การศึกษาระดับโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับความสัมพันธ์ของการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ในรอยโรคระยะต่างๆ ของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร

นางสาวพิชญา ฐิติวณิชภิวงศ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CCNA1 PROMOTER METHYLATION AND ASSOCIATION WITH *HELICOBACTER PYLORI* AND EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION IN MULTISTEP OF GASTRIC CARCINOGENESIS

Miss Pichaya Thitiwanichpiwong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2017
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาระดับโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับความสัมพันธ์ของการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ในรอยโรคระยะต่างๆ ของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร
โดย	นางสาวพิชญา ฐิติวณิชภิวงศ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุพินดา คูณมี)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

พิชญา ฐิติวณิชภิวงศ์ : การศึกษาระดับโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับความสัมพันธ์ของการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ในรอยโรคระยะต่างๆ ของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร (*CCNA1* PROMOTER METHYLATION AND ASSOCIATION WITH *HELICOBACTER PYLORI* AND EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION IN MULTISTEP OF GASTRIC CARCINOGENESIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ.สมบูรณ์ คีลาวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำธร, 76 หน้า.

ปัจจุบันมะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุหนึ่งของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในประชากรโลกรวมถึงในประเทศไทย กระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารเริ่มต้นจากเซลล์ปกติได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยต่างๆ ส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปตามลำดับขั้นโดยเริ่มจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติจนกลายเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารในที่สุด การศึกษาในต่างประเทศพบว่าปัจจัยการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารมีอยู่หลายปัจจัย เช่น อายุ เพศ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และการบริโภคอาหารบางชนิด รวมไปถึงการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะอาหารมีระดับโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* สูงกว่าในกระเพาะอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหารไม่มากนัก นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ในรอยโรคระยะต่างๆ ของกระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยทำการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ จากตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารในพาราฟินบล็อกด้วยเทคนิค real-time PCR การย้อม giemsa และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ตามลำดับ ผลการตรวจสอบพบว่าการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* สามารถจำแนกกระเพาะอาหารที่มีความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง และมะเร็งกระเพาะอาหารออกจากกระเพาะอาหารปกติได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ในทุกระยะของรอยโรค จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Pearson’s chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยสรุปโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดแยกผู้ป่วยที่กระเพาะอาหารมีความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง และผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะอาหารออกจากคนปกติได้ แต่ในส่วนของกลไก และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา 2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

5874053630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: CCNA1 PROMOTER METHYLATION / HELICOBACTER PYLORI INFECTION / EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION / GASTRIC CARCINOGENESIS

PICHAYA THITIWANICHPIWONG: *CCNA1* PROMOTER METHYLATION AND ASSOCIATION WITH *HELICOBACTER PYLORI* AND EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION IN MULTISTEP OF GASTRIC CARCINOGENESIS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON KEELAWAT, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NAKARIN KITKUMTHORN, D.D.S., Ph.D., 76 pp.

Gastric adenocarcinoma is one of serious cause of illness and mortality in global population as well as in Thailand. Gastric carcinogenesis tissues include various stages; normal gastric tissue, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and gastric adenocarcinoma respectively. Previous studied reported that there were many factors related to gastric adenocarcinoma development such as; age, sex, smoking, alcohol consumption and some kind of food as well as *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and Epstein-Barr virus (EBV) infection. In addition, molecular studied showed that high level of *CCNA1* promoter methylation found in gastric adenocarcinoma comparing to normal gastric tissue. In Thailand, there were few studies about *H. pylori* infection in gastric carcinogenesis tissues and no study about *CCNA1* promoter methylation and EBV infection in gastric carcinogenesis tissues. So, the aims of this study was to evaluate *CCNA1* promoter methylation in gastric carcinogenesis tissues and correlate *CCNA1* promoter methylation with *H. pylori* and EBV infection in multistep of gastric carcinogenesis tissues. The results from real-time PCR showed that *CCNA1* promoter methylation can be distinguished gastric cancer and gastric dysplastic lesions from normal gastric tissue, chronic gastritis and intestinal metaplasia. However, the Pearson's chi-square test reported that there are no significant in association (*p*-value > 0.05) between the *CCNA1* promoter methylation and *H. pylori* and EBV infection. In conclusion, *CCNA1* promoter methylation can be differentiated premalignant and gastric adenocarcinoma from non-cancer lesions. However, mechanisms and factors involving should be further studied.

Field of Study: Medical Science	Student's Signature ....
Academic Year: 2017	Advisor's Signature ....
	Co-Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ และรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุพินดา คูณมี ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์คมกฤต เรืองฤทธิ์ชาญกุล อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาววริษา ตันติดลธเนศ นักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการค้นหาตัวอย่างชิ้นเนื้อสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ปรีชา เรืองเวชวรชัย คุณเทียมจิต ไชยชนะ คุณจุฑามาศ วงศ์ภูมิ และคุณจุฑามาศ มากอยู่ อาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการอิมมูโนฮิสโตเคมี ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการย้อมชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก

ขอขอบพระคุณ คุณขนิษฐา คีตาชีวะ นักวิทยาศาสตร์ ประจำหน่วยเตรียมเนื้อเยื่อ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการขอใช้ตัวอย่างและตัดพาราฟินบล็อก

ขอขอบพระคุณ อาจารย์โสภณ สุวรรณโสภณ อาจารย์ ประจำห้องสื่อการสอน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการสแกนสไลด์งานวิจัย

ขอขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณวิชชวัช อักษรกิตติ์ เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจิรายุ เอื้อวรากุล รองอธิการบดีวิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ์ และนางสาวมณีนพ ยิ้มแย้ม หัวหน้างานห้องปฏิบัติการสนับสนุนงานวิจัย โรงพยาบาลจุฬาภรณ์ ที่ให้โอกาสลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท รวมถึงมอบทุนสนับสนุนการศึกษา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บุคคลในครอบครัว ที่คอยเป็นแรงผลักดัน รวมถึงให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นลงได้ด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.... จ

กิตติกรรมประกาศ.... ฉ

สารบัญ.... ช

สารบัญตาราง....ฎ

สารบัญภาพ .... ฐ

สารบัญแผนภูมิ.... ฒ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .... ณ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

ที่มา และความสำคัญของปัญหา 1

คำถามงานวิจัย 2

สมมติฐานงานวิจัย.... 2

วัตถุประสงค์การวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 4

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.... 4

กระเพาะอาหาร 4

กระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร 5

กระเพาะอาหารปกติ 5

กระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง 6

gastric intestinal metaplasia 7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

gastric dysplasia 8
มะเร็งกระเพาะอาหารชนิดต่อม 9
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน 11
ยีน *CCNA1* 12
แบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร 12
ไวรัสเอ็บสไตบาร์ 15
การทำไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ 16
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 17
เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 18
real-time PCR 18
การย้อม hematoxylin และ eosin 18
การย้อม giemsa 18
การย้อม EBV-encoded small RNA 19
บทที่ 3 21
วิธีดำเนินการวิจัย 21
ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม 21
กรอบความคิดงานวิจัย 21
รูปแบบการวิจัย 22
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 22
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 23
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 23
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย 25
การกำหนดขนาดตัวอย่าง 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

การคัดเลือกตัวอย่าง 26
การตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก 26
การกำจัดพาราฟินออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ 26
การย้อม hematoxylin และ eosin 26
การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อในพาราฟินบล็อก 27
การทำไบซัลไฟต์ 28
การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค real-time PCR 29
การย้อม giemsa 30
การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 30
การย้อม EBV-encoded small RNA 32
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ 33
บทที่ 4 35
ผลการวิจัย 35
ผลการตรวจสอบระยะของรอยโรค โดยการย้อม hematoxylin และ eosin 35
ผลการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* โดยใช้เทคนิค real-time PCR 37
ผลการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa 39
ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส และการย้อม EBV-encoded small RNA 40
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ 43
บทที่ 5 45
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 45
รายการอ้างอิง 49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ภาคผนวก... 55

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ และโพรบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยเทคนิค real-time PCR 29

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยเทคนิค real-time PCR 29

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยเทคนิค real-time PCR 30

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 31

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 31

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 31

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอะคริลาไมด์เจล 32

ตารางที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารในรอยโรคระยะต่างๆ โดยการย้อม H&E 35

ตารางที่ 9 รายละเอียดของตัวอย่างที่นำมาใช้ในงานวิจัย โดยจำแนกตามการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา . 36

ตารางที่ 10 รายละเอียดของตัวอย่างที่พบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* 37

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างที่ได้รับการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* 38

ตารางที่ 12 รายละเอียดของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบวินิจฉัย 38

ตารางที่ 13 รายละเอียดของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร 40

ตารางที่ 14 รายละเอียดของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ 43

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ในกลุ่มตัวอย่าง 44

ตารางที่ 16 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม normal 56

ตารางที่ 17 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม chronic gastritis 57

ตารางที่ 18 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม mature intestinal metaplasia 59

ตารางที่ 19 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม immature intestinal metaplasia 63

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 20 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม low grade dysplasia 63

ตารางที่ 21 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม high grade dysplasia 65

ตารางที่ 22 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม intestinal type gastric adenocarcinoma 66

ตารางที่ 23 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม diffuse type gastric adenocarcinoma 66

ตารางที่ 24 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม normal 70

ตารางที่ 25 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม chronic gastritis 70

ตารางที่ 26 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม mature intestinal metaplasia 71

ตารางที่ 27 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม immature intestinal metaplasia 73

ตารางที่ 28 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม low grade dysplasia 73

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 29 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม high grade dysplasia 74

ตารางที่ 30 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม intestinal type gastric adenocarcinoma 74

ตารางที่ 31 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม diffuse type gastric adenocarcinoma 74

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะทางกายวิภาคของกระเพาะอาหาร.......... 4

รูปที่ 2 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหาร.......... 5

รูปที่ 3 กระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร นำเสนอโดย Rui Silva และคณะ 5

รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารปกติ โดยการย้อม H&E 6

รูปที่ 5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารอักเสบแบบเรื้อรัง โดยการย้อม H&E.......... 7

รูปที่ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ mature intestinal metaplasia โดยการย้อม H&E.......... 8

รูปที่ 7 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ low grade dysplasia โดยการย้อม H&E 8

รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ high grade dysplasia โดยการย้อม H&E.......... 9

รูปที่ 9 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งกระเพาะอาหารชนิดต่อมชนิด intestinal โดยการย้อม H&E.......... 10

รูปที่ 10 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งกระเพาะอาหารชนิดต่อมชนิด diffuse โดยการย้อม H&E.......... 10

รูปที่ 11 ปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน.......... 11

รูปที่ 12 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณ CpG island 11

รูปที่ 13 การควบคุมวงจรเซลล์ โดย CDK/cyclin 12

รูปที่ 14 ลักษณะของแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร.......... 14

รูปที่ 15 กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร 14

รูปที่ 16 ลักษณะของไวรัสเอ็บสไตบาร์.......... 16

รูปที่ 17 กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ 16

รูปที่ 18 ขั้นตอนการเปลี่ยนเบสของดีเอ็นเอ โดยการทำไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ 17

รูปที่ 19 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 18

รูปที่ 20 ลักษณะของแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa 19

รูปที่ 21 ลักษณะเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยการย้อม EBER 19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 22 ลักษณะของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa 39

รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 40

รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ 41

รูปที่ 25 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ 41

รูปที่ 26 ลักษณะของตัวอย่างที่มีการติดไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยการย้อม EBER 41

รูปที่ 27 ลักษณะของตัวอย่างที่ไม่มีการติดไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยการย้อม EBER 42

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างในรอยโรคระยะต่างๆ ที่มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* 37

แผนภูมิที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างในรอยโรคระยะต่างๆ ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร 39

แผนภูมิที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างในรอยโรคระยะต่างๆ ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ 42

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
APS	ammonium peroxodisulfate
BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pair
CISH	chromogenic *in situ* hybridization
DNMT	DNA methyl transferase
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EBER	EBV-encoded small RNA
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H&E	hematoxylin and eosin
IL-1b	interleukin-1b
IL-8	interleukin 8
$MgCl_2$	magnesium chloride
NO	nitric oxide
PCR	polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
TBE	tris borate EDTA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

ที่มา และความสำคัญของปัญหา

แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ พุทธศักราช 2556-2560 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ระบุว่ามะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบสูงเป็นอันดับที่ 4 ของโลก[1] โดยมีอุบัติการณ์มากในประเทศแถบเอเชียตะวันออก โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น จีน และเกาหลี นอกจากนี้ข้อมูลจากทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พุทธศักราช 2557 พบว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารมากเป็นอันดับที่ 9 ในประเทศไทย[2]

มะเร็งกระเพาะอาหารเกิดจากการเจริญที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อบุผิว (epithelium) ในกระเพาะอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดบริเวณเยื่อบุผิวที่เรียงตัวกันเป็นต่อม (glandular epithelium) เรียกว่าอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma)

ปัจจุบันพบว่ามีหลายปัจจัยที่สามารถเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคได้ เช่น อายุ เพศ การมีประวัติครอบครัวเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เชื้อชาติ พฤติกรรมการรับประทานอาหาร ภาวะอ้วน เคยได้รับการผ่าตัดกระเพาะอาหารหรือมีโรคประจำตัว การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori*) และไวรัสเอ็บสไตบาร์ (Epstein-Barr virus) เป็นต้น

การวินิจฉัยโรคมะเร็งสามารถทำได้ด้วยการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การย้อมสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (haematoxylin & eosin) และการย้อมทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemical staining) เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

มะเร็งชนิดนี้หากพบในระยะเริ่มแรกและได้เข้ารับการรักษา ผู้ป่วยจะมีการพยากรณ์โรคที่ดี แต่หากพบในระยะลุกลามจะมีโอกาสเสียชีวิตในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นหากสามารถวินิจฉัยได้ตั้งแต่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบุผิวในกระเพาะอาหาร เช่นในระยะที่เป็น gastric intestinal metaplasia หรือ gastric dysplasia และได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการมีชีวิตอยู่ของผู้ป่วยได้มากยิ่งขึ้น[3]

ในอดีตมีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *Cyclin A* โดยการย้อมทางอิมมูโนพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารซึ่งมีระดับเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* สูง พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน *Cyclin A* ต่ำกว่าในคนปกติ[4] ดังนั้นการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาวินิจฉัยโรค นอกจากนี้ในประเทศไทยมีการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหารเพียงเล็กน้อย[5] และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ ของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร รวมทั้งเปรียบเทียบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ จากตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารในพาราฟินบล็อก โดยคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาในประเภทต่างๆ ได้แก่ normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma เพื่อใช้เป็นการศึกษานำร่องที่อาจนำไปสู่การศึกษาอื่นๆ เช่น การนำระดับเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิฉัยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ในอนาคต

คำถามงานวิจัย

1) สามารถใช้การเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* จำแนกผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารออกจากผู้ป่วยที่กระเพาะอาหารมีความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง และผู้ที่กระเพาะอาหารปกติในเบื้องต้นได้หรือไม่
2) การเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์หรือไม่

สมมติฐานงานวิจัย

1) สามารถใช้การเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* จำแนกผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารออกจากผู้ป่วยที่กระเพาะอาหารมีความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง และผู้ที่กระเพาะอาหารปกติในเบื้องต้น
2) การเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัตถุประสงค์การวิจัย

1) เพื่อศึกษาการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร
2) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1) ทำให้ทราบถึงการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งอาจนำไปสู่การศึกษาอื่นๆ เช่น การนำระดับเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ในอนาคต
2) ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

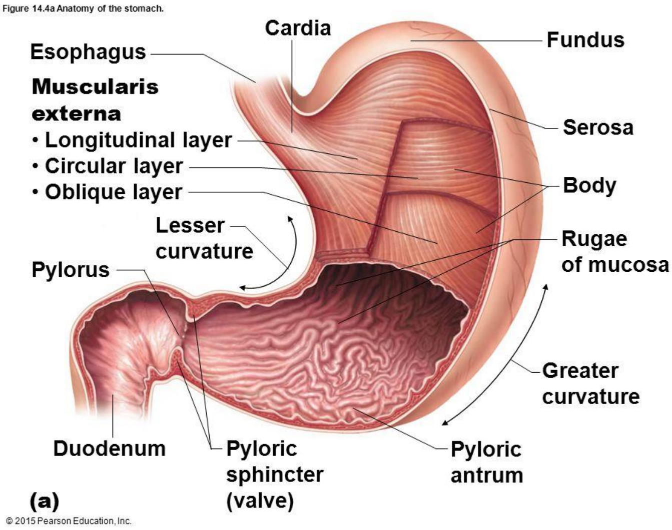
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

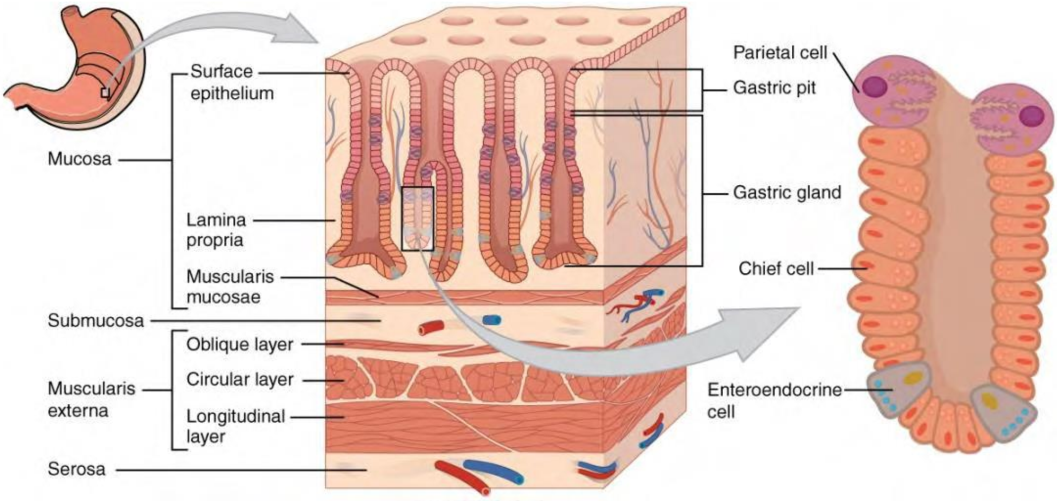
กระเพาะอาหาร (Stomach)

