



การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *14-3-3σ* ในผู้ป่วยคนไทยด้วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก
DNA Methylation of *14-3-3 Sigma* Gene in Thai Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

พิงค์พร เพ็ชรเจริญ

Pingpond Petjaroen

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Master of Science in Biomedical Sciences

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน 14-3-3σ ในผู้ป่วยคนไทยด้วย
โรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

ผู้เขียน นางสาวพิงค์พร เพ็ชรเจริญ

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร. ปฤษญา เรืองรัตน์)

..... ประธานกรรมการสอบ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนศ พงศ์ธีรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

..... กรรมการ
(ดร. ปฤษญา เรืองรัตน์)

.....
(รองศาสตราจารย์ พญ.ปารมี ทองสุกใส)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พญ.ปารมี ทองสุกใส)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร สุวิวัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร สุวิวัฒน์)

..... กรรมการ
(นพ.ศรายุทธ ลูเซียน กิเตอร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร. ปฤษณา เรืองรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวพิงค์พร เพ็ชรเจริญ)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวพิงค์พร เพ็ชรเจริญ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน <i>14-3-3σ</i> ในผู้ป่วยคนไทยด้วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก
ผู้เขียน	นางสาวพิงค์พร เพ็ชรเจริญ
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

บทนำ: มะเร็งปอดมีอุบัติการณ์การเกิดและการตายของผู้ป่วยสูงเป็นลำดับต้นๆในประชากรโลก โดยบ่อยครั้งพบว่ากระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) มีบทบาทต่อการสูญเสียการแสดงออกในระดับ ยีนและมีแนวโน้มว่าสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในผู้ป่วยมะเร็งได้ การสูญเสียการแสดงออกของยีน *14-3-3σ* (14-3-3σ) ได้รับการรายงานในหลายโรคมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของ *14-3-3σ* methylation ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC) ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน

วัตถุประสงค์: เพื่อตรวจสอบ *14-3-3σ* methylation ในผู้ป่วย NSCLC จำนวน 36 ตัวอย่าง โดยทำการสกัด DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อและตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยคนเดียวกัน ทำการตรวจสอบระดับ *14-3-3σ* methylation โดยอาศัยเทคนิคเมทิลเลชันสเปคโทรฟีลิตีซีอาร์ (MSP) และหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ *14-3-3σ* methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัมโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน ขอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

ผลการศึกษา: มีตัวอย่างมะเร็งปอดชนิด squamous carcinoma (SCC) จำนวน 15 ตัวอย่าง (41.7%), ชนิด adenocarcinoma (ADC) จำนวน 17 ตัวอย่าง (47.2%) และไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 4 ตัวอย่าง (11.1%) โดยในตัวอย่างซีรัมพบระดับของ *14-3-3σ* methylation (87.70 ± 9.15) สูงกว่าในตัวอย่างชิ้นเนื้อ (46.72 ± 10.23) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ *14-3-3σ* methylation และการแสดงออกระดับ mRNA ในทุกชนิด อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ในตัวอย่างชนิด ADC มีแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างระดับ *14-3-3σ* methylation ของตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัม ($r = -0.449$, $p = 0.071$) อีกทั้งยังมีแนวโน้มความแตกต่างของระดับ *14-3-3σ* methylation กับการแสดงออกของโปรตีน ($p = 0.055$)

สรุป: การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของ *14-3-3σ* methylation อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคมะเร็ง และตัวอย่างซีรัมอาจสามารถนำมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับช่วยวินิจฉัยในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด ADC ได้

Thesis Title	DNA Methylation of <i>14-3-3 Sigma</i> Gene in Thai Patients with Non-Small Cell Lung Cancer
Author	Miss Pingpond Petjaroen
Major Program	Biomedical Sciences
Academic Year	2014

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer has a high morbidity and mortality worldwide. CpG island methylation is frequently associated with gene silencing and appears as a promising cancer marker. Loss of *14-3-3 σ* expression has been shown in numerous cancers; however, role of *14-3-3 σ* methylation in non-small cell lung cancer (NSCLC) remains unclear.

Aim: The aim of this study was investigate the methylation status of *14-3-3 σ* gene in NSCLC patients (n=36). DNA was obtained from tumor tissues and matched serum samples. Methylation status was determined by Methylation-Specific PCR (MSP) technique. Absolute quantity of methylated and unmethylated PCR product was used to evaluate the methylation level. Association of methylation marker in tissues and serum was determined using Spearman's correlation. p -value<0.05 was considered as significance.

Results: There were 41.7% (n=15) of squamous carcinoma (SCC), 47.2% (n=17) of adenocarcinoma (ADC) and 11.1% (n=4) of unclassified type. *14-3-3 σ* methylation level was significantly higher in matched serum sample (88±10) than tumor tissues (47±10) with p -value<0.001. There was no significant of *14-3-3 σ* methylation level and mRNA expression in all histological types of NSCLC. However, we found a trend to significant of moderate correlation between of *14-3-3 σ* methylation level in tumor tissue and matched serum sample in ADC (r=-0.449, p =0.071). In addition, in ADC, a marginal trend toward significance of the difference of *14-3-3 σ* methylation level and protein expression was also shown with p -value=0.055.

Conclusion: In conclusion, this study suggests that aberrant *14-3-3 σ* methylation may be involved in lung tumorigenesis and it may be used as a blood-based marker for helping diagnosis in ADC of lung.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. ปฤษณา เรืองรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ. พญ.ปารมี ทองสุกใส และ รศ. ดร. สุภาพร สุวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ในการให้ความรู้ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิจัย ให้ความช่วยเหลือด้านการค้นคว้าข้อมูล การตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเป็นแบบอย่างที่ดีในการทำงานเสมอมา ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ธเนศ พงศ์ธีรรัตน์ ประธานกรรมการและคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่กรุณาสละเวลา ในการตรวจทานแก้ไขและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อความถูกต้อง และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ นพ.ศราวุธ ลูเซียน กิเตอร์ , ผศ.พญ.วรางคณา กิรดิชานานนท์ และเจ้าหน้าที่ ทุกท่าน ใน สาขาวิชาโรคระบบหายใจและภาวะวิกฤตระบบหายใจ รพ.สงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

ถือเป็นพระมหากรุณาธิคุณอันล้นพ้นอย่างหาที่สุคมิได้ จากมูลนิธิจุฬาภรณ์ สำหรับเงินค่าเทอมพระราชทานตลอดจนจบการศึกษา ขอขอบคุณเงินทุนคณะแพทยศาสตร์ ที่ให้เงิน สำหรับงานวิจัยทั้งหมด ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุน วิจัยบางส่วน ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ นักวิชาการ ตลอดจนพี่เจ้าพนักงานทุกท่านที่ เคยให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือเสมอมา

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ นายสมศักดิ์ เพ็ชรเจริญ คุณแม่ นางพรทิพย์ เพ็ชรเจริญ และครอบครัว ในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจมาตลอด ขอขอบคุณมิตรภาพดีๆ จาก ญาติมิตร พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวนาม ไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

พิงค์พร เพ็ชรเจริญ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า	
รายการตาราง		(10)
รายการภาพประกอบ		(11)
บทที่		
1. บทนำ		
บทนำต้นเรื่อง		1
บทตรวจเอกสาร		4
วัตถุประสงค์		33
2. วิธีการวิจัย		
วัสดุและอุปกรณ์		34
วิธีการวิจัย		36
3. ผลการวิจัย		48
4. บทวิจารณ์		63
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ		67
เอกสารอ้างอิง		68
ภาคผนวก		80
ประวัติผู้เขียน		105

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	รายละเอียดของจีน 14-3-3 แต่ละไอโซฟอร์มในมนุษย์	10
2	แสดงผลการลดการแสดงออกของกลุ่มยีนชนิดต่างๆ เนื่องจากกระบวนการ DNA methylation ที่นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง	21
3	กระบวนการ 14-3-3 σ methylation ที่มีผลต่อการแสดงออกในหลายโรคมะเร็ง	30
4	ชนิดและจำนวนตัวอย่าง ในแต่ละขั้นตอนการศึกษา	39
5	ระดับ 14-3-3 σ methylation ของกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา	51
6	ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง และลักษณะของผู้ป่วย	53
7	Master mix สำหรับปฏิกิริยา MSP	88
8	ขั้นตอนและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MSP	88
9	Master mix สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR	89
10	ขั้นตอนและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR	89
11	รายละเอียดของผู้ป่วย NSCLC ที่ใช้ในการศึกษา	93
12	ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัม	96
13	ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ bisulfite DNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัม	98
14	ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ทั้งหมดในตัวอย่างชิ้นเนื้อ	100
15	ผลการศึกษาในตัวอย่าง NSCLC	102
16	ผลการศึกษาในตัวอย่างที่ไม่ใช่มะเร็ง	103

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	อุบัติการณ์การเกิดและการตายของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งสูงสุด 10 อันดับ จากสถิติโลก และสถิติประเทศไทย	6
2	กายวิภาคศาสตร์ของปอด	7
3	ชนิดของเซลล์มะเร็งปอด	8
4	สัดส่วนของอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งปอดเมื่อแยกตามชนิดของเซลล์มะเร็ง	9
5	โครงสร้างริบิ้นของโปรตีน 14-3-3 dimer	11
6	ลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มโปรตีน 14-3-3 ทั้ง 7 ไอโซฟอร์ม	12
7	การควบคุมการทำงานและหน้าที่ของโปรตีน 14-3-3	14
8	ขั้นตอนการเกิด DNA methylation ที่นำไปสู่การเกิด gene silencing	20
9	การเกิด DNA hypermethylation และ DNA hypomethylation ในโรคมะเร็ง	21
10	กลไกที่ถูกนำเสนอว่าเป็นไปได้ ในการปลดปล่อย Cell free DNA ออกมาภายในกระแสเลือด	32
11	ตัวอย่างและวิธีการที่ใช้ในการศึกษา	38
12	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเบส cytosine ไปเป็นเบส uracil โดยอาศัยวิธีการ bisulfite treatment	42
13	การตรวจวัดแอนติเจนด้วยเทคนิค IHC แบบ polymer-conjugate technology	45
14	ระดับของ 14-3-3 σ methylation เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี MSP ในชิ้นเนื้อมะเร็ง ปอดและในซีรัม	50
15	กราฟบอกซ์พลอตระดับ 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อปอด และซีรัม	52
16	กราฟบอกซ์พลอตระดับ 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็ง และซีรัมเมื่อ แบ่งชนิดตามจุลพยาธิวิทยา	52
17	แผนภูมิกระจายแสดงระดับของ 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งกับซีรัม ของผู้ป่วย	55
18	ระดับ mRNA ของ 14-3-3 σ และ GAPDH	56
19	แผนภูมิกระจายแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ 14-3-3 σ methylation และ ระดับการแสดงออกของ 14-3-3 σ mRNA	58

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ลักษณะการติดสีในชิ้นเนื้อเมื่อย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเทรีย	60
21	แผนภูมิวงกลมแสดงร้อยละของตัวอย่างที่แสดงออกระดับการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ	61
22	กราฟบ็อกซ์พลอตแสดงระดับ 14-3-3 σ methylation คูตามการแสดงออกของโปรตีน	62
23	ลำดับเบสของ 14-3-3 σ ในมนุษย์	81
24	โปรแกรม CpG Island Searcher	82
25	ตำแหน่ง CpG island ของ 14-3-3 σ เมื่อหาด้วยโปรแกรม CpG Island Searcher	82
26	ลำดับเบสและไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการเกิด 14-3-3 σ methylation	83
27	ลำดับเบสและไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของ 14-3-3 σ	84

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

มะเร็งปอด (Lung cancer) มีอุบัติการณ์การเกิดของโรคสูงเป็นลำดับต้นๆ ในประชากรโลก โดยพบอุบัติการณ์การเกิด และการตายของโรค สูงเป็นอันดับหนึ่งในเพศชายคิดเป็น 34.2 และ 30.0 คนต่อประชากรเพศชายหนึ่งแสนคนตามลำดับ ในเพศหญิงพบอุบัติการณ์การเกิดเป็นอันดับสี่คิดเป็น 13.6 คนต่อประชากรเพศหญิงหนึ่งแสนคน รองจากมะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ และมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ¹ มะเร็งปอดแบ่งออกเป็นสองชนิดหลัก คือมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancer; SCLC) และมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก (non-small cell lung cancer; NSCLC) โดยชนิด SCLC มีการแพร่กระจายในร่างกายรวดเร็วแต่พบได้ประมาณ 20% ของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมดต่างจากชนิด NSCLC ซึ่งเป็นชนิดมะเร็งที่มีรูปร่างเซลล์ใหญ่กว่าสามารถพบได้บ่อยจากผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมดประมาณ 90%² แม้ในปัจจุบันในโรคมะเร็งปอดมีการนำเทคโนโลยีและยาที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการรักษา แต่อัตราการตายของผู้ป่วยเนื่องจากโรคมะเร็งปอดก็ยังคงสูงอยู่ ทั้งนี้เนื่องมาจากไม่สามารถตรวจพบมะเร็งได้ในระยะเริ่มแรกหรือการตรวจพบการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งภายหลังจากได้รับการรักษา ยังไม่สามารถทำได้ ดังนั้นการหา biomarkers ที่มีประสิทธิภาพเพื่อช่วยในการวินิจฉัยหรือใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรงของโรคจึงยังคงมีความสำคัญ

โปรตีน 14-3-3 เป็นกลุ่มของโปรตีนที่พบได้เจ็ดไอโซฟอร์มในมนุษย์ ซึ่งได้แก่ไอโซฟอร์ม β , γ , ϵ , σ , ζ , τ และ η จากการศึกษาพบว่าโปรตีนในกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งที่หลากหลายภายในเซลล์ เช่น วิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (apoptosis pathway), การถ่ายทอดสัญญาณ (signal transductions) และการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle regulation) เป็นต้น³ ซึ่งความผิดปกติของกระบวนการเหล่านี้จะส่งผลต่อการดำเนินของโรคที่รุนแรงมากยิ่งขึ้น โดยไอโซฟอร์ม 14-3-3 ซิกมา (14-3-3 σ) มักถูกนำมาศึกษาและรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับโรคมะเร็ง³ ยีน 14-3-3 σ ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1p36 มีขนาด 1.31 kb. โดยมีสายนิวคลีโอไทด์จำนวน 747 นิวคลีโอไทด์และถอดรหัสได้ 248 กรดอะมิโน โดยจากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ ในระดับที่แตกต่างกันจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง กล่าวคือ การแสดงออกในระดับที่สูงของโปรตีน 14-3-3 σ มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์⁴ และ

มะเร็งลำไส้⁵ แต่ในผู้ป่วยมะเร็งที่หลังโพรงจมูก⁶ และมะเร็งหลอดอาหารชนิดสความัสเซลล์⁷ นั้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ดีขึ้น จากรายงานเหล่านี้ อาจกล่าวได้ว่าการแสดงออกโปรตีน 14-3-3c อาจพบได้ในระดับที่แตกต่างกันไป ในมะเร็งชนิดต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น

สำหรับการลดลง หรือการสูญเสียการแสดงออกของ โปรตีน 14-3-3c ในมะเร็งหลายๆชนิด บ่อยครั้งมีรายงานว่าเกิดจากกระบวนการ DNA methylation ซึ่งเป็นกระบวนการที่เพิ่มความผิดปกติในระดับเหนือยีนจากการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนซึ่งหากกระบวนการนี้เกิดขึ้นในระดับสูงหรือที่เรียกว่า DNA hypermethylation ก็จะส่งผลทำให้ยีนแสดงออกน้อยลงหรือที่เรียกว่า epigenetic silencing⁸ สำหรับยีน 14-3-3c มีรายงานการเกิด DNA hypermethylation ในมะเร็งหลายๆชนิด เช่น มะเร็งเต้านม⁹, มะเร็งตับ¹⁰ และมะเร็งในระบบสืบพันธุ์ (มะเร็งรังไข่, มะเร็งต่อมลูกหมากและ มะเร็ง เยื่อบุโพรงมดลูก)¹¹ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของการเกิด DNA hypermethylation ของยีน 14-3-3c กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ลดลงใน มะเร็งเต้านม¹² และ มะเร็งรังไข่¹³ มีการศึกษาการเกิด DNA hypermethylation ของยีน 14-3-3c ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง 37 ชนิดพบว่า การเกิด DNA hypermethylation สามารถตรวจพบได้ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงชนิด SCLC 69 % และชนิด large cell carcinoma คิดเป็น 57% แต่ในชนิดอื่นๆของกลุ่ม NSCLC พบเพียง 6% ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ผลต่อการแสดงออกที่ลดลง หรือการสูญเสียการแสดงออกทั้งในระดับ RNA และระดับโปรตีนในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงทั้งหมดข้างต้นอีกทั้งยังมีการศึกษาเพิ่มเติม ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด เพื่อดูการแสดงออกในระดับโปรตีน เพื่อทดสอบว่าจะเป็นไปได้ในทิศทางเดียวกันกับ เซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง หรือไม่ พบว่าชนิด SCLC มีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว คิดเป็น 100% ในขณะที่พบการแสดงออกเพียง 5% ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด NSCLC¹⁴

นอกจากนี้จากการศึกษาของทีมผู้วิจัย Raungrut P และคณะ (อยู่ระหว่างดำเนินการตีพิมพ์) จากผลการศึกษา ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3c ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ถึง 83.83 % (140 ตัวอย่าง จาก 167 ตัวอย่าง) แม้ว่าผลจากการศึกษานี้จะแตกต่างจากการศึกษาข้างต้น แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่า การสูญเสียการแสดงออกของโปรตีนตัวนี้ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC อาจเกิดจากกระบวนการ DNA hypermethylation ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานว่า การเกิด DNA methylation สามารถตรวจพบได้จาก DNA ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายในกระแสเลือด (circulating free DNA, CFDNA) โดยทำในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่ได้รับยาเคมีบำบัด¹⁵ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการตรวจสอบการเกิด DNA methylation ของยีนดังกล่าวในซีรัมของผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ดังนั้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักคือศึกษาการเกิด DNA methylation วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด NSCLC และซีรัมจากผู้ป่วยคนเดียวกันที่ยังไม่ได้เข้ารับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด และ วิเคราะห์หา ความสัมพันธ์ ระหว่าง การเกิด DNA methylation กับการแสดงออกทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีน ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วย ซึ่งในการศึกษานี้คาดว่าจะได้มาซึ่งข้อมูลเบื้องต้น อันนำไปสู่การพัฒนา biomarker เพื่อช่วยในการวินิจฉัยหรือคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่ดีและมีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1) มะเร็งปอด

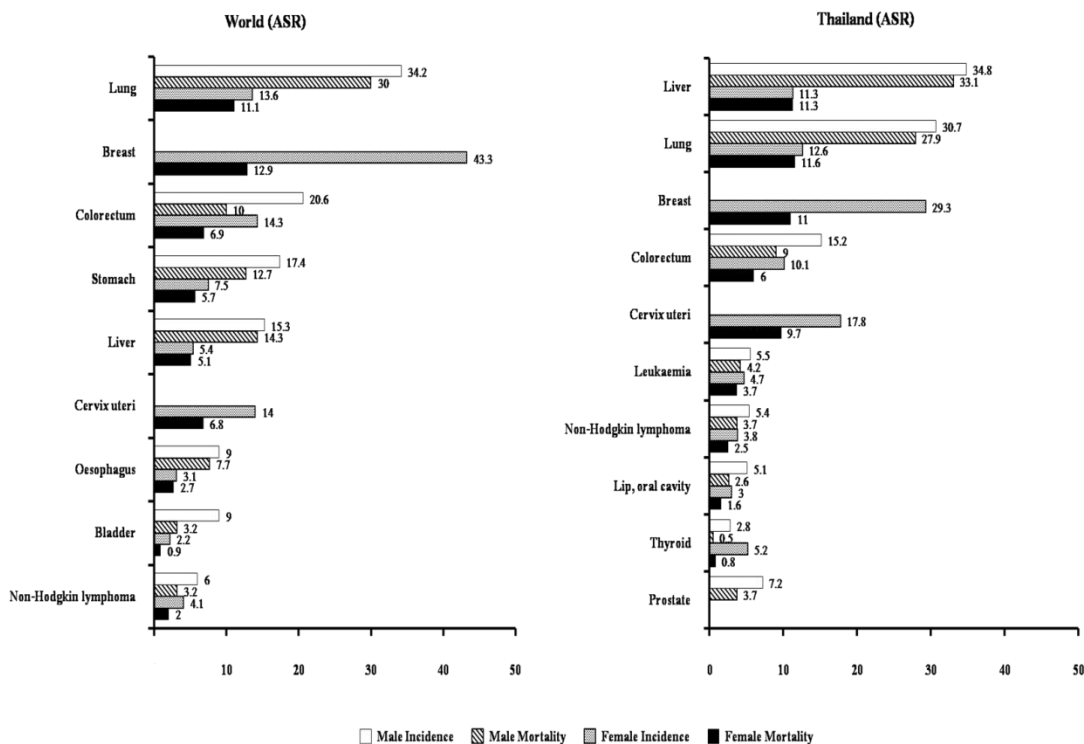
โรคมะเร็งปอดเป็นเนื้องอกชนิดร้ายบริเวณปอด¹⁶ เริ่มแรกจะเป็นก้อนขนาดเล็ก หากปล่อยทิ้งไว้ก้อนมะเร็งจะโตขึ้น และลุกลามเข้าแทนที่เนื้อปอดปกติ จนที่สุดจะแพร่ กระจายไปสู่ อวัยวะอื่นๆ สาเหตุของมะเร็งปอดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานถึงสาเหตุส่งเสริมหรือปัจจัย เสี่ยงในการเกิดมะเร็งปอด หลายปัจจัย¹⁶ เช่น การสูบบุหรี่พบว่าผู้มีประวัติในการสูบบุหรี่มีปัจจัย เสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดมากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ , การได้รับสารเคมีหรือรังสีอย่างต่อเนื่อง , คนในครอบครัวมี ประวัติการเป็นโรคมะเร็งปอด และอาการป่วยอื่นๆที่ส่งผลให้เกิดแผลบริเวณปอด เช่น วัณโรคปอด หรือ โรคถุงลมโป่งพอง เป็นต้นสำหรับอาการที่พบได้บ่อย¹⁶ ได้แก่

- 1) อาการไอแห้งๆ เรื้อรัง หรือมีเสมหะปนเลือด รู้สึกเจ็บหน้าอก
- 2) น้ำหนักลดรวดเร็ว เกิดอาการเบื่ออาหารกลืนได้อาหารลำบาก ตัวซีด รู้สึกอ่อนเพลีย
- 3) มีอาการหอบและเหนื่อยง่าย
- 4) มีอาการบวมบริเวณใบหน้าช่วงคอ หรือหน้าอก จากการที่ก้อนของมะเร็งกดทับเส้นเลือดดำใหญ่

โดยอาการข้างต้นอาจเป็นอาการของ โรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปอดด้วยเช่นกันจะ ทราบแน่ชัดว่าเป็นมะเร็งปอดก็ต่อเมื่อได้รับการ ตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ซึ่งวิธีการวินิจฉัยโรคมะเร็ง ปอด ได้แก่ การเอกซเรย์ปอด,การตรวจเสมหะเพื่อหาเซลล์มะเร็ง , การส่องกล้องเพื่อตรวจดูภายใน หลอดลม หรือปอดและการ ตัดชิ้นเนื้อบางส่วนจากหลอดลม หรือปอด เพื่อใช้วินิจฉัยทางพยาธิ วิทยา¹⁶ จากนั้นเมื่อแพทย์ตรวจว่าเป็นมะเร็งปอดแน่ชัดแล้วจะเข้าสู่ขั้นตอนการรักษา โดยแพทย์จะ ทำการตัดสินใจหรือเลือกวิธีการรักษาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยโดยพิจารณาจากปัจจัยต่างๆของผู้ป่วย เช่น อายุ, ชนิดของมะเร็ง หรือระยะของโรค เป็นต้น โดยวิธีการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอด มีด้วยกันหลักๆ 3 วิธี คือ 1) การผ่าตัด มักทำในผู้ป่วยระยะเริ่มแรก, 2) การฉายรังสีเพื่อรักษา และ 3) การรักษาโดย ใช้เคมีบำบัด ซึ่งในผู้ป่วยบางรายอาจใช้วิธีการรักษามากกว่า 1 วิธีร่วมกันได้ ถ้าเหมาะสมกับผู้ป่วย และช่วยรักษาหรือบรรเทาอาการของผู้ป่วยลงได้¹⁶

1.2.1.1) อุบัติการณ์ของโรค

มะเร็งปอดเป็นมะเร็งที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆของโลก จากฐานข้อมูล GLOBOCAN 2012¹⁷ ในเพศชาย พบอุบัติการณ์การเกิด และการตายของโรค สูงเป็นอันดับหนึ่ง 34.2 และ 30.0 คนต่อประชากร เพศชายหนึ่งแสนคน ตามลำดับ ในเพศหญิงพบอุบัติการณ์การเกิด เป็นอันดับสี่รองจากมะเร็งเต้านม , มะเร็งลำไส้ และมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ โดยมีอุบัติการณ์การเกิด 13.6 คนต่อประชากรเพศหญิงหนึ่งแสนคน และพบอุบัติการณ์การตายเป็นอันดับสองรองมาจากมะเร็งเต้านม พบผู้ป่วย 11.1 คนต่อประชากรเพศหญิงหนึ่งแสนคน จากฐานข้อมูลเดียวกันสถิติในประเทศไทยพบว่าในเพศชายมะเร็งปอดมีอุบัติการณ์การเกิด และการตายสูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งตับ พบผู้ป่วย 30.7 และ 27.9 คนต่อประชากรเพศชายหนึ่งแสนคนตามลำดับ ในเพศหญิงมะเร็งปอดพบบ่อยเป็นอันดับสามรองจากมะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก พบผู้ป่วย 12.6 คนต่อประชากรเพศหญิงหนึ่งแสนคน แต่กลับมีอุบัติการณ์การตาย 11.6 คนต่อประชากรเพศหญิงหนึ่งแสนคนซึ่งสูงเป็นอันดับหนึ่ง (ภาพที่ 1)



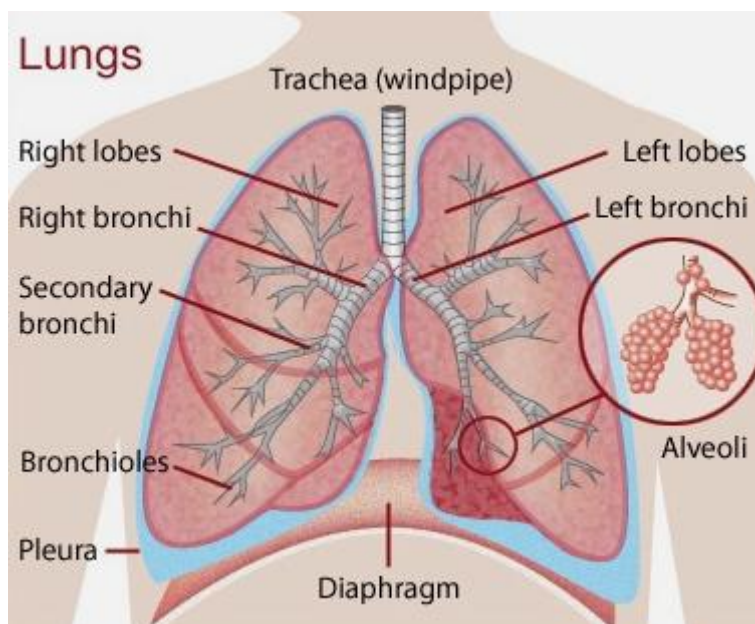
ภาพที่ 1 อุบัติการณ์การเกิดและการตายของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งสูงสุด 10 อันดับ จากสถิติโลก และสถิติประเทศไทย¹⁷

หมายเหตุ ASR (Age-Standardized Rate) คือ อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งของประชากรในพื้นที่ที่สนใจ เทียบกับจำนวนประชากรมาตรฐานโลก โดยที่ประชากรนั้นมีโครงสร้างประชากร (อายุและเพศ) เหมือนกันกับประชากรมาตรฐานโลกคำนวณโดยนำจำนวนผู้ป่วยมะเร็งในกลุ่มอายุหนึ่ง หาค่าด้วยจำนวนประชากรในช่วงอายุเดียวกัน นำผลลัพธ์ที่ได้ไปคูณด้วยค่าประชากรมาตรฐานโลกในแต่ละช่วงอายุ โดยผลรวมของค่าประชากรมาตรฐานโลกจากทุกช่วงอายุมีค่าเท่ากับ 100,000 หลังจากนั้นนำผลลัพธ์ที่ได้ทุกช่วงอายุมารวมกัน ก็จะได้ค่า ASR ต่อประชากรหนึ่งแสนคน

1.2.1.2) กายวิภาคศาสตร์ของปอด

ปอดเป็นอวัยวะที่อยู่ในระบบทางเดินหายใจ ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซเพื่อรักษาระดับออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ให้คงที่ แบ่งออกเป็นสองข้างซ้ายขวา ซึ่งแต่ละข้างจะแบ่งออกเป็นกลีบ (lobe) โดยปอดข้างขวามี 3 lobe ได้แก่ superior lobe, middle lobe และ inferior lobe ปอดข้างซ้ายมี 2 lobe ได้แก่ superior lobe และ inferior lobe ปอดประกอบด้วยสามส่วนสำคัญ คือ ทางเดินหายใจ ถุงลมปอด และหลอดเลือดฝอยที่นำเลือดมาแลกเปลี่ยนก๊าซ¹⁸ ปอดถูกหุ้มด้วยเยื่อหุ้มปอด 2 ชั้น ที่เรียกว่า pleura โดยเยื่อหุ้มปอดชั้นที่ติดกับเนื้อปอดเรียกว่า visceral pleura และชั้นที่ติดกับผนังทรวงอกเรียกว่า pleural cavity ภายในปอดจะมีท่อนำอากาศ หรือหลอดลมที่ขั้วปอดเรียกว่า trachea และท่อทางด้านซ้ายและขวาที่แยกออกมาจากหลอดลมเรียกว่า bronchi จนเมื่อเข้ามาภายในปอด bronchi จะแยกออกเป็นหลอดลมขนาดเล็กจำนวนมาก (secondary bronchi) จนถึงหลอดลม

ฝอย (bronchiole) และสิ้นสุดเป็นถุงลมขนาดเล็ก (alveoli) ซึ่งอยู่ภายในปอดเป็นจำนวนมาก และเป็นบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซกับหลอดเลือดฝอยภายในปอด¹⁹ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กายวิภาคศาสตร์ของปอด²⁰

1.2.1.3) ชนิดของมะเร็งปอด

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization-WHO) จัดหมวดหมู่มะเร็งปอดตามลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาไว้หลากหลาย แต่ชนิดที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งปอดสามารถจำแนกได้สองกลุ่มหลักคือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (SCLC) และมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (NSCLC) ซึ่งในมะเร็งปอดชนิด NSCLC สามารถแบ่งย่อยออกได้ 3 ชนิดหลัก ได้แก่ squamous cell carcinoma (SCC), adenocarcinoma (ADC) และ large cell carcinoma²¹

