

ผลของการแสดงออกของ Progesterone receptor ในการส่งสัญญาณ  
ของ Epidermal Growth factor ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก

นางสาวศรสวรรค์ แก้วประเสริฐศรี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF HUMAN PROGESTERONE RECEPTOR EXPRESSION ON EPIDERMAL GROWTH  
FACTOR SIGNALING IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Miss Sornsawan Kawprasertsri



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

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของการแสดงออกของ Progesterone receptor ใน  
การส่งสัญญาณของ Epidermal Growth factor ใน  
เซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก  
โดย นางสาวศรสวรรค์ แก้วประเสริฐศรี  
สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประวิตร เจนวรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)

.....กรรมการ  
(ดร. เทวฤทธิ์ สระระชนะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ศรสวรรค์ แก้วประเสริฐศรี : ผลของการแสดงออกของ Progesterone receptor ในการส่งสัญญาณของ Epidermal Growth factor ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (EFFECTS OF HUMAN PROGESTERONE RECEPTOR EXPRESSION ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR SIGNALING IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ, 115 หน้า.

ในปัจจุบันเริ่มมีหลักฐานว่า Progesterone receptor (PR) มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งปอดชนิด NSCLC อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการส่งสัญญาณของ PR กับ NSCLC โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า PR มี Polyproline SH3 recognition motif (PXXPXR motif หรือ PPD) ที่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecules ได้ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า PXXPXR motif ของ PR สามารถขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ในเซลล์มะเร็งปอดได้ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตลดน้อยลง โดยทำการทดสอบบทบาทของ PXXPXR motif ในด้านการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณในเซลล์มะเร็งปอดที่มีการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 (มีการกลายพันธุ์ของ PXXPXR motif) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกได้โดย doxycycline ในเซลล์ A549 ผลการทดลอง Western blot และ PRE reporter assay พบว่า Doxycycline สามารถชักนำให้เกิดการ transcription ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ได้ และ PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 ได้ในภาวะที่ไม่มี ligand และเมื่อให้ R5020 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR-B พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 ลดลงมากขึ้น และเมื่อให้ RU486 ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของ PR และ R5020 ทำให้ไม่สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 ได้ ในขณะที่เมื่อให้ R5020 หรือ RU486 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR-B $\Delta$ SH3 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ PR-B สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 ได้เมื่อให้ EGF ในภาวะที่ไม่มี ligand ในขณะที่ PR-B $\Delta$ SH3 ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 และในการทดสอบบทบาทของ PXXPXR motif ของ PR กับการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ AKT พบว่า PR-B สามารถยับยั้ง MAPK activation ได้ แต่ PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถยับยั้ง MAPK activation ได้ จากผลการวิจัยทั้งหมดสรุปได้ว่าการส่งสัญญาณแบบ extra-nuclear ของ PXXPXR motif ของ PR มีความสัมพันธ์กับ EGFR ต่ออัตราการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณใน NSCLC

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

# # 5576663537 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: PROGESTERONE RECEPTOR / SH3 DOMAIN / EGFR / LUNG CANCER

SORNSAWAN KAWPRASERTSRI: EFFECTS OF HUMAN PROGESTERONE RECEPTOR EXPRESSION ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR SIGNALING IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER. ADVISOR: ASST. PROF. VIROJ BOONYARATANAKORNKIT, 115 pp.

Recent evidence suggests possible roles of progesterone receptor (PR) in non-small cell lung cancer (NSCLC). However, very little is known about functional roles of PR in NSCLC. PR contains a polyproline domain (PPD), which directly binds to the SH3 domain of signaling molecules. Since PPD-SH3 interactions are essential for EGF signaling, we hypothesized that the presence of PR-PPD interfered with EGFR-mediated signaling and cell proliferation. We examined the role of PR-PPD in cell proliferation and signaling by stably expressing PR-B or PR-B with disrupting mutations in the PPD (PR-B $\Delta$ SH3) from a tetracycline-regulated promoter in A549 NSCLC cells. PR-B dose-dependently inhibited cell growth in the absence of ligand, and progestin (R5020) treatment further suppressed cell proliferation. Treatment with RU486 abolished PR-B and R5020 inhibition of cell proliferation. Expression of PR-B $\Delta$ SH3 and treatment with R5020 or RU486 had no effect on cell proliferation. In addition, PR-B but not PR-B $\Delta$ SH3 reduced EGF-induced A549 cell proliferation and EGF-induced activation of MAPK, in the absence of ligand. Together, our data demonstrate the significance of PR extranuclear signaling through PPD interactions in EGF-mediated proliferation and signaling in NSCLC cells.

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

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

Molecular Medicine

Academic Year: 2015

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ บุญรัตน์ นกรกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษาต่างๆ รวมไปถึงชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา และแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆในการทำงานวิจัย ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ทั้งยังให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุกๆด้าน จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา และอาจารย์ ดร. เทวฤทธิ์ สະระชนะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณเงินทุน 90ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 25 ครั้งที่ 3 /2556 เลขที่ GCUGR11255725107M

ขอบคุณ พี่น้อง สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความรักและกำลังใจ ส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1.....	5
บทนำ.....	5
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย .....	5
คำถามงานวิจัย .....	8
สมมติฐาน.....	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
ขอบเขตงานวิจัย.....	9
บทที่ 2.....	11
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	11
โรคมะเร็งปอด .....	11
Epidermal growth factor receptor (EGFR) .....	12
MAPK pathway.....	15
AKT pathway .....	16
EGFR กับการเกิดมะเร็งปอดชนิด NSCLC .....	17
การนำ EGFR มาเป็น targeted therapy สำหรับโรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC .....	18
สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones).....	21

Steroid hormones receptors.....	22
กลไกการส่งสัญญาณของ nuclear receptors .....	23
Progesterone receptors (PR) .....	26
บทบาทของ PR กับ EGFR ใน NSCLC .....	27
บทที่ 3 .....	29
วิธีดำเนินการวิจัย .....	29
ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ .....	29
ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง .....	33
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	37
1. ตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของ PR ในเซลล์มะเร็งปอด A549.....	39
1.1 เทคนิค Real-time RT-PCR.....	39
1.2 เทคนิค Western blot.....	40
2. การเพิ่มจำนวน pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 และพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง lentivirus (psPAX2, pMD2G) .....	43
3. ผลิต lenti viral particles สำหรับนำพายีน pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 เข้า สู่เซลล์ NSCLC (A549).....	45
4. สร้างเซลล์โมเดล NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 แบบเหนี่ยวนำได้ โดย doxycycline.....	46
4.1 การ transduce lenti viral particles เข้าไปในเซลล์มะเร็งปอด.....	46
4.2 คัดเลือกเซลล์มะเร็งปอดที่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3.....	47
5. ตรวจสอบการแสดงออกโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3: โดยวิธี Westen blot .....	48



5.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด.....	48
5.2 ทดสอบหาระยะเวลาในการบ่มด้วย doxycycline เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด.....	50
6. ตรวจสอบการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 : โดยวิธี Immunofluorescence .....	51
7. ตรวจสอบ transcription factor ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 : โดยวิธี Luciferase assay.....	52
8. ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการเจริญเติบโตของ NSCLC : โดยวิธี MTT colorimetric assay.....	53
8.1 การศึกษาผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่อการเจริญเติบโตของ NSCLC ในภาวะที่ไม่มี ligand .....	53
8.1.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	53
8.1.2 ศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	54
8.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	54
8.2 การศึกษาผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่อการเจริญเติบโตของ NSCLC ในภาวะที่มี ligand .....	55
8.2.1 ศึกษาผลของ progestin agonist (R5020) และ progestin antagonist (RU486) กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	55
9. ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของ NSCLC : โดยวิธี Western blot.....	56

9.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	56
9.2 ศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	57
10. การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	57
บทที่ 4 .....	58
ผลการทดลอง .....	58
1. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน PR ในเซลล์ A549 .....	58
2. ผลของการเพิ่มจำนวน pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 และพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง lentivirus (psPAX2, pMD2G).....	60
3. ผลการหา Killing curve เพื่อหาความเข้มข้นของ G418 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ A549 ได้ 100%.....	64
4. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Western blot.....	65
5. ผลการตรวจสอบการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 : โดยวิธี Immunofluorescence.....	71
6. ผลการตรวจสอบการทำงานของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3: โดยวิธี Luciferase assay .....	73
7. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการเจริญเติบโตของ NSCLC : โดยวิธี MTT colorimetric assay .....	75
7.1 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	75
7.2 ผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	76

7.3 ผลของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	77
7.4 ผลของ progestin agonist (R5020) และ progestin antagonist (RU486) กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	79
8. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของ NSCLC: โดยวิธี Western blot .....	81
8.1 ผลของความเข้มข้น EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	81
8.2 ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	82
8.3 ผลของความเข้มข้น EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	84
8.4 ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	85
บทที่ 5 .....	86
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง .....	86
รายการอ้างอิง .....	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	115

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ส่วนผสมในการสร้าง lenti viral particles.....	45
ตารางที่ 2 การศึกษาผลของความเข้มข้น doxycycline ที่มีต่อการแสดงออกของPR.....	48
ตารางที่ 3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline ที่มีต่อการแสดงออกของPR.....	50
ตารางที่ 4 ส่วนผสมในการ transfect พลาสมิดเข้าสู่เซลล์โมเดล .....	52
ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์ A549 ที่มีชีวิตกับความเข้มข้นของ G418 .....	65



## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างของ PR ซึ่งมี polyproline SH3 recognition motif.....	7
ภาพที่ 2 การส่งสัญญาณของ EGFR โดยผ่าน signaling molecule ที่มี SH3 domain .....	7
ภาพที่ 3 การส่งสัญญาณของ EGFR เมื่อมี PR.....	8
ภาพที่ 4 โครงสร้างของ EGFR.....	13
ภาพที่ 5 signaling pathways ของ EGFR.....	14
ภาพที่ 6 การส่งสัญญาณของ MAPK และ AKT pathway .....	17
ภาพที่ 7 กลไกของ Monoclonal antibodies กับการยับยั้งการส่งสัญญาณของ EGFR.....	19
ภาพที่ 8 กลไกของ EGFR-TKI กับการยับยั้งการส่งสัญญาณของ EGFR.....	20
ภาพที่ 9 การสร้าง sex steroid hormones.....	22
ภาพที่ 10 โครงสร้างของ nuclear receptor.....	23
ภาพที่ 11 กลไกการส่งสัญญาณของ nuclear receptor .....	24
ภาพที่ 12 plasmid map ของ pHAGE-PR-B.....	29
ภาพที่ 13 การควบคุมการแสดงออกของยีนโดย Doxycycline.....	30
ภาพที่ 14 plasmid map ของ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 .....	31
ภาพที่ 15 plasmid map ของ psPAX2.....	32
ภาพที่ 16 plasmid map ของ pMD2G .....	32
ภาพที่ 17 ลักษณะและรูปร่างของเซลล์มะเร็งรังปอด A549.....	33
ภาพที่ 18 ลักษณะและรูปร่างเซลล์มะเร็งเต้านม T47D.....	34
ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน PR ในเซลล์ A549 ด้วยวิธี Real-time RT-PCR และ Western blot.....	59
ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B.....	60
ภาพที่ 21 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 .....	61

ภาพที่ 22 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ psPAX2 .....	62
ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ pMD2G.....	63
ภาพที่ 24 กราฟแสดงความเข้มข้นของG418ที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ A549ได้ 100%.....	64
ภาพที่ 25 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B .....	66
ภาพที่ 26 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3 .....	67
ภาพที่ 27 ผลของระยะเวลาในบ่มด้วย doxycycline เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B .....	68
ภาพที่ 28 ผลของระยะเวลาในบ่มด้วย doxycycline เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3.....	69
ภาพที่ 29 เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในทั้งสองเซลล์โมเดล....	70
ภาพที่ 30 การแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Immunofluorescence .....	72
ภาพที่ 31 ผลการตรวจสอบ transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Luciferase .....	74
ภาพที่ 32 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	76
ภาพที่ 33 ผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	77
ภาพที่ 34 ผลของความเข้มข้นของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	78
ภาพที่ 35 ผลของ R5020 และ RU486 กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3.....	80
ภาพที่ 36 ผลของความเข้มข้นของ EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 .....	82

**ภาพที่ 37** ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3..... 83

**ภาพที่ 38** ผลของความเข้มข้นของ EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ..... 84

**ภาพที่ 39** ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3..... 85



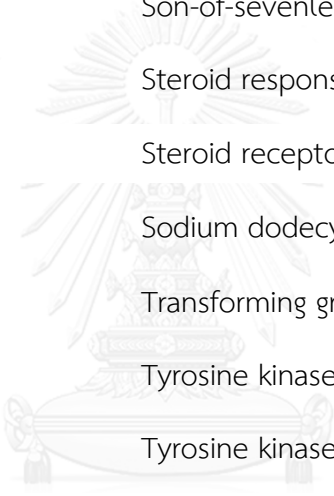
## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์และคำย่อ	ความหมาย
%	Per cent
/	Per
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\mu$	Micro
$\mu$ l	Microlitre
$\mu$ g	Microgram
$^{\circ}$ C	Degree Celsius
AR	Amphiregulin
ATP	Adenosine triphosphate
AF-1	Transcription activation function 1
AF-2	Transcription activation function 2
AR	Androgen receptors
A549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
APS	Ammonium persulfate
Ab	Antibody
bp	Base pairs
BTC	Betacellulin
BSA	Bovine serum albumin
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
C-terminal	Carboxyl-terminus



Dox	Doxycycline
DNA	Deoxyribonucleic acid
DBD	DNA binding domain
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DCC	Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGF	Epidermal growth factor
ER	Estrogen receptor
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
FDA	Food and drug Administration
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
g	G-force
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
hEF1a	Human elongation factor 1a
HB-EGF	Heparin binding EGF-like growth factor
HSP	Heat shock protein
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 cells
IRS-1	Insulin receptor substrate1
JAK/STAT	Janus kinase/ signal transducers and activator of transcription

kDa	Kilo Dalton
Kb	Kilo base
LBD	Ligand binding domain
M	Molar
ml	Millilitre
mg	Milligram
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MTT	3, [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
mRNA	Messenger RNA
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NR	Nuclear receptors
NaF	Sodium fluoride
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sodium orthovanadate
nM	Nanomolar
OD	Optical density
<i>p</i>	P-value
pH	Potential of Hydrogen ion
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3-kinase/AKT
PR	Progesterone receptor
PIs	Proteinase inhibitor cocktail
PBS	Phosphate Buffered Saline
Penstrep	Penicillin Streptomycin
rpm	Revolutions per minute



rtTA	Reverse tetracycline-controlled transactivator
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCLC	Small cell lung cancer
SH2 domain	Src Homology 2 domain
SH3 domain	Src Homology 3 domain
Shc	Src homology domain containing
Syp	Synaptophysin
Sos	Son-of-sevenless
SRE	Steroid response element
SRC	Steroid receptor coactivator,
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor- $\alpha$
Tyr	Tyrosine kinase
TKI	Tyrosine kinase inhibitors
TRE	Tetracycline-responsive promoter element
T47D	Human ductal breast epithelial tumor cell line
TEMED	Tetramethylethylenediamine

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

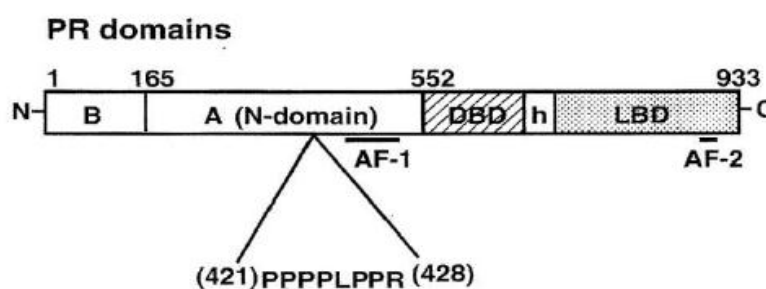
มะเร็งปอดเป็นโรคมะเร็งที่มีอุบัติการณ์การเสียชีวิตสูงทั่วโลก พบได้ทั้งในชายและหญิง[1] มะเร็งปอดแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small cell lung cancer หรือ SCLC) และ มะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก (Non-small cell lung cancer หรือ NSCLC) ซึ่งมะเร็งปอดชนิด NSCLC พบได้ประมาณ 75-80% ของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด และมีอัตราการรอดชีวิตต่ำประมาณ 18%[2] เนื่องจากผู้ป่วย NSCLC ส่วนใหญ่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาแบบเคมีบำบัดและฉายรังสี นอกจากนี้การรักษาด้วยวิธีดังกล่าวยังส่งผลข้างเคียงมากมายต่อผู้ป่วย[3] การค้นหาแนวทางการรักษาใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับผู้ป่วย NSCLC ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์จึงมีความสำคัญ โดยอาศัยโปรตีนหรือชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์มะเร็งปอด เพื่อนำไปใช้ในการคิดค้นและพัฒนาวิธีการรักษาแบบ targeted therapy สำหรับผู้ป่วย NSCLC

Epidermal growth factor receptor (EGFR) มีบทบาทสำคัญในโรคมะเร็งปอด โดยพบว่าใน NSCLC มี mutant EGFR (EGFR กลายพันธุ์) หรือมี EGFR overexpression (จำนวน EGFR ที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเซลล์ปกติ)[4, 5] ดังนั้น EGFR จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการรักษามะเร็งปอด โดย EGFR เป็น transmembrane receptor protein ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย ligand และเกิดการ phosphorylation โดยอาศัย signaling molecule ต่างๆ เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ MAPK (mitogen activated protein kinase) pathway, PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3-kinase/AKT) pathway และ JaK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activator of transcription) pathway ส่งผลให้เกิดการแบ่งตัว การเจริญเติบโตของเซลล์ และยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis[6, 7] นอกจากนี้ Growth factor receptor ที่มีความสำคัญกับโรคมะเร็งปอดแล้ว steroid hormones เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีหลักฐานว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งปอด โดย steroid hormones ทำงานได้โดยอาศัยการจับกับ steroid hormones receptor ซึ่ง steroid hormones receptor ที่สำคัญที่พบว่ามีแสดงออกในเซลล์มะเร็งปอด ได้แก่ Estrogen receptor (ER) และ Progesterone receptor (PR)[8] ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกและการทำงานของ ER ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC มีผู้ทำการศึกษาวินิจฉัยแล้วจำนวนมาก แต่การศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ระหว่าง PR กับมะเร็งปอดยังพบว่ามี

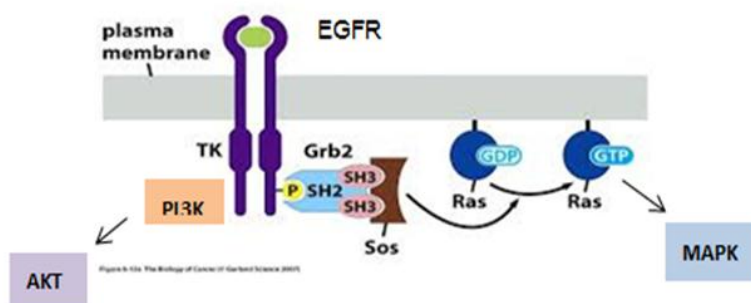
อยู่น้อย โดยจากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า PR มีการแสดงออกน้อยลงในเซลล์มะเร็งปอดเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ[9] และยังพบว่าเมื่อมีการให้ Progesterone ในเซลล์มะเร็งปอดของหนูที่มีการแสดงออกของ PR ทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งตัวของ NSCLC ได้[10, 11] นอกจากนี้การศึกษาทางคลินิกพบว่า PR เป็นปัจจัยในการพยากรณ์โรคมะเร็งปอดได้โดยพบว่า ในมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR จะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตช้าลง ทำให้ผู้ป่วยมีผลการรักษาที่ดี[9, 11] อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของ PR ในเซลล์มะเร็งปอดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าที่ N-terminal region ของ PR บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโน 421-428 มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เรียกว่า polyproline SH3 recognition motif (PXXPXR motif) (ดังแสดงในภาพที่ 1)[12] ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ได้ โดย SH3 domain เป็น adaptor domain ที่ใช้สำหรับการส่งสัญญาณของ growth factor receptor จำนวนมาก และ EGFR เป็น growth factor receptor ที่สำคัญในโรคมะเร็งปอดที่อาศัย signaling molecule ที่มี SH3 domain ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์[13, 14](ดังแสดงในภาพที่ 2)[15] ดังนั้นการแสดงออกของ PR อาจจะมีผลขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ภายในเซลล์มะเร็งปอด

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการส่งสัญญาณของ PR ภายในเซลล์มะเร็งปอดที่เกี่ยวข้องกับ EGFR ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานที่จะศึกษาว่า PXXPXR motif ของ PR สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ในเซลล์มะเร็งปอดได้ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตลดน้อยลง และทำให้ผู้ป่วยมะเร็งมีการรักษาที่ดีขึ้น (ดังแสดงในภาพที่ 3) โดยสำหรับงานวิจัยนี้ผู้วิจัยใช้เซลล์ A549 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี EGFR แบบปกติและไม่มีการแสดงออกของ PR นำมาใช้ในการสร้างเซลล์โมเดล ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของ PR ในภาวะที่ไม่มี ligand (ligand independent mechanism) , ฮอร์โมนหรือ growth factor ต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งเป็นการศึกษาแบบ non-genomic signaling pathways รูปแบบของ PR มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ PR-A และ PR-B โดย PR-A จะพบที่บริเวณนิวเคลียส[16, 17] ในขณะที่ PR-B จะพบที่บริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมในภาวะที่ไม่มี ligand[17, 18] ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ PR-B มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยจะทำการสร้างเซลล์โมเดล 2 แบบ คือแบบแรกเป็นเซลล์ NSCLC ที่มีการแสดงออกของ wild type PR-B (PR-B ปกติ) ซึ่งมี PXXPXR motif เป็นตำแหน่งที่สามารถจับกับ SH3 domain ของ cytoplasmic signaling molecules ได้ และแบบที่สองเป็นเซลล์ NSCLC ที่มีการแสดงออกของ mutant PR-B (PR -B กลายพันธุ์ หรือ PR-B $\Delta$ SH3) ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของ prolines 2 ตำแหน่งไปเป็น alanines (PXXPXR motif ไปเป็น AXXAXR motif) ทำให้ไม่สามารถจับกับ SH3 domain

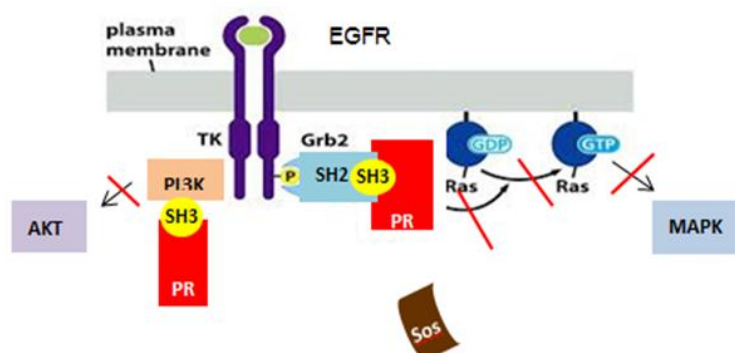
ได้ โดยจะนำเซลล์โมเดลทั้ง 2 แบบมาศึกษาการเจริญเติบโต และการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ AKT pathway หากผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ จะเกิดประโยชน์ในด้านการแพทย์ สามารถพัฒนาหรือออกแบบยาที่มีการทำงานคล้าย PR หรือเฉพาะชิ้นส่วนของ PR (PXXPXR motif ของ PR) ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด หรือคิดค้นกระบวนการใดๆที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ PR เพิ่มขึ้นในเซลล์ของผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตช้าลง ซึ่งประโยชน์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอด ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตหรือมีชีวิตยืนยาวขึ้น



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ PR ซึ่งมี polyproline SH3 recognition motif (PXXPXR motif) ที่บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโน 421-428[12]



ภาพที่ 2 การส่งสัญญาณของ EGFR โดยผ่าน signaling molecule ที่มี SH3 domain[15]



ภาพที่ 3 การส่งสัญญาณของ EGFR เมื่อมี PR

(โดย PR มี PXXPXR motif ที่สามารถจับกับ signaling molecule ที่มี SH3 domain ทำให้ขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR )

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้างเซลล์โมเดลสำหรับใช้ในการศึกษาผลของการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 (PR-B ที่มีการกลายพันธุ์ของ PXXPXR motif) ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC (A549) ที่เหนี่ยวนำได้โดย doxycycline
2. เพื่อศึกษาบทบาทของ PXXPXR motif ของ PR-B ในการขัดขวางการส่งสัญญาณของ pathway ที่ใช้โมเลกุลที่มี SH3 domain เป็นตัวส่งสัญญาณ เช่น MAPK และ AKT pathway ของ EGFR ในเซลล์ NSCLC โดยเปรียบเทียบผลของการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ NSCLC (A549) ในด้านการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ AKT pathway

#### คำถามงานวิจัย

PXXPXR motif ของ PR-B สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ในเซลล์ NSCLC ได้หรือไม่

## สมมติฐาน

การแสดงออกของโปรตีน PR-B ซึ่งมี PXXPXR motif ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งสัญญาณของ pathway ที่ใช้โมเลกุลที่มี SH3 domain เช่น MAPK และ/หรือ AKT pathway ของ EGFR ในเซลล์มะเร็งปอด โดยการขัดขวางการส่งสัญญาณเกิดจากการจับกันระหว่าง polyproline SH3 recognition motif (PXXPXR motif) ของ PR-B กับ SH3 domain ของ signaling molecule ส่งผลให้การส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ลดลง (ดังแสดงในรูปที่ 3) ทำให้เซลล์มะเร็งปอดมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3 ที่มีการกลายพันธุ์ของ PXXPXR motif และไม่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ได้ จึงไม่มีผลหรืออาจมีผลน้อยต่อการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลที่ได้จากการวิจัย ช่วยให้เข้าใจถึงบทบาทของ PXXPXR motif ของ PR-B ในการขัดขวางการส่งสัญญาณของ pathway ที่ใช้โมเลกุลที่มี SH3 domain เช่น MAPK และ/หรือ AKT pathway ของ EGFR ในเซลล์มะเร็งปอดและนำไปใช้เป็นพื้นฐานความรู้ในการศึกษาทั่วโลกในเชิงลึกต่อไปได้
2. หากผลจากการศึกษาพบว่า PXXPXR motif ของ PR-B สามารถขัดขวางการส่งสัญญาณของ pathway ที่ใช้โมเลกุลที่มี SH3 domain เช่น MAPK และ/หรือ AKT pathway ของ EGFR ได้จริงในอนาคตอาจพัฒนาหรือออกแบบยาที่มีการทำงานคล้าย PR-B หรือเฉพาะส่วนของ PXXPXR motif ของ PR-B หรือคิดค้นกระบวนการใดๆที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ PR-B เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งประโยชน์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอด ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตและมีชีวิตยืนยาวขึ้น

## ขอบเขตงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของการแสดงออกของโปรตีน PR-B ในการขัดขวางการส่งสัญญาณของ pathway ที่ใช้โมเลกุลที่มี SH3 domain เช่น MAPK และ/หรือ AKT pathway ของ EGFR ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก (NSCLC) ซึ่งเลือกใช้ A549 ซึ่งมี wild type EGFR หรือ EGFR แบบปกติ โดยจะทำการสร้างเซลล์โมเดล 2 แบบ ได้แก่เซลล์โมเดลแบบที่ 1 เป็นเซลล์ A549 ที่มีการแสดงออกของ PR-B และเซลล์โมเดลแบบที่ 2 เป็นเซลล์ A549 ที่มีการแสดงออกของ PR-B $\Delta$ SH3 (PR-B ที่มีการกลายพันธุ์ของ PXXPXR motif) โดยใช้ไวรัสเป็นตัว



นำพายีนเข้าสู่เซลล์ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์  
โมเดลทั้งสองแบบซึ่งเหนี่ยวนำได้ด้วย doxycycline โดยวิธี Western blot,  
Immunofluorescence และ Luciferase จากนั้นศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการ  
แสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่ออัตราการเจริญเติบโตของ NSCLC ด้วยวิธี MTT assay  
และศึกษาผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่อการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT  
pathway ใน NSCLC ด้วยวิธี Western blot



