

การนำส่งเอกสารอิเล็กทรอนิกส์เพื่อป้องกันการแสดงออกของอคติ
ของไวรัสฮิวแมนปาปิโลมาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นายภากร สนิทรัมย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

DELIVERY OF siRNA THROUGH NANOPOLYPLEX CARRIER FOR SILENCING THE
EXPRESSION OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS ONCOGENES IN
HUMAN CERVICAL CANCER CELLS

Mr. Phakorn Sanitrum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอโดยตัวพานาโนโพลีเพล็กซ์
เพื่อยับยั้งการแสดงออกของโคเอดของไวรัสฮีวี
แมนปาปีโลมาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

โดย

นายภากร สนิทรัมย์

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. ณิชฎีกา แสงกฤษ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. ณิชฎีกา แสงกฤษ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต)

ภาคร สนิทรมย์ : การนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอโดยตัวพานาโนโพลีเพล็กซ์เพื่อยับยั้งการ
แสดงออกของอองโคยีนของไวรัสฮิวแมนปาปิโลมาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก.
(Delivery of siRNA through nanopolyplex carrier for silencing the expression of
Human Papilloma Virus oncogenes in human cervical cancer cells) อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.ณัฐฉิภา
แสงกฤษ, 87 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนประจุบวก Polyethyleneimine-
Introduced Chitosan Shell/Poly (methyl Methacrylate) Core Nanoparticles (ตัวพา CS-PEI)
สำหรับระบบนำส่ง siRNA โดยเบื้องต้นจะทดลองนำส่ง DNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อน
จากนั้นจึงนำส่ง siRNA เพื่อประเมินผลยับยั้งการแสดงออกของอองโคยีนของเชื้อ Human
papillomavirus (HPV) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa สำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติทาง
เคมีกายภาพของตัวพา CS-PEI จะศึกษา ขนาด, ประจุ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อทำจับ
กับ DNA และ siRNA (CS-PEI/DNA, CS-PEI/siRNA) ที่อัตราส่วนโมลของหมู่เอมีน (N) บนตัว
พา ต่อหมู่ฟอสเฟต (P) บนกรดนิวคลีอิก (N/P) ต่าง ๆ ผลที่ได้พบว่า CS-PEI/DNA และ CS-
PEI/siRNA มีขนาดประมาณ 300-400 และ 400-500 นาโนเมตร โดยความเป็นประจุบวกของ
complex จะเพิ่มตามปริมาณของตัวพา CS-PEI และผลจากกล้อง Atomic force microscopy
(AFM) พบลักษณะของ complex เป็นทรงกลมขนาดเล็ก มีการกระจายตัวที่ดี เมื่อทดสอบ
ความสามารถในการจับกับ DNA และ siRNA โดยการทำให้ Gel retardation พบว่าตัวพา CS-PEI
จับได้อย่างสมบูรณ์ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 นอกจากนี้ตัวพาดังกล่าวให้ผลการนำส่ง DNA
เข้าสู่เซลล์สูงสุด และเมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่ง siRNA ให้ผลยับยั้งการแสดงออกของอองโคยีน
E6 และ E7 ที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบเพื่อยืนยันการเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก
ด้วยภาพจากกล้อง differential interference contrast (DIC) confocal จากผลการทดลองที่ได้
พบว่าตัวพา CS-PEI สามารถนำส่ง siRNA เพื่อลดการแสดงออกของอองโคยีนดังกล่าวได้

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....ลายมือชื่อ.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5377206437 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : HUMAN CERVICAL CANCER CELL LINE/ POLYETHYLENEIMINE/
CHITOSAN / CORE-SHELL NANOPARTICLE/ DNA DELIVERY/ siRNA DELIVERY

PHAKORN SANITRUM : DELIVERY OF siRNA THROUGH NANOPOLYPLEX
CARRIER FOR SILENCING THE EXPRESSION OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS
ONCOGENES IN HUMAN CERVICAL CANCER CELLS. ADVISOR : ASST. PROF.
TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., CO-ADVISOR : NATTIKA SAENGRIT, Ph.D.,
87 pp.

We examined the potential of nanoparticle – polyethyleneimine-introduced chitosan shell/poly (methyl methacrylate) core nanoparticles (CS-PEI) for siRNA delivery. Initially, DNA delivery was performed to validate the capability of CS-PEI in the human cervical cancer cell line. siRNA delivery were subsequently carried out to evaluate the silencing effect on targeted oncogenes. Physicochemical properties including size, zeta potential and morphology of CS-PEI/DNA and CS-PEI/siRNA complexes, were analyzed. The surface charges and sizes of the complexes were observed at different N/P ratios. The sizes of the CS-PEI/DNA and CS-PEI/siRNA were approximately 300–400 and 400–500 nm, respectively. Complexes were positively charged depending on the amount of added CS-PEI. AFM images revealed the mono-dispersed and spherical shapes of the complexes. Gel retardation assay confirmed that CS-PEI nanoparticles completely formed complexes with DNA and siRNA at a N/P ratio of 1.6. For DNA transfection, CS-PEI provided the highest transfection result. Localization of siRNA delivered through CS-PEI was confirmed by DIC confocal imaging. The silencing effect of siRNA specific to HPV 16 E6/E7 oncogene was examined at 18 and 24 h post-transfection. The results demonstrated the capacity of CS-PEI to suppress the expression of HVP oncogenes.

Department : Clinical Chemistry..... Student's Signature.....

Field of Study : Clinical Biochemistry and Molecular Medicine..... Advisor's Signature.....

Academic Year : 2012..... Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และ ดร.ณัฐจิภา แสงกฤษฎ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาให้คำแนะนำชี้แนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ตลอดจนให้มุมมองและข้อคิดในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์, ผศ.ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล และ รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและโครงการพัฒนา ศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโนเมดิคัลเทคโนโลยีที่กรุณาให้ใช้สถานที่, วัสดุอุปกรณ์ครุภัณฑ์ วิจัยและเครื่องมือต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology, TGIST) สัญญารับทุนเลขที่ 01-53-054 ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษารวมถึงทุนวิจัยต่าง ๆ ตลอดช่วงการ ศึกษาวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 มะเร็งปากมดลูกและเชื้อ Human papillomavirus.....	6
2.2 กลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูก.....	9
2.3 การตรวจคัดกรองและวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูก.....	10
2.4 การรักษามะเร็งปากมดลูก.....	14
2.5 กระบวนการ RNA interference (RNAi).....	16
2.6 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทำงานของ RNAi.....	17
2.7 กลไกการทำงานของ RNAi.....	19
2.8 ระบบนำส่งสำหรับยีนบำบัด.....	22

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	32
3.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	
- เครื่องมือและอุปกรณ์	32
- สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	34
- เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง	36
- พลาสมิดและตัวพาสำหรับนำส่งยีน	38
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	41
3.2.1 เตรียมตัวพา CS-PEI, พลาสมิด pGL3-CMV และ siRNA	41
3.2.2 ตรวจสอบความสามารถในการจับ DNA และ siRNA และคุณลักษณะทางเคมี กายภาพของตัวพา CS-PEI	
- ตรวจสอบความสามารถของตัวพา CS-PEI ในการจับกับ DNA	41
และ siRNA โดยวิธี Gel retardation assay	
- ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ CS-PEI/DNA	42
และ CS-PEI/siRNA complex โดย Atomic force microscope (AFM)	
- ตรวจสอบขนาดและค่าประจุพื้นผิวของ complex	42
ด้วยการวัด Zetasizer	
- ตรวจสอบร้อยละของการจับ siRNA ของตัวพา CS-PEI	43
3.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวพา CS-PEI	
- ประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยตรวจการแสดงออกของ Luciferase ..	44
- ตรวจสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก	45
โดยวิธี MTT assay	
3.2.4 ตรวจสอบผลการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก	
- ตรวจสอบผลการยับยั้งการแสดงออก ของยีน HPV E6/E7	46
ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี RT-PCR	
- ตรวจสอบผลการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ด้วย	49
วิธี Confocal laser scanning microscopy	
3.3 การวิเคราะห์ผล	51

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	52
4.1 ผลการตรวจสอบคุณลักษณะและคุณสมบัติของตัวพา CS-PEI	
- ผลการตรวจสอบความสามารถในการจับกัน.....	52
ของตัวพา CS-PEI กับ DNA และ siRNA โดยวิธี Gel retardation assay	
- ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ CS-PEI/DNA	54
และ CS-PEI/siRNA complex โดย Atomic force microscope (AFM)	
- ผลการตรวจสอบขนาดและค่าประจุพื้นผิวของ CS-PEI/DNA และ	55
CS-PEI/siRNA complex ด้วยการวัด Zetasizer	
- การวิเคราะห์ความสามารถในการจับ siRNA เชนปริมาณ.....	59
4.2 ผลการทดสอบการนำส่งยีนและความเป็นพิษด้วยตัวพา CS-PEI	
- ผลการประเมินประสิทธิภาพการนำส่งโดยการวัดสัญญาณ Luciferase	60
- ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งที่มีต่อเซลล์.....	63
มะเร็งปากมดลูกโดยวิธี MTT assay	
4.3 ผลการตรวจสอบผลการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก	
- การยืนยันการเข้าสู่เซลล์ (Cellular internalization) ของ	66
CS-PEI/siRNA complex	
- ผลการตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA	68
ของยีน HPV E6/E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยวิธี RT-PCR	
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	70
5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	70
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	73
รายการอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก.....	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการกำจัด DNA จากสิ่งตัวอย่าง.....	48
3.2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการทำ RT-PCR.....	48
3.3 Primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR.....	49
3.4 ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการติดฉลาก siRNA ด้วยสี Rhodamine.....	50
4.1 ค่าขนาดและประจุของตัวพา CS-PEI และ complex ระหว่าง CS-PEI กับ DNA (pGL3-CMV) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6, 4, และ 8	57
4.2 ค่าขนาดและประจุของ complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 และ 4	58
4.3 ความสามารถในการจับ siRNA ของ CS-PEI ในเชิงปริมาณ.....	59

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	7
2.2	10
2.3	11
2.4	19
2.5	20
2.6	25
2.7	26
2.8	28
2.9	29
2.10	30
3.1	36
3.2	37
3.3	37
3.4	38
3.5	39
<p>ของเชื้อ HPV โดยส่วนที่มีการคัดลอกรหัสจะแทนด้วยรูปสี่เหลี่ยมทึบและส่วนของ Intron จะแทนด้วยจุดประ (ภาพ ก), แสดงตำแหน่ง sequence 10 (นิวคลีโอไทด์ที่ 123-141) ของยีน HPV 16E6 ซึ่งเป็นบริเวณที่จำเพาะกับ siRNA (ภาพ ข)</p>	
3.6	40
3.7	40
3.8	44
4.1	53
<p>จับกับ DNA (pGL3-CMV) และ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ ดังระบุ</p>	
4.2	54
<p>CS-PEI กับ DNA (pGL3-CMV) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 และ 4</p>	

ภาพที่	หน้า
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวพา CS-PEI และ Complex ระหว่าง CS-PEI กับ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6	55
4.4 ค่าขนาดและประจุของตัวพา CS-PEI และ complex ระหว่าง CS-PEI กับ DNA (pGL3-CMV) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6, 4, และ 8	56
4.5 ค่าขนาดและประจุของ complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6 และ 4	58
4.6 ปริมาณสัญญาณ Luciferase ของเซลล์ชนิด SiHa เมื่อนำ ส่งพลาสมิด pGL3-CMV โดยตัวพา CS-PEI ที่ N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และเซลล์เปล่า ตามลำดับ	61
4.7 ปริมาณสัญญาณ Luciferase ของเซลล์ชนิด HeLa เมื่อนำ ส่งพลาสมิด pGL3-CMV โดยตัวพา CS-PEI ที่ N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และเซลล์เปล่า ตามลำดับ	61
4.8 ปริมาณสัญญาณ Luciferase ของเซลล์ชนิด C33A เมื่อนำ ส่งพลาสมิด pGL3-CMV โดยตัวพา CS-PEI ที่ N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และเซลล์เปล่า ตามลำดับ	62
4.9 ร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SiHa (% Cell viability) เมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และกลุ่มเซลล์ตามลำดับ	64
4.10 ร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HeLa (% Cell viability) เมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และกลุ่มเซลล์ตามลำดับ	64

ภาพที่	หน้า
4.11 ร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ C33A (% Cell viability) เมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และกลุ่มเซลล์ตามลำดับ	65
4.12 DIC confocal imaging แสดงผลการตรวจสอบการนำส่ง siRNA ที่..... ติดฉลากด้วยสี Rhodamine (Rho-siRNA) ด้วยตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วนของ CS-PEI/Rho-siRNA N/P เท่ากับ 1.6 หลังการนำส่งเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นิวเคลียส ของเซลล์ SiHa ย้อมสี Hoechst	67
4.13 ผลการทำ Z-stack ของเซลล์ SiHa หลังการนำส่ง 18 ชั่วโมง ด้วย CS-PEI/Rho-siRNA ที่ N/P 1.6 ภาพได้จากการยิงแสงเลเซอร์ตัดเซลล์ออกเป็น 7 ชั้น	67
4.14 Semi-quantitative RT-PCR แสดงการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ใน SiHa ที่ผ่านการถ่ายโอน siRNA 18 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่าง เซลล์ที่ถ่ายโอนด้วย naked siRNA (1 µg), Lipofectamine 2000™/siRNA lipoplex และ CS-PEI/siRNA complex, * = ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ค่าระดับ นัยสำคัญ 0.05 (p< 0.05)	69

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Human papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสที่มี DNA สายคู่บางชนิดสามารถก่อโรคได้ โดยทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อจนก่อให้เกิดหูด (Warts) หรือชักนำให้เกิดมะเร็งได้ [1] การติดเชื้อ HPV กลุ่มสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูง (High-risk HPV) จะก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 16 และ 18 เป็นต้น [2] นอกจากนี้ไวรัสดังกล่าวยังทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณปากมดลูก โดยจะติดต่อเข้าสู่ร่างกายเป็นส่วนใหญ่วางเพศสัมพันธ์

ปัจจุบันการรักษามะเร็งปากมดลูกนั้นอาศัยวิธีการผ่าตัด, การบำบัดด้วยรังสี และการใช้สารเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีไหนที่ให้ผลการรักษาอย่างสมบูรณ์แบบ ในบางครั้งต้องรักษาด้วยวิธีการดังกล่าวประกอบกัน ซึ่งวิธีการให้เคมีบำบัดหรือการฉายรังสีรักษานั้นส่งผลเสีย ทำให้เซลล์เป็นพิษได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณและระยะเวลาในการรับรังสี หรือความไวของเนื้อเยื่อปกติต่อการทำเคมีบำบัด ดังนั้นการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมจะมีผลดีต่อการรักษามะเร็งดังกล่าวได้ [3]

จากการที่นักวิจัยค้นพบกลไกการทำงานของกระบวนการ RNA interference (RNAi) ปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะนำ RNAi มาใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูก ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีนไวรัสที่เข้ารหัสสังเคราะห์ HPV E6 และ/หรือ E7 oncoproteins [4, 5] เพราะหากโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติบริเวณปากมดลูก (Cervical epithelial cell) กลายเป็นมะเร็งปากมดลูก (HPV positive cervical cancer cell) [6] ในกระบวนการก่อมะเร็ง E7 oncoprotein จะมีบทบาทเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วโดยควบคุมไม่ได้ [7] รวมถึง E6 oncoprotein ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งกระบวนการ Apoptosis ทำให้เซลล์ปกติที่ได้รับ ความเสียหายหรือมีการเปลี่ยนรูปร่างไม่ถูกทำลายและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้จนก่อให้เกิด เซลล์มะเร็งขึ้นในที่สุด [8]

ประสิทธิภาพในการทำงานของกระบวนการ RNAi นั้นขึ้นกับระบบที่ใช้ในการนำส่ง Small interfering RNA (siRNA) อย่างไรก็ตามการนำส่งดังกล่าวยังคงมีปัญหาล้าภัยกับการนำส่งเพื่อทำยีนบำบัด (Gene therapy) กล่าวคือเมื่อ siRNA ถูกนำส่งเข้าสู่ร่างกายโดยตรงแล้วนั้น มีโอกาสสูงที่จะเกิดการย่อยสลายโดยง่ายส่งผลให้มีจำนวน siRNA กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi น้อยลงรวมถึงความเสถียรที่ต่ำภายในกระแสเลือดอีกด้วย [9, 10] ปัจจุบันมีการศึกษาระบบนำส่ง siRNA โดยใช้ตัวพา (Carrier) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ระบบหลักได้แก่ ระบบที่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา (Viral vectors) และระบบที่ไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา (Non-viral vectors) การใช้ระบบที่อาศัยไวรัสเป็นตัวพานั้นให้ประสิทธิภาพการนำส่งที่สูงแต่อาจมีผลในทางลบจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เพราะไวรัสสามารถแทรกยีนของตัวเองเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านได้ ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการชักนำให้เกิดเป็นมะเร็งจากการนำส่งด้วยวิธีดังกล่าว [11] ด้วยเหตุผลข้างต้นทำให้ระบบการนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมมากขึ้นเมื่อคำนึงถึงความปลอดภัย โดยได้พัฒนาระบบให้มีประสิทธิภาพในการนำส่งที่ดีขึ้น รวมถึงการเพิ่มรูปแบบการนำส่งให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น เช่น การเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์หรือบริเวณเป้าหมาย และการพัฒนาตัวพาให้มีความหลากหลาย (Multifunctional nanocarrier) เป็นต้น โดยส่วนใหญ่ระบบนำส่งดังกล่าวจะนิยมใช้สารจำพวกไขมันประจุบวก (Cationic lipids) และพอลิเมอร์ประจุบวก (Cationic polymers) ซึ่งมีความปลอดภัยสูง, เตรียมได้ง่าย, ราคาไม่แพงและสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก [12, 13]

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาไคโตซาน (Chitosan) นับเป็นพอลิเมอร์ที่ได้มาจากธรรมชาติ และได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในทางการแพทย์รวมถึงการนำส่งยา เนื่องจากคุณสมบัติที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ [14, 15] รวมถึงคุณสมบัติของไคโตซานที่มีประจุบวกทำให้สามารถจับกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) นอกจากนี้เมื่อนำพอลิเอทิลีนอิมีน (Polyethylenimine or PEI) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกมาใช้ร่วมกับไคโตซานในการนำส่งยีนหรือ DNA ที่สนใจในการศึกษา พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งเข้าไปในเซลล์สูงขึ้นและลดความเป็นพิษของพอลิเมอร์ต่อเซลล์ที่ถูก

นำส่งเข้าไปได้ [16] ดังนั้นการใช้โคโตซานร่วมกับพอลิเอทิลีนอิมิน (PEI) จึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็น
ตัวพาในระบบนำส่ง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีเป้าหมายที่จะทดสอบระบบนำส่ง siRNA แบบไม่อาศัยไวรัส
เป็นตัวพา เพื่อพัฒนาระบบนำส่ง siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ในระดับ
mRNA ของ HPV transformed cell โดยใช้อนุพันธ์ผสมของโคโตซานร่วมกับพอลิเอทิลีนอิมินเป็น
ตัวพา (Chitosan-PEI nanoparticles) ซึ่งมีคุณสมบัติที่เพิ่มความเป็นประจุบวกมากขึ้นและลด
ความเป็นพิษต่อเซลล์ลง [17] จากการศึกษาที่ผ่านมาจึงไม่มีการนำอนุพันธ์ผสมดังกล่าวมาใช้
นำส่ง siRNA เพื่อยับยั้งการแสดงออกของในระดับ mRNA ของ HPV oncogenes มาก่อนซึ่งคาดว่า
จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการเลือกระบบนำส่งที่เหมาะสมในการยับยั้งยีนก่อโรคนำไปสู่
การเพิ่มทางเลือกใหม่ในการรักษามะเร็งปากมดลูกต่อไป

สมมติฐานของการวิจัย

1. ตัวพาในรูปอนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ประจุบวกผสมระหว่างโคโตซานกับพอลิเอทิลีนอิมิน (CS-PEI) มีคุณสมบัติในการจับกับ DNA หรือ siRNA ได้
2. ตัวพาดังกล่าวสามารถนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง SiHa, HeLa และ C33A ได้ โดยปริมาณที่ใช้เพียงพอที่จะทำให้ยีนมีระดับการแสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ
3. ตัวพาดังกล่าวสามารถนำส่ง siRNA และชักนำให้เกิดกระบวนการ RNAi ส่งผลยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ต่อยีนที่จำเพาะของเชื้อ HPV ที่อยู่ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ประเมินความสามารถในการนำส่ง DNA และ siRNA ของ CS-PEI โดยการศึกษา นำร่องกับ DNA โดยตรวจสอบความสามารถในการจับ DNA และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ CS-PEI/DNA
2. ถ่ายโอน DNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง SiHa ด้วยตัวพา CS-PEI และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของตัวพา CS-PEI
3. ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวพา CS-PEI เมื่อจับกับ siRNA และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการจับ siRNA (siRNA binding capacity)
4. ยืนยันการเข้าสู่เซลล์ของ siRNA เมื่อนำส่งด้วยตัวพา CS-PEI
5. ตรวจสอบผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7-HPV

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและทดสอบคุณสมบัติของตัวพา CS-PEI เพื่อค้นคว้าพัฒนาและสร้างแนวทางเลือกใหม่ของระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาสำหรับการทำยีนบำบัดในมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่น่าจะนำไปสู่การรักษามะเร็งดังกล่าวต่อไปในอนาคต ในเบื้องต้นจะเริ่มทดสอบระบบนำส่งด้วยตัวพา CS-PEI กับพลาสมิด DNA ก่อนเพื่อประเมินประสิทธิภาพการนำส่งและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง จากนั้นจะศึกษาต่อโดยนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ดังกล่าวเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน HPV E6 และ E7 ที่แสดงออกในเซลล์ดังกล่าว โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ซึ่งอาศัยการเลียนแบบสภาวะของสิ่งมีชีวิตในหลอดทดลองจัดเป็นการศึกษาแบบ *In vitro*

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากการทดสอบระบบนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยงโดยใช้ตัวพา CS-PEI จะต้องเริ่มจากการทดลองในขั้น *In vitro* ก่อน เพื่อหาปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น ปริมาณของตัวพา CS-PEI ที่ใช้รวมถึงระยะเวลาในการนำส่งเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะต้องใช้ทั้งงบประมาณรวมถึงระยะเวลาในการศึกษาวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้ยังไม่มี การทดสอบในสัตว์ทดลอง แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางนำไปต่อยอดการทดลองในขั้น *In vivo* ต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ตัวพาทางเลือกสำหรับนำส่งยีนและ siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการศึกษาพัฒนาต่อไป เช่นการทดสอบในสัตว์ทดลอง เป็นต้น
2. ได้รับความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับมะเร็งปากมดลูก, เชื้อ HPV และกลไกการทำงานต่าง ๆ ในระดับโมเลกุล รวมถึงระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา
3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปวิจัยต่อยอดเพื่อนำเทคนิค RNAi มาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีรักษามะเร็งปากมดลูกที่มีอยู่ในปัจจุบัน
4. ได้รับผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1 เรื่อง ในหัวข้อ “The PEI-introduced CS shell/PMMA core nanoparticle for silencing the expression of E6/E7 oncogenes in human cervical cells” ลงในวารสาร Carbohydrate polymers (impact factor = 3.628)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งปากมดลูกและเชื้อ Human papillomavirus

หากจะกล่าวถึงโรคมะเร็งนั้นสามารถให้คำนิยามได้ว่ามะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติไปจนปราศจากการควบคุมได้ โดยการเรียกชื่อมะเร็งแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับบริเวณแหล่งกำเนิดของมะเร็งนั้น ๆ เมื่อเกิดมะเร็งขึ้นที่บริเวณปากมดลูก (Cervix) จึงตั้งชื่อมะเร็งชนิดดังกล่าวว่ามะเร็งปากมดลูก [18] สาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูกในคนส่วนใหญ่มาจากการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนปาปิโลมา (Human papillomavirus or HPV) ซึ่งเป็นไวรัสที่สามารถติดต่อจากคนสู่คนได้ทางเพศสัมพันธ์ โดยพบว่ามีหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกและหูดที่อวัยวะเพศ (Genital Warts) นอกจากการติดเชื้อ HPV ยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ การสูบบุหรี่, การติดเชื้อ HIV, การใช้ยาคุมกำเนิดเป็นเวลานาน (5 ปีขึ้นไป) รวมถึงการมีบุตรมาก (ตั้งแต่ 3 คนขึ้นไป) [19] สำหรับอาการของโรคมะเร็งปากมดลูกในระยะเริ่มแรกยังไม่พบอาการที่ผิดปกติใด ๆ แต่เมื่อโรสดังกล่าวได้พัฒนาเข้ามาสู่ระยะมะเร็ง จะพบว่ามีเลือดหรือของเหลวไหลออกมาจากบริเวณช่องคลอด เช่น มีเลือดไหลออกมาหลังจากมีเพศสัมพันธ์ เป็นต้น [20]

เชื้อ HPV มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่และมีโปรตีน ห่อหุ้ม (Capsid) ล้อมรอบบริเวณกรดนิวคลีอิก ไวรัสดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 55 นาโนเมตร (nm) ไม่มีชั้นไขมันหุ้มส่วนของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนภายใน (Non-enveloped virus)

การจัดกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อ HPV สามารถแบ่งตามความรุนแรงของการก่อโรคได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูง (High risk) ซึ่งพบว่าร้อยละ 75 ของมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อจากกลุ่มดังกล่าว ได้แก่ HPV ชนิด 16, 18, 31, 45

2. กลุ่มสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงปานกลาง (Intermediate risk) ซึ่งพบว่าร้อยละ 25 ของมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อจากกลุ่มดังกล่าว ได้แก่ HPV ชนิด 33, 35, 39, 52, 56, 58, 59, 68

