รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การค้นหาโปรตีนตัวบ่งชี้เพื่อวินิจฉัยมะเร็งช่องปากของคนไทยในภาคใต้

(Investigation of protein marker for early diagnosis of oral cancer in Thai population in the South of Thailand)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. วราภรณ์ พรหมวิกร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
2. รศ. พญ. ปารมี ทองสุกใส ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
3. รศ. ปลื้มจิต บุณยพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
4. ผศ. นพ. โกวิทย์ พฤกษานุศักดิ์ ภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2549

มีนาคม 2549 - มีนาคม 2552

สารบัญ

	หน้าที่
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
1. บทนำ	
1.1. หลักการและเหตุผล	3
1.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2. วิธีวิจัย	7
2.1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากระยะต่างๆ	7
2.2. การคัดเลือกกลุ่มเซลล์ด้วยวิธี frozen section และ H & E staining	7
2.3. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากด้วย 1D SDS-PAGE	7
2.4. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากด้วย 2D SDS-PAGE	8
2.5. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ	8
2.6. การตรวจหาคุณสมบัติของโปรตีนตัวบ่งชี้	9
2.7. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนตัวบ่งชี้ด้วยวิธี immuno-histochemistry	9
3. ผลการวิจัย	10
3.1. กลุ่มตัวอย่าง	10
3.2. การคัดเลือกเนื้อเยื่อมะเร็ง	10
3.3. การแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากศึกษาด้วย 1D SDS-PSGE	13
3.4. การแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากศึกษาด้วย 2D SDS-PAGE	18
3.5. การวัดความเข้มของจุดโปรตีน และการวิเคราะห์ด้วยสถิติ	26
3.6. การระบุชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีน	53
3.7. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนตัวบ่งชี้ด้วยวิธี immuno-histochemistry	66
4. อภิปรายผลการวิจัย	71
5. สรุปผลการวิจัย	82
6. เอกสารอ้างอิง	83

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้าที่
3.1	เนื้อเยื่อปกติของเยื่อบุผิวภายในช่องปาก	11
3.2	เนื้อเยื่อมะเร็งภายในช่องปากระยะต่าง ๆ	12
3.3	เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะท้าย	13
3.4	ภาพ 1D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติในผู้ป่วยมะเร็งระยะก่อนลุกลาม ระยะต้น ระยะท้าย และ recurrent tumor	14
3.5	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต่าง ๆ	19
3.6	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ	20
3.7	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (OR841)	21
3.8	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 1 (OR915)	22
3.9	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 2 (OR713)	23
3.10	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 3 (OR872)	24
3.11	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 4 (OR618)	25
3.12	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อมะเร็งระยะก่อนลุกลาม	43
3.13	ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ	44
3.14	ภาพ Immuno-histochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (OR822) ย้อมด้วย alpha-tubulin beta-tubulin antibodies	67
3.15	ภาพ Immuno-histochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย (OR900) ย้อมด้วย alpha-tubulin beta-tubulin antibodies	68
3.16	ภาพ Immuno-histochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (OR822) ย้อมด้วย beta-tubulin beta-tubulin antibodies	69
3.17	ภาพ Immuno-histochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย (OR900) ย้อมด้วย beta-tubulin beta-tubulin antibodies	70

รายการตาราง

ตารางที่		หน้าที่
3.1	คุณสมบัติของเนื้อเยื่อมะเร็งที่นำมาศึกษา	10
3.2	ความเข้มของแถบโปรตีนจำนวน 32 แถบแยกด้วย 1D SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งระยะต่าง ๆ	15
3.3	สรุปจำนวนจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งช่องปากระยะต่าง ๆ	17
3.4	สรุปจุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งช่องปากระยะต่าง ๆ	27
3.5	ความเข้มของจุดโปรตีน จำนวน 245 จุดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งช่องปากระยะต่าง ๆ	29
3.6	จุดโปรตีนจำนวน 167 จุด ที่มีความเข้มของจุดโปรตีนแตกต่างตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไประหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะก่อนลุกลามกับระยะเริ่มต้น	45
3.7	จุดโปรตีนจำนวน 96 จุด ที่มีความเข้มของจุดโปรตีนแตกต่างตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไประหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะเริ่มต้นกับเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ	50
3.8	จุดโปรตีนจำนวน 39 จุด ที่มีความเข้มของจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายกับเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ	53
3.9	ชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีนจำนวน 50 ชนิด ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF และ LC-MS/MS และสืบค้นในฐานข้อมูล NCBInr	55
3.10	ลำดับกรดอะมิโนจากการวิเคราะห์ Peptide mass fingerprint ที่ตรงกับฐานข้อมูล	60
3.11	ลำดับกรดอะมิโนจากการวิเคราะห์ Partial peptide sequence ที่ตรงกับฐานข้อมูล	64
4.1	ชนิดของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อเกิดมะเร็งช่องปากที่สามารถระบุได้ในขณะนี้	77

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาโปรตีนตัวบ่งชี้ (protein marker) ของการเกิดมะเร็งช่องปากระยะต่างๆ ในคนไทยภาคใต้ โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (1D, 2D SDS-PAGE) ร่วมกับการระบุชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนวิเคราะห์จาก peptide mass fingerprint และ partial peptide sequence ด้วยเครื่อง mass spectrometer เนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาเป็นเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากจำนวน 12 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น และระยะท้าย กลุ่มละ 5 ราย ระยะก่อนลุกลาม (CIS) และมะเร็งที่เกิดซ้ำ กลุ่มละ 1 ราย ผลการศึกษาด้วย 1D SDS-PAGE พบว่า แถบโปรตีนส่วนใหญ่ของเนื้อเยื่อมะเร็งมีความเข้มมากกว่าของเนื้อเยื่อปกติ แต่ก็มีแถบโปรตีนบางส่วนที่มีความเข้มลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็ง เนื้องอกที่เกิดซ้ำหลังการรักษาด้วยการฉายรังสีมีความเข้มของแถบโปรตีนในภาพรวมคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดขึ้นก่อนการรักษาด้วยรังสี ผลการศึกษาด้วย 2D SDS-PAGE พบว่า 1) ลักษณะการแสดงออกของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะ CIS มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเนื้อเยื่อปกติ และการเปลี่ยนแปลงของจุดโปรตีนมีความชัดเจนมากขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งระยะต้นและระยะท้าย 2) ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระยะท้ายมีลักษณะการแสดงออกของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติคล้ายกับของเนื้อเยื่อมะเร็งมากขึ้น และ 3) จุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำมีลักษณะการแสดงออกคล้ายคลึงกับของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น ผลการวิเคราะห์ความเข้มของจุดโปรตีนพบว่ามีโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งจำนวน 245 จุด ที่แสดงออกแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในจำนวนนี้มีโปรตีนจำนวน 46 จุด ที่แสดงออกสอดคล้องกันระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะ CIS กับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น และมีโปรตีนจำนวน 26 จุด และ 12 จุด ที่แสดงออกสอดคล้องกันระหว่างมะเร็งที่เกิดซ้ำกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น และมะเร็งระยะท้าย ตามลำดับ การระบุชนิดของโปรตีน ได้ผลสำเร็จจำนวน 50 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีการรายงานแล้วในมะเร็งช่องปาก จำนวน 39 ชนิด และเป็นโปรตีนที่ยังไม่เคยมีการรายงานในมะเร็งช่องปากมาก่อน จำนวน 11 ชนิด และในจำนวน 50 ชนิดนี้ พบ 19 ชนิด เป็นโปรตีนที่แสดงออกสอดคล้องกันระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะ CIS กับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น และพบ 6 และ 2 ชนิด เป็นโปรตีนที่แสดงออกสอดคล้องกันระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น และ มะเร็งระยะท้าย ตามลำดับ จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่ระบุได้พบว่า เซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่างไปจากเซลล์ปกติกล่าวคือมีการเพิ่มการสร้างโปรตีน เพิ่มจำนวนเซลล์ ลดการตายของเซลล์ เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเซลล์ปกติ เคลื่อนที่ไปบริเวณอื่น เพิ่มการสร้างพลังงาน และเพิ่มการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ สุดท้ายสามารถสรุปโปรตีนชนิดใหม่ที่อาจมีศักยภาพเป็นโปรตีนตัวบ่งชี้การมีโอกาสเป็นมะเร็งช่องปากในระยะก่อนลุกลาม และในระยะแรกเริ่ม จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Elongation factor 2 Horf6 และ HSPA8 isoform 2 ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปสู่การค้นหาวิธีวินิจฉัยมะเร็งช่องปากให้รวดเร็วและง่ายขึ้น และการหาวิธียับยั้งการแสดงออกของยีนและ/หรือโปรตีนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

Abstract

This study was aimed to investigate the expression and identification of differentially expressed proteins in oral cancer, and to find new potential biomarkers for oral cancer using polyacrylamide gel electrophoresis (1D, 2D SDS-PAGE) in conjunction with mass spectrometers. The samples were taken from 12 oral cancer patients. Normal oral tissues were also collected for being a control group. Groups of 5 patients were in early or late stage cancer, and 2 patients were each in pre-malignant oral cancer; carcinoma in situ stage (CIS), and recurrent tumor. 1D SDS-PAGE showed that in cancer tissue the intensity of most protein bands was greater than normal tissue, although the intensity of some protein bands of cancer tissue was decreased. 2D SDS-PAGE showed that 1) the protein profiling of CIS was different from that of the normal tissue. The difference was more obvious, when the tumors were in early and late stage cancer, 2) in late stage cancer, the protein expression profiling of normal tissue was similar to that of cancer, and 3) the protein profiling of recurrent tumor was similar to that of early stage cancer. Analysis of protein spot intensity showed that 245 protein spots were significantly different between cancer and normal tissues ($p < 0.05$). Forty six spots in CIS were expressed in a similar manner to early stage cancer. Twenty six spots and 12 spots in recurrent tumor were expressed in similar manners to early and late stage cancer, respectively. Identifications and functions of 50 proteins were successfully characterized. Some 39 of 50 proteins have been previously reported, while the other 11 proteins have never been reported associated to oral cancer. Some 19 of 50 proteins were similarly expressed in CIS and early stage cancer. Some 6 and 2 of 50 proteins were similarly expressed in recurrent tumor and either early, or late stage tumor. It is suggested that oral cancer cells function differently from the normal cells; including, increased protein synthesis, increased cell proliferation, increased energy synthesis, increased signal transduction, decreased apoptosis, morphological change and migration. Finally, 3 proteins, including Elongation factor 2, Horf6 and HSPA8 isoform 2, were suggested for new potential markers for indicating CIS and early stage oral cancer. These protein markers may be further used for fast and easy diagnosis of oral CIS, and used as target proteins for gene and/or protein manipulation to inhibit or retard oral cancer progression.

1. บทนำ

1.1. หลักการและเหตุผล

โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาของทุกประเทศทั่วโลก สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 3 รองจากโรคหัวใจและอุบัติเหตุ โดยข้อมูลประมาณการในปี พ.ศ. 2536 พบว่า มีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ทั่วประเทศประมาณ 60,000 ราย ซึ่งคิดเป็นอุบัติการณ์การเกิดโรคที่ปรับฐานอายุ (age-standardized rate) ในเพศชาย 151.3 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน และ ในเพศหญิง 123.8 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน (Deerasamee et al., 1999)

มะเร็งในช่องปาก เป็นมะเร็งที่พบได้ทั่วโลก พบเป็นลำดับที่ 6 ของมะเร็งทุกชนิด โดยมีอุบัติการณ์เฉลี่ยทั่วโลกในเพศชาย 11.0 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน (Parkin et al., 1993) มะเร็งในช่องปากพบมากในประเทศแถบเอเชียตะวันออก เอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย อุบัติการณ์มะเร็งของประเทศไทย พ.ศ. 2536 พบว่า มะเร็งช่องปากในชายจัดอยู่ลำดับที่ 4 และในหญิงจัดอยู่ลำดับที่ 7 โดยมีอุบัติการณ์ 5.4 และ 4.0 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน ตามลำดับ (Deerasamee et al., 1999) การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่ามะเร็งในช่องปากมีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ ดื่มเหล้า และเคี้ยวหมาก (Paterson et al.,1996; Sankaranarayanan et al., 1990)

การรักษามะเร็งทุกชนิด รวมทั้งมะเร็งช่องปาก จะได้ผลดีหรือไม่นั้น ปัจจัยกำหนดที่มีความสำคัญมากที่สุดประการหนึ่งคือ ระยะโรค (stage) ขณะเริ่มรักษา โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราการรอดชีวิต 5 ปีของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากประมาณร้อยละ 40-60 ขึ้นกับระยะโรค (Woolgar et al., 1999; Pericot et al., 2000) การรักษาโรคมะเร็งในระยะลุกลาม พบมีอัตราการกลับเป็นซ้ำ (recurrence) สูง ทั้งที่ตำแหน่งมะเร็งเดิม และที่ต่อมน้ำเหลือง (loco-regional recurrence) อันเป็นสาเหตุสำคัญของการตายของผู้ป่วยมะเร็งระบบนี้ (Worral et al., 1995; Woolgar et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า ประมาณร้อยละ 40 ของผู้ป่วย เสียชีวิตจากความล้มเหลวในการควบคุมโรคเฉพาะที่อย่างเดียว และ ร้อยละ 24 ของผู้ป่วย เสียชีวิตจากการมีมะเร็งแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นที่อยู่ไกลออกไป (Slootweg et al., 1996) ดังนั้นการค้นคว้าเพื่อหาการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และอณูชีวโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการดำเนินของโรคมะเร็งจากระยะเริ่มต้นไปสู่ระยะลุกลาม จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่จะนำไปสู่การรักษาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพและประสิทธิผลมากขึ้น

การที่เซลล์ปกติเกิดการเปลี่ยนแปลงและกลายเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นเพราะกลไกการทำงานและการควบคุมการทำงานของเซลล์เกิดความผิดปกติขึ้น ซึ่งงานวิจัยในปัจจุบันนี้บ่งชี้ชัดว่าการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นในระดับยีน (gene) ซึ่งมีผลทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป การศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งในปัจจุบัน นิยมศึกษาโดยใช้ DNA arrays ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ทำให้สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ transcription เป็นพันเป็นหมื่นยีนพร้อมๆกัน จากการศึกษาพบว่าข้อมูลที่ได้มีประโยชน์ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตามพยากรณ์โรค ซึ่งไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีพยากรณ์โรคแบบเดิม รวมทั้งสามารถใช้แยกกลุ่มมะเร็งที่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางคลินิค และทางพยาธิวิทยา

แม้ว่าการศึกษาด้วยเทคโนโลยี gene arrays จะให้ข้อมูลที่มีประโยชน์ดังกล่าวข้างต้น แต่การศึกษาดังกล่าวยังให้ข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์ เพราะสิ่งที่เกิดขึ้นในระดับ transcription อาจไม่สัมพันธ์กับการทำงานของโปรตีน ด้วยเหตุว่า ยีนเป็นแม่แบบในการสร้าง RNA ผ่านกระบวนการ transcription RNA เป็นแม่แบบในการสร้างโปรตีนผ่านกระบวนการ translation และโปรตีนเป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่างๆภายในเซลล์ ดังนั้นยีนจึงทำงานผ่านโปรตีน หากยีนเกิดผิดปกติ จะส่งผลให้กระบวนการในการสร้างโปรตีนในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งผิดปกติ ผลคืออาจทำให้ไม่มีโปรตีนเกิดขึ้น ได้โปรตีนน้อยลง ได้โปรตีนมากขึ้น หรือได้โปรตีนที

มีความผิดปกติ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกัน ซึ่งเป็นผลให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของโปรตีนนั้นๆ แต่การทำงานของโปรตีนนั้นไม่ได้ถูกควบคุมโดยยีนเพียงอย่างเดียว หากแต่ถูกกำหนดโดยปัจจัยอื่นๆ อีกมาก เช่น กระบวนการปรับแต่งโปรตีน (protein modifications) การควบคุมการทำงานระหว่างโปรตีนภายในเซลล์ด้วยกันเอง (protein-protein interaction) การมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับปัจจัยแวดล้อมภายนอกเซลล์ (protein-extracellular matrix interaction) เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดเป็นเครือข่ายที่โยงใยซับซ้อน

ปัจจุบันเทคนิคในการวิเคราะห์โปรตีนได้พัฒนาจนทำให้สามารถวิเคราะห์โปรตีนต่างๆในเซลล์ได้คราวละจำนวนมากเช่นเดียวกับ DNA microarray เทคโนโลยีดังกล่าวคือการแยกโปรตีนด้วย high resolution 2D gel electrophoresis ตามด้วยการระบุชนิดโปรตีนด้วย mass spectrometry ซึ่งจะทำให้ทราบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน (profiles of protein expression) และ ชนิดของโปรตีน (identification of protein) ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็ง ณ สถานการณ์ต่างๆ การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ ด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกซ์ จะนำไปสู่การทราบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งที่สัมพันธ์กับระยะต่าง ๆ ของมะเร็ง (developmental stages), การลุกลามของมะเร็ง (cancer progression) และกลไกการเกิดมะเร็ง (cellular signaling) (Lewis et al., 2000; Hanash 2000; Bishsel et al., 2001) การค้นพบ biomarker ซึ่งสามารถใช้เป็นเกณฑ์สำคัญในการวินิจฉัยและทำนายการดำเนินของโรค และ การค้นพบวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถนำไปสู่การปรับใช้ให้มีความเหมาะสมเฉพาะบุคคลในโอกาสต่อไป

1.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาในมะเร็งหลายชนิดพบว่าในการเกิดเซลล์มะเร็งจะมีการเปลี่ยนแปลงของยีนสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ จากระยะก่อนเป็นมะเร็ง มะเร็งระยะต้น มะเร็งระยะท้าย จนกระทั่งเป็นมะเร็งที่มีการแพร่กระจาย การศึกษามะเร็งของศีรษะและลำคอ (head and neck cancer) ก็สนับสนุนปรากฏการณ์นี้เช่นกัน (Califano et al., 1996) ในช่วงครึ่งทศวรรษ ที่ผ่านมา มีพัฒนาการด้านเทคโนโลยีที่สามารถตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ transcription เป็นพันเป็นหมื่นยีนพร้อมๆกันที่เรียกว่า cDNA microarray technology เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมามาใช้ในการตรวจการแสดงออกของยีนในเนื้องอกหลายชนิด พบว่าข้อมูล gene expression profiles มีประโยชน์ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตามการพยากรณ์โรค ซึ่งไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีการบอกปัจจัยพยากรณ์โรคแบบเดิม (Nutt et al., 2003; Alizadeh et al., 2000) รวมทั้งสามารถแยกกลุ่มมะเร็งที่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางคลินิค และทางพยาธิวิทยา เช่น อัตราการรอดชีวิต การแบ่งระยะตามลักษณะของเนื้อเยื่อ และ การตอบสนองต่อการรักษา (Van De Vijver et al., 2002; West; et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2001)

การศึกษา gene expression profiles ด้วยเทคโนโลยี DNA microarray ได้เริ่มมีการศึกษากันบ้างแล้วเช่นกัน แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย การศึกษามะเร็งของศีรษะและลำคอส่วนใหญ่ทำเพื่อเปรียบเทียบ gene expression profiles ในระยะต่างๆของมะเร็ง หรือหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับอาการทางคลินิก และลักษณะของเนื้อเยื่อตามพยาธิวิทยา Ha et al., 2003 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเยื่อบุปกติ (N) เซลล์ก่อนเป็นมะเร็ง (PM) และเซลล์ที่เป็นมะเร็ง (M) และพบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม N กับ กลุ่ม M พบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น (up-regulated) จำนวน 965 ยีน และ มีการลดการแสดงออกของยีนลง (down-regulated) เป็นจำนวน 1106 genes ส่วนกลุ่ม PM พบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 108 ยีน และ มีการลดการแสดงออกของยีน เป็นจำนวน 226 ยีน เปรียบเทียบกับกลุ่ม N และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม M กับ PM พบว่า กลุ่ม M มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 5 ยีน

และ มีการแสดงออกของยีนลดลงเป็นจำนวน 13 ยีน ซึ่งผลการศึกษานี้สนับสนุนข้อสรุปที่ว่าระยะของโรคที่รุนแรงขึ้นก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ นอกเหนือจากนี้ได้มีนักวิจัยหลายกลุ่มทำการศึกษาเปรียบเทียบ gene expression profiles ระหว่างมะเร็งช่องปากที่เกิดอยู่กับที่ กับมะเร็งช่องปากที่แพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย การศึกษาเหล่านั้นได้แก่ การศึกษาเปรียบเทียบ gene expression profiles ระหว่างมะเร็งช่องปากระยะลุกลาม (ระยะ 3 – 4) (primary tumor) กับ เนื้อเยื่อมะเร็งที่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง (metastatic tumor) ผลการศึกษาพบยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งใน primary tumor และ metastatic tumor จำนวน 140 genes และยีนที่แสดงออกลดลงจำนวน 94 ยีน เปรียบเทียบกับเยื่อบุช่องปากปกติ (Belbin et al., 2005) การศึกษา gene expression profiles ในมะเร็งช่องปาก 20 ราย เพื่อหาความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิก พยาธิวิทยาและพยากรณ์โรคของผู้ป่วย ซึ่งพบว่า กลุ่มยีน 2 กลุ่มมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดมะเร็งระยะลุกลาม (ระยะ 3 – 4) และกับการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง ($p = 0.035$) (Warner et al., 2004) การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในมะเร็งที่ยังไม่มีการแพร่กระจายกับมะเร็งที่มีการแพร่กระจายแล้วในผู้ป่วย 20 ราย พบว่ามีการแสดงของยีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเป็นจำนวน 101 ยีน ซึ่งได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ extracellular matrix, cell adhesion, cell motility, inflammation, and protease inhibition (Schmalbach et al., 2004) การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ใน primary tumor และ recurrent tumor ในมะเร็งช่องปาก 41 ราย พบว่า gene ที่เกี่ยวข้องกับการลุกลาม (invasion) และ gene ที่เกี่ยวข้องการแพร่กระจาย (metastasis) มีความสัมพันธ์กับมะเร็งที่เป็นซ้ำ (recurrent tumor) (Ginos et al., 2004) จากการศึกษาเหล่านี้ทำให้ความรู้เกี่ยวกับกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งมีความกระจ่างขึ้น และการศึกษาเหล่านี้อาจนำไปสู่การค้นพบตัวบ่งชี้โอกาสการไม่ตอบสนองต่อการรักษาของเนื้อเยื่อมะเร็งต่อไป

การศึกษาด้วยเทคโนโลยี proteomics ในมะเร็งช่องปากยังอยู่ในจุดเริ่มต้น โดย He et al., 2004 วิเคราะห์โปรตีนใน oral tongue carcinoma จากผู้ป่วยจำนวน 10 ราย โดยเปรียบเทียบโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งกับเยื่อบุปกติข้างเคียง โดยวิธี two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy ผลการศึกษาพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการมะเร็งมีการแสดงออกต่างจากเยื่อบุปกติอย่างมีนัยสำคัญ โปรตีนเล่านั้น ได้แก่ heat shock protein (HSP)60, HSP27, alpha B-crystalline, ATP synthase beta, calgranulin B, myosin, tropomyosin และ galectin 1 เป็นต้น ต่อมาคณะผู้วิจัยชุดเดียวกันได้รายงานชนิดของโปรตีนที่พบในมะเร็งกระพุ้งแก้มเพิ่มเติม ได้แก่ glycolytic enzymes, heat-shock proteins, tumor antigens, cytoskeleton proteins, enzymes ในกระบวนการ detoxification and anti-oxidation systems, รวมทั้งโปรตีนใน mitochondrial/intracellular signaling pathways (Chen et al., 2004) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดมะเร็งมีผลกระทบต่อกลไกภายในของเซลล์อย่างมากมาย อย่างไรก็ตาม การศึกษาทั้งสองนี้ ยังไม่มีข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนตามระยะของมะเร็ง (tumor progression) หรือการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับผลการรักษาโรค ล่าสุด Baker et al., 2005 ศึกษา protein expression profiles ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่ลิ้น ซึ่งมีระดับความร้ายแรงต่างๆ จำนวน 5 ราย เปรียบเทียบกับเยื่อบุปกติ โดยเป็น poorly differentiated 1 ราย เป็น moderately differentiated 3 ราย และ เป็น well-differentiated squamous cell carcinoma 1 ราย ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเซลล์มะเร็งที่ต้องการอย่างจำเพาะเจาะจงโดยใช้เทคนิค laser-capture ซึ่งการทำวิธีนี้จะทำให้ได้เซลล์ที่ต้องการโดยไม่มีเซลล์อื่น เช่น stromal cell, inflammatory cell ปะปน แต่การใช้วิธีนี้จะทำให้ได้จำนวนเซลล์ตัวอย่างลดลง ผู้วิจัยจึงนำเซลล์ที่ได้ไปย่อยเพื่อให้ได้โปรตีนและนำไปวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry โดยตรง โดยไม่ได้ทำการแยกและคัดเลือกโปรตีนใน 2-D electrophoresis ก่อน ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

กับโครงสร้างของเซลล์ (cell structure) ได้แก่ keratins 13, 19, and 6c และโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ได้แก่ Hsps

กล่าวโดยสรุป การศึกษา protein expression profiles ในมะเร็งช่องปากได้มีการศึกษากันมาบ้างแล้ว โดยพบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งมีการแสดงออกของโปรตีนหลายตัวที่แตกต่างจากเยื่อบุปกติ อย่างไรก็ตามการศึกษาเปรียบเทียบ protein expression profiles โดย 2D SDS-PAGE ของมะเร็งในระยะต่างๆ และการค้นหาโปรตีนตัวบ่งชี้ที่บอกการตอบสนองต่อการรักษานั้นยังไม่เคยมีรายงาน

1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อค้นหาโปรตีนตัวบ่งชี้ (protein marker) ของการเกิดมะเร็งช่องปากระยะต่างๆ ในคนไทยภาคใต้

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ใช้โปรตีนตังบ่งชี้ (biomarker) ในการวินิจฉัยมะเร็งช่องปากได้อย่างแม่นยำ

1.4.2 ใช้โปรตีนตังบ่งชี้ (biomarker) เป็นเกณฑ์ในการทำนายการดำเนินของโรค การควบคุม และการป้องกัน การเกิดมะเร็งช่องปาก

1.4.3 นำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจมะเร็งช่องปาก

1.4.4 ผู้ป่วยได้รับการรักษาและป้องกันการลุกลามของมะเร็งช่องปาก

1.4.5 ก่อให้เกิดงานวิจัยเพื่อหาแนวทางในการรักษาที่มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมเฉพาะบุคคล

2. วิธีวิจัย

2.1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากระยะต่าง ๆ

วิธีวิจัย

1 คัดเลือกผู้ป่วยที่มารักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งระยะต้น (ระยะ 1 และ 2) หรือ มะเร็งระยะท้าย (ระยะ 3 และ4) โดยใช้การแบ่งระยะตามเกณฑ์ TNM และมีแผนเข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัด (wide excision)

2 เมื่อผู้ป่วยได้รับการผ่าตัด จะทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (ระยะ 1 และ 2) และ มะเร็งระยะท้าย (ระยะ 3 และ 4) จากชิ้นเนื้อที่ตัดออกมาจากผู้ป่วยทันที โดยจะเก็บให้ได้จำนวนตัวอย่างมะเร็งระยะต้น และ มะเร็งระยะท้าย อย่างละ 6 ตัวอย่าง เป็นอย่างน้อย และทุกๆ ชิ้นเนื้อที่ตัดออกมาจากผู้ป่วย จะเลือกเก็บส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อปกติเพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับส่วนที่เป็นโรคด้วย โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติจากชิ้นเนื้อแต่ละชิ้นมีขนาด 0.4 x 0.4 x 0.2 ซ.ม. โดยประมาณ (หมายเหตุ เป็นตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้ในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้)

3 เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ

2.2. การคัดเลือกกลุ่มเซลล์ด้วยวิธี frozen section และ H & E staining

วิธีวิจัย

1 นำเนื้อเยื่อมะเร็งในระยะต่างๆ และ เนื้อเยื่อปกติที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ มาตัดเป็นชิ้นที่มีความหนา 5 ไมโครเมตรที่อุณหภูมิ -20 °ซ ด้วยเครื่อง cryostat

2 วางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วลงบนสไลด์แก้ว

3 ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย H & E staining

4 นำเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเลือกขอบเขตของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา

5 หากตรวจสอบแล้วพบว่าขอบเขตของชิ้นเนื้อกว้างเกินไป ให้ทำการตัดเล็มก้อนเนื้อเยื่อ และย้อมสีชิ้นเนื้อเพื่อตรวจสอบขอบเขตที่เหลือ ดังข้อ 1-4 อีกครั้ง

6 ทำซ้ำดังข้อ 1-4 อีกจนกว่าจะได้กลุ่มเซลล์ที่ต้องการ

2.3. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากด้วย 1D SDS-PAGE

วิธีวิจัย

1 นำเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากในระยะแรกเริ่ม เนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากในระยะลุกลาม และ เนื้อเยื่อปกติในช่องปากที่ทำการคัดเลือกกลุ่มเซลล์แล้ว มาสกัดโปรตีนโดยใช้ lysis buffer

2 ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้

3 นำโปรตีนตัวอย่างจากเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ มาในปริมาณอย่างละ 10 ไมโครกรัม และทำการแยกโปรตีนในแผ่นวุ้น (slab gel) ตามความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของโปรตีน (molecular weight) โดยใช้เวลาประมาณ 6.5 ชั่วโมง

4 ย้อมสีแผ่นวุ้นด้วย silver nitrate หรือ coomassie blue

5 นำแผ่นวุ้นที่ย้อมแล้วมา scan ด้วย gel scanner และเก็บภาพถ่ายแถบโปรตีน (protein bands) ในรูปของ tiff files

6 วิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีน (pixels) โดยใช้โปรแกรม ImageQuant TL (version 2003) (Amersham Bioscience)

7 เปรียบเทียบค่าความเข้มของแถบโปรตีน (pixels) ระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับมะเร็งระยะต้น และระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับมะเร็งระยะท้ายของผู้ป่วยรายเดียวกัน และหาค่าความแตกต่างของความเข้มของแถบโปรตีนที่พบในผู้ป่วยทุกราย (มีโปรตีนจำนวนไม่มากที่พบในผู้ป่วยทุกราย โปรตีนส่วนใหญ่แสดงออกเฉพาะบุคคล) ในกลุ่มมะเร็งระยะต้น และ/หรือในกลุ่มมะเร็งในระยะท้าย ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % หรือไม่

2.4. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากด้วย 2D SDS-PAGE

วิธีวิจัย

1 นำเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากในระยะแรกเริ่ม เนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากในระยะลุกลาม และ เนื้อเยื่อปกติที่ทำการคัดเลือกกลุ่มเซลล์แล้ว มาสกัดโปรตีนโดยใช้ IEF sample buffer

2 ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้

3 นำโปรตีนตัวอย่างจากเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ และเนื้อเยื่อปกติมาในปริมาณเท่าๆ กัน และทำการแยกโปรตีนมิติที่ 1 (first dimension) ในแผ่นวุ้น (IPG strip) ตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง

4 นำหลอดวุ้นที่ได้มาทำการแยกโปรตีนมิติที่ 2 (second dimension) ในแผ่นวุ้น (slab gel) ตามขนาดโมเลกุลของโปรตีน (molecular weight) โดยใช้เวลาประมาณ 2 หรือ 8 ชั่วโมง แล้วแต่ขนาดของแผ่นวุ้น

5 ย้อมสีแผ่นวุ้นด้วย silver nitrate หรือ coomassie blue

6 นำแผ่นวุ้นที่ย้อมแล้วมา scan ด้วย gel scanner และเก็บภาพถ่ายจุดโปรตีน (protein spots) ในรูปของ tiff files

7 ใช้โปรแกรม ImageMaster 2D Platinum (version 5.0) (Amersham Bioscience) วิเคราะห์ความเข้ม (pixels) ของจุดโปรตีน จับคู่จุดโปรตีนบน 2D gel เปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับมะเร็งระยะต้นและระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับมะเร็งระยะท้ายของผู้ป่วยรายเดียวกัน และหาค่าความแตกต่างของความเข้มของจุดโปรตีนที่พบในผู้ป่วยทุกราย ในกลุ่มมะเร็งระยะต้นและ/หรือในกลุ่มมะเร็งระยะท้าย ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % หรือไม่

2.5. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ

วิธีวิจัย

ใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 16 เปรียบเทียบค่าความเข้มของจุดโปรตีนที่วัดได้จากโปรแกรม Image Master 2D Platinum ที่ระดับค่าความเชื่อมั่น 95% (α=0.05) ตามเงื่อนไข ดังนี้

1 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติ (NE) กับมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น (TE) และเนื้อเยื่อปกติ (NL) กับมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้าย (TL) ใช้สถิติ (one-tailed) paired t-test (n=5)

2 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น (NE) กับระยะท้าย (NL) ใช้สถิติ (one-tailed) t-test (n=5)

3 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (TE) กับระยะท้าย (TL) ใช้สถิติ (one-tailed) t-test (n=5)

4 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น (NE) กับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย (TL) ใช้สถิติ (one-tailed) t-test (n=5)

5 เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติ (NE กับ NL) กับเนื้อเยื่อมะเร็ง (TE กับ TL) ใช้สถิติ Kruskal Wallis และ Mann-Whitney U-test (n=10)

2.6. การตรวจหาคุณสมบัติของโปรตีนตัวบ่งชี้ (investigation of protein identification)

วิธีวิจัย

1 ทำการคัดเลือกเฉพาะจุดโปรตีน (protein spots) ที่พบในทุกตัวอย่าง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ใน 2.4.7 – 2.5

2 ตัดจุดโปรตีน (protein spots) ที่คัดเลือกแล้วจากแผ่นวุ้นด้วยมีดปลายแหลม

3 สกัดโปรตีนออกจากแผ่นเจล และตัดสายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน (in-gel digestion)

4 นำท่อนเพปไทด์ไปตรวจสอบ peptide mass fingerprint (PMF) ด้วยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer (ทำที่หน่วยบริการชีวภาพ สวทช. กรุงเทพฯ)

5 นำท่อนเพปไทด์ไปตรวจสอบ partial peptide sequences (PPS) ด้วยเครื่อง LC-MS/MS Q-TOF (ทำที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ)

6 นำ PMF และ/หรือ PPS ที่วิเคราะห์ได้ไปสืบหา (protein informatics) กับฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุชื่อและคุณสมบัติของโปรตีน

2.7. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนตัวบ่งชี้ด้วยวิธี immuno-histochemistry

วิธีวิจัย

1 ตัดชิ้นเนื้อปกติ และ เนื้อเยื่อมะเร็งที่ผ่านการแช่ 10% buffered formalin และฝังอยู่ในพาราฟิน ให้มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน วางบนสไลด์ที่เคลือบไว้ด้วยสาร adhesive

2 อบค้างคืนที่ 45°C และนำมากำจัดพาราฟินออกใน xylene ต่อไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย

3 กู้แอนติเจน (antigen retreival) ด้วยการต้มชิ้นเนื้อใน 10 mM citrate buffer pH 6 ประมาณ 20 นาที กำจัด endogenous peroxidase ออกโดย 3% H_2O_2 และกำจัด non specific background ออกด้วย non-immune serum

4 อบสไลด์ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนตัวบ่งชี้ที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นย้อมต่อด้วย secondary antibody, avidin-biotin complex และสารก่อสี

5 ย้อมบางๆ ด้วย hematoxyllin ปิดสไลด์ด้วย cover slip

6 ถ่ายภาพการติดสีของโปรตีนตัวบ่งชี้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบว่ามีหรือไม่มีการแสดงออกของโปรตีนตัวบ่งชี้ในเนื้อเยื่อมะเร็งเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ

3. ผลการวิจัย

3.1. กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างในการศึกษาโปรตีโอมิกซ์ของเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากจำนวน 12 ราย แบ่งเป็นเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (ระยะที่ 1 หรือ 2) จำนวน 5 ตัวอย่าง มะเร็งระยะท้าย (ระยะที่ 3 หรือ 4) จำนวน 5 ตัวอย่าง มะเร็งระยะก่อนลุกลาม (Cis) จำนวน 1 ตัวอย่าง และมะเร็งที่เกิดซ้ำ (Recurrent tumor) จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.1 เนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาเป็นเนื้อเยื่อบริเวณลิ้น กระพุ้งแก้ม เหงือก และพื้นช่องปาก ซึ่งล้วนเป็นเนื้อเยื่อชนิด squamous epithelium

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติของเนื้อเยื่อมะเร็งที่นำมาศึกษา

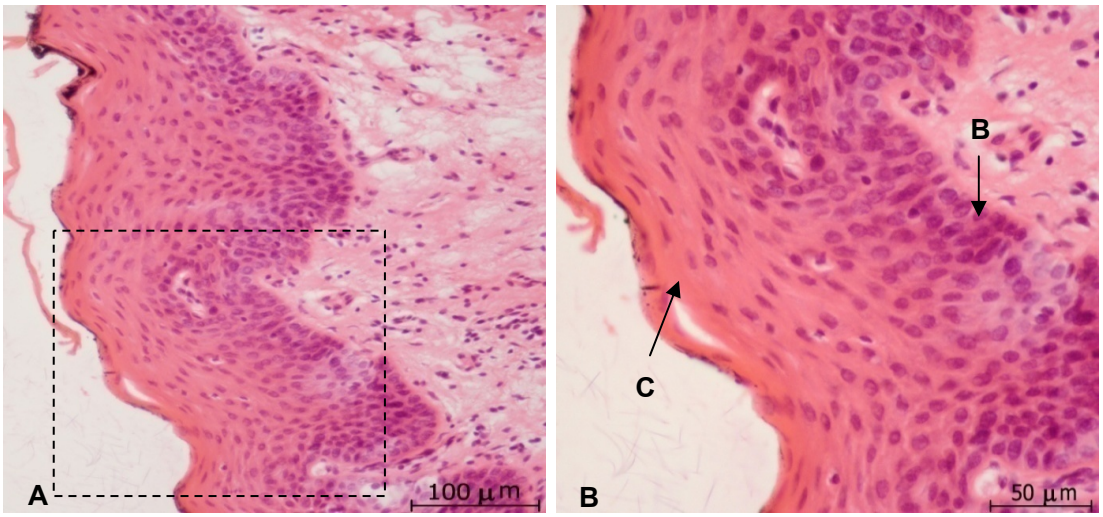
ผู้ป่วย	ระยะมะเร็ง	ตำแหน่งมะเร็ง	รหัสเนื้อเยื่อมะเร็ง	รหัสเนื้อเยื่อปกติ	รหัสเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองที่คอ
1	ระยะต้น	ลิ้น	OR915T	OR915N	
2		กระพุ้งแก้ม	OR713T	OR713N	
3		ลิ้น	OR822T	OR822N	
4		ลิ้น	OR967T	OR967N	
5		เหงือก	OR901T	OR901N	
6	ระยะท้าย	กระพุ้งแก้ม	OR872T	OR872N	OR872L
7		ลิ้น	OR900T	OR900N	OR900L
8		พื้นช่องปาก	OR979T	OR979N	OR979L
9		กระพุ้งแก้ม	OR618T	OR618N	
10		เหงือก	OR628T	OR628N	
11	ระยะก่อนลุกลาม	ลิ้น	OR841T	OR841N	
12	มะเร็งที่เกิดซ้ำ	ลิ้น	OR796T	OR796N	

สำหรับเนื้อเยื่อปกติที่นำมาใช้ในการทดลอง เป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียงก้อนมะเร็ง ซึ่งนำไปศึกษาด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยาแล้วพบว่าเป็นเซลล์ที่มีลักษณะและจำนวนเซลล์ปกติ

3.2. การคัดเลือกเนื้อเยื่อมะเร็ง

เนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งที่จะนำไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีนมีลักษณะปรากฏดังภาพที่ 3.1 – 3.2 เนื้อเยื่อปกติของเยื่อบุผิวภายในช่องปาก (ภาพที่ 3.1) มีเซลล์บุผิว (epidermal cells) เป็นชนิด stratified squamous epithelium ด้านบนสุดของชั้นเซลล์เป็นเคอราทิน

เนื้อเยื่อมะเร็ง (ภาพที่ 3.2) มีลักษณะเซลล์ที่แตกต่างไปจากเนื้อเยื่อปกติอย่างชัดเจน เนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยระยะ CIS เซลล์บุผิวไม่มีการเรียงตัวเป็นชั้นดังเช่นในเนื้อเยื่อปกติ เซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสย้อมติดสีเข้มขึ้น และมีขนาดใหญ่กว่าปกติ เซลล์มะเร็งยังคงอยู่ในบริเวณเยื่อบุผิว ไม่มีการเคลื่อนตัวลงสู่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ด้านล่าง (ภาพที่ 3.2A)



ภาพที่ 3.1 เนื้อเยื่อปกติของเยื่อบุผิวภายในช่องปาก (oral mucosa) โดยบริเวณฐานเป็นเซลล์ทรงสูงชั้นเดียว (B) และชั้นบนสุดเป็นเซลล์แบนหลายชั้นเรียงตัวอัดกันแน่น (C) ซึ่งภาพ A เป็นภาพกำลังขยายต่ำ ส่วนภาพ B เป็นภาพกำลังขยาย 2 เท่าของภาพ A ของบริเวณภายในกรอบเส้นประ

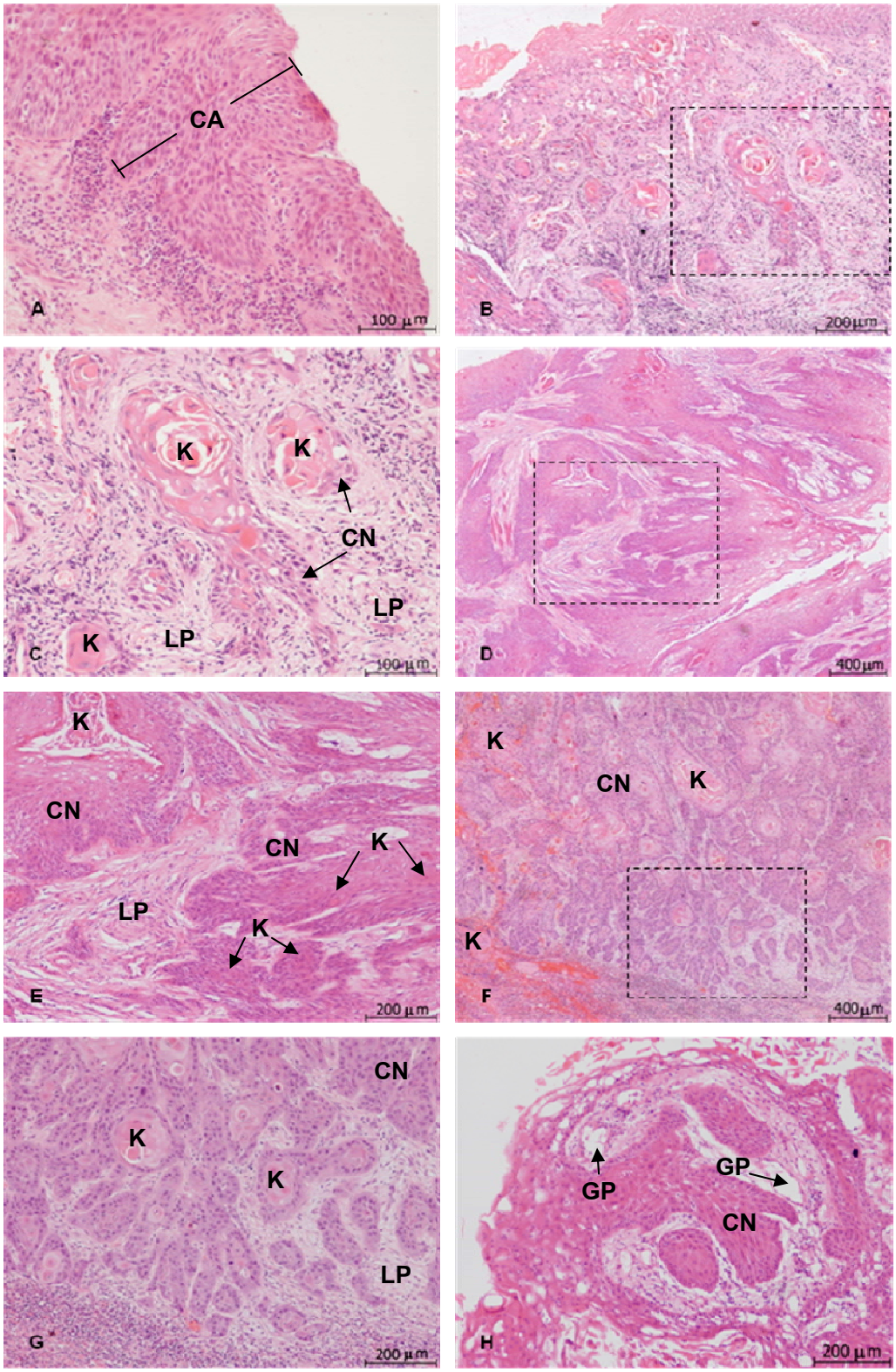
เนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยระยะที่ 1 เซลล์บุผิวที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งมีการเคลื่อนย้ายลงมารวมตัวกันเป็นกลุ่มเซลล์ (cells nest) อยู่ภายในชั้น lamina propria ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ลึกลงไป และมีการสร้างเคอราตินออกมาสะสมอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ ทำให้เห็นเคอราตินเป็นกลุ่มก้อน (ภาพที่ 3.2B และ C)

เนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยระยะที่ 2 พบ cells nest จำนวนเพิ่มขึ้น แทรกตัวลงลึก และกระจายตัวเป็นบริเวณกว้างมากขึ้น เคอราตินที่สะสมมีมากขึ้น และกระจายตัวในบริเวณกว้างมากขึ้น (ภาพที่ 3.2D และ E)

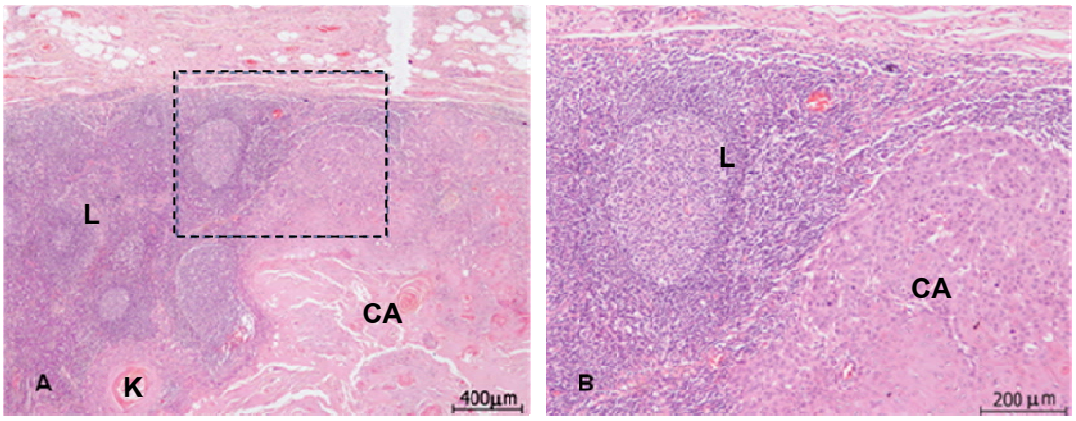
เนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยระยะที่ 3 เซลล์มะเร็งมีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก และพบร่องรอยการเคลื่อนตัวแทรกลงสู่เนื้อเยื่อชั้น lamina propria ได้อย่างชัดเจน การสะสมของเคอราตินเกิดมากขึ้นและกระจายเป็นบริเวณกว้างมากขึ้น (ภาพที่ 3.2F และ G)

เนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยระยะที่ 4 กลุ่มเซลล์มะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการเชื่อมรวมกันของ cell nest และทำลายเนื้อเยื่อชั้น lamina propria ทำให้เซลล์ปกติมีจำนวนลดลงอย่างมาก (ภาพที่ 3.2H) จึงเกิดเป็นช่องว่างอยู่ภายในเนื้อเยื่อ

เนื่องจากในมะเร็งช่องปากระยะท้าย (ระยะที่ 3 และ 4) กลุ่มเซลล์มะเร็งมักมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ ทำให้พบกลุ่มเซลล์มะเร็งอยู่ปะปนกับเซลล์ของต่อมน้ำเหลือง ซึ่งจากภาพที่ 3.3 จะเห็นเซลล์มะเร็งจำนวนมากแทรกตัวอยู่ท่ามกลางเซลล์ของต่อมน้ำเหลือง และมีการสร้างเคอราตินสะสมอยู่ภายในกลุ่มเซลล์มะเร็ง



ภาพที่ 3.2 เนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากของผู้ป่วยระยะ CIS (A, OR841) ระยะที่ 1 (B และ C, OR915) ระยะที่ 2 (D และ E, OR713) ระยะที่ 3 (F และ G, OR872) และระยะที่ 4 (H, OR618) ซึ่งผ่านการตัดเป็นแผ่นบาง และย้อมด้วยสี H&E (CA=cancer cell, LP=lamina propria, K=keratin, CN=cell nest และ GP=Gap) และกรอบสี่เหลี่ยม = บริเวณที่มีการขยายภาพ



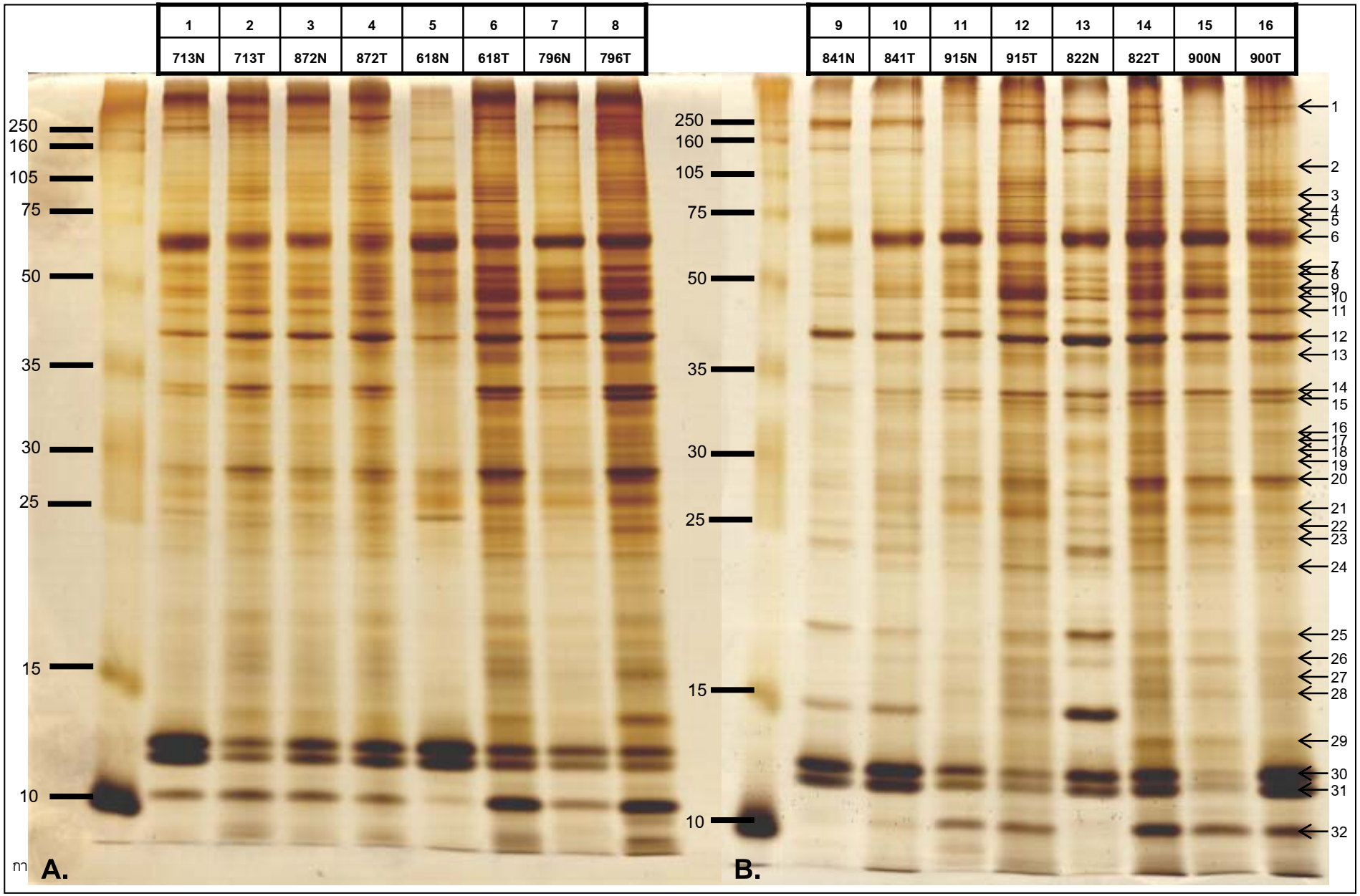
ภาพที่ 3.3 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ (cervical lymph node) ของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะท้าย (OR900) ซึ่งเซลล์มะเร็ง (CA) เคลื่อนย้ายเข้าไปปะปนกับเซลล์ของต่อมน้ำเหลือง (L) โดยภาพ A เป็นภาพกำลังขยายต่ำ และภาพ B เป็นภาพกำลังขยาย 2 เท่าของบริเวณภายในกรอบเส้นประของภาพ A

3.3. การแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากศึกษาด้วย 1D SDS-PSGE

โปรตีนสกัดจากเนื้อเยื่อช่องปากปกติ มะเร็งระยะต้น มะเร็งระยะท้าย และมะเร็งที่เกิดซ้ำหลังการรักษาด้วยการฉายรังสี ผลปรากฏว่าความเข้มของแถบโปรตีนของเนื้อเยื่อมะเร็งแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติอย่างเห็นได้ชัด เมื่อคัดเลือกแถบโปรตีน จำนวน 32 แถบที่แสดงออกในผู้ป่วยทุกคนไปวิเคราะห์ความเข้มพบว่า (ตารางที่ 3.2 และ 3.3) แถบโปรตีนส่วนใหญ่ของเนื้อเยื่อมะเร็งมีความเข้มมากกว่าของเนื้อเยื่อปกติ แต่ก็มีแถบโปรตีนบางส่วนที่มีความเข้มลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็ง การเปรียบเทียบความเข้มภายในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ หรือเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยกันเองพบว่า ในกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งความเข้มของแถบโปรตีนมีทั้งเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเป็นมะเร็งในระยะท้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติความเข้มของแถบโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น แม้ว่าส่วนใหญ่จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติก็ตาม ซึ่งสันนิษฐานว่าเนื้อเยื่อปกติของคนที่เป็นมะเร็งเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์แม้ว่าลักษณะเซลล์ที่เห็นจากภายนอกจะยังดูปกติก็ตาม

ความเข้มของแถบโปรตีนในภาพรวมของมะเร็งที่เกิดซ้ำมีความคล้ายคลึงกับของเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดขึ้นก่อนการรักษาด้วยรังสี (primary tumor) แถบโปรตีนทุกแถบมีพบใน primary tumor จะปรากฏในเนื้องอกที่เกิดซ้ำ และมีความเข้มมากขึ้น (ดังตารางที่ 3.3) ซึ่งน่าจะบ่งบอกว่าเนื้องอกที่เกิดซ้ำหลังการรักษาด้วยการฉายรังสี มีแนวโน้มที่จะรุนแรงและต้านทานต่อการรักษามากขึ้น

ภาพที่ 3.4 (หน้าที่ 14) ภาพ 1D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติของเยื่อบุผิวช่องปาก (A) และลิ้น (B) ในผู้ป่วยมะเร็งระยะ CIS (841) ระยะต้น (712, 822, 915) ระยะท้าย (618, 872, 900) และ มะเร็งที่เกิดซ้ำ(796) แถบโปรตีนจำนวน 32 แถบที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ความเข้มชี้แสดงด้วยศรชี้


1 713N
2 713T
3 872N
4 872T
5 618N
6 618T
7 796N
8 796T
9 841N
10 841T
11 915N
12 915T
13 822N
14 822T
15 900N
16 900T
250
160
105
75
50
35
30
25
15
10
A.
B.
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

ตารางที่ 3.2 ความเข้มของแถบโปรตีนจำนวน 32 แถบแยกด้วย 1D SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งระยะต่างๆ

CIS ← → Early stage tumor ← → Late stage tumor ← → Recurrent tumor

Lane		Intensity of protein band															
		9	10	11	12	13	14	1	2	15	16	5	6	3	4	7	8
Protein band	MW (kDa)	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor
		OR 841	OR 841	OR 915	OR 915	OR 822	OR 822	OR 713	OR 713	OR 900	OR 900	OR 618	OR 618	OR 872	OR 872	OR796	OR796
1	315.11	94.26	103.45	62.21	422.88	145.59	828.00	29.59	764.13	58.12	313.54	33.44	709.28	156.94	747.88	31.16	500.83
2	113.39	50.80	55.43	61.71	146.79	87.86	261.66	41.74	198.08	149.28	213.15	52.79	295.09	124.52	185.96	76.32	218.32
3	89.03	2.41	33.20	74.67	208.04	49.61	268.55	48.21	260.85	185.68	170.71	36.06	810.29	94.94	251.51	25.57	146.12
4	77.13	7.50	185.49	215.52	173.76	237.13	123.30	52.71	83.69	219.68	166.68	44.70	260.13	36.06	85.18	92.80	230.30
5	72.73	8.56	17.51	94.25	824.63	1.82	685.68	41.81	141.10	318.60	330.73	50.93	630.14	63.79	295.64	89.82	181.40
6	65.77	1,516.31	8,875.89	11,117.02	3,176.05	10,121.06	7,248.45	10,186.01	3,441.72	12,217.08	6,870.96	10,867.83	7,060.53	4,558.16	1,143.08	12,027.86	13,059.76
7	54.78	70.72	73.78	103.97	267.05	204.09	415.20	76.76	254.25	218.27	347.90	5.46	979.62	63.95	122.28	171.35	1,228.05
8	50.68	29.17	74.35	56.94	177.05	587.63	403.57	31.19	124.11	181.40	184.40	6.81	366.78	73.75	346.62	91.90	1,456.28
9	48.05	45.95	156.81	77.65	463.01	119.54	387.67	306.38	80.36	226.60	40.72	206.60	274.85	117.24	113.86	393.89	533.81
10	46.78	137.09	188.48	173.77	705.73	544.02	804.86	85.97	203.27	285.68	94.39	324.53	725.17	287.18	449.95	379.24	752.98
11	44.13	10.59	31.11	148.48	526.50	9.82	1,007.22	173.26	896.16	354.65	430.44	28.12	1,518.94	392.71	880.47	394.02	2,641.14
12	39.60	4,048.07	2,835.31	3,987.87	4,281.15	8,796.69	4,411.62	1,069.38	3,289.74	3,714.56	3,392.64	345.24	3,983.22	3,722.69	4,400.40	1,649.71	7,420.69
13	36.47	132.32	234.86	396.20	731.66	558.99	1,589.54	9.52	156.13	451.15	675.99	234.60	1,499.06	39.50	240.34	180.56	2,738.63
14	33.15	329.81	850.56	534.06	3,173.78	2,168.16	2,455.49	241.58	2,186.11	2,736.91	2,861.88	8.43	3,864.33	359.48	1,494.23	384.19	4,585.15
15	32.68	10.83	114.45	413.59	614.32	49.00	1,751.17	328.37	424.36	391.81	1,358.02	4.70	1,259.46	247.73	410.54	220.75	4,483.16
16	31.09	2.99	175.84	42.64	249.67	1.80	357.16	41.67	84.75	164.63	189.06	7.56	111.97	63.59	83.31	47.10	209.80

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

		CIS		Early stage tumor						Late stage tumor						Recurrent tumor	
		Intensity of protein band															
Lane		9	10	11	12	13	14	1	2	15	16	5	6	3	4	7	8
Protein band	MW (kDa)	Normal OR 841	Tumor OR 841	Normal OR 915	Tumor OR 915	Normal OR 822	Tumor OR 822	Normal OR 713	Tumor OR 713	Normal OR 900	Tumor OR 900	Normal OR 618	Tumor OR 618	Normal OR 872	Tumor OR 872	Normal OR796	Tumor OR796
17	30.66	5.12	98.46	89.31	104.41	156.97	241.35	15.76	20.91	12.36	157.81	9.18	109.95	18.51	51.61	4.01	105.81
18	30.09	7.42	124.14	51.89	328.06	80.15	509.30	19.02	60.92	192.94	118.12	7.00	174.98	31.85	86.43	40.96	514.13
19	29.28	13.35	63.90	39.01	115.07	51.97	283.37	9.10	27.69	92.42	84.00	2.67	39.35	14.01	4.28	13.86	311.41
20	28.08	60.98	21.63	303.36	959.95	128.02	2,010.29	369.98	2,441.92	2,190.38	2,685.09	466.05	3,293.37	692.69	1,391.31	279.29	2,396.23
21	26.70	15.85	133.33	295.63	1,215.76	279.67	565.53	69.11	100.59	828.97	265.40	78.78	1,240.86	56.25	79.84	142.96	1,081.52
22	24.76	157.74	263.73	109.66	20.05	315.04	226.88	599.54	199.27	212.54	254.14	1,673.45	155.92	197.29	187.17	65.66	343.93
23	24.10	5.42	8.92	201.69	222.78	8.59	654.70	83.93	229.26	686.84	445.71	13.89	338.77	53.46	78.38	13.25	822.50
24	22.98	22.45	233.11	205.73	1,825.33	158.31	688.57	25.99	70.98	297.43	313.92	11.49	680.46	35.63	188.37	28.03	335.61
25	19.89	1,754.90	834.28	89.19	1,078.04	4,682.26	1,030.92	81.56	503.25	463.08	634.59	4.37	905.57	219.44	585.98	107.94	844.00
26	16.97	26.85	195.63	298.57	901.56	1,146.42	1,211.04	46.38	134.47	1,157.24	419.94	12.86	294.11	65.08	106.77	54.62	203.72
27	16.08	4.49	69.73	3.96	360.32	12.27	527.67	96.08	239.07	64.70	228.50	9.96	355.78	30.42	229.72	41.42	119.62
28	15.24	5.55	78.97	658.76	379.60	11.33	1,263.00	98.68	558.35	752.77	607.19	21.70	406.19	147.41	200.65	80.58	1,221.55
29	13.93	6.81	37.65	40.84	74.01	1.68	936.71	46.13	657.25	709.65	148.89	30.09	730.99	218.05	218.60	54.59	3,377.96
30	12.17	9,757.62	18,173.78	7,316.72	2,526.29	9,358.54	10,407.56	16,026.78	3,162.62	954.16	20,876.30	14,603.10	5,586.45	7,463.03	9,798.76	4,661.30	5,697.31
31	11.59	8,417.50	15,706.55	4,708.32	2,281.08	8,621.28	9,145.58	14,611.59	4,050.20	1,682.92	17,807.08	13,692.64	4,405.13	6,353.80	9,155.70	3,984.43	4,704.93
32	10.10	168.44	590.22	5,422.73	5,250.73	126.81	15,764.75	4,743.23	6,828.26	9,136.99	5,266.88	500.03	20,862.79	4,560.39	3,241.69	2,577.48	22,327.44

ตารางที่ 3.3 สรุปจำนวนโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเป็นมะเร็งระยะต่างๆ ศึกษาด้วย 1D SDS-PAGE

Comparison	Stage of cancer	Change of intensity		Statistical significance only			
		Increase	Decrease	Increase	Decrease	Notes	Protein bands
Normal Vs. Tumor	CIS	30	2	16	0	> 3 or < 3 folds	**3, 4, 6, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 24, 26, 27, 28, 29, 32**
	Early	24	8	7	1	< 0.05, paired t-test	**1, 2, 3, 7, 11, 20, 27,** 6
	Late	28	4	3	1	< 0.05, paired t-test	**1, 17, 27,** 6
	Recurrent	32	0	23	0	> 3 or < 3 folds	**1, 3, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,25, 28, 29**
Early Vs. Late	Normal	17	15	0	0	< 0.05, t-test	No list
Early Vs. Late	Tumor	14	18	0	0	< 0.05, t-test	No list

หมายเหตุ

1. **ตัวอักษรหนา** หมายถึง แถบโปรตีนที่ความเข้มเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจากคู่ตัวแปรที่เปรียบเทียบกัน
2. ตัวอักษรขีดเส้นใต้ หมายถึง แถบโปรตีนที่ความเข้มเปลี่ยนแปลงลดลงจากคู่ตัวแปรที่เปรียบเทียบกัน

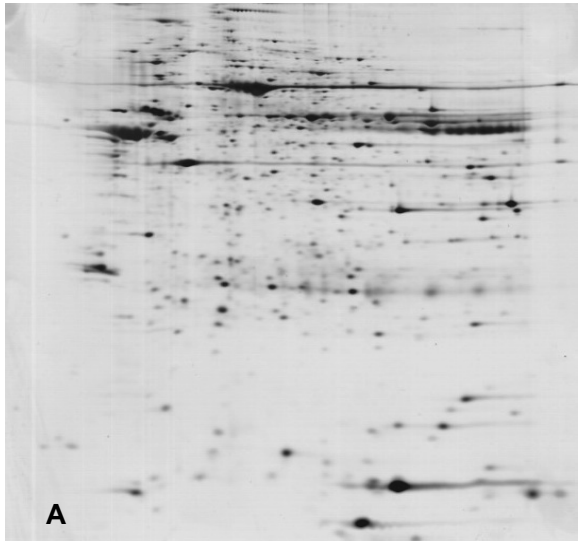
3.4. การแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งช่องปากศึกษาด้วย 2D SDS-PAGE

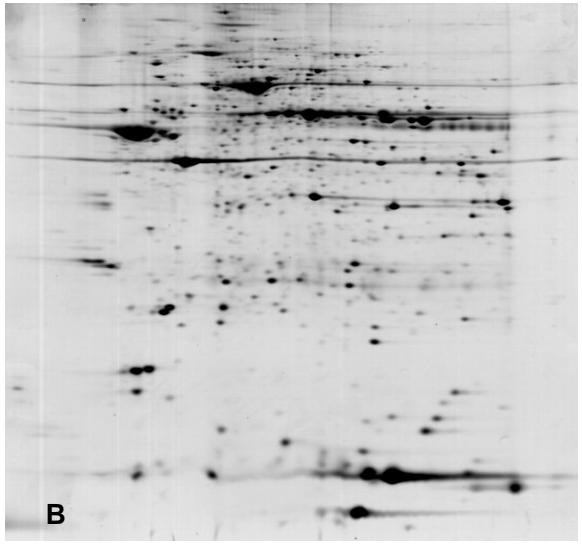
การศึกษานี้ทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มของจุดโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ระหว่างเนื้อเยื่อปกติ และมะเร็งของผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งมีตัวอย่างจากผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น (early stage tumor) จำนวน 5 ราย ระยะท้าย (late stage tumor) 5 ราย ระยะก่อนลุกลาม (CIS) 1 ราย และมะเร็งที่เกิดซ้ำ (recurrent tumor) 1 ราย รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 27 ตัวอย่าง

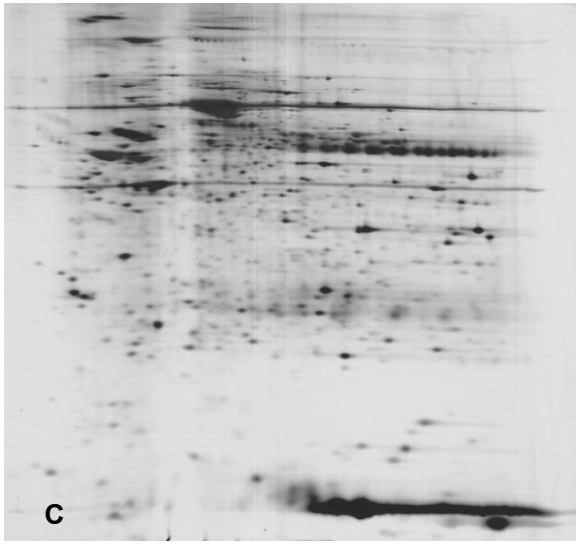
เมื่อเปรียบเทียบภาพจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติ ระหว่างผู้ป่วยมะเร็งระยะต่าง ๆ พบว่า ในมะเร็งระยะต้น (ภาพที่ 3.5A - C) จำนวนจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะของมะเร็งที่เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ขนาดของจุดโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ส่วนมะเร็งระยะท้าย (ภาพที่ 3.5D - E) จำนวนและขนาดของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ตามระยะของมะเร็งที่เพิ่มมากขึ้น

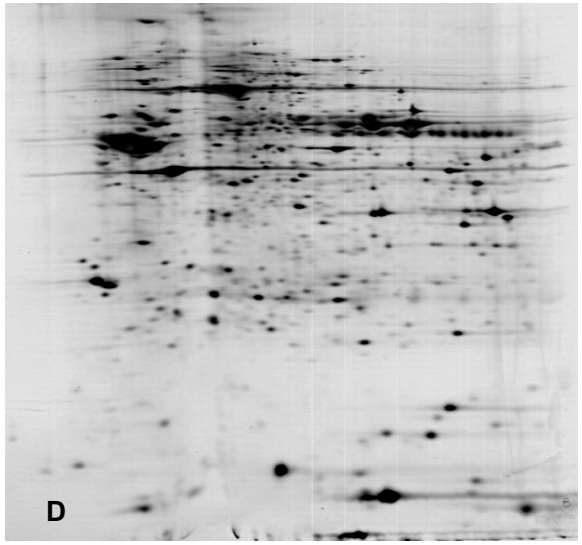
การเปรียบเทียบภาพจุดโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ ด้วยกันเอง พบว่า ในมะเร็งระยะต้น (ภาพที่ 3.6A - C) จำนวนจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะของมะเร็งที่เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ขนาดของจุดโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ส่วนมะเร็งระยะท้าย (ภาพที่ 3.6D - E) จำนวนและขนาดของจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นจากระยะต้นอย่างเห็นได้ชัด

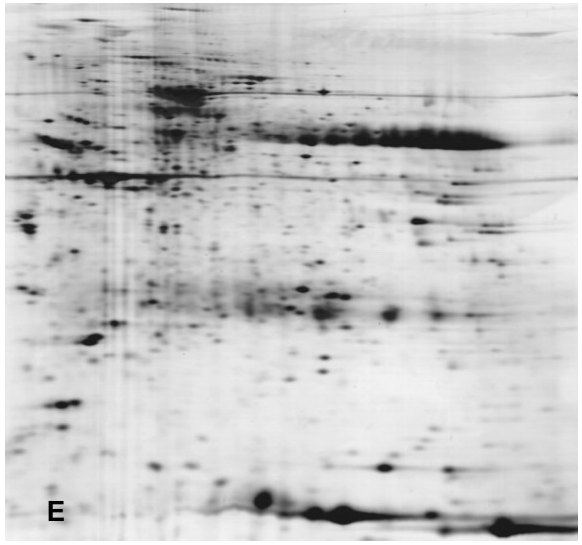
จากการเปรียบเทียบภาพจุดโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็ง พบว่า จำนวนและขนาดของจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งทุกระยะ (ภาพที่ 3.7 – 3.11) โดยมะเร็งระยะต้น (ภาพที่ 3.7 – 3.9) สามารถสังเกตความแตกต่างทั้งจำนวนและขนาดของจุดโปรตีนได้อย่างชัดเจน แต่ในมะเร็งระยะท้าย (ภาพที่ 3.10 – 3.11) ความแตกต่างของทั้งจำนวนและขนาดของจุดโปรตีนสังเกตได้ยาก เนื่องจากเนื้อเยื่อปกติมีการเปลี่ยนแปลงจุดโปรตีนไปคล้ายกับเนื้อเยื่อมะเร็งมากขึ้น