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### โรคมะเร็งปอด

มะเร็งปอดเป็นโรคมะเร็งที่มีอุบัติการณ์การเสียชีวิตสูงที่สุดทั้งในชายและหญิงทั่วโลก ซึ่งจากสถิติโรคมะเร็งในปี 2012 พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งปอด 1.6 ล้านคนทั่วโลก หรือคิดเป็นร้อยละ 19.4 ของการเสียชีวิตจากมะเร็งทั้งหมด[1] โรคมะเร็งปอดเป็นพยาธิสภาพที่มีพัฒนาการของเซลล์ปอดผิดปกติและมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งหากยังไม่ได้รับการรักษา เซลล์มะเร็งเหล่านั้นสามารถแพร่กระจายจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเติบโตที่อวัยวะส่วนอื่นที่ใกล้เคียง (local metastasis) หรือไปยังอวัยวะอื่นที่ไกลออกไป (distant metastasis) ผ่านทางกระแสเลือด (blood metastasis) หรือทางหลอดน้ำเหลือง (lymphatic metastasis) ผู้ป่วยมะเร็งปอดส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการจนกว่าจะมีการลุกลามของโรคไปมากแล้ว ซึ่งอาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่พบคือ ไอหรือมีเสมหะปนเลือด หายใจเหนื่อยหอบ หายใจสั้น เสียงแหบ อ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย เจ็บหน้าอก เบื่ออาหาร น้ำหนักลด เป็นต้น สาเหตุหลักในการเกิดโรคมะเร็งปอดคือการสูบบุหรี่ พบประมาณ 80-90% ของผู้ป่วยมะเร็งปอด[19] สาเหตุรองลงมาได้แก่ ปัจจัยทางพันธุกรรม กรรมพันธุ์, การได้รับก๊าซเรดอน (Radon), แอสเบสตอส (Asbestos)[20] หรือแร่ใยหิน, สารอื่นๆ เช่น โครเมียม นิกเกิล ฝุ่นจากอุตสาหกรรมหนัก ไอสารระเหยน้ำมัน เขม่าควันต่าง ๆ รวมทั้งมลภาวะทางอากาศที่ไม่บริสุทธิ์ วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งปอด ได้แก่ การเอกซเรย์ปอด, computed tomography (CT) scans, การส่องกล้องดูหลอดลม (bronchoscopy) และ การตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา การรักษามะเร็งปอด ได้แก่ การผ่าตัด (surgery), รังสีรักษา หรือการฉายแสง (Radiation therapy) และเคมีบำบัด (Chemotherapy)

มะเร็งปอดแบ่งเป็น 2 ชนิดตามลักษณะเซลล์ที่พบ คือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small cell lung cancer, SCLC) และ มะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก (Non-small cell lung cancer, NSCLC) โดย SCLC หรือเรียกว่า oat cell cancer เนื่องจากลักษณะเซลล์มีขนาดเล็ก พบได้ประมาณ 10-15% ของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด SCLC มักพบในผู้ที่สูบบุหรี่ เซลล์มะเร็งชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและมีการแพร่กระจายไปยังตามส่วนต่างๆของร่างกายอย่างรวดเร็ว สำหรับการรักษาผู้ป่วย SCLC มักตอบสนองได้ดีกับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและการฉายรังสี ส่วนมะเร็งปอดชนิดที่ 2 คือ NSCLC เป็นมะเร็งปอดชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด ซึ่งพบได้ประมาณ 85-90% ของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด โดย NSCLC แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ Adenocarcinomas, Squamous cell carcinomas

และ Large cell carcinomas เนื่องจากทั้ง 3 ชนิดนี้มีการรักษาและการพยากรณ์โรคที่ใกล้เคียงกัน จึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน สำหรับการรักษาผู้ป่วย NSCLC มักไม่ตอบสนองต่อการรักษาแบบเคมีบำบัด และฉายรังสี อีกทั้งวิธีดังกล่าวยังส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ดังนั้นการค้นหาแนวทางการรักษาใหม่ๆ สำหรับผู้ป่วย NSCLC จึงมีความจำเป็นอย่างมาก การศึกษาถึงกลไกการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์จึงมีความสำคัญ โดยอาศัยโปรตีนหรือชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์มะเร็งปกติ เพื่อนำไปใช้ในการคิดค้นและพัฒนาวิธีการรักษาแบบ targeted therapy สำหรับผู้ป่วย NSCLC

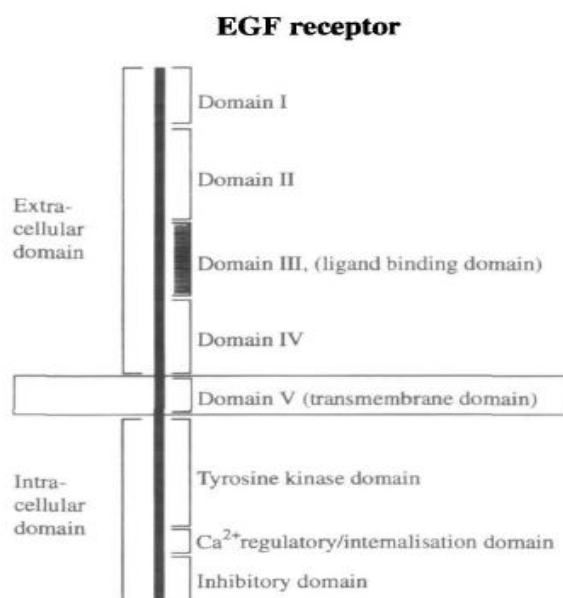
### Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Growth factors และ receptor tyrosine kinase ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้และพยากรณ์การดำเนินของโรคมะเร็ง รวมถึงถูกใช้เป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษามะเร็ง เนื่องจาก Growth factors และ receptor tyrosine kinase เป็นโมเลกุลสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัว, การเจริญเติบโต และการอยู่รอดของเซลล์ หนึ่งใน receptor tyrosine kinase ที่สำคัญคือ EGFR (Epidermal growth factor receptor) มีรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า EGFR มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปกติ โดยพบว่าในเซลล์มะเร็งปกติชนิด NSCLC มีจำนวน EGFR ที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเซลล์ปกติ (EGFR overexpression) หรือพบ EGFR ที่กลายพันธุ์ (mutant EGFR)[4, 5] ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงานของ EGFR จึงมีความสำคัญ เพื่อช่วยพัฒนาแนวทางการป้องกัน วินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วย NSCLC

### โครงสร้างของ EGFR

Epidermal growth factor receptor (EGFR) ประกอบด้วยสายโปรตีนโพลีเปปไทด์จำนวน 1186 กรดอะมิโนเรียงต่อกัน มีขนาด 170 kDalton[6] EGFR เป็น transmembrane receptor tyrosine kinase protein ที่แสดงออกในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังปกติ (normal epithelial), mesenchymal และ เนื้อเยื่อระบบประสาท (neurogenic tissue) โดย EGFR เป็น receptor ในกลุ่ม erbB ซึ่งประกอบด้วย EGFR (ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) และ HER4 (ErbB4)[21] ซึ่ง EGFR ชักนำไปเกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และพัฒนาการของเซลล์ (cell differentiation) ทั้งในเซลล์ปกติและในเซลล์มะเร็งเมื่อจับกับ ligand ที่จำเพาะ โดยโครงสร้างของ EGFR ประกอบด้วย 3 ส่วนหลักคือ extracellular ligand binding domain,

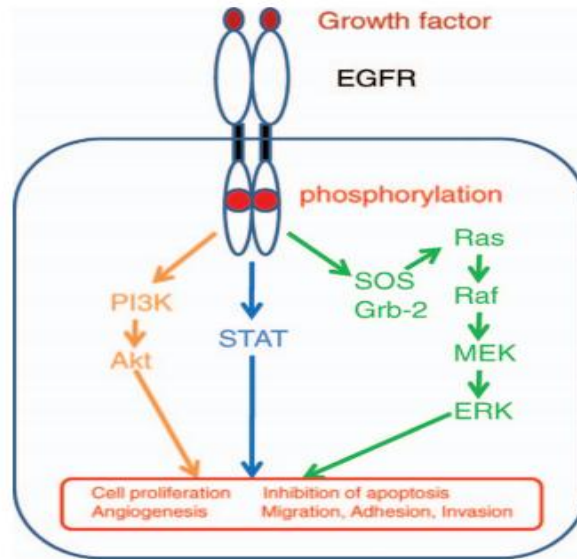
intracellular domain with tyrosine kinase activity และ transmembrane domain (ดังแสดงในภาพที่ 4)[22]



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ EGFR[22]

#### การส่งสัญญาณของ EGFR

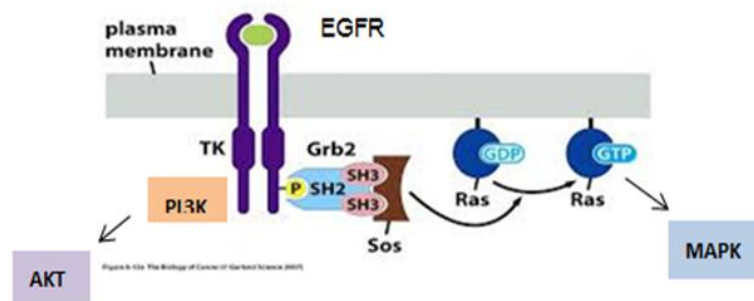
EGFR สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย ligand หลายชนิด ได้แก่ Epidermal growth factor (EGF) , transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), Heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF)[23], amphiregulin (AR)[24], epiregulin และ betacellulin (BTC)[25] การส่งสัญญาณของ EGFR เกิดขึ้นได้เมื่อ EGFR จับกับ ligand ที่ extracellular ligand binding region ทำให้ receptor มีการ homodimerization หรือ heterodimerization ไปกระตุ้น tyrosine kinase (Tyr 992, 1045, 1068, 1148 และ 1173)[26] เกิดการ phosphorylation ที่ tyrosine kinase domain จากนั้นเกิดการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ (signal transduction) ได้แก่ Ras/Raf/MAPK (mitogen activated protein kinase) pathway, PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT pathway และ JaK (Janus kinase)/STAT (signal transducers and activator of transcription) pathway ส่งผลกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ และยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis (ดังแสดงในภาพที่ 5)[27]



ภาพที่ 5 signaling pathways ของ EGFR[27]

จากภาพที่ 5 แสดงภาพรวมของการส่งสัญญาณของ EGFR แต่เมื่อศึกษาในเชิงลึกถึงการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ AKT pathway พบว่าเมื่อมีการ phosphorylation ของ EGFR ที่บริเวณ tyrosine kinase domain จะชักนำให้ adaper proteins ที่มี SH2 domain และ SH3 domain มาจับกัน แล้วเกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณต่อเนื่องเป็นลำดับต่อไปได้ ดังแสดงในภาพที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 2 การส่งสัญญาณของ EGFR โดยผ่าน signaling molecule ที่มี SH3 domain[15]

## MAPK pathway

MAPKs เป็น serine threonine kinases ที่มีบทบาทสำคัญในการแบ่งตัว, การเจริญเติบโต และการอยู่รอดของเซลล์ ในการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK pathway พบว่าเมื่อ EGFR จับกับ ligand ที่จำเพาะ เกิดการ phosphorylation ที่ tyrosine kinase domain จากนั้น phosphorylated tyrosine ของ EGFR จะจับกับ SH2 domain ของ Grb2[28, 29] และ Grb2 จะจับกับ Sos ผ่าน SH3 domain ในตำแหน่งที่มี proline rich ส่งผลกระตุ้น Ras และเกิดการส่งสัญญาณ MAPK ตามลำดับ[30, 31] ดังแสดงในภาพที่ 2

SH2 domain หรือ Src Homology 2 domain ประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวน 100 ตัวเรียงต่อกัน[32] โดย SH2 domain มักพบใน adaper proteins หรือ signaling molecules ต่างๆ มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อ growth factor โดยสามารถไปจับกับ phosphorylated tyrosine ของโปรตีนต่างๆเช่น EGFR, Shc (Src homology domain containing), IRS-1 (Insulin receptor substrate1) และ Syp (Synaptophysin) ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ [33-36]

SH3 domain หรือ Src Homology 3 domain พบได้ในกลุ่มโปรตีน cytoskeleton และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ เช่น Ras protein, Src kinase เป็นต้น โดย SH3 domain เป็นโปรตีนขนาดเล็กประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวน 55–70 ตัวเรียงต่อกัน บทบาทหน้าที่ของ SH3 domain คือเป็นตัวเชื่อมในการจับกันของโปรตีน (protein-protein interactions) โดยจับกับโปรตีนเป้าหมายที่บริเวณ proline-rich เกิดการจับกันเป็นกลุ่มโปรตีนที่ช่วยในการส่งสัญญาณภายในเซลล์[37-39]

Grb2 หรือ Growth factor receptor-bound protein 2 มีขนาด 25 kDa ประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวน 217 ตัว เป็น adaptor proteins ที่เกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณและการสื่อสารภายในเซลล์ ประกอบด้วยยีน Grb2[13] โดย Grb2 สามารถจับกับ receptor ต่างๆได้เช่น EGFR ซึ่ง Grb2 จะมี SH2 domain 1 domain และ SH3 domain 2 domain โดยที่ SH3 domain ของ Grb2 นั้นจะฟอร์มเป็นกลุ่มรวมกับโปรตีนอื่นๆที่ C-terminal ในบริเวณที่มี proline rich[40] ในขณะที่ SH2 domain ของ Grb2 นั้นจะจับกับ phosphorylated tyrosine เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ซึ่งหากมีการขัดขวางการทำงานของ Grb2 จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตในเซลล์หลายๆชนิด

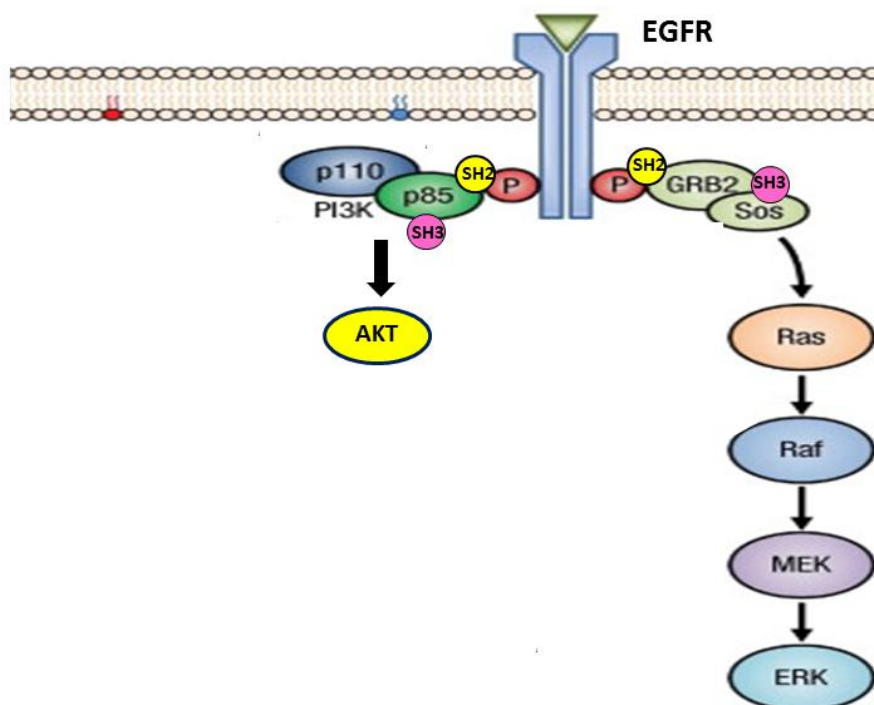
Sos หรือ son-of-sevenless เป็นโปรตีนที่มี guanine nucleotide exchange factor มีความเกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ โดย Sos มี SH3 domain ที่มี proline-

rich ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถจับได้กับ Grb2 โดย Sos จะทำหน้าที่ไปกระตุ้น Ras ให้ทำงานโดยปล่อย GDP (guanosine diphosphate) แล้วไปจับกับ GTP (guanosine triphosphate) แทนเกิดการกระตุ้น Raf , MEK และ ERK1/2 ต่อไปตามลำดับ[30, 41]

### AKT pathway

การส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน AKT พบว่า เมื่อ EGFR จับกับ ligand ที่จำเพาะ เกิดการ phosphorylation ที่ tyrosine kinase domain จากนั้น phosphorylated tyrosine ของ EGFR จะจับกับ SH2 domain ของ p85 subunit ของ PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) แล้วเกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณ AKT ต่อไป (ดังแสดงในภาพที่ 6)

PI3K หรือ phosphatidylinositol 3-kinase เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการแบ่งตัวของเซลล์ การเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ และการอยู่รอดของเซลล์[42-44] โครงสร้างของ PI3K เป็น dimer ประกอบด้วย p85 subunit และ p110 subunit โดย p110 เป็น catalytic subunit ซึ่งมีส่วนของ lipid kinase domain และ p85 subunit เป็น regulatory subunit ประกอบด้วย SH3 domain 1 domain และ SH2 domain 2 domain[37, 45-47] และมี p110-binding motif อยู่ระหว่าง SH2 domains ทั้ง 2 domain ไว้จับกับ p110 subunit[48] ซึ่ง p85 ของ PI3K สามารถจับกับ phosphorylated tyrosine ของ growth factor receptor ได้โดยผ่าน SH2 domain[29] และ p85 สามารถจับกับ signaling molecules ต่างๆ ผ่าน SH3 domain



ภาพที่ 6 การส่งสัญญาณของ MAPK และ AKT pathway ผ่าน signaling molecules ที่มี SH2 domain และ SH3 domain

#### EGFR กับการเกิดมะเร็งปอดชนิด NSCLC

ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC พบว่ามีจำนวน EGFR ที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเซลล์ปกติ (EGFR overexpression) หรือพบ EGFR ที่กลายพันธุ์ (mutant EGFR)

**EGFR overexpression** คือการที่มีจำนวน ligand และ EGFR เพิ่มมากขึ้น พบได้ในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม, มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับอ่อน รวมถึงมะเร็งปอดด้วย[49] มีการศึกษาว่าการแสดงออกของ EGFR ที่เพิ่มมากขึ้น มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่แย่งลง[49, 50]นอกจากนี้พบว่ามี lymphnode metastasis และผู้ป่วยจะมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดลดลง[51, 52]

การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ที่สำคัญมี 2 domain คือ ใน intracytoplasmic domain และ extracellular domain



### การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ที่ intracytoplasmic domain

พบว่ามี 4 ชนิดหลัก คือ 1. point mutations ที่ codon 719 (G719x) ใน exon18, 2. Deletions ใน exon19, 3. Insertion mutations ใน exon20, 4. point mutations ที่ codon 858 (L858R) ใน exon 21 การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ที่ intracytoplasmic domain ที่พบบ่อยที่สุดคือ การ deletions ที่ codon 746-750 ใน exon19 และการ transversion จากเบส T เป็น G ที่ codon 858 ใน exon21 ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้ง 2 แบบนี้ (deletions ใน exon19 และ L858R mutation) เป็นสาเหตุให้ ATP-binding domain มี conformational change เกิด phosphorylation ของ EGFR เพิ่มมากขึ้นโดยปราศจากการกระตุ้นจาก ligand และยังกระตุ้น signal transduction pathways ที่เกี่ยวข้องกับ cell proliferation หรือ antiapoptosis ด้วย เช่น MAPK และ PI3K pathway[21] ทำให้เซลล์ไม่มีการ apoptosis และมีการแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งปอด[53] อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน EGFR จะตอบสนองได้ดีต่อการรักษาด้วย gefitinib โดย gefitinib จะกระตุ้น ให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีขนาดเล็กลง[54]

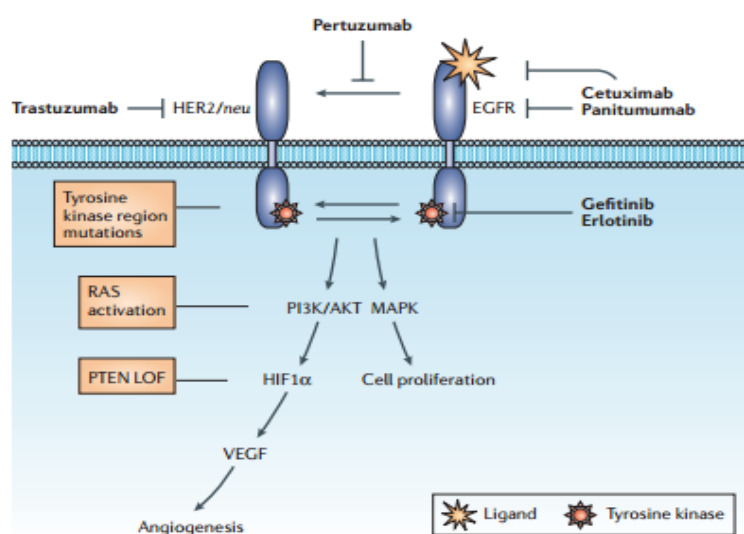
### การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ใน extracellular domain

เกิดจากการ deletions ที่ extracellular domain ของ EGFR มี 3 ชนิด คือ EGFRvi, EGFRvii และ EGFRviii โดย EGFRviii เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในมะเร็งของมนุษย์ ซึ่งมีการ deletions ของกรดอะมิโน 6-273 ใน extracellular domain ทำให้เกิดการกระตุ้น tyrosine kinase activity เพิ่มมากขึ้นโดยไม่มีการจับกับ ligand ใดๆ[55] EGFRviii จะกระตุ้น cell proliferation ได้อย่างอิสระโดยไม่ต้องจับกับ ligand[56] และมีความสัมพันธ์กับมะเร็งหลายชนิด รวมถึง มะเร็งเต้านม, มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancers) และมะเร็งต่อมลูกหมาก [57] ซึ่งพบว่าในเซลล์มะเร็งจะมียีน EGFRviii แสดงออกมากขึ้น[58]

### การนำ EGFR มาเป็น targeted therapy สำหรับโรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC

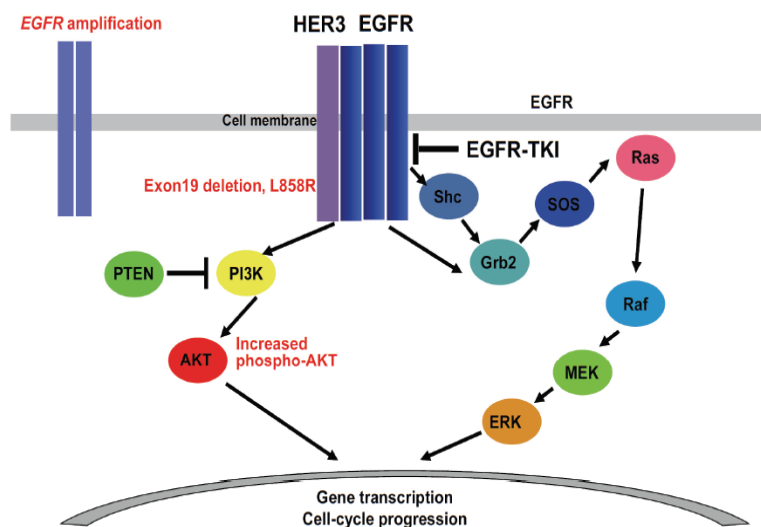
EGFR มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด จึงมีการนำ EGFR มาเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC โดยการใช้โมเลกุลที่จำเพาะไปยับยั้งการทำงานของ EGFR ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีการ apoptosis เพิ่มมากขึ้นและมีการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง[59] ตัวยับยั้ง EGFR tyrosine kinase activity ที่พัฒนาไปเป็นยาเคมีบำบัด มี 2 ชนิดหลักคือ

1. Monoclonal antibodies เช่น Cetuximab เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะกับ EGFR ซึ่งจะไปจับกับ ligand binding site ของ EGFR ทำให้ EGFR ไม่สามารถจับกับ ligand ได้ ทำให้ EGFR ไม่สามารถเกิดการ dimerization และขัดขวางการทำงานของ EGFR ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลง (ดังแสดงในภาพที่ 7)[60]



ภาพที่ 7 กลไกของ Monoclonal antibodies กับการยับยั้งการส่งสัญญาณของ EGFR[60]

2. Small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) เช่น Gefitinib และ Erlotinib เป็นยา oral anticancer ที่จะแย่งกับ Adenosine triphosphate (ATP) ในการจับกับ tyrosine kinase domain ของ EGFR ทำให้ kinase ทำงานไม่ได้ จึงไม่เกิดการ phosphorylation ของ EGFR ส่งผลให้ไม่สามารถเกิดการส่งสัญญาณต่อไปได้ (ดังแสดงในภาพที่ 8)[61] ซึ่งในการใช้ TKI จะตอบสนองได้ดีกับผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR[3]



ภาพที่ 8 กลไกของ EGFR-TKI กับการยับยั้งการส่งสัญญาณของ EGFR[61]

### ตัวอย่างยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งปอด

#### - Gefitinib

เป็นยาที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เป็นสารอนุพันธ์ของ anilinoquinazoline ได้รับอนุมัติจาก Food and drug Administration (FDA) ในปี 2003 เป็นยาที่ใช้รักษาสำหรับผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC แบบเฉพาะที่ (locally) และมะเร็งระยะแพร่กระจาย (metastatic) โดยให้การรักษาด้วยยานี้เมื่อผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย platinumbased และ docetaxel chemotherapies[62] โดยยานี้จะป้องกันการเกิด autophosphorylation ของ EGFR ในเซลล์มะเร็ง ผลข้างเคียงที่อาจพบได้จากการใช้ยานี้ คือ ท้องเสีย เป็นสิว ผื่นแดง คลื่นไส้ อาเจียน ผื่นแดง

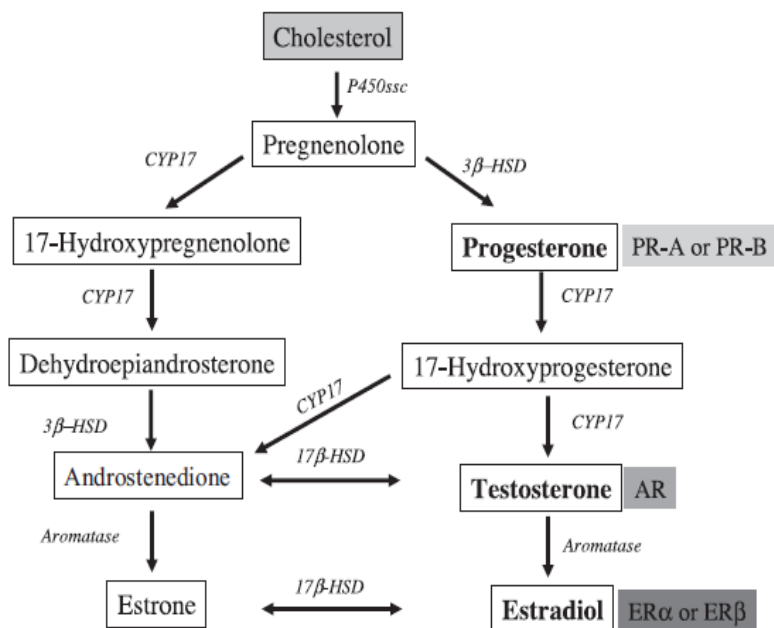
#### - Erlotinib

เป็นยาที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เป็นสารอนุพันธ์ของ quinazoline ได้รับอนุมัติจาก Food and drug Administration (FDA) ในปี 2004 เป็นยาที่ใช้รักษาสำหรับผู้ป่วย advanced NSCLC ที่ต้องการรักษาด้วยเคมีบำบัด ซึ่ง Erlotinib มีความจำเพาะในการยับยั้ง tyrosine kinase activity ของ EGFR ได้ และเป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้ ผลข้างเคียงที่อาจพบได้จากการใช้ยานี้ คือ ผื่นแดง ท้องเสีย ปวดหัว มีเม็ดเลือดขาวลดลง (neutropenia) และ anemia

นอกจาก EGFR ที่มีความสำคัญกับโรคมะเร็งปอดแล้ว ในปัจจุบันเริ่มมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับ Steroid hormones receptor ซึ่งเริ่มมีหลักฐานว่ามีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งปอด โดยจากการศึกษาพบว่าสาเหตุในผู้ป่วยมะเร็งปอดส่วนใหญ่มาจากการสูบบุหรี่ แต่ในปัจจุบันพบผู้ป่วย NSCLC เพศหญิง ที่ไม่ได้สูบบุหรี่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วย NSCLC เพศชายที่ไม่ได้สูบบุหรี่[63] และจากการศึกษาทางคลินิกพบว่าผู้ป่วย NSCLC ที่เป็นเพศหญิงมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย EGFR inhibitors เช่น Gefitinib ได้ดีกว่าผู้ป่วย NSCLC เพศชาย[3] จากการศึกษา งานวิจัยที่ผ่านมาทำให้พบว่าความแตกต่างระหว่างเพศชายและหญิงมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยง การดำเนินโรค ตลอดจนการรักษาโรคมะเร็งปอด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า steroid hormones อาจจะมี บทบาทเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งปอด

### สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones)

steroid hormones เป็น ฮอร์โมนประเภทที่ชอบไขมัน (lipophilic hormone) จึงสามารถ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) แล้วเข้าสู่ไซโทพลาสซึมได้โดยตรง โดยไม่ต้องอาศัยตัวนำพา steroid hormones ถูกสร้างขึ้นจาก อวัยวะสืบพันธุ์ (testicular androgens, estrogens, progestins), ต่อมหมวกไต (cortisol, aldosterone, adrenal androgens) และรกของตัวอ่อนในครรภ์ โดยสารตั้งต้นของการสังเคราะห์เป็น steroid hormone คือ Cholesterol และจะถูก เปลี่ยนเป็น pregnenolone และ progesterone ตามลำดับ และสร้าง เป็นฮอร์โมน testosterone และ estrogens (estradiol) (ดังแสดงในภาพที่ 9)[64]



ภาพที่ 9 การสร้าง sex steroid hormones[64]