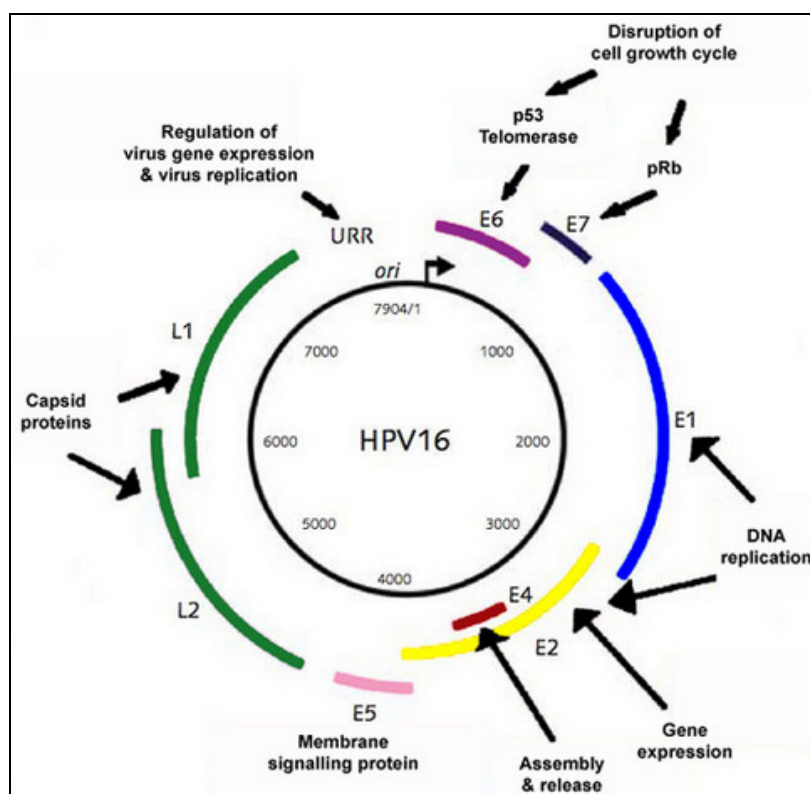
3. สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงต่ำ (Low risk) ไม่ค่อยพบในกรณีของมะเร็งปากมดลูกแต่จะพบได้ในโรคหูดที่อวัยวะเพศ (Genital warts) ได้แก่ HPV ชนิด 6, 11

ในส่วนจีโนมของเชื้อ HPV จะมีลักษณะเป็นวงกลม (Circular DNA genome) โดยมีขนาดประมาณ 8000 คู่เบสแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังภาพที่ 2.1

1. ส่วน Upstream regulatory region (URR) เรียกได้อีกชื่อว่าเป็นส่วน Long control region (LCR) หรือส่วน Non-coding region (NCR) คิดเป็นร้อยละ 10 ของจีโนม ซึ่งมีบทบาทในการเริ่มต้นกระบวนการทำสำเนาของไวรัส (Viral replication) และควบคุมการทำงานของยีน

2. ส่วน Early (E) region คิดเป็นร้อยละ 50 ของจีโนม แบ่งออกเป็นส่วน Large (E1, E2) และ several smaller (E4-E7) reading frames มีบทบาทในการควบคุมการทำงานต่าง ๆ ของไวรัส

3. ส่วน Late (L) region คิดเป็นร้อยละ 40 ของจีโนม แบ่งออกเป็นส่วน L1 และ L2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน Capsid [21]



ภาพที่ 2.1 ลักษณะจีโนมของเชื้อ Human papillomavirus [22]

หน้าที่ของยีนประเภทต่าง ๆ ของเชื้อ HPV มีดังต่อไปนี้

E1 gene: ทำหน้าที่สร้างโปรตีนซึ่งจะไปจับในส่วนของ Origin of replication บน Long control region (LCR) ของจีโนมไวรัส โดยการทำงานของโปรตีน E1 ต้องอาศัย ATP ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Helicase ในการแยกสาย DNA เพื่อเตรียมในขั้นของการเกิด DNA replication

E2 gene: ทำหน้าที่สร้างโปรตีนควบคุมการแสดงออกของยีนในส่วนของ viral promoter บน LCR โดยโปรตีน E2 สามารถจับกับโปรตีน E1 ซึ่งเป็นทั้ง Activators หรือ Represser ในขั้นตอน Transcription เพื่อนำไปสู่กระบวนการ DNA replication นอกจากนี้โปรตีน E2 ยังเป็นตัวควบคุมไม่ให้ E6 และ E7 gene ทำงาน (Negative regulator)

E4 gene: สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของไวรัสรวมถึงการปลดปล่อยไวรัสจากเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเข้าสู่เซลล์ปกติบริเวณรอบข้างซึ่งจะส่งผลทำให้เซลล์ดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนรูปที่ผิดปกติขึ้น โดยโปรตีน E4 จะไปจับกับส่วน Intermediate filaments ของ Keratinocyte cytoskeleton ส่งผลต่อการควบคุมผ่านทาง Mitogenic signalling pathway ใน Host cell โปรตีนดังกล่าวพบได้น้อยในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อและจะพบมากในระยะเวลาที่มีการติดเชื้อเป็นเวลานาน

E5 gene: สร้างโปรตีน E5 ซึ่งมีขนาดเล็กและมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยโปรตีนดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของ Membrane proteins ในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปเพื่อชักนำให้เกิดมะเร็ง

E6 gene: สร้างโปรตีน E6 มีคุณสมบัติในการไปจับกับ p53 tumour suppressor protein และชักนำให้เกิดการทำลายซึ่งจะไปมีผลต่อความสามารถของเซลล์ในการตอบสนองกรณีเกิด DNA damage ขึ้น

E7 gene: สร้างโปรตีน E7 ซึ่งจะไปขัดขวางการจับกันของ Retinoblastoma tumour suppressor protein (pRB) กับ E2F transcription factors โดยการแย่งจับกับ pRB ส่งผลให้เซลล์ขาดกระบวนการควบคุมในการแบ่งเซลล์ที่ปกติไป

L1 gene: ทำหน้าที่สร้างในส่วนของ Major capsid protein ของเชื้อไวรัส

L2 gene: ทำหน้าที่สร้างในส่วนของ Minor capsid protein ของเชื้อไวรัส [22]

กลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูก

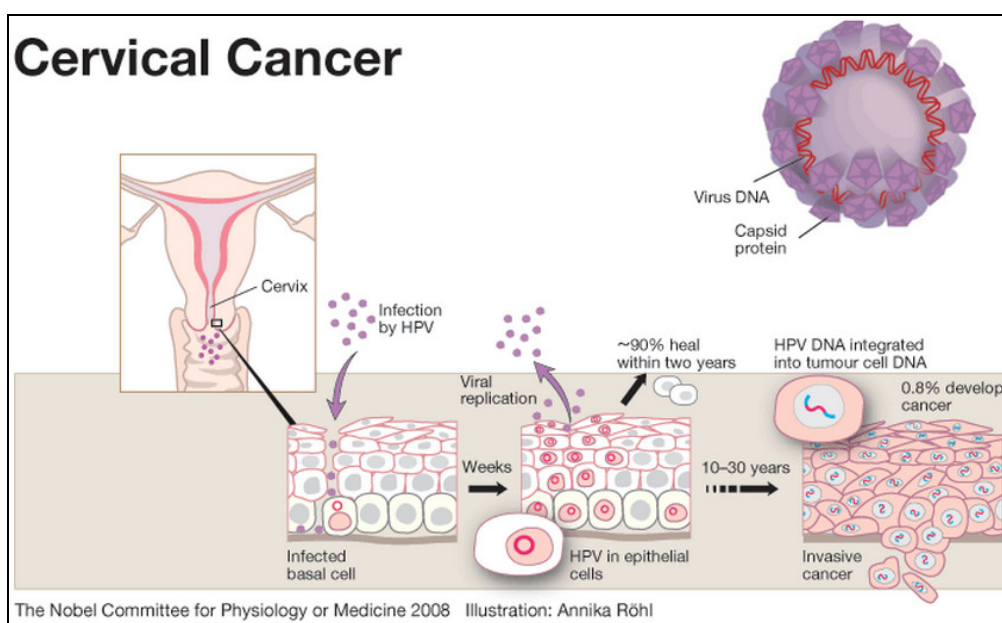
สำหรับกลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นเริ่มจากการติดเชื้อ HPV เป็นระยะเวลาานาน ส่งผลให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนและหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ รวมถึงการแทรก DNA ของตัวเองเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งจะชักนำให้เกิดมะเร็งต่อไป ดังภาพที่ 2.2

การติดเชื้อ HPV ในระยะแรกจะถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย เช่น ระบบ Cell-mediated immune response จะคอยจัดการกับโปรตีนชนิด E1 และ E2 ของเชื้อ HPV ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนตัวเองของไวรัส ขณะที่ระบบ Humoral immune response จะตอบสนองในรูปแบบของแอนติบอดีต่อโปรตีน Capsid ชนิด L1 และ L2 แต่เมื่อใดที่มีการติดเชื้อซ้ำจะพบว่าเชื้อ HPV มีการเคลื่อนที่จากส่วนพื้นผิวของเซลล์ Squamous epithelia ลงไปสู่ชั้นที่ลึกกว่า โดยอยู่ไกลจากระบบเลือดและระบบน้ำเหลืองซึ่งเป็นตำแหน่งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองได้น้อยลง นอกจากนี้ไวรัสดังกล่าวจะไปฝังตัวอยู่ในเซลล์ปกติโดยไม่กระตุ้นหรือชักนำให้เซลล์ตายจึงไม่พบกระบวนการอักเสบในบริเวณดังกล่าว ซึ่งเป็นอีกหนึ่งช่องทางที่ใช้หลีกเลี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกัน

เมื่อมีการติดเชื้อ HPV เป็นเวลานานพบว่าโปรตีนชนิด E6 และ E7 จะทำงานโดยรบกวนสมดุลควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ปกติให้ผิดเพี้ยนไป ส่งผลให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวมากขึ้นจนเกิดเป็นเนื้องอกและอาจรุนแรงถึงขั้นพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด โดยปกติแล้วยีน E6 และ E7 จะถูกควบคุมการทำงานโดยยีน E2 แต่เมื่อมีการแทรก DNA ของไวรัสเข้าสู่จีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน จะทำให้การแสดงออกของยีน E2 ลดลงและโดนทำลายไป เป็นผลให้โปรตีน E6 และ E7 เพิ่มการแสดงออกในปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลให้เซลล์บริเวณที่ติดเชื้อได้รับสัญญาณการแบ่งตัวมากขึ้นจนเกิดเป็นมะเร็งในที่สุด [23]

สำหรับหน้าที่ของโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV ในการชักนำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นเกิดจากโปรตีนดังกล่าวไปรบกวนระบบการทำงานของ Tumor suppressor protein โดยโปรตีน E6 จะไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 ซึ่งมีบทบาทควบคุมไม่ให้เกิดการแบ่งเซลล์ในกรณีที่เซลล์ได้รับความเสียหาย รวมถึงชักนำให้เซลล์ดังกล่าวเกิดการตายแบบ Apoptosis ส่งผล

ให้เซลล์ที่ได้รับความเสียหายสามารถแบ่งตัวต่อได้รวมถึงไม่ถูกชักนำให้ตายไป ในส่วนของโปรตีน E7 จะไปจับกับ Retinoblastoma (Rb) protein ซึ่งมีบทบาทในการตรวจสอบเซลล์ก่อนที่จะมีการแบ่งตัวจาก ระยะ G1 สู่วัฒน S โดยปกติโปรตีน Rb จะไปจับกับโปรตีน E2F แต่เมื่อมีโปรตีน E7 มาแย่งจับจะส่งผลให้โปรตีน E2F ไม่ถูกควบคุมและไปกระตุ้นให้เซลล์สามารถแบ่งตัวเข้าสู่ระยะ S ได้ตลอดเวลาทำให้เซลล์ที่ได้รับความเสียหายสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้จนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งขั้นในที่สุด [24]



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการเกิดมะเร็งปากมดลูกจากเชื้อ HPV [25]

การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก

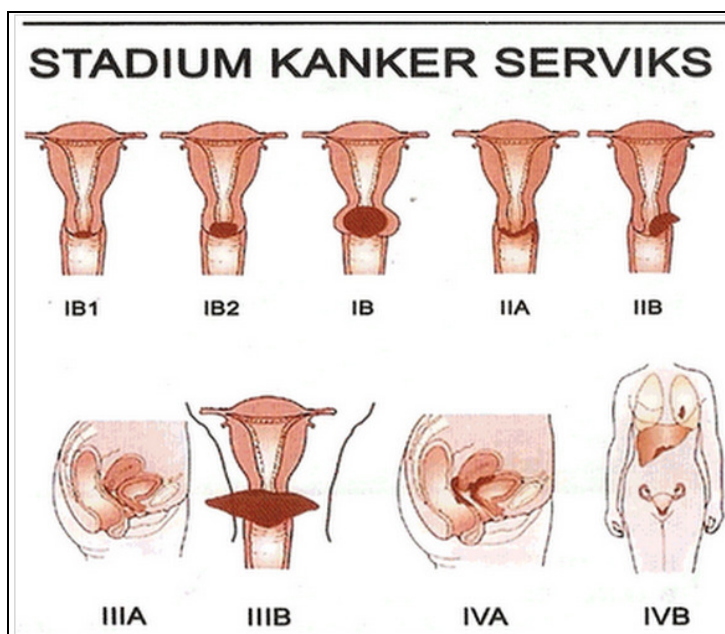
สำหรับการตรวจคัดกรองสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลักดังนี้

1. วิธีการตรวจแบบ Pap test หรือ Pap smear สามารถบอกได้ว่าเรามีโอกาสที่จะเป็นมะเร็งในระยะเริ่มแรกหรือไม่ โดยดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณปากมดลูก การทำ Pap smear เหมาะกับการตรวจในผู้หญิงทุกวัย โดยขั้นตอนการตรวจแพทย์จะใช้เครื่องมือตรวจ (Speculum) เพื่อตรวจสอบลักษณะของช่องคลอดและปากมดลูกจากนั้นจะทำการเก็บเซลล์รวมถึงเยื่อเมือกบริเวณปากมดลูกเพื่อส่งไปให้ทางห้องปฏิบัติการตรวจลักษณะของเซลล์ดังกล่าวว่ามีความผิดปกติหรือไม่อย่างไร [26]

2. วิธีการตรวจหาเชื้อ HPV (HPV test) เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อไวรัสชนิดความเสี่ยงสูง (High risk HPV) ได้แก่ชนิด 16, 18, 31, และ 45 เป็นต้น โดยเชื้อไวรัสดังกล่าวจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณปากมดลูก ตรวจพบได้จากผลการตรวจ Pap smear ที่ผิดปกติ นอกจากนี้การทำ HPV test ยังสามารถบอกได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อ High risk HPV แค่เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมไปถึงใช้ในการติดตามการรักษาอีกด้วย [27]

หลังจากที่ทราบผลการตรวจคัดกรองว่าเป็นมะเร็งปากมดลูก ในขั้นตอนต่อไปคือการวินิจฉัยว่ามะเร็งอยู่ในระยะใด ซึ่งมีความสำคัญต่อการเลือกวิธีการรักษามะเร็งดังกล่าวโดยอาศัยเทคนิคต่าง ๆ ร่วมกับการประเมินระยะของมะเร็ง เช่น การฉายรังสีทรวงอก (Chest x-ray), เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (Computed Tomography or CT. Scan), การถ่ายภาพระบบน้ำเหลือง (Lymphangiogram), การผ่าตัดเพื่อดูระยะของมะเร็ง (Pretreatment surgical staging), การตรวจอัลตราซาวด์ (Ultrasound), การตรวจเอ็กซเรย์ด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic resonance imaging, MRI) และการตรวจเนื้อเยื่อหรือสารน้ำโดยใช้เข็มขนาดเล็ก (Fine-needle aspiration biopsy) ซึ่งผลที่ได้จากเทคนิคเหล่านี้จะใช้วินิจฉัยควบคู่ไปกับผลการตัดชิ้นเนื้อบริเวณปากมดลูก (The original tumor biopsy) ในการบอกระยะของมะเร็งปากมดลูกต่อไป [28]

มะเร็งปากมดลูกที่ใช้ในการวินิจฉัยแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้



ภาพที่ 2.3 ระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูก [29]

1. ระยะ 0 (Carcinoma in Situ or Stage 0) จะพบเซลล์ผิดปกติ (Abnormal cells) บริเวณชั้นในของปากมดลูกซึ่งอาจพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง รวมถึงการแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อปกติ บริเวณรอบ

2. ระยะ 1 (Stage 1) จะพบเซลล์มะเร็งอยู่เฉพาะในบริเวณปากมดลูก ซึ่งระยะ 1 สามารถแบ่งย่อยออกเป็นระยะ 1A และ 1B ตามจำนวนของเซลล์มะเร็งที่พบดังนี้

2.1 ระยะ 1A จะพบเซลล์มะเร็งในปริมาณที่น้อยในส่วนของเนื้อเยื่อบริเวณปากมดลูก โดยตรวจสอบได้จากการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่านั้นซึ่งสามารถแบ่งย่อยตามขนาดของเนื้องอกที่พบโดยแบ่งออกเป็น

2.1.1 ระยะ 1A1 โดยเนื้องอกจะต้องมีความลึกไม่เกิน 3 มิลลิเมตรและกว้างไม่เกิน 7 มิลลิเมตร

2.1.2 ระยะ 1A2 โดยเนื้องอกจะต้องมีความลึกมากกว่า 3 มิลลิเมตรแต่ต้องไม่เกิน 5 มิลลิเมตรและกว้างไม่เกิน 7 มิลลิเมตร

2.2 ระยะ 1B จะพบเซลล์มะเร็งที่มีขนาดลึกมากกว่า 3 มิลลิเมตรและกว้างกว่า 7 มิลลิเมตรโดยจะพบได้จากกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น ในขณะที่เซลล์มะเร็งที่พบได้โดยไม่อาศัยกล้องจุลทรรศน์ในการตรวจสอบจะถูกแบ่งย่อยดังนี้

2.2.1 ระยะ 1B1 เป็นเซลล์มะเร็งที่มีความยาวตั้งแต่ 4 เซนติเมตรลงมา

2.2.2 ระยะ 1B2 เป็นเซลล์มะเร็งที่มีความยาวมากกว่า 4 เซนติเมตร

3. ระยะ 2 (Stage 2) จะพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งออกจากบริเวณปากมดลูก แต่จะไม่เกินในส่วนผนังเชิงกราน (Pelvic wall) หรือครอบคลุมทั้งบริเวณของช่องคลอด โดยสามารถแบ่งตามความสามารถในการกระจายของเซลล์มะเร็งออกเป็น

3.1 ระยะ 2A จะพบเซลล์มะเร็งกระจายออกนอกบริเวณปากมดลูกจนถึงพื้นที่สองในสามของบริเวณช่องคลอดแต่ยังไม่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณรอบมดลูก โดยสามารถแบ่งย่อยตามขนาดของเนื้องอกดังนี้

3.1.1 ระยะ 2A1 เป็นเซลล์มะเร็งที่พบได้โดยไม่ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ในการตรวจสอบและมีความยาวตั้งแต่ 4 เซนติเมตรลงมา

3.1.2 ระยะเวลา 2A2 เป็นเซลล์มะเร็งที่พบได้โดยไม่ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ในการตรวจสอบและมีความยาวมากกว่า 4 เซนติเมตร

3.2 ระยะเวลา 2B จะพบเซลล์มะเร็งกระจายออกนอกบริเวณปากมดลูกจนถึงพื้นที่สองในสามของบริเวณช่องคลอดและกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณรอบมดลูก

4. ระยะเวลา 3 (Stage 3) จะพบการกระจายของเซลล์มะเร็งออกจากบริเวณปากมดลูกจนครอบคลุมทั้งบริเวณของช่องคลอด และ/ หรือกระจายไปถึงส่วนของผนังเชิงกราน (Pelvic wall) รวมถึงทำให้เกิดปัญหาขึ้นกับไต โดยสามารถแบ่งตามความสามารถในการกระจายของเซลล์มะเร็งออกเป็น

4.1 ระยะเวลา 3A จะพบการกระจายของมะเร็งออกจากบริเวณปากมดลูกจนครอบคลุมทั้งบริเวณของช่องคลอดแต่ยังไม่กระจายไปถึงส่วนของผนังเชิงกราน

4.2 ระยะเวลา 3B พบการกระจายของเซลล์มะเร็งไปถึงส่วนของผนังเชิงกรานหรือในบางกรณีที่เนื้องอก (Tumor) มีขนาดใหญ่ขึ้นจนไปอุดตันในส่วนของท่อไต (Ureters) ซึ่งจะส่งผลในทางลบต่อการทำงานของไต นอกจากนี้มะเร็งยังสามารถแพร่กระจายไปทางต่อมน้ำเหลือง (Lymph node) บริเวณกระดูกเชิงกรานได้อีกด้วย

5. ระยะเวลา 4 (Stage 4) จะพบการกระจายของมะเร็งเข้าสู่กระเพาะปัสสาวะ (Bladder), ลำไส้ใหญ่ (Rectum), หรือส่วนต่างๆของร่างกาย ซึ่งสามารถแบ่งย่อยตามบริเวณที่พบมะเร็งดังนี้

5.1 ระยะเวลา 4A พบการกระจายของมะเร็งเข้าสู่บริเวณกระเพาะปัสสาวะและผนังลำไส้ใหญ่หรืออาจจะกระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณกระดูกเชิงกราน

5.2 ระยะเวลา 4B พบการกระจายของมะเร็งจากบริเวณกระดูกเชิงกรานเข้าสู่ส่วนอื่นของร่างกาย เช่น บริเวณช่องท้อง (Abdomen), ตับ (Liver), ทางเดินลำไส้ (Intestinal tract), ปอด (Lung), กระดูก (Bones) และต่อมน้ำเหลืองต่างๆที่อยู่ไกลออกไป [30]

นอกจากการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกแล้วนั้น การป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกถือเป็นเรื่องสำคัญปัจจุบันได้มีวัคซีนป้องกันเชื้อไวรัส HPV อยู่ 2 ผลิตภัณฑ์คือ Gardasil (Merck) และ Cervarix (GSK) ซึ่งเหมาะที่จะฉีดก่อนมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรกคือช่วงอายุตั้งแต่ 9-26 ปี โดย

จะต้องรับวัคซีนจำนวน 3 ครั้ง นอกจากนี้การงดสูบบุหรี่, การใช้ถุงยางเมื่อมีเพศสัมพันธ์ และไม่มีคู่นอนหลายคน ถือเป็นอีกปัจจัยที่ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้อีกทาง [31]

การรักษา มะเร็งปากมดลูก

การรักษา มะเร็งปากมดลูกนั้นมีหลายวิธีที่ถูกนำมาใช้ โดยแบ่งออกเป็นวิธีมาตรฐาน (Standard) และวิธีที่ยังอยู่ในขั้นการทดลอง (Clinical trials) ดังต่อไปนี้

การรักษาโดยใช้วิธีมาตรฐาน (Standard treatment)

1. การผ่าตัด (Surgery) เป็นการนำมะเร็งจากบริเวณปากมดลูกรวมถึงส่วนข้างเคียงออกจากร่างกายโดยวิธีการผ่าตัดซึ่งมีหลายรูปแบบดังนี้

1.1 วิธี Conization เป็นวิธีการผ่าตัดผ่านกล้องจุลทรรศน์เพื่อนำเนื้อเยื่อที่มีลักษณะรูปกรวย (Cone-shaped piece of tissue) ออกจากส่วนของปากมดลูกหรือช่องคลอด ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ได้ทั้งในการวินิจฉัยว่ามะเร็งอยู่ในระยะใดหรือใช้ติดตามผลรักษา มะเร็ง เพราะชิ้นเนื้อที่ตัดออกมาจะถูกนำมาตรวจสอบว่ามะเร็งดังกล่าวมีลักษณะอย่างไร

1.2 วิธีการตัดมดลูก (Hysterectomy) เป็นการผ่าตัดเอาส่วนของมดลูกรวมถึงบริเวณปากมดลูกออกไปซึ่งมีชื่อเรียกในแบบต่าง ๆ ขึ้นกับบริเวณและอวัยวะที่ผ่าตัดออกไปเช่น

1.2.1 Total hysterectomy เป็นการผ่าตัดในส่วนของมดลูกและปากมดลูก

1.2.2 Total hysterectomy with salpingo-oophorectomy เป็นการผ่าตัดในส่วนของมดลูกรวมถึงส่วนของรังไข่และท่อนำไข่ออกไป

1.2.3 Radical hysterectomy เป็นการผ่าตัดเอาส่วนของมดลูก, ปากมดลูก, บางส่วนของช่องคลอด, รังไข่, ท่อนำไข่และในส่วนของเอ็นและเนื้อเยื่อบริเวณรอบอวัยวะเหล่านี้รวมถึงในบางกรณีต้องผ่าตัดอมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงออกไปด้วย

1.3 วิธี Cryosurgery เป็นการรักษาโดยใช้เครื่องมือที่ใช้ความเย็นในการแช่แข็งและทำลายเซลล์ผิดปกติเช่นเซลล์มะเร็งในระยะ 0 (Carcinoma in Situ)

1.4 วิธี Laser surgery เป็นการผ่าตัดโดยใช้แสงเลเซอร์เปรียบเสมือนมีดเพื่อใช้ตัดเนื้อเยื่อที่ต้องการหรือนำเอาเนื้องอกที่เราสงสัยออกมา โดยมีข้อดีคือวิธีนี้จะไม่ทำให้เลือดออกในปริมาณที่มาก

2. การฉายรังสี (Radiation therapy) เป็นวิธีการรักษาโรคมะเร็งโดยอาศัยรังสีเอกซ์เรย์พลังงานสูง (High energy x-rays) หรือรังสีชนิดอื่นเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งหรือควบคุมไม่ให้เจริญเติบโตไปจากเดิม โดยการรักษาโดยการฉายรังสีสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักคือ

2.1 การฉายรังสีจากภายนอกร่างกาย (External radiation therapy) ซึ่งจะอาศัยเครื่องมือส่งรังสีจากภายนอกเข้าสู่บริเวณมะเร็งภายในร่างกายของผู้ป่วย

2.2 การฉายรังสีจากภายใน (Internal radiation therapy) เป็นการนำส่งสารรังสีเข้าสู่บริเวณที่มีมะเร็งอยู่หรือใกล้เคียงในรูปแบบการฉีดหรือผ่านทางท่อเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายโดยตรง

3. การให้เคมีบำบัด (Chemotherapy) เป็นการรักษาโรคมะเร็งโดยใช้ยาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรวมถึงการฆ่าหรือทำให้มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้อีก ซึ่งช่องทางการให้สารเคมีจะให้ผ่านทางปากหรือฉีดเข้าสู่เส้นเลือดดำหรือกล้ามเนื้อ ปัจจุบันมียาที่ได้รับการยอมรับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) เพื่อใช้ในการให้เคมีบำบัดได้แก่ Bleomycin (Blenoxane®), Topotecan Hydrochloride (Hycamtin®), Cisplatin (Platinol-AQ®, Platinol®) [32]

สำหรับการรักษาที่ยังอยู่ในขั้นการทดลอง (Clinical trials) จัดว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาในอนาคต โดยการรักษาดังกล่าวเป็นการทดลองที่เป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอนงานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็ง ซึ่งถ้าทำสำเร็จจะได้วิธีการรักษาแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยมากกว่าวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ตัวอย่างได้แก่การใช้กระบวนการที่เรียกว่า RNA interference (RNAi) ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของเชื้อ HPV เป็นต้น

กระบวนการ RNA interference (RNAi)

