

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็งท่อน้ำดีมีลักษณะการดำเนินโรคที่ค่อนข้างช้า ทำให้กว่าจะสามารถตรวจพบได้ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่ก็อยู่ในระยะสุดท้าย หรือมีการแพร่ลุกลามของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ แล้วส่งผลให้การรักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการก่อโรคมะเร็งชนิดนี้ในระดับโมเลกุลเพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการป้องกัน การดูแลรักษา และการติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป็นเรื่องที่สำคัญมาก นอกจากนั้นผลการวิจัยทางด้านนี้ยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งในระยะแรกเริ่ม โดยคัดเลือกยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นอันดับแรกเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นหรือชักนำให้เป็นมะเร็ง นำมาใช้ในการออกแบบตัวตรวจจับเพื่อตรวจหาชิ้นที่ผ่าเหล่าในเซลล์ของผู้ป่วย ประโยชน์อีกด้านหนึ่งคือคัดเลือกยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ชั้นร้ายแรง (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, Pairajkul, Chauin, & Petmitr, 2007, pp. 2986-2991) ทำให้ทราบสภาพการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ของผู้ป่วยไทย โดยเบื้องต้นใช้วิธีขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *usp14* บนโครโมโซม 18 และเมื่อวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR ของยีนดังกล่าว พบว่าจำนวนชุดของยีนมีการเปลี่ยนแปลง (gene variation) 52% (27/52 ราย) ดังแสดงใน [ตารางที่ 1](#) ทางผู้วิจัยจึงทำการวิจัยต่อยอดเพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RNAi และแนวโน้มในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

ตารางที่ 1.1 จำนวนเท่าในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซม 18p11 วิเคราะห์โดยเทคนิค
real-time PCR

รายชื่อ	จำนวน (เท่า)	หมายเหตุ	รายชื่อ	จำนวน (เท่า)	หมายเหตุ
1	1.292	-	28	1.102	-
2	1.395	-	29	1.329	-
3	1.021	-	30	0.438	(Loss)
4	1.149	-	31	0.490	(Loss)
5	2.445	(Amp)	32	2.751	(Amp)
6	0.807	-	33	1.705	(Amp)
7	0.551	-	34	13.361	(Amp)
8	1.516	(Amp)	35	2.144	(Amp)
9	1.035	-	36	1.879	(Amp)
10	1.079	-	37	3.732	(Amp)
11	1.505	(Amp)	38	6.190	(Amp)
12	0.717	-	39	2.114	(Amp)
13	2.129	(Amp)	40	1.625	(Amp)
14	1.395	-	41	7.160	(Amp)
15	1.474	(Amp)	42	3.272	(Amp)
16	0.758	-	43	0.747	-
17	0.566	-	44	1.558	(Amp)
18	1.181	-	45	3.630	(Amp)
19	0.933	-	46	17.388	(Amp)
20	0.883	-	47	2.362	(Amp)
21	1.474	(Amp)	48	1.197	-
22	0.835	-	49	6.498	(Amp)
23	1.094	-	50	1.223	-
24	0.908	-	51	4.377	(Amp)
25	1.072	-	52	5.657	(Amp)
26	1.189	-	Amp	25/52	(48%)
27	2.028	(Amp)	Loss	2/52	(4%)

Amp คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ≥ 1.5 เท่า; Loss คือ การลดปริมาณดีเอ็นเอ ≤ 0.5 เท่า

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

จากตารางที่ 1.1 พบว่า มีการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอบนยีน *usp14* ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 48% ซึ่งนับว่าสูงมาก จึงน่าจะนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมาศึกษาว่าเกี่ยวข้องกับ oncogene หรือไม่

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

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ออกแบบ RNAi จำนวน 3 ชุด แล้วนำไปทำการศึกษาในเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย เพื่อศึกษาการยับยั้งของยีน *usp14* ในเซลล์ไลน์ดังกล่าว แล้วทำการเลือก RNAi ที่ให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งดีที่สุด เพื่อนำมาศึกษาสถานะของเซลล์ ได้แก่ Proliferation, Migration และ Invasion

