รหัสโครงการ SUT6-606-54-24-07

รายงานการวิจัย

การศึกษาบทบาทและกลไกการทำงานของยีน truncated WT1 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม

(The study for the role of truncated WT1 in breast cancer)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT6-606-54-24-07

รายงานการวิจัย

การศึกษาบทบาทและกลไกการทำงานของยีน truncated WT1 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม

(The study for the role of truncated WT1 in breast cancer)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม

สาขาพยาธิวิทยา

สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ทพญ.ดร.วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี 2554-2555

บทคัดย่อ

. มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในประชากรไทย โดยเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์เป็นอันดับแรกในหญิงไทย และมีอัตราการตายสูง การรักษาในปัจจุบันเป็นการรักษาโดยการผ่าตัดร่วมกับการใช้ยาเคมีบำบัด และการฉายแสง ซึ่งยังมีผลการรักษาที่ไม่ดีนัก และมีภาวะแทรกซ้อนได้บ่อย การรักษาโดยเทคนิคยีนบำบัดเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงต่ำ และมีประสิทธิภาพสูง งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมโดยใช้ lentiviral vector ในการเหนี่ยวนำให้สร้าง siRNA ที่ทำให้เกิดการทำลายของ WT1mRNA ในเซลล์มะเร็งเต้านม ผลการศึกษาพบว่าการยับยั้งยีน *WT1* ทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตช้าลง และการตายแบบ apoptosis มากขึ้น นอกจากนี้การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย WT1 ได้แก่ IGF-1R และ EGFR พบว่าการลดลงของ WT1 ทำให้เซลล์มีการแสดงออกของยีน *IGF-1R* และ *EGFR* ลดลงด้วย ดังนั้นสรุปได้ว่า WT1 ทำหน้าที่ส่งเสริมการเป็นมะเร็งเต้านม และการใช้เทคนิคยีนบำบัดชนิด lentiviral vector เป็นวิธีที่มีวิธีที่มีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีน เพื่อผลในการลดการเจริญเติบโตของมะเร็ง และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ในอนาคต

Abstract

Breast cancer is the major health problem in Thailand as is the most common cancer among Thai women with high mortality rate. The current treatments include surgery combined with chemotherapy and/or radiotherapy. However, the treatment outcome is not satisfactory with common side effects. Gene therapy treatment receives more interest as this modality has less side effects with rather high efficacy. The aim of this project is to inhibit WT1 gene expression in breast cancer cells by using gene therapy technology utilizing lentiviral vector to induce the production of siRNA targeting WT1 mRNA. The data indicated that WT1 gene down-regulation induced growth inhibition and enhanced apoptosis in breast cancer cells. Moreover, WT1 gene down-regulation also lowered the expression of *IGF-1R* and *EGFR*. In conclusion, this study indicated that WT1 acts as an oncogene in breast cancer and gene therapeutic approach employing lentiviral vector is the power tool to selectively inhibit the expression of the interested gene and to control the growth of cancer cells with potential for clinical application in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญเรื่อง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	6
วิธีการดำเนินวิจัยโดยย่อ	6
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	11
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
การรายงานผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล	19
อภิปรายผลการวิจัย.....	19
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	21
บรรณานุกรม	22
ประวัติผู้วิจัย	28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

1. **ภาพที่ 1** การตรวจการแสดงออกของยีน GFP in 293FT packaging cells โดย fluorescent microscope……12
2. **ภาพที่ 2** การตรวจการแสดงออกของยีน GFP ใน 293FT packaging cells หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT siRNA โดยวิธี flow cytometry……13
3. **ภาพที่ 3** การตรวจการแสดงออกของยีน GFP ใน MCF-7 หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT siRNA โดยวิธี flow cytometry และ fluorescent microscope……..13
4. **ภาพที่ 4** ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธี trypan blue exclusion assay……14
5. **ภาพที่ 5** ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธี MTT assay……15
6. **ภาพที่ 6** ผลการเกิด apoptosis ในMCF-7 หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธีการตรวจ caspase-3/7 activities……..16
7. **ภาพที่ 7** ผลการเกิด apoptosis ใน MCF-7 หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธีการ Anexin-V/PI sytaining…..……..……..17
8. **ภาพที่ 8** ผลการตรวจการแสดงออกของยีนใน MCF-7 หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยวิธี RT-PCR……...18

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งเต้านมถือเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับประเทศและระดับโลก เนื่องจากเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในประชากรเพศหญิง โดยจากข้อมูลทะเบียนมะเร็งของประเทศไทยล่าสุดพบว่า มีอุบัติการณ์เท่ากับ 17.2 คน ต่อประชากรหญิง 100,000 คน (Age – specific incidence rate) ในระหว่างปี พ.ศ. 2538 – 2540 (Sriplung et al., 2003) ซึ่งจัดเป็นมะเร็งในเพศหญิงที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปากมดลูก ยิ่งกว่านั้นพบว่าในกรุงเทพมหานคร มะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์สูงที่สุดคือ 25.4 คน ต่อ ประชากร 100,000 คน สูงกว่ามะเร็งปากมดลูก จากการเปรียบเทียบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านม จากอดีตถึงปัจจุบัน พบว่าโรคมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงขึ้นมาตลอด ข้อมูลระบาดวิทยาในระดับโลกพบว่ามะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่มีอุบุติการณ์สูงสุด โดยมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ประมาณปีละ 990,000 ราย ซึ่งคิดเป็น 22 % ของโรคมะเร็งทั้งหมดในเพศหญิง และยังเป็นสาเหตุของการตายประมาณ 375,000 รายต่อปี (Parkin et al., 2002; Parkin et al., 2001) ซึ่งเป็นอันดับสูงสุดในเพศหญิง และยังเป็นมะเร็งที่มีความชุกมากที่สุด คือ 17.2 %ของมะเร็งทั้งหมด คือประมาณ 3.7 ล้านคนในปัจจุบัน (Parkin et al., 2001)

อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมมีความแตกต่างกันมากในระหว่างประเทศโดยพบอุบัติการณ์สูงสุดในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ยุโรป สหรัฐอเมริกา และพบว่าอุบัติการณ์น้อยกว่าในประเทศที่กำลังพัฒนาในแอฟริกา และ เอเชีย (Parkin et al., 2002; Parkin et al., 2001) ซึ่งแสดงให้เห็นปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม และพันธุกรรมที่มีผลต่อการเป็นโรคดังกล่าว จากความรุนแรงของปัญหาดังกล่าวได้มีงานวิจัยมากมายที่มุ่งอธิบายให้เห็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นโรคมะเร็ง รวมทั้งการค้นหาปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคดังกล่าว โดยหวังว่าความรู้ดังกล่าวจะเป็นพื้นฐานสำคัญ ในการลดอุบัติการณ์ของโรค และลดอัตราการตายจากโรคนี้ลง

มีหลักฐานทางระบาดวิทยาชี้ให้เห็นปัจจัยเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านม ซึ่งได้แก่ การมีบุตรคนแรกในผู้มีอายุมาก มีบุตรน้อย ระยะเวลาในการให้นมบุตรที่สั้น (Kelsey et al., 1993) การได้รับ Exogenous hormone (IARC, 1999) และการให้ estrogen ใน post – menopausal period (IARC, 1999) จะเห็นได้ว่ามีปัจจัยด้าน Hormone มีความสำคัญมาก ในการทำให้เกิดมะเร็งชนิดนี้ ปัจจัยอื่นๆที่สำคัญในการส่งเสริมให้เกิดมะเร็งเต้านม คือ อาหาร โดยพบว่าการทานอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ (red -meat) (Department of Health, 1998) จะเพิ่มการเสี่ยงการเป็นมะเร็งแต่การทานอาหารจำพวกผัก และผลไม้ จะช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคนี้ (World Cancer Research Fund, 1997)

เนื่องจากความรู้กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง ในระดับยีนถือเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำไปใช้ในการป้องกัน และดูแลรักษาโรคมะเร็ง งานวิจัยมากมายพยายามแสดงให้เห็นกลไกดังกล่าว พบว่ามะเร็งเต้านมสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามกลไกการเกิด คือ มะเร็งที่เป็น Hereditary group และ มะเร็งชนิด Sporadic group โดยมะเร็งในกลุ่ม Group แรก มีสาเหตุจาก germ – line mutations ของยีนที่มีความสำคัญในการเกิดมะเร็ง ยีนที่เป็นสาเหตุของมะเร็งส่วนใหญ่ ในกลุ่มนี้ คือ *BRCA 1* และ *BRCA2* โดยเชื่อว่า 25% Familial cancer มีสาเหตุมาจากความผิดปรกติของยีน 2 ชนิดนี้ (Carter et al., 2001) มะเร็งในกลุ่ม Sporadic cancer ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการกระตุ้นโดยฮอร์โมนโดยเฉพาะ estrogen ซึ่งเชื่อว่าทำให้เซลล์แบ่งตัวได้ดีขึ้น และสามารถทำให้เกิดการผ่าเหล่าของยีนได้โดยตรง พบความผิดปรกติของยีนหลายชนิดในมะเร็งกลุ่มนี้ โดยสามารถแยกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ความผิดปรกติของ oncogenes ที่สำคัญคือ *c-erb-B2* (Lewis et al., 1990; Hawkins et al., 1991) , *CCND1* (Buckley et al., 1993; Bartkova et al., 1994; Bartkova et al., 1995), *bcl-2* (Johnston et al., 1994; Joensuu et al., 1994; Zhang et al., 1997), *c-myc* (Berns et al., 1993; Watson et al., 1993), *hTERT* (Bieche et al., 2000) เป็นต้น และTumor suppressor genes ได้แก่ *p53* (Bieche et al., 1994; Norberg et al., 1998), *E-cadherin* (Rimm et al., 1995; Heimann et al., 2000), *p16/INK4* (Herman et al., 1995; Geradts et al., 1996; Woodcock et al., 1999), *RB1* (Varley et al., 1989; Berns et al., 1995),*bax* (Krajewski et al., 1997) เป็นต้น