RNAi เป็นกลไกควบคุมการทำงานของยีนภายในสิ่งมีชีวิตซึ่งมีโมเลกุล RNA ขนาดเล็กที่เกี่ยวข้องกับระบบดังกล่าวสองชนิด ได้แก่ MicroRNA (miRNA) และ Small interfering RNA (siRNA) โดยมีหน้าที่สำคัญในการจับกับ Messenger RNA (mRNA) ที่จำเพาะของยีนเพื่อลดการสร้างโปรตีนในกระบวนการแสดงออกของยีนนั้น ๆ นอกจากนี้ RNAi ยังป้องกันยีนจากการติดเชื้อปรสิต, ไวรัส และยีนสัจจร (Transposons) รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการเจริญโตอีกด้วย

RNAi พบได้ในเซลล์ยูแคริโอตหลายชนิดโดยเริ่มต้นกระบวนการจากเอนไซม์ Dicer ซึ่งมีอยู่ภายในเซลล์ไปตัดโมเลกุล RNA สายคู่ที่มีขนาดยาว (Long double-stranded RNA) กลายเป็น RNA สายสั้น ๆ ความยาวประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์หรือเรียกว่า siRNAs ขั้นตอนต่อไปแต่ละ siRNA จะถูกแยกสายออกเป็น RNA สายเดี่ยวสองสาย (Two single-stranded RNAs) ได้แก่ Passenger strand และ Guide strand จากนั้น Passenger strand จะสลายไปส่วน Guide strand จะไปผนวกกับส่วนของ RNA-induced silencing complex (RISC) จากนั้นจะนำไปสู่กระบวนการ Post-transcriptional gene silencing ซึ่งเกิดจากการที่ Guide strand ไปจับกับ mRNA เป้าหมายที่จำเพาะจากนั้นโปรตีน Argonaute ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งใน RISC คอยตัด mRNA จนสลายไปทำให้ไม่สามารถเข้าสู่ขั้นผลิตโปรตีนได้ในขั้นต่อไป [33]

ปี ค.ศ. 1990 Napoli และ Jorgensen [34] ได้รายงานปรากฏการณ์เกี่ยวกับ RNAi เป็นครั้งแรกซึ่งทดลองที่จะเปลี่ยนสีของดอก Petunias โดยการนำส่งยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์ Chalcone synthase ซึ่งจะเพิ่มปริมาณ Pigment บนดอก Petunias ส่งผลทำให้มีสีที่เข้มขึ้น แต่จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวในระดับที่ต่ำซึ่งก็ยังไม่สามารถทราบสาเหตุที่แน่ชัด ต่อมาในปี 1992 Romano และ Macino ได้รายงานปรากฏการณ์ที่คล้ายคลึงกันใน *Neurospora crassa* พบว่าเมื่อนำส่ง Homologous RNA sequences เข้าไปจะทำให้เกิดการระงับ (Quelling) การแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใน (Endogenous gene) [35] กระบวนการเกิด RNA silencing ในสัตว์ถูกบันทึกไว้ครั้งแรกในปี 1995 โดย Guo และ Kemphues ซึ่งทดลองนำส่ง Sense หรือ Antisense RNA ที่จำเพาะต่อ PAR-1 mRNA ในหนอนตัวกลม *Caenorhabditis*

C. elegans ผลที่ได้พบว่าการแสดงออกของ PAR-1 ลดลง [36] จนกระทั่งในปี 1998 ได้มีนักวิทยาศาสตร์ 2 คน คือ Mello และ Fire ได้ทดลองนำส่ง Double strand RNA เข้าสู่หนอนตัวกลม เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยได้ทดลองนำส่งยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนกล้ามเนื้อ Unc-22 พบว่าถ้านำส่ง Sense หรือ Antisense RNA อย่างใดอย่างหนึ่งเข้าไปจะทำให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของหนอนตัวกลมสามารถทำงานได้เป็นปกติ ในขณะที่กรณีของการนำส่งเข้าไปในรูปของ Double strand RNA พบว่าหนอนตัวกลมจะมีการเคลื่อนไหวแบบกระตุก (Twitching movements) คล้ายกับลักษณะการเคลื่อนไหวของหนอนกลุ่มที่ขาดยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนกล้ามเนื้อที่สมบูรณ์อันเนื่องมาจากยีนดังกล่าวถูกยับยั้งการทำงานลงทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการเคลื่อนไหวได้ จึงค้นพบว่า Double strand RNA มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเรียกกระบวนการดังกล่าวว่า RNA interference (RNAi) ซึ่งการค้นพบดังกล่าวได้ถูกเผยแพร่ลงในวารสาร Nature ในปี 1998 และได้รับรางวัลโนเบล สาขาแพทยศาสตร์และสรีรศาสตร์ประจำปี 2006 [37]

องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทำงานของ RNAi

1. Dicer เป็นเอนไซม์ Endoribonuclease ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ RNase III family ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการตัด Double-stranded RNA (dsRNA) และ Pre-microRNA (miRNA) ให้กลายเป็น Double-stranded RNA สายสั้น ๆ ที่เรียก Small interfering RNA (siRNA) ซึ่งมีความยาวประมาณ 20-25 คู่เบส โดยเอนไซม์ Dicer จะประกอบไปด้วยส่วนของ RNase III 2 domains และ PAZ 1 domain รวมถึงมีส่วนของแกนกลางเป็น Platform domain และ Connector helix [38]

2. Small interfering RNA (siRNA) ถูกค้นพบครั้งแรกโดยกลุ่มของ David Baulcombe ซึ่งพบในส่วนของการ Post-transcriptional gene silencing (PTGS) ภายในพืช [39] ต่อมาในปี 2001 Tuschl และคณะค้นพบว่า siRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ RNAi ได้ภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [40] โดย siRNA ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มของ Double stranded RNA ที่มีความยาวประมาณ 20-25 คู่เบส สำหรับลักษณะทาง

โครงสร้างของ siRNA ที่ตำแหน่ง 5' จะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่และที่บริเวณ 3' จะเป็นหมู่ Hydroxyl (-OH) นอกจากนี้ยังมีนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวยื่นออกมาจากปลาย 3' ของแต่ละสาย [41]

3. MicroRNA (miRNA) เป็น RNA สายสั้น ๆ พบได้ในเซลล์ยูแคริโอตทำหน้าที่ควบคุมในขั้น Post-transcriptional ของ mRNA โดยจับกับบริเวณที่จำเพาะส่งผลให้เกิดการระงับการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Translational repression) ทำลาย mRNA เป้าหมายและทำให้เกิด Gene silencing [42] ในปี 1993 มีการค้นพบ miRNA เป็นครั้งแรกจากการทดลองของ Ambros, Lee และ Feinbaum ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับยีน Lin-14 ในหนอนตัวกลม *C. elegans* โดยพบว่าโปรตีน Lin-14 ถูกควบคุมโดย RNA สายสั้นความยาว 22 nucleotide ที่ได้จากยีน Lin-4 ซึ่งมีบางลำดับไปจำเพาะกับ Lin-14 mRNA ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนดังกล่าว [43]

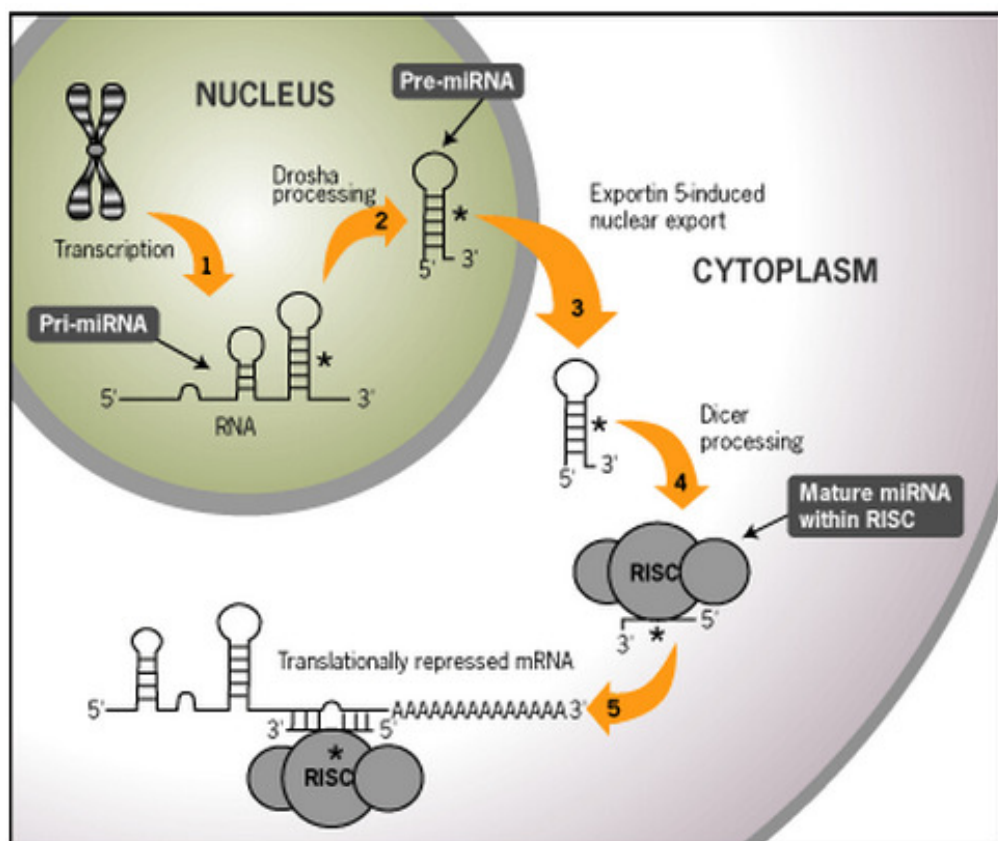
4. Argonaute จัดเป็นโปรตีนองค์ประกอบหนึ่งของ RNA induced silencing complex (RISC) ในกระบวนการ RNAi ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถจับกับ Small non-coding RNAs เช่น miRNAs และ siRNAs เป็นต้น [44] โดย Small non-coding RNAs ดังกล่าวจะชักนำให้ Argonaute ไปยังบริเวณ mRNA ที่จำเพาะเพื่อเกิดการตัด mRNA เป้าหมายนั้น ๆ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า Argonaute protein มีหลายชนิดโดยแต่ละชนิดก็ทำหน้าที่แตกต่างกันเช่น Ago1 ทำหน้าที่แยก miRNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวในขณะที่ Ago2 ทำหน้าที่แยกสาย siRNA สำหรับโครงสร้างของ Argonaute จะประกอบไปด้วย PAZ domains ทำหน้าที่จับ RNA สายเดี่ยวเพื่อช่วยให้ siRNA จับกับ mRNA เป้าหมายได้เสถียรมากขึ้นและ PIWI domains ทำหน้าที่ในการตัด mRNA ให้กับ RISC [45]

5. RNA-induced silencing complex (RISC) เป็นกลุ่มของโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วย Dicer, Argonaute และ TRBP (TAR RNA binding protein) ที่จะไปรวมกับ siRNA หรือ miRNA สายเดี่ยวและจะทำงานร่วมกันตัดสาย mRNA เป้าหมายโดยการกระตุ้นให้เอนไซม์ Rnase ทำงาน ซึ่งจะอาศัยลำดับเบสที่จำเพาะของ RNA สายเดียวดังกล่าว [46]

กลไกการทำงานของ RNAi

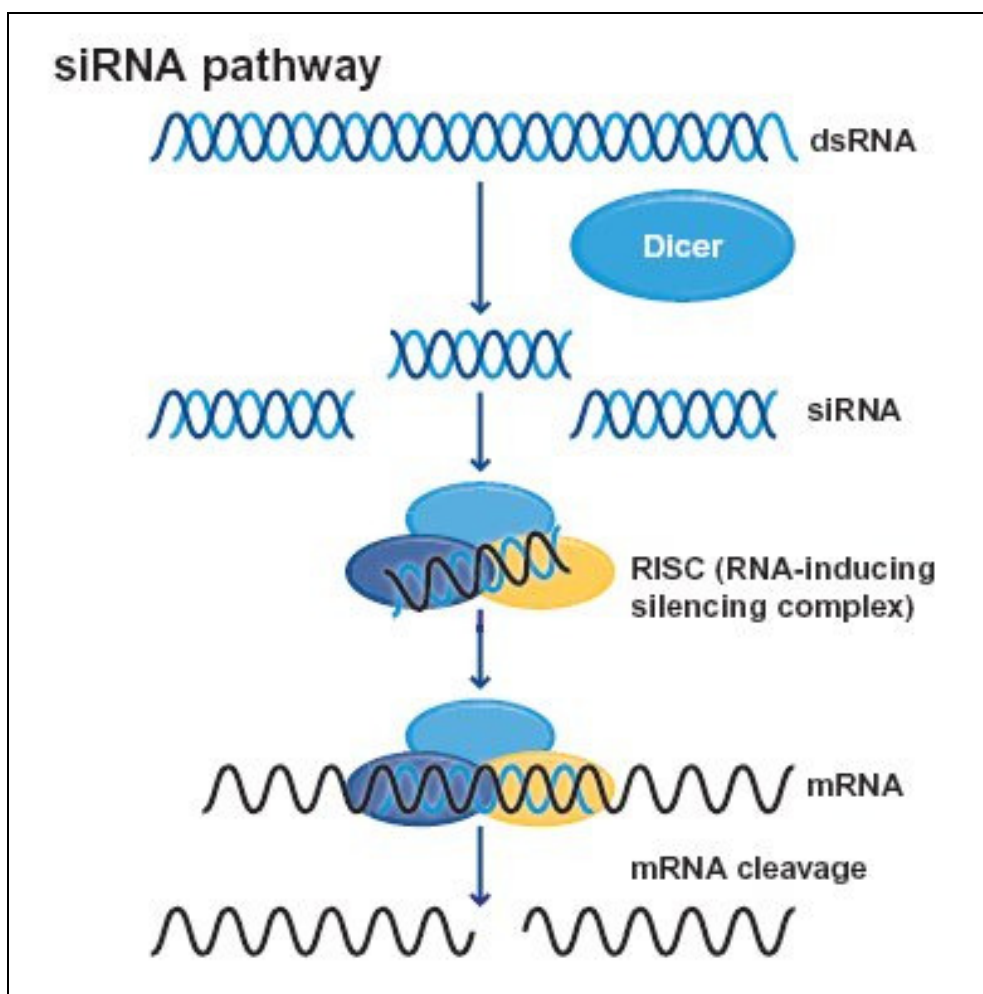
กลไกการทำงานของ RNAi ในเซลล์ยูแคริโอตมี 2 รูปแบบที่สำคัญคือ miRNA และ siRNA โดยมีรูปแบบการทำงานดังต่อไปนี้

1. miRNA pathway จะเริ่มต้นในนิวเคลียสโดยยีนที่มีหน้าที่ในการสร้าง miRNA จะเข้าสู่กระบวนการคัดลอกรหัสโดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II ได้เป็น Primary miRNA (Pri-miRNA) มีลักษณะเป็น Hairpin หลังจากนั้น Pri-miRNA จะถูกเอนไซม์ที่ชื่อว่า Drosha ตัดสั้นลงเกิดเป็น Precursor miRNA (Pre-miRNA) แล้วถูกนำส่งออกจากนิวเคลียสเข้าไปสู่ในส่วนของไซโตพลาสซึมโดยอาศัยการทำงานของ Exportin-5 จากนั้นเอนไซม์ Dicer ทำหน้าที่ตัดสาย Pre-miRNA กลายเป็น miRNA และเข้าสู่กระบวนการ RNAi โดยจับกับกลุ่มของโปรตีน RISC เกิดการยับยั้ง mRNA เป้าหมายไม่ให้เกิดการสร้างโปรตีนต่อไปดังภาพที่ 2.4 [47]



ภาพที่ 2.4 ขั้นตอนการทำงานของ miRNA pathway [48]

2. siRNA pathway เกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมโดยเริ่มจากการทำงานของเอนไซม์ Dicer โดยตัด Double-stranded RNA ให้กลายเป็น siRNA จากนั้นก็จะมีกลุ่มโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น Argonaute, TRBP เข้ามาจับกับส่วนของ siRNA เกิดเป็น RISC และเกิดการแยกสายคู่ของ siRNA ออกจากกันโดยส่วนที่ทำงานคือส่วนของ Guide strand ซึ่งมีตำแหน่งที่จำเพาะ และชักนำให้เกิดการตัด mRNA เป้าหมายทำให้ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต่อไปดังภาพที่ 2.5 [49]



ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของ siRNA pathway [49]

จากการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูกจากเชื้อ HPV โดยการทำงานยีน E6 และ E7 ที่มีบทบาทสำคัญในการชักนำเซลล์ปกติให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้นั้น ทำให้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNAi สำหรับการประยุกต์ใช้ siRNA ที่มีเป้าหมายเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ของเชื้อ HPV ซึ่งมีรายงานดังต่อไปนี้

Butz และคณะในปี 2003 ได้ทดลองใช้ทั้ง Synthetic siRNA และ Vector borne siRNA เพื่อกดการแสดงออกของ E6 oncogene พบว่า siRNA จากทั้งสองระบบสามารถยับยั้งการก่อมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย siRNA ที่ใช้ได้ออกแบบให้จำเพาะกับยีนที่สร้าง E6 oncoprotein โดยไม่รบกวนการผลิต E7 oncoprotein ทำให้มี Proapoptosis activity ในขณะที่ไม่มีการสร้าง Antiapoptotic factor จาก E6 oncoprotein จึงมีผลทำให้การเหนี่ยวนำกระบวนการ Apoptosis ของเซลล์มะเร็งทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ [50]

Hall และคณะในปี 2003 พบว่า siRNA ที่ออกแบบให้กวดการแสดงออกเฉพาะ E7 บน Bicistronic E6 และ E7 mRNA นั้น ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์มะเร็งรวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและทางเคมีไปมีผลเร่งให้เกิดความเสื่อมสภาพของเซลล์ (Senescence) [51]

Putral และคณะในปี 2005 พบว่าการใช้เทคนิค RNAi ยับยั้งการแสดงออกของ HPV oncogene ใน Cervical cancer cells มีผลให้เซลล์มะเร็งมีความไว (Sensitivity) ต่อยาต้านมะเร็ง Cisplatin สูงขึ้น [52]

Sima และคณะในปี 2007 พบว่าเมื่อใช้ Antisense RNA ที่มีความจำเพาะต่อ E6 และ E7 oncogene ของเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่ 16 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมีผลยับยั้งการแสดงออกของปริมาณ Oncogene ดังกล่าวได้โดยทำให้การแสดงออกของ p53 และ retinoblastoma (Rb) pathway มากขึ้นทำให้นำไปสู่กระบวนการ Apoptosis และเกิดความเสื่อมสภาพ (Senescence) ของเซลล์มะเร็ง [53]

Jonson และคณะในปี 2008 พบว่าเมื่อนำ siRNA ที่จำเพาะกับ E6 และ E7 oncogene ของเชื้อ HPV ฉีดเข้าไปในหนูที่ทำให้เป็นมะเร็งปากมดลูก มีผลทำให้ขนาดของก้อนมะเร็งลดลงหรือไม่ปรากฏให้เห็นเมื่อผ่าเอาก้อนมะเร็งออกมาตรวจสอบ [54]

Dutta และคณะในปี 2010 พบว่าเมื่อใช้ Dendrosome เพื่อพัฒนาระบบนำส่ง siRNA ที่จำเพาะต่อ E6 และ E7 oncogene ของเชื้อ HPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง มีผลทำให้การแสดงออกของ E6 และ E7 oncoprotein มีปริมาณที่ลดลงมีผลทำให้ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเพิ่มการทำงานของ Tumor suppressor proteins อีกด้วย [55]

Eaton และคณะในปี 2011 ได้ทดลองนำส่ง siRNA ที่จำเพาะต่อ E6/E7 ของเชื้อ HPV เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SiHa ซึ่งผลได้พบว่าเซลล์เกิดความเสื่อมสภาพ (Senescence) ร่วมกับการแสดงออกของ Death receptors ชนิด DR4 และ DR5 ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้รักษาเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา [56]

Zhou และคณะในปี 2012 ได้ออกแบบ siRNA ที่จำเพาะต่อ E6/E7 ที่ตำแหน่ง Promoter และบนตำแหน่ง E7 จากนั้นนำไปทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง ผลที่ได้พบการลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวรวมถึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและชักนำให้เซลล์ตายแบบ Apoptosis [57]

ระบบนำส่งสำหรับยีนบำบัด

ในปัจจุบันระบบนำส่งยีนสามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบได้แก่ ระบบที่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา (Viral vectors) และระบบที่ไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา (Non-viral vectors) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ระบบนำส่งยีนแบบอาศัยไวรัสเป็นตัวพาเป็นที่นิยมใช้ในงานทางด้านชีวโมเลกุล ซึ่งทำได้ทั้ง *In vivo* และ *In vitro* ระบบดังกล่าวเริ่มใช้ตั้งแต่ปี 1970s โดย Paul Berg อาศัยการนำส่งไวรัสชนิด SV40 ที่บรรจุ DNA ที่ได้จาก Bacteriophage lambda เข้าไปใน Monkey kidney cells [58]

โดยชนิดของไวรัสที่นำมาใช้เป็นตัวพามีดังต่อไปนี้

- 1.1. Retroviruses มีคุณสมบัติสอดแทรกเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Reverse transcriptase ซึ่งนิยมใช้ Moloney murine leukemia virus ในการทดลองกับผู้ป่วย SCID-X1 ในทางคลินิก แต่ข้อเสียของการใช้ไวรัสดังกล่าวเป็นตัวพาอาจทำให้

เกิดมะเร็งได้ นอกจากนี้เซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองควรมีคุณสมบัติที่แบ่งตัวได้ดีทำให้ไม่เหมาะที่จะทำในพวกเซลล์ประสาท [59]

1.2. Lentiviruses จัดเป็น Subclass ของ Retroviruses โดยเป็นตัวพาที่สามารถรวมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านชนิดที่ไม่แบ่งตัวได้ ซึ่งในการทดลองทางคลินิกนิยมให้นำส่งเพื่อทำการรักษาในผู้ป่วย HIV นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ไวรัสดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดอันตรายในเรื่องของการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งในหนูทดลองอีกด้วย [60]

1.3. Adenoviruses มีคุณสมบัติตรงกันข้ามกับ Lentiviruses เพราะไม่สามารถรวมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านได้และไม่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองในระหว่างที่เซลล์กำลังแบ่งตัวอยู่นิยมใช้ไวรัสดังกล่าวในงานของวัคซีนและยีนบำบัด แต่ข้อเสียของไวรัสชนิดนี้คือ เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะส่งผลกระทบต่อระบบหายใจ ทางเดินอาหาร และการติดเชื้อบริเวณตาซึ่งจะไปกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานอย่างเฉียบพลัน ดังนั้นก่อนที่จะใช้ Adenoviruses เป็นตัวพาจะต้องปรับเปลี่ยนให้มีคุณสมบัติกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหมดไปก่อน [61]

1.4. Adeno-associated viruses เป็นไวรัสขนาดเล็กสามารถเข้าสู่เซลล์ชนิดที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวได้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ในระดับปานกลาง บางกรณีสามารถรวมเข้ากับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านได้ ในงานยีนบำบัดจะใช้ไวรัสชนิดนี้ในการทดลองทางคลินิกเพื่อรักษา Retina [62]

2. ระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพามีข้อดีกว่าแบบอาศัยไวรัสตรงที่สามารถเตรียมตัวพาได้ง่ายในปริมาณมากและให้ผลการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามระบบนำส่งดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพในการนำส่งที่ยังด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไวรัสเป็นตัวพา ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยีนแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาให้มีศักยภาพใกล้เคียงกับการใช้ไวรัสเพื่อนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ โดยสามารถแบ่งเป็น 3 วิธีหลักได้ดังนี้

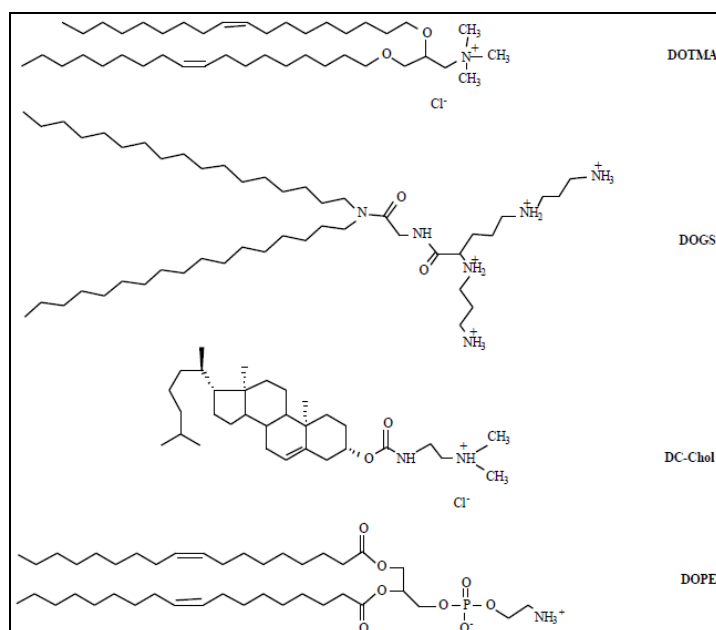
2.1 Injection of Naked DNA เป็นการฉีดพลาสมิด DNA เข้าสู่เซลล์ผ่านทางกล้ามเนื้อโดยตรง ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพา แต่ข้อเสียคือการแสดงออกของยีนที่นำส่งเข้าไปจะต่ำกว่าวิธีอื่นเนื่องมาจากประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ต่ำทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะพัฒนาวิธีการนำเข้าสู่เซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้า

ช่วย (Electroporation), ใช้คลื่นเสียง (Sonoporation) รวมไปถึงการใช้ Gene gun ยิง DNA ที่เข้าสู่เซลล์ [63]

