

การถอดการทำงานของ up-regulated A-repeats ของยีนในมะเร็งปากมดลูกด้วย PNAs-A15



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The suppression of up-regulated A-repeats containing genes
in cervical cancer with PNAs-A15

Miss Jirattha Siriluksana



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกวดการทำงานของ up-regulated A-repeats ของยีน ในมะเร็งปากมดลูกด้วย PNAs-A15
โดย	นางสาวจิรัฐฐา ศิริลักษณ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ จันทร์วรโชติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ จันทร์วรโชติ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำธร)

จรรยา สิริลักษณ์ : การกดการทำงานของ up-regulated A-repeats ของยีนในมะเร็งปากมดลูกด้วย PNAs-A15 (The suppression of up-regulated A-repeats containing genes in cervical cancer with PNAs-A15) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ปิติ จันทรวรโชติ, 63 หน้า.

Mononucleotide A- and T- repeats ถูกพบบริเวณรอบๆ transcription start sites (TSS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านทาง Argonaute proteins นอกจากนี้ยังพบว่า A- and T- repeats สายสั้น (<10 bp) มักพบมากใน tissue-specific genes ในขณะที่ A- and T- repeats สายยาว (≥ 10 bp) มักพบมากใน housekeeping genes ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบ peptide nucleic acid (PNA) ที่เป็นเบสเรียงต่อกัน 15 ตัว เพื่อบกพรการทำงานของโปรตีนที่จับกับ A-repeats และเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ในยีนที่มี A- and T- repeats โดยการใส่ PNA-A15 เข้าสู่เซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa และ C33A) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ (HK-2) ด้วยการทำ MTT assay และ anchorage-independent growth assay จากนั้นศึกษาผลของ PNAs-A15 ที่มีต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) ใน formalin-fixed paraffin-embedded cells blocks ด้วยวิธี Immunocytochemistry ผลการศึกษานี้พบว่า PNAs-A15 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกระดับโปรตีนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในมะเร็งโดยใช้ expression profiles จาก GEO database มาวิเคราะห์ จะพบ A- and T- repeats สายยาว (13-27 bp) จำนวนมากใน up-regulated genes ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในมะเร็งปากมดลูก 2 ชนิดคือ HeLa และ C33A ที่มีการใส่ PNA-A15 พบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับ repeat densities จึงสรุปได้ว่า PNAs-A15 สามารถลดการแสดงออกของยีนที่มี A-repeats และลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งอาจนำความรู้นี้ไปต่อยอดเพื่อพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5574218630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: MONONUCLEOTIDE A-REPEATS, PEPTIDE NUCLEIC ACID

JIRATTHA SIRILUKSANA: The suppression of up-regulated A-repeats containing genes in cervical cancer with PNAs-A15. ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PITHI CHANVORACHOTE, Ph.D., 63 pp.

Mononucleotide A- and T-repeats can be found around transcription start sites (TSS), they may regulate gene expression through Argonaute proteins. Furthermore, short repeats (<10 bp) are enriched in tissue-specific genes, while long repeats (≥ 10 bp) are enriched in housekeeping genes. To interfere protein binding A-repeats and change mRNA levels of genes containing A- and T- repeats, we designed the peptide nucleic acid (PNA) oligo containing long A-repeat sequences [A(15)] to transfect cells. The transfection of PNA-A15 to cancer cell lines resulted in limited proliferation of HeLa and C33A, but not in HK2 detected by MTT assay and anchorage-independent growth assay. To investigate PNAs-A15 affects protein expression on cervical cancer cells, Immunocytochemistry were performed on available formalin-fixed paraffin-embedded cells blocks of HeLa cells. These results suggest that PNAs-A15 were changed protein expression on cervical cancer cell lines, BCL-2 and P53. To explore the gene expression of cancer, the expression profiles reported from GEO database were analyzed. We found long A- and T- repeats (13-27 bp) were higher distributed in up-regulated genes than neutral genes in cervical cancer (GSE9750 and GSE7803). Furthermore, RNA from transfected cells was further analyzed for evaluate alteration of expression of gene containing A- and T-repeats. The results showed gene expression levels were increased in correlation with repeat densities. In conclusion, PNAs-A15 can down-regulate A-repeats containing genes and limited cancer growth. Therefore, PNAs-A15 could be used for cancer treatment in future.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่งานวิจัย ตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องในงานวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ปิติ จันทร์วรโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ในการช่วยเหลือให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะและให้โอกาสเข้าไปทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการเฉพาะทางของภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ประกอบด้วย รศ.ดร. วิไล อโนมะศิริ ประธานกรรมการ, ผศ. ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ กรรมการภายใน และ รศ.ดร.ทพ. นครินทร์ กิตกำธร กรรมการภายนอก ที่เสนอข้อคิดเห็นและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณพี่ๆและเพื่อนๆทุกคนในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ที่ให้ความรู้ ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือแลกเปลี่ยนข้อมูลและประสบการณ์ในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ที่เป็นกำลังใจสำคัญและสนับสนุนทางด้านการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	1
สารบัญตาราง.....	3
บทที่ 1 บทนำ.....	4
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale).....	4
คำถามงานวิจัย (Research question).....	6
วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives).....	6
กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	7
1. การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนมด้วยวิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip.....	8
2. immunocytochemistry.....	9
3. การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation assay) ด้วย 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หลังจากใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์.....	10
4. การศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อน (Anchorage-independent growth assay) หลังจากมีการใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์.....	11
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	12
มะเร็ง (cancer).....	12
มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer).....	13

Targeted therapy.....	14
A- และ T-repeats.....	15
PNAs-A15.....	17
เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	18
Cell culture	18
Anchorage independent growth assay in soft agar.....	19
Immunocytochemistry.....	21
Microarray.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	24
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
วิธีดำเนินงานวิจัย	30
การออกแบบ PNAs-A15	30
การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
การนำ PNAs-A15 เข้าสู่เซลล์	31
การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation assay) ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หลังจากใส่ PNAs และ scramble เข้าสู่เซลล์.....	31
การศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อน (Anchorage-independent growth assay) หลังจากมีการใส่ PNAs และ scramble เข้าสู่เซลล์.....	32
Immunocytochemistry.....	32

การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนมด้วยวิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip	33
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	34
ข้อจำกัด (Limitation).....	34
ประโยชน์ที่ได้ และการประยุกต์ใช้ (Expected benefit and Application).....	34
อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem).....	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	45
รายการอ้างอิง.....	47
ภาคผนวก.....	52
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	63



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การกวดการแสดงออกของยีนในมะเร็งปากมดลูกด้วย PNAs-A15	6
รูปที่ 2 แผนผังกรอบความคิดในงานวิจัย.....	7
รูปที่ 3 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 1	8
รูปที่ 4 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 2.....	9
รูปที่ 5 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 3.....	10
รูปที่ 6 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 4.....	11
รูปที่ 7 กลไกการควบคุมยีนต่างๆในร่างกายซึ่งนำมาใช้ในการกำหนดเป้าหมายในการรักษา โรคมะเร็งด้วย Targeted Therapy (20).....	14
รูปที่ 8 การกระจายของ A- และ T-repeats รอบ TSSs.....	16
รูปที่ 9 การกระจายของ A- และ T-repeats สายสั้น (4 bp) สายยาว (10-30 bp) รอบ TSSs ในมะเร็งปากมดลูก (GSE9750).....	17
รูปที่ 10 การจับของ Argonaute protein ที่ A-repeats บริเวณ upstream ของ TSS	17
รูปที่ 11 สูตรโครงสร้างของ PNAs.....	18
รูปที่ 12 PNAs-A15	18
รูปที่ 13 สูตรโครงสร้างของ MTT และ formazan	19
รูปที่ 14 ขั้นตอนของ Soft agar assay for colony tumor formation	20
รูปที่ 15 (A) ลักษณะของ chip ที่ใช้ใน Affymetrix array (B) ลักษณะของ Bead ที่ใช้ใน illumina array.....	22
รูปที่ 16 ขั้นตอนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนม (A) Affymetrix array (B) illumina array.....	23
รูปที่ 17 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปกติ (A) และเซลล์มะเร็งที่ใส่ PNAs-A15 ที่ความเข้มข้น 2000 nM (B).....	36

รูปที่ 18 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย MTT assay หลังจากที่ใช้ PNAs-A15 และ การทำ Anchorage independent growth assay.....	37
รูปที่ 19 ลักษณะของโคโลนีที่ใช้ Scramble (A) และ PNAs-A15 (B) จากการทำให้ Anchorage-independent growth assay	38
รูปที่ 20 การทำ Immunohistochemistry.....	39
รูปที่ 21 การกระจายตัวของ A- และ T- repeats บริเวณรอบๆ TSS ของจีโนมมนุษย์.....	40
รูปที่ 22 กราฟแสดงการกระจายของ A และ T repeats ของมะเร็งปากมดลูก GSE9750 และ GSE7803.....	41
รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน(Delta of mean fold change) และ repeats density ของ (A) GSE9750 ต่อ HeLa, (B) HeLa_PNAs ต่อ HeLa_SC, (C) GSE9750 ต่อ C33A และ (D) C33A_PNAs ต่อ C33A_SC.....	43
รูปที่ 24 ผลจากการทำ CU-DREAM.....	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการทดลอง Immunocytochemistry ของ HeLa cells.....	39
ตารางที่ 2 Up-regulated genes ในมะเร็งที่มี A- และT- repeats สายยาว (13-27 bp) มากกว่า neutral genes.....	53
ตารางที่ 3 Up-regulated genes ในมะเร็งที่มี A- และT- repeats สายยาว (13-27 bp) น้อย กว่า neutral genes	55
ตารางที่ 4 ยีนที่ up-regulated ใน GSE9750 และ down-regulated ใน GSE76258 อย่างมี นัยสำคัญ (60 genes)	56



บทที่ 1

บทนำ

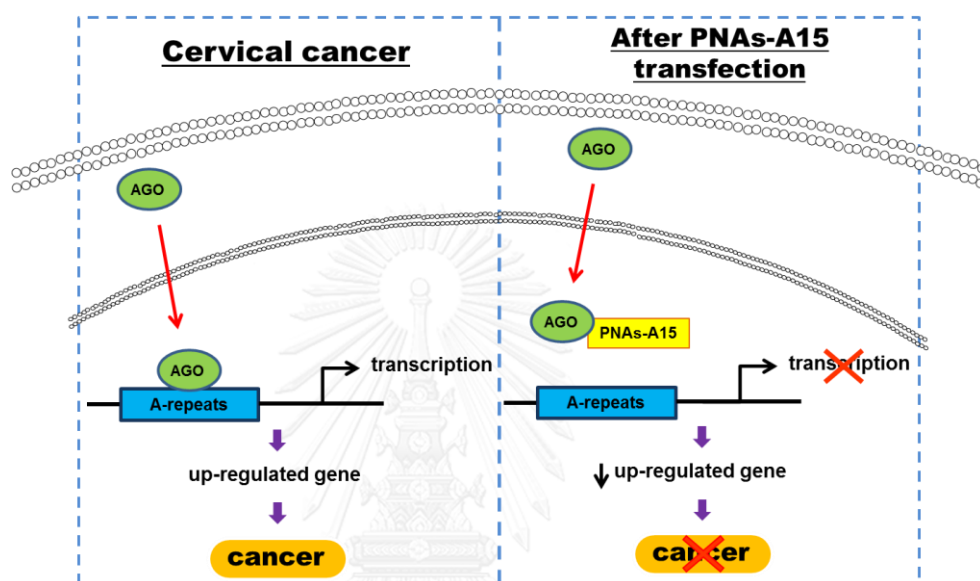
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale)

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของคนทั่วโลกและมะเร็งปากมดลูกยังพบมากเป็นอันดับสองของมะเร็งในผู้หญิงทั่วโลก (1-4) เกิดจากที่เซลล์ในร่างกายมีสารพันธุกรรมผิดปกติสามารถเกิดได้จากสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม จึงทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ที่รวดเร็วผิดปกติ (5) การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันจะใช้เคมีบำบัดหรือ Chemotherapy ร่วมกับการใช้รังสีรักษา การผ่าตัด ตลอดจนการปลูกถ่ายไขกระดูก แต่การรักษาด้วยเคมีบำบัดนอกจากที่จะไปทำลายเซลล์มะเร็งแล้วยังไปทำลายเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วด้วย ยกตัวอย่างเช่น เซลล์เม็ดเลือด เซลล์ผม เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร เซลล์เยื่อบุลำไส้ และเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม เกิดอาการข้างเคียงหลายอย่างได้แก่ อาเจียน รับประทานอาหารได้น้อย อ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย ตัวซีด ผมร่วง ท้องเสีย เม็ดเลือดขาวต่ำ เกล็ดเลือดต่ำ และอื่นๆอีกมากมาย ในคนไข้บางรายไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงได้จึงอาจถึงแก่ชีวิต (6) ต่อมามีการพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งที่เรียกว่า “Targeted Therapy” หรือการรักษาแบบเจาะจงไปยังเป้าหมายที่เป็นเซลล์มะเร็ง ไม่ทำลายเซลล์ปกติอื่นๆในร่างกาย (7-9) โดยจะไปยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ชัดขวางการพัฒนาหลอดเลือดของเนื้องอก ส่งเสริมการตายของเซลล์มะเร็ง (Apoptosis) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่จะทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่ง targeted therapy แต่ละตัวจึงมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน ตัวอย่างการรักษาโรคมะเร็งด้วย Targeted Therapy เช่น โรคมะเร็งปอด โดยจะเฉพาะเจาะจงกับยีน EGFR ที่กลายพันธุ์ (10)