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ในแต่ละระยะของกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งเต้านม พบว่าความผิดปรกติของยีนทั้ง 2 กลุ่ม (Oncogenes และ Tumor suppressor genes) เป็นสาเหตุสำคัญในการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง (malignant transformation) และการเพิ่มความรุนแรงของมะเร็ง (tumor progression) โดยพบว่ามีการสูญเสียหน้าที่ของ tumor suppressor genes เนื่องจากมีการกลายพันธุ์(mutation) หรือการสูญหายไปของยีน (loss of heterozygosity, deletion) ร่วมกับการกระตุ้นให้ oncogenes ทำงานมากขึ้น ด้วยสาเหตุต่างๆ เช่น การเพิ่มจำนวนชุดของยีน (DNA amplification) การแสดงออกที่สูงขึ้น (overexpression) การกลายพันธุ์ของยีน (mutation) โดยยีนที่พบว่ามีบทบาทสำคัญในช่วงต้นของกระบวนการดังกล่าวได้แก่ การทำงานเพิ่มขึ้นของยีนที่ส่งเสริมคุณสมบัติความเป็นมะเร็ง คือ *TGF-α,Telomerase, cyclin D1, c-myc, bcl2*, coactivator of estrogen receptor, *EGFR, IGF-1R, IGF-II* (Mendelsohn et al., 2001) เป็นต้น ส่วนในระยะหลังของกระบวนการเปลี่ยนแปลงจะพบการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือ การเพิ่มจำนวน (amplification) ของยีนส่งเสริมมะเร็ง ได้แก่ *c-erb-B2, c-myc, cyclin D1, FGF receptor, AIB1* (coactivator of ER) ร่วมกับการกลายพันธุ์ (mutation) ของ Tumor suppressor genes ที่สำคัญคือ *p53, PTEN, RB1* (Mendelsohn et al., 2001) การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดเหล่านี้จะทำให้เกิดความผิดปรกติในการทำงานของเซลล์คือ ความผิดปรกติในกระบวนการ apoptosis และการควบคุมวงจรการแบ่งตัว (cell cycle) รวมถึงการเกิดภาวะ genomic instability ในที่สุดจะนำไปสู่การเกิดลักษณะทางคลินิกของโรคที่สำคัญและเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยคือ การแพร่กระจายของมะเร็ง (metastatic phenotype) และการดื้อต่อการรักษาด้วย เคมีบำบัด antihormonal

therapy และรังสีรักษา ด้วยสาเหตุดังกล่าวทำให้เกิดความพยายามในการควบคุมรักษาโรคโดยการแก้ไขความผิดปรกติในระดับยีนหรือ ที่เรียกว่า gene therapy ปัจจัยสำคัญในความสำเร็จของการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวได้แก่ การค้นหายีนเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็งมากที่สุด เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาที่ดี รวมทั้งต้องมีผลต่อเซลล์ปรกติในร่างกายน้อยที่สุด ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถค้นพบวิธีการรักษาที่มีลักษณะสมบูรณ์แบบดังกล่าวไว้ นอกจากนี้ความรู้ดังกล่าวได้ถูกนำไปใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ในหลายรูปอื่นๆโดยเฉพาะการนำไปใช้ในการวินิจฉัยบอกการพยากรณ์โรค บอกการตอบสนองต่อการรักษา อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการนำความรู้ดังกล่าวไปใช้ ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก

ยีน *WT1* (Wilms tumor suppressor gene) เป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็งในมนุษย์ โดยมีหลักฐานจากงานวิจัยบ่งชี้ว่า ยีนดังกล่าวทำหน้าที่เป็น oncogene (ยีนก่อมะเร็ง) ในมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะ Acute Leukenia (Inoue et al., 1994) ,Wilms tumor (Gessler et al., 1994; Little et al., 1992; Bruening et al., 1993) ovarian cancer (Bruening et al., 1993) , melanoma (Rodeck et al., 1994), mesothelioma (Amin et al., 1995) เป็นต้น เนื่องจากพบว่ายีน WT1 ทำงานสูงขึ้นในส่วนใหญ่ของมะเร็งดังกล่าว ซึ่งต่างจากความรู้เดิมที่เชื่อว่ายีน WT1 เป็นยีนต้านมะเร็งเท่านั้น โดยพบว่า WT1 มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแจริญเติบโตของเซลล์ และการตายแบบ apoptsis การศึกษาให้เห็นกลไกในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งพบว่าโปรตีน WT1 อยู่ในกลุ่ม transcription factor (zinc finger family) (Madden et al., 1991; Madden et al., 1993) ที่สามารถควบคุมยีนเป้าหมายหลายชนิด ที่ทำหน้าที่โดยตรงในกระบวนการแบ่งตัว และการเกิด Apoptosis ของเซลล์ โดยยีนเป้าหมายที่สำคัญที่ถูกควบคุมโดยโปรตีน WT1 คือ

1. ยีนที่อยู่ในกลุ่ม growth factor,และ growth factor receptor gene โดยเฉพาะ *IGF –IR* (Werner et al., 1993; Werner et al., 1994), *EGFR* (Englert et al., 1995), *IGF-*Π (Drummond et al., 1992), *PDGF-A* (Wang et al., 1999), *TGF-*β (Dey et al., 1994), Amphiregulin (Leeet et al., 1999) เป็นต้น
2. ยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการเกิด Apoptosis ได้แก่ *bcl2 (*Hewitt *et al., 1995), c-myc (*Hewitt *et al., 1995)* เป็นต้น
3. ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง ได้แก่ *E-cadherin* (Hosonoet al., 2000) เป็นต้น
4. ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ senesence (การแก่ของเซลล์)ได้แก่ *HTERT* (Telomerase) (Oh et al., 1999)

จากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน WT1 เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกในการทำงาน พบว่าโปรตีน WT1 มีได้หลาย isoforms (อย่างน้อย 24 isoforms) อันเป็นผลจาก alternative splicing (Morris et al., 1991), alternative translational start sites (Bruening et al., 1996), RNA editing (Sharma et al., 1994) และพบว่า โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ต่างกัน โดยเฉพาะระหว่าง isoforms ที่เกิดจาก alternative splicing

ซึ่งมีอยู่ 4 isoforms ที่เกิดจาก splicing ใน 2 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งแรกทำให้เกิดการเพิ่มหรือหายไปของส่วนของโปรตีน ที่สร้างจาก exon 5 (17 aâ) หรือ ที่เรียกว่า WT1 + 17 aâ และ WT1 – 17 aâ ตามลำดับ alternative splicing ตำแหน่งที่ 2 ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วน 3 aâ บริเวณรอยต่อระหว่าง zinc finger 3 และ 4 ของโปรตีน มีชื่อเรียกว่า WT1+ KTS, WT1 –KTS ตามลำดับ การศึกษาพบว่า isoform ที่เกิดจาก alternative splicing มีหน้าที่แตกต่างกันโดยเฉพาะระหว่าง WT1+KTS และ WT1–KTS (Wang et al., 1995) ซึ่งเชื่อว่าที่เกิดจากคุณสมบัติในการจับกับส่วนของ promoter DNA ของยีนเป้าหมายที่ต่างกัน

ผลการศึกษาบทบาทของ WT1 ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ชวบูลย์ เดชสุขุม และคณะได้ค้นพบ Transcript ตัวใหม่ของ WT1 ที่เรียกว่า Truncated WT1 Transcript (Dechsukhum et al., 2000) เนื่องจาก Transcript นี้ประกอบด้วยเฉพาะส่วนของ exon 6 ถึง 10 ของ wild type WT1 transcript เท่านั้น นอกจากนี้ Transcript มีส่วนของ Intron 5 บริเวณ 5’ end ทำให้บ่งชี้ว่า การเกิดขึ้นของ Transcript น่าจะเป็นผลจากการใช้ ectopic promoter ใน Intron 5 การตรวจระดับ Truncated WT1 Transcript นี้ พบว่ามีปริมาณสูงในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ชนิด Tumorigenic cell และ metastatic cell เมื่อเทียบกับ non-tumorigenic cell การใช้ RT-PCR ค้นหา Truncated WT1 Transcript ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า สามารถพบได้ใน breast cancer cell line (MCF-7) leukemia cell line (K562) และใน peripleral blood mononuclear cells จากผู้ป่วย acute leukemia ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่า Truncated WT1 อาจมีความสำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็งและหรือการเพิ่มความรุนแรงของโรค แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาต่อเพื่อยืนยัน และค้นหากลไกการทำงานของยีนตัวนี้

การศึกษาพบว่าหน้าที่ของ WT1 ในเซลล์จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับ ชนิดของเซลล์ ซึ่งเหตุผลที่สำคัญเชื่อว่า เกิดจากการควบคุมการทำงานของ WT1 โดยโปรตีนอื่น ที่สำคัญได้แก่ P53 (Maheswaran et al., 1993) และ Par-4 (Johnstone et al., 1996; Sells et al., 1997) โดยพบว่า WT1 จะสามารถลดการทำให้เกิด Apoptosis จาก P53 ในขณะเดียวกัน P53 ทำให้การควบคุมยีนเป้าหมายของ WT1 ต่างไปด้วย ส่วน Par-4 จะยับยั้งการกระตุ้นยีนเป้าหมาย และลดคุณสมบัติการยับยั้งการแบ่งตัว (growth suppression) ของ WT1 ขณะเดียวกัน WT1 ทำให้ความสามารถในการทำให้เกิด apoptosis โดย Par-4 ลดลง เช่นกัน ตัวอย่างการศึกษาที่สำคัญ คือการแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการควบคุมยีนเป้าหมาย *IGF-IR* โดย WT1 ขึ้นอยู่กับภาวะ P53 ในเซลล์ โดยในการทดลองที่ใช้ Transient Transfection เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการทำงานของยีน *IGF-IR* โดย WT1 (Idelman et al., 2003) พบว่า WT1-KTS สามารถยับยั้งการทำงานของยีน *IGF-1R* เฉพาะเมื่อไม่มีการผ่าเหล่า (mutations) ของยีน P53 ดังนั้นการศึกษาว่า WT1 ทำหน้าที่อย่างไรในการควบคุมยีนเป้าหมาย และจะมีคุณสมบัติส่งเสริม (oncogenic) หรือยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Tumor suppression) จำเป็นต้องคำนึงถึงภาวะความผิดปกติของโปรตีนอื่นๆ เหล่านี้ด้วย

งานวิจัยที่ศึกษาบทบาทของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมพบว่ายังมีความขัดแย้งในผลการศึกษาอยู่ โดยการศึกษาการทำงานของยีน *WT1* โดยวิธี RT-PCR ในเซลล์มะเร็งเต้านม และ

