขณะที่เซลล์ที่เป็นกลุ่มควบคุม (C-siRNA) จะไม่พบการตายของเซลล์แต่อย่างใด (รูปภาพที่ 2)





รูปภาพที่ 1 แสดงปริมาณ GFP<sup>+</sup> cells หลังจากกระบวนการ lentiviral transduction เพื่อนำเอา C-siRNA (a) และ WT1-siRNA (c) เข้าสู่เซลล์ K562 และบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ถูกตรวจสอบด้วยเครื่อง flow cytometry และทำการคัดเลือกเฉพาะ GFP<sup>+</sup> cells ด้วยเครื่อง FACs vantage พบว่าปริมาณ GFP<sup>+</sup> cells ของ C-siRNA และ WT1-siRNA เพิ่มมากขึ้น ดังภาพ b และ d ตามลำดับ

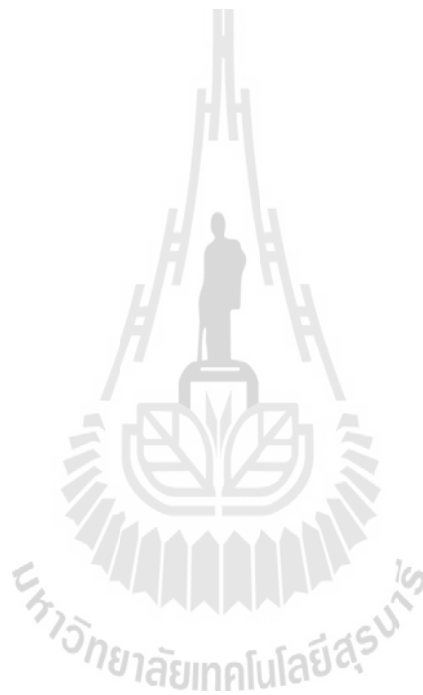


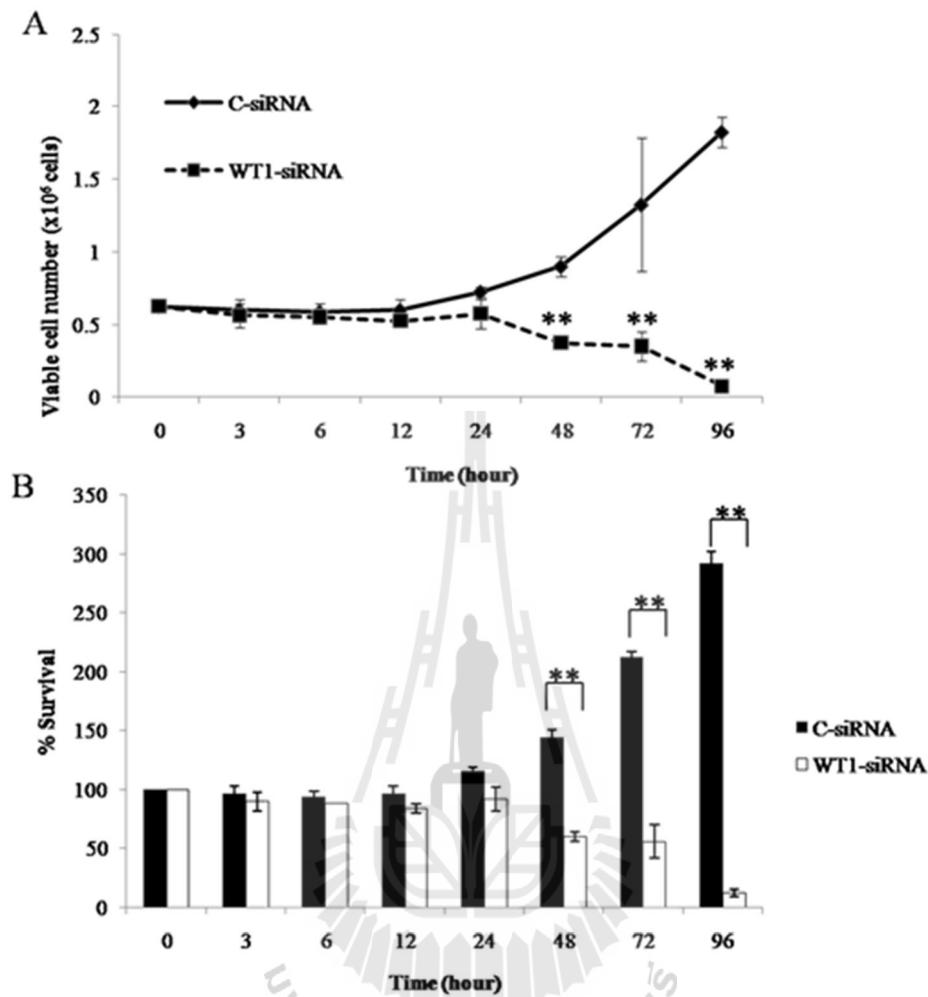
**รูปภาพที่ 2** การแสดงออกของ GFP หลังจากนำ C-siRNA (a b และ c) และ WT1-siRNA (d e และ f) เข้าสู่เซลล์ K562 ด้วย lentivirus ซึ่งถ่ายด้วยกล้อง fluorescent microscope ที่เวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

## 2. ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ K562 cells โดย WT1-siRNA

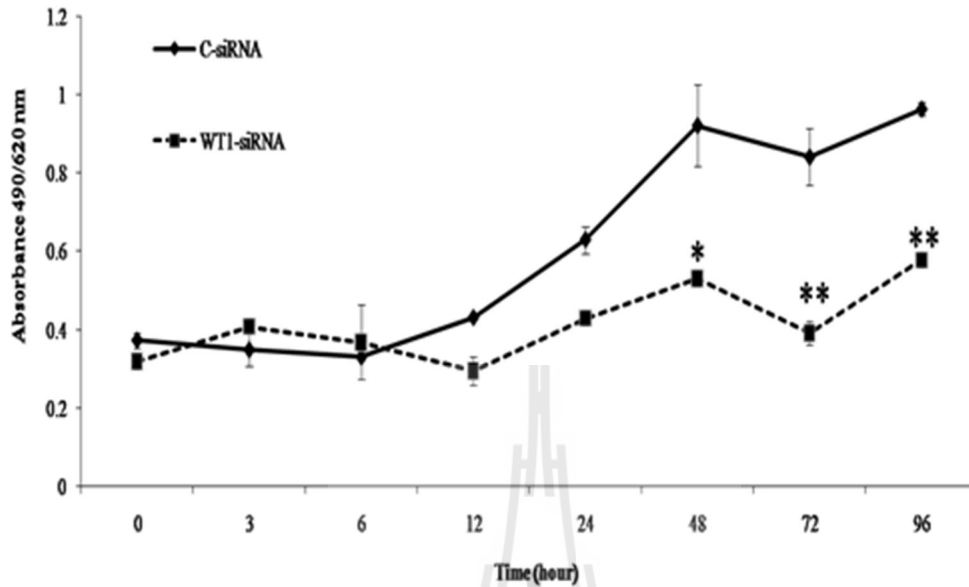
หลังจากกระบวนการ GFP<sup>+</sup> cell sorting แล้ว เซลล์จะถูกนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลาต่าง ๆ ตามที่กำหนดในการทดลอง และเมื่อถึงแต่ละช่วงเวลา เซลล์จะถูกนำไปทดสอบการเจริญด้วยวิธีตรวจนับเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอด และเซลล์ที่ตายไป โดยทำการย้อมสีเซลล์ด้วยสี trypan blue โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอดจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue จากนั้นนับจำนวนเซลล์แต่ละกลุ่ม และคำนวณปริมาณเซลล์ จากการทดลองพบว่าในกลุ่มเซลล์ที่เป็น WT1-siRNA-transduced-cells จะมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงไปตามระยะเวลาที่เลี้ยง ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุม (C-siRNA) จะมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น ตามรูปภาพที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของ WT1-siRNA นั้นมีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 นี้ได้ตามระยะเวลา โดยเห็นผลชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณผลการยับยั้งการเจริญเป็นอัตราร้อยละ พบว่าค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ K562 โดย WT1-siRNA นั้นสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และสูงที่สุดประมาณ 90% เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบเวลา

96 ชั่วโมง (รูปภาพที่ 3) และจากนั้น ทำการยืนยันผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการตรวจวัดอัตราการ proliferation ของเซลล์ที่ถูก transducer โดยใช้ชุดการตรวจวัด MTT assay (Promega) และผลการทดลองก็จะเป็นไปตามการทดลองการวัดการเจริญเติบโตข้างต้น โดยพบว่าเซลล์ในกลุ่ม WT1-siRNA จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม (C-siRNA) ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (รูปภาพที่ 4) ซึ่งสรุปผลได้ว่า WT1-siRNA ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้จริง





รูปภาพที่ 3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ K562 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA โดยหลังจากการคัดเลือกเซลล์ และเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน (0 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง) เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยวและนำมาข้อมสีด้วย trypan blue เพื่อนับปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (B) ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย WT1-siRNA โดยแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ ซึ่งคำนวณจากปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตตั้งต้น และปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตที่เหลือ ณ เวลาต่าง ๆ ที่กำหนดและอัตราการยับยั้งการเจริญได้เพิ่มขึ้นจาก 10% เป็น 90% ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

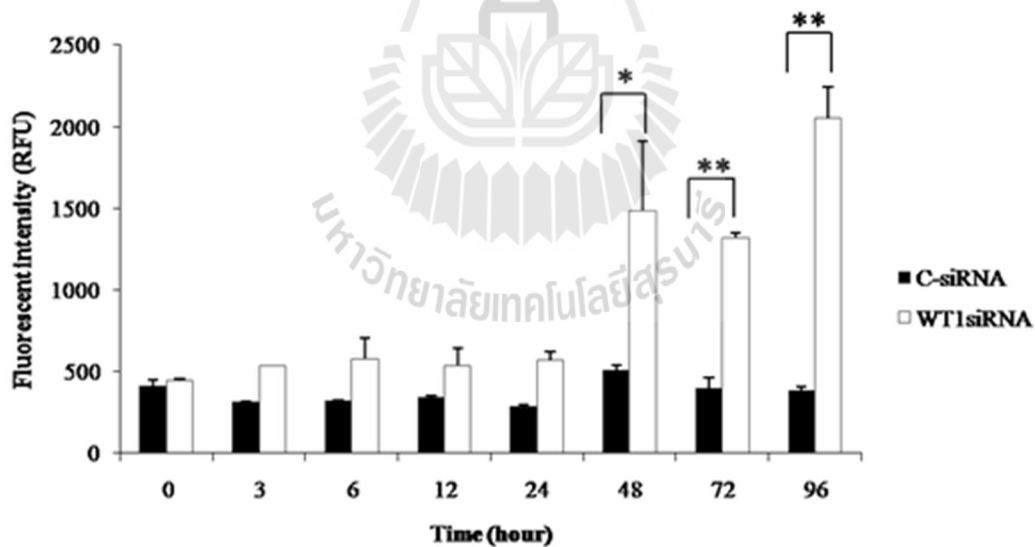


รูปภาพที่ 4 ผลของ WT1-siRNA ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยวและทดสอบด้วยการเติมน้ำยา MTT ลงไปและบ่มให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490/620 nm และแสดงค่าเป็นกราฟการเจริญเติบโต