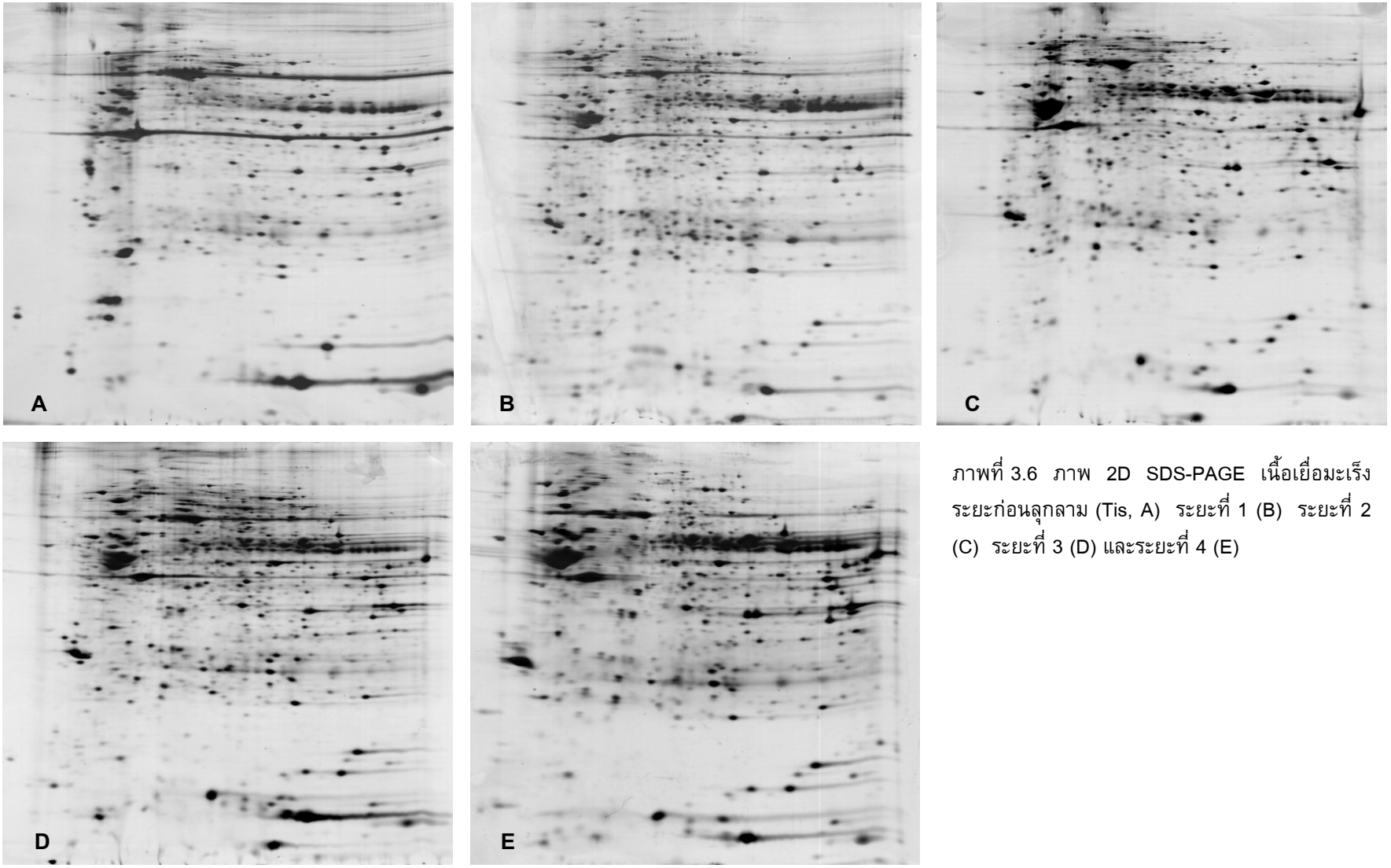




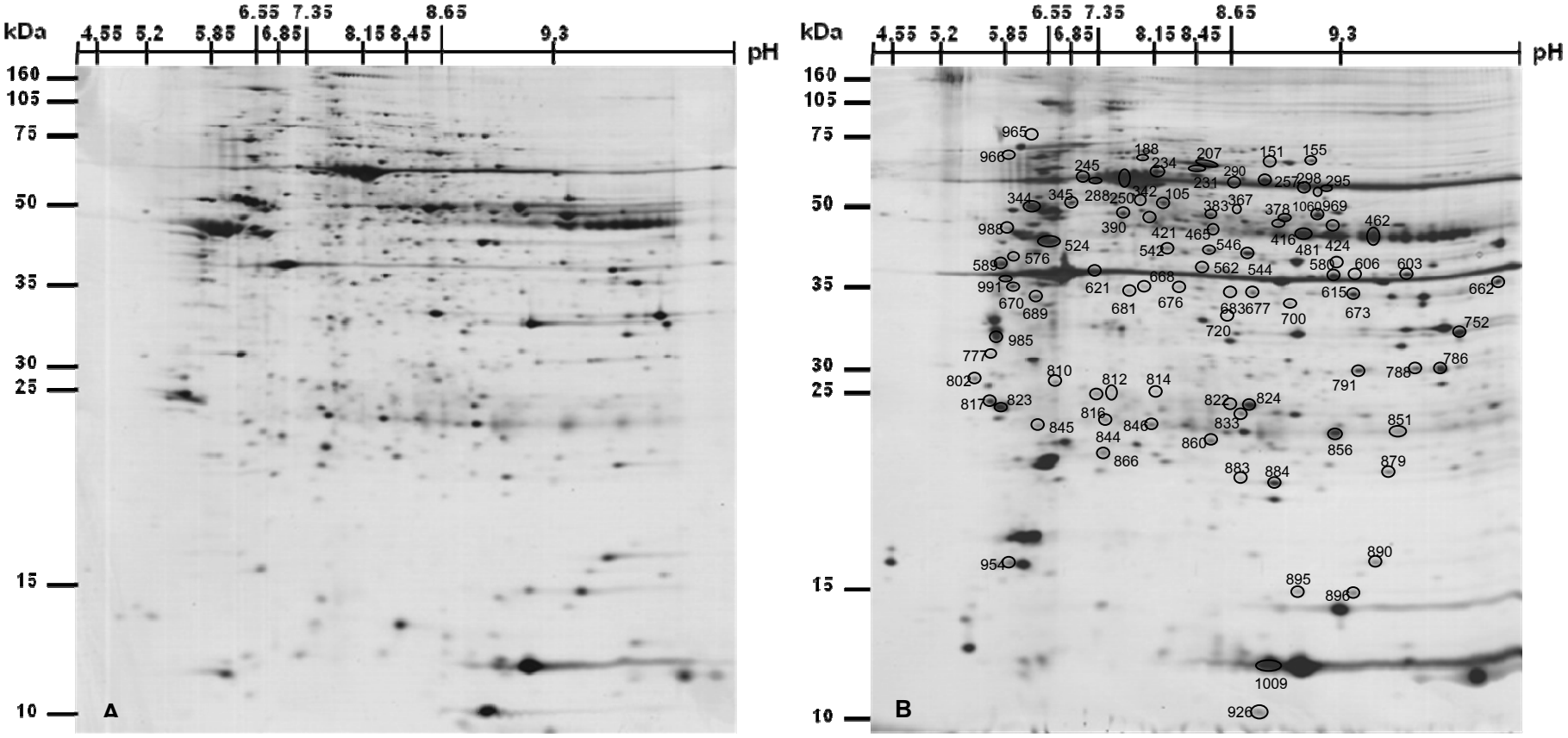




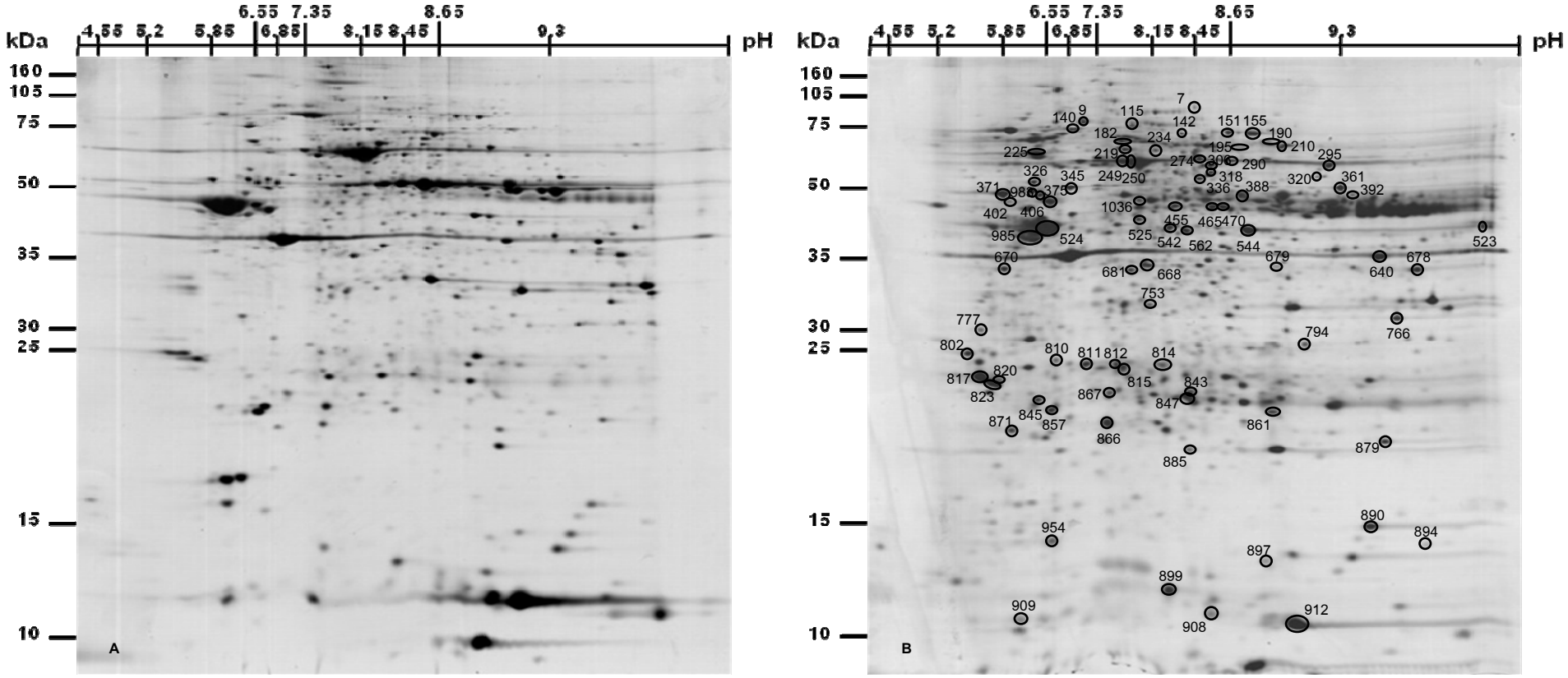
ภาพที่ 3.5 ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (Tis, A) ระยะที่ 1 (B) ระยะที่ 2 (C) ระยะที่ 3 (D) และระยะที่ 4 (E)



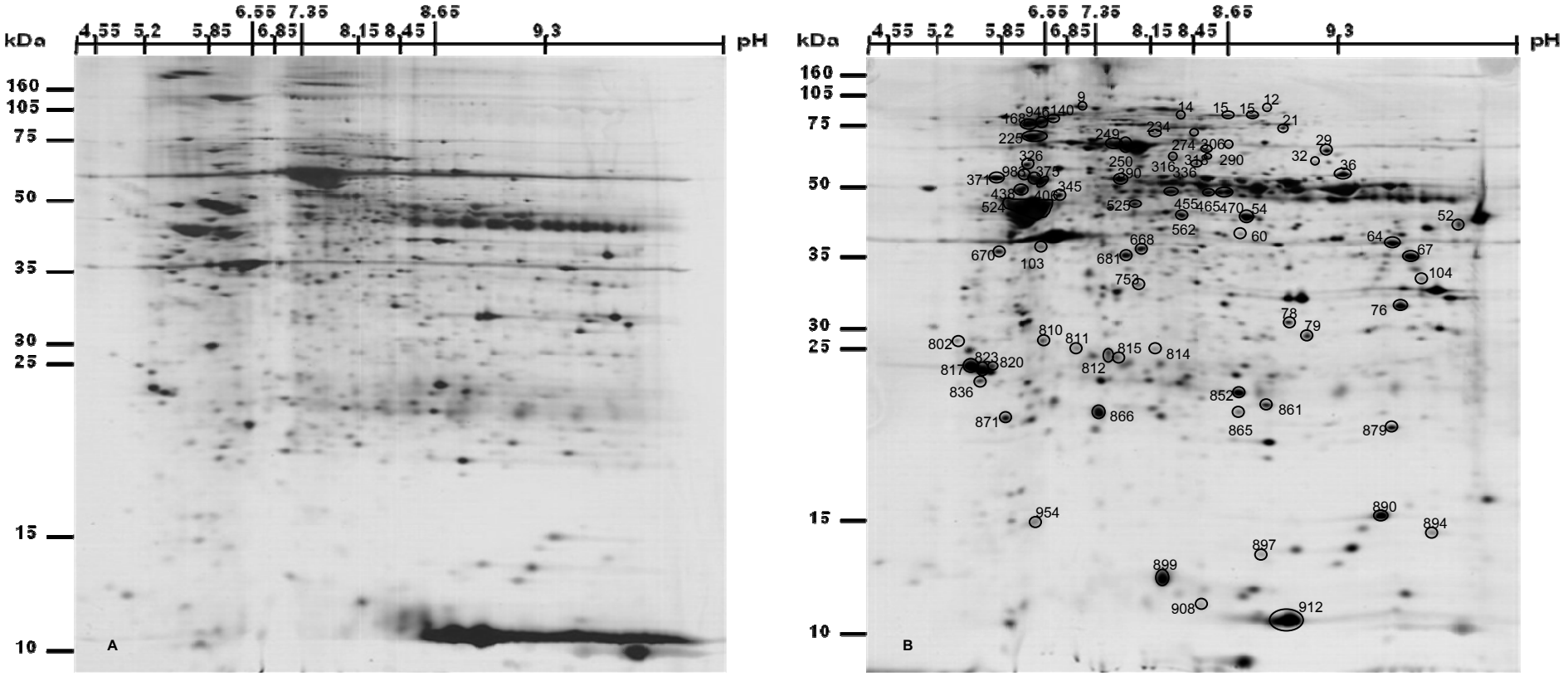
ภาพที่ 3.6 ภาพ 2D SDS-PAGE เนื้อเยื่อมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (Tis, A) ระยะที่ 1 (B) ระยะที่ 2 (C) ระยะที่ 3 (D) และระยะที่ 4 (E)



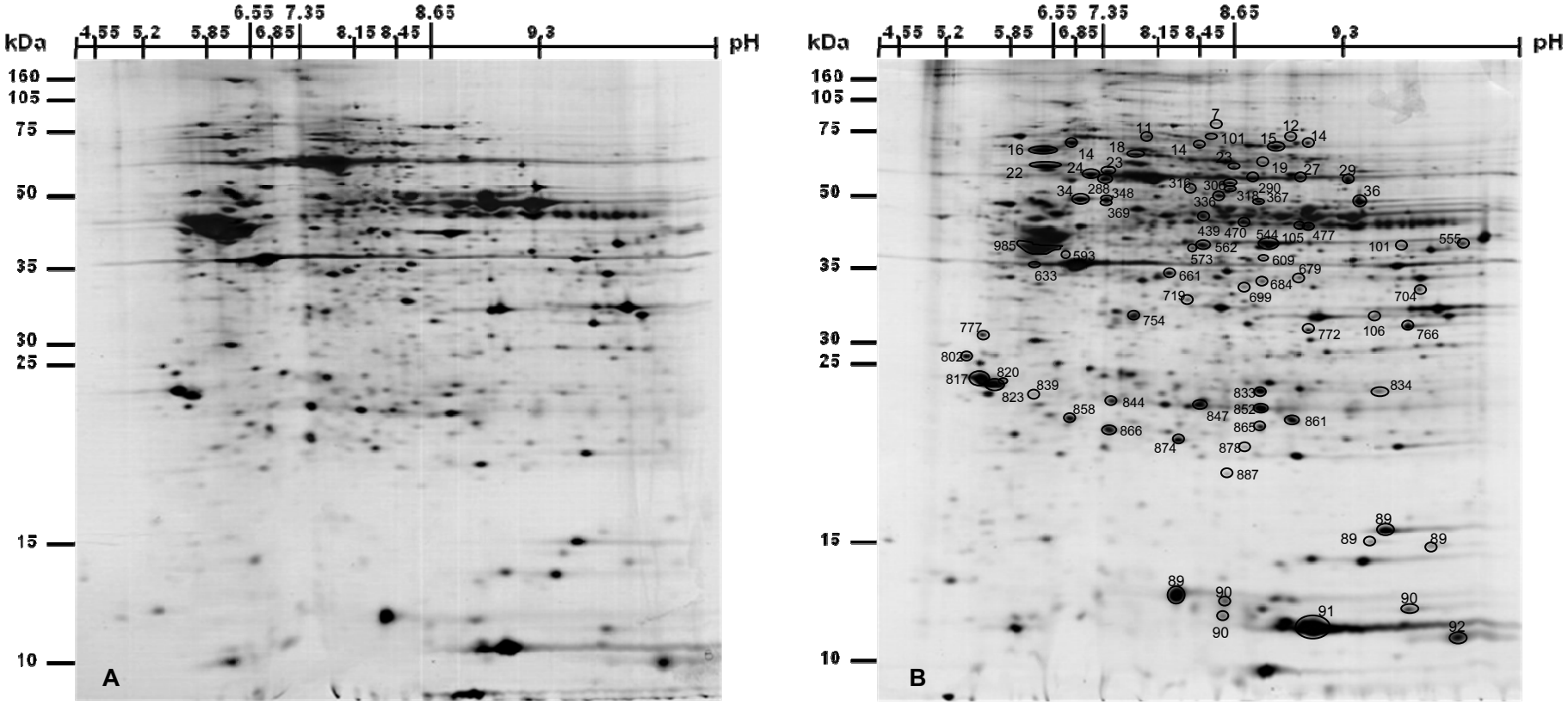
ภาพที่ 3.7 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (B) ของผู้ป่วยมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (OR841) วงกลมระบุตำแหน่งโปรตีนจากเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ (มากกว่า 2 เท่า) ด้านข้างระบุน้ำหนักโมเลกุล และด้านบนระบุค่า pH



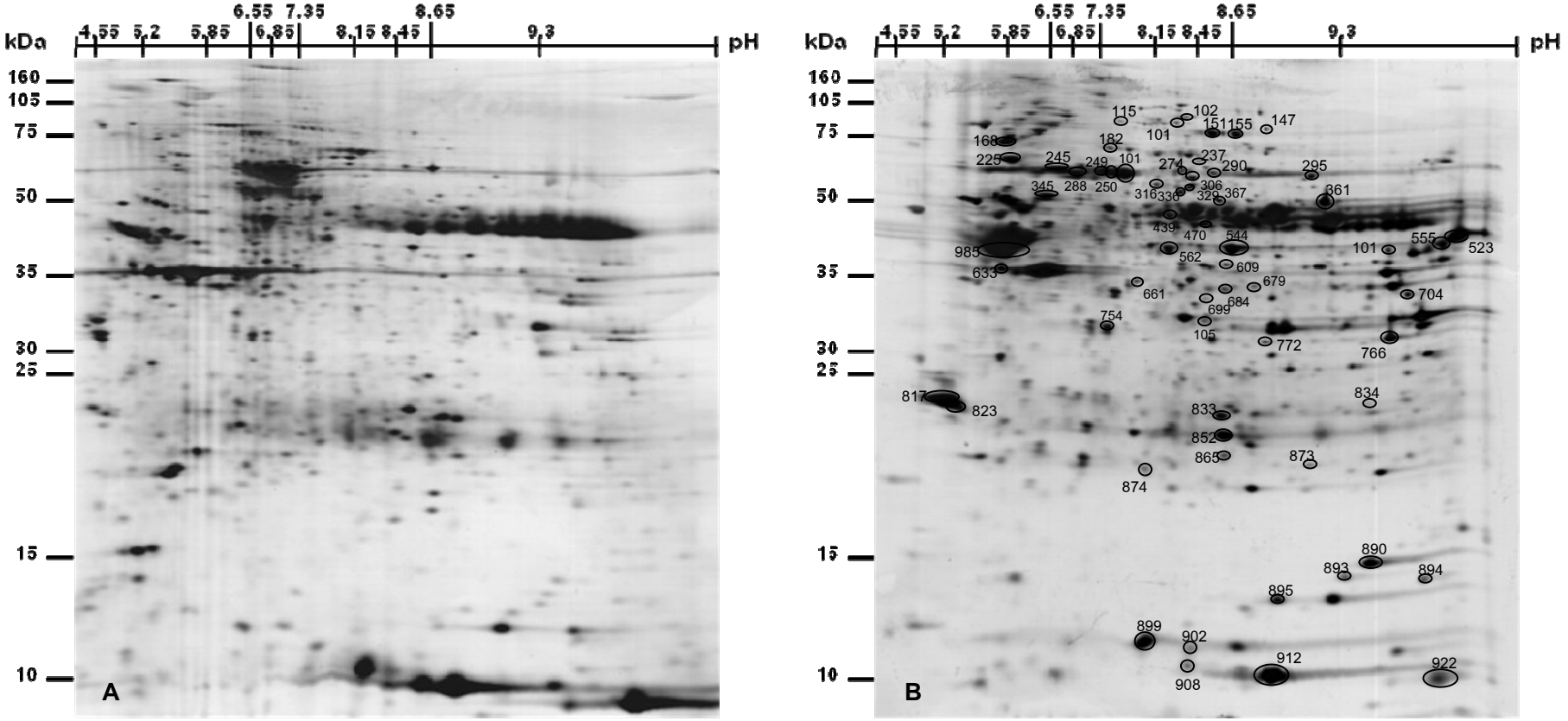
ภาพที่ 3.8 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (B) ของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 1 (OR915) วงกลมระบุตำแหน่งโปรตีนจากเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ ด้านข้างของเจลแสดงน้ำหนักโมเลกุลและด้านบนแสดงค่า pH



ภาพที่ 3.9 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (B) ของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 2 (OR713) วงกลมระบุตำแหน่งโปรตีนจากเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ ด้านข้างแสดงน้ำหนักโมเลกุล และด้านบนแสดงค่า pH



ภาพที่ 3.10 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (B) ของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 3 (OR872) วงกลมระบุตำแหน่งโปรตีนจากเนื้อเยื่อมะเร็งมีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ ด้านข้างแสดงน้ำหนักโมเลกุล และด้านบนแสดงค่า pH



ภาพที่ 3.11 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อปกติ (A) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (B) ของผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 4 (OR618) วงกลมระบุตำแหน่งโปรตีนจากเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ ด้านข้างแสดงน้ำหนักโมเลกุล และด้านบนแสดงค่า pH

3.5. การวัดความเข้มของจุดโปรตีน และการวิเคราะห์ด้วยสถิติ

การวัดความเข้มของจุดโปรตีนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ บนแผ่นเจล ทำโดยใช้โปรแกรม Imagemaster 2D platinum software ค่าความเข้มของจุดโปรตีนจำนวน 488 จุดในแต่ละภาพเจล เป็นค่าที่ประมวลจากเปอร์เซ็นต์ปริมาตร (%volume) ของจุดโปรตีน ที่ผ่านการ normalization เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากค่าความเข้มของพื้นหลังของภาพเจล

การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของความเข้มของจุดโปรตีนจากเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็ง คำนวณโดยใช้ทั้งสถิติ parametric และ non-parametric

ใช้ paired t-testในการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะเดียวกัน คือ ระยะต้น (NE กับ TE) และระยะท้าย (NL กับ TL) เพื่อค้นหาจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีความเข้มแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติ ใช้ t-test ในการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติ ของมะเร็งระยะต้น (NE) กับระยะท้าย (NL) เพื่อค้นหาจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งระยะท้ายที่มีความเข้มแตกต่างจากระยะต้น เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็ง ของมะเร็งระยะต้น (TE) กับระยะท้าย (TL) เพื่อค้นหาจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งของมะเร็งระยะท้ายที่มีความเข้มแตกต่างจากระยะต้น และเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งระยะต้น (NE) กับเนื้อเยื่อมะเร็งของมะเร็งระยะท้าย (TL) เพื่อค้นหาจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายที่มีความเข้มแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งระยะต้น เนื่องจากคาดว่าเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้นมีลักษณะการแสดงออกของโปรตีนใกล้เคียงกับคนปกติมากที่สุด และใช้วิธี Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test ในการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับมะเร็ง ทั้งมะเร็งระยะต้นและระยะท้าย (NE NL TE และ TL) เพื่อยืนยันผลการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งที่วิเคราะห์ด้วย t-test

ผลการวิเคราะห์พบจุดโปรตีนจำนวน 245 จุด จาก 2013 จุด มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง NE กับ TE พบเพิ่มขึ้น 121 จุด และลดลง 11 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง NL กับ TL พบเพิ่มขึ้น 77 จุด และลดลง 6 จุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง NE กับ NL พบเพิ่มขึ้น 26 จุด และลดลง 2 จุด ในจำนวนนี้มีโปรตีนจำนวน 14 จุด พบเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งระยะท้ายเท่านั้น และเป็นมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง TE กับ TL พบเพิ่มขึ้น 26 จุด และลดลง 13 จุด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง NE กับ TL พบเพิ่มขึ้น 145 จุด และลดลง 8 จุด (ตารางที่ 3.4 และ 3.5)

ตารางที่ 3.4 สรุปจำนวนจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งช่องปากระยะต่าง ๆ

คู่เปรียบเทียบ	จำนวนจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างทางสถิติ		สถิติทดสอบ	จุดโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง	หมายเหตุ
	เพิ่มขึ้น	ลดลง			
1. NE : TE	121	11	Paired t-test และ Mann-Whitney U test	**เพิ่มขึ้น**: 96, 123, 140, 142, 151, 155, 168, 190, 210, 219, 225, 233, 274, 290, 295, 306, 316, 318, 320, 326, 329, 336, 345, 348, 361, 371, 388, 392, 402, 406, 416, 438, 453, 455, 465, 470, 523, 524, 525, 542, 544, 58, 562, 573, 595, 609, 633, 640, 668, 670, 677, 678, 679, 681, 712, 721, 753, 757, 758, 766, 768, 777, 781, 794, 799, 802, 807, 810, 811, 812, 814, 815, 817, 820, 823, 834, 836, 843, 845, 847, 848, 852, 857, 861, 863, 865, 866, 867, 871, 879, 885, 890, 94, 897, 899, 908, 909, 946, 954, 985, 986, 1001, 1005, 1015, 1030, 1036, 1038, 1043, 1048, 106, 1064, 1077, 1119, 1128, 1179, 1180, 1198, 1264, 1279, 1370, 1383 **ลดลง**: 249, 250, 253, 375, 873, 912, 985, 1009, 1087, 1097, 1155	
2. NL : TL	77	6	Paired t-test และ Mann-Whitney U test	**เพิ่มขึ้น**: 77, 102, 115, 123, 140, 142, 147, 155, 182, 195, 235, 237, 245, 274, 275, 288, 290, 295, 306, 316, 318, 324, 329, 336, 343, 345, 348, 361, 67, 369, 439, 443, 470, 544, 555, 562, 573, 609, 661, 679, 684, 699, 712, 719, 754, 766, 772, 777, 820, 833, 834, 847, 852, 865, 874, 878, 890, 893, 894, 902, 905, 908, 959, 985, 1015, 1018, 1025, 1058, 1062, 1067, 1197, 1216, 1302, 1308 **ลดลง**: 477, 633, 704, 858, 1052, 1411	

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

คู่เปรียบเทียบ	จำนวนจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างทางสถิติ		สถิติทดสอบ	จุดโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง	หมายเหตุ
	เพิ่มขึ้น	ลดลง			
3. NE : NL	26	2	t-test และ Mann-Whitney U test	**เพิ่มขึ้น**: 140, 345, 402, 486, 523, 679, 781, 815, 845, 848, 857, 861, 899, 906, 909, 954, 979, 1036, 1038, 1092 1093, 1095, 1115, 1118, 1144, 1216 **ลดลง**: 249, 873	มีโปรตีน 14 จุดพบเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งระยะท้าย
4. TE : TL	26	13	t-test และ Mann-Whitney U test	**เพิ่มขึ้น**: 102, 207, 242, 257, 275, 329, 330, 343, 398, 406, 606, 684, 861, 959, 983, 999, 1012, 1013, 1025, 1058, 1072, 1192, 1203, 1207, 1302, 1308 **ลดลง**: 320, 633, 668, 676, 682, 732, 857, 871, 1030, 1128, 1162, 1326, 1383	
5. NE : TL	145	8	t-test และ Mann-Whitney U test	**เพิ่มขึ้น**: 77, 120, 123, 140, 142, 147, 151, 155, 168, 182, 195, 200, 202, 225, 233, 234, 235, 237, 242, 245, 252, 274, 275, 288, 290, 295, 306, 316, 318, 324, 326, 329, 330, 336, 340, 343, 345, 348, 361, 365, 367, 369, 371, 372, 390, 392, 402, 406, 416, 438, 439, 453, 455, 465, 470, 486, 523, 542, 544, 555, 562, 573, 580, 595, 605, 609, 640, 646, 654, 670, 671, 677, 678, 679, 681, 688, 694, 712, 720, 752, 766, 777, 781, 794, 799, 800, 801, 802, 804, 810, 811, 813, 815, 817, 820, 823, 832, 834, 836, 843, 844, 847, 848, 852, 861, 863, 865, 866, 871, 878, 885, 887, 890, 893, 894, 897, 899, 908, 946, 954, 962, 965, 985, 1002, 1013, 1015, 1018, 1025, 1038, 1058, 1062, 1066, 1067, 1091, 1180, 1187, 1194, 1197, 1203, 1210, 1226, 1302, 1308 **ลดลง**: 249, 250, 873, 912, 922, 988, 1010, 1097	

ตารางที่ 3.5 ความเข้มของจุดโปรตีน จำนวน 245 จุดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งช่องปากระยะต่าง ๆ

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
1	77	0	0.4590	0	4.1621	0.1870	**0.0499**	-	0.0656	**0.0499**
2	96	2.3174	10.4386	3.2833	12.5330	**0.0395**	0.0789	0.3020	0.3618	0.0507
3	102	1.1800	0.2176	0	3.3776	0.2425	**0.0302 / 0.019**	0.1870	**0.0357 / 0.034**	0.1233
4	115	1.9346	6.5257	2.9589	5.1059	0.0601	**0.0493**	0.3403	0.3090	0.1242
5	120	1.0674	2.1348	5.3328	7.0033	0.2550	0.2423	0.0585	0.0554	**0.0284**
6	123	0	2.5439	0	2.0939	**0.0367**	**0.0406**	-	0.3772	**0.0406**
7	140	4.1830	23.1206	17.4575	37.0170	**0.0154 / 0.009**	**0.0457**	**0.0430**	0.0901	**0.0055 / 0.009**
8	142	2.5813	7.5584	2.4844	9.8052	**0.0239**	**0.0253**	0.4836	0.2499	**0.0283**
9	147	0.8322	2.6600	0.5724	4.3114	0.0803	**0.0200**	0.3722	0.1801	**0.0216**
10	151	6.0431	17.2367	11.4356	23.4554	**0.0270**	0.0693	0.2067	0.2439	**0.0321**
11	155	8.6180	26.6447	14.0642	39.6982	**0.0181**	**0.0175**	0.2501	0.1049	**0.0012**
12	168	20.1793	57.3865	46.9976	83.1615	**0.0210 / 0.016**	0.1412	0.1484	0.1075	**0.0074 / 0.009**
13	182	3.8878	9.3724	6.8313	12.2150	0.0947	**0.0227**	0.2335	0.2715	**0.0458**
14	190	0.4870	2.4428	0.7659	3.8076	**0.0395**	0.0561	0.3839	0.2494	0.0508
15	195	0.3099	2.3692	0.3595	3.1433	0.0738	**0.0088 / 0.034**	0.4598	0.2840	**0.0056 / 0.019**
16	200	3.2862	8.1746	5.8088	10.2549	0.0689	0.1904	0.2979	0.2230	**0.0440**
17	202	0	1.9741	0.8684	2.2553	0.1317	0.1881	0.0911	0.4415	**0.0486**
18	207	28.4023	16.6757	35.9945	30.7256	0.0663	0.2768	0.2170	**0.0082**	0.3719
19	210	0.6072	11.1490	1.3566	6.0772	**0.0213**	0.1033	0.2461	0.1579	0.0773
20	219	0	11.3167	8.2514	7.7608	**0.0222**	0.4643	0.0737	0.2878	0.0856

