



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการแสดงออกและผลการยับยั้งการแสดงออกของจีนกลุ่ม
signal transduction ในเซลล์เพาะเลี้ยง NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดย
สารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

โดย นางชนิตรา ฐวจิตต์ และคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการแสดงออกและผลการยับยั้งการแสดงออกของจีนกลุ่ม signal transduction ในเซลล์เพาะเลี้ยง NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารคัดหลั่งจาก พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

ผู้วิจัย	สังกัด
1. นางชนิตรา ฐวจิตต์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. นายปิติ ฐวจิตต์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. นายดาวยศ ดาวเรือง	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. นางสาวกุสุมาวดี อุทิศพันธ์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5. นางศศิธร แก้วเกษ	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. Professor Masanao Miwa	Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba, Japan
7. Dr. Kazuhiko Uchida	Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba, Japan

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสมาคมผู้วิจัยและผลิตเภสัชภัณฑ์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และ PReMA ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือทำวิจัยจากนักวิจัยในหลากหลายสาขาวิชา ซึ่งเป็นทั้งผู้ร่วมวิจัยและผู้สนับสนุนงานวิจัยทางอ้อม ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ศศิธร แก้วเกษ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการเตรียมพยาธิใบไม้ตับ ขอขอบคุณ Professor Masanao Miwa และ Dr. Kazuhiko Uchida สำหรับการทำวิจัยในสวนเทคนิค cDNA array นอกจากนี้ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น สนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณนักศึกษาระดับปริญญาโท ได้แก่ นาย ดาวยศ ดาวเรือง และนางสาวกุสุมาวดี อุทิศพันธ์ุ สำหรับการทำงานวิจัยในโครงการนี้ ซึ่งเป็นการฝึกฝนให้นักศึกษาทั้งสองสามารถพัฒนาศักยภาพเป็นนักศึกษาปริญญาเอกในปัจจุบัน และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์โสพิศ วงศ์คำ นักวิจัยพี่เลี้ยง (mentor) สำหรับคำแนะนำและคำวิจารณ์ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดการดำเนินโครงการวิจัย ในด้านการเขียน manuscript เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย ขอขอบพระคุณ Professor James A. Will (University of Wisconsin-Madison) ช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับ ทำยที่สุดขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับสมาคมผู้วิจัยและผลิตเภสัชภัณฑ์ ที่เอื้อให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมายที่วางไว้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนิตรา ธวัชจิตต์

หัวหน้าโครงการวิจัย

มิถุนายน 2550

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ TRG4880004

ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกและผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction ในเซลล์เพาะเลี้ยง NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารคัดหลั่งจาก พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ.ดร.ชนิตรา ฐวจิตต์
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail address tchani@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ กรกฎาคม 2548-มิถุนายน 2550

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (Ov) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่าสารคัดหลั่งจาก Ov สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์ fibroblast โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนในการตอบสนองของเซลล์ต่อสารคัดหลั่งจาก Ov โดยเทคนิค cDNA array และศึกษาเส้นทางสัญญาณภายในเซลล์ ที่พยาธิใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์โดยเทคนิค RNAi ผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่สัมผัสกับสารคัดหลั่งจากพยาธิ มียีนจำนวน 239 ยีนจากทั้งหมด 15,000 ยีน ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป ผลการยืนยันระดับการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค real time RT-PCR บ่งชี้ระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *tgfβ 1i4* ซึ่งเป็นยีนตอบสนองเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย transforming growth factor-beta (TGF-β) เช่นเดียวกับยีน *smad 4* ซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณของ TGF-β นอกจากนี้เมื่อใช้ siTBR11 ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนตัวรับที่ผิวเซลล์ชนิด TGF-β receptor type II (TBR11) พบว่าสามารถลดปริมาณ TBR11 ได้ประมาณ 50-80% ของระดับปกติในเซลล์ เซลล์ที่มีปริมาณ TBR11 ต่ำลงนี้จะไม่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดยสารคัดหลั่งจากพยาธิได้เท่าเซลล์ที่มีปริมาณ TBR11 ปกติ โดยสรุปผลการทดลองบ่งชี้ความเป็นไปได้ที่สารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ Ov สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ fibroblast ผ่านเส้นทางสัญญาณของ TGF-β โดยกระตุ้นผ่านตัวรับ TBR11 และแม้ว่าในอนาคตยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารที่ทำหน้าที่เหมือน growth factor ในสารคัดหลั่งจากพยาธิ เพื่อศึกษากลไกที่แน่นอนที่สารดังกล่าวทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ หากข้อมูลที่ได้จากโครงการนี้บ่งชี้ความเป็นไปได้เกี่ยวกับการกระตุ้นเส้นทางสัญญาณของ TGF-β โดยสารคัดหลั่งจากพยาธิ การยับยั้งเส้นทางสัญญาณดังกล่าว อาจนำไปสู่การยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจากการเหนี่ยวนำโดยสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ Ov

คำหลัก : พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*; สารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ; เส้นทางสัญญาณภายในเซลล์; เทคนิค cDNA array; siTBR11

Abstract

Project Code : TRG4880004

Project Title : Study of signal transduction gene expression and its knockdown effect in *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory products induced NIH-3T3 cell proliferation

Investigator : Assistant Professor Dr. Chanitra Thuwajit M.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

E-mail Address : tchani@kku.ac.th

Project Period : July 2005-June 2007

Opisthorchis viverrini (Ov) is a strong risk factor of bile duct cancer. Its excretory/secretory (ES) product has recently been reported to induce fibroblast cell proliferation. We aim to study the response of fibroblasts to Ov ES product especially the intracellular signal transduction pathway activated by this parasitic product. Gene expression profile of cells exposed to Ov ES product was studied by cDNA array. The results indicated that among a total of 15,000 genes/ESTs, 239 genes with established cell proliferation-related functions were 2 fold-and more-up-regulated by Ov ES product compared to those in cells without exposure. Real time RT-PCR confirmed the highest up-regulated expression of *tgfb 1i4* which is the representative molecule of transforming growth factor-beta (TGF- β) pathway stimulation. In addition, the up-regulated expression of *smad 4*, an important TGF- β signal transduction molecule, was observed in fibroblast treated with Ov ES product. RNAi against TGF- β receptor type II (*TBRII*) was performed and could successfully decrease around 50-80% of intrinsic *TBRII* level. A significant decrement of Ov-induced cell proliferation was observed in *TBRII*-knockdown cells compared to those without si*TBRII* treatment. These results indicated that fibroblast cell proliferation induced by Ov ES product might be through *TBRII*-mediated signal transduction pathway. Though, in the future, the exact growth factor-like substance in Ov ES product should be identified to study in depth of what is the exact mechanism the parasitic product uses to activate cell proliferation. This data may highlight the possibility to do interfering of TGF- β -mediated signal transduction pathway to inhibit Ov ES product-driven cholangiocarcinogenesis.

Keywords: *Opisthorchis viverrini*; Excretory/secretory product; Intracellular signal transduction pathway; cDNA array; si*TBRII*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อ

Abstract

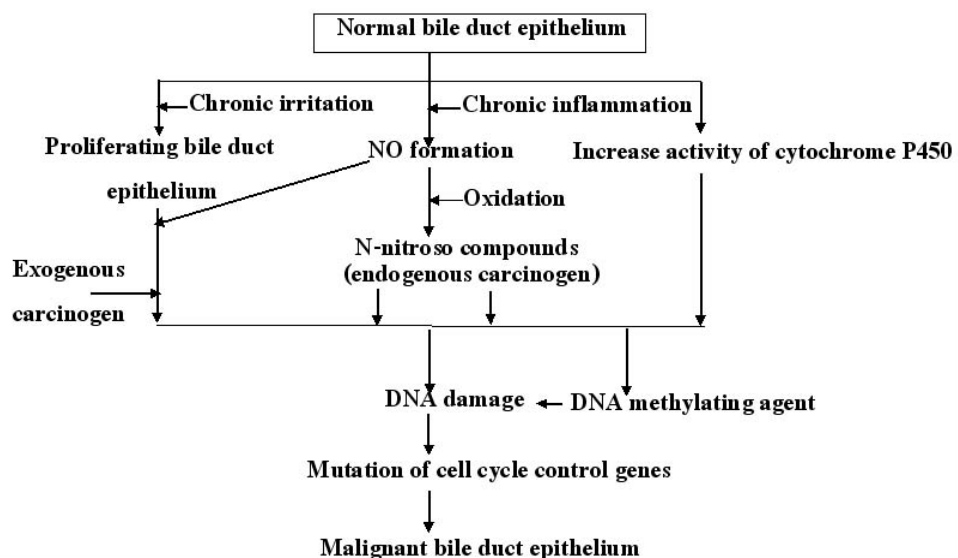
สารบัญ

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ (INTRODUCTION)	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (OBJECTIVES)	7
3. วิธีการทดลอง (MATERIALS AND METHODS)	7
4. ผลการทดลอง (RESULTS)	13
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (CONCLUSION AND DISCUSSION)	25
6. เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)	30
Appendix	34
Output ที่ได้จากโครงการ	38
ภาคผนวก	40
1. Reprint ที่ 1	41
2. Reprint ที่ 2	42
3. Manuscript 3	43

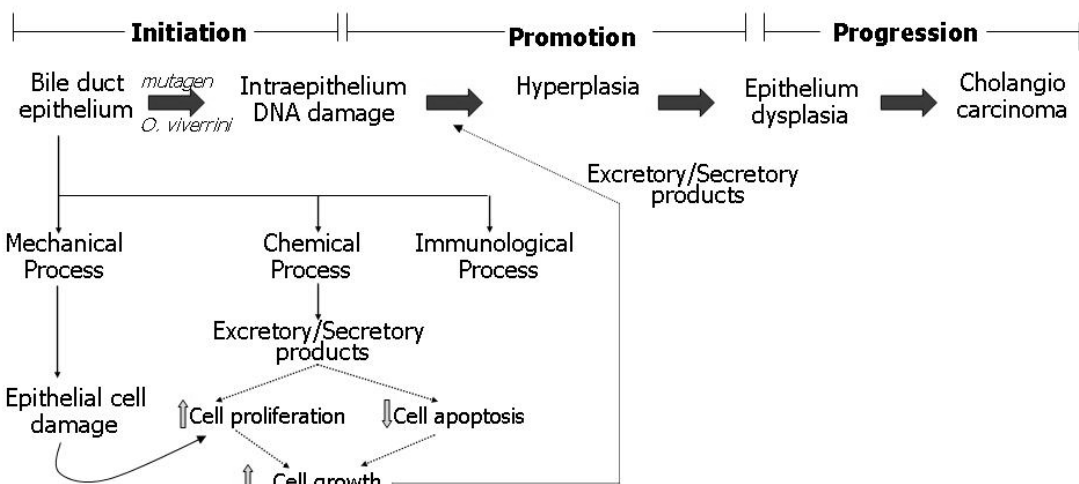
1. บทนำ (INTRODUCTION)

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ลาว และเวียดนาม (1, 2) ในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ควบคู่กับการได้รับสาร N-nitrosamine สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ (3-6) การศึกษาในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* พบว่ากระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจากการเหนี่ยวนำของพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*-associated cholangiocarcinogenesis) ประกอบด้วยหลายขั้นตอนและเกี่ยวข้องกับกลไกหลายอย่าง (7) (รูปที่ 1) การติดเชื้อพยาธิทำให้เกิด chronic irritation ต่อเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีปกติ และเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีเกิดการแบ่งเซลล์เพื่อทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลายไป ต่อมาจะเกิด adenomatous hyperplasia และ periductal fibrosis ของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีบริเวณที่มีพยาธิอาศัยอยู่ (8, 9) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจเกิดจากปัจจัยทาง mechanical หรือ biochemical โดยประการหลังเชื่อว่าเกิดจากสารคัดหลั่ง (excretory/secretory product, ES product) ที่ปล่อยออกมาจากตัวพยาธิ (2) กล่าวคือสารคัดหลั่งที่ปล่อยออกมาจากตัวพยาธิอาจมีผลโดยตรงต่อวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี ทำให้เซลล์มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น และเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) เมื่อโดนกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ถ้าการกลายพันธุ์นี้เกิดที่จีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง เช่น oncogene, tumor suppressor gene, cell cycle control gene, DNA repairing gene จะกระตุ้นให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้เร็วขึ้น



รูปที่ 1 การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีแบบ *O. viverrini*-associated cholangiocarcinogenesis (7)

จากทฤษฎี multistage carcinogenesis (10, 11) ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการที่สำคัญ ได้แก่ กระบวนการ initiation, promotion และ progression เมื่อนำมาใช้ในการอธิบาย cholangiocarcinogenesis เชื่อว่าในขั้นตอนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีนั้น nitrosamine เป็นสารที่ทำให้เกิดกระบวนการ initiation เนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติทำให้เกิด DNA damage หรือเรียกว่า initiator แต่ยังไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง และเชื่อว่าสารที่ผลิตจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นสารที่ทำให้เกิดกระบวนการ promotion เรียกสารประเภทนี้ว่า promoter มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell proliferation) เกิดเป็นภาวะที่เรียกว่า hyperplasia ต่อมา จะเห็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในภาวะ dysplasia หลังจากนั้นจึงเป็นกระบวนการ progression ซึ่งเซลล์จะมี DNA aberration สะสมมากขึ้นโดยเฉพาะจีนในกลุ่ม oncogenes และ tumor suppressor genes ซึ่งเป็น irreversible process และท้ายสุดเกิดเป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี บทบาทของ *O. viverrini* ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีนั้นสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2 โดยในส่วนของ *O. viverrini* ES product นั้น แม้ว่ามีสมมติฐานเกี่ยวกับความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น หากยังไม่มีข้อพิสูจน์ชัดเจนเกี่ยวกับบทบาทดังกล่าว

