



รายงานการวิจัย  
เรื่อง

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีน USP14 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง  
โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์  
(Functional Specific Roles of USP14 in Cholangiocarcinoma Cell Line  
Using Proteomic Techniques)

ผศ.ดร.อุบล ชื่นสำราญ  
ผศ.ดร.อรภัค เรียมทอง

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต  
2560  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต





รายงานการวิจัย  
เรื่อง

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีน USP14 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง  
โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์  
(Functional Specific Roles of USP14 in Cholangiocarcinoma Cell  
Line Using Proteomic Techniques)

ผศ.ดร.อุบล ชื่นสำราญ  
(โรงเรียนการเรือน)  
ผศ.ดร.อรภัค เรียมทอง  
(มหาวิทยาลัยมหิดล)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559)

หัวข้อวิจัย            การศึกษาหน้าที่ของโปรตีน USP14 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิค  
   โปรตีโอมิกส์

ผู้ดำเนินการวิจัย    ผศ.ดร.อุบล ชื่นสำราญ และ ผศ.ดร.อรภาค์ เรียมทอง

ที่ปรึกษา                ศ.ดร.ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร

หน่วยงาน              โรงเรียนการเรือน  
   มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ปี พ.ศ.                 2560

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาหน้าที่ของยีน *usp14* หลังจากถูก knockout ส่งผลต่อโปรตีนอื่นในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างไร และ 2) เปรียบเทียบโปรตีนในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ก่อนและหลังการ knockout ยีน *usp14* โดยทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ด้วยโอลิโกสายสั้น (oligoduplex RNAi) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (transfection) เปรียบเทียบกับ RNAi negative ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry based proteomics ผลการวิจัยพบว่า RNAi ที่ออกแบบไว้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในเวลา 24 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 คือ unnamed protein product (Accession no. 32097) มีมากกว่าปกติ 5.19 เท่า ในขณะที่ Histone H2A.2 (Accession no. 31979) มีน้อยกว่าปกติ 6.33 เท่า จากการที่เอนไซม์ Ubiquitin specific protease 14 (USP14) ทำหน้าที่ควบคุมความยาวของสายโปรตีน Ubiquitin ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในเซลล์ จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ทางการแพทย์

<b>Research Title</b>	Functional specific roles of <i>usp14</i> in Cholangiocarcinoma cell line using proteomic techniques.
<b>Researcher</b>	Asst. Prof. Dr. Ubol Chuensumran and Asst. Prof. Dr. Onrapak Reamtong
<b>Research Consultants</b>	Prof. Dr. Songsak Petmitr
<b>Organization</b>	School of Culinary Arts, Suan Dusit University
<b>Year</b>	2017

This research aimed to study 1) function of *usp14* gene after be knockout, consequence to other proteins in cell lines (M213 and KKU100) of cholangiocarcinoma cells and 2) comparison protein patterns in cell lines after the gene was knockout. RNAi. *Ubiquitin- Specific Protease 14* gene inhibition by RNA interference (RNAi) technique. In this study, the oligoduplex RNAi was designed and used for transfection to cell lines of cholangiocarcinoma cells compared with RNAi negative control in 24 hours. Gene expression (protein level) was then studied using Mass spectrometry based proteomics. The results showed that the highest protein changed in M213 cell line was unnamed protein product (Accession no. 32097) -- 5.19 times. Meanwhile, Histone H2A.2 (Accession no. 31979) was lesser than normal 6.33 times. 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 ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดการวิจัย ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษา บุญยืน และบุคลากรในภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเซลล์

คณะผู้วิจัย

2560

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
<b>บทที่ 1    บทนำ</b>	<b>1</b>
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
<b>บทที่ 2    แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>4</b>
ความผิดปกติของยีน <i>K-ras</i> และ <i>p53</i>	4
ความผิดปกติของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis	5
ความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene)	6
การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนกลุ่ม growth factors	6
กรอบแนวความคิดในการวิจัย	8
<b>บทที่ 3    วิธีดำเนินการวิจัย</b>	<b>9</b>
รูปแบบการวิจัย	9
วัสดุดิบ	9
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย	9
สารเคมีที่ใช้	10
การดำเนินงานวิจัย	10
<b>บทที่ 4    ผลการวิจัย</b>	<b>16</b>
<b>บทที่ 5    สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ</b>	<b>30</b>

บรรณานุกรม	32
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	32
ประวัติผู้วิจัย	36
ผศ.ดร.อุบล ชื่นสำราญ	36
ผศ.ดร.อรภัค เรียมทอง	38

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน <i>usp14</i> (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0)	17

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	โปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 ที่มีการแสดงออกมากขึ้น (up regulated) หลังจากยับยั้งยีน <i>usp14</i>	28
4.2	โปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 ที่มีการแสดงออกลดลง (down regulated) หลังจากยับยั้งยีน <i>usp14</i>	29

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็งท่อน้ำดีมีลักษณะการดำเนินโรคที่ค่อนข้างช้า ทำให้กว่าจะสามารถตรวจพบได้ ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่ก็อยู่ในระยะสุดท้าย หรือมีการแพร่ลุกลามของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ แล้ว ส่งผลให้การรักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้น การศึกษาถึงกลไกการก่อโรคมะเร็งชนิดนี้ในระดับโมเลกุล เพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการป้องกัน การดูแลรักษา และการติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป็นเรื่องที่สำคัญมาก นอกจากนี้ผลการวิจัยทางด้านนี้ยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งในระยะแรกเริ่ม 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 KLU-100 and M213 พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ไลน์ได้

มากกว่าร้อยละ 90 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 อย่างไรก็ตาม รูปแบบการแสดงออกของยีนของเซลล์ไลน์อาจจะไม่เหมือนในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงขอทำโครงการวิจัยต่อยอด เพื่อนำ RNAi ที่ได้ออกแบบไว้แล้วไปศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนว่าเมื่อยีนเป้าหมายถูกยับยั้งแล้วจะมีผลกระทบต่อโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์อย่างไร ซึ่งจะใช้เซลล์ปฐมภูมิหรือเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงในพลาสติกเป็นเซลล์ต้นแบบ ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ทราบแนวโน้มในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *usp14* หลังจากถูก knockout ส่งผลต่อโปรตีนอื่นในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างไร
- 2) เพื่อเปรียบเทียบโปรตีนในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ก่อนและหลังการ knockout ยีน *usp14*

### ขอบเขตการวิจัย

เลี้ยงเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย (KKU100 และ/หรือ M213) แล้วนำโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้แล้ว ไปทำการยับยั้งของยีน *usp14* ในเซลล์ดังกล่าว แล้วทำการศึกษารูปแบบแผนภาพการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry based proteomics

### คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

*Ubiquitin-Specific Protease14 (usp14)* คือ ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในกลุ่มโปรติเอส

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

Intrahepatic Cholangiocarcinoma (ICC) คือ มะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่อยู่ในตับ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี และอาจนำไปใช้กับโรคมะเร็งอื่นๆ
2. นำไปเผยแพร่ในวารสารนานาชาติ

ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Protein profile of USP14 inhibited by Small Interfering RNA in Cholangiocarcinoma cells.

