

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5980053

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์โปรตีโอมิกของน้ำลายและซีรัมในโรคมะเร็งช่องปากเมลาโนมาในสุนัข เพื่อติดตามการตอบสนองต่อการรักษาและการวินิจฉัยระยะแรกก่อนการเกิดโรคซ้ำ และ/หรือการแพร่กระจาย

ชื่อนักวิจัย : รศ.สพ.ญ.ดร.กรรณารณ์ สุริยผล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Gunnaporn.V@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี 5 เดือน (16 มิถุนายน 2559 – 30 พฤศจิกายน 2562)

โรคมะเร็งช่องปากเมลาโนมาเป็นโรคที่พบได้บ่อยในสุนัข เป็นมะเร็งที่มีความรุนแรง แพร่กระจายได้รวดเร็วและมักตรวจพบในระยะท้าย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบโปรตีโอมในน้ำลายและซีรัมที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งช่องปากเมลาโนมาในระยะคลินิกระยะแรก (Early-stage oral melanoma, EOM) ระยะคลินิกระยะท้าย (Late-stage oral melanoma, LOM) LOM ที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดและเคมีบำบัด โรคมะเร็งช่องปากสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมา (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) โรคเนื้องอกช่องปากชนิดไม่ร้าย (Benign tumors, BN) โรคปริทันต์เรื้อรัง (Chronic periodontitis, P) และสุนัขปกติ (Control, C) โดยใช้เทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), Liquid chromatography-tandem MS (LC-MS/MS) และ In-gel digestion coupled with mass spectrometry (GeLC-MS/MS) ผลการศึกษาในน้ำลายโดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ควบคู่กับ LC-MS/MS พบ peptide mass fingerprint (PMF) ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่มและพบการเกาะกลุ่มของโปรตีน (clustering) เฉพาะกลุ่มใน EOM LOM OSCC และ BN ทั้งนี้พบการเกาะกลุ่มของโปรตีนใกล้เคียงกันใน LOM และ OSCC นอกจากนี้พบการเกาะกลุ่มของโปรตีนในกลุ่ม P และ C (CP group) จากการใช้ Western blot ในการยืนยันผลโปรตีโอมิกส์ พบการแสดงออกของ Sentrin-specific protease 7 (SEN7) ใน OSCC การแสดงออกของ Toll-like receptor 4 (TLR4) ใน LOM และ OSCC เมื่อเทียบกับกลุ่ม CP และการแสดงออกของ Nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น TLR4 partner ใน OSCC เมื่อเทียบกับ CP, BN และ EOM และใน LOM เมื่อเทียบกับ EOM ทำการยืนยันลำดับกรดอะมิโนของแบนโปรตีนจาก Western blot ด้วย LC-MS/MS ผลการศึกษาในน้ำลายโดยใช้เทคนิค GeLC-MS/MS และยืนยันผลด้วย Western blot พบการแสดงออกของ Tyrosine phosphatase non-receptor type 5 (PTPN5) มากในกลุ่มเนื้องอกทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับ CP และพบการแสดงออกมากใน LOM และ OSCC เมื่อเทียบกับ BN และ EOM นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ Tumor protein p53 (p53) ซึ่งพบในวิถีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง

PTPN5 และยาเคมีบำบัด มากในกลุ่มเนื้องอกทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับ CP ผลการศึกษาโปรตีนในน้ำลายในกลุ่ม LOM ก่อนการผ่าตัด (Pre-surgery, PreS) หลังการผ่าตัด (Post-surgery, PostS) หลังการทำเคมีบำบัดด้วย ยา Carboplatin 1-7 ครั้ง (AT1-AT7) โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS และยืนยันผลด้วย Western blot พบว่าในกลุ่มที่มีอัตราการอยู่รอดสั้นกว่า 1 ปี (Short-term survival, STS) สัดส่วนของ Free ubiquitin D (fUBD) ต่อ Conjugated ubiquitin D (cUBD) ใน PreS มีมากกว่า AT2, AT4 and AT5 และพบว่าสัดส่วนของ fUBD ต่อ cUBD ใน PreS ในกลุ่ม STS มีมากกว่าสัดส่วนใน PreS ในกลุ่มที่มีอัตราการอยู่รอดยาวกว่า 1 ปี (Long-term survival, LTS) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ fUBD ใน PreS ในกลุ่ม STS มากกว่าใน AT2 สำหรับการศึกษาดูโปรตีนในซีรัมโดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ควบคู่กับ LC-MS/MS พบ peptide mass fingerprint (PMF) ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่มในกลุ่มรวม LOM-OSCC และ กลุ่ม P และพบการเกาะกลุ่มของโปรตีน (clustering) เฉพาะกลุ่มใน EOM LOM OSCC BN P และ C จากการใช้ Western blot ยืนยันผล ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ Immunoglobulin superfamily member 10 (IgSF10) ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิค GeLC-MS/MS และยืนยันผลด้วย Western blot ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ Tumor necrosis factor receptor associated factor 3 interacting protein 1 (TRAF3IP1) สรุปในการศึกษารั้งนี้ พบ PMF ที่มีเอกลักษณ์ในน้ำลายกลุ่ม EOM LOM OSCC BN และ CP และในซีรัมกลุ่มรวม LOM-OSCC และ กลุ่ม P ในตัวอย่างน้ำลายพบการเกาะกลุ่มโปรตีนรวมกัน ใน P และ C และพบความใกล้เคียงของกลุ่ม LOM และ OSCC แสดงถึงความเป็นไปได้ในการเฝ้าระวังโรคโดยใช้ PMF และการเกาะกลุ่มโปรตีน นอกจากนี้ยังพบความเป็นไปได้ของโปรตีนที่อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคได้แก่ SENP7, TLR4, NF- κ B, PTPN5, p53 ส่วนสัดส่วน fUBD ต่อ cUBD อาจใช้แสดงการพยากรณ์อัตราการรอดชีวิตในสัตว์ป่วยเมื่อทำการรักษาด้วยเคมีบำบัด carboplatin งานในอนาคตควรทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวและโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกลุ่มประชากรที่มากขึ้นเพื่อเก็บข้อมูลยืนยันผลดังกล่าว และศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สัดส่วน fUBD ต่อ cUBD ในการหาแนวทางการทำเคมีบำบัดที่เหมาะสมกับสัตว์แต่ละตัวตามแนวทางของหลักการแพทย์แม่นยำ (Precision medicine)