ในงานวิจัยก่อนหน้ามีการศึกษาเกี่ยวกับการกระจายตัวของลำดับเบสที่เป็น A- และ T-repeats ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดย A- และ T-repeats เป็น Mononucleotide repeats หรือลำดับเบสที่มีเบสเพียงเบสเดียว (A, T, C, หรือ G) เรียงต่อกันแบบซ้ำๆ (11) ซึ่งพบว่าการกระจายตัวของ A-repeats บริเวณ upstream ก่อน transcription start sites (TSSs) เกี่ยวข้องกับการควบคุมแบบ cis-regulatory ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 3 ชนิด คือ *R. norvegicus*, *M. musculus*, และ *H. sapiens* โดยควบคุมผ่าน DICER1 และ Argonaute proteins (12) ซึ่งใน human housekeeping genes จะพบ A- และ T-repeats สายยาว (10 to 30 bp) แต่ใน tissue-specific genes มักพบเป็น A- และ T-repeats สายสั้น (2 to 9 bp) (12) คาดว่า A-repeats อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนให้แสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งได้ โดย Argonaute protein จะไปจับกับ A-repeats ที่บริเวณ upstream ของ TSS แล้วทำให้เกิดการ transcription งานวิจัยนี้จึงได้นำหลักการของการรักษาโรคมะเร็งด้วย Targeted Therapy มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกโดยเลือกใช้ PNA หรือ peptide nucleic acid ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความคล้ายคลึงกับ DNA ในธรรมชาติ (13, 14) แต่มีความแตกต่างกันที่บริเวณหมู่น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตจะถูกแทนที่ด้วย N-(2-AMINOETHYL)-glycine เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ โดยการจับกันระหว่าง PNA กับ DNA นั้นจะจับกันด้วยพันธะที่แน่นหนา มีความจำเพาะสูง และไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาย DNA สามารถทนต่อการย่อยสลายโดย nucleases นอกจากนี้ PNA เป็นสาย polypeptide ที่ไม่มีประจุ ทำให้การจับกันระหว่าง PNA กับ DNA มีความเสถียรมากกว่าการจับกันระหว่าง DNA-DNA และ DNA-RNA ตามธรรมชาติ (15) มีการนำ PNA ไปใช้ในการยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการกดแสดงออกของยีนที่มี A-repeats ในมะเร็งปากมดลูกด้วย PNAs-A15 โดยออกแบบ PNA ให้มีลำดับเป็นเบส A เรียงต่อกันความยาว 15 bp เป็น

ความยาวที่เหมาะสมเนื่องจาก A-repeats ความยาวประมาณ 10-30 bp เกี่ยวข้องกับการควบคุมแบบ cis-regulatory ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งการใส่ PNAs-A15 ในเซลล์ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ รูปที่ 1



รูปที่ 1 การลดการแสดงออกของยีนในมะเร็งปากมดลูกด้วย PNAs-A15

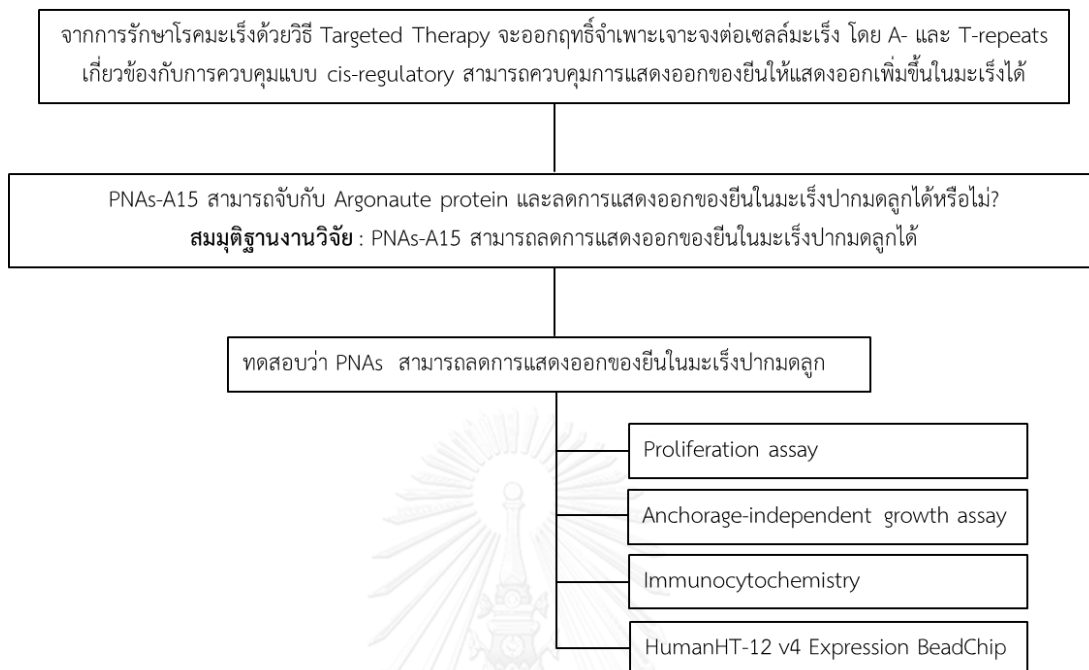
คำถามงานวิจัย (Research question)

- PNAs-A15 สามารถลดการแสดงออกของยีนที่มี A-repeats ในมะเร็งปากมดลูกได้หรือไม่
- PNAs-A15 สามารถใช้รักษามะเร็งปากมดลูกได้หรือไม่

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives)

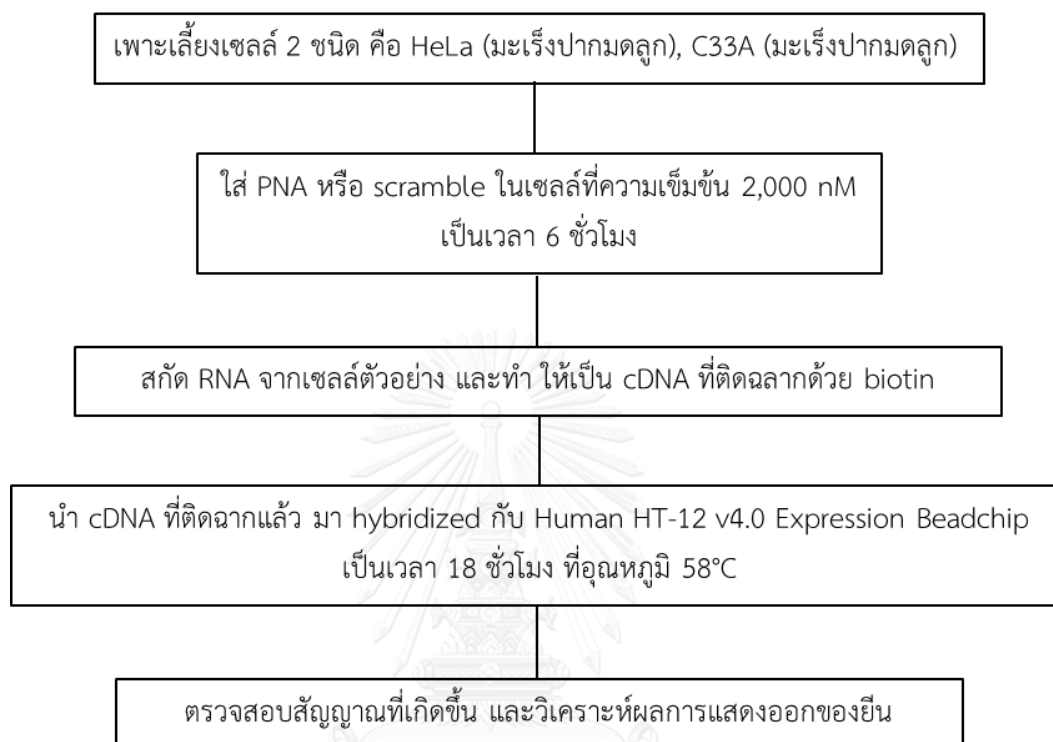
- PNAs-A15 สามารถลดการแสดงออกของยีนที่มี A-repeats และสามารถใช้รักษามะเร็งปากมดลูกได้

กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



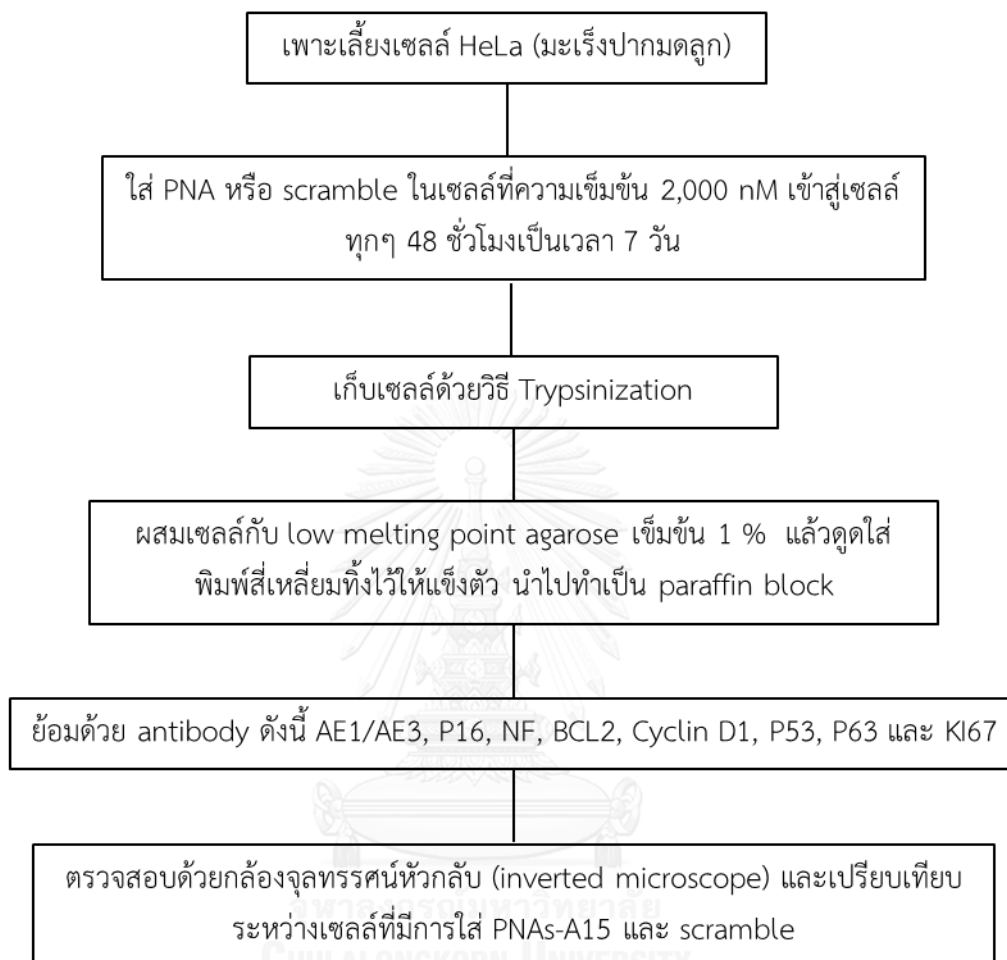
รูปที่ 2 แผนผังกรอบความคิดในงานวิจัย

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนมด้วยวิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip



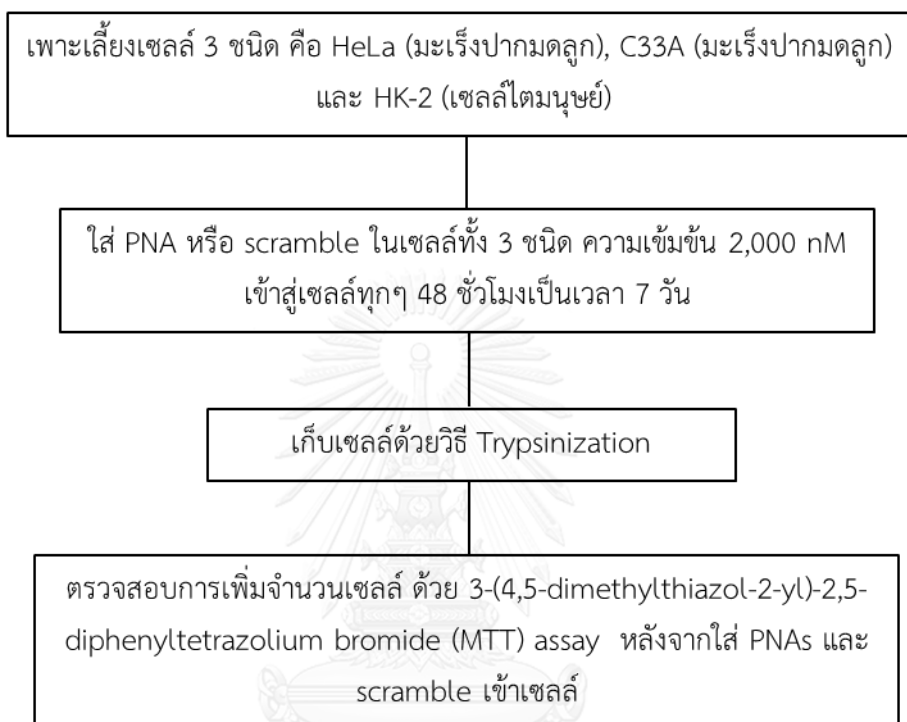
รูปที่ 3 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 1

2. immunocytochemistry



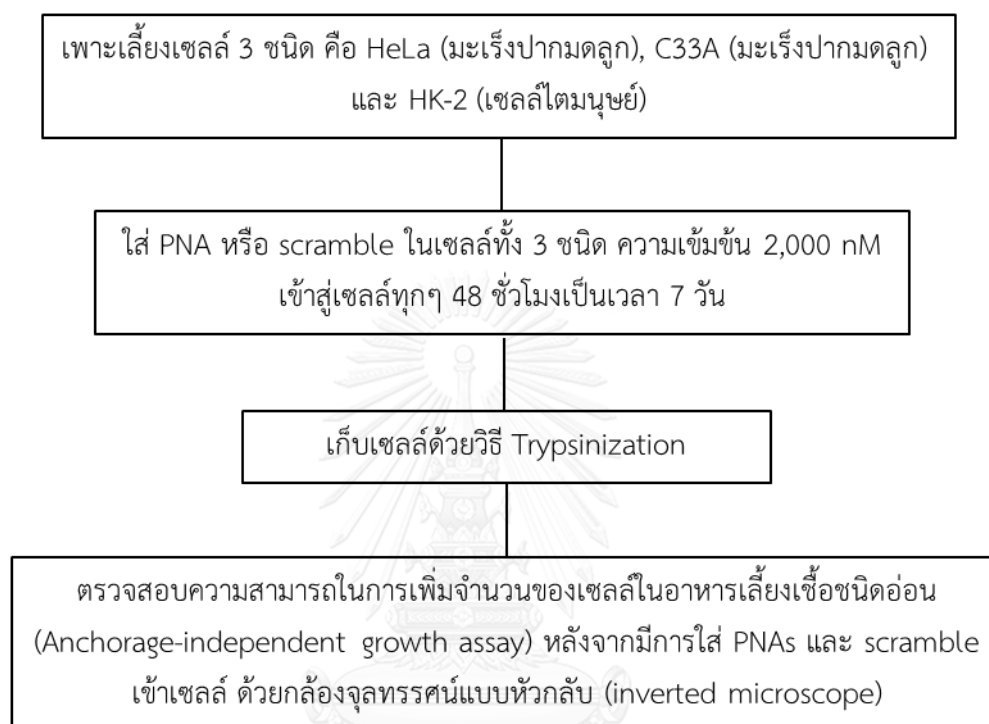
รูปที่ 4 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 2

3. การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation assay) ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หลังจากใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์



รูปที่ 5 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 3

4. การศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อน (Anchorage-independent growth assay) หลังจากมีการใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์



รูปที่ 6 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยของการทดลองที่ 4

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็ง (cancer)

มะเร็งคือโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ในร่างกาย เนื่องจาก DNA ทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนรวดเร็วผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมได้และมีจำนวนมากกว่าปกติ สามารถลุกลามและแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงหรือเซลล์ที่อยู่ไกล มีการเจริญเติบโตไม่เป็นระเบียบ ส่งผลให้อวัยวะในร่างกายไม่สามารถทำงานได้ปกติ เป็นสาเหตุให้เสียชีวิต ซึ่งลักษณะสำคัญของมะเร็ง (hallmark of cancer) แตกต่างจากเซลล์ปกติ 10 ข้อ (16) คือ

1. สามารถต่อต้านโปรแกรมการตายของเซลล์ (Apoptosis)
2. มีจีโนมไม่เสถียร (Genome instability) และเกิดการกลายพันธุ์ได้ (mutation)
3. ส่งเสริมสัญญาณการเพิ่มจำนวน (proliferation)
4. สามารถหลีกเลี่ยงตัวยับยั้งการเจริญเติบโตได้ (growth suppressors)
5. ส่งเสริมให้เกิดการอักเสบของเนื้องอก
6. ส่งเสริมการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis)
7. กระตุ้นให้เกิดการบุกรุก (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis)
8. ยับยั้ง cellular metabolism ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
9. สามารถหลีกเลี่ยงการทำลายจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunity)
10. สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด (immortalization)

สาเหตุของโรคมะเร็งเกิดได้ทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมและเกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยกระบวนการที่เซลล์มีความผิดปกติจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งต้องผ่านหลายขั้นตอน มะเร็งจึงเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลายยีน ลักษณะของเซลล์มะเร็งต่างจากเซลล์ปกติ ได้แก่ มี

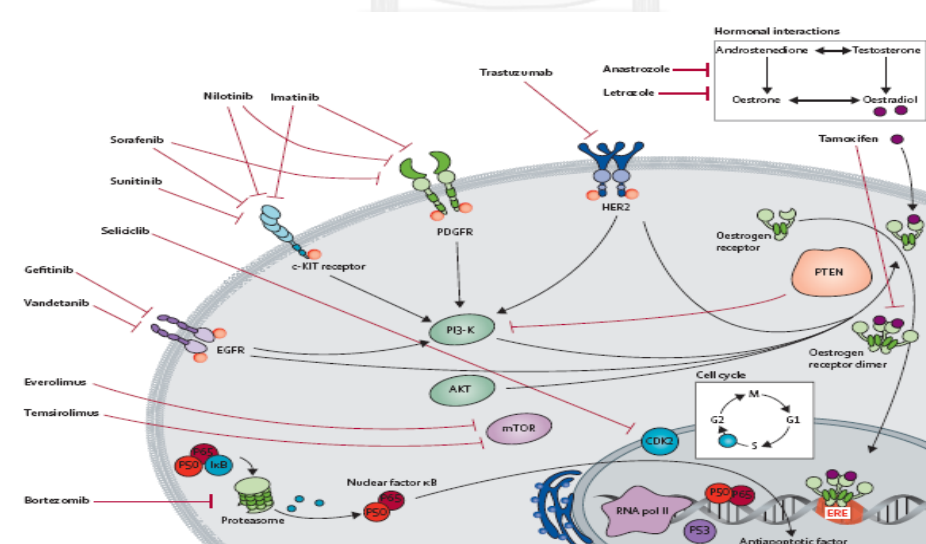
นิวเคลียสขนาดใหญ่ มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน และแตกต่างจากเซลล์ปกติ มีการเจริญซ้อนทับกันอย่างไม่เป็นระเบียบ ไม่มีขอบเขตที่แน่นอน

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer)

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในทั่วโลก รองลงมาจากมะเร็งเต้านม จากการสำรวจใน 187 ประเทศทั่วโลกพบว่ามีอัตราการเกิดโรคเพิ่มขึ้น 0.6% ทำการสำรวจตั้งแต่ปี 1980-2010 โดยปี 2010 มีผู้เป็นมะเร็งปากมดลูกทั้งสิ้น 453,970 ราย แบ่งออกเป็น ในประเทศที่กำลังพัฒนา พบ 34 % ในผู้หญิงอายุ 15-59 ปี และ 42 % ในผู้หญิงอายุ 50 ปีขึ้นไป และในประเทศที่พัฒนาแล้ว พบ 10% ในผู้หญิงอายุ 15-59 ปี และ 14 % ในผู้หญิงอายุ 50 ปีขึ้นไป ซึ่งในประเทศไทยพบมะเร็งปากมดลูกในหญิงไทยอายุประมาณ 35-60 ปี มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นสูงอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี (2, 17)สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคคือ เกิดจากการติดเชื้อ human papilloma virus หรือ HPV (18, 19) บริเวณปากมดลูก จากการมีเพศสัมพันธ์ เมื่อเชื้อไวรัสเข้าไปที่ปากมดลูก จะทำให้ปากมดลูกมีการเปลี่ยนแปลงจนนำไปสู่การเป็นมะเร็งปากมดลูก นอกจากการติดเชื้อ human papilloma virus ยังมีอีกหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เช่น เกิดจากพันธุกรรม มีบุตรหลายคน มีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุน้อย มีคู่นอนหลายคน มีประวัติการเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กินยาคุมกำเนิด เป็นต้น ซึ่งอาการของมะเร็งปากมดลูก พบว่ามีเลือดทางช่องคลอด มีตกขาวผิดปกติ มีกลิ่นเหม็น หรือมีเลือดออกเวลามีเพศสัมพันธ์ ถ้าเป็นในระยะลุกลามอาจมีอาการอาการปวดหลังได้ เนื่องจากมีการกดทับเส้นประสาท มีเลือดปนในปัสสาวะและอุจจาระ

Targeted therapy

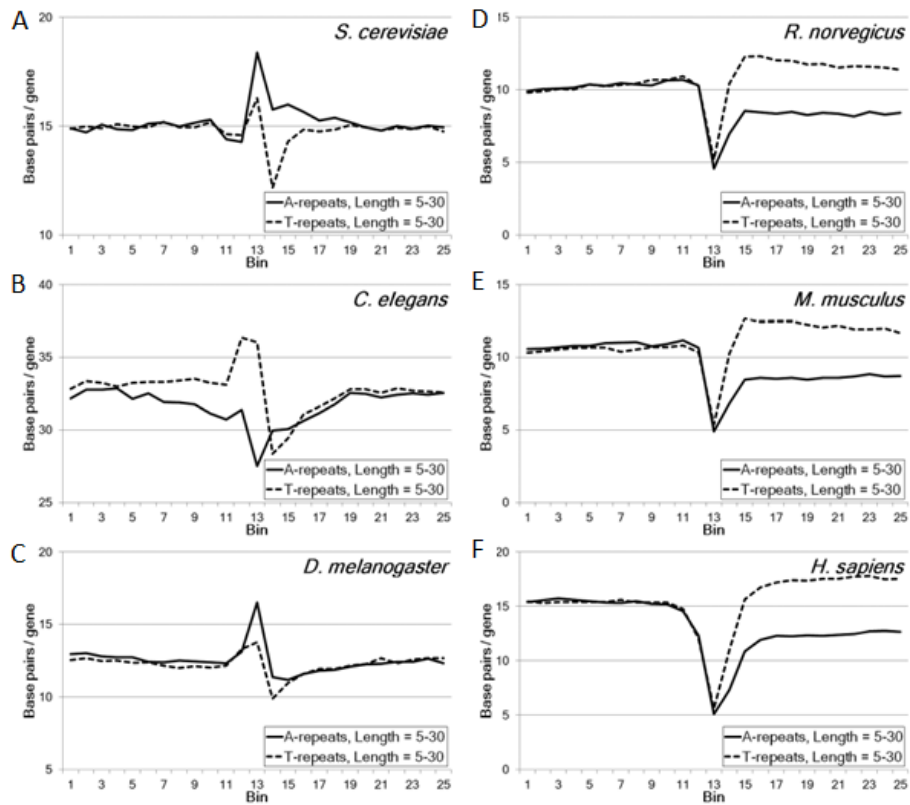
Targeted Therapy หรือ การรักษาแบบเจาะจงไปยังเป้าหมายที่เป็นเซลล์มะเร็ง ไม่ทำลาย เซลล์ปกติอื่นๆในร่างกาย โดยจะไปยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการ เจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ชัดขวางการพัฒนาหลอดเลือดของเนื้องอก ส่งเสริม การตายของเซลล์มะเร็ง (Apoptosis) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่จะทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งการรักษา โรคมะเร็งด้วย Targeted therapy จะมีการระบุเป้าหมายที่มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งดังรูปที่ 7. จากนั้นจึงออกแบบโมเลกุลที่จะไปรบกวนความสามารถในการส่งเสริมการ เจริญเติบโตหรือการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ซึ่ง targeted therapy แต่ละตัวจึงมีกลไกการออกฤทธิ์ ที่แตกต่างกัน เช่น hormone therapies, signal transduction inhibitors, gene expression modulator, apoptosis inducer, angiogenesis inhibitor, immunotherapies และ toxin delivery molecules ในปัจจุบันมี targeted therapy หลายตัวที่ได้รับการยอมรับจากองค์การ อาหารและยาของประเทศอเมริกา (US FDA) (7-9)



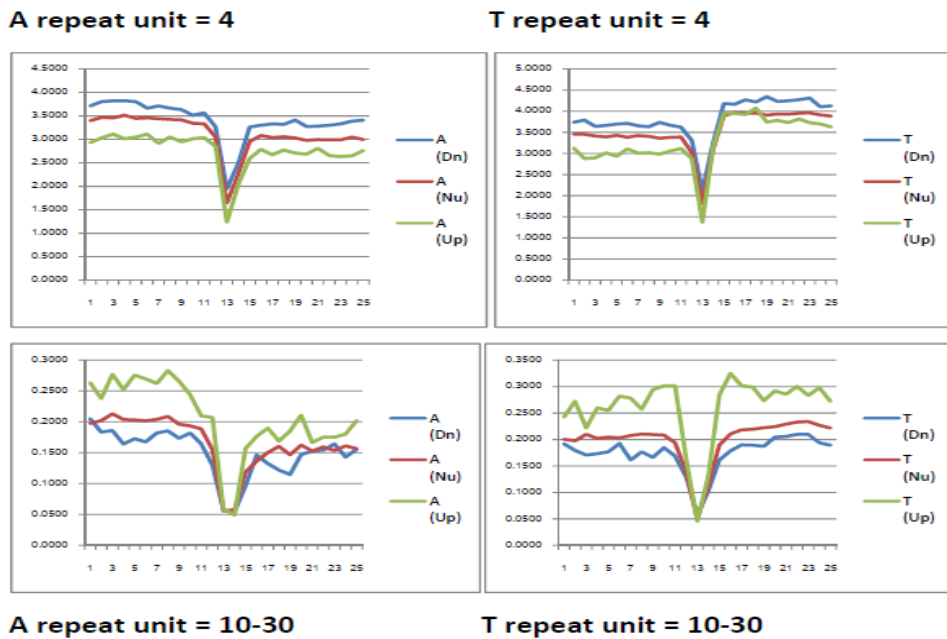
รูปที่ 7 จากรูปแสดงกลไกการควบคุมยีนต่างๆในร่างกายซึ่งนำมาใช้ในการกำหนดเป้าหมายในการ รักษาโรคมะเร็งด้วย Targeted Therapy (20)

A- และ T-repeats

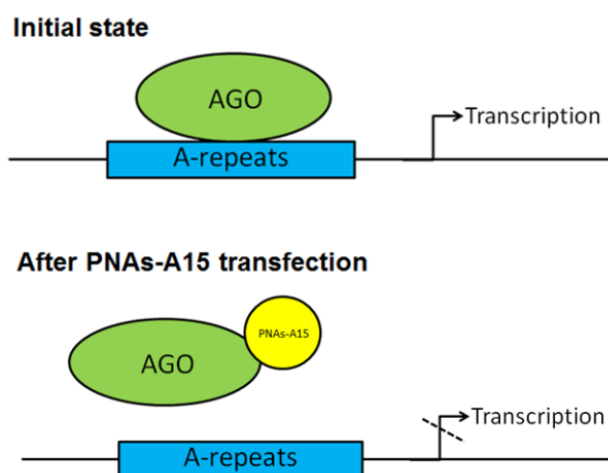
A- และ T-repeats เป็น Mononucleotide repeats หรือลำดับเบสเพียงเบสเดียว (A, T, C, หรือ G) ที่เรียงต่อกันเป็นสาย (11) ซึ่งในอดีตไม่ทราบหน้าที่หรือความสำคัญของ Mononucleotide repeats (21) ต่อมาพบว่า Mononucleotide repeats ที่เป็น A-repeats ซึ่งอยู่บริเวณ upstream ของ transcription start sites (TSSs) เกี่ยวข้องกับการควบคุมแบบ cis-regulatory ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยควบคุมผ่าน DICER1 และ Argonaute proteins (12) ซึ่งจะพบ A-repeats ที่บริเวณ upstream มากกว่าที่บริเวณ downstream ของ TSSs โดยความสามารถนี้สามารถตรวจพบได้ใน 3 จีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ R. norvegicus, M. musculus, และ H. sapiens แสดงในรูปที่ 8. (12) และพบว่า A-และ T-repeats สายยาว (10 to 30 bp) จะพบมากใน human housekeeping genes ต่างจาก A- และ T-repeats สายสั้น (2 to 9 bp) ที่พบมากใน tissue-specific gene (12) และนอกจากนี้ A-repeats ยังสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนให้แสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งได้ดังรูปที่ 9. โดย Argonaute protein จะไปจับกับ A-repeats ที่บริเวณ upstream ของ TSS แล้วทำให้เกิดการ transcription ดังรูปที่ 10. อย่างไรก็ตามการทำงานของ A- และ T-repeats ส่วนใหญ่นั้นยังไม่เป็นที่รู้จัก



รูปที่ 8 จากรูปแสดงการกระจายของ A- และ T-repeats รอบ TSSs โดย (A-F) แสดงการกระจายของ A- และ T-repeats ความยาว 5-30 bp รอบ TSSs ในทั้งจีโนม แขนงอนประกอบด้วย 25 bin แกนตั้ง คือจำนวนของ A-repeats ต่อยีน (12)