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 และพบวาร์้อยละ 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 macrophagee, 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*

จากรายงานการวิจัยหลายฉบับพบว่ามี การกลายพันธุ์ (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) เมื่อไม่ให้ความผิดปกตินั้นถ่ายทอดถึงเซลล์รุ่นหลัง 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 เช่นการเกิดปฏิกิริยา hypermethylation ในบริเวณตำแหน่ง promoter ของยีน *hMLH1* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม ในกรณีที่มี DNA mismatch เกิดขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของยีนดังกล่าวลดต่ำลง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น (Liu, Momoi, Li, Ishikawa, & Fukumoto, 2002, pp. 366-371; Limpiboon, Krissadarak, Sripan, Jearanaikoon, Buhisawasdi, *et al.*, 2002, pp. 215-222)

### การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนกลุ่ม growth factors และ cytokines ต่างๆ

จากการศึกษาพบว่า growth factors และ cytokines หลายชนิดที่มีบทบาทกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อเนื้อเยื่อแบ่งตัว เช่น interleukin-6 (IL-6), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), 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 เหล่านี้ยังถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อเนื้อเยื่อ 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- $\alpha$ , 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 โดยพบว่ามี การเพิ่มขึ้น (Amplification) 48% (25/52 ราย)

โปรตีน Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) จัดอยู่ในกลุ่ม UBP ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้ บางตัวมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับมะเร็ง (เนื่องจากควบคุมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการตายของเซลล์) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 18% มีโปรตีน USP14 ที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับพยาธิสภาพ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมาอย่างต่อเนื่องและต่ำ และมีอัตราการรอดชีวิต (survival rate) ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปริมาณต่ำกว่า (Shinji, Naito, Ishiwata, Ishiwata, Tanaka, et al., 2006, pp. 539-543) นอกจากนี้ ยังพบว่ามี การแสดงออกของยีน *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) หลังจากที่ผู้ป่วยผ่าตัดก้อนเนื้อออก (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 และโปรตีนไคเนส N3 (Sripa, Leungwattanawanit, Nitta, Wongkham, Bhudhisawasdi, *et al.*, 2005, pp. 3392-3397)

จากการศึกษาวิจัยเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ KKU-100 and M213 พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ไลน์ได้มากกว่าร้อยละ 90 หลังจากศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR อย่างไรก็ตาม รูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการแสดงออกของยีนและสำคัญที่สุด อาจจะมีผลต่อโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงขอเสนอโครงการวิจัยต่อยอด เพื่อนำโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้แล้วไปศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนว่าเมื่อยีนเป้าหมายถูกยับยั้งแล้วจะมีผลกระทบต่อโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์อย่างไร ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบวิถีเมแทบอลิซึมของโปรตีน USP14 และมีแนวโน้มในการนำไปใช้รักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่อไป

### 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)

#### วัตถุประสงค์

เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยที่นำมาทำการวิจัยได้รับอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

#### อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย ได้แก่

1. Tissue Culture Hood ชนิด Laminar-flow โดยกรองอากาศผ่าน High Efficiency Particulate Air (HEPA) filter
2. CO<sub>2</sub> 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. เครื่องไมโครพิพพ์
14. Tip ขนาด 1ไมโครลิตร, 20 ไมโครลิตร และ100ไมโครลิตร
15. capillary สำหรับเครื่อง LightCycler (Roche)
16. ไมโครปิเปตขนาด 1-20 ไมโครลิตร, 1-100 ไมโครลิตร, และ 1-1000ไมโครลิตร
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 polmerase
15. ชุดน้ำยา SYBR สำหรับ real-time PCR
16. อะกาโรส

### การดำเนินงานวิจัย

1. คัดเลือกโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้ ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการ knockdown ยีน *usp14* โดยเลือกชนิด Modified RNA duplexes (Stealth) จากฐานข้อมูล [www.invitrogen.com/rnai](http://www.invitrogen.com/rnai)

2. คัดเลือกเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

#### ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย ได้รับจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Sripa, Leungwattanawanit, Nitta, Wongkham, Bhudhisawasdi, *et al.*, 2005, pp. 3392-3397) โดยมีเซลล์ไลน์ M213 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่มีต้นกำเนิดจากมะเร็งท่อน้ำดีชนิด well differentiated เซลล์ไลน์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 10% Fetal bovine serum, และ 1% penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

เซลล์ไลน์ M213 ใช้ในการศึกษาเรื่องการลุกลามของเซลล์มะเร็ง (invasive)

3. นำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (transfection) โดยใช้พลาสมิด 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 หลังจากนั้นดูตาม 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) โดย Stealth RNAi จะมี 2 แบบ คือ 1) Stealth RNAi-*usp14* เรียกว่า S1 และ 2) Stealth RNAi-negative ใช้เป็นตัวควบคุม เรียกว่า S0

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

4) บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. วิเคราะห์สภาวะของเซลล์ หลังจากถูก transfected ด้วย RNAi ในข้อ (3) ได้แก่ Proliferation, Migration, และ Invasion

5. นำเซลล์ไลน์ที่ถูก transfected ด้วย RNAi ในข้อ (3) ไปวิเคราะห์การยับยั้งการแสดงออกของยีน *Usp14* (ปริมาณ mRNA) ด้วยเทคนิค Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

#### การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไลน์

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไลน์ ทำได้ดังนี้

1) เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง (เซลล์จะเกาะที่ผิวของพลาสติกหรือเพลท) 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 นำใสหลอดใหม่ 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 ตะกอนอาร์เอ็นเอจะมีลักษณะใสดุจคล้ายเจลที่ก้นหลอด
- 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

### การสังเคราะห์ First-Strand cDNA ด้วย Superscript VILO

การสังเคราะห์ First-Strand cDNA ด้วย Superscript VILO ทำได้ดังนี้

- 1) การเตรียม master mix (ไม่ใส่ RNA) ดังต่อไปนี้
 

a. 5X VILO reaction mix	4	ไมโครลิตร
b. 10X Superscript enzyme mix	2	ไมโครลิตร
c. RNA (ไม่เกิน 2.5 ไมโครกรัม)	x	ไมโครลิตร
d. 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

### 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 ในแต่ละหลอดคัพิลลารี (LightCycler glass capillary) ซึ่งประกอบด้วย LightCycler Mastermix 18 ไมโครลิตร (น้ำ 8.8 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> 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 เติมนีเอเอ็นเอ 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

6. นำเซลล์ไลน์ที่ถูก transfected ด้วย RNAi ต่อ Usp14 ในข้อ (3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถูกนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดเปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ไลน์ที่ไม่ได้ทำการยับยั้งด้วย RNAi เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีผลจากการยับยั้งการทำงานของยีน Usp14 โดยนำโปรตีนจากเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดมาแยกด้วยตาม pl และมวลโมเลกุลของโปรตีน โดยเทคนิค 2D- gel electrophoresis จากนั้นโปรตีนในเจลทั้งสองจะถูกย้อมด้วยสีย้อม Coomassie blue G แลบบรตีนในเจลทั้งสองจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันและแลบบรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันจะถูกตัด นำไปย่อยด้วยโปรตีเอส และวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรเมตรีเพื่อระบุชนิดของโปรตีนต่อไป

#### การเตรียม cell lysate

นำเซลล์มา resuspend ใน 10mM Tris-HCl buffer (pH 8) และทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Ultrasonication ที่ maximum amplitude เป็นเวลา 5 นาทีบนน้ำแข็ง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 100,000g เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วน supernatant ที่มี soluble proteins มาแยกเก็บไว้ แล้วจึงนำส่วน pellet ซึ่งประกอบไปด้วย membrane protein ไป suspend ใน 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) จากนั้นนำสารละลายโปรตีนทั้งสองส่วนมารวมกันและตกตะกอนด้วย 100% acetone เพื่อกำจัด lipids เมื่อได้ตะกอนโปรตีนแล้วนำมา resuspend ใน 50mM ammonium bicarbonate (pH 8) และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

#### แยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE

โปรตีนของ lysate จะถูกทำให้เสียสภาพโดยการเติม sample buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol และ bromophenol blue แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เตรียมสารละลาย 10% separating gel ซึ่งประกอบด้วย 10% (w/v) acrylamide, 0.3% (w/v) N,N'-methylene bisacrylamide, 250 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) ammonium persulfate และ 0.06% (v/v) N,N,N,N-tetramethyl-ethylenediamine เทสารละลายนี้ลง

