

## ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีนไมโครอาร์เอ็นเอ-221 ต่อยีนเป้าหมายในเซลล์มะเร็งตับ

## EFFECT OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs) ON MICRORNA-221 ON TARGET

## GENE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) CELL LINES

ธัญญา จินาโต<sup>1</sup>, ญัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ<sup>2</sup>, พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์<sup>2</sup>, สัณชัย พงษ์ภกร<sup>3</sup><sup>1</sup> วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย<sup>2</sup> หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถนนพระราม 4 แขวงลุมพินี เขตปทุมวัน กทม.10330

<sup>1</sup> Ji.thananya@gmail.com<sup>2</sup> pisittkvn@yahoo.com<sup>3</sup> sp.medbiochemcu@gmail.com

## บทคัดย่อ

มะเร็งตับเป็นโรคที่มีอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูงเนื่องจากมักตรวจพบโรคนี้ในระยะที่มีความรุนแรงของโรคสูง การหา biomarkers เพื่อนำมาช่วยในการวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรกจึงมีความสำคัญ ซึ่งไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNAs) เป็น non-coding RNAs สายสั้นๆ ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป็นจำนวนมาก มีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันในกลุ่มของคนที่ เป็นโรคและในคนปกติ นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่อยู่บน miRNA ยังส่งผลต่อการทำงานของ miRNAs ในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง rs113054794 (A/C) บนยีน miR-221 ต่อกิจกรรมการควบคุมการแสดงออกของยีน Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (*ARNT*) ในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ทดสอบโดยการสร้าง miR-221 expression vector แล้วนำเข้าสู่เซลล์ HepG2 และวัดระดับการแสดงออกของ miR-221 ด้วย real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกของ miR-221 เพิ่มขึ้นมากถึง 65 เท่าในกลุ่มที่ได้รับ miR-221 expression vector นอกจากนี้ศึกษากันระหว่าง miR-221 และยีน *ARNT* นั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RNAhybrid โดยพิจารณาค่า minimum free energy (mfe) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง rs113054794 (A/C) บนยีน miR-221 ส่งผลต่อการจับระหว่าง miR-221 และยีน *ARNT* ทำให้ค่า mfe จะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน (allele C = -25.9 kcal/mol ในขณะที่ allele A = -18.7 kcal/mol) จากนั้นวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย *ARNT* ด้วย real-time PCR พบว่า miR-221 ทั้ง 2 alleles มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *ARNT* เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม miR-221 allele A และ allele C สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *ARNT* ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง rs113054794 บนยีน miR-221 ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการควบคุมการแสดงออกของยีน *ARNT* อย่างไรก็ตามอาจส่งผลต่อการควบคุมยีนอื่นๆ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: มะเร็งตับ, ไมโครอาร์เอ็นเอ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a disease with a high mortality rate due to the disease is mostly diagnosed in severe phase. The identification of biomarkers is important for early diagnosis of the disease. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play important roles in regulating the expression of many genes and differentially expressed between patients and healthy persons. Moreover, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in miRNAs are affecting on function of miRNAs. This research focused on the effect of SNPs rs113054794 (A/C) within miR-221 for regulation of Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (*ARNT*) gene expression in HCC cell line (HepG2). Validation assay based on construction of mi-221 expression vector then transfected into HepG2 cells and measured the expression level of miR-221 by real-time PCR. The result showed that the expression of miR-221 was 65-folds increased in miR-221 transfected group. In addition, the hybridization pattern and the minimum free energy (mfe) between miR-221 and *ARNT* gene were analyzed by RNAhybrid web-based software. The result revealed that SNPs (A/C) within miR-221 yielded exactly difference in the hybridization pattern and mfe between rs113054794 and *ARNT* gene (allele C = -25.9 kcal/mol whereas allele A = -18.7 kcal/mol). After that, the expression level of target gene (*ARNT*) was measured by real-time PCR in order to test the silencing efficiency of miR-221. The result suggested that both alleles of miR-221 triggered *ARNT* gene silencing. However, *ARNT* expression level was non-statistically different between allele C and allele A. Therefore, SNPs (A/C) within miR-221 were affected the regulation of *ARNT* gene expression. However, these SNPs may regulate other genes, which required further study.

