

ผลของสารยับยั้งแกมมาซีรีเทสต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์



นางสายพิน สุวรรณจณี

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF GAMMA-SECRETASE INHIBITOR ON PROLIFERATION  
OF HUMAN CANCER CELL LINES



Mrs. Saipin Suwanjune

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Faculty of Science Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของสารยับยั้งเกมมาซีกรีเทสต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็ง  
ของมนุษย์

โดย นางสาวพิน สุวรรณจูลี


สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมณะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาคยา งามโรจนวิชัย)

สายพิน สุวรรณจุณี : ผลของสารยับยั้งแกมมาซีครีเทสต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ (EFFECTS OF GAMMA-SECRETASE INHIBITOR ON PROLIFERATION OF HUMAN CANCER CELL LINES) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.ชนาภัทร ปาลกะ, 80 หน้า

Notch คือ โปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ ซึ่งมีการอนุรักษ์ไว้ในระดับสูงในระหว่างวิวัฒนาการ วิถีสัญญาณ Notch มีหน้าที่ควบคุมการเจริญ การแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะและการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส โดยมีเอนไซม์แกมมาซีครีเทสทำหน้าที่ตัดโปรตีน Notch เพื่อกระตุ้นให้มีการส่งสัญญาณ ความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก เป็นต้น งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีครีเทส (GSI) ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด คือ SW620, Kato III, HepG2, BT474, A375 และ Jurkat และศึกษาบทบาทของวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยพบว่า GSI สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Jurkat และ HepG2 ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ ทั้งสองเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Hes1* (ยีนเป้าหมายของ Notch), *Jagged1*, *Jagged2* และ *Dlk1* (Notch ligand) และจากเซลล์ไลน์ทั้งหมด 6 เซลล์ไลน์พบว่า Jurkat และ SW620 เท่านั้นที่มีการแสดงออกของ cleaved Notch1 เมื่อเซลล์ได้รับ GSI เป็นเวลา 4 วัน ไม่พบว่าเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 มีการตายแบบอะพอโทซิสและพบว่าทั้งสองเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของยีน *Hes1* ลดลง และโปรตีน Notch1 เพิ่มขึ้น เมื่อทำการแสดงออกเกินของยีนในส่วนของ intracellular Notch1 (ICN1) ในสองเซลล์ไลน์ พบว่า GSI ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ทั้งสองที่ได้รับพลาสติกที่มีการแสดงออกเกินของ ICN1 ดังนั้นวิถีสัญญาณ Notch มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งตับโดยตรง การยับยั้งแบบจำเพาะต่อวิถีสัญญาณของ Notch โดยตรงด้วย GSI อาจเป็นแนวทางในการรักษามะเร็งทั้งสองชนิดแบบจำเพาะต่อไป

สาขาวิชา ..... เทคโนโลยีชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต ..... *สงพิน ส่วนนุคดี* .....

ปีการศึกษา ..... 2549 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... *สงพิน ส่วนนุคดี* .....

## 4772515523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

Key Word: Notch signaling , gamma-secretase inhibitor , cancer

SAIPIN SUWANJUNEE : EFFECTS OF GAMMA SECRETASE INHIBITOR ON  
PROLIFERATION OF HUMAN CANCER CELL LINES. THESIS ADVISOR :  
ASST.PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 80 pp.

Notch is an evolutionarily conserved transmembrane receptor. Notch signaling is involved in cell fate determination, proliferation and apoptosis. Gamma secretase is responsible for Notch processing leading to activation of Notch signaling. Aberration in Notch signaling is associated with tumor formation of various cell lineages such as T-cell leukemia, breast cancer and cervical cancer. The aims of this study are to determine the effect of gamma-secretase inhibitor (GSI) on proliferation of six human cancer cell lines (SW620, Kato III, HepG2, BT474, A375, Jurkat) and the role of Notch signaling in GSI sensitivity in these cell lines. The result showed that GSI inhibited proliferation of Jurkat and HepG2 cell lines at concentration in the range of 25-50  $\mu$ M. Both cell lines expressed mRNA and protein of *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Hes1* (Notch target gene), *Jagged1*, *Jagged2* and *Dlk1* (Notch ligand). Among six cell lines, only Jurkat and SW620 expressed cleaved Notch1. Jurkat and HepG2 cell lines did not undergo apoptosis upon GSI treatment. Decreased expressions of *Hes1* and increased expression of Notch1 in both cell lines were detected when treated with GSI for 4 days. GSI did not inhibit proliferation when intracellular Notch1 (ICN1) was overexpressed in Jurkat and HepG2. Taken together, these results suggest that Notch signaling is directly involved in proliferation of human tumor cell lines of lymphoid and liver origins. Specific inhibition of Notch signaling by GSI may be a novel therapeutic target in treatment of both cancers in the future.

Field of study..... Biotechnology..... Student's signature ..... *Saipin Suwanjuneel*  
Academic year ..... 2006 ..... Advisor's signature..... *Tanapat Palaga*.....

## กิติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆแก่ผู้วิจัย ในทุกขั้นตอน ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวิชัย ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ ความรู้ต่างๆแก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัย ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ ที่กรุณามอบเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ ให้ความรู้ และคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคการเลี้ยงเซลล์

ขอบพระคุณ Professor Barbara Osborne, University of Massachusetts (สหรัฐอเมริกา) ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์มอบพลาสติกที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2548

ขอบพระคุณสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินีและเจ้าหน้าที่งานทดสอบการแข็งตัวของเลือดทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่ให้ตลอดมา

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านตลอดจน พี่ๆเพื่อนๆและน้องๆ สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุนความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ .....	ท
บทที่ 1 .....	1
บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย .....	3
บทที่ 2 .....	4
ปริทรรศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 Notch และวิถีสัญญาณ Notch.....	4
2.2 มะเร็ง.....	7
2.3 ยีนมะเร็ง.....	7
2.3.1 ยีนมะเร็ง (oncogene) .....	8
2.3.2 ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor) .....	8
2.4 ความสัมพันธ์ของ Notch และการเกิดมะเร็ง .....	9
2.5 GSI.....	11
2.6 การบำบัดมะเร็งแบบจำเพาะ .....	13
บทที่ 3 .....	15
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย .....	15
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง .....	15
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ .....	18
3.3 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ .....	20

3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์.....	20
3.5 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot .....	22
3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ .....	22
3.6.1 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เกาะผิวด้วยเอนไซม์ทริปซิน (HepG2, SW620, KATO III, BT474 และ A375).....	23
3.6.2 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Jurkat) .....	23
3.6.3 การเก็บรักษาเซลล์แบบถาวรในไนโตรเจนเหลว.....	24
3.6.4 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยตรงด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer).....	24
3.6.5 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่มีชีวิต โดยย้อมด้วยสี trypan blue .....	24
3.7 ศึกษาผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด.....	25
3.8 ศึกษาการแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และลิแกนด์ของ Notch (Jagged1) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด โดยวิธี Western blot .....	25
3.8.1 การสกัดโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โดย Western blot.....	25
3.8.2 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) .....	26
3.8.3 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) .....	26
3.8.4 โอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane .....	27
3.8.5 การวิเคราะห์การแสดงออกโดยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Notch1, cleaved Notch1 และ Jagged1 .....	27
3.8.6 การตรวจสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescence และ autoradiography .....	27
3.9 ศึกษาการแสดงออกของ <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> , <i>Notch3</i> , <i>Notch4</i> , <i>Hes1</i> และลิแกนด์ของ Notch ( <i>Jagged 2</i> , <i>Delta-like 1</i> ) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวน โดยวิธี RT-PCR.....	28
3.9.1 การสกัด RNA.....	28
3.9.2 การวัดปริมาณ RNA .....	29
3.9.3 การสังเคราะห์คอมพลีเมนต์เอ (cDNA) โดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส.....	29
3.9.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) .....	30



3.10	ศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ( <i>HES1</i> ) และ <i>Notch1</i> ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธี RT-PCR และ Western blot .....	31
3.11	ศึกษาผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342.....	31
3.11.1	เซลล์แวนลอย (Jurkat).....	31
3.11.2	เซลล์เกาะผิว (HepG2) .....	32
3.12	ศึกษาผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI .....	32
3.12.1	วิธีเตรียมพลาสมิด.....	33
3.12.1.1	การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด (transformation) โดยวิธี heat-shock.....	33
3.12.1.2	การสกัดพลาสมิด .....	34
3.12.1.3	การวัดปริมาณพลาสมิด.....	35
3.12.2	วิธีทรานสเฟกชัน .....	35
3.12.2.1	กลไกไลโปโซมโดยใช้ Fugene6 reagent .....	35
3.12.2.2	วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน .....	36
บทที่ 4	.....	37
ผลการทดลอง	.....	37
4.1	ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด.....	37
4.2	การแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และลิแกนด์ของ Notch ( <i>Jagged 1</i> ) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 6 ชนิดโดยวิธี Western blot.....	40
4.3	การแสดงออกของ <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> , <i>Notch3</i> , <i>Notch4</i> , <i>Hes1</i> และลิแกนด์ของ Notch ( <i>Jagged 2</i> , <i>Delta-like 1</i> ) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวน โดยวิธี RT-PCR .....	42
4.4	ผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ( <i>HES1</i> ) และ <i>Notch1</i> ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธี RT-PCR และวิธี Western blot.....	43

4.5 ผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342.....	48
4.6 ผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI.....	52
บทที่ 5 .....	55
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	55
บทที่ 6 .....	59
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	59
6.1 สรุปผลการทดลอง .....	59
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	60
รายการอ้างอิง .....	61
ภาคผนวก ก.....	69
ภาคผนวก ข.....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	80

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟรเมอร์.....	21
ตารางที่ 3.2 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot .....	22
ตารางที่ 3.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	30



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างโปรตีนของ Notch receptor และลิแกนด์ของ Notch (Radtke และคณะ, 2004).....	4
รูปที่ 2.2 วิถีสัญญาณ Notch (Sjölund และคณะ, 2005) .....	6
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส (Tian และคณะ, 2003) .....	11
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester (DAPT) (สูตร โมเลกุล C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> MW=432.5).....	13
รูปที่ 3.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง .....	34
รูปที่ 4.1 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 83 %).....	37
รูปที่ 4.2 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 97 %).....	38
รูปที่ 4.3 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ KATO III โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 88 %).....	38
รูปที่ 4.4 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ BT474 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 97 %).....	39
รูปที่ 4.5 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ A375 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 85 %).....	39
รูปที่ 4.6 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ SW 620 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 92 %).....	40
รูปที่ 4.7 การแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และ Jagged 1 ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2, SW620, KATO III, BT474, A375 และ Jurkat โดยวิธี Western blot .....	41

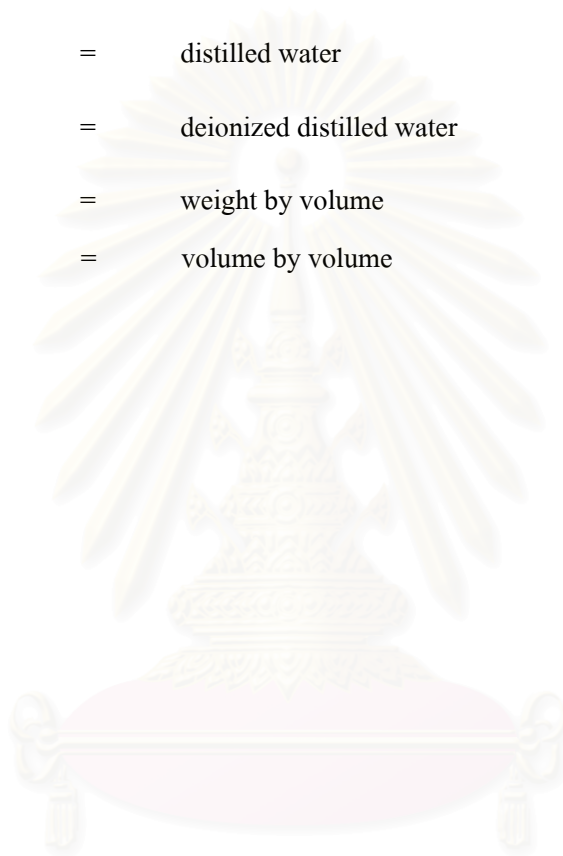
รูปที่ 4.8 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> , <i>Notch3</i> , <i>Notch4</i> และ <i>Hes1</i> ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 ผลิตควบคุม	คือ
HPLC water .....	42
รูปที่ 4.9 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ <i>Jagged 2</i> และ <i>Delta-like 1</i> ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 ผลิตควบคุมคือ HPLC water	
ผลบวกควบคุมคือ peripheral blood mononuclear cell (PBMC).....	43
รูปที่ 4.10 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ( <i>HES1</i> ) และ <i>Notch1</i> ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat โดยวิธี RT-PCR และวิธี Western blot.....	45
รูปที่ 4.11 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ( <i>HES1</i> ) และ <i>Notch1</i> ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 โดยวิธี RT-PCR และวิธี Western blot .....	47
รูปที่ 4.12 ผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า (รูปซ้ายแสงฟลูออเรสเซนซ์และรูปขวา	
แสงธรรมดา) .....	49
รูปที่ 4.13 ผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า (รูปซ้ายแสงฟลูออเรสเซนซ์และรูปขวา	
แสงธรรมดา) .....	51
รูปที่ 4.14 ผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 (stable transfection) โดยวิธี อิเล็กโทรพอเรชัน .....	53
รูปที่ 4.15 ผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 (transient and stable transfection) โดยใช้ Fugene6	
reagent .....	54
รูปที่ 5.1 ไดอะแกรมเสนอผลของ GSI ต่อวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ Jurkat.....	57
รูปที่ 5.2 ไดอะแกรมเสนอผลของ GSI ต่อวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ HepG2 .....	58

## สัญลักษณ์และคำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
$\mu$ M	=	ไมโครโมลาร์
mM	=	มิลลิโมลาร์
kDa	=	กิโลดาลตัน
%	=	เปอร์เซ็นต์
:	=	ต่อ
5x	=	5 เท่า
pH	=	ความเป็นกรด-ด่าง
N	=	Normolarity
/	=	per
A	=	absorbance
CO <sub>2</sub>	=	carbon dioxide
OD	=	optical density
A	=	absorbance
bp	=	base pair
dNTP	=	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dATP	=	deoxyadenoside triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate

$\beta$	=	beta
-ve	=	negative control
+ve	=	positive control
GSI	=	Gamma secretase inhibitor
DAPT	=	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t- Butyl Ester
DMSO	=	dimethylsulfoxide
MTT	=	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetazolium bromide
ATCC	=	American type culture collection
no.	=	number
PVDF	=	polyvinylidene fluoride
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS -PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	phosphate buffer saline
PBST	=	phosphate buffer saline-tween
pcDNA3	=	plasmid cDNA3
pcDNA3-ICN1	=	plasmid cDNA3 with intracellular Notch1
PCR	=	polymerase chain reaction
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic acid
cDNA	=	complementary DNA
HPLC	=	high performance liquid chromatography

<i>Hes1</i>	=	Hairy/Enhancer of Split1
<i>Dlk1</i>	=	delta-like1
T-ALL	=	T-cell acute lymphoblastic leukemia
FBS	=	Fetal bovine serum
dH <sub>2</sub> O	=	distilled water
ddH <sub>2</sub> O	=	deionized distilled water
w/v	=	weight by volume
v/v	=	volume by volume



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมะเร็งเป็นโรคที่เป็นสาเหตุทำให้ประชากรเสียชีวิตทั่วโลกทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งรวมถึงประเทศไทย จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติประจำปี พ.ศ. 2548 พบว่าผู้ป่วยไทยที่เข้ามารับการตรวจรักษาจำนวน 26,558 ราย เป็นมะเร็งจำนวน 2,925 ราย คิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงในการบำบัดรักษาผู้ป่วยมะเร็ง มะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่มีสาเหตุหลักจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกาย โดยมักมีความผิดปกติที่ ดีเอ็นเอ หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัว เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อร้ายและแพร่กระจายไปในอวัยวะต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับทั่วไปว่า มะเร็งมีสาเหตุเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นสาเหตุของมะเร็งผิวหนัง การได้รับสารก่อมะเร็ง เช่น เบนโซไพรีนจากควันบุหรี่เป็นสาเหตุของมะเร็งปอด Afla-toxin B1 จากถั่วลิสงเป็นสาเหตุของมะเร็งตับ การได้รับเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสตับอักเสบบีและซีเป็นสาเหตุของมะเร็งตับ เป็นต้น เทคโนโลยีทางชีววิทยาโมเลกุลที่ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน ทำให้มีการค้นพบยีนและความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งมากมาย เช่น *BCR-ABL* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic myelogenous leukemia; CML) *E6* และ *E7* ในไวรัสฮิวแมนแพปพิลลมา *RBI* ในมะเร็งจอตา รวมถึงกลุ่มยีน *Notch* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ประมวลรหัสโปรตีน *Notch* ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณอยู่บนผิวเซลล์ วิถีสัญญาณ *Notch* มีหน้าที่ควบคุมการเพิ่มจำนวน (proliferation) การแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) และการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) มีรายงานว่าความผิดปกติของวิถีสัญญาณ *Notch* มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (T-cell acute lymphoblastic leukemia; T-ALL) มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งผิวหนัง และมะเร็งปอด เป็นต้น ซึ่งในเซลล์มะเร็งเหล่านี้มักมีการแสดงออกในระดับที่สูงเกินของโปรตีน *Notch* และโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ *Notch* ในปัจจุบันมีวิธีการบำบัดมะเร็ง 3 วิธีคือ ศัลยกรรม ฉายรังสี และการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ได้ใช้ความรู้ทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของมะเร็ง นำไปสู่ความเข้าใจ

ธรรมชาติของมะเร็งในระดับโมเลกุล และมีส่วนสำคัญในการพัฒนาการวินิจฉัยและการพยายามหาแนวทางเลือกใหม่ในการบำบัดมะเร็ง เช่น ใช้ความรู้ทางด้านอิมมูโน โลยี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันวิทยาต่อมะเร็งให้แข็งแรงขึ้น ซึ่งเรียกว่า Immunotherapy เช่น การนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่สามารถต่อต้านเซลล์หรือองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นมะเร็งมาใช้ในการบำบัดมะเร็ง การบำบัดโดยใช้สารไซโตไคน์ เช่น อินเตอร์เฟอรอนแอลฟา บีตา แกมมา และ Tumor necrosis factor (TNF) alpha เป็นต้น การปรับปรุงสัญญาณช่วยกระตุ้น เช่น การใช้เซลล์มะเร็งที่แสดงโมเลกุลช่วยกระตุ้น T lymphocytes การผลิตวัคซีนต่อต้านมะเร็ง เช่น การใช้ killed tumor cells หรือ tumor antigen นอกจากนี้ยังมีการบำบัดด้วยยีนที่จำเพาะต่อยีนที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็ง (gene therapy) การค้นพบล่าสุดคือ small interference RNA (siRNA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านการทำงานของ RNA ในธรรมชาติ ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความสนใจที่จะพัฒนา siRNA เพื่อต่อต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งคาดว่าวิธีการเหล่านี้จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและความจำเพาะสูง มีผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยาเคมีบำบัด ดังนั้น วิธีการเหล่านี้อาจมีบทบาทในการบำบัดมะเร็งที่จำเพาะได้ในอนาคตอันใกล้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษานำสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส (gamma-secretase inhibitor; GSI) มาใช้ในการกดการส่งสัญญาณของวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งต่างๆ ซึ่งจะเป็นการรักษาแบบจำเพาะและอาจเป็นแนวทางเลือกใหม่ในการบำบัดมะเร็ง โดยคาดว่าไม่น่าจะมีผลมากต่อการตายของเซลล์ปกติที่ไม่มีการส่งสัญญาณของ Notch มากเหมือนกับที่ใช้เคมีบำบัดซึ่งเป็นการรักษาที่ส่งผลทำให้ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งตาย ดังนั้น อาจเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษา มะเร็งแบบจำเพาะต่อไปได้ในอนาคตได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ GSI ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด คือ มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (BT474) มะเร็งผิวหนัง (A375) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester (DAPT) ซึ่งเป็น GSI ที่จำเพาะต่อวิถีสัญญาณของ Notch ตัวหนึ่งและศึกษาหน้าที่ของ Notch ในการควบคุมการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ดังกล่าว เพื่อค้นหาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับหน้าที่ของวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งและการพัฒนานำ GSI มาใช้ในการบำบัดโรคมะเร็งบางชนิดที่มีความจำเพาะต่อวิถีสัญญาณ Notch ต่อไป

### 1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด
2. ศึกษาการแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และลิแกนด์ของ Notch (Jagged1) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด โดยวิธี Western blot
3. ศึกษาการแสดงออกของ *Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, HES1* และลิแกนด์ของ Notch (*Jagged 2, Delta-like 1*) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนโดยวิธี RT-PCR
4. ศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES1*) และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธี RT-PCR และ Western blot
5. ศึกษาผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342
6. ศึกษาผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI

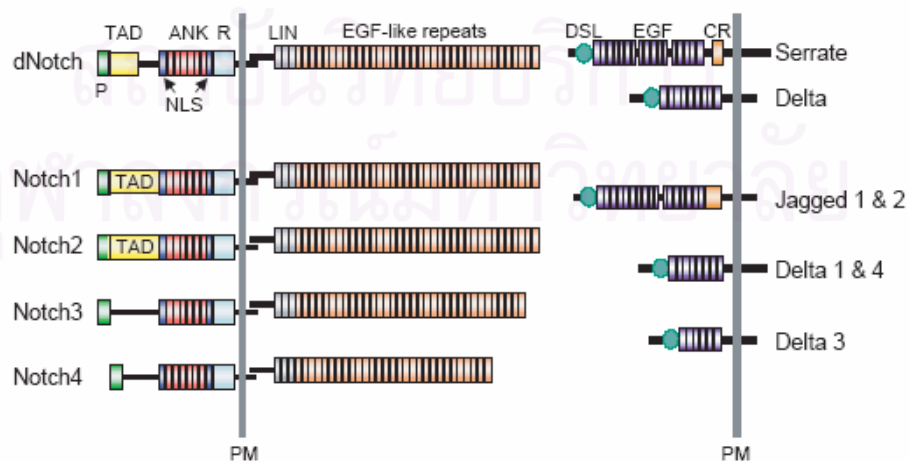
## บทที่ 2

### ปริทรรศน์วรรณกรรม

#### 2.1 Notch และวิถีสัญญาณ Notch

*Notch receptor* คือ กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ประมวลผลโปรตีน Notch ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณแสดงออกบนผิวเซลล์ วิถีสัญญาณ Notch มีหน้าที่ควบคุมการเพิ่มจำนวน (proliferation) การแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) และการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส (apoptosis) ในระหว่างพัฒนาการของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Artavanis-Tsakonas, Rand, Lake, 1999) โดยกลุ่มยีน *Notch* และยีนต่างๆที่ประมวลผลโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ Notch ได้ถูกอนุรักษ์ไว้ในระดับสูงในระหว่างวิวัฒนาการของสัตว์ชั้นสูง เช่น สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน แมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น

Notch receptor ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 4 ชนิด คือ Notch1, Notch2, Notch3 และ Notch4 ซึ่งอยู่บนโครโมโซม 9q34, 1p13-p11, 19p13.2-p13.1 และ 6p21.3 ตามลำดับ (Larsson และคณะ, 1944; Sugaya และคณะ, 1997) โดย Notch จะมีอันตรกิริยากับลิแกนด์ (ligand) 5 ชนิด คือ Jagged1, 2, Delta-like(Dlk) 1, 3, 4 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ที่มีการแสดงออกของ Notch receptor



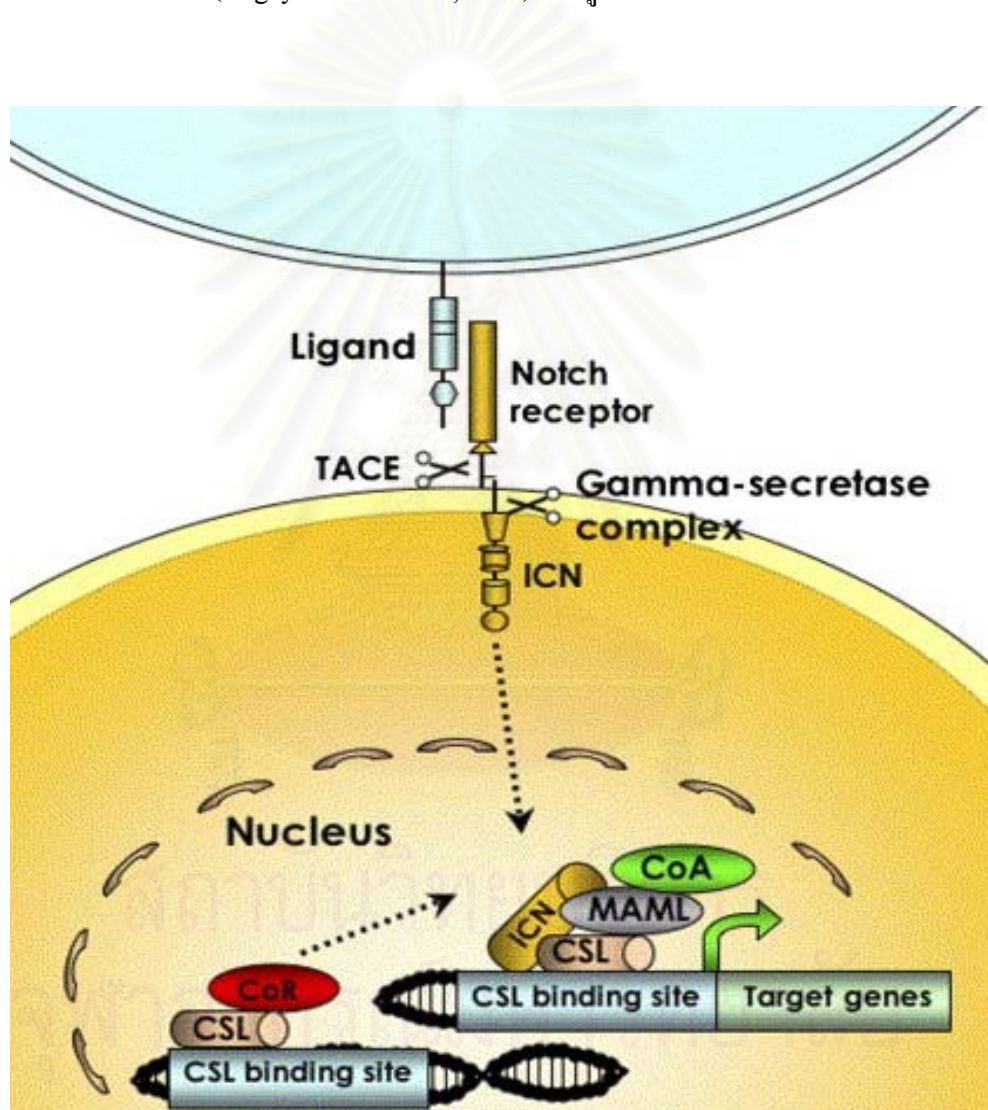
รูปที่ 2.1 โครงสร้างโปรตีนของ Notch receptor และลิแกนด์ของ Notch (Radtke และคณะ, 2004)

ลิแกนด์ของ Notch มีการแสดงออกบนผิวเซลล์ของเซลล์ที่จะทำการส่งสัญญาณ โครงสร้างของลิแกนด์ของ Notch ในส่วนของโปรตีนที่อยู่ภายนอกเซลล์ประกอบด้วยบริเวณ Epidermal growth factor (EGF) like repeat บริเวณ DSL (Delta/Serrate/Lag) และบริเวณ Cysteine-rich region ซึ่งพบเฉพาะใน Jagged1 และ Jagged2 เท่านั้น และมีส่วนที่อยู่ภายในเซลล์สั้นๆ พร้อมด้วยบริเวณที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

Notch receptor ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนในร่างแหเอนโดพลาซิม (endoplasmic reticulum) ซึ่งในระหว่างกระบวนการนี้ จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ fulin-like convertase (Logeat และคณะ, 1998) จากนั้นขนส่งไปยังผิวเซลล์ในลักษณะเฮเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) โดยโครงสร้างของ Notch ประกอบด้วยส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (Notch extracellular domain; NEC) และส่วนที่อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์รวมไปถึงบริเวณที่อยู่ภายในเซลล์ (Notch transmembrane domain; NTM) NEC ประกอบด้วยบริเวณที่ซ้ำๆกันของ Epidermal growth factor (EGF)-like repeat และ Lineage (Lin) domain ซึ่งมีความสำคัญในการทำอันตรกิริยาแบบจำเพาะกับลิแกนด์ Notch1 และ Notch2 มี EGF-like repeat จำนวน 36 ซ้ำ แต่ Notch3 และ Notch4 มี EGF-like repeat จำนวน 34 และ 29 ซ้ำตามลำดับ (Lardelli, Dahlstrand, Lendahl, 1994; Uyttendaele และคณะ, 1996; Gallahan และ Callahan, 1997) NTM ประกอบด้วยบริเวณที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane; TM) และบริเวณที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular Notch; ICN) ICN ประกอบด้วยบริเวณ Membrane-proximal RBP-j-associated molecule (RAM) domain บริเวณที่ซ้ำๆกันของ Ankyrin like repeat (ANK) จำนวน 6 ซ้ำ Nuclear localization sequences (NLS) 2 ตำแหน่ง Transactivation domain (TAD ซึ่งพบเฉพาะใน Notch1 และ Notch2) และ Proline-glutamate serine-threonine-rich (PEST domain) โดย RAM domain มีหน้าที่จับกับ CSL (Tamura และคณะ, 1995) ANK มีหน้าที่จับกับโปรตีนอื่นๆ เช่น Deltex และ Mastermind ซึ่งเป็น negative regulator ของวิถีสัญญาณ Notch (Matsuno และคณะ, 1995; Diederich และคณะ, 1994; Wu และคณะ, 2000) และสามารถจับกับ CSL ได้เช่นกัน (Fortini และ Artavanis, 1994) NLS มีหน้าที่ส่งสัญญาณให้ Notch เข้าสู่เซลล์ TAD มีหน้าที่กระตุ้นให้ Coactivator มาจับกับ CSL และ PEST domain มีหน้าที่ควบคุมความเสถียรของโปรตีน Notch (proteasomal degradation) (Roger และคณะ, 1986) ดังรูปที่ 2.1

วิถีสัญญาณของ Notch เริ่มต้นเมื่อ Notch ทำอันตรกิริยากับลิแกนด์ของเซลล์ข้างเคียง ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ Notch receptor ถูกตัดด้วยเอนไซม์ tumor necrosis factor-alpha convertase (TACE) ที่บริเวณ NEC (Brou และคณะ, 2000; Mumm และคณะ, 2000) และเอนไซม์แกมมาซีรีเทสจะตัดบริเวณ NTM (Destroyer และคณะ, 1999; Saxena และคณะ, 2001) เพื่อปลดปล่อย ICN ให้เป็นอิสระจากบริเวณที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้น ICN จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส (Struhl และ

Adachi, 1998) โดย ICN จะไปทำอันตรกิริยากับโปรตีน CSL ซึ่งเป็น DNA-binding protein (Artavanis-Tsakonas และคณะ, 1999) และชักนำ transcription coactivator (CoA) ให้มารวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ ICN และ CSL นำไปสู่การกระตุ้นยีนเป้าหมาย เช่น *Hairy and enhancer of spilt (HES1)* ซึ่งเป็น basic helix-loop-helix transcriptional repressor ให้มีการถอดรหัสและแปลรหัสในยีนเป้าหมายต่อไป เพื่อยับยั้งการแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ จึงทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน (Kageyama และคณะ, 2000) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.2 วิธีสัญญาณ Notch (Sjölund และคณะ, 2005)

## 2.2 มะเร็ง

มะเร็ง คือกลุ่มของโรคที่เกิดจากการสะสมของการกลายพันธุ์ในเซลล์ร่างกาย (somatic mutation) ของสารพันธุกรรม (Alberts, 2002) โดยพบได้ 4 แบบ คือ การเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งเบส (point mutation) การขาดหายไปของเบสหรือของยีน (deletion) การเพิ่มจำนวนของเบสหรือของยีน (amplification) (Schwab, 1999) และการเคลื่อนย้ายที่อยู่ของยีน (translocation) (Haluska, 1987) ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว และมากกว่าปกติ โดยไม่อยู่ภายใต้กระบวนการควบคุมของร่างกายปกติ การเติบโตอย่างรวดเร็วนี้ ยิ่งเร่งให้มีการสะสมของการกลายพันธุ์ของยีนในอัตราที่เร็วขึ้นทำให้เซลล์เนื้องอกมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อร้ายและแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็ว

Hanahan และ Weingberg (2000) ได้สรุปคุณสมบัติของมะเร็งที่แตกต่างจากเซลล์ปกติไว้ ดังนี้ คือ สามารถปฏิเสธสัญญาณของเซลล์อื่นหรือเซลล์ตนเองที่สั่งให้หยุดการการแบ่งตัว สามารถปฏิเสธสัญญาณการแปรสภาพจากเซลล์อ่อนไปเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่เฉพาะ (การพัฒนาของเซลล์) สามารถหลีกเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์แบบ apoptosis มีความสามารถในการแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง (immortalization) สามารถเบียดแทรกอวัยวะข้างเคียง (invasion) หรือกระจายไปสู่อวัยวะอื่นที่อยู่ห่างไกล และสามารถสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) การกลายพันธุ์ในภาวะปกติสามารถซ่อมแซมหรือกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายได้ แต่การกลายพันธุ์ที่ทำให้เป็นมะเร็งเป็นการกลายพันธุ์ที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็ง ลักษณะสำคัญของการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกาย ทำให้เป็นมะเร็งเกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว (clonal in origin) ที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นหลายครั้ง ในเวลาที่ต่างกัน (multistep process) ทำให้การกลายพันธุ์มีความหลากหลายในเซลล์มะเร็ง (multiple mutations) และในแต่ละเซลล์อาจมีการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันไป (genetic heterogeneity)

## 2.3 ยีนมะเร็ง

ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการทำงาน ที่นำไปสู่การเกิดมะเร็ง ได้แก่

### 2.3.1 ยีนมะเร็ง (oncogene)

ยีนมะเร็ง (oncogene) มีที่มาจากยีนโปรโตอองโคยีน (protooncogene) ซึ่งในภาวะปกติ มีหน้าที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวน การแบ่งตัวของเซลล์ การพัฒนาของเซลล์ การกำหนดที่อยู่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ การสร้างเส้นเลือด และภาวะเสถียรของจีโนม โปรโตอองโคยีนจะมีการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดการแสดงออกเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว โดยทั่วไปมักมีการแสดงออกในเซลล์ปกติในระดับต่ำ ซึ่งเมื่อมีการกลายพันธุ์ของโปรโตอองโคยีน กลายไปเป็นยีนมะเร็งมีผลทำให้ยีนมีการแสดงออกมากตลอดเวลาหรือทำงานมากขึ้น (gain of function mutation) และมีลักษณะเป็นยีนเด่นในระดับเซลล์ (autosomal dominant) (อภิวัฒน์ มุทิรากร, 2546) เช่น ยีนมะเร็งจากไวรัสฮิวแมนแพปิลโลมา *E6* และ *E7* ซึ่งสามารถหยุดการทำงานของยีนต้านมะเร็ง *p53* และเรติโนบลาสโตมา (retinoblastoma, *RBI*) ได้ (Kavamata และคณะ, 2002; Jones, Thompson และ Munger, 1997)

### 2.3.2 ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor)

ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor) เป็นยีนซึ่งในภาวะปกติมีหน้าที่สำคัญในทิศทางที่ยับยั้ง การเจริญเติบโต การแบ่งตัวของเซลล์และลักษณะเฉพาะของมะเร็งอื่นๆ ได้แก่ การสร้างเส้นเลือด การสอดแทรกเบียดทำลายอวัยวะข้างเคียง และการกระจายตัวของมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ ส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์ การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ และการเข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ ยีนต้านมะเร็งจะหยุดการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนทำงานหรือแสดงออกเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว เมื่อเกิดการกลายพันธุ์มีผลทำให้ยีนนั้นๆ สูญเสียหน้าที่ (loss of function mutation) และมีลักษณะเป็นยีนด้อยในระดับเซลล์ (autosomal recessive) (อภิวัฒน์ มุทิรากร, 2546) เช่น *p53* มีหน้าที่เป็นด่านตรวจของวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle check point) ซึ่งพบว่ามะเร็งมากกว่า 60% มีการกลายพันธุ์ของยีนนี้ ทำให้สูญเสียความสามารถในการตรวจเช็คความถูกต้องของจีโนมและการกระตุ้นให้เซลล์ที่ผิดปกติตาย มีรายงานว่า *Notch* สามารถเป็นได้ทั้งยีนมะเร็งและยีนต้านมะเร็งขึ้นอยู่กับชนิดของมะเร็งนั้นๆ เช่น *Notch1* เป็นยีนมะเร็งที่พบมีการแสดงออกเกินใน T-ALL (Ellisen และคณะ, 1991) *Notch1*, *Notch2* และ *Notch4* เป็นยีนมะเร็งที่พบในมะเร็งเนื้อเยื่อประสานชนิดคาร์โปซี (Kaposi's sarcoma) ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่มีอาการภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Curry และคณะ, 2005) *Notch1* และ *Notch2* เป็นยีนต้านมะเร็งที่พบในมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small-cell lung cancer)



โดยสามารถยับยั้งการเจริญ โดยทำให้เซลล์หยุดการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle arrest) (Sriuranpong และคณะ, 2001)

## 2.4 ความสัมพันธ์ของ Notch และการเกิดมะเร็ง

เซลล์มะเร็งมักเป็นเซลล์ที่สามารถหลบหลีกกลไกการควบคุมการเจริญของเซลล์ปกติและมักจะอยู่ในภาวะที่การแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะยังไม่สมบูรณ์ ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัย ปัจจัยหนึ่งคือ ความผิดปกติในระดับยีน ซึ่งความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม เป็นต้น ซึ่งในเซลล์มะเร็งเหล่านี้มักมีการแสดงออกในระดับที่สูงของโปรตีน Notch และโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ Notch ดังรายงานต่อไปนี้

Ellisen และคณะ (1991) ศึกษา T-ALL พบว่า Notch1 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 มีการเคลื่อนย้ายไปเชื่อมต่อกับส่วนของโปรโมเตอร์ของ T-cell  $\beta$  receptor ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 9 t(7;9)(q34;q34.3) ทำให้มีการสร้าง mRNA ที่ผิดปกติโดยมีการแสดงออกเฉพาะส่วน ICN และมีการแสดงออกเกินเฉพาะใน T lymphocyte เท่านั้น

Weng และคณะ (2004) รายงานว่ามากกว่า 50% ของ Human T-ALL มีการผ่าเหล่าของยีน *Notch1* บริเวณ Heterodimerization ของ NEC และ/หรือบริเวณทางด้านปลาย C-terminal ของ *Notch1* ก่อให้เกิดการเพิ่มการส่งสัญญาณวิถีสัญญาณของ *Notch1* มากขึ้น

Girard และคณะ (1996) รายงานว่าเมื่อนำโปรไวรัสติดเชื้อเข้าไปในหนูทดลองดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนก่อมะเร็ง (MMTV/c-myc transgenic mice) ทำให้เกิดก้อนมะเร็งที่ต่อมไทมัส ซึ่งน่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างยีนก่อมะเร็ง *c-myc* และ *Notch1* โดยพบว่าจีโนมของไวรัสจะเข้าแทรกตัวในบริเวณยีน *Notch receptor* นอกจากนั้น Hoemann และคณะ (2000) รายงานว่าโปรไวรัสที่มีการแทรกตัวในบริเวณของ *Notch1* ทำให้เกิดการผ่าเหล่าของยีนมีความสัมพันธ์กับการเจริญเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ในหนูทดลองดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนก่อมะเร็ง *c-myc*

Zagouras และคณะ (1995) รายงานว่าการย้อมเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระยะเริ่มแรกด้วยวิธี immunohistochemistry พบโปรตีนของ *Notch1* และ *Notch2* ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส Rangarajan และคณะ (2001) รายงานว่าวิถีสัญญาณ *Notch1* ทำงานร่วมกับยีน *E6* และ *E7* ของ Human Papilloma Virus ชนิดที่ 16 ซึ่งเป็นยีนมะเร็งในการเปลี่ยนเซลล์เยื่อบุผิวปกติให้กลายเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างไม่หยุดยั้ง และสามารถต้านทานโปรแกรมการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสได้

Dievart, Beaulieu และ Jolicoeur (1999) รายงานว่าวิถีสัญญาณจาก Notch1 ทำให้เกิดมะเร็งเต้านมในหนูทดลอง เมื่อนำโปรไวรัส MMTV ติดเชื้อเข้าไปในหนูทดลองที่มีการแสดงออกเกินของ *erbB2* อยู่แล้ว โดยโปรไวรัสจะเข้าไปแทรกตัวในบริเวณของ *Notch1* ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง (tumor formation) ได้เร็วขึ้น ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างการแสดงออกที่มากเกินไปของ *truncated Notch1* และ *erbB2*

Imatani และ Callahan (2000) ศึกษาการแสดงออกของ *Notch4* ในเซลล์มะเร็งที่มีการแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ พบการถอดรหัสบริเวณ ICN ของ *Notch4* ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งเซลล์มะเร็งเต้านม BT474 และ Hs578T นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกบริเวณ ICN ของ *Notch4* ใน breast epithelium cell line MCF 10A ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ในอาหารกึ่งเหลว (soft agar) แสดงว่าเซลล์ปกติสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างไม่หยุดยั้งได้ เมื่อมีการแสดงออกเกินของ *Notch4* บริเวณ ICN

