บทคัดย่อ

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

Abstract

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