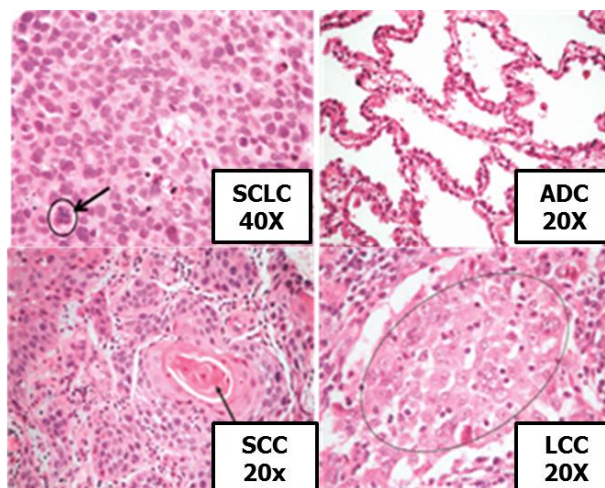
1) SCLC เป็นมะเร็งปอดที่มีขนาดเซลล์เล็ก เซลล์มะเร็งมีต้นกำเนิดจาก bronchial epithelium เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์จะมีลักษณะคล้ายราข้าวโอ๊ต (oat cell carcinoma) และมีการพยากรณ์โรคแยกว่าในชนิด NSCLC²² ภายในเซลล์พบนิวเคลียสเป็นส่วนใหญ่ พบไซโทพลาสซึมน้อย ทำให้เห็นเป็นเซลล์ขนาดเล็กที่มีนิวเคลียสอัดแน่นเกือบเต็มเซลล์ เซลล์มะเร็งมีการเรียงตัวแน่นหนา มีการแบ่งตัว และแพร่กระจายเร็ว²³ (ภาพที่ 3)

2) NSCLC เป็นกลุ่มมะเร็งที่พบได้บ่อยสุดในผู้ป่วยมะเร็งปอด โดย แบ่งเป็นตามลักษณะของเซลล์ได้ 3 ชนิดได้แก่

ก) ADC เป็นมะเร็งชนิดที่สามารถพบได้ ในคนที่ไม่สูบบุหรี่ โดยพบอุบัติการณ์การเกิดโรคร้ายในเพศหญิงและเพศชายเท่าๆกัน มะเร็งปอดชนิดนี้มัก เกิดจากแผลเป็น ภายในปอด²² เป็นเซลล์มะเร็งที่มีการสร้างสารพวกมีวชิน มีลักษณะคล้ายต่อม หรือนิ้วมือ²³ (ภาพที่ 3)

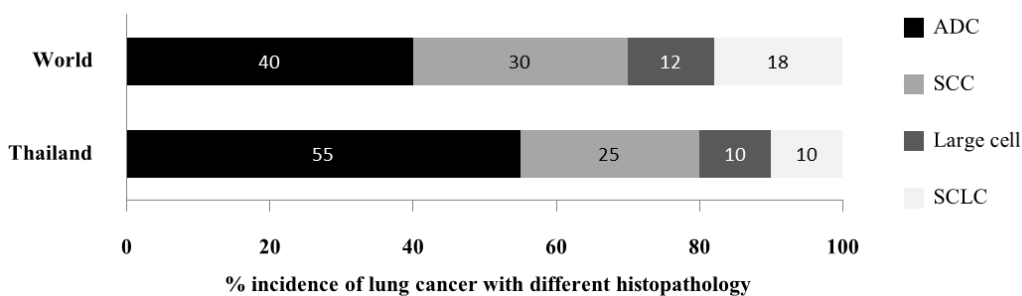
ข) SCC เป็นชนิดที่เกิดจากเยื่อหุ้มหลอดลมมีความผิดปกติ บางส่วนของเนื้อเยื่อมีการสร้างสารเคอราติน²³ เชื่อว่าเซลล์มะเร็งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เยื่อหุ้มชนิดสความัสที่เปลี่ยนมาจากเซลล์เยื่อหุ้มชนิดคอลลัมน์ (metaplastic squamous epithelium) มักพบในผู้ป่วยเพศชายที่มีประวัติการสูบบุหรี่²² (ภาพที่ 3)

ค) Large cell carcinoma เซลล์มีขนาดใหญ่ พบได้น้อยมาก ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยไซโตพลาซึมเป็นส่วนใหญ่ มีการเรียงตัวของเซลล์แตกต่างกับในชนิด SCC และ ADC²³ (ภาพที่3)



ภาพที่ 3 ชนิดของเซลล์มะเร็งปอด ย้อมด้วยสี hematoxilin และ eosin²³

จากการรายงานจากสถิติโลกปีคริสต์ศักราช 2008 ของผู้ป่วยมะเร็งปอดรายใหม่ จำนวน 1.6 ล้านคน พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งปอดรายใหม่ทั้งหมดเป็นผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด ADC ประมาณ 40% ตามด้วยชนิด SCC พบประมาณ 30 % และชนิด large cell carcinoma พบประมาณ 12 % และชนิด SCLC พบประมาณ 18 %² สำหรับผู้ป่วยในผู้ป่วยคนไทยด้วยโรคมะเร็งปอดรายใหม่ในปีพุทธศักราช 2542 จำนวน 12,725 คน พบชนิด NSCLC สูงถึง 90% จากผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด (พบชนิด adenocarcinoma ประมาณ 55%, ชนิด squamous cell carcinoma ประมาณ 25%, และชนิด large cell carcinoma ประมาณ 10%) และพบชนิด SCLC เพียงแค่ 10%²⁴ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 สัดส่วนของอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งปอดเมื่อแยกตามชนิดของเซลล์มะเร็ง

1.2.2) โพรตีน และยีน 14-3-3

โพรตีน 14-3-3 ถูกค้นพบครั้งแรกจากสมองสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในปีคริสต์ศักราช 1967 โดย Moore และ Perez ซึ่งที่มาของชื่อ 14-3-3 ได้จาก fraction number ของโพรตีนเมื่อถูกแยกด้วยวิธี two-dimensional DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose chromatography²⁵ กลุ่มโพรตีน 14-3-3 มีคุณสมบัติเป็น acidic protein ที่มีขนาดเล็กขนาดประมาณ 28-33 kD ต่อหนึ่งโมโนเมอร์ (monomer) และสามารถจับตัวกันเป็นไดเมอร์ (dimer) เพื่อเข้าจับกับโพรตีนตัวอื่นได้หลากหลายภายในเซลล์ ปัจจุบัน ในมนุษย์ พบในยีนที่แตกต่างกันชัดเจนจำนวน 7 ไอโซฟอร์ม (บีตา (β), แกมมา (γ), เอปไซลอน (ε), ซีตา (ζ), อีตา (η), เทตา (τ) และ ซิกมา (σ)), จำนวน 15 ไอโซฟอร์มในพืช และจำนวน 2 ไอโซฟอร์มในยีสต์²⁶ ในมนุษย์ทุกไอโซฟอร์มมีการแสดงออกทั่วไปในหลากหลายเนื้อเยื่อ ยกเว้น ไอโซฟอร์ม τ และ σ ที่พบการแสดงออกแค้ใน T cells และเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) เท่านั้น²⁷ โดย 14-3-3 ถูกรายงานว่าเป็นกลุ่มโพรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งที่หลากหลายภายในเซลล์ เช่น วิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (apoptosis pathway), การถ่ายทอดสัญญาณ (signal transductions) และวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) เป็นต้น²⁸

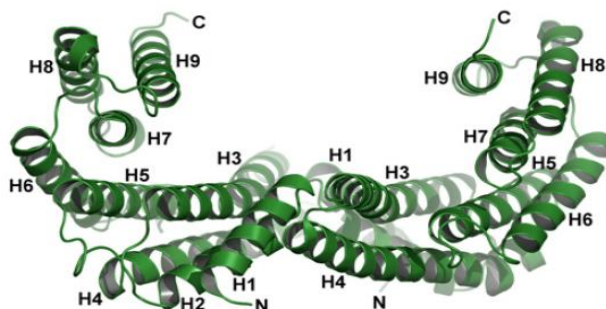
ในปีพุทธศักราช 2557 จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่ากลุ่มยีน 14-3-3 มีตำแหน่งบนโครโมโซม และขนาดของยีนในแต่ละไอโซฟอร์มแตกต่างกัน โดยยีน 14-3-3σ มีขนาดเล็กสุด (1.31kb) และ 14-3-3ε มีขนาดใหญ่สุด (55.84kb) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 และเป็นที่น่าสนใจว่าถึงแม้กลุ่ม 14-3-3 จะมาจากยีนที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม แตกต่างกันชัดเจน แต่เมื่อมีการแปลรหัสพันธุกรรมออกมากลับพบว่ากลุ่มโพรตีน 14-3-3 มีคุณสมบัติเป็น highly conserved proteins คือมีบริเวณการอนุรักษ์ลำดับกรดอะมิโน (conserve region) ที่คล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่จากลำดับอะมิโนทั้งหมด^{29,30}

ตารางที่ 1 รายละเอียดของยีน 14-3-3 แต่ละไอโซฟอร์มในมนุษย์

14-3-3 isoforms	Gene symbol	Genomic localization	Size (kb)
β	<i>YWHAB</i>	20q13.1	22.93
γ	<i>YWHAG</i>	7q11.23	32.23
ϵ	<i>YWHAE</i>	17p13.3	55.84
ζ	<i>YWHAZ</i>	8q23.1	34.91
η	<i>YWHAH</i>	22q12.3	13.11
τ	<i>YWHAQ</i>	2p25.1	47.09
σ	<i>YWHAS</i>	1p35.3	1.31

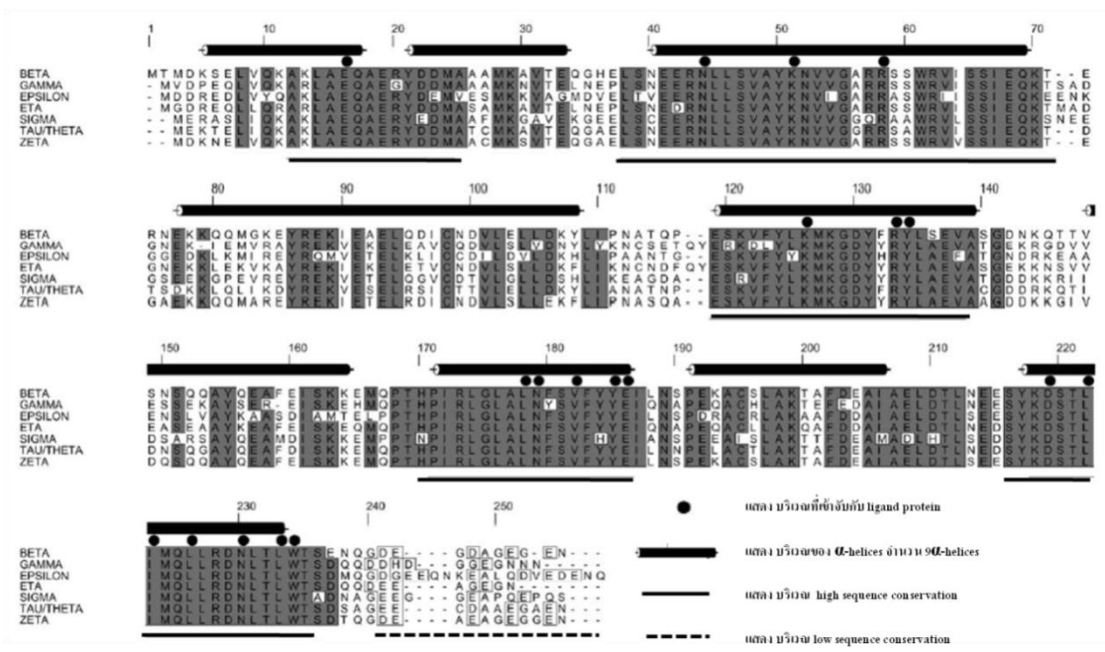
1.2.2.1) โครงสร้างของโปรตีน 14-3-3

โครงสร้างของโปรตีน 14-3-3 มีรูปร่างคล้ายด้วยขนาดใหญ่ที่เกิดจากการจับตัวของ monomer ของโปรตีน 14-3-3 จำนวน 2 monomer ประกอบกันเป็น dimer โดยแต่ละ monomer มีโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน เป็นรูปร่างเกลียวที่เรียกว่า แอลฟาฮีลิก (α -helices) จำนวน 9 α -helices (H1-H9) (ภาพ 5) ซึ่งหาก dimer นั้นเกิดจากการจับตัวกันของ monomer โปรตีน 14-3-3 ที่เหมือนกัน 2 ชนิดจะเรียกว่า homodimer แต่หากเกิดจาก monomer โปรตีน 14-3-3 ที่ต่างกันก็จะเรียกว่า heterodimer³¹ โดย α -helice ที่ 1 ถึง α -helice ที่ 4 เป็นตำแหน่งที่เข้ามาจับกันเพื่อประกอบเป็น dimer และสำหรับ α -helice อื่นที่เหลือจะประกอบกันเป็นร่องแอมฟิพาติก (amphipathic groove) เพื่อเป็นตำแหน่งสำหรับเข้าจับกับโปรตีนตัวรับ (ligand protein)³ ถึงแม้ว่าโครงสร้างของโปรตีน 14-3-3 ทั้ง 7 ไอโซฟอร์มมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ทั้งในรูปแบบที่เป็น 14-3-3 dimer หรือรูปแบบที่เข้าจับกับ ligand protein ก็ตาม แต่ยังพบความแตกต่างเมื่อนำมาเปรียบเทียบโครงสร้างระหว่างไอโซฟอร์ม^{32,33} โดยความแตกต่างนั้นเกิดจากตำแหน่งของ monomer ที่เข้าจับกันเป็น dimer มีความแตกต่างกัน ส่งผลให้เมื่อฟอร์มตัวเป็น dimer มุมที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกัน โดยความแตกต่างนี้ส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 มีความยืดหยุ่นในการเข้าจับกับ ligand protein ที่มีขนาดหรือรูปร่างที่แตกต่างกันได้³² และอีกหนึ่งความแตกต่างที่พบคือความยาวของ α -helice โดยพบความแตกต่างของความยาวบริเวณ α -helice ที่ 3 และ 4 และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ loop ที่แตกต่างกัน ตรง loop ระหว่าง α -helice ที่ 3 และ 4 และ loop ระหว่าง α -helice ที่ 8 และ 9^{33,34}



ภาพที่ 5 โครงสร้างริบบิ้นของโปรตีน 14-3-3 dimer³⁵

จากลำดับดัดแปรกรดอะมิโนของโปรตีน 14-3-3 ที่พบในมนุษย์ทั้ง 7 ไอโซฟอร์ม (ภาพที่ 6) พบว่ากลุ่มโปรตีน 14-3-3 มีจำนวนกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 251–258 กรดอะมิโน และมีบริเวณที่มีการอนุรักษ์ลำดับกรดอะมิโน (conserve region) โดยบริเวณที่มีการอนุรักษ์ลำดับกรดอะมิโนสูง (high sequence conservation) คือบริเวณที่แสดงด้วยเส้นตรงใต้ลำดับกรดอะมิโน มีจำนวน 5 บริเวณ โดยบริเวณนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเข้าจับกับ ligand protein และการฟอร์มเป็น 14-3-3 dimer^{26,36} สำหรับตำแหน่งที่แสดงด้วย วงกลมสีดำคือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เข้าจับกับ ligand protein, บริเวณเส้นตรงหนาที่สีดำด้านบนลำดับกรดอะมิโนแสดงถึง α -helice ที่ 1 ถึง 9 และบริเวณที่แสดงด้วยเส้นประใต้ลำดับกรดอะมิโนแสดงบริเวณปลาย C-terminal โดยบริเวณปลาย C-terminal มีการรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเข้าจับกับ ligand protein^{37,38} และมีลำดับอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ลำดับอะมิโนต่ำ (low sequence conservation) อยู่ภายในซึ่งแสดงด้วยกรดอะมิโนที่อยู่ในกล่องสีขาว



ภาพที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน 14-3-3 ทั้ง 7 ไอโซฟอร์ม ภาพดัดแปลงจาก Yaffe MB, 2002³⁹

โปรตีน 14-3-3 จะเข้าจับกับ ligand protein ได้อย่างจำเพาะก็ต่อเมื่อ ligand protein มีการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยอาศัยปฏิกิริยา ฟอสโฟรีเลชัน ตรงกรดอะมิโน serine หรือกรดอะมิโน threonine ตรงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโน 3 รูปแบบคือ 1) รูปแบบที่ 1 มีลำดับอะมิโน RSXpS/TXP ซึ่งพบลำดับอะมิโนข้างต้นได้ในหลากหลายโปรตีน เช่นโปรตีน Raf1, CDC25C และ MEKK เป็นต้น⁴⁰ 2) รูปแบบที่ 2 มีลำดับอะมิโน RXXXpS/TXP สามารถพบได้ในโปรตีน BAD, CDC25A, PKCγ และ BRC เป็นต้น⁴¹ 3) รูปแบบที่ 3 มีลำดับอะมิโน pS/T-X(1-2)-COOH สามารถพบได้ที่ปลาย C-terminal ของ ligand protein ซึ่งพบลำดับอะมิโนนี้ในโปรตีน arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT)⁴² เมื่อ pS/T คือกรดอะมิโน serine หรือกรดอะมิโน threonine ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต, X หมายถึงกรดอะมิโนตัวใดก็ได้, X (1-2) หมายถึงกรดอะมิโนตัวใดก็ได้จำนวน 1 หรือ 2 ตัว, S คือกรดอะมิโน serine ที่ไม่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต, R คือกรดอะมิโน arginine และ P คือกรดอะมิโน proline เนื่องจากสามารถพบลำดับอะมิโนทั้ง 3 รูปแบบในหลายโปรตีน เป็นสาเหตุให้โปรตีน 14-3-3 สามารถเข้าจับกับ ligand protein และเข้าไปเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการภายในเซลล์

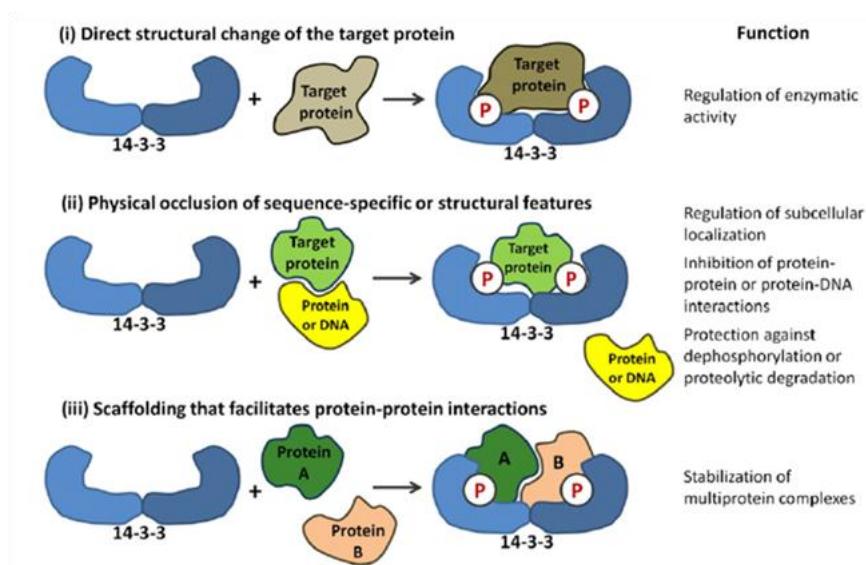
1.2.2.2) การควบคุมการทำงานและหน้าที่ของโปรตีน 14-3-3

การควบคุมการทำงานของโปรตีน 14-3-3 เกิดขึ้นเมื่อ ligand protein มีการเติมหมู่ฟอสเฟต โดยอาศัยปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ด้วยเอนไซม์ serine/threonine kinase ตรงตำแหน่งกรดอะมิโน serine หรือ threonine ส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 สามารถเข้าจับกับ ligand protein ตรงบริเวณ amphipathic groove ได้ซึ่งการเข้าจับของโปรตีน 14-3-3 ส่งผลต่อ ligand protein โดยจะมีผลเข้าไปเปลี่ยนแปลง ligand protein ได้ 3 รูปแบบหลัก^{3,35} (ภาพ 7) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนั้นจะส่งผลให้ 14-3-3 โปรตีนเข้าไปทำหน้าที่ได้แตกต่างกัน ดังนี้

1. กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ligand protein โดยตรงจากนั้นจะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ (regulation of enzymatic activity) เช่น เมื่อโปรตีน 14-3-3ζ เข้าจับกับโปรตีน serotonin-N-acetyltransferase (AANAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเมลาโทนิน (melatonin) ส่งผลให้การทำงานของ AANAT เพิ่มขึ้น³⁵ โดย AANAT เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในการขนย้ายหมู่ acetyl จาก acetyl-coenzyme A ไปยัง serotonin ได้ผลิตภัณฑ์เป็น n-acetylserotonin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสาร melatonin จากการศึกษาของ Ganguly และคณะพบว่า AANAT จัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่มีประสิทธิภาพเนื่องจาก มีความสัมพันธ์ต่ำ (low affinity) ในการเข้าจับกับซับสเตรตของตัวเอง⁴³ แต่เมื่อมีการเข้าจับของโปรตีน 14-3-3 ส่งผลให้โครงสร้างของ AANAT เกิดการเปลี่ยนแปลงและไปเพิ่มความสัมพันธ์ในการเข้าจับกับ ซับสเตรตของตัวเองให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นประมาณ 60%⁴⁴

2. เข้าบดบังลำดับอะมิโนที่จำเพาะในการเข้าจับกับคู่โปรตีนของ ligand protein จะส่งผลให้มีหน้าที่หลากหลาย เช่น 1) ควบคุมการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่อยู่ของ ligand protein (regulation of subcellular localization) เช่น ในกระบวนการตายแบบ apoptosis บริเวณผนังของไมโทคอนเดรียมีโปรตีน BAD จับกับโปรตีน Bcl-x_L แต่เมื่อโปรตีน 14-3-3 เข้าจับกับโปรตีน BAD ส่งผลให้ BAD ไม่สามารถเข้าจับกับโปรตีน Bcl-x_L ได้ เนื่องจาก monomer ของโปรตีน 14-3-3 เข้าบดบังลำดับอะมิโนที่จำเพาะในการเข้าจับระหว่างโปรตีน BAD และ โปรตีน Bcl-x_L จากนั้นโปรตีน BAD ถูกเปลี่ยนตำแหน่งที่อยู่จากไมโทคอนเดรียออกมายัง ไซโทพลาซึม โดยผ่านกระบวนการควบคุมจากโปรตีน 14-3-3^{45,46} 2) ยับยั้งการเข้าจับกันของระหว่างคู่โปรตีน (inhibition of protein-protein interactions) เช่น เมื่อโปรตีน 14-3-3 เข้าจับกับ ligand protein จะส่งผลให้โปรตีนนั้นๆ ไม่สามารถเข้าจับกับโปรตีนตัวอื่นได้ เช่นการเข้าจับของโปรตีน 14-3-3 กับโปรตีน Cdc25A ทำให้โปรตีน Cdc25A สูญเสียความสามารถในการเข้าจับกับโปรตีน CyclinB/Cdk1 ซึ่งเป็นตัว checkpoint ในขั้นตอน G2/M ส่งผลให้โปรตีน Cyclin B/Cdk1 ไม่สามารถทำงานได้ เกิดการยับยั้งกระบวนการ cell cycle ในที่สุด⁴⁷

3. เป็น โปรตีนสคาฟโฟลด์ ตัวเชื่อม ligand protein โดยมีหน้าที่ในการรักษาเสถียรภาพในการเข้าจับของ ligand protein ที่แตกต่างกัน (stabilization of multiprotein complex) คือ monomer แรกก็เข้าจับกับ ligand protein ตัวที่หนึ่ง และอีก monomer ก็เข้าจับกับ ligand protein ตัวที่สอง⁴⁸ เช่นในการศึกษาของ Braselmann และ McCormick พบว่า โปรตีน RAF1 และ โปรตีน BCR สามารถเข้าจับกันได้โดยผ่านทางการทำงานของโปรตีน 14-3-3⁴⁹



ภาพที่ 7 การควบคุมการทำงานและหน้าที่ของโปรตีน 14-3-3³⁵

1.2.2.3) บทบาทของโปรตีน 14-3-3 ต่อกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis

กระบวนการ apoptosis เป็นการตายของเซลล์ แบบตั้งโปรแกรมไว้แล้ว โดยเมื่อเซลล์เกิดความเสียหายและไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์จะสามารถถูกทำลายโดยกระบวนการ apoptosis เซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการ apoptosis จะมีลักษณะหลายรูปแบบ เช่น นิวเคลียสมีการแตกตัวเป็นชิ้นๆ, เซลล์มีการหดตัวเล็กลง, เซลล์มีการพุดพอง และ DNA มีการแตกตัวเป็นท่อนลักษณะต่างๆเหล่านี้ส่งผลให้เกิดเป็นรูปแบบที่มีความจำเพาะเรียกว่า apoptotic body ซึ่งจะถูการทำลายต่อโดยเซลล์ phagocyte ด้วยวิธี phagocytosis⁵⁰ กระบวนการ apoptosis ถูกควบคุมผ่านการส่งสัญญาณของเซลล์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ทางหลักคือ

Extrinsic pathway คือการส่งสัญญาณจากภายนอกเซลล์ เริ่มจากโปรตีนไลแกนด์จากภายนอกเซลล์เข้ามาจับกับโปรตีน death receptor เช่นโปรตีน FAS และ TNFR1 เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีนเรียกว่า death inducing signaling complex (DISC) ที่สามารถเข้าจับ

กับ adaptor protein เช่นโปรตีน FADD ซึ่งโครงสร้างนี้ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ caspase 8, 6, 7, 3 และเกิดกระบวนการ apoptosis ในที่สุด⁵¹

Intrinsic pathway คือการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับไมโทคอนเดรีย⁵² ซึ่งจะทำงานโดยผ่านการควบคุมของโปรตีนในกลุ่ม BCL-2 family⁵³ โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก) กลุ่มโปรตีนที่ยับยั้งการตาย (anti-apoptotic proteins) เช่นโปรตีน BCL₂ และ BCL-x_L⁵⁴
 ข) กลุ่มโปรตีนที่ส่งเสริมการตาย (pro-apoptotic proteins) โดยในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ 1) Multidomain pro-apoptotic proteins เช่นโปรตีน BAX และ BAK ซึ่งโดยปกติปกติ นั้น เริ่มต้นจากโปรตีน BAX และ BAK ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนย้ายจากไซโทซอลมายังผนังเซลล์ไมโทคอนเดรีย และเกิดการเข้าจับกันเองของทั้งสองโปรตีน (BAX-BAK oligomerization) ส่งผลให้ผนังเซลล์ไมโทคอนเดรียเสียหาย หลัง cytochrom c ออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทซอล รวมกับ Apaf-1 และ procaspase-9 กลายเป็น apoptosome จากนั้นกระตุ้น procaspase 9, 3 และเกิดกระบวนการ apoptosis ในที่สุด⁵⁵ 2) Pro-apoptotic BH3-only proteins ซึ่งในกลุ่มนี้ก็สามารถแบ่งออกย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่ม BH3-only activators โดยโปรตีนกลุ่มนี้มีหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการการเกิด BAX-BAK oligomerization โดยตรง เช่นโปรตีน BID และ BIM⁵¹ และอีกกลุ่มหนึ่งคือกลุ่ม BH3-only sensitizers โดยโปรตีนในกลุ่มนี้มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ anti-apoptotic proteins ซึ่งจะส่งผลให้ไม่มีโปรตีน anti-apoptotic proteins ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน BID และ BIM จัดว่าเป็นการส่งเสริมกระบวนการการเกิด BAX-BAK oligomerization ทางอ้อม มีโปรตีนหลากหลายตัวในกลุ่มนี้ เช่นโปรตีน BAD, BIK และ BMF เป็นต้น⁵⁶ ผลจากการทำงานของโปรตีนใน 2 กลุ่มนี้ จะเข้าไปส่งเสริมการเกิดกระบวนการ apoptosis ในที่สุด

สำหรับบทบาทโปรตีน 14-3-3 ต่อกระบวนการ apoptosis มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโปรตีน BAD โดยกระบวนการปกติโปรตีน BAD จะเข้าจับและยับยั้งการทำงานของโปรตีน BCL₂ หรือ BCL-x_L⁵³ โดยจากการศึกษาของ Zha J และคณะ ที่ทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดเพาะเลี้ยงในลูกหนู (FL5.12) พบว่าเมื่อโปรตีน BAD ซึ่งปกติจับกับโปรตีน BCL₂ ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตตรงตำแหน่งกรดอะมิโน serine 112 และ 136 โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ serine/threonine kinase (AKT) ส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 ไอโซฟอร์มบีตาและไอโซฟอร์มซีตาเข้าจับกับโปรตีน BAD และเมื่อเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตอีกครั้งตรงตำแหน่งกรดอะมิโน serine 115 โดยการเหนี่ยวนำของเอนไซม์ protein kinase A (PKA) ส่งผลให้ BCL₂ หลุดออกจากการจับกับโปรตีน BAD เข้าไปยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis ในที่สุด⁴⁵ ในทางตรงข้ามจากการศึกษาของ Won J และคณะ ในเซลล์เพาะเลี้ยงไตปกติของมนุษย์ (HEK 293) พบว่าโปรตีน 14-3-3 epsilon ส่งเสริมให้

เกิดกระบวนการ apoptosis เมื่อเซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ส่งผลให้เอนไซม์ caspase-3 สามารถเข้าไปเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีน 14-3-3 epsilon โดยการตัดกรดอะมิโนกรดแอสปาร์ติก ที่ตำแหน่ง 238 ได้ ส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 epsilon ไม่สามารถเข้าจับกับโปรตีน BAD อีกทั้งยังส่งเสริมการจับของโปรตีน BAD กับ BCL-x_L และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในที่สุด⁵⁷ จะเห็นได้ว่าการรายงานความเกี่ยวข้องของโปรตีนกลุ่ม 14-3-3 กับกระบวนการ apoptosis ข้างต้นยังมีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาข้างต้นเป็นการศึกษาของโปรตีนกลุ่ม 14-3-3 ที่มีไอโซฟอร์มที่แตกต่างกัน

1.2.2.4) บทบาทของโปรตีน 14-3-3 ในวัฏจักรของเซลล์

วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) คือกระบวนการแบ่งตัวหรือเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นวัฏจักร ในหนึ่ง cell cycle จะประกอบด้วย 4 ระยะ คือ 1) ระยะ G₀/G₁ เป็นระยะเตรียมความพร้อมก่อนสร้าง DNA, 2) ระยะ S เป็นระยะสร้าง DNA, 3) ระยะ G₂ เป็นระยะหลังสร้าง DNA และ 4) ระยะ M-phase เป็นระยะที่เซลล์เริ่มมีการแบ่งตัว⁵⁸ โดยในแต่ละ ระยะ ต้องมีกระบวนการตรวจสอบ (checkpoints) ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของโปรตีน cyclin-dependent kinases (CDKs) และ cyclins รวมกันเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนเรียกว่า CDK/cyclin complexes ซึ่งแต่ละระยะจะมี CDKs และ cyclins ที่ควบคุมแตกต่างกัน เพื่อตรวจสอบความพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะต่อไป โดย CDKs จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์กลุ่ม CDK activating enzymes ได้แก่โปรตีนในกลุ่ม Cdc25 phosphatase family เช่น Cdc25A, Cdc25B และ Cdc25C⁵⁹ แต่หากเซลล์เกิดความเสียหายขึ้น กระบวนการ cell cycle จะถูกสั่งให้หยุดเพื่อซ่อมแซมตัวเอง โดยการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) เช่นโปรตีน p16, p21 และ p27 เป็นต้น โดยโปรตีนในกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของโปรตีน cyclins ส่งผลให้โปรตีน cyclin เข้าจับกับโปรตีน CDK ไม่ได้ ทำให้กระบวนการ cell cycle หยุดชะงักหรือที่เรียกว่า cell cycle arrest^{60,61} สำหรับใน cell cycle โปรตีน 14-3-3 เกี่ยวข้องในหลาย ๆ ขั้นตอน⁶² เช่น ในระยะ G₁/S และ G₂/M โปรตีน 14-3-3 ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน checkpoints เช่น Cdc25C, CDK2 และ Cdc25A ส่งผลให้หน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไป จากการศึกษาของ Chen MS และคณะ ซึ่งทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง (HeLa cell) โดยใช้เทคนิค phosphatase assays พบว่าหลังจากโปรตีน CDC25A มีการเติมหมู่ฟอสเฟตด้วยปฏิกิริยา phosphorylation โดยเอนไซม์ serine/threonine protein kinase ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน serine178 และ Threonine507 ส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 เข้าจับกับโปรตีน CDC25A ได้ จากการเข้าจับของโปรตีนสองชนิดนี้ทำให้เซลล์ไม่สามารถเข้าสู่ระยะ M ได้ และเกิดการยับยั้งกระบวนการ cell cycle ในที่สุด⁴⁷ ในทางตรงกันข้ามจาก

การศึกษาของ Naoya F และคณะ⁶³ ซึ่งทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไตของมนุษย์ (293T cell line) และเซลล์ไตของลิง (COS-7 cell line) ด้วยเทคนิค immunoprecipitation พบว่าเมื่อโปรตีน p27 ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วยปฏิกิริยา phosphorylation โดยเอนไซม์ protein kinase B ตรงตำแหน่งกรดอะมิโน Threonine198 ทำให้โปรตีน 14-3-3 สามารถเข้าจับได้ การเข้าจับของโปรตีน 14-3-3 ทำให้ p27 ถูกกักไว้ในไซโทพลาสซึม และไม่สามารถเข้าสู่ภายในนิวเคลียส เพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน cyclin ได้ ส่งผลให้ cell cycle ดำเนินต่อไปแม้เซลล์จะมีความเสียหาย⁶³

1.2.2.5) รายละเอียด 14-3-3σ โดยภาพรวม

14-3-3σ มีชื่อเรียกอีกได้ว่า stratifin (SFN), HEM-1 หรือ human epithelial marker⁴² ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 บริเวณแขนข้างสั้น p36.11 มีขนาด 1.31kb (1,315 เบส) จากเบส 26863142 ถึง 26864456 โดยประกอบไปด้วย 1 exon มี 747 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลรหัสได้ 248 กรดอะมิโน มีรูปร่างและโครงสร้างคล้ายกับไอโซฟอร์มอื่นในกลุ่มโปรตีน 14-3-3 คือมีรูปร่างคล้ายด้วยประกอบไปด้วย 9α-helice และมีลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่ (conserve region)

โปรตีน 14-3-3σ พบการแสดงออก ในระดับสูงที่ เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) สามารถตรวจเจอการติดสีของ 14-3-3σ ด้วยเทคนิค IHC ทั้งในไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสภายในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์⁶⁴ จากการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า โปรตีน 14-3-3σ เป็น dynamic protein คือโปรตีน ที่ถูกส่งจากไซโทพลาสซึมเพื่อกลับเข้าไปทำงานภายในนิวเคลียส โดยจากการศึกษาเดียวกันนี้พบว่าโปรตีน 14-3-3σ มีการแสดงออกสูงใน กิราติโนไซต์ของชั้นผิวหนัง, เยื่อบุ urothelium ในกระเพาะปัสสาวะ, เซลล์ periductal และ periglandular ของต่อมลูกหมาก และเต้านม และในเยื่อบุ squamous ของปากมดลูกบริเวณที่ใกล้เคียงกับช่องคลอด (exocervix) แต่ไม่พบการแสดงออกใน germinal cell ใน อัณฑะ, รังไข่, ต่อมน้ำเหลือง, และกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle)⁶⁴ โดย 14-3-3σ ถูกควบคุมการทำงานจากหลากหลายกลไก ซึ่งทำให้เข้าไปมีผลโดยตรงต่อการเกิดโรคมะเร็ง³ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการ cell cycle มีการรายงานออกมาว่าโปรตีน 14-3-3σ มีบทบาทในการยับยั้ง กระบวนการ cell cycle ในระยะ G₁/S และระยะ G₂/M⁶⁵ เช่น ในการศึกษาของ Hermeking H. และคณะในปีคริสต์ศักราช 1997 พบว่าเมื่อ DNA ถูกทำให้เกิดการเสียหายด้วยการฉายรังสีแกมมาในเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยง จะเกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน 14-3-3σ ในระยะ G₁/S โดยผ่านการควบคุมการทำงานจากโปรตีน p53 ซึ่ง 14-3-3σ มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CDK ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง กระบวนการ cell cycle ระยะ G₁/S ในที่สุด⁶⁶ หรือในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม ซึ่งจากการศึกษาของ Laronga C. และ

คณะพบว่าในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง โปรตีน 14-3-3 σ เข้าไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Cdk2 โดยการเข้าจับโดยตรง⁶⁷ และจากการศึกษาของ Chan TA. และคณะ ซึ่งศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ พบว่า ในระยะ G₂/M มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ 14-3-3 σ ซึ่งเข้าไปเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่อยู่ของคู่โปรตีน Cdc2/cyclinB₁ จากนิวเคลียสออกมายังไซโตพลาสซึม ส่งผลให้เกิดการยับยั้งระยะ G₂/M ในที่สุด⁶⁸ อีกหนึ่งกระบวนการสำคัญที่มีการรายงานว่าโปรตีน 14-3-3 σ เข้าไปเกี่ยวข้องคือกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยการศึกษาของ Samuel T. และคณะ ในปีคริสต์ศักราช 2001 พบว่าในเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อเซลล์ได้รับยาเคมีบำบัด การขาดหายของ โปรตีน 14-3-3 σ กระตุ้นให้เซลล์สู่เข้ากระบวนการตายแบบ apoptosis เนื่องจากโปรตีน 14-3-3 σ บทบาทเข้าไปควบคุมการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่อยู่ของ โปรตีน Bax ซึ่งโปรตีน Bax ทำหน้าที่ในการส่งเสริมกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 σ มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis⁶⁹ แต่ในทิศทางตรงกันข้ามกันจากรายงานของ Tsuruta F. และคณะ ในปีคริสต์ศักราช 2004 กลับพบว่า c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) กระตุ้นการเคลื่อนย้ายโปรตีน Bax ไปยังไมโทคอนเดรียโดยผ่านทางการทำงานของโปรตีน 14-3-3 σ อาจกล่าวได้ว่ากระบวนการข้างต้นเป็นกระบวนการที่ส่งเสริมกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในที่สุด⁷⁰ กล่าวโดยสรุปคือจากรายงานทั้งหมดข้างต้นทั้งในกระบวนการ cell cycle และ apoptosis ยังไม่สามารถสรุปบทบาทหน้าที่ของ 14-3-3 σ ได้อย่างชัดเจนว่ามีบทบาทเป็น tumor suppressor หรือ oncogene ขึ้นอยู่กับว่าโปรตีน 14-3-3 σ เข้าไปเกี่ยวข้องในกระบวนการหรือโมเลกุลใด และส่งผลในแง่ใดในที่สุด

1.2.3) กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

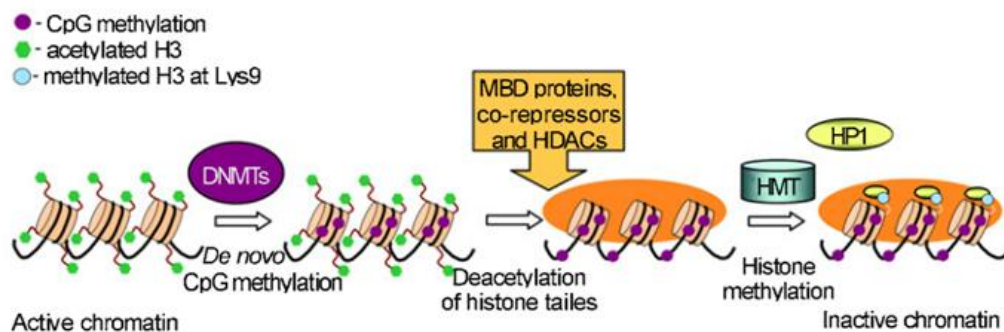
อีพีเจเนติกส์ (epigenetics) คือการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับ nucleotide ของสาย DNA ซึ่งงานวิจัยในอดีตที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetics มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดโรคมะเร็ง การเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetics ที่มักเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาของโรคมะเร็งมี 2 แบบหลัก คือ การเติมหมู่เมทิลบนสาย DNA (DNA methylation) และการดัดแปลงหมู่ฮิสโตน (histone modifications) ของสายโครมาติน⁷¹ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ท้ายสุดจะนำไปสู่การยับยั้งการแสดงออกของยีน การเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetics บ่อยครั้งจะเกิดผ่านกระบวนการ DNA methylation ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA ผ่านการเติมหมู่เมทิลโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMT) ให้กับสาย DNA ตรงเบส cytosine ตำแหน่งที่ 5 ภายใน

บริเวณ CpG island⁷² โดย CpG island คือบริเวณที่มีเบส C และ G อยู่อย่างหนาแน่น โดยมีพันธะ phosphodiester เชื่อมต่อระหว่างเบส C และ G ในภาวะปกติ CpG island มักพบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ประมาณ 60% ของยีนทั้งหมด) ซึ่งโดยทั่วไป CpG island ในบริเวณนี้ของเซลล์มักไม่เกิดกระบวนการ DNA methylation⁷³

1.2.3.1) กระบวนการ DNA methylation ในมนุษย์

กระบวนการ DNA methylation ในเซลล์ปกติจะเกิดขึ้นโดยอาศัย เอนไซม์ DNMT ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ 1) เอนไซม์ DNMT1 ซึ่งทำหน้าที่รักษารูปแบบของ DNA methylation ให้เหมือนกับสาย DNA แม่แบบ จัดเป็นเอนไซม์แบบ maintenance methyltransferase⁷⁴ และ 2) เอนไซม์ DNMT3a และเอนไซม์ DNMT3b ที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลตรงตำแหน่งของ DNA ที่เสียหายเมทิลไปในช่วง กระบวนการ DNA replication จัดเป็นเอนไซม์แบบ de-novo methyltransferase⁷⁵ สำหรับในเซลล์มะเร็งพบการแสดงออกในระดับ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ DNMTs ทั้ง 2 แบบในระดับที่สูง⁷⁶

ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการ DNA methylation จนนำไปสู่การระงับการแสดงออกของยีนเริ่มจาก CpG-dinucleotides ที่อยู่บนสาย active chromatin เกิดกระบวนการ DNA methylation โดยอาศัยเอนไซม์ DNMTs จนเหนี่ยวนำให้เกิดการเข้าจับของ methyl-CpG-binding domain (MBD) และเอนไซม์ histone deacetylases (HDAC) ทำให้เกิดกระบวนการดึงหมู่ acetyl (deacetylation) ออกจากสาย chromatin ตรงบริเวณ n-terminal ของโปรตีนฮิสโตน H3 และ H4 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ นิวคลีโอโซม หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่เมทิลที่โปรตีน histone (histone methylation) ตรงบริเวณ กรดอะมิโนไลซีนตำแหน่งที่ 9 ของโปรตีน H3 และกรดอะมิโนไลซีนตำแหน่งที่ 20 ของโปรตีน H4 ด้วยเอนไซม์ histone methyltransferases (HMTs) ส่งผลให้โปรตีน heterochromatin binding protein 1 (HP1) เข้าจับ และทำให้โครมาตินอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive chromatin) ซึ่งไม่สามารถเกิดกระบวนการ transcription ได้ในที่สุด⁷³ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการเกิด DNA methylation ที่นำไปสู่การเกิด gene silencing⁷³

1.2.3.2) กระบวนการ DNA methylation และ โรคมะเร็ง

กระบวนการ DNA methylation มักเกิดตรงตำแหน่ง CpG island บริเวณ promoter ของยีน หรือที่เรียกว่า promoter methylation ส่งผลให้ยีนนั้นสูญเสียการแสดงออกซึ่งเป็นเหตุการณ์ปกติที่เกิดขึ้นเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน⁷⁷ แต่อย่างไรก็ตามในมะเร็งหลายชนิดพบว่าความผิดปกติของ DNA methylation จะส่งผลต่อกลุ่มยีนหลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง เช่นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต, apoptosis, angiogenesis, invasion, metastasis, และ genomic instability (ตารางที่ 2) จากการศึกษาของ Umbricht CB และคณะ (2001)⁷⁸ พบการเกิด DNA methylation ของยีน *14-3-3σ* ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมในระดับสูง (*14-3-3σ* hypermethylation) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อเต้านมปกติซึ่งตรวจไม่พบการเกิด DNA methylation ของยีนชนิดนี้⁷⁸ ปัจจุบัน *14-3-3σ* มีรายงานว่าทำหน้าที่เป็น tumor suppressor⁷⁹ โดยการควบคุมกระบวนการ cell cycle โดยในศึกษาของ Umbricht CB และคณะ ข้างต้น ระบุว่า การเกิด *14-3-3σ* methylation จะมีระดับที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของการเป็นโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นเหตุให้สูญเสียการแสดงออกของยีนดังกล่าว และจากการศึกษาของ Graff JR และคณะ (2000)⁸⁰ ซึ่งทำการศึกษาการเกิด DNA methylation ของยีน E-cadherin ในชิ้นเนื้อเต้านมปกติและชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม แสดงให้เห็นว่า ไม่พบการเกิด E-cadherin methylation ในชิ้นเนื้อเต้านมปกติแต่พบการเกิด E-cadherin methylation เพิ่มสูงขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมระยะลุกลาม ซึ่งโดยทั่วไป E-cadherin ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์และผลจากการเกิด methylation ของยีนชนิดนี้ส่งผลให้เซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะระหว่างเซลล์ และอาจไปส่งเสริมกระบวนการ invasion และ metastasis เซลล์มะเร็งได้⁸⁰

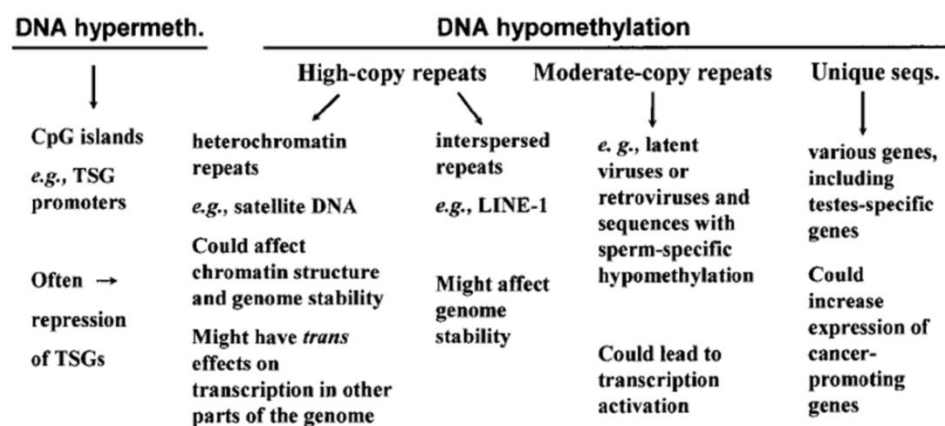
ตารางที่ 2 แสดงผลการลดการแสดงออกของกลุ่มยีนชนิดต่างๆ เนื่องจากกระบวนการ DNA methylation ที่นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง คัดแปลงจาก Taby R และ Issa J-PJ, 2010⁷⁷

<i>Hallmark* (acquired capability)</i>	<i>Gene silenced by DNA methylation</i>	<i>Gene function</i>
Insensitivity to antigrowth signals	p16CDKN2A	Cyclin-kinase inhibitor induce differentiation cell cycle arrest
Self-sufficiency in growth signals Evading apoptosis	RAR β Sigma 14-3-3 RASSF1A Capase-8 TMS1 DAP-kinase p14ARF	Regulation Ras pathway Initiate apoptosis Proapoptosis Proapoptosis Proapoptosis
Limitless replicative potential Sustained angiogenesis	Rb Thrombospondin-1	Tumor suppressor gene Angiogenesis inhibitor stimulate angiogenesis
Increased invasion And metastasis	VHL E-cadherin TIMP3 hMLH1	Suppress metastasis Inhibit metastasis DNA mismatch repair
Genome instability (enabling characteristic)	MGMT BRCA1	Repair alkylated guanine Repair DNA damage

การเกิด DNA methylation แบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบหลักคือ DNA hypermethylation และ DNA hypomethylation โดยทั้งสองมีความแตกต่างกันคือ

1) กระบวนการ DNA hypermethylation มักพบภายใน บริเวณ CpG islands ของยีน แต่การเกิด DNA hypomethylation มักพบได้ในบริเวณลำดับ DNA ที่มีความซ้ำ (repeated DNA sequences)⁸¹ (ภาพที่ 9)

2) กระบวนการ DNA hypermethylation มักส่งผลต่อการ transcription ของยีนที่นำไปสู่การเกิด gene silencing ในขณะที่การเกิด DNA hypomethylation ไม่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับอย่างชัดเจน⁸¹



ภาพที่ 9 การเกิด DNA hypermethylation และ DNA hypomethylation ในโรคมะเร็ง⁸¹

การจำแนกชนิดของกระบวนการ DNA methylation

1) กระบวนการ DNA hypermethylation

การเกิด DNA hypermethylation ในโรคมะเร็ง มักพบที่บริเวณ CpG island ตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ของ ยีนหรือบริเวณใกล้เคียงกับโปรโมเตอร์ เช่น บริเวณ exon1 ซึ่งในเซลล์ปกติบริเวณเหล่านี้จะไม่พบการเกิด DNA hypermethylation⁸² จากการศึกษาของ Costello JF และคณะ (2000) โดยการตรวจหาการเกิด DNA methylation ในตำแหน่งสุ่มที่เป็นบริเวณ CpG island จำนวน 1,184 ตำแหน่ง ในชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดต่างๆ (มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้, มะเร็งสมอง, มะเร็งหู คอ จมูก) จำนวน 98 ตัวอย่าง ด้วยวิธี restriction landmark genomic scanning (RLGS) พบว่ามี การเกิด DNA hypermethylation และเกิดขึ้นเฉลี่ยประมาณ 600 ตำแหน่งในบริเวณ CpG island โดยพบอีกว่าการเกิดกระบวนการ DNA hypermethylation ในตำแหน่งที่เป็นบริเวณ CpG island ของ ชิ้นเนื้อมะเร็งข้างต้นนำมาสู่การ เกิด gene silencing⁸² โดยการเกิด DNA hypermethylation มักพบ บ่อยในกลุ่ม tumor suppressor gene⁸¹ ซึ่งจะสอดคล้องกับการพัฒนาของโรคมะเร็ง โดยเมื่อเกิด กระบวนการ DNA hypermethylation ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน จะส่งผลให้โครงสร้างนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงไปทำให้ transcription factor ต่างๆไม่สามารถเข้ามาจับกับโปรโมเตอร์เพื่อควบคุมการเกิด transcription ได้เป็นผลให้เกิด gene silencing และไม่มีการสร้างโปรตีน หรือสร้างโปรตีนลดน้อยลงในที่สุด⁸³

2) กระบวนการ DNA hypomethylation

กระบวนการ DNA hypomethylation มักพบในช่วง ที่เซลล์ เริ่ม เกิดการเปลี่ยนแปลง⁸⁴ และถูกระบุว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิด genomic instability นำไปสู่การพัฒนาเป็นโรคมะเร็งในที่สุด⁸⁵ โดย Feinberg AP และ Vogelstein B ได้อธิบายถึงกระบวนการ hypomethylation ว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง โดยเข้าไปเกี่ยวข้องกับบริเวณที่ไม่ใช่โปรโมเตอร์⁸⁶ การเกิด DNA hypomethylation จะเกิดขึ้นได้ทั้งบริเวณที่มีลำดับเบสไม่ซ้ำ (non-repetitive sequence หรือ unique sequence หรือ single-copy DNA) ซึ่งมีอยู่ประมาณ 75% ของ DNA ในจีโนม และบริเวณที่มีเบสซ้ำ (repetitive sequence) ซึ่งมีอยู่ประมาณ 25% ของ DNA ในจีโนม ทั้งที่เป็น high-copy repeats (มีจำนวนลำดับเบสซ้ำประมาณ 10^6 copy/genome) และ moderate-copy repeats (มีจำนวนลำดับเบสซ้ำประมาณ 10^3 - 10^5 copy/genome)⁸⁷

ก) การเกิด DNA hypomethylation ที่บริเวณ high-copy repeats มักพบในกลุ่มยีน 2 ชนิด

1) กลุ่ม satellite DNA ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กันในลักษณะที่เรียกว่า tandem array และ satellite DNA มักพบได้ที่บริเวณ centromere และ telomere ของ

โครโมโซม โดยในจีโนมจะมี satellite DNA ขนาดสั้นๆ เรียกว่า minisatellite (มีเบสซ้ำ 20–30 คู่) และ microsatellite หรือ short tandem repeat (STR, มีเบสซ้ำ 2–7 คู่)⁸⁷

2) กลุ่ม interspersed DNA sequences ซึ่งเป็นกลุ่ม DNA sequence ที่พบได้หลายชุดกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม สามารถเคลื่อนย้ายไปยังจุดต่างๆภายในสาย DNA ได้ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์หรือแบ่งตัวผิดปกติภายในเซลล์ เช่น long interspersed nuclear elements-1 (*LINE-1*) ซึ่งมีความยาวอยู่ในช่วง 500-7,000 คู่เบส⁸⁷ ยกตัวอย่างจากการศึกษาของ Qu G และคณะ ทำการศึกษาการเกิด satellite 2 DNA methylation บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่ 16 ในจีนเนื้อมะเร็งรังไข่ ซึ่ง satellite 2 DNA จัดเป็น satellite DNA ชนิดหนึ่ง พบได้บริเวณที่ใกล้กับเซนโทรเมียร์บนแท่งโครโมโซม โดยมักพบ การจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangements) และการเกิด กระบวนการ hypomethylation บริเวณ satellite 2 DNA ในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย (rare recessive genetic disease) ต่างจากในเซลล์ปกติที่มักจะมีเกิดการเกิด DNA methylation ในระดับสูงตรงบริเวณดังกล่าว โดยทีมผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในจีนเนื้อรังไข่ปกติ , เนื้ออกรังไข่, จีนเนื้อมะเร็งรังไข่ชนิดไม่รุนแรง และจีนเนื้อมะเร็งรังไข่ พบว่าในจีนเนื้อมะเร็งรังไข่ชนิดไม่รุนแรง และจีนเนื้อมะเร็งรังไข่ มีการเกิด satellite 2 DNA hypomethylation ในโครโมโซมคู่ที่ 1 และ คู่ที่ 16 ต่างจากในเนื้ออกรังไข่ ที่มีรูปแบบการเกิด DNA methylation คล้ายกับในจีนเนื้อรังไข่ปกติ และจากการศึกษาข้างต้นพบว่าเกิดการเกิด DNA hypomethylation มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาไปของโรคมะเร็งรังไข่ โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ว่าเกิดการเกิด DNA hypomethylation จะส่งเสริมการพัฒนาตัวของโรคมะเร็ง โดยเกิดการเกิด satellite DNA hypomethylation อาจส่งผลให้โครงสร้างของโครโมโซมเกิดการผิดปกติไป⁸⁸ และการเกิด *LINE-1* hypomethylation โดยในสภาวะปกติ *LINE-1* จะถูกยับยั้งการทำงานและการแสดงออกด้วยกระบวนการ DNA hypermethylation ด้วยเอนไซม์ DNMT แต่เมื่อเอนไซม์ DNMT เกิดความผิดปกติ ทำให้ไม่มีเอนไซม์ที่ทำการขนย้ายและเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนส่งผลให้ *LINE-1* เกิด DNA methylation น้อยลง ส่งผลให้ *LINE-1* ทำงานผิดปกติ สามารถแทรกตัวและยับยั้ง การสร้างโปรตีนกลุ่ม tumor suppressor หรือไปกระตุ้น การสร้างโปรตีนกลุ่ม oncogene และส่งเสริมการพัฒนาของโรคมะเร็งในที่สุด⁸⁹ โดยเกิดการเกิด DNA hypomethylation ที่กลุ่มยีนข้างต้นจะไม่สามารถ สะสมความผิดปกติ นี้ได้ต่อไปในรุ่นลูกหลาน ทำให้เกิด ความเสถียรทางพันธุศาสตร์ หรือที่เรียกว่า genome stability⁹⁰

ข) การเกิด DNA hypomethylation ที่บริเวณ moderate-copy repeats เช่นใน retroviruses ซึ่งคือ viral RNA ที่สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นดีเอ็นเอ เพื่อให้สามารถแฝงตัวเป็นกาฝากอยู่ในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอได้ซึ่งการเกิด hypomethylation ของ retroviruses

ส่งผลให้เกิดการทำงานของกระบวนการ transcription เช่นจากการศึกษาของ Howard G และคณะ ในปีคริสต์ศักราช 2008 ซึ่งทำการศึกษากระบวนการ hypomethylation ของ endogenous retroviral DNA พบว่าการเกิด กระบวนการ hypomethylation ของ retroviruses จะส่งผลให้ กระบวนการ transcription และส่งเสริมกระบวนการเกิดโรคมะเร็งได้ในหนู⁹¹

ค) การเกิด DNA hypomethylation ที่บริเวณ unique sequence ซึ่ง unique sequence จัดเป็น nonrepetitive มี DNA อยู่ประมาณ 75% ภายในจีโนม การเรียงตัวของเบส มักจะไม่ซ้ำกัน หน้าที่ของ unique sequence ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่พบว่า ส่วนหนึ่งของ DNA ชนิดนี้ ทำหน้าที่เป็น structural genes ซึ่งการเกิด DNA hypomethylation ในบริเวณนี้อาจจะส่งผลต่อการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในยีนที่ส่งเสริมกระบวนการเกิดโรคมะเร็ง⁸¹ ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Laner T และคณะ ที่ทำการศึกษากระบวนการ methylation ของยีน *X-inactive specific transcript (XIST)* ใน มะเร็งต่อมลูกหมาก โดยยีน *XIST* เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม X ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำหน้าที่สำคัญส่งผลให้เกิดกระบวนการ X inactivation โดยผู้ทำการวิจัยพบว่าการแสดงออกที่ต่ำในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากปกติ และมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเนื้อเยื่อมะเร็งและเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งต่อมลูกหมาก จากการศึกษานี้อาจจะเป็นไปได้ว่ากระบวนการเกิด *XIST* hypomethylation อาจส่งผลต่อการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *XIST* ในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁹²

1.2.3.3) การเกิด DNA methylation ของยีน *14-3-3σ*

การเกิด DNA methylation ของยีน *14-3-3σ* จะเกิดในบริเวณ CpG island ที่อยู่ใน exon แรกของยีนใกล้กับ transcription initiation site มีความยาวทั้งหมดประมาณ 800 bp⁹ ปัจจุบันมีรายงานการเกิด DNA methylation ของยีน *14-3-3σ* ในหลากหลายโรคมะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 3

การศึกษาการเกิด *14-3-3σ* methylation ในโรคมะเร็งเต้านม

จากการศึกษาของ Ferguson A และคณะ (2000) ด้วยเทคนิค Nucleotide sequencing ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งเต้านมโดยการออกแบบ primer ครอบคลุม CpG dinucleotides จำนวน 27 ตำแหน่ง ใน CpG island พบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมเกิด DNA methylation (partial หรือ complete methylation) ใน CpG dinucleotides ทั้ง 27 ตำแหน่ง⁹ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค methylation specific PCR (MSP) ด้วย primer ที่ครอบคลุม CpG dinucleotides ระหว่าง CpG dinucleotides ตำแหน่งที่ 3 ถึง 9 พบว่าเกิด DNA methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมคิดเป็น 86%

(43 ตัวอย่าง จากชั้นเนื้อมะเร็งเต้านม 50 ตัวอย่าง) ซึ่งสอดคล้องกับการสูญเสียการแสดงออกของยีน *14-3-3σ* ที่ศึกษาโดยใช้เทคนิค northern blot analysis⁹

Luo J และคณะ (2010) ตรวจหาการเกิด *14-3-3σ* methylation บริเวณ promoter ของยีน ด้วยเทคนิค MSP ในชั้นเนื้อมะเร็งเต้านม จำนวน 68 ตัวอย่างและชั้นเนื้อเต้านมปกติจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าเกิด *14-3-3σ* methylation ในชั้นเนื้อมะเร็งเต้านม 90% (61 ตัวอย่างจากชั้นเนื้อมะเร็งเต้านม 68 ตัวอย่าง) และไม่พบการเกิด *14-3-3σ* methylation ในชั้นเนื้อเต้านมปกติ อีกทั้งพบว่าการเกิด *14-3-3σ* methylation สัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real time PCR คิดเป็น 83% (15 ตัวอย่างจากชั้นเนื้อมะเร็งเต้านม 18 ตัวอย่าง) นอกจากนี้การเกิด *14-3-3σ* methylation ยังสัมพันธ์กับ histology type, grade, และ lymph node metastases ใดๆก็ตามการเกิด *14-3-3σ* promoter methylation ไม่สัมพันธ์กับการรอดชีวิต (5 years survival) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม¹²

Zurita M และคณะ (2010) ศึกษาการเกิด *14-3-3σ* promoter methylation ในซีรัมอาสาสมัครสุขภาพปกติ (healthy control: HC) จำนวน 34 ตัวอย่าง, ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ไม่แสดงอาการ (disease-free breast cancer; DFBC) จำนวน 77 ตัวอย่าง, และซีรัมของผู้ป่วยระยะแพร่กระจาย (metastatic breast cancer; MBC) จำนวน 34 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค quantitative methylation-specific PCR พบการเกิด *14-3-3σ* methylation ในซีรัมทั้งในกลุ่มผู้ป่วย DFBC และ MBC สูงอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม HC นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ด้วย ROC analysis พบว่าระดับการเกิด *14-3-3σ* methylation ในซีรัมยังสามารถแบ่งแยกกลุ่มผู้ป่วย MBC จากกลุ่มควบคุม HC ได้ โดยพบว่ามีค่าความไว (sensitivity) 81% และมีความจำเพาะ (specificity) ถึง 96.2% ดังนั้นจึงอาจใช้การตรวจวัด *14-3-3σ* promoter methylation ในซีรัม เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เพื่อคัดแยกผู้ป่วยกลุ่ม MBC หรือใช้ในการติดตามการรักษาของผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้³

Gheibi A และคณะ (2012) ทำการศึกษาการเกิด *14-3-3σ* methylation ใน 20 ตัวอย่างชั้นเนื้อปกติ และชั้นเนื้อมะเร็งจากผู้ป่วยเพศหญิงคนเดียวกัน โดยกลุ่มผู้ป่วยมีอายุ 44-58 ปี และใน 20 ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยบริจาคซึ่งมีร่างกายแข็งแรง ทำการศึกษาโดย อาศัยเทคนิค MSP พบการเกิด *14-3-3σ* methylation ในชั้นเนื้อปกติ 20% (4 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง) และในชั้นเนื้อมะเร็งพบ 70% (14 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง) ทดสอบทางสถิติพบว่าระดับการเกิด *14-3-3σ* methylation ในชั้นเนื้อมะเร็งมีระดับที่สูงกว่าในชั้นเนื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าในตัวอย่างเลือดจากกลุ่มประชากรที่มีร่างกายแข็งแรงพบการเกิด *14-3-3σ* methylation 20% (4 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง) เช่นเดียวกันกับในตัวอย่างชั้นเนื้อปกติ ใดๆก็ตามที่ผู้วิจัยไม่พบความสัมพันธ์

ระหว่างการเกิด 14-3-3 σ methylation กับอายุของผู้ป่วย ดังนั้นจากการศึกษาสามารถยืนยันได้ว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation อาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจหาโรคมะเร็งเต้านมที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต⁹⁴

การศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในโรคมะเร็งตับ

Iwata N และคณะ (2000) ศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อตับปกติ 4 ตัวอย่าง, ชิ้นเนื้อมะเร็งตับ, และชิ้นเนื้อข้างเคียงที่ไม่ใช่มะเร็ง (adjacent non-tumor liver) จำนวน 19 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค bisulfite-single strand conformation polymorphism (bisulfite-SSCP) พบการเกิด 14-3-3 σ hypermethylation ระดับสูงในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ 89% (17 ตัวอย่าง จากชิ้นเนื้อมะเร็งตับ 19 ตัวอย่าง) แต่ไม่พบในชิ้นเนื้อตับปกติ สอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค immunohistochemistry (IHC) พบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งตับที่เกิด 14-3-3 σ hypermethylation ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ ในขณะที่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในชิ้นเนื้อมะเร็งปกติที่ไม่เกิด methylation ของยีน สำหรับ adjacent non-tumor liver พบว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation ในระดับต่ำกว่าชิ้นเนื้อมะเร็งและยังมีการแสดงออกของโปรตีนในทุกตัวอย่าง¹⁰

การศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในโรคมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก

จากการศึกษาของ Mhaweck P และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งจำนวน 46 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค MSP พบว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation มีความสัมพันธ์ต่อการแสดงออกที่ลดลงในระดับโปรตีนโดยอาศัยเทคนิค IHC คิดเป็น 57% (26 ตัวอย่าง จาก 46 ตัวอย่าง) จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการเกิด 14-3-3 σ methylation อาจมีความเกี่ยวข้องต่อการแสดงออกที่ลดลงในระดับโปรตีนในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก¹¹

การศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในโรคมะเร็งรังไข่

จากการศึกษาของ Akahira J และคณะ (2004) ศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในเซลล์มะเร็งรังไข่เฉพาะเลี้ยง 12 ชนิดด้วยเทคนิค MSP พบว่าเกิด 14-3-3 σ methylation ในเซลล์มะเร็งรังไข่เฉพาะเลี้ยง 7 ชนิด (คิดเป็น 58%) และมีความสัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ กับการพยากรณ์โรคในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่จำนวน 102

ตัวอย่าง พบว่าโปรตีน 14-3-3σ ไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดมะเร็งรังไข่ได้แต่อย่างไรก็ตาม การสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3σ สัมพันธ์กับการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่ลดลง (worse overall survival)¹³

จากการศึกษาของ Mhaweck P และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการเกิด 14-3-3σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งแบบ paraffin-embedded จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค MSP พบว่าการเกิด 14-3-3σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งคิดเป็น 59% (10 ตัวอย่างจากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง 17 ตัวอย่าง) และเมื่อศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค IHC พบว่าการเกิด 14-3-3σ methylation มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่ลดลงในระดับโปรตีน คิดเป็น 33% (7 ตัวอย่าง จาก 21 ตัวอย่าง) จึงอาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการเกิด 14-3-3σ methylation อาจมีความเกี่ยวข้องต่อการแสดงออกที่ลดลงในระดับโปรตีนในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรังไข่¹¹

การศึกษาการเกิด 14-3-3σ methylation ในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

จากการศึกษาของ Mhaweck P และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการเกิด 14-3-3σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค MSP พบว่าการเกิด 14-3-3σ methylation มีความสัมพันธ์ต่อการแสดงออกที่ลดลงในระดับโปรตีนโดยอาศัยเทคนิค IHC คิดเป็น 55% (22 ตัวอย่าง จาก 40 ตัวอย่าง) จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการเกิด 14-3-3σ methylation อาจมีความเกี่ยวข้องต่อการแสดงออกที่ลดลงในระดับโปรตีนในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก¹¹

การศึกษาการเกิด 14-3-3σ methylation ในโรคมะเร็งที่หลังโพรงจมูก

จากการศึกษาของ Yi B และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการเกิด 14-3-3σ methylation ในเซลล์มะเร็งที่หลังโพรงจมูกเพาะเลี้ยงจำนวน 4 ตัวอย่าง, ในชิ้นเนื้อปกติ (non-cancerous nasopharyngeal epithelial tissue ;NNET) จำนวน 25 ตัวอย่าง และ ในชิ้นเนื้อมะเร็ง (nasopharyngeal carcinoma ;NPC) จำนวน 75 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MSP จากการศึกษาพบการเกิด 14-3-3σ promoter methylation ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้งหมด 100% และผลในชิ้นเนื้อพบว่าใน NPC มีระดับ 14-3-3σ methylation คิดเป็น 84% (63 ตัวอย่างจาก 75 ตัวอย่าง) ซึ่งสูงกว่าใน NNET ที่พบระดับ 14-3-3σ methylation คิดเป็น 28% (7 ตัวอย่าง จาก 25 ตัวอย่าง) และได้รายงานว่าการเกิด 14-3-3σ methylation มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการแสดงออกทั้งในระดับ mRNA เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค RT-PCR และการแสดงออกในระดับ โปรตีนเมื่อศึกษาด้วยวิธี western blot และ IHC อีกทั้ง ยังเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าการเกิด 14-3-3σ methylation สัมพันธ์กับ การเกิด

แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยัง lymph node และอวัยวะห่างไกล (distant metastasis) ในผู้ป่วย ด้วยโรคมะเร็งที่หลังโพรงจมูก⁹⁵

การศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในมะเร็งปอด

Osada H และคณะ (2002) พบการเกิด 14-3-3 σ methylation โดยอาศัยเทคนิค MSP ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง 37 ชนิด สามารถตรวจพบความผิดปกติดังกล่าวได้ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงชนิด SCLC คิดเป็น 69% และในชนิด large cell carcinoma คิดเป็น 57% ในขณะที่ชนิด NSCLC พบเพียง 6% ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกที่ลดลงหรือไม่พบการแสดงออกในระดับโปรตีนที่ศึกษาในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด ซึ่งพบความผิดปกติดังกล่าวในชนิด SCLC ทั้งหมดในทุกตัวอย่าง (8 ตัวอย่าง) ในขณะที่พบเพียง 5% ในชนิด NSCLC การศึกษารังนี้ทีมผู้สรุปว่าเป็นการรายงานครั้งแรกของการขาดหายไปหรือลดลงในการแสดงออกในระดับโปรตีน อาจเป็นผลมาจากการเกิด 14-3-3 σ methylation ในมะเร็งปอดชนิด SCLC แต่ไม่ใช่ในชนิด NSCLC ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าผลของการเกิด 14-3-3 σ methylation อาจมีความจำเพาะกับลักษณะทางพยาธิวิทยาหรือชนิดของโรคมะเร็ง¹⁴

Ramirez และคณะ (2005) รายงานการเกิด 14-3-3 σ methylation โดยอาศัยเทคนิค MSP ในตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่ได้รับยาเคมีบำบัด ชนิด Cisplatin-Plus-Gemcitabine จำนวน 115 ตัวอย่าง โดยพบว่าในผู้ป่วยที่มีเกิด 14-3-3 σ methylation (39 ตัวอย่าง จาก 115 ตัวอย่าง) จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่มีเกิด 14-3-3 σ methylation (76 ตัวอย่าง จาก 115 ตัวอย่าง) และเมื่อมีการจัดกลุ่มออกเป็นผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาจำนวน 51 ตัวอย่างจาก 115 ตัวอย่าง พบว่าผู้ป่วยในกลุ่มนี้เมื่อตรวจพบการเกิด 14-3-3 σ methylation (22 ตัวอย่างจาก 51 ตัวอย่าง) จะมีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีเกิด 14-3-3 σ methylation (29 ตัวอย่างจาก 51 ตัวอย่าง) เช่นเดียวกัน จากการศึกษานี้อาจจะกล่าวได้ว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation อาจสามารถนำมาพยากรณ์อัตราการรอดชีวิตที่ดีในกลุ่มผู้ป่วย NSCLC ที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin-Plus-Gemcitabine ได้¹⁵

Vijayababu M และคณะ (2011) ศึกษาการเกิด 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติ 12 ตัวอย่าง และในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด NSCLC ชนิด ADC และ SCC จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค massarray เปรียบเทียบกับการแสดงออกในระดับ mRNA โดยอาศัยเทคนิค real-time PCR พบว่า ในชิ้นเนื้อปกติมีอัตราการเกิด 14-3-3 σ methylation (อยู่ในช่วง 65-75%) สูงกว่าในชิ้นเนื้อมะเร็ง (อยู่ในช่วง 8-75%) ซึ่งพบว่าระดับการเกิด 14-3-3 σ methylation ที่ต่ำในชิ้นเนื้อมะเร็งมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับ mRNA ที่สูงเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค

quantitative RT-PCR จากการศึกษานี้อาจจะมีความเป็นไปได้ว่าการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน *14-3-3σ* อาจเกิดจากระดับของ *14-3-3σ* methylation ที่เปลี่ยนแปลงไป⁹⁶

Shiba-Ishii A และคณะ (2012) ศึกษาการเกิด *14-3-3σ* methylation โดยอาศัยเทคนิค real-time methylation-specific PCR ในเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยง 8 ชนิด และในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด 32 ตัวอย่าง โดย 11 ตัวอย่างเป็นมะเร็งปอดชนิด ADC in situ และ 21 ตัวอย่างเป็นมะเร็งปอดชนิด invasive ADC จากผลการศึกษาพบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด ADC in situ มีการเกิด *14-3-3σ* methylation อย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ ยีนและโปรตีนสูญเสียไปในขณะที่ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด invasive ADC มีการเกิด *14-3-3σ* methylation ลดลง และมีระดับการแสดงออกของ ยีนและโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง มะเร็งปอดชนิด ADC in situ จากการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าการเกิด *14-3-3σ* methylation อาจมีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคที่รุนแรงมากยิ่งขึ้นในผู้ป่วยด้วยมะเร็งปอดชนิด ADC⁹⁷

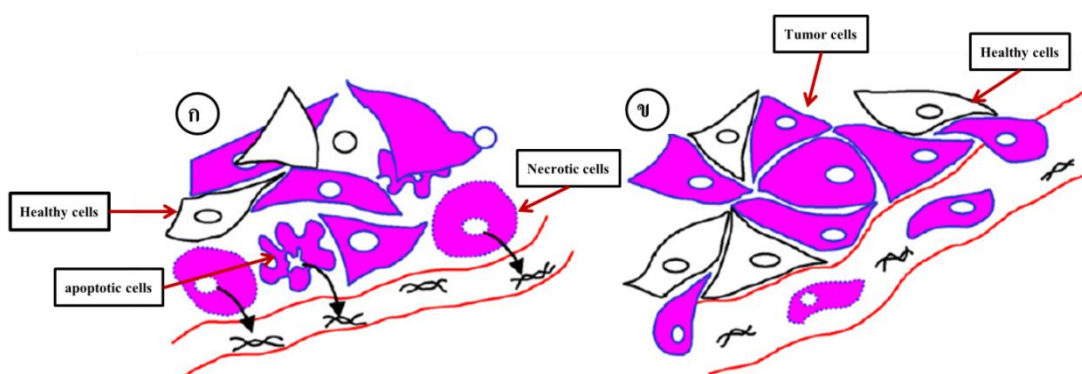
ตารางที่ 3 กระบวนการ 14-3-3σ methylation ที่มีผลต่อการแสดงออกในหลายโรคมะเร็ง

โรค มะเร็ง	การเกิด CpG methylation	การเกิด down-regulation	อ้างอิง
เต้านม	86% (43/50) primary tumors 100% (32/32) microdissected carcinoma	96% (43/45) primary tumors ในระดับ mRNA และไม่ได้ทำการศึกษาในระดับ โปรตีน	Ferguson A และคณะ(2000) ⁹
	0% (0/10) normal tissues 90% (62/68) tumor tissues	83% (15/18) primary tumors ในระดับ mRNA และไม่ได้ทำการศึกษาในระดับ โปรตีน	Luo J และคณะ (2010) ¹²
	low level in serum of healthy control and disease-free breast cancer high level metastatic breast	ไม่ได้ทำการศึกษาทั้งในระดับ mRNA และระดับ โปรตีน	Zurita M และคณะ (2010) ⁹²
ตับ	89% (17/19) primary HCC	88% (14/16) primary HCC ในระดับ โปรตีน และไม่ได้ศึกษาในระดับ mRNA	Iwata N และคณะ (2000) ¹⁰
รังไข่	58% (7/12) ovarian cancer cell lines microdissected ADC	58% (7/12) ovarian cancer cell lines ในระดับ mRNA และ 26% (27/102) primary ADC ในระดับ โปรตีน	Akahira J และคณะ (2004) ¹³
	59% (10/17) ovarian tumor tissues	33% (7/21) of primary ADC ในระดับ โปรตีน และไม่ได้ศึกษาในระดับ mRNA	Mhaweck P และคณะ (2005) ¹¹
เยื่อ โพรงมดลูก	57% (26/46) primary ADC	43 % (20/46) primary ADC และไม่ได้ทำการศึกษาในระดับ mRNA	Akahira J และคณะ(2004) ¹³
ปอด	33% (/24) microdissected primary SCLC, 69% (9/13) SCLC cell lines, 57% (4/7) large-cell NSCLC cell lines and 6% (1/17) other NSCLC cell lines	100% (8/8) primary SCLC, 5% (1/22) primary NSCLC และไม่ได้ทำการศึกษาในระดับ mRNA	Osada H และคณะ (2002) ¹⁴

1.2.3) DNA ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายในกระแสเลือด (circulating free DNA; CFDNA)

CFDNA คือ DNA ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายในกระแสเลือด ถูกพบและรายงานครั้งแรกโดย Mandel P. และ Metais P. ในปีคริสต์ศักราช 1948 และในปีคริสต์ศักราช 1977 จากการศึกษาของ Leon S.A. และคณะ⁹⁸ พบระดับ CFDNA ที่สูงผิดปกติในตัวอย่างซีรัมในผู้ป่วยหลากหลายโรคมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับในซีรัมของคนที่ไม่เป็นโรคมะเร็ง โดยได้ทำการศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งต่างๆจำนวน 173 ตัวอย่าง และซีรัมของผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งจำนวน 55 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค radioimmunoassay พบว่าในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งพบ CFDNA มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 180 ± 38 ng/ml และในซีรัมของผู้ไม่ป่วยเป็นโรคมะเร็งพบ CFDNA มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13 ± 3 ng/ml⁹⁸ จากการรายงานค่าข้างต้นพบว่า ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ CFDNA ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งมีค่าสูงกว่าในเลือดคนปกติมากกว่า 10 เท่า จึงเป็นที่น่าสนใจว่า CFDNA อาจสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวินิจฉัยโรค หรือพยากรณ์โรคได้ ปัจจุบันพบว่าการพยายามศึกษาเพื่อนำ CFDNA มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ทั้งในแง่ที่เกี่ยวกับการเกิด mutation หรือ epigenetic ของยีนต่างๆในหลายโรคมะเร็ง⁹⁹ อย่างไรก็ตามปริมาณที่มากขึ้นของ CFDNA ภายในกระแสเลือดไม่ได้มีสาเหตุจากเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งเพียงเท่านั้น มีรายงานว่า CFDNA อาจมาจากผู้ป่วยที่เป็นเนื้องอก , เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, เป็นโรคหลอดเลือดสมอง, ผู้ป่วยที่มีภาวะบาดเจ็บ หรือภาวะการติดเชื้อได้เช่นกัน⁹⁹ โดยปัจจุบันกลไกทางชีวภาพเกี่ยวกับการปลดปล่อย CFDNA ออกมาภายในกระแสเลือดยังไม่เป็นที่ชัดเจนมากนัก แต่ในปัจจุบันมีสองกลไกหลักที่ถูกลำเสนอคือ 1) ผ่านกระบวนการ apoptosis หรือ necrosis ซึ่งเซลล์จะถูกทำลายและปล่อย CFDNA ออกมาในกระแสเลือด 2) จากเซลล์ปกติที่อยู่ใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็งและกำลังจะแก่ตาย ทำการปลดปล่อย CFDNA ออกมา¹⁰⁰ (ภาพที่ 10) โดยมีการรายงานสนับสนุนคือ ในการศึกษาของ Jahr S. และคณะ พบว่ารูปแบบการแตกหักของ CFDNA ที่พบมีลักษณะคล้ายกับรูปแบบการแตกหักจากเซลล์ที่เกิด apoptosis มีลักษณะเป็น apoptosis ladder จากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นไปได้ว่า CFDNA ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายในกระแสเลือดอาจมาจากกระบวนการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็ง¹⁰¹ ต่อมาจากการศึกษาของ Diehl F. และคณะ ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ (mutations) ของยีน Adenomatous polyposis coli (APC) โดยทำการศึกษาใน CFDNA จากพลาสมาของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งลำไส้ โดยผู้ทำการวิจัยข้างต้นพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด APC mutation กับ DNA ที่เกิดการแตกหัก แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง APC mutation กับ DNA ที่ไม่มีการแตกหัก¹⁰² จากการศึกษาข้างต้นผู้ทำการวิจัยได้สรุปว่า การเกิด mutation ใน DNA ที่มีการแตกหัก อาจมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ที่มี

การตายแบบ necrotic ซึ่งผ่านทางการทำงานของเซลล์ macrophages ซึ่งเข้าไปทำลายและปล่อย DNA ที่มีการแตกหักบางส่วนออกมา สุดท้ายสำหรับกลไกที่ถูกเสนอว่า CFDNA บางส่วนมาจากเซลล์ปกติที่อยู่ใกล้เคียงหรือรอบๆเซลล์มะเร็ง จากการศึกษานของ Jahr S. และคณะ พบว่าจาก CFDNA ทั้งหมด นอกจากมาจากเซลล์มะเร็งแล้ว ก็เป็นไปได้ว่าบางส่วนอาจมาจากเซลล์ปกติรอบๆเซลล์มะเร็งที่เกิดความเสียหายเนื่องจากการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และทำการปลดปล่อย CFDNA ออกมา¹⁰¹



ภาพที่ 10 กลไกที่ถูกนำเสนอว่าเป็นไปได้ ในการ ปลดปล่อย CFDNA ออกมาภายในกระแสเลือด; ภาพ ก. แสดง CFDNA ถูกปล่อยเมื่อเซลล์ผ่านกระบวนการ apoptosis หรือ necrosis และภาพ ข. แสดง CFDNA ที่ถูกปล่อยจากเซลล์ปกติที่อยู่ใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็ง ดัดแปลงจาก Gormally E. และคณะ, 2007¹⁰⁰

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบการเกิด *14-3-3* methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งและซีรัมของผู้ป่วย NSCLC
2. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *14-3-3* methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งและซีรัมของผู้ป่วย NSCLC
3. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *14-3-3* methylation กับการแสดงออกในระดับยีนและโปรตีน ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วย NSCLC

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Avantor performance materials, Inc.
Acrylamide/Bis solution 19:1	Amresco
Agarose	Merck Millipore
Ammonium persulfate	Usb corporation
Beta-mercaptoethanol (beta-ME)	Sigma-Aldrich corporation
Boric acid	Merck Millipore
Chloroform	RCI lab-scan
Citric acid	Ajax Finechem Pty Ltd.
Diethylpyrocarbonate water (DEPC)	Amresco
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Avantor performance materials, Inc.
DNA ladder	New England Biolabs
dNTP mixture: dATP, dTTP, dGTP และ dCTP	Amresco
Ethidium bromide (EtBr)	Sigma-Aldrich corporation
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Bio Basic INC.
EZ DNA Methylation-Gold Kit	Zymo research corporation
Glacial acetic acid	VWR Corporate
Hydrogen chloride (HCl)	Honeywell international, Inc.
Isoamyl alcohol	BIO BASIC Int.
Magnesium chloride (MgCl_2)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Methylated & non-methylated DNA	Zymo research corporation
Mouse monoclonal (IgG1) anti-14-3-3 σ antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethanediamine (TEMED)	Usb corporation
NovoLink Min Polymer Detection system kit	Leica microsystems
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich corporation

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
PCR buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Permount mounting medium	Merck Millipore
Phenol saturated	Amresco
Platinum taq DNA polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc.
Potassium chloride (KCl)	Ajax finechem Pty Ltd.
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH ₂ PO ₄)	RCI lab-scan
Proteinase K	Amresco
RNAlater	Qiagen
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Usb corporation
Taq DNA polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tris base	Merck Millipore
Viral RNA Mini Kit	Qiagen
Xylene	Avantor performance materials, Inc.

2.1.2 อุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Gel doc TM XR and Chemidoc TM XRS+ Image Lab TM 3.0	Bio-Rad
NanoDrop [®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific
Thermo cycle 1000 TM	Bio-Rad

2.2 วิธีการวิจัย วิธีการเก็บตัวอย่าง และรายละเอียดตัวอย่างในการศึกษา

การศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างสองส่วนคือชิ้นเนื้อปอดและเลือด (ภาพที่ 11)

1) ตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด โดยชิ้นเนื้อปอดทั้งหมดได้รับจากผู้ป่วยที่เข้ารับการวินิจฉัยโรคในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 โดยผู้ป่วยต้องลงนามให้ความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรก่อนการเก็บตัวอย่าง การเก็บชิ้นเนื้อปอดจะคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ต้องการจากผู้ป่วยที่เข้ารับการวินิจฉัยจำนวน 62 ตัวอย่าง โดยหลังการวินิจฉัยพบผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC จำนวน 36 ราย ที่เหลือเป็นผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด SCLC จำนวน 1 ราย, ผู้ป่วยวัณโรคปอดและโรคปอดอักเสบอื่น ๆ จำนวน 22 ราย และเป็นปอดปกติจำนวน 3 ราย ในจำนวนผู้ป่วยชนิด NSCLC (n=36) มี 2 ราย ที่สามารถเก็บชิ้นเนื้อปอดปกติได้จากบริเวณ loop ที่แตกต่างจากเก็บชิ้นเนื้อมะเร็ง ฉะนั้นในการศึกษานี้จะได้ชิ้นเนื้อปอดปกติที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-tumor lung tissue) จำนวน 5 ราย ดังแสดงในภาพที่ 11 สำหรับชิ้นเนื้อใช้ศึกษาแบ่งเป็น 3 ส่วน (ภาพที่ 11)

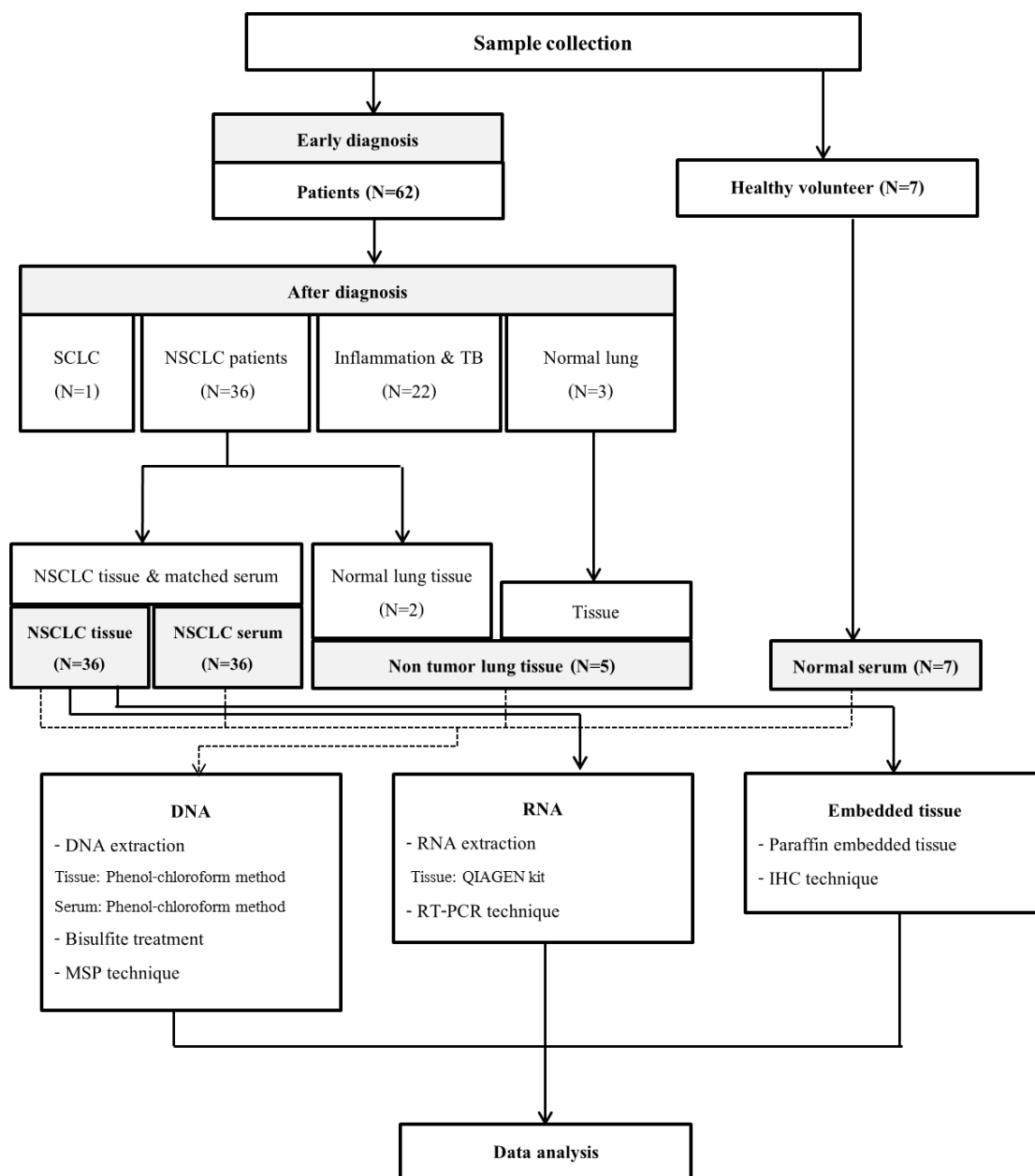
1.1) นำตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งหมด จำนวน 36 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวอย่างชนิด SCC จำนวน 15 ตัวอย่าง, ADC จำนวน 17 ตัวอย่างและชนิด unclassified type จำนวน 4 ตัวอย่าง มาสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐานฟินอล-คลอโรฟอร์ม เพื่อตรวจสอบการเกิด *14-3-3σ* methylation โดยอาศัยเทคนิค Methylation specific PCR (MSP) (ตารางที่ 4)

1.2) นำชิ้นเนื้อมะเร็งมาสกัด RNA ด้วย RNeasy Mini Kit (QIAGEN) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของ *14-3-3σ* โดยอาศัยเทคนิค Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) โดยชิ้นเนื้อจะถูกนำมาแช่ในน้ำยาเฉพาะ (RNA later) ทันทีหลังเก็บเพื่อป้องกันการเสียหายของ RNA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 16 ชั่วโมง ก่อนนำชิ้นเนื้อออกจาก RNA later และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ ในการศึกษาส่วนนี้ทำใน 32 ตัวอย่าง เนื่องจากมี 4 ตัวอย่างเกิด RNA degraded (ตัวอย่างชนิด ADC จำนวน 3 ตัวอย่างและชนิด unclassified type จำนวน 1 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 4)

1.3) นำชิ้นเนื้อมะเร็งไปทำ paraffin block เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน *14-3-3σ* โดยอาศัยเทคนิค Immunohistochemistry (IHC) การทดลองนี้ศึกษาใน 32 ตัวอย่าง เนื่องจากมี 3 ตัวอย่างชิ้นเนื้อไม่เพียงพอนำมาทำ paraffin block และ 1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อมีเซลล์มะเร็งน้อยไม่เพียงพอสำหรับนำมาวิเคราะห์ผล จาก 4 ตัวอย่างแบ่งเป็นตัวอย่างชนิด SCC จำนวน 2 ตัวอย่าง, ADC จำนวน 1 ตัวอย่างและชนิด unclassified type จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

2) ตัวอย่างเลือด สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาแยกซีรัม ส่วนแรกได้ซีรัมจากคู่ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง NSCLC จำนวน 36 ตัวอย่าง และส่วนที่สองได้จากอาสาสมัครสุขภาพปกติจำนวน 7 ราย โดยตัวอย่างเลือดถูกเก็บโดยนักเทคนิคการแพทย์ครั้งละ 7-10 มิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดจะถูกนำมาตั้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างปั่นแยกเพื่อเก็บซีรัมที่ความเร็วรอบ 1,600 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ - 70 °C เพื่อนำมาสกัด DNA เพื่อตรวจสอบการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค MSP (ตารางที่ 4)

และสุดท้ายนำผลการศึกษาที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาพที่ 11) โดยก่อนทำการเก็บตัวอย่างในผู้ป่วย โครงการวิจัยได้ยื่นเรื่องและผ่านการพิจารณา ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมด้านวิจัยเกี่ยวกับการบริหารผู้ป่วย สิ่งส่งตรวจ และสังคมศาสตร์ จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์แล้ว หมายเลข EC 55-020-04-1-2 (ภาคผนวก จ)



ภาพที่ 11 แสดงตัวอย่างและวิธีการที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 4 ชนิดและจำนวนตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนการศึกษา

Sample	ydutS	Type of sample				Note
NSCLC sample						
		SCC	ADC	Unclassified type	Total	
Tissue	DNA	15	17	4	36	-
and	methylation					
Serum						
Tissue	mRNA	15	14	3	32	4 degraded RNA
	expression					
Tissue	Protein	13	16	3	32	3 samples, tissues were not adequate and 1 sample, there was no cancer cells
	expression					
Non-tumor sample						
		Total cases				
Tissue	DNA	5				-
Serum	methylation	7				-

2.2.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA และ RNA)

การสกัด DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

นำชิ้นเนื้อมาบดให้ละเอียดบดน้ำแข็ง เติม SLB (2M Tris, 0.4M EDTA, 3M NaCl, 20% SDS) ปริมาตร 600 μ l, 1 M β -mercaptanol ปริมาตร 15 μ l, 10 mg/ml proteinase K ปริมาตร 6 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 ชม. นำไปปั่นห้วงที่ความเร็วรอบ 8,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน เติมสารประกอบ phenol: chloroform: isoamyl alcohol สัดส่วน 25:24:1 ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลายใสด้านบนที่เก็บได้ และผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นห้วงที่ความเร็วรอบ 13,000 xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน เติมสารประกอบ phenol: chloroform: isoamyl alcohol สัดส่วน 25:24:1 ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลายใสด้านบนที่เก็บได้อีกครั้ง และผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที ปั่นห้วงที่ความเร็วรอบ 13,000 xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน เติม chloroform: isoamyl alcohol สัดส่วน 24:1 ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลาย

ใส่ด้านบนที่เก็บได้ และผสม ให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาตกตะกอน DNA ด้วย 100% ethanol ปริมาตรสองเท่าของสารละลายใสด้านบนที่เก็บได้ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที คูด ethanol ที่เก็บตะกอน DNA ไว้ ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที คูด ethanol ที่ ระเหยแห้ง ตะกอน DNA โดยเปิดฝาหลอดและวางคว่ำไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณครึ่งชั่วโมง หรือจนกว่าตะกอน DNA แห้ง ละลายตะกอน DNA โดยเติมน้ำ DEPC ที่ปราศจากเชื้อ

การสกัด DNA จากตัวอย่างชีรุ่ม

ตั้งต้นด้วยชีรุ่มปริมาตร 348 μ l เติม 20% SDS ปริมาตร 150 μ l เติม 10 mg/ml proteinase K ปริมาตร 102 μ l ที่ละลายในสารละลาย SLB เขย่าสารละลายให้เข้ากัน บ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่า 160 rpm ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 ชม. หรือจนกว่าสารละลายใส เติมสารประกอบ phenol: chloroform: isoamyl alcohol สัดส่วน 25:24:1 ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน เติมสารประกอบ phenol: chloroform: isoamyl alcohol สัดส่วน 25:24:1 ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลายใสด้านบนที่เก็บได้อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน เติม chloroform: isoamyl alcohol สัดส่วน 24:1 ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลายใสด้านบนที่เก็บได้ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลงเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาตกตะกอน DNA ด้วย 100% ethanol ปริมาตรสองเท่าของสารละลายใสด้านบนที่เก็บได้ บ่มที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที คูด ethanol ที่เก็บตะกอน DNA ไว้ ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที คูด ethanol ที่ ระเหยแห้งตะกอน DNA โดยเปิดฝาหลอดและวางคว่ำไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณครึ่งชั่วโมงหรือจนกว่าตะกอน DNA แห้ง ละลายตะกอน DNA โดยเติมน้ำ DEPC ที่ปราศจากเชื้อ

การสกัด RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

การสกัด RNA จากชิ้นเนื้อจะใช้ชุด RNeasy Mini Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำชิ้นเนื้อมาเติมสาร RLT buffer ที่มีส่วนผสมของ beta-ME ปริมาตร 600 μ l ทำให้ชิ้นเนื้อและสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้แท่งบดชิ้นเนื้อ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 xg เป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนละลายใสด้านบน เติม 70% ethanol ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลาย และผสมสารโดยการพลิกหลอดขึ้นลง คูณสารละลาย ปริมาตร 700 μ l มาทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ (RNeasy spin column) ด้วย RPE buffer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง ทำการชะสาร โดยใช้ RNase-free water ปริมาตร 30 μ l

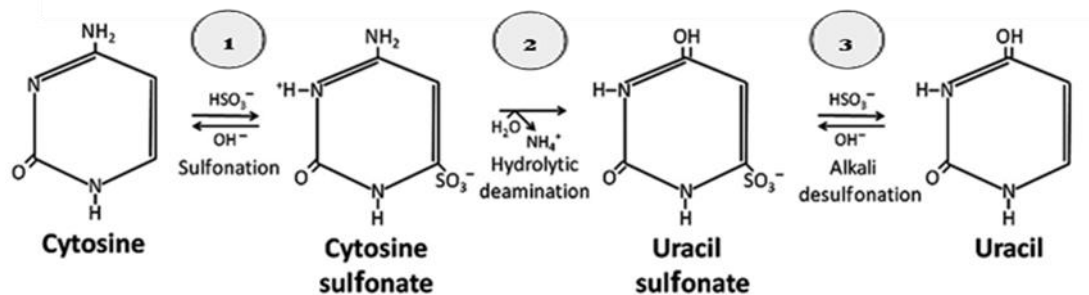
ท้ายสุดทั้ง DNA และ RNA ที่ได้จะนำมาตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารพันธุกรรม ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose และตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยใช้ NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer ก่อนนำไปใช้และทำการเก็บ DNA และ RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

2.2.3 วิธีการ Methylation specific PCR (MSP)

การตรวจวัด DNA methylation จะทำโดยอาศัยเทคนิค MSP ซึ่งวิธีการ MSP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1) Bisulfite treatment

Bisulfite treatment เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ genomic DNA โดยมีหลักการคือ เริ่มแรก DNA ถูกทำให้เสียสภาพ (denaturation) โดยอาศัยความร้อนหรือสารเคมี จากนั้นตัดแปลงโครงสร้างด้วยสาร sodium bisulfite (HSO_3^-) โดยในขั้นตอนนี้อาศัยปฏิกิริยา 3 ปฏิกิริยา ดังภาพที่ 12 1) sulfonation คือกระบวนการที่มีการเติมหมู่ซัลไฟต์ (SO_3^-) ที่เบสไซโตซีน (cytosine) คาร์บอนตรงตำแหน่งที่ 6 ส่งผลทำให้ cytosine เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็น cytosine sulfonate, 2) จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยา hydrolytic deamination โดยมีการเติมน้ำและนำหมู่ NH_2 ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ส่งผลให้โมเลกุลอยู่ในรูปที่เรียกว่า uracil sulfonate, และ 3) กระบวนการ alkali desulfonation ซึ่งเป็นการนำหมู่ SO_3^- ออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ทำให้เกิดเบสยูราซิล โดยปฏิกิริยาข้างต้นจะเกิดขึ้นเฉพาะเบส cytosine ที่ไม่มีหมู่ methyl เกาะอยู่ แต่ในสถานะเดียวกันจะไม่เข้าไปเปลี่ยนแปลงเบส cytosine ที่มีหมู่ methyl เกาะอยู่ ส่งผลให้บริเวณนั้นยังคงเป็นเบส cytosine ดังเดิม



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเบส cytosine ไปเป็นเบส uracil โดยอาศัยวิธีการ bisulfite treatment¹⁰³

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA จะอาศัยชุด EZ DNA Methylation-Gold Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้ ใช้ genomic DNA เริ่มต้นปริมาณ 500 ng-1 μg เติมสาร CT conversion reagent ปริมาตร 130 μl จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermo cycle 1000 TM ซึ่ง genomic DNA จะถูกทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 98 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที และถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่อุณหภูมิ 64 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2.30 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ด้วย M-Wash buffer 1 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำมาเติมสาร M-Desulphonation buffer เพื่อนำหมู่ SO_3^- ออก ทำการล้างด้วย M-Wash buffer และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิมอีก 2 ครั้ง ทำการชะสารโดย elution buffer ปริมาตร 15 μl จากนั้นนำ DNA ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer ทำการเก็บตัวอย่าง bisulfite treated DNA ไว้ที่ -20 $^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

2) Polymerase chain reaction (PCR)

วิธีการ PCR ในขั้นตอนนี้ทำเพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณ bisulfite treated DNA ในปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 20 μl ต่อหนึ่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย bisulfite treated DNA ปริมาณ 50 ng, 1X PCR buffer ปริมาตร 2 μl , 1.5 mM MgCl_2 ปริมาตร 0.6 μl , 0.2 mM dNTP ปริมาตร 1.6 μl , 0.2 pmole forward และ reverse primer ปริมาตร 0.4 μl , 0.04 U/L platinum taq DNA polymerase ปริมาตร 0.16 μl และน้ำ DEPC โดยคู่ไพร์เมอร์จะประกอบไปด้วยตำแหน่ง CG dinucleotide 2 ตำแหน่งในแต่ละเส้นของคู่ไพร์เมอร์ คือ CG dinucleotide ตำแหน่ง 3 และ 4 ในเส้น forward และตำแหน่ง 8 และ 9 ในเส้น reverse primer (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก.) โดยไพร์เมอร์ methylation มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ forward: 5'-GATATGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTCG-3' และ reverse: 5'-CCTCTAACCGCCACACG-3' ขนาดของ MSP product เท่ากับ 108 bp และ

ไพรเมอร์ unmethylation มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ forward: 5'-GATATGGTAGTTTTTA TGAAAGGTGTTGTG-3' และ reverse: 5'-CCCTCTAACCACCCACCACA-3' ขนาดของ MSP product เท่ากับ 109 bp¹⁵ โดยในการศึกษาใช้ universal methylated & non-methylated DNA เป็นตัวควบคุมสำหรับ methylation และ unmethylation primer ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ และใช้ H₂O เป็นตัวควบคุมที่ปราศจาก DNA ตั้งต้น

ทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง thermo cycle 1000 TM โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ซึ่งใช้อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตามด้วยขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 64 °C สำหรับ methylation primer และ ที่อุณหภูมิ 59 °C สำหรับ unmethylation primer เป็นเวลา 30 วินาที และสุดท้ายตามด้วยขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้น MSP product ที่ได้จะนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ electrophoresis ด้วย 10% polyacrylamide (40% acry:bis ปริมาตร 2.5 ml, 10X TBE ปริมาตร 1 ml, 10% APS ปริมาตร 100 µl, TEMED ปริมาตร 5 µl, H₂O ปริมาตร 6.5 ml.) ตามด้วยการย้อม ethidium bromide เพื่อดูแถบ MSP product ในแผ่นเจล จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความเข้มในแถบ MSP product ด้วยโปรแกรม Image lab™ 3.0 และทำการแปลผลการเกิด DNA methylation เป็นเปอร์เซ็นต์ (percentage of methylation) ดังสูตรที่ตามมา

$$\text{Methylation (\%)} = \left[\frac{\text{Relative intensity of methylated product}}{\text{(Relative intensity of methylated product + Relative intensity of unmethylated product)}} \right] \times 100$$

2.2.4 Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

การตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA จะทำโดยอาศัยเทคนิค RT-PCR ซึ่งวิธีการ RT-PCR ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1) การเปลี่ยน total RNA เป็น cDNA โดยใช้ random hexamer จากชุด SuperScript pre-amplification kit ในขั้นตอนนี้ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl ต่อหนึ่งปฏิกิริยา ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ตั้งต้นจาก RNA ปริมาณ 500 ng ในปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 8 µl ผสมกับ random hexamer และ dNTP ปริมาตรอย่างละ 1 µl โดย RNA จะถูกทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารละลายข้างต้นมาผสมด้วย 10X RT buffer ปริมาตร 2 µl, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 4 µl, 0.1 M DTT ปริมาตร 2µl, RNA out ปริมาตร 1 µl และ super script III RT ปริมาตร 1µl และนำ total RNA ไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้สภาวะ 1

รอบของ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 50 °C เป็นเวลา 50 นาทีและ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม RNase H ปริมาตร 1 µl เพื่อทำลาย RNA ที่ยังเหลืออยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที ทำการเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่ -20 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

2) Polymerase chain reaction (PCR)

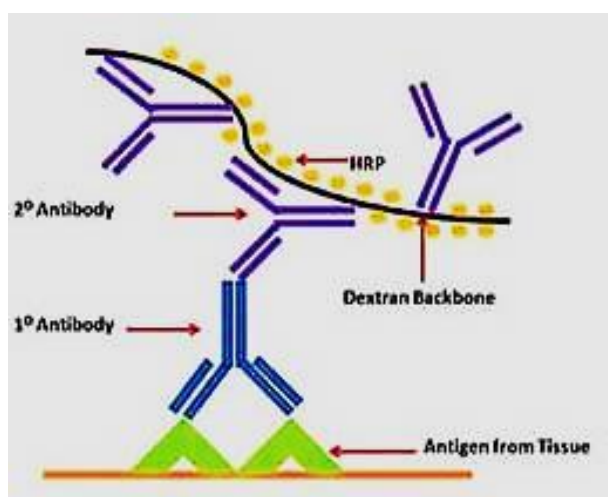
วิธีการ PCR ในขั้นตอนนี้ทำเพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณ cDNA เพื่อการแสดงผลออกในระดับ mRNA ของ *14-3-3σ* โดยเพิ่มจำนวนปริมาณ cDNA ในปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 µl ต่อหนึ่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 2 µl, 1X PCR buffer ปริมาตร 2.5 µl, 1.5 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.75 µl, 0.2 mM dNTP ปริมาตร 2 µl, 0.4 pmole forward และ reverse primer ปริมาตร 1 µl, 0.04 U/L taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 µl และน้ำ DEPC โดยอาศัย primer ที่มีความจำเพาะ¹⁴ มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ forward: 5'-CCTGCTGGACA GCCACCTCA-3' และ reverse: 5'-TGTCGGCCGTCCACAGTGTC -3' เพิ่มจำนวนให้ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เท่ากับ 397 bp และใช้ *GAPDH* เป็น internal control มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ forward: 5'-ACCACAGTCCA TGCCATCAC-3' และ reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' ขนาดของ PCR เท่ากับ 452 bp PCR product จะถูกเพิ่มจำนวน ด้วยเครื่อง thermo cycle 1000 TM โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นตามด้วยขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 61 °C เป็นเวลา 30 วินาที และสุดท้ายตามด้วยขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA เป็นจำนวน 40 รอบ จากนั้น PCR product ที่ได้จะนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ electrophoresis ด้วย 2% Agarose ตามด้วยการย้อม ethidium bromide เพื่อดูแถบ PCR product ในแผ่นเจล จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความเข้มในแถบ PCR product ด้วยโปรแกรม Image lab™ 3.0 และทำการแปลผลการแสดงผลออกในระดับ ยีนของ *14-3-3σ* ดังสูตรที่ตามมา

$$\text{Relative } 14-3-3\sigma \text{ expression} = \frac{\text{Intensity of } 14-3-3\sigma \text{ expression product}}{\text{Intensity of internal control expression product}}$$

2.2.5 อิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (Immunohistochemistry; IHC)

การดูการแสดงออกของโปรตีน โดยอาศัยเทคนิค IHC เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจจับแอนติเจนโดยหลักการของ แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ แอนติเจนที่เราต้องการตรวจวัด ซึ่งสำหรับในการศึกษานี้แอนติเจนที่เราต้องการตรวจวัดคือโปรตีน 14-3-3 α ซึ่งเนื้อเยื่อเร็ง ในการศึกษานี้จะทำโดยอาศัยเทคนิค IHC วิธี indirect method แบบ polymer-conjugate technology ดังแสดงในภาพที่

13



ภาพที่ 13 การตรวจวัดแอนติเจนด้วยเทคนิค IHC แบบ polymer-conjugate technology

ที่มา: <http://vitrovivo.com/new-generation-ihc-detection-systems.html>

โดยเทคนิค IHC มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เริ่มจากละลาย พาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ (deparaffinization) ที่อุณหภูมิ 58 °C จุ่มสไลด์พร้อมทั้งเขย่าในสารละลาย xylene เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้งเพื่อนำพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ ซึ่งในขั้นตอนนี้ควรทำด้วยความรวดเร็วเพื่อป้องกันการกลับไปเคลือบตัวของพาราฟินบนชิ้นเนื้อ จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ นำน้ำเข้าเซลล์ (rehydration) โดยจุ่มสไลด์พร้อมทั้งเขย่าใน 100% ethanol เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ล้างสไลด์ใน PBS บัฟเฟอร์เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการ กู้แอนติเจน (retrieve antigen) โดยใช้ 0.01 M citric acid บัฟเฟอร์ (pH 6.0) โดยใช้ความร้อนจากไมโครเวฟเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าบัฟเฟอร์จะเย็นตัวลง ล้างสไลด์ด้วยน้ำ DI เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง วังขอบเขตของชิ้นเนื้อด้วยปากกาอิมมูโน (immunopen) และยับยั้งเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยหยอดสาร peroxidase block เป็นเวลา 5 นาที ล้างสไลด์โดยจุ่มสไลด์ใน TBS บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ทำการ

ยับยั้งโปรตีนที่ไม่สนใจด้วย Novocastra™ protein block เป็นเวลา 5 นาที ล้างสไลด์ใน TBS บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง หยอด primary antibody โดยใช้ Mouse monoclonal (IgG1) anti-14-3-3σ antibody สัดส่วน 1:500 บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างสไลด์ใน TBS บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นหยอดสาร post primary (Rabbit anti Mouse IgG) ซึ่งเป็น secondary antibody โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างสไลด์ใน TBS บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง หยอดสาร Novolink™ Polymer เพื่อจับกับ secondary antibody และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างสไลด์ใน TBS บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ต่อมาเชื่อมด้วย DAB reagent โดยบริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3σ จะเชื่อมติดสีน้ำตาลของ DAB หลังจากล้างสไลด์ ในน้ำกลั่น สไลด์จะถูกนำมาเชื่อมอีกครั้งด้วย hematoxylin ซึ่งจะทำให้นิวเคลียสภายในเซลล์ติดสีม่วงน้ำเงินของ hematoxylin ล้างสไลด์โดยจุ่มสไลด์ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (dehydration) ในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ 70%, 95% และ 100% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 3 นาที ตามด้วยการจุ่มสไลด์ในสารละลาย 100% xylene เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำสไลด์ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมดมาทำการเคลือบชิ้นเนื้อโดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover slip รอจนกว่าสไลด์แห้ง สุดท้ายนำสไลด์ไปส่องและวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

โดยในการศึกษา ใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเป็นตัวแทนควบคุมผลบวก (positive control) และใช้ชิ้นเนื้อชนิดเดียวกันแต่ไม่มีการบ่มด้วย primary antibody เป็นตัวแทนควบคุมผลลบ (negative control) ซึ่งการวิเคราะห์ผลจากสไลด์จะทำการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสี DAB ที่เชื่อมติดโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเมื่อเทียบกับตัวแทนควบคุม โดยการวิเคราะห์ผลเชิงคุณภาพแปลผลตามความเข้มของสีที่เชื่อมติดโปรตีนภายในเซลล์มะเร็ง โดยมี 4 ระดับคือ ระดับ 0 เท่ากับเชื่อมไม่ติดสี, 1 เท่ากับเชื่อมติดระดับสีอ่อน, 2 เท่ากับเชื่อมติดสีระดับปานกลาง และ 3 เท่ากับเชื่อมติดสีระดับเข้ม สำหรับการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณแปลผลตามเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ที่เชื่อมติดโปรตีนภายในเซลล์มะเร็ง โดยจะมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0-100% จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ทั้งสองส่วนมาคูณกันออกมาเป็นค่าสุดท้าย (final score) ซึ่งจะอยู่ในช่วง 0-300 ทำการแปลผลการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3σ ของเซลล์มะเร็งจาก final score โดยแบ่งออกเป็นช่วงคือ ที่ค่า 0 แปลผลว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีน, ที่ช่วงระหว่าง 1-100 แปลผลว่ามีการแสดงออกของโปรตีนระดับต่ำ, ที่ช่วงระหว่าง 101-200 แปลผลว่ามีการแสดงออกของโปรตีนระดับปานกลาง และที่ช่วงระหว่าง 201-300 แปลผลว่ามีการแสดงออกของโปรตีนในระดับสูง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ความแตกต่างของการเกิด 14-3-3 σ methylation ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง Non-tumor sample และกลุ่ม NSCLC จะถูกทดสอบโดยใช้สถิติ independent sample t-test ความแตกต่างของการเกิด 14-3-3 σ methylation ระหว่างตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัมของกลุ่มผู้ป่วย NSCLC จะถูกทดสอบโดยใช้สถิติ paired sample t-test และความ ความสัมพันธ์ ระหว่างการเกิด 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งและลักษณะของผู้ป่วย จะถูกทดสอบโดยใช้สถิติ chi-square test ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด 14-3-3 σ methylation กับการแสดงออกในระดับ RNA จะถูกทดสอบโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (Spearman's correlation) ความแตกต่างของระดับ 14-3-3 σ methylation ต่อการแสดงของโปรตีนจะถูกทดสอบโดยใช้สถิติ independent sample t-test โดยยอมรับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value <0.05) วิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม R

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1) ลักษณะตัวอย่างในการศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC จากคนเดียวกัน มีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 6 โดยจากตัวอย่างทั้งหมด 36 คู่ตัวอย่าง มาจากผู้ป่วยหญิง 15 คน และผู้ป่วยชาย 21 คน ผู้ป่วยมีอายุอยู่ในช่วง 32-83 ปี มีอายุเฉลี่ย 61 ± 13 ปี แบ่งตามชนิดทางจุลพยาธิวิทยาสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม เป็น SCC 15 ตัวอย่าง (41.7%), ADC 17 ตัวอย่าง (47.2%) และ NSCLC ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ 4 ตัวอย่าง (11.1%) การแบ่งระยะ โรคนแบ่งตามระบบ Tumor, Nodes และ Metastasis (TNM) ของ American Joint Committee on Cancer (AJCC) พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยในระยะ 3 ถึง 4 จำนวน 28 คน พบการกระจายสู่อวัยวะห่างไกล (distant metastases) จำนวน 22 คน (61.1%) สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อปอดที่ไม่ใช่มะเร็ง จำนวน 5 ตัวอย่าง มีอายุอยู่ในช่วง 55-78 ปี มีค่าอายุเฉลี่ย 66 ± 9 ปี และตัวอย่างซีรัมของผู้บริจาค โลหิตจำนวน 7 ตัวอย่าง เป็นผู้บริจาคเพศหญิง 6 ตัวอย่าง และชาย 1 ตัวอย่าง มีอายุอยู่ในช่วง 24-55 ปี และมีอายุเฉลี่ย 41 ± 13 ปี จากข้อมูลเราพบว่าอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุประมาณ 60 ปี ยกเว้นในกลุ่มของผู้บริจาค โลหิตที่มีค่าเฉลี่ยของอายุน้อยกว่า 60 ปี จึงทำให้มีความแตกต่างของชุดข้อมูลในเรื่องอายุเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็ง โดยมีจำนวนผู้ป่วยระหว่างเพศชายและเพศหญิงใกล้เคียงกัน และผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยมะเร็งในระยะท้าย และมีการกระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะห่างไกลมากกว่า 80% (ตารางที่ 6)

3.2) ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA และ RNA ที่ใช้ในการศึกษา

3.2.1) Genomic DNA

Genomic DNA จากชิ้นเนื้อมะเร็งและซีรัมจำนวน 36 คู่ตัวอย่าง มีค่าความเข้มข้นของ DNA ในชิ้นเนื้อ อยู่ในช่วง 13.4-878.8 ng/ μ l และค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) อยู่ในช่วง 1.63-2.32 และ 0.30-2.61 ตามลำดับ ในตัวอย่างซีรัม DNA มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 8.5-293.2 ng/ μ l และค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) อยู่ในช่วง 0.93-1.70 และ 0.16-0.47 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) เมื่อค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) เป็นค่าที่แสดงถึงความบริสุทธิ์ของสารละลาย DNA ต่อการปนเปื้อนจากโปรตีน และค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{230}) เป็นค่าที่แสดงถึงความบริสุทธิ์ของสารละลาย DNA ต่อการปนเปื้อนจากคลอโรฟอร์ม หรือ ethanol โดยค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) ของ DNA ที่ดีควรอยู่ในช่วง 1.80-2.00 ซึ่งค่าข้างต้นจากผลการทดลองในบางตัวอย่างมีค่าความบริสุทธิ์ของ DNA อยู่นอกช่วงค่าที่ดี แต่สามารถยอมรับและนำมาทำการทดลองต่อไปได้

3.2.2) Bisulfite DNA

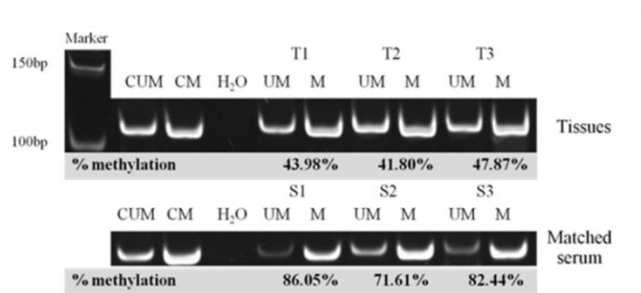
Bisulfite DNA จากชิ้นเนื้อมะเร็งและซีรัมจำนวน 36 คู่ตัวอย่าง มีค่าความเข้มข้นของ DNA จากชิ้นเนื้อ อยู่ในช่วง 24.8-103.2 ng/ μ l และค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) อยู่ในช่วง 1.03-2.98 และ 0.28-1.64 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างซีรัม มีค่าความเข้มข้นของ DNA อยู่ในช่วง 7.3-23.4 ng/ μ l และค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) อยู่ในช่วง 0.57-1.10 และ 0.22-0.55 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) โดยค่าบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) ของ bisulfite DNA ที่ดีควรอยู่ในช่วง 2.00-2.20 ซึ่งค่าข้างต้นจากผลการทดลองในบางตัวอย่างมีค่าความบริสุทธิ์ของ DNA อยู่นอกช่วงค่าที่ดี แต่สามารถยอมรับและนำมาทำการทดลองต่อไปได้

3.2.3) Total RNA

RNA ทั้งหมดจากชิ้นเนื้อมะเร็งจำนวน 32 ตัวอย่าง มีค่าความเข้มข้นของ DNA จากชิ้นเนื้ออยู่ในช่วง 12.8-404.3 (ng/ μ l) และค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) อยู่ในช่วง 1.83-2.13 และ 0.05-2.10 ตามลำดับ รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง ตารางที่ 14 โดยค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) และ (OD_{260}/OD_{230}) ของ RNA ที่ดีควรอยู่ในช่วง 2.00-2.20 ซึ่งค่าข้างต้นจากผลการทดลองในบางตัวอย่างมีค่าความบริสุทธิ์ของ RNA อยู่นอกช่วงค่าที่ดี แต่สามารถยอมรับและนำมาทำการทดลองต่อได้

3.3) ระดับ *14-3-3 σ* methylation ในชิ้นเนื้อปอดและในซีรัม

ผลิตผลจาก MSP เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ DNA ladder ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ระดับของ *14-3-3 σ* methylation เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี MSP ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด (T) และในซีรัม (S) จำนวน 3 คู่ตัวอย่าง เมื่อ CUM แสดงตัวควบคุมสำหรับไพรเมอร์ unmethylated, CM แสดงตัวควบคุมสำหรับไพรเมอร์ methylated, UM แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ unmethylated และ M แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ methylated

3.3.1 ระดับ *14-3-3 σ* methylation ของกลุ่มตัวอย่าง

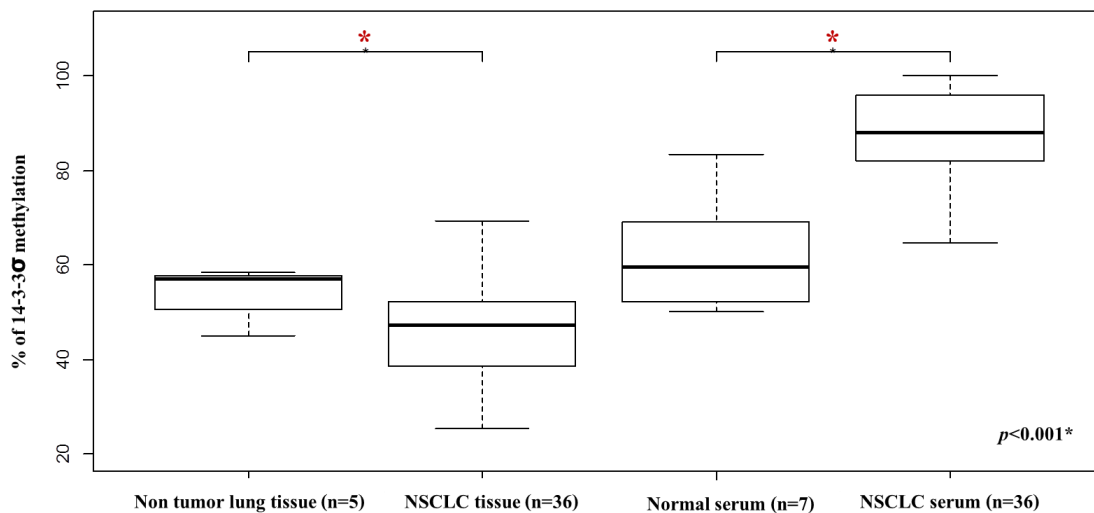
จากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งทั้งหมด 36 คู่ตัวอย่าง มีระดับ *14-3-3 σ* methylation อยู่ในช่วง 25%-69% ค่าเฉลี่ย $47 \pm 10\%$ และในซีรัมพบระดับ *14-3-3 σ* methylation อยู่ในช่วง 65%-100% ค่าเฉลี่ย $88 \pm 10\%$ (ตารางที่ 5) สำหรับระดับ *14-3-3 σ* methylation ของตัวอย่างที่ไม่ใช่มะเร็งจากตัวอย่างชิ้นเนื้อปอดที่ไม่ใช่มะเร็งจำนวน 5 ตัวอย่าง และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต 7 ตัวอย่าง มีระดับ

14-3-3 σ methylation ของชิ้นเนื้อมะเร็งอยู่ในช่วง 45%-58% มีค่าเฉลี่ย 54 \pm 6% และในซีรัมระดับ 14-3-3 σ methylation อยู่ในช่วง 50%-75% มีค่าเฉลี่ย 60 \pm 9% ระดับ 14-3-3 σ methylation ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ independent-sample T-test ทั้งในตัวอย่างมะเร็ง และ ตัวอย่างที่ไม่ใช่มะเร็ง พบว่าระดับ 14-3-3 σ methylation มีระดับสูงใน non-tumor tissue (54 \pm 6%) มากกว่าใน NSCLC tissue (47 \pm 10%) อย่างมีนัยสำคัญด้วยค่า $p < 0.001$ (ภาพที่ 15) ในขณะที่ ตรวจวัดระดับ 14-3-3 σ methylation ในซีรัมของผู้ป่วย NSCLC (88 \pm 10%) สูงกว่าของคนปกติ (60 \pm 9%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ดังแสดงในภาพที่ 15 อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเราไม่พบ ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งและลักษณะของผู้ป่วย (ตารางที่ 6)

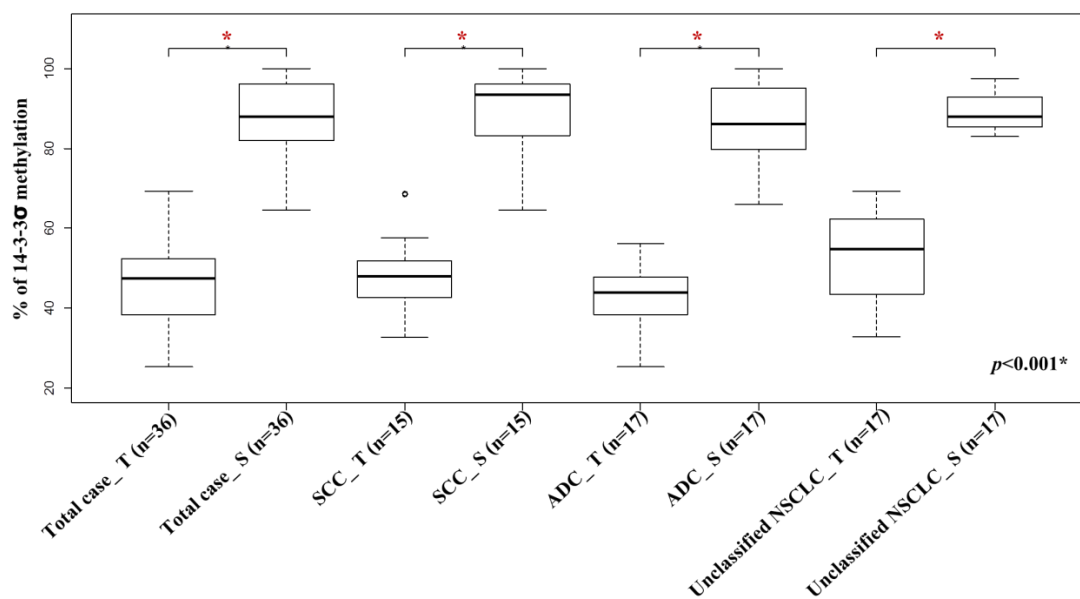
ตารางที่ 5 ระดับ 14-3-3 σ methylation ของกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา

Type of samples	% Methylation in tissue		% Methylation in serum		p- value
	Min-Max	Mean \pm SD	Min-Max	Mean \pm SD	
NSCLC sample					
SCC (n=15)	33-69%	49 \pm 11%	65-100%	89 \pm 10%	$p < 0.001$
ADC (n=17)	25-56%	44 \pm 8%	66-100%	86 \pm 10%	$p < 0.001$
Unclassified type (n=4)	33-69%	53 \pm 15%	83-98%	89 \pm 6%	$p < 0.001$
Total cases (n=36)	25-69%	47 \pm 10%	65-100%	88 \pm 10%	$p < 0.001$
Non-tumor sample					
Lung tissues (n=5)	45-58%	54 \pm 6%	-	-	
Serum (n=7)	-	-	50-75%	60 \pm 9%	

p- value ของสถิติ Paired t-test



ภาพที่ 15 กราฟบ็อกซ์พลอตแสดงระดับ 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อปอด และซีรัม โดยใช้สถิติ independent-sample T-test



ภาพที่ 16 กราฟบ็อกซ์พลอตแสดงระดับ 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็ง (T) และซีรัม (S) เมื่อแบ่งตามชนิดทางจุลพยาธิวิทยา โดยใช้สถิติ paired-sample T-test

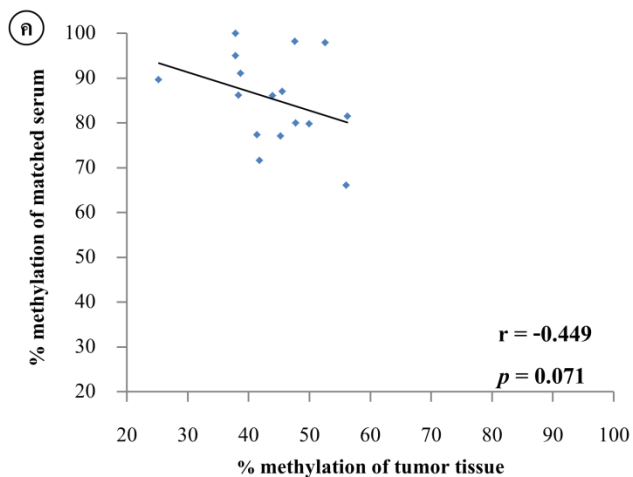
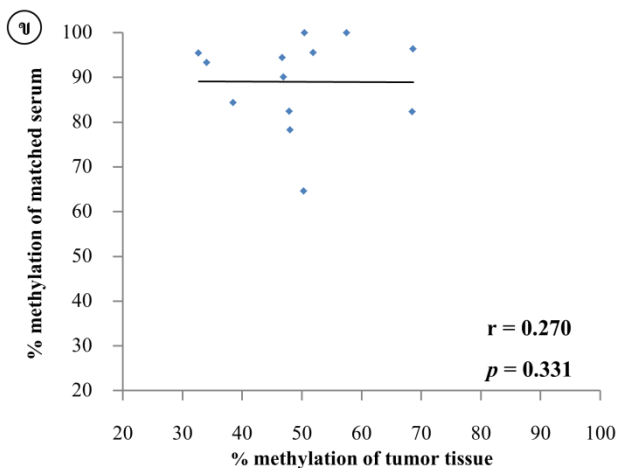
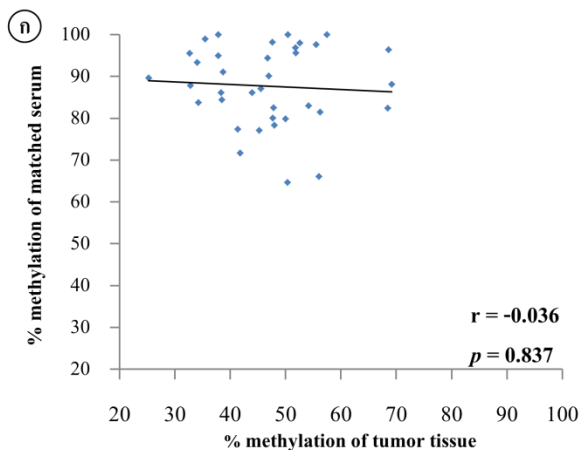
ตารางที่ 6 ความความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งและลักษณะของผู้ป่วย

Characteristics	No. of Patients (n=36) (%)	% of 14-3-3 σ methylation		p-value
		<40 (n=11)	\geq 40 (n=25)	
Age (year)				
\leq 60	14 (38.9)	4	10	1
>60	22 (61.1)	7	15	
Gender				
Male	21 (58.3)	6	15	0.7598
Female	15 (41.7)	5	10	
Histology				
SCC	15 (41.7)	4	11	0.8763
ADC	17 (47.2)	6	11	
Unclassified type	4 (11.1)	1	3	
Tumor stage				
I	1 (2.8)	0	1	0.5766
II	1 (2.8)	1	0	
III	5 (13.9)	2	3	
IV	23 (63.9)	7	16	
Unknown	6 (16.6)	1	5	
Distant metastases				
Yes	22 (61.1)	6	16	0.8808
No	6 (16.6)	2	4	
Unknown	8 (22.3)	3	5	

p-value ของสถิติ chi-square test

3.4) ความสัมพันธ์ของ 14-3-3σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งและซีสต์

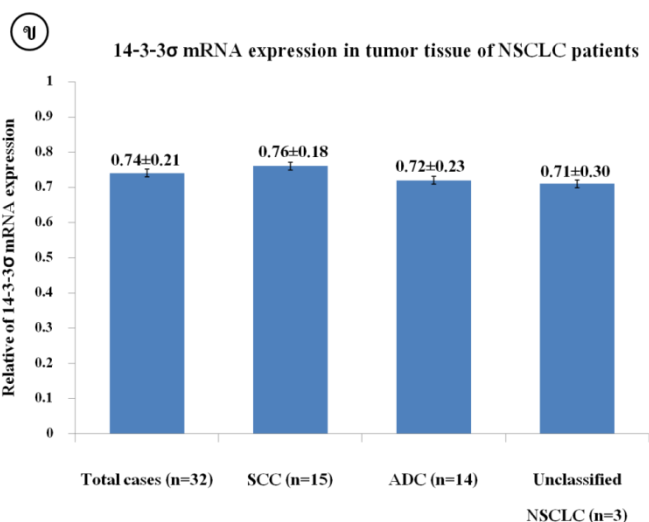
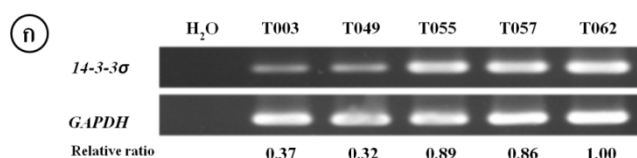
ผลการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 14-3-3σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งกับซีสต์จากผู้ป่วยทั้งหมดพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ของระดับ methylation ที่ค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ -0.036 ($p = 0.837$) ดังแสดงในภาพ 17ก และเมื่อวิเคราะห์แบบแยกชนิดพบว่ากลุ่มตัวอย่างชนิด SCC มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งและซีสต์ ในระดับต่ำ (weak correlation) ที่ค่าความระดับความสัมพันธ์เท่ากับ 0.270 ($p = 0.331$) (ภาพที่ 17ข) ซึ่งรูปแบบความสัมพันธ์เป็นเชิงบวกคือมีระดับ 14-3-3σ methylation ไปด้วยกันทั้งในตัวอย่างซีสต์และชิ้นเนื้อส่วนกลุ่มตัวอย่างชนิด ADC มีแนวโน้มความสัมพันธ์ระดับปานกลาง (moderate correlation) ที่ค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ -0.449 ($p = 0.071$) (ภาพ 17ค) โดยรูปแบบความสัมพันธ์มีแนวโน้มในความเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยชนิด ADC อาจจะมีระดับ 14-3-3σ methylation สูงในตัวอย่างซีสต์และมีระดับ 14-3-3σ methylation ต่ำในตัวอย่างชิ้นเนื้อ



ภาพที่ 17 แผนภูมิกระจายแสดงระดับของ 14-3-3σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งกับซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด (ภาพ ก), SCC (ภาพ ข) และ ADC (ภาพ ค) โดยใช้สถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สเปียร์แมน

3.5) ระดับ mRNA ของ *14-3-3σ* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง

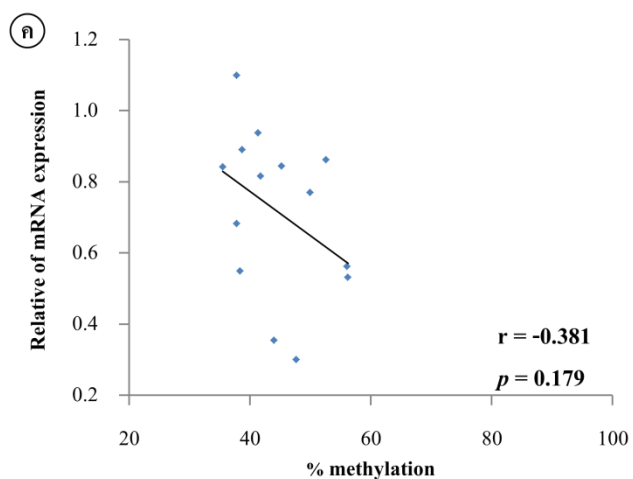
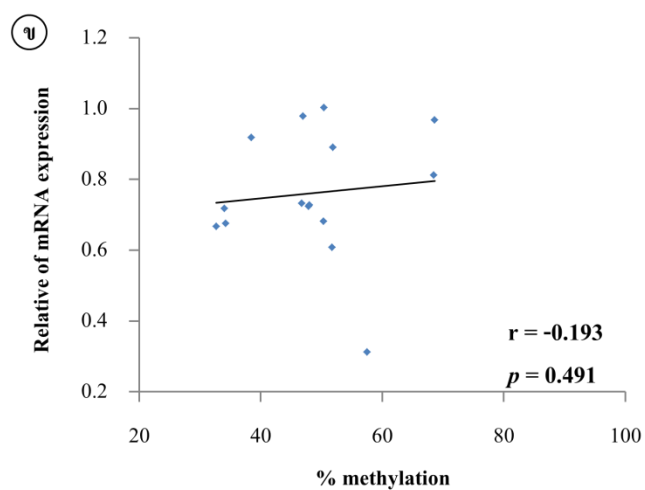
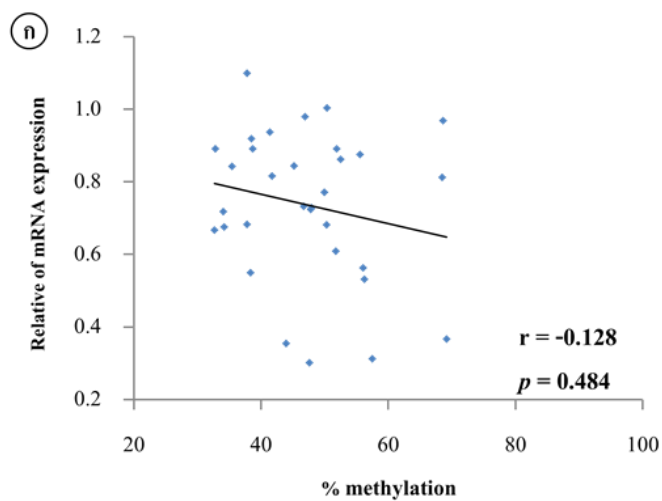
ผลิตผลจาก RT-PCR เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 18ก พบว่าระดับการแสดงออกของ *14-3-3σ* mRNA ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย ทั้งหมด 32 ตัวอย่าง มีค่าการแสดงออกอยู่ในช่วง 0.30-1.10 มีค่าเฉลี่ย 0.74 ± 0.21 และเมื่อวิเคราะห์แยกตามชนิดของผู้ป่วยพบว่าในกลุ่ม SCC พบค่าการแสดงออกของ *14-3-3σ* mRNA ในช่วง 0.33-1.00 มีค่าเฉลี่ย 0.71 ± 0.17 ในกลุ่ม ADC พบค่าการแสดงออกในช่วง 0.30-1.10 มีค่าเฉลี่ย 0.76 ± 0.23 และในกลุ่มผู้ป่วย NSCLC ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ พบค่า *14-3-3σ* mRNA ในช่วง 0.37-0.89 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.72 ± 0.29 (ภาพ 18ข) จากผลการค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของ *14-3-3σ* mRNA มีค่าใกล้เคียงกันทั้งเมื่อวิเคราะห์แบบไม่แยกชนิด และวิเคราะห์แบบแยกชนิด



ภาพที่ 18 ภาพ ก แสดงแผ่นเจลระดับ mRNA ของ *14-3-3σ* เมื่อใช้ *GAPDH* เป็นตัว internal control เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และภาพ ข แสดงแผนภูมิแท่งระดับการแสดงออกของยีน *14-3-3σ* mRNA เมื่อแยกตามชนิดของผู้ป่วย NSCLC

3.6) ความสัมพันธ์ระหว่าง 14-3-3σ methylation และการแสดงออกของ 14-3-3σ mRNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง

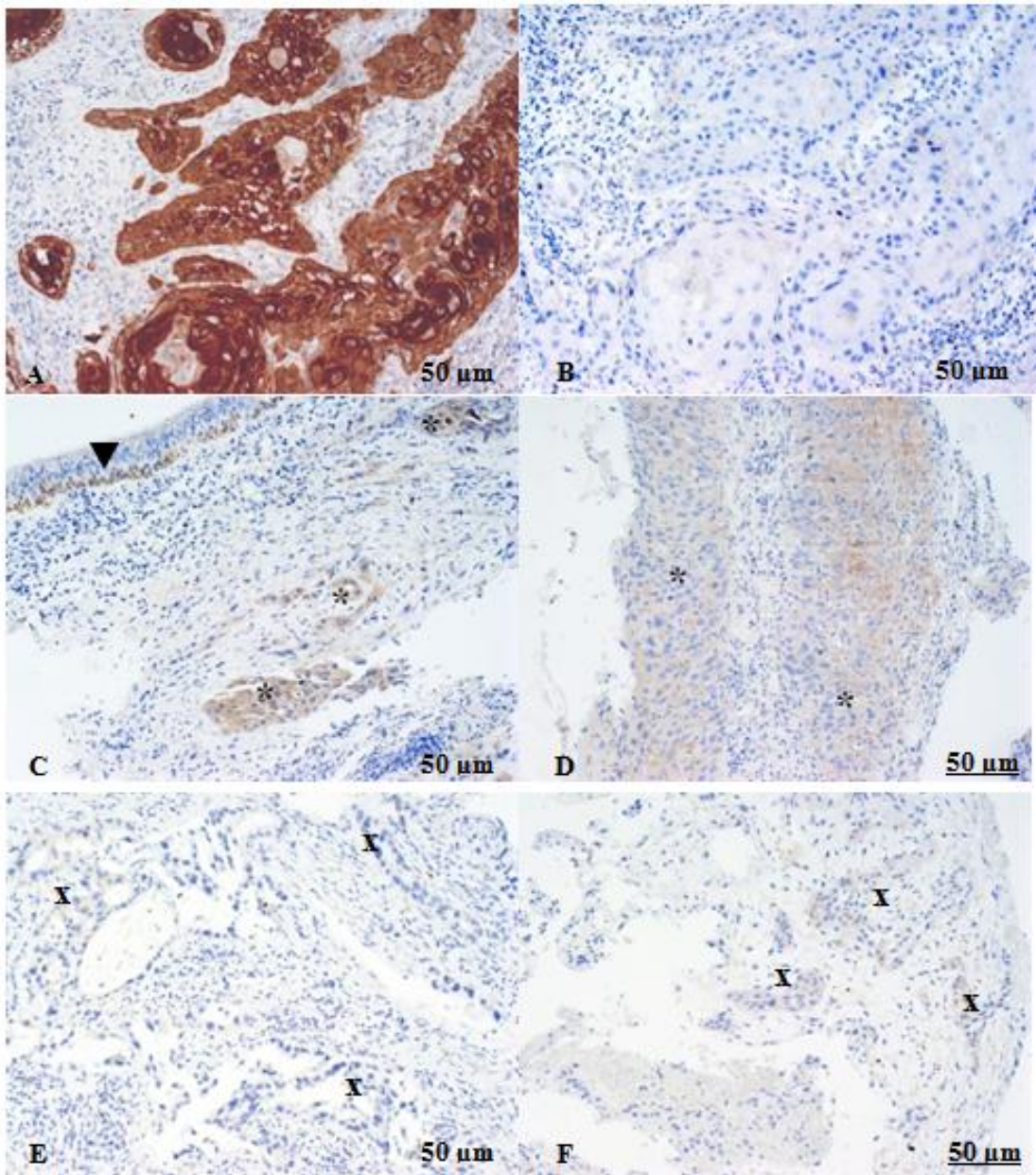
จากผลการศึกษาพบว่าในทุกกลุ่มเมื่อวิเคราะห์แบบไม่แยกชนิด และแยกชนิด ตาม histological type พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด และกลุ่ม SCC ไม่พบความสัมพันธ์ (no correlation) โดยในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมดมีรูปแบบความสัมพันธ์ในเชิงลบ คือเมื่อระดับค่า methylation สูง ค่าการแสดงออกของ 14-3-3σ mRNA จะมีระดับต่ำ ($r = -0.128, p = 0.484$) (รูปที่ 19ก) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่าง SCC ค่าความสัมพันธ์จะเป็นเชิงบวกคือเมื่อระดับ 14-3-3σ methylation สูงค่าการแสดงออกของ 14-3-3σ mRNA จะสูงด้วย (รูปที่ 19ข) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ 14-3-3σ methylation และ 14-3-3σ mRNA ในกลุ่มผู้ป่วย ADC พบว่ารูปแบบความสัมพันธ์เป็นไปในทางลบและมีค่าความสัมพันธ์ในระดับต่ำ (weak correlation) ด้วยค่าสหสัมพันธ์ $r = -0.381$ ($p = 0.179$) ดังแสดงในรูป 19ค อย่างไรก็ตามค่าความสัมพันธ์เหล่านี้ก็ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



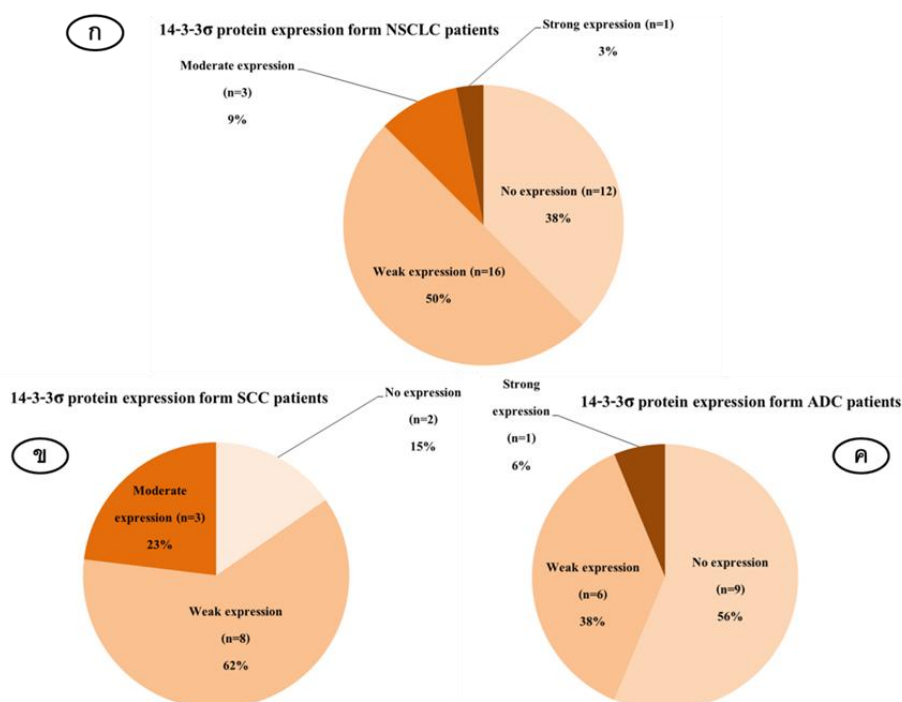
ภาพที่ 19 แผนภูมิกระจายแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ 14-3-3σ methylation และระดับการแสดงออกของ 14-3-3σ mRNA ในผู้ป่วยมะเร็งปอด ทั้งหมด (ภาพ ก), SCC (ภาพ ข) และ ADC (ภาพ ค) โดยใช้สถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สเปียร์แมน

3.7) ผลการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3σ

ผลการศึกษาการแสดงผลการออกของโปรตีน 14-3-3σ ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดโดยวิธี IHC (ภาพที่ 20) พบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดทั้งหมด 32 ตัวอย่าง มีการย้อมติดสี DAB ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทั้งในเซลล์ bronchial epithelium และเซลล์มะเร็ง โดยไม่มีค่าการแสดงผลการออกของโปรตีน (no expression) จำนวน 12 ตัวอย่าง (38%), ค่าการแสดงผลการออกในระดับต่ำ (weak expression) จำนวน 16 ตัวอย่าง (50%), ค่าการแสดงผลการออกในระดับปานกลาง (moderate expression) จำนวน 3 ตัวอย่าง (9%), และค่าการแสดงผลการออกในระดับสูง (strong expression) จำนวน 1 ตัวอย่าง (3%) ดังแสดงในภาพที่ 21ก เมื่อนำแยกวิเคราะห์ตามชนิดของผู้ป่วย พบว่าในกลุ่ม SCC ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการสูญเสียการแสดงผลการออกของโปรตีน (no expression, 15% และ weak expression, 62%) คิดเป็น 77% โดยผู้ป่วยที่เหลือมีการแสดงผลการออกในระดับ moderate expression คิดเป็น 23% (ภาพที่ 21ข) สำหรับในกลุ่ม ADC มีการสูญเสียการแสดงผลการออกของโปรตีนถึง 94% (no expression, 50% และ weak expression, 38%) และที่เหลือเป็นผู้ป่วยที่มีการแสดงผลการออกของโปรตีนในระดับ strong expression (6%) (ภาพที่ 21ค) และในกลุ่มผู้ป่วย unclassified type พบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งไม่มีการแสดงผลการออก (no expression) จำนวน 1 ตัวอย่าง (33.33%) และพบการแสดงผลการออกในระดับ weak expression จำนวน 2 ตัวอย่าง (66.67%) ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าในตัวอย่างส่วนใหญ่มีการสูญเสียการแสดงผลการออกของโปรตีน 14-3-3σ



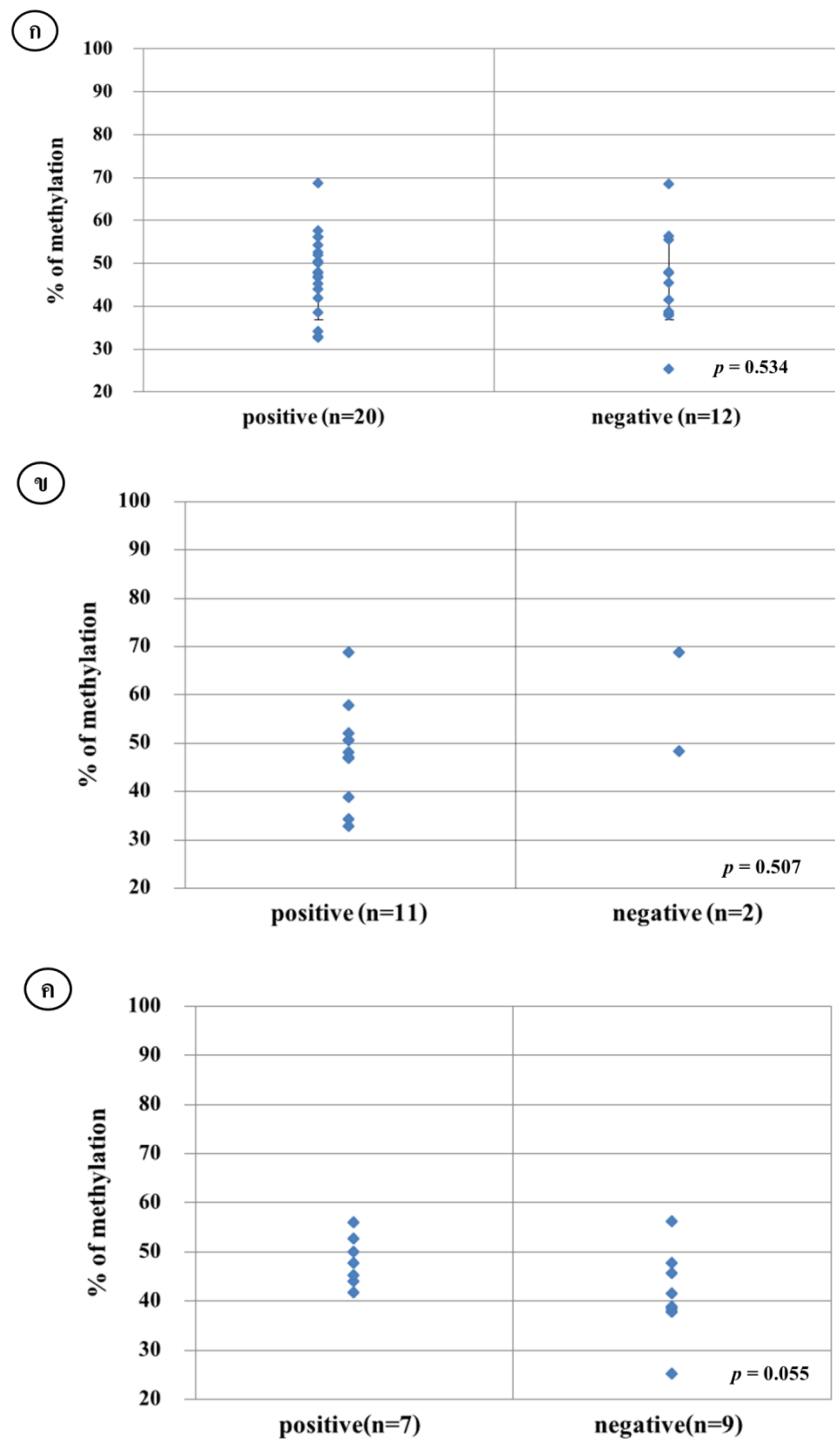
ภาพที่ 20 ลักษณะการติดสีในชิ้นเนื้อเมื่อย้อม ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ภาพ A) ลักษณะจุดพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิด SCC (positive control) ย้อมด้วย anti-14-3-3 σ antibody ติดสีใน cytoplasm ระดับ 3+, ภาพ B) ชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิด SCC ย้อมด้วยบัฟเฟอร์แทนการใช้ antibody (negative control) ไม่ติดสีใน cytoplasm, ภาพ C) และ D) ชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด SCC; * = เซลล์มะเร็ง, ▼ = เซลล์เยื่อบุท่อนลมปอดที่มีการย้อมติดสี, และภาพ E) และ F) ชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด ADC; X = เซลล์มะเร็งปอดชนิด ADC ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 20X



ภาพที่ 21 แผนภูมิวงกลมแสดงร้อยละของตัวอย่างที่แสดงออกระดับการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3σ ในผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด (ภาพ ก), SCC (ภาพ ข) และ ADC (ภาพ ค)

3.8) การเปรียบเทียบระดับ 14-3-3σ methylation ในการแสดงออกระดับโปรตีน

เมื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นกลุ่มขึ้นเนื้อที่มีการแสดงออกของโปรตีน (positive expression) โดยรวมตัวอย่างที่มีการแสดงออกในทุกระดับทั้ง weak, moderate, strong expression และกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน (no expression) หรือ negative expression พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย NSCLC ทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยของระดับ 14-3-3σ methylation ในชิ้นเนื้อที่มี positive expression (48%) สูงกว่าในชิ้นเนื้อที่มี negative expression (45%) ต่างกับกลุ่ม SCC ที่มีค่าเฉลี่ยของระดับ 14-3-3σ methylation ในชิ้นเนื้อที่มี positive expression (48%) ต่ำกว่าในชิ้นเนื้อที่มี negative expression (58%) อย่างไรก็ตามในกลุ่มตัวอย่างชนิด ADC พบค่าสถิติที่มีแนวโน้มความแตกต่างของระดับ 14-3-3σ methylation ที่ส่งผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยพบว่าในกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน จะมีระดับ 14-3-3σ methylation ที่สูง (48%) กว่าในกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน (41%) ($p= 0.055$) ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 กราฟบ็อกซ์พลอตแสดงระดับ 14-3-3 σ methylation ตามการแสดงผลของโปรตีนเมื่อแบ่งกลุ่มตามการย้อม IHC แบบติดสี (positive) และไม่ติดสี (negative) ของชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด (ภาพ ก), SCC (ภาพ ข) และ ADC (ภาพ ค) โดยใช้สถิติ independent-sample T-test

บทที่ 4

บทวิจารณ์

มีรายงานอย่างต่อเนื่องว่าโปรตีน 14-3-3σ เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง และหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้เกิดจากกระบวนการ DNA hypermethylation ของยีน 14-3-3σ ที่เกิดขึ้นในบริเวณ CpG island ของ promoter หรือบริเวณใกล้เคียง⁷³ นอกจากนี้การเกิด 14-3-3σ hypermethylation ยังสามารถตรวจวัดได้ในซีรัม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการเกิด 14-3-3σ hypermethylation สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดมะเร็ง (tumor marker) เพื่อช่วยวินิจฉัยในเลือดได้ การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาการเกิด 14-3-3σ methylation ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC และประเมินผลของการเกิด 14-3-3σ methylation โดยการวัดการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีนในชิ้นเนื้อมะเร็ง จากผลการศึกษาพบการเกิด 14-3-3σ methylation ทั้งในชิ้นเนื้อและซีรัมของผู้ป่วย และการเกิด 14-3-3σ methylation อาจนำมาศึกษาและพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็น blood-based tumor marker ในมะเร็งปอดชนิด ADC ได้

ในผลการศึกษาของทีมผู้วิจัยครั้งนี้พบว่าการเกิด 14-3-3σ methylation มีระดับสูงในซีรัมผู้ป่วย NSCLC เมื่อเปรียบเทียบกับคู่ตัวอย่างชิ้นเนื้อ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการปนเปื้อน DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในตัวอย่างซีรัม โดยมีรายงานว่า การแข็งตัวของเลือดอาจทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแตกตัว และปลดปล่อย DNA ออกมาได้ ด้วยเหตุนี้ส่งผลให้ปริมาณของ CFDNA ภายในตัวอย่างซีรัมมีสูง¹⁰⁴ แต่อย่างไรก็ตามระหว่างขั้นตอนการศึกษา ในการเก็บตัวอย่างซีรัมเราได้ทำการควบคุมเพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนข้างต้น โดยการนำตัวอย่างเลือดมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1.5-2 ชั่วโมง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงและเก็บตัวอย่างซีรัม เพื่อได้มาซึ่ง CFDNA ที่ดีและประสิทธิภาพสูง เนื่องจากที่อุณหภูมิและช่วงเวลาข้างต้นที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดมีการรายงานออกมาจาก Xiaoyan X. และคณะ ว่าสามารถควบคุมการปนเปื้อน DNA จากแหล่งอื่นภายในเลือดได้¹⁰⁵ อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้เราได้ศึกษาตัวอย่างซีรัมในผู้บริจาคโลหิตที่มีร่างกายแข็งแรงเป็นกลุ่มควบคุม และจากผลการศึกษาเราพบการเกิด 14-3-3σ methylation ในซีรัมของผู้ป่วยสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นอาจจึงเป็นไปได้ว่าระดับที่สูงในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วย NSCLC เกิดจากเซลล์มะเร็งที่มีการปลดปล่อย DNA เข้าสู่กระแสเลือดมากกว่าปกติ แม้ว่าในปัจจุบันกลไกของการปลดปล่อย CFDNA ออกมาภายในกระแสเลือดยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่ก็มีความเป็นไปได้ว่าปริมาณที่มากขึ้นของ CFDNA ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยนั้น อาจมีสาเหตุจากร่างกายมีกลไกในการกำจัดเซลล์มะเร็ง เช่นการเกิด apoptosis และ necrosis ส่งผลให้เซลล์มะเร็ง

เกิดความเสียหายและทำการปลดปล่อย CFDNA ออกมาในที่สุด¹⁰⁶ อีกทั้งยังพบว่าในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ไม่ใช่มะเร็งมีระดับ 14-3-3 σ methylation สูงกว่าในชิ้นเนื้อมะเร็ง NSCLC ต่างจากกลุ่มตัวอย่างซีรัม ที่ตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วย NSCLC มีระดับสูงกว่าในซีรัมผู้บริจาคที่มีร่างกายแข็งแรง จะเห็นได้ว่าจากผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค MSP เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างของระดับ 14-3-3 σ methylation ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย NSCLC และกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็งได้ ทั้งในกลุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อและตัวอย่างซีรัม

สิ่งที่น่าสนใจจากการศึกษารั้งนี้คือการพบแนวโน้มความสัมพันธ์ของการเกิด 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อและซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งชนิด ADC โดยพบ 14-3-3 σ methylation level ในซีรัม (86%) สูงกว่าในชิ้นเนื้อมะเร็ง (43%) ปัจจุบันการตรวจวัดการเกิด methylation จาก DNA ในซีรัมได้รับการยอมรับมากยิ่งขึ้นและในมะเร็งหลายๆชนิด พบว่าการเกิด DNA methylation สามารถนำมาใช้เป็น blood-based tumor marker ได้¹⁰⁷ จากการศึกษาของ Reibenwein J. และคณะ แสดงให้เห็นว่าการเกิด 14-3-3 σ hypermethylation สามารถตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากสูงถึง 86% (54 ตัวอย่างจาก 62 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมจากอาสาสมัครสุขภาพปกติ (55.1%, 27 ตัวอย่างจาก 49 ตัวอย่าง) สอดคล้องกับการศึกษาในมะเร็งเต้านม ซึ่งพบระดับการเกิด 14-3-3 σ hypermethylation ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและเนื้องอก (benign disease) สูงถึง 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมจากอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นโรคเกี่ยวกับเต้านม¹⁰⁸ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็ง NSCLC และ matched serum ออกมา อาจเป็นไปได้ว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation อาจมีความจำเพาะกับ histological type ซึ่งจากผลการศึกษาของเรา มีความเป็นไปได้ว่าระดับของ 14-3-3 σ methylation ในตัวอย่างซีรัม อาจนำมาศึกษาเพิ่มและพัฒนาเป็น blood-based tumor marker ในมะเร็งปอดชนิด ADC ได้

ในมะเร็งปอดมีรายงานจาก Ramirez และคณะ ว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation สามารถนำมาใช้พยากรณ์โรคในซีรัมของผู้ป่วยชนิด NSCLC ระยะท้ายที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (Cisplatin-Plus-gemcitabine) ได้ จากศึกษานี้พบการเกิด 14-3-3 σ methylation ในซีรัมผู้ป่วย 39 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 115 ตัวอย่าง (33.9%) อีกทั้งยังพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบการเกิด 14-3-3 σ methylation มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการเกิด 14-3-3 σ methylation นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์แยกกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา (responders) ตรวจพบการเกิด 14-3-3 σ methylation ในซีรัมของผู้ป่วย คิดเป็น 43.1% ซึ่งพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาและตรวจพบการเกิด 14-3-3 σ methylation จะมีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการเกิด 14-3-3 σ methylation เช่นกัน¹⁵ อย่างไรก็ตามในการศึกษาข้างต้นเป็นการศึกษา

ในผู้ป่วย NSCLC ระยะท้ายที่ได้รับการรักษาแล้ว ซึ่งต่างจากการศึกษาของเรา ที่ทำการศึกษาในผู้ป่วย NSCLC ระยะท้ายที่ยังไม่ได้รับการรักษา โดยผลการศึกษาจากทีม Ramirez และคณะ ตรวจพบการเกิด 14-3-3 σ methylation ในซีรัมของผู้ป่วยคิดเป็น 33.9% แตกต่างจากการศึกษาของเราที่พบการเกิด 14-3-3 σ methylation ในซีรัมผู้ป่วยทั้งหมด (36 ตัวอย่าง) จากผลของการศึกษาที่แตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีความแตกต่างกัน อาจกล่าวได้ว่าการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเกิด 14-3-3 σ methylation

ในการศึกษาครั้งนี้เราพบว่าระดับการแสดงออกในระดับ mRNA มีค่าใกล้เคียงกันทั้งในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด และเมื่อแยกเป็นชนิดย่อยทั้ง SCC และ ADC และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง 14-3-3 σ methylation และการแสดงออกในระดับ mRNA ในทุกกลุ่มตัวอย่าง อาจเกิดจากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งที่นำมาสกัด RNA อาจมีการปนเปื้อน RNA จากชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียงจึงทำให้ระดับการแสดงออกในระดับ mRNA ในการศึกษาส่วนใหญ่อยู่ในระดับปานกลางจนถึงระดับสูง (0.71-0.76) เพื่อลดข้อผิดพลาดข้างต้นในการศึกษาหน้าเทคนิคอื่นๆ เช่นเทคนิค laser capture microdissection อาจมีความจำเป็นในการเลือกตัดเฉพาะเซลล์มะเร็งออกมาศึกษา

และอีกหลายๆ การศึกษาได้แสดงให้เห็นว่า การสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ เกิดจาก DNA hypermethylation เช่นการเกิด 14-3-3 σ methylation ที่บริเวณ promoter ของยีนจะพบในชิ้นเนื้อมะเร็งโพรงหลังจมูก 84% (63 ตัวอย่างจาก 75 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อที่ไม่ใช่มะเร็งซึ่งพบแค่ 28% (7 ตัวอย่างจาก 25 ตัวอย่าง) โดยการเกิด 14-3-3 σ methylation นี้จะส่งผลให้ mRNA และโปรตีนมีการแสดงออกลดลง⁹⁵ เช่นเดียวกับในมะเร็งปอด Osada และคณะชี้ให้เห็นว่า 14-3-3 σ hypermethylation จะพบสูงในเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยงชนิด SCLC ถึง 69% (9 ชนิดจาก 13 ชนิด) ในขณะที่เจอเพียงแค่ 6% ในเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยงชนิด NSCLC (1 ชนิดจาก 17 ชนิด) ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกในระดับโปรตีนที่ตรวจพบการสูญเสียการแสดงออกในชิ้นเนื้อ SCLC 100% จากจำนวนชิ้นเนื้อ 8 ตัวอย่างแต่เจอเพียงแค่ 5% ในชิ้นเนื้อ NSCLC (1 ตัวอย่างจาก 22 ตัวอย่าง)¹⁴ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของทีมผู้วิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด NSCLC สามารถเกิดขึ้นเกิดขึ้นได้สูงถึง 83.83% (140 ตัวอย่าง จาก 167 ตัวอย่าง) (Raungrut P และคณะ, อยู่ระหว่างดำเนินการตีพิมพ์) สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค immunohistochemistry พบว่ามีชิ้นเนื้อ NSCLC ที่ไม่มีการแสดงออก (no expression) หรือมีการแสดงออกในระดับต่ำ (weak expression) สูงถึง 87.50 % (28 ตัวอย่างจาก 32 ตัวอย่าง) จากความต่างผลการศึกษาของทีมผู้วิจัยและ Osada และคณะ อาจเกิดจากความต่างของกลุ่มประชากรและขนาดของตัวอย่าง โดยการศึกษาครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน

14-3-3 σ อาจเกี่ยวข้องกับการเกิด methylation ของยีน โดยตรวจพบการเกิด 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิด NSCLC ทุกตัวอย่าง (32 ตัวอย่าง) ด้วยค่าเฉลี่ยของระดับ 14-3-3 σ methylation คิดเป็น 47% และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่าง ของระดับ 14-3-3 σ methylation แบ่งตาม การแสดงออกของโปรตีนกลีบพบแนวโน้มความแตกต่างแคในมะเร็งปอด NSCLC ชนิด ADC เท่านั้น โดยพบว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนพบมีแนวโน้มของระดับการเกิด 14-3-3 σ methylation ที่สูง (48%) กว่ากลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ยของระดับการเกิด 14-3-3 σ methylation ที่ประมาณ 41% ($p = 0.055$)

สำหรับการรายงานที่มีมาก่อนหน้าเกี่ยวกับการเกิด 14-3-3 σ methylation ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย ADC จากการศึกษาของ Shiba-Ishii และคณะ รายงานว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ จะเพิ่มสูงขึ้นในมะเร็งปอดชนิด ADC ที่อยู่ในระยะลุกลาม (invasive adenocarcinoma) คิดเป็น 98% (74 ตัวอย่างจาก 75 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งปอดชนิด ADC ระยะต้น (adenocarcinoma in situ) ซึ่งมีการแสดงออกเพียงแค่ 13% (4 ตัวอย่างจาก 31 ตัวอย่าง)⁹⁷ และจากการศึกษาต่อเนื่องของ Shiba-Ishii และคณะ ยังพบอีกว่ารูปแบบของการเกิด 14-3-3 σ methylation ในมะเร็งปอดชนิด ADC จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะความรุนแรงของโรค กล่าวคือ การเกิด 14-3-3 σ methylation มักจะเกิดขึ้นในมะเร็งปอด adenocarcinoma in situ แต่ในทางตรงข้ามเมื่อมะเร็งปอดรุนแรงขึ้นจนเข้าสู่ระยะ invasive adenocarcinoma การเกิด 14-3-3 σ methylation กลับลดลงซึ่งสัมพันธ์กันกับระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของ mRNA และโปรตีน⁹⁷ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการเกิด 14-3-3 σ methylation ในมะเร็งปอดชนิด ADC ของทีมผู้วิจัยอาจสัมพันธ์กับ histological subtype อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ระบุ histological subtype อีกทั้งขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีน้อย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ขนาดตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเกิด 14-3-3 σ methylation กับ histological subtype ของมะเร็งปอดชนิด ADC

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่พอสรุปได้ว่าการเกิด การสูญเสียการ แสดงออกของโปรตีน 14-3-3σ อาจเป็นผลเนื่องจากการกระบวนการ 14-3-3σ methylation และระดับ 14-3-3σ methylation ในซีรัมอาจสามารถนำมาศึกษาต่อและพัฒนาเป็น blood-based biomarker ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด ADC ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จำนวน ตัวอย่างที่มากขึ้น และตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อปอดปกติยังมีความจำเป็นและควรได้รับการศึกษาในการศึกษาหน้า เพื่อความสมบูรณ์และความจำเพาะของข้อมูลที่มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61:69-90.
2. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2014;84:13-22.
3. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nature reviews Cancer* 2003;3:931-43.
4. Laimer K, Blassnig N, Spizzo G, *et al.* Prognostic significance of 14-3-3 σ expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncology* 2009;45:127-34.
5. Perathoner A, Pirkebner D, Brandacher G, *et al.* 14-3-3sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:3274-9.
6. Cheng AL, Huang WG, Chen ZC, *et al.* Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:435-45.
7. Ren HZ, Pan GQ, Wang JS, *et al.* Reduced stratifin expression can serve as an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Digestive diseases and sciences* 2010;55:2552-60.
8. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertility and sterility* 2013;99:607-15.

9. Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, *et al.* High frequency of hypermethylation at the *14-3-3 sigma* locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:6049-54.
10. Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, *et al.* Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the *14-3-3 sigma* gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5298-302.
11. Mhawech P, Benz A, Cerato C, *et al.* Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005;18:340-8.
12. Luo J, Feng J, Lu J, *et al.* Aberrant methylation profile of *14-3-3 sigma* and its reduced transcription/expression levels in Chinese sporadic female breast carcinogenesis. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2010;27:791-7.
13. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, *et al.* Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10:2687-93.
14. Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, *et al.* Frequent and histological type-specific inactivation of *14-3-3sigma* in human lung cancers. *Oncogene* 2002;21:2418-24.
15. Ramirez JL, Rosell R, Taron M, *et al.* *14-3-3sigma* methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:9105-12.
16. ถ้าเลิศชน ว. คู่มือประชาชน มะเร็งปอด . กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยศึกษาและบำบัดโรคมะเร็ง สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์; 2558.

17. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer, 2013. (Accessed 06/05/2014, at available from: <http://globocan.iarc.fr.>)
18. คณาจารย์เครือข่ายการศึกษาพยาบาลและการสาธารณสุขภาคใต้. โครงการสวัสดิการวิชาการ ภาควิทยาศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 6. นนทบุรี: โครงการสวัสดิการวิชาการ สถาบันพระบรมราชชนก; 2555.
19. ชินธเนศ ว, ตันสถิตย์ ธ, ตันสถิต ม. ภาควิทยาศาสตร์ของมนุษย์ = Human anatomy. พิมพ์ครั้งที่ 13. กรุงเทพฯ: ภาควิทยา ภาควิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ; 2555.
20. Lavelle P. Lung cancer. ABC Health & Wellbeing; 2010 (Accessed 14/02/2015, at available from: <http://www.abc.net.au/health/library/stories/2010/07/29/2967396.htm>)
21. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. The New England journal of medicine 2008;359:1367-80.
22. Stevens A LJ, Scott I. Core pathology. 3rd ed. Edinburgh: Mosby; 2009.
23. ศิริศิริโร ร. การประยุกต์ใช้เพทสแกนทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งปอด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สยามทองกิจ; 2556.
24. Khuhaprema T, Attasara, P., Sriplung, H., Wiangnon,S., and Sangrajrang, S., Cancer in Thailand 2007-2009 Vol.VII. Thailand: National Cancer Institute; 2013.
25. Moore BWaPVJ. First description of 14-3-3 proteins in mammalian brains. Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration 1967:343-59.
26. Wang W, Shakes DC. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. Journal of molecular evolution 1996;43:384-98.
27. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. Seminars in cancer biology 2006;16:162-72.
28. Mhaweck P. 14-3-3 proteins-an update. Cell Res 2005;15:228-36.

29. Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C. Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *Journal of molecular evolution* 2000;51:446-58.
30. Rittinger K, Budman J, Xu J, *et al.* Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Molecular cell* 1999;4:153-66.
31. Jones DH, Ley S, Aitken A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters* 1995;368:55-8.
32. Yang X, Lee WH, Sobott F, *et al.* Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:17237-42.
33. Gardino AK, Smerdon SJ, Yaffe MB. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Seminars in cancer biology* 2006;16:173-82.
34. Benzinger A, Popowicz GM, Joy JK, Majumdar S, Holak TA, Hermeking H. The crystal structure of the non-liganded 14-3-3 protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Res* 2005;15:219-27.
35. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in cell & developmental biology* 2011;22:663-72.
36. Aitken A. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant molecular biology* 2002;50:993-1010.
37. Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 1995;376:191-4.

38. Truong AB, Masters SC, Yang H, Fu H. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* 2002;49:321-5.
39. Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 2002;513:53-7.
40. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996;84:889-97.
41. Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, *et al.* The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 1997;91:961-71.
42. Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B, Klein DC. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:1222-7.
43. Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, *et al.* Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:8083-8.
44. Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F. Crystal Structure of the 14-3-3 ζ :Serotonin N-Acetyltransferase Complex: A Role for Scaffolding in Enzyme Regulation. *Cell* 2001;105:257-67.
45. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell* 1996;87:619-28.
46. Pastorino JG, Tafani M, Farber JL. Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:19411-6.

47. Chen MS, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Molecular and cellular biology* 2003;23:7488-97.
48. Obsilova V, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2008;57 Suppl 3:S11-21.
49. Braselmann S, McCormick F. Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *The EMBO journal* 1995;14:4839-48.
50. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 2007;35:495-516.
51. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9:231-41.
52. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 2007;87:99-163.
53. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 1999;13:1899-911.
54. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627-37.
55. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999;399:483-7.
56. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell* 2005;17:525-35.

57. Won J, Kim DY, La M, Kim D, Meadows GG, Joe CO. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:19347-51.
58. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annual review of biochemistry* 1992;61:441-70.
59. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* 2003;36:131-49.
60. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1999;39:295-312.
61. Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell proliferation* 2000;33:261-74.
62. Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in cancer biology* 2006;16:183-92.
63. Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:28706-13.
64. Nakajima T, Shimooka H, Weixa P, *et al.* Immunohistochemical demonstration of 14-3-3 sigma protein in normal human tissues and lung cancers, and the preponderance of its strong expression in epithelial cells of squamous cell lineage. *Pathology International* 2003;53:353-60.
65. van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2001;23:936-46.
66. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* 1997;1:3-11.

67. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:23106-12.
68. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999;401:616-20.
69. Samuel T, Weber HO, Rauch P, *et al.* The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:45201-6.
70. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, *et al.* JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO journal* 2004;23:1889-99.
71. Baylin SB. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Seminars in cancer biology* 2002;12:331-7.
72. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2013;38:23-38.
73. Lodygin D, Hermeking H. The role of epigenetic inactivation of 14-3-3sigma in human cancer. *Cell Res* 2005;15:237-46.
74. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992;69:915-26.
75. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.
76. Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic acids research* 2000;28:2108-13.
77. Taby R, Issa J-PJ. *Cancer Epigenetics. CA: a cancer journal for clinicians* 2010;60:376-92.

78. Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* 2001;20:3348-53.
79. Yang HY, Wen YY, Chen CH, Lozano G, Lee MH. 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Molecular and cellular biology* 2003;23:7096-107.
80. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:2727-32.
81. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21:5400-13.
82. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132-8.
83. Perini G, Diolaiti D, Porro A, Della Valle G. In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:12117-22.
84. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-54.
85. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science (New York, NY)* 2003;300:489-92.
86. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochemical and biophysical research communications* 1983;111:47-54.
87. Meroni G. Repetitive DNA: A Tool to Explore Animal Genomes/Transcriptomes: InTech; 2012.

88. Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC, Ehrlich M. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutation research* 1999;423:91-101.
89. Rodic N, Burns KH. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS genetics* 2013;9:e1003402.
90. Estecio MR, Gharibyan V, Shen L, *et al.* LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PloS one* 2007;2:e399.
91. Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 2008;27:404-8.
92. Laner T, Schulz WA, Engers R, Muller M, Florl AR. Hypomethylation of the *XIST* gene promoter in prostate cancer. *Oncology research* 2005;15:257-64.
93. Zurita M, Lara PC, del Moral R, *et al.* Hypermethylated *14-3-3-sigma* and *ESR1* gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BMC cancer* 2010;10:217.
94. Gheibi A, Kazemi M, Baradaran A, Akbari M, Salehi M. Study of promoter methylation pattern of *14-3-3 sigma* gene in normal and cancerous tissue of breast: A potential biomarker for detection of breast cancer in patients. *Advanced biomedical research* 2012;1:80.
95. Yi B, Tan SX, Tang CE, *et al.* Inactivation of *14-3-3 sigma* by promoter methylation correlates with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of cellular biochemistry* 2009;106:858-66.
96. Radhakrishnan VM, Jensen TJ, Cui H, Futscher BW, Martinez JD. Hypomethylation of the *14-3-3sigma* promoter leads to increased expression in non-small cell lung cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 2011;50:830-6.

97. Shiba-Ishii A, Noguchi M. Aberrant stratifin overexpression is regulated by tumor-associated CpG demethylation in lung adenocarcinoma. *The American journal of pathology* 2012;180:1653-62.
98. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research* 1977;37:646-50.
99. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews Cancer* 2011;11:426-37.
100. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation research* 2007;635:105-17.
101. Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research* 2001;61:1659-65.
102. Diehl F, Li M, Dressman D, *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:16368-73.
103. Kristensen LS, Hansen LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clinical chemistry* 2009;55:1471-83.
104. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001;41:276-82.
105. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2009;404:100-4.

106. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, *et al.* The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;906:161-8.
107. Board RE, Knight L, Greystoke A, *et al.* DNA methylation in circulating tumour DNA as a biomarker for cancer. *Biomark Insights* 2008;2:307-19.
108. Martinez-Galan J, Torres B, Del Moral R, *et al.* Quantitative detection of methylated ESR1 and *14-3-3-sigma* gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer biology & therapy* 2008;7:958-65.

ภาคผนวก ก

1. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบการเกิด 14-3-3 σ methylation โดยใช้เทคนิค MSP

ใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งพบว่าจีน 14-3-3 σ ตั้งอยู่บนโครโมโซม 1p36.11 ในตำแหน่งที่ 26862944 ถึง 26864652 มีจำนวนเบสเท่ากับ 1,709 bp มีจำนวน 1 exon คือตำแหน่งเบสที่ 199 ถึงเบส 1,513 โดย mRNA ข้างต้นสามารถแปลรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโน โดยเริ่มต้นแปลรหัสจากเบสที่ 270 และสิ้นสุดการแปลรหัสที่เบส 1,016 สามารถแปลรหัสอะมิโนออกมาได้จำนวน 248 กรดอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 23

1 GCCCCACGCC AGATTCTCC TGCTGACTGT TCTGATGATT CACCCCCACA TCCCAGCCTT
 61 TTTACCTTTA CTGCAGAGCC GGAAAGGGTG TGGGGAAGAG AGGAGAGGGA GGCAGGTCTT
 121 GGGCCCTGGT CCCGCCCCCT GCTCCTCCCC ACCCTTCTCT GGGCCTGGCC ACCCAGCCAA
 181 AAGGCAGGCC AAGAGCAGGAGAGACACAGA GTCCGGCATT GGTCCCAGGC AGCAGTTAGC
 241 CCGCCGCCCCG CCTGTGTGTC CCCAGAGCCATGGAGAGAGC CAGTCTGATC CAGAAGGCCA
 301 AGCTGGCAGA GCAGGCCGAA CGCTATGAGG ACATGGCAGC CTTCATGAAA GGCGCCGTGG
 361 AGAAGGGCGA GGAGCTCTCC TGCGAAGAGC GAAACCTGCT CTCAGTAGCC TATAAGAACG
 421 TGGTGGGCGG CCAGAGGGCT GCCTGGAGGG TGCTGTCCAG TATTGAGCAG AAAAGCAACG
 481 AGGAGGGCTC GGAGGAGAAG GGGCCCGAGG TGCGTGAGTA CCGGAGAAG GTGGAGACTG
 541 AGCTCCAGGG CGTGTGCGAC ACCGTGCTGG GCCTGCTGGA CAGCCACCTC ATCAAGGAGG
 601 CCGGGACGC CGAGAGCCGG GTCTTCTACC TGAAGATGAA GGGTACTAC TACCGCTACC
 661 TGCCCAGGT GCCACCGGT GACGACAAGA AGCGCATCAT TGA CTAGCC CGGTCAGCCT
 721 ACCAGGAGGC CATGGACATC AGCAAGAAGG AGATGCCGCC CACCAACCCC ATCCGCTGG
 781 GCCTGGCCCT GAACTTTTCC GTCTTCCACT ACGAGATCGC CAACAGCCCC GAGGAGGCCA
 841 TCTCTGTGGC CAAGACCACT TTCGACGAGG CCATGGCTGA TCTGCACACC CTCAGCGAGG
 901 ACTCTACAA AGACAGCACC CTCATCATGC AGCTGCTGCG AGACAACCTG AACTGTGGA
 961 CGGCCGACAA CGCCGGGGAA GAGGGGGGCG AGGCTCCCCA GGAGCCCCAG AGCTGAGTGT
 1021 TGCCCCCAC CGCCCCGCC TGCCCCCTCC AGTCCCCAC CCTGCCGAGA GGACTAGTAT
 1081 GGGGTGGGAG GCCCCACCCT TCTCCCCTAG GCGCTGTTCT TGCTCCAAAG GGCTCCGTGG
 1141 AGAGGGACTG GCAGAGCTGA GGCCACCTGG GGCTGGGGAT CCCACTCTTC TTGCAGCTGT
 1201 TGAGCGCACC TAACCACTGG TCATGCCCCC ACCCCTGCTC TCCGCACCCG CTTCCTCCCG
 1261 ACCCAGGAC CAGGCTACTT CTCCCCTCT CTTGCCTCCC TCCTGCCCT GCTGCCTCTG
 1321 ATCGTAGGAA TTGAGGAGTG TCCCGCCTTG TGGCTGAGAA CTGGACAGTG GCAGGGGCTG
 1381 GAGATGGGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGTGTGTG TGCGCGCGCG CCAGTGCAAG
 1441 ACCGAGATTG AGGGAAAGCA TGTCTGCTGG GTGTGACCAT GTTCCTCTC AATAAAGTTC
 1501 CCCTGTGACA CTCCTCTGT CTCTTCCA GTTCTGGCG ATGGGCTGGG AGTGGGACTG
 1561 GAATCTGACT TAGAGACCCT GACTTTGGAC CTCTGAGTTA GGGCCCTGAA CTCCCTAGGT
 1621 GGCTCAGTGG CCCGCACGCA AGACTTTGAG TCCAGGTGAG GCCGGGGTCC GGCTCTCTCC
 1681 ATCACGGCGG CCCAGTCAA ACTGGACGG

ภาพที่ 23 แสดงลำดับเบสของ 14-3-3 σ ที่ตั้งบนโครโมโซม 1p36.11 ในมนุษย์ โดยบริเวณกล่องสีแดงตรงตำแหน่งเบสที่ 1 ถึง เบสที่ 198 คือตำแหน่งโปรโมเตอร์ , บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณ mRNA พบจำนวน 1 exon และบริเวณตัวอักษรสีแดงคือนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไม่มีการแปลรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโน

จากนั้นเมื่อทราบตำแหน่งของ CpG island ทำการออกแบบไพรเมอร์โดย methylation primer ต้องออกแบบจาก methylated DNA template และ unmethylation primer ต้องออกแบบมาจาก unmethylated DNA template ได้ไพรเมอร์ดังแสดงในภาพที่ 26

Methylated DNA template and methylation primer

ATGGAGAGAG TTAGTTTGAT TTAGAAGGTT AAGTTGGTAG AGTAGGTCG₁A ACG₂TTATGAG
 Forward primer
 GATATGGTAG TTTTATGAA AGG*CG₃T*CG₄TG GAGAAGGGCG₅ AGGAGTTTTT
 Reverse primer
 TTGG₆AAGAG CG₇AAATTTGC TTTTAGTAGT TTATAAGAA*CG₈TGGTGGG*CG₉GTTAGAGGGT
 TGTTGGAGG GTGTTGTTA GTATTGAGTA GAAAAGTAAC G₁₀AGGAGGGTT CG₁₁GAGGAGAA
 GGGGTTCG₁₂AG GTGCG₁₃TGA

Unmethylated DNA template and unmethylation primer

ATGGAGAGAG TTAGTTTGAT TTAGAAGGTT AAGTTGGTAG AGTAGGTTG₁A ATG₂TTATGAG
 Forward primer
 GATATGGTAG TTTTATGAA AGG*TG₃T*TG₄TG GAGAAGGGTG₅ AGGAGTTTTT TTGTG₆AAGAG
 Reverse primer
 TG₇AAATTTGC TTTTAGTAGT TTATAAGAA*TG₈TGGTGGG*TG₉GTTAGAGGGT TGTTGGAGG
 GTGTTGTTA GTATTGAGTA GAAAAGTAATG₁₀AGGAGGGTT TG₁₁GAGGAGAA GGGGTTTG₁₂AG
 GTGTG₁₃TGA

ภาพที่ 26 แสดงลำดับเบสและไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการเกิด 14-3-3σ methylation

2.) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *14-3-3σ* ด้วยวิธีการ RT-PCR

ใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI สำหรับออกแบบไพรเมอร์ เมื่อนำลำดับเบสไปออกแบบไพรเมอร์ได้ตำแหน่งของไพรเมอร์ดังแสดงในภาพที่ 29 โดยตำแหน่งที่ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA อยู่หลังตำแหน่งทำการตรวจสอบการเกิด DNA methylation เพื่อเป็นตรวจสอบว่าการเกิด DNA methylation ตรงบริเวณที่ใช้ในการศึกษานั้นส่งผลต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *14-3-3σ* หรือไม่

```

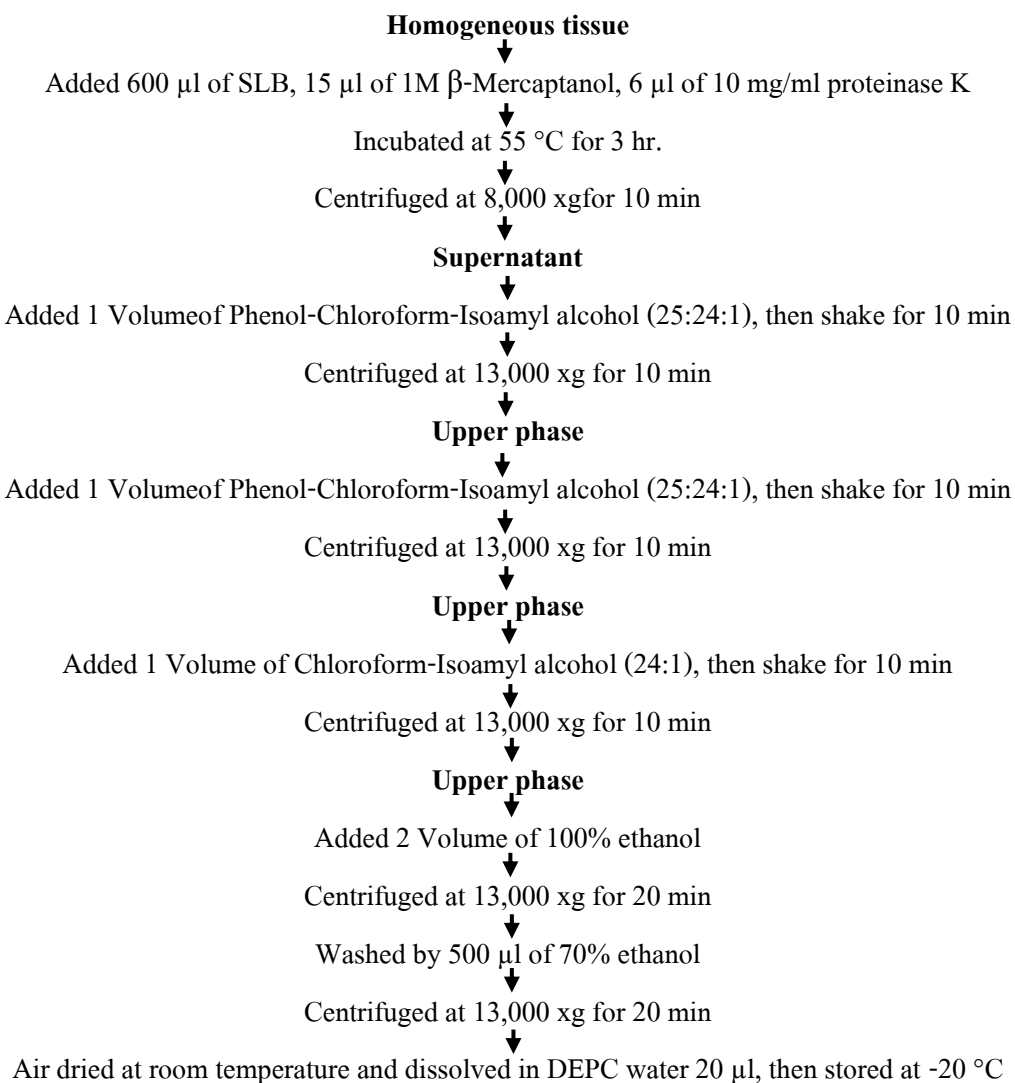
1  GAGAGACACA GAGTCCGGCA TTGGTCCCAG GCAGCAGTTA GCCCGCCGCC CGCCTGTGTG
61  TCCCCAGAGC CATGGAGAGA GCCAGTCTGA TCCAGAAGGC CAAGCTGGCA GAGCAGGCCG
121 AACGCTATGA GGACATGGCA GCCTTCATGA AAGGCGCCGT GGAGAAGGGC GAGGAGCTCT
181 CCTGCGAAGA GCGAAACCTG CTCTCAGTAG CCTATAAGAA CGTGGTGGGC GGCCAGAGGG
241 CTGCCTGGAG GGTGCTGTCC AGTATTGAGC AGAAAAGCAA CGAGGAGGGC TCGGAGGAGA
301 AGGGGCCCCG GGTGCGTGAG TACCGGGAGA AGGTGGAGAC TGAGCTCCAG GGCGTGTGCG
361 ACACCGTGCT GGGCTGCTG GACAGCCACC TCATCAAGGA GGCCGGGAC GCCGAGAGCC
421 GGTCTTCTA CCTGAAGATG AAGGGTGA CTACCGCTA CCTGGCCGAG GTGGCCACCG
481 GTGACGACAA GAAGCGCATC ATTGACTCAG CCCGGTCAGC CTACCAGGAG GCCATGGACA
541 TCAGCAAGAA GGAGATGCCG CCCACCAACC CCATCCGCC TGGCCTGGCC CTGAAC TTT
601 CCGTCTTCCA CTACGAGATC GCCAACAGCC CCGAGGAGGC CATCTCTCTG GCCAAGACCA
661 CTTTCGACGA GGCCATGGCT GATCTGCACA CCCTCAGCGA GGACTCCTAC AAAGACAGCA
721 CCCTCATCAT GCAGCTGCTG CGAGACAACC TGACACTGTG GACGGCCGAC AACGCCGGGG
781 AAGAGGGGGG CGAGGCTCCC CAGGAGCCCC AGAGCTGA

```

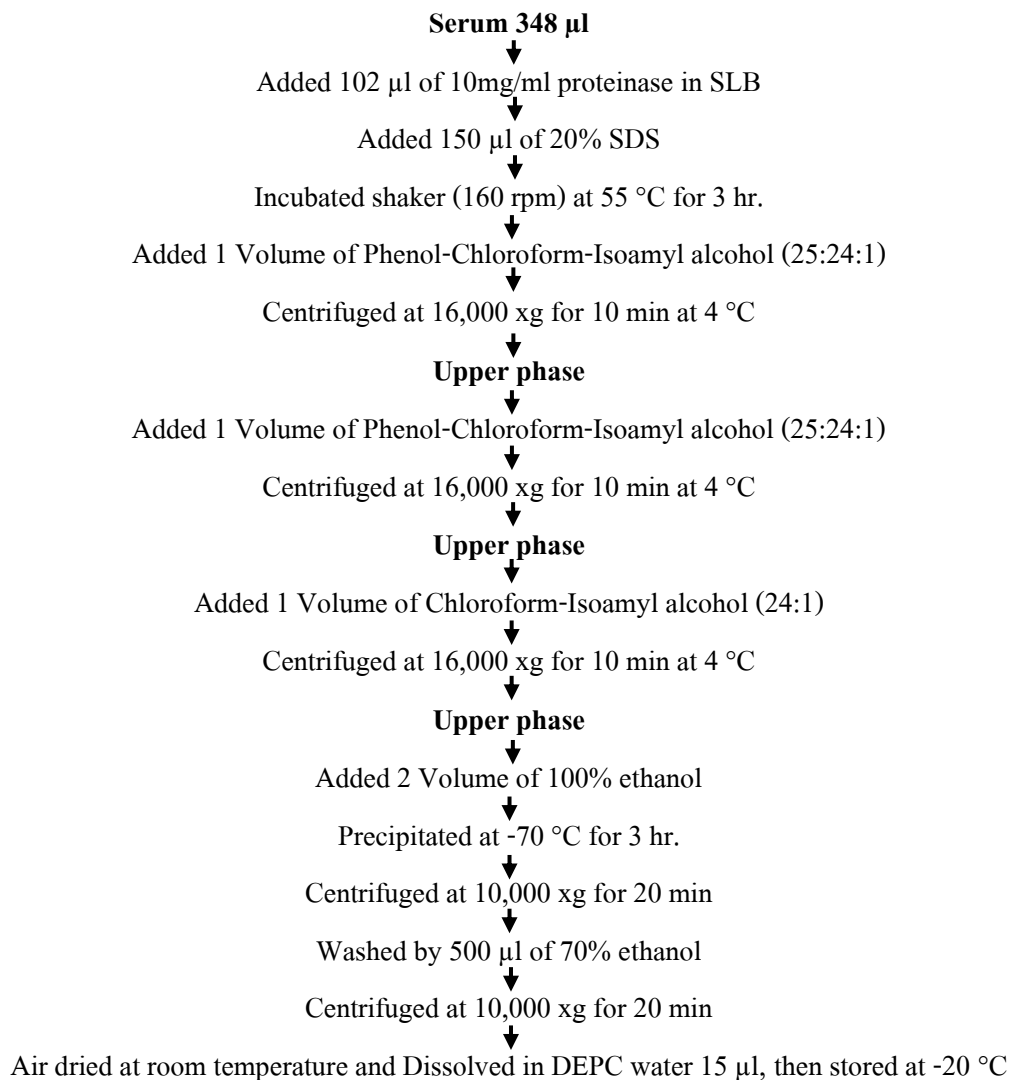
ภาพที่ 27 แสดงลำดับเบสและไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของ *14-3-3σ* mRNA

ภาคผนวก ข

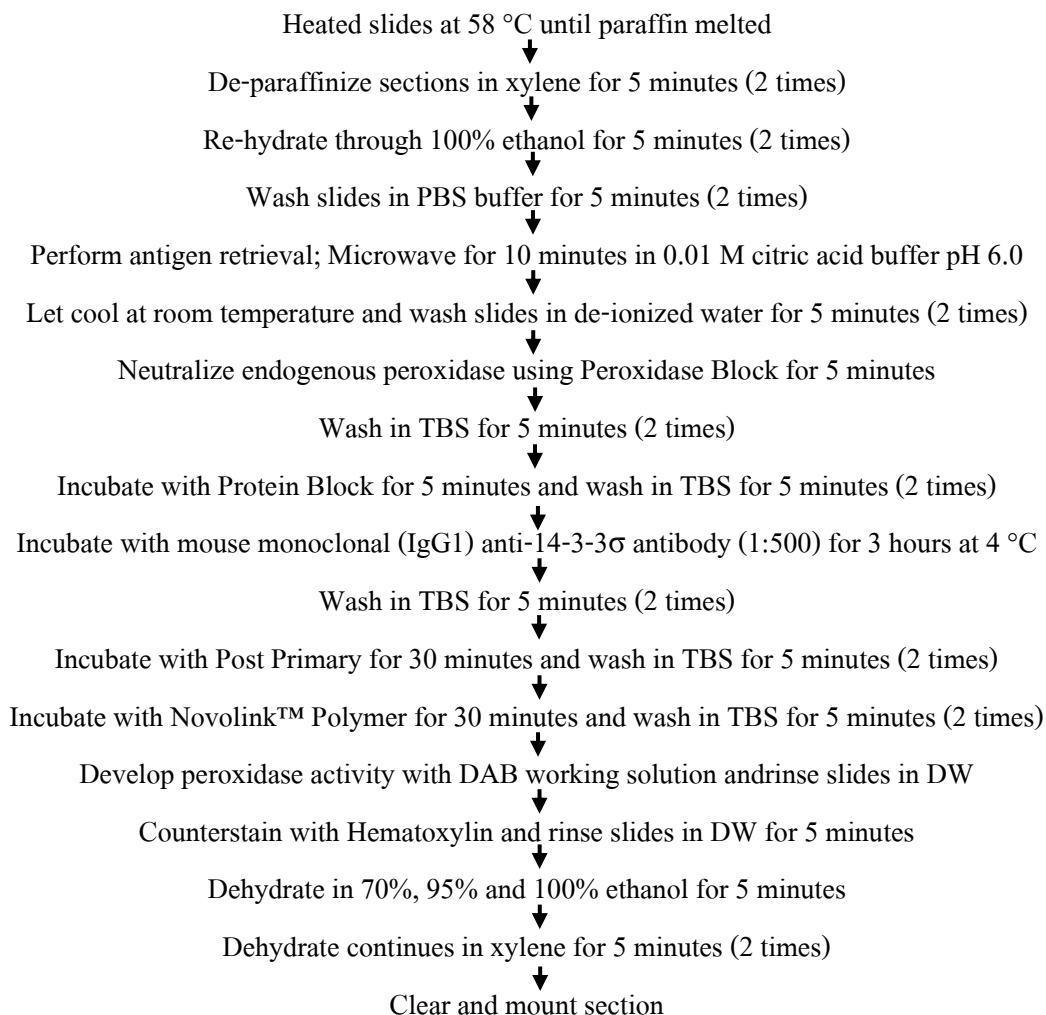
การสกัด DNA จากชิ้นเนื้อ



การสกัด DNA จากซีรัม



วิธีการ IHC



ตารางที่ 7 Master mix สำหรับปฏิกิริยา MSP

Reagent	Stock	Final conc.	Reaction (1X)
PCR buffer (X)	10	1	2
Mgcl ₂ (mM)	50	1.5	0.6
dNTP (mM)	2.5	0.2	1.6
Forward primer (pmole)	10	0.2	0.4
Reverse primer (pmole)	10	0.2	0.4
Platinum taq DNA polymerase	5	0.04	0.16
H ₂ O (μl)	-	-	9.84
Total master mix (μl)	-	-	15
DNA or H ₂ O (μl)	-	-	5
Total volume (μl)	-	-	20

ตารางที่ 8 ขั้นตอนและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MSP

Reaction	Temp. (°C)	Time	Cycle
1) Initiation denaturation	94	30 วินาที	1
2) Denaturation	94	30 วินาที	} 30
3) Annealing		30 วินาที	
for methylation primer	64		
for unmethylation primer	59		
4) Extension	72	5 วินาที	
5) Final extension	72	10 นาที	1

ตารางที่ 9 Master mix สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR

Reagent	Stock	Final conc.	Reaction (1X)
PCR buffer (X)	10	1	2.5
Mgcl ₂ (mM)	50	1.5	0.75
dNTP (mM)	2.5	0.2	2.0
Forward primer (pmole)	10	0.2	1.0
Reverse primer (pmole)	10	0.2	1.0
Platinum taq DNA polymerase	5	0.04	0.2
H ₂ O (μl)	-	-	15.55
Total master mix (μl)	-	-	23
DNA or H ₂ O (μl)	-	-	2
Total volume (μl)	-	-	25

ตารางที่ 10 ขั้นตอนและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR

Reaction	Temp. (°C)	Time	cycle
1) Initiation denaturation	95	5 นาที	1
2) Denaturation	95	45 วินาที	} 40
3) Annealing	61	30 วินาที	
4) Extension	72	30 วินาที	
5) Final extension	72	10 นาที	1

ภาคผนวก ก

10% Ammonium persulfate (1 ml)

APS	0.10	g
Distilled water	1	ml

0.01M Citrate buffer pH 6.0 (1,000 ml)

Citric acid	2.1	g
Distilled water	1,000	ml

Adjust to pH 6.0 using NaOH

0.4 M EDTA pH 8.0 (1,000 ml)

EDTA (FW = 372.24)	148.90	g
Distilled water	1,000	ml

Adjust to pH 8.0 using NaOH

DEPC water (1,000 ml)

Milli-Q water	1	L
DEPC	1	ml

*DEPC drop wise into the water

3M NaCl (1,000 ml)

NaCl	175.32	g
------	--------	---

Distilled water up to 1,000 ml

SLB solution (1,000 ml)

2M Tris pH 7.6	5	ml
0.4 M EDTA pH 8.0	25	ml
3M NaCl	17	ml
Add 250 ml distilled water		
20% SDS	10	ml
Distilled water up to 1,000 ml		

50X TAE buffer (1,000 ml)

Tris base	242.28	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
EDTA	18.61	g
Distilled water up to 1,000 ml		

1M Tris-HCL pH 8.0 (1,000)

Tris base	121.14	g
Distilled water	1,000	ml
Adjust to pH 8.0 using HCl		

2M Tris-HCL pH 7.6 (1,000 ml)

Tris base	242.2	g
Adjust to pH 7.6 using HCl		
Distilled water up to 1,000 ml		

10X TBE buffer (1,000 ml)

Tris base 109.03 g

Boric acid 55.65 g

EDTA 7.45 g

Distilled water up to 1,000 ml

10X TBS buffer pH 7.6 (1,000 ml)

Tris base 24.2 g

NaCl 80 g

Distilled water up to 1,000 ml

Adjust to pH 7.6 using Hcl

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 11 รายละเอียดของผู้ป่วย NSCLC ที่ใช้ในการศึกษา

Sample No.	Age	Gender	Histological type	Sites of tumor	Grade	Stage	Metastases
LCT 002	70	Male	ADC	Over lobe lesion of lung	9	4	Distant metastases
LCT 003	65	Male	Unclassified type of NSCLC	Lung, NOS	9	4	Distant metastases
LCT 008	64	Male	SCC	Middle lobe, lung	9	3	Regional lymph nodes
LCT 010	67	Male	SCC	Middle lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 011	69	Male	SCC	Over lobe lesion of lung	9	3	No data
LCT 012	63	Female	Pleura, ADC	Over lobe lesion of lung	9	4	Distant metastases
LCT 013	35	Male	Pleura, ADC	Over lobe lesion of lung	9	4	Distant metastases
LCT 014	52	Female	Pleura, ADC	Over lobe lesion of lung	9	4	Distant metastases
LCT 015	67	Female	ADC	Lower lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 016	53	Female	SCC	Lower lobe, lung	3	4	Distant metastases
LCT 017	74	Female	ADC	Lung, NOS	1	4	Distant metastases
LCT 020	72	Male	SCC	Lower lobe, lung	9	No data	No data
LCT 021	76	Female	ADC	Upper lobe, lung	9	4	No data

NOS = not otherwise specified

Sample No.	Age	Gender	Histological type	Sites of tumor	Grade	Stage	Metastases
LCT 022	71	Female	SCC	Upper lobe, lung	2	4	Distant metastases
LCT 024	53	Male	ADC	Lung, NOS	9	4	Distant metastases
LCT 025	58	Male	Unclassified type of NSCLC	Over lobe lesion of lung	9	No data	No data
LCT 026	64	Male	SCC	Over lobe lesion of lung	9	3	No data
LCT 031	68	Female	ADC	Over lobe lesion of lung	9	No data	No data
LCT 032	39	Female	ADC	Lung, NOS	1	No data	No data
LCT 034	77	Female	ADC	Lower lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 036	64	Male	SCC	Over lobe lesion of lung	2	No data	No data
LCT 037	53	Male	Unclassified type of NSCLC	Middle lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 043	63	Male	SCC	Lower lobe, lung	2	4	Distant metastases
LCT 044	59	Male	SCC	Over lobe lesion of lung	9	4	Distant metastases
LCT 046	79	Male	SCC	Upper lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 047	67	Male	ADC	Upper lobe, lung	1	2	Localized
LCT 049	75	Male	SCC	Upper lobe, lung	3	3	Direct extension
LCT 051	83	Male	Unclassified type of NSCLC	Middle lobe, lung	9	3	Regional lymph nodes
LCT 053	41	Female	ADC	Over lobe lesion of lung	9	No data	Regional lymph nodes

NOS = not otherwise specified

Sample No.	Age	Gender	Histological type	Sites of tumor	Grade	Stage	Metastases
LCT 054	39	Female	SCC	Middle lobe, lung	2	1	No metastases
LCT 055	57	Female	ADC	Lower lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 057	32	Female	ADC	Lung, NOS	1	4	Distant metastases
LCT 058	68	Female	SCC	Middle lobe, lung	2	4	Distant metastases
LCT 059	58	Male	ADC	Upper lobe, lung	9	4	Distant metastases
LCT 061	76	Male	ADC	Upper lobe, lung	3	4	Distant metastases
LCT 062	57	Male	SCC	Lung, NOS	3	4	Distant metastases

NOS = not otherwise specified

ตารางที่ 12 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัม

ตัวอย่าง ชิ้นเนื้อ	ค่าความ เข้มข้น (ng/ μ l)	ค่าความบริสุทธิ์		ตัวอย่าง ซีรัม	ค่าความ เข้มข้น (ng/ μ l)	ค่าความบริสุทธิ์	
		OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀			OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀
LCT 002	112.5	1.92	1.28	LCS 002	62.9	1.48	0.39
LCT 003	93.7	1.88	1.17	LCS 003	106.5	1.14	0.20
LCT 008	27.1	2.32	1.48	LCS 008	74.8	0.98	0.16
LCT 010	462.5	1.94	2.10	LCS 010	48.9	1.59	0.39
LCT 011	753.9	1.98	2.18	LCS 011	77.6	1.40	0.31
LCT 012	159.9	1.89	1.96	LCS 012	135.9	0.98	0.18
LCT 013	124.1	1.87	2.11	LCS 013	117.9	1.30	0.34
LCT 014	194.1	1.88	2.09	LCS 014	44.6	1.59	0.30
LCT 015	878.8	1.89	2.21	LCS 015	60.8	1.58	0.38
LCT 016	622.8	1.77	2.27	LCS 016	196.1	1.03	0.25
LCT 017	141.4	1.86	2.09	LCS 017	106.7	1.19	0.23
LCT 020	412.2	1.91	2.25	LCS 020	201.5	1.02	0.25
LCT 021	47.0	1.63	0.30	LCS 021	72.0	1.54	0.44
LCT 022	709.9	1.89	2.14	LCS 022	101.0	1.28	0.26
LCT 024	13.4	2.03	1.07	LCS 024	202.0	1.14	0.25
LCT 025	26.3	1.98	1.24	LCS 025	195.9	0.98	0.24
LCT 026	101.5	1.74	1.49	LCS 026	44.1	1.57	0.35
LCT 031	21.6	1.99	1.81	LCS 031	127.2	1.16	0.21
LCT 032	52.4	1.89	1.93	LCS 032	124.7	1.22	0.23
LCT 034	46.6	1.78	1.50	LCS 034	159.8	1.11	0.24
LCT 036	411.4	1.89	2.61	LCS 036	293.2	0.99	0.37
LCT 037	46.7	1.91	1.72	LCS 037	176.6	1.00	0.22
LCT 043	380.9	1.90	2.14	LCS 043	56.0	1.23	0.37
LCT 044	594.9	1.88	1.89	LCS 044	116.4	0.93	0.16
LCT 046	108.7	1.92	2.45	LCS 046	37.2	1.59	0.47
LCT 047	206.0	1.87	2.17	LCS 047	8.5	1.70	0.31

LCT 049	338.9	1.91	1.17	LCS 049	63.0	0.97	0.17
LCT 051	220.7	1.83	1.21	LCS 051	43.1	1.35	0.34
LCT 053	339.8	1.94	1.97	LCS 053	45.4	1.53	0.45
LCT 054	143.8	1.86	0.61	LCS 054	41.2	1.56	0.43
LCT 055	126.9	1.85	1.21	LCS 055	45.7	1.54	0.29
LCT 057	60.4	1.89	1.41	LCS 057	54.9	0.95	0.17
LCT 058	459.8	1.90	1.97	LCS 058	72.6	1.40	0.31
LCT 059	155.8	2.13	1.22	LCS 059	61.2	0.98	0.16
LCT 061	111.0	2.18	1.09	LCS 061	49.5	1.13	0.33
LCT 062	61.9	2.26	0.81	LCS 062	31.4	0.96	0.18

ตารางที่ 13 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ bisulfite DNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและซีรัม

ตัวอย่าง ชิ้นเนื้อ	ค่าความ เข้มข้น (ng/μl)	ค่าความบริสุทธิ์		ตัวอย่าง ซีรัม	ค่าความ เข้มข้น (ng/μl)	ค่าความบริสุทธิ์	
		OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀			OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀
LCT 002	31.7	1.66	0.28	LCS 002	23.4	0.96	0.48
LCT 003	51.9	2.98	0.40	LCS 003	18.5	0.84	0.25
LCT 008	69.9	1.55	1.14	LCS 008	13.3	0.68	0.28
LCT 010	50.5	1.45	0.84	LCS 010	14.1	0.70	0.29
LCT 011	66.0	1.62	1.18	LCS 011	17.1	0.79	0.30
LCT 012	103.2	1.77	1.39	LCS 012	13.0	0.80	0.35
LCT 013	95.0	2.33	0.64	LCS 013	12.2	0.76	0.31
LCT 014	72.4	1.63	0.78	LCS 014	12.0	0.67	0.27
LCT 015	60.1	1.56	0.78	LCS 015	13.4	0.71	0.28
LCT 016	93.3	1.71	0.97	LCS 016	13.9	0.79	0.32
LCT 017	85.1	1.70	1.02	LCS 017	7.3	0.62	0.23
LCT 020	57.4	1.54	1.03	LCS 020	10.3	0.68	0.27
LCT 021	31.2	1.19	0.56	LCS 021	13.7	0.75	0.30
LCT 022	87.6	1.63	1.23	LCS 022	10.9	0.67	0.27
LCT 024	31.8	1.24	0.42	LCS 024	15.9	0.88	0.38
LCT 025	43.5	1.34	0.84	LCS 025	10.9	0.60	0.22
LCT 026	35.5	1.22	0.77	LCS 026	12.5	0.79	0.32
LCT 031	83.6	1.83	1.64	LCS 031	10.1	0.57	0.22
LCT 032	28.9	1.10	0.54	LCS 032	13.9	0.73	0.30
LCT 034	43.0	1.36	0.90	LCS 034	14.9	0.74	0.30
LCT 036	72.0	1.58	1.06	LCS 036	12.8	0.66	0.27
LCT 037	65.1	1.54	1.07	LCS 037	11.7	0.62	0.24
LCT 043	49.7	1.51	0.90	LCS 043	12.9	0.77	0.22
LCT 044	26.5	1.06	0.49	LCS 044	14.9	0.85	0.37
LCT 046	67.7	1.67	1.14	LCS 046	10.1	0.70	0.25
LCT 047	24.8	1.03	0.47	LCS 047	12.1	0.71	0.28

LCT 049	52.3	1.44	0.80	LCS 049	17.4	0.98	0.46
LCT 051	35.4	1.26	0.67	LCS 051	12.2	0.71	0.27
LCT 053	42.6	1.36	0.69	LCS 053	12.1	0.72	0.28
LCT 054	31.3	1.23	0.60	LCS 054	11.9	0.71	0.26
LCT 055	96.3	1.79	1.35	LCS 055	12.3	0.72	0.29
LCT 057	55.2	1.51	0.92	LCS 057	12.7	0.79	0.35
LCT 058	38.9	1.32	0.70	LCS 058	13.1	0.75	0.31
LCT 059	43.5	1.44	0.89	LCS 059	14.3	0.86	0.35
LCT 061	41.9	1.41	0.88	LCS 061	17.0	0.93	0.42
LCT 062	30.7	1.25	0.74	LCS 062	22.4	1.10	0.55

ตารางที่ 14 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ทั้งหมดในตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อ	ความเข้มข้นของ RNA (ng/ μ l)	ความบริสุทธิ์ของ RNA	
		OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
LCT 003	153.2	2.08	2.03
LCT 008	54.6	1.83	0.98
LCT 010	186.3	2.07	2.07
LCT 011	64.5	2.06	1.59
LCT 013	233.5	2.08	1.90
LCT 014	70.9	2.06	1.68
LCT 015	198.5	2.13	1.13
LCT 016	185.6	2.13	1.12
LCT 017	46.7	2.13	0.32
LCT 020	40.7	2.06	0.35
LCT 021	12.8	2.01	0.24
LCT 022	39.4	2.07	0.40
LCT 024	74.7	2.08	1.35
LCT 025	78.0	2.00	0.49
LCT 026	29.0	2.06	0.49
LCT 032	23.9	1.91	1.35
LCT 034	33.0	1.99	1.17
LCT 036	156.0	2.07	2.03
LCT 043	26.4	1.93	1.05
LCT 044	121.0	2.08	1.59
LCT 046	23.0	2.10	0.09
LCT 047	22.5	2.12	0.05
LCT 049	353.2	2.10	2.10
LCT 051	69.2	2.02	0.29
LCT 053	53.9	1.97	0.26
LCT 054	19.7	2.05	0.29
LCT 055	33.8	1.95	0.86

LCT 057	26.0	2.08	0.12
LCT 058	60.9	2.01	0.97
LCT 059	404.3	2.07	2.08
LCT 061	160.6	2.11	1.11
LCT 062	54.9	2.08	0.45

ตารางที่ 15 ผลการศึกษาในตัวอย่าง NSCLC

ตัวอย่าง NSCLC	Methylation level		Relative mRNA expression	Protein expression level
	Tissue	Serum		
LCT 002	25.25	89.60	RNA degrade	0
LCT 003	69.19	88.04	0.37	Tissue sample has not adequate to be slide
LCT 008	51.80	96.83	0.61	Tissue slide has not cancer cell
LCT 010	34.25	83.72	0.68	Tissue sample has not adequate to be slide
LCT 011	38.50	84.38	0.92	80
LCT 012	47.73	80.00	RNA degrade	0
LCT 013	47.65	98.17	0.30	5
LCT 014	38.35	86.11	0.55	0
LCT 015	43.98	86.05	0.35	20
LCT 016	32.70	95.45	0.67	70
LCT 017	41.80	71.61	0.82	1
LCT 020	47.87	82.44	0.72	10
LCT 021	35.51	98.96	0.84	Tissue sample has not adequate to be slide
LCT 022	46.96	90.10	0.98	140
LCT 024	41.40	77.32	0.94	0
LCT 025	55.56	97.59	0.87	0
LCT 026	50.42	100.00	1.00	100
LCT 031	45.54	87.04	RNA degrade	0
LCT 032	37.85	100.00	0.68	0
LCT 034	56.25	81.46	0.53	0
LCT 036	46.75	94.40	0.73	160
LCT 037	54.15	82.98	RNA degrade	5
LCT 043	50.34	64.62	0.68	5
LCT 044	48.02	78.26	0.73	0
LCT 046	34.07	93.33	0.72	40
LCT 047	37.85	94.96	1.10	0

LCT 049	57.52	100.00	0.31	10
LCT 051	32.84	87.76	0.89	80
LCT 053	45.25	77.08	0.84	50
LCT 054	68.52	82.35	0.81	0
LCT 055	38.73	91.04	0.89	0
LCT 057	52.58	97.94	0.86	60
LCT 058	68.64	96.36	0.97	150
LCT 059	56.05	66.07	0.56	210
LCT 061	50.00	79.78	0.77	80
LCT 062	51.90	95.56	0.89	60

ตารางที่ 16 ผลการศึกษาในตัวอย่างไม่ใช่มะเร็ง

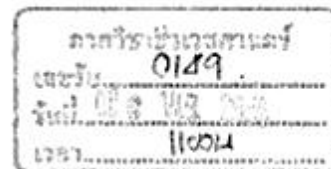
ตัวอย่าง	Methylation level
Non cancer tissue	
NCT 008	44.91
NCT 009	58.43
NCT 010	50.53
NCT 018	57.65
NCT 019	57.09
Normal serum	
NCS 001	50.00
NCS 002	75.00
NCS 003	50.00
NCS 004	83.33
NCS 005	62.86
NCS 006	54.22
NCS 007	59.52

ภาคผนวก จ



EC: 55-020-04-1-2

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่
 จังหวัดสงขลา 90110



หนังสือรับรองนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

- โครงการวิจัยเรื่อง** : บทบาทการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ ต่อกระบวนการบุกรุกของเซลล์ในมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma
 (Role of 14-3-3 σ protein expression on cell invasion in adenocarcinoma of the lung)
- หัวหน้าโครงการ** : ดอกเตอร์ปฤษฎา เรืองรัตน์
- ภาควิชา/คณะ** : ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการอนุกรรมการจริยธรรมด้านวิจัยเกี่ยวกับบริบาลผู้ป่วย สิ่งส่งตรวจ และสังคมศาสตร์ ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 14 พฤศจิกายน 2554

.....ประธานอนุกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์นายแพทย์วิระพล จันทร์ดียิ่ง)
 รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาว พิงค์พร เพ็ชรเจริญ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5410320030

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2553

ผลงานการเผยแพร่งานวิจัย

Methylation of *14-3-3sigma* in Tumor Tissue and Matched Serum DNA from Patients with
Non-Small Cell Lung Cancer