



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารยับยั้งแกมมาซีครีเตสเชิงเปรียบเทียบต่อการอยู่รอด และสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ

ชื่อผู้จัดทำ นายภูมินทร์ สินธราธา รหัสประจำตัว 5932344423

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารยับยั้งแกมมาซีเครีเตสเชิงเปรียบเทียบต่อการอยู่รอดและสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ
Effects of γ -secretase inhibitors on viability and cancer stemness in liver cancer cell lines

ชื่อนิสิต นายภูมินทร์ สีนธารา

เลขประจำตัว 5932344423

ภาควิชา จุฬชิววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

ผลของสารยับยั้งแกมมาซีโรทีเนสเชิงเปรียบเทียบต่อการอยู่รอด
และสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ

โดย

นายภูมินทร์ สินธวารา เลขประจำตัวนิต 5932344423

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

ปีการศึกษา

2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมกัถิติ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล)

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ผลของสารยับยั้งแกมมาซีครีเตสเชิงเปรียบเทียบต่อการอยู่รอด

และสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ

(Effects of γ -secretase inhibitors on viability

and cancer stemness in liver cancer cell lines)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

นิสิตในโครงการ

นายภูมินทร์ สินธรา

รหัสประจำตัวนิสิต 5932344423

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|-------------------------|--|
| ชื่อโครงการ | ผลของสารยับยั้งแกมมาซีรีเทสเชิงเปรียบเทียบต่อการอยู่รอดและสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของเซลล์มะเร็งตับ |
| นิสิตเสนอโครงการ | นายภูมินทร์ สินธารา รหัสนิสิต 5932344423 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ | ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ |
| ภาควิชา | จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562 |

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งตับ เป็นโรคมะเร็งที่มีความสำคัญและพบได้ในประชากรทั่วโลก ซึ่งแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งตับในปัจจุบันด้วยการผ่าตัด การฉายรังสี และเคมีบำบัด ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาการรักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) โดยใช้สารที่สามารถยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์อย่างจำเพาะ เพื่อขัดขวางการเจริญและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ซึ่งได้มีการศึกษาพบว่าการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ Notch ที่มากผิดปกติมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งตับด้วย วิถีสัญญาณ Notch มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน คุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยมีเอนไซม์สำคัญในการกระตุ้นการส่งสัญญาณ คือ แกมมาซีรีเทส (γ -secretase) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการคิดค้นสารยับยั้งแกมมาซีรีเทส (γ -secretase inhibitor; GSI) เพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ Notch งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของ GSI 3 ชนิดในเชิงเปรียบเทียบ คือ GSI-XVI, GSI-IX และ Crenigacestat ต่อการอยู่รอดและสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 พบว่า GSI-XVI และ GSI-IX ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์มะเร็งตับมีชีวิตรอดเฉลี่ยที่ 57.41 % และ 63.49 % ตามลำดับ และ Crenigacestat ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์มะเร็งตับมีชีวิตรอดเฉลี่ยที่ 72.93 % ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ โดย GSI-XVI สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Notch1, 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ GSI-IX ลดการแสดงออกได้เพียงโปรตีน Notch3 และ Crenigacestat ลดการแสดงออกโปรตีน Notch1 ได้ นอกจากนี้ มีเพียง GSI-XVI และ Crenigacestat ที่ลดการอยู่รอดของเซลล์ในการเลี้ยงแบบ spheroid ได้ และ GSI-XVI และ GSI-IX สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *hes1* และ *hey1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch และลดระดับการแสดงออกของยีน *Oct4* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ ซึ่งการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งตับชนิดอื่น โดยการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ หรือการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ด้วยวิธีอื่นอาจนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งตับที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

| | | |
|------------------------|---|-------------------|
| Project title | Effects of γ -secretase inhibitors on viability and cancer stemness in liver cancer cell lines | |
| Name of student | Pumin Sintara | ID No. 5932344423 |
| Advisor | Prof. Tanapat Palaga | |
| Department | Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University | |

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide. Because of the ineffectiveness of the current treatments for HCC such as surgery, radiotherapy and chemotherapy, targeted therapy is currently development using compounds to inhibit cellular signaling that is involved in HCC development and metastasis. Previous studies showed that aberrant signaling in Notch signaling pathway is involved in the development of several cancers, including HCC. Notch signaling pathway regulates proliferation, cancer stemness and invasiveness of cancer cells. It has a key enzyme to activate the signaling pathway called γ -secretase. Currently, many γ -secretase inhibitors (GSIs) have been developed to inhibit Notch signaling via inhibiting γ -secretase. The objectives of this study are to compare the effect of 3 GSIs, including GSI-XVI, GSI-IX, and Crenigacestat, on viability and cancer stemness using liver cancer cell lines, HepG2. In 2D culture, 50 μ M GSI-XVI and GSI-IX inhibit HepG2 viability to 57.41 % and 63.49 % respectively, and 1 μ M Crenigacestat inhibited HepG2 viability to 72.93%. GSI-XVI also significantly inhibited Notch1, Notch2, and Notch3 protein expression, while GSI-IX inhibited Notch3 expression and Crenigacestat inhibited Notch1 expression. GSI-XVI and Crenigacestat inhibited viability of HepG2 in spheroid culture. GSI-XVI and GSI-IX inhibited *hes1* and *hey1*, which are the Notch target genes, and *Oct4*, a cancer stemness-related gene. Further study using other liver cancer cell lines with 3D culturing technique or inhibiting Notch signaling pathway using other methods may provide the evidence for the novel effective therapeutic options for the treatment of hepatocellular carcinoma.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างสูง รวมถึงคำสั่งสอนและคำแนะนำในการนำเสนอและวิธีการการถามตอบคำถาม และยังช่วยปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการและตัวผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณพี่ ๆ นักวิจัยประจำห้องวิจัย 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่สอนและให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคเบื้องต้นในการปฏิบัติงาน การให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ รวมถึงการให้คำปรึกษาและข้อคิดต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว เพื่อน ๆ รุ่นพี่และรุ่นน้องที่คอยเป็นกำลังใจและแรงผลักดัน รวมถึงให้การสนับสนุนแก่ผู้วิจัยเสมอมาตลอดจนสิ้นสุดโครงการ

ภูมินทร์ สินธรา

สารบัญ

| เรื่อง | หน้า |
|---------------------------|------|
| บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการ | 6 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 6 |
| อุปกรณ์ที่ใช้และเคมีภัณฑ์ | 7 |
| วิธีดำเนินการทดลอง | 11 |
| ผลการทดลอง | 17 |
| สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 26 |
| ภาคผนวก | 29 |
| เอกสารอ้างอิง | 30 |

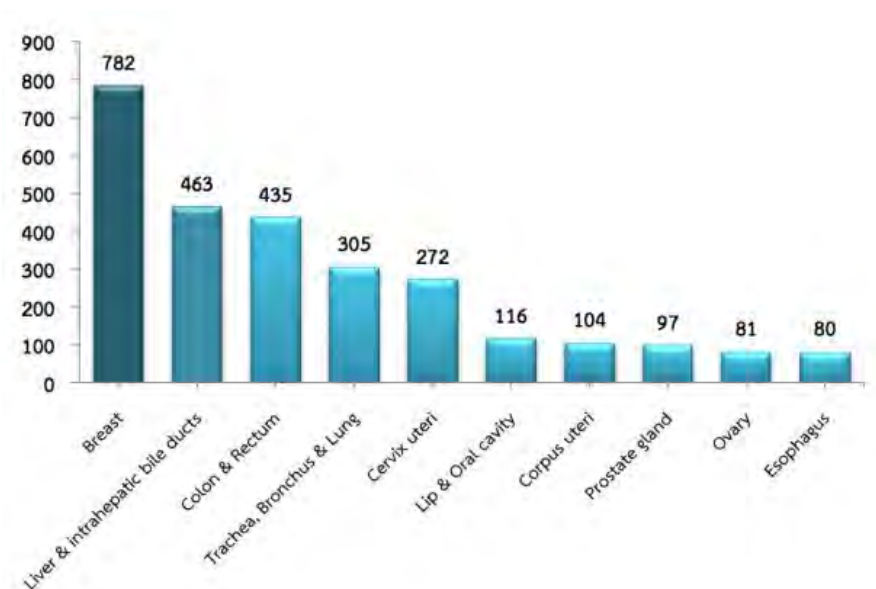
บทที่ 1

บทนำ

อุบัติการณ์และการรักษามะเร็งตับในปัจจุบัน

โรคมะเร็งตับ เป็นโรคที่มีความสำคัญและพบได้ในประชากรทั่วโลก โดยจากสถิติของสำนักงานกองทุนวิจัยมะเร็งโลก (The World Cancer Research Fund : WCRF) พบว่ามะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 5 ในเพศชายและอันดับที่ 9 ในเพศหญิง โดยในพ.ศ. 2561 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งตับรายใหม่เพิ่มขึ้นกว่า 840,000 รายทั่วโลก (1) และประเทศไทยเป็นประเทศที่พบผู้ป่วยมะเร็งตับมากที่สุดเป็นอันดับที่ 8 ของโลก ซึ่งในพ.ศ. 2560 พบโรคมะเร็งตับในประเทศไทยมากที่สุดเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านม (2) (ภาพที่ 1.1) และจากสถิติของ American Cancer Society (ACS) ที่ใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) ตั้งแต่พ.ศ. 2551 ถึง 2557 ซึ่งแบ่งกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเป็น 3 ระยะคือ เฉพาะที่ (ไม่มีการแพร่กระจายของมะเร็งออกจากตับ) ในบริเวณใกล้เคียง (มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังบริเวณหรือต่อมน้ำเหลืองใกล้ ๆ) และ บริเวณห่างไกล (มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นที่อยู่ไกลจากตับ เช่น ปอด) พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดภายใน 5 ปีของผู้ป่วยมะเร็งตับคิดเป็น 18% ของผู้ป่วยมะเร็งตับทั้งหมด เมื่อพิจารณาผู้ป่วยในแต่ละระยะ พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดภายใน 5 ปีของผู้ป่วยคิดเป็น 31% ในระยะเฉพาะที่ (localized), 11% ในบริเวณใกล้เคียง (regional) และ 2% ในบริเวณห่างไกล (distant) (3) (ตารางที่ 1.1) ซึ่งโดยปกติแล้ว หากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาเพื่อกำจัดก้อนมะเร็งออกแล้ว อัตราการมีชีวิตรอดภายใน 5 ปีของผู้ป่วยก็จะเพิ่มสูงขึ้น

โรคมะเร็งตับสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซีแบบเรื้อรัง ภาวะตับแข็งซึ่งเกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์หรือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน โรคทางพันธุกรรมและเมตาบอลิกต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน ทำให้มีไขมันเกาะที่ตับและเกิดเป็นภาวะตับแข็ง และกลายเป็นมะเร็งตับในที่สุด สำหรับแนวทางการรักษามะเร็งตับมีหลายทางขึ้นกับสภาวะความรุนแรงของโรค ระยะของโรค และการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยวิธีการรักษาอาจประกอบด้วย การให้ยา การผ่าตัด การปลูกถ่ายตับ การรักษาด้วยเคมีบำบัด การรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัดและการใช้รังสีรักษา ซึ่งในผู้ป่วยแต่ละรายจะมีลักษณะของมะเร็งและสภาพร่างกายแตกต่างกันไป ทำให้การรักษาในผู้ป่วยแต่ละรายไม่เหมือนกัน แพทย์จึงต้องพิจารณาวิธีการรักษาที่เหมาะสมที่สุดให้กับผู้ป่วย โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับในปัจจุบันที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration : FDA) มีหลายชนิด เช่น sorafenib (Nexavar), lenvatinib (Lenvima), regorafenib (Stivarga), cabozantinib (Cabometyx) หรือยาที่ใช้ในการรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด เช่น nivolumab (Opdivo) และ pembrolizumab (Keytruda) เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนายาใหม่ ๆ ที่มีเป้าหมายในการออกฤทธิ์แตกต่างกัน เพื่อให้การรักษาโรคมะเร็งตับมีประสิทธิภาพมากขึ้น



