

การพิสูจน์การเป็นยีนต้านมะเร็งของ CCNA1



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
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SUBSTANTIATION OF *CCNA1* AS THE TUMOR SUPPRESSOR GENE

Miss Kobkan Intorranut



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

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพิสูจน์การเป็นยีนต้านมะเร็งของ CCNA1
โดย	นางสาวกอบกาญจน์ อินทรนัญญ์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.โชติกา สมรรคจันทร์)

กอบกาญจน์ อินทรนัญ : การพิสูจน์การเป็นยีนต้านมะเร็งของ *CCNA1* (SUBSTANTIATION OF *CCNA1* AS THE TUMOR SUPPRESSOR GENE) อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.
 ธนาภัทร ปาลกะ, 86 หน้า.

ยีน *CCNA1* เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 13 ที่ตำแหน่ง q12.3 ถึง q13 ยีน *CCNA1* แปรรหัสให้โปรตีน cyclin A1 อยู่ในกลุ่ม cyclin family มีหน้าที่ในการควบคุมการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งกระดูกและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ cyclin A1 ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ผ่านกระบวนการ non-homologous end-joining และยังพบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด จากข้อมูลข้างต้นทำให้คาดว่ายีน *CCNA1* อาจมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็ง จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อต้องการพิสูจน์ว่า *CCNA1* เป็นยีนต้านมะเร็ง โดยทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย siRNA ในเซลล์ HN12 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยแปรผันความเข้มข้นของ siRNA และศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยการทำ real-time PCR จากการตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ภายหลังการฉายรังสี UV-C พบว่าในเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่สูงกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 0, 2, 4 และ 48 ชั่วโมงภายหลังการฉายรังสี UV-C ผลที่ได้ยืนยันบทบาทของยีน *CCNA1* ว่ามีความเกี่ยวข้องในการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ การตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์พบว่าในเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของการตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นมะเร็งของเซลล์พบว่าเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีการแบ่งเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง แต่การตายของเซลล์แบบแอฟพอโทซิสไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการรุกรานของเซลล์พบว่าเซลล์ HN12 มีการรุกรานของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่ายีน *CCNA1* มีบทบาทในการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ และมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN12

ภาควิชา	พฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5571914123 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS: CCNA1 / SIRNA / DNA DOUBLE STRAND BREAK / PROLIFERATION / APOPTOSIS / INVASION

KOBKAN INTORRANUT: SUBSTANTIATION OF *CCNA1* AS THE TUMOR SUPPRESSOR GENE. ADVISOR: ASST. PROF. PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 86 pp.

CCNA1 is a gene locating on chromosome 13 at region q12.3-q13. The protein encoded by this gene is cyclin A1. Cyclin A1 is a member of the cyclin family whose members are able to control the progression of cells through the cell cycle in osteosarcoma cell and leukemia cells. Furthermore, *CCNA1* is involved in double strand break repair by non-homologous end-joining and it was *CCNA1* that is methylated in several cancers. From data mentioned above suggests that it might be a tumor suppressor gene. The aim of this study is to substantiate that *CCNA1* is a tumor suppressor gene. The expression of *CCNA1* siRNA in HN12 head and neck cancer cell was suppressed by vary concentration of siRNA. We then evaluated the changes in *CCNA1* expression by real-time PCR. From experiment after knockdown *CCNA1* gene, cells had increased significant in DNA double-strand break at 0, 2, 4 and 48 hours after UV-C irradiation when compared with control group. This result confirmed function of *CCNA1* in double strand break repair. Knockdown of *CCNA1* gene in HN12 did not significant effect cell viability. In part of detected the hallmark of cancer, from experiment after knockdown *CCNA1* gene, cells had significant decrease in proliferation at 2 and 4 hours after UV-C irradiation but significantly increase at 48 hours after UV-C irradiation. Knockdown of *CCNA1* gene did not affect apoptosis. The invasion of cells significant increase after knockdown *CCNA1* gene and induced DNA double strand break when compare with control group. In conclusion, the *CCNA1* gene is involved in double strand break repair and plays a role as a tumor suppressor gene in HN12 head and neck cancer cells.

Department: Botany Student's Signature

Field of Study: Genetics Advisor's Signature

Academic Year: 2015 Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โฉ่หัตถะกุล ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ กรรมการ, อาจารย์ ดร. เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ กรรมการ, ดร. โชติกา สมรรคจันทร กรรมการภายนอก ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีที่จำเป็นสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำแนะนำและกำลังใจในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณดร.วรภา หีบจันทร์ตรี หัวหน้าห้องปฏิบัติการโครโมโซมวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีที่จำเป็นสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อสนั่น อินทรนัญ และคุณแม่हरรรษา อินทรนัญ ที่ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมา

สุดท้ายนี้คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับผู้มีพระคุณทุกท่านดังที่กล่าวมาข้างต้น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	2
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
มะเร็ง (cancer).....	11
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง.....	12
สภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics).....	13
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation).....	13
CCNA1.....	14
CCNA2.....	15
การควบคุมวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle regulation).....	15
จุดตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle checkpoint).....	19

Gene silencing	22
RNA interference หรือ RNAi	23
กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย siRNA.....	23
Small interfering RNA (siRNA)	24
การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์	24
Liposomal based technique.....	25
หลักการในการออกแบบ siRNA.....	26
การตรวจสอบประสิทธิภาพของ siRNA.....	26
MTT assay	27
Apoptosis หรือ Programed cell death	28
Annexin V assay.....	31
Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).....	32
BrdU assay	34
การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์.....	34
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์	35
การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง.....	35
ปัจจัยที่ควรพิจารณาเพื่อเปลี่ยนอาหารในเซลล์เพาะเลี้ยง	37
การนำเซลล์แช่แข็งมาเพาะเลี้ยง.....	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	38
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	38
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	39
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	40
วิธีดำเนินการวิจัย	42

1. การออกแบบ siRNA.....	43
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	45
2.1 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	45
2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	45
2.3 การแปรผันความเข้มข้นของ siRNA.....	47
2.4 การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์โดยวิธี liposomal-based technique.....	47
2.5 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	47
2.6 การตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอ	48
2.7 Reverse transcription	48
2.8 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> , <i>CCNA2</i> , <i>p53</i>	49
2.9 การคำนวณการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ด้วยวิธี $\Delta\Delta$ CT	52
3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการความเสียหายของดีเอ็นเอ สายคู่และการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยวิธี neutral COMET assay	52
4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay.....	53
5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ด้วยวิธี BrdU assay.....	53
6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อแอฟอโปโทซิสของเซลล์ด้วย วิธี annexin V-FITC/PI	54
7. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay.....	54
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	55
1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> และความจำเพาะ ของ <i>CCNA1</i> siRNA	55

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	55
1.2 การตรวจสอบความจำเพาะของ <i>CCNA1</i> siRNA.....	59
2. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อความเสียหายของดีเอ็นเอ สายคู่ด้วยวิธี neutral COMET assay.....	61
3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay.....	62
4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ด้วยวิธี BrdU assay.....	63
5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการตายของเซลล์แบบแอ พอโทซิสด้วยวิธี annexin V-FITC/PI.....	64
6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay.....	65
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	66
อภิปรายผลการวิจัย.....	66
สรุปผลการวิจัย.....	69
ข้อเสนอแนะ	69
รายการอ้างอิง	70
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	86

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อดีและข้อเสียของการถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ (subculture)	36
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	49
ตารางที่ 3 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	50
ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA2</i>	50
ตารางที่ 5 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>p53</i>	51
ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำ real-time PCR	51
ตารางที่ 7 การแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN4 ที่ได้รับ siRNA ที่ความเข้มข้นและ ระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	55
ตารางที่ 8 การแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN12 ที่ได้รับ siRNA ที่ความเข้มข้นและ ระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	57
ตารางที่ 9 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟกด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 24 ชั่วโมง.....	81
ตารางที่ 10 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟกด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 48 ชั่วโมง.....	81
ตารางที่ 11 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟกด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 72 ชั่วโมง.....	82
ตารางที่ 12 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟกด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 24 ชั่วโมง.....	82
ตารางที่ 13 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟกด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 48 ชั่วโมง.....	83
ตารางที่ 14 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟกด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 72 ชั่วโมง.....	83

ตารางที่ 15 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA2</i> ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟกต์ด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 72 ชั่วโมง.....	84
ตารางที่ 16 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>CCNA2</i> ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟกต์ด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 72 ชั่วโมง.....	84
ตารางที่ 17 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>p53</i> ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟกต์ด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 72 ชั่วโมง.....	84
ตารางที่ 18 แสดงค่า Ct ของยีน <i>GAPDH</i> และ <i>p53</i> ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟกต์ด้วย <i>CCNA1</i> siRNA 72 ชั่วโมง.....	85



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 คุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง	11
ภาพที่ 2 การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase	13
ภาพที่ 3 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G ₁ ภายหลังจากการได้รับสัญญาณ mitogen.....	16
ภาพที่ 4 การควบคุมกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ.....	17
ภาพที่ 5 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G ₂	18
ภาพที่ 6 จุดตรวจสอบในวัฏจักรเซลล์ระยะต่างๆ	20
ภาพที่ 7 กลไกการหยุดวัฏจักรเซลล์เมื่อดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย	21
ภาพที่ 8 กลไกการทำงานของยีน p53 ในการหยุดวัฏจักรของเซลล์.....	22
ภาพที่ 9 กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย siRNA.....	24
ภาพที่ 10 การขนส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี Liposomal based technique.....	25
ภาพที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ MTT และผลึกฟอร์มาซาน	28
ภาพที่ 12 การส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอพโทซิสจากสัญญาณภายในเซลล์	29
ภาพที่ 13 การส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอพโทซิสจากสัญญาณภายนอกเซลล์	30
ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระหว่างเกิดการตายแบบแอฟพอพโทซิส.....	30
ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของ phosphatidylserine และการติดสี annexin V และ propidium iodine ในระหว่างที่เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอพโทซิส	31
ภาพที่ 16 เซลล์ที่ถูกย้อมด้วย annexin-V/FITC และ propidium iodine เมื่อวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry.....	32
ภาพที่ 17 การตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยวิธี comet assay ภายใต้อุปกรณ์ fluorescence และค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่วัดได้.....	33
ภาพที่ 18 ระดับความเสียหายของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยวิธี COMET assay	33
ภาพที่ 19 หน้าเวปไซด์ที่ใช้ในการออกแบบ siRNA.....	43

ภาพที่ 20 การใช้งานหน้าเวปไซด์ที่ใช้ในการออกแบบ siRNA.....	43
ภาพที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CCNA1 siRNA ที่ได้จากโปรแกรม BLOCK-IT™ RNAi Designer	44
ภาพที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ที่เลือกมาใช้ในการวิจัย	44
ภาพที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ทั้ง sense strand และ antisense strand	45
ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CCNA1 ในเซลล์ HN4.....	56
ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CCNA1 ในเซลล์ HN12	58
ภาพที่ 26 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CCNA2 ในเซลล์ HN4 และ HN12 ที่ได้รับ CCNA1 siRNA ด้วยวิธี real time PCR วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ CCNA1 siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA.....	59
ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน p53 ในเซลล์ HN4 และ HN12 ที่ได้รับ CCNA1 siRNA ด้วยวิธี real time PCR วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ CCNA1 siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA.....	60
ภาพที่ 28 ค่า Tail moment ซึ่งบอกลถึงความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ HN12 ภายหลังการ.....	61
ภาพที่ 29 ความมีชีวิตของเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลาต่างๆ	62
ภาพที่ 30 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลาต่างๆ.....	63
ภาพที่ 31 เปอร์เซนต์การตายแบบแอฟพอโทซิสของเซลล์ HN12.....	64
ภาพที่ 32 การรุกรานของเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลา 24 ชั่วโมง	65

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่เกิดจากการที่เซลล์เจริญเติบโตและแบ่งตัวแบบไม่หยุดยั้งและไม่สามารถควบคุมได้ (uncontrolled growth) ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเหล่านี้ จะไปรบกวนการทำงานของเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะอื่นที่ปกติหรือไปทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) โดยการกดทับและรบกวนการหล่อเลี้ยงเลือดและการทำงานของระบบประสาทในบริเวณนั้น ในบางกรณี เซลล์มะเร็งอาจหลุดจากตำแหน่งเดิม กระจายไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยทางหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลือง แล้วไปเจริญเติบโตที่ตำแหน่งอื่นต่อไปอีก (metastasis) โดยสร้างเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (angiogenesis) การเรียกชื่อมะเร็งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับเซลล์เหล่านี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น มะเร็งมีสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น สภาพแวดล้อม ลักษณะการดำเนินชีวิต และพันธุกรรม เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งได้แก่ ยีนก่อมะเร็ง (oncogene) ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในจีโนม (Yanatatsaneejit and Khowutthitham, 2012) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้กับยีนเหล่านี้ ได้แก่ การกลายของยีนก่อมะเร็งซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโปรตีน หรืออาจเกิดจากดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็ง ทำให้ยีนต้านมะเร็งสูญเสียหน้าที่การทำงาน จนนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการรายงานว่า พบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปากมดลูก ซึ่งพบว่าการติดเชื้อ HPV ในรูปแบบ integrate form มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* (Yanatatsaneejit, Mutirangura and Kitkumthorn, 2011) ซึ่งพบเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกสูงถึง 93% (Kitkumthorn et al., 2006) และเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ยังเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการพัฒนาของมะเร็งศีรษะและลำคอ (Sun et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์จากตะกอนปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Yu et al., 2007) ยีน *CCNA1* มีหน้าที่ควบคุมกลไกการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ (double strand break) ผ่านกระบวนการ Non-homologous end joining (Muller-Tidow et al., 2004) บางการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของยีน *CCNA1* ต่อการเกิดมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งโพรงหลังจมูก มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งช่องปาก มะเร็งผิวหนังและมะเร็งตับ (Garrido et al., 2012; Shaw et al., 2006; Xu et al., 2004; Yanatatsaneejit et al., 2008; Yu et al.,

2003) จากข้อมูลที่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในมะเร็งหลายชนิดแต่ไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ปกติ และหน้าที่ที่มีความเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอ ทำให้คาดว่า *CCNA1* อาจเป็นยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ซึ่งถ้าสามารถยืนยันได้ว่า *CCNA1* เป็นยีนต้านมะเร็งจะเป็นแนวทางเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นยีนต้านมะเร็งของยีน *CCNA1*

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 สายพันธุ์ที่ไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* คือ เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN4 และ HN12 จากนั้นนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยการแปรผันความเข้มข้นของ siRNA และระยะเวลาในการทรานสเฟก เมื่อได้สภาวะที่ดีที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* จึงนำไปศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในสภาวะที่มีการชักนำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ต่อความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ ระดับการมีชีวิตของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ แอพอพโทซิสของเซลล์ และการรุกรานของเซลล์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ถ้าสามารถยืนยันได้ว่า *CCNA1* เป็นยีนต้านมะเร็งจะเป็นแนวทางเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 6 การทดลอง ดังนี้

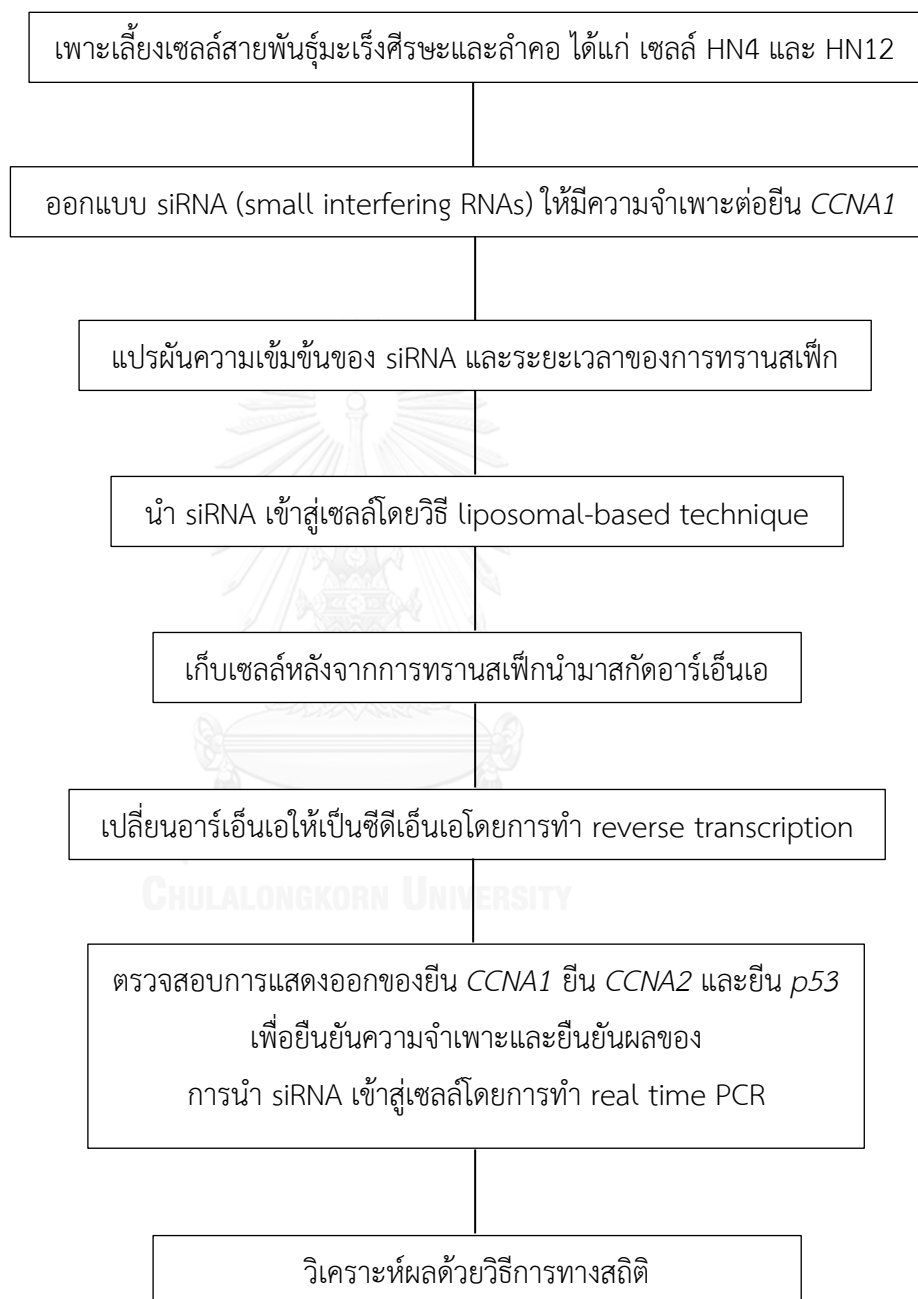
1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และความจำเพาะของ *CCNA1* siRNA
 - 1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ ได้แก่ เซลล์ HN4 และ HN12
 - 1.2 ออกแบบ siRNA (small interfering RNAs) ให้มีความจำเพาะต่อยีน *CCNA1*
 - 1.3 แปรผันความเข้มข้นของ siRNA และระยะเวลาในการทรานสเฟกให้เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์

- 1.4 นำ siRNA เข้าสู่เซลล์โดยวิธี liposomal-based technique
- 1.5 เก็บเซลล์หลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงเวลาของการทรานสเฟกต์ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยการทำให้ real-time PCR และคำนวณระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $\Delta\Delta Ct$ โดยใช้ *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง
- 1.6 เมื่อได้สภาวะที่ดีที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* นำซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 1.5 มาตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *CCNA2* และ *p53* ด้วยการทำให้ real-time PCR และคำนวณระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $\Delta\Delta Ct$ โดยใช้ *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง
2. การตรวจสอบความเสียหายและการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี neutral comet assay
 - 2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งรังสีและลำคอ ได้แก่ เซลล์ HN4 และ HN12
 - 2.2 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย siRNA
 - 2.3 กระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยการฉายรังสี UV-C
 - 2.4 ตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี neutral COMET assay
3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay
 - 3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งรังสีและลำคอ ได้แก่ เซลล์ HN4 และ HN12
 - 3.2 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย siRNA
 - 3.3 กระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยการฉายรังสี UV-C
 - 3.4 ตรวจสอบระดับการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay
4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay
 - 4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งรังสีและลำคอ ได้แก่ เซลล์ HN4 และ HN12
 - 4.2 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย siRNA
 - 4.3 กระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยการฉายรังสี UV-C

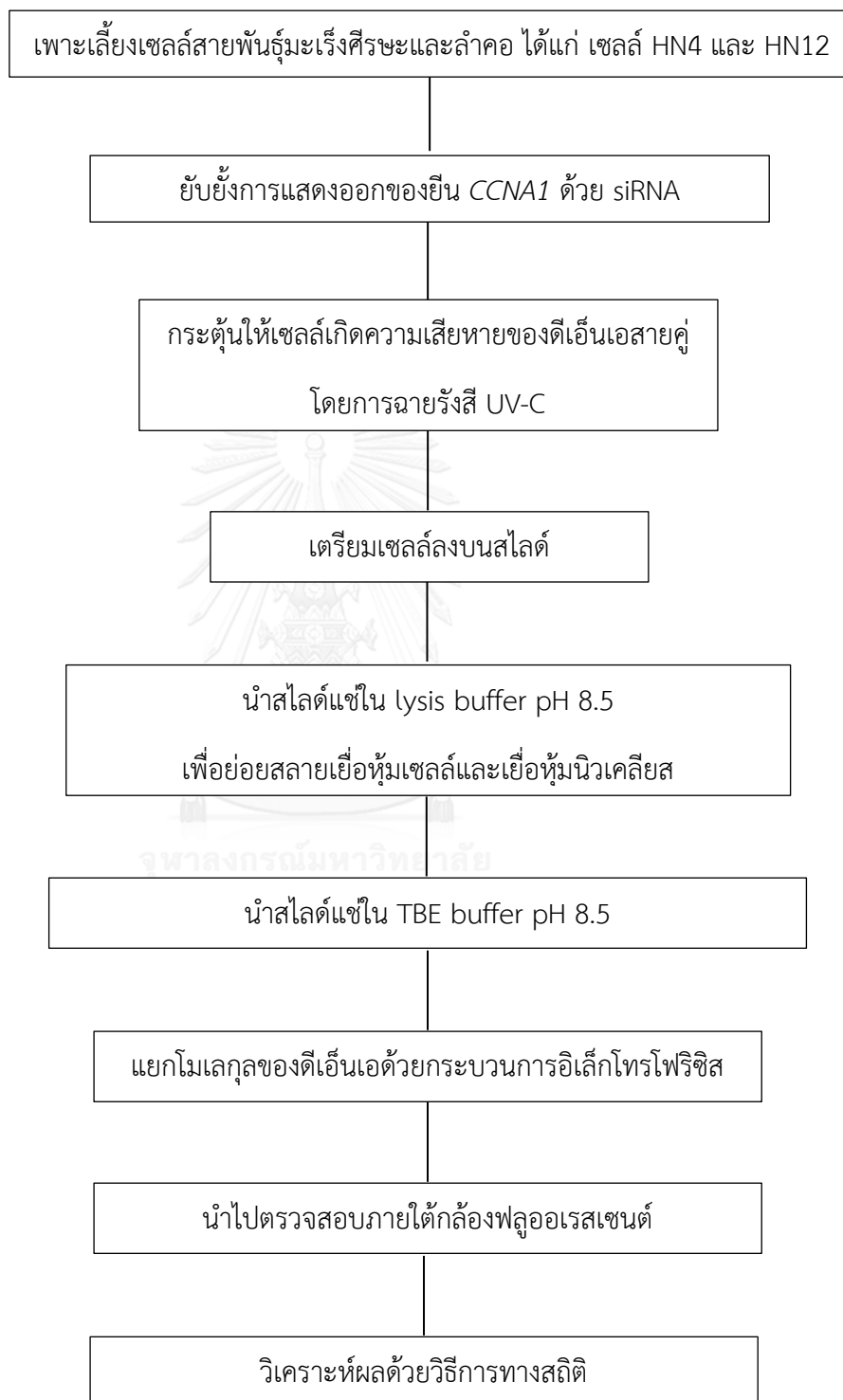
- 4.4 ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay
5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อแอฟอโปโทซิสของเซลล์ด้วยวิธี annexin V-FITC/PI
 - 5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ ได้แก่ เซลล์ HN4 และ HN12
 - 5.2 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย siRNA
 - 5.3 กระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยการฉายรังสี UV-C
 - 5.4 ตรวจสอบแอฟอโปโทซิสของเซลล์ด้วยวิธี annexin V-FITC/PI
6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay
 - 6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ ได้แก่ เซลล์ HN4 และ HN12
 - 6.2 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย siRNA
 - 6.3 กระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยการฉายรังสี UV-C
 - 6.4 ตรวจสอบการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN4 และ HN12