### 3. ผลการทดสอบการกระตุ้นการตายของเซลล์ K562 ด้วย WT1-siRNA

หลังจากการ transduce และ sorting เซลล์ถูกย้อมและนับจำนวนเซลล์ตายด้วย trypan blue พบว่าจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มมากขึ้นในเซลล์กลุ่มที่ทดสอบด้วย WT1-siRNA และจากนั้นเพื่อต้องการทราบว่าเซลล์ที่ตายนั้นเกิดจากการกระตุ้นให้เกิด apoptosis ขึ้นจึงทำการทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis โดยใช้ชุดทดสอบปริมาณเอนไซม์ caspase-3/7 (Apo-One Homogenous caspase- 3/7 reagent (Promega: G778A) ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไปของการทดสอบด้วย WT1-siRNA สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด activity ของ apoptotic enzyme ให้เพิ่มมากขึ้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C-siRNA) (รูปภาพที่ 5) โดยกระตุ้น

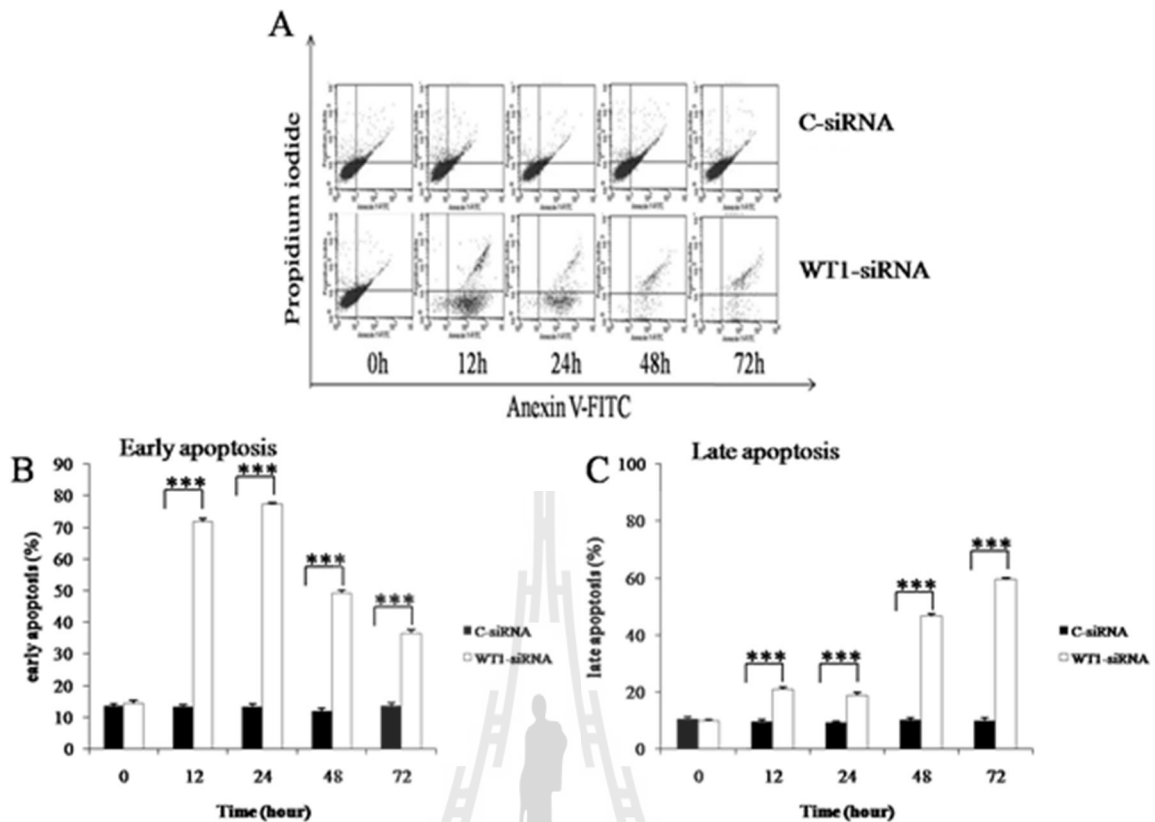
ปริมาณเอนไซม์ได้สูงถึง 3 เท่า และ 4 เท่า เมื่อเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าผลของ WT1-siRNA ว่ามีผลกระทบทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดภาวะการตายแบบ apoptosis ขึ้นได้จริงอย่างมีนัยสำคัญซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวที่ใช้ในการทดสอบการตายแบบ apoptosis นี้ มีความสำคัญและถือว่าเป็นเอนไซม์ลำดับท้าย ๆ ของการเกิด apoptosis cascade ซึ่งกระบวนการเกิดมีลำดับขึ้น มีการกระตุ้น การตัด โมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เป็นลำดับไป ซึ่งในการเกิด apoptosis นี้ สามารถเรียกอีกอย่างได้ว่า program cell death ซึ่งเป็นกระบวนการตายแบบไม่เป็นธรรมชาติ เป็น การตายแบบที่ต้องเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วย death molecule ซึ่งจะส่งผลต่อให้เกิดเส้นทาง (pathway) หรือกลไก โดยแบ่งเป็น 2 เส้นทาง ได้แก่ intrinsic pathway และ extrinsic pathway ซึ่งทั้งสองเส้นทางนี้ถึงแม้ว่ากระบวนการภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกัน แต่ผลสุดท้ายของ กระบวนการก็คือ การตายแบบ apoptosis นั่นเอง เพราะฉะนั้น การเพิ่มขึ้นของ executioner caspases enzyme นั้น ก็เป็นการบ่งบอกได้ถึงกรณีที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ขึ้นนั่นเอง



**รูปภาพที่ 5** การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และ -7 ของเซลล์ K562 หลังจากที่ถูกทดสอบด้วย WT1-siRNA จากนั้น เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยวตามระยะเวลาที่กำหนด เพื่อนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Apo-One Homogenous Caspase-3/7 apoptosis kit (Promega)) หลังจากนั้นให้เกิดปฏิกิริยาแล้ว นำเอาเซลล์ไปตรวจวัดปริมาณความเข้มของ fluorescence ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 499/621 nm บันทึกค่าที่ได้และวิเคราะห์ผล

#### 4. ผลการกระตุ้น apoptosis ของ K562 cells โดย WT1-siRNA

เพื่อตรวจเช็คผลของ WT1-siRNA ในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดการตายแบบ apoptosis ขึ้นเซลล์ที่ได้รับการ transducer ด้วย lentiviruses แล้วจะถูกเก็บเกี่ยวและนำมาทดสอบโดยการย้อมสีด้วย Annexin V-FITC และ Propidium iodide เพื่อวิเคราะห์ลักษณะจำเพาะของการเกิด apoptosis โดยเซลล์ที่เป็น apoptotic cells นั้น จะพบการผิดปกติของผนังเซลล์ กล่าวคือจะมีการย้ายตำแหน่งของโมเลกุลที่ปกติแล้วจะอยู่ภายในของผนังเซลล์ (internal membrane) เมื่อเกิด apoptosis แล้ว โมเลกุลดังกล่าวจะถูกเคลื่อนย้ายออกมาอยู่ด้านนอกของผนังเซลล์ จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้สถานะ apoptosis ของเซลล์ได้ โมเลกุลดังกล่าวคือ phosphatidylserine ซึ่งจะจับได้กับโมเลกุลของ annexin V-FITC ทำให้เซลล์ติดสีเขียวของ annexin V-FITC นั้นเอง จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 ที่ถูก transduction ด้วย WT1-siRNA จะพบ early apoptotic cells ประมาณ 70% เมื่อเวลาผ่านไปเพียงแค่ 12 ชั่วโมงหลังจากการ transduction และเซลล์ที่เกิด late apoptosis จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังสามารถแบ่งกลุ่มของเซลล์ตายได้เป็น 3 กลุ่ม ตามการติดสี กล่าวคือ เซลล์ในกลุ่มที่เป็น early apoptosis จะให้ผลเป็น annexin V-FITC positive, PI negative ส่วนเซลล์ในกลุ่มที่เป็น late apoptosis จะให้ผลบวกทั้ง annexin V-FITC และ PI ส่วนเซลล์ที่ตายแบบ necrosis จะให้ผลบวกเฉพาะ PI เท่านั้นอีกประการหนึ่ง เมื่อเวลาผ่านไปกลุ่มเซลล์จะถูกกระตุ้นให้เข้าสู่ late apoptosis เพิ่มมากขึ้นเป็นการตายแบบสมบูรณ์ (รูปภาพที่ 6) และจากการทดสอบสามารถสรุปได้ว่า WT1-siRNA สามารถมีผลไปกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณ apoptotic cells ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



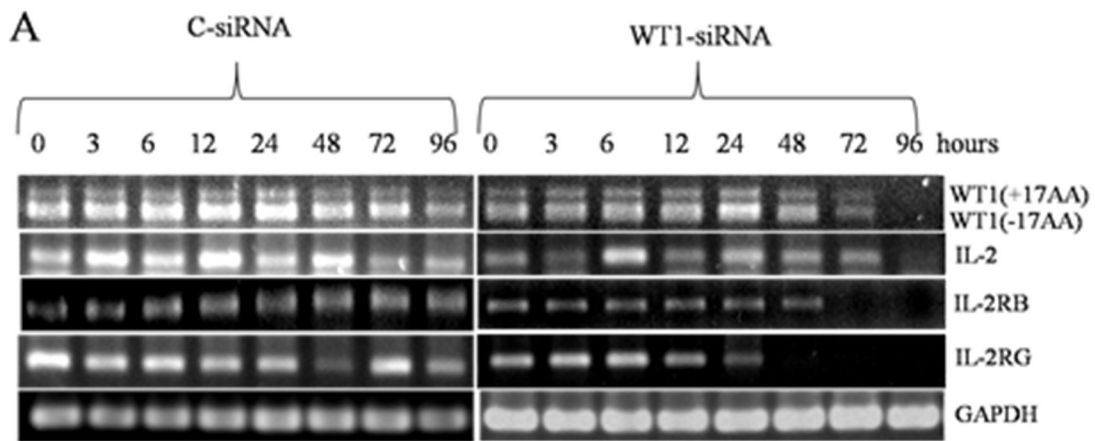
รูปภาพที่ 6 ผลของ WT1-siRNA ต่อการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis โดยเมื่อเซลล์ K562 ได้รับ WT1-siRNA แล้ว เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยว ณ เวลาต่าง ๆ ที่กำหนด และนำมาข้อมติ Annexin V-FITC/PI จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry (A) กราฟแสดงปริมาณเซลล์ที่เข้าสู่ early apoptosis (B) และ late apoptosis (C)

## 5. ผลของ mRNA expression หลังจากการทำ WT1-siRNA transduction

หลังจากที่ทำการ transduction เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 ด้วย WT1-siRNA แล้ว เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยวเพื่อนำมาสกัด total RNA ตามระยะเวลาต่าง ๆ ที่กำหนด คือ 0 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง เซลล์ K562 ถูกปั่นตกตะกอน และนำมาสกัด total RNA และนำมาทำการ convert ให้เป็น cDNA ด้วย reverse transcriptase จากนั้นทำการตรวจสอบ mRNA expression ผลการทดลองพบว่า WT1-siRNA ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของ WT1 mRNA หลังจากการ transduction เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และในการลดการแสดงออกของ WT1 mRNA ก็ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการตายของ



เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้อีกด้วย เนื่องจาก WT1 ทำหน้าที่หลักในการควบคุมการเจริญของเซลล์นั่นเอง ยิ่งไปกว่านั้น โมเลกุลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ก็คือกลุ่ม cytokine เช่น Interleukin 2 และ receptor ของมัน ได้แก่ IL-2 beta และ gamma ก็เป็นที่น่าสนใจในการทดสอบการแสดงออกของมันหลังจากที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวถูก transducer ด้วย WT1-siRNA ซึ่งผลการทดลองพบว่า IL-2 ถูกลดการแสดงออก หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังการ transduction และเพื่อเป็นการทดสอบกลไกการลดการแสดงออกของ IL-2 จึงได้ทำการตรวจหาการแสดงออกของ IL-2 receptor และพบว่า IL-2RG และ IL-2RB ถูกลดการแสดงออกตั้งแต่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการ transduction (รูปภาพที่ 7) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตาย โดยใช้ WT1-siRNA นั้น ส่งผลกระทบต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งได้แก่ IL-2 และกลไกของการลดลงของยีน IL-2 นั้นก็เกิดขึ้นจากการที่ receptor ของมันถูกลดการแสดงออกนั่นเอง อย่างไรก็ตาม receptor ของ IL-2 นั้นมีอยู่ทั้งหมด 3 แบบ (subunit) ได้แก่ IL-2 receptor alpha (IL-2RA) IL-2 receptor beta (IL-2RB) และ IL-2 receptor gamma (IL-2RG) โดยทั้งสามชนิดนี้ทำหน้าที่ร่วมกันในการจับกับ IL-2 บริเวณตำแหน่งที่จำเพาะแบ่งได้ตามความสามารถในการเข้าเกาะกับโมเลกุลของ IL-2 (binding affinity) เพื่อกระตุ้นกลไกการเจริญเติบโตของเซลล์ตามลำดับขั้น แต่การจับกันระหว่าง IL-2 และ receptors นั้น จะจับได้อย่างมั่นคง และกระตุ้นกระบวนการเจริญได้ดีที่สุด จะต้องจับให้ได้ทั้ง 3 receptors คือ alpha, beta และ gamma เรียกว่า heterotrimerization แต่อย่างไรก็ตาม สัญญาณจะถูกลดลงไปถ้าหาก IL-2 จับกับ receptor ได้เป็นบางตัวเท่านั้น เช่น การเกิด heterodimer ระหว่าง IL-2RA และ IL-2RB จะเกิด pseudo-high affinity กับ IL-2 ส่วน IL-2RB และ IL-2RG จะเกิด intermediate affinity กับ IL-2 เพราะฉะนั้น จึงสามารถสรุปได้จากการทดลองนี้ว่า การลดการแสดงออกของ WT1 โดยใช้ WT1-siRNA นั้น ส่งผลกระทบต่อ cytokine IL-2 ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวดังกล่าว โดยผ่านกลไกการลดการแสดงออกของ receptor บนผิวเซลล์ ได้แก่ IL-2RB และ IL-2RG

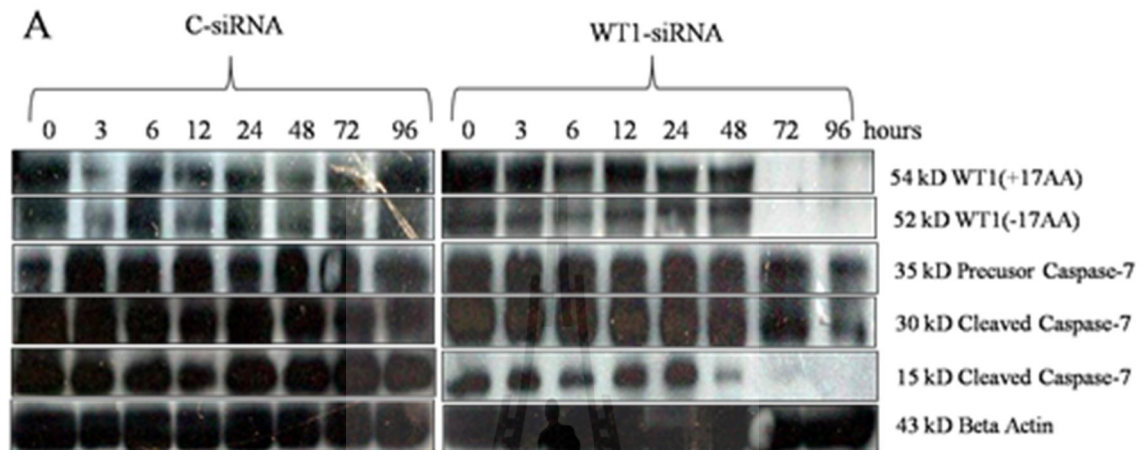


**รูปภาพที่ 7** การแสดงออกของ mRNA ชนิดต่าง ๆ ของ K562 หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA เซลล์ถูกเก็บเกี่ยวที่เวลาต่าง ๆ ที่กำหนดคือ 0 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย reverse transcriptase จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วย RT-PCR ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำมาแยกบน agarose gel และวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านเจล โดยใช้ GAPDH เป็นตัวควบคุม

## 6. การแสดงออกของโปรตีน หลังจาก WT1-siRNA transduction

หลังจากทราบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ว่ามีการลดการแสดงออกลงเมื่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวถูกทดสอบด้วย WT1-siRNA จึงต้องมีการศึกษาผลของ protein expression ด้วย เพื่อเป็นการยืนยันว่า WT1-siRNA มีผลลดการแสดงออกทั้งในระดับยีน และระดับโปรตีน โดยเริ่มจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกและเลี้ยงต่อตามระยะเวลาที่กำหนดในการทดลอง บั่นล้างและตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำเอาเซลล์ไปสกัดเอาเฉพาะส่วนของโปรตีนออกมาด้วยชุดสกัดโปรตีน Celllytic M (sigma, C2978) จากนั้นโปรตีนปริมาณ 20 ไมโครกรัมก็ถูกนำมาแยกขนาดบน SDS-PAGE และทำการย้ายแถบโปรตีนลงบน PVDF membrane จากนั้นนำเอา antibody ที่ต้องการศึกษามาทำปฏิกิริยาจับอย่างจำเพาะกับโปรตีน และประกบกับฟิล์มเพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิด ผลการทดลองพบว่าโปรตีน WT1 ก็ถูกลดการแสดงออกในเวลาเดียวกับการลดการแสดงออกของ WT1 mRNA คือที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง (รูปภาพที่ 8) จากนั้นทำการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด apoptosis เช่น Pro-Caspase 7 ซึ่งเป็น apoptotic enzyme จากการทดลองพบว่าการแสดงออกของ Procaspase-7 ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง procaspase-7 จึงถูก

ลดการแสดงออกของ ซึ่งเป็นเพราะ procaspase-7 จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น active caspase-7 แทน ที่เพื่อให้เกิด apoptosis เป็นไปอย่างสมบูรณ์ ผ่านกระบวนการ intrinsic apoptotic pathway จาก การทดลองสรุปได้ว่า WT1-siRNA มีผลต่อการลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 และส่งผลให้ เซลล์ตายผ่านกระบวนการ intrinsic apoptotic pathway



**รูปภาพที่ 8** การวัดการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลังจากการทำ WT1-siRNA transduction เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยวตามระยะเวลาที่กำหนด และเก็บตะกอนเซลล์ไว้ จากนั้น ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot

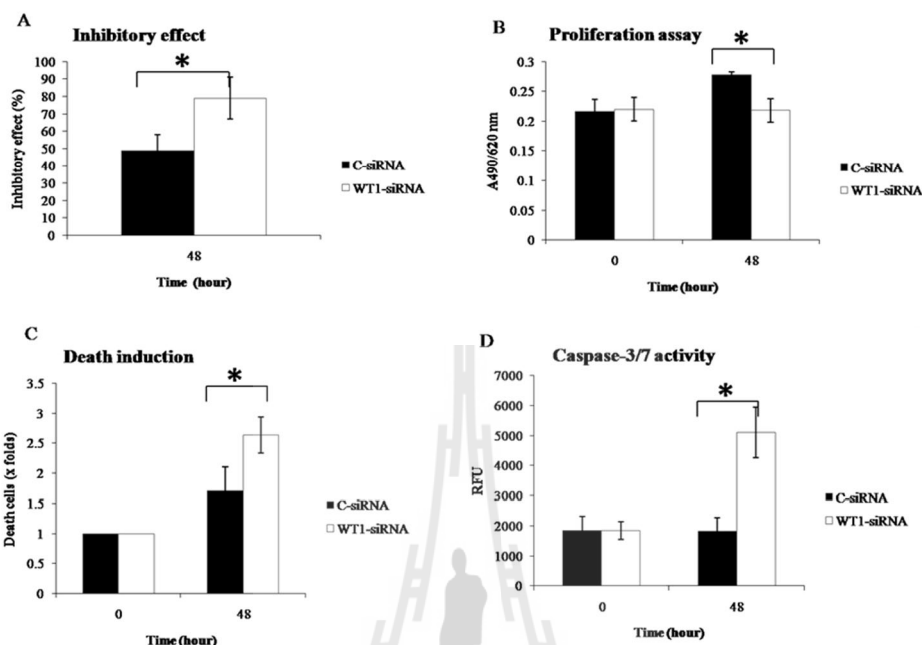
## ผลการทดลองตอนที่ 2

### การทดสอบผลของ WT1-siRNA ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย acute lymphoblastic leukemic cells: ALL-L1

#### 1. WT1-siRNA ยับยั้งอัตราการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบ lymphoblast ที่เก็บจากผู้ป่วยเด็ก อายุระหว่าง 3-15 ปีที่ถูกวินิจฉัยว่าป่วยเป็น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว จากโรงพยาบาลมหาราชานครราชสีมา โดยทุกรายได้รับการชี้แจงและลงนามยินยอมเข้าร่วม โครงการวิจัยครั้งนี้เรียบร้อยแล้ว ตัวอย่าง peripheral blood mononuclear cells (PMBC) ถูกนำไปปั่นแบบ gradient centrifugation เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไปหลังจากที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวถูก transduce ด้วย WT1-siRNA แล้ว พบว่า WT1-siRNA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ที่  $79 \pm 14\%$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่า  $49 \pm 9\%$  (รูปภาพที่ 9A) ในขณะที่วัดค่า proliferation ในกลุ่มที่ได้รับ WT1-siRNA ได้  $0.21 \pm 0.02$  และกลุ่มควบคุมมีค่า  $0.27 \pm 0.005$  (รูปภาพที่ 9B) และจากการศึกษาพบว่า WT1-siRNA สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายได้ถึง  $2.6 \pm 0.3$  เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปภาพ 9C) กลไกในการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL สามารถวัดได้จากการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase -7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ apoptosis ซึ่งการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ดังกล่าวแปรผันตรงกับการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis และจากการทดลองพบว่า WT1-siRNA สามารถกระตุ้นให้มีการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 สูงถึง  $5,104 \pm 836$  RFUs ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าการทำงานของเอนไซม์เพียง  $1,823 \pm 374$  RFUs เท่านั้น (รูปภาพ 9D) ซึ่งข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่า WT1-siRNA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้เป็นอย่างดี ซึ่งได้มีการเปรียบเทียบผลของ WT1-siRNA ในตัวอย่างเม็ดเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดีแล้วพบว่า WT1-siRNA ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต และไม่กระตุ้นการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมจึงสรุปได้ว่า WT1-siRNA ที่ได้ทำการ

ออกแบบมานี้ สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ และกระตุ้นการตายของ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยไม่ส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดปกติ

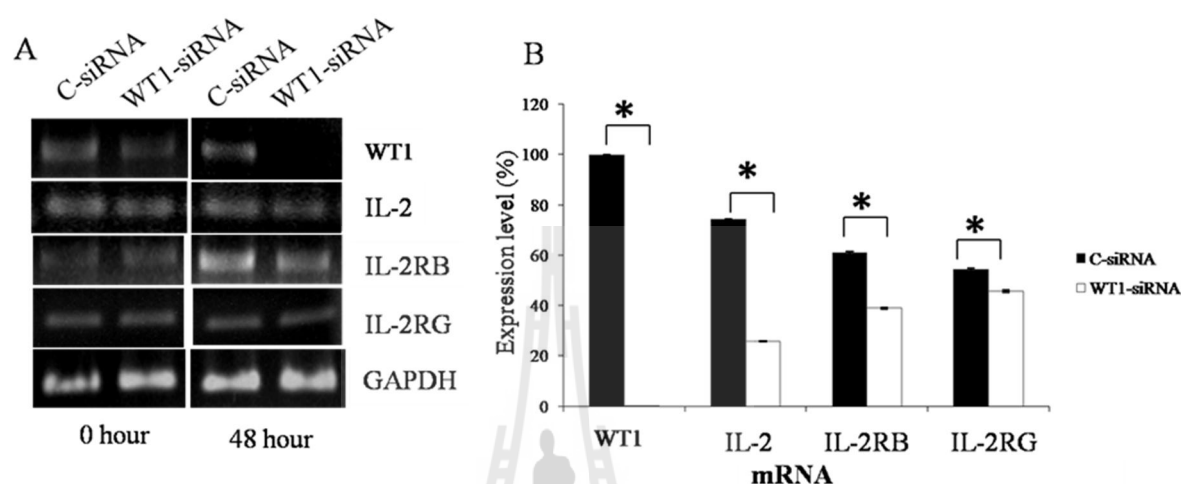


**รูปภาพที่ 9** WT1-siRNA แสดงผลการยับยั้งและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL subtype L1 หลังจากได้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ถูกย้อมด้วย trypan blue และตรวจสอบ Inhibitory effect (A) จากนั้นตรวจวัดค่า proliferation ด้วยวิธี MTT analysis (B) จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการตายด้วย WT1-siRNA (C) และการตรวจสอบการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ Apoptotic ด้วยวิธีวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 (D) (n=5)

## 2. ระดับการแสดงออกของ mRNA หลังจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ได้รับ WT1-siRNA

ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ mRNA โดยใช้เทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด ALL ที่ได้จากผู้ป่วยถูกนำทดสอบด้วย WT1-siRNA และ C-siRNA จากการตรวจวัดพบว่า WT1-siRNA ทำให้ระดับการแสดงออกของ WT1 mRNA ลดลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า WT1 มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลังจากได้รับ WT1-siRNA ไม่เพียงแต่เท่านั้น การกระตุ้นการตายของเซลล์ด้วย WT1-siRNA ยังส่งผลต่อการลดการแสดงออกของ survival cytokines เช่น

IL2 IL-2RB และ IL-2RG (รูปภาพที่ 10A) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าการแสดงออกของ IL-2 IL-2RB และ IL-2RG มีค่าเป็น  $25\pm 0.3\%$   $39\pm 0.3\%$  และ  $45\pm 0.6\%$  ตามลำดับ (รูปภาพที่ 10B) อย่างไรก็ตาม WT1-siRNA ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อค่าการแสดงออกของ mRNA ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงแต่อย่างใด

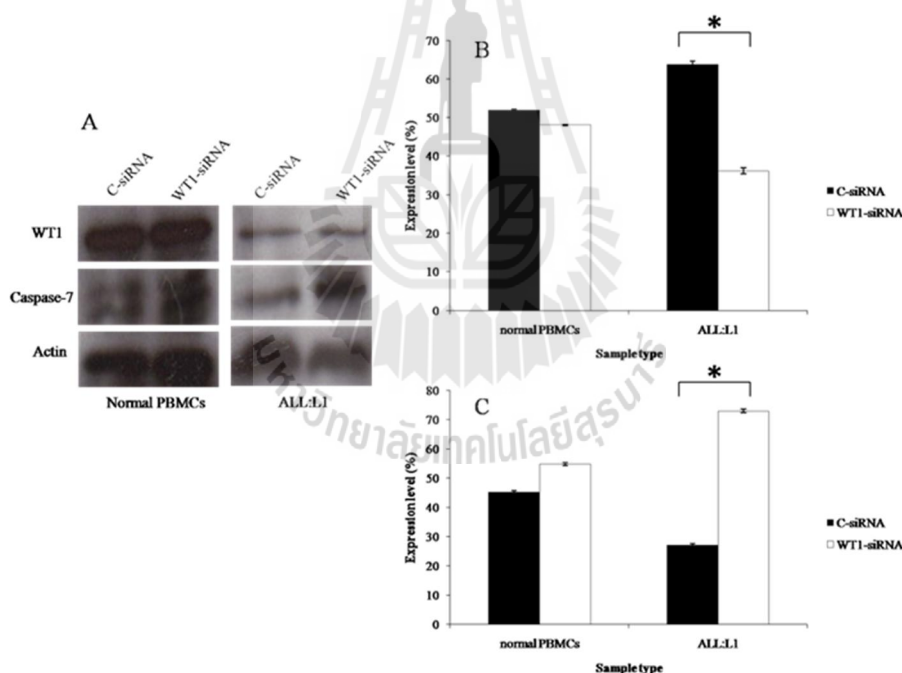


รูปภาพที่ 10 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL จากผู้ป่วยที่ได้รับ WT1-siRNA เซลล์ถูกนำไปสกัด total RNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมงด้วยกระบวนการ Reverse transcriptase PCR (A) กราฟแสดงระดับการแสดงออกของ mRNA จากการวัดค่าความเข้มของ PCR product ด้วยโปรแกรม Image J software (B)

### 3. ระดับการแสดงออกของโปรตีนหลังจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ได้รับ WT1-siRNA

WT1 เป็น transcription factor ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ และการแสดงออกแบบ overexpression ของ WT1 ถูกพบในตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด [5] ในการศึกษาครั้งนี้ มีการนำเอาตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL มาทดสอบการได้รับ WT1-siRNA จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ดังกล่าวมาหาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot analysis ผลการทดลองพบการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปภาพที่ 11A) โดยวัดระดับการแสดงออกของ WT1 ได้ที่  $38\pm 0.6\%$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าการแสดงออกของ WT1 เป็น  $62\pm 0.6\%$  (รูปภาพที่ 11B) ซึ่งการ

ยับยั้งการแสดงออกของ WT1 นี้ส่งผลกระทบต่อการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ซึ่งวัดได้จากการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-7 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็น apoptotic enzyme โดยหากพบการแสดงออกของ Caspase-7 ในระดับที่สูงก็จะเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าเซลล์ได้เข้าสู่การตายแบบapoptosis นั่นเอง ในที่นี้ WT1-siRNA สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ caspase-7 ได้สูงถึง  $60 \pm 1.1\%$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบเพียง  $40 \pm 1.1\%$  เท่านั้น (รูปภาพ 11C) อย่างไรก็ตาม ไม่มีการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1 และ Caspase-7 ในตัวอย่างเม็ดเลือดขาวของอาสาสมัครสุขภาพดี หลังจากได้รับ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์ จึงสามารถสรุปได้ว่า WT1-siRNA สามารถควบคุมการแสดงออกของ WT1 ทั้งระดับ mRNA และ ระดับโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

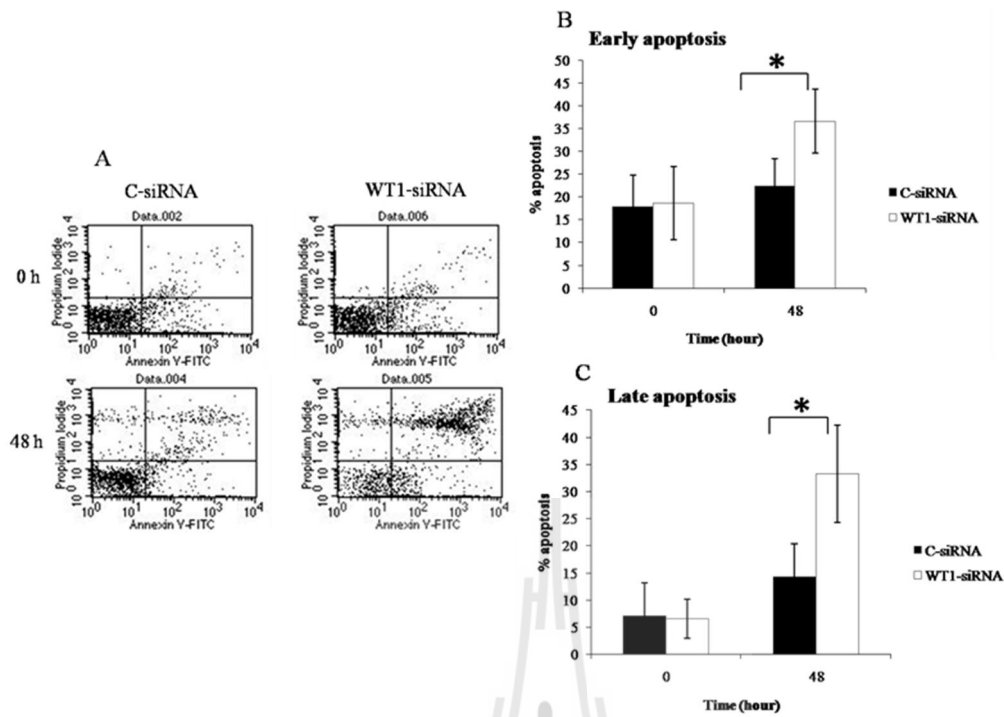


**รูปภาพที่ 11** การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน WT1 และ caspase-7 ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ที่ได้รับ WT1-siRNA ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี western blot analysis (A) ใช้โปรแกรม Image J software ในการวัดความเข้มของโปรตีน WT1 (B) และ caspase-7 (C) และใช้ actin เป็นโปรตีนควบคุม

#### 4. การกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ด้วย WT1-siRNA

WT1 มีความสำคัญกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด WT1-siRNA ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในการควบคุมและลดการแสดงออกของ endogenous WT1 ทั้งในระดับของ mRNA และ protein ที่ 48 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งนี้ พบการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL แบบ apoptosis ด้วยการตรวจสอบการย้อมติดสี Annexin V-FITC/PI ตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับ WT1-siRNA จะแสดงแนวโน้มการเกิดทั้ง early apoptosis และ late apoptosis (รูปภาพที่ 12A) ด้วยอัตรา  $36.63 \pm 6.35\%$  และ  $33.25 \pm 9.8\%$  ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปภาพที่ 12B และ 12C) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C-siRNA) พบว่า WT1-siRNA กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้อย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลดังกล่าวนี้ บ่งชี้ได้ว่า WT1-siRNA สามารถกระตุ้น apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะที่จะใช้ในการวิจัยเพื่อการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไปในอนาคต





รูปภาพที่ 12 WT1-siRNA กระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับ C-siRNA และ WT1-siRNA ถูกนำไปย้อมด้วย annexin V-FITC/PI จากนั้นตรวจสอบด้วย flow cytometry (A) ค่าของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในกลุ่ม early apoptosis (B) และ late apoptosis (C) แสดงด้วยกราฟ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (n=5) (sample t-test  $p \leq 0.05$ )

