รหัสโครงการ SUT6-606-54-24-06

# รายงานการวิจัย

# การศึกษาบทบาทและกลไกการทำงานของยีน WT1 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma

# (The study for the role of WT1 in hepatocellular carcinoma)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT6-606-54-24-06

# รายงานการวิจัย

# การศึกษาบทบาทและกลไกการทำงานของยีน WT1 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma

# (The study for the role of WT1 in hepatocellular carcinoma)

**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

มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma เป็นมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ เนื่องจากมีอุบัติการณ์ และมีอัตราการตายสูง โดยข้อมูลจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติปี 2555 พบว่ามะเร็งตับพบบ่อยเป็นอันดับ 3 ในชายและอันดับ 4 ในสตรี การรักษาในปัจจุบันมีประสิทธิภาพไม่ดีนัก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ตามในเวลา 2 ปี หลังการวินิจฉัย การพัฒนาการรักษาแนวใหม่ที่ลดข้อจำกัดของการรักษาแบบเดิมจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง การวิจัยนี้มีเป้าหมายในการพัฒนาเทคนิคยีนบำบัดที่ใช้ lentiviral vector เป็นตัวนำพาเข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ เพื่อทำให้เกิดการลดการแสดงออกของยีน WT1 ซึ่งน่าจะทำหน้าที่ส่งเสริมการเป็นมะเร็งตับ ผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาเทคนิคได้สำเร็จ โดยสามารถทำให้เซลล์มะเร็งได้รับ vector ถึง 64.26% และพบว่ามีการลดลงของระดับการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์ดังกล่าว ซึ่งนำไปสู่การลดการเจริญเติบโตของเซลล์ และการตายของเซลล์แบบ apoptosis ร่วมกับการลดระดับการแสดงออกของยีน IGF-1R อันเป็นโปรตีนสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ งานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานสำคัญในการนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการรักษาโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ในผู้ป่วยต่อไป

## Abstract

**Hepatocellular carcinoma is the major health problem in Thailand due to its high incidence and mortality rate. According to Thailand cancer registry in 2012 it is the third common cancer in Thai males and the fifth common cancer in females. The current treatment outcome is not satisfactory as the majority of the patients died in 2 years after diagnosis. The development of new treatment modality to overcome those limitations of conventional cancer treatment has received more interest. The aim of this project is to develop the gene therapy technology utilizing lentiviral vector to induce WT1 gene downregulation in hepatocellular carcinoma cells in culture model. The data showed that the majority of cancer cells were transduced successfully with the lentiviral vector (64.26%) with resulting downregulation of *WT1* gene. Moreover, we also demonstrate that the growth of the cells was inhibited and tumor cells died by apoptosis. Additionally downregulation of major growth factor receptor gene, *IGF-1R* was also demonstrated. In conclusion, the study is the foundation of the further research work to apply this gene therapy technology for the treatment of hepatocellular carcinoma in the future.**

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ ..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย ..... | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... | ข |
| สารบัญเรื่อง ..... | ค |
| สารบัญตาราง ..... | ง |
| สารบัญภาพ ..... | จ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ..... | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... | 4 |
| ขอบเขตของการวิจัย ..... | 4 |
| วิธีการดำเนินวิจัยโดยย่อ ..... | 5 |
| ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย ..... | 5 |
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย | |
| ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย ..... | 6 |
| ผลการวิจัย ..... | 9 |
| บทที่ 3 ข้อวิจารณ์ | |
| การรายงานผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล ..... | 16 |
| อภิปรายผลการวิจัย..... | 16 |
| บทที่ 4 บทสรุป | |
| สรุปผลการวิจัย ..... | 19 |
| ข้อเสนอแนะ ..... | 19 |
| บรรณานุกรม ..... | 21 |
| ประวัติผู้วิจัย ..... | 25 |


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญตาราง

**หน้า**

**ตารางที่ 1** แสดง primer sequences for gene expression analysis by RT-PCT…… 9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญภาพ

**หน้า**

**ภาพที่ 1** การตรวจการแสดงออกของยีน GFP in 293T packaging cells
โดย fluorescent microscope and flow cytometry……10
**ภาพที่ 2** การตรวจการแสดงออกของยีน GFP ในเซลล์มะเร็ง HepG2
หลังการ transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA……11
**ภาพที่ 3** ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 หลังการ transduction
โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA……..……..11
**ภาพที่ 4** ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 หลังการ transduction
โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธี trypan blue exclusion
assay……12
**ภาพที่ 5** ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 หลังการ
transduction โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA
โดยการตรวจวิธี MTT assay……13
**ภาพที่ 6** ผลการตายของเซลล์ HepG2 หลังการ transduction
โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธี trypan blue exclusion
assay……14
**ภาพที่ 7** ผลการเกิด apoptosis ใน HepG2 หลังการ transduction
โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธีการตรวจ caspase-3/7
activities……14
**ภาพที่ 8** ผลการตรวจการแสดงออกของยีนใน HepG2 หลังการ transduction
โดย lentiviral vector ที่สร้าง WT1 siRNA โดยการตรวจวิธี RT-PCR……..15

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งตับ ถือเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับประเทศและระดับโลก เนื่องจากเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในเพศชาย และพบว่าเป็นสาเหตุการตายสูงสุด ในเพศชายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นโรคที่มีความรุนแรงและยังไม่มีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ โดยผู้ป่วยส่วนจะตายภายใน 3-6 เดือน หลังการรักษา ดังนั้นจึงมีความพยายามในการค้นคว้าเพื่อหาวิธีการรักษาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเฉพาะการรักษาเพื่อให้มีการทำลายเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะที่เรียกว่า gene targeted thrapy อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีการรักษาในลักษณะดังกล่าวที่ประสบความสำเร็จการรักษาผู้ป่วย

อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับมีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศ โดยประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของโรคเท่ากับ 88/100,000 และ 35.4/100,000 ในเพศชายและหญิง (Parkin et al., 2000) ตามลำดับ ซึ่งเชื่อว่ามีสาเหตุจากการติดเชื้อ Hepatitis virus ชนิด B ซึ่งนับเป็นสาเหตุสำคัญในผู้ป่วยในประเทศกำลังพัฒนา ปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ในมะเร็งตับ ได้แก่ การได้รับ aflatoxin จากอาหาร, Hepatitis C infection การเป็นโรค ตับแข็ง (cirrhosis from alcoholic liver disease), hemochromatosis เป็นต้น

เนื่องจากความรู้กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง ในระดับยีนถือเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำไปใช้ในการป้องกัน และดูแลรักษาโรคมะเร็ง งานวิจัยมากมายพยายามแสดงให้เห็นกลไกดังกล่าวจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ในแต่ละระยะของกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งตับ 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 (gene amplification) การแสดงออกที่สูงขึ้น (overexpression) การกลายพันธุ์ของยีน (mutation) โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งตับ ได้แก่ การขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของโครโมโซมในตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ การหายไปของ 1p, 4q, 8p, 19q, 17q และการเพิ่มในตำแหน่ง 1q, 8q, 20q (Boige et al., 1997; Kusano et al., 1999; Marchio et al., 1997; Nagai et al., 1997; Piao et al., 2000) ภาวะ hyprmethylation ของ promoter DNA ของยีน p16/INK4A (Pang et al., 2003; Liew et al., 1999), DLC1 (Wong et al., 2003), GSTP1 (Su et al., 2007) รวมถึงการกลายพันธุ์ของ tumor supressor gene และ oncogenes โดยเฉพาะ p53 and beta catenin (Nishida et al., 2007) เปลี่ยนแปลงทั้งหมดเหล่านี้จะทำให้เกิดความ