รูปที่ 9 จากรูปแสดงการกระจายของ A- และ T-repeats สายสั้น (4 bp) สายยาว (10-30 bp) รอบ TSSs ในมะเร็งปากมดลูก (GSE9750) โดยแกนนอนประกอบด้วย 25 bin แกนตั้ง คือจำนวนของ A- และ T-repeats ต่อยีน (Aporntewan, personal communication)

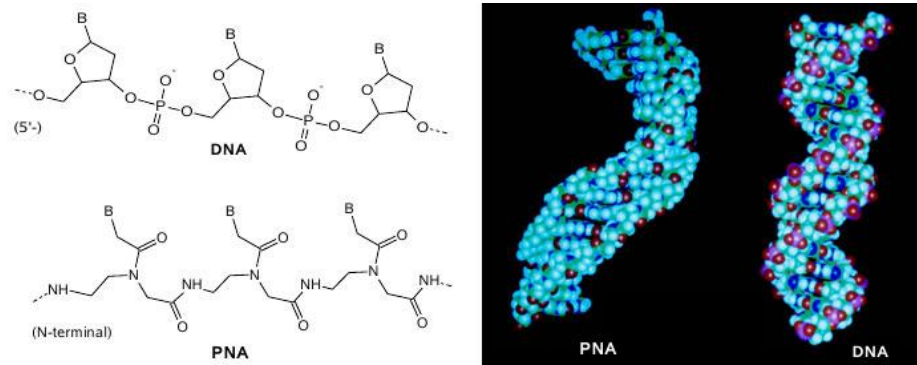


รูปที่ 10 จากรูปแสดงการจับของ Argonaute protein ที่ A-repeats บริเวณ upstream ของ TSS (12)

PNAs-A15

Peptide nucleic acid หรือ PNAs ซึ่งเกิดจากการแทนที่หมู่ น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตใน DNA ด้วย N-(2-AMINOETHYL)-glycine เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ โดยชนิดของเบสในโมเลกุลของ PNA ยังคงเหมือนกับ DNA ในธรรมชาติ สามารถยึดจับกับ DNA อย่างแน่นหนาและมีความจำเพาะสูง ซึ่งการจับกันระหว่าง PNA และ DNA นั้นจะไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาย DNA มีความเสถียรมากกว่าการจับกันระหว่าง DNA และ DNA ตามธรรมชาติด้วยตัวเอง เนื่องจาก PNA เป็นสาย polypeptide ที่ไม่มีประจุ และยังทนทานต่อการย่อยสลายโดย nucleases (รูปที่ 11) แสดงโครงสร้างของ PNA ซึ่งข้อได้เปรียบเหล่านี้จึงมีการพัฒนา PNAs มาใช้ในงานด้านต่างๆทั้งในงานด้านเคมี ชีววิทยา และในงานด้านการแพทย์ เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว ใช้ในการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรม ใช้ในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการกลายพันธุ์ (13-15) โดยใน

งานวิจัยนี้จะใช้ PNAs ที่ออกแบบให้มีลำดับเป็น A-repeats ความยาว 15 bp เพื่อไปกีดการทำงาน
ของ A-repeats ในเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 12



รูปที่ 11 สูตรโครงสร้างของ PNAs (<http://supernovacondensate.net/2012/04/21/could-life-be-any-sweeter/>)

CATGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTACG

รูปที่ 12 PNAs-A15

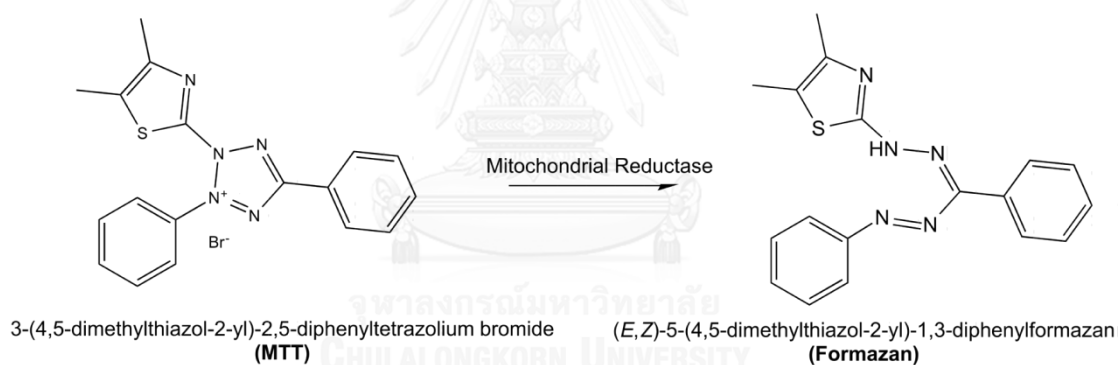
เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

Cell culture

Cell Culture หรือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ คือการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ในหลอดทดลอง โดยจะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และใช้อาหารสังเคราะห์ (Medium) ที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเทคนิคที่สำคัญของงานวิจัยในปัจจุบันเช่น การศึกษาชีววิทยาของเซลล์ (Cell Biology) การศึกษาโครโมโซมของเซลล์ (Cytogenetics) การศึกษาการแสดงออกของยีน (Gene Expression) การศึกษาผลของสารเคมีต่อเซลล์ (Toxicology) และการศึกษาการสร้างโปรตีนของเซลล์ (Protein synthesis) เป็นต้น (22, 23)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

การทำ MTT assay เป็นการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ด้วยการวัด metabolic activity ภายในเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง การวัดสภาวะ reduction environment ของ mitochondria ในเซลล์ จะเกิดขึ้นเมื่อ MTT ที่ปกติจะมีสีเหลือง ถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase (mitochondrial succinate dehydrogenase) สีของ MTT จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงของ formazan มีลักษณะเป็นผลึกตั้งรูปที่ 13. ซึ่งจะนำผลึกนี้ไปละลายด้วย DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย (24, 25)

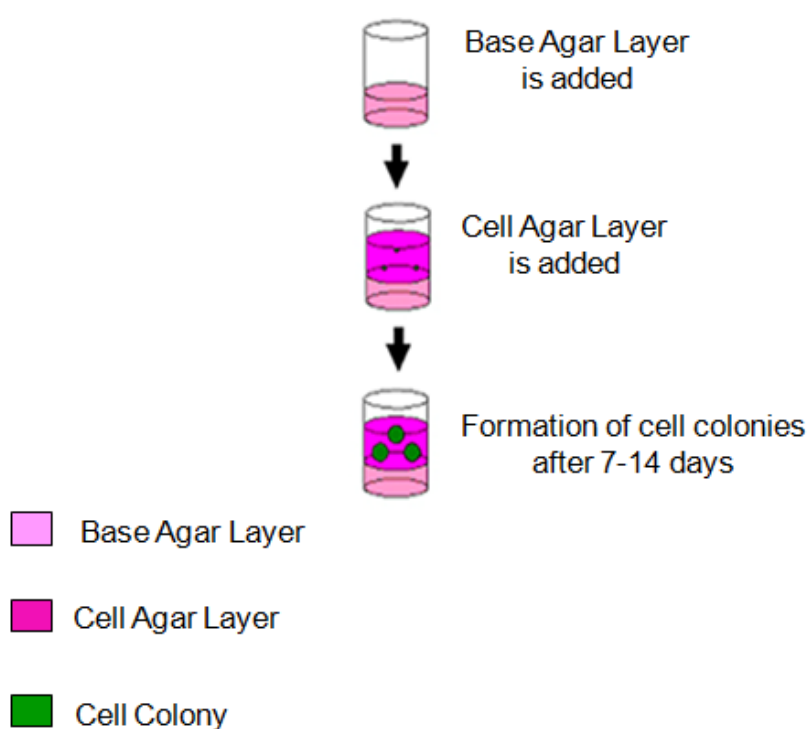


รูปที่ 13 สูตรโครงสร้างของ MTT และ formazan (https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)

Anchorage independent growth assay in soft agar

จากคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งที่สามารถเจริญซ้อนทับกัน เจริญโดยไม่ต้องอาศัยที่ยึดเกาะ เกิดจากการการสูญเสีย contact inhibition ทำให้เซลล์เจริญเป็นกลุ่มก้อนซ้อนทับกันและไม่ต้องอาศัยความสามารถในการยึดเกาะ จึงมีการพัฒนาวิธีการเพื่อตรวจสอบคุณสมบัตินี้ของเซลล์มะเร็งที่มีชื่อว่า Anchorage independent growth assay โดยเซลล์ที่ต้องการตรวจสอบจะลอยอยู่ในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับวุ้นหรือ Agar เพื่อให้มีคุณสมบัติกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งเซลล์ปกติจะไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ได้ โดยสามารถวัดปริมาณการแพร่กระจาย (cell proliferation) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ได้หลังจาก 7-14 วัน ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับเพื่อนับโคโลนีที่เกิดขึ้น (26, 27) รูปที่ 14.



รูปที่ 14 ขั้นตอนของ Soft agar assay for colony tumor formation

(<http://www.cellbiolabs.com/96-well-cell-transformation-assays-standard-soft-agar>)

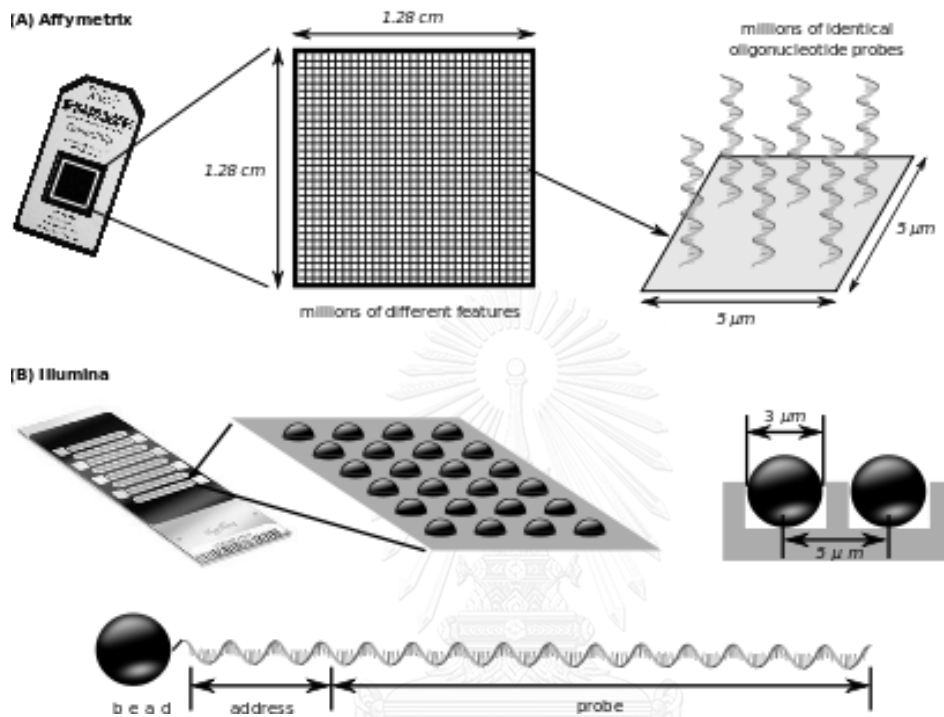
Immunocytochemistry

Immunocytochemistry เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบ antigen ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อาจอยู่บนผิวเซลล์ ภายในเซลล์ หรือ นิวเคลียส โดยใช้ antibody ซึ่งจำเพาะต่อ antigen นั้น โดยที่ antibody จะมี enzyme เชื่อมติดอยู่เพื่อใช้แทนสารเรืองแสง เมื่อหยด Chromogen (DAB) enzyme จะทำปฏิกิริยากับ substrate (H_2O_2) ปรากฏสีตรงตำแหน่งที่มี antibody ไปจับอยู่กับ antigen สามารถตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้ วิธี Immunocytochemistry จะเป็นการตรวจสอบ antigen ในเซลล์ ซึ่งจะมีหลักการคล้ายกับวิธี Immunohistochemistry ที่ตรวจสอบ antigen ในเนื้อเยื่อ ที่มาจากการแช่แข็งหรือการเก็บด้วยวิธีทางเคมีหรือฝังอยู่ในพาราฟิน ซึ่งวิธี Immunocytochemistry จะต้องทำการแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวก่อนที่จะนำไปย้อมด้วย antibody (28, 29)

Microarray

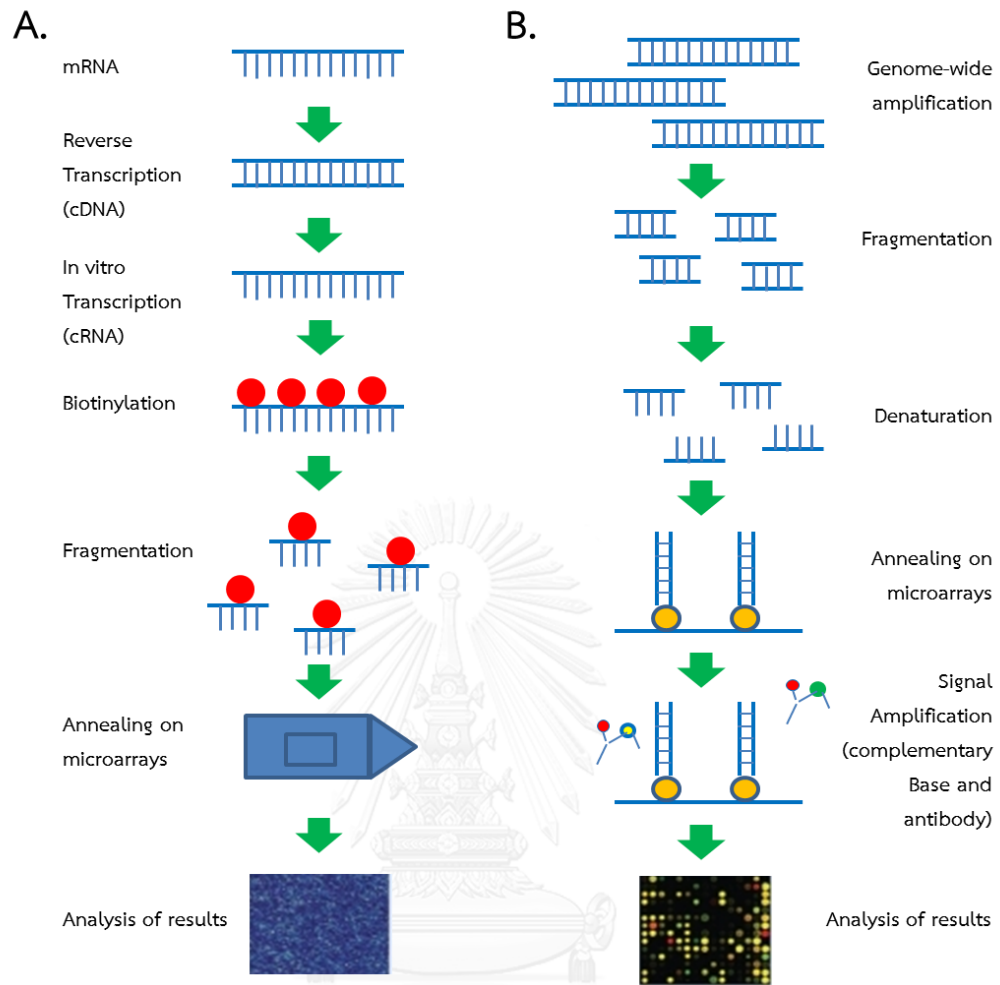
Microarray เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของยีนหลายยีนในเวลาเดียวกัน สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ ระดับการทำงานหรือระดับการแสดงออกของยีน การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนยีนบนโครโมโซม และการกลายพันธุ์ โดยหลักการทำงานจะเกี่ยวข้องกับการจับกันของสาย DNA (hybridization) ด้วยพันธะ hydrogen bonds ระหว่างเบสคู่สม เริ่มจากการนำ mRNA ที่สนใจมาติดฉลากด้วยสี จากนั้นนำมาจับกันกับ DNA ที่อยู่บน chip เรียกว่า DNA chip (Affymetrix) ซึ่งเป็นตัวแทนของยีนทุกๆยีนที่เราทราบของมนุษย์ แล้วอ่านผลและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Micro array นอกจาก Affymetrix array แล้ว ยังมีอีกแบบหนึ่งที่เรียกว่า BeadArray หรือ illumina array ซึ่งมีหลักการทำงานคล้ายกับ Affymetrix array แต่ต่างกันตรงที่ใช้ Bead แทน DNA chip ซึ่ง Bead ที่มี DNA ที่ผ่านการ

hybridization แล้วจะหยดลงหลุมบนแผ่น Silicon wafer เพื่อนำไปวิเคราะห์ (30, 31) รูปที่ 15 และ 16.



