



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
Mitochondrial DNA Mutations in Cholangiocarcinoma Patients

คณะผู้วิจัย

ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์

นายกัณหา มุขสุข

ดร.พญ.กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์

รศ.ดร.ชัยศิริ วงศ์คำ

นางกนกวรรณ อัมภิวล

ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จาก
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มิถุนายน 2556

คำนำและกิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้วิจัยได้ดำเนินการเผยแพร่ผลงานจากโครงการวิจัยนี้ในการประชุมวิชาการ 1 ครั้ง และอยู่ระหว่างการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อจัดเตรียมเป็นบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิจัยนานาชาติต่อไป

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยแก่โครงการนี้ ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับ และมะเร็งท่อน้ำดีที่อนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ภาควิชาชีวเคมี และ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย

ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์

หัวหน้าโครงการวิจัย

28 มิถุนายน 2556

บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ใน DNA ของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA, mtDNA) ในมะเร็งหลายชนิด โดยสามารถพบได้ทั้งในส่วน coding และ non-coding region โดยการกลายพันธุ์เหล่านี้ มีความสัมพันธ์กับการเกิด การพัฒนา และการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยด้วย แม้จะมีการศึกษาการกลายพันธุ์ของ mtDNA ในมะเร็งหลายชนิดแล้ว แต่การศึกษาในมะเร็งท่อน้ำดียังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จึงได้ทำการวิเคราะห์แบบแผนการกลายพันธุ์ของ mtDNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ KKU-M055, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213, KKU-M214 และ KKU-100 โดยในการศึกษา ได้สกัด mtDNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเหล่านี้ และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA โดยใช้ mitoSEQrTM kit และทำ genome assembly โดยใช้โปรแกรม SeqScape® จากนั้น ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA มาตรฐาน (Cambridge Reference Sequence) โดยใช้โปรแกรม Mitomap จากการศึกษา พบการกลายพันธุ์ของ mtDNA ทั้งหมด 61 รูปแบบการกลายพันธุ์ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยแบ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ silent 65 % (40/61) และแบบ missense 35% (21/61) โดยจีนที่มีจำนวนรูปแบบการกลายพันธุ์มากที่สุด คือ NADH-dehydrogenase (ND) โดยพบทั้งสิ้น 33 รูปแบบการกลายพันธุ์ (20 silent + 13 missense) ทั้งนี้ พบว่ามีการกลายพันธุ์ชนิด missense ในจีน ND6 ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ (4 ใน 6) โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติในโครงสร้างสามมิติของโปรตีนได้ นอกจากนี้ยังพบการ กลายพันธุ์แบบ G171A ของจีน cyclooxygenase III ซึ่งส่งผลให้เกิดการหยุดการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ได้ truncated protein ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนเพียง 57 ตัว โดยสรุปการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า มีการกลายพันธุ์ของ mtDNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี หลายหลาย ซึ่งการกลายพันธุ์หลายชนิด ส่งผลต่อโครงสร้างและขนาดของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้น ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย ได้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Mutation of mitochondrial DNA (mtDNA) was found in many types of cancer, resulting in the abnormal function of mitochondria. The mutation was occurred in both coding and non-coding regions of the 16.6 kB mitochondrial genome. The mutation was reported to be associated with tumor development, progression and poor prognosis of the patients. Although the mutation of mtDNA was extensively reported in many cancers, this piece of information is still lacked in cholangiocarcinoma (CCA). Here, we have analyzed the mutation of mtDNA in CCA cell lines by whole mitochondrial genome sequencing. The mtDNA was extracted from 6 CCA cell lines (KKU-M055, KKU-M139, KKU-M213, KKU-M214, and KKU-100) and sequenced using mitoSEQrTM kit followed by the genome assembly with SeqScape® software. Mitomap was used for variant identification comparing with the Cambridge Reference Sequence. Sixty-one mutation, 65 % (40/61) silent and 35% (21/61) missense mutation, were observed in mtDNA of CCA cell lines. The highest mutation rate was found on NADH-dehydrogenase (ND) genes (33 mutations: 20 silent + 13 missense). Three missense mutations of ND6 were detected in 4 of 6 CCA cell lines, suggesting the aberrant conformation of ND6 in the CCA cell lines. Stop codon generated by G171A mutation of cyclooxygenase III was observed in 5 of 6 CCA cell lines, suggesting in truncated-57 amino acids of the enzyme. In summary, this study revealed many mutations of mtDNA in CCA cell lines, suggesting the abnormal of mitochondrial functions in CCA.

สารบัญ

	หน้า
คำนำและกิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญภาพ	vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	viii
1 บทนำ	1
2 วิธีการดำเนินการและผลการวิจัย	6
3 ข้อสรุป อภิปราย/วิจารณ์ผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ	15
บรรณานุกรม	15
ภาคผนวก	16
- เอกสารอ้างอิงที่ 1 บทคัดย่อที่ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการ CCA pre-congress 2012 “การวิจัยและพัฒนาเพื่อกำจัดพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี” วันที่ 9 ตุลาคม 2555 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	Mutation ของจีนใน mitochondrial DNA ของ CCA cell lines
------------	--

8

	หน้า
รูปที่ 1 Mutation ที่พบใน mitochondrial DNA ของมะเร็งชนิดต่างๆ	6
รูปที่ 2 mitoSEQr™ Resequencing Amplicons for mitochondrial DNA โดยใช้ primer 46 คู่	7
รูปที่ 3 แบบแผนการ mutation ของ mtDNA ใน KGU-M055 CCA cell line	12
รูปที่ 4 แบบแผนการ mutation ของ mtDNA ใน KGU-M139 CCA cell line	10
รูปที่ 5 แบบแผนการ mutation ของ mtDNA ใน KGU-M156 CCA cell line	11
รูปที่ 6 แบบแผนการ mutation ของ mtDNA ใน KGU-M213 CCA cell line	12
รูปที่ 5 แบบแผนการ mutation ของ mtDNA ใน KGU-M214 CCA cell line	13
รูปที่ 6 แบบแผนการ mutation ของ mtDNA ใน KGU-100 CCA cell line	14

ATP gene	ATPase gene
CCA	Cholangiocarcinoma
CO gene	Cytochrome C oxigenase gene
Cyt B	Cytochrome B gene
HCC	Hepatocellular carcinoma
ND gene	NADH-dehydrogenase gene
OV	<i>Opisthorchis viverrini</i>
mtDNA	Mitochondrial DNA