Keywords: Hepatocellular carcinoma (HCC), MicroRNAs (miRNAs), Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

### 1.1 Hepatocellular carcinoma (HCC)

HCC จัดเป็นมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (primary liver cancer) จัดเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 5 จากทั่วโลก อุบัติการณ์ในการพบมีการแพร่กระจายในหลายภูมิภาคและกลุ่มประชากร [1] โดยมากการเกิดมะเร็งตับ ร้อยละ 70-90 จะเริ่มต้นจากการเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic liver disease) และตับแข็ง (cirrhosis) สาเหตุในการเกิดมะเร็งตับมาจากปัจจัย 2 ด้าน คือ ปัจจัยภายนอก เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus infection) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis C virus infection) การได้รับสารอัลฟาทอกซิน (aflatoxin) [2] การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ และปัจจัยภายใน ได้แก่ ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ความผิดปกติของระบบการสร้างและสลายสารในเซลล์ (Metabolism) และ สารพันธุกรรม ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะส่งผลให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบและเสียหาย เกิดการเพิ่มจำนวนเพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหายไปจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมและกระบวนการ epigenetic ส่งผลให้กระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง คือ oncogenes และ tumor suppressor genes ให้มีการทำงานผิดปกติเซลล์ส่งผลให้เกิดการกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

ในปัจจุบันยังไม่มี biomarker ในการตรวจโรคมะเร็งตับในระยะเริ่มแรกทำให้โดยมากผู้ป่วยมักตรวจพบว่าเป็นมะเร็งตับในระยะที่มีความรุนแรงของโรคค่อนข้างมากส่งผลให้ทางเลือกในการรักษาโรคและอัตราการรอดชีวิตต่ำลง จึงได้สนใจนำ microRNAs มาช่วยในการวิเคราะห์ เนื่องจากพบว่าในมะเร็งหลายชนิดนั้นจะมีการแสดงออกของระดับ microRNAs แตกต่างไปจากในเซลล์ปกติ นอกจากนี้ microRNAs ยังมีความเสถียรสามารถวัดได้ ทั้งจากใน ซีรัมและพลาสมา ทำให้ผู้ป่วยเจ็บปวดน้อยที่สุดในการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผล [3]

### 1.2 MicroRNAs (miRNAs)

miRNAs จัดเป็น non-coding RNAs ซึ่งเป็นโมเลกุลของ RNAs สายสั้นๆ มีขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ มีบทบาทสำคัญทั้งในพืช สัตว์ และไวรัส ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยจะไปจับบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) ของ mRNA เป้าหมายทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (translational repression) หรือทำลายสาย mRNA เป้าหมาย (mRNA degradation) [4, 5] miRNA มีบทบาทต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ เช่น การพัฒนาของเซลล์ (development) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไปทำหน้าที่จำเพาะ (differentiation) โปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และ การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration/ invasion) [6, 7] โดยทั่วไป miRNA 1 ตัวจะสามารถจับกับ mRNA เป้าหมายได้

โดยประมาณ 200 เป้าหมาย [5] ดังนั้นหาก miRNAs มีรูปแบบของระดับการแสดงออกแตกต่างไปจึงมักจะส่งผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด [8]

จากการศึกษาของ Jipeng Li และคณะ พบว่า microRNA-221 จะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในซีรัมของผู้ที่เป็นโรคมะเร็งตับรวมทั้งยังมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง การเกิดตับแข็ง และระยะของโรคมะเร็ง [9, 10] ในการศึกษาของ Jie Yang และคณะพบว่า miR-221 นั้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น biomarker ของโรคมะเร็งในประชากรเอเชียโดยสามารถวัดได้ทั้งใน ซีรัม พลาสมา และเนื้อเยื่อ [11] จากการศึกษาของ Giang T และคณะได้รายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม rs113054794 บนยีน miR-221 ในกลุ่มประชากร Caucasian ต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งเต้านม [12] และยังไม่มียางานการศึกษาถึงผลของความหลากหลายทางพันธุกรรม rs113054794 (A/C) บนยีน miR-221 ต่อความสามารถในการจับกับยีนเป้าหมาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของความหลากหลายทางพันธุกรรม rs113054794 บนยีน miR-221 ต่อกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