Sriuranpong และคณะ (2001) รายงานว่าเมื่อนำอะดีโนไวรัสที่มีการแสดงออกมากเกินไปของ *truncated Notch1* และ *Notch2* ติดเชื้อเข้าไปในเซลล์ไลน์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancer cell) 2 ชนิด คือ NCI-H209 และ DMS53 วิถีสัญญาณจาก *Notch1* จะชักนำให้เซลล์ NCI-H209 มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา คือ จากเซลล์ปกติมีลักษณะแบนลอยเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่สามารถเกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงได้ และวิถีสัญญาณจาก *Notch2* มีผลที่คล้ายคลึงกันแต่มีระดับที่น้อยกว่า ส่วนวิถีสัญญาณจาก *Notch1* และ *Notch2* จะชักนำให้เซลล์ DMS53 มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา คือ จากเซลล์ปกติมีลักษณะเกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมมากกว่าเซลล์มะเร็งปกติและไม่เกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง นอกจากนี้วิถีสัญญาณจาก *Notch1* และ *Notch2* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก โดยทำให้เซลล์หยุดการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle arrest) แสดงว่า *Notch1* และ *Notch2* ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ในมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก

Haruki และคณะ (2005) รายงานว่าจากการตรวจชิ้นเนื้อมะเร็งปอดของมนุษย์ด้วยวิธี Immunohistochemistry ร่วมกับเทคนิค Microarray พบว่ามีการแสดงออกเกินของ *Notch3* และ Epidermal growth factor receptor (EGFR) มากถึง 39 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ *Notch3* โดยสร้างพลาสมิดที่มียีน *Notch3* เฉพาะบริเวณที่จับกับลิแกนด์แต่ไม่มีบริเวณ ICN ทำให้จำนวนและขนาดของโคโลนีใน Soft agar ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ รายงานนี้แสดงให้เห็นว่าวิถีสัญญาณของ *Notch3* มีบทบาทสำคัญในการเจริญของมะเร็งปอด

Nicolas และคณะ (2003) รายงานว่า *Notch1* ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ในเซลล์ผิวหนังของหนูทดลอง ถ้าในเซลล์ผิวหนังที่ไม่มีการแสดงออกของ *Notch1* จะทำให้มีเซลล์ผิวหนัง

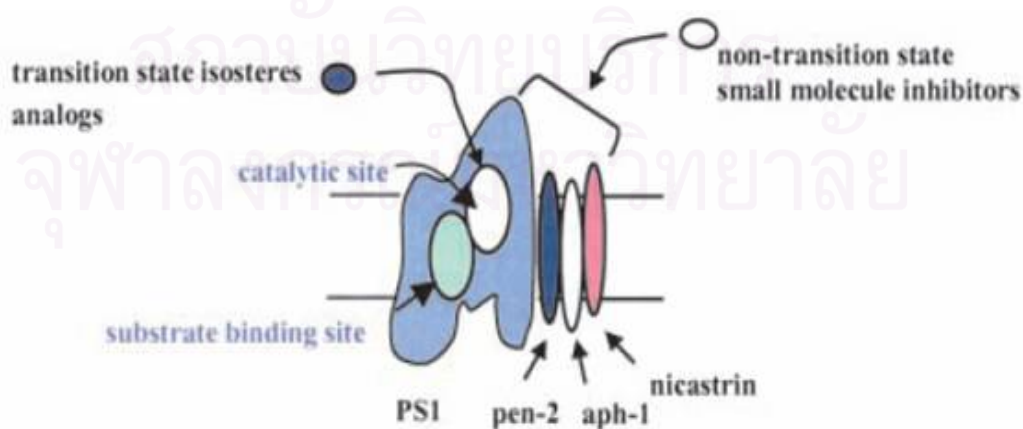
มีการเจริญเพิ่มขึ้นและพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (basal cell carcinoma like tumor) เนื่องจากมีการแสดงออกของ Waf1 (p21/cip1) ลดลง มีการแสดงออกของ Gli2 เพิ่มขึ้น ทำให้มีการส่งสัญญาณของ Sonic hedgehog (Shh) signaling (ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของอวัยวะ เช่น ปอด ผิวหนัง เป็นต้น) เพิ่มขึ้น และเมื่อได้รับสารเคมีจะเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง (skin carcinoma) เร็วขึ้น

Talora และคณะ (2002) รายงานว่าเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกระยะสุดท้าย (HeLa, C4-I, C4-II, SiHa และ Caski) มีการแสดงออกของ Notch1 ลดลง แต่ Notch2 คงที่ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี Immunoblotting, RT-PCR และ Real-time RT-PCR และเมื่อศึกษาการแสดงออกเกินของ activated Notch1 โดยใช้อะดีโนไวรัส พบว่ามีการแสดงออกของ HPV E6 และ E7 ลดลง แสดงว่าวิถีสัญญาณ Notch1 ในมะเร็งปากมดลูกระยะสุดท้ายทำหน้าที่เป็น tumor suppressor

Parr, Watkins และ Jiang (2004) รายงานว่า Notch1 อาจจะเป็นยีนก่อมะเร็งในมะเร็งเต้านม ในขณะที่ Notch2 อาจจะเป็นทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งเต้านม เพราะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่มีอัตราการรอดสูง

## 2.5 GSI

แกมมาซีรีเทส (gamma-secretase) เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนประกอบด้วยหลายซับยูนิต ได้แก่ presenilin (PS) anterior pharynx-defective phenotype (aph-1) nicastrin และ presenilin enhancer (pen-2) (Kimbely และคณะ, 2003) โดย PS เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ คือเป็นบริเวณเร่ง (catalytic center) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส (Tian และคณะ, 2003)

แกมมาซีรีเทสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัด Notch หลังจากที่ Notch receptor ทำอันตรกิริยากับลิแกนด์แล้ว โดยเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับที่ทำหน้าที่ตัดโปรตีน amyloid precursor protein (APP) ในเซลล์ประสาท (Destrooper และคณะ, 1999; Selkoe และ Kopan, 2003) การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส (บริเวณซับยูนิต PS) ทำให้มีการตัด APP ในตำแหน่งที่ผิดปกติซึ่งผลให้เกิดการสะสมของ amyloid- $\beta$  peptide เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อสมองและส่งผลให้เซลล์ประสาทตาย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Citron และคณะ, 1992) ดังนั้น จึงมีการค้นคว้าพัฒนา GSI มาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส เพื่อบำบัดภาวะอัลไซเมอร์และพบว่ายาบางชนิดสามารถควิตีสัญญาณจาก Notch ได้เช่นกัน (Brerezovska และคณะ, 2000) โดยได้มีการเริ่มนำยาที่มีฤทธิ์ดังกล่าวมาใช้ในการขัดขวางการส่งสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็ง ดังรายงานต่อไปนี้

Curry และคณะ (2005) รายงานว่า GSI (Z-Leu-Leu-Nle-CHO และ LY-411,575) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อประสานชนิดคาร์โปซี (Kaposi's sarcoma) ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

Paris และคณะ (2005) รายงานว่า beta secretase inhibitor (Z-VLL-CHO และ DM99-2) และ gamma secretase inhibitor (L-658,458 DAPT และ JLK-6) สามารถยับยั้งการเจริญของ human brain endothelial cell บน Matrigel โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และกีดการสร้างเส้นเลือดฝอย (Capillary structure) ในระดับหลอดทดลอง

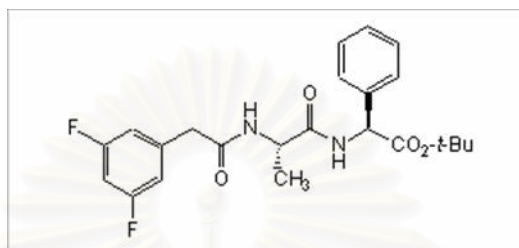
Hallahan และคณะ (2004) รายงานว่า DAPT สามารถลดการเจริญของ medulloblastoma ในหนูทดลองได้

O' Neil และคณะ (2006) รายงานว่า หนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL เมื่อได้รับ DAPT จะชักนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะพัก (G0-G1)

Weng และคณะ (2004) รายงานว่า GSI (compound E) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL ที่ไม่มีการเคลื่อนย้าย Notch1 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ไปเชื่อมต่อกับส่วนของโปรโมเตอร์ของ T-cell  $\beta$  receptor ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 9 (t(7;9)(q34;q34.3)) โดยทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ Go-G1 เพิ่มขึ้น

สารที่มีฤทธิ์กดเอนไซม์แกมมาซีรีเทสมีหลายชนิด เช่น JLK-6 L-685,458 Compound E LY-411,575 ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester (DAPT) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับยับยั้งสามารถแข่งจับกับเอนไซม์ได้ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับยับยั้งได้ โดย DAPT จะจับกับเอนไซม์บริเวณ carboxyl-terminal fragment ของ Presenilin ซึ่งเป็นบริเวณที่แยกจากบริเวณเร่งและบริเวณที่จับกับ

ซึบสเตรต (Morohashi และคณะ, 2006) DAPT มีสูตรโครงสร้าง แสดงดังรูปที่ 2.3 และมีจำหน่ายเชิงพาณิชย์เพื่อการวิจัยศึกษา



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ N-[N-(3,5-Difluorophenyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-Butyl Ester (DAPT) (สูตรโมเลกุล  $C_{23}H_{26}F_2N_2O_4$  MW=432.5)

## 2.6 การบำบัดมะเร็งแบบจำเพาะ

ปัจจุบันวิธีการบำบัดโรคมะเร็งที่ใช้ทั่วไปมี 3 วิธี คือ วิธีศัลยกรรม ฉายรังสี และการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดในการรักษา เช่น การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด เป็นการรักษาโดยการรับประทานยาหรือฉีดยาที่มีความสามารถในการฆ่าหรือทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นการรักษามะเร็งแบบทั้งตัวของผู้ป่วย ส่งผลให้ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งตาย เป็นผลให้เกิดมีอาการข้างเคียงที่รุนแรงได้ ดังนั้น ในปัจจุบันจึงได้มีความพยายามที่จะนำองค์ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวกับยีนที่เป็นสาเหตุของมะเร็งมาใช้ในการบำบัดแบบจำเพาะ โดยทำการตั้งเป้าการทำลายของยาไปที่ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็ง โดยมีผลกระทบน้อยต่อเซลล์ปกติ เช่น ยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของยีน *BCR-ABL* (Philadelphia chromosome-positive CML) โดยยา Gleevec/Glivec หรือ Imatinib (ST-571) ซึ่งมีฤทธิ์จำเพาะต่อเอนไซม์ไคเนสของโปรตีน *BCR-ABL* ซึ่งสามารถ ทำให้เซลล์ที่มี Philadelphia chromosome-positive หายไปได้ (cytogenic remission) ในอัตราที่สูงมากกว่าวิธีการรักษาที่เคยมีมาก่อนทั้งหมด คือ ยาเคมีบำบัดและ interferon alfa-2b เป็นต้น (Druker และคณะ, 1996; La Rosee, O'Dwyer และ Druker, 2002 )

การใช้ GSI ในงานวิจัยนี้จึงเป็นความพยายามในการที่จะนำองค์ความรู้ที่เกี่ยวกับ Notch receptor มาใช้ เป็นการบำบัดแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดที่มีความผิดปกติที่จำเพาะต่อวิถีสัญญาณ Notch โดย GSI จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทสเท่านั้น มีผลทำให้ขัดขวางการส่งสัญญาณ Notch โดยตรง ทำให้เซลล์มะเร็งฝ่อไปในที่สุด

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ GSI ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด คือ มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (BT474) มะเร็งผิวหนัง (A375) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ DAPT ซึ่งเป็น GSI ที่จำเพาะต่อวิถีสัญญาณของ Notch ตัวหนึ่งและศึกษาหน้าที่ของ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ดังกล่าว เพื่อค้นหาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับหน้าที่ของ Notch ในเซลล์มะเร็งและการพัฒนานำ GSI มาใช้ในการบำบัดโรคมะเร็งบางชนิดที่มีความจำเพาะต่อวิถีสัญญาณ Notch ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, JAPAN
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Memmert, Germany
4. เครื่องชั่งรุ่น PG-200-S และ AG 285 ของบริษัท METLER TOLEDO, Switzerland
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
6. ตู้บ่ม 37°C บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (5 % CO<sub>2</sub> incubator) รุ่น 311 ของบริษัท Thermo electron corporation
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene® ของบริษัท Profuge
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
9. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet) รุ่น H1 ของบริษัท Lab service LTD part
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lamda 25 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น S20-K ของบริษัท Mettler Toldo
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C รุ่น ULT 1786 ของบริษัท FORMA Scientific, USA
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C รุ่น MDF-U332 ของบริษัท SANYO Electric, Japan
14. ตู้เย็น 4°C รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric
15. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น Mupid-2 Advance ของบริษัท Cosmo Bio
16. ชุดเครื่องมือทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Protein III System) ของบริษัท Biorad, USA

17. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer cell รุ่น Trans-Blot® SD ของบริษัท Bio-Rad, USA
18. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
19. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ Gel Documentation และ โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
20. ทิปปลอดอาร์เอ็นเอส (RNase-free tip) ปริมาตร 2 , 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
21. เครื่องปั๊มอากาศ (air pump)
22. หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
23. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
24. ปีกเกอร์
25. หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
26. ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton Cryogenics ของบริษัท Harsco corporation, USA
27. Cane ใส่หลอดเก็บเซลล์
28. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
29. ถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (tissue culture plate 24 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
30. จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร x 10 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Corning Incorporation, USA
31. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture Flask ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ยี่ห้อ Corning Incorporation, USA
32. ปิเปตต์แก้ว (seropipette) 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
33. กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ของบริษัท Nikon
34. กล้องถ่ายรูป USB High-Definition CCD Camera รุ่น artcam-2000SH ของบริษัท Artray
35. กล้อง inverted microscope ของบริษัท Olympus
36. กระดาษกรอง (filter paper)
37. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ของบริษัท Boeco
38. ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Kodak Medical x-ray film)
39. ถาดประกบฟิล์ม ของบริษัท OKAMOTO
40. เข็มฉีดยา



41. ครอบงอญีคยาพลาตติคขนาด 1, 5 และ 10 มลลลลลลล
42. ตะเกยงแอลกอสอล
43. Cover Slip
44. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P2 P20 P100 และ P1000 ของบริษัท Gilson, France
  - ปริมาตร 0.01 – 2 ไมโครลลลล
  - ปริมาตร 0.1 – 20 ไมโครลลลล
  - ปริมาตร 10 – 100 ไมโครลลลล
  - ปริมาตร 100 – 1000 ไมโครลลลล
45. แผ่นกระจกสไลด์
46. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 ของบริษัท Bio-tek instrument
47. เครื่องปั่นเหวียง Hettich รุ่น Rotafix 32 ของบริษัท Becthai, Germany
48. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbera รุ่น MW-2020
49. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Clifton Ceraplate
50. ที่ขูดเซลล์ (cell lifter)
51. พาราฟิล์ม (Parafilm)
52. ครอบงอกตวง (cylinder)
53. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 และ 50 มลลลลลลล ของบริษัท Corning Incorporation, USA
54. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลลลลล ของบริษัท Corning Incorporation, USA
55. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มลลลลลลล บริษัท Axygen Scientific, USA
56. เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
57. พลาตติคใส (Wrap membrane)
58. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane ของบริษัท Amersham Biosciences, UK
59. ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ซึ่งมีเครื่องเขย่า (shaker)
60. กิวเวต ขนาด 0.4 เซนติเมตร ของบริษัท Biorad, USA
61. Heat block รุ่น Thermomixer compact ยี่ห้อ eppendorf

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma, USA
2. Trisma base (tris[hydroxymethyl] aminomethane,  $C_4H_{11}NO_3$ ) ของบริษัท Sigma, USA
3. Sodium azide ของบริษัท Merck, Germany
4. Glutaroldehyde ของบริษัท Merck, Germany
5. Alcohol 70%
6. Hoechst 33342 (Bisbenzimidazole) ของบริษัท Sigma, USA
7. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
8. Potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
9. Sodium Chloride (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
10. Potassium di-hydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
11. Sodium di-hydrogen phosphate ( $Na_2HPO_4$ )
12. Sodium hydrogen carbonate ( $NaHCO_3$ ) ยี่ห้อ Anala<sup>®</sup> ของบริษัท BDH, UK
13. Trypsin-EDTA ของบริษัท Hyclone
14. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ของบริษัท Hyclone
15. Sodium pyruvate ของบริษัท Hyclone
16. DAPT ของบริษัท Merck, Germany
17. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
18. น้ำยาสกัด RNA (Trizol reagent) ของบริษัท Invitrogen, UK
19. DEPC (diethylpyrocarbonate) ของบริษัท Sigma, USA
20. 100 bp DNA ladder ของบริษัท Fermentus, Canada
21. Random hexamer ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
22. Ribonuclease inhibitor ของบริษัท Fermentus, Canada
23. HPLC water ของบริษัท Merck, Germany
24. Tag polymerase ของบริษัท Fermentus, Canada
25. M-MuLV reverse transcriptase ของบริษัท Fermentus, Canada
26. dNTP mix ของบริษัท Fermentus, Canada
27. Agarose gel ของบริษัท Research organics

28. Absolute alcohol ของบริษัท Merck, Germany
29. Isopropanol ของบริษัท Merck, Germany
30. Ethidium bromide
31. Protease inhibitor ของบริษัท Sigma, USA
32. Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
33. Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
34. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ของบริษัท Sigma, USA
35. Chloroform ของบริษัท Lab-scan, Thailand
36. Acrylamide/Bisacrylamide 40% solution ของบริษัท Sigma, USA
37. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
38. Amonium persulfate ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
39.  $\beta$ -mercapto-ethanol ของบริษัท Sigma, USA
40. Dithiothreitol (DTT) ของบริษัท USB corporation, USA
41. ECL western blotting ของบริษัท Amersham biosciences, UK
42. Absolute methanol ของบริษัท Merck, Germany
43. Tris buffer pH 8.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
44. Tris buffer pH 6.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
45. Prestain molecular weight marker ของบริษัท Fermentus, Canada
46. Glycerol ของบริษัท Cario ERBA, France
47. Bromphenol blue ของบริษัท Sigma, USA
48. BCA<sup>TM</sup> protein assay ของบริษัท PIERCE
49. Bovine serum albumin (BSA) ของบริษัท Sigma, USA
50. น้ำยาล้างฟิล์ม ของบริษัทเจนเนชั่น
51. Fetal Bovine Serum (FBS) ของบริษัท Hyclone
52. น้ำยาทาเล็บ
53. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640) ของบริษัท Hyclone
54. G418 (Antibiotic G418 sulfate) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
55. Gentamycin sulfate ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
56. Trypan blue 0.5%w/v ของบริษัท Biochrom AG, Germany

57. พลาสมิด pcDNA3 ของบริษัท Invitrogen (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Barbara Osborne, University of Massachusetts, USA)
58. พลาสมิด pcDNA3-ICN1 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Barbara Osborne, University of Massachusetts, USA)
59. Fugen6 reagent ของบริษัท Roche
60. QIA prep spin miniprep kit ของบริษัท Qiagen, Germany
61. Escherichia coli สายพันธุ์ DH<sub>5</sub>α
62. Amplicilin ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
63. Mouse anti-actin ของบริษัท Chemicon international
64. Rabbit anti-Notch1 ของบริษัท Santa cruz Biotechnology
65. Rabbit anti-Cleaved Notch1 ของบริษัท Cell signal technology
66. Goat anti-Jagged1 ของบริษัท Santa cruz Biotechnology
67. Sheep anti-mouse IgG-HRP ของบริษัท Amersham biosciences, UK
68. Donkey anti-rabbit IgG-HRP ของบริษัท Amersham biosciences, UK
69. Rabbit anti-goat IgG-HRP ของบริษัท Sigma, USA

### 3.3 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

Jurkat (Human acute T cell leukemia)	ATCC no. CRL-2063
HepG2 (Human liver hepatoblastoma)	ATCC no. HB-8065
A375 (Human malignant melanoma)	ATCC no. CRL-1619
SW620 (Human colorectal adenocarcinoma)	ATCC no. CCL-227
BT474 (Human ductal carcinoma)	ATCC no. HTB-20
KATO III (Human gastric carcinoma)	ATCC no. HTB-103

### 3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ยีน	Gene Bank accession number	Annealing temp. (°C)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
<i>Notch1</i>	AF 308602	55	Fwd CAGCCTGCACAACCAGACAGA Rev TGAGTTGATGAGGTCCTCCAG	ออกแบบในงานวิจัยนี้
<i>Notch2</i>	AF 315356	55	Fwd TGAGTAGGCTCCATCCAGTC Rev TGGTGTGAGGTAGGGATGCT	Nijjar และคณะ, 2001
<i>Notch3</i>	U97669	56	Fwd TCTTGCTGCTGGTCATTCTC Rev TGCCTCATCCTCTTCAGTTG	Nijjar และคณะ, 2001
<i>Notch4</i>	U95299	56	Fwd CACTGAGCCAAGGCATAGAC Rev ATCTCCACCTCACACCACTG	Nijjar และคณะ, 2001
<i>Hes1</i>	NM 005524	55	Fwd ACGACACCGGATAAACCAAA Rev CGGAGGTGCTTCACTGTCAT	Chiarmonite และคณะ, 2005
<i>Jagged2</i>	AF029778	57	Fwd AATGGTGGCATCTGTGTTGA Rev GCGATACCCGTTGATCTCAT	Chiarmonite และคณะ, 2005
<i>Dlk1</i>	NM003836	58	Fwd CCACGCAGATCAAGAACACC Rev TTGCTATGACGCACTCATCC	Hopfer และคณะ, 2005
$\beta$ -actin	NM001101	55	Fwd ACCAACTGGGACGACATGGACAA Rev GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	Kuroda และคณะ, 2002