ระหว่างกระจก (10 cm x 7 cm x 1 mm) สองแผ่นจากนั้นเท isopropanol ทับด้านบน ทั้งให้สารละลายเกิด polymerization จนสมบูรณ์ แล้วเทชั้นของ isopropanol ทิ้งไป เตรียมสารละลาย 5% stacking gel ซึ่งประกอบด้วย 5% (w/v) acrylamide/ 0.1% (w/v) N,N'-methylene bisacrylamide, 200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) ammonium persulfate และ 0.1% (v/v) N,N,N,N-tetramethyl-ethylenediamine เทสารละลายลงบน separating gel และวาง comb ลงไป ทั้งให้สารละลายเกิด polymerization จนสมบูรณ์ เท running buffer ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine (pH 8.3) และ 0.1% (w/v) SDS ลงในอ่างอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นหยอดโปรตีนจากเซลล์ลงในแต่ละหลุม ตั้งค่ากระแสให้คงที่ที่ 60A ต่อเจล และเริ่มเปิดให้เครื่องทำงานจนแถบสีฟ้า เคลื่อนที่หลุดจากขอบล่างของเจล เพื่อตรวจสอบแถบโปรตีน ที่ได้จากการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส เจลจะถูกย้อมด้วย Coomassie staining solution ประกอบด้วย 2.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 dissolved ใน 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid ใน deionised water เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเททิ้ง และเติม de-staining solution ประกอบด้วย 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid ใน deionised water จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

#### การย่อยแถบโปรตีนด้วยโปรตีเอส

ตัดแถบโปรตีนจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 50mM ammonium bicarbonate และ acetonitrile ให้ท่วมชิ้นเจล เขย่าที่อุณหภูมิห้อง จนสีฟ้าบนแถบโปรตีนหายไป ดูดสารละลายทิ้งและเติม 5 mM dithiothreitol (DTT) ลงในชิ้นเจล จากนั้นนำไป incubate ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อ reduce cystine นำชิ้นเจลมาทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติม 20 mM iodoacetamide ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและมีด เป็นเวลา 40 นาทีเพื่อเติมหมู่ alkyl ให้กับ cysteine เพื่อป้องกันการย้อนกลับไปสู่พันธะ disulfide อีก กำจัด iodoacetamide ที่เกินออกด้วยการเติม DTT จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10mM จากนั้นดูดสารละลายทิ้งหมดทิ้ง และเติม acetonitrile เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้ง ทิ้งเจลไว้จนแห้ง เติม trypsin โดยให้อัตราส่วนระหว่าง trypsin กับโปรตีนเท่ากับ 1:50 นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน สกัดเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโดยการเติม 70µl acetonitrile ที่ทิ้งไว้ 15 นาที และดูดสารละลายมาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

#### การวิเคราะห์ด้วย LC/MS/MS

นำเปปไทด์ที่สกัดได้จากแต่ละชิ้นเจล ละลายใน 0.1% (v/v) formic acid จากนั้นฉีดเข้า reversed phase guard column ทำการชะ column ด้วยสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วย 2% (v/v) acetonitrile และ 0.1% (v/v) formic acid ในน้ำ HPLC grade จากนั้นนำ reversed phase liquid chromatography capillary column เข้าต่อกับ guard column แล้วชะด้วย 48 นาที gradient เริ่มจาก 2% B จนถึง 95% B โดยสารละลาย B ประกอบด้วย 0.1% (v/v) formic acid ใน HPLC grade acetonitrile สารที่ถูกชะออกมาจะ spray เข้าสู่ส่วนไอออนิซของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ จากนั้นเครื่องจะทำการบันทึกค่ามวลต่อประจุในช่วง 400-2000 และ 3 ไอออนที่ตรวจวัดได้สูงสุดจะถูกทำให้แตกเป็นไอออนย่อยทุกๆ 3 วินาที ไอออนย่อย (MS/MS) จะถูกบันทึกในช่วงมวลต่อประจุ 50-1500 และข้อมูลทั้งหมดจะถูกบันทึกลงในคอมพิวเตอร์

### การวิเคราะห์ผล LC/MS/MS ด้วย Bioinformatics

นำข้อมูลที่ได้จาก LC/MS/MS มาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบ .pkl ซึ่งจะประกอบไปด้วยมวลต่อประจุของไอออนตั้งต้น, มวลต่อประจุของไอออนย่อย, ความเข้มของสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากไอออนแต่ละตัว (signal intensities) และจำนวนประจุ ข้อมูลเหล่านี้จะถูกส่งไปสืบค้นใน Mascot version 2.2 โดยใช้ฐานข้อมูล NCBI การระบุชนิดและการตัดแปลงโมเลกุลหลังการแปลรหัสของโปรตีน จะได้รับการยอมรับก็ต่อเมื่อมีค่า false positive ต่ำกว่า 5% และเปปไทด์ที่ถูกระบุจากการสืบค้นจะถูกนำมารายงานเฉพาะเปปไทด์ที่มีค่าความน่าเชื่อถือมากกว่า 95% หลังจากนั้นทุกๆเปปไทด์จะถูกนำมาตรวจสอบไอออนย่อยจาก MS/MS spectra อีกครั้งโดยเปรียบเทียบกับการจำลองการแตกเป็นไอออนย่อยของเปปไทด์ผ่าน Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์จะถูกตรวจสอบ isoform ด้วย Basic Local Alignment Search Tool ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) อีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลอง

### การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ (Bioinformatics analysis)

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System เพื่อจัดกลุ่มตาม Gene ontology และวิเคราะห์ pathway ที่เกี่ยวข้องโดยใช้โปรแกรม STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) ทำให้ทราบหน้าที่ และคุณสมบัติของโปรตีนที่เราวิเคราะห์ได้

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 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/ $\mu$ mol

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

### คัดเลือกเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย

เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย ได้รับจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เซลล์ไลน์ M213 ซึ่งเป็นชนิด well differentiated เลี้ยงเซลล์ไลน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham F-12, 10% Fetal bovine serum, และ 1% penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5%

### นำโอลิโก RNAi เข้าเซลล์เปรียบเทียบกับ RNAi negative control (Transfection)

นำโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้ (S1) เข้าเซลล์ M213 ตามสภาวะที่เหมาะสม โดยมี RNAi negative control (S0) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

### วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน

วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดเปรียบเทียบกับแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ไลน์ที่ไม่ได้ทำการยับยั้งด้วย RNAi เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีผลจากการยับยั้งการทำงานของยีน *Usp14* โดยนำโปรตีนจากเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดมาแยกตาม pI และมวลโมเลกุลของโปรตีน โดยเทคนิค 2D- gel electrophoresis จากนั้นโปรตีนในเจลทั้งสองจะถูกย้อมด้วยสีย้อม Coomassie blue G แลบบริเวณโปรตีนในเจลทั้งสองจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันและแลบบริเวณที่มีความเข้มแตกต่างกันจะถูกตัด นำไปย่อยด้วยโปรตีเอส และวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมตรีเพื่อระบุชนิดของโปรตีนต่อไป

### การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ (Bioinformatics analysis)

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System เพื่อจัดกลุ่มตาม Gene ontology และวิเคราะห์ pathway ที่เกี่ยวข้องโดยใช้โปรแกรม STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) ทำให้ทราบหน้าที่ และคุณสมบัติของโปรตีนที่เราวิเคราะห์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1-4.2