## 2. วิธีดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ HepG2 ในการศึกษา ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ (1) กลุ่ม control ซึ่งไม่มีการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แต่มีการใส่ transfection agent เพื่อดูผลของ transfection agent ว่าเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ (2) Scramble plasmid (3) miR-221 allele A (4) miR-221 allele C เพื่อเปรียบเทียบผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน

### 2.1 ศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมบน miR-221

ศึกษาข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมบน miR-221 โดยโปรแกรม miRNASNP v2.0 (<http://www.bioguo.org/miRNASNP/>)

### 2.2 การวิเคราะห์รูปแบบการจับกัน (hybridization pattern) ระหว่าง miR-221 และยีนเป้าหมาย

การหาเป้าหมายของ miR-221 [7] และวิเคราะห์รูปแบบการจับกันของ miRNA (Hybridization pattern) ยีนเป้าหมาย โดยใช้โปรแกรม RNAhybrid และเลือกยีนเป้าหมายโดยพิจารณาจากค่า minimum free energy (mfe) และรูปแบบการจับที่มีความแตกต่างกันบริเวณ seed region (นิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 จากด้าน 5'UTR ของสาย miRNA) ที่มีผลจากความหลากหลายทางพันธุกรรม

### 2.3 การสร้าง miR-221 expression vector

ขั้นตอนการสร้าง miR-221 expression vector สร้างจาก pSilencer™ siRNA Expression Vectors (Ambion, Life

Technologies, USA) ซึ่งภายในจะมี scramble siRNAs สามารถสร้าง siRNA ที่ไม่จับกับยีนของมนุษย์ จึงสามารถนำมาใช้เป็น control สำหรับการ transfection ได้ จากนั้นจะสร้าง vector ที่มีการแสดงออกของ miR-221 โดยการนำ Hairpin structure และ sequence ของ miR-221 มาจากฐานข้อมูล miRbase (<http://www.mirbase.org/>) นำ sequence ของ Hairpin miRNA มาใส่ระหว่างบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อให้ sequence ของ miRNA เข้าไปในทิศทางที่ถูกต้องได้เป็น p*Silencer* hsa-mir-221 (allele A/C)

#### 2.4 การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HepG2

ใช้ Lipofectamine®2000 Reagent (Invitrogen, Life Technologies, USA) ปริมาณ 1.25 µl ในการนำพลาสมิด p*Silencer* hsa-mir-221 (allele A/C) 500 ng เข้าสู่เซลล์ HepG2 ใน 24-well plate ที่มี DMEM (Gibco, Life Technologies, USA) ผสมกับ 10% FBS (Gibco, Life Technologies, USA) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 2.5 การสกัด mRNA และ miRNA จากเซลล์ HepG2

ใช้ชุดสกัด miRNA purification kit (Norgen Biotek Corp., Canada) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท จะได้ส่วนของ large RNA (50 µl) และ small RNA (50 µl)

#### 2.6 การเติม Polyuridylation และ reverse transcription ของ miRNA

mature miRNAs จะต้องได้รับการเติม polyU (polyuridylation) โดย poly (U) polymerase เพื่อเพิ่มความยาวของสาย miRNA ก่อนที่จะ reverse transcription โดยใช้ stem loop (SL) - poly A primer และ reverse transcriptase หลังจากนั้นนำมาทำ real-time PCR ( SYBR green dye ) โดยใช้ forward primer ที่จำเพาะกับ miRNA ที่ต้องการศึกษา และใช้ universal primer เป็น reverse primer โดยปฏิกิริยา Polyuridylation ประกอบไปด้วย 10x NE buffer 2.5 µl, 50 mM UTP 0.25 µl, 40 units ของ RNase inhibitor, 2 units ของ poly (U) polymerase (New England BioLabs Inc., UK), miRNA 100 pmol และเติม nuclease free water จนปริมาณครบ 25 µl บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น reverse transcription โดยใช้ miRNA ที่เติม poly U แล้วปริมาณ 12.3 µl, 5x RT reaction buffer (Thermo scientific, CA) 4.0 µl, 10 µM SL-poly A primer 0.2 µl, 10 mM dNTPs (Thermo scientific, CA) mix 2 µl, RNase inhibitor (Thermo scientific, CA) 20 units, RevertAid reverse transcriptase (Thermo scientific, CA) 200 units และเติม nuclease free water จนได้ปริมาตร 20 µl