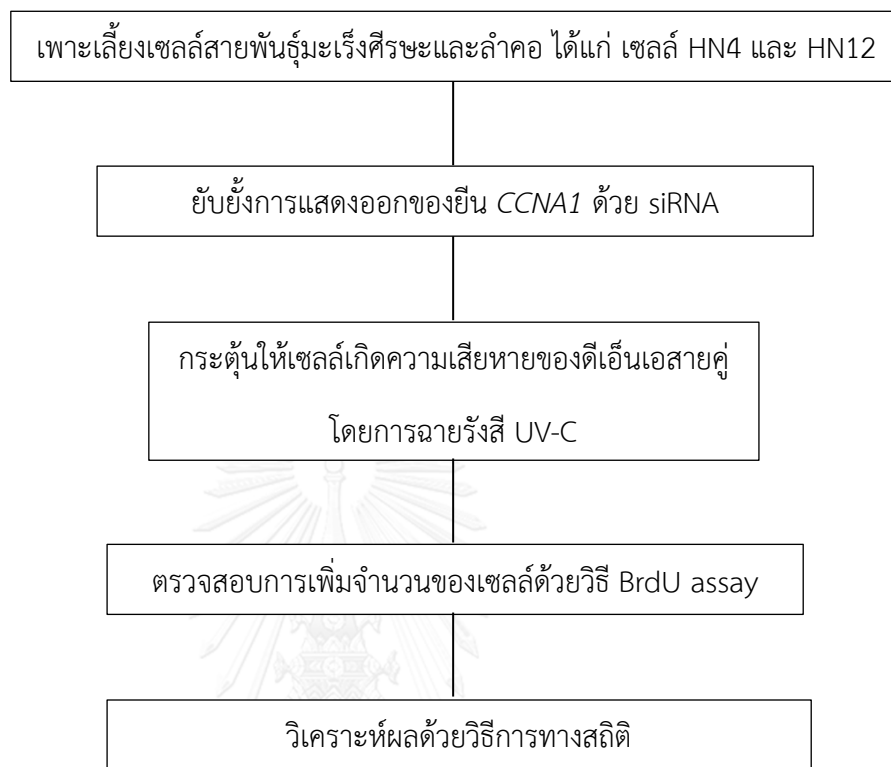
2. การตรวจสอบความเสียหายและการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี neutral comet assay



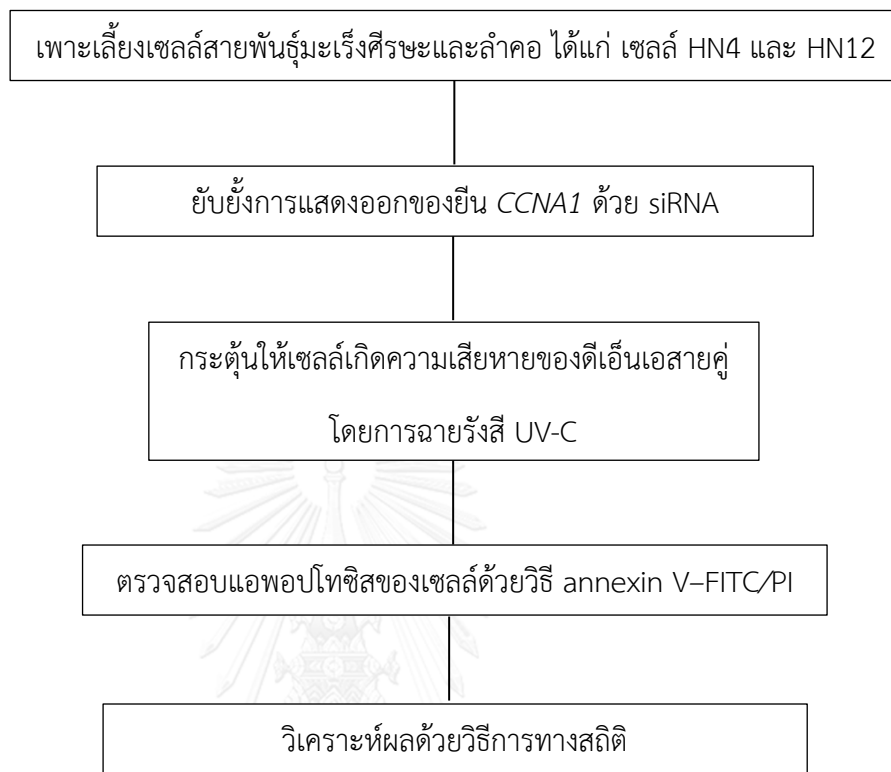
3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการมีชีวิตจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay



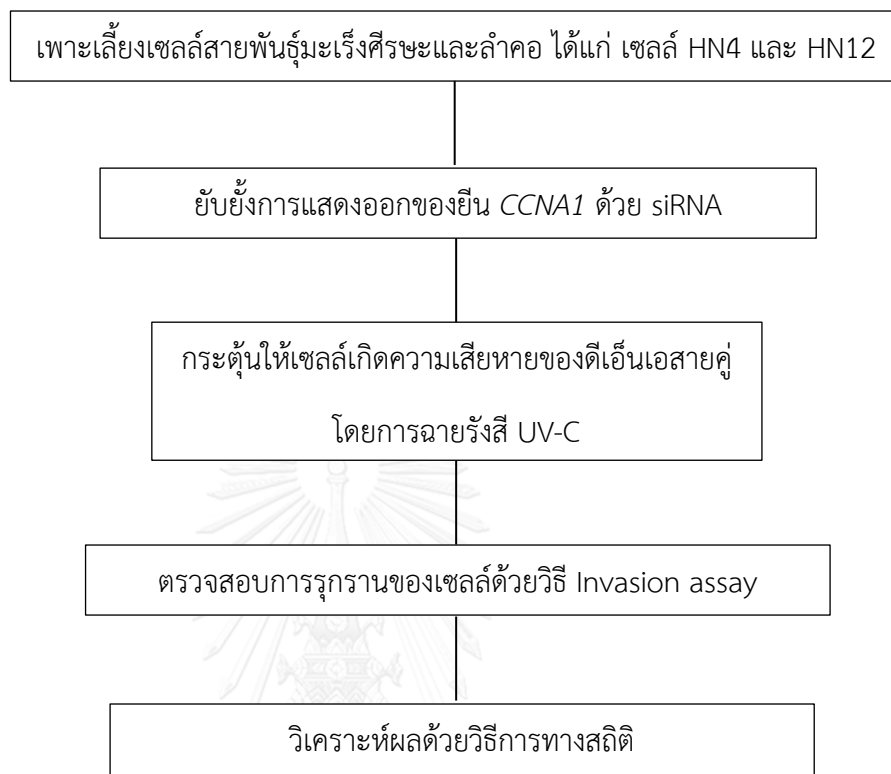
4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay



5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อแอพออโทซิสของเซลล์ด้วยวิธี annexin V-FITC/PI



6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay

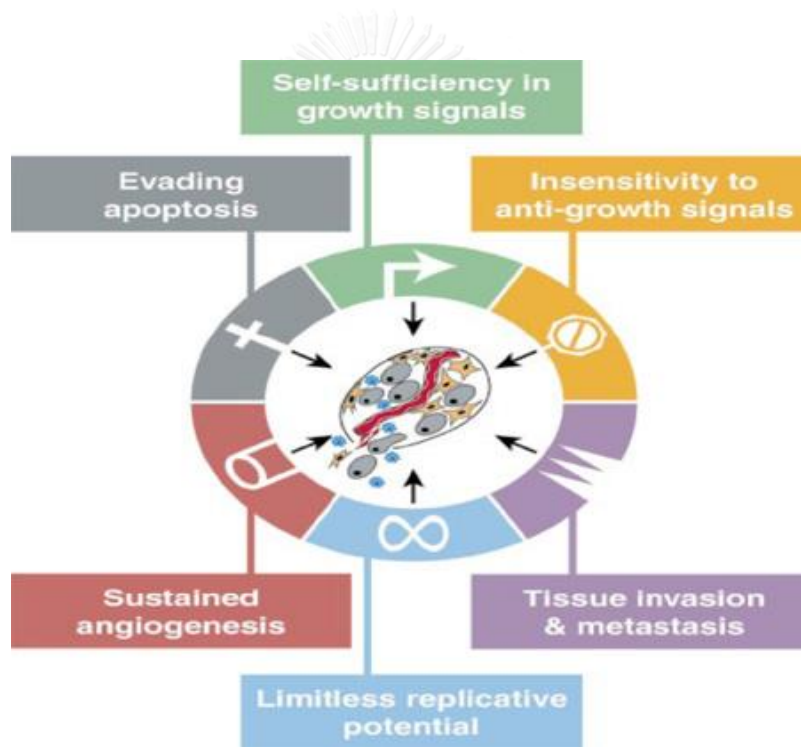


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็ง (cancer)

มะเร็งเป็นสาเหตุสำคัญในการตายของประชากรไทย เกิดจากความผิดปกติระดับโมเลกุลของเซลล์ร่างกาย และมีกระบวนการในการเกิดโรคหลายขั้นตอน ในการที่เซลล์ร่างกายปกติจะกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ เรียกว่า multistep carcinogenesis (เอ็ดมุนด์ สุขประเสริฐ, 2011) คุณสมบัติที่บ่งชี้ว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์มะเร็ง ดังภาพที่ 1 ได้แก่



ภาพที่ 1 คุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง

(Hanahan and Weinberg, 2000)

1. เซลล์มะเร็งสามารถแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง
2. เซลล์มะเร็งสามารถรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ที่ไกลออกไปได้
3. เซลล์มะเร็งไม่ตอบสนองต่อสัญญาณที่ส่งมายับยั้งการเจริญเติบโต

4. เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตได้ โดยไม่ต้องอาศัยสัญญาณจากภายนอกเซลล์
5. เซลล์มะเร็งสามารถหลีกเลี่ยงการตายแบบแอฟพอโทซิสได้
6. เซลล์มะเร็งสามารถสร้างเส้นเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเซลล์เองได้ (Hanahan and Weinberg, 2000)

โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีความซับซ้อน เกิดจากปัจจัยหลายๆ อย่างร่วมกัน ได้แก่ ปัจจัยภายนอก เช่น สิ่งแวดล้อม ลักษณะการดำเนินชีวิต และปัจจัยภายใน เช่น ความผิดปกติทางพันธุกรรม ความบกพร่องในระบบภูมิคุ้มกัน ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการสะสมความผิดปกติในระดับยีนจนนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

การเกิดมะเร็งมียีนที่เกี่ยวข้องอยู่ 3 กลุ่ม คือ ยีนก่อมะเร็ง (oncogene) ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในจีโนม (DNA repair gene) (Yanatatsaneejit and Khowutthitham, 2012) แต่ละยีนมีบทบาทหน้าที่ดังนี้

1. ยีนก่อมะเร็ง (oncogene) เป็นยีนที่เกิดจาก Proto-oncogene เกิดการกลาย ซึ่งในภาวะปกติ Proto-oncogene จะทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรของเซลล์ แต่เมื่อ Proto-oncogene เกิดการกลาย จะทำให้สูญเสียหน้าที่การทำงาน ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนตลอดเวลา

2. ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เป็นยีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์และหยุดวัฏจักรของเซลล์ในสภาวะปกติ แต่เมื่อพบความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น ยีนต้านมะเร็งจะทำหน้าที่หยุดวัฏจักรของเซลล์และส่งสัญญาณให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เมื่อการซ่อมแซมเสร็จสิ้น จะสั่งให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินต่อไป แต่ถ้าความเสียหายของดีเอ็นเอมากเกินไปจนเกินกว่าที่จะซ่อมแซมได้ จะชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิส ตัวอย่างยีนต้านมะเร็งที่สำคัญ คือ ยีน *p53* ซึ่งเมื่อเซลล์มีความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น ยีน *p53* จะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของยีน *p21* ซึ่งเป็น CDK inhibitor ที่ไปยับยั้ง cyclin-CDK complex ส่งผลให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลง และเกิดการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอ ถ้าความเสียหายของดีเอ็นเอมากเกินไปจนเกินกว่าที่จะซ่อมแซมได้ *p53* จะส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิส (Hyland, 2010) หากเกิดการกลายของยีนต้านมะเร็งจะทำให้เซลล์แบ่งตัวได้อย่างไม่หยุดยั้ง จนนำไปสู่การเกิดมะเร็ง (Carnero, 2000)

3. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในจีโนม (DNA repair gene) มีหน้าที่ในการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอ ซึ่งการกลายของยีนในกลุ่มนี้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง

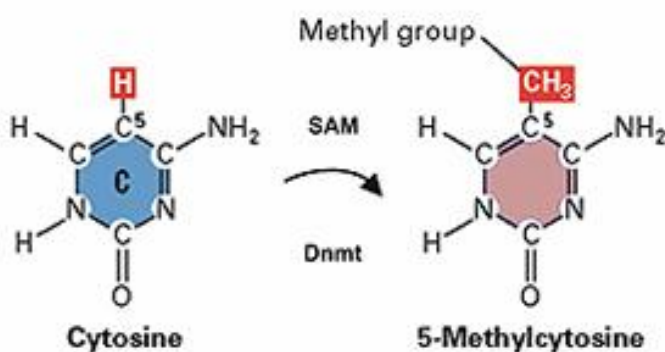
ความสมดุลในการทำงานของยีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดมะเร็ง หากมีการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งมากผิดปกติ หรือในทางตรงกันข้ามยีนต้านมะเร็งและยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในจีโนมถูกยับยั้งหน้าที่การทำงาน จะส่งผลให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด การที่ยีนถูกยับยั้งหน้าที่การทำงานอาจเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การกลายในรูปแบบต่าง ๆ หรืออีกสาเหตุหนึ่งที่สำคัญคือสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) (Duenas-Gonzalez et al., 2005)

สภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics)

epigenetics เป็นกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีน ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (Herceg et al., 2013) ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ โดยที่จีโนไทป์ไม่เปลี่ยนแปลง กลไกทาง epigenetics มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรค โดยเฉพาะการเกิดมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งกลไกทาง epigenetics ที่สำคัญได้แก่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เป็นหนึ่งในกลไกทาง epigenetics ที่พบได้บ่อยในโรคมะเร็งของมนุษย์ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกลไกการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง CpG nucleotide ซึ่งคือคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีนที่อยู่ติดกับเบสกวานีนในสายดีเอ็นเอ ซึ่งบริเวณที่พบ CpG nucleotide อยู่อย่างหนาแน่นจะเรียกว่า CpG island โดยมักพบ CpG island อยู่ภายในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน (จันทนา รักแผน, 2012) การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) โดยเอนไซม์นี้จะทำการเคลื่อนย้ายหมู่เมทิลของ S-adenosyl-methionine ให้กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีนกลายเป็น 5-methylcytosine ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase
(<https://www.premedhq.com/dna-methylation>)

การเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนจะส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลง หรือทำให้ยีนไม่มีการแสดงออก (Muller-Tidow et al., 2004) มีการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันกับการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง เช่น การเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน glutathione-S-transferase P1 (*GSTP1*) นำไปสู่การเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากสูงถึง 90% ซึ่งยีน *GSTP1* เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษและปกป้องเซลล์จากความเสียหายและการก่อตัวของมะเร็ง การกดการแสดงออกของยีนโดยการเกิดเมทิลเลชันจึงส่งผลให้เซลล์มีความไวต่อความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและทำให้อุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งเพิ่มขึ้น (Li, Okino, and Dahiya, 2004) และพบการเกิดเมทิลเลชันในยีน Death-associated protein kinase (*DAP-kinase*) ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ ยีน *DAP-kinase* เป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม pro-apoptosis ที่มีหน้าที่ในการยับยั้งกิจกรรมของ serine/threonine kinase (Yamaguchi et al., 2003) เป็นต้น

CCNA1

ยีน *CCNA1* เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 13 ที่ตำแหน่ง q12.3 ถึง q13 (Yang, Morosetti, and Koeffler, 1997) ยีน *CCNA1* แพลรหัสให้โปรตีน cyclin A1 ที่มีมวลโมเลกุล 53 กิโลดัลตัน มีขนาด 465 กรดอะมิโน cyclin A1 อยู่ในกลุ่ม cyclin family มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรของเซลล์โดยทำงานร่วมกับ cyclin-dependent kinases (CDKs) ในวัฏจักรของเซลล์พบการแสดงออกของ cyclin A1 ในระดับต่ำในขณะ G_0 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระหว่างการพัฒนาวัฏจักรของเซลล์จนสูงสุดในระยะ S และระยะ G_2 / M ในเซลล์มะเร็งกระดุก (Yang, Muller et al., 1999) มีการแสดงออกของยีนสูงในอัมพาตและมีบทบาทสำคัญในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย (Sweeney et al., 1996) นอกจากนี้ cyclin A1 ยังมีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบไมอีลอยด์ (Yang, Nakamaki et al., 1999) ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวข้างต้นเป็นหน้าที่ของโปรโตอองโคจีน ในทางตรงกันข้าม ในเซลล์มะเร็งไต มะเร็งรังไข่และเซลล์มะเร็งปอด cyclin A1 ชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟโปโทซิส และวัฏจักรของเซลล์หยุดที่ระยะ G_2/M (Rivera et al., 2006) การศึกษาของ Muller-Tidow และคณะ (2004) พบว่า cyclin A1-CDK2 จะร่วมกันทำหน้าที่ควบคุมกลไกการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอจากความเสียหายที่เกิดจากการได้รับรังสียูวีและรังสีแกมมา โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Ku70 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ (double strand break repair) ผ่านกระบวนการ Non-homologous end joining (Muller-Tidow et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งหลากหลายชนิด เช่น Weiss และคณะ (2011) พบว่าการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการ

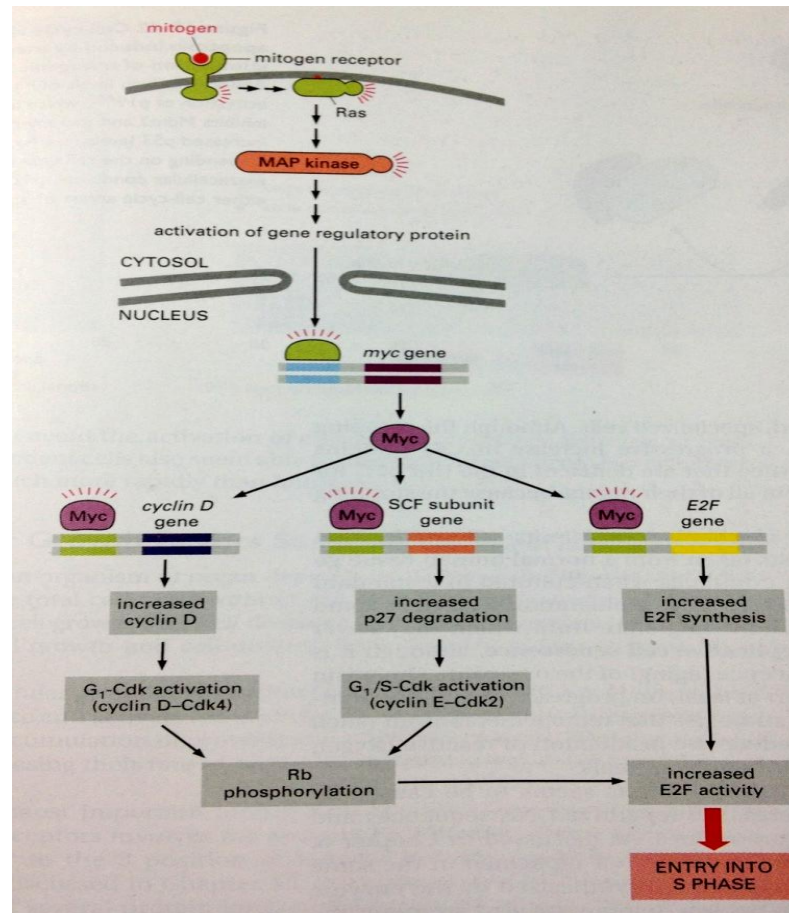
พัฒนาของมะเร็งศีรษะและลำคอ Kitkumthorn และคณะ (2006) พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* สูงถึง 93% ในมะเร็งปากมดลูก Xu และคณะ (2004) พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 100% ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ปกติของอวัยวะที่เกิดมะเร็งที่กล่าวไว้ข้างต้น ด้วยบทบาทหน้าที่ในการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอจากความเสียหาย การชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอพออโทซิส และการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งหลากหลายชนิด ทำให้คาดว่ายีน *CCNA1* อาจมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็ง

CCNA2

ยีน *CCNA2* เป็นยีนในกลุ่ม cyclin family เช่นเดียวกับ *CCNA1* และเป็น 1 ในสมาชิกของ cyclin A ยีน *CCNA2* ถอดรหัสให้โปรตีน cyclin A2 ที่มีหน้าที่สำคัญในวัฏจักรของเซลล์ โดยควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในระยะ S ถึงระยะ G₂/M ในการแบ่งเซลล์ร่างกาย และยังคงพบว่า *CCNA2* มีการแสดงออกในทุกเซลล์ (Sweeney et al., 1996)

การควบคุมวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle regulation)

