



รายงานการวิจัย
เรื่อง

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิคการยับยั้งอาร์เอ็นเอ
ในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
(Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 (*usp14*) by RNA
Interference (RNAi) in Primary Cell of Cholangiocarcinoma)

นางสาวอุบล ชื่นสำราญ
นางทัศนีย์ พาณิชย์กุล

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต



รายงานการวิจัย
เรื่อง

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิคการยับยั้งอาร์เอ็นเอ
ในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
(Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 (*usp14*) by RNA
Interference (RNAi) in Primary Cell of Cholangiocarcinoma)

นางสาวอุบล ชื่นสำราญ
(โรงเรียนการเรือน)
นางทัศนีย์ พาณิชย์กุล
(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557)

หัวข้อวิจัย	การยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>usp14</i> ด้วยเทคนิคการยับยั้งอาร์เอ็นเอในเซลล์ ปฐภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
ผู้ดำเนินการวิจัย ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อุบล ชื่นสำราญ และ ผศ.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล ศ.ดร.ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร รศ.พ.อ.นพ.ไพบุลย์ ปุญญฤทธิ์ ผศ.ดร.ภูมิ อติศักดิ์วัฒนา
หน่วยงาน	โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2559

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *Ubiquitin- Specific Protease 14* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบเปลี่ยนแปลงของยีนในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีที่อยู่ในระดับด้วยวิธีการขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของ ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *Ubiquitin- Specific Protease 14* หรือ *usp14* บนโครโมโซม 18 ซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงร้อยละ 52 ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว ด้วยเทคนิค RNA interference หรือ RNAi ในเบื้องต้นได้ทำการออกแบบโอลิโกสายสั้น (oligoduplex RNAi) แล้วทำการนำเข้าสู่เซลล์ปฐภูมิ (Primary cell) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (transfection) เปรียบเทียบกับ RNAi negative ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ผลการวิจัยพบว่า RNAi ที่ออกแบบไว้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ปฐภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้ร้อยละ 56 – 95 จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่า โอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ได้จริง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อจำกัดด้านการเจริญของเซลล์ปฐภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ทำให้ไม่สามารถศึกษาสภาวะการลุกลามของเซลล์ปฐภูมิหลังจากถูกยับยั้งยีน *usp 14* จากการศึกษาที่เอนไซม์ Ubiquitin specific protease 14 (USP14) ทำหน้าที่ควบคุมความยาวของสายโปรตีนควบคุมที่ชื่อว่า Ubiquitin ด้วยความที่โปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในเซลล์ จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ทางการแพทย์

Research Title	Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 (usp14) by RNA Interference (RNAi) in Primary Cell of Cholangiocarcinoma
Researcher	Asst. Prof. Dr. Ubol Chuensumran and Asst. Prof. Dr. Tasanee Panichakul Asst. Prof. Dr. Poom Adisakwattana
Research Consultants	Prof. Dr. Songsak Petmitr Assoc. Prof. Col. Phaibul Punyarit
Organization	School of Culinary Arts, Suan Dusit University
Year	2016

This research aimed to study *Ubiquitin- Specific Protease 14* gene inhibition by RNA interference (RNAi) technique. Previously, the genomic instabilities of Thai patients with Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) were studied by arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR). Specific region of *Ubiquitin- Specific Protease 14* or *usp14* gene on chromosome 18 giving gene variation 52% was found. In this study, we intended to inhibit the gene expression using RNA interference or RNAi technique. The oligoduplex RNAi was designed and used for transfection to primary cell of cholangiocarcinoma cells compared with RNAi negative control. Gene expression (RNA level) was then studied using quantitative real-time PCR. The results showed that the designed RNAi can inhibit *usp14* gene expression 56-95%. However, invasion assay of this inhibited gene was limitation according to growth retardation of primary cell of cholangiocarcinoma cells. Nevertheless, Ubiquitin specific protease 14 (USP14) plays role to control the length of Ubiquitin, which is the internal cell controller. This study provided information of medical application.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาและมหาวิทยาลัยสวนดุสิตที่ประสานและดูแลงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดการวิจัย และให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเซลล์ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูมิ อดิศักดิ์วัฒนา ภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิตรา ไวกุล รองคณบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือกลาง ขอขอบคุณ พันเอก นายแพทย์ ธีญญ์ อิงคะกุล กองศัลยกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ที่อนุเคราะห์ขึ้นเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี พร้อมทั้ง ขอขอบคุณ รศ.พ.อ.นพ.ไพบุลย์ ปุณณฤทธิ์ สถาบันพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ที่อนุเคราะห์การตรวจวินิจฉัยเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

คณะผู้วิจัย

2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ความผิดปกติของยีน <i>K-ras</i> และ <i>p53</i>	4
ความผิดปกติของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis	5
ความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene)	6
การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนกลุ่ม growth factors	6
กรอบแนวความคิดในการวิจัย	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
รูปแบบการวิจัย	9
วัสดุดิบ	9
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย	9
สารเคมีที่ใช้	10
การดำเนินงานวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	20

บรรณานุกรม	22
บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ	22
ประวัติผู้วิจัย	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ปฐุมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	17
4.2	ปริมาณ ssDNA ที่สร้างจาก RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ปฐุมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	18
4.3	การแสดงออกของยีน <i>usp14</i> โดย quantitative real-time PCR ในเซลล์ปฐุมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรายที่ 2 (ครั้งที่ 1)	18
4.4	การแสดงออกของยีน <i>usp14</i> โดย quantitative real-time PCR ในเซลล์ปฐุมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรายที่ 2 (ครั้งที่ 2)	19

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	หลักการทำงานของ QCM™ Collagen-Based Cell Invasion Assay (Fluorometric)	15
4.1	เซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	16
4.2	การแสดงออกของยีน <i>usp14</i> ในระดับอาร์เอ็นเอในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรายที่ 2 (ครั้งที่ 1) หลังจากถูกยับยั้งด้วย RNAi (S+)	19
4.3	การแสดงออกของยีน <i>usp14</i> ในระดับอาร์เอ็นเอในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรายที่ 2 (ครั้งที่ 2) หลังจากถูกยับยั้งด้วย RNAi (S+)	19

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็งท่อน้ำดีมีลักษณะการดำเนินโรคที่ค่อนข้างช้า ทำให้กว่าจะสามารถตรวจพบได้ ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่ก็อยู่ในระยะสุดท้าย หรือมีการแพร่ลุกลามของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ แล้ว ส่งผลให้การรักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้น การศึกษาถึงกลไกการก่อโรคมะเร็งชนิดนี้ในระดับโมเลกุล เพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการป้องกัน การดูแลรักษา และการติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป็นเรื่องที่สำคัญมาก นอกจากนั้นผลการวิจัยทางด้านนี้ยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งในระยะแรกเริ่ม โดยคัดเลือกยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นอันดับแรกเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นหรือชักนำให้เป็นมะเร็ง นำมาใช้ในการออกแบบตัวตรวจจับเพื่อตรวจหาชิ้นที่ผ่าเหล่าในเซลล์ของผู้ป่วย ประโยชน์อีกด้านหนึ่ง คือ คัดเลือกยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ชั้นร้ายแรง (metastasis) แล้วใช้เป็นตัวตรวจจับเพื่อตรวจหาเซลล์มะเร็งปฐมภูมิที่หลงเหลือจากการผ่าตัดหรือการรักษาโดยวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ยังนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาไปพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งแบบใหม่ๆ ในอนาคต เช่น การใช้ antisense DNA หรือ RNA เพื่อยับยั้งการสร้าง oncoprotein ในเซลล์มะเร็ง หรือการรักษาโรคมะเร็งโดยวิธี gene therapy เป็นต้น

ยีนที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการเกิดเซลล์มะเร็งมี 2 กลุ่ม คือ Oncogenes และ Tumor suppressor genes ซึ่งจะพบการผ่าเหล่าในเซลล์มะเร็งแทบทุกชนิด (รวมทั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วย) ความถี่ของการเกิดการผ่าเหล่าของยีนเหล่านี้หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็ง สาเหตุของการเกิดมะเร็ง และกลุ่มประชากรที่เป็นมะเร็ง ข้อมูลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งสองกลุ่มนี้ในกลุ่มประชากรไทยที่เป็นมะเร็งยังมีรายงานน้อยมาก โดยเฉพาะโรคมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเกิดในคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากที่สุดในโลก โดยมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) ซึ่งเป็นสาเหตุเฉพาะ ไม่เหมือนกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในแถบยุโรปและอเมริกา

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา (Chuensumran, Wongkham, Pairojkul, Chauin, & Petmitr, 2007, pp. 2986-2991; Chuensumran, Saelee, Wongkham, Pairojkul, Chauin, & Petmitr, 2011, pp. 775-779) ทำให้ทราบสภาพการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยไทย โดยเบื้องต้นใช้วิธีขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของ DNA ที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน Ubiquitin-specific protease 14 หรือ usp14 บนโครโมโซม 18 และเมื่อวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนชุดของ DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ของยีนดังกล่าว พบว่าจำนวนชุดของยีนมีการเปลี่ยนแปลง (gene variation) 52% (Chuensumran, Saelee, Punyarit, Wongkham, Pairojkul, Chauin, & Petmitr, 2011, pp. 775-779) จึงทำการศึกษาวินิจฉัยเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว ด้วยเทคนิค RNA interference หรือ RNAi ในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ KKKU-100 and M213 พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ไลน์ได้

มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วทำการศึกษการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่า RNAi ชุดที่ 1 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ KLU-100 ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้มากที่สุด (ร้อยละ 93.35) และ พบว่า RNAi ชุดที่ 3 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ M213 ในเวลา 72 ชั่วโมง ได้มากที่สุด (ร้อยละ 93.84) จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ได้จริง อย่างไรก็ตาม รูปแบบการแสดงออกของยีนของเซลล์ไลน์นี้อาจจะไม่เหมือนในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงขอทำโครงการวิจัยต่อยอด เพื่อนำ RNAi ที่ได้ออกแบบไว้แล้วไปศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนว่าเมื่อยีนเป้าหมายถูกยับยั้งแล้วจะมีผลกระทบต่อโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์อย่างไร ซึ่งจะใช้เซลล์ปฏุมภูมิหรือเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เป็นเซลล์ต้นแบบ ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ทราบแนวโน้มในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ขอบเขตการวิจัย

สร้างเซลล์ปฏุมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย แล้วนำ RNAi ที่ได้ออกแบบไว้แล้ว ไปทำการศึกษการยับยั้งของยีน *usp14* ในเซลล์ดังกล่าว นำมาศึกษาสภาวะของเซลล์ ได้แก่ Proliferation, Migration และ Invasion พร้อมทั้งศึกษารูปแบบแผนภาพการแสดงออกของโปรตีนเมื่อยีน *usp14* ถูกยับยั้ง

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

Ubiquitin-Specific Protease14 (usp14) คือ ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในกลุ่มโปรติเอส

RNA Interference (RNAi) คือ เทคนิคในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ โดยการออกแบบโอลิโกสายสั้นเพื่อให้ไปจับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ทำให้อาร์เอ็นเอเป้าหมายไม่สามารถแปลรหัส (Translation) ไปเป็นโปรตีนได้

Primary Cell คือ เซลล์มะเร็งปฏุมภูมิที่ได้จากเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งของผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัด นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในฟลาสก์สำหรับเลี้ยงเซลล์

Intrahepatic Cholangiocarcinoma (ICC) คือ มะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่อยู่ในตับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี และอาจนำไปใช้กับโรคมะเร็งอื่นๆ
2. นำไปเผยแพร่ในวารสารนานาชาติ

ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Inhibition of USP14 by Small Interfering RNA as a Therapeutic Trend for Thai Patient with Cholangiocarcinoma

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

โรงพยาบาลต่างๆ ที่มีการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี และหน่วยงานที่ทำงานวิจัยทางด้านอนุชีววิทยาของโรคมะเร็ง

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) เป็นมะเร็งที่ถือว่าร้ายแรงที่สุดชนิดหนึ่ง มีการพยากรณ์โรคไม่ดี เพราะอัตราการเกิดโรคและอัตราการตายมีจำนวนพอๆ กัน ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดนี้สูง โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการทำทะเบียนชุมชนของจังหวัดขอนแก่น (Vatanasapt, Martin, Sriplung, Chindavijak, Sontipong, Suwanrungruang, Kamsa-ard, *et al.*, 1995, pp. 475-483) พบอัตราป่วยในเพศชายเท่ากับ 94.8 ต่อประชากรชาย 100,000 คนต่อปี และในเพศหญิงเท่ากับ 39.4 ต่อประชากรหญิง 100,000 คนต่อปี และพบว่าร้อยละ 89 ของมะเร็งตับเป็นมะเร็งท่อน้ำดี มีรายงานอุบัติการณ์ใน จ.ขอนแก่น ระหว่างปี 2533-2543 ในกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 35 ปี อยู่ที่ 93.8-317.6 ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี (Sriamporn, Pisani, Pipitgool, *et al.*, 2004, pp. 588-594) การรักษาส่วนใหญ่ยังต้องพึ่งการผ่าตัด แต่ผลการรักษาไม่เป็นที่น่าพอใจ มีอัตราการรอดชีวิต (5 year survival) เพียงร้อยละ 8 (Uttaravichien & Buddhisawasdi, 1990, pp. 608-611)

ในประเทศไทยเป็นที่แน่ชัดแล้วว่าการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* (OV) (Thamavit, Bhamarapravati, Sahaphong, Vajrasthira, & Angsubhakorn, 1978, pp. 4634-4639; International Agency for Research on Cancer, 1994, pp. 121-175; Vatanasapt, Sripa, Sithithaworn, & Mairiang, 1999, pp. 313-343; Sripa & Kaewkes, 2000, pp. 139-145) โดยสามารถตรวจพบแอนติเจนได้ในเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีและบริเวณรอบท่อน้ำดี นอกจากนี้ยังพบแอนติเจนใน macrophage, epithelioid cell และ giant cell แม้จะไม่พบตัวพยาธิก็ตาม กระบวนการเกิด CCA ประกอบไปด้วยการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่พบภาวะ early hyperplastic (อาจพบ metaplastic ได้ในบางครั้ง) แล้วตามด้วย dysplasia จนกระทั่งเป็นมะเร็ง ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การอักเสบเรื้อรัง และการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี โดยอาจเกิดร่วมกับการมีการอุดตันของท่อน้ำดี การเกิดภาวะ primary sclerosing cholangitis (PSC), hepatolithiasis, Caroli's disease และ congenital choledochal cysts เป็นต้น

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดี นำมาสรุปเพื่ออธิบายบทบาทที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคได้ดังนี้ คือ

ความผิดปกติของยีน *K-ras* และ *p53*

จากรายงานการวิจัยหลายฉบับพบว่าการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *K-ras* และ *p53* และมีการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดี โดย Ohashi และคณะ (Ohashi, Nakajima, Kanehiro, Tsutsumi, Taki, *et al.*, 1995, pp.

1612-1617) พบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ได้ตั้งแต่ระยะต้นของการก่อมะเร็ง ในขณะที่ *p53* จะพบในระยะท้ายของกระบวนการก่อมะเร็ง ในภาวะปกติ *K-ras* จะอยู่ในรูปของ proto-oncogene ซึ่งไม่ทำงาน (inactive form) แต่หากในกรณีที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นจะทำให้ *K-ras* อยู่ในรูปที่ทำงาน (active form) หรือเรียกว่า oncogene จากรายงานการวิจัยพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* มีอุบัติการณ์สูงถึง 100% ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชาวอังกฤษ (Levi, Urbano-Ispizua, Gill, Thomas, Gilbertson, et al., 1991, pp. 3497-3502) ในขณะที่พบการกลายพันธุ์อยู่ในช่วง 4-60% ในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นและคนไทย (Furubo, Harada, Shimonishi, Katayanagi, Tsui, et al., 1999, pp. 230-240; Tada, Omata, & Ohto, 1992, pp. 1115-1118; Petmitr, Pinlaor, Thousungnoen, Karalak, & Migasena, 1998, pp. 71-75) ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ (hot spot) พบที่ codon 12 โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิด glycine (GGT) ไปเป็น aspartic acid (GAT) หรือ valine (TGT) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่ codon 13 และ codon 61 อีกด้วย (Petmitr, Pinlaor, Thousungnoen, Karalak, & Migasena, 1998, pp. 71-75; Ohashi, Tsutsumi, Nakajima, Noguchi, Okita, et al., 1994, pp. 305-310; Tsuda, Satarug, Bhudhisawasdi, Kihana, Sugimura, et al., 1992, pp. 266-269)