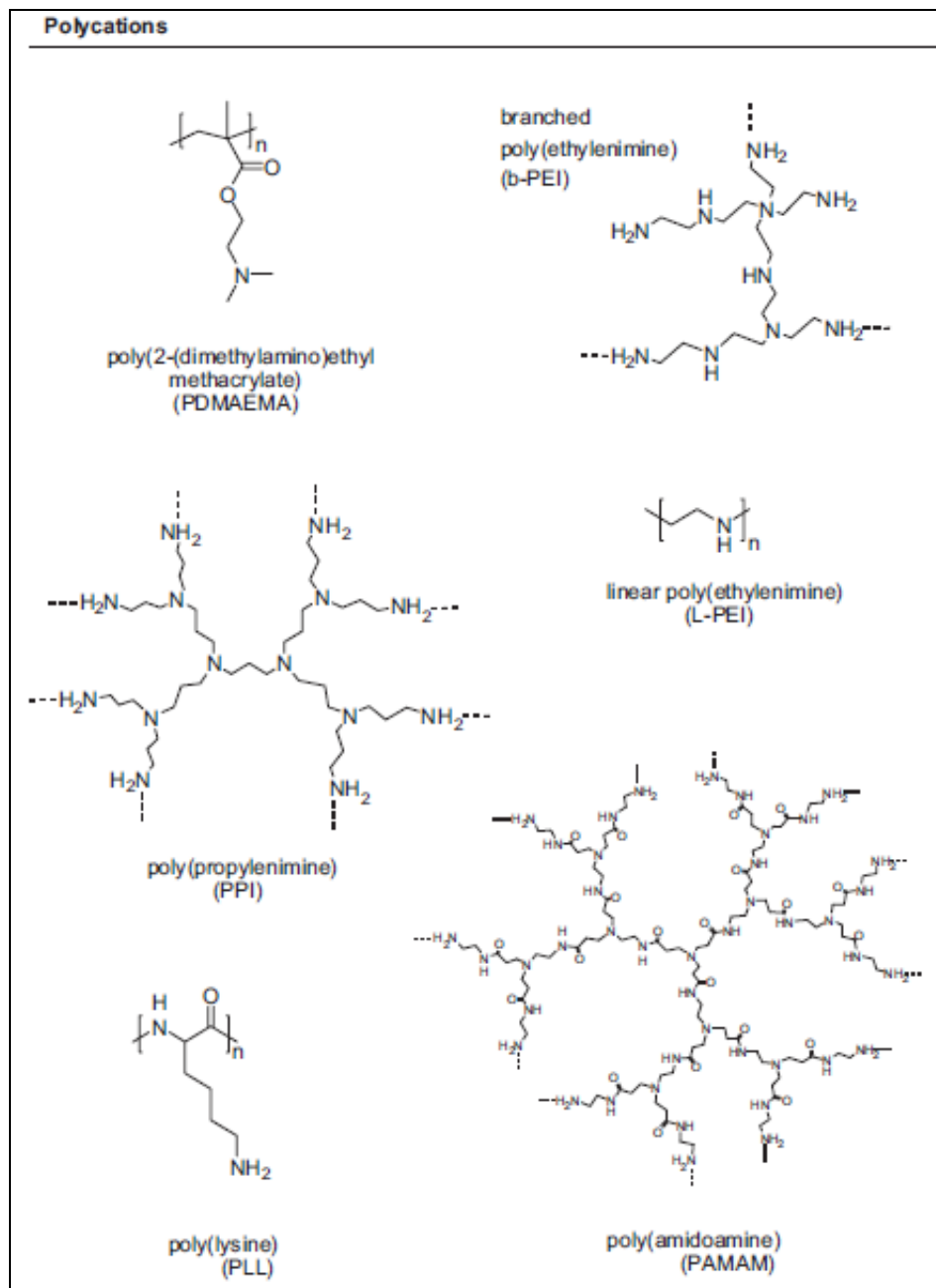
2.2 Physical Methods ได้แก่ Electroporation: เป็นวิธีที่ใช้กระแสความต่างศักย์สูงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูขนาดเล็กชั่วคราวพอให้ DNA ผ่านเข้าไปสู่ภายในเซลล์ ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้กับเซลล์หลายชนิดโดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ต้องระวังในเรื่องของกระแสไฟฟ้าที่ใช้จะต้องมีปริมาณที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้อันตรายต่อเซลล์เจ้าบ้าน [64] Gene Gun: เป็นเทคนิคการนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการเคลือบ DNA ลงบน Gold หรือ Tungsten จากนั้นจะใช้เครื่องมือที่มีลักษณะเป็นปืนยิงเข้าไปภายในเซลล์ ซึ่งใช้ได้กับเซลล์พืชและสัตว์ ตัวอย่างเช่น การนำส่ง DNA เข้าสู่ร่างกายหรือเข้าสู่เซลล์ประสาทของหนู เป็นต้น [65] Sonoporation: เป็นเทคนิคที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic frequencies) ไปปรับคุณสมบัติในการซึมผ่านบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้โมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น DNA สามารถเข้าสู่เซลล์โดยตรงซึ่งวิธีนี้เหมาะกับ Tissue culture โดยเฉพาะเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [66] Magnetofection: เป็นการนำส่ง DNA เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของสนามแม่เหล็กเป็นตัวผลักดันให้ DNA ที่จับกับ Magnetic particles เข้าสู่เซลล์ [67]

2.3 Chemical Methods ได้แก่ ตัวพาชนิดไขมันประจุบวก (Cationic Lipid): โครงสร้างพื้นฐานของ Cationic lipid จะประกอบไปด้วย 3 ส่วนคือ ส่วน Hydrophobic moiety, Linker และ Headgroup โดยในระบบนำส่งยีนจะอาศัยการแรงจับกันระหว่างประจุบวกของ Cationic Lipid กับประจุลบของ DNA (Electrostatic interaction) ซึ่งเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติเรียกการรวมกันดังกล่าวว่า Lipoplex มีคุณสมบัติในการปกป้อง DNA จากการย่อยสลายของเอนไซม์ Nuclease สำหรับกลไกการนำส่ง Lipoplex เข้าสู่เซลล์นั้นอาศัยความเป็นประจุบวกไปจับกับโครงสร้างที่มีประจุลบของผิวเซลล์ เช่น Heparan sulfate และ Proteoglycans นอกจากนี้ยังสามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยกระบวนการ Endocytosis เข้าไปอยู่ในส่วนของ Endosome และจะต้องปลดปล่อย DNA ออกมาในบริเวณไซโตพลาสซึมเพื่อให้ยีนดังกล่าวเดินทางเข้าสู่ Nucleus ต่อไป โดยมีรายงานว่า Cationic lipid ตัวแรกที่มีการใช้คือ DOTMA (N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride) ดังภาพที่ 2.6 โดยในเวลาต่อมาได้มีการพัฒนาตัวนำส่ง

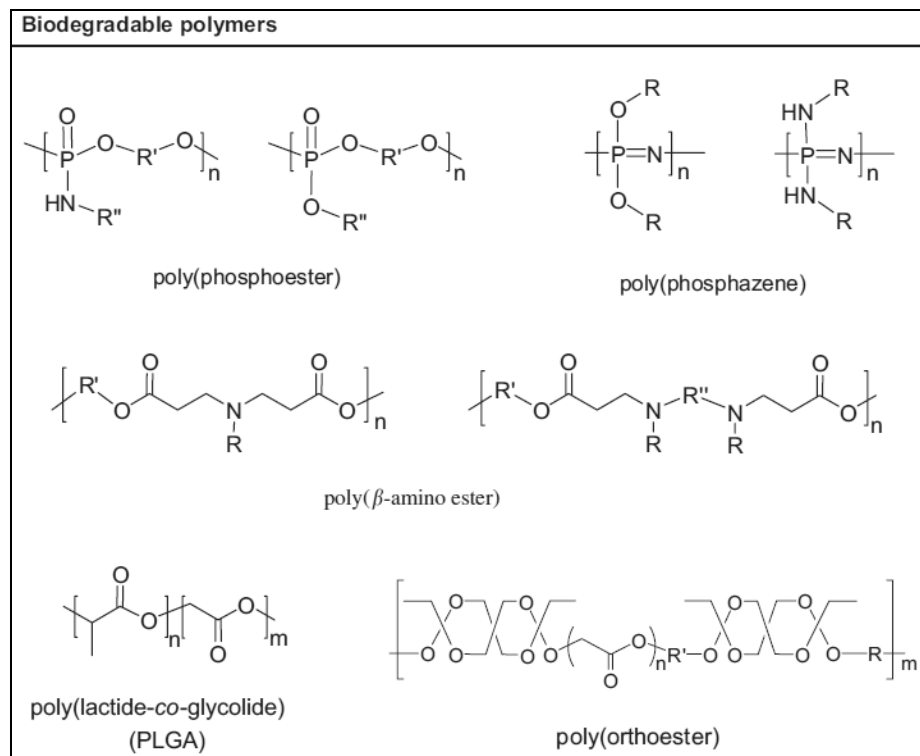
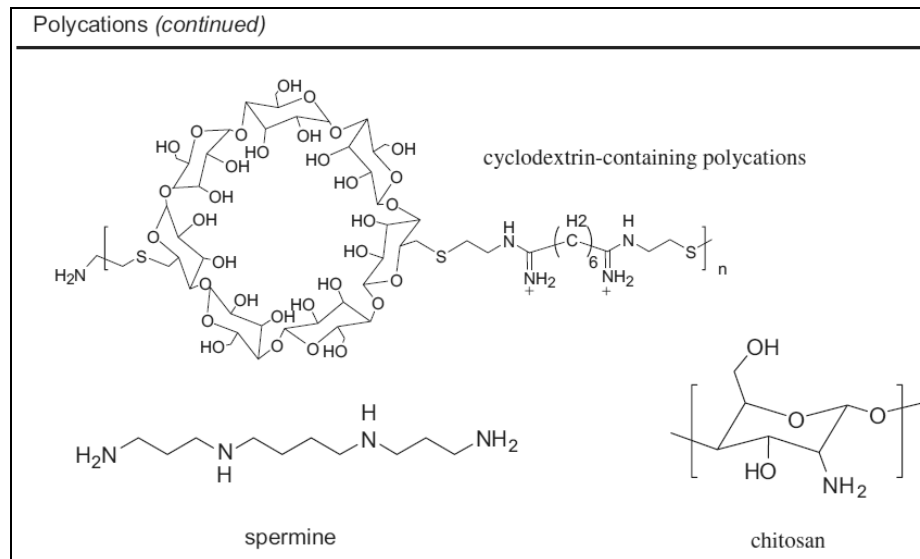
ดังกล่าวโดยทำการสังเคราะห์ Cationic lipid ประเภทอื่น ๆ ตามมาซึ่ง ได้แก่ DC-Chol (3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethyl)carbamoyl]cholesterol) และ DOGS (dioctadecylamido-glycylspermine) โดยการพัฒนาความคิดค้น Cationic lipid รูปแบบใหม่มีอยู่ตลอดเวลา จนค้นพบชนิดที่มีคุณสมบัติและความสามารถในการหลบหลีกออกจาก Endosome ได้ดีนั่นก็คือ DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine) เป็นต้น [68] ตัวพาชนิดต่อมาคือตัวพาพอลิเมอร์ประจุบวก (Cationic Polymer): โดยปกติแล้วการนำส่งยีนโดยใช้พอลิเมอร์ประจุบวกเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับคามนิยมโดยอาศัยคุณสมบัติในการห่อหุ้ม DNA จากการใช้ประจุตรงข้ามกันแล้วนำส่งเข้าสู่เซลล์ผ่านกระบวนการ Endocytosis ซึ่งประสิทธิภาพการนำส่งและความเป็นพิษต่อเซลล์จะขึ้นอยู่กับประเภทของ Cationic Polymer นั้น ๆ เริ่มจากกลุ่มของ poly-L-lysine ถูกนำมาใช้นำส่งยีนแบบ *In vivo* เป็นชนิดแรกนอกจากนี้ยังมีพอลิเมอร์ประจุบวกชนิดอื่น ๆ อีก ได้แก่ Polyethylenimine (PEI), Polyamidoamine/polypropylamine dendrimers, Polyallylamine, Cationic dextran, Chitosan, Cationic proteins (polylysine, protamine, and histones) และ Cationic peptides เป็นต้น [69] สำหรับพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มยีนมีดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.6 ลักษณะโครงสร้างของ Cationic lipids ชนิดต่างๆ [68]



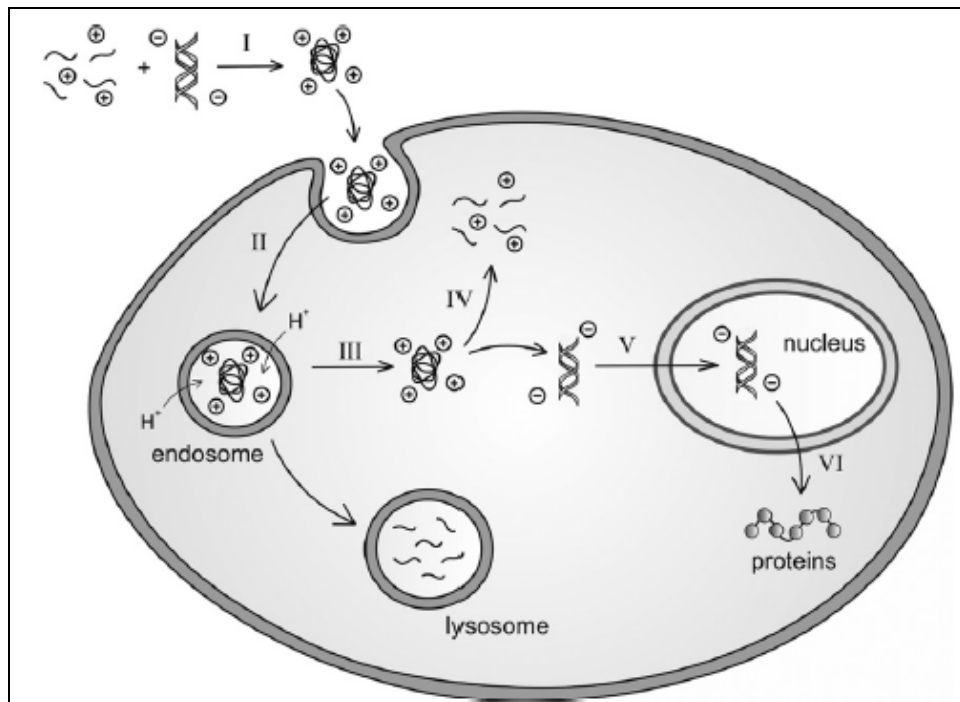
ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างพอลิเมอร์ประจุบวกชนิดต่าง ๆ [70]



ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างพอลิเมอร์ประจุบวกชนิดต่างๆ (ต่อ) [70]

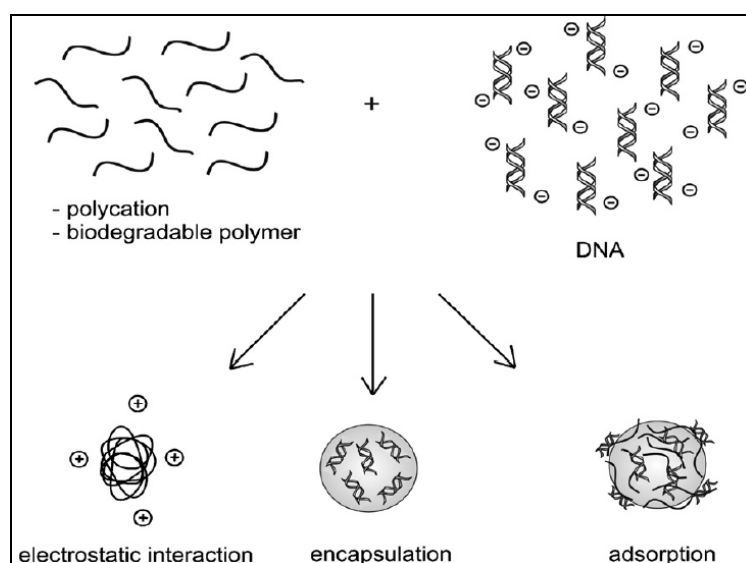
ระบบนำส่งยีนทั้งสองแบบต่างก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน โดยที่ระบบนำส่งแบบอาศัยไวรัสเป็นตัวพาจะให้ประสิทธิภาพการนำส่งเข้าสู่เซลล์สูงแต่มีข้อเสียในเรื่องของความปลอดภัยต่อเซลล์ที่อาจชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดมะเร็งขึ้นรวมถึงการไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย ต่างจากการนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาที่มีความปลอดภัยกว่าและเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามในเรื่องของประสิทธิภาพการนำส่งอาจยังไม่สูงเทียบเท่ากับการนำส่งแบบอาศัยไวรัส ซึ่งถือว่าเป็นคุณสมบัติที่จะต้องปรับเปลี่ยนแก้ไขและพัฒนาต่อไปในอนาคต [71]

สำหรับการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สามารถอธิบายได้เป็น 5 ขั้นตอนหลัก เริ่มจากในขั้นตอนแรกต้องเตรียม complex ระหว่างตัวพาซึ่งมีประจุบวกกับยีนที่จะนำส่งซึ่งมีประจุลบ จากนั้นในขั้นที่สองเป็นการนำส่ง complex ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น Endocytosis ซึ่ง complex ที่นำส่งเข้าเซลล์จะอยู่ภายในออร์แกเนลล์ชนิด Endosome โดยตัวพามีหน้าที่นำ complex ออกจากส่วนดังกล่าวในขั้นตอนที่สาม หลังจากนั้นจะเกิดการปลดปล่อยยีนออกมาจากตัวบริเวณไซโตพลาสซึมในขั้นตอนที่สี่ และยีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะเดินทางเข้าสู่นิวเคลียสเกิดการแสดงออกต่อไปดังขั้นตอนที่ห้าและหกตามลำดับ ดังภาพที่ 2.8



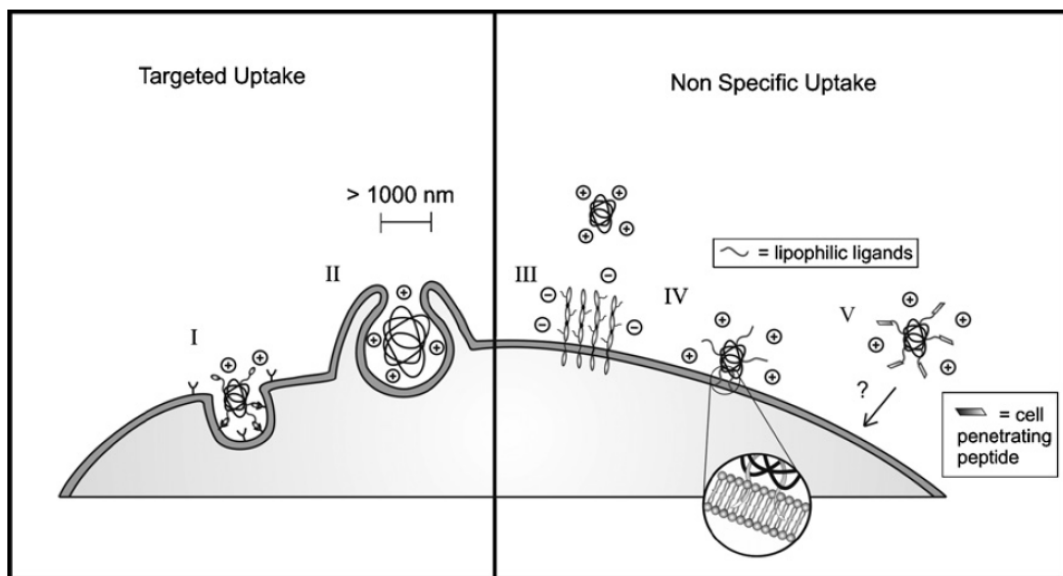
ภาพที่ 2.8 ขั้นตอนการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ [70]

สำหรับรูปแบบการจับกันของตัวพาทั้งที่เป็นพอลิเมอร์และไขมันประจุบวกกับ DNA หรือ ยีนในการนำส่งเข้าสู่เซลล์แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบดังภาพที่ 2.9 ได้แก่ Electrostatic interaction เป็นการจับกันโดยอาศัยแรงระหว่างประจุตรงข้ามกันของหมู่อะมิโนบนตัวพาที่มีประจุบวกกับหมู่ ฟอสเฟตบน DNA ที่เป็นประจุลบเกิดเป็น complex ขึ้นซึ่งมีขนาดที่เหมาะสมในการนำส่งเข้าสู่ เซลล์รวมถึงความสามารถในการป้องกันการทำลายจากเอนไซม์ Nuclease ภายในเซลล์ แต่ อย่างไรก็ตามอาจต้องคำนึงถึงประจุสุทธิของ complex ที่ใช้นำส่งด้วย เพราะการที่มีประจุบวกสูง จะส่งผลให้เกิดพิษต่อเซลล์รวมถึงในขั้นตอนของการปลดปล่อยยีนออกจากตัวพาที่อาจทำได้ยาก ขึ้นด้วย รูปแบบต่อมาคือ Encapsulation เป็นการจับกันโดยมีตัวพาห่อหุ้ม DNA หรือยีนอยู่ ภายในโดยมีลักษณะกลม ตัวพานิยมใช้เป็นชนิดที่มีคุณสมบัติย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Biodegradable polymer) เช่น พอลิเมอร์กลุ่ม Polyester ซึ่งการจับกันดังกล่าวสามารถปรับแต่ง ในเรื่องของความคงทนและการปลดปล่อย DNA ออกจากตัวพาได้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบ ปัญหาในเรื่องของการทนต่อความร้อนและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ยังไม่ดัดแปลงผลให้ยีนที่นำส่งถูก ทำลายไป รูปแบบสุดท้ายคือ Adsorption เป็นการจับกันโดยสังเคราะห์ตัวพาให้มีพื้นผิวรอบนอก เป็นประจุบวกทำให้สามารถจับกับประจุลบของ DNA ได้ การจับกันดังกล่าวจะมีประโยชน์ในเรื่อง ของการปลดปล่อยยีนออกจากตัวพา แต่ข้อเสียคือความสามารถในการปกป้องยีนจากการทำลาย ของเอนไซม์ภายในเซลล์ที่อาจทำได้ไม่ดีนัก



ภาพที่ 2.9 รูปแบบการจับกันของตัวพากับ DNA ที่ใช้ในการนำส่ง [70]

การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สามารถจำแนกรูปแบบการเข้าสู่เซลล์ได้เป็นสองแบบหลักคือ แบบแรกเป็นการเข้าสู่เซลล์อย่างจำเพาะได้แก่ Receptor-mediated endocytosis (I) เป็นการเข้าสู่เซลล์โดยอาศัย ligand ที่อยู่บนตัวพาในการจับกับส่วนของตัวรับบริเวณผิวเซลล์, Phagocytosis via size exclusion (II) เป็นการเข้าสู่เซลล์โดยการจับกินเข้าไปซึ่งเหมาะกับ complex ที่มีขนาดตั้งแต่ 1 ถึง 10 μm และในแบบที่สองเป็นการเข้าสู่เซลล์อย่างไม่จำเพาะได้แก่ Non-specific ionic interactions with membrane-bound proteoglycans (III) เป็นการเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยประจุสุทธิที่เป็นบวกของ complex ในการจับกับส่วนของ proteoglycans บริเวณผิวเซลล์ซึ่งมีประจุลบ, Non-specific lipophilic interactions with phospholipid components of the cell membrane (IV) เป็นการเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยส่วนที่เป็นไขมันบนตัวพาในการหลอมรวมกับส่วนของ phospholipid บนเยื่อหุ้มเซลล์, Cell penetrating peptide (CPP)-mediated uptake (V) เป็นการเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยคุณสมบัติของ CPP ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากไวรัสที่มีคุณสมบัติในการเข้าสู่เซลล์ดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 รูปแบบการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ในลักษณะต่าง ๆ [70]

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้พอลิเมอร์ประจุบวกในกลุ่มของ Chitosan (CS) ผสมกับ Polyethylenimine (PEI) โดยมีแกนกลางเป็น Methyl Methacrylate ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวประสานและยึดติดในผู้ป่วยที่ต้องเปลี่ยนถ่ายกระดูก [72] อนุพันธ์ผสมดังกล่าวมีคุณสมบัติของ Chitosan ในเรื่องของการเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ, เป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและไม่กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ [73] ร่วมกับประสิทธิภาพในการนำส่งของ PEI ซึ่งมีคุณสมบัติที่เรียกว่า “Proton sponge effect” ในการหลบหลีกออกจากส่วนของ Endosome ภายในเซลล์ [74] ซึ่งอนุพันธ์ผสมดังกล่าวได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดย Pimpha และคณะในปี 2010 โดยใช้ชื่อว่า Polyethyleneimine-Introduced Chitosan Shell/Poly(methyl Methacrylate) Core Nanoparticles หรือตัวยา CS-PEI จากการทดลองของ Pimpha และคณะพบว่าตัวยา CS-PEI สามารถห่อหุ้มพลาสมิด DNA และเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งรวมถึงระยะเวลาการแสดงออกของยีนใน Rat mesenchymal stem cells (MSCs) เมื่อเปรียบเทียบกับ การนำส่งด้วยอนุพันธ์ CS หรือ PEI อย่างใดอย่างหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลงเมื่อนำส่งด้วยตัวยา CS-PEI จากผลการทดลองสรุปได้ว่าตัวยา CS-PEI ถือเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในระบบนำส่งยีนแบบที่ไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวยา [17] ทำให้ทางผู้วิจัยตัดสินใจเลือกตัวยาดังกล่าวมาใช้นำส่ง siRNA ที่จำเพาะต่อยีน E6/E7 เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เพื่อประเมินคุณสมบัติและประสิทธิภาพการนำส่งเข้าสู่เซลล์ ซึ่งคาดหวังว่าตัวยาดังกล่าวจะใช้ต่อยอดไปสู่แนวทางการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Atomic force microscope	Seiko SPA4000, ญี่ปุ่น
Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Cell culture flask (25 cm ² , 75 cm ²)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Cell culture plate flat bottom	Nunc, เดนมาร์ก
Centrifuge tube (15 ml, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Confocal microscopy รุ่น Olympus FluoView 1000	Olympus Corporation, ญี่ปุ่น
Disposable serological pipette (5 ml, 10ml, 25 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
EnSpire® Multimode Plate Reader	PerkinElmer, Inc. สหรัฐอเมริกา
Gel electrophoresis apparatus	Bio-Rad Laboratories, Inc., สหรัฐอเมริกา
Gel documentation (Gel doc) systems	Syngene, สหราชอาณาจักร
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี

Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Laminar flow cabinet	E.S.I Flufrance, ฝรั่งเศส
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Liquid nitrogen tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (0.2 ml, 0.6 ml)	Axgen scientific, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Biologix Research Company, สหรัฐอเมริกา
Micro high speed refrigerated centrifuge รุ่น VS-15000 CFNII	Vision Scientific Co., Ltd., เกาหลีใต้
Pipette tips (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sorenson™ BioScience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Sterile aerosol pipette tip (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc., สหรัฐอเมริกา
Thermal cycler รุ่น EP Gradient S	Eppendorf, เยอรมนี
Thermal cycler รุ่น PTC-200	MJ Research Inc., สหรัฐอเมริกา
Thermal cycler รุ่น DNAEngine	Bio-Rad Laboratories, Inc., สหรัฐอเมริกา
UV-Visible spectrophotometer (NanoDrop รุ่น 1000)	ThermoScientific, Inc, สหรัฐอเมริกา
Vacuum concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา

VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader	Perkin Elmer, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer (FINE VORTEX)	FINEPCR, เกาหลีใต้
Water bath	Memmert, เยอรมนี
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, สหราชอาณาจักร
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
24 & 96-well cell culture plates	Nunc, เดนมาร์ก
96-well luminescence and fluorescence plates	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
- 20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
- 80 °C ULT Deep Freezer	IIShin Lab, เกาหลีใต้