ผิดปรกติในการทำงานของเซลล์คือ ความผิดปรกติในกระบวนการ apoptosis และการควบคุมวงจรการแบ่งตัว (cell cycle) รวมถึงการเกิดภาวะ genomic instability ในที่สุดจะนำไปสู่การเกิดลักษณะทางคลินิกของโรคที่สำคัญและเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยคือ การแพร่กระจายของมะเร็ง (metastatic phenotype) และการดื้อต่อการรักษาด้วย เคมีบำบัด และรังสีรักษา ด้วยสาเหตุดังกล่าวทำให้เกิดความพยายามในการควบคุมรักษาโรคโดยการแก้ไขความผิดปรกติในระดับยีนหรือ ที่เรียกว่า gene therapy ปัจจัยสำคัญในความสำเร็จของการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวได้แก่ การค้นหายีนเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็งมากที่สุด เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาที่ดี รวมทั้งต้องมีผลต่อเซลล์ปรกติในร่างกายน้อยที่สุด ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถค้นพบวิธีการรักษาที่มีลักษณะสมบูรณ์แบบดังกล่าวไว้

ยีน *WT1* (Wilms tumor suppressor gene ) เป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็งในมนุษย์ โดยมีหลักฐานจากงานวิจัยบ่งชี้ว่า ยีนดังกล่าวทำหน้าที่เป็น oncogene (ยีนก่อมะเร็ง) ในมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะ Acute Leukenia (Inoue et al., 1994), Wilms tumor (Call et al., 1990; Gessleret al., 1994; Little, et al., 1992) ovarian cancer (Bruening et al., 1993) , melanoma (Rodeck et al., 1997), 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 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-*$\Pi$(Drummond et al., 1992), *PDGF-A* (Wang et al., 1992), *TGF-*$\beta$(Dey et al., 1994), Amphiregulin (Leeet al., 1999) เป็นต้น ยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการเกิด Apoptosis ได้แก่ *bcl2 (48), c-myc (*Hewitt *et al., 1995)* เป็นต้น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง ได้แก่ E-*cadherin* (Hosonoet al., 2000) เป็นต้น และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ senesence (การแก่ของเซลล์)ได้แก่ H*TERT* (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 การศึกษา

พบว่า 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 แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาต่อเพื่อยืนยัน 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 และลดคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโต (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) จำเป็นถึงคำนึงถึงภาวะความผิดปกติของโปรตีนอื่นๆ เหล่านี้ด้วย

งานวิจัยที่ศึกษาบทบาทของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma มีอยู่ไม่มากนัก การศึกษาการแสดงออกของยีน WT1 ในเซล์มะเร็งชนิด hepatocellular carcinoma จำนวน 50 รายพบว่า ระดับการแสดงออกของยีนมีความสัมพันธุ์กับอัตราการอยู่รอดโดยไม่มีโรคใน 5 ปี (5 year-disease free survival) อย่างมีนัยสำคัญ (Sera et al., 2008) โดยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ WT1 สูง จะมีอัตราการอยู่รอด 22% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีการแสดงออกในระดับต่ำ ซึ่งมีการอยู่รอดถึง 79% นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถตรวจพบการทำงานของ WT1 ในเซลล์ปกติที่อยู่ใกล้กับ

มะเร็ง ประมาณ 53% ของผู้ป่วย แต่น่าสนใจว่าระดับการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์ปกตินี้มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค และความรุนแรงของการเกิดเนื้อเยื่อ fibrosis

ดังนั้นจะเห็นว่าบทบาทของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma บ่งชี้ว่า WT1 น่าจะทำหน้าที่เป็นยีนส่งเสริมการเป็นมะเร็ง (oncogene) ในมะเร็งชนิดนี้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องยืนยันผลโดย functional study และกลไกในการควบคุมกระบวนการเกิดมะเร็งชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ด้วยเหตุที่ WT1 ทำหน้าที่ยีนเป้าหมายหลายตัวในกลุ่ม growth factor and growth factor receptors โดยเฉพาะ IGF-1R, EGFR, IGF-II ที่มีความสำคัญมากในการเกิดมะเร็งตับ ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาบทบาทของ WT1 ในกระบวนการเกิดมะเร็งชนิดนี้ วิธีการศึกษาจะใช้การทดลองใน hepatocellular carcinoma cell line โดยใช้เทคนิคกระตุ้นการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 โดยใช้ Lentiviral vector แล้วสังเกตผลจากการยับยั้งทำงานของยีน *WT1* ดังกล่าว ซึ่งรวมถึงคุณสมบัติความเป็นมะเร็งของเซลล์คือ อัตราการเจริญเติบโต (proliferative rate) อัตราการตายแบบ Apoptosis และการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนเป้าหมายของ WT1 ได้แก่ ยีน EGFR, *IGF-IR* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งตับ การศึกษานี้จะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ ที่แสดงให้เห็นบทบาทและ กลไกในระดับยีน ของ WT1ในกระบวนการเกิดมะเร็งตับ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นการรักษาโดยวิธี gene therapy ในอนาคต ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งดีขึ้น

**1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

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

**1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย**

งานวิจัยนี้จะศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาบทบาทของยีน WT1 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma โดยใช้ lentiviral vector เป็นพาหะในการทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma แล้วจึงวัดระดับการทำงานของยีน WT1 ซึ่งจะแสดงให้เห็นความสำเร็จในการยับยั้งการทำงานของยีน จากนั้นจะดูผลต่อคุณสมบัติการเป็นมะเร็งของเซลล์ ซึ่งได้แก่ อัตราการเกิด apoptosis, proliferation rate นอกจากนี้จะศึกษากลไกการทำงานของยีนนี้ โดยวัดระดับการแสดงออกของ ยีน EGFR, IGF-1R ในระดับ RNA

**1.4 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ**

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma โดยใช้ viral vector ชนิด lentiviral vector ในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งดังกล่าว โดยการใช้ lentiviral vector ดังกล่าวสร้าง siRNA (small interfering RNA) ขึ้นในเซลล์เป้าหมาย ซึ่ง siRNA ดังกล่าวจะสามารถจับกับส่วนของ mRNA ของ WT1 ได้อย่างจำเพาะและเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของ WT1 mRNA หลังการนำ lentiviral vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แล้ว จะทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน WT1 เพื่อยืนยันว่าสามารถยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้จริง รวมถึงการวัดคุณลักษณะความเป็นมะเร็งของเซลล์ดังกล่าว ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และอัตราการตายแบบ 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 ในเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ที่มีประสิทธิภาพสูง
2. ได้กระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma โดยใช้ lentiviral vector
3. ได้เทคนิคยีนบำบัดโดยใช้ lentiviral vector ที่สามารถนำไปพัฒนาวิจัยต่อยอดเพื่อการรักษามะเร็งชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะมะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน WT1 ในปริมาณสูง เช่นมะเร็งเม็ดเลือดขาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

<u>หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์</u>

ผู้ป่วยและ ครอบครัว มหาวิทยาลัย โรงพยาบาล วงการแพทย์ นักวิชาการ ผู้ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็ง