ภาพที่ 1.1 สถิติจำนวนผู้ป่วยมะเร็งเร็งรายใหม่ในประเทศไทย พ.ศ. 2560 (2)

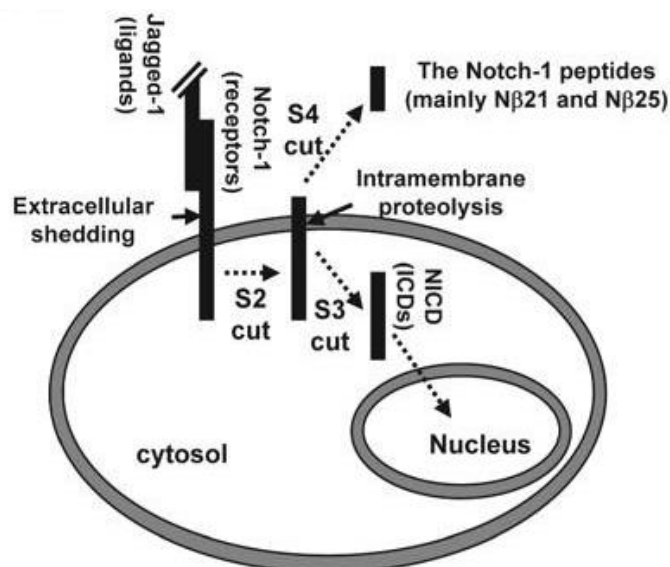
| การแพร่กระจาย | อัตราการมีชีวิตรอดภายใน 5 ปี |
|----------------------------|------------------------------|
| เฉพาะที่ (localized) | 31% |
| บริเวณใกล้เคียง (regional) | 11% |
| บริเวณห่างไกล (distant) | 2% |
| ทุกระยะ | 18% |

ตารางที่ 1.1 อัตราการมีชีวิตรอดภายใน 5 ปีของผู้ป่วยมะเร็งระยะต่าง ๆ ระหว่างค.ศ. 2008 - 2014 (3)

วิถีสัญญาณ Notch

วิถีสัญญาณ Notch เป็นวิถีสัญญาณสำคัญที่ควบคุมการเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนแปลงสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) และการตายของเซลล์ (cell death) ในสัตว์หลายเซลล์ (metazoan) ทุกชนิด (4) Notch คือกลุ่มโปรตีนที่เป็นตัวรับสัญญาณที่แสดงออกอยู่บนผิวเซลล์ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี 4 ชนิด คือ Notch1, Notch2, Notch3, และ Notch4 (5) โดยโปรตีน Notch จะสามารถจับกับลิแกนด์ (ligand) 5 ชนิดประกอบด้วย Jagged-1, 2 และ Delta-like (DLL) 1, 3, 4 โดยวิถีสัญญาณ Notch จะเริ่มต้นขึ้นเมื่อ Notch จับกับลิแกนด์ซึ่งแสดงออกอยู่บนเซลล์ข้างเคียง จากนั้นตัวรับสัญญาณ Notch จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์แกมมาซีรีเทส (γ -secretase) การย่อยโปรตีนจะย่อยโดยใช้ตำแหน่ง S2, S3

และ S4 ของเอนไซม์ (6, 7) ทำให้ Notch intracellular domain (NICD) หลุดออกจากบริเวณผิวเซลล์และถูกส่งต่อไปยังนิวเคลียสและเกิดเป็น Notch transcriptional complex (ภาพที่ 1.2) ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เช่น *hairy/enhancer of split-1 (hes1)* (8) ซึ่งเป็น basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional regulator ให้มีการถอดรหัสและแปลรหัสในยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป (9) ซึ่งในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งตับ พบการกระตุ้นให้มีการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ Notch ที่มากผิดปกติ นอกจากนี้ วิถีสัญญาณ Notch ยังมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell, CSC) (10) ซึ่ง CSC มีคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง (11) ซึ่งจะนำไปสู่การรุกราน (invasiveness) และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) การดื้อยาของเซลล์มะเร็ง และการกลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) (12) ทำให้การรักษามะเร็งในปัจจุบันด้วยวิธีเคมีบำบัดยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้น วิถีสัญญาณ Notch จึงเป็นเป้าหมายที่ดีสำหรับการใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับและมะเร็งอื่น ๆ อีกหลายชนิด (13)

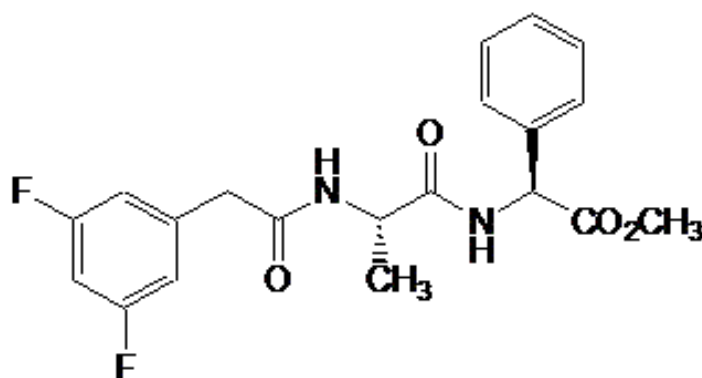


ภาพที่ 1.2 วิถีสัญญาณ Notch

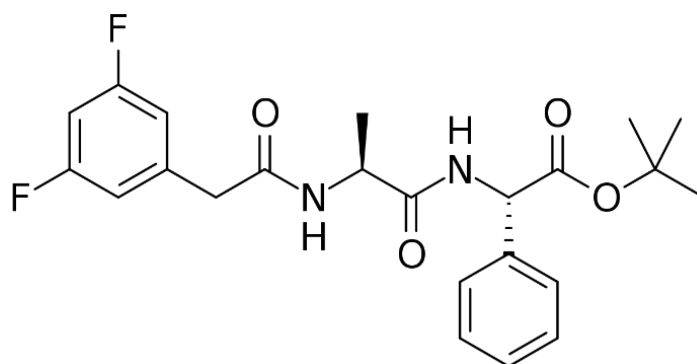
การย่อยโปรตีน Notch ด้วยเอนไซม์แกมมาซีรีเทสเพื่อเหนี่ยวนำการส่งสัญญาณของวิถีสัญญาณ Notch (14)

สารยับยั้งแกมมาซีเครีเตส (γ -secretase inhibitor; GSI)

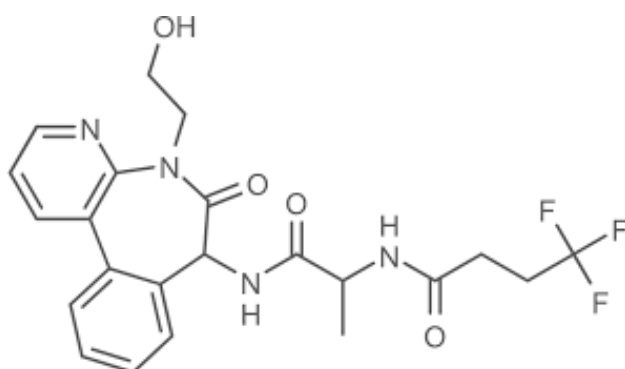
แกมมาซีเครีเตส (γ -secretase) เป็นเอนไซม์ประเภท protease ที่แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบขึ้นจาก 4 หน่วยย่อยได้แก่ presenilins (PSEN1 และ PSEN2), nicastrin, anterior, pharynx defective homolog 1 (aph-1) และ presenilin enhancer 2 (pen-2) มีหน้าที่หลักในการย่อยโปรตีนหลากหลายชนิด เช่น APP, APP-like proteins (APLPs), E-Cadherin และ Notch เป็นต้น ซึ่งในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่าการทำงานที่ผิดปกติของเอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อยโปรตีน APP ทำให้เกิดการสะสมของ Amyloid- β -peptide ในเนื้อเยื่อสมอง ทำให้เกิดเป็นโรคอัลไซเมอร์ในที่สุด (15) จึงได้มีการคิดค้น GSI เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีเครีเตส ซึ่งนอกจากจะใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์แล้ว GSI บางชนิดสามารถลดการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ Notch ได้เช่นกัน ทำให้ในปัจจุบันเริ่มมีการนำ GSI มาศึกษาในการรักษาโรคมะเร็งต่าง ๆ รวมถึงมะเร็งตับมากขึ้น (16-18) โดยกระบวนการยับยั้งอาจเกิดจากการที่ GSI ไปจับกับหน่วยย่อยต่าง ๆ ของเอนไซม์แกมมาซีเครีเตส โดยจากการศึกษาพบว่าหน่วยย่อยที่เป็นเป้าหมายในการทำงานของ GSI ส่วนใหญ่ คือ PSEN1 และ PSEN2 (19) แต่มีรายงานว่า GSI แต่ละชนิดมีฤทธิ์ต่อโปรตีนซับสเตรตที่ต่างกัน (20) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ GSI 3 ชนิดได้แก่ GSI-XVI (DAPM, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl-S-phenylglycine Methyl Ester] ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีเครีเตสในการผลิต $A\beta_{40}$ (21) (ภาพที่ 1.3), GSI-IX (DAPT, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีเครีเตสในการผลิตโปรตีน $A\beta$ (22) (ภาพที่ 1.4) และ Crenigacestat (LY3039478) ซึ่งสามารถยับยั้งการย่อย Notch-1 intracellular domain (N1ICD) (23) (ภาพที่ 1.5) โดยข้อมูลจาก clinicaltrials.gov ยังไม่พบการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วยโรคมะเร็งของ GSI-IX และ GSI-XVI แต่พบการทดลองทางคลินิกในระยะที่ 1 (Phase 1) ของ Crenigacestat กับโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL), มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น แต่ยังไม่มีการทดลองในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ



ภาพที่ 1.3 สูตรโครงสร้างของ GSI-XVI (สูตรโมเลกุล $C_{20}H_{20}F_2N_2O_4$ MW = 390.4)



ภาพที่ 1.4 สูตรโครงสร้างของ GSI-IX (สูตรโมเลกุล $C_{23}H_{26}F_2N_2O_4$ MW = 432.46)



ภาพที่ 1.5 สูตรโครงสร้างของ Crenigacestat (สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{23}F_3N_4O_4$ MW = 464.44)

ปัญหาที่พบในการใช้ GSI เพื่อรักษามะเร็ง

ในปัจจุบันการใช้ GSI เพื่อรักษามะเร็งยังไม่สามารถนำไปใช้ได้จริงเนื่องจากแกมมาซีรีเตสเป็น เอนไซม์ที่มีซับสเตรตหลายชนิดที่มีการแสดงออกในเซลล์ปกติ (24) ทำให้เมื่อถูกยับยั้งไปอาจเกิดการ ทำงานที่ผิดปกติของเซลล์ปกติที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ การใช้ GSI จะยับยั้งแกมมาซีรีเตสโดยไม่ได้ ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเท่านั้น จึงอาจเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์อื่น ๆ ในร่างกายได้ (18) นอกจากนี้ กลไก การทำงานทั้งหมดของ GSI และผลของ GSI ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงมะเร็งที่ยังคงไม่ทราบแน่ ชัด รวมถึงผลของการยับยั้ง Notch ด้วย GSI ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์ ผิวหนัง ทำให้เกิดเป็นมะเร็งชนิดอื่น ๆ ได้ (19) ทำให้ยังไม่สามารถนำ GSI มาใช้ในการรักษามะเร็งได้จริง จึง ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อแก้ไขข้อจำกัดเหล่านี้