ในกรณีของยีน *p53* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม tumor suppressor gene ทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติหรือทำหน้าที่ชักนำให้มีการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติโดยกระบวนการ apoptosis ดังนั้น หากมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับการทำงานของยีน *p53* จะส่งผลให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็งได้ พบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *p53* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 5-53% โดยเฉพาะชนิด mass-forming (Ohashi, Nakajima, Kanehiro, Tsutsumi, Taki, et al., 1995, pp. 1612-1617; Furubo, Harada, Shimonishi, Katayanagi, Tsui, et al., 1999, pp. 230-240) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์ชนิด missense (มีการสร้างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปจากเดิม) ส่วนน้อยจะเป็นการกลายพันธุ์แบบ nonsense (ไม่สร้างกรดอะมิโน)

ความผิดปกติของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis

ในเซลล์ปกติจะมีการทำงานของยีนและโปรตีนที่มีบทบาทในการกระตุ้นและยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis กล่าวคือ ถ้าเซลล์ได้รับบาดเจ็บระดับหนึ่ง เซลล์จะสามารถเหนี่ยวนำให้ตายลง (apoptosis) เมื่อไม่ให้ความผิดปกตินั้นถ่ายทอดยังเซลล์รุ่นหลัง แต่ในกรณีที่เซลล์มีความผิดปกติจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง จะมีความผิดปกติของการทำงาน กล่าวคือ จะมีการแสดงออกที่ลดลงของยีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิด apoptosis แต่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของยีนกลุ่มที่ยับยั้งการเกิด apoptosis ทำให้เซลล์ที่เกิดความผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งสามารถเจริญแบ่งตัวต่อไปได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด การศึกษาในมะเร็งท่อน้ำดี พบว่ายีนที่มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการ apoptosis หลายชนิดมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น เช่น ยีน *Bcl-2*, *Bcl-X* และ *Mcl-1*

ความผิดปกติของกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA (DNA repairing gene)

ในภาวะปกติเมื่อมีการทำลายดีเอ็นเอเกิดขึ้น เซลล์จะมีระบบซ่อมแซมด้วยกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า DNA repairing enzymes ซึ่งเป็นผลของ DNA repairing genes แต่หากเซลล์มีการแสดงออกผิดปกติ หรือการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่มนี้จะทำให้เกิดการสะสมของดีเอ็นเอที่มีความผิดปกติมากขึ้นจนส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนหลายๆ ตำแหน่ง ในที่สุดการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้กับยีนในทุกกลุ่ม ได้แก่ oncogenes, tumor suppressor genes, apoptosis genes รวมไปถึง DNA repairing genes ด้วย ทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติมีการแบ่งตัวอย่างไม่สิ้นสุด พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งได้ นอกจากความผิดปกติของยีนต่างๆ โดยตรงแล้ว ยังพบความผิดปกติที่กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งเรียกว่า epigenetic stage ได้อีกด้วย เช่น การเกิดปฏิกิริยา hypermethylation ในบริเวณตำแหน่ง promoter ของยีน *hMLH1* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม ในกรณีที่มี DNA mismatch เกิดขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น (Liu, Momoi, Li, Ishikawa, & Fukumoto, 2002, pp. 366-371; Limpaboon, Krissadarak, Sripa, Jearanaikoon, Bhuhisawasdi, *et al.*, 2002, pp. 215-222)

การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนกลุ่ม growth factors และ cytokines ต่างๆ

จากการศึกษาพบว่า growth factors และ cytokines หลายชนิดที่มีบทบาทกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีแบ่งตัว เช่น interleukin-6 (IL-6), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- α (TGF- α), epidermal growth factor (EGF), c-erbB-2, heterogenous immunoglobulin A (IgA) และ leukocyte inhibitory factor (LIF) เป็นต้น (Terada, Ashida, Endo, Horie, Maeta, *et al.*, 1998, pp. 325-331; Harada, Terada, & Nakanuma, 1996, pp. 787-792; Radaeva, Ferreira-Gonzalez, & Sirica, 1999, pp. 1453-1462; Alpini, Glaser, Ueno, Pham, Podila, *et al.*, 1998, pp. G767-775) โดยการกระตุ้นเป็นได้ทั้งแบบ autocrine หรือ paracrine นอกจากนี้ยังพบว่า receptor ของ growth factors และ cytokines เหล่านี้ยังถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เช่น Met ซึ่งเป็น receptor ของ HGF หรือ c-erbB-2 ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีความคล้ายคลึง (homologous) กับ EGFR จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกรณีที่มีพยาธิสภาพของเยื่อบุทางเดินน้ำดี ซึ่งการแสดงออกของ growth factors และ cytokines ชนิดต่างๆ รวมไปถึง receptor เหล่านี้จะมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อยู่ตลอดเวลาโดยเฉพาะเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติอยู่แล้ว จนส่งผลให้เซลล์เหล่านี้มีการเจริญเติบโตที่ไม่สิ้นสุด

โดยพบว่าเมื่อมีการอักเสบทำให้ inflammatory cytokines (eg. TNF- α , IL-6) ไปกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) มีผลทำให้ 1) มีการสร้าง endogenous nitric oxide (NO) (Sirica, Lai, Endo, Zhang, & Yoon, 2002, pp. 303-313; Pascher, Jonas, & Neuhaus, 2003, pp. 282-287) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ดีเอ็นเอบาดเจ็บ ยับยั้งการ

ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีในท่อขนาดเล็ก 2) ทำให้ยีน *COX-2* (cyclooxygenase-2) แสดงออกมากขึ้น ส่งเสริมให้มีการเจริญของเซลล์ และยับยั้งกระบวนการ apoptosis

จากงานวิจัยที่ผ่านมา (งปม.51-52) (Chuensumran, Saelee, Punyarit, Wongkham, Pairojkul, et al., 2011, pp. 775-779) ทำให้ทราบสภาพการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยไทย โดยเบื้องต้นใช้วิธีขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของ DNA ที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *usp14* (Ubiquitin-specific protease 14) บนโครโมโซม 18 โดยพบว่ามีกำเริบเพิ่มขึ้น (Amplification) 48% (25/52 ราย)

โปรตีน Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) จัดอยู่ในกลุ่ม UBP ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้บางตัวมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับมะเร็ง (เนื่องจากควบคุมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการตายของเซลล์) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 18% มีโปรตีน USP14 ที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับพยาธิสภาพ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมายังต่อมน้ำเหลืองและตับ และมีอัตราการรอดชีวิต (survival rate) ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปริมาณต่ำกว่า (Shinji, Naito, Ishiwata, Ishiwata, Tanaka, et al., 2006, pp. 539-543) นอกจากนี้ ยังพบว่ามีกำเริบแสดงออกของยีน *usp14* มากผิดปกติในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Ishiwata, Katayama, Shindo, Ozawa, Itoh, et al., 2001, pp. 13-17) เช่นเดียวกัน

เทคนิค RNA interference (RNAi) คือกระบวนการที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น (dsRNA) ที่มีความจำเพาะ ไปใช้ยับยั้งการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญหลังจากการถอดรหัส (posttranscriptional gene silencing) ซึ่งมีผลต่อโปรตีนและอาร์เอ็นเอในเซลล์ นักวิทยาศาสตร์พบกระบวนการดังกล่าวครั้งแรกในพืชในปี 1990 (Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990, pp. 279-289) และมีการศึกษาอย่างเป็นระบบเป็นครั้งแรกในปี 1998 ใน หนอนนีมาโทดาที่โปร่งใส มีความยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร (*Caenorhabditis elegans*) (Fire, Xu, Montgomery, Kostas, Driver, et al., 1998, pp. 806-811) ซึ่งทำให้ Andrew Fire และ Craig Mello ได้รับรางวัลโนเบลสาขา Medicine or Physiology ในปี 2006 (Mello, 2007, pp. 6985-6994; Fire, 2007, pp. 6966-6984) ได้มีการนำเทคนิค RNAi ไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยนำไปยับยั้งยีนที่จำเพาะ โดยเฉพาะ oncogenes ดังนี้

1. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดเพื่อนำสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (angiogenesis)
2. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) หลังจากที่ถูกผู้ป่วยผ่าตัดก้อนเนื้องอก (primary tumors) ออกแล้ว (Wu, Hait, & Yang, 2003, pp. 1515-1519)
3. ยีน *mdr* (multidrug resistance gene) ซึ่งเป็นสาเหตุของการไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดและรังสีรักษา (Zukiel, Nowak, Wyszko, Rolle, Gawronska, et al., 2006, pp. 1002-1007)