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 และหน่วยงานที่ทำงานวิจัย
ทางด้านอณูชีววิทยาของโรคมะเร็ง

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) เป็นมะเร็งที่ถือว่าร้ายแรงที่สุดชนิดหนึ่ง มีการพยากรณ์โรคไม่ดี เพราะอัตราการเกิดโรคและอัตราการตายมีจำนวนพอๆ กัน ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดนี้สูง โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการสำรวจพบผู้ป่วยของจังหวัดขอนแก่น (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) โดยสามารถตรวจพบแอนติเจนได้ในเซลล์เยื่อท่อน้ำดีและบริเวณรอบท่อน้ำดี นอกจากนี้ยังพบแอนติเจนใน macrophage, epithelioid cell และ giant cell แม้จะไม่พบตัวพยาธิก็ตาม กระบวนการเกิด CCA ประกอบไปด้วยการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่พบภาวะ early hyperplastic (อาจพบ metaplastic ได้ในบางครั้ง) แล้วตามด้วย dysplasia จนกระทั่งเป็นมะเร็ง ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการติดพยาธิใบไม้ตับ การอักเสบเรื้อรัง และการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อท่อน้ำดี โดยอาจเกิดร่วมกับการมีการอุดตันของท่อน้ำดี การเกิดภาวะ primary sclerosing cholangitis (PSC), hepatolithiasis, Caroli's disease และ congenital choledochal cysts เป็นต้น

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดี นำมาสรุปเพื่ออธิบายบทบาทที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคได้ดังนี้คือ

ความผิดปกติของยีน *K-ras* และ *p53*

จากรายงานการวิจัยหลายฉบับพบว่ามีการกลายพันธุ์ (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 จากรายงานการวิจัยพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *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

ในเซลล์ปกติจะมีความทำงานของยีนและโปรตีนที่มีบทบาทในการกระตุ้นและยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ 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 เซลล์จะมีระบบซ่อมแซมด้วยกลุ่มเอ็นไซม์ที่เรียกว่า 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* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมในกรณีที่มี DNA mismatch เกิดขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของยีนดังกล่าวลดต่ำลง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น (Liu, Momoi, Li, Ishikawa, & Fukumoto, 2002, pp. 366-371; Limpaiboon, Krissadarak, Sripa, Jearanaikoon, Buhisawasdi, 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 เหล่านี้จะมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อยู่ตลอดเวลาโดยเฉพาะเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติอยู่แล้ว 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 ยับยั้งการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีในท่อขนาดเล็ก 2) ทำให้ยีน COX-2 (cyclooxygenase-2) แสดงออกมากขึ้น ส่งเสริมให้มีการเจริญของเซลล์ และยับยั้งกระบวนการ apoptosis

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

โปรตีน Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) จัดอยู่ในกลุ่ม UBP ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้ บางตัวมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับมะเร็ง (เนื่องจากควบคุมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการตายของเซลล์) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 18% มีโปรตีน USP14 ที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับพยาธิสภาพ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมาอย่างต่อเนื่อง น้ำเหลืองและตับ และมีอัตราการรอดชีวิต (survival rate) ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปริมาณต่ำกว่า (Shinji, Naito, Ishiwata, Ishiwata, Tanaka, *et al.*, 2006, pp. 539-543) นอกจากนี้ ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *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 ในหนอนนีมาโทดาที่โปร่งใส 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) หลังจากผู้ป่วยผ่าตัดก้อนเนื้อออก (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 นอกจากนี้ยังมียื่นอื่นๆ ที่บริษัทยากำลังพัฒนา ได้แก่ M2 subunit ของเอนไซม์ ribonucleotide reductase และโปรตีนไคเนส N3 (Sripa, Leungwattanawanit, Nitta, Wongkham, Bhudhisawasdi, *et al.*, 2005, pp. 3392-3397)

การศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง เพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *usp14* ในเซลล์ไลน์ของ มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย 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. หลอดไมโครพิพพ์
10. เจลแชนเบอร์
11. เครื่อง DNA Thermal Cycler

12. Vortex mixer
13. เครื่องไมโครพิพม์
14. Tip ขนาด 1ไมโครลิตร, 20 ไมโครลิตร และ100ไมโครลิตร
15. capillary สำหรับเครื่อง LightCycler (Roche)
16. ไมโครปิเปตขนาด 1-20 ไมโครลิตร, 1-100 ไมโครลิตร, และ 1-1000ไมโครลิตร
17. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (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 polmerase
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. เซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย ได้รับจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Sripa, Leungwattananit, Nitta, Wongkham, Bhudhisawasdi, *et al.*, 2005, pp. 3392-3397) โดยมีเซลล์ไลน์ 2 ชนิด แยกตามลักษณะของเซลล์ 1) KKK100 เป็นชนิด poorly differentiated และ 2) M213 เป็นชนิด well differentiated เซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 10% Fetal bovine serum, และ 1% penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5%

เซลล์ไลน์ M213 ใช้ในการศึกษาเรื่องการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (invasive)

3. การนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ไลน์

นำโอลิโก RNAi ทั้ง 3 ชุด เข้าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (transfection) โดยใช้ฟลูออเรสเซนท์ BLOCK-iT (Invitrogen) ในการติดตามประสิทธิภาพของการนำโอลิโก RNAi เข้าสู่เซลล์ 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 หลังจากนั้น ดูดมา 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. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไลน์

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไลน์ ทำได้ดังนี้

1. เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง (เซลล์จะเกาะที่ผิวของฟลาค์หรือเพลท) 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 เติมเอทานอล 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 โดยใช้อปิเปตดูดขึ้น-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 (ไม่ใส่ 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 ในแต่ละหลอดคอปิลลารี (LightCycler glass capillary) ซึ่งประกอบด้วย LightCycler Mastermix 18 ไมโครลิตร (น้ำ 8.8 ไมโครลิตร, MgCl₂ 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 เติมนิวคลีโอไทด์ 2 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม)

สภาวะของพีซีอาร์ 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

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ออกแบบ RNAi

ได้ oligoduplex RNAi จำนวน 3 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

Primer 2.1: (RNA) – UAG AGU AGA ACG UAA GCG AUA UGC C (USP14-HSS113438) ความเข้มข้น 293.4 OD/ μ mol

Primer 2.2: (RNA) – GGC AUA UCG CUU ACG UUC UAC UCU A (USP14-HSS113438) ความเข้มข้น 253.8 OD/ μ mol

Primer 3.1: (RNA) – UAC CAU UCG AGG UUC AUC UGU AUU C (USP14-HSS189873) ความเข้มข้น 259.5 OD/ μ mol

Primer 3.2: (RNA) – GAA UAC AGA UGA ACC UCC AAU GGU A (USP14-HSS189873) ความเข้มข้น 292.5 OD/ μ mol

