

การศึกษาระดับการแสดงผลของไมโครอาร์เอ็นเอสำหรับการวินิจฉัย
โรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี



นางสาวภัทรพร นิมเสมอ

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
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A study of miRNA expression for early detection of
hepatitis B-related hepatocellular carcinoma



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอสำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

โดย

นางสาวภัทรพร นิ่มเสมอ

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร)

.....กรรมการ
(ดร.นพัต จันทรวิสูตร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์กิตติยศ ภู่วรรณ)

5974038330 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) / MICRORNA (MIRNA), / HEPATITIS B VIRUS (HBV) / MICRORNA PROFILE (MIRNA PROFILE) / HSA-MIR-21-5P / HSA-MIR-125B-5P

PATTARAPORN NIMSAMER: A study of miRNA expression for early detection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. ADVISOR: PROF.PISIT TANGKIJVANICH, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., pp.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the one of cancers which has high mortality rate and causes the public health problem in worldwide. Hepatitis B virus (HBV) infection is a major risk factor of HCC. Most of patients with the disease are diagnosed in late stage of HCC that leads to the low survival rate. Recently, miRNAs play importance role in many biological processes especially carcinogenesis. The aim of this study was to investigate miRNA expression for early detection of HBV-related hepatocellular carcinoma (HBV-HCC). miRNA profile was analyzed by using NanoString and candidate miRNAs were selected for further validate in 22 liver tissues and serum (50 healthy control, 92 CHB and 98 HBV-HCC). From Real-time PCR (qRT-PCR) results, the level of miR-21-5p slightly increased in cancerous tissues compared to adjacent non-cancerous tissues (ANCTs) ($P=0.068$). Serum miR-21-5p was significantly up-regulated in CHB compared with healthy control and HCC ($P=0.0019$ and $P<0.001$ respectively) while serum miR-21-5p slightly increased in HCC when compared with healthy control ($P=0.2332$). In contrast, the level of miR-125b-5p was significantly down-regulated in cancerous tissue compared to ANCTs ($P=0.0391$). Similarly, serum miR-125b-5p was significantly down-regulated in HCC compared with CHB and healthy control ($P=0.0234$ and $P<0.001$ respectively). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis revealed that area under the curve (AUC) of miR-125b-5p combined with alpha fetoprotein (AFP) was 0.94. In conclusion, combination of miR-125b-5p and AFP might be potential biomarker for early detection of HBV-HCC.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณา ความเสียสละ และความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน รวมถึงบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนประเภท 60/40 ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รองศาสตราจารย์ ดร.สัญญา พยุงบร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาสละเวลาให้ความรู้ แรงบันดาลใจ คำแนะนำ คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำงานวิจัย รวมทั้งสนับสนุนการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จ ตลอดจนปรับปรุงและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.นพัต จันทรวิสูตร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์กิตติยศ ภู่วรรณ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลามาร่วมดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย เพื่อให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงและเกิดประโยชน์ในภายภาคหน้า

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ อบรมสั่งสอน และแนวทางการคิดวิเคราะห์ ซึ่งเป็นพื้นฐานของการทำงานวิจัย รวมทั้งศูนย์จีโนมโปร (Chula GenePRO Center) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการเอื้ออำนวย และให้ความช่วยเหลือต่างๆในการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ

ขอขอบคุณสมาชิกศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ (Excellence Center of Hepatitis and Liver Cancer) ห้องปฏิบัติการ 725, สมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 อาคารแพทย์พัฒนา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำปรึกษา ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาผู้ให้กำเนิด และทุกคนในครอบครัว สำหรับความรักความอบอุ่น กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาเล่าเรียนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	15
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย.....	15
1.2 คำถามของงานวิจัย	16
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	16
1.4 สมมติฐาน	17
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	18
1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	19
1.7 คำสำคัญ.....	19
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	19
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
2.1 โรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma, HCC)	20
2.2 สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับ	20
2.3 การแบ่งระยะของโรคมะเร็งตับ	23
2.4 การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ.....	25
2.5 ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA)	26
การเรียกชื่อ การแบ่งกลุ่ม และการจัดกลุ่มของไมโครอาร์เอ็นเอ.....	26
การสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ.....	31
การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ.....	33

2.6	บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอในโรคตับ	35
2.7	เทคนิคในการวิเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ	35
2.8	nCounter [®] Human V3 miRNA Expression Assay หรือ NanoString.....	37
2.9	การนำไมโครอาร์เอ็นเอมาประยุกต์ใช้	40
2.10	Real-time polymerase chain reaction.....	41
	1. TaqMan probe real-time PCR assay	42
	2. SYBR Green real-time PCR assay	43
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	46
3.1	รูปแบบการวิจัย	46
3.2	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	46
3.3	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	47
3.4	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	47
3.5	ระเบียบวิธีวิจัย.....	49
	3.5.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย.....	49
	3.5.2 ขนาดของประชากรตัวอย่าง	51
3.6	การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	52
	3.6.1 การเก็บตัวอย่าง.....	52
	3.6.2 การสกัด RNA จากชิ้นเนื้อโดย GenUP [™] Total RNA kit.....	52
	3.6.3 การวัดความเข้มข้นของ RNA โดย Qubit [™] RNA HS Assay Kit	53
	3.6.4 การวิเคราะห์ miRNA profiling โดย nCounter [®] Human V3 miRNA Expression Assay	54
	3.6.5 การวิเคราะห์ผล miRNA profile โดย nSolver Analysis software	56
	3.6.6 การทำตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive Control)	58

3.6.7 การเติม polyuridylation และ การสังเคราะห์ cDNA synthesis.....	59
3.6.8 การสกัด miRNA จากชิ้นเนื้อ โดยใช้ NORGEN microRNA Purification Kit.....	60
3.6.9 การสกัด miRNA จากซีรัม โดยใช้ Geneaid® miRNA Isolation kit.....	61
3.6.10 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA โดย qRT-PCR	62
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	63
3.8 ข้อพิจารณาทางจริยธรรม	64
3.9 ข้อจำกัดในการวิจัย.....	65
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	66
4.1 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile).....	66
4.1.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย (Baseline characteristics).....	66
4.1.2 รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile).....	66
4.1.3 การเลือก candidate miRNA.....	68
4.2 ระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	70
4.2.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย (Baseline characteristics).....	70
4.2.2 ระดับการแสดงออกของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในชิ้นเนื้อ.....	71
4.3 ระดับการแสดงออกของ miRNA ในซีรัม.....	73
4.3.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย (Baseline characteristics).....	73
4.3.2 ระดับการแสดงออกของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในซีรัม.....	74
4.4 ประสิทธิภาพของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ .	76
4.5 การทำนายยีนเป้าหมายของ miR-21-5p และ miR-125b-5p (<i>In silico</i> prediction)	78
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ.....	81
.....	90

ญ

หน้า

รายการอ้างอิง 90

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 100



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูป

รูปที่ 1 สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศแถบทวีปเอเชีย..... 21

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี 22

รูปที่ 3 แสดงการแบ่งระยะและแนวทางการรักษาโรคมะเร็งตับโดยระบบ BCLC staging..... 23

รูปที่ 4 แสดงระดับของพารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้ในการประเมินความรุนแรงของภาวะตับแข็ง..... 24

รูปที่ 5 แสดงการเรียกชื่อของ miRNA โดยจำแนกตามสิ่งมีชีวิตที่ค้นพบ 26

รูปที่ 6 แสดงการเรียกชื่อของ miRNA โดยจำแนกตามสายของ miRNA 27

รูปที่ 7 แสดงชนิดของ miRNA โดยแบ่งตามตำแหน่งและโครงสร้างของยีน 28

รูปที่ 8 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ miRNA cluster 28

รูปที่ 9 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ miRNA family..... 29

รูปที่ 10 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ paralogous miRNA..... 29

รูปที่ 11 แสดงกระบวนการเกิด mirtron 30

รูปที่ 12 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ isomiR..... 31

รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างของ primary miRNA บริเวณที่ Drosha และ DGCR8 เข้าจับ..... 32

รูปที่ 14 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ miRNA แบบ Standard และ Alternative pathway 33

รูปที่ 15 แสดงการเข้าจับกันระหว่าง miRNA กับ mRNA เป้าหมายโดยอาศัย seed region..... 34

รูปที่ 16 แสดงการทำงานของ miRNA 34

รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างของ capture probe และ reporter probes (รูปบน)
 การเข้าจับกันระหว่าง capture probe, reporter probes และยีนเป้าหมาย (รูปล่าง) ... 37

รูปที่ 18 แสดงขั้นตอนในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ
 (miRNA profiling)..... 39

รูปที่ 19 แสดงกลไกในการปล่อย miRNA เข้าสู่กระแสเลือด 40

รูปที่ 20 แสดงระยะต่างๆในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วย qPCR..... 41

รูปที่ 21 แสดงโครงสร้างของ TaqMan probe ที่ประกอบด้วย reporter และ quencher และการเกิดปฏิกิริยาเมื่อถูกย่อยโดย DNA polymerase	43
รูปที่ 22 แสดงการเข้าจับของ SYBR Green บริเวณ minor groove ของ DNA สายคู่.....	44
รูปที่ 23 แสดงขั้นตอนการตรวจวัด miRNA ด้วยเทคนิค SYBR Green real-time PCR assay.....	45
รูปที่ 24 แสดง miRNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ miRNA profile โดย nCounter® Human V3 miRNA Expression Assay และวิเคราะห์ผลโดย nSolver Analysis Software	67
รูปที่ 25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่จัดอยู่ใน let-7 family	69
รูปที่ 26 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่จัดอยู่ใน family เดียวกับ hsa-miR-125b-5p.....	70
รูปที่ 27 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (ANCT) normalize ด้วย U6..	72
รูปที่ 28 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (ANCT) normalize ด้วย U6..	73
รูปที่ 29 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในซีรัม normalize ด้วย U6.....	75
รูปที่ 30 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในซีรัม normalize ด้วย U6	76
รูปที่ 31 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC curve ของ miR-21-5p, AFP และ miR-21-5p+AFP ในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (HCC) ออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรคมะเร็งตับ (non-HCC).....	77
รูปที่ 32 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC curve ของ miR-125b-5p, AFP และ miR-125b-5p+AFP ในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (HCC) ออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรคมะเร็งตับ (non-HCC)	78
รูปที่ 33 แสดงกลไกของ PTEN ในกระบวนการเกิดมะเร็ง	87
รูปที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ของ miR-21 กับกลไกการอักเสบ	88
รูปที่ 35 แสดงการทำหน้าที่ของ miR-125b ในการเกิดโรคต่างๆ.....	89

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงเทคนิคในการวิเคราะห์ miRNA profile และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ของแต่ละเทคนิค.....	36
ตารางที่ 2 แสดงสถานะที่ใช้ในขั้นตอน Annealing.....	55
ตารางที่ 3 แสดงสถานะที่ใช้ในขั้น Ligation.....	55
ตารางที่ 4 แสดงสถานะที่ใช้ในขั้น Purification.....	56
ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation	59
ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse transcription.....	60
ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR.....	62
ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR.....	62
ตารางที่ 9 แสดง condition ของ U6 ที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR.....	63
ตารางที่ 10 แสดง condition ของ miRNA ที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR.....	63
ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย จำนวน 5 ราย.....	66
ตารางที่ 12 แสดงผลการแสดงการแสดงออกของ miRNA candidate ที่ได้จากการวิเคราะห์ miRNA profile โดย nCounter [®] Human V3 miRNA Expression Assay และ วิเคราะห์ผลโดย nSolver Analysis Software.....	68
ตารางที่ 13 แสดงผลของ miRNA ที่จัดอยู่ใน let-7 family.....	69
ตารางที่ 14 แสดงผลของ miRNA ที่จัดอยู่ใน miR-125 family.....	70
ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อ ไวรัสตับอักเสบบี และได้รับการผ่าตัดก้อนมะเร็ง.....	71
ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง.....	74
ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC analysis ของ miR-21-5p และ AFP.....	77
ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC analysis ของ miR-125b-5p และ AFP.....	78
ตารางที่ 19 แสดงผลการทำนายยีนเป้าหมายและรูปแบบการจับของ miR-21-5p และ miR-125b-5p กับยีนเป้าหมาย โดย miRTarBase.....	80

ตารางที่ 20 แสดงการศึกษาเกี่ยวกับ miR-21 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ	84
ตารางที่ 21 แสดงการศึกษาเกี่ยวกับ miR-125b ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ.....	86



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

โรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) เป็นหนึ่งในโรคมะเร็งที่สามารถพบได้ทั่วโลกและมีอัตราการตายเป็นอันดับต้นๆของโลก (1-3) หนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับร้อยละ 70-80 เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus, HBV) เนื่องจากเชื้อไวรัสจะส่งผลต่อการทำลายเซลล์ตับ เมื่อเซลล์ตับได้รับความเสียหายอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอันยาวนานจะพัฒนาไปสู่โรคมะเร็งตับ ซึ่งผู้ป่วยโรคมะเร็งตับส่วนใหญ่จะมีการแสดงอาการที่ผิดปกติก็ต่อเมื่อการดำเนินของโรคเข้าสู่ในระยะกลางจนถึงระยะท้ายของโรคทำให้ยากต่อการรักษา และส่งผลต่ออัตราการตายของผู้ป่วย โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าระยะของโรคมะเร็งตับ และการรักษาโรคมะเร็งตับมีความสัมพันธ์ต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย โดยพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ได้รับการวินิจฉัยพบในระยะแรก (early stage) จะได้รับการรักษาแบบที่มีโอกาสหายขาด (curative treatment) และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 80 (4) แต่ในปัจจุบันผู้ป่วยโรคมะเร็งตับส่วนใหญ่มักจะแสดงอาการของโรคและได้รับการวินิจฉัยในขณะที่การพัฒนาของโรคอยู่ในระยะท้าย (late stage) ซึ่งพบก้อนมะเร็งขนาดใหญ่หรือมีการแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกาย ส่งผลให้ผู้ป่วยร้อยละ 84 มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 5 ปีภายหลังจากการวินิจฉัย (5, 6) เพราะฉะนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามศึกษาและมุ่งเน้นในการหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรก

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA) เป็นโมเลกุลของอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่มีขนาดเล็ก มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนหลังการถอดรหัส (post transcriptional modification) (7, 8) และมีหลากหลายการศึกษาพบว่า miRNA มีความสัมพันธ์กับหลากหลายกระบวนการภายในร่างกายของมนุษย์ เช่น การพัฒนา (development) การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (differentiation) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) รวมไปถึงการตายของเซลล์ (apoptosis) อีกทั้งยังมีการค้นพบ miRNA ที่มีความจำเพาะในแต่ละอวัยวะ (tissue specific miRNA) (9, 10) นอกจากนี้แล้วมีการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าการแสดงออกของ miRNA มีความเกี่ยวข้องทั้งกับการติดเชื้อไวรัส และการดำเนินโรคของผู้ป่วย (11) ต่อมาในปีพ.ศ. 2556 มีการศึกษาค้นพบว่า เมื่อเซลล์ตับได้รับความเสียหายจะมีการปล่อย miRNA ออกสู่กระแสเลือด (circulating miRNA) ผ่านกลไกต่างๆ และสามารถตรวจพบได้ (8) ซึ่งในปัจจุบันมีการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ

(miRNA profile) โดยอาศัยเทคนิค high throughput ยกตัวอย่างเช่น NanoString (12) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA โดยไม่มีการเพิ่มจำนวน เพื่อลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน miRNA (amplification bias) อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูง

จากหลากหลายการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อเกิดความเสียหายของเซลล์ระดับการแสดงออกของ miRNA ภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ miRNA ที่ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดมีระดับเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้น miRNA จึงเป็นหนึ่งใน biomarker ที่นิยมนำมาใช้ในการวินิจฉัยการเกิดโรคมะเร็งตับ นอกจากนี้การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรกของการเกิดโรคอาจช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับอีกด้วย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา miRNA profile ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue, ANCT) และหาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ miRNA กับระยะของโรค รวมไปถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อและซีรัมของผู้ป่วย เพื่อนำไปใช้เป็น biomarker สำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และเป็นประโยชน์ในทางคลินิกต่อไปในอนาคต

1.2 คำถามของงานวิจัย

1. รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile) ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue) มีความแตกต่างกันหรือไม่
2. ระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile) ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue)
2. เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในชิ้นเนื้อ
3. เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัม สำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

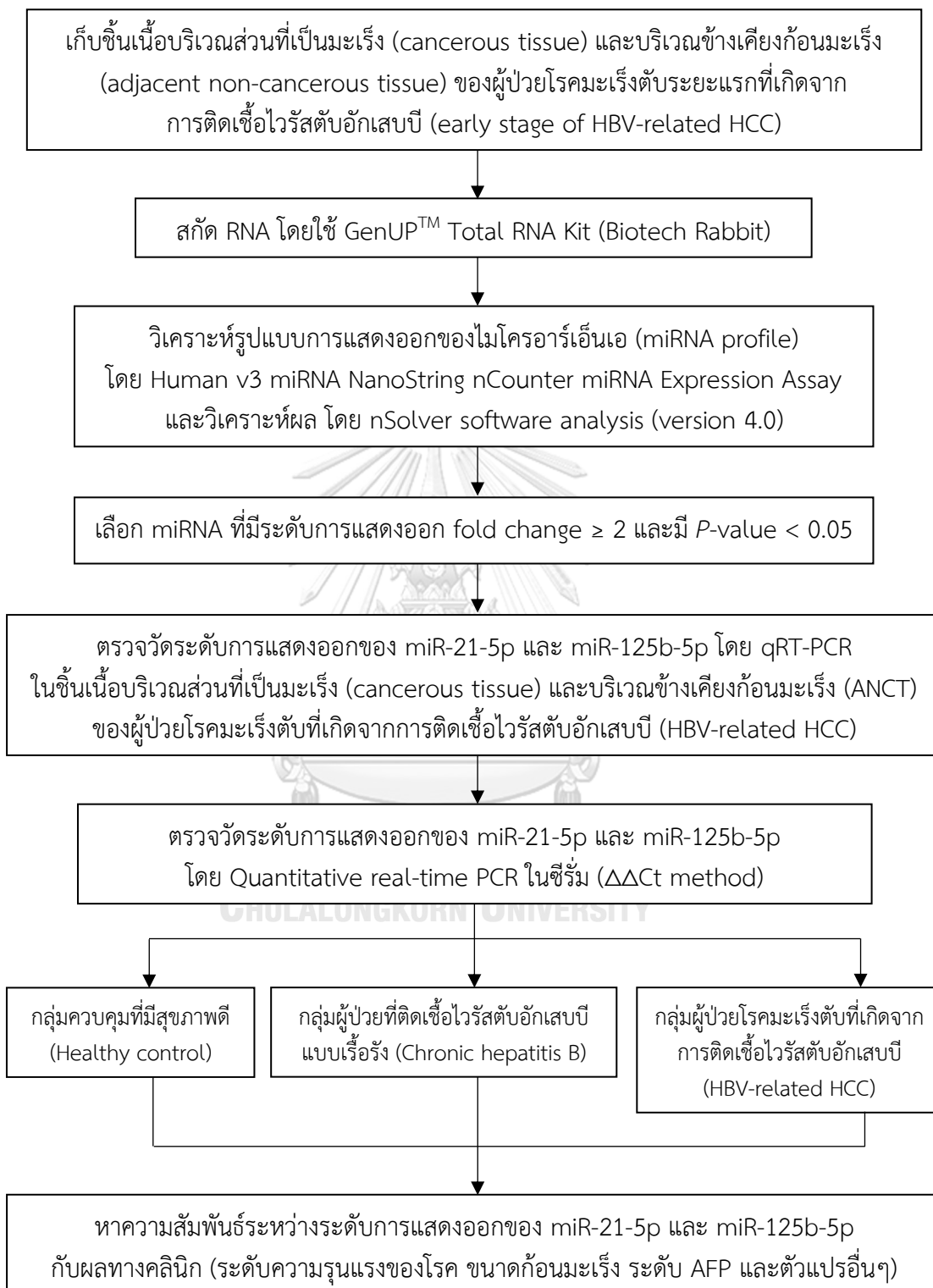
1.4 สมมติฐาน

1. รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile) ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue) มีความแตกต่างกัน

2. ระดับการแสดงออกที่ผิดปกติของไมโครอาร์เอ็นเอในซีรัมสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี



1.5 ขอบเขตของการวิจัย



1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

NanoString เป็นหนึ่งในเทคนิค high throughput ชนิดหนึ่ง ที่ใช้ในการหารูปแบบของระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจ รวมไปถึงระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA Expression Profile) ซึ่งอาศัย capture probe และ reporter probe ในการเข้าจับระหว่าง RNA และ DNA (RNA–DNA hybridization)

1.7 คำสำคัญ

Hepatocellular carcinoma (HCC)

Hepatitis B virus (HBV)

MicroRNA (miRNA)

MicroRNA profile (miRNA profile)

hsa-miR-21-5p

hsa-miR-125b-5p

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA (miRNA profile) ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ miRNA กับการพัฒนาของโรค รวมไปถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อและซีรัมของผู้ป่วย ซึ่งหากมีความสัมพันธ์กันอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทั้งยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย และไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บตัว

บทที่ 2

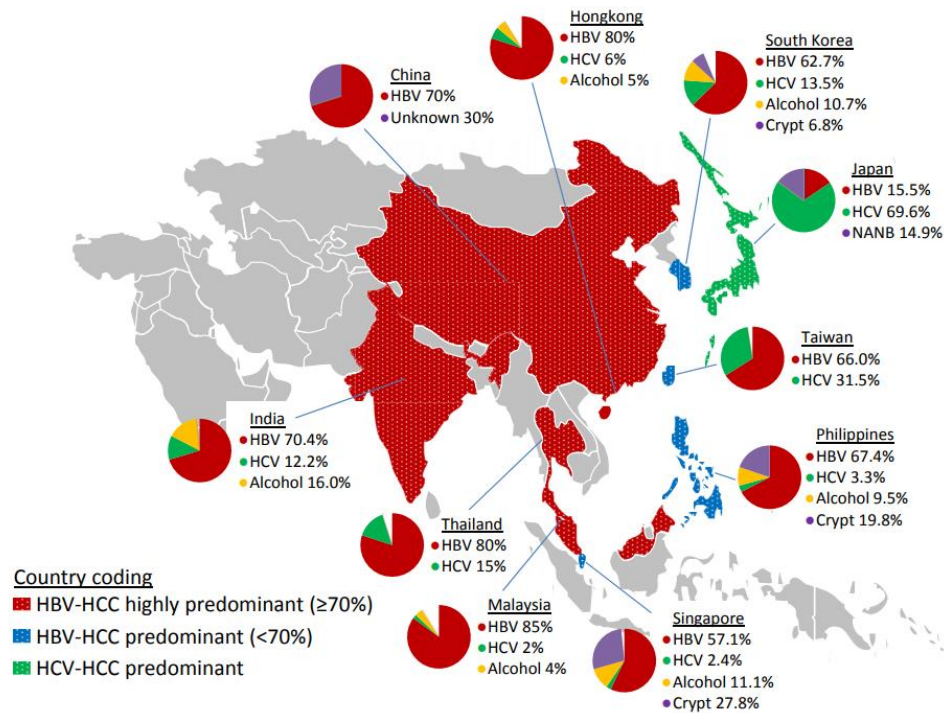
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma, HCC)

โรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) เป็นปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญ เนื่องจากมีข้อมูลทางระบาดวิทยาในปีพ.ศ. 2555 ที่ทำการสำรวจในประชากรของผู้ป่วยโรคมะเร็งทั่วโลก (Global Cancer Statistics) พบว่าโรคมะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่สามารถพบได้เป็นอันดับที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังมีอัตราการตายสูงเป็นอันดับที่ 2 ของโรคมะเร็งทั้งหมด โดยอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งตับนั้นพบได้มากที่สุด ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งรวมถึงประเทศไทย และแถบแอฟริกา (2, 3, 12) โรคมะเร็งตับส่วนใหญ่ที่พบในปัจจุบันเป็นมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (primary liver cancer) หมายถึงมะเร็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตับ ท่อน้ำดี หลอดเลือด และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ภายในเซลล์ตับ เช่น โรคมะเร็งตับ, โรคมะเร็งท่อน้ำดี (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)

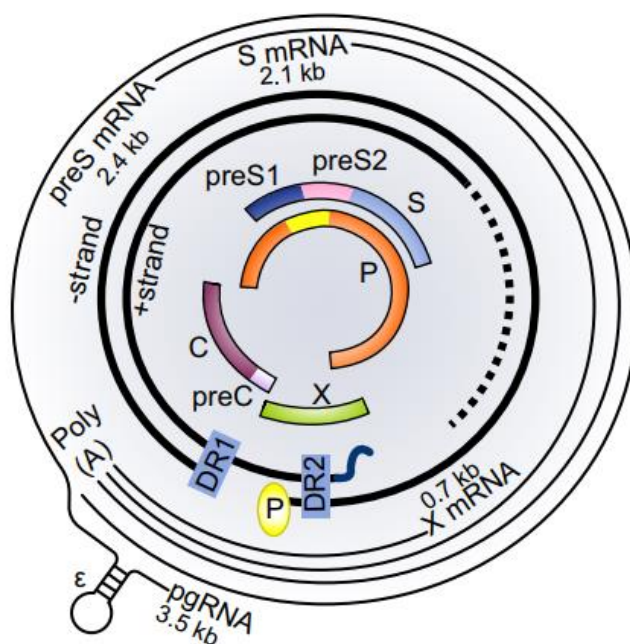
2.2 สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับ

สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับนั้นมีด้วยกันหลากหลายสาเหตุ ไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus, HBV) ไวรัสตับอักเสบบีซี (hepatitis C virus, HCV) การดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic steatohepatitis, ASH) ไขมันคั่งสะสมในตับ (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) หรือได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและการอักเสบของเซลล์ตับ ซึ่งเมื่อเกิดเป็นระยะเวลานานจะส่งผลทำให้พัฒนาเป็นมะเร็งตับต่อไป นอกจากนี้แล้วการอักเสบอย่างต่อเนื่องยังอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) ในเซลล์ตับที่มีการสร้างใหม่ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (13)



รูปที่ 1 สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศแถบทวีปเอเชีย (14)

หนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับ ร้อยละ 70-80 เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus, HBV) ถูกจัดอยู่ในตระกูล *Hepadnaviridae* เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) รูปร่างทรงกลมขนาดประมาณ 42 นาโนเมตร ประกอบไปด้วย nucleocapsid (core particle) ซึ่งห่อหุ้มสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไว้ภายใน



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี (15)

ไวรัสตับอักเสบบีมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ ที่มีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ไม่สมบูรณ์ (partially double-stranded DNA, dsDNA หรือ relaxed-circular DNA, rcDNA) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอสายลบที่มีความยาวประมาณ 3,200 เบส และดีเอ็นเอสายบวกที่มีขนาดไม่แน่นอน มีตำแหน่ง direct repeat (DR) เป็นบริเวณที่ดีเอ็นเอทั้งสองสายเชื่อมกัน (16) สายลบของสารพันธุกรรม ประกอบด้วย 4 open reading frame (ORF) ได้แก่

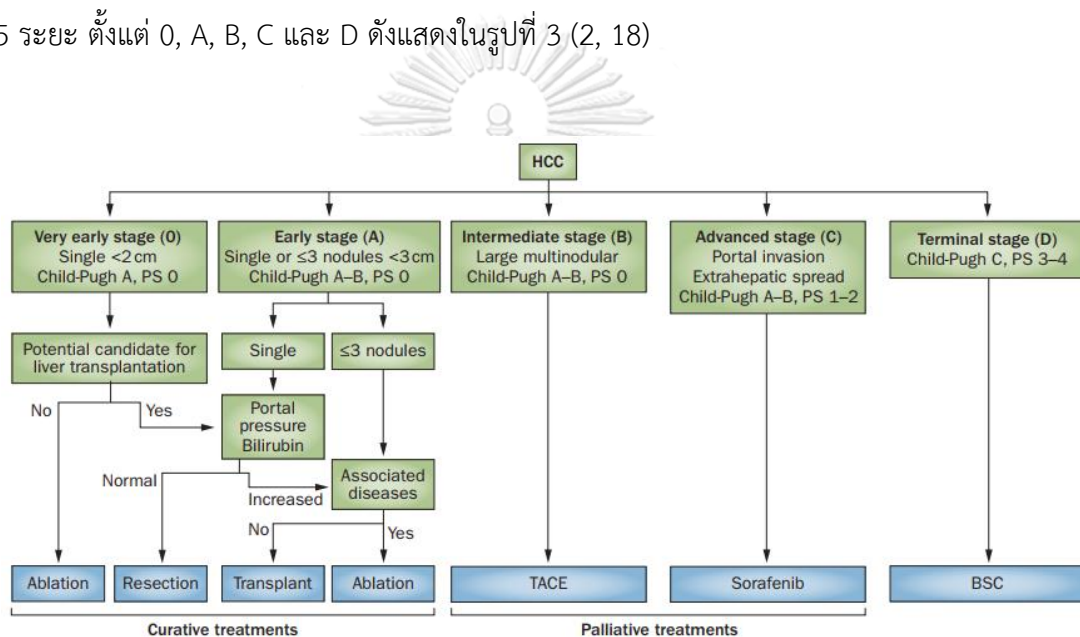
1. P-ORF เป็นส่วนที่สร้าง เอนไซม์ polymerase และเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ซึ่งมีหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนของไวรัส
2. S-ORF เป็นส่วนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้ม (surface protein, HBsAg) โดยประกอบไปด้วย โปรตีน 3 ขนาดแตกต่างกัน ได้แก่ โปรตีนขนาดใหญ่ เกิดจากส่วน Pre-S2, Pre-S1 และ S, โปรตีน ขนาดกลาง เกิดจากส่วน Pre-S2 และ S, และโปรตีนขนาดเล็ก เกิดจากส่วน S
3. C-ORF เป็นส่วนที่สร้าง e antigen (HBeAg) และ core protein ซึ่งจะถูกรูปร่างเป็น nucleocapsid เพื่อใช้ในการห่อหุ้มสารพันธุกรรมของไวรัส
4. X-ORF เป็นส่วนที่สร้าง hepatitis B protein (HBx) (15, 17) ดังแสดงในรูปที่ 2

2.3 การแบ่งระยะของโรคมะเร็งตับ

ในปัจจุบันการแบ่งระยะของโรคมะเร็งมีความสำคัญเนื่องจากสามารถใช้เป็นแนวทางในการวินิจฉัยและการรักษาโรค ซึ่งแต่ละระบบจะมีการประเมินระยะจากพารามิเตอร์แตกต่างกัน

Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging

BCLC เป็นระบบที่มีการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายซึ่งจะพิจารณาจากก้อนมะเร็ง (tumor status) การทำงานของตับ (liver function) และสภาพร่างกายของผู้ป่วย (health status) ตามระบบ Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ซึ่งสามารถแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 5 ระยะ ตั้งแต่ 0, A, B, C และ D ดังแสดงในรูปที่ 3 (2, 18)



รูปที่ 3 แสดงการแบ่งระยะและแนวทางการรักษาโรคมะเร็งตับโดยระบบ BCLC staging (18)

นอกจากการแบ่งระยะของผู้ป่วยแล้ว ยังสามารถแบ่งแนวทางการรักษาออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้

1. การรักษาที่มีโอกาสหายขาด (curative treatments) จัดเป็นวิธีพื้นฐานในการรักษา มะเร็งซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะกำจัดก้อนมะเร็งให้หายไป โดยทำการผ่าตัด (resection) เพื่อตัดบริเวณ ก้อนมะเร็งการปลูกถ่ายตับ (liver transplant) และการให้ความร้อนกับก้อนมะเร็ง (radiofrequency Ablation, RFA) เพื่อให้เกิดเป็นเนื้อตาย วิธีเหล่านี้เหมาะสำหรับการรักษาผู้ป่วยในระยะเริ่มต้น (very early stage และ early stage) เนื่องจากมีก้อนมะเร็งขนาดเล็ก จำนวนไม่มาก และยังไม่มีการ แพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกาย

2. การรักษาแบบประคองอาการ (palliative treatment) มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็ง รวมทั้งยับยั้งการแพร่กระจายของก้อนมะเร็ง โดยทำการให้สารเคมีบำบัดผ่านทางหลอดเลือดแดงเข้าสู่บริเวณก้อนมะเร็งเพื่อไม่ให้เลือดสามารถไปเลี้ยงบริเวณก้อนมะเร็ง และการใช้ยา เช่น sorafenib ซึ่งมีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ของเซลล์มะเร็ง วิธีเหล่านี้เหมาะกับการรักษาผู้ป่วยในระยะกลางของโรค (intermediate stage และ advanced stage) เนื่องจากผู้ป่วยไม่สามารถผ่าตัดได้ ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ และมีการลุกลามเข้าสู่เส้นเลือด

3. การรักษาแบบพยุงอาการ (best supportive care, BSC) เป็นการรักษาตามอาการที่เกิดขึ้นของผู้ป่วยมะเร็งระยะสุดท้าย มีวัตถุประสงค์เพื่อบรรเทาอาการและลดภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่อาจเกิดขึ้น (4, 12, 18)

Child-Pugh

เป็นระบบที่ใช้ในการประเมินความรุนแรงของภาวะตับแข็ง (cirrhosis) โดยพิจารณาจากระดับของ albumin, bilirubin, ระยะเวลาในการแข็งตัวของเลือด (international normalized ratio, INR), ภาวะท้องมาน (ascites) และ ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นกับสมอง (encephalopathy) ซึ่งจะใช้พารามิเตอร์ต่างๆในการให้คะแนน (19, 20) ดังแสดงในรูปที่ 4

Child-Turcotte-Pugh Classification for Severity of Cirrhosis			
Clinical and Lab Criteria	Points*		
	1	2	3
Encephalopathy	None	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4
Ascites	None	Mild to moderate (diuretic responsive)	Severe (diuretic refractory)
Bilirubin (mg/dL)	< 2	2-3	>3
Albumin (g/dL)	> 3.5	2.8-3.5	<2.8
Prothrombin time			
Seconds prolonged	<4	4-6	>6
or			
International normalized ratio	<1.7	1.7-2.3	>2.3
*Child-Turcotte-Pugh Class obtained by adding score for each parameter (total points)			
Class A = 5 to 6 points			
Class B = 7 to 9 points			
Class C = 10 to 15 points			

รูปที่ 4 แสดงระดับของพารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้ในการประเมินความรุนแรงของภาวะตับแข็ง (19)

การศึกษาในปีพ.ศ. 2553 ชี้ให้เห็นว่าระยะของโรคมะเร็งตับ และการรักษาโรคมะเร็งตับ มีความสัมพันธ์ต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย โดยพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่วินิจฉัยพบในระยะแรก (very early stage) จะได้รับการรักษาแบบ curative treatment และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 81.7 แต่ผู้ป่วยในระยะสุดท้าย (terminal stage) จะมีอัตราการรอดชีวิตไม่ถึง 3 ปี ภายหลังจากการวินิจฉัย (1) เช่นเดียวกับการศึกษาในปีพ.ศ. 2555 ที่ทำการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (21) และการศึกษาในปีพ.ศ. 2558 พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับมากกว่าร้อยละ 60 มักจะได้รับการวินิจฉัยในระยะท้ายของการเป็นมะเร็ง ซึ่งพบมะเร็งขนาดใหญ่ หรือมีการแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย ส่งผลให้ผู้ป่วยร้อยละ 84 มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 5 ปี ภายหลังจากการวินิจฉัย แต่ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ได้รับการวินิจฉัยในระยะเริ่มแรกของมะเร็ง จะมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าถึงร้อยละ 70 (6, 22) แต่อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรกยังเป็นเรื่องที่ยาก เนื่องจากในระยะแรกของโรคผู้ป่วยจะยังไม่มีการแสดงอาการของโรค จึงทำให้มะเร็งเกิดการพัฒนาได้เรื่อยๆ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะท้ายๆ ของโรคที่ก่อนมะเร็งเกิดการลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆ จนส่งผลต่อระบบการทำงานของร่างกาย

2.4 การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ

การตรวจวินิจฉัยการเกิดโรคมะเร็งตับที่ใช้อยู่ในปัจจุบันอ้างอิงจาก guidelines ของ The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) โดยจะอาศัยการตรวจคัดกรองด้วยการอัลตราซาวด์ (ultrasound) ร่วมกับการตรวจวัดระดับ alpha-fetoprotein (AFP) และติดตามทุก 6-12 เดือน (23) นอกจากนี้อาจประเมินร่วมกับระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ เช่น เอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST หรือ serum glutamic oxaloacetic transaminase, SGOT และ เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT หรือ serum glutamic pyruvate transaminase, SGPT) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองตัวจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อเซลล์ตับได้รับความเสียหาย และเกิดการหลั่งเอนไซม์เข้าสู่กระแสเลือด แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าการใช้ระดับของ AFP ในซีรัมเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับนั้นมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่ต่ำ เนื่องจากระดับของ AFP ในซีรัมสามารถตรวจพบได้ในขณะที่ตั้งครรภ์ รวมไปถึงในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric carcinoma) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) และมะเร็งอัณฑะ (testicular

carcinoma) (24) ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false-positive) นอกจากนั้นแล้วผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในระยะแรก ระดับ AFP จะอยู่ในเกณฑ์ปกติ ซึ่งอาจทำให้เกิดผลลบปลอม (false-negative) (25) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยตั้งแต่ในระยะแรกของโรคมะเร็งตับที่มีความไวและความจำเพาะที่สูง รวมทั้งไม่ทำให้ผู้ป่วยบาดเจ็บ (non-invasive biomarker) เช่น วัดระดับของโปรตีน, เอนไซม์, ไซโตไคน์ (cytokines) และสารพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ระดับของ mRNA หรือ miRNA ภายในกระแสเลือด

2.5 ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA) เป็น RNA ชนิดหนึ่งที่มีขนาดประมาณ 18-24 นิวคลีโอไทด์อยู่ในส่วนของ noncoding RNA (ncRNA) ถูกค้นพบครั้งแรกใน *Caenorhabditis elegans* เมื่อปีพ.ศ. 2536 โดย miRNA ตัวแรกที่ถูกค้นพบมีชื่อว่า *lin-4* มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนหลังการถอดรหัส (post transcriptional modification) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ mRNA (26)

การเรียกชื่อ การแบ่งกลุ่ม และการจัดกลุ่มของไมโครอาร์เอ็นเอ

การเรียกชื่อของไมโครอาร์เอ็นเอ

1. การเรียกชื่อโดยระบุ species ที่ค้นพบ ยกตัวอย่างเช่น

“hsa” มาจาก *Homo sapiens* ซึ่งเป็น miRNA ที่สามารถพบได้ในจีโนมของมนุษย์

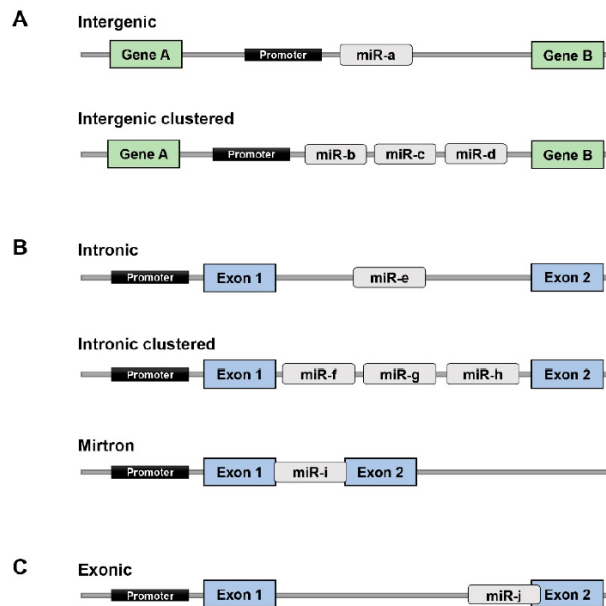
“mmu” มาจาก *Mus musculus* ซึ่งเป็น miRNA ที่สามารถพบได้ในจีโนมของหนู

“rno” มาจาก *Rattus norvegicus* ซึ่งเป็น miRNA ที่สามารถพบได้ในจีโนมของหนู

“cel” มาจาก *Caenorhabditis elegans* ซึ่งเป็น miRNA ที่สามารถพบได้ในจีโนมของหนอนตัวกลม ดังแสดงในรูปที่ 5

Accession	ID
MI0000076	hsa-mir-20a
MI0000568	mmu-mir-20a
MI0000638	rno-mir-20a

รูปที่ 5 แสดงการเรียกชื่อของ miRNA โดยจำแนกตามสิ่งมีชีวิตที่ค้นพบ

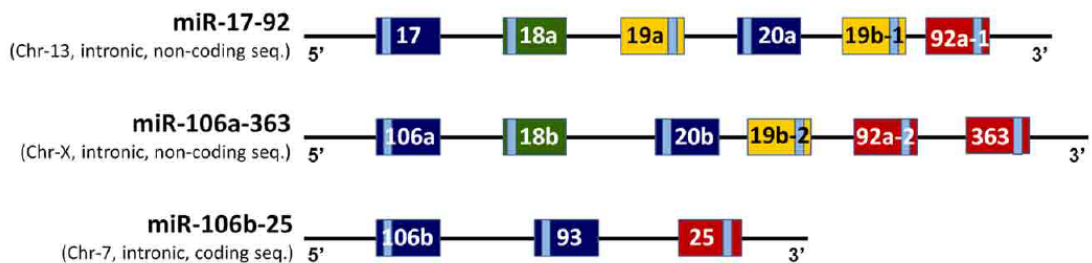


รูปที่ 7 แสดงชนิดของ miRNA โดยแบ่งตามตำแหน่งและโครงสร้างของยีน (29)

การจัดกลุ่มของไมโครอาร์เอ็นเอ

1. miRNA cluster

miRNA ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกัน และมีระยะห่างกันไม่เกิน 10 kb ซึ่งจะถูก transcript โดย RNA polymerase ออกมาพร้อมกัน เนื่องจากมี promoter เดียวกัน ดังนั้น miRNA ที่อยู่ใน cluster เดียวกันส่วนใหญ่จะมีระดับการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน โดยการเรียกชื่อของ miRNA cluster จะเรียกชื่อของ miRNA ตัวแรกและตัวสุดท้ายที่เกิดการ transcription พร้อมกัน ยกตัวอย่าง เช่น miRNA-17-92 บนโครโมโซมที่ 13 เมื่อเกิดการ transcription จะได้ miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 และ miR-92a-1 ออกมาพร้อมกัน ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ miRNA cluster (30)

2. miRNA family

miRNA ที่มีบริเวณ seed region เหมือนกัน ดังนั้นการทำงานของ miRNA ที่อยู่ใน family เดียวกัน ส่วนใหญ่มักจะไปจับกับ RNA target เดียวกัน โดยการเรียกชื่อของ miRNA family จะเรียกชื่อของ miRNA แล้วตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษ ยกตัวอย่างเช่น let-7 family ประกอบด้วย hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-let-7g และ hsa-let-7i ดังแสดงในรูปที่ 9

hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU

รูปที่ 9 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ miRNA family (ดัดแปลงจาก (31))

3. Paralogous miRNA

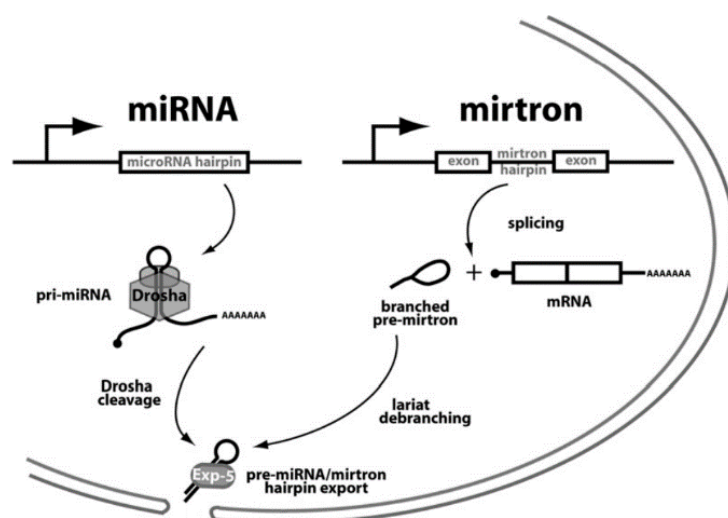
miRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกตำแหน่ง แต่ primary miRNA (pri-miRNA) มาจากคนละโครโมโซม ยกตัวอย่างเช่น miR-92a ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในมนุษย์และหนู โดยการเรียกชื่อของ Paralogous miRNA จะเรียกชื่อของ miRNA และมีตัวเลขต่อท้ายตามลำดับที่ถูกค้นพบ ยกตัวอย่างเช่น hsa-miR-92a-1 มี pri-miRNA อยู่บนโครโมโซมที่ 13 ในขณะที่ hsa-miR-92a-2 มี pri-miRNA อยู่บนโครโมโซม X ส่วน mmu-miR-92a-1 มี pri-miRNA อยู่บนโครโมโซมที่ 14 ในขณะที่ mmu-miR-92a-2 มี pri-miRNA อยู่บนโครโมโซม X ดังแสดงในรูปที่ 10

hsa-miR-92a-1	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-92a-2	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
mmu-miR-92a-1	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG
mmu-miR-92a-2	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG

รูปที่ 10 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ paralogous miRNA (ดัดแปลงจาก (32))

4. mirtron

miRNA ที่เกิดจากบริเวณ intron ของยีน โดยปกติแล้วเมื่อเกิดการ transcription โดย RNA polymerase จะเกิดกระบวนการ splicing เพื่อตัดบริเวณ intron ออกและเชื่อมบริเวณ exon เข้าด้วยกัน เพื่อเกิดกระบวนการ translation ต่อไป ซึ่งส่วนของ intron นั้นจะเกิดการจับกันเป็น Lariat และเกิดกระบวนการ debranching เกิดเป็น precursor mirtron (pre-mirtron) ที่มีลักษณะเป็น stem-loop หลังจากนั้น pre-mirtron จะถูกขนส่งออกจากนิวเคลียสไปสู่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยอาศัยโปรตีน exportin-5 ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงกระบวนการเกิด mirtron (ดัดแปลงจาก (33))