มีการนำ RNAi ไปใช้ครั้งแรกในคลินิกเพื่อรักษาผู้ป่วยมะเร็งที่สมอง (Glioblastoma multiforme) โดยนำไปยับยั้งยีน Tenascin-C (Zukiel, Nowak, Wyszko, Rolle, Gawronska, et

al., 2006, pp. 1002-1007) ซึ่งประสบความสำเร็จ โดยสามารถป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลังจากผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อออกแล้ว ขณะนี้อยู่ในช่วงพัฒนาโดย Senetek PLC นอกจากนี้ยังมียีนอื่นๆ ที่บริษัทยากำลังพัฒนา ได้แก่ M2 subunit ของเอนไซม์ ribonucleotide reductase และโปรตีนโคเนส N3 (Sripa, Leungwattanawanit, Nitta, Wongkham, Bhudhisawasdi, *et al.*, 2005, pp. 3392-3397)

จากการศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ KKU-100 และ M213 พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ไลน์ได้มากกว่าร้อยละ 90 แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่า RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดมากกว่าร้อยละ 90 อย่างไรก็ตาม รูปแบบการแสดงออกของยีนของเซลล์ไลน์อาจจะไม่เหมือนในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการวิจัยต่อยอดโดยการนำ RNAi ที่ได้ออกแบบไว้แล้วไปศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนว่าเมื่อยีนเป้าหมายถูกยับยั้งแล้วจะมีผลกระทบต่อโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์อย่างไร ซึ่งจะใช้เซลล์ปฐมภูมิ หรือเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงในพลาสติกเป็นเซลล์ต้นแบบ ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ทราบแนวโน้มในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

กรอบแนวความคิดในการวิจัย

จากงานวิจัยที่ผ่านมา (Chuensumran, Saelee, Punyarit, Wongkham, Pairojkul, & Petmitr, 2011, pp.775-779) พบว่า มีการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอบนยีน *usp14* ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 48% ซึ่งนับว่าสูงมาก จึงน่าที่จะนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมาศึกษาว่าเกี่ยวข้องกับยีนมะเร็ง (oncogene) หรือไม่

นอกจากนี้ยังนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาไปพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งแบบใหม่ๆ ในอนาคต เช่น การใช้ antisense DNA หรือ RNA (เรียกว่า RNA interference, RNAi) เพื่อยับยั้งการสร้างโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็ง (oncoprotein) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง เพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *usp14* ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

วัตถุดิบ

เซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยที่นำมาทำการวิจัยได้รับการอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จ.ขอนแก่น

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย ได้แก่

1. Tissue Culture Hood ชนิด Laminar-flow โดยกรองอากาศผ่าน High Efficiency Particulate Air (HEPA) filter
2. CO₂ Incubator
3. Aspiration Pump
4. ภาชนะเพาะเลี้ยงที่เป็น Disposable Plastics (T-25, T-75)
5. Multi-well Plates หลายขนาด เช่น 12-well, 96-well
6. 24-well biocoat matrigel invasion chamber
7. 8 µm pore filters (Transwell)
8. ตัวกรอง media (0.22 µm membrane)
9. หลอดไมโครพิพม์
10. เจลแชนเบอร์
11. เครื่อง DNA Thermal Cycler
12. Vortex mixer
13. เครื่องไมโครพิพม์
14. Tip ขนาด 1 ไมโครลิตร, 20 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร
15. capillary สำหรับเครื่อง LightCycler (Roche)
16. ไมโครปิเปตขนาด 1-20 ไมโครลิตร, 1-100 ไมโครลิตร, และ 1-1000 ไมโครลิตร
17. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator)

18. เครื่องไมโครเวฟ

19. เครื่องถ่ายรูป

สารเคมีที่ใช้

1. Media & Supplements ได้แก่ Ham's F12
2. fetal bovine serum
3. HEPES
4. ยาปฏิชีวนะ (Penicillin-Streptomycin)
5. OPTI MEM I (Gibco)
6. Lipofectamine 2000 reagent
7. MTT
8. Block-it transfection kit (Gibco)
9. Trypsin-EDTA 0.25%
10. Trypan blue stain
11. Trizol reagent (Invitrogen)
12. synthetic oligonucleotide (Invitrogen)
13. SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen)
14. Taq DNA polymerase
15. ชุดน้ำยา SYBR สำหรับ real-time PCR
16. อะกาโรส

การดำเนินงานวิจัย

1. การออกแบบ RNAi

ออกแบบ RNAi จำนวน 3 ชุด (ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน) บนยีน *usp14* โดยเลือกชนิด Modified RNA duplexes (Stealth) จากฐานข้อมูล www.invitrogen.com/rnai

2. เตรียมเซลล์ปฐมภูมิ

2.1 คัดกรองผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีชนิดในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) เนื่องจากพบมากในผู้ป่วยชาวไทย จากผลการตรวจทางพยาธิ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาโดยการผ่าตัด

2.2 เก็บเนื้อเยื่อมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีของผู้ป่วยและข้อมูลทางพยาธิสรีระวิทยา จำนวน 5 ราย (ทำทีละราย ไม่จำเป็นต้องรอพร้อมกัน) นำเนื้อเยื่อใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12 (GIBCO) ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Gentamycin 100 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทันทีจากห้องผ่าตัด ทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

2.3 ล้างเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7.2 ตัดเนื้อเยื่อด้วยมีดผ่าตัด

2.4 นำเซลล์ใส่ฟลาस्कสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12, fetal bovine serum 15%, epithelium growth factor 10 ng/ml, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Gentamycin 100 µg/ml)

2.5 บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2.6 สังเกตการเกาะของเซลล์ที่ผิวฟลาस्कทุกวัน ประมาณ 3 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-5 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เซลล์ที่ได้เรียกว่าเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell) ซึ่งหากสามารถเลี้ยงเซลล์ต่อไป แล้วทำการเปลี่ยนเซลล์ (passage) ทุกๆ 7-10 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12 และ FBS 10% แต่ไม่ต้องใส่ EGF เซลล์ที่ได้จะเรียกว่า เซลล์ไลน์

3. การนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ปฐมภูมิ

นำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ปฐมภูมิมะเร็งท่อน้ำดี (transfection) โดยทำควบคู่ไปกับ negative control

การนำ Stealth RNAi เข้าสู่เซลล์ (Transfection) ใน 12-well plate

1. ก่อนที่จะทำ Transfection 1 วัน ให้เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร โดยไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ จะทำให้ได้จำนวนเซลล์ 30-50% confluent ก่อนทำการ Transfection

2. เตรียม Oligomer-Lipofectamine ดังต่อไปนี้

- นำ Stealth RNAi จำนวน 40 พิโคโมล ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM I Reduced Serum จำนวน 100 ไมโครลิตร (ทำให้ได้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเท่ากับ 40 นาโนโมลาร์) ผสมเบาๆ

- ทำ Lipofectamine ให้เป็นเนื้อเดียวกันเบาๆ ก่อนใช้งาน หลังจากนั้นดูตามา 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM I Reduced Serum จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ห้ามเกิน 25 นาที)

- ผสม Stealth RNAi ในขั้นตอนที่ 1 และ Lipofectamine ในขั้นตอนที่ 2 ให้เข้ากันเบาๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที (จะได้สารละลายลักษณะขาวขุ่น)

3. เติม Oligomer-Lipofectamine จำนวน 4 ไมโครลิตร ไปที่เซลล์ที่เตรียมไว้ ผสมเบาๆ ด้วยวิธี rocking

4. บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง

4. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ปฐมภูมิ

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ปฐมภูมิ ทำได้ดังนี้

1. เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง (เซลล์จะเกาะที่ผิวของฟลาस्कหรือเพลท) หลังจากนั้น เติม Trizol reagent 1 มิลลิลิตร/พื้นที่ผิว 10 ตารางเซนติเมตร สำหรับ 12 well plate มีพื้นที่ผิว 4 ตารางเซนติเมตร จะใช้ Trizol reagent 400 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อชะเซลล์ให้หลุด ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. เติมคลอโรฟอร์ม 80 ไมโครลิตร (คลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร/Trizol reagent 1 มิลลิลิตร) ผสมแรงๆ 15 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. เก็บส่วนใสส่วนบน นำใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropyl alcohol 200 ไมโครลิตร (Isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร/Trizol reagent 1 มิลลิลิตร)
5. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนอาร์เอ็นเอจะมีลักษณะสีขาวคล้ายเจลที่ก้นหลอด
6. ทิ้งส่วนใส เติมนเอทานอล 75% จำนวน 400 ไมโครลิตร (เอทานอล 1 มิลลิลิตร/Trizol reagent 1 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
8. ทิ้งส่วนใส รอให้แห้งเอง (air dry) ประมาณ 5-10 นาที
9. ละลายอาร์เอ็นเอด้วย RNase free water โดยใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลงประมาณ 2-3 ครั้ง นำไปบ่มที่ 55-60 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที

5. การสังเคราะห์ First-Strand cDNA ด้วย Superscript VILO

การสังเคราะห์ First-Strand cDNA ด้วย Superscript VILO ทำได้ดังนี้

1. การเตรียม master mix (ไม่ใช่ RNA) ดังต่อไปนี้

■ 5X VILO reaction mix	4	ไมโครลิตร
■ 10X Superscript enzyme mix	2	ไมโครลิตร
■ RNA (ไม่เกิน 2.5 ไมโครกรัม)	x	ไมโครลิตร
■ DEPC-treated water เพื่อให้ได้	20	ไมโครลิตร
2. ผสมเบาๆ นำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยเริ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
5. นำ cDNA ที่ได้ไปทำ real-time PCR หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

6. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *usp14*

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler (Roche) ใช้ชุดน้ำยา SYBR Green I (Roche) โดยใช้ไพรเมอร์ *usp14Ex4F/usp14-Active R1* (forward 5'-ACC CTC AGC CAA AAC TGT C-3'/ reverse 5'-AGG GCT GCA GTA ATA TAC TG-3') ซึ่งมีขนาดขนาด 224 เบส เทียบกับไพรเมอร์เบต้า-แอกติน (forward 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3'/ reverse 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3') ซึ่งมีขนาด 285 เบส ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดคัปิลลารี (LightCycler glass capillary) ซึ่งประกอบด้วย LightCycler Mastermix 18 ไมโครลิตร (น้ำ 8.8 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 5 mM 3.2 ไมโครลิตร, forward primer 0.5 μM 2 ไมโครลิตร, reverse primer 0.5 μM 2 ไมโครลิตร , และ LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Germany) 2 ไมโครลิตร) หลังจากนั้น เติมนีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม)

สถานะของพีซีอาร์ ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, อุณหภูมิ 67 → 57 องศาเซลเซียส 5 วินาที (คงไว้ 15 รอบ เรียกว่า touchdown PCR) และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 45 รอบ

จุดที่เริ่มตรวจพบ PCR product เรียกว่า cycle threshold (Ct) โดยทำการเปรียบเทียบกับยีนพื้นฐาน (Housekeeping gene) ได้แก่ เบต้า-แอกติน โดยทำการคำนวณตามสูตร ดังนี้ (Livak & Schmittgen, 2001, pp. 402-408)

$$\text{DNA copy number} = 2^{-(\Delta\text{case}-\Delta\text{actin})};$$

โดยที่ $\Delta\text{case} = \text{Ct}_{\text{tumor}} - \text{Ct}_{\text{normal}}$ สำหรับไพรเมอร์จำเพาะ และ

$\Delta\text{actin} = \text{Ct}_{\text{tumor}} - \text{Ct}_{\text{normal}}$ สำหรับไพรเมอร์เบต้า-แอกติน

3.5.7 การศึกษาการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (Invasion)

วิธีที่ 1

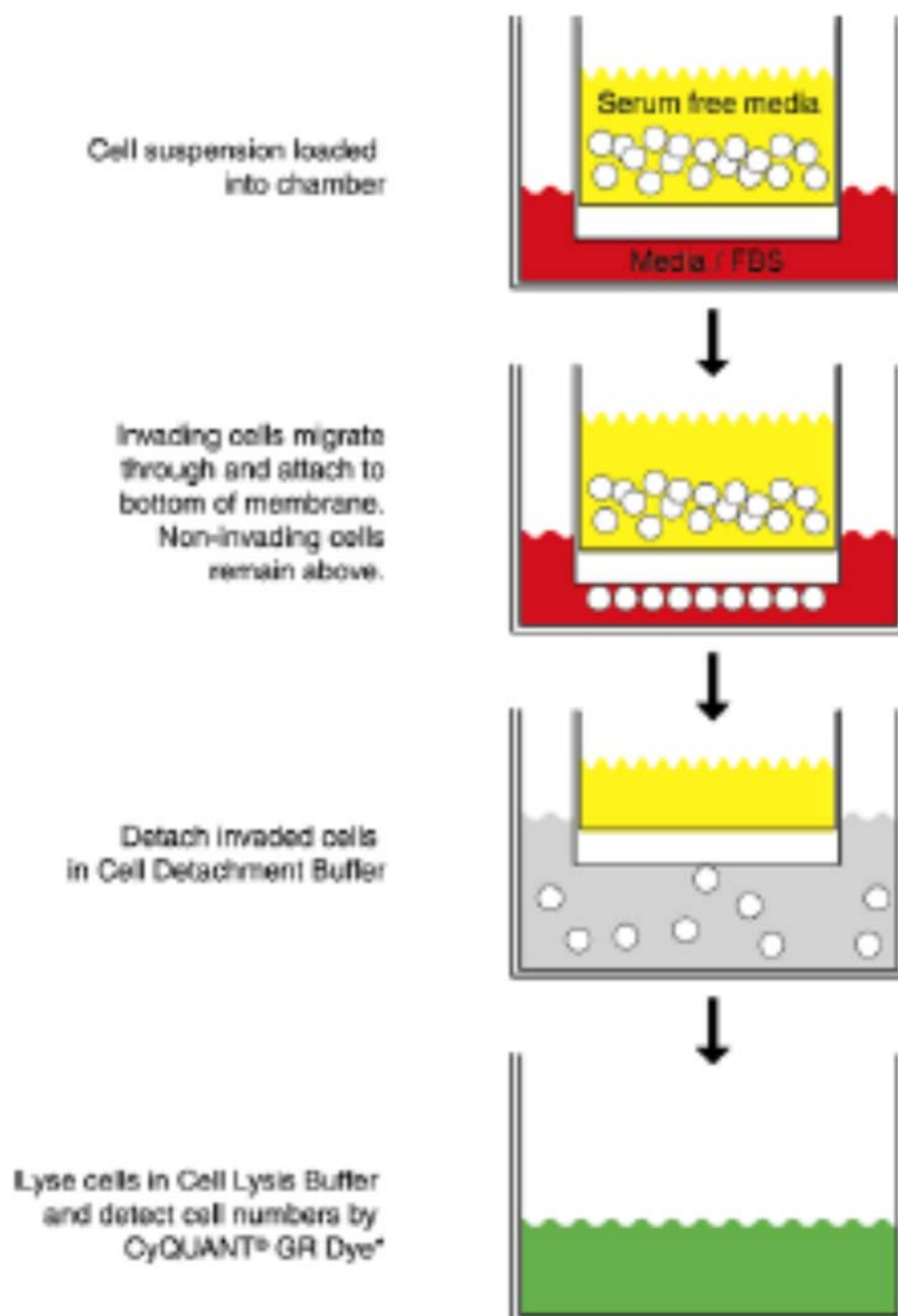
การศึกษาการลุกลามของเซลล์ไลน์ (Invasion) โดยใช้ 24-well Transwell chamber ที่มีเมมเบรนขนาด 8 ไมครอน (Transwell, Coster, Boston, Ma) ใช้เซลล์จำนวน 100,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F-12 โดยไม่ใส่ Fetal Bovine Serum (FBS) นำใส่เข้าส่วนบนของ chamber ที่เคลือบด้วย Matrigel 30 ไมโครกรัมต่อหลุม (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10% ในส่วนล่างของ chamber จำนวน 650 ไมโครลิตร หลังจากนั้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่อยู่ด้านบนเมมเบรนด้วยไม้พันสำลี ส่วนเซลล์ที่ลุกลามไปยังด้านล่างของเมมเบรน (Invade) จะถูกตรึงไว้ด้วยเมทานอล และย้อมด้วยสี Giemsa แล้วนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