**ตารางที่ 4.1** การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
406	gi 32097	unnamed protein product [Homo sapiens]	7.41	5.21	10.4	5.19
87	gi 119617060	keratin 8, isoform CRA_d [Homo sapiens]	n/a	0	1.01	1.01
212	gi 181400	cytokeratin 8 [Homo sapiens]	n/a	0	0.96	0.96
640	gi 6470150	BiP protein [Homo sapiens]	0.5	0.75	1.64	0.89
308	gi 221042312	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.82	0.82
123	gi 126035028	liver histone H1e [Homo sapiens]	n/a	0	0.62	0.62
70	gi 119607256	hCG1988300, isoform CRA_a [Homo sapiens]	0.71	0	0.58	0.58
322	gi 229532	ubiquitin	n/a	0	0.49	0.49
510	gi 4505773	prohibitin [Homo sapiens]	0.61	0.61	1.05	0.44
50	gi 119590106	hCG27371 [Homo sapiens]	n/a	0	0.44	0.44
555	gi 4885377	histone H1.3 [Homo sapiens]	0.17	0.17	0.61	0.44
467	gi 386772	histone H3 [Homo sapiens]	0.98	0.58	0.98	0.4
625	gi 62089104	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide variant [Homo sapiens]	n/a	0	0.37	0.37
641	gi 662841	heat shock protein 27 [Homo sapiens]	n/a	0	0.37	0.37

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
349	gi 27436946	lamin A/C isoform 1 precursor [Homo sapiens]	n/a	0.34	0.71	0.37
368	gi 28862	AS1 [Homo sapiens]	n/a	0	0.36	0.36
84	gi 119617035	keratin 6E, isoform CRA_b [Homo sapiens]	n/a	0	0.35	0.35
306	gi 221042182	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.14	0.49	0.35
560	gi 5031839	keratin, type II cytoskeletal 6A [Homo sapiens]	n/a	0	0.35	0.35
221	gi 186685	keratin type 16 [Homo sapiens]	n/a	0	0.33	0.33
261	gi 194379984	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.33	0.33
272	gi 194388088	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.33	0.33
521	gi 4507953	14-3-3 protein zeta/delta [Homo sapiens]	0.47	0.14	0.47	0.33
260	gi 194379798	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.3	0.3
523	gi 4529892	HSP70-2 [Homo sapiens]	n/a	0	0.3	0.3
76	gi 119610275	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5, isoform CRA_b [Homo sapiens]	no emPAI	0	0.29	0.29
504	gi 4504255	histone H2A.Z [Homo sapiens]	0.29	0	0.29	0.29
138	gi 13938339	ATP5A1 protein [Homo sapiens]	n/a	0	0.27	0.27
544	gi 4757810	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor [Homo sapiens]	no emPAI	0	0.27	0.27
606	gi 5803209	urotensin 2 isoform b preproprotein [Homo sapiens]	n/a	0	0.27	0.27
670	gi 7331218	keratin 1 [Homo sapiens]	n/a	0.39	0.64	0.25

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
129	gi 131412225	keratin, type I cytoskeletal 13 isoform a [Homo sapiens]	0.24	0	0.24	0.24
174	gi 158259731	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.24	0.24
181	gi 15928608	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6 [Homo sapiens]	n/a	0	0.24	0.24
460	gi 37267	transketolase [Homo sapiens]	n/a	0	0.24	0.24
381	gi 306549	homology to rat ribosomal protein L23 [Homo sapiens]	n/a	0	0.23	0.23
38	gi 119581148	keratin 9 (epidermolytic palmoplantar keratoderma) [Homo sapiens]	0.29	0.06	0.29	0.23
519	gi 4507677	endoplasmic precursor [Homo sapiens]	n/a	0	0.22	0.22
252	gi 1942609	Chain A, Human Rap1a, Residues 1-167, Double Mutant (E30d,K31e) Complexed With Gppnhp And The Ras-Binding-Domain Of Human C-Raf1, Residues 51-131	n/a	0	0.2	0.2
127	gi 13111901	ATP5A1 protein [Homo sapiens]	n/a	0	0.19	0.19
385	gi 306891	90kDa heat shock protein [Homo sapiens]	0.04	0	0.19	0.19
79	gi 119613210	hCG39634, isoform CRA_a [Homo sapiens]	n/a	0	0.18	0.18
614	gi 609308	cytoplasmic chaperonin hTRiC5 [Homo sapiens]	n/a	0	0.18	0.18
230	gi 188492	heat shock-induced protein [Homo sapiens]	0.05	0	0.17	0.17
386	gi 307086	keratin-10 [Homo sapiens]	0.26	0	0.17	0.17
536	gi 46409270	tubulin alpha-3E chain [Homo sapiens]	0.16	0	0.16	0.16

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
128	gi 13129092	transmembrane protein 109 precursor [Homo sapiens]	0.15	0	0.15	0.15
219	gi 184414	70 kDa heat shock protein [Homo sapiens]	n/a	0	0.14	0.14
224	gi 187302	epithelial cell marker protein 1 [Homo sapiens]	n/a	0	0.14	0.14
229	gi 188036175	Chain A, Crystal Structure Of Bar Domain Of Endophilin-ii	n/a	0	0.14	0.14
264	gi 194384180	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.14	0.14
270	gi 194387042	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.14	0.14
301	gi 220702506	Chain A, TapasinERP57 HETERODIMER	n/a	0	0.14	0.14
410	gi 32189394	mitochondrial ATP synthase beta subunit precursor [Homo sapiens]	n/a	0	0.14	0.14
416	gi 32532	unnamed protein product [Homo sapiens]	0.14	0	0.14	0.14
608	gi 5803227	14-3-3 protein theta [Homo sapiens]	n/a	0	0.14	0.14
200	gi 178067	actin prepeptide [Homo sapiens]	n/a	0.34	0.48	0.14
241	gi 190200	porin [Homo sapiens]	n/a	0.33	0.46	0.13
382	gi 306553	ribosomal protein small subunit [Homo sapiens]	0.13	0	0.13	0.13
509	gi 4505753	phosphoglycerate mutase 1 [Homo sapiens]	n/a	0	0.13	0.13
514	gi 4506661	ribosomal protein L7a [Homo sapiens]	0.27	0	0.13	0.13
564	gi 51094513	phosphoglycerate mutase 2 (muscle) [Homo sapiens]	n/a	0	0.13	0.13
607	gi 5803225	14-3-3 protein epsilon [Homo sapiens]	0.13	0	0.13	0.13
71	gi 119607405	ribosomal protein L7, isoform CRA_a [Homo sapiens]	n/a	0	0.12	0.12

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
549	gi 48257068	HSPA8 protein [Homo sapiens]	n/a	0	0.12	0.12
391	gi 31092	unnamed protein product [Homo sapiens]	0.15	0.43	0.54	0.11
250	gi 193788267	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.11	0.11
303	gi 221040644	unnamed protein product [Homo sapiens]	0.11	0	0.11	0.11
516	gi 4506675	ribophorin I precursor [Homo sapiens]	n/a	0	0.11	0.11
576	gi 54303910	aging-associated gene 9 protein [Homo sapiens]	n/a	0	0.1	0.1
19	gi 1181994	hair type I acidic keratin [Homo sapiens]	n/a	0	0.08	0.08
195	gi 1710248	protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]	0.08	0	0.08	0.08
227	gi 187761884	RecName: Full=Tubulin beta-8 chain B	n/a	0	0.08	0.08
288	gi 21361322	tubulin beta-4 chain [Homo sapiens]	n/a	0	0.08	0.08
313	gi 223486	tubulin beta	n/a	0	0.08	0.08
348	gi 27368062	class IVb beta tubulin [Homo sapiens]	n/a	0	0.08	0.08
498	gi 4503143	cathepsin D preproprotein [Homo sapiens]	0.08	0	0.08	0.08
657	gi 7106439	tubulin beta-5 chain [Mus musculus]	n/a	0	0.08	0.08
17	gi 116488398	keratin, type I cuticular Ha2 [Homo sapiens]	n/a	0	0.07	0.07
161	gi 153945736	keratin, type I cytoskeletal 27 [Homo sapiens]	n/a	0	0.07	0.07
256	gi 194374687	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.07	0.07
305	gi 221041944	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.07	0.07

