

การเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิลเลชั่นของ LINE-1 ในมะเร็งระหว่างที่มีการแพร่กระจาย

นายฉัตรชัย นพวิชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHANGES IN LINE-1 METHYLATION LEVEL IN CANCERS DURING METASTASIS

MR. CHATCHAI NOPVICHAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชั่นของ LINE-1 ในมะเร็ง  
ระหว่างที่มีการแพร่กระจาย

โดย

นายฉัตรชัย นพวิชัย

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโชติ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติสร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโชติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายแพทย์ ทรงคุณ วิญญูวรรณ์)

อัครชัย นพวิชัย: การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในมะเร็งระหว่างที่มีการแพร่กระจาย (CHANGES IN LINE-1 METHYLATION LEVEL IN CANCERS DURING METASTASIS) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: ศ.นพ.ชนพ ช่างโชติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, 70 หน้า

ที่มาและปัญหา: มะเร็งหลายชนิดนั้นมักพบการลดลงของระดับเมทิลเลชันของลำดับซ้ำ LINE-1 เมื่อเปรียบเทียบกับในเซลล์ปกติโดยเฉพาะในมะเร็งที่มีการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้น จึงมีความน่าสนใจว่าการเกิดการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นอาจมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการแพร่กระจายของมะเร็งที่มีการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้น

วัตถุประสงค์: เปรียบเทียบระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งระหว่างมะเร็งปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย

วิธีทดลอง: ใช้เทคนิค COBRA ในการวัดและทำการเปรียบเทียบระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ระหว่างมะเร็งปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ที่เก็บได้จากตัวอย่างมะเร็ง 5 ชนิด (จากผู้ป่วย 10 รายที่เป็นมะเร็งศีรษะและลำคอ, มะเร็งต่อมธัยรอยด์, มะเร็งปอด, มะเร็งเต้านม, และมะเร็งลำไส้)

ผลการทดลอง: ในมะเร็งศีรษะและลำคอและมะเร็งปอดพบว่าระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในมะเร็งจากตำแหน่งแพร่กระจายต่ำกว่าในมะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) ในขณะที่มะเร็งเต้านมนั้นพบการเปลี่ยนแปลงทิศทางของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในบางลักษณะ ( $p < 0.05$ ) ในทางตรงข้ามไม่พบความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 อย่างมีนัยสำคัญระหว่างมะเร็งปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายที่เก็บได้จากมะเร็งชนิดลำไส้และมะเร็งต่อมธัยรอยด์

สรุปผลการทดลอง: พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในตำแหน่งแพร่กระจายเมื่อเปรียบเทียบกับในตำแหน่งปอดของมะเร็งศีรษะและลำคอและมะเร็งปอดซึ่งเป็นมะเร็งที่มีการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้น อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นเป็นเหตุทำให้เกิดการแพร่กระจายหรือเป็นผลที่เกิดจากการแพร่กระจายของมะเร็ง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5174767430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: LINE-1 METHYLATION, MULTI-STEP ONCOGENESIS, PRIMARY TUMOR, METASTASIS, TUMOR PROGRESSION

CHATCHAI NOPVICHAI: CHANGES IN LINE-1 METHYLATION LEVEL IN CANCERS DURING METASTASIS. THESIS ADVISOR: PROF. SHANOP SHUANGSHOTI, MD., CO-ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D. 70 pp.

Background: Significantly lower LINE-1 methylation level has been observed in several cancers, compared to their normal cell counterparts. It is of interest to note that this epigenetic phenomenon is rather common to cancers with multistage oncogenesis.

Objective: To compare LINE-1 methylation level of cancer cells between the primary and matched metastatic sites.

Methods: COBRA method was used to determine LINE-1 methylation level of tumor cells at the primary and matched metastatic sites in 5 malignancies (10 cases each of head and neck squamous carcinoma, papillary thyroid carcinoma, non-small cell lung cancer, invasive mammary ductal carcinoma, and colorectal adenocarcinoma). LINE-1 methylation level between the primary and matched metastatic site was compared.

Results: In head and neck cancer and lung cancer, significantly lower LINE-1 methylation level was noted in the metastatic site, compared to the primary site ( $p < 0.01$ ). Significant changes in direction of LINE-1 methylation in many loci were found in breast cancer ( $p < 0.05$ ) but not in LINE-1 methylation levels. No significant changes in LINE-1 methylation level, between the primary and matched metastatic site, were found in the remaining cancers tested.

Conclusion: Significantly lower LINE-1 methylation level was found at the metastatic site of head and neck cancer and lung cancer, as compared to the matched primary tumor. Further studies are warranted to determine whether this altered methylation is the result or the cause of cancer metastasis.

Field of Study: Medical Sciences

Academic Year: 2010

Student's Signature.....

Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโชติ และศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัดน์ มุทิตางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่กรุณาเมตตาโอกาส และให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำงาน ให้คำแนะนำและความเอื้อเฟื้อ รวมถึงให้กำลังใจและชี้แนะแนวทางในการทำงาน รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณนายแพทย์อนพัช สรรพาวัตถ์ ที่ร่วมทำงานด้วยกันตลอดจนงานวิจัยนี้เสร็จเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนให้แนวคิด และกำลังใจในการทำงานเสมอ

กราบขอบพระคุณอาจารย์ นายแพทย์อมรพันธ์ เสรีมาศพันธ์ ที่กรุณาช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจในการดำเนินชีวิตและการทำงานเสมอมา

กราบขอบพระคุณ อาจารย์ เจ้าหน้าที่ และแพทย์ประจำบ้านทุกท่านของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ และครอบครัววนพิชัย ผู้ซึ่งเป็นแรงบันดาลใจให้กระทำการใดๆ จนเสร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณ อิงค์มาต โทณะวนิก และคุณแม่สร้อยนภา โทณะวนิก ที่เป็นกำลังใจให้ในยามที่เหนื่อยล้า และเป็นแรงบันดาลใจในการทำงานเสมอมา

ขอขอบพระคุณ Mr.Paul Zarha ที่แนะนำสิ่งดีๆ ช่วยเหลือและเกื้อกูลในยามที่ข้าพเจ้าประสบปัญหาและความลำบาก

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย) .....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
สารบัญคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1. บทนำ.....	1
บทที่ 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	8
2.2 ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค PCR.....	9
2.3 ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค COBRA.....	13
2.4 การวัดระดับเมทิลเลชันด้วยวิธีใหม่.....	15
2.5 กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (epigenetics).....	16
2.6 มะเร็ง (cancers).....	20
บทที่ 3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.....	27
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
3.3 สารเคมีและชุดการทดลองที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	34
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	34
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	34
3.3.3 การหาระดับเมทิลเลชันของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค COBRA.....	35
3.3.4 การแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์และการวัดความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ.....	38
3.3.5 การคำนวณค่าเมทิลเลชัน.....	39
3.3.6 การคำนวณค่าทางสถิติ.....	40

## หน้า

บทที่ 4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	41
4.1 ผลการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายด้วยเครื่อง nanodrop spectrometer	41
4.2 การแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ผ่านเจลอะคริลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้า (polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE)	41
4.3 ผลการวัดระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 และผลการวิเคราะห์ทิศทางการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 รูปแบบต่างๆ	42
บทที่ 5. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	51
รายการอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	63
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	64
ภาคผนวก ข. ตัวอย่างรูปทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดต่างๆ	65
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	70



## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างของโมเดลและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง.....	25
2 ค่าเมทริกซ์ของ LINE-1 ที่วัดได้ในการทดลองนำร่องในตัวอย่างเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอจากตำแหน่งปฐมภูมิเปรียบเทียบกับตำแหน่งแพร่กระจายสำหรับใช้ในการคำนวณขนาดประชากร....	28
3 การคำนวณขนาดประชากรที่ต้องใช้ในการทดลองซ้ำ.....	30
4 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	35
5 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR.....	36
6 อุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR.....	36
7 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	37
8 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นตัวกลาง.....	38
9 ผลการคำนวณทางสถิติของระดับเมทริกซ์ของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	43
10 ผลการคำนวณทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงทิศทางของการเพิ่มระดับเมทริกซ์ของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	45
11 ผลการคำนวณทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทริกซ์ผสมของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	47
12 ผลการคำนวณทางสถิติของทิศทางของการลดระดับเมทริกซ์ของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	49

## สารบัญภาพ

รูป	หน้า	
1	ขั้นตอนย่อยในแต่ละรอบของกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR.....	10
2	ปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ในการเปลี่ยนเบสไซโทซีนไปเป็นยูราซิล.....	13
3	การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจากการทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมโบรไมด์.....	14
4	ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จาก COBRA PCR และตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่แตกต่างกันที่อยู่บนสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์.....	15
5	โครงสร้างของลำดับซ้ำ LINE-1 ในสภาพสมบูรณ์.....	17
6	แผนภาพแสดงการทำงานของลำดับซ้ำ LINE-1 ในการเคลื่อนย้ายตัวเองเข้าไปแทรกในตำแหน่งต่างๆของจีโนม.....	18
7	การพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้นของมะเร็งศีรษะและลำคอ.....	23
8	รูปตัวอย่างของการแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา COBRA PCR.....	41
9	การกระจายตัวของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	44
10	การกระจายตัวของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	46
11	การกระจายตัวของระดับเมทิลเลชั่นผสมของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	48
12	การกระจายตัวของทิศทางการลดระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ.....	50

## สารบัญคำย่อ

คำย่อ		คำเต็ม
LINE-1	=	Long intersperse nuclear element - 1
HNSC	=	Head and neck squamous cell carcinoma
PTC	=	Papillary thyroid carcinoma
NSCLC	=	Non-small cell lung carcinoma
IDC	=	Invasive ductal carcinoma
CRC	=	Colorectal adenocarcinoma
COBRA	=	Combine bisulfite restriction analysis
PCR	=	Polymerase chain reaction
FFPE	=	Formalin-fixed paraffin-embedded
ORF	=	Open reading frame
LTR	=	Long terminal repeat
LOH	=	Loss of heterozygosity
OSCC	=	Oral squamous cell carcinoma
EGFR	=	Epidermal growth factor receptor
TGF- $\alpha$	=	Transforming growth factor alpha
KRAS	=	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
RET/PTC	=	rearranged in transformation/papillary thyroid carcinoma

**คำย่อ****คำเต็ม**

BRAF	=	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
MSS	=	Microsatellite stability
MSI	=	Microsatellite instability
CIMP	=	CpG island methylator phenotype
HER-2	=	Human epidermal growth factor receptor - 2

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเกิดภาวะสูญเสียระดับเมธิลเลชันของจีโนมนั้นถือเป็นอุบัติการณ์ที่พบได้บ่อยของการเกิดมะเร็ง<sup>[1,2]</sup> โดยการเกิดภาวะสูญเสียระดับเมธิลเลชันนั้นอาจเกิดได้กับหลายตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอในจีโนม โดยเฉพาะกับลำดับซ้ำเช่น LINE และ Alu<sup>[3]</sup> โดยลำดับซ้ำ LINE-1 (long intersperse nuclear element 1) นั้นคาดว่ามียูถึงประมาณ 600,000 ซ้ำ หรือคิดเป็น 17% ของลำดับเบสทั้งหมดและแทรกอยู่ทั่วไปในจีโนมของมนุษย์ โดยมีประมาณ 5,000 ชุดอยู่ในรูปร่างสมบูรณ์ และคาดว่ายังมีลำดับซ้ำ LINE-1 ที่ยังสามารถแสดงออกได้อยู่ประมาณ 100 ซ้ำ<sup>[4-6]</sup> โดยทั่วไปแล้วการเกิดการสูญเสียระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 นั้นอาจส่งผลให้ลำดับซ้ำ LINE-1 สามารถแสดงออกและทำให้เกิดความผิดปกติของจีโนมได้ ยกตัวอย่างเช่น การเกิดการสูญเสียความสามารถในการถอดรหัสของยีน (transcriptional deregulation), การเกิดการกลายพันธุ์ชนิดสอดแทรก (insertion mutation), การแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA breaks), หรือแม้แต่การเกิดการรวมตัวของสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติ (abnormal recombination)<sup>[6-8]</sup> ซึ่งเหตุการณ์ทั้งหมดเหล่านี้อาจส่งผลให้จีโนมสูญเสียความสามารถในการทำงาน และอาจทำให้เกิดการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนและการสูญเสียเสถียรภาพของโครโมโซม (Chromosomal instability) ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้<sup>[1]</sup>

มีการศึกษาหลายชิ้นก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการมีการลดลงของระดับเมธิลเลชันของลำดับซ้ำ LINE-1 ในมะเร็งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ<sup>[6,9-13]</sup> ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่ว่า การลดลงของระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 นั้นมักพบในมะเร็งที่มีลักษณะการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้น (multi-stage oncogenesis) โดยมีการพบการลดลงของระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 ในมะเร็งศีรษะและลำคอ (head and neck cancer), มะเร็งหลอดอาหาร (esophageal cancer), มะเร็งเต้านม (breast cancer), มะเร็งตับ (liver cancer), มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder cancer), มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer), และมะเร็งปากมดลูก (uterine cervix cancer)<sup>[10,14]</sup> ซึ่งมะเร็งทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้มีลักษณะการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้น โดยมักพบรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็ง (pre-cancerous lesion หรือ dysplastic lesion) ในบริเวณเดียวกันกับอวัยวะที่เกิดมะเร็ง แต่ในทาง

ตรงกันข้ามนั้นไม่พบการลดลงของระดับเมธิลเลชันของลำดับซ้ำ LINE-1 ในมะเร็งของต่อมไทรอยด์ (ชนิด papillary thyroid carcinoma), มะเร็งของไต (ชนิด renal cell carcinoma), และมะเร็งของต่อมน้ำเหลือง (malignant lymphoma) ซึ่งมะเร็งทั้งสามชนิดที่ได้กล่าวมานั้นเป็นมะเร็งที่ไม่มีรอยโรคก่อนมะเร็ง<sup>[10]</sup> ซึ่งจากข้อมูลที่ได้กล่าวมานี้ จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าภาวะที่เกิดการลดลงของระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 นั้น อาจมีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งชนิดที่มีการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้นเท่านั้น

การลุกลาม (invasiveness) และการแพร่กระจาย (metastasis) นั้นถือเป็นพฤติกรรมหนึ่งที่สำคัญ ของเซลล์มะเร็ง โดยเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพและเป็นอันตรายที่อาจส่งผลกระทบต่อชีวิตของผู้ป่วย โดยมักเกิดการเปลี่ยนแปลงและความผิดปกติทางพันธุกรรม และกลไกควบคุมการแสดงออกทาง พันธุกรรมของเซลล์มะเร็งควบคู่ไปในระหว่างที่มีการแพร่กระจาย<sup>[15,16]</sup> ซึ่งด้วยเหตุผลที่ว่า การแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็งนั้นเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการเกิดมะเร็ง คณะผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่ามะเร็งที่มี ลักษณะการพัฒนาย่างเป็นลำดับขั้น (รวมถึงมีภาวะการลดลงของระดับเมธิลเลชันของ LINE-1) น่าจะมีการ เกิดการสูญเสียระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 อย่างเป็นลำดับควบคู่ไปในระหว่างที่มีการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็ง ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวัดระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 ในมะเร็งชนิดต่างๆ โดย ทำการเปรียบเทียบระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 ระหว่างเซลล์มะเร็งในตำแหน่งเริ่มต้น (primary tumor) กับมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย (metastasis tumor) เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว องค์ความรู้ที่ได้จาก การศึกษาครั้งนี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็ง อันจะเป็น ประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งในอนาคต

## คำถามงานวิจัย

เซลล์มะเร็งมีการลดลงของระดับเมธิลเลชันของลำดับซ้ำ LINE-1 ในระหว่างที่มีการแพร่กระจาย หรือไม่

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาระดับเมธิลเลชันที่ลดลงของลำดับซ้ำ LINE-1 ระหว่างการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง แต่ละชนิด

## สมมติฐานของการวิจัย

ในระหว่างการแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ เซลล์มะเร็งที่อยู่ในระยะแพร่กระจายควรมีระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ที่ลดลงจากเซลล์มะเร็งในระยะเริ่มต้น

## ข้อตกลงเบื้องต้น

- 1) ตัวอย่างชิ้นเนื้อทุกรายผ่านการวินิจฉัยและตรวจทานจากพยาธิแพทย์
- 2) ข้อมูลของตัวอย่างทั้งหมดถูกปิดบังไว้สำหรับผู้ปฏิบัติงานวิจัยเพื่อป้องกันอคติในการวัดผลการทดลอง
- 3) เก็บตัวอย่างโดยใช้วิธี laser-captured microdissection เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียงเซลล์มะเร็ง

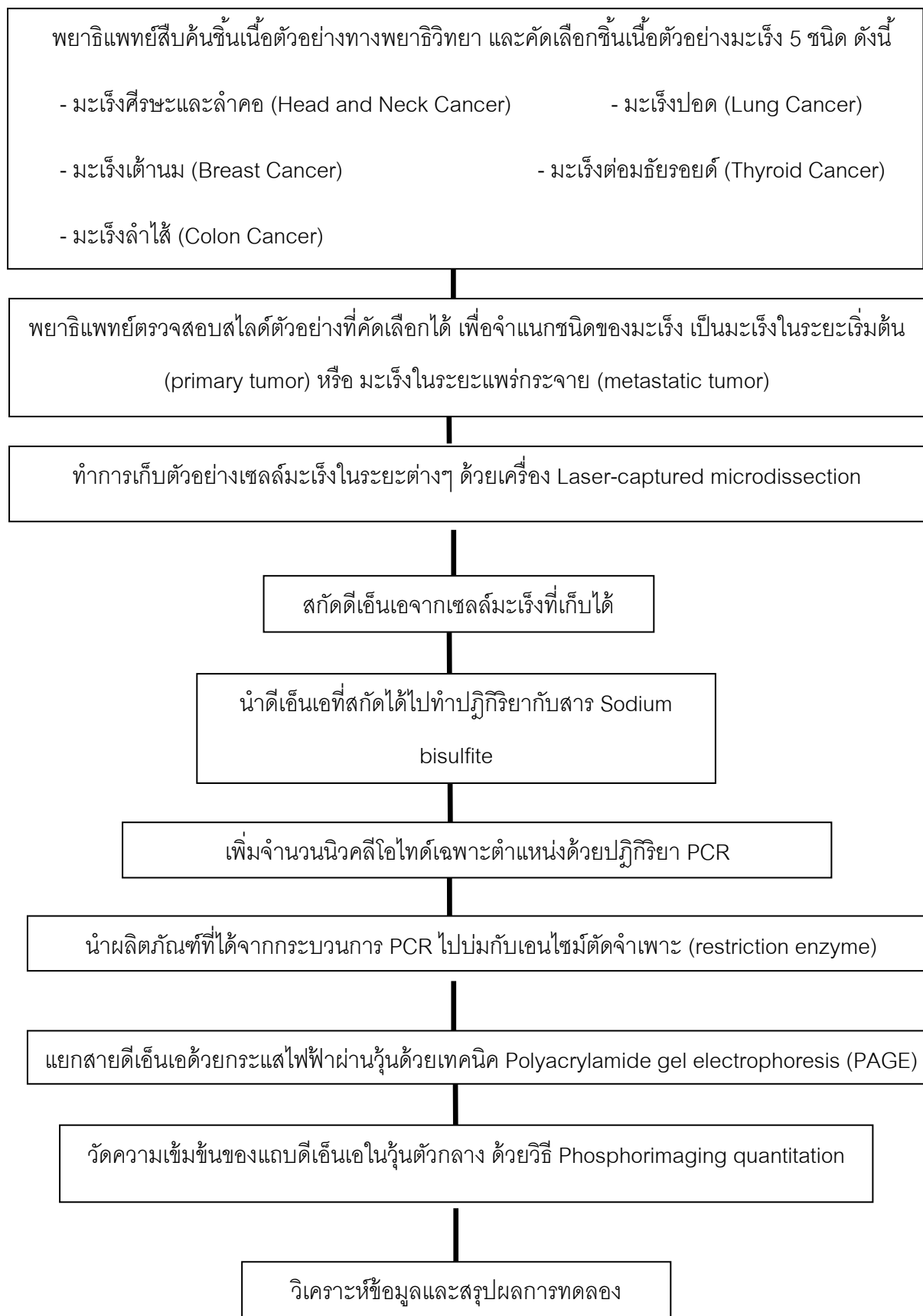
## คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Primary tumor	คือ เนื้ออกที่เกิดขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดที่ เกิดความผิดปกติขึ้นในตำแหน่งดั้งเดิมของเนื้อเยื่อชนิดนั้นๆ
Metastatic tumor	คือ เนื้ออกที่เกิดขึ้นจากการกระจายตัวของ primary tumor ในตำแหน่งที่ห่างไกลออกไปจากตำแหน่งดั้งเดิมของ เนื้อเยื่อชนิดนั้นๆ
COBRA technique	คือ เทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับเมทิลเลชันของสายดีเอ็นเอ โดยอาศัยการออกแบบ primer และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่กับลำดับ เบสที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมไบ ซัลไฟต์
Phosphorimager quantitation	คือ การวัดปริมาณความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอในแผ่นเจล โดยใช้หลักการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของสารย้อมสีที่ติด กับดีเอ็นเอภายใต้แสงในความยาวคลื่นต่างๆเป็นค่าอ้างอิง