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
21	225	16.0858	67.8562	44.7846	72.1254	**0.0058 / 0.009**	0.0598	0.0730	0.3925	**0.0018 / 0.009**
22	233	4.7012	22.2710	19.5178	26.1002	0.0532	0.3477	0.0947	0.3478	**0.0161**
23	234	0.7580	4.9955	1.7458	5.2331	**0.0028 / 0.026**	0.0962	0.1841	0.4501	**0.0282**
24	235	7.0123	15.6165	7.4753	13.6088	0.0597	**0.0043**	0.4159	0.3399	**0.0061**
25	237	1.0012	2.5066	0.2050	3.6751	0.0708	**0.0127**	0.1604	0.2619	**0.0388**
26	242	1.3720	3.3977	4.5113	6.2914	0.1070	0.3049	0.2208	**0.0379**	**0.0111**
27	245	22.5296	69.8420	31.5407	70.9816	0.0584	**0.0379 / 0.028**	0.1817	0.4831	**0.0200 / 0.009**
28	249	188.2986	37.4990	60.3777	49.3665	0.0371 / 0.009	0.3701	0.0446	0.1622	0.0352 / 0.009
29	250	127.0111	54.9848	128.6888	73.9984	0.0136	0.0983	0.4853	0.2193	0.0485
30	252	2.0009	4.1268	3.9899	6.2463	0.1380	0.0844	0.2295	0.1766	**0.0174**
31	253	7.5822	1.4706	6.6660	4.0845	0.0013	0.2161	0.4037	0.1501	0.1031
32	257	30.0624	10.1393	26.5910	25.5509	0.0572	0.4658	0.3942	**0.0410**	0.3656
33	274	2.0881	6.5232	1.4269	7.7838	**0.0315**	**0.0086 / 0.013**	0.4006	0.3478	**0.0350 / 0.024**
34	275	1.9596	0.8434	0	8.3158	0.1870	**0.0085 / 0.019**	0.1870	**0.0101 / 0.034**	**0.092 / 0.034**
35	288	15.6919	31.2900	21.5533	38.9742	0.1661	**0.0175**	0.2849	0.2932	**0.0221**
36	290	0	5.7235	2.1811	8.7517	**0.0329 / 0.019**	**0.0357**	0.1870	0.2010	**0.0133 / 0.019**
37	295	6.6499	21.0469	9.8792	20.2141	**0.0100 / 0.009**	**0.0061 / 0.047**	0.2231	0.4173	**0.0019 / 0.009**
38	306	4.8268	11.7496	8.3040	16.1907	**0.0036 / 0.009**	**0.0265 / 0.009**	0.0918	0.0788	**0.0017 / 0.009**
39	316	1.4139	5.7131	1.5961	6.7997	**0.0121**	**0.0149 / 0.026**	0.4382	0.2877	**0.0077 / 0.008**
40	318	1.9204	8.8711	3.0904	13.5121	**0.0036 / 0.009**	**0.0077 / 0.08**	0.2161	0.0587	**0.0017 / 0.009**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
41	320	0.2658	2.2563	0.9314	0.6975	**0.0127**	0.4260	0.2594	0.0473	0.1989
42	324	1.0019	2.7694	0.4079	5.1806	0.1796	**0.0161 / 0.007**	0.3026	0.0866	**0.0215**
43	326	6.0895	13.2026	13.0378	13.9726	**0.0223**	0.4258	0.0583	0.3977	**0.0102**
44	329	1.4441	6.0328	2.3444	8.7122	**0.0090**	**0.0036**	0.1475	**0.0484**	**0.0001**
45	330	0	0	0.3996	2.2150	-	0.0558	0.1870	**0.0362**	**0.0362**
46	336	1.4712	6.8440	2.5153	11.2803	**0.0295**	**0.0108 / 0.013**	0.2458	0.0788	**0.0032 / 0.008**
47	340	1.2357	2.2431	2.1418	3.0505	0.2142	0.3036	0.3053	0.1989	**0.0445**
48	343	0.8391	1.5360	0.3837	4.4665	0.3188	**0.0155**	0.3202	**0.0376**	**0.0201**
49	345	10.1009	50.4788	27.6015	59.7914	**0.0223 / 0.009**	**0.0068 / 0.028**	**0.0458**	0.2710	**0.0010 / 0.009**
50	348	2.1838	7.8334	2.0864	9.5722	**0.0104 / 0.015**	**0.0052 / 0.016**	0.4773	0.2342	**0.0099 / 0.015**
51	361	6.1320	53.0394	24.5131	71.5157	**0.0072 / 0.008**	**0.0380**	0.1444	0.0588	**0.00001**
52	365	0.4846	4.7443	5.2618	6.8593	0.0787	0.2904	0.0504	0.2250	**0.0027 / 0.008**
53	367	3.0561	6.0171	3.4412	7.9356	0.0740	**0.0321**	0.4372	0.0759	**0.0254**
54	369	1.8427	5.4267	1.7302	8.9274	0.1102	**0.0011 / 0.009**	0.4709	0.0926	**0.0046 / 0.026**
55	371	31.2969	70.8978	57.1348	87.8920	**0.0463**	0.1022	0.1458	0.2149	**0.0169**
56	372	0.7069	3.2672	2.8121	4.8860	0.0891	0.1152	0.1780	0.0936	**0.0013**
57	375	76.7384	20.3297	43.3932	36.3834	0.0350	0.2988	0.1256	0.0675	0.0905
58	388	5.3637	20.5680	9.5184	5.6124	**0.0287**	0.1699	0.1935	0.0796	0.4757
59	390	15.6220	33.8186	42.6146	51.0592	0.1495	0.3078	0.0548	0.1508	**0.0193**
60	392	0.2124	10.0691	0.9143	5.6843	**0.0460 / 0.007**	0.0743	0.1529	0.2058	**0.0372 / 0.034**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
61	398	8.6096	3.4819	20.0908	7.2830	0.1027	0.1899	0.2196	**0.0445**	0.3950
62	402	0	7.3674	4.7348	3.8968	**0.0198**	0.3590	**0.0463**	0.1394	**0.0393**
63	406	17.4042	48.8163	52.1895	91.7663	**0.0109**	0.1371	0.0865	**0.0435 / 0.047**	**0.0055 / 0.009**
64	416	3.7440	13.4687	6.4221	15.4351	**0.0287 / 0.026**	0.1127	0.2556	0.3484	**0.0144 / 0.009**
65	438	11.8219	36.3578	28.6747	50.6062	**0.0021 / 0.028**	0.0916	0.0961	0.0962	**0.0015 / 0.009**
66	439	5.2773	10.3007	7.1642	12.9564	0.1863	**0.0408**	0.2588	0.3014	**0.0160**
67	443	1.0795	3.5780	0.4435	1.4829	0.1937	**0.0451**	0.2331	0.1898	0.3455
68	453	0.8775	4.0521	3.2019	3.5980	**0.0133**	0.4097	0.1621	0.3889	**0.0406**
69	455	4.1317	17.7827	11.5640	17.5822	**0.0015 / 0.009**	0.2331	0.1163	0.4854	**0.0163 / 0.016**
70	465	3.8086	15.9597	5.1183	14.1462	**0.0244**	0.0521	0.3594	0.3692	**0.0115**
71	470	6.0092	22.8499	5.3944	18.2015	**0.0284 / 0.015**	**0.0058 / 0.028**	0.4366	0.2955	**0.0429 / 0.045**
72	477	15.5274	9.8339	32.5561	13.4200	0.3173	0.0278	0.1158	0.2624	0.4259
73	486	1.2539	24.2184	19.3574	39.1827	0.0920	0.2066	**0.0450 / 0.034**	0.2446	**0.0334 / 0.007**
74	523	4.8775	45.2259	20.5418	71.2352	**0.0383**	0.0720	**0.0250**	0.2128	**0.0267**
75	524	96.8047	454.5275	207.2875	183.6791	**0.0407**	0.4288	0.1161	0.1143	0.1279
76	525	0.6011	7.7883	9.0948	8.4199	**0.0377**	0.4648	0.1531	0.4540	0.0632
77	542	4.9813	15.0527	7.2375	23.6524	**0.0078 / 0.016**	0.1302	0.3237	0.2213	0.0677
78	544	53.4780	114.9070	83.0827	156.9558	**0.0034 / 0.028**	**0.0290**	0.1814	0.0644	**0.0019 / 0.009**
79	551	0	2.5999	0.8408	5.2461	0.0562	0.0533	0.1870	0.1503	**0.0287 / .019**
80	552	0	1.3185	0.8533	5.5648	0.1432	0.0544	0.1870	0.0591	**0.0273 / 0.009**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
81	555	0	8.4061	2.4170	23.7993	0.0593	**0.0409 / 0.024**	0.1870	0.0641	**0.0182 / 0.005**
82	558	0.7338	4.1740	2.0695	4.8069	**0.0369**	0.2326	0.2848	0.4253	0.0990
83	562	3.5965	25.4058	8.1956	33.6426	**0.0082 / 0.009**	**0.0107 / 0.009**	0.1530	0.1333	**00004 / 0.009**
84	573	1.2913	5.4226	1.0283	4.4664	**0.0071 / 0.008**	**0.0120**	0.4161	0.1885	**0.0029**
85	580	0	0.7183	0.5108	1.6623	0.1056	0.1185	0.1870	0.1567	**0.0414**
86	593	2.7007	2.6547	2.0404	5.2832	0.4868	**0.0125**	0.4131	0.1349	0.2097
87	595	0.6868	3.4012	1.3274	3.2989	**0.0116 / 0.007**	0.0653	0.2579	0.4459	**0.0027 / 0.007**
88	605	4.6844	8.7916	7.7506	15.8181	0.1854	0.0853	0.1595	0.0745	**0.0146**
89	606	3.1428	1.7187	2.6096	4.1149	0.2866	0.2595	0.4339	**0.0480**	0.3571
90	609	0	3.2382	0.6930	4.4868	**0.0003 / 0.005**	**0.0166 / 0.013**	0.1870	0.0954	**0.0021 / 0.005**
91	633	7.0701	27.6697	28.4783	9.2914	**0.0265**	0.0387	0.0503	0.0116	0.3392
92	640	38.1120	97.3623	46.2580	104.9797	**0.0079 / 0.009**	0.0642	0.3472	0.3961	**0.0176 / 0.028**
93	646	0	5.6362	2.2576	7.0316	0.1001	0.1265	0.1870	0.3886	**0.0403**
94	654	0.4650	2.8668	1.6748	3.1925	0.1512	0.2878	0.2600	0.4403	**0.0154**
95	661	4.8285	7.2233	5.1479	8.1406	0.3184	**0.0359**	0.4683	0.3882	0.2215
96	668	11.0191	28.4292	9.0064	12.8835	**0.02434 / 0.028**	0.2822	0.4038	0.0076	0.3351
97	670	3.9623	25.9873	17.4097	19.2837	**0.0009 / 0.008**	0.4290	0.0949	0.1260	**0.0062 / 0.08**
98	671	4.9886	8.5576	8.3345	11.0203	0.1860	0.2215	0.2448	0.2223	**0.0378**
99	676	3.3955	8.5603	6.0781	3.1455	0.0556	0.1301	0.1734	0.0118	0.4618
100	677	0	2.0091	1.2974	1.7812	**0.0490**	0.3719	0.0944	0.4281	**0.0418**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
101	678	19.1273	72.9638	25.3052	62.3107	**0.0488**	0.0581	0.2953	0.3636	**0.0395**
102	679	0	5.0594	2.6680	4.5112	**0.0060 / 0.019**	**0.0380**	**0.073 / 0.032**	0.3336	**0.0001 / 0.005**
103	681	15.5864	37.1496	19.8857	44.9129	**0.0332**	0.0822	0.3070	0.2983	**0.0289**
104	682	1.4294	3.9850	4.1198	1.3431	0.0764	0.1122	0.1280	0.0156	0.4799
105	684	3.3486	2.6555	0.6539	8.9180	0.4400	**0.0039 / 0.007**	0.2354	**0.0162 / 0.045**	0.0948
106	688	0.5806	3.8487	0.7105	2.4585	0.0718	0.0535	0.4455	0.2337	**0.0305**
107	694	0	1.6033	0.3253	3.3241	0.1011	0.0503	0.1870	0.1632	**0.0289**
108	699	2.7857	2.3958	1.5224	3.5456	0.4505	**0.0400**	0.2929	0.2219	0.3725
109	704	1.4079	5.7282	6.9228	4.6017	0.0942	0.0428	0.1069	0.3964	0.2026
110	712	0.3795	2.5379	0	3.0771	**0.0204 / 0.024**	**0.0001 / 0.005**	0.1870	0.1746	**0.0003 / 0.007**
111	719	3.3743	4.7530	1.9370	5.0177	0.2562	**0.0390 / 0.013**	0.2284	0.4096	0.1971
112	720	2.1529	3.8269	2.6814	5.0343	0.1095	0.1309	0.3546	0.1934	**0.0374**
113	721	0	12.5494	2.8201	7.8134	**0.0039 / 0.0007**	0.1835	0.0949	0.1638	0.0518
114	732	4.4179	7.0097	1.9669	3.8660	0.1433	0.1632	0.2338	0.0492	0.4332
115	752	24.9132	35.1296	28.5968	50.4740	0.2984	0.0863	0.3847	0.1532	**0.0166**
116	753	1.1369	5.7852	0.7497	3.7755	**0.0268**	0.0545	0.3922	0.2395	0.1476
117	754	22.7431	32.3696	16.3716	28.2911	0.1215	**0.0170 / 0.028**	0.0738	0.2926	0.1478
118	757	0	3.0718	1.1129	1.4103	**0.0031 / 0.005**	0.4347	0.1870	0.0867	0.1009
119	758	0	2.5657	0.8947	2.1660	**0.0007**	0.2567	0.1870	0.3788	0.0696
120	766	18.7471	70.9782	21.7299	75.2805	**0.0247 / 0.009**	**0.0348**	0.3828	0.4311	**0.0082 / 0.009**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
121	768	0.7871	5.8135	7.5304	4.3987	**0.0139**	0.2839	0.1286	0.3137	0.0654
122	772	0	23.3334	1.7951	8.8796	0.1537	**0.0364**	0.1870	0.2579	0.0624
123	777	0	5.7479	1.9645	5.0279	**0.0005 / 0.007**	**0.0174**	0.0998	0.3479	**0.0178 / 0.034**
124	781	3.8806	9.6654	7.9678	9.0739	**0.0138**	0.3429	**0.0420**	0.4091	**0.0038**
125	794	4.2214	13.2934	7.9605	11.9447	**0.0125**	0.2035	0.1707	0.3722	**0.0087**
126	799	0.5962	6.2385	4.3709	7.2592	**0.0184**	0.1388	0.1281	0.3589	**0.0134**
127	800	0	1.0902	0.9201	2.2170	0.1870	0.2448	0.1870	0.2363	**0.0480**
128	801	0.5968	3.7683	5.0399	9.5694	0.0661	0.1433	0.0563	0.0950	**0.0311**
129	802	3.6887	17.2026	9.2290	16.1541	**0.0041 / 0.026**	0.1189	0.1297	0.4005	**0.0032 / 0.08**
130	804	1.2920	3.8624	1.5014	5.1828	0.0674	0.0781	0.4529	0.2684	**0.0287**
131	807	1.6423	4.4583	7.0763	3.8580	**0.0340**	0.1457	0.0512	0.3046	0.0875
132	810	6.4753	18.6770	13.9908	16.6634	**0.0304**	0.3518	0.1060	0.3355	**0.0277**
133	811	4.1157	28.1944	12.6625	14.3435	**0.0333**	0.3975	0.0680	0.1140	**0.0168**
134	812	7.0768	24.0181	12.0676	17.6191	**0.0466**	0.1588	0.2450	0.2239	0.0967
135	813	0	0.3703	0.9471	1.5953	0.1870	0.3424	0.1870	0.0954	**0.0489**
136	814	0.6814	11.0512	4.1709	8.5594	**0.0257**	0.2391	0.0645	0.3475	0.0732
137	815	2.2287	29.1916	16.0359	17.1072	**0.0207 / 0.015**	0.4260	**0.0143 / 0.008**	0.1174	**0.0029 / 0.015**
138	817	32.4762	269.8678	152.4538	146.8587	**0.0227 / 0.009**	0.4576	0.0973	0.0931	**0.0054 / 0.009**
139	820	2.1633	17.6158	4.5761	17.0943	**0.0030 / 0.008**	**0.0439**	0.2475	0.4690	**0.0280**
140	823	27.8523	140.9162	73.2153	148.6927	**0.0208**	0.1179	0.1567	0.4371	**0.0060**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
141	832	0	4.9613	4.7849	3.0691	0.0698	0.3563	0.0977	0.2781	**0.0468**
142	833	41.0848	28.9990	13.4689	34.7167	0.3263	**0.0075 / 0.009**	0.1729	0.0701	0.4087
143	834	1.8417	11.8579	3.3324	11.5898	**0.0351 / 0.041**	**0.0281 / 0.045**	0.3074	0.4744	**0.094 / 0.024**
144	836	4.5943	21.9866	10.8791	15.4258	**0.0098**	0.1557	0.1414	0.0906	**0.0110 / 0.026**
145	839	0.9344	2.6882	0	5.7715	0.1073	**0.0340**	0.1870	0.1397	0.0543
146	843	2.4406	12.2656	6.7696	11.0855	**0.0230 / 0.15**	0.0881	0.1273	0.3283	**0.0025 / 0.015**
147	844	11.6585	39.1608	38.9281	27.7208	0.0861	0.2631	0.0555	0.2231	**0.0376**
148	845	4.2741	18.7803	12.5129	10.0107	**0.0341**	0.3095	**0.0347**	0.0900	0.0978
149	847	13.0284	28.9295	15.8094	30.6726	**0.0402 / 0.047**	**0.0225 / 0.028**	0.3376	0.3968	**0.0045 / 0.016**
150	848	0	12.9206	11.5566	10.6971	**0.0171**	0.4559	**0.0148**	0.3601	**0.0354**
151	852	44.64618	64.9357	40.9308	93.3817	**0.0401**	**0.0103**	0.3631	0.0592	**0.0098 / 0.028**
152	857	2.158618	18.8070	10.9410	5.6051	**0.0170 / 0.015**	0.1965	**0.0158**	0.0243	0.1804
153	858	28.54006	24.1021	35.0691	27.0463	0.4195	0.0266	0.3476	0.3950	0.4650
154	861	5.99509	19.2742	18.0839	25.3912	**0.0100 / 0.016**	0.0535	**0.0075 / 0.028**	**0.0248**	**0.0006 / 0.009**
155	863	0	4.4839	0.8360	2.5179	**0.0094/ 0.024**	0.0937	0.1870	0.1216	**0.0353 / 0.008**
156	865	2.588746	9.1317	1.1239	10.0104	**0.0047 / 0.008**	**0.0008 / 0.007**	0.1516	0.3031	**0.0003 / 0.008**
157	866	28.394676	61.8845	82.2291	62.5275	**0.0308**	0.3036	0.1456	0.4856	**0.0377**
158	867	7.4872	13.4686	7.1858	7.9012	**0.0263**	0.3580	0.4442	0.0867	0.4449
159	871	7.558726	26.1497	13.4364	18.5901	**0.0028 / 0.28**	0.1444	0.0593	0.0465	**0.0010**
160	873	13.562182	5.9434	4.1868	4.6130	0.0428 / 0.028	0.4535	0.0083	0.2998	0.0101 / 0.028

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
161	874	14.304752	21.3826	14.5435	25.5842	0.0532	**0.0448**	0.4739	0.2607	0.0545
162	878	0	0.5980	0	2.0711	0.1870	**0.0430**	-	0.1100	**0.0430**
163	879	7.998884	25.5425	13.6104	50.8947	**0.0128 / 0.009**	0.1024	0.1960	0.1470	0.0546
164	885	1.066414	8.1293	3.1339	6.9810	**0.0198 / 0.024**	0.1363	0.2242	0.3251	**0.0031 / 0.024**
165	887	0	0.9534	0	1.5895	0.1870	**0.0353**	-	0.2992	**0.0353**
166	890	8.05348	66.5863	27.9935	84.4673	**0.0031 / 0.008**	**0.0153 / 0.028**	0.0717	0.1892	**0.0020 / 0.008**
167	893	1.3112	8.9699	1.9930	14.5780	0.0511	**0.0260 / 0.024**	0.3917	0.1118	**0.0048 / 0.008**
168	894	0	11.1184	13.9090	12.1915	**0.0027 / 0.019**	0.4313	0.1136	0.3798	**0.0053 / 0.005**
169	897	0	8.3828	6.6169	10.0443	**0.0031 / 0.005**	0.2192	0.1108	0.2102	**0.0004 / 0.005**
170	899	22.115164	163.7629	80.2069	144.5699	**0.0201 / 0.009**	0.0898	**0.0387**	0.3657	**0.0120 / 0.009**
171	902	6.62822	9.9744	0	12.5966	0.1776	**0.0138 / 0.005**	0.1870	0.3581	0.2304
172	905	81.6164	27.1256	9.6480	20.9536	0.2715	**0.0449**	0.2142	0.1386	0.2494
173	906	0	11.1791	25.2154	17.9032	0.1169	0.3355	**0.0445**	0.3126	0.0819
174	908	0	11.7532	0	15.8261	**0.0381 / 0.019**	**0.0157 / 0.019**	-	0.2868	**0.0157 / 0.019**
175	909	0	12.9194	11.6186	11.2214	**0.0219**	0.4724	**0.0097**	0.4059	0.0502
176	912	1051.8958	434.6562	773.3142	493.4232	0.0135	0.1918	0.2041	0.3981	0.0251
177	922	293.2436	189.1089	278.0018	103.5347	0.1570	0.0961	0.4569	0.2728	0.0211
178	946	2.16598	20.0192	16.0690	21.0096	**0.0134**	0.2462	0.0540	0.4563	**0.0246**
179	954	1.482012	23.4145	13.8363	23.0762	**0.0015 / 0.008**	0.1821	**0.0122**	0.4785	**0.0074 / 0.008**
180	959	1.098694	0.3877	0	2.2091	0.1870	**0.0197**	0.1870	**0.0349**	0.2142

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
181	962	0.617518	3.2521	2.2356	3.9303	0.0544	0.1915	0.1096	0.3540	**0.0252**
182	965	0.916942	3.0962	1.8578	5.6648	0.0525	0.0582	0.3171	0.1329	**0.0240**
183	979	0	2.0783	4.5864	1.9678	0.1702	0.2180	**0.0340**	0.4821	0.1181
184	983	91.26966	20.7742	54.8727	53.2421	0.0364	0.4677	0.1561	**0.0477**	0.1558
185	985	1.066896	109.2648	28.6871	120.6591	**0.0129 / 0.007**	**0.0180**	0.0744	0.4029	**0.0099 / 0.034**
186	986	11.22426	109.0169	97.1891	62.2599	**0.0179**	0.1199	0.0752	0.1622	0.0742
187	988	11.666984	4.5096	5.8166	0.8450	0.1511	0.0843	0.1532	0.1597	0.0376
188	999	4.57149	0	6.0161	10.6729	0.0593	0.2401	0.3542	**0.0335 / 0.005**	0.1274
189	1001	0.817082	3.6739	2.0628	2.7582	**0.0381**	0.3861	0.2242	0.3313	0.1170
190	1002	0	5.7129	4.1160	6.1381	0.1314	0.3569	0.0896	0.4683	**0.0429**
191	1005	0	7.5216	0	2.8280	**0.0355**	0.0980	-	0.1171	0.0980
192	1009	127.47172	32.1917	88.2831	65.9591	0.0325	0.3558	0.1972	0.1851	0.0898
193	1010	391.5448	244.9824	315.1326	193.4054	0.0616	0.0852	0.2218	0.1654	0.0190
194	1012	10.920508	5.1617	16.5384	12.1872	0.0847	0.2125	0.1928	**0.0490**	0.4038
195	1013	0	0	3.2865	2.1941	-	0.2852	0.0889	**0.0409**	**0.0409**
196	1015	0	4.6310	2.1221	8.0758	**0.0455 / 0.019**	**0.0143 / 0.013**	0.0919	0.1184	**0.0043 / 0.005**
197	1018	0.595398	2.0815	0.7230	3.3897	0.1093	**0.0262**	0.4476	0.1654	**0.0160**
198	1025	0	0	0	1.7071	-	**0.0003**	-	**0.0003**	**0.0003**
199	1030	4.082356	19.6894	11.2645	6.5278	**0.0164**	0.1986	0.0937	0.0378	0.1982
200	1036	3.235202	8.7977	15.3785	2.6289	**0.0391**	0.0509	**0.0434**	0.1061	0.3969

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
201	1038	0	4.6570	2.9325	6.5793	**0.0162**	0.0763	**0.0469**	0.2925	**0.0464**
202	1043	0	3.7300	0	2.4190	**0.0446**	0.1409	-	0.3117	0.1409
203	1048	3.03225	6.6279	4.7241	5.2058	**0.0449**	0.4584	0.2502	0.3345	0.2688
204	1052	38.03272	15.5617	38.1352	15.8625	0.1847	0.0111	0.4982	0.4836	0.1663
205	1058	0.699744	2.0124	0.5293	7.4478	0.1218	**0.0124**	0.4256	**0.0391**	**0.0149**
206	1062	1.294828	8.2524	4.5449	15.6303	**0.0448**	**0.0063**	0.2622	0.1846	**0.0458**
207	1064	0	67.2484	3.7740	29.8154	**0.0288 / 0.019**	0.1288	0.1870	0.1358	0.0910
208	1066	0.806042	11.8137	4.4482	13.7630	0.1493	**0.0111**	0.1315	0.4242	**0.0132**
209	1067	0	5.0654	4.3435	5.0851	0.0923	0.4116	0.1157	0.4978	**0.0139**
210	1072	3.345254	1.4155	1.3821	13.0136	0.0898	0.0608	0.2433	**0.0497**	0.0788
211	1077	4.060918	12.3543	7.0571	4.4266	**0.0360**	0.2695	0.2430	0.0819	0.4587
212	1087	10.168	0	3.8442	1.4698	0.0456	0.3108	0.1614	0.1870	0.0667
213	1091	0	1.7087	1.3115	2.7128	0.1151	0.2044	0.0906	0.2833	**0.0403**
214	1092	0	4.6788	2.2215	3.6510	0.0902	0.3252	**0.0484**	0.3936	0.0916
215	1093	0	2.3324	2.3567	3.1855	0.1870	0.3690	**0.0382**	0.3898	0.0752
216	1095	0	3.0057	2.3648	3.2468	0.1092	0.3834	**0.0390**	0.4686	0.1018
217	1097	10.75706	0.4276	3.9867	0.3302	0.0495	0.2105	0.1484	0.4309	0.0421
218	1115	0	0	3.8829	7.7516	-	0.2874	**0.0497**	0.1656	0.1656
219	1118	0	3.7232	3.4854	6.0345	0.0939	0.3132	**0.0390**	0.3016	0.0817
220	1119	5.1515	9.3709	2.4993	2.9336	**0.0375**	0.4072	0.2343	0.1229	0.2825

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
221	1128	0	1.9289	0.8922	0.0300	**0.0368**	0.1962	0.1870	0.0383	0.1870
222	1144	0	1.9442	4.4571	1.2637	0.1870	0.0836	**0.0364**	0.3889	0.1870
223	1155	8.867768	0	4.0259	2.7793	0.0454	0.3885	0.1725	0.1298	0.1131
224	1162	140.44988	10.1120	52.2671	0.6471	0.0800	0.0920	0.1660	0.0205	0.0705
225	1179	0	15.1736	0	1.1926	**0.0473 / 0.019**	0.1050	-	0.0574	0.1050
226	1180	0	4.8257	2.3623	4.6362	**0.0402**	0.1867	0.0970	0.4713	**0.0175**
227	1187	0	14.8325	1.5726	12.0223	0.1870	0.0707	0.1870	0.4322	**0.0336**
228	1194	0	0	7.1722	1.8102	-	0.2504	0.1870	**0.0468**	**0.0468**
229	1197	0	1.2510	0	3.2397	0.1870	**0.0496**	-	0.1710	**0.0496**
230	1198	0	8.2391	4.0548	4.6157	**0.0374**	0.4567	0.1085	0.2159	0.0802
231	1203	0	1.0144	3.5126	5.2985	0.1870	0.3210	0.1870	**0.0181**	**0.0083 / 0.019**
232	1207	2.569	0	3.1770	4.1729	0.1870	0.3514	0.4428	**0.0411**	0.3125
233	1210	0	7.5434	0	5.0589	0.0506	**0.0487**	-	0.2892	**0.0487**
234	1216	0	0.9462	5.7924	1.7257	0.1870	0.0521	**0.0353**	0.3110	0.1096
235	1226	0	7.7317	1.0365	2.5930	0.1870	0.0554	0.1870	0.2728	**0.0467**
236	1231	0	6.1387	1.2536	2.0310	**0.0146**	0.3789	0.1870	0.0677	0.1418
237	1264	1.634636	9.2747	6.4160	4.4814	**0.0058**	0.3265	0.0890	0.0619	0.1680
238	1279	0	0.9579	0.5389	0.9360	0.0919	0.2908	0.1870	0.4884	**0.0437**
239	1302	0	1.1822	0	5.4258	0.1870	**0.0145**	-	**0.0356**	**0.0145**
240	1308	0	0.9535	0	5.2261	0.1870	**0.0056 / 0.019**	-	**0.0117**	**0.0059 / 0.019**

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	Mean intensity x 10^{-2} (Arbitrary unit)				Statistic significance (parametric / non-parametric; P<0.05)				
		NE	TE	NL	TL	NE : TE	NL : TL	NE : NL	TE : TL	NE : TL
241	1326	3.9326	1.1088	0	0.0943	0.1465	0.1870	0.0844	0.0021	0.0885
242	1370	0	3.9616	0	0.5764	**0.0369**	0.1870	-	0.0551	0.1870
243	1383	0	4.1609	0	0.1376	**0.0452**	0.1870	-	0.0491	0.1870
244	1411	141.5428	63.2770	218.4386	34.2049	0.2355	0.0452	0.2973	0.2146	0.1596
245	1495	0	3.2907	0.4662	3.1351	0.0889	0.0429	0.1870	0.4760	0.0502

หมายเหตุ

1. Mean intensity หมายถึง ค่าเฉลี่ยความเข้มของจุดโปรตีนของตัวอย่างแต่ละกลุ่ม
2. Statistic significance หมายถึง ค่า p-value ระหว่างคู่ตัวแปรที่เปรียบเทียบกัน ด้วยสถิติ parametric และ non-parametric โดยกำหนดระดับนัยสำคัญน้อยกว่า 0.05
3. NE หมายถึง เนื้อเยื่อปกติระยะเริ่มต้น, TE หมายถึง เนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น, NL หมายถึง เนื้อเยื่อปกติระยะท้าย และ TL หมายถึง เนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย
4. **ตัวอักษรหนา** หมายถึง โปรตีนที่ความเข้มเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจากคู่ตัวแปรที่เปรียบเทียบกัน
5. ตัวอักษรขีดเส้นใต้ หมายถึง โปรตีนที่ความเข้มเปลี่ยนแปลงลดลงจากคู่ตัวแปรที่เปรียบเทียบกัน
6. ตัวอักษรปกติ หมายถึง โปรตีนที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างคู่ตัวแปรที่เปรียบเทียบกัน

เนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะ CIS และมะเร็งที่เกิดซ้ำ มีกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง จึงไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธีทางสถิติได้ ดังนั้นการเปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งของมะเร็งทั้ง 2 ชนิดนี้จึงวัดเป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง

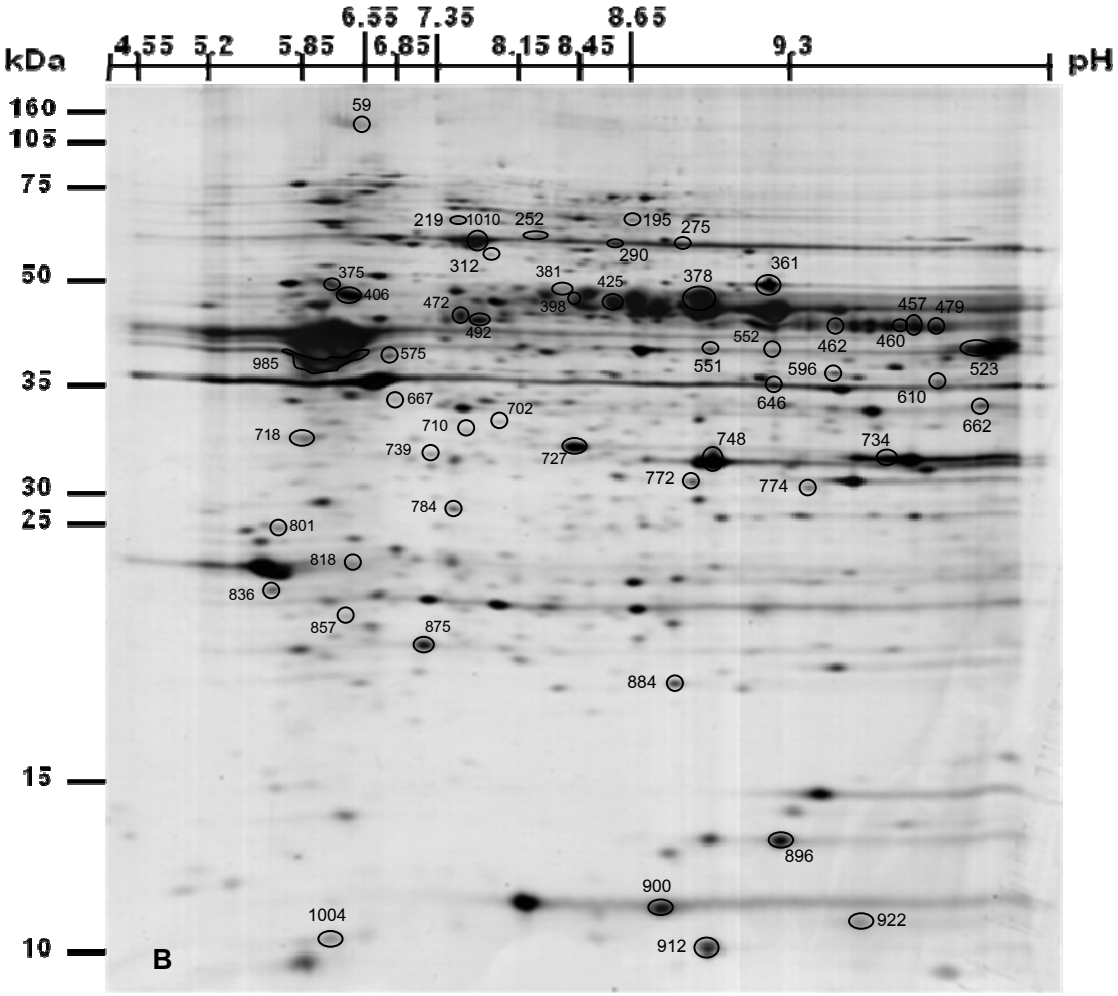
การเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งในระยะ CIS กับระยะต้นพบว่าจุดโปรตีนจำนวน 167 จุดในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มต่างไปจากระยะก่อนลุกลาม (ภาพที่ 3.12) โดยมีความเข้มเพิ่มขึ้น 67 จุด และลดลง 68 จุด ในกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นมีการเพิ่มขึ้น 2 เท่า จำนวน 37 จุด 3 เท่า จำนวน 16 จุด 4 เท่า จำนวน 5 จุด 5 เท่า จำนวน 6 จุด 6 เท่า จำนวน 2 จุด 7 8 และ 11 เท่า อย่างละจำนวน 1 จุด และกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงลดลงมีการลดลง 2 เท่า จำนวน 28 จุด 3 เท่า จำนวน 14 จุด 4 เท่า จำนวน 12 จุด 5 เท่า จำนวน 5 จุด 6 เท่า จำนวน 6 จุด 7 8 และ 9 เท่า อย่างละจำนวน 1 จุด 10 เท่า จำนวน 4 จุด และมากกว่า 10 เท่า จำนวน 26 จุด (ตารางที่ 3.4) ในจำนวน 167 จุดนี้มีจำนวน 46 จุดที่แสดงออกสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3 (ตัวอักษรหนา) 15 จุดที่แสดงออกตรงกันข้ามกับผลในตารางที่ 3.3 (ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้) และมี 106 จุดที่ไม่พบในตารางที่ 3.3 (ตัวอักษรปกติ) ในการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในระยะต่าง ๆ

การเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งที่เกิดซ้ำกับเนื้อเยื่อมะเร็งในระยะต้นพบว่าจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำจำนวน 96 จุด มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มต่างไปจากมะเร็งในระยะต้น โดยเพิ่มขึ้นจำนวน 68 จุด และลดลง 28 จุด ในกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นมีการเพิ่มขึ้น 2 เท่า จำนวน 31 จุด 3 เท่า จำนวน 16 จุด 4 เท่า จำนวน 7 จุด 5 เท่า จำนวน 3 จุด 6 เท่า จำนวน 6 จุด 7 และ 9 เท่า อย่างละจำนวน 1 จุด 14 เท่า จำนวน 2 จุด และ 15 เท่า จำนวน 1 จุด และกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงลดลงมีการลดลง 2 เท่า จำนวน 21 จุด 3 เท่า จำนวน 2 จุด 4 เท่า จำนวน 3 จุด 5 เท่า จำนวน 1 จุด และ 8 เท่า จำนวน 1 จุด (ตารางที่ 3.5) และจากการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งที่เกิดซ้ำพบว่ามีโปรตีนจำนวน 26 จุด (ตัวอักษรหนา) ที่แสดงออกสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3 9 จุด (ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้) ที่แสดงออกตรงกันข้ามกับผลในตารางที่ 3.3 และ 61 จุดที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3 (ตัวอักษรปกติ) จุดโปรตีนจำนวน 35 จุดดังกล่าวได้ชี้แสดงไว้ในภาพที่ 3.13