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
507	gi 4504935	keratin, type II cuticular Hb5 [Homo sapiens]	0.07	0	0.07	0.07
526	gi 4557699	keratin, type I cytoskeletal 12 [Homo sapiens]	n/a	0	0.07	0.07
577	gi 5453603	chaperonin containing TCP1, subunit 2 [Homo sapiens]	0.13	0.06	0.13	0.07
390	gi 31074631	keratin 1b [Homo sapiens]	0.12	0.06	0.12	0.06
489	gi 42760012	keratin 3 [Homo sapiens]	0.06	0.06	0.12	0.06
581	gi 547752	RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 2 oral; AltName: Full=Cytokeratin-2P; Short=CK-2P; Short=K2P; AltName: Full=Keratin-76; Short=K76; AltName: Full=Type-II keratin Kb9	n/a	0	0.06	0.06
671	gi 73535278	Chain A, Human Pyruvate Kinase M2	n/a	0	0.06	0.06
676	gi 74722492	RecName: Full=Putative heat shock protein HSP 90-beta-3; AltName: Full=Heat shock protein 90-beta c; Short=Heat shock protein 90Bc	n/a	0	0.05	0.05
149	gi 14595132	Raichu404X [Homo sapiens]	n/a	0	0.04	0.04
165	gi 15620923	KIAA1932 protein [Homo sapiens]	0.04	0	0.04	0.04
412	gi 32358	hnRNP U protein [Homo sapiens]	n/a	0	0.04	0.04
500	gi 4503483	elongation factor 2 [Homo sapiens]	n/a	0	0.04	0.04
618	gi 61656603	Heat shock protein HSP 90-alpha 2 [Homo sapiens]	n/a	0	0.04	0.04
135	gi 1359715	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ATPase [Homo sapiens]	n/a	0	0.03	0.03
423	gi 33324437	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting alpha 4 [Homo sapiens]	n/a	0	0.03	0.03
593	gi 577295	KIAA0088 [Homo sapiens]	no emPAI	0	0.03	0.03

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
124	gi 12667788	myosin-9 [Homo sapiens]	0.05	0.1	0.12	0.02
359	gi 28243	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0	0.01	0.01
297	gi 21757428	unnamed protein product [Homo sapiens]	0.05	0.05	0.06	0.01
83	gi 119617032	keratin 6B, isoform CRA_a [Homo sapiens]	0.44	0.35	0.35	0
3	gi 1063621	mutated in ataxia telangiectasia [Homo sapiens]	n/a	0.01	0	-0.01
248	gi 193785261	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.03	0	-0.03
690	gi 83753119	Chain A, Crystal Structure Of Human Full-Length Vinculin (Residues 1- 1066)	n/a	0.03	0	-0.03
247	gi 193784902	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.04	0	-0.04
239	gi 189306	nucleolin [Homo sapiens]	0.05	0.05	0	-0.05
394	gi 31283	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.05	0	-0.05
461	gi 37403	unnamed protein product [Homo sapiens]	no emPAI	0.05	0	-0.05
508	gi 4505257	moesin [Homo sapiens]	n/a	0.05	0	-0.05
13	gi 1136741	KIAA0002 [Homo sapiens]	n/a	0.06	0	-0.06
108	gi 119632243	hCG20535 [Homo sapiens]	n/a	0.06	0	-0.06
694	gi 886258	alcam [Homo sapiens]	n/a	0.06	0	-0.06
205	gi 179279	ATP synthase beta subunit [Homo sapiens]	n/a	0.14	0.07	-0.07
533	gi 460789	transformation upregulated nuclear protein [Homo sapiens]	n/a	0.07	0	-0.07
542	gi 47132620	keratin 2 [Homo sapiens]	0.25	0.25	0.18	-0.07
417	gi 32567786	keratin, type II cytoskeletal 79 [Homo sapiens]	0.21	0.21	0.13	-0.08

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
187	gi 16579885	ribosomal protein L4 [Homo sapiens]	n/a	0.08	0	-0.08
307	gi 221042248	unnamed protein product [Homo sapiens]	0.08	0.08	0	-0.08
356	gi 27894337	keratin 20 [Homo sapiens]	n/a	0.08	0	-0.08
393	gi 31179	enolase [Homo sapiens]	n/a	0.08	0	-0.08
695	gi 8923920	core histone macro-H2A.2 [Homo sapiens]	n/a	0.09	0	-0.09
637	gi 63055057	beta-actin-like protein 2 [Homo sapiens]	0.19	0.29	0.19	-0.1
15	gi 114155140	tropomyosin alpha-3 chain isoform 1 [Homo sapiens]	no emPAI	0.11	0	-0.11
77	gi 119610782	enolase 3 (beta, muscle), isoform CRA_b [Homo sapiens]	n/a	0.11	0	-0.11
189	gi 166795236	tumor-associated calcium signal transducer 2 precursor [Homo sapiens]	n/a	0.11	0	-0.11
486	gi 4204880	heat shock protein [Homo sapiens]	no emPAI	0.11	0	-0.11
228	gi 187956842	LOC440563 protein [Homo sapiens]	n/a	0.12	0	-0.12
320	gi 226052117	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like [Homo sapiens]	n/a	0.12	0	-0.12
85	gi 119617038	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types), isoform CRA_a [Homo sapiens]	n/a	0.45	0.32	-0.13
383	gi 306875	C protein [Homo sapiens]	n/a	0.25	0.12	-0.13
520	gi 4507949	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide [Homo sapiens]	0.29	0.13	0	-0.13