# บทที่ 2
# เนื้อเรื่อง

## 2.1 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Invitrogen, CA, USA) ที่เติม Fetal bovine serum ปริมาณ 10% (Gibco), penicillin (100U/ml) และ streptomycin (100 µg /ml) และทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 5% $CO_2$ จากนั้นเลี้ยงเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตไวรัส (packaging cells) ชนิด 293FT ใน complete DMEM ที่ไม่เติม antibiotics

### 2. การสร้าง Lentivirus vector และการ Transduction เพื่อยับยั้งทำงานของยีน WT1

2.1 จะใช้ Lentivirus vector ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง shRNA ที่จับและเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma 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 ที่ได้จากการทำ 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
- ทำการตกตะกอน plasmid ที่สกัดได้ด้วย $CaCl_2$ และทำ plasmids transfection (pLP1, pLP2, pLPv, และ P201 หรือ 1528 WT1-siRNA) เข้าสู่ 293FT cell lines จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% $CO_2$ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยไม่เติมยาปฏิชีวนะ เพื่อให้เซลล์ผลิตไวรัสออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% $CO_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคไวรัสอยู่ แล้วกรองสิ่งปนเปื้อนด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคไวรัสด้วยวิธี ultracentrifugation ที่ความเร็ว 28,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.06 ชั่วโมง ละลายตะกอนไวรัสด้วย DMEM without antibiotic ปริมาณ 1 ml. จะได้ความเข้มข้นของไวรัสเพิ่มขึ้นเป็น

ประมาณ 20 เท่า จากนั้นทำการเติม 32 μg/ml polybrene ลงใน viral supernatant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ transduction และนำอนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี spin transduction ที่ 1800 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 12-18 ชั่วโมง จากนั้นก็บ่มเซลล์ไว้ในตู้บ่มเซลล์ จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมยาปฏิชีวนะด้วยเพื่อป้องกันการ contamination บ่มในภาชนะเลี้ยงเซลล์และบ่มเซลล์ต่อไปอีก 1-2 วัน นำเอาเซลล์ HepG2 ที่ผ่านการทำ transduction ซึ่งในที่นี้จะให้รหัสของเซลล์เป็น HepG2-WT1-siRNA และ HepG2-C-siRNA cells มาทำการทดลองต่อไป โดย HepG2-WT1-siRNA cells หมายถึงเซลล์มะเร็งตับที่ถูก transduction โดย lentiviral vector ที่สามารถสร้าง siRNA ที่มีฤทธ์ยับยั้ง WT1 mRNA ขึ้นในเซลล์ ส่วน HepG2-C-siRNA cells หมายถึงเซลล์มะเร็งตับที่ถูก transduction โดย control lentiviral vector ซึ่งสร้าง siRNA ที่ไม่จำเพาะกับยีนใดๆของเซลล์มนุษย์

**3. การศึกษาคุณลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferative rate)**

HepG2-WT1-siRNA จะถูกนำมาเลี้ยงต่อตามระยะเวลาที่กำหนดในการทดลอง ได้แก่ 0, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวมาทดสอบหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยวิธี Trypan blue exclusion method จากนั้นทำการตรวจสอบการเจริญของเซลล์ด้วยการใช้ชุดทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ CellTiter 96 Aqueous One solution reagent (Promega, WI, USA) โดยใช้เซลล์จำนวน 10000 cells ใน 100 μl cDMEM จากนั้นเติมสาร MTT reagent ปริมาณ 20 μl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 10% SDS ลงไป 25 μl เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำเอาเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490/620 nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและวิเคราะห์เป็นอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

**4. การวัดอัตราการเกิด Apoptosis**

หลังจากที่เซลล์ถูกคัดเลือกมาแล้ว ณ เวลาต่าง ๆ ที่กำหนด เซลล์จะถูกเก็บเกี่ยวและแบ่งเซลล์จำนวน 10000 cells เพื่อตรวจวัดการตาย แบบ apoptosis ของเซลล์ ด้วยการใช้หลักการตรวจหากิจกรรมของเอ็นไซม์คาสเปส 3 และ 7 โดยการใช้ชุดทดสอบ ApoOne homogenous caspase-3/7 reagent (Promega) วิธีการแบบย่อ ๆ เป็นดังนี้ เตรียม cell suspension ปริมาณ 100 μl ที่มีเซลล์ 10000 cells ใน 96 well plate จากนั้นเติมสาร ApoOne homogeneous caspase-3/7 reagent ปริมาณ 100 μl และทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง fluorescent microplate reader ที่ความยาวคลื่น $499_{Ex}/521_{Em}$ nm และบันทึกค่าดังกล่าวไว้เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอ็นไซม์คาสเปสต่อไป

**5. การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับ RNA**

เซลล์ HepG2-WT1-siRNA และ HepG2-C-siRNA ถูกเก็บเกี่ยวตามระยะเวลาที่ระบุในการทดลอง และนำมาปั่นล้างตกตะกอนเซลล์ จากนั้นสกัด total RNA จากตะกอนเซลล์ที่เตรียมได้ด้วยชุดสกัด RNA ชนิด Total RNA mini kit (geneaid) จากนั้นตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop จากนั้นทำการสังเคราะห์สาย cDNA ขึ้นมาด้วยกระบวนการ reverses transcription โดยใช้ ReverseAid First strand cDNA Synthesis kit ตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือการใช้งาน (Invitrogen, CA, USA) 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 (Table 1), 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

**Table 1 Primer sequences of RT-PCR analyses**

| gene | Primer sequences | Annealing temp. | Product size |
|---|---|---|---|
| WT1 | F: 5'-AGACATACAGGTGTGAAACC-3'<br>R: 5'-TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTT-3' | 51 | 215 |
| TWT1 | F: 5'-GAACCCTGCATCTAAAGTGG-3'<br>R: 5'- CGTTGTGTGGTTATCGCTCT -3' | 60 | 90 |
| EGFR | F: 5'-TAACAAGCTCACGCAGTTGG-3'<br>R: 5'-GTTGAGGGCAATGAGGACAT-3' | 60 | 190 |
| IGF1R | F: 5'- GTGTACGTTCCTGATGAGTGGGAG-3'<br>R: 5'-GCCCCGTGTCATCAGTTCCATGAT-3' | 65 | 300 |
| GAPDH | F: 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'<br>R: 5'GTACTCAGCGGCCAGCATCG-3' | 60 | 315 |