เซลล์ที่ไม่เป็นมะเร็งพบว่ายีน *WT1* มีการทำงานที่สูงขึ้น ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยตรวจพบ WT1 จำนวน 27 จาก 31 รายของผู้ป่วย หรือประมาณ 87% แต่พบ WT1 ในเซลล์ปรกติเพียง 1 ใน 20 รายหรือประมาณ 5 % (Loeb et al., 2001) นอกจากนี้ การวัดระดับ WT1 mRNA ในเซลล์มะเร็งเต้านมจากผู้ป่วย 99 รายพบว่า ระดับที่สูงของ WT mRNA บ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Miyoshi et al., 2002) อย่างไรก็ตามการศึกษาการทำงานของยีน WT1 โดยวิธี immunohistochemical study ในมะเร็งเต้านม พบว่า สามารถตรวจพบโปรตีน WT1 ในเซลล์ปรกติ แต่ปริมาณ WT1จะลดลงในเซลล์มะเร็ง (Silberstein et al., 1997) โดยพบว่า 40% ผู้ป่วยไม่สามารถตรวจพบ WT1 ในเซลล์มะเร็งได้เลย และ 28% ของผู้ป่วยสามารถตรวจพบ WT1 ในส่วนน้อยของเซลล์มะเร็ง (< 50%) แต่การศึกษานี้พบว่าใน high – grade adenocarcinoma กลับสามารถพบ WT1 ได้ในสัดส่วนที่มากขึ้นคือประมาณ 66% ของผู้ป่วย และพบว่าภาวะ WT1 ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับการมีภาวะผ่าเหล่าของยีน *p53* และการสูญเสีย estrogen receptor นอกจากนี้ยังพบว่า WT1 มีการสะสมใน cytoplasm ของเซลล์ซึ่งต่างจากภาวะปรกติที่อยู่ใน nucleus การศึกษาถึงบทบาทของ WT1 gene โดยนักวิจัยในกลุ่มอื่นๆ พบว่าได้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่า WT1 น่าจะมีบทบาทเป็น tumor suppressor gene ได้แก่ การศึกษาใน เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF10AT3B พบว่า WT1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทั้งในห้องทดลอง และหลังการฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไปในหนูและยังพบว่า WT1 สามารถ กระตุ้นการทำงานของยีน $p19^{ARF}$ ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (Wang et al., 2008) นอกจากนี้การศึกษาโดยกลุ่มอื่นๆ พบว่า wide type WT1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เต้านมชนิด H16N-2 โดยสัมพันธ์กับการทำงานที่เพิ่มขึ้นของยีน p21 และสามารถกระตุ้นการสร้างเป็น highly-organized acinar structure ที่มีลักษณะที่คล้ายกับท่อของ mammary gland (Burwell et al., 2007) การศึกษาเพื่อค้นหากลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่า WT1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB 231 ทั้งในห้องทดลอง (soft agar assay) และ ในหนู (nude mice) โดยการศึกาดังกล่าวพบว่า WT1 กระตุ้นให้มีการทำลาย beta catenin เพิ่มขึ้น (destabilization of beta catenin) โดยผ่านการกระตุ้น GSK-3 beta (Zhang et al., 2003) อย่างไรมีการศึกษาอื่นๆ ที่บ่งชี้ว่า WT1 อาจทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่การศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT-474, SKBr3 พบว่า HER2/neu สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของยีน WT1 (Tuna et al., 2005) นอกจากนี้ พบว่า WT1 สามารถกระตุ้นการทำงานของยีน karatinocyte growth factor (KGF) และทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโต และเคลื่อนที่ได้มากขึ้น (Zang et al., 2008) ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาเพื่อวัดระดับการทำงานของยีน WT1 โดย Real-time RT-PCR ในมะเร็งเต้านมพบว่า ระดับการทำงานที่สูงของ WT1 ในเซลล์มะเร็งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Miyoshi et at., 2002)

ดังนั้นจะเห็นว่าบทบาทของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมยังไม่มีข้อสรุปชัดเจน โดยข้อมูลส่วนใหญ่บ่งชี้ว่า WT1 น่าจะทำหน้าที่เป็นยีนส่งเสริมการเป็นมะเร็ง (oncogene) ในมะเร็งชนิดนี้ และกลไกในการควบคุมกระบวนการเกิดมะเร็งชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ด้วยเหตุที่ WT1 ทำ

หน้าที่ยีนเป้าหมายหลายตัวในกลุ่ม growth factor and growth factor receptors โดยเฉพาะ IGF-1R, EGFR, IGF-II ที่มีความสำคัญมากในการเกิดมะเร็งเต้านม ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาบทบาทของ WT1 ในกระบวนการเกิดมะเร็งชนิดนี้ วิธีการศึกษาจะใช้การทดลองใน breast cancer cell lines MCF7 โดยใช้เทคนิคกระตุ้นการทำงานยับยั้งการทำงานของยีน WT1 โดยใช้ Lentiviral vector แล้วสังเกตผลจากการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ดังกล่าว ซึ่งรวมถึงคุณสมบัติความเป็นมะเร็งของเซลล์คือ อัตราการเจริญเติบโต (proliferate rate) อัตราการตายแบบ Apoptosis และการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนเป้าหมายของ WT1 ได้แก่ ยีน *IGF-IR, EGFR* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งเต้านม การศึกษานี้จะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ ที่แสดงให้เห็นบทบาทและ กลไกในระดับยีน ของ WT1 ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นการรักษาโดยวิธี gene therapy ในอนาคต ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งดีขึ้น รวมถึงการลดผลข้างเคียงจากการรักษาโดยวิธี chemotherapy และ radiotherapy ลงได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. สร้างระบบการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็ง ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยใช้ lentiviral vector
2. ศึกษาผลของการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเต้านมต่อคุณสมบัติความเป็นมะเร็งของเซลล์ ได้แก่ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (proliferative rate) อัตราการเกิด Apoptosis (apoptosis index)
3. ศึกษากลไกการทำงานของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยการตรวจวัดระดับการทำงานของยีน *IGF-IR, EGFR* ในระดับ mRNA

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาบทบาทของยีน WT1 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม โดยใช้ lentiviral vector เป็นพาหะในการทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 แล้วจึงวัดระดับการทำงานของยีน WT1 ซึ่งจะแสดงให้เห็นความสำเร็จในการยับยั้งการทำงานของยีน จากนั้นจะดูผลต่อคุณสมบัติการเป็นมะเร็งของเซลล์ ซึ่งได้แก่ อัตราการเกิด apoptosis, proliferation rate นอกจากนี้จะศึกษากลไกการทำงานของยีนนี้ โดยวัดระดับการแสดงออกของ ยีน EGFR, IGF-1R ในระดับ RNA

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยใช้ viral vector ชนิด lentiviral vector ในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งดังกล่าว โดยการใช้ lentiviral vector ดังกล่าวสร้าง si RNA (small interfering RNA) ขึ้นในเซลล์เป้าหมาย ซึ่ง si RNA ดังกล่าวจะสามารถจับกับส่วนของ mRNA ของ WT1 ได้อย่างจำเพาะและเหนี่ยวนำให้

เกิดการทำลายของ WT1 mRNA หลังการนำ lentiviral vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แล้ว จะทำการวัระดับการแสดงออกของยีน WT1 เพื่อยืนยันว่าสามารถยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้จริง รวมถึงการวัดคุณลักษณะความเป็นมะเร็งของเซลล์ดังกล่าว ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และอัตราการตายแบบ apoptosis และมีการศึกษาให้เห็นกลไกที่เกี่ยวข้องในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในคุณลักษณะความเป็นมะเร็งดังกล่าวโดยการวัดระดับ mRNA ของยีนเป้าหมายที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดย WT1 ได้แก่ ยีน *IGF-1R* และ *EGFR* ในระดับ RNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้ lentiviral vector ที่สามารถใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีประสิทธิภาพสูง
2. ได้กระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 โดยใช้ lentiviral vector
3. ได้เทคนิคยีนบำบัดโดยใช้ lentiviral vector ที่สามารถนำไปพัฒนาวิจัยต่อยอดเพื่อการรักษามะเร็งชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะมะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน WT1 ในปริมาณสูง เช่นมะเร็งเม็ดเลือดขาว

<u>หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์</u>

ผู้ป่วยและ ครอบครัว มหาวิทยาลัย โรงพยาบาล วงการแพทย์ นักวิชาการ ผู้ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เนื้อเรื่อง

2.1 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ

เซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 แต่ละชนิดจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงชนิด DMEM/F12 MEDIUM (Invitrogen, CA, USA) ที่ถูกเสริมด้วย 10% Fetal bovine serum เซลล์ถูกปล่อยให้เจริญเติบโตในตู้อบ 37°C ที่มี 5% CO_2 เซลล์จะถูกปล่อยให้เจริญจนได้ความหนาแน่นประมาณ 80% แล้วจึงถูก trypsinized และ subculture ในอัตราที่เหมาะสม

2. การสร้าง Lentivirus vector และการ Transduction เพื่อยับยั้งการทำงานของยีน WT1

2.1 จะใช้ Lentivirus vector ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง shRNA ที่จับและเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยขั้นตอนการสร้าง vector ดังกล่าวสามารถกล่าวโดยสังเขปดังนี้

- สร้างส่วนของ DNA ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง siRNA (shRNA) ที่จับอย่างจำเพาะกับยีน WT1 สามารถทำได้โดยวิธีการ PCR โดยใช้ oligonucleotides เป็นแม่แบบ
- ตัดส่วนของ vector ที่บริเวณ multicloning region โดย restriction enzyme 2 ชนิด ที่สามารถตัดปลายทั้ง 2 ด้านของ cDNA
- เชื่อมต่อ ชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากาการทำ PCR เข้าสู่ Lentiviral vector (pPRIME-CMV-GFP) โดยใช้ enzyme ligase แล้วจึงนำ vector ที่ได้ transform เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (supercompetent cells) ปล่อยให้แบคทีเรียเจริญใน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ เลือก clone ที่มีส่วนของยีน WT1 โดยวิธี PCR แล้วจึงเลี้ยง clone ให้มีปริมาณมาก เพื่อนำไปสกัด plasmid โดยวิธี Alkaline-lysis with column purification method (Promega, WI, USA)
- เลี้ยง retroviral packaging cell lines (T293 cell) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented by 10% FCS, 0.1% P/S and 0.1% Glutamine. นำ WT1-siRNA-lentivital vector เข้าสู่เซลล์ 293T/17 cell lines ร่วมกับ packaging plasmid 3 ตัวโดยใช้ Fugene 6 transfection reagent (Promega, WI, USA) จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เข้าไป โดยไม่เติมยาปฏิชีวนะ เพื่อให้เซลล์ผลิตไวรัสออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส 10% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคไวรัสอยู่ แล้วกรองส่งปนเปื้อนด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน
- จากนั้นทำการ transduce อนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ MCF-7 โดยใช้วิธี spin transduction ที่ 1800 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 12-18 ชั่วโมง

