



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยเรื่อง

“แบบแผนการแสดงออกของยีน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งปากมดลูก”

“Gene Expression Profiling for Disease Diagnosis in Cervical Cancer”

จัดทำโดย

- | | |
|------------------|-------------|
| 1. ดร.ไพฑูรย์ | อบเชย |
| 2. ผศ.ดร.หทัยชนก | เนียมทรัพย์ |
| 3. ผศ.ดร.พัชณี | แสงทอง |
| 4. อ.ดร.นิสา | ชวพันธ์ |

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2558



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยเรื่อง

“แบบแผนการแสดงออกของยีน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งปากมดลูก”

“Gene Expression Profiling for Disease Diagnosis in Cervical Cancer”

จัดทำโดย

- | | |
|------------------|-------------|
| 1. ดร.ไพฑูรย์ | อบเชย |
| 2. ผศ.ดร.หทัยชนก | เนียมทรัพย์ |
| 3. ผศ.ดร.พัชณี | แสงทอง |
| 4. อ.ดร.นิสา | ชวพันธ์ |

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2558

คำนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย นับเป็นมะเร็งที่พบบมากที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง ในหญิงไทย ด้วยสถิติของผู้เสียชีวิตเฉลี่ยสูงถึง 7 คนต่อวัน สาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูก เกิดจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) โดยเพศสัมพันธ์ รวมถึงปัจจัยอื่น เช่น การมีคู่นอนหลายคน การมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุน้อย หรือการตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อย เป็นต้น ปัจจุบันการตรวจหาและรักษาความผิดปกติในระยะเริ่มแรกของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ การตรวจทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก (Pap smear) การตรวจหาเชื้อ HPV สายพันธุ์ก่อมะเร็ง (HPV DNA test) แต่ยังมีข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีเหล่านี้เนื่องจากมีราคาที่สูงมาก และต้องอาศัยนักเซลล์วิทยาที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ทำให้คนทั่วไปไม่สามารถเข้าถึงการตรวจด้วยวิธีนี้

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาหาตัวบ่งชี้มะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma และ Carcinoma ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก โดยใช้เทคนิคทางการแสดงออกของยีน (gene expression) และการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ตัวบ่งชี้ดังกล่าวในการวินิจฉัยมะเร็งระยะเริ่มต้นและเป็นแนวทางในการรักษาโรคต่อไป

คณะนักวิจัย

กันยายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “แบบแผนการแสดงออกของยีน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งปากมดลูก” เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสถาบันดังกล่าวที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัยในโครงการนี้ ทำให้นักวิจัยสามารถทำการศึกษาค้นคว้าวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อพัฒนาประเทศได้มากขึ้นและทำให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. นิสา ชวพันธ์ หน่วยรังสีรักษาและมะเร็งวิทยา ภาควิชารังสีการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รวมทั้งภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ ตลอดจนการใช้เครื่องมือ สารเคมีที่จำเป็นบางอย่างสำหรับการวิจัยจนงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ แบบแผนการแสดงออกของยีน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งปากมดลูก
ผู้เขียนรายงาน ดร.ไพฑูรย์ ออบเชย

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยและพบมากเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก ซึ่งประมาณ 80% อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา สาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนแพปพิโลมาไวรัสชนิดกลุ่มเสี่ยงสูง อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและพัฒนาวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น จะช่วยลดอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย มะเร็งปากมดลูก จะแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ตามพยาธิวิทยาของรอยโรค ได้แก่ Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma และ Carcinoma การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการหา ยีนที่แสดงแตกต่างแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งเชื้อสายทั้ง 4 ชนิด เทียบกับเซลล์ปกติโดยใช้เทคนิค qPCR

ผลการศึกษา จากการคัดเลือกยีนจำนวน 61 ยีนจากข้อมูล public DNA microarray และตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะที่มี GAPDH เป็น housekeeping gene ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด (HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756) โดยใช้เทคนิค qPCR พบยีน VAV2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง Adenocarcinoma (HeLa), Squamous cell carcinoma (SiHa) และ Carcinoma (SW756) และในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง Papilloma (C-4 I) พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน RCC1 และจากผลของการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ายีน VAV2 น่าจะเป็นตัวบ่งชี้เฉพาะสำหรับมะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma และ Carcinoma และยีน RCC1 น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ของมะเร็งปากมดลูกชนิด Papilloma ตามลำดับ จากผลการศึกษาวิจัยดังกล่าว แสดงว่าตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอาจจะนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดกรอง และการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูกต่อไป

Abstract

Title **Gene Expression Profilling for Disease Diagnosis in Cervical Cancer**

Report by **Dr. Paitoon** **Aobchey**

Cervical cancer is the most common cancer in women worldwide, with developing countries accounting for 80% of the disease burden. Infection with a high-risk group of human papilloma viruses (HPVs) is caused mainly by carcinogenesis of cervical cancer. Although, active diagnosis has been improved treatment efficacy in reducing the incidence and mortality rate. Cervical cancer is generally classified into four histopathological subtypes; Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma and Carcinoma. In this study, the gene expression profiles of these four subtypes in cervical cancer cell lines were compared to normal cervical tissue using quantitative real-time PCR (qPCR).

Sixty one genes from public DNA microarray data were selected. The expression of 30 candidate genes were quantified including a housekeeping gene, GAPDH with qPCR using HeLa, SiHa, C-4 I and SW756 showing a more than 1.5-fold difference in their expression. VAV2 gene was found to overexpress in Adenocarcinoma (HeLa), Squamous cell carcinoma (SiHa) and Carcinoma (SW756) and RCC1 gene was overexpressed in Papilloma (C-4 I) of cervical cell lines. Based on their upregulation, VAV2 gene was identified as candidate markers for Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, and Carcinoma and RCC1 gene was identified as candidate marker for Papilloma subtype of cervical cancer, respectively. The candidate biomarkers may be useful for screening and diagnosis of cervical cancer.

สารบัญเรื่อง

หน้า

คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ณ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 โรคมะเร็งปากมดลูก	5
1.2.1 ระบาดวิทยาของมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทย	5
1.2.2 พยาธิสภาพ	10
1.2.3 ระยะในการดำเนินของโรค	10
1.2.4 การแบ่งระยะของโรคมะเร็งปากมดลูก	10
1.2.5 สาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูก	11
1.2.6 เชื้อ HPV	13
1.2.7 ชนิดของเชื้อ HPV	13
1.2.8 อาการและอาการแสดง	14
1.2.9 แนวทางการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก	15
1.2.10 การพยากรณ์โรค	16
1.2.11 การป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก	16
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	19
1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย	20
1.6 ระเบียบวิธีวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	20

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	20
1.8 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	21
บทที่ 2 การทดลอง	22
2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	22
2.1.1 สารเคมี	22
2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	24
2.2 ชุดทดลอง	26
2.3 เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก	26
2.4 การเลี้ยงและเตรียมเซลล์เชื้อสายมะเร็ง	27
2.4.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็ง	27
2.4.2 การเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก	27
2.4.3 การเตรียมเซลล์ในลักษณะแขวนลอย	28
2.5 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสาย	29
ด้วยเทคนิค Real-time quantitative PCR [RT-qPCR]	
2.5.1 Primer design	29
2.5.2 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ	29
จากเซลล์เชื้อสายมะเร็ง	
2.5.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจากเซลล์ปกติ	34
2.5.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	37
บทที่ 3 ผลการทดลอง	42
3.1 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยรวม	42
ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิดกับเซลล์ปกติด้วยเทคนิค	
DNA microarray analysis	
3.2 วิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะ	42
ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค RT-qPCR	

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 วิจัยรณและสรุปลผลการทดลอง	49
4.1 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยรวม ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิดกับเซลล์ปกติด้วยเทคนิค DNA microarray analysis	49
4.2 การวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะ ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค RT-qPCR	49
4.3 สรุปลผลการทดลอง	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	60

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งนรีเวชที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ.2540-2548	8
1.2 อายุของผู้ป่วยเมื่อวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาล มหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ.2540-2548	8
1.3 ระยะของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาล มหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ.2540-2548	9
1.4 พยาธิของมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ.2540-2548	9
2.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็งทางนรีเวช (Gynecological cancer cell lines)	27
2.2 Forward และ Reverse Primer ของยีน 30 ชนิด ที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	30
2.3 ปริมาณอาร์เอ็นเอของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก	32
2.4 สารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ	33
2.5 ปริมาณซีดีเอ็นเอของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก	34
2.6 Forward และ Reverse Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	38
2.7 การเจือจาง cDNA template (จากเซลล์เชื้อสาย HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756) ที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	40
2.8 สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	40
2.9 PCR Mix ของ GAPDH Mixture และ HSPG2 Mixture ลงในแต่ละ well	41
2.10 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	41
3.1 กลุ่มและยีนที่ป้อนเฉพาะจำนวน 30 ยีน จาก public DNA microarray data	43
3.2 ค่า Relative Quantification คิดเป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกในเซลล์ปกติ	46

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
1.1 มะเร็งปากมดลูกในแต่ละภาค ในช่วง พ.ศ. 2544-2546	7
1.2 พยาธิวิทยาของมะเร็งปากมดลูกในแต่ละภาคในช่วง พ.ศ. 2544-2546	7
3.1 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa กับยีนบ่งชี้เฉพาะ	47
3.2 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SiHa กับยีนบ่งชี้เฉพาะ	47
3.3 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง C-4 I กับยีนบ่งชี้เฉพาะ	48
3.4 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SW756 กับยีนบ่งชี้เฉพาะ	48

อักษรย่อและสัญลักษณ์

°C	Degree Celsius
cm	Centrimetre
ddH ₂ O	Distilled water
g	Gravity force
g/L	Gram/ Liter
h	Hour
kDa	Kilodalton
L	Liter
mg	Milligram
mL	Milliliter
mm	Millimetre
mM	Millimolar
min	Minute
MW	Molecular weight
ng	Nanogram
nm	Nanometre
<i>p</i>	Level of significant
rpm	Round per minute
T _m	Melting temperature
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume
μl	Microliter
μg	Microgram
%	Percent
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction

บทที่ 1

บทนำ

1.1) ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุขพบว่าคนไทยมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับหนึ่ง และมีแนวโน้มว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นอย่างมาก จากข้อมูลล่าสุดในปี 2549 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 66,000 ราย โดยในผู้ชายพบมะเร็งปอดมากที่สุด 5,535 ราย รองลงมา คือโรคมะเร็งตับ ส่วนผู้หญิงพบมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด 1,484 ราย รองลงมาคือ มะเร็งปอด และมะเร็งเต้านม ตามลำดับ โรคมะเร็งจัดเป็นโรคที่ต้องมีค่าใช้จ่ายสูงในการบำบัดและเป็นโรคเรื้อรัง ซึ่งเป็นกลุ่มโรคที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาชนไทยในปัจจุบัน ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียชีวิต เกิดความพิการจากการเจ็บป่วย ส่งผลไปถึงเพิ่มรายจ่ายด้านสุขภาพของครัวเรือน สังคม ตลอดจนเป็นภาระค่าใช้จ่ายโดยรวมของประเทศ

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับหนึ่งในหญิงไทย ด้วยสถิติของผู้เสียชีวิตเฉลี่ยสูงถึง 7 คนต่อวัน สาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ผ่านการมีเพศสัมพันธ์ ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีวัคซีน HPV เพื่อป้องกันมะเร็งปากมดลูกแต่สามารถป้องกันได้เฉพาะผู้หญิงที่ไม่เคยมีเพศสัมพันธ์ แต่ก็ยังมีสาเหตุหรือปัจจัยอื่นๆ ที่ทำให้ปากมดลูกมีโอกาสติดเชื้อได้สูงขึ้น หรือง่ายขึ้น เช่น การมีคู่นอนหลายคน การมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุน้อย หรือการตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อย เป็นต้น พฤติกรรมเสี่ยงเหล่านี้จะทำให้การติดเชื้อ HPV คงอยู่และสืบหน้าหรือดำเนินโรคต่อไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาหาตัวบ่งชี้โรคมะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma และ Carcinoma เพื่อการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นได้รวดเร็ว และอาจนำไปประยุกต์ในด้านการบำบัดโรคด้วย

สืบเนื่องจากรายงานของ American Cancer Society (ACS) ซึ่งตีพิมพ์ในปี 2010 รายงานว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 (National Center for Health Statistic, Center of Disease Control and Prevention, North American Association of Central Cancer Registries and National Center for Health Statistic) ในสหรัฐอเมริกา พบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นถึง 1,638,910 คน สถิติการเสียชีวิตของชาวอเมริกัน ชี้ให้เห็นว่าการเสียชีวิตเนื่องจากโรคมะเร็งมีถึงเกือบหนึ่งในสี่ของผู้เสียชีวิตทั้งหมด หรือ 577,190 ราย มีอัตราการเกิดมะเร็งในผู้ชายลดลง 0.6% ต่อปี แต่จะคงที่ในผู้หญิง ในขณะที่อัตราการตายจากมะเร็งลดลง 1.8% ต่อปีในผู้ชาย

และ 1.6% ต่อปีในผู้หญิง เมื่อเปรียบเทียบกับจากปี 2004-2008 [1] ในปี ค.ศ. 2012 สหรัฐอเมริกาประมาณการณไว้ว่า มีการวินิจฉัยพบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นถึง 1.7 ล้านคน แยกเป็นชาย 848,170 คนและหญิง 790,740 คน มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งเต้านม จะเป็นสิ่งที่ถูกวินิจฉัยเพิ่มขึ้นในชายและหญิง ตามลำดับ ตามด้วยมะเร็งปอดและลำไส้ใหญ่ทั้งในชายและหญิง สำหรับผู้ชาย พบว่าเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างเดียว จำนวน 29% (241,740 ราย) และในผู้หญิง พบเป็นมะเร็งเต้านมรายใหม่ถึง 29% (226,870 ราย) [1]

และจากรายงานของ GLOBOCAN 2008 ซึ่งตีพิมพ์ในปี 2010 มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับ 3 ของมะเร็งในสตรีทั่วโลก แต่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของสตรีเป็นอันดับ 4 ในการเสียชีวิตจากมะเร็งของสตรีทั่วโลก ในปี 2008 จะมีผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ 529,512 คน ซึ่งประมาณร้อยละ 86 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา ในจำนวนผู้ป่วยรายใหม่นี้จะเสียชีวิตประมาณครึ่งหนึ่งคือ 274,967 คน ซึ่งร้อยละ 88 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาเช่นกัน ภูมิภาคมีความเสี่ยงสูง ประกอบด้วย Eastern และ Western Africa มีความเสี่ยงต่อการสะสม (cumulative risk; 0-74) 3.8%, Southern Africa (2.9%), South-Central Asia (2.6%), Middle Africa และ South America (2.5%) ความเสี่ยงน้อยที่สุด จะพบใน Western Asia, Northern America and Australia/New Zealand (0.5%). มะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดของผู้หญิงเฉพาะใน Eastern Africa, South-Central Asia และ Melanesia ทั่วโลก มีอัตราการรอดชีวิตต่อการเกิดโรค (mortality: incidence ratio) ที่ 52% และ ในปี 2008 มีการเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูก 275,000 ราย ประมาณ 88% เกิดขึ้นในประเทศกำลังพัฒนา ใน Africa เสียชีวิต 53,000 ราย 31,400 รายใน Latin America และ Caribbean และใน Asia 159,800 ราย [2]

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยพบเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในสตรีไทย รองจากมะเร็งเต้านม จากรายงานของ WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Thailand. Summary Report 2010 ได้รายงานในปี พ.ศ.2551 ประเทศไทยมีประชากรสตรีที่เสี่ยงต่อมะเร็งปากมดลูก 26.09 ล้านคน มีอายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป มีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ปีละ 9,999 ราย เสียชีวิต 5,216 ราย หรือประมาณร้อยละ 53 ถ้าคิดเป็นวันแล้วจะมีสตรีไทยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกเฉลี่ยวันละ 14 คน อุบัติการณ์โดยรวมของมะเร็งปากมดลูกในช่วง 15 ปีที่ผ่านมาลดลงเพียงเล็กน้อย แต่จำนวนผู้ป่วยรายใหม่สูงขึ้นเรื่อยๆ ถ้าอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกยังคงสูงในระดับนี้โดยไม่มีการตรวจหรือยุทธวิธีใหม่ที่มีประสิทธิภาพมาป้องกัน คาดว่าในปี พ.ศ.2568 จะมีจำนวนผู้ป่วยรายใหม่สูงขึ้น

เป็นปีละประมาณ 13,082 คน เสียชีวิต 7,871 คน สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกยังไม่ทราบแน่ชัด [3]

สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer, IARC), Globocan 2008 ได้รายงานในปี พ.ศ.2551 ว่าในประเทศไทย มะเร็งเต้านมมีอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ หรือ age-standardized incidence rate (ASR) = 36.7 ต่อประชากร 100,000 คน/ปี รองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก (ASR = 29.2) และมะเร็งตับ (ASR = 22.9) อุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกในช่วงปี 2541-2545 ที่จังหวัดเชียงใหม่สูงที่สุดในประเทศ คือ 28.9 จังหวัดลำปาง คือ 22.4 และ จังหวัดสงขลา คือ 17.8 ต่อประชากร 100,000 คน/ปี [3] จากการศึกษาทางด้านไวรัส พบว่าเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิลโลมา (Human papillomavirus, HPV) หรือไวรัสเอชพีวี โดยเฉพาะไวรัสเอชพีวี 16 และ 18 เป็นสาเหตุหลักให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก [4,5] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้มีโอกาสติดเชื้อไวรัส ได้แก่ การมีคู่นอนหลายคน การมีเพศสัมพันธ์และการตั้งครรภ์เมื่ออายุน้อย

ในภาพรวมของประเทศ ชนิดของมะเร็งปากมดลูกที่พบได้บ่อยที่สุด คือ Squamous cell carcinoma คิดเป็นร้อยละ 69.3-81.8 รองลงมา ได้แก่ Adenocarcinoma คิดเป็นร้อยละ 9.8-22.8 สำหรับระยะของมะเร็งปากมดลูกเมื่อแรกวินิจฉัย พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 10.3-55.2 เป็นโรคในระยะที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกราน (regional lymph nodes metastasis) เป็นสัดส่วนที่สูงกว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคระยะแรกที่ยังไม่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (localized disease) คิดเป็นร้อยละ 5.6-44.8 ของผู้ป่วยทั้งหมด นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 0.8-8.5 มีการแพร่กระจายของโรคไปยังอวัยวะห่างไกล (distant metastasis) และยังพบผู้ป่วยที่ไม่ทราบระยะของโรคอีกร้อยละ 2.8-81.6 จากข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายของระยะโรค ชี้ชัดถึงความจำเป็นของแนวทางในการดูแลรักษาแบบสหสาขา (multidisciplinary approach) [6]