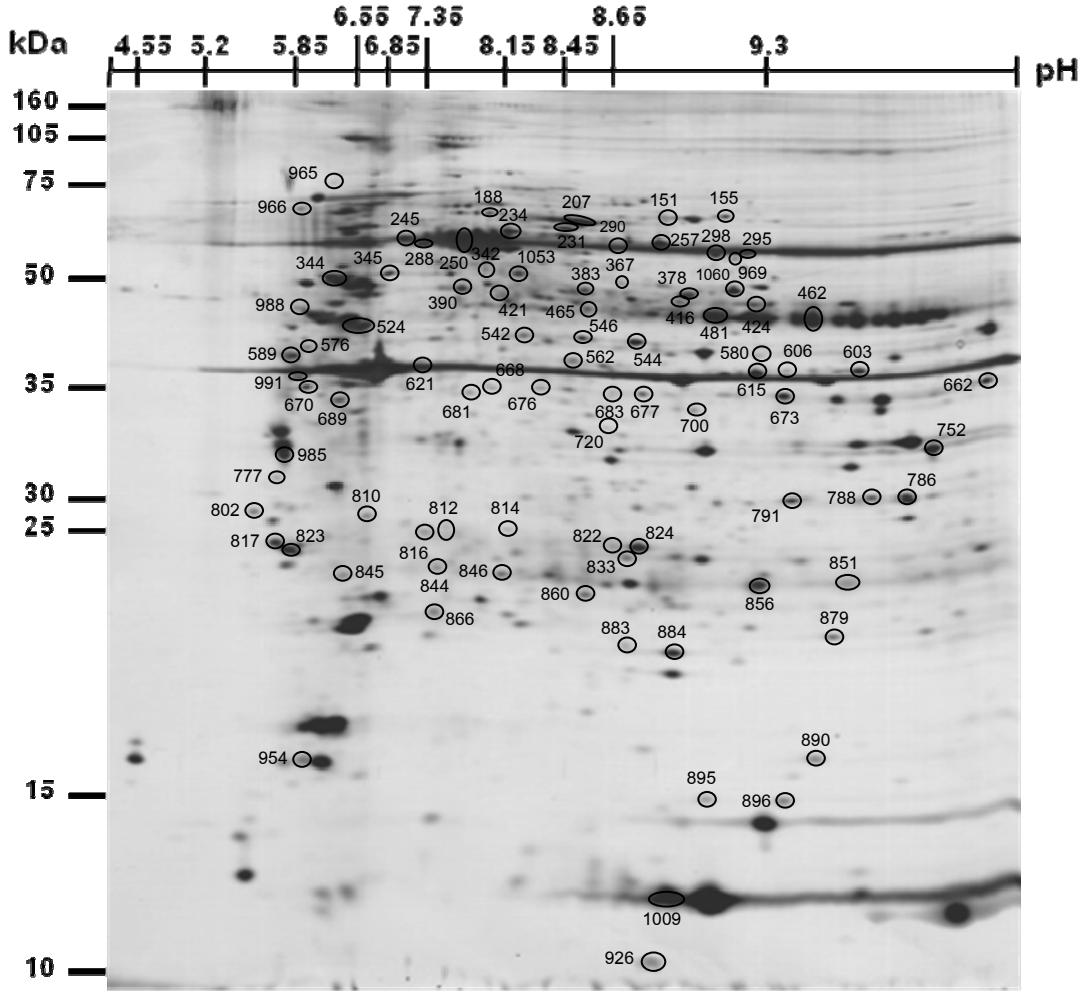
การเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งในมะเร็งที่เกิดซ้ำกับเนื้อเยื่อมะเร็งในระยะท้ายพบว่ามีจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำจำนวน 39 จุดมีความเข้มลดลงจากมะเร็งในระยะท้าย โดยลดลง 2 เท่า จำนวน 24 จุด 3 เท่า จำนวน 10 จุด 4 เท่า จำนวน 3 จุด 7 เท่า จำนวน 1 จุด และ 10 เท่าจำนวน 1 จุด (ตารางที่ 3.6) และจากการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งที่เกิดซ้ำพบว่ามีโปรตีนจำนวน 12 จุด (ตัวอักษรหนา) ที่แสดงออกสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3 4 จุด (ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้) ที่แสดงออกตรงกันข้ามกับผลในตารางที่ 3.3 และ 23 จุด (ตัวอักษรปกติ) ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3 จุดโปรตีนจำนวน 39 จุดดังกล่าวชี้แสดงไว้ในภาพที่ 3.13

จากการเปรียบเทียบข้างต้นพบว่าลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำมีความคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น

การที่พบจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกตรงกันข้าม และให้ผลไม่สอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3 อาจเนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะก่อนลุกลาม และมะเร็งที่เกิดซ้ำมีเพียงกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง ค่าที่นำไปเปรียบเทียบจึงไม่ใช่ค่าเฉลี่ย ประกอบกับระดับการแสดงออกของจุดโปรตีนในคนแต่ละคนนั้นไม่เท่ากัน จึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการเปรียบเทียบ



ภาพที่ 3.12 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะ CIS วงกลมระบุตำแหน่งโปรตีนที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น ด้านข้างแสดงน้ำหนักโมเลกุล และด้านบนแสดงค่า pH



ภาพที่ 3.13 ภาพ 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ วงกลมระบุตำแหน่งจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นและระยะท้าย ด้านข้างแสดงน้ำหนักโมเลกุล และด้านบนแสดงค่า pH

ตารางที่ 3.6 จุดโปรตีนจำนวน 167 จุด ที่มีความเข้มของจุดโปรตีนแตกต่างตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไประหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะก่อนลุกลามกับระยะเริ่มต้น

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
1	91	0.02782	0.06344	2	
2	124	0.10878	0.04446		2
3	**142**	**0.03336**	**0.07572**	**2**	
4	**155**	**0.11505**	**0.26696**	**2**	
5	188	0.07047	0.14735	2	
6	**235**	**0.07027**	**0.15636**	**2**	
7	**250**	**0.25681**	**0.55091**	**2**	
8	**288**	**0.14870**	**0.31324**	**2**	
9	**295**	**0.08027**	**0.21082**	**2**	
10	**318**	**0.03960**	**0.08886**	**2**	
11	**329**	**0.02987**	**0.06044**	**2**	
12	342	0.03076	0.07974	2	
13	344	0.31119	0.13439		2
14	**390**	**0.15684**	**0.33878**	**2**	
15	**416**	**0.04608**	**0.13492**	**2**	
16	425	0.14827	0.35074	2	
17	**455**	**0.07261**	**0.17817**	**2**	
18	460	0.92345	0.32219		2
19	462	0.87158	0.43546		2
20	464	0.15259	0.07052		2

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
21	**465**	**0.06071**	**0.15990**	**2**	
22	501	0.02464	0.06606	2	
23	**542**	**0.06922**	**0.15077**	**2**	
24	546	0.10311	0.04669		2
25	**562**	**0.11778**	**0.25446**	**2**	
26	**573**	**0.02485**	**0.05431**	**2**	
27	**606**	**0.03656**	**0.01722**	-	**2**
28	615	0.53152	0.18618		2
29	621	0.27140	0.10819		2
30	**670**	**0.12409**	**0.26034**	**2**	
31	673	0.21241	0.10340		2
32	**676**	**0.03287**	**0.08575**	**2**	
33	683	0.05442	0.02302		2
34	700	0.05479	0.11110	2	
35	710	0.02656	0.06534	2	
36	**720**	**0.01635**	**0.03833**	**2**	
37	724	0.03909	0.01734		2
38	**752**	**0.97204**	**0.35194**		**2**
39	764	0.29337	0.12227		2
40	**777**	**0.02867**	**0.05759**	**2**	

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
41	788	0.12641	0.05666		2
42	**802**	**0.06848**	**0.17236**	**2**	
43	**810**	**0.07201**	**0.18709**	**2**	
44	822	0.03599	0.07524	2	
45	824	0.37043	0.13208		2
46	**833**	**0.09930**	**0.29052**	**2**	
47	**843**	**0.06003**	**0.12287**	**2**	
48	**845**	**0.08359**	**0.18815**	**2**	
49	**847**	**0.12678**	**0.28984**	**2**	
50	851	0.15381	0.07261		2
51	856	0.44707	0.19560		2
52	**879**	**0.10417**	**0.25584**	**2**	
53	884	0.32353	0.73191	2	
54	914	1.12632	0.47778		2
55	**946**	**0.09415**	**0.19760**	**2**	
56	966	0.03445	0.08304	2	
57	969	0.03349	0.01280		2
58	**1009**	**0.87227**	**0.32262**		**2**
59	1031	0.14544	0.06650		2
60	1117	0.03658	0.01804		2

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
61	**1226**	**0.22498**	**0.07739**		**2**
62	1274	0.15315	0.05797		2
63	1362	0.03851	0.01883		2
64	1367	0.02901	0.01015		2
65	1425	0.07938	0.03006		2
66	**96**	**0.03396**	**0.10461**	**3**	
67	126	0.09219	0.02781		3
68	**151**	**0.04342**	**0.17266**	**3**	
69	230	0.09114	0.02417		3
70	**245**	**0.22858**	**0.74421**	**3**	
71	**367**	**0.01969**	**0.06029**	**3**	
72	378	0.28180	0.88491	3	
73	383	0.13626	0.48248	3	
74	398	0.11418	0.03489		3
75	409	0.10901	0.03604		3
76	421	0.10792	0.42598	3	
77	457	0.64784	0.17026		3
78	481	0.79407	0.24534		3
79	**544**	**0.32592**	**1.15091**	**3**	
80	547	0.03971	0.13760	3	

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
81	549	0.04889	0.16046	3	
82	**595**	**0.01114**	**0.03406**	**3**	
83	**677**	**0.07066**	**0.02011**	-	**3**
84	689	0.10455	0.03218		3
85	786	0.46369	0.13126		3
86	791	0.18527	0.04887		3
87	**812**	**0.07275**	**0.24062**	**3**	
88	**814**	**0.03092**	**0.10822**	**3**	
89	816	0.04230	0.15918	3	
90	**823**	**0.45769**	**1.41184**	**3**	
91	846	0.11106	0.35871	3	
92	883	0.04069	0.01133		3
93	1146	0.15764	0.04680		3
94	1487	0.04033	0.01051		3
95	1541	0.04541	0.01377		3
96	198	0.37587	0.08750		4
97	231	0.23218	0.05208		4
98	**290**	**0.22959**	**0.05734**		**4**
99	319	0.05241	0.01308		4
100	**345**	**0.11329**	**0.50557**	**4**	

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
101	479	0.71845	0.17883		4
102	**524**	**0.99725**	**4.55785**	**4**	
103	589	0.15538	0.03128		4
104	603	0.28953	0.07210		4
105	778	0.06230	0.01288		4
106	895	0.08363	0.37648	4	
107	896	0.14265	0.69363	4	
108	**954**	**0.99806**	**0.23455**		**4**
109	**965**	**0.00639**	**0.03102**	**4**	
110	**988**	**0.21947**	**0.04523**		**4**
111	**1012**	**0.23074**	**0.05175**		**4**
112	1053	0.10732	0.02180		4
113	**257**	**0.51228**	**0.10156**		**5**
114	385	0.02464	0.12487	5	
115	424	0.26853	1.43842	5	
116	432	0.06213	0.36441	5	
117	**890**	**0.12575**	**0.66704**	**5**	
118	926	0.24860	1.38309	5	
119	**985**	**0.18561**	**1.03466**	**5**	
120	987	0.21908	0.04090		5

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
121	1372	0.08398	0.01584		5
122	1479	0.07871	0.01449		5
123	1533	0.63049	0.11239		5
124	**234**	**0.33151**	**0.05005**		**6**
125	576	0.04775	0.00761		6
126	**580**	**0.04633**	**0.00719**		**6**
127	**844**	**0.05993**	**0.39214**	**6**	
128	860	0.10761	0.01743		6
129	866	0.09093	0.61999	6	
130	991	0.09766	0.01588		6
131	1082	0.18122	0.02939		6
132	**668**	**0.03884**	**0.28484**	**7**	
133	1489	0.20130	0.02755		7
134	**681**	**0.04589**	**0.37208**	**8**	
135	1443	0.19177	0.02207		8
136	1201	0.12686	0.01370		9
137	**207**	**1.67660**	**0.16704**		**10**
138	662	0.24175	0.02230		10
139	1060	0.35594	0.03284		10
140	1534	0.31207	0.02845		10
141	**817**	**0.23440**	**2.70379**	**11**	
142	**959**	**0.04457**	**0.00389**		**11**
143	973	0.06221	0.00484		12
144	1373	0.18313	0.01378		13
145	1416	0.15672	0.01176		13
146	1528	0.70427	0.05345		13
147	584	1.03799	0.07026		14
148	**1216**	**0.15092**	**0.00946**		**15**
149	80	0.05536	0.00333		16
150	323	0.04113	0.00248		16
151	992	0.42573	0.02272		18
152	1140	0.28794	0.01530		18
153	**1162**	**2.24946**	**0.10134**		**22**
154	1512	0.32831	0.01447		22
155	298	0.14405	0.00612		23
156	1080	0.26802	0.01163		23
157	1228	0.06978	0.00295		23
158	1349	1.52955	0.06489		23
159	1432	0.56444	0.02400		23
160	**253**	**0.11989**	**0.00472**		**25**

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน $x10^{-2}$ (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะก่อนลุกลาม	ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	เพิ่มขึ้น	ลดลง
161	1309	0.61944	0.02154		28
162	1393	0.40917	0.01358		30
163	1163	2.43870	0.07258		33
164	1073	0.33086	0.00729		45
165	1457	0.79763	0.00824		96
166	1333	0.37957	0.00320		118
167	1377	2.52541	0.01575		160

ตัวอักษรหนา หมายถึง โปรตีนที่แสดงออกสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3

ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้ หมายถึง โปรตีนที่แสดงออกตรงกันข้ามกับผลในตารางที่ 3.3

ตัวอักษรปกติ หมายถึง โปรตีนที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.7 จุดโปรตีนจำนวน 96 จุด ที่มีความเข้มของจุดโปรตีนแตกต่างตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไประหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นกับเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	มะเร็งที่เกิดซ้ำ	เพิ่มขึ้น	ลดลง
1	59	0.07873	0.02690		2
2	83	0.07734	0.03601		2
3	**190**	**0.02447**	**0.05840**	**2**	
4	**195**	**0.02373**	**0.04943**	**2**	
5	**210**	**0.11163**	**0.05219**		**2**
6	**235**	**0.15636**	**0.05465**		**2**
7	**252**	**0.04134**	**0.09282**	**2**	
8	**274**	**0.06535**	**0.13368**	**2**	
9	**290**	**0.05734**	**0.14455**	**2**	
10	**348**	**0.07846**	**0.02759**		**2**
11	**361**	**0.53112**	**1.23540**	**2**	
12	**365**	**0.04750**	**0.11116**	**2**	
13	**369**	**0.05436**	**0.02319**		**2**
14	**375**	**0.20362**	**0.08060**		**2**
15	378	0.88491	2.37377	2	
16	**398**	**0.03489**	**0.09311**	**2**	
17	**406**	**0.48881**	**1.11192**	**2**	
18	425	0.35074	0.84159	2	
19	**443**	**0.03586**	**0.08169**	**2**	
20	457	0.17026	0.49893	2	
21	460	0.32219	0.14489		2
22	462	0.43546	0.20850		2
23	479	0.17883	0.40082	2	
24	501	0.06606	0.15474	2	
25	575	0.03304	0.08466	2	
26	596	0.03090	0.07789	2	
27	600	0.11081	0.05196		2
28	635	0.07322	0.18573	2	
29	667	0.07702	0.02812		2
30	702	0.01082	0.02889	2	
31	710	0.06534	0.02767		2
32	718	0.07039	0.18348	2	
33	739	0.11784	0.04912		2
34	748	1.14831	2.57355	2	
35	**772**	**0.23358**	**0.10942**		**2**
36	774	0.03592	0.08314	2	
37	**801**	**0.03776**	**0.08790**	**2**	
38	818	0.04697	0.12569	2	
39	**836**	**0.22029**	**0.10807**		**2**
40	875	0.14065	0.04767		2

ตารางที่ 3.7 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน x10^{-2} (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	มะเร็งที่เกิดซ้ำ	เพิ่มขึ้น	ลดลง
41	900	0.26979	0.75803	2	
42	967	0.07045	0.02726		2
43	**1010**	**2.45419**	**0.88476**		**2**
44	1023	0.05056	0.01918		2
45	1042	0.10122	0.04812		2
46	**1064**	**0.67306**	**1.72713**	**2**	
47	**1066**	**0.11827**	**0.33828**	**2**	
48	1076	0.07048	0.16407	2	
49	**1264**	**0.09290**	**0.03807**		**2**
50	**1411**	**0.63362**	**1.30218**	**2**	
51	1417	0.10004	0.23056	2	
52	1426	0.02663	0.07929	2	
53	**219**	**0.11339**	**0.02846**		**3**
54	381	0.12313	0.04018		3
55	434	0.60117	1.96902	3	
56	472	0.07122	0.22447	3	
57	492	0.10908	0.39884	3	
58	**523**	**0.45262**	**1.57790**	**3**	
59	**551**	**0.02603**	**0.10278**	**3**	
60	610	0.02894	0.10290	3	
61	727	0.26793	0.88306	3	
62	778	0.01288	0.04167	3	
63	791	0.04887	0.17611	3	
64	**985**	**1.03466**	**3.75926**	**3**	
65	1004	0.08814	0.27312	3	
66	1037	0.22627	0.76585	3	
67	**1203**	**0.01014**	**0.03250**	**3**	
68	1206	0.07603	0.24956	3	
69	1363	0.02351	0.07365	3	
70	1424	0.00690	0.02388	3	
71	256	0.00997	0.04874	4	
72	312	0.09979	0.02080		4
73	342	0.07974	0.01647		4
74	**552**	**0.01320**	**0.05650**	**4**	
75	**580**	**0.00719**	**0.03425**	**4**	
76	**646**	**0.05643**	**0.24687**	**4**	
77	734	0.08716	0.41968	4	
78	884	0.73191	0.16307		4
79	1016	0.06781	0.29289	4	
80	1032	0.03351	0.15376	4	

ตารางที่ 3.7 (ต่อ)

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน $x10^{-2}$ (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง	
		ระยะเริ่มต้น (ค่าเฉลี่ย)	มะเร็งที่เกิดซ้ำ	เพิ่มขึ้น	ลดลง
81	869	0.01410	0.08449	5	
82	**922**	**1.89540**	**0.33907**		**5**
83	1198	0.08253	0.47998	5	
84	1201	0.01370	0.07802	5	
85	**388**	**0.20614**	**1.32671**	**6**	
86	662	0.02230	0.15177	6	
87	784	0.01583	0.10779	6	
88	973	0.00484	0.03059	6	
89	1402	0.10565	0.66768	6	
90	1429	0.01511	0.09866	6	
91	1123	0.01097	0.08038	7	
92	**912**	**4.35578**	**0.48963**		**8**
93	1356	0.00407	0.03859	9	
94	**275**	**0.00845**	**0.12090**	**14**	
95	1112	0.01156	0.17296	14	
96	982	0.00830	0.13199	15	

ตัวอักษรหนา หมายถึง โปรตีนที่แสดงออกสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.5

ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้ หมายถึง โปรตีนที่แสดงออกตรงกันข้ามกับผลในตารางที่ 3.5

ตัวอักษรปกติ หมายถึง โปรตีนที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.8 จุดโปรตีนจำนวน 39 จุด ที่มีความเข้มของจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายกับเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ

ลำดับ	protein ID	ความเข้มจุดโปรตีน $x10^{-2}$ (Arbitrary unit)		จำนวนเท่าของการเพิ่มขึ้น
		ระยะท้าย (ค่าเฉลี่ย)	มะเร็งที่เกิดซ้ำ	
1	59	0.07958	0.07521	2
2	95	0.13440	0.07519	2
3	108	0.63618	0.46162	2
4	153	0.06889	0.07855	2
5	**219**	**0.07762**	**0.25290**	**2**
6	231	0.08438	0.04729	2
7	**235**	**0.13627**	**0.13775**	**2**
8	**242**	**0.06299**	**0.04865**	**2**
9	**318**	**0.13531**	**0.09491**	**2**
10	**336**	**0.11297**	**0.12773**	**2**
11	377	0.08383	0.04614	2
12	**439**	**0.12975**	**0.07960**	**2**
13	475	0.19125	0.13538	2
14	547	0.17982	0.13257	2
15	600	0.12605	0.05682	2
16	838	0.05824	0.05797	2
17	**874**	**0.25864**	**0.19149**	**2**
18	875	0.12567	0.10813	2
19	**879**	**0.50981**	**0.27912**	**2**
20	884	0.33084	0.56131	2
21	**1010**	**1.93638**	**1.70784**	**2**
22	**1012**	**0.12201**	**0.05559**	**2**
23	1023	0.04971	0.04001	2
24	1033	0.23856	0.25040	2
25	312	0.07050	0.05186	3
26	**348**	**0.09580**	**0.09125**	**3**
27	**369**	**0.08938**	**0.07076**	**3**
28	460	0.56106	0.41749	3
29	680	0.47973	0.07144	3
30	696	0.09173	0.02321	3
31	739	0.15164	0.13613	3
32	**922**	**1.03725**	**0.59040**	**3**
33	**965**	**0.05670**	**0.08235**	**3**
34	1042	0.16711	0.11548	3
35	83	0.14944	0.14781	4
36	342	0.07312	0.09498	4
37	**375**	**0.36467**	**0.13870**	**4**
38	587	0.15844	0.01956	7
39	**912**	**4.94153**	**4.43146**	**10**

ตัวอักษรหนา หมายถึง โปรตีนที่แสดงออกสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.5

ตัวอักษรปกติ หมายถึง โปรตีนที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลในตารางที่ 3.5

ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้ หมายถึง โปรตีนที่แสดงออกตรงกันข้ามกับผลในตารางที่ 3.5

3.6. การระบุชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีน

การระบุชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Mass spectrometer (MS) ทำโดยตัดจุดโปรตีนจำนวน 60 จุดจากแผ่นเจล (ภาพที่ 3.13) ซึ่งมีจำนวน 45 จุด ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งแบบ parametric และแบบ non-parametric และจำนวน 15 จุด ที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะแบบ parametric นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกจุดโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จำนวน 47 จุด ไปศึกษาระบุชนิดด้วยเพื่อประโยชน์ของงานวิจัยในอนาคต

การระบุชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนในการศึกษานี้ระบุด้วยการใช้ peptide mass fingerprint (PMF) ด้วยเครื่อง MALDI-TOF จุดโปรตีนที่มีผลจากการ PMF ไม่ชัดเจน เนื่องจากการระบุชนิดโปรตีนจาก PMF เป็นการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักของ PMF จากตัวอย่างกับฐานข้อมูลสารสนเทศ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่อาจส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนระหว่างกระบวนการสืบค้นชนิดโปรตีนได้ จึงต้องยืนยันชนิดจากการใช้ลำดับกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence, PPS) ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลจากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีได้ถูกนำไปสืบค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล NCBInr ผ่านทางเวบไซต์ www.matrixscience .com

เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาเลือกชนิดของจุดโปรตีน ได้แก่ ความสอดคล้องระหว่างมวลโมเลกุลและค่า pI ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี 2D SDS-PAGE (observed MW./pI) กับฐานข้อมูล (theoretical MW./pI) คะแนนที่ได้จากการสืบค้นในฐานข้อมูล (mowse score) โดยจะต้องมีค่ามากกว่า based mowse score เปอร์เซ็นต์การครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดนั้น (%coverage) และวิธีการวิเคราะห์ (method) การวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี (PMF และ PPS) ผลการสืบค้นควรได้โปรตีนชนิดเดียวกัน การพิจารณาทำโดยพิจารณาค่า mowse score ซึ่งควรสูงกว่าค่า based mowse score มีค่า %coverage สูงกว่า 10% กรณีที่โปรตีนที่ค้นพบมีค่า mowse score ต่ำกว่าค่า based mowse score จะพิจารณาที่วิธีวิเคราะห์ และความสอดคล้องของค่า MW./pI หากเกณฑ์ทั้ง 2 มีความสอดคล้องกันก็จะพิจารณาเลือกโปรตีนชนิดนั้น ส่วนโปรตีนที่ผลการสืบค้นจากการวิเคราะห์ด้วย PMF ไม่ตรงกับ PPS จะพิจารณาความสอดคล้องของค่า MW./pI

ผลการศึกษาพบว่ามีโปรตีนที่ได้รับการยืนยันชนิดจำนวน 50 ชนิด จากโปรตีนที่มีความแตกต่างทางสถิติจำนวน 60 จุด ซึ่งเป็นการระบุชนิดด้วยเครื่อง MALDI-TOF จำนวน 32 ชนิด เครื่อง LC-MS/MS จำนวน 6 ชนิด และทั้ง 2 เครื่อง จำนวน 12 ชนิด (ตารางที่ 3.9) ลำดับกรดอะมิโนจากการวิเคราะห์จาก PMF และ PPS ที่ตรงกับฐานข้อมูลได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.10 และ 3.11 ตามลำดับ

โปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ชนิดจำนวน 50 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cell differentiation) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (Energy synthesis) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immune defense) กลุ่มโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction) และโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่อยู่ในกลุ่มข้างต้น

ตารางที่ 3.9 ชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีนจำนวน 50 ชนิด ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF และ LC-MS/MS และสืบค้นในฐานข้อมูล NCBInr

No.	protein ID	Protein name	Observed MW./pI	Theoretical MW./pI	accession No.	*	**	% coverage	method	Protein function	Expression in cancer	Reference
1	155	Eukaryotic translation elongation factor 2	78.58/8.55	96.25/6.41	NP_001952	81	66	25%	MAL	Translation factor	up in L	Perentesis, 1992
2	562	Translation elongation factor 1γ	41.06/7.96	48.75/6.24	EAW74026	67	66	21%	MAL	Translation factor	up in E and L	Lew *et al*., 1992
				50.43/6.25	NP_001395	98	42	18%	LC			
3	168	Heat shock protein 90 kDa	70.16/5.42	68.61/5.11	AAI08696	80	66	26%	MAL	Chaperone protein	up in E and L	Csermely *et al*., 1998
4	195	Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1	66.39/8.48	71.08/5.37	NP_006588	104	66	26%	MAL	Chaperone protein	up in L	Son *et al*., 2005
5	225	Heat shock 70kDa protein 5	64.84/5.44	72.4/5.07	NP_005338	258	66	44%	MAL	Chaperone protein	up in E and L	Son *et al*., 2005
6	245	Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 2	59.24/6	53.6/5.62	NP_694881	111	66	30%	MAL	Chaperone protein	up in E and L	Son *et al*., 2005
7	336	Chaperonin containing TCP1, subunit 6A	53.55/8.15	53.71/6.85	NP_001009186	35	66	15%	MAL	Chaperone protein	up in E and L	Frydman *et al*., 1992
8	679	Keratin 1	34.41/867	66.2/8.16	AAG41947	82	66	21%	MAL	Keratinocyte differentiation	up in E and L	Moll et al., 2008
9	455	Keratin 6A	46.79/7.77	60.32/7.59	AAH69269	119	66	33%	MAL	Keratinocyte proliferation	up in E and L	Moll et al., 2008
10	985	Keratin 17	39.9/5.38	48.36/4.87	NP_000413	195	66	44%	MAL	Protein synthesis regulator	up in E and L	Kim et al., 2006
				48.61/4.97	NP_000413	808	42	50%	LC			

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

No.	protein ID	Protein name	Observed MW./pI	Theoretical MW./pI	accession No.	*	**	% coverage	method	Protein function	Expression in cancer	Reference
11	345	Peripherin	51.36/5.73	53.96/5.43	AAA60190	47	66	18%	MAL	Neuronal intermediate filament	up in E and L	Ericksson *et al*., 2008
12	295	Tranketolase	60.95/8.97	58.74/6.51	AAH24026	138	66	21%	MAL	Pentose phosphate pathway enzyme	up in E and L	Lengbein, 2006
				68.44/7.9	CAA47919	162	43	38%	LC			
13	361	Pyruvate kinase 3	50.81/9.04	60.28/8.22	1ZJH_A	108	66	39%	MAL	Glycolytic enzyme	up in E and L	Ervens et al., 2008
				58.45/7.95	AAA36449	353	42	58%	LC			
14	544	Enolase 1	41.3/8.52	47.48/7.01	NP_001419	134	66	29%	MAL	Glycolytic enzyme	up in E and L	Liu, 2007
				47.49/7.01	NP_001419	837	42	68%	LC			
15	640	Phosphoglycerate kinase 1	35.96/9.32	44.99/8.30	NP_000282	351	42	51%	LC	Glycolytic enzyme	up in E and L	Semenza *et al*., 1994
16	766	L-Lactate Dehydrogenase	31.96/9.4	36.82/8.46	1I10_A	78	66	23%	MAL	Anaerobic respirational enzyme	up in E and L	Koukourakis *et al*., 2003
				36.95/8.44	NP_005557	337	43	34%	LC			
17	852	Triosephosphate isomerase	22.18/8.49	26.81/6.51	1HTI_A	46	66	15%	MAL	Glycolytic enzyme	up in E and L	Robert *et al*., 1961
				26.81/6.51	1HTI_A	299	43	48%	LC			
18	551	2-phosphopyruvate-hydratase α-enolase	41.54/8.83	47.42/7.01	CAA59331	87	66	20%	MAL	Glycolytic enzyme	up in L	Liu, 2007
19	752	(R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase	32.13/9.67	38.51/8.64	AAA58352	52	66	18%	MAL	Ketone synthetic and degraded enzyme	up in L	Chelius *et al*., 2000
20	151	Squamous cell carcinoma antigen 1	73.55/8.37	35.46/7.77	AAO92269	38	66	24%	MAL	Serine protease inhibitors	up in E and L	Huang *et al*., 2006

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

No.	protein ID	Protein name	Observed MW./pI	Theoretical MW./pI	accession No.	*	**	% coverage	method	Protein function	Expression in cancer	Reference
21	406	Tubulin alpha 6	47.32/5.55	50.55/4.96	NP_116093	130	66	26%	MAL	Main protein in microtubules	up in E and L	Oakley, 2000
				50.55/4.96	NP_116094	363	43	34%	LC			
22	438	Tubulin, beta 2	46.13/5.37	49.25/4.88	EAW88369	95	66	20%	MAL	Main protein in microtubules	up in E and L	Oakley, 2000
				50.26/4.79	NP_006079	896	42	57%	LC			
23	678	tRNA splicing endonuclease	34.49/9.49	33.74/8.53	NP_076980	39	66	23%	MAL	Pre-tRNA splicing enzyme	up in E and L	Winay and Culbertson., 1988
24	681	Protein phospatase 1F	34.36/6.97	31.42/5.48	EAW5943	31	66	10%	MAL	Proliferation associated protein	up in E and L	Luo *et al*., 2007
25	823	Tumor protein D52	23.36/4.94	22.49/5.46	NP_003278	47	66	33%	MAL	Vesicle traffic regulator	up in E and L	Boutros *et al*., 2004
26	871	Translationally controlled tumor associated protein	20.59/5.22	19.97/4.79	1YZ1_A	60	66	31%	MAL	Antioxidant	up in E and L	Gnanasekar and Ramaswamy., 2007
27	486	Thymidine phosphorylase	43.8/5.7	49.51/5.28	1UOU_A	95	66	25%	MAL	Angiogenic enzyme	up in L	Moghaddam *et al*., 1995
				50.35/5.36	AAH5221	357	42	46%	LC			
28	555	KIAA1199	40.5/9.68	57.51/9.28	AAG41059	51	66	21%	MAL	Proliferation associated protein	up in E and L	Michishita *et al*., 2006
29	802	Tumor necrosis factor-α converting enzyme	25.54/4.52	30.03/5.79	1ZXC_A	36	66	23%	MAL	Proliferation associated protein	up in E and L	Moro *et al*., 2003
30	326	Matrix metalloproteinase 1	52.13/5.41	46.7/6.57	BAD96776	31	66	12%	MAL	Extracellular matrix for development	up in E and L	Nagase *et al*., 1999

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

No.	protein ID	Protein name	Observed MW./pI	Theoretical MW./pI	accession No.	*	**	% coverage	method	Protein function	Expression in cancer	Reference
31	306	WD repeat domain 1	59.36/8.25	58.58/6.41	EAW92689	92	66	19%	MAL	Signal transducer	up in E and L	Fujibuchi *et al*., 2005
32	890	Cofilin 1	15.69/9.25	18.72/8.22	NP_005498	166	43	33%	LC	Actin modulating protein	up in E and L	Toshima *et al*., 2001
33	670	Vimentin	34.65/5.12	35.09/4.7	AAA61282	46	66	20%	MAL	Cell migration associated protein	up in E and L	Nieminen *et al*., 2006
34	893	Aldehyde dehydrogenase 4	15.23/9.13	16.65/8.8	CIA39492	41	66	32%	MAL	Aldehyde oxidation associated protein	up in L	Yoshida *et al*., 1998
35	817	Stratifin	23.28/4.74	27.87/4.68	NP_006133	125	66	35%	MAL	Phosphorylational enzyme	up in E and L	Dellambra, 1995
				27.88/4.68	NP_006134	550	42	66%	LC			
36	316	Aminopeptide puromycin sensitive	56.14/7.78	55.14/6.01	EAW94813	35	66	8%	MAL	Peptide digestic enzyme	up in E and L	Bhutani *et al*., 2007
37	861	Karyopherin beta-2	21.64/8.65	24.52/7.01	1QBK_C	88	43	24%	LC	Nuclear transport protein	up in E and L	Chook and Blobel, 1999
38	954	Translation initiation factor 5A isoform B	15.19/5.52	17.05/5.08	NP_001961	19	43	23%	LC	Nuclocytoplasmic shuttle protein	up in E and L	Somoza-Martin *et al*., 1990
39	815	Proteasome activator	23.97/6.84	28.88/5.78	NP_006254	151	43	29%	LC	Immunoproteasome system activator	up in E and L	Zhang *et al*., 2007
40	866	MHC class I antigen	21.15/6.56	21.05/5.97	CAL69876	33	66	43%	MAL	Immune associated protein	up in E and L	Shawer *et al*., 2009

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

No.	protein ID	Protein name	Observed MW./pI	Theoretical MW./pI	accession No.	*	**	% coverage	method	Protein function	Expression in cancer	Reference
41	897	B cell anitibody heavy chain variable region	13.98/8.61	13.32/8.39	ABF83309	28	66	15%	MAL	Antibody	up in E and L	Chen and Gu, 2007
42	908	Imminoglobulin M heavy chain	11.99/8.23	9.4/8.93	CAA05651	34	66	77%	MAL	Antibody	up in E and L	Chen and Gu, 2007
43	329	AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase	54.82/8.22	64.94/6.39	AAA97405	53	66	19%	MAL	Inosine monophophate synthesis enzyme	up in E and L	Rayl *et al*., 1996
44	777	Proliferating cell nuclear antigen	30.7/4.75	29.09/4.57	NP_002583	36	66	16%	MAL	DNA replication and repair regulator	up in E and L	Essers *et al*., 2005
45	465	Pertussis toxin-insensitive G protein	46.21/8.25	41.43/7.53	BAA14180	31	66	23%	MAL	Signal transducers	up in E and L	Sugiua *et al*., 1996
46	847	Horf6	22.65/8	25.13/6	NP_004896	52	66	16%	MAL	Intracellular messenger	up in E and L	Choi *et al*., 1998
				25.01/6	1PRX_A	111	43	31%	LC			
47	899	Fatty acid binding protein 5	12.77/7.63	15.5/6.6	NP_001435	109	43	26%	LC	Signal transducer	up in L	Uma *et al*., 2007
48	609	Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	37.87/8.49	35.56/7.42	NP_002345	34	66	21%	MAL	Cell adhesion molecule	up in E and L	Simon *et al*., 1990
49	894	Cervical cancer 1 protooncogene	14.93/9.55	17.42/9.6	AAP85625	34	66	44%	MAL	unknown	up in E and L	Jiang *et al*. 2004
50	1010	Albumin	60.35/7.22	68.43/5.67	1A06_A	133	66	31%	MAL	Serum transporter	down in L	Mcculey *et al*., 1683