วิธีที่ 2

การศึกษาการลุกลามของเซลล์ไลน์ (Invasion) โดยใช้ QCM™ Collagen-Based Cell Invasion Assay (Floorometric) (Merck Millipore, MA, USA) ทำการทดลองใน Invasion Chamber ตามทฤษฎีของ Boyden chamber assay (Chen, 2005, pp. 15-22) ที่มีเมมเบรนโพลีคาร์บอนเนต ขนาดรูพรุน 8 ไมครอน เคลือบด้วยคอลลาเจน ชั้นของคอลลาเจนจะอุดรูพรุนของเมมเบรน ป้องกันเซลล์แพร่ผ่านเมมเบรน (migrating through) เซลล์ชนิดลุกลาม (invasive) เท่านั้นที่จะแพร่ทะลุผ่านชั้นของคอลลาเจนได้ แล้วไปเกาะด้านใต้ของเมมเบรน จะนำเซลล์ลุกลามเหล่านี้ออกจากด้านใต้เมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ Cell Detachment แล้ววิเคราะห์สีฟลูออเรสเซนต์ CyQuant GR® dye (ภาพที่ 3.1) รายละเอียดดังนี้

1. นำอุปกรณ์และสารเคมีต่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทุกขั้นตอนต้องทำใน tissue culture hood

2. ฆ่าเชื้อปากคีบ (forceps) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% และคิบบินเสิร์ท (insert) ด้วยปากคีบ
3. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (prewarmed) 300 ไมโครลิตร ใส่ด้านในอินเสิร์ท เพื่อให้ชั้นคอลลาเจนบวมน้ำ ใช้เวลา 15-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. หลังจากนั้น ค่อยๆ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป 250 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ไปโดนชั้นคอลลาเจน
5. เตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม ความเข้มข้น 0.5-1.0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
6. ดูดเซลล์จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่ลงในอินเสิร์ท
7. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10%FBS จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงไปที่ด้านล่างของ chamber
8. ปิดเพลท บ่มไว้ 24-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5%
9. ดูดเซลล์ส่วนบนทิ้งโดยใช้ปิเปต นำอินเสิร์ทไปใส่ในหลุม (well) ที่มีสารละลาย Cell Detachment (prewarmed) 225 ไมโครลิตร บ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
10. เอียง chamber หน้า-หลัง เพื่อเอาเซลล์ออก นำอินเสิร์ทออกจากหลุม
11. เตรียมสารละลาย Lysis Buffer/Dye Solution โดยการทำให้ CyQuant GR Dye ให้เจือจาง 1:75 ด้วย 4x Lysis Buffer (เช่น สี 4 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ 300 ไมโครลิตร) เติมสารผสมนี้ 75 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
12. ดูดสารผสมที่ได้ไป 200 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate เพื่อทำการวิเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์
13. อ่านค่าฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ฟิเตอร์ 480/520 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.1 หลักการทำงานของ QCM™ Collagen-Based Cell Invasion Assay (Fluorometric)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ออกแบบ RNAi

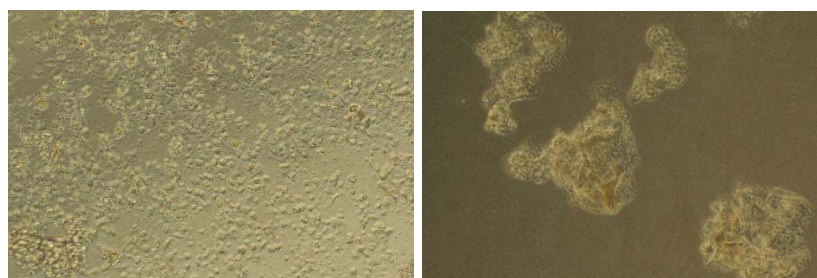
ทำการออกแบบ oligoduplex RNAi จำนวน 1 ชุด บนยีน *usp14* โดยเลือกชนิด Modified RNA duplexes (Stealth) ดังต่อไปนี้

Primer 1.1: (RNA) – AUA UCU UCU GGU GUU ACG AUG CUG A (USP14-HSS113437) ความเข้มข้น 263.9 OD/ μ mol

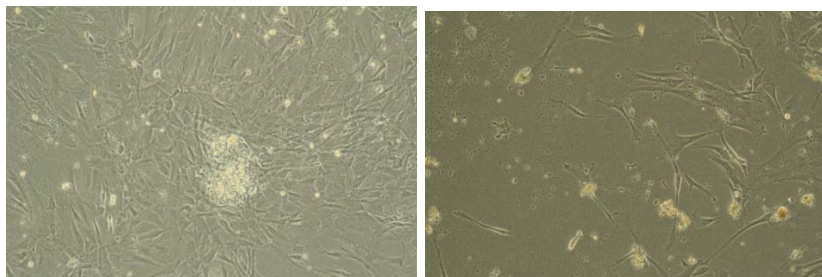
Primer 1.2: (RNA) – UCA GCA UCG UAA CAC CAG AAG AUA U (USP14-HSS113437) ความเข้มข้น 288.1 OD/ μ mol

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี นำมาจากเนื้อเยื่อผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดี โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า จำนวน 2 ราย เป็นชนิด moderately differentiated เซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งสองรายชนิดถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 15% Fetal bovine serum, Epithelium Growth Factor 10 ng/ml, Insulin-Transferrin-Selenium 10 ng/ml และยาปฏิชีวนะ (penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml, gentamycin 100 μ g/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5%



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.1 เซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (ก) รายที่ 1 (ข) รายที่ 2

4.3 นำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ไลน์

4.3.1 การนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์เปรียบเทียบกับ RNAi negative control (Transfection)

นำโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้ นำเข้าเซลล์ปฐมภูมิตามสภาวะที่เหมาะสม โดยมี RNAi negative control ที่เวลา 24 ชั่วโมง

4.3.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ

(1) การสกัด total RNA จากเซลล์ในข้อ 4.3.1 นำไปวัดความเข้มข้น (Nanodrop) ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

#	Sample ID	ปริมาณ RNA (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	Remark
1	Primary cell	604.1	15.102	9.179	1.65	รายชื่อที่ 1
2	Primary cell S+	52.1	1.302	0.728	1.79	รายชื่อที่ 1
3	Primary cell S-	29.7	0.744	0.401	1.8	รายชื่อที่ 1
4	Primary cell S+	705.4	17.636	9.694	1.82	รายชื่อที่ 2-1
5	Primary cell S-	1107.6	27.690	14.755	1.88	รายชื่อที่ 2-1
6	Primary cell	333.4	8.360	4.469	1.87	รายชื่อที่ 2-2
7	Primary cell S+	339.8	8.464	4.411	1.93	รายชื่อที่ 2-2
8	Primary cell S-	546.2	13.655	7.458	1.83	รายชื่อที่ 2-2

(2) นำ total RNA ที่ได้ไปสร้าง First strand (cDNA) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

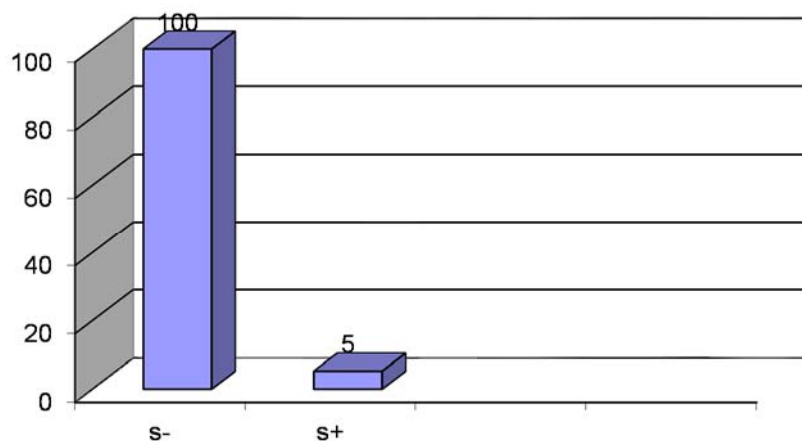
ตารางที่ 4.2 ปริมาณ ssDNA ที่สร้างจาก RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

#	Sample ID	ปริมาณ ssDNA (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	Remark
1	Primary cell	1777.2	35.544	20.184	1.76	รายชื่อที่ 1
2	Primary cell S+	1905.7	38.113	21.659	1.76	รายชื่อที่ 1
3	Primary cell S-	1969.9	39.399	22.291	1.77	รายชื่อที่ 1
4	Primary cell S+	1265.7	38.353	21.023	1.82	รายชื่อที่ 2-1
5	Primary cell S-	1368.3	41.464	22.853	1.81	รายชื่อที่ 2-1
6	Primary cell	1335.4	40.468	22.219	1.82	รายชื่อที่ 2-2
7	Primary cell S+	1425.6	43.201	23.753	1.82	รายชื่อที่ 2-2
8	Primary cell S-	1406.9	42.634	23.433	1.82	รายชื่อที่ 2-2