การรักษาโรคมะเร็งนั้น โดยสากลมีวิธีการหลัก คือ การคัดกรองและการตรวจหาเบื้องต้น [7, 8-12] การผ่าตัด [13,14] การใช้สารเคมีบำบัด (รวมถึงการใช้ฮอร์โมน) การบำบัดด้วยรังสีรักษา หรือการฉายแสงและชีวบำบัด [15-18] แต่อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งยังสูงอยู่ เนื่องจากผู้ป่วยบางคนอาจจะกลับมาเป็นมะเร็งอีกและเป็นเหตุของการเสียชีวิต [19] ทำให้นักวิจัยทั่วโลกพยายามเร่งหาหนทางในการตรวจวินิจฉัยและป้องกันมะเร็งในระยะก่อนลุกลาม หรือในระยะเซลล์กำลังเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งจะช่วยชีวิตผู้หญิงและลดอัตราการเสียชีวิตได้ การแสดงออกของยีนในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด Squamous cell carcinoma และ Adenocarcinoma สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับพัฒนาการและความก้าวหน้าของการเกิดมะเร็ง

การใช้ประโยชน์จากข้อมูลดังกล่าวเพื่อเป็นแหล่งสำคัญในการศึกษาและมีคุณค่ามากที่สุดสำหรับศึกษาค้นคว้าตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อใช้ติดตามการตอบสนองต่อการรักษา และเพื่อทำนายอาการของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกได้ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดเดียว หรือตัวบ่งชี้มะเร็งที่เฉพาะเจาะจงที่จะปรับปรุงวิธีการตรวจวัด การรักษาและการทำนายอาการของโรคที่มีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันพบว่าโรคหลายชนิดมีสาเหตุสืบเนื่องมาจากความผิดปกติของยีน และมีผู้ศึกษาถึงกลไกการเกิดความผิดปกติในระดับยีนมากขึ้น เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการเกิดมะเร็งเป็นต้น มะเร็งเป็นโรคหนึ่งที่เกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมซึ่งมีผลให้เซลล์นั้น ๆ มีรูปร่างลักษณะหรือมีการทำงานผิดปกติและกลายเป็นเซลล์มะเร็ง มียีนหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้องในแต่ละขั้นตอนของการเกิดเซลล์มะเร็ง ยีนบางชนิดไม่ได้ทำหน้าที่หรือมีการแสดงออกให้เกิดการสร้างโปรตีนใด ๆ โดยตรง แต่มีหน้าที่ควบคุมให้ยีนอื่น ๆ ทำงานหรือหยุดทำงาน เทคนิคไมโครแอเรย์ของดีเอ็นเอ (DNA microarray technique) เป็นเทคนิคที่สำคัญที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีน และมีข้อดีคือสามารถใช้ศึกษายีนได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน (high-throughput technique) โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของยีนได้ 3 รูปแบบ คือ 1) ระดับการทำงานหรือระดับการแสดงออกของยีนโดยตรวจวัดปริมาณของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNA) 2) การเพิ่ม-ลดจำนวนยีนบนโครโมโซม และ 3) การกลายพันธุ์ (mutation) ในดีเอ็นเอ เช่น การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) [20] การศึกษาการทำงานของยีนด้วยไมโครแอเรย์ของดีเอ็นเอ ใช้ศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน ระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์มะเร็งทำให้ทราบได้ว่าในสถานะที่เซลล์เกิดความผิดปกติมียีนใดแสดงออกมากน้อยต่างกันอย่างไร การค้นหายีนใหม่และกระบวนการที่เกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็ง การค้นหาตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค ตลอดจนตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ใช้ติดตามผลการรักษา

คณะผู้วิจัยได้ใช้การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (Molecular biological) ได้แก่ DNA microarray การหาระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก โดยใช้ quantitative real-time PCR (qPCR) เพื่อหาตัวบ่งชี้มะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma และ Carcinoma และทราบถึงเครือข่ายทางชีวภาพของยีนที่บ่งชี้มะเร็งปากมดลูก เพื่อการวินิจฉัยโรคได้รวดเร็ว ซึ่งมีความสำคัญและมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นทางคลินิก และการประยุกต์ทางด้านยารักษาโรค สร้างขีดความสามารถในการพัฒนาประเทศสู่สังคมฐานความรู้ต่อไป

1.2) โรคมะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับ 3 ของมะเร็งในสตรีทั่วโลก รองจากมะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ประมาณ 529,000 คน ซึ่งประมาณร้อยละ 86 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา ในจำนวนนี้จะเสียชีวิตประมาณครึ่งหนึ่ง คือประมาณ 275,000 คน ซึ่งร้อยละ 88 ของผู้เสียชีวิตนี้อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาเช่นกัน ในทวีปเอเชียประเทศที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกสูงที่สุดคือ ประเทศอินเดีย ซึ่งมีอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ เท่ากับ 30.66 ต่อประชากร 100,000 คน และมีอัตราการเสียชีวิตสูงที่สุดด้วย คือ 17.43 ต่อประชากร 100,000 คน เฉพาะในประเทศอินเดียประเทศเดียว มีผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ปีละ 125,952 ราย หรือประมาณ 1 ใน 4 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกทั่วโลก ซึ่งเป็นจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่มากที่สุดในโลก ภูมิภาคที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกต่ำ คือ กลุ่มประเทศอาหรับ มีอัตราอุบัติการณ์ประมาณ 3-6 เท่านั้น ประเทศซีเรียมีอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกต่ำที่สุดในโลก คือ 2.99 [21]

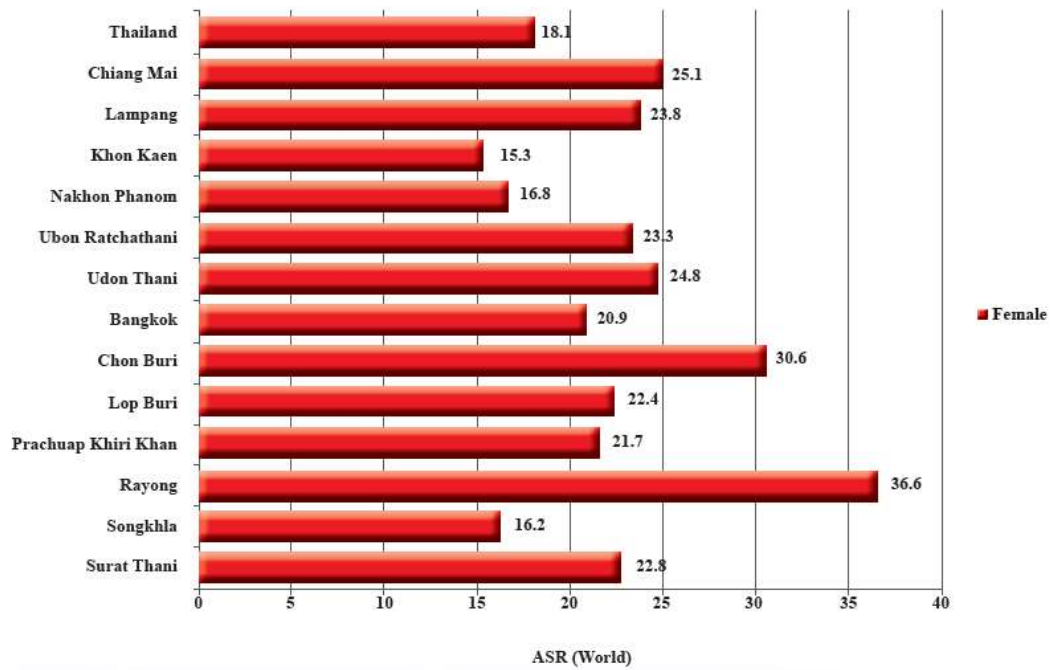
ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มะเร็งปากมดลูกพบเป็นอันดับ 2 รองมาจากมะเร็งเต้านม อุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกสูงที่สุดในประเทศเมียนมาร์ ซึ่งมีอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ เท่ากับ 24.64 รองลงมา คือ กัมพูชา ฟิลิปปินส์ และไทย ซึ่งมีอุบัติการณ์เท่ากับ 23.88, 22.66 และ 20.73 ต่อประชากร 100,000 คน ตามลำดับ ประเทศที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกต่ำที่สุดในภูมิภาคนี้ คือ ประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีอุบัติการณ์เท่ากับ 12.02 [21]

1.2.1 ระบาดวิทยาของมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทย

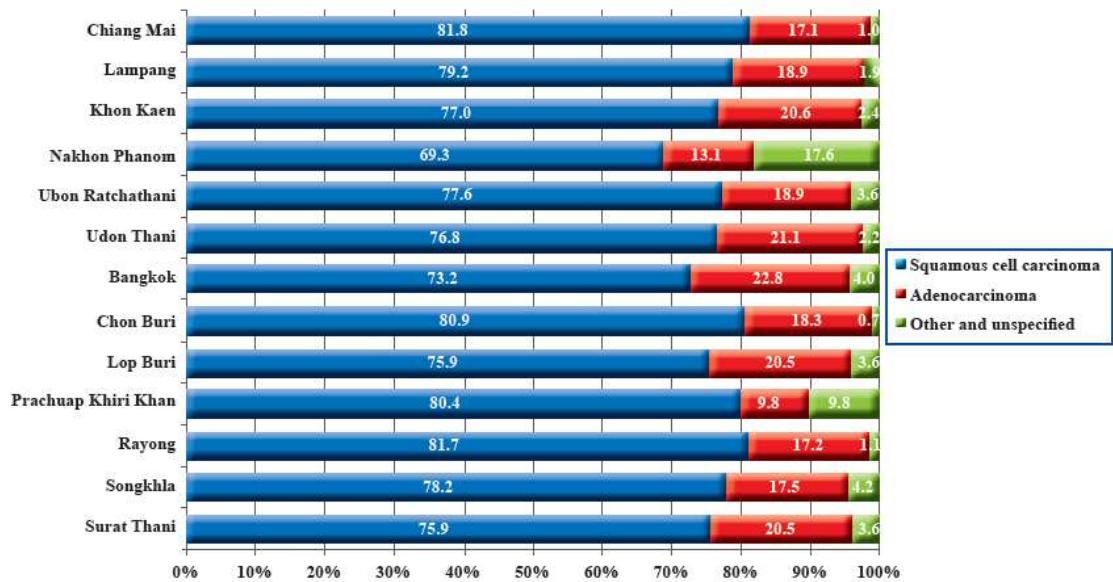
มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 ในมะเร็งของสตรีไทย รองลงมาจากมะเร็งเต้านม มีอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ หรือ age-standardized incidence rate (ASR) เท่ากับ 18.1 ต่อประชากร 100,000 คน/ปี ในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ประมาณปีละ 6,000 คน อุบัติการณ์โดยรวมของประเทศไทยในช่วง 15 ปีที่ผ่านมา ลดลงเพียงเล็กน้อย แต่จำนวนผู้ป่วยรายใหม่สูงขึ้นเรื่อยๆ ถ้าอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกยังคงสูงในระดับนี้ คาดว่าในปี 2551 จะมีจำนวนผู้ป่วยรายใหม่สูงขึ้นเป็นปีละ 8,000 คน โดยส่วนใหญ่อยู่ในภาคกลางมากที่สุด เนื่องจากมีจำนวนประชากรมากที่สุด ถึงแม้ว่าจะมีอุบัติการณ์ต่ำกว่าในภาคเหนือ

อุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทยพบมากที่สุดที่ภาคตะวันออก คือ จังหวัดระยอง เท่ากับ 36.6 รองลงมา คือ จังหวัดชลบุรี เท่ากับ 30.6 ส่วนในภาคเหนือ อุตการณ์ของมะเร็งปากมดลูกสูงสุด คือ จังหวัดเชียงใหม่ เท่ากับ 25.1 ซึ่งมีอุบัติการณ์ (ASR) เป็นอันดับ 3 ของประเทศ ดังรูปที่ 1.1 สำหรับพยาธิวิทยาของมะเร็งปากมดลูกพบว่าเป็น ชนิดสแควมัสร้อยละ 80 ส่วนมะเร็งชนิดต่อมพบประมาณร้อยละ 15 ดังรูปที่ 1.2 [22]

ในผู้ป่วยมะเร็งบริเวณที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ในช่วง พ.ศ.2540-2548 พบว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกประมาณร้อยละ 70 รองลงมาคือ มะเร็งรังไข่ และมะเร็งของเต้านม ดังตารางที่ 1.1 ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่จังหวัดเชียงใหม่อยู่ในช่วง อายุ 41-50 ปี มากที่สุด และอยู่ในช่วงอายุ 31-60 ปี ประมาณร้อยละ 80 อายุต่ำสุดและ สูงสุดที่พบมะเร็งปากมดลูก คือ 17 ปี และ 91 ปี ตามลำดับ ดังตารางที่ 1.2 ระยะของผู้ป่วย มะเร็งปากมดลูกเมื่อวินิจฉัยโรคได้ พบว่าอยู่ในระยะที่ I และ II ประมาณ 3 ใน 4 หรือประมาณ ร้อยละ 75 ดังตารางที่ 1.3 ซึ่งใกล้เคียงกับที่สหพันธ์โรคนานาชาติได้รายงานไว้ในปี พ.ศ. 2547 สำหรับพยาธิวิทยาของมะเร็งปากมดลูกพบว่าเป็นชนิดสแควมัสร้อยละ 80 ส่วนมะเร็ง ชนิดต่อมพบประมาณร้อยละ 15 ดังตารางที่ 1.4 สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ หรือ International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้รายงานในปี พ.ศ. 2547 ว่าประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกปีละ 6,192 คน เสียชีวิต 3,166 คน หรือประมาณร้อยละ 51 ถ้าคิดเป็นวันแล้วจะมีสตรีไทยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกเฉลี่ยวันละ 9 คน [21]



รูปที่ 1.1 มะเร็งปากมดลูกในแต่ละภาค ในช่วง พ.ศ. 2544-2546 [22]



รูปที่ 1.2 พยาธิวิทยาของมะเร็งปากมดลูกในแต่ละภาค ในช่วง พ.ศ. 2544-2546 [22]

ตารางที่ 1.1 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งบริเวณที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ.2540-2548 [23]

มะเร็ง	จำนวน (คน)	ร้อยละ
ปากมดลูก	4,731	71.0
รังไข่	906	13.6
เต้านม	577	8.7
ปากช่องคลอด	203	3.0
ช่องคลอด	62	0.9
เนื้อรก	132	2.0
อื่นๆ	52	0.8
รวม	6,663	100.0

ตารางที่ 1.2 อายุของผู้ป่วยเมื่อวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ.2540-2548 [23]

อายุ (ปี)	จำนวน (คน)	ร้อยละ
≤ 20	3	0.1
21-30	106	2.2
31-40	936	19.7
41-50	1,722	36.4
51-60	1,032	21.8
≥ 60	932	19.8
รวม	4,731	100.0

ตารางที่ 1.3 ระยะของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่
พ.ศ.2540-2548 [23]

ระยะ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
I	1,697	35.9
II	1,796	38.0
III	1,063	22.4
IV	175	3.7
รวม	4,731	100.0

ตารางที่ 1.4 พยาธิของมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่
พ.ศ.2540-2548 [23]

พยาธิวิทยา	จำนวน (คน)	ร้อยละ
Squamous CA	3,795	80.2
Adeno CA	690	14.6
Adenosquamous CA	127	2.7
Neuroendocrine	92	1.9
อื่นๆ	27	0.6
รวม	4,731	100.0

1.2.2 พยาธิสภาพ

โรคมะเร็งปากมดลูก เกิดจากเซลล์บุปากมดลูกบริเวณรอยต่อของเยื่อบุสแควมัสกับเยื่อบุคอลัมน์ (Squamo-Columnar Junction) มีการเจริญเติบโตผิดปกติทั้งขนาด รูปร่าง และองค์ประกอบภายในเซลล์ กลายเป็นรอยโรค และเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ควบคุมไม่ได้ และเข้าสู่มะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (Invasive Carcinoma) สามารถแทรกทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง ตลอดจนกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ทางหลอดเลือดและระบบน้ำเหลืองของร่างกาย ชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุด คือ สแควมัส โดยพบได้ประมาณร้อยละ 85 นอกจากนั้นเป็นชนิดอดีโนคาร์ซิโนมา (Adenocarcinoma) และซาร์โคมา (Sarcoma) [24]

1.2.3 ระยะในการดำเนินของโรค

มะเร็งปากมดลูกจากระยะปกติไปจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งระยะเริ่มแรก ใช้เวลาประมาณ 7-8 ปี [25] แบ่งระยะในการดำเนินของโรคได้ 3 ระยะ คือ

1. CIN I หรือ Mild Dysphasia หมายถึง ระยะที่มีความผิดปกติในส่วนล่างโดยมีความหนาประมาณ 1 ใน 3 ของความหนาของชั้นเยื่อบุสแควมัสเซลล์ของปากมดลูก
2. CIN II หรือ Moderate Dysphasia หมายถึง ระยะที่มีความผิดปกติในส่วนล่างโดยมีความหนาประมาณ 2 ใน 3 ของความหนาของชั้นเยื่อบุสแควมัสเซลล์ของปากมดลูก
3. CIN III หรือ Severe Dysphasia หมายถึง ระยะที่มีความผิดปกติเกือบทั้งหมดของความหนาของชั้นเยื่อบุสแควมัสเซลล์ของปากมดลูก แต่ชั้นบนยังปกติอยู่ หรือเป็นมะเร็งในระยะเริ่มแรก (Carcinoma In Situ หรือ Epithelial Carcinoma) ซึ่งมีความผิดปกติเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมดของเยื่อบุสแควมัส แต่ไม่ทะลุต่ำกว่าชั้นล่างสุด (Basement Membranes)

1.2.4 การแบ่งระยะของโรคมะเร็งปากมดลูก

สหพันธ์สูติรีเวชระหว่างประเทศ (The National Federation of Gynecology and Obstetrics [FIGO]) ได้แบ่งระยะของโรคมะเร็งปากมดลูก ดังนี้

1. มะเร็งในระยะก่อนลุกลาม (Pre-invasive Carcinoma)

ระยะ 0 เป็นมะเร็งระยะเริ่มแรก ซึ่งหมายรวมถึง CIN และ CIS

2. มะเร็งระยะลุกลาม (Invasive Carcinoma)

ระยะ I มะเร็งยังอยู่บริเวณปากมดลูกเท่านั้น

ระยะ Ia มองไม่เห็นความผิดปกติด้วยตาเปล่า ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ จึงจะมองเห็นการลุกลามของมะเร็งได้ชัดเจน

ระยะ Ib เป็นระยะที่มะเร็งลุกลามมากขึ้น สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ระยะ II มะเร็งลุกลามออกไปนอกปากมดลูก แต่ไม่ถึงผนังช่องเชิงกราน หรือไปที่ช่องคลอดแต่ไม่ถึงบริเวณ 1 ใน 3 ของช่องคลอดส่วนล่าง

ระยะ IIa มะเร็งลุกลามไปที่ช่องคลอดส่วนบน แต่ไม่ถึงพารามิเทียม (Parametrium)