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสองมิติและสามมิติ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นหนึ่งในส่วนสำคัญที่ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินต่อไปได้ ซึ่งการศึกษาโดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งในหลอดทดลอง (*in vitro*) ส่วนมากจะใช้การเพาะเลี้ยงแบบสองมิติเป็นหลัก โดยสำหรับเซลล์ไลน์มะเร็งที่สามารถยึดเกาะได้ เซลล์จะเจริญเป็นชั้นเดียว (monolayer) และแผ่ขยายออกจนเต็มพื้นที่ของภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น จานเลี้ยง หรือขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น (25) การเลี้ยงเซลล์มะเร็งด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือไม่ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายน้อย แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบ 2 มิติยังคงมีข้อจำกัดในหลาย ๆ ด้าน ทั้งการไม่สามารถเลียนแบบโครงสร้างและสภาวะธรรมชาติของก้อนมะเร็ง รวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ การเพิ่มจำนวน การแสดงออกของยีนและโปรตีน รวมไปถึงการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหรือยาต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไป (26) ดังนั้น จึงมีการคิดค้นวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่สามารถเลียนแบบสภาวะการเจริญในร่างกายของก้อนมะเร็งได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติ เป็นต้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสามมิติในอดีตนั้น เริ่มต้นจากเลี้ยงในวุ้นอ่อน (soft agar) และมีการพัฒนาต่อมาจนในปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 3 รูปแบบคือ 1.) เลี้ยงในจานเลี้ยงที่เคลือบสารป้องกันการยึดเกาะ 2.) เลี้ยงในอาหารที่มีลักษณะคล้ายเจล และ 3.) เลี้ยงโดยมีโครง (scaffold) ช่วยพยุง (26) โดยในงานวิจัยนี้จะใช้การเลี้ยงในจานที่เคลือบสารป้องกันการยึดเกาะ เนื่องจากมีข้อดีคือไม่ซับซ้อน ใช้เวลาน้อย และสามารถแยกเซลล์ออกจากอาหารมาทำการทดลองต่อไปได้ง่าย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของ GSI ชนิดต่าง ๆ ต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ
2. เพื่อศึกษาผลของ GSI ชนิดต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ Notch และสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

รู้ความแตกต่างของฤทธิ์ของ GSI ต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับและการแสดงออกของโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ Notch และคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์มะเร็งตับ

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ทิวป์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
2. หลอด falcon ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร
3. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 และ 24 หลุม
4. Ultra-Low Attachment 96-, 6-well plate (Corning Inc., USA)
5. ปิเปตทิป (pipette tips) ขนาด 0.5-10, 200, 1,000 ไมโครลิตร
6. ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 200, 1,000 ไมโครลิตร
7. จานเพาะเชื้อ
8. เครื่องซังสาร รุ่น L2220 P (Scientific promotion)
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 (Tomy, Japan)
10. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 (ISSCO)
11. ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MITSUBISHI, Japan)
12. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SHARP, Japan)
13. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
14. เครื่องทำน้ำแข็ง รุ่น OF 146 (Newton, Thailand)
15. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E (Scientific industries, USA)
16. หลอด cryovial (SPL Life Sciences, Korea)
17. ฮีโมไซโตมิเตอร์ บริษัท ISOLAB Laborgerate GmbH, Germany
18. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
19. เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 (Biochrom Ltd, England)
20. เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Varioskan Flash Multimode (Thermo Fisher Scientific, USA)

21. เครื่องชั่งรุ่น PG6002-S และ AG285 (Mettler Toledo, Switzerland)
22. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
23. กล้องจุลทรรศน์ บริษัท OLYMPUS CKX3-SLP (OLYMPUS, Japan)
24. ขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรองขนาด 25 ซม² (Nunc Thermo Fisher Scientific, USA)
25. ตู้บ่มเซลล์ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide incubator) รุ่น 311 (Thermo Electron Corporation, USA)
26. ชุดเครื่องมือทำ agarose gel electrophoresis
27. ชุดเครื่องมือทำ SDS-PAGE
28. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer
29. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane
30. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA
31. อุปกรณ์ถ่ายภาพ Chemiluminescence (Uvitec Ltd, UK)
32. อุปกรณ์ถ่ายภาพ Gel documentation (Uvitec Ltd, UK)
33. ทิปปลอด RNase (RNase-free tip) ปริมาตร 2, 20, 200 ไมโครลิตร
34. หลอด PCR (PCR tube)
35. เครื่องเขย่า (shaker)
36. Heat block

เคมีภัณฑ์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose medium (DMEM) (Hyclone, USA)
2. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)
3. Trypsin-EDTA (Gibco, USA)
4. Gentamycin (Gibco, USA)

5. Sodium pyruvate (Hyclone, USA)
6. HEPES (Hyclone, USA)
7. Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)
8. MTT reagent (Sigma-Aldrich, USA)
9. ATPlite 1 step substrate solution (PerkinElmer Inc., USA)
10. Ethanol
11. GSI-IX (Merck, Germany)
12. GSI-XVI (Merck, Germany)
13. Crenigacestat
14. Trizol reagent (Life Technologies, USA)
15. DEPC
16. Hypure water
17. Random hexamer
18. 5x Reverse transcriptase buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)
19. dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
20. Reverse transcriptase
21. RNase inhibitor
22. Chloroform
23. Isopropanol (Merck, Germany)
24. Agarose
25. RIPA buffer
26. Protease inhibitor (Cell Signaling Technology, USA)

27. Phosphatase inhibitor (Cell Signaling Technology, USA)
28. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
29. Tris buffer
30. Acrylamide (Bio-Rad Laboratories, USA)
31. TEMED (Bio-Rad Laboratories, USA)
32. Ammonium persulfate
33. β -mercapto-ethanol (Sigma-Aldrich, USA)
34. Absolute methanol (Merck, Germany)
35. BCA protein assay
36. Trypan blue (Gibco, USA)
37. Rabbit anti-Notch1 (Cell Signaling Technology, USA)
38. Rabbit anti-Notch2 (Cell Signaling Technology, USA)
39. Rabbit anti-Notch3 (Cell Signaling Technology, USA)
40. Anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling Technology, USA)
41. Mouse anti-actin (Merck, Germany)
42. Sheep anti-mouse IgG-HRP (GE Healthcare, USA)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. GSI และเซลล์มะเร็งตับ

GSI ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 3 ชนิดคือ GSI-XVI (Merck, Germany), GSI-IX (Merck, Germany) และ Crenigacestat () เพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของแกมมาซีรีเทส โดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 (ATCC® HB-8065™) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma ที่ไม่มีจีโนมของไวรัสตับอักเสบนชนิดบี (HBV)

2. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ

2.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับแบบ 2 มิติ (monolayer)

เลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 (ATCC® HB-8065™) ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Gentamycin, 1% HEPES และ 1% Sodium pyruvate ในภาชนะ T25 Flask ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

2.2 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับแบบสามมิติในรูป spheroid

เลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 (ATCC® HB-8065™) จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่ออาหาร 2 มิลลิลิตร (27) ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Gentamycin, 1% HEPES และ 1% Sodium pyruvate ในภาชนะ 6-well Ultra-low attachment plate (Corning Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับด้วย MTT assay

วัดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เลี้ยงแบบ monolayer ด้วย MTT assay โดยนับจำนวนเซลล์ HepG2 10^4 เซลล์ต่ออาหารปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำ GSI แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5, 1.58, 5, 15.8 และ 50 μ M สำหรับ GSI-IX, GSI-XVI และ 0.01, 0.032, 0.1, 0.32 และ 1 สำหรับ Crenigacestat) โดยใช้เซลล์ที่ให้ DMSO เป็นชุดควบคุม บ่มในสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เติมน้ำ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/ml) ลง

ไป 10 μ l ต่อหลุม และบ่มอีก 4 ชั่วโมง ละลายตะกอน formazan ที่เกิดขึ้นใน DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย MULTISKAN FC microplate reader (Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้อาหาร DMEM เปล่าเป็น blank และนำไปคำนวณหา % cell viability ด้วยสูตร

$$\% \text{ cell viability} = ((A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})) \times 100$$

โดย A คือค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 540 nm

4. ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับที่เลี้ยงแบบสามมิติด้วย ATP assay

วัดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เลี้ยงแบบสามมิติ โดยนับจำนวนเซลล์ HepG2 200,000 เซลล์ต่ออาหารที่ผสมกับ GSI-IX 50 μ M , GSI-XVI 50 μ M หรือ Crenigacestat 1 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน 6-well ultra-low attachment plate โดยใช้เซลล์ที่ให้ DMSO เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์ใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยคงเหลืออาหารไว้ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายซัสเตรต 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลาย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในเพลทสำหรับวัดการเรืองแสงและวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องวัดการเรืองแสงโดยใช้อาหาร DMEM เปล่าเป็น blank และนำไปคำนวณหา % cell viability ด้วยสูตร

$$\% \text{ cell viability} = ((RLU_{\text{sample}} - RLU_{\text{blank}}) / (RLU_{\text{control}} - RLU_{\text{blank}})) \times 100$$

โดย RLU (Relative light unit) คือปริมาณแสงที่ถูกปลดปล่อยจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง ATP กับสารละลายซัสเตรตที่อ่านได้จากเครื่องวัดการเรืองแสง

5. ศึกษาการแสดงออกของ Notch1, Notch2 และ Notch3 หลังจากได้รับ GSI ของเซลล์มะเร็งตับ ด้วยวิธี Western blot

นับจำนวนเซลล์มะเร็งตับ HepG2 50,000 เซลล์ในอาหาร DMEM 1 มิลลิลิตรต่อหลุมใน 12-well plate ทิ้งไว้ข้ามคืน ให้ GSI แต่ละชนิด (GSI-IX 50 μ M , GSI-XVI 50 μ M หรือ Crenigacestat 1 μ M) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนด้วย RIPA buffer ที่ผสมกับสารยับยั้งเอนไซม์ protease และ phosphatase นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4° เซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay และนำมาแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE

โดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ใน separating gel 10% โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 80 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อ 1 เจล ละลาย PVDF membrane มาแช่ใน clocking solution (3% skim milk ใน PBST) เป็นเวลา 15 นาที นำมาแช่ใน แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ที่จำเพาะต่อ Notch1, Notch2 และ Notch3 ตามตารางที่ 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บใส่ตู้เย็น 4° เซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่มี Horse-radish peroxidase ติดฉลากอยู่ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที และล้างด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 3 ครั้ง และเติมสารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 100 mM Tris pH 8.5, Coumaric acid, Luminol และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีและนำไปตรวจสัญญาณด้วย Chemiluminescence โดยใช้เซลล์ที่ได้รับ Dimethyl sulfoxide (DMSO) แทน GSI เป็นชุดควบคุม และตรวจสอบการแสดงออกโปรตีน β -actin เพื่อใช้เป็น loading control