จากนั้นก็บ่มเซลล์ไว้ในตู้บ่มเซลล์ จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เป็นแบบที่เติมยาปฏิชีวนะด้วยเพื่อป้องกันการ contamination บ่มเซลล์ต่อไปอีก 1-2 วัน นำเอาเซลล์ MCF-7 ที่ผ่านการทำ transduction ซึ่งในที่นี้จะให้จะให้รหัสของเซลล์เป็น MCF-7-WT1-siRNA-GFP^{+} และ MCF-7-C-siRNA-GFP^{+} cells มาทำการทดลองในขั้นตอนอื่นๆต่อไป

3. การศึกษาคุณลักษณะความเป็นมะเร็งของเซลล์ (proliferative rate)

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* จะใช้น้ำยาสำเร็จรูป คือ CellTiTer 96 Aqueous one solution cell preliferation assay kit (Promega, WI, USA)โดยมีวิธีการทดลองโดยสรุปดังนี้

- เลี้ยงเซลล์มะเร็งใน 96-well titer plate ให้ได้ปริมาณ 3000 cell ต่อหลุม โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารปรกติ
- ทำการเคลื่อนย้าย plasmid เข้าสู่เซลล์โดยใช้ Lipofectamine 2000 เป็นตัวนำพา ตามวิธีการข้างต้น
- หลังจากนั้น 24 ชม. จึงเติมสารละลาย MTS+PES ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปล่อยทิ้งไว้ 4 ชม.
- นำเซลล์ที่ได้ไปวัดคาวมเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 490 nm
- นำค่าที่วัดได้ไปสร้างเป็น growth curve

4. การวัดอัตราการเกิด Apoptosis

จะเลือกใช้ การวัด activity of caspase 3/7 ในเซลล์ หลัง transfection โดยมีขั้นตอนสังเขปดังนี้

การวัดการทำงานของ Caspase 3/7

เนื่องจาก caspase 3/7 เป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นในกระบวนการเกิด Apoptosis โดยจะถูกเปลี่ยนเป็น Active enzyme ที่สามารถย่อยสลายโปรตีน caspase ตัวอื่นๆ ได้ ดังนั้นการวัด activity ของ caspase 3/7 เป็นการบ่งถึงระดับ Apoptosis ที่เกิดขึ้น (จำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis) โดยการวัดจะใช้สารที่สามารถย่อยด้วย active caspase 3/7 คือ สาร Ac-DEVD-pNA เติมในสารสกัดโปรตีนที่แยกได้จากเซลล์ที่ต้องการศึกษา ซึ่งเมื่อสารดังกล่าวถูกย่อยโดย active caspase 3/7 จะทำให้เกิดสีที่สามารถวัดได้โดยเครื่อง luminometer ที่ความยาวคลื่น $485_{Ex}/527_{Em}$ nm ค่าที่วัดได้จะแปรผันตามปริมาณ active caspase 3/7 ที่เกิดขึ้น ขั้นตอนการทดลองเป็นดังนี้

- สกัดโปรตีน จากเซลล์ที่ต้องการศึกษา โดยจะสกัดจากเซลล์ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในปริมาณที่เท่ากัน

- เติมสารละลาย caspase assay buffer และสาร DVED-pNA
- ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไป 4 ชม. ที่ 37°C
- วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดยวัด absorbance ที่ 527 nm
- นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ apoptosis ที่เกิดขึ้น

5. การตรวจสอบการตายของเซลล์โดยการย้อมสี Anexin V-FITC/PI

การกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ MCF-7 ได้รับการยืนยันจากการทดสอบการย้อม Anexin V-FITC/PI โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) ปั่นล้างเซลล์ MCF-7 จำนวน $1x10^5$ cells ด้วย PBS และทำการเติม 1X buffer ลงไป 100 μl จากนั้นเติม anexin V-FITC ลงไป 5 μl และเติม Propidium iodide อีก 5 μl ลงไปในหลอดทดลองขนาด 5 ml จากนั้นทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสง เติม 1X buffer อีก 400 μl และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry

6. การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับ RNA

เซลล์ MCF-7-WT1-siRNA-GFP+ และ MCF-7-C-siRNA-GFP+ ถูกเก็บเกี่ยวตามระยะเวลาที่ระบุในการทดลอง และนำมาปั่นล้างตกตะกอนเซลล์ จากนั้นสกัด total RNA จากตะกอนเซลล์ที่เตรียมได้ ด้วยชุดสกัด RNA ชนิด Total RNA mini kit (geneaid) จากนั้นตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop จากนั้นทำการสังเคราะห์สาย cDNA ขึ้นมาด้วยกระบวนการ reverses transcription โดยใช้ ReverseAid First strand cDNA Synthesis kit (Invitrogen, CA, USA) ตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือการใช้งาน จากนั้น cDNA สายใหม่ก็ถูกนำมาเป็น template ในการเพิ่มจำนวนของ PCR product โดย reaction mixed ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs mix, 2 mM MgCl2, 0.4 pmole primers ซึ่งมีลำดับดังนี้

WT1 reverse primer: 5'-TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTT-3'

WT1 forward primer: 5'-AGACATACAGGTGTGAAACC-3'

tWT1 reverse primer : 5'-CGTTGTGTGGTTATCGCTCT -3'

tWT1 forward primer: 5'-GAACCCTGCATCTAAAGTGG-3'

EGFR reverse primer: 5’-GTTGAGGGCAATGAGGACAT-3’

EGFR forward primer: 5’-TAACAAGCTCACGCAGTTGG-3’

IGF1R reverse primer: 5’-GCCCCGTGTCATCAGTTCCATGAT-3’

IGF1R forward primer: 5’-GTGTACGTTCCTGATGAGTGGGAG-3’

GAPDH reverse primer: 5’-GTACTCAGCGGCCAGCATCG-3’

GAPDH forward primer: 5’-AGCCACATCGCTCAGACACC-3’

1 unit of Taq DNA polymerase, 10.0 µl cDNA from reverse transcription step and RNase/DNase free water ปรับให้เป็น 25 µl/reaction จากนั้นเซตค่าอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ทำปฏิกริยา ดังนี้

95°C for 5 minutes จากนั้น 40 cycles ที่ 95°C for 45 second, 51°C for 30 second และ 72°C for 5 minutes สำหรับ WT1

95°C for 5 minutes จากนั้น 35 cycles ที่ 95°C for 45 second, 60°C for 30 second และ 72°C for 5 minutes สำหรับ tWT1 และ GAPDH

94°C for 1 minute จากนั้น 35 cycles ที่ 94°C for 30 second, 60°C for 30 second, 72°C for 30 second และ 72 for 10 minutes สำหรับ EGFR

94°C for 1 minute จากนั้น 35 cycles ที่ 94°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, 72°C for 3 minutes และ 72 for 10 minutes สำหรับ IGF1R

จากนั้นเก็บ PCR Product ไว้และนำไปแยกขนาดด้วยวิธีกระแสไฟฟ้า บน agarose gel เข้มข้น 1.5% และตรวจดู PCR Product ด้วยการย้อมด้วย ethidium bromide

2.2 ผลการวิจัย

ประสิทธิภาพของสร้าง lentivirus ใน packaging cells และการ transduction of lentiviral vector เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

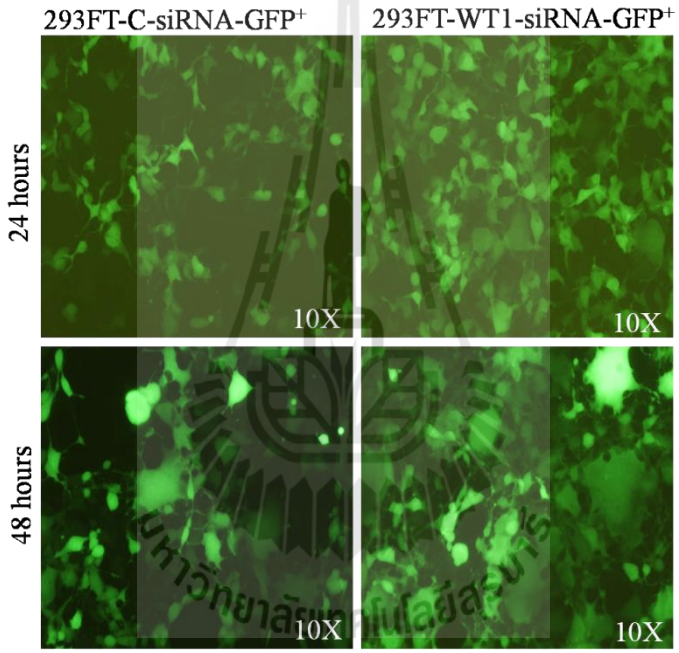
จากที่ได้ทำการเลี้ยงเซลล์และผลิตไวรัสขึ้นมาเพื่อนำพา siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย เราสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตไวรัสและการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์โดยการตรวจค่า GFP expression โดยดูจากภาพในกล้อง Fluorescent microscope และการตรวจปริมาณของเซลล์ที่ติดสี GFP ด้วยเครื่อง Flow cytometry

ภาพที่ 1 แสดงให้เห็นปริมาณของเซลล์ 293FT ที่ผ่านการทำ plasmid transfection ซึ่งเมื่อเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากกระบวนการ transfection เซลล์ 293FT จะมีการแสดงออกของโปรตีน GFP ขึ้นมาภายในเซลล์ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิต lentivirus virion ได้ ปริมาณของ GFP+ cells จะเป็นเครื่องบ่งชี้ในเชิงคุณภาพ ถึงความเข้มข้นของไวรัสนั่นเอง กล่าวคือหากมีปริมาณ GFP+ cells มาก ความเข้มข้นของไวรัสก็จะมากขึ้นด้วย โดยจากภาพจะเห็นว่า ประสิทธิภาพการ transfection ในเซลล์ 292FT มีปริมาณสูง ทั้งในกรณีที่ใช้ control plasmid (C-siRNA-GFP$^+$ plasmid) และ WT1-siRNA plasmid (WT1-siRNA-GFP$^+$ plasmid) ทั้งนี้ control plasmid จะทำให้เกิด lentiviral vector ชนิดที่สร้าง siRNA ที่ไม่จำเพาะกับยีนใด โดยใช้ชื่อว่า C-siRNA-GFP$^+$ vector จึงทำการทดลองโดยใช้ control lentiviral vector ดังกล่าวร่วมด้วย กับ WT1-siRNA- GFP$^+$ vector ซึ่งสามารถสร้าง siRNA ที่ยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในการทดลองทุกขั้นตอน