กระเพาะอาหารเป็นอวัยวะที่อยู่บริเวณช่องท้องส่วนบน มีลักษณะคล้ายรูปตัวเจ (J) แบ่งเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ส่วนแรก cardia เป็นส่วนที่ต่อมาจากหลอดอาหาร ถัดมาทางด้านบนเรียก fundus อยู่ด้านบนสุดของกระเพาะอาหาร ส่วนที่อยู่ถัดลงมาเรียก body เป็นส่วนกลางซึ่งมีความโค้ง และส่วนสุดท้าย antrum กับ pylorus อยู่ด้านล่างติดกับลำไส้เล็กส่วนต้น[6-10] ดังรูปที่ 1 ซึ่งในบริเวณ antrum กับ pylorus เป็นบริเวณที่พบมะเร็งกระเพาะอาหารได้มากที่สุด รองลงมาคือส่วน cardia กับ fundus และ body โดยพบว่ามีอัตราการเกิดมะเร็งอยู่ที่ 40, 35 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ[11]

โครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหารประกอบด้วยชั้นต่างๆ 4 ชั้น จากด้านในออกมาด้านนอก ได้แก่ ชั้นเยื่อเมือก (mucosa) ประกอบด้วยชั้นของเซลล์เยื่อบุผิวที่เรียงตัวกันเป็นต่อม ถัดมาทางด้านนอกเป็นชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นหลัก ถัดไปเป็นชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis externa) ประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อเรียบ 3 ชั้น และชั้นเยื่อหุ้มด้านนอกสุด (serosa) เป็นชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ห่อหุ้มกระเพาะอาหาร[6-8] ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 ลักษณะทางกายวิภาคของกระเพาะอาหาร[12]



รูปที่ 2 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหาร[13]

กระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric carcinogenesis)

กระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric carcinogenesis) เริ่มต้นจากเซลล์ปกติได้รับการกระตุ้นให้มีความผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็นการเสื่อมสภาพ การสูญเสียคุณสมบัติหรือหน้าที่ในการทำงาน การแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างเหนือการควบคุม และเกิดการลุกลามออกไปสู่บริเวณอื่นโดยจะเกิดขึ้นในลักษณะที่เป็นลำดับขั้น ดังรูปที่ 3

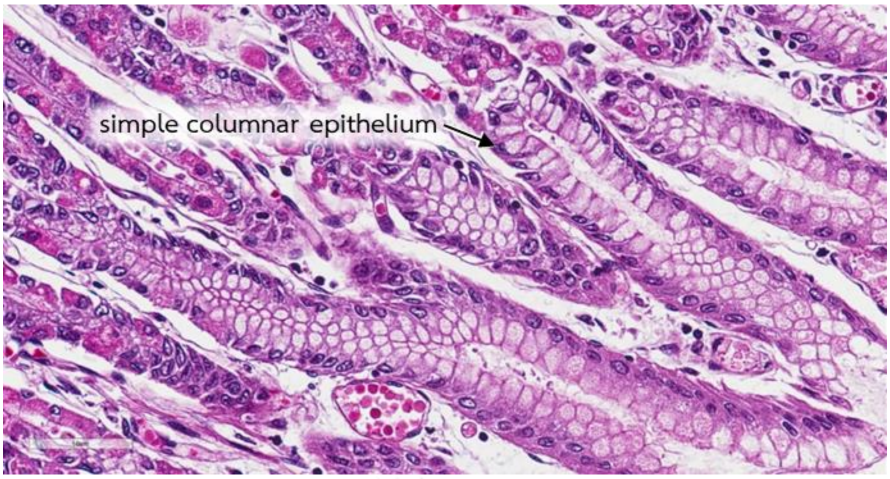
รูปที่ 3 กระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร นำเสนอโดย Rui Silva และคณะ[14]

(Correa’s cascade of multistep gastric carcinogenesis)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กระเพาะอาหารปกติ (normal stomach)

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารปกติประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple columnar epithelium อยู่ในบริเวณชั้นเยื่อเมือก (mucosa)[6, 7] ดังรูปที่ 4

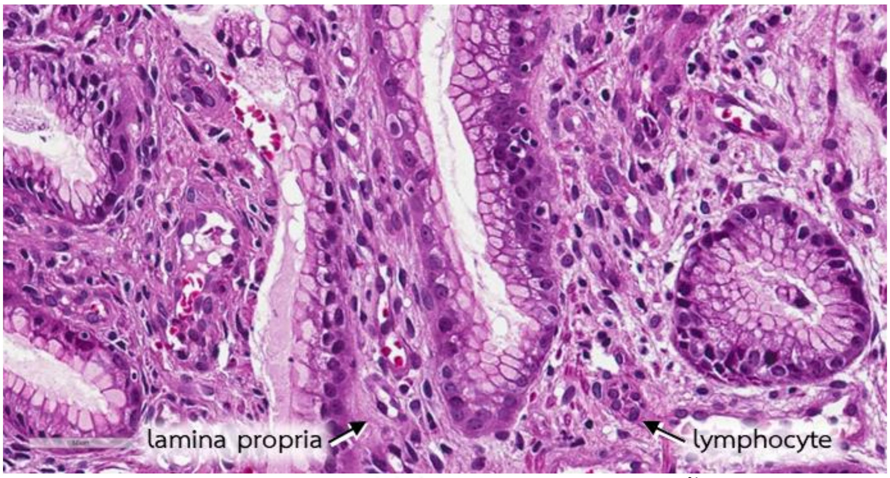


รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารปกติ โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple columnar epithelium

กระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง (chronic gastritis)

กระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง (chronic gastritis) คือการอักเสบของกระเพาะอาหารเรื้อรังเป็นระยะเวลานาน ซึ่งส่งผลให้เซลล์เยื่อเมือกบุกระเพาะอาหารมีปริมาณลดลง เกิดการฝ่อลีบ และอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติได้ สามารถจำแนกชนิดของกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังตามสาเหตุของการเกิดโรคได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดแรกเกิดจากปฏิกิริยาภูมิต้านทานตนเอง (autoimmune-induced gastritis หรือ type A) มักเกิดการอักเสบในบริเวณ fundus และ body ชนิดที่สองเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori*-associated gastritis, bacterial gastritis หรือ type B) มักเกิดการอักเสบในบริเวณ antrum และอาจลามไปถึง body ซึ่งการอักเสบในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบได้บ่อยที่สุด ชนิดที่สามเกิดจากการได้รับสารเคมี (reflux gastritis, chemical gastritis หรือ type C) มักเกิดในบริเวณรอยต่อของกระเพาะอาหารกับลำไส้เล็ก และชนิดสุดท้ายกลุ่มไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic chronic gastritis) มักเกิดทั่วไปทั้งกระเพาะอาหาร

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารอักเสบแบบเรื้อรังพบว่ามีลักษณะของเยื่อบุกระเพาะอาหารชนิดต่อม (glandular epithelium) ปกติ แต่ในส่วนของ lamina propria จะพบ neutrophils lymphocyte และ plasma cell[15] ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารอักเสบแบบเรื้อรัง โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่ามีเม็ดเลือดขาวปะปนอยู่ในชั้น lamina propria เป็นจำนวนมาก

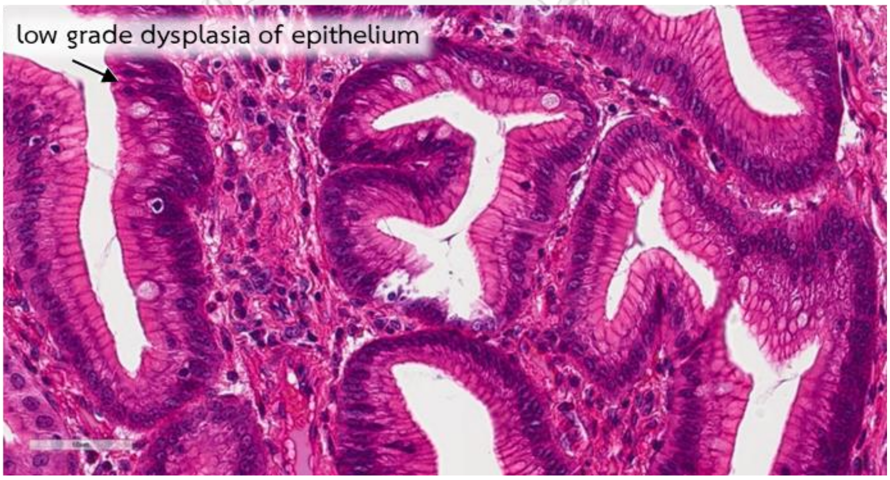
gastric intestinal metaplasia

gastric intestinal metaplasia เป็นการเจริญของเซลล์โดยเปลี่ยนจากลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (gastric mucosa) ไปมีลักษณะคล้ายเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal mucosa) ซึ่งประกอบไปด้วย goblet cell, endocrine cell และอาจพบลักษณะของ rudimentary villi ที่ใช้ในการดูดซึมอาหารคล้ายในเยื่อบุลำไส้เล็ก พบได้บ่อยที่บริเวณ antrum และอาจต่อเนื่องไปถึง body[3] ปัจจัยที่อาจเป็นสาเหตุให้เกิด gastric intestinal metaplasia ได้แก่ การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร[16-20] ภาวะพร่องวิตามินซีและสารต้านอนุมูลอิสระ การสูบบุหรี่ การฉายรังสี[19, 21] และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม[21] โดยสามารถจำแนกลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ intestinal metaplasia ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก complete type, mature type หรือ type I เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวจากเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารกลายเป็นลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปเป็นคุณลักษณะของลำไส้เล็ก คือ สามารถหลั่ง peptide และดูดซึมอาหารได้ ซึ่งกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบได้บ่อยที่สุด ดังรูปที่ 6 กลุ่มที่สอง incomplete type, immature type หรือ type II มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาคล้ายกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ และกลุ่มสุดท้าย mixed type หรือ type III พบการเปลี่ยนแปลงของทั้ง type I และ type II โดยการเปลี่ยนแปลงจะเริ่มจากแบบ complete ไปเป็น incomplete และมีโอกาสที่ intestinal metaplasia จะเปลี่ยนเป็นมะเร็งในระยะเวลา 5 ปี อยู่ที่ร้อยละ 0.25[3, 22]

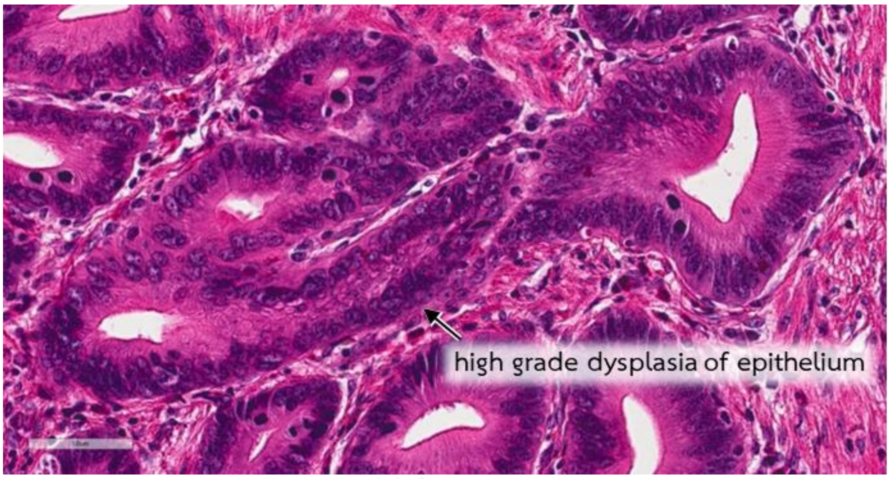
รูปที่ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ mature intestinal metaplasia โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารเปลี่ยนแปลงไปมีลักษณะคล้ายเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้เล็ก ซึ่งประกอบด้วย goblet cell และ villi

gastric dysplasia

gastric dysplasia เป็นการเจริญที่ผิดปกติทั้งทางด้านรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ แต่ยังไม่มีการลุกลาม (non-invasive) สามารถจำแนกลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ dysplasia ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ low grade ดังรูปที่ 7 และ high grade ดังรูปที่ 8 โดยโอกาสที่ low grade และ high grade dysplasia จะเปลี่ยนเป็นมะเร็งในระยะเวลา 5 ปี อยู่ที่ร้อยละ 0.6 และ 69 ตามลำดับ[22]



รูปที่ 7 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ low grade dysplasia โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบนิวเคลียสของเซลล์ติดสีเข้มไม่สม่ำเสมอ

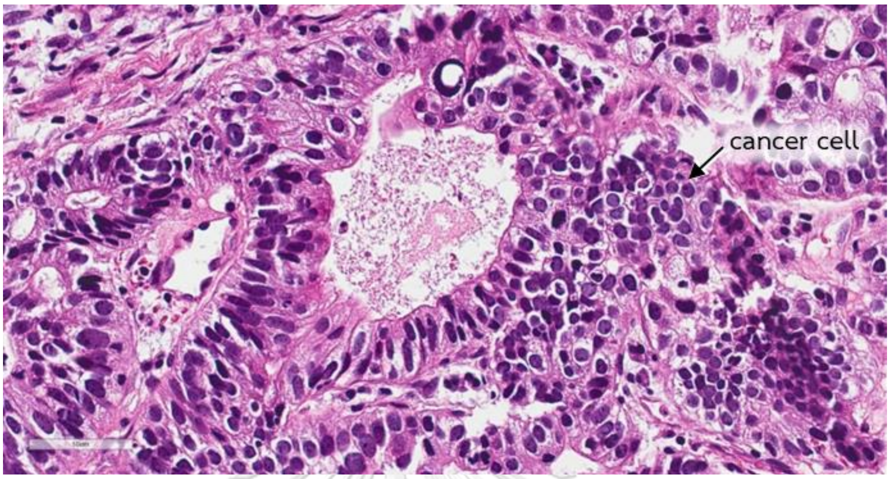


รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ high grade dysplasia โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบนิวเคลียสของเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น หลากหลายขนาดและรูปร่าง ติดสีเข้มไม่สม่ำเสมอ และเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ

มะเร็งกระเพาะอาหารชนิดต่อม (gastric adenocarcinoma)

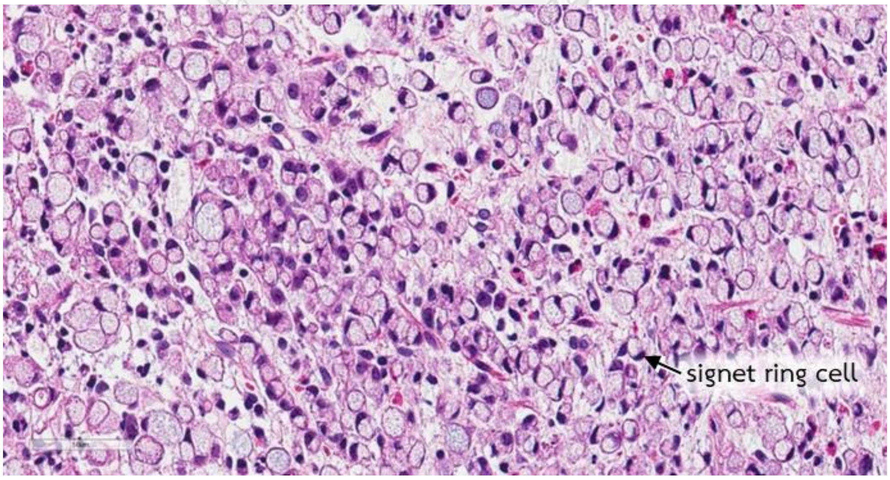
มะเร็งกระเพาะอาหารที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผิวในบริเวณที่เรียงตัวกันเป็นต่อม (gastric adenocarcinoma) พบได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร[11] มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เช่น อายุ เมื่ออายุมากขึ้นจะมีโอกาสเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้มากขึ้น,เพศ เพศชายมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งมากกว่าเพศหญิง 2 เท่า[23], หมู่เลือด บุคคลที่มีหมู่เลือด A มีความเสี่ยงมากกว่าหมู่เลือดอื่นๆ ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์[24], เชื้อชาติ พบมะเร็งกระเพาะอาหารในชาวเอเชียมากที่สุด โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นและประเทศในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออก[11], พฤติกรรมการรับประทานอาหาร เช่น การรับประทานอาหารปิ้ง ย่าง หมักดอง ตากเค็ม รมควัน อาจเพิ่มโอกาสในการเป็นมะเร็ง ส่วนการรับประทานผลไม้และผักสดอาจช่วยลดความเสี่ยงได้, พฤติกรรมการดำเนินชีวิต เช่น การสูบบุหรี่และดื่มเหล้าอาจเพิ่มโอกาสในการเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหารมากขึ้น, การมีประวัติโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในครอบครัว[23], การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรทำให้มีอาการอักเสบและเกิดเป็นแผลในกระเพาะอาหาร ซึ่งเพิ่มโอกาสในการเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร[25, 26], การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์[27] และมีประวัติเป็นโรคชนิดอื่นๆ เช่น กระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง gastric intestinal metaplasia เนื้องอกกระเพาะอาหาร หรือเนื้องอกลำไส้ที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม[11] สามารถใช้หลักของ Lauren ในการจำแนกลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งกระเพาะอาหารชนิดนี้ได้เป็น 2 ลักษณะ คือ intestinal type และ diffuse-infiltrative type[28]

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ intestinal type จะมีลักษณะเป็นต่อม (glandular structure) คล้ายลักษณะที่พบในลำไส้ เซลล์มะเร็งมีนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ ติดสีเข้ม เห็น nucleolus ชัดเจน มีการเจริญลุกลามของเซลล์มะเร็งเข้าไปในผนังของกระเพาะอาหาร[27] ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งกระเพาะอาหารชนิดต่อมชนิด intestinal โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มะเร็งมีการจัดเรียงตัวเป็นต่อม

