รายงานการวิจัย
เรื่อง

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

(Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 by RNA Interference (RNAi) in Cholangiocarcinoma Cell)

นางสาวอุบล ชื่นสำราญ
ศ. โสพิศ วงศ์คำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2556
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

รายงานการวิจัย
เรื่อง

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

(Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 by RNA Interference (RNAi) in Cholangiocarcinoma Cell)

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

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2556
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
(งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555)

หัวข้อวิจัย การยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ด้วยเทคนิค RNAi ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผู้ดำเนินการวิจัย ดร.อุบล ชื่นสำราญ และ ศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ
ที่ปรึกษา ศ.ดร.ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร
ผศ.ยุพาภรณ์ ณ พัทลุง
หน่วยงาน โรงเรียนการเรือน
มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

ปี พ.ศ. 2556

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ในปัจจุบันกำลังมีการศึกษาตัวบ่งชี้ทางโมเลกุลสำหรับโรคนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบเปลี่ยนแปลงของยีนในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีที่อยู่ในตับด้วยวิธีการขยายยีนแบบสุ่ม (AP-PCR) พบส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีอยู่บนยีน *Ubiquitin- Specific Protease 14* หรือ *usp14* บนโครโมโซม 18 ซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงร้อยละ 52 ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว ด้วยเทคนิค RNA interference หรือ RNAi ในเบื้องต้นได้ทำการออกแบบโอลิโกสายสั้น (oligoduplex RNAi) จำนวน 3 ชุด แล้วทำการนำเข้าสู่เซลล์ไลน์ (transfection) ที่ใช้ทำการศึกษา ได้แก่ KKU-100 and M213 พบว่าโอลิโกที่ออกแบบไว้สามารถเข้าเซลล์ไลน์ได้มากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับ RNAi negative ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่า RNAi ชุดที่ 1 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ KKU-100 ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้มากที่สุด (ร้อยละ 93.35) และ พบว่า RNAi ชุดที่ 3 ยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ในเซลล์ M213 ในเวลา 72 ชั่วโมง ได้มากที่สุด (ร้อยละ 93.84) จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าโอลิโก RNAi ที่ได้ออกแบบไว้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14* ได้จริง และเมื่อศึกษาสภาวะการลุกลามของเซลล์ไลน์หลังจากถูกยับยั้งยีน *usp 14* พบว่า ไม่มีผลต่อการลุกลามของเซลล์ M213 อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ Ubiquitin specific protease 14 (USP14) ทำหน้าที่ควบคุมความยาวของสายโปรตีนควบคุมที่ชื่อว่า Ubiquitin ด้วยความที่โปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในเซล จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ทางการแพทย์ โดยเฉพาะด้านการป้องกันการลุกลามของเซลล์มะเร็ง

Research Title Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease14 by RNA Interference (RNAi) in Cholangiocarcinoma Cell
Researcher Dr. Ubol Chuensumran and Prof.Dr. Sopit Wongkam
Research Consultants Prof.Dr. Songsak Petmitr
Asst.Prof. Yupaporn Napatalung
Organization School of Culinary Arts, Suan Dusit Rajabhat University
Year 2013

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC), a malignant neoplasm of the biliary epithelium in the liver is a major health problem in Northeast Thailand. At present, the molecular marker finding of the disease has been elucidated. Previously, the genomic instabilities of Thai patients with ICC were studied by arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR). Specific region of *Ubiquitin- Specific Protease 14* or *usp14* gene on chromosome 18 giving gene variation 52% was found. In this study, we intended to inhibit the gene expression using RNA interference or RNAi technique. The 3 sets of oligoduplex RNAi were designed and used for transfection to cell lines including KKU-100 and M213 cells. The results showed that almost 90% of the cell lines were transfected with the RNAi compared with RNAi negative control. Gene expression (RNA level) was then studied using quantitative real-time PCR. The results showed that RNAi set no.1 has the highest efficiency in KKU-100 cell in 24 hour (93.35%). As well as, RNAi set no.3 has the highest efficiency in M213 cell in 72 hour (93.84%). The conclusion is that the designed RNAi (s) can be used to inhibit *usp14* gene expression. However, invasion assay of this inhibited gene in M213 was shown no different. Nevertheless, Ubiquitin specific protease 14 (USP14) plays role to control the length of Ubiquitin, that is the internal cell controller. This study provided information of medical application especially a prevention from invaded cancer cells.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาและมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ประสานและดูแลงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุพาภรณ์ ณ พัทลุง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต และ ศาสตราจารย์ ดร.ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร และ ดร.ชรินทร์ ถาวรคุโณ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดการวิจัย และให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ ดร.ภูมิ อดิศักดิ์วัฒนา ภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งและอนุเคราะห์ให้ใช้ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเซลล์ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิตรา ไวคกุล รองคณบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือกลาง พร้อมทั้ง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนเซลล์ไลน์ต้นแบบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย

คณะผู้วิจัย
2556

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ฉ
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
	ขอบเขตการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	**4**
	ความผิดปกติของยีน *K-ras* และ *p53*	4
	ความผิดปกติของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis	5
	ความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene)	6
	การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนกลุ่ม growth factors	6
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	**9**
	รูปแบบการวิจัย	9
	วัตถุดิบ	9
	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย	9
	สารเคมีที่ใช้	10
	การดำเนินงานวิจัย	11
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	**16**
บทที่ 5	**สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	**29**
บรรณานุกรม		**32**
ประวัติผู้วิจัย		**36**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	จำนวนเท่าในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซม 18p11 วิเคราะห์โดยเทคนิค real-time PCR	2
4.1	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ	19
4.2	ความเข้มข้นของ cDNA	19
4.3	ค่า crossing point จากเครื่อง real time PCR นำมาคำนวณเปรียบเทียบกับ negative control	21
4.4	ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ (480/520 nm) ของเซลล์ไลน์ที่ถูกยับยั้งยีน usp14 ด้วย RNAi	24

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	เซลล์ KKU-100	17
4.2	เซลล์ M213	18
4.3	เปรียบเทียบการยับยั้งการแสดงออกของยีน *usp14*	23
4.4	เซลล์ M213 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า	25
4.5	เซลล์ M213 ที่ถูกยับยั้งยีน usp14 ด้วย RNAi ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (ก) RNAi ชุดที่ 1 และ (ข) RNAi ชุดที่ 2	26
4.6	เซลล์ M213 ที่ถูกยับยั้งยีน usp14 ด้วย RNAi ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (ก) RNAi ชุดที่ 3 และ (ข) RNAi negative	27
4.7	เซลล์ M213 ซึ่งเป็นเซลล์ปกติไม่ได้ผ่านการยับยั้งยีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า	28
4.8	เซลล์ M213 ที่ผ่านเมมเบรนได้ (Invasion) พบสารฟลูออเรสเซนต์ย้อมติดที่นิวเคลียส	28