ตารางที่ 2.1 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot

| โปรตีน | อัตราส่วนแอนติบอดีปฐมภูมิต่อ blocking solution (บริษัทสังเคราะห์) | อัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิต่อ blocking solution (บริษัทสังเคราะห์) |
|--------|---|---|
| Notch1 | Rabbit anti-Notch1 1:1,000 (Cell Signaling Technology, USA) | Anti-Rabbit IgG-HRP 1:4000 (Cell Signaling Technology, USA) |
| Notch2 | Rabbit anti-Notch2 1:2,000 (Cell Signaling Technology, USA) | Anti-Rabbit IgG-HRP 1:4000 (Cell Signaling Technology, USA) |
| Notch3 | Rabbit anti-Notch3 1:2,000 (Cell Signaling Technology, USA) | Anti-Rabbit IgG-HRP 1:4000 (Cell Signaling Technology, USA) |
| Actin | Mouse anti-actin 1:10,000 (Merck, Germany) | Sheep anti-mouse IgG-HRP 1:4000 (GE Healthcare, USA) |

6. ศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch และยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งด้วยวิธี PCR

ตรวจการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch คือ *HES1* และ *HEY1* และยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งคือ *OCT4* ด้วยวิธี PCR โดยนับจำนวนเซลล์ HepG2 200,000 เซลล์ต่ออาหารที่ผสมกับ GSI-IX 50 μ M , GSI-XVI 50 μ M หรือ Crenigacestat 1 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน 6-well ultra-low attachment plate โดยใช้เซลล์ที่ให้ DMSO เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ Trizol reagent ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลอด เติม Chloroform ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าและนำไปปั่นที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4° เซลเซียส 10 นาที ถ่ายส่วนใสไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ที่มี Chloroform 60 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°เซลเซียส 10 นาที จากนั้นถ่ายส่วนบนไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ที่มี isopropanol 150 ไมโครลิตร ทิ้งให้ตกตะกอนที่ -20° เซลเซียสข้ามคืน นำไปปั่นที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4° เซลเซียส 30 นาที นำ supernatant ออกและล้างตะกอนด้วย 75% เอทานอล 900 ไมโครลิตรและปั่นที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°เซลเซียส 5 นาที 2 ครั้ง และล้างด้วย 100% เอทานอล 200 ไมโครลิตรและปั่นที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°เซลเซียส 5 นาที นำ supernatant ออกและปล่อยให้ตะกอนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC 20 ไมโครลิตรและนำไปต้มที่ 80° เซลเซียส 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำอาร์เอ็นเอไปทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อเปลี่ยนเป็น cDNA โดยนำ RNA มาวัดความเข้มข้นและคำนวณเพื่อให้ได้ปริมาณสำหรับ RNA 500 นาโนกรัม จากนั้นผสมกับ random hexamer 0.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC ให้ได้ปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 65 ° เซลเซียส 5 นาที จากนั้นเติม 5x Reverse Transcriptase buffer, 10 mM dNTP, เอนไซม์ Reverse transcriptase (RTase) และสารยับยั้งเอนไซม์ RNase ตามตารางที่ 2 จากนั้นดำเนินปฏิกิริยา reverse transcription และนำ cDNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในตารางที่ 3 และไพรเมอร์ต่อยีน *hes1* และ *hey1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch และ *oct4* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตามที่แสดงในตารางที่ 4 จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำ agarose gel electrophoresis โดยนำ cDNA 5 ไมโครลิตรมาผสมกับ Gel red 1 ไมโครลิตร และหยอดลงใน 2% agarose gel และแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 มิลลิโวลต์ 30 นาที และนำไปตรวจสอบผลด้วยการส่องกับ UV

ตารางที่ 2.2 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา Reverse transcription

| ส่วนประกอบ | ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร) |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 5x Reverse transcriptase buffer | 4 |
| 10 mM dNTP mix | 2 |
| Reverse transcriptase | 1 |
| RNase inhibitor | 0.5 |

ตารางที่ 2.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR

| ส่วนประกอบ | ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร) |
|----------------------|------------------------------------|
| Emerald Green | 12.5 |
| 10 mM Forward primer | 0.5 |
| 10 mM Reverse primer | 0.5 |
| Hypure water | 9 |
| cDNA | 7.5 |

ตารางที่ 2.4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

| ยีน | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') F: Forward, R: Reverse (บริษัทสังเคราะห์) | Annealing temperature (องศาเซลเซียส) | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR (bp) |
|-------------|--|---|---------------------------|
| <i>hes1</i> | F: ACGACACCGGATAAACCAAA R: CGGAGGTGCTTCACTGTCAT (Integrated DNA Technologies, USA) | 55 | 200 |
| <i>hey1</i> | F: AACTGTTGGTGGCCTGAATC R: GCGGTAAATGCAGGCGTAT (Integrated DNA Technologies, USA) | 55 | 160 |
| <i>oct4</i> | F: CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA R: CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA (Macrogen, Korea) | 68 | 169 |

การคำนวณความเข้มของแถบโปรตีน หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR

ความเข้มของแถบโปรตีนจากการทำ Western blot หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำ PCR และ Gel electrophoresis จะถูกวัดโดยใช้โปรแกรม ImageJ (NIH, USA) ตามวิธีอ้างอิงจาก Diamantina Institute ของ The University of Queensland (28) โดยสร้างพื้นที่ปิดรอบแถบโปรตีน หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่สนใจ จากนั้นวัดความเข้มของแถบโดยโปรแกรมจะแสดงผลในรูปฮิสโตแกรม (Histogram) โดยอิงจากจำนวนพิกเซล (pixel) ที่อยู่ภายในพื้นที่ปิดล้อมที่สร้างขึ้น คำนวณพื้นที่ใต้กราฟของฮิสโตแกรม และนำพื้นที่ใต้กราฟของแถบโปรตีน หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่สนใจหารด้วยพื้นที่ใต้กราฟของแถบโปรตีน หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR ควบคุมของชุดการทดลองเดียวกัน จะได้สัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีน หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR ในชุดการทดลองเดียวกัน จากนั้นนำสัดส่วนที่ได้จากแต่ละชุดการทดลอง หารด้วยสัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีน หรือแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของชุดการทดลองควบคุม (ชุดการทดลองที่ได้รับ DMSO แทน GSI)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

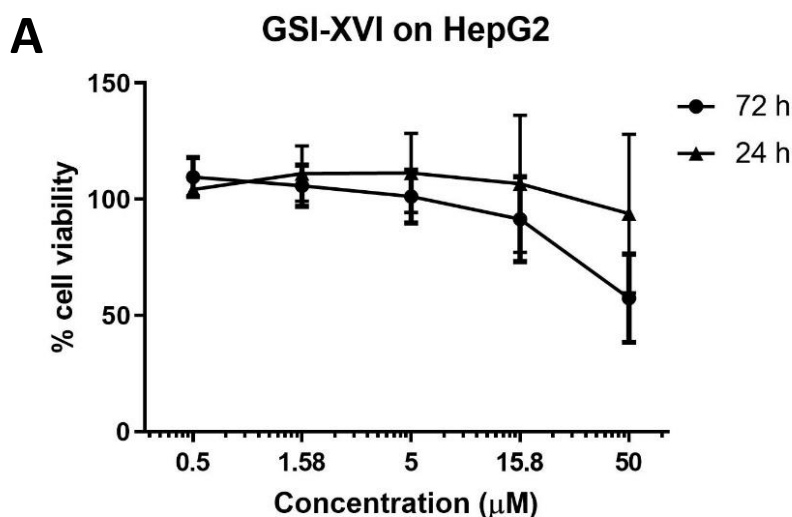
ผลการทดลองถูกแสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบผลการทดลองของชุดทดลองที่ได้รับ GSI แต่ละชนิดกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ unpaired t-test ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, USA) โดย * หมายถึง ข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), ** หมายถึง $p < 0.01$ และ *** หมายถึง $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

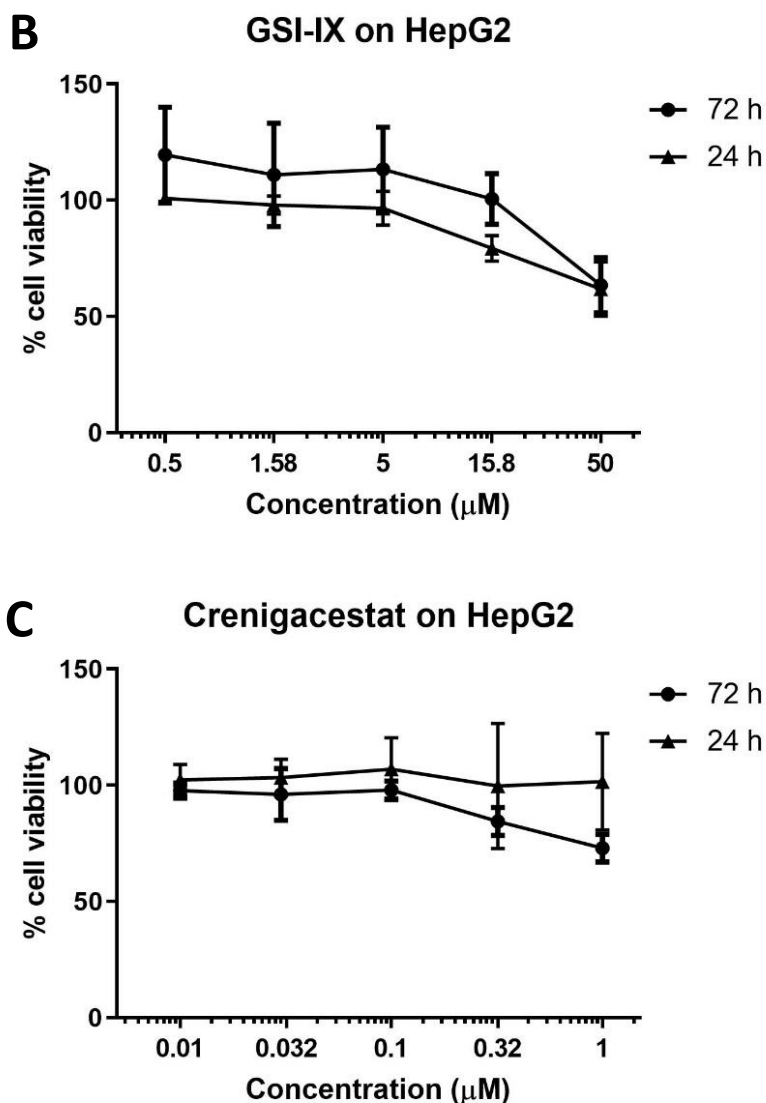
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการทดสอบผลของ GSI ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ผลการทำ MTT assay ของเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับ GSI-XVI พบว่า GSI-XVI ไม่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับ HepG2 มีชีวิตรอดน้อยลงในทุกความเข้มข้นที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับมีชีวิตรอดลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยให้ผลการยับยั้งมากที่สุดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์มะเร็งตับมีชีวิตรอดเฉลี่ยที่ 57.41 % (ภาพที่ 3.1A) การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับ GSI-IX พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (0.5, 1.58, 5 ไมโครโมลาร์) GSI-IX สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ทั้งเวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง โดยการมีชีวิตรอดเฉลี่ยมีค่าใกล้เคียงกันคือ 61.79 และ 63.49 % ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเซลล์มะเร็งตับได้รับ GSI-IX ที่ความเข้มข้นต่ำ กลับทำให้การมีชีวิตรอดสูงขึ้น (ภาพที่ 3.1B) และการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับ Crenigacestat พบว่า Crenigacestat ไม่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับมีชีวิตรอดน้อยลงในทุกความเข้มข้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และให้ผลการยับยั้งมากที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ในเวลา 72 ชั่วโมง โดยเซลล์มะเร็งตับมีชีวิตรอดเฉลี่ยที่ 72.93 % (ภาพที่ 3.1C)