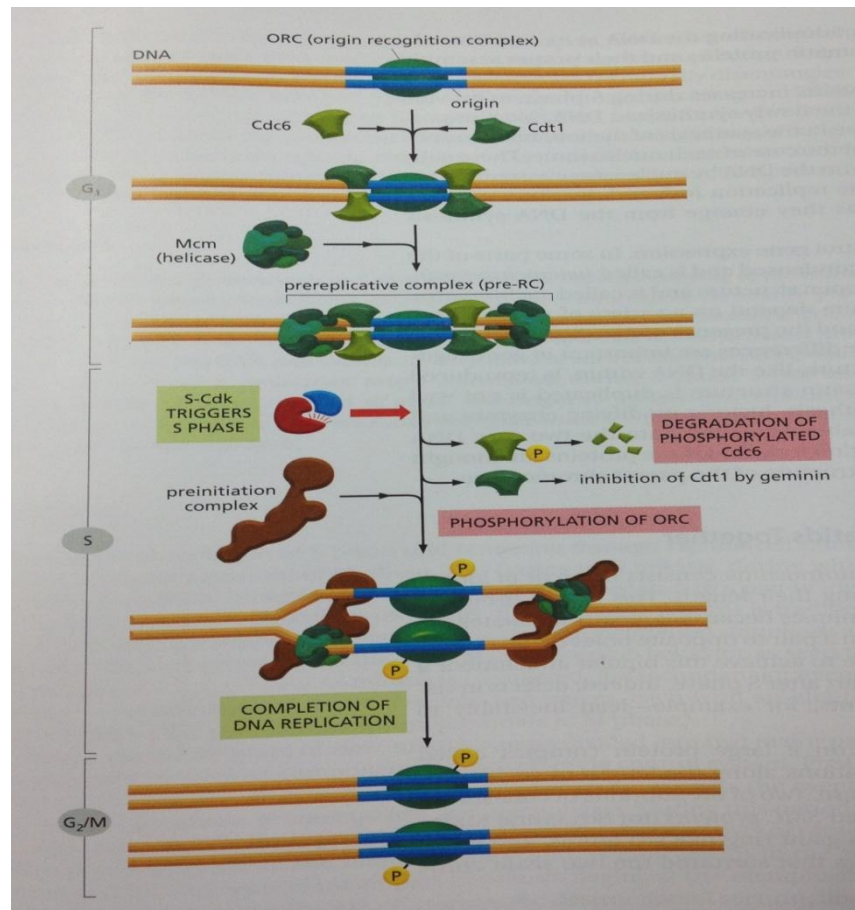
ในระยะ G₁ เริ่มจากการมีสัญญาณ mitogen ทำให้ GTPse Ras ถูกกระตุ้น เมื่อ GTPse Ras ถูกกระตุ้นทำให้ MAP kinase cascade ทำงาน กลไกนี้ทำให้เกิดการถอดรหัสของยีน Myc ซึ่งจะส่งเสริมวัฏจักรของเซลล์โดยผ่านหลายๆ กลไก ได้แก่ Myc ทำให้เกิดการ transcription ของยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีน cyclin D ทำให้กิจกรรมของ cyclin D/CDK4, cyclin D/CDK6 เพิ่มขึ้น และ Myc ยังเพิ่มการถอดรหัสของ SCF ubiquitin ligase ทำให้เกิดการลดลงของโปรตีน CKI p27 ซึ่งเป็น CDK inhibitor ส่งผลให้กิจกรรมของ cyclinE/CDK2 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Myc ยังกระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่แปลรหัสให้ E2F cyclin D ที่ไปจับกับ CDK4 และ CDK6 เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ tumor suppressor retinoblastoma (RB) ให้อยู่ในรูปที่มีฟอสเฟตต่ำ ๆ และทำให้เกิดการ transcription ของ cyclin E ซึ่งจำเป็นสำหรับการเข้าสู่ระยะ S เมื่อ cyclin E ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจะเข้าจับกับ CDK2 เกิดเป็นสารประกอบระหว่าง cyclinE/CDK2 และเพิ่มการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RB ทำให้ RB อยู่ในรูป hyperphosphorylated จนไม่สามารถจับกับ E2F โดย E2F ที่เป็นอิสระจะไปกระตุ้น transcription factor ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและยีนที่ถอดรหัสให้ S-phase CDK complex และผลักดันวัฏจักรของเซลล์ให้เข้าสู่ระยะ S ดังภาพที่ 3 (Alberts, 2002)



ภาพที่ 3 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในระยะเวลา G_1 ภายหลังจากการได้รับสัญญาณ mitogen (Alberts, 2002)

ในระยะเวลา S จะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้น โดยในระยะเวลา G_1 cdc6 และ Cdt1 จะจับอยู่กับ ORC (origin recognition complex) ที่ตำแหน่ง origin of replication และเกิดการ recruit Minichromosome Maintenance proteins (MCM) รวมตัวกันเป็น pre-replication complex (pre-RC) เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ S จะเกิดการจับกันของ cyclin A/CDK2 สารประกอบระหว่าง cyclin A/CDK2 จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ cdc6 ทำให้ cdc6 ถูกทำลายโดย SCF enzyme complex และถูกส่งออกไปยังไซโทพลาซึมเพื่อป้องกันการกลับมาจับกับ origin recognition complex (ORC) และ MCM proteins ที่ทำให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้ง ส่วน Cht1 จะถูกยับยั้งด้วย geminin cyclin A/CDK2 นอกจากจะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ cdc6 แล้ว มันยังเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ ORC ทำให้เกิดการรวมตัวของ DNA polymerase, primase และเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการจำลองดีเอ็นเอ และยังกระตุ้น MCM proteins ให้เคลื่อนไปบนสายดีเอ็นเอทำให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอ

เอเป็นสายเดี่ยวโดยการตัดพันธะไฮโดรเจนบนสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 4 (Alberts, 2002)

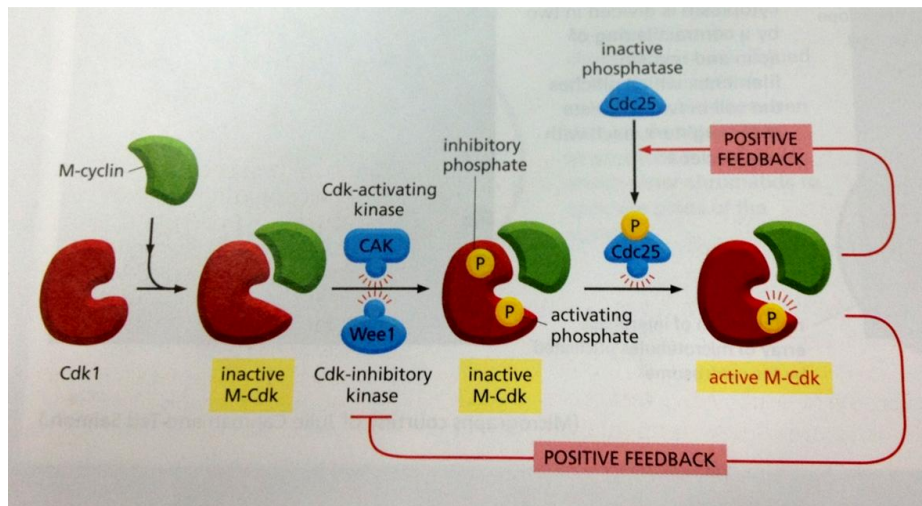


ภาพที่ 4 การควบคุมกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ

(Alberts, 2002)

ในระยะ G_2 เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่ มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โปรตีนที่จำเป็นสำหรับการแบ่งนิวเคลียสและไซโทพลาซึมที่จะเกิดขึ้นในระยะ mitosis การควบคุมระยะ G_2 ในช่วงแรก cyclin A ร่วมกับ CDK1 กระตุ้นให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินต่อไป ในช่วงปลายของระยะ G_2 ถูกควบคุมโดย cyclin B/CDK1 ซึ่ง cyclin B ถูกถอดรหัสในช่วงปลายของระยะ S cyclin B/CDK1 หรือเรียกว่า maturation promoting factor (MPF) ถูกควบคุมโดยมีการเติมและดึงหมู่ฟอสเฟตออกจาก CDK1 โดย cdc2 activating kinase (CAK) และ cdc25 โดย CAK จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ CDK1 ที่ตำแหน่ง threonine 161 ส่วน cdc25 phosphatase จะดึงหมู่ฟอสเฟตออกจาก CDK1 ที่ตำแหน่ง tyrosine 15 ทำให้ CDK1 ทำงาน cyclin B/CDK1 กระตุ้นการทำงานของ cdc25 โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ cdc25 และยับยั้งการทำงานของ Wee1 ที่มีหน้าที่ใน

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ CDK1 ที่ตำแหน่ง tyrosine 15 เมื่อมี active MPF มากพอ เซลล์จะถูกผลักดันให้เข้าสู่ระยะ M ดังภาพที่ 5 (Alberts, 2002)



ภาพที่ 5 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G₂
(Alberts, 2002)

ในระยะ M เซลล์จะมีการแบ่งนิวเคลียสและไซโทพลาซึม

ในระยะ prophase: cyclin B/CDK1 ทำให้เกิด chromatin condensation โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ condensin complex นอกจากนี้ cyclin B/CDK1 ยังเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน lamin ซึ่งในระยะ interphase lamin จะจับตัวกันเป็นตาข่าย เป็นโครงสร้างที่ยึดเยื่อหุ้มนิวเคลียสให้คงรูปร่างเอาไว้ เมื่อโปรตีน lamin ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตทำให้มันกลายเป็น dimer เล็กๆ สูญเสียโครงสร้างตาข่ายทำให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายไป เมื่อเยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายไปทำให้โครโมโซมเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ

ในระยะ prometaphase: cyclin B/CDK1 เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนที่ควบคุม microtubule ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ microtubule ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง spindle fiber และการแบ่งไซโทพลาซึม cyclin B/CDK1 ยังรวมกับ duplicated centrosome และส่งเสริมให้เกิดการแยกของ centrosome โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ centrosome-associated motor protein Eg5 ทำให้ centriole ทั้ง 2 เคลื่อนที่ไปยังแต่ละขั้วเซลล์ และที่รอบๆ centriole จะมี spindle fiber ยื่นออกมามากมาย เรียกว่า aster

ในระยะ metaphase: เส้นใยสปินเดิลจะจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่ง kinetochore ทำให้โครโมโซมเคลื่อนที่มาเรียงตัวอยู่ในแนวกลางเซลล์ (metaphase plate)

ในระยะเวลา anaphase: เส้นใยสปินเดิลจะหดตัวสั้นลง ดึง sister chromatid ให้แยกออกจากกันไปยังขั้วทั้ง 2 ของเซลล์ ก่อนระยะ anaphase securin จะจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ separase เมื่อสิ้นสุดระยะ metaphase การทำลาย securin จะเกิดขึ้นโดย APC/C ที่ถูกกระตุ้นด้วย cdc20 ทำให้เอนไซม์ separase ถูกปลดปล่อยและไปทำลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ cohesion ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยึด sister chromatid ทั้ง 2 ไว้ด้วยกัน นอกจากนี้ APC/C ยังทำให้เกิด ubiquitin-dependent proteolysis ของ cyclinB/CDK1 ทำให้ cyclinB/CDK1 ถูกทำลาย

ระยะ telophase: เป็นระยะสุดท้ายของ mitosis หลังจากโครโมโซมถูกแยกจากกันด้วยเส้นใยสปินเดิล และ cyclinB/CDK1 ถูกทำลาย โครโมโซมจะมีการคลายตัวกลายเป็นโครมาติน เกิดการสลายไปของเส้นใยสปินเดิลและมีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสมัลล้อมรอบกลุ่มของโครมาตินที่แต่ละขั้วเซลล์ ทำให้ได้นิวเคลียส 2 นิวเคลียส เมื่อสิ้นสุด telophase จะมีการแบ่งไซโทพลาซึม โดยเกิด contractile ring ของ actin และ myosin filament เกิดเป็น cleavage furrow ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์คอดจนแยกออกจากกัน ได้เซลล์ 2 เซลล์ที่เหมือนกันทุกประการ (Alberts, 2002)

จุดตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle checkpoint)

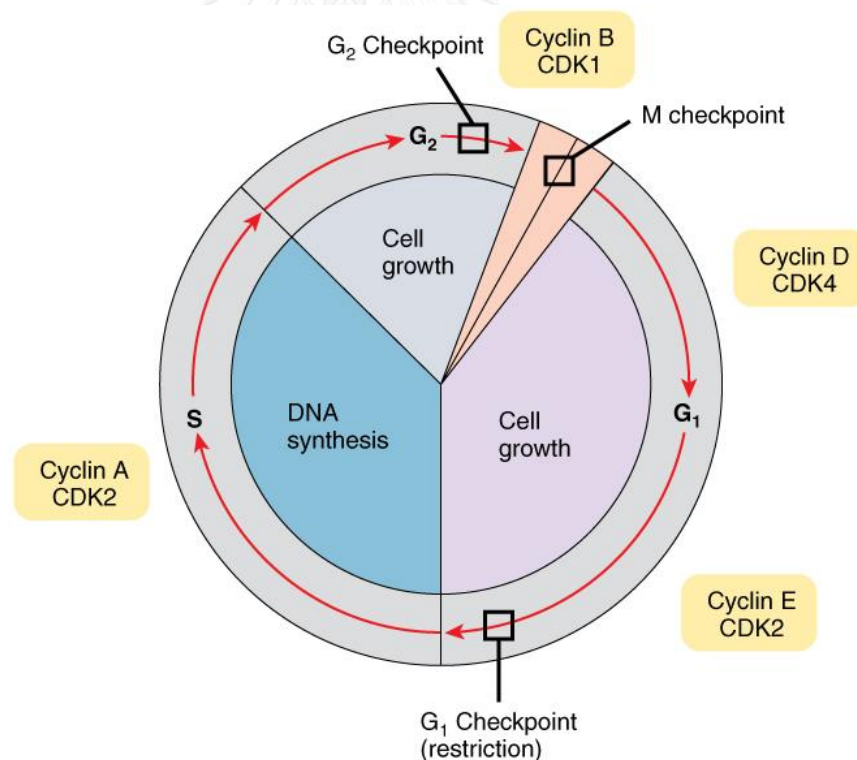
จุดตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ เป็นกลไกในการตรวจสอบความถูกต้องและความผิดปกติของดีเอ็นเอก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ในระยะถัดไป โดยเซลล์ที่ผิดปกติจะถูกหยุดไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์และมีการซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่ผิดปกติ ก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ต่อไป แต่หากไม่สามารถซ่อมแซมแก้ไขได้ เซลล์จะถูกชักนำให้เกิดการตายแบบแอพออโทซิส (Alberts, 2002)

จุดตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ จะเกิดขึ้นที่บริเวณรอยต่อของแต่ละระยะ ดังภาพที่ 6 ได้แก่

1. G₁ checkpoint (restriction point) เป็น checkpoint ที่อยู่ที่ตอนปลายของระยะ G₁ เป็นการตรวจสอบความพร้อมของเซลล์เพื่อเข้าสู่ระยะ S ได้แก่ ขนาดของเซลล์ growth factor และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการจำลองดีเอ็นเอ ถ้ามีปัจจัยต่าง ๆ พร้อม เซลล์จะเข้าสู่ระยะ S แต่หากขาดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งไปเซลล์จะเข้าสู่ระยะพัก หรือหากตรวจพบความผิดปกติหรือความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น p53 จะถูกกระตุ้น ซึ่งการทำงานของ p53 จะทำให้เกิดการ transcription ของยีน p21 ซึ่งเป็น CDK inhibitor ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้ง complex ของ cyclin/CDK ทำให้ไม่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RB ทำให้ RB ยังคงจับอยู่กับ E2F จึงไม่เกิดการ transcription ของยีนที่จำเป็นสำหรับการจำลองดีเอ็นเอ เซลล์จึงไม่สามารถเข้าสู่ระยะ S ได้
2. G₂ checkpoint เป็น checkpoint ที่อยู่ที่จุดสิ้นสุดของระยะ G₂ เป็นการตรวจสอบความพร้อมของเซลล์เพื่อเข้าสู่ระยะ M โดยโครโมโซมจะต้องประกอบด้วย 2 โครมาทิดและโครมาทิดในโครโมโซมเดียวกันต้องมีสารพันธุกรรมที่เหมือนกัน เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบต่าง

ๆ ว่าครบถ้วนสมบูรณ์แล้ว เซลล์จะเข้าสู่ระยะ M โดย cyclin B/CDK1 หรือ MPF จะเกี่ยวข้องกับ G₂ checkpoint คือถ้าตรวจพบความผิดปกติหรือความเสียหายของดีเอ็นเอ วัฏจักรของเซลล์จะหยุดลง โดยเป็นผลมาจากโปรตีน ATM kinase ที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ cdc25 ทำให้ cdc25 inactivate และถูกติดฉลากด้วย ubiquitin และถูกทำลายด้วย proteosome ทำให้ CDK1 ยังคงถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง tyrosine 15 โดย Wee1 cyclin B/CDK1 จึงอยู่ในสภาพ inactive

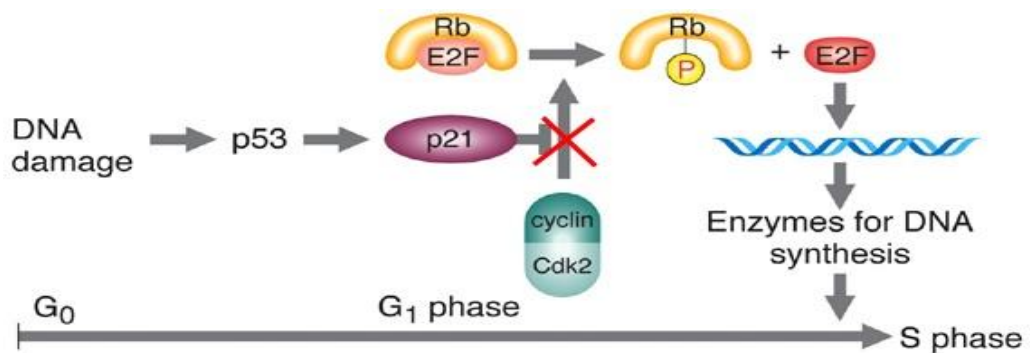
3. M checkpoint เป็น checkpoint ที่อยู่ใน Mitosis เป็นการตรวจสอบว่าเส้นใยสปินเดิลจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่ง kinetochore อย่างครบถ้วนหรือยัง และโครโมโซมมีการเคลื่อนที่มาเรียงตัวอยู่ในแนวกลางเซลล์ M checkpoint เกิดขึ้นที่ระยะ metaphase ถ้าเส้นใยสปินเดิลจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่ง kinetochore อย่างครบถ้วนเซลล์ก็จะเข้าสู่ระยะ anaphase แต่ถ้าการจับกันของเส้นใยสปินเดิลที่ตำแหน่ง kinetochore ของโครโมโซมยังไม่สมบูรณ์ Mad2 จะไปยับยั้ง cdc20 ทำให้ APC/C ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการทำลาย securin เซลล์ก็จะไม่สามารถเข้าสู่ anaphase ได้ (Alberts, 2002)



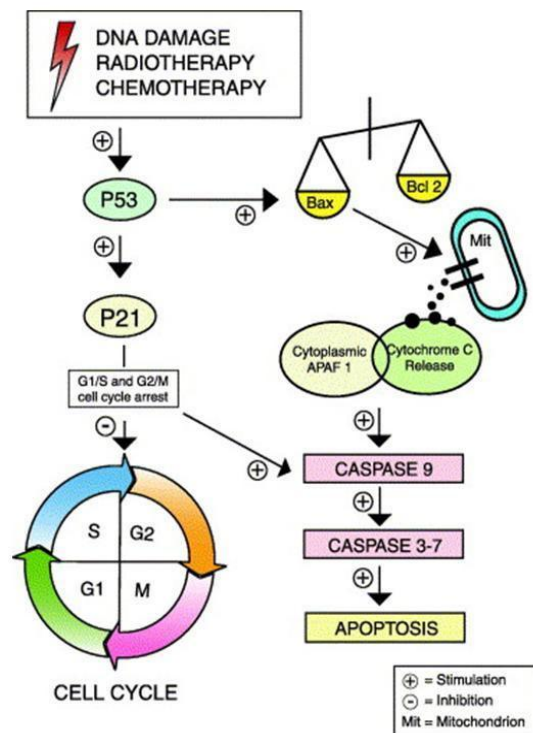
ภาพที่ 6 จุดตรวจสอบในวัฏจักรเซลล์ระยะต่างๆ

(<https://courses.candelalearning.com/biology11xmaster/chapter/cell-cycle-with-cyclins-and-checkpoints/>)

ในวัฏจักรของเซลล์เมื่อมีความผิดปกติหรือมีความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น วัฏจักรของเซลล์จะหยุดเพื่อให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย โดยจะเกิดการกระตุ้นยีน *p53* ซึ่งเมื่อ *p53* ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการ transcription ของยีน *p21* ซึ่งเป็น CDK inhibitor ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้ง complex ของ cyclin/CDK ทำให้ไม่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต ให้กับ RB ทำให้ RB ยังคงจับกับ E2F ซึ่งเป็น transcription factor เอาไว้ จึงไม่เกิดการ transcription ทำให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลง และกระตุ้นให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอ แต่ถ้าความเสียหายของดีเอ็นเอมากเกินไปที่จะซ่อมแซมได้ *p53* จะชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิส ดังภาพที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 กลไกการหยุดวัฏจักรเซลล์เมื่อดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย
(http://www.bio.miami.edu/dana/250/250SS15_15.html)



ภาพที่ 8 กลไกการทำงานของยีน *p53* ในการหยุดวัฏจักรของเซลล์ และการชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอพอโทซิส

Gene silencing

เป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน มีด้วยกัน 2 ระยะ คือ ในระดับการถอดรหัส และระดับหลังการถอดรหัส

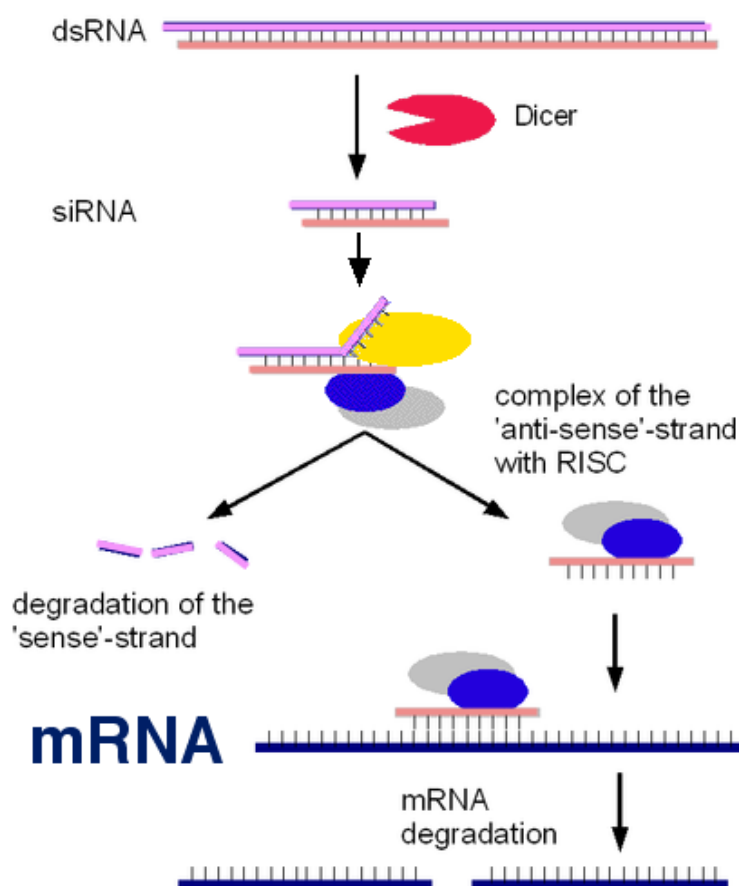
1. การยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส (transcriptional gene silencing) เป็นผลมาจากกลไกทาง epigenetics ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ และการเปลี่ยนแปลงฮิสโตน กลไกทาง epigenetics เป็นกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทำให้ไม่เกิดการ transcription ขึ้น (Kawasaki et al., 2005)
2. การยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับหลังการถอดรหัส (post-transcriptional gene silencing) เกิดจากกระบวนการ RNA interference (RNAi) โดยผ่านการทำงานของอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก ได้แก่ siRNA shRNA และ miRNA ในการตัดและทำลายอาร์เอ็นเอของยีนเป้าหมาย หรือยับยั้งการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน RNA interference เป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน สามารถป้องกันเซลล์จากไวรัสและป้องกันจีโนมจาก transposon ได้ (KawasakiTaira and Morris, 2005)