#### 2.7 การ Reverse transcription ของ mRNA

ปฏิกิริยา Reverse transcription mRNA ประกอบด้วย mRNA 11.5 µl, 5x RT reaction buffer (Thermo scientific, CA) 4.0 µl, 10 µM random hexamer primer 1 µl, 10 mM dNTPs (Thermo scientific,

CA) mix 2 µl, RNase inhibitor (Thermo scientific, CA) 20 units , RevertAid reverse transcriptase (Thermo scientific, CA) 200 units และเติม nuclease free water จนครบปริมาณ 20 µl

#### 2.8 การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนโดยใช้ real-time PCR

วัดปริมาณ miRNA โดยใช้ Step One Plus real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) และใช้ SYBR green dye ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo scientific, CA) 6.25 µl, 10 µM ของ primer แต่ละตัว 0.4 µl , cDNA 1 µl และเติม nuclease free water จนครบ 12.5 µl โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers แต่ละตัวได้สรุปไว้ใน ตารางที่ 1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อแสดงออกของ miRNA-221 และ U6 (internal control) คือ initial denaturation ที่ 94°C 3 นาที, เพิ่มปริมาณโดยใช้ อุณหภูมิ 95 °C 15 วินาที, 50°C (miR-221) หรือ 55°C (U6) 30 วินาที และ 62°C 30 วินาที ทั้งหมด 50 รอบ ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อแสดงออกของ ARNT และ GAPDH คือ initial denaturation ที่ 94°C 3 นาที, เพิ่มปริมาณโดยใช้ อุณหภูมิ 95 °C 15 วินาที, 58°C (GAPDH) หรือ 59°C (ARNT) 30 วินาทีและ 72°C 30 วินาที ทั้งหมด 50 รอบ

#### 2.9 คำนวณหา relative quantitation

บันทึกค่า Threshold cycle (Ct) แล้วคำนวณหา relative quantitation ดังสมการ

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene sample}) - Ct (\text{Ref. gene}) \quad (1)$$

$$\Delta Ct (\text{calibrator}) = Ct (\text{target gene calibrator}) - Ct (\text{Ref. gene}) \quad (2)$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{sample}) - \Delta Ct (\text{calibrator}) \quad (3)$$

$$\text{ปริมาณเชิงเปรียบเทียบ} = 2^{-\Delta \Delta Ct} \quad (4)$$

จากนั้นวิเคราะห์และนำไปคำนวณเพื่อหาค่าทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA

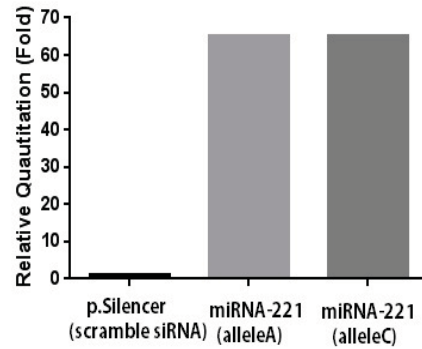
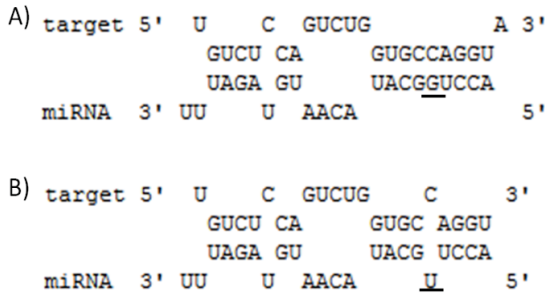
### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลจากการทำนายการจับระหว่าง miR-221 กับ ยีนเป้าหมาย ARNT ด้วยโปรแกรม RNAhybrid