4.2 คัดเลือกเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย

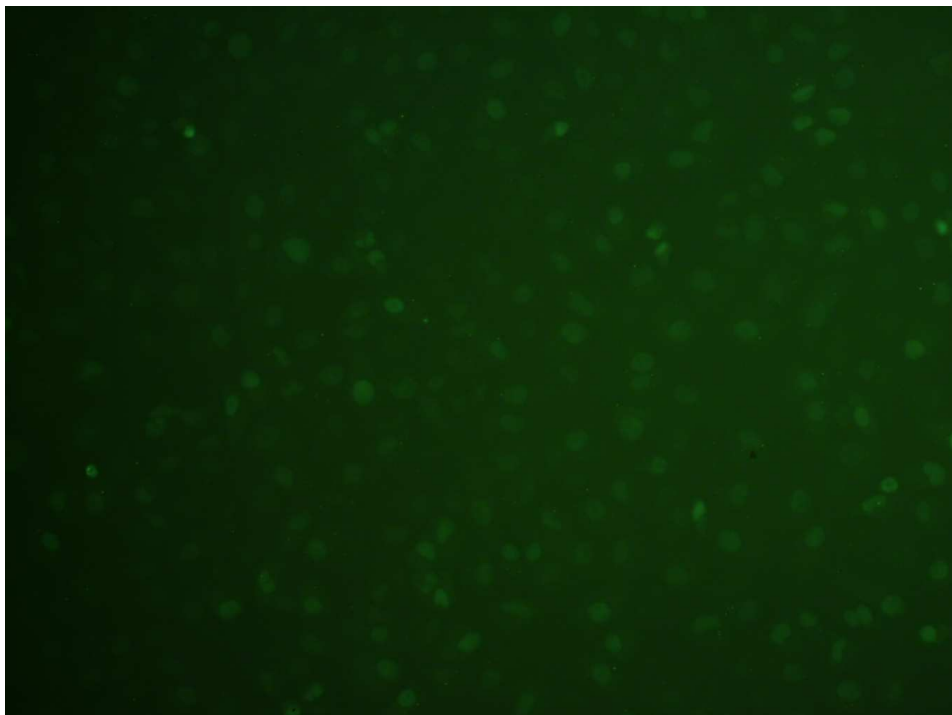
เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย ได้รับจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีเซลล์ไลน์ 2 ชนิด แยกตามลักษณะของเซลล์ 1) KKU100 เป็นชนิด poorly differentiated และ 2) M213 เป็นชนิด well differentiated เซลล์ไลน์ทั้งสองชนิด ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 10% Fetal bovine serum, และ 1% penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5%

เซลล์ไลน์ M213 ใช้ในการศึกษาเรื่องการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (invasive)

4.3 นำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ไลน์

4.3.1 ตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ (Transfection)

การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ (Transfection) โดยใช้ BLOCK-iT Fluorescent Oligo (Invitrogen) โดยโอลิโกเส้นคู่ดังกล่าว (dsRNA) จะติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อนำไปตรวจด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่าโอลิโกสามารถเข้าเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 90 ดังภาพที่ 4.1-4.2

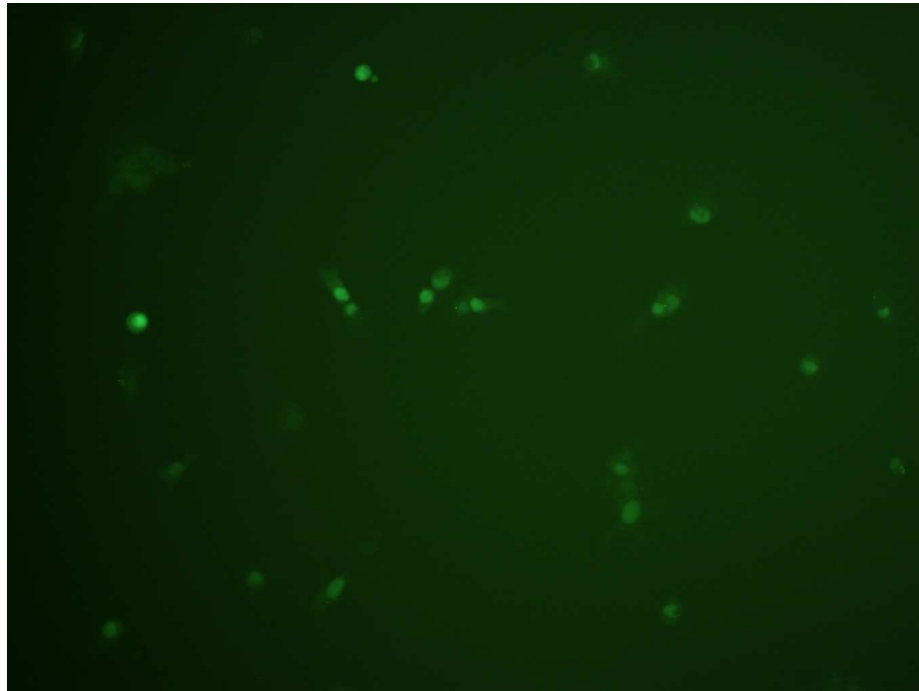


(a)