(3) ทำ quantitative real-time PCR โดยใช้ปริมาณ cDNA ตัวอย่างละ 25 นาโนกรัม ได้ผลดังตารางที่ 4.3-4.4 และภาพที่ 4.2-4.3 พบว่า ในรายชื่อที่ 1 คุณภาพของ RNA ไม่เหมาะสม ส่งผลให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย real-time PCR และไม่สามารถทำซ้ำได้ เนื่องจากเซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต ในรายชื่อที่ 2 การทดลองครั้งที่ 1 พบว่า RNAi (S+) ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ปฐมภูมิในเวลา 24 ชั่วโมง ได้ร้อยละ 94.78 และ ในรายชื่อที่ 2 การทดลองครั้งที่ 2 พบว่า RNAi (S+) ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ปฐมภูมิ ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้ร้อยละ 55.56

ตารางที่ 4.3 การแสดงออกของยีน *usp14* โดย quantitative real-time PCR ในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรายชื่อที่ 2 (ครั้งที่ 1)

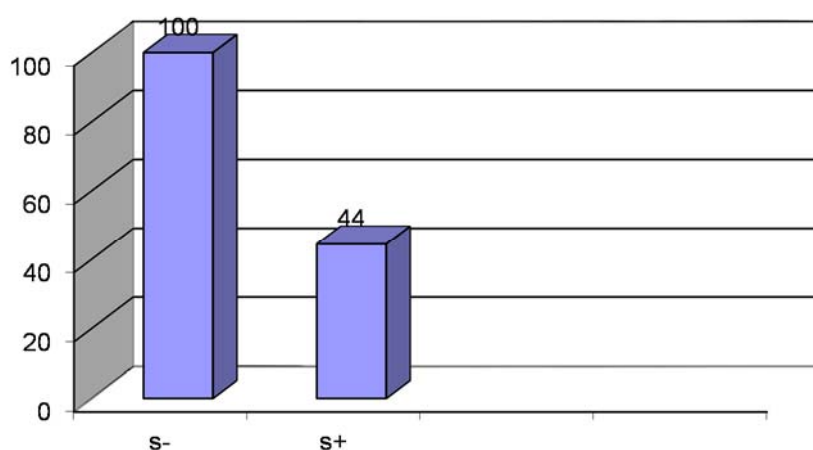
case	actin		usp14-224					Conc.1/2 ^Δ	express(%)
	N	T	Δactin	N	T	Δcase	Δcase - Δactin		
s+	19.27	18.92	-0.35	26.65	30.56	3.91	4.26	0.05	5.22
s-	19.27	19.27	0.00	26.65	26.65	0.00	0.00	1.00	100.00



ภาพที่ 4.2 การแสดงออกของยีน *usp14* ในระดับอาร์เอ็นเอในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รายที่ 2 (ครั้งที่ 1) หลังจากถูกยับยั้งด้วย RNAi (S+)

ตารางที่ 4.4 การแสดงออกของยีน *usp14* โดย quantitative real-time PCR ในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรายที่ 2 (ครั้งที่ 2)

	actin			usp14-224					
case	N	T	Δactin	N	T	Δcase	Δcase - Δactin	Conc.1/2^Δ	express(%)
s+	20.55	20.03	-0.52	34.27	34.92	0.65	1.17	0.44	44.44
s-	20.55	20.55	0.00	34.27	34.27	0.00	0.00	1.00	100.00
cell	20.30	20.30	0.00	32.10	32.10	0.00	0.00	1.00	100.00



ภาพที่ 4.3 การแสดงออกของยีน *usp14* ในระดับอาร์เอ็นเอในเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รายที่ 2 (ครั้งที่ 2) หลังจากถูกยับยั้งด้วย RNAi (S+)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดจากปีงบประมาณ 2555 ซึ่งทราบสภาพการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยไทย โดยเบื้องต้นใช้วิธีขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *usp14* บนโครโมโซม 18 และเมื่อวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR ของยีนดังกล่าว พบว่าจำนวนชุดของยีนมีการเปลี่ยนแปลง (gene variation) 52% (27/52 ราย) ทางคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โดยออกแบบโอลิโกสายสั้น หรือ oligoduplex RNAi บนยีน *usp14* โดยเลือกชนิด Modified RNA duplexes (Stealth) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังต่อไปนี้

RNAi 1.1 – AUA UCU UCU GGU GUU ACG AUG CUG A (USP14-HSS113437);

RNAi 1.2 – UCA GCA UCG UAA CAC CAG AAG AUA U (USP14-HSS113437);

หลังจากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจากท้องผ่าตัด โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า โดยมีเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 2 ราย เป็นชนิด moderately differentiated เซลล์ปฐมภูมิทั้งสองรายถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 10% Fetal bovine serum, Epithelium Growth Factor 10 ng/ml, Insulin-Transferrin-Selenium 10 ng/ml และ 1% penicillin-streptomycin-Gentamycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ เริ่มตั้งแต่การสกัด total RNA จากเซลล์ที่ถูก Transfection ด้วยโอลิโก RNAi แล้ว นำไปสร้าง First strand (cDNA) หลังจากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ โดยทำ quantitative real-time PCR พบว่า RNAi ที่ออกแบบไว้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ปฐมภูมิ ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้มากที่สุดร้อยละ 94.78

หากจะวิเคราะห์ระดับนิวคลีโอไทด์ของ RNAi ที่ได้ออกแบบไว้ พบว่า โปรตีน ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase) นั้นมีโครงสร้างที่ต่างกัน 2 ชนิด (isoform a และ b) หรือถ้าเป็นในระดับอาร์เอ็นเอ เรียกว่า มี transcript variant 2 ชนิด โดยที่ variant 1 จะมีขนาดอาร์เอ็นเอส่งขาว (mRNA) 4156 เบส ส่วน variant 2 จะสั้นกว่าเล็กน้อย คือมีขนาดอาร์เอ็นเอส่งขาว (mRNA) 4051 เบส (ต่างกัน 105 เบส) โดยมีรายละเอียดแยกตาม variant ด้วยโปรแกรม BLAST: Basic Local Alignment Search Tool บนฐานข้อมูล NCBI: National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ดังนี้

Variant 1::RNAi 1

```

Query    1      TCAGCATCGTAACACCAGAAGATAT   25
          |||||
Sbjct    1580  TCAGCATCGTAACACCAGAAGATAT   1604

```

Variant 2::RNAi 1

```

Query    1      TCAGCATCGTAACACCAGAAGATAT   25
          |||||
Sbjct    1475  TCAGCATCGTAACACCAGAAGATAT   1499

```

RNAi ที่ได้ออกแบบไว้ อยู่บนเอ็กซอน (exon) 16 จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ได้จริง อย่างไรก็ตาม การทดลองมีข้อจำกัดในการศึกษาสถานะของเซลล์ปฐภูมิหลังจากถูกยับยั้งยีน *usp 14* ได้แก่ การลุกลามของเซลล์มะเร็ง (Invasion) เนื่องจากเป็นสถานะที่พบได้ในเซลล์มะเร็ง พบว่า เซลล์ปฐภูมิไม่มีการเจริญเติบโต

เอนไซม์ Ubiquitin specific protease 14 (USP14) ทำหน้าที่ควบคุมความยาวของสายโปรตีนควบคุมที่ชื่อว่า Ubiquitin ด้วยความที่โปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในเซลล์ จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ทางการแพทย์ เช่น งานวิจัยของ Lee BH, *et al.* (2010) ที่ทำการยับยั้งโปรตีน USP14 ส่งเสริมให้เกิดการสลายของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อในระบบประสาท (amyloidogenic neurodegeneration) และป้องกันการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (D'Arcy P, Brnjic S, Olofsson MH, *et al.*, 2011, pp. 1636-1640)

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ

- Alpini, G., Glaser, S. S., Ueno, Y., Pham, L., Podila, P. V., Caligiuri, A., LeSage, G., LaRusso, N. F. (1998). Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am J Physiol*, 274, G767-775.
- Chen, HC. (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 294, 15-22.
- Chuensumran, U., Saelee, P., Punyarit, P., Wongkham, S., Pairojkul, C., Chauin, S., Petmitr, S. (2011). Ubiquitin-specific protease 14 expression associated with intrahepatic cholangiocarcinoma cell differentiation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 775-779.
- Chuensumran, U., Wongkham, S., Pairojkul, C., Chauin, S., Petmitr, S. (2007). Prognostic value of DNA alterations on chromosome 17p13.2 for intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 13, 2986-2991.
- D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M. H., *et al.* (2011). Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med*, 17, 1636-1640
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Fire, A. Z. (2007). Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 6966-6984.
- Furubo, S., Harada, K., Shimonishi, T., Katayanagi, K., Tsui, W., Nakanuma, Y. (1999). Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*, 35, 230-240.
- Harada, K., Terada, T., Nakanuma, Y. (1996). Detection of transforming growth factor- α protein and messenger RNA in hepatobiliary diseases by immunohistochemical and in situ hybridization techniques. *Hum Pathol*, 27, 787-792.
- International Agency for Research on Cancer. (1994). Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 61, 121-175.
- Ishiwata, S., Katayama, J., Shindo, H., Ozawa, Y., Itoh, K., Mizugaki, M. (2001). Increased expression of queuosine synthesizing enzyme, tRNA-guanine transglycosylase, and queuosine levels in tRNA of leukemic cells. *J Biochem*, 129, 13-17.

