

การแสดงออกของยีนและคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ไลน์ U87MG  
glioblastoma



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gene expression and characterization of cancer stem cell populations in U87MG  
glioblastoma cell line



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

Department of Biochemistry

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนและคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิด มะเร็งในประชากรเซลล์ไลน์ U87MG glioblastoma
โดย	น.ส.รุ่งนภา บุตรศรี
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร.นพัต จันทรวิสูตร

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร.นพัต จันทรวิสูตร)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงกร)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วรรณพ สุขภารังษี)	

รุ่งนภา บุตรศรี : การแสดงออกของยีนและคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์  
ไลน์ U87MG glioblastoma . ( Gene expression and characterization of cancer stem  
cell populations in U87MG glioblastoma cell line ) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ดร.นพต จันทรวิสุต

มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา (Glioblastoma หรือ GBM) เป็นมะเร็งสมองชนิดที่พบมากที่สุด มีความรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูง ทำให้คนไข้โดยเฉลี่ยเสียชีวิตภายในหนึ่งปี นอกจากนี้เซลล์ GBM ยังมีความหลากหลายทางสัณฐาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่เป็นประชากรที่มีความสำคัญในแง่ของการตอบสนองต่อการรักษาและการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็ง การที่จะสามารถพัฒนาการรักษาที่มีความจำเพาะในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนี้ จะต้องมีการระบุในการระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (identification) ที่มีความจำเพาะและแม่นยำ ผู้วิจัยจึงต้องการค้นคว้าในเชิงลึกเพื่อหาการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยทำการแยกประชากรเซลล์ U87MG ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่ และประชากรเซลล์เล็กออกจากกัน โดยใช้ความแตกต่างของขนาดเซลล์ ด้วยเทคนิค Fluorescence-activated cell sorting (FACS) จากนั้นนำประชากรดังกล่าวมาเลี้ยงแยกกัน โดยทำการศึกษาประชากรทั้งหมด ประชากรขนาดใหญ่และประชากรขนาดเล็ก แล้วศึกษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในระดับอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค Real-Time PCR โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษา (1) pluripotency markers/ transcription factor ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* และ *c-MYC* (2) cancer stem cell signalling ได้แก่ mTOR pathway โดยเน้นไปที่ mTORC2 และ LIN28/let-7 pathway และ (3) cellular phenotypes ได้แก่ วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง GBM ใน U87MG โดยการแยกเซลล์ออกเป็นประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กด้วย FACS โดยพบว่าเซลล์ U87MG มีการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, *LIN28B*, *c-MYC*, *ZWINT*, *TYMS* และ *RCF4* ยีนที่เกี่ยวข้องกับ GBM ที่ทำการศึกษาการแสดงออก ได้แก่ *SPARCL1*, *GDF15*, *LAMA1*, *RPL13A*, *EGFR*, *AKT* และ *RICTOR* ในประชากรเซลล์รวมมีการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดสูงที่สุด อีกทั้งยังพบว่าเซลล์ U87MG ต้องการการอยู่ร่วมกันของเซลล์จึงจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ การค้นพบนี้อาจนำไปสู่การหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง GBM ที่มีความจำเพาะแม่นยำ และอาจนำไปสู่วิธีการรักษาใหม่

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์  
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 6174070930 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORD: Glioblastoma (GBM), Cancer stem cells (CSCs), U87MG glioblastoma cell line, Gene expression, Cell characterization

Rungnapa Bootsri : Gene expression and characterization of cancer stem cell populations in U87MG glioblastoma cell line . Advisor: Naphat Chantaravisoot, Ph.D.

Glioblastoma brain cancer (GBM) is the most common type of brain cancer. It is extremely aggressive and has a high mortality rate. GBM patient has low survival within one year. In addition, the heterogeneity characteristics of GBM cells result in a variety of GBM cell sizes. Here, we recognized the importance of cancer stem cells as an essential population in response to treatment and cancer recurrence. To be able to develop a specific treatment to eliminate the cancer stem cells a process to specifically and accurately identify cancer stem cells is required. Here, we aimed to study the expression of stemness-related genes and proteins by separating the U87MG cell lines into three groups: U87A (All population), U87B (Big population), and U87Sm (Small population). We isolated U87 glioblastoma cell populations according to cells forward scatter detection followed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Then, we studied the three populations that were maintained separately (U87A, U87B and U87Sm). The expression of genes associated with stemness properties and proliferation was studied by Real-Time PCR technique, focusing on (1) pluripotency markers/transcription factors including *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* and *c-MYC* (2) cancer stem cells signaling, including the mTOR pathway, emphasizing the mTORC2 and LIN28/let-7 pathways and (3) cellular phenotypes, including cell cycle, cell proliferation, and cell migration. This is the first report to study GBM cancer stem cells in U87MG by separating cells into U87B and U87Sm populations by FACS. We found that U87MG cells express all stemness-related marker genes, including *OCT4*, *SOX2*, *LIN28B*, *c-MYC*, *ZWINT*, *TYMS*, *RCF4*. GBM-associated genes investigated in this study include *SPARCL1*, *GDF15*, *LAMA1*, *RPL13A*, *EGFR*, *AKT*, and *RICTOR*. The U87A population significantly expressed higher cancer stemness-related genes than U87B and U87Sm populations. In addition, the proliferation of the U87A population is the highest compared to the others. Both U87B and U87Sm cells might support each other to grow. These findings might lead to the discovery of novel biomarkers for the precise diagnosis of GBM and developing new cancer treatments.

Field of Study: Medical Biochemistry

Student's Signature .....

Academic Year: 2020

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.นพัต จันทรวิสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้โอกาส ให้ความรู้ในการศึกษา ให้แนวคิดในการวิจัย ให้แรงบันดาลใจในการทำงานและเรียนรู้สิ่งใหม่ ๆ สนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนเล่มรายงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรธรรษาเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัยและ อ.ดร. วรณพ สุขภารังษี กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลามาร่วมดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนชี้แนะและขัดเกลาให้เกิดวิทยานิพนธ์นี้ขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และวางรากฐานการศึกษาแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ อ.ดร. วรณพ สุขภารังษี ผู้ให้โอกาสและเป็นแรงบันดาลใจในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทมาบัดนี้ ทั้งยังผลักดันสิ่งที่คิดว่าเป็นไปได้ยากให้เป็นไปได้และขอขอบคุณบุคลากรเพื่อน ๆ พี่ ๆ ทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกศูนย์ชีววิทยาเชิงระบบ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUSB) ห้องปฏิบัติการ 815 สมาชิกห้องปฏิบัติการ 716 อาคารแพทยพัฒน์และเพื่อน ๆ น้องๆ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับความช่วยเหลือกำลังใจและคำปรึกษาในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณเจ้าของเอกสารและงานวิจัยทุกท่านที่ข้าพเจ้าได้ค้นคว้าและนำมาอ้างอิงในการทำวิจัย จนกระทั่งวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณทุก ๆ คนในครอบครัวสำหรับการอุปการะอบรมเลี้ยงดู ตลอดจนส่งเสริมการศึกษา คอยให้ความรัก ความอบอุ่น ตลอดเส้นทางการเติบโตตั้งแต่เด็กจนโตของข้าพเจ้า ทุกกำลังใจผลักดันให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจและทำงานจนประสบความสำเร็จได้

ขอขอบพระคุณทุกๆ ท่านด้วยใจจริงค่ะ

รุ่งนภา บุตรศรี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	1
คำถามของงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
สมมติฐาน.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
มะเร็งสมองชนิด Glioblastoma (GBM).....	7
เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดกลัยโอบลาสโตมา (Glioblastoma).....	11
Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา.....	15
LIN28/let-7 pathway ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา.....	16
เครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการตรวจสอบตัวบ่งชี้ที่นิยมใช้ในการศึกษา เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา.....	16

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	18
รูปแบบการวิจัย .....	18
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย .....	18
3.1 อุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในงานวิจัย.....	18
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย .....	18
3.3 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดอาร์เอ็นเอ.....	19
3.4 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดโปรตีน.....	19
3.5 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse transcription .....	19
3.6 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Real-Time PCR.....	19
3.7 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Cell culture.....	20
3.8 สารเคมีใช้ในการทำ Cell proliferation assay .....	20
3.9 cell lines.....	20
3.10 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
วิธีดำเนินการวิจัย .....	20
การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	20
การเตรียมเซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วย Fluorescence-activated cell sorting (FACS) โดยใช้ side scatter และ forward scatter.....	21
การสกัดอาร์เอ็นเอด้วย RNeasy Mini Kit (Qiagen).....	21
การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) .....	22
การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับโปรตีน ด้วยวิธี western blot analysis.....	24
ตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วย Cell viability assay .....	25
ตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ (living cell) ด้วย Cell proliferation assay.....	25
ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา ด้วยวิธี Wound healing assay.....	25



ศึกษาการแสดงออกของ CD133, E-Cadherin และ Nestin ด้วยวิธี Immunofluorescence staining.....	26
ศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ด้วยวิธี Cell cycle analysis.....	26
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	27
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	28
4.1 การเตรียมเซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วย Fluorescence-activated cell sorting (FACS) โดยใช้ side scatter และ forward scatter.....	28
4.2 การประเมินความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก .....	30
4.3 การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR).....	31
4.4 การตรวจสอบ Cellular phenotypes.....	34
4.4.1 Cell cycle checkpoints analysis by propidium iodide (PI) .....	34
4.4.2 Cell proliferation assay .....	35
4.4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาและขนาดของเซลล์.....	36
4.5 การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา ด้วยวิธี wound healing assay .....	37
4.6 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วย Western blot analysis.....	39
4.7 ผลศึกษาการแสดงออกของ CD133, E-Cadherin และ Nestin ด้วยวิธี Immunofluorescence staining .....	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ.....	42
บรรณานุกรม.....	55
ประวัติผู้เขียน.....	57

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงหน้าที่ของตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่สำคัญใน GBM .....	14
ตารางที่ 2 Primers สำหรับ real-time PCR .....	22
ตารางที่ 3 แสดงสถานะในการทำ real-time PCR ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG .....	24
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากประชากรเซลล์ U87MG ทั้งหมดของประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก .....	30
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นและคุณภาพของ cDNA จากการทำให้ RT-PCR ของประชากรเซลล์ U87MG ทั้งหมดของ ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก .....	31
ตารางที่ 6 การเคลื่อนที่ของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง .....	38

## สารบัญภาพ

### หน้า

ภาพที่ 1 แสดงการจำแนกระดับความรุนแรงของมะเร็งสมองตามองค์การอนามัยโลก (WHO).....	7
ภาพที่ 2 แสดงอัตราที่พบมะเร็งสมองที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เกลีย (Glia cell) .....	8
ภาพที่ 3 แสดงวิถีการส่งสัญญาณ PI3K/Akt/mTOR pathway ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา.....	9
ภาพที่ 4 แสดงวิถีการส่งสัญญาณ PI3K / AKT / SOX2.....	10
ภาพที่ 5 แสดงบทบาทการส่งสัญญาณ mTOR ใน Glioma Stem / Progenitor Cells (GSPCs) .	11
ภาพที่ 6 แสดงการทำงานของ pluripotency transcription factors ใน GBM.....	12
ภาพที่ 7 แสดงประเภทของตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง.....	13
ภาพที่ 8 แสดงวิถีการส่งสัญญาณ mTORC.....	15
ภาพที่ 9 แสดงการแยกเซลล์ด้วยเครื่อง FACS .....	29
ภาพที่ 10 แสดงจำนวนครั้งที่ทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่อง FACS .....	29
ภาพที่ 11 แสดงกราฟข้อมูลการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง .....	33
ภาพที่ 12 แสดงจำนวนเซลล์ของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กใน ระยะ Interphase.....	34
ภาพที่ 13 ร้อยละการอยู่รอดของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก ..	35
ภาพที่ 14 จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก .....	36
ภาพที่ 15 แสดงขนาดของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก รวมถึง ประชากรเซลล์มะเร็ง LN229 และ H4 ที่มีความรุนแรงต่ำกว่าประชากรเซลล์ U87MG.....	37
ภาพที่ 16 แสดงการแสดงออกของโปรตีน OCT4, SOX2, NANOG, LIN28B, RICTOR, pAKT(S473) และ tAKT .....	40
ภาพที่ 17 แสดงภาพถ่ายจากกล้อง confocal เครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการ บ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา.....	41

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาวินิจฉัย

กลัยโอบลาสโตมา (Glioblastoma หรือ GBM) เป็นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เกลีย (glia cell) จัดอยู่ในกลุ่มของมะเร็งแอสโตรไซโตมาเกรดสูง (high-grade astrocytoma) ในระดับที่ 4 ตามองค์การอนามัยโลก (World Health Organization หรือ WHO) ที่ได้แบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็งสมองตามลักษณะอัตรการเติบโตของเนื้อเยื่อ คือ ระดับที่ I ถึงระดับที่ IV (การเจริญเติบโตที่ช้าที่สุดไปจนถึงการเจริญเติบโตที่เร็วที่สุดตามลำดับ) โดยระดับ III และ IV จัดเป็นกลัยโอบลาสโตมาที่มีความรุนแรงสูงสุด (high-grade gliomas หรือ HGG) (1) มีรายงานสถิติของการเกิดเนื้องอกสมองน้อยกว่าร้อยละ 2 ของการเกิดโรคมะเร็งทั้งหมด (2) โดยพบเนื้องอกสมองแอสโตรไซโตมาเกรดสูง ที่ 3.56 ต่อ 100,000 ประชากร และร้อยละ 90 เป็นมะเร็ง GBM (3) GBM จึงเป็นมะเร็งสมองชนิดที่พบมากที่สุดและมีการเสียชีวิตสูง โดยเฉลี่ยเสียชีวิตภายในหนึ่งปีหากไม่ได้รับการรักษาใดๆ (1, 4) แม้ว่าในปัจจุบัน WHO จะมีการทำการประเมินด้วย molecular classification เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรค (diagnostic biomarkers markers) ที่แนะนำไว้เดิม เช่น *TP53/ TERTp mutant/ EGFR amplified* (5) แต่วิธีการรักษายังมีไม่มากและมะเร็งมักต้านทานต่อการรักษาทำให้การรักษาไม่ได้ผล เนื่องจากความรุนแรงของ GBM ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด คือ เป็นเซลล์ที่สามารถเพิ่มจำนวนของตัวเองได้อย่างไม่จำกัด (self-renewal) และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่จำเพาะได้ (differentiation) (6-9) ถ้า GBM ใกล้เคียงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากก็จะมี ความรุนแรง (aggressiveness) มาก อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณและกระบวนการในเซลล์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle, aging และ morphogenesis (10) โดยเฉพาะยีนที่เป็นตัวหลักในมะเร็งหลายชนิด เช่น *RAS, TP53, PIK3* เป็นต้น (11, 12) ซึ่งยีนที่ใช่ยารักษา GBM เช่น *EGFR* พบว่าถูก amplified มากประมาณร้อยละ 50 และหนึ่งในวิถีสัญญาณที่ถูกกระตุ้นโดยโปรตีน *EGFR* คือ *PI3K/ AKT/ mTOR* พบว่าสัญญาณนี้ถูกกระตุ้นมากถึงร้อยละ 90 (13) อีกทั้ง GBM บางกลุ่มมี *EGFR* ที่กลายพันธุ์ทำให้ยาที่ใช้ในการยับยั้งไม่ได้ผล นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า GBM มีการแสดงออกของ mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) โดยสัญญาณนี้ถูกกระตุ้นมากถึงร้อยละ 80-90 (12, 13, 20, 21) ส่งผลต่อโอกาสที่จะรักษาคนไข้กลับมาเป็นมะเร็งใหม่หลังการรักษาภายในระยะเวลาอันสั้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 25 ของผู้ป่วยจะมีมัธยฐานระยะเวลาการอยู่รอด (median survival) เป็นเวลา 2 ปี และร้อยละ 10 ของผู้ป่วยจะอยู่รอดเป็นเวลา 5 ปี (14)

การสร้างเซลล์ประสาท (neurogenesis) และการพัฒนาของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) มีความเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณในระดับเซลล์โดยเฉพาะ mammalian target of rapamycin (mTOR) ทั้งหน้าที่ทางสรีรวิทยาหลายอย่าง เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) การสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) และการแปลรหัส (transcription) รวมถึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้บทบาทการส่งสัญญาณ mTOR pathway ใน Glioma Stem / Progenitor Cells (GSPCs) ยังมีส่วนร่วมในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ประสาท (neural stem cells หรือ NSCs) (11, 12) อีกด้วย

งานวิจัยทางด้านเซลล์ต้นกำเนิดมีการค้นพบว่า LIN28/let-7 pathway เป็นหนึ่งในวิถีที่ควบคุมสถานะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและความเป็นเซลล์จำเพาะ (undifferentiated vs differentiated states) โดย LIN28 เป็น RNA binding protein ที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต เมแทบอลิซึมและวัฏจักรของเซลล์ LIN28 สามารถจับกับ microRNA ชื่อว่า let-7 และยับยั้งกระบวนการสร้าง mature let-7 ได้ ในทางตรงกันข้าม let-7 microRNAs สามารถยับยั้ง LIN28 ด้วยการจับกับ 3'UTR และทำให้ mRNA ถูกย่อยสลาย (15) การที่ LIN28/let-7 ทำหน้าที่ตรงข้ามและยับยั้งกันและกันนั้น ทำให้เซลล์สามารถดำรงอยู่ในสถานะใดสถานะหนึ่งได้ เช่น ถ้ามีปริมาณ LIN28 สูง ก็จะยับยั้ง let-7 และทำให้เซลล์อยู่ในสถานะของเซลล์ต้นกำเนิด เป็นต้น