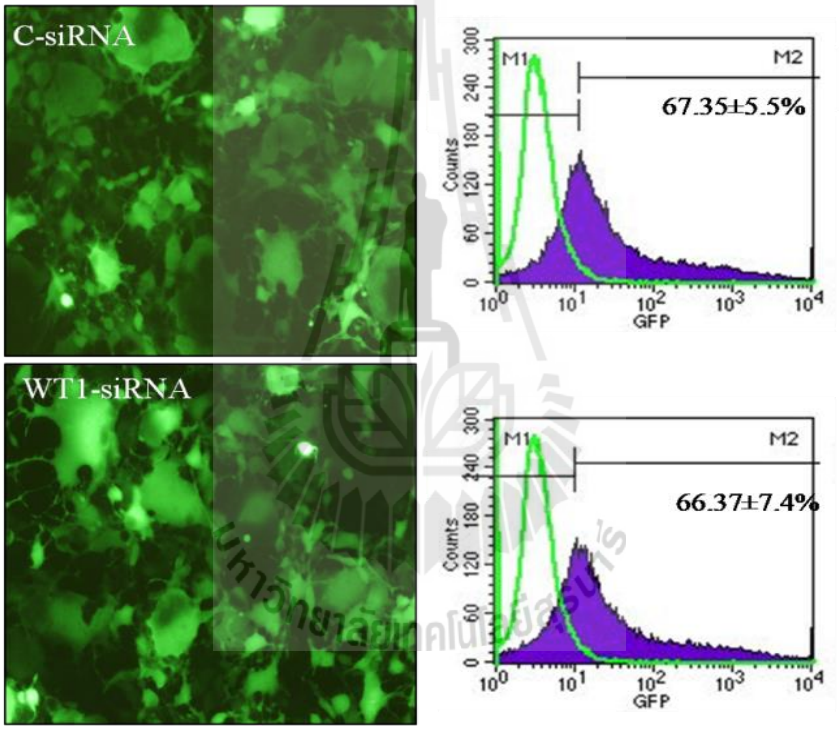
**2.2 ผลการวิจัย**

**ประสิทธิภาพของสร้าง lentivirus ใน packaging cells และการ transduction of lentiviral vector เข้าสู่เซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma**

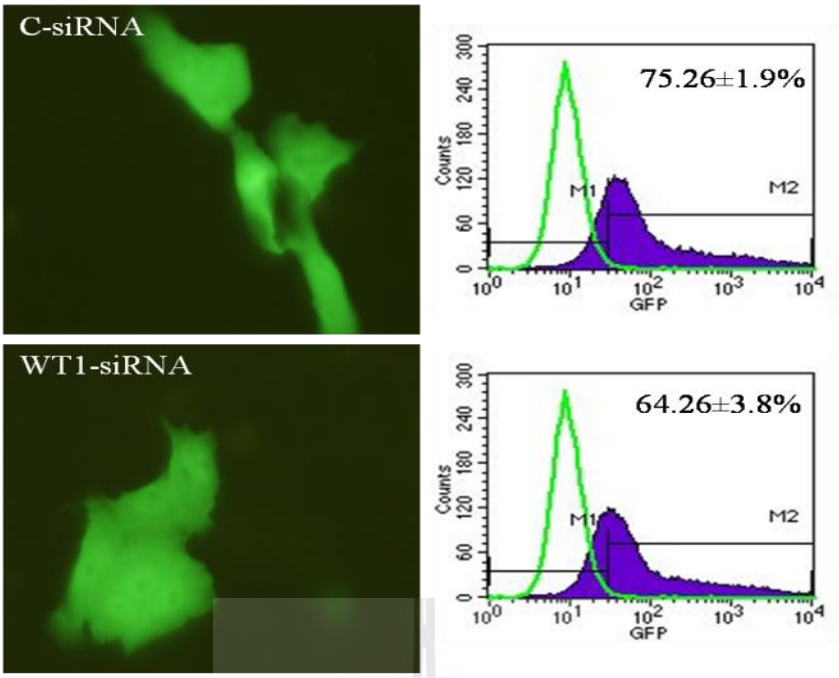
**ผลการทดลอง: ประสิทธิภาพของ lentivirus**

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 และจากภาพที่ 1 แสดงถึงจำนวน 293FT-C-siRNA-$GFP^+$ cells และ 293FT-WT1-siRNA-$GFP^+$ cells ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งวัดได้จาก flow cytometry มีค่า 67.35±5.5% และ 66.37±7.4% ตามลำดับ ซึ่งจากผลของ flow cytometry พบว่า packaging cells ส่วนใหญ่มีการ express GFP ไม่สูงมากนัก สังเกตได้จาก peak สูงสุดของ diagram จะค่อนไปทางซ้ายมือ ระหว่าง cut point ของ GFP negative และ GFP positive ดังนั้น ปริมาณไวรัสที่จะถูกปลดปล่อยจากเซลล์อาจจะน้อย จึงเป็นผลทำให้ต้องใช้วิธีการ concentration ไวรัสเพื่อให้ได้ความเข้มข้นมากพอที่จะใช้ในการ transduction และจากการทำ lentiviral transduction ด้วย

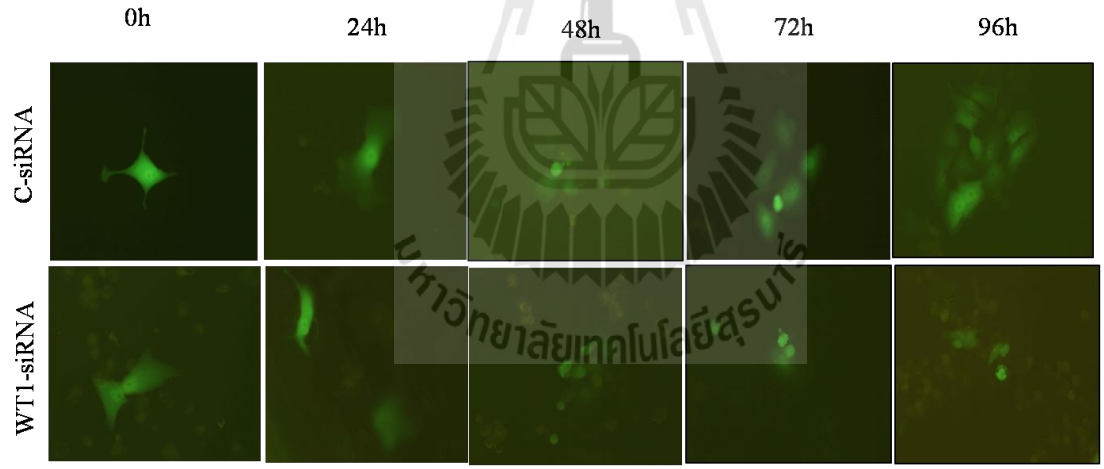
viral supernatant ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นประมาณ 20 เท่า พร้อมกับเติม polybrene เข้มข้น 32 μg/ml เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย HepG2 พบว่า เราสามารถนำ C-siRNA และ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์ได้ 75.26±1.9% และ 64.26±3.8% ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 นี้ต้องใช้ไวรัสและ polybrene ที่ความเข้มข้นสูงในการทำ transduction จึงจะประสบความสำเร็จในการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ดังกล่าว และวิธีการ spin transduction นี้ก็ยังคงมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงที่ช่วยในการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 จากนั้น เราทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับที่ผ่านการทำ transduction แล้วเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ พบว่า เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ที่ได้รับ WT1-siRNA เข้าไปนั้นมีรูปร่างเซลล์ที่เปลี่ยนไป คือจะไม่เพิ่มจำนวน มีการหดตัวของเซลล์ รูปร่างกลม และตายในที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่ได้รับ C-siRNA นั้นยังคงสามารถ proliferate ได้ สังเกตได้จากปริมาณเซลล์ที่ติดสี GFP จะเพิ่มจำนวนขึ้นตามภาพที่ 3




**ภาพที่ 1** 293FT cells exhibit GFP expression after 48 hours of transfection process. 293FT packaging cells were transfected with C-siRNA (above panel) or WT1-siRNA (lower panel). At 48 hours after transfection cells were trypsinized for determination of transfection efficiency based on GFP expression. (10x). Flow cytometry analysis shows percent GFP expression of each siRNA transduced cells.




