

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งเต้านมระยะต้น ระยะท้าย และ ระยะแพร่กระจาย

Protein expression in early, advanced and metastatic breast cancer

รายงานโดย

รศ.พญ. ปารมี ทองสุกใส

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทนำ

มะเร็งเต้านม นับเป็นปัญหาสำคัญของสตรีทั่วโลก สตรีในประเทศแถบยุโรปและอเมริกา มีอุบัติการณ์สูงสุด อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยเอง มะเร็งก็ถือเป็นปัญหาสำคัญเช่นกัน เนื่องจากพบเป็นมะเร็งที่พบบ่อยอันดับ 2 ในสตรีไทย รองจากมะเร็งปากมดลูก โดยมีอุบัติการณ์ 17.2 ต่อประชากร 100 000 ในปี 1995-1997 และที่สำคัญยิ่งคือมีแนวโน้มอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นในทุกภาคของประเทศในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา (Sriplung et al., 2003)

ถึงแม้จะมีการศึกษาระดับลึกมากมายเกี่ยวกับ breast cancer แต่กระบวนการสำคัญที่ทำให้เซลล์เต้านมปกติเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งเกิดขึ้นในระดับยีน (gene) ซึ่งมีผลทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป การศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งในปัจจุบัน นิยมศึกษาโดยใช้ DNA arrays ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ทำให้สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ transcription เป็นพันเป็นหมื่นยีนพร้อมๆกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาระดับยีน หรือ mRNA อาจไม่เพียงพอ หรือไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในการสร้างโปรตีนโดยมียีนเป็นตัวกำหนดนั้น ผ่านการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน และได้โปรตีนที่ไม่เหมือนกัน และอาจมีหน้าที่ต่างๆ หรือจำเพาะกับตำแหน่งเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ การทำงานของโปรตีนนั้น ไม่ได้ถูกควบคุมโดยยีนเพียงอย่างเดียว หากแต่ถูกกำหนดโดยปัจจัยอื่นๆ อีกมาก เช่น การควบคุมการทำงานระหว่างโปรตีนภายในเซลล์ด้วยกันเอง (protein-protein interaction) การมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับปัจจัยแวดล้อมภายนอกเซลล์ (protein-extracellular matrix interaction) เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดเป็นเครือข่ายที่โยงใยซับซ้อน

ปัจจุบันเทคนิคในการวิเคราะห์โปรตีนได้พัฒนาจนทำให้สามารถวิเคราะห์โปรตีนต่างๆ ในเซลล์ได้คราวละจำนวนมากเช่นเดียวกับ DNA microarray เทคโนโลยีดังกล่าวคือการแยกโปรตีนด้วย high resolution 2D gel electrophoresis ตามด้วยการระบุชนิดโปรตีนด้วย mass spectrometry ซึ่งจะช่วยให้ทราบรูปแบบการแสดง ออกของโปรตีนและ ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็ง ณ สถานการณ์ต่างๆ การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ ด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ จะนำไปสู่การทราบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งที่สัมพันธ์กับระยะต่าง ๆ ของมะเร็ง, การดูกลายของมะเร็ง และ กลไกการเกิดมะเร็ง (Hanash et al., 2001; Bishsel et al., 2001) การค้นพบโปรตีน marker สำหรับใช้ในการตรวจหามะเร็ง การค้นพบ biomarker ซึ่งสามารถใช้เป็นเกณฑ์สำคัญในการวินิจฉัยและทำนายการดำเนินของโรค และการค้นพบวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถนำไปสู่การปรับใช้ให้มีความเหมาะสมเฉพาะบุคคลในโอกาสต่อไป

ในมะเร็งเต้านม พบมีการเปลี่ยนแปลงก่อนที่จะเป็นมะเร็งเต็มที่ได้แก่ atypical duct hyperplasia ต่อมาเป็นมะเร็งก่อนลุกลาม และในที่สุดเป็นมะเร็งที่ และ ในระยะท้ายสุด เซลล์มะเร็งก็จะแพร่กระจายจากเต้านม เข้าไปยังหลอดน้ำเหลือง ไปยังต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ และ เข้าสู่กระแสเลือดแพร่ไปสู่อวัยวะที่ไกล ซึ่งเป็นระยะที่มีพยากรณ์โรคเลวที่สุด ปัจจัยที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้พยากรณ์โรคที่สำคัญที่สุดในปัจจุบันคือ ระยะโรค (stage) (Carter et al, 1989; Fisher et al, 2001) ซึ่งเป็นระบบที่ประเมินขนาดของก้อนมะเร็ง สถานะแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ และการแพร่กระจายไปที่ไกล ในการศึกษาหนึ่งพบว่า ผู้ป่วยที่มีก้อนมะเร็งน้อยกว่า 2 ซม. และไม่มีมีการแพร่กระจายมีอัตราการรอดชีวิต 5 ปีเกินกว่าร้อยละ 95 ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีก้อนมะเร็งขนาดใหญ่มากกว่า 5 ซม. และมีการแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ มีอัตราการรอดชีวิต 5 ปีเพียงร้อยละ 45 ดังนั้น การวินิจฉัยมะเร็งเต้านมได้ตั้งแต่วัยเริ่มแรก ที่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้จึงมีความสำคัญยิ่ง ทั้งนี้ การศึกษาเพื่อค้นหาโปรตีนที่บ่งชี้การเกิด

มะเร็ง การลุกลาม และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จะช่วยทำนายการลุกลามของโรค และเป็นแนวทางในการรักษาได้ด้วย

การศึกษาที่ผ่านมาพบมีการเปลี่ยนแปลงของยีนและโปรตีนที่สำคัญ ที่ช่วยในการวินิจฉัย บอกลักษณะโรค รวมทั้งช่วยในการเลือกใช้ในในกลุ่มฮอร์โมน อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนทั้งเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งระยะต่างๆ ด้วยเทคโนโลยี proteomics ยังมีจำกัด (Somari et al., 2005; Wulfkühle et al., 2002; Luo et al., 2005) งานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนในเซลล์เต้านมปกติ และ เซลล์มะเร็งชนิด in situ carcinoma; เปรียบเทียบเซลล์ปกติ และ invasive duct carcinoma, และเปรียบเทียบโปรตีนในมะเร็งชนิด lobular carcinoma และ ductal carcinoma ซึ่งต่างก็สามารถตรวจพบโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มการศึกษาที่เปรียบเทียบกัน

อย่างไรก็ตาม สำหรับการศึกษเปรียบเทียบโปรตีนในมะเร็งเต้านมแต่ละระยะ ซึ่งได้แก่ ระยะต้น ระยะลุกลาม และระยะแพร่กระจายนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษา ดังนั้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้โดยมีความพยายามที่จะศึกษาการแสดงออกที่แตกต่างกันของโปรตีนระหว่างเซลล์มะเร็งทั้งสามระยะนี้ ซึ่งอาจนำไปสู่การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนแต่ละตัวที่แสดงอย่างแตกต่างและพัฒนาไปเป็นโปรตีนบ่งชี้ (biomarker) ในการทำนายการดำเนินของโรครวมทั้งอาจใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษามะเร็งเต้านมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งเต้านมระยะต่างๆ คือระยะต้น ระยะท้าย และ ระยะลุกลาม โดยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์

วิธีการศึกษา (Materials and methods)

1) Patients and tissue samples

Tissue samples were classified into 2 groups according stage of disease; early stage group (or non-metastatic group), and late stage group (metastatic group). Fresh tissue of normal breast tissue, breast cancer tissue and metastatic axillary lymph node were obtained at the time of surgical resection from 11 breast cancer patients of Songklanakarind Hospital, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla. The selected tissues were removed from the resection specimens and stored at -70°C until processing. The patients were staged according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) 6th edition staging manual. Histopathological characteristics were reviewed and confirmed by a single pathologist before use in the study. The research protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine.

2) Sample preparation and Protein extraction

To obtain the representative area, each sample was sectioned in $0.5\ \mu\text{m}$ thickness at $-20\ ^{\circ}\text{C}$, stained with routine H&E and examined under light microscopy. If the tissue sections still contain undesirable areas, the original

gross tissues were trimmed, processed for histological procedures, and examined until the specific area was acquired.

The representative frozen tissues were ground with lysis buffer containing 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT and 2% IPG buffer (pH 3-10). The mixture were then frozen with liquid nitrogen, and thawed. The protein mixture was centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was taken as protein extract for further analysis. Protein concentrations were determined using DC assay (Bio-Rad), which was based on Bradford's method with bovine serum albumin as a standard.

The proteins were separated by 13-cm immobilized pH gradient (IPG) strips, pH 3–10 range (linear) followed by SDS-PAGE. Trace contaminants in the protein solution were removed using 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Seventy-five micrograms of protein extract were subjected to IEF in the first step of protein separation for the total 18.8 kVh at 20 °C. The focused IPG strips were then equilibrated with equilibration buffer I containing SDS and 65 mM DTT for 15 min and with equilibration buffer II containing SDS and 135 mM iodoacetamide for 15 min. The second step of protein separation was performed by 12% SDS-PAGE. The protein spots were visualized by silver staining.

3) One-dimension sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis (1D SDS-PAGE)

Ten micrograms of protein extract was subject to electrophoretic separation using 10% SDS polyacrylamide resolving gel and 4% SDS polyacrylamide stacking gel with electric current 10 milliamps per gel.

4) Two-dimensional gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

The protein was separated by 13 cm immobilized pH gradient (IPG) strips, pH 3–10 range (linear) followed by SDS-PAGE. Traced contaminants in the protein solution were removed by using 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Seventy-five micrograms of protein extract were subject to IEF in first step of protein separation for the total 18.8 kVh at 20 °C. The focused IPG strip was equilibrated with equilibration buffer I containing SDS and 65 mM DTT for 15 min and with equilibration buffer II containing SDS and 135 mM iodoacetamide for 15 min. The second step of protein separation was performed by 12% SDS-PAGE. The protein spots were visualized by silver staining.

5) Image analysis

The stained gels were scanned with an Image Scanner™ (Amersham Biosciences) at 300 dpi resolution, and the images were saved as MEL files. The images were further processed by 2D gel analysis software, Image Master 2D Platinum (Amersham Biosciences). Cropping of the clusters of spots of all images was performed. Protein spots in the cropped images were detected and matched to a reference gel. The missing spots were added manually to the reference gel and all matched gels. Mismatched spots were edited and then the intensities of protein spots were analysed. To eradicate the error of the different levels of stained protein, normalisation was made by calculating the ratio of individual spot intensity to the mean intensity of protein spots in each gel image.

The comparison of mean intensities of protein spots were compared statistically using *t-test* for 4 comparison sets: (1) normal breast vs breast tumor of non-metastatic group ; (2) normal breast vs breast tumor of metastatic group; (3) Breast tumor of non-metastatic group vs breast tumor of metastatic group; (4) Breast tumor of node-positive group (Tn⁺) and their lymph node metastases (L)

6) Tryptic in-gel digestion

Protein spots were washed with 100 μ L de-ionized water, 3 times. To destain silver nitrate from the proteins, 30-50 μ L of 15 mM $K_3Fe(CN)_6$ and 50 mM $Na_2S_2O_3$ was added and vortexed for 1-2 min. This procedure was repeated until the gel pieces were clear. Afterwards, those gel pieces were washed 3 times with 50 μ L of 25 mM NH_4HCO_3 , 10 min each time and then the gel was dried completely by Speed Vac. Disruption of disulfide bonds between cyteine residue within polypeptide chains was achieved by adding 50 μ L of 0.1 mM NH_4HCO_3 , 10 mM DTT, and 1 mM EDTA and incubated at 45 °C for 45 min. The solvent was discarded and quickly replaced by a freshly prepared solution of 100 mM of iodoacetamide in 0.1 mM NH_4HCO_3 . The solution was then agitated at room temperature in the dark for 30 min. The solution was removed and gel pieces were washed 3 times with 50 μ L iodoacetamide washing solution (0.05 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 50% acetronitrile), at 10 min each time. The gels were entirely dried. Thirty μ L of working trypsin solution (resuspended trypsin in 0.1% acetic acid, 0.05 mM Tris-HCl, 10% acetronitrile, 1 mM $CaCl_2$, pH 8.5) was added and incubated, accompanied with stirring at 37°C overnight. The mixture was removed to a new tube. The gels were soaked in 2% trifluoroacetic acid at 60°C for 30 min and vortexed continuously. The gel pieces were placed in 40 μ L of digestive buffer (0.05 mM Tris-HCl, 1 mM $CaCl_2$, pH 8.5) and agitated at 30°C for 10 min. Subsequently, the gels were put in a sonicator for 5 min. Forty μ L of 100% acetronitrile was added and incubated at 30°C for 10 min. The mixture was again placed in sonicator for 5 min. Next, the mixture was pulled on to a new tube and 40 μ L of 5% formic acid and 100% acetronitrile (1:1) were added and incubated in the agitator at 30°C for 10 min. The mixture was sonicated for 5 min and pulled on to a new tube. Finally, the Speed Vac. was used to dry the samples.

7) Protein identification by MALDI-TOF-MS

Mass spectra chromatogram of protein was obtained using a BRUKER reflex IV MALDI TOF mass spectrometer. The tryptic digested protein was dissolved in 3 μ L of 60% acetronitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (1:1). The matrix solution, 10 mg of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid was prepared by dissolving in 500 μ L of 100% acetronitrile and same volume of 0.1% trifluoroacetic acid. Afterwards, 1 μ L of the mixture of tryptic digested protein and dissolving solution was mixed with 3 μ L of matrix solution. Zero point eight μ L of the mixture was pulled up and spotted onto the anchor chip plate. The plate was left to dry at room temperature. Subsequently, the mixture was ionized using a 337 nm UV laser.

8) Protein identification by LC-MS/MS

Peptides were analysed by LC-MS/MS (Waters, Micromass Q-Tof microTM). Electrospray ionisation quadrupole-time of flight (Column C18, 300 µm by 15 cm) mass spectrometry was used to analyse the amino acid sequences of the tryptic peptides. The standard peptide (Glu-fibrinopeptide) was injected into the capillary column and afterwards a peptide sample of protein spot was also injected into the same capillary column. Peptides were separated by 2 eluents, including eluent A (3% ACN, 0.1% formic acid in H₂O) and eluent B (0.1% formic acid in 97% ACN). Ninety three percent of A and 7% of B were used at 0 min, 50% of A and B at 35 min, 20% of A and 80% of B at 45 and 49 min respectively, and 93% of A and 7% of B at 50 and 60 min respectively. The system was run until the peptide separation finished.

The monoisotopic peptide masses for all samples were measured and then searched into the search engine MASCOT (Matrix Science, London, UK). The data were searched against NCBI non-redundant protein sequence database. The variable modifications (phospho ST), mass values (monoisotopic), protein mass (unrestricted), peptide mass tolerance (± 1.2 Da) and fragment mass tolerance (± 0.2 Da) were included in the search parameters. A maximum of one trypsin missed cleavage was allowed. Protein identifications were considered to be correct when the protein score was greater than based Mowse score ($p < 0.05$).

9) Immunohistochemistry

Three micron thick formalin-fixed paraffin-embedded sections were cut and placed on APES coated slides. The slides were incubated in an incubator at 45°C overnight and then deparaffinized by xylene and further rehydrated in graded alcohol. Antigen retrieval was accomplished by immersing slides in Tris EDTA buffer pH 9 in a pressure cooker at 95°C for 4 minutes and immediately cooling down the slides in running tap water for 20 minutes. After cooling down, they were rinsed by distilled water and then quenched endogenous hydrogen peroxide by 3% H₂O₂ for 5 minutes. The slides were washed in distilled water and immersed in PBS buffer pH 7.6 for 5 minutes. After blotting the excess PBS, the slides were incubated with 3% normal horse serum to block non specific protein for 30 minutes in moist chamber. The sections were incubated with antibodies 1 hour as follows: **Heat Shock Protein 60** (clone LK1, DBS Mob313-05, DBS, USA) dilution 1:25; **Annexin V** (clone 1F4-1A5, SERO-MCA2931Z, Serotec, UK) dilution 1:2,000; **Tubulin-β-6** (clone TBN06, MS-1226-R7, NeoMarkers, USA) ready to use. After antibody incubation, the slides were washed by PBS buffer and then incubated with EnVision for 30 minutes. The sections were washed in PBS buffer and then incubated with DAB for color development. After rinsing the slides in running tap water, they were subjected to hematoxylin for nuclear staining. The slides were dehydrated in graded alcohol and cleared in xylene and then mounted with adhesive medium. Immunoreactivity against each antibody was evaluated under light microscopy.

ผลการศึกษา

1) ผู้ป่วยและตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อนำมาศึกษาจากผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 11 ราย มีอายุอยู่ระหว่าง 36-76 ปี รายละเอียดของระยะโรค และ ลักษณะทางพยาธิวิทยาแสดงในตารางที่ 1 โดยสรุปคือ ผู้ป่วย 2 รายเป็นมะเร็งระยะก่อนลุกลามชนิด DCIS สามรายเป็นผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น (I-II) ที่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง และ หกรายเป็นผู้ป่วยมะเร็งระยะท้ายที่มีการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง ลักษณะจุลพยาธิวิทยาของตัวอย่างเนื้อเต้านมปกติ มะเร็ง และ ต่อมน้ำเหลืองแสดงในรูปที่ 1-2

Table 1. Characteristics of the cases used in the study.

Case no.	Sample No.	Age	T	pN	M	Stage	Grade	Histology	Sample
1	B517	52	Tis	0	0	0	-	DCIS	N, T
2	B597	47	Tis	0	0	0	-	DCIS	T
3	B646	72	1	0	0	I	1	IDC	N, T
4	B665	46	2	0	0	IIA	3	ILC	N, T
5	B700	58	1	0	0	I	3	IDC	T
6	B486	76	2	3	0	IIIC	2	IDC	N, T
7	B621	44	3	2	0	IIIA	3	IDC	N, T, L
8	B635	36	2	3	0	IIIC	3	ILC	N, T, L
9	B666	71	2	3	0	IIIC	3	IDC	T, L
10	B694	58	1	1	0	IIA	3	IDC	T, L
11	B711	52	3	2	0	IIIA	3	IDC	N, T, L,

Three parameters of TNM classification for breast cancer are shown as *T*, size or direct extent of the tumor; *pN*, degree of axillary lymph nodes examined by pathological examination; *M*, presence of distant metastasis. **DCIS**, ductal carcinoma *in situ*; **IDC**, infiltrating ductal carcinoma; **ILC**, infiltrating lobular carcinoma; **N**, non-tumor breast tissue, **T**, breast tumor; **L**, metastatic lymph node.