## คำสำคัญ

LINE-1 methylation, multi-step oncogenesis, primary tumor, metastasis, tumor progression

## ขั้นตอนของการวิจัย





## ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ชิ้นเนื้อตัวอย่างมีปริมาณจำกัด จึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำหรือทำการทดลองเพิ่มเติมในส่วนที่สนใจศึกษาเพิ่มเติมได้
2. เนื่องจากสารเคมีและวัสดุ รวมถึงครุภัณฑ์มีปริมาณจำกัด จึงไม่สามารถทำการทดลองเพื่อจำแนกชนิดย่อยทางพันธุศาสตร์ในมะเร็งแต่ละชนิดได้

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ของเซลล์มะเร็งในระยะเริ่มต้นและระยะแพร่กระจาย
2. สามารถประยุกต์ใช้องค์ความรู้ที่ได้รับในการพยากรณ์การเกิดการแพร่กระจายของโรคมะเร็งในผู้ป่วยได้ในอนาคต
3. สามารถนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติ รวมถึงตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารที่เกี่ยวข้องในด้านมะเร็ง หรือพยาธิวิทยาได้

## วิธีดำเนินการวิจัย

1. Sample Collection (การเก็บตัวอย่าง)
  - 1.1) เก็บเซลล์ตัวอย่างจากสไลด์ที่ตัดจาก Formalin-fixed paraffin-embedded tissue โดยวิธี laser-captured microdissection ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์
2. Method (วิธีการทดลอง)

### 2.1) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

หลังจากได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดต่างๆในรูปแบบ Formalin-fixed paraffin-embedded จากพยาธิแพทย์แล้ว นำมาตัด section หนา 6 ไมครอน จำนวน 1-2 สไลด์ จากนั้นนำไปเก็บตัวอย่างเซลล์จากสไลด์โดยใช้เครื่อง laser-captured microdissection โดยใช้สไลด์ Hematoxylin-Eosin ที่พยาธิแพทย์ได้กำหนดตำแหน่งไว้แล้วเป็นแม่แบบ

### 2.2) ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ

เมื่อได้เซลล์ตัวอย่างที่ต้องการแล้ว นำเซลล์ตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด MagneSil Genomic, Fixed Tissue System Kits (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

### 2.3) ขั้นตอนการทำ Combined bisulfate restriction analysis

นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยากับโซเดียมไบซัลไฟต์เพื่อเปลี่ยนเบสไซโทซีน (cytosine) ที่ไม่มีหมู่เมทิลทั้งหมดให้กลายเป็นเบสยูราซิล (uracil) โดยใช้ชุด EZ DNA methylation kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ primer ที่จำเพาะกับลำดับ LINE-1<sup>[10]</sup> และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอน PCR มาทำการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* และ *TasI* เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

### 2.4) ขั้นตอนการทำ gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ความเข้มข้น 8% จากนั้นย้อมด้วยสีย้อมสารพันธุกรรม GelStar® Nucleic Acid Stains (Lonza Rockland Inc., Rockland, ME)

### 2.5) ขั้นตอนการวัดปริมาณความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ

นำแผ่นเจลที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4 ไปวัดความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Phosphorimager quantitation โดยใช้เครื่อง ImageQuant software (Molecular Dynamics, GE Healthcare, Slough, UK)

### 2.6) ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลการทดลองที่ได้จากข้อ 2.5 และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณระดับเมทิลเลชันของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำผลการทดลองไปคำนวณทางสถิติ ก่อนนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์

## ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. เปรียบเทียบร้อยละของระดับเมทิลเลชันระหว่างมะเร็งระยะเริ่มต้น และระยะแพร่กระจายใน มะเร็งชนิดต่างๆ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมทั้งคำนวณค่าทางสถิติโดยการ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชนิด pair sample student t-test one-tailed analysis
2. ตรวจสอบและวิเคราะห์ข้อมูลงานศึกษาก่อนหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางพันธุศาสตร์และ การควบคุมการแสดงออกของมะเร็งชนิดต่างๆ รวบรวมผลและเชื่อมโยงกับข้อมูลที่ได้จากการ ทดลอง
3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 และกลไกทางพันธุศาสตร์ของ มะเร็งชนิดต่างๆ ในระหว่างที่มีการแพร่กระจาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพยากรณ์โรคมะเร็งในผู้ป่วย ต่อไปในอนาคต
4. สรุปผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล และนำเสนอผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

ในเซลล์เนื้องอก (benign) หรือ มะเร็ง (malignant) หลายชนิดนั้นมักพบภาวะถดถอยของระดับเมทิลเลชันของจีโนม (global hypomethylation) ที่สูงขึ้นในมะเร็งที่มีการลุกลามมากขึ้น (invasive cancer) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติหรือเซลล์เนื้องอกที่การแบ่งตัว (proliferative benign cell) <sup>[17]</sup> โดยการลดลงของระดับเมทิลเลชันของจีโนมนั้นมักมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของระดับเมทิลเลชันของลำดับซ้ำต่างๆที่แทรกกระจายทั่วไปในจีโนม (intragenomic endoparasitic DNA) <sup>[18]</sup> โดยลำดับซ้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันที่พบได้บ่อย ได้แก่ LINE-1 (Long Interspersed nuclear elements) และ Alu <sup>[19]</sup> เป็นต้น

เป็นที่น่าสังเกตว่าการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 มักพบในมะเร็งชนิดที่มีรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็ง (pre-malignant lesion) ให้ตรวจพบ เช่น ในมะเร็งศีรษะและลำคอ (head and neck cancer), มะเร็งหลอดอาหาร (esophageal cancer), มะเร็งเต้านม (breast cancer), มะเร็งตับ (liver cancer), มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder cancer), มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer), และมะเร็งภายในช่องคลอด (uterine cervix cancer) เป็นต้น แต่การลดลงของระดับเมทิลเลชันดังกล่าว ตรวจไม่พบในมะเร็งที่ไม่มีรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งให้เห็น <sup>[10]</sup> จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ได้ข้อสันนิษฐานว่า การลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งชนิดที่มีกระบวนการเกิดแบบหลายขั้นตอน (multi-step carcinogenesis) ซึ่งการแพร่กระจายหรือลุกลาม (metastasis) นั้นถือเป็นคุณลักษณะสำคัญของเซลล์มะเร็ง และเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเกิดแบบหลายขั้นตอนของการเกิดมะเร็ง

ในปัจจุบัน เทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับเมทิลเลชันของสายดีเอ็นเอนั้นทำได้หลายวิธี โดยเทคนิคใหม่ๆได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อหาระดับเมทิลเลชันที่เปลี่ยนแปลงไปของลำดับเบสที่สนใจตามการพัฒนาของเทคโนโลยีชีวภาพที่รวดเร็วในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นการใช้เทคนิค quantitative polymerase chain reaction (qPCR) หรือการตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing เป็นต้น แต่ทั้งนี้ ทั้งสองวิธี

ที่ได้ยกตัวอย่างมานั้นต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูงที่มีราคาแพง ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่องานวิจัยที่ขาดแคลนเครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูงได้ นอกจากนี้ ยังไม่สามารถจำแนกรายละเอียดและทิศทางการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันของลำดับซ้ำ LINE-1 ได้ เนื่องจากเครื่องมือเหล่านี้จะให้ผลการทดลองในลักษณะเป็นการสรุปผลรวมของค่าทั้งหมด โดยทั่วไปแล้วยังมีอีกเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดระดับเมทิลเลชันที่เปลี่ยนไปของลำดับเบส นั่นคือเทคนิคการวิเคราะห์ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ Combine bisulfite restriction analysis (COBRA) ซึ่งเทคนิคนี้ไม่มีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ระดับสูง หากแต่เพียงใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR cycler) ชนิดธรรมดา ร่วมกับการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเท่านั้น โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากในปัจจุบันในการวัดระดับเมทิลเลชันที่เปลี่ยนแปลงไปของลำดับซ้ำ LINE-1 ในห้องปฏิบัติการวิจัยทางการแพทย์ นอกจากนี้ เทคนิคนี้ยังได้มีการปรับปรุงความสามารถในการวิเคราะห์ผลการทดลองทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดและจำเพาะเจาะจงที่สามารถระบุและพยากรณ์ทิศทางการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันได้ในปัจจุบัน

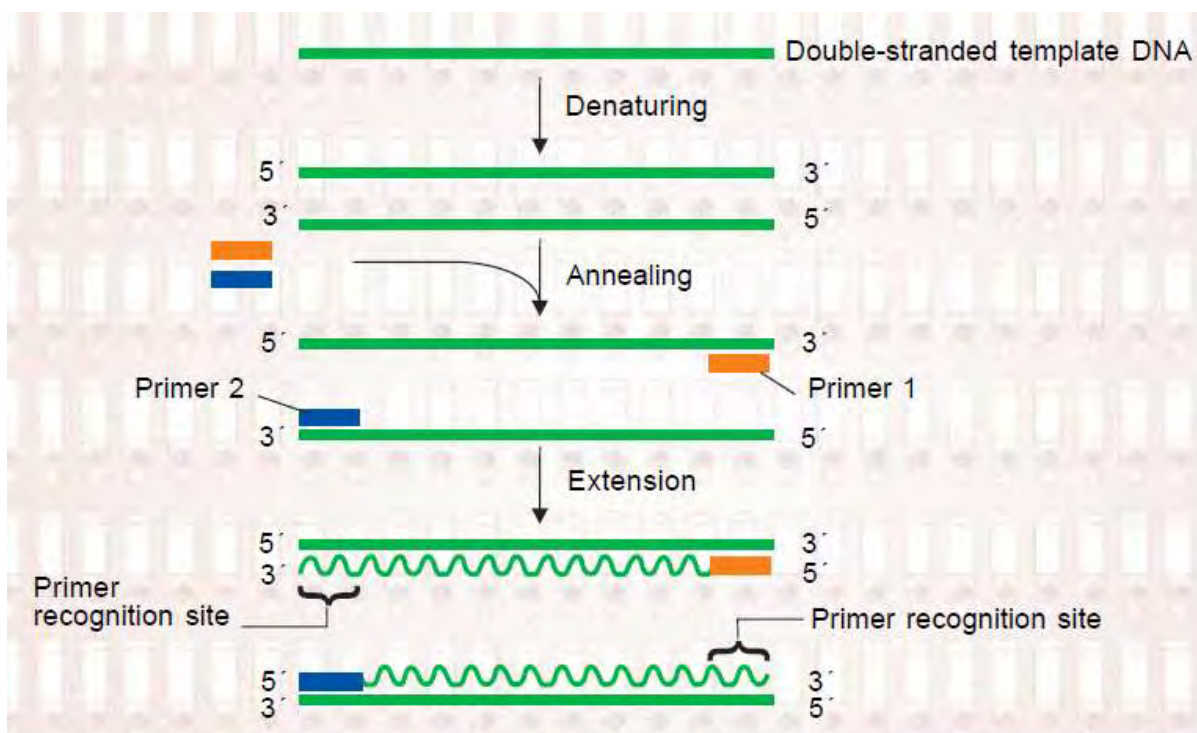
### ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) นั้นถูกพัฒนาขึ้นในปี 1983 โดย Kary Mullis และคณะ โดยเป็นเทคนิคที่มีจุดเด่นที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะโดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นที่ความจำเพาะกับลำดับเบสที่ต้องการวิเคราะห์ และอาศัยกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำลองในหลอดทดลอง (*in vitro* gene amplification) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase สำหรับเป็นเอนไซม์ต่อสายนิวคลีโอไทด์ (polymerase enzyme) ในต่อสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาให้ยาวออกไปจากไพรเมอร์ โดยเลือกจับกับสารนิวคลีโอไทด์อิสระ (dNTP) ที่เป็นคู่สม (complementary) กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ภายใต้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเหมาะสมและอำนวยความสะดวกการทำงานของเอนไซม์ โดยมีการทำปฏิกิริยาร่วมกันต่อเนื่องหลายรอบจนเอนไซม์หมดประสิทธิภาพหรือสารตั้งต้นของปฏิกิริยาหมดลง ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วยสารละลายดังต่อไปนี้

- 1) สารพันธุกรรมตั้งต้น (DNA template)
- 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (DNA primer)
- 3) อนุพันธ์นิวคลีโอไทด์อิสระ (deoxyribonucleotide triphosphate) ประกอบไปด้วย

- a. deoxyadenosine triphosphate (dATP)
  - b. deoxythymidine triphosphate (dTTP)
  - c. deoxyguanosine triphosphate (dGTP)
  - d. deoxycytosine triphosphate (dCTP)
- 4) เกลือ Magnesium chloride ( $MgCl_2$ ) ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของ *Taq* polymerase
  - 5) *Taq* DNA polymerase

ในปฏิกิริยาของ PCR แต่ละรอบ จะประกอบไปด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้



รูปที่ 1. แสดงขั้นตอนย่อยในแต่ละรอบของกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR (อ้างอิงจาก เอกสาร PCR-based technologies: PCR basic. IPGRI and Cornell university. 2003. <http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/PCR%20basics.pdf>)

- 1) ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturing) เป็นขั้นตอนที่แยกสายของดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ (double strand DNA) ให้กลายเป็นสายเดี่ยว (single strand DNA) ด้วยการให้ความร้อนที่

อุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอระหว่างหมู่เบสของสายดีเอ็นเอทั้งสองสาย (อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้อยู่ที่ประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส)

- 2) ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์ (primer annealing) เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาลงเพื่อให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไพรเมอร์และสายดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณตำแหน่งจำเพาะ
- 3) ขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) เป็นขั้นตอนที่ Taq DNA polymerase จะเข้ามาจับกับไพรเมอร์ด้านปลาย OH (ด้านปลาย 3') และจากนั้นจะมีการเกิด polymerization สร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาจากอนุพันธ์ดีเอ็นเออิสระ (dNTP) ที่อยู่ในสารละลาย

ปริมาณดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR นั้นจะเป็นทวีคูณของสายดีเอ็นเอตั้งต้นทุกครั้งในแต่ละรอบ โดยอาจคิดปริมาณได้เป็น  $2^n$  เท่าของสารตั้งต้น เมื่อ  $n$  แทนจำนวนรอบของปฏิกิริยา เช่น เมื่อทำปฏิกิริยาไปจำนวน 30 รอบ จะได้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์เป็น 230 เท่าของปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น

การตั้งค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นในปฏิกิริยา PCR (PCR optimization)

ในการออกแบบปฏิกิริยา PCR ให้มีประสิทธิภาพดีที่สุดนั้น มีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องคำนึงถึง ซึ่งจะกล่าวถึงโดยสังเขป ดังนี้

1. การออกแบบคู่ไพรเมอร์ และการกำหนดอุณหภูมิสำหรับขั้นตอนการจับของไพรเมอร์
  - a. การออกแบบไพรเมอร์นั้นเริ่มต้นที่การสืบค้นข้อมูลของลำดับเบสที่เราสนใจก่อนเป็นอันดับแรก โดยสามารถสืบค้นข้อมูลและรายละเอียดของลำดับเบสที่สนใจได้ที่ฐานข้อมูลออนไลน์ที่ [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) หรือ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
  - b. การออกแบบไพรเมอร์นั้น ควรมีอัตราส่วนของเบสชนิด Guanine และ cytosine (GC content) ที่ ประมาณร้อยละ 40-60 และควรมีจำนวนเบสทั้งหมดที่ประมาณ 20-25 คู่เบส และที่บริเวณ 5 ลำดับเบสสุดท้ายด้านปลาย 3' ควรมีเบส G หรือ C อยู่อย่างน้อย 1-2 ตัว เพื่อเพิ่มความจำเพาะ แต่ไม่ควรมี G หรือ C เกิน 3 ตัว ในบริเวณ 5 เบสสุดท้ายทางปลาย 3'
  - c. ค่า  $T_m$  ของไพรเมอร์ (melting temperature) นั้นเป็นค่าที่มีผลต่อการกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ( $T_a$ ) ค่า  $T_m$  ของไพรเมอร์ทั้งลำดับหน้า (forward primer) และลำดับหลัง (reverse primer) ควรจะมีค่าใกล้เคียงกันโดยสามารถคำนวณได้จากสูตร  $T_m$

=  $4(G+C)+2(A+T)$  โดย  $T_m$  ควรมีค่าอยู่ในช่วง 53-75 องศาเซลเซียส และจะคิดค่า  $T_a$  จากค่า  $T_m$  โดยค่า  $T_a$  จะอยู่ในช่วง +5 หรือ -5 องศาเซลเซียสจากค่า  $T_m$  ค่า  $T_a$  ที่สูงเกินไปอาจทำให้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลดลงจากการที่คู่ไพรมเมอร์ไม่สามารถจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ ในทางกลับกันค่า  $T_a$  ที่ต่ำเกินไปอาจส่งผลให้ไพรมเมอร์เกิดการจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบที่ผิดพลาดได้ไม่ตรงตามตำแหน่งที่ต้องการ ทำให้เกิดสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะ (non-specific product) ได้ นอกจากนี้ ความเข้มข้นของไพรมเมอร์ไม่ควรเกิน 3 ไมโครโมลาร์ต่อหนึ่งปฏิกิริยา โดยความเข้มข้นของไพรมเมอร์ที่สูงเกินไปอาจทำให้คู่ไพรมเมอร์จับกันเป็นไดเมอร์ (primer dimer) หรือเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะได้ [20]

## 2. การกำหนดค่าความเข้มข้นของเกลือ $MgCl_2$

ค่าความเข้มข้นของเกลือ  $MgCl_2$  นั้นสามารถเลือกกำหนดได้หลากหลายและแตกต่างกันออกไปในแต่ละปฏิกิริยา และควรทำการหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทุกครั้ง สำหรับการกำหนดค่าความเข้มข้นของสารละลายในแต่ละการทดลอง มีข้อพึงระวัง คือ

- ความเข้มข้นของ dNTP จะส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของเกลือ  $MgCl_2$  นั้นลดลง เนื่องจาก dNTP จะสามารถสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลกับไอออน  $Mg^{+2}$
- ค่าความเข้มข้นของเกลือ  $MgCl_2$  ที่สูงเกินไป อาจทำให้เกิด non-specific product ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจะทำให้ *Taq* polymerase ทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ

## 3. การกำหนดค่าความเข้มข้นของสายดีเอ็นเอตั้งต้น

สายดีเอ็นเอตั้งต้นนั้นเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญที่มีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์โดยตรง เนื่องจากความเข้มข้นของสายดีเอ็นเอที่น้อยเกินไปอาจส่งผลให้ได้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์น้อย แต่ในทางตรงกันข้ามหากความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นมากเกินไปอาจทำให้ต้องใช้ปริมาณของสารตั้งต้นมากในรอบแรกๆ ทำให้สารตั้งต้นของปฏิกิริยาหมดก่อนที่จะครบจำนวนรอบของปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ซึ่งส่งผลให้ได้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่น้อยเกินไปเช่นกัน ดังนั้นควรมีการหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับทุกครั้งสำหรับการกำหนดค่าความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละการทดลอง

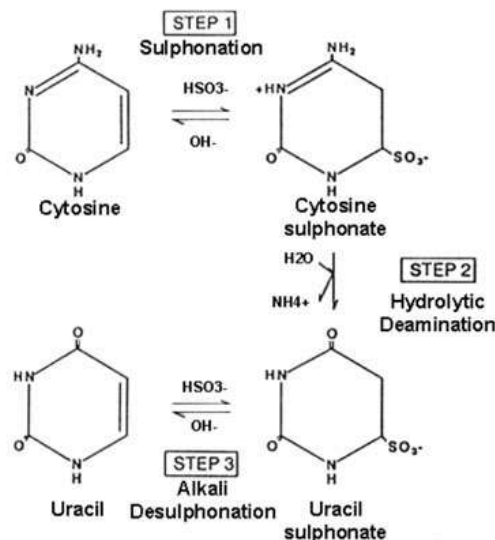


## ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค Combine bisulfite restriction analysis (COBRA)

เทคนิค COBRA นั้นเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของลำดับเบสที่สนใจ โดยมีหลักการโดยสังเขปดังนี้

1. การเปลี่ยนเบสไซโทซีน (cytosine) ไปเป็นเบสยูราซิล (uracil) โดยการบ่มด้วยสารโซเดียมไบซัลไฟท์ (sodium bisulfite)