**ภาพที่ 2** GFP expression of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells at 48 hours post transduction. Fluorescent fields of HepG2-C-siRNA-GFP$^{+}$ cells were shown in above panel and HepG2-WT1-siRNA-GFP$^{+}$ cells were shown in lower panel. (40x)

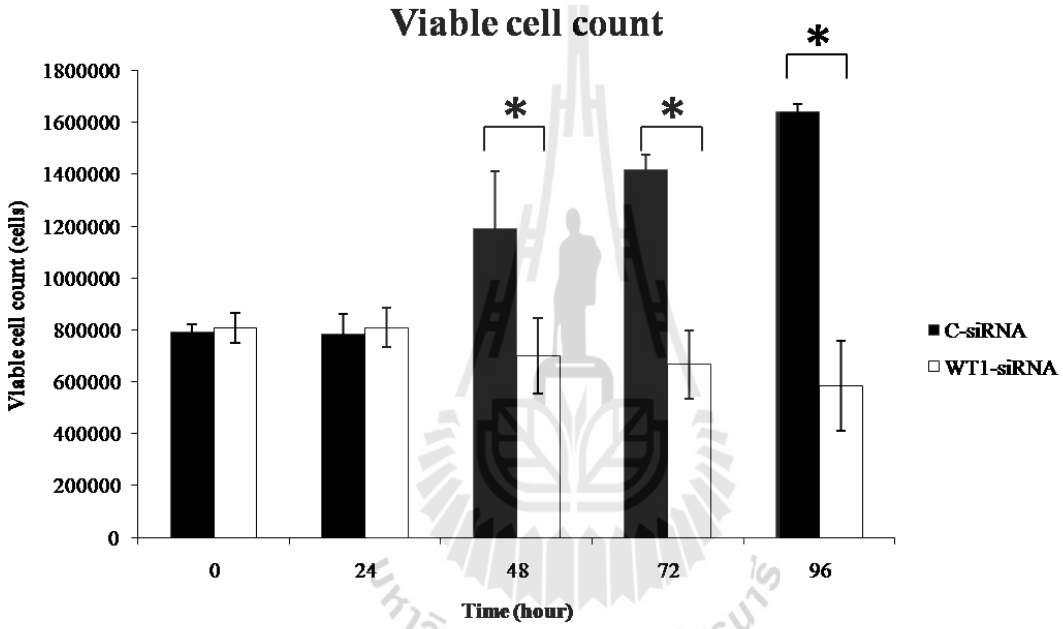



**ภาพที่ 3** Comparison of HepG2 cells growth after siRNA transduction. HepG2 cells were captured at 0, 24, 48, 72, and 96 hours post transduction with C-siRNA or WT1-siRNA for detection of GFP expression. (20x)

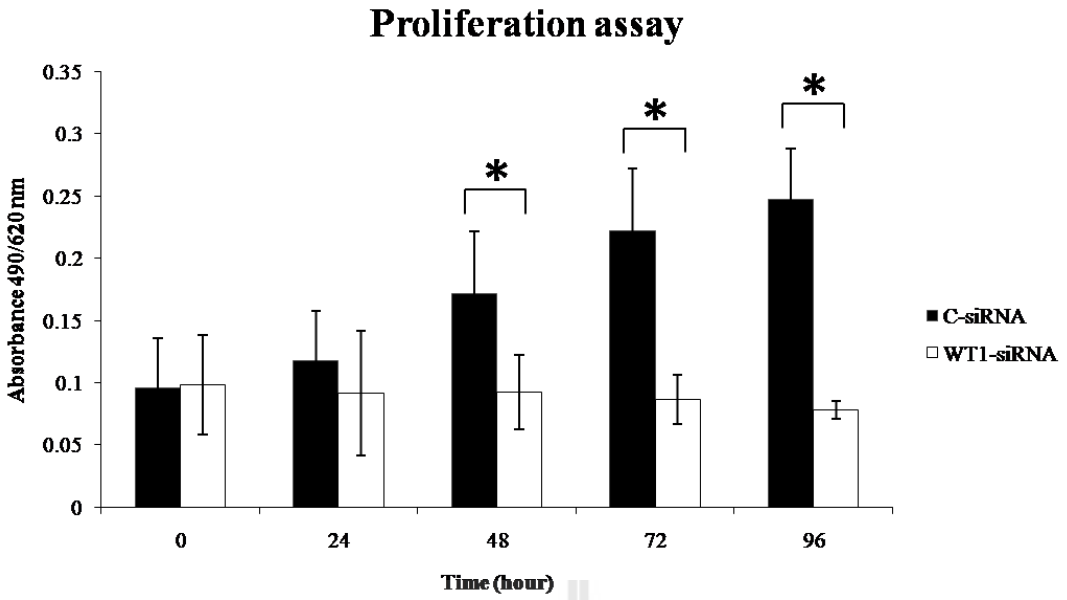
**การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma**

นำเอาเซลล์ที่ได้มาตรวจสอบหาการรอดชีวิตของเซลล์พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป HepG2-WT1-siRNA-GFP$^{+}$ cells มีอัตราการรอดชีวิตลดน้อยลงไป ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดที่เวลา 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์รอดชีวิตลดจำนวนลงจากเวลาเริ่มต้น ในขณะที่ HepG2-C-siRNA-GFP$^{+}$ cells ซึ่งใช้เป็น

กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่า WT1-siRNA มีผลลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 และเพื่อเป็นการยืนยันผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์ จึงได้ทำการทดลองตรวจสอบค่าการเจริญเติบโตด้วยชุดทดสอบ MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 490/620 nmพบว่า ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในกลุ่ม HepG2-WT1-siRNA-GFP$^+$ มีการลดลงสอดคล้องกับจำนวนเซลล์รอดชีวิตที่ลดลงเช่นกัน อัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ดังนี้ 0.098±0.04, 0.092±0.05, 0.092±0.03, 0.087±0.02, 0.078±0.007 ในเวลา 0, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งตับถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วย WT1-siRNA ในขณะที่กลุ่มควบคุม (HepG2-C-siRNA-GFP$^+$ cells) มีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มมากขึ้นตามปกติ (ภาพที่ 5) กล่าวโดยสรุป WT1-siRNA มีผลต่อการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับนั่นเอง




**ภาพที่ 4** WT1-siRNA inhibits cell growth of HepG2. At specific time points of transduction, HepG2-WT1-siRNA-GFP$^+$ and WT1-C-siRNA-GFP$^+$ cells were collected and determined viable cell count by trypan blue exclusion assay.