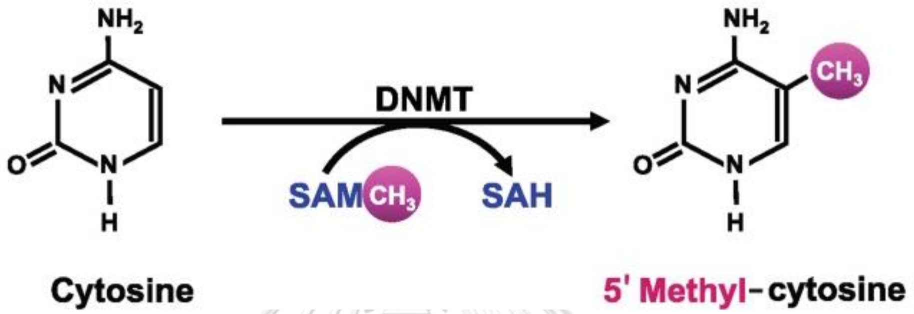
diffuse-infiltrative type มีลักษณะของเซลล์มะเร็งกระจายอยู่ในชั้น mucosa และ gastric wall แบบเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มเล็กๆ ไม่พบโครงสร้างที่เป็นต่อม ภายในไซโทพลาซึมมี mucin vacuole ขนาดใหญ่จนเบียดนิวเคลียสให้ไปอยู่ชิดขอบของเซลล์ทำให้มองเห็นเป็นลักษณะคล้ายแหวน (signet ring cell)[27] ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งกระเพาะอาหารชนิดต่อมชนิด diffuse โดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มะเร็งมีลักษณะกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ สร้างเมือกมาก ไซโทพลาซึมใส นิวเคลียสอยู่ชิดขอบเซลล์ปรากฏลักษณะคล้ายแหวน (signet ring cell)

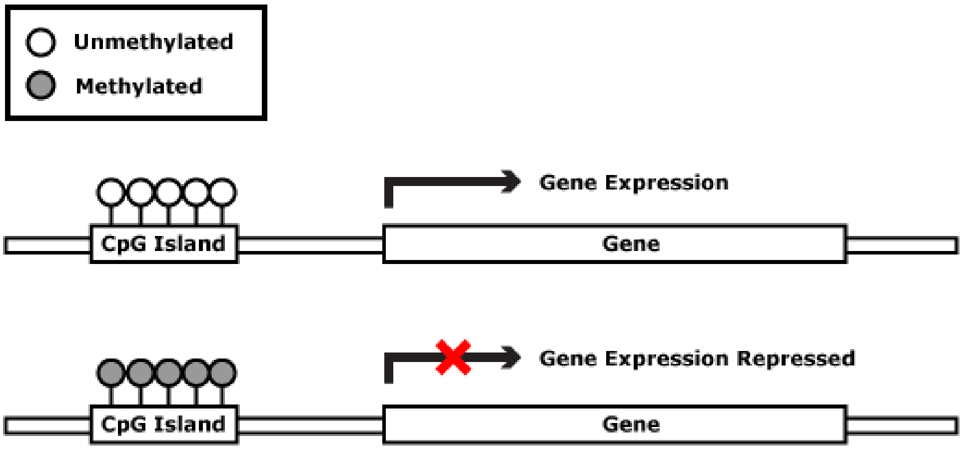
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นกระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetic)[29] มีบทบาทสำคัญในการการควบคุมการแสดงออกของยีน เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltranferase (DNMT) ทำให้เกิดการย้ายหมู่เมทิล (-CH3) จาก S-adenosylmethionine (SAM) ไปที่ตำแหน่ง 5’ ของเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ด้านหน้าติดกับเบสกวานีน (guanine) (5’-CG-3’) มักเกิดขึ้นในบริเวณ CpG islands (CGI) ซึ่งส่วนมากเป็นบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เรียกเบสไซโตซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิลว่า 5’-methyl-cytosine[30] ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน[31]

เมื่อเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์จะส่งผลต่อโครงสร้างของโครมาติน โดยโครมาตินจะเกิดการขดม้วนอย่างหนาแน่น เรียกว่า heterochromatin ทำให้มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน ดังรูปที่ 12 ซึ่งในแต่ละอวัยวะจะมีรูปแบบของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกัน เรียกว่า tissue specific methylation โดยการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบนี้จะแตกต่างกันไปตามกระบวนการพัฒนาของร่างกาย[32]

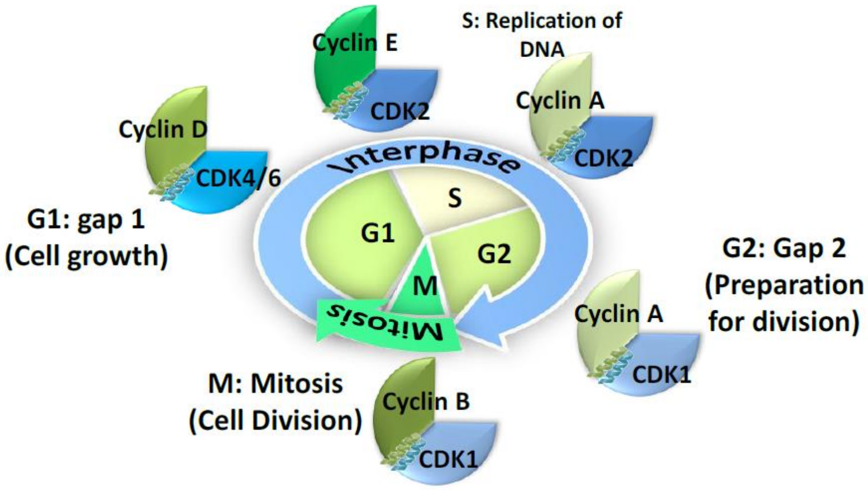


รูปที่ 12 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณ CpG island[33]

การตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชันสามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น การตรวจโดยใช้เทคนิค methylation specific PCR (MSP) เทคนิค combined bisulfite restriction analysis (COBRA) และเทคนิค real-time PCR เป็นต้น

ยีน *CCNA1*

CCNA1 จัดอยู่ในตระกูล Cyclin ในมนุษย์ยีน *CCNA1* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 แขน q ตำแหน่งที่ 13.3 มีความยาวประมาณ 12,000 คู่เบส เมื่อ *Cyclin A* รวมตัวกับ cyclin-dependent kinase (CDK) ที่มีบทบาทในการควบคุมวงจรเซลล์ (cell cycle) จะเกิดเป็น CDK/Cyclin complex โดยมี 2 complex ที่เกี่ยวข้องกับ *Cyclin A* คือ CDK2/*Cyclin A* เกี่ยวข้องกับระยะ S phase ควบคุมการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) และ CDK1/*Cyclin A* เกี่ยวข้องกับระยะ G2 phase ควบคุมการเตรียมตัวสำหรับการแบ่งเซลล์[34] ดังรูปที่ 13 โดยปกติการแสดงออกของ *CCNA1* มีลักษณะจำเพาะในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ในปีคริสต์ศักราช 2014 Marie Loh และคณะ พบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะอาหารมีระดับโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* (*CCNA1* promoter methylation) สูงกว่าในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติที่ไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรมีระดับโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* สูงกว่าในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปกติที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร[35]



รูปที่ 13 การควบคุมวงจรเซลล์ โดย CDK/cyclin[34]

แบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori*)

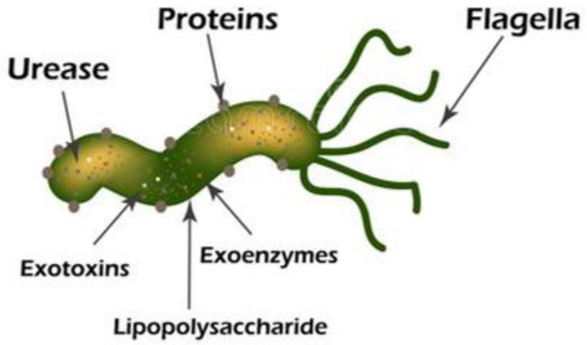
แบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียว (spiral form)[36] ขนาดกว้าง 0.5-1 ไมโครเมตร ยาว 2-4 ไมโครเมตร[37] มีแฟลเจลลาแบบ

มีเปลือกหุ้ม (sheathed flagella) ประมาณ 4-5 แฟลเจลลา อยู่บริเวณข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ ดังรูปที่ 14 แบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการอักเสบของกระเพาะอาหาร อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (gastric epithelium) โดยมักอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นเซลล์ที่มีการหลั่งเมือก (mucus) มากกว่าบริเวณอื่น เนื่องจากในบริเวณนี้มีค่า pH เป็นกลางมากที่สุด[38] สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) มีการสร้างสารยับยั้งโปรตีน (protein inhibitor) เพื่อยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และหลั่งสารเพื่อช่วยในการยึดเกาะเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารได้[36] นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่ไม่ได้สร้างสปอร์สามารถเปลี่ยนรูปร่างจากรูปเกลียว (spiral form) เป็นทรงกลม (cocciod form) ได้เมื่อสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง[36, 37] แบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรเป็นแบคทีเรียตัวเดียวที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)[39] การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรพบได้บ่อยในบุคคลทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา เชื้อสามารถแพร่กระจายได้หลายช่องทาง เช่น ทางน้ำลาย (oral-oral route) การสัมผัสสารคัดหลั่งจากกระเพาะอาหาร (gastric-oral route) การดื่มน้ำหรือรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อมากับอุจจาระ (fecal-oral route)[40]

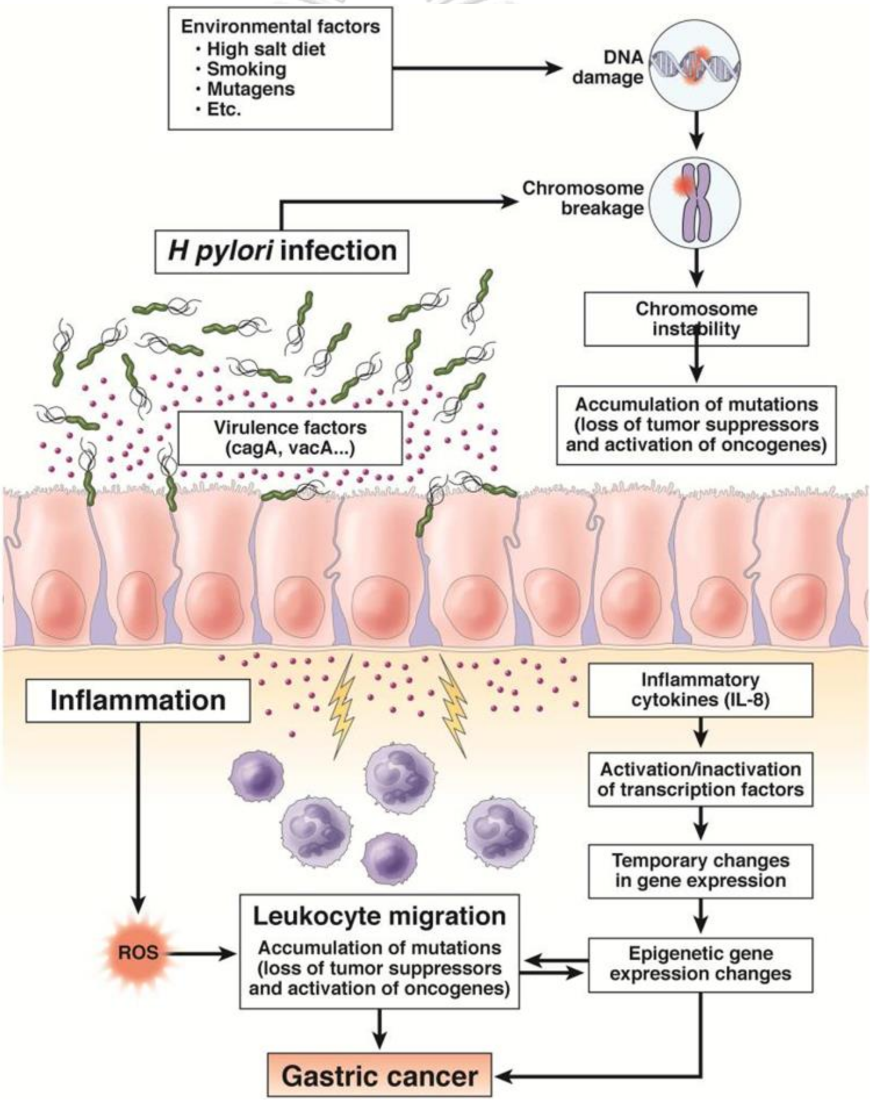
กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรผลิตโปรตีน cagA จากยีน cytotoxin-associated gene A มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร และโปรตีน vagA จากยีน vacuolating cytotoxin gene A ที่มีส่วนช่วยในการดำรงอยู่ของเชื้อในชั้นเยื่อเมือกในด้านต่างๆ เช่น ส่งผลต่อการทำงานของ adhesin กระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารเกิด pro-inflammatory signaling เพิ่มสภาพการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของช่องทางลำเลียงสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่เซลล์ (endocytic compartment) เพิ่มสภาพการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ไมโทคอนเดรีย (mitochondrial membrane) และทำให้เกิดการเกิดช่องว่างในเซลล์ (vacuolization) เป็นต้น โดยโปรตีนเหล่านี้จะส่งผลให้เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารหลั่งอินเตอร์ลิวคิน 8 (interleukin 8, IL-8) ซึ่งจะก่อให้เกิดการอับเสบของเนื้อเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารอย่างรุนแรง เมื่อเกิดการอักเสบจะส่งผลให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) และทำให้มีการยับยั้งการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ (tumor suppressor gene) รวมทั้งกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มยีนก่อมะเร็ง (oncogene) จนอาจก่อให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้[41] ดังรูปที่ 15

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) การย้อมพิเศษ (special staining)

การย้อมสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (hematoxylin & eosin) การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction) และการเพาะเชื้อ เป็นต้น[42]



รูปที่ 14 ลักษณะของแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร[43]



รูปที่ 15 กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร[41]

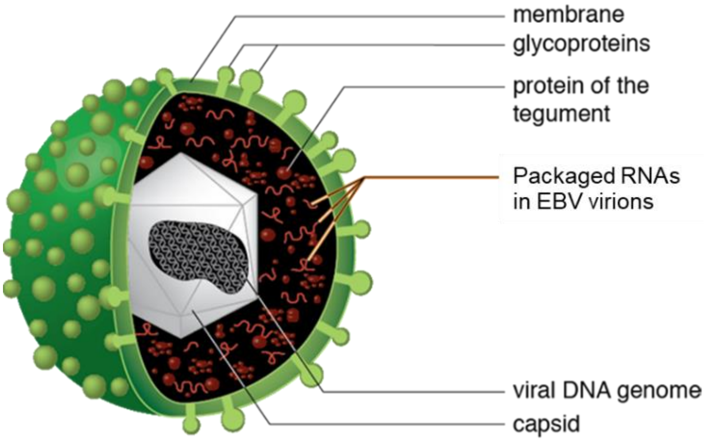
ไวรัสเอ็บสไตบาร์ (Epstein-Barr virus)

ไวรัสเอ็บสไตบาร์ (Epstein-Barr virus) มีขนาดเอนวิโลป (envelope) และแคปซิด (capsid) ประมาณ 120 และ 100 นาโนเมตร ตามลำดับ แคปซิดเป็นรูปเหลี่ยม 20 ด้าน (icosahedral) ภายในจีโนม (genome) ประกอบด้วย DNA สายคู่ (double stranded DNA) มีขนาดประมาณ 172 กิโลคู่เบส[44] ดังรูปที่ 16 สามารถแพร่กระจายเชื้อโดยง่ายผ่านทางน้ำลาย ในจำนวนผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารจากทั่วโลกพบว่ามีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์[45] หนึ่งในยีนของไวรัสเอ็บสไตบาร์ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในคน คือ *LMP1* ซึ่งจะสังเคราะห์โปรตีนที่จะไปยับยั้งกระบวนการ apoptosis นอกจากนี้ยังทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์อีกด้วย[44]

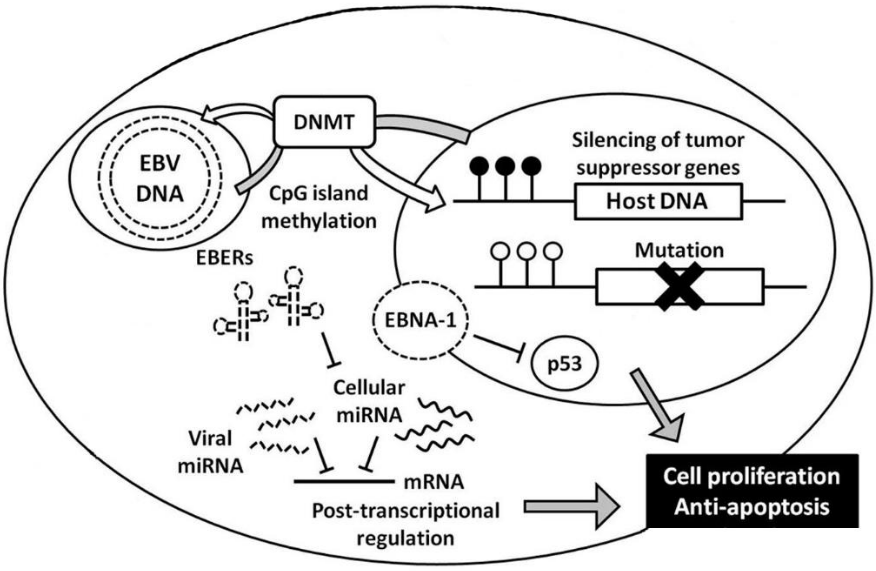
กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ ประกอบด้วย 4 กลไก ได้แก่ กลไกแรกดีเอ็นเอ (DNA) ของไวรัสไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltranferase, DNMT) ทำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เมื่อเกิดขึ้นกับกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ (tumor suppressor gene) จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ กลไกที่สองดีเอ็นเอของไวรัสทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ในกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ กลไกที่สามโปรตีนของไวรัสไปยับยั้งการทำงานของกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ และกลไกสุดท้ายอาร์เอ็นเอ (RNA) ของไวรัสไปยับยั้งกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอหลังกระบวนการถอดรหัส (post-transcriptional RNA processing) ซึ่งกลไลต่างๆ เหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และยับยั้งการเกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis)[45] ดังรูปที่ 17

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจโดยวิธี *in situ* hybridization การตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) และการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction) เป็นต้น[44]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 16 ลักษณะของไวรัสเอ็บสไตบาร์[46]

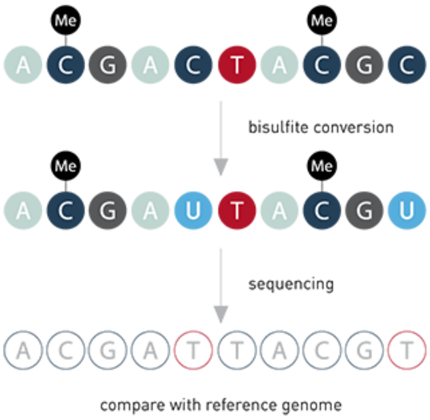


รูปที่ 17 กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์[45]