### Steroid hormones receptors

steroid hormones ทำงานได้โดยอาศัยการจับกับตัวรับสัญญาณ หรือ steroid hormones receptors ซึ่ง steroid hormones receptors ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม nuclear receptors ซึ่งพบได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม โดย nuclear receptors เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factors ที่สามารถตอบสนองต่อ steroid หรือ signalling molecules ต่างๆ ซึ่งเมื่อ steroid hormones receptors จับกับ ligand ที่เป็นตัวกระตุ้น (agonistic) หรือตัวยับยั้ง (antagonistics) จะชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้แตกต่างกันทั้ง positive effect และ negative effect[65]

### ตัวอย่างการจับกันแบบจำเพาะของ steroid hormones และ nuclear receptors ได้แก่

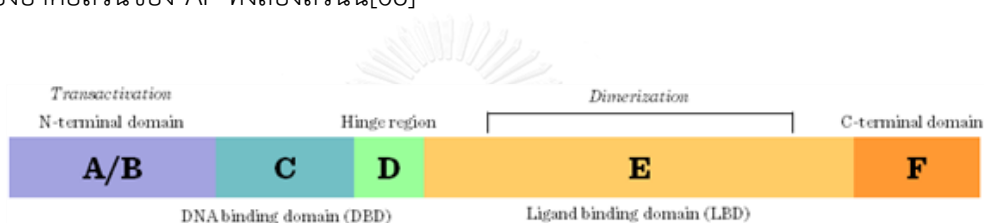
Estrogen	Estrogen receptors (ER $\alpha$ และ ER $\beta$ )
Progestin	Progesterone receptor (PR)
Testosterone	Androgen receptor (AR)
Cortisol	Glucocorticoid receptor (GR)

Aldosterone

Mineralcorticoid receptor (MR)

### โครงสร้างของ nuclear receptor

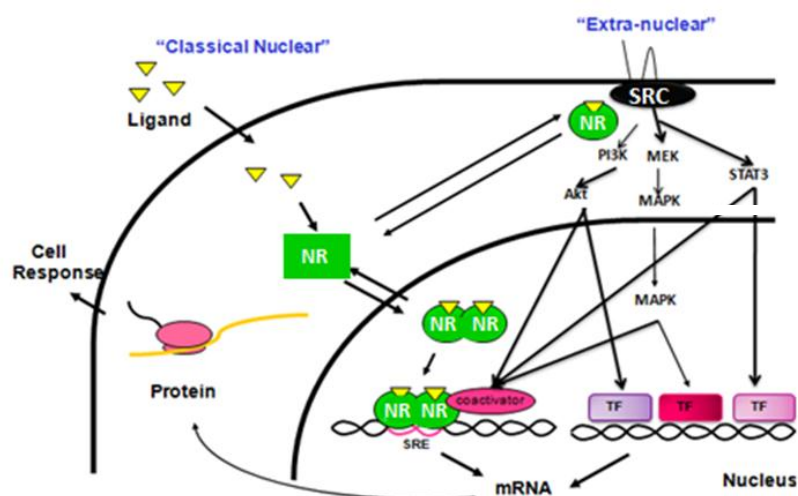
ประกอบด้วย 6 ส่วน ( A-F) ได้แก่ N-terminal domain (A/B), DNA binding domain หรือ DBD (C), hinge region (D), ligand binding domain หรือ LBD (E) และ C-terminal domain (F)[66] ดังแสดงในภาพที่ 10[67] ซึ่งบริเวณ N-terminal domain (A/B) จะเป็น ligand-independent-activation function1 (AF-1) และที่ C-terminal domain (F) จะเป็น ligand-inducible activation function (AF-2) ซึ่งขั้นตอนการ transcription ของ nuclear receptor จะต้องอาศัยส่วนของ AF ทั้งสองส่วนนี้[68]



ภาพที่ 10 โครงสร้างของ nuclear receptor[67]

### กลไกการส่งสัญญาณของ nuclear receptors

การส่งสัญญาณของ nuclear receptors หรือ Steroid hormone receptors มี 2 ประเภทได้แก่ การส่งสัญญาณแบบ classical หรือ genomic signaling pathway และการส่งสัญญาณแบบ extranuclear หรือ non-genomic signaling pathway โดยการส่งสัญญาณแบบ genomic signaling pathway เป็นการส่งสัญญาณที่เกิดขึ้นในนิวเคลียส ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับยีน การทำงานของ nuclear receptor ในนิวเคลียส เริ่มจาก lipophilic steroid hormone มาจับกับ nuclear receptor ทำให้ heat shock protein (HSP) ถูกแยกตัวออกไปจาก nuclear receptor ส่งผลให้ nuclear receptor เกิด conformational change แล้วจับคู่กับ receptor อีกตัวหนึ่ง (dimerization) จากนั้นเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสกลายเป็น transcription factor เพื่อไปจับกับ steroid response element (SRE) บน DNA ชักนำ coactivator และ RNA polymerase เกิดการ transcription DNA เป็น mRNA แล้ว translate เป็นโปรตีน (ดังแสดงในภาพที่ 11)[69]



ภาพที่ 11 กลไกการส่งสัญญาณของ nuclear receptor ที่เกิดใน classical nuclear และ extra-nuclear (SRC คือ steroid receptor coactivator, NR คือ nuclear receptors ซึ่งได้แก่ Estrogen receptors (ER), Progesterone receptors (PR) และ Androgen receptors (ARs)[69]

สำหรับการส่งสัญญาณแบบ non-genomic signaling pathway เกิดขึ้นในบริเวณ extra-nuclear หรือในไซโทพลาสซึม เริ่มจาก nuclear receptor ที่อยู่บริเวณไซโทพลาสซึมหรือในเยื่อหุ้มเซลล์จับกับ cytoplasmic และ/หรือ cell-membrane-signaling molecules หรือ adaptor proteins ต่างๆ เช่น G-Protein-Coupled Receptors, c-Src tyrosine kinase ทำให้เกิดการกระตุ้นการ phosphorylation ของ Src/Raf/MAPK และ PI3K/AKT เกิดการส่งสัญญาณเป็นลำดับต่อเนื่องไป ส่งผลให้เกิดการควบคุมการแบ่งเซลล์แบบ non-genomic (แบบไม่ผ่านยีน)

Src tyrosine kinase เป็นโมเลกุลสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณแบบ non-genomic signaling pathway ของ sex steroid hormone receptor[70] Src tyrosine kinase มี 4 domain ได้แก่ N-terminus ที่มี SH4 domain สำหรับใช้ยึดเกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์, domain ที่สองคือ SH3 domain ใช้สำหรับจับกับ polyproline motifs, domain ที่สามคือ SH2 domain สำหรับจับกับ phosphotyrosine และ domain สุดท้ายคือ SH1 catalytic domain ซึ่งมี tyrosine phosphorylation site (Y527) โดย SH2 domain, SH3 domain และ tyrosine phosphorylation site (Y527) จะจับกันเป็นกลุ่มก่อนโปรตีน ทำให้ Src อยู่ในภาวะไม่พร้อมทำงาน และ Src สามารถพร้อมทำงานได้ต่อเมื่อมีการ dephosphorylation ของ C-terminus tyrosine

527 เพื่อปล่อย SH2 domain ให้ไปจับกับ phosphotyrosine และให้ SH3 domain ไปจับกับ polyproline motifs[71]

สำหรับ steroid hormones receptors ที่พบหลักฐานว่ามีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งปอดที่สำคัญได้แก่ estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR) และ androgen receptors (ARs)[8]

### Estrogen receptors (ER)

ER มี 2 isoform ได้แก่ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  และจากการศึกษาทางงานวิจัยเกี่ยวกับการแสดงออกและการทำงานของ ER ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC มีผู้ค้นคว้าวิจัยแล้วจำนวนมากพอสมควร ในการศึกษาการแสดงออกของ ER พบว่าในเซลล์มะเร็งปอดมีจำนวน ER และ เอนไซม์ aromatase มากกว่าในเซลล์ปกติ[72] และพบโปรตีน ER $\alpha$  และ ER $\beta$  บริเวณนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งปอด นอกจากนี้พบว่าในเซลล์ NSCLC ที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  สูงและมีระดับของ aromatase ต่ำ มีความสัมพันธ์กับผลการรักษาทางคลินิกที่ดีขึ้น[73, 74] และการแสดงออกของ aromatase มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ estradiol[75] ในด้านการศึกษาการทำงานของ ER ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC มีงานวิจัยที่พบว่า estrogens ทำงานผ่าน ER $\alpha$  และ ER $\beta$  กระตุ้น MAPK และ AKT kinase รวมถึงการ phosphorylation ของ steroid receptors coactivators (SRC-3/AIB1) โดยจะส่งผลให้การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดเพิ่มมากขึ้น, การสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้น (angiogenesis) และเกิดการดำเนินของเซลล์มะเร็งปอดรวดเร็วขึ้น (tumor progression) นอกจากนี้การทดลองใช้ antiestrogen fulvestrant และ aromatase inhibitors ในเซลล์มะเร็งปอด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเพิ่มอัตราการตายของเซลล์มะเร็งปอดได้ [76-80]

### Androgen receptors (ARs)

ARs ถูกตรวจพบในช่วงของการพัฒนาเซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแขนงปอดของทารกในครรภ์[81, 82] และการแสดงออกของ ARs พบทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งปอดในวัยผู้ใหญ่ บทบาทของ ARs ก็กับการเกิดโรคมะเร็งปอดยังไม่มีหลักฐานแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่รายงานว่ามีการแสดงออกของ ARs ทั้งในเนื้อเยื่อและใน cell line ของ NSCLC[83]

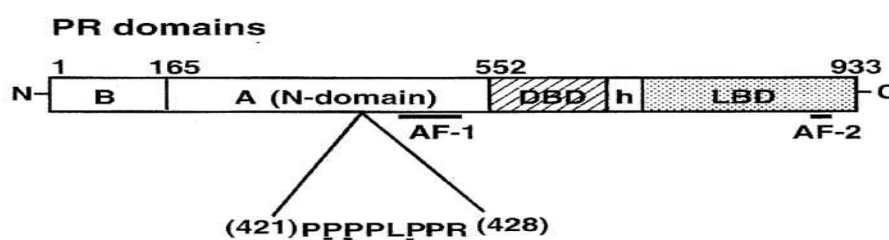


## Progesterone receptors (PR)

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับ PR และ NSCLC พบว่ามีการแสดงออกของ PR น้อยลงในเซลล์มะเร็งปอดเมื่อเทียบกับเซลล์ปอดปกติ[84] และเมื่อมีการให้ progesterone ในเซลล์มะเร็งปอด (H23 adenocarcinoma) และในหนู nude mice ที่ถูก inject ด้วยเซลล์ NSCLC ที่มี PR-positive พบว่าเซลล์มะเร็งปอดมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง[10, 11] และมีการศึกษาทางคลินิกพบว่า PR เป็นปัจจัยในการพยากรณ์โรคมะเร็งปอดได้ โดยในมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR ต่ำลง ทำให้ผู้ป่วยมีผลการรักษาที่แย่งลง[9, 11] ซึ่งยังไม่มียาวิจัยใดที่แสดงถึงความสำคัญของกลไกการทำงานของ PR ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC

## โครงสร้างของ Progesterone receptor (PR)

Progesterone receptor (PR) เป็น nuclear receptor มี 2 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ PR-A และ PR-B ซึ่ง PR-B มีขนาดยาวกว่า PR-A 164 นิวคลีโอไทด์ โดย PR-A ทำหน้าที่เป็น ligand dependent repressor ของ steroid hormone receptors ตัวอื่นๆ เช่น PR-B, estrogen receptor, androgen receptor, glucocorticoid receptor และ mineralcorticoid receptor[85] ในขณะที่ PR-B ทำหน้าที่เป็น activator ของ progesterone-responsive genes ซึ่ง PR-B จะทำหน้าที่เป็น transcription factor ได้ดีกว่า PR-A[86] นอกจากนี้ PR-A จะพบที่บริเวณนิวเคลียส[17, 18] ในขณะที่ PR-B จะพบทั้งที่บริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม[16] ซึ่ง PR ทั้งสอง isoform มีโครงสร้างที่เหมือนกันคือ ประกอบด้วย N-terminal domain, DNA binding domain (DBD) และ C-terminal ligand binding domain (LBD) (ดังแสดงในภาพที่ 1)[12]



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ PR[12]

มีการศึกษาพบว่าที่ N-terminal region ของ PR บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโน 421-428 มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เรียกว่า polyproline SH3 recognition motif (PXXPXR motif)[12] โดย PXXPXR motif ของ PR ทำหน้าที่เป็นเหมือนกับ external peptide ligand ที่สามารถจับกับ

SH3 domain ของ Src รวมถึง cytoplasmic signaling molecule และ adaptor proteins ต่างๆ ได้ เช่น PI3K (p85) และ GRB2[87] โดย steroid hormone receptor ตัวอื่นๆ เช่น ER และ GR ไม่สามารถจับกับ Src SH3 domain ได้ เนื่องจากไม่มีส่วนของ PXXPR motif รวมทั้ง AR ที่มีส่วนของ polyproline สายสั้นๆ ก็ไม่สามารถจับกับ Src SH3 domain ได้เช่นกัน[12]

### การส่งสัญญาณของ Progesterone receptor (PR)

การส่งสัญญาณแบบ classical หรือ genomic signaling pathway PR สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยฮอร์โมน Progesterone ทำหน้าที่เป็น ligand activated transcription factors โดยเมื่อฮอร์โมน Progesterone มาจับกับ PR ทำให้ receptor เกิดการ dimerization กลายเป็น transcription factor เข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับ DNA ชักนำ Coactivator และ RNA polymerase เกิดการ transcription ได้เป็น messenger RNA และถูก translated โดย ribosomes ได้เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะ นอกจากนี้ PR ยังทำหน้าที่ได้นอกเหนือจากในนิวเคลียสดังที่ได้กล่าวมา คือ การส่งสัญญาณแบบ extranuclear หรือ non-genomic signaling pathway โดย PR สามารถเป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณต่างๆในไซโตพลาสซึมได้โดยอาศัย PXXPR motif ของ PR ในการจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule และ adaptor proteins ต่างๆ เกิดการส่งสัญญาณ MAPK, AKT pathway (ดังแสดงในภาพที่ 11)

### บทบาทของ PR กับ EGFR ใน NSCLC

ใน NSCLC ที่พบว่ามีการแสดงออกของ EGFR ที่เพิ่มมากขึ้น[49, 50] และมีการแสดงออกของ PR ต่ำลง ทำให้ผู้ป่วยมีผลการรักษาที่แย่งลง[9] ซึ่งมีรายงานว่า EGFR ที่เพิ่มขึ้น และ PR ที่ลดลงอาจส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กันระหว่าง PR กับ EGFR ภายในเซลล์มะเร็งปอด อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงการส่งสัญญาณของ PR ภายในเซลล์มะเร็งปอดที่เกี่ยวข้องกับ EGFR

จากการศึกษาการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ AKT pathway พบว่าจำเป็นต้องอาศัย signaling molecule ที่มี SH3 ligand และ SH3 domain ที่สามารถจับกันและเกิดการส่งสัญญาณต่อเนื่องเป็นลำดับต่อไปได้ และในการศึกษาโครงสร้างของ PR พบว่าที่บริเวณ N-terminal region ตำแหน่งกรดอะมิโน 421-428 มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เรียกว่า polyproline SH3 recognition motif (PXXPR motif)[12] (ดังแสดงในภาพที่ 1) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถจับกับ

SH3 domain ของ signaling molecule ได้ โดย SH3 domain เป็น adaptor domain ที่ใช้สำหรับการส่งสัญญาณของ growth factor receptor จำนวนมาก และ EGFR เป็น growth factor receptor ที่สำคัญในโรคมะเร็งปอดที่อาศัย signaling molecule ที่มี SH3 domain ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (ดังแสดงในภาพที่ 2) ดังนั้นการแสดงออกของ PR อาจจะมีผลขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ภายในเซลล์มะเร็งปอด

ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานที่จะศึกษาว่า PXXPR motif ของ PR สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ในเซลล์มะเร็งปอดได้ (ดังแสดงในภาพที่ 3) ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตลดน้อยลง และทำให้ผู้ป่วยมะเร็งมีการตอบสนองต่อการรักษาดีขึ้น โดยผลการทดลองที่จะเกิดขึ้นทำให้ทราบถึงบทบาทของ PXXPR motif ของ PR ในการขัดขวางการส่งสัญญาณของ pathway ที่ใช้โมเลกุลที่มี SH3 domain เป็นตัวส่งสัญญาณ เช่น MAPK และ/หรือ AKT pathway ของ EGFR ในเซลล์มะเร็งปอดและนำไปใช้เป็นพื้นฐานความรู้ในการศึกษากลไกในเชิงลึกต่อไปได้

### บทที่ 3

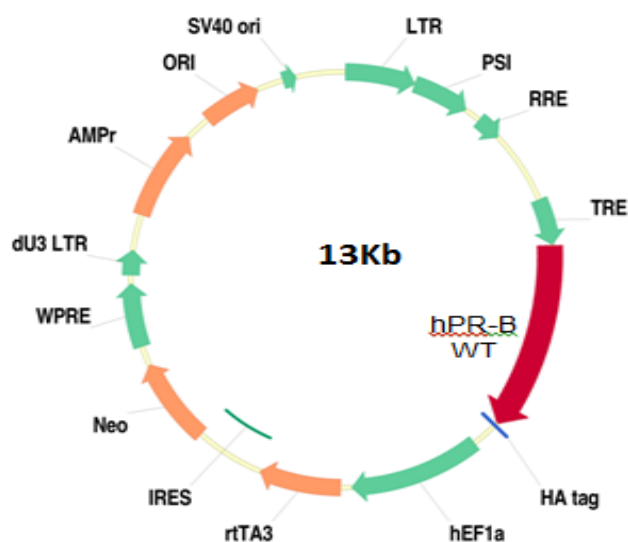
#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. พลาสมิดดีเอ็นเอที่จะนำมาใช้ในการสร้างเซลล์โมเดล ได้แก่ pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3, psPAX2 และ pMD2G

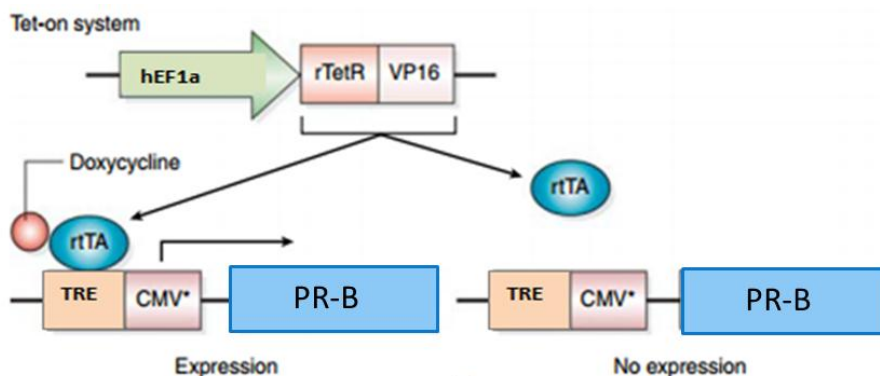
##### 1.1 pHAGE-PR-B

pHAGE-PR-B เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก Dean P. Edwards Lab Baylor college of medicine, สหรัฐอเมริกา ซึ่ง pHAGE-PR-B มีขนาด 13 Kb ที่มีส่วนของ hPR-B (human progesterone receptor B) และ rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) โดย rtTA จะทำหน้าที่เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน ซึ่งการแสดงออกของยีน PR-B จะเกิดขึ้นเมื่อมีการใส่ antibiotic tetracycline analog เช่น Doxycycline โดย Doxycycline จะจับกับ rtTA และไปกระตุ้น TRE (tetracycline-responsive promoter element) ส่งผลให้มีการแสดงออกของ PR-B ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13



ภาพที่ 12 plasmid map ของ pHAGE-PR-B

(Dean P. Edwards Lab Baylor college of medicine)

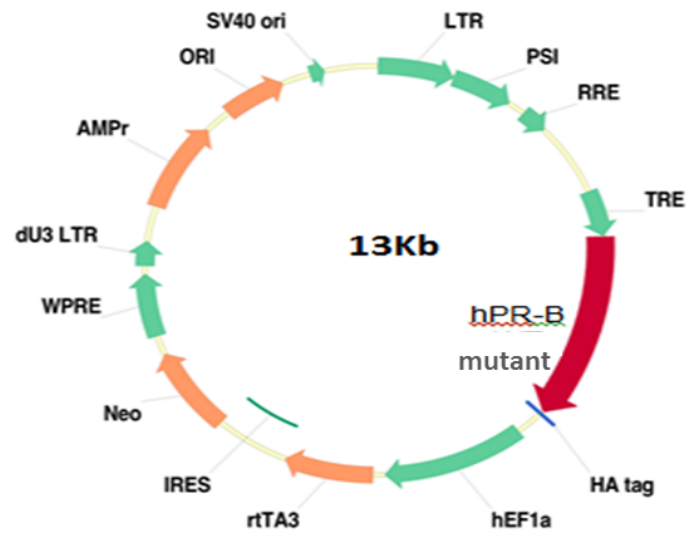


ภาพที่ 13 การควบคุมการแสดงออกของยีนโดย Doxycycline[88]

จากภาพที่ 13 promoter hEF1a (human elongation factor 1a) ควบคุมการแสดงออกของ rtTA โดย rtTA จะประกอบด้วย mutate TetR domain ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ rtTA จะจับกับ TRE (Tetracycline Response Elements) ได้เมื่อมี Doxycycline เท่านั้น ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน PR-B เรียกระบบที่เกิดขึ้นนี้ว่า tet-on system ในทางตรงข้าม เมื่อไม่มี Doxycycline, rtTA ไม่สามารถไปจับกับ TRE ได้ จึงไม่เกิดการแสดงออกของยีน PR-B [88]

### 1.2 pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3

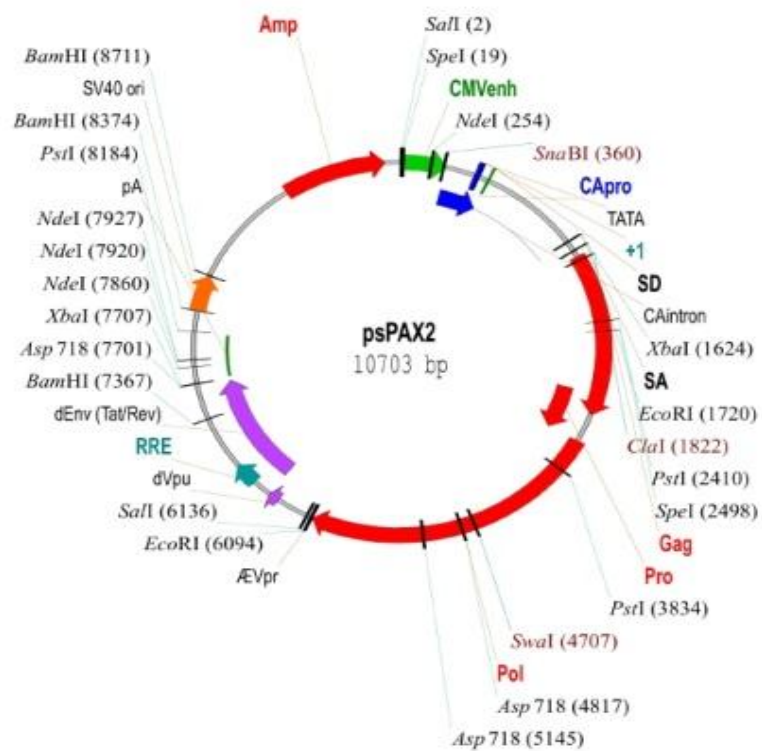
pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก Dean P. Edwards Lab Baylor college of medicine, สหรัฐอเมริกา ซึ่ง pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 มีขนาด 13 Kb ที่มีส่วนของ mutant human progesterone receptor B ซึ่งมีการตรวจสอบยืนยันจากการ sequencing แล้วว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง PXXPXR motif ไปเป็น AXXAXR motif และมี rtTA ที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกับ pHAGE-PR-B ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 plasmid map ของ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3  
(Dean P. Edwards Lab Baylor college of medicine)

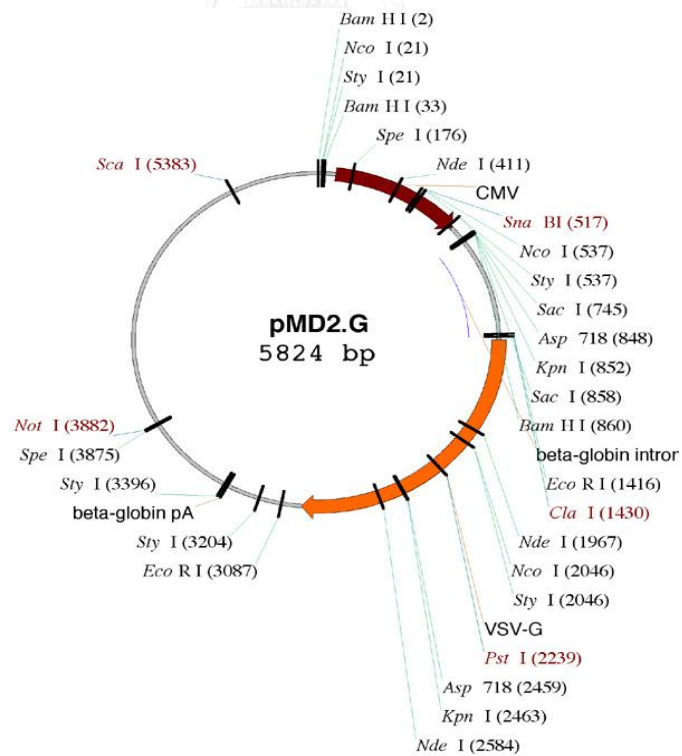
### 1.3 พลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง lenti viral particles (psPAX2 และ pMD2G)

psPAX2 เป็นพลาสมิดขนาด 10.7 Kb ที่ใช้ในการประกอบตัวของไวรัส (packaging) ซึ่งประกอบด้วย ยีน Gag, Pro และ Pol ดังแสดงในภาพที่ 15 ส่วน pMD2G เป็นพลาสมิดขนาด 5.8 Kb ใช้ในการสร้างชั้นไขมันหุ้มล้อมรอบ nucleocapsid ของไวรัส (envelope) ซึ่งประกอบด้วยยีน VSV-G ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 15 plasmid map ของ psPAX2

(<https://www.addgene.org/12260/>)

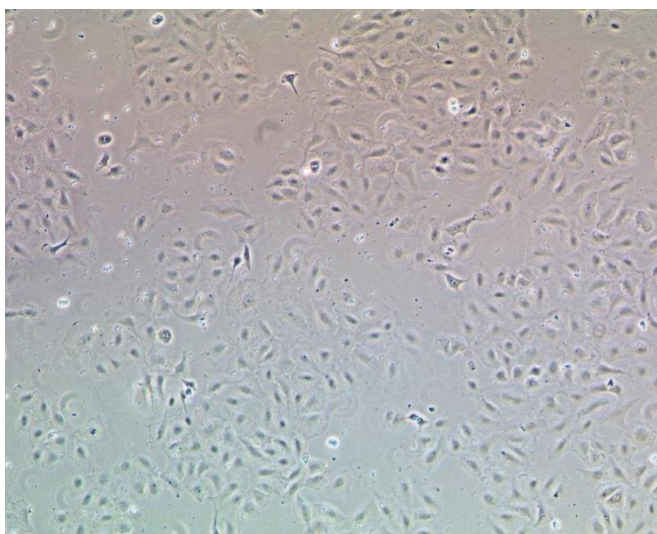


ภาพที่ 16 plasmid map ของ pMD2G

(<http://www.addgene.org/12259/>)

### ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

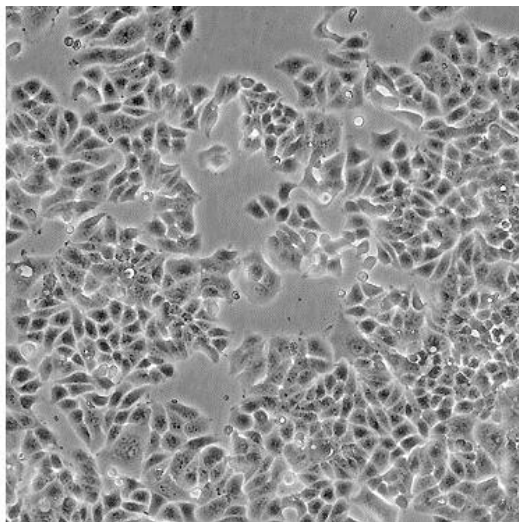
1. เซลล์มะเร็งรังปอด A549 (Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) ได้รับการอนุเคราะห์จาก Diana C. Marquez-Garban ภาควิชา Medicine สาขา Hematology/Oncology, David Geffen School of Medicine สหรัฐอเมริกา เป็นเซลล์มะเร็งรังปอดชนิด NSCLC ซึ่งมี EGFR แบบปกติ (wild type EGFR) และไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PR-B



ภาพที่ 17 ลักษณะและรูปร่างของเซลล์มะเร็งรังปอด A549

2. เซลล์มะเร็งเต้านม T47D (human ductal breast epithelial tumor cell line) ได้รับการอนุเคราะห์จาก Diana C. Marquez-Garban ภาควิชา Medicine สาขา Hematology/Oncology, David Geffen School of Medicine สหรัฐอเมริกา โดยเซลล์มะเร็งเต้านม T47D เป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR-B ในปริมาณมาก เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR อยู่ตลอดเวลา หรือเรียกว่า constitutive PR expression จึงนำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ในการศึกษาแสดงออกของโปรตีน PR-B