รูปที่ 15 (A) ลักษณะของ chip ที่ใช้ใน Affymetrix array (B) ลักษณะของ Bead ที่ใช้ใน illumina array

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Affymetrix_GeneChip_and_Illumina_BeadChip_designs.svg)



รูปที่ 16 ขั้นตอนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนม (A) Affymetrix array (B) illumina array (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047903/pdf/jaa-3-107.pdf>)

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. ตู้แช่แข็ง -20°C และ -80°C (Revco, Japan)
2. ตู้เย็น (Misubishi, Japan)
3. ตู้อบ (incubator) (Mettler, Germany)
4. ตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO_2 (Shel lab, USA)
5. ตู้ปลอดเชื้อ class II (laminar flow cabinet) (Gelman sciences, Singapore)
6. ตู้ดูดควัน (fume hood) (S.K.Powerrable, Thailand)
7. เครื่องให้ความร้อน (heat block) (Bockel, UK)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettler, Germany)
9. ชั่งวางปิเปตต์ (Mondotech, Thailand)
10. ไมโครปิเปตต์ขนาด P2, P20, P200 และ P1,000 (Eppendorf, Germany)
11. ปิเปตต์บอย (Tecnomara, Switzerland)
12. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (microcentrifuge) (Boeco, Germany)
14. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nano drop) (Thermo Scientific, USA)

15. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirrer) (Labtech, Korea)
16. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (thermal cycler) (Eppendorf, Germany)
17. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Denver Instrument, USA)
18. เครื่องเขย่าสาร (vortex) (Scientific industries, USA)
19. เครื่องชั่งดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
20. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultrapure water type I) (Millipore, France)
21. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ในสภาพจริง (real-time PCR) (Applied Biosystems, UK)
22. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
23. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
24. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (Bio-RAD, USA)
25. UV transilluminator (Fotodyne, USA)
26. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 และ T75 (Corning, USA)
2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml, 500ml, 1,000ml และ 2000 ml (Pyrex, USA)
3. ขวดดูเรนขนาด 50 ml, 100ml, 250ml, 500ml และ 1,000 ml (Duran, Germany)
4. งานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม, 12 หลุม, 24 หลุม และ 96 หลุม (Costar, USA)
5. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) (Boeco, Germany)
6. Cryovial tube (Corning, USA)
7. กระบอกตวงขนาด 100ml และ 1000 ml (Witeg, USA)
8. กระจกปิดสไลด์ (Chance, UK)
9. ซ้อนตักสาร
10. กระดาษฟลอยด์ (Aro, China)
11. กล่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Nalgene labware, USA)
12. ถาดเตรียมเจลพร้อมหัว (Bioer, China)
13. หลอดขนาด 0.2 ml, 0.5ml และ 1 ml (Bio-RAD Elkay, USA)
14. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml และ 50 ml (Elkay, USA)
15. ทิปขนาด 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Gilson, France)

16. ถุงมือยางพารา (Handpro, Thailand)

17. แม่เหล็ก (Agimatic-e, China)

18. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)

19. พลาสติกสำหรับห่อ (Diamond, USA)

20. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)

21. ฟอ์เซป (Forcep)

22. แท่นวางหลอด (rack) (Autopack, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

1. Diethylpyrocaronate (DEPC) (Sigma, USA)

2. Absolute ethanol (Merck, Germany) วิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)


4. Bromophenol blue (USB, Germany)

5. Choroform (Meack, Germany)

6. Agarose (Cambrex, USA)

7. EDTA (USB, Germany)

8. Ethidium bromide (Gibco BRL, Scotland)

9. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
 10. Isopropanol (VWR, France)
 11. Nuclease free water (Fermentas, Canada)
 12. Trypan blue (Sigma, USA)
 13. SYBR green I Nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
 14. Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) (Omnipur, Germany)
 15. 50 base pair DNA ladder (Promega, USA)
 16. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
 17. Phenol (USB, USA)
 18. Sodium chloride (Merck, Germany)
 19. Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 

2. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, USA)
2. Trypsin EDTA (Gibco, USA)
3. Trypan blue (Gibco, USA)
4. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)

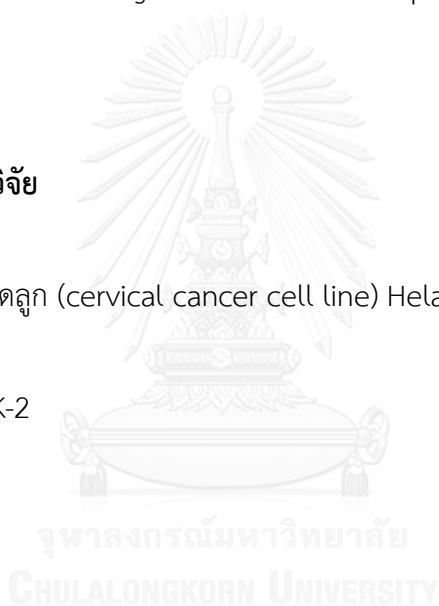
5. Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, USA)
6. Anti-anti (100x) antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)
7. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA).

3. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

1. TargetAmp-Nano Labeling Kit for Illumina Expression BeadChip (EPICENTRE, Madison, USA)

4. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

1. เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer cell line) Hela และ C33A
2. เซลล์ไตมนุษย์ HK-2



วิธีดำเนินงานวิจัย

เพื่อทดสอบว่า PNAs สามารถกีดการแสดงออกของยีนในมะเร็งปากมดลูกจะแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองย่อยดังนี้

1. การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation assay) ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หลังจากใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์ (32)
2. การศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อน (Anchorage independent growth assay in soft agar) หลังจากมีการใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์ (33)
3. immunocytochemistry (34)
4. การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนมด้วยวิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (35)

การออกแบบ PNAs-A15

ออกแบบ PNAs ที่ประกอบด้วยเบส A เรียงต่อกันที่มีความยาว 15 bp (PNAs-A15) และสังเคราะห์โดย PANAGENE (<http://www.panagene.com>)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

นำเซลล์ที่ใช้ในการทดลองมาเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum 10% ใน flask บ่มตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยเซลล์ที่ใช้ใน

งานวิจัยนี้คือ HeLa cells (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) C33A cells (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ HK-2 cells (เซลล์ไต)

การนำ PNAs-A15 เข้าสู่เซลล์

นำเซลล์ทั้ง 3 ชนิดมาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 5,000 cells/well และทำการใส่ PNAs และ scramble (ตัวควบคุมที่มีลำดับเบสอื่นไม่สามารถจับกับ DNA หรือโปรตีนในเซลล์ได้) เข้าสู่เซลล์ที่ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 nM ปริมาตร 500 μ l เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำ 1) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 2) Anchorage-independent growth assay 3) Immunocytochemistry และ 4) HumanHT-12 v4 Expression BeadChip โดยดูจากรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนไป พร้อมทั้งเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ 2,000 nM

การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation assay) ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หลังจากใส่ PNAs และ scramble เข้าสู่เซลล์

เก็บเซลล์ที่มีการใส่ PNAs-A15 และ scramble ความเข้มข้น 2,000 nM เข้าสู่เซลล์ทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธี trypsinization จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) จำนวน 5,000 cells/well ปริมาตร 100 μ l จากนั้นที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บเซลล์ทั้งหมดมาวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้ว เติมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5 mg/ml ลงไปหลุมละ 100 μ l บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะเกิดเป็นตะกอนสีม่วงขึ้น ดูดสารละลาย MTT ที่งและละลายตะกอนด้วย DMSO 100 μ l แล้ววัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ยี่ห้อ ASYS รุ่น UVM 340 และใช้โปรแกรม Galapagos

การศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อน (Anchorage-independent growth assay) หลังจากมีการใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์

เก็บเซลล์ที่มีการขนส่ง PNAs และ scramble ความเข้มข้น 2,000 nM เข้าสู่เซลล์ทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วันด้วยวิธี trypsinization จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในภาชนะหลอดเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) โดยชั้นแรกจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับวุ้น (agar) เข้มข้น 0.5% ไม่มีเซลล์ อยู่ในชั้นนี้ ปริมาตร 500 μ l และชั้นที่ 2 จะประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่มีการขนส่ง PNAs และ scramble เข้าสู่เซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 1,000 cells/well และวุ้น (agar) ที่ความเข้มข้น 0.2% ปริมาตรรวม 300 μ l จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อหล่อด้านบนเพื่อไม่ให้ชั้นที่ 2 แห้ง แล้วนำภาชนะหลอดเลี้ยงเซลล์นี้ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลาจึงนำมานับจำนวนโคโลนีมีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope)

Immunocytochemistry

เก็บเซลล์ที่มีการขนส่ง PNAs และ scramble ความเข้มข้น 2,000 nM เข้าสู่เซลล์ทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วันด้วยวิธี trypsinization ล้างด้วย PBS แล้วปั่นตกที่ 500 g จำนวน 2 ครั้ง แล้วใส่ low melting point agarose เข้มข้น 1 % ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากันจากนั้นดูดใส่พิมพ์สี่เหลี่ยมทิ้งไว้ให้แข็งตัว นำไปทำเป็น paraffin block แล้วตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนา 3-4 microns แล้วจึงนำไปย้อมด้วย antibody ดังนี้ AE1/AE3, P16, BCL2, Cyclin D1, P53, P63 และ KI67 จากนั้นนำมาถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) และเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่มีการใส่ PNAs-A15 และ scramble

การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนมด้วยวิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี microarray จะใช้วิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip ซึ่งจะมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมเซลล์

นำเซลล์ HeLa และ C33A มาเพาะเลี้ยงในภาชนะหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ตั้งต้นประมาณ 150,000 cells/well และทำการใส่ PNAs และ scramble ที่ความเข้มข้น 2,000 nM ปริมาตร 1,500 μ l บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เมื่อครบ 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ด้วยวิธี trypsinization

2. การสกัด RNA

นำเซลล์ที่เก็บได้มาสกัด RNA ด้วยวิธี Trizol และประเมินความสมบูรณ์และความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง nanodrop และ Agilent 2100 Bioanalyzer

3. การติดฉลากและการทำให้บริสุทธิ์

นำ RNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และมาทำให้เป็น cRNA ที่ติดฉลากด้วย TargetAmp-Nano Labeling Kit for Illumina Expression BeadChip เริ่มจากการนำ RNA ที่สกัดได้ 500 ng มาเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ T7 oligo (dT) primer และสังเคราะห์ Second-strand cDNA ในหลอดทดลองจากนั้นติดฉลากด้วย biotin-NTP แล้วนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง NanoDrop

4. การ Hybridization และการรายงานผล

นำ cRNA ที่ติดฉลากมา hybridized กับ Human HT-12 v4.0 Expression Beadchip ที่อุณหภูมิ 58°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้ Amersham fluorolink streptavidin-Cy3 (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK) ในการตรวจจับสัญญาณด้วยเครื่อง Illumina

bead array Reader confocal scanner และใช้โปรแกรม Illumina GenomeStudio v2011.1 (Gene Expression Module v1.9.0) เพื่อวิเคราะห์ผลการแสดงออกเป็นข้อมูลดิบ

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นการวัด metabolic activity ภายในเซลล์ที่มีชีวิต ที่ค่าการดูดกลืนแสง 570 nm และใช้ Paired t-test analysis เพื่อทดสอบความแตกต่างหรือเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมใช้สำหรับการทดสอบข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบปกติ (Normal Distribution)
2. Anchorage-independent growth assay เป็นการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยการนับโคโลนีที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ และใช้ Paired t-test analysis เพื่อทดสอบความแตกต่างหรือเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมใช้สำหรับการทดสอบข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบปกติ (Normal Distribution)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อจำกัด (Limitation)

มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ A-repeats ยังไม่แพร่หลาย จึงทำให้ไม่มีข้อมูลมาสนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้มาก

ประโยชน์ที่ได้ และการประยุกต์ใช้ (Expected benefit and Application)

ในงานวิจัยนี้ เพื่อเป็นการศึกษานำร่องสำหรับการผลิตยามารักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วย

PNAs

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem)