CHULALONGKORN UNIVERSITY

การทำไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ (bisulfite DNA)

การทำไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ (bisulfite DNA) ใช้สำหรับตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) โดยใช้ sodium bisulfite เปลี่ยนเบสของดีเอ็นเอที่ไม่มีเมทิลเลชันจากไซโตซิน (cytosine, C) ให้กลายเป็นยูราซิล (uracil, U) และไทมิน (thymine, T) ตามลำดับ ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีเมทิลเลชันจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว[47] ดังรูปที่ 18



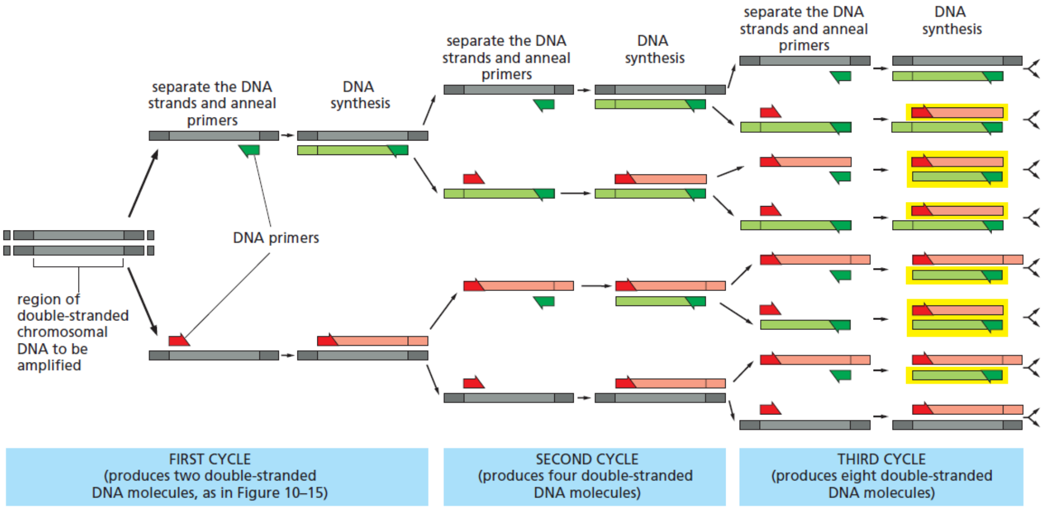
รูปที่ 18 ขั้นตอนการเปลี่ยนเบสของดีเอ็นเอ โดยการทำไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ[48]

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) จากนั้นนำดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ (primer) มาจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วเติมเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerase) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ทั้ง 4 ชนิด คือ อะดินิน (adenine, A) กัวนิน (guanine, G) ไทมิน (thymine, T) และไซโตซิน (cytosine, C) เพื่อเริ่มปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 1 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ในขั้นนี้ดีเอ็นเอสายคู่จะถูกแยกออกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนการเข้าจับคู่ (annealing) ในขั้นนี้ไพรเมอร์สายคู่สมจะเข้าจับคู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่อุณหภูมิประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส และขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ (extension) โดยใช้เอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอช่วยในการต่อนิวคลีโอไทด์กับไพรเมอร์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งมีลำดับเบสเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2^n เท่า เมื่อ n คือจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา[47, 49] ดังรูปที่ 19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 19 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส[50]

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ที่มีประจุโดยใช้สนามไฟฟ้า เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งสามารถใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และใช้อะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก[49]

real-time PCR

real-time PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) ร่วมกับการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ทำให้สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้นๆ ได้[51]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

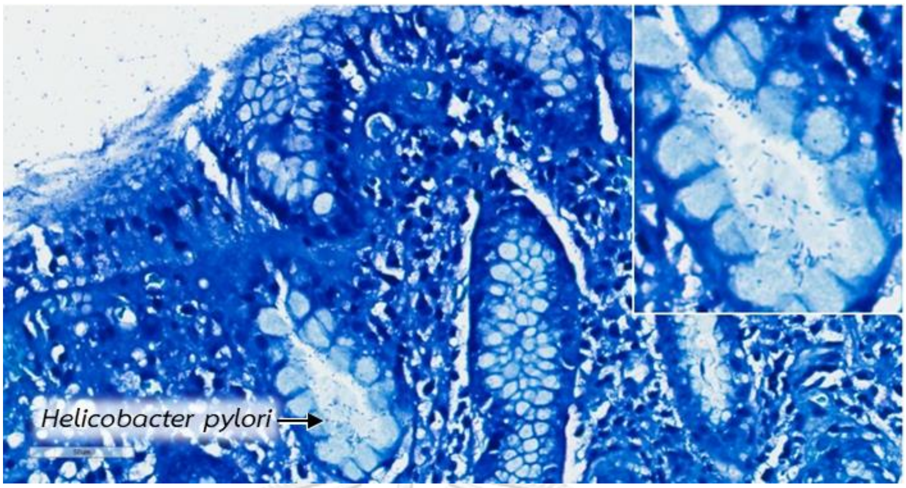
การย้อม hematoxylin และ eosin (H&E)

การย้อม hematoxylin และ eosin (H&E) เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อพื้นฐานทางจุลพยาธิวิทยา ใช้ในการเพิ่มความแตกต่างให้โครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยสี 2 ชนิด คือ hematoxylin มีเบสเป็นส่วนประกอบทำให้ย้อมติดสีน้ำเงินในโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่มีอนุมูลกรด เช่น นิวเคลียส (nucleus) และ eosin มีกรดเป็นส่วนประกอบทำให้ย้อมติดสีส้มอมแดงในโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่มีอนุมูลเบส เช่น ไซโทพลาซึม (cytoplasm) และโปรตีน[9]

การย้อม giemsa

การย้อม giemsa เป็นการย้อมสีพิเศษ (special stain) ทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร มีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) ร้อยละ 96 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 98[52] นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจทางพยาธิวิทยา

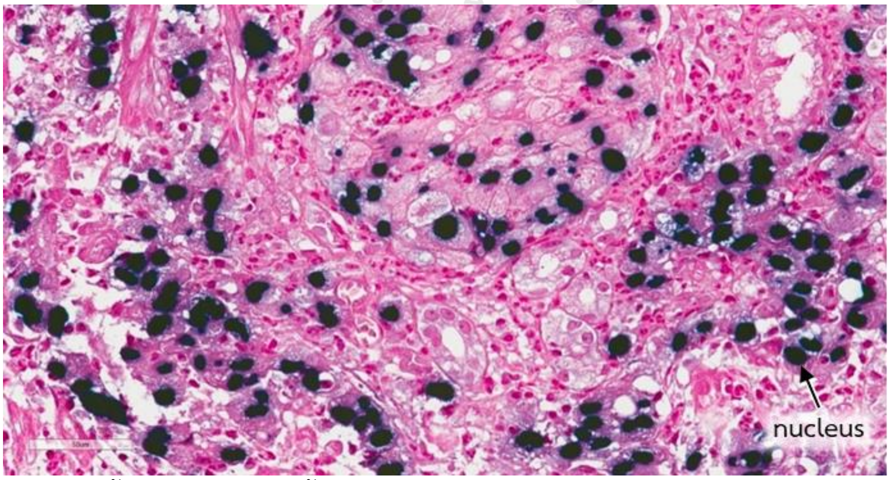
เพราะสามารถย้อมติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรได้โดยตรง นอกจากนี้ยังสามารถระบุตำแหน่งของชิ้นเนื้อในบริเวณที่มีการติดเชื้อได้ ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ลักษณะของแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa ที่กำลังขยาย 400 เท่า มีลักษณะเป็นเส้นบางๆ ย้อมติดสีน้ำเงิน

การย้อม EBV-encoded small RNA (EBER)

การย้อม EBV-encoded small RNA (EBER) เป็นการย้อมโครโมจินิกอินซิตูไฮบริไดเซชั่น (chromogenic *in situ* hybridization, CISH) ซึ่งถือเป็นวิธีตรวจสอบมาตรฐาน (gold standard test) ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ เนื่องจากมีความแม่นยำสูง โดยมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 94 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 69 การตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ได้ทั้งในระยะแบ่งตัว (lytic) และระยะแอบแฝง (latency)[53] ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ลักษณะเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยการย้อม EBER ที่กำลังขยาย 400 เท่า ย้อมติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร ได้แก่ การเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อดังกล่าวกับการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ ของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารเพียงเล็กน้อย ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ เพื่อประโยชน์ในการพยากรณ์ และป้องกันโรคต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

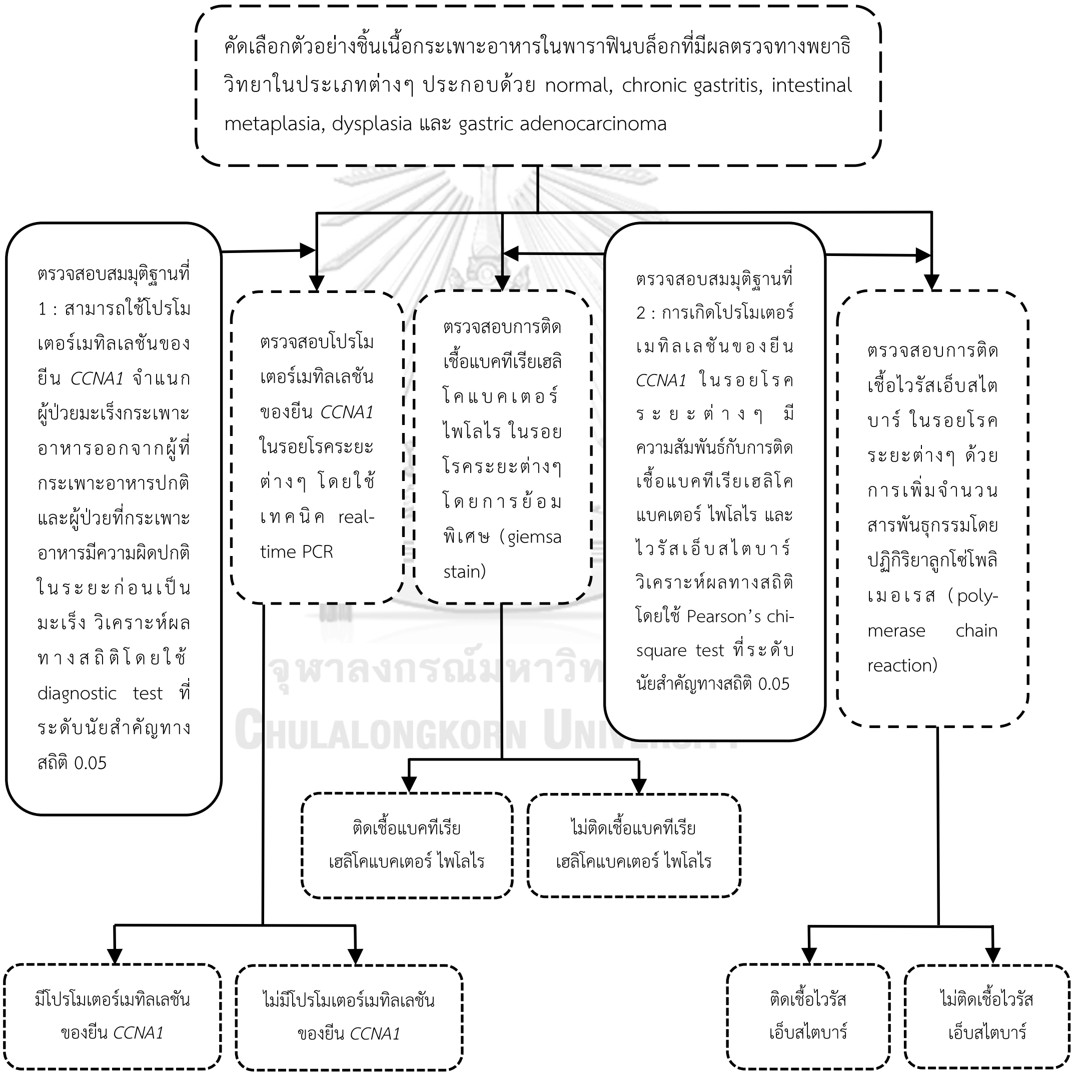
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

งานวิจัยนี้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข IRB 089/60

กรอบความคิดงานวิจัย



รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (cross-sectional descriptive design)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1) กล้องจุลทรรศน์ ชนิด 2 ตา (Motic, China)
2) เครื่องเขย่าสาร (Scientific Industries, USA)
3) เครื่องควบคุมการดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Integra Biosciences, Switzerland)
4) เครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับสารพันธุกรรม (Perkin elmer, USA)
5) เครื่องชั่งสารดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
6) เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 10 ไมโครลิตร (Transferpette, Germany)
7) เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
8) เครื่องถ่ายภาพเจล (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
9) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Hirayama, Japan)
10) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Biobase, China)
11) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
12) เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Millipore, France)
13) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Eppendorf, Germany)
14) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง (Thermo Scientific, USA)
15) เครื่องย้อมสิ่งส่งตรวจทางอิมมูโนฮีสโตเคมี และอินซิตูไฮบริไดเซชั่น (Ventana, USA)
16) เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific, USA)
17) เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Thermo Electron Corporation, USA)
18) เครื่องสแกนสไลด์ (Leica, Germany)
19) เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Enduro, USA)
20) ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Japan)
21) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
22) ตู้ดูดควัน (S.K. Powerable, Thailand)
23) ตู้ปลอดเชื้อ (S.K. Powerable, Thailand)
24) ตู้อบ (Memmert, Germany)
25) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1) กระจกปิดสไลด์ (Thermo Scientific, Germany)
2) กระจกสไลด์ (Marienfeld, Germany)
3) กระบอกตวงขนาด 20, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Vitlab, Germany)
4) ถาดเตรียมเจลพร้อมหวี (Bio-Rad, USA)
5) ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (Sri Trang Gloves, Thailand)
6) แท่นวางหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Autopack, USA)
7) บีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
8) พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
9) ภาชนะสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง ชนิด plate 96 หลุม (Thermo Fisher Scientific, USA)
10) ไมโครปิเปตทิปขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
11) หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
   1.1) absolute ethanol (Merck, Germany)
   1.2) ammonium acetate (Merck, Germany)
   1.3) chloroform (Merck, Germany)
   1.4) EDTA (Affymetrix, USA)
   1.5) phenol (USB, USA)
   1.6) proteinase K (USB, USA)
   1.7) sodium chloride (Merck, Germany)
   1.8) sodium dodecyl sulfate (Calbiochem, Japan)
   1.9) xylene (Merck, Germany)
2) สารเคมีที่ใช้ในการทำไบซัลไฟต์ทรีเมนท์
   2.1) EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo research, USA)
3) สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR
   3.1) 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
   3.2) 10mM deoxynucleotide triphosphates (Promega, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3) 25mM magnesium chloride (Qiagen, Germany)
3.4) hot start Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany)
3.5) oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)

4) สารเคมีใช้ในการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis)
4.1) 25 basepair DNA ladder (Promega, USA)
4.2) acrylamide (Bio-Rad, USA)
4.3) ammonium peroxodisulfate (Affymetrix, USA)
4.4) boric acid (Affymetrix, USA)
4.5) bromophenol blue (Merck, Germany)
4.6) EDTA (Affymetrix, USA)
4.7) ficoll (Sigma-Aldrich, USA)
4.8) SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
4.9) TEMED (Merck, Germany)
4.10) tris (Affymetrix, USA)

5) สารเคมีใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงด้วยวิธี real-time PCR
5.1) fluorogenic probe (Biosearch Technologies, USA)
5.2) hot start Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany)
5.3) oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)
5.4) TagMan GTXpress master mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

6) สารเคมีใช้ในการย้อม hematoxylin และ eosin (H&E)
6.1) absolute ethanol (Merck, Germany)
6.2) eosin solution (C.V. Laboratories, Thailand)
6.3) modifide hematoxylin solution (C.V. Laboratories, Thailand)
6.4) mounting medium (Thermo Scientific, USA)
6.5) xylene (Merck, Germany)

7) สารเคมีใช้ในการย้อม giemsa
7.1) absolute ethanol (Merck, Germany)
7.2) giemsa solution (C.V. Laboratories, Thailand)
7.3) mounting medium (Thermo Scientific, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7.4) xylene (Merck, Germany)

8) สารเคมีใช้ในการย้อม EBV-encoded small RNA (EBER)

8.1) ISH iVIEW Blue Detection Kit (Ventana, USA)

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

1) GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA)
2) IBM SPSS Statistics 22 (IBM, USA)
3) ImageScope (Leica, Germany)
4) QuantStudio^{TM} Real-Time PCR Software (Thermo Scientific, USA)
5) Storm865 Scanner control (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)

การกำหนดขนาดตัวอย่าง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความแตกต่างของข้อมูลชนิดนับในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (two independent groups) ซึ่งใช้สูตรในการคำนวณหาขนาดตัวอย่างดังนี้[54]

$$n=\left(Z_{\alpha/2}\sqrt{2P_1Q_1}+Z_{\beta}\sqrt{P_2Q_2+P_1Q_1}\right)^2/\left(P_2-P_1\right)^2$$

โดย n คือจำนวนตัวอย่าง

α คือโอกาสของความผิดพลาดในการปฏิเสธสมมติฐานที่ถูกต้อง (type I error) โดยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ α มีค่าเท่ากับ 0.05

β คือโอกาสของความผิดพลาดในการยอมรับสมมติฐานที่ผิด (type II error) โดยที่ระดับอำนาจทางสถิติ (statistical power) 90 เปอร์เซ็นต์ β มีค่าเท่ากับ 0.1

Z คือค่าปกติมาตรฐาน โดยที่ $Z_{\alpha/2}$ มีค่าเท่ากับ 1.96 และ Z_{β} มีค่าเท่ากับ 1.28

P_1 คืออัตราการเกิดเหตุการณ์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 0.05

P_2 คืออัตราการเกิดเหตุการณ์ในกลุ่มศึกษา ซึ่งในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 0.63

Q มีค่าเท่ากับ 1-P

เมื่อแทนค่าต่างๆ ลงในสมการ พบว่า n มีค่าเท่ากับ 5 หมายความว่าในงานวิจัยนี้ต้องใช้ตัวอย่างอย่างน้อยกลุ่มละ 5 ตัวอย่าง จึงจะเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสาคัญ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในกระบวนการก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมากในการหาความสัมพันธ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าที่คำนวณได้จากสมการ โดยใช้ตัวอย่างในกลุ่ม normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma จำนวน 19, 36, 40, 15 และ 33 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้นจำนวน 143 ตัวอย่าง