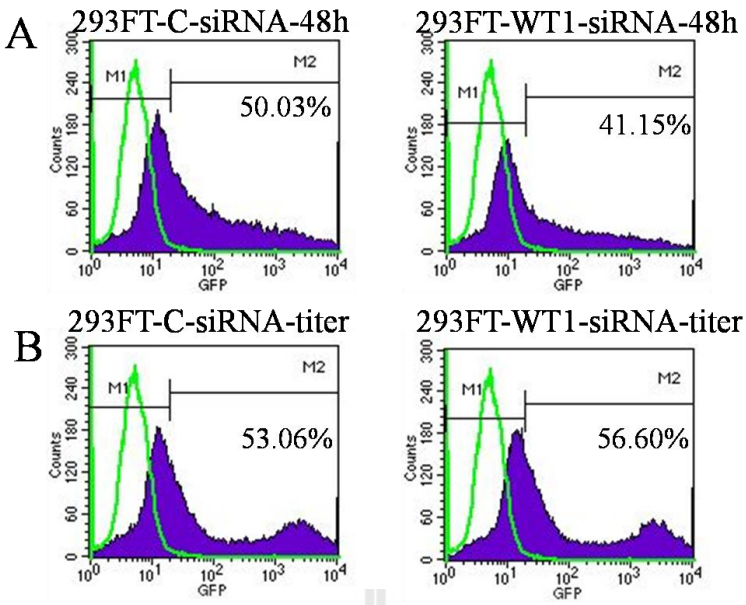
ภาพที่ 2A แสดงถึงจำนวน 293FT-C-siRNA-GFP$^+$ cells และ 293FT-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังได้รับการ transfection โดย plasmid DNA ซึ่งวัดได้จาก flow cytometry และเมื่อนำเอา

lentiviral supernatant ที่ได้ไปทดสอบ viral titer พบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้จากการทดสอบ viral titer มีค่า 53.06% และ 56.60% ในเซลล์ 293FT-C-siRNA-GFP^{+} และ 293FT-WT1-siRNA-GFP^{+} ตามลำดับ (ภาพที่ 2B) ซึ่งค่า titer ที่ได้นี้ สามารถทำนายค่า transduction efficiency ได้อีกด้วย กล่าวคือ ถ้า titer สูง การ transduction ก็จะเกิดได้ดีเช่นกัน

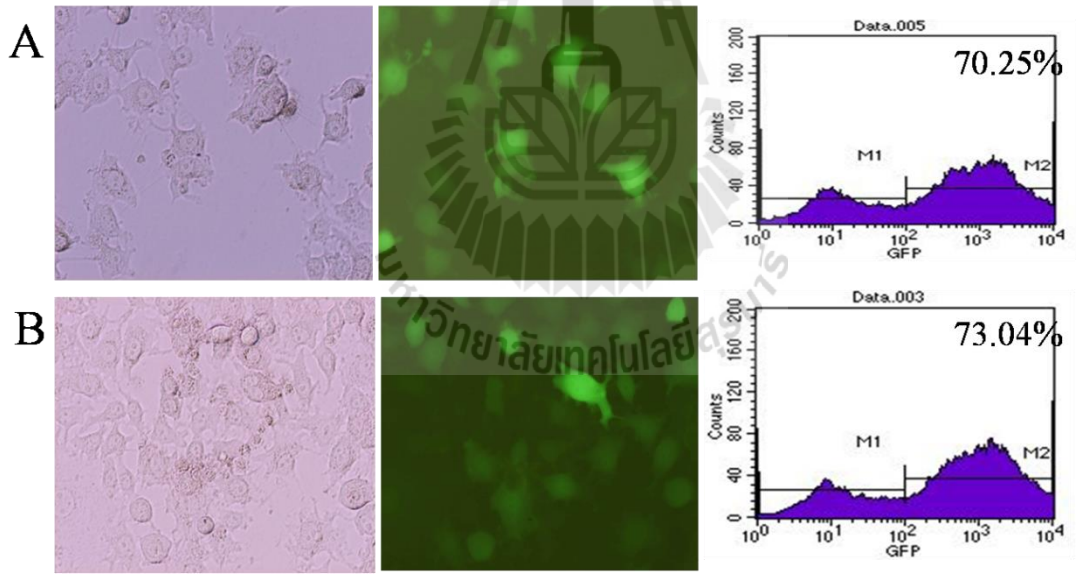
ภาพที่ 3 เป็นผลการทำ lentiviral transduction เข้าสู่เซลล์เป้าหมายคือ เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 พบว่า เราสามารถนำ C-siRNA-GFP^{+} vector และ WT1-siRNA-GFP^{+} vector เข้าสู่เซลล์ได้ 70.25% และ 73.04% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าวิธีการ spin transduction นี้มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงในการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์ชนิดดังกล่าว



ภาพที่ 1 293FT cells exhibit GFP expression after 24 and 48 hours of transfection process.



ภาพที่ 2 293FT packaging cell lines were transfected with WT1-siRNA or C-siRNA. At 48 hours after transfection cells were trypsinized for determination of transfection efficiency based on GFP expression (A). Lentiviral supernatant was filtrated and transduced to 293FT, for titer measurement which directly refer to transduction efficiency (B).

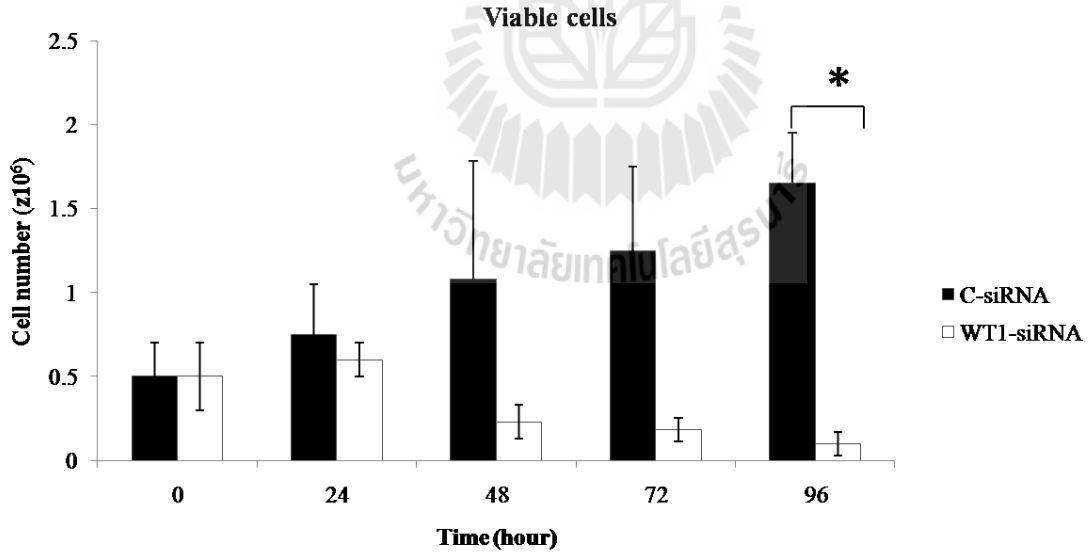


ภาพที่ 3 GFP expression of human breast cancer (MCF-7) cell lines at 48 hours post transduction. Bright field and fluorescent field were parallel compared and approximately 70% of MCF-7-C-siRNA-GFP^{+} cells were shown (panel A) and 73% of MCF-7-WT1-siRNA-GFP^{+} cells were shown (panel B). Bright field was compared with fluorescent filed with 10X magnification power.

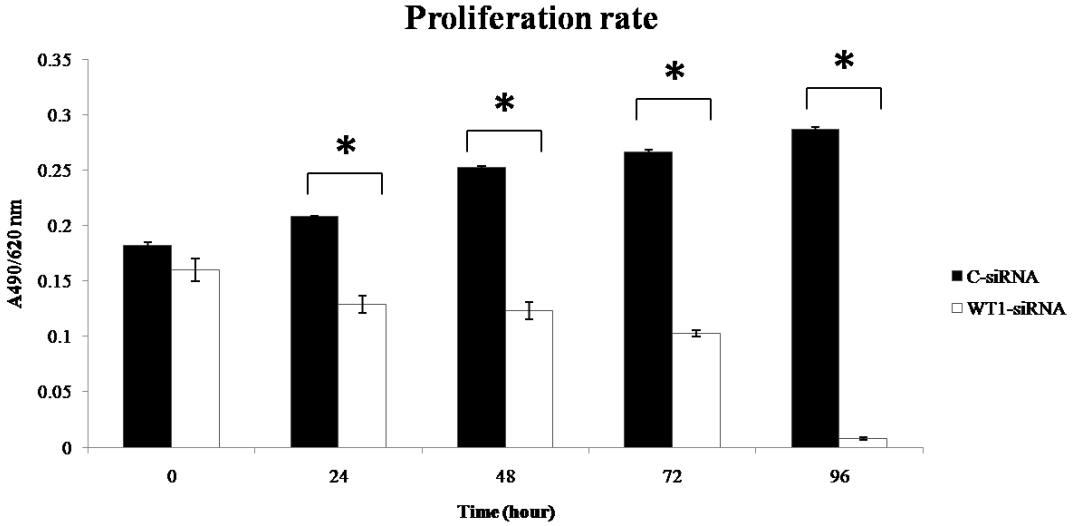
การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์

ผลการทดลอง: WT1-siRNA ส่งผลลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

นำเอาเซลล์ที่ได้มาตรวจสอบหาการรอดชีวิตของเซลล์พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป MCF-7-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells มีอัตราการรอดชีวิตลดน้อยลงไป ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดที่เวลา 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์รอดชีวิตลดจำนวนลงมากกว่า 3 เท่าจากเวลาเริ่มต้น ในขณะที่ MCF-7-C-siRNA-GFP$^+$ cells ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่า WT1-siRNA มีผลลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 และเพื่อเป็นการยืนยันผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์ จึงได้ทำการทดลองตรวจสอบค่าการเจริญเติบโตด้วยชุดทดสอบ MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 490/620 nmพบว่า ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในกลุ่ม MCF-7-WT1-siRNA-GFP+ มีลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ ดังนี้ 0.16±0.01, 0.13±0.01, 0.12±0.003, 0.10±0.003, 0.08±0.003 ในเวลา 0, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นชี้ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งเต้านมถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วย WT1-siRNA ในขณะที่กลุ่มควบคุม (MCF-7-C-siRNA-GFP$^+$ cells) มีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มมากขึ้นตามปกติ (ภาพที่ 5) กล่าวโดยสรุป WT1-siRNA มีผลต่อการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมนั่นเอง



ภาพที่ 4 WT1-siRNA inhibits cell growth of MCF-7. At specific time points of transduction, MCF-7-WT1-siRNA-GFP$^+$ and WT1-C-siRNA-GFP$^+$ cells were collected and determined viable cell count by trypan blue exclusion assay.