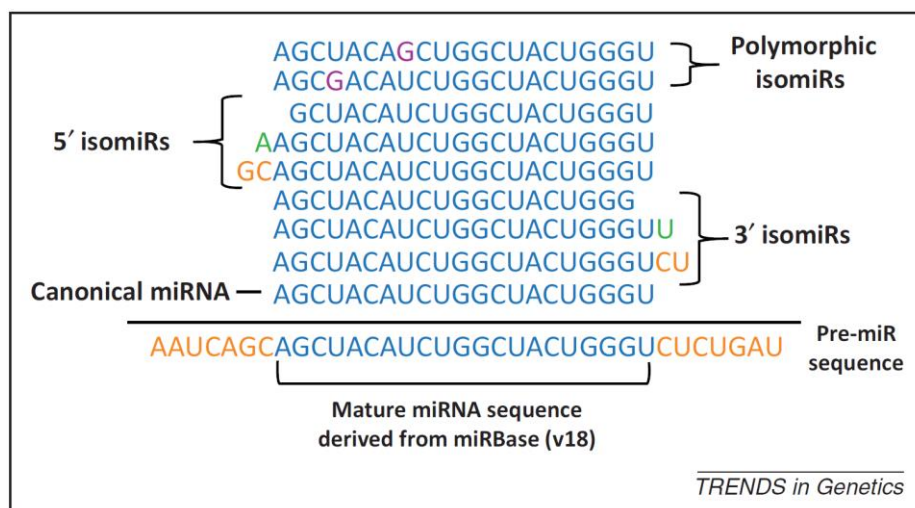
5. isomiR

miRNA ที่เกิดจาก pri-miRNA และ pre-miRNA เดียวกัน แต่ mature miRNA มีความแตกต่างกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ และความยาวของ mature miRNA ซึ่งความยาวของ miRNA ที่แตกต่างกันนั้น อาจเกิดจากตัดของเอนไซม์ Drosha และ Dicer หรือเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ exonuclease ซึ่งจะทำการตัดและหรือเติมเบสที่บริเวณปลาย 5' หรือปลาย 3' การจำแนกชนิดของ isomiR แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. Polymorphic isomiRs ลำดับเบสของ mature miRNA เปลี่ยนไปบางตำแหน่ง ในขณะที่ขนาดไม่เปลี่ยนแปลง

2. 5'-isomiRs มีการตัดและหรือเติมเบสทางปลาย 5' ของ miRNA โดยการเติมเบสนั้น อาจเกิดการเติมเบสที่อาศัยการเข้าคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (templated addition) หรือการเติมเบสโดยไม่อาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (non-templated addition)

3. 3'-isomiRs มีการตัดและหรือเติมเบสทางปลาย 3' ของ miRNA โดยการเติมเบสนั้น อาจเกิดการเติมเบสที่แบบ templated addition หรือ non-templated addition เช่นเดียวกับ 5'-isomiRs (34) ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงลักษณะและการเรียกชื่อของ isomiR (34)

การสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

กระบวนการในการสังเคราะห์ miRNA นั้นจะเกิดขึ้นทั้งภายในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักได้แก่

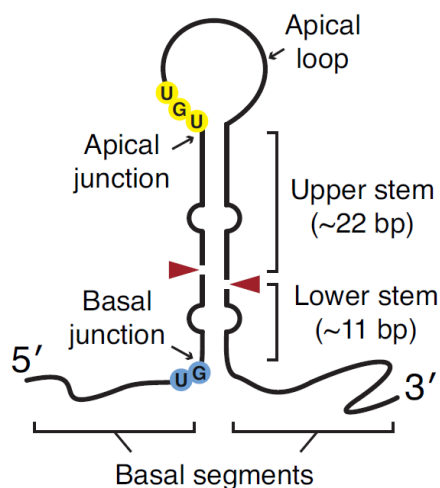
1. กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส (Nuclear processing)

กระบวนการสังเคราะห์ miRNA ที่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส แบ่งออกเป็น 2 pathway คือ

1. Standard pathway

miRNA เกิดการ transcription โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II (RNA pol II) ภายในนิวเคลียสเกิดเป็น pri-miRNA ขนาดประมาณ 80 นิวคลีโอไทด์ มีลักษณะเป็น hairpin loop จากนั้นจะมีเอนไซม์ Drosha ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของ RNase III-type endonucleases มีคุณสมบัติในการเข้าจับและสามารถตัด RNA สายคู่ (double-stranded RNA, dsRNA) โดยการทำงานของเอนไซม์ Drosha นั้นจะเข้าจับกับ pri-miR บริเวณรอยต่อระหว่าง RNA สายเดี่ยว และ RNA สายคู่ (ssRNA-dsRNA junction) ประกอบกับ UG motif บริเวณฐานของ pri-miRNA และมี cofactor ชื่อ DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) ที่จะอาศัย UGU motif บริเวณ stem-loop ของ pri-miR ทำงานร่วมกันเกิดเป็น Drosha-DGCR8 complex หรือ

microprocessor ตัดสายนิวคลีโอไทด์บริเวณเหนือจากฐานประมาณ 11 เบส ทำให้สั้นลง เกิดเป็น pre-miRNA ขนาดประมาณ 65 นิวคลีโอไทด์



รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างของ primary miRNA บริเวณที่ Drosha และ DGCR8 เข้าจับ (35)

2. Alternative pathway

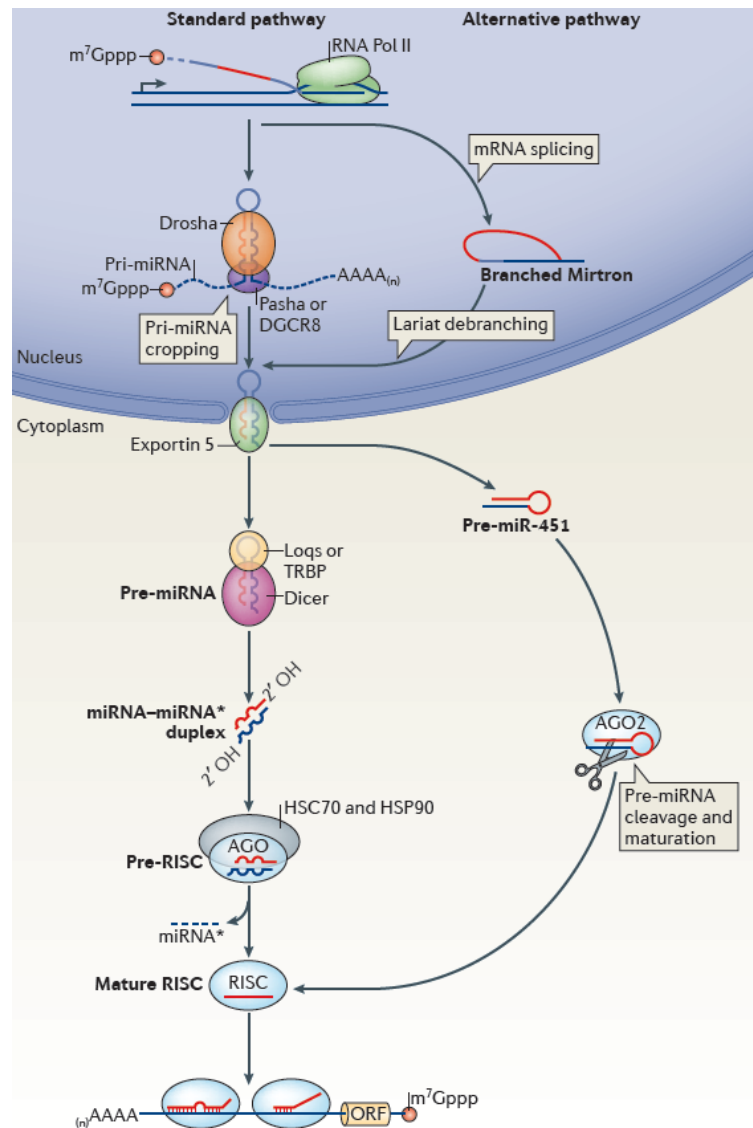
หลังจากที่เกิดการ transcription โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II (RNA pol II) ภายในนิวเคลียส บริเวณ intron ของยีนที่เกิดจากการ splicing จะเกิดการม้วนจับกันเป็น Lariat และเกิดกระบวนการ Debranching โดยอาศัยเอนไซม์ lariat debranching (Dbr) enzyme เกิดเป็น pre-mirtron หรือ pre-miRNA (36)

2. กระบวนการขนส่งออกจากนิวเคลียส (Nuclear export)

pre-miRNA หรือ pre-mirtron จะถูกขนส่งจากนิวเคลียสออกมายังไซโตพลาสซึม โดยอาศัยโปรตีน exportin-5 และ GTP-binding nuclear protein (RAN-GTP) ผ่าน nuclear pore

3. กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic processing)

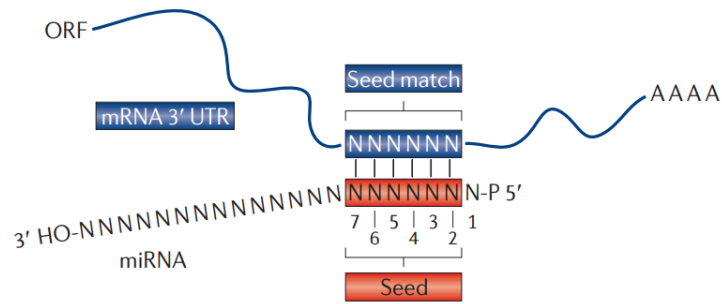
เมื่อ pre-miRNA ถูกขนส่งออกมายังไซโตพลาสซึมแล้ว ภายในไซโตพลาสซึมจะมีเอนไซม์ RNase III อีกตัวหนึ่งชื่อเอนไซม์ Dicer ซึ่งจะทำางานร่วมกับ transactivation response RNA-binding protein (TRBP) เพื่อตัดบริเวณ loop ของ pre-miRNA เกิดเป็นไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สมบูรณ์ (miRNA duplex) ขนาดประมาณ 18-24 นิวคลีโอไทด์



รูปที่ 14 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ miRNA แบบ Standard และ Alternative pathway (37)

การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ

การทำงานของ miRNA จะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ RNA helicase แยกสายของ miRNA duplex จากนั้น miRNA สายหนึ่งจะเกิดการรวมกับ Argonaute2 (Ago2) และอาศัย seed region บริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 จากปลาย 5' ในการเข้าจับกับ mRNA เป้าหมาย เกิดเป็น RNA-induced silencing complex (RISC complex) โดยทั่วไปแล้วปลาย 5' ของ miRNA จะจับกับบริเวณปลาย 3' untranslated region (3' UTR) ของ mRNA เป้าหมาย (mRNA target) ดังแสดงในรูปที่ 15

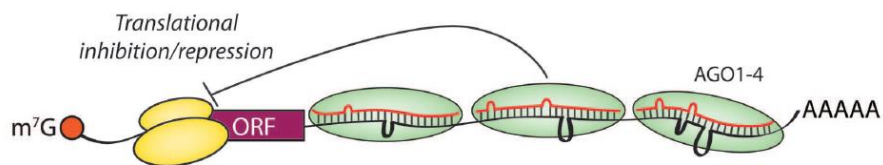


รูปที่ 15 แสดงการเข้าจับกันระหว่าง miRNA กับ mRNA เป้าหมายโดยอาศัย seed region (38)

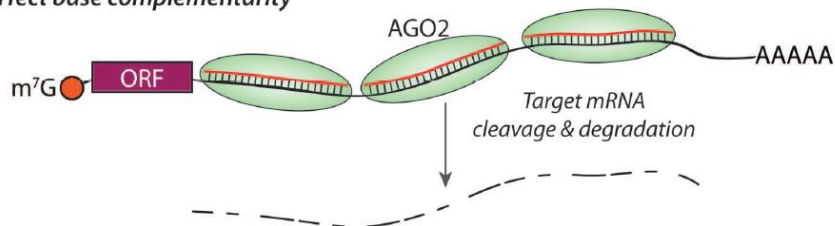
การเข้าจับกันระหว่าง miRNA กับ mRNA เป้าหมาย สามารถเกิดขึ้นได้ 2 กรณี คือ ในกรณีที่ miRNA จับกับ mRNA เป้าหมายได้เพียงบางส่วน (partial complementary หรือ imperfect complementary) จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัสของ mRNA (translational repression) แต่กรณีที่ miRNA จับกับ mRNA เป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์ (perfect complementary) จะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของ mRNA (mRNA degradation) ดังแสดงในรูปที่ 16

MicroRNA-mediated gene silencing

Imperfect base complementarity



Perfect base complementarity



รูปที่ 16 แสดงการทำงานของ miRNA (39)

2.6 บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอในโรคตับ

ในปัจจุบันมีการค้นพบไมโครอาร์เอ็นเอจำนวนมาก และหลากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นถึงบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนา (development) การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (differentiation) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) รวมไปถึงการตายของเซลล์ (apoptosis) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของ miRNA ที่มีความจำเพาะต่ออวัยวะหรือเนื้อเยื่อแต่ละประเภท ยกตัวอย่างเช่น miR-133a และ miR-133b ที่มีการแสดงออกสูงในกล้ามเนื้อ miR-302 family ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) (40) รวมไปถึง miR-122 ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ตับ ซึ่งถูกค้นพบเมื่อปีพ.ศ. 2545 โดยมีการศึกษาพบว่าในสภาวะปกติ miR-122 มีการแสดงออกสูงถึงร้อยละ 70 ในเซลล์ตับของหนู และ ร้อยละ 52 ในเซลล์ตับของมนุษย์ มีการรายงานเกี่ยวกับ miR-122 ถึงบทบาทสำคัญเกี่ยวกับเซลล์ตับ เช่น กระบวนการสังเคราะห์ไขมัน กระบวนการเมทาบอลิซึมของคลอเลสเทอรอล (9, 10) นอกจากนั้นแล้ว miRNA ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆในมนุษย์ รวมถึงการเกิดมะเร็ง (tumorigenesis) การศึกษาในปีพ.ศ. 2545 ชี้ให้เห็น miRNA ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง โดยพบ miR-15a และ miR-16-1 อยู่บริเวณโครโมโซมที่ 13q14 มักจะเกิดการ deletion หรือมีการแสดงออกที่ลดลงในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (chronic lymphocytic leukemia, CLL) ในกรณีที่ miR-15 และ miR-16 มีระดับการแสดงออกที่ลดลงนั้น ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *bcl-2* ที่มากขึ้น และส่งผลให้เกิดการตายแบบ apoptosis ลดลง ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (41) อีกทั้งยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง miRNA กับผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่ามี miRNA จำนวนมากที่มีความเกี่ยวข้องทั้งการเกิดโรค ความรุนแรงของโรค การเพิ่มจำนวนของไวรัส รวมไปถึงตัวผู้ป่วยเอง (11)

2.7 เทคนิคในการวิเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

microRNA profile (miRNA profile) เป็นการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA ซึ่งในปัจจุบันมีด้วยกันหลากหลายเทคนิค ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ miRNA profile โดยอาศัยเทคนิค high-throughput จะแสดงให้เห็นรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด หรือในสภาวะที่แตกต่างกัน ดังนั้นระดับการแสดงออกของ miRNA อาจจะมีบทบาทในการใช้ทำนายหรือการวินิจฉัยการเกิดโรคต่างๆได้ ในปัจจุบันจึงมีหลากหลาย

การศึกษาให้ความสนใจกับรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในแต่ละสภาวะ การเลือกใช้เทคนิคในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ miRNA นั้นต้องคำนึงถึงตัวอย่างที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ รวมทั้งปริมาณ และความเข้มข้นของ RNA และหรือ miRNA ขึ้นต่ำขึ้นอยู่กับคำแนะนำของแต่ละเทคนิค การศึกษาโดยอาศัยเทคนิค high-throughput แต่ละวิธีจะมีขั้นตอน รวมทั้งข้อดี และข้อเสียแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

Profiling method	Workflow	Sensitivity	Specificity	Throughput	Absolute quantification /accuracy	Flexibility	Can identify novel miRNAs	Data analysis	Other
qRT-PCR	Reverse transcription Optional pre-amplification PCR	+++	+++	+ / +++	+++	+++	N	E	Normalization
GeneChip microarrays	Biotin labeling Hybridization Staining Scanning	+	+	+++	+	+ / -	N	M	Various species on the same array
Oligonucleotide microarrays	Cy3 labeling Hybridization Scanning	+ / +++	+ / +++	+++	+	++	N	M	
Exiqon miRCURY microarrays	Hy3/Hy5 labeling Hybridization Mono- or dual-wavelength scanning	++	++	+++	++	++	N	M	LNA-capture probes Allows for either mono- or dual-wavelength scanning
nCounter Analysis System	In-solution hybridization (biotinylated capture probe and a miRNA-specific fluorescent reporter probe) Complexes immobilization and alignment Scanning	++	++	++	++	++	N	M	Normalization
NextGen sequencing	3' Adaptor ligation 5' RT primer annealing 5' adaptor ligation Reverse transcription PCR	++	+++	+++	++	+++	Y	D	Highest cost

ตารางที่ 1 แสดงเทคนิคในการวิเคราะห์ miRNA profile และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพต่างๆของแต่ละเทคนิค (42)

Can identify novel miRNAs: Y = yes; N = no

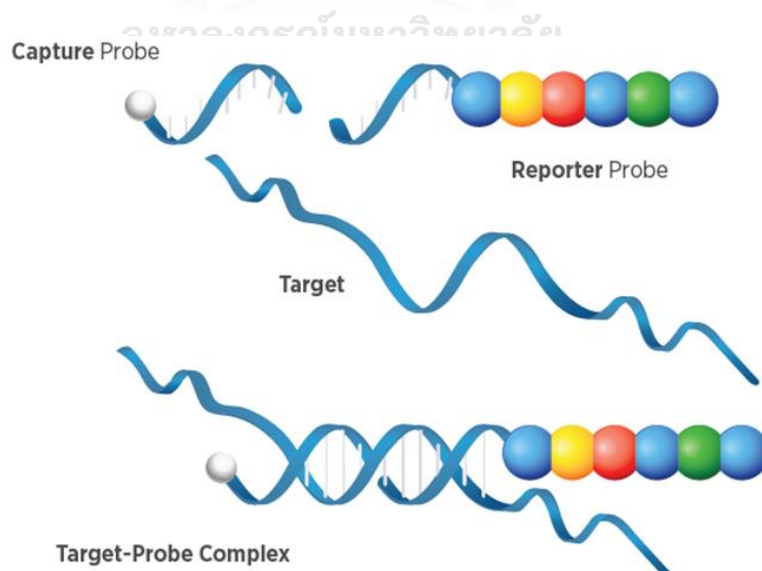
Data analysis: E = relatively easy; M = moderate; D = difficult

2.8 nCounter[®] Human V3 miRNA Expression Assay หรือ NanoString

nCounter[®] Human V3 miRNA Expression Assay หรือ NanoString เป็นเทคนิคที่ได้รับการออกแบบมาเพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miRNA ในตัวอย่างซึ่งมีความไวสูง (sensitivity) และความแม่นยำสูง (reproducibility) รวมทั้งสามารถวิเคราะห์ miRNA จำนวนมากพร้อมๆกัน (multiplexed method) โดยอาศัยหลักในการเข้าจับกันระหว่าง RNA และ DNA (RNA-DNA hybridization) และใช้การติดฉลากโมเลกุลที่สนใจด้วย nCounter Reporter Probes ซึ่งสามารถวิเคราะห์ miRNA ของมนุษย์ได้ประมาณ 800 ชนิด นอกจากนั้นแล้วยังเป็นการตรวจหา miRNA โดยไม่อาศัยเอนไซม์ในการ reverse transcription และเพิ่มจำนวน (amplification) miRNA จึงลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น (no amplification bias)

ซึ่งจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอน hybridization จะเป็นการเข้าจับระหว่าง probe 2 ชนิด กับโมเลกุลเป้าหมาย
 1. capture Probe เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดประมาณ 30-50 เบส โดยทางปลาย 5' จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย และทางปลาย 3' จะติดอยู่กับ biotin
 2. reporter Probes เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดประมาณ 30-50 เบส โดยทางปลาย 5' จะมีรหัสสี (color code) 4 สี (แดง, เขียว, เหลือง, น้ำเงิน) จำนวน 6 ตำแหน่งเพื่อใช้เป็นสัญญาณในการตรวจวัด และทางปลาย 3' จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายดังแสดงในรูปที่ 17

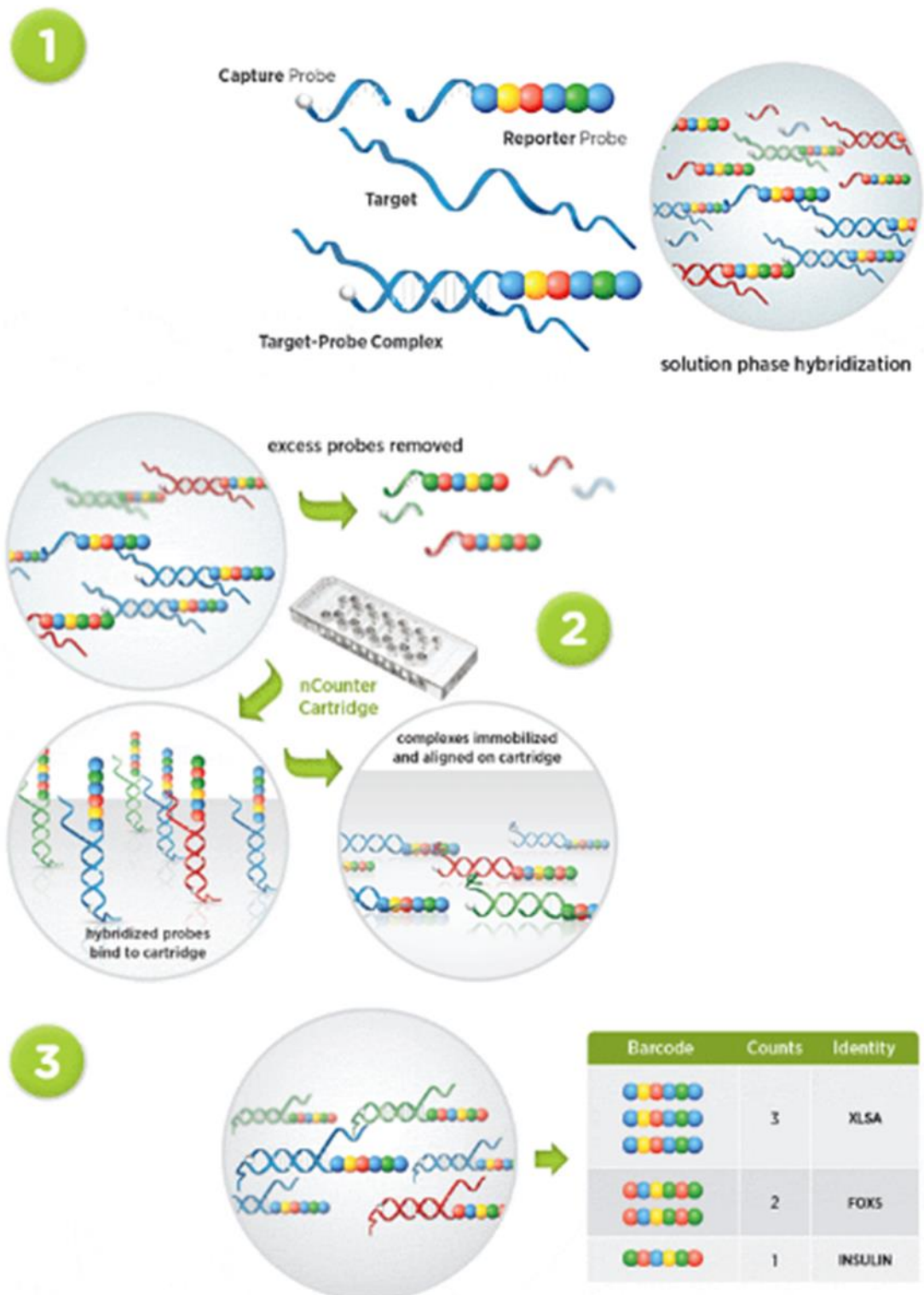


รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างของ capture probe และ reporter probes (รูปบน) การเข้าจับกันระหว่าง capture probe, reporter probes และยีนเป้าหมาย (รูปล่าง)

2. ขั้นตอน purification และ immobilization เป็นการล้าง probe ส่วนเกินออก และยึด target-probe complex ไว้กับ cartridge โดยอาศัย biotin ที่อยู่บริเวณปลาย 3' ของ capture probe จับกับ streptavidin ที่เคลือบบนผิวของ cartridge

3. ขั้นตอน data collection เป็นการอ่านผลโดยอาศัยสัญญาณของ fluorescent ซึ่งเป็นรหัสที่จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย โดยจำนวนที่นับได้จะเท่ากับจำนวนโมเลกุลของ miRNA ที่สนใจโดยตรงที่พบในตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 18



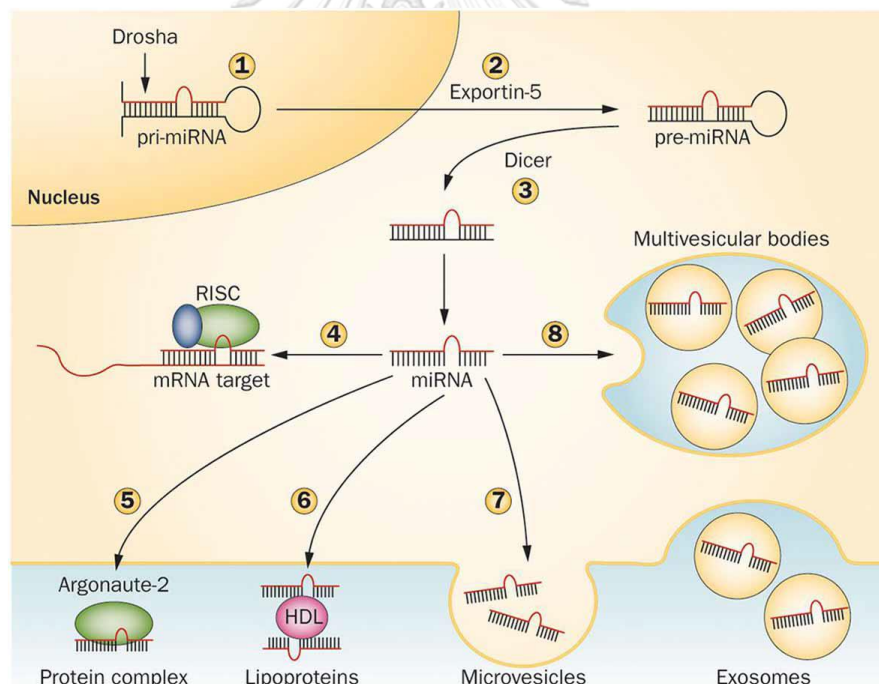


รูปที่ 18 แสดงขั้นตอนในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profiling)

โดยใช้เทคนิค nCounter® Technology

2.9 การนำไมโครอาร์เอ็นเอมาประยุกต์ใช้

หลากหลายการศึกษาชี้ให้เห็นว่ามีการปลดปล่อย miRNA จากเซลล์เข้าสู่ของเหลวภายในร่างกาย (body fluid) ไม่ว่าจะเป็นกระแสเลือด น้ำลาย น้ำตา ปัสสาวะ หรือแม้กระทั่งน้ำนม ทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะที่เป็นโรค ซึ่งการปลดปล่อย miRNA ออกมายังไม่ทราบกลไกเป็นที่แน่นอน แต่มักจะอยู่ในรูปที่ป้องกันการโดนทำลายจากเอนไซม์ RNase ภายในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น การรวมกับ RNA-binding protein, รวมกับ lipid หรือ lipoprotein, ถูกปล่อยออกมาพร้อมกับ microvesicles, exosome และ apoptotic bodies (43, 44) การศึกษาในปีพ.ศ. 2556 พบว่า เมื่อเซลล์ตับได้รับความเสียหายจากปัจจัยต่างๆไม่จำเป็นการได้รับแอลกอฮอล์หรือการติดเชื้อไวรัส จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของตับ รวมทั้งระดับการแสดงออกของ miRNA ภายในเซลล์ตับ เมื่อเซลล์ตับได้รับความเสียหายจึงส่งผลให้ miRNA ภายในเซลล์หลุดเข้าสู่ภายในกระแสเลือด (8)



รูปที่ 19 แสดงกลไกในการปล่อย miRNA เข้าสู่กระแสเลือด (44)

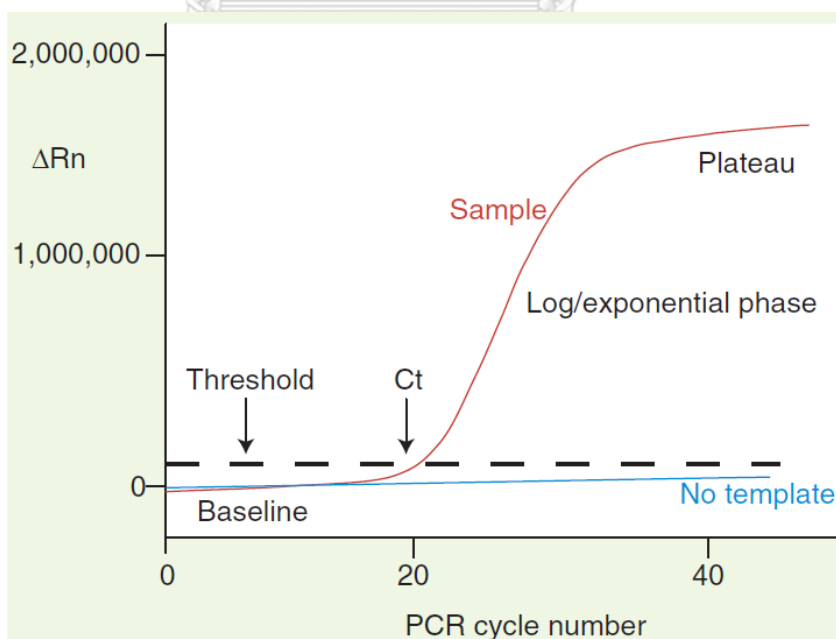
จากหลากหลายการศึกษาชี้ให้เห็นว่า miRNA เป็นโมเลกุลที่ถูกผลิตขึ้นจากร่างกาย และสามารถตรวจพบได้จากของเหลวภายในร่างกายทั้งในสภาวะปกติ หรือเมื่อเกิดพยาธิสภาพ ดังนั้น miRNA อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆภายในร่างกาย รวมทั้งอาจจะสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัย และพยากรณ์แนวโน้มที่จะเกิดโรคต่างๆ ซึ่งการตรวจวัด miRNA ภายในกระแสเลือด

ถือเป็นหนึ่งวิธีที่ไม่ทำให้ผู้ป่วยบาดเจ็บ (non-invasive) ในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะศึกษา miRNA ที่มีความจำเพาะ และสามารถบ่งบอกการเกิดพยาธิสภาพของโรคได้

2.10 Real-time polymerase chain reaction

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนโดยอาศัย primer ที่มีความจำเพาะ พร้อมกับตรวจวัดปริมาณของ DNA หรือ complementary DNA (cDNA) ที่สนใจที่เพิ่มขึ้นในทุกช่วงเวลาได้ทันที โดยไม่ต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน โดยอาศัยการเรืองแสงของสี fluorescence และแสดงผลออกมาเป็นค่า cycle threshold (C_t) โดยกราฟที่ได้จากการทำ real-time PCR สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลักๆ ได้แก่

1. linear ground phase เป็นช่วงต้นของการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจ ประมาณช่วง 10-15 cycle แรก ซึ่งมีจำนวนยีนที่สนใจค่อนข้างต่ำ ทำให้มี minor groove ในการที่ fluorescence จะเข้าจับค่อนข้างต่ำ ระดับของการเปล่งแสง fluorescence จึงใกล้เคียงกับ background
2. log-linear หรือ exponential phase เป็นช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนของยีนที่สนใจเป็น 2 เท่า โดยจุดตัดของกราฟ exponential จะเป็นบริเวณที่แสดงค่า C_t ของตัวอย่าง
3. plateau phase เป็นช่วงท้ายของการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากจะเป็นช่วงที่มีองค์ประกอบในการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจปริมาณที่มากเกินพอ



รูปที่ 20 แสดงระยะต่างๆในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วย qPCR (45)

คำศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับการทำ real-time PCR

- baseline หมายถึง สัญญาณช่วงแรกของการเกิดปฏิกิริยาที่มีการเปล่งแสง fluorescence เพียงเล็กน้อย ซึ่งระดับการเปล่งแสงของ fluorescence จะมีค่าใกล้เคียงกับ background

- ΔRn เป็นผลจากการคำนวณ $Rn = Rnf - Rnb$

Rnf คือ ระดับของแสง fluorescence ที่เปล่งออกมาเมื่อจับกับ PCR product ในแต่ละช่วงเวลา

Rnb คือ ระดับของแสง fluorescence ที่เปล่งออกมาของ baseline

- threshold หมายถึง ระดับที่มีการเปล่งแสง fluorescence สูงกว่า background เป็นตำแหน่งที่เริ่มวัดระดับของแสง fluorescence ในตัวอย่าง โดยทั่วไปแล้ว threshold จะมีค่าประมาณ 10 เท่า ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับแสง fluorescence ที่เปล่งออกมา ตั้งแต่รอบที่ 3-15

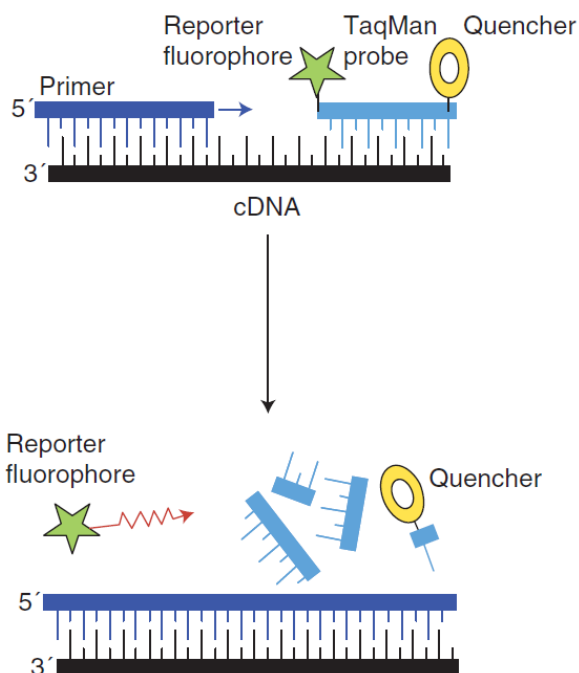
- cycle threshold (C_t) หมายถึง จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจ จนมีระดับการเปล่งแสง fluorescence สูงกว่า background ซึ่งค่า C_t จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณ DNA ตั้งต้น กล่าวคือ ตัวอย่างที่มีค่า C_t ต่ำ แสดงว่ามีปริมาณ DNA ตั้งต้นในตัวอย่างมาก ตัวอย่างที่มีค่า C_t สูง แสดงว่ามีปริมาณ DNA ในตัวอย่างน้อย

- melt curve หมายถึง กราฟที่ได้จากอุณหภูมิที่ทำให้ DNA สายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว ครั้งหนึ่ง โดย melt curve จะสามารถบอกการเกิดการจับกันของ primer (primer dimer) โดยดูจาก melting temperature

ระบบในการตรวจวัดยีนที่สนใจด้วย real-time PCR ประกอบไปด้วย 2 วิธีหลักๆ ได้แก่

1. TaqMan probe real-time PCR assay

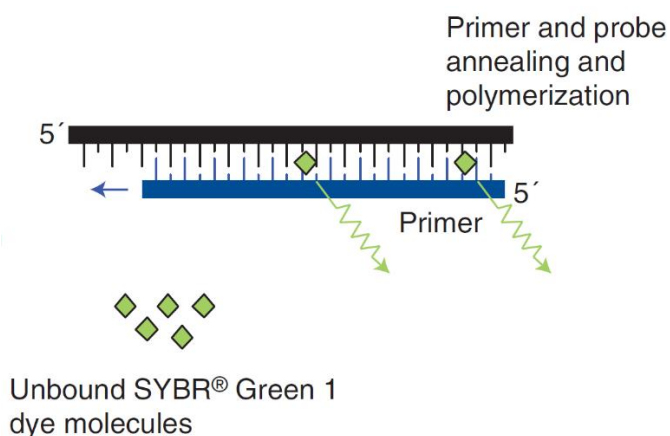
เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะ โดยอาศัย primer และ probe ซึ่งเป็น oligonucleotide สายสั้นๆที่มีการติดฉลากด้วยโมเลกุลที่สามารถเปล่งแสง fluorescence (reporter) ซึ่งจะมีตัวดับบั้ง (quencher) ติดอยู่ด้วย เมื่อมีการเพิ่มจำนวนยีน โดยอาศัย DNA polymerase จะเกิดการย่อย probe ทำให้ reporter หลุดออกจาก quencher จึงสามารถเปล่งแสง fluorescence ได้ ดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงโครงสร้างของ TaqMan probe ที่ประกอบด้วย reporter และ quencher และการเกิดปฏิกิริยาเมื่อถูกย่อยโดย DNA polymerase (45)

2. SYBR Green real-time PCR assay

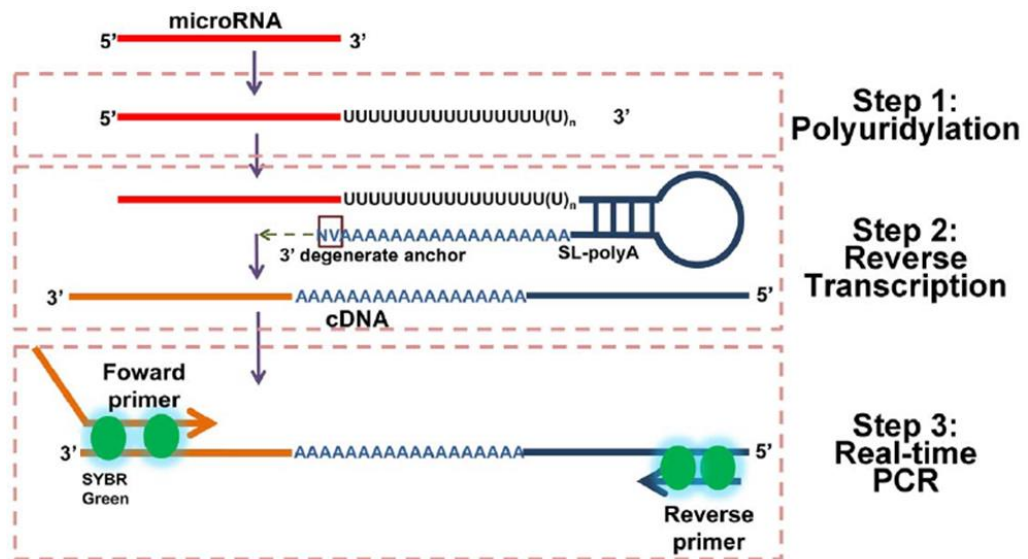
เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะ โดยอาศัยการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome เช่น SYBR Green ซึ่งสามารถเข้าจับกับบริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) ดังแสดงในรูปที่ 22 ดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มจำนวนของ DNA ที่สนใจโดยอาศัย primer และ DNA polymerase สี fluorochrome จะเข้าจับกับ DNA และมีการเปล่งแสง fluorescence ออกมาทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นได้ในทุกช่วงเวลาที่เกิดปฏิกิริยา (real-time detection) ซึ่งปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการเกิดปฏิกิริยาจะแปรผันตรงกับสัญญาณการเรืองแสงของ SYBR Green ที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 22 แสดงการเข้าจับของ SYBR Green บริเวณ minor groove ของ DNA สายคู่ (45)

ในการวิเคราะห์ miRNA ด้วยเทคนิค SYBR Green real-time PCR assay ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Polyuridylation เป็นการเติม UTP แบบสุ่มบริเวณปลาย 3' ของอาร์เอ็นเอ โดยอาศัย เอนไซม์ Poly(U) polymerase เพื่อให้ miRNA มีขนาดยาวพอที่ primer จะสามารถจับได้
2. Reverse Transcription เป็นการสร้าง cDNA โดยอาศัย universal poly(A) stem-loop RT primer หรือ SL-poly(A) (46) ซึ่งจะประกอบไปด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่
 - 3' poly(A) ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถจับกับ Poly(U) ที่ได้จากการเติมในขั้นตอน Polyuridylation โดยมี Degenerate Anchor Sequence อยู่บริเวณปลาย 3' เพื่อใช้เป็นตำแหน่งในการจับกับ miRNA
 - 5' Stem-loop ซึ่งเป็นส่วนที่ universal reverse primer สามารถจับได้อย่างจำเพาะ
3. Real-time PCR เป็นขั้นตอนในการเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับของ miRNA ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงขั้นตอนการตรวจวัด miRNA ด้วยเทคนิค SYBR Green real-time PCR assay (ดัดแปลงจาก (46))

การวิเคราะห์ผล real-time PCR สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่

1. Absolute quantification

เป็นการหาปริมาณยีนที่สนใจในตัวอย่าง โดยอาศัยการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) จากการเจือจาง template ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และแสดงผลในรูปแบบ copies/ μ l

2. Relative quantification

เป็นการวัดปริมาณยีนที่สนใจเปรียบเทียบกับ reference gene โดยแสดงผลในรูปอัตราส่วนของยีนที่สนใจต่อ reference gene

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษารูปแบบ Retrospective cohort study เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เป็นโรค และกลุ่มที่ไม่เป็นโรค โดยผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB No.726/60

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Autoclave (Hiramaya, USA)
2. Block heater (Bioer Technology, China)
3. Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
4. Force Mini (Lio Lab International, Korea)
5. Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
6. Freezer -80°C (Panasonic, Japan)
7. Microwave oven (Sharp, Japan)
8. Mini Centrifuge (Eppendorf, Germany)
9. Nanophotometer (Implen, Germany)
10. nCOUNTER SPRINT (NanoString Technologies, USA)
11. nCOUNTER MAX (NanoString Technologies, USA)
12. PCR cabinet (CaHC, Japan)
13. PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)
14. Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, USA)
15. Refrigerator 4°C (Panasonic, Japan)
16. Shaker-Incubator ES-20 (BIOSAN, Latvia)
17. StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)
18. UV transilluminator gel doc (Vilber Lourmat, France)
19. Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Automatic Pipette ขนาด 2.5µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl และ 1000 µl (Eppendorf, Germany)
2. Cylinder ขนาด 100 ml, 250 ml และ 1000 ml (K-EXAX, USA)
3. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (Axygen, USA)
4. Para film (Plastic Packaging, USA)
5. PCR tube ขนาด 0.2 ml (Axygen, USA)
6. Pipette tip ขนาด 10 µl, 200 µl และ 1000 µl (Axygen, USA)
7. Reagent bottle ขนาด 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml (Schott Duran, Germany)
8. Real-Time PCR tube ขนาด 0.1 ml (Kisker Biotech, Netherlands)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1. RNA later (Cat No. 76106, QIAGEN, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA

1. GenUP™ Total RNA Kit (Cat No. BR0700902, Biotechrabbit, Germany)
2. Ethanol (Cat No. 1009832500, Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นของ RNA

1. Qubit™ RNA HS Assay Kit (Cat No. Q32852, Thermo Scientific, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ miRNA profiling

1. nCounter® Human V3 miRNA Expression Assay Kits (Cat No. CSO-MIR3-12)
2. Water-DEPC treated (Cat No. DD1005, Bio Basic, Canada)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด miRNA จาก cell line

1. miRNA Isolation kit (Cat No. RMI050, Geneaid Biotech, USA)
2. ddH₂O saturated phenol (Cat No. 0945, Amresco, USA)
3. Chloroform (Cat No. AR1027E, RCI Labscan, Thailand)

4. Absolute ethanol (Cat No. 1009832500, Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ polyU

1. Poly(U) polymerase (Cat No. M0337S, New England Biolabs, UK)
2. UTP (Cat No. R0471, Thermo Scientific, USA)
3. RiboLock RNase Inhibitor (Cat No. E00382, Thermo Scientific, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

1. primer (Integrated DNA Technologies, Singapore)
2. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No. 1622, Thermo Scientific, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่สนใจด้วย gel electrophoresis

1. Agarose (Cat No. 0710-100G, Amresco, USA)
2. Tris (Cat No. 0826-1KG, Amresco, USA)
3. Boric Acid (Cat No. 100165, Merck, Germany)
4. EDTA (Cat No. EB0185 Bio Basic, Canada)
5. Redsafe Nucleic Acid Staining Solution (Cat No. 21141, iNtRON biotechnology, Korea)
5. 6X DNA Loading dye
6. 100bp DNA Ladder H3 RTU (Cat No. DM003-R500, RBC Bioscience, Taiwan)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด miRNA จากชิ้นเนื้อ

1. microRNA Purification Kit (Cat No. 21300, Norgen, Canada)
2. TRIzol (Cat No. 15596026, Thermo Scientific, USA)
3. Chloroform (Cat No. AR1027E, RCI Labscan, Thailand)
4. Absolute ethanol (Cat No. 1009832500, Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด miRNA จากซีรัม

1. miRNA Isolation kit (Cat No. RMI050, Geneaid Biotech, USA)
2. ddH₂O saturated phenol (Cat No. 0945, Amresco, USA)
3. Chloroform (Cat No. AR1027E, RCI Labscan, Thailand)

4. Absolute ethanol (Cat No. 1009832500, Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Real-time PCR

1. QPCR Green Master Mix HRox (Cat No. BR0500402, Biotechrabbit, Germany)
2. Distilled water
3. Specific primer (Integrated DNA Technologies, Singapore)
4. cDNA template

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
2. BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.5.3)
3. EndNote X8 (Version 8.2)
4. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA)
5. miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)
6. nSolver Analysis Software (Version 4.0)
7. Oligos (Version 9.1)
8. StepOne Software (Version 2.3)
9. SPSS software for Windows version 23 (SPSS, Chicago, IL)

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย

3.5.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

กลุ่มประชากรที่ทำการเก็บชิ้นเนื้อ

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. ผู้ที่มีเชื้อชาติไทย อายุ 40 ปีขึ้นไป
2. ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีการวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยา หรือได้รับการวินิจฉัยทางรังสีวิทยา ตรงตามมาตรฐานเกณฑ์การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ และได้รับการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในช่วงปี พ.ศ. 2555-2560
3. ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg positive)

4. ผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดครั้งแรกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณ ส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียง (adjacent non-cancerous tissue) เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว

5. มีการประเมินผลทางคลินิกก่อนการรักษา (ระยะความรุนแรงของโรค ขนาดก้อนมะเร็ง ค่า AFP และตัวแปรอื่นๆ) และติดตามอัตราการรอดชีวิตจากแฟ้มประวัติ

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยชาวต่างชาติ
2. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบซี (HCV) หรือเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)
3. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อในใบยินยอม เข้าร่วมการศึกษาวิจัย

กลุ่มประชากรที่ทำการเก็บชีรัม

1. กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV-related HCC)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. ผู้ที่มีเชื้อชาติไทย อายุอายุ 40 ปีขึ้นไป
2. ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีการวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยา หรือได้รับการวินิจฉัยทางรังสีวิทยา ตรงตามมาตรฐานเกณฑ์การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ และได้รับการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในช่วงปี พ.ศ. 2555-2560

3. ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg positive)

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยชาวต่างชาติ
2. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบซี (HCV) หรือเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)

2. กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (Chronic hepatitis B virus infection)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. ผู้ที่มีเชื้อชาติไทย
2. ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg positive)

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยชาวต่างชาติ

2. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบซี (HCV) หรือเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)

3. กลุ่มคนปกติ (Healthy control)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. ผู้ที่มีสัญชาติไทย
2. ผู้ที่ได้รับการตรวจว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus)

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยชาวต่างชาติ
2. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบซี (HCV) หรือเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)

3.5.2 ขนาดของประชากรตัวอย่าง

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เป็นโรค และกลุ่มที่ไม่เป็นโรค (Retrospective case-control study) ดังนั้นจึงคำนวณประชากรได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$N = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

N = จำนวนประชากรที่ศึกษา

P = $(P_1 + P_2) / 2$

P_1 = $(P_2 \times \text{odd ratio}) / 1 + P_2 (\text{odd ratio} - 1)$

P_2 = อัตราการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอที่สนใจในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

Z_{α} = ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test

โดย $Z_{\alpha} / 2 = 1.96$ เมื่อกำหนด $\alpha = 0.05$

Z_{β} = ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 โดย $Z_{\beta} = 1.28$

แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังไม่ทราบอัตราการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอที่สนใจ จึงอ้างอิงขนาดตัวอย่างจากการศึกษา Hepatic miR-126 is a potential plasma biomarker for detection of hepatitis B virus infected hepatocellular carcinoma โดย Ghosh และคณะ ในปีพ.ศ. 2559 (47) ที่มีรูปแบบการศึกษาใกล้เคียงกัน โดยจะแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 ขั้นตอนการหารูปแบบการแสดงออกของ miRNA (miRNA profile) จะใช้ตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างจะมีการเก็บชิ้นเนื้อทั้งบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue)

ส่วนที่ 2 ขั้นตอนการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ miRNA (miRNA validation) ในชิ้นเนื้อจะใช้ตัวอย่างทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างจะมีการเก็บชิ้นเนื้อทั้งบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue)

ส่วนที่ 3 ขั้นตอนการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ miRNA (miRNA validation) ในซีรัมจะแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะใช้ตัวอย่าง 100 ตัวอย่างต่อกลุ่ม

3.6 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.6.1 การเก็บตัวอย่าง

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อ ทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue) ใน 50 ml tube ที่มี RNA later เพื่อรักษาสภาพของ nucleic acid จากนั้นทำการตัดเป็นชิ้นประมาณ 20 มิลลิกรัม ลงใน cryo-preserved tube ที่มี RNA later และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

2. ตัวอย่างเลือด ทำการเก็บเลือดประมาณ 5 ml ลงในหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 นาที เพื่อทำการแยกบริเวณส่วนของซีรัม (serum) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

3.6.2 การสกัด RNA จากชิ้นเนื้อโดย GenUP™ Total RNA kit

1. เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาดประมาณ 20 มิลลิกรัม เติม LYSIS LR 450 μl ลงในโกร่งบดชิ้นเนื้อ

2. บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน และดูดสารละลายทั้งหมดลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

3. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

4. นำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน Mini Filter DNA (คอลัมน์สีฟ้า) ที่ประกอบอยู่กับ collection tube

5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ตั้งคอลัมน์
6. นำส่วนสารละลายใส่ที่ผ่านการกรองมาเติม 70% ethanol ในปริมาตรที่เท่ากัน (ประมาณ 400 μ l) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต
7. นำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน Mini Filter RNA (คอลัมน์สีม่วง) ที่ประกอบอยู่กับ collection tube
8. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ตั้งสารที่ผ่านจากการกรอง พร้อมทั้ง collection tube
9. นำ Mini Filter RNA (คอลัมน์สีม่วง) ประกอบกับ collection tube หลอดใหม่
10. ใส่ Buffer WASH A 500 μ l
11. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ตั้งสารที่ผ่านจากการกรอง พร้อมทั้ง collection tube
12. นำ Mini Filter RNA (คอลัมน์สีม่วง) ประกอบกับ collection tube หลอดใหม่
13. ใส่ Buffer WASH B 700 μ l
14. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ตั้งสารที่ผ่านจากการกรอง พร้อมทั้ง collection tube
15. นำ Mini Filter RNA (คอลัมน์สีม่วง) ประกอบกับ collection tube หลอดใหม่
16. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ตั้งสารที่ผ่านจากการกรอง พร้อมทั้ง collection tube
17. นำ Mini Filter RNA (คอลัมน์สีม่วง) ประกอบกับ elution tube
18. ใส่ RNase-free water 50 μ l บริเวณกึ่งกลาง Mini Filter RNA (คอลัมน์สีม่วง)
19. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
20. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
21. วัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop

3.6.3 การวัดความเข้มข้นของ RNA โดย Qubit™ RNA HS Assay Kit

1. เตรียม Standard

- เตรียม Qubit® Working Solution โดยทำการผสม Qubit® RNA Reagent 1 μ l กับ Qubit® RNA Buffer 199 μ l ต่อ 1 reaction

- ผสม Qubit[®] Working Solution 190 μ l กับ Qubit[®] Standard #1 10 μ l จากนั้น vortex เป็นเวลา 2-3 วินาที
- ผสม Qubit[®] Working Solution 190 μ l กับ Qubit[®] Standard #2 10 μ l จากนั้น vortex เป็นเวลา 2-3 วินาที
- นำหลอด Standard ทั้ง 2 หลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

2. เตรียมตัวอย่าง RNA

- ผสม Qubit[®] Working Solution 199 μ l กับ ตัวอย่าง RNA 1 μ l จากนั้น vortex เป็นเวลา 2-3 วินาที
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

3. เปิดเครื่อง Qubit[®] 2.0 Fluorometer ตั้งค่า Standard #1 และ #2

4. วัดความเข้มข้น ตัวอย่าง RNA

3.6.4 การวิเคราะห์ miRNA profiling โดย nCounter[®] Human V3 miRNA Expression Assay

การเตรียมตัวอย่าง miRNA (sample preparation)

1. นำ RNA ที่ได้จากการสกัดและวัดความเข้มข้นด้วย Qubit มาปรับความเข้มข้นด้วย DEPC ให้ได้ 33 ng/ μ l
2. เตรียม 1:500 miRNA Assay control โดยผสม DEPC 499 μ l และ miRNA Assay Controls 1 μ l จากนั้น vortex และ spin down
3. เตรียม annealing master mix โดยผสม Annealing Buffer 13 μ l กับ nCounter miRNA Tag Reagent 26 μ l และ 1:500 miRNA Assay Controls 6.5 μ l จากนั้นผสมให้เข้ากัน ด้วยปิเปต และ spin down
4. แบ่ง annealing master mix 3.5 μ l ใส่ลงใน strip tube จำนวน 12 หลอด
5. ใส่ตัวอย่าง RNA 3 μ l (100 ng) ลงใน strip tube ผสมให้เข้ากัน และ spin down
6. นำ strip tube ใส่เข้าสู่เครื่อง thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ในขั้นตอน Annealing

อุณหภูมิ (°C)	เวลา
94°C	1 นาที
65°C	2 นาที
45°C	10 นาที
48°C	hold

7. เตรียม ligation master mix โดยผสม PEG 19.5 μ l และ Ligation Buffer 13 μ l
8. แบ่ง ligation master mix 2.5 μ l ใส่ลงใน strip tube จำนวน 12 หลอด ผสมให้เข้ากัน และ spin down
9. นำ strip tube กลับเข้าสู่เครื่อง thermocycler บ่มที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 5 นาที
10. ใส่ Ligase 1 μ l ลงใน strip tube จำนวน 12 หลอด ในขณะที่ strip tube บ่มอยู่ที่อุณหภูมิ 48°C ในเครื่อง thermocycler จากนั้น ตั้งโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่ใช้ในขั้น Ligation

อุณหภูมิ (°C)	เวลา
48°C	3 นาที
47°C	3 นาที
46°C	3 นาที
45°C	5 นาที
65°C	10 นาที
4°C	hold

11. ใส่ Ligation Clean-Up Enzyme 1 μ l ลงใน strip tube จำนวน 12 หลอด จากนั้น ผสมให้เข้ากัน และ spin down
12. นำ strip tube ใส่เข้าสู่เครื่อง thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงสถานะที่ใช้ในขั้น Purification

อุณหภูมิ (°C)	เวลา
37°C	60 นาที
70°C	10 นาที
4 °C	hold

- ใส่ DEPC 40 µl ลงใน strip tube จำนวน 12 หลอด ผสมให้เข้ากัน และ spin down
- นำ strip tube จำนวน 12 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 5 นาที และบ่มในน้ำแข็งทันที

การ miRNA Hybridization

- เตรียม master mix โดยผสม Reporter CodeSet 130 µl และ hybridization buffer 130 µl ผสมให้เข้ากัน และ spin down
- แบ่ง master mix 20 µl ใส่ลงใน strip tube ใหม่ จำนวน 12 หลอด
- แบ่ง miRNA ที่ผ่านขั้นตอน Sample Preparation แต่ละหลอด 5 µl ใส่ลงใน strip tube ใหม่แต่ละหลอด จำนวน 12 หลอด
- ใส่ Capture ProbeSet 5 µl ใส่ลงใน strip tube จำนวน 12 หลอด
- บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 12-30 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA

- ประกอบอุปกรณ์เข้าเครื่อง nCOUNTER SPRINT รวมทั้งนำ strip tube ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง
- ย้าย Cartridge เข้าสู่เครื่อง nCOUNTER MAX เพื่อทำการถ่ายภาพ และนับจำนวนโมเลกุลของยีนเป้าหมาย

3.6.5 การวิเคราะห์ผล miRNA profile โดย nSolver Analysis software

ภายหลังจากการอ่านผลการแสดงออกของ miRNA ด้วยเครื่อง nCOUNTER MAX แล้ว จะทำการส่งข้อมูลในรูปแบบ .RCC file เพื่อทำการวิเคราะห์โดย nSolver Analysis Software 4.0

- Data Import เป็นการเลือกข้อมูลเข้าไปยังโปรแกรม nSolver Analysis Software 4.0 ซึ่งจะประกอบไปด้วยข้อมูลเป็น 2 ประเภท ได้แก่

- Reporter Library Files (.RLF) ไฟล์ RLF จะเป็นข้อมูลรายละเอียดของชุดวิเคราะห์ nCounter® Human V3 miRNA Expression Assay Kits ประกอบไปด้วย

Probe ID, miRNA เป้าหมายที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ Probe, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ทุกตัวที่สามารถวิเคราะห์ได้

- Reporter Code Counts (.RCC) ไฟล์ RCC จะเป็นไฟล์ข้อมูลดิบที่วิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ซึ่งได้จากการดาวน์โหลดข้อมูลจากเครื่อง Digital Analyzer และต้องอาศัยไฟล์ RLF เป็นตัวกำหนดการวิเคราะห์ต่างๆในโปรแกรม nSolver Analysis Software 4.0

2. Quality Control (QC) เป็นการตรวจสอบคุณภาพของข้อมูล ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจนถึงการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Digital Analyzer ซึ่งจะประกอบไปด้วยการตรวจสอบคุณภาพ 4 ประเภท ได้แก่

- Imaging QC เป็นการตรวจสอบคุณภาพในการถ่ายภาพของเครื่อง Digital Analyzer โดยคิดเป็นร้อยละของ miRNA เป้าหมายที่อ่านได้ใน 1 ครั้งของการถ่ายภาพในแต่ละตัวอย่าง

- Binding Density QC เป็นการตรวจสอบคุณภาพในการยึดเกาะของ probe บน Cartridge ในแต่ละตัวอย่าง เนื่องจากถ้ามีปริมาณ probe ที่ยึดเกาะมากเกินไปความสามารถในการวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละ probe จะลดลง แต่ถ้ามีปริมาณ probe ที่ยึดเกาะน้อยเกินไป ความสามารถในการวิเคราะห์อาจเกิดความผิดพลาด ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบการยึดเกาะของ probe ในทุกๆตารางไมครอนของแต่ละตัวอย่าง

- Positive Control Linearity QC เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับผลของการนับจำนวนโมเลกุลของ positive control แต่ละตัวที่ใส่ลงไปในการวิเคราะห์

- Positive Control Limit of Detection QC เป็นการควบคุมความสามารถในการวิเคราะห์ โดยจะมีการใส่ positive control ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ negative control ที่ probe ไม่สามารถจับได้ โดยคาดหวังว่าโมเลกุลของ positive control ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด (0.5 fM) จะต้องนับได้มากกว่าค่าเฉลี่ยของ negative control

3. Sample Annotation เป็นการจัดกลุ่มให้กับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เหมาะสำหรับการเปรียบเทียบในหลายๆสถานะ เนื่องจากสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆในแต่ละกลุ่มใหญ่ได้ เพื่อให้สะดวกในการวิเคราะห์ขั้นถัดไปหลังจากนี้

4. Background Subtraction เป็นการหักลบค่าที่อาจเกิดจากข้อผิดพลาดออกในทุกๆตัวอย่างโดยค่าที่ใช้ในการหักลบนั้น อาจเป็นค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric

mean), ค่ามัธยฐาน (median), ค่าสูงสุด (max) ของโมเลกุลของ negative control ที่นับได้ หรือ ค่าที่อ่านได้จากเลนที่ไม่มีตัวอย่างในการหกลบ

5. Normalization เป็นการปรับค่าที่จะใช้ในการวิเคราะห์ด้วย ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) ของ miRNA 100 อันดับแรกที่พบมากที่สุด และมีจำนวนโมเลกุลมากกว่า 100 โมเลกุล

6. Ratio Building เป็นการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในแต่ละกลุ่ม โดยสามารถกำหนดว่าต้องการเปรียบเทียบกับกลุ่มไหน ตามที่ได้จัดกลุ่มไว้ข้างต้น เช่น รูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในกลุ่มของชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) เปรียบเทียบกับกลุ่มของบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็ง (adjacent non-cancerous tissue)

7. Analysis เป็นการแสดงผลรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ซึ่งสามารถแสดงผลได้หลากหลายรูปแบบ เช่น heat map, violin plot, box plot, scatter plot และ histogram

3.6.6 การทำตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive Control)

การสกัด miRNA จาก HepG2 cell line โดยใช้ Geneaid® miRNA Isolation kit

Sample Preparation & Lysis

1. นำตะกอนเซลล์ HepG2 เติม Lysis Buffer 200 μ l และนำไป vortex
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

RNA Precipitation

3. ใส่ Mi Buffer 20 μ l, ddH₂O saturated phenol 180 μ l และ chloroform 40 μ l จากนั้นผสมให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 2 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
5. นำสารละลายใสส่วนบน ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
6. ใส่ absolute ethanol คิดเป็น 35% ของปริมาตรส่วนสารละลายใส (ถ้าสารละลายใส มีปริมาตร 200 μ l ใส่ absolute ethanol 108 μ l) ผสมให้เข้ากัน

RNA Binding

7. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน RNA Column ที่ประกอบอยู่กับ 2 ml collection tube
8. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
10. นำส่วนสารละลายที่ผ่านการกรองใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

11. ใส่ absolute ethanol คิดเป็น 70% ของปริมาตรส่วนสารละลายที่ผ่านการกรอง (ถ้าสารละลายที่ผ่านการกรองมีปริมาตร 290 μ l ใส่ absolute ethanol 676 μ l) ผสมให้เข้ากัน
12. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน RNA Column ที่ประกอบอยู่กับ 2 ml collection tube
13. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
- 14.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

Wash

15. ใส่ Wash Buffer 200 μ l
16. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
17. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

Elution

18. นำ RNA Column ประกอบกับ 1.5 ml microcentrifuge tube
19. ใส่ Release Buffer (ที่มีการให้ความร้อนที่ 65°C) 30 μ l บริเวณกึ่งกลาง RNA Column
20. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
21. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
22. วัดความเข้มข้นของ miRNA ด้วยเครื่อง Nanodrop

3.6.7 การเติม polyuridylation และ การสังเคราะห์ cDNA synthesis

1. เตรียม master mix โดยใช้สารเคมีดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation

สารเคมี	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X NEBuffer	2.50	1
50 mM UTP	0.25	2.5 mM
40 U/ μ l RiboLock RNase Inhibitor	1.00	40 units
2 U/ μ l Poly (U) polymerase	1.00	2 units
Distilled water	0.25	
Small RNA	20.00	
ปริมาตรรวม	25.00	

2. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที
3. ใส่ 10 μ M SL-poly(A) primer 0.2 μ l ร่วมกับ small RNA ที่เติม poly (U) แล้วจากขั้นตอน polyuridylation 12.5 μ l
4. บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที และบ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที
5. เตรียม Reverse transcription master mix โดยใช้สารเคมีดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse transcription

สารเคมี	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X Reaction Buffer	4.00	1X
20 U/ μ l RiboLock RNase Inhibitor	0.50	10 units
10 mM dNTPs mix	2.00	1 mM
200 U/ μ l RevertAid Reverse Transcriptase	1.00	200 units
RNA ที่ผ่านขั้นตอน Polyuridylation	12.50	
ปริมาตรรวม	20.00	

6. บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บ cDNA ที่ -20°C

3.6.8 การสกัด miRNA จากชิ้นเนื้อ โดยใช้ NORGEN microRNA Purification Kit

Lysate Preparation from Animal Tissues

1. ตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างขนาดประมาณ 20 มิลลิกรัม จากนั้นใส่ TRIzol 1,000 μ l ทำการบดด้วยโกร่งบดชิ้นเนื้อ
2. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา
3. ใส่ chloroform 200 μ l แล้วเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,760 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
5. ดูดส่วนใส (aqueous phase) ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube และเติม 96-100% ethanol ปริมาตรครึ่งหนึ่งของส่วนใส (50 μ l ของ ethanol ต่อ 100 μ l ของส่วนใส) ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex

Purification of small RNA (Large RNA removal)

6. นำ Large RNA Removal Column ประกอบกับ collection tube
7. ดูดสารละลายไลสของ lysate ที่ผสมกับ ethanol (ในขั้นตอนที่ 5) ใส่ใน Large RNA Removal Column จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
8. นำส่วนสารละลายใสที่ผ่านการกรองใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube

Small RNA Capture

9. ใส่ 96-100% ethanol ปริมาตรเท่ากับส่วนใสที่ผ่านการกรอง ผสมให้เข้ากัน โดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที
10. นำ microRNA Enrichment Column ประกอบกับ collection tube
11. ดูดสารละลายใสที่ผสมกับ ethanol (ในขั้นตอนที่ 9) ใส่ใน microRNA Enrichment Column จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

Column Wash

12. ใส่ Wash Solution A 400 μ l ลงใน microRNA Enrichment Column และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารที่ผ่านจากการกรอง
13. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 12 ซ้ำอีก 2 ครั้ง
14. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 เป็นเวลา 2 นาที

Small RNA Elution

15. นำ microRNA Enrichment Column ประกอบกับ Elution tube
16. ใส่ Elution Solution A 40 μ l จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
17. วัดความเข้มข้นของ miRNA ด้วยเครื่อง Nanodrop
18. Reverse transcription โดยใช้ SL-poly(A)
19. วัดระดับการแสดงออกของ miRNA ด้วยวิธี qRT-PCR โดยใช้เครื่อง StepOnePlus

Real-time PCR

3.6.9 การสกัด miRNA จากซีรัม โดยใช้ Geneaid[®] miRNA Isolation kit

1. เตรียมตัวอย่างซีรัม 200 μ l
2. สกัดมาสกัด miRNA โดยใช้ Geneaid[®] miRNA Isolation kit
3. Reverse transcription โดยใช้ SL-poly(A)

4. วัดระดับการแสดงออกของ miRNA ด้วยวิธี qRT-PCR โดยใช้เครื่อง StepOnePlus Real-time PCR

3.6.10 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA โดย qRT-PCR

1. เตรียม master mix โดยผสมสารเคมีดังตารางที่ 7 และ primer ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR

สารเคมี	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X QPCR Green Master mix	6.25	1X
10 μ M forward primer	0.25	0.2 μ M
10 μ M reverse primer	0.25	0.2 μ M
Distilled water	4.75	
cDNA template	1.00	
ปริมาตรรวม	12.50	

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR

ชื่อ Primer	ลำดับเบส (5'→3')	อุณหภูมิในขั้น annealing ($^{\circ}$ C)
SL-poly(A)	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACAAAAAATAAAAAAAAAAVN	-
U6 (F)	CTCGCTTCGGCAGCACA	55
hsa-miR-21-5p (F)	GCTTATCAGACTGATGTTGA	55
hsa-miR-125b-5p (F)	TCCCTGAGACCCTAACTTG	53
Reverse primer	GCAGGGTCCGAGGTATTC	-

F = forward

2. ลงเครื่อง StepOnePlus Real-time PCR System โดยตั้งโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดง condition ของ U6 ที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	15 วินาที	
Annealing	55	30 วินาที	50
Extension	62	30 วินาที *	

* หมายถึง Fluorescence detection

ตารางที่ 10 แสดง condition ของ miRNA ที่ใช้ในกระบวนการ qRT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	15 วินาที	
Annealing	55-62 #	30 วินาที	50
Extension	72	20 วินาที *	

* หมายถึง Fluorescence detection

ขึ้นอยู่กับชนิดของ miRNA ที่ตรวจวัด

นำค่า C_t ที่ได้หลังจากการทำ qRT-PCR มาทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA โดยใช้วิธี $\Delta\Delta C_t$ method (45, 48) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณเชิงเปรียบเทียบ} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{ตัวอย่าง}) - \Delta C_t (\text{calibrator})$$

$$\Delta C_t (\text{ตัวอย่าง}) = C_t (\text{target gene ของตัวอย่าง}) - C_t (\text{reference gene ของตัวอย่าง})$$

$$\Delta C_t (\text{calibrator}) = C_t (\text{target gene ของ calibrator}) - C_t (\text{reference gene ของ calibrator})$$