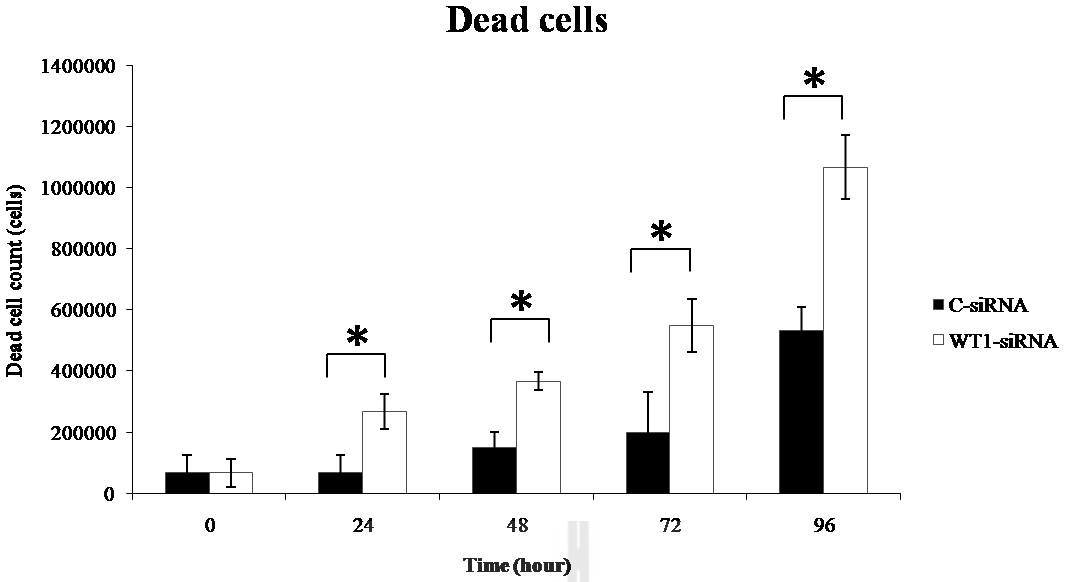



**ภาพที่ 5** WT1-siRNA induces cellular proliferation suppression of HepG2. At specific time points of transduction, HepG2-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells and HepG2-C-siRNA-GFP$^+$ cells were collected and evaluated proliferation rate by MTT assay.

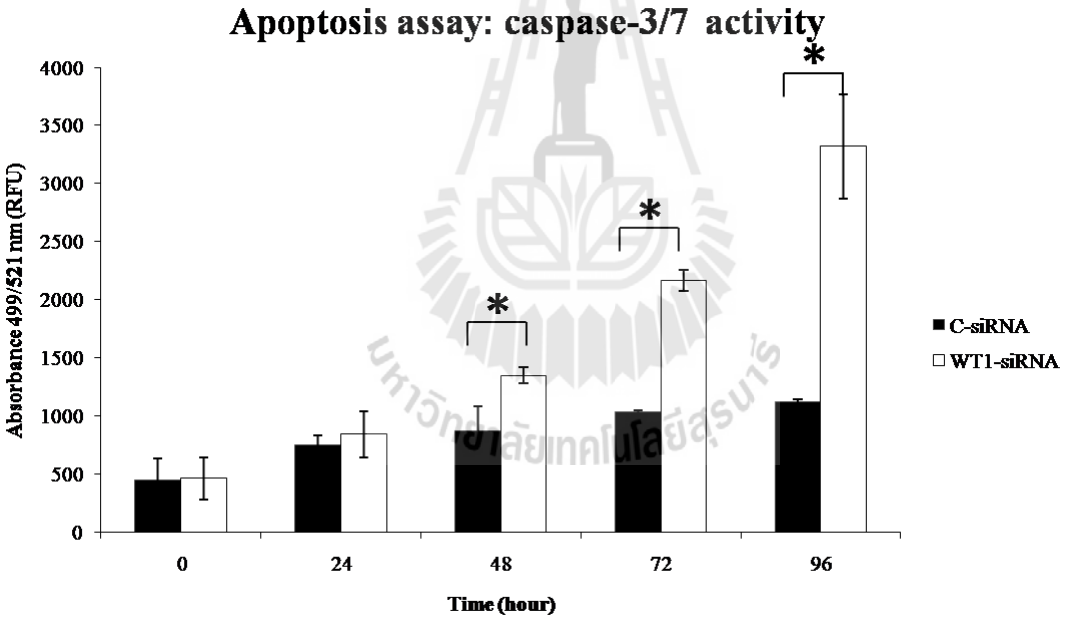
**การตรวจสอบการตายของเซลล์ โดยวัดจากการทำงานของเอนไซม์คาสเปส 3/7**

**ผลการทดลอง: WT1-siRNA กระตุ้นการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2**

หลังจากเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ได้รับการทดสอบด้วย WT1-siRNA แล้ว เราตรวจพบการตายของเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นตามเวลาที่ทดสอบ (ภาพที่ 6) เพื่อเป็นการยืนยันการตายของเซลล์เป็นผลมาจาก WT1-siRNA เราได้ทำการทดสอบอัตราการเกิด apoptosis ด้วยวิธีวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบ apoptosis ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ Caspase-3/7 ซึ่ง Caspase-3/7 เป็นเอนไซม์ในลำดับสุดท้ายใน apoptotic pathway และหากพบการแสดงออกของเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้นแสดงว่าเซลล์ถูกกระตุ้นให้ตายแบบ apoptosis นั่นเอง จากข้อมูลดังกล่าวเราจึงทำการศึกษาผลของ WT1-siRNA ในการกระตุ้นการตายของเซลล์ โดยวัดจาก caspases activity จากการทดลองพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น อัตราของ caspase-3/7 activities ก็เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ HepG2-WT1-siRNA cells โดยให้ค่า 841±199, 1,349±71, 2,167±93 และให้ค่าสูงสุด 3,320±452 RFU ที่เวลา 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม HepG2-C-siRNA cells (ภาพที่ 7) 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 มีประสิทธิภาพอย่างมากในการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งตับ HepG2




**ภาพที่ 6** Induction of HepG2 cells death after WT1-siRNA transduction. At specific time points, transduced cells were stained with trypan blue for determination of dead cells.

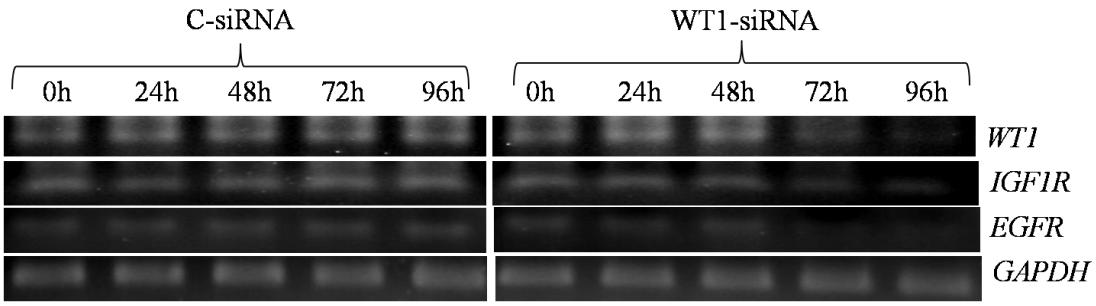



**ภาพที่ 7** WT1-siRNA induces apoptosis of HepG2. At specific time points, HepG2-WT1-siRNA cells and HepG2-C-siRNA cells were collected for apoptosis determination based on the activation of Caspase-3/7 enzyme activities.

**การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR**

**ผลการทดลอง: การลดการแสดงออกของยีน *WT1* หลังจากทดสอบด้วย WT1-siRNA**

WT1 เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้ง มะเร็งตับ และการลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวเป็นเป้าหมายในการวิจัยเพื่อศึกษาผลของการใช้ WT1-siRNA ในการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งตับ ในการทดลองนี้ได้ทำการนำ WT1-siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย อันได้แก่เซลล์มะเร็งตับด้วยกระบวนการ lentiviral transduction เพื่อยับยั้งและทำลาย mRNA ของยีน WT1 ตรงตำแหน่งจำเพาะกับลำดับเบสบนสาย siRNA จากที่ได้ทราบมาแล้วว่า siRNA มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่จำเพาะเพราะฉะนั้นในการใช้ WT1-siRNA จึงต้องพิสูจน์ว่ายีน *WT1* ถูกลดการแสดงออกลงด้วยจริงและเป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับด้วย ในการทดลองใช้ WT1-siRNA เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ และศึกษาผลของ WT1-siRNA นั้น ๆ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ต่อไปเรื่อย ๆ พบว่า การแสดงออกของ *WT1* ในเซลล์ HepG2-WT1-siRNA-GFP$^+$ ถูกลดการแสดงออกลง เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมงของการทดสอบ (ภาพที่ 8) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ WT1-siRNA นั้นเป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในขณะที่เซลล์ในกลุ่มควบคุม HepG2-C-siRNA-GFP$^+$ นั้นยังคงมีการแสดงออกของยีน *WT1* อยู่ในระดับเท่า ๆ กัน แม้ว่าเวลาจะเพิ่มขึ้นก็ตาม จากผลที่ปรากฏขึ้นนี้ สอดคล้องกับผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ HepG2 และพร้อมกันนั้นก็เกิดการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ด้วย เพราะฉะนั้นบทบาทหน้าที่ของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งก็คือการควบคุมการเจริญของเซลล์เป็นสำคัญ ดังนั้น WT1-siRNA จึงได้ส่งผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเนื่องจากว่า ยีน WT1 ทำหน้าที่เป็น transcription factor ชนิดหนึ่ง ดังนั้น การยับยั้งการแสดงออกของยีน WT1 จึงส่งผลต่อยีนที่เป็นเป้าหมายของ WT1 อันได้แก่ GF1R โดยยีนชนิดนี้มีการแสดงออกที่ลดลง หลังการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ซึ่งน่าจะเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 หยุดการเจริญเติบโต และตายหลังจากได้รับการทดสอบด้วย WT1-siRNA




**ภาพที่ 8** Gene expression of HepG2-WT1-siRNA-GFP$^+$ compared with HepG2-C-siRNA-GFP$^+$.

# บทที่ 3
# ข้อวิจารณ์

## 3.1 การรายงานผลการวิจัย และการวิเคราะห์ผล

1. สามารถผลิต lentiviral vector DNA ที่มีคุณสมบัติการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ โดยใช้ vector ชนิด Lentiviral vector (pPRIME-CMV-GFP) โดยการตัดต่อส่วนของ DNA ที่สามารถสร้างเป็น short hairpin RNA ซึ่งมีคุณสมบัติการทำลาย mRNA ในเซลล์เป้าหมายได้
2. ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการนำพา vector DNA เข้าสู่ packaging cells เพื่อให้มีการสร้าง lentiviral vector โดยพบว่าได้สัดส่วนของเซลล์ที่มีการสร้าง lentiviral vector ที่สูงประมาณ 66.86% ของเซลล์ตั้งต้นทั้งหมด
3. ปริมาณ lentiviral vector ที่ได้มีปริมาณเพียงพอในการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1*
4. สามารถนำ lentiviral vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เป้าหมายคือ เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถทำให้เกิดการ transduction ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ถึง 69.76%
5. พบว่าวิธีการที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 โดยใช้ lentiviral vector เพื่อการกระตุ้นการสร้าง shRNA ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* โดยแสดงให้เห็นจากผลการทำ RT-PCR
6. สามารถแสดงผลของการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยพบว่าการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ดังกล่าว นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติของการเป็นมะเร็ง ได้แก่ การทำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ที่ยืนยันจากการตรวจวัดระดับ Caspase-3/7 activity ซึ่งพบว่าระดับการทำงานของ Caspase-3/7 มีระดับเพิ่มจาก 841 เป็น 3320 ในเวลา 96 ชม. หลังการทำ transduction พร้อมกับมีการลดลงของอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่ตรวจโดยใช้ MTT assay
7. สามารถแสดงให้เห็นกลไกของการต้านคุณสมบัติของความเป็นมะเร็งหลังการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้ว่า น่าจะเป็นผลมาจากการที่มีการยับยั้งการทำงานของยีน *EGFR* โดยผลการลดลงของการทำงานของยีนจะเห็นชัดในเวลา 72 ชม. หลังการ transduction

## 3.2 อภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจากการทดลองนี้ เป็นการนำเทคโนโลยี RNAi (RNA interference) โดยใช้หลักการในการยับยั้งการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งด้วย siRNA ซึ่งเป็น RNA สายสั้น ที่ฟอร์มในรูป short hairpin (shRNA) การนำเข้า siRNA ครั้งนี้ทำโดยใช้ lentiviral vector เป็นพาหะ จากการตรวจการ

แสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับเช่น HepG2 และ PLC cell lines รวมทั้งพบในตัวอย่างมะเร็งตับที่ได้จากผู้ป่วย Hepatocellular carcinoma (Sera et al., 2008) พบว่าเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวมีการแสดงออกของ ยีน WT1 ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยีน WT1 นี้มีผลต่อการทำให้เซลล์มะเร็งตับมีความต้านทานต่อการทดสอบด้วยยาต้านมะเร็งชนิด doxorubicin และเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการตายแบบ apoptosis มากขึ้น (Perugorria et al., 2009)

จากหลักฐานการทำวิจัยดังกล่าวบ่งชี้ว่า WT1อาจสามารถเป็นยีนเป้าหมายที่ใช้เพื่อการรักษามะเร็งตับได้ และในการศึกษาของเราครั้งนี้ใช้เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะต้องใช้ lentivirus ในการกระตุ้นการสร้าง siRNA ขึ้นในเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลการทดลองพบว่าสามารถบรรลุเป้าหมายในการทำวิจัยได้ โดยสามารถพัฒนาเทคนิคยีนบำบัดเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้ และพบว่าการยับยั้งยีนดังกล่าวมีผลให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตช้าลงร่วมกับการตายแบบ apoptosis ที่มากขึ้น และแสดงให้เห็นถึงกลไกในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตดังกล่าว โดยพบว่าการลดลงของยีน WT1 ส่งผลให้มีการลดลงของการแสดงออกของยีน IGF-1R ซึ่งบ่งชี้ว่า WT1 น่าจะทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนดังกล่าวในเซลล์มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma

ในแง่รายละเอียดทางเทคนิค พบว่าการทดลองการทำ transduction ในเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ viral vector ที่ความเข้มข้นสูงในการเข้าสู่เซลล์ โดยการที่จะได้ความเข้มข้นของ lentivirus สูงนั้นจะต้องผ่านการทำ ultracentrifugation และสามารถเพิ่มความเข้มข้นได้เป็นประมาณ 20 เท่า และเมื่อใช้ packing cells ในปริมาณมากขึ้นก็จะยิ่งทำให้ได้ปริมาณ viral vector ในการทดลองมากขึ้นด้วย นอกจากนี้จะต้องใช้ปริมาณเซลล์ (cell density) น้อยหรือประมาณ 100000 cells/ml เพื่อให้ประสิทธิภาพการ transduction ของ ไวรัสดีขึ้น อีกประการหนึ่ง จะต้องใช้ polybrene ความเข้มข้นสูงกว่าปกติคือ 32 μg/ml และทำ spin transduction ในขณะ transduced อีก 1 ชั่วโมง WT1-siRNA ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโต และลดอัตราการ proliferation ของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ได้ตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ด้วยการเพิ่ม Caspase-3/7 apoptotic enzyme activities ส่งผลให้ HepG2 cells ตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน WT1