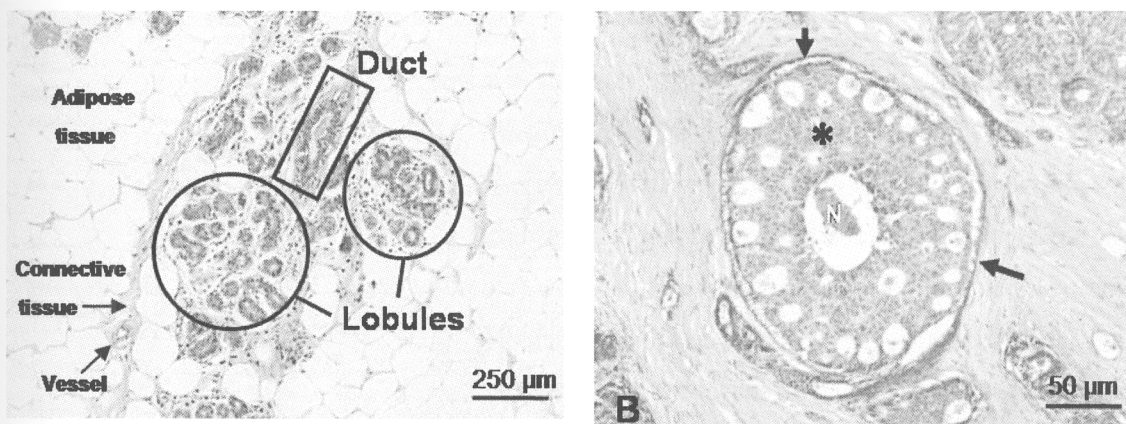


Fig 1. Normal breast tissue (A). Ductal carcinoma in situ (DCIS) of sample B597(B) *, tumor; N, necrotic tumor; arrow, basement membrane. (H&E stain)

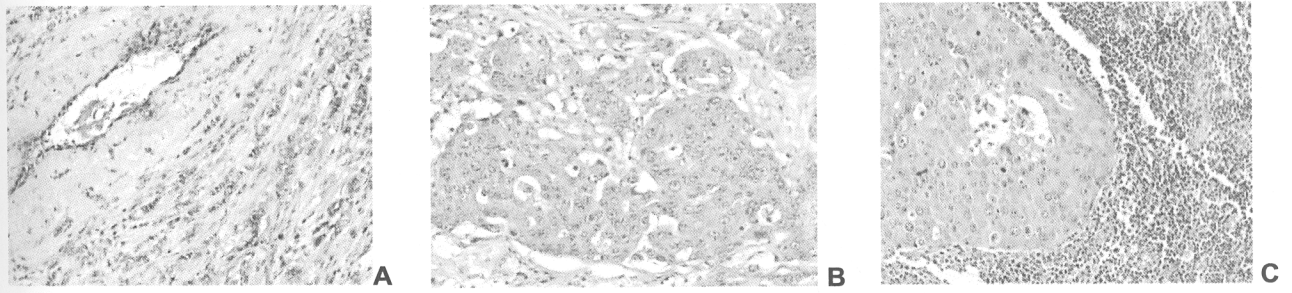


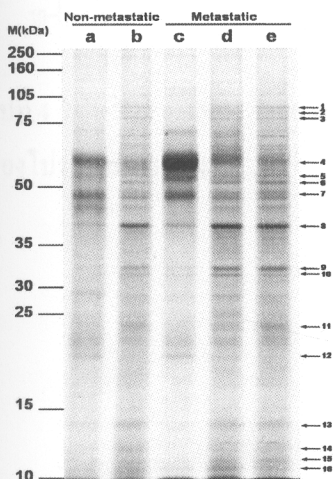
Fig 2. Invasive lobular carcinoma of B646 (A). Invasive duct carcinoma (B) and metastatic axillary node of B621 (C)

2) การแสดงออกของโปรตีนโดย 1D SDS-PAGE

ได้ทำการแยกโปรตีนในตัวอย่างโดยวิธี 1DE SDS-PAGE ซึ่งเป็นการประเมินรูปแบบโปรตีนเบื้องต้นด้วยตาเปล่า โดยดูความแตกต่างกันของความเข้มและความหนาบางของแถบโปรตีน และสามารถดูน้ำหนักของกลุ่มโปรตีนในแถบสีที่ปรากฏได้ โดยการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาร์คเกอร์ (prestained marker) โปรตีนที่อยู่แถบด้านล่างคือ กลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยไล่ขึ้นไปเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าตามลำดับ

ผลการเปรียบเทียบการแสดงผล (รูปที่ 3) พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งมีแถบโปรตีนจำนวนมากกว่า และสีเข้มกว่าเนื้อเยื่อปกติทั้งในมะเร็งกลุ่มที่ยังไม่แพร่กระจาย และที่แพร่กระจาย แถบโปรตีนของเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งที่ยังไม่แพร่กระจาย และที่แพร่กระจายแล้ว (แถว c) มีความคล้ายคลึงกัน แถบโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่ยังไม่แพร่กระจาย และที่แพร่กระจายแล้ว มีความคล้ายคลึงกัน และแถบโปรตีนของต่อมน้ำเหลืองที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจาย คล้ายคลึงกับลักษณะแถบโปรตีนของเนื้อเยื่อมะเร็งที่เต้านมระยะแพร่กระจาย

อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย 1-DE นั้นทำโดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนหนึ่งแถบอาจประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน เนื่องจากการแยกครั้งนี้เป็นการแยกตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเท่านั้น การที่จะแยกโปรตีนให้ละเอียดมากขึ้นจนได้เป็นโปรตีนเดี่ยวจึงต้องเพิ่มการแยกครั้งที่ 2 ตามความแตกต่างของประจุไฟฟ้าของโปรตีนซึ่งเป็นเทคนิคที่เรียกว่า 2D SDS-PAGE



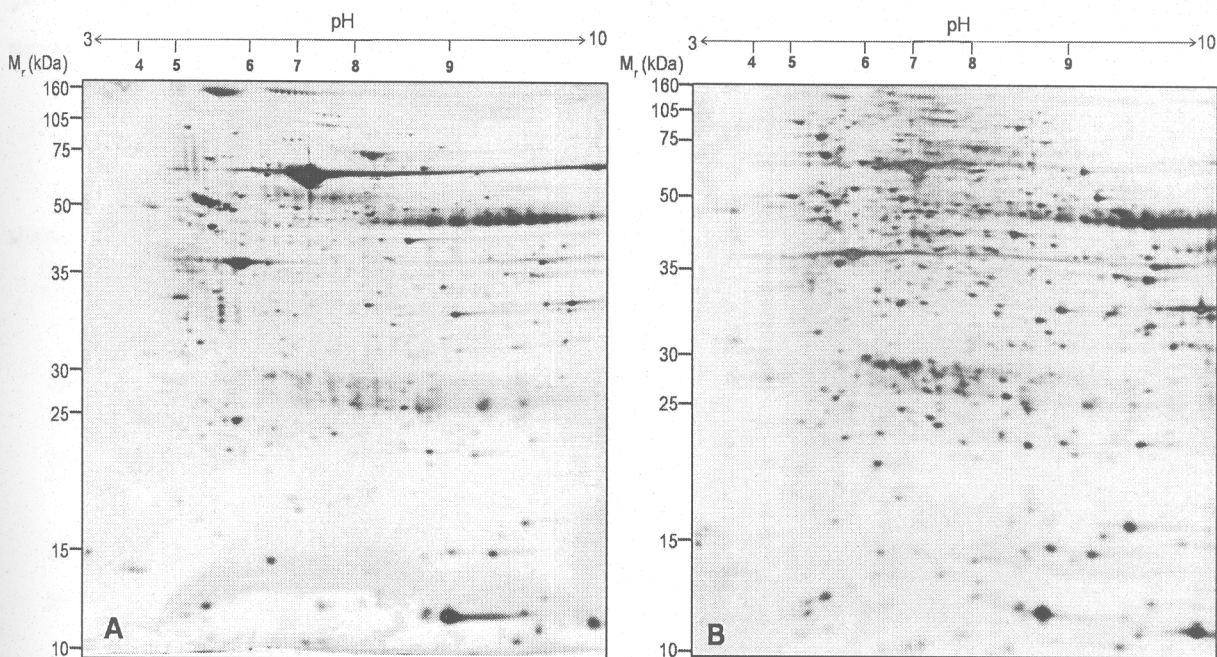
รูปที่ 3 ภาพ 1D SDS-PAGE แยกด้วย 10% SDS-PAGE และย้อมด้วย silver nitrate; a เนื้อเยื่อปกติระยะที่ยังไม่แพร่กระจาย (ตัวอย่าง 665), b เนื้อเยื่อมะเร็งระยะที่ยังไม่แพร่กระจาย (ตัวอย่าง 665), c เนื้อเยื่อปกติระยะแพร่กระจาย (ตัวอย่าง 621), d เนื้อเยื่อมะเร็งระยะแพร่กระจาย (ตัวอย่าง 621), e เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ที่มีเซลล์มะเร็งเต้านมแพร่กระจายไป (ตัวอย่าง 621), M แถบโปรตีนมาตรฐาน, ลูกศรชี้แถบโปรตีนหมายเลข 1-16 แสดงแถบโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็ง

3) การแสดงออกของโปรตีนโดย 2D SDS-PAGE

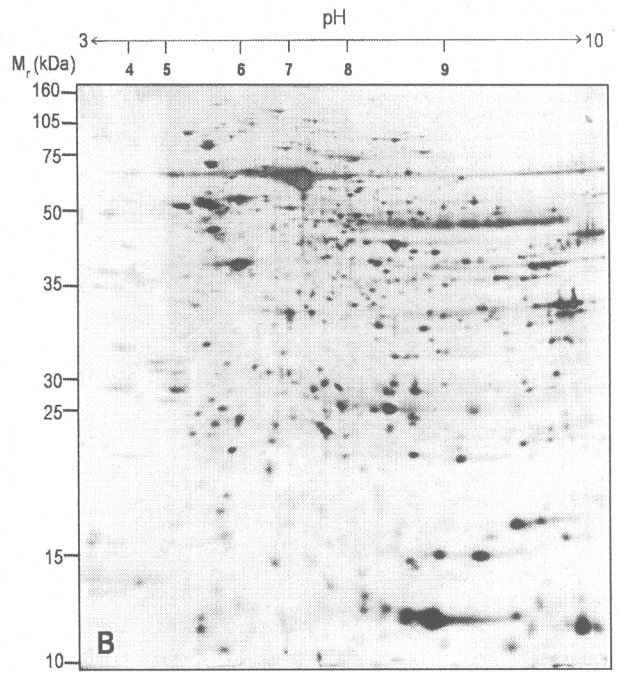
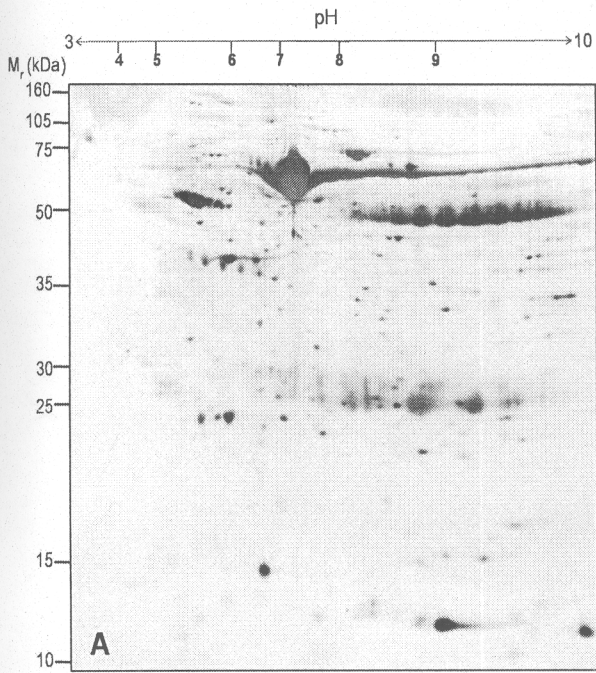
การเปรียบเทียบจุดโปรตีนในแผนเจล ดำเนินการเปรียบเทียบ 5 คู่ดังนี้

- (1) เนื้อเต้านมปกติ กับ เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม ในกลุ่มมะเร็งระยะที่ยังไม่แพร่กระจาย
- (2) เนื้อเต้านมปกติ กับ เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม ในกลุ่มมะเร็งระยะที่ไม่แพร่กระจาย
- (3) เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่ยังไม่แพร่กระจาย กับ เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่ยังแพร่กระจาย
- (4) เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม กับ ต่อม้าน้ำเหลืองที่มีมะเร็งแพร่กระจายไป

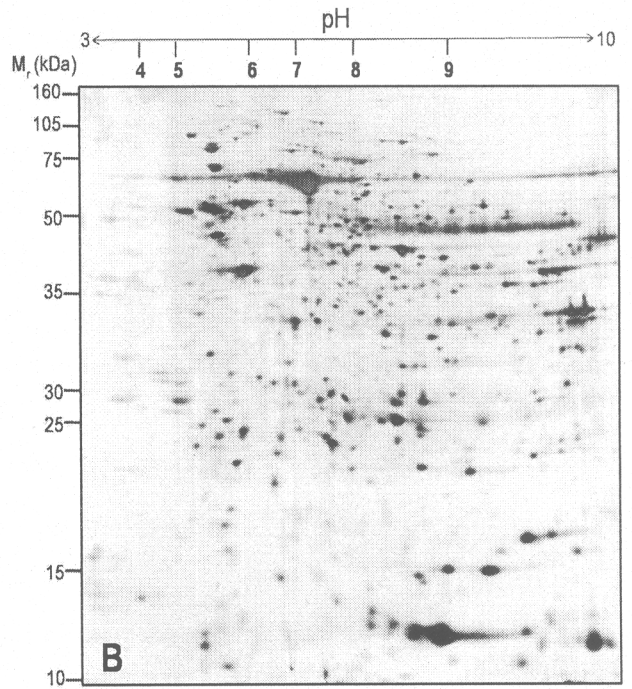
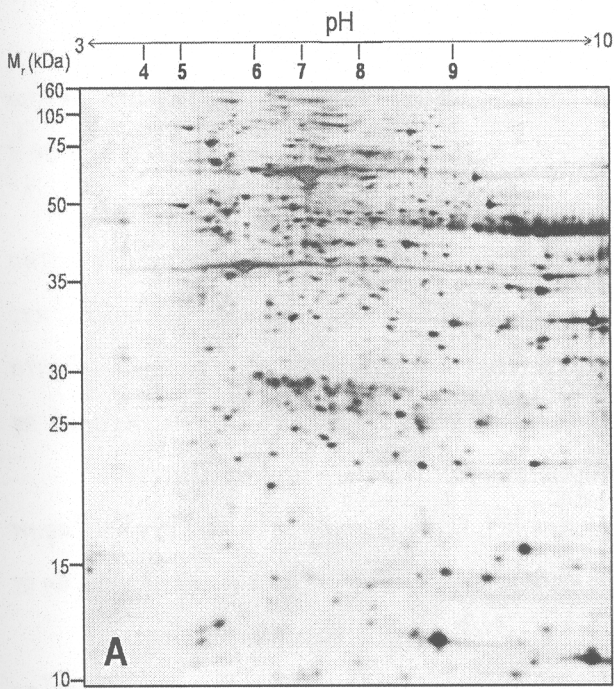
ผลการเปรียบเทียบลักษณะของจุดโปรตีนด้วยสายตาระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็ง ทั้งในกลุ่มมะเร็งที่ยังไม่แพร่กระจายและกลุ่มที่แพร่กระจาย พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งมีจุดโปรตีนจำนวนมาก ขนาดใหญ่ และมีสีเข้มกว่าจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติ แต่มีจุดโปรตีนบางจุดในเนื้อเยื่อปกติที่มีขนาดใหญ่กว่าจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็ง (รูปที่ 4, 5) ส่วนลักษณะของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะไม่แพร่กระจายกับระยะแพร่กระจาย (T_n - vs T_n +) (รูปที่ 6) และเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายกับต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์มะเร็งแพร่กระจายในรายเดียวกัน (T_n + vs L) (รูปที่ 7) พบว่าลักษณะของภาพจุดโปรตีนมีความคล้ายคลึงกัน



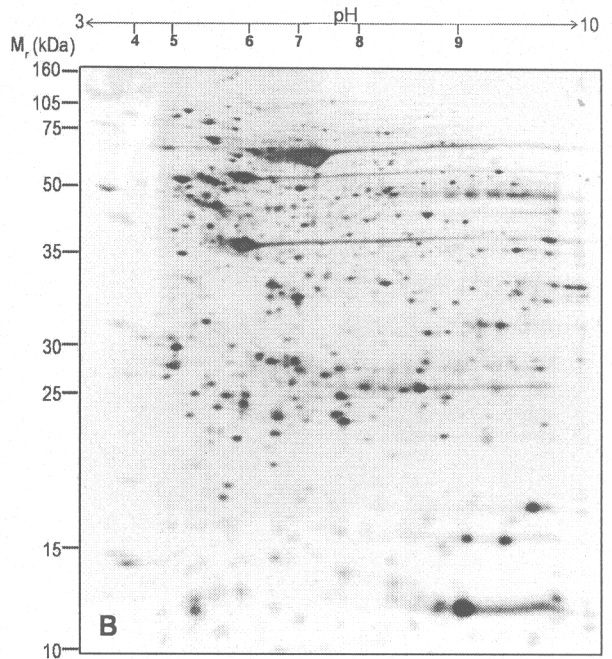
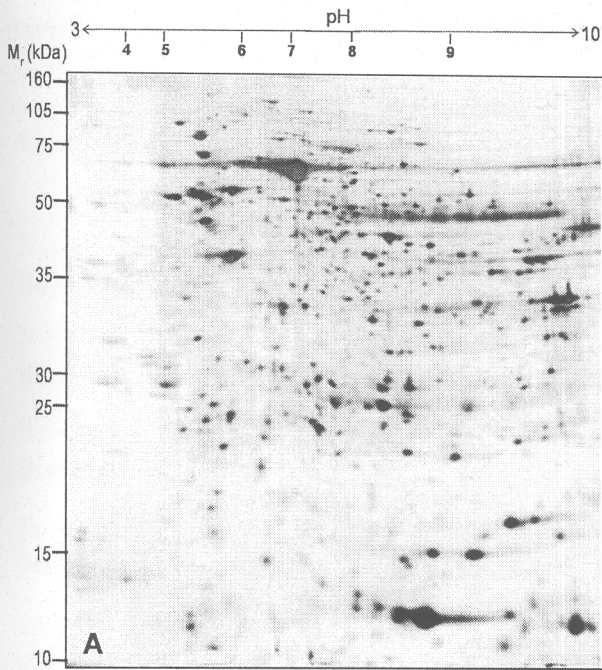
รูปที่ 4 ภาพ 2D gel ของตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (B) ในกลุ่มไม่แพร่กระจาย, M_r = น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 5 ภาพ 2D gel ของตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อเมะเร็ง (B) ในระยะแพร่กระจาย, Mr = น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 6 ภาพ 2D gel ของตัวอย่างเนื้อเยื่อเมะเร็งระยะไม่แพร่กระจาย (A) และระยะแพร่กระจาย (B), Mr = น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 7 ภาพ 2D gel ของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะแพร่กระจาย (A) และเนื้อเยื่อต่อน้ำเหลืองที่มีมะเร็งเต้านมแพร่กระจายไป (B), Mr = น้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนมาตรฐาน

4) การวิเคราะห์ค่าความเข้มของจุดโปรตีน

ผลการวิเคราะห์จุดโปรตีนจำนวน 678 จุดบนภาพ 2D gel ด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum software พบมีจุดโปรตีนจำนวนทั้งหมด 161 จุด ที่มีความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างคู่เปรียบเทียบทั้งหมด (ตารางที่ 2)

โดยมีจุดโปรตีน 89 จุด ที่มีความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งที่ยังไม่แพร่กระจายกับเนื้อเยื่อปกติ เป็นจุดโปรตีนที่ความเข้มเพิ่มขึ้นในมะเร็งจำนวน 79 จุด และลดลงจำนวน 10 จุด ระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งที่แพร่กระจายกับเนื้อเยื่อปกติ 117 จุด (เพิ่ม 105 ลด 12 จุด) ในจำนวนนี้มีกลุ่มของจุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มอย่างต่อเนื่องตั้งแต่มะเร็งระยะที่ยังไม่แพร่กระจายจนถึงมะเร็งระยะแพร่กระจายจำนวน 58 จุด โดยมีจุดโปรตีนที่มีความเข้มเพิ่มขึ้น 52 จุด และลดลง 6 จุด

ผลการเปรียบเทียบจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่ยังไม่แพร่กระจายกับเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่แพร่กระจาย พบจุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 23 จุด โดยมีความเข้มเพิ่มขึ้นในระยะแพร่กระจายจำนวน 20 จุด และลดลง 3 จุด

ผลการเปรียบเทียบจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เต้านมกับต่อน้ำเหลืองข้างรักแร้ที่เซลล์มะเร็งลุกลามไป พบจุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 37 จุด โดยมีความเข้มเพิ่มขึ้นในต่อน้ำเหลืองที่เซลล์มะเร็งลุกลามไป จำนวน 14 จุด และลดลงจำนวน 23 จุด

ตารางที่ 2 จำนวนจุดโปรตีนที่มีความแตกต่าง เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อกลุ่มต่างๆ

Comparison group	Statistic	Number of significantly changed protein spots		
		Total	Up-regulated	Down-regulated
N (n=3) vs T (n=3) (Mon-metastatic group)	Paired t-test	89	79	10
N (n=4) vs T (n=4) (Metastatic group)	Paired t-test	117	105	12
N (n=3) vs N (n=4) (Non-metas vs Metastatic)	t-test	6	5	1
Tn- (n=5) vs Tn+ (N=6) (Non-metas vs Metastatic)	t-test	23	20	3
Tn+ vs L (n=5) (Metastatic group)	Paired t-test	37	14	23

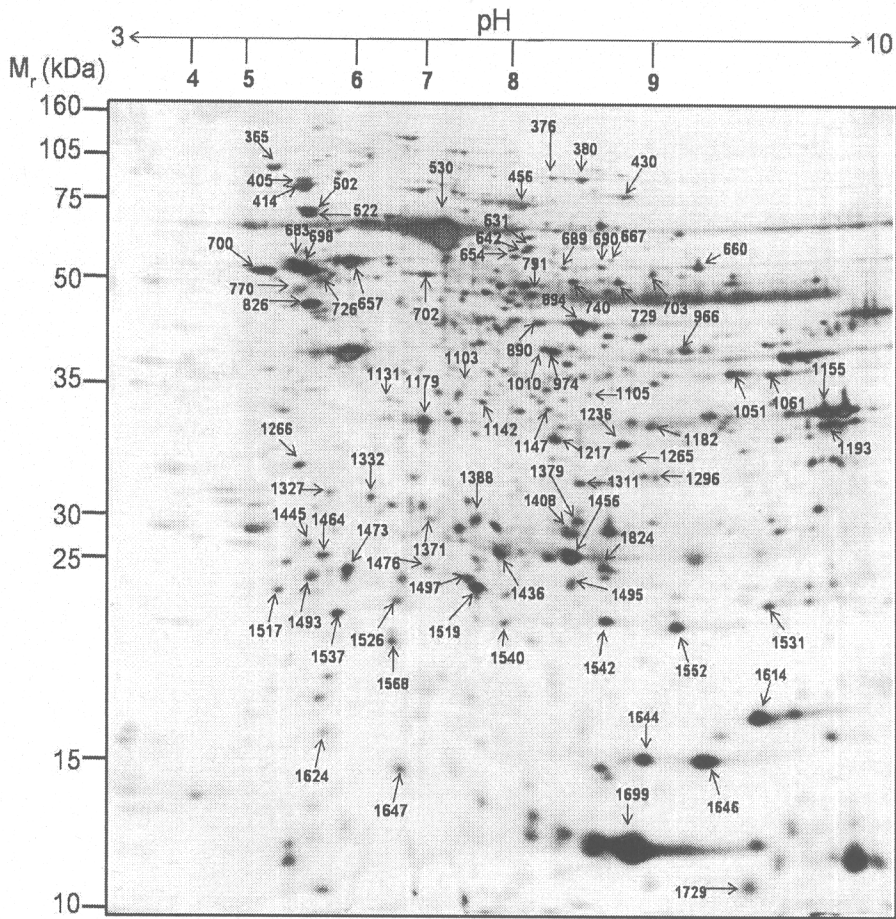
หมายเหตุ N = เนื้อเยื่อปกติ, T = เนื้อเยื่อมะเร็งที่เต้านม, L = มะเร็งที่ต่อมน้ำเหลือง

5) ชนิดของโปรตีนระบุด้วย peptide mass fingerprint (PMF) และ partial peptide sequence (PPS)

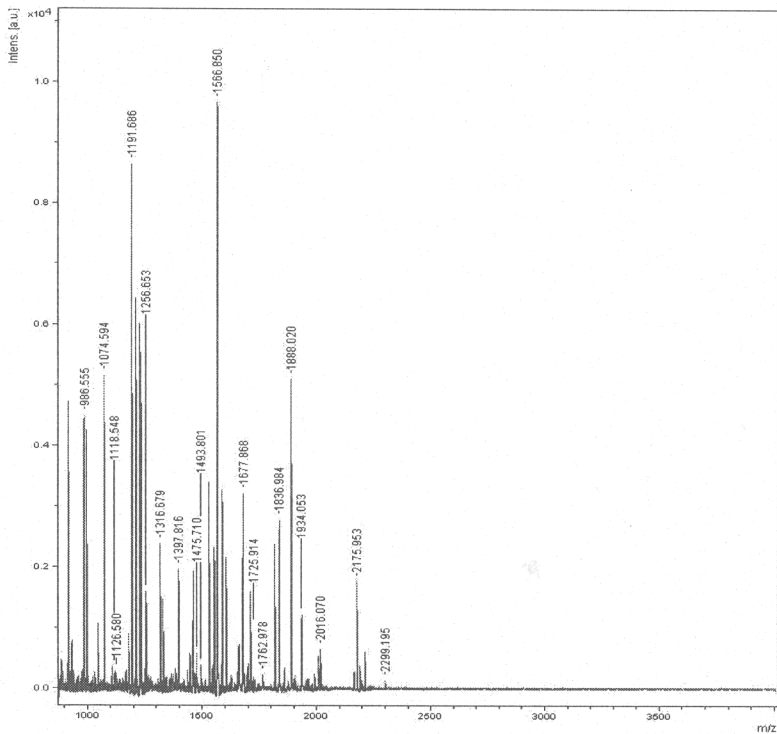
จุดโปรตีนจำนวน 82 จุดในรูปที่ 8 ได้ถูกนำไปคัดเลือกเพื่อวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของโปรตีน โดยการเลือกตัดจุดโปรตีนขนาดใหญ่จาก 2D gel ที่ย้อมด้วย 0.1% comassie blue R-250 จำนวน 25 จุด และจุดโปรตีนขนาดเล็กจาก 2D gel ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรด จำนวน 57 จุด

ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย PMF ด้วยเครื่อง MALDI-TOF ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่า มวลต่อประจุ (m/z) ของเปปไทด์ ด้วยเครื่อง MALDI-TOF (รูปที่ 9) พบว่า มีโปรตีนหลายชนิดที่มีค่า identity score มากกว่า base mowse score และ โปรตีนแต่ละชนิดมีค่า Mr และค่า pI ใกล้เคียงกัน ทำให้ยากต่อการตัดสินใจ จึงได้ใช้การวิเคราะห์ partial peptide sequence (PPS) ด้วย LC-MS/MS มาช่วยยืนยันผลการระบุโปรตีน

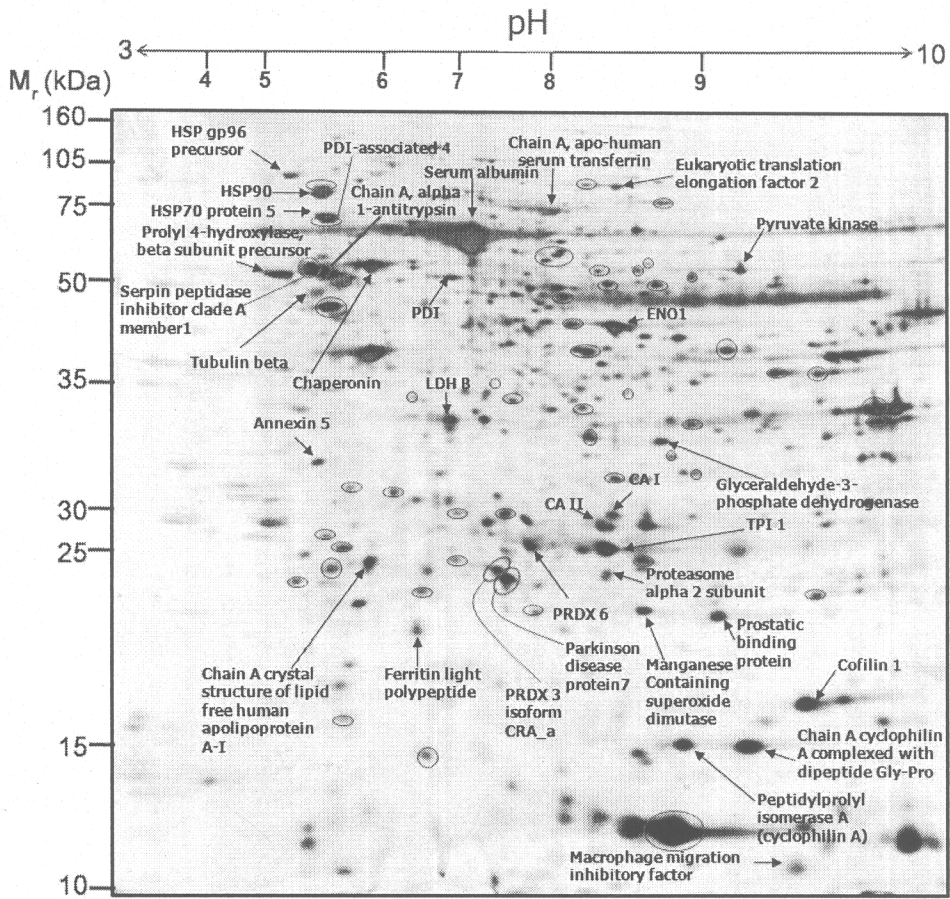
จากจุดโปรตีนทั้งหมด 82 จุดที่นำไปวิเคราะห์ PMF และ PPS สามารถระบุชื่อโปรตีนได้สำเร็จจำนวน 33 จุด (รูปที่ 10) แสดงรายชื่อแยกตามกลุ่มเปรียบเทียบในรูปที่ 11 และแสดงชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนทั้งหมด 33 ตัวที่ระบุได้ใน ตารางที่ 3



รูปที่ 8: ภาพ 2D SDS-PAGE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็ง B711 ลูกศรชี้จุดโปรตีนจำนวน 82 จุดที่นำไประบุชนิด, M_r คือ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 9: ภาพ PMF ของโปรตีนหมายเลข 502



รูปที่ 10 : แสดงจุดโปรตีนที่ระบุชนิดได้

ภาพที่ 11 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จาก PMF และ PPS แสดงเป็น 3 กลุ่ม คือ A เปรียบเทียบภายในกลุ่มมะเร็งระยะไม่แพร่กระจาย, B เปรียบเทียบภายในกลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจาย และ C เปรียบเทียบกลุ่มมะเร็งระยะไม่แพร่กระจายกับกลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจาย

A: Non-metastatic group

Normal tissue vs Tumor tissue

1. ID 365 Heat shock protein gp96 precursor
2. ID 380 Eukaryotic translation elongation factor 2
3. ID 414 90kDa heat shock protein
4. ID 502 Heat shock 70kDa protein 5
5. ID 522 Protein disulfide isomerase-associated 4
6. ID 530 Serum albumin
7. ID 657 Chaperonin
8. ID 683 Serpin peptidase inhibitor clade A, member 1
9. ID 700 Prolyl 4-hydroxylase beta subunit precursor
10. ID 702 Protein disulfide isomerase
11. ID 770 Tubulin beta (ID 770)
12. ID 1179 Lactate dehydrogenase B
13. ID 1236 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
14. ID 1408 Carbonic anhydrase II
15. ID 1456 Triosephosphate isomerase 1
16. ID 1495 Proteasome alpha 2 subunit
17. ID 1519 Parkinson disease protein 7
18. ID 1542 Manganese-containing superoxide dismutase
19. ID 1552 Prostatic binding protein
20. ID 1644 Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
21. ID 1614 Cofilin 1
22. ID 1646 Chain A cyclophilin A complexed with dipeptide Gly-Pro

B: Metastatic group

Normal tissue vs Tumor tissue

1. ID 365 Heat shock protein gp96 precursor
2. ID 380 Eukaryotic translation elongation factor 2
3. ID 414 90kDa heat shock protein
4. ID 456 Chain A apo-human serum transferrin (non-glycosylated)
5. ID 502 Heat shock 70kDa protein 5
6. ID 522 Protein disulfide isomerase-associated 4
7. ID 530 Serum albumin
8. ID 657 Chaperonin
9. ID 660 Pyruvate kinase
10. ID 683 Serpin peptidase inhibitor clade A, member 1
11. ID 698 Chain A alpha 1-antitrypsin
12. ID 702 Protein disulfide isomerase
13. ID 770 Tubulin beta
14. ID 894 Enolase 1
15. ID 1236 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
16. ID 1266 Annexin 5
17. ID 1408 Carbonic anhydrase II
18. ID 1456 Triosephosphate isomerase 1
19. ID 1473 Chain A crystal structure of lipid-free human apolipoprotein A-I
20. ID 1495 Proteasome alpha 2 subunit
21. ID 1497 Peroxiredoxin 3 isoform CRA_a
22. ID 1519 Parkinson disease protein 7

C: Non-metastatic group vs Metastatic group

Normal tissue vs Normal tissue

1. ID 456 Chain A apo-human serum transferrin (non-glycosylated)

Tumor tissue vs Tumor tissue

1. ID 1266 Annexin 5
2. ID 1379 Carbonic anhydrase I
3. ID 1436 Peroxiredoxin 6
4. ID 1495 Proteasome alpha 2 subunit

ภาพที่ 11 (ต่อ)

A: Non-metastatic group

Normal tissue vs Tumor tissue

-

B: Metastatic group

Normal tissue vs Tumor tissue

23. ID 1542 Manganese-containing superoxide dismutase
24. ID 1552 Prostatic binding protein
25. ID 1568 Ferritin light polypeptide
26. ID 1614 Cofilin 1
27. ID 1644 Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
28. ID 1646 Chain A cyclophilin A complexed with dipeptide Gly-Pro
29. ID 1729 Macrophage migration inhibitory factor

Breast tumor tissue vs metastatic node

1. ID 414 90kDa heat shock protein
2. ID 456 Chain A apo-human serum transferrin (non-glycosylated)
3. ID 502 Heat shock 70kDa protein 5
4. ID 698 Chain A alpha1-antitrypsin
5. ID 700 Prolyl 4-hydroxylase beta subunit precursor
6. ID 702 Protein disulfide isomerase
7. ID 770 Tubulin beta
8. ID 894 Enolase 1
9. ID 1179 Lactate dehydrogenase B
10. ID 1456 Triosephosphate isomerase 1
11. ID 1729 Macrophage migration inhibitory factor

C: Non-metastatic group vs Metastatic group

Normal tissue vs Normal tissue

-

Tumor tissue vs Tumor tissue

-

ตารางที่ 3 ชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีนจำนวน 33 ชนิด ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง MALDI-TOF และ LC-MS/MS