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ miRNA profile โดยอาศัยโปรแกรม nSolver Analysis Software (Version 4.0) เปรียบเทียบจำนวนโมเลกุลของ miRNA ในกลุ่ม cancerous tissue และ ANCT โดยใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean) ของ miRNA ที่มีจำนวนโมเลกุลที่ตรวจวัดได้สูงที่สุด 100 อันดับแรก และมีจำนวนโมเลกุลมากกว่า 100 counts เป็น reference gene ในการ normalization

นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย unpaired t-test และเลือก candidate miRNA ที่มีระดับของ fold change ≥ 2 และ P -value < 0.05

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียง (ANCT) ด้วย relative quantitation โดยใช้วิธี $\Delta\Delta C_t$ method โดยใช้ U6 เป็น reference gene ในการ normalization นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเลือก paired t-test และเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับผลทางคลินิก (ระยะความรุนแรงของโรค ขนาดของก้อนมะเร็ง ระดับ AFP และตัวแปรอื่นๆ) ด้วย Pearson's correlation และวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic (ROC) เพื่อทำการหาค่า sensitivity และ specificity โดยใช้โปรแกรม SPSS และ Graphpad

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในซีรัมโดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มคนปกติ (healthy control), กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (CHB) และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV-related HCC) ด้วย relative quantitation of miRNA วิธี $\Delta\Delta C_t$ method โดยใช้ U6 เป็น reference gene ในการ normalization นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเลือก unpaired t-test และเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับผลทางคลินิก (ระยะความรุนแรงของโรค ขนาดของก้อนมะเร็ง ระดับ AFP และตัวแปรอื่นๆ) Pearson's correlation และวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic (ROC) เพื่อวิเคราะห์ sensitivity และ specificity โดยใช้โปรแกรม SPSS และ Graphpad

การเก็บข้อมูลเชิงปริมาณ (Continuous variables) ใช้จำนวนร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่ามัธยฐาน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเลือก unpaired t-test และนำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล สำหรับข้อมูลเชิงกลุ่ม (Categorical variables) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเลือก Chi-square และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P -value < 0.05)

3.8 ข้อพิจารณาทางจริยธรรม

ใช้หลักจริยธรรมการทำวิจัยในคนทั่วไป ประกอบด้วย 3 หลัก ดังนี้

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect of person)

เป็นการเคารพในศักดิ์ศรีความเป็นมนุษย์ โดยจะมีการให้ข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยแก่ผู้เข้าร่วมโครงการโดยไม่ปิดบัง และเคารพการตัดสินใจของการผู้เข้าร่วมโครงการ โดยปราศจากการบังคับหรือโน้มน้าว ผู้ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องลงลายมือชื่อลงในใบยินยอม (informed consent) ก่อนที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยจะขอใช้ชิ้นเนื้อและเลือดที่เหลือจากโครงการวิจัยก่อน

หน้า เลขที่อ้างอิง IRB No. 108/60 และ IRB No. 438/60 ทั้งหมด และไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูล โดยตรงจากผู้ป่วย สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้นี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมเลขที่อ้างอิง IRB No. 726/60

2. หลักคุณประโยชน์ ไม่ก่ออันตราย (Beneficence)

จากการประเมินความเสี่ยงหรืออันตรายที่อาจเกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่าไม่มีผลเสียที่อาจจะส่งผลต่อผู้เข้าร่วมโครงการ โดยถึงแม้ว่าจะไม่มีผลประโยชน์โดยตรงต่อผู้ป่วย แต่งานวิจัยนี้อาจได้ชิ้นส่วนขององค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และใช้พัฒนาในทางคลินิกในอนาคตต่อไปได้ และยึดหลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) ทั้งนี้ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้ป่วยอย่างเคร่งครัด ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวตน เช่น แบบบันทึกข้อมูล (CRF) จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของผู้เข้าร่วมโครงการจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน ซึ่งจะไม่มีข้อมูลที่สามารถเชื่อมโยงถึงตัวบุคคลโดยตรง

3. หลักความยุติธรรม (Justice)

การให้ความเป็นธรรม จะสามารถประเมินได้จากเกณฑ์การคัดเลือกและออกของผู้เข้าร่วมโครงการ มีความชัดเจน และไม่ถือคติในการเลือก นอกจากนี้งานวิจัยนี้ไม่ได้แสวงหาผลประโยชน์เพื่อบุคคลใด บุคคลหนึ่งแต่เป็นการศึกษาที่มุ่งหวังให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ในอนาคต

3.9 ข้อจำกัดในการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีจำนวนจำกัด จึงทำให้ถูกจำกัดขนาดของกลุ่มประชากรที่จะนำมาทำการศึกษา
2. งบประมาณในการศึกษาวิจัยค่อนข้างมีจำกัด จึงอาจถูกจำกัดจำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคใหม่ๆ
3. ไม่สามารถทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อและในซีรัมของผู้ป่วยคนเดียวกันได้ เนื่องจากไม่สามารถเก็บชิ้นเนื้อและซีรัมที่ตรงกันของผู้ป่วย
4. ไม่สามารถพบ miRNA ตัวใหม่ เนื่องจากเป็นข้อจำกัดของเทคนิค nCounter® Human V3 miRNA Expression Assay

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile)

4.1.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย (Baseline characteristics)

จากการคัดเลือกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในช่วงปีพ.ศ. 2555-2560 จำนวน 5 คน ผู้ป่วยทุกคนได้รับการวินิจฉัยรวมทั้งมีผลทางพยาธิวิทยา ยืนยันการวินิจฉัยโรค และได้รับการผ่าตัดครั้งแรกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณ ส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (ANCT) โดยทำการเก็บรักษา ไว้ในไนโตรเจนเหลว รวมทั้งมีการบันทึกข้อมูลก่อนการรักษาภายในแฟ้มประวัติของผู้ป่วย จากการรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วย ประกอบด้วย เพศชายจำนวน 3 คน และเพศหญิงจำนวน 2 คน อายุเฉลี่ย 54.84 ปี ขนาดของก้อนมะเร็งเฉลี่ย 5.86 เซนติเมตร ทุกคนมีภาวะโรคตับแข็ง รวมทั้ง มีผลการตรวจเลือดพบ HBsAg positive ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย จำนวน 5 ราย

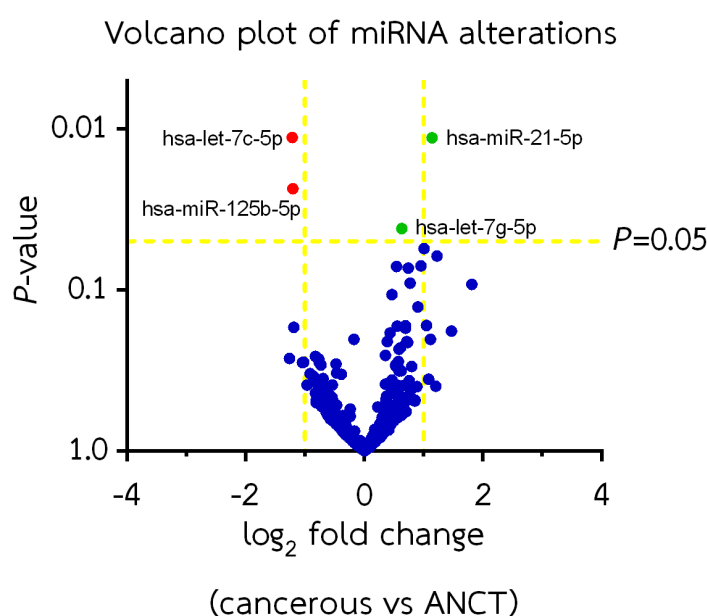
No.	Gender	Age (years)	AFP (IU/ml)	Cirrhosis	Tumor size (cm.)	Stage [#]
1	male	50	347.00	+	2	moderate
2	male	71	7.95	+	4.1	moderate
3	female	42	145.89	+	15.6	moderate
4	male	59	10.06	+	3.6	moderate
5	female	52	1.70	+	4	moderate

[#] moderate = ระยะของโรคมะเร็งตับจากผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

4.1.2 รูปแบบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA profile)

การนำตัวอย่าง RNA ที่ได้จากชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) จำนวน 5 ตัวอย่าง และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (ANCT) จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ผ่านการวัดระดับ ความเข้มข้นของ RNA โดย Qubit™ RNA HS Assay Kit มาวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออก ของ miRNA ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็งเปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง โดย nCounter® Human V3 miRNA Expression Assay และวิเคราะห์ระดับการแสดงออก

ของ miRNA โดยโปรแกรม nSolver Analysis Software (Version 4.0) พบว่า RNA ทุกตัวอย่างผ่านการตรวจสอบคุณภาพทั้ง 4 ขั้นตอนของโปรแกรม จากนั้นทำการ normalize ด้วยค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) ของ miRNA ที่มีโมเลกุลมากที่สุด 100 อันดับแรก และมีจำนวนโมเลกุลมากกว่า 100 โมเลกุล จากผลการวิเคราะห์ miRNA profile นำระดับการแสดงออก (fold change) ของ miRNA มาสร้างกราฟ volcano plot เพื่อดูการกระจายของข้อมูล และเป็นแนวทางในการเลือก candidate miRNA ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดง miRNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ miRNA profile โดย nCounter® Human V3 miRNA Expression Assay และวิเคราะห์ผลโดย nSolver Analysis Software จุดสีแดง หมายถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกต่ำในบริเวณก้อนมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จุดสีเขียว หมายถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกสูงในบริเวณก้อนมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการวิเคราะห์พบว่ามี miRNA จำนวน 4 ตัว ที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} < 0.05$) ระหว่างในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง โดยมี miRNA จำนวน 2 ตัวที่มีระดับการแสดงออกสูงในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง ได้แก่ hsa-miR-21-5p มีระดับการแสดงออกสูง 2.21 เท่า ($P\text{-value} = 0.011$) และ hsa-let7g-5p มีระดับการแสดงออกสูง 1.55 เท่า ($P\text{-value} = 0.042$) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง และมี miRNA จำนวน 2 ตัวที่มีระดับการแสดงออกต่ำในชิ้นเนื้อบริเวณ

ส่วนที่เป็นมะเร็ง ได้แก่ hsa-miR-125b-5p มีระดับการแสดงออกต่ำ 2.3 เท่า (P -value=0.023) และ hsa-let-7c-5p มีระดับการแสดงออกต่ำ 2.32 เท่า (P -value=0.011) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลการแสดงการแสดงออกของ miRNA candidate ที่ได้จากการวิเคราะห์ miRNA profile โดย nCounter[®] Human V3 miRNA Expression Assay และวิเคราะห์ผลโดย nSolver Analysis Software

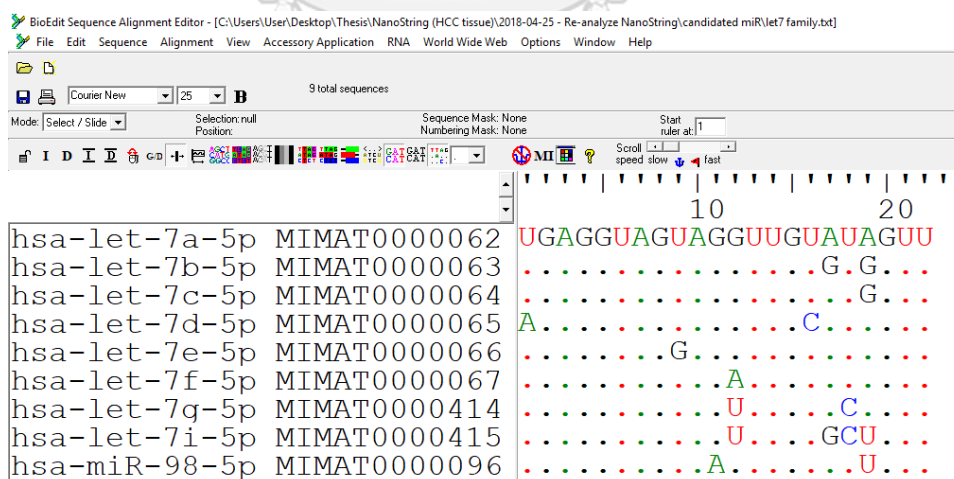
miRNA	Accession Number	Fold change	P-value
hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	-2.32	0.011
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	2.21	0.011
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	-2.3	0.023
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	1.55	0.042

4.1.3 การเลือก candidate miRNA

การเลือก candidate miRNA จากผลการวิเคราะห์ miRNA profile เพื่อทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miRNA โดยเทคนิค SYBR Green real-time PCR ต้องทำการตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่อยู่ใน family เดียวกัน โดยอาศัยการค้นหาจากฐานข้อมูล miRBase พบว่า hsa-let-7c-5p และ hsa-let-7g-5p ถูกจัดอยู่ใน let-7 family ที่มีสมาชิกจำนวน 12 ตัว ประกอบไปด้วย hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f-1, hsa-let-7f-2, hsa-let-7g, hsa-let-7i และ hsa-miR-98 ดังแสดงในตารางที่ 13 ผลจากการ alignment โดยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน ดังแสดงในรูปที่ 26 และ hsa-miR-125b-5p ถูกจัดอยู่ใน family เดียวกับ hsa-miR-125a, hsa-miR-125b-1 และ hsa-miR-125b-2 ดังแสดงในตารางที่ 14 ผลจากการ alignment โดยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน ดังแสดงในรูปที่ 27

ตารางที่ 13 แสดงผลของ miRNA ที่จัดอยู่ใน let-7 family

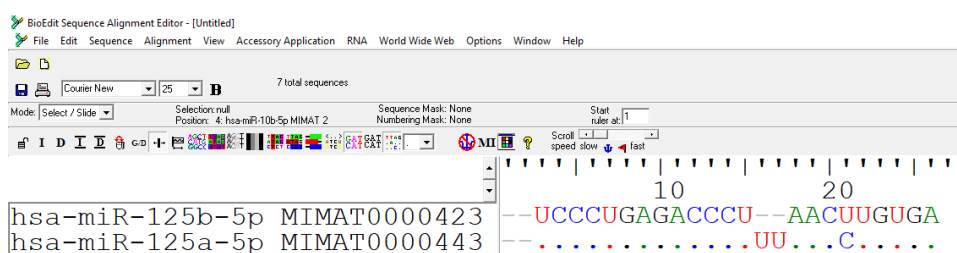
ID	Accession	Chromosome	Start	End	Strand
hsa-let-7a-1	MI0000060	chr9	94175957	94176036	+
hsa-let-7a-2	MI0000061	chr11	122146522	122146593	-
hsa-let-7a-3	MI0000062	chr22	46112749	46112822	+
hsa-let-7b	MI0000063	chr22	46113686	46113768	+
hsa-let-7c	MI0000064	chr21	16539828	16539911	+
hsa-let-7d	MI0000065	chr9	94178834	94178920	+
hsa-let-7e	MI0000066	chr19	51692786	51692864	+
hsa-let-7f-1	MI0000067	chr9	94176347	94176433	+
hsa-let-7f-2	MI0000068	chrX	53557192	53557274	-
hsa-let-7g	MI0000433	chr3	52268278	52268361	-
hsa-let-7i	MI0000434	chr12	62603686	62603769	+
hsa-mir-98	MI0000100	chrX	53556223	53556341	-



รูปที่ 25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่จัดอยู่ใน let-7 family

ตารางที่ 14 แสดงผลของ miRNA ที่จัดอยู่ใน miR-125 family

ID	Accession	Chromosome	Start	End	Strand
hsa-mir-125a	MI0000469	chr19	51693254	51693339	+
hsa-mir-125b-1	MI0000446	chr11	122099757	122099844	-
hsa-mir-125b-2	MI0000470	chr21	16590237	16590325	+



รูปที่ 26 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่จัดอยู่ใน family เดียวกับ hsa-miR-125b-5p

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า miRNA candidate ที่จะนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกในชิ้นเนื้อ และซีรัม ได้แก่ hsa-miR-21-5p และ hsa-miR-125b-5p

4.2 ระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

4.2.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย (Baseline characteristics)

จากการศึกษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการผ่าตัดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 22 คน โดยมีการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง และบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง รวมทั้งมีการเก็บบันทึกข้อมูลภายในแฟ้มประวัติของผู้ป่วย จากผลการรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยพบว่า มีผู้ป่วยเพศชายจำนวน 24 คน คิดเป็นร้อยละ 83.33 ซึ่งมีจำนวนมากกว่าผู้ป่วยเพศหญิงที่มีจำนวน 4 คน คิดเป็นร้อยละ 16.67 มีอายุเฉลี่ย 59.92 ปี ขนาดของก้อนมะเร็งเฉลี่ย 8.15 เซนติเมตร ร้อยละ 83.33 ของผู้ป่วยมีภาวะตับแข็ง นอกจากนี้ยังมีการแบ่งระยะของโรคมะเร็งตามระบบ BCLC พบว่าผู้ป่วยที่อยู่ในระยะเริ่มต้นของการเป็นมะเร็ง (BCLC ระยะ A) คิดเป็นร้อยละ 8.33 ผู้ป่วยที่อยู่ใน BCLC ระยะ B คิดเป็นร้อยละ 62.5 และผู้ป่วยที่อยู่ใน BCLC ระยะ C คิดเป็นร้อยละ 25 ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับการผ่าตัดก้อนมะเร็ง

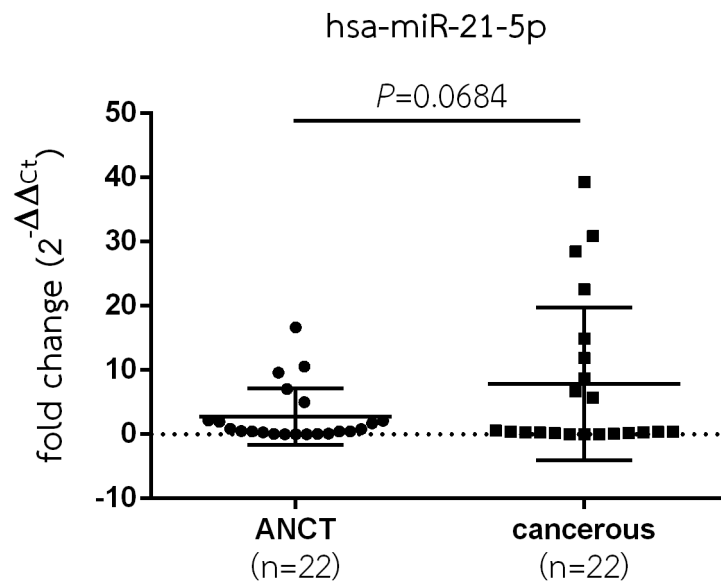
Parameters	Patients with HBV-related HCC (n=22)
Gender	
Male	18 (81.82%)
Female	4 (18.18%)
Age (years)	59.23 ± 10.76
AST (IU/L)	215.50 ± 154.20
ALT (IU/L)	159.10 ± 122.80
Albumin (g/L)	3.06 ± 0.64
Total bilirubin (mg/dl)	1.16 ± 0.82
AFP (IU/ml)	801.20 ± 3,299.00
Log ₁₀ HBV DNA (IU/mL)	2.01 ± 1.75
Cirrhosis	19 (86.36%)
Tumor size (cm.)	8.32 ± 6.55
BCLC stage	
0-A	2 (9.09%)
B	14 (63.64%)
C	6 (27.27%)

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD); จำนวน (ร้อยละ)

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AFP, alpha-fetoprotein

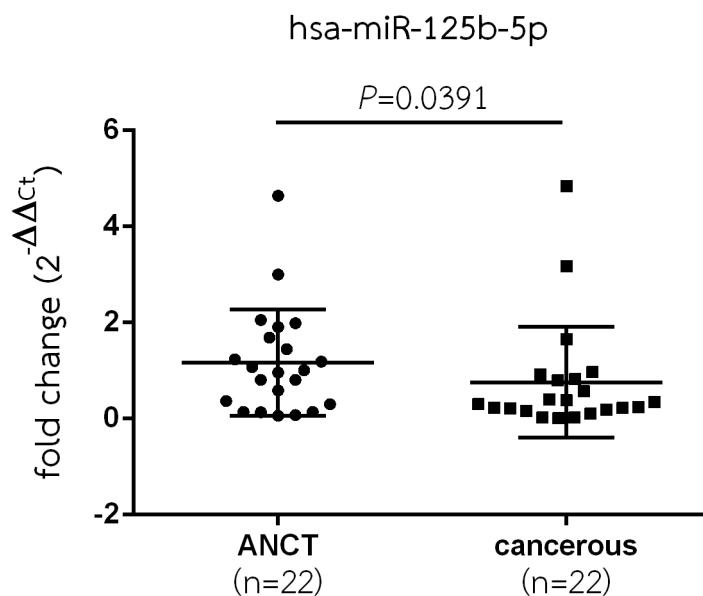
4.2.2 ระดับการแสดงออกของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในชิ้นเนื้อ

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็งเปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็งจำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วย SYBR Green real-time PCR assay พบว่าระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.84 ± 11.93 ซึ่งสูงกว่าบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็งที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.78 ± 4.40 โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed-ranked test พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (P -value=0.0684) ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 27 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็ง (ANCT) normalize ด้วย U6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูล±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหนึ่งจุด แทนตัวอย่าง 1 คน

ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็ง จำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วย SYBR Green real-time PCR assay พบว่าระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76 ± 1.15 ซึ่งต่ำกว่าบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็งที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.17 ± 1.10 โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed-ranked test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P -value=0.0391) ดังแสดงในรูปที่ 29



รูปที่ 28 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็ง (ANCT) normalize ด้วย U6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูล±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหนึ่งจุด แทนตัวอย่าง 1 คน

4.3 ระดับการแสดงออกของ miRNA ในซีรัม

4.3.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย (Baseline characteristics)

จากการศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในซีรัม โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy) จำนวน 50 คน ประกอบด้วยเพศชายร้อยละ 56 เพศหญิง ร้อยละ 44 มีอายุเฉลี่ย 52.64 ปี กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (CHB) จำนวน 92 คน ประกอบด้วยเพศชายร้อยละ 51.1 เพศหญิงร้อยละ 48.9 มีอายุเฉลี่ย 49.6 ปี และ กลุ่มผู้ป่วย โรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HCC) จำนวน 98 คน ประกอบด้วยเพศชายร้อยละ 82.7 เพศหญิงร้อยละ 17.3 มีอายุเฉลี่ย 59.34 ปี จากการทดสอบโดยใช้สถิติ one-way ANOVA พบว่า เพศและอายุมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value}<0.0001$) ระดับ AST, ALT, albumin และ AFP มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ โดยใช้สถิติ Student t test แต่ไม่พบความแตกต่างของ total bilirubin ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง
ที่ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ในซีรัม

Parameters	healthy control	CHB	HCC	P-value
	(n=50)	(n=92)	(n=98)	
Gender				
Male	28 (56%)	47 (51.1%)	81 (82.7%)	<0.0001 ^a
Female	22 (44%)	45 (48.9%)	17 (17.3%)	
Age (years)	52.64 ± 3.52	49.60 ± 14.14	59.34 ± 11.71	<0.0001 ^a
AST (IU/L)	NA	33.58 ± 27.18	106.45 ± 130.50	<0.0001
ALT (IU/L)	NA	40.61 ± 42.55	57.48 ± 50.27	0.016
Albumin (d/L)	NA	4.17 ± 0.61	3.62 ± 0.51	<0.0001
Total bilirubin (mg/dl)	NA	0.86 ± 0.65	1.05 ± 0.64	0.224
AFP (IU/ml)	NA	3.44 ± 2.90	14,419.17 ± 54,897.32	0.013
Cirrhosis	NA	13 (14.13%)	89 (92.7%)	0.35
Tumor size (cm.)	NA	NA	7.81 ± 6.20	
Child-Pugh				
A	NA	NA	66 (67.35%)	
B	NA	NA	9 (9.18%)	
C	NA	NA	1 (1.02%)	
BCLC stage				
0-A	NA	NA	32 (32.65%)	
B	NA	NA	31 (31.63%)	
C	NA	NA	33 (33.67%)	