หมายเหตุ

1. * หมายถึง Mowse score
2. ** หมายถึง Based mowse score
3. MAL หมายถึง การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF
4. LC หมายถึง การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS
5. E หมายถึง มะเร็งระยะเริ่มต้น
6. L หมายถึง มะเร็งระยะท้าย

ตารางที่ 3.10 ลำดับกรดอะมิโนจากการวิเคราะห์ Peptide mass fingerprint ที่ตรงกับฐานข้อมูล

No.	Protein ID	Protein name	Matched peptide sequence
1	155	Eukaryotic translation elongation factor 2	VNFTVDQIRNMSVIAHVDHGKAGETRFTDTRQFAEMYVAKGEGQLGPAERVEDMMKKYFDPANGKVFDAIMNFKGPLMMYISKVFSGLVSTGLKEDL YLKPIQRTGTITTFEHAHNMRNPADLPKLVEGLKSDPVVSYRGVQYLNEIKGGGQIIPTARCLYASVLTAQPRGHVFEESQVAGTPMFVVKAYLPVNES FGFTADLREGIPALDNFLDKL
2	562	Translation elongation factor 1γ	ALIAAQYSGAQVRQVLEPSFRQAFPNTNRLCEKMAQFDAKFAETQPKKQKPQAERKAKDPFAHLPKSTFVLDEFKRLDPGSEETQTLVR
3	168	Heat shock protein 90 kDa	ELHINLIPNKQDRADLINNLGTIAKTDTGEPMGRGTKVILHLKEDQTEYLEERYIDQEELNKNPDDITNEEYGEFYKHFSVEGQLEFRRAPFDLFENRKG VVDSEDLPLNISRFYEQFSKHIYYITGETKDQVANSAFVEREGLELPEDEEEKNQTAEKEEFEHQQK
4	195	Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1	VEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERNQVAMNPTNTVFDAKSFYPEEVSSMVLTKTVTNAVVTVPAYFNDSQRIINEPTAAAIAYGLDKKSTAGDTHLGGE DFDNRMVNHFIAEFKARFEELNADLFRSQIHDIVLVGGSTRLLQDFFNGKNSLESYAFNMK
5	225	Heat shock 70kDa protein 5	VEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERNQLTSNPENTVFDAKTKPYIQVDIGGGQTKTFAPEEISAMVLTKVTHAVVTVPAYFNDAQRDAGTIAGLNVMRIIN EPTAAAIAYGLDKRVMEHFIKALSSQHQARIEIESFYEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRKSDIDEIVLVGGSTREFFNGKEPSRSQIFSTASDNQPTVTI KVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRITITNDQNRLTPEEIERNELESYAYSLKELEEIVQPIISKLYGSAGPPPTGEEDTAEKDEL
6	245	Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 2	VEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERNQVAMNPTNTVFDAKSFYPEEVSSMVLTKTVTNAVVTVPAYFNDSQRIINEPTAAAIAYGLDKKSTAGDTHLGGE DFDNRMVNHFIAEFKARFEELNADLFRSQIHDIVLVGGSTRLLQDFFNGK
7	406	Tubulin alpha 6	TIGGGDDSFNTFFSETGAGKAVFVDLEPTVIDEVRQLFHPEQLITGKEDAANNYAREIIDLVLDRNLDIERPTYTNLNRIHFPLATYAPVISAEKVGINYQP PTVVPGGDLAKFDLMYAK
8	438	Tubulin beta 2	INVYYNEATGGKAVLVDLEPGTMDSVRIREEYPDRIMNTFSVVPSPKFPGQLNADLRKLAVNMVPFPREVDEQMLNVQNKISEQFTAMFR
9	679	Keratin 1	SGGGFSSGSAGIINYQRSLNNQFASFIDKFLEQQNQVLQTKTNAENEFVTIKSLDLDSIIAEVKAQYEDIAQKSKAEAESLYQSKYEELQITAGRIEISELN RQISNLQQSISDAEQRDYQELMNTKTLLEGEESR
10	455	Keratin 6A	GFSANSARLPGVSRSGFSSVSVSRFLEQQNKQLDSIVGERGRLDSELRGMQDLVEDFKTAAENEFVTLKDVDAAYMNKADTLTDEINFLRNLDLDSIIA EVKAQYEEIAQRSRYEELQVTAGRQEIAEINRSEIDHVKKNKLEGLEDALQKAKQDLAWLLKKLLEGEECRAIGGGLSSVGGGSSTIK

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

No.	Protein ID	Protein name	Matched peptide sequence
11	985	Keratin 17	QFTSSSSIKLSGGLGAGSCRATMQNLNDRALEEANTELEVKDYSQYYRTIEELQNKTKFETEQALRLSVEADINGLRVLDELTLARNHEEEMNALREVA TN ELVQSGKSEISELRRTMQALEIELQSQLSMKASLEGNLAETENRTRLEQEIATYRRLLEGEDAHLTQYKQVRTIVEEVQDGKEQVHQTTR
12	295	Tranketolase	ISSDLDGHPVPKLDNLVAILDINRHQPTAIIAKILATPPQEDAPSVDIANIRNSTFSEIFKKSVPTSTVFYPSDGVATEKTSRPENAIIYNNNEDFQVGQAKV LDPFTIKPLDR
13	316	Aminopeptide puromycin sensitive	KGMNMYLTKLKILMDKPEMNVVLKAGIISTVEVLKATLEEARR
14	544	Enolase 1	GNPTVEVDLFTSKAAVPSGASTGIYEALELRKLNVTEQEKLAMQEFMILPVGAANFRIGAEVYHNLKDATNVGDEGGFAPNILENKVVIGMDVAASEFF RSGKYDLDFKYISPDQLADLYKIEEELGSK
15	551	2-phosphopyruvate-hydratase α-enolase	GNPTVEVDLFTSKAAVPSGASTGIYEALELRIGAEVYHNLKDATNVGDEGGFAPNILENKSGKYDLDFKYISPDQLADLYKIEEELGSK
16	329	AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase	DVSELTGFPEMLGGRNIPEDNADMARGTSLETRRQYSKGVSQMPLREALGIPAAASFKTLTPISAAYARRNNGVVDKSLFSNVVTKNGQVIGIGAGQQ SRRSGVAYIAAPSGSAADK
17	678	tRNA splicing endonuclease	MLVVEVANGRRQELLEKITEGQAAKKSALLVQLATARPRPVKARPLDWRKTLLLCSPQPDGKVVYTSLQWASLQ
18	681	Protein phospatase 1F	RTDQMFLRKLMEPHRPERQDEKVNGTLAVSR
19	802	Tumor necrosis factor-α converting enzyme	RADPDPMKLLVVADHRSPQEVKPGEKKNIYLNSGLTSTKNYGKTILTKTIESKAQECFQER
20	847	Horf6	LPFPIIDDRVVFVFGPDKKNFDEILR
21	852	Triosephosphate isomerase	HVFGESDELIGQKTATPQQAQEVHEKSNVSDAVAQSTR
22	486	Thymidine phosphorylase	VSLVLAPALAACGCKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEQARVAAALTAMDKPLGRVAAALDDGSALGRMLAAQGVDPGLAREQEELLAPADGTVEL VRDGPALSGPQSRALQEALVLSDR
23	326	Matrix metalloproteinase 1	LTFDAITTIRDRFYMRRSMDPGYPKDGFFYFFHGTRQYKFDPKANSWFNCR
24	752	(R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase	GFLVFAGCLMKDKGHDGVKELDSLNSDRQVAEVNLWGTVRSFLPLIRRYEMYPLGVKYFDEKIAK

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

No.	Protein ID	Protein name	Matched peptide sequence
25	766	L-Lactate Dehydrogenase	DQLIYNLLKDLADELALVDVIEDKLKGEMMDLQHGSLFLRLVIITAGARFIIPNVVKQVVESAYEVIKVTLTSEEEAR
26	893	Aldehyde dehydrogenase 4	NKAIEAALAARKEWDLKPIADRAQIFLKAADMLSGPREGVVTLPLCQMTK
27	361	Pyruvate kinase 2	LDIDSPPITARLNFSHGTHEYHAETIKTATESFASDPILYRPVAVALDTKITLDNAYMEKIYVDDGLISLQVKGADFLVTEVENGGSLGSKKGVNLPGAAV DLPAVSEKFGVEQDVDMVFASFIRIENHEGVRRFDEILEASDGIMVARGDLGIEIPAEKGDYPLEAVREAEAAIYHLQLFEELRLAPITSDPTEATAVGAV EASFKVNFAMNVGK
28	151	Squamous cell carcinoma antigen 1	MNSLSEANTKDNTAQQIKSTDAYELKIANKEEKFWPNKNTYKSIQMMRVDLHLPRFKVEESYDLKDTLRTMGMV
29	609	Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	LAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKCLVMKAEMNGSKSLRTALQK
30	823	Tumor protein D52-like 1	HLVEIKQKLGMNLMNELKQNFSKSWHDMQTTTAYKATAAFSNVGTAISKKFGDMSYSIRHSISMPAMR
31	871	Translationally controlled tumor associated protein	DLISHDEMFSDIYKLEEQRPERVKPFMTGAAEQIKEDGVTPYMIFFKDGLEMEKC
32	894	Cervical cancer 1 protooncogene	MALSRVCWARLQLGRSGLAWGAPRSSKLHLSPKADVKNLMSYVVTKYHRFLGRHFPRAGDWPADCSGSK
33	908	Imminoglobulin M heavy chain	SGFNFRGFFMHWVRQAAGKGLVWVSRISGDGGITNYADPVKGRDTLFLQMNTLRAEDTAVYYCAR
34	1010	Serum albumin	FKDLGEENFKLVNEVTEFAKSLHTLFGDKQEPERNECFLQHKYLYEIARAAFTECCQAADKLDELRDEGKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKTYETTL EKFQNALLVRKVPQVSTPTLVEVSRCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKKQTALVELVKAVMDDFAAFVEKADDKETCFAEEGKK
35	306	WD repeat domain 1	KVFASLPQVERYAPSGFYIASGDVSGKYEYQPFAGKIAVVGEGREKFKFTVGDHSRFVNCVRFATASADGQIYIYDGKNNPSKPLHVIKLYSILGTTLKD EGK
36	336	Chaperonin containing TCP1, subunit 6A	MILVSGAGDIKIITEGFEAAKALQFLEEVKETLIDVARSETDTSLIRGLVLDHGARTEVNSGFFYKGFVVINQK
37	345	Peripherin	LLGSASPSSSVRALLRLPSERFLEQQNAALRGELSQARDGLAEDLAALKQRIESLMDEIEFLKKLHEEELRNHEALRQAKEYQELLNVK
38	465	Pertussis toxin-insensitive G protein	LLLLGTSNSGKIDFHNPDRGEITPELLGVMRRIAAADYIPTVEDILRSRFTFKELTFKRIPLTICFPEYKGQNTYEEAAVYIQR

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

No.	Protein ID	Protein name	Matched peptide sequence
39	555	KIAA1199	GSAAARVFKVSQTKGGEKISDLWKFLCGKPVRPKSCAPNQVKAAHLEGTELKNTFDHCLGLLVKTLPIGQNFPIRNDNWLVRNAGVSDCTATAYPKAV VDVPMPKKLFGSQLKTKDHFLEVKGPWTRVLEKEQMAFVGFKAKIFQVVPIPVVK
40	670	Vimentin	LQEEMLQREEAENTLQSFRNNDALRQAKQESTEYRGTNESLERLQDEIQNMKEEMARHLR
41	777	Proliferating cell nuclear antigen	MFEGRLVQGSILKSEGFDTYRCAGNEDIITLRMPSGEFARLSQTSNVDKYLNFFTKIADMGHLKYNLAPK
42	817	Stratifin	YEDMAAFMKNLLSVAYKVLSSIEQKSNEEGSEEKGPEVRMKGDYYRYLAEVATGDDKSAYQEAMDISKKEMPPTNPIRDSTLIMQLLR
43	866	MHC class I antigen	YFSTSVSRPGRGEPRFDSDAASQRMEPRENLRIALRFLRGYHQYAYDGRDYIALKKWEAAHVAEQQRAYLEGTCVDGLR
44	897	B cell anitibody heavy chain variable region	NYVDSVKGRVVFLQMTGLR

ตารางที่ 3.11 ลำดับกรดอะมิโนจากการวิเคราะห์ Partial peptide sequence ที่ตรงกับฐานข้อมูล

No.	Protein ID	Protein name	Matched peptide sequence
1	562	Tranlation elongation factor 1γ	ALIAAQYSGAQVRILGLLDAYLKQVLEPSFRWFLTCINQPQFRSTFVLDEFKRLDPGSEETQTLVREYFSWEGAFQHVGK
2	406	Tubulin alpha 6	QLFHPEQLITGKEDAANNYAREIIDLVLDRLSVDYGKNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASLRIHFPLATYAPVISAEKYMACCLLYRDVNAAIATIKAVCM LSNTTAVAEAWARLDHKFDLMYAKAFVHWYVGEGMEEGEFSEAREDMAALEK
3	438	Tubulin beta 2	EIVHLQAGQCGNQIGAKINVYYNEATGGKAVLVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRIREEYPDRI MNTFSVVPSPKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVPFPRLHFFMPGFAPLTSRALTVPELTQQMFDAKYLTVAAVFREVD EQMLNVQNKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRMSATFIGNSTAIQELFKISEQFTAMFR
4	985	Keratin 17	LSGGLGAGSCRLASYLDKIRDWYQRDYSQYYRTIEELQNKILTATVRADLEMQIENLKEELAYLKNHEEEMNALRGQVGGEINVEMDAAPGVDLSRDA EDWFFSKEVATNS ELVQSGKSEISELRTMQALEIELQSQLSM KASLEGNLAETENRTRLEQEIATYRLLEG EDAHLTQYKTIVEEVQDGK
5	295	Transketolase	FVLSKISSDLDGHPVPKLDNLVAILDINRLGQSDPAPLQHQMDIYQKCEAFGWHAIIVDGHSVEELCKHQPTAIIAKNMAEQIIQEIYSQIQSKILATPPQE DAPSVDIANIRMPSLPSYKNSTFSEIFKKTVPFCSTFAAFFTRAFDQIRSKDDQVTVIGAGVTLHEALAAAELLKVLDPFTIKPLDRKLILDSARILTVEDHY YEGGIGEAVSSAVVGEPGITVTHLAVNRGLITK
6	544	Enolase 1	EIFDSRGNPTVEVDLFTSKAAVPSGASTGIYEALELRTIAPALVSKLNVTEQEKLMIEMDGTENKFGANAILGVSLAVCKHIADLAGNSEVILPVPAFNVIN GGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFRIGAEVYHNLKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDKVVIGMDVAASEFFRYDLDFKYISPDQL ADLYKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKLAQANGWGVMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKYNQLLRIEEELGSK
7	847	Horf6	DFTPVXTTELGRLPFPIIDDRVVFVFGPDKKLSILYPATTGRVVISLQLTAEKDGDSVMVLPTIPEEEAK
8	852	Triosephosphate isomerase	KFFVGGNWKQSLGELIGTLNAAKIAVAAQNCYKDCGATWVVLGHSERVAHALAEGLGVIACIGEKVVLAYEPVWAIGTGKSNVSDAVAQSTRELASQP DVDGFLVGGASLKPEFVDIINAK
9	486	Thymidine phosphorylase	QLPELIRVSLVLAPALAACGCKLVEGLSALVVDVKFGGAAVFPNQEQARTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQ GAARVAAALDDGSALGRMLAAQGVDPGLARALCSGSPAEREQEELLAPADGTVELVRALPLALVLHELGAGRLGVGAELLVDVGQRDGPALSGPQS RALQEALVLSDRAPFAAPLPFAELVLPPQQ
10	766	L-lactate dehydrogenase	DQLIYNLLKDLADELALVDVIEDKGEMMDLQHGSLFLRLVIITAGARNVNIFKVIGSGCNLDSARTLHPDLGTDKGYTSWAIGLSVADLAESIMKVTLTSE EEARSADTLWGIQK

ตารางที่ 3.11 (ต่อ)

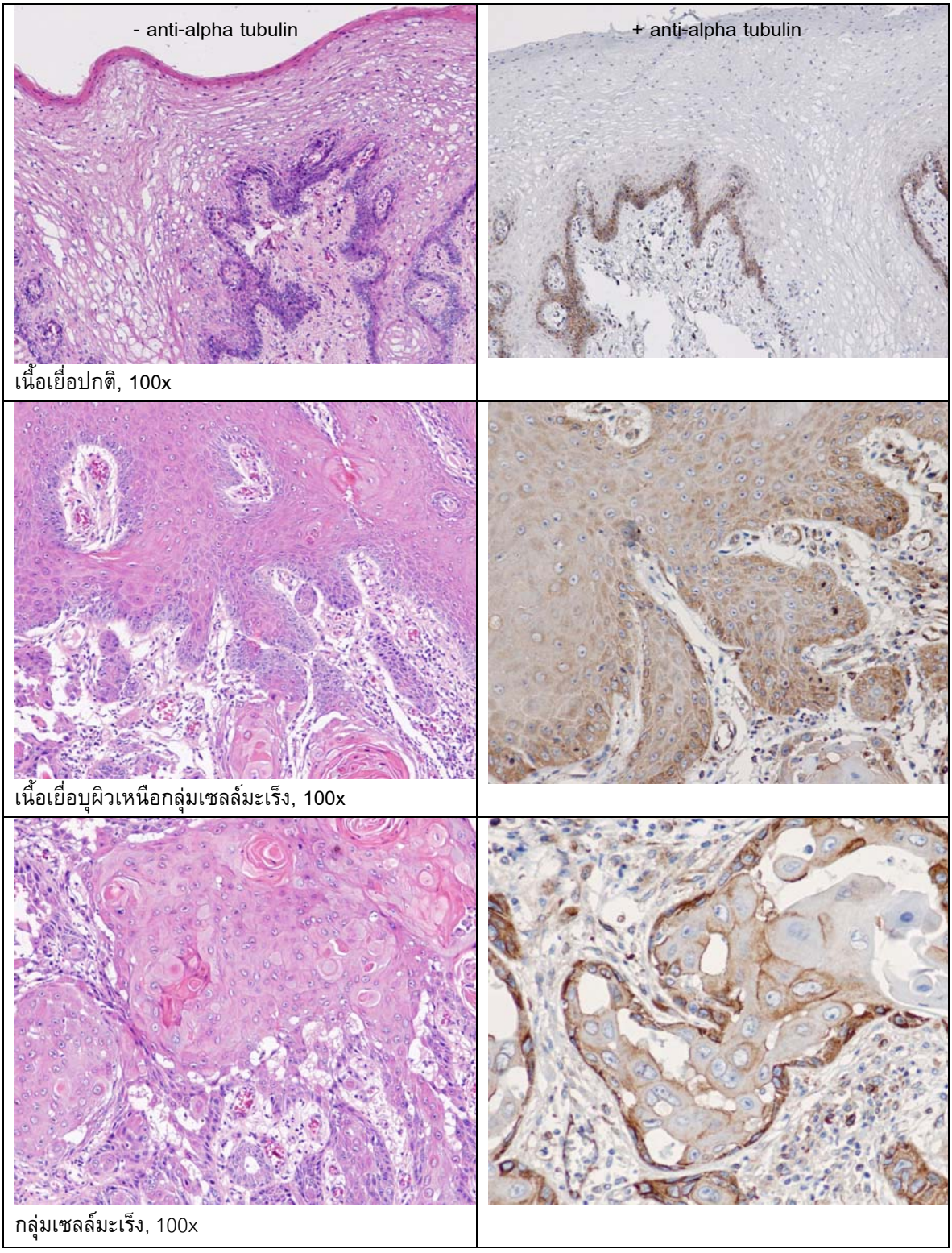
No.	Protein ID	Protein name	Matched peptide sequence
11	640	Phosphorylate kinase 1	VDFNVPMKAAVPSIKFCLDNGAKYSLEPVAVELKSLLGKDCVGPEVEKACANPAAGSVILLENLRFHVEEEGKLGDVYVNDAFGTAHRAHSSMVGVNL PQKAGGFLMKIQLINNMLDKVNEMIIGGGMAFTFLKVLNNMEIGTSLFDEEGAKITLPVDFVTADKFDENAKALMDEVVKGCITIIGGGDTATCCAKVSH VSTGGGASLELLEGK
12	815	Proteasome activator	TENLLGSYFPKISELDAFLKEPALNEANLSNLKAPLDIPVPDPVKIVVLLQRLEGFHTQISKNAYAVLYDIILK
13	361	Pyruvate kinase 2	LDIDSPPITARNTGIICTIGPASRLNFSHGTHEYHAETIKTATESFASDPILYRPVAVALDTKGSGTAEVELKKITLDNAYMEKCDENILWLDYKIYVDDGLI SLQVKGADFLVTEVENGGSLGSKKGVNLPGAAVDLPAVSEKDIQDLKIENHEGVRFDEILEASDGIMVARGDLGIEIPAEKVFLAQKMMIGRAGKPVICA TQMLESMIKAEGSDVANAVLDGADCIMLSGETAKGDYPLEAVREAEAAIYHLQLFEELRRCCSGAIIVLTKAPIIAVTRGIFPVLCKKGDVVIVLTGWRPG SGFTNTMR
14	817	Stratifin	YEDMAAFMKGEELSCEERNLLSVAYKVLSSIEQKSNEEGSEEKGPEVREKVETELQGVCDTVLGLLDSHLIKVFYLKYLAEVATGDDKSAYQEAMDIS KKEMPPTNPIRLGLALNFSVFHYEIANSPEEAISLAKTTFDEAMADLHTLSEDSYKDSTLIMQLLR
15	861	Karyopherin beta 2	LVLVGDGGTGKHLTGEFEKFNVWDTAGQEKVCENIPIVLCGNKNLQYYDISAK
16	899	Fatty acid binding protein 5	GFDEYMKELGVGIALRTTQFSCTLGEKFEETTADGR
17	954	Translation initiation factor 5A	VHLVGIDIFTGKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVR
18	890	Cofilin 1	AVLFCLSEDKKNIILEEGKFVKMLPDKDCRYALYDATYETKKEDLVFIFWAPESAPLK

3.7. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนตัวบ่งชี้ด้วยวิธี immuno-histochemistry

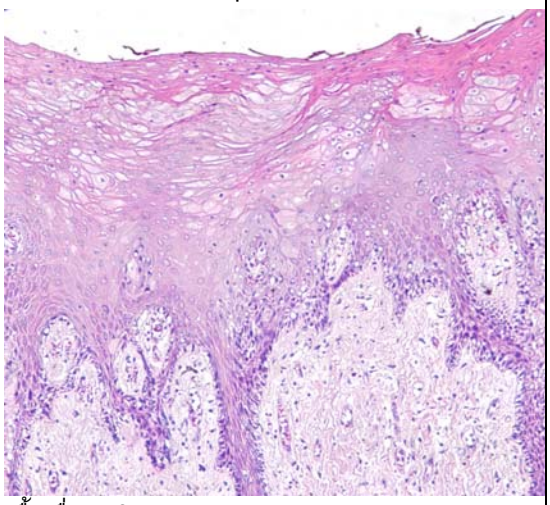
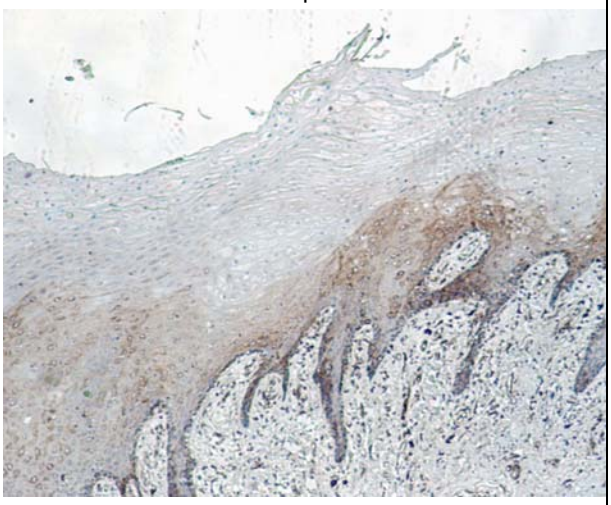
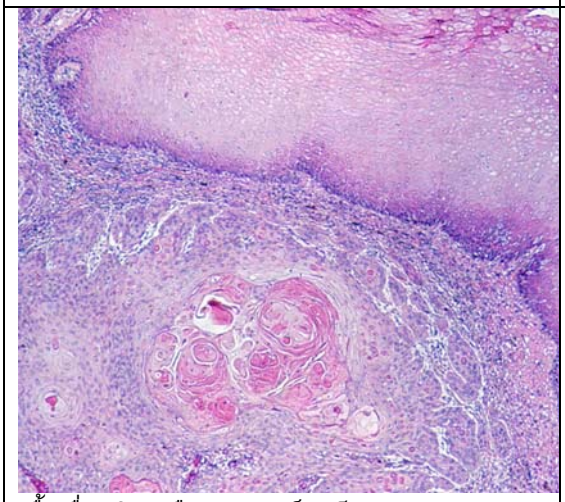
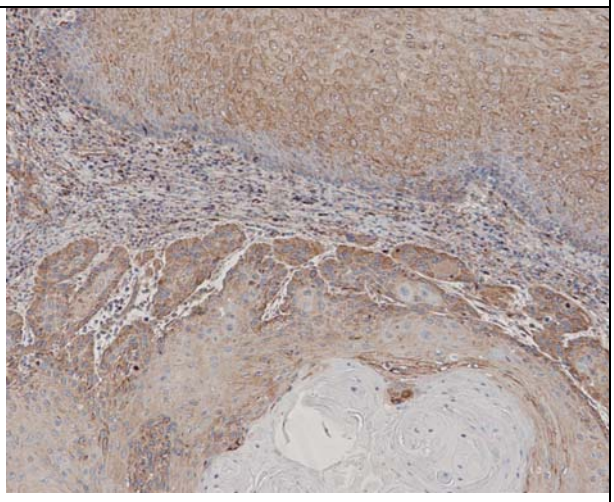
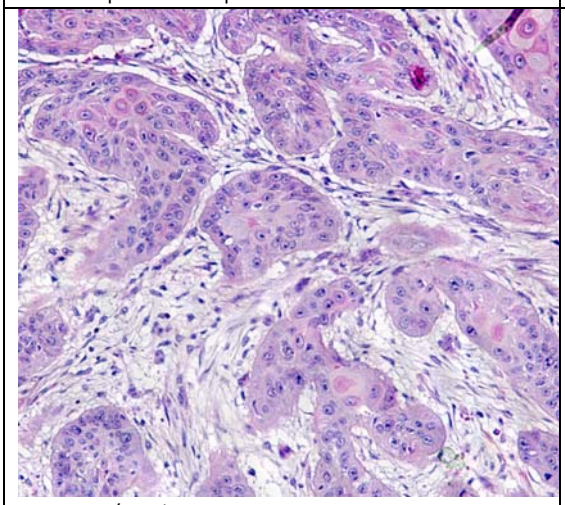
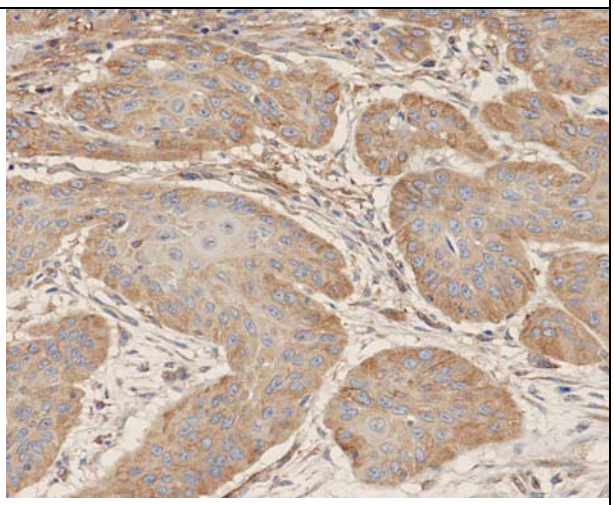
ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน alpha-tubulin และ beta-tubulin ด้วยวิธี immuno-histochemistry โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากระยะต้นและระยะท้าย จำนวน 10 คน โดย 5 คน เป็นตัวอย่างที่ใช้ทำการทดลองในโครงการนี้ และ อีก 5 คน เป็นตัวอย่างที่มาจากผู้ป่วยอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับโครงการนี้ พบว่า การย้อมโปรตีน alpha-tubulin (ภาพที่ 3.14 -3.15) และ beta-tubulin (ภาพที่ 3.16 – 3.17) ติดสีเข้มในบริเวณของกลุ่มเซลล์มะเร็ง โดยการติดสีจะเข้มมากขึ้นในมะเร็งระยะท้าย ในขณะที่บริเวณเยื่อบุผิวปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้นมีการติดสีเฉพาะบริเวณ basal cells แต่การติดสีมีบริเวณกว้างมากขึ้นในเยื่อบุผิวปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้าย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวัดความเข้มของจุดโปรตีนด้วยวิธี 2D SDS-PAGE

ทำให้มั่นใจได้ว่ารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปาก ศึกษาด้วยวิธีโปรตีโอมิกซ์ให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือ และโปรตีนตัวบ่งชี้ที่ระบุได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความเป็นไปได้สูงที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบทางคลินิกได้จริงในอนาคต

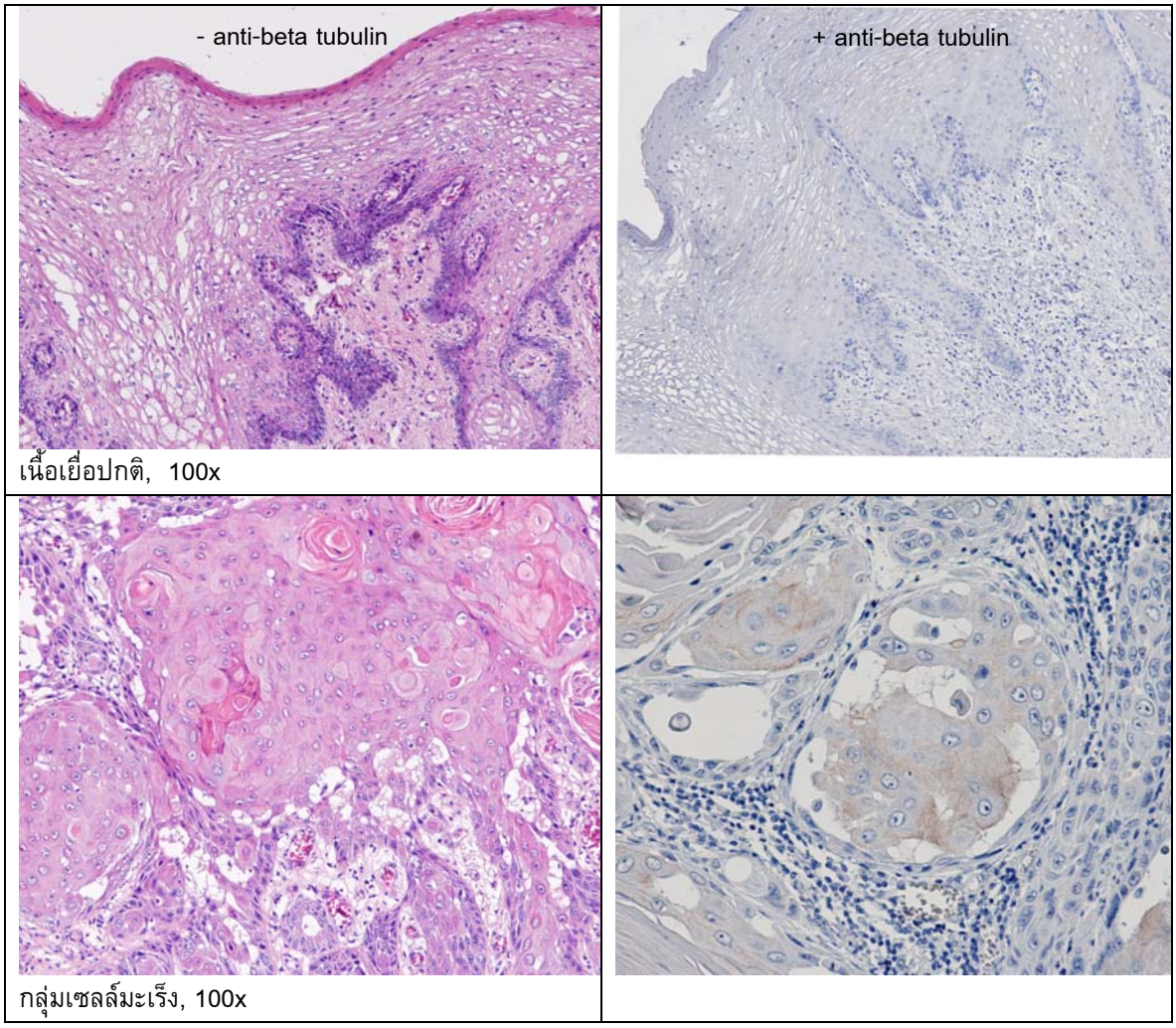
ทั้งนี้โปรตีนตัวบ่งชี้อื่นๆที่เหลือ และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Elongation factor 2, Aminopeptide puromycin sensitive, HSPA8 isoform 2 และ Horf6 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวบ่งชี้ที่ค้นพบได้เป็นครั้งแรกในโครงการนี้ ยังไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี immuno-histochemistry ได้ เพราะไม่สามารถหาซื้อ antibody ได้ เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและยังเป็นโปรตีนที่ไม่ได้เป็นเป้าหมายของการศึกษาอื่นทั่วไป ทำให้ยังไม่มีบริษัทใดผลิต antibody ขาย ซึ่งหากต้องการตรวจสอบจะต้องทำการผลิต antibody เอง ซึ่งไม่ได้อยู่ในขอบเขตของโครงการวิจัยนี้