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

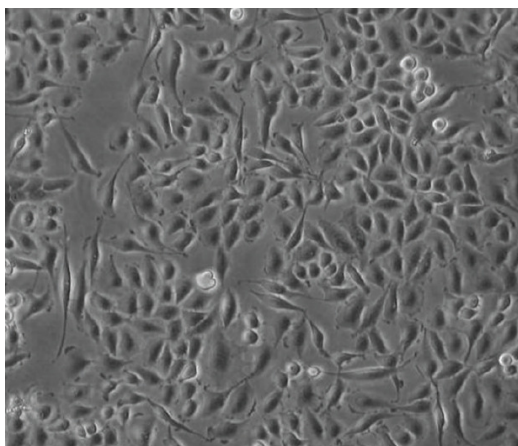
Absolute ethanol	Merck, เยอรมนี
Antibiotic/Antimycotic solution	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Brilliant Blue G	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
DNA ladder 100 bp	Fermentas, แคนาดา
Ethidium bromide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
GenePure LE Agarose	ISE BioExpress, สเปน
Hoechst 33258 dye	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Isopropanol	Merck, เยอรมนี
Label IT® siRNA Tracker Intracellular Localization Kit	Mirus Bio Corporation, สหรัฐอเมริกา
Luciferase Assay System	Promega Corporation, สหรัฐอเมริกา
Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Phosphate buffered saline (PBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Phosphoric acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Primer	Pacific Science Co.,Ltd., ไทย
Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
RQ1 RNase-Free DNase	Promega Corporation, สหรัฐอเมริกา
Sodium Chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Transcriptor One-Step RT-PCR Kit	Roche, สหรัฐอเมริกา
TRI Reagent®	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

Tris base	Promega Corporation, สหรัฐอเมริกา
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
0.25% Trypsin-EDTA (1X)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
6X DNA Loading Dye	Fermentas, แคนาดา

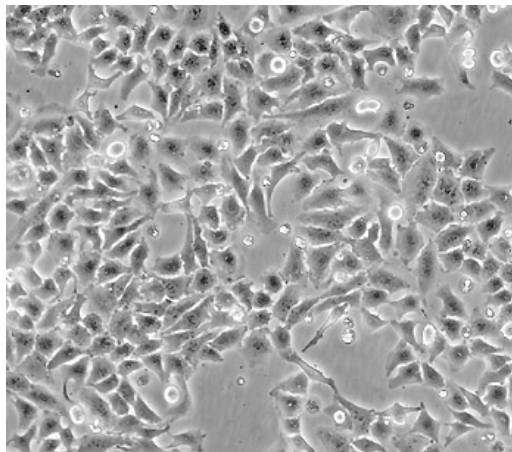
3.1.3 เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง

3.1.3.1 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบเกาะ ได้มาจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ Squamous cell บริเวณปากมดลูก (Squamous cell carcinoma) ภายในเซลล์มีเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่ 16 อาศัยอยู่ 1-2 Copies และจัดเป็นเซลล์ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 2 ดังภาพที่ 3.1 [75]



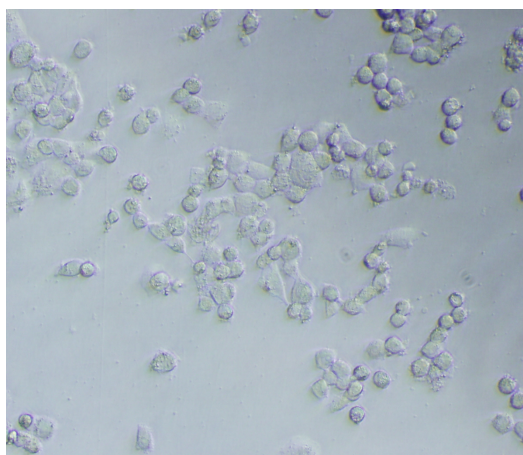
ภาพที่ 3.1 ลักษณะเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa [76]

3.1.3.2 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบเกาะได้มาจากส่วนเยื่อ
บุผิวบริเวณปากมดลูก (Adenocarcinoma) ภายในเซลล์มีเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่ 18 อาศัยอยู่ ดัง
ภาพที่ 3.2 [77]



ภาพที่ 3.2 ลักษณะเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa [77]

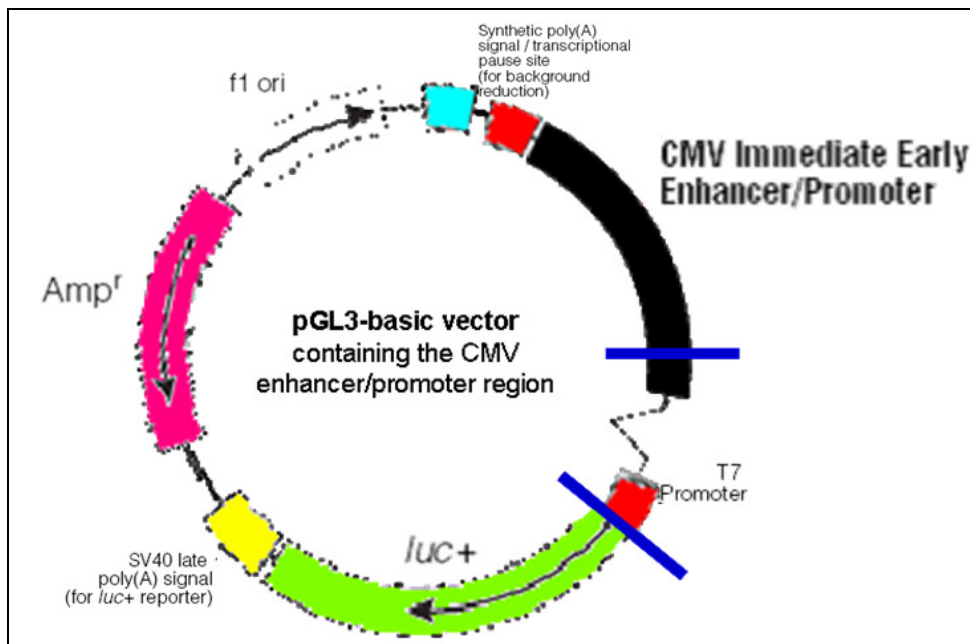
3.1.3.3 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบเกาะได้มาจากส่วน
เยื่อบุผิวบริเวณปากมดลูกภายในไม่มีเชื้อ HPV อาศัยอยู่ ดังภาพที่ 3.3 [78]



ภาพที่ 3.3 ลักษณะเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A

3.1.4 พลาสมิดและตัวพาสำหรับนำส่งยีน

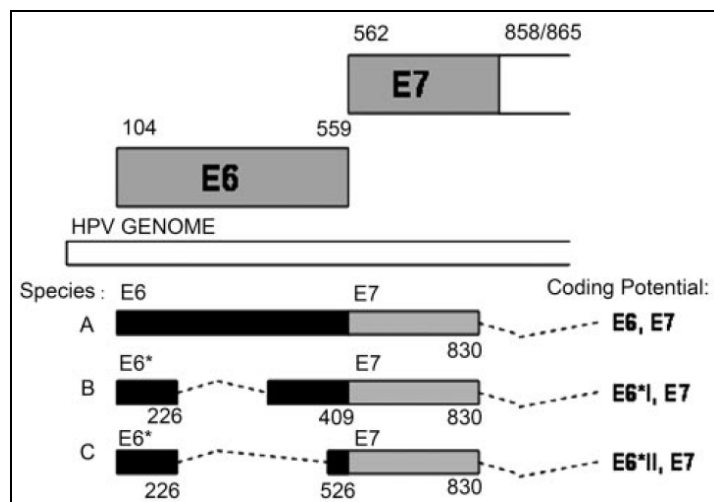
3.1.4.1 พลาสมิด DNA ชนิด pGL3-basic vector containing CMV enhancer promoter (pGL3-CMV) ดังภาพที่ 3.4 ได้มาจาก Tencomnao และคณะในปี 2008 [79] โดยพลาสมิดดังกล่าวมีการบรรจุยีนเครื่องหมาย Luciferase ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ CMV enhancer/promoter ที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ Luciferase ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม



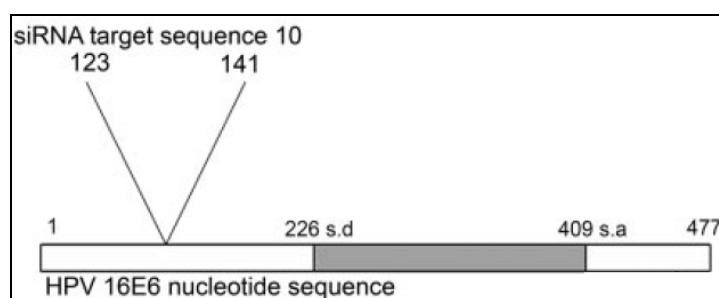
ภาพที่ 3.4 ลักษณะโครงสร้างของพลาสมิด DNA ชนิด pGL3-CMV [80]

3.1.4.2 siRNA ที่ใช้นำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ได้สังเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสของ Putral และคณะในปี 2005 ดังนี้ Sense: 5'-GCAACAGUUACUGCGACGUUU-3' และ Antisense 3'-UUCGUUGUCA AUGACGCUGCA-5' [52] โดย siRNA ดังกล่าวมีคุณสมบัติที่จำเพาะกับยีน E6 ของเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่ 16 ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 123-141 ซึ่งเมื่อชักนำให้เกิดกระบวนการ RNAi จะสามารถลดการแสดงออกของ E6/E7 mRNA ดังภาพที่ 3.5

ก)

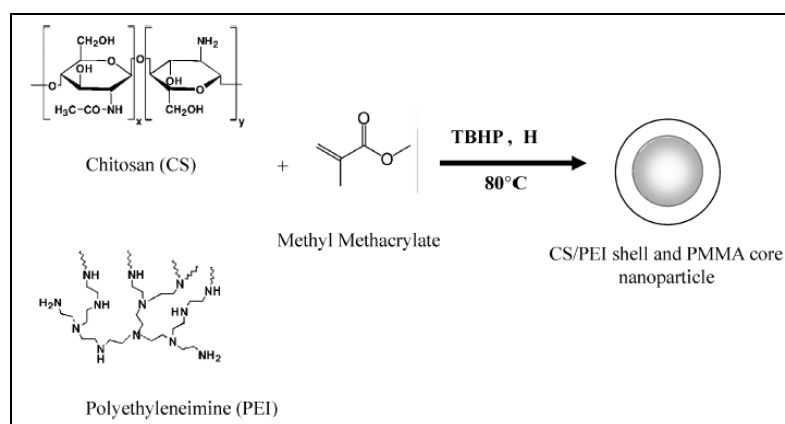


ข)



ภาพที่ 3.5 ลักษณะรูปแบบของ mRNA ที่สร้างจากยีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV โดยส่วนที่มีการคัดลอกรหัสจะแทนด้วยรูปสี่เหลี่ยมทึบและส่วนของ Intron จะแทนด้วยจุดประ (ภาพ ก), แสดงตำแหน่ง sequence 10 (นิวคลีโอไทด์ที่ 123-141) ของยีน HPV 16E6 ซึ่งเป็นบริเวณที่จำเพาะกับ siRNA (ภาพ ข) [52]

3.1.4.3 ตัวพาประเภทพอลิเมอร์ประจุบวกที่ใช้นำส่งพลาสมิด pGL3-CMV และ siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ Polyethyleneimine-Introduced Chitosan Shell/Poly(methyl Methacrylate) Core Nanoparticles (CS-PEI) ได้มาความอนุเคราะห์จาก ดร.ณัฐพร พิมพะ [17] ตัวพานี้เป็นตัวพาที่สังเคราะห์ให้ผิวเป็นพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PEI และ Chitosan ที่มี Methyl Methacrylate เป็นแกนกลางดังภาพที่ 3.6 โดยมีอัตราส่วนโดยน้ำหนัก (w/w) ของ CS/PEI เป็น 0.5/0.5



ภาพที่ 3.6 ตัวพาประเภทพอลิเมอร์ประจุบวกชนิด CS-PEI nanoparticle (ตัวพา CS-PEI) [17]

3.1.4.4 ตัวพาประเภทไขมันประจุบวกชนิด Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, New York, USA) สั่งซื้อมาจากบริษัท Life Technologies [80] ใช้ในการนำส่งพลาสมิด DNA pGL3-CMV และ siRNA เพื่อเป็นกลุ่มตัวแปรควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองที่นำส่งโดยใช้ตัวพา CS-PEI



ภาพที่ 3.7 ตัวพาประเภทไขมันประจุบวกชนิด Lipofectamine™ 2000 [81]

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เตรียมตัวพา CS-PEI, พลาสมิด pGL3-CMV และ siRNA

ปรับความเข้มข้นของตัวพา CS-PEI และพลาสมิด pGL3-CMV ให้เป็น 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวปรับความเข้มข้นในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ขณะที่ siRNA ใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่นที่ปราศจากเอนไซม์ Ribonuclease ด้วยสาร Diethylpyrocarbonate (DEPC)

3.2.2 ตรวจสอบความสามารถในการจับ DNA และ siRNA และคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของตัวพา CS-PEI

3.2.2.1 ตรวจสอบความสามารถของตัวพา CS-PEI ในการจับกับ DNA และ siRNA โดยวิธี Gel retardation assay

เพื่อศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA และ siRNA ของตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วนโมลอะตอมของไนโตรเจนบนตัวพากับฟอสเฟตบนกรดนิวคลีอิก (N/P ratio) ต่าง ๆ เพื่อหาอัตราส่วนของ complex ที่สามารถจับกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยเตรียม complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับพลาสมิด pGL3-CMV ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 และ 4 โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้นำ complex ดังกล่าวผสมกับ 1X loading dye แล้วหยอดลงเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1% เพื่อทำ Gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 90 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมกับ Ethidium bromide และส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Gel documentation systems (Syngene, Cambridge, United Kingdom) โดยปกติแล้ว DNA และ siRNA จะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวกในการทำ Gel electrophoresis แต่เมื่อเกิดการจับกันกับตัวพา CS-PEI ซึ่งมีประจุบวกจะทำให้เกิดการต้านการเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิกดังกล่าว ส่งผลให้มีระยะทางการเคลื่อนที่สั้นลงอันเนื่องมาจาก complex ที่เกิดขึ้นมีขนาดและประจุเป็นบวกมากขึ้น ในกรณีที่ตัวพา CS-PEI ที่สามารถจับได้อย่างสมบูรณ์จะทำให้ไม่พบแถบการเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิกบนแผ่นเจล

สำหรับ complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น ซึ่งใช้อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6, 4 และ 8 โดยทำ gel retardation assay ที่ความต่างศักย์ 70 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

3.2.2.2 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA complex โดย Atomic force microscope (AFM)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโน CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA ที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบได้ด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic force microscope: AFM) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะพื้นผิววัสดุในระดับนาโน อาศัยหลักการของอันตรกิริยาของแรงระหว่างอะตอม (Atomic force) ระหว่างหัวเข็มวัดในระดับนาโนกับพื้นผิวของสารและจะทำการประมวลผลออกในลักษณะของภาพพื้นผิว ซึ่งจะช่วยให้เราเห็นลักษณะรูปร่างของ complex ที่เตรียมได้ การทดลองนี้ได้ใช้ CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 และ 4 ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml บ่มให้เกิดการคดแน่นของ complex เป็นเวลา 30 นาทีแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 20 μ l จากนั้นหยดลงบนแผ่นไมกาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที เพื่อให้อนุภาคจับเกาะและระเหยน้ำ ภาพ AFM ในงานวิจัยนี้ใช้วิเคราะห์ด้วย AFM Seiko SPA4000 (Chiba, Japan) เพื่อตรวจสอบ complex ในบริเวณ $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ ด้วยความเร็วของเข็ม 1.0 Hz

3.2.2.3 ตรวจสอบขนาดและค่าประจุพื้นผิวของ complex ด้วยการวัด Zetasizer

เพื่อศึกษาหาขนาดและค่าประจุของ CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA complex ที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ ด้วยใช้เครื่องวัด Zetasizer ZS ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวัดหาขนาดอนุภาคของสารในช่วง 0.6 nm ถึง 6 μm โดยใช้หลักการ Dynamic Light Scattering (DLS) และสามารถหาค่า Zeta Potential หรือค่าประจุมบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนได้ เตรียม CS-PEI/DNA complex ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6, 4 และ 8 และเตรียม CS-PEI/siRNA complex ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6 และ 4 โดยเตรียมในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้

เป็น 1 ml แล้วนำไปวัดขนาดของอนุภาคและประจุบนผิวด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) ที่อุณหภูมิ 25 °C ผลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอย่างที่ทำการวัด 3 ครั้ง พร้อมค่า standard deviation (SD)

3.2.2.4 ตรวจสอบร้อยละของการจับ siRNA ของตัวพา CS-PEI

ความสามารถในการจับ siRNA ของตัวพา CS-PEI สามารถหาได้จากหาร้อยละของการจับ siRNA ของตัวพา CS-PEI (% Binding capacity) ที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ โดยใช้ชุด Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent (Invitrogen, New York, USA) ซึ่งมีสาร Fluorophores ที่มีคุณสมบัติในการจับกับ siRNA แล้วเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้น ซึ่งค่า Fluorescence intensity ที่วัดได้จะแปรผันตามปริมาณของ unbound-siRNA ที่ลอยอยู่ในสารแขวนลอยทำให้สามารถใช้คำนวณต่อไปได้ว่า siRNA ถูกจับไว้อยู่บนตัวพา CS-PEI ได้คิดเป็นร้อยละเท่าใดเมื่อเทียบกับ siRNA เริ่มต้น

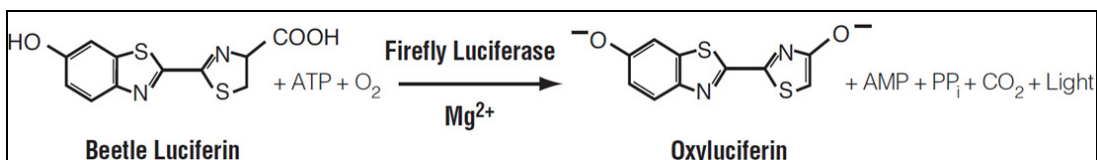
วิธีการวิจัยทำโดยเตรียม complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 4 และ 8 ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาทีแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 µl ด้วย 1X TE buffer ใน 96-well microplate เติมน้ำยาที่ใช้ตรวจสอบหาปริมาณ siRNA จาก Quant-iT™ Ribogreen® RNA Assay Kit ลงไปหลุมละ 100 µl บ่มเป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปอ่านค่า Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Inc. Massachusetts, USA) ที่ความยาวคลื่น 485/530 ทำการทดลอง 3 ครั้งสำหรับการหาค่าเฉลี่ย และค่า SD นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่าร้อยละของการจับ siRNA ดังนี้

$$\text{ร้อยละของการกักเก็บ siRNA ในตัวพา} = \left[\frac{\text{ปริมาณ siRNA เริ่มต้น} - \text{ปริมาณ siRNA ที่คงเหลือ}}{\text{ปริมาณ siRNA เริ่มต้น}} \right] \times 100$$

3.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการนำส่งยีนและความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวพา CS-PEI

3.2.3.1 ประเมินประสิทธิภาพการนำส่งยีนโดยตรวจการแสดงออกของ Luciferase

เพื่อประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของตัวพา CS-PEI ในการนำส่งพลาสมิด DNA ชนิด pGL3-CMV ที่บรรจุยีนเครื่องหมาย Luciferase เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดต่าง ๆ โดยวัดปริมาณเอนไซม์ Luciferase ที่สร้างจากพลาสมิดนำส่งด้วยวิธี Luciferase assay โดยแสง Luminescence ที่วัดได้เกิดจากปฏิกิริยา Oxidation ทางเคมีของสารตั้งต้น Luciferin เกิดเป็น Oxyluciferin โดยการทำงานของเอนไซม์ Firefly Luciferase ที่สร้างจากพลาสมิด pGL3-CMV ซึ่งค่าที่ได้จะแปรผันตามปริมาณของเอนไซม์ดังกล่าว ดังภาพที่ 3.8



ภาพที่ 3.8 ปฏิกิริยา Bioluminescence จากการทำงานของเอนไซม์ Firefly Luciferase [82]

วิธีการทดลองเริ่มจากการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa, HeLa และ C33A ในอาหารชนิด Minimum Essential Medium (MEM) Alpha media ซึ่งมี Fetal bovine serum (FBS) อยู่ 10% เมื่อเซลล์เจริญเติบโตได้ประมาณ 80-90% Confluence ให้ถ่ายเซลล์ลงใน 96-well microplate โดยใช้ปริมาณเซลล์หลุมละ 30,000 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อรอทำการถ่ายโอนยีนต่อไป เตรียม CS-PEI/DNA โดยใช้อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4 และ 8 โดยมีตัวพาไขมันประจุบวกชนิด Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, New York, USA) เป็นชุดควบคุมในการประเมินประสิทธิภาพการนำส่งโดยใช้ปริมาณ 0.4 µl ต่อพลาสมิด DNA 1 µg เปลี่ยนอาหารของเซลล์ที่เตรียมไว้เป็น Serum free media ก่อน แล้วใส่ CS-PEI/DNA complex, Lipofectamine™ 2000 และ naked DNA บ่มกับเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารกลับมาเป็น 10% FBS MEM Alpha media เลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงวัดปริมาณเอนไซม์ Luciferase โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออกแล้วเติมน้ำยา Cell culture lysis reagent ลงไปหลุมละ 30 µl เพื่อย่อยเซลล์ จากนั้นทำการวัดปฏิกิริยา Bioluminescence โดยใช้ชุด Luciferase assay

system ซึ่งจะใช้เซลล์หลังจากการย่อยปริมาณ 10 μ l ต่อน้ำยาวัดเอนไซม์ Luciferase ปริมาณ 90 μ l ของแต่ละหลุมของ 96-well luminescence plates จากนั้นนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader เพื่อดูปริมาณของเอนไซม์ Luciferase โดยค่าที่วัดได้จะรายงานเป็นหน่วยของ Relative Luminescence Units (RLU) และถูก normalize ด้วยการหาปริมาณ Total protein ของเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยวิธี Bradford protein assay ตามวิธีมาตรฐาน [83] เติมเซลล์หลังจากการย่อยลงใน 96-well microplate หลุมละ 5 μ l แล้วเติม Bradford reagent หลุมละ 250 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader (Biotek instruments, inc., Vermont, USA) จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากการเทียบกับกราฟ Standard curve เพื่อทำ Normalization กับผล Luciferase ให้อยู่ในหน่วยของ RLU/mg protein

3.2.3.2 ตรวจสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยวิธี MTT assay

วิธี MTT assay เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ต่อตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ Mitochondrial reductase ในเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะทำปฏิกิริยา Reduction กับน้ำยา (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) กลายเป็นตะกอน Formazan สีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ โดยสามารถละลายได้ใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งจะให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 570 nm ในการทดลองนี้ต้องการทดสอบความเป็นพิษของตัวพาต่อเซลล์โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง SiHa, HeLa และ C33A เป็นเซลล์ทดสอบ เลี้ยงเซลล์ทั้งสามชนิดใน 10% FBS MEM Alpha media เมื่อเซลล์โตได้ประมาณ 80-90% Confluence ถ่ายเซลล์ลง 96-well microplate หลุมละ 30,000 เซลล์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียม complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับพลาสมิด pGL3-CMV และ Lipofectamine เช่นเดียวกับการทดลองประเมินประสิทธิภาพการนำส่งโดยการวัดสัญญาณ Luciferase แล้วนำส่งเข้าสู่เซลล์ จากนั้นตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยใส่น้ำยา MTT (3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ในแต่ละหลุมของเซลล์ใช้ความเข้มข้นที่ 0.1 mg/ml แล้วนำเซลล์ไปบ่มที่ 37 °C สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดแล้วละลายตะกอนสีม่วงที่เกิดขึ้นด้วย DMSO 150 μ l นำ plate ไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสจำนวน 100 μ l มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \left[\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงจากเซลล์กลุ่มตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงจากเซลล์กลุ่มควบคุม}} \right] \times 100$$

3.2.4 ตรวจสอบผลการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก

3.2.4.1 ตรวจสอบผลการยับยั้งการแสดงออก ของยีน HPV E6/E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี RT-PCR

ประสิทธิภาพการนำส่ง siRNA ด้วยตัวพา CS-PEI เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยอาศัยการชักนำให้เกิดกระบวนการ RNAi เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน HPV E6/E7 ในระดับ mRNA สามารถตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR เนื่องจาก RNAi เป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ซึ่งจะต้องอาศัยโมเลกุล RNA สายคู่ขนาดเล็ก เช่น siRNA ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ HPV ในการชักนำให้เกิดกระบวนการดังกล่าว โดยอาศัยตัวพา CS-PEI นำส่งเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นจึงวัดระดับการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA โดยวิธี RT-PCR ซึ่งผลการยับยั้งการแสดงออกที่ได้จะแปรผันตรงกับประสิทธิภาพในการนำส่งของตัวพาดังกล่าว งานทดลองนี้เลือกใช้เซลล์ SiHa ในการทดสอบ โดยเลี้ยง SiHa ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS MEM Alpha media เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 80-90% Confluence ถ่ายเซลล์ลง 12-well cell culture plate หลุมละ 30,000 เซลล์ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้รอนำส่งเข้าสู่เซลล์ จากนั้นเตรียม complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA ที่

อัตราส่วน N/P 1.6 โดยมีตัวพา Lipofectamine เป็นกลุ่มตัวแปรควบคุม ก่อนทำการทดสอบให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น Serum free media ก่อนแล้วนำส่ง complex ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนกลับเป็น 10% FBS MEM Alpha media และเลี้ยงเซลล์ต่อที่ช่วงเวลา 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สกัด RNA จากเซลล์หลังจากการนำส่งที่ช่วงเวลาดังกล่าว โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมดแล้วเติมน้ำยา TRI Reagent® ลงไปหลุมละ 1 ml บ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทั้งหมดใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม Chloroform ลงไปหลอดละ 200 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer (FINEPCR, Gyenggi-do, Korea) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยเครื่อง Micro high speed refrigerated centrifuge ดูดส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วเติม 100% Isopropanol ลงไปในหลอดจำนวน 500 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วข้างต้นอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและเติม 70% Ethanol in DEPC ลงไป 1 ml แล้วปั่นล้างที่ความเร็ว 7,500 g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เทส่วนใสทิ้งอีกครั้งแล้วตากตะกอน RNA ที่สกัดได้ให้แห้งแล้วละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำกลั่น DEPC-treated Water เพื่อนำไปทำ RT-PCR โดยใช้ชุด Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (Roche) ต่อไป

ก่อนการทำ RT-PCR จะต้องมีขั้นตอนการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนมาในขั้นตอนของการสกัด RNA โดยใช้ชุด RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Wisconsin, USA) ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของ RNA ที่สกัดได้เท่ากับ 55 ng โดยเตรียมสัดส่วนของสารเคมีต่าง ๆ ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการกำจัด DNA จากสิ่งตัวอย่าง

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (µl)
RQ1 DNase 10X Reaction Buffer	1
RQ1 RNase-Free DNase	1
RNA ความเข้มข้น 55 ng/µl	1
DEPC-treated water	7