## บทที่ 4

### ข้อวิจารณ์

เทคนิคที่เรียกว่า small interference RNA (siRNA) เป็นเทคนิคที่ใช้ siRNA เพื่อยับยั้งการทำงานของ mRNA เป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน โดยมีกลไกในการตัดทำลาย mRNA เป้าหมายด้วยเอนไซม์ Dicer และส่งผลให้ mRNA นั้น ๆ ไม่เกิดการ transcript และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญและมีประสิทธิภาพมากในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งในที่นี้ ยีนที่เป็นเป้าหมายในการใช้ siRNA เข้าไปยับยั้งคือยีน Wilms' tumor 1 (WT1) โดยยีน *WT1* ทำหน้าที่เป็น transcription factor ซึ่งมีบทบาทสำคัญจัดเป็นยีนที่กระตุ้นการเกิดโรคมะเร็ง ในมะเร็งหลายชนิด ซึ่งมีการแสดงออกอย่างมากเมื่อตรวจพบ การตรวจพบปริมาณยีน *WT1* มากกว่าปกติจะถูกใช้เป็นตัวชี้วัดในการตัดสินใจ และคาดเดาการรักษาของโรคมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาลดการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังในสาย myeloid leukemia cell (K562) โดยการใช้ WT1siRNA ซึ่งเป็น siRNA ที่จำเพาะกับยีน WT1 ตรงบริเวณ ตำแหน่งลำดับเบสที่ 1528 มาเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน *WT1* รวมทั้งควบคุมการเจริญเติบโต และกระตุ้นการตายของเซลล์ K562 อีกด้วย ซึ่งในการนำเอา WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมายนั้นจะใช้วิธี viral delivery โดยใช้ Lentiviruses เป็นพาหะในการนำ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเนื่องจาก lentiviruses เป็นไวรัสที่สามารถ transducer เข้าสู่เซลล์ได้หลายหลายชนิด ทั้งที่เป็นเซลล์ในระยะแบ่งตัว หรือเซลล์ในระยะพักตัวก็ตาม ซึ่งจากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย WT1-siRNA นั้นลดลง ตามระยะเวลาของการเลี้ยงเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่เป็นกลุ่มควบคุม ยิ่งไปกว่านั้น จากการวิเคราะห์หาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่า เซลล์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากถึงประมาณ 85% เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง หลังจากการ transduction ไม่เพียงแต่ลดการเจริญเติบโตของเซลล์เท่านั้น WT1-siRNA ยังส่งผลกระตุ้นการตายของเซลล์ แบบ apoptosis ได้อีกด้วย ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าร้อยละของการติดสี annexin V-FITC ซึ่งเป็นตัวชี้บ่งถึงการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ พบสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทำ

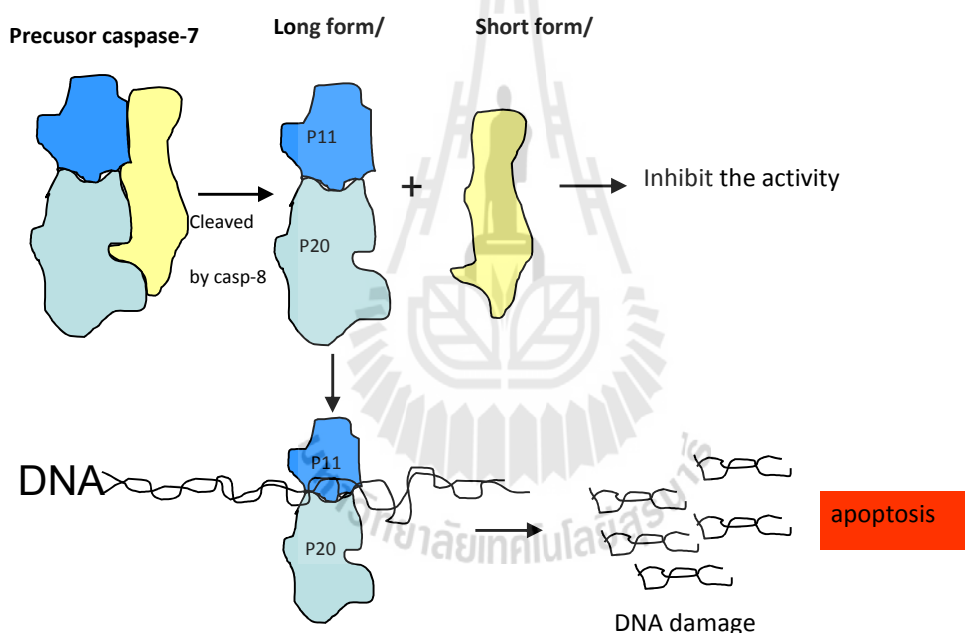
การทดสอบสรุปได้ว่าการทดสอบทางด้านเซลล์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ด้วย WT1-siRNA ส่งผลต่อการยับยั้งเจริญเติบโตของเซลล์ และกระตุ้นการตายของเซลล์ได้ จากนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าผลกระทบดังกล่าวเกิดขึ้นผ่านกระบวนการใด ๆ ภายในเซลล์ จึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลภายในเซลล์ โดยเริ่มต้นจากการพิสูจน์ผลของ WT1-siRNA ต่อการแสดงออกของยีน WT1 พบว่าหลังจากที่เซลล์ถูก transduce ด้วย WT1-siRNA แล้ว นำเอาเซลล์แต่ละช่วงเวลาที่กำหนดมาสกัดเอา total RNA และเปลี่ยนเป็น cDNA จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของ WT1 mRNA ผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของ WT1 mRNA ได้ถูกลดระดับลงตามระยะเวลา และตรวจไม่พบการแสดงออกเลยตั้งแต่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการ transduction ซึ่งผลที่ได้นี้ก็เกิดจากการทำงานของ siRNA ที่จำเพาะกับยีน *WT1* และส่งผลทำลายโครงสร้างของยีนตรงบริเวณตำแหน่งของเบสคู่สมกัน และเนื่องจาก WT1 ทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และควบคุมการตายของเซลล์ เมื่อ WT1 ถูกทำลายไป หรือไม่สามารทำหน้าที่ได้ ผลกระทบก็จะต้องเกิดขึ้นกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะการที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายเพิ่มมากขึ้นนั่นเอง นอกจากนี้ในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งยีนที่เป็นปัจจัยหนึ่งของการควบคุมการเจริญเติบโต คือยีนที่ทำหน้าที่เป็น cytokine ซึ่งจำเป็นต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ดังกล่าว ในที่นี้ได้ทำการศึกษายีนชนิด Interleukin-2 (IL-2) ว่าได้รับผลกระทบอย่างไรหรือไม่จากการลดการแสดงออกของ WT1 mRNA ผลการทดลองพบว่า IL-2 mRNA ก็ถูกลดการแสดงออกเช่นกันกับ WT1 mRNA แต่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 96 ชั่วโมงหลังจากการ transduction ซึ่งก็สามารถสรุปได้ว่า ในการกระตุ้นการตายของเซลล์ K562 นั้น เป้าหมายลำดับต่อมาของการที่ WT1 mRNA ถูกลดระดับการแสดงออกลง ก็คือทำให้ IL-2 ลดการแสดงออกลงด้วย และยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาว่าเหตุใด IL-2 ถึงถูกลดลงด้วย เราจึงทำการศึกษาการแสดงออกของ IL-2 receptor ซึ่งเป็นตัวรับที่จับกับโมเลกุลของ IL-2 และส่งสัญญาณต่าง ๆ ต่อไปจนเกิดกระบวนการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ และพบว่า IL-2 receptor subunit beta และ gamma หนึ่งในสาม ของ IL-2 receptor ถูกลดการแสดงออกลงตั้งแต่เวลา 48 ชั่วโมงของการทดสอบ และเนื่องจากการส่งสัญญาณการเจริญเติบโตผ่าน IL-2 pathway นั้นต้องอาศัยการจับกันระหว่าง IL-2 และ IL-2 receptors ซึ่ง IL-2 receptors นี้ ประกอบไปด้วย 3 subunits ได้แก่ IL-2 receptor subunit alpha (IL-2RA) IL-2 receptor subunit beta (IL-2RB) และ IL-2 receptor subunit gamma (IL-2RG) ซึ่งแต่ละ subunit ถูกแบ่งแยกตามความสามารถในการเกาะกับโมเลกุล

ของ IL-2 โดยที่การเกาะระหว่าง IL-2 IL-2RB และ IL-2R จะมีความเสถียรมากที่สุดจะต้องอาศัย heterotrimer ของ ทั้งสาม subunit ถึงจะกระตุ้น IL-2 signaling pathway ได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม heterodimer ระหว่าง IL-2RA และ IL-2RB หรือ IL-2RB และ IL-2RG ก็ยังสามารถกระตุ้น IL-2 signaling pathway ได้เช่นกัน เพราะฉะนั้น การที่ IL-2RG ถูกลดการแสดงออกลงนั้นก็ส่งผลให้การแสดงออกของ IL-2 ได้ และกระตุ้นการตายของเซลล์ได้ ทั้งนี้ WT1-siRNA มีผลต่อกลไกการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่านการยับยั้งกระบวนการควบคุมการเจริญของเซลล์ เช่น IL-2 signaling pathway ให้หยุดการทำงาน

การทดสอบผลของ WT1-siRNA ต่อการแสดงออกของโปรตีน WT1 พบว่าผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการแสดงออกของ WT1 กล่าวคือ ทั้ง mRNA และโปรตีน WT1 ต่างก็ถูกยับยั้งการแสดงออกเมื่อเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากทดสอบเซลล์ด้วย WT1-siRNA นั้นแสดงให้เห็นว่าผลของ WT1-siRNA ส่งผลทั้งระดับ mRNA และระดับโปรตีน ซึ่งจะทำให้กระบวนการเจริญของเซลล์ถูกยับยั้งได้ดีขึ้น และยิ่งไปกว่านั้น WT1 เมื่อถูก translate เป็นโปรตีนแล้วจะมีโครงสร้างแตกต่างกันได้หลัก ๆ แล้ว 4 โครงสร้าง ขึ้นกับกระบวนการ splicing ในบริเวณ regulatory domain ตรงบริเวณ exon5 และบริเวณ DNA binding domain ตรงตำแหน่งระหว่าง zinc-finger ที่ 3 และ zinc-finger ที่ 4 ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้ บริเวณแรก จะมีการแทรกเข้าหรือการตัดออกของ กรดอะมิโน จำนวน 17 ตัว ทำให้เกิด isoform หลัก ๆ ขึ้น 2 isoforms ได้แก่ WT1(+17AA) และ WT1(-17AA) ส่วนบริเวณที่เกิดการ splicing บริเวณที่ 2 จะเกิดจากการแทรกเข้า หรือการตัดออกของ amino acid จำนวน 3 ตัว ได้แก่ lysine threonine และ serine (KTS) จึงทำให้เกิดอีก isoform ขึ้นอีก 2 isoforms คือ WT1(+KTS) และ WT1(-KTS) จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น สามารถแบ่ง WT1 ได้เป็น 4 isoforms หลัก ๆ ได้แก่ WT1(+17AA/+KTS) WT1(+17AA/-KTS) WT1(-17AA/+KTS) และ WT1(-17AA/-KTS) ซึ่งทั้ง 4 isoforms นี้เมื่อนำไปแยกด้วยวิธี western blot จะพบว่า มีแบนด์ของโปรตีนแยกกันเป็น 2 แบนด์ ขนาด 52 และ 54 กิโลดาลตัน (Avril & Michael, 2006) และพบว่า WT1-siRNA ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน WT1 ทั้งสองขนาด ดังที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่า WT1-siRNA มีผลอย่างมากต่อการยับยั้งทั้งระดับยีน และระดับโปรตีนของ WT1 ดังที่มีการศึกษาจากนักวิจัย Gunter และคณะ (Gunter et al., 2008) ได้ทำการศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งชนิดเฉียบพลัน และชนิดเรื้อรัง โดยการลดปัจจัยต่อการเจริญเติบโต เช่น ลด Fetal calf serum และ เพิ่มความเป็นกรด หรือ ค่าของอาหารเลี้ยงเซลล์ และ