เบสไซโทซีนในสายดีเอ็นเอที่ไม่มีหมู่เมทิลเลชันนั้นจะเกิดปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน (sulfonation) กับสารโซเดียมไบซัลไฟท์ เกิดการเติมหมู่ซัลไฟท์เข้าไปในตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ของวง จากนั้นน้ำจะเข้ามาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลติกดีเอมีเนชัน (hydrolytic deamination) เกิดการแทนที่หมู่อะมิโน (amino group) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ด้วยหมู่ออกซี (oxy group) เปลี่ยนแปลงเบสไซโทซีนซัลโฟเนต (cytosinesulfonate) ไปเป็นยูราซิลซัลโฟเนต (uracilsulfonate) และสุดท้ายไอออนของโลหะจะเข้ามาปฏิกิริยาดีซัลโฟเนชัน (alkali desulfonation) ดึงหมู่ซัลไฟท์ออก ในขณะที่เบสไซโทซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมไบซัลไฟท์เนื่องจากหมู่เมทิลบนตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ของเบสไซโทซีนจะขัดขวางปฏิกิริยาซัลโฟเนชัน

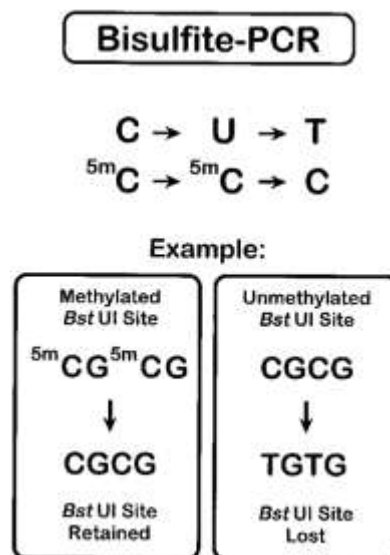


รูปที่ 2. แสดงปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ในการเปลี่ยนเบสไซโทซีนไปเป็นยูราซิล (อ้างอิงรูปจาก

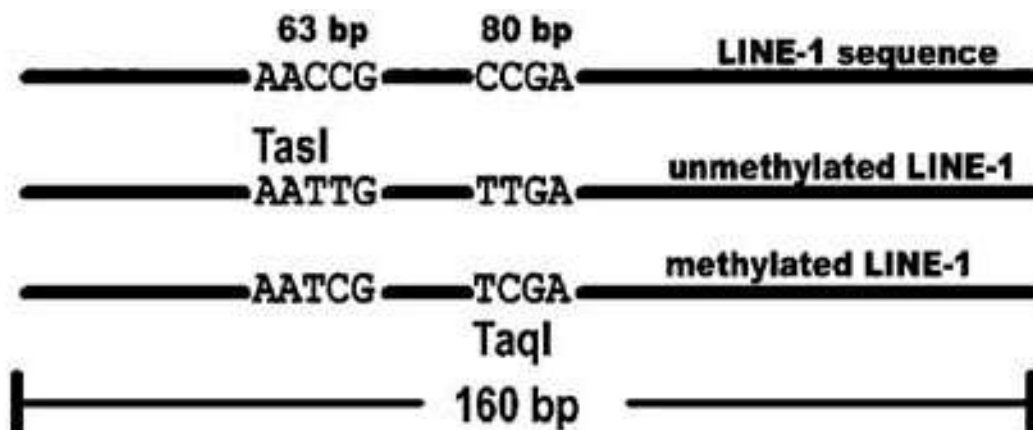
<http://www.ous-research.no/home/lothe/methods/1382>)

## 2. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ COBRA PCR

ดังหลักการที่ได้กล่าวมาข้างต้นในข้อ 1 จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเกิดขึ้นในสายดีเอ็นเอตั้งต้นจากการทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมไบซัลไฟท์ โดยเบสไซโทซีนที่ไม่มีหมู่เมธิลเลชันทั้งหมดในดีเอ็นเอตั้งต้นจะเปลี่ยนไปเป็นเบสยูราซิล (ก่อนที่กลายเป็นเบสไทมีน (thymine) ในขั้นตอน PCR) ในขณะที่เบสเมธิลไซโทซีนจะยังคงอยู่ในรูปเดิมไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR จึงต้องคำนึงถึงลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยจะมีการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ เพื่อให้เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถสร้างสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างระหว่างสายดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีเมธิลเลชันและไม่มีเมธิลเลชัน



รูปที่ 3. แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจากการทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมไบซัลไฟท์<sup>[21]</sup>



รูปที่ 4. ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จาก COBRA PCR และตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่แตกต่างกันที่อยู่บนสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์<sup>[10]</sup>

#### การวัดระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 ด้วยวิธีใหม่

เทคนิคการวัดระดับเมธิลเลชันแบบใหม่นั้นพัฒนาขึ้นโดย Poobsook และคณะในปี 2011 โดยถือหลักการที่ว่าระดับเมธิลเลชันที่ CpG สองตำแหน่งภายในสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นมีความแตกต่างกันออกไปในเซลล์แต่ละชนิด รวมถึงระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง โดยเทคนิคการวัดแบบใหม่นี้ จะสามารถให้ข้อมูลที่แสดงถึง

1. ระดับเมธิลเลชันโดยรวมของ LINE-1 (LINE-1 methylation levels)
2. ทิศทางการเปลี่ยนแปลงการเพิ่มระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 (percent number of LINE-1 hypermethylated loci)
3. ทิศทางการเปลี่ยนแปลงการลดระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 (percent number of LINE-1 hypomethylated loci)
4. ระดับเมธิลเลชันผสมของ LINE-1 (percent number of partial methylation of LINE-1)

ซึ่งค่าเมธิลเลชันที่ได้จากการคำนวณทั้ง 4 ค่า จะสามารถใช้เป็นข้อมูลที่แสดงถึงรายละเอียดและทิศทางการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิลเลชันในส่วนต่างๆ ได้อย่างแม่นยำและน่าสนใจ รวมถึงพยากรณ์แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ได้ ซึ่งแตกต่างจากวิธีดั้งเดิมที่บอกได้

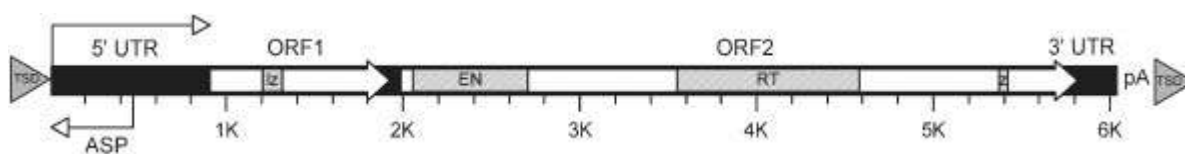
เพียงแค่ระดับเมธิลเลชันโดยรวมของ LINE-1 เท่านั้น (รายละเอียดการคำนวณค่าจะแสดงต่อไปในบทที่ 3)<sup>[22]</sup>

### กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (Epigenetics)

กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (Epigenetics) โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสในยีน เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชันของสายดีเอ็นเอ (DNA methylation), การเปลี่ยนแปลงรูปของฮิสโตนโปรตีน (Histone modification), การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNAs) และการเปลี่ยนแปลงรูปแบบต่าง ๆ ของโปรตีนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับโครมาติน<sup>[23-27]</sup> โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชันของดีเอ็นเอ นั้นเป็นกลไกสำคัญที่พบได้บ่อยมากทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ผิดปกติ โดยกลไกการเกิดดีเอ็นเอเมธิลเลชันนั้นเกิดขึ้นได้โดยมีการเติมหมู่เมธิลเลชันลงในตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ของเบสไซโทซีน (cytosine) ที่มีการร่วมพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) กับเบสกวานีน (guanine) หรือที่เรียกว่าซีพีจี (CpG) โดยตำแหน่งที่อุดมไปด้วย CpG ในสายดีเอ็นเอ นั้นเรียกว่า CpG island ซึ่งพบมากในบริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory sequence) โดยเฉพาะในบริเวณที่เรียกว่า โปรโมเตอร์ (promoter) ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการถอดรหัส (transcription) ของยีน โดยในเซลล์ปกติมักพบกลไกการเกิดดีเอ็นเอเมธิลเลชันในสองลักษณะ คือ 1) การเกิดเมธิลเลชันที่ตำแหน่ง promoter ของยีนบางชนิด เช่น ยีนตั้งแบบของยีนมะเร็ง (proto-oncogene) หรือยีนจากการถ่ายทอด (imprinted gene)<sup>[28]</sup> เป็นต้น และ 2) การเกิดดีเอ็นเอเมธิลเลชันเพื่อควบคุมการแสดงออกของลำดับที่ไม่ใช่ยีน (non-coding sequence) เช่น อินทรอน (introns), ลำดับซ้ำ (repetitive sequence), และลำดับเบสที่เคลื่อนย้ายตัวเองในจีโนมได้ (transposable element) [29] นอกจากนี้ การเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชันของสายดีเอ็นเอ นั้นสามารถพบได้บ่อยในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชันของเซลล์มะเร็งนั้นสามารถแบ่งได้ออกเป็นสองลักษณะ คือ 1) การลดลงของระดับเมธิลเลชันของทั้งจีโนม (global hypomethylation) และ 2) การเพิ่มขึ้นของระดับเมธิลเลชันบนตำแหน่งจำเพาะของยีน (site-specific hypermethylation) โดยการเพิ่มขึ้นของระดับเมธิลเลชันนั้นคาดการณ์ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มดีเอ็นเอเมธิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase) และการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของฮิสโตนโปรตีน (histone modification) โดยมักพบการเพิ่มขึ้นของระดับเมธิลเลชันนี้ในบริเวณ CpG island ที่อยู่ในบริเวณส่วน

ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยยีนที่พบการเกิดการเพิ่มขึ้นของระดับเมทิลเลชันมักเป็นยีนในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เช่น VHL, p16INK4a หรือ BRCA1 เป็นต้น และ/หรือยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ เช่น MGMT, hMLH1 หรือ Werner's syndrome gene เป็นต้น ซึ่งระดับเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้นในบริเวณ CpG island ในตำแหน่งควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ มักส่งผลให้ยีนไม่เกิดการแสดงออกหรือแสดงออกได้น้อยลง และมักส่งผลกระทบต่อกลไกหลายอย่างของเซลล์ อาทิ เช่น Cell cycle, DNA repair, toxic catabolism, cell adherence, apoptosis และ angiogenesis เป็นต้น [30-36]

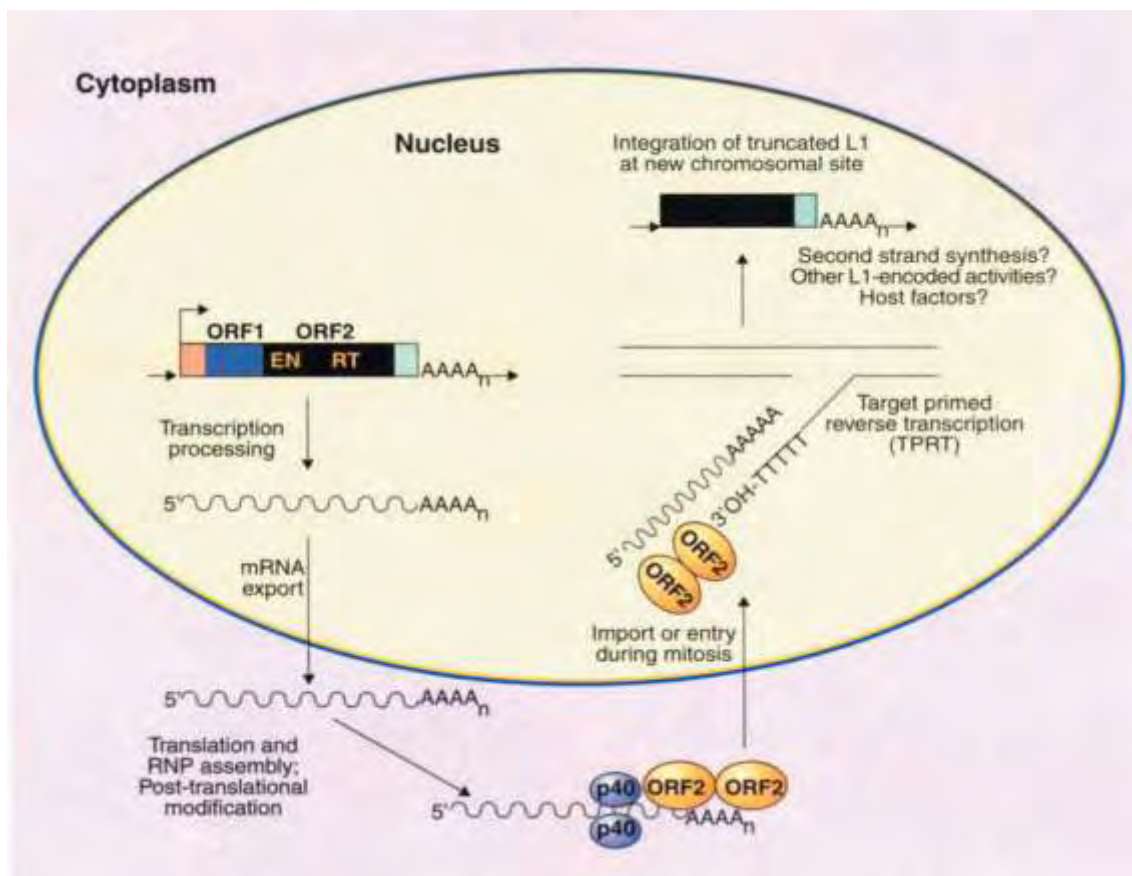
ในกรณีของการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของทั้งจีโนม (global hypomethylation) นั้น มักเกิดจากการลดลงของระดับเมทิลเลชันของลำดับซ้ำชนิดต่างๆ เช่น LINE หรือ Alu เป็นต้น เนื่องจากลำดับซ้ำเหล่านี้มีอยู่จำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมจึงสามารถใช้เป็นตัวแทนในการวัดระดับเมทิลเลชันของทั้งจีโนมได้ [18] โดยลำดับซ้ำ LINE-1 (long intersperse nuclear element 1) นั้นเป็นลำดับซ้ำชนิดที่สามารถเคลื่อนย้ายตัวเองได้ผ่านการทำงานของ RNA (RNA intermediate retrotransposons) ชนิดที่ไม่มีการซ้ำที่ปลายสาย (non-long terminal repeats-non LTR) และคาดการณ์ว่ามีลำดับซ้ำ LINE-1 จำนวนถึงประมาณ 600,000 ซ้ำแทรกตัวอยู่ทั่วไปในจีโนม หรือคิดเป็น 17% ของจำนวนเบสทั้งหมดในจีโนม โดยขนาดสมบูรณ์ของ LINE-1 มีจำนวนเบสประมาณ 6 กิโลเบส ซึ่งประกอบไปด้วย 1) 5'untranslated region (5'UTR), 2) open reading frames (ORF) จำนวน 2 ตำแหน่ง และ 3) 3' UTR ซึ่งต่อกับบริเวณที่อุ้มนำไปด้วยเบสอะดีนีน (polyA tail) [1,9,10,37-40]



รูปที่ 5. โครงสร้างของลำดับซ้ำ LINE-1 ในสภาพสมบูรณ์ [40]

LINE-1 ที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและแทรกตัวเองเข้าไปในตำแหน่งต่างๆของจีโนมได้ โดยการแสดงออกของลำดับซ้ำ LINE-1 นั้นเกิดขึ้นผ่านกลไกการถอดรหัสของโปรโมเตอร์ของมันเอง (internal promoter) ที่อยู่ในบริเวณ 5'UTR โดยการถอดรหัสนี้คาดว่าจะเกิดขึ้นด้วยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase II และกลุ่มโปรตีนชนิดต่างๆและจะถูกส่งออกมาสู่ไซโทพลาสซึม โดยหลังจากการถอดรหัสแล้วนั้น การเกิดการแปลรหัสและการเข้าแทรกตัวของลำดับซ้ำ LINE-1 นั้นจะ

เกิดขึ้นในสองส่วน คือ 1) ส่วน ORF1 ซึ่งจะถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีน p40 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายตัวเองของ LINE-1 ซึ่งโปรตีน p40 นี้จะทำงานเป็น sequence-specific RNA-binding protein เข้าไปจับกับสาย mRNA ของ LINE-1 ในบริเวณใกล้เคียงกับปลาย 5' ของ ORF2 ซึ่งทั้งหมดนี้จะรวมเรียกว่า ribonucleoprotein particles (RNPs) โดย RNPs นี้จะบรรจุทุก RNA ของลำดับซ้ำ LINE-1 ที่สมบูรณ์และทำงานได้ซึ่งจะถูกเคลื่อนย้ายและเข้าแทรกในจีโนมในตำแหน่งอื่นๆต่อไป และ 2) ส่วนของ ORF 2 นั้นจะถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ร่วมกับ p40 ในการเคลื่อนย้ายตัวเองกลับเข้าสู่นิวเคลียสอีกครั้ง โดย ORF2 ของ LINE-1 นี้จะมีส่วนหนึ่งทำหน้าที่เป็น N-terminal endonuclease (EN) domain ในการทำหน้าที่ตัดสายเดี่ยวของ DNA (single-strand nick leaving) ที่ระหว่างตำแหน่ง 5'-phosphate และ 3'-hydroxyl และเข้าแทรกในสายดีเอ็นเอ จากนั้น ORF2 ซึ่งมีด้านหนึ่งทำหน้าที่เป็น reverse transcriptase domain จะทำการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สมของมันขึ้นมาจากปลายดีเอ็นเอตรงข้าม<sup>[9]</sup>



รูปที่ 6. แผนภาพแสดงการทำงานของลำดับซ้ำ LINE-1 ในการเคลื่อนย้ายตัวเองเข้าไปแทรกในตำแหน่งต่างๆของจีโนม<sup>[9]</sup>

โดยปกติแล้ว การแสดงออกของ LINE-1 นั้นมักเกิดในระหว่างที่เซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้น (early germ cell) หรือในเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูป (undifferentiated cell) <sup>[9]</sup> โดยในเซลล์ปกติ ระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละชนิด <sup>[38-40]</sup> แต่ในเซลล์มะเร็งต้นกำเนิด (undifferentiated tumor cell) หรือเซลล์มะเร็ง (cancer cell) นั้นมักพบการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ ลำดับซ้ำ LINE-1 ที่ต่ำกว่าในเซลล์ปกติ (normal cell) ซึ่งปรากฏการณ์นี้มักเกิดควบคู่กับการแสดงออกของลำดับซ้ำ LINE-1 และส่งผลให้เกิดความผิดปกติในรูปแบบต่างๆ เช่น การเกิดการสูญเสียความสามารถในการถอดรหัสของยีน (transcriptional deregulation), การเกิดการกลายพันธุ์ชนิดสอดแทรก (insertion mutation), การแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA breaks), หรือแม้แต่การเกิดการรวมตัวของสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติ (abnormal recombination) ซึ่งปรากฏการณ์เหล่านี้ อาจส่งผลให้เกิดการเกิดการทำงานที่ผิดปกติของจีโนม (genome disorganization) และการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน รวมไปถึงการสูญเสียเสถียรภาพของโครโมโซม (chromosomal instability) ได้ <sup>[5,7,8]</sup> ซึ่งลักษณะเหล่านี้ สอดคล้องกับการสูญเสียคุณลักษณะของเซลล์ปกติและพัฒนาไปสู่การเป็นเซลล์มะเร็งได้ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า LINE-1 ที่แทรกอยู่ในจีโนมจะมีอยู่เป็นจำนวนมาก แต่มีจำนวนเพียง 80-100 เท่านั้นที่อยู่ในรูปสมบูรณ์ แต่ถึงอย่างไรก็ตาม คาดว่ามี LINE-1 ในรูปสมบูรณ์เพียง 6 ซ้ำเท่านั้นที่คาดว่าจะเกิดการแสดงออกในการเคลื่อนย้ายตำแหน่งได้ หรืออีกนัยหนึ่ง การแสดงออกของ LINE-1 ในสภาพสมบูรณ์เพียงอย่างเดียวอาจไม่ใช่สาเหตุหลักที่ทำให้จีโนมเกิดความไม่เสถียร จึงมีข้อสังเกตว่าน่าจะมีกลไกบางอย่างในการเกิดการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของจีโนม ด้วยสมมุติฐานนี้ Apontewan และคณะ จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 กับการแสดงออกของยีน ซึ่งผลการทดลอง LINE-1 ที่อยู่แทรกอยู่ในยีน (Intragenic LINE-1) นั้นมีส่วนทำให้เกิดการลดระดับการแสดงออกของยีนนั้นๆได้ โดยในเซลล์ปกติที่ถูกลดระดับเมทิลเลชันด้วยสาร 5-aza-2'deoxyctidine นั้น พบการลดระดับการแสดงออกของยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อจีโนมของเซลล์มะเร็งเกิดการลดระดับเมทิลเลชันลง จะส่งผลให้ LINE-1 สามารถเกิดการถอดรหัสออกมาเป็น RNA ได้ และจากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของโปรตีน AGO2 มาจับกับ RNA ของ LINE-1 เกิดเป็นโครงสร้างโมเลกุลที่มีความซับซ้อนเพื่อป้องกันมิให้เกิดการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของ LINE-1 และจากนั้นจะเกิดยับยั้งการถอดรหัสของยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่ ส่งผลให้ยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่นั้นถูกลดระดับการแสดงออกได้

อาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า การเกิดการลดระดับเมธิลเลชั่นของ LINE-1 สามารถส่งผลให้ยีนต่างๆเกิดการลดระดับการแสดงออกได้ผ่านการทำงานร่วมกันกับโปรตีน AGO2 อย่างไรก็ตาม LINE-1 ที่แทรกตัวอยู่ในยีนนั้นมีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ได้รับอิทธิพลจากการลดระดับเมธิลเลชั่นของทั้งจีโนมในเซลล์มะเร็งและสามารถให้เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ เนื่องจากในบางกลไก LINE-1 อาจเสริมให้เกิดการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน ซึ่งการอธิบายการทำงานของ LINE-1 และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกและความผิดปกติของจีโนมที่เกิดขึ้นจากตัวมันนั้นยังต้องอาศัยการศึกษาต่อไปในอนาคต <sup>[41]</sup>

## มะเร็ง (cancers)

มะเร็ง (cancer) เป็นสาเหตุของการตายที่พบได้บ่อยมากอย่างหนึ่งในปัจจุบัน โดยในร่างกายของมนุษย์นั้นซึ่งเป็นเรื่องที่มีชีวิตที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมากนั้นจะมีการเกิดการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา ซึ่งหากมีเซลล์ใดเซลล์หนึ่งเกิดจากความผิดปกติในระดับพันธุกรรม และไม่อาจถูกกำจัดไปตามกลไกทางธรรมชาติของร่างกาย เซลล์ที่มีความผิดปกติเพียงเซลล์เดียวนั้นอาจมีความสามารถในการดำรงอยู่และแบ่งเซลล์ต่อไปได้ในลักษณะของการเพิ่มจำนวนของตัวเอง (proliferates) และการขยายขนาด (grows) ลักษณะของกลุ่มของเซลล์ที่มีความผิดปกตินี้เรียกได้ว่าเป็นเนื้องอก (neoplasm หรือ tumor) โดยเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติ (neoplastic cells) นั้นมักประกอบไปด้วยคุณลักษณะที่สำคัญของลักษณะ คือ

- 1) สามารถแบ่งเซลล์ที่มีความผิดปกติได้โดยที่กลไกป้องกันของร่างกายไม่สามารถกำจัดหรือควบคุมเอาไว้ได้
- 2) มีความสามารถในการลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงหรืออวัยวะได้ (invasiveness)

โดยหากว่าเซลล์ที่มีความผิดปกตินั้นมีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ได้โดยที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ แต่ปราศจากการลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียง อาจเรียกเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกตินั้นได้ว่าเป็นเนื้องอกที่ชนิดที่ไม่ใช่มะเร็ง (benign tumor) แต่หากว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกตินั้นมีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์และมีความสามารถในการลุกลามเข้าสู่เซลล์ข้างเคียง จะเรียกเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกตินั้นว่าเนื้อร้าย หรือมะเร็ง (malignant tumor)

โดยปกติแล้วมะเร็งนั้นสามารถแบ่งประเภทได้ตามชนิดของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่เป็นต้นกำเนิดของเซลล์มะเร็ง โดยสามารถแบ่งได้ดังนี้

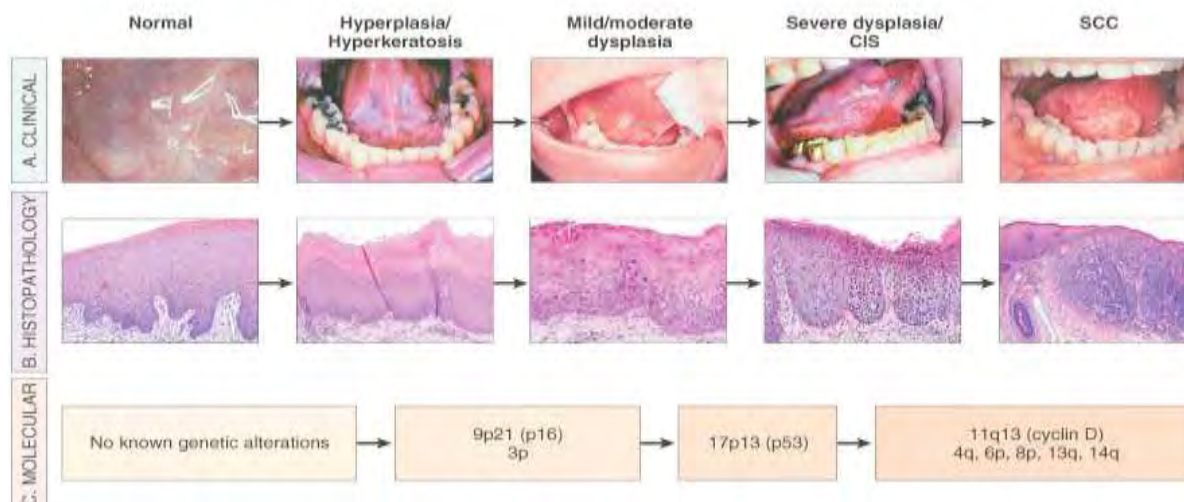


1. Carcinomas เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นจากเซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) จัดเป็นมะเร็งที่พบได้มากที่สุด  
ในมนุษย์
2. Sarcomas เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นจากเซลล์จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) หรือจากเซลล์  
กล้ามเนื้อ (muscle cells)
3. มะเร็งที่ไม่ได้เกิดจากสองลักษณะที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งอาจยกตัวอย่างได้ดังต่อไปนี้
  - 3.1. Lymphomas เป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ระบบน้ำเหลือง (lymphatic system)
  - 3.2. Leukemias เป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เลือด (blood cells) หรือจากเซลล์ตั้งต้นในระบบเลือด  
(hematopoietic cells)
  - 3.3. มะเร็งชนิดที่เกิดจากเซลล์ระบบประสาท (nervous system) ซึ่งชนิดของมะเร็งขึ้นกับเซลล์ต้น  
กำเนิดของมะเร็ง เช่นมะเร็งชนิด astrocytomas เกิดจากเซลล์ประสาทชนิด astrocytes เป็น  
ต้น

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น มะเร็งนั้นเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมของเซลล์เพียงเซลล์หนึ่ง ซึ่ง  
ร่างกายไม่สามารถกำจัดหรือควบคุมเอาไว้ได้ และเซลล์ที่มีความผิดปกตินั้นเกิดการแบ่งตัวและขยาย  
ขนาดขึ้นมาเป็นเนื้องอก และอาจกลายเป็นมะเร็งที่มีความสามารถในการลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะ  
ข้างเคียงได้ โดยการเกิดการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง (carcinogenesis หรือ tumor progression) นั้นอาจ  
เกิดขึ้นได้ในสองส่วน คือ 1) การเกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม (genetic change) ซึ่งเป็นการเกิด  
การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในจีโนม ยกตัวอย่างเช่น การเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในสายดี  
เอ็นเอ (point mutation), การเกิดการแทรกสอดของลำดับเบส (insertion), หรือการหายไปของลำดับเบส  
(deletion) เป็นต้น และ 2) การเกิดความผิดปกติของกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน (epigenetic  
change) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส แต่มีความผิดปกติของกลไกควบคุมการแสดงออกต่างๆ  
ดังที่ได้กล่าวเอาไว้แล้วข้างต้น <sup>[42]</sup>

กลไกการพัฒนาของเซลล์มะเร็งนั้นเป็นกลไกที่ยังมีความซับซ้อนประกอบไปด้วยการเกิดการ  
เปลี่ยนแปลงและความผิดปกติทางพันธุกรรมที่หลากหลายและยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนใน  
ปัจจุบัน โดยมะเร็งแต่ละชนิดนั้นก็จะมีกลไกการพัฒนาของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกันออกไป แต่อาจกล่าว  
ได้ว่า มะเร็งหลายชนิดนั้นเกิดขึ้นจากเซลล์ที่มีการสะสมความผิดปกติที่เพิ่มมากขึ้นตามความรุนแรงของ  
โรคที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเรียกได้ว่าเป็นการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง (tumor progression) ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นถึง  
การพัฒนาของเซลล์มะเร็งในที่นี้เป็นการพัฒนาของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิด squamous cell

carcinoma (head and neck squamous cell carcinoma) ซึ่งเป็นมะเร็งที่มีการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้น (multi-step progression) โดยในช่วงก่อนการเกิดมะเร็งนั้น ผู้ป่วยมักมีรอยโรคในช่องปากเป็นลักษณะเป็นแผลสีขาว และมีการเกิดการสะสมของสารเคราติน (hyperkeratosis) ซึ่งเรียกรอยโรคชนิดนี้ว่าลิวโคพลาเคีย (leukoplakia) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้นั้นได้เกิดความผิดปกติในระดับพันธุกรรมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์จากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะที่ผิดปกติออกไป โดยตัวอย่างการเกิดความผิดปกติได้แก่ การเกิดการหายไปของโครโมโซมในตำแหน่ง 3p และ 9p21 (loss of chromosome 3p และ 9p21) นอกจากนี้ยังพบการเกิด loss of heterozygosity (LOH) ร่วมกันกับการเกิดภาวะระดับเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้นของโปรโมเตอร์ (promoter hypermethylation) ซึ่งส่งผลให้ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) p16 ไม่ทำงาน จากนั้นเมื่อเซลล์ที่มีความผิดปกติเกิดความผิดปกติที่มากขึ้น เช่น เกิด LOH ที่ตำแหน่งโครโมโซม 17p และการเกิด mutation ที่ยีนต้านมะเร็ง p53 จะทำให้เซลล์ลิวโคพลาเคียเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปไปสู่อุเซลล์ที่มีความผิดปกติที่มากขึ้นที่เรียกว่าเซลล์ dysplasia และเซลล์ที่มีความผิดปกติเหล่านี้จะทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ และสะสมความผิดปกติที่มากขึ้น ยกตัวอย่างได้แก่การเกิดการหายไปของลำดับเบส (deletion) ที่ตำแหน่ง 4q, 6p, 8p, 11q, 13q, และ 14q บนโครโมโซม รวมไปถึงการเกิดการเพิ่มจำนวน (amplification) และการแสดงออกที่มากผิดปกติ (overexpression) ของยีน cyclinD1 ซึ่งอยู่บนโครโมโซม 11q13 ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์และวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle progression) ความผิดปกติเหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์ dysplasia กลายเป็นเซลล์มะเร็ง (malignant cell) ที่มีความสามารถในการลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อปกติข้างเคียงได้ โดยอาจพบลักษณะผสมของเซลล์มะเร็งในแต่ละระยะอยู่ภายในก้อนมะเร็งเดียวกันได้ [42,43]



รูปที่ 7. แสดงการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้น (multi-step progression) ของมะเร็งศีรษะและลำคอชนิด squamous cell carcinoma <sup>[43]</sup>

ในทางตรงกันข้าม มะเร็งบางชนิดอาจไม่มีการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้น ยกตัวอย่างเช่นมะเร็งต่อมธัยรอยด์ชนิด papillary thyroid carcinoma (PTC) ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบได้มากที่สุดของมะเร็งต่อมธัยรอยด์ โดยเป็นมะเร็งที่มีลักษณะเป็นก้อนทรงกลม (circumscribe) หรือเป็นก้อนหลายก้อนประกอบ (multifocal) ก้นภายใต้การเกิดเยื่อหุ้มก้อนไว้ (encapsulated) โดย PTC นั้นเป็นมะเร็งที่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม มักเกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งดังต่อไปนี้ 1) หนึ่งในสามของ PTC นั้นมักพบการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่ง (point mutation) ของยีนมะเร็ง (oncogene) BRAF ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณที่ผิดปกติของกลไก Mitogen-activating protein (MAP) kinase 2) อาจเกิดจากการย้ายตำแหน่ง (rearrangement) ของยีน RET ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ tyrosine kinase receptor บนโครโมโซม 10q11 ซึ่งส่งผลให้เกิดยีนลูกผสม (fusion gene) ที่เรียกว่า ret/PTC ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการทำงานที่มากขึ้นอย่างผิดปกติของยีน RET และส่งผลต่อการทำงานที่เพิ่มขึ้นของกลไก MAP kinase เช่นเดียวกันกับการเกิดความผิดปกติของ BRAF และ 3) การเคลื่อนย้ายตำแหน่งของยีน NTRK1 (neurotrophic tyrosine kinase receptor 1) บนโครโมโซม 1q ซึ่งจะเห็นได้ว่ามะเร็งต่อมธัยรอยด์ชนิด PTC นั้นเกิดจากความผิดปกติที่สำคัญเพียงอย่างเดียวหนึ่ง จึงทำให้มะเร็งชนิดนี้ไม่มีลักษณะการพัฒนาของเซลล์มะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้น <sup>[44]</sup>

การลุกลาม (invasiveness) นั้นเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของมะเร็ง (malignant) ที่แตกต่างไปจากเนื้องอก (benign) เซลล์มะเร็งนั้นมักมีการลุกลามของเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงและอวัยวะข้างเคียง หรืออาจเกิดการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะที่อยู่ห่างออกไปจากตำแหน่งของรอยโรคแรก ซึ่งการเกิดการแพร่กระจายนี้ทำให้การบำบัดรักษาผู้ป่วยยากลำบากมากขึ้น และมักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งเสียชีวิต โดยการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้นอาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งนั้นมีการแบ่งตัวและแทรกเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง (lymphatic system) หรือเข้าสู่ระบบหลอดเลือด (blood vessels) ไปสู่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่อยู่ห่างไกลออกไปในร่างกาย หรือแม้กระทั่งการลุกลามโดยตรงไปสู่อวัยวะข้างเคียง (direct invasion or seeding within body cavities) ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งตับอ่อน (pancreatic carcinoma) นั้นมีความสามารถในการลุกลามเข้าสู่ช่องท้อง (peritoneal cavity) และกระเพาะอาหาร (stomach) ได้โดยตรง เช่นเดียวกับกับมะเร็งปอด (lung carcinoma) นั้นสามารถลุกลามเข้าสู่ช่องปอด (plural cavity) หรือเข้าสู่ช่องท้องโดยทะลุผ่าน diaphragm ได้โดยตรง หรือแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองที่ติดกับระบบหายใจ เช่น bronchial lymph node, tracheobronchial lymph node, หรือ hilar lymph node เป็นต้น หรืออย่างในมะเร็งเต้านม (breast carcinoma) นั้นจะมีความซับซ้อนยิ่งกว่า ยกตัวอย่างเช่น หากว่ามะเร็งได้เกิดขึ้นในตำแหน่งด้านนอกบน (upper outer quadrant) นั้นมักจะมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ (axillary lymph node) แต่หากว่ามะเร็งนั้นได้เกิดขึ้นในตำแหน่งใกล้เคียงกับตรงกลางของเต้านม (medial region) นั้นเซลล์มะเร็งมักจะมีการลุกลามผ่านแผ่นอก (chest wall) เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองในบริเวณใกล้เคียงกับหลอดเลือดของระบบท่อน้ำนม (internal mammary artery) เป็นต้น ในขณะที่มะเร็งรังไข่ (ovarian carcinoma) นั้นไม่มีความสามารถในการแพร่กระจายตัวไปสู่เนื้อเยื่ออื่น แต่จะมีการเกิดขึ้นในตำแหน่งใหม่ในเนื้อเยื่อช่องท้องแทน [45] โดยเมื่อมะเร็งมีการแพร่กระจายออกไปแล้ว เราจะเรียกเซลล์มะเร็งที่เป็นต้นกำเนิด หรือเรียกตำแหน่งแรกบนอวัยวะที่เซลล์มะเร็งนั้นได้อุบัติขึ้นว่าเป็นมะเร็งจากตำแหน่งเริ่มต้นหรือมะเร็งปฐมภูมิ (primary tumor) และเรียกมะเร็งที่แพร่กระจายไปสู่ตำแหน่งอื่นที่ไกลออกไปจากตำแหน่งเริ่มต้นว่ามะเร็งแพร่กระจาย (metastasis tumor) อย่างไรก็ตาม กลไกการเกิดการแพร่กระจายนั้นยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด แต่เชื่อว่าการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งยังต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนและโมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกหลายชนิด โดยเฉพาะโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการเอาตัวรอดของเซลล์มะเร็ง (survival), โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ (adhesion and deadhesion molecules), การหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune escape), การสร้างหลอดเลือดและ

ระบบน้ำเหลือง (lymph-/angiogenesis), การย้ายตำแหน่งของเซลล์และการกำหนดเป้าหมายของการย้ายตำแหน่ง (migration and homing on target organs) เป็นต้น<sup>[46]</sup>

ตารางที่ 1. ตัวอย่างของโมเลกุลและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง<sup>[46]</sup>

Biological capability	Molecular examples/pathway entities
Survival	IGF survival factors
Adhesion and deadhesion	CAMs, cadherins, integrins
Migration	Met-SF/HGF signaling, FAK
Proteolysis/ECM remodeling	MMPs, uPA, ADAMs, heparanase
Immune escape	Downregulation of intrinsic immunogenicity, MHC loss
Lymph-/angiogenesis	VEGF, PDGF, bFGF
Homing on target organs	Chemokines/chemokine receptors, CD44, osteopontin

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว

#### ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งที่ถูกรักษาสภาพของชิ้นเนื้อด้วยการแช่ formalin และถูกเก็บรักษาในรูปแบบของบล็อกพาราฟินทางพยาธิวิทยา (Formalin-fixed paraffin-embedded specimen) โดยกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษา เป็นตัวอย่างที่ได้คัดเลือกมาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2553 โดยตัวอย่างทั้งหมดจะถูกวินิจฉัยและคัดเลือกเข้าสู่การศึกษาโดยพยาธิแพทย์ โดยจำแนกชนิดของตัวอย่างได้ตามชนิดของมะเร็งดังนี้

1. มะเร็งหู คอ จมูก ชนิด Head and neck squamous cell carcinoma (HNSC)
2. มะเร็งต่อมธัยรอยด์ ชนิด Papillary thyroid carcinoma (PTC)
3. มะเร็งปอด ชนิด Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) ประเภท Adenocarcinoma
4. มะเร็งเต้านม ชนิด Invasive ductal carcinoma (IDC)
5. มะเร็งลำไส้ ประเภท Adenocarcinoma (CRC)

โดยตัวอย่างแต่ละชนิด จะถูกเก็บในสองส่วน คือ ชิ้นเนื้อจากส่วนที่เป็นมะเร็งปฐมภูมิ (primary tumor) และจากส่วนที่เป็นมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย (metastasis tumor) ที่บริเวณต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง โดยทั้งสองส่วนจะถูกเก็บมาจากผู้ป่วยรายเดียวกันเท่านั้นในแต่ละตัวอย่าง (ภาคผนวก ข.)