เมื่อเตรียมสารดังกล่าวครบแล้วให้นำหลอดทดลองดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Stop Solution ลงไป 1 µl แล้วนำไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 65 °C อีก 10 นาทีแล้ว นำ RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนไปทำ RT-PCR ต่อไปโดยใช้สัดส่วนสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT-PCR ดังนี้

ตารางที่ 3.2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการทำ RT-PCR

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (µl)
5X Reaction buffer (vial 2)	3
Forward primer (ตารางที่ 3.5)	final concentration 0.4 µM
Reward primer (ตารางที่ 3.5)	final concentration 0.4 µM
Transcriptoe Enzyme Mix (vial 1)	0.2
Water PCR Grade (vial 3)	Final volume 15 µl
Template RNA (5 ng/µl)	1

หลังจากเตรียมสารที่ใช้ทำ RT-PCR เสร็จสิ้นขั้นตอนต่อไปก็จะนำหลอดทดลอง PCR ไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler รุ่น DNA Engine โดยตั้งโปรแกรมขั้น Reverse Transcription ที่อุณหภูมิ 50 °C 30 นาทีต่อด้วยขั้น Initial Denaturation ที่ 94 °C 7 นาที ตามด้วยขั้น Standard PCR profile แบ่งออกเป็น Denaturation ที่ 94 °C 10 วินาที, Annealing ที่ 58 °C 30 วินาที และ Elongation ที่ 68 °C 30 วินาทีโดยตั้งค่าไว้ 30 รอบในการทำ จากนั้นเข้าสู่ขั้น Final Elongation ที่ 68 °C 7 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบโดยการทำ Agarose Gel

Electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 3% และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 90 โวลต์ 30 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยเครื่อง Gel documentation (Gel doc) systems (Syngene, Cambridge, United Kingdom)

ตารางที่ 3.3 Primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR [84]

Primer	Sequence		ความยาวของ PCR product
E6	forward primer	5' TGAGGTATATGACTTTGCTTTTC 3'	297 bp
	reverse primer	5' CAAGACATACATCGACCGGTCC 3'	
E7	forward primer	5' AAATGACAGCTCAGAGGAGGAG 3'	209 bp
	reverse primer	5' GTTTCTGAGAACAGATGGGGCAC 3'	
GAPDH	forward primer	5' GACCACAGTCCATGCCATCACT 3'	452 bp
	reverse primer	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'	

3.2.4.2 ตรวจสอบผลการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี Confocal laser scanning microscopy

เพื่อศึกษาผลการนำส่ง siRNA โดยตัวพา CS-PEI เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง โดยอาศัยการย้อมสีเซลล์และติดตาม siRNA ด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด Rhodamine โดยใช้ชุด *Label IT® siRNA Tracker Intracellular Localization Kit* ตรวจสอบผลด้วย Confocal laser scanning microscopy โดยชุดน้ำยา *The Label IT® siRNA Tracker Kits* ที่ใช้ติดตามมีคุณสมบัติในการจับกับส่วนของ siRNA โดยไม่ไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติในการชักนำให้เกิดกระบวนการ RNAi หลังจากนำส่ง siRNA ที่ติดตามเข้าสู่เซลล์แล้วตรวจสอบโดยการทำงานของ Confocal laser scanning microscopy จะอาศัยแสง Laser เป็นแหล่งกำเนิดแสงส่องผ่านไปยังวัตถุ เมื่อวัตถุได้รับพลังงานจากแสง Laser ก็จะไปปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปแบบของการเรืองแสง ซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์เซลล์หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทำให้เราทราบลักษณะของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้นำส่ง siRNA เข้าไปภายในเซลล์

ในขั้นตอนแรกจะเริ่มจากการติดฉลาก siRNA ที่จะใช้ในการนำส่งด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด Rhodamine โดยใช้ชุด Label IT® siRNA Tracker Intracellular Localization Kit (Mirus Bio Corporation) ซึ่งมีสัดส่วนของสารเคมีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.4 ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการติดฉลาก siRNA ด้วยสี Rhodamine

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (µl)
H ₂ O (Molecular biology grade)	70
10X labeling Buffer A	10
siRNA duplex ความเข้มข้น 1 µg/µl	10
Label IT siRNA Tracker Reagent	10

หลังจากที่เตรียมสารดังกล่าวในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เสร็จแล้ว ให้นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที (เมื่อผ่านไป 30 นาทีแรกให้นำหลอดทดลองออกมา Spin down) เมื่อครบเวลาให้เติม 5M NaCl จำนวน 10 µl ร่วมกับ 100% Ethanol ที่แช่เย็น ลงไป 250 µl จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที ขั้นตอนต่อมาให้นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,500 g เป็นเวลา 15 นาที 4 °C แล้วดูดส่วน Ethanol ออกจากนั้นล้างตะกอนอีกรอบด้วย 70% Ethanol ปริมาณ 500 µl ปั่นที่ความเร็วเดิมแล้วดูดเอาส่วนใสออก จะได้ตะกอนของ siRNA ที่ติดฉลากด้วยสี Rhodamine ขั้นสุดท้ายให้ละลายตะกอนด้วย siRNA Dilution buffer 40 µl เพื่อใช้ในการนำส่งเข้าสู่เซลล์ต่อไป

เลี้ยงเซลล์ SiHa ใน 10% FBS MEM Alpha media เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 80-90% Confluence ถ่ายเซลล์ลง 6-well cell culture plate ที่มี Cover slip ขนาด 35 mm² อยู่ที่ก้นหลุม โดยใช้ปริมาณเซลล์หลุมละ 500,000 นำไปปั่นที่ 37 °C สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียม complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด Rhodamine ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 เมื่อเตรียม complex เสร็จสิ้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น Serum free media ก่อนแล้วนำส่ง complex ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนกลับมาเป็น 10% FBS MEM Alpha media แล้วเลี้ยงต่อไปอีก 18 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมให้หมดแล้วล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) สองรอบจากนั้น Fixed cell ด้วย 100% Ethanol จำนวน 2 ml ลงไปในหลุมที่มีเซลล์แล้วจับเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องจากนั้นดูดออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ml ที่ผสมกับสีชนิด Hoechst 33258 จำนวน 40 μ l (ความเข้มข้น 0.1 mg/ml) แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้าง PBS แล้วนำแผ่น Cover slip ด้านใต้ของหลุมที่มีเซลล์ที่ย้อมอยู่มาเตรียมเป็นแผ่นสไลด์เพื่อตรวจสอบต่อไปด้วยกล้อง Confocal laser scanning microscopy รุ่น Olympus Fluoview 1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)

3.3. การวิเคราะห์ผล

ผลการทดลอง Luciferase assay, รั้อยละของการกักเก็บ siRNA ภายในตัวพา CS-PEI, Cell viability และการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA จะแสดงเป็นค่า Mean \pm Standard deviation (SD) โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง และในการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองจะใช้สถิติ One-way analysis of variance (One-way ANOVA) ตามด้วยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณของ Tukey's HSD (honestly significant difference) test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS รุ่น 17.0

บทที่ 4

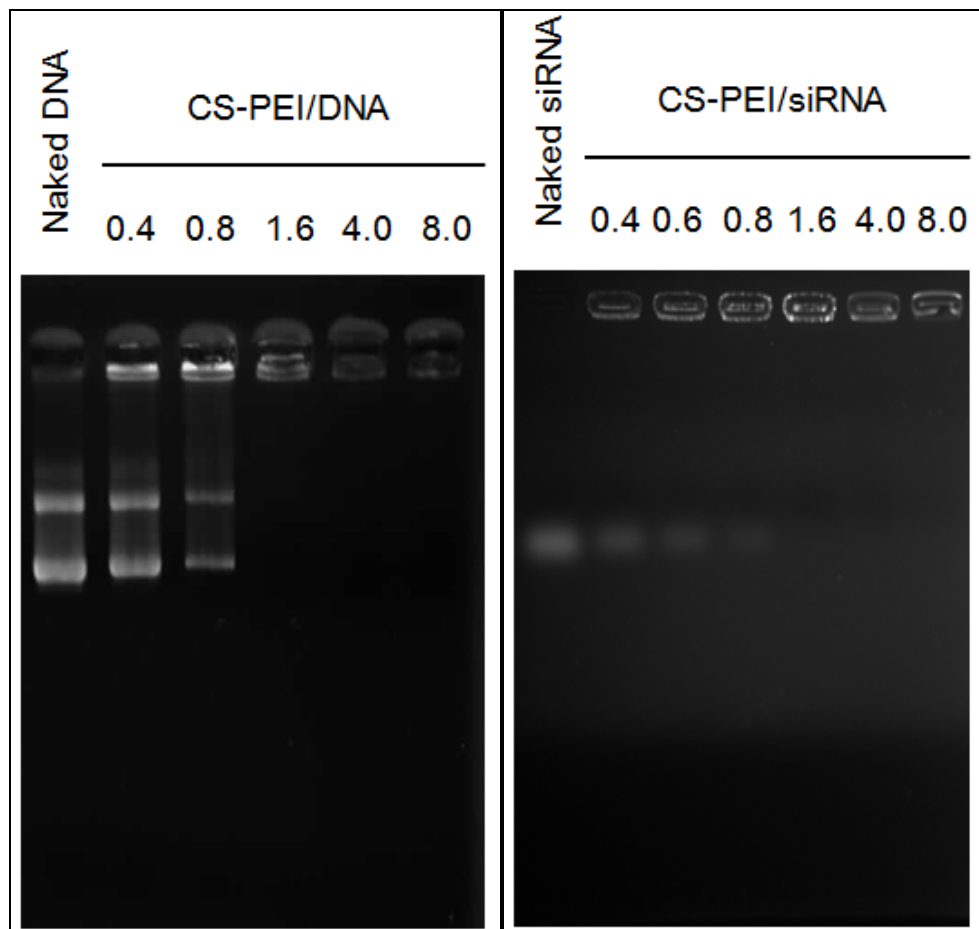
ผลการทดลอง

4.1 ผลการตรวจสอบคุณลักษณะและคุณสมบัติของตัวพา CS-PEI

4.1.1 ผลการตรวจสอบความสามารถในการจับกันของตัวพา CS-PEI กับ DNA และ siRNA โดยวิธี Gel retardation assay

ความสามารถในการจับ DNA และ siRNA ของตัวพา CS-PEI ทดสอบได้โดยการทำให้ Gel retardation assay วิธีนี้ยังใช้หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ complex ที่เกิดการจับของ CS-PEI และ DNA ได้อีกด้วย การจับตัวพาของ DNA เตรียมโดยผสม CS-PEI/DNA complex ที่อัตราส่วน amine/phosphate molar ratio (N/P) ของอนุภาคและพลาสมิด CS-PEI/pGL3-CMV เป็น 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 และการจับกับ siRNA เตรียมโดยผสม CS-PEI/siRNA complex ที่อัตราส่วน N/P เป็น 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 เมื่อเกิดการจับกันระหว่างตัวพา CS-PEI ซึ่งมีประจุบวกกับ DNA หรือ siRNA ซึ่งมีประจุลบที่อัตราส่วนแตกต่างกัน จะเกิด complex ที่มีขนาดและประจุที่แตกต่างกัน มีผลต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของ complex ตรวจสอบได้ด้วยการทำให้ Gel electrophoresis หากมีการจับกันอย่างสมบูรณ์ระหว่าง CS-PEI และ DNA หรือ siRNA ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ถูกหน่วงจนไม่สามารถตรวจสอบพบ DNA หรือ siRNA ในเจลได้ เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide

ผลการทำ Gel retardation assay พบว่าที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 ตัวพา CS-PEI สามารถจับกับทั้ง DNA และ siRNA ได้อย่างสมบูรณ์เปรียบเทียบกับลักษณะแถบของ DNA และ siRNA เปล่าที่ไม่ได้จับกับตัวพา (Naked DNA และ Naked siRNA) ในขณะที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4 ถึง 0.8 ยังคงเห็นแถบการเคลื่อนอันเนื่องมาจากการจับกันที่ไม่สมบูรณ์ของตัวพาดังภาพที่ 4.1

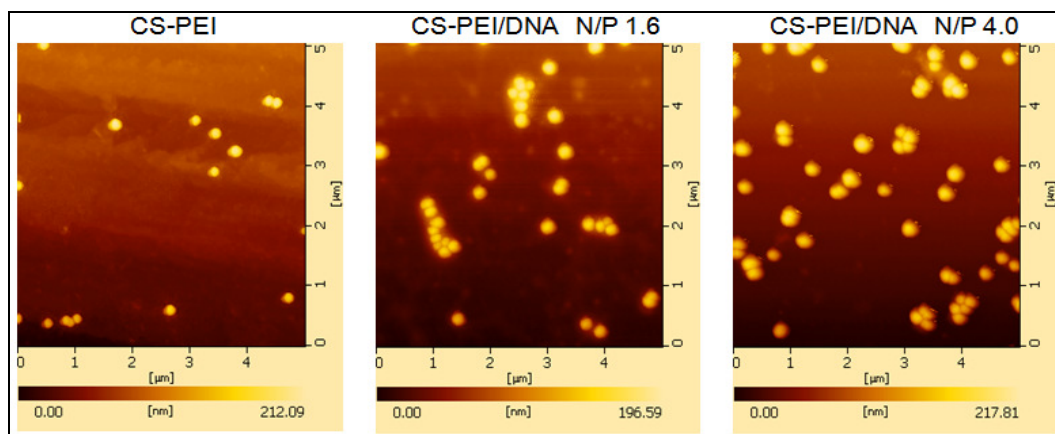


ภาพที่ 4.1 ผลการทำ Gel retardation assay โดยใช้ตัวพา CS-PEI จับกับ DNA (pGL3-CMV) และ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ

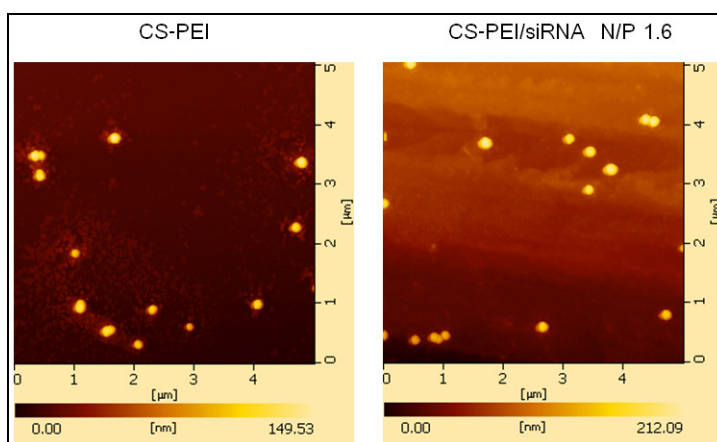
4.1.2 ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA complex โดย Atomic force microscope (AFM)

การตรวจสอบรูปร่างของตัวพา และ complex ที่เกิดจากการจับกันของ CS-PEI และ DNA ทำได้โดยใช้ AFM ซึ่งเตรียมตัวอย่างสำหรับส่องกล้องด้วยการหยดตัวอย่างลงบนแผ่น mica เมื่อตัวอย่างแห้งแล้ว นำมาสแกนภาพด้วยเข็มที่มีความเร็ว 1.0 Hz ในบริเวณ $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ ด้วย Dynamic force microscope (DFM) mode (Seiko SPA4000, Japan) ผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 4.2 พบว่า complex N/P 1.6 และ 4.0 มีขนาดมากขึ้นเนื่องจากการจับของ DNA ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับผล gel retardation ที่ complex เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ที่ N/P ดังกล่าวนอกจากนี้ยังพบว่า complex มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็กมีการกระจายตัวอย่างอิสระและมีขนาดสม่ำเสมอ และมีขนาดใหญ่กว่าตัวพาปกติเนื่องจากการสะสมของ DNA

ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบตาม CS-PEI/siRNA complex เช่นกัน แต่เนื่องจาก siRNA มีขนาดเล็กและสั้นทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับการตรวจสอบตามผลการจับด้วย AFM ผลที่ได้จึงไม่พบแตกต่างระหว่างตัวพาและ CS-PEI/siRNA complex (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวพา CS-PEI และ complex ระหว่าง CS-PEI กับ DNA (pGL3-CMV) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 และ 4



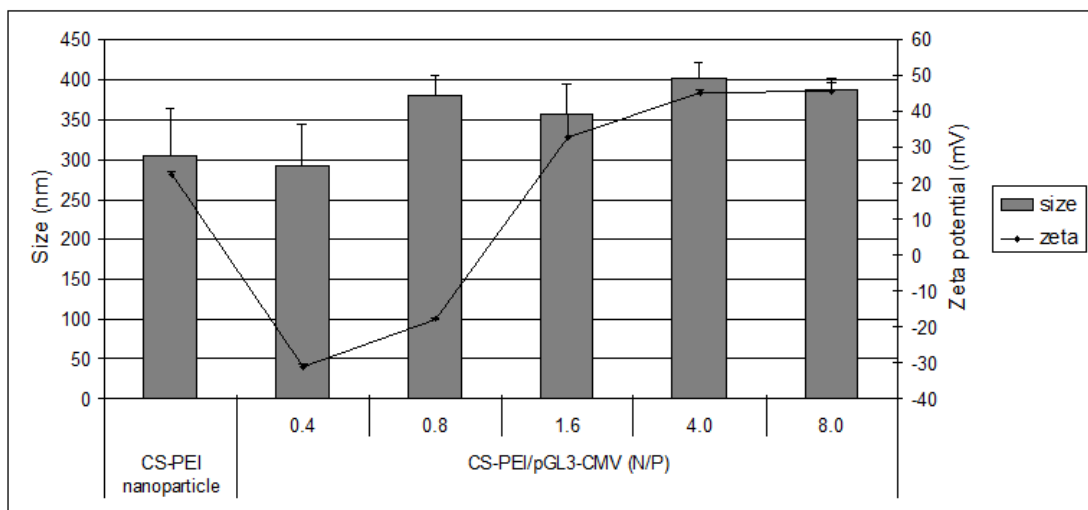
ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวพา CS-PEI และ complex ระหว่าง CS-PEI กับ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6

4.1.3 ผลการตรวจสอบขนาดและค่าประจุพื้นผิวของ CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA complex ด้วยการวัด Zetasizer

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ CS-PEI/DNA complex อันประกอบด้วยขนาดของอนุภาคแขวนลอย (Z-average hydrodynamic diameter) และค่าประจุพื้นผิวของอนุภาค ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย dynamic light scattering (DLS) (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) ผลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่ทำการวัด 3 ครั้ง พร้อมค่า standard deviation (SD)

ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของ CS-PEI/DNA complex เมื่อวัดด้วย DLS แสดงผลในภาพ 4.4 พบว่าไม่มีความแตกต่างในกลุ่มของ CS-PEI/DNA ที่มีอัตราส่วน N/P เป็น 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 ขนาดของ complex ที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 300 ถึง 400 nm ซึ่งเป็นขนาดที่ยอมรับได้สำหรับการถ่ายโอนยีน [87, 88] จากเดิมที่ค่าประจุของอนุภาค CS-PEI เท่ากัน 22.23 mV แต่เมื่อเกิดเป็น complex แล้วค่าประจุของ complex เปลี่ยนไปที่ N/P ratio ต่าง ๆ ผลของค่าประจุที่วัดได้สอดคล้องกับผลของ gel retardation กล่าวคือ ที่ N/P 0.4 และ 0.8 ประจุรวมของ complex solution มีค่าเป็นลบและประจุมีค่าเป็นบวกเพิ่มเรื่อย ๆ โดยเมื่อ N/P 1.6, 4.0 และ 8.0 มีค่าประจุเป็น 32.80, 45.36 และ 45.80 mV ตามลำดับ

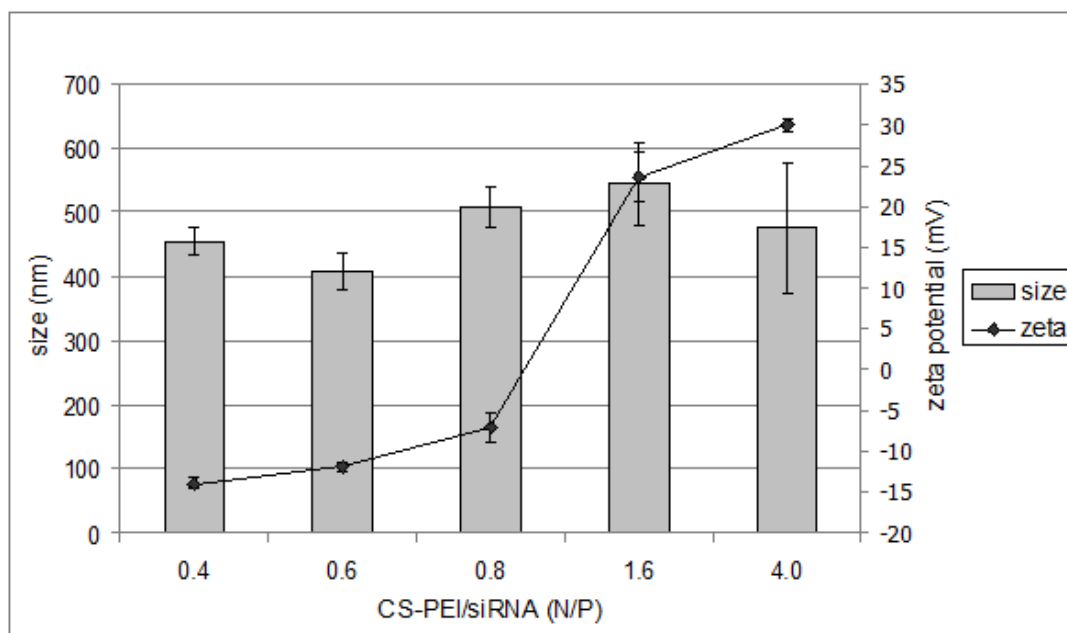
ผลการวัดขนาดพบว่า CS-PEI/siRNA complex ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 และ 4.0 ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกับ CS-PEI/siRNA complex ขนาดที่ได้อยู่ในช่วง 400-500 nm และค่าประจุเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของ N/P ratio ดังภาพ 4.5 ค่าประจุที่เป็นบวกนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการนำส่งเนื่องจาก complex ประจุบวกมีความชอบและจับได้ดีกับผนังเซลล์ซึ่งมีประจุเป็นลบได้ดี



ภาพที่ 4.4 ค่าขนาดและประจุของตัวพา CS-PEI และ complex ระหว่าง CS-PEI กับ DNA (pGL3-CMV) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6, 4, และ 8

ตารางที่ 4.1 ค่าขนาดและประจุของตัวพา CS-PEI และ complex ระหว่าง CS-PEI กับ DNA (pGL3-CMV) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.8, 1.6, 4, และ 8

Sample	N/P	Size (nm)	Zeta (mV)
CS-PEI		305 ± 59	22 ± 1.0
CS-PEI/DNA	0.4	293 ± 52	-31 ± 1.0
CS-PEI/DNA	0.8	380 ± 24	-17 ± 0.5
CS-PEI/DNA	1.6	356 ± 37	32 ± 6.0
CS-PEI/DNA	4.0	402 ± 18	45 ± 0.6
CS-PEI/DNA	8.0	388 ± 7	45 ± 3.0



ภาพที่ 4.5 ค่าขนาดและประจุของ complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 และ 4

ตารางที่ 4.2 ค่าขนาดและประจุของ complex ระหว่างตัวพา CS-PEI กับ siRNA (Si16E6-Sequence 10) ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 และ 4

Sample	N/P	Size (nm)	Zeta (mV)
CS-PEI/siRNA	0.4	455 ± 22	-14 ± 0.7
CS-PEI/siRNA	0.6	409 ± 29	-12 ± 0.5
CS-PEI/siRNA	0.8	509 ± 31	-7 ± 1.7
CS-PEI/siRNA	1.6	545 ± 65	24 ± 3.1
CS-PEI/siRNA	4.0	475 ± 101	30 ± 0.8

4.1.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการจับ siRNA เติงปริมาณ

ความสามารถในการจับ siRNA ของตัวพา CS-PEI เมื่อเตรียม complex ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 สามารถวิเคราะห์ออกมาในเชิงปริมาณได้ด้วยชุด Quant-iT™ RiboGreen® RNA reagent (Invitrogen, New York, USA) ดังขั้นตอนการทำการทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.2.4 ผลการทดลองสรุปดังตารางที่ 4.3 ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับผล gel retardation กล่าวคือ gel retardation พบว่า complex เริ่มเกิดอย่างสมบูรณ์ที่ N/P 1.6 ซึ่งตรงกับค่า binding capacity ที่ 99.5 ± 0.50 % แสดงว่าแทบจะไม่มีปริมาณ unbound siRNA เหลืออยู่ และแม้ว่าจะใส่อนุภาคเพิ่มขึ้นที่ N/P มากขึ้นเป็น 4.0 และ 8.0 ค่า binding capacity ก็ยังมีค่าใกล้เคียงเดิมคือ 99.3 ± 0.30 % และ 97.9 ± 0.50 ตามลำดับ การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการจับ siRNA และยืนยันว่าผลการจับอย่างสมบูรณ์เกิดขึ้นได้เมื่อ N/P เท่ากับ 1.6 หรือมากกว่า ดังนั้นสำหรับการนำส่ง siRNA เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนจึงเลือก N/P 1.6 สำหรับการศึกษาดังต่อไป

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการจับ siRNA ของ CS-PEI ในเชิงปริมาณ

CS-PEI/siRNA (N/P)	Binding capacity (%)
0.4	35.9 ± 12.8
0.6	59.7 ± 14.7
0.8	72.5 ± 13.3
1.6	99.5 ± 0.50
4.0	99.3 ± 0.30
8.0	97.9 ± 0.50

4.2 ผลการทดสอบการนำส่งยีนและความเป็นพิษด้วยตัวพา CS-PEI

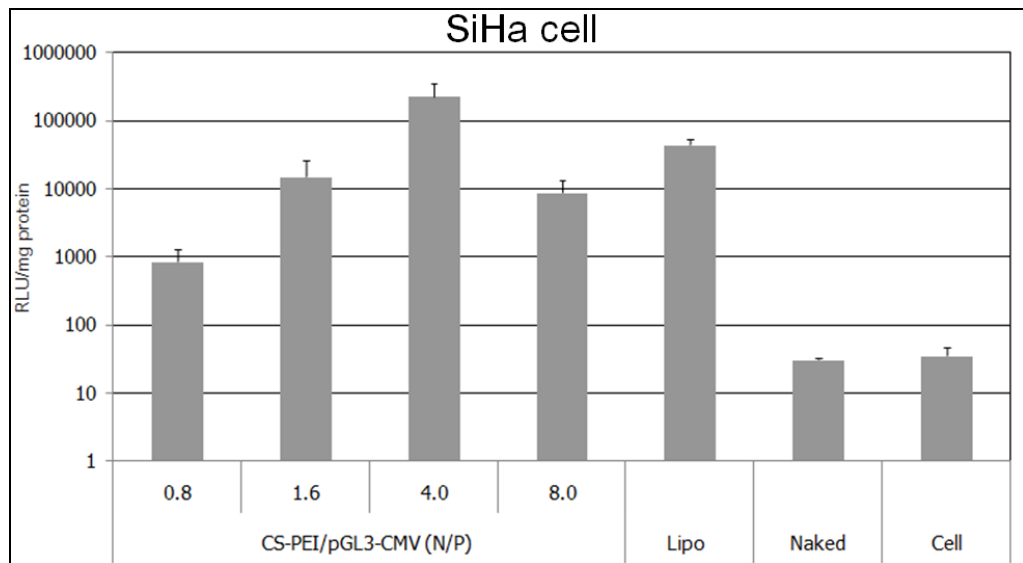
4.2.1 ผลการประเมินประสิทธิภาพการนำส่งโดยการวัดสัญญาณ Luciferase