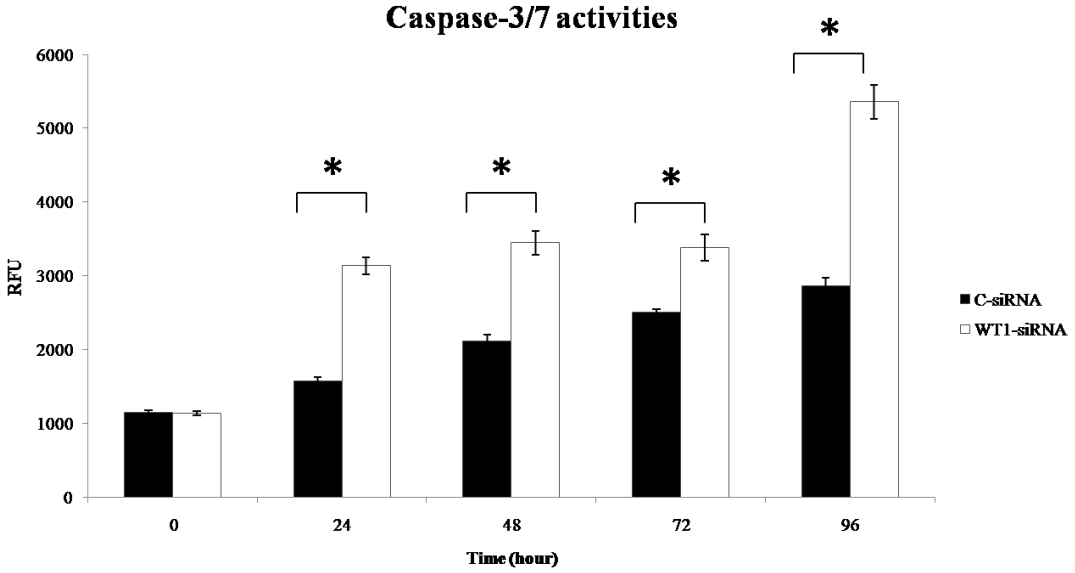


ภาพที่ 5 WT1-siRNA induces cellular proliferation suppression of MCF-7. At specific time points of transduction, MCF-7-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells and MCF-7-C-siRNA-GFP$^+$ cells were collected and evaluated proliferation rate by MTT assay.

การตรวจสอบการตายของเซลล์ โดยวัดจากการทำงานของเอนไซม์คาสเปส 3/7

ผลการทดลอง: WT1-siRNA กระตุ้นการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์ MCF-7

Caspase-3/7 เป็นเอนไซม์ในกระบวนการเกิด apoptosis ของเซลล์ โดยจะเป็นเอนไซม์ในลำดับสุดท้ายใน apoptotic pathway และหากพบการแสดงออกของเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้นแสดงว่าเซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis นั่นเอง จากข้อมูลดังกล่าวเราจึงทำการศึกษาผลของ WT1-siRNA ในการกระตุ้นการตายของเซลล์ โดยวัดจาก caspases activity จากการทดลองพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น อัตราของ caspase-3/7 activities ก็เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ MCF-7-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells โดยให้ค่า 3,138±117, 3,443±164, 3,383±178 และให้ค่าสูงสุด 5,358±229 RFU ที่เวลา 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม MCF-7-C-siRNA-GFP$^+$ cells โดยสามารถสรุปได้ว่า WT1-siRNA กระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ได้ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น caspase-3/7 จัดเป็น executioner caspases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการตัดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis เช่น PARP เป็นต้น และการที่เอนไซม์ทั้งสองจะทำงานได้จะต้องได้รับการกระตุ้นให้กลายเป็น active form ก่อน แล้วจึงทำหน้าที่ได้ และจากการศึกษาผลของ WT1-siRNA พบว่ามี activity ของเอนไซม์เกิดขึ้นสูงหลังจากทดสอบ แสดงให้เห็นว่า WT1-siRNA มีประสิทธิภาพอย่างมากในการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7



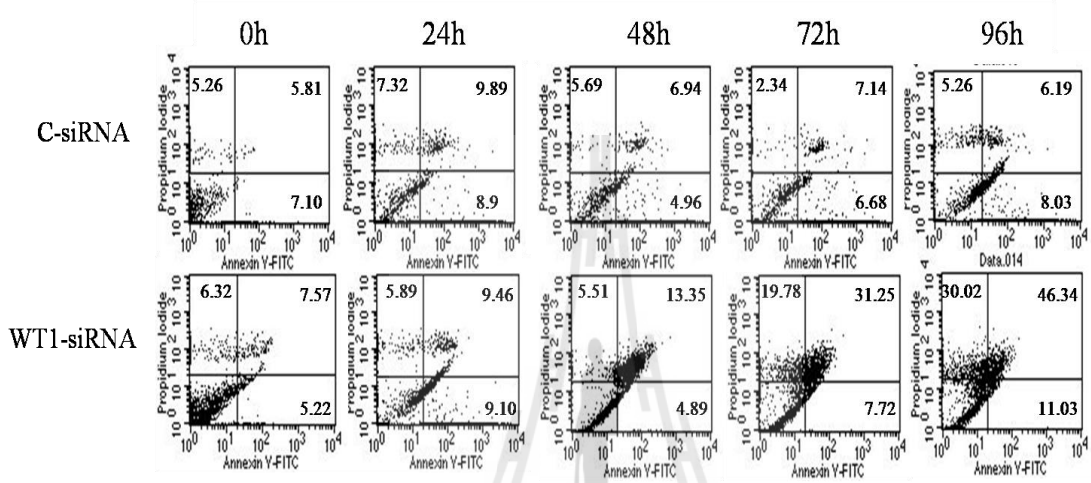
ภาพที่ 6 WT1-siRNA induces apoptosis of MCF-7. At specific time points, MCF-7-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells and MCF-7-C-siRNA-GFP$^+$ cells were collected for apoptosis determination based on the activation of Caspase-3/7 enzyme activities.

การตรวจสอบการตายของเซลล์โดยการย้อมสี Anexin V-FITC/PI

ผลการทดลอง: WT1-siRNA กระตุ้นการตายของ MCF-7 cells แบบ apoptosis

กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis นั้น เกิดขึ้นจากการถูกกระตุ้นด้วยสารบางชนิด ที่สามารถจับกับตัวรับ และกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่านโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องมาเป็นลำดับ โดยแบ่งเส้นทางการกระตุ้นเป็น 2 เส้นทาง คือ intrinsic และ extrinsic pathway ขึ้นกับตัวกระตุ้น เซลล์จะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิด apoptosis เช่น มีการเหี่ยวลง (cell shrinking) ขนาดเล็กลง (small size) เกิด DNA condensation เกิดการพลิกกลับของผนังเซลล์ จากด้านในออกมาด้านนอก (membrane permeability) ทำให้สามารถใช้หลักการนี้ในการตรวจหาเซลล์ apoptosis ได้ โดยจะมีโมเลกุลบนผนังเซลล์ที่เรียกว่า phosphatidylserine ซึ่งปกติจะอยู่ที่ผนังเซลล์ด้านใน (inner membrane) จะถูกย้ายออกมาอยู่ที่ผนังเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ให้เพื่อทำการตรวจเช็คผลของ WT1-siRNA ต่อการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เราได้ทำการทดสอบด้วยการย้อมสี anexin V-FITC และ propidium iodide (PI) โดยที่ anexin V จะทำปฏิกิริยาเกาะกับ โมเลกุลของ phosphatidylserine และ PI จะแทรกเข้าไปในเซลล์และไปติดสี DNA ที่เมื่อเกิด apoptosis แล้วจะเกิด DNA fragmentation ด้วย จากการทดลองพบเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis เพิ่มมากขึ้นในกลุ่มที่ทดสอบด้วย WT1-siRNA โดยปริมาณเซลล์ early apoptosis เพิ่มจาก 5.22% เป็น 11.03% เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุม MCF-7-C-siRNA-GFP+ cellsให้ผลการกระตุ้นไม่แตกต่างกัน และหากพิจารณาจากปริมาณเซลล์ที่เป็น late apoptosis พบว่า WT1-siRNA กระตุ้นการตายของเซลล์ MCF-7 ได้มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่าตั้งแต่ 7.57%, 9.49%, 13.35%, 31.25%, และ 46.34% เมื่อเวลา 0, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 7) จากผลการทดลองใช้ WT1siRNA ในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ให้ตายแบบ apoptosis นั่นก็พอจะสรุปได้ว่า

กระบวนการกระตุ้นด้วย WT1-siRNA ทำให้เซลล์เกิด apoptosis ซึ่งตรวจพบทั้งทางด้านกายภาพคือการที่เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง รวมถึงคุณสมบัติของผิวเซลล์ และในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่เอนไซม์คาสเปส เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดมีค่ามสอดคล้องกัน และยืนยันให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีการตายแบบ apoptosis สูงขึ้นอย่างชัดเจน



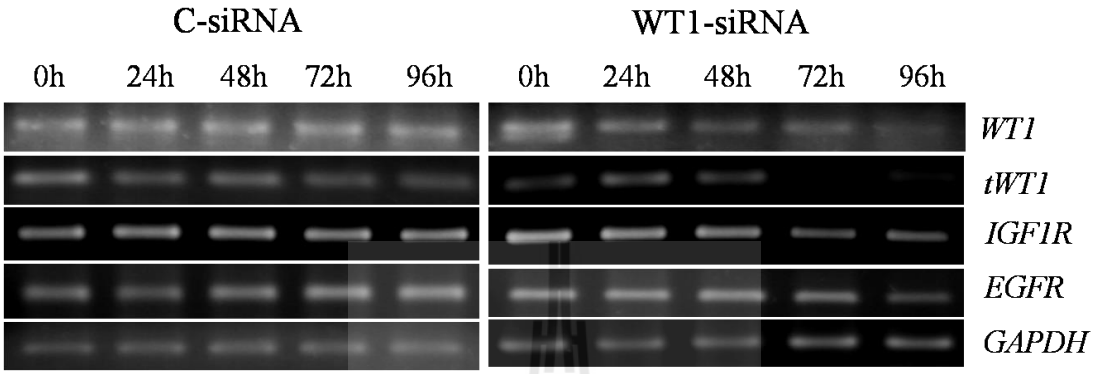
ภาพที่ 7 Apoptosis induction by WT1-siRNA on MCF-7 breast cancer cells. MCF-7-WT1-siRNA-GFP+ cells and MCF-7-C-siRNA-GFP+ cells were collected for Anexin-V/PI staining. Cells were analyzed by flow cytometry.