No. Spot	Accession number	Protein name	Observed Mr/pt	Theoretical Mr/pt	PMF			LC-MS/MS			Reported function(s)	Protein expression					References	
					Identity score	BMS coverage	Sequence	Identity score	BMS coverage	Sequence		Non-met	Met	Non-met vs Met	Met vs L			
												N vs T	N vs T	N1 vs N2	T1 vs T2	T vs L		
1	365	gij15010550	Heat shock protein gp96 precursor	94,800/5.22	90,138/4.73	176	66	28	384	44	31	Posses the ability to signal and active immune cells, assists protein folding	N<T	N<T	--	--	--	Linderoth et al (2000) Melendez et al (2006)
2	380	gij4503483	Eukaryotic translation elongation factor 2	90,000/8.72	96,246/6.41	unmatched	66	--	192	41	30	Promotes protein synthesis	N<T	N<T	--	--	--	Caraglia et al (2000)
3	414	gij306891	90kDa heat shock protein	78,350/5.46	83,584/4.97	121	66	33	1050	41	32	Helps protein stabilization, controls cell cycle and apoptosis	N<T	N<T	--	--	T>L	Goetz et al (2003) Neckers (2007) Pick (2007)
4	456	gij110590597	Chain A, apo-human serum transferrin	71,250/8.10	76810 / 6.58	unmatched	66	--	916	41	36	Transportation of Fe ³⁺ to blood plasma	--	N<T	N1<N2	--	T>L	Wally et al (2006)
5	502	gij16507237	Heat shock 70kDa protein 5	70,250/5.50	72,288/5.07	246	66	44	629	44	42	Protein folding, prevention of stress-related protein aggregation, translocation of proteins across membranes	--	N<T	--	--	T<L	Melendez et al (2006) Torronteguy et al (2006)
6	522	gij4758304	Protein disulfide isomerase-associated 4	68,750/5.50	72,887/4.96	218	66	38	535	44	28	Maintains estrogen receptor α structure and function, regulates the redox state of proteins, anti-apoptotic protein	N<T	N<T	--	--	--	Schultz-Norton et al (2006) Na et al (2007)
7	530	gij23307793	Serum albumin	64,000/7.10	71,344/6.13	298	66	60	Searching failed			Binds water,cations (such as Ca ²⁺ , Na ⁺ and K ⁺), fatty acids, hormones, bilirubin, and drugs, Regulates the colloidal osmotic pressure of blood	N>T	N>T	--	--	--	Sugio et al (1999)
8	657	gij31542947	Chaperonin	55,750/5.82	61,187/5.70	--	--	--	420	41	30	Prevents protein aggregation, helps protein folding, functions as pro-survival and pro-apoptotic molecules	N<T	N<T	--	--	--	Chandra et al (2007)
9	660	gij35505	Pyruvate kinase	54,250/9.10	58,411/7.58	--	--	--	612	41	46	Enzyme involved in glycolysis	--	N<T	--	--	--	Hennipman et al (1988)
10	683	gij15990507	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	54,375/5.42	46,850/5.37	129	66	36	491	41	29	Inhibits serine protease, functions as chaperoning proteins or transporting hormone	N>T	N>T	--	--	--	Kueppers (1973)
11	698	gij157831596	Chain A, Alpha1-Antitrypsin	52,750/5.50	44,280/5.37	111	66	36	401	57	31	Inhibits serine protease, functions as chaperoning proteins or transporting hormone	--	N>T	--	--	T>L	Kueppers (1973)
12	700	gij20070125	Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor	53,875/5.13	57,480/4.76	109	66	56	849	42	37	Involves in hydroxylation of prolyl residues in procollagen, catalyzes the formation,breakage and rearrangement of disulfide bonds, Inhibits aggregation of misfolded protein, binds thyroid hormone, roles in both the influx and efflux of S-nitrosothiol-bound nitric oxide, functions as a subunit of the microsomal triglyceride transfer protein complex	N<T	--	--	--	T<L	John (1993)
13	702	gij860986	Protein disulfide isomerase	51,750/6.85	5,7043/6.10	--	--	--	351	42	45	Maintains estrogen receptor α structure and function, catalyzes thiol-disulfide exchange reaction through two thio-redoxin-like domains, anti-apoptotic protein	N<T	N<T	--	--	T<L	Schultz-Norton et al (2006) Sook Na et al (2007)
14	770	gij18088719	Tubulin, beta	49,025/5.39	50,096/4.75	unmatched	66	--	782	42	59	Microtubule protein	N<T	N<T	--	--	T<L	Luduen (1993)
15	894	gij4503571	Enolase 1	43,325/6.72	47,481/7.01	80	66	47	907	42	69	Interacts with the cytoskeleton system to promote the migration of tumor cells, plasminogen-binding receptor	--	N<T	--	--	T>L	Liu and Shih (2007)

No. Spot	Accession number	Protein name	Observed Mr/Pl	Theoretical Mr/Pl	PMF			LC-MS/MS			Reported function(s)	Protein expression					References	
					Identity score	BMS coverage	Sequence coverage	Identity score	BMS coverage	Sequence coverage		Non-met	Met	Non-met vs Met		Met vs L		
												N vs T	N vs T	N1 vs N2	T1 vs T2	T vs L		
16	1179	gij4557032	Lactate dehydrogenase B	33,350/6.82	36,900/5.71	--	66	--	346	42	43	Carbohydrate metabolism, involves energy production	N<T	--	--	--	T<L	Schwartz (1973)
17	1236	gij7669492	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	32,350/8.81	36,201/8.57	unmatched	66	--	210	42	15	Involves glycolytic pathway, nuclear tRNA transport, apoptosis, DNA repair, DNA replication in the nucleus, vesicular transport, membrane fusion	N<T	N<T	--	--	--	Harada et al (2007)
18	1266	gij4502107	Annexin 5	31,675/5.39	35,971/4.94	unmatched	66	--	527	42	53	Inhibits protein kinase C	--	N<T	--	T1<T2	--	Gerke and Moss (2002)
19	1379	gij4502517	Carbonic anhydrase I	28,400/8.66	28,909/6.59	--	--	--	212	42	55	Maintains acid-base balance in cytosol of red blood cell and GI tract	--	--	--	T1<T2	--	Nogradi (1998)
20	1408	gij4557395	Carbonic anhydrase II	27,600/8.57	29,228/6.87	unmatched	66	--	123	41	36	Maintains acid-base balance in cytosol in almost ubiquitous tissue	N<T	N<T	--	--	--	Lloyd et al (2005)
21	1436	gij4758638	Peroxiredoxin 6	26,050/7.80	25,133/6.00	110	66	43	372	42	72	H ₂ O ₂ -scavenging enzyme in cytoplasm and nucleus	--	--	--	T1<T2	--	Chang et al (2007)
22	1456	gij17389815	Triosephosphate isomerase 1	25,700/8.59	26,910/6.45	123	66	40	457	42	54	Glycolytic enzyme	N<T	N<T	--	--	T<L	Ralsler et al (2008)
23	1473	gij90108664	Chain A, Crystal Structure Of Lipid-free Human Apolipoprotein A-I	25,100/5.74	28,061/5.27	--	66	--	313	42	63	The major protein component of HDL-cholesterol, a cofactor for cholesterol acyltransferase (LCAT, ACAT)	--	N>T	--	--	--	Chang et al (2007) Jiang et al (2006)
24	1495	gij4506181	Proteasome alpha 2 subunit	24,275/8.64	25,996/6.92	--	66	--	80	42	5	Protein degradation	N<T	N<T	--	T1<T2	--	Almond and Cohen (2002) Lipkowitz (2003)
25	1497	gij119569781	Peroxiredoxin 3, isoform CRA_a	24,075/7.36	24,941/5.73	unmatched	66	--	168	42	35	Mitochondrion-specific H ₂ O ₂ -scavenging enzyme	--	N<T	--	--	--	Karihtala et al (2003) Nonn et al (2003)
26	1519	gij31543380	Parkinson disease protein 7	23,625/7.49	20,050/6.33	unmatched	66	--	116	42	61	Helps protein folding, Refolds damage protein, Delivers selected proteins to proteasome	N<T	N<T	--	--	--	http://ghr.nlm.nih.gov/gene=park7 (31/3/2009)
27	1542	gij62912502	Manganese-containing superoxide dimutase	22,425/8.77	23,681/7.34	unmatched	66	--	94	42	13	Antioxidant enzyme in mitochondria	N<T	N<T	--	--	--	Marklund et al (1982)
28	1552	gij4505621	Prostatic binding protein	22,600/9.02	21,158/7.01	unmatched	66	--	373	42	70	Controls activity of kinases, serine protease inhibitor	N<T	N<T	--	--	--	Hengst et al (2001) Granovsky and Rosner (2008)
29	1568	gij20149498	Ferritin, light polypeptide	21,325/6.24	20,064/5.51	unmatched	66	--	155	42	50	Stores iron in a soluble and non-toxic state in cell	--	N<T	--	--	--	Güner et al (1992)
30	1614	gij5031635	Cofilin 1 (non-muscle)	17,725/9.28	18,719/8.22	unmatched	66	--	341	42	50	Depolymerizes filamentous F-actin, inhibits the polymerization of monomeric G-actin in pH-dependent manner, involves in the translocation of actin-cofilin complex from cytoplasm to nucleus	N<T	N<T	--	--	--	Hotulainen et al (2005)
31	1644	gij13937981	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	15,850/8.89	18,228/7.68	unmatched	66	--	187	43	53	Catalyzes the cis-trans isomerization of the peptide bonds preceding proline residues	N<T	N<T	--	--	--	Choi et al (2007)
32	1646	gij1633054	Chain A, Cyclophilin A Complexed With Dipeptide Gly-Pro	15,788/9.11	18,098/7.82	115	66	35	Searching failed			Catalyzes the cis-trans isomerization of the peptide bonds preceding proline residues	N<T	N<T	--	--	--	Choi et al (2007)
33	1729	gij4505185	Macrophage migration inhibitory factor	11,050/9.23	12,639/7.74	--	--	--	112	42	26	Regulation of macrophage function in host defense through the suppression of anti-inflammatory effect of glucocorticoids	--	N<T	--	--	T>L	Bando et al (2002)

Non-met=non-metastatic group, **Met**=metastatic group, **N**=normal breast tissue, **N1**= normal breast tissue of non-metastatic group, **N2**= normal breast tissue of metastatic group, **T**=tumor breast tissue, **T1**= tumor tissue of non-metastatic group, **T2**=tumor tissue of metastatic group, **L**=metastased axillary lymph node, BMS=Base Mowse Score. Protein scores greater than base mowse score are significant (p<0.05). p-value is lesser than 0.05 that indicates significant differences in protein intensity.

6) ผลการย้อม Immunohistochemistry (IHC)

Heat Shock Protein 60 (HSP60)

การติด ผลการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็ง 12 ราย (ตารางที่ 4, รูปที่ 12) ซึ่งเป็น non-metastatic disease 6 ราย และ metastatic group 6 ราย พบว่าตัวอย่างเกือบทั้งหมดคือ 11 ใน 12 ราย เซลล์มะเร็งที่ได้นำให้ผลบวกระดับปานกลาง(2+) ถึงเข้มข้น (3+) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ปกติซึ่งให้ผลลบต่อการย้อม อีก 1 ราย ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งให้ผลบวกต่อการย้อมเท่ากัน (2+) สรุปการแสดงออกของ HSP60 โดย IHC ให้ผลที่สอดคล้องกับ 2D-PAGE

Annexin V

ผลการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ พบว่าส่วนใหญ่ ทั้งเซลล์เต้านมปกติ และ เซลล์มะเร็งที่ได้นำ ให้ผลการย้อมไม่แตกต่างกัน คือไม่ติดสี หรือ ติดสีระดับ 1+ ในเซลล์มะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้ มีการติดสีมากกว่าเซลล์มะเร็งที่ได้นำเป็นส่วนใหญ่ (5 ใน 6 ราย) ดังนั้นผลการแสดงออกของโปรตีนที่ตรวจด้วยวิธี IHC ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลของการแสดงออกโปรตีนใน 2D-Gel (ตารางที่ 4, รูปที่ 13)

Beta-Tubulin

ผลการย้อม Beta-tubulin ในตัวอย่างมะเร็ง 9 ราย พบว่าทั้งเซลล์เต้านมปกติ และ เซลล์มะเร็งให้ผลบวกต่อการย้อมระดับ 1-2+ และไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) แต่เซลล์มะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองติดสีเข้ม (3+) กว่ามะเร็งที่ได้นำ ดังนั้นผลการย้อม beta-tubulin ด้วย IHC ให้ผลสอดคล้องเฉพาะในกลุ่มเปรียบเทียบระหว่างมะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองเทียบกับมะเร็งที่เต้านม

Table 4 Results of immunohistochemical staining for HSP60 and Annexin V.

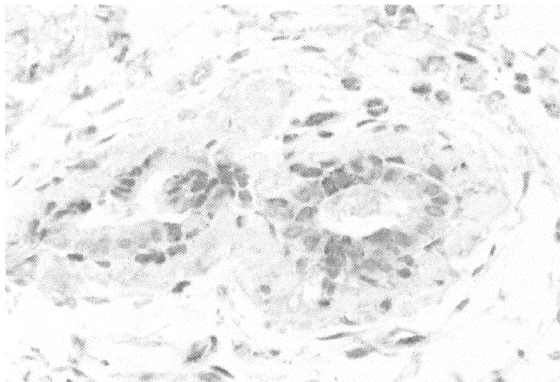
Section num	Disease status	HSP60			Annexin V					
		N	T	T vs N	N	T	L	Tvs N	L vs T	
1	S45-8011 (case)	Non-Metas	0	2+	T>N	0-1+	0	-	T~N	-
2	S46-5990 (case)	Non-Metas	0-1+	2-3+	T>N	0-1+	0	-	T~N	-
3	S48-3911 (case)	Non-Metas	0	3+	T>N	0	0	-	T~N	-
4	S53-3393	Non-Metas	0	2+	T>N	3+	2+	-	T>N	-
5	S53-0291	Non-Metas	0	2+	T>N	0-1+	0-1+	-	T~N	-
6	S53-0563	Non-Metas	0	3+	T>N	0	2+	-	T>N	-
7	S47-3048 (case)	Metas	0	1-2+	T>N	0	0-2+	3+	T>N	L>T
8	S49-6077 (B694)	Metas	0	2+	T>N	0	1+	2-3+	T>N	L>T
9	S50-5676 (B711)	Metas	0	2+	T>N	0	0	2+ (f)	T~N	L>T
10	S52-13738	Metas	0	2+	T>N	1-2+	1-2+	0-2+	T~N	L>T
11	S52-14919	Metas	0	2+	T>N	0-1+	0-1+	2+ (f)	T~N	L>T
12	S52-8297	Metas	2+	2+	T~N	2+	2+	0	T~N	L<T

T, tumor; N, normal; L, axillary lymph node

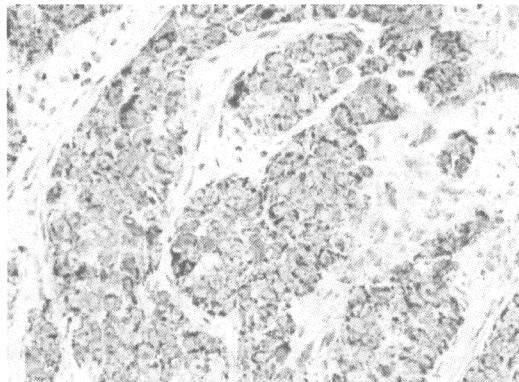
Table 5 Results of immunohistochemical staining for Beta-tubulin

	Section Num	Disease status	Intensity of IHC staining			Summary of comparison	
			Normal	Tumor	Node	T vs N	L vs T
1	S45-8011 A	DCIS	2+	2+	-	T=N	
2	S46-5990 C	DCIS	1+	2+	-	T>N	
4	S48-3911 G	Non-metas	2+	2+	-	T=N	
5	S45-3476 G	Metas	1+	1+	2+	T=N	L>T
6	S47-0757 D	Metas	2+	2+	3+	T=N	L>T
7	S47-3048 L	Metas	1+	2+	3+	T>N	L>T
8	S48-4818 D	Metas	-	1-2+	3+	-	L>T
9	S50-5676 A	Metas	2+	3+	3+	T>N	L=T

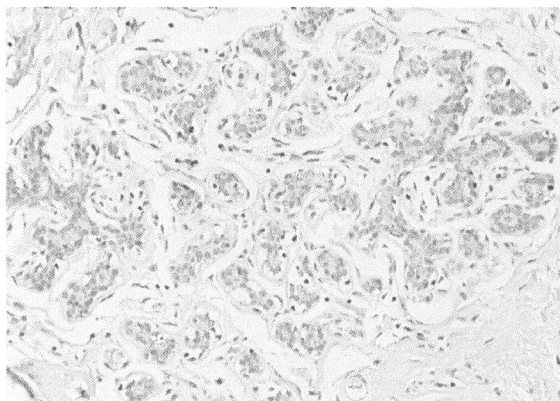
หมายเหตุ: T, tumor; N, normal; L, axillary lymph node



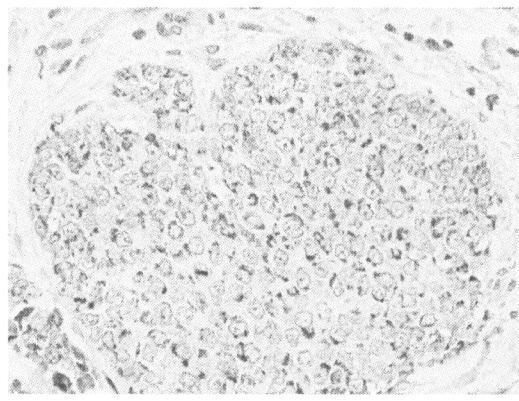
(A) S53-0563, normal



(A) S53-0563, invasive tumor



(C) S50-5676, normal



(D) S50-5676, invasive tumor

Fig 12. IHC staining for HSP60. Normal duct (A) and invasive carcinoma (B) of S53-0563 (non-metastatic case) and normal duct (C) and invasive carcinoma (D) of S50-5676 (metastatic case).