(b)

ภาพที่ 4.1 เซลล์ KKU-100 (a) แสงฟลูออเรสเซนส์ (b) แสงขาว



(a)



(b)

รูปที่ 4.2 เซลล์ M213 (a) แสงฟลูออเรสเซนซ์ (b) แสงขาว

4.3.2 การนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์เปรียบเทียบกับ RNAi negative control (Transfection)

นำโอลิโก RNAi ทั้ง 3 ชุด ที่ได้ออกแบบไว้ นำเข้าเซลล์ KKU-100 และ M213 ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 โดยมี RNAi negative control ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง

4.3.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ

(1) การสกัด total RNA จากเซลล์ในข้อ 4.3.2 นำไปวัดความเข้มข้น (Nanodrop) ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ng/μl)		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
KKU100-RNAi ชุดที่ 1	739.64	556.79	862.30
KKU100-RNAi ชุดที่ 2	668.01	641.17	1097.60
KKU100-RNAi ชุดที่ 3	635.17	537.99	752.80
KKU100-RNAi negative	938.57	1194.12	1402.36
M213-RNAi ชุดที่ 1	825.88	969.36	1022.37
M213-RNAi ชุดที่ 2	851.31	1078.35	631.70
M213-RNAi ชุดที่ 3	2441.44	1321.62	2348.36
M213-RNAi negative	886.43	1126.39	1926.27

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

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของ cDNA

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl)		
	24 ช.ม.	48 ช.ม.	72 ช.ม.
KKU100-RNAi ชุดที่ 1	2301.17	2165.76	1114.50
KKU100-RNAi ชุดที่ 2	2319.50	2262.54	1567.26
KKU100-RNAi ชุดที่ 3	2427.98	2223.40	1708.78
KKU100-RNAi negative	2131.09	2314.91	1942.05
M213-RNAi ชุดที่ 1	1456.67	2294.92	2221.03
M213-RNAi ชุดที่ 2	1286.73	2403.99	2273.92
M213-RNAi ชุดที่ 3	1749.67	2246.97	2490.57
M213-RNAi negative	1860.98	2235.91	2520.78

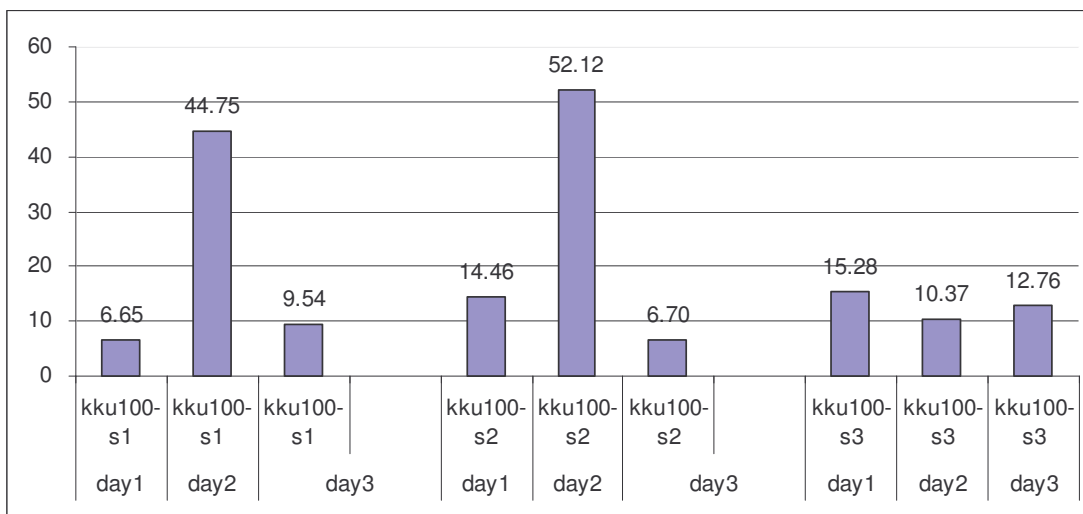
(3) ทำ quantitative real-time PCR โดยใช้ปริมาณ cDNA ตัวอย่างละ 25 นาโนกรัม ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3 พบว่า RNAi ชุดที่ 1 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ KKU-100 ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้มากที่สุด (ร้อยละ 93.35) และ พบว่า RNAi ชุดที่ 3 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ M213 ในเวลา 72 ชั่วโมง ได้มากที่สุด (ร้อยละ 93.84)