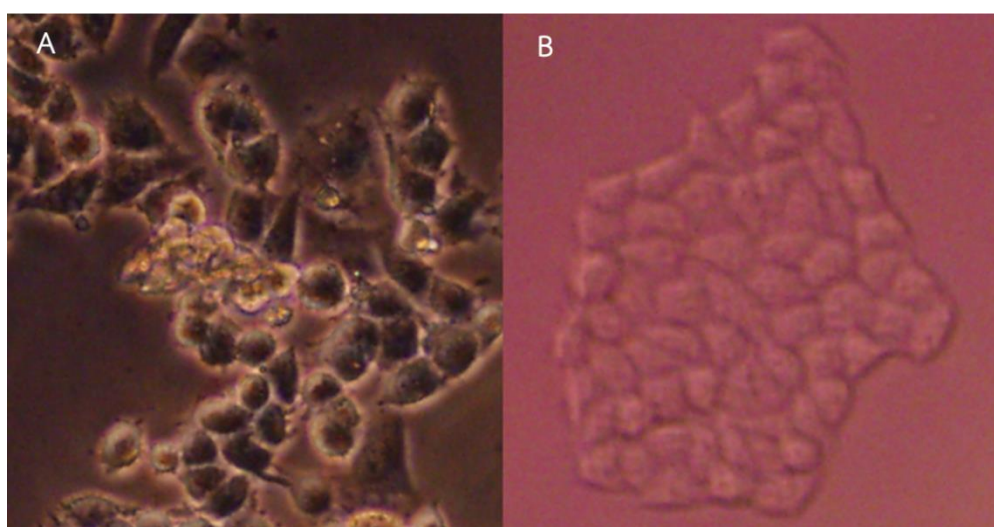
1. PNAs-A15 มีราคาแพง ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศทำให้เสียเวลาในการรอ
2. ต้องใช้เทคนิคขั้นสูงในการตรวจวิเคราะห์ผลการทดลอง เช่น เทคนิค soft agar assay for colony formation เป็นต้น



บทที่ 4

ผลการทดลอง

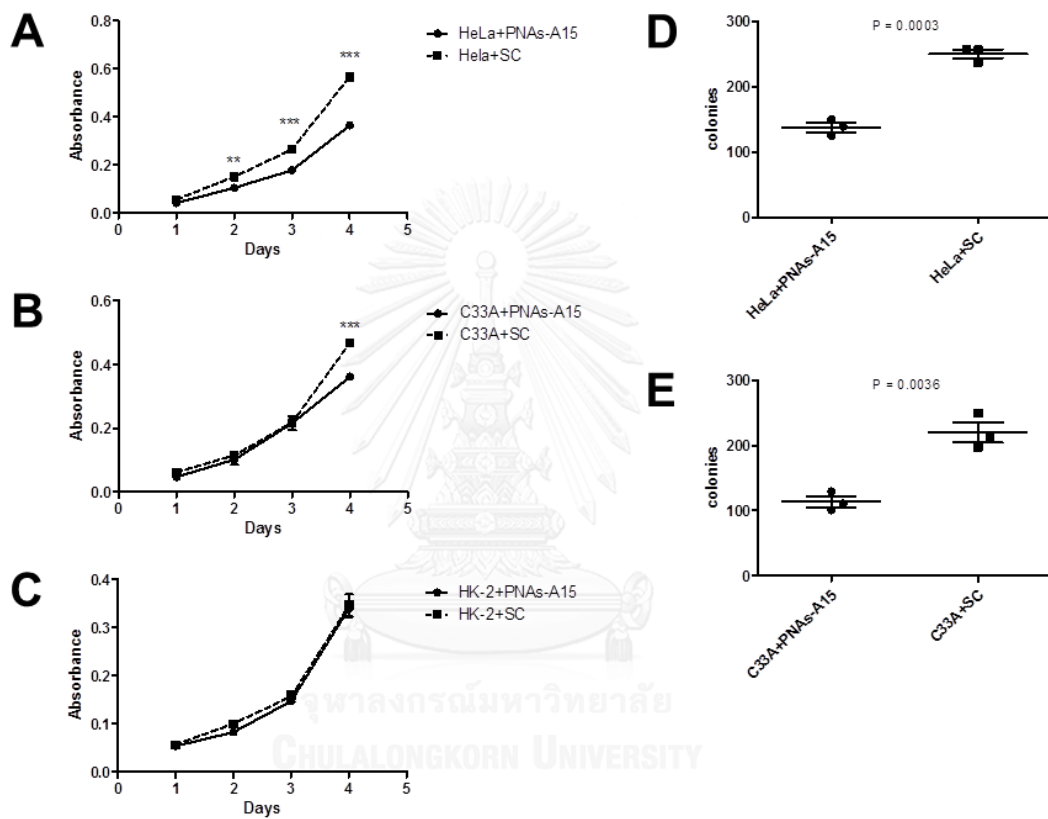
จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้โดยทำจากใส่ PNAs-A15 ที่ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 nM พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2,000 nM โดยดูจากรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง รูปที่ 17



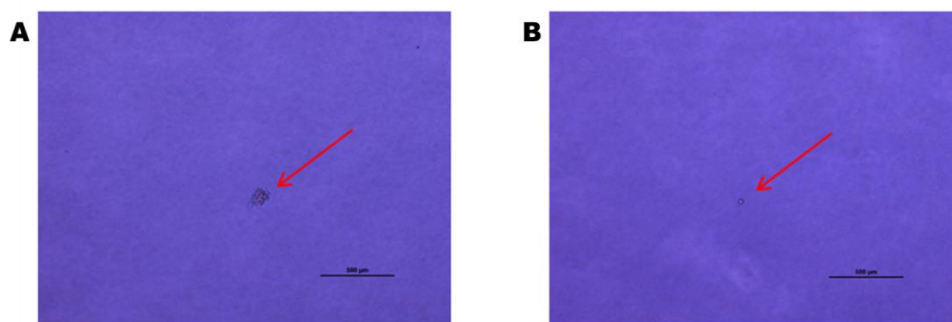
รูปที่ 17 แสดงรูปร่างของเซลล์มะเร็งปกติ (A) และเซลล์มะเร็งที่ใส่ PNAs-A15 ที่ความเข้มข้น 2000 nM (B)

จากนั้นศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferation assay) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกคือ HeLa และ C33A และเซลล์ไตของมนุษย์ HK-2 ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หลังจากใส่ PNAs และ scramble เข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 7 วัน โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า PNAs-A15 สามารถทำให้เซลล์มะเร็ง (HeLa และ C33A) มีการเพิ่มจำนวนลดลง แต่จะไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ (HK-2) (รูปที่18) และเพื่อยืนยันว่า PNAs-A15 สามารถกุดการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ จึงทำการทดสอบด้วย Anchorage independent growth assay ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อนหรือ

soft agar หลังจากมีการใส่ PNAs และ scramble เข้าเซลล์ โดยการนับจำนวน colonies ที่เกิดขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับเมื่อครบ 14 วัน ดังรูปที่ 19 ซึ่งพบว่าความสามารถในการเจริญของเซลล์มะเร็งบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอ่อนหรือ soft agar ลดลงเมื่อมีการใส่ PNAs-A15 อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 18 การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย MTT assay หลังจากใส่ PNAs-A15 เข้าเซลล์ HeLa (A) C33A (B) และ HK-2 (C) จากนั้นยืนยันผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย Anchorage independent growth assay ใน HeLa (D) และ C33A (E)

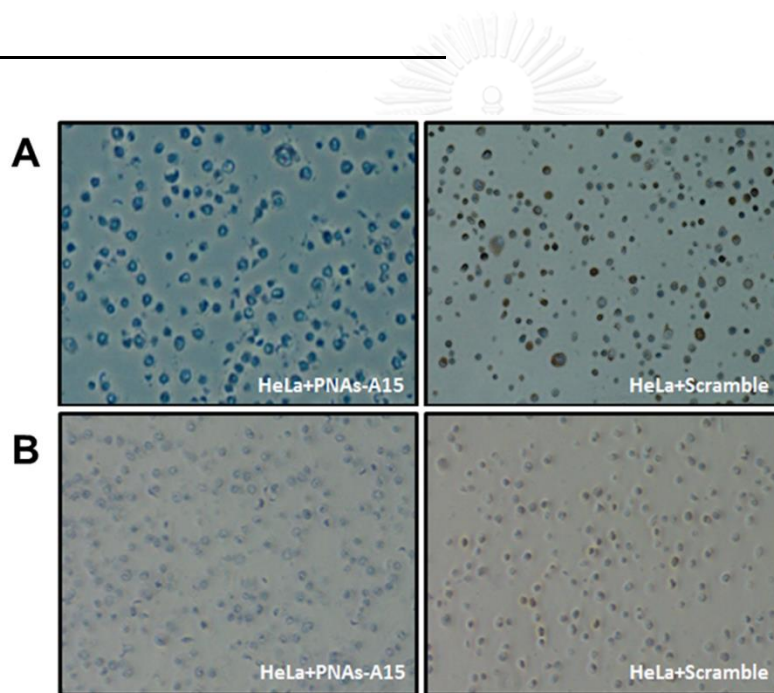


รูปที่ 19 ลักษณะของโคโลนีที่ใส่ Scramble (A) และ PNA-A15 (B) จากการทำให้ Anchorage-independent growth assay

จากการนำเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) ที่มีการใส่ PNA-A15 หรือ scramble มาศึกษาด้วยวิธี immunocytochemistry เพื่อการแสดงผลในระดับโปรตีน โดยเตรียมเซลล์ให้อยู่ใน paraffin block แล้วนำ paraffin block นี้ไปตัดด้วยเครื่อง Microtome และย้อมด้วย antibody จากนั้นเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่มีการใส่ PNA-A15 และ scramble ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1. จะพบว่าเมื่อย้อมด้วย BCL2 และ P53 จะให้ผลแตกต่างกันโดยจะให้ผลเป็นลบ (negative) ในเซลล์ที่มีการใส่ PNA-A15 แต่จะให้ผลเป็นบวก (positive) ในเซลล์ที่ใส่ Scramble รูปที่ 20. ในขณะที่การย้อมด้วย AE1/AE3, P16, Cyclin D1, P63 และ KI67 ให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่ใส่ PNA-A15 และ Scramble ดังนั้น PNA-A15 สามารถทำให้เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกลดลงได้

ตารางที่ 1 ผลการทดลอง Immunocytochemistry ของ HeLa cells.

Antibody	PNAs-A15	Scramble
Bcl2	-	++
P53	-	+
KI67	+	++
P16	+++	+++
AE1/AE3	++	+++
cyclin D1	-	-
P63	-	-

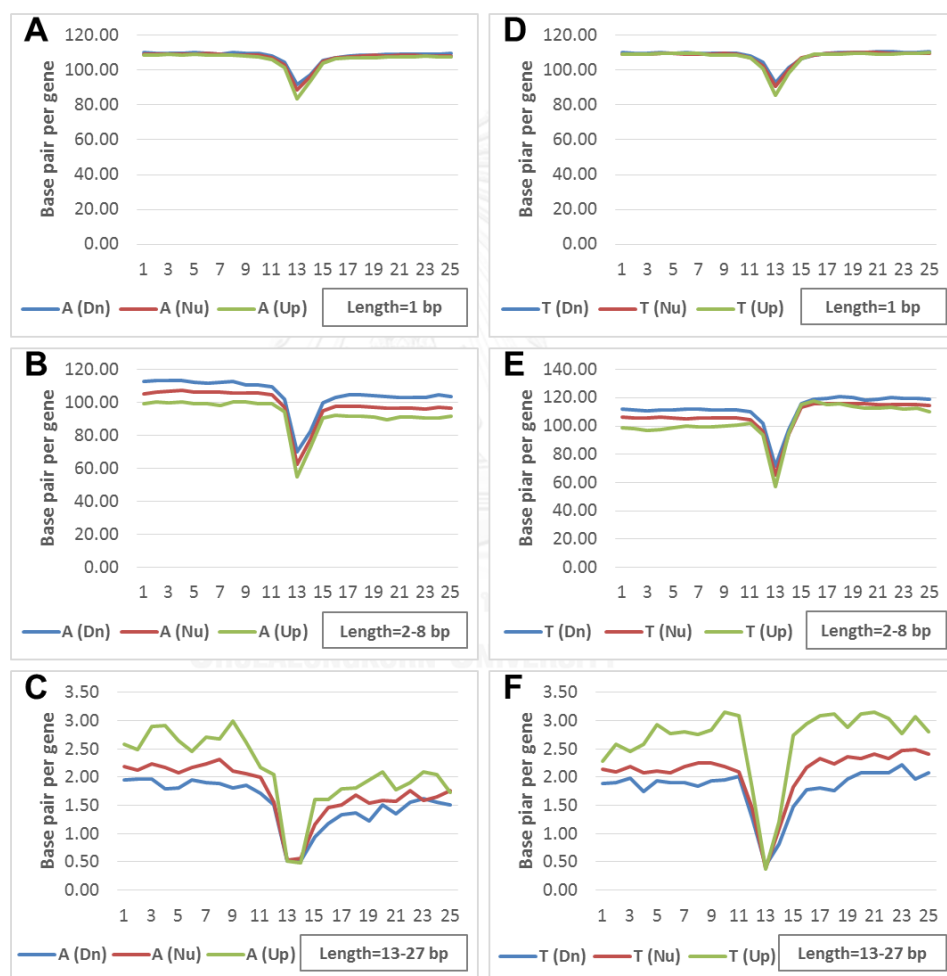


รูปที่ 20 การทำ Immunohistochemistry ด้วย BCL-2 Oncoprotein clone 124 (A) และ P53 protein clone DO-7 (B) บน cells blocks sections ของ HeLa cells ที่มีการใส่ PNAs-A15 หรือ Scramble.