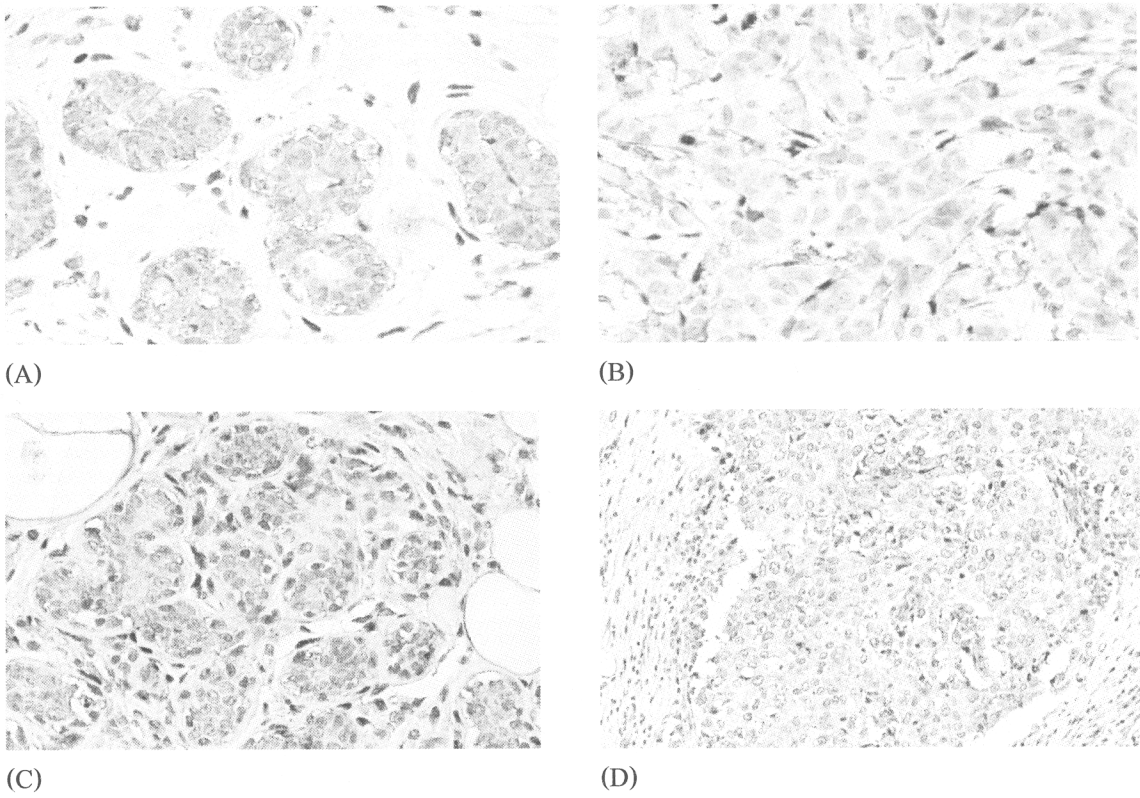
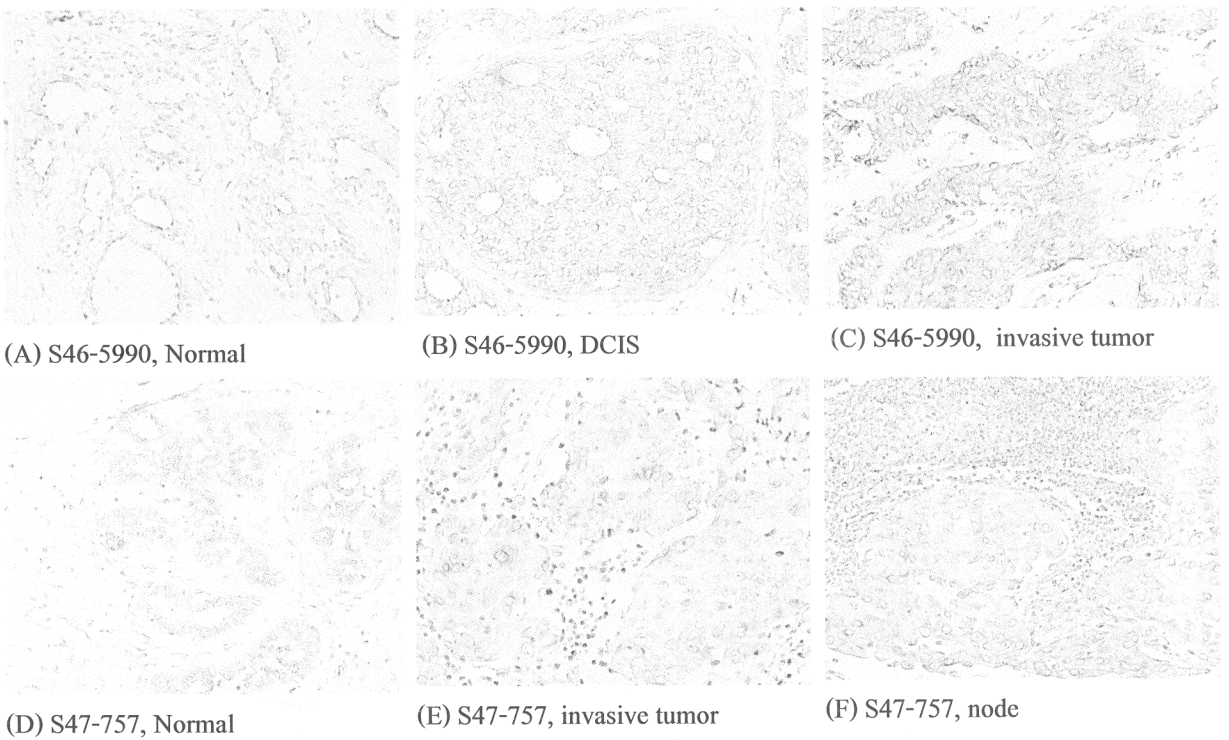


Fig 13 IHC staining for Annexin V. Normal duct (A) and invasive carcinoma (B) of S53-0291 (non-metastatic case) **and** normal duct (C) and invasive carcinoma (D) of S49-6077 (metastatic case).



(A) S46-5990, Normal

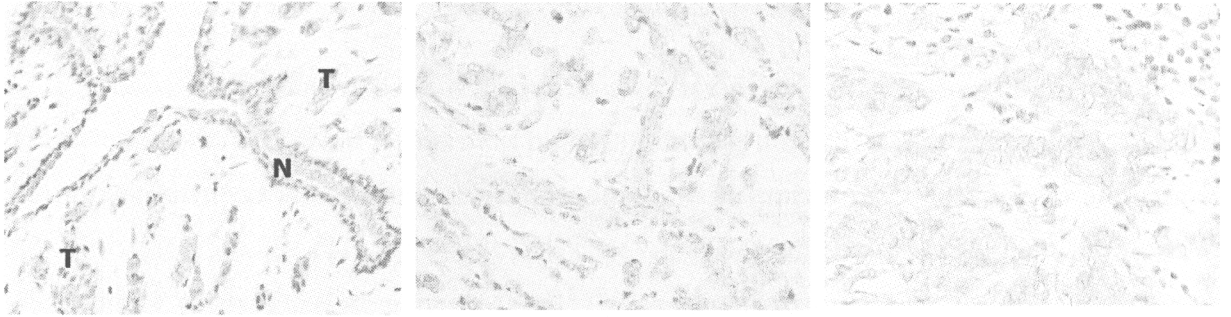
(B) S46-5990, DCIS

(C) S46-5990, invasive tumor

(D) S47-757, Normal

(E) S47-757, invasive tumor

(F) S47-757, node



(G) S47-3048, Normal (N) and surrounding tumor (T)

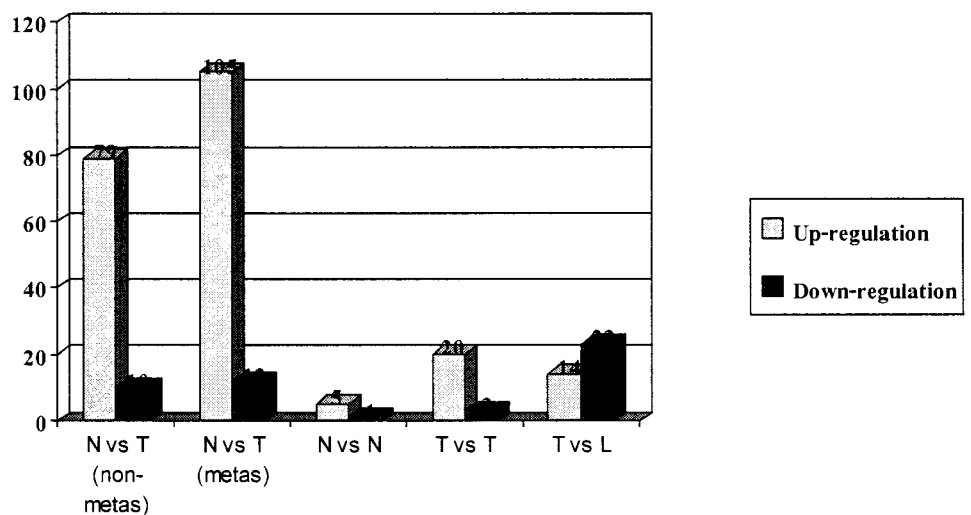
(H) S47-3048, invasive tumor

(I) S47-3048, node

Fig 14. . IHC staining for beta-tubulin. Normal duct (A), insitu (B) and invasive carcinoma (C) of S46-5990 (non-metastatic case) and normal duct (D, G), invasive carcinoma (E, F) and metastatic node of S47-757 and S47-3048 (metastatic cases) respectively.

วิจารณ์

การศึกษาโปรตีโอมิกส์ของมะเร็งเต้านมในครั้งนี้ ใช้วิธีอิเล็กโทรโฟริซิส 2D SDS-PAGE เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งระยะต้นที่ยังไม่มีการแพร่กระจาย และ มะเร็งเต้านมระยะที่มีการกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้แล้ว รวมทั้งเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของโปรตีนอย่างต่อเนื่องตามลำดับขั้นของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติ เป็นมะเร็ง เป็นเซลล์มะเร็งระยะต้น และเซลล์มะเร็งระยะลุกลามและแพร่กระจาย (ภาพที่ 12) และสามารถระบุโปรตีนได้ 33 ตัวซึ่ง พบว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการต่างๆ ในการอยู่รอดและเพิ่มการเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis, antioxidant enzymes, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและการรักษาสมดุล โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีน การเคลื่อนที่ของเซลล์ และ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต้านมะเร็ง



ภาพที่ 15 แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างในกลุ่มเปรียบเทียบต่าง ๆ ในการศึกษา

การแสดงออกของโปรตีนที่ได้ 2D SDS-PAGE

จากผลการแสดงออกและการเปรียบเทียบของจุดโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อเต้านมปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็ง ซึ่งพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวนมากในมะเร็งเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ ยืนยันความรู้ที่ว่า เซลล์มะเร็งมีกระบวนการทำงานต่างๆ ของเพิ่มขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกันและส่วนใหญ่เป็นการแสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งเต้านมเทียบกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ ทั้งการเปรียบเทียบมะเร็งก่อนลุกลามชนิด DCIS กับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ (Wulfkuhle *et al.*, 2002) และศึกษาเปรียบเทียบมะเร็งระยะลุกลามชนิด invasive duct carcinoma กับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ (Luo *et al.*, 2005; Somiari *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009)

ผลการเปรียบเทียบเนื้อเยื่อมะเร็งกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติในมะเร็งทั้งสองกลุ่ม ซึ่งพบจำนวนจุดโปรตีนในมะเร็งที่มีการแพร่กระจายแล้ว มากกว่ามะเร็งระยะต้น (105 เทียบกับ 79 จุด) และมีโปรตีนจำนวนหนึ่งที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจากระยะเริ่มต้นสู่ระยะแพร่กระจาย (โปรตีน 52 จุด พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในการเปรียบเทียบเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ และกลุ่มเปรียบเทียบมะเร็งระยะแพร่กระจายกับเนื้อเยื่อปกติ) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานต่างๆ มากขึ้นเมื่อเซลล์มีความร้ายแรงมากขึ้น และโปรตีนที่

แสดงออกต่อเนื้อเหล่านี้ น่าจะเป็นโปรตีนที่มีเกี่ยวข้องหรือมีบทบาทต่อการเติบโตและแพร่กระจายของมะเร็ง นอกจากนี้ โปรตีนที่พบความแตกต่างในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะแพร่กระจายกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (โปรตีน 23 จุด) ก็ น่าจะเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการเติบโตและแพร่กระจายด้วยเช่นกัน

ผลการเปรียบเทียบการแสดงผลของโปรตีนของมะเร็งที่แพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองกับมะเร็งที่เต้านม ซึ่งเป็นต้นกำเนิด พบว่ามีรูปแบบการแสดงผลคล้ายคลึงกันทั้งในภาพ 1D-gel และ 2D-gel ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาทั้งที่ศึกษาแบบ Proteomics (Nakagawa *et al*, 2006; Vydra *et al*, 2008; Li *et al*, 2008) และการศึกษาแบบ genomic (Li *et al*, 2008; Suzuki *et al*, 2007) ดังเช่นการศึกษาของ Suzuki *et al*, 2007 ที่ศึกษาเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งที่เต้านมเปรียบเทียบกับที่แพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองรั้วด้วยวิธี oligonucleotide arrays พบว่ามียีนที่แสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด เพียง 155 ยีน จากยีนที่วิเคราะห์ทั้งหมด 22,000 ยีน (Suzuki *et al*, 2007) ซึ่งคิดเป็น 0.7% ผลการศึกษาเหล่านี้ รวมทั้งการศึกษาในครั้งนี้ สะท้อนว่าเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายมาและเติบโตได้ในต่อมน้ำเหลือง ยังรักษาสภาพและการทำงานได้คล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิด อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ก็ยังมีโปรตีนจำนวนหนึ่ง (37 จุด) ที่แสดงออกอย่างแตกต่าง โปรตีนเหล่านี้ น่าจะมีบทบาทต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในสภาพแวดล้อมใหม่

การจัดกลุ่มโปรตีนตามกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อกลุ่มต่างๆ พบว่ามีจุดโปรตีนที่มีการแสดงผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจำนวน 161 จุด คัดเลือกโปรตีนจำนวน 82 จุด นำไประบุชนิดและคุณสมบัติด้วย PMF และ PPS ได้จุดโปรตีนที่ระบุชนิดและคุณสมบัติได้ในครั้งนี้ จำนวน 33 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่ได้ 7 กลุ่มได้แก่ 1) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis 2) โปรตีนที่ต้านสารอนุมูลอิสระ 3) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและการรักษาสมดุล ซึ่งรวมถึงโปรตีนในวิถีไกลโคไลซิส 4) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ 5) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ 6) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีน 7) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ 8) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

จากคู่เปรียบเทียบในการศึกษานี้ โปรตีนที่ระบุชนิดได้นั้น สามารถจัดกลุ่มตามขั้นตอนการพัฒนาการของมะเร็งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) การกำเนิดมะเร็ง (tumorigenesis) และ 2) ระยะลุกลามและแพร่กระจาย (progression and metastasis) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตาราง 4 โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกสัมพันธ์กับพัฒนาการของมะเร็งเต้านม

Tumorigenesis	Progression and Metastasis
<p><i>Apoptosis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● 90kDa heat shock protein ● Annexin 5 ● Chain A cyclophilin A complexed with dipeptide Gly-Pro ● Chaperonin ● Heat shock 70 kDa protein 5 ● Prostatic binding protein ● Protein disulfide isomerase ● Protein disulfide isomerase associated 4 ● Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) 	<p><i>Apoptosis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● 90kDa heat shock protein ● Annexin 5 ● Heat shock 70 kDa protein 5 ● Protein disulfide isomerase
<p><i>Anti-oxidant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Manganese-containing superoxide dismutase ● Peroxiredoxin 3, isoform CRA_a 	<p><i>Anti-oxidant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Peroxiredoxin 6
<p><i>Glycolytic enzyme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ● Lactate dehydrogenase B ● Pyruvate kinase ● Triosephosphate isomerase 1 	<p><i>Glycolytic enzyme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Lactate dehydrogenase B ● Triosephosphate isomerase 1
<p><i>Cell migration</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Enolase 1 ● Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1 ● Cofilin 1 (non-muscle) ● Chain A, alpha1-antitrypsin 	<p><i>Cell migration</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Enolase 1 ● Chain A, alpha1-antitrypsin
<p><i>Metabolisms and homeostasis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Carbonic anhydrase II ● Chain A, apo-human serum transferrin ● Serum albumin ● Chain A, Crystal Structure Of Lipid-free human apolipoprotein A-I ● Ferritin, light polypeptide 	<p><i>Metabolisms and homeostasis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Chain A, apo-human serum transferrin ● Carbonic anhydrase I
<p><i>Protein synthesis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Eukaryotic translation elongation factor 2 ● Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor 	<p><i>Protein synthesis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor
<p><i>Protein degradation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Parkinson disease protein 7 ● Proteasome alpha 2 subunit 	<p><i>Protein degradation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Proteasome alpha 2 subunit
<p><i>Protein proliferation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Tubulin, beta 	<p><i>Protein proliferation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Tubulin, beta
<p><i>Immune defense</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Heat shock protein gp 96 precursor ● Macrophage migration inhibitory factor 	<p><i>Immune defense</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Macrophage migration inhibitory factor

หมายเหตุ ตัวหนา คือ โปรตีนที่แสดงออกทั้งในกลุ่ม 2 กลุ่ม

บทบาทของโปรตีนที่ค้นพบ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis

Apoptosis หรือ programmed cell death หรือโปรแกรมการตายของเซลล์ เป็นกระบวนการที่ตรงกันข้ามกับการแบ่งเซลล์ Apoptosis จะเกิดเมื่อเซลล์เกิดความเสียหายเกินกว่าที่จะซ่อมแซมได้หรือเซลล์หมดอายุขัย การแบ่งเซลล์และการตายของเซลล์เกิดขึ้นอย่างสมดุลเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะปกติ การที่เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งเกิดจากความไม่สมดุลของกระบวนการทั้งสองนี้ ในกระบวนการ apoptosis มีสารชีวโมเลกุลจำนวนมากที่ทำงานร่วมกันเมื่อสารตัวใดตัวหนึ่งมีความผิดปกติก็ย่อมส่งผลกระทบต่อสารอื่นด้วยซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติเป็นลูกโซ่ ทำให้เซลล์ไม่ตาย อยู่รอดนานขึ้น และ เข้าสู่การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้

จากการศึกษานี้พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis ที่แสดงออก ในขั้น tumorigenesis คือ 90kDa heat shock protein, Annexin 5, Chain A cyclophilin A complexed with dipeptide Gly-Pro, Chaperonin, Heat shock 70 kDa protein 5, Prostatic binding protein, Protein disulfide isomerase, Protein disulfide isomerase associated 4, Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A), Peroxiredoxin 3 isoform CRA_a และในจำนวนนี้มีโปรตีน 4 ชนิดได้แก่ Annexin 5, Heat shock 70 kDa protein 5, 90kDa heat shock protein และ Protein disulfide isomerase น่าจะมีบทบาทในกระบวนการเติบโตและแพร่กระจายด้วย

Heat shock proteins (HSPs) เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมีการสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ของร่างกายเผชิญกับความร้อน และปัจจัยกระตุ้นที่สร้างความเครียดต่างๆ ต่อเซลล์ โปรตีนในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็น molecular chaperones ซึ่งช่วยให้เซลล์ค่อยๆ ปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่อันตรายหรือไม่เหมาะสม ทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ ดังนั้น HSPs จึงเข้าไปเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดยมีทั้ง HSPs ที่มีบทบาทด้านการตาย (anti-apoptotic) และ ส่งเสริมการตาย (pro-apoptotic) (Garrido *et al.*, 2001)