### 3.5 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot

แอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot

แอนติเจน	อัตราส่วนแอนติบอดีปฐมภูมิต่อ Blocking solution	อัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิต่อ Blocking solution
Notch1	Rabbit anti-Notch1 1:1,000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000
Cleaved Notch1	Rabbit anti-Cleaved Notch1 1:1,000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000
Jagged1	Goat anti-Jagged1 1:1,000	Rabbit anti-goat IgG-HRP 1:12,000
Actin	Mouse anti-actin 1:5,000	Sheep anti-mouse IgG-HRP 1:5,000

### 3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

นำเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด (HepG2, SW620, KATO III, BT474, A375 และ Jurkat) ซึ่งแช่แข็งอยู่ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยง โดยแช่หลอดเก็บเซลล์ในอ่างน้ำอุ่น 37°C ทันทีกว้างหลอดไปมาให้ น้ำแข็งละลายอย่างรวดเร็ว โดยให้รอยต่อของฝาหลอดอยู่เหนือระดับน้ำเสมอ เช็ดหลอดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ใช้ปิเปตต์แก้วดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ปราศจากซีรัม (serum free media) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 10% HEPES ความเข้มข้น 1% sodium pyruvate ความเข้มข้น 1% gentamycin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมเปอร์มิลลิลิตร หรือ complete media ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์แก้วดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นดูดใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ นำไปบ่มให้เซลล์เจริญในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% ตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทุกวัน เมื่อเซลล์เจริญหนาแน่นทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์, 2547) ดังนี้

### 3.6.1 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เกาะผิวด้วยเอนไซม์ทริปซิน (HepG2, SW620, KATO III, BT474 และ A375)

ใช้ปิเปตต์แก้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ภายในตู้ปลอดเชื้อ ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS (ปลอด  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mg}^{2+}$ ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เอียงให้ทั่วผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ 5-6 ครั้งแล้วดูดทิ้ง เติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์เริ่มหลุดตัวแล้วดูด trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ทิ้ง ใช้เวลาประมาณ 3-5 นาที (ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ปราศจากซีรัมปริมาตร 5 มิลลิลิตรและชุดสารละลายชะเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ ดูดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบาๆ ดูดเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ ขวดใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนหรือนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือนำกลับไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ การนำไปใช้ต่อไป หรือถ้าต้องการเลี้ยงในภาชนะเดิม หลังจากชะเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้วให้เหลือเซลล์ไว้ประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม complete media ให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ  $\text{CO}_2$  5% ต่อไป

### 3.6.2 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Jurkat)

ใช้ปิเปตต์แก้วดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่จับกลุ่มเป็นก้อนให้หลุดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ ดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบาๆ ดูดเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนหรือนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือนำกลับไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ต่อไป หรือถ้าต้องการเลี้ยงในภาชนะเดิมให้ใช้ปิเปตต์แก้วดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง ดูดทิ้ง โดยเหลือสารละลายไว้ประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม complete media ให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ  $\text{CO}_2$  5% ต่อไป

### 3.6.3 การเก็บรักษาเซลล์แบบถาวรในไนโตรเจนเหลว

นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 มาเทส่วนใสทิ้งและใช้นิวเคลาะหลอดเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติมอาหารสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็งปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) คูดขึ้นลงเบาๆ แล้วคูดใส่ในหลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) เก็บในตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$  นาน 1 วันแล้วนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

### 3.6.4 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยตรงด้วยฮีโมไซโทมิเตอร์

(haemocytometer)

นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 มาเทส่วนใสทิ้งและใช้นิวเคลาะหลอดเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติม complete media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คูดขึ้นลงเบาๆ แล้วปิเปตต์เซลล์ปริมาตร 11 ไมโครลิตรลงตรงช่องว่างระหว่างตัวฮีโมไซโทมิเตอร์ กับ cover slip นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ โดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 1 มุม (16 ช่องเล็ก) และคำนวณจำนวนเซลล์ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \times 10^4}{4}$$

4

### 3.6.5 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่มีชีวิต โดยย้อมด้วยสี trypan blue

นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 มาเทส่วนใสทิ้งและใช้นิวเคลาะหลอดเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติม complete media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คูดขึ้นลงเบาๆ ปิเปตต์เซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม Trypan blue ความเข้มข้น 0.5%w/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตต์เซลล์ปริมาตร 11 ไมโครลิตรลงตรงช่องว่างระหว่างตัวฮีโมไซโทมิเตอร์ กับ cover slip นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ โดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 1 มุม (16 ช่องเล็ก) และคำนวณจำนวนเซลล์ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \times 10^4 \times 2}{4}$$

4



### 3.7 ศึกษาผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด

เตรียมเซลล์ HepG2, SW620, KATO III, BT474, A375 และ Jurkat ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร แปรความเข้มข้นของ GSI และ DMSO ที่ใช้ในการทดสอบ โดยทำการเจือจาง GSI ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำละลายใน DMSO และ DMSO ความเข้มข้น 100% ที่อัตราส่วน 1:200 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นนำมาเจือจางลง 2 เท่า ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ GSI เท่ากับ 0, 0.032, 0.016, 0.8, 10, 20 และ 100 ไมโครโมลาร์ และ DMSO เท่ากับ  $3.2 \times 10^{-7}$ ,  $1.6 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  และ  $1 \times 10^{-2}$  เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมเซลล์ที่ต้องการทดสอบจำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายของ GSI เท่ากับ 0, 0.016, 0.008, 0.4, 5, 10 และ 50 ไมโครโมลาร์ และ DMSO เท่ากับ  $1.6 \times 10^{-7}$ ,  $0.8 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  และ  $5 \times 10^{-3}$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 4 วัน ในวันที่ 4 เติม MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมเปอร์มิลลิลิตร (Mosmann, 1983) ซึ่งละลายใน PBS ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม HCl ความเข้มข้น 0.04 N ในไอโซโพรพานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมโดยใช้ปิเปตต์หลายช่อง (multi channel pipette) ดูดขึ้นลงให้ตะกอนสีม่วงละลายจนหมด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (%viability) โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\%Viability = \frac{(OD_{test\ average} - OD_{blank\ average}) \times 100}{OD_{control\ cell\ average} - OD_{blank\ average}}$$

OD<sub>control cell average</sub> - OD<sub>blank average</sub>

OD<sub>test average</sub> = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ใช้ทดสอบด้วย GSI หรือ DMSO

OD<sub>control cell average</sub> = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์

OD<sub>blank average</sub> = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

### 3.8 ศึกษาการแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และลิแกนด์ของ Notch (Jagged1) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด โดยวิธี Western blot

#### 3.8.1 การสกัดโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โดย Western blot

ทำการสกัดโปรตีนเซลล์ไล่น้มนะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด โดยเซลล์เกาะผิวให้ทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ที่ขูดเซลล์ (rubber policeman) ส่วนเซลล์แขวนลอยสามารถนำมาสกัดโปรตีนได้เลย โดยใช้ปีเปตต์ดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ใช้ที่เขย่าหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เบาๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจาย ปั่นล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างด้วย buffer A (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ buffer B (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติมน้ำ protease inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 7,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เก็บส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ -80°C

### 3.8.2 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ protein assay kit ของบริษัท PIERCE ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน A:B = 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารตัวอย่าง โดยทำการเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมซึ่งสารมาตรฐาน BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำปลอดประจุที่ความเข้มข้น 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 จำนวน 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ (ทำสองหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง) เติมน้ำ working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่างหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ออกมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

### 3.8.3 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมเจล SDS-polyacrylamide gel ขนาด 8.3x8.3 เซนติเมตรหนา 1.5 มิลลิเมตร โดย separating gel และ stacking gel ใช้ acrylamide ความเข้มข้น 8% และ 5% ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) เตรียมตัวอย่างทดสอบความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมโดยปรับให้มีปริมาตร 30 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ เติมน้ำ staining buffer 30 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันนำไปต้ม 100°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน หยอดสารละลายโปรตีนแต่ละตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในช่อง SDS-polyacrylamide gel ทำการแยกโปรตีนด้วย

กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ใน Western blot running buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้ชุดเครื่องมือ Protein III System ของบริษัท Biorad

### 3.8.4 โอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane

หลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธีข้างต้นแล้ว ตัดบริเวณ stacking gel ที่วัดขนาดของเจล นำเจลไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ข) วางบนเครื่องเย่าประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรอง และ PVDF membrane ให้มีขนาดเท่ากับเจลจำนวน 6 แผ่น และ 1 แผ่นตามลำดับ นำแผ่น PVDF membrane แช่ในเมทานอลสัมบูรณ์ (absolute methanol) ให้ชุ่มทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 2 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน transfer buffer จากนั้นนำกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น PVDF membrane เจล และ กระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น วางบนเครื่อง Semi-dry transfer apparatus ตามลำดับ ทำการไล่ฟองอากาศโดยกลิ้งหลอดแก้วบนกระดาษกรองและ PVDF membrane เบาๆ 3 ครั้ง ไปในทิศทางเดียวกัน หยอด transfer buffer ปริมาตรเพียงเล็กน้อย ปิดฝาเครื่อง semi-dry western blot ทำการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อเจลหนึ่งแผ่น

### 3.8.5 การวิเคราะห์การแสดงออกโดยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ

#### Notch1, cleaved Notch1 และ Jagged1

ปิดสวิทช์ power supply ของเครื่อง semi-dry western blot จากนั้นเปิดฝาเครื่อง และ PVDF membrane มาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง นำมาแช่ในแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ที่จำเพาะต่อ โปรตีนที่ต้องการตรวจสอบซึ่งเจือจางใน blocking solution (ภาคผนวก ข) ตามตารางที่ 3.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาวางบนเครื่องเย่าเป็นเวลา 30 นาที เทแอนติบอดีปฐมภูมิใส่ในหลอดทดลอง ล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 2 ครั้ง เท PBST ที่เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่มีเอนไซม์ Horse-radish peroxidase ติดฉลากอยู่ ซึ่งเจือจางใน blocking solution ตามตารางที่ 3.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเย่าเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 2 ครั้ง

### 3.8.6 การตรวจสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescence และ autoradiography

เตรียมซับสเตรตของเอนไซม์ horse-radish peroxidase โดยใช้ ECL Western Blot Reagent ของบริษัท Amersham Biosciences โดยผสมรีเอเจนต์ 1 กับ รีเอเจนต์ 2 ในอัตราส่วน 1:1 (v/v)

นำ PVDF membrane แฉ่งไปในซบสเตรต นาน 30 วินาที ใช้ปากคีบคีบเมมเบรนวางลงบนพลาสติกใส (wrap membrane) และปิดทับเมมเบรน ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสให้ห่างจากเมมเบรนเล็กน้อย นำไปวางบนถาดประกบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดทั้งสี่มุม ปิดฝาถาด นำไปประกบฟิล์ม X-ray และล้างฟิล์ม X-ray ในห้องมืด

### 3.9 ศึกษาการแสดงออกของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Hes1* และลิแกนด์ของ Notch (*Jagged 2*, *Delta-like 1*) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนโดยวิธี RT-PCR

#### 3.9.1 การสกัด RNA

เซลล์เกาะผิวให้เปลี่ยนถ่ายเลี้ยงเซลล์จากภาชนะเลี้ยงเซลล์ไปยังถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ตามวิธีทำในข้อ 3.6.1 บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 1-2 วัน ให้เซลล์เจริญดีและเป็นชั้นเดียว (monolayer) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ถ้าเป็นเซลล์แขวนลอยให้ดูดเซลล์ปริมาตร 1-1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมน้ำยา Trizol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมหรือหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ และใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อแยก RNA ให้อยู่ใน aqueous phase ปิดฝาหลอดให้สนิท เขย่าแรงๆ ประมาณ 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที ที่ 2-8°C เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมี RNA อยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ประมาณ 400-450 ไมโครลิตร เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน RNA ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ หกครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 g นาน 10 นาที ที่ 2-8°C หลังจากนั้นสังเกตจะเห็นตะกอน RNA สีขาว เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน RNA ด้วยเอทานอล 75% ในน้ำปลอดประจุปลอด RNAase (DEPC water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสาร (vortex mixer) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง คั่วหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ลงบนกระดาษทิชชู นานประมาณ 15 นาที สังเกตจุดอนแรกจะเห็นตะกอนสีขาว ถ้าเริ่มแห้งจะใสขึ้น เติมน้ำปลอดประจุปลอด RNAase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มในเครื่องทำน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 55-60°C นาน 10 นาที เก็บที่ -80°C หรือนำไปวัดปริมาณ RNA

### 3.9.2 การวัดปริมาณ RNA

เจือจางสารละลาย RNA ที่สกัดได้ 100 เท่า ด้วยน้ำปลอดประจุปลอด RNAase โดยเปิดตัวสารละลาย RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในน้ำปลอดประจุปลอด RNA ปริมาตร 198 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำปลอดประจุปลอด RNA เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) คำนวณหาค่าเข้มข้นของ RNA จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณ RNA (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}$$

เมื่อกำหนดให้ RNA 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 (Ausubel และคณะ 1999)

ความบริสุทธิ์ของ RNA คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  ค่าที่เหมาะสมอยู่ควรรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามี DNA ปนเปื้อนสูง

### 3.9.3 การสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (cDNA) โดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส

ใช้ RNA ตัวอย่างที่เตรียมได้ตามข้อ 3.9.2 จำนวน 1 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอโดยใส่ในหลอดพีซีอาร์ เดิม random hexamer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอด RNAase จนปริมาตรครบ 11 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler; Perkin Elmer, USA) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 75°C นาน 15 นาที และ 4°C นาน 5 นาที นำมาเติม 5 x Reverse Transcriptase buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร dNPT mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Ribonuclease inhibitor ความเข้มข้น 20 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติมนิวคลีโอไซด์ Reverse Transcriptase ความเข้มข้น 200 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เก็บรักษาคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -80°C หรือนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

### 3.9.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR)

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์โดยใช้คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอจากข้อ 3.9.3 เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ Actin, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Hes1, Jagged2 และ Delta-like1 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Taq 10x Buffer	10 เท่า	2.5 ไมโครลิตร	1 เท่า
dNTP mix	10 มิลลิโมลาร์	1.6 ไมโครลิตร	0.64 มิลลิโมลาร์
Forward primer	10 ไมโครโมลาร์	0.5 ไมโครลิตร	0.2 ไมโครโมลาร์
Reverse primer	10 ไมโครโมลาร์	0.5 ไมโครลิตร	0.2 ไมโครโมลาร์
Taq polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร	2.5 ยูนิต/ไมโครลิตร
Mg <sup>2+</sup>	25 มิลลิโมลาร์	2 ไมโครลิตร	2 มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดจุลินทรีย์		14.9 ไมโครลิตร	
cDNA		2.5 ไมโครลิตร	
ปริมาตรสุทธิ		25 ไมโครลิตร	

และดำเนินการทำการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ	94°C	5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ	55°C	30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	30 วินาที	
Final Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที	

**หมายเหตุ** ทุกไพรเมอร์ใช้ Annealing Temperature ที่ 55°C ยกเว้น Notch3, Notch4, Jagged2, Delta-like1 ใช้ Annealing Temperature ที่ 56, 56, 57 และ 58°C ตามลำดับ

ดำเนินการปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตามภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงด้วย การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นย้อมอะกาโรสด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่เกินออกในน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (โดยใช้เครื่อง Gel doc ของบริษัท Bio-Rad)

### 3.10 ศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES1*) และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธี RT-PCR และ Western blot

ทำการศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES1*) และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทำละลายใน DMSO และ DMSO ความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ตามลำดับเป็นเวลา 4 วัน โดยวิธี RT-PCR และเป็นเวลา 4 วัน และเป็นช่วงเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน โดยวิธี Western blot ซึ่งวิธีทำเหมือนข้อ 3.9 และ 3.8 ตามลำดับ

### 3.11 ศึกษาผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342

#### 3.11.1 เซลล์แขวนลอย (Jurkat)

เตรียมเซลล์ Jurkat ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จำนวน 3 หลุม เติม GSI ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทำละลายใน DMSO และ DMSO ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลุมที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 4 วัน โดยมีเซลล์ Jurkat ที่เติม etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 12 ชั่วโมงเป็นผลบวกควบคุม ใช้ปีเปตต์ดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม glutaraldehyde ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°C นาน 2 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C ซ้ำมึน ปีเปตต์ glutaraldehyde ความเข้มข้น

1% ที่ นำมาปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 300 ไมโครลิตร ที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเติม PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มีदनาน 5 นาที ใช้ปิเปตต์ดูดไว้บนกระจกสไลด์ ปิดด้วยแผ่นกระจกใส (cover slip) ใช้น้ำยาทาเล็บปิดรอบๆด้าน cover slip ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มี apoptotic nuclei ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

### 3.11.2 เซลล์เกาะผิว (HepG2)

เตรียม HepG2 ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร x 10 มิลลิเมตร จำนวน 3 จาน เติม GSI ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ซึ่งทำละลายใน DMSO และ DMSO ความเข้มข้น 0.05% ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ซึ่งมี cover slip ที่ปราศจากเชื้อวางอยู่) จานที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 4 วัน โดยมีเซลล์ HepG2 ที่เติม etoposide ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 36 ชั่วโมง เป็นเซลล์ผลบวกควบคุม ใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดทิ้ง เติม glutaraldehyde ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มีदनาน 2 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C นาน 24 ชั่วโมง ปิเปตต์ glutaraldehyde ความเข้มข้น 1% ที่ ล้างด้วย PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปิเปตต์ PBS ที่ ใช้ปิเปตต์ดูด PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์ เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2 ไมโครลิตร ใช้เข็มทิ่มแผ่น cover slip โดยหันด้านที่มีเซลล์เกาะอยู่คว่ำลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ในที่มีदनาน 5 นาที ใช้น้ำยาทาเล็บปิดรอบๆด้าน cover slip ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มี apoptotic nuclei ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

### 3.12 ศึกษาผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI

การแสดงออกเกินของ intracellular Notch1 (ICN1) ในเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 โดยใช้พลาสมิด pcDNA3 ที่มียีน *ICN1* (pCDNA3-ICN1) เฉพาะบริเวณที่ประมวลรหัสระหว่างกรดอะมิโนที่ 1759-2556 และพลาสมิด pcDNA3 ที่เป็นเวกเตอร์พาหะ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Barbara Osborne, University of Massachusetts, USA) แสดงดังรูป 13.1 โดยวิธีทรานสเฟกชัน (transfection) เข้าไปในเซลล์ไลน์ HepG2 และ Jurkat แบบชั่วคราวและแบบถาวร



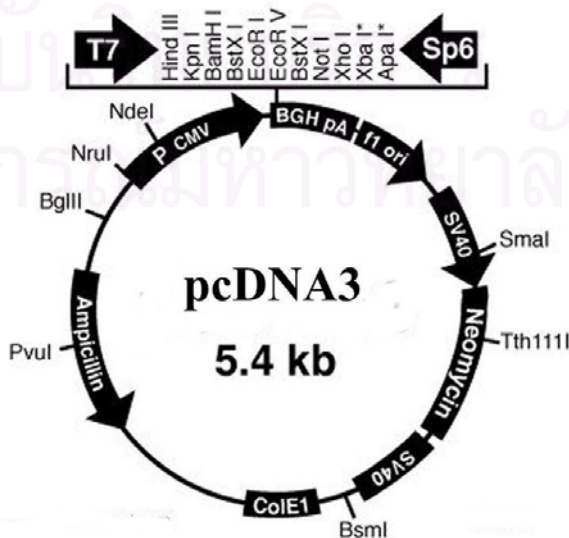
โดยใช้กลไกไลโปโซม (liposome) โดยใช้ Fugene6 reagent ของบริษัท Roche ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ และวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ตามลำดับ ซึ่งมีวิธีทำดังต่อไปนี้

### 3.12.1 วิธีเตรียมพลาสมิด

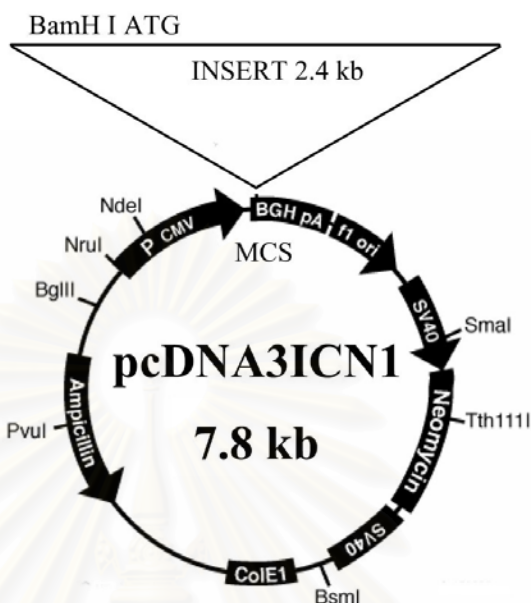
#### 3.12.1.1 การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด (transformation) โดยวิธี heat-shock

นำ competent cell (*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ) ออกมาจากตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -70 $^{\circ}$ C ทิ้งไว้ให้ละลายในน้ำแข็ง ปิเปตต์สารละลายใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลอด เติมพลาสมิด pCDNA3 และ pCDNA3-ICN1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดที่ 1 และ 2 วางไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปจุ่มในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิ 42 $^{\circ}$ C นาน 90 วินาที นำไปวางในน้ำแข็งนาน 2 นาที ปิเปตต์สารละลายในแต่ละหลอดใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที จากนั้นปิเปตต์สารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งเติมแอมพิซิลลิน (ampicillin) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LBA) ใช้แท่งแก้ว (spreader) แช่ในแอลกอฮอล์ 95% ยกแท่งแก้วไปเผาไฟบนตะเกียงแอลกอฮอล์เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ ตั้งทิ้งไว้เย็นสักครู่ นำแท่งแก้วไปกระจายเชื้อที่อยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LBA ให้ทั่ว นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตโคโลนี

ก.