การจับกันระหว่าง miR-221 กับยีน ARNT แสดงการจับบริเวณ seed region (ตำแหน่งที่ 2-8 จากด้าน 5'UTR ของสาย miRNA) ของ miR-221 (allele C) นั้นพบว่าสามารถจับกับ target gene โดยมีค่าพลังงาน minimum free energy (mfe) เท่ากับ -25.9 kcal/mol ในขณะที่ miR-221 (allele A) มีค่า minimum free energy (mfe) เท่ากับ -18.7 kcal/mol ซึ่งแสดงค่าการจับที่น้อยกว่าใน miR-221 (allele C) เนื่องจากมีการเกิด mismatch บริเวณ seed region (รูปที่ 1)

#### 3.2 ผลการแสดงออกของ miR-221 ในเซลล์ HepG2

ในการทดสอบว่า miR-221 expression vector ของทั้ง 2 allele สามารถสร้าง miR-221 (mimic miR-221) ภายในเซลล์ HepG2 ได้จริง



รูปที่ 1 Hybridization pattern ระหว่าง miRNA และยีนเป้าหมาย แสดงการจับระหว่าง miR-221 กับ บริเวณ 3'UTR ตำแหน่งที่ 1528 ของยีนเป้าหมาย ARNT ด้วยโปรแกรม RNAhybrid

- A) แสดงการจับของ miR-221 (allele C) mfe =-25.9 kcal/mol
- B) แสดงการจับของ miR-221 (allele A) mfe =-18.7 kcal/mol

รูปที่ 2 ระดับการแสดงออกของ miR-221

การแสดงออก miR-221 ในเซลล์ HepG2 โดยใน pSilencer (scramble siRNA) พบการแสดงออกของ miR-221 มีค่าเท่ากับ 1.0 ในขณะที่เซลล์ HepG2 ที่มี miR-221 allele A และ allele C มีการแสดงออกของ miR-221 เพิ่มขึ้นเป็น 65.1 และ 65.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers และ oligonucleotides ที่ใช้ในการทดลอง

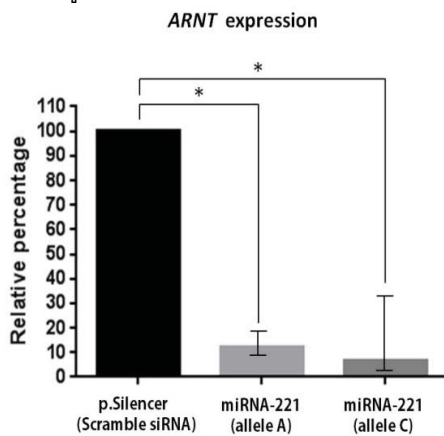
Primers / oligos	Sequence (5' → 3')	Strand	Application
miR_221-5p_TS (G)	GATCCGCACCTGCATACAATGTAGATTTCTGTGTTTCGTTAGGCAACAGCTACATTGTCT GCTGGGTTTCGCTTTTTTGGAAA	Top strand	สำหรับสร้าง miR-221 expression vector
miR_221-5p_BS (C)	AGCTTTTCCAAAAAGCGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTGTTGCCTAACGAACACAGAA ATCTACATTGTATGCAGGTGCG	Bottom strand	
miR_221-5p_TS (T)	GATCCGCACCTGCATACAATGTAGATTTCTGTGTTTCGTTAGGCAACAGCTACATTGTCTG CTGGGTTTCGCTTTTTTGGAAA	Top strand	
miR_221-5p_BS (A)	AGCTTTTCCAAAAAGCGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTGTTGCCTAACGAACACAGAA ATCTACATTGTATGCAGGTGCG	Bottom strand	
Stem loop (SL) poly (A) (Mei et al.,2012)	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGATATTCGCACTGGATACGACAAAAA	Sense	Reverse transcription
Fw_Arnt_CDS389	ATGATGATCAGATGTCTAACGATA	Sense	Real-time PCR
Rw_Arnt_CDS521	TCTGACAGTTCTGTGATGTAGG	Antisense	
GAPDH-F85	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	Sense	
GAPDH-R191	TCAATGAAGGGTCATTGATGG	Antisense	
miR-221_FW (5p)	ACCTGGCATAAATGTAGATT	Sense	
U6	CTCGCTTCGGCAGCACAA	Sense	
Universal qPCR_R (Mei et al., 2012)	GCAGGGTCCGAGGTATTC	Antisense	