ระยะ IIb มะเร็งมีการลุกลามไปยังพารามิเทียม แต่ไม่ถึงผนังช่องเชิงกราน

ระยะ III มะเร็งลุกลามไปถึงผนังช่องเชิงกรานและช่องคลอดส่วนล่างถึง 1 ใน 3

ระยะ IIIa มะเร็งลุกลามไปที่ 1 ใน 3 ของช่องคลอดส่วนล่าง แต่ยังไม่ถึงผนังช่องเชิงกราน

ระยะ IIIb มะเร็งลุกลามไปถึงผนังช่องเชิงกรานและท่อไต ทำให้ไตบวมน้ำและสูญเสียหน้าที่

ระยะ IV มะเร็งลุกลามออกนอกอวัยวะเชิงกรานไปยังอวัยวะอื่นๆ

ระยะ IVa มะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียง เช่น กระเพาะปัสสาวะ และทวารหนัก เป็นต้น

ระยะ IVb มะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆ ในร่างกาย เช่น สมอง และปอด เป็นต้น

1.2.5 สาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูก

สาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูกยังไม่ทราบแน่ชัด แต่การศึกษาวิจัยทางการแพทย์ เช่น งานวิจัยของธีระ ทองสง (2537) [25] พบว่ามีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ดังนี้

1. การติดเชื้อต่างๆ โดยมีความเชื่อว่า มะเร็งปากมดลูกมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ กล่าวคือ

1.1 Human Papilloma Virus (HPV) เป็นไวรัสที่เป็นต้นเหตุสำคัญที่สุดของการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยมีมากกว่า 70 ชนิด ชนิดที่ถือว่ามีความเสี่ยงสูงเฉพาะมะเร็งปากมดลูก คือ Type 16 และ Type 18 [24]

1.2 Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) ไวรัสชนิดนี้เป็นตัวกระตุ้นให้ไวรัสตัวอื่น เช่น HPV ให้มีฤทธิ์ส่งเสริมการเกิดมะเร็งปากมดลูก [26]

1.3 การติดเชื้ออื่นๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของมะเร็งในระยะเริ่มแรกได้ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด เช่น ทริโคโมแนส (Trichomonas) เชื้อหนองใน และเชื้อซิฟิลิส เป็นต้น

2. การแต่งงานหรือการมีเพศสัมพันธ์ พบว่าความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการมีเพศสัมพันธ์ ดังนี้

2.1 การแต่งงาน หรือมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุยังน้อย โดยเฉพาะอายุต่ำกว่า 17 ปี ซึ่งเป็นช่วงที่ปากมดลูกไวต่อการเปลี่ยนแปลง [26]

2.2 มีเพศสัมพันธ์กับผู้ชายหลายคน

2.3 ความถี่ของการมีเพศสัมพันธ์สูง โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเร็งปากมดลูก จะมีความถี่ในการร่วมเพศสูงกว่าผู้ที่ไม่เป็นโรคมะเร็งปากมดลูก [27]

2.4 จำนวนครั้งของการตั้งครรภ์ และการมีบุตรมาก เนื่องจากการตั้งครรภ์ และการคลอดบุตร ทำให้เซลล์บริเวณปากมดลูกเกิดการเปลี่ยนแปลง เพราะมีการฉีกขาดและการซ่อมแซมปากมดลูกบ่อยๆ [27]

3. อายุ โรคมะเร็งปากมดลูกในระยะลุกลาม พบมากในสตรีที่มีอายุระหว่าง 45-55 ปี

4. ลักษณะของสามีหรือคู่นอน ในปัจจุบันการศึกษายังพบว่า ผู้ชายมีส่วนสำคัญต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรีมีสรุปได้ดังนี้

4.1 ผู้ชายที่ขลิบหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศ (Circumcision) สาเหตุเนื่องมาจากใน Smegma จะมี *Mycobacteria Smegmatis* ซึ่งสามารถเปลี่ยนคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ในเซลล์ที่ตายให้เป็นสารก่อมะเร็งได้ [26]

4.2 ผู้ชายที่เคยเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ หรือมีประสบการณ์ทางเพศ ตั้งแต่อายุยังน้อย และมีพฤติกรรมสลับทางเพศ

4.3 ผู้ชายที่เป็นมะเร็งอวัยวะเพศชาย (Penile Cancer)

4.4 ผู้ชายที่มีประวัติภรรยาคนก่อนเป็นโรคมะเร็งปากมดลูก

4.5 ผู้ชายที่ลักษณะของหัวอสุจิมีโปรตีนชนิดหนึ่ง คือ โปรมีน (Promine) ซึ่งมีผลต่อดีเอ็นเอ (DNA) ของเซลล์ปากมดลูกให้เปลี่ยนเป็นดิสเพลเซีย (Dysphasia) ได้

5. การใช้ฮอร์โมนในการคุมกำเนิด

6. การสูบบุหรี่ มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกชนิดสแควมัส (Squamous Cell Carcinoma) [25]

7. สตรีที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือได้รับยาที่มีสารหรือตัวยาที่กดภูมิคุ้มกัน โดยจะพบอัตราการเกิดมะเร็งปากมดลูกสูงขึ้น และมักจะมีการติดเชื้อของระบบอวัยวะสืบพันธุ์ คือ เชื้อ HSV-2 และ HPV ได้ง่าย [25]

8. การขาดวิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และโฟเลต จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้

9. ผู้ที่ฐานะทางเศรษฐกิจและสังคมต่ำ โดยทั่วไป พบว่าสตรีที่มีการศึกษาต่ำ ฐานะยากจน มีอัตราเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งปากมดลูกประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับสตรีที่มีฐานะทางเศรษฐกิจและสังคมที่ดีกว่า [26]

10. เชื้อชาติ ศาสนา และวัฒนธรรม มีผลต่อการเกิดโรคนี้อันซึ่งจะพบมะเร็งปากมดลูกในสตรีออฟริกันผิวดำมีมากกว่าสตรีเอเชียชนผิวขาว [28]

1.2.6 เชื้อ Human Papilloma Virus (HPV)

เชื้อ HPV เป็นไวรัสชนิด DNA ที่มี DNA 2 สาย เชื้อ HPV สามารถทนทานต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้สูงมาก มีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางเพียง 55 นาโนเมตร รูปร่างคล้ายลูกกอล์ฟ ประกอบด้วยเปลือกหลายเหลี่ยม ซึ่งมีปุ่มโปรตีน (capsomers) 72 ปุ่มล้อมรอบจีโนมรูปวงกลมซึ่งมีประมาณ 8,000 คู่เบส โปรตีนเปลือกหุ้ม (capsid protein) เป็นสารก่อภูมิคุ้มกันจีโนมของเชื้อ HPV แบ่งออกเป็น 3 บริเวณ คือ 1. long control region (LCR) 2. early region (E1-E8) และ 3. late region (L1 และ L2) โปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (oncoprotein) คือ E6 และ E7 โดย E6 ยับยั้งการทำงานของ p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor gene ทำให้เซลล์ไม่ตายตามกำหนด (apoptosis) ส่วน E7 จะจับกับ retinoblastoma (Rb) genes ทำให้เซลล์แบ่งตัวไม่หยุดในแต่ละปุ่มโปรตีนที่ล้อมรอบจีโนม จะประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของเชื้อ HPV เรียกว่าโปรตีน L1 และ L2 โปรตีนส่วน L1 เป็นโปรตีนหลักของเปลือกหุ้มที่นำมาใช้ผลิตวัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่วนโปรตีน L2 เป็นโปรตีนรองของเปลือกหุ้ม ไม่ได้นำมาใช้ผลิตวัคซีน

1.2.7 ชนิดของเชื้อ HPV

เชื้อ HPV ที่ทำให้เกิดรอยโรคที่อวัยวะเพศและทวารหนัก แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความเสี่ยงหรือศักยภาพในการก่อมะเร็ง (oncogenic potential) คือ

1. กลุ่มความเสี่ยงต่ำ คือ เชื้อ HPV ที่ทำให้เกิดรอยโรคหูดหงอนไก่ (condyloma) และ low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) ได้แก่ สายพันธุ์ 6, 11, 42-44, 53-55, 62 และ 70 เชื้อ HPV เหล่านี้ไม่ก่อมะเร็ง

2. กลุ่มความเสี่ยงสูง คือ เชื้อ HPV ที่ทำให้เกิดรอยโรค LSIL, HSIL และมะเร็งได้ จึงเรียกว่า “oncogenic HPV” ได้แก่ สายพันธุ์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 61 และ 66-68

จากการตรวจหาเชื้อ HPV ในชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูก ทั้งชนิดสแควมัสและชนิดต่อมของสตรีจำนวน 2,633 ราย จาก 25 ประเทศ พบว่าชนิดของเชื้อ HPV ที่พบบ่อยที่สุด 12 อันดับแรก เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย คือ HPV 16 (ร้อยละ 57.4) HPV 18 (ร้อยละ 16.6) HPV 45 (ร้อยละ 6.8) HPV 31 (ร้อยละ 4.3) HPV 33 (ร้อยละ 3.7) HPV 52 (ร้อยละ 2.5) HPV 58 (ร้อยละ 2.3) HPV 35 (ร้อยละ 2.2) HPV 59 (ร้อยละ 1.5) HPV 56 (ร้อยละ 1.3) HPV 39 (ร้อยละ 1.2) HPV 51 (ร้อยละ 1.1) ส่วนเชื้อ HPV สายพันธุ์อื่นๆ เช่น HPV 73, HPV 68, HPV 66 พบน้อยกว่าร้อยละ 1 [29–31]

จากการทบทวนเอกสารอย่างเป็นระบบในปี พ.ศ. 2549 เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ HPV สายพันธุ์ต่างๆ ในชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกทั่วโลกจำนวน 14,557 ราย พบว่าเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18 เป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกประมาณร้อยละ 70 โดยเชื้อ HPV 7 ชนิดแรก ที่พบบ่อยที่สุดและเป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกประมาณร้อยละ 90 คือ เชื้อ HPV 16 (ร้อยละ 54.6) HPV 18 (ร้อยละ 15.8) HPV 33 (ร้อยละ 4.2) HPV 45 (ร้อยละ 3.7) HPV 31 (ร้อยละ 3.5) HPV 58 (ร้อยละ 3.4) HPV 52 (ร้อยละ 2.5) [32]

1.2.8 อาการและอาการแสดง

อาการและอาการแสดงจะเริ่มด้วยอาการของมะเร็งในระยะก่อนลุกลามจนถึงอาการในระยะลุกลาม ดังนี้ [33]

1. ไม่มีอาการแสดง มักพบในระยะก่อนลุกลาม เนื่องจากพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นยังไม่รุนแรง ยังไม่มีการติดเชื้อหรือมีเส้นเลือดมาก หรือมาหลอเลียงบริเวณอวัยวะเพศมาก
2. มีตกขาวเป็นมูกใสที่เกิดจากปฏิกิริยาของเซลล์แต่ละเซลล์แต่ละต่อมบนพื้นผิวปากมดลูกคล้ายกับการอักเสบทั่วๆ ไป และเป็นอาการนำอย่างหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบแพทย์
3. เลือดออกผิดปกติหรือมีการตกเลือด ระยะเริ่มต้นอาจมีเลือดออกผิดปกติทางช่องคลอดเป็นหยดๆ ในขณะหรือหลังร่วมเพศ และในระยะสุดท้ายของโรคจะมีเลือดออกมากกว่าปกติ
4. มีการเปลี่ยนแปลงของปากมดลูก ซึ่งพบลักษณะใดลักษณะหนึ่ง ได้แก่ ปากมดลูกที่เคยมีเพศสัมพันธ์หรือเคยมีบุตรมาแล้ว ปากมดลูกแสดงถึงการอักเสบเรื้อรัง และปากมดลูกที่มีแผลถลอก (Erosion)
5. อาการเจ็บปวด จะเกิดในระยะสุดท้ายของโรค และมีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังเส้นประสาทและอวัยวะต่างๆ เช่น อาการปวดท้องน้อยจากการอักเสบของปากมดลูกจนเกิด

การอักเสบของหลอดเลือดในอุ้งเชิงกราน (Pelvic Thrombophlebitis) หลอดน้ำเหลืองอักเสบ (Lymphagitis) และการอักเสบ (Cellulitis) เป็นต้น

6. อาการของมะเร็งระยะสุดท้าย เกิดจากการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น กระเพาะปัสสาวะ ต่อม้ำเหลือง กระดูก และปอด เป็นต้น โดยผู้ป่วยจะมีอาการซีด ผอมแห้ง อ่อนเพลีย ปัสสาวะมีเลือดปน เกิดการบวมของขา มีอาการไอและเหนื่อยหอบ

1.2.9 แนวทางการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก

1. การผ่าตัดตามสังเกต ในรายที่พยาธิสภาพขนาดเล็กและไม่รุนแรง (CIN I และ CIN II) ซึ่งอาจจะหายไปแล้วหลังจากการตัดชิ้นเนื้อไปตรวจ

2. การจี้ปากมดลูกด้วยไฟฟ้า (Electrocautery) มีอัตราในการหายจากโรคประมาณร้อยละ 89 ในการจี้ครั้งแรก และร้อยละ 97 ในการจี้ครั้งที่ 2

3. การจี้ด้วยความเย็น (Cryosurgery) มีประโยชน์มากในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกระยะแรกเริ่ม ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา ระยะเวลาในการรักษา และหลีกเลี่ยงการผ่าตัดที่ไม่จำเป็นลง เหมาะสำหรับรายที่พยาธิสภาพไม่ใหญ่มากนัก และต้องการตั้งครรภ์หรือมีบุตร

4. การผ่าตัดด้วยแสงเลเซอร์ (Laser Surgery) คาร์บอนไดออกไซด์เลเซอร์สามารถทำลายเนื้อเยื่อผิดปกติ (Dysphasia) ที่อยู่เป็นหย่อมและยังไม่ลุกลาม

5. การรักษาด้วยอุณหภูมิต่ำมาก (Cold Coagulation) ที่อุณหภูมิ -100 องศาเซลเซียส เพื่อให้ปากมดลูกแข็งตัวซึ่งใช้เวลาไม่นาน ไม่เจ็บปวด ไม่สิ้นเปลืองมาก และมีผลข้างเคียงน้อยและได้ผลดี

6. การตัดปากมดลูกเป็นรูปกรวย (Therapeutic Conization) เป็นการผ่าตัดที่นิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกระยะแรกเริ่ม ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอายุน้อย หรือต้องการมีบุตร

7. การผ่าตัดเอามดลูกออก (Hysterectomy) มักใช้รักษาโรคมะเร็งปากมดลูกระยะแรกเริ่มไม่เกินระยะ Ib และ IIa

8. การใช้รังสีรักษา ใช้ในการรักษาสำหรับมะเร็งปากมดลูกระยะ II, III และ IV

9. การใช้เคมีบำบัด กรณีที่มะเร็งมีการแพร่กระจายหรือในรายที่หวังผลในการควบคุมโรค

1.2.10 การพยากรณ์โรค

ผลการรักษามะเร็งปากมดลูกในปัจจุบันได้ผลดีมากกว่าในสมัยก่อน โดยเฉพาะในระยะก่อนมะเร็งและระยะลุกลามเริ่มแรก

1. ระยะก่อนมะเร็งหรือระยะก่อนลุกลาม รักษาได้ผลดีเกือบร้อยละ 100
2. ระยะลุกลาม
 - ระยะที่ 1 มีอัตราการอยู่รอด 5 ปี ร้อยละ 80-95
 - ระยะที่ 2 มีอัตราการอยู่รอด 5 ปี ร้อยละ 60-70
 - ระยะที่ 3 มีอัตราการอยู่รอด 5 ปี ร้อยละ 40-50
 - ระยะที่ 4 มีอัตราการอยู่รอด 5 ปี ร้อยละ 10-20

1.2.11 การป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก

1. การป้องกันแบบปฐมภูมิ เป็นการกำจัดสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค โดยการหลีกเลี่ยงสาเหตุต่างๆ เช่น

- 1.1 การงดสูบบุหรี่ และหลีกเลี่ยงจากบริเวณที่มีควันบุหรี่
- 1.2 ใช้การป้องกันคุมกำเนิดที่มีเครื่องกัน เช่น ถุงยางอนามัย ห่วงอนามัย กรณีการใช้ยาคุมกำเนิดต้องพิจารณาชนิด และระยะเวลาให้เหมาะสม
- 1.3 หลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เป็นโรคมะเร็งปากมดลูก เช่น การมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุน้อย การมีบุตรมาก การสำส่อนทางเพศ เป็นต้น
- 1.4 ดูแลรักษาความสะอาดของอวัยวะเพศอยู่เสมอ
- 1.5 ละเว้นต่อการสัมผัสสารก่อมะเร็ง
- 1.6 การเพิ่มภูมิคุ้มกันต้านทานร่างกายต่อการเกิดมะเร็ง คือ สุขภาพที่สมบูรณ์แข็งแรงทั้งกายและจิตใจ โดยการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ รักษาความสะอาดร่างกาย ออกกำลังกายสม่ำเสมอ การพักผ่อนนอนหลับให้เพียงพอ การรักษาสภาพจิตใจไม่ให้เกิดความเครียด

2. การป้องกันแบบทุติยภูมิ ใช้วิธีการค้นหาด้วยการตรวจหาโรคมะเร็งปากมดลูกโดยทำการตรวจทางเซลล์วิทยา ซึ่งวิธีที่ได้ผลที่สุด คือ การตรวจแปปสเมียร์ (Pap Smear) ซึ่งเป็นการตรวจหาเซลล์วิทยาของปากมดลูก โดยการใส่เครื่องมือช่วยตรวจภายใน (Vaginal Speculum) และป้ายเซลล์บริเวณทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation Zone) บริเวณคอมดลูกส่วนนอก (Exocervix) และคอมดลูกส่วนใน (Endocervix) ของปากมดลูกไปตรวจ ซึ่งสามารถทำได้ง่าย สะดวก ปลอดภัยและราคาถูก ให้ผลการตรวจที่เชื่อถือมากยิ่งขึ้น โดยก่อนการตรวจจะต้องเตรียมตัวก่อน โดยงดการร่วมเพศก่อนตรวจ 48-72 ชั่วโมง งดใช้ผ้าอนามัยแบบสอด

และใช้ยาสอดเข้าไปในช่องคลอด ตลอดจนถึงการล้างสวนช่องคลอด ความถี่ในการตรวจแพปสเมียร์ มีผู้เสนอไว้แตกต่างกัน เช่น American Cancer Society (ACS) แนะนำให้ตรวจซ้ำทุก 3 ปี ถ้าผลการตรวจครั้งที่ 2 หลังจากการตรวจครั้งแรกปกติ The American College of Obstetricians and Gynaecologists (ACOG) แนะนำให้สตรีที่มีอายุ 18 ปีขึ้นไป หรือมีเพศสัมพันธ์ประจำ ให้ตรวจหามะเร็งปากมดลูกทุกปีตลอดไป National Institute of Health แนะนำให้สตรีไปรับการตรวจแพปสเมียร์เมื่อมีเพศสัมพันธ์เป็นประจำและตรวจซ้ำภายใน 1 ปี ถ้าการตรวจผลปกติก็ให้ตรวจซ้ำทุก 1-3 ปี