ข้อบ่งชี้ในการคัดเลือกตัวอย่างออกจากการศึกษา มีเกณฑ์และคุณลักษณะดังต่อไปนี้

1. ชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟินมีขนาดต่ำกว่า 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยประมาณ
2. บล็อกพาราฟินมีสภาพชำรุด หรือไม่สมบูรณ์

### การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

การศึกษานี้กระทำการวัดระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปของมะเร็ง 2 ชนิดคือ มะเร็งปฐมภูมิ (primary tumor) และมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย (metastatic tumor) โดยทั้งสองชนิดไม่เป็นอิสระต่อกัน (Two dependent group) ซึ่งได้ข้อมูลจากการทำ Pilot Study ในมะเร็งศีรษะและคอ โดยข้อมูลที่ได้จากการทำ Pilot Study ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มีดังนี้

ตารางที่ 2. แสดงค่าเมทิลเลชันของ LINE-1 ที่วัดได้ในการทดลองนำร่องในตัวอย่าง เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอจากตำแหน่งปฐมภูมิเปรียบเทียบกับตำแหน่งแพร่กระจายเพื่อใช้ในการคำนวณขนาดประชากร

Case	%Hypomethylation		d
	Primary	Metastasis	
1	64.83	72.33	7.5
2	61.04	65.41	4.37
3	63.95	64.57	0.62
4	48	56.7	8.7
5	58.71	56.75	-1.96
6	53.42	64.48	11.06
7	58.1	64.45	6.35
8	35.53	52.04	16.51
9	60.08	66.19	6.11

กำหนดให้  $n$  = ขนาดตัวอย่างของมะเร็งในแต่ละกลุ่ม

$d$  = ความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันในแต่ละชนิด

$\bar{X}_d$  = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันในแต่ละชนิด

$\sigma^2_d$  = ค่าแปรปรวนของความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันในแต่ละชนิด

$Z$  = ค่าปกติมาตรฐานที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน

โดยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่  $\alpha = 0.05$

ให้  $z_{\alpha/2} = 1.96$

และ power 90% โดยที่  $\beta = 0.1$

ให้  $z_{\beta} = 1.28$



จากสูตร 
$$n = [(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 d] / \bar{X} d^2$$

แทนค่าตัวแปรด้วย

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 1.28$$

$$SDd = 5.45$$

$$\bar{X} d = 6.58$$

แทนค่าลงในสมการ จะได้ 
$$n = [(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 d] / \bar{X} d^2$$

$$n = [(1.96 + 1.28)^2 * 5.45^2] / 6.58^2$$

$$n = 7.2$$

ดังนั้น การทดลองนี้ควรเลือกใช้ขนาดของตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม อย่างน้อยกลุ่มละ 7 ตัวอย่าง

ในการทดลองนี้ มีตัวอย่างขึ้นเนื้อพาราฟิน กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างในแต่ละกลุ่มมะเร็งทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ทั้งหมด 5 กลุ่ม รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง จึงสรุปได้ว่าจากจำนวนตัวอย่างที่มีนั้น สามารถใช้เป็นตัวแทนของการศึกษาระดับเมทิลเลชั่นที่เปลี่ยนแปลงไปในมะเร็งชนิดต่างๆในระหว่างที่มีการแพร่กระจายได้ ซึ่งจะให้ผลการศึกษาเป็นที่น่าเชื่อถือได้

### การคำนวณขนาดประชากรศึกษาซ้ำจากระดับเมทิลเลชั่นที่ได้จากการทดลอง

เมื่อทำการศึกษาแล้ว ได้ทำการคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้ในการทดลองในอนาคต เพื่อให้ผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอีกครั้ง ซึ่งผลการคำนวณที่ได้ ดังตารางต่อไปนี้

case	d Average	SD <sub>d</sub>	n
pilot HNSC	6.5844444	5.450080529	7.19213091
HNSC	8.0746911	6.954817199	7.787707435
PTC	2.1761399	13.45886134	401.5439024
NSCLC	2.5566444	3.024757571	14.69367744
CRC	0.1230879	6.45724136	28890.38201
IDC	3.4004714	8.387008934	63.85956715

ตารางที่ 3. การคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้ในการทดลองซ้ำ

### เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 1) Pipette 2.5, 10, 20, 100, 200, 1000  $\mu$ L (Eppendorf, Germany)
- 2) Pipette tip 10, 20, 100, 200, 1000  $\mu$ L (AxyGEN, USA)
- 3) Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)
- 4) Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- 5) Glass slide
- 6) Metal rack
- 7) Glass bowl
- 8) Centrifuge
- 9) 0.2 mL Microcentrifuge tube
- 10) 1.5 mL Microcentrifuge tube
- 11) Vortex mixture
- 12) Heat box
- 13) PCR chamber
- 14) Thermal cycler (Applied Biosystem, USA)
- 15) Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo scientific, USA)
- 16) Palm microbeam' laser-captured microdissection machine (Zeiss, Germany)

- 17) Vertical gel electrophoresis kit (Biorad, USA)
- 18) Power supply (Biorad, USA)
- 19) Gel doc
- 20) Strom phosphoimager (Molecular Dynamics,UK)
- 21) Computer (with ImageQuant software, Molecular Dynamics,UK)
- 22) 4°C Refrigerator
- 23) -20 °C Freezer
- 24) -80 °C Freezer
- 25) Autoclave

### **สารเคมีและชุดการทดลองที่ใช้ในงานวิจัย**

#### **1. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างและสกัด DNA**

- 1) Hematoxillin - Eosin dye
- 2) Nuclear fast red dye
- 3) Xylene
- 4) 70% Ethanol
- 5) 100% Ethanol
- 6) Water
- 7) 100% Propanol
- 8) MagneSil Genomic, Fixed Tissue System Kits (Promega Corporation, USA)

## 2. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับโซเดียมไบซัลไฟด์

- 1) EZ DNA methylation gold kit (Zymo Research, USA)
- 2) Universal methylated DNA (Chemicon International, USA)
- 3) Universal unmethylated DNA (Chemicon International, USA)
- 4) 100% Ethanol
- 5) 100% Propanol
- 6) Water

## 3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

- 1) 10x buffer gold (Applied Biosystem, USA)
- 2) MgCl<sub>2</sub> solution (Applied Biosystem, USA)
- 3) dNTP (Applied Biosystem, USA)
- 4) LINE-1 forward primer (Bio-active, Thailand)
- 5) LINE-1 reverse primer (Bio-active, Thailand)
- 6) AmpliTaq gold DNA polymerase (Applied Biosystem, USA)
- 7) Water

#### 4. สารเคมีที่ใช้ในการบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- 1) BSA (MBI Fermentas, USA)
- 2) NEB3 buffer (MBI Fermentas, USA)
- 3) TaqI restriction enzyme (MBI Fermentas, USA)
- 4) TasI restriction enzyme (MBI Fermentas, USA)
- 5) Water

#### 5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis

- 1) 5x Tris-EDTA
- 2) 40% acrylamide (19:1)
- 3) 10% Ammoniumpersulfate
- 4) Tetramethylethelenediammine
- 5) Gel star nucleic acid strain (Cambrex bioscience, USA)
- 6) Water

## ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

### การเก็บตัวอย่าง

1. คัดเลือกตัวอย่างและค้นหาตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งในที่อยู่ในรูปแบบของ Formalin-fixed paraffin-embedded block (FFPE) จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีรหัสปีที่รับตัวอย่างตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2553 จำนวนทั้งหมด 5 กลุ่มตัวอย่างมะเร็งดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มตัวอย่างมะเร็งปฐมภูมิ (Primary tumor) และกลุ่มตัวอย่างมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย (Metastasis tumor) รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างทั้งหมดในรูปแบบของ FFPE จะถูกนำมาทำเป็นสไลด์และย้อมด้วยสี Hematoxyllin-Eosin เพื่อให้พยาธิแพทย์ระบุตำแหน่งของเนื้อเยื่อมะเร็งที่ต้องการนำมาทดลอง จากนั้นตัวอย่าง FFPE จะถูกนำมาทำสไลด์อีกครั้งและย้อมด้วยสี nuclear-fast red เพื่อใช้สำหรับระบุรูปร่างของเนื้อเยื่อในเครื่อง laser-captured microdissection
3. ตัวอย่างสไลด์ที่ถูกย้อมด้วยสี nuclear-fast red จะถูกนำมาเก็บตัวอย่างโดยใช้เครื่อง laser-captured microdissection โดยกำหนดพื้นที่เก็บเซลล์โดยประมาณ 700,000-1,000,000 เซลล์ (ปฏิบัติตามคู่มือการใช้เครื่อง Palm's laser-captured microbeam ของบริษัท Zeiss ประเทศเยอรมัน)
4. ตัวอย่างที่ได้ จะถูกเก็บไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 200 ไมโครลิตร และถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### การสกัดดีเอ็นเอ

1. การสกัดดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ ใช้ชุดสกัด MagneSil Genomic, Fixed Tissue System Kits ซึ่งเป็นชุดสกัดสำหรับตัวอย่างชนิด FFPE โดยเฉพาะ ของบริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา (ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน)

2. ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด จะถูกแบ่งนำไปวัดปริมาณของดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้เครื่อง nanodrop spectrophotometer ของบริษัท Thermo scientific (ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน)
3. ดีเอ็นเอจากตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### การหาระดับเมทิลเลชันของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

##### 1. การทำปฏิกิริยากับโซเดียมไบซัลไฟต์

- 1.1. ดีเอ็นเอตัวอย่างจะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมไบซัลไฟต์เพื่อเปลี่ยนเบสไซโทซีนในสายดีเอ็นเอให้กลายเป็น Uracil โดยใช้ชุด EZ DNA methylation gold kit ของบริษัท Zymo Research ประเทศสหรัฐอเมริกา (ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน)
- 1.2. ตัวอย่างดีเอ็นเอจากขั้นตอนนี้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

##### 2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

- 2.1. เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ตารางที่ 4. ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

ชื่อสาร	ปริมาตรต่อสาร 1 ตัวอย่าง ( $\mu\text{L}$ )	ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร[1x]	
Water	16.875	-	
10x Buffer Gold (ABI)	2.5	1	x
MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5	mM
dNTP	0.5	200	$\mu\text{M}$
PrimerF(L1COBRA-F)	0.75	0.3	$\mu\text{M}$
PrimerR(L1COBRA-R)	0.75	0.3	$\mu\text{M}$
TaqGold (ABI)	0.125	0.625	U
total MasterMix volume	23		
DNA template	2		ng
Final volume	25		$\mu\text{L}$

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้อ้างอิงลำดับเบสจากงานวิจัยของ Chalichakorn K, et al. (2004) โดยมีลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 5. ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

COBRA L1 forward primer	5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT-3'
COBRA L1 reverse primer	5'-RTAAAACCCCTCCRAACCAAATATAAA-3'

2.2. นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymerase chain reaction) โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler ของบริษัท Applied Biosystem ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 6. อุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาต่อรอบ (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Initiation step		97	10	1
PCR cycle	denaturing step	97	0.3	40
	annealing step	53	0.3	
	extension step	65	0.3	
final extension		65	7	1

2.3. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะถูกเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส



### 3. ขั้นตอนการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้

ตารางที่ 7. ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ชื่อสาร	ปริมาณสารต่อ 1 ตัวอย่าง ( $\mu$ L)
NEB3	2
BSA	0.2
water	1
TaqI	0.4
TasI	0.4
Total	4
PCR pdt	16

- 3.1. นำสารละลายที่เตรียมไว้ผสมกับดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ  
ดังสัดส่วนที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น
- 3.2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 4 ชั่วโมง

ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis และการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ phosphorimager quantification

เตรียมสารละลายอะครีลาไมด์สำหรับเป็นวุ้นตัวกลางในการแยกสายดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (polyacrylamide gel electrophoresis) ดังนี้

ตารางที่ 8. ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นตัวกลาง

ชื่อสาร	ปริมาตรต่อเจล 1 แผ่น (µL)
40% Acrylamide-bis acylamide	1500
Water	4500
5x Tris buffer	1500
10% APS	65
TEMED	6.5

- นำดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาหยอดลงวุ้นอะครีลาไมด์ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 15 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่างต่อหนึ่งช่องหยอด
- รันวุ้นอะครีลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ขนาด 150 โวลท์, 23-25 แอมป์ (ต่อวุ้น 1 แผ่น) เป็นเวลา 65 นาที
- นำวุ้นอะครีลาไมด์จากข้อ 3 ไปย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ Gelstar® nucleic acid stain (Cambrex bioscience, USA) เป็นเวลา 20 นาที
- นำวุ้นอะครีลาไมด์ไปแปลผลค่าความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่ 63, 80, และ 97 คู่เบสด้วยเครื่อง Storm phosphorimager

### การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลลง data sheet

## การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูล มีการใช้โปรแกรมทางวิเคราะห์ข้อมูลดังต่อไปนี้

1. Image Quant software เป็นโปรแกรมที่ใช้วัดและวิเคราะห์ขนาดความเข้มชั้นของแถบดีเอ็นเอ
2. SPSS version 17.0 เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับคำนวณข้อมูลทางสถิติ

## การคำนวณค่าความเมธิลเลชัน

1. บันทึกค่าความเข้มชั้นของแถบดีเอ็นเอที่ 63, 80 และ 97 คู่เบส โดยใช้โปรแกรม ImageQuant software
2. นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณระดับเมธิลเลชันของตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยอ้างอิงการคำนวณจาก Pobsook, T, et al. Clin Chem Acta. 2011. ดังนี้

2.1. หาค่าความเข้มชั้นของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบด้วยค่าคงตัวจำเพาะของความยาวของตัวมัน โดยกำหนดให้

$$\%160/160 = A, \%97/94 = B, \%80/79 = C, \%63/62 = D$$

2.2. ค่าความเข้มชั้นของแถบ 18bp ให้มีค่า = E

$$\text{โดยคิดจาก } E = D - B$$

2.3. จำแนกค่า C เป็น C1 จากค่าของ C โดยมาจาก uCmC และค่า C2 โดยมาจาก 2 แถบซ้ำของ mCmC

$$\text{โดยกำหนดให้ } C1 = E \text{ และ } C2 = C - C1$$

2.4. คำนวณระดับเมธิลเลชันของ LINE-1 จากสมการ

$$mC/(mC+uC)\% = 100X(C+A)/(C+A+A+B+D)$$

2.4. คำนวณค่า LINE-1 hypermethylation จากตำแหน่ง mCmC จากสมการ

$$\%mCmC/(mCmC+uCmC+mCuC+uCuC = 100X((C-E)/2)/(((C-E)/2)+E+A+B)$$

2.6. คำนวณค่าการเกิดเมธิลเลชันในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของ LINE-1 (partial LINE-1 methylation) (uCmC+mCuC) จากสมการ

$$uCmC+mCuC = 100X(A+E)/((C-E)/2)+A+E+B)$$

2.7. คำนวณค่าการเกิดเมธิลเลชันในบางตำแหน่งของ LINE-1 (mCuC) จากสมการ

$$\text{partial LINE-1 methylation (mCuC)} = 100X(A)/((C-E)/2)+A+E+B)$$

2.8. คำนวณค่า LINE-1 hypomethylation (uCuC) จากสมการ

$$uCuC = 100XB/((C-E)/2)+A+E+B)$$

### การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ระหว่างมะเร็งปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายนั้น ถูกคำนวณหาความสัมพันธ์ทางสถิติต่างๆ ด้วยโปรแกรม SPSS ค่าที่ใช้เพื่อการทดสอบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดข้อมูล ได้แก่ pair sample t-test one-tailed analysis ค่าที่ยอมรับได้กำหนดให้มีค่า P-value ( $p$ ) ต่ำกว่า 0.05

## บทที่ 4

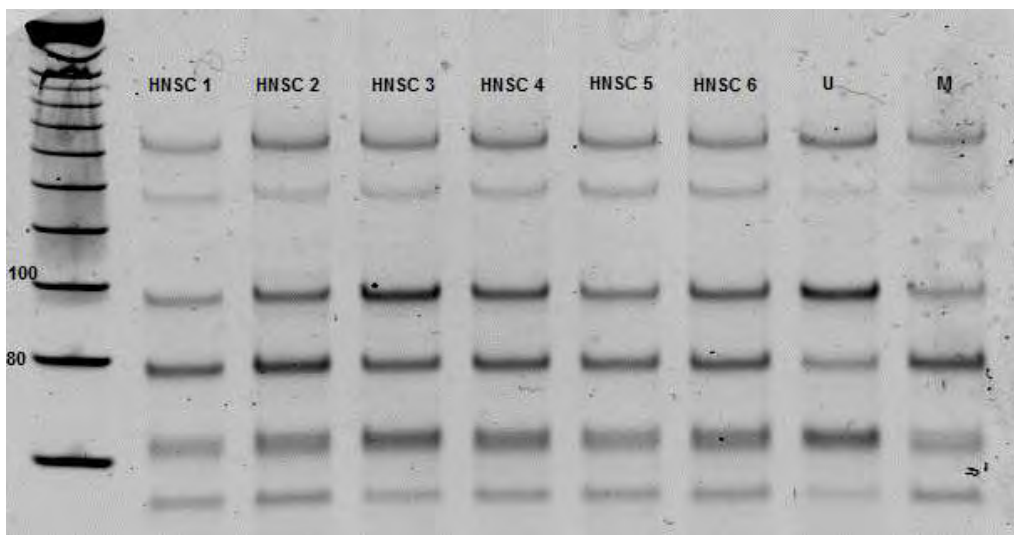
### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer

จากการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่เก็บได้จากเครื่อง Laser-captured microdissection ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer นั้น พบว่าค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นความถี่ 260นาโนเมตร วัดได้เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5-20 นาโนกรัมต่อสารละลาย 1 ไมโครลิตร

การแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ผ่านเจลอะคริลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้า (polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE)

การทดลองนี้มีขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี PAGE ก่อนนำไปวัดความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ แสดงตัวอย่างของผลที่ได้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 8. รูปตัวอย่างของการแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา COBRA PCR โดย HNSC 1 ถึง HNSC 6 แทนตัวอย่างจากเซลล์มะเร็งจากมะเร็งศีรษะและลำคอ (head and neck cancer), U คือตัวอย่างควบคุมชนิด universal unmethylated, M คือตัวอย่างควบคุมชนิด universal methylated

## ผลการวัดระดับเมธิลเลชั่นของ LINE-1 และผลการวิเคราะห์ทิศทาง การเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิลเลชั่นของ LINE-1 รูปแบบต่างๆ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองในกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่ม คือ มะเร็งศีรษะและลำคอ, มะเร็งปอด, มะเร็งต่อมธัยรอยด์, มะเร็งเต้านม, และมะเร็งลำไส้ โดยแต่ละกลุ่มได้ทำการเปรียบเทียบระดับเมธิลเลชั่นของ LINE-1 ระหว่างตัวอย่างเซลล์มะเร็งสองชนิด คือ เซลล์มะเร็งปฐมภูมิ และเซลล์มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย โดยแต่ละชนิดมาจากผู้ป่วยรายเดียวกัน ได้ผลการทดลองดังนี้

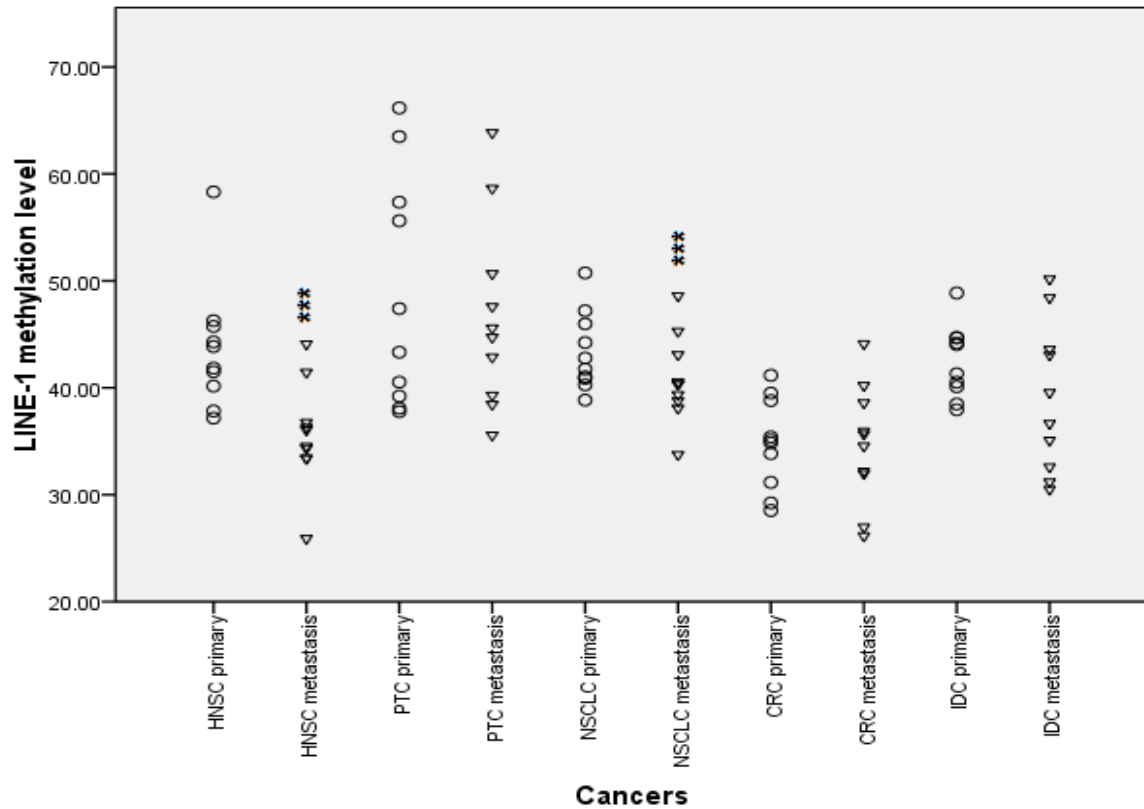
1. มะเร็งศีรษะและลำคอ ตำแหน่งปฐมภูมิมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $43.70 \pm 5.99$
2. มะเร็งศีรษะและลำคอ ตำแหน่งแพร่กระจายมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $35.62 \pm 4.88$
3. มะเร็งต่อมธัยรอยด์ ตำแหน่งปฐมภูมิมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $48.90 \pm 10.88$
4. มะเร็งต่อมธัยรอยด์ ตำแหน่งแพร่กระจายมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $46.72 \pm 8.94$
5. มะเร็งปอด ตำแหน่งปฐมภูมิมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $43.37 \pm 3.67$
6. มะเร็งปอด ตำแหน่งแพร่กระจายมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $40.81 \pm 4.08$
7. มะเร็งลำไส้ ตำแหน่งปฐมภูมิมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $34.76 \pm 4.27$
8. มะเร็งลำไส้ ตำแหน่งแพร่กระจายมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $34.63 \pm 5.61$
9. มะเร็งเต้านม ตำแหน่งปฐมภูมิมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $42.48 \pm 3.39$
10. มะเร็งเต้านม ตำแหน่งแพร่กระจายมีค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชั่นที่ร้อยละ  $39.08 \pm 7.04$

1. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่าง เซลล์มะเร็งปอดปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ

ตารางที่ 9. ผลการคำนวณทางสถิติของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่าง เซลล์มะเร็งปอดปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, PTC แทนมะเร็งต่อมไทรอยด์, NSCLC แทนมะเร็งปอด, CRC แทนมะเร็งลำไส้ และ IDC แทน มะเร็งเต้านม