ตารางที่ 4.3 ค่า crossing point จากเครื่อง real time PCR นำมาคำนวณเปรียบเทียบกับ negative control

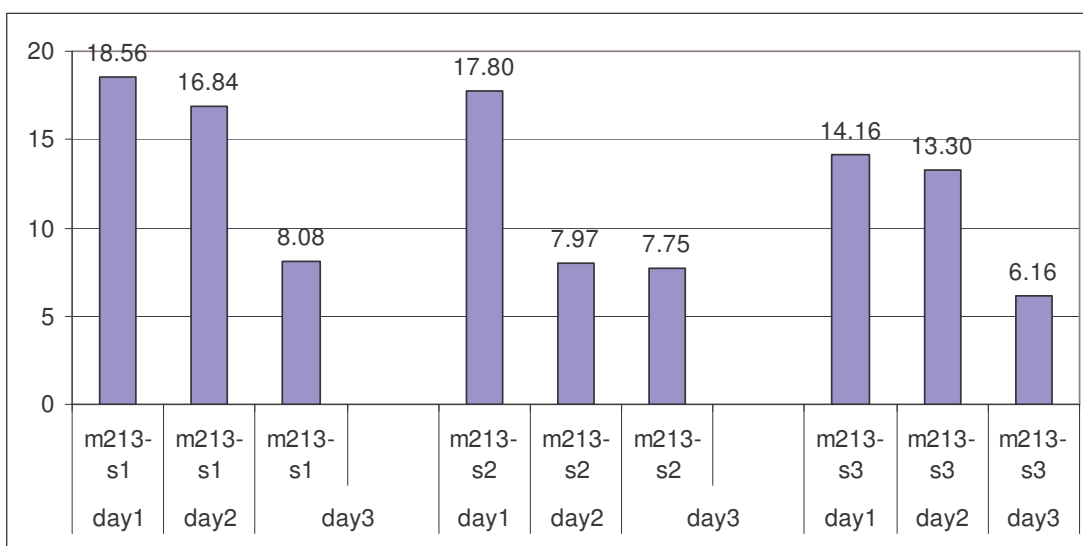
no	case	actin		Δ actin	usp14-224		Δ case	Δ case - Δ actin	Conc.1/2 ^{Δ}	express(%)	Results
		N	T		N	T					
day1	kku100-s1	22.95	21.58	-1.37	27.33	29.87	2.54	3.91	0.07	6.65	Loss
day1	kku100-s2	22.95	21.84	-1.11	27.33	29.01	1.68	2.79	0.14	14.46	Loss
day1	kku100-s3	22.95	22.48	-0.47	27.33	29.57	2.24	2.71	0.15	15.28	Loss
day1	kku100-s-	22.95	22.95	0.00	27.33	27.33	0.00	0.00	1.00	100.00	Normal
day1	m213-s1	18.63	18.07	-0.56	25.04	26.91	1.87	2.43	0.19	18.56	Loss
day1	m213-s2	18.63	18.33	-0.30	25.04	27.23	2.19	2.49	0.18	17.80	Loss
day1	m213-s3	18.63	20.54	1.91	25.04	29.77	4.73	2.82	0.14	14.16	Loss
day1	m213-s-	18.63	18.63	0.00	25.04	25.04	0.00	0.00	1.00	100.00	Normal
day2	kku100-s1	25.49	21.03	-4.46	32.23	28.93	-3.30	1.16	0.45	44.75	Loss
day2	kku100-s2	25.49	21.24	-4.25	32.23	28.92	-3.31	0.94	0.52	52.12	Loss
day2	kku100-s3	25.49	23.80	-1.69	32.23	33.81	1.58	3.27	0.10	10.37	Loss
day2	kku100-s-	25.49	25.49	0.00	32.23	32.23	0.00	0.00	1.00	100.00	Normal
day2	m213-s1	21.94	21.63	-0.31	26.93	29.19	2.26	2.57	0.17	16.84	Loss
day2	m213-s2	21.94	21.54	-0.40	26.93	30.18	3.25	3.65	0.08	7.97	Loss
day2	m213-s3	21.94	21.58	-0.36	26.93	29.48	2.55	2.91	0.13	13.30	Loss
day2	m213-s-	21.94	21.94	0.00	26.93	26.93	0.00	0.00	1.00	100.00	Normal