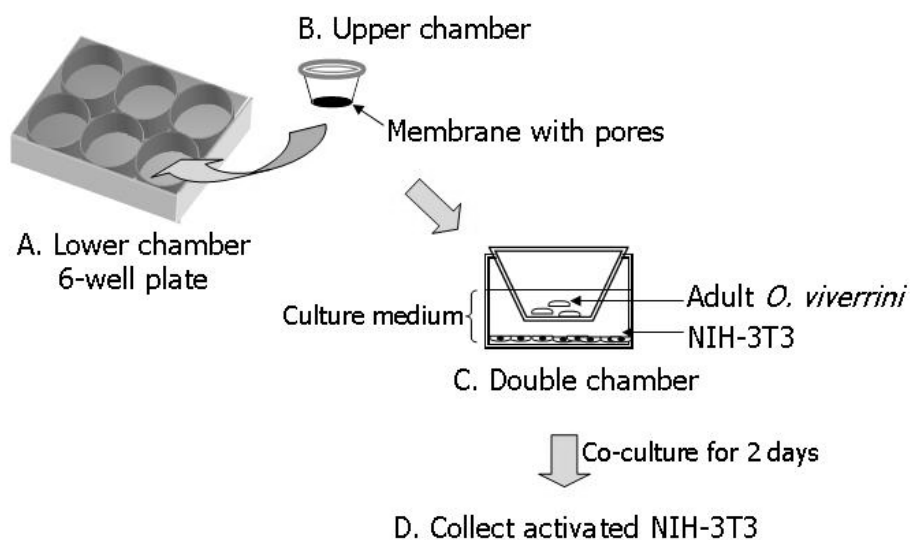


รูปที่ 2 บทบาทของ *O. viverrini* ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

รายงานในวารสารวิชาการเกี่ยวกับการศึกษาวิจัยผลของสารคัดหลั่งจากพยาธิชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ เช่น การศึกษาผลของสารคัดหลั่งจาก *Trypanosoma cruzi* ต่อการเติบโตของ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) โดยเลี้ยงเซลล์ PBMC และพยาธิร่วมกันโดยวิธีที่เรียกว่า co-culture technique (12) ผลการศึกษาพบว่าสารคัดหลั่งของ *T. cruzi* มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ PBMC นอกจากนี้การศึกษาผลของสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola hepatica* (13) พบว่าสารคัดหลั่งจากพยาธิตัวนี้สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของแกะ (sheep lymphocyte) ได้ และในขณะเดียวกันก็ลดปริมาณ CD₄ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นด้วย ซึ่งทั้งหมดนี้ทำให้กระบวนการสร้างภูมิคุ้มกัน (immune system) ของ

โฮสต์ (host) ลดลง อันจะเป็นประโยชน์ต่อพยาธิในการอาศัย และเติบโตได้ในเซลล์ตับและท่อน้ำดี จากผลการวิจัยดังกล่าวเหล่านี้ จะเห็นว่าการวิจัยเกี่ยวกับผลของสารคัดหลั่งจากพยาธิมีทั้งการศึกษาทั้งเซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยสารคัดหลั่งจากพยาธิมีผลต่อเซลล์ในลักษณะลดการแบ่งตัวของเซลล์ภูมิคุ้มกัน

การวิจัยโดยชนิตรา ฐวจิตต์และคณะ (14) เมื่อไม่นานมานี้เกี่ยวกับผลของสารคัดหลั่งจากพยาธิ *O. viverrini* ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยใช้เทคนิค non-contact co-culture ใน double chamber plate โดยเลี้ยงพยาธิ *O. viverrini* ไว้ในส่วนที่เรียกว่า upper chamber ซึ่งมีรูพรุน และเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการดูการเปลี่ยนแปลงไว้ในส่วน lower chamber (รูปที่ 3) ในการทดลองดังกล่าวนี้เลือกใช้เซลล์ mouse fibroblast cell line ชนิด NIH-3T3 เนื่องจากข้อดีของเซลล์ที่มีความไวต่อการกระตุ้นจากสารจากภายนอก กล่าวอีกนัยหนึ่งคือสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ได้ง่าย แม้ว่าสารกระตุ้นจากภายนอกจะมีปริมาณไม่มากก็ตาม ในเทคนิค non-contact co-culture นี้ สารคัดหลั่งที่สร้างจากพยาธิจะสามารถแพร่ผ่านรูพรุนลงไปสู่เซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงอยู่ด้านล่างได้ ข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้เทียบกับการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) คือ ในเทคนิค non-contact co-culture นี้ จะไม่มีผลของการสัมผัสกันของตัวพยาธิกับเซลล์เพาะเลี้ยงมารบกวน ทำให้สามารถศึกษาผลของสารคัดหลั่งจากพยาธิต่อเซลล์แต่เพียงอย่างเดียวได้ การทดลองดังกล่าวสรุปว่าสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงไว้ร่วมกันมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น (increased cell proliferation) โดยผ่านกลไกการควบคุมที่ G1-S phase ของ cell cycle โดยเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารคัดหลั่งจากพยาธิจะมีการแสดงออกของโปรตีนที่สำคัญ 2 ตัว คือ cyclin D1 และ phosphorylated retinoblastoma (pRB) เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์ผ่านเข้าสู่ระยะ S-phase ของ cell cycle ได้มากขึ้น เห็นได้จากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในระยะ S-phase จากการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของ cell cycle ด้วย flow cytometer จากความรู้เกี่ยวกับ cholangiocarcinogenesis ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยพยาธิ *O. viverrini* ดังแสดงในรูปที่ 1 (7) พบว่ากระบวนการเพิ่มการแบ่งเซลล์ (induction of cell proliferation) เป็นขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการเกิดมะเร็ง เนื่องจากเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น (hyperplastic cell) จะเป็นเซลล์ที่เกิด DNA damage ได้ง่ายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และเมื่อ DNA damage นั้นเกิดที่จีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น oncogene, tumor suppressor gene, DNA repairing gene หรือ cell cycle control gene ก็จะสามารถทำให้เซลล์นั้นเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด ในกรณีของ cholangiocarcinogenesis มีงานวิจัยหลายชิ้นพิสูจน์ว่ามี endogenous และ exogenous carcinogens หลายชนิดที่สร้างจากเซลล์ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อพยาธิ ทำให้เกิด DNA damage ของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี (15-17) จึงเป็นไปได้ที่บทบาทของพยาธิใบไม้ตับในการก่อให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีนั้น นอกจากตัวพยาธิ *O. viverrini* จะเป็น initiator แล้ว อาจทำหน้าที่เป็น promoter ในการทำให้เซลล์แบ่งตัวได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งทั้งหมดนี้จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีปกติเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด



รูปที่ 3 องค์ประกอบของระบบ double chamber culture สำหรับศึกษาผลของ ในหลอดทดลอง (18)

- A. ชั้นล่าง (lower chamber) เป็นหลุมที่ใช้เลี้ยงเซลล์ NIH-3T3
- B. ชั้นบน (upper chamber) เป็นชิ้นส่วนซึ่งจะประกอบเข้าในชั้นล่าง โดยส่วนประกอบของชั้นบนจะมีแผ่นกรองที่มีรูขนาดเล็กอยู่ด้านใต้ เพื่อกั้นระหว่างองค์ประกอบของชั้นบนและชั้นล่าง โดยขนาดของรูจะเล็กพอที่จะกั้นไม่ให้พยาธิตัวเต็มวัยหลุดลอดออกมาในชั้นล่างได้
- C. องค์ประกอบเมื่อทำการทดลอง non-contact co-culture น้ำเลี้ยงเซลล์จะเป็นชนิดเดียวกันทั้งเซลล์ชั้นบนและชั้นล่าง *O. viverrini* ES product สามารถลอดผ่านแผ่นกรองมาอยู่ในชั้นล่างซึ่งมีเซลล์ NIH-3T3 อยู่
- D. เซลล์ NIH-3T3 จะถูกเก็บเพื่อไปนับจำนวนและ/หรือศึกษาการตอบสนองต่อ *O. viverrini* ES product

นอกจากนี้ผลการวิจัยโดย ชนิตรา ฐวจิตต์ และคณะ (14) ยังบ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารคัดหลั่งจากพยาธิ *O. viverrini* ทำให้เซลล์มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นนั้น เหมือนกับผลที่เกิดขึ้นในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 10% serum ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าในสารคัดหลั่งจากพยาธิ *O. viverrini* อาจมีสารที่ทำหน้าที่คล้ายกับ growth factor (growth factor-like substance) ที่มีอยู่ใน serum ซึ่งสามารถมากระตุ้นให้เซลล์มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นได้ การตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้นจากภายนอกที่เป็นสารพวก growth factor เกิดเมื่อ growth factor มาจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์ (cell surface receptor or membrane receptor) และกระตุ้นให้เกิด intracellular signal transduction เพื่อส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์แบบเป็นลำดับขั้น (signaling cascade) และท้ายสุดเข้าไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องทั้งโดยตรงและโดยอ้อมต่อการแบ่งตัวของเซลล์

ข้อมูลเบื้องต้นจาก ชนิตรา ฐวจิตต์ และคณะ (unpublished data) พบว่าเมื่อนำเซลล์ NIH-3T3 ที่เลี้ยงร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมดในเซลล์โดยเทคนิค cDNA microarray บ่งชี้ว่ามียีนหลายกลุ่มที่มีระดับการแสดงออกที่ระดับ mRNA เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นโดยสารคัดหลั่งจากพยาธิ *O. viverrini* โดยกลุ่มยีนที่มีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าเซลล์ตอบสนองต่อ *O. viverrini* growth factor-like substance ใดๆนั้น ได้แก่ ยีนในกลุ่ม signal transduction pathway และ transcription factor ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction pathway ในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เปรียบเทียบกับเซลล์ NIH-3T3 ปกติ เพื่ออธิบายกลไกภายในเซลล์ที่สารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว โดยได้คัดเลือกยีนที่มีระดับการแสดงออกมากขึ้นเป็นจำนวน 2 เท่าขึ้นไป จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค cDNA array และเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathway ของ known growth factor ได้แก่ epidermal growth factor (EGF) platelet-derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factor-beta (TGF- β) ยีนที่เกี่ยวข้องใน pathway ของการกระตุ้นโดย PDGF ได้แก่ ยีน tyrosine kinase (*abl*) (19, 20), protein kinase C (*pkC*) (21, 22), PDGF receptor α -polypeptide (*pdgfra*), *h ras* และ *jak 1* protein tyrosine kinase (23, 24) ยีนที่เกี่ยวข้องใน pathway ของการกระตุ้นโดย EGF ได้แก่ EGF receptor pathway substrate 8 (*eps 8*) (25) และยีนที่เกี่ยวข้องใน pathway ของการกระตุ้นโดย TGF- β ได้แก่ TGF- β 1 induced transcript 4 (*tgfb 1/4*) และ serine-threonine receptor-associated protein (*strap*) (26, 27) ดังได้สรุปรายชื่อยีนและระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ NIH-3T3 จากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product เปรียบเทียบกับระดับปกติในเซลล์ NIH-3T3 (ตารางที่ 1) ในโครงการวิจัยนี้จะได้ศึกษายีนยีนระดับการแสดงออกดังกล่าวโดยเทคนิค real time RT-PCR

ตารางที่ 1 รายชื่อกลุ่ม signal transduction pathway ที่จะทำการศึกษายืนยันระดับการแสดงออก โดยเทคนิค real time RT-PCR (แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดของ growth factor)

ลำดับที่	Gene name(s)	Up-regulated fold (cDNA array data)
PDGF/EGF signal transduction genes		
1	Tyrosine kinase	7.12
2	Protein kinase C	4.23
3	Platelet-derived growth factor, alpha polypeptide	2.64
4	JAK1 protein tyrosine kinase	2.56
5	H-ras	2.26
EGF signal transduction gene		
6	EGF receptor pathway substrate 8	2.32
TGF-β signal transduction genes		
7	TGF- β induced transcript 4	8.24
8	Serine/threonine kinase receptor-associated protein	3.40

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้วางแผนครอบคลุมการใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) ในการทดสอบบทบาทของยีนกลุ่ม signal transduction pathway ที่มีระดับการแสดงออกสูง เพื่อบ่งชี้บทบาทของยีนนั้นต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์จากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product โดยเทคนิค RNAi ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) (28, 29) แม้ว่าประสิทธิภาพในการทำ RNAi ใน mammalian cell จะไม่แน่นอนขึ้นกับชนิดของเซลล์และยีนที่ต้องการยับยั้ง แต่รายงานการทำ RNAi เพื่อทำให้เกิดการลดลงของระดับโปรตีน (protein knockout) ในเซลล์ NIH-3T3 นั้นมีประสิทธิภาพสูง (30) ในโครงการวิจัยนี้ signal transduction pathway ที่มีผลบ่งชี้ว่าน่าจะถูกกระตุ้นโดย *O. viverrini* ES product จะถูกยับยั้งการส่งสัญญาณ แล้วนำเซลล์ดังกล่าวไปทดสอบการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เปรียบเทียบกับเซลล์ NIH-3T3 ปกติ โดยเฉพาะคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (OBJECTIVES)