คำสำคัญ: โรคมะเร็งช่องปากเมลาโนมา โรคเนื้องอกช่องปาก โปรตีนโอมิกส์ น้ำลาย ซีรัม สุนัข ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

Abstract

Project Code : RSA5980053

**Project Title : Salivary and serum proteomic analyses to monitor treatment response
and early detect recurrence and/or metastasis in canine oral melanoma**

Investigator : Assoc. Prof. Dr. Gunnaporn Suriyaphol

E-mail Address : Gunnaporn.V@chula.ac.th

Project Period : 3 years 5 months (16 June 2016 – 30 November 2019)

Oral melanoma is one of the most common and aggressive oral malignancies in dogs and often found at the late-clinical stages. The present study aimed to use Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), Liquid chromatography-tandem MS (LC-MS/MS) and In-gel digestion coupled with mass spectrometry (GeLC-MS/MS) to search for particular peptide mass fingerprints (PMFs) and conceivable biomarkers in serum and saliva of dogs with early- and late-stage oral melanoma (EOM and LOM, respectively), OM treated with surgery and chemotherapy, oral squamous cell carcinoma (OSCC), benign oral tumors (BN), and periodontitis and healthy controls (CP). Specific peptide fragments from peptide mass fingerprints (PMFs) were sequenced by LC-MS/MS and BLAST-searched with mammalian protein databases. Western blot analysis was used to confirm protein expression of the diseases. Expressed protein sequences from western blots were verified by LC-MS/MS. The results of salivary proteomics using MALDI-TOF MS showed unique peptide fragments appeared in the tumor groups (EOM, LOM, OSCC and BN), in the LOM and OSCC groups and in the CP controls. Western blot analysis exhibited increased expression of sentrin-specific protease 7 (SEN7) in OSCC and Toll-like receptor 4 (TLR4) in LOM and OSCC, compared with the CP group. The expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B), a TLR4 partner, was notably increased in OSCC compared with CP, BN and EOM and in LOM compared with EOM. For the GeLC-MS/MS-based salivary proteomic profiling, increased expression of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 5 (PTPN5) was shown in all tumor groups compared with the CP group. Marked expression of PTPN5 was also observed in LOM and OSCC compared with that in BN and EOM. In addition, tumor protein p53 (p53), which appeared in

the PTPN5–drug interactions, was exhibited to be expressed in all tumor groups compared with that in the CP group. For the salivary proteomics of LOM treated with surgery and chemotherapy drugs, carboplatin, for 1-7 times. In dogs with short-term survival (less than 12 months after surgery), a significantly increased ratio of free ubiquitin D (fUBD) to conjugated ubiquitin D (cUBD) was shown in the pre-surgery stage (PreS) compared with that after being treated with surgery and carboplatin for 2, 4 and 5 times (AT2, AT4 and AT5). In addition, the ratio was also shown to be significantly augmented in PreS group with short-term survival compared with that in PreS group with long-term survival (more than 12 months after surgery). In addition, the expression of fUBD was enhanced in PreS compared with that of AT2 in STS group. In conclusion, discrete clusters of EOM, LOM, OSCC, BN and CP groups and potential protein candidates associated with the diseases were demonstrated by salivary and serum proteomics. Western blot analysis verified SENP7, TLR4, NF- κ B, PTPN5 and p53 as potential salivary biomarkers of canine oral tumors. A ratio of fUBD to cUBD in PreS was plausibly shown to be a potential prognostic biomarker for survival in dogs with LOM.

Keywords: Oral Melanoma, Oral tumor, Proteomics, Saliva, Serum, Dog, Biomarker