การคัดเลือกตัวอย่าง

การวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารในพาราฟินบล็อก โดยคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2549-2559 ที่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาในประเภทต่างๆ ประกอบด้วย

1) normal	19	ราย
2) chronic gastritis	36	ราย
3) intestinal metaplasia	40	ราย
4) dysplasia	15	ราย
5) gastric adenocarcinoma	33	ราย

การตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก

มีขั้นตอนการตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก ดังนี้

1) ตัดชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนา 2 ไมโครเมตร
2) นำแผ่นเนื้อเยื่อมาลอยบนผิว 70% ethanol และน้ำที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เพื่อให้แผ่นเนื้อเยื่อตึง จากนั้นจึงนำแผ่นสไลด์มาช้อนแผ่นเนื้อเยื่อ
3) อบสไลด์อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อแห้งสนิท

การกำจัดพาราฟินออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

มีขั้นตอนการกำจัดพาราฟินออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ ดังนี้

1) แช่สไลด์ใน xylene 1 2 และ 3 รวมเป็นเวลา 10 นาที
2) จุ่มสไลด์ขึ้นลงใน absolute ethanol 1 2 และ 3 ภาชนะละ 10 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การย้อม hematoxylin และ eosin (H&E)

การย้อม hematoxylin และ eosin (H&E) เพื่อตรวจสอบระยะของรอยโรค มีขั้นตอนดังนี้

1) ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อกให้มีความหนา 2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปตรึงบนแผ่นสไลด์
2) กำจัดพาราฟินออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ
3) แช่สไลด์ลงในอ่างที่มีน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 1 นาที เพื่อเอาน้ำเข้าชิ้นเนื้อ จากนั้นล้างน้ำกลั่น แล้วสะบัดสไลด์ให้แห้งมากที่สุด
4) แช่สไลด์ลงในอ่างสี hematoxylin ทิ้งไว้ 5 นาที
5) แช่สไลด์ลงในอ่างที่มีน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างสี hematoxylin ส่วนเกิน
6) จุ่มสไลด์ขึ้นลงในอ่าง 95% ethanol 10 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อ

7) แช่สไลด์ลงในอ่างสี eosin ทิ้งไว้ 5 นาที
8) จุ่มสไลด์ขึ้นลงในอ่าง 95% ethanol 1 และ 2 แล้วจุ่มสไลด์ขึ้นลงในอ่าง absolute ethanol 1 และ 2 อ่างละ 10 ครั้ง ตามลำดับ เพื่อล้างสี eosin ส่วนเกิน
9) จุ่มสไลด์ขึ้นลงในอ่าง xylene 1 และ 2 อ่างละ 10 ครั้ง ตามลำดับ เพื่อให้ xylene เข้าไปแทนที่ ethanol และเป็นสื่อนำให้ mounting medium แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างทั่วถึง
10) mount สไลด์ด้วย mounting medium

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อในพาราฟินบล็อก

มีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อในพาราฟินบล็อก ดังนี้

1) ตัดพาราฟินบล็อกหนา 10 ไมโครเมตร ประมาณ 3 – 4 แผ่น (ขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นเนื้อ) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2) เติม xylene 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วดูด xylene ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 2 ครั้ง
3) เติม absolute alcohol 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด absolute alcohol ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 2 รอบ
4) เติม lysis buffer II 500 ไมโครลิตร 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 50 ไมโครลิตร และ proteinase K 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1 วัน หรือจนกว่าเนื้อจะย่อยหมด
5) เติมสารละลาย phenol-chloroform 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
6) ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
7) เติม 10M NH_4COOCH_3 250 ไมโครลิตร และ absolute alcohol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex
8) เพิ่มการตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน
9) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
10) เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอนสีขาว
11) เติม 70% alcohol 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
12) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
13) เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอน และรอให้แห้ง

14) เติมน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 วัน
15) วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop

การทำไบซัลไฟต์

ใช้ชุดทดสอบ EZ DNA methylation ของบริษัท Zymo research ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่ได้จับกับหมู่เมทิลให้กลายเป็นเบสยูราซิล โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 750 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
2) เตรียมน้ำยา CT conversion โดยการเติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร M-dilution buffer 300 ไมโครลิตร และ M-dissolving buffer 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 10 นาที
3) เติมน้ำยา CT conversion 130 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่มีดีเอ็นเอ แล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง
4) บ่มที่อุณหภูมิ 98 และ 67 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตามลำดับ จากนั้นสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 20 ชั่วโมง
5) เติม M-binding buffer 600 ไมโครลิตร และตัวอย่างดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นกลับคอลัมน์ขึ้นลง 3-5 ครั้ง เพื่อให้สารเคมีในหลอดทำปฏิกิริยากันอย่างทั่วถึง
6) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายส่วนล่างทิ้ง
7) เติม M-wash buffer 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 30 วินาที
8) เติม M-desulphonation buffer 200 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 30 วินาที
9) เติม M-wash buffer 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 30 วินาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเทสารละลายส่วนล่างทิ้ง
10) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเอาคอลัมน์ส่วนล่างทิ้ง
11) นำหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่มาต่อกับคอลัมน์ส่วนบน
12) เติม M-elution buffer 10 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
13) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้างตัวอย่างไบซัลไฟต์ดีเอ็น จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค real-time PCR

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* มีขั้นตอนดังนี้

1) สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อในพาราฟินบล็อก
2) การทำไบซัลไฟต์
3) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้สารเคมีและสภาวะ ดังตารางที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ และโพรบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยเทคนิค real-time PCR

ไพรเมอร์ และโพรบ	ลำดับเบส (5’ → 3’)
beta-actin probe[55]	Cy5-AAGGTGAAYGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGG-BHQ
beta-actin forward primer[55]	GTGTATTTGATTTTTGAGGAGA
beta-actin reverse primer[55]	CCTTAATACCAACCTACCCAA
CCNA1 probe	FAM-CGTAGTTTCGAGGATTTCGCGTCG-MGB
CCNA1 forward primer	GGCGTCGTAGTTTGCGTAG
CCNA1 reverse primer	TACGCGACCCGCTCCTAAA

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยเทคนิค real-time PCR

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
TagMan GTXpress master mix	10
10 µM *beta-actin* forward primer	0.4
10 µM *beta-actin* reverse primer	0.4
10 µM *beta-actin* probe	0.4
10 µM *CCNA1* forward primer	0.4
10 µM *CCNA1* reverse primer	0.4
10 µM *CCNA1* probe	0.4
hot start Tag polymerase	0.1
dH_2O	5.5
bisulfite DNA	2
รวมทั้งหมด	20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยเทคนิค real-time PCR

ขั้นตอน		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	หมายเหตุ
holding stage	step 1	50	2 นาที	
	step 2	95	10 นาที	
cycling stage	step 1	95	15 วินาที	60 รอบ
	step 2	59	1 นาที	
holding stage	step 1	72	7 นาที	

4) แปลผลโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* จาก amplification plot

การย้อม giemsa

การย้อม giemsa เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร มีขั้นตอนดังนี้

1) ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อกให้มีความหนา 2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปตรึงบนแผ่นสไลด์
2) กำจัดพาราฟินออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ
3) แช่สไลด์ลงในอ่างที่มีน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 1 นาที เพื่อเอาน้ำเข้าชิ้นเนื้อ จากนั้นล้างน้ำกลั่น แล้วสะบัดสไลด์ให้แห้งมากที่สุด
4) หยดสี working giemsa solution ลงบนเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ 30 นาที
5) ล้างด้วยน้ำกลั่น
6) อบสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
7) mount สไลด์ด้วย mounting medium

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction)

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ มีขั้นตอนดังนี้

1) สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อในพาราฟินบล็อก
2) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้สารเคมีและสภาวะ ดังตารางที่ 4, 5 และ 6

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5’ → 3’)
LMP1 forward primer[56]	CCAGACAGCAGCCAATTGTC
LMP1 reverse primer[56]	GGTAGAAGACCCCCTCTTAC
GAPDH forward primer	CAGCCGCATCTTCTTTTG
GAPDH reverse primer	GCCCAATACGACCAAATC

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10 mM dNTP	0.2
10X buffer	1
25 mM $MgCl_2$	0.4
Tag polymerase	0.1
10 µM *LMP1* forward primer	0.1
10 µM *LMP1* reverse primer	0.1
10 µM *GAPDH* forward primer	0.1
10 µM *GAPDH* reverse primer	0.1
dH_2O	6.9
DNA	1
รวมทั้งหมด	10

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
initial denature	95	15	
denature	95	1	
annealing	64.2	1	40 รอบ (denature, annealing, extension)
extension	72	1	
final extension	72	7	
hold	4	∞	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3) เตรียมอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารเคมี ดังตารางที่ 7 ใส่ลงในกระจกที่มีความหนา 1.5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอะคริลาไมด์เจล

สารเคมี	ปริมาตร
40% acrylamide	2 มิลลิลิตร
10X TBE	1 มิลลิลิตร
dH_2O	7 มิลลิลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร
10% APS	100 ไมโครลิตร
รวมทั้งหมด	10 มิลลิลิตร

4) ผสมดีเอ็นเอกับ 6X bromophenol blue loading dye 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นโหลดดีเอ็นเอลงในเจล
5) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับ 25 bp ladder
6) จ่ายกระแสไฟ 120 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที
7) นำเจลออกจากกระจก จากนั้นย้อมเจลด้วย SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที
8) ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Image scanner (STROM) ยี่ห้อ GE Healthcare

การย้อม EBV-encoded small RNA (EBER)

การย้อม EBV-encoded small RNA (EBER) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ มีขั้นตอนดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1) ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อกให้มีความหนา 2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปตรึงบนแผ่นสไลด์
2) ติดบาร์โค้ดย้อม EBER ลงบนแผ่นสไลด์
3) เรียงสไลด์ไว้บนแท่นวางสไลด์ของเครื่องย้อมสิ่งส่งตรวจทางอิมมูโนฮีสโตเคมี และอินซิตูไฮบริไดเซชั่น ยี่ห้อ Ventana รุ่น Benchmark XT
4) วางสารเคมีต่างๆ ได้แก่ Ventana ISH protease 2, INFORM EBER (Epstein-Barr virus early RNA) probe, nuclear fast red counterstain และ ISH iVIEW Blue Detection Kit ซึ่งประกอบด้วย anti-fluorescein, biotinylated ig, streptavidin alkaline phosphatase, enhancer, NBT และ BCIP ลงบนเครื่องย้อม

5) ตั้งเวลาสำหรับกระบวนการย้อม โดยบ่มด้วย Ventana ISH protease 2 เป็นเวลา 8 นาที และย้อมด้วย nuclear fast red counterstain 2 เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นจึงเริ่มกระบวนการย้อม
6) นำสไลด์ออกจากเครื่องเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย้อม
7) จุ่มสไลด์ขึ้นลงในอ่าง absolute ethanol 1 และ 2 อ่างละ 10 ครั้ง ตามลำดับ เพื่อนำน้ำ และของเหลวต่างๆ ออกจากชิ้นเนื้อ
8) จุ่มสไลด์ขึ้นลงในอ่าง xylene 1 และ 2 อ่างละ 10 ครั้ง ตามลำดับ เพื่อให้ xylene เข้าไปแทนที่ ethanol และเป็นสื่อนำให้ mounting medium แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างทั่วถึง
9) mount สไลด์ด้วย mounting medium

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

1) การศึกษาการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ

ตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิค real-time PCR ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม แล้วอ่านผลจาก amplification plot ซึ่งสามารถแปลผลได้ 2 แบบ คือ มี และไม่มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* จากนั้นรายงานผลตัวอย่างที่มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันเป็นเปอร์เซ็นต์ รวมทั้งวิเคราะห์ผลโดยทำการทดสอบวินิจฉัย (diagnostic test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ผ่านเว็บ https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php

2) การศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรในรอยโรคระยะต่างๆ

ตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรในรอยโรคระยะต่างๆ โดยการย้อม giemsa แล้วนำมาอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถแปลผลได้ 2 แบบ คือ มี และไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร จากนั้นรายงานผลการติดเชื้อเป็นเปอร์เซ็นต์

3) การศึกษาการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในรอยโรคระยะต่างๆ

ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในรอยโรคระยะต่างๆ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม แล้วอ่านผลจากอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis) ซึ่งสามารถแปลผลได้ 2 แบบ คือ มี และไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ จากนั้นรายงานผลการติดเชื้อเป็นเปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในกลุ่ม dysplasia และ gastric adenocarcinoma โดยการย้อม EBER แล้วนำมาอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งสามารถแปลผลได้ 2 แบบ คือ มี และไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ จากนั้นรายงานผลการติดเชื้อเป็นเปอร์เซ็นต์

4) การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์

วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 22 โดยใช้ Pearson’s chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของตัวอย่างที่มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับจำนวนของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

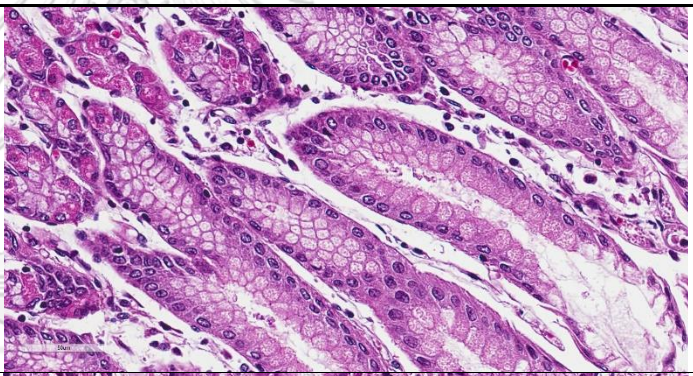
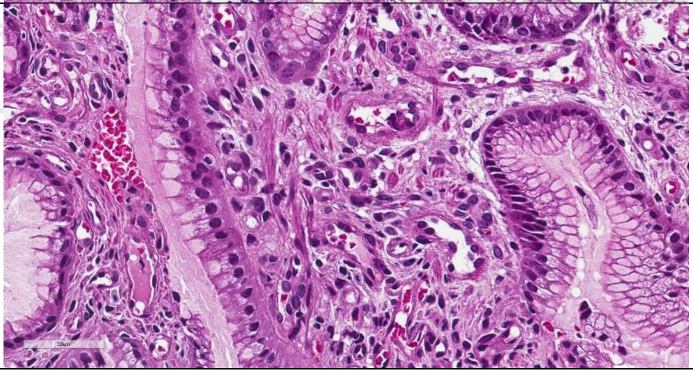
บทที่ 4

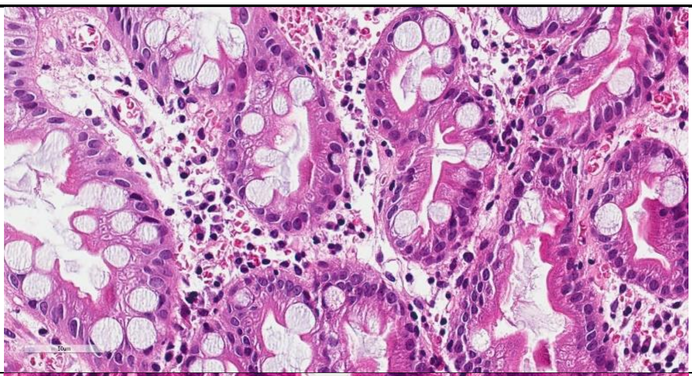
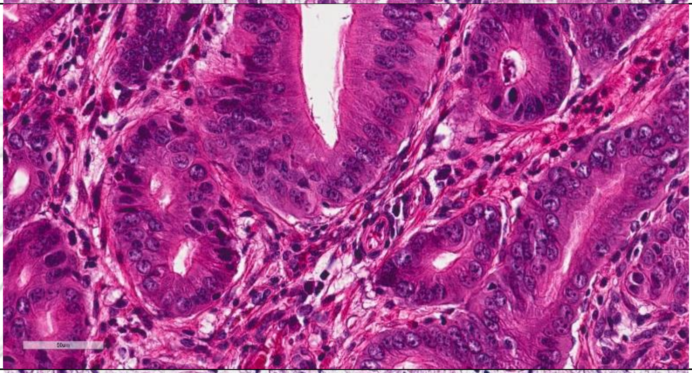
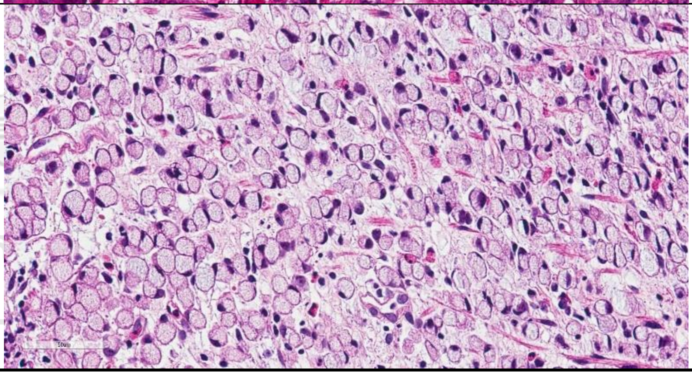
ผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบระยะของรอยโรค โดยการย้อม hematoxylin และ eosin (H&E)

เมื่อคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารในพาราฟินบล็อกที่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาในประเภทต่างๆ เรียบร้อยแล้ว จึงนำตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าวมาตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ผลการตรวจสอบพบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งหมดที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในงานวิจัยมีบริเวณที่เป็นรอยโรคเหลืออยู่ตรงตามผลตรวจทางพยาธิวิทยา ดังตารางที่ 8, 9

ตารางที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารในรอยโรคระยะต่างๆ โดยการย้อม H&E

ระยะของรอยโรค	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาโดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า
normal	
chronic gastritis	

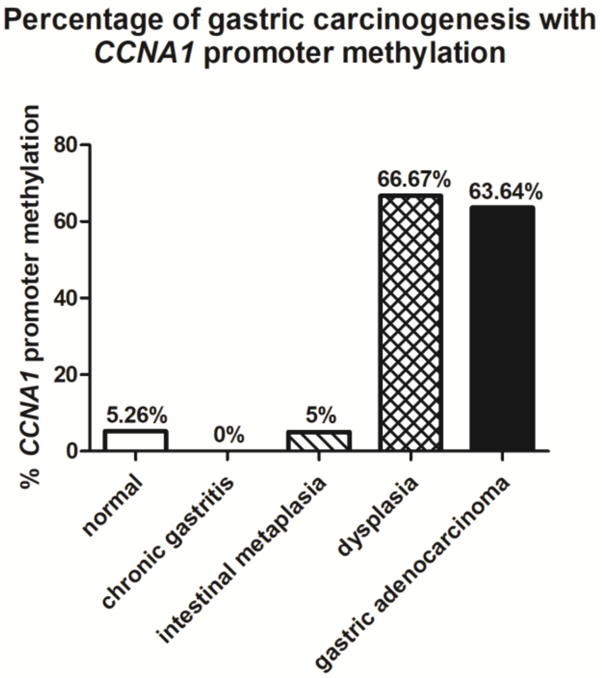
ระยะของรอยโรค	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาโดยการย้อม H&E ที่กำลังขยาย 400 เท่า
intestinal metaplasia	
dysplasia	
gastric adenocarcinoma	