ภาพที่ 18 ลักษณะและรูปร่างเซลล์มะเร็งไต T47D

3. เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 cells) เป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตง่ายและรวดเร็ว นิยมนำมาใช้ในการ transfect ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell biology) จึงนำเซลล์นี้มาใช้ในการ transfect พลาสมิดที่ใช้ในการสร้างไวรัสในงานวิจัยนี้

#### สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B ในเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

Genezol reagent	Geneaid, Taiwan
Accupower RT Premix	Bioneer, Korea
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

#### สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

Competent cells <i>E.coli</i> สายพันธุ์ Stbl2	Real biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Competent cells <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$	Real biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Tryptone	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา

Yeast extract	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
NaCl	Merck Millipore, เยอรมนี
Agar	Oxiod, สหราชอาณาจักร
Isopropanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck Millipore, เยอรมนี
Ampicillin	Applichem, Germany
DNA ladder 1000 bp	Gene direx, สหรัฐอเมริกา
Plasmid Maxi kits	Qiagen, เยอรมนี
Restriction enzyme: <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i> และ <i>Sall</i>	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา

#### สารเคมีที่ใช้ในการสร้างเซลล์โมเดลและคัดเลือกเซลล์โมเดล

Opti-MEM I medium	Gibco/Life Technologies, สหรัฐอเมริกา
X-tremeGENE HP DNA transfection reagent	Roche, Mannheim, เยอรมนี
Polybrene transfection reagent	Merck Millipore, เยอรมนี
G418	Gibco/Life Technologies, สหรัฐอเมริกา
HEPES buffer	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Trypan blue	Gibco/Life Technologies, สหรัฐอเมริกา
Doxycycline	Merck Millipore, เยอรมนี

#### สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B, PR-B $\Delta$ SH3, Phospho-MAPK (Erk1/2) และ Phospho-AKT ด้วยวิธี Western blot

RIPA lysis buffer	Merck Millipore, สหรัฐอเมริกา
Proteinase inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, Germany
Standard protein Bovine serum albumin (BSA)	Merck Millipore, สหรัฐอเมริกา

Bradford dye reagent	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Precision Plus Protein Standards ladders	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
1294 mouse monoclonal antibody	Boonyaratanakornkit V, et al., 2001
Anti mouse IgG, HRP linked Ab 7076s	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Pierce® ECL WesternBlotting Substrate	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) Rabbit mAb4370	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Phospho-Akt (Ser473) Ab	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
P44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit mAb4695	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา
Akt (pan)(c67E7)4691	Cell Signaling Technology, สหรัฐอเมริกา

**สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ด้วยวิธี Immunofluorescence**

R5020	PerkinElmer, สหรัฐอเมริกา
Paraformaldehyde	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
TritonX-100	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Prolong® Gold antifade reagent	Invitrogen, Carlsbad, สหรัฐอเมริกา

**สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการ transcription ของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ด้วยวิธี Luciferase**

Lipofectamine® 3000 transfection Kit	Thermo fisher scientific, สหรัฐอเมริกา
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega, สหรัฐอเมริกา

Lysis reagent 5x Promega, สหรัฐอเมริกา

### สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT

MTT	Appllichem, เยอรมนี
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
RU486	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

### สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

DMEM	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
RPMI	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Fetal bovine serum (FBS)	Merck Millipore, เยอรมนี
Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum	Thermo fisher scientific, สหรัฐอเมริกา
Penicillin Streptomycin	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25% (1x)	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS)	HyClone Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Trypan Blue	Gibco, สหรัฐอเมริกา

### เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

-20°C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80°C ULT Deep Freezer	UShin Lab, เกาหลีใต้
4°C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
12 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
96 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก

Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
Biotek Synergy Mx microplate reader	Biotek, สหรัฐอเมริกา
Cell Culture Flask (25 cm <sup>2</sup> )	Nunc, เดนมาร์ก
Centrifuge tube 15, 50 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
CO <sub>2</sub> incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Confocal microscope รุ่น LSM700	Carl Zeiss, เยอรมนี
Disposable Serological pipette (2, 5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Laminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Luminometer Plate	PerkinElmer, ฟินแลนด์
Microcentrifuge	Denver Instrument, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Micro Refrigerated Centrifuge	Vision Scientific, เกาหลีใต้
Multichannel pipette	Brand, เยอรมนี

Pipette tips (10, 200, 1000, $\mu$ l)	Biobasic, แคนาดา BIORAD, สหรัฐอเมริกา
Thermal Cycler	MJ Research Inc., สหรัฐอเมริกา
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้
Water Bath	Memmert, เยอรมนี

น้ำที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดเป็นน้ำ Milli-Q™ ผ่านความต่างศักย์ 18 m $\Omega$  แสงอัลตราไวโอเล็ต และรูกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

## วิธีทดลอง

### 1. ตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของ PR ในเซลล์มะเร็งปอด A549

#### 1.1 เทคนิค Real-time RT-PCR

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ A549 และ T47D (ตัวควบคุมบวก) ใน 6-well tissue culture plate โดยใช้ RPMI ผสมกับ 5% FBS และ 1% Penicillin Streptomycin สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ของ A549 จำนวนเซลล์  $1.5 \times 10^5$  เซลล์/หลุม และ DMEM ผสมกับ 10% FBS และ 1% Penicillin Streptomycin สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ของ T47D จำนวนเซลล์  $7.5 \times 10^5$  เซลล์/หลุม เลี้ยงเซลล์ประมาณ 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 80-90% จากนั้นจึงทำการ Lyse cell โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วใส่ cold PBS 1 ml เพื่อชะล้างเศษเซลล์ 2 ครั้ง แล้วจึงใส่ Genexol reagent ปริมาตร 1 ml บ่ม 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นลงแล้วนำไปใส่ tube ขนาด 1.5 ml เก็บที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  วันต่อมาทำการสกัด RNA จากเซลล์ A549 และ T47D โดยเติม Chloroform 200  $\mu$ l ต่อตัวอย่างโปรตีน 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 14000 g 15 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  จะพบว่าสารละลายถูกแบ่งเป็น 3 ชั้น และ RNA จะอยู่ในชั้นบนที่เป็นน้ำใสไม่มีสีหรือ aqueous phase แล้วทำการดูดส่วนของ RNA นี้มาใส่ใน tube ขนาด 1.5 ml แล้วเติม isopropanol เพื่อทำการตกตะกอน RNA โดยใส่ isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดมา บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 14000 g 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  จากนั้นทำการล้างตะกอน RNA ด้วย 70% ethanol แล้วนำไปปั่นที่ 14000 g 5 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  แล้วดูดส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้โดนตะกอน RNA ล้างตะกอนทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วทำให้ตะกอน RNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมง ต่อมาทำการเติม Rnase-free water เพื่อละลายตะกอน RNA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ  $55-60^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาณ total

RNA ด้วยเครื่อง Nano drop ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260/280 วันต่อมาทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้ Accupower RT Premix โดยนำ RNA 1  $\mu\text{g}$  ผสมกับ Oligo dT<sub>18</sub> 0.5  $\mu\text{g}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็ง จากนั้นทำการย้ายส่วนผสมใส่ Accupower RT Premix tube แล้วเติมน้ำให้ครบปริมาตรสุดท้าย 20  $\mu\text{l}/\text{reaction}$  แล้วเอาเข้าเครื่อง Bioneer exicycler™96 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°C 60 นาที 94°C 5 นาที เมื่อเสร็จปฏิกิริยานำผลผลิตเก็บที่ -20°C วันต่อมาทำ Real-time RT-PCR โดยใช้ primer สำหรับ PR คือ forward primer; 5' TCGCCTTAGAAAGTGCTGTC 3', reverse primer; 5' GCTTGGCTTTCATTTGGAACG 3' โดยใส่ 2x Greenstar Master Mix, 10 $\mu\text{M}$  forward primer, 10 $\mu\text{M}$  reverse primer, 1  $\mu\text{g}$  cDNA และเติมน้ำให้ครบปริมาตรสุดท้าย 25  $\mu\text{l}/\text{reaction}$  แล้วนำไปเข้าเครื่อง Bioneer exicycler™96 ทำปฏิกิริยา Pre-Denaturation 95°C 10 นาที, Denaturation 95°C 15 วินาที, PR Annealing 56°C 30 วินาที และ GAPDH Annealing 57°C 30 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ แล้วนำผลผลิตจาก Real-time RT-PCR ไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ถูกต้อง โดยเตรียมเจล 2% agarose gel (agarose 2 g. ผสมกับ TAE buffer 100 ml) แล้วทำการหยอดดีเอ็นเอลงบนเจล รันดีเอ็นเอที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 135 volt เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลา นำเจลไปดูขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation (gel doc) systems

## 1.2 เทคนิค Western blot

Western blot เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis แยก denatured protein ตามขนาดของมวลโมเลกุลของโปรตีน ต่อมาโปรตีนจะถูก transfer ไปยัง PVDF membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้นๆ สำหรับขั้นตอนการทำมีดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ A549 จำนวนเซลล์  $1.5 \times 10^5$  เซลล์/หลุม และ T47D (ตัวควบคุมบวก) จำนวนเซลล์  $7.5 \times 10^5$  เซลล์/หลุม ใน 6-well tissue culture plate เลี้ยงเซลล์ประมาณ 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 80-90% จากนั้นจึงทำการ Lyse cell เตรียม Lysis buffer โดยผสม 1x RIPA lysis buffer (10x RIPA lysis buffer ประกอบด้วย 0.5M Tris-HCL pH7.4 ,1.5M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10%NP-40, 10mM EDTA) กับ proteinase inhibitor cocktail ( หรือ PIs ประกอบด้วย serine proteases, esterases, cysteine proteases, metalloproteases, trypsin-like proteases) ในอัตราส่วน PIs : RIPA buffer เท่ากับ 1:7 แล้วทำการใส่ Lysis buffer (RIPA buffer ที่ผสมกับ PIs แล้ว) 100  $\mu\text{l}$  ลงใน 6-well tissue

culture plate วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเซลล์แต่ละหลุมเก็บใส่ใน tube จากนั้นปั่นเหวี่ยง tube cell lysates ที่ความเร็วรอบ 8000g 10 นาที อุณหภูมิ 4°C แล้วทำการดูดส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B โดยวิธี Western blot ต่อไป โดยการทำให้ Western blot มีขั้นตอนดังนี้

#### การวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford

เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณการใส่โปรตีนสำหรับในขั้นตอนการรัน Western blot โดยเริ่มจากการเตรียม standard protein Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0 mg/ml , Bradford dye reagent (ประกอบด้วย Bradford dye, phosphoric acid, methanol) อัตราส่วน 1:5, blank sample (lysis buffer อัตราส่วน 1:15 ในน้ำ milli Q) และตัวอย่างโปรตีน cell lysate จากนั้นใส่ BSA standard และ ตัวอย่างโปรตีนลงใน 96-well plate หลุมละ 10 µl เติม dye reagent 200 µl ในที่มีด บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที (ไม่เกิน 1 ชั่วโมง) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานและสมการเส้นตรง จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่างเพื่อนำไปใช้หยอดลงเจลเพื่อรัน Western blot

#### การเตรียม Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE gel)

ทำการเตรียม 6% stacking gel และ 10% separation gel สำหรับการรันโปรตีน PR-B ขนาด 118 kda จากนั้นประกบแผ่นกระจก 2 แผ่นแล้วใส่ในเครื่องประกอบเจล หยอด separation gel ลงไประหว่างแผ่นกระจกทั้งสองให้มีปริมาตรสูง 2 ใน 3 ของแผ่นกระจก แล้วเติมน้ำให้เต็มแผ่นกระจกเพื่อไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ให้เจลส่วน separation gel แข็ง แล้วเทน้ำทิ้ง จากนั้นหยอด stacking gel ลงไปให้เต็มแผ่นกระจกแล้วใส่หัว ทิ้งไว้ให้เจลแข็ง แล้วจึงนำหัวออก จากนั้นนำแผ่นเจลที่มีกระจกประกบอยู่ไปแช่ใน 1x Running buffer (10x running buffer 100 ml, 20% SDS 5 ml, milliQ water 900 ml) สำหรับเตรียมรันโปรตีนต่อไป



### การรัน Gel electrophoresis

ทำการแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล โดยเริ่มจากนำตัวอย่างโปรตีนที่คำนวณความเข้มข้นโปรตีนที่จะหยอดลงเจลมาผสมสี leamli โดยใช้ตัวอย่างโปรตีน 15  $\mu$ l และสี leamli 5 $\mu$ l แล้วนำไป heat ที่อุณหภูมิ 95°C 10 นาที จากนั้นหยอด Precision Plus Protein Standards ladders, ตัวอย่างโปรตีน และ T47D ตัวควบคุมบวก (positive control) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR สูง ลงในเจล แล้วให้โปรตีนเคลื่อนตัวผ่านในส่วน stacking gel 70 volt 30 นาที จากนั้นให้โปรตีนเคลื่อนตัวผ่านในส่วน separation gel อีก 120 volt เป็นเวลา 90 นาที

### การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน

เริ่มจากนำ PVDF membrane แช่ใน methanol 5 นาที จากนั้นย้ายเมมเบรนมาแช่ใน transfer buffer และทำการประกอบแผ่นในการย้ายเจลสู่เมมเบรน โดยวางฟองน้ำ, กระดาษกรอง 3 แผ่น, แผ่นเจล, PVDF membrane, กระดาษกรอง 3 แผ่น, ฟองน้ำ ตามลำดับ นำแผ่นที่ประกบเสร็จแล้วเข้าเครื่อง transfer Western blot แล้วใส่ transfer buffer ที่แช่เย็น แล้วรันที่ 150mAmp 90 นาที

### Blocking

เพื่อป้องกันการเกิดโปรตีนอื่นๆที่ไม่จำเพาะเข้ามาจับกับ PVDF membrane โดยนำ PVDF membrane มาแช่ใน 5% Blotting-Grade Blocker (Blotting-Grade Blocker 1.5 g ผสมกับ TBST 30 ml) นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย TBST buffer 10 นาที 3 ครั้ง

### การติดตามผล

การติดตามผลแบบ Two-step detection โดยการนำ PVDF membrane บ่มด้วย primary antibody PR-B (1294 mouse monoclonal antibody; Boonyaratanakornkit V, et al., 2001), โดยเจือจาง primary antibody ใน 5%BSA อัตราส่วน 1:2500 (primary antibody 4 $\mu$ l ใน 5%BSA 10 ml) เขย่าที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (primary antibody เป็นแอนติบอดีที่

จำเพาะต่อตัวโปรตีนที่สนใจ) หลังจากนั้นทำการล้าง PVDF membrane ด้วย TBST buffer 10 นาที 3 ครั้ง เพื่อชะ non-specific binding ออก แล้วนำ PVDF membrane มาบ่มด้วย secondary antibody Anti mouse IgG, HRP linked Ab โดยเจือจาง secondary antibody ใน 5%BSA อัตราส่วน 1:2500 (secondary antibody 4ul ใน 5%BSA 10 ml) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง PVDF membrane ด้วย TBST buffer 10 นาที 3 ครั้ง (secondary antibody จะเข้าจับกับ primary antibody อย่างจำเพาะ) จากนั้นติดตามว่า antibody ไปเกาะกับโปรตีน PR-B ที่ตำแหน่งใด โดยวิธี Immuno chemiluminescence detection เริ่มจากการเตรียม substrate working solution Pierce® ECL WesternBlotting Substrate อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำแผ่น PVDF membrane จุ่มใน substrate แล้วนำมาวางในถาดที่มีแผ่นพลาสติกทับอีกชั้นหนึ่ง จากนั้นตัดแผ่นฟิล์ม X-ray แล้วนำมาประกบกับ PVDF membrane บนถาด 1-5 นาที ระยะเวลาที่ใช้ในการประกบขึ้นอยู่กับปริมาณของโปรตีน จากนั้นนำแผ่นฟิล์ม X-ray มาแช่ใน Developer 1 นาที และล้างน้ำ 1 นาที แล้วย้ายมาแช่ใน Fixer อีก 1 นาที สุดท้ายล้างน้ำ แล้วนำแผ่นฟิล์ม X-ray มาตากในที่แห้ง แล้วดูผล band ที่เกิดขึ้น สำหรับการทำให้ Western blot จะใช้ GAPDH เป็น loading control เพื่อทดสอบความเท่าเทียมของปริมาณโปรตีนของตัวอย่างโปรตีน cell lysate ที่เติมลงในเจล จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มของ band (band intensity) โดยใช้เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย GeneTools (Image Analysis Software) สำหรับการวิเคราะห์ผล คำนวณโดยใช้อัตราส่วนระหว่างความเข้ม band ของ PR-B ต่อความเข้ม band ของ GAPDH

## 2. การเพิ่มจำนวน pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-BΔSH3 และพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง lentivirus (psPAX2, pMD2G)

สำหรับการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอใช้วิธี Transformation ซึ่งมีหลักการคือ เป็น วิธีการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (competent cells) โดยกระตุ้นเซลล์ด้วยความร้อน 42°C (heat shock) จะทำให้ส่วนประกอบของผนังเซลล์เคลื่อนที่ ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอถูกดูดเข้าไปในเซลล์ เมื่อนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เซลล์จะเริ่มซ่อมแซมผนังเซลล์ที่ร้าวกลับไปสู่สภาพเดิม และพลาสมิดจะเริ่มเพิ่มจำนวน

ขั้นตอน : ทำการ Transformation โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนปริมาตร 5 µl ใส่เข้าไปในเซลล์ผู้รับ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Stb12 (เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีเอนไซม์ recombinase ทำให้มีความเสถียรของพลาสมิดมากขึ้น เนื่องจากมีโอกาสที่จะเกิด recombinant plasmid และการกลาย

พันธุ์ของพลาสมิดลดน้อยลง) ปริมาตร 50  $\mu$ l ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยการใช้วิธีดีดเบาๆ จากนั้นวางบนน้ำแข็ง 20 นาที เมื่อครบเวลานำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C 1 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งต่ออีก 20 นาที เมื่อครบเวลาเติม soc medium 450  $\mu$ l แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมา spread ลงบน LB agar plate ที่มียา Ampicillin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml บ่มที่ 37 °C ซ้ำมคืน วันถัดมาหากพบโคโลนีขึ้นบน LB agar plate ก็จะทำการศึกษาเลือกโคโลนีมาเลี้ยงใน culture tube ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertini broth (LB) 5 ml ผสมกับ Ampicillin 100  $\mu$ g/ml นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm อุณหภูมิ 37°C 14-16 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkaline lysis ด้วยชุด Qiagen plasmid Maxi kits โดยใช้ buffer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100 $\mu$ g/mL RNase A ) ในการละลายตะกอนแบคทีเรีย และ buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) เพื่อทำลายผนังเซลล์, buffer P3 (3.0M potassium acetate, pH 5.5 ) ใช้สำหรับทำให้ค่า pH เป็นกลาง และ purify ดีเอ็นเอผ่านคอลัมน์ Qiagen tip ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol และล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol เติมน้ำ 350  $\mu$ l เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วจึงนำไปวัดค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano drop จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยสำหรับ pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 จะตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I ส่วน psPAX2 และ pMD2G ทำการ Transformation เช่นเดียวกันกับ pHAGE-PR-B แต่ต่างกันโดยใช้เซลล์ผู้รับเป็น *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  และตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ที่อุณหภูมิ 37°C 2 ชั่วโมง จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์มาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยเตรียมเจล 0.7% agarose gel (agarose 0.7 g. ผสมกับ TAE buffer 100 ml) แล้วทำการหยอดดีเอ็นเอลงบนเจล รั้นดีเอ็นเอที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลานำเจลไปดูขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation (gel doc) systems

### 3. ผลิต lenti viral particles สำหรับนำพายีน pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 เข้าสู่เซลล์ NSCLC (A549)

ใช้เซลล์ HEK293T (Human embryonic kidney cell line 293T) ในการสร้าง second generation lentiviral particles โดยใส่ transfer vector, packaging vector และ envelope vector ในการประกอบตัวเป็นไวรัสที่มียีนที่ต้องการ โดยขั้นตอนในการผลิตไวรัสมีดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T ใน 6-well tissue culture plate โดยใช้ DMEM ผสมกับ 10% FBS และ 1% Penicillin Streptomycin สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HEK293T เลี้ยงเซลล์ประมาณ 24 hours โดยให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 60-70% จากนั้นจึงทำการใส่ส่วนผสมต่างๆลงใน tube 1.5 ml 2 tube ได้แก่ Opti-MEM I medium พลาสมิดที่ใช้ในการประกอบตัวไวรัส (packaging plasmid: psPAX2 และ envelope plasmid: pMD2G , DNA construct (pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3) และ X-tremeGENE HP DNA transfection reagent ตามลำดับ (โดยใช้อัตราส่วน DNA construct : psPAX2 : pMD2G เท่ากับ 1:2:1 และใช้อัตราส่วน DNA construct : X-tremeGENE HP DNA transfection reagent เท่ากับ 1:3.5 ) ดังแสดงในตารางที่ 1 (ส่วนผสมดังกล่าวสำหรับต่อ 1 หลุมใน 6-well tissue culture plate)

DNA construct	DNA ( $\mu$ g)	pHAGE-PR-B (0.74 $\mu$ g/ $\mu$ l)	pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 (1.74 $\mu$ g/ $\mu$ l)
Lenti-Retro construct	0.57	0.77 $\mu$ l	0.33 $\mu$ l
psPAX2 (1.84 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1.00	0.54 $\mu$ l	0.54 $\mu$ l
pMD2G (1.09 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.55	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Opti-MEM I medium		200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
X-tremeGENE		3.5 $\mu$ l	3.5 $\mu$ l

ตารางที่ 1 ส่วนผสมในการสร้าง lenti viral particles

เมื่อใส่ส่วนผสมในตารางครบแล้วทำการผสมให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดหลอดเบาๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 6-well tissue culture plate แล้วนำส่วนผสมในแต่ละ tube หยดลงใน 6-well tissue culture plate ที่มีเซลล์ HEK293T อยู่ หลุมละประมาณ 200  $\mu$ l บ่มในตู้ incubator ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24

ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วบ่มต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัส แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 2 ml ลงไปใน 6-well tissue culture plate ทุกหลุม บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C ต่ออีกจนครบ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัส จากนั้นกรองน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ทั้งสองครั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมงด้วย sterile filter PVDF membrane ขนาด 0.45 $\mu$ m แบ่งใส่ tube ละ 1 ml แล้วนำไวรัสไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C [89]

#### 4. สร้างเซลล์โมเดล NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 แบบเหนี่ยวนำได้โดย doxycycline

##### 4.1 การ transduce lenti viral particles เข้าไปในเซลล์มะเร็งปอด

ใช้เซลล์มะเร็งปอด A549 ซึ่งเป็นเซลล์ NSCLC ซึ่งมี EGFR แบบปกติและไม่มีการแสดงออกของ PR-B สำหรับขั้นตอนเริ่มจากเพาะเลี้ยงเซลล์ A549 ใน cell culture dish โดยใช้ RPMI ผสมกับ 5% FBS และ 1% Penicillin Streptomycin สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงเซลล์ประมาณ 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 50-60% จากนั้นจึงเตรียม tube 15 ml 2 tube สำหรับทำการผสมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี virus particles pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ผลิตได้จากข้อ 2 โดย tube แรกสำหรับ pHAGE-PR-B ใส่ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี virus particles pHAGE-PR-B 2.5 ml ผสมกับ RPMI serum-free 2.5ml และ polybrene transfection reagent ความเข้มข้น 8  $\mu$ g/ml ปริมาตร 4  $\mu$ l ส่วน tube ที่สองสำหรับ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ใส่ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี virus particles pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 2.5 ml ผสมกับ RPMI serum-free 2.5ml และ polybrene ความเข้มข้น 8  $\mu$ g/ml ปริมาตร 4  $\mu$ l เช่นเดียวกัน[89] จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใน cell culture dish แล้วนำส่วนผสมจากทั้ง 2 tube ใส่ลงใน cell culture dish 5 ml ทั้ง 2 dish คือ dish แรกสำหรับ pHAGE-PR-B และอีกหนึ่ง dish สำหรับ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 บ่มในตู้ incubator ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 5 ml แล้วบ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

#### 4.2 คัดเลือกเซลล์มะเร็งปอดที่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3

สำหรับการคัดเลือกเซลล์มะเร็งปอดที่มีการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ทำได้โดยการใส่ยา G418 เพราะเนื่องจากพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 มียีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา G418 (G418 หรือ Neomycin resistance) ทำให้เมื่อใส่ยา G418 ลงไปในเซลล์ ยาจะสามารถฆ่าเซลล์ที่ไม่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 เท่านั้น ทำให้เหลือเฉพาะเซลล์ที่มีพลาสมิดของ pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 อยู่ จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ออกมาได้

##### 4.2.1 ทำ Killing curve เพื่อหาความเข้มข้นของ G418 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ A549 ได้ 100%

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ A549 ใน 6-well tissue culture plate ประมาณ 24 hours โดยให้เซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นประมาณ 40-50% วันถัดมาจึงทำการ dilute ยา G418 ด้วย 10mM HEPES buffer ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ใน 6-well tissue culture plate แล้วใส่ยา G418 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0,100,300,500,700,1000  $\mu$ g/ml) ลงใน 6-well tissue culture plate บ่มในตู้ incubator ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา G418 ที่ความเข้มข้นต่างๆทุกๆสามวัน เมื่อครบ 14 วันจึงทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตโดยการ ใส่ trypsin ทำให้เซลล์หลุดออกจาก 6-well plate แล้วนำ trypan blue มาทำการย้อมเซลล์และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

##### 4.2.2 การคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3

ต่อจากข้อ 4.1 เมื่อเซลล์ A549 ถูก transduce ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี virus particles PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ครบ 72 ชั่วโมงแล้ว จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดของ pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 โดยทำตามขั้นตอนดังข้อ 4.2.1 แต่เลือกใช้ความเข้มข้นยา G418 ที่ต่ำที่สุดเพียงความเข้มข้นเดียวที่สามารถฆ่าเซลล์ที่ไม่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ได้ จากนั้นบ่มในตู้ incubator ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา G418 ทุกๆสามวัน เมื่อครบ 14 วัน จึงทำการเก็บเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## 5. ตรวจสอบการแสดงออกโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3: โดยวิธี Westen blot

### 5.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด

ต่อจากข้อ 4.2.2 นำเซลล์ A549 ที่ถูก transduce ด้วย PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 และคัดเลือกเซลล์ด้วย G418 แล้ว (A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3) มาใส่ doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจาก dilute doxycycline จาก stock ความเข้มข้น 50mg/ml ให้มีความเข้มข้น 50  $\mu$ g/ml จากนั้นใส่ยา doxycycline ที่ความเข้มข้น 0,50,200,500,700 และ 1000 ng/ml[90] ลงใน 6-well tissue culture plate (ดังแสดงในตารางที่ 2) เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 บ่มในตู้ incubator ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้เซลล์ T47D เป็นตัวควบคุมบวกเนื่องจาก T47D มีการแสดงออกของ PR สูง[91, 92]

A549+PR-B

0 ng/ml	50 ng/ml	200 ng/ml
500 ng/ml	700 ng/ml	1000 ng/ml

A549+PR-B $\Delta$ SH3

0 ng/ml	50 ng/ml	200 ng/ml
500 ng/ml	700 ng/ml	1000 ng/ml

ตารางที่ 2 การศึกษาผลของความเข้มข้น doxycycline ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เตรียม Lysis buffer โดยผสม 1x RIPA lysis buffer (10x RIPA lysis buffer ประกอบด้วย 0.5M Tris-HCL pH7.4 ,1.5M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10%NP-40, 10mM EDTA) กับ proteinase inhibitor cocktail ( หรือ PIs ประกอบด้วย serine proteases, esterases, cysteine proteases, metalloproteases, trypsin-like proteases) ในอัตราส่วน PIs : RIPA buffer เท่ากับ 1:7 แล้วทำการใส่ Lysis buffer (RIPA buffer ที่ผสมกับ PIs แล้ว) 100  $\mu$ l ลงใน 6-well tissue culture plate ทั้ง 2 plate (A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3) วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเซลล์แต่ละหลุมเก็บใส่ใน tube จากนั้นปั่นเหวี่ยง tube cell lysates ที่ความเร็วรอบ 8000g 10 นาที อุณหภูมิ 4°C แล้วทำการดูดส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Western blot ต่อไป เพื่อเลือกความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้มีการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด โดยวิเคราะห์ความเข้มของ band (band intensity) โดยใช้เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย GeneTools (Image Analysis Software) สำหรับการวิเคราะห์ผล คำนวณโดยใช้อัตราส่วนระหว่างความเข้ม band ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่อความเข้ม band ของ GAPDH สำหรับการทดลองดังกล่าวจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้มของband ที่เกิดขึ้น



## 5.2 ทดสอบหาระยะเวลาในการบ่มด้วย doxycycline เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด

นำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาใส่ doxycycline ความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุดที่ได้จากผลการทดสอบจากข้อ 5.1 บ่มในตู้ incubator ที่มีที่คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และใช้เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ไม่ใส่ doxycycline เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) (ดังแสดงในตารางที่ 3) เมื่อครบเวลาจึงทำการ Lyse cell เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Westen blot เพื่อเลือกระยะเวลาในการบ่มด้วย doxycycline ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด

### A549-PR-B

A549-PR-B - Dox	A549-PR-B + Dox 24 ชม.	
A549-PR-B + Dox 48 ชม.	A549-PR-B + Dox 72 ชม.	