- Lee BH, Lee MJ, Park S, *et al.* (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, *467*, 179-84.
- Levi, S., Urbano-Ispizua, A., Gill, R., Thomas, D. M., Gilbertson, J., Foster, C., Marshall, C. J. (1991). Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res*, *51*, 3497-3502.
- Limpaiboon, T., Krissadarak, K., Sripa, B., Jearanaikoon, P., Bhuhisawasdi, V., Chau-in, S., Romphruk, A., Pairojku, C. (2002). Microsatellite alterations in liver fluke related cholangiocarcinoma are associated with poor prognosis. *Cancer Lett*, *181*, 215-222.
- Liu, D., Momoi, H., Li, L., Ishikawa, Y., Fukumoto, M. (2002). Microsatellite instability in thorotrast-induced human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Cancer*, *102*, 366-371.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*, 402-408.
- Mello, C. C. (2007). Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution (Nobel Lecture):. *Angew Chem Int Ed Engl*, *46*, 6985-6994.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, *2*, 279-289.
- Ohashi, K., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Tsutsumi, M., Taki, J., Aomatsu, Y., Yoshimura, A., Ko, S., Kin, T., Yagura, K. (1995). Ki-ras mutations and p53 protein expressions in intrahepatic cholangiocarcinomas: relation to gross tumor morphology. *Gastroenterology*, *109*, 1612-1617.
- Ohashi, K., Tsutsumi, M., Nakajima, Y., Noguchi, O., Okita, S., Kitada, H., Tsujiuchi, T., Kobayashi, E., Nakano, H., Konishi, Y. (1994). High rates of Ki-ras point mutation in both intra- and extra-hepatic cholangiocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol*, *24*, 305-310.
- Pascher, A., Jonas, S., Neuhaus, P. (2003). Intrahepatic cholangiocarcinoma: indication for transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, *10*, 282-287.
- Petmitr, S., Pinlaor, S., Thousungnoen, A., Karalak, A., Migasena, P. (1998). K-ras oncogene and p53 gene mutations in cholangiocarcinoma from Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, *29*, 71-75.
- Radaeva, S., Ferreira-Gonzalez, A., Sirica, A. E. (1999). Overexpression of C-NEU and C-MET during rat liver cholangiocarcinogenesis: A link between biliary

- intestinal metaplasia and mucin-producing cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 29, 1453-1462.
- Shinji, S., Naito, Z., Ishiwata, S., Ishiwata, T., Tanaka, N., Furukawa, K., Suzuki, H., Seya, T., Matsuda, A., Katsuta, M., Tajiri, T. (2006). Ubiquitin-specific protease 14 expression in colorectal cancer is associated with liver and lymph node metastases. *Oncol Rep*, 15, 539-543.
- Sirica, A. E., Lai, G. H., Endo, K., Zhang, Z., Yoon, B. I. (2002). Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets. *Semin Liver Dis*, 22, 303-313.
- Sriamporn, S., Pisani, P., Pipitgool, V., Suwanrungruang, K., Kamsa-ard, S., Parkin, D. M. (2004). Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Trop Med Int Health*, 9, 588-594.
- Sripa, B., Kaewkes, S. (2000). Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. *Parasite Immunol*, 22, 139-145.
- Sripa, B., Leungwattananit, S., Nitta, T., Wongkham, C., Bhudhisawasdi, V., Puapairoj, A., Sripa, C., Miwa, M. (2005). Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). *World J Gastroenterol*, 11, 3392-3397.
- Tada, M., Omata, M., Ohto, M. (1992). High incidence of ras gene mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer*, 69, 1115-1118.
- Terada, T., Ashida, K., Endo, K., Horie, S., Maeta, H., Matsunaga, Y., Takashima, K., Ohta, T., Kitamura, Y. (1998). c-erbB-2 protein is expressed in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Histopathology*, 33, 325-331.
- Thamavit, W., Bhamarapravati, N., Sahaphong, S., Vajrasthira, S., Angsubhakorn, S. (1978). Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res*, 38, 4634-4639.
- Tsuda, H., Satarug, S., Bhudhisawasdi, V., Kihana, T., Sugimura, T., Hirohashi, S. (1992). Cholangiocarcinomas in Japanese and Thai patients: difference in etiology and incidence of point mutation of the c-Ki-ras proto-oncogene. *Mol Carcinog*, 6, 266-269.
- Uttaravichien, T., Bhudhisawasdi, V. (1990). Experience of non-jaundiced cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*, 37, 608-611.

- Vatanasapt, V., Martin, N., Sriplung, H., Chindavijak, K., Sontipong, S., Sriamporn, H., Parkin, D. M., Ferlay, J. (1995). Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 4, 475-483.
- Vatanasapt, V., Sripa, B., Sithithaworn, P., Mairiang, E. (1999). *Liver flukes and liver cancer*. In: Newton Beral V, Weiss RA, editors. *Infections and human cancer*. Bangkok. 313-343.
- Wu, H., Hait, W. N., Yang, J. M. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res*, 63, 1515-1519.
- Zukiel, R., Nowak, S., Wyszko, E., Rolle, K., Gawronska, I., Barciszewska, M. Z., Barciszewski, J. (2006). Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C. *Cancer Biol Ther*, 5, 1002-1007.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาวอุบล ชื่นสำราญ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่
โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
228-228/1-3 ถ.สีรินธร แขวง/เขต บางพลัด กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02-423-9468-9 e-mail: ubol_c@yahoo.com
4. ประวัติการศึกษา

B.Sc. (Nursing)	มหาวิทยาลัยมหิดล	พ.ศ. 2537
M.Sc. (Biotechnology)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	พ.ศ. 2541
Ph.D. (Tropical Medicine)	มหาวิทยาลัยมหิดล	พ.ศ. 2550
5. ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์ (นานาชาติ)

Thira Woratanarat, **Ubol Chuensumran**, Chanchana Siripanwattana, Wiroj Jiamjarasrangsee, Patarawan Woratanarat. (2015). Mitigating Health Inequity through Healthy Foods Network Development. SDU Research Journal (Special Issue: Tourism, Hospitality and Culinary Arts, Volume 11 January - December 2015). pp. 87-94.

Suriyaprom K, Phonrat B, **Chuensumran U**, Tungtrongchitr A, Tungtrongchitr R. Association of HTTLPR and 5-HT2A T102C polymorphisms with smoking characteristics and anthropometric profiles of Thai males. Genet Mol Res. 2012 Oct 15;11:

Saelee P, **Chuensumran U**, Wongkham S, Chariyalertsak S, Tiwawech D, Petmitr S. Hypermethylation of suppressor of cytokine signaling 1 in hepatocellular carcinoma patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(7):3489-93.

Chuensumran U, Saelee P, Punyarit P, Wongkham S, Pairojkul C, Chauin S, and Petmitr S. Ubiquitin-specific protease 14 expression associated with intrahepatic cholangiocarcinoma cell differentiation. Asian Pac J Cancer Prev. 2011; 12: 775-779.

Chuensumran U, Saelee P, Wongkham S, Pairojkul C, Chauin S, and Petmitr S. Histological type of intrahepatic cholangiocarcinoma differentiated by genetic alteration from AP-PCR fingerprint. Asian Pac J Cancer Prev. 2011; 12: 1377-80.

Saelee P, Wongkham S, Chariyalertsak S, Petmitr S, **Chuensumran U**. RASSF1A Promoter Hypermethylation as a Prognostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(6):1677-81.

Chuensumran U, Wongkham S, Pairojkul C, Chauin S, Petmitr S. Prognostic value of DNA alterations on chromosome 17p13.2 for intrahepatic cholangiocarcinoma. World J Gastroenterol. 2007; 13: 2986-91.