RNA interference หรือ RNAi

RNAi เป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ โดยการทำลายโมเลกุลของอาร์เอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจง ถูกค้นพบโดย Fire และ Mello ซึ่งต่อมาได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาและแพทย์ในปี ค.ศ. 2006 ในการศึกษากลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนในหนอน *C. elegans* กระบวนการ RNAi เป็นกระบวนการในการป้องกันเซลล์จากการบุกรุกของไวรัส สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนสัญจร (jumping genes) หรือทรานสโพซอน และยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ (ณยา วงศ์พูน, 2011)

กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย siRNA

เมื่อนำ dsRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเข้าสู่เซลล์ จะถูกตัดโดยเอนไซม์ Dicer ให้มีขนาดประมาณ 21-25 คู่เบส เรียกว่า siRNA จากนั้น siRNA จะเข้าจับกับโปรตีน Ago2 เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า RNA Inducing Silencing Complex (RISC) จากนั้นเอนไซม์ RNA helicase จะทำการแยกสายของอาร์เอ็นเอจากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว โดยสายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเรียกว่าสาย “Antisense” หรือ “Guide strand” ส่วนอีกสายเรียกว่า “Sense” หรือ “Passenger strand” โดย Guide strand จะนำ RISC ไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง จากนั้นเอนไซม์ nuclease จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์บนสายเอ็มอาร์เอ็นเอ ทำให้สายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายสลายตัว ไม่มีเอ็มอาร์เอ็นเอถูกส่งเข้าสู่กระบวนการแปลรหัส จึงไม่มีโปรตีนของยีนนี้ (ณยา วงศ์พูน, 2011) ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย siRNA
(http://en.wikiversity.org/wiki/RNA_interference)

Small interfering RNA (siRNA)

เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ มีขนาดประมาณ 20-25 คู่เบส ถูกใช้ในการตัดและทำลายโฮโมโลกัสเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (homologous mRNA) ในระดับหลังการถอดรหัส (post-transcription) (Mette et al., 2000) เพื่อไม่ให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมาย siRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้อย่างจำเพาะเจาะจง มักใช้ในการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน ในอนาคตอาจนำมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากความผิดปกติของยีน การยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย siRNA มักใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว มันสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้นาน 3-5 วันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และความเข้มข้นของ siRNA ที่ใช้

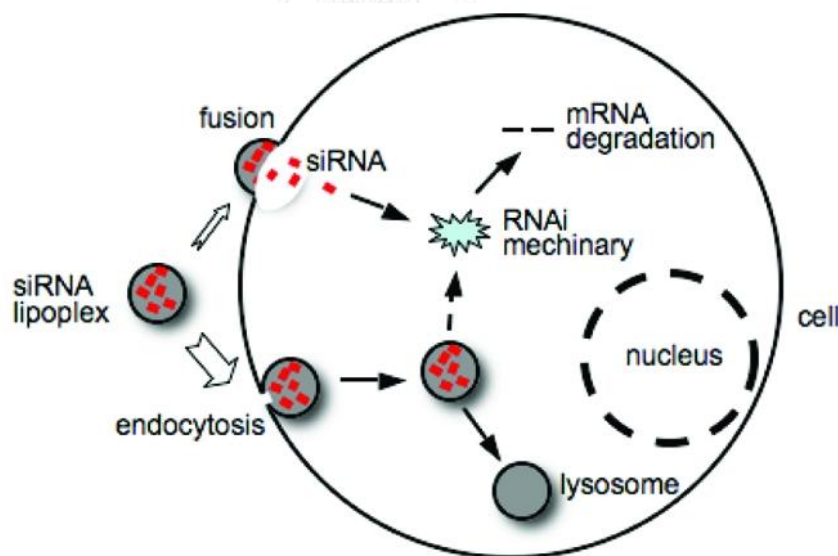
การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์

การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การใช้ไวรัสเป็นพาหะในการขนส่ง siRNA การใช้สารละลายในการขนส่ง siRNA วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่ให้ผลในการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์

ที่มีประสิทธิภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และใช้ได้กับเซลล์หลากหลายชนิด ได้แก่ liposomal based technique (Dalby et al., 2004)

Liposomal based technique

ในการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ด้วย liposomal-based technique ประมาณ 95% ของ siRNA lipoplex จะเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี endocytosis ส่วน siRNA lipoplex บางส่วนจะเข้าสู่เซลล์ โดยการหลอมรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Lu, Langer, and Chen, 2009) liposome ที่มีประจุบวกจะจับกับประจุลบของ siRNA และนำ siRNA เข้าสู่เซลล์โดยวิธี endocytosis โดยอาศัย receptor ที่จำเพาะกับ liposome ทำให้ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ตรงจุดที่โมเลกุลของ siRNA lipoplex มาสัมผัสเกิดการเว้าเข้า โอบล้อม complex และเคลื่อนตัวจากด้านนอกเข้าสู่ด้านใน จนหลุดเข้าสู่ไซโทพลาซึมของเซลล์ ดังภาพที่ 10 ส่วนในเซลล์ที่ทรานสเฟกได้ยากหรือ non-dividing cell มักใช้ไวรัสในการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ แต่การนำส่งด้วยวิธีนี้มีข้อเสียคืออาจกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหรืออาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (Qiagen, 2010 : ออนไลน์)



ภาพที่ 10 การขนส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี Liposomal based technique

(<https://www.scienceopen.com/document/vid/504123fe-1aae-4544-bd73-090664e278d0>)

หลักการในการออกแบบ siRNA

การออกแบบ siRNA เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน มีหลักการดังนี้

1. siRNA ควรมีความยาวประมาณ 20-25 คู่เบส
2. ออกแบบให้อยู่ในส่วนของ exon
3. หลีกเลี่ยงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็น secondary structure
4. หลีกเลี่ยงบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำกันเกิน 4 ตัวหรือมากกว่า เช่น GGGG, CCCC
5. มีค่า GC content อยู่ในช่วง 30-65%
6. หลีกเลี่ยงตำแหน่งที่เป็น SNPs
7. หลีกเลี่ยงตำแหน่ง 5'UTR และ 3'UTR
8. Blast ดูว่าให้แน่ใจว่า siRNA ที่ออกแบบไม่มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่น (Petri and Meister, 2013)

นอกจากการออกแบบ siRNA ที่ดีแล้ว ประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย siRNA ยังขึ้นอยู่กับ

1. ความเข้มข้นของ siRNA ซึ่งไม่ควรเกิน 100 nM การใช้ siRNA ที่มีความเข้มข้น 100 nM หรือมากกว่า จะทำให้เกิด nonspecific silencing
2. เลือกใช้ siRNA ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน เพื่อให้ไม่เกิดการกระตุ้น cellular stress response
3. ใช้เซลล์ที่มี % confluent อยู่ที่ 60-80% และมีจำนวน passage น้อยกว่า 50 passage
4. ในการทรานสเฟก siRNA เข้าสู่เซลล์ หลีกเลี่ยงการเติม antibiotic ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Petri and Meister, 2013)

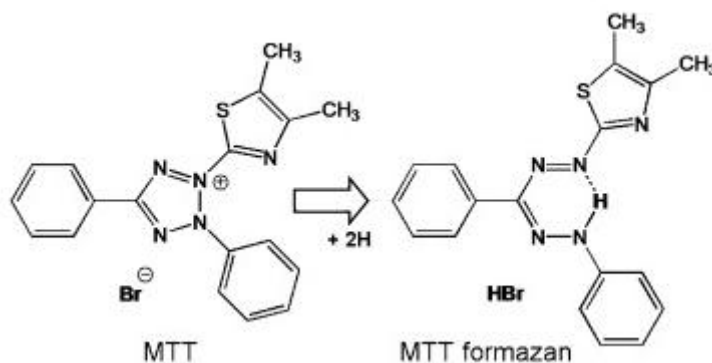
การตรวจสอบประสิทธิภาพของ siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

1. การวัดระดับโปรตีนของยีนเป้าหมายโดยการทำให้ Western blot analysis หรือ Immunoblotting ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนต่างชนิดกันออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุลโปรตีนโดยการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นย้ายโปรตีนไปยังเมมเบรน และตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้ antibody ที่จำเพาะในการจับกับโปรตีนเป้าหมาย (Sharkey, Banat, and Marchant, 2004)
2. การวัดระดับ mRNA ของยีนเป้าหมายโดยการทำให้ reverse transcription PCR หรือทำ real-time PCR

- reverse transcription PCR (RT-PCR) เป็นวิธีที่ใช้วัดการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ โดยประกอบด้วย 2 ปฏิกริยา คือ
 1. reverse transcription คือการสร้าง cDNA จาก RNA template โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase
 2. การเพิ่มปริมาณ cDNA โดยสามารถทำได้ใน 2 รูปแบบคือ
 1. one step RT-PCR ซึ่งทั้งปฏิกริยา reverse transcription และ PCR จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องภายในหลอดเดียวกัน โพรเมอร์ที่ใช้จะต้องเป็น gene specific primer เท่านั้น
 2. Two step RT-PCR ปฏิกริยา reverse transcription และพีซีอาร์เกิดขึ้นคนละหลอด คือสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ โดยใช้โพรเมอร์แบบใดก็ได้ เช่น Oligo-DT primer, Random hexamers primer หรือ gene specific primer จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปทำ PCR ในหลอดที่ 2 ต่อโดยใช้ gene specific primer (Sharkey et al., 2004)
- Real-time PCR หรือ Quantitative PCR เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากการทำพีซีอาร์แบบดั้งเดิม โดยสามารถติดตามปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ในทุกรอบของปฏิกริยา ไม่ต้องรอเสร็จสิ้นกระบวนการเหมือนกับพีซีอาร์แบบดั้งเดิม การติดตามผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการทำ real-time PCR ทำได้โดยการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงพวก intercalating dye เช่น SYBR Green ซึ่งจะเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ตรงตำแหน่ง minor groove และแสดงค่าออกมาเป็นการเพิ่มขึ้นของสัญญาณ fluorescence เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV (Sharkey et al., 2004)

MTT assay

เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีของ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลือง ให้กลายเป็นผลึกฟอร์มazan ที่มีสีม่วง โดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial reductase ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ที่พบได้ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตเท่านั้น ดังภาพที่ 11 ดังนั้นความเข้มของสีจึงแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Riss et al., 2004)



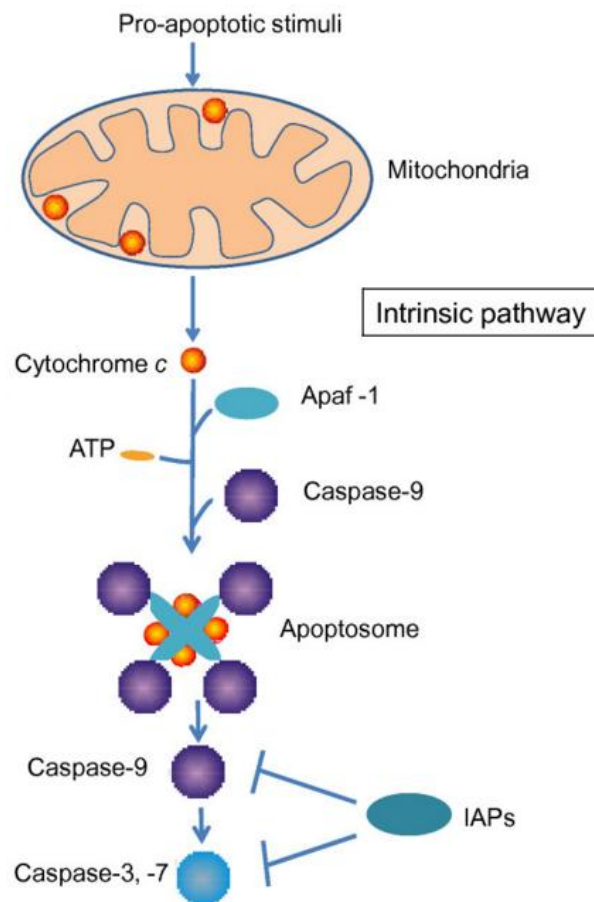
ภาพที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ MTT และผลึกฟอร์มazan

(Stockert et al., 2012)

Apoptosis หรือ Programed cell death

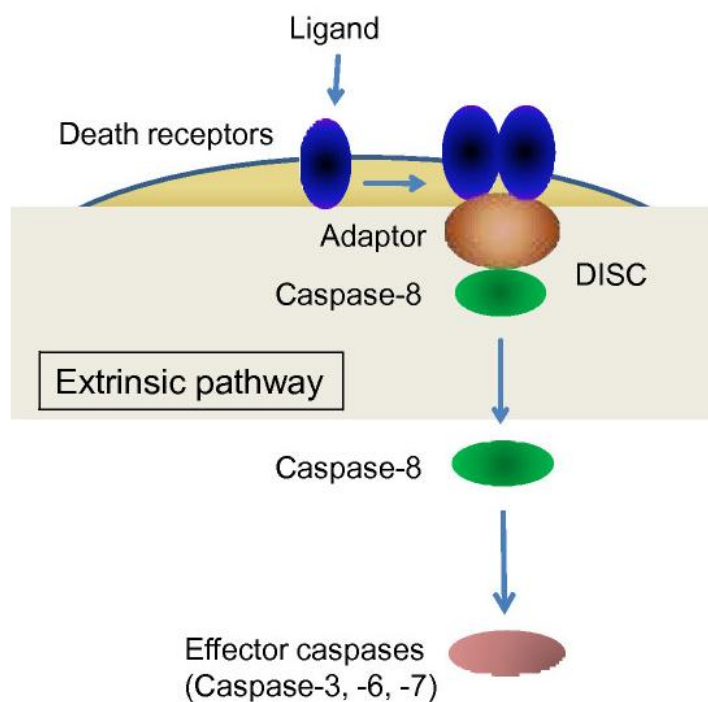
การตายแบบแอฟพอโทซิสเป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นปกติในร่างกายมนุษย์ ในระหว่างการพัฒนา การแก่และการรักษาสมดุลของเซลล์ในเนื้อเยื่อ และเป็นกลไกที่เกิดขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์ ในระบบภูมิคุ้มกันหรือเมื่อเซลล์เสียหายจากการเกิดโรค จากสารที่เป็นพิษอย่างร้ายแรง เช่น ยารังสี (Elmore, 2007) การที่เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการตายแบบแอฟพอโทซิส จะต้องได้รับการส่งสัญญาณ ซึ่งอาจเป็นสัญญาณที่ส่งมาจากภายในเซลล์ (intrinsic pathway) หรือสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway)

1. การชักนำให้เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิสจากสัญญาณภายในเซลล์ โดยการกระตุ้นผ่านไมโทคอนเดรีย (intrinsic mitochondrial-dependent pathway) ปัจจัยที่ทำให้เซลล์ส่งสัญญาณมากระตุ้นไมโทคอนเดรีย ได้แก่ รังสี สารเคมี ภาวะเครียดของเซลล์ ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ส่งผลให้ยีน *p53* ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้ *mdm2* ไม่สามารถจับกับ *p53* ได้ *p53* กระตุ้นให้มีการสร้าง BAX (BAX เป็น pro-apoptosis protein) เพิ่มมากขึ้น และเคลื่อนย้ายจาก cytosol ไปยังไมโทคอนเดรีย กระตุ้น membrane permeability ให้กับไมโทคอนเดรีย ทำให้ cytochrome C ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียถูกปลดปล่อยออกมา cytochrome C ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะเข้าจับกับโปรตีน APAF1 รวมตัวกันเป็น apoptosome กระตุ้น caspase-9 ให้ไปกระตุ้น caspase-3 และ caspase-7 ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิสดังภาพที่ 12 ในเซลล์ปกติ permeabilization ของไมโทคอนเดรียจะมีความสมดุลระหว่าง pro-apoptosis protein (เช่น BAX, BAK, BH3) และ anti-apoptosis protein (เช่น Bcl-2, Bcl-XL) แสดงว่าปริมาณของ pro-apoptosis protein และ anti-apoptosis protein จะเป็นตัวบ่งชี้ในการเกิดการตายของเซลล์แบบแอฟพอโทซิส (Melino, and Vaux, 2010)



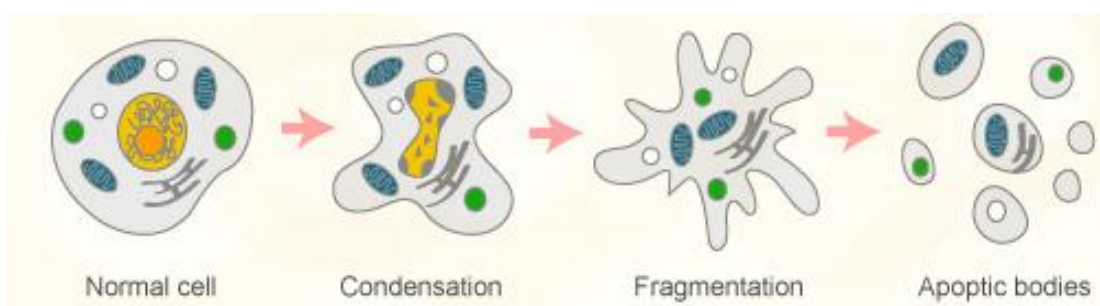
ภาพที่ 12 การส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิสจากสัญญาณภายในเซลล์
(<http://www.molecularbrain.com/content/5/1/15/figure/F1?highres=y>)

- การชักนำให้เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิสจากสัญญาณภายนอกเซลล์ โดย death receptor (extrinsic death receptor- dependent pathway) ซึ่ง death receptor ได้แก่ TNF และ fas receptor สัญญาณที่จะเหนี่ยวนำเรียกว่า ligand ได้แก่ fas ligand (fasL), tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) การจับกันของ receptor และ ligand ทำให้เกิดการเชื่อมต่อสัญญาณของ death domain (DD) และ death effector domain (DED) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า death-inducing signaling complex (DISC) โดย DED จะ recruit และกระตุ้น caspase-8 ให้แยก Bid ออกจากกัน จากนั้น truncated Bid (tBid) จะถ่ายทอดสัญญาณให้เซลล์ฆ่าตัวตายไปยังไมโทคอนเดรียและ apoptosome ทำให้ caspase-3, caspase-6 และ caspase-7 ถูกกระตุ้นและทำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิสขึ้น ดังภาพที่ 13 (Melino et al., 2010)



ภาพที่ 13 การส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟโพโทซิสจากสัญญาณภายนอกเซลล์
(<http://www.molecularbrain.com/content/5/1/15/figure/F1?highres=y>)

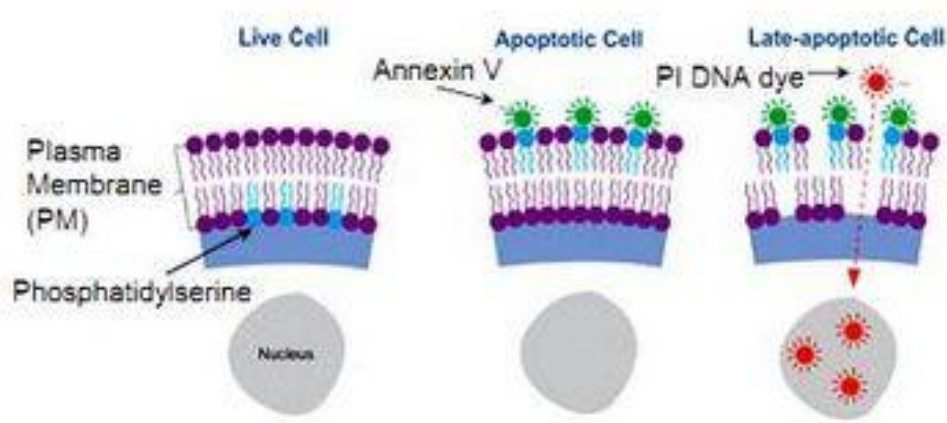
เซลล์ที่เกิดการตายแบบแอฟโพโทซิสจะมีสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป ในระยะแรกที่เซลล์เกิดการตายแบบแอฟโพโทซิส เซลล์จะหดตัวและมีการรวมตัวกันแน่นของโครมาติน ทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอ ในขณะที่เดียวกันเยื่อหุ้มเซลล์จะเหี่ยวฝ่อลง หุ้มเอานิวเคลียสและออร์แกเนลล์ต่างๆ รวมตัวกันเป็น apoptotic body จากนั้นจะเกิดการสลายตัวหรือถูกจับกินโดย phagocyte หรือ macrophage (Erwig and Henson, 2008) ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระหว่างเกิดการตายแบบแอฟโพโทซิส
(<http://www.abnova.com/support/resources.asp>)

Annexin V assay

เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการตายแบบแอฟโพโทซิสของเซลล์ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ในการตรวจสอบ ซึ่งในเซลล์ปกติ phosphatidylserine ที่มีคุณสมบัติเป็น anionic phospholipid จะถูกส่งเข้าสู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์โดย aminophospholipid translocase แต่เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบแอฟโพโทซิส phosphatidylserine จะถูกส่งออกมาอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ annexin V ที่มีประจุบวกจับกับประจุลบของ phosphatidylserine ได้ annexin V ที่ใส่ลงไปจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) เซลล์ที่ติดสีของ annexin-V/FITC จึงเป็นเซลล์ที่มีการตายแบบแอฟโพโทซิส การตรวจสอบด้วย annexin-V มักใส่สีย้อม propidium iodide ลงไปด้วยเพื่อให้สามารถแยกเซลล์ที่มีการตายแบบแอฟโพโทซิสกับเนโครซิสออกจากกันได้ เนื่องจากสี propidium iodide จะเข้าแทรกในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพได้เท่านั้น มันไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ได้ (Rieger et al., 2011) ดังรูปที่ 15



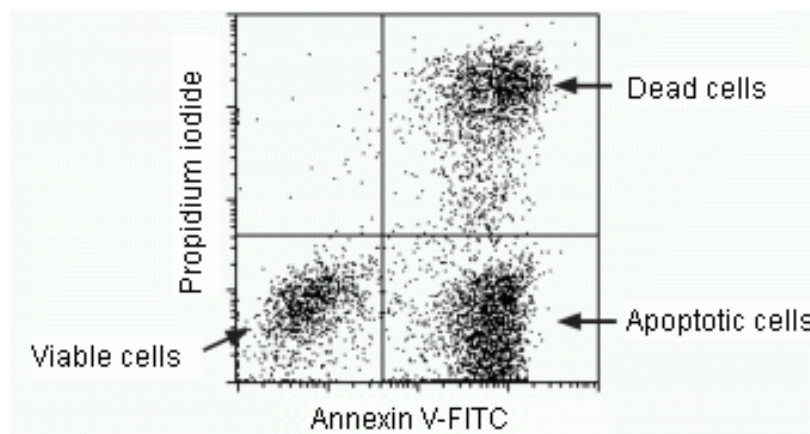
ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของ phosphatidylserine และการติดสี annexin V และ propidium iodine ในระหว่างที่เซลล์เกิดการตายแบบแอฟโพโทซิส