ก่อนที่จะมีการทดสอบการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกนั้น งานวิจัยนี้ได้ทดลองนำส่งยีนเพื่อเป็นประเมินความสามารถของตัวพา CS-PEI ในเบื้องต้น โดยใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิด DNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa, SiHa และ C33A เป็นการศึกษา นำร่องเพื่อยืนยันว่าตัวพาที่ใช้สามารถนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกได้จริง อีกทั้งการนำส่งยีน ยังตรวจติดตามประสิทธิภาพได้ง่ายเมื่อเทียบกับการนำส่ง siRNA สำหรับ complex ของ CS-PEI/DNA ถูกเตรียมโดยใช้พลาสมิด DNA ชนิด pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เป็น 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 ดังกล่าวไว้ในข้อ 3.2.3.1 มี Lipofectamine ซึ่งเป็นตัวพาทางการค้า และพลาสมิดเปล่า (Naked pGL3-CMV) ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ประสิทธิภาพการนำส่งวัดได้จากปริมาณของเอนไซม์ Luciferase ที่เป็นผลจากการแสดงออกของพลาสมิดที่ถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะวัดออกมาเป็นค่า Relative Luminescence Units (RLU) เทียบกับปริมาณโปรตีนแต่ละหลุมเพื่อปรับให้อยู่ในรูปของ RLU/mg protein

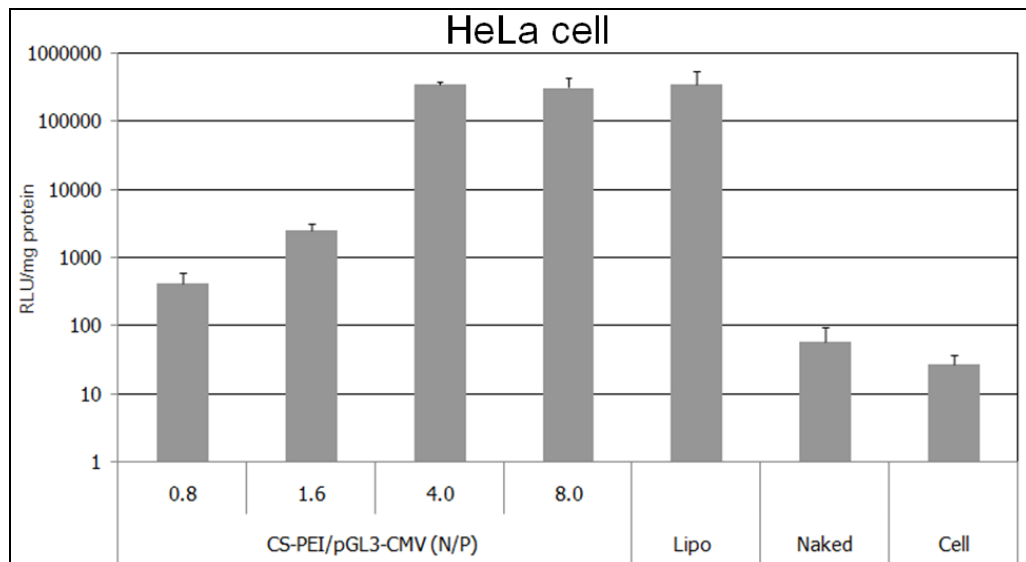
ผลการนำส่งพลาสมิด DNA เข้าสู่เซลล์ SiHa พบว่าที่อัตราส่วน N/P ระหว่างตัวพา CS-PEI กับพลาสมิด pGL3-CMV เท่ากับ 4 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งเข้าสู่เซลล์สูงที่สุดรองลงมาคือ การนำส่งด้วยตัวพา Lipofectamine และตัวพา CS-PEI ที่ N/P 1.6 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.6

ผลการนำส่งพลาสมิด DNA เข้าสู่เซลล์ HeLa พบว่าที่อัตราส่วน N/P ระหว่างตัวพา CS-PEI กับพลาสมิด pGL3-CMV เท่ากับ 4 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งเข้าสู่เซลล์สูงที่สุดรองลงมาคือ การนำส่งด้วยตัวพา Lipofectamine และตัวพา CS-PEI ที่ N/P 8 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.7

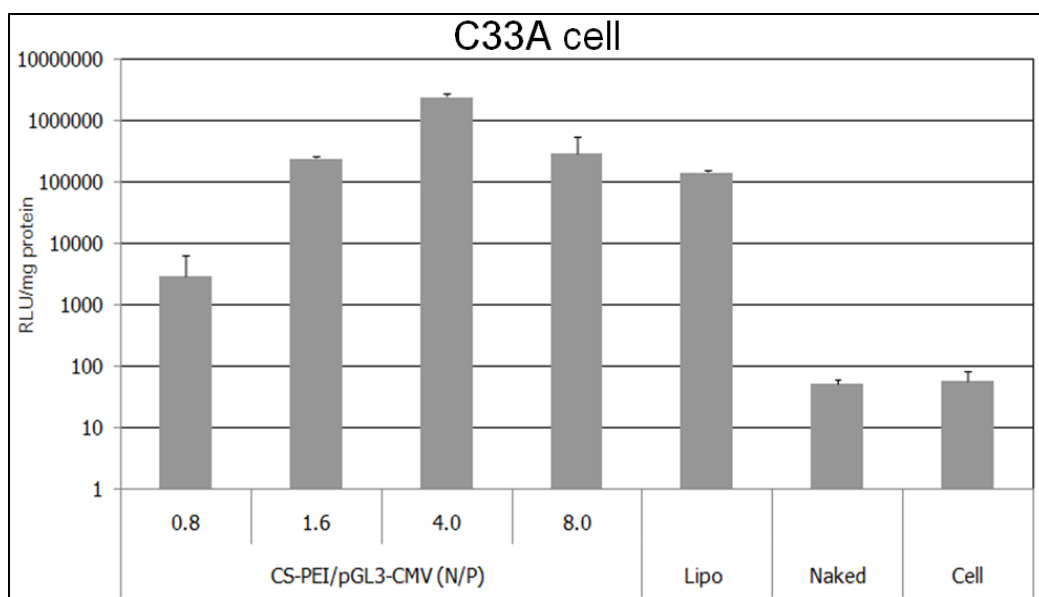
ผลการนำส่งพลาสมิด DNA เข้าสู่เซลล์ C33A พบว่าที่อัตราส่วน N/P ระหว่างตัวพา CS-PEI กับพลาสมิด pGL3-CMV เท่ากับ 4 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งเข้าสู่เซลล์สูงที่สุดรองลงมาคือ การนำส่งโดยใช้ตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 8 และ 1.6 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณสัญญาณ Luciferase ของเซลล์ชนิด SiHa เมื่อนำส่งพลาสมิด pGL3-CMV โดยตัวพา CS-PEI ที่ N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และเซลล์เปล่า ตามลำดับ



ภาพที่ 4.7 แสดงปริมาณสัญญาณ Luciferase ของเซลล์ชนิด HeLa เมื่อนำส่งพลาสมิด pGL3-CMV โดยตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และเซลล์เปล่า ตามลำดับ



ภาพที่ 4.8 แสดงปริมาณสัญญาณ Luciferase ของเซลล์ชนิด C33A เมื่อนำส่งพลาสมิด pGL3-CMV โดยตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และเซลล์เปล่า ตามลำดับ

ผลการทดลองในภาพที่ 4.6, 4.7 และ 4.8 แสดงให้เห็นว่า CS-PEI สามารถนำส่งยีน luciferase เข้าสู่เซลล์ได้และให้ผลดีเทียบเคียงได้กับ Lipofectamine ประสิทธิภาพการนำส่งของ CS-PEI นั้นขึ้นอยู่กับค่า N/P ของ complex พบว่า N/P ในช่วง 1.6 และ 8.0 ให้ผลการถ่ายโอนที่ดี โดยจะดีที่สุดที่ N/P 4.0 ในเซลล์ทั้งสามชนิด หาก N/P ต่ำกว่า 1.6 ผลการถ่ายโอนยีนจะมีประสิทธิภาพต่ำ อาจเนื่องมาจากปริมาณของอนุภาคไม่เพียงพอที่จะจับ DNA ปริมาณ 1 μg ได้หมด ทำให้การนำส่งและการปกป้อง DNA เกิดได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ แต่หากถ่ายโอนยีนด้วย complex ที่ N/P ratio มากเกินไป ปริมาณอนุภาคซึ่งมีอยู่มากเกินไปอาจจะชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากประจุบวกที่มากเกินไปมีแนวโน้มทำให้เซลล์รั่วได้ ซึ่งจะได้ทดสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งวิเคราะห์ได้โดยการทำการ MTT assay ดังที่จะกล่าวต่อไป

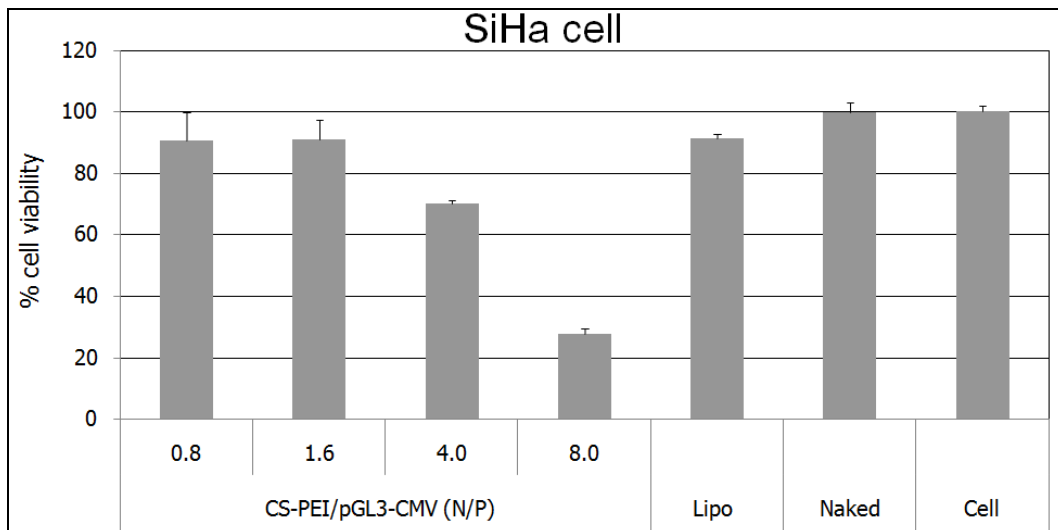
4.2.2 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยวิธี MTT assay

ความเป็นพิษของตัวพา CS-PEI ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa, HeLa และ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแล้ว ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay เพื่อหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ผลที่ได้เป็นดังภาพที่ 4.10, 4.11 และ 4.12

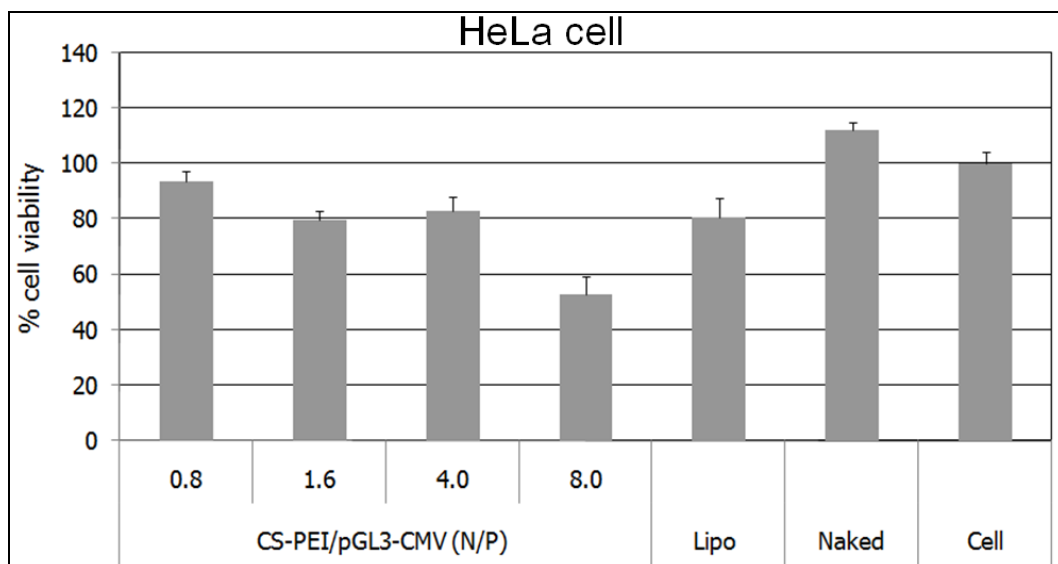
ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ SiHa พบว่าเมื่อใช้ตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4 และ 8 ให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 91%, 91%, 70% และ 28% ในขณะที่ตัวพา Lipofectamine รวมถึง Naked pGL3-CMV กับกลุ่มเซลล์เปล่าให้ค่าอยู่ที่ 91%, 100% และ 100% ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.9

ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa พบว่าเมื่อใช้ตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4 และ 8 ให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 94%, 80%, 83% และ 53% ในขณะที่ตัวพา Lipofectamine รวมถึง Naked pGL3-CMV กับกลุ่มเซลล์เปล่าให้ค่าอยู่ที่ 81%, 112% และ 100% ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.10

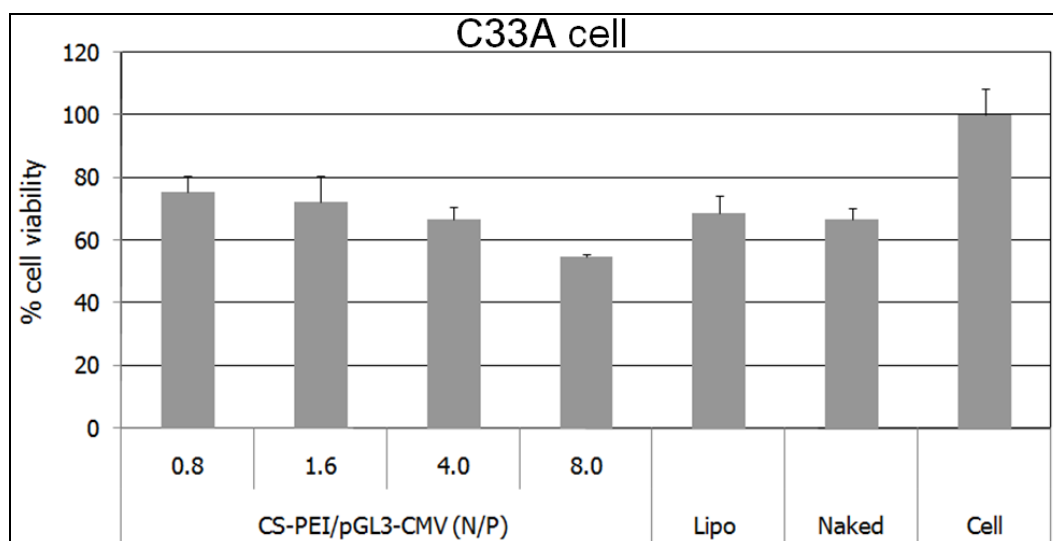
ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ C33A พบว่าเมื่อใช้ตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4 และ 8 ให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 76%, 72%, 67% และ 55% ในขณะที่ตัวพา Lipofectamine รวมถึง Naked pGL3-CMV กับกลุ่มเซลล์เปล่าให้ค่าอยู่ที่ 69%, 67% และ 100% ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.9 แสดงร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SiHa (% Cell viability) เมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิด pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และกลุ่มเซลล์ตามลำดับ



ภาพที่ 4.10 แสดงร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HeLa (% Cell viability) เมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิด pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และกลุ่มเซลล์ตามลำดับ



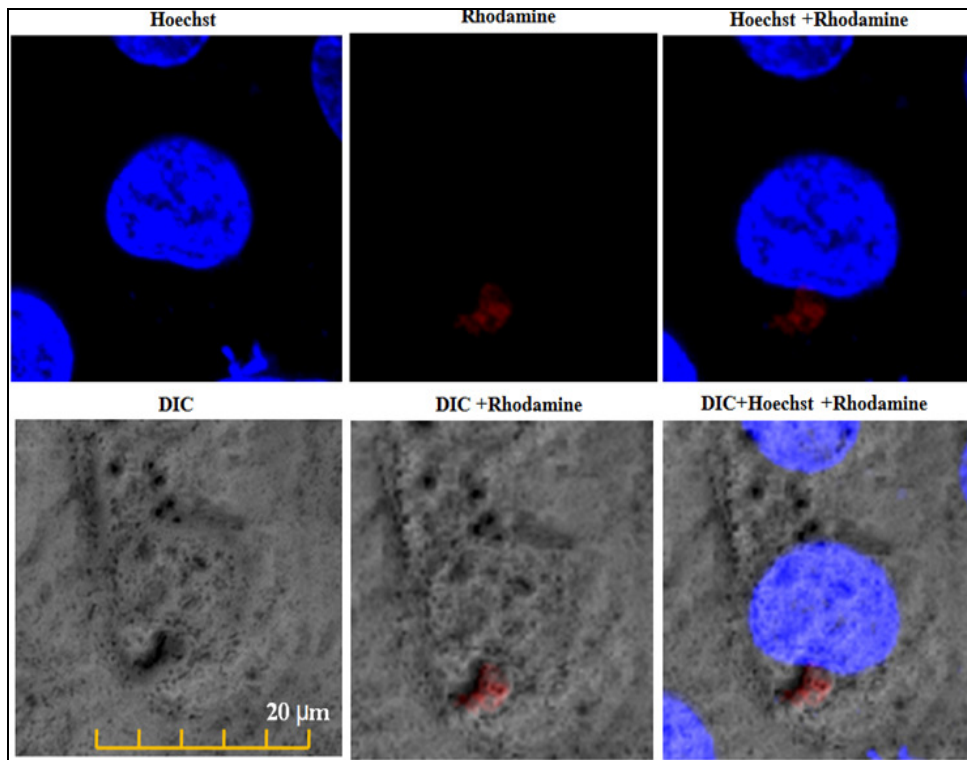
ภาพที่ 4.11 แสดงร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ C33A (% Cell viability) เมื่อใช้ตัวพา CS-PEI นำส่งพลาสมิด DNA pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 0.8, 1.6, 4.0 และ 8.0 รวมถึงกลุ่มควบคุมที่นำส่งด้วย Lipofectamine, Naked pGL3-CMV และกลุ่มเซลล์ ตามลำดับ

ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวพาที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa, HeLa และ C33A โดยวิธี MTT assay พบว่าเมื่อนำส่งด้วยตัวพา CS-PEI, Lipofectamine และพลาสมิด DNA เปล่า เซลล์แต่ละชนิดมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของตัวพา โดยใน SiHa และ HeLa พบว่า CS-PEI/DNA ที่ N/P เท่ากับ 4 และ 8 จะส่งผลทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ (มีอัตราการรอดต่ำกว่า 70 %) สอดคล้องกับผลการนำส่ง luciferase ที่สะท้อนว่าหากถ่ายโอนยีนด้วย complex ที่ N/P ratio มากเกินไป ปริมาณอนุภาคจะชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และในที่สุดจะทำให้เซลล์ร่วงและตายได้ ดังนั้นการใช้ตัวพาประจวบในการถ่ายโอนยีนนั้นต้องใช้ปริมาณของอนุภาคที่พอเหมาะด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่า C33A มีอัตราการรอดที่ต่ำกว่า SiHa และ HeLa ดังนั้นสำหรับการนำส่ง siRNA ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ SiHa เป็นเซลล์ทดสอบเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงง่าย สะดวกต่อการสกัด RNA มาวิเคราะห์ต่อไป

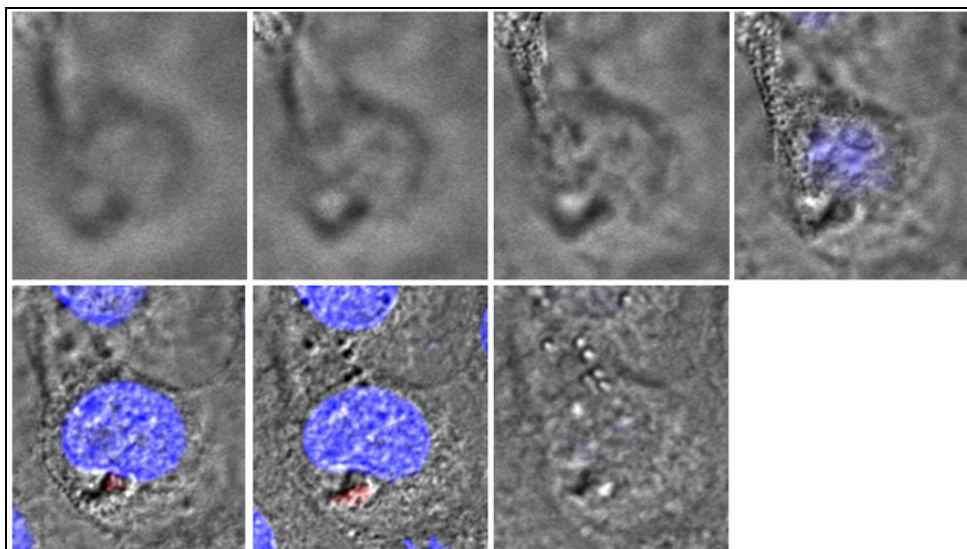
4.3 ผลการตรวจสอบผลการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก

4.3.1 การยืนยันการเข้าสู่เซลล์ (Cellular internalization) ของ CS-PEI/siRNA complex

จากผลการนำส่งยีนและความเป็นพิษด้วยตัวพา CS-PEI ใน SiHa พบว่าที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งในระดับที่ดีมีค่าใกล้เคียงกับการนำส่งด้วยตัวพา Lipofectamine รวมถึงความปลอดภัยต่อเซลล์ จึงจะเลือกอัตราส่วนดังกล่าวมาใช้นำส่ง siRNA ที่จำเพาะต่อยีน E6/E7 ของเชื้อ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa โดยในขั้นนี้จะตรวจสอบความสามารถของตัวพา CS-PEI ในการนำส่ง siRNA ที่ติดฉลากด้วยสี Rhodamine (Rho-siRNA) แล้ว โดยเตรียม CS-PEI/Rho-siRNA complex ที่ N/P 1.6 นำส่งเข้า SiHa เพื่อตรวจสอบการเข้าสู่เซลล์ของ complex หลังจากการทำ transfection 18 ชั่วโมง ด้วย differential interference contrast (DIC) confocal imaging โดยได้ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสี Hoechst จากภาพที่ 4.12 พบสัญญาณของ Rho-siRNA ใน cellular compartment แสดงว่าการนำส่ง siRNA ด้วย CS-PEI ประสบผลสำเร็จ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากภาพการทำ Z-stack confocal image โดยยิงแสงเลเซอร์ผ่านเซลล์เป็นชั้น ๆ ทำให้เห็น siRNA อยู่ภายในเซลล์ได้ (ภาพที่ 4.13)



ภาพที่ 4.12 DIC confocal imaging แสดงผลการตรวจสอบการนำส่ง siRNA ที่ติดฉลากด้วยสี Rhodamine (Rho-siRNA) ด้วยตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วนของ CS-PEI/Rho-siRNA N/P เท่ากับ 1.6 หลังการนำส่งเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นิวเคลียสของเซลล์ SiHa ย้อมสี Hoechst

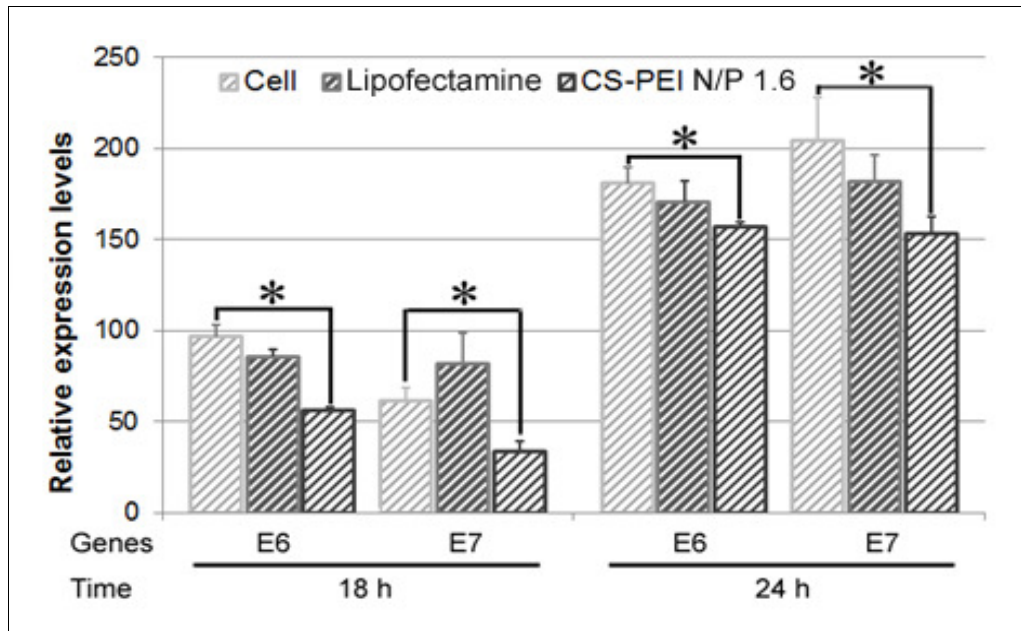


ภาพที่ 4.13 ผลการทำ Z-stack ของเซลล์ SiHa หลังการนำส่ง 18 ชั่วโมง ด้วย CS-PEI/Rho-siRNA ที่ N/P 1.6 ภาพได้จากการยิงแสงเลเซอร์ตัดเซลล์ออกเป็น 7 ชั้น

4.3.2 ผลการตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน HPV E6/E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยวิธี RT-PCR