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

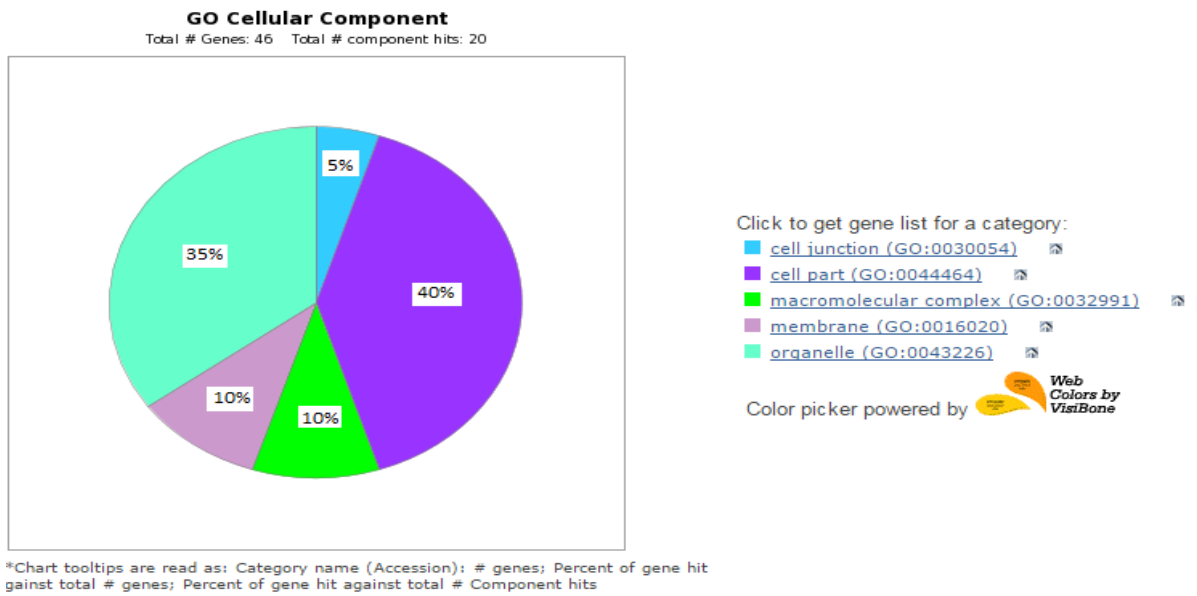
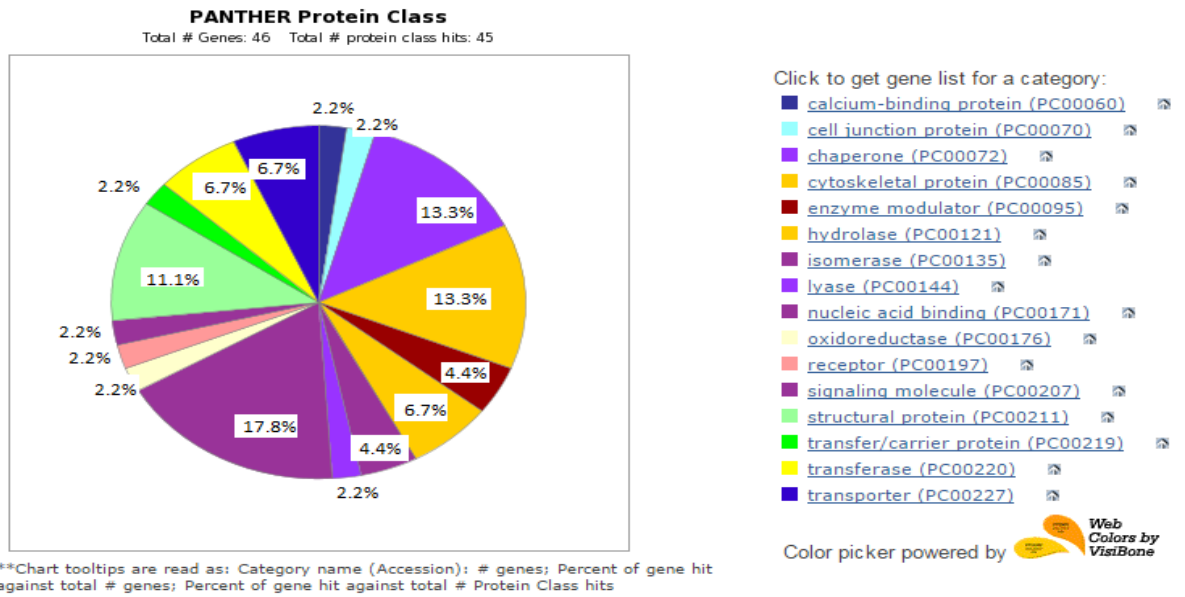
No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
271	gi 194387076	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.14	0	-0.14
506	gi 4504771	eukaryotic translation initiation factor 6 isoform a [Homo sapiens]	n/a	0.14	0	-0.14
265	gi 194384224	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.15	0	-0.15
428	gi 337926	splicing factor [Homo sapiens]	n/a	0.15	0	-0.15
54	gi 119591124	tubulin, alpha 1 (testis specific), isoform CRA_a [Homo sapiens]	n/a	0.16	0	-0.16
584	gi 550023	ribosomal protein S9 [Homo sapiens]	n/a	0.17	0	-0.17
650	gi 693933	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase; carbonate dehydratase [Homo sapiens]	n/a	0.17	0	-0.17
427	gi 337518	ribosomal protein [Homo sapiens]	0.18	0.18	0	-0.18
399	gi 31542947	60 kDa heat shock protein, mitochondrial [Homo sapiens]	n/a	0.19	0	-0.19
558	gi 495126	ribosomal protein L11 [Homo sapiens]	n/a	0.19	0	-0.19
678	gi 74739412	RecName: Full=Beta-actin-like protein 3; AltName: Full=Kappa-actin	n/a	0.19	0	-0.19
612	gi 5930071	ezrin [Homo sapiens]	n/a	0.2	0	-0.2
613	gi 6063147	ezrin [Homo sapiens]	n/a	0.2	0	-0.2
369	gi 28940	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.21	0	-0.21
462	gi 37492	alpha-tubulin [Homo sapiens]	0.33	0.54	0.33	-0.21
53	gi 119591067	hCG15580 [Homo sapiens]	0.22	0.22	0	-0.22
468	gi 386785	heat shock protein [Homo sapiens]	0.17	0.23	0	-0.23