ผลปรากฏว่าเกิดการลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ควบคู่ไปกับการลดการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของเราที่ว่า เมื่อลดการแสดงออกของ WT1 แล้ว จะทำให้ลดการเจริญเติบโตของเซลล์ลงไปด้วย และยิ่งไปกว่านั้น การลดการแสดงออกของ WT1 mRNA ยังส่งผลในการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis อีกด้วย โดยการวัดการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด apoptosis ได้แก่เอนไซม์ caspase-7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Interleukin-1 beta converting enzyme (ICE)/ced-3 subfamily ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็น effector หรือ executioner caspases ซึ่งจะถูกตัดโมเลกุลโปรตีนด้วยกระบวนการ proteolysis ด้วย เอนไซม์ caspase-7 ในกลุ่มที่เป็น ตัวยับยั้ง ซึ่งได้แก่ caspase-8 caspase-9 และ caspase 10 การที่ caspase-7 ที่เป็น long form ที่ปราศจาก prodomain หรือที่เรียกว่า active form ถูกแสดงออกอย่างมกานั้น สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ (รูปภาพที่ 13) ซึ่งในภาพแสดงให้เห็นว่า caspase-7 precursor ขนาด 35 กิโลดาลตัน ถูกแสดงออก และถูกยับยั้งการแสดงออกในช่วงเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการทดสอบ ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า ณ เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง โมเลกุลของ caspase-7 precursor ได้ถูก degrade ไปเป็น active form ทำให้กระบวนการ apoptosis เกิดขึ้น และยิ่งไปกว่านั้น caspase-7 ที่เป็น short isoform ที่ทำหน้าที่เป็น inactive form นั้นสามารถส่งผลยับยั้งการทำงานของ caspase-7 ที่เป็น active form ได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า WT1 สามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้ทั้งแบบ intrinsic และ extrinsic pathway (Morrison, English, & Licht, 2005) เมื่อเป็นที่ทราบดีแล้วว่า WT1siRNA มีผลต่อการกระตุ้น apoptosis จึงได้ทำการศึกษาผลของ WT1-siRNA ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น anti-apoptosis ซึ่งได้แก่ โปรตีน BCL-2 โดยมีการรายงานว่า BCL-2 เป็นเป้าหมายหนึ่งของ WT1 ในการควบคุมการแสดงออกโดยเซลล์มะเร็งบางชนิดเช่น rhabdoid tumor (Mayo, et al., 1999) และ breast cancer (Tuna, Chavez-Reyes, & Tari, 2005) จะมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของ BCL-2 หลังจากถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกอย่างมากของ WT1 แต่ในขณะที่ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากนั้น BCL-2 promoter ไม่ได้ถูกควบคุมโดย WT1 (Cheema, et al., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 ตั้งแต่ 12 ชั่วโมง จนถึง 96 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า endogenous WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของ BCL-2 ซึ่งเหมือนกับในเซลล์ HeLa cell ซึ่งมีการ overexpress ของ WT1 และพบการยับยั้งการ transcription ของ BCL-2 promoter (Hewitt, Hamada, McDonnell, Rauscher, & Saunders, 1995) ดังนั้นการที่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการทำงาน

ของ BCL-2 เกิดขึ้นในเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย WT1-siRNA เป็นเพราะการที่ WT1 ถูกทำลายไปจึงส่งผลยับยั้งการถอดการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 นั่นเอง อีกประการหนึ่ง บทบาทของ WT1 ส่วนหนึ่งก็ทำหน้าที่ยับยั้งการ transcription ของ growth factors บางชนิด เช่น insulin-like growth factor II (IGF-II) (Drummond et al., 1992) PDGF alpha (Wang, Madden, Deuel, & Rauscher, 1992) และ transforming growth factor beta I(TGF $\beta$ 1) (Dey et al., 1994) และยังทำหน้าที่ในการกระตุ้น colony-stimulation factor 1 (CSF1) และ insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) (Werner et al., 1994) อีกด้วย ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การยับยั้ง WT1 ด้วย WT1-siRNA นั้น ส่งผลกระทบโดยตรงต่อหลายกระบวนการภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์



รูปภาพที่ 13 แสดงกลไกการเกิด apoptosis โดยผ่านกระบวนการทำงานของเอนไซม์ caspase-7

มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ระบุว่า WT1 ภายในเซลล์ทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ และในการทดลองของเราก็ทำการทดสอบผลของ WT1-siRNA ซึ่งทำให้ลดการแสดงออกของยีน WT1 และส่งผลต่อเนื่องให้กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ มีรายงานหนึ่งฉบับระบุว่า การลดการแสดงออกของ WT1 (+17AA/+KTS) และ WT1 (-17AA/-KTS) สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงเซลล์ให้เป็นเซลล์ในกลุ่ม megakaryopoiesis ซึ่งถูก

กระตุ้นด้วย 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) โดยการวัดค่าการลดลงของ Nitroblue tetrazolium (NBT) และการลดลงของ CD61 หลังจากที่ WT1 ถูกยับยั้งการแสดงออก (Carrington & Algar, 2000) และอีกประการหนึ่ง มีรายงานวิจัยที่อ้างว่า เซลล์ K562 ที่มีการแสดงออกอย่างมากของ WT1 เกิดการสูญเสียความสามารถในการลงเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ และยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่ามีเซลล์เป็น floating cells อยู่มากในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นให้มีการ overexpression ของ WT1 อย่างไรก็ตามผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันมากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า WT1 สามารถกระตุ้นสัญญาณการเกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ และยังสามารถยับยั้งโปรแกรมการเปลี่ยนแปลงเซลล์ได้อีกด้วย ในขณะที่ผลที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้กระตุ้นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เพราะฉะนั้น หน้าที่โดยตรงของ WT1 คือ ควบคุมเซลล์ให้เปลี่ยนเป็น megakaryopoiesis ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น ๆ ที่สรุปว่า WT1 ทำหน้าที่เป็น ยีนกระตุ้นได้เกิดมะเร็ง และยิ่งไปกว่านั้น ก็เกี่ยวข้องกับการเพิ่มสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้อีกด้วย โดยทั่วไปแล้ว การยับยั้งการแสดงออกของ WT1 มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดไปเป็นสาย myeloid ดังนั้น WT1 จึงทำหน้าที่ในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ hematopoietic cells ในช่วงแรก (earlier stage of lineage commitment) และมีรายงานอีกฉบับที่ระบุว่า การลดการแสดงออกของ WT1 ลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงในระยะแรก ๆ ของเม็ดเลือดสาย erythroid, megakaryocyte และ myelomonocytic (Svedberg, et al., 1999) และอย่างไรก็ตาม มีข้อโต้แย้งจากกลุ่มวิจัยของ Smith และคณะ ที่ระบุว่า WT1(+KTS) แสดงบทบาททั้งการกระตุ้นและการยับยั้งให้เม็ดเลือดเปลี่ยนไปเป็น monocytic ในเซลล์ชนิด murine promyelocytic leukemia M1 (S. Smith, Weil, Johnson, Boyd, & Li, 1998) อีกประการ ไม่ใช่เพียงแค่เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเหมือนเซลล์เม็ดเลือด แต่การควบคุมการแสดงออกของ WT1 ยังสามารถส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ K562 ให้เปลี่ยนไปเป็น เซลล์ที่คล้ายเซลล์ประสาท ได้อีกด้วย (Goodfellow et al., 2011)

### Primary leukemic cell

Wilms' tumor 1 หรือ WT1 ทำหน้าที่เป็น zinc-finger transcription factor ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บน chromosome ที่ 11p13 โดยมีความสำคัญอย่างยิ่ง ต่อกระบวนการกระตุ้นหรือการยับยั้งกระบวนการ transcription ภายในเซลล์ ส่งผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลง และการตายของเซลล์ (D. M. Loeb et al., 2002; Sugiyama, 2002) ซึ่งจากการวิจัยพบว่า WT1 มีการ

แสดงออกอย่างมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมไปถึง มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยที่ Acute lymphoblastic leukemic cells (ALL) จะพบการแสดงออกของ WT1 ประมาณ 70-90% โดยการทดสอบด้วย PCR ซึ่งการเพิ่มการแสดงออกของ WT1 ส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ บ่งชี้ให้เห็นว่า WT1 มีความสำคัญมากต่อการศึกษาวิธีการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Boublikova et al., 2006) ยิ่งไปกว่านั้น ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวส่วนใหญ่ (92%) ถูกตรวจพบว่ามี การแสดงออกของ WT1 มากกว่าปกติ อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบระหว่าง T-cell และ B-cell ALL แล้ว ใน immature B-lineage จะพบการ overexpress ของ WT1 มากกว่าใน mature T-lineage และ mature B-lineage ในผู้ป่วย ALL ที่เป็นผู้ใหญ่ ตามลำดับ และยังมี การรายงานพบการแสดงออกอย่างมากของ WT1 ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ที่มี myeloid marker มากกว่า ALL ที่ไม่พบการ coexpression ของ myeloid marker (Busse et al., 2009) และในทำนองเดียวกัน ในกรณีการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วย ALL, AML ก็พบการ overexpress ของ WT1 เช่นกัน (Hu et al., 2010)

จากผลการทดลองพบว่า WT1-siRNA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ primary ALL cells โดยลดแสดงค่าอยู่ที่  $0.20 \pm 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C-siRNA) ซึ่งมีค่าสูง  $0.27 \pm 0.005$  หรือประมาณ 22% ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการใช้ WT1-siRNA ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย CML (UPN3) โดยที่ WT1-siRNA ส่งผลลดการเจริญเติบโต จาก  $27.5 \pm 2.7\%$  เป็น  $18.7 \pm 2.1\%$  และยังคงลดลงอย่างมีนัยสำคัญเป็น  $8.6 \pm 1.1\%$  เมื่อให้การรักษาพร้อมกับ BCR-ABL-siRNA (A. H. Elmaagacli et al., 2005) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การยับยั้งการแสดงออกของ WT1 ภายในเซลล์มะเร็งนั้นสามารถรบกวนอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ยิ่งไปกว่านั้น ผลกระทบจาก WT1-siRNA ยังส่งไปถึงการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ได้อีกด้วย โดย WT1-siRNA เพิ่มอัตราการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็น  $2.6 \pm 0.3$  เท่า ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุม (C-siRNA) คงมีค่าเพียง  $1.7 \pm 0.4$  เท่า ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML WT1-siRNA สามารถกระตุ้นการตายได้  $19.6 \pm 1.9\%$  และเพิ่มขึ้นเป็น  $24.8 \pm 2.1\%$  เมื่อทดสอบร่วมกับ BCR-ABL siRNA (A. H. Elmaagacli, et al., 2005) ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่า ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด myeloid มียีนก่อมะเร็งสำคัญได้แก่ *WT1* และ *BCR-ABL* ซึ่งจะถูกใช้เป็นเป้าหมายในการให้การรักษาผู้ป่วยโรคดังกล่าว และเพื่อเป็นการยืนยันผลการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยการใช้ WT1-siRNA ที่ได้ทำการออกแบบมานี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis อันได้แก่เอนไซม์ caspase-3/7 ผลการทดลองแสดงให้เห็นการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7 ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับ WT1-siRNA ที่