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Perugorria et al, 2009 ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงสมรรถนะของระบบการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยใช้ lentivirus system ซึ่งทำให้สามารถนำเข้า WT1-siRNA สู่เซลล์ได้ในปริมาณมาก และชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ WT1-siRNA ในการเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการยับยั้งการเจริญและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 อย่างไรก็ตามงานวิจัยชิ้นนี้ต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Perugorria et al., 2009) เนื่องจากมีการใช้ siRNA เพียง sequence เดียวก็สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน

*WT1* ได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังได้แสดงให้เห็นกลไกสำคัญในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าว ได้แก่ การลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (downstream gene) ของ *WT1* อันได้แก่ *IGF1R* ได้อีกด้วย ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตับหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ซึ่งนับว่าเป็นผลที่จะสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนางานวิจัยได้ โดยการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาวิธีการเพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับได้ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 4
# สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

**สรุปผลการทำวิจัยและข้อเสนอแนะ**

การวิจัยนี้สามารถสรุปผลการทดลองดังนี้

1. การใช้เทคนิคยีนบำบัดโดยการใช้ lentiviral vector เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับ โดยพบว่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 64.26% มีการ transduction โดยไวรัส ได้สำเร็จ
2. กระบวนการใช้ lentiviral vector ดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์มะเร็งตับ
3. การลดลงของการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งตับ ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง และมีการตายแบบ apoptosis มากขึ้น
4. การลดลงของ WT1 มีผลทำให้การแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย WT1 ได้แก่ *IGF-1R* มีปริมาณลดลง
5. จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า WT1 ทำหน้าที่ส่งเสริมคุณสมบัติความเป็นมะเร็งตับ และการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 นี้ มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเพื่อการรักษามะเร็งชนิดนี้ในอนาคตต่อไป

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคยีนบำบัดมาในการยับยั้งการทำงานของยีน WT1 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma โดยได้เลือก lentiviral vector เป็นพาหะในกระบวนการดังกล่าว เนื่องจาก vector ดังกล่าวมีความสามารถในการ transduction สูง โดยสามารถเกิดได้ทั้งในเซลล์ที่แบ่งตัว หรือ เซลล์ในระยะพัก (resting cell) และยังสามารถมีการแสดงออกของยีน หรือ การสร้าง siRNA ได้เป็นเวลานาน ซึ่งมีผลดีในการนำไปใช้ในทางคลินิก ผลการทดลองแสดงให้เห็นศักยภาพของวิธีการดังกล่าวที่จะนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ในผู้ป่วย เนื่องจากการรักษาในปัจจุบันมีข้อจำกัด ในด้านประสิทธิภาพ และผลข้างเคียง โดยเหตุที่ต้องใช้การผ่าตัดเอาเนื้องอกออก ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด ผลการรักษาในภาพรวมจึงไม่ดี ผู้ป่วยส่วนใหญ่เสียชีวิตในเวลา 1 ปี หลังการวินิจฉัย การพัฒนาเพื่อให้ได้การรักษาแบบใหม่ที่แก้ไขข้อด้อยของการรักษาแบบเดิมจึงได้รับความสนใจอย่างมาก

คุณสมบัติที่จำเป็นในการที่การรักษามะเร็งโดยการใช้เทคนิคยีนบำบัด ได้แก่ การที่ต้องทำให้มีการยับยั้งยีนก่อมะเร็งในเซลล์มะเร็งมากที่สุด และมีผลต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด ซึ่งความสำเร็จทั้งสองประการจะเกิดขึ้นได้ ต้องอาศัยปัจจัยสำคัญ ได้แก่ การเลือก vector ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าสู่เซลล์มะเร็ง ร่วมกับ

การเลือกยับยั้งยีนที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติ ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถพัฒนาเทคนิคที่มีคุณสมบัติสำคัญดังกล่าวแล้ว ดังนั้นผลงานชิ้นนี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำไปทำวิจัยต่อยอดในสัตว์ทดลอง และในผู้ป่วยมะเร็งตับ ชนิด hepatocellular carcinoma ในอนาคต เพื่อยืนยันให้เห็นประสิทธิภาพ และความปลอดภัยในการใช้วิธีการดังกล่าวนี้ ในการรักษาโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ซึ่งน่าจะเป็นการรักษาทางเลือกที่สำคัญในผู้ป่วยบางรายโดยเฉพาะผู้ที่ล้มเหลวในการรักษาแบบเดิม หรือผู้ที่เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรักษา หรืออาจประยุกต์ใช้ร่วมกับการรักษาแบบเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดีขึ้น นอกจากมะเร็งตับแล้ว เทคนิคยีนบำบัดยังสามารถประยุกต์ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ ที่ WT1 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็ง เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# 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. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, et al. (1997) Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. Cancer Res **57**:1986–1990.
3. 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.
4. Bruening W, Pelletier J. (1996) A non-AUG translation initiation events generates novel WT1 isoforms. J Biol Chem 271:8646-8654.
5. 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.
6. 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.
7. Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJIII, Kim SJ. (1994) Repression of the transformimg growth factor -$\beta$1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. Mol Endocrinol 8:595-602.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. 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):3474-82. Epub 2002 Nov 19
14. 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.
15. 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.
16. Kusano N, Shiraishi K, Kubo K, Oga A, Okita K, Sasaki K. (1999) Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: their relationship to clinicopathological features. Hepatology 29:1858–1862.
17. 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.
18. Liew CT, Li HM, Lo KW, et al. (1999) High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. Oncogene 18:789–95
19. 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.
20. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ III. (1991) Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms' tumor gene product. Science 253:1550-1552.
21. 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.
22. 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 US 90:5100-5104.
23. Marchio A, Meddeb M, Pineau P, et al. (1997) Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer **18**:59–65.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

24. 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.

25. Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A. (1997) Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. Oncogene 14:2927–33.

26. Nishida N, Nishimura T, Nagasaka T, Ikai I, Goel A, Boland CR. (2007) Extensive methylation is associated with beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma: evidence for two distinct pathways of human hepatocarcinogenesis. Cancer Res 67:4586–4594.

27. 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.

28. Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL. (2003) Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 146: 8–15.

29. Parkin DM. (2000) Global cancer statistics in the year. Lancet Oncol 2:533-543

30. Perugorria MJ, Castillo J, Latasa MU, Goñi S, Segura V, Sangro B, Prieto J, Avila MA, Berasain C. (2009) WT1 gene expression in hepatocellular carcinoma promotes cell dedifferentiation and resistance to chemotherapy Cancer Res 15;69(4):1358-1367.

31. Piao Z, Kim H, Malkhosyan S, Park C. (2000) Frequent chromosomal instability but no microsatellite instability in hepatocellular carcinomas. Int J Oncol 17(3):507-12

32. 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 .

33. 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.

34. Sera T, Hiasa Y, Mashiba T, Tokumoto Y, Hirooka M, Konishi I, Matsuura B, Michitaka K, Udaka K, Onji M. (2008) Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. Eur J Cancer 44(4):600-608. Epub 2008 Feb 5.

35. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher GJ, Sukumar S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene. Genes Dev 8:720-731.

36. Su PF, Lee TC, Lin PJ, et al. (2007) Differential DNA methylation associated with hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 121: 1257–1264.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

37. 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.

38. 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.

39. 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.

40. 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.

41. Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. (2003) Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. Cancer Res 63**:** 7646–7651.

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