ตารางที่ 9 รายละเอียดของตัวอย่างที่นำมาใช้ในงานวิจัย โดยจำแนกตามการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

ระยะของรอยโรค	จำนวน (ราย)	เพศ (ราย)		อายุ (ปี)	
		ชาย	หญิง	ต่ำสุด-สูงสุด	มัธยฐาน
normal	19	10	9	18-93	55
chronic gastritis	36	16	20	31-86	65
intestinal metaplasia	40	16	24	22-85	62
dysplasia	15	7	8	49-92	72
gastric adenocarcinoma	33	11	22	27-94	63

ผลการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* โดยใช้เทคนิค real-time PCR

เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ และเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์และโพรบ 2 คู่ คือ *beta-actin* เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ และ *CCNA1* เพื่อตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* จากนั้นอ่านผลด้วย amplification plot พบว่ากลุ่ม normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชัน 5.26, 0, 5, 66.67 และ 63.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแผนภูมิที่ 1 และตารางที่ 10



แผนภูมิที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างในรอยโรคระยะต่างๆ ที่มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 10 รายละเอียดของตัวอย่างที่พบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

ระยะของรอยโรค	จำนวน (ราย)	มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*	
		ราย	%
normal	19	1	5.26
chronic gastritis	36	0	0.00
intestinal metaplasia	40	2	5.00
dysplasia	15	10	66.67
gastric adenocarcinoma	33	21	63.64

จากนั้นวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ด้วยการทดสอบวินิจฉัย (diagnostic test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ผ่านเว็บ https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php โดยนำกลุ่มของรอยโรคทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma มาจัดกลุ่มใหม่เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม non-cancer ประกอบด้วยตัวอย่างในกลุ่ม normal, chronic gastritis และ intestinal metaplasia และกลุ่ม premalignant & malignant ประกอบด้วยตัวอย่างในกลุ่ม dysplasia และ gastric adenocarcinoma ดังตารางที่ 11, 12

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างที่ได้รับการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

ระยะของรอยโรค	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*		จำนวนทั้งหมด (ราย)
	มี	ไม่มี	
normal	1	18	19
chronic gastritis	0	36	36
intestinal metaplasia	2	38	40
dysplasia	10	5	15
gastric adenocarcinoma	21	12	33
จำนวนทั้งหมด (ราย)	34	109	143

ตารางที่ 12 รายละเอียดของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบวินิจฉัย

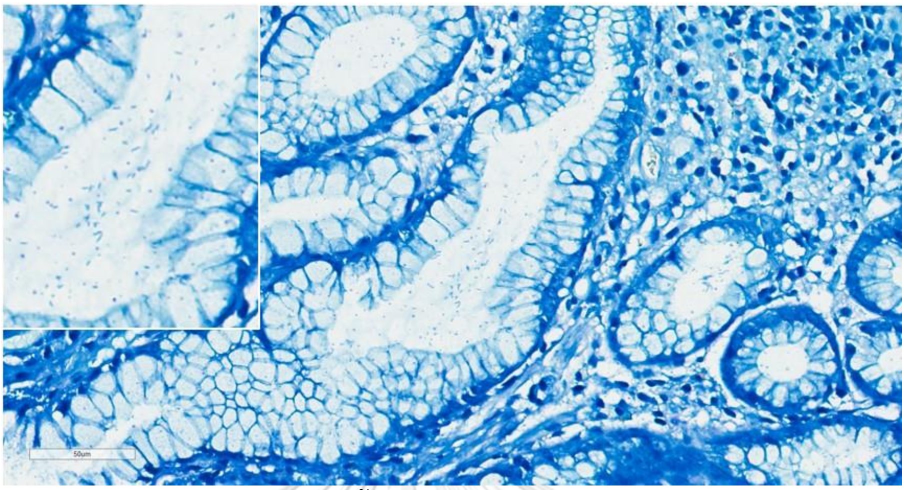
โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1	รอยโรค	
	premalignant & malignant	non-cancer
มี	31	3
ไม่มี	17	92

จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในกลุ่ม premalignant & malignant และ non-cancer พบว่ามีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) ร้อยละ 64.58 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 96.84 ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ร้อยละ 91.18 และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) ร้อยละ 84.40

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

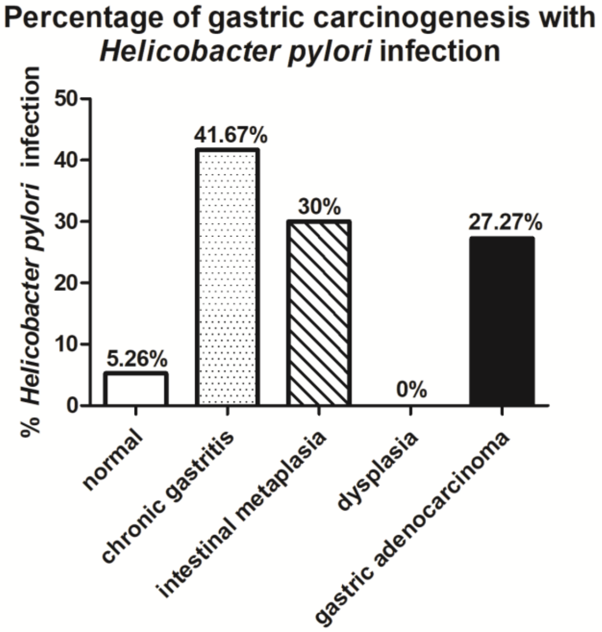
ผลการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa

เมื่อนำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อม giemsa มาอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะมองเห็นเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร ติดสีน้ำเงินในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ ดังภาพที่ 22



รูปที่ 22 ลักษณะของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa ที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร ในรอยโรคระยะต่างๆ พบว่าตัวอย่างในกลุ่ม normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma มีการติดเชื้อ 5.26, 41.67, 30, 0 และ 27.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดัง แผนภูมิที่ 2 และตารางที่ 13



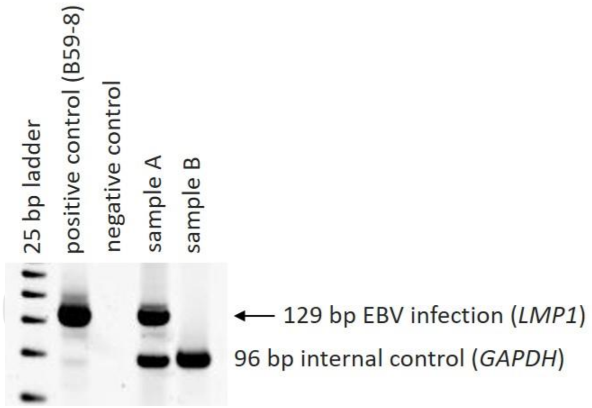
แผนภูมิที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างในรอยโรคระยะต่างๆ ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร

ตารางที่ 13 รายละเอียดของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร

ระยะของรอยโรค	จำนวน (ราย)	พบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร	
		ราย	%
normal	19	1	5.26
chronic gastritis	36	15	41.67
intestinal metaplasia	40	12	30.00
dysplasia	15	0	0.00
gastric adenocarcinoma	33	9	27.27

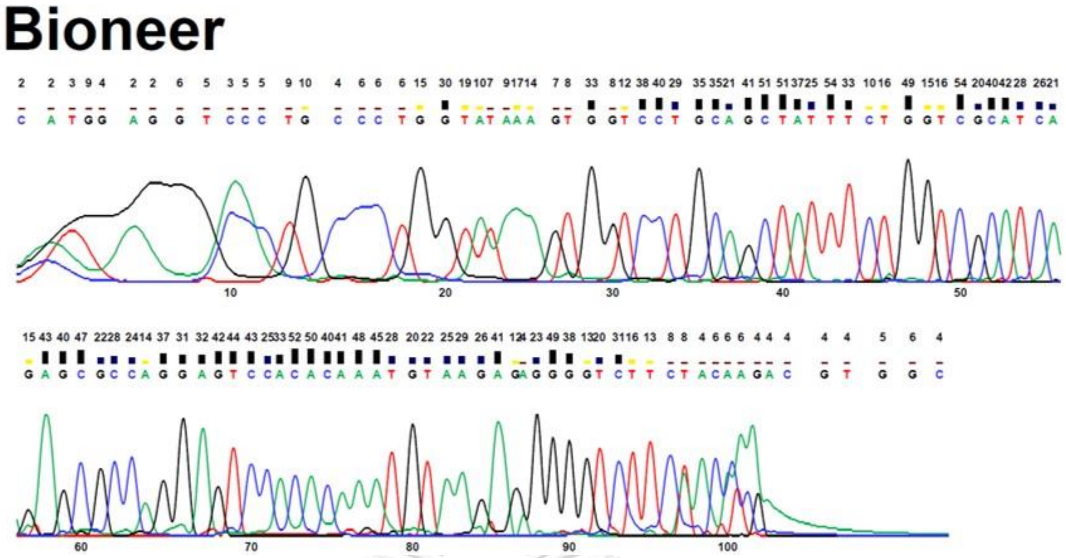
ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส และการย้อม EBV-encoded small RNA (EBER)

เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ และเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ *GAPDH* เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ และ *LMP1* เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ ซึ่งหากมีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จะสามารถพบ PCR product ขนาด 129 bp เมื่อนำมาผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง A มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ ในขณะที่ตัวอย่าง B ไม่มีการติดเชื้อ

จากนั้นนำ PCR product ของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์บางส่วนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม (Genbank) ด้วยโปรแกรม BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) จากการตรวจสอบพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเอ็บสไตบาร์จากฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 24, 25



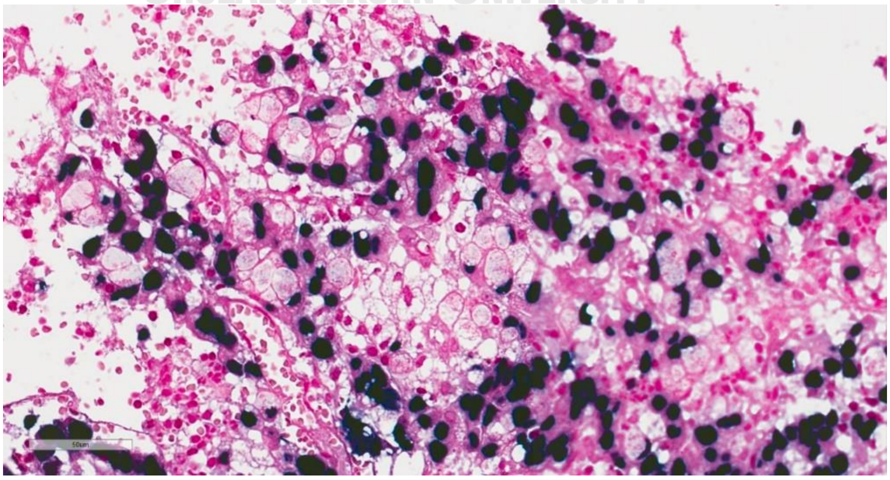
รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Epstein-Barr virus (EBV) genome, strain B95-8	134	1474	100%	3e-28	99%	V01555.2

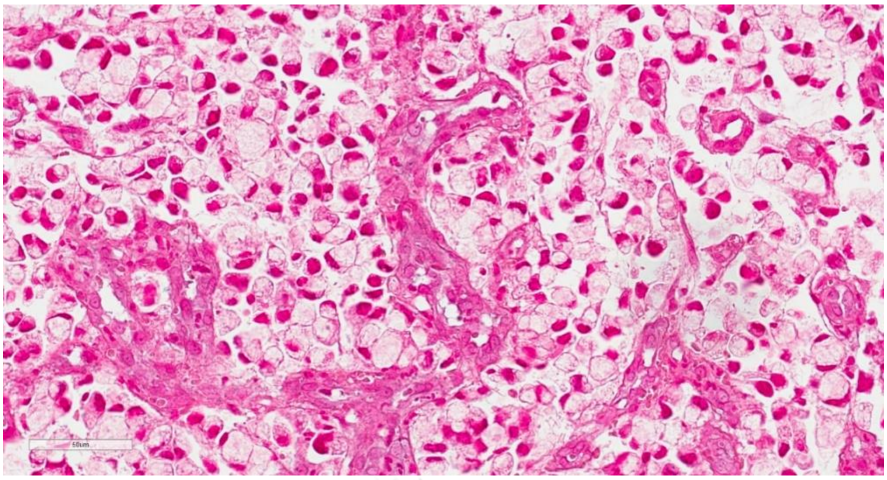
รูปที่ 25 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ ด้วยโปรแกรม BLAST

อย่างไรก็ตามไวรัสเอ็บสไตบาร์สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของผู้ติดเชื้อ (host) ได้ทั้งในลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงมีการพิสูจน์หาตำแหน่งที่มีการติดเชื้อในกลุ่ม dysplasia และ gastric adenocarcinoma โดยการย้อม EBER เพิ่มเติมในตัวอย่างที่ตรวจพบการติดเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส จากนั้นนำมาอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จะย้อมติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส แต่หากไม่มีการติดเชื้อจะไม่พบลักษณะดังกล่าว ดังรูปที่ 26, 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

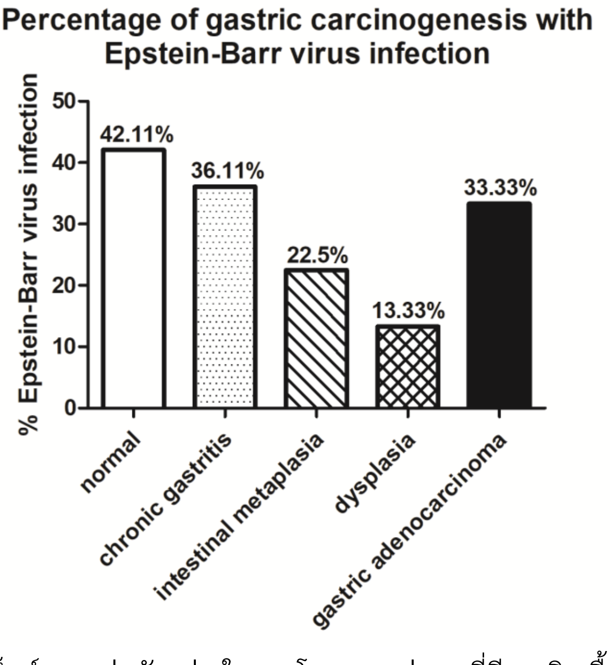


รูปที่ 26 ลักษณะของตัวอย่างที่มีการติดไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยการย้อม EBER ที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 27 ลักษณะของตัวอย่างที่ไม่มีการติดไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยการย้อม EBER ที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส พบว่ากลุ่ม normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma มีการติดเชื้อ 42.11, 36.11, 22.50, 13.33 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแผนภูมิที่ 3 และตารางที่ 17 แต่เมื่อนำตัวอย่างที่มีการติดเชื้อมาตรวจสอบอีกครั้งโดยการย้อม EBER พบการติดเชื้อในกลุ่ม dysplasia และ gastric adenocarcinoma เป็น 0 และ 12.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 14



แผนภูมิที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างในรอยโรคระยะต่างๆ ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์

ตารางที่ 14 รายละเอียดของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์

ระยะของรอยโรค	จำนวน (ราย)	พบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์			
		ทำ PCR		ย้อม EBER	
		ราย	%	ราย	%
normal	19	8	42.11	-	-
chronic gastritis	36	13	36.11	-	-
intestinal metaplasia	40	9	22.50	-	-
dysplasia	15	2	13.33	0	0.00
gastric adenocarcinoma	33	11	33.33	4	12.12

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 22 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ของตัวอย่างในกลุ่ม normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma โดยใช้ Pearson’s chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่าไม่พบความความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ในทุกระยะของรอยโรค (p-value > 0.05) ซึ่งได้แสดงรายละเอียดการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ของแต่ละตัวอย่างไว้ในตารางที่ 15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ในกลุ่มตัวอย่าง โดยกำหนดให้ช่อง 1 คอลัมน์ แทนตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง

normal																			
โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□

chronic gastritis																																				
โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□

intestinal metaplasia																																								
โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□

dysplasia															
โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□
การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	□	□	□	□

gastric adenocarcinoma																																	
โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□
การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	□	□	□	□	□

■ หมายถึง มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*
หรือมีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร
หรือมีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์

□ หมายถึง ไม่มีโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1*
หรือไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร
หรือไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่าง (demographic data) จากการคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารในรอยโรคต่างๆได้แก่ normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma ของภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2549-2559 รวมเป็นจำนวนทั้งสิ้น 143 ตัวอย่าง พบว่าผู้ป่วยในกลุ่ม chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma มีอายุอยู่ในช่วง 31-86, 22-85, 49-92 และ 27-94 ปี ตามลำดับ โดยในแต่ละกลุ่มพบผู้ป่วยที่ป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ซึ่งแตกต่างจากรายงานของโรงพยาบาลจุฬาภรณ์ที่พบว่าเพศชายมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารสูงกว่าเพศหญิง 2 เท่า[23]