(<http://www.flow-cytometry.us/index.php?page=apoptosis>)

เมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการย้อม ด้วย annexin-V/FITC และ propidium iodide ไปตรวจสอบด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ จะพบเซลล์ 3 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีทั้ง annexin V และ propidium iodine ปรากฏกลุ่มเซลล์ในช่องทางด้านล่างซ้าย
2. กลุ่มเซลล์ที่อยู่ในระยะ early apoptosis เซลล์จะย้อมติดสี annexin V แต่ไม่ติดสีของ propidium iodine ปรากฏกลุ่มเซลล์ในช่องทางด้านล่างขวา

3. กลุ่มเซลล์ที่อยู่ในระยะ late apoptosis และ necrosis จะย้อมติดทั้งสี annexin V และ propidium iodide ปรากฏกลุ่มเซลล์ในช่องทางด้านบนขวา (Vermes et al., 1995) ดังภาพที่ 16

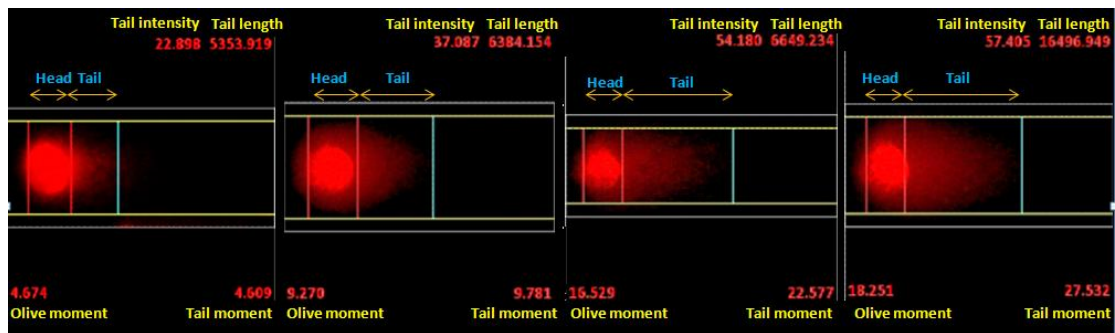


ภาพที่ 16 เซลล์ที่ถูกย้อมด้วย annexin-V/FITC และ propidium iodine เมื่อวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry

(<http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/mac3-flow-cytometry/reagents/support-reagents/annexin-v-fitc-kit.aspx>)

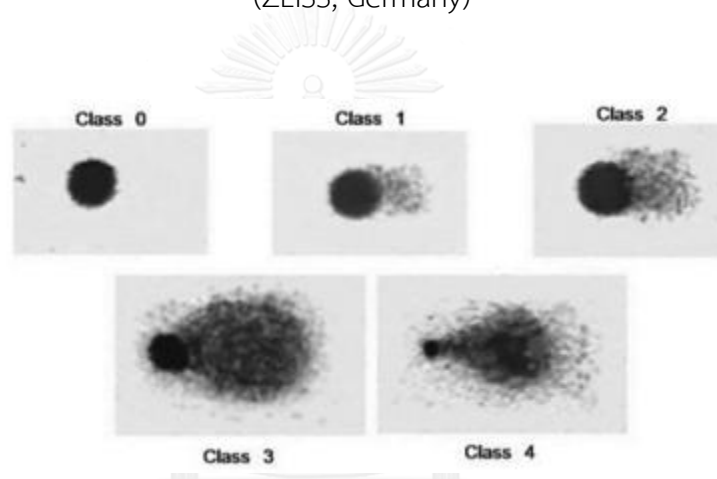
Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) หรือที่รู้จักในชื่อ COMET assay ถูกค้นพบโดย Östling และ Johansson ในปี 1984 และต่อมาได้รับการพัฒนาขึ้นโดย Singh ในปี 1988 เป็นเทคนิคที่ใช้ในการประเมินความเสียหายของดีเอ็นเอ การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอและการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อดีเอ็นเอในเซลล์ยูคาริโอต โดยอาศัยหลักการของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในการเคลื่อนที่ผ่านเจล ด้วยกระบวนการเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเซลล์จะถูกฝังใน agarose gel บนสไลด์ เมื่อผ่านกระบวนการอิเล็กโทรโฟรีซิส เซลล์ที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอจะมีการแตกหักเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก เมื่อย้อมดีเอ็นเอด้วยสีที่จำเพาะกับดีเอ็นเอ และตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ จะปรากฏภาพเซลล์คล้ายลักษณะดาวหาง ซึ่งส่วนหัวคือนิวเคลียสหรือดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ไม่ได้รับความเสียหาย ส่วนหางคือดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหาย (Olive and Banath, 2006) ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยวิธี comet assay ภายใต้กล้อง fluorescence และค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่วัดได้

(ZEISS, Germany)



ภาพที่ 18 ระดับความเสียหายของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยวิธี COMET assay

(Hasue et al., 2013)

สามารถจำแนกระดับความเสียหายของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยวิธี COMET assay ได้ทั้งหมด 4 ระดับ ดังภาพที่ 18 คือ

ระดับ 0 ไม่มีความเสียหายของดีเอ็นเอ : ส่วนหัวมีขนาดใหญ่ มีลักษณะกลมและสมบูรณ์ ไม่มีหาง

ระดับ 1 ความเสียหายเล็กน้อย : ส่วนหัวมีขนาดใหญ่ มีส่วนหางที่สั้น ซึ่งมีความยาวของหางน้อยกว่าหรือเท่ากับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว และความกว้างของหางน้อยกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว

ระดับ 2 ความเสียหายปานกลาง : ส่วนหัวมีขนาดใหญ่ ส่วนหางที่สั้น ซึ่งมีความยาวของหางมากกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว 1-2 เท่า และความกว้างของหางน้อยกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว

ระดับ 3 ความเสียหายรุนแรง : ส่วนหัวมีขนาดเล็ก ส่วนหางมีขนาดใหญ่และยาว ซึ่งมีความยาวของหางมากกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว 2-3 เท่า และความกว้างของหางมากกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัว 2-3 เท่า

ระดับ 4 ความเสียหายรุนแรงมาก : ส่วนหัวมีขนาดเล็กมาก ส่วนหางมีขนาดใหญ่และยาวมาก มีการกระจายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เสียหายจึงยากที่จะกำหนดขอบเขต (Hasue et al., 2013)

การวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นคำนวณจากค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

Head intensity คือ ความเข้มของส่วนหัว แสดงถึงดีเอ็นเอที่ไม่ได้รับความเสียหาย

Tail intensity คือ ความเข้มของหาง แสดงถึงดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหาย

%DNA in tail คือ $(\text{Tail intensity} \times 100) / \text{Total intensity}$

Tail length คือ ความยาวทั้งหมดของหางวัดจากขอบเขตของส่วนหัว ซึ่งแสดงขอบเขตของดีเอ็นเอที่เสียหาย

Tail moment คือ $\%DNA \text{ in tail} \times \text{Tail length}$

Olive tail moment คือ $\%DNA \text{ in tail} \times \text{Tail moment length}$

Tail moment length คือ ความยาวของหาง ซึ่งวัดจากจุดศูนย์กลางของหัวมายังจุดศูนย์กลางของหาง

ยังมีความเสียหายของดีเอ็นเอมากเท่าไร ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เหล่านี้ จะมากตามไปด้วย (Singh, 2006 : online)

BrdU assay

BrdU assay เป็นวิธีที่ใช้วัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยอาศัย BrdU (Bromodeoxydridine) ซึ่งเป็น pyrimidine analog โดยระหว่างที่เซลล์มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในระยะ S ของวัฏจักรเซลล์ BrdU จะเข้าไปแทนที่ thymidine หลังจาก BrdU เข้าไปแทนที่ thymidine ในนิวเคลียสแล้ว ตัวอย่างจะถูกคงที่ไว้และนำไปทำการแยกสายของดีเอ็นเอจากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวและติดตามปริมาณ BrdU ด้วย Anti-BrdU antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase จากนั้นทำการใส่ซับสเตรทลงไป เพื่อให้เอนไซม์ทำการย่อยซับสเตรทจนสารละลายเปลี่ยนแปลงสี (Wright, Connon, and Springer, 2013) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ เป็นการนำเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อของสัตว์หรือจากเซลล์ไลน์มาเพาะเลี้ยงในสภาวะภายนอกร่างกาย เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนในภาชนะเพาะเลี้ยง

ที่เป็นแก้วหรือพลาสติกบรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะกับเซลล์แต่ละชนิด การเพาะเลี้ยงเซลล์ แบ่งเป็น organ culture, explant culture และ cell culture ซึ่ง cell culture เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ที่นิยมที่สุด โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ เนื่องจากเซลล์มีคุณสมบัติคงที่ และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ จะต้องมีความเหมาะสมที่เซลล์อยู่รอด เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน โดยมีหลายปัจจัยในอาหารที่เป็นองค์ประกอบ เช่น ระบบบัฟเฟอร์ ความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และสารอาหาร ซึ่งต้องพิจารณาให้มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง
2. ก๊าซ ก๊าซที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์คือ ก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถทำได้โดย

1. การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมให้เซลล์เกิดการเจริญ มีเมตาบอลิซึมและเกิด differentiation สารอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ จะถูกใช้ไปหรือเสื่อมไปตามระยะเวลาการบ่มเลี้ยง ขณะเดียวกันก็ทำให้ metabolites สะสมอยู่ในสารละลายอาหาร จึงควรมีการเปลี่ยนอาหารเพื่อให้มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม โดยทั่วไปการเปลี่ยนอาหารมีจุดประสงค์อยู่ 3 ประการคือ

1. เพื่อใส่สารอาหารที่จำเป็น หรือสารอาหารที่มีปริมาณขาดแคลนและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์
2. เพื่อกำจัดหรือเจือจาง metabolites ที่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ หรือสารยับยั้งการเจริญของเซลล์ออกไป
3. เพื่อช่วยปรับระดับ pH ในสารละลายอาหารไม่ให้เป็นกรดมากเกินไป

โดยความถี่ในการเปลี่ยนอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ อัตราการเจริญและเมตาโบลิซึมของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณก๊าซในสถานะการเลี้ยง (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

2. การถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ (subculture) เป็นวิธีการรักษาเซลล์ที่มีทั้งข้อดีและข้อเสีย ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อดีและข้อเสียของการถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ (subculture)

(กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และนวนลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

ข้อดี	ข้อเสีย
<ul style="list-style-type: none"> - เซลล์มีการเจริญได้จำนวนเซลล์มากขึ้น - เซลล์มีชนิดเดียวเป็น Homogeneity เมื่อทำโคลนนิ่ง - กระจายให้ได้เซลล์ที่เป็น replicate sample 	<ul style="list-style-type: none"> - เกิดการคัดเลือกเซลล์ที่เจริญรวดเร็ว และสูญเสียคุณสมบัติ differentiation - เซลล์มีพันธุกรรมไม่คงที่ และเกิดความเสียหายจากการ subculture - เซลล์มีอายุมากขึ้นหรือมีความสามารถในการถ่ายเลี้ยงลดลง

การถ่ายเซลล์ไปยังภาชนะใหม่ นิยมใช้เอนไซม์ในการแยกเซลล์ เนื่องจากการเกาะจับกันของเซลล์แต่ละเซลล์ มีการเกาะจับกันด้วย glycoprotein เช่น cell adhesion molecules หรือ CAMs หรืออาจเป็นประเภทที่ต้องการ Ca^{2+} เช่น Cadherins การจับกันของเซลล์โดยโมเลกุลประเภทนี้ มีความไวต่อ chelating agent เช่น EDTA นอกจากนี้ การจับกันของเซลล์ยังอาศัย glycoprotein ประเภท fibronectin และ laminin ซึ่งมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน การแยกให้เซลล์หลุดออกจากการเกาะจับกันจึงสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น ทริปซิน หรือ trypsin/EDTA (กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และนวนลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

3. การเก็บเซลล์แช่แข็ง

การเก็บเซลล์แช่แข็งเป็นวิธีที่สามารถเก็บเซลล์ได้นาน โดยไม่ทำให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนแปลง กลไกการแช่แข็งเซลล์ เป็นการนำน้ำออกจากเซลล์ และการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆในขั้นตอนการแช่แข็ง ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์แช่แข็ง ดังนั้นการเก็บเซลล์แช่แข็งจึงต้องคำนึงถึง อัตราการทำให้เย็น ชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant โดยทั่วไปเซลล์สามารถอยู่รอดจากการแช่แข็งและการละลาย (thawing) ได้ด้วยสารป้องกันที่เรียกว่า cryoprotective agent เช่น glycerol หรือ DMSO ซึ่งมักใส่ประมาณ 5-10% (v/v) สารดังกล่าวมีผลต่อการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ คือทำให้น้ำออกจากเซลล์ขณะที่อุณหภูมิลดลง และสามารถลดจุดเยือกแข็งของสารละลายลง จึงทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์จนหมด ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ การเก็บเซลล์แช่แข็งมักเก็บในหลอดเล็กๆ (vial) และจุ่มในไนโตรเจนเหลว (กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และนวนลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

ปัจจัยที่ควรพิจารณาเพื่อเปลี่ยนอาหารในเซลล์เพาะเลี้ยง

1. pH ของสารละลายอาหาร การพิจารณาการเปลี่ยนอาหารโดยดูค่า pH เป็นวิธีที่นิยมมาก โดย pH ของอาหารเป็นค่าที่ขึ้นกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแลคติก ซึ่งมีผลให้ pH ลดลงเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน การเปลี่ยนอาหารควรเปลี่ยนเมื่อ pH ของสารละลายมีค่า 6.8 คืออาหารมีสีเหลือง-ส้ม โดยก่อนเปลี่ยนควรสังเกตดูปริมาณเซลล์ได้กล้องด้วย เนื่องจากการฉีดคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากเกินไปสามารถทำให้อาหารเป็นกรดได้ จึงควรตรวจดูให้แน่ใจว่าการลดลงของ pH เป็นผลมาจากเมตาโบลิซึมของเซลล์ที่เกิดจากการเจริญ
2. สารยับยั้งการเจริญ เมตาโบลิซึมของเซลล์เพาะเลี้ยง ทำให้เกิดสารที่มีพิษต่อเซลล์ สะสมในสารละลายอาหาร
3. สารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง การขาดแคลนสารอาหารชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะกรดอะมิโน ทำให้เซลล์ขาดการนำอาหารเข้าเซลล์อย่างเหมาะสม และเกิดเมตาโบลิซึมได้ไม่ดี (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวนลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

การนำเซลล์แช่แข็งมาเพาะเลี้ยง

การละลายเซลล์แช่แข็ง มีหลักปฏิบัติง่ายๆ โดยละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็วที่สุด อาจทำได้โดยการจุ่มหลอดเซลล์แช่แข็งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C พร้อมกับกวนเบาๆ ให้น้ำแข็งละลายหมดภายใน 1-5 นาที (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวนลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2007)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ฟอยล์ (Aro, China)
2. Serological pipette : 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning, USA)
3. ขวดเลี้ยงเซลล์ : 25 cm², 75 cm² (Corning, USA)
4. ทิป : 10 µl, 200 µl, 100 µl (Axygen, USA)
5. Cryovial tube (Corning, USA)
6. Autopipette (Corning, USA)
7. แผ่นวางหลอด (Autopack, USA)
8. CO₂ (สารสิทธิ์ออกซิเจน, Thailand)
9. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometry) (Boeco, Germany)
10. Polypropylene conical tube : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
11. พาราฟิล์ม (American National Can, USA)
12. ตัวกรองขนาด 0.2 µm (Corning, USA)
13. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ : 6 well/plate, 12 well/plate, 96 well/plate (Corning, USA)
14. ภาชนะสำหรับเตรียมเจลพร้อมหัว (Bioer, China)
15. ขวดรูปชมพู่ : 250 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
16. ขวดใส่สาร : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
17. ปีกเกอร์ : 100 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
18. Magnetic stirrer (Agilent, USA)
19. ซ้อนตักสาร (Pyrex, USA)
20. กระบอกตวง (Pyrex, USA)
21. หลอดฉีดยา (Nipro, Japan)
22. สไลด์ (Todoscan, China)
23. Cover slip (Menzel-glaser, England)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Microcentrifuge tube : 200 μ l, 1,500 μ l (Bio-rad Elkay, USA)
2. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
3. Water bath (Major Science, Taiwan)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Hettichzentrifugen, Germany)
5. เครื่องชั่งดิจิตอล (OHAUS, USA)
6. เครื่องผสมสาร (vortex) (WiseMix, Korea)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Agilent, USA)
8. อิเล็กโทรโพรซิซิส (Bioer, China)
9. เครื่อง polymerase chain reaction (Biometra, Germany)
10. ไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
11. Storm 840 and ImageQuanNT software (Amersham, UK)
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Ta chang, Taiwan)
13. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)
14. Vacuum pump
15. เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-Rad, USA)
16. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Motic, Germany)
17. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์
18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate leader) (Dyner, USA)
19. เครื่อง flow cytometry รุ่น FC500MPL (Beckman Coulter, USA)
20. ตู้เย็น (Sharp, Japan)
21. ตู้แช่แข็ง -20°C (Sander Inter Cool, Thailand)
22. ตู้แช่แข็ง -80°C (New Brunswick scientific, USA)
23. ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ (Thermo Scientific, USA)
24. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (Mettler Toledo, USA)
25. เครื่อง stirrer (Thermo fisher scientific, USA)
26. เครื่องฉายยูวี (Uvitec, UK)
27. เครื่องเขย่าสาร (Stovall, Georgia)
28. เครื่องรินเจลบนสไลด์ (Amersham, UK)
29. Horizontal Tank (Hofer, USA)
30. เครื่อง realtime PCR (Applied biosystems, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Absolute ethanol (Merck, USA)
- 1.2 Agarose-LE, ultrapure, molecular biology grade (USB, USA)
- 1.3 Bromophenol blue (Sigma, USA)
- 1.4 Chloroform (Merck, USA)
- 1.5 Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma, USA)
- 1.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)
- 1.7 EDTA (Merck, USA)
- 1.8 Ethidium bromide (Sigma, USA)
- 1.9 Hydrochloric acid (Merck, USA)
- 1.10 Isopropanol (Merck, USA)
- 1.11 Low melting point agarose (USB, USA)
- 1.12 SDS (BDH, England)
- 1.13 Sodium hydroxide (Merck, USA)
- 1.14 Tris-base (USB, USA)
- 1.15 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 1.16 Trypan blue (Sigma, USA)
- 1.17 Trypsin (Sigma, USA)
- 1.18 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.19 100 base pair DNA ladder (Promega, USA)

2. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์

- 2.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (Thermo, USA)
- 2.2 Fetal bovine serum (Gibco, USA)
- 2.3 Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA)
- 2.4 100X penicillin/streptomycin (Gibco, USA)
- 2.5 Sodium bicarbonate (Sigma, USA)
- 2.6 Trypsin-EDTA (Gibco, USA)

3. สารเคมีสำหรับทำ PCR

- 3.1 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
- 3.2 25 mM Magnesium chloride (Qiagen, Germany)
- 3.3 10 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega, USA)
- 3.4 Oligonucleotide primer (Bioscience, Thailand)
- 3.5 Hot start *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Germany)

4. สารเคมีสำหรับทำ transfection

- 4.1 Lipofectamine (Invitrogen, USA)
- 4.2 Opti-MEM reduced serum medium (Gibco, USA)
- 4.3 Stealth RNATM negative control medium CG duplex (Invitrogen, USA)
- 4.4 20 nMol Stealth RNAiTM siRNA (Invitrogen, USA)

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ COMET assay

- 5.1 Agarose-LE, ultrapure, molecular biology grade (USB, USA)
- 5.2 Agarose-ME, ultrapure (USB, USA)
- 5.3 PBS
- 5.4 Lysis buffer
- 5.5 TBE buffer

6. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

- 6.1 FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit (Invitrogen, USA)
- 6.2 RT premix (Bioneer, Korea)
- 6.3 SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad, USA)
- 6.4 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche, USA)
- 6.5 CytoSelectTM 24-well cell Invasion Assay (Basement Membrane, Colorimetric Format) (Cell Biolabs, France)

7. ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

เซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ (Head and neck cancer) HN4 และ HN12

8. โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

- 8.1 Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA)
- 8.2 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)
- 8.3 BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen, USA)
- 8.4 COMET (Carl Zeiss, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 7 ส่วน ได้แก่

1. การออกแบบ siRNA
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1*
3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี COMET assay
4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay
5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay
6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อแอพอปโทซิสของเซลล์ด้วยวิธี annexin V-FITC/PI
7. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay

1. การออกแบบ siRNA

การออกแบบ siRNA ใช้โปรแกรม BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen, USA) โดยไปที่เว็บไซต์ <https://maidesigner.lifetechnologies.com/maiepress/> เมื่อเข้าสู่โปรแกรมแล้ว เลือก target design option เป็น Stealth RNAi™ siRNA

1.1 ใส่ Accession number หรือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CCNA1* ลงไป ดังภาพที่ 19

Target Design Options: **Stealth RNAi™ siRNA** siRNA miR RNAi shRNA siRNA to Stealth RNAi™ siRNA siRNA to shRNA

Find out more about [Stealth RNAi™ siRNA](#), the next generation RNAi molecule.

Step 1: Enter an accession number or provide a nucleotide sequence

Accession number:

OR

Nucleotide sequence: Enter only A, C, G, T, and U. See the online Help for additional information

```

1  gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
61  gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
121 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
181 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
241 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
301 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
361 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
421 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
481 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg

```

ภาพที่ 19 หน้าเว็บไซต์ที่ใช้ในการออกแบบ siRNA

1.2 เลือกตำแหน่งของยีนเพื่อเป็นเป้าหมายในการยับยั้งการแสดงออก

1.3 เลือกฐานข้อมูลเพื่อทำการ BLAST

1.4 กำหนด %GC ที่ต้องการ จากนั้นคลิกปุ่ม RNAi Design ดังภาพที่ 20

Step 2: If you entered an accession number in Step 1, select regions for target design

Open reading frame (ORF) 5' UTR 3' UTR

Step 3: Choose database for Blast

Human - Homo sapiens **NOTE:** BLAST is used to compare input sequence with sequences in the database to find unique regions against which to design RNAi targets. The databases contain representative gene sequences for that species. Blast databases were updated on May 01, 2008 and the design output reflects the most up-to-date designs.

Step 4: Choose minimum and maximum G/C percentage

Minimum G/C percentage: 50% Maximum G/C percentage: 60%

Step 5: Click "RNAi Design" to design your Stealth RNAi™ siRNA molecules.