เวลา 48 ชั่วโมง สูงถึง  $5,104 \pm 836$  RFU ในขณะที่กลุ่มควบคุม (C-siRNA) ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเพียง  $1,823 \pm 374$  RFU เท่านั้น ผลครั้งนี้ชี้ให้เห็นกลไกการเกิด apoptosis ด้วยการใส่ WT1-siRNA โดยเกิดผ่านทางการกระตุ้นการทำงานของ caspase-3/7 และกระตุ้นให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่าง และอีกประการหนึ่ง ได้มีการทดสอบเพื่อยืนยันการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดยใช้การย้อมสี Annexin V-FITC/PI ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผนังเซลล์ (cytoplasmic membrane permeability) ซึ่งการเกิด apoptosis จะทำให้เกิดการสลับที่ของ phospholipid phosphatidylserine (PS) จากด้านในออกสู่ด้านนอกของ plasma membrane และสีย้อม Annexin V-FITC มีคุณสมบัติในการจับกับ PS ได้เป็นอย่างดี ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์กำลังอยู่ในสถานะเริ่มต้น apoptosis ในการทดลองครั้งนี้ตรวจพบจำนวนเซลล์ที่ได้รับ WT1-siRNA ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ early apoptosis จำนวน  $36.63 \pm 6.35\%$  และ late apoptosis จำนวน  $33.25 \pm 9.8\%$  ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังได้รับ WT1-siRNA ซึ่งชี้ให้เห็นประสิทธิภาพของ WT1-siRNA ที่ได้ออกแบบขึ้นเพื่อการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวนี้ และเนื่องจาก WT1-siRNA มีคุณสมบัติในการจับกับตำแหน่งที่เป็นคู่สมของ WT1 mRNA ซึ่งจะทำลายกระบวนการ transcription และยับยั้งกระบวนการ translation ของโปรตีน WT1 การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นการยับยั้ง การแสดงออกของ mRNA ของ WT1 IL2 IL-2RB และ IL-2RG ซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และยังกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ผ่านทางการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7

อย่างไรก็ตาม WT1 มีหลากหลาย isoform เกิดจาก กระบวนการ RNA splicing RNA editing alternative splicing และ กระบวนการถอดรหัส โปรตีนโดยจุดเริ่มต้นที่ต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของแต่ละ isoform ทำให้ WT1 มีบทบาทหน้าที่หลายอย่าง (Hohenstein & Hastie, 2006) นอกจากนี้แล้วยังมีการตรวจพบ truncated WT1 ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม MCF-7 มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 ซึ่งทำให้จัดได้ว่า truncated WT1 มีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็งได้ (Dechsukhum et al., 2000)

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 1. สรุป

WT1-siRNA-lentiviral system ที่ออกแบบใหม่ในโครงการนี้สามารถใช้ในลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน WT1 ได้สำเร็จ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว สามารถยับยั้ง IL-2 pathway สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งนี้ตายแบบ apoptosis และกระตุ้นการทำงานของ apoptotic enzyme caspase-3/7 ได้ทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 (chronic myeloid leukemia) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วย acute lymphoblastic leukemia เนื่องจากการโคลน WT1-siRNA ลงใน lentiviral vector และสร้างเป็นอนุภาคไวรัสในการนำ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อน ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยียับยั้งโดยวิธีนี้นับเป็นวิธีใหม่ที่มีประโยชน์สูงมาก ผลการทดลองในโครงการนี้นับเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยทางการแพทย์ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังช่วยส่งเสริมการผลิตบุคลากรที่มีความรู้ความ สามารถทางด้านยับยั้งให้กับประเทศไทย องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดต่อไปได้อีกมากมายไม่ว่าจะเป็นการวิจัยหรือเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาสู่การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดด้วยเทคโนโลยียับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

#### 2. ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ควรมีการต่อยอดในการศึกษาการนำ WT1-siRNA-lentiviral system นี้ไปทดสอบการรักษาโรคในสัตว์ทดลองที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้สามารถศึกษาต่อในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกหรือ mechanism ของเซลล์มะเร็งที่ตอบสนองต่อ WT1-siRNA ในระดับจีโนม ยีนและโปรตีนต่างๆ เช่น กลุ่ม signaling pathway และอื่นๆต่อไปได้

## บรรณานุกรม

- Asao, H., Takeshita, T., Ishida, N., Kumaki, S., Nakamura, M., & Sugamura, K. (1993). Reconstitution of functional interleukin 2 receptor complexes on fibroblastoid cells: involvement of the cytoplasmic domain of the gamma chain in two distinct signaling pathways. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*(90), 4127-4131.
- Attasara, P., & Buasom, R. (Eds.). (2011). *Hospital-based cancer registry 2010*. Bangkok.
- Avril, A., & Michael, R. (2006). Presence of WT1 in nuclear messenger RNP particles in the human acute myeloid leukemia cell lines HL60 and K562. *Cancer letter*, 244, 136-141.
- Barbolina, M., Adlay, B., & Shea, L. (2008). Wilms tumor gene protein 1 is associated with ovarian cancer metastasis and modulates cell invasion. *Cancer*, 112, 1632-1641.
- Bergmann, L., Miething, C., and, & Maurer, U. (1997). High levels of Wilm's tumor gene (WT1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*, 90, 1217-1225.
- Biedler, J. L. (1994). Drug resistance: genotype versus phenotype. *Cancer res*, 54, 666-678.
- Bor, Y., Swartz, J., & Aorrison, A. (2006). The wilms' tumor 1(WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes development*, 20, 1597-1608.
- Boublikova, L., Kalinova, M., Ryan, J., Quinn, F., O'Marcaigh, A., Smith, O., et al. (2006). Wilms'tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia*, 20, 254-263.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P., & MacDonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase *Nature*, 326, 515-517.
- Busse, A., Gokbuget, N., Siehl, J. M., Hoelzer, D., Schwartz, S., Rietz, A., et al. (2009). Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and impact on clinical outcome. *Ann Hematol.*, 88, 1199-1205.
- Call, K., Glaser, T., Ito, C., Buckler, A., Pelletier, J., & Haber, D. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the hyman chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60, 509-520.

- Carrington, D., & Algar, E. M. (2000). Overexpression of murine WT1<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> isoforms has no effect on chemoresistance but delays differentiation in the K562 leukemia cell line. *Leukemia research*, 24, 927-936.
- Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R. a., & Lopez-Berestein, G. (2003). Par-4 transcriptionally regulates BCL-2 through a WT1-binding site on the Bcl-2 promoter. *Journal of Biological chemistry*, 278, 19995-20005.
- Davies, R. C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S. H., Lamond, A. I., and, & Hastie, N. D. (1998). WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Gene and development*, 12, 3217-3225.
- Dechsukhum, C., Garrett, C. T., Ferreira-Gonzalez, A., Supantsetakul, N., Burks, R. T., Morgan, W., et al. (2000). Expression of WT1 transcripts in human prostate cancers.
- Dey, B. R., Sukhatme, V. P., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Rauscher, F. J., & Kim, S. J. (1994). Repression of the transforming growth factor-beta1 gene by the Wilm's tumor suppressor WT1 gene product. *Endocrinology*, 8, 595-602.
- Drummond, I. A., Madden, S. L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G. I., Sukhatme, V. P., & Rauscher, F. J. (1992). Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilm's tumor suppressor WT1. *Science*, 257, 674-678.
- Elmaagacli, A., Koldehoff, M., Peceny, R., Klein-Hitpass, L., Ottinger, H., Beelen, D., et al. (2005). WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Leukemogenesis Research Paper*, 90(3), 326-334.
- Elmaagacli, A. H., Koldehoff, M., Peceny, R., Klein-Hitpass, L., Ottinger, H., Beelen, D. W., et al. (2005). WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica*, 90(3), 326-334.
- Englert, C., Vidal, M., Maheswaran, S., Ge, Y., Ezzell, R. M., Isselbacher, K. J., et al. (1995). Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 92, 11960-11964.
- Gaiger, A., Reese, V., Disis, M. L., & Cheever, M. A. (2000). Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 96, 1480-1489.

- Gessler, M., Konig, A., & Bruns, G. A. (1992). The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics*, *12*, 807-813.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R., Orkin, S., & Bruns, G. (1990). Homozygous deletion in Wilms' tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, *343*, 774-778.
- Ghysdeal, J., Quang, C. T., Deiner, E. M., Dolznig, H., Mullner, E. W., & Beug, H. (2000). Erythroid cell development and leukemic transformation: interplay between signal transduction, cell cycle control and oncogenes. *Pathol Biol*, *48*, 211-226.
- Goodfellow, S. J., Rebello, M. R., Toska, E., Zeef, L. A. H., Rudd, S. G., Medler, K. F., et al. (2011). WT1 and its transcriptional cofactor BASP1 redirect the differentiation pathway of an established blood cell line. *Biochemical journal*, *435*, 113-125.
- Gu, W., Chen, Z., Hu, S., Shen, H., Qie, G., & Cao, X. (2005). Changes in expression of WT1 isoforms during induced differentiation of the NB4 cell line. *Hematologica*, *90*(3), 403-404.
- Gu, W., Hu, S., Chen, Z., Qui, G., Cen, J., He, B., et al. (2010). High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemia with more predominant WT1+17AA isoforms at relapse. *Leukemia research*, *34*, 46-49.
- Gunter, K., Nina, B., Susanne, V., Friederike, G., Marketa, K., Jan, T., et al. (2008). WT1 protein expression in slowly proliferating myeloid leukemic cell lines is scarce throughout the cell cycle with a minimum in G0/G1 phase. *Leukemia Research*, *32*, 1393-1399.
- Gunter Kerst, N. B., Susanne Viebahn, Friederike Gieseke,, & Marketa Kalinova, J. T., Rupert Handgretinger, Ingo M"uller. (2008). WT1 protein expression in slowly proliferating myeloid leukemic cell lines is scarce throughout the cell cycle with a minimum in G0/G1 phase. *Leukemia Research*, *32*, 1393-1399.
- Hammes, A., guo, J. K., Lutsch, G., Leheste, J. R., Landrock, D., Ziegler, U., et al. (2001). Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, *106*, 319-329.
- Harber, D. A., Sohn, R. L., Buckler, A. J., Pelletier, J., Call, K. M., & Housman, D. E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*(21), 9618-9622.

- Hewitt, S. M., Hamada, S., McDonnell, T. J., Rauscher, F. J., & Saunders, G. F. (1995). Regulation of the Proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' Tumor suppressor gene WT1. *Cancer research*, *55*, 5386-5389.
- Hohenstein, P., & Hastie, N. D. (2006). The many facets of the Wilms'tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics*, *15*, R196-R201.
- Hu, S. Y., Gu, W. Y., Chen, Z. X., Wang, X. L., GCen, J. N., He, H. L., et al. (2010). The significance of detecting WT1 expression in childhood acute leukemias. *Pediatric Hematology Oncology*, *27*(8), 581-591.
- Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., & Miwa, H. (1994). WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, *84*, 3071-3079.
- Ishida, N., Kanamori, H., Noma, T., Nilaido, T., Sabe, H., Suzuki, N., et al. (1985). Molecular cloning and structure of the human interleukin 2 receptor gene. *Nucleic Acids Res.*, *13*, 7579-7589.
- Ito, K., Oji, Y., Tatsumi, N., Shimizu, S., Nakazawa, T., Asada, M., et al. (2006). Antiapoptotic function of 17AA(+) WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway Antiapoptotic function of WT1 in leukemia. *Oncogene*, *25*, 4217-4229.
- Koesters, R., Linnebacher, M., Coy, J. F., Germann, A., Schwitalle, Y., Findeisen, P. a., et al. (2004). WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *International Journal of Cancer*, *100*, 385-392.
- Koldehoff, M., Steckel, N., Beelen, D., & Elmaagacli, A. (2007). Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Clinical Experiment Medicine*, *7*, 47-55.
- Larsson, S. H., Charlieu, J. P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., et al. (1995). Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, *81*, 391-401.
- Leonard, W. J., Depper, J. M., Kanehisa, M., Kronke, M., Pfeffer, N. J., Svetlik, P. B., et al. (1985). Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science*, *230*, 633-639.
- Liu, J. J., Wang, Z. Y., Deuel, T. F., & Xu, Y. H. (1999). Imbalanced expression of functionally different WT1 isoforms may contribute to sporadic unilateral Wilms' tumor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *254*, 197-199.