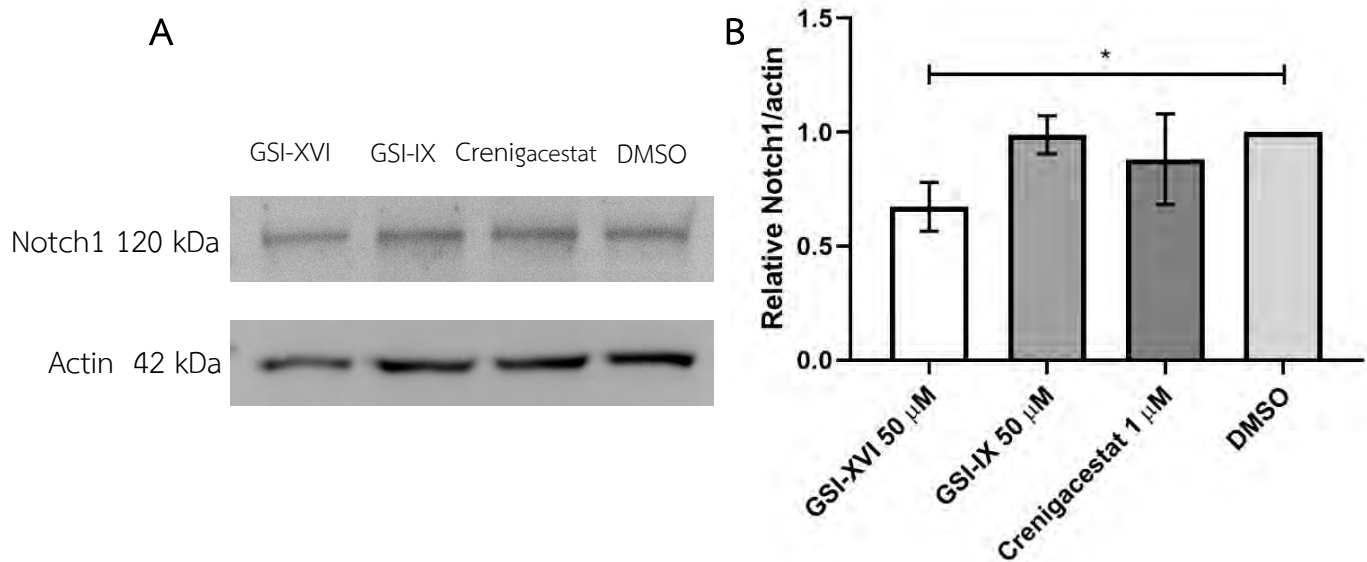
ภาพที่ 3.1 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อได้รับ GSI แต่ละชนิด

วัดการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 ที่ได้รับ GSI-XVI (A), GSI-IX (B) และ Crenigacestat (C) เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO ด้วยวิธี MTT assay โดยแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกโปรตีน Notch ในเซลล์ HepG2

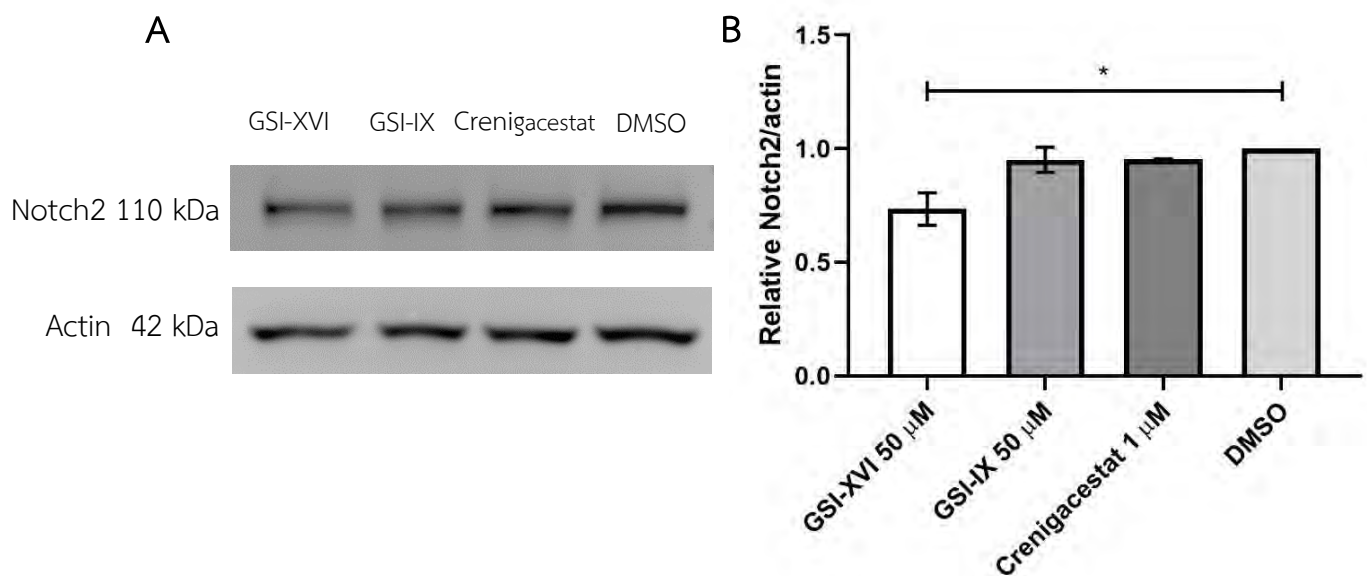
ผลการแสดงออกโปรตีน Notch1 พบว่า GSI-XVI 50 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Notch1 มากที่สุด โดย Crenigacestat 1 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของ Notch1 ได้เพียงเล็กน้อย และไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน Notch1 ในชุดทดลองที่ได้รับ GSI-IX 50 ไมโครโมลาร์กับชุดควบคุมเลย (ภาพที่ 3.2.1) ผลการแสดงออกโปรตีน Notch2 พบว่า GSI-XVI 50 ไมโครโมลาร์

สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Notch2 มากที่สุด แต่ Crenigacestat 1 ไมโครโมลาร์ และ GSI-IX 50 ไมโครโมลาร์ไม่สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Notch2 ได้เลย (ภาพที่ 3.2.2) และผลการแสดงออกของโปรตีน Notch3 พบว่า GSI-XVI 50 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Notch3 ได้มากที่สุด ซึ่งมากกว่า GSI-IX 50 ไมโครโมลาร์เล็กน้อย และไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน Notch3 ในชุดทดลองที่ได้รับ Crenigacestat 1 ไมโครโมลาร์กับชุดควบคุมเลย (ภาพที่ 3.2.3)



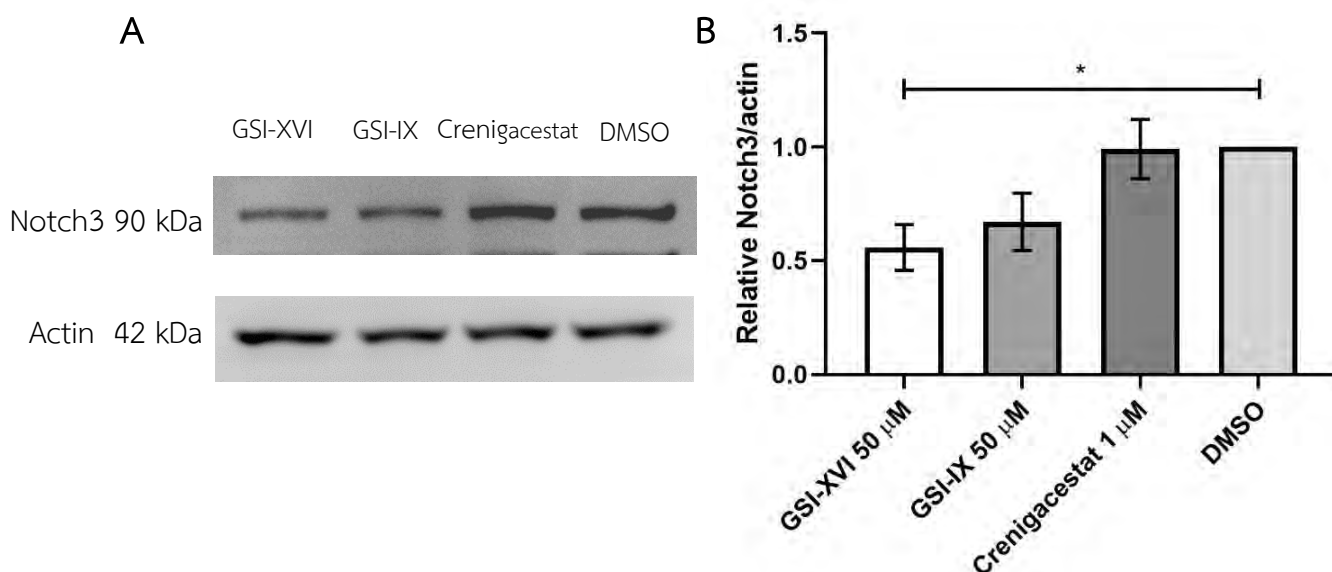
ภาพที่ 3.2.1 ระดับการแสดงออกโปรตีน Notch1 โดยวิธี Western blot

(A) วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Notch1 ใน HepG2 ที่ได้รับ GSI แต่ละชนิดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot โดยแสดงสัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนเฉลี่ยต่อโปรตีน β -actin ในชุดการทดลองเดียวกัน เทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO โดย (B) แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 2 ซ้ำ (* หมายถึง ข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO ด้วย unpaired t-test)



ภาพที่ 3.2.2 ระดับการแสดงออกโปรตีน Notch2 โดยวิธี Western blot

(A) วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Notch2 ใน HepG2 ที่ได้รับ GSI แต่ละชนิดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot โดยแสดงสัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนเฉลี่ยต่อโปรตีน β -actin ในชุดการทดลองเดียวกัน เทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO โดย (B) แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 2 ซ้ำ (* หมายถึง ข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO ด้วย unpaired t-test)



ภาพที่ 3.2.3 ระดับการแสดงออกโปรตีน Notch3 โดยวิธี Western blot

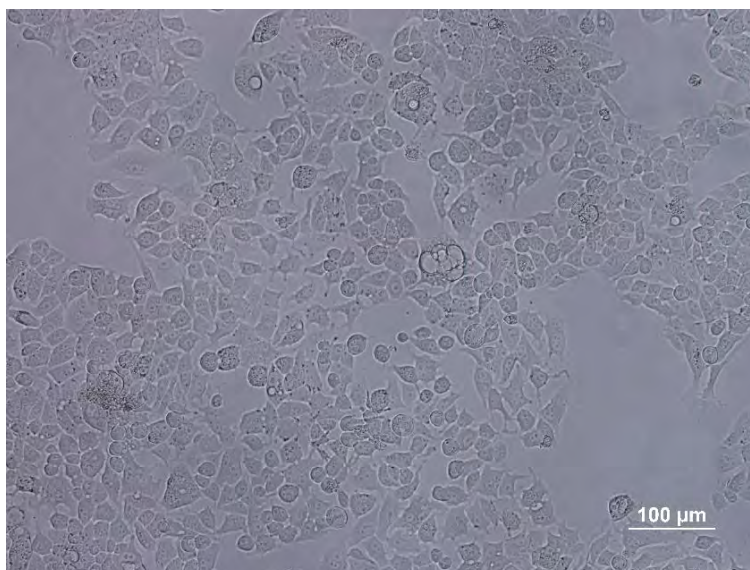
(A) วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Notch3 ใน HepG2 ที่ได้รับ GSI แต่ละชนิดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot โดยแสดงสัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนเฉลี่ยต่อโปรตีน β -actin ในชุดการทดลองเดียวกัน เทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO โดย (B) แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 2 ซ้ำ (* หมายถึง ข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO ด้วย unpaired t-test)