RNAi Design **Reset Form**

ภาพที่ 20 การใช้งานหน้าเว็บไซต์ที่ใช้ในการออกแบบ siRNA

1.5 เลือก siRNA ที่มีค่า rank มากที่สุด เพื่อประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน จากนั้นกด continue ดังภาพที่ 21

Recommended Stealth RNAi™ siRNA molecules

Gene Name:	Unknown	Accession:	Unknown	GI:	Unknown
Organism:	Unknown	Length:	1844	ORF Region:	Unknown
Definition:	Unknown				

10 Stealth RNAi™ siRNA target sequences (Up to 10 top scoring Stealth RNAi™ siRNA sequences are reported, sorted by the Start position and ranked as ★★★★★ to ★★☆☆☆ to indicate knockdown probability). Select the sequence to order and click "Continue".

Select	No.	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Rank ¹
<input type="checkbox"/>	1	340	GCA GCCCGTGGAGTCTGAA GCAATG		60.0	★★★★★
<input type="checkbox"/>	2	350	GAGTCTGAA GCAATGCACTGCAGCA		52.0	★★★★★
<input type="checkbox"/>	3	377	CCCAAGAGTGGAGTTGTGCTGGCTA		56.01	★★★★★
<input checked="" type="checkbox"/>	4	382	GAGTGGAGTTGTGCTGCTACAGTG		56.01	★★★★★
<input type="checkbox"/>	5	409	COGAGGTCOCGATGCTTGCAGATA		56.01	★★★★★
<input type="checkbox"/>	6	467	CAGAGGACAGTGCTAGGGCTGCTAA		56.01	★★★★★
<input type="checkbox"/>	7	726	COGACACTCAAGTCAGACCTOCA		60.0	★★★★★
<input type="checkbox"/>	8	1087	GCA GCTCAGGAACAGCACTATG		56.01	★★★★★
<input type="checkbox"/>	9	1302	GCGTCAGGACTGAGAACCTGGCTAA		56.01	★★★★★
<input type="checkbox"/>	10	1531	CCATCGACCTCAGCAAGCAATTAGG		52.0	★★★★★

¹Note: As a result of the recent update to the BLOCK-IT™ RNAi Designer, the "Star Scoring System" has also been updated to reflect our more highly refined RNAi duplex designs. Only the duplexes with the highest probability of success are provided which means that out of a possible five stars, no duplex has less than a three-star ranking. While each individual RNAi duplex is designed to achieve the highest quality results, we recommend selecting the top three star-ranked designs for your target of interest to guarantee your knockdown success.

ภาพที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CCNA1 siRNA ที่ได้จากโปรแกรม BLOCK-IT™ RNAi Designer

1.6 หน้าเว็บไซต์จะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ที่เลือก จากนั้นกด Order online ดังภาพที่ 22

Selected Stealth RNAi™ siRNA molecules with negative control sequences

The negative control sequence for each selected Stealth RNAi™ siRNA molecule is displayed. Select control sequences to order and click 'Order Online'

Select order format first before selecting products to order: Tube Plate

Select	No.	Name	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Rank
<input checked="" type="checkbox"/>	1	stealth_382	382	GAGTGGAGTTGTGCTGCTACAGTG		56.01	★★★★★
<input type="checkbox"/>		stealth_control_382		GAGAGTGGTGTTCGGTCCAAGTGTG		56.01	

ภาพที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ที่เลือกมาใช้ในการวิจัย

1.7 หน้าเว็บไซต์จะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ทั้ง sense และ antisense strand กด Save to Excel Spreadsheet ทำการส่งอีเมลเพื่อทำการสั่งซื้อต่อไป ดังภาพที่ 23

Target Design Options: [Stealth RNAi™ siRNA](#) [siRNA](#) [miR RNAi](#) [shRNA](#) [siRNA to Stealth RNAi™ siRNA](#) [siRNA to shRNA](#)

Save RNAi Order - instructions to order:
 1. Click "Save to Excel Spreadsheet" button to download order to Excel Spreadsheet
 2. Fill in (or have Purchasing Agent fill-in) customer information in rows 2-10 (5 and 6 are optional fields)
 3. Send to hk-srna@invitrogen.com.

Researcher Name: * Required field

Stealth RNAi™ siRNA Order #:

Primer Name	Purity	Scale
stealth_382	Desalted	20 nmole
Sense Sequence		
GAGUCGAGUUCUCUGGCUACAGUC		
Antisense Sequence		
CACUUAAGCCAGCAGACUCCACUC		

ภาพที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ทั้ง sense strand และ antisense strand

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน CCNA1

2.1 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษา

เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 2 ชนิด คือ

2.1.1 HN4 cells (Head and neck Cancer cell lines) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ บริเวณลิ้น

2.1.2 HN12 cells (Head and neck Cancer cell lines) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ บริเวณต่อมน้ำเหลือง (วัชรพงษ์ ภักดีชายแดน, 2013)

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษา ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง

การเพาะเลี้ยงเซลล์จะทำในตู้ปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงจะถูกเก็บแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพเซลล์และทำให้เก็บเซลล์ได้เป็นเวลานาน การนำกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ทำโดยการนำเซลล์ออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว และละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว โดยการจุ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C จากนั้นดูดฟันทิ้งให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ถ้าย้ายลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิตร ที่มี serum 10%V/V ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำเซลล์ไปบ่มเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อกำจัดหรือเจือจาง cryoprotective ที่ยังคงหลงเหลืออยู่และลดความเป็นพิษต่อเซลล์

2.2.2 การถ่ายเลี้ยงเซลล์

การถ่ายเลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการทดลองและเพิ่มปริมาณเซลล์ ภายหลังจากการนำเซลล์ที่แช่แข็งมาเพาะเลี้ยง ควรตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นระยะๆ เมื่อพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนประมาณ 70-80% ของพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์ ต้องทำการถ่ายเซลล์ไปยังขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยการ trypsinization เริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจนหมด ล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร เอียงให้ทั่วขวดเลี้ยงเซลล์หลายๆครั้ง แล้วดูดสารละลาย PBS ทั้ง (กรณีที่ใช้เซลล์เกาะผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์อย่างแข็งแรง ควรล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย PBS อีกครั้ง) เดิมเอนไซม์ทริปซินปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาให้เอนไซม์ทริปซินคลุมทั่วพื้นผิวเซลล์ นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5-10 นาที ระยะเวลาในการบ่มขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในขวดเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปซิน ดูดพ่นให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แบ่งถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ และนำเซลล์ไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อถ่ายเลี้ยงเซลล์หรือหากพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองควรทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อมีปริมาณเซลล์เพียงพอจึงนำไปทำการทดลองต่อไป หรือแบ่งเซลล์มาเก็บแช่แข็งไว้

2.2.3 การเก็บเซลล์แช่แข็ง

เมื่อต้องการเก็บเซลล์แช่แข็ง ให้ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจนหมด ล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร เอียงให้ทั่วขวดเลี้ยงเซลล์หลายๆครั้ง แล้วดูดสารละลาย PBS ทั้ง (กรณีที่ใช้เซลล์เกาะผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์อย่างแข็งแรง ควรล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย PBS อีกครั้ง) เดิมเอนไซม์ทริปซินปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาให้เอนไซม์ทริปซินคลุมทั่วพื้นผิวเซลล์ นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5-10 นาที ระยะเวลาในการบ่มขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในขวดเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปซิน ดูดพ่นให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นดูดสารละลายเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จ ดูดสารออกจนหมด เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูดพ่นให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้ง หลังปั่นเหวี่ยงเสร็จ ดูดสารออกจนหมด เติม freezing media (90% serum+10% DMSO) ดูดพ่นเบาๆให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ดูดเซลล์ใส่ลงใน cryotube หลอดละ 1 มิลลิลิตร ระบุชนิดของเซลล์และวันที่เก็บข้างหลอดให้ชัดเจน และปิดทึบบริเวณรอยต่อของฝากับหลอดเก็บเซลล์ ด้วยพาราฟิล์ม ปริมาณของเซลล์ในแต่ละหลอดเก็บเซลล์ควรอยู่ที่ $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำ cryotube ใส่ในกล่องที่บรรจุ isopropyl alcohol ที่แช่อยู่ในตู้แช่แข็ง -80°C โดยแช่ cryotube เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมงเพื่อให้อุณหภูมิค่อยๆลดลงอย่างช้าๆแล้วจึงย้าย cryotube ไปใส่ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

2.3 การแปรผันความเข้มข้นของ siRNA

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN4 และ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 200,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย siRNA โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของ siRNA ที่ 10, 30, 50, 70, 90 pmol และระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บเซลล์นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

2.4 การนำ siRNA เข้าสู่เซลล์โดยวิธี liposomal-based technique

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ HN4 และ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 200,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ใส่ลงในหลุม หลุมละ 800 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเตรียม

2.4.1 Opti-MEM reduced serum medium 99 ไมโครลิตร + Lipofectamine 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

2.4.2 Opti-MEM reduced serum medium 99.5 ไมโครลิตร + 20 nMol CCNA1 siRNA 0.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 10 pmol)

ใช้ Stealth RNATM negative control medium CG duplex แทน CCNA1 siRNA เพื่อเป็นตัวควบคุมลบ

หลังบ่มสารในข้อ 2.2.1 ครบ 15 นาที ผสมสารในข้อ 2.2.1 กับ 2.2.2 เข้าด้วยกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารทั้งหมดใส่ลงในหลุม เขย่าจานเลี้ยงเซลล์เบาๆ เพื่อให้ siRNA กระจายไปทั่วๆหลุม นำจานเลี้ยงเซลล์ใส่ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บเซลล์นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

2.5 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม เติม TRIzol reagent ลงไปหลุมละ 1 มิลลิลิตร ผสมจนกว่าจะใสด้วยไปเปิด ดูดของเหลวทั้งหมดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป พลิกหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 21,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่

อุณหภูมิ 4°C เมื่อปั่นเสร็จจะเห็นสารแยกกันเป็น 2 ชั้น ดูดชั้นบน (upper layer) ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม 100% isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C หลังปั่นเหวี่ยง อาร์เอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด เทสารละลายส่วนในทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทสารละลายส่วนในทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง โดยสังเกตจากตะกอนอาร์เอ็นเอเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นใส ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หรือเก็บที่อุณหภูมิ -80°C (Invitrogen, USA)

2.6 การตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Agilent, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยก่อนทำการวัดต้องทำการเตรียมตัวอย่างโดยดูดอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตรเจือจางด้วย DEPC water อัตราส่วน 1:100 ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวทั้งหมดใส่ในคิวเวทท์ จากนั้นนำคิวเวทท์ใส่ลงใน cuvette holder ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง บันทึกค่าที่ได้ นำมาคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

$$\text{ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ng/ml)} = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ ng/ml} \times \text{dilution factor}$$

ค่า OD_{260/280} เป็นค่าที่บอกถึงความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ ถ้ามีค่า ≥ 2.0 แสดงว่ามีการเจือปนของโปรตีน (Barbas et al., 2007)

2.7 Reverse transcription

การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป RT premix (Bioneer, Korea) โดยนำอาร์เอ็นเอมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ ใช้อาร์เอ็นเอเริ่มต้น 5 ไมโครกรัมใน DEPC water ปรับปริมาตรรวมด้วย DEPC water ให้ได้ 9 ไมโครลิตรในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร เติม Oligo(dT)18 primer 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวางหลอดในอ่างน้ำแข็ง ระหว่างรอบ่ม เติม DEPC water ลงในหลอด RT-premix หลอดละ 10 ไมโครลิตร ดูดอาร์เอ็นเอที่ผสมกับไพรเมอร์ใส่ในหลอด RT-premix นำเข้าเครื่องพีซีอาร์เพื่อสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ ตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เครื่องทำการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ และอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ จัดเก็บซีดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C หรือนำไปทำการทดลองต่อไป

2.8 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*, *CCNA2*, *p53*

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*, *CCNA2*, *p53* และใช้ *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ระบุในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Accession number	ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
ENSG00000133101	<i>CCNA1</i>	Forward primer : ATTCATTAAGTGAAATTGTGC Reverse primer : CTTCCATTCAGAACTTTTTG (Kitkumthorn et al., 2006)
ENSG00000145386	<i>CCNA2</i>	Forward primer : CAGAAAACCATTGGTCCCTC Reverse primer : CACTCACTGGCTTTTCATCTTC (Zhang et al., 2011)
ENSG00000141510	<i>p53</i>	Forward primer : TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC Reverse primer : AGGACAGGCACAAACACGCACC (Weglarz et al., 2006)
ENSG00000111640	<i>GAPDH</i>	Forward primer : AGGTCGGAGTCAACGACGGATTTG Reverse primer : GTGATGGCATGGACTGTGGT (Kitkumthorn et al., 2006)

ตารางที่ 3 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ชนิดของสารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (nM)
1. SsoFast TM EvaGreen® Supermix	5	1X
2. 20 µM Forward <i>CCNA1</i> primer	0.1	200
20 µM Reverse <i>CCNA1</i> primer	0.1	200
หรือ		
20 µM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.1	200
20 µM Reverse <i>GAPDH</i> primer	0.1	200
3. H ₂ O	3.8	
4. cDNA	1	
ปริมาตรรวม	10	

ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA2*

ชนิดของสารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (nM)
1. SsoFast TM EvaGreen® Supermix	5	1X
2. 20 µM Forward <i>CCNA2</i> primer	0.1	200
20 µM Reverse <i>CCNA2</i> primer	0.1	200
หรือ		
20 µM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.1	200
20 µM Reverse <i>GAPDH</i> primer	0.1	200
3. H ₂ O	3.8	
4. cDNA	1	
ปริมาตรรวม	10	

ตารางที่ 5 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *p53*

ชนิดของสารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (nM)
1. SsoFast TM EvaGreen® Supermix	5	1X
2. 20 μ M Forward <i>p53</i> primer	0.1	200
20 μ M Reverse <i>p53</i> primer หรือ	0.1	200
20 μ M Forward <i>GAPDH</i> primer	0.1	200
20 μ M Reverse <i>GAPDH</i> primer	0.1	200
3. H ₂ O	3.8	
4. cDNA	1	
ปริมาตรรวม	10	

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำ real-time PCR

ขั้นตอนการทำ realtime PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. Initial activation	95	2 นาที
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denaturation	95	5 วินาที
- Annealing/Extension	59	30 วินาที
3. Melt curve	95	15 วินาที
	65-95 (เพิ่มครั้งละ 0.5°C)	15 วินาที

2.9 การคำนวณการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$

การคำนวณการแสดงออกของยีน จะวัดปริมาณแบบสัมพัทธ์ (relative quantification) โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในตัวอย่างต่างๆ โดย normalized กับยีนอ้างอิงซึ่งในที่นี้คือ ยีน *GAPDH* และคำนวณออกมาเป็นจำนวนเท่า ด้วยสูตร (Livak and Schmittgen, 2001)

$$\text{Fold change of expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

โดย $\Delta\Delta CT = \Delta CT (CCNA1_{siRNA} - GAPDH_{siRNA}) - \Delta CT (CCNA1_{scramble\ siRNA} - GAPDH_{scramble\ siRNA})$

หรือ $\Delta\Delta CT = \Delta CT (CCNA1_{treat} - GAPDH_{treat}) - \Delta CT (CCNA1_{control} - GAPDH_{control})$

3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการความเสียหายของดีเอ็นเอ สายคู่และการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยวิธี neutral COMET assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 200,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ฉายรังสี UV-C เป็นเวลา 25 นาที เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 0, 2, 4, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C โดยการ trypsinize เซลล์ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วย PBS buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง resuspend เซลล์ด้วย PBS buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ดูดเซลล์มา 10 ไมโครลิตร นำไปนับจำนวนเซลล์ โดยในแต่ละตัวอย่างต้องเตรียมเซลล์ให้มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 μl /assay ผสมเซลล์ที่นับได้กับ 1% low melting point agarose ในสารละลาย PBS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% agarose ในสารละลาย PBS (เตรียมล่วงหน้า 1 วัน) ปิดทับด้วย coverslip ทำให้เจลแข็งตัวโดยนำสไลด์ใส่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลา 15 นาที นำ coverslip ออก ปิเปต 1% agarose ในสารละลาย PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์อีกชั้น ปิดทับด้วย coverslip ทำให้เจลแข็งตัวโดยนำสไลด์ใส่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลา 15 นาที นำ coverslip ออก แช่สไลด์ใน lysis buffer (30mM EDTA, 0.5% SDS pH 8.3) ที่อุณหภูมิ 43°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วย 1xTBE (90mM Tris base, 2mM EDTA, 90mM Boric acid pH 8.5) 3 ครั้ง แช่สไลด์ใน 1xTBE ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสไลด์ไปรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ 18 volt 300 mA เป็นเวลา 25 นาที ย้อมสไลด์ด้วย 20 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide นำไปวิเคราะห์ผลด้วยการถ่ายภาพภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์และวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ (Calini, Urani, and Camatini, 2002)

4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ฉายรังสี UV-C เป็นเวลา 25 นาที เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 0, 2, 4, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C โดยการเติม 5 mg/ml ของ MTT ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น เติม DMSO ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสูตร (Mandal et al., 2006)

$$\% \text{Cell viability} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA
 A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ฉายรังสี UV-C เป็นเวลา 25 นาที เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 0, 2, 4, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C โดยการเติม BrdU labeling solution ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดสารออกจากหลุม เติม FixDenat ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 15-25°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ดูดสารออกจากหลุม แล้วเติม anti-BrdU-POD working solution ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 15-25°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วย washing solution หลุมละ 200-300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม substrate solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 15-25°C ประมาณ 5-30 นาที จนกว่าสีจะเปลี่ยน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Roche, USA)

6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อแอพออโทซิสของเซลล์ด้วยวิธี annexin V-FITC/PI

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 400,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ฉายรังสี UV-C เป็นเวลา 25 นาที เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C โดยการใช้ scraper ขูดเซลล์ ออกจากพื้นผิวภาชนะเบาๆ และล้างเซลล์ด้วย PBS ที่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วย PBS ที่เย็นอีกครั้ง ดูดสารละลายทิ้ง resuspend เซลล์ด้วย 1X annexin-binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดูดเซลล์มา 10 ไมโครลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ โดยในแต่ละตัวอย่างต้องเตรียมเซลล์ให้มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^6 cell/ml ปริมาตร 100 μ l/assay เติม 5 ไมโครลิตร ของ FITC annexin V (Component A) และ 1 ไมโครลิตร ของ 100 μ g/mL PI working solution ลงใน 100 ไมโครลิตร ของเซลล์แขวนลอย บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากบ่ม เติม 400 ไมโครลิตรของ 1X annexin-binding buffer ผสมเบาๆ และเก็บตัวอย่างในน้ำแข็ง นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometry (Invitrogen, USA)

7. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay

Invasion assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ HN12 ในถาดเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 400,000 เซลล์ต่อหลุม ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ฉายรังสี UV เป็นเวลา 25 นาที หลังฉายรังสี UV-C trypsinize เซลล์ใส่ลงใน upper chamber ที่อยู่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก upper chamber ใช้ไม้พันสำลีเช็ดเซลล์ที่ไม่รุกรานออกจากด้านในของ upper chamber จนหมด ย้อมเซลล์ด้วย cell stain solution ปริมาตร 400 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำ upper chamber มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง และตากให้แห้ง นำไปนับจำนวนเซลล์รุกรานภายใต้กล้องจุลทรรศน์หรือเติม extraction solution หลุมละ 200 μ l บ่มบนเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Cell biolabs, USA)

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติโดยใช้โปรแกรม t-test (Microsoft Corporation, USA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และความจำเพาะของ *CCNA1* siRNA

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1*

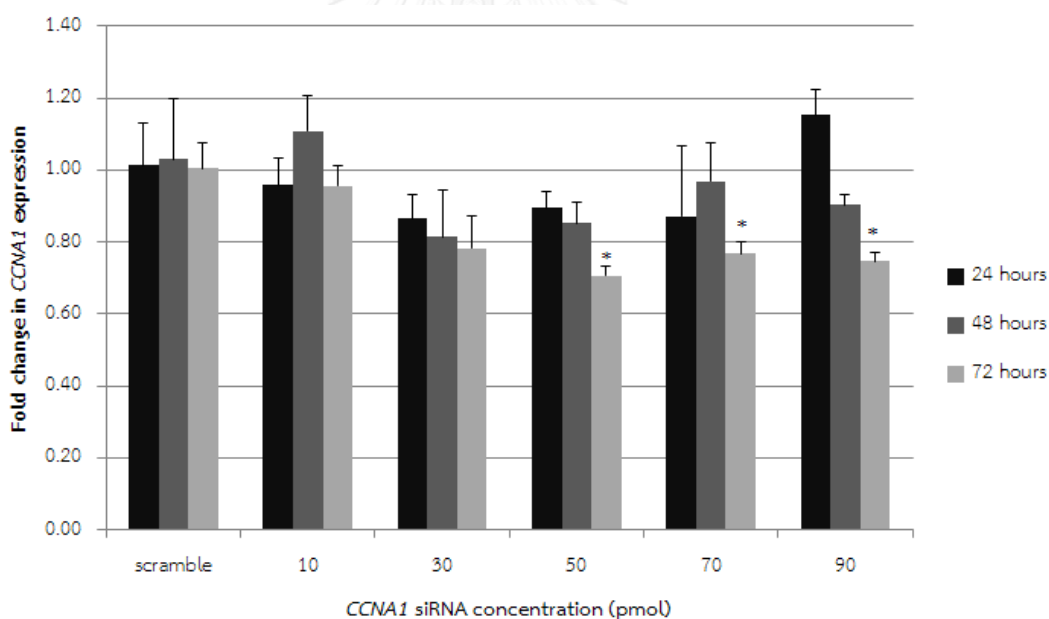
ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN4 และ HN12 โดยการแปรผันความเข้มข้นของ siRNA ระหว่าง 10-90 pmol และระยะเวลาในการทรานสเฟก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยเทคนิค Real time PCR และคำนวณการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ โดยใช้ *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง พบว่าการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงไปตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN4 ที่ได้รับ siRNA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น siRNA (pmol)	ระยะเวลาในการทรานสเฟก (ชั่วโมง)	การแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	P-value
10	24	ลดลงเหลือ 0.96 เท่า	$P>0.05$
	48	เพิ่มขึ้น 1.11 เท่า	$P>0.05$
	72	ลดลงเหลือ 0.96 เท่า	$P>0.05$
30	24	ลดลงเหลือ 0.87 เท่า	$P>0.05$
	48	ลดลงเหลือ 0.81 เท่า	$P>0.05$
	72	ลดลงเหลือ 0.78 เท่า	$P>0.05$
50	24	ลดลงเหลือ 0.89 เท่า	$P>0.05$
	48	ลดลงเหลือ 0.85 เท่า	$P>0.05$
	72	ลดลงเหลือ 0.71 เท่า	$P<0.05^*$
70	24	ลดลงเหลือ 0.87 เท่า	$P>0.05$
	48	ลดลงเหลือ 0.97 เท่า	$P>0.05$
	72	ลดลงเหลือ 0.77 เท่า	$P<0.05^*$