- 2.1 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction ในเซลล์เพาะเลี้ยง NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารคัดหลังจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*
- 2.2 เพื่อพิสูจน์หน้าที่ของยีนกลุ่ม signal transduction ต่อการแบ่งเซลล์จากการกระตุ้นโดยสารคัดหลังจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*
- 2.3 เพื่อบ่งชี้ signal transduction pathway ที่สารคัดหลังจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ใช้ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์

3. วิธีการทดลอง (MATERIALS AND METHODS)

3.1 การเตรียมพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตัวเต็มวัย

พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ metacercaria ถูกคัดแยกจากการย่อยเนื้อปลากลุ่ม cyprinoid (cyprinoid fish) ซึ่งหาได้ใน endemic area ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อันเป็นแหล่งที่มีอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในปลาสูง โดยนำเนื้อปลามาย่อยด้วย Pepsin-HCl จากนั้นคัดเลือกเฉพาะพยาธิใบไม้ตับระยะ metacercaria ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ นำ metacercaria ที่ได้ไปให้หนู hamster อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์กิน (ad libitum) ในอัตราส่วน metacercaria 50 ตัวต่อหนู 1 ตัว เลี้ยงหนูเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ พยาธิจะพัฒนาเป็นพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัย อยู่ในท่อน้ำดี ของหนู hamster จากนั้นคัดแยกพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัยจากหนู โดยวิธี semi-sterile นำพยาธิตัวเต็มวัยล้างในสารละลาย PBS ที่มี 100 mg/L penicillin และ 100 kU/L streptomycin จำนวน 2 ครั้ง และแช่พยาธิในสารละลายดังกล่าว ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อโรคที่อาจปนเปื้อนมาในขั้นตอนของการคัดแยกพยาธิ นำพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัยไปใช้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ NIH-3T3 หรือใช้ในการเก็บ ES product ต่อไป การทดลองในส่วนนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Animal Ethics Committee of Khon Kaen University) เลขที่อนุมัติ AEKKU011/04 ซึ่งเป็นไปตามหลักการทำทดลองที่ถูกต้องในสัตว์ทดลองของ Ethics of Animal Experimentation of National Research Council of Thailand

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 และการเพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตัวเต็มวัยแบบ non-contact co-culture

เซลล์ mouse fibroblast cell line ชนิด NIH-3T3 จัดซื้อจาก American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) เพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) ที่ประกอบด้วย 100 mL/L (10%) calf serum (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) (complete medium) ในตู้ CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C ในแบบเซลล์เกาะติด (adherent cell) เมื่อเซลล์มีจำนวนมากพอ trypsinize เซลล์ โดยใช้ 0.25%

trypsin pH 7.5 เพาะเลี้ยงใน cell culture flask ใหม่ ใช้เทคนิค trypan blue staining ในการย้อมเพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) โดยเซลล์ที่มี viability มากกว่า 95% จะถูกนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตัวเต็มวัยต่อไป

เซลล์ NIH-3T3 และพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตัวเต็มวัยถูกนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันแบบ non-contact co-culture (14) ใน 24-well transwell (Costar, Corning Incorporated, Cambridge, NY, USA) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 ไว้ในส่วน lower chamber (รูปที่ 3) และเลี้ยงพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตัวเต็มวัยในส่วน upper chamber ซึ่งประกอบด้วย membrane ที่มีรูขนาด 8- μ m ซึ่งสารคัดหลั่งจากพยาธิสามารถผ่าน membrane ดังกล่าวลงไปสัมผัสกับเซลล์ NIH-3T3 ที่อยู่ด้านล่างได้ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 จำนวน 10,000 เซลล์เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับ cell culture plate อย่างดี และจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ไม่มี calf serum (serum free medium) ใส่พยาธิตัวเต็มวัยใน upper chamber จำนวน 5 ตัว เพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัยเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้เทคนิค trypan blue staining ในการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell) เซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ตาย (dead cell) โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิและที่เพาะเลี้ยงตามลำพัง โดยใช้สภาวะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 ใน complete medium และใน serum free medium เป็น positive และ negative controls ตามลำดับ เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิตัวเต็มวัยส่วนหนึ่งใน RNeasy (Ambion®, Hilden, Germany) เพื่อใช้ในการสกัดแยก RNA เพื่อทดสอบระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction pathway ในการทดลองต่อไป

3.3 การวัดระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction ในเซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัย โดยเทคนิค real-time RT-PCR

สกัดแยก total RNA จากเซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิใบไม้ตับโดย Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Fegersheim, France) ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารประกอบสินค้า (manufacturer's leaflet) กำจัดการปนเปื้อน DNA โดยใช้ DNase I (Promega Corporation, Madison, WI, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำลาย DNase I โดย incubate ที่ 75°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ total RNA จำนวน 1 μ g ไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) นำ cDNA ที่ได้ไปวัดการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction pathway แบบ semi-quantitative PCR โดยใช้ SYBR-based method ทำปฏิกิริยาปริมาณรวม 12.5 μ L ในเครื่อง Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research) โดยมีขั้นตอนการทำ real time PCR ดังต่อไปนี้ denature cDNA ที่ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ทำ PCR จำนวน 50 cycles; Denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 52, 55, 58, 58, 54, 52, 52, 62, 65, และ 60°C สำหรับยีน *abl* 1, *pkc*, *pdgfr α* , *jak* 1, *eps* 8, *tgf β* 1i4, *strap*, *raf* 1, *h ras*, และ β_2m ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที (ตารางที่ 2)

ลำดับเบสของ primer สำหรับแต่ละจีนแสดงในตารางที่ 2 ใช้ β_2 -microglobulin (β_2m) เป็นจีนควบคุม (internal control) เปรียบเทียบค่า CT ที่ได้จากการทำ real time PCR กับ ปริมาณ RNA ตั้งต้น โดยการทำให้ standard curve และใช้เทียบค่า CT ที่ได้จากการทดลองเพื่อ บ่งชี้ปริมาณ RNA ของจีนชนิดต่างๆ ในเซลล์ NIH-3T3 ที่เลี้ยงร่วมกับพยาธิเทียบกับเซลล์ NIH-3T3 ปกติ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์หาความแตกต่างและความน่าเชื่อถือทางสถิติ โดย STATA version 8 (StataCorp LP, Texas, USA) นำค่าการแสดงผลออกของจีนแต่ละตัว เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการศึกษาโดย cDNA array (วิธีทำการทดลองและผลการทดลอง cDNA array แสดงใน Appendix)

ตารางที่ 2 แสดง nucleotide sequences ของ primer แต่ละตัวสำหรับจีนกลุ่ม signal transduction pathway

Group of stimulating growth factor ¹	Gene	Primer sequence	Annealing temperature(°C)/ Product size (bp)
PDGF/EGF	<i>abl</i> 1	Forward: 5'-TGAAGTTGGTGGGCTGCA-3' Reverse: 5'-TTTTCACTGGGCCCCGCA-3'	52/148
	<i>pkC</i>	Forward: 5'-GGCATGCCTTGTCTCTGGAGA-3' Reverse: 5'-TGTAGCCCTGCCTCGAGAGA-3'	55/149
	<i>jak</i> 1	Forward: 5'-CAGCCTCGCTCGTCCTT-3' Reverse: 5'-CCAAGCCCTTCAGAGCT-3'	58/147
	<i>raf</i> 1	Forward: 5'-TTTCCCGGATGCCTGCTA-3' Reverse: 5'-TCCTGCTGTCCCATGCA-3'	62/147
	<i>h ras</i>	Forward: 5'-TGGTGGGCAACAAGTGTGA-3' Reverse: 5'-CCGCAATTTATGCTGCCGAA	65/150
PDGF	<i>pdgfrα</i>	Forward: 5'-TGCGGGGAAGGACTGGA-3' Reverse: 5'-GTGAGGAGACAGCTGAGGA-3'	58/122
EGF	<i>eps</i> 8	Forward: 5'-CCGCTCCGTGGGTATGGA-3' Reverse: 5'-ACGTCCGACACACTGCTGA-3'	54/146
TGF-β	<i>tgfβ</i> 1/4	Forward: 5'-GCAAGTGTGGTAGCTATCGA-3' Reverse: 5'-CAGATTGTTCTCCTGCTCC-3'	52/136
	<i>strap</i>	Forward: 5'-GCCGGGAGATACAGGAGA-3' Reverse: 5'-TGCTTATGAGCCGGGTCA-3'	52/153

¹แบ่งตามการทำงานของผลิตภัณฑ์ของจีนในแต่ละ signal transduction pathway โดยการกระตุ้นจาก growth factor ที่ต่างกัน; PDGF; platelet-derived growth factor, EGF; epidermal growth factor, TGF-β; transforming growth factor-β

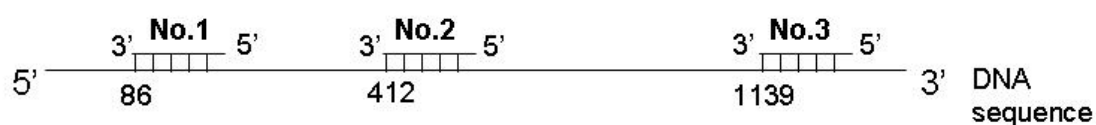
²Primers สำหรับ internal control (β_2m): 5'-CATGGCTCGCTCGGTGA-3' forward primer และ 5'-AATGTGAGGCGGGTGGAA-3' reverse primer โดยใช้ annealing temperature และได้ product size เท่ากับ 60°C และ 148 bp ตามลำดับ

3.4 การยับยั้งการแสดงออกของ transforming growth factor- β receptor type II (TBRII) โดยเทคนิค RNAi

เทคนิค RNAi ถูกนำมาใช้เพื่อลดการแสดงออกของยีน transforming growth factor- β receptor type II (TBRII) ตามขั้นตอนที่ได้มีการรายงานในวารสาร (31) ขั้นตอนโดยย่อ ได้แก่ การออกแบบ siRNA ที่จำเพาะต่อ mRNA ของยีน TBRII โดยใช้โปรแกรม RNAi designer (StealthTM RNAi, invitrogenTM) ได้สาย siRNA ที่เหมาะสมในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TBRII จำนวน 3 สาย (ตารางที่ 3) ซึ่งจับที่บริเวณที่แตกต่างกันไปบนสาย mRNA ของยีน TBRII (รูปที่ 4) นำ siRNA ทั้ง 3 สายไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TBRII ทั้งแบบใช้สายเดี่ยว และแบบผสม โดยใช้ siRNA สายที่ 2, สายที่ 2+1 และสายที่ 2+3 ปริมาณ 20 μ g ร่วมกับ Lipofectamine (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:40 ใส่สารละลาย siRNA แต่ละชนิดดังกล่าวในเซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงใน complete medium มาเป็นเวลา 1 วัน โดย incubate สารละลาย siRNA กับเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็น complete medium และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึง trypsinize เซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin pH 7.5 เพื่อนำไปสกัดแยก total RNA ในขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้เพื่อยืนยันประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน TBRII

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของสาย siRNA ต่อยีน TBRII (siTBRII)

No.	siRNA sequences	Coverage (base-base)
1	GGUUCAGCCAAUUGUCACUACAGUA	86-110
2	ACAUUGUACCUUCUCACGUUGCUGAA	412-436
3	AGUUCUCGAGAUUGUAGGAUCACUU	1139-1163



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งการจับของ siRNA แต่ละชนิดบนสาย mRNA ของยีน TBRII

3.5 การวัดระดับการแสดงออกของยีน *TBR1* โดยเทคนิค real time RT-PCR

สกัดแยก total RNA โดยใช้สาร Trizol (Invitrogen) ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารประกอบสินค้า (manufacturer's leaflet) กำจัดการปนเปื้อน DNA โดยใช้ DNase I (Promega Corporation, Madison, WI, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำลาย DNase I โดย incubate ที่ 75°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ total RNA จำนวน 1 µg ไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) นำ cDNA ที่ได้ไปวัดการแสดงออกของยีน *TBR1* แบบ Relative-quantification PCR โดยใช้ SYBR-based method ทำปฏิกิริยาปริมาณ 25 µL ในเครื่อง ABI 7500 (Apply Biosystem) โดยมีขั้นตอนการทำ real time PCR ดังต่อไปนี้ denature cDNA ที่ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ทำ PCR จำนวน 50 cycles; denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 54°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ลำดับ base ของ *TBR1* primers ที่ใช้คือ 5' GGCTTCACTCTGGAAGATGC 3' สำหรับ forward primer และ 5' GGGACTGCTGGTGGTGTATT 3' สำหรับ reverse primer ใช้ β_2m เป็น internal control โดยใช้ primers และ annealing temperature ดังที่แสดงในข้อ 2.3 นำค่า CT ที่ได้จากการศึกษาวัดระดับการแสดงออกของยีน *TBR1* ในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูก treat ด้วย si*TBR1*, เซลล์ที่ treat ด้วย lipofectamine และเซลล์ NIH-3T3 ปกติ มาเปรียบเทียบกันโดยใช้สูตรการคำนวณแบบ Relative-quantification $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method (32)