90kDa heat shock protein (HSP90) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการช่วยให้เซลล์อยู่รอดเมื่อเซลล์เผชิญภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยทำหน้าที่กระตุ้นและรักษาสภาวะการทำงานของโปรตีนในกระบวนการต่างๆ ให้สามารถทำงานอย่างปกติ เช่น ตัวรับฮอร์โมน protein kinases โปรตีนในกระบวนการแบ่งเซลล์ โปรตีนในกระบวนการตายของเซลล์ รวมทั้งป้องกันโปรตีนที่เกิดจากยีนที่กลายพันธุ์ในช่วงที่เซลล์ปกติกำลังพัฒนาไป (Neckers and Ivy, 2003) นอกจากนี้ ยังพบว่า HSP90 กระตุ้นให้การสร้าง vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งมีบทบาทสร้างหลอดเลือดไปเลี้ยงก้อนมะเร็ง (Calderwood *et al.*, 2006) และ รักษาสภาพของโปรตีน PI3K และ AKT ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการ anti-apoptosis (Stebbins *et al.*, 1997) ในการศึกษาครั้งนี้พบ HSP90 มีการแสดงมากขึ้นในมะเร็งเทียบกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wulfkuhle *et al.*, 2002 ที่พบ HSP90 แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด DCIS เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ และสอดคล้องกับมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น มะเร็งผิวหนัง melanoma ก็พบการแสดงออกของ HSP90 มากกว่า benign melanotic lesion (Becker *et al.* 2004) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ พบการแสดงออกของ HSP90 ในมะเร็งที่แพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองลดลงเมื่อเทียบกับมะเร็งที่ต้นกำเนิด ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Pick *et al.*, 2007 ซึ่งพบการแสดงออกของ HSP90 สัมพันธ์การแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง และสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง

Chaperonin หรือ HSP60 มีหน้าที่ในการป้องกันการตกตะกอนของโปรตีนภายในเซลล์ ช่วยในการขจัดวัณโปรตีน ส่งเสริมและป้องกันการตายของเซลล์จากภาวะเครียด (Chandra *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามมีรายงานจาก

การศึกษา in-vitro และในการศึกษาทางคลินิกว่า HSP60 มีบทบาทส่งเสริมการเกิด apoptosis ด้วย โดยกลไกที่ป้องกันการตายเกี่ยวข้องการลดการเคลื่อนย้าย pro-apoptotic Bax เข้าสู่ไมโทครอนเดรีย (Shan, 2003) ส่วนบทบาทส่งเสริมการตายผ่านการกระตุ้น caspase-3 (Samali *et al* 1999) การศึกษาในมะเร็งหลายชนิดพบการแสดงออกของ HSP60 มีทั้งที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง เช่น พบการเพิ่มขึ้นของ HSP60 ในมะเร็งปากมดลูก (Cappello *et al.*, 2002) และในมะเร็งหลอดอาหาร (Faried *et al* 2004) ในทางตรงกันข้ามพบการลดลงของ HSP60 ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของมะเร็ง (Lebret *et al.*, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้พบ HSP60 แสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ และการยืนยันการแสดงออกด้วยวิธี immunohistochemistry ก็ให้ผลที่สอดคล้องกับผลของ 2D-SDS PAGE สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ (Bini *et al.*, 1998; Somiari *et al.*, 2003; Desmetx *et al.*, 2008) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Desmetx *et al* ยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเป็นลำดับของ HSP60 จากเซลล์เต้านมปกติ เซลล์มะเร็งก่อนลุกลาม (DCIS) และเซลล์มะเร็งชนิดลุกลาม และยังพบว่าผู้ป่วย DCIS และมะเร็งเต้านมระยะต้น (early stage) มี autoantibody ต่อ HSP60 ในสัดส่วนที่มากกว่าคนปกติ (ประมาณ 30% เทียบกับ 4.3%) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการแสดงออกของ HSP60 สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปต่อมน้ำเหลือง (Li *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออก HSP60 ในมะเร็งระยะต้น และ ระยะแพร่กระจาย ซึ่งจะสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าว

Hsp 70 protein 5 (HSPA5) หรือ Grp78 หรือ BiP เป็น molecular chaperone พบที่ endoplasmic reticulum (Hendershot LM, 2004) มีหน้าที่ในการช่วยป้องกันการตกตะกอนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดของเซลล์ ช่วยการขจัดของโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ และช่วยในการส่งโปรตีนข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ (Melendez *et al.*, 2006) และยังเป็นโปรตีนหลักที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียด และมีบทบาทอย่างมากในขณะที่เซลล์ตอบสนองต่อความร้อน ภาวะเนื้อเยื่อขาดเลือดมาเลี้ยง และ oxidative change (Lindquist 1986; Subjeck and Shyy, 1986) การทำงานของ HSPA5 จึงมีผลแบบ antiapoptotic โดยมีกลไกไปยับยั้งการทำงานของ apoptotic protease-activating factor-1 (Xanthoudakis and Nicholson, 2000) หรือ apoptosis inducing factor (Ravagnan *et al.*, 2001) ทำให้กระบวนการตายของเซลล์ถูกยับยั้ง ในการศึกษาครั้งนี้พบ Hspa5 มีบทบาทในกระบวนการ tumorigenesis และ progression and metastasis ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งเต้านมด้วย western blot และ immunohistochemistry (Fernandez *et al.*, 2000) และ 2D SDS-PAGE (Wulfkuhle *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2006) พบ HSPA5 แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารไปยังต่อมน้ำเหลือง (Zhang *et al.*, 2006) การพบการแสดงออกของ HSPA5 แสดงออกในมะเร็งที่ต่อมน้ำเหลือง สนับสนุนว่า HSPA5 น่าจะมีบทบาทปกป้องเซลล์มะเร็งที่ไปอยู่ที่ต่อมน้ำเหลืองจากสภาวะแวดล้อมใหม่

Annexins เป็นโปรตีนกลุ่ม membrane binding proteins ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับผิวเซลล์ (Gerke *et al.*, 2005). Annexin A5 หรือ Annexin V เป็น annexin ที่พบทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ โดยมีคุณสมบัติจับกับ phosphatidylserine (PS). PS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่แสดงออกมด้านนอกผิวเมื่อเซลล์เกิด apoptosis การจับกันนี้ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ที่เกิด apoptosis (Munoz *et al.*, 2007) และรบกวน macrophage ในการเก็บกินเซลล์ที่ตาย (Bondanza *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม ผลของการทำงานของ Annexin A5 ต่อเซลล์มะเร็งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาครั้งนี้ พบ Annexin A5 แสดงออกมากขึ้นในมะเร็งเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ สอดคล้องกับการศึกษา proteomics ของมะเร็งเต้านมชนิด DCIS ของ Wulfkuhle *et al.*, 2002

และในมะเร็งปากมดลูก (Bae *et al*, 2006) นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่า Annexin A5 แสดงออกในมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายมากกว่ามะเร็งระยะต้น แสดงว่า Annexin A5 อาจเกี่ยวข้องกับการเติบโตและลุกลามของมะเร็ง ไม่นานมานี้มีรายงานว่า Annexin A5 อาจส่งผลต่อการเติบโตและลุกลามของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Wehder *et al*, 2009)

Raf kinase inhibitory protein (RKIP) (T2>N; T1>N) มีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ phosphatidylethanolamine binding protein 1 (PEBP1) และ Prostatic binding protein ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ protein kinase หลายชนิดในกระบวนการตายของเซลล์ ควบคุมการแสดงออกของยีนและการแบ่งเซลล์ (Granovsky and Rosner, 2008) และยับยั้งการทำงานของ nuclear factor-KappaBeta (NF-KB) ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ (Yeung *et al*, 2001; Cao and Karin, 2003) ผลลัพธ์คือการส่งเสริมให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis มีรายงานการศึกษาหลายรายงานซึ่งสอดคล้องกันระบุว่า RKIP แสดงออกลดลงในเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจาย นำมาซึ่งสมมติฐานว่า RKIP เป็นโปรตีนตัวสำคัญในการลดลุกลามและแพร่กระจายของมะเร็ง (Fu Z, *et al*, 2006; Chatterjee D, *et al*, 2004; Hagan *et al.*, 2005) และเชื่อว่ากลไกต่อการลดการแพร่กระจายเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis (Chatterjee D, *et al* 2004) ในทางกลับกัน RKIP แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเมื่อเซลล์ถูกชักนำโดย death factor คือ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณภายนอกเซลล์หลักที่ชักนำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตาย (Baritaki *et al*, 2007) ในการศึกษานี้พบการแสดงออกของ RKIP ทั้งในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ยังไม่แพร่กระจายและที่แพร่กระจาย สะท้อนว่า RKIP อาจถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากขึ้นในภาวะที่เซลล์กำลังเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง และอาจมีบทบาทอย่างต่อเนื่องเพื่อโรครุนแรงและแพร่กระจาย

Protein disulfide isomerase (PDI) และ Protein disulfide isomerase associated 4 (PDI associated 4) (T>N ทั้งใน early and late) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum พบเป็น substrate ของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-7 ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการ apoptosis ดังนั้น PDI (Na *et al.*, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้พบ PDI มีบทบาทใน กระบวนการ tumorigenesis และ progression and metastasis โดยมีการแสดงออกมากขึ้นใน เซลล์มะเร็ง และแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย PDI associated 4 มีบทบาทเฉพาะในกระบวนการ tumorigenesis โดยมีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งเต้านมด้วย 2D SDS-PAGE 1 รายงานที่พบการแสดงออกของ PDI เพิ่มขึ้นในมะเร็งเทียบกับเซลล์ปกติ (Bini *et al*, 1997) นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาใน cell line พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนสองชนิดนี้สัมพันธ์กับการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม (Na *et al.*, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า PDI และ PDI associated 4 มีแสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็ง ซึ่งอาจส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีชีวิตอยู่ได้โดยมีกลไกการหลีกเลี่ยงไม่ให้เข้าสู่โปรแกรมการตาย

โปรตีนกลุ่ม anti-oxidant

Manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD) ทำหน้าที่เป็น antioxidant enzyme ในไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่กำจัดอนุมูล superoxide anion (O_2^-) (McCord *et al.*, 1971; Li and Oberley., 1997) และต่อต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจาก tumor necrosis factor α (TNF- α) (Manna *et al.*, 1998) MnSOD แสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งในขณะที่ยังมี antioxidant enzyme ตัวอื่น คือ copper containing superoxide dismutase และ zinc-containing superoxide dismutase มีปริมาณลดลงในเซลล์มะเร็ง (Marklund *et al.*, 1982) การเพิ่มขึ้นของ MnSOD

สามารถป้องกันการตายของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของ TNF- α ซึ่งเป็นตัวชักนำให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตาย (Manna *et al.*, 1998) จากงานศึกษานี้พบ MnSOD มีบทบาทในกระบวนการ tumorigenesis โดยมีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ศึกษายีน Mn-SOD ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ายีน Mn-SOD แสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่ลุกลามเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (Mukhopadhyay *et al.*, 2004) รวมทั้งในมะเร็งชนิดอื่น เช่น มะเร็งช่องปาก

ในการศึกษารุ่นนี้ พบโปรตีนซึ่งเป็น antioxidant enzyme ในกลุ่ม Peroxiredoxins สองไอโซฟอร์มคือ Peroxiredoxins PRDX 3 และ PRDX6 เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีหน้าที่กำจัด H₂O₂ และ peroxides ตัวอื่นๆ ซึ่งเป็น oxygen superoxides ที่เกิดขึ้นในกระบวนการต่างๆ ในเซลล์มีภาวะเครียด มีรายงานมานานแล้วเซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่อยู่ในภาวะเครียดและมีการผลิต reactive oxygen species (ROS) ออกมาปริมาณมากขึ้น (Klaunig, *et al.*, 1998) ในเซลล์มะเร็งเต้านม (Ambrosone, *et al.*, 2000; Haklar *et al.*, 2001; Brown and Bicknell, 2001) จึงน่าเป็นเหตุผลสนับสนุนที่ทำให้พบการแสดงออกของ Peroxiredoxins ในการศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Karihtala *et al.*, 2003 ที่พบรายงานการแสดงออกของ PRDXI-PRDXVI ในเซลล์มะเร็งเต้านมประมาณ 52-94% ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Karihtala *et al.*, 2003)

การศึกษานี้พบ PRDX 3 ในมะเร็งเทียบกับเนื้อเต้านมปกติในกลุ่มระยะแพร่กระจาย แต่ไม่พบแตกต่างระหว่างมะเร็งระยะต้นกับเซลล์ปกติ แสดงว่า PRDX3 จึงน่าจะมียบทบาทเมื่อเซลล์มะเร็งมีการลุกลามมากขึ้นแล้ว มีการศึกษาพบการเพิ่มขึ้นของ PRDX 3 มีผลในการป้องกันเซลล์จากการตายอันเกิดจาก H₂O₂ และทำให้เซลล์ต้านยา imexon ซึ่งเป็นยาที่ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งเข้าสู่ apoptosis (Nonn *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีชีวิตรอยู่ได้นานกว่าปกติ

ในการศึกษารุ่นนี้พบ PRDX 6 มีบทบาทในกระบวนการ progression and metastasis แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง ซึ่งนอกจากบทบาท oxidative enzymes ของ PRDX6 แล้ว ยังมีรายงานการศึกษากลไกอื่น โดย Chang *et al.*, 2007 พบว่า PRDX 6 แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งระยะแพร่กระจายและสัมพันธ์กับการลดลงของยีน TIMP-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2) และการเพิ่มขึ้นของยีน uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor), MMP-9 (matrix metallo-proteinase 9) ความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวกับยีน PRDX 6 ส่งผลให้เกิดการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Chang *et al.*, 2007) โดย TIMP-2 ยับยั้งการสร้าง matrix metalloproteinase 2 ซึ่งสามารถย่อย extracellular matrix ได้ เมื่อ TIMP-2 แสดงออกลดลงจึงส่งผลให้เซลล์สามารถผลิต matrix metalloproteinase 2 ได้มากขึ้น uPAR มีบทบาทในการกระตุ้น collagenase ให้ย่อย extracellular matrix เมื่อ uPAR แสดงออกมากขึ้น จึงไปส่งเสริมการลุกลามของเซลล์มะเร็ง MMP-9 ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ matrix metallo-proteinase 9 ที่สามารถย่อย extracellular matrix ได้เช่นกัน (Chang *et al.*, 2007) ที่น่าสนใจคือ เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานพบว่า PRDX6 อาจใช้เป็น tumor marker เนื่องจากตรวจพบซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม แต่ไม่พบในคนปกติ (Desmetz *et al.*, 2008)

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและการรักษาสมดุล

จากการศึกษานี้พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและการรักษาสมดุลที่ แสดงออกเพิ่มขึ้น tumorigenesis คือ Carbonic anhydrase II, Chain A apo-human serum transferrin, Serum albumin, Chain A crystal

structure of lipid-free human apolipoprotein A-I, Ferritin light polypeptide โปรตีนที่แสดงออกในขั้น progression and metastasis คือ Chain A apo-human serum transferrin, Carbonic anhydrase I

Serum albumin เป็นจุดโปรตีนขนาดใหญ่บนภาพ 2D gel ทำหน้าที่ในการลำเลียงกรดไขมัน สอร์โม่โมยา และแร่ธาตุที่มีประจุบวก เช่น Ca^{2+} Na^+ K^+ ควบคุมแรงดันออสโมติกในกระแสเลือด และของเหลวที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อ เนื่องจากพบหลอดเลือดในเนื้อเยื่อนำมาศึกษาจึงพบโปรตีน serum albumin การลดลงของปริมาณ serum albumin เป็นตัวชี้วัดการอักเสบของเนื้อเยื่อ (Gabay and Kushner, 1999) การอักเสบเกี่ยวข้องกับการเจริญของโรคมะเร็งโดยเซลล์มะเร็งใช้สารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ Cytokines Chemokines Tumor necrosis factor (TNF) และ Selectin เพื่อการแบ่งเซลล์ (Balkwill and Mantovani, 2002) และการลดลงของ serum albumin ยังสัมพันธ์กับภาวะทุพโภชนาการแบบ cachexia ในมะเร็ง มีรายงานว่า TNF เป็นโปรตีนที่ชักนำให้เกิดภาวะนี้ (Brenner *et al.*, 1990) ฉะนั้นการลดลงของ serum albumin จึงสะท้อนว่าเซลล์มะเร็งมีการเจริญโดยแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนโดยไม่ต้องอาศัย growth factor เพียงอย่างเดียว และสะท้อนถึงสภาวะร่างกายของผู้ป่วยมะเร็งที่มีอาการของ cachexia คือ น้ำหนักลด สูญเสียไขมันกล้ามเนื้อ ผอมแห้ง เมื่ออาหาร และอ่อนแรง ในการศึกษาครั้งนี้พบ serum albumin มีบทบาทเฉพาะในกระบวนการ tumorigenesis โดยมีการแสดงออกลดลงในเซลล์มะเร็งคล้ายกับผลการศึกษาของ Deng และคณะ (2006) ที่พบว่า Serum albumin มีการแสดงออกลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะลุกลาม และพบมีความสัมพันธ์กับระยะปลอดโรคที่ลดลงในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Lis *et al.*, 2003)

Carbonic anhydrase I (CA I) และ **Carbonic anhydrase II (CA II)** เป็น zinc-containing metalloenzyme พบมากในไซโตซอลของเซลล์เกือบทุกชนิด ทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และ H^+ เพื่อรักษาสมดุลของน้ำและกรด-เบส ในกระแสเลือด (Nogradi, 1998) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า CA I น่าจะเกี่ยวข้องกับการเติบโตลุกลามของมะเร็งเนื่องจากการแสดงออกมากขึ้นในมะเร็งระยะท้าย (แพร่กระจาย) มากกว่ามะเร็งระยะต้นที่ยังไม่แพร่กระจาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Luo และคณะ (2005) ส่วน CA II พบแสดงออกในมะเร็งเทียบกับเนื้อเด้านมปกติ ทั้งกลุ่มมะเร็งระยะต้น และกลุ่มมะเร็งระยะท้าย การเพิ่มขึ้นของ CA ในเนื้อเยื่อมะเร็งสะท้อนว่าในเซลล์มะเร็งมีการบวนการหายใจมากกว่าเซลล์ปกติทำให้เซลล์มีปริมาณ CO_2 สูงขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีกลไกกำจัด CO_2 ที่มากเกินไปเพื่อรักษาสมดุลของตัวมันเองให้อยู่รอด