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR

ผลการทดลอง: การลดการแสดงออกของยีน *WT1* และยีนเป้าหมายของ WT1 หลังจากทดสอบด้วย WT1siRNA

จากที่ได้ทราบมาแล้วว่า siRNA มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่จำเพาะเพราะฉะนั้นในการใช้ WT1-siRNA จึงต้องพิสูจน์ว่ายีน *WT1* ถูกลดการแสดงออกลงด้วยจริงและเป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วย ในการทดลอง ใช้ WT1-siRNA เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม และศึกษาผลของ WT1-siRNA นั้น ๆ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ต่อไปเรื่อย ๆ พบว่า การแสดงออกของ *WT1* ในเซลล์ MCF-7-WT1-siRNA-GFP$^+$ ถูกลดการแสดงออกลง เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมงของการทดสอบ (ภาพที่ 8) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ WT1-siRNA นั้นมีผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุม MCF-7-C-siRNA-GFP$^+$ นั้นยังคงมีการแสดงออกของยีน *WT1* อยู่ในระดับเท่า ๆ กัน แม้ว่าเวลาจะเพิ่มขึ้นก็ตาม จากผลที่ปรากฏขึ้นนี้ สอดคล้องกับผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ MCF-7 และพร้อมกันนั้นก็เกิดการกระตุ้นให้

เซลล์ตายแบบ apoptosis ด้วย เพราะฉะนั้นบทบาทหน้าที่ของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งก็คือการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ และยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากการศึกษาการทำงานของ WT1 target genes ที่สำคัญ คือ IGF-1R and EGFR พบว่าการลดการแสดงออกของยีน WT1 ส่งผลต่อยีนเป้าหมายของ WT1 อีกด้วย ได้แก่ growth factor gene: *IGF-1R* ซึ่งถูกลดการแสดงออกที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง และยีน *EGFR* ซึ่งถูกลดการแสดงออกลงเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 Gene expression of MCF-7-WT1-siRNA-GFP^{+} compared with MCF-7-C-siRNA-GFP^{+}.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ข้อวิจารณ์

3.1 การรายงานผลการวิจัย และการวิเคราะห์ผล

งานวิจัยได้ผลการทดลองดังนี้

1. สามารถสร้าง lentiviral vector DNA ที่มีคุณสมบัติการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้ โดยใช้ vector ชนิด Lentiviral vector (pPRIME-CMV-GFP) โดยการตัดต่อส่วนของ DNA ที่สามารถสร้างเป็น shRNA ในเซลล์เป้าหมายได้
2. ได้วิธีการที่ใช้ในการสร้าง lentiviral vector ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถกระตุ้นให้ packaging cells มีการสร้าง lentiviral vector ได้ในสัดส่วนที่สูงประมาณ 54.83%
3. ได้ทำการผลิต lentiviral vector ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ได้อย่างเพียงพอ
4. สามารถนำ lentiviral vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เป้าหมายคือ เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถทำให้เกิดการ transduction ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้ถึง 71.65%
5. พบว่าวิธีการที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 โดยใช้ lentiviral vector เพื่อการกระตุ้นการสร้าง shRNA ในเซลล์มะเร็งเต้านม เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* โดยแสดงให้เห็นจากผลการทำ RT-PCR
6. สามารถแสดงผลของการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยพบว่าการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ดังกล่าว นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติของการเป็นมะเร็งที่สำคัญ ได้แก่ การทำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ทั้งแบบ late and early apoptosis โดยการเกิด early apoptosis เพิ่มขึ้นจาก 5.22% เป็น 11.03% ส่วนการเกิด late apoptosis เพิ่มขึ้นจาก 7.57% เป็น 46.34% ในเวลา 96 ชม. รวมถึงการลดลงของอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่ตรวจโดยใช้ MTT assay
7. สามารถแสดงให้เห็นกลไกของการต้านคุณสมบัติของความเป็นมะเร็งหลังการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้ว่า น่าจะเป็นผลมาจากการที่มีการยับยั้งการทำงานของยีน *EGFR* and *IGF-1R* โดยผลการลดลงของการทำงานของยีนจะเห็นชัดในเวลา 96 ชม. หลังการ transduction

3.2 อภิปรายผลการวิจัย

WT1-siRNA ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโต และลดอัตราการ proliferation ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ด้วยการเพิ่ม Caspase-3/7 apoptotic enzyme activities ส่งผลให้ MCF-7 cells ตายแบบ apoptosis ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการย้อมสี Anexin/PI ที่ให้ผลการเพิ่มปริมาณเซลล์ตายทั้งแบบ early และ late apoptosis ในกลุ่มเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย WT1-siRNA ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นผลจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* อันเนื่องจาก WT1-siRNA นั่นเอง ยิ่งไปกว่านั้น ยีนที่ทำ

หน้าที่เป็น Growth factor ได้แก่ *IGF-1R* และ *EGFR* ก็ได้รับผลกระทบจากการลดการแสดงออกของยีน *WT1* ซึ่งสังเกตได้จากมีการลดการแสดงออกลงของยีน *IGF1R* และ *EGFR* ในกลุ่มของ WT1-siRNA transduced cells ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 โดย siRNA นั้น น่าจะผ่านการยับยั้งการทำงานของ WT1-target genes ที่สำคัญ คือ *IGF1R* และ *EGFR*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทำวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้สามารถสรุปผลการทดลองดังนี้

1. การใช้เทคนิคยีนบำบัดโดยการใช้ lentiviral vector เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยพบว่าเซลล์มะเร็ง 73.04% มีการ transduction โดยไวรัส ได้สำเร็จ
2. กระบวนการใช้ lentiviral vector ดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
3. การลดลงของการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง และมีการตายแบบ apoptosis มากขึ้น
4. การลดลงของ WT1 มีผลทำให้การแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย WT1 ได้แก่ *IGF-1R* and *EGFR* มีปริมาณลดลง
5. จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า WT1 ทำหน้าที่ส่งเสริมคุณสมบัติความเป็นมะเร็งเต้านม และการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 นี้ มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเพื่อการรักษามะเร็งชนิดนี้ในอนาคตต่อไป

การรักษามะเร็งโดยเทคนิคยีนบำบัดได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และมีผลข้างเคียงของการรักษาน้อยกว่าการรักษาแบบเดิมที่ใช้ยาเคมีบำบัด ที่มีราคาแพงและมีภาวะแทรกซ้อนสูง งานวิจัยนี้เป็นความพยายามในการพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งเต้านมในรูปแบบยีนบำบัด โดยใช้ lentiviral vector ในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งมีหลักฐานจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่า อาจทำหน้าที่เป็นยีนส่งเสริมการเป็นมะเร็ง (oncogene) ชนิดดังกล่าวนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิคยีนบำบัดโดยใช้ lentivitral vector เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีนใดยีนหนึ่งที่ต้องการ และเป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็ง ดังเช่น ยีน WT1 ในมะเร็งเต้านมเป็นต้น และสนับสนุนความเป็นไปได้ในการนำวิธีการยีนบำบัดที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง และในผู้ป่วยมะเร็งในอนาคต เพื่อยืนยันให้เห็นประสิทธิภาพ และความปลอดภัยในการให้วิธีการดังกล่าวนี้ ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งน่าจะเป็นการรักษาทางเลือกที่สำคัญในผู้ป่วยบางราย โดยเฉพาะผู้ที่เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรักษาในแบบเดิม หรืออาจประยุกต์ใช้ในแบบ complementary treatment โดยใช้ร่วมกับ การรักษาแบบเดิมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดีขึ้น นอกจากมะเร็งเต้านมแล้ว เทคนิคยีนบำบัดยังสามารถประยุกต์ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ โดยอาศัยหลักการดังกล่าว หรือรวมถึงการรักษาโรคทางพันธุกรรมที่สำคัญอื่นๆ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา ลดภาวะแทรกซ้อน และลดค่าใช้จ่ายของการรักษาลง อันจะเป็นผลดีต่อระบบการรักษาของประเทศโดยรวมในที่

บรรณานุกรม

1. Amin KM, Litzky LA, Smythe WR, Mooney AM, Morris JM, Mews DJY, Pass HI, Kari C, Rodeck U, Rauscher FJ, Kaiser IR, Albelda SM. (1995) Wilms' tumor (WT1) susceptibility gene product are selectively expressed in malignant mesothelioma. Am J Pathol 146:344-356.
2. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M and Bartek J. (1994) Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. Int J Cancer 57:353–361.
3. Bartkova J, Lukas J, Strauss M and Bartek J. (1995) Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis. Oncogene 10:775–778.
4. Berns EM, de Klein A, van Putten WL et al. (1995) Association between RB-1 gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. Int J Cancer 64:140–145.
5. Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H and Foekens JA. (1992) c-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. Cancer Res 52:1107–1113.
6. Bieche I et al. (2000) Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. Clin Cancer Res 6:452–459.
7. Bruening W, Gros P, Sato T, Stanimir J, Nakamura Y, Housman D, Pelletier J. (1993) Analysis of the 11p13 Wilms tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. Cancer Invest 11(4):393-399.
8. Bruening W, Pelletier J. (1996) A non-AUG translation initiation events generates novel WT1 isoforms. J Biol Chem 271:8646-8654.
9. Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA et al. (1993) Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. Oncogene 8:2127–2133.
10. Burwell EA, McCarty GP, Simpson LA, Thompson KA, Loeb DM.(2007) Isoform of WT1 have distinct effect onnmammary epithelial cells. Oncogene 26:3423-3430.
11. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, Jones C, Housman DE. (1990) Isolation and characterization of zinc finger polypeptide gene at the chromosome11 Wilms' tumor locus. Cell 60:509-520.
12. Carter RF: BRCA1, BRCA2 and breast cancer: a concise clinical review. (2001) Clin Invest Med 24(3):147-157. Review
13. Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS and Garrett CT. (2000) Detection of novel truncated WT1 transcription in human neoplasia. Mol Diag 5:1-12.