3.6 การวัดผลการกระตุ้นเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของ *TBR1* โดยสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

หลังจากที่ยับยั้งการแสดงออกของ *TBR1* ด้วยเทคนิค RNAi โดยวิธีการดังกล่าว ใน 2.4 แล้ว เซลล์ส่วนหนึ่งจะถูกนำไปวัดผลการกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดยสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เปรียบเทียบกับเซลล์ NIH-3T3 ที่ treat ด้วยสาร Lipofectamine และเซลล์ NIH-3T3 ปกติ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate จำนวน 6,000 cells ใน complete medium ในตู้ CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออก ล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM ที่ปราศจาก serum (serum-free medium) เพื่อกำจัด serum ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออก จากนั้นเติมสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จำนวน 200 µl เพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึง trypsinize เซลล์ โดยใช้ 0.25% trypsin pH 7.5 เพื่อนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell) เซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ตาย (dead cell) โดยใช้เทคนิค trypan blue staining โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับพยาธิและที่เพาะเลี้ยงตามลำพัง โดยใช้สภาวะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ NIH-3T3 ใน complete medium และใน serum free medium เป็น positive และ negative controls ตามลำดับ

4. ผลการทดลอง (RESULTS)

4.1 การแสดงออกของ *signal transduction-related genes* ต่อสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

ผลการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีน (gene expression profile) ในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นจาก *O. viverrini* ES product โดยเทคนิค cDNA array พบว่ามีจีนมากกว่า 885 ชนิดที่มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นจากเซลล์ NIH-3T3 ปกติ (รายละเอียดใน Appendix) ในจำนวนจีนดังกล่าวมี 239 จีน ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ (cell proliferation-related function) และเมื่อนำมาแบ่งกลุ่มตามหน้าที่พบว่าอยู่ในกลุ่ม energy and metabolism, signal transduction, protein synthesis and translation, matrix and structural protein, transcription control, cell cycle และ DNA replication ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องทั้งโดยตรงและโดยอ้อมต่อการแบ่งตัวและการเติบโตของเซลล์

เมื่อพิจารณาจีนกลุ่มที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณในเซลล์ (signal transduction pathway) พบว่ามีจำนวน 59 จีน ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ES product ให้มีการแสดงออกมากขึ้นกว่าในเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสกับสารคัดหลั่ง เป็นจำนวน 2 เท่าขึ้นไป ได้แก่จีนที่เกี่ยวข้องใน signal transduction pathway ของการกระตุ้นโดย growth factor ต่างชนิดกัน ได้แก่ PDGF or EGF, PDGF, EGF และ TGF- β (ตารางที่ 4) โดยจีน *tgfb 1i4* และ *abl 1* ซึ่งเป็นจีนใน signal transduction pathway ของ TGF- β และของ PDGF/EGF ตามลำดับ มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุดสองลำดับแรก

นอกจากจีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนจำเพาะใน signal transduction pathway แล้ว ยังมีการแสดงออกของจีนที่ทำหน้าที่เป็น receptor เพิ่มขึ้น จากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product เช่น tyrosine kinase และ serine-threonine kinase receptors (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 รายชื่อ signal transduction-related genes ในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดย *O. viverrini* (แบ่งเป็นกลุ่มตามการตอบสนองต่อ growth factor แต่ละชนิด)

Related growth factor (Accession number)	Gene name/Production	Folding (cDNA array data)
PDGF/EGF		
AW544655	Tyrosine kinase (<i>v abl</i>)	7.12
C80388	Protein kinase C (<i>pkC</i>)	4.23
AU042564	Casein kinase I-alpha isoform (<i>csnk 1 α1</i>) ¹	3.81
C87299	Casein kinase I-epsilon (<i>csnk 1 ϵ</i>)	2.88
AU046274	Ras-GTPase activating protein SH3-domain binding protein (<i>c3bp</i> -pending)	2.73
C87788	<i>JAK1</i> protein tyrosine kinase	2.56
AU017366	<i>H ras</i>	2.26
AW552623	<i>N ras</i>	2.01
PDGF		
AW537708	PDGF receptor, alpha-polypeptide (<i>pdgfr α</i>)	2.64
EGF		
C88280	Epidermal growth factor receptor pathway substrate (<i>eps 8</i>)	2.32
TGF-β		
AW546174	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4 (<i>tgfβ1i4</i>)	8.24
AU016757	<i>c myc</i>	3.70
C79202	Serine/threonine kinase receptor associated protein (<i>strap</i>)	3.40

¹represents human gene

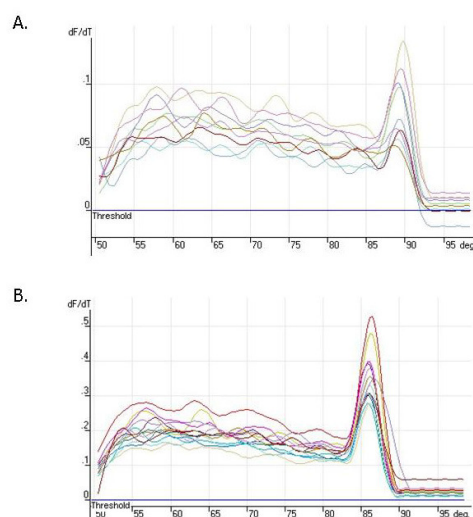
ตารางที่ 5 รายชื่อ kinase receptors ในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดย *O. viverrini*

Receptor kinases	Gene names (Accession number)	Folding (cDNA array data)
Serine-threonine kinase receptor	Serine/threonine kinase receptor associated protein (C85710)	3.40
	Serine/threonine kinase* (C81033)	3.88
	Serine/threonine protein-kinase* (AW546799)	2.05
Tyrosine kinase receptor	TYRO3 protein tyrosine kinase 3 (AW556118)	2.60
	JAK1 protein tyrosine kinase (C87788)	2.56
	Protein tyrosine kinase 9 (AW544421)	1.83
	Downstream of tyrosine kinase (AW557123)	1.59

4.2 การแสดงออกของ *signal transduction-related genes* จำเพาะต่อ *growth factor* ชนิดต่าง ๆ

การศึกษายืนยันระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *signal transduction pathway* ที่จำเพาะต่อการกระตุ้นโดย *growth factor* แต่ละชนิด โดยเทคนิค *real time RT-PCR* พบว่าผลการทำ *real time PCR* มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการทำ *PCR* ให้ผลเป็น *single peak* แสดงว่าไม่มี *non-specific product* เกิดขึ้นในขั้นตอนของการทำ *PCR* (รูปที่ 5) ผลการทดลองบ่งชี้ปริมาณการแสดงออกที่ต่างกันของยีนในเซลล์ที่สัมผัส และไม่ได้สัมผัสกับ *O. viverrini* ES product (รูปที่ 6) เมื่อนำค่า CT ที่ได้จากตัวอย่างทั้งสองไปเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า CT และปริมาณ mRNA ตั้งต้น (*standard curve*) (รูปที่ 7 และ 8) พบระดับการแสดงออกของยีน *tgfb 1i4*, *eps 8*, *pkC* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยีน *jak 1*, *strap* และ *h ras* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *pdgfra* ไม่เปลี่ยนแปลง และยีน *abl 1* และ *raf 1* มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเซลล์สัมผัสกับ *O. viverrini* ES product (ตารางที่ 6)

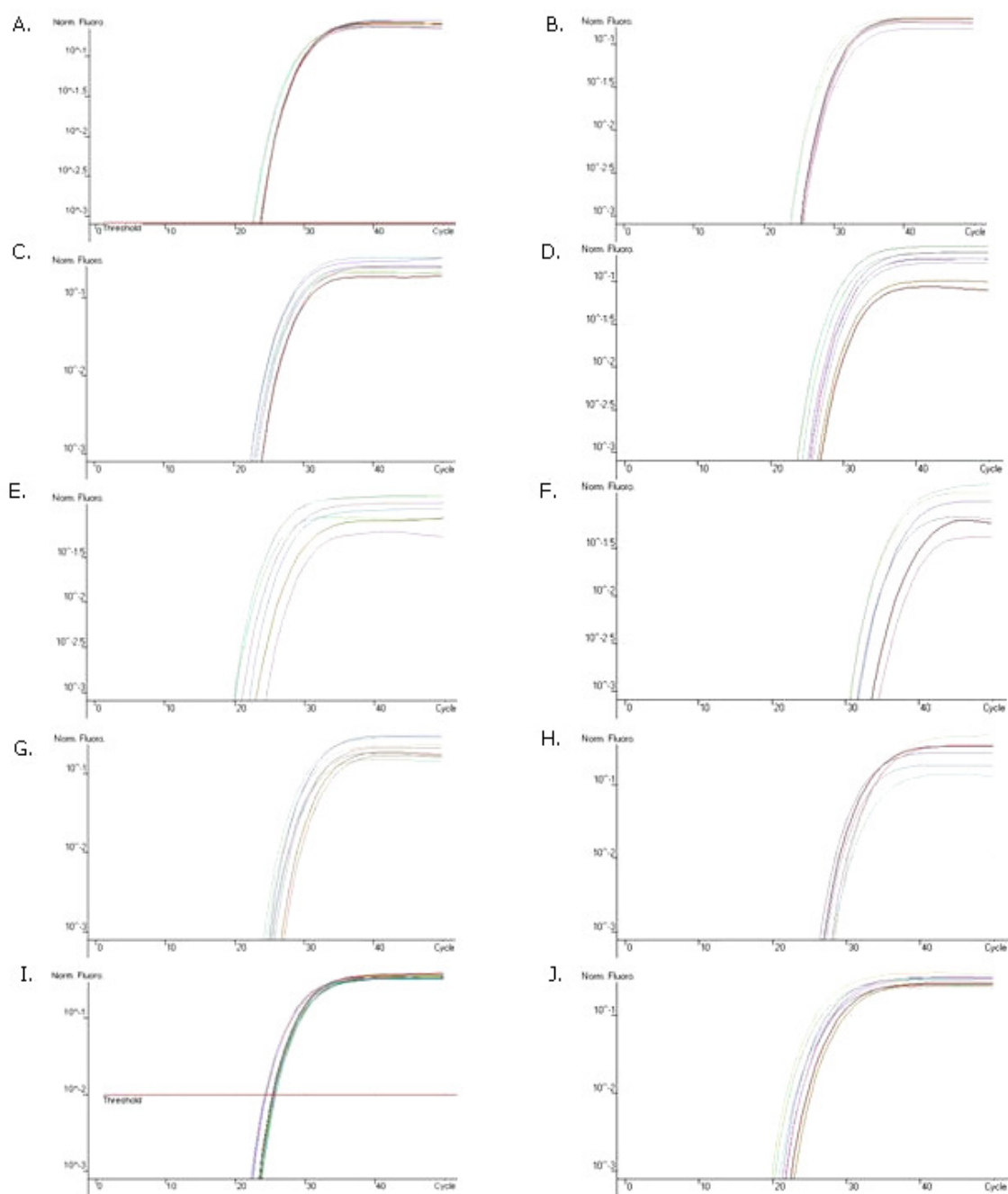
เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนจากการศึกษาโดยเทคนิค *real time RT-PCR* กับผลการศึกษาโดย *cDNA array* พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลการแสดงออกของยีนที่สอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ กล่าวคือ ยีน *pkC*, *jak 1*, *h ras*, *pdgfra*, *eps 8*, *tgfb 1i4*, และ *strap* มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product เหมือนกันจากทั้งสองเทคนิค อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ยีน *pkC*, *eps 8* และ *tgfb 1i4* เท่านั้น ในขณะที่ผลจากการทำ *real time RT-PCR* บ่งชี้ระดับการแสดงออกที่ลดลงของยีน *abl 1* และ *raf 1* ต่างจากผลที่ได้จาก *cDNA array* (รูปที่ 9)



รูปที่ 5 ตัวอย่าง Melting peak จากการทำ *real time RT-PCR*

A = β_2m (internal control)

B = *eps8*



รูปที่ 6 กราฟแสดงผล real time RT-PCR ของจีโนมเซลล์ NIH-3T3 ที่เลี้ยงและไม่ได้เลี้ยง ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัย

A = *raf 1*

B = *abl*

C = *eps 8*

D = *strap*

E = *pdgfra*

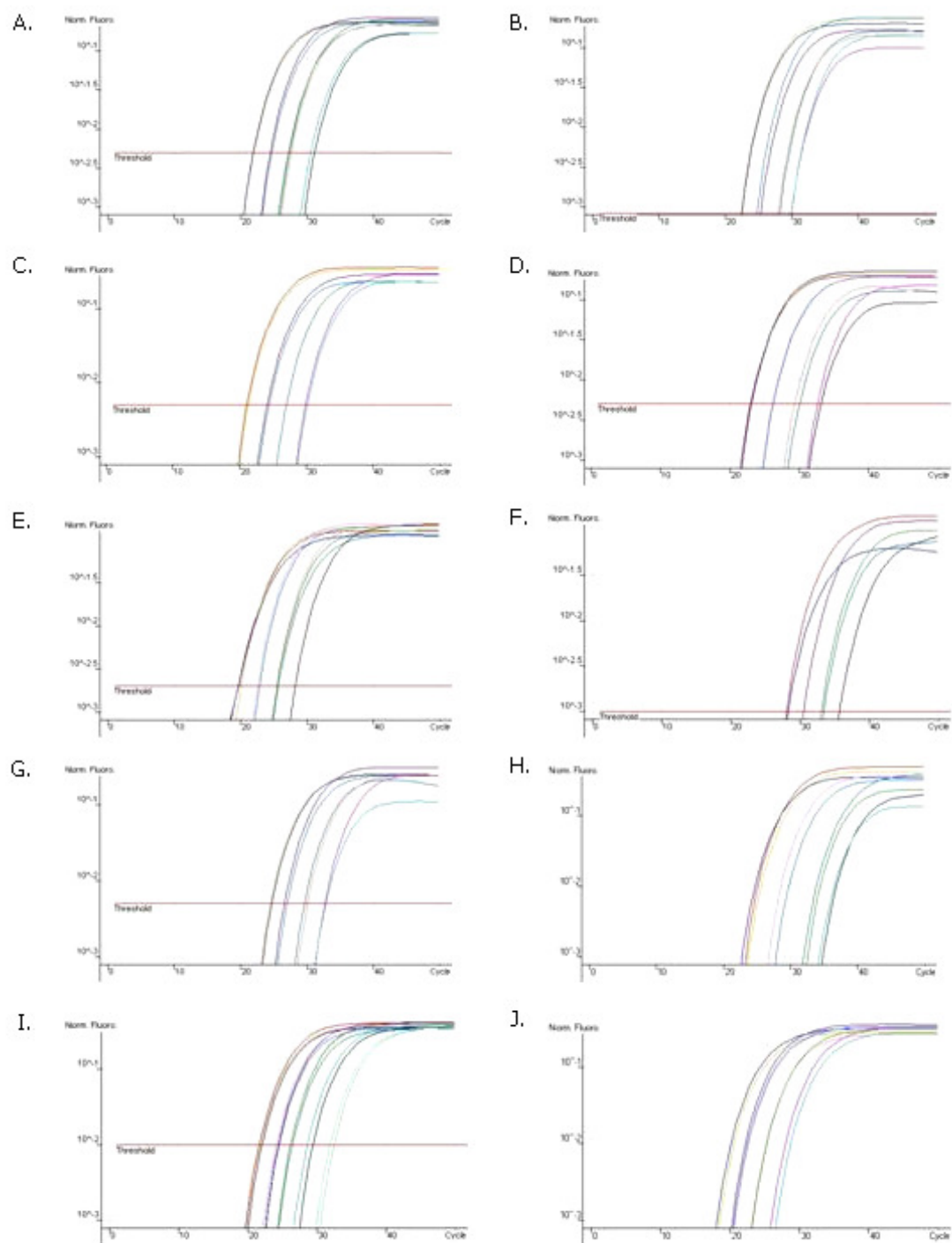
F = *pkC*

G = *jak 1*

H = *tgfb 1i4*

I = *h ras*

J = β_2m (internal control)



รูปที่ 7 กราฟแสดงผล real time RT-PCR ของจีน เมื่อใช้ cDNA ปริมาณต่างๆ

A = *raf 1*

B = *abl*

C = *eps 8*

D = *strap*

E = *pdgfra*

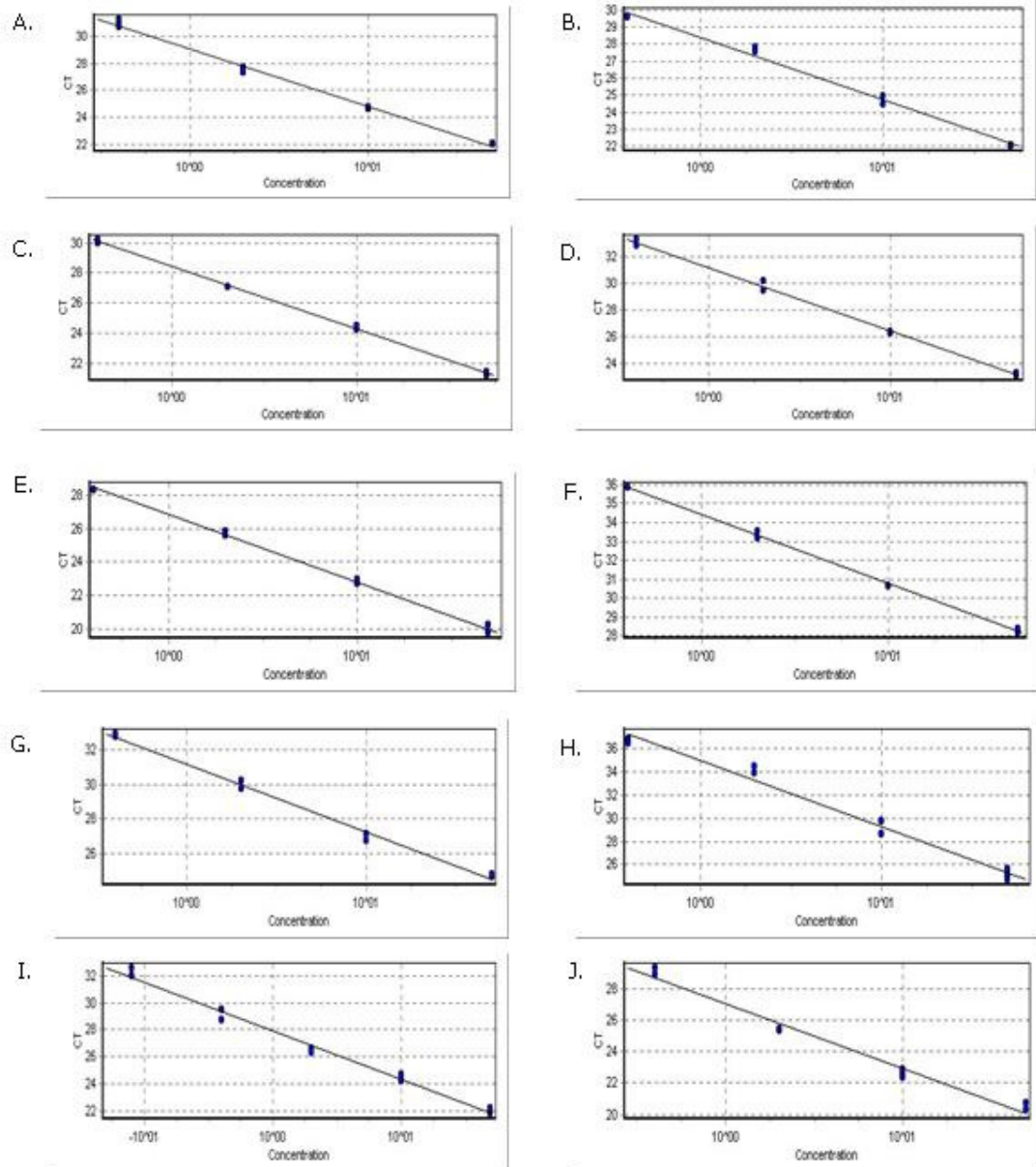
F = *pkC*

G = *jak 1*

H = *tgfβ 1i4*

I = *h ras*

J = β_2m (internal control)



รูปที่ 8 Standard curve จากการทำ real time RT-PCR ของจีนต่างๆ

A = *raf 1*

B = *abl*

C = *eps 8*

D = *strap*

E = *pdgfra*

F = *pkC*

G = *jak 1*

H = *tgf β 1i4*

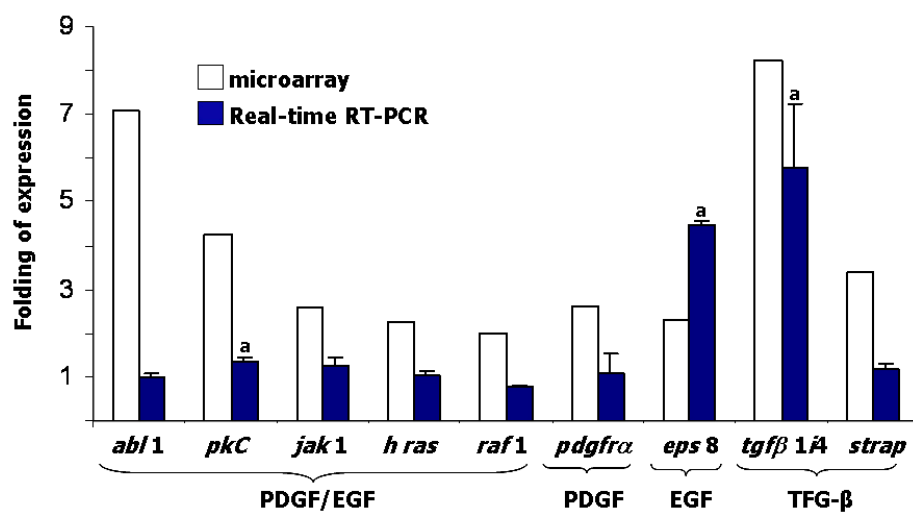
I = *h ras*

J = β_2m (internal control)

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาการระดับการแสดงออกของ signal transduction genes โดยเทคนิค real time RT-PCR ในเซลล์ NIH-3T3 ที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆ

Genes	Amount of interested gene/amount of β_2m in NIH-3T3 cells treated with (mean value)			Up-regulation folding (b/a) (mean $\pm$ SD)
	0% serum ^a	<i>O. viverrini</i> ^b	10% serum	
<i>tgfβ 1i4</i>	0.22	1.31	2.59	5.95 $\pm$ 1.455*
<i>strap</i>	1.24	1.44	1.16	1.16 $\pm$ 0.163
<i>abl</i> 1	1.43	1.40	2.50	0.98 $\pm$ 0.107
<i>raf</i> 1	1.70	1.32	2.13	0.78 $\pm$ 0.001
<i>eps</i> 8	0.50	2.25	1.93	4.40 $\pm$ 0.099*
<i>h ras</i>	0.7	0.74	0.71	1.066 $\pm$ 0.0815
<i>jak</i> 1	1.47	1.85	1.52	1.25 $\pm$ 0.177
<i>pkC</i>	0.65	0.86	0.3	1.53 $\pm$ 0.124*
<i>pdgfrα</i>	2.1	2.28	1.13	1.08 $\pm$ 0.442

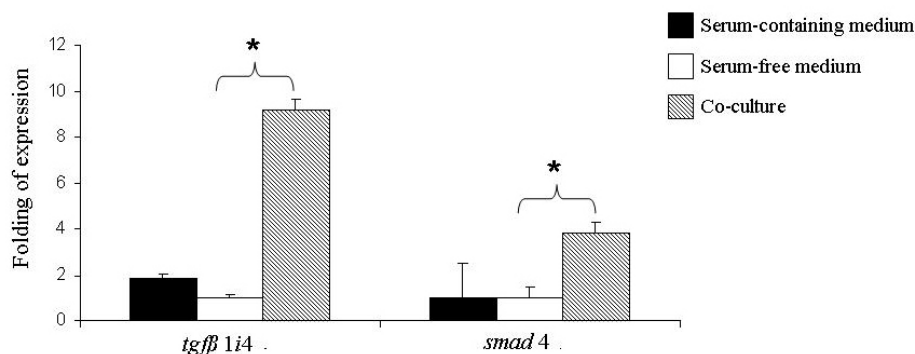
* p value < 0.05



รูปที่ 9 ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม signal transduction pathway เปรียบเทียบระหว่างเทคนิค DNA array และ real time RT-PCR (mean $\pm$ SD, ^a p value < 0.05)

4.2 ผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ *TGF- β* (*TGF- β related gene*) ในเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกกระตุ้นโดย *O. viverrini* ES product

ในเส้นทางส่งสัญญาณของเซลล์จากการกระตุ้นโดย *TGF- β* (*TGF- β mediated signal transduction pathway*) นั้นพบว่ามีเส้นทางที่สำคัญ 2 เส้นทางภายในเซลล์ที่สามารถส่งสัญญาณในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ ได้แก่ เส้นทางที่ใช้ *smad* เป็นโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณ (*smad dependent*) และเส้นทางที่ไม่ใช้ *smad* เป็นโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณ *smad independent* (33) โดยมีรายงานว่าเส้นทางที่เป็น *smad dependent* เป็นเส้นทางสำคัญที่ *TGF- β* ใช้ในการกระตุ้นการเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblast (34) พบว่าเมื่อนำเซลล์ NIH-3T3 ที่สัมผัสกับ *O. viverrini* ES product มาศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *smad 4* พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *smad 4* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเซลล์ NIH-3T3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี growth factor เป็นส่วนประกอบ (serum-free medium) เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี serum (serum containing medium) (รูปที่ 10) ในขณะที่ยีน *tgfb 1i4* ซึ่งเป็นยีนตอบสนอง (responsive gene) ต่อการกระตุ้นโดย *TGF- β* พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า *O. viverrini* ES product สามารถกระตุ้น *TGF- β mediated signal transduction pathway* โดยน่าจะผ่าน *smad dependent pathway*