จึงได้วัดระดับการแสดงออกของ miR-221 ด้วยเทคนิค real-time PCR หลังจากมีการนำ miR-221 expression vector เข้าสู่เซลล์ HepG2 โดยแกน y คือ relative quantitation คัดโดยวิธี Delta Ct method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ซึ่งใช้ในการคำนวณปริมาณเชิงเปรียบเทียบพบว่าในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ pSilencer 3.0 H-1 (scramble siRNA) จะไม่มีการสร้าง mimic miR-221 ในขณะที่กลุ่มที่มีการ transfect miR-221 expression vector ของทั้ง 2 allele มีการสร้าง mimic miR-221 ได้จริงโดยมีค่า relative quantitation มากกว่าในกลุ่มควบคุมถึง 65 เท่า (รูปที่ 2)

### 3.3 ผลการแสดงออกของยีน ARNT ระดับ mRNA ในเซลล์ HepG2

ผลจากการวัดการแสดงออกของยีน ARNT ด้วย real-time PCR หลังจาก transfection พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HepG2 พบว่าในกลุ่มที่ transfect pSilencer 3.0 H-1 ที่มี scramble siRNA อยู่เป็น negative control พบว่ายังคงมีการแสดงออกของยีน ARNT ตามปกติ ไม่เกิด off-target effect ส่วนในกลุ่มที่มีการ transfect vector miRNA-221 allele A และ allele C พบว่า มีการสร้าง miR-221 allele A และ allele C ออกมา และจับกับยีน ARNT และลดการแสดงออกของยีน ARNT เหลือ 12.23 และ 6.67 % และพบว่าการแสดงออกของยีน ARNT ที่ลดลงระหว่างกลุ่ม miR-221 allele A และ allele C แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ทางสถิติ แต่การลดลงของการแสดงออกของยีน *ARNT* นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม pSilencer 3.0 H-1 ที่มี scramble siRNA (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *ARNT* การแสดงออกของยีน *ARNT* ระดับ mRNA ในเซลล์ HepG2 คัดจากค่า Relative เป็นเปอร์เซ็นต์ โดยในกลุ่มควบคุม pSilencer (scramble siRNA) เทียบการแสดงออกของยีน *ARNT* เป็น 100 % ในเซลล์ HepG2 ที่มี miR-221 allele A และ allele C มีการแสดงออกของยีน *ARNT* ลดลงเหลือเพียง 12.23 และ 6.67 % ตามลำดับ

#### 4.สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การจับกันระหว่าง miRNAs กับยีนเป้าหมายนั้นจะส่งผลให้เกิดการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยรูปแบบการจับกันระหว่าง miRNAs กับยีนเป้าหมายนั้นจะมีหลายรูปแบบและจะส่งผลแตกต่างกันในการควบคุมการแสดงออก หาก miRNAs สามารถจับกับยีนเป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์ (perfect complementary) จะทำให้สาย mRNA ของยีนเป้าหมายนั้นถูกทำลาย (mRNA degradation) แต่หากการจับกันระหว่าง miRNAs กับยีนเป้าหมายนั้นไม่สมบูรณ์ (partial complementary) จะเกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของสาย mRNA (translation repression) [4, 5] และพบว่ารูปแบบในการจับของ miRNAs จะส่งผลต่อความจำเพาะในการจับกับยีนเป้าหมายโดยพบว่ามีรูปแบบในการจับของ miRNAs จะขึ้นกับบริเวณที่จับซึ่งโดยมากมักอยู่ในบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 จากทางด้าน 5'UTR ของสาย miRNAs (seed region) และมักจะเข้าคู่กับบริเวณ 3'UTR ของยีนเป้าหมาย [13] ดังนั้นการดูความจำเพาะในการจับระหว่าง miRNAs กับยีนเป้าหมายนั้นจึงจะให้ความสำคัญกับบริเวณ seed region โดยหากเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณดังกล่าวจึงส่งผลให้ค่าพลังงานในการจับระหว่าง miRNAs กับยีนเป้าหมาย นั้นเปลี่ยนแปลงไปรวมถึงอาจส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย [8] สอดคล้องกับผลการทำนายการจับระหว่าง miR-221 กับยีนเป้าหมาย *ARNT* ด้วยโปรแกรม RNAhybrid เมื่อเกิด mismatch บริเวณ seed region ใน miR-221 allele A ทำให้ค่าพลังงานในการจับกับยีนเป้าหมาย *ARNT* ลดลงและผลการแสดงออกของยีน *ARNT* ในเซลล์ HepG2 นั้นยืนยันว่า

