



245688



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในมะเร็งเซลล์
ในสุนัขทางเซลล์พยาธิวิทยาวิจัย

โดย

อจริยา ไสละสูต
- अनुเทพ รังสีพิพัฒน์
ภัทรกฤษฎิ์ ธีระสุตระกุล

กุมภาพันธ์ 2555



245688



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การแสดงออกของอองโคยีน $c - kit$ ในมะเร็งเซลล์
ในสุนัขทางเซลล์พยาธิวิทยาวิจัย

โดย

อัจฉริยา ไสละสุต
อนุเทพ รังสีพิพัฒน์
ภัทรกฤษฎิ์ ธีระสูตรระกูล



กุมภาพันธ์ 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2552 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ Prof. Dr. Vilma Yuzbasiyan-Gurkan, และอาจารย์ สัตวแพทย์หญิงทัศนาว ไทยวงษ์ Department of Small Animal Clinical Sciences, Michigan State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับตัวอย่างยีนกลายพันธุ์ของ *c-kit* ตัวควบคุมบวก (Positive control) และตัวควบคุมปกติ (Normal control) ของมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข สำหรับการทดลอง Polymerase Chain Reaction รวมทั้ง ขอขอบคุณเจ้าของสัตว์ป่วยทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างและติดตามผล นายสัตวแพทย์และคณะทำงานเจ้าหน้าที่คลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก นักวิทยาศาสตร์ของหน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเซลล์และเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต

หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

ชื่อโครงการวิจัย

การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขทางเซลล์
พยาธิวิทยา

ชื่อผู้วิจัย

รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสุต

รศ.น.สพ.ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์

น.สพ.ภัทรกฤษ ชีวสุตระกูล

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ

ธันวาคม พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ

245688

เนื้องอกหรือมะเร็งที่ผิวหนังชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขเป็นเนื้องอกที่พบได้เป็นอันดับสองในสุนัข เนื้องอกชนิดนี้มีอุบัติการณ์อยู่ระหว่าง 7-21% สุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดนี้จะมีอายุโดยเฉลี่ยที่ 8 ปี การเกิดเนื้องอกชนิดนี้ไม่ขึ้นอยู่กับการสายพันธุ์และเพศของสุนัข และเนื้องอกชนิดนี้ต้องการการวินิจฉัย จำแนกเกรด รวมทั้งการพยากรณ์โรคที่รวดเร็ว ในปัจจุบันวิธีที่เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยจำแนกเกรดและพยากรณ์เนื้องอกชนิดนี้จะใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยาโดย Patnaik และคณะ (1984) การเจาะดูดเซลล์เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยพยาธิสัตวแพทย์ในการตรวจกรองก้อนเนื้องอกและมะเร็งซึ่งสะดวกและรวดเร็ว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ ในการใช้ตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่เก็บได้จากการเจาะดูด นำมาช่วยในการวินิจฉัยจากรูปแบบการติดสี KIT หรือ CD117 ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมี และการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* รวมทั้งตรวจการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีการเจาะดูด จากสุนัขป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ จำนวน 30 ตัว พบว่าสุนัขมีอายุเฉลี่ย 9.6 ปี (>5 - 18 ปี) เป็นเพศเมียร้อยละ 40 (12/30) และ เพศผู้ร้อยละ 60 (18/30) พันธุ์สุนัขที่พบคือ พันธุ์ผสม ร้อยละ 53.34 (16/30) และพันธุ์แท้ร้อยละ 46.66 (14/30) การติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมี พบว่าการติดสีรูปแบบที่ II ร้อยละ 46.66 (14/30) รูปแบบที่ III ร้อยละ 33.33 (10/30) และรูปแบบที่ I ร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมีมีความสัมพันธ์กับเกรดที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.641$, $P < 0.05$) และได้เปรียบเทียบรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมีจากตัวอย่างเซลล์ที่เก็บโดยวิธีเจาะดูด พบว่า รูปแบบที่ II ร้อยละ 40 (12/30) รูปแบบที่ III ร้อยละ 36.66 (11/30) และรูปแบบที่ I ร้อยละ 23.33 (7/30) ตามลำดับ ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของ

เซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไฮสโตเคมี มีความสัมพันธ์กับเกรดจากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615, P < 0.05$) ดังนั้นรูปแบบการติดสี KIT หรือ CD117 ของเซลล์มะเร็ง และ เนื้อเยื่อจากมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไฮสโตเคมี และอิมมูโนฮิสโตเคมี ตามลำดับมีความสัมพันธ์กับวิธีการจำแนกเกรดมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยาสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้ และพบว่าการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธีพีซีอาร์ จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) โดยพบการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ปกติที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) ในตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (9 ตัวอย่าง) เกรด II (6 ตัวอย่าง) และ เกรด III (5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ และพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ร้อยละ 28.57 (8/28) ในตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งมาสต์เซลล์ เกรด II (5 ตัวอย่าง) และเกรด III (3 ตัวอย่าง) ดังนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด สามารถใช้ศึกษาการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* พบในมะเร็งมาสต์เซลล์ทั้งเกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I และพบว่าอาการทางคลินิกและการประเมินสุขภาพทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือด ไม่พบความสัมพันธ์กับเกรดของเนื้องอกและการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* สรุปผลการประยุกต์ใช้เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูดจากมะเร็งมาสต์เซลล์ โดยใช้รูปแบบการติดสี KIT หรือ CD 117 ทางอิมมูโนไฮสโตเคมี สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการวินิจฉัยจำแนกเกรด และตรวจการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในการวินิจฉัย และพยากรณ์โรคมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขเพื่อช่วยกำหนดแผนการรักษาในระดับข้างตัวสัตว์ต่อไป

คำสำคัญ: มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด อิมมูโนไฮสโตเคมี พีซีอาร์

Project Title **The Expression of *c-kit* oncogene on Mast cell tumor in dogs by**

Cytopathology Diagnosis

Name of the Investigators	Assoc. Prof. Dr. Achariya Sailasuta
	Assoc. Prof. Dr. Anudep Rungsipipat
	Dr. Patharakrit Teewasutrakul

Year December 2010

Abstract

245688

Canine mast cell tumor (MCT) is the second most cutaneous tumor found in dogs. The incidence is varied from 7-21% and average age of dogs is approximately 8 years. There are no breed or even gender predilections. In general, the dogs with MCT are required a rapid assessment for grading, diagnosis and prognosis. Recently, the gold standard protocol used for MCT grading, diagnosis and prognosis has been based on Patnaik grading system (1984). To date, fine-needle aspiration is enable for pathologist and clinician in routinely screening for MCT diagnosis. Therefore, the objectives of this study are to establish the standard protocols of the immunocytochemical KIT (CD 117) staining patterns and expression of *c-kit* using fine needle aspiration mast cell tumors (FNA-MCT cells) from 30 MCT dogs at the Oncology Clinic, Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. The dogs were 9.6 years of age (>5 -18 years). There were male at 60% (18/30) and female at 40% (12/30). The breeds were mixed breed at 53.34% (16/30) and pure breed at 46.66% (14/30). By comparing the histopathology grading and immunohistochemical KIT (CD 117) staining patterns of MCT (IHC-MCT), the results revealed that IHC-MCT were mostly in pattern II at 46.66 % (14/30), pattern III at 33.33% (10/30) and pattern I at 20% (6/30) respectively. There was significantly positive correlated (Spearman Correlation: $r = 0.641$, $P < 0.05$). In case of immunocytochemical KIT (CD 117) staining patterns of MCT (ICC-MCT) in comparison to histopathology grading demonstrated that ICC-MCT were

also mostly in pattern II at 40 % (12/30), pattern III at 36.60% (11/30) and pattern I at 23.33% (7/30) respectively. There was significantly positive correlated (Spearman Correlation: $r = 0.615$, $P < 0.05$). It is suggested that both KIT staining patterns of ICC-MCT and IHC-MCT could be used as the practical tool for MCT grading in comparison to standard histopathology method. The establishment using FNA-MCT cells for *c-kit* expression by PCR was successfully performed which were demonstrated as 93.33 % (28/30). There were normal *c-kit* at 71.42% (20/28), which were 9 samples in grade I, 6 samples in grade II and 5 samples in grade III respectively. While, the mutation in Exon 11 of *c-kit* was at 28.57 % (8/28), which were 5 samples in grade II and 3 samples in grade III. The mutation of *c-kit* in MCT grade I could not be detected. Regards to the clinical signs, hematological and blood chemistry analysis, there was no significant correlated to the grade and mutation of Exon 11 of *c-kit*. In conclusion, it is speculated that the methods used in this study based on FNA-MCT cells could be used as a bed-side tool for MCT grading, diagnosis, prognosis, and therapeutic planning.