ผลการนำส่งยีนและความเป็นพิษด้วยตัวพา CS-PEI ใน SiHa พบว่าที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งในระดับที่ดี มีค่าใกล้เคียงกับการนำส่งด้วยตัวพา Lipofectamine รวมถึงความปลอดภัยต่อเซลล์ และภาพจาก DIC confocal imaging ช่วยยืนยันการเข้าสู่เซลล์ได้จริงของ siRNA ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกเตรียม CS-PEI/siRNA ที่อัตราส่วนดังกล่าวเพื่อนำส่ง siRNA ที่จำเพาะต่อยีน E6/E7 ของเชื้อ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ของยีนดังกล่าว โดยใช้ Lipofectamine เป็นตัวพาควบคุมในการนำส่ง และวิเคราะห์ผลการนำส่งด้วย RT-PCR เพื่อดูผลการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA หลังการนำส่ง 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน E6 และ E7 นอกจากนี้ยังมียีน GAPDH เป็นตัวปรับค่าซึ่งจะรายงานออกมาเป็นค่า Relative expression levels ดังที่กล่าวในข้อ 3.2.4.1 เซลล์ที่รับการถ่ายโอน siRNA แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการทดลองคือ กลุ่มเซลล์ควบคุม, กลุ่มเซลล์ที่นำส่ง siRNA โดยใช้ Lipofectamine และ กลุ่มเซลล์ที่นำส่ง siRNA ด้วยตัวพา CS-PEI ผลที่ได้แสดงภาพที่ 4.14

ผลการทดลองพบว่า การยับยั้งการแสดงออกของ E6 และ E7 mRNA เกิดขึ้นที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมงหลังการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งจะลดลงไปเมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเซลล์ต่อไปอีกเมื่อเทียบกับการบ่มเซลล์หลังการนำส่งที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง เป็นที่ทราบกันว่าความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย siRNA มักจะไม่เสถียร ดังนั้นผลการยับยั้งจะมีการแปรเปลี่ยนได้ตามเวลาที่ตรวจสอบ นอกจากนี้ระยะเวลาการเจริญและสภาพของเซลล์ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการศึกษาผลการยับยั้งด้วย อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการนำส่ง siRNA ด้วย CS-PEI เพื่อลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็งปากมดลูก



ภาพที่ 4.14 Semi-quantitative RT-PCR แสดงผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ในระดับ mRNA ของเซลล์ SiHa หลังจากการนำส่ง siRNA ที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ถ่ายโอนด้วย naked siRNA (1 µg), Lipofectamine 2000™/siRNA lipoplex และ CS-PEI/siRNA complex, * = ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ค่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบระบบนำส่งยีนและ siRNA แบบไม่อาศัยไวรัสเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง โดยใช้ตัวพาที่ชื่อ PEI-introduced chitosan shell/poly(methyl methacrylate) core nanoparticles หรือตัวพา CS-PEI ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นโดยการใช้ตัวพา CS-PEI เป็นตัวพาสำหรับนำส่ง DNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa เพื่อหาสภาวะและอัตราส่วนที่เหมาะสมใช้สำหรับนำส่ง siRNA

การทดลองส่วนแรกเป็นการทดสอบคุณสมบัติของตัวพา CS-PEI กับ DNA และ siRNA ด้วยการทำให้ Gel retardation assay โดยเตรียม complex ของ CS-PEI/pGL3-CMV และ CS-PEI/siRNA ที่อัตราส่วน N/P ต่าง ๆ จากนั้นแยกความแตกต่างโดยอาศัยลักษณะการเคลื่อนที่ของ complex บนเจลด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) สำหรับรูปแบบการจับกันของตัวพากับ DNA และ siRNA นั้นอาศัยแรงระหว่างประจุของสารที่มีขั้วต่างกัน (Electrostatic interaction) ซึ่งเกิดจากประจุบวกของหมู่เอมีนบนตัวพา CS-PEI กับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตบนสารพันธุกรรมกรดนิวคลีอิกที่ให้นำส่ง โดยปริมาณของตัวพาที่ใช้มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ complex จากบริเวณความต่างศักย์ที่เป็นขั้วลบไปหาบวก ผลที่ได้พบว่าตัวพา CS-PEI สามารถจับกับทั้งพลาสมิด DNA และ siRNA ได้อย่างสมบูรณ์ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 สังเกตจากการที่ไม่พบแถบการเคลื่อนที่ของ complex บนเจล จากการศึกษาพบว่าค่า N/P ของทั้ง CS-PEI/DNA และ CS-PEI/siRNA มีค่าเท่ากันแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับ DNA และ siRNA ของตัวพา CS-PEI ขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่เอมีนและฟอสเฟต ไม่ได้เกี่ยวข้องกับขนาดของ DNA และ siRNA

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวพาและ complex ด้วย AFM พบว่าตัวพา CS-PEI มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็ก กระจายดี แต่เมื่อทำ complex กับพลาสมิด pGL3-CMV ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 และ 4 พบว่าอนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีขนาดใหญ่ขึ้น อันเป็นผลมาจากการจับกันระหว่างตัวพากับพลาสมิด DNA ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าที่อัตราส่วน N/P ที่สูงขึ้นจะส่งผลทำให้อนุภาคทรงกลมเกิดการเกาะกลุ่มกัน ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากตัวพา CS-PEI ที่มีประจุบวกมากเกินไปแย่งจับกับพลาสมิด DNA ที่มีประจุลบ อย่างไรก็ดี

ตาม เทคนิค AFM ไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของ CS-PEI และ CS-PEI/siRNA complex ได้ คาดว่าเป็นเพราะ siRNA นั้นมีขนาดเล็กจนไม่สามารถตรวจด้วย AFM ได้ เมื่อวิเคราะห์ขนาดและประจุพื้นผิวสุทธิของ complex พบว่า ขนาดของ CS-PEI/DNA อยู่ในช่วง 300-400 nm และ CS-PEI/siRNA อยู่ในช่วง 400-500 nm ตัวพา CS-PEI สามารถจับได้ทั้ง DNA และ siRNA ที่ปริมาณ 1 μg ได้อย่างสมบูรณ์ที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 และมีประจุพื้นผิวรวมเป็นบวก ขนาดและประจุที่ได้นี้เหมาะสมสำหรับให้นำส่งเข้าเซลล์ [85, 86] ในส่วนของ CS-PEI/siRNA complex นั้น แม้จะไม่สามารถตรวจพบการจับ siRNA บนอนุภาคได้ แต่ผลจากการวัดปริมาณการจับ siRNA ด้วยเทคนิคการตรวจสอบจากชุด Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent ซึ่งมีหลักการคือสาร Fluorophores มีคุณสมบัติในการจับกับ siRNA แล้วเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ขึ้น โดยค่า Fluorescence intensity ที่วัดได้จะแปรผันตามปริมาณของ unbound-siRNA ที่ลอยอยู่ในสารแขวนลอย ซึ่งยืนยันได้ว่า CS-PEI สามารถจับ siRNA ได้จริง และที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 1.6 ให้ผลการจับได้ประมาณ 100 % ผลการทดลองในส่วนของการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของตัวพา CS-PEI ที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pimpha และคณะในปี 2010 [17]

จากการทดสอบการนำส่งยีนและทดสอบความเป็นพิษด้วยตัวพา CS-PEI โดยทดลองนำส่งพลาสมิด pGL3-CMV เข้าสู่เซลล์ SiHa, HeLa และ C33A มี Lipofectamine เป็นตัวแปรควบคุมร่วมกับการนำส่งพลาสมิด DNA เปล่า องค์ประกอบหลักของตัวพาดังกล่าวประกอบด้วย Chitosan (CS) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติทำให้มีคุณสมบัติในการเข้ากันกับเซลล์ได้ดีและย่อยสลายง่าย แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ของ CS ยังไม่ดีนัก ซึ่งเกิดจากความไม่เสถียรของ complex ที่เตรียมได้ ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มอยู่บริเวณภายนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการเข้าสู่เซลล์ต่ำ [87] แต่ด้วยคุณสมบัติของ PEI บนตัวพาซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกสูงทำให้สามารถจับกับยีนได้ดีรวมถึงประสิทธิภาพการนำส่งที่สูง โดยอาศัยคุณสมบัติที่เรียกว่า “Proton sponge effect” ซึ่งเป็นกลไกที่ PEI ใช้หลบหนีออกจากส่วนของ Endosome ในขั้นตอนการนำส่งเข้าสู่เซลล์ [88] ซึ่งผลที่ได้พบว่าที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 4 ให้ผลการนำส่งที่ดีที่สุด ซึ่งน่าจะเกิดจาก complex มีประจุบวกสุทธิเป็นบวกสูง ทำให้เข้าสู่เซลล์ได้ดีและสามารถปกป้องพลาสมิดจากการทำลายโดยเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ รวมถึงการหลบหนีออก

จากส่วนของ Endosome เพื่อปลดปล่อยพลาสมิดเข้าสู่นิวเคลียสจนเกิดการแสดงออกในที่สุด โดยสังเกตจากผล Luciferase assay ในการวัดสัญญาณของเอนไซม์ Luciferase ที่สร้างจากพลาสมิดดังกล่าวเมื่อนำส่งเข้าสู่เซลล์ ในขณะที่ Lipofectamine และตัวพา CS-PEI ที่อัตราส่วน N/P 1.6 ให้ประสิทธิภาพการนำส่งที่รองลงมา แต่เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวพาที่มีต่อเซลล์ควบคู่กันไปกับกลับพบว่าที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 4 ให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ประมาณ 70% ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าเมื่อเทียบกับการนำส่งด้วย Lipofectamine และตัวพา CS-PEI ที่ N/P 1.6 ที่ให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ประมาณ 90-100 % สาเหตุที่ทำให้เซลล์เป็นพิษเป็นผลมากจากการที่ complex มีประจุสุทธิเป็นบวกสูง เมื่อเข้าสู่เซลล์ จะเกิดการตกค้างและเกาะติดในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การทำงานดังกล่าวผิดปกติไปจนก่อให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด [89] จากผลการทดลองข้างต้น ผู้ทำวิจัยจึงเลือกอัตราส่วน N/P 1.6 ไปใช้ในการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อไป โดยคำนึงถึงประสิทธิภาพการนำส่งและความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่ำ

ในส่วนของการนำส่ง siRNA นั้น ผู้วิจัยได้เริ่มจากการนำส่ง siRNA ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine เพื่อยืนยันการเข้าสู่เซลล์ของ siRNA ด้วยตัวพา CS-PEI ตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ภาพจาก DIC-confocal imaging แล้วจึงนำส่ง siRNA เข้าสู่ SiHa เพื่อยับยั้งการแสดงออก ของ ยีน E6/E7 ในระดับ mRNA ผลการทำ RT-PCR หลังจากนำส่งด้วยตัวพา CS-PEI และ Lipofectamine ที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ที่นำส่งด้วยตัวพา Lipofectamine ซึ่งใช้เป็นกลุ่มการทดลองควบคุมให้ผลการยับยั้งในปริมาณที่ไม่มากนัก เนื่องจากยังไม่มี การทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวพาดังกล่าวเพื่อใช้ในการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ในช่วงเวลาที่ทดสอบ ในขณะที่ผลของตัวพา CS-PEI ที่นำส่ง siRNA พบความแตกต่างของการแสดงออกในยีน E6/E7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม นอกจากนี้ยังพบผลลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมงอีกด้วย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Putral และคณะในปี 2008 ที่ใช้ siRNA ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกับงานวิจัยครั้งนี้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ของเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่ 16 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa โดย siRNA ที่นำส่งเข้าไปสามารถชักนำให้เกิด

กระบวนการ RNAi และส่งผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนดังกล่าวจริง [52] แต่อย่างไรก็ตามการประสิทธิภาพการทำงานของ siRNA ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เหมาะสม [90] ซึ่งจะต้องอาศัยการทดสอบในหลายช่วงเวลาต่อไป

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้ได้ข้อสรุปว่าตัวพา CS-PEI ซึ่งเป็นอนุภาคพอลิเมอร์ประจุบวกซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในเรื่องของประสิทธิภาพการนำส่งเข้าสู่เซลล์จาก PEI และเข้ากันกับเซลล์ได้ดีรวมถึงการย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติของ CS นั้นสามารถจับกับสารพันธุกรรมกรดนิวคลีอิกได้ทั้งพลาสมิด DNA และ siRNA โดย complex ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดระดับ sub-micron นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการนำส่งพลาสมิด DNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดี รวมถึงให้ผลการแสดงออกของยีน E6/E7 ในระดับ mRNA เมื่อนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่อย่างไรก็ตามในการนำส่งต้องคำนึงปริมาณของตัวพาที่ใช้ให้มีความเหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดพิษต่อเซลล์ จากเหตุผลที่ได้กล่าวมาข้างต้นตัวพา CS-PEI จึงเป็นตัวนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาที่น่าสนใจและสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การหาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน E6/E7 ในระดับ mRNA มีค่าค่อนข้างต่ำ อาจเป็นผลมาจากการนำส่งยีนหรือ siRNA มีหลายปัจจัยเกี่ยวข้องที่ต้องคำนึงถึง ไม่ว่าจะเป็นจำนวนเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ระยะเวลาที่ใช้นำส่งรวมถึงสัดส่วนปริมาณตัวพากับสิ่งที่นำส่ง ซึ่งทั้งหมดนี้จะต้องใช้เวลาในการทดสอบและหาปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสมมากที่สุดเพื่อนำไปสู่การต่อยอดการทดลองในอนาคตให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของระบบนำส่งแบบไม่อาศัยไวรัสเป็นตัวพาต่อไป

รายการอ้างอิง

- [1] Bosch, F. X., and others. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. Journal of the National Cancer Institute 87 (June 1995) : 796-802.
- [2] Govan, V. A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil). Therapeutics and Clinical Risk Management 4 (February 2008) : 65-70.
- [3] Jones, B. Toxicity after cervical cancer treatment using radiotherapy and chemotherapy. Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)) 21 (February 2009) : 56-63.
- [4] Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. Oncogene 22 (September 2003) : 5938-45.
- [5] Alvarez-Salas, L. M., Cullinan, A. E., Siwkowski, A., Hampel, A., and DiPaolo, J. A. Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (February 1998) : 1189-94.
- [6] von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E., and Gissmann, L. Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. Cancer Research 48 (July 1988) : 3780-86.
- [7] Yugawa, T., and Kiyono, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Reviews in Medical Virology 19 (January 2009) : 97-113.
- [8] Thomison, J., 3rd, Thomas, L. K., and Shroyer, K. R. Human papillomavirus:

- molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Human Pathology 39 (February 2008) : 154-66.
- [9] Stein, C. A. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity. Trends in Biotechnology 14 (May 1996) : 147-49.
- [10] Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubyko, F., and Aigner, A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. Gene Therapy 12 (December 2004) : 461-66.
- [11] Glover, D. J., Lipps, H. J., and Jans, D. A. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. Nature Reviews Genetics 6 (April 2005) : 299-310.
- [12] Anderson, W. F. Human gene therapy. Nature 392 (April 1998) : 25-30.
- [13] Li, S., and Huang, L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. Gene Therapy 7 (January 2000) : 31-34.
- [14] Illum, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharmaceutical Research 15 (September 1998) : 1326-31.
- [15] Singla, A. K., and Chawla, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. Journal of Pharmacy and Pharmacology 53 (August 2001) : 1047-67.
- [16] Zhao, Q. Q., Chen, J. L., Han, M., Liang, W. Q., Tabata, Y., and Gao, J. Q. Combination of poly(ethylenimine) and chitosan induces high gene transfection efficiency and low cytotoxicity. Journal of Bioscience and Bioengineering 105 (January 2008) : 65-68.
- [17] Pimpha, N., Sunintaboon, P., Inphonlek, S., and Tabata, Y. Gene delivery efficacy of polyethyleneimine-introduced chitosan shell/poly(methyl methacrylate) core nanoparticles for rat mesenchymal stem cells. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 21 (January 2010) : 205-23.
- [18] Centers for Disease Control and Prevention. Cervical Cancer [Online]. 2012.

- Available from : <http://www.cdc.gov/cancer/cervical/index.htm> [2012, May 30]
- [19] Centers for Disease Control and Prevention. Cervical Cancer Risk Factors [Online]. 2011. Available from : http://www.cdc.gov/cancer/cervical/basic_info/risk_factors.htm [2011, February 9]
- [20] Centers for Disease Control and Prevention. Symptoms of Cervical Cancer [Online]. 2010. Available from : http://www.cdc.gov/cancer/cervical/basic_info/symptoms.htm [2010, September 2]
- [21] Camilleri, G. The Human Papillomaviruses (HPVs) and HPV DNA Testing. Research Journal of Biological Sciences 4 (2009) : 29-36.
- [22] MicrobiologyBytes. Papillomaviruses [Online]. 2009. Available from : <http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html> [2009, April 8]
- [23] Nemose. Mechanism of neoplastic development [Online]. 2011. Available from : <http://www.metapathogen.com/papillomavirus/HPV-cancer-development.html> [2011, August 21]
- [24] InCyte Pathology. The Molecular Pap: E6 and E7 Hold Promise for Cervical Cancer Screening [Online]. 2011. Available from : <http://incytepathology.wordpress.com/2011/12/29/e6e7/> [2011, December 29]
- [25] OncoHealth. Science and Technology [Online]. 2011. Available from : <http://oncohealthcorp.com/technology.html> [2011]
- [26] Centers for Disease Control and Prevention. Cervical Cancer Screening [Online]. 2012. Available from : http://www.cdc.gov/cancer/cervical/basic_info/screening.htm [2012, July 18]
- [27] Healthwise. Human Papillomavirus (HPV) Test [Online]. 2010. Available from :

- <http://www.webmd.com/sexual-conditions/hpv-genital-warts/human-papillomavirus-hpv-test> [2010, June 28]
- [28] National Cancer Institute. After cervical cancer has been diagnosed, tests are done to find out if cancer cells have spread within the cervix or to other parts of the body [Online]. 2012. Available from : <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/cervical/Patient/page2> [2012, April 19]
- [29] KKH-Komunitas Karyawan Hotel. Cervical cancer [Online]. 2009. Available from : <http://healthcare-womens.blogspot.com/2009/12/13-things-you-must-know-about-cervical.html> [2009, December 27]
- [30] National Cancer Institute. The following stages are used for cervical cancer [Online]. 2012. Available from : <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/cervical/Patient/page2#Keypoint9> [2012, April 19]
- [31] National Cancer Institute. Cervical Cancer Prevention [Online]. 2012. Available from : <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/cervical/Patient/page3> [2012, May 24]
- [32] National Cancer Institute. Treatment Option Overview [Online]. 2012. Available from : <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/cervical/Patient/page4> [2012, July 17]
- [33] Life Technologies. RNA Interference Overview [Online]. 2012. Available from : <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/rnai/RNA-Interference-Overview.html> [2012, July 22]
- [34] Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. The Plant Cell 2 (April 1990) : 279-89.
- [35] Romano, N., and Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in

- Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. Molecular Microbiology 6 (November 1992) : 3343-53.
- [36] Guo, S., and Kemphues, K. J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 81 (May 1995) : 611-20.
- [37] Nobelprize.org. The 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Advanced Information [Online]. 2012. Available from : http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/advanced.html [2012, July 22]
- [38] Macrae, I. J., and others. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. Science 311 (January 2006) : 195-98.
- [39] Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286 (October 1999) : 950-52.
- [40] Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411 (May 2001) : 494-98.
- [41] Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409 (January 2001) : 363-66.
- [42] Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136 (January 2009) : 215-33.
- [43] Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. *elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75 (December 1993) : 843-54.
- [44] Ghildiyal, M., and Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nature Reviews Genetics 10 (February 2009) : 94-108.
- [45] Hutvagner, G., and Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9 (January 2008) : 22-32.

- [46] Sen, G. L., Wehrman, T. S., and Blau, H. M. mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage. Differentiation 73 (July 2005) : 287-93.
- [47] MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (January 2008) : 512-17.
- [48] ImmunoTrends. MicroRNAs and Immunity [Online]. 2010. Available from : http://immunotrends.blogspot.com/2010/05/micrnas-mirna-are-small-noncoding_8794.html [2010, May 26]
- [49] Claudie Hooper. RNA interference - a comprehensive overview [Online]. 2012. Available from : <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10787&pid=10007> [2012, July 22]
- [50] Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. Oncogene 22 (September 2003) : 5938-45.
- [51] Hall, A. H., and Alexander, K. A. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. Journal of Virology 77 (May 2003) : 6066-69.
- [52] Putral, L. N., and others. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. Molecular Pharmacology 68 (November 2005) : 1311-19.
- [53] Sima, N., and others. Antisense targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes contributes to apoptosis and senescence in SiHa cervical carcinoma cells. Gynecologic Oncology 106 (August 2007) : 299-304.
- [54] Jonson, A. L., Rogers, L. M., Ramakrishnan, S., and Downs, L. S., Jr. Gene

- silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 111 (November 2008) : 356-64.
- [55] Dutta, T., Burgess, M., McMillan, N. A., and Parekh, H. S. Dendrosome-based delivery of siRNA against E6 and E7 oncogenes in cervical cancer. *Nanomedicine* 6 (June 2010) : 463-70.
- [56] Eaton, S., Wiktor, P., Thirstrup, D., Lake, D., and Nagaraj, V. J. Efficacy of TRAIL treatment against HPV16 infected cervical cancer cells undergoing senescence following siRNA knockdown of E6/E7 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405 (February 2011) : 1-6.
- [57] Zhou, J., and others. Transcriptional gene silencing of HPV16 E6/E7 induces growth inhibition via apoptosis in vitro and in vivo. *Gynecologic Oncology* 124 (February 2012) : 296-302.
- [58] Goff, S. P., and Berg, P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9 (December 1976) : 695-705.
- [59] Cavazzana-Calvo, M., and others. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 (April 2000) : 669-72.
- [60] Montini, E., and others. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature Biotechnology* 24 (June 2006) : 687-96.
- [61] Qbiogene. *Introduction to Adenovirus Technology* [Online]. 2012. Available from : http://www.qbiogene.com/products/adenovirus/ch7_intro.shtml [2012, July 22]
- [62] Maguire, A. M., and others. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England Journal of Medicine* 358 (May 2008) : 2240-48.
- [63] Gene Therapy Net. *Naked DNA* [Online]. 2012. Available from :

- <http://www.genetherapynet.com/non-viral-vectors/naked-dna.html> [2012, July 22]
- [64] Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. The EMBO Journal 1 (January 1982) : 841-45.
- [65] Amna Adnan. Technique of Gene Gun [Online]. 2010. Available from : <http://www.biotecharticles.com/Biotechnology-products-Article/Technique-of-Gene-Gun-237.html> [2010, July 11]
- [66] Leprini, A., and others. Hematic infiltrates and the expression of HLA-DR antigens in naso-sinusoidal polyps of the fibrous type. Bollettino- Societa Italiana Biologia Sperimentale 66 (November 1990) : 1073-80.
- [67] Plank, C., and others. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. Biological Chemistry 384 (May 2003) : 737-47.
- [68] Martin, B., and others. The design of cationic lipids for gene delivery. Current Pharmaceutical Design 11 (2005) : 375-94.
- [69] Gao, X., Kim, K. S., and Liu, D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. AAPS Journal 9 (March 2007) : E92-104.
- [70] Wong, S. Y., Pelet, J. M., and Putnam, D. Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future. Progress in Polymer Science 32 (June 2007) : 799-837.
- [71] Kootstra, N. A., and Verma, I. M. Gene therapy with viral vectors. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 43 (April 2003) : 413-39.
- [72] Nordin, M. Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System. New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [73] Koping-Hoggard, M., and others. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. Gene Therapy 9 (July 2001) : 1108-21.
- [74] Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M., and Langer, R. Exploring polyethylenimine-

mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. The Journal of Gene Medicine 7 (May 2005) : 657-63.

[75] ATCC. HTB-35 [Online]. 2012. Available from :

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-35&Template=cellBiology> [2012, July 22]

[76] Yasmeen, A., Alachkar, A., Dekhil, H., Gambacorti-Passerini, C., and Al Moustafa, A. E. Locking Src/Abl Tyrosine Kinase Activities Regulate Cell Differentiation and Invasion of Human Cervical Cancer Cells Expressing E6/E7 Oncoproteins of High-Risk HPV. Journal of Oncology (July 2010)

[77] ATCC. CCL-2 [Online]. 2012. Available from :

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2.2&Template=cellBiology> [2012, July 30]

[78] ATCC. CRM-HTB-31 [Online]. 2012. Available from :

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRM-HTB-31&Template=cellBiology> [2012, July 30]

[79] Tencomnao, T., Rakkhitawatthana, V., and Sukhontasing, K. Evaluation of a novel luciferase reporter construct: a positive control plasmid for reporter gene assay. African Journal of Biotechnology 7 (July 2008) : 2124–27.

[80] Life Technologies. Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent [Online]. 2012.

Available from : <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/Transfection-Selection/lipofectamine-2000.html> [2012, July 22]

[81] Life Technologies. Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent [Online]. 2012.

Available from : <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/11668027> [2012, July 30]

[82] Promega. Luciferase Assay System Technical Bulletin [Online]. 2012. Available

- from : <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/luciferase-assay-system-protocol/> [2012, August 6]
- [83] Zor, T., and Selinger, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Analytical Biochemistry 236 (May1996) : 302-08.
- [84] Divya, C. S., and Pillai, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. Molecular Carcinogenesis 45 (May 2006) : 320-32.
- [85] Rakkhithawatthana, V., Sanitrum, P., Sajomsang, W., Na Ubon, P., Tencomnao, T., and Saengkrit, N. Investigation of gene transferring efficacy through nano-polyplex consisting of methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride and poly(ethylenimine) in human cell lines. Carbohydrate Polymers 80 (March 2010) : 276-84.
- [86] Tencomnao, T., and others. Gold/cationic polymer nano-scaffolds mediated transfection for non-viral gene delivery system. Carbohydrate Polymers 84 (February 2011) : 216-22.
- [87] Koping-Hoggard, and others. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. Gene Therapy 11(October 2004) : 1441-52.
- [88] Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, A. G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. Journal of Controlled Release 60 (August 1999) : 149-60.
- [89] Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H. P., and Kissel, T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. Pharmaceutical Research 16 (August 1999) : 1273-79
- [90] Liao, Z. X., Ho, Y. C., Chen, H. L., Peng, S. F., Hsiao, C. W., and Sung, H. W.

Enhancement of efficiencies of the cellular uptake and gene silencing of chitosan/siRNA complexes via the inclusion of a negatively charged poly(γ -glutamic acid). Biomaterials 31 (November 2010) : 8780-88.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

Bradford stock solution	ประกอบด้วย	95% Ethanol 100ml 88% Phosphoric acid 200 ml Brilliant Blue G 350 mg
Bradford working buffer	ประกอบด้วย	Bradford stock solution 30 ml 95% Ethanol 15 ml 88% Phosphoric acid 30ml Distilled water 425 ml
Luciferase Assay Systems	ประกอบด้วย	Luciferase Assay Reagent Cell Culture Lysis Reagent
Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit	ประกอบด้วย	Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent 1ml 20X TE Buffer, RNase-free 25 ml

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภากร สนิทรัมย์ เกิดวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2531 สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตศึกษาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น และในระดับอุดมศึกษาได้รับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาเทคนิคการแพทย์ (เกียรตินิยมอันดับ 2) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2552 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี 2553 โดยได้รับทุนวิจัยจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) และทุนจากโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศโอมิกส์-นาโนเมดิคัล เทคโนโลยี