ตารางที่ 4.3 ค่า crossing point จากเครื่อง real time PCR นำมาคำนวณเปรียบเทียบกับ negative control (ต่อ)

no	case	actin		Δ actin	usp14-224		Δ case	Δ case - Δ actin	Conc.1/2 ^{Δ}	express(%)	Results
		N	T		N	T					
day3	kku100-s1	22.51	22.25	-0.26	28.13	31.26	3.13	3.39	0.10	9.54	Loss
day3	kku100-s2	22.51	22.14	-0.37	28.13	31.66	3.53	3.90	0.07	6.70	Loss
day3	kku100-s3	22.51	22.59	0.08	28.13	31.18	3.05	2.97	0.13	12.76	Loss
day3	<i>kku100-s-</i>	22.51	22.51	0.00	28.13	28.13	0.00	0.00	1.00	100.00	Normal
day3	m213-s1	23.80	18.07	-5.73	29.01	26.91	-2.10	3.63	0.08	8.08	Loss
day3	m213-s2	23.80	18.33	-5.47	29.01	27.23	-1.78	3.69	0.08	7.75	Loss
day3	m213-s3	23.80	20.54	-3.26	29.01	29.77	0.76	4.02	0.06	6.16	Loss
day3	<i>m213-s-</i>	23.80	23.80	0.00	29.01	29.01	0.00	0.00	1.00	100.00	Normal



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ KKU-100 (ก) และ M213 (ข)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อยอดจากปีงบประมาณ 2552 ซึ่งทราบสภาพการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยไทย โดยเบื้องต้นใช้วิธีขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *usp14* บนโครโมโซม 18 และเมื่อวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR ของยีนดังกล่าว พบว่าจำนวนชุดของยีนมีการเปลี่ยนแปลง (gene variation) 52% (27/52 ราย) ทางคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RNAi และแนวโน้มในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

โดยเริ่มจากการออกแบบโอลิโกสายสั้น หรือ oligoduplex RNAi จำนวน 3 ชุด บนยีน *usp14* โดยเลือกชนิด Modified RNA duplexes (Stealth) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

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);

RNAi 2.1 – UAG AGU AGA ACG UAA GCG AUA UGC C (USP14-HSS113438);

RNAi 2.2 – GGC AUA UCG CUU ACG UUC UAC UCU A (USP14-HSS113438);

RNAi 3.1 – UAC CAU UCG AGG UUC AUC UGU AUU C (USP14-HSS189873);