ความเข้มข้น siRNA (pmol)	ระยะเวลาในการทรานสเฟก (ชั่วโมง)	การแสดงออกของยีน CCNA1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	P-value
90	24	เพิ่มขึ้น 1.15 เท่า	$P>0.05$
	48	ลดลงเหลือ 0.9 เท่า	$P>0.05$
	72	ลดลงเหลือ 0.75 เท่า	$P<0.05^*$

ซึ่งความเข้มข้นของ siRNA และเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่มีผลทำให้การแสดงออกของยีน CCNA1 ลดลงมากที่สุดในเซลล์ HN4 คือที่ความเข้มข้นของ CCNA1 siRNA 50 pmol ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ HN4 มีการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเหลือ 0.71 เท่า ($P<0.05^*$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CCNA1 ในเซลล์ HN4 ที่ได้รับ CCNA1 siRNA ที่สภาวะต่างๆ ด้วยวิธี real time PCR (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ CCNA1 siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

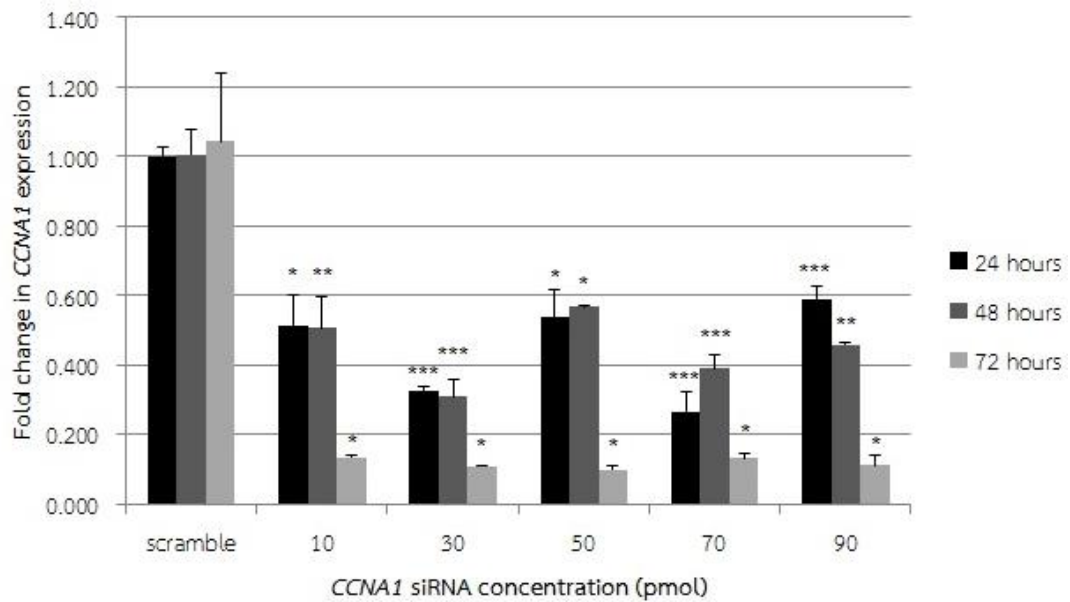
* แสดงถึงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN12 พบว่าการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงไปตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN12 ที่ได้รับ siRNA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น siRNA (pmol)	ระยะเวลาในการทรานสเฟก (ชั่วโมง)	การแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	P-value
10	24	ลดลงเหลือ 0.51 เท่า	$P < 0.05^*$
	48	ลดลงเหลือ 0.51 เท่า	$P < 0.01^{**}$
	72	ลดลงเหลือ 0.13 เท่า	$P < 0.05^*$
30	24	ลดลงเหลือ 0.33 เท่า	$P < 0.001^{***}$
	48	ลดลงเหลือ 0.31 เท่า	$P < 0.001^{***}$
	72	ลดลงเหลือ 0.11 เท่า	$P < 0.05^*$
50	24	ลดลงเหลือ 0.54 เท่า	$P < 0.05^*$
	48	ลดลงเหลือ 0.57 เท่า	$P < 0.05^*$
	72	ลดลงเหลือ 0.1 เท่า	$P < 0.05^*$
70	24	ลดลงเหลือ 0.26 เท่า	$P < 0.001^{***}$
	48	ลดลงเหลือ 0.39 เท่า	$P < 0.001^{***}$
	72	ลดลงเหลือ 0.13 เท่า	$P < 0.05^*$
90	24	ลดลงเหลือ 0.59 เท่า	$P < 0.001^{***}$
	48	ลดลงเหลือ 0.46 เท่า	$P < 0.01^{**}$
	72	ลดลงเหลือ 0.11 เท่า	$P < 0.05^*$

ซึ่งความเข้มข้นของ siRNA และเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลงมากที่สุดในเซลล์ HN12 คือที่ความเข้มข้นของ *CCNA1* siRNA 50 pmol ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ HN12 มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเหลือ 0.1 เท่า ($P < 0.05^*$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 25 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN12 ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA ที่สภาวะต่างๆ ด้วยวิธี real time PCR (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

* แสดงถึงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

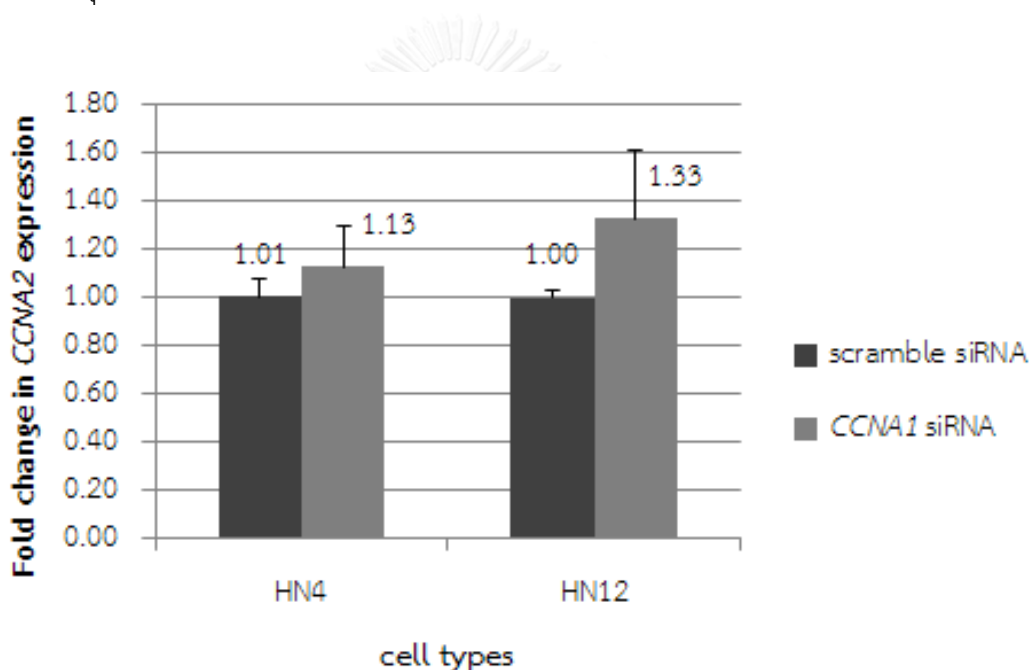
** แสดงถึงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

*** แสดงถึงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.001$

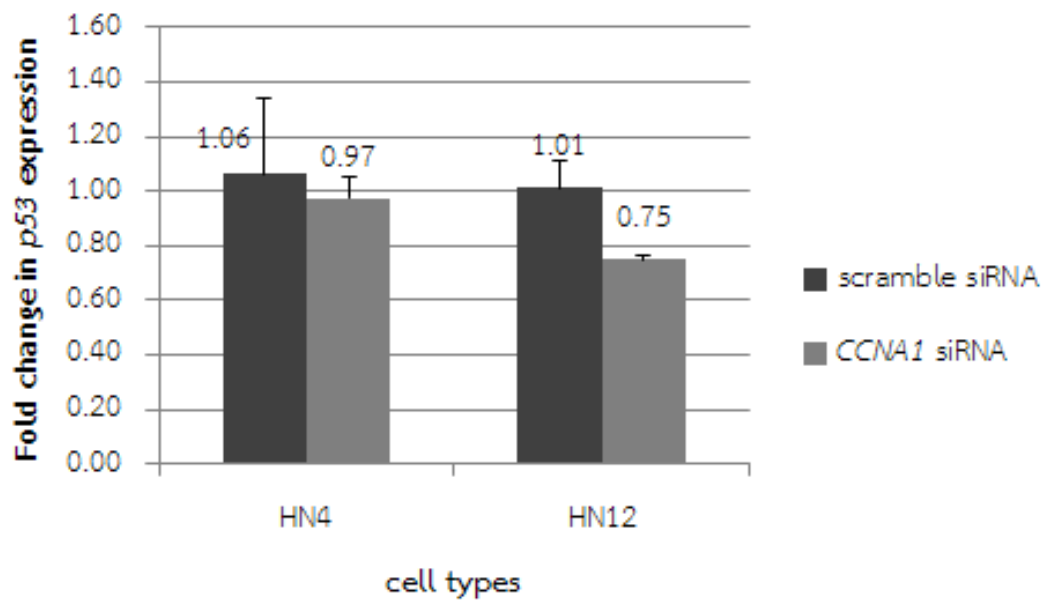
เนื่องจากในเซลล์ HN4 การแสดงออกของยีน *CCNA1* มีการลดลงเหลือ 0.71 เท่า ($P < 0.05$) ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับในเซลล์ HN12 ที่การแสดงออกของยีนลดลงเหลือเพียง 0.1 เท่า ($P < 0.05^*$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงเลือกใช้เซลล์ HN12 ในการทำการทดลองอื่นๆ ต่อไป

1.2 การตรวจสอบความจำเพาะของ *CCNA1* siRNA

ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ *CCNA1* siRNA ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN4 และ HN12 ว่ามีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA2* และยีน *p53* หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA2* และยีน *p53* ด้วยเทคนิค real time PCR และคำนวณการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ โดยใช้ *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง พบว่าภายหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วย *CCNA1* siRNA การแสดงออกของยีน *CCNA2* และยีน *p53* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอทั้งสองสายพันธุ์ ดังภาพที่ 26 และภาพที่ 27



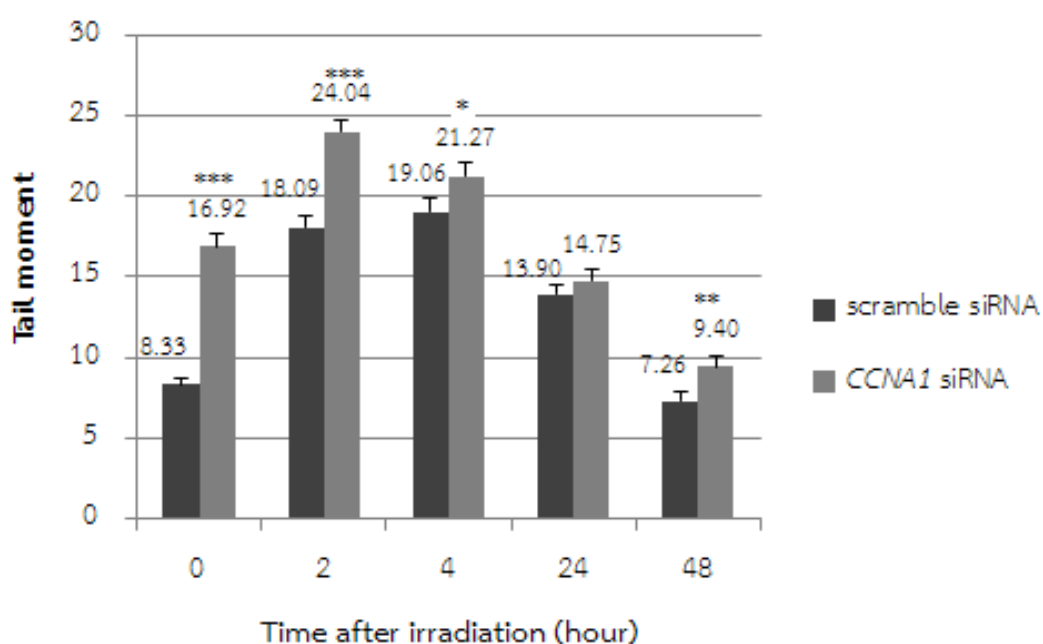
ภาพที่ 26 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA2* ในเซลล์ HN4 และ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA ด้วยวิธี real time PCR วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA



ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *p53* ในเซลล์ HN4 และ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA ด้วยวิธี real time PCR วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

2. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อความเสียหายของดีเอ็นเอ สายคู่ด้วยวิธี neutral COMET assay

จากการทดลองพบว่าภายหลังการฉายรังสี UV-C เซลล์ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA มีความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เวลา 0 ($p < 0.0001^{***}$), 2 ($p < 0.0001^{***}$), 4 ($p = 0.048^*$) และ 48 ชั่วโมง ($p = 0.005^{**}$) โดยมีค่า Tail moment สูงกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม 8.59, 5.95, 2.21 และ 2.14 ตามลำดับ ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 ค่า Tail moment ซึ่งบอกถึงความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ Tail moment \pm SEM (วัดค่าจาก 50 เซลล์ต่อสไลด์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ)
วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test

เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

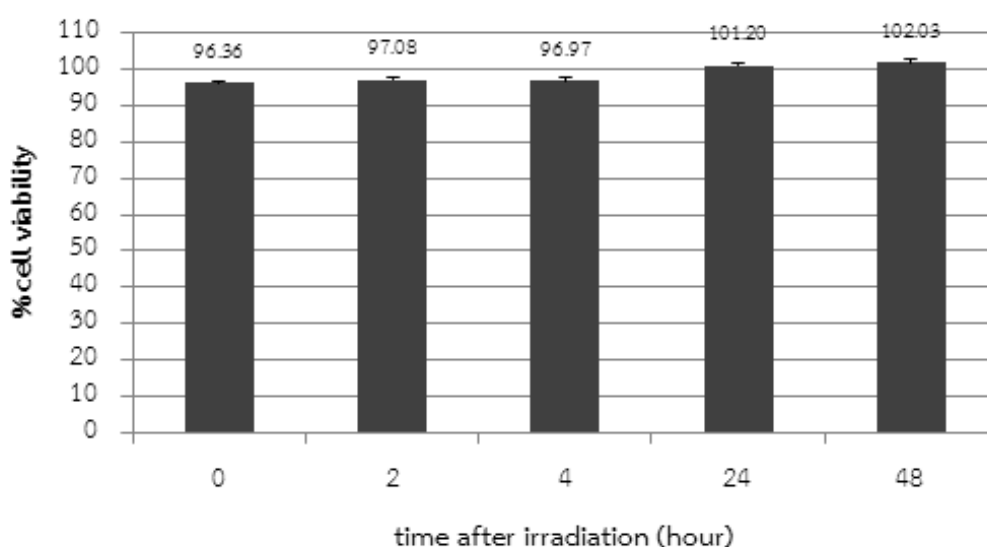
* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

*** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.001$

3. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

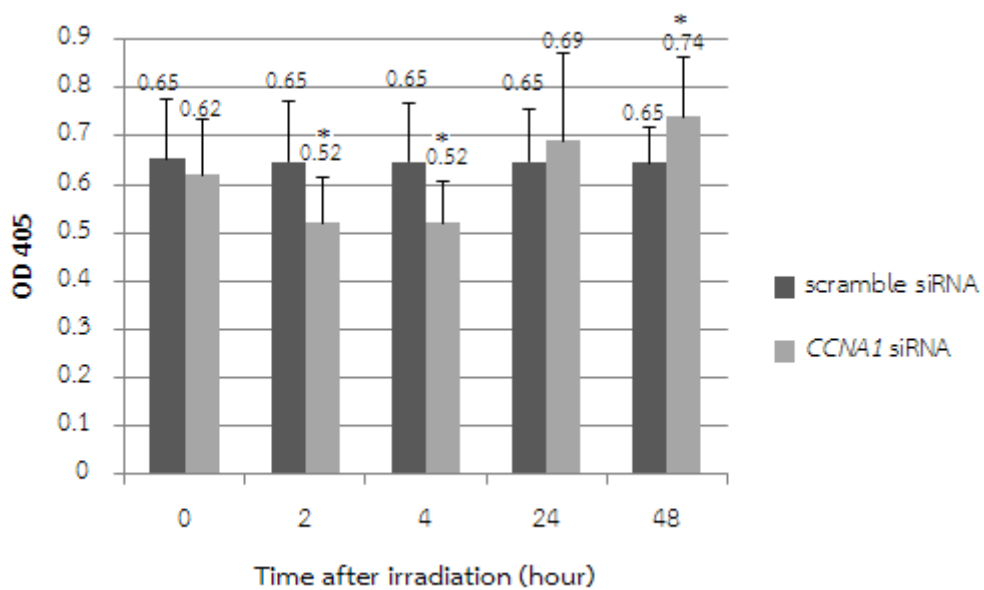
จากการทดลองพบว่าภายหลังการฉายรังสี UV-C เซลล์ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA มีระดับการมีชีวิตของเซลล์ลดลง 3.64%, 2.92% และ 3.03% ที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C และมีระดับการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น 1.2% และ 2.03% ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากฉายรังสี UV-C แต่ผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 ความมีชีวิตของเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลาต่างๆ (ทำการทดลอง 9 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

4. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ด้วยวิธี BrdU assay

จากการทดลองพบว่าภายหลังการฉายรังสี UV-C เซลล์ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA มีการแบ่งเซลล์ลดลง 4.43%, 20.34% ($P<0.05^*$) และ 19.64% ($P<0.05^*$) ที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังการฉายรังสี UV-C และมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น 5.66% และ 13.31% ($P<0.05^*$) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงภายหลังการฉายรังสี UV-C เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 30

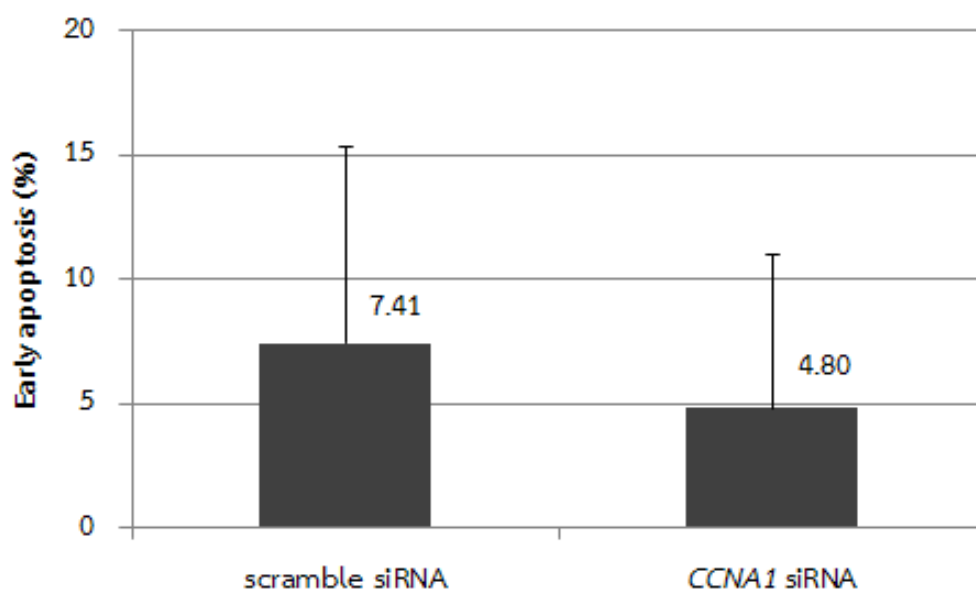


ภาพที่ 30 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลาต่างๆ (ทำการทดลอง 9 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

* แสดงถึงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

5. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการตายของเซลล์แบบแอพอโทซิสด้วยวิธี annexin V-FITC/PI

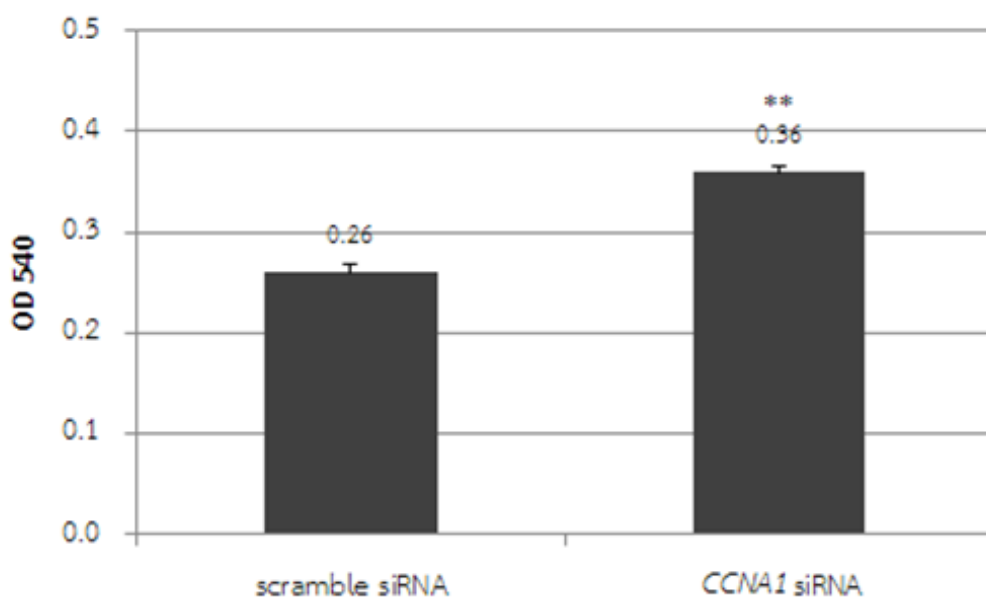
จากการทดลองพบว่าภายหลังการฉายรังสี UV-C เซลล์ HN12 ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายของเซลล์แบบแอพอโทซิสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์การตายแบบแอพอโทซิสของเซลล์ HN12 ภายหลังการฉายรังสี UV-C 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบด้วย flow cytometry (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

6. การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ต่อการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay

จากการทดลองพบว่าเซลล์มีการรุกรานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 39.88% ($P < 0.01^{**}$) ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมดังภาพที่ 32



ภาพที่ 32 การรุกรานของเซลล์ HN12 ภายหลังจากการฉายรังสี UV-C ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ *CCNA1* siRNA กับเซลล์ที่ได้รับ scramble siRNA

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดลองที่เลือกใช้เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอมาทำการศึกษานี้ เนื่องจากในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* (วัชรพงษ์ ภัคดีชายแดน, 2013) ดังนั้นการเกิดเป็นมะเร็งของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจึงไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของยีน *CCNA1* และที่เลือกทำการศึกษานี้ในเซลล์มะเร็งเนื่องจากอ้างอิงกับงานวิจัยของ Xu, Zhao และคณะ โดยในงานวิจัยของ Xu และคณะ (2002) ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นยีนต้านมะเร็งของยีน *PTEN* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์เจอร์แคท โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *PTEN* ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิส ลดขนาดของเซลล์และทำให้เซลล์มีความไวต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบแอฟพอโทซิส ส่วนในงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2011) ได้ค้นพบยีนต้านมะเร็งยีนใหม่จากการทดลองในเซลล์มะเร็งตับ โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *LZAP* ด้วย siRNA ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 แล้วพบว่าเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *LZAP* มีการแบ่งเซลล์และการสร้างโคโลนีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม และในเซลล์ HepG2 ที่ถูกอินเฟกต์ด้วย adenovirus *LZAP* เซลล์มีการรุกรานและแพร่กระจายลดลง

ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN4 และ HN12 โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN4 คือ ที่ความเข้มข้นของ *CCNA1* siRNA 50 pmol ระยะเวลาในการทรานสเฟก 72 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์ HN4 มีการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเหลือ 0.71 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN12 คือ ที่ความเข้มข้นของ *CCNA1* siRNA 50 pmol ระยะเวลาในการทรานสเฟก 72 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์ HN12 มีการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเหลือ 0.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบผลของ siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเห็นว่าในเซลล์ HN4 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลงเหลือ 0.71 เท่า ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับในเซลล์ HN12 ที่การแสดงออกของยีนลดลงเหลือเพียง 0.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และความเข้มข้นนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay จึงเลือกใช้เซลล์ HN12 ในการทำการทดลองอื่นๆต่อไป ซึ่งการที่ระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN4 มีการลดลงน้อยกว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สภาวะเดียวกันกับในเซลล์ HN12 อาจเป็น

ผลมาจากการที่เซลล์ทั้ง 2 ชนิด มาจากอวัยวะคนละส่วนของร่างกาย กลไกต่างๆในเซลล์แต่ละชนิด แต่เนื้อเยื่อจึงแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนได้ และการที่ระดับการแสดงออกของยีน *CCNA2* และยีน *p53* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อทรานสเฟกต์ด้วย *CCNA1* siRNA เข้าสู่เซลล์ เป็นการยืนยันว่า siRNA ที่ทำการออกแบบมีความจำเพาะต่อยีน *CCNA1* เพียงยีนเดียวและการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *CCNA2* และยีน *p53*

การเลือกกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน เนื่องจากการที่คิดว่ายีน *CCNA1* เป็นยีนต้านมะเร็ง การที่ยีนต้านมะเร็งจะทำงานได้ ก็ต่อเมื่อเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอขึ้นภายในเซลล์ และการเลือกฉายรังสี UV-C เป็นเวลา 25 นาที เนื่องจากได้ทำการแปรผันระยะเวลาในการฉายรังสี UV-C ที่เวลา 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 60 นาที แล้วพบว่าที่เวลา 25 นาที รังสี UV-C สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีระดับความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ซึ่งการฉายรังสี UV-C เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอสายคู่ โดยทำให้เกิด reactive oxygen species ขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ (Rolfsmeier, Laughery, and Haseltine, 2010) เมื่อตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ในเซลล์ HN12 ด้วยวิธี neutral COMET assay ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C พบว่าที่เวลา 0, 2, 4 และ 48 ชั่วโมงภายหลังจากการฉายรังสี UV-C เซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Muller-Tidow และคณะ (2004) ที่พบว่ายีน *CCNA1* มีบทบาทที่สำคัญในการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากการฉายรังสี โดยกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอผ่านกระบวนการ non-homologous end-joining ดังนั้นในเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* จึงพบความเสียหายของดีเอ็นเอที่มากกว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* และจากการทดลองที่พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์มีความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ค่อยๆ ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่ยังมีการแสดงออกของยีนหลงเหลืออยู่ 0.1 เท่า ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายหรืออาจเกิดจากกระบวนการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอกลไกอื่นๆภายในเซลล์ร่วมด้วย

การตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ HN12 ด้วยวิธี MTT assay ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C พบว่าเซลล์มีระดับความมีชีวิตของเซลล์ลดลงที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังจากการฉายรังสี UV-C ส่วนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงภายหลังจากการฉายรังสี UV-C เซลล์มีระดับความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นแต่ผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำให้ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่ลดลงส่งผลกระทบต่อเพิ่มจำนวนของเซลล์หรือไม่

ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HN12 ด้วยวิธี BrdU assay พบว่าเซลล์มีการแบ่งเซลล์ลดลงที่เวลา 0, 2 ($P < 0.05$) และ 4 ($P < 0.05$) ชั่วโมง และมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นที่เวลา 24, 48 ($P < 0.05$) ชั่วโมง ภายหลังจากฉายรังสี UV-C ซึ่งการที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์ลดลงที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังจากฉายรังสี UV-C สัมพันธ์กับความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบด้วยวิธี COMET assay เมื่อมีความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น วัฏจักรของเซลล์จะหยุดลงเพื่อให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย โดยยีน *p53* ซึ่งเมื่อ *p53* ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการ transcription ของยีน *p21* ซึ่งเป็น CDK inhibitor ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้ง complex ของ cyclin/CDK ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในวัฏจักรของเซลล์ ทำให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลงและเกิดกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย (Pellegata et al., 1996) ที่พบว่าที่เวลา 24, 48 ($P < 0.05$) ชั่วโมง ภายหลังจากฉายรังสี UV-C แล้วเซลล์มีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* การที่ไม่มียีน *CCNA1* มากระตุ้นกลไกการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ เซลล์ที่เสียหายจึงไม่ได้รับการซ่อมแซม ทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำลองดีเอ็นเอ จนนำไปสู่การเป็นพัฒนาเป็นมะเร็งได้ในที่สุด

ผลการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบแอฟโพโทซิสด้วยวิธี annexin V-FITC/PI ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C พบว่าภายหลังจากฉายรังสี UV-C 48 ชั่วโมง เซลล์ HN12 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีการตายของเซลล์แบบแอฟโพโทซิสลดลง แต่ผลการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่เซลล์มีแนวโน้มที่มีการตายของเซลล์แบบแอฟโพโทซิสลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การแบ่งเซลล์ จะเห็นว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการแบ่งเซลล์ การที่เซลล์มีการตายของเซลล์แบบแอฟโพโทซิสลดลงจึงส่งผลให้เซลล์มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น

ในส่วนของการตรวจสอบการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C พบว่าเซลล์ HN12 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีการรุกรานของเซลล์เพิ่มขึ้น 39.88% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *CCNA1* มีผลต่อการรุกรานของเซลล์ ซึ่งการรุกรานของเซลล์หรือเนื้อเยื่อข้างเคียงเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งของการเป็นเซลล์มะเร็ง ในงานวิจัยของ Wegial และคณะ (2008) พบว่า *CCNA1* ควบคุมการแสดงออกของยีน *MMP2* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMP) ที่ผลิตเอนไซม์ matrix metalloproteinase มาย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์ซึ่งได้แก่ collagen type IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ basement membranes จึงส่งผลต่อการรุกรานและการแพร่กระจายของเซลล์ นอกจากนี้ยีน *MMP2* ยังมีบทบาทที่สำคัญในการพัฒนาของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ (Chien et al., 2013) ผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kitkumthorn และคณะ (2006) ที่พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปร

โมเตอร์ของยีน *CCNA1* เพิ่มมากขึ้นตามระยะความรุนแรงของโรค โดยพบสูงถึง 93.3% ในมะเร็งปากมดลูกระยะที่มีการลุกลาม ซึ่งการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนส่งผลให้ยีนมีระดับการแสดงออกที่ลดลง (Du et al., 2012)

สรุปผลการวิจัย

จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C แล้วพบว่าเซลล์ HN12 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่มากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม ผลการทดลองที่ได้เป็นการยืนยันบทบาทในกระบวนการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ของยีน *CCNA1*

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายด้วยการฉายรังสี UV-C ไม่มีผลต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์ HN12 สำหรับการศึกษาคุนสมบัติการเป็นยีนต้านมะเร็งของ *CCNA1* โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นมะเร็งของเซลล์ ซึ่งได้แก่ การแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์แบบแอฟอพโทซิสและการรุกรานของเซลล์ ซึ่งจากการทดลองพบว่าภายหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และกระตุ้นให้เซลล์เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ด้วยการฉายรังสี UV-C เซลล์ HN12 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีการแบ่งเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการฉายรังสี UV-C ที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังการฉายรังสี UV-C และมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 48 ชั่วโมงภายหลังการฉายรังสี UV-C แต่การยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์แบบแอฟอพโทซิส ในส่วนของการรุกรานของเซลล์พบว่าเซลล์มีการรุกรานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากฉายรังสี UV-C จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สรุปได้ว่ายีน *CCNA1* มีบทบาทในการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอสายคู่ และเป็นยีนต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN12

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดลองในเซลล์ปกติ เนื่องจากเซลล์ที่นำมาทำการศึกษาคุนเป็นเซลล์มะเร็งอยู่แล้ว จึงทำให้เห็นผลภายหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ไม่ชัดเจน
2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ควรตรวจสอบในระดับโปรตีนด้วย เนื่องจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR เป็นการตรวจสอบในระดับอาร์เอ็นเอ ซึ่งการที่ระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอลดลง อาจยังมีโปรตีนหลงเหลืออยู่ในภายในเซลล์
3. ควรทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนแบบถาวรร่วมด้วย เพื่อให้สามารถติดตามผลได้ในระยะยาว

รายการอ้างอิง

- กัลยาณี จิระศรีพงศ์พันธ์และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. 2550. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ สัตว์. นครปฐม : มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ณยา วงศ์พูน. 2555. การบำบัดโรคด้วย RNA interference (RNAi). วารสารไทยโภชนาการ: 1-20.
- วัชรพงศ์ ภักดีชายแดน. 2555. เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วยยีน *E7* ของ Human Papillomavir 16. วิทยาศาสตร์ปริญา มหาบัณฑิต, สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เอื่อมแข สุขประเสริฐ. 2555. Cancer therapy. Workshop and Traineeship for Oncology Pharmacy Practitioners 25-39.
- Alberts, B. 2002. Molecular biology of the cell, 4th edn (New York: Garland Science).
- Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., and Silverman, G.J. 2007. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protoc* 2007, 47.
- Calini, V., Urani, C., and Camatini, M. 2002. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biology and Toxicology* 18, 369-379
- Carnero, A., Hudson, J.D., Hannon, G.J. and Beach, D.H., 2000. Loss-of-function genetics in mammalian cells: the p53 tumor suppressor model. *Nucleic Acids Research* 28, 2234-2241.
- Chien, M.H., Lin, C.W., Cheng, C.W., Wen, Y.C., and Yang, S.F. 2013. Matrix metalloproteinase-2 as a target for head and neck cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17, 203-216.
- Dalby, B., et al. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33, 95-103.
- Du, X., Han, L., Guo, A.Y., and Zhao, Z. 2012. Features of methylation and gene expression in the promoter-associated CpG islands using human methylome data. *Comparative and Functional Genomics*, 10.1155/2012/598987.

- Duenas-Gonzalez, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., and Cervera, E. 2005. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 4, 38.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35, 495-516.
- Erwig, L.P., and Henson, P.M. 2008. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation* 15, 243-250.
- Garrido, C., et al. 2012. MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells. *Carcinogenesis* 33, 687-693.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hasue, M.J., et al. 2013. Assessment of genotoxicity and depuration of anthracene in the juvenile coastal fish *Trachinotus carolinus* using the comet assay. *Brazilian Journal of Oceanography* 61, 215-222.
- Herceg, Z., et al. 2013. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis* 34, 1955-1967.
- Hyland, K.M. 2010. Tumor Suppressor Genes and Oncogenes: Genes that Prevent and Cause Cancer. *Biochemistry/Molecular Biology Lecture* 1, 71-86.
- Kawasaki, H., Taira, K., and Morris, K.V. 2005. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle* 4, 442-448.
- Kitkumthorn, N., et al. 2006. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer* 6, 55.
- Li, L.C., Okino, S.T., and Dahiya, R. 2004. DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1704, 87-102.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lu, J.J., Langer, R., and Chen, J. 2009. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Molecular Pharmaceutics* 6, 763-771.
- Mandal, M., et al. 2006. The Akt inhibitor KP372-1 inhibits proliferation and induces

- apoptosis and anoikis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 42, 430-439.
- Melino, G., and Vaux, D. 2010. Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 17, 730–732.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., and Matzke, A.J. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO journal* 19, 5194-5201.
- Muller-Tidow, C., et al. 2004. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 24, 8917-8928.
- Olive, P.L., and Banath, J.P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1, 23-29.
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L., and Stanbridge, E.J. 1996. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15209-15214.
- Petri, S., and Meister, G. 2013. siRNA design principles and off-target effects. *Methods in Molecular Biology* 986, 59-71.
- Rieger, A.M., Nelson, K.L., Konowalchuk, J.D., and Barreda, D.R. 2011. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Riss, T.L., et al. 2004. Cell Viability Assays. In Assay Guidance Manual (Bethesda (MD)).
- Rivera, A., Mavila, A., Bayless, K.J., Davis, G.E., and Maxwell, S.A. 2006. Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 63, 1425-1439.
- Rolfsmeier, M.L., Laughery, M.F., and Haseltine, C.A. 2010. Repair of DNA double-strand breaks following UV damage in three *Sulfolobus solfataricus* strains. *Journal of Bacteriology* 192, 4954-4962.
- Sharkey, F.H., Banat, I.M., and Marchant, R. 2004. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3795-3806.
- Shaw, R.J., et al. 2006. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1

- and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *British Journal of Cancer* 94, 561-568.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W., and Villanueva, A. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. 114, 785-796.
- Sun, W., et al. 2012. Comparison of promoter hypermethylation pattern in salivary rinses collected with and without an exfoliating brush from patients with HNSCC. *PloS one* 7, 33642.
- Sweeney, C., et al. 1996. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development* 122, 53-64.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39-51.
- Wegiel, B., et al. 2008. Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 1022-36.
- Weglarz, L., Molin, I., Orchel, A., Parfiniewicz, B., and Dzierzewicz, Z. 2006. Quantitative analysis of the level of p53 and p21(WAF1) mRNA in human colon cancer HT-29 cells treated with inositol hexaphosphate. *Acta Biochimica Polonica* 53, 349-356.
- Weiss, D., Basel, T., Sachse, F., Braeuninger, A., and Rudack, C. 2011. Promoter methylation of cyclin A1 is associated with human papillomavirus 16 induced head and neck squamous cell carcinoma independently of p53 mutation. *Molecular Carcinogenesis* 50, 680-688.
- Wright, B., Connon, C.J., and Springer Science+Business Media 2013. Corneal regenerative medicine : methods and protocols.
- Xu, Z., Stokoe, D., Kane, L.P., and Weiss, A. 2002. The Inducible Expression of the Tumor Suppressor Gene PTEN Promotes Apoptosis and Decreases Cell Size by Inhibiting the PI3K/Akt Pathway in Jurkat T Cells. *Cell Growth and Differentiation* 13, 285-296.

- Xu, X.L., et al. 2004. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World journal of Gastroenterology : WJG* 10, 3441-3454.
- Yamaguchi, S., Asao, T., Nakamura, J., Ide, M., and Kuwano, H. 2003. High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Letters* 194, 99-105.
- Yanatatsaneejit, P., et al. 2008. Promoter hypermethylation of CCNA1, RARRES1, and HRASLS3 in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncology* 44, 400-406.
- Yanatatsaneejit, P., Mutirangura, A., and Kitkumthorn, N. 2011. Human papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation in cervical cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 21, 902-906.
- Yanatatsaneejit, P., and Khowutthitham, S. 2012. Cancer: secret in genetic code. *Thai Journal of Genetics* 5, 1-20.
- Yang, R., Morosetti, R., and Koeffler, H.P. 1997. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines. *Cancer Research* 57, 913-920.
- Yang, R., Muller, C., Huynh, V., Fung, Y.K., Yee, A.S., and Koeffler, H.P. 1999. Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2400-2407.
- Yang, R., et al. 1999. Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. *Blood* 93, 2067-2074.
- Yu, J., Zhang, H.Y., Ma, Z.Z., Lu, W., Wang, Y.F., and Zhu, J.D. 2003. Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *Cell Research* 13, 319-333.
- Yu, J., et al. 2007. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 7296-7304.
- Zhang, C., et al. 2011. Definition of a FoxA1 Cistrome that is Crucial for G1-S Phase

Cell-Cycle Transit in Castration-Resistant Prostate Cancer. *National Institute of Health* 71, 6738–6748.

Zhao, J., et al. 2011. Identification of LZAP as a New Candidate Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma. *PloS one* 6, 26608.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

การเตรียม Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM)

- | | | |
|---------------------------|------|-----------|
| - DMEM high glucose | 15.6 | กรัม |
| - NaHCO ₄ | 3.7 | กรัม |
| - Penicillin/Streptomycin | 10 | มิลลิลิตร |

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.2 เสร็จแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอหรือกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM+10%FBS)

- | | | |
|--|-----|-----------|
| - Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium | 900 | มิลลิลิตร |
| - Fetal Bovine Serum | 100 | มิลลิลิตร |

เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C

การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS)

- | | | |
|---|-------|------|
| - NaCl | 8.0 | กรัม |
| - KCl | 0.203 | กรัม |
| - NaHPO ₄ .2H ₂ O | 0.77 | กรัม |
| - KH ₂ PO ₄ | 0.19 | กรัม |

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.2 เสร็จแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอหรือกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 10X TBE buffer สำหรับรันเจล

- | | | |
|--------------|--------|------|
| - Tris base | 107.78 | กรัม |
| - EDTA | 9.3 | กรัม |
| - Boric acid | 55 | กรัม |

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร การให้ความร้อนจะช่วยให้สารสามารถละลายได้ง่ายขึ้น

การเตรียม TE buffer สำหรับละลายไพรเมอร์

- | | | |
|-----------------|-----|-----------|
| - 1 M Tris base | 1 | มิลลิลิตร |
| - 0.5 M EDTA | 0.2 | มิลลิลิตร |

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอรหัสหรือกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียม 1 M Tris base pH 8.0

- | | | |
|-------------|-------|------|
| - Tris base | 12.11 | กรัม |
|-------------|-------|------|

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 8.0 ด้วย Conc. HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.5 M EDTA pH 8.0

- | | | |
|--------|-------|------|
| - EDTA | 18.61 | กรัม |
|--------|-------|------|

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมเกล็ด NaOH ลงไป จนกว่า EDTA จะละลายจนหมด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 2% agarose gel

- | | | |
|---------------|---|------|
| - agarose gel | 2 | กรัม |
|---------------|---|------|

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อน จนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทเจลลงในถาดสำหรับใส่เจล

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

- MTT 25 มิลลิกรัม
- ละลายด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิกรัม นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C

การเตรียม DEPC water

- Diethylpyrocarbonate (DEPC) 1 มิลลิกรัม
- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระหว่างการบ่ม เขย่าเป็นระยะ จนกระทั่งสารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

การเตรียม 1X TBE buffer pH 8.5 สำหรับ comet assay

- Tris base 10.9 กรัม
- EDTA 0.74 กรัม
- Boric acid 5.56 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 8.5 ด้วย Conc. HCl หรือ NaOH ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิกรัม

การเตรียม lysis solution pH 8.3

- EDTA 11.17 กรัม
- SDS 5 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 8.3 ด้วย Conc. HCl หรือ NaOH ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิกรัม

การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ Annexin V/FITC assay

1. การเตรียม 1X annexin-binding buffer
 - เตรียมโดยดูด 1 มิลลิกรัม ของ 5X annexinbinding buffer (Component C) + 4 มิลลิกรัม ของ deionized water
2. การเตรียม 100 µg/mL working solution of PI
 - เตรียมโดยดูด 5 ไมโครลิตร ของ 1 mg/mL PI stock solution (Component B) + 45 ไมโครลิตร ของ 1X annexin-binding buffer (ในข้อ 1)

การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ BrdU assay

1. การเตรียม BrdU labeling solution
 - เตรียมโดยดูด 1 มิลลิลิตร ของ BrdU labeling reagent ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 มิลลิลิตร
2. การเตรียม anti-BrdU-POD working solution
 - เตรียมโดยดูด 100 ไมโครลิตรของ anti-BrdU-POD stock solution ผสมกับ antibody dilute solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. การเตรียม washing solution
เตรียมโดยดูด 10 มิลลิลิตรของ washing buffer ผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ข

1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* และ ความจำเพาะของ *CCNA1* siRNA

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ระยะเวลาในการทรานสเฟ็กต์ 24 ชั่วโมงในเซลล์ HN4

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA1</i>
Scramble siRNA	20.03	25.76
10	20.01	24.81
30	19.3	25.25
50	19.37	26.06
70	18.45	25.15
90	18.94	24.48

ตารางที่ 9 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟ็กต์ด้วย
CCNA1 siRNA 24 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการทรานสเฟ็กต์ 48 ชั่วโมงในเซลล์ HN4

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA1</i>
Scramble siRNA	19.55	25.49
10	17.07	23
30	17.48	23.88
50	17.56	23.86
70	17.52	23.65
90	17.28	23.5

ตารางที่ 10 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟ็กต์ด้วย
CCNA1 siRNA 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในเซลล์ HN4

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA1</i>
Scramble siRNA	18.69	27.96
10	17.64	26.97
30	17.71	27.35
50	17.53	27.3
70	17.54	27.19
90	17.54	27.23

ตารางที่ 11 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* ในเซลล์ HN4 ภายหลังจากทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 72 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 24 ชั่วโมงในเซลล์ HN12

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA1</i>
Scramble siRNA	17.24	27.16
10	15.78	26.7
30	15.43	26.97
50	15.7	26.55
70	15.58	27.51
90	15.91	26.6

ตารางที่ 12 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 24 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 48 ชั่วโมงในเซลล์ HN12

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA1</i>
Scramble siRNA	16.71	27.53
10	16.22	28.07
30	15.66	28.2
50	16.11	27.74
70	15.76	27.95
90	15.07	27.02

ตารางที่ 13 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในเซลล์ HN12

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA1</i>
Scramble siRNA	19.72	29.79
10	17.5	30.48
30	17.82	31.1
50	17.53	30.96
70	17.27	30.3
90	17.14	30.49

ตารางที่ 14 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* ในเซลล์ HN12 ภายหลังจากทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 72 ชั่วโมง

1.2 การตรวจสอบความจำเพาะของ CCNA1 siRNA

ความเข้มข้นของ CCNA1 siRNA 50 pmol ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในเซลล์ HN4

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA2</i>
Scramble siRNA	17.42	23.61
50	17.09	23.13

ตารางที่ 15 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA2* ในเซลล์ HN4 ภายหลังทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ CCNA1 siRNA 50 pmol ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในเซลล์ HN12

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>CCNA2</i>
Scramble siRNA	17.56	25.05
50	16.68	23.83

ตารางที่ 16 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA2* ในเซลล์ HN12 ภายหลังทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ CCNA1 siRNA 50 pmol ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในเซลล์ HN4

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>p53</i>
Scramble siRNA	18.17	20.2
50	17.57	19.65

ตารางที่ 17 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *p53* ในเซลล์ HN4 ภายหลังทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ *CCNA1* siRNA 50 pmol ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในเซลล์ HN12

ความเข้มข้นของ siRNA (pmol)	ค่า Ct	
	<i>GAPDH</i>	<i>p53</i>
Scramble siRNA	17.99	19.9
50	17.5	19.82

ตารางที่ 18 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *p53* ในเซลล์ HN12 ภายหลังทรานสเฟ็กด้วย *CCNA1* siRNA 72 ชั่วโมง



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวกอบกาญจน์ อินทรนัฐ

วัน เดือน ปีเกิด 11 สิงหาคม พ.ศ.2528 สถานที่เกิด จังหวัดนครปฐม

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ
วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม จากมหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2551

ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ห้องปฏิบัติการโครโมโซม
วินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาว โรงพยาบาลศิริราช