Keywords: Canine mast cell tumor, *c-kit* expression, Fine needle aspiration sample, KIT, (CD117) immunocytochemistry, PCR

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	iv
สารบัญ.....	vi
สารบัญตาราง.....	viii
สารบัญภาพ.....	ix

บทที่

1. คำนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2. การสำรวจแนวคิด และการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เนื้องอกและมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข.....	3
2.2 เทคนิคการเจาะดูดเซลล์.....	4
2.3 วิธีimmunohistochemistry.....	5
2.4 อองไคยีน <i>c-kit</i> และการกลายพันธุ์.....	5
3. วิธีการวิจัย.....	12
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	13

3.2	วิธีการศึกษารูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) IHC-MCT.....	15
3.3	วิธีการศึกษารูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ICC-MCT.....	16
	ตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)	
3.4	วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>c-kit</i> และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ <i>c-kit</i> จาก FNA-MCT cells ด้วยเทคนิค PCR.....	16
4.	ผลการวิจัย และการวิเคราะห์ข้อมูล.....	18
4.1	รูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ในตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนัง ในสุนัขทางภูมิคุ้มกัน โนฮิสโตเคมี และการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา.....	18
4.2	ผลของรูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ICC-MCT และการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา.....	20
4.3	การแสดงออกของยีน <i>c-kit</i> และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ <i>c-kit</i> จากเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ด้วยวิธี PCR.....	22
4.4	ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิก โลหิตวิทยา และเคมีเลือด ของสุนัขที่ได้ศึกษากับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์.....	24
4.5	การวิเคราะห์ข้อมูล.....	25
5.	การอภิปราย ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ.....	26
5.1	การอภิปรายผล.....	26

5.2 ข้อสรุป.....28

5.3 ข้อเสนอแนะ.....28

เอกสารอ้างอิง.....30

ภาคผนวก.....33

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. การแบ่งระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอกและมะเร็ง (Owen, 1980).....13
2. ผลการจำแนกเกรดมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข ทางจุลพยาธิวิทยา.....23

รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี และจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์

ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนไซโตเคมี

และ การแสดงออกของอองไคยีน *c-kit* (n=30)

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

1. โครงสร้างของ KIT receptor (ที่มา Zemke et al., 2001).....	7
2. แสดงแถบของ PCR product จากตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข.....	10
ที่พบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ <i>c-kit</i> (M) และ แถบ PCR product	
จากตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ปกติไม่พบการกลายพันธุ์ (normal MCT, N)	
(ที่มา Webster et al., 2007)	
3. ภาพสุนัขป่วยด้วยมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนัง.....	12
4. แสดงการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์.....	14
5. แสดงการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งโดยการเจาะดูด (FNA-MCT cells).....	14
6. วิธีการพ่นเซลล์ป้ายละอองบนสไลด์เพื่อตรึงสภาพและย้อมสีต่อไป.....	14
7. ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์พบว่าเซลล์มะเร็งรูปร่างกลมมี granules.....	14
Giemsa's stain	
8. ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์ พบว่า เซลล์มะเร็งรูปร่างกลมมีสี.....	14
Metachromatic granules Toluidine blue	
9. ภาพจำแนกเกรดก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข.....	19
ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา H&E และรูปแบบการติดสี KIT (CD 117) IHC-MCT	
10. ภาพรูปแบบการติดสี KIT (CD 117) IHC-MCTและ ICC-MCT.....	21
จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)	
11. แสดงแถบของผลผลิต PCR จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์.....	22
ที่ผิวหนังในสุนัขที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)	