3. การป้องกันแบบตติยภูมิ โดยการให้การรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีที่เหมาะสม เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาว

โรคมะเร็งปากมดลูก ได้ชื่อว่าเป็นโรคที่ร้ายแรง แต่เป็นโรคมะเร็งที่สามารถตรวจหาได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก และสามารถป้องกันได้ โดยลดพฤติกรรมเสี่ยงต่อการเกิดโรค ในระยะเริ่มแรกของโรคมักไม่มีอาการแสดง ส่วนใหญ่จึงมักพบผู้ป่วยที่อยู่ในระยะลุกลามไปแล้ว ดังนั้น การรับรู้เกี่ยวกับโรคและมีความเชื่อด้านสุขภาพเกี่ยวกับการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูกของสตรีที่ถูกต้อง จะมีส่วนช่วยให้สตรีสามารถป้องกันและตรวจหาโรคนี้ได้เร็วยิ่งขึ้น

1.3) งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีการใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีนจากผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด เพื่อประยุกต์ใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นของผู้ป่วยมะเร็ง เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) [34] มะเร็งปอด (lung cancer) [35] มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) และ มะเร็งเต้านม (breast cancer) [36] อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งปากมดลูกน้อยมาก ซึ่งในประเทศกำลังพัฒนา มีความต้องการตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งปากมดลูก เพื่อใช้ในการตรวจ (screening) การวินิจฉัยโรคเบื้องต้น (early detection) และการติดตามอัตราการรอดชีวิตหลังการรักษา (post-treatment surveillance) Jeong *et al.* [37] ศึกษาการแสดงออกของ plasma protein โดยใช้ 2-DE และ MALDI-MS พบ ceruloplasmin, complement C3, afamin และ alpha-1-B glycoprotein เป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma (SCC) Zhu *et al.* [38] พบว่าในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous มีการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (overexpression) คือ Tyk2, S100A9 และ Zinc finger protein 217 Hwang *et al.* [39] ใช้ 2D gel, semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และ western blot พบการเพิ่มขึ้นของ Heat Shock Protein 60 kDa (HSP60) จาก

เนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก Ono *et al.* [40] ใช้เนื้อเยื่อที่เก็บด้วยวิธี Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous และใช้เทคนิค 2-DE ร่วมกับ LC-MS/MS พบว่า Heat Shock Protein 27 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น Gadducci *et al.* [41] รายงานว่า Serum squamous cell carcinoma antigen (SCC) ใช้เป็น serum marker ของ squamous cell carcinoma ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ส่วน serum CA 125 (Cancer antigen 125) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ใช้ในการติดตามผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด adenocarcinoma

โปรตีนที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งอื่นๆ เช่น Nishigaki *et al.* [34] รายงานว่าพบโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน คือ MAD1L1, HSP27 และ CYR61 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ gastric carcinoma และใช้เป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังมีการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอื่นๆทางด้านคลินิก [42] ซึ่งประกอบด้วย

- Prostate specific antigen (PSA) ใช้ในการวินิจฉัยโรคขั้นต้น (early stage) ของมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) [43]
- Cancer antigen 125 (CA125) หรือเรียกอีกชื่อว่า muc16 ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดซ้ำมาอีก (recurrence) ของมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) แต่ใช้เป็นตัวตรวจสอบก่อนการมีอาการ (presymptomatic detection) ของมะเร็งรังไข่ ยังให้ผลที่ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะต่ำ [44]
- Carcinoembryonic antigen (CEA) ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal) เต้านม (breast) ปอด (lung) และ ตับอ่อน (pancreatic cancer)
- NMP-22 เป็น specific nuclear matrix protein ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดซ้ำมาอีกของมะเร็งต่อมลูกหมาก และใช้เป็นตัวตรวจสอบก่อนการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก [45]
- CA19-9 เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งเหมือนกับ CEA หรือ CA125 พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน (pancreatic) กระเพาะอาหาร (stomach) และมะเร็งท่อน้ำดี (bile duct cancer) [46] และมีรายงานว่าใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และมะเร็งตับอ่อน และเป็นตัวบ่งชี้การเกิดซ้ำมาอีกของมะเร็งตับอ่อน [47]

คณะผู้วิจัยได้ใช้การวิเคราะห์โดยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองมิติ (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE ร่วมกับ เครื่องมือวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF) เพื่อหาตัวบ่งชี้มะเร็งในตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก และเปรียบเทียบตัวอย่างปัสสาวะจากคนสุขภาพดี ที่ไม่เป็นโรคมะเร็ง พบโปรตีนในปัสสาวะที่เป็น

ตัวบ่งชี้มะเร็งเบื้องต้น ได้แก่ Protocadherin-8 [PCDH8], Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 2 [ARNTL2], Serum albumin [ALB] และ Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (perlecan) [HSPGs] นอกจากนี้การบ่งชี้โปรตีนที่พบเหล่านี้ได้ยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต พบว่า ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก มีโปรตีน ARNTL2 หลั่งออกมาสูงมากกว่าคนปกติ ทั้งนี้โปรตีนดังกล่าวเป็นสมาชิกในวงศ์ basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) ของ transcription factors ที่ควบคุม circadian rhythm โปรตีน ARNTL2 มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (tumour development) ในมนุษย์ และช่วยยับยั้งการแพร่กระจายเซลล์เชื้อสาย 293 ARNTL2 และสมาชิกของ bHLH/PAS family จะทำหน้าที่ควบคุม key regulatory immune functions และมีผลต่อภาวะที่มีภูมิคุ้มกันต้านทานต่อตัวเอง (autoimmunity) [48]

ปัจจุบันการตรวจหาและรักษาความผิดปกติในระยะเริ่มแรกของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ การตรวจทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก (Pap smear) การตรวจหาเชื้อ HPV สายพันธุ์ก่อมะเร็ง (HPV DNA test) แต่ยังมีข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีเหล่านี้ เนื่องจากมีราคาที่สูงมาก และต้องอาศัยนักเซลล์วิทยาที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ทำให้คนทั่วไปไม่สามารถเข้าถึงการตรวจด้วยวิธีนี้ ดังนั้นการศึกษาหาตัวบ่งชี้มะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma และ Carcinoma ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก โดยใช้เทคนิคทางการแสดงออกของยีน (gene expression) และการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ตัวบ่งชี้ดังกล่าวในการวินิจฉัยมะเร็งระยะเริ่มต้นและเป็นแนวทางในการรักษาโรคต่อไป

1.4) วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.4.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก (cervical cell lines) และเซลล์ปกติ และศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่ค้นพบในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

1.4.2 เพื่อประยุกต์ใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคเบื้องต้น (disease diagnostic) ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

1.5) ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.5.1 ทำการค้นหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก รวมถึงเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆในระดับโมเลกุลหรือยีน

1.5.2 ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยรวมในเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด (HeLa : Adenocarcinoma, SiHa : Squamous cell carcinoma, C-4 I : Papilloma) และ SW756 : Carcinoma) กับเซลล์ปกติด้วยวิธี RT-qPCR

1.6) ระเบียบวิธีวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1.6.1 ระเบียบวิธีวิจัย

1.6.1.1 ค้นหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก รวมถึงเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆในระดับโมเลกุลหรือยีน

1.6.1.2 วิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยรวมในเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด (Squamous cell carcinoma และ Adenocarcinoma) กับเซลล์ปกติด้วยเทคนิค DNA microarray analysis

1.6.1.3 วิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค RT-qPCR

1.6.1.4 วิเคราะห์และประเมินหาขอบเขตและระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในมะเร็งปากมดลูกในเซลล์ชนิดอื่นๆด้วยวิธี RT-qPCR

1.6.1.5 วิจัยและสรุปผลการทดลอง

1.6.2 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หน่วยรังสีรักษาและมะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.7) ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์

1.7.1 สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกในแต่ละชนิดได้

1.7.2 สามารถเข้าใจเครือข่ายทางชีวภาพจากความสัมพันธ์ของยีนที่บ่งชี้มะเร็งปากมดลูกในแต่ละชนิดได้

1.7.3 สามารถใช้ข้อมูลแบบแผนการแสดงออกของยีนในมะเร็งปากมดลูกและความจำเพาะของยีนต่อมะเร็งปากมดลูกในแต่ละชนิดสำหรับการวินิจฉัยโรคทางคลินิกเบื้องต้นและ/หรือพัฒนาวิธีการบำบัดและรักษามะเร็งปากมดลูก

1.7.4 เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการวิจัยต่อไป รวมทั้งสร้างขีดความสามารถในการพัฒนาประเทศสู่ สังคมฐานความรู้

1.7.5 หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้แก่ หน่วยงานทางการแพทย์และเภสัชกรรม

1.8) แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ในลำดับแรกผลการวิจัยจะถ่ายทอดโดยการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการต่างๆ ทั้งในและนอกประเทศ ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการต่างๆ และรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไว้เป็นฐานข้อมูลให้มีการสืบค้นได้สะดวก

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1) วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Sigma–Aldrich, USA
Chloroform Lot# BCBH3014V	Sigma–Aldrich, USA
DEPC–treated water	Sigma–Aldrich, USA
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Germany
DMSO for Cell Culture	Sigma–Aldrich, USA
Dulbecco’s Modified Eagle Medium powder Cat # 6816	Gibco® by life technologies™, USA
EDTA	Fluka, Switzerland
Ethanol	Carlo Erba, Italy
Fetal Bovine Serum	Gibco, USA
Forward primer	Macrogen, South Korea
Hydrochloric acid	Carlo Erba, Italy
Isopropanol 99+% water≤ 0.05%	Sigma, USA
For molecular Biology Lot# 062K3673	
Leibovitz’s L–15, Mod. Medium with L–Glutamine	Corning, USA
MEM (eagle) with Earle’s Salts	Sigma, USA
MEM Non–Essential Amino Acids (100x)	Sigma, USA
Non–Essential Amino Acids (NEAA)	Sigma, USA
Penicillin–Streptomycin	Gibco, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (10x)	Gibco® by life technologies™, USA
[–] Calcium Chloride, [–] Magnesium Chloride	
Polyxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma, USA
Reverse primer	Macrogen, South Korea

ชื่อสารเคมี

บริษัทผู้ผลิต

RNase-free water

Sigma, USA

Sodium bicarbonate (for cell culture)

Gibco, USA

Cat # 31600-026

Sodium carbonate

GE Healthcare (Amersham), USA

Sodium chloride, NaCl, minimum assay 99.5%,

BDH Chemical, UK

Sodium hydroxide

Merck, USA

Sodium pyruvate (100x)

Gibco, USA

Trizol[®] reagent

Invitrogen, USA

Trypan blue stain Cat # 15250-061

Gibco, USA

0.25% Trypsin-EDTA (1x) REF # 25200-056

Gibco[®] by life technologies™, USA

Waymouth's (1x) MB 752/1 Medium

Gibco[®] by life technologies™, USA

[+] L-Glutamine REF # 11220-035

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave MLS-3780	Sanyo, JAPAN
Balance 2 digits	Merrler Toledo, USA
Balance 4 digits Model AT261 Delta Range	Merrler Toledo, USA
BioRad DNAEngine® Pelter Thermal Cycle	Bio-Rad, USA
BioRad Chromo 4™ Real-Time PCR Detector	Bio-Rad, USA
Centrifuge (rotor 12 x 35 g 6000 rpm), รุ่น MIKRO 22R	HETTICH, Netherland
Centrifuge 5430	Eppendorf, Germany
Centrifuge 5702	Eppendorf, Germany
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Germany
Centrifuge tube	Millipore, USA
96 well culture plate	NUNC™, USA
100x20 mm culture dish	NUNC™, USA
Disposable gloves	Microflex, Malaysia
Drying Oven MOV-212	Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd, JAPAN
Freezer -20°C MDF-U333	Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd, JAPAN
Freezer -80°C REVCO Legaci®	Refrigeration System, USA
Hot plate stirrer	Whatman, JAPAN
Lamina Flow Biohazard class II (Type s@fe flow 1.2)	BIOAIR Instruments, ITALY
Magnetic stirrer	Clifton Cerastir, England
Microcentrifuge Mini Spin	Eppendorf, Germany
Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL	Eppendorf, Germany
Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 mL	Eppendorf, Germany
Micropipette	Biohit, Gilson, USA
Micropipette 2 – 20 µl	LAB MATE, Poland

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Micropipette 20 – 200 µl รุ่น WITOPET digital	WITEG, Germany
Micropipette 100–1,000 µl	ISO LAB, Germany
Microwave	SHARP, JAPAN
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, USA
Pasteur pipette	Local Supplier, THAILAND
PCR Strip tube	NUNC™, USA
Pipette tips	Biohit, USA
Platform shaker STR8	Stuart Scientific, UK
pH meter, Model 713	Methrom, Switzerland
Refrigerator	Sanyo, JAPAN
Shaker Incubator GFL®1086	GFL, Netherland
Vortex mixer	Vortex Genie 2, USA
Water bath	Memmert, Germany
Cryo 1°C Freezing Container	NALGENE™, USA
ตู้เย็น 4°C	TOSHIBA, JAPAN
ตู้อบที่มีปริมาณ CO ₂ 5% ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C	Sanyo Electric Biomedical
และความชื้นสัมพัทธ์ 95% (CO ₂ incubator) MCO–20 AIC	Co., Ltd, JAPAN
กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope)	OLYMPUS CKX41, USA
กล้องจุลทรรศน์เลนส์วัดอยู่ด้านล่าง	OLYMPUS CKX41, USA
(inverted microscope)	
Hemocytometer	Local Supplier, THAILAND
Cover slip	Local Supplier, THAILAND
ปากคีบ (forceps)	Local Supplier, THAILAND
ขวดแก้ว (Duran)	Duran, USA
Vaccumn filtration	NUNC™, USA
Parafilm	Local Supplier, THAILAND
Tip ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่	Biohit, USA
Volumetric pipette ขนาด 1, 5, 10 และ 25 mL	Pyrex, USA

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องนับจำนวนเซลล์	Local Supplier, THAILAND
ปีกเกอร์	Pyrex, USA
ถุงมือยาง SUPRENO®	Microflex, Malaysia
อลูมิเนียมฟลอย Diamond®	Reynolds, USA
Centrifuge rack	Local Supplier, THAILAND
ชุดกระบอกฉีดยาพร้อมเข็ม	Local Supplier, THAILAND

2.2) ชุดทดลอง

1. Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit #K0731, USA
2. Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622, USA
3. Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix #K0392, #K0393, USA
4. illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit #25-0500-71, GE Healthcare, UK
5. SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR #18080-051, Invitrogen Life Technologies, USA

2.3) เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer cell lines)

1. HeLa Human cervix, adenocarcinoma
2. SiHa Human cervix, grade II, squamous cell carcinoma
3. C-4 I Human cervix, carcinoma
4. SW756 Human cervix, squamous cell carcinoma

ชื่อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC®), USA รายละเอียดดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็งทางนรีเวช (Gynecological cancer cell lines)

ATCC®No.	Name	Cell Type	Disease	Age	Ethnicity
CCL-2™	HeLa	epithelial	adenocarcinoma	31 years adult	Black
HTB-35™	SiHa		grade II, squamous cell carcinoma	55 years adult	Asian
CRL-1594™	C-4 I		Papilloma	41 years adult	Caucasian
CRL-10302™	SW756		squamous cell carcinoma	46 years adult	Caucasian

2.4) การเลี้ยงและเตรียมเซลล์เชื้อสายมะเร็ง

2.4.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็ง (Cancer cell lines)

ในการวิจัยนี้ใช้เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756 สำหรับเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน

2.4.2 การเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก

เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก HeLa เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 90% Dulbecco's Modification Eagle's MEM (DMEM) low glucose (25 mM) ที่มี L-glutamine, 110 mg/L Sodium pyruvate, Pyridoxine hydrochloride ผสมกับ fetal bovine serum (FBS) 10%

เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก SiHa เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 90% MEM (Eagle) with Earle's Salts ที่มี 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L Sodium bicarbonate, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids (NEAA) และ 1 mM Sodium pyruvate ผสมกับ fetal bovine serum (FBS) 10%

เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก C-4 I เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 90% Waymouth's MB 752/1 medium ที่มี L-glutamine ผสมกับ fetal bovine serum (FBS) 10%

เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก SW756 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitz's L-15, Mod. medium ที่มี L-glutamine ผสมกับ fetal bovine serum (FBS) 10%

เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกทุกเซลล์ เลี้ยงเซลล์ใน 100x20 mm culture dish โดยเพาะเลี้ยงไว้ในตู้บกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3-4 วัน หรือตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัดอยู่ด้านล่างว่าเซลล์เจริญเติบโตดี โดยมีเซลล์ประมาณ 70-80% confluent

2.4.3 การเตรียมเซลล์ในลักษณะแขวนลอย

เนื่องจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์เกาะทั้งหมด (adherent cells) จึงใช้เทคนิค trypsinization เพื่อให้เซลล์หลุดจากจานเพาะเลี้ยง (dish) ซึ่งมีกระบวนการดังต่อไปนี้

1. เริ่มจากดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 2 mL เพื่อไม่ให้มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคลือบอยู่ เพราะโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ จะรบกวนการทำงานของสารละลาย trypsin/EDTA
2. เติมสารละลาย trypsin/EDTA ปริมาตร 1 mL ลงในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่างว่าเซลล์หลุดออกจากพื้นจานเพาะเลี้ยงหรือไม่
3. เมื่อเซลล์หลุดหมด (มากกว่าร้อยละ 80) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 5 mL แล้วใช้ Pasteur pipette ดูดพ่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นจานเพาะเลี้ยงและกระจายออกจากกัน
4. ดูดสารละลายเซลล์ออกมาเพียงบางส่วน เพื่อทำการนับเซลล์โดยใช้ hemocytometer และคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ (ภาคผนวก ข้อ 3)
5. ปรับปริมาตรของเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^6 cell/mL ปริมาตร 10 mL ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 x 20 mm
6. เลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยง 100 x 20 mm โดยเพาะเลี้ยงไว้ในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%
7. ปิเปตเซลล์มาใส่ในหลอด microcentrifuge ประมาณ 5×10^6 cell ต่อหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง
8. เติม PBS ปริมาตร 1 mL ลงในแต่ละ microcentrifuge ดูด-เป่าๆ หลายครั้งให้เซลล์กระจายตัว และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูด PBS ทิ้ง
9. เก็บหลอด microcentrifuge ที่มีเซลล์เชื้อสายมะเร็งแต่ละชนิดไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป

2.5) การวิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด (Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Papilloma และ Carcinoma) กับเซลล์ปกติด้วยเทคนิค Real-time quantitative PCR [RT-qPCR]