*ARNT* เป็นยีนเป้าหมายของ miR-221 จริง และถึงแม้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบน miR-221 จะไม่ส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ในกลุ่มของ miR-221 allele C ซึ่งมีการจับบริเวณ seed region อย่างสมบูรณ์ มีแนวโน้มจะลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย *ARNT* ได้ดีกว่ากลุ่ม miR-221 allele A ซึ่งมีการจับบริเวณ seed region อย่างไม่สมบูรณ์

*ARNT* หรืออีกชื่อหนึ่งคือ hypoxia-induced factor-1b (HIF-1 $\beta$ ) จัดเป็น nuclear transcription factors อยู่ในกลุ่ม basic helix-loop-helix/Per-ARNT-SIM (bHLH/PAS) superfamily เมื่อมีสิ่งกระตุ้นจะทำงานรูป heterodimeric complex โดยจับกับ aryl hydrocarbon receptor (AHR), hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1 $\alpha$ ) หรือ single minded homolog 2 (SIM) มีบทบาททางชีวภาพเกี่ยวข้องกับ สภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia reaction), การกำจัดสิ่งแปลกปลอม (xenobiotic metabolism) และการพัฒนาของตัวอ่อน (embryonic development) เป็นต้น [14]

ในงานวิจัยของ Qinggong Yuan และคณะพบว่า miR-221 มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ Cyclin dependent kinase inhibitors คือ CDKN1B/p27 โดยระดับการแสดงออกของ *ARNT* จะแปรผันตรงกับระดับการแสดงออกของ CDKN1B/p27 ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ โดยการไปจับกับ Cyclin dependent kinase ซึ่งหาก miR-221 มีการแสดงออกมากส่งให้ไปยับยั้งการทำงานของทั้ง CDKN1B/p27 และ *ARNT* ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ [15]

จากการศึกษาของ Zhen-Zhen Zhang และคณะได้ทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 3 โมเดล ได้แก่ กลุ่มที่เป็น HCC, acute HBV infection และ chronic HBV infection เมื่อเทียบระดับการแสดงออกของ miR-221 พบว่าในกลุ่ม acute HBV infection มีระดับการแสดงออกของ miR-221 ลดลง chronic HBV infection มีระดับการแสดงออกของ miR-221 อยู่ในระดับปกติ ส่วนในกลุ่ม HCC มีระดับการแสดงออกของ miR-221 สูงกว่าปกติ [16] งานวิจัยของ Pascal และคณะพบว่า miR-221 มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นในผู้ที่เป็นโรคมะเร็งตับ [15] และระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ miR-221 นี้สามารถวัดได้ทั้งจากในซีรัมของผู้ป่วยหรือจากชิ้นเนื้อของตับ โดย miR-221 จะไปเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์และลดการเจริญไปเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่จำเพาะจนสุดท้ายจึงพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับในที่สุด miR-221 [17, 18] โดย miR-221 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (mitogenic signaling pathway) ผ่านทาง Receptor tyrosine kinases (RTKs) โดยเมื่อ RTKs ทำงานจะไปกระตุ้น pathways ที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง หนึ่งในนั้นคือ phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานโดย Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) ไม่ให้ไปกระตุ้น AKT pathway ให้ทำงาน โดยหาก

miR-221 สูงกว่าปกติไปจะยับยั้งการทำงานของ PTEN เกิดการกระตุ้น AKT pathway มีผลให้ต่อวัฏจักรเซลล์ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ miR-221 ยังจับกับ mRNA เป้าหมายในกลุ่มของ Cyclin dependent kinase inhibitors ส่งผลให้ลดการแสดงออกของ CDKN1B/p27 และ CDKN1C/p57 ที่มีความสำคัญในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ มีหน้าที่ไปยับยั้งการทำงานของ Cyclin dependent kinases (CDKs) ได้แก่ CDK1, CDK2, CDK4, และ CDK6 ไม่ให้จับกับ Cyclin ใน phase ต่างๆ ส่งผลให้วัฏจักรเซลล์สามารถดำเนินไปได้อย่างรวดเร็วกว่าปกติ [17-20] และการที่ยีนเป้าหมายของ miR-221 คือทั้ง CDKN1B/p27 และ ARNT และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ ARNT จะส่งผลต่อ CDKN1B/p27 ที่มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรเซลล์ [15] ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป้าหมายเนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรม บน miR-221 จึงอาจมีผลต่อความสามารถในการเกิดโรคมะเร็งและอาจส่งผลแตกต่างกันในระยะต่างๆ ของโรคตัวอีกเสบหรือรังและมะเร็งตับซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ในงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าหลากหลายทางพันธุกรรม rs113054794 (A/C) บนยีน miR-221 ไม่ส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ARNT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามอาจส่งผลต่อการควบคุมยีนอื่นๆ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

#### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคตับอักเสบและมะเร็งตับภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### เอกสารอ้างอิง

[1] H. B. El-Serag, and K. L. Rudolph, "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 7, Jun, 2007, pp. 2557-76.

[2] K. Hagymasi, and Z. Tulassay, "[Epidemiology, risk factors and molecular pathogenesis of primary liver cancer]," *Orv Hetil*, vol. 149, no. 12, Mar 23, 2008, pp. 541-8.

[3] V. Bihrer et al., "Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, 2011, pp. e26971.

[4] D. P. Bartel, "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function," *Cell*, vol. 116, no. 2, Jan 23, 2004, pp. 281-97.

[5] A. Muniategui et al., "Quantification of miRNA-mRNA interactions," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, 2012, pp. e30766.

[6] K. Uchino et al., "RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment," *Jpn J Clin Oncol*, vol. 43, no. 6, Jun, 2013, pp. 596-607.

[7] S. Khare et al., "Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA," *World J Gastroenterol*, vol. 19, no. 33, Sep 7, 2013, pp. 5439-45.

[8] W. P. Kloosterman, and R. H. Plasterk, "The diverse functions of microRNAs in animal development and disease," *Dev Cell*, vol. 11, no. 4, Oct, 2006, pp. 441-50.

[9] J. Li et al., "Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 406, no. 1, Mar 4, 2011, pp. 70-3.

[10] P. Pineau et al., "miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 1, Jan 5, 2010, pp. 264-9.

[11] J. Yang et al., "Prognostic role of microRNA-221 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis of 20 related studies," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, 2014, pp. e87606.

[12] G. T. Nguyen-Dien et al., "Genetic polymorphisms in miRNAs targeting the estrogen receptor and their effect on breast cancer risk," *Meta Gene*, vol. 2, no. 0, 12//, 2014, pp. 226-236.

[13] J. Brennecke et al., "Principles of microRNA-target recognition," *PLoS Biol*, vol. 3, no. 3, Mar, 2005, pp. e85.

[14] Y. Liang et al., "Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator is associated with tumor growth and progression of hepatocellular carcinoma," *Int J Cancer*, vol. 130, no. 8, Apr 15, 2012, pp. 1745-54.

[15] Q. Yuan et al., "MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration," *Hepatology*, vol. 57, no. 1, Jan, 2013, pp. 299-310.

[16] Z. Z. Zhang et al., "Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the miRNA level," *World J Gastroenterol*, vol. 17, no. 28, Jul 28, 2011, pp. 3353-8.

[17] S. O. Yoon et al., "Deregulated expression of microRNA-221 with the potential for prognostic biomarkers in surgically resected hepatocellular carcinoma," *Hum Pathol*, vol. 42, no. 10, Oct, 2011, pp. 1391-400.

[18] F. Fornari et al., "MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma," *Oncogene*, vol. 27, no. 43, Sep 25, 2008, pp. 5651-61.

[19] X. Li et al., "microRNA: a promising diagnostic biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma," *Dig Dis Sci*, vol. 59, no. 6, Jun, 2014, pp. 1099-107.

[20] M. Rong et al., "Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro," *BMC Cancer*, vol. 13, 2013, pp. 21.