ปัจจุบันมีหลักฐานการศึกษามากมายในการยืนยันถึงการมีอยู่จริงของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (16-24) ซึ่งพบในมะเร็งหลายชนิด พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการทำให้การกลับเป็นซ้ำของมะเร็ง (relapse) (14, 25, 26) (18) ทำให้เกิดการก้าวหน้าของมะเร็ง (progression) (27-30) และการแพร่กระจาย (metastasis) (31, 32) การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอย่างกว้างขวางเพื่อมุ่งเป้าในการทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเพื่อหวังผลให้การรักษามะเร็งหายขาด ในการระบุประชากรเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยทั่วไปจะใช้การระบุจากโปรตีนจำเพาะที่ผิวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (surface marker) แต่ปัจจุบันยังไม่มี surface marker ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่สามารถใช้ตรวจได้ในมะเร็งทุกชนิด จึงเป็นความยากในการที่จะมุ่งเป้าในการทำลายเฉพาะเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เนื่องจากมะเร็งมี progression ของโรคทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ surface marker ยิ่งเพิ่มความยากในการระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (18, 19, 33-35) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทั้งในระดับ in vitro และ in vivo เพื่อพัฒนาวิธีการต่างๆ ในการกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นการมุ่งเป้าโดยอาศัย surface marker ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ATP-driven efflux transporters ต่างๆ (20, 36-40) key signaling cascade ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (18, 41) หรือแม้กระทั่งการทำลาย microenvironment niche ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (29, 30)

แม้ว่าหลายวิธีจะมีแนวโน้มในการรักษาที่ดีแต่ก็ยังไม่สามารถกำจัดมะเร็งได้ จากความสัมพันธ์ที่กล่าวมาข้างต้น คุณสมบัติของกลุ่มประชากรเซลล์ GBM มีความหลากหลาย (heterogeneity) ที่ภายในเนื้อเยื่อมะเร็งจะปรากฏความหลากหลายของลักษณะทางจุลกายพยาธิสภาพ (Histopathological appearances) และลักษณะการแสดงออกทางโมเลกุล (Molecular expression profile) ของเซลล์มะเร็งและยังมีความใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิด (glioblastoma stem cells หรือ GSCs) ทำให้มะเร็งมีความรุนแรง (aggressiveness) รวมถึงเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณและกระบวนการในเซลล์ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อการรักษา จึงถือเป็นปัญหาที่ต้องการการแก้ไข และพัฒนาและการศึกษาค้นคว้าต่อไปเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่เป็นประชากรที่มีความสำคัญในแง่ของการตอบสนองต่อการรักษาและการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็ง การที่จะสามารถพัฒนาการรักษาที่มีความจำเพาะในการกำจัดเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดนี้ จะต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งในการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะต้องมีกระบวนการในการระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (identification) ที่ให้ความจำเพาะและแม่นยำ ผู้วิจัยจึงต้องการค้นคว้าในเชิงลึกเพื่อหาการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องใหม่เพิ่มเติม โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษา (1) pluripotency markers/ transcription factor ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* และ *c-MYC* (2) cancer stem cell signaling ได้แก่ mTOR pathway โดยเน้นไปที่ mTORC2 และ LIN28/let-7 pathway และ (3) cellular phenotypes ได้แก่ วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ซึ่งอาจนำไปสู่การหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง GBM ที่มีความจำเพาะแม่นยำ และอาจนำไปสู่วิธีการรักษาใหม่ สามารถที่จะกำจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้และทำให้มะเร็งสามารถรักษาหายขาดได้ต่อไปในอนาคต

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### คำถามของงานวิจัย

- 1.สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนและคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ U87MG ได้หรือไม่
- 2.ประชากรเซลล์ U87MG ที่ขนาดแตกต่างกันมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างกันหรือไม่

### วัตถุประสงค์การวิจัย

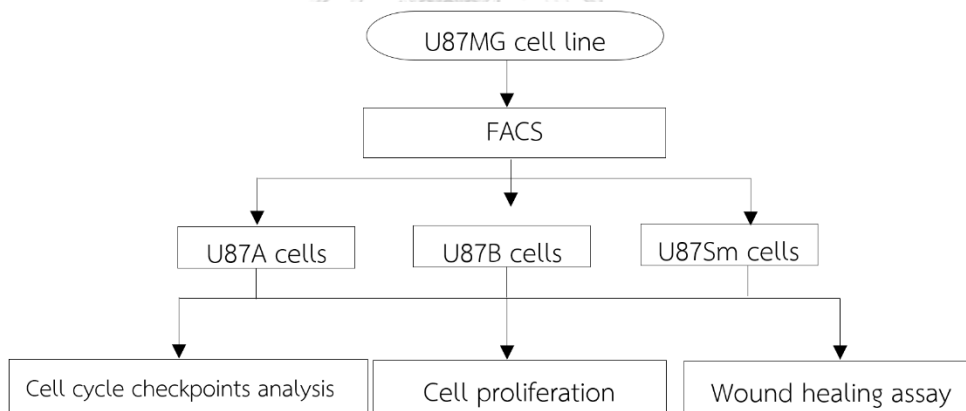
1. เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG โดยใช้เทคนิค Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)
2. เพื่อศึกษา cellular phenotypes หลัก ของ U87MG ในประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก

### สมมติฐาน

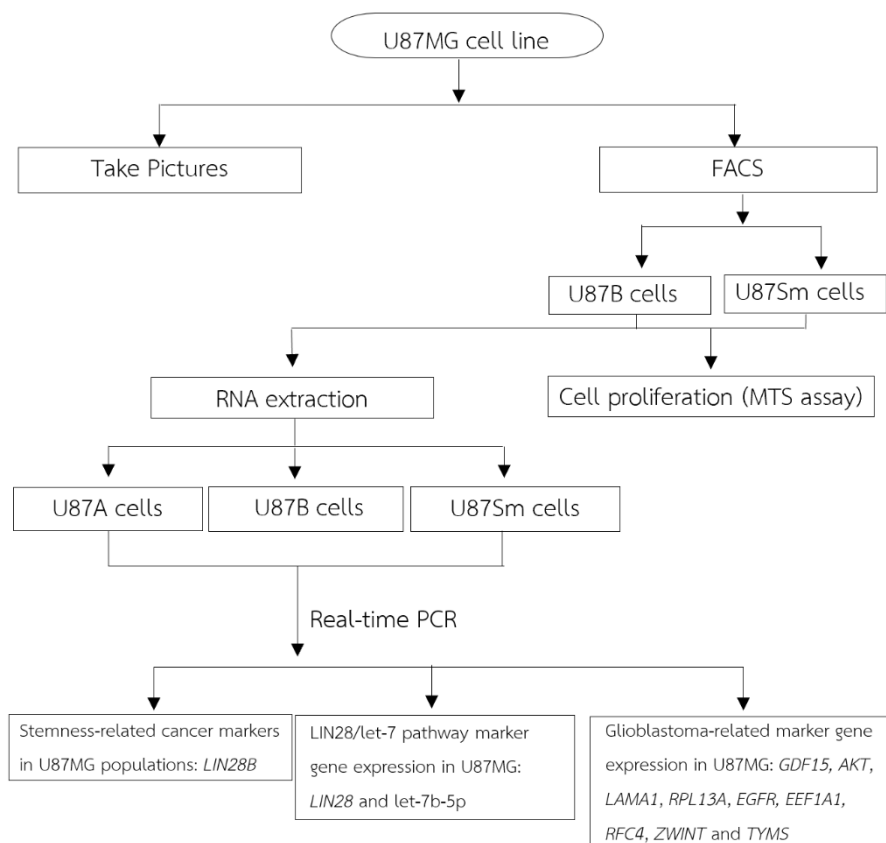
1. สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนและคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ในประชากรเซลล์ U87MG
2. ประชากรเซลล์ U87MG ที่ขนาดแตกต่างกันมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งต่างกัน

### ขอบเขตของการวิจัย

1. การตรวจสอบ cellular phenotypes ของ U87MG cell line

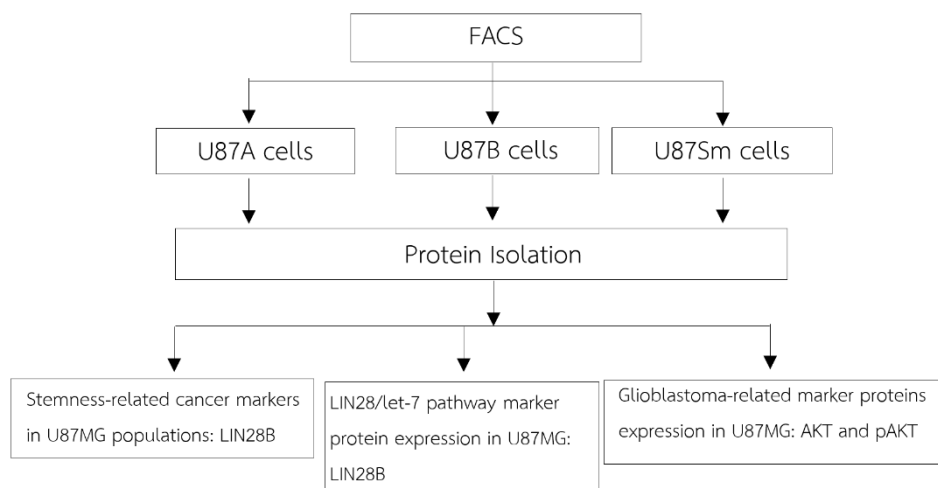


2. การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) ในประชากรเซลล์ U87MG





3. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนในประชากรเซลล์ U87MG ด้วย Western blot analysis



### คำสำคัญ

Glioblastoma (GBM)  
Cancer stem cells (CSCs)  
U87MG glioblastoma cell line  
Gene expression  
Cell characterization

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

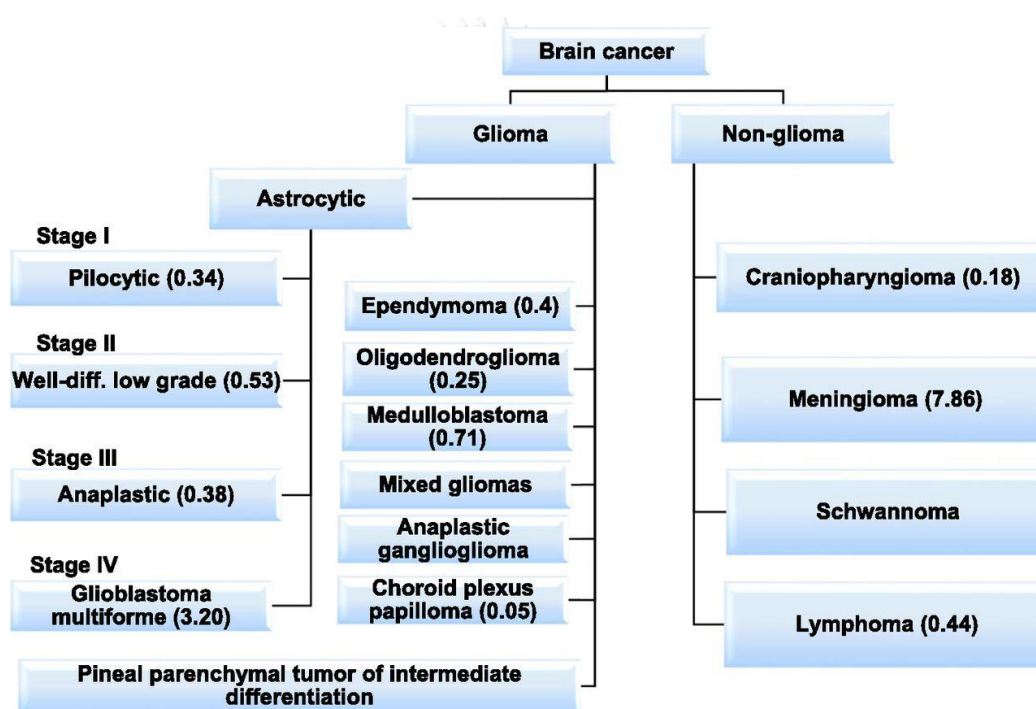
งานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่ามีความหลากหลายของประชากรเซลล์ของ U87MG ที่แบ่งตามขนาดของเซลล์และความสัมพันธ์ของประชากรเซลล์ U87MG ที่แตกต่างกันมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดต่างกัน ซึ่งหากมีความต่างกันนี้อาจนำมาใช้เป็นการศึกษาเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัย และ/หรือทำนายความรุนแรงของโรคมะเร็ง GBM ได้ในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

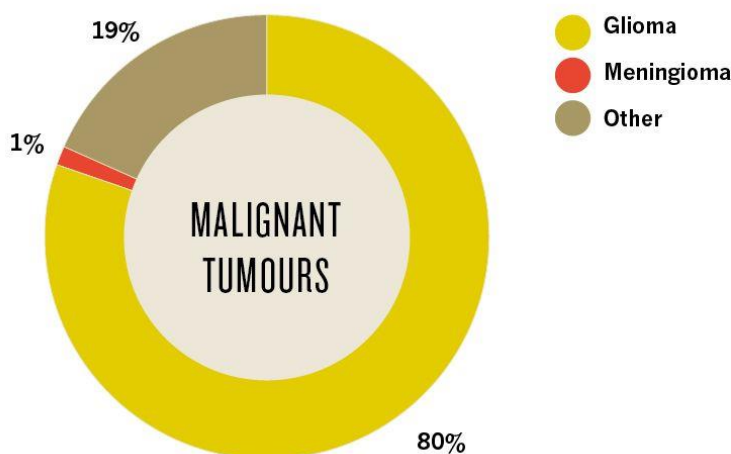
#### มะเร็งสมองชนิด Glioblastoma (GBM)

เนื้องอกกลัยโอเบลาสโตมา (Glioblastoma tumours) เป็นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจาก เซลล์เกลีย (Glia cell) จัดเป็นมะเร็งในระดับ 4 ตามองค์การอนามัยโลก (WHO) ที่มีความรุนแรงที่สุด (High-grade gliomas หรือ HGG) (1) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการจำแนกระดับความรุนแรงของมะเร็งสมองตามองค์การอนามัยโลก (WHO) (1)

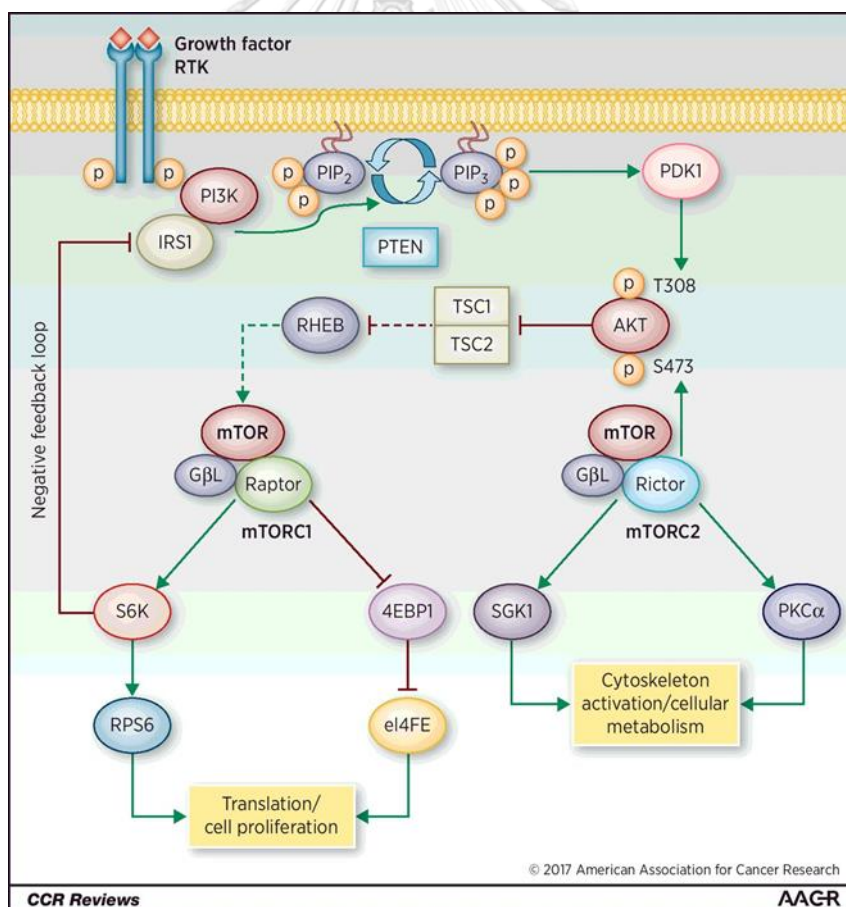
กลุ่มมะเร็งกลัยโอมาส่วนใหญ่ คือกลุ่มแอสโตรไซโตมา (Astrocytoma) ซึ่งประกอบด้วย มะเร็งที่พบบ่อย คือมะเร็งกลัยโอเบลาสโตมา และมะเร็งแอนนาพลาสติกแอสโตรไซโตมา (Anaplastic Astrocytoma หรือ AA) โดยทั้งสองชนิดดังกล่าวที่มีความรุนแรงหรือเรียกรวมกันว่า high-grade astrocytoma glioblastoma โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้องอก GBM เป็นเนื้องอกสมองที่มีความรุนแรงมากและพบบ่อยที่สุด (1, 42) แสดงดังภาพที่ 2



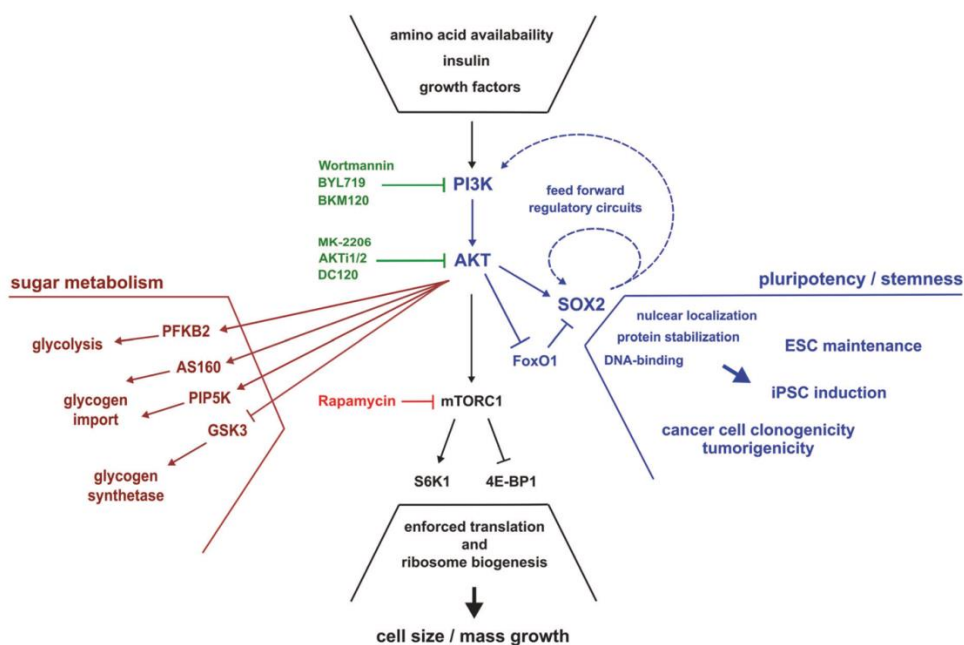
ภาพที่ 2 แสดงอัตราที่พบมะเร็งสมองที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เกลีย (Glia cell)(42)

Glioblastoma แบ่งเป็น 4 ประเภท ได้แก่ (1) neural: NL (2) proneural: PN (3) mesenchymal: MES และ (4) classical: CL (43) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม CL ความรุนแรง (aggressive) ของมะเร็งสมองชนิด GBM ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีคุณสมบัติเข้าใกล้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากก็จะมี ความรุนแรงมาก (aggressiveness) มากส่งผลต่อโอกาสในการรักษา ซึ่งการค้นพบในปัจจุบันเกี่ยวกับวิถีสัญญาณและกระบวนการในเซลล์ที่มีบทบาทในมะเร็ง GBM หนึ่งในวิถีสัญญาณที่ถูกกระตุ้นโดยโปรตีน EGFR ได้แก่ PI3K/Akt/mTOR ที่ทำหน้าที่ควบคุมการอยู่รอดของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์และการสร้างหลอดเลือด โดยกลไกในการส่งสัญญาณของวิถีนี้เริ่มต้นจากตัวกระตุ้นที่จำเพาะ (specific ligand) เช่น epidermal growth factor (EGF) และ insulin-like growth factor (IGF) จับกับ receptor tyrosine kinase บนผิวเซลล์แล้วทำให้เกิดการจับคู่และเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไทโรซีน เมื่อโปรตีนตัวรับได้รับสัญญาณจากปัจจัยกระตุ้นต่างๆ โปรตีนตัวรับก็จะไปกระตุ้น phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) เพื่อเติมหมู่ฟอสเฟตแก่ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) ซึ่งได้ผลผลิตคือ phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P3) สารตัวนี้จะไปกระตุ้นโปรตีน Akt ซึ่งเป็น serine/threonine kinase จัดเป็น downstream effector ของ PI3K โดย Akt จะถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตสองตำแหน่ง คือ ทรีโอนีน 308 (T308) ของ kinase domain และ เซอรีน 473 (S473) ของบริเวณ regulatory domain การเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง T308 ใช้เอนไซม์ชื่อ phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) ส่วนการเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง S473 ใช้ mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) เมื่อ Akt อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นจะทำหน้าที่เป็นตัวกลาง จากนั้นโปรตีน Akt จะไปกระตุ้นโปรตีน mechanistic

target of rapamycin (mTOR) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน mTOR จากนั้นจะส่งสัญญาณไปยังตัวตอบสนอง 2 ชนิด ซึ่งทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแปลรหัส ได้แก่ 70kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) และ 40S ribosomal protein S6 (40S rpS6) (26, 44, 45) นอกจากนี้ S6K ยังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างพลังงานเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดการแปลไปเป็นโปรตีนและการสร้างไรโบโซมซึ่งส่งผลต่อขนาดและมวลของเซลล์ (46) ดังภาพที่ 4 การกระตุ้น PI3K/Akt จะสิ้นสุดลงเมื่อ PTEN ดึงหมู่ฟอสเฟตออกจาก PIP3 ที่ตำแหน่ง 3'-OH group ใน inositol ring หรือเอนไซม์ SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) ทำหน้าที่ดึงหมู่ฟอสเฟตออกจาก PIP3 ที่ตำแหน่ง 5'-OH group และพบว่า PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase (PHLPP) สามารถยับยั้ง Akt ได้โดยดึงหมู่ฟอสเฟตออกจากตำแหน่ง S473 และ/หรือ T308 ของ Akt ดังนั้น PTEN, SHIP และ PHLPP จึงทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม(negative regulator) สำหรับวิถีนี้ดังภาพที่ 3

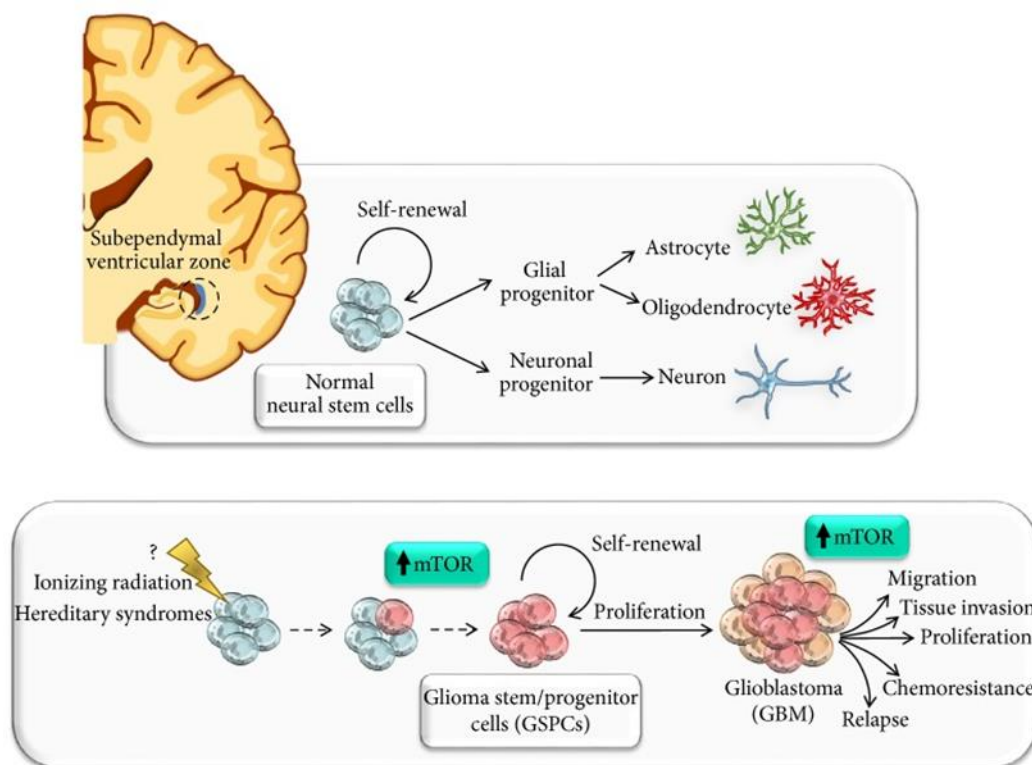


ภาพที่ 3 แสดงวิถีการส่งสัญญาณ PI3K/Akt/mTOR pathway ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา (45)



ภาพที่ 4 แสดงวิธีการส่งสัญญาณ PI3K / AKT / SOX2 ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด กระบวนการ cellular reprogramming และการเกิดมะเร็ง (46)

ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับวิถี PI3K/Akt/mTOR หากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีนี้จะทำให้เซลล์แบ่งตัวอย่างไม่จำกัดขณะเดียวกัน GBM มีการแสดงออกของ mTORC2 มากกว่ามะเร็งชนิดอื่น กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณมาก การเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง S473 จะเกิดขึ้นในระดับที่มากกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้นอันเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง ได้แก่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) การบุกรุกของเนื้อเยื่อ (tissue invasion) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การต้านยาเคมีบำบัด (chemoresistance) และการกลับมาเป็นใหม่ (relapse) ดังภาพที่ 5 ในทางตรงกันข้ามถ้ามีปริมาณที่น้อยจะส่งผลให้การเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง S473 ไม่สมดุล ทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียด เซลล์จึงมีกลไกการเกิด negative feedback เพื่อให้เซลล์มีการรับส่งสัญญาณในภาวะปกติซึ่งจัดเป็นการควบคุมการทำงานของเซลล์เพื่อให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้



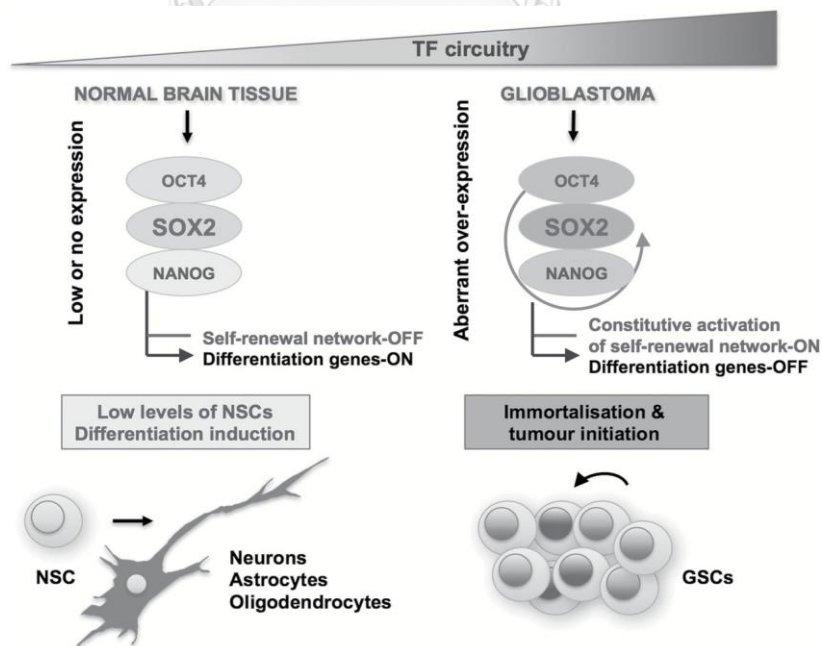
ภาพที่ 5 แสดงบทบาทการส่งสัญญาณ mTOR ใน Glioma Stem / Progenitor Cells (GSPCs) mTOR ใน Glioma Stem / Progenitor Cells (GSPCs) มีส่วนเกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณให้เซลล์ตั้งต้นเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สมองและระบบประสาทที่สมบูรณ์ สามารถแบ่งจำนวนได้อย่างไม่จำกัดและเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่จำเพาะได้ (47)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งชนิดกลัยโอบลาสโตมา (Glioblastoma)

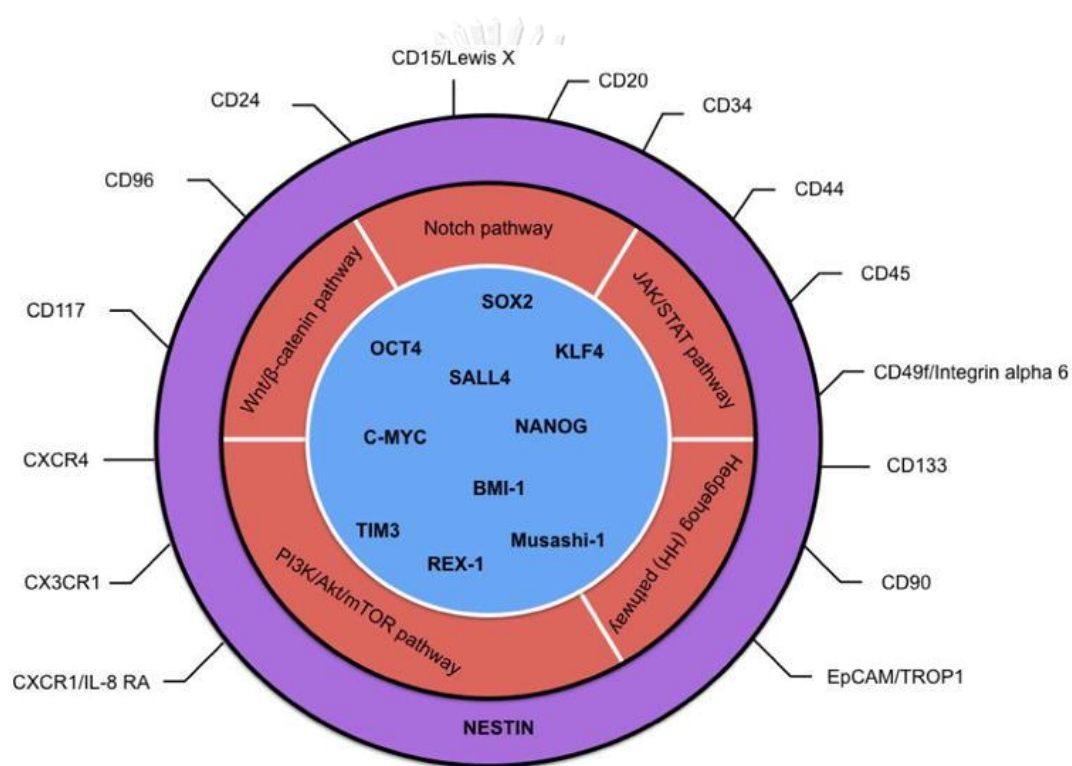
เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer stem cells หรือ CSCs) หรือเซลล์ตั้งต้นที่ทำให้เกิดเซลล์มะเร็ง (cancer initiating cells หรือ CICs) จะมีความสามารถในการรักษาคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของตัวเองได้อย่างไม่จำกัดและสามารถพัฒนาเป็นเซลล์จำเพาะได้หลายชนิด (multilineage differentiation) เหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดทั่วไป แต่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดทั่ว ๆ ไป คือ สามารถเกิดเป็นมะเร็งก้อนใหม่ได้ (tumor formation) ทำให้เกิดการพัฒนาก้าวหน้าของโรค (progression) และเกิดการกระจายไปยังที่อื่น ๆ (metastasis) เซลล์สมองโดยปกติจะมีการแสดงออกของ transcription factor ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ (differentiation) เช่น *OCT4*, *SOX2* และ *NANOG* ในระดับที่ต่ำหรือไม่พบการแสดงเลย เนื่องจากมีการปิดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน

ของตัวเองได้อย่างไม่จำกัด (self-renewal) ขณะเดียวกันก็มีการเปิดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ (differentiation genes) ส่งผลให้เซลล์ประสาทสามารถเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่จำเพาะได้ตามปกติ แต่มะเร็งสมองชนิด GBM จะมีการแสดงออกของ transcription factor ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ (differentiation) ดังกล่าว ในระดับที่สูง กล่าวคือมีการเปิดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของตัวเองได้อย่างไม่จำกัด (self-renewal) และปิดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ (differentiation genes) เป็นสาเหตุที่ทำให้ GBM มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดและมีความรุนแรงสูง (48) แสดงดังภาพที่ 6 จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมากขึ้นเพื่อให้พยากรณ์โรคมะเร็งในผู้ป่วยได้แม่นยำขึ้น โดยปกติประชากรเซลล์ในก้อนมะเร็งส่วนใหญ่จะตอบสนองดีต่อการรักษาแบบให้ยาเคมีบำบัดควบคู่กับการฉายรังสี มีเพียงประชากรส่วนน้อยที่เรียกว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ที่มีคุณสมบัติต่อการรักษา โดยมีรายงานพบว่าเกิดจากหลายกลไกที่พบในเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดแต่ไม่พบในเซลล์ปกติทั่วไป เช่น มีการเพิ่มขึ้นของกลไก Wnt/ $\beta$ -catenin, Hedgehog และ Notch signalling (18, 49) และมีกระบวนการซ่อมแซม DNA ที่ดี (36) เป็นต้น ดังนั้นการที่จะรักษามะเร็งให้หายขาดไม่กลับมาเป็นซ้ำอีก ต้องทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและส่งผลกระทบน้อยต่อเซลล์ปกติ การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจึงต้องมีวิธีการที่จะระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้อย่างแม่นยำและจำเพาะซึ่งปัจจุบันวิธีใน การระบุเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งยังไม่มีข้อสรุปชัดเจน



ภาพที่ 6 แสดงการทำงานของ pluripotency transcription factors ใน GBM (48)

ปัจจุบันมีการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกันมากขึ้น ทำให้มีข้อมูลในด้านต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น (1) วิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้แก่ Hedgehog (HH), Notch, JAK/STAT, PI3K/Akt/mTOR และ Wnt/  $\beta$ -catenin pathway (2) ตัวบ่งชี้ที่อยู่บนพื้นผิวที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น TRA-1-60, SSEA-1, EpCam, CD133 เป็นต้น (3) transcriptional factors การรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เช่น OCT4, SOX2, KLF4, NANOG และ SALL4 (50) แสดงดังภาพที่ 7 ซึ่งบทบาทหน้าที่ของตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งก็แตกต่างแสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 7 แสดงประเภทของตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (50)



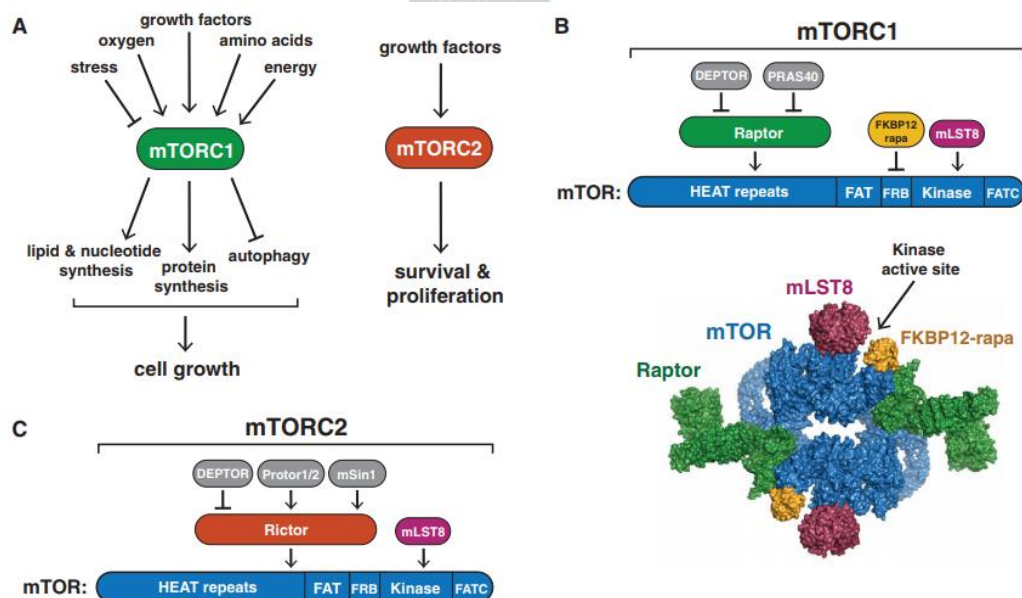
ตารางที่ 1 แสดงหน้าที่ของตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่สำคัญใน GBM

Marker	Other names	Function in stem cell	Characteristics	Selected Refs
OCT4	Oct3/4 or POU5F1	Stem cell self-renew and pluripotency maintenance	Oct family of POU5 transcription factor	(51, 52)
SOX2	-	Stem cell self-renew and pluripotency maintenance	1) HMG-box-type transcription factor 2) Oct4 partner	(52-54)
KLF4	-	Stem cell self-renew and pluripotency maintenance	Zinc-finger transcription factor	(55-57)
C-MYC	-	Stem cell self-renewal	Transcription factor and an oncogene	(52, 58, 59)
NANOG	-	Stem cell self-renew and pluripotency maintenance	Transcription factor	(60, 61)

### Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา

mTOR เป็นกลุ่ม protein Kinase ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณสารต่าง ๆ เพื่อควบคุมระดับพลังงานภายในเซลล์ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโต (cell growth) ได้ mTOR ประกอบไปด้วยกลุ่มโปรตีน 2 complex คือ mTOR complex 1 (mTORC1) เป็นตัวกลางสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย ถูกควบคุมโดย growth factors, oxidative stress, กรดอะมิโน, ปริมาณ ATP, ระดับกรด phosphatidic และระดับกลูโคส ส่วน mTOR complex 2 (mTORC2) เกี่ยวข้องกับโครงสร้างค้ำจุนของเซลล์ (cytoskeleton) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ mTORC2 ถูกกระตุ้นได้ด้วย growth factor เท่านั้น mTORC2 ประกอบด้วย DEPTOR (DEP domain TOR-binding protein), mSIN1 (Stress-activated map kinase-interacting protein 1), PROTOR (Protein observed with RICTOR และ RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) (46, 62, 63) ดังภาพที่ 8

โดยปกติแล้ว mTOR มีการใช้ตัวยับยั้ง (inhibitor) ของ mTOR เช่น rapamycin ในการยับยั้งมะเร็ง GBM ผ่านทางโปรตีน EGFR แต่ต่อมามีการศึกษาพบว่า EGFR ที่กลายพันธุ์ทำให้ยาใช้ยับยั้งไม่ได้ผล และยังมีรายงานพบว่ามะเร็งชนิด GBM มักมีการแสดงออกของ mTORC2 เพิ่มขึ้น แต่ยา rapamycin ไม่ได้มีคุณสมบัติในการยับยั้ง mTORC2 (64)



ภาพที่ 8 แสดงวิธีการส่งสัญญาณ mTORC1) แสดงหน้าที่ของ mTORC1 และ mTORC2 B) แสดง downstream ของ mTORC1 C) แสดง downstream ของ mTORC2 (63)

### LIN28/let-7 pathway ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา

บทบาทของ LIN28/let-7 pathway มีรายงานพบว่า LIN28 สามารถจับกับ microRNA ที่ชื่อว่า let-7 และยับยั้งกระบวนการสร้าง mature let-7 ได้ และในทางตรงกันข้าม let-7 microRNAs ก็สามารถยับยั้ง LIN28 ด้วยการจับกับ 3'UTR และทำให้ mRNA ถูกย่อยสลายหรือไม่ถูกแปลไปเป็นโปรตีน (15) บทบาทของ LIN28/let-7 โดยส่วนมากเป็นความสัมพันธ์ของ LIN28B (LIN28 paralog) ใน GBM (15, 64, 65) โดยมีรายงานพบว่า LIN28B มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดและดำเนินไปของมะเร็ง และยังพบว่าการยับยั้ง LIN28B ด้วยการ ใช้ siRNAs นั้นให้ผลดีในการรักษามะเร็งในหนู (64, 66) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า LIN28A สามารถจับกับ ดีเอ็นเอได้โดยทำงานร่วมกับ Tet1 ในการเปลี่ยนแปลง DNA methylation ได้โดยตรง (67)

### เครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการตรวจสอบตัวบ่งชี้ที่นิยมใช้ในการศึกษา เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา

ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่าวิธีการใดเป็นวิธีที่เหมาะสมและมีความแม่นยำมากที่สุดในการระบุประชากรเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง แต่มีวิธีการที่นิยมมากและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือการวิเคราะห์โปรตีนบ่งชี้ (marker-based analysis) โดยอาศัยโปรตีนบ่งชี้ที่มีความจำเพาะ (specific marker) กับการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง หรือจับการแสดงออกของโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular marker) เช่น โปรตีนที่อยู่ภายในนิวเคลียส (nuclear protein) หรือโปรตีนที่อยู่ในน้ำภายในเซลล์ (cytoskeletal protein)

การศึกษาเครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาที่นิยม เช่น E-cadherin, CD133, SOX2, OLIG2, NESTIN, CD15/SSEA-1, CD44, integrin alpha6, L1CAM เป็นต้น (68-71) การยึดเกาะของเซลล์จะอาศัยการทำงานของ cell adhesion molecule (CAMs) เป็นหลัก (72) CAMs เป็นโปรตีนประเภทที่อยู่บนผิวของเซลล์เมมเบรน (transmembrane proteins) ทำให้เนื้อเยื่อคงรูปร่างและทำงานได้ โครงสร้างของ CAMs ประกอบด้วย 3 โดเมน คือ transmembrane domain, extracellular domain และ intracellular domain ซึ่งเชื่อมโยงกับส่วนโครงสร้างค้ำจุน (cytoskeleton) โดย CAMs จำแนกออกได้เป็น 4 ประเภท คือ integrin, cadherin, selectin และ immunoglobulin superfamily (Ig-SF) (70, 71) และหนึ่งในตัวที่นิยมใช้ในการศึกษา คือ E-cadherin (CDH1) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลใน adherens junction ช่วยในการยึดจับกันระหว่าง epithelial cell กับโครงสร้างค้ำจุนภายในเซลล์ โดยผ่านโปรตีนที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อ เช่น catenin (71) นอกจากนี้ E-cadherin ยังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของวิถีส่งสัญญาณต่าง ๆ เช่น PI3K และ MAPK และที่สำคัญ การลดลงของ E-cadherin ยังช่วยส่งเสริมการเกิดกระบวนการ Epithelial-mesenchymal

transition (EMT) ที่ทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะกันของเซลล์ และลุกลามไปยังบริเวณอื่น (71)

Nestin เป็น intermediate filament protein ซึ่งมักใช้เป็น marker ของ Neuronal stem cells มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ของเนื้อเยื่อประสาทแรกเริ่ม (primitive neural tissue) (69) จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ดี

CD133 เป็นโปรตีนที่พบบนผิวเซลล์ โดยเฉพาะในมะเร็งสมองกลัยโอมา จะมีการแสดงออกของโปรตีน CD133 ที่สูง ซึ่งใช้บอกได้ว่าเซลล์นี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทหรือเซลล์เกลียต่อไป (68) บทบาทของ CD133 จึงเป็นตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ โดยอาศัยหลักการที่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีโปรตีนที่ผิวเซลล์ที่จำเพาะแตกต่างจากเซลล์ปกติอื่นๆ (73)



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรเซลล์ที่มีขนาดต่างกัน ระหว่างประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก รวมถึงเปรียบเทียบผลการวิจัย (Analytical study design) ของแต่ละกลุ่มประชากรเซลล์ โดยผ่านการพิจารณาและอนุมัติจาก คณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB No. 061/63

#### วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### 3.1 อุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในงานวิจัย

1. Autoclave (Hirayama, USA)
2. BD FACSAria™ II (BD Biosciences)
3. Eppendorf Centrifuge 5810R (Hettich Centrifuge, UK)
4. Class II Laminar Airflow (Thermo Scientific, USA)
5. Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
6. Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
7. Freezer -80°C (Panasonic, Japan)
8. Heating block (Bioer Technology, USA)
9. Microwave oven (Sharp, Japan)
10. Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
11. StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Scientific, USA)

##### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Automatic pipette: (0.1-0.2 µl), (0.5-10.0 µl), (2.0-20.0 µl), (20.0-200.0 µl) and (100-1,000 µl) (Eppendorf, Germany)
2. Micro centrifuge tube: 1.5 ml (ExtraGene, USA)
3. Parafilm (Plastic Packaging, USA)
4. Petri dishes: 100 mm (Thermo Scientific, USA)

5. PCR tube: 0.2 ml and 0.5 ml (Bioline, USA)
6. Pipette tip: 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l and 1,000  $\mu$ l (Thermo Scientific, USA)
7. Plate: 6 and 96 Well Plate (Thermo Scientific, USA)
8. Polypropylene conical tube: 15 ml and 50 ml (ExtraGene, USA)
9. Real-Time PCR tube (Kisker Biotech, Netherlands)

### 3.3 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดอาร์เอ็นเอ

1. Absolute ethanol (Merc, Germany)
2. Chloroform (RCI Labscan, Thailand)
3. Nuclease free water
4. DNase I (Cat. no. M0303S, New England Biolabs, England)
5. QIAzol Lysis Reagent (Cat. no.79306217004, Qiagen, Germany)
6. RNeasy Mini Kit (Cat. no. 217004, Qiagen, Germany)

### 3.4 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดโปรตีน

1. NaCl
2. EDTA
3. Triton X-100
4. Tris HCl

### 3.5 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse transcription

1. miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Germany)
2. cDNA reverses transcription kit
3. Nuclease-free water (Thermo Scientific, USA; Cat No.R0581)

### 3.6 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Real-Time PCR

1. 2X Luna® Universal SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Cat. no.M3003, New England Biolabs, England)
2. Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
3. Nuclease-free water (Thermo Scientific, USA; Cat No.R0581)
4. cDNA template (RT product)

### 3.7 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Cell culture

1. 0.25% Trypsin EDTA (Gibco)
2. Antibiotic-Antimycotic (Gibco)
3. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low glucose (Hyclone)
4. Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone)

### 3.8 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Cell proliferation assay

1. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)  
(Cat. no.G358c, Promega)

### 3.9 cell lines

U-87 MG (ATCC)

### 3.10 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA)

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์ U87MG ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% antibiotic-antimycotic เมื่อเซลล์โตแน่น (confluency) ภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80-90% ต้องทำการ subculture เซลล์ไปใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อเพิ่มจำนวน เพื่อป้องกันการเกิด overconfluency ซึ่งอาจทำให้เซลล์เกิดความผิดปกติได้ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> ที่ อุณหภูมิ 37°C

### การเตรียมเซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วย Fluorescence-activated cell sorting (FACS) โดยใช้ side scatter และ forward scatter

นำเซลล์ U87MG ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ มาทำการดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วล้างด้วย 1X phosphate buffered saline (PBS) 1 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะโดยเติม 0.25% trypsin ปริมาตร 5 ml ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 mm หรือพอให้ท่วมผิวเซลล์แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำภาชนะมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะหมดแล้ว แล้วใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่ เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin (neutralization step) ปริมาตร 10 ml และปิเปตขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell suspension) และนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer โดยใช้ 300,000 เซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วย FACS จากนั้นนำเซลล์ suspension ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที และดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกให้เหลือเฉพาะเซลล์ pellet และเติม 1% FBS ใน 1X PBS อัตราส่วน 1:10 จากนั้นนำเซลล์ไปทำการแยกเซลล์ด้วย FACS โดยแยกด้วยขนาดแบ่งเป็นประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กเพื่อใช้ในการทำการทดลองต่อไป

### การสกัดอาร์เอ็นเอด้วย RNeasy Mini Kit (Qiagen)

นำเซลล์ที่ได้จากการแยกเซลล์ด้วย FACS มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยแบ่งการสกัดเป็น 3 กลุ่มประชากรเซลล์ ได้แก่ ประชากรเซลล์รวมที่ไม่ได้ทำการแยก ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก จากนั้นนำแต่ละประชากรเซลล์มาเติม chloroform ปริมาตร 140  $\mu$ l เพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenize) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C แล้วดูดเอาสารละลายใสส่วนบน ย้ายลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติม 70% ethanol ปริมาตร 600  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,500 เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 25°C และล้าง pellet อีกครั้งด้วย RPE buffer ปริมาตร 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,500 เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 25°C จากนั้นล้าง pellet ด้วย RWT buffer ปริมาตร 700  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 25°C ทำการละลาย pellet ของอาร์เอ็นเอ ด้วย RNase free water ปริมาตร 30  $\mu$ l และทำการกำจัดดีเอ็นเอที่เจือปน (DNase treatment) โดยการผสมเอนไซม์ DNase และ DNase buffer อย่างละ 1  $\mu$ l ในอาร์เอ็นเอตัวอย่าง 10  $\mu$ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย EDTA 1  $\mu$ l เพื่อยับยั้งการทำงานของ DNase บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop โดยวัดได้จากอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.80-2.00



### การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) โดยเริ่มจากนำเซลล์ที่สกัดได้จากข้อ 3 จากนั้นทำการสังเคราะห์ complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) โดยใช้ชุดสกัด miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Germany) ต่อมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (PCR amplification) ด้วยการใช้ primer ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ดังตารางที่ 2 สภาวะสำหรับการทำ real-time PCR แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 Primers สำหรับ real-time PCR

No.	Name and Nucleotide positions	Sequene (5'-3')	No.of Sequenes	Tm
1	h1R1CTOR_F_5073-5092	AAATGCATGAAGAAGCAGAG	20	54.0
	h1R1CTOR_R_5270-5249	AACAGTGTACAGAAGATACTC	21	52.0
2	hOCT4_F_595- 615	TATTCAGCCAAACGACCATCT	21	54.1
	hOCT4_R_697- 678	TCAGCTTCCTCCACCCACTT	20	58.4
3	hSOX2_F_919- 941	GCACATGAACGGCTGGAGCAAC G	23	63.3
	hSOX2_R_1124- 1101	GCTGCGAGTAGGACATGCTGTA GG	24	61.2
4	NANOG_F_1-24	ACCAGAACTGTGTTCTCTTCCA CC	24	58.7
	NANOG_R_505-528	CCATTGCTATTCTTCGGCCAGTT G	24	58.2
5	hLIN28B_F_279- 301	CATCTCCATGATAAACCGAGAG G	23	58.0
	hLIN28B_R_443- 423	GTTACCCGTATTGACTCAAGG	21	56.0
6	c-MYC_F_1131-1148	TGAGGAGACACCGCCCAC	18	59.9
	c-MYC_R_1201-1177	CAACATCGATTTCTTCCTCATCT TC	25	53.9

No.	Name and Nucleotide positions	Sequene (5'-3')	No.of Sequenes	Tm
7	<i>RFC4_F_136-157</i>	GCGGAAACCTGAGGAACGAGCC	22	62.6
	<i>RFC4_R_277-255</i>	TGGCAGCTACTCCTCGATCCTT G	23	60.5
8	<i>ZWINT_F_595-621</i>	CCGCTCGAGCCCAACCATCATT ACAGG	27	64.6
	<i>ZWINT_R_697-690</i>	AGCTTTCCTGCAGGATTCTGGT TCACCGCAAG	32	66.3
9	<i>TYMS_F_574-555</i>	GCAGTTGGTCAACTCCCTGT	20	57.6
	<i>TYMS_R_466-485</i>	AGAGAAGAAGGGGACTTGGG	20	56.1
10	<i>SPARCL1_F_1837-1856</i>	GCCAGGATCCAGTGACTTGT	20	57.1
	<i>SPARCL1_R_1896-1877</i>	TGTCAGTGCCACAACTTGA	20	54.8
11	<i>EEF1A1_F_1057-1074</i>	GACCCACCAATGGAAGCA	18	55.3
	<i>EEF1A1_R_1126-1106</i>	CGCTTATTTGGCCTGGATGGT	21	58.0
12	<i>GDF15_F_245-264</i>	GAGCTGGGAAGATTCTGAACA	20	54.7
	<i>GDF15_R_350-331</i>	AGAGATACGCAGGTGCAGGT	20	58.4
13	<i>LAMA1_F_7046-7065</i>	GGCTACCGTGACCCAGATAA	20	56.3
	<i>LAMA1_R_7194-7175</i>	GTCCTGAACCCAGGTCAGTC	20	57.3
14	<i>EGFR_F_749-770</i>	CACTGCCTCATCTCTCACCATC	22	57.2
	<i>EGFR_R_905-886</i>	GACTCACCGTAGCTCCAGAC	20	56.9
15	<i>AKT_F_52-68</i>	GAAGGACGGGAGCAGGC	17	58.8
	<i>AKT_R_687-668</i>	AAGGTGCGTTCGATGACAGT	20	56.9
16	<i>GAPDH_F_86-105</i>	GTGAAGGTTCGGAGTCAACGG	20	60.0
	<i>GAPDH_R_192-171</i>	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG	22	58.0
17	<i>RPL13A_F_749-768</i>	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	20	55.4
	<i>RPL13A_R_905-886</i>	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG	20	55.4
18	<i>TBP_F_1023-1043</i>	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC	21	53.8
	<i>TBP_R_1140-1119</i>	TCTGGGTTTGTATCATTCTGTAG	22	52.1

ตารางที่ 3 แสดงสถานะในการทำ real-time PCR ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG

Step	Temperature (°C)	Times	Cycle
Pre-denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	15 วินาที	40
Annealing	50-68 <sup>#</sup>	30 วินาที	
Extension	72	20 วินาที *	

\* หมายถึง Fluorescence detection

# ขึ้นอยู่กับชนิดของยีนที่ตรวจวัด

#### การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับโปรตีน ด้วยวิธี western blot analysis

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG ด้วยวิธี western blot analysis ซึ่งใช้ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจเช่นเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาในในระดับอาร์เอ็นเอ โดยเริ่มจากนำเซลล์ในแต่ละประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก มาทำการสกัดโปรตีนโดยใช้ cell lysis buffer ซึ่งมี protease inhibitor และ phosphatase inhibitor เป็นส่วนประกอบด้วย จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้มาทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel ทำการแยกโดยใช้เครื่อง SE 260 mini-vertical gel electrophoresis ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากเจลมายังแผ่นเมมเบรน (nitrocellulose membrane) แล้วบ่มแผ่นเมมเบรนด้วย 5% bovine serum albumin เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วทำการล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Tris-buffered saline ที่มี 0.1% tween-20 จากนั้นย้อมด้วย primary antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ เช่นเดียวกันกับการทำ real-time PCR บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างแผ่นเมมเบรน จากนั้นย้อมด้วย secondary antibody และทำการตรวจสอบโปรตีนที่ตรวจหาโดยใช้ Odyssey Imaging System

### ตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วย Cell viability assay

ทำการ seed เซลล์ U87MG ในแต่ละประชากรเซลล์ ประกอบด้วย ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก ลงใน 96-well plate จำนวน 30,000 เซลล์/หลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM low glucose ปริมาตร 100  $\mu$ l จากนั้นนำบ่มตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเซลล์ลงเกาะที่พื้นผิวภาชนะ ทำการนับเซลล์ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยการ trypsinize และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที อุณหภูมิ 25°C แล้ว resuspend ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับเซลล์ด้วย hemocytometer แล้วบันทึกผลที่ได้

### ตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ (living cell) ด้วย Cell proliferation assay

ทำการเลี้ยงเซลล์ U87MG ที่แยกประชากรเซลล์แล้ว ประกอบด้วย ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM low glucose เมื่อเซลล์โตแน่นภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 90% จากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะโดยเติม 0.25% trypsin ปริมาตร 5 ml ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่ เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin (neutralization step) และปิเปตขึ้นลง เบบ ๆ เพื่อให้เซลล์แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell suspension) นับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer แล้วดูตกลงใน 96-well plate จำนวน 2,000 เซลล์/หลุม จากนั้นทำการวัด proliferation ด้วย MTS assay โดยทำการวัดที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เริ่มต้นด้วยการ ปิเปต CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution ปริมาตร 20  $\mu$ l แล้วบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดการอยู่รอดของเซลล์ด้วย microplate reader โดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ 490 nm ซึ่งจำนวนของ living cell จะมีสัดส่วนสัมพันธ์กับปริมาณของ formazan product จากนั้นคำนวณ %viability แล้วเปรียบเทียบแต่ละประชากรเซลล์ดังกล่าว

### ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งกัลยโอบลาสโตมา ด้วยวิธี Wound healing assay

ทำการเลี้ยงเซลล์ U87MG ที่แยกประชากรเซลล์แล้ว ประกอบด้วย ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM low glucose เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งโตแน่นภาชนะประมาณ 95% ใน 6-well plate บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นขีดเซลล์ด้วยปิเปตปิขนาด 200  $\mu$ l หรือความกว้าง 1 mm ให้เป็นเส้นตรงกลางหลุมและล้างเศษเซลล์ที่ขีดออกด้วยสารละลาย 1X phosphate buffer saline (PBS) นำไปถ่ายรูปด้วยกล้อง phase-contrast microscope และทำการวัดความกว้างของรอยแผลที่ขีดที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณความกว้างที่เปลี่ยนแปลงไป โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การปิดของรอยที่ทำการขีด

### ศึกษาการแสดงออกของ CD133, E-Cadherin และ Nestin ด้วยวิธี Immunofluorescence staining

เลี้ยงเซลล์ U87MG ที่แยกประชากรเซลล์แล้ว ประกอบด้วยประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM low glucose โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 2,000 เซลล์/หลุม ใน 8-well chambers ขนาด 40  $\mu\text{m}$  บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์โตแน่น ภาวะประมาณ 80-90% นำไปทำ indirect immunofluorescence เริ่มต้นโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย 1X PBS 3 ครั้ง จากนั้น fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 1X PBS 3 ครั้ง แล้ว permeabilize ด้วย 0.1% triton X-100 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1X PBS 3 ครั้ง จากนั้นทำการ block เซลล์ใน 1% BSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อม primary antibody ของโปรตีนที่สนใจ ได้แก่ Rabbit Anti-CD133, Mouse Anti-E Cadherin และ Rat Anti-Nestin ทำการย้อมคู่กับ secondary antibody ได้แก่ Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594), Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup> 555) และ Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) ตามลำดับ และย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI โดยใช้ความเข้มข้น 1/1,000 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และ dry slide ด้วย 100% ethanol แล้วปิด coverslip ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ และวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal

### ศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ด้วยวิธี Cell cycle analysis

เตรียมเซลล์ให้มีความหนาแน่น  $5 \times 10^5$  ถึง  $1 \times 10^6$  cells/ml จากนั้นเติม 1X nuclear green CCS1 แล้วบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30-60 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 1X PBS 3 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที จากนั้น resuspend เซลล์ด้วย 0.5 ml assay buffer (component B) แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer โดยใช้ FL1 channel (Ex/Em = 490/525 nm)

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

11.1 การวิเคราะห์แยกประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก จากผลการทำ FACS โดยใช้ side scatter และ forward scatter

11.2 การวิเคราะห์ relative quantitation ที่ได้จากผล real-time PCR โดยใช้ค่า Ct

นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยเลือก unpaired t-test โดยนำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและพิจารณาผลโดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติอยู่ที่  $p < 0.05$  คำนวณค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA)

### ข้อจำกัดในการวิจัย

ประชากรเซลล์ไลน์ U87MG ที่ใช้ในการศึกษาในหลอดทดลอง อาจไม่สามารถแยกประชากรเซลล์ใหญ่กับประชากรเซลล์เล็กออกจากกันอย่างชัดเจน เนื่องจากการคัดเลือกขนาดของเซลล์ยังไม่มีตัวคัดแยกที่ชัดเจน



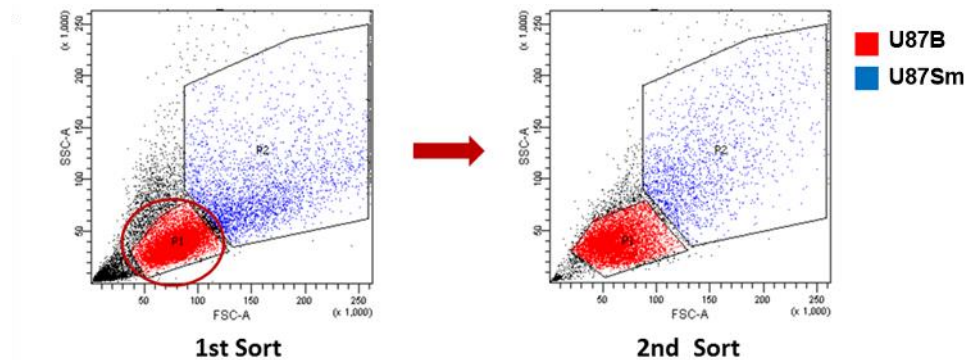
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

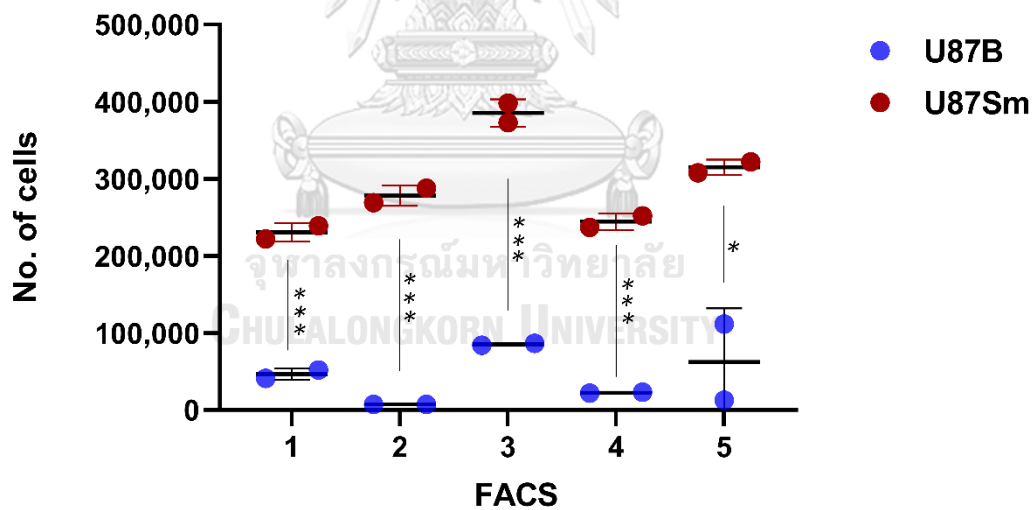
#### 4.1 การเตรียมเซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วย Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

##### โดยใช้ side scatter และ forward scatter

หลังจากที่นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่อง FACS โดยใช้ side scatter และ forward scatter โดยประชากรเซลล์รวมที่นำไปทำการแยกในครั้งที่ 1 ทั้งหมด 300,000 เซลล์ สามารถแยกประชากรเซลล์ใหญ่ได้จำนวน 41,111 เซลล์ และประชากรเซลล์เล็กได้จำนวน 222,000 เซลล์ และเมื่อนำเซลล์เล็กที่ได้จากการแยกครั้งที่ 1 ไปทำการแยกต่อในครั้งที่ 2 และเมื่อนำเซลล์เล็กที่ได้จากการแยกครั้งที่ 1 (1st Sort) ไปทำการเลี้ยงต่อเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หรือ 2 passage ก่อนจะนำมาแยกต่อในครั้งที่ 2 (2nd Sort) โดยประชากรเซลล์เล็กทั้งหมดที่นำไปทำการแยก ทั้งหมด 500,000 เซลล์ สามารถแยกเซลล์ใหญ่ได้จำนวน 86,500 เซลล์ และเซลล์เล็กได้จำนวน 398,060 เซลล์ ดังนั้นพบว่าจำนวนประชากรเซลล์รวมของเซลล์ U87MG ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดหลากหลาย ตั้งแต่เล็กถึงใหญ่ โดยสัดส่วนของเซลล์ขนาดใหญ่มีจำนวนน้อยกว่าประชากรเซลล์ที่มีขนาดเล็กประมาณ 5 เท่าจากประชากรเซลล์รวมแสดงดังภาพที่ 9 และเซลล์มีลักษณะทางสัณฐานและขนาดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และทำการแยกเซลล์ด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้นไปทั้งหมด 5 ครั้ง พบว่าลักษณะของประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กจะอยู่บริเวณเดิม คือมีขนาดใกล้เคียงกันนั่นเองดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 9 แสดงการแยกเซลล์ด้วยเครื่อง FACS โดยใช้ side scatter และ forward scatter โดยสีแดงแสดงประชากรเซลล์เล็กและสีน้ำเงินแสดงประชากรเซลล์ใหญ่ sort เซลล์ U87 ครั้งที่ 1 จำนวนเซลล์ทั้งหมด 300,000 เซลล์ มีจำนวนเซลล์ใหญ่ 41,111 และจำนวนเซลล์เล็ก 222,000 เซลล์ การ sort ครั้งที่ 2 จำนวนเซลล์ทั้งหมด 500,000 เซลล์ มีจำนวนเซลล์ใหญ่ 86,500 และจำนวนเซลล์เล็ก 398,060 เซลล์



ภาพที่ 10 แสดงจำนวนครั้งที่ทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่อง FACS โดยใช้ side scatter และ forward scatter โดยสีแดงแสดงประชากรเซลล์เล็กและสีน้ำเงินแสดงประชากรเซลล์ใหญ่ ค่าสถิติเปรียบเทียบระหว่างประชากรเซลล์ใหญ่กับประชากรเซลล์เล็กในแต่ละครั้ง (\*,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



#### 4.2 การประเมินความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ ทำการวัดโดยใช้เครื่อง Nanophotometer ประเมินผลและเปรียบเทียบค่า A260/A230 และพบว่าค่าที่ได้ในแต่ละประชากรเซลล์มีค่าตามมาตรฐานความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ กล่าวคือไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้น และมีความเข้มข้นเพียงพอต่อการนำไปทำ RT-PCR ซึ่งต้องการความเข้มข้นที่ 10 µg แสดงในตารางที่ 4

ผลการทำ RT-PCR โดยใช้ miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Germany) ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ cDNA พบว่าไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้น และมีความเข้มข้นเพียงพอต่อการนำไปทำ real-time PCR แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากประชากรเซลล์ U87MG ทั้งหมดของ ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก

No.	Sample	Total volume (µl)	Nanophotometer			
			Conc. (ng/µl)	Total RNA (µg)	A260/280	A260/230
1	U87A	30	1987.8	59.634	1.96	2.12
2	U87B	30	1773.6	53.208	1.94	2.31
3	U87Sm	30	1325.4	39.762	1.91	2.07

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นและคุณภาพของ cDNA จากการทำ RT-PCR ของประชากรเซลล์ U87MG ทั้งหมดของ ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก

No.	Sample	Total volume (μl)	Nanophotometer			
			Conc. (ng/μl)	Total RNA (μg)	A260/280	A260/230
1	U87A	10	698.40	20.95	2.06	2.24
2	U87B	10	614.35	18.43	2.01	2.24
3	U87Sm	10	974.90	29.25	2.02	2.16

#### 4.3 การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)

การวัดระดับการทำงานของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) ใช้การตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent signal) ที่เกิดขึ้นจากการทำ PCR ในแต่ละรอบ โดยสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าวเกิดจากการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome คือ SYBR Green พบว่ามีการแสดงของของยีน ดังนี้

ยีนที่แสดงออกใน Stemness-related marker ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, และ *LIN28B* พบว่าทั้ง 3 ยีนมีการแสดงออกในประชากรเซลล์รวมมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

ยีน *c-Myc* พบว่ามีการแสดงออกในประชากรเซลล์รวมมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

ยีน *ZWINT*, *TYMS* และ *RCF4* พบว่ามีการแสดงออกในประชากรเซลล์รวมมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

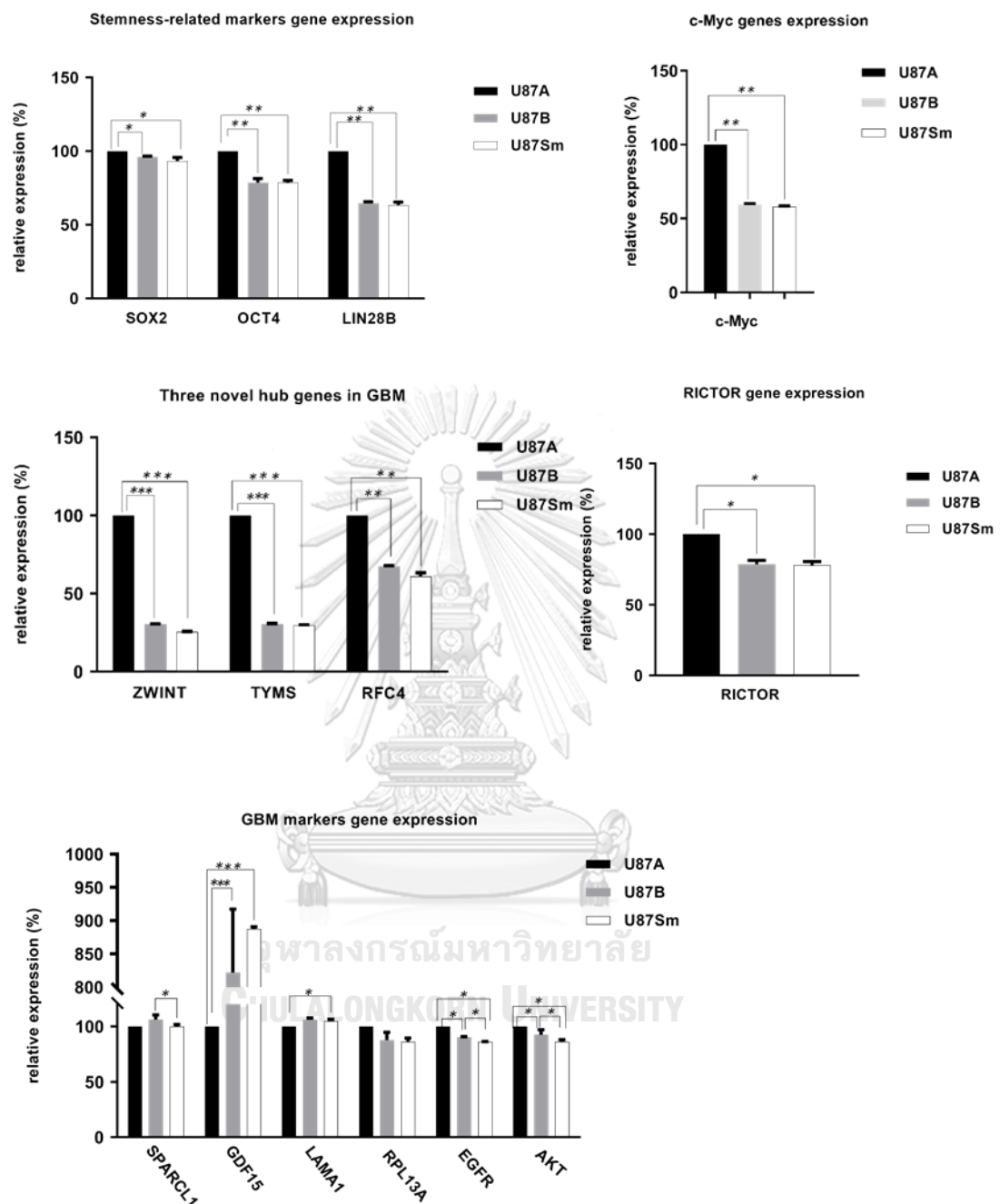
ยีน *RICTOR* พบว่ามีการแสดงออกในประชากรเซลล์รวมมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งยีน *OCT4*, *SOX2*, *LIN28B*, *c-Myc*, *ZWINT*, *TYMS*, *RCF4* และ *RICTOR* มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กไม่แตกต่างกัน

ยีนที่แสดงออกใน GBM ได้แก่ *SPARCL1*, *GDF15*, *LAMA1*, *RPL13A* พบว่าทุกยีนสามารถเพิ่มจำนวนในทุก ๆ ประชากรเซลล์ได้ทั้งหมดในปริมาณที่แตกต่างกัน ในขณะที่ยีน *EGFR* และ *AKT* พบว่ามีการแสดงออกในประชากรเซลล์รวมมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และแสดงออกในประชากรเซลล์ใหญ่มากกว่าประชากรเซลล์เล็กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 ดังภาพที่

11



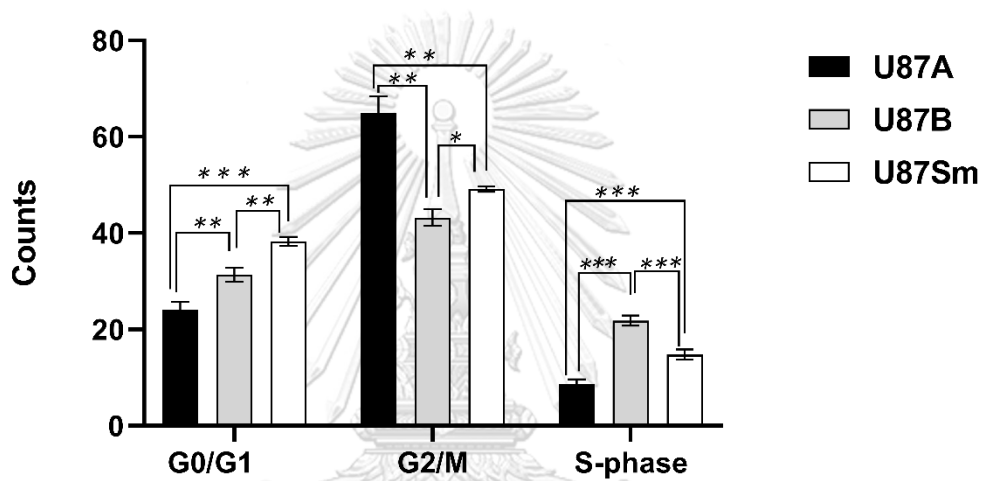


ภาพที่ 11 แสดงกราฟข้อมูลการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง OCT4, SOX2, LIN28B, c-MYC, ZWINT, TYMS, RCF4 และยีนที่แสดงออกใน GBM ได้แก่ SPARCL1, GDF15, LAMA1, RPL13A, EGFR, AKT และ RICTOR เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก (\*,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

#### 4.4 การตรวจสอบ Cellular phenotypes

##### 4.4.1 Cell cycle checkpoints analysis by propidium iodide (PI)

วัฏจักรของเซลล์ในระยะ Interphase ประกอบไปด้วยระยะย่อย G1, S และ G2/M ซึ่งสามารถวัดได้จาก DNA content และนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ FACS หลังย้อมสีเซลล์ด้วย PI ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่าในระยะ G0/G1 ประชากรเซลล์เล็กมีจำนวนมากที่สุด ระยะ G2/M ประชากรเซลล์รวมมีจำนวนมากที่สุดและระยะ S ประชากรเซลล์ใหญ่มีจำนวนมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า U87MG ต้องการการอยู่รวมกันของเซลล์จึงจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ

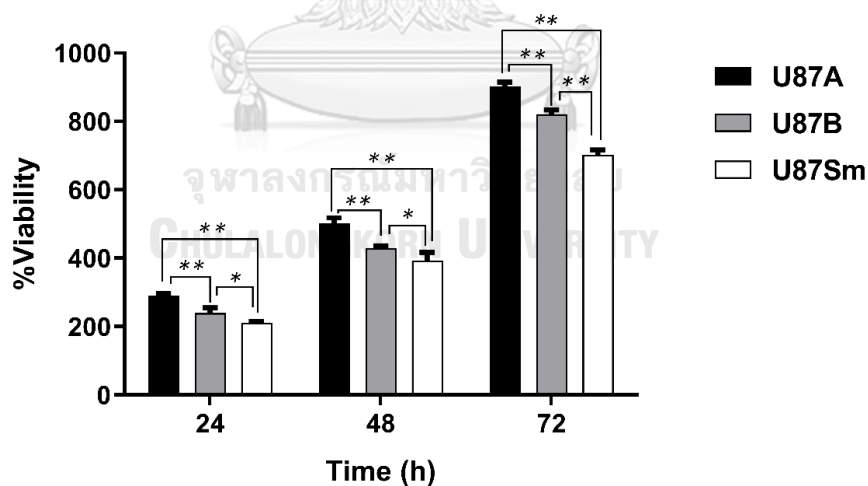


ภาพที่ 12 แสดงจำนวนเซลล์ของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กในระยะ Interphase (\*,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

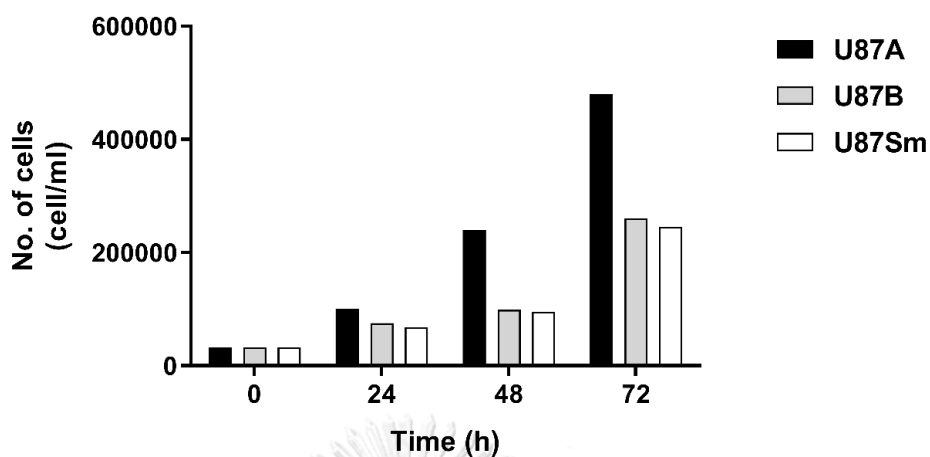
#### 4.4.2 Cell proliferation assay

จากการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย MTS assay ใน 96-well plate บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในแต่ละประชากรเซลล์ ได้แก่ ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ ร้อยละการอยู่รอด (%viability) ประชากรเซลล์ทั้งหมดมีการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือสามารถอยู่รอดได้มากกว่า ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.01 ดังภาพที่ 13

นอกจากนี้การวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย 6-well plate โดย seed เซลล์ลงในภาชนะ จำนวน 32,000 โดยคำนวณจากอัตราของจำนวนเซลล์ต่อพื้นที่ภาชนะ ในแต่ละประชากรเซลล์ ได้แก่ ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก พบว่าเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการอยู่รอด (%viability) ประชากรเซลล์รวมมีการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือสามารถอยู่รอดได้มากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กไม่แตกต่างกันดังภาพที่ 14 อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อดูแนวโน้มและยืนยันความแม่นยำของผลจาก MTS assay เท่านั้น จึงไม่สามารถคิดค่านัยสำคัญทางสถิติได้



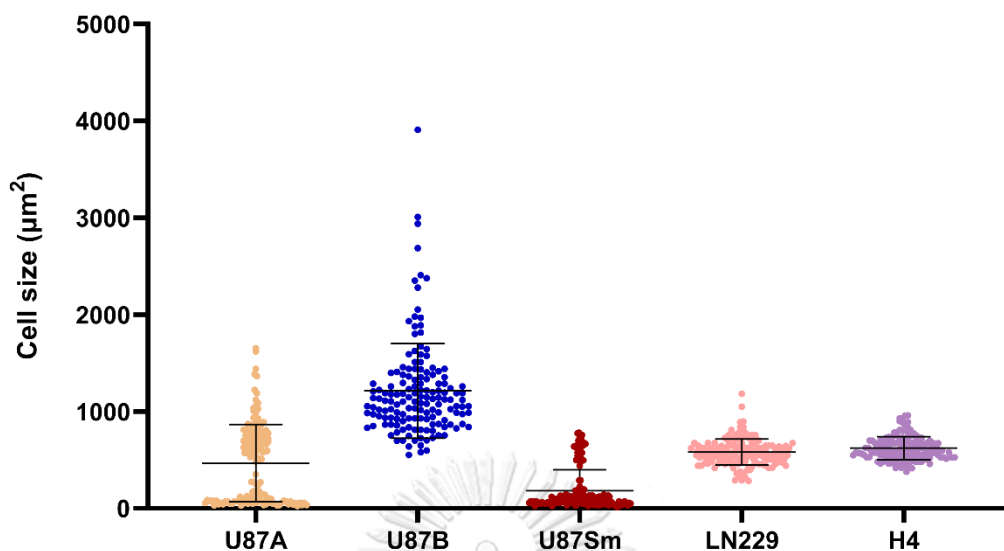
ภาพที่ 13 ร้อยละการอยู่รอดของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (\*,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



ภาพที่ 14 จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

#### 4.4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาและขนาดของเซลล์

จากการศึกษาวัฏจักรของเซลล์ในระยะ Interphase โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย Propidium iodide (PI) ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์สำหรับย้อม DNA และนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ Flow cytometer โดยได้ทำการวัดขนาดของเซลล์ในแต่ละประชากรเซลล์ จำนวน 150 เซลล์ ผลที่ได้พบว่าขนาดของประชากรเซลล์รวมเฉลี่ยที่  $466.73 \mu\text{m}^2$  ประชากรเซลล์ใหญ่เฉลี่ยที่  $1213.59 \mu\text{m}^2$  ประชากรเซลล์เล็กเฉลี่ยที่  $182.09 \mu\text{m}^2$  ในขณะที่เซลล์มะเร็งชนิดที่มีความรุนแรงต่ำกว่า คือ LN229 และ H4 มีขนาดเฉลี่ยที่  $580.10 \mu\text{m}^2$   $620.68 \mu\text{m}^2$  ตามลำดับแสดงในภาพที่ 15



	U87A	U87B	U87Sm	LN229	H4
Std. Deviation	398.42	488.78	216.77	135.68	118.95
Std. Error of Mean	32.53	39.91	17.70	11.08	9.71

ภาพที่ 15 แสดงขนาดของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก รวมถึง ประชากรเซลล์มะเร็ง LN229 และ H4 ที่มีความรุนแรงต่ำกว่าประชากรเซลล์ U87MG

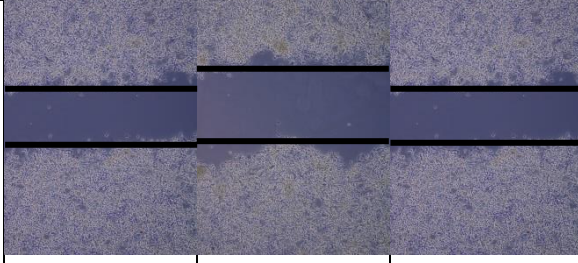
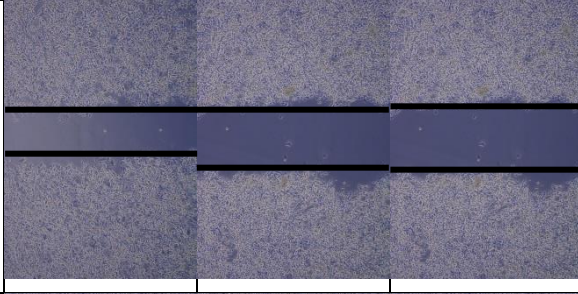
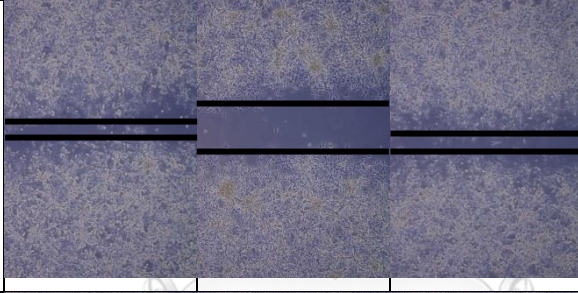
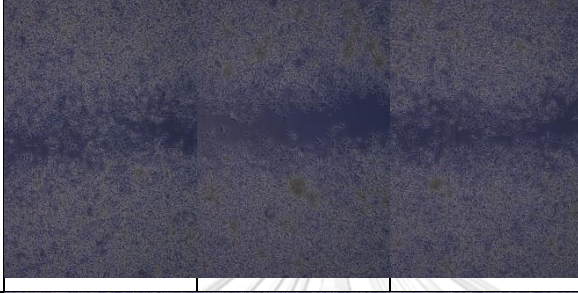
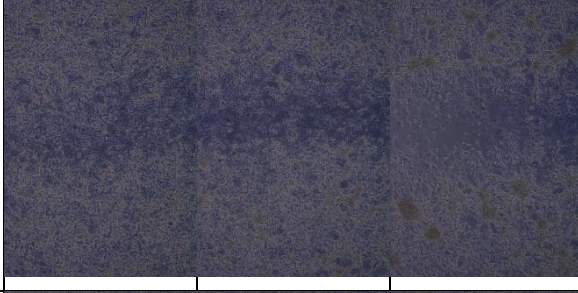
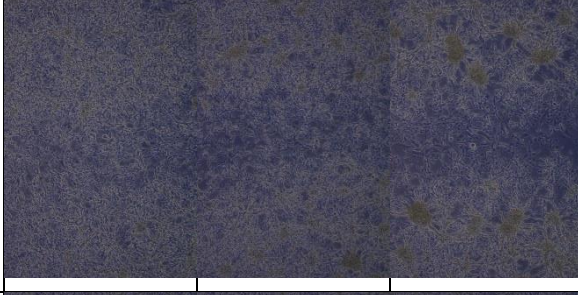
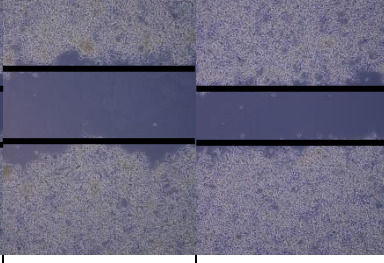
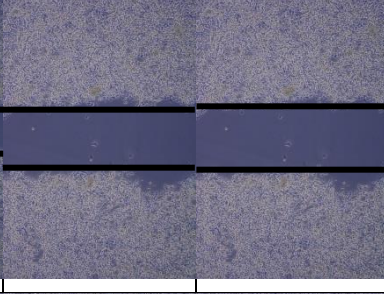
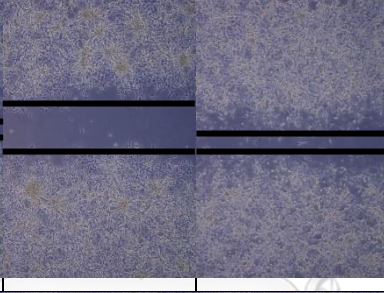
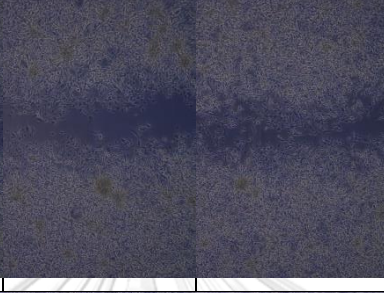
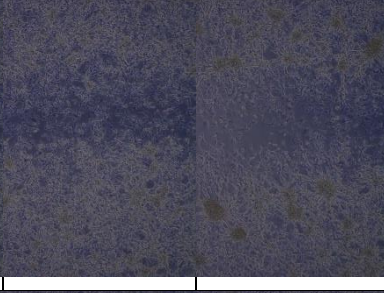
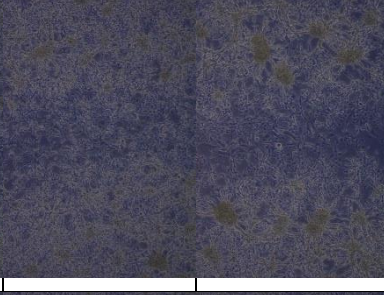
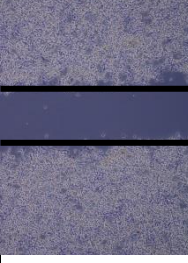
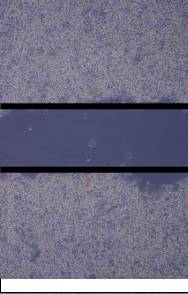
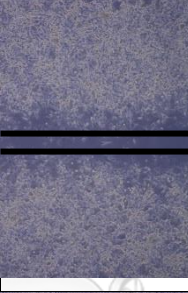

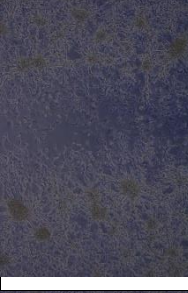
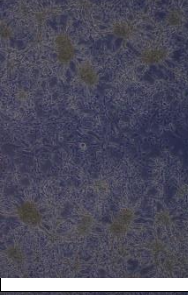
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.5 การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา ด้วยวิธี wound healing assay

จากการวัดการทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เพื่อวัดเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยการ scrape เซลล์ให้มีความกว้าง 1 มิลลิเมตร ในแต่ละประชากรเซลล์ ได้แก่ ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ของเซลล์ทุก ๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าประชากรเซลล์รวมมีการเคลื่อนที่เข้าหากันจนปิดบริเวณช่องว่างที่เวลา 16 ชั่วโมง ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กเคลื่อนที่เข้าหากันจนปิดบริเวณช่องว่างที่เวลา 20 ชั่วโมง แสดงว่า ประชากรเซลล์รวมเคลื่อนที่เร็วกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก ดังตารางที่ 6



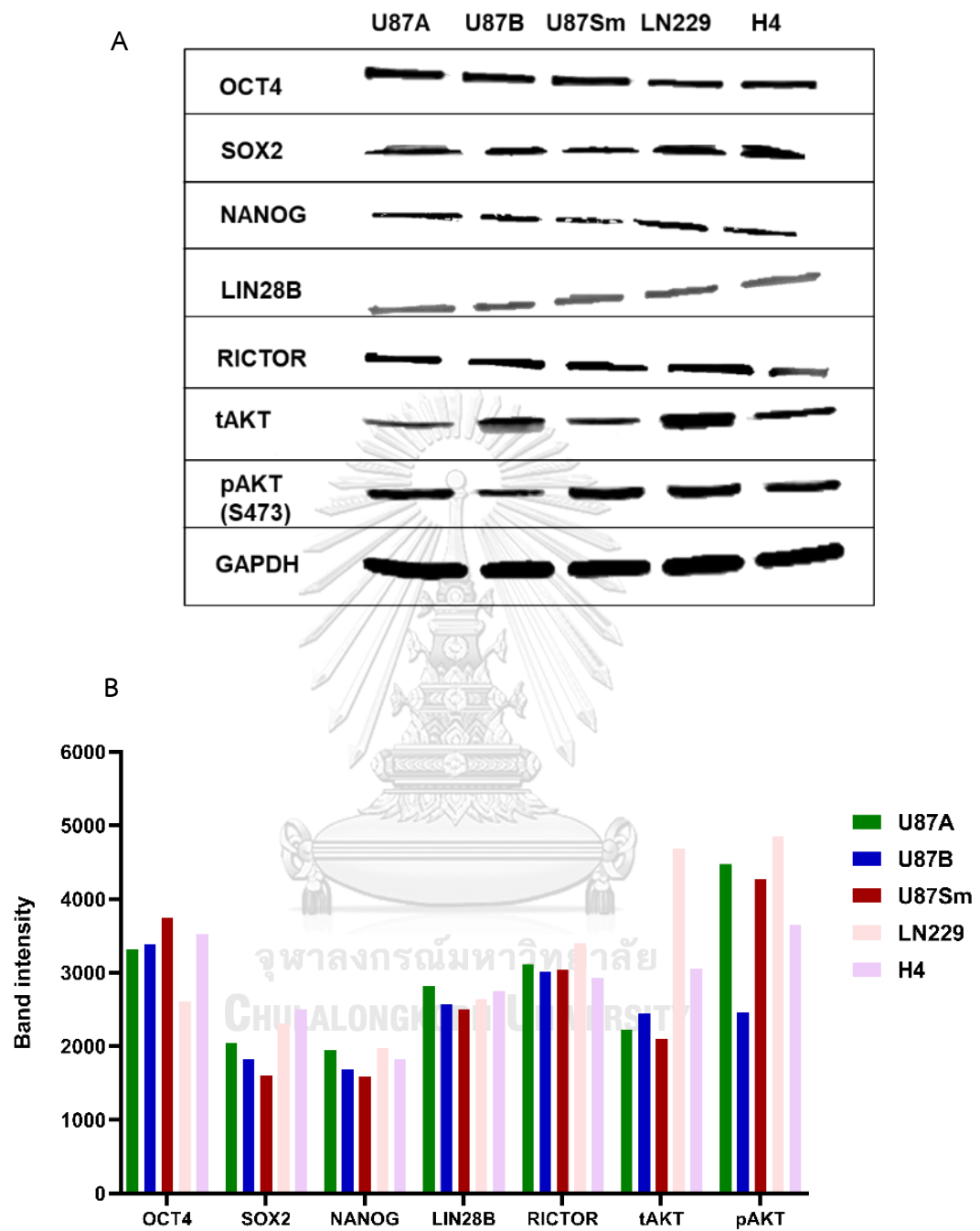
ตารางที่ 6 การเคลื่อนที่ของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

	0 hour	4 hours	8 hours	16 hours	20 hours	24 hours
U87A						
U87B						
U87Sm						

#### 4.6 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วย Western blot analysis

ผลการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG ด้วยวิธี western blot analysis โดยโปรตีนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ OCT4, SOX2, NANOG, LIN28B, RICTOR, พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละประชากรเซลล์ คือ ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กมีการแสดงออกของโปรตีนที่ศึกษาดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ pAKT(S473) และ tAKT พบว่าประชากรเซลล์ใหญ่มีการแสดงออกของโปรตีนน้อยกว่าประชากรเซลล์รวมและประชากรเซลล์เล็กแสดงดังภาพที่ 16



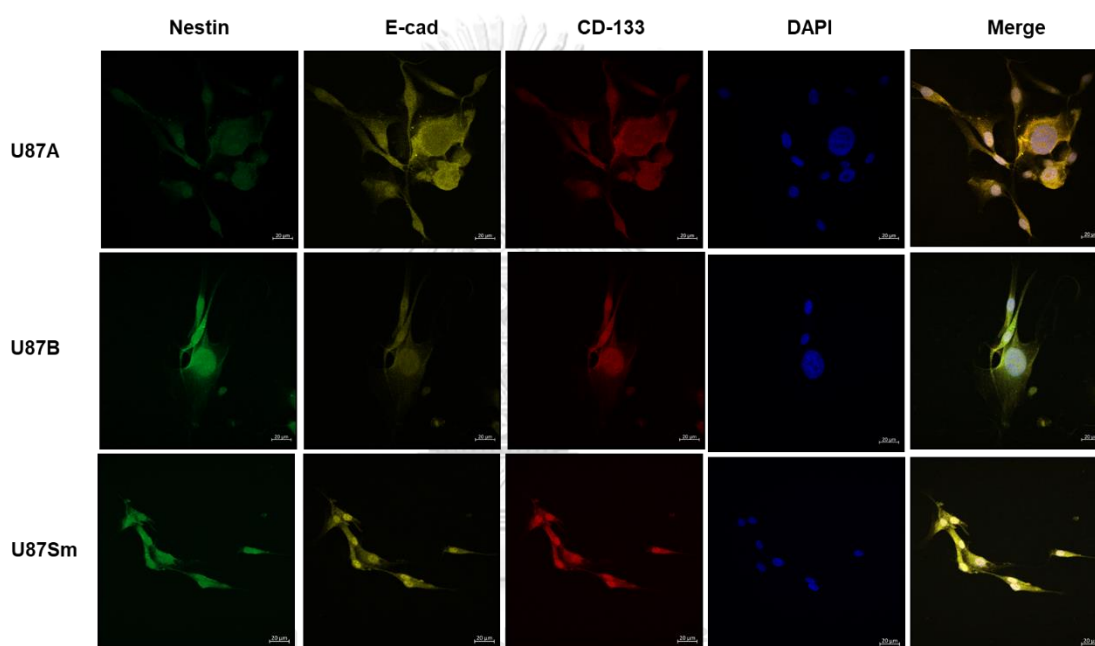


ภาพที่ 16 แสดงการแสดงออกของโปรตีน OCT4, SOX2, NANOG, LIN28B, RICTOR, pAKT(S473) และ tAKT A) แสดง Protein band B) แสดง Band intensity ใน U87MG ในประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก และเซลล์มะเร็งชนิดรุนแรงต่ำกว่า ได้แก่ LN229 และ H4

#### 4.7 ผลศึกษาการแสดงออกของ CD133, E-Cadherin และ Nestin ด้วยวิธี

##### Immunofluorescence staining

การศึกษาการแสดงออกของเครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งรังไข่โอบลาสโตมา ได้แก่ CD133, E-Cadherin และ Nestin พบว่าเครื่องหมายแอนติเจนทั้ง 3 ตัวในประชากรเซลล์รวมมีการแสดงออกกระจายทั่วทั้งเซลล์ ในขณะที่ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กจะมีการแสดงออกของ CD133, E-Cadherin และ Nestin บริเวณนิวเคลียสมากกว่าปกติ ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงภาพถ่ายจากกล้อง *confocal* เครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งรังไข่โอบลาสโตมา ได้แก่ CD133, E-Cadherin และ Nestin ของประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก โดยสีแดงแสดง CD133 สีเหลืองแสดง E-Cadherin และสีเขียวแสดง Nestin ตามลำดับ

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง GBM ใน U87MG โดยการแยกเซลล์ออกเป็นประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กด้วย FACS ใช้วิธีในการแยกโดย side scatter และ forward scatter เนื่องจากยังไม่มีตัวบ่งชี้ขนาดของเซลล์ที่ชัดเจน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถทำการแยกประชากรเซลล์ได้ทั้ง 5 ครั้ง พบว่าจำนวนประชากรเซลล์ใหญ่มีจำนวนน้อยกว่าประชากรเซลล์เล็กประมาณ 5 เท่าจากประชากรเซลล์รวม แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยังสามารถแบ่งตัวเจริญต่อไปได้แม้จะถูกทำให้ประชากรเซลล์โดยปกติเปลี่ยนไป ซึ่งการที่เซลล์ยังสามารถแบ่งตัวเจริญได้อาจเป็นผลมาจากการแยกประชากรเซลล์ใหญ่และเล็กออกจากกันไม่หมดแล้ว ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ตามปกติ โดยที่สิ่งแวดล้อมในการส่งสัญญาณของเซลล์เพื่อนบ้านเปลี่ยนไป (6-9) อีกทั้งการแยกเซลล์โดยใช้ side scatter และ forward scatter นั้นยังไม่สามารถแยกประชากรเซลล์ได้ทั้งหมด เพราะไม่ได้ทำการย่อยเซลล์ เนื่องจาก Flow cytometry เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์เซลล์ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ลงสู่เซลล์ แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์และไหลผ่านเครื่อง ซึ่งเทคนิคนี้มีความไวสูง สามารถวัดเซลล์จำนวนมากได้รวดเร็ว และมีการแยกความเข้มของแสงหรือขนาดของเซลล์ได้อย่างแม่นยำ (74)

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ ที่ทำการวัดโดยใช้เครื่อง Nanophotometer พบว่าไม่มีความปนเปื้อนและมีความเข้มข้นมาก แต่ค่าที่ได้จาก Nanophotometer จะมีความแม่นยำน้อยกว่า Qubit flurometer เนื่องจากเป็นการใช้สาร fluorescent จับกับอาร์เอ็นเอ ทำให้เกิดความผิดพลาดได้ ในขณะที่ Nanophotometer ใช้การดูดกลืนแสงในการวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ(75) ซึ่งต่อไปในอนาคตหากจะสกัดอาร์เอ็นเอสำหรับทำ RNA sequencing ควรทำการวัดทั้ง Nanophotometer, Qubit flurometer และ Bioanalyzer เพื่อวัด RNA integrity number (RIN) เป็นค่าที่บอกถึงความสมบูรณ์ของ RNA หลังจากการสกัด

ยีนที่แสดงออกในเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* และ *LIN28B* รวมถึงยีนใน mTORC2 คือ *RICTOR* พบว่าทุกยีนสามารถเพิ่มจำนวนในทุก ๆ ประชากรเซลล์รวม โดยยีน *RICTOR*, *LIN28B*, *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในจำนวนประชากรเซลล์รวมมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก แสดงว่าในระดับอาร์เอ็นเอประชากรเซลล์ของ U87MG มีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ซึ่งจากการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งนั้นถูกค้นพบครั้งแรกในมะเร็งเม็ดเลือดขาว (acute myeloid leukemia, AML) โดย John dick และคณะ (76) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และภายหลังทำให้มีข้อมูลมากขึ้น

ทำให้ทราบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells หรือ cancer initiating cells) จะมีลักษณะจำเพาะ ประกอบไปด้วย ความสามารถในการแบ่งตัวเจริญเติบโตได้อย่างไม่จำกัด (infinite proliferative capacity) สามารถแบ่งตัวเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่างๆ ได้หลายชนิด (multilineage differentiation potential) รวมถึงความสามารถในการแบ่งตัวแล้วได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนตัวเอง (self-renewal ability) ซึ่งคุณสมบัติจำเพาะดังกล่าวจะเหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดปกติ แต่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไป คือ สามารถส่งเสริมให้เกิดเป็นก้อนมะเร็งขึ้นใหม่ (tumor formation) ทำให้เกิดการพัฒนาก้าวหน้าของโรค (progression) และทำให้เกิดการกระจายไปที่อื่น (metastasis) (14, 25, 26) (18) และจากรายงานลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจะสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลาที่ยาวนานจะถูกควบคุมใหญ่โดยควบคุมของยีนต่าง ๆ เช่น *Oct3/4*, *Sox2*, *NANOG* และ *LIN28B* เป็นต้น (77-81) แสดงให้เห็นว่าเมื่อแยกประชากรเซลล์ U87MG ออกจากกันมีผลต่อการลดความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลดลง (6-9) รวมถึงยีน *RICTOR* ก็พบว่ามีแสดงออกของยีนไปในทางเดียวกันกับยีนที่ทำหน้าที่ในการรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับวิถี PI3K/Akt/mTOR หากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีนี้จะทำให้เซลล์แบ่งตัวอย่างไม่จำกัดขณะเดียวกัน GBM มีการแสดงออกของ mTORC2 มากกว่ามะเร็งชนิดอื่น ซึ่งจะพบยีน *RICTOR* ใน mTORC2 กล่าวคือถ้ามีปริมาณมาก การเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง S473 จะเกิดขึ้นในระดับที่มากกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้นอันเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง ได้แก่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) การบุกรุกของเนื้อเยื่อ (tissue invasion) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การต้านยาเคมีบำบัด (chemoresistance) และการกลับมาเป็นใหม่ (relapse) นั่นเอง (46, 62, 63) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กไม่แตกต่างกัน ซึ่งในการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุสาเหตุได้ว่าเพราะเหตุใดในประชากรเซลล์ใหญ่จึงมีการแสดงออกของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดน้อยกว่าประชากรเซลล์เล็ก สรุปได้เพียงว่าประชากรเซลล์ใหญ่มีการแสดงออกของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดสูงที่สุด

สำหรับปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าอุณหภูมิ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่จะนำอุณหภูมิดังกล่าวมาใช้ในปฏิกิริยา PCR เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ไม่ต่ำกว่า  $T_m$  ที่คำนวณจากความยาวของไพรเมอร์ ให้ไม่เกิด non-specific band และอุณหภูมิไม่สูงเกิน  $\pm 5$  องศาเซลเซียสทำให้ไพรเมอร์ จับได้อย่างจำเพาะและสมบูรณ์ตามขนาดที่ blast ได้จากฐานข้อมูล NBCI

จากการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย MTS assay พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ %viability ประชากรเซลล์รวมมีการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือสามารถอยู่รอดได้มากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก แสดงให้เห็นว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ U87MG และเซลล์ U87MG จะสามารถแบ่งจำนวนได้ตามปกติเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมของประชากรรวมที่มีความหลากหลายตามปกติ

จากการวัดการทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เพื่อวัดเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าประชากรเซลล์รวมมีการเคลื่อนที่เข้าหากันได้เร็วกว่าประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก อาจเกิดจากการที่เซลล์ U87MG จะสามารถแบ่งเซลล์ได้ตามปกติจำเป็นต้องอยู่รวมกัน เพราะเมื่อทำการแยกเซลล์พบว่าการแบ่งตัวช้ากว่าตอนอยู่รวมกันและส่งผลให้การเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ทำการแยกประชากรช้าลงด้วย

จากผลการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในประชากรเซลล์ของ U87MG ด้วยวิธี western blot analysis โดยโปรตีนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ OCT4, SOX2, NANOG, LIN28B และ RICTOR พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละประชากรคือ ประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็กมีการแสดงออกของโปรตีนที่ศึกษาดังกล่าวไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ายีนที่แสดงออกถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในระดับอาร์เอ็นเอมีการแสดงออกมากและแตกต่างกัน แต่ในระดับโปรตีนมีการแสดงออกน้อยและไม่แตกต่างกัน เนื่องจากยีนดังกล่าวอาจถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนในปริมาณที่น้อยนั่นเอง แต่ที่น่าสนใจคือ การแสดงออกของโปรตีน pAKT/AKT ของประชากรเซลล์ใหญ่น้อยกว่าในประชากรเซลล์รวมและประชากรเซลล์เล็กอย่างชัดเจน ซึ่งจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการที่สัดส่วนของ pAKT/AKT สูงขึ้นหรือต่ำลงเกี่ยวข้องกับวิถี PI3K/AKT ที่ทำหน้าที่ควบคุมการอยู่รอดของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์และการสร้างหลอดเลือด เพื่อรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (42) อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณและกระบวนการในเซลล์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle, aging และ morphogenesis (10) โดยเฉพาะยีนที่เป็นตัวหลักในมะเร็งหลายชนิด เช่น *RAS*, *TP53*, *PIK3* เป็นต้น (11, 12) ซึ่งยีนที่ใช้ยารักษา GBM เช่น *EGFR* พบว่าถูก amplified มากประมาณร้อยละ 50 และหนึ่งในวิถีสัญญาณที่ถูกกระตุ้นโดยโปรตีน *EGFR* คือ *PI3K/AKT* พบว่าสัญญาณนี้ถูกกระตุ้นมากถึงร้อยละ 90 (13) อีกทั้ง GBM บางกลุ่มมียีน *EGFR* ที่กลายพันธุ์ทำให้ยาที่ใช้ในการยับยั้งไม่ได้ผล แต่ทั้งนี้ก็ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าประชากรเซลล์เล็กที่มีการแสดงออกของ pAKT จะมีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมากกว่าประชากรเซลล์ใหญ่ เนื่องจากการทำงานของ cell signaling ในเซลล์แต่ละประชากรเซลล์อาจมีความแตกต่างกันซึ่งยังต้องต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม

การศึกษาการแสดงออกของเครื่องหมายแอนติเจน (antigenic marker) ที่ใช้ในการบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา ได้แก่ CD133, E-Cadherin และ Nestin พบว่าเครื่องหมายแอนติเจนทั้ง 3 ตัวมีการแสดงออกบริเวณขอบเซลล์ในประชากรเซลล์ใหญ่ ในขณะที่ประชากรเซลล์เล็กจะมีการแสดงออกของ CD133, E-Cadherin และ Nestin ในนิวเคลียสมากกว่าบริเวณขอบเซลล์ แต่เมื่ออยู่รวมกันเป็นประชากรเซลล์รวมทั้ง CD133, E-Cadherin และ Nestin พบว่ามีการแสดงออกทั่วทั้งเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า E-cadherin มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลช่วยในการยึดจับกันระหว่าง epithelial cell กับโครงสร้างค้ำจุนภายในเซลล์ (71) และเกี่ยวข้องกับเกิดการกระตุ้นการทำงานของวิถีส่งสัญญาณต่าง ๆ เช่น PI3K และ MAPK และที่สำคัญ การลดลงของ E-cadherin ยังช่วยส่งเสริมการเกิดกระบวนการ Epithelial-mesenchymal transition (EMT) ที่ทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะกันของเซลล์ และลุกลามไปยังบริเวณอื่น (71) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ Nestin มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่โปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ของเนื้อเยื่อประสาทแรกเริ่ม (primitive neural tissue) (69) จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ดี และพบการแสดงออกของ CD133 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จะมีการแสดงออกสูงในมะเร็งสมองกลัยโอบลาสโตมา ซึ่งใช้บอกได้ว่าเซลล์นี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทหรือเซลล์เกลียต่อไป (68) แสดงว่าการมีอยู่ของโปรตีนทั้ง 3 ตัวบ่งบอกถึงการมีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่จะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไปได้เรื่อยๆ อย่างยาวนานเมื่อมีการอยู่รวมกันเป็นประชากรเซลล์รวม เพราะพบการแสดงออกทั่วทั้งเซลล์ แต่เมื่อแยกกันพบว่ามีแสดงออกบริเวณที่แตกต่างกันในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ซึ่งในการศึกษานี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าประชากรเซลล์ใดที่ทำหน้าที่รักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งไว้

กล่าวโดยสรุปการศึกษานี้ทำการศึกษาดัชนีชี้ของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในประชากรของ U87MG ในประชากรที่ทำการแยกเป็นประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก โดยใช้เทคนิค real-time PCR พบว่าเซลล์ U87MG มีการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, *LIN28B*, *c-MYC*, *ZWINT*, *TYMS*, *RCF4* ยีนที่แสดงออกใน GBM ได้แก่ *SPARCL1*, *GDF15*, *LAMA1*, *RPL13A*, *EGFR*, *AKT* และ *RICTOR* ในประชากรเซลล์รวม ประชากรเซลล์ใหญ่และประชากรเซลล์เล็ก และในประชากรเซลล์รวมมีการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดสูงสุด อีกทั้งยังพบว่าเซลล์ U87MG ต้องการการอยู่รวมกันของเซลล์จึงจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ

ในอนาคตควรศึกษาความหลากหลายของขนาดเซลล์ต่อการแสดงออกของยีนอื่น ๆ เพิ่มเติม ทั้งในระดับโปรตีน โดยอาจศึกษาในระดับ omics เช่น transcriptomics, proteomics รวมถึงการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง เพื่ออธิบายคุณสมบัติและความแตกต่างของเซลล์ได้อย่างชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น



**บรรณานุกรม**

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
2. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013;15 Suppl 2:ii1-56.
4. Lonser RR, Walbridge S, Vortmeyer AO, Pack SD, Nguyen TT, Gogate N, et al. Induction of glioblastoma multiforme in nonhuman primates after therapeutic doses of fractionated whole-brain radiation therapy. *Journal of neurosurgery*. 2002;97(6):1378-89.
5. Masui K, Mischel PS, Reifenberger G. Molecular classification of gliomas. *Handbook of clinical neurology*. 2016;134:97-120.
6. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401.
7. Gao X, McDonald JT, Naidu M, Hahnfeldt P, Hlatky L. A proposed quantitative index for assessing the potential contribution of reprogramming to cancer stem cell kinetics. *Stem cells international*. 2014;2014:249309.
8. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*. 2015;36(2):177-85.
9. Safa AR, Saadatzadeh MR, Cohen-Gadol AA, Pollok KE, Bijangi-Vishehsaraei K. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis*. 2015;2(2):152-63.
10. Serão NVL, Delfino KR, Southey BR, Beever JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Med Genomics*. 2011;4:49-.
11. Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(5):492-507.

12. Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer journal* (Sudbury, Mass). 2014;20(1):66-72.
13. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12.
14. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-66.
15. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28. *Science*. 2008;320(5872):97-100.
16. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*. 2015;29(12):1203-17.
17. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(3):781-6.
18. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. 2008;452(7187):650-3.
19. Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015;12(8):445.
20. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009;14(1):3-9.
21. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-99.
22. Prager BC, Bhargava S, Mahadev V, Hubert CG, Rich JN. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer*. 2020;6(3):223-35.
23. Mitchell K, Troike K, Silver DJ, Lathia JD. The evolution of the cancer stem cell state in glioblastoma: emerging insights into the next generation of functional interactions. *Neuro-Oncology*. 2020;23(2):199-213.

24. Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E6.
25. Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(3):307-19.
26. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50.
27. Lee ES, Gao Z, Kim D, Park K, Kwon IC, Bae YH. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH(e) specific TAT exposure and multidrug resistance. *J Control Release*. 2008;129(3):228-36.
28. Folkins C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res*. 2007;67(8):3560-4.
29. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia*. 2009;23(1):43-52.
30. Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, Andreeff M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat*. 2009;12(4-5):103-13.
31. Fan L, Li F, Zhang H, Wang Y, Cheng C, Li X, et al. Co-delivery of PDTC and doxorubicin by multifunctional micellar nanoparticles to achieve active targeted drug delivery and overcome multidrug resistance. *Biomaterials*. 2010;31(21):5634-42.
32. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res*. 2007;67(5):2187-96.
33. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):2804-8.
34. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.

35. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. 2005;132(2):335-44.
36. Gerson SL, Reese J, Kenyon J. DNA repair in stem cell maintenance and conversion to cancer stem cells. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*. 2006(5):231-44.
37. Schulz A, Meyer F, Dubrovskaja A, Borgmann K. Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):862.
38. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501(7467):328-37.
39. Sun X-x, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015;36(10):1219-27.
40. Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*. 2015;5(159).
41. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004;431(7009):707-12.
42. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
43. Fedele M, Cerchia L, Pegoraro S, Sgarra R, Manfioletti G. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(11).
44. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9):a011189.
45. Fan QW, Nicolaidis TP, Weiss WA. Inhibiting 4EBP1 in Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(1):14-21.
46. Schaefer T, Lengerke C. SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene*. 2019.

47. Ryskalin L, Lazzeri G, Flaibani M, Biagioni F, Gambardella S, Frati A, et al. mTOR-Dependent Cell Proliferation in the Brain. *BioMed research international*. 2017;2017:7082696.
48. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*. 2014;36(2):177-85.
49. Abel EV, Kim EJ, Wu J, Hynes M, Bednar F, Proctor E, et al. The Notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PloS one*. 2014;9(3):e91983.
50. Zhao W, Li Y, Zhang X. Stemness-Related Markers in Cancer. *Cancer translational medicine*. 2017;3(3):87-95.
51. Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N, Cappellano A, de Souza JE, Cavaleiro S, et al. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *Journal of neuro-oncology*. 2012;106(1):71-9.
52. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2012;17(6):6196-236.
53. Ye F, Li Y, Hu Y, Zhou C, Hu Y, Chen H. Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(1):131-7.
54. Li C, Yan Y, Ji W, Bao L, Qian H, Chen L, et al. OCT4 positively regulates Survivin expression to promote cancer cell proliferation and leads to poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one*. 2012;7(11):e49693.
55. Liu Z, Yang H, Luo W, Jiang Q, Mai C, Chen Y, et al. Loss of cytoplasmic KLF4 expression is correlated with the progression and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2013;63(3):362-70.
56. Pham DL, Scheble V, Bareiss P, Fischer A, Beschorner C, Adam A, et al. SOX2 expression and prognostic significance in ovarian carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2013;32(4):358-67.

57. Inoue Y, Matsuura S, Kurabe N, Kahyo T, Mori H, Kawase A, et al. Clinicopathological and Survival Analysis of Japanese Patients with Resected Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring NKX2-1, SETDB1, MET, HER2, SOX2, FGFR1, or PIK3CA Gene Amplification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(11):1590-600.
58. Riou G, Barrois M, Le MG, George M, Le Doussal V, Haie C. C-myc proto-oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet (London, England)*. 1987;1(8536):761-3.
59. Wang F, Guo Y, Chen Q, Yang Z, Ning N, Zhang Y, et al. Stem cell factor SALL4, a potential prognostic marker for myelodysplastic syndromes. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6(1):73.
60. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LH, Pauchnik M, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer*. 2005;104(10):2092-8.
61. Lee M, Nam EJ, Kim SW, Kim S, Kim JH, Kim YT. Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2012;22(9):1489-96.
62. Kelberman D, de Castro SC, Huang S, Crolla JA, Palmer R, Gregory JW, et al. SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(5):1865-73.
63. Jhanwar-Uniyal M, Wainwright JV, Mohan AL, Tobias ME, Murali R, Gandhi CD, et al. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Advances in biological regulation*. 2019;72:51-62.
64. Iwanami A, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Arsenic reverses glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2013;12(10):1473-4.
65. Alarcon VB, Marikawa Y. ROCK and RHO Playlist for Preimplantation Development: Streaming to HIPPO Pathway and Apicobasal Polarity in the First Cell Differentiation. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 2018;229:47-68.

66. Wang T, Wang G, Hao D, Liu X, Wang D, Ning N, et al. Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Molecular cancer*. 2015;14:125.
67. Zeng Y, Yao B, Shin J, Lin L, Kim N, Song Q, et al. Lin28A Binds Active Promoters and Recruits Tet1 to Regulate Gene Expression. *Molecular cell*. 2016;61(1):153-60.
68. Coskun V, Wu H, Blanche B, Tsao S, Kim K, Zhao J, et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(3):1026-31.
69. Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, et al. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 8):1204-12.
70. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*. 2013;18(1-2):43-73.
71. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(5):402-18.
72. Korthuis RJ, Anderson DC, Granger DN. Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. *Journal of critical care*. 1994;9(1):47-71.
73. Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, Sisco PN, Murphy CJ. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(2):190-9.
74. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.-5.1.11.
75. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150528-e.
76. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-7.
77. Boquest AC, Shahdadfar A, Brinchmann JE, Collas P. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods Mol Biol*. 2006;325:35-46.

78. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
79. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
80. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
81. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*. 2009;15(2):59-68.







จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	รุ่งนภา บุตรศรี
วัน เดือน ปี เกิด	6 พฤศจิกายน 2538
สถานที่เกิด	อำเภอขามเฒ่า จังหวัดกาฬสินธุ์
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่ปัจจุบัน	21/13 บ้านคำแมด ตำบลบัวบาน อำเภอขามเฒ่า จังหวัดกาฬสินธุ์
ผลงานตีพิมพ์	นำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบบรรยาย ในหัวข้อ The Study of Stemness-Related Markers in U87 Glioblastoma Populations by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) ณ งานประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 52