^a ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA

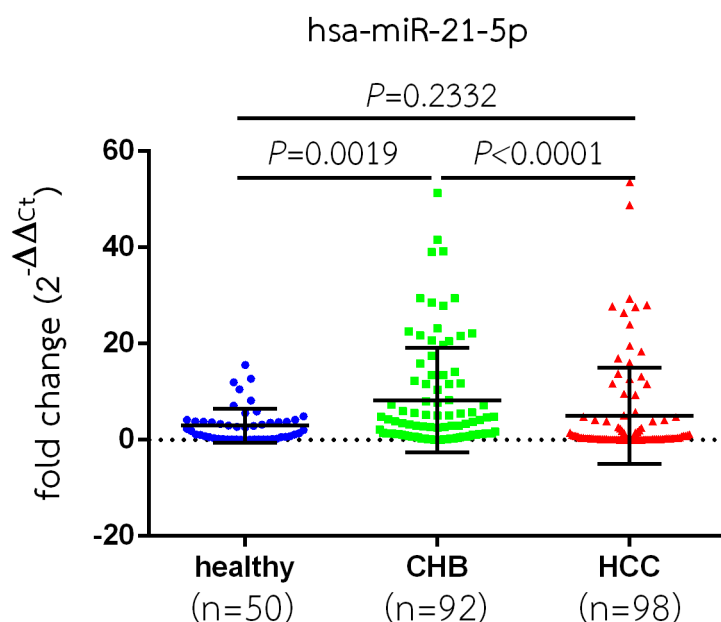
ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD); จำนวน (ร้อยละ); NA หมายถึง not available;

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AFP, alpha-fetoprotein;

4.3.2 ระดับการแสดงออกของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในซีรัม

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในซีรัมด้วย SYBR Green real-time PCR assay โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy), กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (CHB) และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส

ตับอักเสบบี (HCC) พบว่าระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในกลุ่ม healthy มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.93 ± 3.57 กลุ่ม CHB มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.23 ± 10.89 และกลุ่ม HCC มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.01 ± 10.00 เมื่อทำการเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test พบว่าการแสดงออกของ miR-21-5p ในกลุ่ม CHB มีระดับสูงกว่ากลุ่ม healthy และกลุ่ม HCC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P -value=0.0019 และ P -value<0.0001 ตามลำดับ) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในกลุ่ม HCC เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม healthy (P -value=0.2332) ดังแสดงในรูปที่ 30



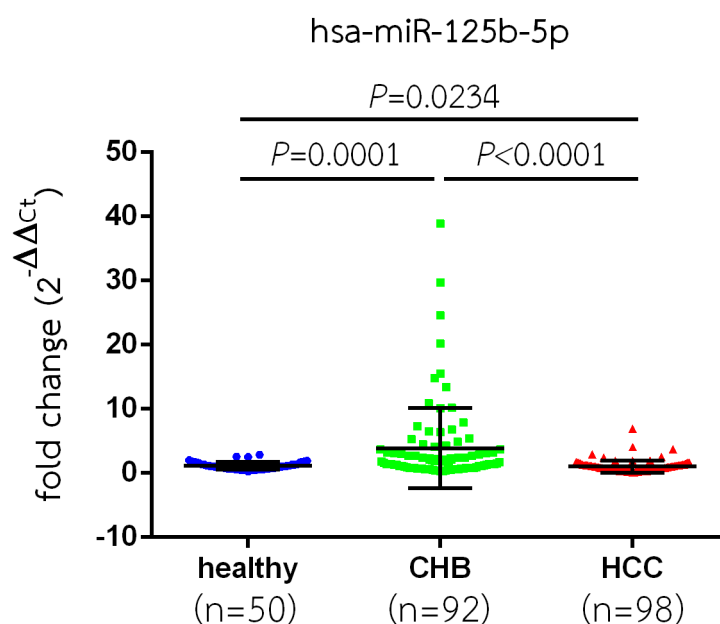
รูปที่ 29 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในซีรัม normalize ด้วย U6

โดยแบ่งออกเป็นกลุ่ม 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม healthy, กลุ่ม CHB และ กลุ่ม HCC

หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และ

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ของข้อมูล

ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในกลุ่ม healthy มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.13 ± 0.59 กลุ่ม CHB มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.88 ± 6.27 และกลุ่ม HCC มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.00 ± 0.93 เมื่อทำการเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test พบว่าการแสดงออกของ miR-125b-5p ในกลุ่ม CHB มีระดับสูงกว่ากลุ่ม healthy และกลุ่ม HCC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P -value=0.0001 และ P -value<0.0001 ตามลำดับ) และระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในกลุ่ม HCC มีระดับต่ำกว่ากลุ่ม healthy อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P -value=0.0234) ดังแสดงในรูปที่ 31

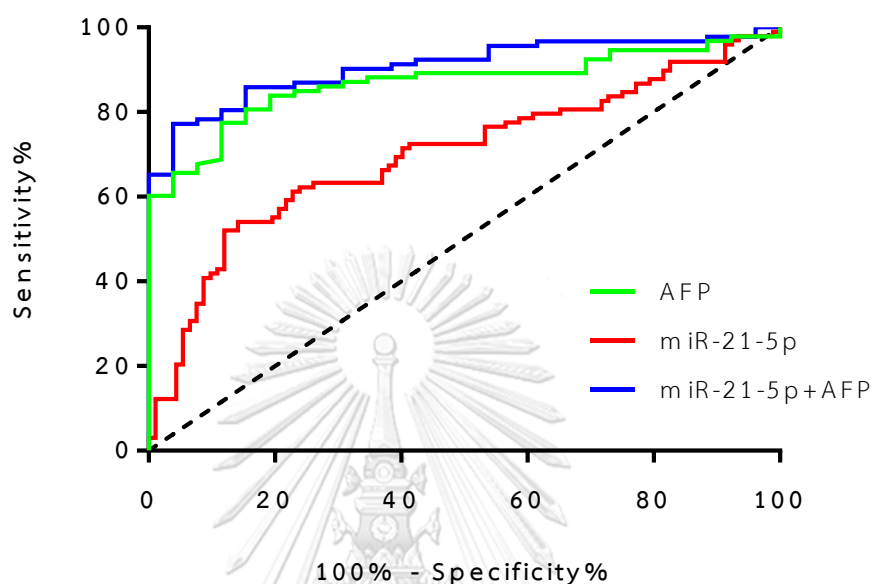


รูปที่ 30 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ในซีรัม normalize ด้วย U6 โดยแบ่งออกเป็นกลุ่ม 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม healthy, กลุ่ม CHB และ กลุ่ม HCC หมายเหตุ หนึ่งจุด แสดงจำนวนตัวอย่าง 1 คน และ กราฟแสดงค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ของข้อมูล

4.4 ประสิทธิภาพของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของ miR-21-5p และ miR-125b-5p ในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จากการคำนวณความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดย Receiver operating characteristic (ROC) curve พบว่าพื้นที่ใต้กราฟของ AFP มีค่าเท่ากับ 0.8687 [95% CI (0.80-0.93), P -value<0.0001] คิดเป็นร้อยละ 84 sensitivity และร้อยละ 81 specificity พื้นที่ใต้กราฟของ miR-21-5p มีค่าเท่ากับ 0.6993 [95% CI (0.62-0.77), P -value<0.0001] คิดเป็นร้อยละ 63 sensitivity และร้อยละ 74 specificity พื้นที่ใต้กราฟของอัตราส่วนระหว่าง AFP ต่อ miR-21-5p มีค่าเท่ากับ 0.9076 [95% CI (0.85-0.96), P -value<0.0001] คิดเป็นร้อยละ 86 sensitivity และร้อยละ 85 specificity ดังแสดงในรูปที่ 32 และตารางที่ 17 พื้นที่ใต้กราฟของ miR-125b-5p มีค่าเท่ากับ 0.7537 [95% CI (0.69-0.82), P -value<0.0001] คิดเป็นร้อยละ 72 sensitivity และร้อยละ 64 specificity พื้นที่ใต้กราฟของอัตราส่วนระหว่าง AFP ต่อ miR-125b-5p มีค่าเท่ากับ

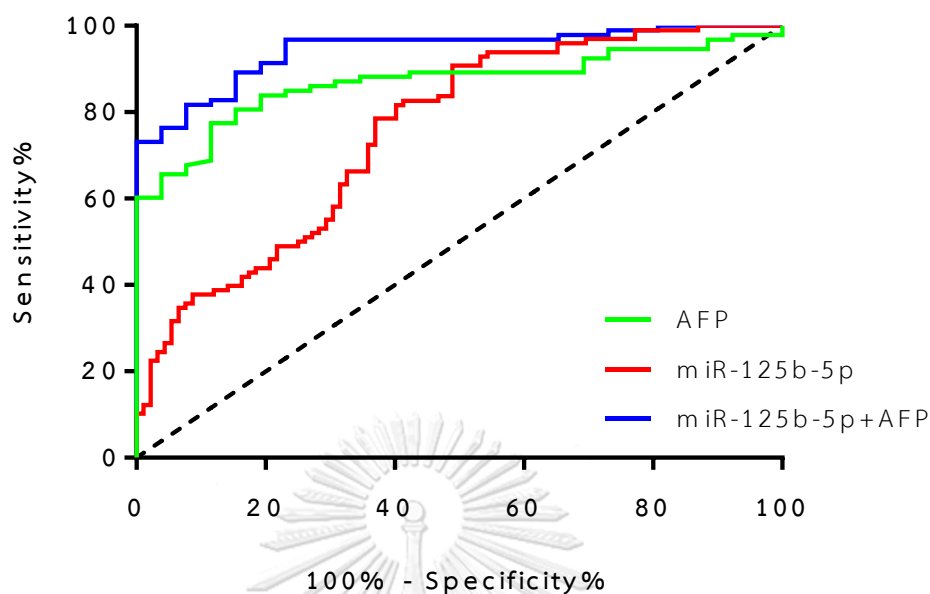
0.9433 [95% CI (0.90-0.98), P -value<0.0001] คิดเป็นร้อยละ 89 sensitivity และร้อยละ 85 specificity ดังแสดงในรูปที่ 33 และตารางที่ 18



รูปที่ 31 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC curve ของ miR-21-5p, AFP และ miR-21-5p+AFP ในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (HCC) ออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรคมะเร็งตับ (non-HCC)

ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC analysis ของ miR-21-5p และ AFP

Parameters	AFP	miR-21-5p	AFP/miR-21-5p
AUC	0.8687	0.6993	0.9076
P -value	<0.0001	<0.0001	<0.0001
95% CI	0.80-0.93	0.62-0.77	0.85-0.96
% sensitivity	83.87	63.27	86.02
% specificity	80.77	73.91	84.62
cut-off	>4	<1.2	>2.5



รูปที่ 32 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC curve ของ miR-125b-5p, AFP และ miR-125b-5p+AFP ในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (HCC) ออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรคมะเร็งตับ (non-HCC)

ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ ROC analysis ของ miR-125b-5p และ AFP

Parameters	AFP	miR-125b-5p	AFP/miR-125b-5p
AUC	0.8687	0.7537	0.9433
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001
95% CI	0.80-0.93	0.69-0.82	0.90-0.98
% sensitivity	83.87	72.45	89.25
% specificity	80.77	64.13	84.62
cut-off	>4	<1.2	>4.1

4.5 การทำนายยีนเป้าหมายของ miR-21-5p และ miR-125b-5p (*In silico* prediction)

การทำนายยีนเป้าหมาย (mRNA target) ของ miRNA ที่นำมาทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกในชิ้นเนื้อและซีรัม โดย miRTarBase ซึ่งอาศัยการเข้าคู่กันระหว่างเบสของ miRNA และ target gene ในการทำนายโอกาสการเข้าจับของ miRNA พิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ seed region ร่วมกับรูปแบบการจับกันระหว่าง miRNA และ target gene เป็นหลัก รวมทั้งผลการศึกษาก่อนหน้าที่มีการศึกษา interaction ของ miRNA กับ target gene ด้วยเทคนิคต่างๆ

ยกตัวอย่างเช่น qRT-PCR และ western blot ที่สามารถวัดระดับการแสดงออกของ mRNA และ โปรตีนที่เป็นยีนเป้าหมายของ miRNA, luciferase reporter assay ที่สามารถบอกตำแหน่งที่จำเพาะในการเข้าจับของ miRNA กับ mRNA target นอกจากนี้ยังมีเทคนิค northern blot, ribonuclease protection assay และ *in situ* hybridization ที่สามารถบอกระดับการแสดงออกที่สวนทางกัน (reciprocal expression) ของ miRNA กับ mRNA target

จากการทำนายยีนที่เป็นเป้าหมายของ miR-21-5p พบว่า *PDCD4* (Programmed cell death protein 4) และ *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) ในส่วนของ miR-125b-5p พบ *TP53* (Tumor protein p53) เป็นยีนเป้าหมาย ดังแสดงในตารางที่ 19 ซึ่งมีการศึกษาด้วยเทคนิค Reporter assay, Western blot และ qPCR ทุกยีนเป้าหมาย



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ในปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากมุ่งเน้นที่จะหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ในการพยากรณ์ และการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ เนื่องจากโรคมะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบได้อันดับต้นๆ และมีอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูง สาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับนั้นส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หลายการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ได้รับการวินิจฉัยพบตั้งแต่ระยะแรกของการเกิดโรคมะเร็ง จะมีแนวทางการรักษาและอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยพบในระยะกลางถึงระยะท้ายของการเกิดโรคมะเร็ง แต่ด้วยหลากหลายสาเหตุ ยกตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในระยะแรกยังไม่มีการแสดงอาการของโรค รวมทั้ง AFP ยังอยู่ในระดับปกติ จึงไม่สามารถตรวจพบโรคมะเร็งตับได้ ดังนั้นจึงเป็นอีกหนึ่งความท้าทายในการศึกษาหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สามารถวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในระยะแรกของการเกิดโรค ซึ่ง miRNA เป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นนิวคลีโอไโตนที่สร้างขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ post-transcriptional modification อีกทั้งยังมีรายงานว่า miRNA มีความเสถียรสูงในของเหลวภายในร่างกาย เนื่องจากกระบวนการต่างๆของการปลดปล่อย miRNA ภายในเซลล์เข้าสู่ของเหลวภายในร่างกายนั้นจะอยู่ในรูปของ microvesicle หรือจับอยู่กับโปรตีน (8, 43, 44) ซึ่งสามารถป้องกันไม่ให้ miRNA ถูกทำลายโดยเอนไซม์ RNase กระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นในสภาวะปกติรวมทั้งเมื่อเซลล์เกิดความเสียหาย ดังนั้น miRNA อาจเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดี เนื่องจากสามารถตรวจพบได้ภายในกระแสเลือด ในปัจจุบันมีการค้นพบ miRNA จำนวนมาก และมีการรวบรวมเป็นฐานข้อมูล miRBase นอกจากนี้การศึกษาในรูปแบบ high-throughput สามารถวิเคราะห์ miRNA ได้จำนวนมาก จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ miRNA หนึ่งในการศึกษาแบบ high-throughput ได้แก่ เทคนิค nCounter[®] Human V3 miRNA Expression Assay หรือ NanoString เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในมนุษย์ได้ถึง 800 miRNA รวมทั้งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะ และความไวสูง และเป็นเทคนิคที่นับจำนวนโมเลกุลของ miRNA ภายในตัวอย่าง โดยไม่มีการใช้เอนไซม์ในการเพิ่มจำนวน ที่อาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนได้ (no amplification bias) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อและซีรัม เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

จากการวิเคราะห์ miRNA profile ทำให้เห็นภาพรวมของรูปแบบการแสดงออกของ miRNA แต่ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน และค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง จึงไม่นิยมนำมาใช้ในทางคลินิก อย่างไรก็ตามยังพบการศึกษาเฉพาะบางตัวหรือกลุ่มของ miRNA ที่มีความจำเพาะและความไวในการวินิจฉัยการเกิดโรค ซึ่งเทคนิค NanoString เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA โดยอาศัยหลักการจับของ probe ที่มีความจำเพาะสูง และสามารถแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันของ miRNA ใน family เดียวกัน นอกจากนี้ยังใช้ปริมาณ RNA ตั้ต้นค่อนข้างต่ำ และลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของ miRNA ที่สนใจ จึงนำไปสู่การศึกษาในครั้งนี้ โดยผลจากการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ miRNA ด้วยเทคนิค NanoString พบ miRNA จำนวน 4 ตัว ที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (ANCT) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่ hsa-miR-21-5p และ hsa-let7g-5p มีระดับการแสดงออกสูงในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง hsa-miR-125b-5p และ hsa-let-7c-5p มีระดับการแสดงออกต่ำในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง

การเลือก candidate miRNA ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อและซีรัมของกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้น เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์จาก NanoString ต้องคำนึงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mature miRNA ซึ่งเป็นตัวที่ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน เนื่องด้วย miRNA มีขนาดเล็กจึงมีโอกาที่จะพบ miRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกัน ยกตัวอย่างเช่น miRNA family, paralogous miRNA และ isomiR ดังนั้นการเลือกวิธีในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miRNA นั้นจึงมีความสำคัญ ในปัจจุบันเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจวัดระดับของ miRNA และเป็นที่ยอมรับได้แก่ การวิเคราะห์โดย qRT-PCR แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงวิธีการออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อ miRNA ที่ต้องการศึกษา รวมทั้งต้องหลีกเลี่ยงการเกิด primer dimer เนื่องจากขนาดของ primer มีความใกล้เคียงกับ miRNA ในกรณีที่ primer ไม่สามารถแยก miRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันได้ หรือในกรณีที่เกิด primer dimer จะส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ miRNA เกิดผลบวกปลอม (49) นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาในปีพ.ศ.2561 พบว่า ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mature miRNA นั้นส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการ microprocessor ในขั้นตอนที่เอนไซม์ Drosha ทำการตัด pri-miRNA ให้กลายเป็น pre-miRNA พบว่ามีโอกาสที่เอนไซม์ Drosha จะตัดผิดตำแหน่งและส่งผลต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pre-miRNA และ mature miRNA (35) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการศึกษเกี่ยวกับ miRNA นั้นมีข้อพึงระวังมากมาย ก่อนเลือก candidate miRNA นั้นจึงต้องมีการตรวจสอบเบื้องต้น เช่น สมาชิกของ miRNA ที่จัดอยู่ใน family เดียวกัน จากฐานข้อมูล miRBase

พบว่า hsa-let-7c-5p และ hsa-let7g-5p ถูกจัดอยู่ใน let-7 family ซึ่งประกอบไปด้วยสมาชิกจำนวน 12 ตัว ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกัน การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SYBR Green real-time PCR assay ไม่สามารถแยก hsa-let-7c-5p และ hsa-let7g-5p ออกจากสมาชิกตัวอื่นๆใน family เดียวกันได้ ในส่วนของ hsa-miR-125b ถูกจัดอยู่ใน family เดียวกับ hsa-miR-125a โดยมีสมาชิกใน family เดียวกันจำนวน 3 miRNA ซึ่งสามารถออกแบบ primer ให้จับกับบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงให้ความสนใจในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miR-21-5p และ miR-125b-5p

การศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ในชิ้นเนื้อ โดยทำการเปรียบเทียบชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็งกับบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็งมีการแสดงออกของ miR-21-5p ในระดับสูง สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า miR-21 เป็น oncogene ในโรคมะเร็งหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) (50, 51), โรคมะเร็งหลอดอาหาร (esophageal squamous cell carcinoma) (52, 53), มะเร็งของเนื้อเยื่อไต (renal cell carcinoma) (54) และมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) (55) นอกจากการศึกษานี้ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งแล้ว ยังพบการศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-21 ในตัวอย่างเลือด ไม่ว่าจะเป็นซีรัมหรือพลาสมา การศึกษาส่วนใหญ่พบว่า ระดับการแสดงออกของ miR-21 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็ง จะมีระดับสูงกว่าคนที่ไม่เป็นโรคมะเร็ง ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer) (56, 57) และมะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) (58) จากผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า miR-21-5p มีระดับการแสดงออกสูงภายในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก่อนมะเร็ง (ANCT) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับมะเร็งหลายๆชนิด รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับ miR-21 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ ดังแสดงในตารางที่ 18 ในขณะที่ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ในซีรัม พบการแสดงออกที่สูงขึ้นภายในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (CHB) และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV-HCC) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ (healthy control) แต่มีการแสดงออกที่ลดลงในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV-HCC) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (CHB) ซึ่งให้ผลสวนทางกับการศึกษาส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-21 ในประชากรจีนเมื่อปีพ.ศ. 2554 เป็นอีกหนึ่งการศึกษาที่พบการแสดงออกของ miR-21 ภายในซีรัมของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับมีระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มคนปกติตามลำดับ หนึ่งในสาเหตุที่อาจเกิดขึ้นได้

ตารางที่ 20 แสดงการศึกษาเกี่ยวกับ miR-21 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

Year	Sample	Ethnicity	Sample type	expression	Ref.
2007	3 HCC	USA	tissue	up	(59)
2008	54 HCC	USA	tissue	up	(60)
2011	89 HC, 48 CHB, 101 HCC	China	serum	up	(61)
2011	68 HC, 75 CHB, 60 LC, 204 HCC	USA	plasma	up	(62)
2011	34 HC, 48 CHB, 70 HCC	China	serum	down	(63)
2012	50 HC, 30 CHB, 126 HCC	Japan	plasma	up	(64)
2014	119 HCC	China	tissue	up	(65)
2015	30 HC, 97 HCC	China	serum	up	(66)
2015	112 HCC	China	tissue	up	(67)
2015	20 CHB, 20 LC, 20 HCC	Korea	serum	up	(68)
2016	10 HBV-HCC, 10 non-HCC	India	tissue	up	(47)
2016	42 HC, 36 CHC, 78 HCC	Egypt	serum	up	(69)
2017	60 HC, 60 CHC, 60 HCC	Egypt	plasma	up	(70)
2018	119 HC, 100 CHB, 69 HBV-LC, 118 HBV-HCC	Vietnam	serum	up	(71)

HC, healthy control; CHB, patients with chronic hepatitis B virus infection; CHC, patients with chronic hepatitis C virus infection; LC, patients with liver cirrhosis; HBV-LC, patients with HBV-related liver cirrhosis; HBV-HCC, patients with HBV-related HCC

เนื่องจาก miRNA ภายในซีรัมมีความจำเพาะต่ำกว่าในชิ้นเนื้อ และอาจถูกรบกวนระดับการแสดงออก จากปัจจัยอื่นๆได้ ดังนั้นการใช้ miRNA เพียงตัวเดียวอาจไม่เพียงพอในการวินิจฉัยโรค