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

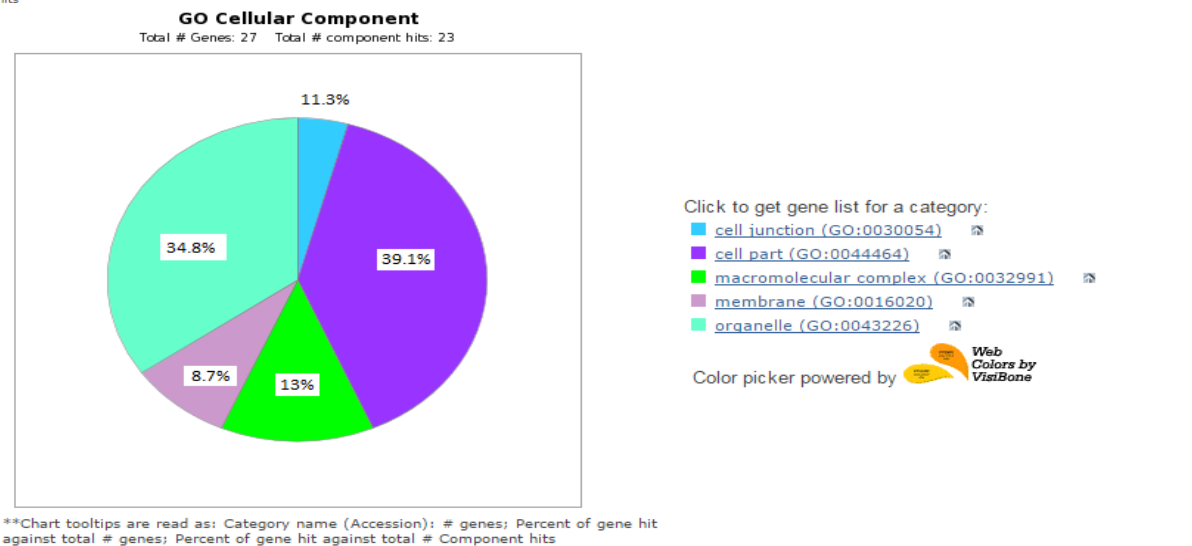
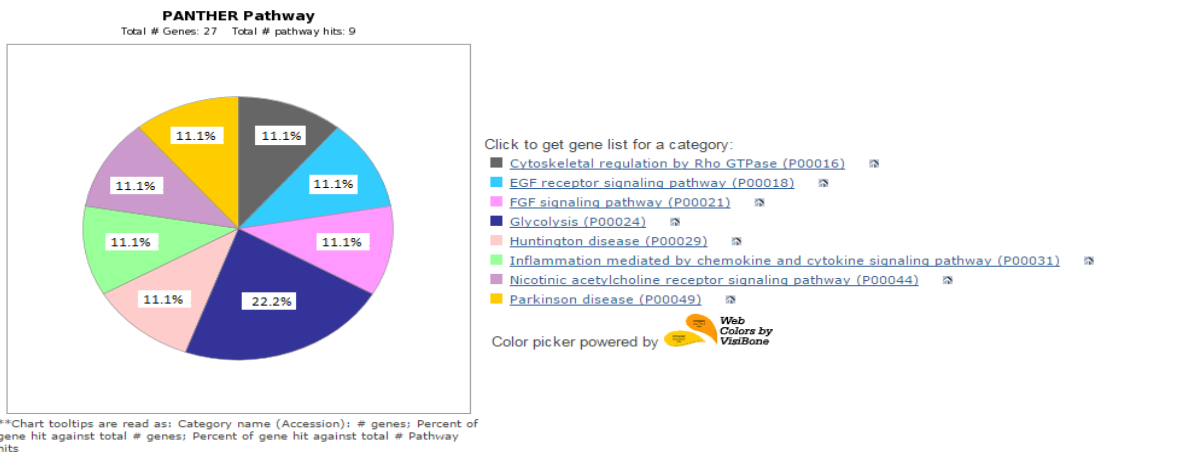
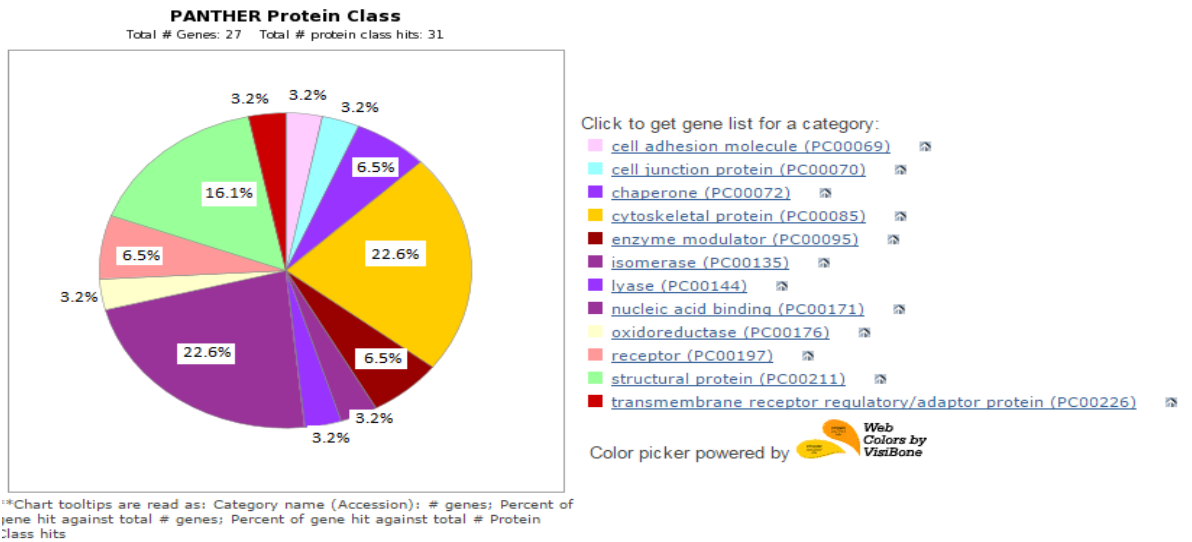
No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
11	gi 113459	RecName: Full=ADP/ATP translocase 2; AltName: Full=Adenine nucleotide translocator 2; Short=ANT 2; AltName: Full=ADP,ATP carrier protein 2; AltName: Full=Solute carrier family 25 member 5; AltName: Full=ADP,ATP carrier protein, fibroblast isoform	no emPAI	0.24	0	-0.24
639	gi 6457378	cytovillin 2 [Homo sapiens]	no emPAI	0.24	0	-0.24
401	gi 31645	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	n/a	0.35	0.1	-0.25
503	gi 4504253	histone H2A.x [Homo sapiens]	n/a	0.26	0	-0.26
335	gi 24586679	histone H2B type 1-A [Homo sapiens]	0.28	0.28	0	-0.28
452	gi 3493529	histone macroH2A1.2 [Homo sapiens]	n/a	0.31	0	-0.31
213	gi 181402	epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	n/a	0.32	0	-0.32
281	gi 20357599	histone H2A.V isoform 2 [Homo sapiens]	n/a	0.33	0	-0.33
543	gi 4757756	annexin A2 isoform 2 [Homo sapiens]	1.3	2.67	2.34	-0.33
18	gi 1174149	small GTP binding protein Rab7 [Homo sapiens]	n/a	0.35	0	-0.35
505	gi 4504517	heat shock protein beta-1 [Homo sapiens]	1.17	0.36	0	-0.36
243	gi 190613719	Chain B, Crystal Structure Of A Complex Of Sse1p And Hsp70, Selenomethionine-Labeled Crystals	n/a	0.41	0	-0.41

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 หลังจากยับยั้งยีน *usp14* (S1) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (S0) (ต่อ)

No.	Accession no.	Protein	M213	M213 S0	M213 S1	S1-S0
539	gi 46812692	Keratin 6A [Homo sapiens]	n/a	0.43	0	-0.43
633	gi 62897653	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 variant [Homo sapiens]	n/a	0.43	0	-0.43
364	gi 283807117	Chain X, E2~ubiquitin-Hect	n/a	0.46	0	-0.46
656	gi 7023238	unnamed protein product [Homo sapiens]	n/a	0.54	0	-0.54
376	gi 2981743	Chain A, Secypa Complexed With Hagpia (Pseudo-Symmetric Monomer)	n/a	0.81	0.22	-0.59
566	gi 510990	histone H2A [Homo sapiens]	n/a	0.7	0	-0.7
434	gi 34039	unnamed protein product [Homo sapiens]	2.69	3.71	3	-0.71
527	gi 4557701	keratin, type I cytoskeletal 17 [Homo sapiens]	1.28	1.85	1.11	-0.74
183	gi 1633054	Chain A, Cyclophilin A Complexed With Dipeptide Gly-Pro	0.22	0.8	0	-0.8
216	gi 181965	elongation factor 1 alpha [Homo sapiens]	n/a	0.8	0	-0.8
634	gi 62897923	prohibitin variant [Homo sapiens]	n/a	0.82	0	-0.82
631	gi 62897441	keratin 8 variant [Homo sapiens]	n/a	0.83	0	-0.83
214	gi 181573	cytokeratin 8 [Homo sapiens]	1.4	0.96	0	-0.96
646	gi 67782365	keratin, type II cytoskeletal 7 [Homo sapiens]	3.67	3.06	2.07	-0.99
496	gi 4502101	annexin A1 [Homo sapiens]	n/a	2.33	1.3	-1.03
168	gi 1568551	histone H2B [Homo sapiens]	3.46	6.33	1.71	-4.62
405	gi 31979	histone H2A.2 [Homo sapiens]	3.46	6.33	0	-6.33



ภาพที่ 4.1 โปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 ที่มีการแสดงออกมากขึ้น (up regulated) หลังจากยับยั้งยีน *usp14*



ภาพที่ 4.2 โปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 ที่มีการแสดงออกลดลง (down regulated) หลังจากยับยั้ง *usp14*

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *usp14* หลังจากถูก knockout ส่งผลต่อโปรตีนอื่นในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างไร และ 2) เพื่อเปรียบเทียบโปรตีนในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ก่อนและหลังการ knockout ยีน *usp14* โดยทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ด้วยโอลิโกสายสั้น (oligoduplex RNAi) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (transfection) เปรียบเทียบกับ RNAi negative ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry based proteomics

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);