RNAi 3.2 – GAA UAC AGA UGA ACC UCC AAU GGU A (USP14-HSS189873)

หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีเซลล์ไลน์ 2 ชนิด แยกตามลักษณะของเซลล์ 1) KKKU100 เป็นชนิด poorly differentiated และ 2) M213 เป็นชนิด well differentiated เซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 10% Fetal bovine serum, และ 1% penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาเรื่องการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (invasive) คือ M213

เมื่อนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ไลน์ ต้องทำการตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์ (Transfection) โดยใช้ BLOCK-iT Fluorescent Oligo (Invitrogen) โดยโอลิโกเส้นคู่ดังกล่าว (dsRNA) จะติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อนำไปตรวจด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 90 หลังจากนั้นจึงนำโอลิโก

RNAi ทั้ง 3 ชุด ที่ได้ออกแบบไว้ เข้าเซลล์ KKU-100 และ M213 ตามสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น โดยมีตัวควบคุม คือ RNAi negative control ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง

แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ เริ่มตั้งแต่การสกัด total RNA จากเซลล์ไลน์ที่ถูก Transfection ด้วยโอลิโก RNAi แล้ว นำไปสร้าง First strand (cDNA) หลังจากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ โดยทำ 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)

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 1::RNAi 2

```
Query 1 GGCATATCGCTTACGTTCTACTCTA 25
      |||
Sbjct 1631 GGCATATCGCTTACGTTCTACTCTA 1655
```

Variant 1::RNAi 3

```
Query 1 GAATACAGATGAACCTCCAATGGTA 25
      |||
Sbjct 276 GAATACAGATGAACCTCCAATGGTA 300
```

Variant 2::RNAi 1

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

Variant 2::RNAi 2

```
Query 1 GGCATATCGCTTACGTTCTACTCTA 25
        |||
Sbjct 1526 GGCATATCGCTTACGTTCTACTCTA 1550
```

Variant 2::RNAi 3

```
Query 1 GAATACAGATGAACCTCCAATGGTA 25
        |||
Sbjct 276 GAATACAGATGAACCTCCAATGGTA 300
```

พบว่า RNAi 1 และ 2 อยู่บนเอ็กซอน (exon) 16 ในขณะที่ RNAi 3 อยู่บนเอ็กซอนที่ 2 นอกจากนั้น เซลล์ไลน์ K KU-100 เป็นเซลล์ชนิด poor differentiated ในขณะที่เซลล์ไลน์ M213 เป็นเซลล์ชนิด well differentiated (Sripa, Leungwattanawanit, Nitta, Wongkham, Bhudhisawasdi, *et al.*, 2005, pp. 3392-3397) จึงเป็นไปได้ที่ RNAi จะยับยั้งการแสดงออกของ ยีนได้แตกต่างกัน

จากการที่ RNAi ชุดที่ 1 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ K KU-100 ได้มากที่สุด ในเวลา 24 ชั่วโมง และ พบว่า RNAi ชุดที่ 3 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ M213 ได้มากที่สุด ในเวลา 72 ชั่วโมง ทั้งนี้ เซลล์ไลน์ M213 เป็นชนิดลุกลาม (invasive) แตกต่างจากเซลล์ไลน์ชนิด K KU-100 ซึ่งไม่ลุกลาม เมื่อเวลามากขึ้น เซลล์มีการเพิ่มจำนวน ทำให้โปรตีนดังกล่าวเพิ่มปริมาณมากขึ้น

จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ได้จริง ลำดับถัดไปควรจะมีการศึกษาสภาวะของเซลล์ไลน์หลังจากถูกยับยั้งยีน *usp 14* ได้แก่ Proliferation, Migration, และ Invasion เนื่องจากเป็นสภาวะที่พบได้ในเซลล์มะเร็ง

รายการอ้างอิง

- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Leungwattanawanit, 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., Bhamarapavati, 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., Buddhisawasdi, 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 มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

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. ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

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.

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, 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.