ข.



รูปที่ 3.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ก. แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pCDNA3

ข. แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pCDNA3 ที่มียีนของ *Notch1* ระหว่างกรดอะมิโนที่ 1759-2556 แทรกอยู่ (pCDNA3-ICN1) ภายใต้โปรโมเตอร์ของ Cytomegalovirus (CMV)

### 3.12.1.2 การสกัดพลาสมิด

นำ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่ได้รับพลาสมิด pCDNA3 และ pCDNA3-ICN1 ในข้อ 13.12.1.1 มาทำการสกัดพลาสมิด โดยเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งเติมแอมพิซิลลินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C นาน 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อยของ QIA prep spin miniprep kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต เก็บรักษาพลาสมิดไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ C

### 3.12.1.3 การวัดปริมาณพลาสติก

เจือจางสารละลายพลาสติกที่สกัดได้ 50 เท่า ด้วยน้ำปลอดประจุ โดยปีเปตต์สารละลายพลาสติกตัวอย่างปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงในน้ำปลอดประจุ 147 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำปลอดประจุเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาค่าความเข้มข้นของพลาสติกจากสมการ

$$\text{ปริมาณพลาสติก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

เมื่อกำหนดให้พลาสติกดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0

ความบริสุทธิ์ของ DNA คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  ค่าที่เหมาะสมอยู่ควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนสูง

## 3.12.2 วิธีทรานสเฟกชัน

### 3.12.2.1 กลไกไลโปโซมโดยใช้ Eugene6 reagent

ถ่ายเลี้ยงเซลล์ HepG2 ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีทำในข้อ 3.6.1 นับและปรับจำนวนเซลล์ เท่ากับ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จำนวน 3 หลุม บ่มในตู้บ่ม 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 24 ชั่วโมง ใช้ปีเปตต์อัตโนมัติดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ปราศจาก FBS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 18.8 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมสารละลาย Eugene6 ของบริษัท Roche ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (ห้ามสัมผัสกับด้านข้างของหลอด) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม pCDNA3 และ pCDNA3-ICN1 จำนวน 0.4 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารที่ความเร็วรอบสูงสุด นาน 1 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นนำไปเติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าถาดเลี้ยงเซลล์เบาๆ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% นาน 2 วัน เก็บเซลล์ที่ได้รับพลาสติกชั่วคราว (transient transfection) เพื่อสกัดโปรตีนสำหรับทำ Western blot หรือเติมสารปฏิชีวนะ G418

จำนวน 800 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (stable transfection) บ่มเลี้ยงเซลล์ต่อไป สังเกตด้วยกล้อง inverted microscope ทุกวัน ประมาณ 2-3 อาทิตย์ จะสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด ทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยลดความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ G418 ลงครึ่งหนึ่ง

### 3.12.2.2 วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

ถ่ายเลี้ยงเซลล์ Jurkat ตามวิธีทำในข้อ 3.6.2 นับและปรับจำนวนเซลล์ เท่ากับ  $1 \times 10^6$  เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวตต์ ขนาด 0.4 เซนติเมตร (cuvette 0.4 cm Gap) จำนวน 3 คิวเวตต์ แช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติมพลาสมิด pCDNA3 และ pCDNA3-ICN1 จำนวน 0.5 ไมโครกรัมลงไปในหลอดที่ 1 และ 2 ทำการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ของบริษัท Biorad ใช้กระแสไฟฟ้า 280 โวลต์ 950  $\mu\text{F}$  จากนั้นนำคิวเวตต์มาแช่น้ำแข็งนาน 15 นาที ใช้ปิเปตต์ดูดใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม เติม complete media ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม  $37^{\circ}\text{C}$  บรรยากาศ  $\text{CO}_2$  5% นาน 48 ชั่วโมง เติมยาปฏิชีวนะ G418 จำนวน 800 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (stable transfection) บ่มเลี้ยงเซลล์ต่อไป สังเกตด้วยกล้อง inverted microscope ทุกวัน ประมาณ 2-3 อาทิตย์ จะสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด ทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ G418 ลงครึ่งหนึ่ง

เมื่อเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเจริญดีแล้วจะนำไปตรวจสอบผลการแสดงออกเกินของ ICN1 โดยวิธี Western blot และศึกษาผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด โดยวิธี MTT cell proliferation assay ตามวิธีทำในข้อ 3.7 -3.10 ต่อไป

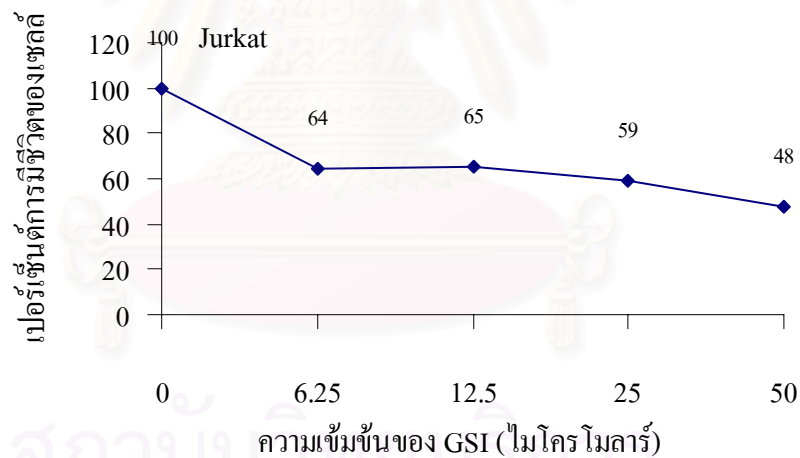
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

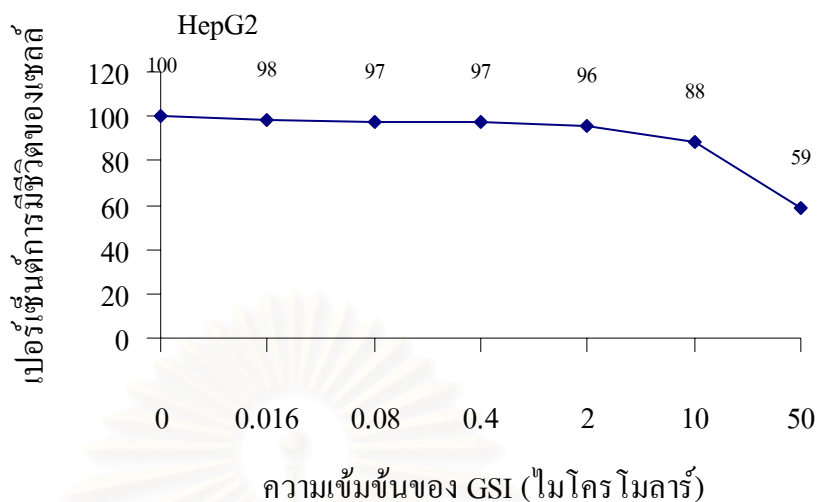
### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด

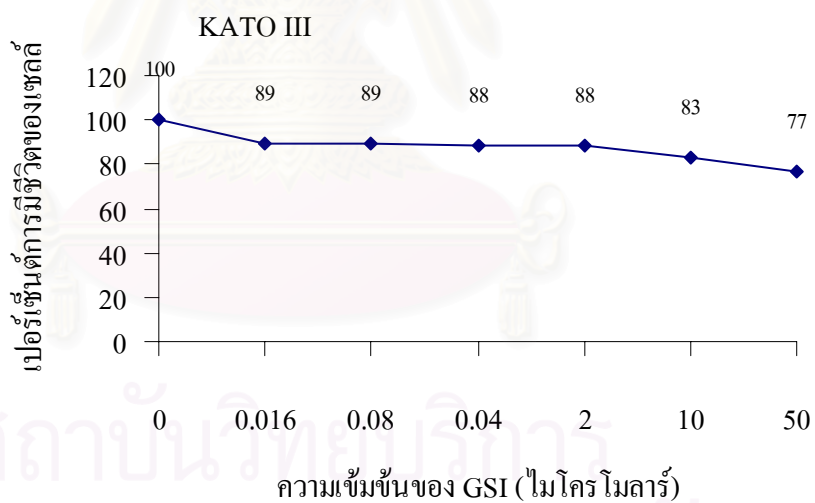
การศึกษาผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด คือ HepG2, SW620, KATO III, BT474, A375 และ Jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay พบว่า GSI สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Jurkat และ HepG2 โดยไม่มีผลกการเพิ่มจำนวนของเซลล์ชนิดอื่น ความเข้มข้นของ GSI ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Jurkat และ HepG2 คือ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 48 และ 59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงผลดังรูปที่ 4.1-4.6



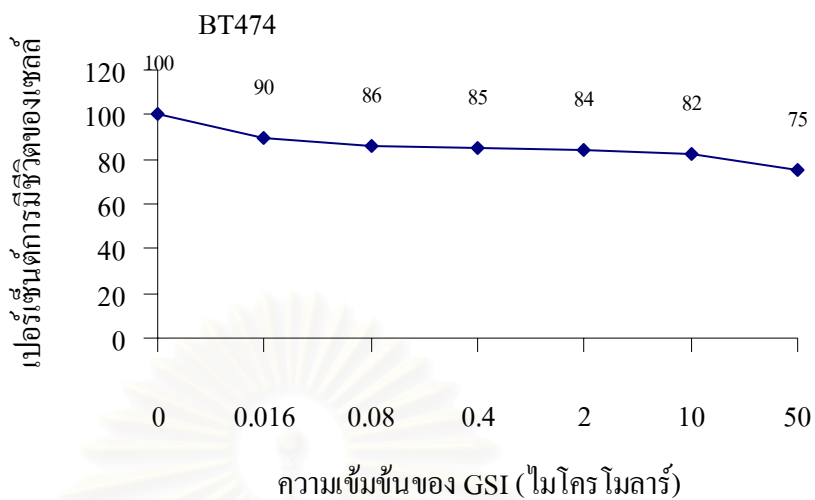
รูปที่ 4.1 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 83 %)



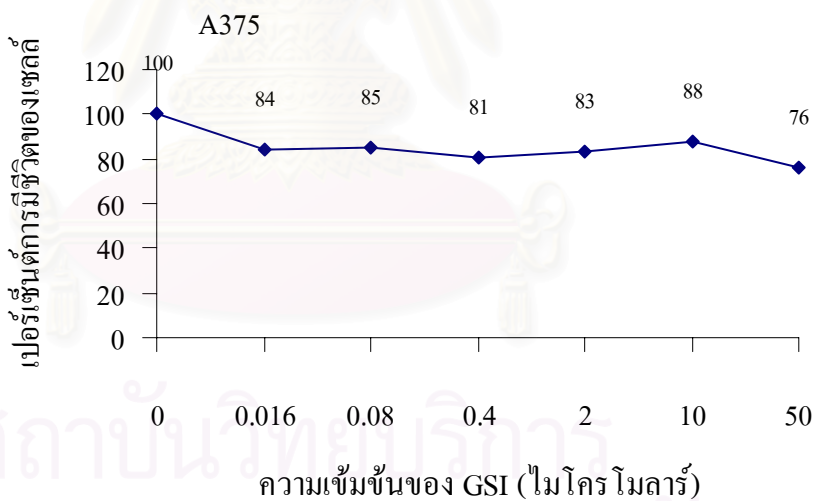
รูปที่ 4.2 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 97 %)



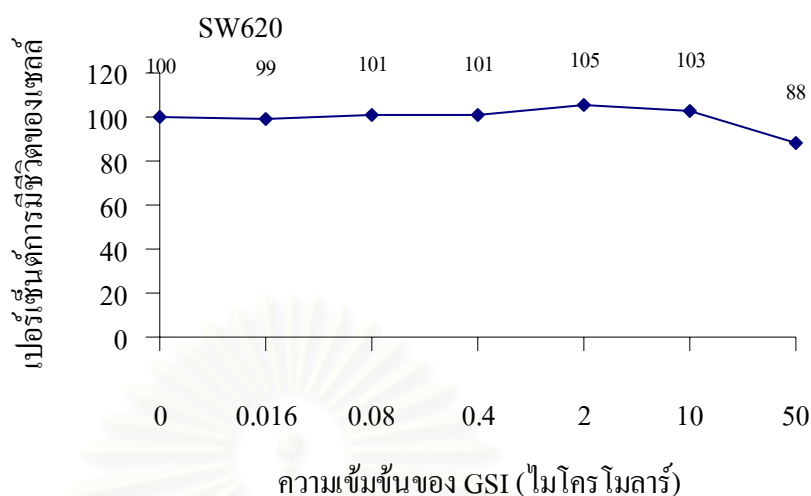
รูปที่ 4.3 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ KATO III โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 88 %)



รูปที่ 4.4 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ BT474 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 97 %)



รูปที่ 4.5 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ A375 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 85 %)



**รูปที่ 4.6 ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ SW 620 โดยวิธี MTT proliferation assay (ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.005 % เท่ากับ 92 %)**

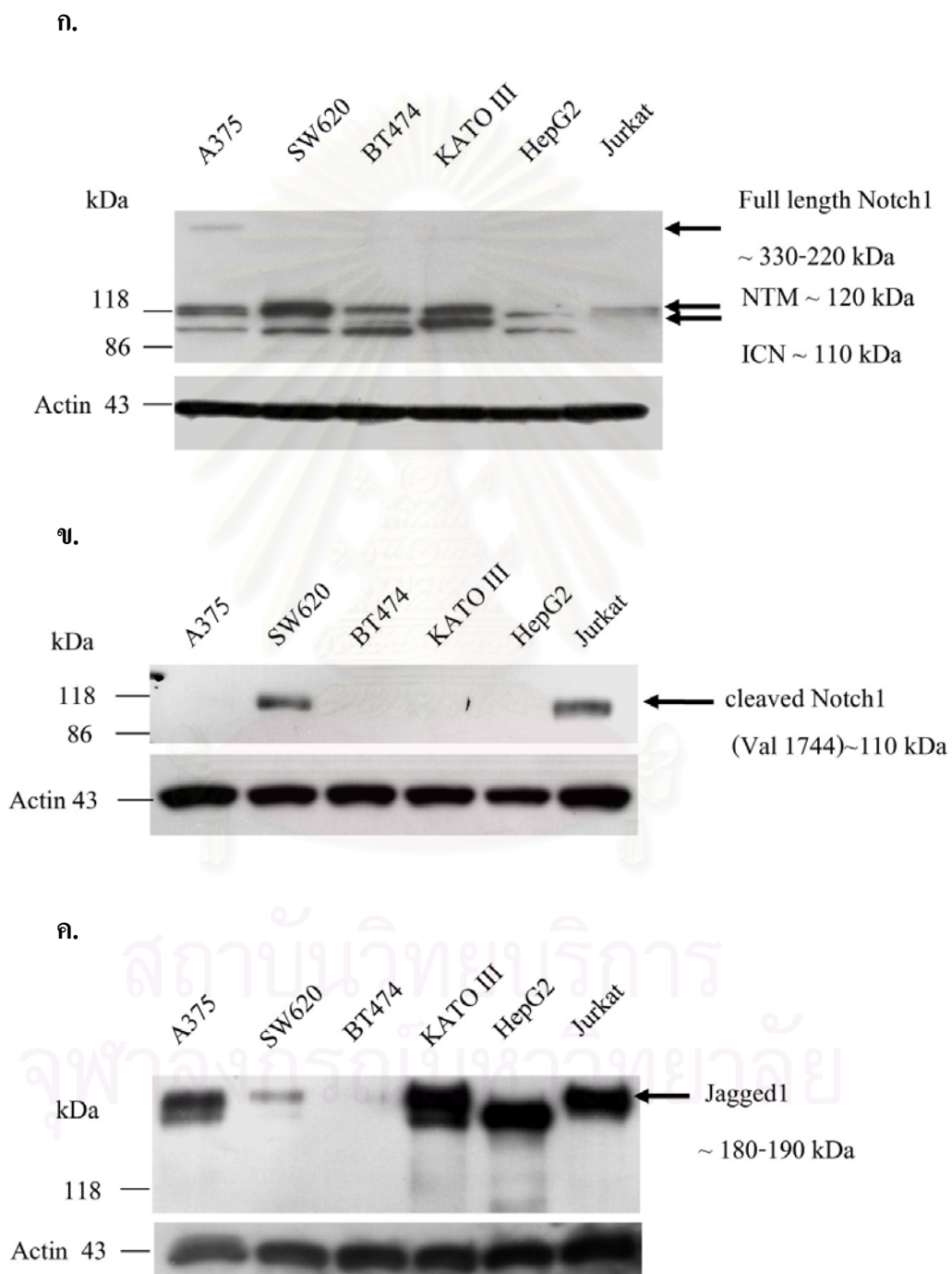
จากผลของ GSI ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ดังแสดงข้างต้น จึงทำการศึกษาในหน้าที่ของวิถีสัญญาณ Notch ต่อการเจริญของสองเซลล์ไลน์นี้ในการทดลองต่อไปในงานวิจัยนี้

#### **4.2 การแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และลิแกนด์ของ Notch (Jagged 1) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 6 ชนิดโดยวิธี Western blot**

เพื่อเป็นการยืนยันว่าในเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ มีการแสดงออกของโปรตีน Notch1 จึงทำการศึกษาการแสดงออกของ Notch1, Cleaved Notch1 และ Jagged 1 ของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด คือ HepG2, SW620, KATO III, BT474, A375 และ Jurkat โดยพบว่าทุกเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของ Notch1 และ Jagged 1 ในระดับที่แตกต่างกัน ยกเว้น BT474 ไม่มีการแสดงออกของ Jagged 1 ในเซลล์ไลน์ทั้งหมด แอ็บโปรตีนที่พบเมื่อวิเคราะห์โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Notch1 นั้นมีขนาดที่แตกต่างกัน และในเซลล์ไลน์บางชนิดก็พบมีการแสดงออกหลายแถบ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากการเกิดการผ่าเหล่าของยีน Notch1 ทำให้โปรตีนที่มีการแสดงออกมีขนาดเปลี่ยนไป โดยมากมีขนาดสั้นลง อีกทั้งเมื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Notch1 ที่มีการย่อยโดยเอนไซม์แกมมาซีรีเทสพบว่าเฉพาะในเซลล์ไลน์ SW620 และ Jurkat มีการแสดงออกของ



Cleaved Notch1 ดังแสดงผลในรูปที่ 4.7 ดังนั้น จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าในเซลล์ไลน์สองชนิดนี้มีการส่งสัญญาณผ่าน Notch1 อย่างต่อเนื่อง

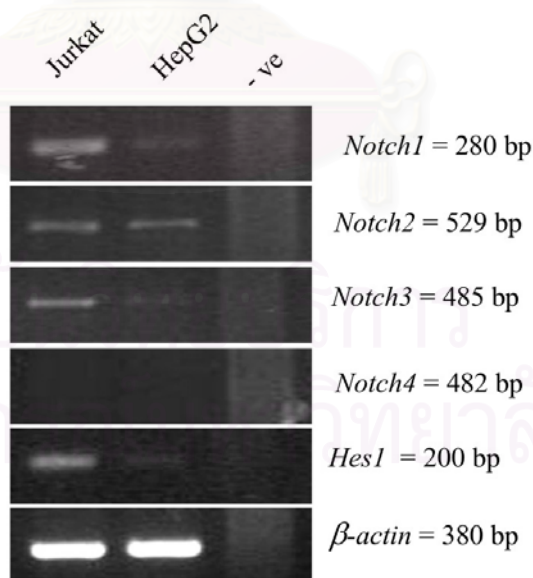


รูปที่ 4.7 การแสดงออกของ Notch1, cleaved Notch1 และ Jagged 1 ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2, SW620, KATO III, BT474, A375 และ Jurkat โดยวิธี Western blot

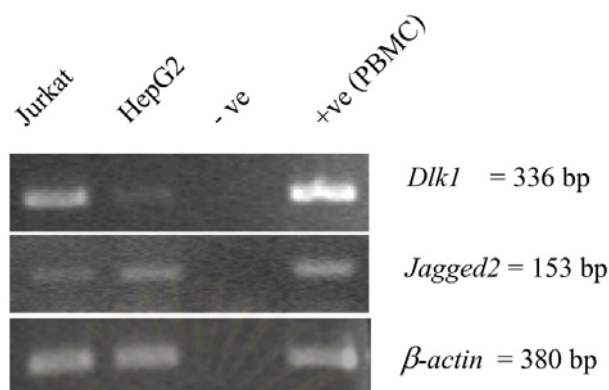
- ก. การแสดงออกของ Notch1
- ข. การแสดงออกของ cleaved Notch1
- ค. การแสดงออกของ Jagged 1