2.5.1 Primer design

การออกแบบ primer สำหรับวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน โดยสังเคราะห์ primer จากบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ดังตารางที่ 2.2

2.5.2 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจากเซลล์เชื้อสายมะเร็ง

2.5.2.1 การเตรียมเซลล์เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์ที่กล่าวมาทั้งหมดในข้อ 2.4.2 มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ จะต้องใช้เซลล์อย่างน้อย 5×10^6 เซลล์ขึ้นไป ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอมีดังนี้

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 cm จนได้เซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะ mid log จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด
2. ปิเปต Trizol[®] reagent ปริมาตร 3 mL ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เขย่าสารให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่างว่าเซลล์หลุดออกจากพื้นจานเพาะเลี้ยงหรือไม่
3. ใช้ pipette ดูดฟั่นเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นจานเพาะเลี้ยงและกระจายออกจากกัน
4. ดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 mL ลงใน sterile centrifuge tube ขนาด 1.5 mL และ vortex จากนั้นนำไปสกัดอาร์เอ็นเอหรือเก็บไว้ที่ -80°C

2.5.2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA Isolation)

อาร์เอ็นเอมีคุณสมบัติที่ไวต่อการถูกทำลาย เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลไรโบสสายเดี่ยว ดังนั้นกระบวนการในการสกัดอาร์เอ็นเอจึงควรทำที่อุณหภูมิต่ำหรือประมาณ 4°C

1. นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.2.1 มาเติมด้วย Lysis buffer ปริมาตร 600 μL แล้ว vortex sterile centrifuge tube ให้สารละลายเข้ากัน เป็นเวลา 10 วินาที และ spin down (หากเซลล์ชั้นหนืดมาก ให้ใช้ชุดเข็มฉีดยาดูด - ปลอ่ย หลายๆครั้ง) ตั้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

ตารางที่ 2.2 Forward และ Reverse Primer ของยีน 30 ชนิดที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

No.	Gene name	Forward	Tm (°C)	Reverse	Tm (°C)
1	ADAM33	GCTTTGCTCACAAGTCTG	56.23	AACTCAGGGAGGTCACAG	55.37
2	ALB	AACCTCTTGGAAGAGCCT	58.56	GGGTACTTTCTTGTTAACGA	58.01
3	APP	AGAACTACATCACCGCTCTG	57.05	GTGCTGTCTGCTCTTCTG	54.99
4	ARNTL2	GCAAGTTCACAGTAATCTCCA	55.90	TCCATGCTCTTCTTTGACAG	55.37
5	ATF2	CAACCAGTACAGTCAGAAGCA	57.89	GAGTCCTAACCAATCCGCTACC	60.22
6	ATF6	GAACCATGCTTTACATTCCTC	55.69	CATGTCTATGAACCCATCCTC	55.54
7	BAAT	CCATAACTATGAAGACCTGCC	55.82	AACGCCTGAGCCAAAGAC	57.93
8	CALD1	TCCAAGAAGACAAGCCTACC	56.85	CGACTTAACCTCTGTAAATCCC	54.61
9	CELSR2	GTGACTACTGCGAGACCGAG	59.90	GTGTAGCCATCACGACAGAG	58.09
10	DPYSL3	TGCCATCACCATTGCCAG	57.98	CTCACCAAGACTACATTTCTT	55.74
11	GAPDH	CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC	58.48	AGTAGAGGCAGGGATGATGTTT	59.30
12	HSPG2	GGCATCGGGCAATGCTAT	57.91	CCTTTGAATCCATCTCGACACA	58.40
13	LAMA2	TGAGGTGTACCTGCACCCATCTG	64.09	ACGGACTGGAAATGTGTGCCAT	63.20
14	MAPRE3	ATGATGGAAAGGATTACAACCC	56.09	CTCTGTGGAAGTGTGTG	55.30
15	NASP	GGAGCTACTGAGAAATCACCTG	58.21	AGCCTTCAGTTTCTTCACCC	57.72
16	NAV3	GCCACAGATCCAGTACCA	55.88	TTGACGGTGACAGGACTC	56.19
17	PAK7	TACATCTCCACGGCTTCC	56.00	CCGAAACTGTTTCATGGGAC	56.23
18	PARD3B	GCCGAGAGTGAAGTTCCA	56.59	AAATATACTGCTGAATCCACCC	55.91
19	PCDH8	GTGTCCACTTATGTCTCGG	55.05	TAGCTTGGATGCGAACGTC	57.96
20	PGF	ATGTTACGCCCATCCTGTGTC	60.37	CCCAGAACGGATCTTTAGGAG	57.54
21	PPP2R2C	GCAACCTCTTCGTCTACAG	55.38	GAATGAGCGGTTACTGGG	55.13
22	PRPF4B	GACGAAGGAGCAGAAGCA	57.00	CTTCAAGGTTATCATCAGACGA	55.66
23	RCC1	GGTGTGATTGGACTGTTGG	56.12	CAAGTGGTCGTTTCTGAG	55.88
24	RPA3	TGTCTGCTTCGTAGGGAG	55.62	CCAGAGATTTCTTCATCAAGGG	56.49
25	SASH1	TATAATCAGCAAGCCACCCA	56.58	GGTTTCTCCTCGCTTCAC	55.28
26	SRPK1	GAGTCCTGTTGAAAGACCC	55.13	GCACCACCCTCTGTATCAC	57.54
27	STK17A	TGATGTTTTGTCTGAGTCGGCTGTTG	64.01	TCTTCAGCAGTGGCTCGATCTCAGG	66.30
28	TCF4	CTCCAGATCACACTACAACAG	56.47	CCTCCATTTCTAGACCAACAG	56.43
29	TNFSF13	CCATTAAACGCCACCTCCA	56.95	AGATAAACTCCAGCATCCTG	54.52
30	VAV2	TACCCCTGGTTTGCAGGTAAC	59.93	GCTTATTGCAAAGCGCTCA	57.30

2. นำไปปั่นตกตะกอนในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 14,000 x g (14,453 rpm) อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5-6 นาที

3. ถี้อหลอด sterile centrifuge ในระดับสายตา ใช้ micropipette ดูด aqueous phase ครั้งละ 200 µl จำนวน 2 ครั้ง ระวัง DNA และโปรตีน (phase อื่นๆ) ฟุ้งขึ้นมา ไปใส่ใน sterile centrifuge tube ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่

4. เติม absolute ethanol ปริมาตร 360 µl จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันด้วยการเอียงหลอดเบาๆไปมาประมาณ 5-10 ครั้ง หรือใช้ micropipette ดูด - ปล่อยหลายๆครั้ง และ spin down ตั้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูด supernatant จากข้อ 4 มา 700 µl ใส่ลงใน GeneJET RNA Purification Column ที่ inserted ใน collection tube (ที่มีอยู่ในชุด kit) นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง thermo-centrifuge ความเร็ว 12,000 x g (12,800 rpm) อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ข้างล่างทิ้งไป แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที จนกว่า lysate จะผ่านคอลัมน์จนหมด จากนั้นทิ้ง collection tube แล้วนำ purification column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่ (ที่มีอยู่ในชุด kit)

6. เติม Wash buffer 1 ปริมาตร 700 µl ลงใน purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้งไป

7. เติม Wash buffer 2 ปริมาตร 600 µl ลงใน purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้งไป

8. เติม Wash buffer 2 ปริมาตร 250 µl ลงใน purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้งไป

หากยังมีสารละลายตกค้างอยู่ใน purification column ให้ปั่นซ้ำที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที จนกว่าสารละลายจะผ่าน column จนหมด จากนั้นทิ้ง collection tube แล้วนำ purification column ไปใส่ใน sterile 1.5 mL RNase-free microcentrifuge tube (ที่มีอยู่ในชุด kit)

9. เติม nuclease-free water (ที่มีอยู่ในชุด kit) ปริมาตร 100 µl ลงตรงกลางของ purification column membrane ซึ่ง microcentrifuge tube วางอยู่บนน้ำแข็ง ทิ้งไว้ 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะ RNA จากนั้นเติมนuclease-free water ปริมาตร 100 µl โดยที่ microcentrifuge tube วางอยู่บนน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที (หากต้องการให้ RNA เข้มข้นขึ้น ให้เติมนuclease-free water เพียงปริมาตร 50 µl ทั้ง 2 steps)

10. ทิ้ง purification column แล้วดูดแบ่ง RNA มาใส่ sterile centrifuge tube ขนาด 0.2 mL หลอดละ 2 μ L เพื่อวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer แสดงในตารางที่ 2.3

11. เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

2.5.2.3 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (First Strand cDNA Synthesis)

จากการหาปริมาณอาร์เอ็นเอจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก แสดงในตารางที่ 2.3 อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์เชื้อสายจะทำให้กลายเป็นซีดีเอ็นเอสายคู่โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม sterile, nuclease-free PCR tube ใหม่ไว้ 2 หลอด โดยในหลอดแรก เติมสารตามตารางที่ 2.4

– เติม Template RNA โดยใช้ RNA ปริมาณ 1 μg ซึ่งทำการคำนวณปริมาตร RNA ที่จะใช้เติมลงไปได้ดังนี้

$1000/\text{conc. of RNA} = \text{ปริมาตร RNA ที่ใช้เติมลงในหลอด}$

– เติม Oligo (d)T Primer ปริมาตร 1 μL

– เติม nuclease-free water ให้ได้ปริมาตรครบ 12 μL

ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากัน จากนั้นจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง BioRad DNAEngine® Pelter Thermal Cycle

(หากต้องการใช้ตัวอย่างเดียวกันหลายหลอด อาจจะทำ master mix ในหลอด 1.5 mL แล้วแบ่งใส่หลอดเล็กขนาด 0.2 mL หลอดละ 12 μL ก่อนบ่ม)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณอาร์เอ็นเอของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก

เซลล์เชื้อสายมะเร็ง	ปริมาณ RNA (ng/ μL)
HeLa	300.0
SiHa	268.4
C-4 I	253.2
SW756	154.9

ตารางที่ 2.4 สารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

สารละลาย			HeLa	SiHa	C-4 I	SW756
Template RNA	Total RNA 1 µg (µl)		3.3	3.7	3.9	6.5
Primer	Oligo dT ₁₈ (µl)		1.0	1.0	1.0	1.0
RNase-free water		to 12.5 µl	8.2	7.8	7.6	5.0

2. เตรียม PCR tube ใหม่ หลอดที่สอง เตรียมเป็น pre-mixed solution ไว้ก่อน โดยเติมสารดังต่อไปนี้

- 5X Reaction Buffer ปริมาตร 4 µl
- RiboLock RNase Inhibitor ปริมาตร 1 µl
- 10 mM dNTP Mix, each ปริมาตร 2 µl
- RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl) ปริมาตร 1 µl

ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากัน โดยการ spin down

3. ปิเปตสารละลายจาก PCR tube หลอดที่ 2 (pre-mixed solution) ลงใน PCR tube หลอดที่ 1 ของแต่ละเซลล์เชื้อสาย ปริมาตร 7.5 µl ผสมสารเบาๆ และ spin down จากนั้นจึงนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที

4. เก็บตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิ -20°C (ตารางที่ 2.5) เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการศึกษาต่อไป

2.5.2.4 การตรวจสอบปริมาณซีดีเอ็นเอ

เจือจางสารละลายซีดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณ โดยผสมน้ำกลั่นปริมาตร 995 µl กับสารละลายซีดีเอ็นเอปริมาตร 5 µl ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความบริสุทธิ์ของซีดีเอ็นเอ (OD_{260/280}) และค่าความเข้มข้นของซีดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการปรับปริมาณซีดีเอ็นเอให้เท่ากับ 12.5 ng/µl ก่อนนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase Chain Reaction; PCR)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณซีดีเอ็นเอของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก

เซลล์เชื้อสายมะเร็ง	ปริมาณ cDNA (ng/ μ l)	OD 260/280	OD 260/230
HeLa	2,559.6	1.72	2.07
SiHa	2,448.9	1.73	2.09
C-4 I	2,515.0	1.72	2.09
SW756	2,512.5	1.73	2.09

2.5.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจากเซลล์ปกติ

2.5.3.1 การสกัด RNA จากเซลล์ปกติ

นำเซลล์ปกติจาก tumor cervix tissue มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอมีดังนี้

1. เตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL ที่กลั้วด้วย DEPC-treated water และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 หลอด
2. ผสม β -mercaptoethanol ปริมาตร 3.5 μ l และ Lysis buffer ปริมาตร 350 μ l ลงในหลอด microcentrifuge หลอดแรก ผสมให้เข้ากัน จากนั้น vortex และ spin down
3. ตัดชิ้นเนื้อเยื่อจากหลอดเก็บตัวอย่าง มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และสับให้ละเอียดด้วยมีดผ่าตัด ในหลอด microcentrifuge จากนั้นเติมสารละลาย β -mercaptoethanol ลงไป แล้วนำไป vortex และ spin down
4. ใช้ชุด syringe ที่มีเข็มฉีดยาที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูด-ปล่อยสารละลายเนื้อเยื่อ (lysate) ประมาณ 15 ครั้ง เพื่อให้เนื้อเยื่อถูกย่อยสลายให้มากที่สุด จากนั้น spin down
5. เตรียม RNAspin Mini Filter (หลอดสีแดง) ใส่ลงใน collection tube เติมสารละลายเนื้อเยื่อ (lysate) จากข้อ 4 ลงไป ปริมาตรประมาณ 360 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 $\times$ g (12,800 rpm) เป็นเวลา 1 นาที
6. ทิ้ง RNAspin Mini Filter ไป ดูด filtrate ใส่ในหลอด RNase-free microcentrifuge ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่
7. ตกตะกอน DNA/RNA โดยเติม 70% ethanol ปริมาตร 360 μ l จากนั้น spin down และใช้ micropipette ดูดขึ้น-ลง 3 รอบ

8. ปิเปตตะคอน DNA/RNA (lysate) ลงใน RNAspin Mini Filter (หลอดสีฟ้า) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $8,000 \times g$ (10,900 rpm) เป็นเวลา 45 วินาที หาก lysate ยังลงมาไม่หมด ให้ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำ RNAspin Mini Filter ไปใส่ใน collection tube หลอดใหม่

9. เติม Desalting Buffer ปริมาตร 350 μL ลงใน RNAspin Mini Filter และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ (12,800 rpm) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเท filtrate ทิ้งไป

10. ขั้นตอนการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase เริ่มจากเตรียม DNase reaction mixture โดยเติม DNase I ปริมาตร 10 μL รวมกับ DNase reaction buffer ปริมาตร 90 μL ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 250 μL แล้วใช้ micropipette ดูดขึ้น-ลง ซ้ำเย็นไว้ จากนั้นเติม DNase I reaction mixture ปริมาตร 95 μL ลงตรงกลาง silica membrane ของ column แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

11. เมื่อครบเวลา เติม Wash Buffer I ปริมาตร 200 μL ลงใน RNAspin Mini Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ (12,800 rpm) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำ RNAspin Mini Column ใส่ลงใน collection tube หลอดใหม่

12. เติม Wash Buffer II ปริมาตร 600 μL ลงใน RNAspin Mini Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ (12,800 rpm) เป็นเวลา 1 นาที เท filtrate ทิ้งไป

13. เติม Wash Buffer II ปริมาตร 250 μL ลงใน RNAspin Mini Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ (12,800 rpm) เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง collection tube ไป จากนั้น dry membrane โดยวาง RNAspin Mini Column ลงในหลอด ขนาด 1.5 mL nuclease-free microcentrifuge tube

14. ขั้นตอนการชะ RNA โดยเติม RNase-free water ปริมาตร 30 μL ลงใน RNAspin Mini Column (ตรงกลางคอลัมน์ ห้ามโดนขอบ) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งก่อน 10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ (12,800 rpm) เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นทำซ้ำอีกครั้ง โดยดูด filtrate ที่ได้ลงใน RNAspin Mini Column ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งก่อน 10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $11,000 \times g$ (12,800 rpm) เป็นเวลา 1 นาที และวางบนน้ำแข็ง หลังจากนั้นปิเปต RNA ที่ได้ลงในหลอดขนาด 250 μL ที่เตรียมไว้หลอดละ 1.8 μL เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพ RNA

2.5.3.2 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (First Strand cDNA Synthesis)

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ปกติจะทำให้กลายเป็นซีดีเอ็นเอสายคู่โดยใช้ SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม sterile, nuclease-free PCR tube ใหม่ไว้ 2 หลอด โดยในหลอดแรก เติมสารดังต่อไปนี้

– เติม Template RNA โดยใช้ RNA ปริมาณ 1 µg ซึ่งทำการคำนวณปริมาตร RNA ที่จะใช้เติมลงไปดังต่อไปนี้

$1000/\text{conc. of RNA} = \text{ปริมาตร RNA ที่ใช้เติมลงในหลอด}$

– เติม 50 µM Oligo (d)T₂₀ Primer ปริมาตร 1 µl

– เติม 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 µl

– เติม DEPC-treated water ให้ได้ปริมาตรครบ 10 µl

ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากัน จากนั้นจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง Thermocycler

(หากต้องการใช้ตัวอย่างเดียวกันหลายหลอด อาจเตรียม master mix ในหลอด 1.5 mL แล้วแบ่งใส่หลอดเล็กขนาด 0.2 mL หลอดละ 12 µl ก่อนบ่ม)

2. เตรียม PCR tube ใหม่ หลอดที่สอง เตรียมเป็น pre-mixed solution ไว้ก่อน โดยเติมสารดังต่อไปนี้

– 10X RT Buffer ปริมาตร 2 µl

– 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 4 µl

– 0.1 M DTT ปริมาตร 2 µl

– RnaseOUT™ (40 U/ µl) ปริมาตร 1 µl

– SuperScript® III RT (200 U/µl) ปริมาตร 1 µl

ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากัน โดยการ spin down

3. ปิเปตสารละลายจาก PCR tube หลอดที่ 2 (pre-mixed solution) ลงใน PCR tube หลอดที่ 1 ปริมาตร 7.5 µl ผสมสารเบาๆ และ spin down จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที

4. เก็บตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการศึกษาต่อไป

2.5.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

หลังจากได้สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756 แล้วจึงนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนบ่งชี้เฉพาะ โดยยีนที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมคือ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) และใช้ Primer แสดงในตารางที่ 2.6