### A549-mPR-B

A549-PR-B $\Delta$ SH3 - Dox	A549-PR-B $\Delta$ SH3 + Dox 24 ชม.	
A549-PR-B $\Delta$ SH3 + Dox 48 ชม.	A549-PR-B $\Delta$ SH3 + Dox 72 ชม.	

ตารางที่ 3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline ที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

## 6. ตรวจสอบการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 : โดยวิธี Immunofluorescence

Immunofluorescence เป็นเทคนิคทางชีวภาพที่ใช้ย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนหรือแอนติเจนที่ต้องการศึกษา ซึ่งสามารถตรวจสอบแอนติเจนได้หลากหลายและสามารถตรวจสอบโปรตีนหรือตำแหน่งของแอนติเจนที่จำเพาะในเซลล์ได้[93]

ขั้นตอน : นำเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ T47D (ตัวควบคุมบวก) มาเลี้ยงบน coverslip ใน 6-well tissue culture plate (เพื่อให้เซลล์เกาะติดที่บน coverslip) บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 วันต่อมาใส่ R5020 ความเข้มข้น 10nM บ่มในตู้ incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้าย coverslip ที่มีเซลล์เกาะอยู่มาใส่ใน 12-well tissue culture plate ล้างเซลล์ด้วย PBS pH7.4 นาน 5 นาที 2 ครั้ง และ fixed เซลล์ด้วย 4% Paraformaldehyde 20 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง และล้างด้วย 0.5% tritonX-100 เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว block ด้วย 1% FBS-BSA 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วนำเซลล์มาบ่มด้วย Primary antibodies สำหรับ PR-B (1294 mouse monoclonal antibody) โดยใช้อัตราส่วน 1:1000 ใน 1%BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วบ่มเซลล์ด้วย Secondary antibody (Alexa568) โดยใช้อัตราส่วน 1:3000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วบ่มเซลล์ด้วย DAPI 10 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่อยู่บน coverslip มา mount บน microscope slides ด้วย prolong® Gold antifade reagent วิเคราะห์ผลการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B and PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยการนำ coverslip มาส่องดูด้วยกล้อง confocal scanning microscope และใช้เลเซอร์ 405 สำหรับการปล่อยแสง DAPI และเลเซอร์ 561 สำหรับการปล่อยแสง Alexa555

## 7. ตรวจสอบ transcription factor ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 : โดยวิธี Luciferase assay

Luciferase assay เป็นการศึกษา transcription factor เพื่อดูการแสดงออกของยีน โดยการวัด firefly luciferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ catalyses luciferin เป็น Oxyluciferin แล้วเกิดการเปล่งแสงออกมา ความเข้มของแสงที่ปล่อยออกมาจะแปรผันตรงกับปริมาณของเอนไซม์ luciferase ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยเครื่อง luminometer[94]

ขั้นตอน : เพื่อศึกษาการควบคุมการ transcription ของ PR-B and PR-B $\Delta$ SH3 โดย R5020 นำเซลล์ A549, A549-PR-B และเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาเลี้ยงใน RPMI ที่มี 5%FBS ใน 24-wells tissue culture plate จำนวนเซลล์ 3x10<sup>4</sup> เซลล์/หลุม บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันต่อมา นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี 5%DCC จากนั้น transfected เซลล์ด้วย Lipofectamine® 3000 transfection Kit โดยเตรียม tube 1.5 ml 2 tube สำหรับเตรียมสารดังแสดงในตารางที่ 4

เจือจาง Lipofectamine 3000 reagent ใน Opti-MEM

Opti-MEM	25 $\mu$ l
Lipofectamine 3000 reagent	1 $\mu$ l

เตรียม master mix ดีเอ็นเอ

Opti-MEM	25 $\mu$ l
**DNA	0.5 $\mu$ g
P3000 reagent	1 $\mu$ l

**ตารางที่ 4** ส่วนผสมในการ transfect พลาสมิดเข้าสู่เซลล์โมเดล

\*\*DNA ที่ใช้ประกอบด้วย pRL-CMV (Renilla control vector) ความเข้มข้น 50ng และ PRETK-Luc plasmids ความเข้มข้น 450ng (ได้รับการอนุเคราะห์จาก น.ส.ปรางวัลย์ พาทีทิน) จากนั้นใส่ master mix ดีเอ็นเอผสมกับ lipofectamine reagent ที่เจือจางแล้วในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปใส่ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 24-wells tissue culture plate หลุมละ 50  $\mu$ l บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก transfected ครบ 24 ชั่วโมง จึงเติม 500 ng/ml doxycycline และ 10nM R5020 หรือ ethanol ในหลุม control

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการ lyse เซลล์ด้วย lysis reagent 50  $\mu$ l/หลุม วางบนน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเซลล์แต่ละหลุมเก็บใส่ใน tube แล้วนำ tube cell lysates ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000g 10 นาที อุณหภูมิ 4°C แล้วทำการดูดส่วนใสใส่ 96-well plate หลุมละ 30  $\mu$ l แล้วนำมาวิเคราะห์ luciferase activity โดยใช้ Dual-Glo® Luciferase Assay System โดยใส่ Dual Luciferase reagent 30  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัด firefly luciferase activity จากนั้นนำ 96-well plate เดิมที่วัดแล้ว มาใส่ stop&Glo buffer 30  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัด renilla luciferase activity จากนั้นคำนวณอัตราส่วนระหว่าง firefly luciferase ต่อ renilla luciferase

## 8. ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการเจริญเติบโตของ NSCLC : โดยวิธี MTT colorimetric assay

MTT colorimetric assay เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหา Cell viability โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยความเข้มสีจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

### 8.1 การศึกษาผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่อการเจริญเติบโตของ NSCLC ในภาวะที่ไม่มี ligand

#### 8.1.1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของ doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ในการทดลองนี้ใช้ GFP มาเป็นตัวควบคุม (control) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี virus particles GFP (ได้รับการอนุเคราะห์จาก น.ส.สุทธิรัตน์ อุดมเมธาภรณ์) มา transduce เข้าสู่เซลล์ A549 โดยใช้วิธีเช่นเดียวกันกับ pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ตามการทดลองที่ 4.1 เนื่องจาก GFP มีโครงสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอเหมือนกับ pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GFP ได้ด้วย doxycycline ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวควบคุม เนื่องจาก GFP เป็นโปรตีนที่ไม่มี PXXPXR motif

**ขั้นตอน:** นำเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP มาเพาะเลี้ยงใน RPMI+5% DCC+1% penstrep ใน 96-well tissue culture plate จำนวน 3,000 เซลล์/หลุม บ่มใน

คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาใส่ ยา doxycycline ความเข้มข้นต่างๆ 0, 50, 200 และ 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B ที่ต่างกัน เมื่อครบเวลาใส่สารละลาย 3, [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20  $\mu$ l ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารที่มีสารละลาย MTT ออก และเติม 200  $\mu$ l DMSO เพื่อละลายผลึก formazan สีม่วงให้อยู่ในรูปสารละลาย จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ measurement filter 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) การทดลองดังกล่าวจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำ (triplicate) สำหรับในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ที่ไม่ได้ใส่ยา doxycycline และเซลล์ A549-GFP เป็นตัวควบคุม

### 8.1.2 ศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ขั้นตอน: นำเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP มาเพาะเลี้ยงใน RPMI+5% FBS +1% penstrep ใน 96-well tissue culture plate จำนวน 3,000 เซลล์/หลุม บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาใส่ ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B ที่ต่างกัน เมื่อครบเวลาใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20  $\mu$ l ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ measurement filter 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) การทดลองดังกล่าวจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำ (triplicate) สำหรับในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ที่ไม่ได้ใส่ยา doxycycline และเซลล์ A549-GFP เป็นตัวควบคุม

### 8.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ขั้นตอน: นำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาเพาะเลี้ยงใน RPMI+5% DCC+1% penstrep ใน 96-well tissue culture plate จำนวน 3,000 เซลล์/หลุม บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาใส่ ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B วันต่อมาใส่ EGF ที่ความเข้มข้น

ต่างๆ 0, 10, 20, 50 และ 100 ng/ml [97] บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20  $\mu$ l ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ measurement filter 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) การทดลองดังกล่าวจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำ (triplicate) สำหรับในการทดลองนี้จะใช้ เซลล์ที่ไม่ได้ใส่ยา doxycycline เป็นตัวควบคุม

## 8.2 การศึกษาผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ต่อการเจริญเติบโตของ NSCLC ในภาวะที่มี ligand

### 8.2.1 ศึกษาผลของ progestin agonist (R5020) และ progestin antagonist (RU486) กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ขั้นตอน: นำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาเพาะเลี้ยงใน RPMI+2% DCC+1% penstrep ใน 96-well tissue culture plate จำนวน 3,000 เซลล์/หลุม บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาใส่ ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B วันต่อมา ใส่ R5020 ความเข้มข้น 10 nM และ RU486 ความเข้มข้น 100nM [95, 96] บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20  $\mu$ l ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ measurement filter 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) การทดลองดังกล่าวจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำ (triplicate) สำหรับในการทดลองนี้จะใช้ เซลล์ที่ไม่ได้ใส่ยา doxycycline เป็นตัวควบคุม

## 9. ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของ NSCLC : โดยวิธี Western blot

ศึกษาผลการแสดงออกของ PR-B ที่มีต่อการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ AKT pathway ซึ่งหาก PXXPXR motif ของ PR-B สามารถจับกับ signaling molecule ที่มี SH3 domain ได้ ดังนั้น PR-B อาจมีผลยับยั้งการส่งสัญญาณของ EGFR ได้ (ดังแสดงในภาพที่ 3) ทำให้ EGFR สามารถกระตุ้นผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR-B $\Delta$ SH3

### 9.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ขั้นตอน : นำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาเพาะเลี้ยงใน RPMI+2% DCC+1% penstrep ใน cell culture dish จำนวน 200,000 เซลล์/หลุม บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 วันต่อมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น RPMI serum free 4 ชั่วโมง จากนั้นใส่ EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0, 10, 20 และ 50 ng/ml[98] บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการ lyse เซลล์ด้วย Ripa lysis buffer ผสมกับ proteinase inhibitor, 5mM NaF และ 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> หลุมละ 100  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาใช้ cell scraper ขูดเซลล์แต่ละหลุมเก็บใส่ใน tube จากนั้นปั่นเหวี่ยง tube cell lysates ที่ความเร็วรอบ 8000g 10 นาที อุณหภูมิ 4°C แล้วทำการดูดส่วนใสเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน Phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2) และ Phospho-Akt (Ser473) โดยวิธี Western blot เช่นเดียวกับกับวิธีในข้อ 1.2 แต่ต่างกันที่แอนติบอดีที่ใช้ โดยในการทดลองนี้จะใช้แอนติบอดีสำหรับ MAPK คือ Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb อัตราส่วน 1:1000 ซึ่งเป็น antibody ที่ตรวจวัด activated MAPK และสำหรับ AKT ใช้ Phospho-Akt (Ser473) Ab อัตราส่วน 1:1000 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ตรวจวัด activated AKT และใช้ P44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit mAb สำหรับตรวจวัด total MAPK protein และใช้ total AKT (Akt (pan)(c67E7) สำหรับตรวจวัด total AKT protein สำหรับการวิเคราะห์ผลใช้ total MAPK และ total AKT เป็น loading control เพื่อทดสอบความเท่าเทียมของปริมาณโปรตีน

ของ sample cell lysate ที่เติมลงในเจล และเซลล์ที่ไม่ได้ถูกเติม EGF จะเป็นตัวควบคุมในการทดลองนี้ จากนั้นคำนวณโดยใช้อัตราส่วนระหว่างความเข้ม band ของ activated MAPK ต่อความเข้ม band ของ total MAPK และ ความเข้ม band ของ activated AKT ต่อความเข้ม band ของ total AKT โดยจะเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 สำหรับการทดลองดังกล่าวจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้ม band ที่เกิดขึ้น

## 9.2 ศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ขั้นตอน : นำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาเพาะเลี้ยงใน RPMI+2% DCC+1% penstrep ใน cell culture dish จำนวน 200,000 เซลล์/หลุม บ่มในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B วันต่อมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น RPMI serum free 4 ชั่วโมง จากนั้นใส่ EGF ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาทำการ lyse เซลล์ด้วย Ripa lysis buffer ผสมกับ proteinase inhibitor, 5mM NaF และ 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> แล้วนำเซลล์ lysate ไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน Phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2) และ Phospho-Akt (Ser473) โดยวิธี Western blot และเซลล์ที่ไม่ได้ถูกเติม EGF จะเป็นตัวควบคุมในการทดลองนี้ สำหรับการวิเคราะห์ผลทำเช่นเดียวกันกับวิธีในข้อ 9.1

## 10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี MTT จะถูกทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง และนำมาหาค่าเฉลี่ยสำหรับการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดย student pair t-test และ one-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20 ซึ่งค่า p-value ที่ระดับน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 และ 0.01 จะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

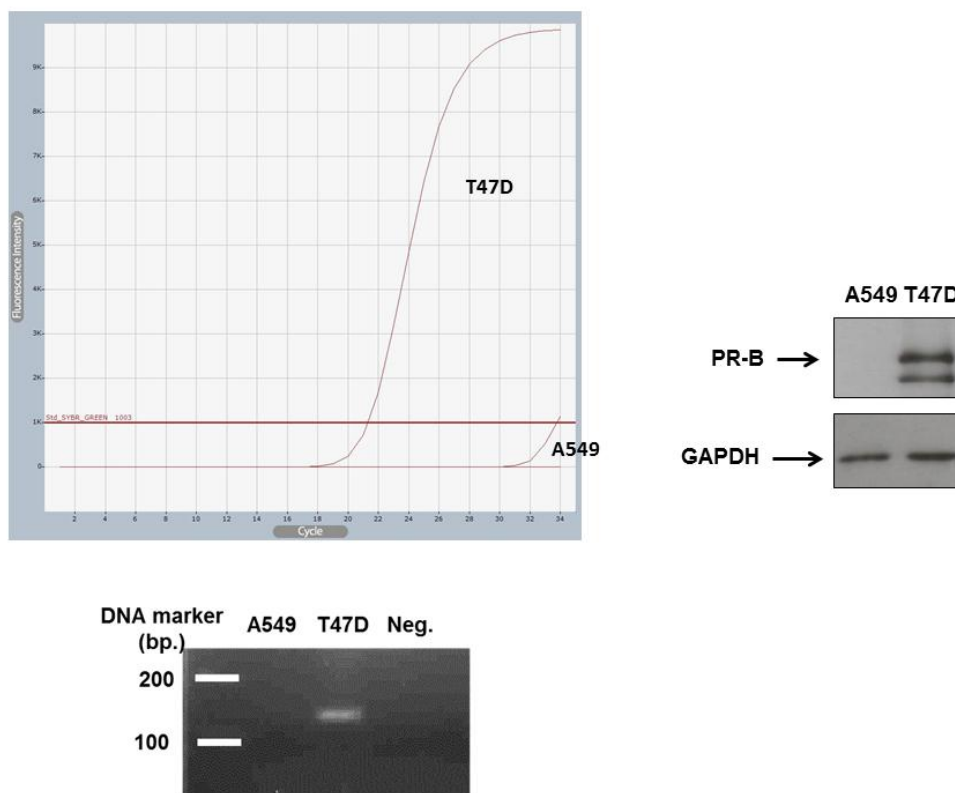


## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน PR ในเซลล์ A549

จากผลการตรวจสอบปริมาณ mRNA ของ PR ในเซลล์ A549 ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (ภาพถ่ายบน) ผลพบว่าไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของ PR ในเซลล์ A549 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ T47D (ตัวควบคุม) และเพื่อยืนยันผลที่ได้จึงนำผลผลิตจากการทำ Real-time RT-PCR มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอบนเจล (ภาพถ่ายล่าง) โดยช่องรันเจลหลุม 1 เป็น DNA ladder 1 Kb ช่องรันเจลหลุม 2 เป็นเซลล์ A549, ช่องรันเจลหลุม 3 เป็นเซลล์ T47D (ตัวควบคุมบวก) และช่องรันเจลหลุม 4 เป็นตัวควบคุมลบ (ไม่ได้ใส่ดีเอ็นเอ) จากผลการรันเจลพบดีเอ็นเอของ PR ขนาด 138 bp. ในเซลล์ตัวควบคุมบวก T47D แต่ไม่พบ PR ในเซลล์ A549 และจากผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR ในเซลล์ A549 ด้วยวิธี Western blot (ภาพขวา) ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PR ในเซลล์ A549 เช่นกัน ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าเซลล์ A549 ไม่มีการแสดงออกของ PR จริง (ดังแสดงในภาพที่ 19)

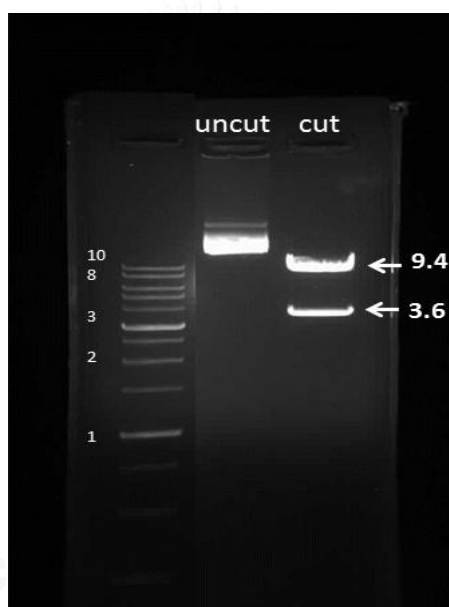


**ภาพที่ 19** ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน PR ในเซลล์ A549 ด้วยวิธี Real-time RT-PCR และ Western blot จากภาพซ้ายแสดงการทดสอบหาปริมาณ mRNA ของ PR ในเซลล์ A549 และ T47D โดยทำการสกัด total RNA แล้วเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นทำ real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ PR-A และ PR-B โดยมี T47D เป็นตัวควบคุม และภาพขวาแสดงการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน PR ในเซลล์ A549 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PR คือ PR-specific antibody 1294 ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu\text{g}$  และใช้เซลล์ T47D ปริมาณโปรตีน 3  $\mu\text{g}$  เป็น ตัวควบคุมบวกและ GAPDH เป็น loading control

## 2. ผลของการเพิ่มจำนวน pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 และพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง lentivirus (psPAX2, pMD2G)

### 2.1 pHAGE-PR-B

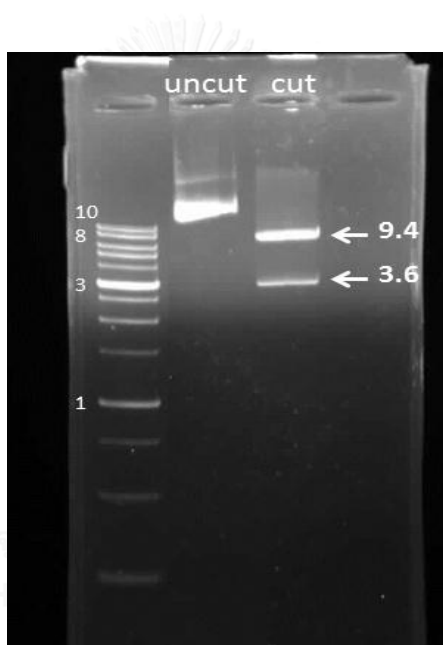
เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B ที่สกัดด้วยชุด Qiagen plasmid Maxi kits แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I จากนั้นนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยช่องรันเจลหลุม 1 เป็น DNA ladder 1 Kb ช่องรันเจลหลุม 2 เป็น pHAGE-PR-B ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ และช่องรันเจลหลุม 3 เป็น pHAGE-PR-B ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I ผลพบว่า ได้ขนาดดีเอ็นเอ 3.6 และ 9.4 Kb ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I

## 2.2 pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3

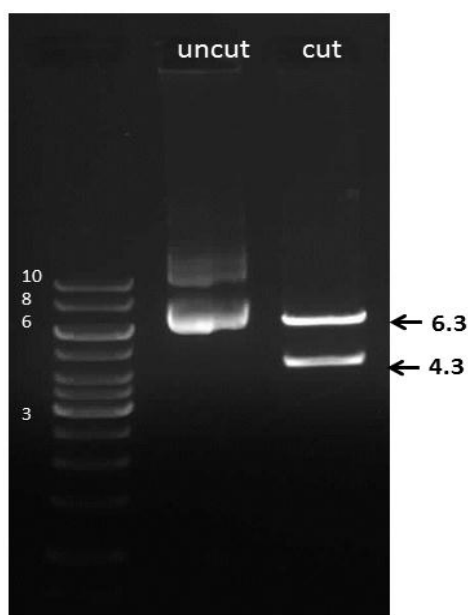
เมื่อนำของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ที่สกัดด้วยชุด Qiagen plasmid Maxi kits แล้ว นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *Sall* จากนั้นนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยช่องรันเจลหลุม 1 เป็น DNA ladder 1 Kb ช่องรันเจลหลุม 2 เป็น pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ และช่องรันเจลหลุม 3 เป็น pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *Sall* ผลพบว่า ได้ขนาดดีเอ็นเอ 3.6 และ 9.4 Kb ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *Sall*

### 2.3 psPAX2

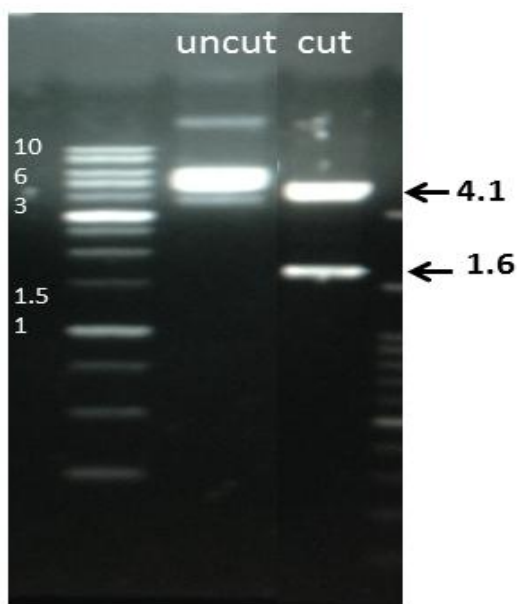
เมื่อนำของพลาสมิดดีเอ็นเอ psPAX2 ที่สกัดด้วยชุด Qiagen plasmid Maxi kits แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จากนั้นนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยช่องรันเจลหลุม 1 เป็น DNA ladder 1 Kb ช่องรันเจลหลุม 2 เป็น psPAX2 ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ และช่องรันเจลหลุม 3 เป็น psPAX2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ผลพบว่า ได้ขนาดดีเอ็นเอ 4.3 และ 6.3 Kb ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ psPAX2  
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

## 2.4 pMD2G

เมื่อนำของพลาสมิดดีเอ็นเอ pMD2G ที่สกัดด้วยชุด Qiagen plasmid Maxi kits แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จากนั้นนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยช่องรันเจลหลุม 1 เป็น DNA ladder 1 Kb ช่องรันเจลหลุม 2 เป็น pMD2G ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ และช่องรันเจลหลุม 3 เป็น pMD2G ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ผลพบว่า ได้ขนาดดีเอ็นเอ 1.6 และ 4.1Kb ดังแสดงในภาพที่ 23

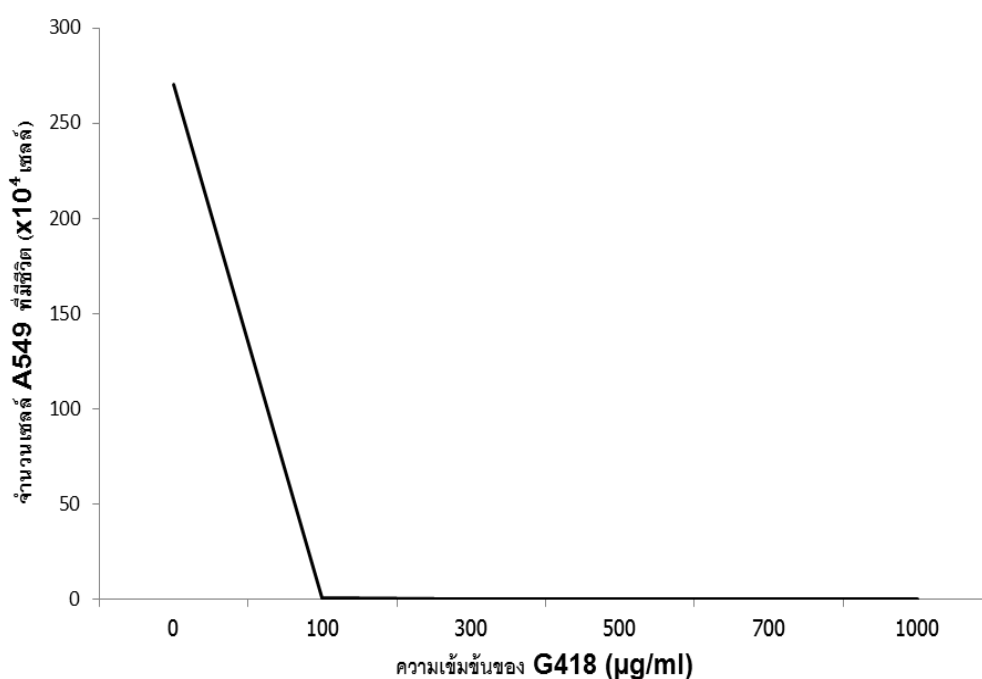


ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอ pMD2G โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

### 3. ผลการหา Killing curve เพื่อหาความเข้มข้นของ G418 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ A549 ได้ 100%

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ A549 แล้วใส่ยา G418 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0,100,300,500,700,1000  $\mu\text{g/ml}$ ) บ่มในตู้ incubator ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบ 14 วันจึงทำการนับเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าที่ความเข้มข้น G418 500  $\mu\text{g/ml}$  เป็นความเข้มข้นของ G418 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ A549 ได้ 100% ดังแสดงในภาพที่ 24

กราฟแสดงความเข้มข้นของ G418 กับจำนวนเซลล์ A549 ที่มีชีวิต



ภาพที่ 24 กราฟแสดงความเข้มข้นของ G418 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ A549 ได้ 100%

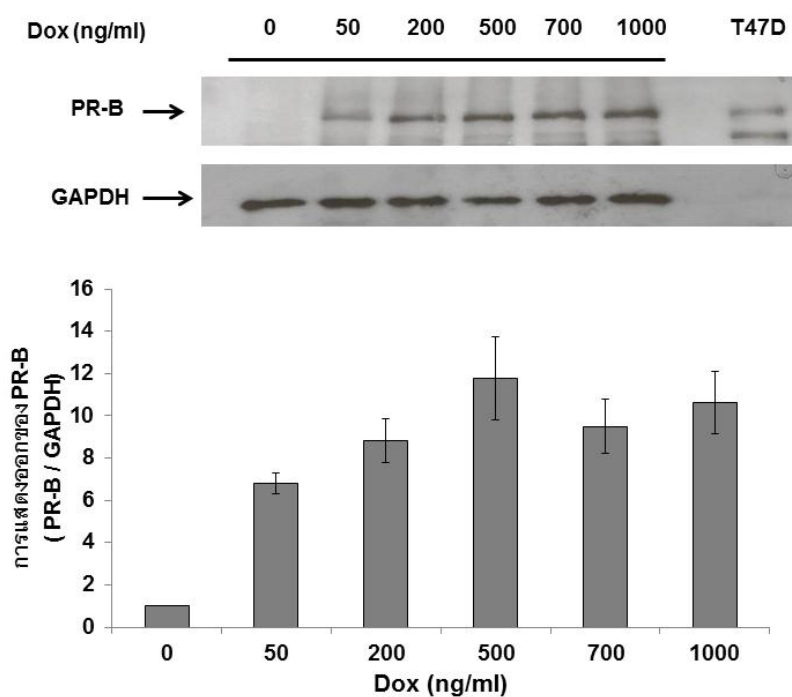
ความเข้มข้นของ G418 ( $\mu\text{g/ml}$ )	จำนวนเซลล์ A549 ที่มีชีวิต ( $\times 10^4$ เซลล์)
0	270
100	1.08
300	0.04
500	0
700	0
1000	0

ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์ A549 ที่มีชีวิตกับความเข้มข้นของ G418 ( $\mu\text{g/ml}$ )