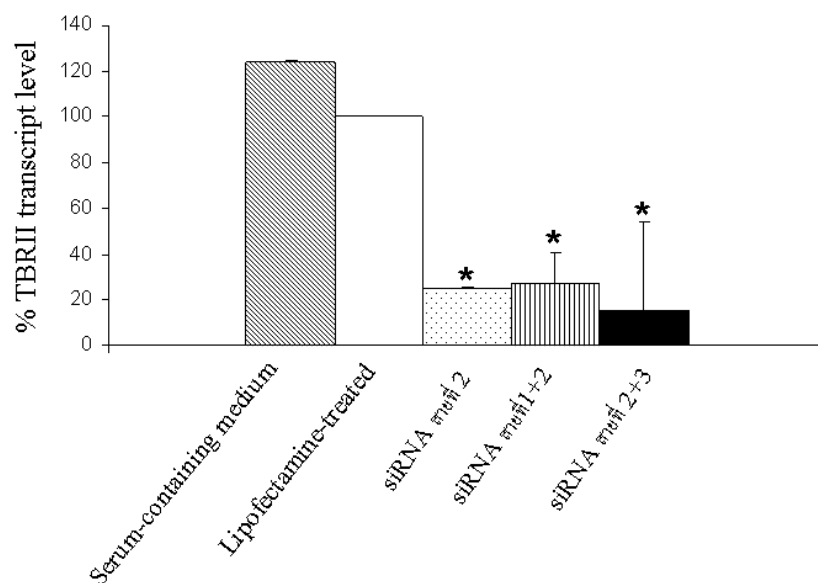


รูปที่ 10 แสดงระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *smad 4* ในเซลล์ NIH-3T3 จากการกระตุ้นโดย *O. viverrini* ES product (* p value < 0.05)

4.3 ผลการยับยั้งการแสดงออกของ *TBR11* โดยเทคนิค *RNAi*

เนื่องจากข้อมูลในข้อที่กล่าวผ่านมาข้างต้น บ่งชี้ความเป็นไปได้ที่เซลล์ NIH-3T3 จะถูกกระตุ้นให้การทำงานของ TGF- β mediated signal transduction pathway เพิ่มขึ้น จากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว ผู้วิจัยได้ทำการขัดขวางเส้นทางการส่งสัญญาณของ TGF- β mediated signal transduction pathway เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวโดย *O. viverrini* ES product เปรียบเทียบกับในเซลล์ที่มี signal transduction pathway ดังกล่าวปกติ เนื่องจากเส้นทางการส่งสัญญาณโดย TGF- β ไม่ว่าจะเป็นแบบ smad dependent หรือ smad independent ก็ตามจะต้องใช้ *TBR11* ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับที่ผิวเซลล์ (membrane receptor) ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค *RNAi* ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TGF- β receptor type II (*TBR11*) โดยหลักการหาโปรตีนตัวนี้มีระดับการแสดงออกน้อยลง การตอบสนองของเซลล์ต่อการกระตุ้นโดย TGF- β จะน้อยลงด้วย

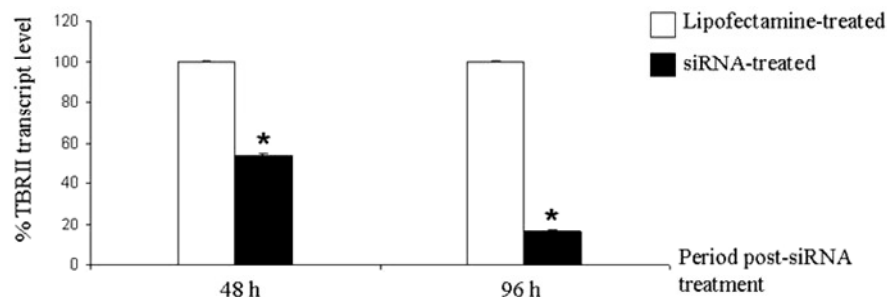
ผลการทดลองโดยใช้ siRNA ต่อ TGF- β ที่มีตำแหน่งจับที่แตกต่างกันบน mRNA ของยีน *TBR11* (ตารางที่ 3) พบว่า siRNA แต่ละสายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *TBR11* แตกต่างกัน (รูปที่ 11) โดยสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *TBR11* ในเซลล์ NIH-3T3 ได้ประมาณ 50-70% ของระดับการแสดงออกปกติ ทั้งนี้การใช้ siRNA สายที่ 2 ร่วมกับสายที่ 3 จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *TBR11*



รูปที่ 11 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *TBR11* โดยใช้ si*TBR11* ที่ตำแหน่งต่างกันบน mRNA ของยีน *TBR11* (* p value ≤ 0.05)

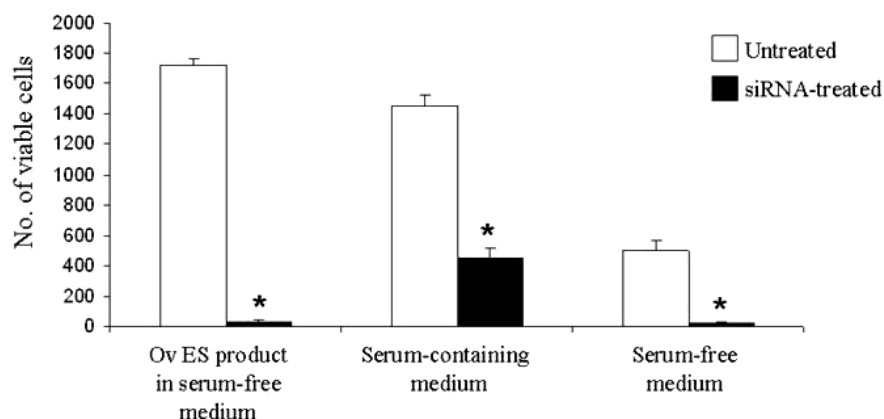
4.3 ผลการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ *TBRIL-knockdown NIH-3T3*

เมื่อนำเซลล์ NIH-3T3 ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของจีน *TBRIL* (*TBRIL-knockdown NIH-3T3*) ไปสัมผัสกับ *O. viverrini* ES product เป็นระยะเวลา 2 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่พิสูจน์แล้วว่าในเซลล์ NIH-3T3 ยังมีระดับการแสดงออกของจีน *TBRIL* ต่ำกว่าเซลล์ NIH-3T3 ปกติ (รูปที่ 12) ผลการทดลองพบว่าเซลล์ *TBRIL-knockdown NIH-3T3* ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นได้เมื่อสัมผัสกับ *O. viverrini* ES product (รูปที่ 13) ต่างจากเซลล์ NIH-3T3 ปกติที่มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจากการเหนี่ยวนำโดย ES product นอกจากนี้ผลการยับยั้งการแสดงออกของจีน *TBRIL* ยังทำให้เซลล์ NIH-3T3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี serum (serum containing medium) ตอบสนองต่อ serum น้อยลงกว่าเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ *TBRIL* ปกติอีกด้วย



รูปที่ 12 ระดับการแสดงออกของจีน *TBRIL* ในระยะเวลา 48 และ 96 ชั่วโมงหลังสัมผัส si*TBRIL*

(* p value < 0.05)



รูปที่ 13 การตอบสนองของเซลล์ *TBRIL-knockdown NIH-3T3* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

(* p value < 0.05)

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (CONCLUSION AND DISCUSSION)

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในประชากรภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศไทย ประเทศลาว ประเทศเวียดนาม และประเทศจีนตอนใต้ (1, 2) ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีรายงานอุบัติการณ์สูงสุดอยู่ที่จังหวัดขอนแก่น พบผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมากถึง 88 คน ต่อประชากร 100,000 คน (35) กลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีปกติเปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยพยาธิใบไม้ตับนั้น มีผู้ศึกษามาเป็นเวลานานพบว่าการกัดกินเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีจากปากของพยาธิ (sucker) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี (mechanical damage) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อตัวพยาธิ (immunological damage) เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานที่บ่งชี้ ความสำคัญของสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ (ES product) ในการกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้น (increased cell proliferation) (14) หากยังไม่มียางานเกี่ยวกับกลไกที่พยาธิใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อ *O. viverrini* ES product เพื่ออธิบายกลไกที่ ES product ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้น จากผลการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตอบสนองของเซลล์ต่อ ES product โดยศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีน (gene expression profile) ในเซลล์ที่สัมผัสกับสารคัดหลั่งโดยเทคนิค cDNA array พบว่าจากจีนและ EST จำนวน 15,000 ชนิด มีจีนจำนวน 885 ชนิดมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (เท่ากับหรือมากกว่า 2 เท่า) ในเซลล์ที่สัมผัสกับ ES product เทียบกับเซลล์ปกติ และพบอีกว่ามีเพียง 239 จีนเท่านั้นที่มีรายงานว่าทำหน้าที่เกี่ยวกับการแบ่งตัวของเซลล์ ได้แก่ จีนผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ enzymatic metabolism และ biosynthesis เช่น glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, alpha-enolase, aldehyde dehydrogenase, cytochrome C oxidase และ ATP synthase เป็นต้น จีนผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA replication เช่น RPII215 polymerase, topoisomerase II และ DNA primase เป็นต้น จีนผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle progression เช่น cyclins และ CDKs ชนิดต่างๆ เป็นต้น จีนผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ protein synthesis/degradation of superfluous proteins เช่น translation initiation factors, elongation factors, translation initiation factors และ elongation factors เป็นต้น จีนผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ matrix and structural proteins (รายละเอียดใน Appendix) ข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นความสามารถในการเหนี่ยวนำการแบ่งเซลล์ของ *O. viverrini* ES product ที่คล้ายคลึงกับฤทธิ์ของ growth factor (36)

นอกเหนือจากการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อ *O. viverrini* ES product ในภาพรวมโดยดูแบบแผนการแสดงออกของจีนดังกล่าวแล้ว ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของจีนกลุ่ม signal transduction pathway ยังมีความสำคัญในการบ่งชี้ pathway ที่ถูกกระตุ้นโดย ES product และเป็นผลให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับแบบแผนการแสดงออกของจีนกลุ่ม signal transduction pathway จำเพาะที่ตอบสนองต่อ growth factors ชนิดต่างๆ ตามที่มีรายงานมาแล้ว ประกอบกับผลการศึกษาของกลุ่มผู้วิจัย พบว่าคุณสมบัติการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของ *O. viverrini* ES product นั้น มีส่วนคล้ายคลึงกับสถานะที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย calf serum (37) ซึ่งประกอบด้วย growth factors หลายชนิด ได้แก่ platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- β และ insulin-like growth factor (IGF) เซลล์สามารถตอบสนองต่อ growth factors ชนิดต่างๆ ดังกล่าวด้วยรูปแบบการแสดงออกของจีนที่แตกต่างกัน (38, 39) การศึกษาในโครงการนี้ผู้วิจัยจึงได้เจาะลึกที่แบบแผนการแสดงออกของจีนกลุ่ม signal transduction pathway เพื่อบ่งชี้ signal transduction pathway ที่ *O. viverrini* ES product ใช้ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์

ผลการศึกษาโดย cDNA array สามารถคัดเลือกจีนกลุ่ม signal transduction pathway จำนวน 9 จีน ที่มีระดับการแสดงสูงขึ้นจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product และเป็นตัวแทนของการกระตุ้นโดย growth factor ต่างชนิดกัน ได้แก่จีน *abl 1*, *pkC*, *h ras*, *jak 1* และ *raf 1* ทำหน้าที่ใน signal transduction pathway ของ PDGF และ/หรือ EGF (PDGF/EGF) จีน *pdgfra* ทำหน้าที่ใน signal transduction pathway ของ PDGF จีน *eps 8* ทำหน้าที่ใน signal transduction pathway ของ EGF และจีน *tgfb 1i4* ทำหน้าที่ใน signal transduction pathway ของ TGF- β (38, 39)

เมื่อพิจารณา signal transduction molecule ระหว่าง pathway ที่กระตุ้นโดย TGF- β และที่กระตุ้นโดย EGF/PDGF จะพบว่าสิ่งที่แตกต่างกันในระดับแรก และมีความสำคัญในการแยก signal transduction pathway ทั้งสองกลุ่มนี้ออกจากกัน คือชนิดของ receptor โดย receptor ของ TGF- β -mediated signal transduction pathway คือ กลุ่มที่มีการทำงานเป็น serine-threonine kinase ในขณะที่ EGF/PDGF-mediated signal transduction pathway ใช้ tyrosine kinase receptor (38, 39) ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของจีนกำหนดโปรตีน receptor ทั้งสองกลุ่มนี้โดยเทคนิค cDNA array บ่งชี้ว่ามีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product จึงยังไม่สามารถใช้ข้อมูลนี้ในการบ่งชี้แน่ชัดว่า *O. viverrini* ES product มีผลไปกระตุ้น signal transduction pathway ไດในเซลล์เป็นสำคัญ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษาระดับการแสดงออกของจีนโดยเทคนิค cDNA array สามารถบ่งชี้รูปแบบการแสดงออกของจีนแต่ละกลุ่ม (gene expression pattern) และคัดกรอง (screening) จีนที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปโดยสิ่งกระตุ้นต่างๆ ได้ดี แต่หากต้องการบอกระดับการแสดงออกที่แน่นอนของจีน ต้องอาศัยเทคนิคอื่นในการยืนยันผลการทดลอง