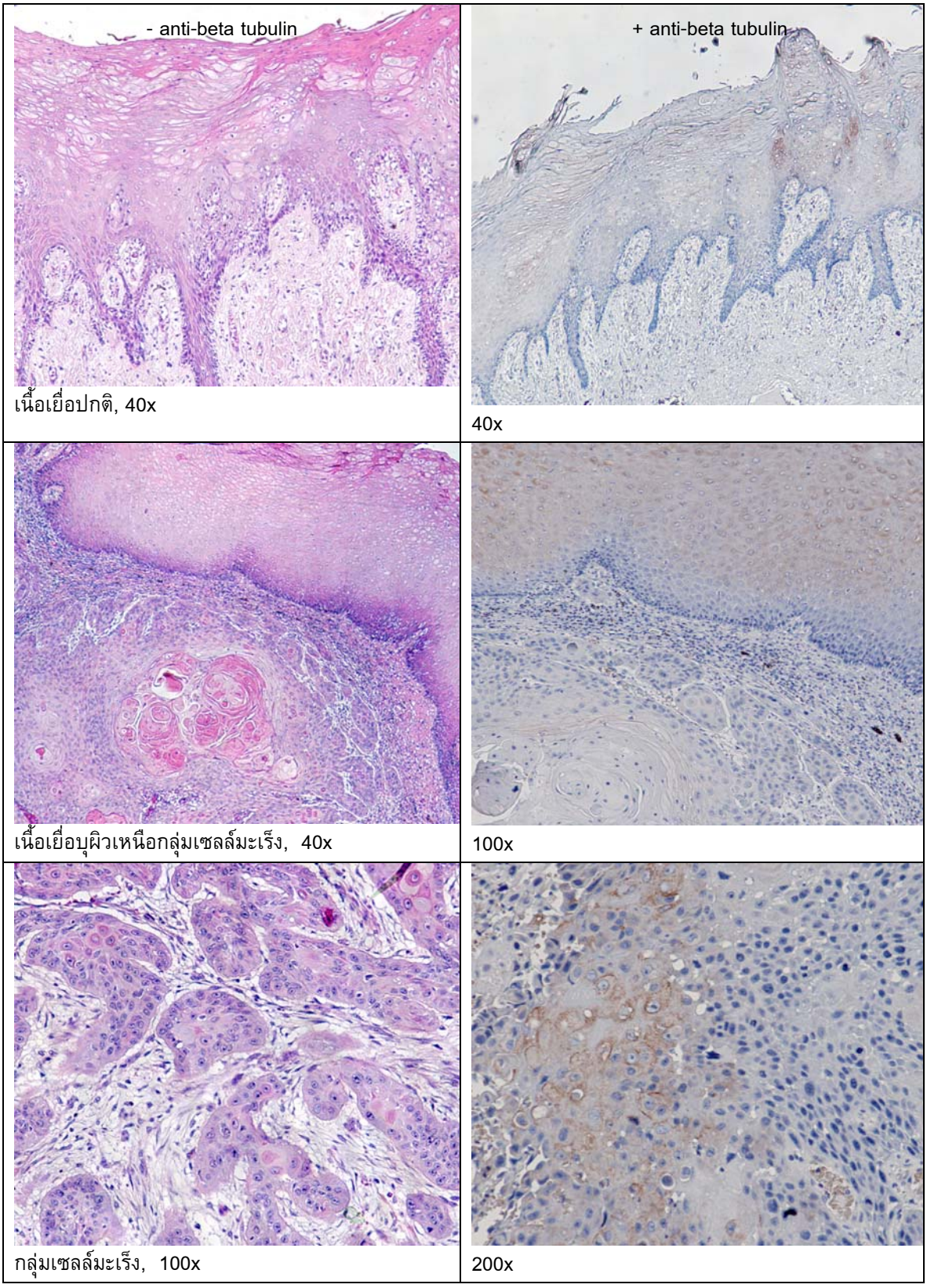
ภาพที่ 3.14 ภาพ Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (OR822) ย้อมด้วย anti-alpha tubulin antibody (คอลัมน์ขวา) หรือ hematoxylin & eosin

- anti-alpha tubulin	+ anti-alpha tubulin
	
เนื้อเยื่อปกติ, 40x	40x
	
เนื้อเยื่อบุผิวเหนือกลุ่มเซลล์มะเร็ง, 40x	100x
	
กลุ่มเซลล์มะเร็ง, 100x	200x

ภาพที่ 3.15 ภาพ Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย (OR900) ย้อมด้วย anti-alpha tubulin antibody (คอลัมน์ขวา) หรือ hematoxylin & eosin



ภาพที่ 3.16 ภาพ Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น (OR822) ย้อมด้วย anti-beta tubulin antibody (คอลัมน์ขวา) หรือ hematoxylin & eosin



ภาพที่ 3.17 ภาพ Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย (OR900 ย้อมด้วย anti-beta tubulin antibody (คอลัมน์ขวา) หรือ hematoxylin & eosin

4. อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบและคัดเลือกบริเวณของเนื้อเยื่อที่จะนำมาศึกษาด้วยวิธี 2D SDS-PAGE โดยการตัดเนื้อเยื่อมะเร็งที่ตัดมาจากผู้ป่วยและแช่แข็งไว้ด้วยเครื่อง cryostat และย้อมสี H&E แม้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์จะเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการศึกษาด้วยวิธี 2D SDS-PAGE แต่อาจไม่สะท้อนรูปแบบการแสดงออกที่แท้จริงของเซลล์ที่อยู่ภายในร่างกาย เพราะเป้าหมายที่สำคัญของการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกซ์ คือ การศึกษาความซับซ้อนในระดับโมเลกุลภายใต้สภาพแวดล้อมจริงของเนื้อเยื่อ (Zang *et al*., 2004) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกศึกษาโปรตีโอมิกซ์จากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก และสามารถนำผลการศึกษามาอภิปรายได้ดังนี้

4.1. การระบุชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนใช้การวิเคราะห์ 2 วิธี คือวิเคราะห์จาก peptide mass fingerprint (PMF) และ partial peptide sequence (PPS) เพื่อเป็นการยืนยันผลการวิเคราะห์ของแต่ละวิธี การวิเคราะห์ PMF ด้วยเครื่อง MALDI-TOF เป็นวิธีที่มีความไว ใช้เวลาน้อยในการเตรียมและวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่าง จึงเหมาะกับการวิเคราะห์โปรตีนจำนวนมาก มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป และเนื่องจากฐานข้อมูลโปรตีนที่ศึกษาในมนุษย์มีมาก จึงทำให้ได้ผลการสืบค้นค่อนข้างดี แต่มีโปรตีนบางจุดที่ให้ผลการสืบค้นยังไม่ชัดเจน เพราะมีค่า mowse score ต่ำ และ/หรือ ค่า MW/pI จากฐานข้อมูลไม่สอดคล้องกับภาพเจล การเตรียมโปรตีนตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ PMF ง่าย และรวดเร็ว เพียงผสมโปรตีนเข้ากับ matrix เท่านั้น หากเกิดข้อผิดพลาดระหว่างการวิเคราะห์ก็จะสามารถเตรียมโปรตีนเพื่อนำไปวิเคราะห์ซ้ำได้ทันที เครื่อง MALDI-TOF จะใช้แสงเลเซอร์ที่มีพลังงานสูงเป็นตัวกระตุ้นโมเลกุลของโปรตีนให้หลุดเข้าสู่สนามแม่เหล็กไฟฟ้า การเลื่อนตำแหน่งการกระตุ้นตัวอย่างจะทำให้ได้จำนวนชิ้นโปรตีนเข้าสู่สนามแม่เหล็กไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น วิธีนี้มีข้อด้อยคือ ไม่สามารถส่งโปรตีนตัวอย่างที่ผสมกับ matrix เข้าไปวิเคราะห์ได้ทั้งหมด และเครื่องจะทำการวิเคราะห์มวลของชิ้นเปปไทด์ ทำให้ไม่เหมาะกับการวิเคราะห์โปรตีนที่มีปริมาณน้อย ส่วนการเตรียมโปรตีนตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ PPS ด้วยเครื่อง LC-MS/MS มีความยุ่งยาก และซับซ้อนมากกว่า โดยต้องผสมโปรตีนตัวอย่างกับสารเคมีหลายชนิดเพื่อนำเข้าเครื่อง LC-MS/MS โดยการฉีดเป็นละอองโปรตีนตัวอย่างที่มีประจุ (electrospray ionization, ESI) เข้าสู่สนามแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้สามารถส่งโปรตีนตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปวิเคราะห์ได้ และเครื่องจะทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของชิ้นเปปไทด์ ทำให้สามารถวิเคราะห์โปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้แม่นยำกว่าวิธีแรก วิธีนี้มีข้อด้อยคือ ไม่เหมาะกับการวิเคราะห์โปรตีนจำนวนมาก และใช้เวลานานในการเตรียมและวิเคราะห์โปรตีน หากเกิดข้อผิดพลาดระหว่างการวิเคราะห์จะไม่สามารถเตรียมโปรตีนเพื่อนำไปวิเคราะห์ซ้ำได้ทันที

4.2. ผลการเปรียบเทียบลักษณะและระดับการแสดงออกของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต่าง ๆ พบว่า มีจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจำนวน 245 จุด โดยในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นพบโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นจากเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น จำนวน 121 จุด และลดลง 11 จุด และในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายพบโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นจากเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้าย 77 จุด และลดลง 6 จุด หากเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายกับเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยระยะเริ่มต้นพบจุดโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 145 จุด และลดลง 8 จุด แสดงว่าโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงกลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์ต่างไปจากเซลล์ปกติ และการเปลี่ยนแปลงนี้รุนแรงขึ้นในระยะท้ายของมะเร็ง

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถระบุชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในการเกิดมะเร็งช่องปากได้ 50 ชนิด โดยสามารถจัดกลุ่มโปรตีน ตามหน้าที่ได้ 8 กลุ่ม (ตาราง 3.9) คือ

4.2.1. กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) จำนวน 7 ชนิด

1) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) จำนวน 15 ชนิด
2) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cell differrentiation) จำนวน 4 ชนิด
3) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration) จำนวน 6 ชนิด
4) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (Energy synthesis) จำนวน 8 ชนิด
5) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune defense) จำนวน 4 ชนิด
6) กลุ่มโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction) จำนวน 4 ชนิด
7) โปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่อยู่ในกลุ่มข้างต้น จำนวน 2 ชนิด

4.2.2. บทบาทที่เป็นไปได้ของโปรตีนต่าง ๆ ที่พบในการศึกษานี้ต่อการเป็นมะเร็งช่องปาก มีดังนี้

1) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis)

โปรตีนที่แสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย ได้แก่ Elongation factor 1γ (ID 562) Elongation factor 2 (ID 155) HSP90AA1 (ID 168) HSPA5 (ID 225) และ Chaperonin-containing TCP-1 (ID 336) และที่แสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย ได้แก่ HSPA8 isoform 1 (ID 195) และ HSPA8 isoform 2 (ID 245)

Elongation factor 1γ ทำหน้าที่เป็น nucleotide-exchange subunits (Riis *et al*., 1990) ช่วยขนส่ง aminoacyl tRNA ไปสู่ไรโบโซมในการเพิ่มความยาวสาย polypeptide (Riis *et al*., 1990; Mimori *et al*., 1995) มีรายงานพบการเพิ่มการแสดงออกของยีน *EF-1γ* ในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อน (Lew *et al*., 1992) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Chi *et al*., 1992;) ทวารหนัก (Ender *et al*., 1993) และกระเพาะอาหาร (Mimori *et al*., 1995)

Elongation factor 2 เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ขนย้าย tRNA จากตำแหน่ง A ไปสู่ P และจาก P ไปสู่ E ของไรโบโซมในกระบวนการแปลรหัส และชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างพันธะเปปไทด์ในรอบถัดไป (Ortiz and Kinzy, 2005)

Hsp70 (HSPA5 และ HSPA8) Hsp90 (HSP90AA1) และ Chaperone มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการม้วนของโปรตีน (protein folding) การแสดงออกเพิ่มขึ้นของ Hsp70 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเยื่อบุผิวภายในช่องปากที่มีระดับความรุนแรงมาก (poor differentiation) (Kaur *et al*., 1998) เป็นตัวบ่งชี้การเกิดมะเร็งตับ (Chuma *et al*.,2003) และสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเต้านม (Lazaris *et al*., 1997) และมะเร็งรังไข่ (Elpek *et al*., 2003) HSPA8 มีการแสดงออกในเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (undifferentiated cell) และลดลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Son *et al*., 2005)

Hsp90 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยทำงานร่วมกับโปรตีนกลุ่ม Kinase transcription factor และโมเลกุลอื่นอีกหลายชนิด (Ciocca and Calderwood, 2005) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับ การเพิ่มกิจกรรม การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Baker *et al*., 2005) และการยับยั้งกลไกการตายของเซลล์ (apoptosis) (Csermely *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่จับกับโปรตีน HER2/neu และโปรตีน P53 เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายจากการทำงานของ proteosome (Ciocca and Calderwood, 2005) การแสดงออกของ Hsp เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพจากเซลล์มะเร็ง หรือเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ และมักพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะ Hsp70 และ Hsp90

Chaperonin-containing TCP-1 มีส่วนช่วยในการม้วนตัวของโปรตีน actin (Gao *et al*., 1992) และ Tubulins (Frydman *et al*., 1992; Yaffe *et al*., 1992) และมีส่วนร่วมในกระบวนการ capsid assembly ของไวรัสตับอักเสบ บี (Lingappa *et al*., 1994)

โปรตีนกลุ่มนี้มีส่วนส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และ/หรือเพื่อส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่า เซลล์มะเร็งมีการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่เป็นมะเร็งระยะต้น และการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ อย่างจำเพาะในมะเร็งระยะท้ายบ่งบอกว่า โปรตีนบางชนิดมีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเฉพาะในมะเร็งระยะท้าย

2) กลุ่มโปรตีนที่ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation)

โปรตีนที่แสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย ได้แก่ โปรตีน Squamous cell carcinoma antigen-1 (ID 151) AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ID 329) Peripherin (ID 345) Tubulin alpha 6 (ID 406) Keratin 6A (ID 455) tRNA splicing endonuclease (ID 678) Protein phosphatase 1F (ID 681) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA, ID 777) Tumor protein D52 (ID 823) Karyopherin beta-2 (ID 861) Translationally controlled tumor protein (ID 871) และ Translation initiation factor 5A (ID 954) และที่แสดงออกมากเฉพาะในระยะท้าย ได้แก่ โปรตีน Thymidine phosphorylase (ID 486) Tubulin beta 2 (ID 438) และ KIAA1199 (ID 555)

โปรตีน Squamous cell carcinoma antigen-1 สามารถยับยั้งกลไกการตายของเซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของ proteinase (Huang *et al*., 2006)

โปรตีน AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานใน 2 ขั้นตอนคือ เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนก่อนสุดท้าย และขั้นตอนสุดท้ายของการสร้าง purine (Rayl *et al*, 1996)

โปรตีน Peripherin เป็น type III intermediate filament พบในเซลล์ประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) มีบทบาทในการเพิ่มความยาวและการฟื้นฟู axon (Barclay *et al*., 2007) พบแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งประสาทโดยมีบทบาทในการยับยั้ง apoptosis (Sunesson *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการรายงานการแสดงออกของ Peripherin ในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปาก

โปรตีน Tubulins (α และ β) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง microtubule ซึ่งจำเป็นต่อการเคลื่อนย้ายของโครโมโซมในกระบวนการแบ่งเซลล์

โปรตีน Keratin 6A (K6A) เป็น type II keratin มีบทบาทในการรักษาบาดแผลของเยื่อบุผิว โดยมีการชักนำให้ keratinocyte บริเวณขอบของบาดแผลสร้างโปรตีน K6A ขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนการเกิดกระบวนการฟื้นฟู (regeneration process) (Moll *et al*., 2008) และพบแสดงออกในเซลล์ผิวหนัง และเซลล์เยื่อบุผิวชนิด non-keratinized stratified squamous epithelium (Moll *et al*., 1982; Moll *et al*., 2008) สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเพิ่มจำนวนมากกว่าปกติของ keratinocyte (Weiss *et al*., 1984; Moll *et al*., 2008) และสัมพันธ์กับเนื้องอกชนิด benign tumor (Moll *et al*., 2008)

โปรตีน tRNA-spicing endonuclease เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ตัด intron ของ pre-tRNA ในขั้นตอน splicing ของการสร้าง tRNA (Winey and Culbertson, 1988) โปรตีน Protein phosphatase 1 ทำหน้าที่กระตุ้นวิถีสัญญาณ Wnt/β-catenin ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Luo *et al*., 2007)

โปรตีน PCNA มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจำลอง และการซ่อมแซม DNA (Essers *et al*., 2005)

โปรตีน Tumor protein D52 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งหลายชนิด มีส่วนกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยทำให้เกิดการ amplification ของยีนมะเร็ง (Boutros *et al*., 2004)

โปรตีน Karyopherin beta-2 ทำหน้าที่ควบคุมการนำเข้าและส่งออกสาร macromolecule ระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาสซึม (Chook and Blobel, 1999)

โปรตีน Translationally controlled tumor protein ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการแปลรหัส โดยทำให้ GDP หลุดออกจากโปรตีน EF1A (Cans *et al*., 2003)

โปรตีน Translation initiation factor 5A ทำหน้าที่ควบคุมการส่ง mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์จากนิวเคลียสออกไปสู่ไซโทพลาสซึม (Taylor *et al*., 2007)

โปรตีน Thymidine phosphorylase มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และพบแสดงออกมากสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (Moghaddam *et al*., 1995)

โปรตีน KIAA1199 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (Michishita *et al*., 2006) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด

เซลล์มะเร็งช่องปากมีการเพิ่มกลไกการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์ และยับยั้งการตายของเซลล์เพื่อเอื้อต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่า เนื้อเยื่อมะเร็งมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าปกติตั้งแต่ระยะเริ่มต้น การที่โปรตีน K6A แสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้ายและไม่พบความแตกต่างกับเนื้อเยื่อมะเร็ง บ่งบอกว่า เนื้อเยื่อ(ที่ดูเหมือน)ปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้ายถูกชักนำจากเซลล์มะเร็งให้สร้างโปรตีน K6A เพิ่มขึ้น และการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ อย่างจำเพาะในมะเร็งระยะท้ายบ่งบอกว่า เนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายมีการสร้างหลอดเลือด และเพิ่มจำนวนเซลล์มากยิ่งขึ้น

3) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cell differentiation)

โปรตีน Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) Keratin 1 (ID 679) Keratin 17 (ID 985) และ Stratifin (ID 817) โดยมีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย

โปรตีน Aminopeptide puromycin sensitive เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญของเซลล์ โดยพบการแสดงออกตลอดกระบวนการเจริญของเซลล์ แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Brooks *et al*., 2003; Bhutani *et al*., 2007)

โปรตีน Keratin 1 (K1) เป็น Keratin ที่แสดงออกในเซลล์เหนือชั้น basal layer และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงที่มีการสร้าง Keratin และช่วงท้ายของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ keratinocytes (Moll *et al*., 2008) โปรตีน K1 ใช้เป็นโปรตีนตัวบ่งชี้ของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Moll *et al*., 1982) และมีการแสดงออกเด่นชัดในเนื้อเยื่อมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma (SCC) (Moll *et al*., 1998)

โปรตีน Stratifin เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในเยื่อบุผิวชนิด stratified squamous epithelium (Leffers *et al*., 1993) ทำหน้าที่ควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ในกระบวนการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ keratinocyte (Gherzi *et al*., 1992; Matsui *et al*., 1992; Punnonen *et al*., 1993; Dlugosz and Yuspa, 1994) การแสดงออกมากของ Stratifin ทำให้เกิดความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและยับยั้งกลไกการตายของเซลล์มะเร็ง (Rosenquist, 2003; Ghahary *et al*., 2005)

โปรตีน K17 เป็น type I keratin แสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเยื่อบุผิวในช่องปาก (Ohkura *et al*., 2005) และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Carrilho *et al*., 2004) การสร้างโปรตีน K17 เกิดขึ้นเฉพาะในช่วงแรกของการพัฒนาเยื่อบุผิว ทำให้พบการแสดงออกของโปรตีน K17 ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในชั้น basal layer แต่จะไม่พบการแสดงออกในเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และเซลล์ที่โตเต็มที่ (Hudson *et al*., 2001) โปรตีน K17 จึงน่าจะมีส่วนกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์อย่างไม่สิ้นสุด ซึ่งเป็นสาเหตุของการมีรูปร่างที่ผิดจากปกติของเซลล์มะเร็ง

การแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่า เซลล์มะเร็งมีกลไกส่งเสริมให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่างไปจากเซลล์ปกติตั้งแต่ระยะเริ่มต้น

4) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration)

โปรตีนที่แสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย ได้แก่ โปรตีน Matrix metalloproteinse-1 (ID 326) WD repeat domain 1 (ID 306) Vimentin (ID 670) Tumor necrosis factor-α

converting protein (ID 802) และ Cofilin-1 (ID 890) และที่แสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย ได้แก่ โปรตีน Aldehyde dehydrogenase 4 (ID 893)

โปรตีน Matrix metalloproteinse-1 (MMP-1) เป็น zinc-dependent protease ทำหน้าที่ย่อยสลาย extracellular matrix (ECM) การเพิ่มการแสดงออกของ MMP-1 เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการรุกรานเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ด้านล่างของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวในช่องปาก และการดำเนินของโรคที่แย่ลง (Gray *et al*., 1992; Bendardaf *et al*., 2003; Impola *et al*., 2004; Katayama *et al*., 2004)

โปรตีน WD repeat domain 1 เป็น cofactor ที่สำคัญร่วมกับ Cofilin-1 เพื่อช่วยนำ Actin ที่หลุดออกจากส่วนท้ายของสาย F-actin มาเชื่อมต่อกับส่วนต้น ในกระบวนการ assembly เพื่อทำให้เกิดการยืดของเซลล์ระหว่างการเคลื่อนที่ (Fujibuchi *et al*., 2005)

โปรตีน Vimentin เป็น intermediate filament ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์ (Nieminen *et al*., 2006)

โปรตีน Tumor necrosis factor-α converting protein มีส่วนร่วมในการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็ง (Zhang *et al*., 2006a)

โปรตีน Aldehyde dehydrogenase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ การเจริญเติบโต การยึดกัน (adhesion) การเคลื่อนที่ การรุกราน และการ metastasis (Croker *et al*., 2008)

การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่าเซลล์มะเร็งมีการสร้างโปรตีนที่เอื้อต่อการเคลื่อนที่ไปรุกรานโครงสร้างข้างเคียง (invasion) ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น และการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีน Aldehyde dehydrogenase เฉพาะในมะเร็งระยะท้ายบ่งบอกว่า เซลล์มะเร็งระยะท้ายมีกระบวนการส่งเสริมให้เกิด metastasis

5) กลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (Energy synthesis)

โปรตีนที่แสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย ได้แก่ โปรตีน Transketolase (ID 295) Pyruvate kinase 3 (ID 361) Enolase-1 (ID 544) Phosphoglycerate kinase 1 (ID 640) Lactate dehydogenase (ID 766) และ Triosephosphate isomerase 1 (ID 852) และที่แสดงออกมากเฉพาะระยะท้าย ได้แก่ 2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase (ID 551) และ (R)-3-hydroxybuthyrate dehydrogenase (ID 752)

การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์มะเร็งทำให้เซลล์ขาดออกซิเจน เซลล์มะเร็งจึงมีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน และใช้โปรตีน Lactate dehydrogenase Enolase-1 Transketolase Triosephosphate isomerase 2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase และ Phosphoglycerate kinase 1 เพื่อสร้างพลังงานจากวิถีไกลโคไลซิส ทำให้พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวเพิ่มขึ้น มีรายงานว่าโปรตีน Lactate dehydrogenase แสดงออกมากในผู้ที่เป็น lichen planus ในช่องปาก (Semenza *et al*., 1994) และมีรายงานเพิ่มเติมว่า Enolase-1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานให้กับระบบโครงร่างของเซลล์มะเร็งในการเกิด metastasis (Liu and Shih, 2007)

โปรตีน (R)-3-hydroxybuthyrate dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่พบในไมโทคอนเดรีย โดยมีหน้าที่เปลี่ยน (R)-3-hydroxybutyrate เป็น Acetoacetate เพื่อนำไปสร้างเป็นพลังงาน เมื่อเนื้อเยื่ออยู่ในสภาวะขาดแคลนสารอาหาร (Chelius *et al*., 2000)

นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Altenberga และ Greulich ซึ่งพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 70% มียีนของวิถีไกลโคไลซิสแสดงออกมากกว่าปกติ โดยเฉพาะยีน *Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase* *Enolase-1* และ *Pyruvate kinase* (Altenberga and

Greulich, 2004) การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่าเซลล์มะเร็งมีความต้องการพลังงานมากขึ้นตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการอยู่รอด และการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ เฉพาะในมะเร็งระยะท้ายบ่งบอกว่าเซลล์มะเร็งระยะท้ายมีความต้องการพลังงานสูงมาก จึงมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานแสดงออกมากขึ้น

6) กลุ่มโปรตีนที่ตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune defense)

โปรตีน Proteasome activator (ID 815) MHC class-I (ID 866) B cell antibody heavy chain variable region (ID 897) และ Immunoglobulin M (ID 908) โดยมีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย

โปรตีนทั้ง 4 ชนิดมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเกี่ยวข้องกับการจับกับ antigen เพื่อกระตุ้นการทำงานของ T lymphocyte มีรายงานเพิ่มเติมว่า Proteasome activator เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ MHC class-I ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีส่วนร่วมในกระบวนการปฏิเสธเนื้อเยื่อ (transplant rejection) และกระตุ้นการทำงานของ cytotoxic T cell ในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปาก (Shawar *et al*., 1990; Cruz *et al*., 1999; Miyagi *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้โปรตีน Immunoglobulin M เป็นโปรตีนตัวบ่งชี้สำหรับมะเร็งตับ ลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก (Luca *et al*., 2007)

การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่าร่างกายของผู้ป่วยมีความพยายามในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านเซลล์มะเร็ง

7) กลุ่มโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction)

โปรตีน Pertussis toxin-insensitive G protein (ID 465) Tumor associated calcium signal transducer 1 (ID 609) และ Fatty acid binding protein (ID 899) โดยมีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย

โปรตีน Pertussis toxin-insensitive G protein ทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (Sugiura *et al*., 1996)

โปรตีน Tumor associated calcium signal transducer 1 ทำหน้าที่ส่งสัญญาณแก่ epithelial cell adhesion molecule เพื่อกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Went *et al*., 2004)

โปรตีน Fatty acid binding protein ทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเจริญเติบโต และการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อมะเร็งลิ้น (Uma *et al*., 2007)

การแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายบ่งบอกว่าเซลล์มะเร็งมีการสื่อสารกับเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียงมากขึ้นเพื่อกระตุ้นกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่เอื้อต่อการเจริญของเซลล์มะเร็ง

8) โปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มข้างต้น

โปรตีน Horf6 (ID 846) และ Cervical cancer 1 (ID 894) ซึ่งแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งระยะเริ่มต้นและระยะท้าย และโปรตีน Albumin (ID 1010) ซึ่งแสดงออกลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้าย

โปรตีน Cervical cancer 1 ถูกสร้างมาจากยีน *Cervical cancer 1* ซึ่งเป็น proto oncogene ที่แสดงออกมากในเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Kim, 2004)

โปรตีน Horf6 เป็นโปรตีนชนิดใหม่ของกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ (Choi *et al*., 1998) เซลล์มะเร็งเพิ่มการแสดงออกโปรตีนชนิดนี้อาจเพื่อป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์จากสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในเซลล์

โปรตีน Albumin เป็นโปรตีนที่พบในพลาสมาของเลือด ซึ่งมีหน้าที่รักษาแรงดันออสโมซิสภายในเลือดและช่วยขนส่งสารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ รวมทั้งยาบางชนิด สามารถใช้บ่งชี้ความสมบูรณ์ทางโภชนาการของเนื้อเยื่อมะเร็ง (McCauley and Brennan, 1983) เนื่องจากภายในเนื้อเยื่อตัวอย่างมีหลอดเลือดขนาดเล็กแทรกอยู่ ดังนั้นโปรตีน Albumin ที่พบอาจเป็นโปรตีน Albumin ที่อยู่ในกระแสเลือด การมีโปรตีนชนิดนี้ลดลงอาจบ่งบอกถึงภาวะขาดสารอาหาร (malnutrition) เนื่องจากเซลล์มะเร็งระยะท้ายมีการใช้สารอาหารภายในเซลล์มาก จึงทำให้ปริมาณของโปรตีนชนิดนี้หลงเหลืออยู่ในปริมาณน้อย

กลุ่มโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในการเกิดมะเร็งช่องปากที่สามารถระบุได้ทั้งหมด ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ชนิดของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อเกิดมะเร็งช่องปากที่สามารถระบุได้ในขณะนี้

Functional groups	**Protein candidates**	
	Consistently expressed in early and late stage	**Expressed only in late stage**
1.Protein synthesis	1 Elongation factor 1γ (ID 562) 2 Elongation factor 2 (ID 155) 3 HSP90AA1 (ID 168) 4 HSPA5 (ID 225) 5 Chaperonin-containing TCP-1 (ID 336)	1 HSPA8 isoform 1 (ID 195) 2 HSPA8 isoform 2 (ID 245)
2.Cell proliferation	1 Squamous cell carcinoma antigen-1 (ID 151) 2 AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ID 329) 3 Peripherin (ID345) 4 Tubulin alpha 6 (ID 406) 5 Keratin 6A (ID 455) 6 tRNA splicing endonuclease (ID 678) 7 Protein phosphatase 1F (ID 681) 8 Proliferating cell nuclear antigen (ID 777) 9 Tumor protein D52 (ID 823) 10 Karyopherin beta-2 (ID 861) 11 Translationally controlled tumor protein (ID 871) 12 Translation initiation factor 5A (ID 954)	1 Thymidine phosphorylase (ID 486) 2 Tubulin beta 2 (ID 438) 3 KIAA1199 (ID 555)
3.Cell differentiation	1 Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) 2 Keratin 1 (ID 679) 3 Keratin 17 (ID 985) 4 Stratifin (ID 817)	-

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Functional groups	Protein candidates	
	Consistently expressed in early and late stage	**Expressed only in late stage**
4.Cell migration	1 Matrix metalloproteinse-1 (ID 326) 2 WD repeat domain 1 (ID 306) 3 Vimentin (ID 670) 4 Tumor necrosis factor-α converting protein (ID 802) 5 Cofilin-1 (ID 890)	1 Aldehyde dehydrogenase 4 (ID 893)
5.Energy synthesis	1 Transketolase (ID 295) 2 Pyruvate kinase 3 (ID 361) 3 Enolase-1 (ID 544) 4 Phosphoglycerate kinase 1 (ID 640) 5 Lactate dehydogenase (ID 766) 6 Triosephosphate isomerase 1 (ID 852)	1 2-phosphopyruvate-hydratase 2 alpha-enolase (ID 551) 3 (R)-3-hydroxybuthyrate dehydrogenase (ID 752)
6.Immune defense	1 Proteasome activator (ID815) 2 MHC class-I (ID 866) 3 B cell antibody heavy chain variable region (ID 897) 4 Immunoglobulin M (ID 908)	-
7.Signal transduction	1 Pertussis toxin-insensitive G protein (ID 465) 2 Tumor associated calcium signal transducer 1 (ID 609) 3 Fatty acid binding protein (ID 899)	-
8.Others	1 Horf6 (ID 846) 2 Cervical cancer 1 (ID 894)	1 Albumin (ID 1010)

4.3. ผลการเปรียบเทียบลักษณะและระดับการแสดงออกของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติ ระหว่างมะเร็งระยะต้นและมะเร็งระยะท้าย พบว่า มะเร็งระยะท้ายมีจำนวนจุดโปรตีนมากกว่า โดยมีจุดโปรตีนจำนวน 26 จุด ที่มีระดับความเข้มเพิ่มขึ้น และ 2 จุด ที่มีระดับความเข้มลดลงจากมะเร็งระยะต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า แม้ภาพรวมของการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้นและระยะท้ายมีความคล้ายคลึงกัน แต่ก็มีโปรตีนจำนวนหนึ่งที่แสดงออกอย่างแตกต่าง โดยเป็นโปรตีนที่ได้รับผลกระทบอย่างเด่นชัดจากการเป็นมะเร็ง เซลล์ปกติที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็งอาจถูกชักนำจากเซลล์มะเร็งให้เกิดความผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีนได้ ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งระยะท้ายมีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น ทั้ง ๆ ที่รูปร่างของเซลล์ไม่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งระยะต้น เซลล์ปกติที่ถูกชักนำจากเซลล์มะเร็งนานไปอาจเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งการจะทราบว่าเซลล์ปกติที่อยู่ใกล้เคียงเซลล์มะเร็งมีความผิดปกติหรือไม่ ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคในปัจจุบัน แต่ต้องใช้วิธีการทางโปรตีโอมิกซ์ในการวินิจฉัย แต่อย่างไร

ก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่ระบุแน่ชัดถึงสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงไปของการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติของมะเร็งในระยะท้าย แต่มีความเป็นไปได้ว่าจุดโปรตีนที่มีความเข้มเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้ายนั้นอาจเกิดจากเซลล์ปกติกำลังจะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง และ/หรือมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สร้างโปรตีนจำนวนหนึ่งออกมาต่อต้านหรือทำลายเซลล์มะเร็ง

จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าโปรตีน Peripherin (ID 345) Thymidine phosphorylase (ID 486) K1 (ID 679) Proteasome activator (ID 815) Karyopherin beta 2 (ID 861) Fatty acid binding protein 5 (ID 899) และ Translation initiation factor 5A (ID 954) มีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้าย ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ล้วนมีบทบาทในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ จุดโปรตีนจำนวนหนึ่งมีความเข้มลดลงในเนื้อเยื่อปกติของตัวอย่างมะเร็งระยะท้าย แต่ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ ซึ่งการลดลงอาจเกิดจากมีปัจจัยบางอย่างภายนอกเซลล์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนั้น ๆ มีรายงานว่าเซลล์มะเร็งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ extracellular matrix ของเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง และส่งผลให้เซลล์สร้าง extracellular matrix ลดลง (Ingbera, 2008)

4.4. ผลการเปรียบเทียบลักษณะและระดับการแสดงออกของจุดโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระหว่าง มะเร็งระยะต้นและระยะท้าย พบว่า เนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายมีจำนวนจุดโปรตีนมากกว่า และมีระดับการแสดงออกแตกต่างจากเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวน 39 จุด โดยเพิ่มขึ้น 26 จุด และลดลง 13 จุด แสดงว่าโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายได้รับผลกระทบจากปัจจัยที่ก่อให้เกิดมะเร็งมากกว่า หรือเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงต่อเนื่องมาจากการเป็นมะเร็งระยะต้น การสะสมความผิดปกติของสารพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดมะเร็ง (Jefferies and Foulkes, 2001) เนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายมีเวลาในการสะสมความผิดปกติมากกว่าเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้นทำให้ความผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีนเกิดขึ้นเด่นชัดกว่า

สาเหตุของการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายมากกว่าระยะเริ่มต้น สามารถแบ่งได้ 2 ประการ ประการแรกเซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีความตื่นตัวมากและทำกิจกรรมเพื่อเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์ตลอดเวลา ประการที่ 2 เซลล์มะเร็งตกอยู่ในภาวะเครียด เช่น การขาดออกซิเจน การขาดเลือดมาหล่อเลี้ยง และผลกระทบจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายซึ่งได้รับผลกระทบเป็นเวลานานกว่า จึงมีปริมาณการแสดงออกของโปรตีนสูงกว่าระยะเริ่มต้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบโปรตีน Tubulin alpha 6 (ID 406) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายมากกว่าในระยะเริ่มต้น การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ Tubulin alpha 6 ระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายกับระยะเริ่มต้นยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะท้ายลดลงจากระยะเริ่มต้น อาจเกิดจากเซลล์มะเร็งซึ่งมีพฤติกรรมลดการทำงานของกลไกที่ส่งเสริมการตาย และการหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นเซลล์มะเร็งจึงลดหรือยับยั้งการสร้างโปรตีนที่กระตุ้นกลไกการตาย การหยุดการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ในการศึกษานี้พบโปรตีน Translationally controlled tumor associated protein (ID871) แสดงออกลดลงในมะเร็งระยะท้าย โดยโปรตีนนี้มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (Cans *et al*., 2003) ยังไม่มีรายงานการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน Translationally controlled tumor associated protein กับมะเร็งระยะต่าง ๆ

4.5. หากเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาในอดีต พบว่าในจำนวนโปรตีน 50 ชนิดที่ระบุได้มีโปรตีนที่ยังไม่เคยรายงานในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากมาก่อน จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ Elongation factor 1γ (ID 562) Elongation factor 2 (ID 155) Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ID 329) Hoft6 (ID 846) Cervical cancer 1 (ID 894) Peripherin

(ID 345) Tubulin beta 2 (ID 438) KIAA1199 (ID 555) HSPA8 isoform 2 (ID 245) และ Tumor protein D52 (ID 823)