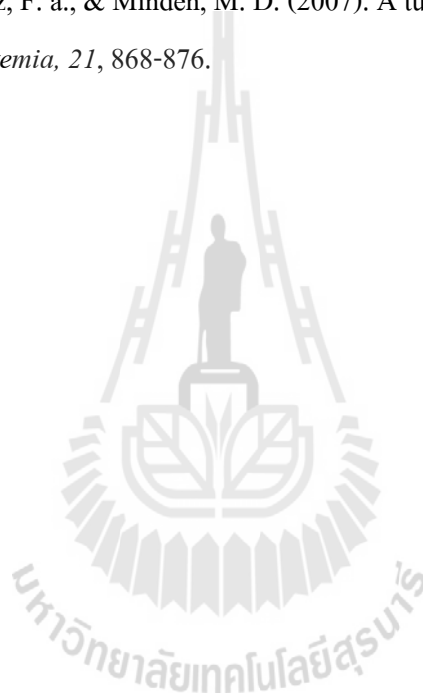
- Loeb, D., Evron, E., Patel, C., & Sharma, P. (2001). Wilm's tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res*, *61*, 921-925.
- Loeb, D. M., Korz, d., Katsnelson, M., Burwell, E. A., Friedman, A. D., & Sukumar, S. (2002). Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. *J Biol Chem*, *277*, 19627-19632.
- Matsuoka, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Ohkubo, T., & sugamura, K. (1993). Kinetic study of interleukin-2 binding on the reconstituted interleukin-2 receptor complexes including the human gamma-chain. *Eur. J. Immunol.*, *23*, 2472-2476.
- Mayo, M. W., Wang, C. Y., Drouin, S. S., Madrid, L. V., Marshall, A. F., Reed, J. C., et al. (1999). WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the Bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J*, *18*, 3990-4003.
- Mendessohn, J., Howley, P., Israel, M., & Liotta, L. (2001). *The molecular basis of cancer.*: WB Saunder.
- Miwa, H., Beran, M., & Saunders, G. F. (1992). Expression of wht Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia*, *6*, 405.
- Moorwood, K., Salpekar, A., Ivins, S. M., Hall, J., Powlesland, R. M., Brown, K. W., et al. (1999). Transactivation of the WT1 antisense promoter is unique to the WT1(+/-) isoform. *Federation of European Biochemical Societies*, *456*, 131-136.
- Morrison, D. J., English, M. A., & Licht, J. D. (2005). WT1 Induces Apoptosis through Transcriptional Regulation of the Proapoptotic Bcl-2 Family Member Bak. *cancer research*, *65*, 8174-8181.
- Nunez., R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current issues molecular biology*, *3*(3), 67-70.
- Oji, Y., Miyoshi, S., & Maeda, H. (2002). Overexpression of the Wilm's tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *International Journal of Cancer*, *100*, 297-303.
- Oji, Y., Suzuki, T., Nakano, Y., Maruno, M., Nakatsuka, S., Jomgeow, T., et al. (2004). Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumours. *Cancer science*, *95*, 822-827.
- Ortiga, A., Niksic, M., Bachi, A., Wilm, M., Sanchez, L., Hastie, N. D., et al. (2003). Biochemical function of female lethal (2)D/ Wilm's tumor suppressor 1 associated proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Journal of Biological chemistry*, *278*, 3040-3047.

- Parkin, D., Muir, C., Whelan, S., Ferlay, J., Raymond, L., & Yong, J. (2002). *Cancer incidence in five continents* (Vol. 7).
- Phelan, S. A., Lindberg, C., & Call, K. M. (1994). Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differentiation*, 5, 677.
- Rauscher, F. J. (1993). The WT1 Wilm's tumor gene product: A developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB*, 7, 896-903.
- Rauscher, F. J., Morris, J. F., Tournay, O. E., Cook, D. M., & Curran, T. (1990). Binding of the wilm's tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*, 250, 1259-1262.
- Rosenfeld, C., Cheever, M. A., & Gaiger, A. (2003). WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *molecular targets for therapy (leukemia)*, 17, 1301-1312.
- Rowley, J. D. (2001). Chromosome translocations, dangerous liaisons revisited. *Nat Rev Cancer*, 1, 245-250.
- Scharnhorst, V., Van der Eb, A. J., & Jochemsen, A. G. (2001). WT1 proteins: Functions in growth and differentiation. *Gene* 273, 141-161.
- Sekiya, M., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K., & Yachi, A. (1994). Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood*, 83, 1876.
- Shirley, I. S., Dominique, W., Gregory, R. J., Andrew, W. B., & Chung, L. L. (1998). Expression of the Wilm's tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood*, 91, 764-773.
- smith, K. A. (1988). The interleukin 2 receptor. *Adv. Innumol.*, 42, 165-174.
- Smith, S., Weil, D., Johnson, G., Boyd, A., & Li, C. (1998). Expression of the Wilms tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood*, 91, 764-773.
- Sriplang, H., Sontipong, S., Martin, N., Wiangnon, S., Vootiplux, V., Sheirsilpa, A., et al. (2003). *Cancer in Thailand* (Vol. 3).
- Sugiyama, H. (2002). Wilms' tumor gene WT1 as a tumor marker for leukemic blast cells and its role in leukemogenesis. *Methods Mol Med*, 68, 223-237.



- Svedberg, H., Chylicki, K., & Gullberg, U. (1999). Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) is not a prerequisite for erythrocytic or megakaryocytic differentiation of the leukemic cell line K562. *Experimental hematology*, *27*, 1057-1062.
- Takeshita, T., Ohtani, K., Asao, H., Kumaki, S., Nakamura, M., & Sugamura, K. (1992). An associated molecule, p64, with IL-2 receptor beta chain. Its possible involvement in the formation of the functional intermediated affinity IL-2 receptor complex. *J. Immunol.*, *148*, 2154-2158.
- Tsiftoglou, A. S., Pappas, I. S., & Vizirianakis, I. S. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacology and therapeutics*, *100*, 257-290.
- Tsiftoglou, A. S., & Robinson, S. H. (1985). Differentiation of leukemic cell lines: a review focusing on murine erythroleukemia and human HL-60 cells. *International journal of Cell Cloning*, *3*, 349-366.
- Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Elisseeva, O. A., Tamaki, H., Oji, Y., et al. (1999). Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Leukemia research*, *23*, 499-505.
- Tuna, M., Chavez-Reyes, A., & Tari, A. (2005). HER2/neu increases the expression of Wilms' tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, *24*, 1648-1652.
- Wang, Z. Y., Madden, S. L., Deuel, T. F., & Rauscher, F. J. (1992). The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *Journal of Biological Chemistry*, *267*, 21999-22002.
- Werner, H., Rauscher, F. J., Sukhatme, V. P., Drummond, I. A., Roberts, C. T. J., & LeRoith, D. (1994). Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *Journal of Biological Chemistry*, *269*, 12577-12582.
- Whalen, A. M., Galasinski, S. C., Shapiro, P. S., Nahreini, T. S., & Ahn, N. G. (1997). Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, *17*, 1947-1958.

- Wilda, M., Fuchs, U., Wossemann, W., & Borkhardt, A. (2002). Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). . *Oncogene*, *21*, 5716-5724. .
- Wolfgang, G., Luise, M., & Johannes, W. (2009). Wilm's tumor gene1 (WT1) as a target in curcumin treatment of pancreatic cancer cells. *European journal of cancer*, *45*, 874-880.
- Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., Hirata, M., et al. (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., Suarez Saiz, F. a., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, *21*, 868-876.



## ภาคผนวก

### 1. Reagent for cell culture

#### 1.1 cDMEM

DMEM	10.0	g
FBS	10.0	ml
NaHCO <sub>3</sub>	3.7	g
1000 U/ml Penicillin/1000 ug/ml Streptomycin	10.0	ml
2 mg/ml Amphotericin B	0.4	ml

เติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตร 1,000 ml จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันและปรับ pH เป็น 7.25 ก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2  $\mu$ m

#### 1.2 cDMEM for viral production

DMEM	10.0	g
FBS	10.0	ml
NaHCO <sub>3</sub>	3.7	g
D-Glucose	3.5	g

เติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตร 1,000 ml จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันและปรับ pH เป็น 7.25 ก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2  $\mu$ m

#### 1.3 cRPMI 1640

RPMI 1640	10.4	g
FBS	10.0	ml
NaHCO <sub>3</sub>	2.0	g
10x HEPES	10.0	ml
1000 U/ml Penicillin/1000 ug/ml Streptomycin	10.0	ml
2 mg/ml Amphotericin B	0.4	ml

เติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตร 1,000 ml จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันและปรับ pH เป็น 7.25 ก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2  $\mu$ m

**1.4 Trypsin/EDTA**

Trypsin	0.25	g
EDTA	0.04	g

เติม sterile PBS ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml.

**1.5 Phosphate Buffer Saline (PBS)**

NaCl	8.00	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	g
KCl	0.20	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	g

เติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตร 1,000 ml จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันและปรับ pH เป็น 7.4 ก่อนนำไปผ่านกระบวนการปลอดเชื้อโดยการ autoclaved ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีก่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2. Reagent for viral production****2.1 2.5 M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub>	18.375	g
-------------------	--------	---

เติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตร 50 ml จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันและนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 μm

**2.2 2x BBS**

NaCl	4.09	g
BES	2.66	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	52.5	mg

เติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตร 240 ml จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันและปรับ pH เป็น 6.95 ด้วย 1 M NaOH จากนั้นเติมน้ำ ultra-pure ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 ml ก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 μm

### 2.3 100x Polybrene

Hexadimethrin Bromide 16.0 mg

เติม cDMEM ที่ปราศจาก antibiotic ให้ได้ปริมาตร 10 ml ก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2  $\mu\text{m}$  จากนั้นเก็บที่ 4°C ควรใช้น้ำยานี้ภายใน 2 สัปดาห์หลังจากเตรียมเสร็จ



### ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2513 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการแพทย์ (พ.ศ. 2535) และ ปริญญาโท วท.ม. ชีวเคมีทางการแพทย์ (พ.ศ. 2539) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก สาขา Microbiology and Immunology โดยเน้นทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์ และ 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 มหาวิทยาลัยขอนแก่นในปี 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 สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี วท.บ. แพทยศาสตร์ (พ.ศ. 2533) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ Diploma Thai Board สาขา Anatomical Pathology จาก ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จากนั้นได้ศึกษา ต่อในระดับ 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 ประเทศไทย อาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล King Scholarship award, Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research (พ.ศ. 2551) และ รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล ปัจจุบันอาจารย์ 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 สาขาวิชาพยาธิ วิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ด.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 \_ e-mail : chavaboon@sut.ac.th

### ประวัติผู้วิจัย

นาง ดวงนภา เศรษฐชัย เกิดวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2521 สถานที่เกิด จ. นครราชสีมา สำเร็จ  
วุฒิการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาจุลชีวะวิทยา จากมหาวิทยาลัย ขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2542  
ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาเอก สาขาวิชาจุลชีวะวิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีวะวิทยา สำนักกวีวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ.  
มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