เทคนิคที่นิยมใช้ในการยืนยันผลการศึกษาระดับการแสดงออกของจีน คือ เทคนิค real time RT-PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่น่าเชื่อถือ ทำได้ง่าย และราคาไม่แพง ผลการศึกษายืนยันระดับการแสดงของจีนกลุ่ม signal transduction pathway ทั้ง 9 ชนิด พบว่าระดับการแสดงออกของจีนที่ศึกษาโดยใช้เทคนิค real time RT-PCR ให้ผลระดับการแสดงออกตรงกับที่ได้จาก cDNA array ทุกจีน ยกเว้นจีน *abl* 1 และ *raf* 1 อย่างไรก็ตามในจำนวนจีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากการศึกษาทั้งสองเทคนิคนั้นพบว่า จีน *tgfb* 1*i4*, *eps* 8 และ *pkC* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05) ในเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัยเมื่อเทียบกับ negative control โดยเพิ่มขึ้น 5.95, 4.40 และ 1.53 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 6 และรูปที่ 9) อย่างไรก็ตามยังมี signal transduction gene บางตัวที่ผลการทดสอบด้วย real time RT-PCR ให้ผลการแสดงออกเพิ่มขึ้นหากไม่มีความสำคัญทางสถิติได้แก่ *strap*, *jak* 1 และ *h ras* ส่วน *pdgfra* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก ในขณะที่ *abl* 1 และ *raf* 1 มีระดับการแสดงออกที่ลดลงในเซลล์ที่สัมผัสกับสารคัดหลั่งจากพยาธิ และเมื่อพิจารณาจากระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดของจีน *tgfb* 1*i4* ทั้งจากการศึกษาโดยเทคนิค cDNA array และยืนยันผลโดยเทคนิค real time RT-PCR ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ *O. viverrini* ES product กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์โดยอาศัย signal transduction pathway ของ TGF- β

มีรายงานว่าเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นโดย TGF- β จะมีระดับการแสดงออกของจีน *tgfb* 1*i4* (40, 41) โดยจีน *tgfb* 1*i4* เป็น transcriptional modulator ของการกระตุ้นโดย TGF- β นอกจาก TGF- β แล้วพบว่าจีน *tgfb* 1*i4* สามารถถูกกระตุ้นได้โดย 12-myristate 13-acetate และ serum แต่ไม่มีรายงานว่าถูกกระตุ้นได้โดย EGF (41) ประกอบกับพบว่าระดับการแสดงออกของจีน *strap* ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง pathway ดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ปกติ ข้อมูลนี้สนับสนุนความเป็นไปได้ที่ *O. viverrini* ES product สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ โดยใช้ TGF- β signal transduction pathway

ในส่วนการแสดงออกของจีน *abl* 1, *jak* 1, *h ras* และ *raf* 1 ซึ่งเป็น signal molecule ของ EGF/PDGF-stimulated signal transduction pathway ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ร่วมกับระดับการแสดงออกของจีน *pdgfra* ซึ่งทำหน้าที่ใน PDGF-mediated signal transduction pathway อยู่ในเกณฑ์ปกติ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ความเป็นไปได้ที่เซลล์จะใช้ EGF/PDGF-stimulated signal transduction pathway ในการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดย *O. viverrini* ES product

ในส่วนการกระตุ้นจำเพาะของ EGF-stimulated signal transduction pathway นั้น ข้อมูลการแสดงออกของจีน *eps* 8 และ *pkC* ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า *O. viverrini* ES product อาจกระตุ้นเส้นทางดังกล่าว เพื่อใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบ่งตัวมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานว่า *eps* 8 เกี่ยวข้องโดยตรงกับฤทธิ์ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ EGF (42)

โดยสรุปข้อมูลการแสดงออกของจีนจากการกระตุ้นโดย *O. viverrini* บ่งชี้ความเป็นไปได้มากที่เซลล์จะใช้ TGF- β stimulated signal transduction pathway หรือ EGF-stimulated signal transduction pathway ในการตอบสนองต่อ *O. viverrini* ES product มีรายงานว่าทั้ง TGF- β และ EGF มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์ปกติให้กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ โดย TGF- β สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ทั้งเซลล์เยื่อบุหรือเซลล์ stroma (stromal cell) (43) ทำให้สามารถใช้การกระตุ้นโดย TGF- β ในการบ่งชี้และพยากรณ์สภาวะมะเร็งได้ ส่วนการแสดงออกของจีน EGF นั้นสามารถพบได้ในมะเร็งหลายชนิด (44) จึงมีความเป็นไปได้ที่เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีสัมผัสกับพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัยจะได้รับการกระตุ้นจาก ES product ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์แบบเดียวกับ TGF- β หรือ EGF เห็นยวนำให้ TGF- β mediated signal transduction pathway และ/หรือ EGF mediated signal transduction pathway ถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา สภาวะแบบนี้สามารถเห็นยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีปกติ เปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ในที่สุด อย่างไรก็ตามข้อมูลระดับการแสดงออกของจีน *tgfb 1i4* และ *smad 4* ที่สูงมากในเซลล์ที่สัมผัสกับ *O. viverrini* ES product (รูปที่ 10) สนับสนุนข้อมูลที่ TGF- β -mediated signal transduction pathway น่าจะเป็น pathway ที่พยาธิใบไม้ตับใช้ในการเห็นยวนำให้เกิดการแบ่งเซลล์มากที่สุด

การส่งสัญญาณภายในเซลล์จากการกระตุ้นโดย TGF- β นั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าเริ่มต้นที่ตัวรับที่ผิวเซลล์ (membrane) ที่ชื่อว่า TGF- β receptor type II (TBRII) และผ่าน signal transduction molecule ที่สำคัญคือ smad เรียกว่า smad-dependent signal transduction pathway (33) แม้ว่ามีรายงานการกระตุ้นเซลล์โดย TGF- β โดยไม่ใช้ smad (smad-independent signal transduction pathway) แต่พบว่าเซลล์ fibroblast จะตอบสนองต่อ TGF- β ในทิศทางการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นนั้นมักใช้ smad-dependent signal transduction (34) ผลการทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของจีน *TBRII* โดยเทคนิค RNAi ซึ่งสามารถลดระดับการแสดงออกของจีน *TBRII* ได้โดยเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ และยังสามารถตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นจากภายนอก เช่น growth factor ใน serum ได้ (รูปที่ 13) และเมื่อนำ *TBRII*-knockdown fibroblast ดังกล่าวไปทดสอบการกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดย *O. viverrini* ES product พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการตอบสนองต่อสารคัดหลั่งจากพยาธิน้อยกว่าเซลล์ NIH-3T3 ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ความเป็นไปได้ที่ *O. viverrini* ES product สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดยใช้ TGF- β -mediated signal transduction pathway และเนื่องจาก *TBRII*-knockdown fibroblast สามารถตอบสนองต่อ *O. viverrini* ES product ได้น้อยมาก ในขณะที่สามารถเกิดการแบ่งเซลล์ได้บ้างในสภาวะการกระตุ้นโดย serum ซึ่งใน serum นั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าประกอบด้วย growth factor หลายชนิด ข้อมูลนี้บ่งชี้โดยอ้อมว่า growth factor-like substance ใน *O. viverrini* ES product น่าจะใช้ TGF- β -mediated signal transduction pathway เป็นหลักในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เมื่อ *TBRII* ซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณที่สำคัญใน pathway นี้มีระดับการแสดงออกที่น้อยลง จึงส่งผลต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์โดย ES product อย่างเห็นได้ชัด

ในกระบวนการเกิดมะเร็งของเยื่อบุ (carcinoma) นั้นพบว่านอกจากการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) แล้ว มีรายงานการเปลี่ยนแปลงในเซลล์กลุ่ม stroma (stromal cell) โดยมีรายงานการเกิด fibrosis จากการกระตุ้นเซลล์ fibroblast ให้มีการสร้าง collagen มากขึ้น มีรายงานทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ว่าสามารถพบภาวะ periductal fibrosis (8, 9) ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ จึงอาจเป็นไปได้ที่นอกจาก *O. viverrini* ES product จะไปกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีโดยตรงดังที่ได้กล่าวแล้ว *O. viverrini* ES product ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast ได้ชั้นเยื่อบุท่อน้ำดีแบ่งตัวเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้าง collagen (ข้อมูล cDNA array บ่งชี้การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนกำหนดการสร้าง collagen ในเซลล์ NIH-3T3 จากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product, unpublished data) สะสมจนเกิดภาวะ fibrosis ในที่สุด นอกจากนี้อาจเกิดจากการที่ *O. viverrini* ES product ไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและส่งผลโดยอ้อมให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ fibroblast อีกต่อหนึ่ง ทั้งหมดนี้บ่งชี้ความสำคัญของบทบาทของ *O. viverrini* ES product ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

โดยสรุปงานวิจัยนี้แสดงข้อมูลการแสดงออกของยีน (gene expression profile) ในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product ข้อมูลการแสดงออกของยีนสนับสนุนปรากฏการณ์ที่เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสกับสารคัดหลั่งจากพยาธิ เนื่องจากยีนส่วนมากที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นนั้น มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ แบบแผนการแสดงออกของยีนกลุ่ม signal transduction pathway สามารถบ่งชี้เส้นทางที่ *O. viverrini* ES product ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้น ข้อมูลทั้งจากการศึกษาโดยเทคนิค cDNA array และเทคนิค real time RT-PCR ในเซลล์ที่สัมผัสกับสารคัดหลั่งจากพยาธิ ยืนยันระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องใน TGF- β และ EGF-stimulated signal transduction pathway นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังบ่งชี้ว่าเซลล์ลดการตอบสนองต่อ *O. viverrini* ES product อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเซลล์มีระดับการแสดงออกของยีน *TBR11* ลดลง ทั้งหมดนี้บ่งชี้ความเป็นไปได้ที่ *TBR11*-mediated signal transduction pathway จะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดย *O. viverrini* ES product แม้ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับ growth factor-like substance ในสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับ หากข้อมูลที่ได้บ่งชี้บทบาทสำคัญของ *O. viverrini* ES product ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี อันอาจสามารถประยุกต์ใช้ข้อมูลดังกล่าว ในการยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจากการเหนี่ยวนำโดย *O. viverrini* ES product ได้

6. เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)

1. Jongsuksuntigul P, Imsomboon T. Epidemiology of opisthorchiasis and national control program in Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1998; 29: 327-332.
2. Vatanasapt V, Sripa B, Sithithaworn P, Mairiang P. Liver flukes and liver cancer. Cancer Survey 1999; 33: 313-343.
3. Bhamarapavati N, Thamavit W, Vajrasthira S. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1978; 27: 787-794.
4. Pairojkul C, Shirai T, Hirohashi S, Thamavit W, Bhudhisawat W, Uttaravicien T, Itoh M, Ito N. Multistage carcinogenesis of liver-fluke-associated cholangiocarcinoma in Thailand. Princess Takamatsu Symposium 1991; 22: 77-86.
5. Satarug S, Haswell-Elkins MR, Tsuda M, Mairiang P, Sithithaworn P, Mairiang E, Esumi H, Sukprasert S, Yongvanit P, Elkins DB. Thiocyanate-independent nitrosation in humans with carcinogenic parasite infection. Carcinogenesis 1996; 17: 1075-1081.
6. Satarug S, Haswell-Elkins MR, Sithithaworn P, Bartsch H, Ohshima H, Tsuda M, Mairiang P, Mairiang E, Yongvanit P, Esumi H, Elkins DB. Relationships between the synthesis of N-nitrosodimethylamine and immune responses to chronic infection with the carcinogenic parasite, *Opisthorchis viverrini*, in men. Carcinogenesis 1998; 19: 485-491.
7. Watanapa P, Watanapa WB. Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. British Journal of Surgery. 2002; 89: 962-970.
8. Bhamarapavati N, Thamavit W, Vajrasthira S. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1978; 27: 787-794.
9. Riganti M, Pungpak S, Punpoowong B, Bunnag D, Harinasuta T. Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 1989; 20: 95-100.

10. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. Multistage carcinogenesis. In: The molecular basis of cancer. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1995, pp. 72.
11. Macfarlane PS, Reid R, Callander R. Carcinogenesis. In: Pathology Illustrated, 5th ed. Churchill Livingstone. London. 2000, pp.147, 154.
12. Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Sztejn MB. Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. Journal of Immunology 1990; 144: 4000-4004.
13. Prowse RK, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW. Fasciola hepatica cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. Parasite Immunology 2002; 24: 57-66.
14. Thuwajit C, Thuwajit P, Kaewkes S, Sripa B, Uchida K, Miwa M. Increased cell proliferation of mouse fibroblast NIH-3T3 *in vitro* induced by excretory/secretory product(s) from *Opisthorchis viverrini*. Parasitology 2004; 129, 455-464.
15. Migaena P, Reaunsuwan W, Changbumrung S. Nitrates and nitrites in local Thai preserved protein foods. Journal of Medical Association of Thailand 1980, 63, 500-505.
16. Mitacek E, Brunnemann KD, Suttajit M, Martin N, Limsila T, Ohshima H, Caplan LS. Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. Food and Chemical Toxicology 1999; 37: 297-305.
17. Pinlaor S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P, Kawanishi S. 8-nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003; 309: 567-571.
18. Cos S, Fernandez R, Guezmes A, Sanchez-Barcelo EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. Cancer Research 1998; 58: 4383-4390.
19. Plattner R., Kadlec L., DeMali KA., Kazlauskas., Pendergast AM. C-Abl is activated by growth factors and Src family kinase and has a role in the cellular response to PDGF. Gene&Development 1999; 13: 2400-2411.
20. Plattner R., Koleske AJ, Kazlauskas A., Pendergast AM. Bidirectional signaling links the Abelson kinase to the platelet-derived growth factor receptor. Mol. Cell Biol. 2004; 24(6): 2573-2583.