2.5.4.1 Real-time PCR

ในการวิจัยได้ใช้ชุดทดลอง Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เจือจาง cDNA ของเซลล์เชื้อสาย HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756 ลง 10 เท่า (cDNA ปริมาตร 10 μ l ในน้ำ PCR-grade ปริมาตร 90 μ l) (ตารางที่ 2.7)
2. เตรียม PCR Primer ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า โดยปิเปต Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 20 μ l เจือจางใน PCR-grade water ปริมาตร 180 μ l โดยให้ PCR primer มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2–1 μ M
3. เตรียม PCR Mix ผสมสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (ตารางที่ 2.8) ใช้ 15 wells เตรียมเพื่อไว้ 17 wells ผสมสารอย่างระมัดระวัง โดยใช้ปิเปตดูดเป่าขึ้น-ลง ห้าม vortex เด็ดขาด
4. ปิเปต PCR Mix ปริมาตร 7.5 μ l ทั้ง GAPDH Mixture และ HSPG2 Mixture ลงในแต่ละ well ของ BioRad Chromo 4™ Real-Time PCR Detector
5. เติม cDNA template (จากเซลล์เชื้อสาย HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756) ปริมาตร 2 μ l (cDNA template ความเข้มข้น = 12.5 ng/ μ l) และใช้ PCR-grade water เป็น Negative control (ตารางที่ 2.9)
6. ปิดฝีก PCR strip ด้วย cover และนำ PCR strip ใส่ลงใน eppendorf centrifuge 5430 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,500xg เป็นเวลา 2.30 นาที เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ
7. ย้าย PCR strip ลงใน plate holder ของเครื่อง BioRad Chromo 4™ Real-Time PCR Detector
8. ตั้งอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา real-time PCR จากเครื่อง BioRad Chromo 4™ Real-Time PCR Detector (ตารางที่ 2.10) โดยใช้โปรแกรม DRJOE2 สำหรับควบคุมและเก็บข้อมูลการทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงเริ่มทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 2.6 Forward และ Reverse Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

Primer	เติมน้ำให้ได้ 100 pmol/μl (μl) (Stock primer solution)	เติมน้ำให้ได้ 10 μM (μl) (Working primer solution)	หมายเหตุ ปริมาตร (μl)
GAPDH -F	390	(50) + 450	500
GAPDH -R	370	(50) + 450	500
HSPG2 -F	400	(20) + 180	200
HSPG2 -R	410	(20) + 180	200
SASH1 -F	350	(20) + 180	200
SASH1 -R	450	(20) + 180	200
SPRK1 -F	420	(20) + 180	200
SPRK1 -R	410	(20) + 180	200
VAV2 -F	390	(20) + 180	200
VAV2 -R	410	(20) + 180	200
STK17A -F	380	(20) + 180	200
STK17A -R	380	(20) + 180	200
ADAM33 -F	420	(20) + 180	200
ADAM33 -R	420	(20) + 180	200
ALB -F	380	(20) + 180	200
ALB -R	380	(20) + 180	200
APP -F	400	(20) + 180	200
APP -R	420	(20) + 180	200
ARNTL2 -F	410	(20) + 180	200
ARNTL2 -R	410	(20) + 180	200
ATF2 -F	400	(20) + 180	200
ATF2 -R	380	(20) + 180	200
ATF6 -F	390	(20) + 180	200
ATF6 -R	400	(20) + 180	200
BAAT -F	400	(20) + 180	200
BATT -R	400	(20) + 180	200
CALD1 -F	380	(20) + 180	200
CALD1 -R	380	(20) + 180	200
CELSR2 -F	380	(20) + 180	200
CELSR2 -R	390	(20) + 180	200
DPYSL3 -F	420	(20) + 180	200
DPYSL3 -R	400	(20) + 180	200
LAMA2 -F	410	(20) + 180	200
LAMA2 -R	410	(20) + 180	200

ตารางที่ 2.6 Forward และ Reverse Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR (ต่อ)

Primer	เติมน้ำให้ได้ 100 pmol/μl (μl) (Stock primer solution)	เติมน้ำให้ได้ 10 μM (μl) (Working primer solution)	หมายเหตุ ปริมาตร (μl)
MAPRE3 –F	370	(20) + 180	200
MAPRE3 –R	400	(20) + 180	200
NASP –F	400	(20) + 180	200
NASP –R	400	(20) + 180	200
NAV3 –F	410	(20) + 180	200
NAV3 –R	400	(20) + 180	200
PAK7 –F	450	(20) + 180	200
PAK7 –R	390	(20) + 180	200
PARD3B –F	430	(20) + 180	200
PARD3B –R	390	(20) + 180	200
PCDH8 –F	420	(20) + 180	200
PCDH8 –R	420	(20) + 180	200
PGF –F	400	(20) + 180	200
PGF –R	380	(20) + 180	200
PPP2R2C –F	420	(20) + 180	200
PPP2R2C –R	410	(20) + 180	200
PRPF4B –F	400	(20) + 180	200
PRPF4B –R	410	(20) + 180	200
RCC1 –F	410	(20) + 180	200
RCC1 –R	430	(20) + 180	200
RPA3 –F	400	(20) + 180	200
RPA3 –R	390	(20) + 180	200
TCF4 –F	420	(20) + 180	200
TCF4 –R	400	(20) + 180	200
TNFSF13 –F	420	(20) + 180	200
TNFSF13 –R	410	(20) + 180	200

ตารางที่ 2.7 การเจือจาง cDNA template (จากเซลล์เชื้อสาย HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756) ที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

Cell lines	ปริมาตร cDNA (μl)	ปริมาตร PCR-grade water (μl)
HeLa	1.95	398.05
SiHa	2.04	397.96
C-4 I	1.99	398.01
SW756	1.99	398.01
Normal	25.00	375.00

หมายเหตุ เจือจางให้ได้ 12.5 ng/μl ปริมาตรรวม = 400 μl

ตารางที่ 2.8 สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR (HSPG2)

สารเคมี	1x ปริมาตร (μl)	GAPDH 17 x ปริมาตร (μl)	HSPG2 17 x ปริมาตร (μl)
Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (2x)	10	170	170
10 μM Forward Primer	0.6	10.2	10.2
10 μM Forward Primer	0.6	10.2	10.2
PCR-grade water	6.8	115.6	115.6
แบ่งใส่ strip tube ละ 18 μl			
Template cDNA	2	2 μl/ rxn	2 μl/ rxn

(Total volume = 20 μl/reaction)

หมายเหตุ ใช้ cDNA template ความเข้มข้น = 12.5 ng/μl เดิมลงไป 2 μl (จะได้ cDNA ปริมาณ 25 ng/reaction) จะได้ final concentration of cDNA = 1.25 ng/μl

ตารางที่ 2.9 PCR Mix ของ GAPDH Mixture และ HSPG2 Mixture ลงในแต่ละ well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				control #1	HeLa #1	SiHa #1	C-4 I #1	SW756 #1				
B				control #2	HeLa #2	SiHa #2	C-4 I #2	SW756 #2				
C				control #3	HeLa #3	SiHa #3	C-4 I #3	SW756 #3				
D								-ve control GAPDH				
E				control #1	HeLa #1	SiHa #1	C-4 I #1	SW756 #1				
F				control #2	HeLa #2	SiHa #2	C-4 I #2	SW756 #2				
G				control #3	HeLa #3	SiHa #3	C-4 I #3	SW756 #3				
H								-ve control HSPG2				

ตารางที่ 2.10 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
pre-incubation (1 รอบ)	95	10 นาที	
Amplification (40 รอบ)			เป็นขั้นตอนที่เก็บข้อมูลจาก real-time PCR product
Denature	95	15 วินาที	
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Melting Curve	95	5 วินาที	Melting Curves
	65	1 นาที	
	97	-	
Cooling	40	30 วินาที	

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1) การวิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยรวมในเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิดกับเซลล์ปกติด้วยเทคนิค DNA microarray analysis

โดยคัดเลือกยีนจำนวน 64 ยีน จาก public DNA microarray data นำยีนทั้งหมดมาตรวจสอบใน Cervical Cancer gene DataBase (CCDB. <http://crdd.osdd.net/raghava/ccdb>) พบยีนจำนวน 51 ยีน ที่ไม่ได้อยู่ในฐานข้อมูลดังกล่าว จากนั้นค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ (Function) รวมทั้ง Subcellular location ของยีนแต่ละตัว ทำการจัดกลุ่มและคัดเลือกยีนที่บ่งชี้เฉพาะ (Candidate genes) จำนวน 30 ยีน โดยมี GAPDH (Housekeeping gene) เป็น internal control แสดงในตารางที่ 3.1 เพื่อมาทำการวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค RT-qPCR ต่อไป

3.2) วิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค RT-qPCR

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด (Subtypes) HeLa (Adenocarcinoma), SiHa (grade II, Squamous Cell Carcinoma), C-4 I (Papilloma) และ SW756 (Carcinoma) โดยใช้เซลล์ปกติ เป็นเซลล์ควบคุม จากการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน (Relative Quantification) พบว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด Adenocarcinoma cell line; HeLa มีการแสดงออกของยีน จำนวน 25 ยีน (ADAM33, APP, ARNTL2, ATF2, ATF6, BAAT, CADL1, CELSR2, DPYSL3, HSPG2, LAMA2, MARPE3, NASP, NAV3, PAK7, PARD3B, PGF, PPP2R2C, RCC1, RPA3, SASH1, SRPK1, STK17A, TNFSF13 และ VAV2) โดยที่ยีน VAV2 มีการแสดงออกมากที่สุดเป็น 3.013973 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

สำหรับในเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด grade II, Squamous Cell Carcinoma cell line; SiHa มีการแสดงออกของยีน จำนวน 24 ยีน (ADAM33, APP, ARNTL2, ATF2, ATF6, BAAT, CADL1, CELSR2, HSPG2, LAMA2, MARPE3, NASP, NAV3, PAK7, PARD3B, PGF, PPP2R2C, RCC1, RPA3, SASH1, SRPK1, STK17A, TNFSF13 และ VAV2) โดยที่ยีน VAV2 มีการแสดงออกมากที่สุดเป็น 3.575967 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

ตารางที่ 3.1 กลุ่มและยีนที่บ่งชี้เฉพาะจำนวน 30 ยีน จาก public DNA microarray data

No.	Gene Name	Description	Functions	Subcellular location
1	ADAM33	ADAM metalloproteinase domain 33	metalloendopeptidase activity, cell matrix interaction	Membrane
2	ALB	albumin	antioxidant activity, chaperone binding	Secreted
3	APP	amyloid beta (A4) precursor protein	acetylcholine receptor binding	Membrane
4	ARNTL2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 2	E-box binding, ranscription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	Nucleus
5	ATF2	activating transcription factor 2	transcriptional activation	Nucleus, Cytoplasm, Mitochondrion outer membrane
6	ATF6	activating transcription factor 6	Transcription factor	Endoplasmic reticulum membrane
7	BAAT	BRCA1-associated ATM activator 1	involved in metabolic pathways	Nucleus
8	CALD1	caldesmon 1	actin binding, calmodulin binding	Cytoplasm
9	CELSR2	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	calcium ion binding, G-protein coupled receptor activity	Cell membrane
10	DPYSL3	dihydropyrimidinase-like 3	cytoskeletal remodeling	Cytoplasm, Cell projection
11	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	housekeeping gene	Cytoplasm
12	HSPG2	Endorepellin LG3	Angiogenesis, calcium ion binding, protein C-terminus binding	Basement membrane
13	LAMA2	laminin, alpha 2	cell adhesion, extracellular matrix organization	Secreted
14	MAPRE3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	signaling and migration of cells	Cytoplasm
15	NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	cell division	Cytoplasm, Nucleus
16	NAV3	neuron navigator 3	tumor suppressor gene	Nucleus outer membrane

ตารางที่ 3.1 กลุ่มและยีนที่บ่งชี้เฉพาะจำนวน 30 ยีน จาก public DNA microarray data (ต่อ)

No.	Gene Name	Description	Functions	Subcellular location
17	PAK7	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7	signaling and migration of cells	Mitochondrion, Cytoplasm, Nucleus
18	PARD3B	par-3 family cell polarity regulator beta	tight junctions	Endomembrane system
19	PCDH8	protocadherin 8	calcium ion binding	Cell membrane
20	PGF	placental growth factor	placental growth factor	Secreted
21	PPP2R2C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	phosphatase	Cellular Component
22	PRPF4B	pre-mRNA processing factor 4B	RNA splicing	Nucleus
23	RCC1	regulator of chromosome condensation 1	cell cycle regulatory gene	Nucleus, Cytoplasm
24	RPA3	replication protein A3, 14kDa	DNA repair and replication	Nucleus
25	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	tumor suppressor gene	Membrane, Protein complex
26	SRPK1	SRSF protein kinase 1	protein kinase	Cytoplasm, Nucleus matrix, Microsome
27	STK17A	serine/threonine kinase 17a	ATP binding, positive regulation of apoptotic process	Nucleus
28	TCF4	transcription factor 4	transcription factor	Nucleus
29	TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	apoptosis-related gene	Secreted
30	VAV2	vav 2 guanine nucleotide exchange factor	angiogenesis	Cytosol, Plasma membrane

ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด Papilloma cell line; C-4 I มีการแสดงออกของยีน จำนวน 24 ยีน (ADAM33, APP, ARNTL2, ATF2, ATF6, BAAT, CADL1, CELSR2, HSPG2, LAMA2, MARPE3, NASP, NAV3, PAK7, PARD3B, PGF, PPP2R2C, RCC1, RPA3, SASH1, SRPK1, STK17A, TNFSF13 และ VAV2) โดยที่ยีน RCC1 มีการแสดงออกมากที่สุดเป็น 6.161721 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

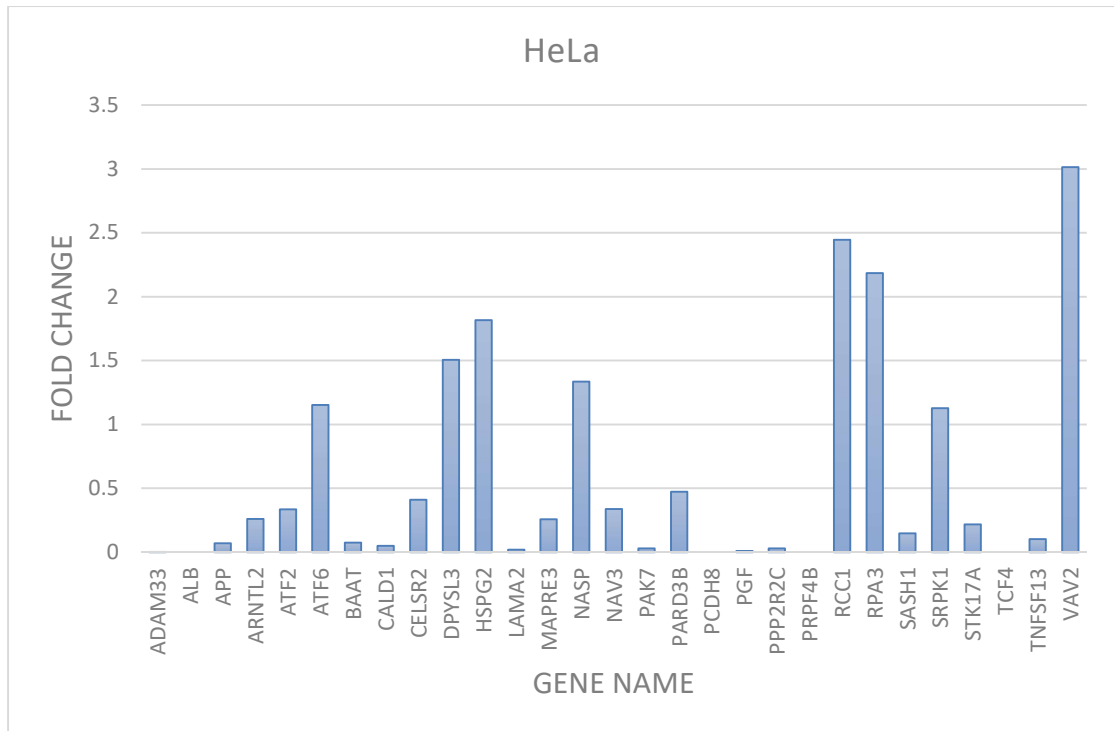
และในเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด Carcinoma cell line; SW756 มีการแสดงออกของยีน จำนวน 22 ยีน (ADAM33, APP, ARNTL2, ATF2, ATF6, CADL1, CELSR2, HSPG2, LAMA2, MARPE3, NASP, NAV3, PAK7, PARD3B, PGF, RCC1, RPA3, SRPK1, STK17A, TCF4, TNFSF13 และ VAV2) โดยที่ยีน VAV2 มีการแสดงออกมากที่สุดเป็น 2.025578 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

สำหรับยีน DPYSL3 พบการแสดงออกในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa เท่านั้น และยีน TCF4 พบการแสดงออกในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SW756 เท่านั้น และจะไม่พบการแสดงออกของยีน ALB, PCDH8 และ PRPF4B ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกทุกเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.1-3.4

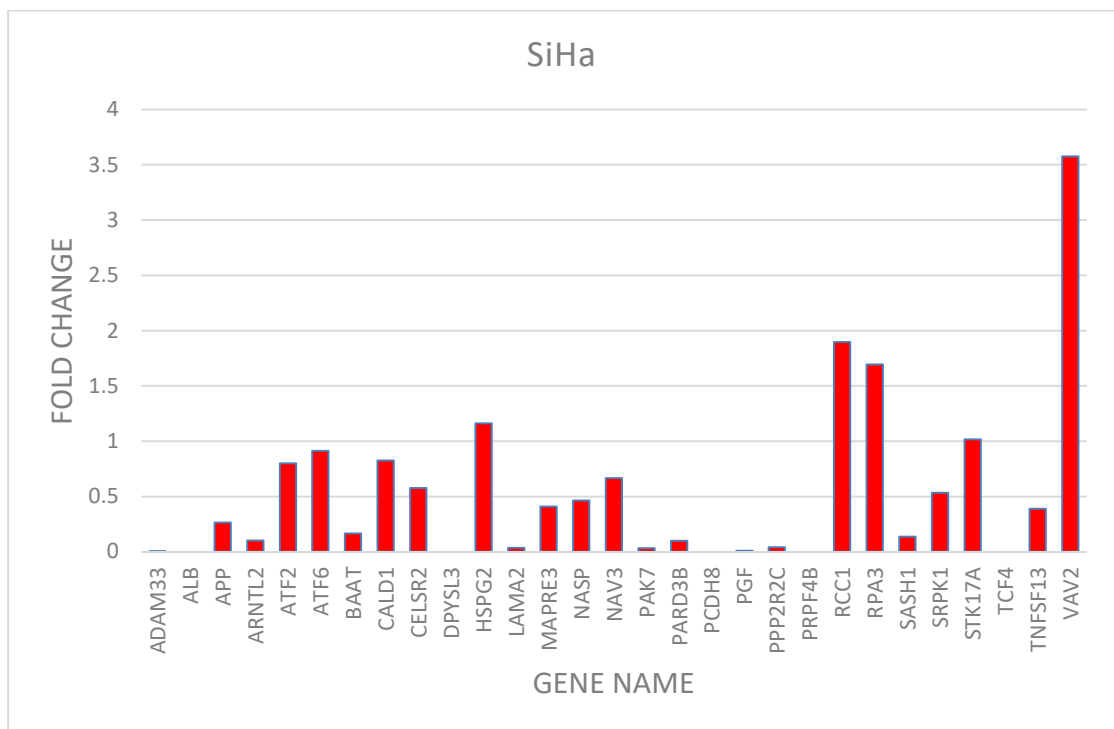
สำหรับการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก HeLa, SiHa, C-4 I และ SW756 โดยใช้เซลล์ปกติ เป็นเซลล์ควบคุม ที่มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ พบว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa มีการแสดงออกของยีน จำนวน 5 ยีน (DPYSL3, HSPG2, RCC1, RPA3 และ VAV2) ส่วนในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SiHa มีการแสดงออกของยีน จำนวน 3 ยีน (RCC1, RPA3 และ VAV2) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง C-4 I มีการแสดงออกของยีน จำนวน 10 ยีน (ATF6, CELSR2, HSPG2, NASP, NAV3, RCC1, RPA3, SRPK1, STK17A และ VAV2) และในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SW756 มีการแสดงออกของยีน จำนวน 1 ยีน (VAV2) เท่านั้น

ตารางที่ 3.2 ค่า Relative Quantification คิดเป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกในเซลล์ปกติ

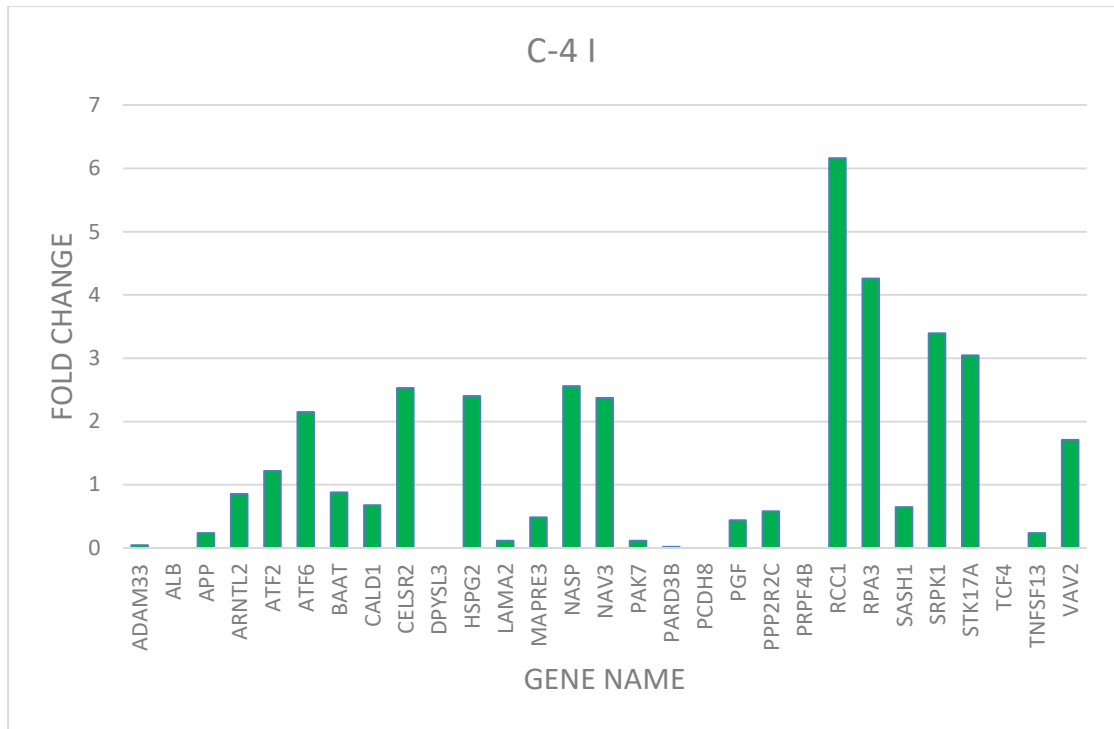
No.	Gene name	Cell lines			
		HeLa	SiHa	C-4 I	SW756
1	ADAM33	0.000704	0.002093	0.044708	0.003051
2	ALB	N/A	N/A	N/A	N/A
3	APP	0.069348	0.264866	0.239816	0.018432
4	ARNTL2	0.259415	0.102474	0.852635	0.655197
5	ATF2	0.334482	0.80107	1.219819	0.398688
6	ATF6	1.151355	0.913831	2.148505	0.092569
7	BAAT	0.073302	0.164938	0.878633	N/A
8	CALD1	0.048923	0.824543	0.679871	1.404445
9	CELSR2	0.409897	0.575678	2.531513	0.768438
10	DPYSL3	1.505247	N/A	N/A	N/A
11	GAPDH	Housekeeping	Housekeeping	Housekeeping	Housekeeping
12	HSPG2	1.815038	1.162046	2.400497	0.098073
13	LAMA2	0.018283	0.036906	0.115023	0.04133
14	MAPRE3	0.258219	0.408951	0.487452	0.22324
15	NASP	1.33484	0.463294	2.560928	0.444421
16	NAV3	0.338368	0.66742	2.372925	0.793701
17	PAK7	0.028197	0.033726	0.114493	0.03357
18	PARD3B	0.473029	0.099672	0.023009	0.103426
19	PCDH8	N/A	N/A	N/A	N/A
20	PGF	0.008277	0.009377	0.439317	0.04915
21	PPP2R2C	0.027905	0.041617	0.582367	N/A
22	PRPF4B	N/A	N/A	N/A	N/A
23	RCC1	2.445281	1.896492	6.161721	0.689362
24	RPA3	2.183537	1.693491	4.257481	0.740549
25	SASH1	0.147966	0.135842	0.64992	N/A
26	SRPK1	1.127661	0.53465	3.39416	0.816014
27	STK17A	0.216134	1.016305	3.045474	0.756109
28	TCF4	N/A	N/A	N/A	0.000138
29	TNFSF13	0.10083	0.389582	0.237062	0.077482
30	VAV2	3.013973	3.575967	1.71119	2.025578



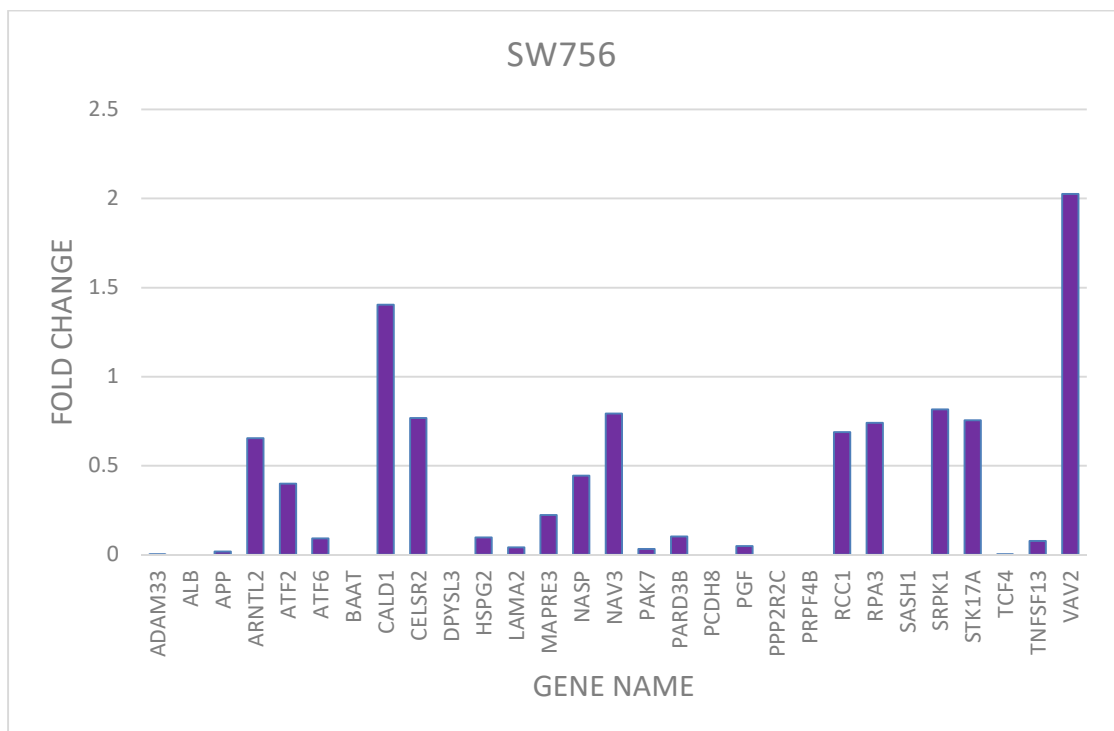
รูปที่ 3.1 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa กับยีนบ่งชี้เฉพาะ



รูปที่ 3.2 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SiHa กับยีนบ่งชี้เฉพาะ



รูปที่ 3.3 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง C-4 I กับยีนป้องกันเฉพาะ



รูปที่ 3.4 ค่า Relative Quantification ระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SW756 กับยีนป้องกันเฉพาะ

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1) การวิเคราะห์และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยรวมในเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิดกับเซลล์ปกติด้วยเทคนิค DNA microarray analysis

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้การวิเคราะห์โดยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองมิติ, 2-DE ร่วมกับเครื่องมือวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร, MALDI-TOF เพื่อหาตัวบ่งชี้มะเร็งในตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก และเปรียบเทียบตัวอย่างปัสสาวะจากคนสุขภาพดี ที่ไม่เป็นโรคมะเร็ง พบโปรตีนในปัสสาวะที่เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งเบื้องต้น ได้แก่ Protocadherin-8 [PCDH8], Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 2 [ARNTL2], Serum albumin [ALB] และ Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (perlecan) [HSPGs]

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายด้วยเทคนิค Real-time quantitative PCR ของยีนบ่งชี้เฉพาะที่คัดเลือกจาก public DNA microarray data และยีน HSPG2 (Endorepellin LG3), PCDH8, ARNTL2, ALB รวมทั้งหมด 30 ยีน

4.2) การวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค RT-qPCR

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (Adenocarcinoma), SiHa (Squamous cell carcinoma), C-4 I (Papilloma) และ SW756 (Carcinoma) โดยใช้เซลล์ปกติ เป็นเซลล์ควบคุม และมียีน GAPDH เป็น housekeeping gene ที่มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ พบว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa มีการแสดงออกของยีน DPYSL3, HSPG2, RCC1, RPA3, VAV2 ส่วนในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SiHa มีการแสดงออกของยีน RCC1, RPA3, VAV2 ในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง C-4 I มีการแสดงออกของยีน ATF6, CELSR2, HSPG2, NASP, NAV3, RCC1, RPA3, SRPK1, STK17A, VAV2 และในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง SW756 มีการแสดงออกของยีน VAV2 เท่านั้น โดยที่ยีน VAV2 มีระดับการแสดงออกมากที่สุด ในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa, SiHa และ

SW756 มีค่าเป็น 3.013973, 3.575967 และ 2.025578 เท่า สำหรับในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง C-4 I มีการแสดงออกของยีน RCC1 เป็น 6.161721 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

Schuebel *et al.* รายงานว่า ยีน VAV2 ทำหน้าที่เป็น guanosine nucleotide exchange factor (GEF) ซึ่งไปกระตุ้นสมาชิกที่แตกต่างของ Rho/Rac family ของเอนไซม์ GTPase ใน tyrosine phosphorylation-dependent manner [49] นอกจากนี้ Brantley-Sieders *et al.* ยังพบว่า VAV2 มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งใน host-mediated tumor progression และ angiogenesis โดยเฉพาะใน tumor endothelium [50] สำหรับยีน STK17A เป็น serine/threonine kinase ซึ่งเป็นที่รู้กันว่ามี apoptosis-inducing activity [51] มีรายงานว่ามีการแสดงออกของยีนที่ลดลง (down regulated) ในมะเร็งหลายชนิด และใน melanoma cell lines และ laryngeal squamous cell carcinoma cell line [52] Thomas *et al.* [53] รายงานว่าจากข้อมูล microarray พบยีน VAV2 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเฉพาะในมะเร็งปากมดลูกซึ่งสหพันธ์สูติศาสตร์และนรีเวชวิทยานานาชาติ (International Federation of Gynaecology and Obstetrics) หรือ FIGO Stage I ในขณะที่ ยีน STK17A มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเฉพาะใน FIGO Stage II อย่างไรตาม เมื่อทำการ validation ด้วย real-time PCR พบการแสดงออกของยีนทั้งสองยีน ที่ FIGO Stage อื่นด้วย

ยีน DPYSL3 มีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณ (signal transduction) จากการศึกษาการแสดงออกของยีนจากชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะที่ IIIB ที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยใช้เทคนิค Oligonucleotide array พบยีน DPYSL3 แสดงออกลดลง [54] DPYSL3 ทำหน้าที่ cell adhesion molecule และมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อปกติของ Cardiac myocytes, Brain, Pineal body, Retina และ กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle) และมีการแสดงออกปานกลาง (Moderately expressed) ในเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น เนื้อเยื่อตับ [55,56] ระดับการแสดงออกของ DPYSL3 ความสัมพันธ์ผกผันกับ Vascular endothelial growth factor (VEGF) และ Focal adhesion kinase (FAK) ทั้งในเซลล์ Hepatocellular carcinoma (HCC cells) และเนื้อเยื่อ [57]

ยีน RCC1 เป็นยีนที่ทำหน้าที่ cell cycle regulatory พบว่าเกิดการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น ใน FIGO Stage III [53] สามารถจับกับ chromatin และทำหน้าที่เป็น guanine exchange factor (GEF) บน Ras homologue Ran [58] Cekan *et al.* รายงานว่า RCC1 เกิดการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในเซลล์ปกติ (normal cells) และเกิด high endogenous RCC1 expression ในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HCT116 colorectal carcinoma cells ซึ่งมีความเสถียรในระดับ Ran levels ใน cells recovering จาก DNA damage [59]

ยีน RPA3 (Replication Protein A3) ทำหน้าที่เป็น Protein Coding gene Umbricht *et al.* (1993) ทำการโคลนยีน RPA3 ด้วย 14-kD subunit ของ human RPA จาก cDNA library ของเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa [60] Thomas *et al.* รายงานว่าจากข้อมูล microarray พบยีน RPA3 (DNA repair and replication) มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในมะเร็งปากมดลูก FIGO Stage I ส่วนยีน NAV3 (tumor suppressors) มีการแสดงออกของยีนลดลงมากใน advance stage ของมะเร็งปากมดลูก [53]

ยีน ATF6 (apoptosis-related gene) มีการแสดงออกของยีนลดลงใน advance stage เมื่อเปรียบเทียบกับ early-stage ของมะเร็งปากมดลูก [53]

ยีน CELSR2 เกี่ยวข้องกับ adhesion มีการแสดงออกของยีนลดลง ในขณะที่ยีน NASP (cell division) และ ยีน SRPK1 (kinase) พบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในมะเร็งปากมดลูก Stage II และ III [53]

จากงานวิจัยหลายฉบับ พบว่า Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein [HSPGs] เป็นไกลโคโปรตีน ประกอบด้วยโปรตีนแกนหลัก (core protein) ซึ่งจับกับ heparan sulfate sugar side chains ด้วยพันธะโควาเลนต์ HSPGs พบที่ basement membranes และที่ผิวหน้าเซลล์ของเซลล์หลายชนิด และมีความเกี่ยวพันในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การกรองผ่านกลูเมอรูลัส (glomerular filtration) การติดยึดของเซลล์ (cell adhesion) การเคลื่อนที่ (migration) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และการจำแนกความแตกต่าง (differentiation) [61–64] ซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อโดยการจับกับ chemokines, cytokines, enzymes, growth factors หรือ สารเร่งทางชีวภาพ (bioactive molecules) [65]

HSPGs (perlecan) เป็น membrane protein ขนาดใหญ่ มีมวลโมเลกุล 480 kDa เมื่อ perlecan ถูกตัดด้วย BMP-1 ที่ single specific site ระหว่าง Asn4196 และ Asn4197 จะได้ endorepellin LG3 fragment มีมวลโมเลกุล 25 kDa ซึ่งโปรตีนนี้มีผลต่อการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (antiangiogenic) บนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดด้วยการทำลาย actin stress fibers และป้องกันการเคลื่อนที่ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและ capillary morphogenesis ผ่านทาง integrin mediated signaling pathway [66, 67, 68] ซึ่งเป็นการยับยั้งกระบวนการขยายตัวของหลอดเลือดอันเนื่องมาจากกระบวนการเติบโตของเยื่อบุผิวหลอดเลือด (vascular endothelial growth factor หรือ VEGF) LG3 มีรายงานว่ามีการแสดงออกลดลงในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเต้านม (breast cancer cell line) เป็นการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (antiangiogenesis factor) และมีระดับพลาสมา (plasma level) ของ Endorepellin LG3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และ

Chang *et al.* ได้แสดงให้เห็นว่า Endorepellin LG3 เป็นตัวบ่งชี้ของซีรัม [serological biomarker] ชนิดใหม่ของมะเร็งเต้านม [69]

มีการศึกษาการแสดงออกของ plasma protein โดยใช้เทคนิค 2-DE และ MALDI-MS พบโปรตีน ceruloplasmin, complement C3, afamin และ alpha-1-B glycoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma (SCC) [70] นอกจากนี้ยังมีรายงานของว่า Serum squamous cell carcinoma antigen (SCC) ใช้เป็น serum marker ของ squamous cell carcinoma ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ส่วน serum CA 125 (Cancer antigen 125) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ใช้ในการติดตามผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด adenocarcinoma [71] ส่วนโปรตีนที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งอื่นๆ เช่น CA19-9 เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งเหมือนกับ CEA หรือ CA125 พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน (pancreatic) กระเพาะอาหาร (stomach) และมะเร็งท่อน้ำดี (bile duct cancer) [72] และมีรายงานว่าใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และมะเร็งตับอ่อน และเป็นตัวบ่งชี้การเกิดขึ้นมาอีกของมะเร็งตับอ่อน [73]

4.3) สรุปผลการทดลอง

การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก 4 ชนิด (Subtypes) ; HeLa (Adenocarcinoma), SiHa (Squamous cell carcinoma), C-4 I (Papilloma) และ SW756 (Carcinoma) พบการแสดงออกของยีน VAV2 มากที่สุดในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง HeLa, SiHa และ SW756 มีค่าเป็น 3.013973, 3.575967 และ 2.025578 เท่า ตามลำดับ และในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง C-4 I มีการแสดงออกของยีน RCC1 เป็น 6.161721 เท่า และจากผลการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ายีน VAV2 และ RCC1 น่าจะเป็นตัวบ่งชี้เฉพาะ (Candidate markers) มะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Carcinoma tumors และสำหรับ Papilloma tumor ตามลำดับ

การศึกษาในขั้นต่อไป ต้องศึกษาให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ของยีนที่บ่งชี้เฉพาะของมะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด เพื่อหาตัวบ่งชี้มะเร็งปากมดลูกชนิด Adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma, Carcinoma และ Papilloma และทราบถึงเครือข่ายทางชีวภาพของยีนที่บ่งชี้มะเร็งปากมดลูก เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรคทางคลินิกเบื้องต้น เพื่อการวินิจฉัยโรคได้รวดเร็ว และเป็นแนวทางในการรักษาโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., Cancer Statistics, (2012) *CA Cancer J. Clin.* 62 : 10–29.
2. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 127 : 2893–2917.
3. WHO/ICO (2010) Summary Report on HPV and Cervical cancer statistics in Thailand, 1–61.
4. Haverkos, H.W. (2004) Viruses, chemicals and co-carcinogenesis. *Oncogene.* 23 : 6492–6499.
5. Haverkos, H. W. (2005) Multifactorial etiology of cervical cancer : a hypothesis. *Med Gen Med.* 7 : 57–64.
6. Khuhaprema, T., Srivatanakul, P., Attasara, P., Sriplung, S., Wiangnon, S., Sumitsawan, Y. (2010) Cancer in Thailand. Bangkok Medical Publisher, Bangkok, 45–50.
7. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., *et al.* (2005) Global Cancer Statistics 2002. *CA Cancer J Clin.* 55 : 74–108.
8. Goldie, S.J., Gaffikin, L., Goldhaber, J.D., *et al.* (2005) Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med.* 353 : 2158–2168.
9. Soler, M.E., Gaffikin, L., Blumenthal, P.D. (2000) Cervical cancer screening in developing countries. *Prim Care Update Ob Gyns.* 7 : 118–123.
10. Abdel-Hady, E. S., Emam, M., Al-Gohary, A., *et al.* (2006) Screening for cervical carcinoma using visual inspection with acetic acid. *Int J Gynaecol Obstet.* 93 : 118–122.
11. Niikura, H., Okamura, C., Akahira, J., *et al.* (2004) Sentinel lymph node detection in early cervical cancer with combination 99mTc phytate and patent blue. *Gynecol Oncol.* 94 : 528–532.
12. Herzog, T.J. (2003) New approaches for the management of cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 90 : S22–27.