และมีโปรตีนที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว จำนวน 39 ชนิด ได้แก่ โปรตีน HSP90AA1, ID 168 (Ciocca and Calderwood, 2005) HSPA5, ID 225 (Min *et al*. 2008) HSPA8 isoform 1, ID 195 (Son *et al*., 2005) Tubulin alpha 6, ID 406 (Radcliffe *et al*., 2000) K1, ID 679 K6A, ID 455 (Moll *et al*., 1982) K17, ID 985 (Magin *et al*., 2005) Transketolase, 295 (Langbein *et al*., 2006) Enolase-1, ID 544 2-phosphopyruvate hydratase α-enolase, ID 551 (Lui and Shih, 2007) tRNA splicing endonuclease, ID 678 (Winey and Culbertson,1988) Protein phosphatase 1F, ID 681 (Luo *et al*., 2007) Tumor necrosis factor-α converting enzyme, ID 802 (Moro *et al*., 2003) Triosephosphate isomerase, ID 852 (Robert *et al*., 1961) Thymidine phosphorylase, ID 486 (Moghaddam *et al*., 1995) MMP-1, ID 326 (Bendardaf *et al*., 2003) (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase, ID 752 (Chelius *et al*., 2000) Lactate dehydrogenase, ID 766 (Koukourakis *et al*., 2003) Aldehyde dehydrogenase 4, ID 893 (Croker *et al*., 2008) Phosphoglycerate kinase 1, ID 640 (Firth *et al*., 1994) Proteasome activator, ID 815 (Miyagi *et al*., 2003) Pyruvate kinase 3, ID 361 (Ervens *et al*., 2008) Squamous cell carcinoma antigen 1, ID 151 (Huang *et al*., 2006) Tumor-associated calcium signal transducer 1, ID 609 (Simon *et al*., 1990) Immunoglobulin M (heavy chain), ID 908 (Löning and Burkhardt, 1979) Albumin, ID 1010 (McCauley and Brennan, 1983) WD repeat domain 1, ID 306 Chaperonin containing TCP-1, ID 336 (Frydman *et al*., 1992) Pertussis toxin-sensitive, ID 465 (Matsuoka *et al*., 1990) Vimentin, ID 670 (Nieminen *et al*., 2006) PCNA, ID 777 (Essers *et al*., 2005) Stratifin, ID 817 (Dellembra *et al*, 1995) MHC class 1, ID 866 (Shawar *et al*., 1990) Cofilin 1, ID 890 (Toshima *et al*., 2001) B cell antibody (heavy chain variable), ID 897 (Löning and Burkhardt, 1979) Translationally controlled tumor protein, ID 871 (Cans *et al*., 2003) Karyopherin beta-2, ID 861 (Zhang *et al*., 2006b) Translation initiation factor 5A, ID 954 (José *et al*., 2005) และ Fatty acid binding protein, ID 899 (Ibrahim *et al*., 1999)

4.6. โปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (Tis) จำนวน 46 จุด ที่แสดงออกสอดคล้องกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น สามารถระบุชนิดได้จำนวน 19 ชนิด ได้แก่ Elongation factor 1γ (ID 562) Elongation factor 2 (ID 155) AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ID 329) Hoft6 (ID 846) Peripherin (ID 345) HSPA8 isoform 2 (ID 245) Transketolase (ID 295) K6A (ID 455) Pertussive toxin-sensitive (ID 465) Vimentin (ID 670) PCNA (ID 777) Tnf-α converting enzyme (ID 802) Squamous cell carcinoma antigen 1 (ID 151) Enolase-1 (ID 544) Tumor protein D52 (ID 823) Cofilin-1 (ID 890) K17 (ID 985) Protein phosphatase 1F (ID 681) และ Stratifin (ID 817)

4.7. โปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ จำนวน 26 จุด ที่แสดงออกสอดคล้องกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น สามารถระบุชนิดได้จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ HSPA8 isoform 1 (ID 195) Pyruvate kinase 3 (ID 361) Tubulin alpha 6 (ID 406) Albumin (ID 1010) K17 (ID 985) และ 2-phosphopyruvate hydratase α-enolase (ID 551)

และโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำ จำนวน 12 จุด ที่แสดงออกสอดคล้องกับมะเร็งระยะท้ายสามารถระบุชนิดได้จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ Chaperonin containing TCP-1 (ID 336) และ Albumin (ID 1010)

4.8. จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถระบุโปรตีนที่อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงโอกาสการเป็นมะเร็งช่องปาก ได้ดังนี้

4.8.1 โปรตีนที่อาจเป็นตัวบ่งชี้การมีโอกาสเป็นมะเร็งช่องปากในระยะแรกเริ่ม จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Elongation factor-2 (ID 562) HSPA8 isoform 2 (ID 245) Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) และ Horf6 (ID 847) โดยพิจารณาจากการที่เป็นโปรตีนที่แสดงออกในผู้ป่วยทุกราย มีแนวโน้มการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกันตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะท้าย และไม่มีรายงานการแสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดอื่น ในจำนวนนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ของการมีโอกาสเป็นมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (Tis) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Elongation factor-2 (ID 562) HSPA8 isoform 2 (ID 245) และ Horf6 (ID 847)

4.8.2. โปรตีนที่อาจเป็นตัวบ่งชี้การชักนำให้เซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียงกลุ่มเซลล์มะเร็งเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมคล้ายกับเซลล์มะเร็ง จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ โปรตีน Peripherin (ID 345) Thymidine phosphorylase (ID 486) Proteasome activator (ID 815) Karyopherin beta-2 (ID 861) Fatty acid binding protein 5 (ID 899) และ Translation initiation factor 5A (ID 954) โดยพิจารณาจากมีการแสดงออกในทุกตัวอย่าง และมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้ายมากกว่าระยะเริ่มต้น

4.8.3. โปรตีนชนิดใหม่ที่อาจเป็นตัวบ่งชี้การมีโอกาสเป็นมะเร็งช่องปากในระยะแรกเริ่ม ที่ค้นพบจากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีน Elongation factor 2 (ID 562) Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) HSPA8 isoform 2 (ID 245) และ Hoft6 (ID 847) ในจำนวนนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ของการมีโอกาสเป็นมะเร็งระยะก่อนลุกลาม (Tis) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Elongation factor 2 (ID 562) HSPA8 isoform 2 (ID 245) และ Hoft6 (ID 847)

4.8.4. โปรตีนที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยมะเร็งช่องปาก ได้แก่ โปรตีน Hoft6 (ID 847) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มักพบเฉพาะในเซลล์ที่อยู่ในสภาวะเครียด มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 3.3) และไม่เคยมีรายงานในมะเร็งชนิดอื่น อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการพบโปรตีน Horf6 ในกระแสเลือดหรือสารคัดหลั่ง

4.8.5. ยังไม่พบโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็งช่องปาก ซึ่งควรเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก และไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปกติของเซลล์

5. สรุปผลการวิจัย

1. เนื้อเยื่อมะเร็งมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไปจากเนื้อเยื่อปกติมากขึ้นตั้งแต่ ผู้ป่วยระยะก่อนลุกลาม (Tis) จนถึงระยะท้าย
2. ลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงไปจากเนื้อเยื่อปกติมากขึ้นตั้งแต่เนื้อเยื่อระยะก่อนลุกลามจนถึงระยะท้าย
3. ลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อปกติจะคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อมะเร็งมากขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระยะรุนแรงมากขึ้น
4. ลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งที่เกิดซ้ำมีความคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อมะเร็งระยะต้น
5. เซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่างไปจากเซลล์ปกติ ดังนี้
    5.1 เพิ่มการสร้างโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ
    5.2 เพิ่มจำนวนเซลล์ และยับยั้งการตายของเซลล์
    5.3 เปลี่ยนแปลงรูปร่างต่างไปจากเซลล์ปกติ
    5.4 เคลื่อนตัวไปสู่โครงสร้างข้างเคียง และอวัยวะอื่นของร่างกายได้
    5.5 เพิ่มการสร้างพลังงานเพื่อขับดันกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์
    5.6 เพิ่มการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์
6. ร่างกายของผู้ป่วยพยายามต่อต้านการเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง โดยการเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน
7. พบโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อเป็นมะเร็งช่องปาก จำนวน 50 ชนิด ในจำนวนนี้มีโปรตีนที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ Elongation factor 1γ (ID 562) Elongation factor 2 (ID 155) Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) AICR formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ID 329) Hoft6 (ID 846) Cervical cancer 1 (ID 894) Peripherin (ID 345) Tubulin beta 2 (ID 438) KIAA1199 (ID 555) HSPA8 isoform 2 (ID 245) และ Tumor protein D52 (ID 823)
8. พบโปรตีนชนิดใหม่ที่อาจมีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้การมีโอกาสเป็นมะเร็งช่องปากในระยะก่อนลุกลาม (Tis) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Elongation factor-2 (ID 562) HSPA8 isoform 2 (ID 245) และ Horf6 (ID 847)
9. พบโปรตีนชนิดใหม่ที่อาจมีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้การมีโอกาสเป็นมะเร็งช่องปากในระยะแรกเริ่ม จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Elongation factor 2 (ID 562) Aminopeptide puromycin sensitive (ID 316) HSPA8 isoform 2 (ID 145) และ Horf6 (ID 847)
10. โปรตีนที่อาจเหมาะสมในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยมะเร็งช่องปาก ได้แก่ Horf6 (ID 847)

6. เอกสารอ้างอิง

Akervall, J.A., Jin, Y., Wennerberg, J.P., Zätterström, U.K., Kjellen, E., Mertens, F., Willen, R., Mandahl, N., Heim, S. and Mitelman, F. 1995. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 76: 853-859.

Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., et al. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature (Lond.). 403: 503-511.

Altenberga, B. and Greulich, K.O. 2004. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. Genomics. 84: 1014-1020.

Baker, H., Patel, V., Molinolo, A.A., Shillitoe, E.J., Ensley, J.F., Yoo, G.H., Garcia, M.A., Myers, J.N., Naggar, E.A.K., Gutkind, J.S. and Hancock, W.S. 2005. Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. Oral Oncol. 41: 183-199.

Barclay, M., Noakes, P.G., Ryan, A.F., Julien, J.P. and Housley, G.D. 2007. Neuronal expression of peripherin, a type III intermediate filament protein, in the mouse hindbrain. Histochem. Cell Biol. 128(6): 541-550.

Bau, D.T., Tseng, H.C., Wang, C.H., Chiu, C.C., Hua, C.H., Wu, C.N., Liang, C.Y., Wang, C.H., Tsai, C.W. and Tsai, M.H. 2008. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. Oral Oncol. 44: 1047-1051.

Belbin, T.J., Singh, B., Smith, R.V., Socci, N.D., Wreesmann, V.B., Sanchez-Carbayo, M., et al. 2005. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. Otolaryngol. Head Neck Surg. 131:10-8.

Bendardaf, R., Lamlum, H., Vihinen, P., Ristamäki, R., Laine, J. and Pyrhönen, S. 2003. Low collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma. Oncology. 65(4): 337-346.

Bhattacharjee, A., Richards, W.G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P, et al. 2001. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 13790-13795.

Bhutani, N., Venkatraman, P. and Goldberg, A. L. 2007. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. EMBO J. 26: 1385-1396.

Bishsel, V.E., Liotta, L.A., Petricoin, E.F. 2001. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal-pathway profiling. Cancer J. 7: 69-78.

Boutros, R., Fanayan, S., Shehata, M. and Byrne, J.A. 2004. The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 325: 1115–1121.

Brooks, D.R., Hooper, N.M. and Isaac, R.E. 2003. The Caenorhabditis elegans orthologue of mammalian Puromycin-sensitive Aminopeptidase has roles in embryogenesis and reproduction. J. Biol. Chem. 278(44): 42795–42801.

Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W. and Sidransky, D. 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res. 56: 2488-2492.

Cans, C., Passer, B.J., Shalak, V., Portebois, N.V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., Fiucci, G., Goud, B., Mirande, M., Amson, R. and Telerman, A. 2003. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(24): 13892-13897.

Carrilho, C., Alberto, M., Buane, L. and David, L. 2004. Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. Hum. Pathol. 35(3): 546-551.

Chelius, D., Hennard, L.C., Fleischer, S., McIntyre, J.O., Marks, A.R., De, S., Hahn, S., Jehl, M.M., Moeller, J., Philipp, R., Wise, J.G. and Trommer, W.E. 2000. Phosphatidylcholine activation of human heart (R)-3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase mutants lacking active center sulfhydryls: Site-directed mutagenesis of a new recombinant fusion protein. Biochemistry. 39: 9687-9697.

Chen, A.Y. and Myers, J.N. 2001. Cancer of the Oral Cavity. Disease-a-Mounth. 47(7): 266-361.

Chen, J., He, Q.Y., Yuen, A.P., Chiu, J.F. 2004. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. Proteomics. 4:2465-75.

Chen, Z. and Gu, J. 2007. Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J. 21: 2931-2938.

Chi, K., Jones, D.V. and Frazier, M.L. 1992. Expression of an elongation factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. Gastroenterology. 103(1): 98-102.

Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, C.H., Rhee, S.G. and Ryu, S.E. 1998. Crystallization and preliminary X-ray studies of hORF6, a novel human antioxidant enzyme. Acta Crystallogr. 54(3): 436.

Chook, Y.M. and Blobel, G. 1999. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-β2–Ran GppNHp. Nature. 399: 230-237.

Chuma, M., Sakamoto, M., Yamazaki, K., Ohta, T., Ohki, M., Asaka, M. and Hirohashi, S. 2003. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: Identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. Hepatology. 37(1): 198-207.

Ciocca, D.R. and Calderwood, S.K. 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones. 10(2): 86-103.

Croker, A.K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B.D., Hess, D.A. and Allan, A.L. 2008. High Aldehyde Dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. J. Cellular Mol. Med. (article in press).

Cruz, I., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M., Snijders, P.J.F. and Waal, I.V. 1999. Lack of MHC class I surface expression on neoplastic cells and poor activation of the secretory pathway of cytotoxic cells in oral squamous cell carcinomas. Br. J. Cancer. 81(5): 881-889.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Nardai, G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical application. A comprehensive review. Phatmacol. Ther. 79(2): 126-168.

Deerasamee, S., Martin, N., Sontipong, S., Sriamporn, S., Sriplung, H., Srivatanakul, P., et al. 1999. Cancer in Thailand Vol II, 1992-1994. IARC Technical Report No. 34 Lyon:IARC: 17-27.

Dellambra, E., Patrone, M., Sparatore, B., Negri, A., Ceciliani, F., Bondanza, S., Molina, F., Cancedda, F.D. and Luca, M.D. 1995. Stratifin, a keratinocyte specific 14-3-3 protein, harbors a pleckstrin homology (PH) domain and enhances protein kinase C activity. J. Cell Sci. 108: 3569-3579.

Dlugosz, A.A. and Yuspa, S.H. 1994. Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGk) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. J. Invest. Dermatol. 102: 409-414.

Elpek, G.O., Karaveli, S., Simsek, T., Keles, N. and Aksoy, N.H. 2003. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 111(4): 523-530.

Ender, B., Lynch, P., Kim, Y.H., Inamdar, N.V., Cleary, K.R. and Frazier, M.L. 1993. Overexpression of an elongation factor-1 γ-hybridizing RNA in colorectal adenomas. Mol. Carcinog. 7(1): 18-20.

Eriksson, K.S., Zhang, S., Lin, L., Larivière, R.C., Julien, J.P. and Mignot, E. 2008. The type III neurofilament peripherin is expressed in the tuberomammillary neurons of the mouse. BMC Neurosci. 9: 26.

Ervens, J., Fuchs, H., Niemann, V.T. and Hoffmeister, B. 2008. Pyruvate kinase isoenzyme M2 is not of diagnostic relevance as a marker for oral cancer. J. Craniomaxillofac. Surg. 36: 89-94.

Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., Cappellen, W.A.V., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R. and Vermeulen, W. 2005. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. Mol. Cell. Biol. 25(21): 9350–9359.

Fang, L., Hu, Q., Hua, Z., Li, S. and Dong, W. 2008. Growth inhibition of a tongue squamous cell carcinoma cell line (Tca8113) in vitro and in vivo via siRNA-mediated downregulation of skp2. Oral Maxillofac. Surg. 37(9): 847-852.

Firth, J.D., Ebert, B.L., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. 1994. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91(14): 6496–6500.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Hediye, E.B., Wall, J.S., Tempst, P. and Hartl, F.U. 1992. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. EMBO J. 11(13): 4767-4778.

Fujibuchi, T., Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Kamei, Y., Murase, R., Ueda, N., Shigemoto, K., Yamamoto, H. and Kito, K. 2005. AIP1/WDR1 supports mitotic cell rounding. Biochem. Biophys. Res. Commun. 327: 268–275.

Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H. and Cowan, N.J. 1992. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes β-actin folding. Cell. 69(6): 1043-1050.

Garcia, M., Jemal, A., Ward, E.M., Center, M.M., Hao, Y., Siegel, R.L. and Thun, M.J. 2007. Global Cancer Facts & Figures 2007. Jacketflab publisher: pp. 1-8.

Ghahary, A., Marcoux, Y., Busheri, K.F., Li, Y., Tredget, E.E., Kilani, R.T., Lam, E. and Weinfeld, M. 2005. Differentiated keratinocyte-releasable stratifin (14-3-3 sigma) stimulates MMP-1 expression in

dermal fibroblasts. J. Invest. Dermatol. 124(1): 170-177.

Gherzi, R., Sparatore, B., Patrone, M., Sciutto, A. and Briata, P. 1992. Protein kinase C mRNA levels and activity in reconstituted normal human epidermis: relationship to cell differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184: 283-291.

Ginos, M.A., Page, G.P., Michalowicz, B.S., Patel, K.J., Volker, S.E., Pambuccian, S.E., Ondrey, F.G., Adams, G.L. and Gaffney, P.M. 2004. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res. 64: 55-63.

Gray, S.T., Wilkins, R.J. and Yunt, K. 1992. Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. Am. J. Pathol. 141: 301-306.

Ha, P.K., Benoit, N.E., Yochem, R., Sciubba, J., Zahurak, M., Sidransky, D., Pevsner, J., Westra, W.H. and Califano, J. 2003. A transcriptional progression model for head and neck cancer. Clin. Cancer Res. 9: 3058-64.

Hanash, S.M. 2000. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. Electrophoresis. 21: 1202-1209

He, Q.Y., Chen, J., Kung, H.F., Yuen, A.P. and Chiu, J.F. 2004. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. Proteomics. 4: 271-8.

Huang, X., Wei, Y., Li, L., Wen, Y., Yang, J., Liu, B., Song, X. and Zhao, J. 2006. Serum proteomics study of the squamous cell carcinoma antigen 1 in tongue cancer. Oral Oncol. 42(1): 25-30.

Hudson, D.L., Guy, A.T., Fry, P., Hare, M.J.O., Watt, F.M. and Masters, J.R.W. 2001. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: Identification of intermediate phenotypes by keratin expression. J. Histochem. Cytochem. 49(2): 271-278.

Ibrahim, S.O., Lillehaug, J.R., Johannessen, A.C., Liavaag, P.G., Nilsen, R. and Vasstrand, E.N. 1999. Expression of biomarkers (p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erbB-2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. Oral Oncol. 35: 302-313.

Impola, U., Uitto, V.J., Hietanen, J., Hakkinen, L., Zhang, L., Larjava, H., Isaka, K. and Kere, U.S. 2004. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. J. Pathol. 202: 14-22.

Ingbera, D.E. 2008. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?. Seminars Cancer Biol. 18: 356–364.

Institute of medical research. 2004. Precancer and cancer & primary prevention and early detection. http://www.imr.gov.my/org/stoma_r.htm. (accessed 20/06/08).

Jefferies, S. and Foulkes, W.D. 2001. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol. 37(2): 115-126.

Jiang, X., Coffino, P. and Li, X. 2004. Development of a method for screening short-lived proteins using green fluorescent protein. Genome Biol. 5(10): R81.

José, M.S.M., Abel, G.G., Francisco, B.A., Eva, O.R., María, T.E., Andrés, B.C. and José, M.G.R. 2005. Gene Expression Profile in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Pilot Study. J. Oral Maxillofac. Surg. 63: 786-792.

Katayama, A., Bandoh, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Nonaka, S. and Harabuchi, Y. 2004. Expressions of Matrix Metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. Clin. Cancer Res. 10: 634-640.

Kaur, J., Srivastava, A. and Ralhan, R. 1998. Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity. Oral Oncol. 34(6): 496-501.

Kavanagh, K.T. 1999. Smoking Tobacco Facts, Death & Cancer. http://www.tobaccofacts.info/images/20050310-oral-leukoplakia-750-1.jpg. (accessed 20/06/08).

Kim, J.W. 2004. Human cervical cancer 1 protooncogene and protein encoded therein. US Patent 6815180, September 11.

Kim, S., Wong, P. and Coulombe, P.A. 2006. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. Nature. 441: 362-365.

Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K.C. and Harris, A.L. 2003. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. Br. J. Cancer. 89: 877-885.

Langbein, S., Zerilli, M., Hausen, A.Z., Staiger, W., Boschert, R.K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M.P., Steidler, A., Weiss, C., Grobholz, R., Willeke, F., Alken, P., Stassi, G., Schubert, P. and Coy, J.F. 2006. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. Br. J. Cancer. 94: 578-585.

Lazaris, A.C., Chatzigianni, E.B., Panoussopoulos, D., Tzimas, G.N., Davaris, P.S. and Golematis, B.C. 1997. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immuno-localization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. Breast Cancer Res. Treat. 43(1): 43-51.

Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Honore, B., Andersen, A.H., Walbum, E., Vandekerckhove, J. and Celis, J.E. 1993. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker Stratifin: A member of a protein family that has been Involved in the Protein Kinase C signalling pathway. J. Mol. Biol. 231(4): 982-998.

Lew, Y., Jones, D.V., Mars, W.M., Evans, D., Byrd, D. and Frazier, M.L. 1992. Expression of Elongation Factor-1 Gamma related sequence in human pancreatic cancer. Pancreas. 7(2): 144-152.

Lewis, T.S., Hunt, J.B., Aveline, L.D., Jonsher, K.R., Loiuie, D.F., Yeh, J.M., et al. 2000. Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. Mol. Cell. 6: 1343-1354.

Lingappa, J.R., Martin, R.L., Wong, M.L., Ganem, D., Welch, W.J. and Lingappa, V.R. 1994. A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle. J. Cell Biol. 125(1): 99-111.

Liu, K.J. and Shih, N.Y. 2007. The role of enolase in tissue invasion and metastasis of pathogens and tumor cells. J. Cancer Mol. 3(2): 45-48.

Löning, T. and Burkhardt, A. 1979. Plasma cells and immunoglobulin-synthesis in oral precancer and cancer. Virchows. Arch. A Path. Anat. Histol. 384(1): 109-120.

Luca, B., Tommaso, P.G., Marcello, G.G.A., Andrea, G., Giovanni, B., Francesco, P. and Giorgio, F.

2007. Detection of prostate-specific antigen coupled to immunoglobulin M in prostate cancer patients. Cancer Detect Prev. 31: 402-407.

Luo, W., Peterson, A., Garcia, B.A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Yost, H.J. and Virshup, D.M. 2007. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the β-catenin degradation complex. EMBO J. 26: 1511–1521.

Magin, T.M., Reichelt, J. and Chen, J. 2005. The role of keratins in epithelial homeostasis. In: Skin barrier. Elias, P.M. and Feingold, K.R. Ed: Taylor and Francis, New york, pp. 141–170.

Matsui, M.S., Chew, S.L. and Seleo, V.A. 1992. Protein kinase C in normal human epidermal keratinocytes during proliferation and calciuminduced differentiation. J. Invest. Dermatol. 99: 565-571.

Matsuoka, M., Itoh, H. and Kaziro, Y. 1990. Characterization of the human gene for Gx alpha, a pertussis toxin-insensitive regulatory GTP-binding protein. J. Biol. Chem. 265(22): 13215-13220.

McCauley, R.L. and Brennan, M.F. 1983. Serum Albumin levels in cancer patients receiving total parenteral nutrition. Ann. Surg. 197: 3305-3309

Michishita, E., Garce, G., Barrett, J.C. and Horikawa, I. 2006. Upregulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality. Cancer Lett. 239: 71–77.

Mimori, K., Mori, M., Akiyoshi, T., Tanaka, S. and Sugimachi, K. 1995. The overexpression of elongation factor-1γ mRNA in gastric carcinoma. Cancer. 75(6): 1446-1449.

Min, S.K., Lee, S.K., Park, J.S., Lee, J., Paeng, J.Y., Lee, S.I., Lee, H.J., Kim, Y., Pae, H.O. and Kim, E.C. 2008. Endoplasmic reticulum stress is involved in hydrogen peroxide induced apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. J. Oral Pathol. Med. 37(8): 490-498.

Miyagi, T., Tatsumi, T., Takehara, T., Kanto, T., Kuzushita, N., Sugimoto, Y., Jinushi, M., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M. and Hayashi, N. 2003. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. J. Gastroenterol. Hepatol. 18(1): 32-40.

Moghaddam, A., Zhang, H.T., Fan, T.P.D., Hu, D.E., Lees, V.C., Turley, H., Fox, S.B., Gatter, K.C., Harris, A.L. and Bicknell, R. 1995. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 998-1002.

Moll, R. 1998. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. Subcell. Biochem. 31: 205-262.

Moll, R., Divo, M. and Langbein, L. 2008. The human keratins: biology and pathology. Histochem. Cell Biol. 129: 705-733.

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 31: 11-24.

Moro, M.A., Hurtado, O., Cárdenas, A., Romera, C., Madrigal, J.L.M., Tomé, F.P., Leza, J.C., Lorenzo, P. and Lizasoain, I. 2003. Expression and Function of Tumour Necrosis Factor alpha Converting Enzyme in the Central Nervous System. Neurosignals. 12(2): 53-58.

Nagase, H. and Woessner, J.F. 1999. Matrix Metalloproteinases. J. Biol. Chem. 274(31): 21491–21494.

Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Ichihara, M.F., Eriksson, J.E. and Jalkanen, S. 2006. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. Nat. Cell Biol. 8(2): 156-165.

Nutt, C.L., Mani, D.R., Betensky, R.A., Tamayo, P., Cairncross, J.G., et al. 2003. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. Cancer Res. 63: 1602-1607.

Oakley, B.R. 2000. An abundance of tubulins. Trends Cell Biol. 10: 537-542.

Ohkura, S., Kondoh, N., Hada, A., Arai, M., Yamazaki, Y., Sindoh, M., Takahashi, M., Matsumoto, I. and Yamamoto, M. 2005. Differential expression of the keratin-4, -13, -14, -17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia. Oral Oncol. 41: 607-613.

Ortiz, P.A. and Kinzy, T.G. 2005. Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. Nucleic Acids Res. 33(18): 5740-5748.

Paladini, R.D., Takahashi, K., Bravo, N.S. and Coulombe, P.A. 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. J. Cell Biol. 132(3): 381-397.

Parkin, D.M. Pisani, P. and Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Int. J. Cancer. 54: 594-606

Partridge, M., Emilon, G. and Langdon, J.D. 1996. LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. Br. J. Cancer. 73(3): 366-371.

Paterson, I.C., Eveson, J.W. and Prime, S.S. 1996. Molecular changes in oral cancer may reflect aetiology and ethnic origin. Oral Oncol. Eur. J. Cancer. 32B: 150-3.

Perentesis, J.P., Phan, L.D., Gleason, W.B., LaPorte, D.C., Livingston, D.M. and Bodley, J.W. 1992. Saccharomyces cerevisiae Elongation Factor 2. J. Biol. Chem. 267(2): 1190-1197.

Perez, V.L. 1996. Cicatricial Pemphigoid involving the conjunctiva and the oral mucosa. http://www.uveitis.org/medical/articles/case/lichenplanus.html (accessed 20/06/08).

Pericot, J. et al. 2000. Survival evaluation of treatment modality in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. J. Cranio-Maxillofacial Surgery. 28: 49-55.

Punnonen, K., Denning, M., Lee, E., Li, L., Rhee, S.G. and Yuspa, S.H. 1993. Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. J. Invest. Dermatol. 101: 719-726.

Quaresima, B., Crugliano, T., Gaspari, M., Faniello, M.C., Cosimo, P., Valanzano, R., Genuardi, M., Cannataro, M., Veltri, P., Baudi, F., Doldo, P., Cuda, G., Venuta, S. and Costanzo, F. 2008. A proteomics approach to identify changes in protein profiles in serum of Familial Adenomatous Polyposis patients. Cancer Lett. 272(1): 40-52.

Radcliffe, P.A., Garcia, M.A. and Toda, T. 2000. The cofactor-dependent pathways for α- and β-Tubulins in microtubule biogenesis are functionally different in fission yeast. Genetics. 156(1): 93-103.

Ralhan, R., Nath, N., Agarwal, S., Mathur, M., Wasylyk, B. and Shukia, N.K. 1998. Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer: Correlation with p53 alterations. Clin. Cancer Res. 4: 2147-2152.

Rayl, E.A., Moroson, B.A. and Beardsley, G.P. 1996. The human purH gene product, 5-Aminoimidazole-

4-carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase. J. Biol Chem. 271(4): 2225–2233.

Riis, B., Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C. and Merrick, W.C. 1990. Eukaryotic protein elongation factors. Trends Biochem. Sci. 15(11): 420-424.

Robert, J., Rymenant, M.V. and Laga, F. 1961. Enzymes in cancer. Cancer. 14: 1166-1174.

Rosenquist, M. 2003. 14-3-3 proteins in apoptosis. Braz. J. Med. Biol. Res. 36: 403-408.

Sankaranarayanan, R. 1990. Oral cancer in India: An epidemiologic and clinical review. Oral Surg. Oral Med. Oral Patho. 69: 325-30.

Schmalbach, C.E., Chepeha, D.B., Giordano, T.J., Rubin, M.A., Teknos, T.N., Bradford, C.R., et al. 2004. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 130: 295-302.

Sciubba, J.J. 1995. Oral leuoplakia. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 6(2): 147-160.

Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. and Wang, G.L. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor I. J. Biol. Chem. 269(38): 23757-23763.

Shawar, S.M., Cook, R.G., Rodgers, J.R. and Rich, R.R. 1990. Specialized functions of MHC class I molecules. J. Exp. Med. 171: 897-912.

Simon, B., Podolsky, D.K., Mildenhauer, G., Isselbacher, K.J., Celli, G.S. and Brand, S.J. 1990. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 87: 2755-2759.

Slootweg, P.J., Horolijk, G.J., Koole, R. 1996. Autopsy findings in patients with head and neck squamous cell carcinoma and their therapeutic relevance. Oral Oncol. Eur. J. Cancer. 32B:413-5.

Somers, K.D., Cartwright, S.L. and Schechter, C.L. 1990. Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. Oncogene. 5(6): 915-920.

Son, Y.S., Park, J.H., Kang, Y.K., Park, J.S., Choi, H.S., Lim, J.Y., Lee, J.E., Lee, J.B., Ko, M.S., Kim, Y.S., Ko, J.H., Yoon, H.S., Lee, K.W., Seong, R.H., Moon, S.Y., Ryu, C.J. and Hong, H.J. 2005. Heat Shock 70-kDa Protein 8 Isoform 1 is expressed on the surface of human embryonic stem cells and downregulated upon differentiation. Stem Cells. 23(10): 1502-1513.

Stosiek, P., Kasper, M. and Moll, R. 1992. Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. Virchows. Arch. A Path. Anat. Histol. 421(2): 133-141.

Sugiura, T., SIiIrasuna, K., Hayashidot, Y., SakaIn, t. and Matsuya, T. 1996. Effects of human fibroblasts on invasiveness of oral cancer cells in vitro: Isolation of a chemotactic factor from human fibroublast. Int. J. Cancer. 68: 774-781.

Sunesson, L., Hellman, U. and Larsson, C. 2008. PKCε binds peripherin and induces its aggregation which is accompanied by apoptosis of neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. (article in press).

Taylor, C.A., Sun, Z., Cliche, D.O., Ming, H., Eshaque, B., Jin, S., Hopkins, M.T., Thai, B. and Thompson, J.E. 2007. Eukaryotic translation initiation factor 5A induces apoptosis in colon cancer cells and associates with the nucleus in response to tumour necrosis factor α signalling. Exp. Cell Res. 313: 437-449.

Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K. 2001. Cofilin phosphorylation by protein kinase Testicular Protein Kinase 1 and its role in Integrin-mediated Actin reorganization and focal adhesion formation. Mol. Biol. Cell. 12: 1131–1145.

Toyoshima, T., Vairaktaris, E., Nkenke, E., Schlegel, K., Neukam, F. and Ries, J. 2008. Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 134(4): 523-524.

Uma, R.S., Naresh, K.N., Cruz, A.K., Mulherkar, R. and Borges, A.M. 2007. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue is associated with down-regulation of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP). Oral Oncol. 43: 27-32.

Van De Vijver, M.J., He, Y.D., Van't Veer, L.J., Dai, H., Hart, A.A., Voskuil, D.W., et al. 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N. Engl. J. Med. 347: 1999-2009.

Vicente, J.C., Fresno, M.F., Villalain, L., Vega, J.A. and Arranz, J.S.L. 2005. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 41: 568-579.

Warner, G.C., Reis, P.P., Jurisica, I., Sultan, M., Arora, S., Macmillan, C., et al. 2004. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. Int. J. Cancer. 110:857-68.

Weiss, R.A., Eichner, R. and Sun, T.T. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. J. Cell Biol. 98(4): 1397-1406.

Went, P.T.H., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G. and Dirnhofer, S. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. Hum. Pathol. 35(1): 122-128.

West, M., Blanchette, C., Dressman, H., Huang, E., Ishida, S., Spang, R. et al. 2001. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 11462-11467.

Winey, M. and Culbertson, M.R. 1988. Mutations affecting the tRNA Splicing Endonuclease activity of saccharomyces cerevisiae. Genetics. 118: 609-617.

Woolgar, J.A., Rogers, S., Wesr, C.R., Errington, R.D., Brown, J.S., and Vaughan, E.D. 1999. Survival and patterns of recurrence in 200 cancers patients treated by radical surgery and neck dissection. Oral Oncol. 35: 257-65.

Worral SF, Corrigan M. An audit of one surgeon's experience of oral squamous cell carcinoma using computalized malignancy database. Ann Royal Coll Surg Engl 1995; 77: 332-6

Yaffe, M.B., Farr, G.W., Miklos, D., Horwich, A.L., Sternlicht, M.L. and Sternlicht, H. 1992. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. Nature. 358(6383): 245-248.

Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S.I., Yoshitomi, I., Yoshida, H. and Mizuno, A. 2008. Ribonucleotide reductase small subunit p53R2 promotes oral cancer invasion via the E-cadherin/β-catenin pathway. Oral Oncol. (article in press).

Yoshida, A., Rzhttsky, A., Hsu, L.C. and Chanf, C. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. Eur. J. Biochem. 251: 549-557.

Yoshida, Y. 2007. Effective biological marker to detect oral squamous cancer cells-expression patterns

of CK 10, 17, 19 and SCCA mRNA. Kokubyo Gakkai Zasshi. 73(3)-74(1): 37-42.

Zang, L., Toy, P.D., Hancock, W.S., Sgroi, D.C. and Karger, B.L. 2004. Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and 16O/18O isotopic labeling. J. Proteome Res. 3(3): 604-612.

Zhang, D., Lim, S.G. and Koay, E.S.C. 2007. Proteomic identification of down-regulation of oncoprotein DJ-1 and proteasome activator subunit 1 in hepatitis B virus-infected well-differentiated hepatocellular carcinoma. Int. J. Oncol. 31: 577-584.

Zhang, P., Zhang, Z., Zhou, X., Qiu, W., Chen, F. and Chen, W. 2006b. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. BMC Cancer 6: 224.

Zhang, Q., Thomas, S.M., Lui, V.W.Y., Xi, S., Siegfried, J.M., Fan, H., Smithgall, T.E., Mills, G.B. and Grandis, J.R. 2006a. Phosphorylation of TNF-α converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 6901–6906.