LINE-1 methylation level	Paired Differences					Sig. (1-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference		
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper	
HNSC primary - metastasis	8.07469	6.95482	2.19931	3.09951	13.04987	0.002571539
PTC primary - metastasis	2.17614	13.45886	4.25607	-7.45175	11.80403	0.310722887
NSCLC primary - metastasis	2.55664	3.02476	.95651	.39286	4.72043	0.012750876
CRC primary - metastasis	.12309	6.45724	2.04196	-4.49614	4.74232	0.476625246
IDC primary - metastasis	3.40047	8.38701	2.65221	-2.59923	9.40018	0.115918254

ผลการวัดระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างมะเร็งในตำแหน่งปฐมภูมิเปรียบเทียบกับมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย พบการลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งแพร่กระจายจากมะเร็งศีรษะและคอ และมะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.002$  และ  $p = 0.012$  ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปฐมภูมิคู่สม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในมะเร็งชนิดอื่นๆที่ร่วมการทดลอง



รูปที่ 9. การกระจายตัวของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิ และมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC, PTC, NSCLC, CRC, และ IDC แทน มะเร็งศีรษะ และคอ, มะเร็งต่อมธัยรอยด์, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, และมะเร็งเต้านม ตามลำดับ, เครื่องหมายดอก จันทร 3 ดอกเหนือกลุ่มตัวอย่างแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p\text{-value} < 0.01$

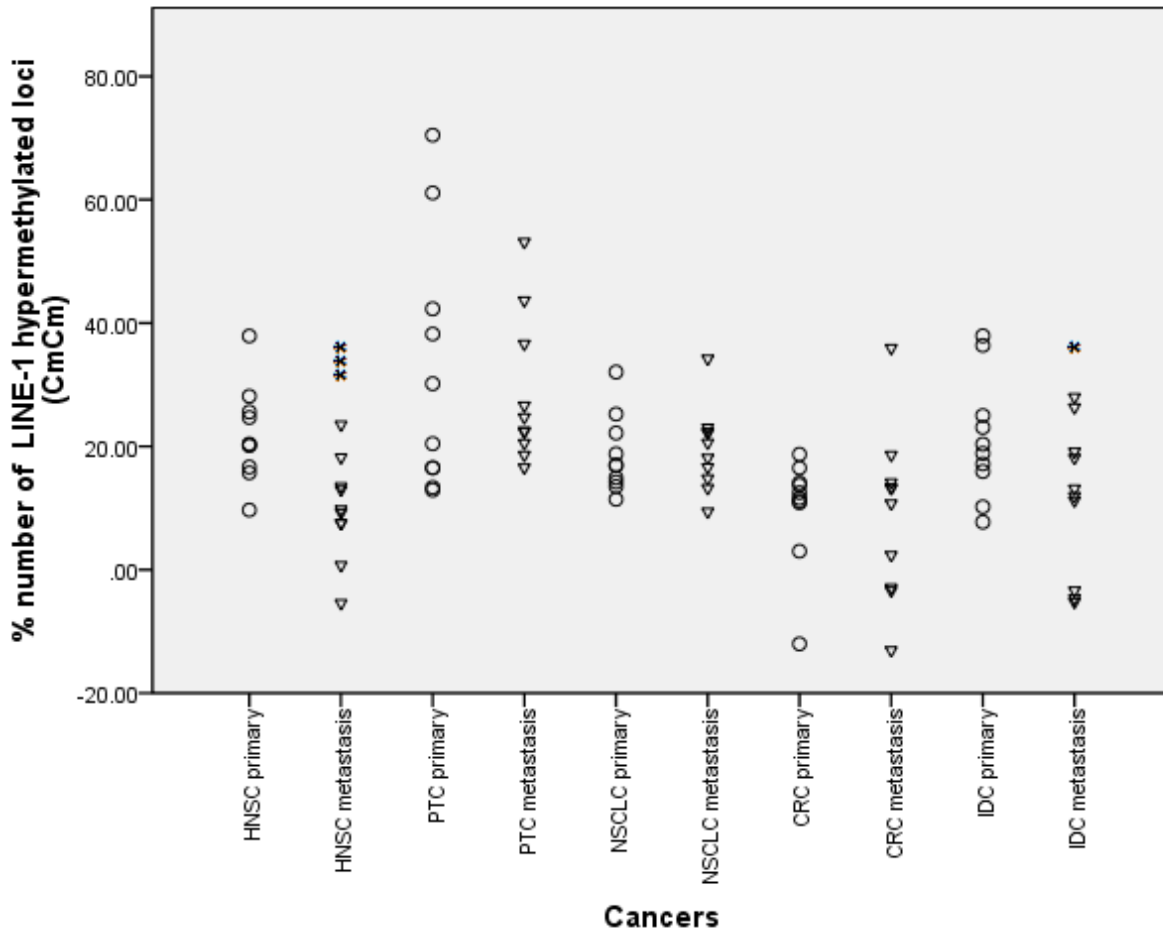


2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของทิศทางการเปลี่ยนแปลงของการเพิ่มระดับเมทิลเลชั่น (percent number of hypermethylated loci) ของ LINE-1 (mCmC) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ

ตารางที่ 10. แสดงผลการคำนวณทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงทิศทางการเพิ่มระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, PTC แทนมะเร็งต่อมไทรอยด์, NSCLC แทน มะเร็งปอด, CRC แทนมะเร็งลำไส้ และ IDC แทนมะเร็งเต้านม

Percent number of hypermethylated loci of LINE-1 (mCmC)	Paired Differences					Sig. (1-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference		
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper	
HNSC primary - metastasis	12.15015	10.92061	3.45340	4.33802	19.96229	0.003266351
PTC primary - metastasis	3.65841	24.58679	7.77502	-13.92992	21.24673	0.324584222
NSCLC primary - metastasis	-.84076	11.01245	3.48244	-8.71859	7.03708	0.407317367
CRC primary - metastasis	1.11151	17.01647	5.38108	-11.06134	13.28436	0.420475898
IDC primary - metastasis	9.80839	14.45127	4.56989	-.52943	20.14620	0.030199281

ผลการวิเคราะห์ทิศทางการเปลี่ยนแปลงของการเพิ่มระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างมะเร็งในตำแหน่งปอดเปรียบเทียบกับมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย พบว่าการเพิ่มระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งแพร่กระจายจากมะเร็งศีรษะและคอและมะเร็งเต้านมนี้มีทิศทางลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.003$  และ  $p = 0.03$  ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ แต่ไม่พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในมะเร็งชนิดอื่นๆที่ร่วมการทดลอง



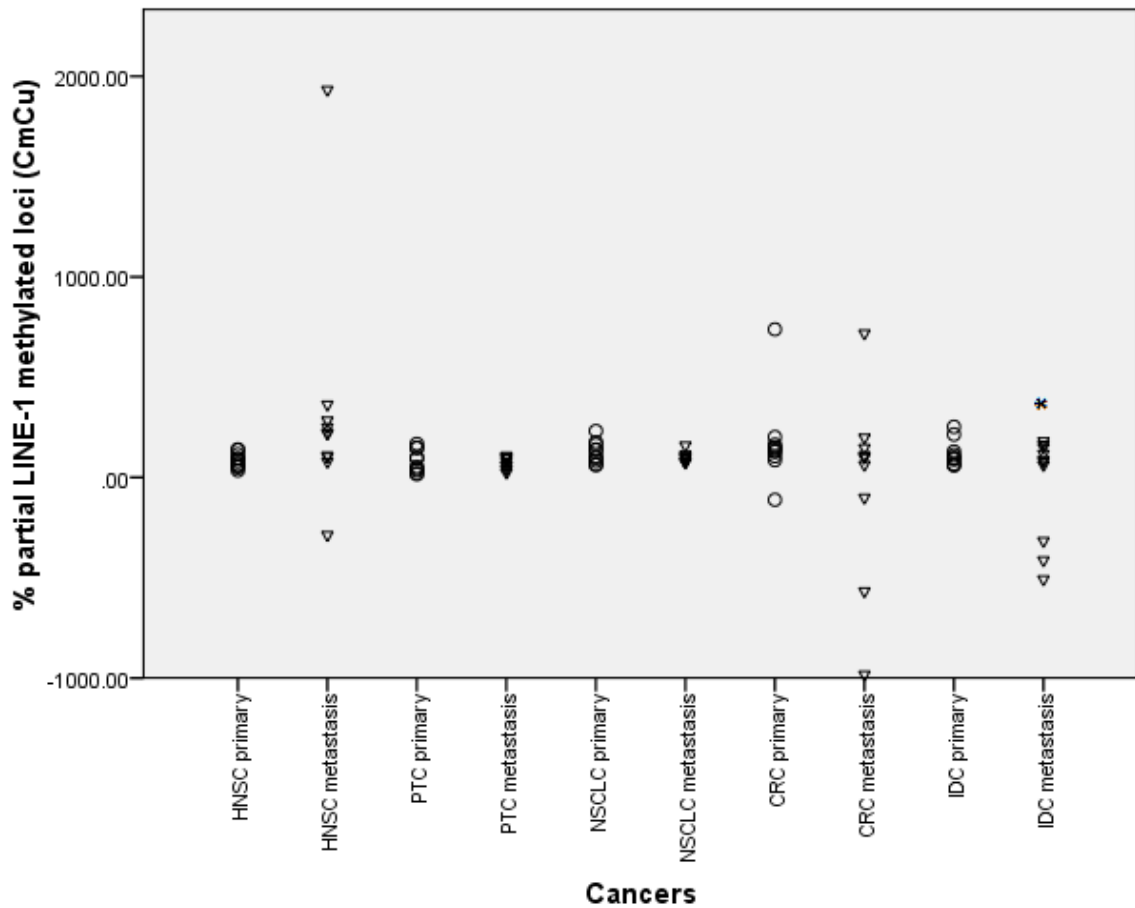
รูปที่ 10. การกระจายตัวของการเพิ่มระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC, PTC, NSCLC, CRC, และ IDC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, มะเร็งต่อมธัยรอยด์, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, และมะเร็งเต้านม ตามลำดับ, เครื่องหมายดอกจัน 3 ดอกเหนือกลุ่มตัวอย่าง และ 1 ดอกเหนือกลุ่มตัวอย่างแสดงทิศทางการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p\text{-value} < 0.01$  และ  $0.05$  ตามลำดับ

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของทิศทางการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันผสม (percent number of partial methylated loci) ของ LINE-1 (mCuC) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ

ตารางที่ 11. ผลการคำนวณทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันผสมของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, PTC แทนมะเร็งต่อมไทรอยด์, NSCLC แทนมะเร็งปอด, CRC แทนมะเร็งลำไส้ และ IDC แทนมะเร็งเต้านม

Percent number of partial methylated loci of LINE-1 (mCuC)	Paired Differences					Sig. (1-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference		
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper	
HNSC primary - metastasis	-240.99050	573.02533	181.20652	-650.90812	168.92713	0.108130781
PTC primary - metastasis	11.77762	56.82036	17.96818	-28.86922	52.42446	0.264280805
NSCLC primary - metastasis	25.74547	69.06702	21.84091	-23.66210	75.15304	0.134356279
CRC primary - metastasis	194.82430	461.00807	145.78355	-134.96101	524.60961	0.107110777
IDC primary - metastasis	157.82584	258.63576	81.78781	-27.19103	342.84272	0.04285693

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันผสม LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างมะเร็งในตำแหน่งปฐมภูมิเปรียบเทียบกับมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันผสมของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งแพร่กระจายจากมะเร็งเต้านมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.04$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปฐมภูมิคุ้ม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในมะเร็งชนิดอื่นๆ ที่ร่วมการทดลอง



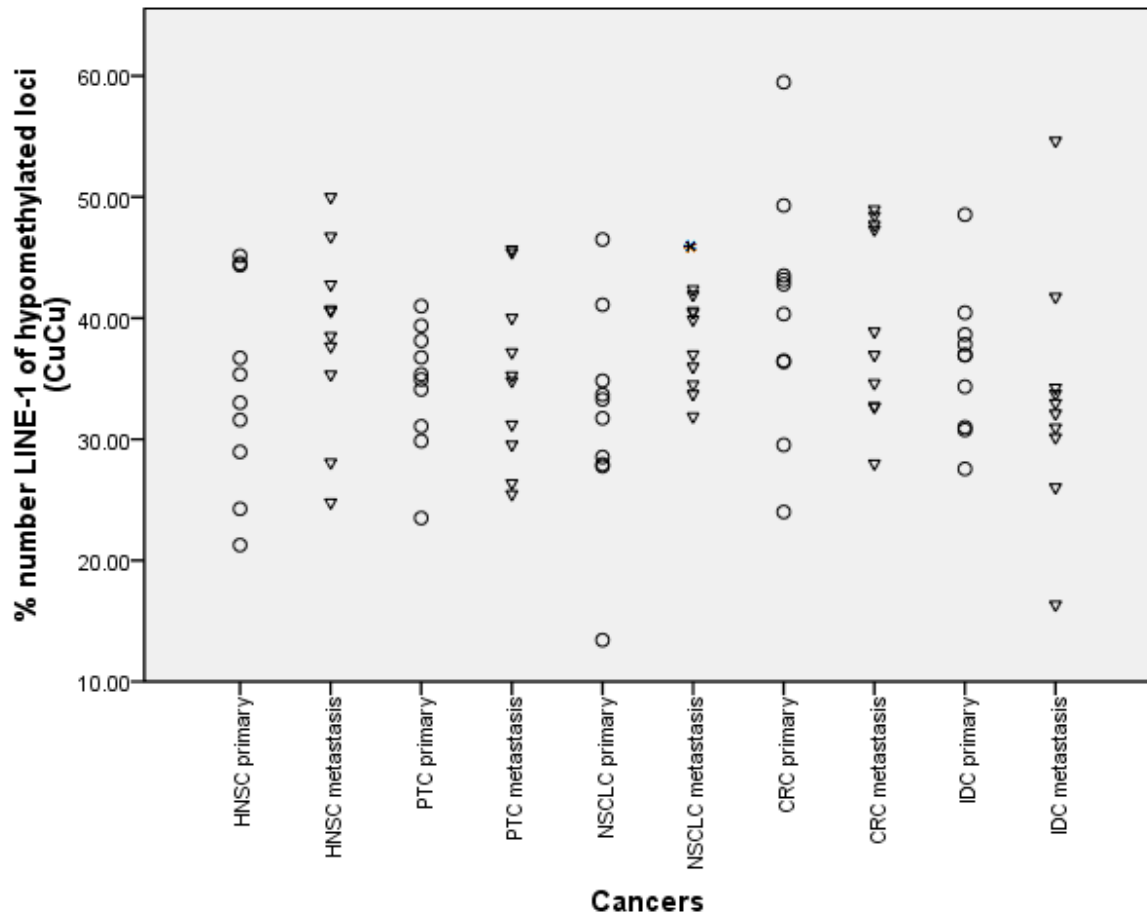
รูปที่ 11. การกระจายตัวของระดับเมทิลเลชั่นผสมของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC, PTC, NSCLC, CRC, และ IDC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, มะเร็งต่อมไทรอยด์, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, และมะเร็งเต้านม ตามลำดับ, เครื่องหมายดอกจัน 1 ดอกเหนือกลุ่มตัวอย่างแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของทิศทางการเปลี่ยนแปลงของการลดระดับเมทิลเลชัน (percent number of hypomethylated loci) ของ LINE-1 (uCuC) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ

ตารางที่ 12 ผลการคำนวณทางสถิติของทิศทางการเปลี่ยนแปลงการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, PTC แทนมะเร็งต่อมไทรอยด์, NSCLC แทนมะเร็งปอด, CRC แทนมะเร็งลำไส้ และ IDC แทนมะเร็งเต้านม

Percent number of hypomethylated loci of LINE-1  (uCuC)	Paired Differences					Sig. (1-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference		
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper	
HNSC primary - metastasis	-3.99923	13.15934	4.16135	-13.41285	5.41439	0.180819004
PTC primary - metastasis	-.69387	8.77670	2.77544	-6.97234	5.58460	0.404098451
NSCLC primary - metastasis	-5.95405	8.18182	2.58732	-11.80697	-.10112	<b>0.023452029</b>
CRC primary - metastasis	.86533	10.58577	3.34751	-6.70727	8.43794	0.400917648
IDC primary - metastasis	3.00744	11.36145	3.59281	-5.12005	11.13494	0.212110021

ผลการวิเคราะห์ทิศทางการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างมะเร็งในตำแหน่งปฐมภูมิเปรียบเทียบกับมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย พบทิศทางการเพิ่มขึ้นของการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งแพร่กระจายจากมะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.02$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปฐมภูมิคู่สม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในมะเร็งชนิดอื่นๆที่ร่วมการทดลอง



รูปที่ 12. การกระจายตัวของทิศทางการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิและมะเร็งแพร่กระจายของมะเร็งชนิดต่างๆ โดย HNSC, PTC, NSCLC, CRC, และ IDC แทน มะเร็งศีรษะและคอ, มะเร็งต่อมไทรอยด์, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, และมะเร็งเต้านม ตามลำดับ, เครื่องหมายดอกจัน 1 ดอกเหนือกลุ่มตัวอย่างแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p$ -value < 0.05

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ในปัจจุบันเป็นที่เชื่อกันว่ามะเร็งหลายชนิดมักเกิดการเปลี่ยนแปลงของกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนชนิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งงานวิจัยหลายชิ้นนั้นได้มีการพิสูจน์พบการลดลงของระดับเมทิลเลชันของลำดับซ้ำ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติในเนื้อเยื่อของอวัยวะชนิดเดียวกัน โดยเฉพาะในมะเร็งที่มักพบรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็ง (pre-cancerous/dysplastic lesion) หรือมีในมะเร็งที่มีการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้น (multistage oncogenesis)<sup>[10,14]</sup> ในงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค COBRA เพื่อตรวจวัดและเปรียบเทียบระดับเมทิลเลชันระหว่างเซลล์มะเร็งปฐมภูมิ (primary tumor) และเซลล์มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย (metastasis tumor) ในเนื้อเยื่อมะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ มะเร็งศีรษะและลำคอ, มะเร็งปอด, มะเร็งของต่อมธัยรอยด์, มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ โดยมีสมมติฐานว่าในมะเร็งชนิดที่มีการพัฒนาของมะเร็งอย่างเป็นลำดับขั้นนั้น ควรจะมีระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งจากตำแหน่งแพร่กระจายต่ำกว่าในเซลล์มะเร็งปฐมภูมิ หรืออีกนัยหนึ่ง มะเร็งที่มีการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้นควรจะมีการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ควบคู่ไปกับการพัฒนาและการแพร่กระจายของมะเร็ง

มะเร็งศีรษะและลำคอ (head and neck cancer) เป็นมะเร็งที่มีการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้นจากเนื้อเยื่อชนิด squamous epithelial ไปสู่เนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติ (squamous dysplasia) และกลายเป็นเซลล์มะเร็งที่มีความผิดปกติรุนแรงและสามารถลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง (invasive squamous carcinoma) ตามลำดับ<sup>[47]</sup> การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาเหล่านี้ทำให้เกิดควบคู่ไปกับการเกิดความผิดปกติที่เพิ่มมากขึ้นอย่างเป็นลำดับขั้นของยีนและกลไกการควบคุมการแสดงออกต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น ในเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ในบริเวณรอยโรคที่มีความผิดปกติมักตรวจพบการเพิ่มจำนวนของยีน EGFR และ TGF- $\alpha$  หรือการแสดงออกที่มากอย่างผิดปกติของ Telomerase หรือแม้แต่การแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่เพิ่มมากขึ้นในวงค์ p53 (เช่น ยีน p53, p63, p73) และ retinoblastoma (Rb) (เช่น ยีน p16) ซึ่งความผิดปกติทั้งหมดเหล่านี้เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับขั้นตามการพัฒนาของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ โดยมีอัตราส่วนของความผิดปกติที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อปกติ<sup>[48-51]</sup> โดยผลการทดลองที่ได้จากการทดลองพบว่า การเพิ่มระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 (hypermethylation loci of LINE-1) มีทิศทางที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างเซลล์มะเร็งในระยะ

แพร่กระจายเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปฏุมภูมิที่เป็นคู่สม โดยคาดว่า การเพิ่มระดับของเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ที่มีทิศทางที่ลดลงอาจส่งผลทำให้ระดับเมทิลเลชั่นโดยรวมของ LINE-1 นั้นเกิดการลดลงได้ โดยผลการทดลองที่ได้นี้มีผลสอดคล้องกับสมมติฐานที่คาดว่าระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็ง ในตำแหน่งแพร่กระจายควรจะลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งในชนิดปฏุมภูมิในมะเร็งที่มีการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถบ่งชี้ได้ว่าการลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 นั้นอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองจากงานวิจัยของ Subbaalekha และคณะ<sup>[52]</sup> โดยงานวิจัยของ Subbaalekha และคณะซึ่งได้ใช้เทคนิค COBRA LINE-1 ทำการทดลองหาระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในตัวอย่างน้ำบ้วนปากจากผู้ป่วยมะเร็ง โดย Subbaalekha และคณะ ได้รายงานว่าการลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในน้ำบ้วนปากของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งในช่องปาก (oral squamous cell carcinoma: OSCC) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำบ้วนปากกับคนปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ระหว่างตัวอย่างน้ำบ้วนปากและตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้จากเก็บชิ้นเนื้อจากการผ่าตัด (biopsy) ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีระยะของมะเร็ง (tumor stage) ที่แตกต่างกัน<sup>[52]</sup> ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วการที่ไม่พบความแตกต่างของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ระหว่างมะเร็งแต่ละระยะนั้น อาจเกิดจากการที่ตัวอย่างน้ำบ้วนปากสามารถเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งได้จากผิวหนังนอกของรอยโรคภายในช่องปาก หรืออาจเป็นเพราะการทดลองของ Subbaalekha และคณะนั้นได้ทำการทดลองโดยใช้เนื้อเยื่อที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากมะเร็งในระยะต่างๆทั้งหมดจากมะเร็งที่อยู่ในตำแหน่งปฏุมภูมิต่างกัน ซึ่งแตกต่างจากการทดลองนี้ที่ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งปฏุมภูมิ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้จากมะเร็งที่ลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ส่งผลให้ผลการทดลองระหว่างทั้งสองงานวิจัยนี้มีความแตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ได้พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอที่เก็บจากตำแหน่งแพร่กระจายเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากที่เก็บได้จากมะเร็งในตำแหน่งปฏุมภูมินั้น สามารถเป็นที่ยืนยันว่าการลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 นั้นมีความสัมพันธ์กับพัฒนาของมะเร็งประเภทนี้

มะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma นั้นมักพบความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย และคาดว่าเกิดการพัฒนาอย่างเป็นลำดับขั้นเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น การกลายพันธุ์ของยีน Epidermal growth factor receptor (EGFR) และ KRAS โดยมักพบการกลายพันธุ์ของยีน KRAS ในผู้ป่วยมะเร็งปอด



ที่พบประวัติการสูบบุหรี่เป็นระยะเวลาสั้น ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน EGFR มักพบในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ไม่มีประวัติการสูบบุหรี่ เป็นต้น<sup>[53]</sup> โดยในการทดลองนี้ พบว่าการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 (hypomethylation loci of LINE-1) นั้นมีทิศทางที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์มะเร็งที่อยู่ในระยะแพร่กระจาย ในขณะที่การเพิ่มระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ที่มีทิศทางที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นมีการลดลงได้ โดยแตกต่างจากในมะเร็งศีรษะและคอที่คาดว่าอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ที่มีทิศทางลดลง

มะเร็งของต่อมธัยรอยด์ชนิด papillary (papillary thyroid carcinoma) นั้นมีความถี่คิดเป็น 70-80% ของมะเร็งต่อมธัยรอยด์ทั้งหมด<sup>[54]</sup> ซึ่งโดยส่วนมากแล้วมะเร็งต่อมธัยรอยด์ชนิดนี้มักพบการเคลื่อนย้ายตำแหน่ง (rearrangement) ของยีน RET/PTC หรือการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน BRAF เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง<sup>[55-61]</sup> โดยมะเร็งของต่อมธัยรอยด์ชนิดนี้ไม่มีการปรากฏของรอยโรคที่ผิดปกติก่อนการเกิดมะเร็ง ซึ่งตรงกันข้ามกับมะเร็งศีรษะและคอที่มักพบการปรากฏของรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งผลการทดลองในส่วนของมะเร็งต่อมธัยรอยด์ในงานวิจัยนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 รวมถึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงทิศทางของการเพิ่มหรือการลดของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 อย่างมีนัยสำคัญระหว่างมะเร็งปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจาย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากงานวิจัยของ Chalitchakorn และคณะที่ไม่พบความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันของมะเร็งชนิดนี้ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์จากเนื้อเยื่อปกติ<sup>[10]</sup>

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ระหว่างมะเร็งปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายของมะเร็งลำไส้และมะเร็งเต้านม โดยผลการทดลองในส่วนของมะเร็งเต้านมนั้น พบการเพิ่มขึ้นของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นมีทิศทางที่ลดลง เช่นกันกับอัตราการเกิดเมทิลเลชันแบบผสมของ LINE-1 (percent partial methylation of LINE-1) นั้นพบว่ามีความทิศทางที่ลดลงเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์มะเร็งในระยะแพร่กระจายเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งชนิดปอดและมะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมนั้นอาจเกิดจากการที่การเพิ่มของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 และการเกิดเมทิลเลชันแบบผสมนั้นมีทิศทางที่ลดลง แต่ไม่มากพอที่จะส่งผลให้ระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นมีการลดลงได้ ซึ่งอาจเกิดได้จากจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดลองมีจำนวนน้อยเกินไป หรืออาจเกิดจากการที่มะเร็งเต้านม

นมมันสามารถจำแนกชนิดย่อยตามลักษณะทางพันธุกรรมที่ผิดปกติได้ถึง 5 ชนิด โดยอาศัยความแตกต่างของการแสดงออกของยีน (สามารถแบ่งได้เป็นชนิด lumina A, lumina B, basal-like, normal breast-like, และ HER2 overexpression) <sup>[62-64]</sup> ซึ่งสามารถเป็นไปได้ว่ารูปแบบของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 นั้นอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดย่อยๆของมะเร็งเต้านม

ผลการทดลองในส่วนของมะเร็งลำไส้ นั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 รวมถึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงทิศทางของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบต่างๆด้วยเช่นกัน โดยอาจสรุปได้ว่ามะเร็งลำไส้ นั้นไม่มีการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในระหว่างที่เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมะเร็งลำไส้ นั้นสามารถพบความผิดปกติทางพันธุกรรมและกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนที่หลากหลาย เช่น microsatellite instability (MSI), Microsatellite stability (MSS), CpG island methylator phenotype High (CIMP-H) และ CpG island methylator phenotype low (CIMP-L) เป็นต้น ซึ่งระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ ชนิดที่มี MSI และ CIMP-H มักสูงกว่ามะเร็งลำไส้ ชนิดที่มี MSS หรือ CIMP-L เสมอ <sup>[65-68]</sup> ซึ่งจากเหตุนี้ อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งระหว่างที่มีการแพร่กระจายนั้น อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งลำไส้ ก็เป็นไปได้

ด้วยเหตุนี้ ถึงแม้ว่ามะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ นั้นจะเป็นที่ทราบว่าเป็นมะเร็งที่มีรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งเช่นเดียวกับมะเร็งปอดและมะเร็งศีรษะและลำคอ การที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันใดๆของ LINE-1 ในมะเร็งทั้งสองชนิดนั้นอาจอธิบายได้ที่เกิดจากเหตุที่มะเร็งทั้งสองประเภทนี้นั้นมีความซับซ้อนและหลากหลายทางพันธุกรรมหรืออาจเป็นไปได้ที่เกิดจากจำนวนประชากรตัวอย่างมีจำนวนไม่เพียงพอ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนประชากรตัวอย่างหรือการจำแนกชนิดย่อยทางพันธุกรรมของมะเร็งทั้งสองชนิดนี้ก่อนการทำการวัดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 อาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างออกไปได้ ซึ่งต้องทำการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

โดยสรุปแล้ว งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พบการลดลงของระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 อย่างมีนัยสำคัญระหว่างเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายของมะเร็งศีรษะและลำคอและมะเร็งปอด รวมถึงพบการเปลี่ยนแปลงของทิศทางการเพิ่มหรือลดระดับเมทิลเลชันของ LINE-1 ในมะเร็งศีรษะและคอ, มะเร็งปอด, และมะเร็งเต้านมด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของ

LINE-1 ในรูปแบบต่างๆนั้นมีความเกี่ยวข้องนั้นเป็นสาเหตุหรือเป็นผลที่เกิดจากการแพร่กระจายของ เซลล์มะเร็งนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

- (1) Laird, P.W., and Jaenisch, R. DNA methylation in cancer. Hum Mol Genet.3 (1994): 1487-1495.
- (2) Laird, P.W.,and Jaenisch, R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. Annu Rev of Genet. 30 (1996): 441–464.
- (3) Karpf, A.R., and Matsui, S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. Cancer Res.65 (2005): 8635-8639.
- (4) Esteller, M. The necessity of a human epigenome project. Carcinogenesis. 27 (2006): 1121-1125.
- (5) Schulz, W.A. L1 retrotransposons in human cancers. J Biomed Biotechnol. 65 (2006): 8635-8639.
- (6) Takai,D., Yagi, Y., Habib, N., Sugimura, T., and Ushijima T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. Jpn J Clin Oncol. 30 (2000): 306-309.
- (7) Almeida, A., et al. Hypomethylation of classical satellite DNA and chromosome instability in lymphoblastoid cell lines. Hum Genet. 1993; 91: 538-546.
- (8) Schulz, W.A., et al. Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. Genes Chromosomes Cancer. 35 (2002): 58-65.
- (9) Kazazian, H.H., and Moran J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. Nat Genet. 19 (1998): 19-24.
- (10) Chalitchagorn, K., et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. Oncogene. 23 (2004): 8841-8846.
- (11) Suter, C.M., Martin, D.I., and Ward, R.L. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. Int J Colorectal Dis. 19 (2004): 95-101.

- (12) Jürgens, B., Schmitz-Dräger, B.J., and Schulz, W.A. Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. Cancer Res. 56 (1996): 5698-5703.
- (13) Smith, I.M., Mydlarz, W.K., Mithani, S.K., and Califano, J.A. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. Int J Cancer. 121 (2007): 1724-1728.
- (14) Shuangshoti, S., Hourpai, N., Pumsukl, U., and Mutirangura, A. Line-1 hypomethylation in multistage carcinogenesis of the uterine cervix. Asian Pac J Cancer Prev. 8 (2007): 307-309.
- (15) Nguyen, D.X., and Massague, J. Genetic determinants of cancer metastasis. Nat Rev Genet. 8 (2007): 341-352.
- (16) Jones, P.A., and Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 3 (2002): 415.
- (17) Fraga, M.F., et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet. 37 (2005): 391-400.
- (18) Yang, A.S., Estecio, M.R.H., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E.H., and Issa, J.P.J. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Res. 32 (2004): e38.
- (19) Karpf, A.R., and Matsui, S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. Cancer Res. 65 (2005): 8635-8639.
- (20) Roux, K.H. Optimization and troubleshooting in PCR. Genome Res. 4 (1995): 185-194.
- (21) Xiong, Z., and Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 25 (1997): 2532-2534.
- (22) Pobsook, T., Subbalekha, K., Sannikorn, P., and Mutirangura, A. Improved measurement of LINE-1 sequence methylation for cancer detection. Clin Chim Acta. 412 (2011): 314-321.

- (23) Rennie, P.S., and Nelson, C.C. Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer. Cancer and Metastasis Rev. 17 (1999): 401–9.
- (24) Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin in human cancer. Nature Rev Genet. 7 (2006): 21-33.
- (25) Feinberg, A.P., and Tycko, B. The history of cancer epigenetics. Nature Rev Cancer. 4 (2004): 143–153.
- (26) Esteller, M. The necessity of a human epigenome project. Carcinogenesis. 27 (2006): 1121-1125.
- (27) Ng, H.H., and Bird, A. DNA methylation and chromatin modification. Curr Opin Genet and Dev. 9 (1998): 158-163.
- (28) Jones, P.A., and Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature Rev Genet. 3 (2002): 415.
- (29) Eden, A., et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science. 300 (2003): 455.
- (30) Baylin, S.B., et al. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspects of neoplasia. Adv Cancer Res. 72 (1998): 141-196.
- (31) Herman, J.G., et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res. 55 (1995): 4525-4530.
- (32) Herman, J.G., and Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med. 349 (2003): 2042-2054.
- (33) Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet. 8 (2007): 286-298.
- (34) Hoffman, M.J., and Schulz, W.A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. Biochem Cell Biol. 2005; 83(3): 296-321.
- (35) Feinberg A.P., Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 301 (1983): 89-92.

- (36) Ehrlich, M. Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation. Curr Top in Microbiol Immunol. 310 (2006):251-274.
- (37) Lander, E.S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409 (2001): 860-921.
- (38) Ostertag, E.M., and Kazazian, H.H. Biology of mammalian L1 retrotransposon. Annu Rev Genet. 4 (2001): 143-153.
- (39) Phokeaw, C., et al. LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. Nucleic Acids Res. 36 (2008): 5704-5712.
- (40) Babushok, D.V., and Kazazian, H.H. jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. Hum mutat. 28 (2007): 527-39.
- (41) Aporn Dewan, C., et al. Hypomethylation of Intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2. PLoS one. (2011): e17934.]
- (42) Attardi, L., et al. Cancer. In: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., editors. Molecular biology of the cell 5th ed., 1205-1268. Madison Avenue, New York: Garland Science, 2008.
- (43) Lingen, M.W., and Kumar, V. Head and neck. In: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., editors, Robbins and Cotran pathologic basis of disease 7th ed., 773-796. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2005.
- (44) Maitra, A. The endocrine system. In: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., editors, Robbins and Cotran pathologic basis of disease 8th ed., 752-801. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2007.
- (45) Coleman, W.B., Rubinas, T.C. Neoplasia. In: Coleman, W.B., Tsongalis, G.J. Molecular pathology: the molecular basis of human disease, 63-86. Burlington, MA: Elsevier, 2009.
- (46) Bogenrieder, T., and Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. Oncogene. 22 (2003): 6524-6536.

- (47) Lingen, M.W., et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. Oral Dis. 17 (2011): 7-22.
- (48) Kim, M.M., and Califano, J.A. Molecular pathology of head and neck cancer. Int J Cancer. 112 (2004): 545-553.
- (49) Taoudi Benchekroun, M., et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. Cancer Prev Res (Phila). 3 (2010): 800-809.
- (50) Grandis, J.R., and Twardy, D.J. TGF- $\alpha$  and EGFR in head and neck cancer. J Cell Biochem Suppl. 17 (1993): 188-191.
- (51) El-Naggar, A.K., et al. Expression of p16, Rb and cyclinD1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implication. Hum Pathol. 30 (1999): 1013-1018.
- (52) Subbalekha, K., et al. Detection of LINE-1s hypomethylation in oral rinses of oral squamous cell carcinoma patients. Oral Oncol. 45 (2009): 184-191.
- (53) Yee, S.T., Lap, P.C., and Wai, S.S. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. Clin Cancer Res. 12 (2006): 1647-1653.
- (54) He, H., et al. The role of micro RNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA. 107 (2005): 19075-19080.
- (55) Zhu, Z., Ciampi, R., Nikiforova, M.N., Gandhi, M., and Nikiforov, Y.E. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. J Clin Endocrinol Metab. 91 (2006): 3603-3610.
- (56) Nikiforova, M.N., and Nikiforov, Y.E. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. Expert Rev Mol Diagn. 8 (2008): 83-95
- (57) Nikiforov, Y.E. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. Endocr Pathol. 13 (2002): 3-16.



- (58) Kimura, E.T., Nikiforova, M.N., Zhu, Z., Knauf, J.A., Nikiforov, Y.E., and Fagin, J.A. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res. 63 (2003): 1454-1457.
- (59) Salvatore, G., et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 89 (2004): 5175–5180.
- (60) Frattini, M., et al. Alternative mutation of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. Oncogene. 23 (2004): 7436-7440.
- (61) Fagin, J.A. Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics-role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. J Clin Endocrinol Metab. 89 (2004): 4264-4266.
- (62) Livasy, C.A., et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Mod Pathol. 19 (2006): 264-271.
- (63) Carey, L.A., et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast study. JAMA. 295 (2006): 2492-502.
- (64) Rouzier, R., et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin Cancer Res. 11 (2005): 5678-5685.
- (65) Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Histopathology. 50 (2007): 113–130.
- (66) Matsuzaki, K., Deng, G., Tanaka, H., Kakar, D., Miura, S., and Kim, Y.S. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 11 (2005): 8564-8569.
- (67) Ogino, S., et al. LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Int J Cancer. 122 (2008): 2767-2773.

- (68) Estécio, M.R., et al. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. PLoS one. 2 (2007): e399.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก

### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 1X Tris/Borate/EDTA (TBE)
 

Distrill water	9	ลิตร
10X TBE	1	ลิตร
  
2. 5X Tris/Borate/EDTA (TBE)
 

Distrill water	8	ลิตร
10X TBE	2	ลิตร
  
3. Gel star® for nucleic acid stain
 

Distrill water	100	ไมโครลิตร
Gel star®	5	ไมโครลิตร
  
4. 75% ethanol
 

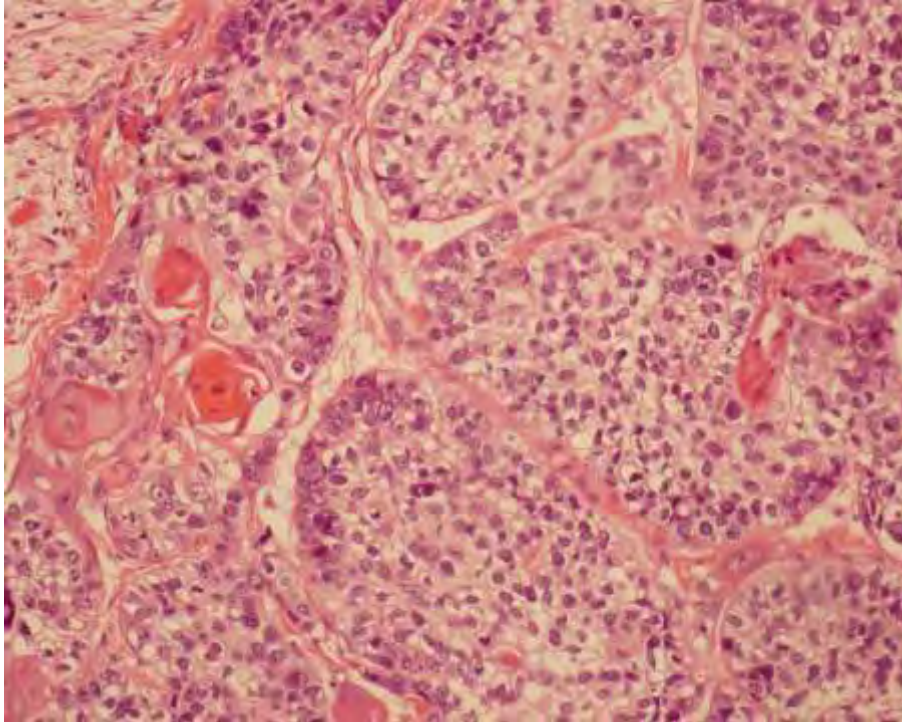
Absolute ethanol	75	มิลลิลิตร
Diltrill water	25	มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข.

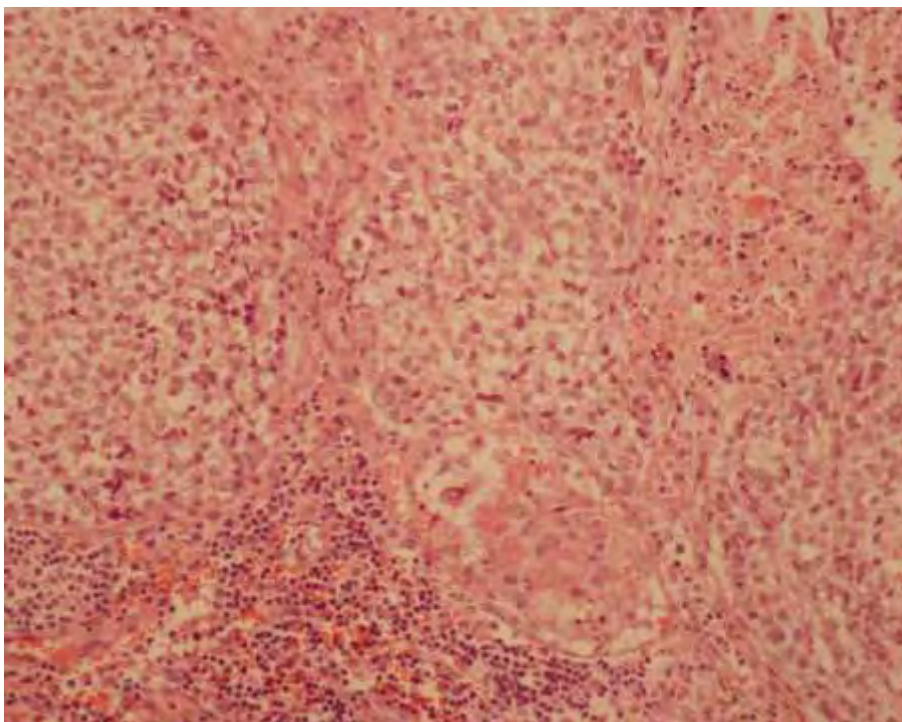
ตัวอย่างรูปทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดต่างๆ

1. มะเร็งศีรษะและคอชนิด Head and neck squamous cell carcinoma

1) มะเร็งปฐมภูมิ



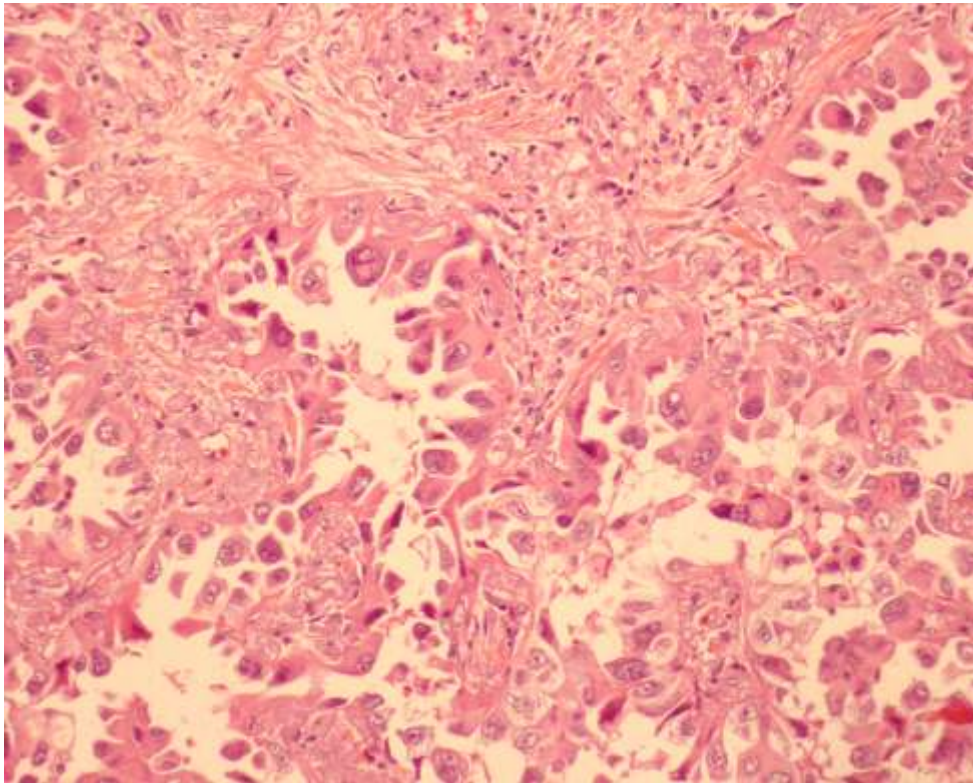
2) มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง



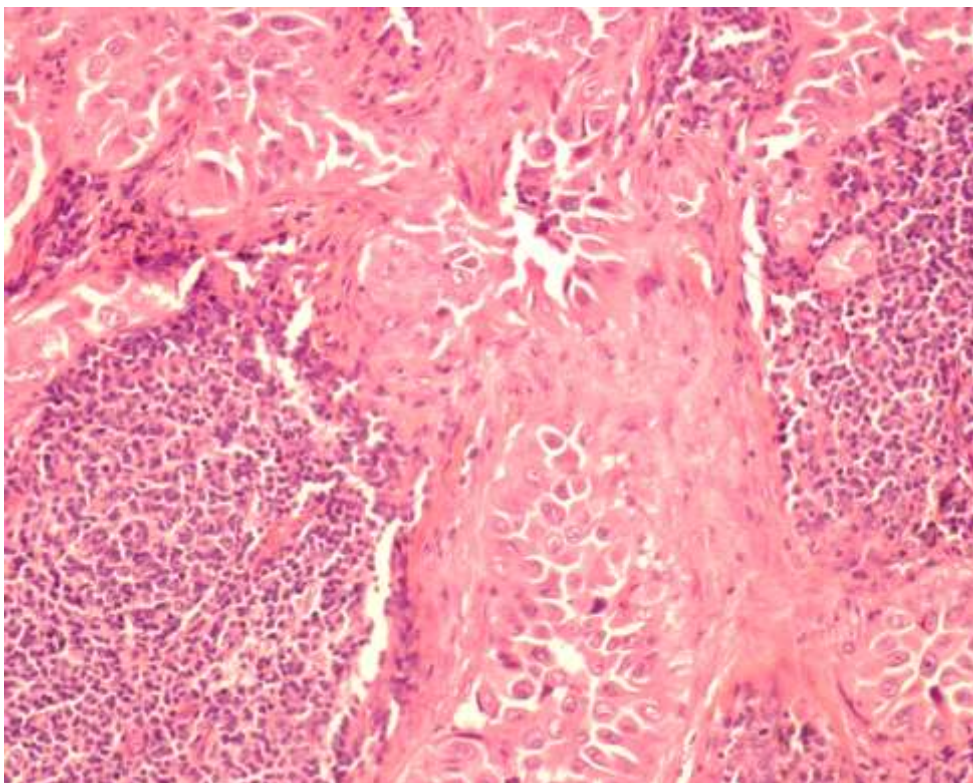


2. มะเร็งปอดชนิด non-squamous cell carcinoma ประเภท adenocarcinoma

1) มะเร็งปฐมภูมิ



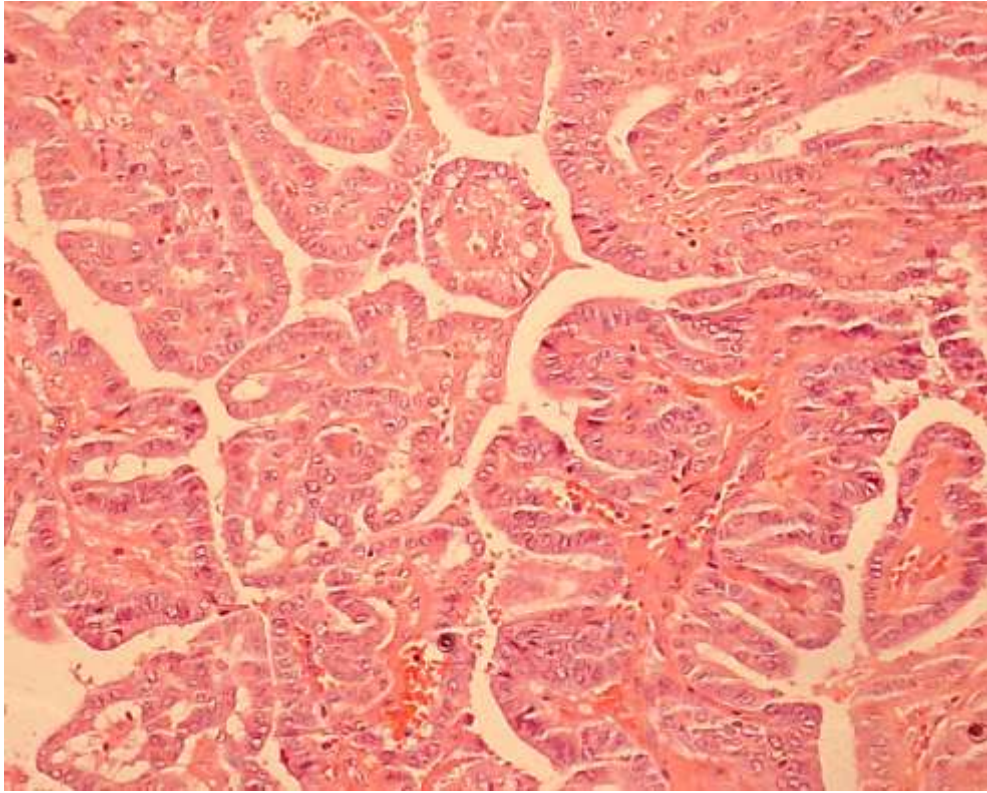
2) มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง



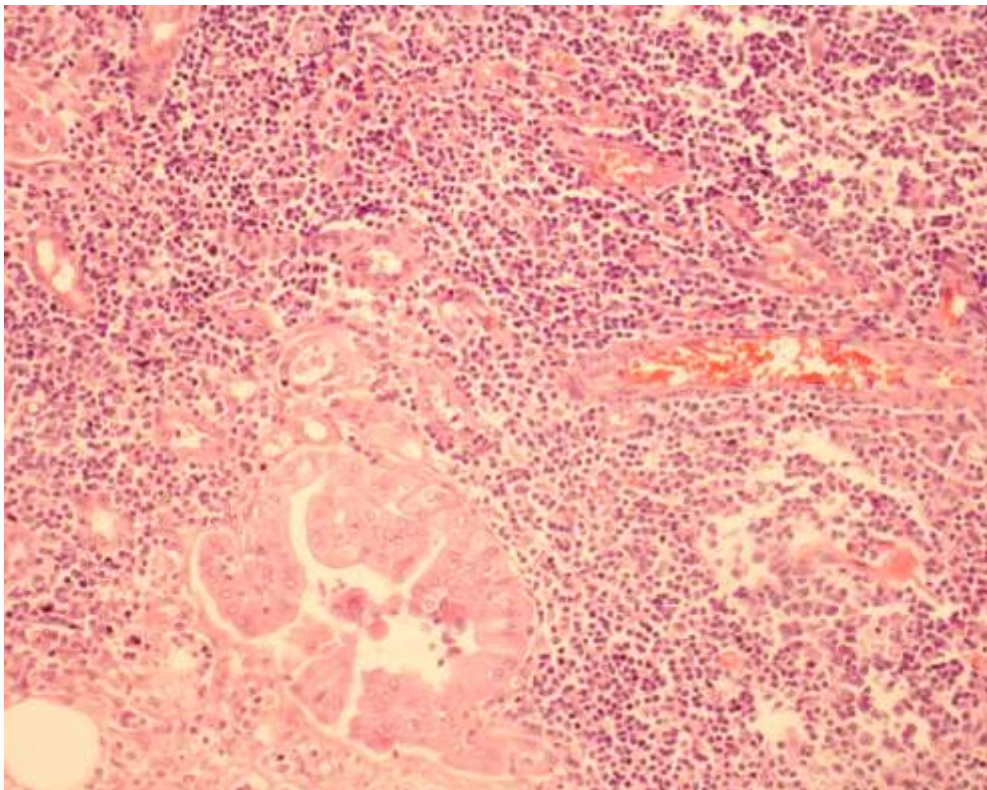


3. มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด Papillary thyroid carcinoma

1) มะเร็งปฐมภูมิ



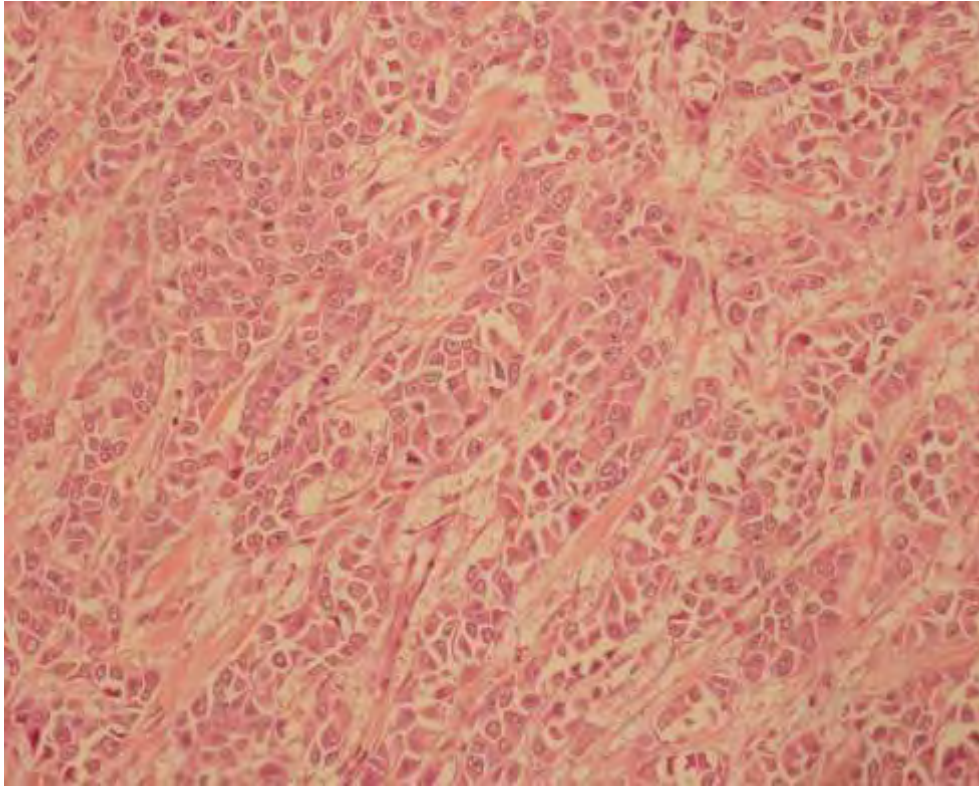
2) มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง



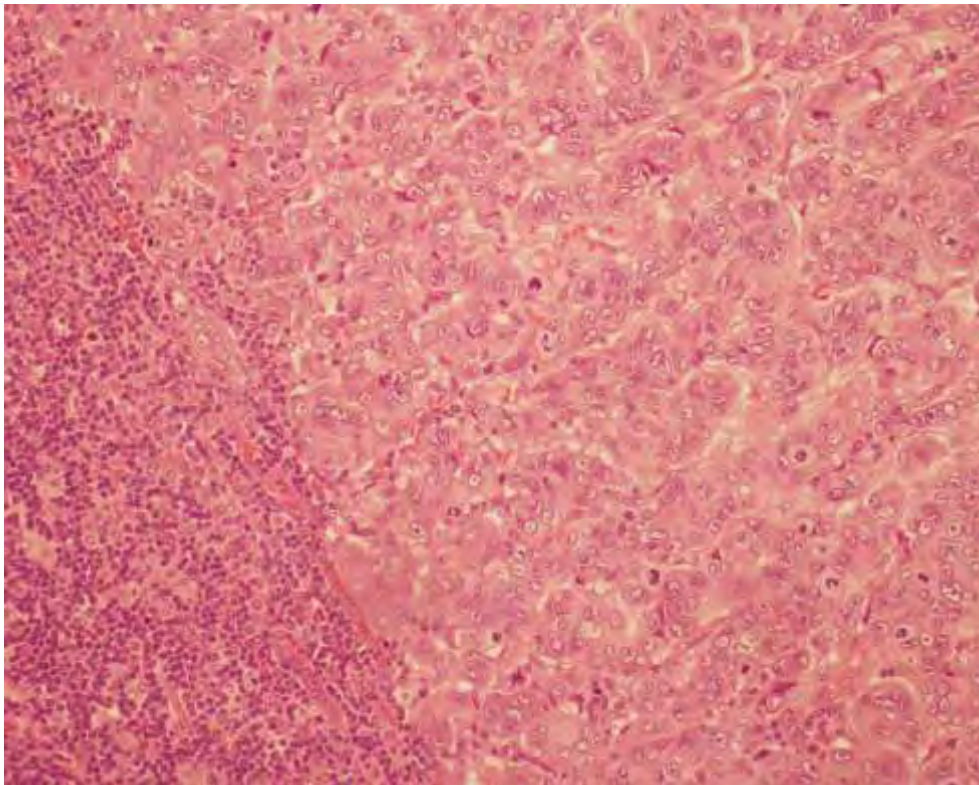


4. มะเร็งเต้านมชนิด invasive ductal carcinoma

1) มะเร็งปฐมภูมิ



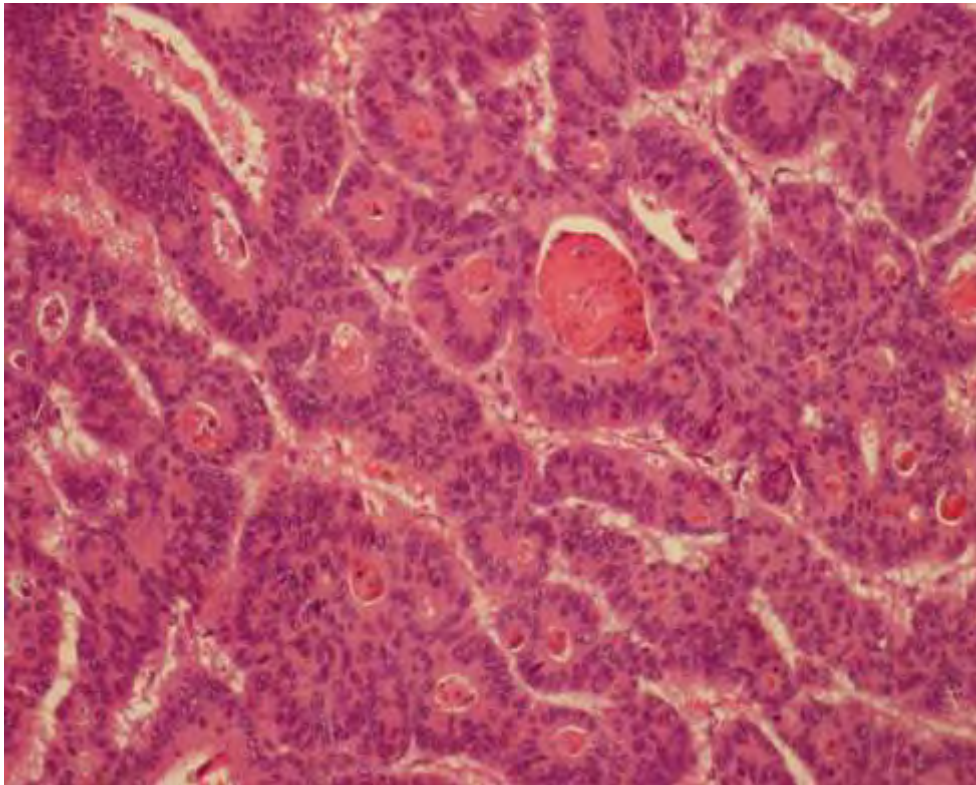
2) มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง



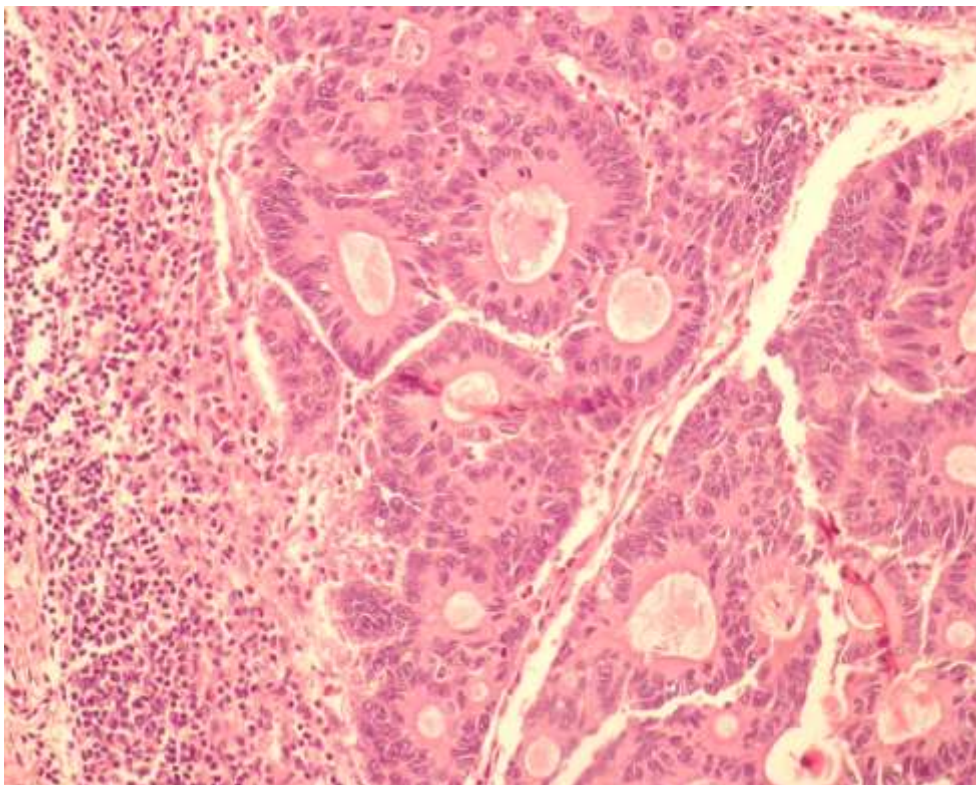


5. มะเร็งลำไส้ชนิด adenocarcinoma

1) มะเร็งปฐมภูมิ



2) มะเร็งในตำแหน่งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายฉัตรชัย นพวิชัย เกิดเมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 มีภูมิลำเนาที่กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เป็นบุตรคนที่สามของนายวีระศักดิ์ นพวิชัย และนางนิศารัตน์ บุญเลิศ

### ประวัติการศึกษา

- ปีพ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยม โรงเรียนหอวัง
- ปีพ.ศ. 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์พฤกษศาสตร์และพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปีพ.ศ. 2551 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ผลงานวิจัยและกิจกรรมทางวิทยาศาสตร์

1. ผลงานตีพิมพ์: Nopvichai C, et al. PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Necrotizing Non-Granulomatous Lymphadenitis Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue: A study in Thai patients. *J. Clin. Pathol.* 2009; 62; 812-815.
2. บรรยายพิเศษ: PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Necrotizing Non-Granulomatous Lymphadenitis Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue: A study in Thai patients. Science Forum 2008, Faculty of science, Chulalongkorn university.
3. สัมมนา: Human Genetics Research and Progress on the Yale-Chula Drug Dependence Genetic Training Program. Faculty of Medicine, Chulalongkorn university.