ยีน *CCNA1* เป็นยีนในกลุ่มของ cyclin A ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมวงจรเซลล์ (cell cycle) โดยการทำงานของโปรตีน *CCNA1* จะถูกเหนี่ยวนำผ่าน *p53* pathway ส่งผลให้กระบวนการแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์เกิดขึ้นได้ตามปกติ[57] ผลการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าในกลุ่ม dysplasia และ gastric adenocarcinoma พบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* เท่ากับ 66.67 และ 63.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในกลุ่ม normal และ intestinal metaplasia ที่พบ 5.26 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในกลุ่ม chronic gastritis ซึ่งไม่พบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชัน อย่างเห็นได้ชัด จากผลดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ส่งผลให้กระบวนการตายของเซลล์ทำงานผิดปกติ ทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ A. Rivera และคณะในปี 2006[57] อย่างไรก็ตามกระบวนการดังกล่าวอาจเกิดร่วมกับการทำงานของยีนอื่นผ่านการทำงานของ *p53* pathway ดังเช่นงานวิจัยของ Mina Waraya และคณะในปี 2015 ที่ได้ศึกษาการเกิดเมทิลเลชันของยีน *PGP9.5*, *NMDAR2B*, *CCNA1* และ *p53* ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวยังไม่สามารถหาข้อสรุปของกลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้[4] เมื่อนำผลที่ได้จากงานวิจัยนี้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* โดยการทดสอบวินิจฉัย (diagnostic test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่ามีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) ร้อยละ 64.58 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 96.84 ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ร้อยละ 91.18 และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) ร้อยละ 84.40 แสดงถึงความเป็นไปได้ในอนาคตว่าสามารถใช้การเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ของยีน *CCNA1* ในการจำแนกผู้ป่วยที่กระเพาะอาหารมีความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง (dysplasia, premalignant) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric adenocarcinoma) ออกจากผู้ที่กระเพาะอาหารปกติได้ในเบื้องต้น โดยอาจนำไปประยุกต์ใช้ในกรณีที่ชิ้นเนื้อที่ต้องการวินิจฉัยมีบริเวณที่เป็นรอยโรคเพียงเล็กน้อย ชิ้นเนื้อได้รับความเสียหายจากกระบวนการเก็บตัวอย่าง หรือแม้กระทั่งนำไปใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำล้างกระเพาะอาหาร เป็นต้น

ผลการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร โดยการย้อม giemsa พบว่าในกลุ่ม chronic gastritis มีการติดเชื้อสูงที่สุด คือ 41.67 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่พบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างกลุ่มนี้สูงที่สุดเนื่องมาจากเมื่อเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายจะผลิตโปรตีน cagA จากยีน cytotoxin-associated gene A มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร และโปรตีน vagA จากยีน vacuolating cytotoxin gene A ที่มีส่วนช่วยในการดำรงอยู่ของเชื้อในชั้นเยื่อเมือกในด้านต่างๆ โดยโปรตีนเหล่านี้จะส่งผลให้เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารหลั่งอินเตอร์ลิวคิน 8 (interleukin 8, IL-8) ซึ่งจะก่อให้เกิดการอับเสบของเนื้อเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารอย่างรุนแรง[41] จัดเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังชนิด B[15] พบติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการติดเชื้อรองลงมาได้แก่ intestinal metaplasia, gastric adenocarcinoma และ normal เป็น 30, 27.27 และ 5.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม dysplasia ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการพบเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรในมะเร็งกระเพาะอาหาร 27.27 เปอร์เซ็นต์ ก็ยังไม่อาจสรุปได้ว่ามีมะเร็งกระเพาะอาหารที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรเพียงเท่านี้ เนื่องจากอาจมีผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารบางรายที่เข้ารับการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียจนหายขาดแล้ว

ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส พบว่าสามารถพบการติดเชื้อไวรัสได้ทั่วไปในทุกระยะของรอยโรค โดยพบการติดเชื้อในกลุ่ม normal, chronic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia และ gastric adenocarcinoma เป็น 42.11, 36.11, 22.50, 13.33 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไวรัสเอ็บสไตบาร์สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของผู้ติดเชื้อ (host) ได้ทั้งในลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงมีการพิสูจน์หาตำแหน่งที่มีการติดเชื้อในกลุ่ม dysplasia และ gastric adenocarcinoma โดยการย้อม EBER เพิ่มเติมในตัวอย่างที่ตรวจพบการติดเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ผลการย้อม EBER ไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างของกลุ่ม dysplasia แต่พบการติดเชื้อในตัวอย่างของกลุ่ม gastric adenocarcinoma 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.12 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างในกลุ่ม gastric adenocarcinoma แสดงให้เป็นว่ามีไวรัสเอ็บสไตบาร์ที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (EBV-associated gastric adenocarcinoma) 12.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศที่พบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์จากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารในประเทศต่างๆ ทั่วโลกประมาณ 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เปอร์เซ็นต์[45] รวมถึงประเทศในภูมิภาคเอเชีย ได้แก่ เกาหลี ฮ่องกง จีน และญี่ปุ่น[56] ในปี 2004 Myung Ah Lee และคณะ ได้ตรวจหาเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารพบว่ามีการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสในมะเร็งต่อมน้ำเหลืองซึ่งแพร่กระจายมาจากมะเร็งกระเพาะอาหาร (metastatic lymph node) พวกเขาจึงคาดว่าการตรวจพบเชื้อไวรัสในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวไม่ใช่เหตุบังเอิญ และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร[56] เมื่อนำผลจากงานวิจัยข้างต้นมาวิเคราะห์ร่วมกับผลการวิจัยในครั้งนี้ซึ่งพบการติดเชื้อไวรัสในทุกระยะของรอยโรคทำให้ข้อสันนิษฐานดังกล่าวมีความเป็นไปได้มากขึ้น โดยผู้วิจัยคาดว่าเมื่อเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์เข้าสู่ร่างกายจะสามารถส่งผลให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารปกติเกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ด้วยกลไกบางอย่าง อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ในรอยโรคระยะต่างๆ ของกระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในผู้ป่วยรายเดียวกันได้ ดังนั้นสมมติฐานนี้จึงต้องรอการพิสูจน์ต่อไป

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในรอยโรคระยะต่างๆ กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ โดยใช้ Pearson’s chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ไม่พบความความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ในทุกระยะของรอยโรค (p-value > 0.05) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์อาจส่งผลให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในผู้ป่วยบางรายเท่านั้น อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน และได้รับเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสต่างสายพันธุ์กัน จึงทำให้มีความรุนแรงในการก่อโรคมะเร็งกระเพาะอาหารแตกต่างกัน[42] ซึ่งผลการหาความสัมพันธ์ของการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยในอดีตที่พบว่าการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดเมทิลเลชันในบริเวณ CpG island ซึ่งส่วนมากพบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีกลไกการทำให้เกิดเมทิลเลชันที่แตกต่างกัน ดังนี้ เมื่อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร เข้าสู่ร่างกายจะทำให้เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารเกิดการอักเสบ ส่งผลให้มีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน 1 บี (interleukin-1b, IL-1b) และมีการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดเมทิลเลชัน[58] แต่เมื่อไวรัสเอ็บสไตบาร์เข้าสู่ร่างกาย ไวรัสจะสร้างโปรตีนแฝง (latent protein) ซึ่งไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase, DNMT) ส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันและการดัดแปลงโปรตีนฮิสโทน (histone modification)[59-62] นอกจากนี้เมื่อดีเอ็นเอของไวรัสเข้าสู่เซลล์ของผู้ติดเชื้อ (host) เซลล์ของผู้ติดเชื้อจะมีการป้องกันดีเอ็นเอของไวรัส

โดยกระตุ้นให้ดีเอ็นเอของไวรัสเกิดเมทิลเลชัน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวอาจชักนำให้เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์ของผู้ติดเชื้อด้วย[59]

โดยสรุปมีความเป็นไปได้ในอนาคตที่จะนำการตรวจโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* มาประยุกต์ใช้ในการคัดแยกผู้ป่วยที่กระเพาะอาหารมีความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง และผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะอาหารออกจากคนปกติได้ในเบื้องต้นสำหรับผู้ป่วยบางราย แต่ในส่วนของกลไกและปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* กับการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และไวรัสเอ็บสไตบาร์ ไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน ซึ่งบ่งชี้ว่าการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารอาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย และมีกลไกการเกิดที่แตกต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

1) NCI. National cancer control programmes 2013-2017. Bangkok: The agricultural cooperative federation of Thailand; 2013.
2) NCI. Hospital-based cancer registry annual report 2014. Bangkok: Pornsup printing; 2014.
3) Tanapunpanit A, Pausawasdi N, Manatsathit S. Gastric intestinal metaplasia. The gastroenterological association of Thailand. 2009;1(86):9-26.
4) Waraya M, Yamashita K, Ema A, Katada N, Kikuchi S, Watanabe M. Exclusive association of *p53* mutation with super-high methylation of tumor suppressor genes in the *p53* pathway in a unique gastric cancer phenotype. Plos one. 2015;10(10):1-17.
5) Uchida T, Miftahussurur M, Pittayanon R, Vilaichone RK, Wisedopas N, Ratanachu-Ek T, et al. *Helicobacter pylori* infection in Thailand: a nationwide study of the CagA phenotype. Plos one. 2015;10(9):1-13.
6) Mahakknaukrauh P. General anatomy. Chiang Mai: Chiang Mai university; 2010.
7) Bundit V. Histology 2. Bangkok: Chulalongkorn university printing house; 2002.
8) Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. Wheater's functional histology, a text and colour atlas. 5th ed. China: Elsevier's health sciences; 2006.
9) Piyathamrongrat K. Histology. Bangkok: Odeonstore; 2003.
10) Darnvivat K. Histoanatomy. Bangkok: Thammasat university press; 2003.
11) Songtong A. Gastric cancer [Internet]. King Chulalongkorn memorial hospital. 2016 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://www.chulacancer.net/uploads/articles_attc/1406704001.pdf.
12) Pearson education. Anatomy of stomach [Internet]. 2013 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://slideplayer.com/slide/9143212/.
13) Philschatz. Histology of the stomach [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46517.html.

14) Silva R, Gullo I, Carneiro F. The PD-1:PD-L1 immune inhibitory checkpoint in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: a comprehensive review and future perspectives. Porto biomedical journal. 2016;1(1):4-11.

15) Wannakrairot P, Sampatanukul P. Atlas of histopathology. Bangkok: Year book publisher; 1998.

16) Ernst P. Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. Alimentary pharmacology and therapeutics. 1999;13(1):13-8.

17) Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham DY. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. Helicobacter. 2001;6(4):294–9.

18) Walker MM. Is intestinal metaplasia of the stomach reversible? Gut. 2003;52:1-4.

19) Xia HH, Kalantar JS, Talley NJ, Wyatt JM, Adams S, Cheung K, et al. Antral-type mucosa in the gastric incisura, body, and fundus (antralization): a link between *Helicobacter pylori* infection and intestinal metaplasia? The american journal of gastroenterology. 2000;95(1):114-21.

20) De Vries AC, Van Grieken NC, Looman CW, Casparie MK, De Vries E, Meijer GA, et al. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. Gastroenterology. 2008;134(4):945-52.

21) Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. Cancer. 1994;74(2):556-64.

22) Lertrakranskul T. Premalignant lesions of esophageal and gastric cancer [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://medinfo2.psu.ac.th/surgery/Collective%20review/2558/21.Premalignant_lesions_of_esophageal_cancer%20(Thonphong%2021.10.58).pdf.

23) Jonglertham P, Lrnlerthon W. Gastric cancer [Internet]. Chulabhorn hospital. 2016 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://www.cccthai.org/l-th/images/stories/knowledge/book10-Gastric.pdf.

24) Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, Norda R, Wikman A, Melbye M, et al. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: a cohort study. American journal of epidemiology. 2010;172(11):1280-5.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

25) Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. The journal of clinical investigation. 2007;117(1):60-9.

26) Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2007;133(2):659-72.

27) Chiang Mai university. Atlas for pathology of gastrointestinal system [Internet]. Chiang Mai university. 2014 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://www.med.cmu.ac.th/secret/edserv/curriculum/file/2557/ATLAS%20for%20Pathology%20of%20Gastrointestinal%20System%20%E0%B8%AD.%E0%B8%84%E0%B8%A1%E0%B8%AA%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%95%E0%B9%8C).pdf.

28) Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. Acta pathologica et microbiologica scandinavica. 1965;64(1):31-49.

29) Oakeley E. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. Pharmacology and therapeutics. 1999;84(1):389-400.

30) Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science. 2001;293(1):1068-70.

31) Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. Alcohol research. 2013;1(1):6-16.

32) Muangsub T, Samsuwan J, Tongyoo P, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Analysis of methylation microarray for tissue specific detection. Gene. 2014;553(1):31-41.

33) UCSF school of medicine. DNA methylation [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 14]. Available from: http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html.

34) Peyressatre M, Prevel C, Pellerano M, Morris MC. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. Cancers. 2015;7(1):179-237.

35) Loh M, Liem N, Vaithilingam A, Lim PL, Sapari NS, Elahi E, et al. DNA methylation subgroups and the CpG island methylator phenotype in gastric cancer: a comprehensive profiling approach. BMC gastroenterology. 2014;14(1):1-11.

36) Romaniuk PJ, Zoltowaska B, Trust TJ, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR, et al. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter sp.* Journal of bacteriology. 1987;169(5):2137-41.

37) Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical microbiology reviews. 2006;19(3):449-90.

38) Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. The journal of clinical investigation. 1994;94(1):4-8.

39) IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: World health organization; 1994.

40) Ford AC, Axon AT. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. Helicobacter. 2010;15(1):1-6.

41) Graham DY. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. Gastroenterology. 2015;148(4):719-31.

42) Tomtichong P. Textbook of *Helicobacter pylori* and surgical practice. Bangkok: Beyond enterprise; 2012.

43) Timonina I. The structure of *Helicobacter pylori* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 10]. Available from: https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-helicobacter-pylori-infographics-vector-illustration-background-image64678577.

44) Mitarnun W. Epstein-Barr virus-associated peripheral T-cell proliferative disease. Songklanagarind medical journal. 2006;24(4):347-68.

45) Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). International journal of oncology. 2015;46(4):1421-34.

46) AGV research unit gene vectors. EBV [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 10]. Available from: https://www.helmholtz-muenchen.de/agv/research/research-groups/prevention-and-immunomodulation/projects/index.html.

47) Pituckpakorn M, Jirawatnotai S, Suktitipat B. Principle of molecular genetics and cancer genetics. Bangkok: P.A. living; 2016.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

48) Diagenode innovating epigenetics solution. Bisulfite conversion [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 10]. Available from: https://www.diagenode.com/en/categories/bisulfite-conversion.

49) Kakeewong H. Molecular genetics. Bangkok: Boonchai printing; 2006.

50) Bray A, Johnson H, Raff L, Walter R. Essential cell biology. 3rd ed. New York: Garland science; 2009.

51) Pocathikorn A. Introduction to real time-PCR and its applications [Internet]. Songkla university. 2013 [cited 2017 Oct 10]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/235973510_xeksarprakxbkarprachumcheingptibatikar_reuxng_Introduction_to_Real_time-PCR_and_its_applications.

52) Lee JY, Kim N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. Annals of translational medicine. 2015;3(1):10.

53) Fanaian NK, Cohen C, Waldrop S, Wang J, Shehata BM. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA: automated in-situ hybridization (ISH) compared with manual ISH and immunohistochemistry for detection of EBV in pediatric lymphoproliferative disorders. Pediatric and developmental pathology. 2009;12(3):195-9.

54) Kamolratanakul P, Chalaprawat M, Tanprayoon T. Principles of research. Bangkok: Text and journal publication; 2005.

55) Rattanatanyong P, Keelawat S, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Epithelial-specific SHP1-P2 methylation - a novel universal tumor marker for detection of colorectal cancer lymph node metastasis. Asian pacific journal of cancer prevention. 2016;17(8):4117-23.

56) Lee MA, Hong YS, Kang JH, Lee KS, You JY, Lee KY, et al. Detection of Epstein-Barr virus by PCR and expression of LMP1, p53, CD44 in gastric cancer. The korean journal of internal medicine. 2004;19(1):43-7.

57) Rivera A, Mavila A, Bayless KJ, Davis GE, Maxwell SA. Cyclin A1 is a *p53*-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. Cellular and molecular life sciences. 2006;63(12):1425-39.

58) Huang FY, Chan AO, Rashid A, Wong DK, Cho CH, Yuen MF. *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1beta activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. Cancer. 2012;118(20):4969-80.

59) Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. Cancer research. 2012;72(14):3445-50.

60) Tsai CL, Li HP, Lu YJ, Hsueh C, Liang Y, Chen CL, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH_2-terminal kinase signaling. Cancer research. 2006;66(24):11668-76.

61) Seo SY, Kim EO, Jang KL. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 suppresses the growth-inhibitory effect of retinoic acid by inhibiting retinoic acid receptor-beta2 expression via DNA methylation. Cancer letters. 2008;270(1):66-76.

62) Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. Cancer science. 2008;99(9):1726-33.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 16 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม normal

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	NG01	หญิง	62	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	11/30/2553
2	NG02	หญิง	50	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	2/14/2554
3	NG03	ชาย	84	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	4/4/2554
4	NG04	ชาย	83	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	11/3/2554
5	NG05	ชาย	93	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	12/31/2554
6	NG06	หญิง	40	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	4/24/2555
7	NG07	หญิง	18	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	7/10/2555
8	NG08	ชาย	47	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	7/18/2555
9	NG09	หญิง	74	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	8/6/2555
10	NG10	ชาย	29	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	9/21/2556
11	NG11	หญิง	23	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	10/16/2557
12	NG12	หญิง	76	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	1/11/2558
13	NG13	ชาย	45	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	3/12/2558
14	NG14	หญิง	90	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	7/22/2558
15	NG15	ชาย	50	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	11/9/2558
16	NG16	หญิง	73	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	1/14/2559
17	NG17	ชาย	59	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	3/31/2559
18	NG18	ชาย	52	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	6/27/2559
19	NG19	ชาย	55	Normal gastric pits and foveolar epithelium	ไม่ระบุ	7/8/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 17 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม chronic gastritis

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	CG01	ชาย	80	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Body	1/6/2559
2	CG02	หญิง	56	Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis	Body	1/14/2559
3	CG03	หญิง	56	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Body	1/15/2559
4	CG04	หญิง	31	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Antrum	1/18/2559
5	CG05	ชาย	63	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Body	1/20/2559
6	CG06	หญิง	58	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Body	1/20/2559
7	CG09	ชาย	64	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Body	1/27/2559
8	CG10	หญิง	56	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Fundus	1/29/2559
9	CG11	หญิง	68	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Cardia	2/2/2559
10	CG12	หญิง	40	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Antrum	2/11/2559
11	CG14	หญิง	48	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Antrum	2/16/2559
12	CG15	หญิง	54	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Body	2/16/2559
13	CG16	ชาย	61	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	2/18/2559
14	CG18	ชาย	65	Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis	Antrum	2/18/2559
15	CG19	ชาย	68	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Antrum	2/24/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
16	CG20	หญิง	70	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Antrum	2/25/2559
17	CG21	หญิง	68	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	2/26/2559
18	CG22	หญิง	73	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Antrum	3/3/2559
19	CG23	ชาย	81	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • No malignancy seen	Antrum	3/10/2559
20	CG24	ชาย	36	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	3/22/2559
21	CG25	ชาย	68	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	3/22/2559
22	CG26	หญิง	65	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Antrum	3/23/2559
23	CG27	ชาย	69	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Body	3/24/2559
24	CG28	ชาย	70	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Body	3/25/2559
25	CG29	ชาย	31	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation	Body	3/25/2559
26	CG30	ชาย	64	Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis	Antrum	3/25/2559
27	CG31	หญิง	73	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	3/29/2559
28	CG32	หญิง	56	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	3/29/2559
29	CG33	หญิง	69	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	3/30/2559
30	CG34	หญิง	56	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	4/7/2559
31	CG35	หญิง	86	• Moderate chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	4/8/2559
32	CG36	ชาย	76	• Moderate chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Antrum	4/19/2559
33	CG37	ชาย	75	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Body	4/20/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
34	CG38	ชาย	76	• Mild chronic gastritis with focal lymphoid aggregation • No *H. pylori* seen	Body	4/20/2559
35	CG39	หญิง	74	Mild chronic gastritis	Antrum	4/25/2559
36	CG40	หญิง	63	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen	Body	5/4/2559

ตารางที่ 18 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม mature intestinal metaplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	IM01	ชาย	41	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/16/2558
2	IM02	หญิง	22	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/20/2558
3	IM03	หญิง	72	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/20/2558
4	IM04	ชาย	56	• Moderate chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/19/2558
5	IM05	หญิง	67	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Body	1/8/2559
6	IM06	ชาย	85	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/14/2559
7	IM07	หญิง	39	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/19/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
8	IM08	หญิง	49	• Mild chronic gastritis with focal lymphoid aggregation • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/20/2559
9	IM09	หญิง	49	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	1/28/2559
10	IM10	ชาย	61	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum and oxyntic	2/10/2559
11	IM11	ชาย	55	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	2/17/2559
12	IM12	ชาย	52	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	2/23/2559
13	IM13	ชาย	64	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type • Lymphoid aggregation	Antrum	3/2/2559
14	IM14	หญิง	82	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/2/2559
15	IM15	ชาย	54	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/8/2559
16	IM16	หญิง	60	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/8/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
17	IM17	หญิง	57	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/23/2559
18	IM18	หญิง	67	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/25/2559
19	IM19	ชาย	70	• Mild chronic gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	3/29/2559
20	IM20	หญิง	66	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	4/1/2559
21	IM21	หญิง	76	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	4/28/2559
22	IM22	หญิง	60	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	5/3/2559
23	IM23	ชาย	63	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type • Lymphoid aggregation	Antrum	5/3/2559
24	IM24	หญิง	59	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Body	5/11/2559
25	IM25	หญิง	51	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	5/12/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
26	IM26	ชาย	70	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	5/13/2559
27	IM27	หญิง	44	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	6/10/2559
28	IM28	หญิง	76	• Moderate chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	6/16/2559
29	IM29	ชาย	69	• Mild chronic gastritis with focal lymphoid aggregation • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	6/17/2559
30	IM30	หญิง	30	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	6/21/2559
31	IM31	ชาย	78	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type	Antrum	6/29/2559
32	IM32	หญิง	83	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Lymphoid aggregation • Intestinal metaplasia, mature type	Body	6/29/2559
33	IM33	หญิง	71	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type • Lymphoid aggregation	Body	8/4/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 19 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม immature intestinal metaplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	II01	หญิง	79	• Intestinal metaplasia, immature type • No *H. pylori* seen	Antrum	4/5/2553
2	II02	หญิง	60	• Mild chronic and acute gastritis • Intestinal metaplasia, immature type • No *H. pylori* seen	Antrum	11/15/2553
3	II03	หญิง	63	• Mild chronic gastritis with focal immature intestinal metaplasia • No *H. pylori* seen	Antrum	1/30/2555
4	II04	ชาย	41	• Mild chronic gastritis with focal immature intestinal metaplasia • No *H. pylori* seen	Antrum	3/28/2555
5	II05	หญิง	54	• Mild chronic gastritis with focal immature intestinal metaplasia • No *H. pylori* seen	Antrum	12/25/2555
6	II06	ชาย	85	• Hyperplastic polyp with immature intestinal metaplasia • No *H. pylori* or malignancy seen	Fundus	3/14/2556
7	II07	ชาย	74	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia, immature type • Lymphoid aggregation	Antrum	10/1/2556

ตารางที่ 20 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม low grade dysplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	DL01	หญิง	72	Gastric ulcer and adenoma, low grade dysplasia	Body	1/29/2552
2	DL02	ชาย	60	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia with focal low grade dysplasia	Antrum	4/4/2554

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
3	DL03	หญิง	73	• Gastric antral mucosa with low grade dysplasia, adenomatous polyp is suspected • No invasion seen on the plane of examination	Antrum	9/5/2554
4	DL04	หญิง	65	Hyperplastic polyp with focal surface erosion and low grade dysplasia	Body	9/29/2554
5	DL05	หญิง	92	• Hyperplastic polyp with low grade dysplasia • No malignant transformation or organism seen	Antrum	2/16/2555
6	DL06	ชาย	70	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia with focal low grade dysplasia	Antrum	6/11/2555
7	DL08	ชาย	63	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type, with low grade dysplasia	Antrum	9/26/2555
8	DL09	ชาย	49	• Mild chronic atrophic gastritis with mature intestinal metaplasia and low grade dysplasia • No *H. pylori* or malignant transformation seen	Antrum	1/8/2557
9	DL10	ชาย	72	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis • Intestinal metaplasia with low grade dysplasia • No malignant transformation seen	Cardia	9/2/2557

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
10	DL11	ชาย	74	• Mild chronic atrophic gastritis • Intestinal metaplasia, mature type, with focal low grade dysplasia • No *H. pylori* or malignancy seen	Antrum	7/15/2558
11	DL12	ชาย	75	• Mild chronic gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia, mature type, with focal low grade dysplasia	Antrum	10/21/2558
12	DL13	หญิง	55	• Low grade dysplasia, arising on chronic atrophic gastritis with immature intestinal metaplasia • No *H. pylori* seen	Antrum	5/13/2559

ตารางที่ 21 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม high grade dysplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	DH01	หญิง	72	Gastric adenoma, high grade dysplasia	Antrum	7/30/2552
2	DH02	หญิง	72	• Hyperplastic polyp with patchy intestinal metaplasia and focal high grade dysplasia • No obvious malignant transformation or invasiveness seen • Complete excision	Antrum	2/21/2555
3	DH03	หญิง	73	• Mild chronic atrophic gastritis with patchy mature intestinal metaplasia • Presence of focal high grade dysplasia • No *H. pylori* or invasive cancer seen	Antrum	6/23/2557

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 22 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม intestinal type gastric adenocarcinoma

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	AI01	หญิง	71	• Adenocarcinoma, intestinal type with lamina propria invasion (T1) • Moderately differentiated adenocarcinoma	Cardia	3/1/2554
2	AI02	หญิง	75	• Moderately differentiated gastric adenocarcinoma, intestinal type • No atypical lymphoid cell present	Antrum and oxyntic	2/27/2558

ตารางที่ 23 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่ม diffuse type gastric adenocarcinoma

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
1	AD02	ชาย	70	Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring appearance	Antrum	11/29/2550
2	AD03	หญิง	55	Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell type	Cardia	5/20/2552
3	AD04	ชาย	82	Poorly differentiated adenocarcinoma with focal signet ring cell appearance	Antrum	9/8/2552
4	AD05	หญิง	40	• Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell type • Presence of *H. pylori*	Antrum	10/26/2552
5	AD06	ชาย	69	• Moderately differentiated adenocarcinoma with signet ring appearance • No *H. pylori* seen	Body	11/19/2552
6	AD07	ชาย	68	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell	Body	11/20/2552

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
7	AD08	หญิง	85	• Moderate chronic and acute gastritis • No *H. pylori* seen • Intestinal metaplasia • Presence of signet ring cell adenocarcinoma • Well differentiated adenocarcinoma	Antrum	12/8/2552
8	AD09	หญิง	59	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance	Body	8/27/2553
9	AD10	หญิง	70	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance	Body, greater curvature	11/4/2553
10	AD11	หญิง	62	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance	Cardia	11/26/2553
11	AD12	ชาย	70	Presence of poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance, gastric cardia cancer involving distal part of esophagus is most likely	Cardia	12/27/2553
12	AD13	หญิง	50	• Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance • Moderate to severe chronic active *H. pylori* gastritis with ulcer	Body	2/10/2555
13	AD14	ชาย	49	• Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance • Moderate to severe chronic and acute gastritis with ulcer • Presence of few *H. pylori*	Cardia	3/22/2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
14	AD15	หญิง	60	• Poorly differentiated adenocarcinoma with focal signet ring appearance • No *H. pylori* or intestinal metaplasia seen	Body	7/23/2555
15	AD16	หญิง	75	• Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance • Moderate to severe chronic and acute gastritis • Presence of few *H. pylori*	Antrum	7/31/2555
16	AD17	ชาย	61	Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell type	Antrum	8/30/2555
17	AD18	ชาย	58	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance	Body	10/1/2555
18	AD19	หญิง	77	• Well differentiated adenocarcinoma with mucin producing area, with focal signet ring cell appearance • No *H. pylori* seen • Negative Her-2 staining (2+)	Antrum and pylorus	12/3/2555
19	AD20	หญิง	42	Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell type	Antrum	1/7/2556
20	AD22	ชาย	57	• Hyperplastic polyp with focal intestinal metaplasia • Presence of poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance • No *H. pylori* seen	Antrum and oxyntic	7/19/2556
21	AD23	หญิง	94	• Poorly differentiated adenocarcinoma with focal signet ring cell appearance • No *H. pylori* seen	Cardia	8/19/2556

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	บริเวณรอยโรค	วันที่เก็บชิ้นเนื้อ
22	AD24	ชาย	51	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell feature	Antrum	10/9/2556
23	AD25	ชาย	38	Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell type	Body	11/19/2556
24	AD26	หญิง	27	• Mild chronic active *H. pylori* associated gastritis with ulcer • Presence of poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance	Antrum	1/20/2557
25	AD27	หญิง	76	• Poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell adenocarcinoma • Presence of few *H. pylori*	Cardia	3/13/2557
26	AD28	หญิง	78	• Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell appearance • No *H. pylori* seen	Antrum	10/14/2557
27	AD30	หญิง	78	• Diffuse type adenocarcinoma • Poorly differentiated adenocarcinoma	Antrum	7/7/2558
28	AD31	หญิง	55	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell feature	Antrum	10/2/2558
29	AD32	หญิง	64	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell feature and ulcer	Antrum	10/22/2558
30	AD33	หญิง	51	Poorly differentiated adenocarcinoma with focal signet ring cell appearance	Antrum, greater curvature	11/6/2558
31	AD35	หญิง	63	Poorly differentiated adenocarcinoma with signet ring cell feature	Antrum	4/18/2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 24 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม normal

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	NG01	✓			✓	✓	
2	NG02		✓	✓			✓
3	NG03		✓		✓		✓
4	NG04		✓		✓	✓	
5	NG05		✓		✓		✓
6	NG06		✓		✓		✓
7	NG07		✓		✓	✓	
8	NG08		✓		✓	✓	
9	NG09		✓		✓	✓	
10	NG10		✓		✓	✓	
11	NG11		✓		✓		✓
12	NG12		✓		✓		✓
13	NG13		✓		✓		✓
14	NG14		✓		✓		✓
15	NG15		✓		✓		✓
16	NG16		✓		✓	✓	
17	NG17		✓		✓		✓
18	NG18		✓		✓	✓	
19	NG19		✓		✓		✓
จำนวนทั้งหมด		1	18	1	18	8	11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 25 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม chronic gastritis

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	CG01		✓		✓	✓	
2	CG02		✓	✓		✓	
3	CG03		✓	✓			✓
4	CG04		✓	✓			✓
5	CG05		✓	✓			✓
6	CG06		✓	✓			✓
7	CG09		✓		✓		✓
8	CG10		✓		✓	✓	

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
9	CG11		✓	✓			✓
10	CG12		✓	✓			✓
11	CG14		✓	✓		✓	
12	CG15		✓	✓			✓
13	CG16		✓		✓	✓	
14	CG18		✓	✓			✓
15	CG19		✓	✓			✓
16	CG20		✓	✓		✓	
17	CG21		✓		✓	✓	
18	CG22		✓		✓		✓
19	CG23		✓		✓		✓
20	CG24		✓		✓		✓
21	CG25		✓		✓		✓
22	CG26		✓	✓		✓	
23	CG27		✓		✓	✓	
24	CG28		✓	✓			✓
25	CG29		✓	✓			✓
26	CG30		✓		✓		✓
27	CG31		✓		✓	✓	
28	CG32		✓		✓	✓	
29	CG33		✓		✓	✓	
30	CG34		✓		✓		✓
31	CG35		✓		✓		✓
32	CG36		✓		✓	✓	
33	CG37		✓		✓		✓
34	CG38		✓		✓		✓
35	CG39		✓		✓		✓
36	CG40		✓		✓		✓
จำนวนทั้งหมด		0	36	15	21	13	23

ตารางที่ 26 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม mature intestinal metaplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	IM01		✓		✓		✓
2	IM02		✓		✓	✓	

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรีย เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
3	IM03		✓		✓	✓	
4	IM04		✓		✓		✓
5	IM05		✓	✓			✓
6	IM06		✓		✓	✓	
7	IM07		✓		✓	✓	
8	IM08		✓		✓		✓
9	IM09		✓		✓	✓	
10	IM10		✓	✓			✓
11	IM11		✓	✓			✓
12	IM12		✓		✓		✓
13	IM13		✓		✓		✓
14	IM14		✓	✓			✓
15	IM15		✓		✓		✓
16	IM16		✓		✓		✓
17	IM17		✓	✓			✓
18	IM18		✓	✓		✓	
19	IM19		✓		✓		✓
20	IM20	✓			✓		✓
21	IM21		✓		✓		✓
22	IM22		✓	✓			✓
23	IM23		✓		✓		✓
24	IM24		✓		✓		✓
25	IM25		✓	✓			✓
26	IM26		✓	✓			✓
27	IM27		✓		✓		✓
28	IM28		✓	✓			✓
29	IM29		✓		✓		✓
30	IM30		✓	✓		✓	
31	IM31		✓		✓		✓
32	IM32		✓		✓		✓
33	IM33		✓		✓		✓
จำนวนทั้งหมด		1	32	11	22	7	26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 27 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม immature intestinal metaplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรีย เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	II01		✓		✓		✓
2	II02		✓		✓	✓	
3	II03		✓		✓		✓
4	II04		✓		✓		✓
5	II05		✓		✓		✓
6	II06		✓		✓	✓	
7	II07	✓		✓			✓
จำนวนทั้งหมด		1	6	1	6	2	5

ตารางที่ 28 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม low grade dysplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรีย เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <PCR>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <EBER>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	DL01	✓			✓	✓			✓
2	DL02	✓			✓		✓		
3	DL03	✓			✓		✓		
4	DL04	✓			✓		✓		
5	DL05	✓			✓		✓		
6	DL06	✓			✓		✓		
7	DL08		✓		✓		✓		
8	DL09		✓		✓		✓		
9	DL10		✓		✓	✓			✓
10	DL11	✓			✓		✓		
11	DL12		✓		✓		✓		
12	DL13	✓			✓		✓		
จำนวนทั้งหมด		8	4	0	12	2	10	0	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 29 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม high grade dysplasia

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรีย เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	DH01		✓		✓		✓
2	DH02	✓			✓		✓
3	DH03	✓			✓		✓
จำนวนทั้งหมด		2	1	0	3	0	3

ตารางที่ 30 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม intestinal type gastric adenocarcinoma

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรีย เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <PCR>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	AI01		✓		✓		✓
2	AI02	✓			✓		✓
จำนวนทั้งหมด		1	1	0	2	0	2

ตารางที่ 31 ผลการตรวจสอบโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน CCNA1 การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ของตัวอย่างในกลุ่ม diffuse type gastric adenocarcinoma

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรีย เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <PCR>		การติดเชื้อไวรัส เอ็บสไตบาร์ <EBER>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
1	AD02	✓			✓		✓		
2	AD03		✓	✓			✓		
3	AD04		✓		✓		✓		
4	AD05		✓	✓		✓			✓
5	AD06	✓			✓	✓		✓	
6	AD07		✓	✓			✓		
7	AD08	✓		✓			✓		
8	AD09	✓			✓		✓		
9	AD10	✓			✓	✓			✓
10	AD11		✓		✓		✓		
11	AD12	✓		✓		✓		✓	
12	AD13	✓		✓			✓		
13	AD14	✓		✓			✓		
14	AD15		✓		✓	✓		✓	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	โปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* <Real-time PCR>		การติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร <Giemsa>		การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ <PCR>		การติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ <EBER>	
		มี	ไม่มี	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
15	AD16		✓		✓	✓			✓
16	AD17	✓			✓	✓			✓
17	AD18	✓			✓	✓			✓
18	AD19		✓		✓		✓		
19	AD20	✓			✓		✓		
20	AD22		✓		✓	✓			✓
21	AD23	✓			✓		✓		
22	AD24	✓			✓	✓		✓	
23	AD25	✓			✓		✓		
24	AD26		✓	✓			✓		
25	AD27	✓		✓			✓		
26	AD28	✓			✓		✓		
27	AD30	✓			✓		✓		
28	AD31	✓			✓	✓			✓
29	AD32	✓			✓		✓		
30	AD33	✓			✓		✓		
31	AD35		✓		✓		✓		
จำนวนทั้งหมด		20	11	9	22	11	20	4	7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1) ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ	นางสาวพิชญา ฐิติวณิชภิวงศ์
เพศ	หญิง
วัน/เดือน/ปีเกิด	9 กรกฎาคม 2530
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 12 ซอย 84 แยก 2-7 ถนนโชคชัย 4 แขวง/เขตลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร 10230
เบอร์โทรศัพท์	0847436203
อีเมล	dee-devil@hotmail.com

2) ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558 – 2560	วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาพยาธิวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2549 – 2553	วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3) ประสบการณ์การทำงาน

17 ก.ย. 2555 – ปัจจุบัน	ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ หน่วยคลังเนื้อเยื่อ โรงพยาบาลจุฬาภรณ์
11 ต.ค. 2553 – 14 ก.ย. 2555	ตำแหน่งเจ้าหน้าที่หน่วยเคลื่อนที่ เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร กลุ่มพัฒนาระบบ สำนักอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University