ในขณะที่ miR-125b-5p มีระดับการแสดงออกต่ำภายในชิ้นเนื้อบริเวณส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงก้อนมะเร็ง (ANCT) ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออก ของ miR-125b ในซีรัม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV-HCC) มี miR-125b ต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (CHB) และกลุ่มคนปกติ (healthy control) และเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า ดังแสดงในตารางที่ 19 แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับ miR-125b ยังมีความหลายหลายอยู่ เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องของ ทั้งในกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์, กระบวนการอักเสบ, รวมทั้งกระบวนการควบคุม cell cycle โดยมีรายงานว่า miR-125b มีระดับสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) (72), มะเร็งระบบเลือด (hematological malignances) (73) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (74) ซึ่งในทางตรงกันข้าม มีรายงานถึงระดับการแสดงออกของ miR-125b ที่ต่ำในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม (75), มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) (76) และมะเร็งตับ (77) ดังนั้น miR-125b อาจทำหน้าที่เป็นทั้ง oncogenic miRNA หรือ tumor suppressive miRNA ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจาก miRNA ชนิดนี้มี paralogous miRNA ซึ่งสามารถสังเคราะห์มาได้จาก 2 บริเวณ จากฐานข้อมูลพบว่า hsa-miR-125b-1 อยู่บริเวณโครโมโซม 11 ในขณะที่ hsa-miR-125b-1 อยู่บริเวณโครโมโซม 21 โดย miRNA ทั้ง 2 ตัว มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mature miR-125b เหมือนกัน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าระดับการแสดงออกของ miR-125b ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ในแต่ละโรคนั้นเกิดขึ้นจากบริเวณใด

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น พร้อมกับการรวมรวมการศึกษาก่อนหน้า แสดงให้เห็นว่า miRNA เพียง 1 ตัวอาจไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการใช้วินิจฉัยโรค ดังนั้นจึงมีการเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของการใช้ miRNA เพียงตัวเดียวกับการใช้ miRNA ร่วมกับการวินิจฉัยพื้นฐาน ในปัจจุบัน จากผลของ ROC curve แสดงให้เห็นว่าการใช้ระดับการแสดงออกของ miR-21-5p ร่วมกับระดับของ AFP หรือการใช้ระดับการแสดงออกของ miR-125b-5p ร่วมกับระดับของ AFP มี ประสิทธิภาพในการแยกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีออกจาก กลุ่มคนปกติได้ดีกว่าการวัดระดับการแสดงออกของ miRNA เพียงตัวเดียว หรือระดับ AFP เพียงอย่างเดียว

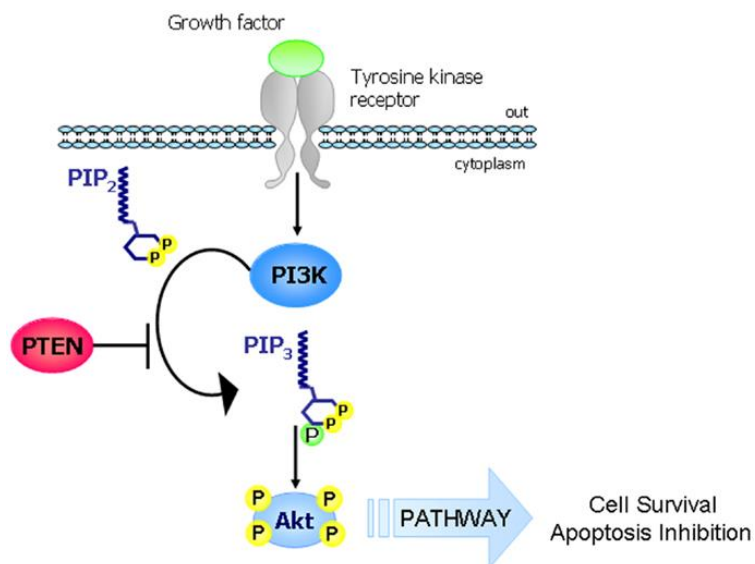
ตารางที่ 21 แสดงการศึกษาเกี่ยวกับ miR-125b ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

Year	Sample	Ethnicity	Sample type	expression	Ref.
2007	3 HCC	USA	tissue	down	(59)
2008	5 HCC	China	tissue	down	(78)
2009	3 normal liver, 5 HCC	China	tissue	down	(79)
2010	19 HCC	China	tissue	down	(80)
2014	28 HC, 24 CHB, 22 HBV-LC, 20 HBV-HCC	Turkey	plasma	up	(81)
2014	49 HCC	Hong Kong	tissue	down	(82)
2015	27 HCC	China	tissue	down	(83)
2017	56 HC, 63CHB, 59 HBV-LC, 64 HBV-HCC	China	plasma	down	(84)

HC, healthy control; CHB, patients with chronic hepatitis B virus infection; HBV-LC, patients with HBV-related liver cirrhosis; HBV-HCC, patients with HBV-related HCC

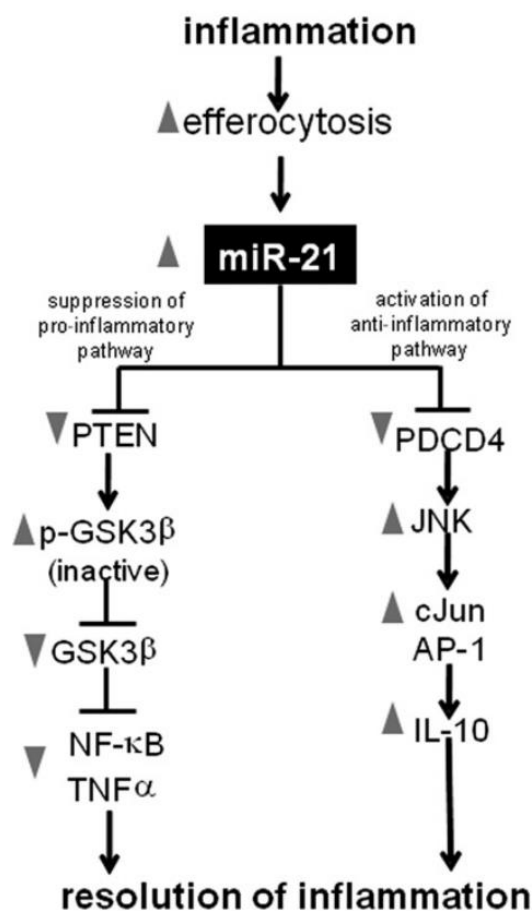
นอกจากระดับการแสดงออกของ miRNA จะสามารถใช้ในทำนายการเกิดมะเร็งได้แล้วนั้น ยังพบการรายงานเกี่ยวกับกลไกที่อาจส่งผลต่อการเกิดมะเร็ง โดยหลายการศึกษาพบว่า Programmed Cell Death 4 (PDCD4) และ Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) เป็นยีนเป้าหมายของ miR-21 โดย PDCD4 ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor gene เกี่ยวข้องในกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis), กระบวนการการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell transformation) และกระบวนการลุกลามของก้อนมะเร็ง (invasion) เนื่องจาก PDCD4 ทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์ matrix-metalloproteinase (MMPs) ดังนั้นเมื่อมีระดับการแสดงออกของ miR-21 ที่สูงขึ้น ส่งผลให้ PDCD4 ลดลง ในขณะที่ระดับของ MMPs สูงขึ้นจึงส่งเสริมการเกิดการเปลี่ยนแปลงของและเกิดกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) (54, 85, 86) นอกจากนั้นแล้วพบว่าในเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ miR-21 สูง จะไปยับยั้งการทำงานของ PTEN ส่งผลต่อ downstream PI3K/AKT signaling pathways โดยไปเพิ่ม

ระดับการ phosphorylation ของ Akt ส่งผลให้เกิด cell survival (87) และยับยั้งการตายของเซลล์ โดยกระบวนการ autophagy และ apoptosis ตามลำดับ (88) ดังแสดงในรูปที่ 33



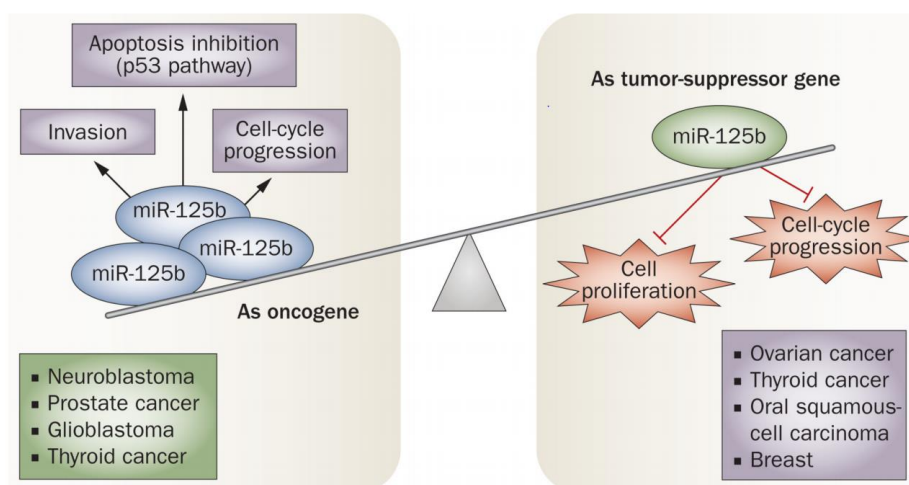
รูปที่ 33 แสดงกลไกของ PTEN ในกระบวนการเกิดมะเร็ง (87)

นอกจากยีนที่เป็นเป้าหมายของ miR-21 จะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งแล้วนั้น ยังมีการศึกษาในปีพ.ศ. 2557 รายงานเกี่ยวกับ miR-21 ในกระบวนการเกิดการอักเสบ โดยในเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ miR-21 ที่สูงนั้นจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเซลล์ ผ่านยีนเป้าหมายทั้ง 2 ตัว ตามกลไก ดังแสดงในรูปที่ 34



รูปที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ของ miR-21 กับกลไกการอักเสบ (inflammation)

ในขณะที่ผลการทำนายเป้าหมายของ miR-125b นั้นยังมีความแตกต่างกันในหลายการศึกษา หนึ่งในเป้าหมายได้แก่ Tumor protein p53 (p53) กล่าวเมื่อการแสดงออกของ miR-125b มีระดับต่ำลง ส่งผลให้มี p53 สูงขึ้น จึงทำให้เซลล์ไม่เกิดการ apoptosis แต่อย่างไรก็ตาม miR-125b สามารถทำหน้าที่ได้ทั้ง oncomiR และ tumor suppressive miRNA ขึ้นเป้าหมายของ miR-125b จึงอาจเกี่ยวข้องกับหลากหลายกระบวนการภายในเซลล์ (89) ดังแสดงในรูปที่ 35



รูปที่ 35 แสดงการทำหน้าที่ของ miR-125b ในการเกิดโรคต่างๆ (89)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความน่าจะเป็นในการนำ miR-21 และ miR-125b มาใช้ในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งระดับในระยะแรกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่อย่างไรก็ตามเพื่อความจำเพาะที่สูงขึ้น อาจจะต้องทำการตรวจสอบระดับการแสดงออก และประสิทธิภาพของ miRNA ทั้ง 2 ตัว ในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้น หรือในกลุ่มประชากรที่มีเชื้อชาติแตกต่างกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาโดยอาศัยเทคนิค high-throughput เป็นการแสดงให้เห็นถึงภาพรวมของระดับการแสดงออกของ miRNA แต่อย่างไรก็ตาม การเลือกกลุ่มประชากรตัวอย่างในการนำมาวิเคราะห์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญของการแสดงตัวแทนที่ดีของ miRNA เพื่อนำมาทำการตรวจสอบในกลุ่มประชากรที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อให้เห็นถึงความจำเพาะของ miRNA อาจจำเป็นต้องทำการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในกลุ่มประชากรที่มีสาเหตุรวมทั้งระยะการดำเนินของโรคแตกต่างกัน และทำการตรวจสอบผลของการเกิดโรค เมื่อมีระดับ miRNA ที่เปลี่ยนแปลงไป

รายการอ้างอิง

1. Kuo Y-H, Lu S-N, Chen C-L, Cheng Y-F, Lin C-Y, Hung C-H, et al. Hepatocellular carcinoma surveillance and appropriate treatment options improve survival for patients with liver cirrhosis. *European Journal of Cancer*. 2010;46(4):744-51.
2. Kinoshita A, Onoda H, Fushiya N, Koike K, Nishino H, Tajiri H. Staging systems for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *World journal of hepatology*. 2015;7(3):406.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
4. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system: IARC press Lyon.; 2000.
5. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso MDC, Sala M, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology*. 1999;29(1):62-7.
6. Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2015;21(37):10573.
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
8. Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2013;10(9):542-52.
9. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685-9.
10. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism*. 2006;3(2):87-98.

11. Liu W-H, Yeh S-H, Chen P-J. Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2011;1809(11):678-85.
12. Chonprasertsuk S, Vilaichone R-k. Epidemiology and treatment of hepatocellular carcinoma in Thailand. *Japanese journal of clinical oncology*. 2017;47(4):294-7.
13. Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis. *International journal of oncology*. 2013;42(4):1133-8.
14. Goh GB-B, Chang P-E, Tan C-K. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2015;29(6):919-28.
15. Tong S, Revall P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *Journal of hepatology*. 2016;64(1):S4-S16.
16. Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2012;2(4):353-65.
17. Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma research*. 2016;2:163.
18. Forner A, Gilabert M, Bruix J, Raoul J-L. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014;11(9):525-35.
19. Peters M, Carbone J. Evaluation and prognosis of patients with cirrhosis. Online: https://depts.washington.edu/hepstudy/presentations/uploads/19/m2_l5_evaluation_and_prognosis_of_patients_with_cirrhosis.pdf. 2013.
20. Duseja A. Staging of hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2014;4:574-S9.
21. Sarkar M, Stewart S, Yu A, Chen M, Nguyen TT, Khalili M. Hepatocellular carcinoma screening practices and impact on survival among hepatitis B-infected Asian Americans. *Journal of viral hepatitis*. 2012;19(8):594-600.
22. Liovet J. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology*. 1999;29:62-7.

23. Sarin S, Kumar M, Lau G, Abbas Z, Chan H, Chen C, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatology international*. 2016;10(1):1-98.
24. Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clinica chimica acta*. 2008;395(1):19-26.
25. Zhao Y-J, Ju Q, Li G-C. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Molecular and clinical oncology*. 2013;1(4):593-8.
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
27. Guo L, Chen F. A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene*. 2014;544(1):1-7.
28. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology*. 2010;222(3):540-5.
29. Wong LL, Wang J, Liew OW, Richards AM, Chen Y-T. MicroRNA and heart failure. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(4):502.
30. Khuu C, Jevnaker A-M, Bryne M, Osmundsen H. An investigation into anti-proliferative effects of microRNAs encoded by the miR-106a-363 cluster on human carcinoma cells and keratinocytes using microarray profiling of miRNA transcriptomes. *Frontiers in genetics*. 2014;5:246.
31. Vasconcellos JF, Byrnes C, Lee YT, Allwardt JM, Kaushal M, Rabel A, et al. Tough decoy targeting of predominant let-7 miRNA species in adult human hematopoietic cells. *Journal of translational medicine*. 2017;15(1):169.
32. Yuva-Aydemir Y, Xu X-L, Aydemir O, Gascon E, Sayin S, Zhou W, et al. Downregulation of the host gene *jigr1* by miR-92 is essential for neuroblast self-renewal in *Drosophila*. *PLoS genetics*. 2015;11(5):e1005264.
33. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130(1):89-100.
34. Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs—the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in Genetics*. 2012;28(11):544-9.

35. Nguyen TA, Park J, Dang TL, Choi Y-G, Kim VN. Microprocessor depends on hemin to recognize the apical loop of primary microRNA. *Nucleic acids research*. 2018.
36. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*. 2011;93(11):1897-904.
37. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(8):475.
38. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):99.
39. Eipper-Mains JE, Eipper BA, Mains RE. Global approaches to the role of miRNAs in drug-induced changes in gene expression. *Frontiers in genetics*. 2012;3:109.
40. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;717(1):85-90.
41. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(24):15524-9.
42. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(3):371-90.
43. Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Achievements in the Life Sciences*. 2016;10(2):175-86.
44. Maffioletti E, Tardito D, Gennarelli M, Bocchio Chiavetto L. Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:75.
45. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005;5(2):209-19.

46. Mei Q, Li X, Meng Y, Wu Z, Guo M, Zhao Y, et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PloS one*. 2012;7(10):e46890.
47. Ghosh A, Ghosh A, Datta S, Dasgupta D, Das S, Ray S, et al. Hepatic miR-126 is a potential plasma biomarker for detection of hepatitis B virus infected hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*. 2016;138(11):2732-44.
48. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-88.
49. Dellett M, Simpson DA. Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 2016;16(4):407-14.
50. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova D, Leupold J, Colburn N, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27(15):2128.
51. Fassan M, Pizzi M, Giacomelli L, Mescoli C, Ludwig K, Pucciarelli S, et al. PDCD4 nuclear loss inversely correlates with miR-21 levels in colon carcinogenesis. *Virchows Archiv*. 2011;458(4):413-9.
52. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*. 2009;15(6):1915-22.
53. Fassan M, Realdon S, Pizzi M, Balistreri M, Battaglia G, Zaninotto G, et al. Programmed cell death 4 nuclear loss and miR-21 or activated Akt overexpression in esophageal squamous cell carcinogenesis. *Diseases of the Esophagus*. 2012;25(3):263-8.
54. Li X, Xin S, He Z, Che X, Wang J, Xiao X, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2014;33(6):1631-42.
55. Lou Y, Yang X, Wang F, Cui Z, Huang Y. MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through

- inhibiting the expression of PTEN protein. *International journal of molecular medicine*. 2010;26(6):819-27.
56. Liu X, Feng J, Tang L, Liao L, Xu Q, Zhu S. The regulation and function of miR-21-FOXO3a-miR-34b/c signaling in breast cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):3148-62.
57. Chen J, Wang X. MicroRNA-21 in breast cancer: diagnostic and prognostic potential. *Clinical and Translational Oncology*. 2014;16(3):225-33.
58. Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, Tamai K, Yamaguchi K, Sato I, et al. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. *International journal of oncology*. 2015;46(2):539-47.
59. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.
60. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clinical cancer research*. 2008;14(2):419-27.
61. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, et al. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Molecular carcinogenesis*. 2011;50(2):136-42.
62. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(36):4781-8.
63. Qi P, Cheng S-q, Wang H, Li N, Chen Y-f, Gao C-f. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PloS one*. 2011;6(12):e28486.
64. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2012;56(1):167-75.

65. Wang W-Y, Zhang H-F, Wang L, Ma Y-P, Gao F, Zhang S-J, et al. miR-21 expression predicts prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2014;38(6):715-9.
66. Wang X, Zhang J, Zhou L, Lu P, Zheng Z-G, Sun W, et al. Significance of serum microRNA-21 in diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC): clinical analyses of patients and an HCC rat model. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(2):1466.
67. Huang C-S, Yu W, Cui H, Wang Y-J, Zhang L, Han F, et al. Increased expression of miR-21 predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(6):7234.
68. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho J-Y, Cho HC, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Experimental & molecular medicine*. 2015;47(9):e184.
69. El-Tawdi AHF, Matboli M, Shehata HH, Tash F, El-Khazragy N, Azazy AE-SM, et al. Evaluation of circulatory RNA-based biomarker panel in hepatocellular carcinoma. *Molecular diagnosis & therapy*. 2016;20(3):265-77.
70. Demerdash HM, Hussien HM, Hassouna E, Arida EA. Detection of MicroRNA in hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma in hepatitis C genotype-4 in Egyptian patients. *BioMed research international*. 2017;2017.
71. Trung NT, Duong DC, Van Tong H, Hien TTT, Hoan PQ, Bang MH, et al. Optimisation of quantitative miRNA panels to consolidate the diagnostic surveillance of HBV-related hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2018;13(4):e0196081.
72. Pang Y, Young CY, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2010;42(6):363-9.
73. Chaudhuri AA, So AY-L, Mehta A, Minisandram A, Sinha N, Jonsson VD, et al. Oncomir miR-125b regulates hematopoiesis by targeting the gene Lin28A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(11):4233-8.
74. Yamada A, Horimatsu T, Okugawa Y, Nishida N, Honjo H, Ida H, et al. Serum miR-21, miR-29a, and miR-125b are promising biomarkers for the early detection of colorectal neoplasia. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(18):4234-42.

75. Zhang Y, Yan L-X, Wu Q-N, Du Z-M, Chen J, Liao D-Z, et al. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer research*. 2011;71(10):3552-62.
76. Wu S, Liu F, Xie L, Peng Y, Lv X, Zhu Y, et al. miR-125b suppresses proliferation and invasion by targeting MCL1 in gastric cancer. *BioMed research international*. 2015;2015.
77. Zhao A, Zeng Q, Xie X, Zhou J, Yue W, Li Y, et al. MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. *Journal of Genetics and Genomics*. 2012;39(1):29-35.
78. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2008;123(7):1616-22.
79. Su H, Yang J-R, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer research*. 2009;69(3):1135-42.
80. Alpini G, Glaser SS, Zhang J-P, Francis H, Han Y, Gong J, et al. Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer. *Journal of hepatology*. 2011;55(6):1339-45.
81. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Molecular biology reports*. 2014;41(7):4513-9.
82. Tsang FH, Au V, Lu W-J, Shek FH, Liu AM, Luk JM, et al. Prognostic marker microRNA-125b inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells via suppressing tumorigenic molecule eIF5A2. *Digestive diseases and sciences*. 2014;59(10):2477-87.
83. Zhou JN, Zeng Q, Wang HY, Zhang B, Li ST, Nan X, et al. MicroRNA-125b attenuates epithelial-mesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4. *Hepatology*. 2015;62(3):801-15.

84. Chen S, Chen H, Gao S, Qiu S, Zhou H, Yu M, et al. Differential expression of plasma microRNA-125b in hepatitis B virus-related liver diseases and diagnostic potential for hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2017;47(4):312-20.
85. Talotta F, Cimmino A, Matarazzo M, Casalino L, De Vita G, D'esposito M, et al. An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. *Oncogene*. 2009;28(1):73.
86. Ma X, Kumar M, Choudhury SN, Buscaglia LEB, Barker JR, Kanakamedala K, et al. Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(25):10144-9.
87. Molinari F, Frattini M. Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;3:326.
88. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Meneses-Acosta A, De la O-Gómez F, Fernández-Tilapa G, Gómez-Cerón C, et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC cancer*. 2016;16(1):215.
89. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):467.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว ปัทรพร นิมเสมอ
 ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Miss Pattaraporn Nimsamer
 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 4 ถนนราชพฤกษ์ แขวงบางแวก เขตภาษีเจริญ กทม.10160
 เบอร์โทรศัพท์ 087-409-5300
 E-mail k.knim@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

- วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทุการศึกษาที่ได้รับ

- พุนออดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนประเภท 60/40 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

- นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง Serum hsa-mir-299-5p and hsa-mir-379-5p are novel diagnostic markers for HBV-related hepatocellular carcinoma ในการประชุมวิชาการ The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology (BMB 2018) “Networking in Molecular Biosciences towards Creativity and Innovation” ในระหว่างวันที่ 20-22 มิถุนายน พ.ศ. 2561 จัดขึ้น ณ โรงแรม Rayong Resort จังหวัดระยอง