14. Deng G, Chen LC, Schott DR et al. (1994) Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. Cancer Res 54:499–505.

15. Department of Health. Reports on health and social subjects No. 48. (1998) Nutritional aspects of the development of cancer. The Stationery Office: Norwich

16. Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJIII, Kim SJ. (1994) Repression of the transformimg growth factor -β1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. Mol Endocrinol 8:595-602.

17. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3d. (1992) Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. Science 257:674-678.

18. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber DA. (1995) WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. EMBO J 14:4662-4675.

19. Geradts J and Wilson PA. (1996) High frequency of aberrant p16(INK4A) expression in human breast cancer. Am J Pathol 149:15–20.

20. Gessler M., Konig A., Arden K., Grundy P., Orkin S., Sallan S., Peters C., Ruyle S., Mandell J., Li F., Cavenee W. and Brun G. (1994) Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' tumors. Hum Mutat 3:212–222.

21. Hawkins RA, Killen E, Whittle IR Jack WJ, Chetty U and Prescott RJ. (1991) Epidermal growth factor receptors in intracranial and breast tumours: their clinical significance. Br J Cancer 63:553–560.

22. Heimann R, Lan F, McBride R and Hellman S. (2000) Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. Cancer Res 60:298–304.

23. Herman JG, Merlo A, Mao L et al. (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 55:4525–4530.

24. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJIII, Saunders GF. (1995) Regulation of the proto-oncogene bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. Cancer Res 55:5386-5389 .

25. Hosono S., Gross I., English M.A., Hajra K.M., Fearon E.R. and Licht, J.D. (2000) E-cadherin is a WT1 target gene. J Biol Chem 275:10943-10953.

26. Idelman G, Glaser T, Roberts CT Jr, Werner H. (2003) WT1–p53 interactions in insulin-liked growth factor-I receptor gene regulation. J Biol Chem 278(5):3474-3482. Epub 2002 Nov 19

27. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H et al. (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.

28. International Agency for Research on Cancer. (1999) Hormonal contraceptives, progesterone only. In: IACR Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human Vol. 72 Hormonal Contreception and Hormonal Therapy. IARC Press: Lyon, pp. 339-397

29. International Agency for Research on Cancer. (1999) Hormonal contraceptives, progesterone only. In: IACR Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human Vol. 72 Hormonal Contreception and Hormonal Therapy. IARC Press: Lyon, pp. 399-530

30. Joensuu H, Pylkkanen L and Toikkanen S : Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. Am J Pathol. 1994;145:1191-1198.

31. Johnston SR, MacLennan KA, Sacks NP, Salter J, Smith IE and Dowsett M. (1994) Modulation of Bcl-2 and Ki-67 expression in oestrogen receptor-positive human breast cancer by tamoxifen. Eur J Cancer 11:1663-1669.

32. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, Shi Y. (1996) A novel repressor, par-4, modulate transcription and growth suppressor function of the Wilms' tumor suppressor WT1. Mol Cell Biol 19:6945-6956.

33. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. (1993) Reproductive factors and breast cancer. Epidemiol Rev 15(1):36-47. Review

34. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Krajewska M, Reed JC. (1997) Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. Clin Cancer Res 3199–3208.

35. Lee S.B., Huang K., Palmer R., Truong V.B., Herzlinger D., Kolquist K.A., Wong J., Paulding C., Yoon S.K., Gerald W., Oliner J.D. and Haber D.A.. (1999) The Wilms' tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. Cell 98:663–673.

36. Lewis S, Locker A, Todd JH et al. (1990) Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. J Clin Pathol 43:385–389.

37. Little, M.H., Prosser, J., Condie, A., Smith, P.J., van Heyningen, V. and Hastie, N.D. (1992) Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms' tumor patients. Proc Natl Acad Sci USA 89:4791–4795.

38. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjan B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S. (2001) Wilms' tumor soppresso gene (WT1) is expressed in primary breast tumor despite tumor specific promoter methylation. Cancer Research 61:921-925.

39. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ III. (1991) Transcriptional repression mediated by the WT Wilms' tumor gene product. Science 253:1550-1552.

40. Madden SL, Cook DM, Rauscher FJ III. (1993) A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor supressor protein. Oncogene 8:1713-1720.

41. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, Hill DF, Haber DA. (1993) Physical and functional interation between WT1 and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 90:5100-5104.

42. Mendelsohn J, Howlay PM, Israel MA, Liotta LA. (2001) The Molecular Basis of Cancer. W.B. Saunder

43. Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H, Noguchi S. (2002) High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. Clin Cancer Res 8(5):1167-1171.

44. Morris JF, Madden SL, Tournay OE, Cook DM, Sukhatme VP, Rauscher FJ. (1991) Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus Oncogene 6:2339-2348.

45. Norberg T, Lennerstrand J, Mnganas M and Bergh J. (1998) Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. Int J Cancer 79:376–383.

46. Oh, S., Song, Y., Yim, J. and Kim, T.K. (1999) The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. J Biol Chem 274:37473-37478.

47. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer Oct;37 Suppl 8:S4-66. Review

48. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (eds). (2002) Cancer Incidence in five Continents, Vol. VII. IACR Scientific Publications, 143, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

49. Rimm DL, Sinard JH and Morrow JS. (1995) Reduced alpha-catenin and E-cadherin expression in breast cancer. Lab Invest 72:506–512.

50. Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humpray CW, Gyorfi T, Maurer J, Thiel E, Messen HD. (1994) Expression of WT1 Wilms' tumor suppresor gene by normal and malignant melanocytes. Int J Cancer 59:78-82.

51. Sells SF, Han SS, Muthukkumar S, Maddiwar N, Johnstone R, Boghaert E, Gillis D, Liu G, Nair P, Monnig S, Collini P, Mattson MP, Sukhatme VP, Zimmer SG, Wood DP Jr, McRoberts JW,

Shi Y, Rangnekar VM. (1997) Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. Mol Cell Biol 17(7):3823-3832.

52. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher GJ, Sukumar S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene. Genes Dev 8:720-731.
53. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Robert CT Jr, Daniel CW: Altered expression of WT1 Wilms' tumor supressor gene in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:8132-8137.
54. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, Kanchanabat C, Khuhaprem. (2003) Cancer in Thailand, Vol III. Ministry of Public Health and Ministry of University Affair.
55. Tuna M, Chavez-Reyes and Tari AM. (2005) HER2/*neu* increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cell. Oncogene 24(9):1648-1652.
56. Varley JM, Armour J, Swallow JE et al. (1989) The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumours. Oncogene 4:725–729.
57. Wang L, Wang ZY. (2008) The Wilms tumor suppressor gene (WT1) inhibit malignant progression of neolastigenic mammary epithelial cells. Anticancer Res 28:2155-2160.
58. Wang Z, Qiu Q, Haung J, Gurrieri M, Deuel TF. (1995) Products of alternative splice transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, have alter DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. Oncogene 10:415-422.
59. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher JFIII. (1992) The Wilms' tumor suppressor gene product, WT1, repress transcription of the platelet-derived growth factor A chain gene. J Biol Chem 267:21999-22002.
60. Watson PH, Safneck JR, Le K, Dubik D and Shiu RP. (1993) Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. J Natl Cancer Inst 85902–907.
61. Werner H, Rauscher FJ 3rd, Sukhatme VP, Drummond IA, Roberts CT Jr, 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. J Biol Chem 269:12577-12582.
62. Werner H, Roberts CT Jr, LeRoith D. (1993) The regulation of IGF-I receptor gene expression by positive and negative zinc-finger transcription factors. Adv Exp Med Biol 343:91-103.

63. Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Doherty JP and Warren WD. (1999) DNA methylation in the promoter region of the p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) gene in human breast tumours. Br J Cancer 79:251–256.

64. World Cancer Research Fund. American Institute for Cancer Research. (1997) Food, Nutrition and Prevention of Cancer: a Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington DC.

65. Zang XP, Pento JT, Tari AM. (2008) Wilms' tumor 1 protein and focal adhesion kinase mediate keratinocyte growth factor signaling in breast cancer cells. Anticancer Res. 28:13-137.

66. Zhang GJ, Kimijima I, Abe R et al. (1997) Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. Clin Cancer Res 3:2329-2335.

67. Zhang TF, Yu SQ, Guan LS, Wang ZY. (2003) Inhibition of breast cancer cell growth by WT1 is associated with destabilizationof beta-catenin. Anticancer Res 23(5A):3575-3584.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2509 สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี 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. 2543) ปัจจุบัน ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม ทำงานในตำแหน่งหัวหน้าสาขาวิชาพยาธิวิทยา และเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุมได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล King Scholarship award, Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research (พ.ศ. 2551) และ รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล ปัจจุบันอาจารย์ ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 15 ผลงาน และผลงานจดสิทธิบัตร เรื่อง“A nucleic acid marker of cancer” Serial No.09/434,620, filed Nov.5, 1999 Joy L Ware, Chavaboon Dechsukhum, Carleton T Garrett (Detection of novel WT1 transcript in human malignancy, including prostate, breast cancer and acute leukemia) สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 E-mail : chavaboon@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2513 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการแพทย์(พ.ศ. 2535) และ ปริญญาโท วท.ม. ชีวเคมีทางการแพทย์ (พ.ศ. 2539) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับ ปริญญาเอก สาขา Microbiology and Immunology โดยเน้นทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์ และ เซลล์ต้นกำเนิด ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศ สหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2544 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน stem cell transplantation and stem cell regulation ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ National Institute of Health ประเทศ สหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2545-2546) ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ทำงานในตำแหน่งอาจารย์ประจำ สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย อาจารย์วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ 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 มูลนิธิอานันท มหิดล พ.ศ. 2551-2554 และ รางวัลศิษย์เก่าดีเด่นด้านวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่นในปี พ.ศ. 2554 ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 18 ผลงาน สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 E-mail : wilairat@g.sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี