

ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับการเจริญงอกขยาย การเปลี่ยนแปลงสภาพ และการตายของเซลล์

ในมะเร็งศีรษะและลำคอ

p53 Alterations in Relation to Proliferation, Differentiation and Apoptosis

in Head and Neck Cancer



นุจรี เสาวภา

Nujaree Saowapa

๐

เลขที่	RC26๗. ๔๕๒ ๒๕๔๓ ๑.๒
Bib Key	211911
	1. 1. ๐. ๒. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Oral and Maxillofacial Surgery

Prince of Songkla University

2543


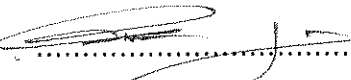
ชื่อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับการเจริญงอกขยาย การเปลี่ยนแปลงสภาพ และการตาย  
ของเซลล์ในมะเร็งศีรษะและลำคอ

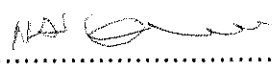
ผู้เขียน นางสาวนุจรี เสาวภา

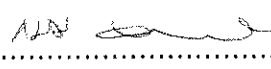
สาขาวิชา ศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล

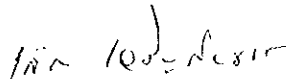
คณะกรรมการที่ปรึกษา

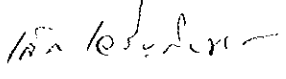
คณะกรรมการสอบ

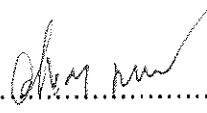
 ประธานกรรมการ  ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.สิทธิชัย ชุนทองแก้ว) (รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.สิทธิชัย ชุนทองแก้ว)

 กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ.กษม อายตวงษ์)

 กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ.กษม อายตวงษ์)


 กรรมการ  
(นายแพทย์เล็ก เจริญกิจขจร)

 กรรมการ  
(นายแพทย์เล็ก เจริญกิจขจร)

 กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นพ.วิญญู มิตรานันท์)

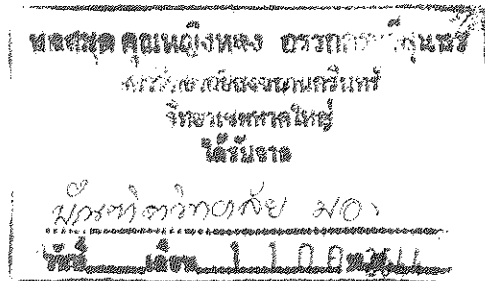
 กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ทพ.วินัย ศิริจิต)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและ  
แม็กซิลโลเฟเชียล

  
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฎีคุณ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับการเจริญงอกขยาย การเปลี่ยนแปลง และการตาย  
 ของเซลล์ในมะเร็งศีรษะและลำคอ  
 ผู้เขียน นางสาวนุจรีย์ เสาวภา  
 สาขาวิชา ศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล  
 ปีการศึกษา 2543



**บทคัดย่อ**

การเจริญงอกขยายของเซลล์มะเร็งเกิดจากการเสียสมดุลระหว่างการเจริญงอกขยายและการตายของเซลล์ การศึกษาบทบาทของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญงอกขยายและการตายของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอกชนิดสควมัสจะทำให้เข้าใจกลไกการเกิดมะเร็งชนิดนี้ ยีนต้านมะเร็ง p53 เป็นยีนที่ทำหน้าที่ตรวจสอบเซลล์ที่ระยะ G<sub>1</sub> เมื่อ DNA ในเซลล์ได้รับความเสียหายยีน p53 จะกระตุ้นให้เซลล์หยุดที่ระยะ G<sub>1</sub> โดยกระตุ้นให้ยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> สร้างโปรตีน p21 ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน cyclin-dependent kinase ซึ่งปกติทำหน้าที่กระตุ้นให้วงจรเซลล์เคลื่อนตัวไปตามระยะต่างๆ จากนั้นเซลล์จะมีการซ่อมแซม DNA ที่ได้รับความเสียหาย แต่ในกรณีที่ DNA ได้รับความเสียหายเกินกว่าจะซ่อมแซมได้ ยีน p53 จะกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายโดยกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน bcl-2 ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ตายและยับยั้งการสร้างโปรตีน bax ซึ่งเป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการตายของเซลล์ โปรตีน p21 นอกจากจะมีบทบาทในการหยุดวงจรเซลล์แล้วยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โปรตีน Ki-67 เป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่พบทุกระยะในวงจรเซลล์ ยกเว้นระยะพัก(G<sub>0</sub> phase) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนชนิดนี้จึงเป็นตัวบ่งชี้การเจริญงอกขยายของเซลล์ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับการเจริญงอกขยาย การเปลี่ยนแปลง และการตายของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอกชนิดสควมัส โดยศึกษาจากชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอกชนิดสควมัสจำนวน 52 ราย ทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรียโดยใช้ Streptavidin-biotin complex ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในวงจรเซลล์ซึ่งได้แก่โปรตีน p53, p21, bcl-2, bax และ Ki-67 โดยเปรียบเทียบกับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา ผลการวิจัยพบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษามีความผิดปกติของโปรตีน p53 ร้อยละ 50 และพบการสะสมของโปรตีน p21, bcl-2, bax และ Ki-67 ร้อยละ 94, 60, 92, 73 ตามลำดับ อัตราส่วนระหว่าง bcl-2/bax มีค่าลดลงและพบความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของ bcl-2 และ bax อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง

โปรตีน p53 กับโปรตีนอื่นๆ และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้ง 5 ชนิดกับระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในวงจรเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย(bcl-2 และ bax) การเปลี่ยนสภาพ(โปรตีน p21) และการเจริญงอกขยายของเซลล์(โปรตีน Ki-67) อาจเกิดขึ้นได้โดยไม่มีความสัมพันธ์กับสถานภาพของ p53



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและตรวจพิจารณาแก้ไขจากรองศาสตราจารย์ ดร.ทพ. สิทธิชัย ขุนทองแก้ว ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และกรรมการที่ปรึกษาร่วม คือ นพ.เล็ก เจริญกิจขจร แพทย์กลุ่มงานพยาธิวิทยาภาค วิชาค โรงพยาบาลหาดใหญ่และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. กษม อายตวงษ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ทพ.วินัย ศิริจิตร และรองศาสตราจารย์ นพ.วิญญู มิตรานันท์ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครศรีธรรมราชซึ่งเป็นต้นสังกัดในการลาศึกษาต่อ

ขอขอบคุณคุณจงรัก เจริญสิน เจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาภาค โรงพยาบาลหาดใหญ่ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการตัดชิ้นเนื้อที่ใ้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และน้องๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนสำหรับกำลังใจ คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นุจรี เสาวภา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(9)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	17
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	18
วัสดุ	18
อุปกรณ์	19
วิธีการ	19
3. ผลการทดลอง	25
4. บทวิจารณ์และสรุปผล	39
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้เขียน	65

## รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. เกณฑ์การแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็งศีรษะและลำคอ	20
2. การแจกแจง อายุ เพศ ตำแหน่งและระดับความรุนแรงของมะเร็งในแต่ละตัวอย่าง	27
3. จำนวนชิ้นเนื้อ(%)ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสที่ให้ผลบวกและลบต่อการย้อม p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67	34
4. การติดสีของโปรตีน p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67 แบ่งตามระดับชั้นเยื่อบุผิวในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	34
5. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน p21 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	35
6. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน bcl-2 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	36
7. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน bax ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	36
8. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	37
9. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน bcl-2 และโปรตีน bax ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	38



## รายการรูป

รูป	หน้า
1. ระยะต่างๆ ในวงจรเซลล์	4
2. โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน p53	7
3. โครงสร้างของยีน p53 ตำแหน่งที่พบเกิดการผ่าเหล่า	8
4. บทบาทของโปรตีน p53 ในการควบคุมการทำงานของโปรตีน p21	10
5. บทบาทของโปรตีน p21 ในการหยุดการแบ่งตัวในวงจรเซลล์	11
6. การตายแบบเนโครซิสและการตายที่เซลล์ถูกกำหนดให้ตาย	13
7. บทบาทของโปรตีน p53 ในการหยุดวงจรเซลล์และกระตุ้นการตายของเซลล์โดยการควบคุมผ่านการทำงานของโปรตีน p21, bax และ bcl-2	15
8. แผนภูมิแสดงการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรีโดยวิธี Streptavidin-Biotin-Complex	23
9. มะเร็งชนิดสแควมัสที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยารุนแรงในระดับ well differentiation	25
10. มะเร็งชนิดสแควมัสที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยารุนแรงในระดับ moderate differentiation	26
11. มะเร็งชนิดสแควมัสที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยารุนแรงในระดับ poor differentiation	26
12. การติดสีของโปรตีน p53 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	29
13. การติดสีของโปรตีน p53 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส บริเวณรอบๆ กลุ่มเซลล์มะเร็ง	30
14. การติดสีของโปรตีน p21 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส ที่กระจายในทุกชั้นของเยื่อผิว	30
15. การติดสีของโปรตีน bcl-2 ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	31
16. การติดสีของโปรตีน bcl-2 ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส	31
17. การติดสีของโปรตีน bax ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส โดยพบการติดสีทั้งบริเวณรอบๆและตรงกลางของกลุ่มเซลล์มะเร็ง	32
18. การติดสีของโปรตีน bax ในไซโทพลาสซึมและเยื่อหุ้มนิวเคลียสของมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส โดยพบการติดสีของโปรตีนส่วนใหญ่บริเวณตรงกลางของกลุ่มเซลล์มะเร็ง	32
19. การติดสีของโปรตีน Ki-67 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสซึ่งพบได้ทั่วไปในทุกชั้น	33
20. การติดสีของโปรตีน Ki-67 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส บริเวณรอบๆของกลุ่มเซลล์มะเร็ง	33
21. ความสัมพันธ์ระหว่าง p53, p21, bcl-2, bax และ Ki-67 ในการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอ	49

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. บทนำต้นเรื่อง

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของโลกในปัจจุบัน ในแต่ละปีมีจำนวนผู้ป่วยและเสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นจำนวนมาก ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาความก้าวหน้าเป็นอย่างมากในสาขาพันธุวิศวกรรมและวิทยาภูมิคุ้มกัน และได้มีการนำมาใช้ในการศึกษากลไก พยาธิกำเนิด และพฤติกรรมของโรคมะเร็ง ทำให้ทราบว่ามะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการสะสมความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่มีความสำคัญต่อการควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการรักษาความสมดุลของเนื้อเยื่อ ยีนมีบทบาทในการควบคุมพฤติกรรมต่างๆของสิ่งมีชีวิต การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อปกติเกิดจากการควบคุมของยีนในสภาพสมดุลระหว่างการเจริญงอกขยาย (proliferation) และการตายของเซลล์(apoptosis) ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากสาเหตุใดสาเหตุหนึ่ง และ/หรือความผิดปกติร่วมกันเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดมะเร็ง' ดังนั้นการศึกษาพฤติกรรมของโรคมะเร็งจึงต้องเข้าใจการทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญงอกขยายและการตายของเซลล์ในระดับโมเลกุลโดยศึกษาบทบาทของยีนที่ทำหน้าที่ดังกล่าว หนึ่งในปัจจุบันยังขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหน้าที่ในการทำงานร่วมกันของยีนต่างๆ รวมทั้งยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวงจรเซลล์ ยีนมะเร็งและยีนต้านมะเร็งต่อบทบาทการควบคุมความสมดุลของปริมาณเซลล์ในเนื้อเยื่อทั้งสภาวะปกติและในกระบวนการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการวิจัยเพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกการเกิดโรคมะเร็งในระดับยีนจะเป็นพื้นฐานนำไปสู่การวิจัยในระยะเริ่มแรก การรักษาและการป้องกันโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

ยีนต้านมะเร็ง *p53* เป็นยีนที่พบความผิดปกติได้บ่อยในการเกิดมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์รวมทั้งมะเร็งของศีรษะและลำคอ โดยยีนนี้มีบทบาทในการควบคุมการดำเนินไปของวงจรเซลล์โดยสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่คอยตรวจสอบความผิดปกติที่จะเกิดขึ้นกับวงจรเซลล์ที่ระยะ G<sub>1</sub> ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะการสังเคราะห์ DNA(S phase) ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ที่มี DNA ผิดปกติผ่านเข้าสู่ระยะการสังเคราะห์ DNA ของวงจรเซลล์ซึ่งหากเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมผิดปกติผ่านเข้าสู่ระยะการสังเคราะห์ DNA และเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์(M phase)จะได้เซลล์ที่มีความผิดปกติและไม่มีเสถียรภาพซึ่งเชื่อต่อการเกิดมะเร็ง

โปรตีน p53 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมวงจรเซลล์อย่างน้อยสองบทบาทซึ่งได้แก่ การยับยั้งวงจรเซลล์ที่ระยะระหว่าง G<sub>1</sub>/S และการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ผิดปกติตาย โดยในการยับยั้งวงจรเซลล์นั้น p53 จะไปควบคุมการทำหน้าที่ของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclin-dependent kinase (CDK) และมีผลให้การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้ง ส่วนการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายนั้นเกิดขึ้นโดยโปรตีน p53 ไปยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีน bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ตาย และส่งเสริมการทำหน้าที่ของโปรตีน bax ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นให้เซลล์ตาย อย่างไรก็ตามบทบาทในการควบคุมการตายของเซลล์อาจเกิดขึ้นโดยไม่ถูกควบคุมจากโปรตีน p53

การเจริญงอกขยายของเซลล์เป็นกลไกพื้นฐานหนึ่งของเซลล์ในการที่จะคงสภาพเนื้อเยื่อและขนาดของอวัยวะต่างๆให้อยู่ในภาวะสมดุล หากเซลล์มีอัตราการเจริญงอกขยายมากเนื้อเยื่อจะเสียหายและเป็นสาเหตุนำไปสู่การเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ ดังนั้นในกระบวนการแบ่งเซลล์จึงต้องมีการควบคุมขั้นตอนต่างๆในวงจรเซลล์ให้ดำเนินไปอย่างถูกต้อง โดยเซลล์จะมีการสร้างและสลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องในแต่ละระยะ ซึ่งสามารถแบ่งระยะต่างๆในวงจรเซลล์ได้เป็น 4 ระยะคือ G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> และ M โดยมี G<sub>0</sub> เป็นระยะพักของวงจรเซลล์ โปรตีน Ki-67 เป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่มีการเปลี่ยนแปลงคู่ขนานไปกับการดำเนินของวงจรเซลล์ ดังนั้นจึงมีการศึกษากระบวนการเจริญงอกขยายของเซลล์โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนชนิดนี้ กระบวนการเกิดมะเร็งนอกจากจะขึ้นกับการควบคุมสมดุลระหว่างการสร้างและการตายของเซลล์แล้ว ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของเซลล์ กล่าวคือในสภาวะปกติเซลล์จะถูกกำหนดให้มีการแบ่งตัวหรือหยุดการเจริญเติบโตเพื่อให้เซลล์ปรับเข้าสู่การเปลี่ยนสภาพ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดรวมทั้งโปรตีน p21 จากเหตุผลที่กล่าวข้างต้นจึงสรุปได้ว่าการควบคุมการเจริญงอกขยาย การตายและการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรเซลล์ซึ่งได้แก่โปรตีน p53 p21 bax bcl-2 และ Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเหล่านั้นตลอดจนหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวกับระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา

## 2. บทตรวจเอกสาร

มะเร็งเกิดจากการที่เซลล์สูญเสียกลไกในการรักษาสมดุลระหว่างการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ในวงจรเซลล์ และการที่เซลล์ออกจากวงจรเซลล์ไม่ว่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพ(differentiation) หรือการตายของเซลล์(apoptosis) ดังนั้นกลไกที่ควบคุมสมดุลในการทำหน้าที่ของทั้งสองกลไกที่ทำหน้าที่ตรงกันข้ามนี้จึงมีความสำคัญ การศึกษายีนที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุลดังกล่าวจะทำให้เข้าใจการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามการที่จะเข้าใจการเสียสมดุลที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องเข้าใจกลไกปกติในการควบคุมสมดุลของเซลล์

### 2.1 วงจรเซลล์

วงจรเซลล์(cell cycle) คือ ช่วงระยะเวลาที่เซลล์ 1 เซลล์แบ่งเป็น 2 เซลล์โดยวิธีไมโทซิส<sup>2</sup> ซึ่งประกอบด้วย 4 ระยะต่อเนื่องกันไป คือ G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M โดยที่ 3 ระยะแรก คือ ช่วงระยะอินเตอร์เฟส(interphase) อันเป็นระยะที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมเพื่อเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์และระยะ M ซึ่งเป็นช่วงระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส โดยมีรายละเอียดของระยะทั้ง 4 ในวงจรเซลล์ดังนี้

1) *ระยะ G<sub>1</sub>* เป็นระยะที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมก่อนจะมีการสังเคราะห์หรือจำลองตัวเองของ DNA โดยจะมีการสร้างและสะสมเอ็นไซม์และวัตถุดิบที่จะใช้สังเคราะห์ DNA ในระยะสังเคราะห์ DNA โดยเซลล์ในระยะ G<sub>1</sub> นี้จะยังไม่มีการสร้าง DNA

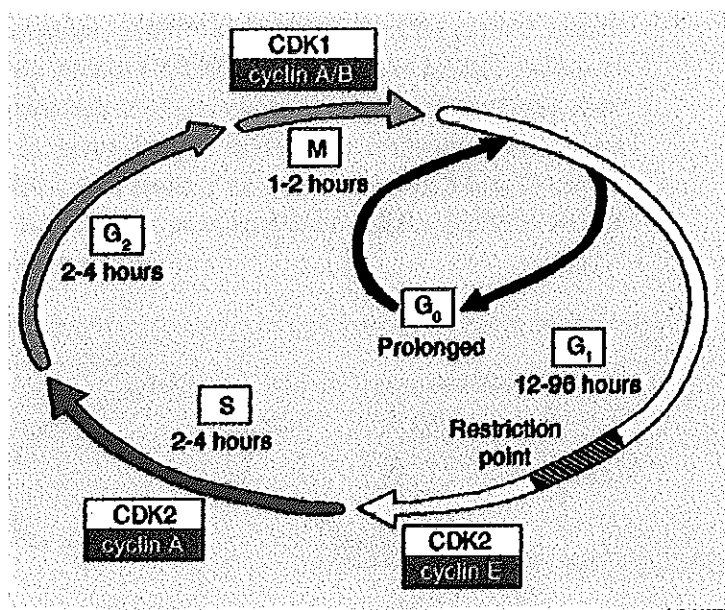
2) *ระยะสังเคราะห์ DNA (Synthesis; S)* เป็นระยะที่เซลล์มีการสังเคราะห์ DNA ทำให้เซลล์มี DNA เพิ่มขึ้นจากเดิม 1 เท่าตัว

3) *ระยะ G<sub>2</sub>* เป็นระยะที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมเพื่อจะมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นในระยะต่อไป เช่น มีการสร้างและสะสมพลังงานสำหรับการเคลื่อนที่ของโครโมโซม มีการสร้างโปรตีน RNA และ microtubule เป็นต้น ในระยะนี้นิวเคลียสจะมีการเพิ่มปริมาณของ DNA เป็นสองเท่าของปกติ

4) *ระยะแบ่งเซลล์ (Mitosis; M)* เป็นระยะสุดท้ายของวงจรเซลล์ เซลล์จะมีการแบ่งตัวจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ โดยผ่านระยะย่อยๆ 4 ระยะ คือ โพรเฟส(prophase) เมทาเฟส(metaphase) อะนาเฟส(anaphase) และทีโลเฟส(telophase)

เมื่อสิ้นสุดระยะแบ่งเซลล์ เซลล์ลูกแต่ละเซลล์ก็จะเข้าสู่ระยะ G<sub>1</sub> อีกครั้งหนึ่งซึ่งเป็นการเข้าสู่รอบใหม่ของวงจรเซลล์ โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาที่เซลล์อยู่ในวงจรเซลล์แตกต่างกัน

ชาติ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีระยะเวลาที่เซลล์อยู่ในวงจรเซลล์โดยเฉลี่ยนานประมาณ 30 ชั่วโมง โดยใช้เวลาที่ระยะ  $G_1$  นานที่สุด โดยปกติร่างกายจะมีการควบคุมการสร้างและการตายของเซลล์ภายในอวัยวะเพื่อรักษาสภาวะสมดุล ซึ่งนอกจากกระบวนการทั้งสองที่กล่าวมาเซลล์ยังมีกระบวนการที่ควบคุมให้เซลล์เข้าสู่ระยะพัก ( $G_0$  phase) เพื่อรอการกลับเข้าสู่วงจรเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นหรืออาจเปลี่ยนแปลงเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนสภาพและพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีความเฉพาะ ซึ่งในขั้นตอนต่างๆของวงจรเซลล์จะถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดรวมทั้ง cyclin และ CDK โดยโปรตีนทั้งสองทำงานร่วมกันในลักษณะ complex ซึ่งจะถูกสร้างและสลายไปในระยะต่างๆในวงจรเซลล์(รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ระยะต่างๆ ในวงจรเซลล์<sup>3</sup>

## 2.2 กลไกการเกิดมะเร็ง

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งมีหลายขั้นตอน โดยเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนเป็นตัวผลักดันให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในเซลล์ โดยเซลล์มะเร็งจะสูญเสียความสามารถในการรักษาสสมดุลและการเจริญงอกขยายตามปกติในวงจรเซลล์ ซึ่งเชื่อว่ากระบวนการเกิดมะเร็งเซลล์จะต้องผ่านขั้นตอนที่ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมอย่างน้อย 6-10 ขั้นตอนโดยมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญดังนี้<sup>4,5</sup> คือ

1. มีสัญญาณที่กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้เอง (self-sufficiency in growth signal)

การเปลี่ยนแปลงจากสภาวะที่เซลล์ไม่แบ่งตัวไปสู่ระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนซึ่งสภาวะปกติเซลล์ต้องอาศัยสัญญาณจากภายนอกเซลล์มากกระตุ้น แต่ยีนมะเร็งหลายชนิดในเซลล์มะเร็งสามารถกระตุ้นให้เซลล์ทำการแบ่งตัวได้เองโดยไม่ต้องอาศัยสัญญาณกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่จำกัด

2. สูญเสียสัญญาณควบคุมที่ยับยั้งการเจริญแบ่งเซลล์ (insensitivity to growth-inhibitory signal)

เนื้อเยื่อปกติจะมีสัญญาณควบคุมที่ยับยั้งไม่ให้เซลล์แบ่งตัวอย่างผิดปกติเพื่อรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อ โดยสัญญาณดังกล่าวยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยผ่านกลไก 2 แบบ คือ

- 1) เซลล์ถูกทำให้สูญเสียความสามารถในการเจริญงอกขยายโดยผ่านเข้าสู่ระยะพัก ( $G_0$  phase) ชั่วคราว ซึ่งหากเซลล์เหล่านี้ถูกกระตุ้นโดยสัญญาณที่เหมาะสมก็สามารถที่กลับจะเข้าสู่วงจรเซลล์ได้ใหม่
- 2) เซลล์ถูกทำให้สูญเสียความสามารถในการเจริญงอกขยายอย่างถาวร โดยการกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ระยะหลังการแบ่งตัว ซึ่งเซลล์จะสลายไปในที่สุด เซลล์มะเร็งจะสูญเสียกลไกดังกล่าวจึงทำให้การแบ่งเซลล์มีมากกว่าปกติ

3. เซลล์หลุดรอดจากกลไกที่ควบคุมการตาย (evasion of programmed cell death (apoptosis))

เซลล์มะเร็งมีความสามารถหลบหลีกหรือต้านกระบวนการตายปกติของเซลล์ได้ ทำให้มะเร็งมีการเสียสมดุลและมีการเจริญงอกขยายมากกว่าปกติ

4. เซลล์สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด (limitless replication potential)

เซลล์ปกติการแบ่งตัวของเซลล์อยู่ภายใต้การควบคุม โดยจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในระยะที่มีการเจริญเติบโต หลังจากที่ว่าร่างกายเจริญเติบโตเต็มที่แล้วการแบ่งตัวของเซลล์จะเกิดขึ้นเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์เดิมที่ตายในบางอวัยวะเท่านั้น ในขณะที่เซลล์มะเร็งไม่ยอมอยู่ภายใต้การควบคุมการแบ่งตัวตามกลไกของร่างกายมีผลให้เซลล์มีการแบ่งตัวเรื่อยไปโดยไม่หยุดยั้ง

5. มีการงอกของเส้นเลือดเข้าไปเลี้ยงเซลล์ (sustained angiogenesis)

โดยปกติแล้วเมื่อมะเร็งมีการเจริญเติบโตระดับหนึ่งเซลล์มะเร็งมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับสารอาหารและสารอื่นๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นเซลล์มะเร็งจึงมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้มีการสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อแทรกเข้าไปในกลุ่มเซลล์มะเร็งเพื่อการเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้

6. มีคุณสมบัติในการเจริญแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อและแพร่กระจายไปสู่ส่วนอื่นๆของร่างกายได้ (Tissue invasion and metastasis)

เซลล์ปกติมักจะอยู่เป็นที่ ไม่แพร่กระจายไปอวัยวะอื่นแต่เซลล์มะเร็งแตกต่างออกไป คือสามารถจะแทรกตัวไปในระหว่างเนื้อเยื่ออื่น หรือหลุดและแพร่กระจายเพิ่มจำนวนในอวัยวะที่อยู่ห่างไกลโดยผ่านทางหลอดน้ำเหลืองหรือหลอดเลือดและไปเกาะติดกับเนื้อเยื่อแห่งใหม่ แล้วเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้อวัยวะนั้นกลายเป็นมะเร็งได้อีก

### 2.3 ยีนมะเร็งและยีนต้านมะเร็ง (oncogene and tumor suppressor gene)

การเกิดมะเร็งจะต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนในยีนทำให้มีการสะสมความผิดปกติของยีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและมีผลทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมและขาดความเสถียรภาพ(genome instability) โดยความผิดปกติดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับยีน 2 กลุ่ม คือ ยีนมะเร็ง และยีนต้านมะเร็ง

#### 1. ยีนมะเร็ง (oncogene)

ยีนมะเร็ง คือ ยีนที่พบในร่างกายแต่อยู่ในสภาวะสงบซึ่งเรียกว่า proto-oncogene ในกรณีที่ยีนดังกล่าวถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าต่างๆ อาทิ สารก่อมะเร็ง(carcinogen) รังสี(radiation) และไวรัส proto-oncogene จะเปลี่ยนแปลงลักษณะ(transformation) และกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

#### 2. ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene)

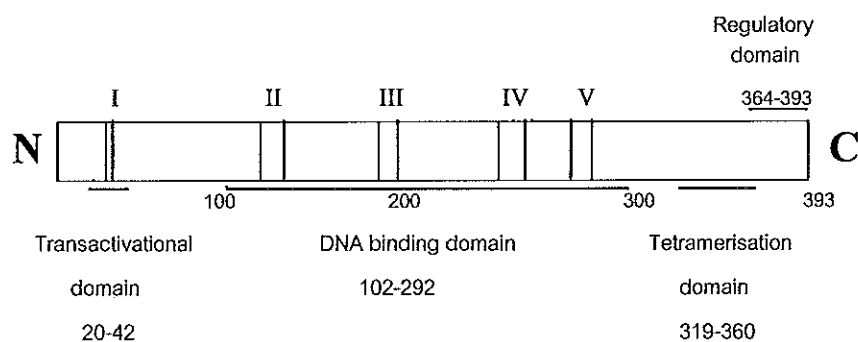
ยีนต้านมะเร็งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญออกขยายของเซลล์ โปรตีนผลผลิตของยีนต้านมะเร็งทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์โดยทำงานในลักษณะที่ตรงข้ามกับกลุ่มของยีนมะเร็ง ดังนั้นหากยีนต้านมะเร็งสูญเสียการทำงานที่ให้มีผลให้การควบคุมการแบ่งเซลล์ในวงจรเซลล์ผิดปกติ ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดยั้งซึ่งเป็นลักษณะของมะเร็ง ในโรคมะเร็งหลายชนิดมักพบยีนที่ผิดปกติอยู่หลายยีน ซึ่งส่วนใหญ่มักจะพบความผิดปกติของยีนมะเร็งควบคู่ไปกับยีนต้านมะเร็ง ทำให้ออกจากกระบวนการกระตุ้นการแบ่งเซลล์จะเพิ่มขึ้นแล้วกระบวนการยับยั้งการแบ่งเซลล์ยังลดลงด้วย ดังนั้นความผิดปกติในยีนทั้งสองชนิดนี้จึงเป็นไปในทิศทางส่งเสริมกันทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ยีนต้านมะเร็ง p53 เป็นยีนต้านมะเร็งที่พบความผิดปกติได้บ่อยในมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์ รวมทั้งมะเร็งของสัตว์และลำคอ<sup>7,8</sup> โดยพบความผิดปกติของยีนดังกล่าวได้มากถึงครึ่งหนึ่ง

## 2.4 ยีนต้านมะเร็ง p53

การศึกษาในมนุษย์พบว่ายีน p53 อยู่ในโครโมโซม 17 ที่ตำแหน่ง 17p13.1<sup>9</sup> มีความยาว 20 กิโลเบส(kb) ประกอบด้วย 11 exon ซึ่ง exon แรกไม่สามารถถอดรหัสได้ โดยยีน p53 ถอดรหัสได้ mRNA ขนาด 2.8-3.0 กิโลเบสซึ่งจะถูก translate เป็นโปรตีน p53

### 2.4.1 โปรตีน p53

ปลายทศวรรษที่ 70 มีการค้นพบโปรตีน p53 ก่อนจะพบยีน p53 ในเวลาต่อมา โปรตีน p53 เป็นโปรตีนประเภทนิวเคลียสฟอสโฟโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์มีน้ำหนักโมเลกุล 53 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยบริเวณที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน 4 ตำแหน่งดังอธิบายในรูปที่ 2 โปรตีน p53 มีกรดอะมิโนจำนวน 393 ตัว<sup>10</sup> กรดอะมิโนลำดับที่ 20-42 มีบทบาทในการส่งเสริมการถอดรหัส DNA (transactivation) ส่วนกรดอะมิโนลำดับที่ 102-292 เป็นส่วนที่ใช้จับกับ DNA (DNA binding domain) กรดอะมิโนลำดับที่ 319-360 เป็นส่วนที่ใช้จับกับตัวมันเอง (tetramerisation domain) และกรดอะมิโนลำดับที่ 364-393 ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน (regulatory domain) ในสภาวะปกติ โปรตีน p53 ทำหน้าที่เสมือนยาม (guardian of genome)<sup>11</sup> ที่คอยเฝ้าระวังไม่ให้เกิดเหตุร้ายขึ้นกับเซลล์ โดยปกติโปรตีน p53 จะมีครึ่งชีวิตสั้นเพียง 6 ถึง 20 นาที<sup>12</sup> แต่ถ้ายีน p53 มีการกลายพันธุ์จะมีผลให้สร้างโปรตีน p53 ที่มีโครงสร้างเปลี่ยนไป ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ปกติได้รวมทั้งถูกทำลายได้ ซ้ำลงจึงทำให้โปรตีน p53 ที่ผิดปกตินี้มีความเสถียรมากขึ้นและครึ่งชีวิตยาวนานถึง 6-8 ชั่วโมง<sup>13</sup> จึงมีปริมาณสะสมในเซลล์มากพอที่จะตรวจจสอบได้ด้วยวิธีอิมมูโนเคมีสตรี้

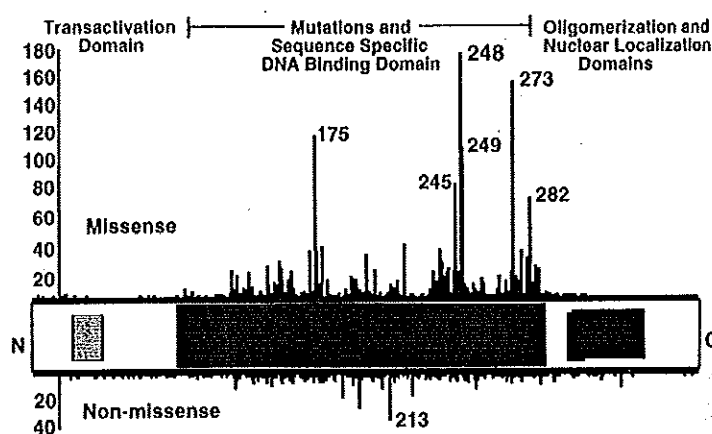


รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน p53 ประกอบด้วยตำแหน่งที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน 4 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ทำหน้าที่กระตุ้นหรือกวดการทำงานของยีนเป้าหมาย (transactivation domain) ตำแหน่งที่ทำหน้าที่จับจำเพาะยีนเป้าหมาย (DNA binding domain) ตำแหน่งที่ใช้จับกับตัวเอง (tetramerisation domain) และตำแหน่งที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน<sup>14</sup>



## 2.4.2 การผ่าเหล่าในยีน p53

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความผิดปกติของโปรตีน p53 ที่พบในมะเร็งนั้นมากกว่าร้อยละ 90 เป็นความผิดปกติอันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของเบสหนึ่งตำแหน่ง (missense mutation) ซึ่งมีผลให้กรดอะมิโนที่สร้างขึ้นเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม<sup>15</sup> Boyle และคณะ<sup>16</sup> รายงานว่าพบการเปลี่ยนแปลงของเบสหนึ่งตำแหน่งในยีน p53 ในมะเร็งชนิดสแควมัสของศีรษะและลำคอถึงร้อยละ 72 ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าความผิดปกติดังกล่าวจะพบอยู่ระหว่าง exon ที่ 5 และ 9 ของยีน p53 โดยตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงได้บ่อยที่สุด คือ ตำแหน่ง codon ที่ 175, 245, 248, 249, 273 และ 282<sup>17</sup> (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 โครงสร้างของยีน p53 ตำแหน่งที่พบเกิดการผ่าเหล่า<sup>17</sup>

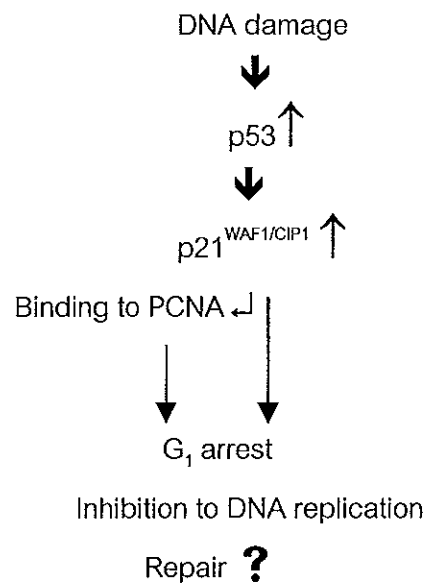
## 2.4.3 บทบาทหน้าที่ของยีน p53

ยีน p53 เป็นยีนด้านมะเร็งที่มีบทบาทในวงจรเซลล์ในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์โดยทำหน้าที่ผ่านการทำงานของยีนหลายชนิด โดยมีบทบาทที่สำคัญอย่างน้อย 2 บทบาท คือ

1. โปรตีน p53 ทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวในระยะ G<sub>1</sub> ก่อนเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA
2. โปรตีน p53 ควบคุมการตายของเซลล์ในภาวะที่เซลล์ถูกกำหนดให้ตาย (programmed cell death หรือ apoptosis)

#### 2.4.4 การแบ่งตัวในระยะ $G_1$ เข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA ในวงจรเซลล์โดยการควบคุมของโปรตีน p53

เมื่อเกิดความเสียหายขึ้นกับ DNA เซลล์จะตอบสนองโดยชะลอการแบ่งตัวในวงจรเซลล์ ซึ่งเชื่อว่าเป็นเพื่อให้เซลล์มีเวลาในการซ่อมแซม DNA ก่อนที่เซลล์จะเริ่มการสังเคราะห์ DNA หรือเริ่มแบ่งตัว เพื่อให้เซลล์ถูกมีข้อมูลพันธุกรรมเหมือนเซลล์เดิม แต่ถ้าหากเซลล์ไม่สามารถจะทำการซ่อมแซมความผิดปกติก่อนที่เซลล์จะเริ่มสังเคราะห์ DNA หรือเริ่มแบ่งตัวจะก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้น และหากความผิดปกติดำเนินต่อไปจนทำให้เซลล์มีความผิดปกติมากเกินไปที่จะได้รับการแก้ไข เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงได้ 2 ทาง คือเปลี่ยนแปลงลักษณะไปเป็นเซลล์มะเร็ง ในกรณีนี้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจะต้องเอื้ออำนวยต่อการเจริญแบบผิดปกติ หรืออีกทางหนึ่งคือกระตุ้นให้เซลล์ที่ผิดปกติตายไปโดยอาศัยกลไกตามธรรมชาติ(programmed cell death) ซึ่งมีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนซึ่งสร้างจากยีน p53 มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่คอยตรวจสอบการทำงานของเซลล์ในวงจรเซลล์ในระยะ  $G_1$ <sup>18,19</sup> ก่อนเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA โดยหากเกิดความผิดปกติต่อ DNA ของเซลล์ เซลล์จะมีการตรวจสอบความผิดปกติดังกล่าวและทำการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนหลายชนิดรวมทั้ง p53 เพื่อซ่อมแซม DNA โปรตีน p53 จะทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในวงจรเซลล์ที่ระยะ  $G_1$  เพื่อให้เซลล์มีการซ่อมแซม DNA ก่อนเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA โดยโปรตีน p53 จะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ซึ่งจะสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่จับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอมเพล็กซ์ cyclin-dependent kinase(CDK) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์ยังอยู่ในระยะ  $G_1$  ตามเดิม เซลล์จึงมีเวลาในการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นก่อนที่จะแบ่งตัวต่อไป สรุปได้ว่าเมื่อปริมาณของโปรตีน p53 เพิ่มขึ้นจะทำให้โปรตีน p21 เพิ่มตามมา ซึ่งจะเอื้ออำนวยให้เซลล์มีการซ่อมแซม DNA พร้อมทั้งกับการที่เซลล์ถูกหยุดให้อยู่ในระยะ  $G_1$ (รูปที่ 4) ดังนั้นหากเกิดความผิดปกติของโปรตีน p53 จะทำให้ไม่มีการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ที่ได้รับความเสียหาย ทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติสามารถผ่านเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA เปิดโอกาสให้มีการสะสมความผิดปกติมากขึ้น เป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดมะเร็ง



รูปที่ 4 บทบาทของโปรตีน p53 ในการควบคุมการทำงานของโปรตีน p21(ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 17)

## 2.5 ยีน $p21^{WAF1/CIP1}$

ยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  เป็นยีนต้านมะเร็งที่อยู่ในโครโมโซมที่ 6 ตำแหน่ง 6p21.2 จะถูกกระตุ้นโดยโปรตีน p53 ในสถานะที่ DNA ได้รับความเสียหาย<sup>20</sup> อย่างไรก็ตาม  $p21^{WAF1/CIP1}$  อาจทำงานได้โดยไม่ต้องอาศัย p53<sup>21, 22</sup>

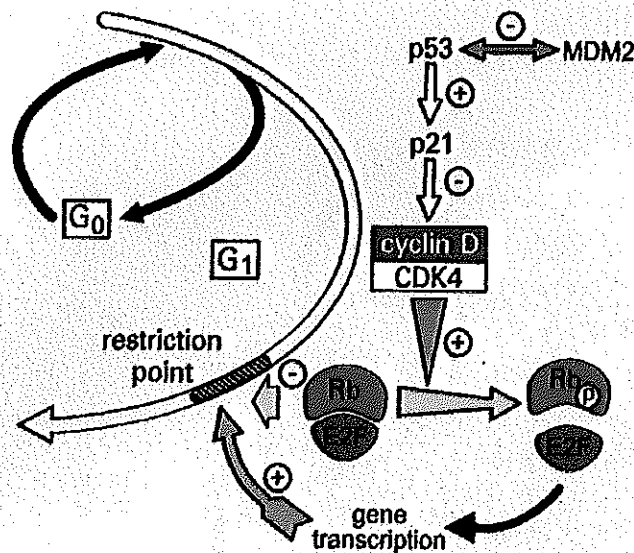
### 2.5.1 โปรตีน p21

โปรตีน p21 มีน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน สังเคราะห์โดยยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  โดยจะมีการสังเคราะห์โปรตีน p21 ขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งเพื่อหยุดยั้งเซลล์ในระยะ G<sub>1</sub> ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA โปรตีน p21 ทำงานทั้งโดยการควบคุมผ่านทางโปรตีน p53 และโดยการกระตุ้นผ่านกลไกอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน p53 โดยเชื่อว่าผลจากการทำหน้าที่ของโปรตีน p21 จะเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพและการแก่ตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งรวมทั้งการควบคุมและเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย โดยการทำหน้าที่ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับโปรตีน p53 และโปรตีน retinoblastoma(pRb)

## 2.5.2 บทบาทของโปรตีน p21 กับการหยุดการแบ่งตัวในวงจรเซลล์

การแสดงออกมากเกินไป(overexpression)ของโปรตีน p21 จะทำให้การแบ่งตัวในวงจรเซลล์หยุด<sup>18,19</sup> โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดที่ระยะ  $G_0$ -  $G_1$  ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีน p21 มีความสำคัญในการยับยั้งการผ่านเข้าสู่จุดตรวจจสอบในระยะ  $G_1$  ของวงจรเซลล์โดยทำหน้าที่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นทั้งจากภายนอกและภายในเซลล์

โปรตีน p21 ทำงานโดยไปยับยั้งการทำหน้าที่ของ CDK โดยเฉพาะ CDK4 และ CDK6 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ โปรตีน p21 ทำงานในนิวเคลียสโดยจะรวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ cyclin, CDK และ proliferating cell nuclear antigen(PCNA) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้มีความจำเป็นในการควบคุมการแบ่งเซลล์ โดยเมื่อเอนไซม์ CDK ถูกจับด้วยโปรตีน p21 ทำให้การทำงานของ CDK ถูกยับยั้ง และไม่สามารถเติมฟอสเฟตให้แก่โปรตีน pRb ทำให้ pRb อยู่ในสภาวะ inactivation และยังจับอยู่กับ E2F ซึ่งเป็น transcription factor จึงไม่มีการปลดปล่อย E2F ที่จะไปกระตุ้นการ transcription ยีนที่เกี่ยวข้องในการผลักดันเซลล์ให้เคลื่อนไปในระยะอื่นๆต่อไป จึงทำให้เซลล์ถูกยับยั้งอยู่ที่ระยะ  $G_1$  จนกว่าจะมีการซ่อมแซม DNA ที่เสียหายให้ถูกต้องตามเดิม(รูปที่ 5)



รูปที่ 5 บทบาทของโปรตีน p21 ในการหยุดการแบ่งตัวในวงจรเซลล์<sup>23</sup>

### 2.5.3 บทบาทของโปรตีน p21 ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์

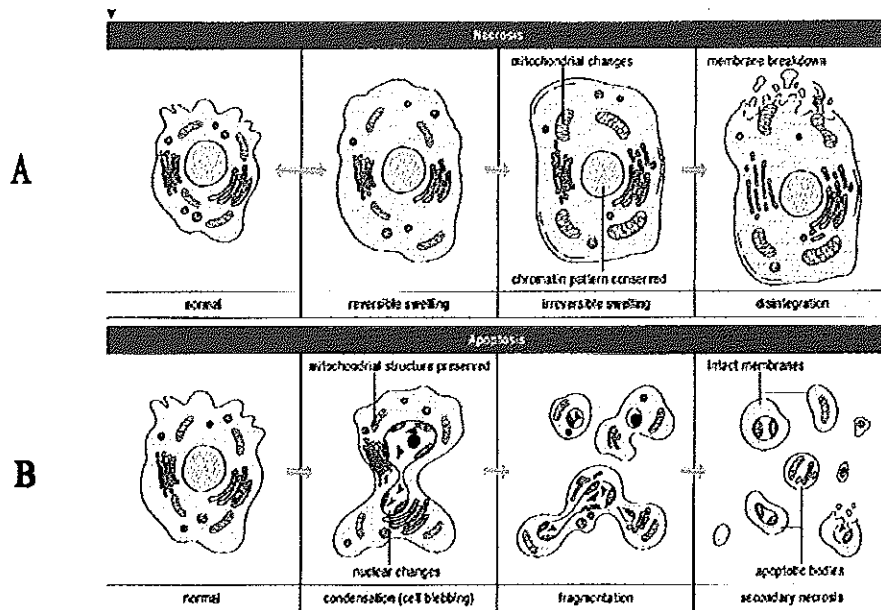
โดยทั่วไปสามารถพบการสะสมของโปรตีน p21 ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของเยื่อเมือก โดยพบการสะสมของโปรตีน p21 ในชั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพของมะเร็งศีรษะและลำคอซึ่งได้แก่ชั้นเนื้อฐานและชั้นผิว<sup>10</sup> จากการศึกษาอะเรย์กลองเสียง Nadal และคณะ<sup>24</sup> รายงานว่าการสะสมของโปรตีน p21 สัมพันธ์กับระดับการเปลี่ยนแปลงสภาพของมะเร็ง โดยพบว่าเซลล์ที่มี differentiation ระดับต่ำมีการติดสีของโปรตีน p21 น้อย ในขณะที่เซลล์มะเร็งที่มี differentiation สูง จะพบการสะสมของโปรตีน p21 มาก

## 2.6 การตายของเซลล์

การตายของเซลล์เป็นกลไกหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของเซลล์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์มีปริมาณมากเกินไปจนเสียสมดุล โดยจะมีการทำงานตรงข้ามกันระหว่างกลไกที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ตายและกลไกที่ส่งเสริมให้เซลล์ตายเพื่อคงขนาดของเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาวะสมดุล การตายของเซลล์แบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ<sup>25-27</sup>

1) การตายแบบเนโครซิส(necrosis) เป็นการตายของเซลล์ที่เกิดจากพยาธิสภาพ โดยสาเหตุอาจเกิดจากเซลล์ได้รับอันตรายหรือขาดเลือดไปเลี้ยง เป็นต้น การตายในรูปแบบนี้เป็นการตายแบบ passive ของเซลล์ ลักษณะของเซลล์ที่ตาย คือ ออแกเนลล์(organelle)ต่างๆ ในเซลล์จะบวม โครมาติน(chromatin)จะรวมตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ มีการสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส และส่วนประกอบภายในเซลล์รวมทั้งเอนไซม์ proteases และ lysozymes ทำให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบ หลังจากนั้นเซลล์จะถูกกลืนกินโดยเม็ดเลือดขาว การตายของเซลล์ในลักษณะนี้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยังคงอยู่รวมกันจนกระทั่งเซลล์ถูกกลืนกินโดยเม็ดเลือดขาว (รูปที่ 6A)

2) การตายที่เซลล์ถูกกำหนดให้ตาย(programmed cell death หรือ apoptosis) เป็นการตายตามธรรมชาติของเซลล์เพื่อกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ เพื่อป้องกันสิ่งมีชีวิตจากความผิดปกติใน DNA โดยลักษณะของเซลล์ที่ตายจะเริ่มจากนิวเคลียสของเซลล์จะรวมตัวกัน ต่อจากนั้นนิวเคลียสจะถูกย่อยเป็นส่วนๆ ซึ่งประกอบด้วย nucleic acid ประมาณ 300 base และมีเยื่อหุ้มเซลล์มาล้อมรอบ ทำให้เกิดลักษณะที่เรียก apoptotic bodies ซึ่งต่อมา apoptotic bodies จะถูกทำลายหรือกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ใกล้เคียงภายในเวลาหนึ่งชั่วโมง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นโดยไม่อาศัย lysozyme จึงทำให้การตายในลักษณะนี้ไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในเนื้อเยื่อ (รูปที่ 6B)



รูปที่ 6 การตายแบบเนโครซิส(necrosis, A) และการตายที่เซลล์ถูกกำหนดให้ตาย(apoptosis, B)

### 2.6.1 การตายของเซลล์ที่ควบคุมโดยโปรตีน p53

โปรตีน p53 มีบทบาทในการกระตุ้นให้เซลล์ตาย คือ หาก DNA ได้รับความเสียหายมากจนไม่สามารถที่จะซ่อมแซมได้ โปรตีน p53 จะกระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวเข้าสู่โปรแกรมการตาย ดังนั้นหากยีน p53 ผิดปกติจะทำให้เซลล์ที่มี DNA ผิดปกติเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA เกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ผิดปกติ การทำงานของโปรตีน p53 ในการทำให้เซลล์ตายโดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ตาย และเพิ่มการทำงานของโปรตีน bax ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มเดียวกับ bcl-2 แต่ทำหน้าที่ตรงกันข้ามคือ โปรตีน bax ทำหน้าที่ส่งเสริมการตายของเซลล์ ซึ่งการควบคุมให้เซลล์ตายจะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างโปรตีน bcl-2:bax โดยหากมีการสร้าง bax มากกว่า bcl-2 เซลล์ก็จะเข้าสู่สภาวะการตาย ดังนั้นจึงมีการใช้อัตราส่วนระหว่างโปรตีน bcl-2:bax ในการวัดการตายของเซลล์<sup>28, 29</sup>

### 2.6.2 ยีน bcl-2

ยีน bcl-2 เป็นชื่อของ B-cell lymphoma/leukemia-2 gene<sup>30</sup> ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซม 18 ในตำแหน่ง 18q21.3<sup>27,31</sup> ประกอบด้วย 3 exon โดย exon แรกไม่สามารถถอดรหัสได้ ยีน bcl-2 จัดอยู่ในประเภทยีนมะเร็ง<sup>32</sup> ที่ค้นพบครั้งแรกใน ค.ศ.1984 โดยพบการเปลี่ยนตำแหน่ง

(translocation)ของยีนระหว่างโครโมโซม 14 และ 18 (t(14;18):q32;q21) ใน B cell leukemia และ non-Hodgkin's follicular lymphoma ผลจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งจากโครโมโซม 18q21 ไปยังโครโมโซม 14q32 ทำให้การสร้างโปรตีนภายใต้การควบคุมของยีน 14q32<sup>33,34</sup> มีความผิดปกติ ในปัจจุบันเชื่อว่าการแสดงออกของยีน *bcl-2* จะส่งผลให้เซลล์มีชีวิตนานขึ้นและกลุ่มของยีนที่มีลำดับของ base ที่ homology กับยีน *bcl-2* จะถูกรวมเรียกว่า "*bcl-2* gene family" ซึ่งยีนกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์โดยมีลักษณะการทำงานที่ตรงกันข้าม(counterpart) ซึ่งสามารถแบ่งยีนในกลุ่มนี้ออกตามการทำหน้าที่ได้เป็น 2 ประเภท<sup>31</sup>

1. กลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ตาย ยีนในกลุ่มนี้ได้แก่ *bcl-2*, *Bcl-XL*, และ *MCL-1* เป็นต้น
2. กลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่ส่งเสริมให้เซลล์ตาย ได้แก่ *Bax*, *Bcl-Xs*, *Bak* และ *Bad* เป็นต้น

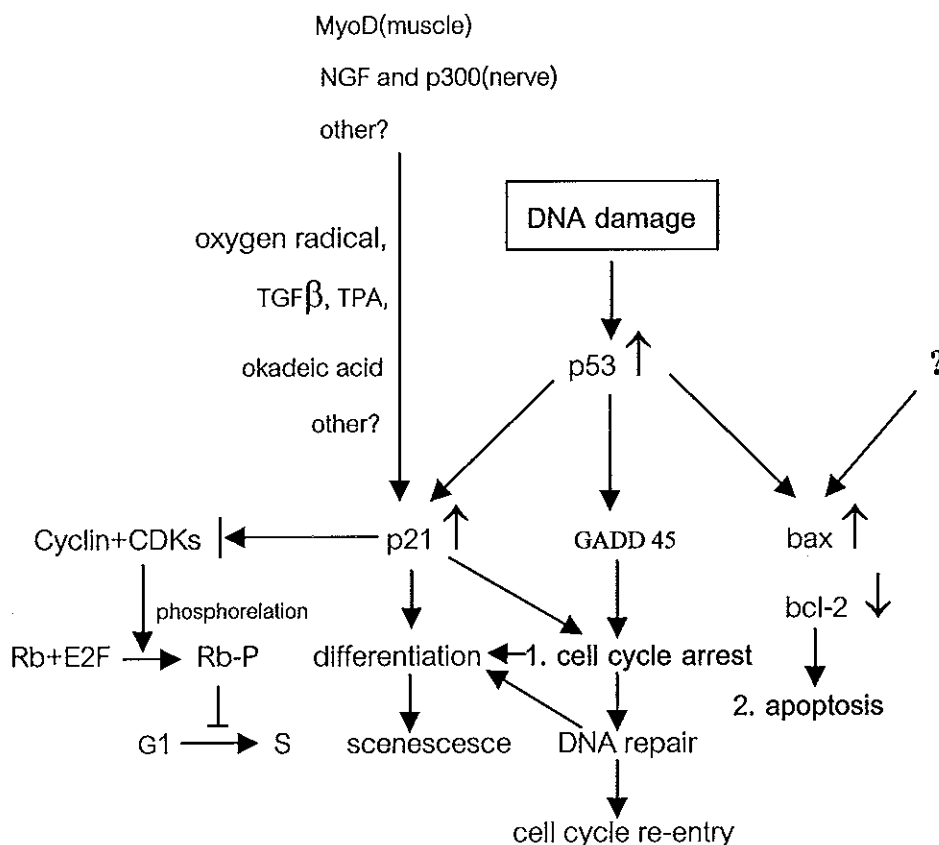
### 2.6.3 โปรตีน *bcl-2*

โปรตีน *bcl-2* มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ในการยับยั้งการตายของเซลล์ ความผิดปกติของโปรตีน *bcl-2* จะทำให้เซลล์มีชีวิตนานขึ้น โดยสามารถศึกษาการสะสมของโปรตีน *bcl-2* ได้โดยวิธีทางอิมมูโนเคมีสตรี้ซึ่งจะพบการติดสีในไซโตพลาสซึม การศึกษาในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสพบว่าการแสดงออกของโปรตีน *bcl-2* มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา<sup>35</sup>

### 2.6.4 โปรตีน *bax*

โปรตีน *bax* เป็นชื่อย่อของ *bcl-2* antagonist-X มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ส่งเสริมให้เซลล์ตาย โดยการทำหน้าที่ของโปรตีน *bax* ถูกควบคุมโดยโปรตีน *p53*<sup>36</sup> โดย Ito และคณะ<sup>37</sup> พบว่ามะเร็งช่องปากชนิด poor differentiation และมีการแสดงออกของโปรตีน *bax* ที่น้อยกว่าปกติจะมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

จากที่กล่าวมาแล้วสรุปได้ว่าในเซลล์ปกติยีน *p53* จะทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็งที่คอยป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายขึ้นกับเซลล์ กล่าวคือเมื่อ DNA ได้รับความเสียหายยีน *p53* จะสร้างโปรตีน *p53* เพิ่มขึ้นเพื่อไปทำหน้าที่ส่งเสริมการถอดรหัสของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องในการทำงานในวงจรเซลล์โดยบทบาทที่สำคัญ คือ หยุดการดำเนินไปในวงจรเซลล์เพื่อให้เซลล์มีเวลาซ่อมแซม DNA ที่เสียหายหรือกระตุ้นให้เซลล์ตาย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีน *p53* มีบทบาทสำคัญในวงจรเซลล์ทั้งที่ควบคุมโดยตรงและควบคุมโปรตีนอื่นเพื่อให้วงจรเซลล์ทำงานได้ปกติ(รูปที่ 7) ดังนั้นหากโปรตีน *p53* สูญเสียการทำหน้าที่จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติในสารพันธุกรรมและเป็นสาเหตุนำไปสู่มะเร็งในที่สุด



รูปที่ 7 บทบาทของโปรตีน p53 ในการหยุดวงจรเซลล์และกระตุ้นการตายของเซลล์โดยการควบคุมผ่านการทำงานของโปรตีน p21, bax และ bcl-2 (← แทน การยับยั้ง, ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 37)

## 2.7 การเจริญงอกขยาย

การเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นกลไกพื้นฐานหนึ่งของเซลล์ในการที่จะคงสภาพเนื้อเยื่อและขนาดของอวัยวะต่างๆให้อยู่ในภาวะสมดุล หากเซลล์มีอัตราการเจริญงอกขยายมากเนื้อเยื่อจะเสียสมดุลและเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดมะเร็ง การเจริญงอกขยายของเซลล์เป็นอัตราส่วนของเซลล์ที่เข้าสู่วงจรเซลล์ต่อจำนวนของเซลล์ทั้งหมด<sup>39,40</sup> ซึ่งสัดส่วนที่มีการเจริญงอกขยายในเซลล์มะเร็งจะแสดงถึงพฤติกรรมของมะเร็ง ดังนั้นการเจริญงอกขยายจึงเป็นเครื่องมืออย่างหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความผิดปกติของมะเร็ง และอาจจะช่วยในการพยากรณ์โรคมะเร็ง การวัดการเจริญงอกขยายของเซลล์มะเร็งในทางจุลพยาธิวิทยาสามารถทำได้หลายวิธี ในทางทฤษฎีเครื่องมือที่เป็นตัวชี้วัดการเจริญงอกขยายของเซลล์ที่ดีจะต้องประเมินการแบ่งเซลล์ได้ถูกต้อง ทำได้ง่าย ทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม(reproducibility)



วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อที่จะศึกษาไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายไม่แพง และใช้ได้กับชิ้นเนื้อแช่แข็ง(frozen section) เนื้อเยื่อที่เก็บในน้ำยารักษาสภาพ และเซลล์จากการเพาะเลี้ยง<sup>39,41</sup> ในปัจจุบันการวัดการเจริญงอกขยายทำได้หลายวิธี<sup>41</sup>

### 1. การนับการแบ่งตัวของเซลล์

ขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัวในวงจรเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงในนิวเคลียส ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวของวงจรเซลล์ที่โครโมโซมมีรูปร่างที่สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การนับจำนวนของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นการวัดวิธีหนึ่งที่ใช้ในการประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่เนื่องจากการจำแนกเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวทำได้ค่อนข้างยาก และโดยปกติจะทำการนับเฉพาะเซลล์ที่เห็นได้ชัดเจนว่ามีการแบ่งตัว ส่วนเซลล์ที่สงสัยว่าจะมีการแบ่งตัวจะถูกตัดออกไปซึ่งทำให้ค่าที่ได้จากการวัดวิธีนี้อาจจะต่ำกว่าความเป็นจริง แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเนื่องจากประหยัดค่าใช้จ่าย การเตรียมชิ้นเนื้อที่จะทำการศึกษาไม่ยุ่งยาก ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา

### 2. การวัดปริมาณ DNA

การวัดปริมาณ DNA เป็นการวิเคราะห์การเจริญงอกขยายของเซลล์ในระยะการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเพิ่มสารพันธุกรรมเป็นสองเท่า(tetraploid genome) ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะการแบ่งตัว ดังนั้นจึงสามารถวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้โดยวัดจากปริมาณ DNA ซึ่งวิธีที่ใช้ในการวัดมีหลายวิธี เช่น การติดฉลากไทมิดีน(thymidine labelling), Bromodeoxyuridine incorporation, flow cytometry เป็นต้น

### 3. การตรวจสอบโดยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี้

การวัดการเจริญงอกขยายของเซลล์โดยวัดจากวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี้เป็นอีกวิธีที่มีการนำมาใช้ โดยวิธีการดังกล่าวอาศัยหลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญงอกขยายของเซลล์ อาทิ Ki-67 และ PCNA กับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถใช้แอนติบอดีที่สัมพันธ์กับระยะต่างๆของแอนติเจนในวงจรเซลล์ได้และเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซึ่งแอนติบอดีที่ใช้ในการวัดด้วยวิธีนี้มีอยู่หลายชนิด

#### 2.7.1 แอนติบอดี Ki-67

โมโนโคลนอล(monoclonal)แอนติบอดี Ki-67 เป็นแอนติบอดีต้นแบบ(prototype) โดยจะจับกับแอนติเจนในนิวเคลียสของเซลล์ที่มีการเจริญงอกขยาย<sup>42</sup> จึงสามารถใช้แอนติบอดี Ki-67 วัดเซลล์ที่มีการเจริญงอกขยายได้ในเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็ง แอนติเจน Ki-67 สร้างโดยยีนที่อยู่ในโครโมโซม

10(10q25) ซึ่งจะสร้างโปรตีนในนิวเคลียสขนาด 345 และ 395 กิโลดาลตัน<sup>43</sup> โปรตีนจะถูกสร้างขึ้นในเซลล์ที่มีการเจริญงอกขยายเกือบทุกระยะ ยกเว้นระยะ  $G_0$ <sup>42</sup> คือแสดงออกทั้งในระยะ  $G_1$  และ  $G_2$  ระยะสังเคราะห์ DNA และระยะแบ่งเซลล์ หลังจากนั้น Ki-67 จะสลายไป โดยแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่นิวเคลียสของเซลล์ที่มีการเจริญงอกขยาย แต่ข้อจำกัดของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลนี้ คือ ใช้ได้เฉพาะกับเนื้อเยื่อที่เตรียมใหม่ๆ หรือชิ้นเนื้อแช่แข็ง(frozen section) เนื่องจาก epitope จะถูกทำลายในขั้นตอนการเก็บชิ้นเนื้อ ซึ่งต่อมาก็ได้มีการพัฒนาแอนติบอดีตัวใหม่ขึ้นมา คือ แอนติบอดี Ki-67 ชนิดโพลีโคลนอล(polyclonal) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ใช้กับชิ้นเนื้อที่เตรียมโดยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาและสามารถเป็นตัวชี้วัดการเจริญงอกขยายของเซลล์ได้ดี ถึงแม้จะมีบางรายงานกล่าวว่า การวัดการเจริญงอกขยายโดยใช้แอนติบอดี Ki-67 อาจเปลี่ยนไปตามชนิดของแอนติบอดีที่ใช้ อย่างไรก็ตามการใช้ Ki-67 เป็นตัวชี้วัดการเจริญงอกขยายของเซลล์ยังเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้องและยอมรับกันโดยทั่วไป<sup>40,44</sup>

### 3 วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน p53 p21 bax bcl-2 และ Ki-67 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเตรียและหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเหล่านั้น
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง p53 p21 bax bcl-2 และ Ki-67 กับระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

#### 1. วัสดุ

##### สารเคมีทั่วไป

	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
3-amino-9-ethyl-carbazole	Sigma
Citric acid	Merck
Chloral hydrate	Fluka
Hematoxylin	Merck
N, N dimethyl formamide	Fluka
Poly-L-Lysine solution	Sigma
Potassium alum	Fluka
di-Sodium hydrogen phosphate	Merck
Sodium dihydrogen phosphate dihydrate	Fluka
Sodium chloride	Carlo erba reagenti
Sodium hydroxide	Merck
Sodium iodate	Merck

##### แอนติบอดี

	บริษัทผู้ผลิต
Ki-67	Zymed
p53-12	Zymed
bcl-2	Novocastra
p21	Santa Cruz Biotechnology
bax	Santa Cruz Biotechnology

##### ชุดน้ำยาย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

	บริษัทผู้ผลิต
Goat serum	Sigma
Biotinylate goat anti mouse, rabbit guinea pig immunoglobulin	Zymed
Mounting media	Zymed

## 2. อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Nikon)
2. เตอบไมโครเวฟ (Turbora รุ่น TRX 1440)
3. เครื่องกวน (Magnetic stirrer, Ehret)
4. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น MC210S)
5. ตู้เย็น
6. เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)
7. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter, Orion รุ่น EA920)

## 3. วิธีการ

### 3.1 กลุ่มตัวอย่าง

การออกแบบวิจัยนี้เป็น retrospective study โดยศึกษาจากชิ้นเนื้อในพาราฟินของผู้ป่วยที่ได้จากกลุ่มงานพยาธิกายวิภาค โรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระหว่าง พ.ศ. 2542-2543 โดยเลือกชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์ว่าเป็นมะเร็งของศีรษะและลำคอ และไม่เคยมีประวัติในการทำรังสีหรือเคมีบำบัดจำนวนทั้งสิ้น 52 ราย ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 5 ไมครอน จำนวน 6 ชิ้นติดกัน แล้วนำชิ้นที่ 1 มาย้อมด้วยฮีมาโตไซลีน(hematoxylin)และอีโอซิน (eosin) ส่วนชิ้นเนื้อที่เหลือนำมาย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ด้วยวิธี streptavidin-biotin complex โดยใช้ Histostain-SP(Streptavidin-Peroxidase) immunological staining kits ของบริษัท Zymed laboratories Inc. ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดของขั้นตอนต่างๆ ต่อไป

### 3.2 การจัดระดับความรุนแรง(grading)ของมะเร็งโดยอาศัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ทำการจัดระดับความรุนแรงของมะเร็งโดยพิจารณาจากลักษณะจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ของชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยฮีมาโตไซลีนและอีโอซินภายใต้กำลังขยาย 200 เท่าโดยเลือกบริเวณที่มีการรุกรานของมะเร็งมากที่สุด(deep invasive margin)<sup>45,46</sup> ซึ่งในการจัดระดับความรุนแรงของมะเร็งนั้นอาศัยเกณฑ์ตามลักษณะของเซลล์มะเร็งและความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งกับเนื้อเยื่อยึดติด(connective tissue) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากนั้นให้คะแนนของแต่ละเกณฑ์ โดยในการศึกษานี้ไม่นำคะแนนที่ได้จากจำนวน mitoses เนื้อชิ้นฐานมารวม(เกณฑ์ที่ 1.3 ในตารางที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากมีข้อเสนอนี้เกี่ยวกับปัญหาความเที่ยงตรง(validity)ของการนับอันเนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่าง อาทิ ความไม่เป็นเอกพันธ์ของมะเร็ง(tumor heterogeneity) ความหลากหลายในขนาดของพื้นที่ภายใต้กำลังขยายขนาดสูง(high power field)ของกล้องจุลทรรศน์ในแต่ละบริษัท อย่างไรก็ตามการวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าในกรณีที่ไม่นำเกณฑ์ดังกล่าวมาพิจารณาจะทำให้มีความแม่นยำในการจำแนกระดับความรุนแรงของมะเร็งเพิ่มขึ้น<sup>47</sup>

ตารางที่ 1 เกณฑ์การแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็งศีรษะและลำคอ

เกณฑ์(ภายใต้กำลังขยายที่ 200x)	คะแนน
<p>1. ลักษณะของเซลล์มะเร็ง</p> <p>1.1 ระดับการสร้าง keratin (degree of keratinization)</p>	<p>1 = มีเซลล์ที่สร้าง keratin มากกว่า 50% ของเซลล์ทั้งหมด</p> <p>2 = มีเซลล์ที่สร้าง keratin ประมาณ 20-50% ของเซลล์ทั้งหมด</p> <p>3 = มีเซลล์ที่สร้าง keratin ประมาณ 5-20% ของเซลล์ทั้งหมด</p> <p>4 = มีเซลล์ที่สร้าง keratin น้อยกว่า 5% ของเซลล์ทั้งหมด</p>
<p>1.2 ความผิดปกติของนิวเคลียส (nuclear polymorphism)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- นิวเคลียสมีขนาดใหญ่โตขึ้น</li> <li>- รูปร่างผิดปกติ</li> <li>- โครมาตินติดสีไม่สม่ำเสมอ</li> <li>- อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาสซึมเพิ่มขึ้น</li> </ul>	<p>1 = มีเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติน้อยกว่า 25% ของเซลล์ทั้งหมด</p> <p>2 = มีเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติประมาณ 25-50% ของเซลล์ทั้งหมด</p> <p>3 = มีเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติประมาณ 50-75% ของเซลล์ทั้งหมด</p> <p>4 = มีเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติมากกว่า 75% ของเซลล์ทั้งหมด</p>
<p>1.3 จำนวนเซลล์ในชั้นเนื้อฐานและชั้นผิวที่มี mitoses โดยศึกษาภายใต้กำลังขยาย 400x</p>	<p>1 = พบจำนวน 0-1 เซลล์</p> <p>2 = พบจำนวน 2-3 เซลล์</p> <p>3 = พบจำนวน 4-5 เซลล์</p> <p>4 = พบจำนวนมากกว่า 5 เซลล์</p>
<p>2. ความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งกับเนื้อเยื่อยึดต่อ</p> <p>2.1 รูปแบบการรุกรานของมะเร็ง (pattern of invasion) จากชั้นเยื่อบุผิวเข้าไปในเนื้อเยื่อยึดต่อ</p>	<p>1 = ไม่มีการรุกรานของมะเร็งเข้าไปในเนื้อเยื่อยึดต่อ</p> <p>2 = ลักษณะการรุกรานของมะเร็งเป็นสายหรือแถบ</p> <p>3 = ลักษณะการรุกรานของมะเร็งเป็นกลุ่มๆ โดยมีจำนวนเซลล์มะเร็งในแต่ละกลุ่มมากกว่า 15 เซลล์</p> <p>4 = ลักษณะการรุกรานของมะเร็งเป็นกลุ่มๆ โดยมีจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มน้อยกว่า 15 เซลล์และ/ หรือกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ</p>
<p>2.2 จำนวนลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์ (lymphoplasmocytic infiltration)</p>	<p>1 = มีลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์มาก</p> <p>2 = มีลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์ปานกลาง</p> <p>3 = มีลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์เล็กน้อย</p> <p>4 = ไม่พบลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์</p>

จากนั้นรวมคะแนนที่ได้ในแต่ละเกณฑ์เป็นดัชนีที่ใช้ระบุความรุนแรงของมะเร็งโดยแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

คะแนน 4-8 คือ มะเร็งที่มีความรุนแรงต่ำสุด(well differentiation)

คะแนน 9-12 คือ มะเร็งที่มีความรุนแรงปานกลาง(moderate differentiation)

คะแนน 13-16 คือ มะเร็งที่มีความรุนแรงมาก(poor differentiation)

### 3.3 การย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี

นำเนื้อเยื่อชิ้นที่ 2-6 มาย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี ตามลำดับขั้นตอนดังนี้

#### 1. การละลายชิ้นฝังพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ

นำสไลด์เข้าเครื่องทำความร้อนที่ตั้งอุณหภูมิไว้สูงกว่าจุดหลอมเหลวของชิ้นฝังพาราฟิน ในที่นี้ใช้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อละลายชิ้นฝังพาราฟิน หลังจากนั้นนำสไลด์ออกมาจากเครื่องทำความร้อน ปล่อยให้เย็นให้เย็นเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วปล่อยให้ละลายชิ้นฝังพาราฟินด้วยสารละลายไซลีน(xylene) 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที เพื่อละลายชิ้นฝังพาราฟินที่เหลืออยู่ในชิ้นเนื้อออกให้หมด เนื่องจากชิ้นฝังที่หลงเหลืออยู่อาจจะทำให้เกิดสีที่ไม่จำเพาะ(background staining)

#### 2. การนำน้ำกลับเข้าเซลล์(rehydration)

นำสไลด์มาแช่ในเอธานอล แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 100, 95, และ 85% โดยใช้เวลา 2 นาที ในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 นาที

#### 3. การ retrieve แอนติเจนด้วย microwave

เนื่องจากเชื่อว่าน้ำยาฟอรมาลินที่ใช้ในการเก็บรักษาสภาพชิ้นเนื้อเพื่อรักษาสภาพของเซลล์(fixation) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจตุรภูมิ(quaternary structure)ของโปรตีน โดยทำให้เกิดการจับตัวกันของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลเดียวกันหรือโมเลกุลข้างเคียง ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการขัดขวางไม่ให้แอนติบอดีเข้าไปจับตัวกับแอนติเจน ดังนั้นในการย้อม p21, bcl-2, bax และ Ki-67 จึงต้องทำการ retrieve แอนติเจนโดยใช้ไมโครเวฟ ในกรณีของ p53 ไม่ต้องการ retrieve แอนติเจนซึ่งเป็นไปตามข้อเสนอแนะของบริษัท Zymed ในการ retrieve แอนติเจน ดำเนินโดยนำสไลด์แช่ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ที่มี pH เท่ากับ 6.0 แล้วทำการอบด้วยไมโครเวฟที่ความร้อน 400 วัตต์นาน 3-5 นาที จากนั้นเพิ่มความร้อนไปที่ 600 วัตต์ นาน 10 นาที ซึ่งในการนี้จะมีการสูญเสียสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์อันเนื่องจากความร้อน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ใหม่ก่อนที่จะทำการ retrieve แอนติเจน ตามกระบวนการเดิมอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำสไลด์มาทำให้เย็นโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 30-45 นาที ทำการล้างสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

#### 4. การป้องกันการติดสีที่ไม่จำเพาะ(background staining)ในเนื้อเยื่อ

เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ peroxidase ในเซลล์(endogenous peroxidase) จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ที่ใช้ ซึ่งจะทำให้การแปลผลการย้อมผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงต้องหยุดการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวโดยแช่สไลด์ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ความเข้มข้น 3.5% ในเมทานอล(methanol)เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อกำจัด peroxidase ภายในเซลล์ จากนั้นล้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกโดยแช่สไลด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(phosphate buffer)ที่มี pH เท่ากับ 7.4 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงทำการป้องกันการติดสีที่ไม่จำเพาะ(nonspecific staining) โดยแช่สไลด์ใน goat serum ที่ทำให้เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 15 นาที

#### 5. ทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบกับแอนติบอดีปฐมภูมิ(primary antibody)

หยุดแอนติบอดีปฐมภูมิประมาณ 100-200 ไมโครลิตรให้ท่วมชิ้นเนื้อโดยทำการเจือจางแอนติบอดีด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วนดังนี้

1. p53 : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:50
2. p21 : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:100
3. bcl-2 : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1: 80
4. bax : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:100
5. Ki-67 : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1: 50

แช่สไลด์ไว้ประมาณ 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นซับสารละลายแอนติบอดีออก ต่อจากนั้นทำการกำจัดแอนติบอดีปฐมภูมิส่วนเกินออกโดยล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที แล้วจึงนำชิ้นเนื้อไปตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์

#### 6. การตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์

นำชิ้นเนื้อมาตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ โดยหยุดแอนติบอดีทุติยภูมิที่จับกับ biotin(biotinylated secondary antibody)ชนิด broad spectrum ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ immunoglobulin ของ mouse กระต่าย และ guinea pig โดยให้แอนติบอดีทุติยภูมิทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 แล้วจึงล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกโดยแช่สไลด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที จากนั้นเติม streptavidin-horseradish peroxidase ที่ทำให้เจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:150 เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ streptavidin จับกับ biotin ในแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ แล้วล้างเอนไซม์ส่วนเกินออกโดยแช่สไลด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที หลังจากนั้นนำไปทำให้เกิดสี

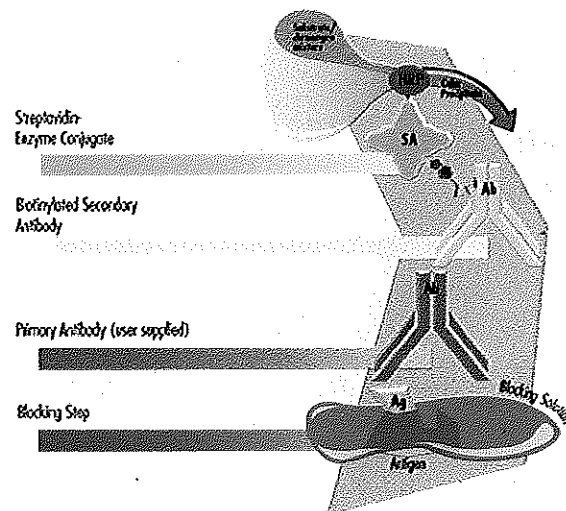
### 7. การทำให้เกิดสี

นำชิ้นเนื้อมาทำให้เกิดสีด้วยการทำปฏิกิริยากับ chromogen(3-amino-9-ethyl carbazole, AEC เข้มข้น 0.02%) และ substrate(ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3.5%) เป็นเวลา 30 นาที โดย streptavidin-horseradish peroxidase จะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ออกซิเจนอิสระ ซึ่งจะ oxidise AEC เกิดเป็นตะกอนสีแดงที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

### 8. การย้อมสีเพื่อทำให้เกิดความแตกต่าง (counterstain)

ทำการหยดสารละลาย Meyer's hematoxylin solution ให้ท่วมชิ้นเนื้อนาน 3 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์อย่างละ 1 นาทีตามลำดับแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง การย้อมดังกล่าวจะทำให้เกิดความแตกต่างของตะกอน AEC ซึ่งมีสีแดงกับโครงสร้างของเซลล์ จากนั้นหยดสารละลายตัวกลาง(mounting media)แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วบาง (cover slip)

ในการทดลองนี้ได้ทำ positive control โดยการย้อมตัวอย่างร่วมกับชิ้นเนื้อที่ทราบผลว่า positive ในทุกครั้งที่ย้อมโดยเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งเป็นการย้อมตัวอย่างตามขั้นตอนต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วยกเว้นในขั้นตอนที่ 5 ให้ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนแอนติบอดีปฐมภูมิ ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีโดยวิธี Streptavidin-Biotin-Complex



### 3.4 การอ่านค่าผลการย้อมภูมิโมโนฮีสโตเคมีสเตรีย

ทำการอ่านผลการย้อมภูมิโมโนฮีสโตเคมีสเตรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200 เท่าโดยเลือกกลุ่มจากกลุ่มเซลล์มะเร็งตำแหน่งต่างๆ จำนวน 3 ตำแหน่ง จากนั้นทำการประมาณร้อยละของเซลล์ที่ติดสีในแต่ละ field (200x) แล้วทำการแบ่งระดับการติดสีของโปรตีนตามเกณฑ์ดังต่อไปนี้<sup>48</sup>

ระดับ 0 = ไม่พบเซลล์ที่ติดสี

ระดับ 1 = มีเซลล์ที่ติดสีน้อยกว่าร้อยละ 25 ต่อ field

ระดับ 2 = มีเซลล์ที่ติดสีประมาณร้อยละ 25-50 ต่อ field

ระดับ 3 = มีเซลล์ที่ติดสีมากกว่าร้อยละ 50 ต่อ field

นอกจากนั้นทำการตรวจสอบการกระจายของเซลล์ตามชั้นต่างๆ โดยแบ่งชั้นของเยื่อผิวตามเกณฑ์ของ Ng และคณะ<sup>49</sup> ดังนี้

เซลล์ชั้นฐาน(basal layer) คือ เซลล์ติดสีชั้นที่ติดกับ basement membrane

เซลล์ชั้นเหนือฐาน(suprabasal layer) คือ เซลล์ติดสีเหนือชั้น basal layer 5 ชั้น

เซลล์ชั้นผิว(superficial layer) คือ เซลล์ติดสีถัดจากชั้น suprabasal layer

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์สถิติของการวิจัยนี้ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม InStat (GraphPad Software, CA, USA)

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 และ p21, p53 และ bcl-2, p53 และ bax, p53 และ Ki-67, bcl-2 และ bax โดย Chi-square test หรือ Fisher's exact test(two-sided) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $\alpha$ ) = 0.05 โดยในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Chi-square test อันเนื่องมาจากความถี่คาดหวังที่น้อยกว่า 5 มีมากถึง 20% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด ซึ่งจะทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง ให้ทำการจัดระดับการติดสีใหม่ คือ

negative หมายถึง มีเซลล์ติดสีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% (รวมกลุ่มที่มีการติดสีระดับ 0 ระดับ 1 และระดับ 2)

positive หมายถึง มีเซลล์ติดสีจำนวนมากกว่า 50% (การติดสีระดับ 3)

และใช้ Fisher's exact test

ทำการทดสอบความแตกต่างของระดับการติดสีระหว่าง bcl-2 และ bax โดยใช้ Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $\alpha$ ) = 0.05

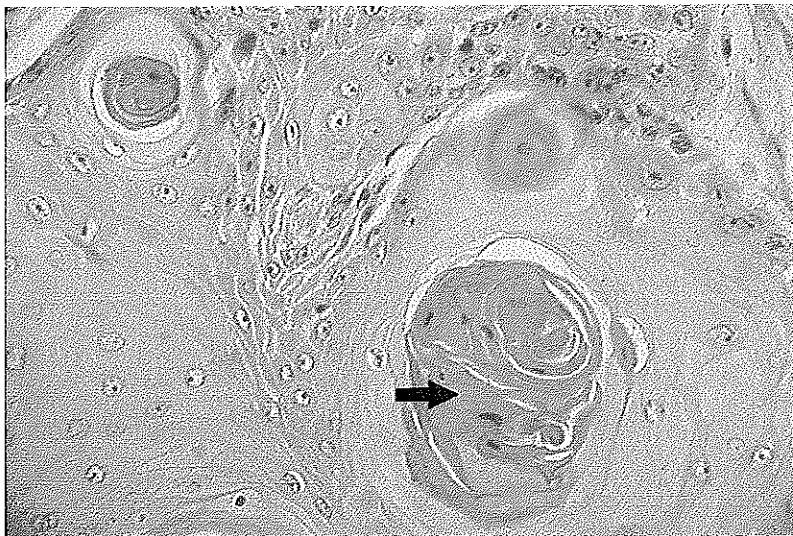
- 2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งทางจุลพยาธิวิทยาและระดับการย้อมติดสีของโปรตีน p53, p21, Ki-67, bcl-2 และ bax โดยใช้สถิติ Spearman rank correlation ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $\alpha$ ) = 0.05

### บทที่ 3

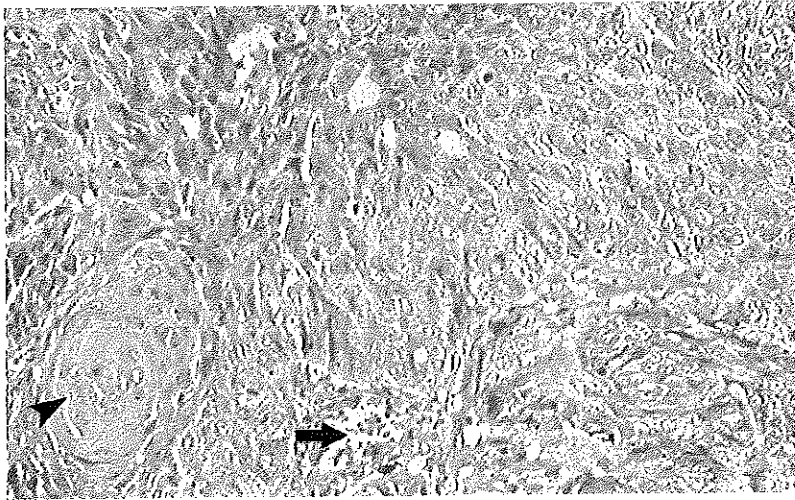
#### ผลการทดลอง

##### 1. ผู้ป่วย

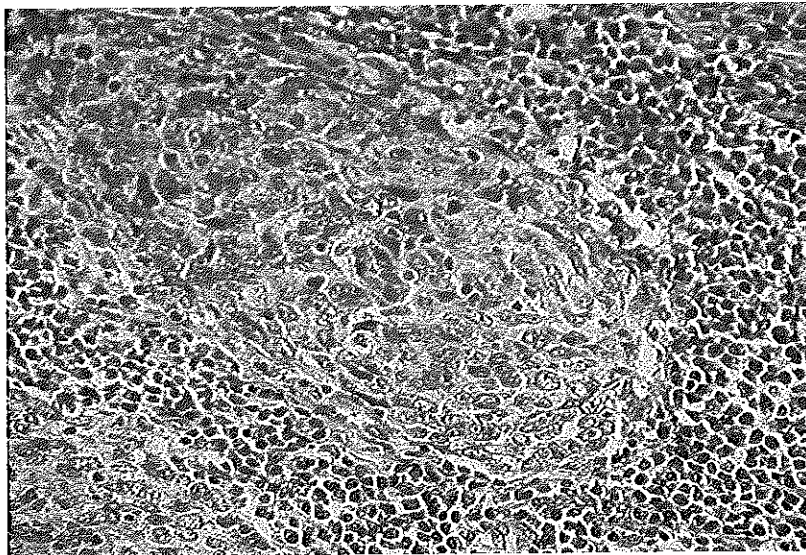
การศึกษาในครั้งนี้ทำการศึกษาจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสจำนวน 52 ราย เป็นผู้ป่วยชาย 40 ราย หญิง 12 รายอายุระหว่าง 23-87 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย  $61.45 \pm 15.19$  ปี แบ่งเป็นมะเร็งช่องปาก 32 ราย มะเร็งกล่องเสียง 12 รายและมะเร็งที่บริเวณอื่นๆ ของศีรษะและลำคอจำนวน 8 ราย โดยสามารถแบ่งกลุ่มตามความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาตามเกณฑ์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นเป็น well differentiation (รูปที่ 9) จำนวน 29 ราย moderate differentiation (รูปที่ 10) จำนวน 22 รายและ poor differentiation (รูปที่ 11) จำนวน 1 รายซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2



รูปที่ 9 มะเร็งชนิดสแควมัสที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยารุนแรงในระดับ well differentiation โดยมีการสร้าง keratin pearl (ลูกศร)ชัดเจน (200x)



รูปที่ 10 มะเร็งชนิดสแควมัสที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยารุนแรงใน  
ระดับ moderate differentiation ซึ่งในภาพแสดงมะเร็งรุกรานมาใกล้กับ  
หลอดเลือด(ลูกศร) โดยยังมีการสร้าง keratin pearl (หัวลูกศร)(200x)



รูปที่ 11 มะเร็งชนิดสแควมัสที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยารุนแรงใน  
ระดับ poor differentiation เซลล์มะเร็งมีนิวเคลียสติดสีเข้ม มีรูปร่างและ  
ขนาดที่หลากหลาย โดยไม่พบการสร้าง keratin pearl(200x)

ตารางที่ 2 การแจกแจง อายุ เพศ ตำแหน่งและระดับความรุนแรงของมะเร็งในแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ตำแหน่ง	คะแนนในแต่ละเกณฑ์*					ระดับความรุนแรง**	
				1	2	3	4	5	รวม	รุนแรง**
1.	64	ช	กล่องเสียง	3	3	4	3	2	11	M
2.	54	ช	จมูกร่วมคอหอย	3	2	3	4	1	10	M
3.	59	ช	ช่องปาก	2	2	3	3	2	9	M
4.	87	ช	กล่องเสียง	4	2	3	3	1	10	M
5.	61	ช	ช่องปาก	3	3	3	3	2	11	M
6.	48	ช	ช่องปาก	2	1	1	3	2	8	W
7.	72	ช	ช่องปาก	1	1	2	3	3	8	W
8.	23	ช	ช่องปาก	2	1	1	2	2	7	W
9.	69	ช	ผิวหนังบริเวณจมูก	1	2	3	3	3	9	M
10.	27	ช	ช่องปาก	1	1	1	3	2	7	W
11.	65	ญ	จมูกร่วมคอหอย	4	2	2	3	2	11	M
12.	76	ช	ช่องปาก	1	1	2	3	3	8	W
13.	62	ช	ช่องปาก	3	2	2	3	3	11	M
14.	55	ช	ช่องปาก	3	1	1	3	1	8	W
15.	86	ช	คอหอย	1	1	2	3	3	8	W
16.	-	ช	กล่องเสียง	1	1	2	2	2	6	W
17.	73	ญ	ช่องปาก	1	1	3	2	3	7	W
18.	76	ช	ช่องปาก	1	2	2	3	2	8	W
19.	68	ช	กล่องเสียง	1	2	2	3	2	8	W
20.	67	ญ	ช่องปาก	2	1	1	2	2	7	W
21.	42	ช	ช่องปาก	2	1	1	3	2	8	W
22.	39	ญ	ช่องปาก	3	3	4	4	3	13	P
23.	38	ช	ช่องปาก	1	1	1	3	1	6	W
24.	72	ช	ช่องปาก	1	2	2	3	2	8	W
25.	62	ญ	ช่องปาก	3	1	1	3	1	8	W
26.	56	ช	จมูกร่วมคอหอย	4	1	1	4	2	11	M
27.	76	ช	ช่องปาก	3	1	3	2	2	10	M
28.	85	ญ	ช่องปาก	2	1	2	2	2	7	W

ตารางที่ 2(ต่อ) การแจกแจง อายุ เพศ ตำแหน่งและระดับความรุนแรงของมะเร็งในแต่ละตัวอย่าง

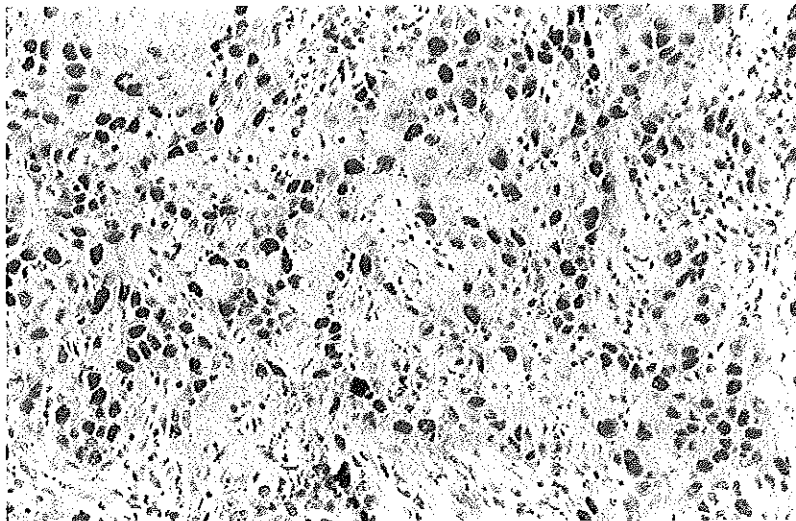
ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ตำแหน่ง	คะแนนในแต่ละเกณฑ์*					รวม	ระดับความ รุนแรง**
				1	2	3	4	5		
29.	43	ช	ช่องปาก	4	2	2	2	2	10	M
30.	50	ช	กล่องเสียง	1	1	2	3	2	7	W
31.	75	ญ	ช่องปาก	1	1	2	3	2	7	W
32.	80	ญ	ช่องปาก	1	2	3	2	2	7	W
33.	55	ช	จมูกร่วมคอหอย	3	2	2	2	2	9	M
34.	51	ช	ช่องปาก	2	2	3	2	2	8	W
35.	77	ช	ช่องปาก	1	2	2	2	2	7	W
36.	51	ช	กล่องเสียง	4	2	2	3	3	12	M
37.	41	ช	กล่องเสียง	2	1	2	2	3	8	W
38.	64	ช	โพรงจมูกแมกซิลลา	1	1	2	3	2	7	W
39.	81	ช	กล่องเสียง	2	1	3	2	3	8	W
40.	79	ญ	ช่องปาก	3	2	3	3	2	10	M
41.	67	ช	ช่องปาก	1	2	3	3	2	8	W
42.	41	ช	ช่องปาก	2	1	2	3	3	9	M
43.	71	ช	กล่องเสียง	4	2	3	3	2	11	M
44.	57	ช	ช่องปาก	3	2	3	3	2	10	M
45.	71	ช	ช่องปาก	4	3	3	3	1	11	M
46.	58	ช	กล่องเสียง	4	2	2	4	2	12	M
47.	60	ช	แก้ม	4	3	4	3	1	11	M
48.	63	ญ	กล่องเสียง	1	2	3	3	2	8	W
49.	75	ช	ช่องปาก	1	2	2	2	2	7	W
50.	64	ช	ช่องปาก	1	1	3	3	2	7	W
51.	63	ญ	กล่องเสียง	1	2	3	2	2	7	W
52.	35	ญ	ช่องปาก	4	2	3	4	2	12	M

\* 1 = ระดับการสร้าง keratin, 2 = ความผิดปกติของนิวเคลียส, 3 = จำนวนเซลล์ในชั้นเหนือฐานและชั้นผิวที่มี mitoses, 4 = รูปแบบการรุกรานของมะเร็ง, 5 = จำนวนลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์

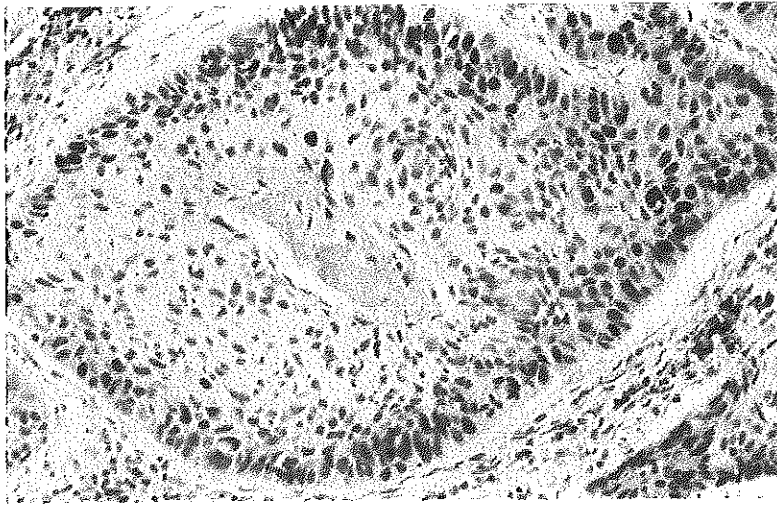
\*\* W = well differentiation, M = moderate differentiation, P = poor differentiation

## 2. ระดับโปรตีน p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

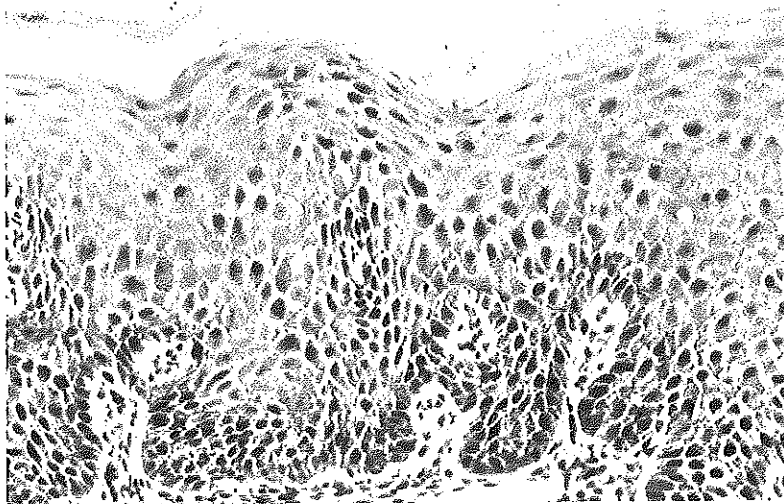
การศึกษาขึ้นเนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสจำนวน 52 ราย พบการสะสมโปรตีน p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67 (ตารางที่ 3) โดยมีการสะสม p53 จำนวน 26 ราย ซึ่งส่วนใหญ่พบการสะสมของโปรตีน p53 ในเซลล์ชั้นฐานและเนื้อฐาน(รูปที่ 12 และ 13) ในขณะที่พบการสะสมโปรตีน p21 จำนวน 49 รายคิดเป็นร้อยละ 94 โดยส่วนใหญ่พบการติดสีของโปรตีน p21 ในนิวเคลียสของเซลล์ทุกชั้นของเยื่อเมือก(รูปที่ 14) แต่จะพบการติดสีมากในชั้นเนื้อฐานและชั้นผิว ในบางรายพบการติดสีของโปรตีน p21 ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ การย้อม bcl-2 พบการติดสีในไซโทพลาสซึมของเซลล์ทุกชั้นจำนวน 31 ราย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีการติดสีชัดในชั้นที่มีการเจริญงอกขยายคือเซลล์ชั้นฐานและเนื้อฐาน(รูปที่ 15 และ 16) ในขณะที่พบการติดสีโปรตีน bax ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ทุกชั้นจำนวน 48 ราย โดยส่วนใหญ่มีการติดสีเข้มของเซลล์บริเวณเนื้อฐานและชั้นผิว(รูปที่ 17) และในบางรายพบการติดสีของโปรตีน bax บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส(nuclear membrane)ของเซลล์มะเร็ง(รูปที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบการติดสีของโปรตีน bcl-2 กับการติดสีของโปรตีน bax พบว่าการติดสีของโปรตีน bax เข้มกว่าการติดสีของโปรตีน bcl-2 นอกจากนั้นพบการติดสีของโปรตีน Ki-67 จำนวน 38 ราย ซึ่งพบการติดสีในนิวเคลียสโดยส่วนใหญ่พบโปรตีน Ki-67 ที่ชั้นฐานและเนื้อฐาน(รูปที่ 19 และ 20) (ตารางที่ 4)



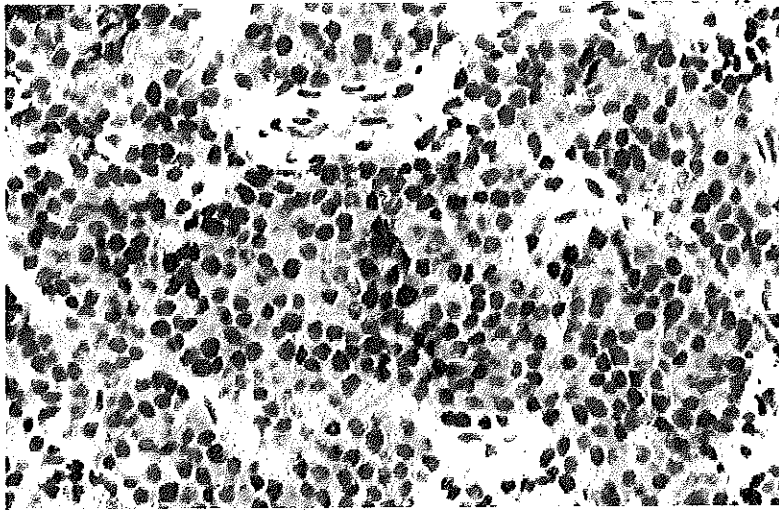
รูปที่ 12 การติดสีของโปรตีน p53 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส (100x)



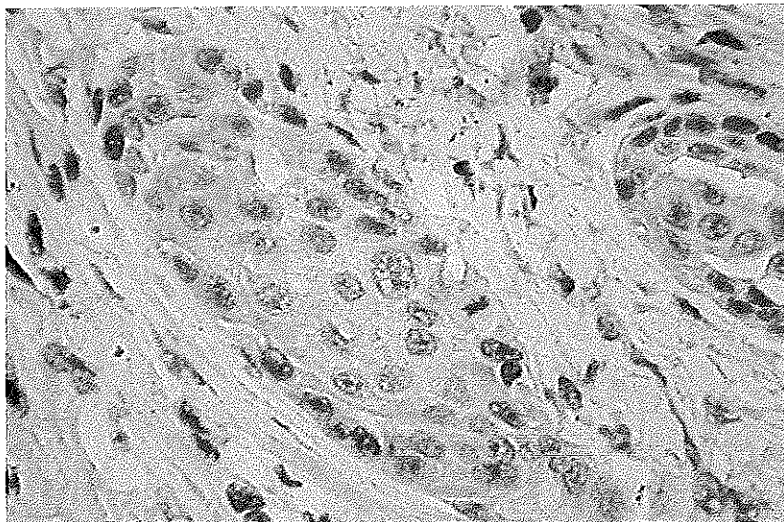
รูปที่ 13 การติดสีของโปรตีน p53 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสบริเวณรอบๆ กลุ่มเซลล์มะเร็ง (100x)



รูปที่ 14 การติดสีของโปรตีน p21 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสที่กระจายในทุกชั้นของเยื่อผิวหนัง (100x)



รูปที่ 15 การติดสีของโปรตีน bcl-2 ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็ง  
ศีรษะและลำคอชนิดสควมัส (200x)

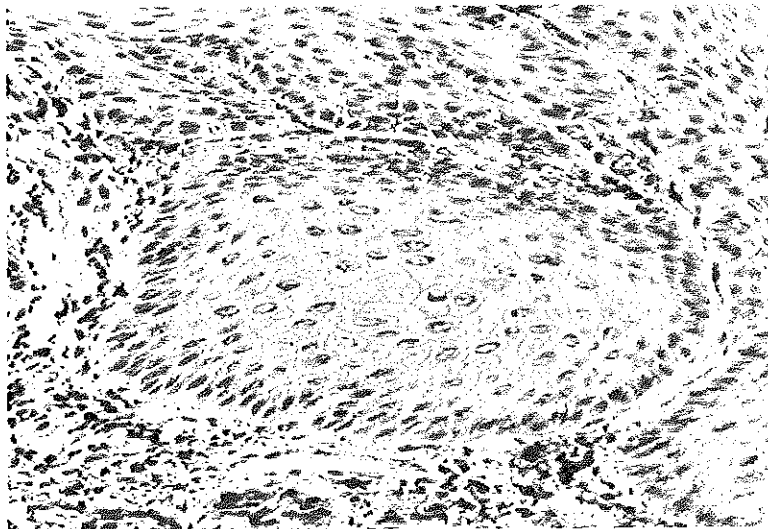


รูปที่ 16 การติดสีของโปรตีน bcl-2 ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็ง  
ศีรษะและลำคอชนิดสควมัส (400x)

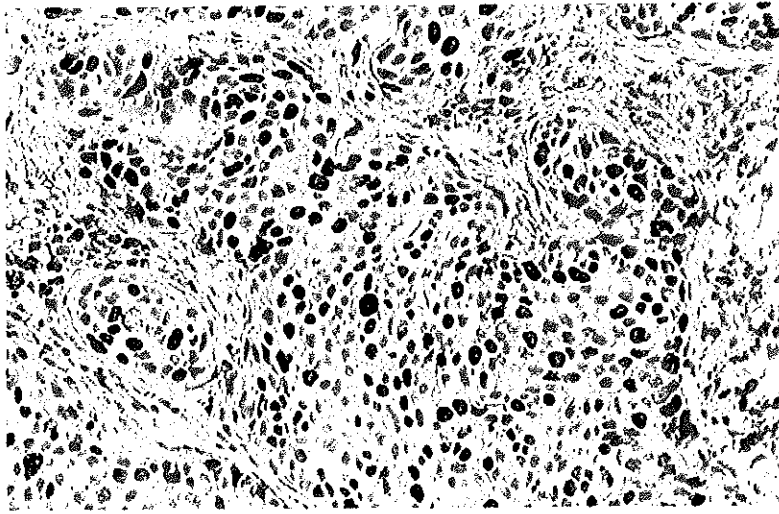




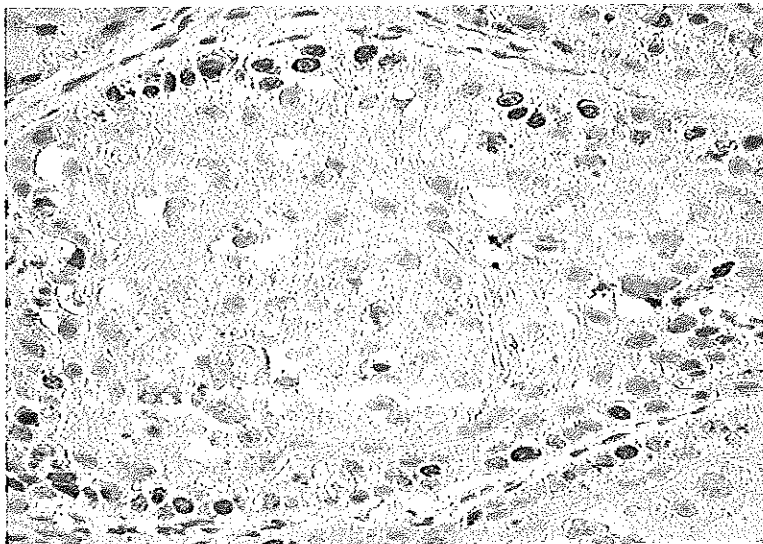
รูปที่ 17 การติดสีของโปรตีน bax ในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็ง  
ศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส โดยพบการติดสีทั้งบริเวณรอบๆ และ  
ตรงกลางของกลุ่มเซลล์มะเร็ง (200x)



รูปที่ 18 การติดสีของโปรตีน bax ในไซโทพลาสซึมและเยื่อหุ้ม  
นิวเคลียสของมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส โดยพบการติดสี  
ของโปรตีนส่วนใหญ่บริเวณตรงกลางของกลุ่มเซลล์มะเร็ง (100x)



รูปที่ 19 การติดสีของโปรตีน Ki-67 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส ซึ่งพบได้ทั่วไปในทุกชั้น (100x)



รูปที่ 20 การติดสีของโปรตีน Ki-67 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส บริเวณรอบๆ ของกลุ่มเซลล์มะเร็ง (200x)

ตารางที่ 3 จำนวนชิ้นเนื้อ(%)ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสที่ให้ผลบวกและลบต่อการย้อม p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67

โปรตีน	การย้อมติดสี (%)		รวม
	+	-	
p53	26(50.00%)	26(50.00%)	52
p21	49(94.23%)	3(5.77%)	52
bax	48(92.31%)	4(7.69%)	52
bcl-2	31(59.62%)	21(40.38%)	52
Ki-67	38(73.08%)	14(26.92%)	52

+ = เซลล์ติดสีจำนวนมากกว่า 50%

- = เซลล์ติดสีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50%

ตารางที่ 4 การติดสีของโปรตีน p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67 แบ่งตามระดับชั้นเยื่อผิวในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

โปรตีน	ระดับชั้นเยื่อผิว		
	basal	suprabasal	superficial
p53	+++	+++	±
p21	+	+++	+++
bax	+	+++	+++
bcl-2	+++	++	±
Ki-67	+++	++	±

± = พบการติดสีของโปรตีนเล็กน้อยหรือไม่พบ

+

++ = พบการติดสีของโปรตีนมาก

+++ = พบการติดสีของโปรตีนมากที่สุด

### 3. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับโปรตีน p21 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

การศึกษาผู้ป่วยจำนวน 52 ราย พบการติดสีของโปรตีน p53 ทั้งหมด 26 ราย โดยพบการสะสมของโปรตีนทั้งสองร่วมกัน(p53+/p21+) จำนวน 23 ราย และไม่พบการสะสมโปรตีน p21 จำนวน 3 ราย ส่วนอีก 26 รายที่ไม่ติดสีโปรตีน p53 นั้นจะพบโปรตีน p21 ในทุกราย ซึ่งในการวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน p21 (two-sided p=0.24) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน p21 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

ผลการย้อม	จำนวน	ร้อยละ
p53+/p21+	23	44.23
p53+/p21-	3	5.77
p53-/p21+	26	50.00
p53-/p21-	0	0
รวม	52	100

Fisher's exact test, two-sided p=0.24

### 4. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับโปรตีน bcl-2 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

การศึกษานี้พบการติดสีของโปรตีน bcl-2 ร่วมกับโปรตีน p53(p53+/bcl-2+) จำนวน 17 ราย โดยพบการติดสีของโปรตีน p53 แต่ไม่พบการติดสีของโปรตีน bcl-2 (p53+/bcl-2-) จำนวน 9 ราย และไม่พบการติดสีของโปรตีนทั้งสอง(p53-/bcl-2-) จำนวน 12 ราย ส่วนที่เหลืออีก 14 รายพบการติดสีของโปรตีน bcl-2 แต่เพียงอย่างเดียว (p53-/bcl-2+) โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน bcl-2 (two-sided p=0.57) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน bcl-2 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

ผลการย้อม	จำนวน	ร้อยละ
p53+/ bcl-2+	17	32.69
p53+/ bcl-2-	9	17.31
p53-/ bcl-2+	14	26.92
p53-/ bcl-2-	12	23.08
รวม	52	100

Fisher 's exact test, two-sided p=0.57

5. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับโปรตีน bax ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

การศึกษาครั้งนี้พบการติดสีของโปรตีน bax จำนวน 48 รายในจำนวนนี้มี 23 รายที่พบการติดสีของโปรตีน p53 รวมด้วย (p53+/bax+) ที่เหลืออีก 25 รายไม่พบการติดสีของโปรตีน p53 (p53-/bax+) ส่วนอีก 4 รายที่ไม่พบการติดสีของโปรตีน bax นั้นมี 3 รายที่ติดสีของโปรตีน p53 (p53+/bax-) และ 1 รายไม่พบการติดสีของโปรตีนทั้งสอง(p53-/bax-) อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามี ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน bax (two-sided p=0.61) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน bax ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

ผลการย้อม	จำนวน	ร้อยละ
p53+/ bax +	23	44.23
p53+/ bax -	3	5.77
p53-/ bax +	25	48.08
p53-/ bax -	1	1.92
รวม	52	100

Fisher 's exact test, two-sided p=0.61

## 6. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับโปรตีน Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

การย้อมโปรตีน Ki-67 พบการติดสีจำนวน 38 รายซึ่งในจำนวนนี้มี 17 รายที่พบการติดสีของโปรตีน p53 ร่วมด้วย(p53+/Ki-67+) และ 21 รายไม่พบการติดสีของโปรตีน p53(p53-/Ki-67+) ส่วน 14 รายที่ไม่พบการติดสี Ki-67 นั้นปรากฏว่าพบการติดสีของโปรตีน p53(p53+/Ki-67-) จำนวน 9 ราย และไม่พบการติดสีของโปรตีน p53(p53-/Ki-67-) จำนวน 5 ราย โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน Ki-67 (two-sided  $p=0.35$ ) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และโปรตีน Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

ผลการย้อม	จำนวน	ร้อยละ
p53+/ Ki-67+	17	32.69
p53+/ Ki-67 -	9	17.31
p53-/ Ki-67 +	21	40.38
p53-/ Ki-67 -	5	9.62
รวม	52	100

Fisher's exact test, two-sided  $p=0.35$

## 7. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน bcl-2 กับโปรตีน bax ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

จากการศึกษาพบการติดสีของโปรตีน bcl-2 ร่วมกับโปรตีน bax(bcl-2+/bax+) จำนวน 31 ราย ไม่พบการติดสีของโปรตีนทั้งสองชนิด(bcl-2-/bax-) จำนวน 1 ราย ส่วนที่เหลืออีก 20 รายพบการติดสีของโปรตีน bcl-2 แต่ไม่พบการติดสีของโปรตีน bax(bcl-2+/bax-) จำนวน 3 ราย อีก 17 รายพบการติดสีของโปรตีน bax แต่ไม่พบการติดสีของโปรตีน bcl-2(bcl-2-/bax+) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน bax และโปรตีน bcl-2 (two-sided  $p=1.00$ ) (ตารางที่ 9) อนึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งมีการติดสีโปรตีนทั้งสองแตกต่างกันกล่าวคือ ค่ามัธยฐานระดับการติดสีของ bcl-2 และ bax เท่ากับ 3 และ 2 ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบโดย Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test พบความแตกต่างในการติดสี bcl-2 และ bax อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.01$ ) โดยมีอัตราส่วนระหว่าง bcl-2 และ bax เท่ากับ 0.62 ซึ่งแสดงว่ามีการลดลงของ bcl-2 ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของ bax อย่างชัดเจน

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน bcl-2 และโปรตีน bax ในมะเร็งศีรษะ  
และลำคอชนิดสแควมัส

ผลการย้อม	จำนวน	ร้อยละ
bcl-2+/ bax +	31	59.62
bcl-2+/ bax -	3	5.77
bcl-2-/ bax +	17	32.69
bcl-2-/ bax -	1	1.92
รวม	52	100

Fisher 's exact test, two-sided p=1.00

8. ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 p21 bax bcl-2 และ Ki-67 กับระดับความรุนแรงทาง  
จุลพยาธิวิทยาของมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของมะเร็งกับโปรตีน p53, p21, bax, bcl-2 และ Ki-67 ในผู้ป่วยจำนวน 52 รายปรากฏว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งทางจุลพยาธิวิทยากับการติดสีของ p53( $\rho = -0.17$ , two-sided  $p = 0.24$ ), p21( $\rho = -0.09$ , two-sided  $p = 0.54$ ), bax( $\rho = 0.04$ , two-sided  $p = 0.76$ ), bcl-2( $\rho = 0.19$ , two-sided  $p = 0.19$ ) และ Ki-67( $\rho = -0.05$ , two-sided  $p = 0.74$ )

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์และสรุปผล

ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญงอกขยายและการตายมีความสำคัญต่อการคงสภาพของเนื้อเยื่อและขนาดอวัยวะ การเสียสมดุลดังกล่าวเป็นสาเหตุนำไปสู่โรคมะเร็ง ถึงแม้ว่าเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันไปตามพยาธิกำเนิด(pathogenesis)และตำแหน่ง แต่โดยทั่วไปแล้วเซลล์มะเร็งมีคุณสมบัติที่เหมือนกันกล่าวคือจะสูญเสียการควบคุมในกระบวนการปกติของเซลล์ อาทิ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การหยุดแบ่งเซลล์ การเสื่อมสภาพและการตายของเซลล์ ดังนั้นการศึกษาโปรตีนต่างๆ ในวงจรการแบ่งเซลล์จะทำให้เข้าใจกลไกการเกิดมะเร็งได้มากขึ้น

ยีนต้านมะเร็ง p53 เป็นยีนที่มีบทบาทในการควบคุมการเจริญงอกขยายและมีผลให้เซลล์ตายจึงทำให้มีความสนใจศึกษาวิจัยยีนดังกล่าวอย่างกว้างขวางในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากพบว่าเป็นยีนที่มักจะทำให้เกิดความผิดปกติได้มากในมะเร็งหลายชนิด<sup>7</sup> รวมทั้งในมะเร็งศีรษะและลำคอ<sup>50</sup> การกลายพันธุ์ของยีน p53 เป็นผลให้ไม่มีการสร้าง p53 หรือสร้างโปรตีนที่มีความผิดปกติและไม่สามารถทำหน้าที่ปกติได้ หนึ่งในสภาวะปกติจะไม่สามารถตรวจพบโปรตีน p53 ภายในเซลล์ได้ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเตรียทั้งนี้เนื่องจากโปรตีน p53 มีครึ่งชีวิต(half-life)สั้น กล่าวคือประมาณ 6-20 นาที แต่ในกรณีที่ยีน p53 กลายพันธุ์และมีผลให้สร้างโปรตีน p53 ที่มีการเปลี่ยนโครงสร้างไปซึ่งทำให้โปรตีนดังกล่าวถูกทำลายได้ช้ากว่าปกติและมีครึ่งชีวิตยาวนานถึง 6 ชั่วโมง<sup>51</sup> จากองค์ความรู้ที่ได้จึงทำให้นำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจโปรตีน p53 ที่ผิดปกติได้ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเตรีย โดยในกรณีที่พบการติดสีโปรตีน p53 ภายในเซลล์นั้นแสดงว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน p53 อย่างไรก็ตามเราอาจไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีดังกล่าวได้ในกรณีที่การกลายพันธุ์นั้นไม่สร้างโปรตีน p53

#### 1. การแบ่งระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งโดยวิธีการทางจุลพยาธิวิทยามีจุดประสงค์เพื่อใช้ในการแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็ง ใน ค.ศ. 1920 Broders ได้เริ่มทำการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งชนิดคาร์ซิโนมา(carcinoma)โดยอาศัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และพบว่ามะเร็งที่มีลักษณะ poor differentiation จะมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี<sup>52</sup> การศึกษาต่อมาพบว่าวิธีการแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็งด้วยวิธีการของ Broders ไม่สัมพันธ์กับการพยากรณ์



โรคในผู้ป่วย ต่อมาจึงได้มีปรับปรุงวิธีการแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็งอีกหลายครั้ง<sup>45,46,53</sup> การศึกษาในครั้งนี้ได้จัดระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาโดยใช้วิธีการของ Bryne และคณะ<sup>45,46</sup> ซึ่งแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็งโดยใช้เกณฑ์ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา 5 ลักษณะ โดยเลือกบริเวณที่มีการรุกรานของเซลล์มะเร็งเข้าไปในชั้นเนื้อเยื่อยึดต่อลึกที่สุดเป็นตัวแทนของมะเร็งทั้งสไลด์ ซึ่ง Bryne<sup>54</sup> ได้แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวสามารถเป็นตัวแทนที่ดีและให้ผลในการพยากรณ์โรคได้ถูกต้อง ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าระดับความรุนแรงของมะเร็งส่วนใหญ่เป็น well และ moderate differentiation อย่างไรก็ตาม Anneroth และ Hansen<sup>55</sup> พบว่าเกณฑ์การให้คะแนนบางเกณฑ์อาจส่งผลกระทบต่อการจัดระดับความรุนแรงของมะเร็ง เช่น จำนวนการสร้าง keratin เนื่องจากในสภาวะปกติตำแหน่งต่างๆ ของศีรษะและใบหน้ามีการสร้าง keratin ในปริมาณที่แตกต่างกันไปและบางตำแหน่งก็ไม่มีการสร้าง keratin ดังนั้นการเปรียบเทียบระดับคะแนนที่ได้จากมะเร็งในตำแหน่งที่แตกต่างกัน อาจให้ผลไม่ถูกต้องทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะปกติเซลล์เหล่านั้นอาจมีการสร้าง keratin ที่แตกต่างกันอยู่แล้ว นอกจากนี้ทิศทางการตัดชิ้นเนื้อยังมีผลต่อเกณฑ์ในการให้คะแนนรูปแบบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้ศึกษาจากชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เก็บอยู่ในพาราฟินโดยบางส่วนเป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy ซึ่งผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าขนาดของชิ้นเนื้อที่มีผลต่อเกณฑ์การแบ่งระดับความรุนแรงของมะเร็ง โดย Fisher<sup>56</sup> รายงานว่าการจัดระดับความรุนแรงของมะเร็งที่ศึกษาจากชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy บางครั้งอาจให้ค่าต่ำกว่าการจัดระดับที่ได้จากชิ้นเนื้อหลังการผ่าตัด(surgical specimen)ในผู้ป่วยคนเดียวกัน นอกจากนี้ Bryne และคณะ<sup>45</sup> พบว่าประมาณร้อยละ 15 ของชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy มะเร็งช่องปากมีขนาดไม่เพียงพอต่อการให้คะแนนได้ครบในทุกเกณฑ์ซึ่งมีผลให้ไม่สามารถจัดระดับความรุนแรงของมะเร็งได้อย่างถูกต้อง

## 2. การแสดงออกของโปรตีน p53

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีน p53 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส 26 ราย(ร้อยละ 50) จากจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 52 ราย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา<sup>57-61</sup> โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติในการแสดงออกของโปรตีน p53 กับระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา<sup>60,62,63</sup> อย่างไรก็ตามแม้ว่าการติดสีของโปรตีน p53 เมื่อย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเตรียจะแสดงถึงสภาวะการกลายพันธุ์ของยีน p53 แต่ในบางสภาวะเซลล์อาจมีการสะสมโปรตีน p53 ปกติจนสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีดังกล่าว เช่น เมื่อเซลล์เกิดความผิดปกติในกลไกการสลายโปรตีน p53 หรือโปรตีน p53 จับกับโปรตีนอื่นจะส่งผลให้โปรตีน p53 มีครึ่งชีวิตนานขึ้น<sup>64</sup> ซึ่งสภาวะเหล่านี้โปรตีน p53 จะสูญเสีย

การทำหน้าที่ นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีบางสภาวะที่ยีนกลายพันธุ์โดยไม่มีการสร้างโปรตีน เช่น สภาวะที่ยีน p53 ขาดหายไป(deletion)ทั้งสองอัลลีล(allels) หรือการกลายพันธุ์ของยีนแบบ non-sense<sup>65,66</sup> ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความผิดปกติในการแสดงออกของโปรตีน p53 เมื่อข้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรีนั้นอาจไม่จำเป็นว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน p53<sup>66-69</sup> และเช่นเดียวกับการไม่พบความผิดปกติในการแสดงออกของโปรตีน p53 ก็ไม่ได้แสดงว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน p53<sup>51, 65</sup> รวมทั้งยังพบการกลายพันธุ์ของยีน p53 โดยไม่มีการเพิ่มเสถียรภาพของโปรตีน p53<sup>70</sup> ดังนั้นการแปลผลการกลายพันธุ์ของยีนด้วยการข้อมโปรตีน p53 เพียงอย่างเดียวจึงไม่ถูกต้องเนื่องจากผลการข้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรีของโปรตีน p53 อาจเป็นได้ทั้งผลบวกเทียม(false positive)หรือผลลบเทียม(false negative)<sup>71</sup> แต่จากการศึกษาพบว่ากรณีดังกล่าวเกิดขึ้นน้อย นอกจากนี้การศึกษาของ Xu และคณะ<sup>65</sup> พบการสะสมของโปรตีน p53 โดยไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส ร้อยละ 34 ส่วนการศึกษาของ Wood และคณะ<sup>72</sup> พบเพียงร้อยละ 29 นอกจากนั้นการใช้แอนติบอดีต่อ p53 ที่แตกต่างกันในแต่ละบริษัทอาจมีผลต่อการติดสีของโปรตีน p53<sup>73</sup> ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน p53 เป็นเพียงกลไกหนึ่งที่ทำให้โปรตีน p53 มีเสถียรภาพมากขึ้น แต่เสถียรภาพของโปรตีน p53 นั้นอาจเกิดได้จากปัจจัยอื่นๆ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการแปลผลการศึกษาจึงต้องคำนึงถึงกรณีดังกล่าวด้วย

การวิจัยครั้งนี้พบการติดสีโปรตีน p53 ส่วนใหญ่ในชั้นฐานและเหนือฐานซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shin และคณะ<sup>59</sup> ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 50 ไม่พบการสะสมของโปรตีน p53 แสดงว่าการกลายพันธุ์ของยีน p53 อาจไม่จำเป็นและไม่มีผลเพียงพอที่จะทำให้เกิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสหรือเซลล์มะเร็งสามารถหลบหลีกการตรวจสอบของยีน p53 อย่างไรก็ตามเนื่องจากในปัจจุบันเทคโนโลยีการตรวจสอบความผิดปกติของยีนโดยหาลำดับของยีน(sequencing)หลังจากการทำ polymerase chain reaction เป็นวิธีการที่ให้ความไวในการตรวจสอบสูงกว่าวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรีที่ถึงแม้ว่าจะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่ข้อเสียคือไม่มีความจำเพาะในการบ่งชี้ผิดปกติของยีนได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ไม่มีการสร้างโปรตีน p53 อันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของยีน p53 แบบ nonsense หรือมีการหายไปของยีนดังกล่าว<sup>74</sup> นอกจากนั้นยังมีปัญหาเกี่ยวกับการเลือกค่า cut-off point ที่แตกต่างกันจึงทำให้มีผลต่อ reliability ในการแปลผล นอกจากปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้นความแตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนของวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรีในแต่ละห้องปฏิบัติการอาจมีผลให้ไม่สามารถนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้การประมวลผลความรู้จากบทความวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ p53 ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรีจึงมีข้อจำกัด

และมีความจำเป็นที่ต้องอาศัยผลการศึกษาที่ได้จากเทคนิคและวิธีการอื่นที่มีความไวและความถูกต้องในการตรวจสอบมากขึ้น

### 3. การแสดงออกของโปรตีน p21

โปรตีน p21 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญชนิดหนึ่งในวงจรเซลล์โดยทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ cyclin-dependent kinase ส่งผลให้วงจรเซลล์หยุดที่ระยะ G<sub>1</sub><sup>19</sup> ดังนั้นหากโปรตีน p21 สูญเสียการทำงานที่จะส่งผลให้เซลล์มะเร็งเพิ่มการเจริญออกขยาย จากการศึกษาพบการสะสมของโปรตีน p21 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสร้อยละ 94 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา คือ พบการสะสมของโปรตีน p21 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสประมาณร้อยละ 70-90<sup>20,21,24,75</sup> อนึ่งโดยปกติแล้วเซลล์เยื่อบุผิวมีการสะสมของโปรตีน p21 น้อยกว่าร้อยละ 5 และใน leucoplakia พบการสะสมของโปรตีน p21 ร้อยละ 60 ดังนั้นการที่เซลล์มะเร็งมีการสะสมของโปรตีน p21 มากกว่าเซลล์ปกติแสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส อย่างไรก็ตามการทำหน้าที่ของโปรตีน p21 ที่มากกว่าปกติเพียงลำพังอาจจะไม่สามารถหยุดวงจรเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง<sup>76</sup>

การศึกษานี้พบการสะสมของโปรตีน p21 ในทุกชั้นของเยื่อบุผิวของมะเร็งโดยส่วนใหญ่พบการสะสมของโปรตีน p21 ในเซลล์ชั้นเหนือฐานและชั้นผิวซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Yook และ Kim<sup>21</sup> ที่พบการสะสมของโปรตีน p21 ทุกชั้นของเยื่อบุผิวของมะเร็งช่องปาก ในขณะที่เยื่อบุผิวช่องปากปกติก็พบการแสดงออกของโปรตีน p21 ในเซลล์ชั้นเหนือฐานและชั้นผิวซึ่งเป็นชั้นที่ไม่มีการเจริญออกขยายเช่นเดียวกัน<sup>20,21,77</sup> ดังนั้นการที่รูปแบบการติดสีโปรตีน p21 ในชั้นต่างๆของมะเร็งโดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่มีความรุนแรงระดับ well differentiation มีลักษณะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปกติ จึงทำให้เชื่อว่าโปรตีน p21 อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์มะเร็ง โดย van Oijen และคณะ<sup>20</sup> รายงานความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของโปรตีน p21 กับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nadal และคณะ<sup>24</sup> ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของโปรตีน p21 และ mRNA กับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ในมะเร็งกล่องเสียง อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของโปรตีน p21 กับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ที่ต่างกันหรือการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เกิดขึ้นจากกลไกอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีน p21<sup>78,79</sup> อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เชื่อว่า p21 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ

การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์มะเร็งและอาจมีบทบาทอื่นนอกเหนือจากการทำหน้าที่หยุดวงจรเซลล์ อาทิ โปรตีน p21 มีผลยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ neuroblastoma<sup>80</sup> และเซลล์ myoblast<sup>81</sup>

#### 4. การแสดงออกของโปรตีน Ki-67

การเพิ่มการเจริญงอกขยายมากผิดปกติเป็นตัวชี้วัดการเสียชีวิตในการควบคุมปริมาณเซลล์และก่อให้เกิดมะเร็ง ดังนั้นจึงมีการศึกษาความผิดปกติดังกล่าวด้วยวิธีการต่างๆ รวมทั้งวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี้ Ki-67 เป็นโปรตีนที่สะสมอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ที่มีการเจริญงอกขยายทุกระยะในวงจรเซลล์ซึ่งได้แก่ระยะ G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> และ M ด้วยเหตุดังกล่าว Ki-67 จึงเป็นตัวแทนในการวัดการเจริญงอกขยายของเซลล์ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี้<sup>82,83</sup> ด้วยเหตุดังกล่าวจึงทำให้มีการศึกษาการเจริญงอกขยายในการเกิดมะเร็งโดยใช้ Ki-67 เป็นตัวชี้วัดความผิดปกติของการเจริญงอกขยาย จากการศึกษาในครั้งนี้พบการสะสมของโปรตีน Ki-67 ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสจำนวนร้อยละ 73 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในพิสัยของรายงานการวิจัยที่ผ่านมา<sup>84,85</sup> นอกจากนี้การวิจัยนี้พบการสะสมของโปรตีน Ki-67 ทุกชั้นของเยื่อบุผิวโดยพบมากบริเวณขอบของกลุ่มเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะที่ชั้นฐานและเหนือฐานซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น<sup>86-88</sup> อนึ่งการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของโปรตีน Ki-67 และระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Roland และคณะ<sup>89</sup> ผลการวิจัยครั้งนี้และการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นให้เกิดการเจริญงอกขยายของเซลล์เป็นกระบวนการที่สำคัญในการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส

#### 5. การแสดงออกของโปรตีน bcl-2

ยีน *bcl-2* เป็นยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็งโดยป้องกันไม่ให้เซลล์ตาย ดังนั้นการแสดงออกของยีน *bcl-2* จึงส่งผลให้เซลล์มีชีวิตนานขึ้น จากการศึกษาพบการสะสมของโปรตีน *bcl-2* ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสจำนวนร้อยละ 60 ในขณะที่การศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี้ที่ผ่านมารายงานการสะสมของโปรตีน *bcl-2* แตกต่างกันไป คือ พบการสะสมของโปรตีน *bcl-2* ตั้งแต่ร้อยละ 15 จนถึงร้อยละ 60<sup>90-92</sup> ซึ่งรายงานการสะสมของโปรตีน *bcl-2* ที่แตกต่างกันอาจเกิดจากการใช้ค่า cut-off point ที่แตกต่างกันหรือการติดสีของโปรตีนเมื่อศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีมีสตรี้อาจไม่บ่งชี้สถานะภาพที่แท้จริงในการแสดงออกของยีน *bcl-2* ได้อย่างถูกต้อง โดย Chen และคณะ<sup>92</sup> พบ mRNA ของยีน *bcl-2* ในมะเร็ง

ช่องปาก ร้อยละ 88 ในขณะที่พบการสะสมของโปรตีน bcl-2 เพียงร้อยละ 29 ทั้งนี้เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงในระดับ post-transcription ทำให้ mRNA ที่ transcription จากยีน *bcl-2* ไม่สามารถ translate เป็นโปรตีน bcl-2 ทั้งหมด

ผลการวิจัยครั้งนี้และรายงานวิจัยอื่นแสดงให้เห็นว่ามะเร็งศีรษะและลำคอมีการแสดงออกโปรตีน bcl-2 น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ โดยมีรายงานว่าสามารถพบการสะสมของโปรตีน bcl-2 ร้อยละ 90-100 ของเยื่อเมือช่องปากปกติ<sup>29,93</sup> ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบเหตุผลว่าทำไมจึงมีการแสดงออกของ bcl-2 ลดลงในมะเร็งต่างๆที่ bcl-2 ควรจะเพิ่มขึ้นเพราะว่า bcl-2 เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการตายของเซลล์ การศึกษาในครั้งนี้พบการสะสมของโปรตีน bcl-2 ในชั้นฐานและเนื้อฐานซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา<sup>29,90,94</sup> แต่การวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการสะสมของโปรตีน bcl-2 และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่พบการสะสมของโปรตีน bcl-2 เพิ่มขึ้นในมะเร็งที่มีความรุนแรงระดับ poor differentiation<sup>62,90,92</sup> ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากชิ้นเนื้อมะเร็งที่นำมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็น well differentiation และ moderate differentiation โดยมีชิ้นเนื้อที่เป็น poor differentiation จำนวนน้อยทำให้ไม่มีการกระจายของกลุ่มตัวอย่างมากพอที่จะนำมาเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของ bcl-2 อย่างไรก็ตามแม้การวิเคราะห์ทางสถิติไม่ยืนยันความสัมพันธ์ระหว่าง bcl-2 กับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ในมะเร็งศีรษะและลำคอแต่การพบ bcl-2 ในมะเร็งดังกล่าวที่มีความรุนแรงระดับ well differentiation และ moderate differentiation แสดงให้เห็นว่าการสะสมของโปรตีน bcl-2 อาจมีบทบาทเกี่ยวกับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์นอกเหนือจากการยับยั้งไม่ให้เซลล์ตาย<sup>95</sup>

## 6. การแสดงออกของโปรตีน bax

ยีน *bax* เป็นยีนในกลุ่มเดียวกับยีน *bcl-2* แต่ทำหน้าที่ตรงข้ามกับยีน *bcl-2* คือกระตุ้นให้เซลล์ตาย จากการศึกษาในครั้งนี้พบการสะสมของโปรตีน bax ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสจำนวนร้อยละ 92 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Xie และคณะ<sup>96</sup> ซึ่งพบการสะสมของโปรตีน bax ร้อยละ 98 ส่วน Chen และคณะ<sup>92</sup> รายงานว่าพบการสะสมของโปรตีน bax ร้อยละ 89 ในขณะที่ Jordan และคณะ<sup>90</sup> รายงานว่าพบการสะสมของโปรตีน bax ในมะเร็งช่องปากร้อยละ 63 และการสะสมของโปรตีนดังกล่าวจะเพิ่มเป็นร้อยละ 72 ในมะเร็งที่มีความรุนแรงระดับ well differentiation อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมโปรตีน bax กับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ ในขณะที่รายงานวิจัยบางฉบับแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมโปรตีน bax กับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์โดยพบการสะสมโปรตีน bax ลดลงในมะเร็งที่มีความรุนแรงใน

ระดับ poor differentiation<sup>97</sup> หนึ่ง การศึกษานี้พบการสะสมโปรตีน bax ส่วนใหญ่ในชั้นเหนือฐาน และชั้นผิวหรือบริเวณส่วนกลางของกลุ่มเซลล์มะเร็งซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยฉบับอื่น<sup>29,90</sup> อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ทำให้มะเร็งศีรษะและลำคอมีการเพิ่มปริมาณ bax หรือ apoptosis

## 7. ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับการเจริญงอกขยาย

ในสภาวะปกติโปรตีน p53 ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการเจริญงอกขยายของเซลล์ ดังนั้นหากยีน p53 กลายพันธุ์จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำหน้าที่ของโปรตีน ทำให้เซลล์ไม่สามารถหยุดตรวจสอบความผิดปกติและมีการถ่ายทอดความผิดปกตินั้นไปยังเซลล์ลูก Ki-67 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้วัดการเจริญงอกขยาย<sup>42,98,99</sup> โดยวัดการเจริญงอกขยายทุกระยะของเซลล์ยกเว้นระยะ G<sub>0</sub> การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของการแสดงออกของ p53 กับการเจริญงอกขยายโดยใช้แอนติบอดี Ki-67 ในครั้งนี้ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ<sup>72,100,101</sup> แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีน p53 ไม่มีผลโดยตรงต่อการเจริญงอกขยายของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำหน้าที่ของโปรตีน p53 นอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีน p53 เองแล้วยังขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ภายในเซลล์<sup>102</sup> นอกจากนั้นพบว่าในการควบคุมการเจริญของเซลล์นั้นอาจเกิดจากปัจจัยอื่นนอกเหนือจาก p53 อาทิ Ha-ras, C-fos, ยีนในกลุ่ม jun และ c-myc รวมทั้ง trophic factors<sup>103</sup> นอกจากปัจจัยทางชีวภาพที่กล่าวมาแล้วยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากการใช้ Ki-67 เป็นตัวชี้วัดการเจริญงอกขยายทั้งนี้เนื่องจาก Ki-67 เป็นโปรตีนที่ใช้บอกสภาวะ(state)ที่เซลล์กำลังมีการเจริญงอกขยายแต่ไม่สามารถบ่งชี้อัตรา(rate)การเจริญงอกขยายที่แท้จริงของเซลล์ได้<sup>104</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ในระยะต้นของ G<sub>1</sub> มีการแสดงออกของ Ki-67 ในระดับต่ำซึ่งอาจไม่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีได้และมีผลให้การประเมินสถานภาพการเจริญงอกขยายต่ำกว่าความเป็นจริง<sup>105</sup>

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Warnakulasuriya<sup>106</sup> ที่พบว่ามะเร็งที่มีความผิดปกติของโปรตีน p53 จะมีการเจริญงอกขยายของเซลล์เมื่อวัดด้วยแอนติบอดี Ki-67 เพิ่มขึ้นอันเป็นการแสดงว่าเมื่อโปรตีน p53 สูญเสียการทำงานที่ไปจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญงอกขยายเพิ่มขึ้น

## 8. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p21 กับ p53

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ที่วัดโดยโปรตีน p21 จะขึ้นกับสถานะของ p53 หรือไม่ โดยในการทดลองนี้พบว่าร้อยละ 56(29/52) ของชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษา มีการแสดงออกของ p21 ที่ขึ้นกับ p53(p53-dependence) และร้อยละ 44(23/52) ไม่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง p21 กับ p53(p53-independence) ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานของ Ng และคณะ<sup>49</sup> ที่พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก 84 รายมีการแสดงออกของ p21 ที่ขึ้นกับ p53 ร้อยละ 35 และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา<sup>20,21,107,108</sup> ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าการแสดงออกของยีน p53 ในการหยุดวงจรเซลล์ที่ผิดปกติได้ดำเนินไปโดยอาศัยกลไกต่างๆ รวมทั้งการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน p21<sup>109</sup> ซึ่งจากผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามะเร็งอาจเกิดจากกลไกอื่นนอกเหนือจากการกลายพันธุ์ของยีน p53 โดยมีรายงานว่า การสะสมของโปรตีน p21 อาจเกิดขึ้นได้แม้มีการกลายพันธุ์ของยีน p53<sup>24,76</sup> และระดับการแสดงออกของ p21 อาจไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดมะเร็งหรือโปรตีน p21 เพียงลำพังไม่สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้

นอกจากนั้นการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการสะสมของโปรตีน p21 อาจเกิดขึ้นได้โดยไม่เกี่ยวข้องกับสถานะของ p53 เช่น การศึกษาโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์จะถูกกระตุ้นให้สร้าง p21 มากขึ้นเมื่ออยู่ในสถานะ serum starvation, สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเซลล์อื่น (contact inhibition) และเมื่อเซลล์แก่ (senescence)<sup>76</sup> อันเนื่องมาจากการสร้าง p21 อาจเกิดจากการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , vitamin D, TPA, MyoD, nerve growth factor และ okadaic acid<sup>38,110,111</sup> นอกจากนี้มีรายงานว่า การสะสมของโปรตีน p21 ภายในเซลล์สามารถเกิดในหนูที่ขาดยีน p53<sup>112</sup> จากรายงานวิจัยต่างๆ ที่กล่าวมา รวมทั้งการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการสะสมของโปรตีน p21 ไม่จำเป็นต้องขึ้นกับการทำหน้าที่ของโปรตีน p53 เพียงอย่างเดียวซึ่งเป็นการชี้ชัดว่าการสร้างโปรตีน p21 อาจเกิดขึ้นได้โดยไม่ผ่านการทำงานของ p53<sup>113</sup>

## 9. ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับการตายของเซลล์

การตายของเซลล์เป็นกระบวนการที่สิ่งมีชีวิตใช้กำจัดเซลล์ที่ไม่จำเป็นซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาสมดุลและช่วยกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติหรือได้รับความเสียหาย ดังนั้นความผิดปกติของกระบวนการตายของเซลล์จึงมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของมะเร็งโดยส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดมากขึ้น เมื่อ DNA ภายในเซลล์ได้รับความเสียหายโปรตีน p53 จะกระตุ้นให้เซลล์ซึ่งได้รับความเสียหายนั้นหยุดซ่อมแซม DNA ที่ระยะ G<sub>1</sub> ก่อนเข้าสู่ระยะ S แต่หาก DNA ได้รับความเสียหายเกินกว่าที่เซลล์

จะซ่อมแซมได้โปรตีน p53 จะกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตาย<sup>114</sup> โดยควบคุมการแสดงออกของ ยีน *bcl-2* และ ยีน *bax*<sup>115</sup>

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าร้อยละ 55 เป็นการตายของเซลล์มะเร็งที่เชื่อว่าเกิดขึ้นโดยผ่านการควบคุมของ p53(p53-dependence) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yao และคณะ<sup>63</sup> ที่รายงานว่า มีเพียงร้อยละ 60 ของมะเร็งที่ลึ้นที่มีการตายของเซลล์มะเร็งขึ้นกับ p53 นอกจากนั้นการวิจัยนี้ยังพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง p53 กับ *bcl-2* หรือ *bax* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น<sup>91,116,117</sup> อันแสดงว่าการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในมะเร็งชนิดสแควมัสของศีรษะและลำคออาจไม่ขึ้นกับ p53 เพียงปัจจัยเดียว โดยอาจเกิดขึ้นได้ทั้งที่อาศัยและไม่อาศัยกลไกการทำหน้าที่ของโปรตีน p53<sup>118-120</sup> อนึ่งเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในการแสดงออกของยีน *bcl-2* และ *bax* พบว่าเซลล์มะเร็งมีการสะสมโปรตีน *bcl-2* น้อยกว่า *bax* ทำให้อัตราส่วนระหว่างโปรตีนทั้งสอง(*bcl-2/bax*)ในมะเร็งลดลง ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Loro และคณะที่ศึกษาในมะเร็งช่องปากมนุษย์<sup>29</sup> และ Shilkaitis และคณะที่ศึกษาในหนูที่ทำให้เป็นมะเร็งเต้านม<sup>121</sup> ผลการศึกษาในอดีตรวมทั้งการวิจัยครั้งนี้บ่งชี้ว่ามี apoptosis เกิดขึ้นมากในการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะชนิดที่มีความรุนแรงระดับ well differentiation ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ก่อให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว

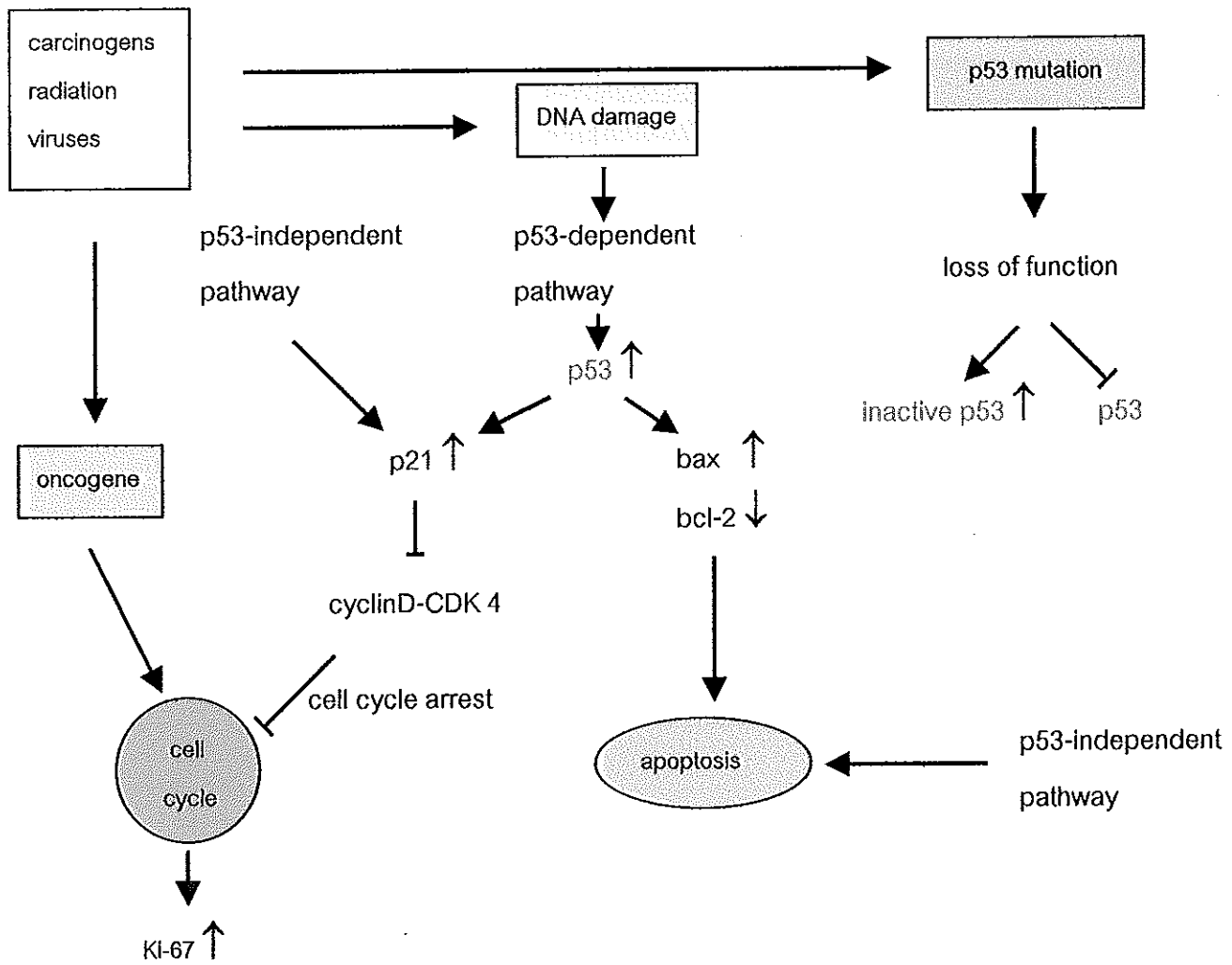
#### 10. ความสัมพันธ์ระหว่าง p53, p21, *bcl-2*, *bax* และ Ki-67 ในการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอ

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่ามะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ไม่ได้รับการแก้ไขและถูกถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูก โดยกระบวนการเกิดโรคมะเร็งมีหลายขั้นตอนและเกี่ยวข้องกับยีนหลายชนิด รวมทั้งยีนมะเร็ง(*oncogene*) และยีนต้านมะเร็ง(*tumor suppressor gene*) ความผิดปกติของยีนดังกล่าวมีผลให้เซลล์เสียสมดุลในการควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยหลายวิธีการรวมทั้งการวัด Ki-67 ซึ่งการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการสร้าง Ki-67 เพิ่มขึ้นในมะเร็งศีรษะและลำคอ ยีน *p53* เป็นยีนต้านมะเร็งที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันและแก้ไขไม่ให้เซลล์มีความผิดปกติและกลายเป็นมะเร็ง โดยในสภาวะที่มีความผิดปกติเกิดขึ้นที่ DNA ยีน *p53* จะถูกกระตุ้นให้สร้างโปรตีน p53 ซึ่งมีหน้าที่หยุดวงจรเซลล์เพื่อแก้ไขความผิดปกติดังกล่าวหรืออาจทำให้เซลล์ที่ผิดปกติและไม่สามารถแก้ไขความผิดปกตินั้นได้ตายไป จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าร้อยละ 50 ของการแสดงออกของโปรตีน p53 ผิดปกติ ซึ่งยืนยันผลการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานว่าโดยทั่วไปจะพบการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ได้ในมะเร็งชนิดต่างๆรวมทั้งมะเร็งศีรษะและลำคอซึ่งความถี่ที่พบความผิดปกตินั้นจะขึ้นกับชนิดของมะเร็ง แต่โดยเฉลี่ยแล้วพบได้มากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของ *p53* ทำให้ยีนไร้เสถียรภาพและเอื้อต่อการเกิดมะเร็ง ด้วยเหตุที่กล่าวมาแล้วจะ



เห็นได้ว่าการที่ยีน p53 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหยุดวงจรเซลล์และการตายของเซลล์จึงทำให้การทำงานของยีน p53 เกี่ยวข้องกับยีนอื่นๆ อาทิ bcl-2, bax และ p21 โปรตีน p53 ทำหน้าที่หยุดวงจรเซลล์โดยกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนหลายชนิดรวมทั้ง p21 โดย p21 ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมวงจรเซลล์ อาทิ CDK2 CDK4 และ CDK6 อนึ่ง p21 อาจถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยอื่นนอกเหนือจาก p53 นอกจากบทบาทในการหยุดวงจรเซลล์แล้ว p21 ยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ การวิจัยครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของ p21 มีทั้งที่เกี่ยวข้องกับ p53 และไม่เกี่ยวข้องกับ p53

การศึกษาการตายของเซลล์โดยการวัด bcl-2 และ bax ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ พบว่าเซลล์มะเร็งมีอัตราส่วนของ bcl-2 ต่อ bax ลดลง ทำให้เชื่อว่ามะเร็งอาจมีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นในขณะที่มีการเพิ่มการเจริญงอกขยายมากกว่าและทำให้เซลล์ที่ผิดปกติมีการแบ่งตัวมากขึ้นจนกลายเป็นมะเร็ง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีมะเร็งศีรษะและลำคออีกประมาณร้อยละ 50 ที่ไม่พบความผิดปกติในการแสดงออกของโปรตีน p53 ซึ่งเป็นข้อมูลที่บ่งชี้โดยนัยว่ากระบวนการเกิดมะเร็งอาจเกิดขึ้นได้โดยไม่เกี่ยวข้องกัน p53 (p53-independent pathway) โดยอาจเกิดจากความผิดปกติของยีนอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของ p53 จากการศึกษาครั้งนี้รวมทั้งรายงานวิจัยอื่นจึงสรุปความสัมพันธ์ระหว่าง p53, p21, bcl-2, bax และ Ki-67 ในการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอได้ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่าง p53, p21, bcl-2, bax และ Ki-67 ในการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอ (—| แทน การยับยั้ง)

## สรุปผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. พบความผิดปกติในการสะสมของโปรตีน p53, p21, bcl-2, bax และ Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส
2. ยีน p53 สูญเสียการทำงานที่จำนวนร้อยละ 50 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส
3. ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกอย่างผิดปกติของโปรตีน p53 และการสะสมโปรตีน p21, bcl-2, bax และ Ki-67 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสและไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของโปรตีนเหล่านี้กับระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส
4. การสะสมของโปรตีน p21 ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสอาจเกิดขึ้นได้ทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีน p53
5. มะเร็งศีรษะและลำคามีอัตราส่วน bcl-2/bax ลดลงโดยมีความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งแสดงว่ามีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นในมะเร็งดังกล่าว
6. กระบวนการตายของเซลล์เกิดขึ้นทั้งที่อาศัยและไม่อาศัยการควบคุมจากการทำหน้าที่ของโปรตีน p53
7. การสะสมของโปรตีน p53 ไม่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญงอกขยายของเซลล์ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัส
8. การเจริญงอกขยายของเซลล์มีอิทธิพลในกระบวนการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอทั้งนี้เนื่องจากแม้จะพบว่าเซลล์มะเร็งมีการตายมากขึ้นแต่กลไกดังกล่าวก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญงอกขยายของเซลล์ที่ผิดปกติได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Saunders, J.R. 1997. The genetic basis of head and neck carcinoma. *Am J Surg* 174: 459-461.
2. Goodger, N.M., Gannon, J., Hunt, T. and Morgan, P.R. 1997. Cell cycle regulatory proteins —an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol* 33: 61-73.
3. Israels, E.D. and Israels, L.G. 2000. The cell cycle. *The Oncologist* 5: 510-513.
4. Emilion, G., Langdon, J.D., Speight, P. and Partridge, M. 1996. Frequent gene deletions in potentially malignant oral lesions. *Br J Cancer* 73: 809-813.
5. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
6. Harris, A.L. 1990. Mutant p53—the commonest genetic abnormality in human cancer? *J Pathol* 6: 162-165.
7. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
8. Lavielle, J.P., Brambilla, E., Riva-Lavielle, C., Reyt, E., Charachon, R. and Brambilla, C. 1995. Immunohistochemical detection of p53 protein in preneoplastic lesions and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngologica* 115: 344-339.
9. McBride, O.W., Merry, D. and Givol, D. 1986. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 130-134.
10. Steele, R.J.C., Thompson, A.M., Hall, P.A. and Lane, D.P. 1998. The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg* 85: 1460-1467.
11. Lane, D.P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
12. Field, J.K., Pavelic, Z.P., Spandidos, D.A., Stambrook, P.J., Jones, A.S. and Gluckman, J.L. 1993. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 1118-1122.
13. Scully, C., Field, J.K. and Tanzawa, H. 2000. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 36: 311-327.

14. Nylander, K., Dabelsteen, E. and Hall, P.A. 2000. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 29: 413-425.
15. Harris, C.C. 1993. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262: 1980-1981.
16. Boyle, J.O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R.H., Roa, R.A., Correo, R., Eby, Y.J., Ruppert, J.M. and Sidransky, D. 1993. The incidence of p53 mutation increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 53: 4477-4480.
17. Gangopadhyay, S.B., Abraham, J., Lin, Y.P. and Benchimol, S. 1997. "The tumour suppressor gene p53", In *oncogenes and tumour suppressors*. p261-291. Peters, G. and Vousden, K.H. New York: Oxford university press.
18. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1993. *WAF 1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.
19. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. 1993. The p21 Cdk – interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
20. van Oijen, M.G.C.T., Tilanus, M.G.J., Medema, R.H. and Slootweg, P.J. 1998. Expression of p21(Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Pathol Med* 27: 367-375.
21. Yook, J.I. and Kim, J. 1998. Expression of p21 WAF1/ CIP1 is unrelated to p53 tumour suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 34: 198-203.
22. Warnakulasuriya, K.A.A.S., Tavassoli, M. and Johnson, N.W. 1998. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 27: 376-381.
23. Israels, L.G. and Israels, E.D. 1999. Apoptosis. *The Oncologist* 4: 332-339.
24. Nadal, A., Jares, P., Cazorla, M., Fernandez, P.L., Sanjuan, X., Hernandez, L., Pinyol, M., Aldea, M., Mallofre, C., Muntane, J., Traserra, J., Campo E. and Cardesa,

- A. 1997. p21<sup>WAF1/Cip1</sup> expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 183: 156-163.
25. Kerr, J.F.R., Winterford, C.M. and Harmon, B.V.C. 1994. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026.
26. Thomson, C.B.C. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
27. Korsmeyer, S.J. 1999. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res (Suppl)* 59: 1693s-1700s.
28. Hockenbery, D.M. 1994. bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci (Suppl)* 18: 51-55.
29. Loro, L.L., Vintermyr, O.K., Liavaag, P.G., Jonsson, R. and Johannessen, A.C. 1999. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol* 30: 1097-1105.
30. Reed, J.C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6.
31. Lu, Q., Abel, P., Foster, C.S. and Lalani, E. 1994. *Bcl-2*: Role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 27: 102-110.
32. Korsmeyer, S.J. 1992. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886.
33. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P. and Croce, P.C. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097-1099.
34. Tsujimoto, Y., Jaffe, E. and Croce, C.M. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443.
35. Friedman, M., Grey, P., Venkatesan, T.K., Bloch, I., Chawla, P., Caldarelli, D.D. and Coon, J.S. 1997. Prognostic significance of bcl-2 expression in localized squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 160: 445-450.
36. Miyashita, T. and Reed, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80: 293-299.

37. Ito, T., Fujieda, S., Tsuzuki, H., Sunaga, H., Fan, G., Sugimoto, C., Fuguda, M. and Saito, H. 1999. Decreased expression of bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 140: 81-91.
38. Cox, L.S. 1997. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21<sup>Cip1/WAF1/Sdi1</sup>. *J Pathol* 183: 134-140.
39. Hall, P.A., and Levison D.A. 1990. Review : Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43: 184-192.
40. Scott, R.J., Hall, P.A., Haldane, J.S., Noorden, S.V., Price, Y., Lane, D.P. and Wright, N.A. 1991. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 165: 173-178.
41. Hall, P.A. and Coates, P.J. 1995. Assessment of cell proliferation in pathology-what next? *Histopathology* 26: 105-112.
42. Gerdes, J., Schwab U., Lemke, H. and Stein, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20.
43. Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E. and Flad, H. 1991. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138: 867-873.
44. Rose, D.S.C., Maddox, P.H. and Brown, D.C. 1994. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 47: 1010-1014.
45. Bryne, M., Koppang, H.S., Lilleng, R., Stene, T., Bang, G. and Dabelsteen, E. 1989. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Borders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 18: 432-437.
46. Bryne, M., Koppang, H.S., Lilleng, R. and Kjaerheim, A. 1992. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 166: 375-381.

47. Quinn, C.M. and Wright, N.A. 1990. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 160: 93-102.
48. Koontongkaew, S., Chareonkitkajorn, L., Chanvitan, A., Leelakriangsak, M., Amornphimontham, P. 2000. Alterations of p53, pRb, cyclin D<sub>1</sub> and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 36: 334-339.
49. Ng, I.O.L., Lam, K.Y., Ng, M. and Regezi, J.A. 1999. Expression of p21/ waf1 in oral squamous cell carcinomas—correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol* 35: 63-69.
50. Raybaud-Diogene, H., Tetu, B., Morency, R., Fortin, A. and Monteil, R.A. 1996. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Oral Oncol* 32: 143-149.
51. Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D. and Harris, A.L. 1990. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679.
52. Broders, A.C. 1920. Squamous-cell epithelioma of the lip. *J Am Med Assoc* 74: 656-664.
53. Anneroth, G., Batsakis, J. and Luna, M. 1987. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 95: 229-249.
54. Bryne, M. 1991. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinomas: a review. *J Oral Pathol Med* 20: 413-420.
55. Anneroth, G. and Hansen, L.S. 1984. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res* 92: 448-468.
56. Fisher, H.R. 1975. Grading of biopsies of laryngeal carcinomas by multiple criteria. *Can J Otolaryngol* 4: 881-884.
57. Warnakulasuriya, K.A.A.S. and Johnson, N.W. 1992. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 21: 404-408.



58. Regezi, J.A., Zarbo, R.J., Regev, E., Pisanty, S., Silverman, S. and Gazit, D. 1995. p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and *in situ* carcinoma. *J Oral Pathol Med* 24: 18-22.
59. Shin, D.M., Kim, J., Ro, J.Y., Hittelman, J., Roth, J.A., Hong, W.K. and Hittelman, W.N. 1994. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54: 321-326.
60. Obata, A., Eura, M., Sasaki, J., Saya, H., Chikamatsu, K., Tada, M., Iggo, R.D. and Yumoto, E. 2000. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer* 89: 187-193.
61. Walting, D.L., Gown, A.M. and Coltrera, M.D. 1992. Overexpression of p53 in head and neck cancer. *Head Neck* 14: 437-444.
62. Narayna, A., Vaughan, A.T., Gunaratne, S., Kathuria, S., Walter, S.A. and Reddy, S.P. 1998. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer* 82: 286-291.
63. Yao, L., Iwai, M. and Furuta, I. 1999. Correlations of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 35: 56-62.
64. Rubio, M.P., von Deimling, A., Yandell, D.W., Wiestler, O.D., Gusella, J.F. and Louis, D.N. 1993. Accumulation of wild type p53 protein in human astrocytomas. *Cancer Res* 53: 3465-3467.
65. Xu, L., Chen, Y.T., Huvos, A.G., Zlotolow, I.M., Rettig, W.J., Old, L.J. and Garin-Chesa P. 1994. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinomas of head and neck without apparent gene mutation. *Diagn Mol Pathol* 3: 83-92.
66. Nylander, K., Nilsson, P., Mehle, C. and Roos, G. 1995. p53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 71: 826-830.
67. Thompson, A.M., Anderson, T.J., Condie, A., Prosser, J., Chetty, U., Carter, D.C., Evans, H.J. and Steel, C.M. 1992. p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 50: 528-532.

68. Bodner, S.M., Minna, J.D., Jensen, S.M., D' Amico, D., Carbone, D., Mitsudomi, T., Fedorko, J., Buchagen, D.L., Nau, M.M., Gazdar, A.F. et al. 1992. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 7: 743-749.
69. MacGeoch, C., Barnes, DM., Newton, J.A., Mohammed, S., Hodgson, S.V., Ng, M., Bishop, D.T. and Spurr, N.K. 1993. p53 protein detected by immunohistochemical staining is not always mutant. *Dis Markers* 11: 239-250.
70. Midgley, C.A. and Lane, D.P. 1997. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on mdm2 binding. *Oncogene* 15: 1179-1189.
71. Wynford-Thomas D. 1992. p53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry?: editorial. *J Pathol* 166: 329-330.
72. Wood, N.B., Kotelnikov, V.D., Caldarelli, D.D., Hutchinson, J., Panje, W.R., Hedge, P., Leurgans, S., LaFollette, S., Taylor, S.G., Preisler, M.D. and Coon, J.S. 1997. Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck: relationship to tumor cell proliferation. *Laryngoscope* 107: 827-833.
73. Jacquemier, J., Moles, J.P., Penault-Llorca, F., Adelaide, J., Torrente, M., Viens, P., Birnbaum, D. and Theillet, C. 1994. p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results. *Br J Cancer* 69: 846-852.
74. Darnton, S.J. 1998. Demystified...p53. *J Clin Pathol* 51: 245-253.
75. Erber, R., Klein, W., Andl, T., Enders, C., Born, A.I., Conradt, C., Bartek J. and Bosch, F.X. 1997. Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head and neck cancer. *Int J Cancer* 74: 383-389.
76. Agarwal, S., Mathur, M., Shukla, N.K. and Ralhan, R. 1998. Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21<sup>waf1/cip1</sup> in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status. *Oral Oncol* 34: 353-360.
77. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.

1995. Topological control of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 55: 2910-2919.
78. Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D. and Lassar, A.B. 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267: 1018-1021.
79. Soddu, S., Blandino, G., Scardigli, R., Coen, S., Marchetti, A., Rizzo, M.G., Bossi, G., Cimino, L., Crescenzi, M. and Sacchi, A. 1996. Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J Cell Biol* 134: 193-204.
80. Poluha, W., Poluha, D.K., Chang, B. Crosbie, N.E., Schonhoff, C.M., Kilpatrick, D.L. and Ross, A.H. 1996. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1) is required for survival of differentiating neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 16: 1335-1341.
81. Wang, J. and Walsh, K. 1996. Resistance to apoptosis conferred by cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273: 359-361.
82. Cattoretti, G., Becker, M.H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. and Gerdes, J. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363.
83. Scholzen, T. and Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322.
84. Raybaud, H., Fortin, A., Bairati, I., Morency, R., Monteil, R.A. and Tetu, B. 2000. Nuclear DNA content, and adjunct to p53 and Ki-67 as a marker of resistance to radiation therapy in oral cavity and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Int. J Oral Maxillofac Surg* 29: 36-41.
85. Schoelch, M.L., Regezi, J.A., Dekker, N.P., Ng, I.O.L., McMillan, A., Zlober, B.L., Le, Q.T., Silverman, S. and Fu, K.K. 1999. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 35: 333-342.
86. Zidar, N., Gale, N., Cor, A. and Kambic, V. 1996. Expression of Ki-67 antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. *J Laryngol Otol* 110: 440-445.

87. Kushner, J., Bradley, G., Young, B. and Jordan, R.C.K. 1999. Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28: 77-81.
88. Saito, T., Nakajima, T. and Mogi, K. 1999. Immunohistochemical analysis of cell cycle analysis of cell-cycle associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 28: 226-232.
89. Roland, N.J., Caslin, A.W., Bowie, G.L. and Jones, A.S. 1994. Has the cell proliferation marker Ki-67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Clin Otolaryngol* 19: 13-18.
90. Jordan, R.C.K., Catzavelos, G.C., Barrett, A.W. and Speight, P.M. 1996. Differential expression of *bcl-2* and *bax* in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 32B: 394-400.
91. Hotz, M.A., Bosq, J., Zbaeren, P., Reed, J., Schwab, G., Krajewski, S., Brousset, P. and Borner, M.M. 1999. Spontaneous apoptosis and the expression of the p53 and *bcl-2* family proteins in locally advanced head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 417-422.
92. Chen, Y., Kayano, T. and Takagi, M. 2000. Dysregulated expression of *bcl-2* and *bax* in oral carcinomas: evidence of post-transcription control. *J Oral Pathol Med* 29: 63-69.
93. Kokawa, K., Shikone, T., Otani, T. and Nakano, R. 1999. Apoptosis and the expression of *bax* and *bcl-2* in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 85: 1799-1809.
94. Polakowska, R.R., Piachentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L.A. and Haake, A.R. 1994. Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cell. *Dev Dyn* 199: 176-188.
95. Harada, H., Mitsuyasu, T., Maruoka, Y., Toyoshima, K. and Yasumoto, S., 1998. Overexpression of *bcl-2* protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes *in vitro*. *J Oral Pathol Med* 27: 11-17.

96. Xie, X., De Angelis, P., Clausen, O.P.F. and Boysen, M. 1999. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 35: 502-509.
97. Ravi, D., Ramadas, K., Mathew, B.S., Nalinakumari, K.R., Nair, M.K. and Pillai, M.R. 1999. *De novo* programmed cell death in oral cancer. *Histopathology*. 34: 241-249.
98. McCormick, D., Chong, H., Hobbs, C., Datta, C. and Hall, P.A. 1993. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded section with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 22: 355-360.
99. Lui, S.C. and Klein-Szanto, A.J.P. 2000. Marker of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 36: 145-151.
100. Slootweg, P.J., Koole, R. and Hordijk, G.J. 1994. The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 30B: 138-141.
101. Nylander, K., Stenling, R., Gustafsson, H., Zackrisson, B. and Roos, G. 1995. p53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 75: 87-93.
102. Almog, N. and Rotter, V. 1997. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1333: 1-27.
103. Studzinski, G.P. 1989. Oncogenes, growth, and the cell cycle: an overview. *Cell Tiss Kinet* 22: 405-424.
104. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U. and Stein, H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1716.
105. Brown, D.C. and Gatter, K.C. 1990. Invited reviewed: monoclonal antibody Ki-67—its use in histopathology. *Histopathology* 17: 489-503.
106. Warnakulasuriya, K.A.A.S.W. 1994. Association of overexpression of p53 oncoprotein with the state of cell proliferation in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 23: 246-250.

107. Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W. and Elledge, S.J. 1995. p53-independent expression of p21<sup>Cip</sup> in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267: 1024-1027.
108. Zeng, X.Y. and El-Deiry, W.S. 1996. Regulation of p21<sup>WAF/Cip1</sup> expression by p53-dependent pathways. *Oncogene* 12: 1557-1564.
109. Waldman, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55: 5187-5190.
110. Di Giuseppe, J.A., Redston, M.S., Yeo, C.J., Kern, S.E. and Hruban, R.H. 1995. p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 47: 884-886.
111. Harada, K. and Ogden, G.R. 2000. An overview of the cell cycle arrest protein, p21<sup>WAF1</sup>. *Oral Oncol* 36: 3-7.
112. Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J.H., Mercer, W.E. and Givol, D. 1994. Induction of WAF/Cip1 by a p53 independent pathway. *Cancer Res* 54: 3391-3395.
113. Boulaire, J., Fotedar, A. and Fotedar, R. 2000. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol* 48: 190-202.
114. Cardon-Cardo, C. 1995. Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol* 147: 545-560.
115. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewski, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A. et al. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805.
116. Xie, X., Clausen, O.P.F., De Angelis, P. and Boysen, M. 1999. The prognostic value of spontaneous apoptosis, bax, bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 86: 915-920.
117. Dijkema, I.M., Struikmans, H., Dullens, H.F.J., Kal, H.B., van der Tweel, I., and Battermann, J.J. 2000. Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer proteins. *Oral Oncol* 36: 54-60.
118. O' Connor, L., Huang, D.C.S., O' Reilly, L.A. and Strasser, A. 2000. Apoptosis and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 12: 257-263.

119. Jackel, M.C., Dorudian, M.A., Marx, D., Brinck, U., Schauer, A. and Steiner, W. 1999. Spontaneous apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma is independent of bcl-2 and bax protein expression. *Cancer* 85: 591-599.
120. Mostafapour, S.P., Hockenbery, D.M. and Rubel, E.W. 1999. Life and death in otolaryngology: mechanisms of apoptosis and its role in pathology and treatment of disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 729-737.
121. Shilkaitis, A., Graves, J., Mehta, R.R., Hu, L., You, M., Lubet, R., Steele, V., Kelloff, G. and Christov, K. 2000. Bcl-2 and bax are differentially expressed in hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis. *Cell Growth Differ* 11: 437-455.

## ภาคผนวก

### 1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

#### 1.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(phosphate buffer)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. di-Sodium hydrogen phosphate( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (สาร A)
2. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (สาร B)
3. Sodium chloride( $\text{NaCl}$ ) (สาร C)

วิธีการเตรียม

ผสมสาร A 2.84 กรัม สาร B 2.40 กรัม สาร C 17.52 กรัม เติมน้ำกลั่น ผสมสารละลายให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าสาร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลาย 5M Sodium hydroxide ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 2 ลิตร

#### 1.2 การเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์(citrate buffer)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Citric acid (สาร A)
2. 5M Sodium hydroxide (สาร B)

วิธีการเตรียม

ผสมสาร A 2.1 กรัมลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าสาร ปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายด้วย 5M Sodium hydroxide ให้ได้ 6.00 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

### 2. การเคลือบสไลด์ด้วยสารละลาย Poly-L-Lysine solution

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

Poly-L-Lysine solution

วิธีการเตรียม

1. นำสไลด์ที่จะเคลือบมาทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาด(detergent) ล้างด้วยน้ำกลั่น ปลออยสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
2. เจือจางสาร Poly-L-Lysine solution ด้วยน้ำที่สกัดเอาแร่ธาตุออกแล้ว(deionize water) ในอัตราส่วน 1:10
3. แช่สไลด์ในสารละลายที่เตรียมไว้นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ปลออยสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง



### 3. การเตรียมสารละลาย 0.02% 3-amino-9-ethyl-carbazole

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. 3-amino-9-ethyl-carbazole (สาร A)
2. N, N dimethyl formamide (สาร B)
3. 0.1 M acetate buffer pH5 (สาร A)

วิธีการเตรียม

1. สารละลาย A 10 มิลลิกรัม ในสารละลาย B 2.5 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นผสมสารละลาย B ลงไป 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ผสมสารละลายที่เตรียมในข้อ 1 จำนวน 100 ไมโครลิตรกับสาร C จำนวน 900 ไมโครลิตร
3. เติม 3.5% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป 40 ไมโครลิตร
4. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman (no.1)

### 4. การเตรียมสารละลาย Meyer' s hematoxylin solution

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Hematoxylin (สาร A)
2. Sodium iodate (สาร B)
3. Potassium alum (สาร C)
4. Citric acid (สาร D)
5. Chloral hydrate (สาร E)

วิธีการเตรียม

ผสมสาร A 1 กรัมลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าสาร หลังจากนั้นผสมสารละลาย B ลงไป 0.2 กรัม และสาร C ลงไป 50 กรัม ผสมให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าสาร จากนั้นผสมสาร D ลงไป 1 กรัม และสาร E ลงไป 50 กรัม ผสมให้เข้ากัน

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวนุจรี เสาวภา

วัน เดือน ปีเกิด 22 กุมภาพันธ์ 2515

## วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2539