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 จะมีขนาดอาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) 4156 เบส ส่วน variant 2 จะสั้นกว่าเล็กน้อย คือมีขนาดอาร์เอ็นเอส่งข่าว (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
```

ผลการวิจัยพบว่า RNAi ที่ออกแบบไว้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในเวลา 24 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ M213 คือ unnamed protein product (Accession no. 32097) มีมากกว่าปกติ 5.19 เท่า ในขณะที่ Histone H2A.2 (Accession no. 31979) มีน้อยกว่าปกติ 6.33 เท่า สำหรับการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ไลน์ KKKU100 คือ Histone H2A type 1 (Accession no. 4504239) มีมากกว่าปกติ 2.41 เท่า ในขณะที่ unnamed protein product (Accession no. 32097) มีน้อยกว่าปกติ 6.57 เท่า

ผลเซลล์ไลน์ M213 ที่ up-regulated จากโปรแกรม PANTHER จำแนก Protein class ส่วนใหญ่เป็นชนิด Nucleic acid binding (17.8%) จำแนกเป็น Cell part สูงสุด 40%

ผลเซลล์ไลน์ M213 ที่ down-regulated จากโปรแกรม PANTHER จำแนก Protein class ส่วนใหญ่เป็นชนิด Nucleic acid binding (22.6%) ใน Glycolysis pathway (22.2%) จำแนกเป็น Cell part สูงสุด 39.1%

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

### บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

- 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. *American Journal of Physiology*, 274, G767-775.
- Chen, HC. (2005). Boyden chamber assay. *Methods in Molecular Biology*, 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 Pacific Journal of Cancer Prevention*, 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 Journal of Gastroenterology*, 13, 2986-2991.
- D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M. H., *et al.* (2011). Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nature Medicine*, 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). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 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- $\alpha$  protein and messenger RNA in hepatobiliary diseases by immunohistochemical and in situ hybridization techniques. *Human Pathology*, 27, 787-792.
- International Agency for Research on Cancer. (1994). Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis*). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 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. *The Journal of Biochemistry*, *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 Research*, *51*, 3497-3502.
- Limpaiboon, T., Krissadarak, K., Sripa, B., Jearanaikoon, P., Buhisawasdi, V., Chau-in, S., Romphruk, A., Pairojkul, C. (2002). Microsatellite alterations in liver fluke related cholangiocarcinoma are associated with poor prognosis. *Cancer Letters*, *181*, 215-222.
- Liu, D., Momoi, H., Li, L., Ishikawa, Y., Fukumoto, M. (2002). Microsatellite instability in thorotrast-induced human intrahepatic cholangiocarcinoma. *International Journal of 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):. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *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. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, *24*, 305-310.
- Pascher, A., Jonas, S., Neuhaus, P. (2003). Intrahepatic cholangiocarcinoma: indication for transplantation. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, *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. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and 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. *Oncology Reports*, 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. *Seminars in Liver Disease*, 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. *Tropical Medicine & International Health*, 9, 588-594.
- Sripa, B., Kaewkes, S. (2000). Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. *Parasite Immunology*, 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 Journal of Gastroenterology*, 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 Research*, 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. *Molecular Carcinogenesis*, 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 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 Research*, 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 Biology & Therapy*, 5, 1002-1007.

## ประวัติผู้วิจัยหัวหน้าโครงการ

- ชื่อ - นามสกุล นางสาวอุบล ชื่นสำราญ
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- 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
- ประวัติการศึกษา

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



2. โครงการวิจัยเรื่อง “ความหลากหลายของจุลินทรีย์จากป่าเพื่อการผลิตชีวทานอลจากชีวมวลทางการเกษตร” ทุนงบประมาณแผ่นดิน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ พ.ศ. 2559 – 2562
3. โครงการวิจัยเรื่อง “การใช้แบคทีเรียโอเฟจในการควบคุมการติดเชื้อ *Clostridium difficile*” ทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2560 – 2562
4. โครงการวิจัยเรื่อง “Effect of physical and chemical factors on *Clostridium difficile* spore germination” ทุนศูนย์วิจัยด้านโรคอุบัติใหม่และโรคที่ไม่ได้รับการรักษา ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2558
5. โครงการวิจัยเรื่อง “Molecular typing and antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* in Thailand” ทุนวิจัยร่วมคณะวิทยาศาสตร์และคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2554 - พ.ศ. 2556

### 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

Senthong P, Millington CL, Wilkinson OJ, Marriott AS, Watson AJ, Reamtong O, Eysers CE, Williams DM, Margison GP, Povey AC. The nitrosated bile acid DNA lesion O6-carboxymethylguanine is a substrate for the human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2013; 1;41(5):3047-55

Reamtong O. Mass Spectrometry-based Parasitic Proteomics. *J. Trop. Med. Parasitol.* 2013; 36(1)

Sookrung N, Wong-Din-Dam S, Tungtrongchitr A, Reamtong O, Indrawattana N, Sakolvaree Y, Visitsunthorn N, Manuyakorn W, Chaicumpa W. Proteome and Allergenome of Asian Wasp, *Vespa affinis*, Venom and IgE Reactivity of the Venom Components. *J Proteome Res.* 2014; 7;13(3):1336-44

Danpaiboon W, Reamtong O, Sookrung N, Seesuy W, Sakolvaree Y, Thanongsaksrikul J, Dong-din-on F, Srimanote P, Thueng-in K, Chaicumpa W. Ophiophagus hannah venom: proteome, components bound by *Naja kaouthia* antivenin and neutralization by *N. kaouthia* neurotoxin-specific human ScFv. *Toxins.* 2014; 13;6(5):1526-58

Sookrung N, Khetsuphan T, Chaisri U, Indrawattana N, Reamtong O, Chaicumpa W, Tungtrongchitr A. Specific B-cell Epitope of Per a 1: A Major Allergen of American Cockroach (*Periplaneta americana*) and

- Anatomical Localization. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014; 6(4):325-32
- Ngamdee W, Tandhavanant S, Wikraiphath C, Reamtong O, Wuthiekanun V, Salje J, Low DA, Peacock SJ, Chantratita N. Competition between *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *BMC Microbiol.* 2015; 3;15(1):56
- Adisakwattana P, Suwandittakul N, Petmitr S, Wongkham S, Sangvanich P, Reamtong O. ALCAM is a Novel Cytoplasmic Membrane Protein in TNF- $\alpha$  Stimulated Invasive Cholangiocarcinoma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(9):3849-56
- Dutta S, Reamtong O, Pangvongsa W, Kitdumrongthum S, Janpipatkul K, Sangvanich P, Piyachaturawat P, Chairoungdua A. Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Sep;1852(9):1989-99
- Isarangkul D, Wiyakrutta S, Kengkoom K, Reamtong O, Ampawong S. Mitochondrial and cytoskeletal alterations are involved in the pathogenesis of hydronephrosis in ICR/Mlac-hydro mice. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 15;8(6):9192-204.
- Reamtong O, Srimuang K, Saralamba N, Sangvanich P, Day NJ, White NJ, Imwong M. Protein profiling of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum* using mass spectrometry-based proteomics. *Int. J. Mass. Spectrom.* 2015;391:82-92.
- Molee P, Adisakwattana P, Reamtong O, Petmitr S, Sricharunrat T, Suwandittakul N, Chaisri U. Up-regulation of AKAP13 and MAGT1 on cytoplasmic membrane in progressive hepatocellular carcinoma: a novel target for prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):9796-811.
- Choopong J, Reamtong O, Sookrung N, Seesuyay W, Indrawattana N, Sakolvaree Y, Chaicumpa W, Tungtrongchitr A. Proteome, Allergenome, and Novel Allergens of House Dust Mite, *Dermatophagoides farinae*. *J Proteome Res.* 2016 Feb 5;15(2):422-30.
- Saisavoey T., Sangtanoo P., Reamtong O., Karnchanatat A. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Defatted Rice Bran (*Oryza Sativa* L.) Protein Hydrolysates on Raw 264.7 Macrophage Cells. *J Food Biochem.* 2016 Mar:1745–4514.

Pattarayingsakul W., Nilavongse A., Reamtong O., Chittavanich P, Mungsantisuk I., Mathong Y., Prasitwuttisak W., Panbangred W. Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides from digestion of larvae and pupae of Asian weaver ant, *Oecophylla smaragdina*, *Fabucious*. *J Sci Food Agric*. 2016 Nov 23.

Suwandittakul N., Reamtong O., Molee, P., Maneewatchararangsri S., Sutherat M., Chaisri U., Wongkham S., Adisakwattana P.\*. Disruption of endocytic trafficking protein Rab7 impairs invasiveness of cholangiocarcinoma cells, *Cancer Biomarker*. 2017, 20:3, 255-266.

#### 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. โครงการวิจัยเรื่อง “A search for immunomodulatory molecules of *Brugia malayi* and restoration of host immunity” ทุนอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ. 2559 – 2560
2. โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาฟอสโฟโปรตีนโอมิกของพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mekongi* เพศผู้และเพศเมีย” ทุนมหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2559 – 2561