งานวิจัยเรื่อง

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

โดย

นางสาวอุบล ซื่นสำราญ
รศ. โสพิศ วงศ์คำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2555

งานวิจัยเรื่อง

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

โดย

นางสาวอุบล ชื่นสำราญ
(ปร.ด. อายุรศาสตร์เขตร้อน)
รศ. โสพิศ วงศ์คำ
(ปร.ด. ชีวเคมี)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2555

(งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554)

หัวข้อวิจัย การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
ผู้ดำเนินการวิจัย ดร.อุบล ชื่นสำราญ และ รศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ
ที่ปรึกษา รศ.ดร.ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร
ผศ.ยุพาภรณ์ ณ พัทลุง
หน่วยงาน โรงเรียนการเรือน
มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ปีงบประมาณ 2555

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ในปัจจุบันกำลังมีการศึกษาตัวบ่งชี้ทางโมเลกุลสำหรับโรคนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบเปลี่ยนแปลงของยีนในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีที่อยู่ในตับด้วยวิธีการขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *Ubiquitin-Specific Protease 14* หรือ *usp14* บนโครโมโซม 18 ซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงร้อยละ 52 ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว ด้วยเทคนิค RNA interference หรือ RNAi ในเบื้องต้นได้ทำการออกแบบโอลิโกสายสั้น (oligoduplex RNAi) จำนวน 3 ชุด แล้วทำการนำเข้าสู่เซลล์ไลน์ (transfection) ที่ใช้ทำการศึกษา ได้แก่ KKU-100 and M213 พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ไลน์ได้มากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับ RNAi negative ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่า RNAi ชุดที่ 1 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ KKU-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 ลำดับถัดไปควรจะมีการศึกษาสภาวะของเซลล์ไลน์หลังจากถูกยับยั้งยีน *usp 14* ได้แก่ Proliferation, Migration, และ Invasion เนื่องจากเป็นสภาวะที่พบได้ในเซลล์มะเร็ง

Research Title	Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 by RNA Interference (RNAi) in Cholangiocarcinoma Cell
Researcher	Dr. Ubol Chuensumran and Assoc.Prof.Dr. Sopit Wongkam
Research Consultants	Assoc.Prof.Dr. Songsak Petmitr Asst.Prof. Yupaporn Napatalung
Organization	School of Culinary Arts, Suan Dusit Rajabhat University
Fiscal Year	2012

ABSTRACT

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC), a malignant neoplasm of the biliary epithelium in the liver is a major health problem in Northeast Thailand. At present, the molecular marker finding of the disease has been elucidated. Previously, the genomic instabilities of Thai patients with 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 3 sets of oligoduplex RNAi were designed and used for transfection to cell lines including KKU-100 and M213 cells. The results showed that almost 90% of the cell lines were transfected with the RNAi compared with RNAi negative control. Gene expression (RNA level) was then studied using quantitative real-time PCR. The results showed that RNAi set no.1 has the highest efficiency in KKU-100 cell in 24 hour (93.35%). As well as, RNAi set no.3 has the highest efficiency in M213 cell in 72 hour (93.84%). The conclusion is that the designed RNAi (s) can be used to inhibit *usp14* gene expression. However, there are some conditions after gene was inhibited including the proliferation, migration, and invasion of the cells that frequently found in cancer cells should be studied.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาและมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ประสานและดูแลงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุพาภรณ์ ณ พัทลุง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต และ ศาสตราจารย์ ดร. ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดการวิจัย และให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้ง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนด้านชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยและตรวจสอบทางพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ฉ
สารบัญตาราง ซ
สารบัญภาพ ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญ 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย 4
ขอบเขตของโครงการวิจัย 4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
ความผิดปกติของยีน *K-ras* และ *p53* 7
ความผิดปกติของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis 8
ความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene) 8
การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนกลุ่ม growth factors 9

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 12
รูปแบบการวิจัย 12
วัตถุดิบ 12
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย 12
สารเคมีที่ใช้ 13

หน้า

การดำเนินงานวิจัย 14

บทที่ 4 ผลการวิจัย 18

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 27

รายการอ้างอิง 30

ประวัติผู้วิจัย 34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	จำนวนเท่าในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซม 18p11 วิเคราะห์โดยเทคนิค real-time PCR	3
4.1	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ	22
4.2	ความเข้มข้นของ cDNA	23
4.3	ค่า crossing point จากเครื่อง real time PCR นำมาคำนวณเปรียบเทียบกับ negative control	24

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	เซลล์ KKU-100	20
4.2	เซลล์ M213	21
4.3	เปรียบเทียบการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14*	26