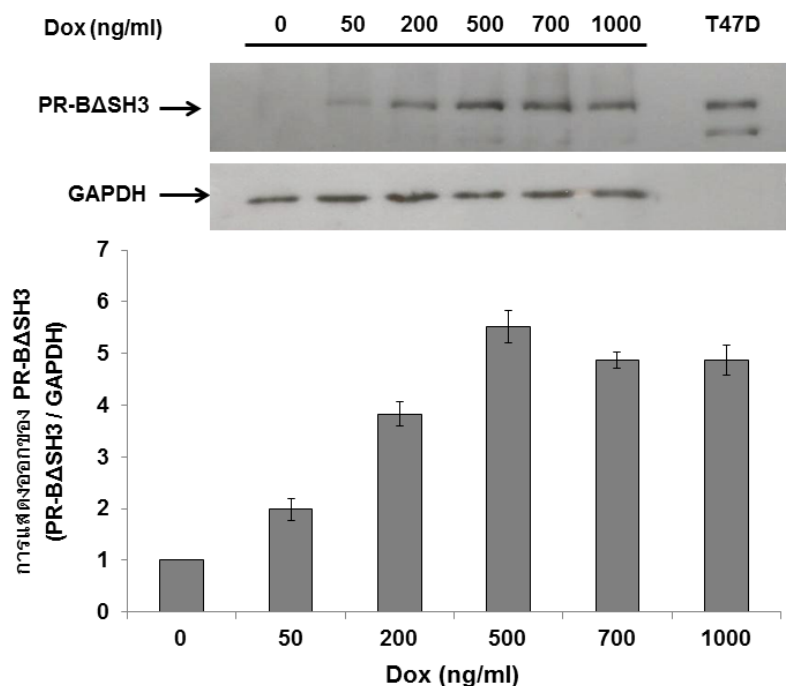
#### 4. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Western blot

เมื่อสร้างเซลล์โมเดลสำเร็จแล้ว จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ด้วยการควบคุมการแสดงออกโดย doxycycline โดยเริ่มจากการหาความเข้มข้นของ doxycycline ที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุด จากผลการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ doxycycline 500 ng/ml ส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 25 และ 26



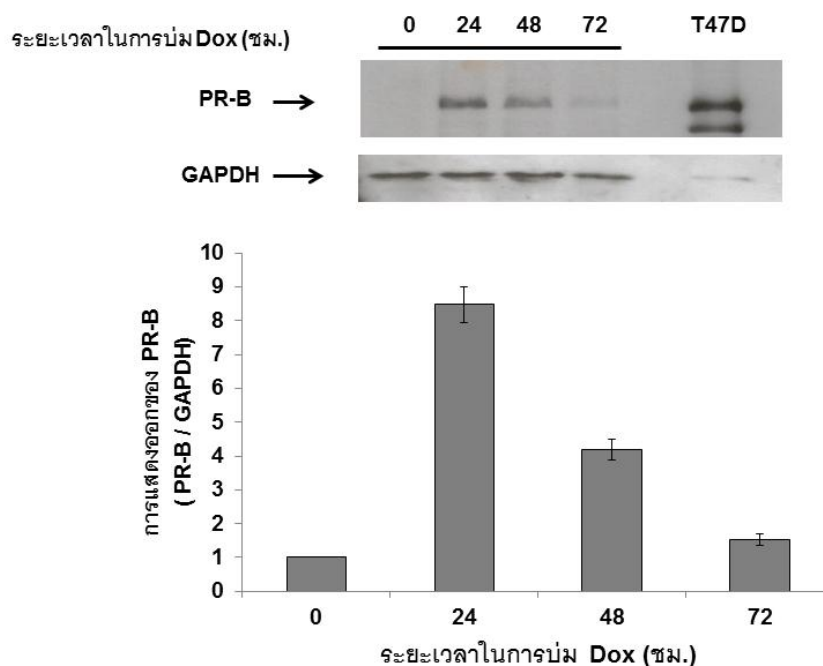


ภาพที่ 25 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B ที่มากที่สุด เซลล์ A549-PR-B เมื่อมีการให้ยา doxycycline ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 50, 200, 500, 700 และ 1000 ng/ml เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B ซึ่งทำการทดลองโดยวิธี Western blotting ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PR คือ PR-specific antibody 1294 ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g และใช้เซลล์ T47D ปริมาณโปรตีน 3ug เป็น ตัวควบคุมบวกและ GAPDH เป็น loading control

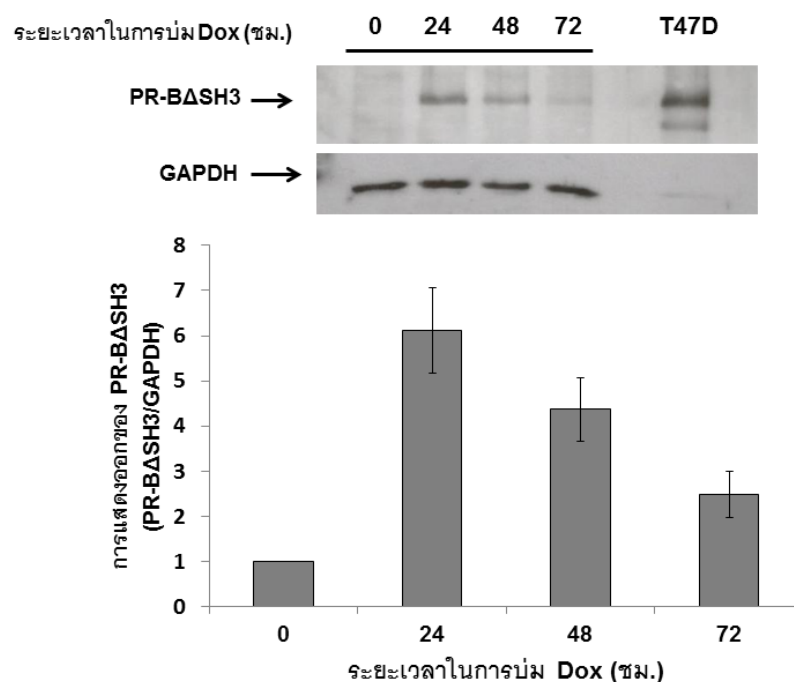


ภาพที่ 26 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด เซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อมีการให้ยา doxycycline ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 50, 200, 500, 700 และ 1000 ng/ml เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3 ซึ่งทำการทดลองโดยวิธี Western blotted ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PR คือ PR-specific antibody 1294 ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g และใช้เซลล์ T47D ปริมาณโปรตีน 3ug เป็น ตัวควบคุมบวกและ GAPDH เป็น loading control

เมื่อทราบระดับความเข้มข้นของ doxycycline ที่ชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุดแล้ว จากนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองหาระยะเวลาในการบ่ม doxycycline ที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุด โดยในการทดลองจะใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml ในเซลล์โมเดลทั้งสอง บ่มที่ระยะเวลาต่างกันคือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการบ่ม doxycycline ที่ 24 ชั่วโมง สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 27 และ 28

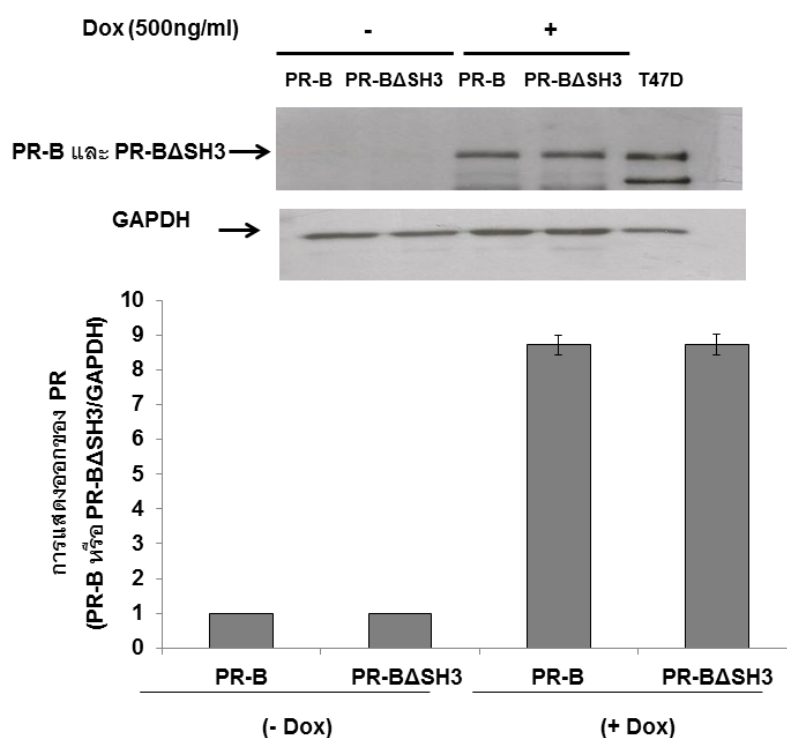


ภาพที่ 27 ผลของระยะเวลาในการบ่มด้วย doxycycline เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B ที่มากที่สุด เซลล์ A549-PR-B เมื่อมีการให้ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml และบ่มที่ระยะเวลาต่างกันคือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B ซึ่งทำการทดลองโดยวิธี Western blotted ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PR คือ PR-specific antibody 1294 ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g และใช้เซลล์ T47D ปริมาณโปรตีน 3ug เป็นตัวควบคุมบวก และ GAPDH เป็น loading control



ภาพที่ 28 ผลของระยะเวลาในการบ่มด้วย doxycycline เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3 ที่มากที่สุด เซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อมีการให้ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml และบ่มที่ระยะเวลาต่างกันคือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B $\Delta$ SH3 ซึ่งทำการทดลองโดยวิธี Western blotted ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PR คือ PR-specific antibody 1294 ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g และใช้เซลล์ T47D ปริมาณโปรตีน 3ug เป็นตัวควบคุมบวก และ GAPDH เป็น loading control

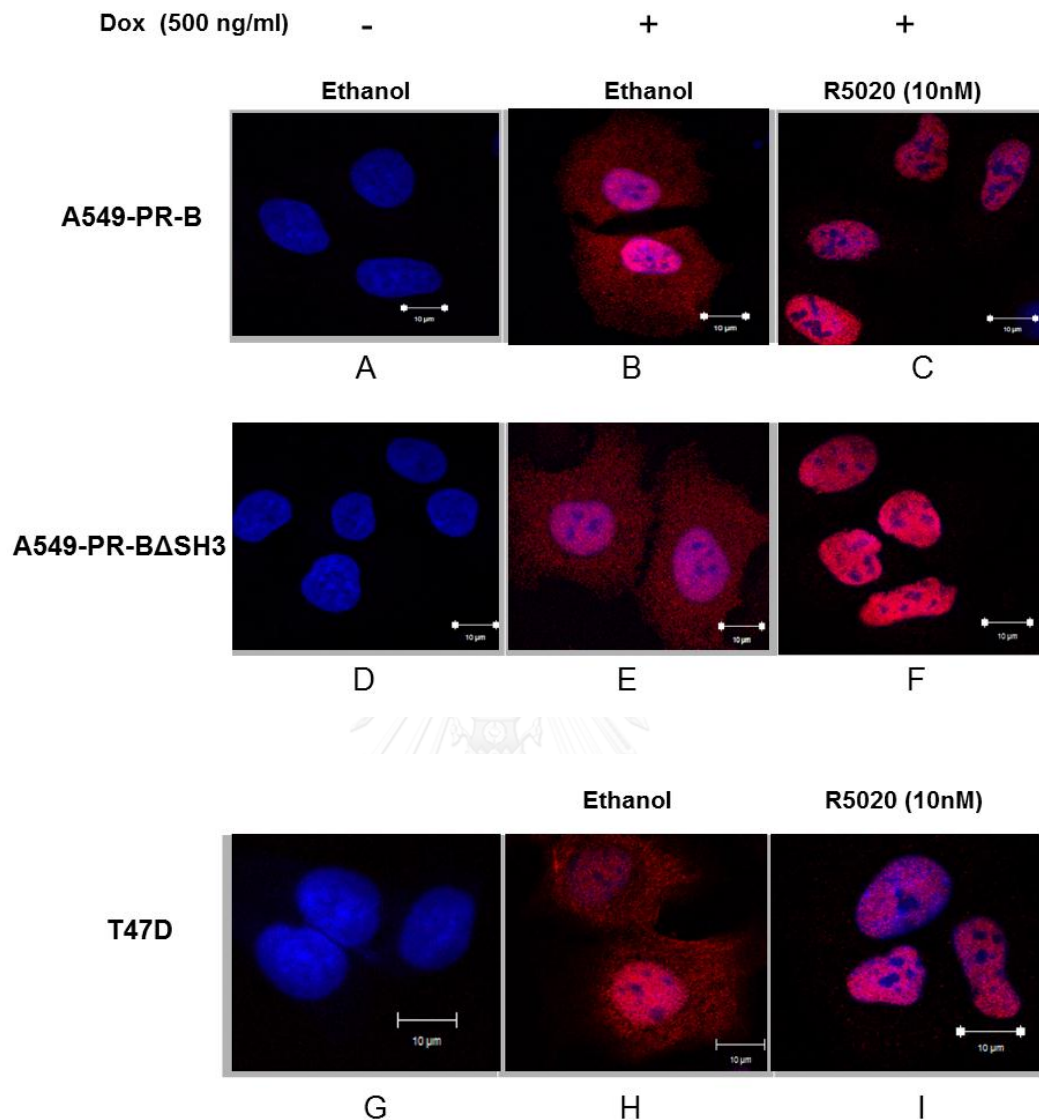
จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในทั้งสองเซลล์โมเดล โดยทำการให้ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml กับเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุด จากผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 จากทั้งสองเซลล์โมเดลมีการแสดงออกที่เท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 29 เพราะฉะนั้นเซลล์โมเดลทั้งสองคือ เซลล์ A549-PR-B และเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 สามารถใช้งานได้จริง และสามารถที่จะนำไปทำการทดลองอื่นๆต่อไปได้



ภาพที่ 29 เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-BΔSH3 ในทั้งสองเซลล์โมเดล เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-BΔSH3 เมื่อมีการให้ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-BΔSH3 ซึ่งทำการทดลองโดยวิธี Western blotted ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PR คือ PR-specific antibody 1294 ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงเจลต่อหลุมเท่ากับ 20 μg และใช้เซลล์ T47D ปริมาณโปรตีน 3ug เป็นตัวควบคุมบวกและ GAPDH เป็น loading control

## 5. ผลการตรวจสอบการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 : โดยวิธี Immunofluorescence

ในการทดลองนี้จะแสดงให้เห็นถึงการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์โมเดล โดยทำการทดลองกับเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ T47D ซึ่งจะใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการทดลองนี้ และแบ่งเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มแรกไม่มีการให้ยา doxycycline กลุ่มที่สองให้ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มที่สามให้ doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับ R5020 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัวอย่างที่จะถูกนำมาทำการทดลองนี้จะถูกตรึงใน 4% Paraformaldehyde และบ่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ PR-B คือ 1294 mouse monoclonal antibody และใช้ Alexa568 เป็น secondary antibody โดยการย้อมติดสีแดงแสดงถึงโปรตีน PR-B และ สีน้ำเงินเป็นสีของการย้อมนิวเคลียส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 30 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์โมเดลสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้เมื่อมีการใส่ R5020 ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับตัวควบคุม (T47D) แสดงให้เห็นว่า โปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์โมเดลนี้มีการเคลื่อนที่เหมือนกับโปรตีน PR-B ปกติทั่วไป

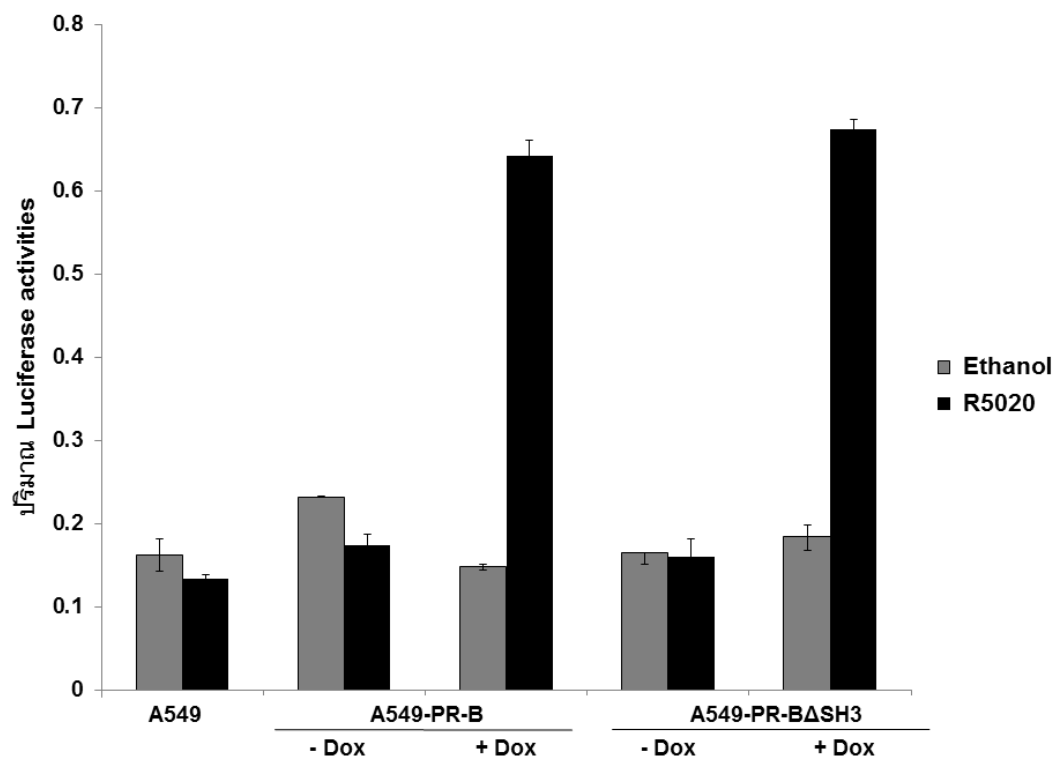


**ภาพที่ 30** การแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Immunofluorescence ช่อง A และ D เป็นเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ไม่ได้ใส่ยา doxycycline เป็นตัวควบคุมลบ ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3, ช่อง B และ E เป็นเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ใส่ยา doxycycline แสดงให้เห็นการย้อมสีติด PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่บริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม, และช่อง C, F และ I เป็นเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และ T47D ที่มีการใส่ยา doxycycline ร่วมกับ R5020 แสดงให้เห็นการย้อมสีติด PR-B ที่บริเวณนิวเคลียส, ช่อง G แสดงเซลล์ T47D ที่บ่มด้วย secondary antibody เท่านั้น เป็นตัวควบคุมลบในการทดลองนี้, ช่อง H แสดงเซลล์ T47D ที่เป็นตัวควบคุมบวกสำหรับการแสดงออกของโปรตีน PR-B

## 6. ผลการตรวจสอบการทำงานของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3: โดยวิธี Luciferase assay

เพื่อตรวจสอบ transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์โมเดล จึงทำการทดลองโดยนำเซลล์ A549, A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาทำการ cotransfected ด้วย pRL-CMV (Renilla) และ PRETK-Luc plasmids เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในแต่ละเซลล์โมเดลจะถูกควบคุมการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 โดย doxycycline และแบ่งเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มแรกให้ ethanol (ตัวควบคุม) และกลุ่มที่สองให้ R5020 ความเข้มข้น 10nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองปริมาณ Luciferase ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการให้ doxycycline ร่วมกับ ethanol (4.3 เท่า  $\pm$  0.21 ในเซลล์ A549-PR-B และ 3.72 เท่า  $\pm$  0.45 ในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3, \*P  $\leq$  0.01) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Luciferase ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 พบว่าไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าทั้งสองเซลล์โมเดลมี transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่เท่ากัน (ดังแสดงในภาพที่ 31)



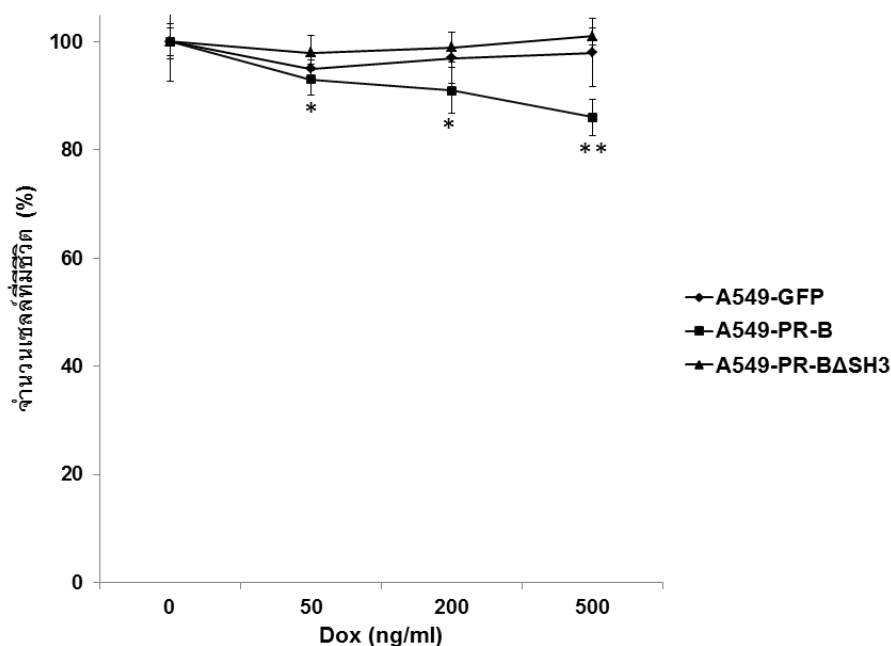


ภาพที่ 31 ผลการตรวจสอบ transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Luciferase ปริมาณ luciferase ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีการให้ doxycycline ร่วมกับ ethanol ( $P < 0.01$ ) ปริมาณ Luciferase ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 พบว่าไม่แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยของ firefly/renilla luciferase แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

## 7. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการเจริญเติบโตของ NSCLC : โดยวิธี MTT colorimetric assay

### 7.1 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มีส่วนของ polyproline SH3 recognition motif (PXXPXR motif) ที่ต่างกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาถึงผลของการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่ต่างกันที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC โดยจะทำการนำเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP ใส่ยา doxycycline ความเข้มข้นต่างๆ 0, 50, 200 และ 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลอง MTT พบว่า ความเข้มข้นของ doxycycline หรือ ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PR-B มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ NSCLC ได้ โดยที่ความเข้มข้นของ doxycycline 500ng/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ NSCLC ได้มากที่สุด 14% ดังนั้น PXXPXR motif ของเซลล์ A549-PR-B อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ที่ลดลง (ดังแสดงในภาพที่ 32)



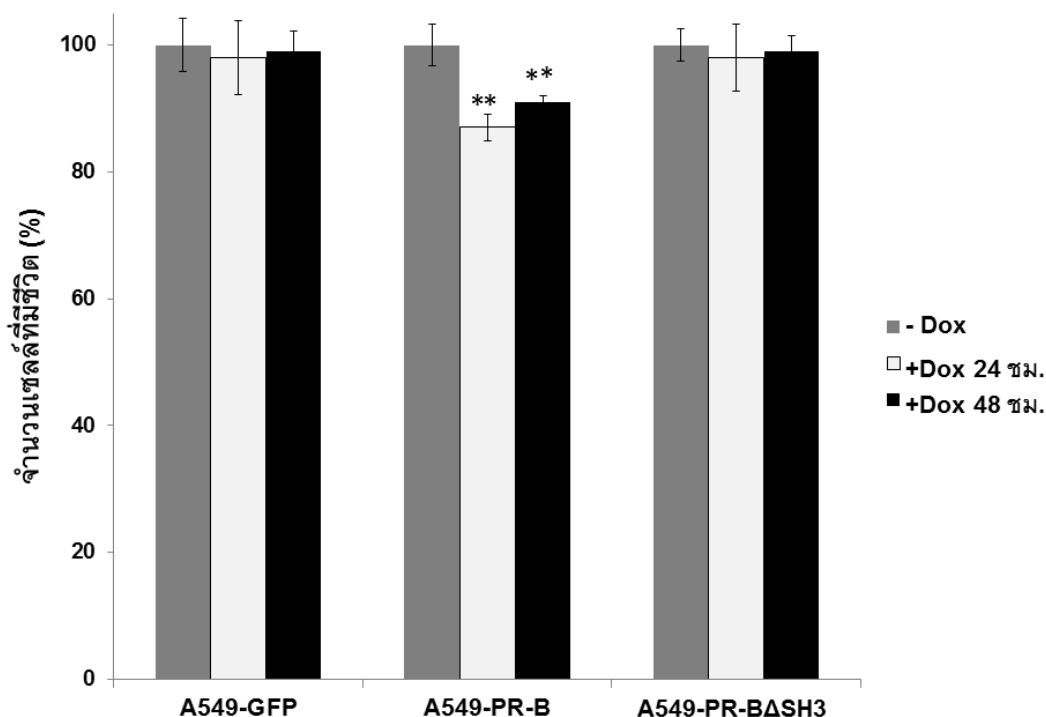
ภาพที่ 32 ผลของความเข้มข้นของ doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 กราฟเส้นแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ A549-PR-B เปรียบเทียบกับเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 และ A549-GFP (ตัวควบคุม) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ A549-PR-B ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP (จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ใส่ doxycycline เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ doxycycline)

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 7.2 ผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline ซึ่งจะทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่ต่างกันซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC โดยจะทำการนำเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP ใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลอง MTT พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B ลดลงเมื่อบ่มด้วย doxycycline ทั้ง 24 (13%) และ 48 ชั่วโมง (4%) ซึ่งในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง (ดังแสดงในภาพที่ 33)

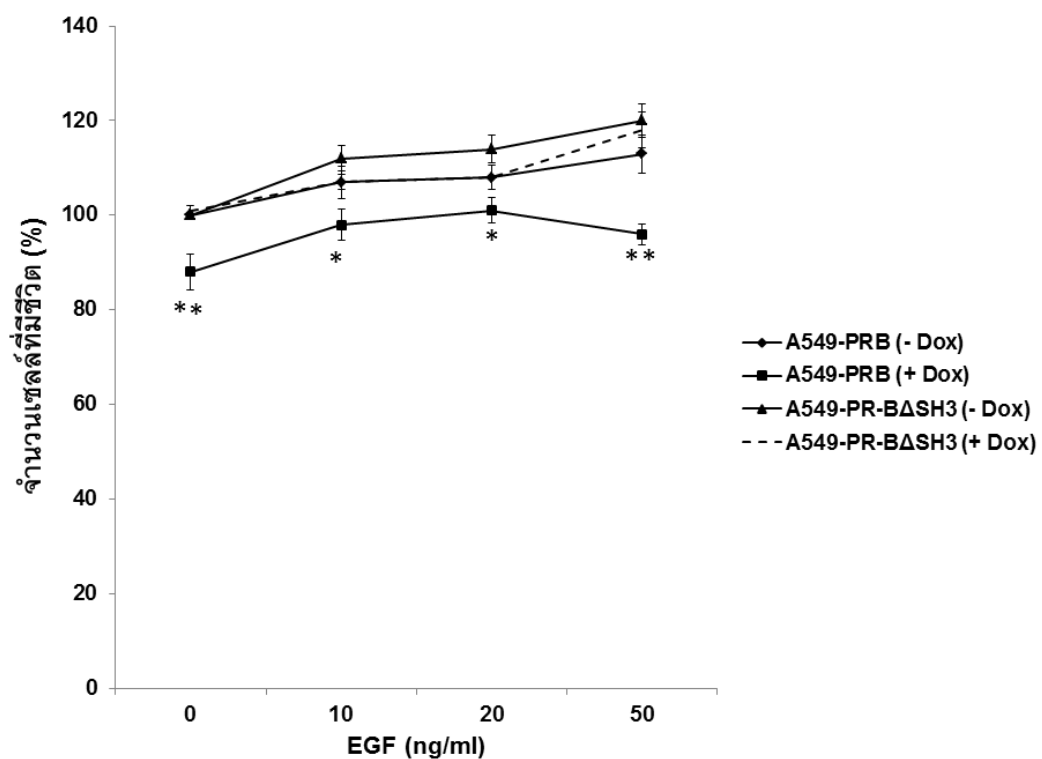


ภาพที่ 33 ผลของระยะเวลาในการบ่ม doxycycline กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โปรตีน PR-B สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตในเซลล์ A549-PR-B ได้ที่ระยะเวลาในการบ่ม doxycycline ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง และไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง) (จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ใส่ doxycycline เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ doxycycline) (\*\* $p \leq 0.01$  จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

### 7.3 ผลของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ใน NSCLC พบว่ามีการแสดงออกของ EGFR สูง และพบว่ามีแสดงออกของ PR ต่ำ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับผลการรักษาของผู้ป่วย NSCLC ที่แย่งลง[9] ซึ่งมียืนยันว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC สูงขึ้น ดังนั้น PR อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ EGFR ในเซลล์ NSCLC ผู้วิจัยจึงทำการทดลองผลของ PR-B กับ EGFR ในการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC โดยนำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ถูกชักนำด้วย 500 ng/ml doxycycline เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่

EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0, 10, 20 and 50 ng/ml จากผลการทดลองพบว่าเมื่อกระตุ้นการส่งสัญญาณของ EGFR ด้วย EGF พบว่า PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC โดยที่ EGF ความเข้มข้น 50 ng/ml พบว่า PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ลดลงได้มากที่สุด 17% เมื่อเทียบกับเซลล์ A549-PR-B ที่ไม่ได้ใส่ doxycycline ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 (ดังแสดงในภาพที่ 34) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า การแสดงออกของโปรตีน PR-B มีความเกี่ยวข้องกับ EGFR ในด้านการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC

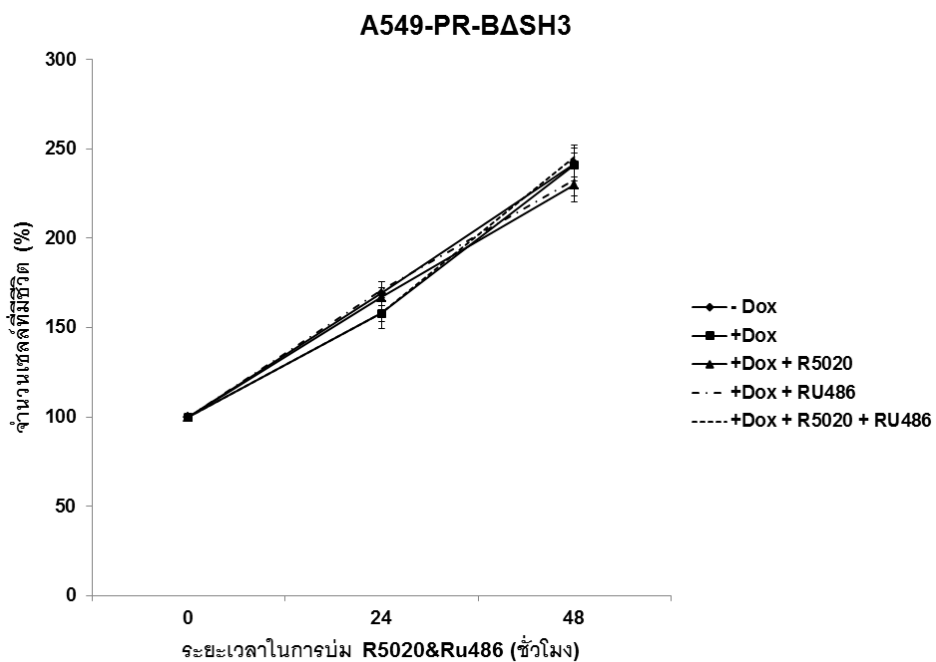
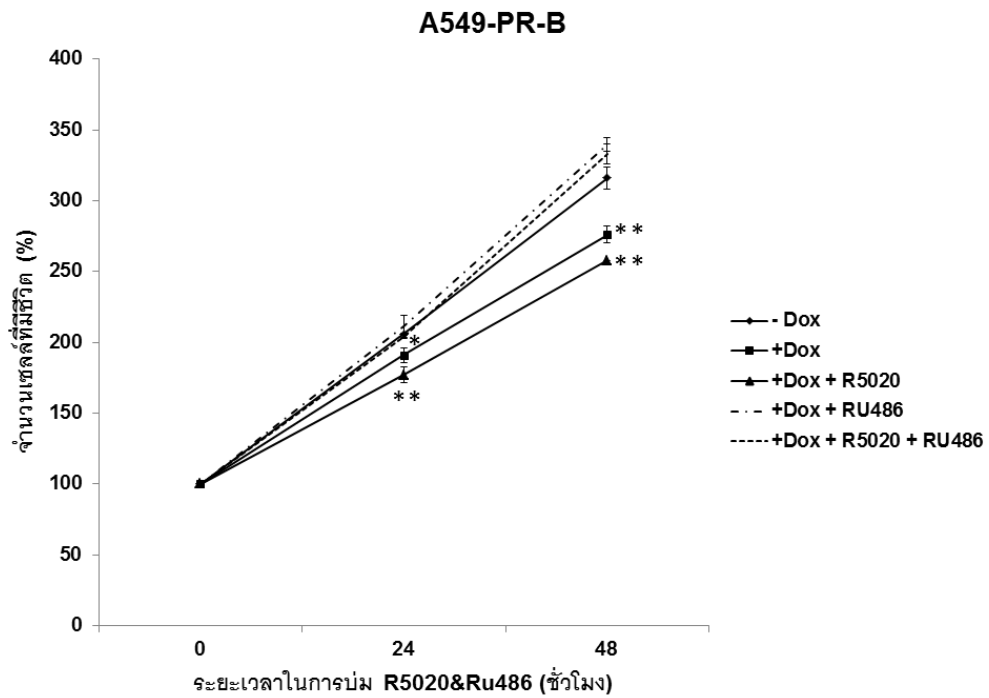


ภาพที่ 34 ผลของความเข้มข้นของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดย PR-B สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B ที่ถูกชักนำด้วย doxycycline ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ A549-PR-B ที่ไม่ได้ใส่ doxycycline กราฟเส้นแสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง) (จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ใส่ doxycycline เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ doxycycline) (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

#### 7.4 ผลของ progestin agonist (R5020) และ progestin antagonist (RU486) กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

เพื่อพิสูจน์ว่าผลของการแสดงออกของโปรตีน PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โมเดลได้จริง ในการทดลองนี้จึงมีการใส่ ligand โดยทำการทดลองกับ progestin agonist (R5020) และ progestin antagonist (RU486) โดยจะนำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ถูกชักนำด้วย 500 ng/ml doxycycline เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่ 10 nM R5020 และ 100 nM RU486 บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลอง MTT พบว่าโปรตีน PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ NSCLC โดย NSCLC ลดลง 15% ที่ 24 ชั่วโมง และ 40% ที่ 48 ชั่วโมงเมื่อถูกชักนำด้วย doxycycline อย่างเดียว นอกจากนี้โปรตีน PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ NSCLC ได้มากขึ้นโดย NSCLC ลดลง 29% ที่ 24 ชั่วโมง และ 54% ที่ 48 ชั่วโมงเมื่อถูกชักนำด้วย doxycycline ร่วมกับ R5020 และไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 (ดังแสดงในภาพที่ 35)





ภาพที่ 35 ผลของ R5020 และ RU486 กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โปรตีน PR-B สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตในเซลล์ A549-PR-B เมื่อถูกชักนำด้วย doxycycline อย่างเดียว และเมื่อชักนำด้วย doxycycline ร่วมกับ R5020 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 กราฟเส้นแสดง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่า

เบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 และ/หรือ RU486 เทียบกับเซลล์ที่ใส่ doxycycline อย่างเดียว (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

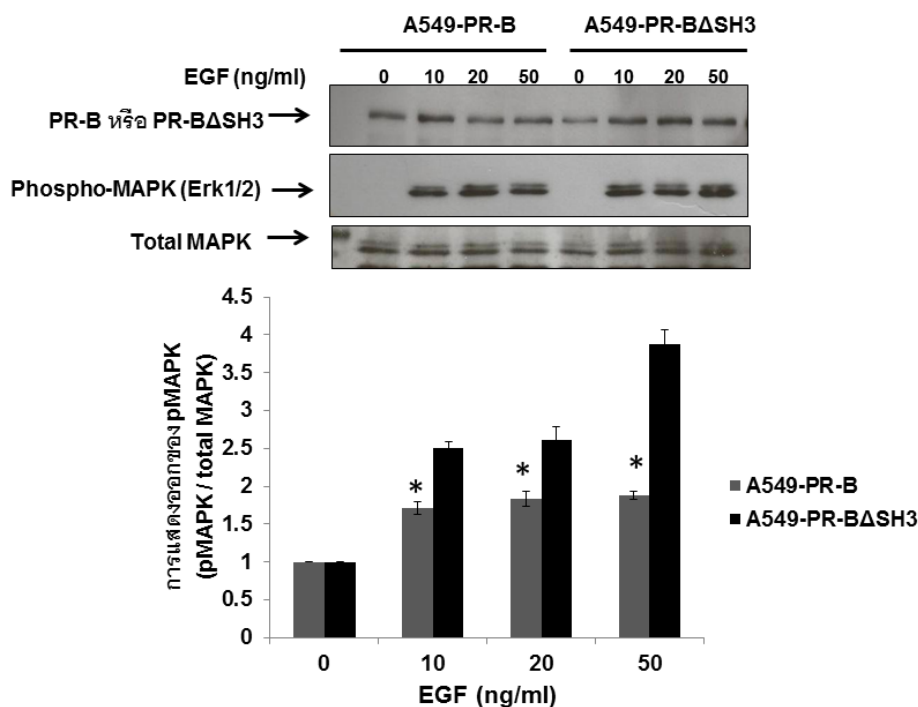
## 8. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในด้านการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT ของ NSCLC: โดยวิธี Western blot

เพื่อศึกษาบทบาทของ PXXRXR motif ของ PR-B ที่มีต่อการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน SH3 domain ซึ่งส่งผลให้ขัดขวางการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT pathways ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการกระตุ้นการทำงานของ EGFR โดยการใส่ EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่ระยะเวลาต่างๆกัน แล้วศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในการยับยั้งโปรตีน phosphorylated ของ MAPK และ AKT ในเซลล์ NSCLC

### 8.1 ผลของความเข้มข้น EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

โดยจะนำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 จากนั้นใส่ EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0, 10, 20 และ 50 ng/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากผลการทดลองเมื่อกระตุ้นการส่งสัญญาณของ EGFR ด้วย EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า phosphorylated ของ MAPK ในเซลล์ A549-PR-B ลดลง และที่ความเข้มข้นของ EGF 50 ng/ml ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง phosphorylated ของ MAPK มากที่สุดในเซลล์ A549-PR-B เมื่อเทียบกับเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 (ภาพที่ 36)



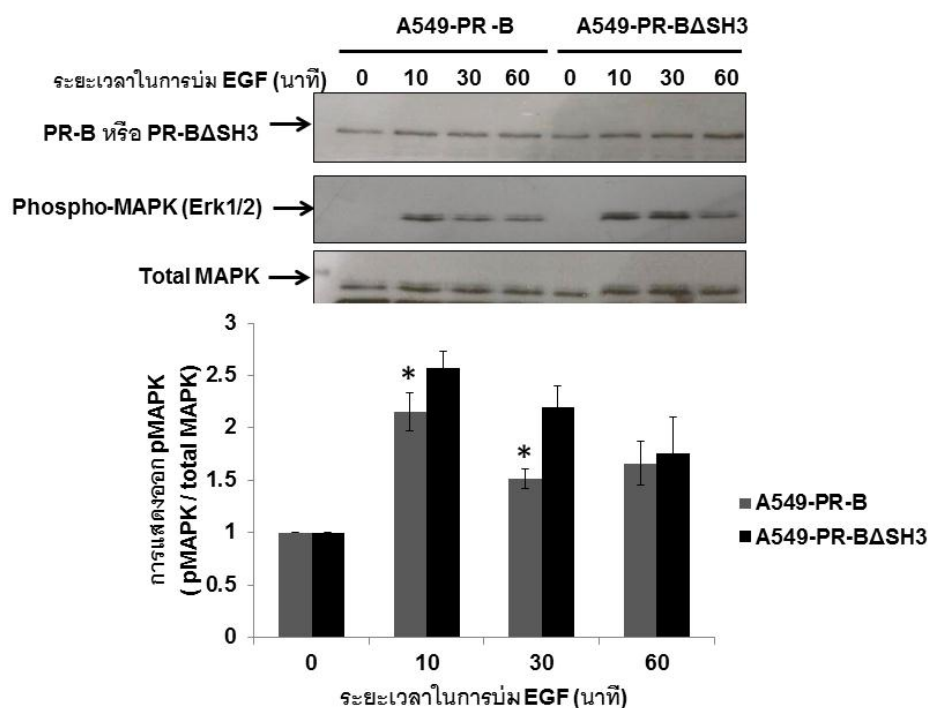


ภาพที่ 36 ผลของความเข้มข้นของ EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ถูกกระตุ้นด้วย EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0,10, 20 และ 50 ng/ml เพื่อชักนำให้เกิด phosphorylated ของ MAPK ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotted และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb #4370 สำหรับตรวจหาโปรตีน phosphorylated ของ MAPK และ total MAPK (P44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit mAb #4695 สำหรับใช้เป็น loading controls ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงบนเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g (\* $p \leq 0.01$  phosphorylated ของ MAPK ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

## 8.2 ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการกระตุ้นการทำงานของ EGFR โดยการใส่ EGF แล้วบ่มที่ช่วงเวลาต่างๆ แล้วศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในการยับยั้งโปรตีน phosphorylated ของ MAPK ในเซลล์ NSCLC โดยจะนำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 จากนั้นใส่ EGF ความเข้มข้น 50 ng/ml บ่มที่

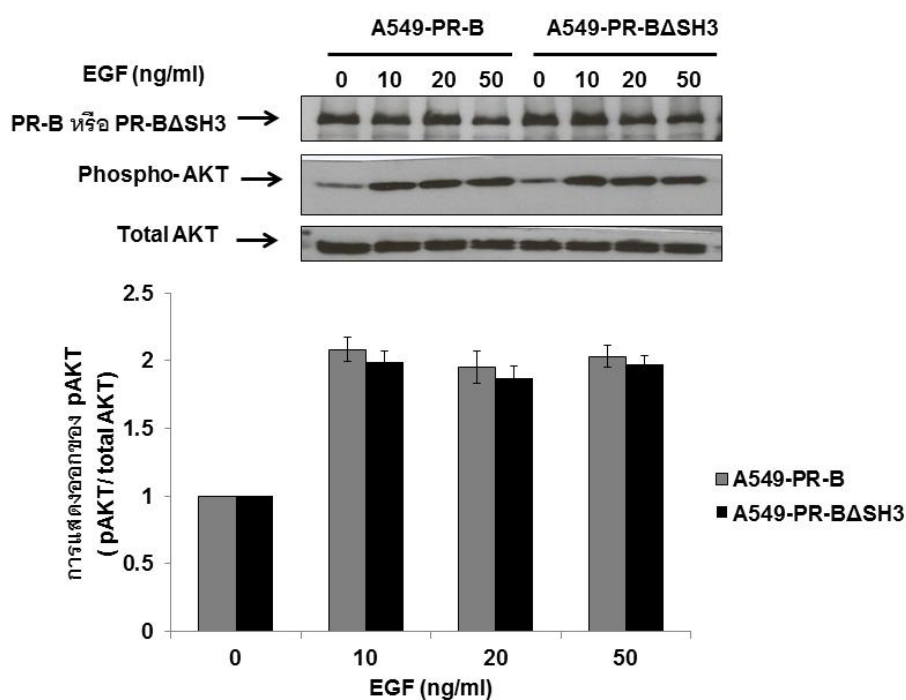
37°C เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที จากผลการทดลองเมื่อกระตุ้นการส่งสัญญาณของ EGFR ด้วยการใส่ EGF ในระยะเวลาต่าง ๆ กันพบว่า phosphorylated ของ MAPK ในเซลล์ A549-PR-B ลดลงและที่ระยะเวลาในการบ่ม EGF ที่ 30 นาที ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง phosphorylated ของ MAPK มากที่สุดในเซลล์ A549-PR-B เมื่อเทียบกับเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับ การส่งสัญญาณ MAPK ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ถูกกระตุ้นด้วย EGF ความเข้มข้น 50 ng/ml เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที เพื่อชักนำให้เกิดโปรตีน phosphorylated ของ MAPK ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotted และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb #4370 สำหรับตรวจหาโปรตีน phosphorylated ของ MAPK และ total MAPK (P44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit mAb #4695 สำหรับใช้เป็น loading controls ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงบนเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g (\* $p \leq 0.01$  phosphorylated ของ MAPK ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

### 8.3 ผลของความเข้มข้น EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

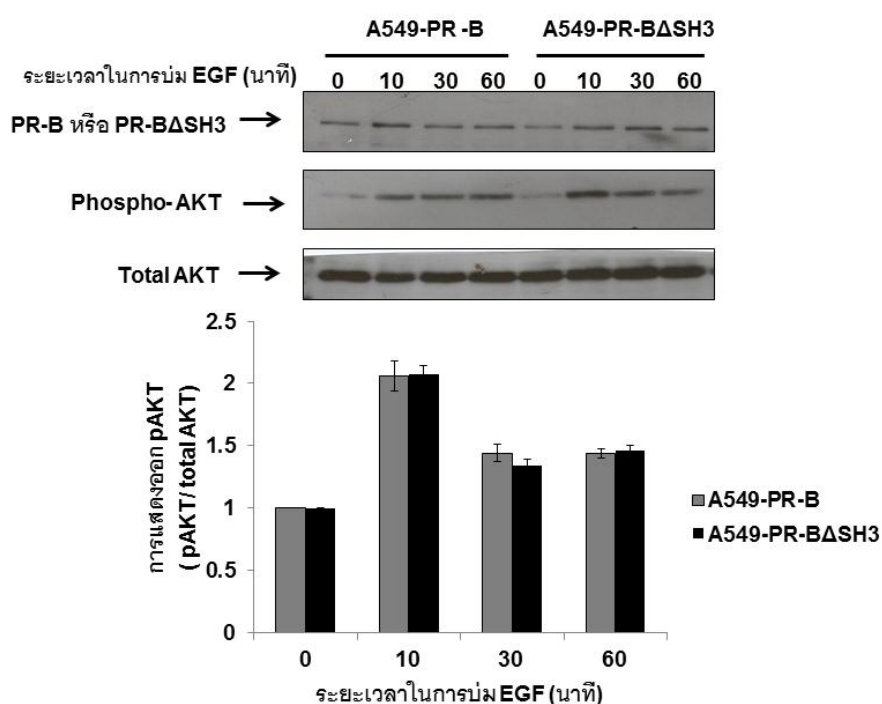
โดยจะนำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 จากนั้นใส่ EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0, 10, 20 และ 50 ng/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากผลการทดลองเมื่อกระตุ้นการส่งสัญญาณของ EGFR ด้วย EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า phosphorylated ของ AKT ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระหว่างเซลล์ A549-PR-B and A549-PR-B $\Delta$ SH3 (ภาพที่ 38)



**ภาพที่ 38** ผลของความเข้มข้นของ EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ถูกกระตุ้นด้วย EGF ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0,10, 20 และ 50 ng/ml เพื่อชักนำให้เกิด phosphorylated ของ AKT ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotted และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ P-Akt (S473) (D9E) Rabbit mAb #4060 สำหรับตรวจหาโปรตีน phosphorylated ของ AKT และ total AKT (Akt (pan)(c67E7) #4691s Rabbit mAb สำหรับใช้เป็น loading controls ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงบนเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g

#### 8.4 ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการกระตุ้นการทำงานของ EGFR โดยการใส่ EGF แล้วบ่มที่ช่วงเวลาต่างๆ แล้วศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในการยับยั้งโปรตีน phosphorylated ของ AKT ในเซลล์ NSCLC โดยจะนำเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 มาใส่ยา doxycycline ความเข้มข้น 500ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 จากนั้นใส่ EGF ความเข้มข้น 50 ng/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที จากผลการทดลองเมื่อกระตุ้นการส่งสัญญาณของ EGFR ด้วยการใส่ EGF ในระยะเวลาต่างๆกันพบว่า Phosphorylated ของ AKT ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระหว่างเซลล์ A549-PR-B and A549-PR-B $\Delta$ SH3 (ภาพที่ 39)



**ภาพที่ 39** ผลของระยะเวลาในการบ่ม EGF กับการส่งสัญญาณ AKT ของเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ถูกกระตุ้นด้วย EGF ความเข้มข้น 50 ng/ml เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที เพื่อชักนำให้เกิดโปรตีน phosphorylated ของ AKT ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotted และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ P-Akt (S473) (D9E) Rabbit mAb #4060 สำหรับตรวจหาโปรตีน phosphorylated ของ AKT และ total AKT (Akt (pan)(c67E7) #4691s Rabbit mAb สำหรับใช้เป็น loading controls ปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่หยอดลงบนเจลต่อหลุมเท่ากับ 20  $\mu$ g

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

Progesterone receptor (PR) ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก และในปัจจุบันเริ่มมีหลักฐานว่า PR มีความเกี่ยวข้องกับการพยากรณ์และการดำเนินของโรคมะเร็งปอด โดยในมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR จะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตช้าลง ทำให้ผู้ป่วยมีผลการรักษาที่ดี อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของ PR ในเซลล์มะเร็งปอดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด EGFR เป็น growth factor receptor ที่สำคัญในโรคมะเร็งปอดที่อาศัย signaling molecule ที่มี SH3 domain ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ มีการศึกษาพบว่าที่ N-terminal region ของ PR มี polyproline SH3 recognition motif หรือ PXXPXR motif ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ได้ ดังนั้นการแสดงออกของ PR อาจจะมีผลขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ภายในเซลล์มะเร็งปอด อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการส่งสัญญาณของ PR ภายในเซลล์มะเร็งปอดที่เกี่ยวข้องกับ EGFR ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานที่จะศึกษาว่า PXXPXR motif ของ PR สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK และ/หรือ AKT pathway ในเซลล์มะเร็งปอดได้ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดมีการเจริญเติบโตลดลง และทำให้ผู้ป่วยมะเร็งมีการรักษาที่ดีขึ้น

ในงานวิจัยนี้ เซลล์โมเดลที่สร้างขึ้นจะใช้ศึกษาผลของการแสดงออกของโปรตีน PR-B ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย doxycycline โดยเลือกใช้เซลล์ A549 มาสร้างเซลล์โมเดล ซึ่ง A549 เป็นเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่มี wild type EGFR และไม่พบการแสดงออกของ PR-B จากผลการทำ Western blot (ภาพที่ 19) แต่ในการศึกษาของ Hironori และคณะ[11] รายงานว่าพบการแสดงออกของ PR-A และ PR-B ในเซลล์ A549 ข้อแตกต่างที่พบในงานนี้อาจเนื่องมาจาก primary antibody สำหรับ PR และอัตราส่วนที่ใช้ต่างกัน โดยผู้วิจัยใช้ 1294 monoclonal antibody ในการทำ Western blot ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ PR สูง นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบ mRNA และ transcription ของ PR ในเซลล์ A549 ด้วยวิธี Real-time RT-PCR และ PRE-luciferase assay จากผลการทดลอง ไม่พบ mRNA และ transcription ของ PR ในเซลล์ A549 (ภาพที่ 19 และ 31) สรุปได้ว่า A549 ไม่มีการแสดงออกของ PR จริง ดังนั้นจึงสามารถนำเซลล์ A549 มาสร้างเป็นเซลล์โมเดลเพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของ PR ได้ และผู้วิจัยเลือกใช้ PR-B isoform ในการสร้างเซลล์โมเดล 2 แบบ คือแบบแรกเป็นเซลล์ A549 ที่มีการแสดงออกของ wild

type PR-B (PR-B ปกติ) ซึ่งมี PXXPXR motif เป็นตำแหน่งที่สามารถจับกับ SH3 domain ของ cytoplasmic signaling molecules ได้ และแบบที่สองเป็นเซลล์ NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR-B $\Delta$ SH3 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของ prolines 2 ตำแหน่งไปเป็น alanines (PXXPXR motif ไปเป็น AXXAXR) ทำให้ไม่สามารถจับกับ SH3 domain ได้

การทดลองการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 และพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง lentivirus (psPAX2, pMD2G) ด้วยการ transformation โดยใช้ความร้อนช่วงสั้นๆ (heat shock) จากผลการทดลองพบว่าได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกต้อง และมีจำนวนเพิ่มขึ้นและเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการสร้างไวรัสในการทดลองต่อไป จากนั้นผลิต lenti viral particles สำหรับนำพายีน pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 เข้าสู่เซลล์ A549 โดยใช้เซลล์ HEK293T ในการสร้าง second generation lentiviral particles เนื่องจากเป็นเซลล์ที่โตง่ายและรวดเร็ว และเป็นเซลล์ที่มี Large T-antigen ที่สามารถจับกับ DNA polymerase ชักนำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน virus genome แล้วประกอบตัวเป็นไวรัสซึ่งมีส่วนของยีนที่ต้องการศึกษา เพื่อนำไป transduce เข้าสู่เซลล์อื่นต่อไป จึงนิยมนำเซลล์ HEK293T มาใช้ในการผลิต retroviral vectors จากนั้น transduce lenti viral particles ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pHAGE-PR-B, pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 เข้าไปในเซลล์มะเร็งปอด A549 ข้อดีในการใช้ไวรัสสำหรับ transduce เข้าสู่เซลล์คือ มีประสิทธิภาพในการ infect เข้าสู่เซลล์สูง เนื่องจากไวรัสที่สร้างขึ้นเป็น single strand RNA genome ที่สามารถ reverse transcription เปลี่ยนเป็น double strand DNA แล้ว integrate เข้าสู่ genome ของเซลล์ A549 และดีเอ็นเอที่ถูก transfect สามารถเข้าไปได้ทั้งในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและไม่มีการแบ่งตัว เมื่อ DNA ที่ต้องการศึกษาเข้าสู่ genome ของเซลล์แล้ว หลังจากนั้นไวรัสจะตายเนื่องจากขาด envelope protein ทำให้ไม่สามารถประกอบตัวเป็นไวรัสได้อีก ดังนั้นการใช้ lenti virus จึงไม่เป็นอันตรายทั้งต่อเซลล์และผู้ทำวิจัย เมื่อทำการ transduce PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 เข้าสู่เซลล์ A549 แล้ว ต่อมาทำการคัดเลือกเซลล์โดยใช้ G418 เนื่องจากพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 มียีนดื้อยา G418 จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด pHAGE-PR-B และ pHAGE-PR-B $\Delta$ SH3 ออกมาได้

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ด้วยวิธี Western blot ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ดูการแสดงออกในระดับโปรตีน

สามารถตรวจหาและวัดปริมาณโปรตีนได้ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง จากผลการทดลองพบว่า เมื่อไม่มีการใส่ doxycycline ก็จะไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 แต่เมื่อเติม doxycycline ความเข้มข้น 500 ng/ml บ่ม 24 ชั่วโมงแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มากที่สุด (ภาพที่ 25-28) และทั้งสองเซลล์โมเดลมีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่เท่ากัน (ภาพที่ 29) ซึ่งเป็นการแสดงออกที่ไม่มากเกินไป เพราะมีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 เพียง 1 ใน 7 เท่าของเซลล์มะเร็งเต้านม T47D ที่มีการแสดงออกของ PR ปริมาณมาก จากการทดลองนี้อภิปรายผลได้ว่า เซลล์ A549-PR-B และเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ โปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ได้โดยการใส่ doxycycline เนื่องจากทั้งสองเซลล์โมเดลมี promoter hEF1a (human elongation factor 1a) ควบคุมการแสดงออกของ rtTA ซึ่งการแสดงออกของยีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 จะเกิดขึ้นเมื่อมีการใส่ Doxycycline โดย Doxycycline จะจับกับ rtTA และไปกระตุ้น TRE ส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อไม่มี Doxycycline rtTA ไม่สามารถไปจับกับ TRE ได้ จึงไม่เกิดการแสดงออกของยีน[88] เพราะฉะนั้นจึงสามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ได้ตามต้องการ และในบางภาพของ band Western blot พบว่ามี band ของโปรตีน PR เกิดขึ้น 2 band คือที่ band ตำแหน่ง 118 kda เป็น band ของ PR-B และ band ที่มีขนาดเล็กกว่าเป็น band ที่เกิดจากโปรตีนสลายตัว (protein degrade) ไม่ใช่ band ของ PR-A เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้เป็นพลาสมิดที่มีการกลายพันธุ์ของ start codon ATG ของยีน PR-A จึงไม่สามารถพบการแสดงออกของโปรตีน PR-A ได้ ดังนั้น band ของโปรตีนที่พบในเซลล์โมเดลนี้จึงแสดงถึงการแสดงออกของโปรตีน PR-B เท่านั้น

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกและตำแหน่งของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Immunofluorescence เป็นเทคนิคที่ใช้ย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและมีความจำเพาะจากการทดลองพบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อไม่ได้เติม doxycycline ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับกับผลจาก Western blot และเมื่อเติม doxycycline พบการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 อยู่ที่บริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ซึ่งเป็นไปตามรายงานที่ผ่านมา ที่พบ PR-B บริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ในสภาวะที่ไม่มี ligand หรือ

ฮอร์โมนมาจับกับ receptor[17, 18] นอกจากนี้เมื่อเติม doxycycline ร่วมกับ R5020 พบว่า โปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับเซลล์ตัวควบคุม (T47D) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Boonyaratanakornkit V. และคณะ[17] อภิปรายผลนี้ได้ว่า R5020 เป็นฮอร์โมน progesterone ซึ่งเป็น ligand ที่สามารถไปจับกับกับ PR-B แล้วทำหน้าที่เป็น transcription factor เข้าสู่ในนิวเคลียส จึงพบการแสดงออกของ โปรตีน PR-B ที่บริเวณนิวเคลียสเมื่อมี ligand หรือ R5020 นอกจากนี้ผลการตรวจสอบ transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 พบว่า ปริมาณ Luciferase ในเซลล์ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ที่ใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และทั้งสองเซลล์โมเดลมีปริมาณ Luciferase ไม่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่า transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 เท่ากัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผล Western blot (ภาพที่ 29) ที่ทั้งสองเซลล์โมเดลมีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่เท่ากัน อภิปรายผลได้ว่า R5020 ไปจับกับ PR-B แล้วทำหน้าที่เป็น transcription factor ไปจับกับ PRE reporter แล้วเกิดการ transcription และ translation ได้ เป็นโปรตีน luciferase จึงพบปริมาณ Luciferase ที่สูงขึ้น จากผลการทดลองข้างต้น สรุปรวมได้ว่า เซลล์โมเดลในงานวิจัยนี้สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ได้เมื่อต้องการ โดยการใส่ doxycycline และเซลล์โมเดลนี้มีโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ที่สามารถเคลื่อนที่และมี transcription activity ได้เหมือนกับ PR ปกติทั่วไป ดังนั้นเซลล์โมเดลในงานวิจัยนี้จึงสามารถนำมาใช้งานได้จริง และสามารถนำมาใช้ทดสอบในการทดลองอื่นๆต่อไปได้

การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ NSCLC ประกอบด้วยสองการทดลองหลักคือ ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี MTT และศึกษาการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT pathways ของเซลล์โมเดลโดยวิธี Western blot ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี MTT ซึ่งเป็นวิธีที่ดู metabolic ของเซลล์ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในภาวะที่ไม่มี ligand หรือ non-genomic signaling pathways ดังนั้นเซลล์ A549-PR-B, A549-PR-B $\Delta$ SH3 และเซลล์ A549-GFP จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก growth factor หรือ ฮอร์โมน เพื่อเป็นการทดสอบว่าโปรตีน PR-B สามารถขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่านทาง non-genomic signaling pathways ผลจากการทดลอง MTT พบว่า



ความเข้มข้นของ doxycycline หรือ ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน PR-B มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ A549-PR-B (ภาพที่ 32) แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ PR-B มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC โดยการแสดงออกของ PR-B ที่มากขึ้น ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC เพิ่มมากขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของ doxycycline 500 ng/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC มากที่สุด สอดคล้องกับผล Western blot (ภาพที่ 25) ที่มีการแสดงออกของ PR-B มากที่สุดที่ความเข้มข้น doxycycline 500 ng/ml นอกจากนี้ PR-B สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากบ่มด้วย doxycycline (ภาพที่ 33) แต่ที่ 24 ชั่วโมง จะยับยั้งได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผล Western blot ที่พบการแสดงออกของ PR-B ที่มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมงหลังจากบ่มด้วย doxycycline ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใส่ doxycycline ที่ 24 ชั่วโมงเพียงครั้งเดียว จึงพบว่าการแสดงออกของโปรตีน PR-B ลดลงหลังจากบ่มด้วย doxycycline เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 27) เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป doxycycline มีการสลายตัวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้การยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ลดลงเช่นเดียวกัน และจากการทดลองนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ซึ่งอาจเนื่องมาจาก PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถจับกับ SH3 domains ได้ ดังนั้น PXXPXR motif ของ PR-B อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ที่ลดลง และในการศึกษาผลของ EGF กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC (ภาพที่ 34) เมื่อใส่ EGF เพื่อกระตุ้นการทำงานของ EGFR พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ PR-B ในทางตรงกันข้าม PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้ อธิบายผลได้ว่า PR-B อาจไปขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ลดลง

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของการแสดงออกของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในภาวะที่มี ligand หรือ genomic signaling pathways โดยศึกษาผลของ R5020 (progestin agonist) และ RU486 (progestin antagonist) กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC (ภาพที่ 35) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อมีการใส่ doxycycline กระตุ้นการแสดงออกของ PR-B พบว่าเซลล์ NSCLC มีการเจริญเติบโตลดลง โดย PXXPXR motif ของ PR-B อาจทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณแบบ extre-nuclear หรือ non-genomic signaling pathways ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC และเมื่อมีการใส่ doxycycline ร่วมกับ R5020 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ลดลงมากกว่าใส่ doxycycline เพียงอย่างเดียว อธิบายได้ว่า PXXPXR motif ของ PR-B สามารถทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณได้ทั้ง 2 pathways คือ genomic pathway และ non-

genomic pathway จึงทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้มากกว่า สรุปได้ว่า progesterone สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่รายงานว่า progesterone ยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ที่มีการแสดงออกของ PR[10, 11] และในผลการทดลองนี้พบว่าเมื่อใส่ doxycycline ร่วมกับ RU486 พบว่า PR-B ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้ ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่า RU486 สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC[84, 99] อาจเนื่องจากชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง, ความเข้มข้นของ RU486 และวิธีในการทดลองต่างกัน นอกจากนี้ R5020 ไม่สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC เมื่อให้ร่วมกับ RU486 ซึ่งให้ผลการทดลองที่เหมือนกับงานวิจัยที่ผ่านมา[84] อภิปรายผลการทดลองนี้ได้ว่า RU486 ซึ่งเป็น progestin antagonist จะไปยับยั้งการทำงานของ PR-B ทำให้ไม่สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้ ในขณะที่เซลล์ A549-PR-B $\Delta$ SH3 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อใส่ doxycycline, R5020 หรือ RU486 จึงสรุปผลการทดลองนี้ได้ว่า PXXPXR motif ของ PR-B มีความสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ทั้งในภาวะที่ไม่มี ligand (non-genomic signaling pathway) และมี ligand (genomic signaling pathway) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bravo ML. และคณะ[100] ที่รายงานว่า PXXPXR motif ของ PR-B มีความสำคัญต่อ non-genomic และ genomic signaling ในเซลล์มะเร็งเต้านม และอาศัย MAPK activation ร่วมด้วย แต่ในรายงานนี้ยังไม่ทราบถึงกลไกในการส่งสัญญาณของ PXXPXR motif ของ PR-B

การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของผลการแสดงออกของโปรตีน PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ใน NSCLC ในด้านการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT pathways ของเซลล์ NSCLC โดยวิธี Western blot เพื่อศึกษาบทบาทของ PXXPXR motif ของ PR-B ที่มีต่อการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน SH3 domain ซึ่งส่งผลให้ขัดขวางการส่งสัญญาณ MAPK และ AKT pathways การทดลองนี้จะใส่ EGF เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการทำงานของ EGFR และเกิดการ phosphorylation ของ MAPK และ AKT จากผล Western blot พบว่า PR-B สามารถยับยั้ง phosphorylated-MAPK ได้เมื่อมีการใส่ EGF เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PR-B $\Delta$ SH3 (ภาพที่ 36,37) จากผลการทดลองนี้อธิบายได้ว่า EGF จะไปจับกับ EGFR เกิดการ phosphorylation ที่ tyrosine kinase domain จากนั้น PXXPXR motif ของ PR-B อาจจะไปจับกับ SH3 domain ของ signaling molecules ที่มีความสำคัญในการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK pathway ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้น Ras, Raf, Mek และ Erk เพราะฉะนั้นการ phosphorylation ของ Erk1/2 จึงลดลง ในขณะที่ PR-B $\Delta$ SH3 ที่มีส่วนของ PXXPXR motif ที่กลายพันธุ์ไปทำให้ไม่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecules ได้ จึงเกิดการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK ได้ตามปกติ ทำให้ phosphorylation

ของ Erk1/2 ไม่ลดลง นอกจากนี้ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถยับยั้ง phosphorylated-AKT ได้ (ภาพที่ 38,39) เนื่องจาก PXXPXR motif ของ PR-B ไม่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecules ที่มีความสำคัญในการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน AKT pathway หรืออาจจับกันได้แต่ไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะส่งผลต่อการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน AKT ทำให้ phosphorylation ของ AKT เกิดขึ้นได้ตามปกติ phosphorylated-AKT จึงไม่ลดลง

จากผลทั้งหมดสรุปได้ว่าความแตกต่างของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณของ EGFR ในเซลล์ NSCLC ซึ่งในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า PXXPXR motif ของ PR-B สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ในไซโทพลาสซึมได้โดยตรง ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ผ่าน MAPK pathway ในเซลล์ NSCLC และผลของการแสดงออกของ PR-B สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ได้ ในขณะที่ PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถยับยั้งได้ เนื่องจาก AXXAXR motif ของ PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถจับกับ SH3 domain ของ signaling molecule ได้ ทำให้ PR-B $\Delta$ SH3 ไม่สามารถขัดขวางการส่งสัญญาณของ EGFR ได้ สรุปได้ว่า PXXPXR motif ของ PR-B มีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณแบบ extra-nuclear หรือ non-genomic signaling pathways ของ EGFR และ PR-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ NSCLC ผ่าน PXXPXR motif เพราะฉะนั้นสามารถนำ PR-B หรือเฉพาะส่วน PXXPXR motif ของ PR-B มาใช้ในการรักษาผู้ป่วย NSCLC มากไปกว่านั้นเซลล์โมเดลในงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอื่นโดยการนำ lenti viral particles ที่ใช้ในการนำพายีน PR เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ศึกษาการทำงานของ PR ในเซลล์อื่นต่อไปได้ในอนาคต

## รายการอ้างอิง

1. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. 136(5): p. E359-86.
2. Eldridge, L. Lung Cancer Survival Rates by Type and Stage. 2015 October 13, 2015 [cited 2015 November, 12 ]; Available from: <http://lungcancer.about.com/od/whatislungcancer/a/lungcancersurvivalrates.htm>.
3. Lynch, T.J., et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004. 350(21): p. 2129-39.
4. Hirsch, F.R., et al., Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*, 2003. 21(20): p. 3798-807.
5. Kanematsu, T., et al., Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Oncol Res*, 2003. 13(5): p. 289-98.
6. Carpenter, G. and S. Cohen, Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 1990. 265(14): p. 7709-12.
7. Jorissen, R.N., et al., Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*, 2003. 284(1): p. 31-53.
8. Verma, M.K., Y. Miki, and H. Sasano, Sex steroid receptors in human lung diseases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011. 127(3-5): p. 216-22.
9. Stabile, L.P., et al., Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(1): p. 154-64.

10. Su, J.M., et al., Expression of estrogen and progesterone receptors in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical study. *Anticancer Res*, 1996. 16(6b): p. 3803-6.
11. Ishibashi, H., et al., Progesterone receptor in non-small cell lung cancer--a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6450-8.
12. Boonyaratanakornkit, V., et al., Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell*, 2001. 8(2): p. 269-80.
13. Lowenstein, E.J., et al., The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 1992. 70(3): p. 431-42.
14. Li, W., et al., A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(1): p. 509-17.
15. Mikaela L. H.P growth factor receptors 2014. 2014 [cited 2015 15 November ]; Available from:  
[https://www.google.co.th/search?q=H.+P.+growth+factor+receptors+2014+sh3+www.studyblue.com.&es\\_sm=122&biw=1366&bih=633&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ\\_AUoAWoVChMI4vTemKuKyQIVCBamCh2J6A2I#tbm=isch&q=egfr+sh3+domain&imgsrc=-XR3-fzTan0ZIM%3A](https://www.google.co.th/search?q=H.+P.+growth+factor+receptors+2014+sh3+www.studyblue.com.&es_sm=122&biw=1366&bih=633&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMI4vTemKuKyQIVCBamCh2J6A2I#tbm=isch&q=egfr+sh3+domain&imgsrc=-XR3-fzTan0ZIM%3A)
16. Lim, C.S., et al., Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol*, 1999. 13(3): p. 366-75.
17. Boonyaratanakornkit, V., et al., The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(2): p. 359-75.
18. Leslie, K.K., et al., Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2005. 96(1): p. 32-41.

19. Anne S. Tsao. Lung Carcinoma. 2013 February 2013 [cited 2015 15 November]; Available from: <http://www.merckmanuals.com/professional/pulmonary-disorders/tumors-of-the-lungs/lung-carcinoma#sec05-ch062-ch062b-1405>.
20. O'Reilly, K.M., et al., Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician*, 2007. 75(5): p. 683-8.
21. Yarden, Y. and M.X. Slivkowski, Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.
22. Voldborg, B.R., et al., Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol*, 1997. 8(12): p. 1197-206.
23. Marquardt, H., et al., Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(15): p. 4684-8.
24. Shoyab, M., et al., Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(17): p. 6528-32.
25. Shing, Y., et al., Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science*, 1993. 259(5101): p. 1604-7.
26. Downward, J., P. Parker, and M.D. Waterfield, Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature*, 1984. 311(5985): p. 483-5.
27. Inamura, K., et al., Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med*, 2010. 134(1): p. 66-72.
28. Pawson, T. and G.D. Gish, SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell*, 1992. 71(3): p. 359-62.

29. Mayer, B.J. and D. Baltimore, Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol*, 1993. 3(1): p. 8-13.
30. Chardin, P., et al., Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, 1993. 260(5112): p. 1338-43.
31. Rozakis-Adcock, M., et al., The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, 1993. 363(6424): p. 83-5.
32. Russell, R.B., J. Breed, and G.J. Barton, Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains. *FEBS Lett*, 1992. 304(1): p. 15-20.
33. Buday, L. and J. Downward, Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 1993. 73(3): p. 611-20.
34. Skolnik, E.Y., et al., The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *Embo j*, 1993. 12(5): p. 1929-36.
35. Buday, L., et al., A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem*, 1994. 269(12): p. 9019-23.
36. Koytiger, G., et al., Phosphotyrosine signaling proteins that drive oncogenesis tend to be highly interconnected. *Mol Cell Proteomics*, 2013. 12(5): p. 1204-13.
37. Koch, C.A., et al., SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, 1991. 252(5006): p. 668-74.
38. Cicchetti, P., et al., Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science*, 1992. 257(5071): p. 803-6.
39. Pawson, T. and J. Schlessingert, SH2 and SH3 domains. *Curr Biol*, 1993. 3(7): p. 434-42.

40. Egan, S.E., et al., Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 1993. 363(6424): p. 45-51.
41. Simon, J.A. and S.L. Schreiber, Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol*, 1995. 2(1): p. 53-60.
42. Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley, Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 481-507.
43. Katso, R., et al., Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. 17: p. 615-75.
44. Knight, Z.A., et al., A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*, 2006. 125(4): p. 733-47.
45. Otsu, M., et al., Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell*, 1991. 65(1): p. 91-104.
46. Skolnik, E.Y., et al., Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell*, 1991. 65(1): p. 83-90.
47. Hiles, I.D., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*, 1992. 70(3): p. 419-29.
48. Cuevas, B.D., et al., Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 2001. 276(29): p. 27455-61.
49. Scagliotti, G.V., et al., The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(12 Pt 2): p. 4227s-4232s.



50. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 2001. 37 Suppl 4: p. S9-15.
51. Ogawa, J., et al., Immunohistochemical study of glutathione-related enzymes and proliferative antigens in lung cancer. Relation to cisplatin sensitivity. *Cancer*, 1993. 71(7): p. 2204-9.
52. Fontanini, G., et al., Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(1): p. 241-9.
53. Salomon, D.S., et al., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995. 19(3): p. 183-232.
54. Choi, S.H., J.M. Mendrola, and M.A. Lemmon, EGF-independent activation of cell-surface EGF receptors harboring mutations found in gefitinib-sensitive lung cancer. *Oncogene*, 2007. 26(11): p. 1567-76.
55. Batra, S.K., et al., Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ*, 1995. 6(10): p. 1251-9.
56. Ekstrand, A.J., et al., Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene*, 1994. 9(8): p. 2313-20.
57. Pedersen, M.W., et al., The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol*, 2001. 12(6): p. 745-60.
58. Wikstrand, C.J., et al., Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res*, 1995. 55(14): p. 3140-8.

59. Ciardiello, F. and G. Tortora, A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(10): p. 2958-70.
60. Krejsa, C., M. Rogge, and W. Sadee, Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(6): p. 507-21.
61. Gotoh, N., Somatic mutations of the EGF receptor and their signal transducers affect the efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011. 4(4): p. 403-9.
62. Cohen, M.H., et al., United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(4): p. 1212-8.
63. Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar, Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(10): p. 778-90.
64. Carey, M.A., et al., The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 293(2): p. L272-8.
65. Beato, M. and J. Klug, Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update*, 2000. 6(3): p. 225-36.
66. Germain, P., et al., Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 2006. 58(4): p. 685-704.
67. Berki, T. *Signal Transduction (Medical Biotechnology)*. 2011 [cited 2014 5 March ]; Available from: [http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011\\_1A\\_Jelatvitel\\_en\\_book/ch03s02.html](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/ch03s02.html).
68. Warnmark, A., et al., Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*, 2003. 17(10): p. 1901-9.

69. Boonyaratanakornkit, V. and D.P. Edwards, Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem*, 2004. 40: p. 105-20.
70. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. 13: p. 513-609.
71. Xu, W., et al., Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*, 1999. 3(5): p. 629-38.
72. Abe, K., et al., Highly concordant coexpression of aromatase and estrogen receptor beta in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*, 2010. 41(2): p. 190-8.
73. Schwartz, A.G., et al., Nuclear estrogen receptor beta in lung cancer: expression and survival differences by sex. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(20): p. 7280-7.
74. Wu, C.T., et al., The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005. 130(4): p. 979-86.
75. Niikawa, H., et al., Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(14): p. 4417-26.
76. Fasco, M.J., G.J. Hurteau, and S.D. Spivack, Gender-dependent expression of alpha and beta estrogen receptors in human nontumor and tumor lung tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 188(1-2): p. 125-40.
77. Stabile, L.P., et al., Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Res*, 2002. 62(7): p. 2141-50.
78. Kawai, H., et al., Combined overexpression of EGFR and estrogen receptor alpha correlates with a poor outcome in lung cancer. *Anticancer Res*, 2005. 25(6c): p. 4693-8.
79. Weinberg, O.K., et al., Aromatase inhibitors in human lung cancer therapy. *Cancer Res*, 2005. 65(24): p. 11287-91.

80. Mah, V., et al., Aromatase expression predicts survival in women with early-stage non small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2007. 67(21): p. 10484-90.
81. Kimura, Y., et al., Expression of androgen receptor and 5alpha-reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible correlation with branching morphogenesis. *Clin Sci (Lond)*, 2003. 105(6): p. 709-13.
82. Plante, J., et al., Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009. 117(4-5): p. 139-45.
83. Mikkonen, L., et al., Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 317(1-2): p. 14-24.
84. Marquez-Garban, D.C., et al., Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids*, 2011. 76(9): p. 910-20.
85. Wen, D.X., et al., The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(12): p. 8356-64.
86. Vegeto, E., et al., Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol*, 1993. 7(10): p. 1244-55.
87. Boonyaratanakornkit, V. and D.P. Edwards, Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med*, 2007. 25(3): p. 139-53.
88. Kohan, D.E., Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int*, 2008. 74(4): p. 427-37.
89. Alexeyev, M.F., et al., A retro-lentiviral system for doxycycline-inducible gene expression and gene knockdown in cells with limited proliferative capacity. *Mol Biol Rep*, 2010. 37(4): p. 1987-91.

90. Krishnapuram, R., et al., Doxycycline-regulated 3T3-L1 preadipocyte cell line with inducible, stable expression of adenoviral E4orf1 gene: a cell model to study insulin-independent glucose disposal. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e60651.
91. Savouret, J.F., et al., Origin of the high constitutive level of progesterone receptor in T47-D breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1991. 75(2): p. 157-62.
92. Vladusic, E.A., et al., Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncol Rep*, 2000. 7(1): p. 157-67.
93. Ramos-Vara, J.A., Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 2011. 691: p. 83-96.
94. Smale, S.T., Luciferase assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010. 2010(5): p. pdb.prot5421.
95. Skildum, A., E. Faivre, and C.A. Lange, Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol*, 2005. 19(2): p. 327-39.
96. McGowan, E.M., et al., Progestins reinitiate cell cycle progression in antiestrogen-arrested breast cancer cells through the B-isoform of progesterone receptor. *Cancer Res*, 2007. 67(18): p. 8942-51.
97. Tomshine, J.C., et al., Cell proliferation and epidermal growth factor signaling in non-small cell lung adenocarcinoma cell lines are dependent on Rin1. *J Biol Chem*, 2009. 284(39): p. 26331-9.
98. Jaramillo, M.L., et al., Differential sensitivity of A549 non-small lung carcinoma cell responses to epidermal growth factor receptor pathway inhibitors. *Cancer Biol Ther*, 2008. 7(4): p. 557-68.
99. Check, J.H., et al., Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous lung cancer. *Anticancer Res*, 2010. 30(1): p. 119-22.

100. Bravo, M.L., et al., Progesterone regulation of tissue factor depends on MEK1/2 activation and requires the proline-rich site on progesterone receptor. *Endocrine*, 2015. 48(1): p. 309-20.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### ข้อมูลจากการทดลอง

1.ผลการตรวจสอบ transcriptional activity ของ PR-B และ PR-B $\Delta$ SH3 ในเซลล์ A549, A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 โดยวิธี Luciferase assay

Cells types	ethanol	10nM R5020
A549 (- Dox)	0.16 $\pm$ 0.0195	0.13 $\pm$ 0.0051 (p=0.18)
A549-PR-B (- Dox)	0.23 $\pm$ 0.0006	0.17 $\pm$ 0.0128 (p=0.076)
A549-PR-B (+ Dox)	0.15 $\pm$ 0.0031	0.64 $\pm$ 0.0189 (p=0.00075)**
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (- Dox)	0.16 $\pm$ 0.0132	0.16 $\pm$ 0.0213 (p=0.813)
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox)	0.18 $\pm$ 0.0172	0.67 $\pm$ 0.0115 (p=0.00089)**

ค่าของ firefly/renilla luciferase แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

\*\* ค่าเฉลี่ยของ firefly/renilla luciferase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.01$



2. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ A549-GFP, A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อทดสอบกับ doxycycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT

Cells types	Doxycycline (ng/ml)			
	0	50	200	500
A549-GFP	100	95 $\pm$ 1.67 (p=0.404)	97 $\pm$ 4.73 (p=0.716)	98 $\pm$ 6.25 (p=0.810)
A549-PR-B	100	93 $\pm$ 2.87 (p=0.027)*	91 $\pm$ 4.27 (p=0.022)*	86 $\pm$ 3.39 (p=0.005)**
A549-PR-B $\Delta$ SH3	100	98 $\pm$ 3.25 (p=0.590)	99 $\pm$ 2.78 (p=0.730)	101 $\pm$ 1.62 (p=0.813)

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.05$

\*\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.01$

3. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ A549-GFP, A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อทดสอบกับระยะเวลาต่างๆในการบ่ม doxycycline ด้วยวิธี MTT

Cells types	ช่วงเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	
	24	48
A549-GFP (- Dox)	100	100
A549-GFP (+ Dox)	98 $\pm$ 5.82 (p=0.64)	99 $\pm$ 3.2 (p=0.68)
A549-PR-B (- Dox)	100	100
A549-PR-B (+ Dox)	87 $\pm$ 2.1 (p=0.0015)**	91 $\pm$ 1.06 (p=0.00041)**
A549- PR-B $\Delta$ SH3 (- Dox)	100	100
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox)	98 $\pm$ 5.34 (p=0.61)	99 $\pm$ 2.41 (p=0.72)

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

\*\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.01$

4. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อทดสอบกับ doxycycline และ EGF ด้วยวิธี MTT

Cells treatment	EGF (ng/ml)			
	0	10	20	50
A549-PR-B (- Dox)	100	107 $\pm$ 3.46	108 $\pm$ 2.52	113 $\pm$ 4.04
A549-PR-B (+ Dox)	88 $\pm$ 3.79 (p=0.006)**	98 $\pm$ 3.21 (p=0.027)*	101 $\pm$ 2.65 (p=0.034)*	96 $\pm$ 2.21 (p=0.0009)**
A549- PR-B $\Delta$ SH3 (- Dox)	100	113 $\pm$ 0.58	114 $\pm$ 2.83	120 $\pm$ 3.61
A549- PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox)	101 $\pm$ 1.15 (p=0.116)	106 $\pm$ 1.53 (p=0.098)	108 $\pm$ 0.23 (p=0.095)	118 $\pm$ 3.79 (p=0.483)

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.05$

\*\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.01$

5. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ A549-PR-B และ A549-PR-B $\Delta$ SH3 เมื่อทดสอบกับ doxycycline, R5020 และ RU486 ด้วยวิธี MTT

Cells treatment	ระยะเวลาในการบ่ม R5020 และ RU486 (ชั่วโมง)		
	0	24	48
A549-PR-B (- Dox)	100	206 ± 0.25	316 ± 7.60
A549-PR-B (+ Dox)	100	191 ± 5.22 (p=0.031)*	276 ± 5.96 (p=0.0068)**
A549-PR-B (+ Dox + R5020)	100	177 ± 5.67 (p=0.0026)**	258 ± 0.34 (p=0.0084)**
A549-PR-B (+ Dox + RU486)	100	211 ± 8.10 (p=0.46)	340 ± 4.81 (p=0.064)
A549-PR-B (+ Dox + R5020 + RU486)	100	204 ± 0.76 (p=0.13)	333 ± 6.72 (p=0.077)
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (- Dox)	100	169 ± 6.49	242 ± 9.97
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox)	100	158 ± 4.55 (p=0.11)	241 ± 6.72 (p=0.93)
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox + R5020)	100	167 ± 8.52 (p=0.82)	230 ± 9.74 (p=0.36)
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox + RU486)	100	171 ± 1.62 (p=0.74)	233 ± 9.14 (p=0.36)
A549-PR-B $\Delta$ SH3 (+ Dox + R5020 + RU486)	100	158 ± 8.81 (p=0.30)	246 ± 4.18 (p=0.54)

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนการทดลอง=3ครั้ง)

\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.05$

\*\* จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.01$



## ภาคผนวก ข

## การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

## การเตรียม LB broth และ LB agar

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Tris HCl	10 ml
H <sub>2</sub> O	1000 ml

ปรับ pH 7.5-8.0 โดย NaOH แล้วนำ LB broth แบ่งมา 500 ml ผสมกับ agar A 7.5 g และ ampicillin 100 mg/ml 500  $\mu$ l สำหรับทำเป็น LB agar

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI

RPMI	47 ml
FBS	2.5 ml
Penicillin streptomycin	500 $\mu$ l

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM

RPMI	45 ml
FBS	5 ml
Penicillin streptomycin	500 $\mu$ l

**การเตรียมสารละลาย MTT 5mg/ml**

MTT	250 mg
-----	--------

PBS	50 ml
-----	-------

กรองด้วย sterile filter PVDF membrane ขนาด 0.22 $\mu$ M แล้วเก็บที่ -20°C ห้ามโดนแสง

**การเตรียมสี 4% leamli กับ 10%BME**

0.5 M Tris pH 6.8	12.5 ml
-------------------	---------

SDS	2 g
-----	-----

Glycerol	10 ml
----------	-------

Bromphenol Blue	5 mg
-----------------	------

BME	5 ml
-----	------

**การเตรียม Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE gel)**6% stacking gel

MilliQ water	5.2 ml
--------------	--------

30% acrylamide	2 ml
----------------	------

0.5M Tris pH 6.8	2.5 ml
------------------	--------

10% SDS	100 $\mu$ l
---------	-------------

10% APS	100 $\mu$ l
---------	-------------

TEMED	10 $\mu$ l
-------	------------

10% separation gel

MilliQ water	3.2 ml
--------------	--------

30% acrylamide	2.67 ml
----------------	---------

1.5M Tris pH 8.8	2 ml
------------------	------

10% SDS	80 $\mu$ l
10% APS	80 $\mu$ l
TEMED	8 $\mu$ l

\* เติม 10%APS, TEMED ท้ายสุด เพื่อให้เจลแข็งตัว

จากนั้นประกบแผ่นกระจก 2 แผ่นแล้วใส่ในเครื่องประกอบเจล หยอด separation gel ลงไประหว่างแผ่นกระจกทั้งสองให้มีปริมาตรสูง 2 ใน 3 ของแผ่นกระจก แล้วเติมน้ำให้เต็มแผ่นกระจกเพื่อไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ให้เจลส่วน separation gel แข็ง แล้วเทน้ำทิ้ง จากนั้นหยอด stacking gel ลงไปให้เต็มแผ่นกระจกแล้วใส่หวี ทิ้งไว้ให้เจลแข็ง แล้วจึงนำหวีออก จากนั้นนำแผ่นเจลที่มีกระจกประกบอยู่ไปแช่ใน 1x Running buffer (10x running buffer 100 ml, 20%SDS 5 ml, milliQ water 900 ml) สำหรับเตรียมรันโปรตีนต่อไป

**เตรียมสารต่างๆที่ใช้ในการทำ Western blot ได้แก่**

10x running buffer

Tris	30 g
Glycine	144 g
milliQ water	1000 ml

1x Running buffer

10x running buffer	100 ml
20% SDS	5 ml
milliQ water	900 ml

Transfer buffer

10x running buffer	100 ml
Methanol	100 ml
20% SDS	500 $\mu$ l
milliQ water	800 ml



TBST buffer

Tris base	20 ml
NaCl	30 ml
Tween 20	500 $\mu$ l
milliQ water	950 ml

5%BSA สำหรับเตรียมทำ primary antibody และ secondary antibody

BSA	0.5 g
TBST	10 ml



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศรสวรรค์ แก้วประเสริฐศรี เกิดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2532 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 ซึ่งในขณะที่ศึกษานั้นได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนสำหรับผู้สมัครที่ไม่ผ่านการคัดเลือกทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