13. NG, H. T., Yen, M. S., Chao, K. C., *et al.* (2005) Radical hysterectomy : past, present, and future. *Eur J Gynaecol Oncol.* 26 : 585–588.
14. Hoffam, M. S. (2004) Extent of radical hysterectomy : evolving emphasis. *Gynecol Oncol.* 94 : 1–9.
15. Umanzor, J., Aguiluz, M., Pineda, C., *et al.* (2006) Concurrent cisplatin/gemcitabine chemotherapy along with radiotherapy in locally advanced cervical carcinoma : a phase II trial. *Gynecol Oncol.* 100 : 70–75.
16. Tanaka, T., Kokawa, K., Umesaki, N. (2005) Preoperative chemotherapy with irinotecan and mitomycin for FIGO stage III b cervical squamous cell carcinoma : a pilot study. *Eur J Gynaecol Oncol.* 26 : 605–607.
17. Linghu, H., Xu, X. R., Mei, Y. Y., *et al.* (2004) Response of early stage bulky cervical squamous carcinoma to preoperative adjuvant chemotherapy. *Chin Med Sci J.* 19 : 116–119.
18. Candelaria, M., Garcia-Arias, A., Cetina, L., *et al.* (2006) Radiosensitizers in cervical cancer, Cisplatin and beyond. *Radiat Oncol.* 5 : 1–15.
19. Goto, T., Kino, N., Shirai, T., *et al.* (2005) Late recurrence of invasive cervical cancer : twenty years' experience in a single cancer institute. *J Obstet Gynaecol Res.* 31 : 514–519.
20. วรพรรณ ลิทธิธาวรร (2006) DNA Microarray Technology. *Thai Pharm Health Sci J.* 1(2) : 139–145.
21. Ferlay, J., Bary, F., Pisani, P., Parkin, D. M. (2004) GLOBOCAN 2002 : Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No.5 version 2.0. IARC Press, Lyon, 2004.
22. Khuhaprema, T., Srivatanakul, P., Attasara, P., Sriplung, H., Wiangnon, S. Sumitsawan, Y. (2010) Cancer in Thailand, Vol V, 2011–2003. Bangkok : Bangkok Medical Publisher : 52–82.
23. Annual Report on Gynecologic Oncology. Division of Gynecologic Oncology, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. 1997–2005.
24. จตุพล ศรีสมบุญ (2547) มะเร็งปากมดลูก : การวินิจฉัยและการรักษา กรุงเทพฯ : พี.บี. ฟอเรนซิกส์เซ็นเตอร์ : 1–119.

25. ชีระ ทองสง (2537) นรีเวชฉบับสอบบอर्ड ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ : 1-736.
26. ชีระ ทองสง จตุพล ศรีสมบูรณ์ และอภิชาติ โอพาร (2539) นรีเวช : ฉบับสอบบอर्ड กรุงเทพฯ : พี.บี. ฟอเรนบู้คส์เซนเตอร์ : 1-119.
27. จตุพล ศรีสมบูรณ์ (2540) มะเร็งวิทยานรีเวช กรุงเทพฯ : พี.บี. ฟอเรนบู้คส์ : 1-697.
28. วสันต์ ลีนะสมิต และณัฐพงศ์ อิศรางกูร ณ อยุธยา (2542) ตำรามะเร็งนรีเวชวิทยา ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
29. zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical practice. *Nature Rev.* 2 : 342-350.
30. Pagliusi, S. R., Aguado, T. (2004) Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine.* 23 : 569-578.
31. Franco, E. L., Harper, D. M. (2005) Vaccination against human papillomavirus infection : a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine.* 23 : 2388-2394.
32. Smith, J. S. (2006) Spectrum of HPV related burden of disease. EUROGIN 2006, Paris, April 23-26. [abstract p. 149].
33. ยุพิน เพียรมงคล (2547) การพยาบาลผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ : 1-184.
34. Nishigaki, R., Osaki, M., Hiratsuka, M., Toda, T., Murakami, H., Jeang, K. T., *et al.* (2005) Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics.* 5 : 3205-3213.
35. Murphy, L., Clynes, M., Keenan, J. (2007) Proteomic analysis to dissect mitoxantrone resistance associated proteins in a squamous lung carcinoma. *Anticancer Res.* 27 : 1277-1284.
36. Veenstra, T. D., Prieto, D. A., Conrads, T. P. (2004) Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discov Today.* 9 : 889-897.
37. Jeong, D. H., Kim, H. K., Prince, A. E. B., Lee, D. S., Kim, Y. N., Han, J., Kim, K. T. (2008) Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol.* 9(3) : 173-180.

38. Zhu, X., Lv, J., Yu, L., Zhu, X., Wu, J., Zou, S., Jiang, S. (2009) Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 112 : 248–256.
39. Hwang, Y. J., Lee, S. P., Kim, S. Y., Choi, Y. H., Kom, M. J., Lee, C. H., Lee, J. Y., Kim, D. Y. (2009) Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med J.* 50(3) : 399–406.
40. Ono, A., Kumai, T., Koizumi, H., Nishikawa, H., Kobayashi, S., Tadokoro, M. (2009) Overexpression of heat shock protein 27 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix : a proteomic analysis using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol.* 40 : 41–49.
41. Gadducci, A., Tana, R., Cosio, S., Riccardo, A., Genazzani, A. R. (2008) The serum of tumor markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer : A review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66 : 10–20.
42. Tainsky, M. A. (2009) Genomic and proteomic biomarkers for cancer : A multitude of opportunities. *Biochim Biophys Acta.* 1796 : 176–193.
43. Thompson, I. M., Ankerst, D. P. (2007) Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer. *CMAJ.* 176 : 1853–1858.
44. Zurawski, V. R., Orjaseter, H., Andersen, A., Jellum, E. (1988) Elevated serum CA125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia ; relevance for early detection of ovarian cancer. *Int J Cancer.* 42 : 677–680.
45. Friedrich, M. G., Hellstern, A., Hautmann, S. H., Graffen, M., Conrad, S., Huland, E., Huland, H. (2002) Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma : a comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against Lewis X and 486p3/12 with the BTA STAT and NMP22 tests. *J Urol.* 168 : 470–474.
46. Steinberg, W. M., Gelfand, R., Anderson, K. K., Glenn, J., Kurtzman, S. H., Sindelar, W. F., Toskes, P. P. (1986) Comparison of the sensitivity and specificity of the CA19–9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology.* 90 : 343–349.

47. Safi, F., Schlosser, W., Falkenreck, S., Beger, H. G. (1998) Prognostic value of CA19-9 serum course in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterol.* 45 : 253–259.
48. ไพฑูรย์ อบเชย และคณะ (2554) การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ของมะเร็งปากมดลูกในตัวอย่างปัสสาวะ รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 ทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
49. Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L. and Bustelo, X. R. (1998) Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J.* 17 : 6608–6621.
50. Brantley-Sieders, D. M., Zhuang, G., Vaught, D., Freeman, T., Hwang, Y., Hicks, D. *et al.* (2009) Host deficiency in Vav2/3 guanine nucleotide exchange factors impairs tumor growth, survival, and angiogenesis in vivo. *Mol. Cancer Res.* 7 : 615–623.
51. Sanjo, H., Kawai, T., Akira, S. (1998) DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem.* 273 : 29066–29071.
52. Giefing, M., Martin-Subero, J. I., Kiwerska, K., Jarmuz, M., Grenman, R., Siebert, R. *et al.* (2008) Characterization of homozygous deletions in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 184 : 38–43.
53. Thomas, A., Mahantshetty, U., Kannan, S., Deodhar, K., Shrivastava, S. K., Kumar-Sinha, C., Mulherkar, R. (2013) Expression profiling of cervical cancers in Indian women at different stages to identify gene signatures during progression of the disease. *Cancer Medicine.* 2(6) : 836–848.
54. มณฑิรา สกุลเจีย พัทรี เจียรนัยกุล พิสมัย ยืนยาว อินทิรา ทศคร เต็มดวง ลี้มโพบูลย์ (2010) การจำแนกการแสดงออกของจีนในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา *J Med Tech Phy Ther.* 22(1) : 5–16.
55. Blasco, H., Bernard-Marissal, N., Vourc'h, P., Guettard, Y. O., Sunyach, C., Augereau, O., Khederchah, J., Mouzat, K., Antar, C., Gordon, P. H., Veyrat-Durebex, C., Besson, G., Andersen PM, Salachas F, Meininger V, Camu W, Pettmann B, Andres CR, Corcia P. (2013) A rare motor neuron deleterious missense mutation in the DPYSL3 (CRMP4) gene is associated with ALS. *Hum Mutat.* 34 : 953–960.

56. Kanda, M., Nomoto, S., Oya, H., Shimizu, D., Takami, H., Hibino, S., Hashimoto, R., Kobayashi, D., Tanaka, C., Yamada, S., Fujii, T., Nakayama, G., Sugimoto, H., Koike, M., Fujiwara, M., Koder, Y. (2014) Dihydropyrimidinase-like 3 facilitates malignant behavior of gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 33: 66.
57. Oya, H., Kanda, M., Sugimoto, H., Shimizu, D., Takami, H., Hibino, S., Hashimoto, R., Okamura, Y., Yamada, S., Fujii, T., Nakayama, G., Koike, M., Nomoto, S., Fujiwara, M., Koder, Y. (2015) Dihydropyrimidinase-like 3 is a putative hepatocellular carcinoma tumor suppressor. *J Gastroenterol.* 50 : 590–600.
58. Hadjebi, O., Casas–Terradellas, E., Garcia–Gonzalo, F. R., Luis Rosa, J. (2008) The RCC1 superfamily: From genes, to function, to disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 : 1467–1479.
59. Cekana, P., Hasegawa, K., Pana, Y., Tubman, E., Odde, D., Chen, J.–Q., Herrmann, M. A., Kumar, S., Kalab, P. (2016) RCC1–dependent activation of Ran accelerates cell cycle and DNA repair, inhibiting DNA damage–induced cell senescence. *Mol Biol of Cell* 27 : 1346–1357.
60. Umbricht, C. B., Erdile, L. F., Jabs, E. W., Kelly, T. J. (1993) Cloning, overexpression, and genomic mapping of the 14–kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem.* 268: 6131–6138.
61. Carey, D. J. (1997) Syndecans : Multifunctional cell–surface co–receptors. *Biochem J.* 327 : 1–16.
62. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W. *et al.* (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 68 : 729–777.
63. Raats, C. J., Van der Born, J., Berden, J. H. (2000) Glomerular heparin sulfate alterations : Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* 57 : 385–400.
64. Iozzo, R. V. (1998) Matrix proteoglycans : From molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 67 : 609–652.
65. Jackson, R. L., Busch, S. J., Cardin, A. D. (1991) Glycosaminoglycans : Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev.* 71 : 481–539.

66. Gonzalez, E. M., Reed, C. C., Bix, G., Fu, J. *et al.* (2005) BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J Biol Chem.* 280 : 7080–7087.
67. Mongiat, M., Sweeney, S. M., San Antonio, J. D., Fu, J., Iozzo, R. V. (2003) Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem.* 278 : 4238–4249.
68. Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E. M., Macro, L. *et al.* (2004) Endorepellin causes $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J Cell Biol.* 166 : 97–109.
69. Chang, J. W., Kang, U. –B., Kim, D. H., Yi, J. K., Lee, J. W., Noh, D. –Y., Lee, C., Yu, M. –H. (2008) Identification of circulating endorepellin LG3 fragment : Potential use as a serological biomarker for breast cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2 : 23–32.
70. Jeong, D. H., Kim, H. K., Prince, A. E. B., Lee, D. S., Kim, Y. N., Han, J., Kim, K. T. (2008) Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol.* 9(3) : 173–180.
71. Gadducci, A., Tana, R., Cosio, S., Riccardo, A., Genazzani, A. R. (2008) The serum of tumore markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer : A review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66 : 10–20.
72. Steinberg, W. M., Gelfand, R., Anderson, K. K., Glenn, J., Kurtzman, S. H., Sindelar, W. F., Toskes, P. P. (1986) Comparison of the sensitivity and specificity of the CA19–9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology.* 90 : 343–349.
73. Safi, F., Schlosser, W., Falkenreck, S., Beger, H. G. (1998) Prognostic value of CA19–9 serum course in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterol.* 45 : 253–259.

ภาคผนวก

เทคนิคในการทดลองและการคำนวณ

1. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเดิมออกให้หมดแล้วทิ้งไป
2. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงในจานเพาะเลี้ยงเดิม
3. นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แยก (Subculture)

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด
2. ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 mL ต่อจานเพาะเลี้ยง
3. ใส่ trypsin/EDTA solution ปริมาตร 1 mL ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์
4. นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้บกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 10 นาที
ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง ว่าเซลล์หลุดออกจากพื้นจานเพาะเลี้ยงหรือไม่
5. เมื่อเซลล์หลุดหมด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 5 ml หลังจากผสมกันดีแล้วดูดออกด้วยอัตราส่วน (split ratio) 1:3 หรือ 1:4 หรือดูดเซลล์ ปริมาตร 2 mL ลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่ และเติมอาหารเลี้ยงปริมาตร 6 mL
6. นำเซลล์ที่เหลือ ดูดออกมานับจำนวนเซลล์และคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดในจานเพาะเลี้ยง (cells/mL)

3. การนับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer

เป็นการนับเซลล์เพื่อให้ทราบจำนวนเซลล์ (Cells/mL) โดย

1. นำเซลล์มา 20 μ l ผสมกับ 0.4% trypan blue 20 μ l ผสมกันบนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นใช้ micropipette ดูด-เป่า และดูดส่วนผสมที่ได้ออกมา 20 μ l
2. เติมลงในช่องว่างระหว่าง cover slip และ hemocytometer
3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ นับเซลล์ภายในช่อง 1-4 ซึ่งจำนวนเซลล์ที่นับได้ จะเป็นจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาตร 0.1 cm^3 (แต่ละช่องมีพื้นที่ $1 \times 1 \text{ mm}^2$ และมีความลึก 0.1 mm) นับทั้ง 4 ช่อง นำจำนวนที่นับได้ไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count) ในปริมาตร 1 cm^3 โดยใช้สูตร

สูตรการหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count)

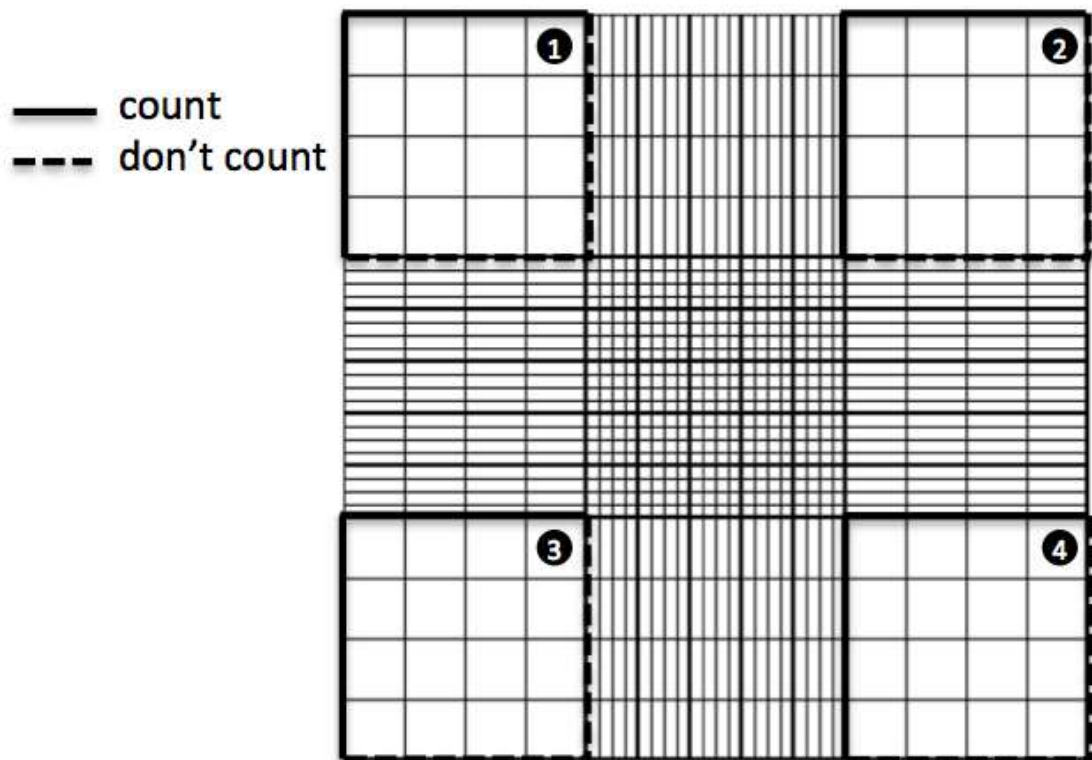
$$t = \frac{(X \times d)}{n} \times 10^4$$

t = total cell count (Cells/mL)

X = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ใน 4 ช่อง 1-4 (ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต) (เซลล์ที่มีชีวิต จะไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue)

D = จำนวนการผสมสีกับเซลล์ (ในที่นี้ = 2 คือ สี 1 ส่วน : เซลล์ 1 ส่วน)

n = จำนวนซ้ำที่นับ (4 ช่อง A)



รูปที่ 1 ตารางนับเซลล์ใน hemocytometer