21. Dijk Marc CM., Hilkmann H., Blitterswijk WJM. Platelet-derived growth factor activation of mitogen-activated protein kinase depends on the sequential activation of phosphatidylcholine-specific phosphorylase C, protein kinase C- ξ and raf-1. *Biochem. J.* 1997; 325: 303-307.
22. Moriya S., Kazlauskas A., Akimoto K., Hirai SI., Mizuno K., Takenawa T., Fukui Y., Watanabe Y., Ozaki S., Ohno S. Platelet-derived growth factor activates protein kinase C ϵ through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C γ or phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 151-155.
23. Vignals ML., Sadowski HB., Watling D., Rogers NC., Gilman M.L Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinase and STAT proteins. *Mol. Cell Biol.* 1996; 16: 1759-1769.
24. Marrero MB., Schieffer B., Li B., Sun J., Harp JB., Ling BN. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 24684-24690.
25. Faziolo F., Minichiello L., Matoska V., Castagnino P., Miki T., Wong WT., Di Fiore PP. Eps8, a substrate for the epidermal growth factor receptor kinase, enhances EGF-dependent mitogenic signals. *EMBO J.* 1993; 12: 3799-3808.
26. Datta PK., Moses H. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor β signaling. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 3157-3167.
27. Lutz M., Knaus P. Integration of TGF- β pathway into the cellular signaling network. *Cell. Signalling.* 2002; 14: 977-988.
28. Downward J. RNA interference. *Br. Med. J.* 2004; 328: 1245-1248.
29. Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJM. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1677: 129-141.
30. Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Manganese (II) induces apoptotic cell death in NIH-3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 20135-20138.
31. Nakamura H, Siddiqui SS, Shen X, Malik AB, Pulido JS, Kumar NM, Yue BY. RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol. Vis.* 2004; 4: 10:703-711.

32. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
33. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF beta signaling and its roles in tumor pathogenesis. *Acta Biochim. Polo.* 2005; 52: 329-337.
34. Robert AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, Flanders KC. Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 2001; 120: 43S-47S.
35. Sriamporn S, Pisani P, Pipitgool V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard S et al. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeastern Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 2004; 9: 588-594.
36. Winkles JA. Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 58: 41-78.
37. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999; 283: 83-87.
38. Claesson-Welsh L. Signal transduction by the PDGF receptors. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5 : 37-54.
39. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577-584.
40. Kester HA, Ward-van Oostwaard TM, Goumans MJ, van Rooijen MA, van Der Saag PT, van Der Burg B, Mummery CL. Expression of TGF-beta stimulated clone-22 (TSC-22) in mouse development and TGF-beta signalin. *Dev Dyn* 2000; 218: 563-572.
41. Shibamura M, Kuroki T, Nose K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *J Biol Chem* 1992; 267: 10219-10224.
42. Fazioli F, Minichiello L, Matoska V, Castagnino P, Miki T, Wong WT, Di Fiore PP. Eps8, a substrate for the epidermal growth factor receptor kinase, enhances EGF-dependent mitogenic signal. *EMBO J* 1993; 12: 3799-3808.
43. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 22-29.
44. Pedersen MW, Poulsen H. Epidermal growth factor receptor in cancer therap. *Science & Medicine* 2002; 8: 206.

Appendix 1

การทดสอบแบบแผนการแสดงออกของจีน (Gene expression profile) ในเซลล์ NIH-3T3
จากการกระตุ้นโดยสารคัดหลังจากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (ES product)

Hybridization and array data analysis

The in-house prepared mouse cDNA array was prepared by Dr. Kazuhiko Uchida, Department of Biochemistry and Molecular Oncology, Comprehensive Human Science, Graduate School, University of Tsukuba, Japan. It consists of 15K of either mouse or human genes/ESTs. Firstly, the total RNA extraction from NIH-3T3 cells treated and untreated with adult *O. viverrini* ES product was performed. Briefly, total of $2-5 \times 10^6$ cells were collected in RNeasy lysis solution (Qiagen®, Crawley, UK) and processed for total RNA with a commercial kit (RNeasy; Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's protocol. The RNA quality was confirmed by subjecting the samples to electrophoresis on formaldehyde-agarose gel and staining the 18S and 28S RNA bands for visualization. Then, a 2- μ g portion of the intact total RNA was dissolved in 8 μ L of RNase-free water; 2 μ L of oligo(dT) primer (1 g/L; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were then added. The sample was heated for 10 min at 70 °C and immediately chilled on ice. The following were then added to the sample: 5 μ L of first-strand cDNA synthesis buffer, 1 μ L of DTT (0.1 mol/L final concentration), 1.5 μ L of deoxynucleotide triphosphates (20 mmol/L dATP, dGTP, and dTTP), 1.5 μ L of SuperScript (200 MU/L; Invitrogen), and [33 P]dCTP (111 PBq/mol; Amersham). The reaction was incubated at 37 °C for 90 min. Labeled cDNA was then denatured for 3 min at 95 °C. The array was prehybridized at 42 °C for 2 h in MicroHyb solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 0.5 mg/L poly(dA) and 1 mg/L COT1 DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The probes were hybridized at 42 °C overnight in the same solution. The membrane array was washed twice at 50 °C with 2X SSC-10 g/L SDS for 20 min and at room temperature with 0.5X SSC-10 g/L SDS for 15 min. The membrane array was exposed to an imaging plate which was scanned with a BAS 5000 imaging analyzer (Fuji Film, Tokyo, Japan). Spot intensity was quantified with ArrayVision version 5.0 software (Imaging Research, Ontario, Canada). GeneSpring version 5.0 software (Silicon Genetics, Redwood, CA) was used to normalize values for each gene for data analysis.

Gene responding to O. viverrini ES product

Using a mouse cDNA array, we examined the gene expression profile of cell proliferation stimulated by *O. viverrini* ES product. A total of 15 000 genes and ESTs were tested. *O. viverrini* caused widespread alteration in gene expression. The ratios of gene expression between treated and untreated with the parasite ES product equal and greater than 2 were focused on because of their striking changes. Among all genes/ESTs in 15K cDNA array, 885 genes fitted to this criterion. Among these genes, only 536 genes had a variety of molecular functions and only 239 genes within these 536 genes had cell proliferation-related functions. These 239 genes were categorized in groups as proteins playing roles in energy and metabolism, signal transduction, protein synthesis and translation, matrix and structural protein, transcription control, cell cycle and DNA replication. The percentage distribution of genes in each group is 25.2, 21, 18.9, 17, 12.6, 3.3, and 2, respectively. The examples of genes in each group are summarized in Table 1.

Table 1 Proliferation-related genes with 2-fold and more¹ up-regulated in fibroblast cell proliferation activated by the *O. viverrini* ES product compared with the negative control (not exhaustive)

A. Energy and metabolism	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapd</i>), cytochrome C oxidase, alpha-enolase, ATP synthase beta subunit ² , thioredoxin, aldehyde dehydrogenase
B. Signal transduction	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4 (<i>tgfb 1i4</i>), tyrosine kinase (<i>abl 1</i>), interleukin 1 receptor-associated kinase, MAP kinase phosphatase (<i>mkp 6</i>), colony stimulating factor 3 receptor, protein kinase C, Janus kinase 2 (<i>jak 2</i>), casein kinase I alpha (<i>csnk 1a1</i>), <i>c myc</i>
C. Protein synthesis and translation	Polyubiquitin C (<i>Ubc</i>) gene, ribosomal protein S27a ² , ribosomal protein L27, elongation factor Tu, RNA polymerase 1-2, translation initiation factor 4 gamma ²
D. Matrix and structural protein	Lysophospholipase 1 (<i>lypla 1</i>)
E. Transcription control	Transformation/transcription domain-associated protein (<i>trrap</i>) ² , telomeric repeat binding factor 1 (<i>terf 1</i>), transcription factor EB (<i>tcfeb</i>), DEAD-box RNA helicase (<i>ddx 21</i>) ²
F. Cell cycle	Kinesin family member 3a (<i>kif 3a</i>), mitotic kinesin-like protein 1 ² , cyclin dependent kinase 4 (<i>cdk 4</i>), <i>cdk 5</i> , cyclin B1
G. DNA replication	RPII215 polymerase II large subunit, topoisomerase II alpha, DNA primase p58 subunit (<i>prim 2</i>), ribonucleotide reductase

¹Sequence in each group is ordered from high to low expression increases

²represents human gene

Output ที่ได้จากโครงการ



1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 **Thuwajit C***, Thuwajit P, Uchida K, Daoraueng D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M (2006). Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World Journal Gastroenterology*, 12: 3585-3592 (impact factor 3.3)
- 1.2 **Thuwajit C***, Utispan K, Chuaysri C, Thuwajit P. The mitogenic effect of *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product and its activated signal transduction pathways, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, in press (impact factor 0.1)
- 1.3 Utispan K, Daorueang D, Thuwajit P, **Thuwajit C***. RNA interference targeting transforming growth factor- β receptor type II decreases fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in preparation (impact factor 3.00)

* Corresponding author

2. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ โครงการนี้สามารถส่งเสริมหัวหน้าโครงการวิจัย ซึ่งเป็นนักวิจัยรุ่นใหม่ในการทำงานวิจัยของตนเอง โดยมีนักวิจัยรุ่นพี่เป็น mentor ทำให้สามารถเริ่มต้นงานวิจัยและพัฒนาตนเองเป็นนักวิจัยที่มีคุณภาพในอนาคต นอกจากนี้ยังทำให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสติดต่อกับนักวิจัยทั้งในและนอกประเทศ อันจะส่งเสริมให้ผู้วิจัยสามารถสร้างเครือข่ายงานวิจัยต่อไปในอนาคต นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังได้ช่วยสนับสนุนให้นักศึกษาระดับปริญญาโทมีโอกาสฝึกหัดเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่างๆ และได้มีเรียนรู้การทำงานวิจัยที่เป็นระบบ นอกจากนี้ยังสามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติและนานาชาติ รวมทั้งเผยแพร่ผลงานในวารสารระดับนานาชาติได้ ผลงานที่ได้จากโครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งในผลงานของสถาบันการศึกษาและศูนย์วิจัยต้นสังกัด ได้แก่ คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น รวมถึงสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำยี่สุดผลงานที่ได้นับเป็นองค์ความรู้ในการส่งเสริมให้เกิดแนวทางใหม่ ในการป้องกันและยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

3. อื่น ๆ

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Poster presentation

1. **Thuwajit C**, Daoruaeng D, Thuwajit P, Yongvanit P, Kaewkes S (2004). Expression of *raf-1* and *ras* signaling genes in *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory products induced cell proliferation. In the "17th FAOBMB Symposium/ 2nd IUBMB Special Meeting/A-IMBN Meeting: Genomic and Health in the 21st Century", 22-26 November, Bangkok, Thailand.
2. **Thuwajit C**, Daoruaeng D, Thuwajit P, Kazuhiko U, Kaewkes S, Masanao M, Wongkham S (2006). Candidate signal transduction pathways in cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 18-23 June, Kyoto, Japan.

Oral presentation

3. **Thuwajit C**, Dowruang D, Thuwajit P, Kaewkes S, Uchida K, Miwa M, Wongkham S (2005). Expression profile of signaling genes in cell proliferation stimulated by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product(s). In the "3rd Takeo Wada Cancer Research Symposium: Molecular Targets for Cancer Prevention and Control", 24-25 February, Khon Kaen, Thailand.
4. **Thuwajit C** (2006). The mitogenic effect of *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product and its activated signal transduction pathways. In the 5th Seminar on Food- and Water-Borne Parasitic Zoonoses, 28-30 November, Bangkok, Thailand.
5. Utispan K, Daorueang D, Thuwajit P, **Thuwajit C*** (2007). RNA interference targeting transforming growth factor- β receptor type II decreases fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. In the 1st Biochemistry and Molecular Biology (BMB) Conference: Biochemistry and Molecular Biology for the Integration of Life, 26-27 April, Bangkok, Thailand.

ภาคผนวก

Publication ที่ 1

Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product

Chanitra Thuwajit*, *Peti Thuwajit, Kazuhiko Uchida, Daoyot Daorueang, Sasithorn Kaewkes, Sopit Wongkham, and Masanao Miwa*

* corresponding author

World Journal Gastroenterology 2006, 12: 3585-3592

Publication ที่ 2

The mitogenic effect of *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product and its activated signal transduction pathways

Chanitra Thuwajit*, Kusumawadee Utispan, Chanisa Chuaysri and Peti Thuwajit

* corresponding author

Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, in press

Manuscript 3

**RNA interference targeting transforming growth factor- β receptor type II
decreases fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini*
excretory/secretory product**

Utispan K, Daorueang D, Thuwajit P, **Thuwajit C***

Biochemical and Biophysical Research Communications, in preparation