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 ทีมี GFP เป็น reporter gene จากนั้น ทำการผลิต lentivirus ด้วยเทคนิคตกตะกอนด้วยแคลเซียม จากนั้นนำไวรัสที่ผลิตได้เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML โดยใช้ K562 cell line และ ALL ชนิด ALL-L1 จากผู้ป่วย จากนั้นนำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับ WT1-siRNA ไปผ่านการคัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของ 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 และตั้งแต่เวลา 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 จากการศึกษาการตายแบบ 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 องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากโครงการ

นี้นับว่าเป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยและเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดชนิด 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^+ 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 caspacse 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.