

**INHIBITION OF COLLAGEN PRODUCTION IN KELOID
FIBROBLASTS USING RNA INTERFERENCE**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การยับยั้งการผลิตคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใยจากแผลคีลอยด์โดยใช้การแทรกแซงอาร์เอ็นเอ
(INHIBITION OF COLLAGEN PRODUCTION IN KELOID FIBROBLASTS
USING RNA INTERFERENCE)

พันธกานต์ ทิศอุ่น 4736343 SIBC/M

วท.ม.(ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์, MD. Ph.D., วรพรรณ ศิริวัฒน์อักษร, MD. Ph.D.

บทคัดย่อ

แผลคีลอยด์เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการผลิตคอลลาเจนที่มากเกินไปของผิวหนังในระหว่างที่มีการหายของบาดแผลโดยเฉพาะคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ short-interfering RNA (siRNA) ในการยับยั้งการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากแผลคีลอยด์ของผู้ป่วย โดยได้ทำการสังเคราะห์ siRNA ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ขึ้นมาจำนวน 4 ชนิดคือ COL1A1-21bp, COL1A1-23bp, COL1A2-21bp และ COL1A2-23bp เพื่อให้มีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 คือ COL1A1 และ COL1A2 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า siRNA ทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพและความจำเพาะสูงในการลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยที่ระดับ mRNA ของยีน COL1A1 และ COL1A2 ในกลุ่มที่ได้รับ siRNA ที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ เหลือประมาณ 15-30% ของระดับในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ RNA ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า siRNA ยังมีผลทำให้การอยู่รอดของเซลล์สร้างเส้นใยจากแผลคีลอยด์ลดลงเหลือเพียง 70-90% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ siRNA ในการลดการสร้างคอลลาเจน โดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้างคอลลาเจนอย่างจำเพาะ รวมทั้งสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์สร้างเส้นใยได้อีกด้วย ดังนั้นการใช้ siRNA ดังกล่าวอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ในอนาคตที่เกิดจากการสร้างคอลลาเจนหรือพังผืดมากผิดปกติ เช่น คีลอยด์ หรือ fibrotic disease ของอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด และ ไต เป็นต้น

82 หน้า.

INHIBITION OF COLLAGEN PRODUCTION IN KELOID FIBROBLASTS USING RNA INTERFERENCE.

PHANTHAKARN TIT-OON 4736343 SIBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: CHATCHAWAN SRISAWAT, MD. Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY), VORAPAN SIRIVATANAUKSORN, MD. Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

ABSTRACT

Keloid is a fibroproliferative disorder resulting from excessive collagen production during wound healing, particularly collagen type I. In this study, the use of the short-interfering RNAs (siRNA) targeting the collagen type I genes was evaluated as a means of suppressing collagen production in primary keloid fibroblast cultures. Four enzymatically-synthesized siRNAs (COL1A1-21bp, COL1A1-23bp, COL1A2-21bp, and COL1A2-23bp) were generated to target *COL1A1* and *COL1A2* genes, respectively. All siRNAs could specifically and efficiently suppress the corresponding target gene expression; the mRNA levels of *COL1A1* and *COL1A2* in the groups treated with the corresponding siRNAs were significantly reduced to ~15-30% of those in the control group receiving no RNA ($p < 0.05$). In addition, keloid fibroblast survival was also altered by the siRNAs, resulting in a significant decrease in fibroblast viability (~70-90% viability) compared with the control group ($p < 0.05$). This study demonstrated the effectiveness of the collagen-targeting siRNAs in reducing collagen production by specifically silencing the collagen gene expression as well as eliminating collagen-producing fibroblasts by causing cell death. The use of these siRNAs could potentially be developed into a novel treatment not only for keloids, but also for other fibrotic diseases of other organs such lungs and kidneys as well.

KEY WORDS: RNA INTERFERENCE/ siRNA/ KELOID/ COLLAGEN/
FIBROBLAST

82 pp.