3.3 การเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนตัวรับสัญญาณ Notch ในการเลี้ยงเซลล์ไลน์ HepG2 แบบสองมิติ (monolayer) และสามมิติ (spheroid)

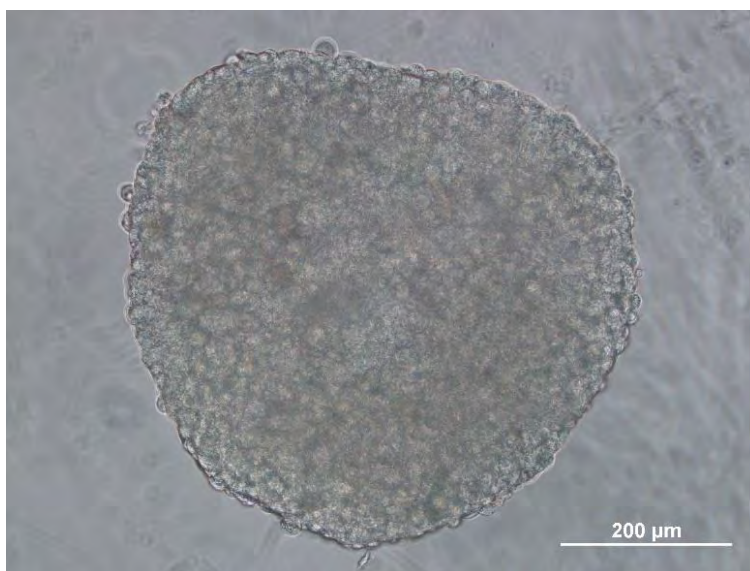
ผลการทำ Western blot เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน Notch ด้วยโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ HepG2 ที่เลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันที่ 6,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 72 ชั่วโมงใน 96-well plate สำหรับการเลี้ยงแบบสองมิติ (ภาพที่ 3.3.1A) หรือ 96-well ultra-low attachment plate สำหรับ

การเลี้ยงแบบสามมิติ (ภาพที่ 3.3.1B) พบว่าในการเลี้ยงแบบสามมิติ HepG2 มีการแสดงออกของโปรตีน Notch1 (ภาพที่ 3.3.2A) และ Notch2 (ภาพที่ 3.3.2B) มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงแบบสองมิติ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกศึกษาด้วยการเลี้ยงแบบสามมิติแทนการเลี้ยงแบบสองมิติ

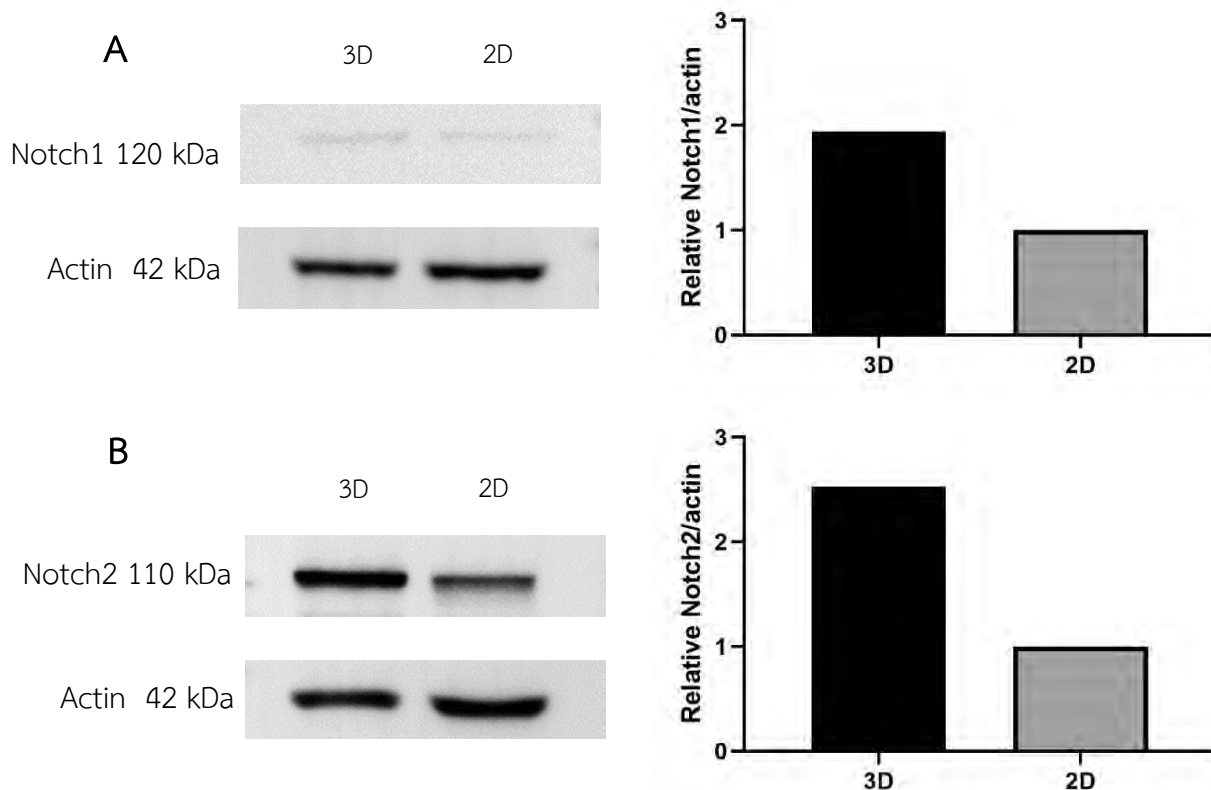
A



B



ภาพที่ 3.3.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ HepG2 ที่เลี้ยงแบบสองมิติและสามมิติภายใต้กล้องจุลทรรศน์
เซลล์ไลน์ HepG2 แบบ monolayer ที่เลี้ยงใน 96-well plate (A) และ spheroid ที่เลี้ยงใน 96 well ultra-low attachment plate (B) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

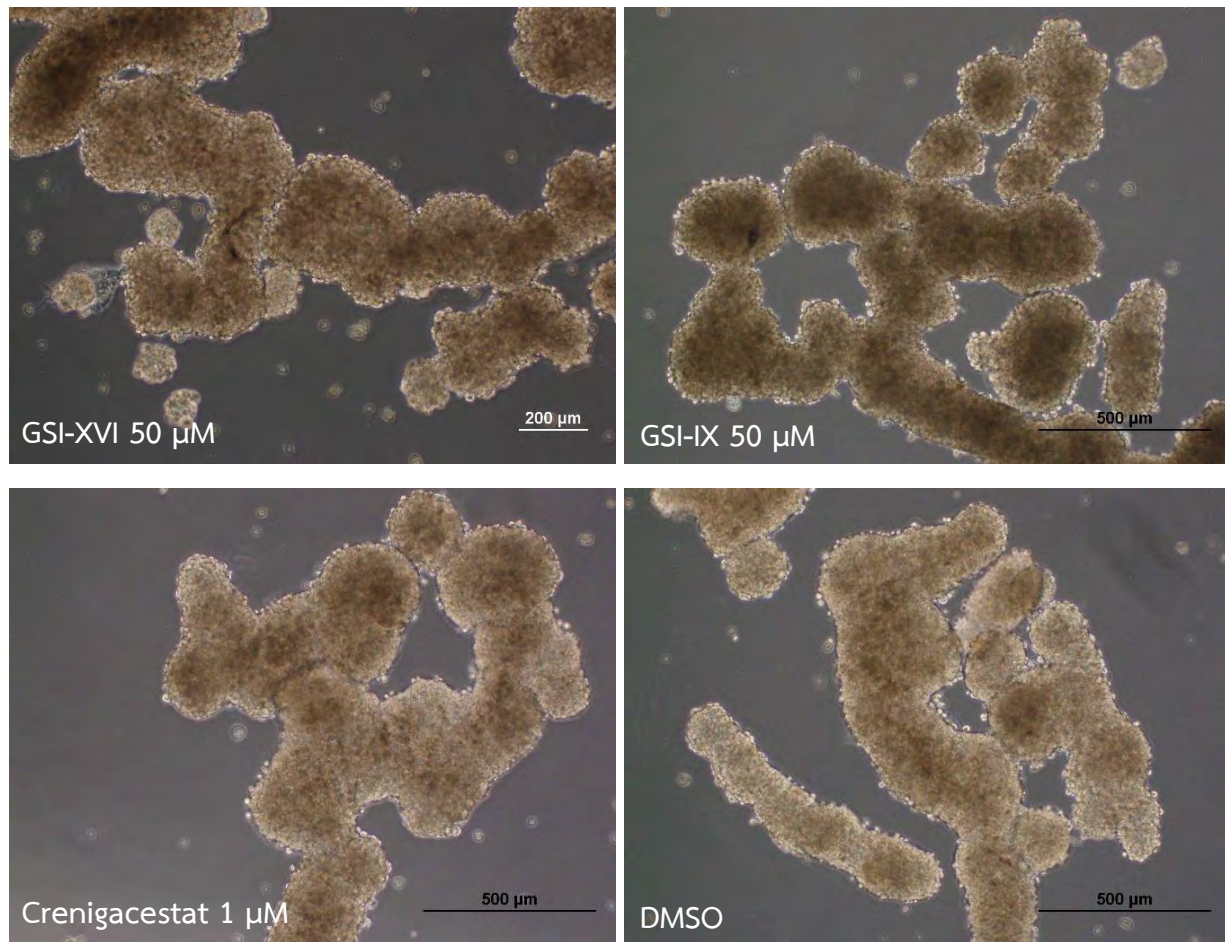


ภาพที่ 3.3.2 ระดับการแสดงออกโปรตีน Notch1 และ Notch2

วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Notch1 (A) และ Notch2 (B) ใน HepG2 ที่เลี้ยงแบบสองมิติ (2D) และสามมิติแบบ spheroid (3D) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot โดยแสดงสัดส่วนความเข้มของแถบโปรตีนเฉลี่ยต่อโปรตีน β -actin ในชุดการทดลองเดียวกัน โดยแสดงค่าจากการทดลอง 1 ซ้ำ

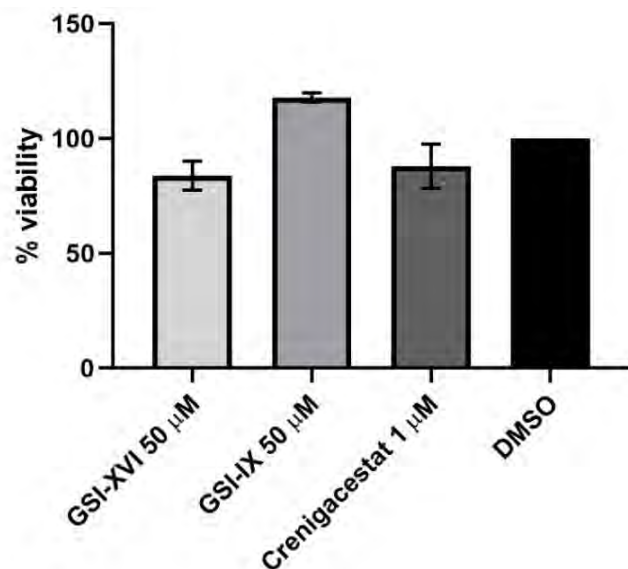
3.4 การตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งระดับที่ได้รับ GSI เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการเลี้ยงแบบสามมิติ (spheroid)