#### 4.3 การแสดงออกของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Hes1* และลิแกนด์ของ Notch (*Jagged 2*, *Delta-like 1*) ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนโดยวิธี RT-PCR

เพื่อศึกษาว่าเซลล์ไลน์ที่มีความไวต่อ GSI มีการแสดงออกของยีน *Notch* อื่นๆและลิแกนด์หรือไม่ จึงทำการศึกษาการแสดงออกของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Jagged 2* และ *Delta-like 1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 โดยวิธี RT-PCR พบว่าทั้งสองเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Jagged 2* และ *Delta-like 1* แต่ไม่มีการแสดงออกของ *Notch4* ดังแสดงผลดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *Hes1* ซึ่งเป็นหนึ่งในยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch พบว่ามีการแสดงออกในเซลล์ไลน์ทั้งสองในภาวะปกติ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าในเซลล์ไลน์ทั้งสองนี้มีการส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ Notch อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจจะเป็นการส่งสัญญาณ โดยใช้ลิแกนด์ที่มีการแสดงออกในเซลล์เหล่านี้



รูปที่ 4.8 อะกาโรสเจลแสดงผลที่ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4* และ *Hes1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 ผลลบควบคุมคือ HPLC water



รูปที่ 4.9 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *Jagged 2* และ *Delta-like 1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 ผลบวกควบคุมคือ HPLC water ผลบวกควบคุมคือ peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

#### 4.4 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES1*) และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI โดยวิธี RT-PCR และวิธี Western blot

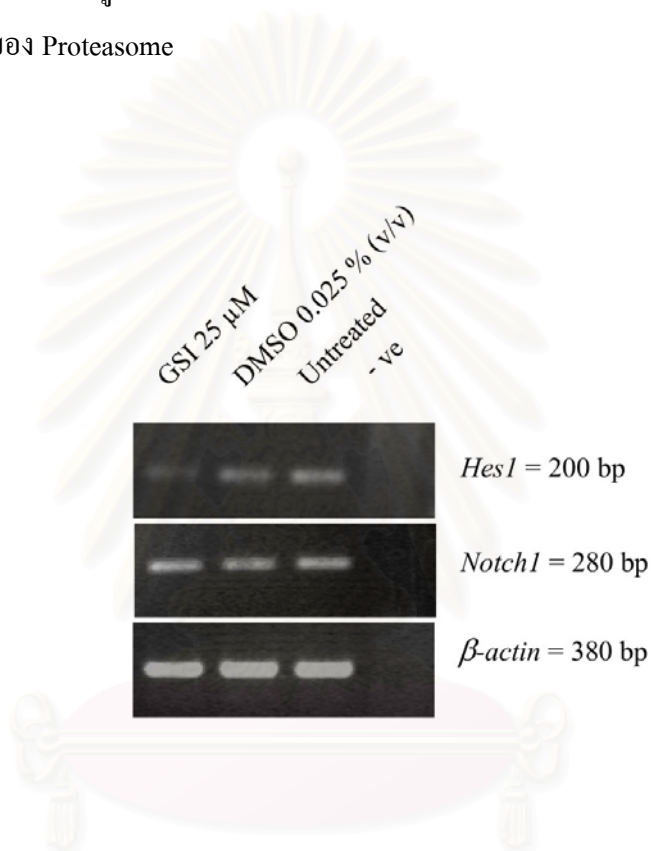
เพื่อยืนยันว่าเมื่อเซลล์ได้รับยา GSI แล้ว มีการกดสัญญาณ Notch จริง จึงทำการศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ได้แก่ *HES1* และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ในเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ตามลำดับเป็นเวลา 4 วัน พบว่าทั้ง Jurkat และ HepG2 มีการแสดงออกของ *HES1* ลดลง ในส่วนของการแสดงออกของ *Notch1* พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA ไม่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ Jurkat และลดลงในเซลล์ HepG2 เมื่อทำการศึกษาผลของ GSI ต่อการแสดงออกของ *Notch1* ด้วยวิธี Western blot โดยเติม GSI ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ในเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีปริมาณของ *Notch1* เพิ่มขึ้นทั้งสองเซลล์และเมื่อทำการศึกษาให้ละเอียดขึ้นโดยศึกษาที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน พบว่ามีการแสดงออกของ *Notch1* เพิ่มขึ้นทั้งสองเซลล์ไลน์ ดังแสดงผลดังรูปที่ 4.10, 4.11, 4.12 และ 4.13

ดังนั้น เมื่อเซลล์ไลน์ทั้งสองได้รับยา GSI แล้ว วิถีสัญญาณ Notch ถูกกด ส่งผลให้มีการลดลงของยีนเป้าหมาย *Hes1* ในระดับการถอดรหัส ส่วนการแสดงออกของ *Notch1* ในระดับ mRNA ในเซลล์ Jurkat นั้นไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในเซลล์ HepG2 มีระดับลดลง แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ไลน์สองชนิดนี้มีกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีน *Notch1* ต่างกัน กล่าวคือ ในเซลล์

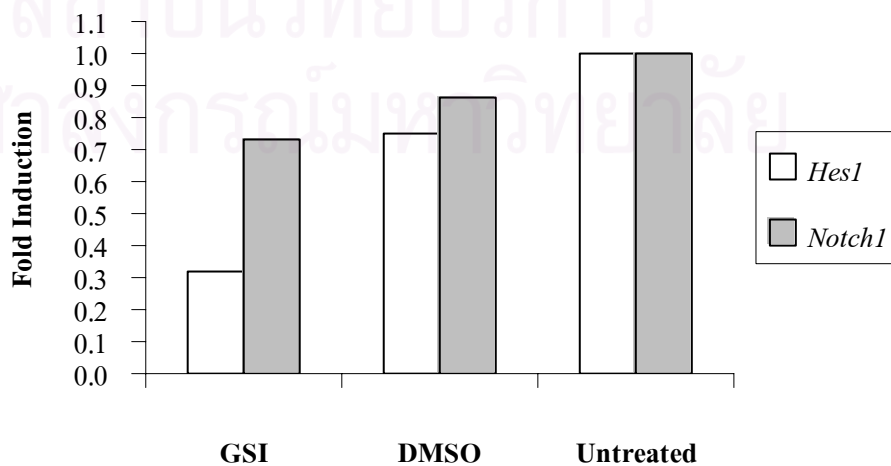
Jurkat นั้น การแสดงออกของ *Notch1* ไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของวิถีสัญญาณ Notch แต่ในเซลล์ HepG2 วิถีสัญญาณ Notch ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมระดับการแสดงออก

จากการที่พบว่าปริมาณโปรตีน *Notch1* สะสมในเซลล์ทั้งสองชนิดที่ได้รับยา GSI นั้น คาดว่าน่าจะเป็นผลที่ *Notch1* ไม่ถูกตัด เนื่องจากมีการกดของยา GSI ทำให้มีโปรตีนสะสมบนผิวเซลล์ เพราะหากโปรตีนถูกตัดแล้ว จะมีการ turn over ของโปรตีนอย่างรวดเร็ว โดยจะถูกย่อยผ่านกระบวนการของ Proteasome

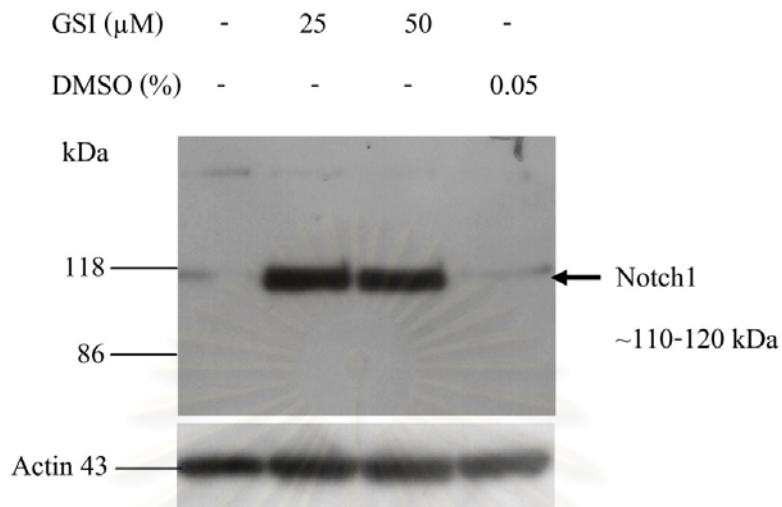
ก.



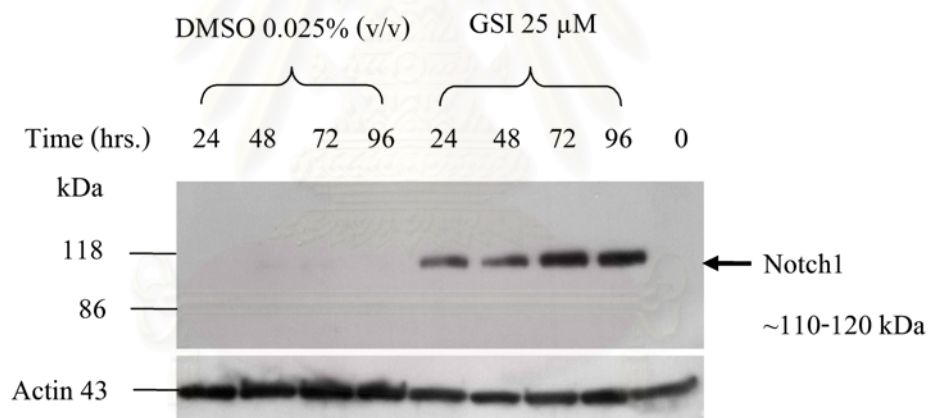
ข.



## ค. (1)



## (2)



รูปที่ 4.10 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES1*) และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat โดยวิธี RT-PCR และวิธี Western blot

ก. ออคาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *HES1* และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลานาน 4 วัน

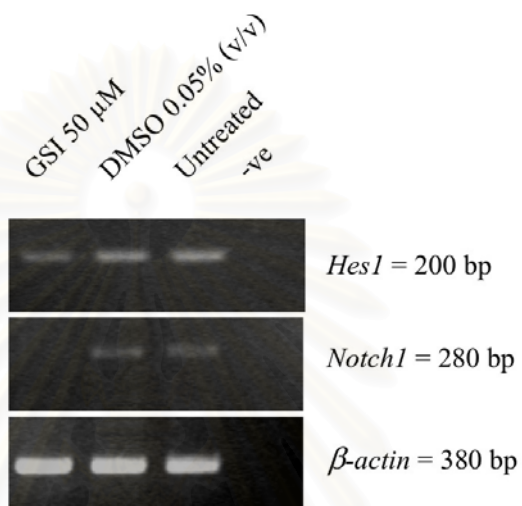
ข. Fold induction ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลจากรูป 4.10 ก

ค. การแสดงออกของ Notch1 ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ โดยวิธี Western blot

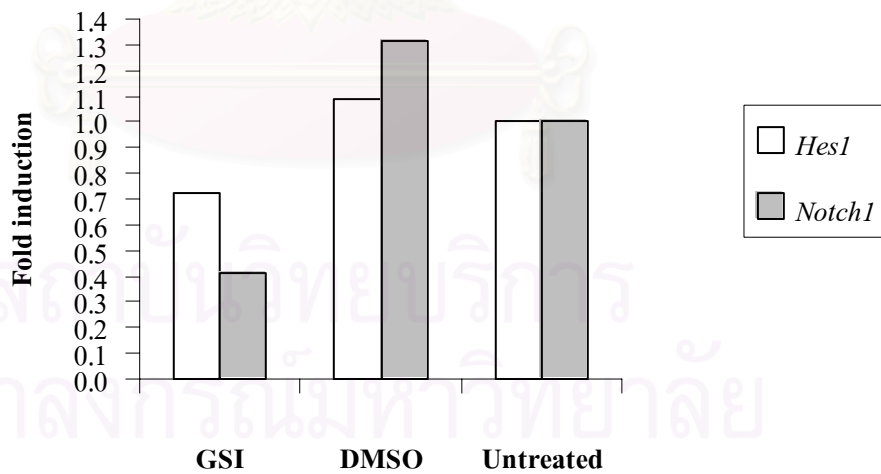
(1) เป็นเวลานาน 3 วัน

(2) เป็นเวลานาน 1, 2, 3 และ 4 วัน

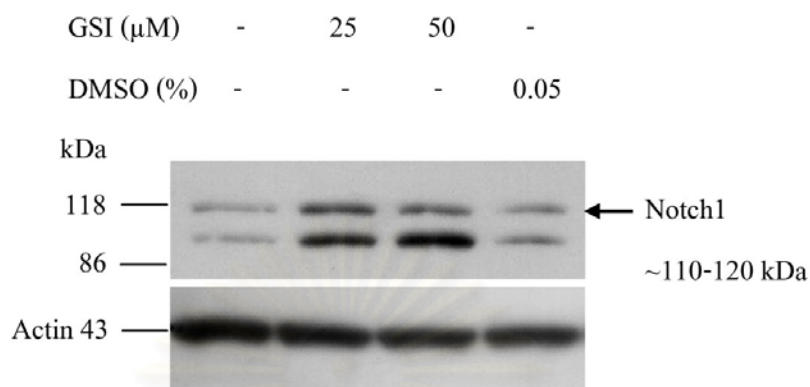
ก.



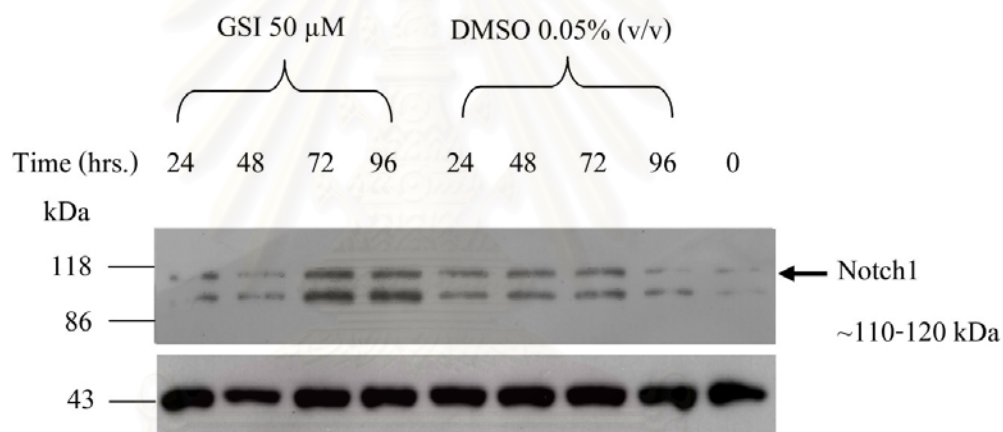
ข.



## ค. (1)



## (2)



รูปที่ 4.11 ผลของ GSI ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES1*) และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 โดยวิธี RT-PCR และวิธี Western blot

ก. อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *HES1* และ *Notch1* ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลานาน 4 วัน

ข. Fold induction ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลจากรูป 4.11 ก

ค. การแสดงออกของ Notch1 ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ โดยวิธี Western blot

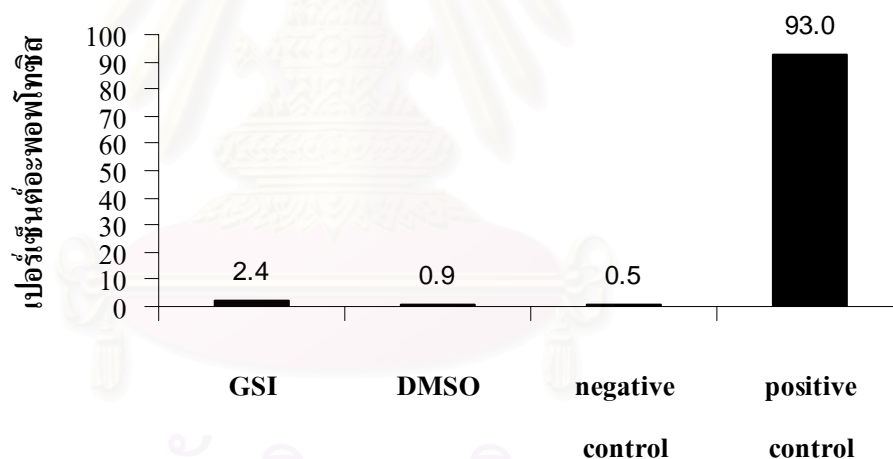
(1) เป็นเวลานาน 3 วัน

(2) เป็นเวลานาน 1, 2, 3 และ 4 วัน

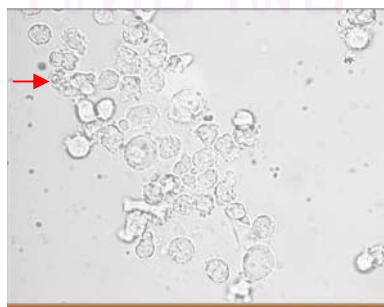
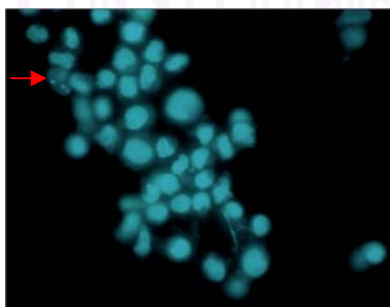
#### 4.5 ผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342

เพื่อศึกษาว่าเมื่อเซลล์ได้รับยา GSI แล้ว GSI ทำลายเซลล์มะเร็ง โดยกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส หรือเพียงแค่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเท่านั้น จึงทำการศึกษาผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat และ HepG2 เมื่อเติม GSI ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ในเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ตามลำดับเป็นเวลา 4 วัน โดยวิธีย้อมด้วย Hoechst 33342 พบว่าทั้งสองเซลล์ไม่มีการตายแบบอะพอพโทซิส แสดงว่า GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เท่านั้นแสดงผลดังรูปที่ 4.12 และ 4.13

ก.

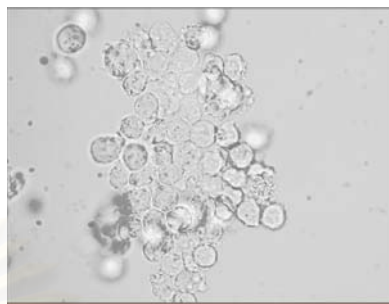
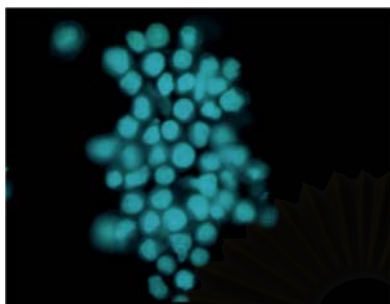


ข.

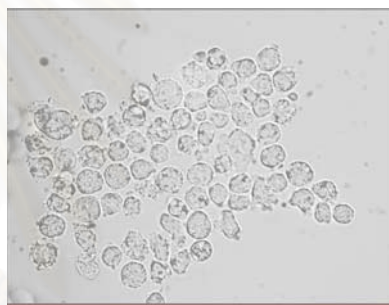
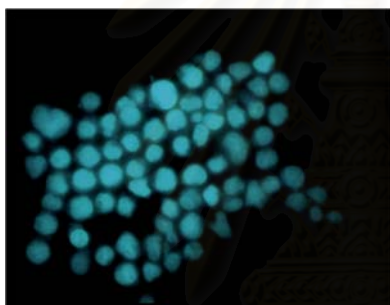




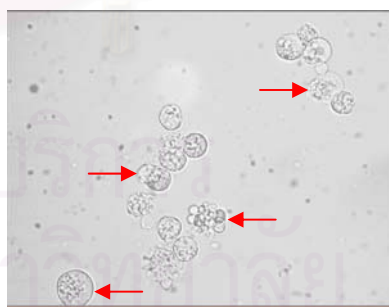
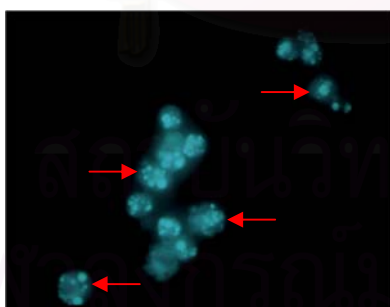
ค.



ง.



จ.