Chain A crystal structure of lipid-free human apolipoprotein A-I (apo A-I) เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ high density lipoprotein (HDL) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน และช่วยขนส่งยาต้านมะเร็ง (Lacko *et al.*, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้พบ Chain A crystal structure of lipid-free human apo A-I น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง โดยมีการแสดงออกลดลงในเซลล์มะเร็งซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Chang JJ, *et al.*, 2007) มีรายงานว่า การลดลงของ apoA-I สามารถบ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่เลวในมะเร็งตับได้ (Jiang *et al.*, 2006) การลดลงของ Chain A crystal structure. of lipid-free human apo A-I อาจบ่งบอกว่าภายในเซลล์มะเร็งมีปริมาณ HDL ลดลง ซึ่งอาจเป็นกลไกที่เซลล์มะเร็งพยายามต้านทานต่อยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง

Chain A apo-human serum transferrin (Chain A apo-hTF) ทำหน้าที่รักษาระดับของธาตุเหล็กในพลาสมาให้อยู่ในภาวะสมดุลระหว่างธาตุเหล็กที่เก็บสำรองและที่ใช้ไป Chain A apo-hTF เป็นโมเลกุล transferrin ที่ไม่มีธาตุเหล็กเกาะหลังจากการปลดปล่อยโมเลกุลธาตุเหล็กออกสู่เซลล์ (Wally *et al.*, 2006) มีรายงานว่า ในเซลล์มะเร็งมีปริมาณธาตุเหล็กมากกว่าเซลล์ปกติ (Weinberg, 1992) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งต้องการใช้ธาตุเหล็กมากกว่าปกติ บทบาทของธาตุเหล็กที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งยังไม่มียางานเป็นที่แน่ชัด แต่มีรายงานว่าปฏิกิริยาที่

เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็กสามารถทำให้เกิดอนุมูลหุ้ม hydroxyl ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ สามารถทำลายดีเอ็นเอโดยกระตุ้นการทำงานของ oncogene และยับยั้งการทำงานของ tumor suppressor gene (Kabat and Rohan, 2007) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณของธาตุเหล็กภายในเซลล์เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็กน่าจะสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเช่นเดียวกัน และจากงานศึกษานี้พบ Chain A apo-hTF แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง และมีการแสดงออกมากขึ้นในเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งระยะแพร่กระจายเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อปกติของเซลล์มะเร็งระยะไม่แพร่กระจาย จึงเป็นไปได้ว่า Chain A apo-hTF มีบทบาทต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างไร

Ferritin light polypeptide ทำหน้าที่เป็น iron storage protein (Anderson and Anderson, 2002) มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็กเช่นเดียวกับ chain A apo-hTF จากงานศึกษานี้พบ ferritin light polypeptide แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่พบปริมาณ ferritin ในเนื้อเยื่อมะเร็งด้านมะเร็งมากกว่าในเนื้อเยื่อธรรมดา (Güner *et al.*, 1992) จึงเป็นไปได้ว่า ferritin light polypeptide มีบทบาทต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเช่นเดียวกับ chain A apo-hTF ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดสัมพันธ์กับการขนส่งและสะสมธาตุเหล็กภายในเซลล์ โดยผลจากปฏิกิริยาของธาตุเหล็กทำให้เกิดสารก่อกลายพันธุ์ซึ่งทำให้เซลล์มีความผิดปกติจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์

จากการศึกษานี้พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่แสดงออกในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติได้แก่ Enolase 1, Cofilin 1 (non-muscle), Chain A alpha1-antitrypsin และ Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 และโปรตีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างระหว่างมะเร็งระยะแพร่กระจายกับระยะต้น หรือ แตกต่างระหว่างมะเร็งในต่อมน้ำเหลืองที่แพร่กระจายไปกับเซลล์มะเร็งที่ต้นกำเนิด ได้แก่ Chain A alpha1-antitrypsin และ Peroxiredoxin 6

Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1 และ **Chain A alpha1-antitrypsin** ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ serine proteases ซึ่งสามารถย่อยสลาย extracellular matrix (Kueppers, 1973) ในการศึกษาครั้งนี้พบโปรตีนทั้งสองชนิดมีการแสดงออกลดลงในเซลล์มะเร็ง จึงเป็นไปได้ว่า serine protease สามารถทำงานได้มากขึ้นส่งผลให้เนื้อเยื่อข้างเคียงมะเร็งถูกย่อยสลายจึงทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเกิดการเคลื่อนที่และแพร่กระจายไปได้ ซึ่งทำให้โรคมะเร็งมีความรุนแรงมากขึ้น

Cofilin 1 (CFL1) หรือ actin depolymerizing factor (ADF) ทำหน้าที่สลายร่างแหของเส้นใย F-actin ซึ่งเป็นโครงสร้างขาเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยจับกับ G-actin ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ F-actin แล้วทำให้โมเลกุล G-actin หลุดออกจากเส้นใย F-actin ในส่วนที่เป็นขาเคลื่อนที่ส่วนท้ายของเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ติดอยู่ที่เดิมและเคลื่อนไปข้างหน้าได้ (Hotulainen *et al.*, 2005) ในการศึกษาครั้งนี้พบ CFL1 มีแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์เต้านมปกติทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะแพร่กระจาย สอดคล้องกับการศึกษาของ Luo และคณะ (2005) พบ CFL1 แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ และการศึกษาของ Wang และคณะ (2004) ซึ่งศึกษา *in vivo* invasion assay การแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งกลุ่มที่ทำให้มีคุณสมบัติการลุกลาม พบว่า CFL1 (และ Annexin A5 เป็นสองในกว่า 30 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่) แสดงออกเพิ่มขึ้นเทียบกับเซลล์มะเร็งตั้งต้น จากผลการศึกษานี้ สะท้อนว่า CFL1 น่าจะมีบทบาทต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ มีรายงานยืนยันบทบาทการลุกลามในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหาร พบว่า CFL1 ระดับ mRNA มีการแสดงออกในของ CFL1 ในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ และ สัมพันธ์กับการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองและระยะโรค (Wang *et al.*, 2010)

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิส

มีรายงานว่าเซลล์มะเร็งมีอัตราการเกิดวิถีไกลโคไลซิส (glycolytic pathway) แบบใช้ออกซิเจนมากกว่าเซลล์ปกติ (Warburg, 1956) วิถีไกลโคไลซิสเป็นกระบวนการเริ่มต้นของกระบวนการออกซิเดชันของกลูโคส โดยสลายกลูโคสเพื่อให้ได้พลังงาน ในรูป ATP และโมเลกุลย่อยเพื่อปฏิกิริยาการสร้างสารอื่นๆ เมตาบอลิซึมของกลูโคสภายในเซลล์ เริ่มจากกลูโคสถูกลำเลียงโดยตัวขนส่งกลูโคสจากกระแสเลือดและนำเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้น hexokinase เปลี่ยนกลูโคสเป็น glucose-6-phosphate กระบวนการดำเนินต่อไปจนได้ pyruvate และได้ ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ในขณะที่เซลล์ได้รับออกซิเจน pyruvate ถูกออกซิไดซ์ในไมโทคอนเดรียจนกลายเป็น HCO_3^- (carbonic acid) เข้าสู่กระแสเลือด และในทางตรงกันข้ามถ้าเซลล์ขาดออกซิเจน pyruvate ถูกรีดิวซ์ในไซโทพลาสซึมเป็น lactate และถูกนำออกนอกเซลล์สู่กระแสเลือด

จากการศึกษานี้พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิส ที่แสดงออกในขั้น tumorigenesis คือ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Lactate dehydrogenase B, Pyruvate kinase และ Triosephosphate isomerase 1 โปรตีนที่แสดงออกในขั้น progression and metastasis คือ Lactate dehydrogenase B และ Triosephosphate isomerase 1 ส่วน Enolase พบมีบทบาทในทั้ง tumorigenesis และ progression&metastasis.

Enolase 1 (ENO1) หรือ α -enolase เป็น glycolytic enzyme ตัวหนึ่งที่แสดงออกในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิด นอกจากนี้ มีรายงานว่า enolase-1 ยังทำหน้าที่อื่นๆ เช่นเป็น plasminogen-binding receptor บนผิวเซลล์เพื่อรับ plasminogen ซึ่งจะถูกละลายเป็น plasmin และไปกระตุ้นให้ collagenase ย่อย fibrin และ extracellular matrix จึงทำให้เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายออกไปได้ (Liu and Shih, 2007) จากผลการศึกษาพบ α -enolase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะแพร่กระจายเทียบกับเต้านมปกติ แสดงว่า ENO1 น่าจะมีบทบาทในกระบวนการเติบโตของเซลล์มะเร็ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Wulfkuhle และคณะ (2002) และ Kabbage และคณะ (2008) ที่พบ α -enolase แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมเทียบกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ ทั้งนี้สนับสนุนว่าเซลล์มะเร็งมีวิถีไกลโคไลซิสมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ นอกจากนี้ในการศึกษายังพบว่า ENO1 น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายด้วยเนื่องจากพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นมะเร็งระยะแพร่กระจาย (T>L) กลไกที่เป็นไปได้คือการกระตุ้นการทำงานของ protease เพื่อย่อย extracellular matrix ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถเคลื่อนที่ออกจากก้อนมะเร็งผ่านชั้นเนื้อเยื่อต่างๆ ไปได้

Triosephosphate isomerase (TPI) มีบทบาทในขั้นตอนที่ 5 ในวิถีไกลโคไลซิส แบบใช้ออกซิเจน ทำหน้าที่เปลี่ยน Dihydroxyacetone phosphate เป็น Glyceraldehyde 3-phosphate สำหรับ Triosephosphate isomerase 1 (TPI 1) ที่พบในการศึกษานี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็ง

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) มีบทบาทในขั้น ตอนที่ 6 ในวิถีไกลโคไลซิส แบบใช้ออกซิเจน ทำหน้าที่เปลี่ยน Glyceraldehyde 3-phosphate เป็น D-glycerate 1,3-bisphosphate มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง

Pyruvate kinase มีการทำงานเพิ่มขึ้นในมะเร็งระยะแพร่กระจาย (Hennipman *et al.*, 1988) มีบทบาทในขั้นตอนที่ 10 ในวิถีไกลโคไลซิสแบบใช้ออกซิเจน ทำหน้าที่เปลี่ยน phosphoenolpyruvate เป็น pyruvate (Meisenberg and Simmons, 1998) การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ดังกล่าวแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของวิถีไกลโคไลซิสในเซลล์มะเร็ง มีผลทำให้เกิดภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) เนื่องจากเซลล์มีการใช้ออกซิเจนในปริมาณมากส่งผลให้วิถีไกลโคไลซิสแบบไม่ใช้ออกซิเจนแทน ทำให้มีปริมาณ lactate เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดและส่งผลให้เลือดมี

ภาวะเป็นกรด lactate เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน pyruvate เป็น lactate โดยเอนไซม์ Lactate dehydrogenase วิถีไกลโคไลซิสแบบไม่ใช้ออกซิเจนถูกยับยั้งโดยออกซิเจนในมะเร็งระยะที่ยังไม่แพร่กระจายแต่ในมะเร็งระยะแพร่กระจายนั้นจะยังคงมีวิถีแบบไม่ใช้ออกซิเจนเกิดขึ้นแม้จะมีออกซิเจนก็ตาม วิถีไกลโคไลซิสแบบไม่ใช้ออกซิเจนเกิดมากในมะเร็งระยะแพร่กระจาย (Schomack and Gillies, 2003) และสัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคมะเร็งและมีระยะปลอดโรคน้อยลง (Walenta *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้พบ pyruvate kinase และ Lactate dehydrogenase B มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง

การเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่มีบทบาทในวิถีไกลโคไลซิสทั้งที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อมะเร็งสะท้อนว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งมีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตสูงแสดงว่าเซลล์มะเร็งต้องการพลังงานอย่างมากในการทำกิจกรรมต่างๆ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ที่พบการแสดงออกอย่างแตกต่างได้แก่ Heat shock protein gp 96 precursor และ Macrophage migration inhibitory factor

Heat shock protein gp 96 (gp96) precursor เป็น precursor ของ gp96 ซึ่งทำหน้าที่ส่งสัญญาณกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Linderoth *et al.*, 2000) พบการแสดงออกของ gp96 ที่ผิวเซลล์มะเร็งเต้านม (Melendez *et al.*, 2006) สัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกัน โดย gp96 จะชักนำให้ร่างกายหลั่งโปรตีน cytokines IL-1 β และ IL-2 (Zheng *et al.*, 2001) ซึ่งโปรตีนสองชนิดนี้ชักนำให้เกิดการอักเสบซึ่งเป็นกลไกในการกำจัดสารหรือโมเลกุลแปลกปลอมออกจากร่างกาย ในการศึกษาครั้งนี้พบ gp96 precursor มีการแสดงออกมากขึ้นการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งทั้งมะเร็งระยะต้นและระยะแพร่กระจายเทียบกับเซลล์ปกติ แสดงว่าร่างกายอาจมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อต้านเซลล์มะเร็งโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเมื่อเป็นมะเร็งตั้งแต่ระยะเริ่มแรกและเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) เป็น mediator ในกระบวนการอักเสบ มีผลหลายอย่าง เช่น ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ macrophage กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ และส่งเสริมการสร้างหลอดเลือด (Calandra T, 2003) ผลการศึกษาบทบาทของ MIF ในโรคมะเร็งพบว่า MIF สามารถยับยั้งการเจริญของโรคมะเร็งโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกล่าวคือ กระตุ้นให้ macrophage สร้าง cytokines คือ tumor necrosis factor (TNF) α หรือ interleukin-1 β ซึ่งเป็นสารสื่อกลางในปฏิกิริยาการอักเสบ (Pozzi and Weiser, 1992) และยังทำหน้าที่ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ macrophage ไม่ให้ออกจากบริเวณที่มีการอักเสบอีกด้วย อีกด้านหนึ่งพบว่า MIF มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านการส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดในมะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งหลอดอาหาร (Shun *et al.*, 2005 and Ren *et al.*, 2005) โดยสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีน 2 ชนิด ที่ทำหน้าที่ในการสร้างหลอดเลือด ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ interleukin-8 (IL-8) และสัมพันธ์กับระยะปลอดโรคน้อยลง (Xu *et al.*, 2008) รายงานการศึกษาของ Verjans E, 2009 ได้แสดงให้เห็นบทบาททั้งสองด้านนี้ในเซลล์มะเร็งเต้านม โดยพบว่าการแสดงออกของ MIF ในซัยโตพลาสซึมในเซลล์มะเร็งเต้านมสัมพันธ์กับปัจจัยที่ชี้บ่งไปในทางยับยั้ง ในขณะที่ การแสดงออก MIF นอกเซลล์ มีบทบาทในการกระตุ้นการเติบโตปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งและ stromal cell

ในการศึกษาครั้งนี้พบ MIF มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเทียบกับเนื้อเด้านปกติ และในมะเร็งที่เต้านมมากกว่ามะเร็งที่ต่อมน้ำเหลือง ดังนั้น MIF น่าจะเกี่ยวข้องกับบทบาทในแง่การส่งเสริมการเจริญของ

มะเร็งด้วยการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดมาเลี้ยงก้อนมะเร็ง อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งที่นำมาศึกษาในการศึกษานี้ มีทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ไม่ใช่มะเร็งปะปนกัน ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์หาค่า

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีน

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีน ที่แสดงออกในขั้น tumorigenesis คือ Parkinson disease protein 7, Proteasome alpha 2 subunit โปรตีนที่แสดงออกในขั้น progression and metastasis คือ Proteasome alpha 2 subunit

Parkinson disease protein 7 (PARK7) หรือ DJ-1 ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จาก oxidative stress ที่เกิดจากอนุมูลอิสระซึ่งอาจทำให้เซลล์เสียหายหรือตาย โดยเฉพาะเซลล์สมอง นอกจากนี้ยังช่วยการขจัดของโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ กลายการขจัดเมื่อโปรตีนได้รับความเสียหาย และขนส่งโปรตีนที่เสียหายเข้าสู่ proteasome ในการศึกษาที่พบ PARK7 แสดง ออกอย่างจำเพาะในขั้น tumorigenesis โดยแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็ง ดังเช่นการศึกษา ที่ผ่านมาพบ PARK7 แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้ PKB/Akt ซึ่งเป็นโปรตีน ที่อยู่ในกระบวนการ anti-apoptosis ทำงานได้มากขึ้น ส่งผลเซลล์มะเร็งไม่เข้าสู่กระบวนการ ตายจึงมีอัตราการอยู่รอดมากยิ่งขึ้น (Kim RH *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบ PARK7 แสดงออก มากขึ้นในเซลล์มะเร็งตับอ่อน (Melle *et al.*, 2007)

Proteasome alpha 2 subunit เป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนที่มีความผิดปกติหรือโปรตีนที่เซลล์ไม่ต้องการ โปรตีนที่จะถูกย่อยจะมีสาย polyubiquitin มาเกาะแล้วเคลื่อนเข้าสู่ proteasome เพื่อถูกย่อยเป็นเปปไทด์ชิ้นเล็กๆ ด้วยปฏิกิริยา proteolysis มีรายงานว่า proteasome subunit alpha type 1 แสดงออกมากขึ้นใน infiltrating ductal carcinoma (Deng *et al.*, 2006) และ Proteasome $\beta 4$ -subunit แสดงออกมากขึ้นในมะเร็งเต้านมเพศชายชนิด infiltrating ductal carcinoma ด้วยเช่นกัน (Chahed *et al.*, 2008) ในการศึกษาที่พบ Proteasome alpha 2 subunit มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในขั้น tumorigenesis และ progression and metastasis อาจสะท้อนว่ามีการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติเป็นอย่างมากภายในเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เซลล์สร้าง proteasome เพิ่มมากขึ้นเพื่อทำลายโปรตีนที่ผิดปกติเหล่านั้น

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ที่แสดงออกในขั้น tumorigenesis คือ Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF-2), Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor โปรตีนที่แสดงออกในขั้น progression and metastasis คือ Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor

Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF-2) ทำงานร่วมกับ GTP ในรูปของ EEF-2*GTP แล้วไปจับกับไรโบโซมเพื่อทำการขนย้าย mRNA และ tRNA จาก A-site ไป P-site ในขั้นตอน elongation ของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Caraglia *et al.*, 2000) ในการศึกษาที่พบ EEF-2 แสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งเทียบกับเนื้อเต้านมปกติ ทั้งกลุ่มมะเร็งระยะต้นและระยะแพร่กระจาย สอดคล้องการศึกษาที่ผ่านมาพบ elongation factor 1 α แสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งเต้านมชนิด DCIS (Wulfkuhle *et al.*, 2002) และพบ elongation factor 1-beta แสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งเต้านมชนิดลุกลาม (Deng *et al.*, 2006) โปรตีนทั้งสองชนิดเกี่ยวข้องกับการ สังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกัน

Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor เป็นเอนไซม์ในตระกูล protein disulfide isomerase ทำหน้าที่เป็นโปรตีน chaperone ในกระบวนการ post-translational modification ของ collagen ด้วยกระบวนการ hydroxylation (John, 1993) ในการศึกษาที่พบ Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในมะเร็งเต้านมเทียบกับเซลล์ปกติ และ ในมะเร็งที่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองรักแร้ แสดงว่า Prolyl 4-hydroxylase น่าจะมีบทบาทอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะต้นจนระยะแพร่กระจาย อย่างไรก็ตาม บทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งยังไม่มีรายงาน

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์

ในการศึกษานี้พบการแสดงออกของ Tubulin, beta ในมะเร็งเต้านมทั้งระยะต้นและระยะแพร่กระจาย รวมทั้งในมะเร็งที่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง

Tubulin, beta เป็นส่วนประกอบของเส้นใย microtubule ที่ทำหน้าที่ยึดและดึงโครโมโซมให้แยกจากกัน ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ Tubulin แสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็ง ซึ่งบ่งบอกว่าเซลล์มะเร็งมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงขึ้น ผลการศึกษายืนยันโดยวิธี IHC ในการศึกษาที่พบว่ามะเร็งที่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองมีการแสดงออกของ Tubulin, beta มากกว่ามะเร็งแม่ที่เต้านม แสดงว่า เซลล์มะเร็งส่วนที่มีความสามารถแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง มีอัตราการแบ่งตัวสูงกว่า หรือในทางกลับกัน เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ Tubulin, beta มากกว่า จะไปเพิ่มความสามารถในการแพร่กระจายมากขึ้น

สรุป

การศึกษาค้นคว้าความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่างๆของมะเร็งเต้านมโดยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE และ protein identification ในครั้งนี้ ได้แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของโปรตีนอย่างต่อเนื่องตามลำดับขั้นของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติ เป็นมะเร็ง เป็นเซลล์มะเร็งระยะต้น และเซลล์มะเร็งระยะลุกลามและแพร่กระจาย ซึ่งพบว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการต่างๆ ในการอยู่รอดและเพิ่มการเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis, antioxidant enzymes, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและการรักษาสมดุล โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีน การเคลื่อนที่ของเซลล์ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต้านมะเร็ง กระบวนการเหล่านี้ เป็นกระบวนการสำคัญในการก่อเกิดเซลล์มะเร็ง การเติบโต การลุกลาม และการแพร่กระจายของมะเร็ง การศึกษาในครั้งนี้ สามารถระบุชื่อโปรตีนในกระบวนการเหล่านี้ได้ถึง 33 ตัว ซึ่งหลายตัวเป็นโปรตีนที่ได้มีรายงานการศึกษาอื่นๆ ซึ่งช่วยสนับสนุนคุณภาพของวิธีการศึกษาในครั้งนี้ทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีรายงานการพบการแสดงออกของโปรตีนอย่างแตกต่างโดยการศึกษาแบบโปรตีโอมิกส์ กลไกการทำงานในเชิงลึก หรือเชิงกระบวนการที่เกี่ยวข้องการกับกระบวนการของมะเร็งของโปรตีนที่ได้รายงานแต่ละตัว ยังต้องทำการศึกษาต่อไป รวมทั้งการศึกษาที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกต่อไป

References

- Almond JB**, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2002;16:433-43. Review
- Ambrosone CB**. Oxidants and antioxidants in breast cancer. *Antioxid. Redox Signal*. 2000; 2: 903–17.
- Anderson NL**, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:845-67. Review.
- Bae SM**, Min HJ, Ding GH, et al. Protein Expression Profile using Two-Dimensional Gel Analysis in Squamous Cervical Cancer Patients. *Cancer Res Treat* 2006;38:99-107.
- Balkwill F** and Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 2002; 357: 539-45.
- Bando H**, Matsumoto G, Bando M, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:389–96.
- Baritaki S**, Katsman A, Chatterjee D, Yeung KC, Spandidos DA, Bonavida B. Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Yin Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation. *J Immunol* 2007;179:5441-53.
- Becker B**, Multhoff G, Farkas B, et al. Induction of HSP90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp Dermatol* 2004; 13 27–32.
- Bichsel VE**, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. *Cancer J*. 2001;7:69-78. Review
- Bini L**, Magi B, Marzocchi B et al. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*. 1997;18:2832-41.
- Bondanza A**, Zimmermann VS, Rovere-Querini P, et al. Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo. *J Exp Med* 2004; 200: 1157-65.
- Brenner DA**, Buck M, Feitelberg SP, Chojkier M. Tumor necrosis factor- α inhibits albumin gene expression in a murine model of cachexia. *J Clin Invest* 1990;85:248-55.
- Brown NS**, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;3:323-7.
- Calandra T**. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):573-6. Review.
- Calderwood SK**, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 2006;31:164-72.
- Cao Y**, Karin M. NF- κ B in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8:215–23.

- Capello F**, Bellafiore M, Palma A, et al. Expression of 60-kD heat shock protein increases during carcinogenesis in the uterine exocervix. *Pathobiology*. 2002-2003;70:83-8.
- Caraglia M**, Budillon A, Vitale G, Lupoli G, Tagliaferri P, Abbruzzese A. Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation. *Eur J Biochem*. 2000; 267:3919-36.
Review
- Carter CL**, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-7.
- Ciechanover A**. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994;79:13-21. Review
- Chahed K**, Kabbage M, Hamrita B, et al. Detection of protein alterations in male breast cancer using two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: the involvement of several pathways in tumorigenesis. *Clin Chim Acta* 2008;388:106-14.
- Chang SJ**, Hou MF, Tsai SM, et al. The association between lipid profiles and breast cancer among Taiwanese women. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:1219-23
- Chandra D**, Choy G and Tang GD. Cytosolic Accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release. *J Biological Chemistry* 2007; 282: 31289-301.
- Chang XZ**, Li DQ, Hou YF, et al. Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9:R76.
- Chatterjee D**, Bai Y, Wang Z, et al. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:17515–23.
- Deng SS**, Xing TY, Zhou HY, et al. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2006; 4: 165-72.
- Desmetz C**, Bibeau F, Boissière F, et al. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in early stage breast cancer and ductal carcinoma in situ. *J Proteome Res* 2008;7:3830-7.
- Faried A**, Sohda M., Nakajima M, Miyazaki T, Kato H. Kuwano H. Expression of heat-shock protein Hsp60 correlated with the apoptotic index and patient prognosis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2804–11.
- Fernandez PM**, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59:15-26.
- Fisher ER**, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer* 2001; 91(8 Suppl): 1679-87.
- Fu Z**, Kitagawa Y, Shen R, et al. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 2006;66:248–56.
- Gabay C**, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448-54.

- Garrido C**, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 433-42.
- Gerke V**, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 ; 6: 449-61.
- Granovsky AE**, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res.* 2008;18:452-7.
- Güner G**, Kirkali G, Yenisey C, Töre IR. Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma. *Cancer Lett.* 1992; 67:103-12.
- Hanash SM**. Global profiling of gene expression in cancer using genomics and proteomics. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 538-45.
- Hagan S**, Al-Mulla F, Mallon E, et al. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005;11:7392-7.
- Haklar G**, Sayin-Ozveri E, Yüksel M, Aktan AO, Yalçın AS. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Lett.* 2001;165:219-24.
- Hamrita B**, Chahed K, Kabbage M, et al. Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in breast cancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA). *Clin Chim Acta.* 2008 Jul 17;393(2):95-102. Epub 2008 Mar 27.
- Hendershot LM**. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 2004; 71: 289–97.
- Hotulainen P**, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell.* 2005;16:649-64.
- Jiang J**, Nilsson-Ehle P, Xu N. Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism. *Lipids Health Dis.* 2006 Mar 3;5:4.
- John DC**, Grant ME, Bulleid NJ. Cell-free synthesis and assembly of prolyl 4-hydroxylase: the role of the beta-subunit (PDI) in preventing misfolding and aggregation of the alpha-subunit. *EMBO J.* 1993 Apr;12(4):1587-95.
- Kabat GC** and Rohan TE. Does excess iron play role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. *Cancer Cause & Control* 2007; 18: 1047-53
- Karihtala P**, Mañtyniemi A, Kang SW, Kinnula VL, and Soini Y. Peroxiredoxins in breast carcinoma. *Clin Can Res* 2003; 9: 3418-24.
- Klaunig JE**, Xu Y, Isenberg JS, et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 1:289-95. Review.
- Kim DH**, Bae J, Lee JW, et al. Proteomic analysis of breast cancer tissue reveals upregulation of actin-remodeling proteins and its relevance to cancer invasiveness. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3: 30-40.
- Kim RH**, Peters M, Jang Y, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 2005;7:263-73.

- Kueppers F.** Alpha1-antitrypsin. *Am J Hum Genet.* 1973;25:677-86. Review.
- Lacko AG,** Nair M, Paranjape S, Johnso S, McConathy WJ. High density lipoprotein complexes as delivery vehicles for anticancer drugs. *Anticancer Res.* 2002;22:2045-9
- Lebret T,** Watson RW, Molinié V, et al. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer.* 2003;98:970-7.
- Li DQ,** Wang L, Fei F, et al. Identification of breast cancer metastasis-associated proteins in an isogenic tumor metastasis model using two-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Proteomics.* 2006;6:3352-68.
- Li J,** Gromov P, Gromova I, et al. Omics-based profiling of carcinoma of the breast and matched regional lymph node metastasis. *Proteomics* 2008; 8: 5038-52.
- Li JJ,** Oberley LW. Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia. *Cancer Res.* 1997 May 15;57(10):1991-8.
- Linderoth NA,** Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5472-7.
- Lindquist S.** The Heat-Shock Response. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55: 1151-91.
- Lis CG,** Grutsch JF, Vashi PG, Lammersfeld CA. Is serum albumin an independent predictor of survival in patients with breast cancer? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2003;27:10-5.
- Luo Y,** Zhang J, Liu Y, et al. Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. *Mol Biotechnol* 2005; 29: 233-44.
- Liu K.** and Shih, N.. The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *Journal of cancer molecules.* 2007; 3: 45-48.
- Ludueña RF.** Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol Biol Cell.* 1993;4:445-57.
- Luo Y,** Zhang J, Liu Y, et al. Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. *Mol Biotechnol.* 2005;29:233-44
- Manna SK,** Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem.* 1998;273:13245-54.
- Marklund SL,** Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 1982;42:1955-61
- McCord JM,** Keele BB Jr, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:1024-7.

- Melendez K**, Wallen SE, Edwards SB, Mobarak DC, Bear GD and Moseley LP. Heat Shock Protein 70 and Glycoprotein 96 are Differentially Expressed on The Surface of Malignant and Nonmalignant Breast Cells. *Cell Stress & Chaperones*. 2006;11: 334-342.
- Melle C**, Ernst G, Escher N. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker. *Clin Chem* 2007; 4: 1-7.
- Munoz LE**, Franz S, Pausch F, et al. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 6-14
- Mukhopadhyay S**, Das SK, Mukherjee S. Expression of Mn-Superoxide Dismutase Gene in Nontumorigenic and Tumorigenic Human Mammary Epithelial Cells. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004(4):195-202.
- Na KS**, Park BC, Jang M, et al. Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cells*. 2007;24:261-7.
- Nakagawa T**, Huang SK, Martinez SR, et al. Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:11825-30.
- Neckers L** and Ivy SP. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 2003;15:419-24.
- Nogradi A**. The Role of Carbonic Anhydrases in Tumors. *Am J Pathol* 1998;153(1): 1-4.
- Nonn L**, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* 2003;1:682-9.
- Pick E**, Kluger Y, Giltane JM, et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 2932-7.
- Pozzi LA**, Weiser WY. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill tumor cells. *Cell Immunol*. 1992 Dec;145(2):372-9.
- Ravagnan L**, Gurbuxani S, and Susin SA. et al.. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:839-43
- Ren Y**, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wong J. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma.
- Samali A**, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 1999;18:2040-8
- Schornack PA**, Gillies RJ. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia*. 2003 Mar-Apr;5(2):135-45
- Shan YX**, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:1135-43

- Shun CT**, Lin JT, Huang SP, Lin MT, Wu MS. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 28;11(24):3767-71.
- Somiari RI**, Sullivan A, Russell S, et al., High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*. 2003;3:1863-73
- Somiari RI**, Sullivan A, Russell S, et al. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*. 2003;3:1863-73
- Sriplung H**, Sontipong S, Martin N, et al. *Cancer in Thailand vol. III, 1995-1997*. Bangkok medical publisher: Bangkok. 2003: pp.47-8.
- Stebbins CE.**, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997; 89: 239–50.
- Subjectk JR**, Shyy TT. Stress protein systems of mammalian cells. *Am J Physiol*. 1986;250:C1–C17.0002-9513(1986)250[C1:SPSOMC]2.0.CO;2
- Suzuki M**, Tarin D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: clinical implications. *Mol Oncol* 2007; 1: 172-80.
- Verjans E**, Noetzel E, Bektas N, et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;14;9:230.
- Vydra J**, Selicharová I, Smutná K, et al. Two-dimensional electrophoretic comparison of metastatic and non-metastatic human breast tumors using in vitro cultured epithelial cells derived from the cancer tissues. *BMC Cancer* 2008; 8: 107.
- Wally J**, Halbrooks PJ, Vornrhein C, et al. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *J Biol Chem*. 2006 ;281:24934-44. Epub 2006 Jun 22.
- Wang W**, Goswami S, Lapidus K, et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* 2004;64:8585-94.
- Wang WS**, Zhong HJ, Xiao DW, et al. The expression of CFL1 and N-WASP in esophageal squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *Dis Esophagus*. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
- Warburg O**. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-14.
- Wehder L**, Arndt S, Murzik U, et al. Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma. *Cell Cycle* 2009 ;8: 1552-8.
- Weinberg ED**. Roles of iron in neoplasia. Promotion, prevention and therapy. *Biol Trace Elem Res* 1992; 34: 123-40. Review.
- Wulfkühle JD**, Sgroi DC, Krutzsch H, et al. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002; 62: 6740-9.

Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol.* 2000;2:E163-5. Review.

Xu X, Wang B, Ye C, Yao C, Lin Y, Huang X, Zhang Y, Wang S. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. *Cancer Lett.* 2008 Mar 18;261(2):147-57. Epub 2008 Jan 2.

Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 2001;21:7207-17.

Yokoe H, Nomura H, Yamano Y, et al. Characterization of intracellular superoxide dismutase alterations in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with lymph node metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135: 1625-33.

Zhang B, Wang Y, Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett.* 2009;286:154-60.

Zhang J, Jiang Y, Jia Z, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2006; 23:401-10.

6) ผลการย้อม Immunohistochemistry (IHC)

Heat Shock Protein 60 (HSP60)

การติด ผลการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็ง 12 ราย (ตารางที่ 4, รูปที่ 12) ซึ่งเป็น non-metastatic disease 6 ราย และ metastatic group 6 ราย พบว่าตัวอย่างเกือบทั้งหมดคือ 11 ใน 12 ราย เซลล์มะเร็งที่เต้านมให้ผลบวกกระดับปานกลาง(2+) ถึงเข้มข้น (3+) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ปกติซึ่งให้ผลลบต่อการย้อม อีก 1 ราย ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งให้ผลบวกต่อการย้อมเท่ากัน (2+) สรุปการแสดงผลออกของ HSP60 โดย IHC ให้ผลที่สอดคล้องกับ 2D-PAGE

Annexin V

ผลการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ พบว่าส่วนใหญ่ ทั้งเซลล์เต้านมปกติ และ เซลล์มะเร็งที่เต้านม ให้ผลการย้อมไม่แตกต่างกัน คือไม่ติดสี หรือ ติดสีระดับ 1+ ในเซลล์มะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้ มีการติดสีมากกว่าเซลล์มะเร็งที่เต้านมเป็นส่วนใหญ่ (5 ใน 6 ราย) ดังนั้นผลการแสดงผลออกของโปรตีนที่ตรวจด้วยวิธี IHC ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลของการแสดงผลออกโปรตีนใน 2D-Gel (ตารางที่ 4, รูปที่ 13)

Beta-Tubulin

ผลการย้อม Beta-tubulin ในตัวอย่างมะเร็ง 9 ราย พบว่าทั้งเซลล์เต้านมปกติ และ เซลล์มะเร็งให้ผลบวกต่อการย้อมระดับ 1-2+ และไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) แต่เซลล์มะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองติดสีเข้ม (3+) กว่ามะเร็งที่เต้านม ดังนั้นผลการย้อม beta-tubulin ด้วย IHC ให้ผลสอดคล้องเฉพาะในกลุ่มเปรียบเทียบระหว่างมะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองเทียบกับมะเร็งที่เต้านม

Table 4 Results of immunohistochemical staining for HSP60 and Annexin V.

Section num	Disease status	HSP60			Annexin V					
		N	T	T vs N	N	T	L	Tvs N	L vs T	
1	S45-8011 (case)	Non-Metas	0	2+	T>N	0-1+	0	-	T~N	-
2	S46-5990 (case)	Non-Metas	0-1+	2-3+	T>N	0-1+	0	-	T~N	-
3	S48-3911 (case)	Non-Metas	0	3+	T>N	0	0	-	T~N	-
4	S53-3393	Non-Metas	0	2+	T>N	3+	2+	-	T>N	-
5	S53-0291	Non-Metas	0	2+	T>N	0-1+	0-1+	-	T~N	-
6	S53-0563	Non-Metas	0	3+	T>N	0	2+	-	T>N	-
7	S47-3048 (case)	Metas	0	1-2+	T>N	0	0-2+	3+	T>N	L>T
8	S49-6077 (B694)	Metas	0	2+	T>N	0	1+	2-3+	T>N	L>T
9	S50-5676 (B711)	Metas	0	2+	T>N	0	0	2+ (f)	T~N	L>T
10	S52-13738	Metas	0	2+	T>N	1-2+	1-2+	0-2+	T~N	L>T
11	S52-14919	Metas	0	2+	T>N	0-1+	0-1+	2+ (f)	T~N	L>T
12	S52-8297	Metas	2+	2+	T~N	2+	2+	0	T~N	L<T

T, tumor; N, normal; L, axillary lymph node