เมื่อใช้ข้อมูลของจีโนมมนุษย์ (hg19, GRCh37) (<https://genome.ucsc.edu/>) มาศึกษา

การกระจายตัวของ A และ T รอบๆ transcription start sites (TSSs) ซึ่งความยาวของ A และ T

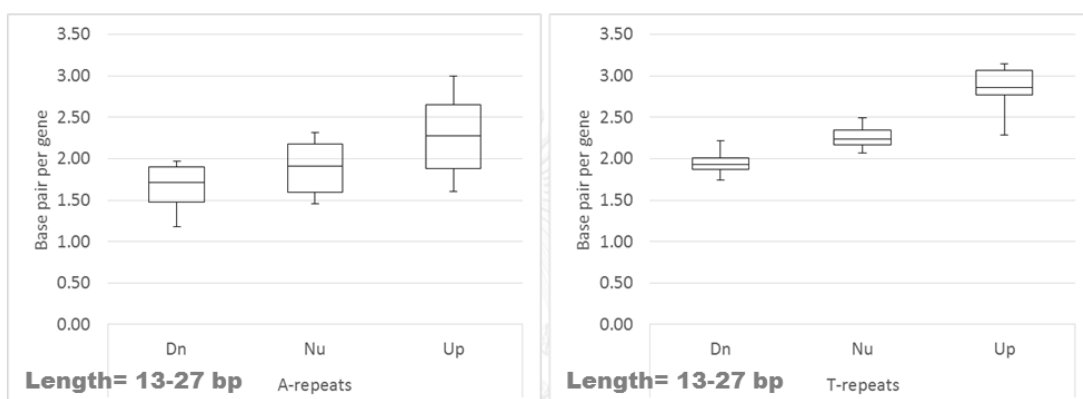
จะแบ่งออกเป็น 3 ช่วงคือ 1 bp ,2-8 bp และ 13-27 bp รูปที่ 21. โดยแบ่งยื่นออกเป็น 3 กลุ่มคือ down-regulated gene (Dn) neutral genes (Nu) และ up-regulated genes (Up) จะพบว่ายื่นใน cancer cells สามารถ down-regulated หรือ up-regulated ต่างจากเซลล์ปกติ โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนจะเกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของ A และ T รอบๆ transcription start sites (TSSs) ซึ่ง A- และ T-repeats สายยาว จะพบอย่างหนาแน่น ใน up-regulated genes



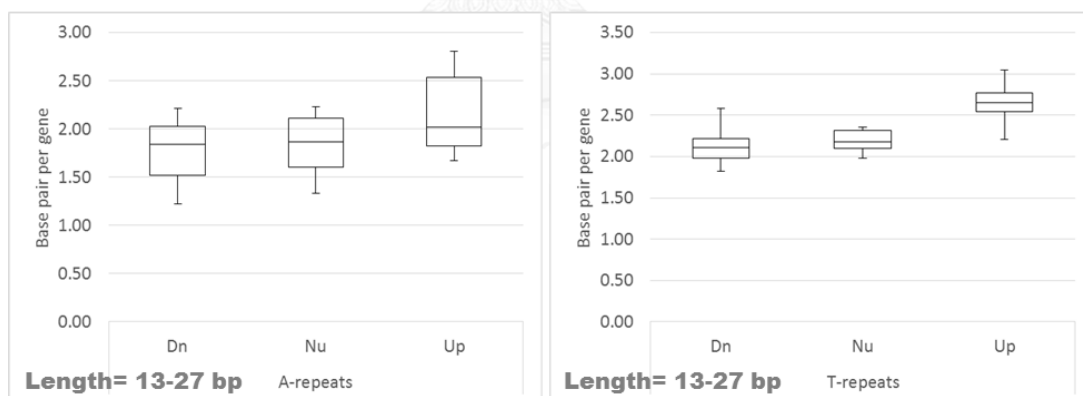
รูปที่ 21 การกระจายตัวของ A- และ T- repeats บริเวณรอบๆ TSS ของจีโนมมนุษย์ โดยแกน Y แสดงจำนวนของ repeats ต่อยีน ส่วนแกน X แสดงบริเวณรอบๆ TSS โดยแบ่งออกเป็น 25 bins แต่ละ bin ประมาณ 800 bp และ bin ที่ 13 คือบริเวณที่เป็น TSS และ (A-C) A-repeats, (D-F) T-repeats.

เมื่อศึกษาการกระจายของ A และ T repeats ที่ความยาว 13-27 bp ในมะเร็งปากมดลูก GSE9750 และ GSE7803 ซึ่งจะแบ่งยื่นออกเป็น 3 กลุ่ม คือ down-regulated gene, neutral genes และ up-regulated genes รูปที่ 22. จะพบว่า A- และ T- repeats สายยาว (13-27bp) กระจายอยู่มากใน up-regulated genes มากกว่า neutral genes

GSE9750

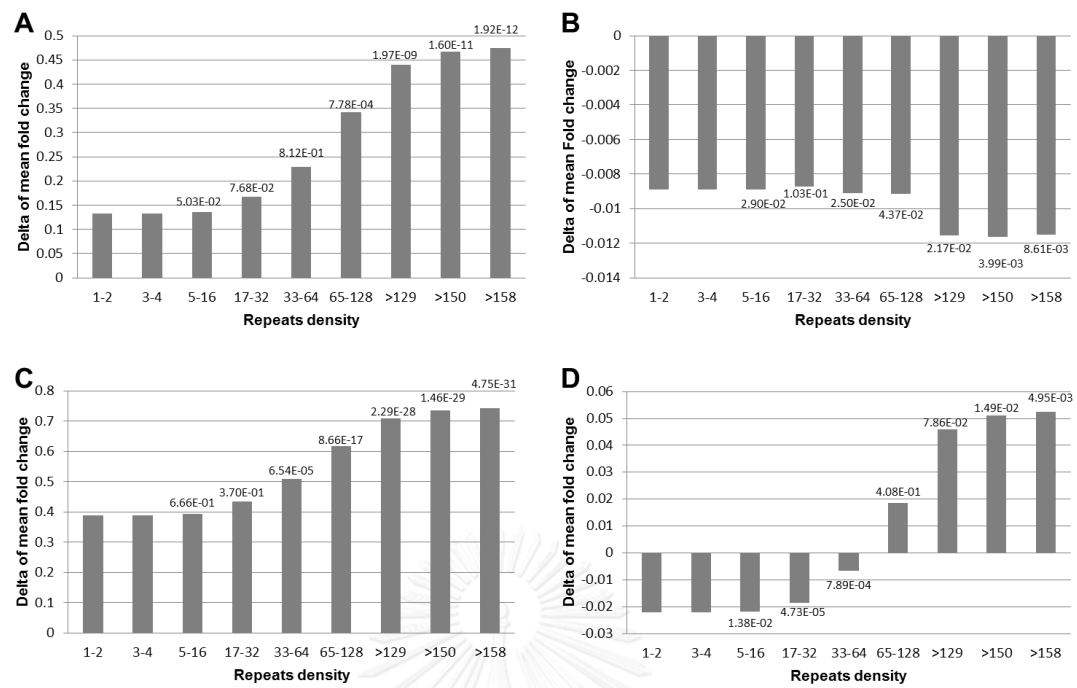


GSE7803



รูปที่ 22 กราฟแสดงการกระจายของ A และ T repeats ของมะเร็งปากมดลูก GSE9750 และ GSE7803

หลังจากนำเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa และ C33A cell line ที่มีการใส่ PNAs-A15 หรือ Scramble เข้าสู่เซลล์ มาสกัด RNA เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี HumanHT-12 v4 Expression BeadChip ซึ่งข้อมูลของการแสดงออกของยีนนี้ สามารถดาวน์โหลดได้ที่ NCBI GEO database (series record GSE76258) เมื่อพิจารณากราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Delta of mean fold change ของการแสดงออกของยีนกับ repeats density ใน cervical cancer (GSE9750) พบว่าเมื่อ repeats density จะเพิ่มขึ้นตาม Delta of mean fold change ของการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ทั้งใน HeLa (รูปที่ 23A) and C33A (รูปที่ 23C) cells line ดังนั้น A- และ T-repeats สายยาวจึงอาจเกี่ยวข้องกับ up-regulated genes ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งต่างจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการใส่ PNAs-A15 หรือ Scramble เข้าสู่เซลล์(รูปที่ 23B และ 23D) ที่ค่า Delta of mean fold change จะลดลงเมื่อ repeats density สูงอย่างมีนัยสำคัญใน HeLa cell lines ส่วน C33A cell lines จะมีนัยสำคัญที่ repeats density ต่ำ ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า PNAs-A15 มีความสามารถ down-regulated genes ในเซลล์มะเร็งได้ แต่เนื่องจาก repeats density มีปริมาณเยอะและ PNAs-A15 สามารถเข้าสู่เซลล์ในปริมาณที่ต่างกัน จึงทำให้เห็นการควบคุมการแสดงออกที่ต่างกัน



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน(Delta of mean fold change) และ repeats density ของ (A) GSE9750 ต่อ HeLa, (B) HeLa_PNAs ต่อ HeLa_SC, (C) GSE9750 ต่อ C33A และ (D) C33A_PNAs ต่อ C33A_SC

เมื่อนำข้อมูลของ GSE9750 (มะเร็งปากมดลูก) และ GSE7258 (HeLa และ C33A cell ที่มี PNA-A15) มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM จะพบว่ามียีนกลุ่มของ up-regulated genes จำนวน 60 ยีนที่ down-regulated ในมะเร็งปากมดลูกเมื่อเปรียบเทียบกับ normal cervical epithelium อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.00001$) รูปที่ 24.

GSE9750 cervical cancer		GSE76258 HeLa and C33A cells were treated with PNAs-A15		GSE9750 cervical cancer		GSE76258 HeLa and C33A cells were treated with PNAs-A15	
		Up	Not up			Down	Not down
Up		8	1,074	Up		0	1,082
Not up		166	11,190	Not up		31	11,325
Lower 95% CI	0.25	P-value	5.32E-02	Lower 95% CI	#NUM!	P-value	8.53E-02
Upper 95% CI	1.02	Odds Ratio	0.50	Upper 95% CI	#NUM!	Odds Ratio	0.00
GSE9750 cervical cancer		GSE76258 HeLa and C33A cells were treated with PNAs-A15		GSE9750 cervical cancer		GSE76258 HeLa and C33A cells were treated with PNAs-A15	
		Down	Not down			Up	Not up
Down		7	2,729	Down		60	2,676
Not down		24	9,678	Not down		114	9,588
Lower 95% CI	0.45	P-value	9.37E-01	Lower 95% CI	1.38	P-value	6.22E-05
Upper 95% CI	2.40	Odds Ratio	1.03	Upper 95% CI	2.59	Odds Ratio	1.89

รูปที่ 24 ผลจากการทำ CU-DREAM



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งพบว่ายีนที่มี A- และ T- repeats สายยาว จะมีการ transcript มากกว่ายีนที่มี A- และ T- repeats สายสั้นหรือไม่มี repeats ซึ่ง A- และ T- repeats นี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการ transcription ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ใน housekeeping genes จะมี A- และ T- repeats กระจายอยู่หนาแน่น ในขณะที่ tissue specific genes จะพบแต่ repeat สายสั้น (12) เพื่อรักษา cancer phenotype เซลล์มะเร็งจึงต้องขัดขวางไม่ให้เซลล์เปลี่ยนไปอยู่ในขั้น terminal differentiation (36, 37) ดังนั้นการแสดงออกของ tissue specific genes จึงถูกจำกัด การรักษาระดับการแสดงออกของ housekeeping genes ที่มีการแสดงออกสูงจึงจำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง โดยการควบคุมผ่าน A- และ T- repeats ใน housekeeping genes

ในการศึกษานี้พบว่า PNAs-A15 สามารถยับยั้งการควบคุมการแสดงออกของยีนที่มี A- และ T- repeats สายยาวที่จำนวนจำกัดและมียีนหลายยีนที่มี A- และ T- repeats ใน HeLa และ C33A ที่ถูก down regulated เนื่องจากมีการกระจายของ A- และ T- repeats เป็นจำนวนมาก ความสามารถในการเข้าเซลล์ของ PNAs-A15 มีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์หรือเกิดจาก cell metabolism ของ HeLa และ C33A นอกจากนี้ยังพบยีนจำนวนหนึ่งที่เคยมีการแสดงออกน้อยในเซลล์มะเร็งแต่กลับมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากการที่ PNAs-A15 ไปรบกวนการควบคุมการแสดงออก ซึ่งการขัดขวางการจับกันระหว่าง AGO protein กับ A- และ T- repeats สายยาวอาจไปเปลี่ยนแปลงการทำงานของ AGO protein โดยไปควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น การที่ PNAs-A15 ไปขัดขวางการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้น จะไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ อาจเป็นไปได้ว่าผลของการที่ PNAs-A15 ไป

ยับยั้งการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งจะไปเพิ่มการ transcript ของยีนที่เคยถูกกดการทำงานในเซลล์มะเร็ง ซึ่งการยกเลิกการควบคุมยีนเหล่านี้อาจลดเซลล์มะเร็งได้

ดังนั้นการมี A- และ T- repeats สายยาวเพื่อควบคุมให้มี transcription ของยีนในระดับสูงสามารถลดการแสดงออกนี้ได้โดย PNAs-A15 ซึ่งอาจนำความรู้นี้ไปต่อยอดเพื่อพัฒนาการรักษาแบบ targeted therapy ได้ในอนาคต



รายการอ้างอิง



1. Castellsagué X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjosé S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *New England journal of medicine*. 2002;346(15):1105-12.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
3. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *The oncologist*. 2010;15(6):556-65.
4. Park S, Bae J, Nam B-H, Yoo K-Y. Aetiology of cancer in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008;9(3):371-80.
5. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*. 2008;25(9):2097-116.
6. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*. 2008;68(21):8643-53.
7. Charlton P, Spicer J. Targeted therapy in cancer. *Medicine*. 2016;44(1):34-8.
8. Malinowsky K, Wolff C, Gündisch S, Berg D, Becker K. Targeted therapies in cancer-challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues. *J Cancer*. 2011;2:26-35.
9. Wu H-C, Chang D-K, Huang C-T. Targeted therapy for cancer. *J Cancer Mol*. 2006;2(2):57-66.
10. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-500.
11. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(6):435-45.
12. Apornthewan C, Pin-on P, Chaiyaratana N, Pongpanich M, Boonyaratanakornkit V, Mutirangura A. Upstream mononucleotide A-repeats play a cis-regulatory role in mammals through the DICER1 and Ago proteins. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(19):8872-85.

13. Nielsen PE. Applications of peptide nucleic acids. *Current opinion in biotechnology*. 1999;10(1):71-5.
14. Ray A, Nordén B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *The FASEB Journal*. 2000;14(9):1041-60.
15. Nielsen PE. A new molecule of life? *Scientific American*. 2008;299(6):64-71.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
17. Bosch F, Lorincz A, Munoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(4):244-65.
18. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(11):796-802.
19. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
20. Manchana T, Ittiwut C, Mutirangura A, Kavanagh JJ. Targeted therapies for rare gynaecological cancers. *The lancet oncology*. 2010;11(7):685-93.
21. Birney E. Journey to the genetic interior. Interview by Stephen S Hall. *Scientific American*. 2012;307(4):80-2, 4.
22. Doyle A, Griffiths JB. *Mammalian cell culture*: John Wiley & Sons Ltd.; 1997.
23. Freshney RI. *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. John Wiley and Sons, inc.
24. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*. 1991;51(10):2515-20.
25. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*. 1997;69(2):581-93.
26. Ren X-S, Yin M-H, Zhang X, Wang Z, Feng S-P, Wang G-X, et al. Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting E2F3 in human lung cancer cells. *Cancer letters*. 2014;344(2):195-203.

27. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Rathinam MKK, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The soft agar colony formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2014(92):e51998-e.
28. Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, et al. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene*. 1992;7(4):743-9.
29. Ishimaru S, Itoh M, Hanada K, Tsuchida A, Iwao T, Kajiyama G. Immunocytochemical detection of p53 protein from pancreatic duct brushings in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1996;77(11):2233-9.
30. Pease J. Robust target labeling from small amounts of RNA for Illumina [reg] Expression BeadChip [reg] arrays. *Nature Methods*. 2011;8(8).
31. Barnes M, Freudenberg J, Thompson S, Aronow B, Pavlidis P. Experimental comparison and cross-validation of the Affymetrix and Illumina gene expression analysis platforms. *Nucleic acids research*. 2005;33(18):5914-23.
32. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
33. Yongsanguanchai N, Pongrakhananon V, Mutirangura A, Rojanasakul Y, Chanvorachote P. Nitric oxide induces cancer stem cell-like phenotypes in human lung cancer cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2015;308(2):C89-C100.
34. Keelawat S, Thorner P, Shuangshoti S, Bychkov A, Kitkumthorn N, Rattanatanyong P, et al. Detection of global hypermethylation in well-differentiated thyroid neoplasms by immunohistochemical (5-methylcytidine) analysis. *Journal of endocrinological investigation*. 2015;38(7):725-32.
35. Samuel S, Beljanski V, Van Grevenynghe J, Richards S, Yebdri FB, He Z, et al. BCL-2 inhibitors sensitize therapy-resistant chronic lymphocytic leukemia cells to VSV oncolysis. *Molecular Therapy*. 2013;21(7):1413-23.
36. Nojiri H, Manya H, Isono H, Yamana H, Nojima S. Induction of terminal differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cells by brefeldin A, a drug affecting ganglioside biosynthesis. *FEBS letters*. 1999;453(1-2):140-4.

37. Scott RE, Tzen C-Y, Witte MM, Blatti S, Wang H. Regulation of differentiation, proliferation and cancer suppressor activity. *International Journal of Developmental Biology*. 1993;37:67-.



ภาคผนวก



ตารางที่ 2 Up-regulated genes ในมะเร็งที่มี A- และ T- repeats สายยาว (13-27 bp) มากกว่า neutral genes

organ	GSE	cancer	A-repeats	T-repeats
Bladder #1	GSE3167	Carcinoma	+	+
Bladder #2	GSE3167	Carcinoma	+	+
Bladder #3	GSE3167	Carcinoma	+	+
Bladder #4	GSE3167	Carcinoma	+	+
Cervix #1	GSE9750	Carcinoma	+	+
Cervix #2	GSE7803	Carcinoma	+	+
HNSCCs	GSE6631	Carcinoma	+	+
HGSCs	GSE10971	Carcinoma	+	+
Nasopharynx	GSE13597	Carcinoma	+	+
Ovary	GSE29450	Carcinoma	+	+
Vulva	GSE5563	Carcinoma	+	+
Breast #1	GSE10810	Adenocarcinoma	+	+
Breast #2	GSE1299	Adenocarcinoma	+	+
Breast #3	GSE21422	Adenocarcinoma	+	+
Breast #7	GSE7904	Adenocarcinoma	+	+
Colon #1	GSE10714	Adenocarcinoma	+	+
Colon #2	GSE13911	Adenocarcinoma	+	+
Colon #3	GSE18105	Adenocarcinoma	+	+
Colon #4	GSE18105	Adenocarcinoma	+	+
Colon #6	GSE4183	Adenocarcinoma	+	+
Colon #7	GSE9576	Adenocarcinoma	+	+
Liver #2	GSE14520	Adenocarcinoma	+	+
Liver #3	GSE14811	Adenocarcinoma	+	+
Liver #5	GSE19665	Adenocarcinoma	+	+
Liver #6	GSE19665	Adenocarcinoma	+	+
Liver #7	GSE6566	Adenocarcinoma	+	+
Liver #8	GSE6764	Adenocarcinoma	+	+
Liver #9	GSE6764	Adenocarcinoma	+	+
Liver #10	GSE6764	Adenocarcinoma	+	+
Liver #11	GSE6764	Adenocarcinoma	+	+
Liver #12	GSE9839	Adenocarcinoma	+	+

organ	GSE	cancer	A-repeats	T-repeats
Lung #1	GSE12345	Adenocarcinoma	+	+
Lung #2	GSE12472	Adenocarcinoma	+	+
Lung #3	GSE12472	Adenocarcinoma	+	+
Lung #4	GSE18842	Adenocarcinoma	+	+
Lung #5	GSE5816	Adenocarcinoma	+	+
Lung #6	GSE7670	Adenocarcinoma	+	+
Pancreas #1	GSE19650	Adenocarcinoma	+	+
Pancreas #2	GSE19650	Adenocarcinoma	+	+
Prostate #2	GSE6919	Adenocarcinoma	+	+
Prostate #3	GSE6956	Adenocarcinoma	+	+
Renal #1	GSE15641	Adenocarcinoma	+	+
Renal #2	GSE15641	Adenocarcinoma	+	+
Renal #3	GSE15641	Adenocarcinoma	+	+
Renal #4	GSE15641	Adenocarcinoma	+	+
Renal #5	GSE15641	Adenocarcinoma	+	+
Renal #6	GSE16449	Adenocarcinoma	+	+
Renal #7	GSE8050	Adenocarcinoma	+	+
Thyroid #1	GSE27155	Adenocarcinoma	+	+
Adrenal gland #1	GSE10927	Adenocarcinoma	+	+
Adrenal gland #2	GSE14922	Adenocarcinoma	+	+
Fat	GSE21122	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #2	GSE11889	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #5	GSE15777	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #6	GSE15777	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #7	GSE2191	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #8	GSE24870	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #9	GSE24870	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #10	GSE24870	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #11	GSE24870	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #12	GSE26725	CNT and Glia	+	+
Hematopoietic #15	GSE32231	CNT and Glia	+	+
Skeleton	GSE17679	CNT and Glia	+	+

organ	GSE	cancer	A-repeats	T-repeats
Brain #1	GSE12657	CNT and Glia	+	+
Brain #2	GSE12657	CNT and Glia	+	+
Brain #3	GSE12657	CNT and Glia	+	+
Brain #4	GSE14805	CNT and Glia	+	+
Brain #5	GSE19728	CNT and Glia	+	+
Brain #6	GSE25604	CNT and Glia	+	+

ตารางที่ 3 Up-regulated genes ในมะเร็งที่มี A- และ T- repeats สายยาว (13-27 bp) น้อยกว่า neutral genes

organ	GSE	cancer	A-repeats	T-repeats
Breast #4	GSE25835	Adenocarcinoma	-	-
Breast #5	GSE25835	Adenocarcinoma	-	-
Breast #6	GSE5764	Adenocarcinoma	-	-
Breast #8	GSE7904	Adenocarcinoma	-	-
Breast #9	GSE7904	Adenocarcinoma	-	-
Colon #5	GSE4107	Adenocarcinoma	-	-
Liver #1	GSE14323	Adenocarcinoma	-	-
Liver #4	GSE17967	Adenocarcinoma	-	-
Prostate #1	GSE3868	Adenocarcinoma	-	-
Thyroid #2	GSE3467	Adenocarcinoma	-	-
Bone #1	GSE19276	CNT and Glia	-	-
Bone #2	GSE19276	CNT and Glia	-	-
Hematopoietic #1	GSE11889	CNT and Glia	-	-
Hematopoietic #3	GSE11889	CNT and Glia	-	-
Hematopoietic #4	GSE11889	CNT and Glia	-	-
Hematopoietic #13	GSE2779	CNT and Glia	-	-
Hematopoietic #14	GSE32231	CNT and Glia	-	-

ตารางที่ 4 ยีนที่ up-regulated ใน GSE9750 และ down-regulated ใน GSE76258 อย่างมีนัยสำคัญ (60 genes)

NCBI gene name	Official Full Name
ITGB5	integrin subunit beta 5
ILK	integrin linked kinase
INS-IGF2	INS-IGF2 readthrough
CTSS	cathepsin S
ANK2	ankyrin 2, neuronal
INPP5A	inositol polyphosphate-5-phosphatase A
FCGR2A	Fc fragment of IgG receptor IIa
RGS3	regulator of G-protein signaling 3
SLC4A4	solute carrier family 4 (sodium bicarbonate cotransporter), member 4
IL2RG	interleukin 2 receptor subunit gamma
GADD45G	growth arrest and DNA damage inducible gamma
FLT1	fms related tyrosine kinase 1
DST	dystonin
PCGF3	polycomb group ring finger 3
RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
FOXN3	forkhead box N3
FGF13	fibroblast growth factor 13
CDC14A	cell division cycle 14A
LRRC17	leucine rich repeat containing 17
CASP10	caspase 10
LIPT1	lipoyltransferase 1
PCDHGA7	protocadherin gamma subfamily A, 7
GREB1	growth regulation by estrogen in breast cancer 1
PLCL1	phospholipase C like 1
DPEP1	dipeptidase 1 (renal)

NCBI gene name	Official Full Name
MAGI1	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1
SPINLW1	epididymal peptidase inhibitor
MIA	melanoma inhibitory activity
CLEC10A	C-type lectin domain family 10 member A
PDE5A	phosphodiesterase 5A
PAX5	paired box 5
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1
CSF1	colony stimulating factor 1
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
CACNB2	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3
HIC1	hypermethylated in cancer 1
ABCC6	ATP binding cassette subfamily C member 6
RASA4	RAS p21 protein activator 4
CHI3L1	chitinase 3 like 1
RARRES2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2
CD300A	CD300a molecule
RORA	RAR related orphan receptor A
CCL23	chemokine (C-C motif) ligand 23
WISP3	WNT1 inducible signaling pathway protein 3
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
LDB3	LIM domain binding 3
ZNF467	zinc finger protein 467
FCGR1B	Fc fragment of IgG receptor 1b
DDI2	DNA-damage inducible protein 2

NCBI gene name	Official Full Name
ZNF528	zinc finger protein 528
MAGEH1	MAGE family member H1
DCHS1	dachsous cadherin-related 1
CD248	CD248 molecule
ITIH5	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 5
ZNF267	zinc finger protein 267
KIF26B	kinesin family member 26B
RAB23	RAB23, member RAS oncogene family
SLC44A1	solute carrier family 44 member 1



1. การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จากช่องแช่แข็ง (thaw cell)

อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้สำหรับทำ cell culture จะต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วย 70% แอลกอฮอล์ทั้งก่อน-หลังใช้งาน และทำในตู้ปลอดเชื้อทุกครั้งโดยจะต้องเปิดยูวีเพื่อฆ่าเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้ออย่างน้อย 15 นาทีก่อนการใช้งาน โดยการเก็บรักษา Cell line ในระยะยาวนิยมเก็บในหลอด cryotube ที่แช่อยู่ในถังไนโตรเจนเหลว เมื่อต้องการใช้เซลล์จึงนำออกมาวางทิ้งไว้ให้ละลายก่อน จากนั้นจึงดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ml (T25) ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM, 10% FBS และ 1% antibiotic-antimycotic ปริมาตรรวม 5 ml เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาเพื่อให้เซลล์กระจายทั่วทั้งขวด แล้วนำขวดเลี้ยงเซลล์นี้ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อให้เซลล์เกาะหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อลดความเป็นพิษจาก DMSO ที่ใช้สำหรับทำการแช่แข็งเซลล์

2. การเลี้ยงเซลล์

เมื่อเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเซลล์ควรมีการตรวจดูการเจริญเติบโตของเซลล์เป็น ระยะเวลาๆ หากเซลล์มีการเจริญช้า มีปริมาณเซลล์น้อยแต่อาหารเลี้ยงเซลล์มีสีเปลี่ยนจากชมพูเป็นส้มอมเหลือง ควรเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อเพิ่มสารอาหารให้เซลล์ หรือเมื่อเซลล์ที่เลี้ยงไว้มีประมาณ 80% ขึ้นไป ควรทำการ sub culture โดยเริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นล้างด้วย PBS ปริมาตร 5 ml จำนวน 2 รอบ เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นใส่ trypsin EDTA ปริมาตร 0.5 ml (trypsinization) บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลาประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ เมื่อครบเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 เท่าของ trypsin เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ trypsin และดูดขึ้น-ลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นดูดเซลล์ออกเหลือไว้เท่าที่ต้องการ

และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 1% antibiotic-antimycotic ปริมาตร 5 ml

3. ขั้นตอนในการสกัด RNA ด้วยวิธี Trizol

นำเซลล์ที่ต้องการสกัด RNA มาดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก และล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 ml จำนวน 2 รอบ จากนั้นเติม Trizol® reagent 200 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Chloroform ปริมาตร 200 μ l พลิกหลอดไปมาให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 ml และเติม Isopropanol 500 μ l พลิกไปมาเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบ 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป และล้างตะกอน RNA โดยเติม 75% Ethanol 1ml แล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 7,500 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายด้านบนทิ้งไป แล้วปล่อยให้ตะกอน RNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อตะกอน RNA แห้งจึงเติม DEPC water ปริมาตร 20 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอน RNA สุดท้ายนำ RNA ที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม สามารถเก็บ RNA ได้ที่อุณหภูมิ -80°C

ตารางที่ 5. ข้อมูลของ GSE9750 ระหว่าง cervical cancer cells และ normal cervix.

Test	Control
GSM246087 Cervical cancer cell line, C4-I	GSM246422 Normal cervix, commercial_Ambion
GSM246088 Cervical cancer cell line, CaSki	GSM246423 Normal cervix, commercial_Stratagene
GSM246089 Cervical cancer cell line, C-33A	GSM246484 Normal cervix, commercial_BioChain
GSM246090 Cervical cancer cell line, HT-3	
GSM246119 Cervical cancer cell line, SiHa	
GSM246120 Cervical cancer cell line, SW756	
GSM246121 Cervical cancer cell line, MS751	
GSM246122 Cervical cancer cell line, ME-180	
GSM246123 Cervical cancer cell line, HeLa	

ตารางที่ 6. ข้อมูลของ GSE76258 ระหว่าง HeLa and C33A cells ที่มีการใส่ PNAs-A15 และ HeLa and C33A cells ที่มีการใส่ scramble.

Test	Control
GSM1977953 HeLa_PNA	GSM1977954 HeLa_SC
GSM1977955 C33A_PNA	GSM1977956 C33A SC

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวจิรัฐฐา ศิริลักษณ์

วันเดือนปีเกิด 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ปีการศึกษา 2555 จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์และเข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตศึกษา แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาที่ 2 ปีการศึกษา 2555

ประวัติเผยแพร่ผลงาน

การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 10 ปีการศึกษา 2558 มหาวิทยาลัยรังสิต หัวข้อเรื่อง การลดเซลล์มะเร็งด้วยการกดการทำงานของ up-regulated A-repeats ของ ยีนด้วย PNAs-A15