รูปที่ 4.12 ผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ไอน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat  
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า (รูปซ้ายแสงฟลูออเรสเซนซ์และรูปขวาแสง  
ธรรมดา)

ก. เปอร์เซ็นต์อะพอโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat เมื่อเติม GSI ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์

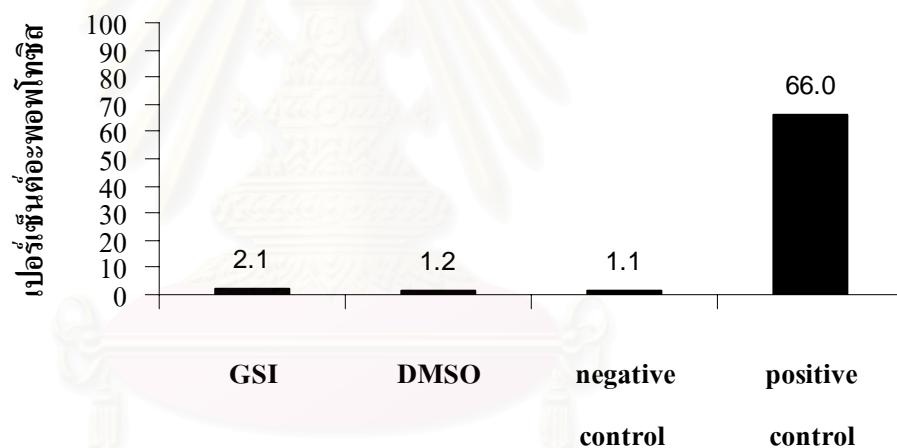
ข. เติม GSI ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 4 วัน

ค. เติม DMSO ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 วัน

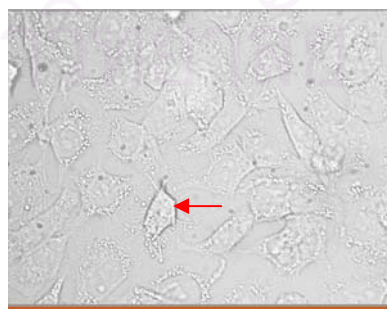
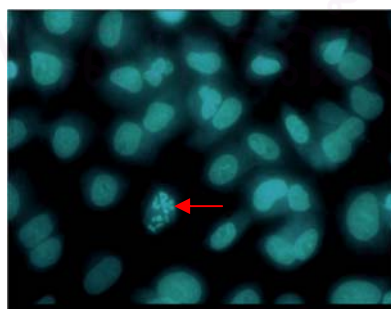
ง. เซลล์ผลลบควบคุม

จ. เซลล์ผลบวกควบคุม (เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือ เซลล์ที่มีการตายแบบอะพอโทซิส

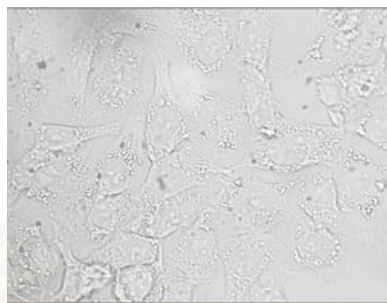
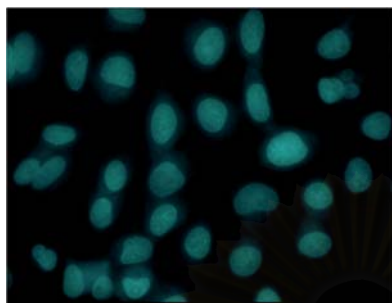
ก.



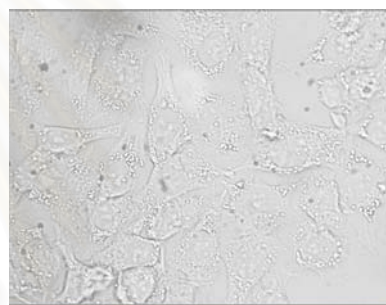
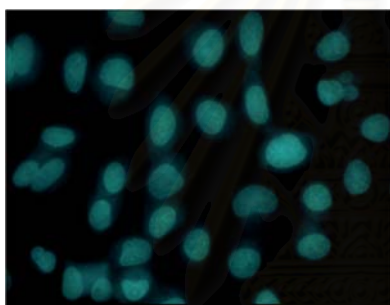
ข.



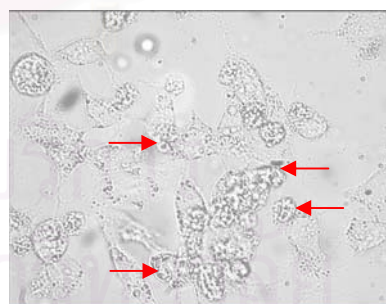
ค.



ง.



จ.



รูปที่ 4.13 ผลของ GSI ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า (รูปซ้ายแสงฟลูออเรสเซนซ์และรูปขวาแสงธรรมดา)

ก. เปรอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat เมื่อเติม GSI ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์

- ข. เดิม GSI ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 4 วัน
  - ค. เดิม DMSO ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 วัน
  - ง. เซลล์ผลลบควบคุม
  - จ. เซลล์ผลบวกควบคุม (เดิม Etoposide ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือ เซลล์ที่มีการตายแบบอะพอโทซิส

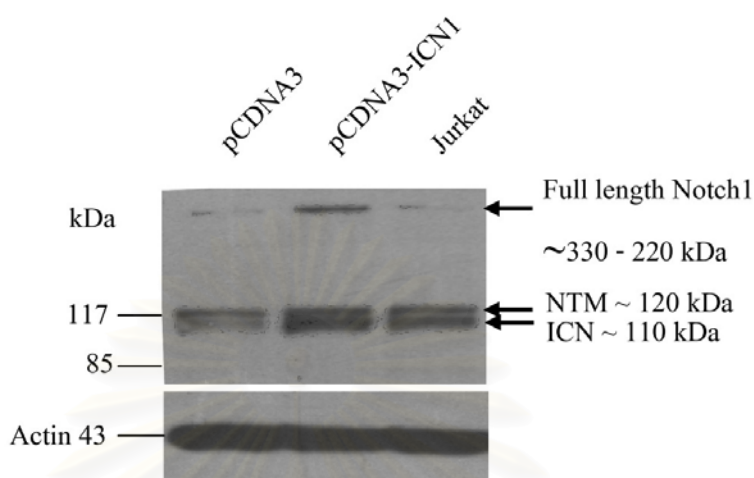
#### 4.6 ผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ไวต่อ GSI

เพื่อพิสูจน์ว่าฤทธิ์ของ GSI ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งทั้งสองชนิดผ่านการกดวิถีสัญญาณ Notch จึงทำการศึกษาการแสดงออกเกินของ truncated Notch โดยใช้พลาสมิดที่มียีน intracellular Notch1 (pcDNA3-ICN1) โดยการทำให้ stable transfection ในเซลล์ Jurkat โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พบการแสดงออกเกินของโปรตีน Notch1 เมื่อตรวจสอบโดยวิธี Western blot และเมื่อเติม GSI และ DMSO เป็นเวลา 4 วัน พบว่า GSI ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p > 0.005$  (t-test) เมื่อเทียบกับในภาวะที่มี DMSO ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี MTT proliferation assay ดังรูปที่ 4.14

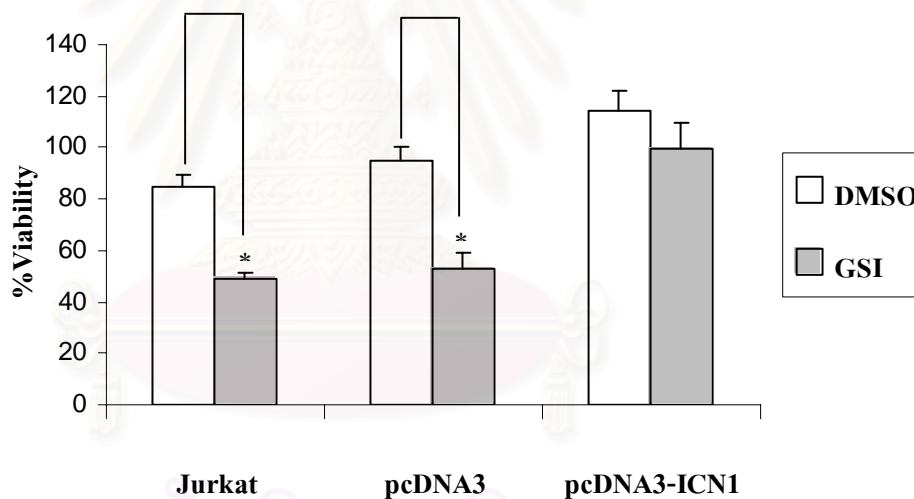
การศึกษากการแสดงออกเกินของ truncated Notch โดยใช้พลาสมิดที่มียีน intracellular Notch1 (pcDNA3-ICN1) โดยการทำให้ transient transfection ในเซลล์ไลน์ HepG2 โดยใช้ Fugene6 reagent เมื่อตรวจสอบโดยวิธี Western blot พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน Notch1 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3 และเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิด ในขณะที่ stable transfection ไม่พบการแสดงออกเกินของโปรตีน Notch1 และเมื่อเติม GSI และ DMSO เป็นเวลา 4 วัน พบว่า GSI ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p > 0.005$  (t-test) เมื่อเทียบกับในภาวะที่มี DMSO ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี MTT proliferation assay ดังรูปที่ 4.15

แสดงว่า truncated Notch1 สามารถช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มี GSI หรือ GSI ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งทั้งสองชนิดผ่านการกดวิถีสัญญาณ Notch

ก.



ข.



รูปที่ 4.14 ผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 (stable transfection) โดยวิธี อิเล็กโทรพอเรชัน

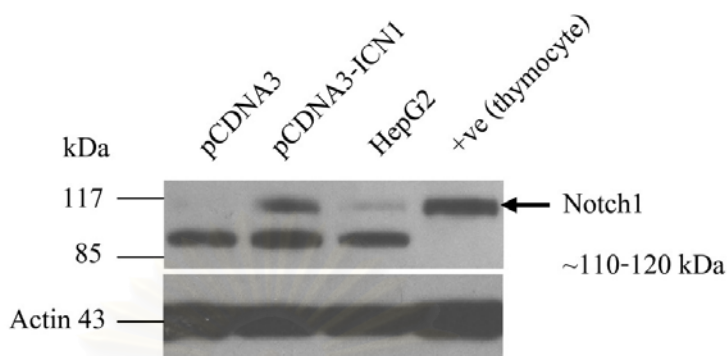
ก. การแสดงออกของ Notch1 ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 วิเคราะห์โดยวิธี Western blot

ข. ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 โดยวิธี MTT proliferation assay

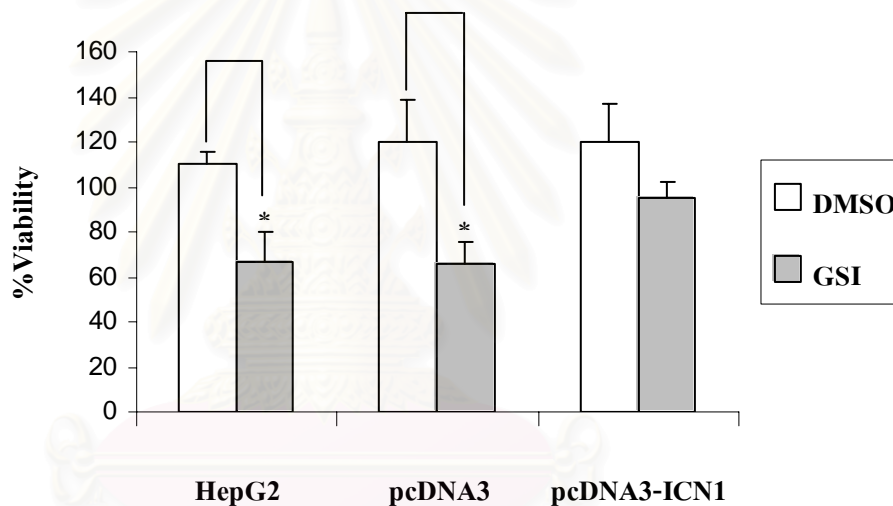
หมายเหตุ เครื่องหมาย T แสดงค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร

\* แสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ก.



ข.



รูปที่ 4.15 ผลของการแสดงออกเกินของ truncated Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 (transient and stable transfection) โดยใช้ Fugene6 reagent

ก. การแสดงออกของ Notch1 ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 วิเคราะห์โดยวิธี Western blot (transient transfection)

ข. ผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA3-ICN1 โดยวิธี MTT proliferation assay (stable transfection) หมายถึง เครื่องหมาย T แสดงค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร

\* แสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 5

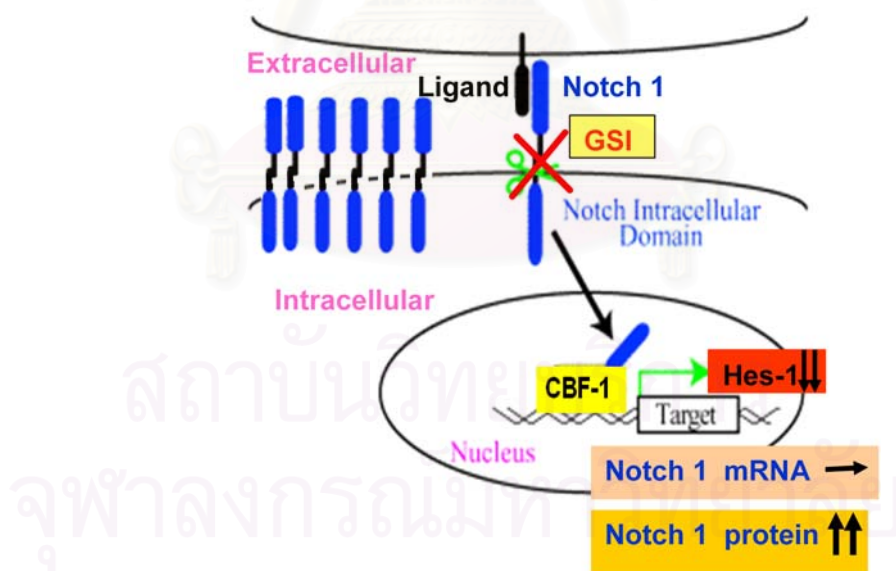
### วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของ GSI ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 6 ชนิด คือ SW620, Kato III, HepG2, BT474, A375 และ Jurkat พบว่า GSI สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Jurkat และ HepG2 ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ ทั้งหกเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของ Notch1 และ Jagged1 ในระดับที่แตกต่างกัน ยกเว้น BT474 ไม่มีการแสดงออกของ Jagged1 นอกจากนี้ Jurkat และ SW620 มีการแสดงออกของ cleaved Notch1 (active form) Jurkat และ HepG2 มีการแสดงออกของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Hes1* (ยีนเป้าหมายของ Notch), *Jagged1*, *Jagged2* และ *Dlk1* (Notch ligand) แต่ไม่มีการแสดงออกของ *Notch4* ซึ่งการแสดงออกของ *Notch1*, *Jagged1*, *Jagged2* และ *Dlk1* ใน Jurkat ได้ผลคล้ายกับรายงานการวิจัยของ Chiaramonte และคณะ (2005) ส่วนการแสดงออกของ *Notch3*, *Jagged1*, *Dlk1* และ *Hes1* ในเซลล์ HepG2 ได้ผลคล้ายกับรายงานการวิจัยของ Giovannini และคณะ (2006) และ GSI ไม่ได้ส่งผลให้ Jurkat และ HepG2 มีการตายแบบอะพอพโทซิส แสดงว่า GSI มีผลเพียงแคื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เท่านั้น เมื่อเซลล์ Jurkat และ HepG2 ได้รับ GSI เป็นเวลา 4 วัน พบว่าทั้งสองเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของยีน *Hes1* ลดลง ในขณะที่ *Notch1* คงที่ในเซลล์ไลน์ Jurkat และลดลงในเซลล์ไลน์ HepG2 และทั้งสองเซลล์ไลน์มีการแสดงออกของ Notch1 เพิ่มขึ้นในวันที่ 1-4 จึงสันนิษฐานว่าในเซลล์ Jurkat มีการสังเคราะห์ mRNA ของ *Notch1* ในระดับเท่าเดิมแต่ไม่สามารถทำงานได้เนื่องจาก GSI ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส Notch1 จึงไม่ถูกตัดให้สั้นลง หรือมี intracellular Notch1 (active form) ลดลง ทำให้ระดับการแสดงของ *Hes1* ลดลง และมีการสะสมของโปรตีน Notch1 บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้น แสดงว่าการแสดงออกของ *Notch1* ไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของวิถีสัญญาณ Notch ซึ่งอาจมีวิถีสัญญาณอื่นไปควบคุมการแสดงออกของ Notch1 (upregulation) ดังรูปที่ 5.1 ส่วนในเซลล์ไลน์ HepG2 สันนิษฐานว่าวิถีสัญญาณของ Notch1 ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ Notch1 เอง (autoregulation) จึงมีการสังเคราะห์ mRNA ของ *Hes1* และ *Notch1* ลดลงตามไปด้วย เนื่องจาก GSI ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีรีเทส Notch1 จึงไม่ถูกตัดให้สั้นลงหรือมี intracellular Notch1 ลดลง ทำให้ระดับการแสดงออกของ *Hes1* ลดลง และมีการสะสมของโปรตีน Notch1 บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 5.2 ผลการศึกษาข้างต้นสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Weng และคณะ (2003) พบว่า DEF-AA (compound E) ซึ่งเป็น GSI ตัวหนึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ T6E และมีการสะสมของโปรตีน Notch1 (ส่วนที่เหลือ

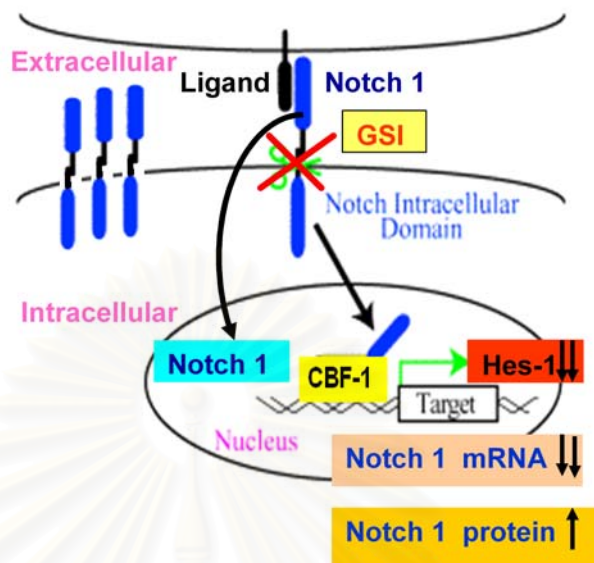




มีความจำเป็นที่จะต้องคัดกรองมะเร็งที่มีความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch ดังที่แสดงผลในงานวิจัยนี้ ในกลุ่มยีน Notch เองนั้นก็มียีนที่มีการแสดงออกเกินในเซลล์ไลน์มะเร็ง แต่การใช้ GSI นั้นจะกดวิถีสัญญาณทั้งหมด โดยไม่แยกแยะว่ามาจาก Notch ใด ดังนั้น เพื่อเป็นการศึกษาในรายละเอียดว่า Notch ใดมีหน้าที่หลักในกระบวนการเกิดมะเร็ง จำเป็นต้องใช้เทคนิคการลดการแสดงออกของยีนแบบจำเพาะ เช่น วิธี Small interfering RNA (siRNA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านการทำงานของ RNA เป็นต้น มาร่วมใช้ในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ควรทำการศึกษา Cell cycle analysis ของเซลล์ Jurkat และ HepG2 หลังจากได้รับ GSI โดยย้อมด้วยสารเรืองแสง เช่น propidium iodide แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Flow cytometry เพื่อบ่งบอกว่า GSI มีผลทำให้เซลล์มะเร็งทั้งสองเข้าสู่ระยะ  $G_0/G_1$  หรือไม่ เนื่องจากเซลล์ทั้งสองเมื่อได้รับ GSI ไม่ตายแต่หยุดการแบ่งตัว ดังมีรายงานว่าวิถีสัญญาณ Notch ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์หลายยีน เช่น cyclin D (Ronchini และ Capobianco, 2001) และ c-myc (Satoh และคณะ, 2004; Weng และคณะ, 2007)



รูปที่ 5.1 ไออะแกรมเสนอผลของ GSI ต่อวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ Jurkat



รูปที่ 5.2 ไดอะแกรมเสนอผลของ GSI ต่อวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ HepG2

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผลการทดลอง

1. GSI สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Jurkat และ HepG2 ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ โดยวิธี MTT proliferation assay
2. เซลล์ที่นำมาใช้ในงานวิจัย (SW620, Kato III, HepG2, BT474, A375 และ Jurkat) มีการแสดงออกของโปรตีน Notch1 และ Jagged1 ในระดับที่แตกต่างกัน ยกเว้น BT474 ไม่มีการแสดงออกของ Jagged1
3. Jurkat และ SW620 มีการแสดงออกของ cleaved Notch1
4. Jurkat และ HepG2 มีการส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ Notch อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจจะเป็นการส่งสัญญาณโดยใช้ลิแกนด์ที่มีการแสดงออกในเซลล์เหล่านี้ เพราะมีการแสดงออกของ mRNA ของ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Hes1*, *Jagged1*, *Jagged2* และ *Dlk1* แต่ไม่มีการแสดงออกของ *Notch4*
5. GSI มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Jurkat และ HepG2 โดยไม่ส่งผลให้มีการตายแบบอะพอโทซิส
6. เมื่อเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ได้รับ GSI แล้ววิถีสัญญาณ Notch ถูกกดส่งผลทำให้การแสดงออกของ *Hes1* ลดลงในระดับการถอดรหัส ส่วนการแสดงออกของ *Notch1* ในระดับ mRNA ในเซลล์ Jurkat นั้นไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในเซลล์ HepG2 มีระดับลดลงและทั้งสองเซลล์ไลน์มีการสะสมของโปรตีน Notch1 บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้น
7. การแสดงออกเกินของ truncated Notch1 สามารถช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มี GSI หรือ GSI สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ Jurkat และ HepG2 ผ่านการกดวิถีสัญญาณ Notch
8. วิถีสัญญาณ Notch มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งตับ

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษา Cell cycle analysis ของเซลล์ Jurkat และ HepG2 หลังจากได้รับ GSI โดยย้อมด้วยสารเรืองแสง เช่น propidium iodide แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Flow cytometry เพื่อบ่งบอกว่า GSI มีผลทำให้เซลล์มะเร็งทั้งสองเข้าสู่ระยะ  $G_0/G_1$  หรือไม่ เนื่องจากเซลล์ทั้งสองเมื่อได้รับ GSI ไม่ตายแต่หยุดการแบ่งตัว

2. ทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีน Notch และยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch อื่นๆ นอกเหนือจากที่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ เพื่อเป็นดัชนีบ่งบอกถึงแอกติวิตีของวิถีสัญญาณนี้ เช่น Hes5 และ Deltex1 เป็นต้น

3. ใช้เทคนิคการลดการแสดงออกของยีนแบบจำเพาะ เช่น วิธี siRNA ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการแสดงออกของ mRNA มาใช้เพื่อศึกษาในรายละเอียดว่า Notch ใดมีหน้าที่หลักในกระบวนการเกิดมะเร็งต่อไปในอนาคต โดยนำ small interfering RNA ของ Notch แต่ละชนิดเข้าสู่เซลล์ Jurkat และ HepG2 นำไปทดสอบด้วยวิธี MTT proliferation assay เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์จะมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ โดยกลไกการทำงานของ siRNA คือในเซลล์จะมีการทำงานของเอนไซม์ dicer เพื่อย่อยให้เป็น siRNA ซึ่งจะจับกับ RNA-induced silencing complex (RISC) complex ส่งผลให้ siRNA กลายเป็น single strand siRNA ซึ่งจะจับกับ sense-strand mRNA ที่สร้างขึ้นในเซลล์ ทำให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ slicer ส่งผลให้การแสดงออกของ Notch ลดลง

4. ทำการศึกษาผลของ GSI และศึกษาถึงประสิทธิภาพ ความเป็นพิษและผลข้างเคียงของ GSI ในระดับสัตว์ทดลอง (in vivo) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้ในมนุษย์ต่อไป โดยทำการฉีดเซลล์ไลน์มะเร็ง Jurkat หรือ HepG2 เข้าไปได้ผิวหนังของหนูทดลอง Nude mice เพื่อปลูกก้อนมะเร็ง หลังจากนั้นฉีด GSI แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนมะเร็ง ซึ่งจะมีขนาดเล็กลงเนื่องจาก GSI ไปยับยั้งการทำงานของวิถีสัญญาณ Notch

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์. 2547. เซลล์เกาะผิว เซลล์แขวนลอย และการถ่ายเลี้ยงเซลล์. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ : 47-62. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- อภิวัฒน์ มุทิรางกูร. 2546. อณูพันธุศาสตร์ของมะเร็ง. เวชศาสตร์โมเลกุล สุรางค์ นุชประยูร จินตนา จิรถาวร และ ณีฎฐิยา หิรัญกาญจน์ (บรรณาธิการ) : 177-198. กรุงเทพมหานคร.