จากการทดลองพบว่าลักษณะภายนอกของ spheroid ของ HepG2 ที่เกิดขึ้นหลังได้รับ GSI แต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3.4.1) โดยผลการทำ ATP assay พบว่า GSI-XVI และ Crenigacestat สามารถทำให้การมีชีวิตรอดเฉลี่ยลดลงเหลือ 83.87 และ 87.95 % ตามลำดับ ซึ่งจะสังเกตได้ว่า GSI ทั้งสองชนิดทำให้การมีชีวิตรอดลดลงน้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงแบบสองมิติ ส่วน GSI-IX ทำให้การมีชีวิตรอดเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 117.95 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO (ภาพที่ 3.4.2)



ภาพที่ 3.4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Spheroid ของ HepG2 ที่ได้รับ GSI แต่ละชนิด

ลักษณะของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 ที่เลี้ยงแบบสามมิติ (spheroid) และได้รับ GSI-XVI, GSI-IX และ Crenigacestat เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO

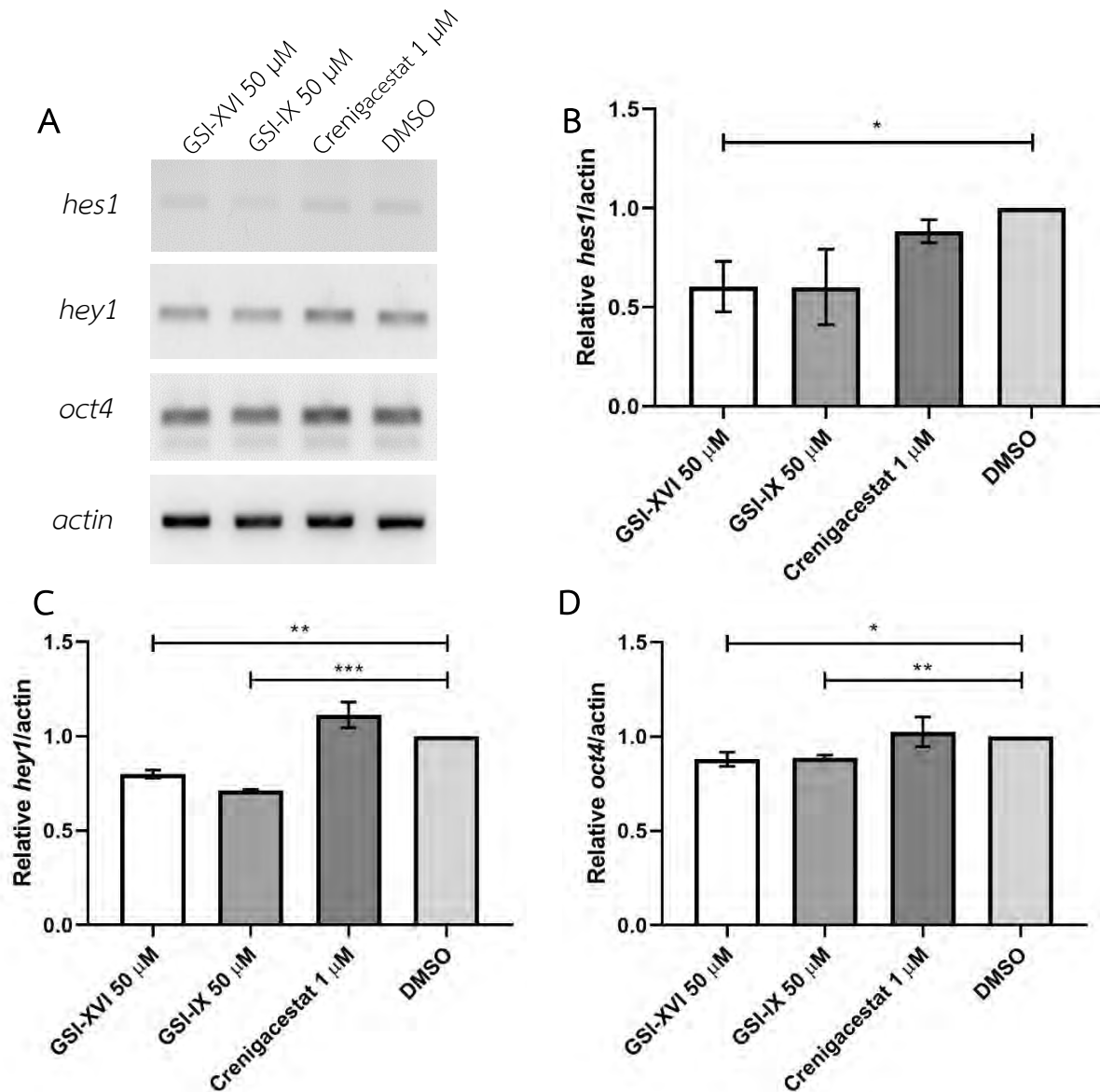


ภาพที่ 3.4.2 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของ HepG2 ที่เลี้ยงแบบสามมิติในรูป spheroid เมื่อได้รับ GSI

วัดการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 ที่เลี้ยงแบบสามมิติ (spheroid) ได้รับ GSI-XVI, GSI-IX และ Crenigacestat เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO ด้วยวิธี ATP assay โดยแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch และยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งด้วยวิธี PCR

จากการนำ spheroid ที่ได้รับ GSI แต่ละชนิดมาสกัด RNA นำไปผ่านกระบวนการ reverse transcription และ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ต่อยีน *hes1* และ *hey1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch และ *oct4* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง พบว่ายีน *hes1* และ *hey1* มีการแสดงออกที่ลดลงใน spheroid ที่ได้รับ GSI-XVI และ GSI-IX 50 ไมโครโมลาร์ แต่มีการแสดงออกของยีน *hes1* ลดลง และมีการแสดงออกของยีน *hey1* เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ Crenigacestat 1 ไมโครโมลาร์ ส่วนระดับการแสดงออกของยีน *oct4* เมื่อได้รับ GSI-XVI และ GSI-IX 50 ไมโครโมลาร์ มีระดับการแสดงออกลดลงเพียงเล็กน้อย และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อได้รับ Crenigacestat 1 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 3.5 ผลของ GSI ต่อระดับการแสดงออกของยีน *hes1*, *hey1* และ *oct4* ในเซลล์ไลน์ HepG2

(A) วัดระดับการแสดงออกของยีน *hes1*, *hey1* และ *oct4* ใน HepG2 ที่ได้รับ GSI แต่ละชนิดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี PCR เทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO โดยแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัดส่วนความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR เฉลี่ยของยีน *hes1* (B), *hey1* (C) และ *oct4* (D) ต่อยีน β -actin จากการทดลอง 2 ซ้ำ (* หมายถึง ข้อมูลของชุดทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), ** หมายถึง $p < 0.01$ และ *** หมายถึง $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับ DMSO ด้วย unpaired t-test)

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

เนื่องจากกลไกการทำงานที่แตกต่างกันของ GSI แต่ละชนิด โดย GSI-XVI ยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีครีเตสในการผลิต $\text{A}\beta_{40}$ เป็นหลัก (21), GSI-IX จะยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีครีเตสในการผลิตโปรตีน $\text{A}\beta$ เป็นหลัก (22) และ Crenigacestat ซึ่งยับยั้งการย่อย Notch-1 intracellular domain (N1ICD) ด้วยเอนไซม์แกมมาซีครีเตสเป็นหลัก (23) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 แตกต่างกันไป นอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง อาจยังไม่ใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีรายงานว่า การยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ด้วย GSI เป็นการยับยั้งโดยขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent) (29), (30) ดังนั้น เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ GSI ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งตับที่เหมาะสม จึงควรทำการทดลองโดยใช้ GSI ในช่วงความเข้มข้นหลากหลายขึ้นเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ที่มีประสิทธิภาพสำหรับ GSI แต่ละชนิดเพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่า GSI-IX (DAPT) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.016 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถลดการมีชีวิตรอดของ HepG2 ได้ และสามารถลดการมีชีวิตรอด HepG2 ได้ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์เท่านั้น (31) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ และเนื่องจากยังไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ GSI-XVI และ Crenigacestat ในเซลล์ไลน์ HepG2 จึงสรุปว่า GSI-XVI, GSI-IX ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และ Crenigacestat ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 ในการเลี้ยงแบบสองมิติได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของ GSI แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นดังกล่าวในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ พบว่าให้ผลการยับยั้งได้น้อยกว่าการเลี้ยงแบบสองมิติ ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ก็ได้รายงานว่า การเลี้ยงเซลล์สามมิติแบบ spheroid ทำให้เซลล์มีการดี้อาหรือสารที่ใช้ในการทดลองมากขึ้น (32, 33) โดยอาจมีสาเหตุจากการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติในรูป spheroid ทำให้การส่งสัญญาณและปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ การสร้าง extracellular matrix (ECM) แตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ (34) รวมถึงการที่ยาไม่สามารถแพร่ผ่านโครงสร้างของ spheroid เข้าไปยังเซลล์ที่อยู่ด้านใน และสถานะไม่มีออกซิเจน (hypoxia) ใน spheroid สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์และการดี้อาได้ (35) จึงอาจส่งผลให้ผลของ GSI ต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 ในการเลี้ยงแบบสองมิติแตกต่างจากการเลี้ยงแบบสามมิติในรูป spheroid ซึ่งหากเปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ สามารถเลียนแบบโครงสร้างและสภาวะธรรมชาติของก้อนมะเร็ง รวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม ได้มากกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ การเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการศึกษาผลของ GSI ต่อเซลล์มะเร็งต่อไปในอนาคต

จากผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวรับสัญญาณ Notch ทั้ง 3 ชนิด คือ Notch1, Notch2 และ Notch3 และการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch คือ *hes1* และ *hey1* พบว่าการที่โปรตีน Notch บางชนิดที่มีระดับการแสดงออกลดลงเพียงเล็กน้อยหรือไม่ลดลงเมื่อได้รับ GSI อาจเกิดจากการสะสมของโปรตีนเหล่านั้นบนผิวเซลล์ เนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทสโดย GSI ทำให้ไม่เกิดการย่อยโปรตีน Notch เหล่านี้และยังคงมีการสะสมบนผิวเซลล์ (31) ดังนั้นหากทำการทดลองโดยเพิ่มระยะเวลาให้มากกว่า 72 ชั่วโมงเพื่อให้โปรตีนเหล่านั้นที่สะสมอยู่บนผิวเซลล์ถูกย่อยสลายไปอาจทำให้เห็นความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีน Notch มากขึ้น โดยยืนยันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทสได้จากระดับการแสดงออกของยีน *hes1* และ *hey1* ที่ลดลงเมื่อได้รับ GSI-XVI และ GSI-IX แต่ในกรณีของเซลล์ที่ได้รับ Crenigacestat จะเห็นว่าระดับการแสดงออกทั้งของโปรตีน Notch และยีน *hes1* และ *hey1* ลดลงเพียงเล็กน้อยหรือไม่ลดลงเลย อาจเกิดจากการใช้ความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ใน HepG2 ได้ ดังนั้น เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนขึ้นอาจทำการทดลองโดยเปรียบเทียบการใช้ Crenigacestat ที่ความเข้มข้นที่หลากหลายเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป และเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง คือ *oct4* พบว่า GSI-XVI และ GSI-IX ลดระดับการแสดงออกของยีน *oct4* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกที่ลดลงของยีนเป้าหมายในวิถีสัญญาณ Notch และให้ผลไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ในการลดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 โดยใช้ GSI-IX (31) และการลดระดับการแสดงออกของ *oct4* โดยใช้ GSI-IX (36) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าการใช้ GSI ในการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ Notch สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้

อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของงานวิจัยคือ การทดลองนี้ได้ใช้เซลล์ไลน์มะเร็งตับเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งตับชนิดอื่น ๆ เช่น Huh7, BEL-7402, BEL-7404, 97L, PLC/PRF/5, QGY-7701 และ SMMC-7721 เป็นต้น (37, 38) เนื่องจากเซลล์ไลน์มะเร็งตับแต่ละชนิดมีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องวิถีสัญญาณ Notch หรือยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ที่แตกต่างกัน (38) รวมไปถึงการปรับความเข้มข้นของ GSI ให้เหมาะสมในการทดลองเพื่อให้เห็นผลชัดเจนยิ่งขึ้น และยังคงต้องมีการศึกษาผลของ GSI ต่อระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเพิ่มเติม นอกจากนี้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานเกี่ยวกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็งตับต่อยาที่ใช้รักษามะเร็งตับในปัจจุบันหลายชนิด เช่น Sorafenib (39-41) , 5-fluorouracil และ Vincristine (42-44) ซึ่งการดื้อยาเหล่านี้เกิดจากการส่งสัญญาณในวิถีสัญญาณ Notch ที่มากผิดปกติในเซลล์มะเร็งตับ ทำให้เซลล์มะเร็งเหล่านั้นมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell, CSC) (10) ซึ่ง CSC มีคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนโดยยังคงความเป็น CSC ไว้ได้ (11) ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่สนับสนุนให้เกิดการรุกราน

(invasiveness) และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis), การดื้อยาของเซลล์มะเร็ง, และการกลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) (12) ซึ่งได้มีรายงานว่า การยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ด้วย GSI PF-03084014 ทำให้เซลล์มะเร็งตับมีความไวต่อยา Sorafenib มากขึ้น (10) นอกจากนี้ การยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ด้วย DAPT สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตับมีความไวต่อยา 5-fluorouracil และ Vincristine ได้ (37) ดังนั้น การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้ GSI ร่วมกับยาอื่น ๆ ที่ใช้ในปัจจุบันอาจนำไปสู่แนวทางใหม่การรักษาโรคมะเร็งตับที่มีประสิทธิภาพได้

จากการศึกษาเกี่ยวกับวิถีสัญญาณ Notch จะเห็นได้ว่าการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch สามารถยับยั้งได้หลากหลายวิธี ไม่เพียงแต่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีครีเตสเท่านั้น เช่น การยับยั้งการแสดงออกของลิแกนด์และตัวรับสัญญาณ Notch, การขัดขวางการจับกับระหว่างลิแกนด์และตัวรับสัญญาณ Notch และการขัดขวางกระบวนการสร้าง Notch transcriptional complex เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยกระบวนการเหล่านี้ยังคงอยู่ในระหว่างการพัฒนา (45) โดยตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่โมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) ต่อโปรตีน Notch โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือแอนติบอดีที่จับกับ negative regulator region (NRR) ที่อยู่นอกเซลล์ของโปรตีน Notch ซึ่งจะขัดขวางการเปลี่ยนโครงสร้าง (conformational change) ก่อนที่จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ในวิถีสัญญาณต่อไป ส่วนอีกรูปแบบหนึ่งคือแอนติบอดีต่อ ligand binding domain (LBD) ของโปรตีนตัวรับสัญญาณ Notch ซึ่งจะจับกับตัวรับสัญญาณแบบแข่งขันกับลิแกนด์ (46) นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ด้วยรูปแบบอื่น เช่นการใช้ Notch decoy ประกอบด้วยส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular domain) ของลิแกนด์หรือตัวรับสัญญาณ Notch โดยไม่มีส่วนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณได้ (45) จะเห็นได้ว่า หากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้ GSI หรือการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ด้วยวิธีอื่น ๆ ร่วมกับการรักษารูปแบบอื่น ๆ ในปัจจุบัน อาจนำไปสู่การพัฒนาารูปแบบการรักษาโรคมะเร็งตับแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS DMEM (ทั้งหมด 40 ml)

| | | |
|--|------|----|
| ดีเอ็มเอ็ม (DMEM) | 43.8 | ml |
| ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum) | 5 | ml |
| ยาปฏิชีวนะ Gentamycin | 0.5 | ml |
| hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES) | 0.5 | ml |
| โซเดียม ไพรูเวท (Sodium pyruvate) | 0.5 | ml |

2. ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS ความเป็นกรด-ด่าง 7.4)

| | | |
|---|------|---|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 8 | g |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.2 | g |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄) | 3.63 | g |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄) | 0.24 | g |
| น้ำกลั่น | 1 | L |

3) Freezing media (ทั้งหมด 1000 µl)

| | | |
|--------------|-----|----|
| 10% FBS DMEM | 900 | µl |
| DMSO | 100 | µl |

4) 95% Ethanol (ทั้งหมด 100 ml)

| | | |
|------------------|----|----|
| Absolute ethanol | 95 | ml |
| น้ำกลั่น | 5 | ml |

เอกสารอ้างอิง

1. Fund WCR. Worldwide cancer data n.d. [Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>.
2. Thailand NCI. Cancer Registry 2002-2018 n.d. [Available from: http://www.nci.go.th/th/cancer_record/cancer_rec1.html.
3. team TACSmaec. Liver Cancer Survival Rates 2019 [Available from: <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
4. Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10).
5. Kumar R, Juillerat-Jeanneret L, Golshayan D. Notch Antagonists: Potential Modulators of Cancer and Inflammatory Diseases. *J Med Chem.* 2016;59(17):7719-37.
6. Krishnaswamy S, Verdile G, Groth D, Kanyenda L, Martins RN. The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(5-6):282-301.
7. Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang YW. The gamma-secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:427.
8. Borggrefe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(10):1631-46.
9. Murata K, Hattori M, Hirai N, Shinozuka Y, Hirata H, Kageyama R, et al. Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1. *Mol Cell Biol.* 2005;25(10):4262-71.
10. Yang X, Xia W, Chen L, Wu CX, Zhang CC, Olson P, et al. Synergistic antitumor effect of a γ -secretase inhibitor PF-03084014 and sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(79).
11. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-51.
12. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 2014;14(3):275-91.
13. Guo H, Lu Y, Wang J, Liu X, Keller ET, Liu Q, et al. Targeting the Notch signaling pathway in cancer therapeutics. *Thorac Cancer.* 2014;5(6):473-86.
14. Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, et al. Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(12):7890-8.
15. Wolfe MS. gamma-Secretase as a target for Alzheimer's disease. *Adv Pharmacol.* 2012;64:127-53.

16. Dai G, Deng S, Guo W, Yu L, Yang J, Zhou S, et al. Notch pathway inhibition using DAPT, a gamma-secretase inhibitor (GSI), enhances the antitumor effect of cisplatin in resistant osteosarcoma. *Mol Carcinog.* 2019;58(1):3-18.
17. Rao SS, O'Neil J, Liberator CD, Hardwick JS, Dai X, Zhang T, et al. Inhibition of NOTCH signaling by gamma secretase inhibitor engages the RB pathway and elicits cell cycle exit in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* 2009;69(7):3060-8.
18. Wu CX, Xu A, Zhang CC, Olson P, Chen L, Lee TK, et al. Notch Inhibitor PF-03084014 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth and Metastasis via Suppression of Cancer Stemness due to Reduced Activation of Notch1-Stat3. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(8):1531-43.
19. Golde TE, Koo EH, Felsenstein KM, Osborne BA, Miele L. gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(12):2898-907.
20. Ran Y, Hossain F, Pannuti A, Lessard CB, Ladd GZ, Jung JI, et al. gamma-Secretase inhibitors in cancer clinical trials are pharmacologically and functionally distinct. *EMBO Mol Med.* 2017;9(7):950-66.
21. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 2002;416(6880):535-9.
22. H. F. Dovey VJ, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L. Y. Fang, et al. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of Neurochemistry.* 2001;76:9.
23. Abdel-Magid AF. Inhibition of notch pathway signaling: a one compound mission to treat cancer. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(4):373-4.
24. Haapasalo A, Kovacs DM. The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(1):3-28.
25. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013;18(5-6):240-9.
26. Kapalczynska M, Kolenda T, Przybyla W, Zajackowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910-9.
27. Le AP, Zhang LL, Liu W, Shi YF. Cantharidin inhibits cell proliferation and induces apoptosis through G2/M phase cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma stem cells. *Oncol Rep.* 2016;35(5):2970-6.

28. Queensland TUo. Using ImageJ to quantify blots 2017 [updated Apr 27, 2017]. Available from: <https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/sparq-ed-services/using-imagej-quantify-blots>.
29. Zhou L, Wang DS, Li QJ, Sun W, Zhang Y, Dou KF. Downregulation of the Notch signaling pathway inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by inactivation of matrix metalloproteinase-2 and -9 and vascular endothelial growth factor. *Oncol Rep.* 2012;28(3):874-82.
30. Mancarella S, Serino G, Dituri F, Cigliano A, Ribback S, Wang J, et al. Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis. *Cell Death & Differentiation.* 2020.
31. Suwanjonee S, Wongchana W, Palaga T. Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. *Anti-Cancer Drugs.* 2008;19(5):477-86.
32. Karlsson H, Fryknas M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res.* 2012;318(13):1577-85.
33. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Hutmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials.* 2010;31(32):8494-506.
34. Speight PM, Farthing PM. The pathology of oral cancer. *British Dental Journal.* 2018;225(9):841-7.
35. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2007;99(19):1441-54.
36. Jiang L-Y, Zhang X-L, Du P, Zheng J-H. γ -Secretase Inhibitor, DAPT Inhibits Self-renewal and Stemness Maintenance of Ovarian Cancer Stem-like Cells In Vitro. *Chin J Cancer Res.* 2011;23(2):140-6.
37. Hemati H, Kaur J, Sobti RC, Trehanpati N. Inhibition of NOTCH signaling pathway chemosensitizes HCC CD133(+) cells to vincristine and 5-fluorouracil through upregulation of BBC3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;525(4):941-7.
38. Shen Y, Lv D, Wang J, Yin Y, Miao F, Dou F, et al. GSI-I has a better effect in inhibiting hepatocellular carcinoma cell growth than GSI-IX, GSI-X, or GSI-XXI. *Anticancer Drugs.* 2012;23(7):683-90.

39. Chen J, Jin R, Zhao J, Liu J, Ying H, Yan H, et al. Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 2015;367(1):1-11.
40. Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(1):25-34.
41. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(4):378-90.
42. Jiang X, Gwye Y, Russell D, Cao C, Douglas D, Hung L, et al. CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. *BMC Cancer*. 2010;10(1):116.
43. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008;27(12):1749-58.
44. Pressey JG, Haas MC, Pressey CS, Kelly VM, Parker JN, Gillespie GY, et al. CD133 marks a myogenically primitive subpopulation in rhabdomyosarcoma cell lines that are relatively chemoresistant but sensitive to mutant HSV. *Pediatric Blood & Cancer*. 2013;60(1):45-52.
45. Espinoza I, Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2013;139(2):95-110.
46. Aste-Amezaga M, Zhang N, Lineberger JE, Arnold BA, Toner TJ, Gu M, et al. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *PLoS One*. 2010;5(2):e9094.