ชื่อวิทยานิพนธ์	บทบาทของยีน WT1 ที่มีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของมะเร็งเต้านม
ผู้เขียน	นางสาวรักษพรรณ นวคณิต
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการตายที่พบในเพศหญิงทั่วโลก พบว่ามะเร็งชนิดนี้มีระดับการแสดงออกของยีน *WT1* สูง โดยระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *WT1* ที่สูงนี้มีความสัมพันธ์ต่อการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีต่อผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านม อีกทั้งมีการศึกษาว่าระดับโปรตีน WT1 มีความสัมพันธ์ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของโปรตีน WT1 ต่อกระบวนการเกิดของมะเร็งเต้านมมีข้อบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวที่ไม่ชัดเจน สมมติฐานในการศึกษาครั้งนี้คาดว่ายีน *WT1* มีบทบาท ต่อการควบคุมการเจริญและการพัฒนาของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยการใช้เทคนิค small interfering RNA (siRNA) ในการยับยั้งยีนเป้าหมาย WT1 ($siRNA_{WT1}$) กับเซลล์เพาะเลี้ยง MCF-7 โดยใช้ความเข้มข้นและช่วงเวลาในการบ่มที่แตกต่างกัน เพื่อดูผลการทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* และวิเคราะห์ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* โดยใช้วิธี Western Immunoblotting ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่า mixed $siRNA_{WT1}$ ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 nM มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* หลังจากที่นำเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้รับ Lipofectamine™2000 เท่านั้น และเป็นที่น่าสนใจเมื่อใช้ siRNA ที่ความเข้มข้น 100 nM สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 โดยฤทธิ์จะมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของ siRNA ที่แตกต่างกันโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มจาก 0, 25, 50, 100, 200, 400 และ 800 nM พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังการนำเข้าสู่เซลล์ ที่ความเข้มข้น 25 nM สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และจำนวนเซลล์ที่นับได้ลดลงถึง 71 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่ความเข้มข้นของ siRNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *WT1* คือ ความเข้มข้นที่ 50 nM และเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 800 nM พบว่าไม่พบการแสดงออกของยีน *WT1* และเมื่อนับจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวพบว่าจำนวนเซลล์ลดลงถึง 95 เปอร์เซนต์ จากการศึกษาครั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าการแสดงออกของยีน *WT1* ในการผลิตโปรตีนที่ลดลง มีผลให้เซลล์มะเร็งเพิ่ม

จำนวนได้ช้าลงโดยขึ้นกับเวลาและความเข้มข้นที่ใช้ จากข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนว่า WT1 เป็นยีนที่มีบทบาทส่งเสริมการเป็นมะเร็งเต้านมและ WT1 น่าจะเป็นยีนเป้าหมายที่ดียีนหนึ่งที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโดยวิธียีนบำบัดต่อไป

Thesis Title	The Role of WT1 Gene in Breast Cancer Development and Progression
Author	Miss Ruxapon Navakanit
Major Program	Biomedical Sciences
Academic Year	2007

ABSTRACT

Breast cancer is one of the leading causes of cancer death in women worldwide. High expression of WTl is a frequent genetic alteration seen in this malignancy. High levels of WTl mRNA have been shown to correlate with poor prognosis in breast cancer patients. However, the role of WTl in breast cancer remains unclear. The hypothesis of this experiment is that WT1 protein plays a role in breast cancer tumorigenesis by acting as a survival factor. Small interfering RNA (siRNA) directed against *WTl* gene ($siRNA_{WT1}$) was used to transfect MCF-7 cells in different time points and concentrations, and analyzed for specific inhibition of WT1 expression by Western immunoblotting. The results showed that mixed $siRNA_{WT1}$ (R88, R89 and R90) at 200 and 400 nM was sufficient to knock down WT1 protein expression at 48 h compared with the control. The control cells were transfected with only Lipofectamine™2000 reagent and did not show significant effect on either WT1 protein level or cell proliferation. Surprisingly, 100 nM of mixed $siRNA_{WT1}$ was able to inhibit the proliferation of MCF-7 cells and WT1 protein level in a time-dependent phenomenon. To determine the dose-effect of $siRNA_{WT1}$, the cells were transfected with different concentrations (0, 25, 50, 100, 200, 400 and 800 nM) of $siRNA_{WT1}$ and incubated for 72 h. The inhibitory effect was significantly depended on the $siRNA_{WT1}$ concentration in which the minimum effective dose was 25 nM that could reduce 71% of tumor cells. The minimum dose of siRNA to significantly knock down WT1 protein expression was 50 nM and completely abolish WT1 protein expression was 800 nM which can induce 95% growth inhibition. These findings indicate that down regulation of WT1 protein expression led to breast cancer cell reduction in time and dose dependent phenomena. These data suggest that *WT1* gene acts as a survival factor in the oncogenesis of breast cancer and can be one of ideal candidates for gene targeted therapy for breast cancer.