### ภาษาอังกฤษ

- Alberts, B. 2002. Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> ed. New York. Garland Sciences.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. 1999. Notch signaling : cell fate control and signal integration in development. Science. **284**: 770-776.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidan, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4<sup>rd</sup> ed. New York. John Willey & Sons.
- Berezovska, O., Jack, C., McLean, P., Aster, J. C., Hicks, C., Xia, W., Wolfe, M. S., Kimberly, W. T., Weinmaster, G., Selkoe, D. J. and Hyman, B. T. 2000. Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair Notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of Notch1 signaling. J. Neurochem. **75**: 583-593.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumanò, A., Roux, P., Black, R. A. and Israel, A. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol. Cell. **5**: 207-216.
- Chiaromonte, R., Basile, A., Tassi, E., Calzavara, E., Cecchinato, V., Rossi, V., Biondi, A. and Comi, P. 2005. A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. Cancer Lett. **219**:113-120.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. and Selko, D. J. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. Nature. **360**: 672-674.

- Curry, C. L., Reed, L. L., Golde, T. E., Miele, L., Nickoloff, B. J. and Foreman, K.E. 2005. Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. Oncogene. **24**: 6333-6344.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. and Kopan, R. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature. **398**: 518-522.
- Diederich, R. J., Matsuno, K., Hing, H. and Artavanis-Tsakonas, S. 1994. Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway. Development. **120**: 473-481.
- Dievart, A., Beaulieu, N. and Jolicoeur, P. 1999. Involvement of Notch1 in the development of Mouse mammary tumors. Oncogene. **18**: 5973-5981.
- Druker, B. J., Sawyers C. L., Kantarjian, H., Resta. D. J., Reese, S. F., Ford, J.M., Capdeville, R. and Talpaz, M. 2001. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N. Engl. J. Med. **344**: 1038-1042.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S.D. and Sklar, J. 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell. **66**: 649-661.
- Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S. 1994. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. Cell. **79**: 273-282.
- Gallahan, D. and Callahan, R. 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). Oncogene. **14**: 1883-1890.
- Giovannini, C., Lacchini, M., Gramantieri, L., Chieco, P. and Bolondi, L. 2006. Notch3 intracellular domain accumulates in HepG2 cell line. Anticancer Res. **26**: 2123-2127.
- Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C.D., Simard, C., Kozak, C. A. and Jolicoeur, P. 1996. Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTV<sup>D</sup>/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. Genes. Dev. **10**: 1930-1944.

- Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Hansen, S., Benson, M., Stoeck, J., Hatton, B. A., Russell, T. L., Ellenbogen, R. G., Bernstein, I. D., Beachy, P. A. & Olson, J. M. 2004. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. Cancer Res. **64**, 7794-7800.
- Haluska, FG., Tsujimoto, Y. and Croce C. M. 1987. Oncogene activation by chromosome translocation in human malignancy. Annu. Rev. Genet. **21**: 321-345.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. Cell. **100**: 57-50.
- Haruki, N., Kawaguchi, K. S., Eichenberger, S., Massion, P. P., Olson, S., Gonzalez, A., Carbone D. P. and Dang, T. P. 2005. Dominant Negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and growth of human lung cancer. Cancer Res. **65**: 3555-3561.
- Hoemann, C. D., Beaulieu, N., Girard, L., Rebai, S. N. and Jolicoeur, P. 2000. Two distinct *Notch1* mutant alleles are involved in the induction of T-cell leukemia in c-myc transgenic mice. Mol. Cell. Biol. **20**: 3831-3842.
- Hopfer, O., Zwahlen, D., Fey, M. F. and Aebi, S. 2005. The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas. Br. J. Cancer. **93**: 709-718.
- Ikeuchi, T. and Sisodia, S. S. 2003. The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage. J. Biol. Chem. **278**: 7751-7754.
- Imatani, A. and Callahan, R. 2000. Identification of a novel *Notch4/int-3* RNA species encoding an activated gene product in certain human tumor cell lines. Oncogene. **19**: 223-231.
- Jones, D. L., Thompson, D. A. and Munger K. 1997. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. Virology. **239**: 97-107.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Tomita, K. 2000. The bHLH gene *Hes1* regulates differentiation of multiple cell types. Mol. Cells. **10**: 1-7.
- Kavamata, Y., Mitsuhashi, A., Unno, Y., Kado, S., Shino, Y., Uesugi, K., Eguchi, O., Ishii, J., Seki, K., Sekiya, S. and Shirasawa, H. 2002. HPV 16-E6-mediated degradation of intrinsic p53 is compensated by upregulation of p53 gene expression in normal cervical keratinocyte. Int. J. Oncol. **21**: 561-567.

- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. 2003. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **100**: 6382-6387.
- Kuroda, E., Sugiura, T., Okada, K., Zeki, K. and Yamashita, U. 2001. Prostaglandin E2 up-regulates macrophage-derived chemokine production but suppresses IFN-inducible protein-10 production by APC. J. Immunol. **166**: 1650-8.
- Lardelli, M., Dahlstrand, J. and Lendahl U. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. Mech. Dev. **46**: 123-136.
- La Rosee, P., O'Dwyer, M. E., and Druker, B. J. 2002. Insights from pre-clinical studies for new combination. treatment regimens with the Bcr-Abl kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec/Glivec) in chronic myelogenous leukemia: a translational perspective. Leukemia. **16**: 1213-1219.
- Larsson, C., Lardelli, M., White, I. and Lendahl, U. 1994. The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. Genomics. **24**: 253-258.
- Lee, H. J., Jung, K. M., Haung, Y. Z., Bennett, L. B., Lee, J. S., Mei, L. and Kim, T. W. 2002. Presenilin-dependent  $\gamma$ -secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. J. Biol Chem. **277**: 6318-6323.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 8108-8112.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarnier, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. and Robakis, N. K. 2002. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. Embo. J. **21**: 1948-1956.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S. 1995. Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development. **121**: 2633-2644.



- Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T. and Tomita, T. 2006. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). J. Biol. Chem. **281**: 14670-14676.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Meth. **65**: 55-63
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J. and Kopan, R. 2000. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol. Cell. **5**: 197-206.
- Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E. and Carpenter, G. 2001. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. Science. **294**: 2179-2181.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mil, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P. and Radtke, F. 2003. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. Nat. Genet. **33**: 416-421.
- Nickoloff, B. J., Osborne, B. A. and Miele, L. 2003. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. Oncogene. **22**: 6598-6608.
- Nijjar, S. S., Crosby, H. A., Wallace, L., Hubscher, S. G. and Strain, A. J. 2001. Notch receptor expression in adult human liver: a possible role in bile duct formation and hepatic neovascularization. Hepatology. **34**: 1184-1192.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Murakami, D., Sasayama, T., Araki, N., Miki, T., Wong, A. J. and Saya, H. 2001. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. J. Cell. Biol. **155**: 755-762.
- O'Neil, J., Calvo, J., McKenna, K., Krishnamoorthy, V., Aster, J. C., Bassing, C. H., Alt, F. W., Kelliher, M. and Look, T. 2006. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. Blood. **107**: 781-785.

- Paris, D., Quadors, A., Patel, N., DelleDonne, A., Humphrey, J. and Mullan, M. 2005. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma inhibitors. Eur. J. Pharm. **514**: 1-15.
- Parr, C., Watkins, G. and Jiang, W. G. 2004. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. Int. J. Mol. Med. **14**: 779-786.
- Radtke, F., Wilson A., Mancini, S. J. C. and MacDonald, H. R. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nat. Immunol. **5**: 247-253.
- Rangarajan, A., Syal, R., Selvarajah, S., Chakrabarti, O., Sarin, A., and Krishna, S. 2001. Activated Notch1 signaling cooperates with Papillomavirus in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/AKT. Virology. **286**: 23-30.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science. **234**: 364-368.
- Ronchini, C. and Capobianco, A. J. 2001. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity By Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). Mol. Cell Biol. **21**: 5925-5934.
- Sambook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Satoh, Y., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Sugahara, H., Mizuki, M., Shibayama, H., Ishiko, E., Ishiko, J., Nakajima, K. and Kanakura, Y. 2004. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. J. Biol. Chem. **279**: 24986-93.
- Saxena, M.T., Schroeter, E.H., Mumm, J. S. and Kopan, R. 2001. Murine notch homologs (N1-4) Undergo presenilin-dependent proteolysis. J. Biol. Chem. **276**: 40268-40273.
- Schwab, M. 1999. Oncogene amplification in solid tumors. Semin. Cancer Biol. **9**: 319-325.
- Selkoe, D. and Kopan, R. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. Annu. Rev. Neurosci. **26**: 565-597.

- Sjölund, J., Manetopoulos, C., Stockhausen, M. T. and Axelson, H. 2005. The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. Eur. J. Cancer. **41**: 2620-2629.
- Sriuranpong, V., Borges, M. W., Ravi, R. K., Arnold, D. R., Nelkin, B. D., Baylin, S. B., and Ball, D. W. 2001. Notch signaling induce cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. Cancer Res. **61**: 3200-3205.
- Struhl, G. and Adachi, A. 1998. Nuclear access and action of notch in vivo. Cell. **93**: 649-60.
- Sugaya, K., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Fukagawa, T., Nakamura, Y., Ando, A., Inoko, H., Ikemura, T. and Mita K. 1997. Gene organization of human NOTCH4 and (CTG)<sub>n</sub> polymorphism in this human counterpart gene of mouse proto-oncogene Int3. Gene. **189**: 235-244.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T. 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). Curr. Biol. **5**: 1416-1423.
- Talora, C., Sgroi, D. C., Crum, C. P. and Dotto, G. P. 2002. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. Genes Dev. **16**: 2252-2263.
- Tian, G., Ghanekar, S. V., Aharony, D., Shenvi, A. B., Jacobs, R. T., Liu, X. and Greenberg, B. D. 2003. The mechanism of gamma-secretase: multiple inhibitor binding sites for transition state analogs and small molecule inhibitors. J. Biol. Chem. **278**: 28968-28975.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D. and Kitajewski, J. 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. Development. **122**: 2251-2259.
- Weng, A. P., Nam, Y., Wolfe, M. S., Pear, W. S., Griffin J. D., Blacklow, S. C. and Aster, J. C. 2003. Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of Notch signaling. Mol. Cell Biol. **23**: 655-664.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t. Silverman, L. B, Sanchez-Irizarry, J., Blacklow, S. C., Look, A. T. and Aster, J. C. 2004. Activating mutation of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. **306**: 269-271.

- Weng, A. P., Millholland, J. M., Ohtani, Y. Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Bianco, C. D., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M. S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S.C., Pear, W. and Aster, J. C. 2007. *c-Myc* is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Genes Dev. **20**: 2096-2109.
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. and Griffin, J. D. 2000. MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. Nat. Genet. **26**: 484-489.
- Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller C, M., Carcangius, M. L. and Artanvisn Tsakonas, S. 1995. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 6414-6418.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**ภาคผนวก**

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

#### 1. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผงสำเร็จรูป	10.4 กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1N ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ

#### 2. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 % (working reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)	90 มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
Gentamycin (100 mg/ml)	100 ไมโครลิตร
HEPES	1 มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1 มิลลิลิตร

#### 3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (working reagent)	9 มิลลิลิตร
DMSO	1 มิลลิลิตร

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth) (Sambrook และ Russell, 2001)

ทริปโตเนน (tryptone)	10 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 มิลลิลิตร ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) (Sambrook และ Russell, 2001)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เต็มวุ้น (Bacto agar) จำนวน 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียา Ampicillin (LBA agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิ ประมาณ 55°C เติม Ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ Free) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaHPO <sub>4</sub>	1.44	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS (สำหรับทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น)	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากัน กรองผ่านชุดกรองลำรีจรูปปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นฟอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมถุงมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

#### 3. สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

นำ volume metric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม ไอโซโพรพานอล จำนวน 80 มิลลิลิตร เติม HCl 0.331 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยไอโซโพรพานอล เก็บที่อุณหภูมิห้อง



#### 4. สารละลาย 100 mM DAPT

ละลาย DAPT จำนวน 5 มิลลิกรัม ใน DMSO 115.7 ไมโครลิตร ให้ละลายจนหมด (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 10 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

#### 5. สารละลาย 10 mM EGTA

ละลาย EGTA จำนวน 0.11 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$

#### 6. สารละลาย 1 M Dithiothreitol (DTT)

ละลาย DTT จำนวน 3.09 กรัม ใน Sodium acetate ความเข้มข้น 0.01 M pH 5.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง (filter disc) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ์ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 7. สารละลาย 500 mM Tris-HCl (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2)

ละลาย Tris-HCl จำนวน 7.88 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 8. สารละลาย 1.4 M KCl

ละลาย KCl จำนวน 10.437 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 9. สารละลาย 25 mM MgCl

ละลาย MgCl จำนวน 0.508 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย  
กระบอกตวงจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปทิ้งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ  
ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 10. สารละลาย Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน

10mM EGTA	1 มิลลิลิตร
10mM DTT	1 มิลลิลิตร
500mM Tris-HCl (pH 7.2)	1 มิลลิลิตร
1.4 M KCl	1 มิลลิลิตร
25mM MgCl	1 มิลลิลิตร
ddH <sub>2</sub> O	5 มิลลิลิตร

### 11. สารละลาย Buffer B

Buffer A	990 ไมโครลิตร
1% Nonidet p-40	10 ไมโครลิตร

### 12. สารละลาย มาตรฐาน BSA 10 mg/ml

BSA	0.02 กรัม
ddH <sub>2</sub> O	2 มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวซ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 500 ไมโครลิตร  
เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

### 13. สารละลาย BCA<sup>TM</sup> protein assay

สารละลาย A 50 ส่วน

สารละลาย B 1 ส่วน

### 14. สารละลาย 1.5M Tris ความเป็นกรด-ด่าง 8.8

ละลาย trisma base จำนวน 90.855 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 8.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 15. สารละลาย 1M Tris ความเป็นกรด-ด่าง 6.8

ละลาย trisma base จำนวน 12.114 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 6.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 16. สารละลาย 10% SDS

ละลาย SDS (Sodium dodecyl sulfate) จำนวน 5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 50 มิลลิลิตร

### 17. สารละลาย 10% Ammonium persulfate (APS)

ละลาย Ammonium persulfate จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

**18. 8% Separating gel**

ddH <sub>2</sub> O	5.3	มิลลิลิตร
40% Acrylamide	2.0	มิลลิลิตร
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% APS	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	0.006	มิลลิลิตร

**19. 5% stacking gel**

ddH <sub>2</sub> O	1.482	มิลลิลิตร
40% Acrylamide	0.248	มิลลิลิตร
1.5 M Tris pH 6.8	0.25	มิลลิลิตร
10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
10% APS	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร

**20. สารละลาย 5x Running buffer**

trisma base	15.1	กรัม
glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

**21. สารละลาย 2x laemmli buffer**

10% SD	4 มิลลิลิตร
Glycerol 87%	2.29 มิลลิลิตร
1.0 M Tris pH 6.8	1 มิลลิลิตร
ddH <sub>2</sub> O	2.71 มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001 กรัม

**22. สารละลาย Staining buffer**

$\beta$ -mercapto ethanol	100 ไมโครลิตร
2x laemmli buffer	900 ไมโครลิตร

**23. สารละลาย Transfer buffer**

Glycine	2.9 กรัม
Trisma base	15.1 กรัม
SDS	0.37 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 700 มิลลิลิตร เติมเมทานอลสัมบูรณ์  
จำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่  
อุณหภูมิ 121°C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

**24. สารละลาย 10x Phosphate buffer saline (PBS)**

NaCl	80.0 กรัม
KCl	2.0 กรัม
NaHPO <sub>4</sub>	14.4 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 25. สารละลาย Phosphate buffer saline tween20 (PBST)

1x Phosphate buffer	1 ลิตร
Tween 20	0.5 มิลลิลิตร

#### 26. สารละลาย Blocking solution (PBST in 3% non-fat dry milk)

PBST	200 มิลลิลิตร
non fat dry milk	6 กรัม

#### 27. ECL Western blot reagent

สารละลาย 1	2 มิลลิลิตร
สารละลาย 2	2 มิลลิลิตร

#### 28. น้ำยาล้างฟิล์ม

Developer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน
Fixer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน

#### 29. น้ำปลอด RNAase (DEPC water)

เติมสารละลาย Diethylpyrocarbonate (DEPC) 10 ไมโครลิตรลงในน้ำ HPLC ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 30. สารละลาย 75% Ethanol in DEPC water

Absolute Ethanol	7.5 มิลลิลิตร
DEPC water	2.5 มิลลิลิตร

### 31. สารละลาย 50x TAE buffer

Tris base acetate	48.4 กรัม
Garcial acetic acid	11.42 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปตั้งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 32. 2% Agarose gel

สารละลาย 1x TAE buffer	20 มิลลิลิตร
Agarose gel	0.4 กรัม

### 33. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

### 34. สารละลาย Ampicillin 50 mg/ml

ละลาย Ampicillin จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจำนวน 10 มิลลิลิตรให้ละลายจนหมด (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตรเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

**35. สารละลาย Gentamycin 100 mg/ml**

ละลาย Gentamycin จำนวน 1 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจำนวน 10 มิลลิลิตร ให้ละลายจนหมด (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

**36. สารละลาย G418 50 mg/ml**

ละลาย G418 จำนวน 1 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจำนวน 20 มิลลิลิตร ให้ละลายจนหมด (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสายพิน สุวรรณจुณี เกิดวันที่ 7 เมษายน พ.ศ 2516 ที่จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2537 เข้ารับราชการ ณ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี สังกัดกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2540 และศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

### ผลงานทางวิชาการ

Suwanjune, S. and Palaga, T. Effects of gamma secretase inhibitor on proliferation of human cancer cell lines. The 16<sup>th</sup> National Symposium on Graduate Research, 13-24 October 2006, Mahitala Dhibesra building Chulalongkorn University, Bangkok Thailand. p.258

Suwanjune, S. and Palaga, T. Effects of gamma secretase inhibitor on proliferation of human cancer cell lines. 1<sup>st</sup> Biochemistry and Molecular Biology (BMB) conference: Biochemistry and Molecular Biology for the Intergration of life. 26-27 April 2007, Mahamakut building Chulalongkorn University, Bangkok Thailand. p.78

### ทุนวิจัย

ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2548 บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย