

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรโมเตอร์เมทิลเลชันกับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน
กลุ่มตาโรอิน เอส-ทรานส์เฟอเรนซินด์พีหนึ่ง ในมะเร็งเต้านม

นายศุภฤทธิ ภัคดีไทย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

RELATIONSHIP BETWEEN PROMOTER METHYLATION AND PROTEIN
EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE CLASS *P1*
IN BREASTCANCER

MR. SUPPARIT PAKDEETHAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันกับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีนกลูตาไธโอน เอส-ทรานส์เฟอเรส ชนิดพีหนึ่งในมะเร็งเต้านม
โดย	นายศุภฤทธิ ภัคดีไทย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้มหาวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธเนศ พงศ์ธีรรัตน์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างไชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ศันสนีย์ วงศ์ไวยศยวรรณ)

ศุภฤทธิ ภัคดีไทย : ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันกับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีนกลูตาไธโอน-เอส-ทรานส์เฟอเรสชนิดพีหนึ่งในมะเร็งเต้านม.

(RELATIONSHIP BETWEEN PROMOTER METHYLATION AND PROTEIN EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE CLASS P1 IN BREAST CANCER) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. นพ. พิเชฐ สัมปทานุกุล, 56 หน้า.

ที่มาและปัญหา: กลูตาไธโอน เอส-ทรานส์เฟอเรส ยีน ชนิดพีหนึ่ง (*GSTP1*) แสดงออกเป็นโปรตีน *GSTP1* ซึ่งทำหน้าที่เร่งกระบวนการกำจัดสารพิษของกลูตาไธโอน การขาดเอ็นไซม์ *GSTP1* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งและเกี่ยวข้องกับการเกิดโปรโมเตอร์ เมทิลเลชัน (promoter methylation) งานวิจัยก่อนหน้านี้นับผลการเกิด *GSTP1* hypermethylation ในมะเร็งเต้านมมีความสัมพันธ์ที่หลากหลายกับดัชนีชี้วัดทางคลินิกและพยาธิวิทยา และสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน *GSTP1*

วัตถุประสงค์: ศึกษาความสัมพันธ์ของผลระหว่างการเกิด promoter methylation กับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน *GSTP1* ในมะเร็งเต้านม

วิธีการทดลอง: ใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมจาก 100 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาการเกิด promoter methylation โดยเทคนิค methylation specific assay (MSP) จากชิ้นเนื้อสด ในขณะที่การแสดงออกเป็นโปรตีนศึกษาโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) จากชิ้นเนื้อที่ผ่านการรักษาสุขภาพในฟอร์มาลินและตรึงในพาราฟิน และใช้สถิติ Chi Square ในการวิเคราะห์เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างผลที่ได้จากสองเทคนิคนี้และความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ทางพยาธิวิทยาคลินิก (clinicopathological parameters)

ผลการทดลอง: อัตราการเกิด hypermethylation ของ *GSTP1* เป็น 28% (28 ราย) ในจำนวนนี้มีตัวอย่าง 8 ราย เกิด methylation และ unmethylation (2-band signal) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากเซลล์มะเร็งมีสองชนิดปนกัน หรือมีเซลล์มะเร็งไม่ลุกลามหรือเซลล์ต่อมมนปกติปนอยู่ มีตัวอย่าง 1 รายพบชิ้นเนื้อที่คู่กันเป็น non-invasive carcinoma ดังนั้นจึงเหลือตัวอย่างที่เป็น invasive carcinoma และมี hypermethylation 19 ตัวอย่าง พบมีการแสดงออกเป็นโปรตีน 12.5% ความสัมพันธ์ของผลที่ได้จากเทคนิค MSP และ IHC วิเคราะห์โดย Chi Square ได้ค่า $p = 0.04$ เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างสองเทคนิคนี้กับ ดัชนีทางคลินิกและพยาธิวิทยา แสดงให้เห็นว่า ผลบวกโดย MSP มีความสัมพันธ์กับตัวรับโปรเจสโตโรน ($p=0.05$) และ ผลบวกโดย IHC มีความสัมพันธ์กับตัวรับเอสโตรเจน ($p=0.001$) ส่วน ดัชนีอื่น เช่น ขนาดและเกรดของมะเร็ง, การแพร่ไปต่อมน้ำเหลือง, HER2-IHC score และ Ki67 index นั้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน

สรุปผลการทดลอง: ผลที่ได้ระหว่างการเกิด hypermethylation ของ *GSTP1* โดยเทคนิค MSP และการแสดงออกเป็นโปรตีนของ *GSTP1* โดยเทคนิค IHC นั้นมีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตามอาจมีปัญหาทางเทคนิคในวิธีการของ MSP ที่ควรต้องมีการศึกษาต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2554.

ลายมือชื่อ.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

5274869930 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1 / PROMOTER METHYLATION / BREAST
CANCER

SUPPARIT PAKDEETHAI : RELATIONSHIP BETWEEN PROMOTER METHYLATION AND
PROTEIN EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE CLASS *P1* IN
BREAST CANCER. ADVISOR : PROF. PICHET SAMPATANUKUL, M.D., 56 pp.

Background: Glutathione S-transferase gene class P1 (*GSTP1*) encodes glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) that catalyses detoxifying metabolism of glutathione. The lack of *GSTP1* expression is linked to carcinogenesis and is related to promoter methylation. The previous studies of *GSTP1* hypermethylation in breast cancer revealed diverse results and suspicious correlation with *GSTP1* expression.

Objective: To investigate the correlation between promoter methylation and protein expression of *GSTP1* in breast cancer.

Methods: One hundred breast cancer samples were used. The study of promoter methylation employed methylation specific assay (MSP) on fresh tissues while the assessment of protein expression was done with immunohistochemistry (IHC) on formalin fixed paraffin embedded tissues. The results were correlated each other and with clinicopathologic parameters using Chi Square statistics.

Results: The rate of hypermethylation of *GSTP1* was 28%. Of which, 8 cases showed double-band signals – methylation and unmethylation bands. This might be caused by heterozygous or contaminant factors. Another one case was found in a non-invasive carcinoma. Of the left 19 cases with hypermethylation status, 12.5% revealed protein expressions. The correlation of the results between MSP and IHC methods yielding the Chi Square test, p-value= 0.04. The correlations with clinicopathological parameters showed that progesterone receptor correlated with MSP status (p-value= 0.05) and estrogen receptor correlated with IHC status (p-value= 0.001). The other parameters – tumor size, tumor grade, lymph node status, HER2-IHC score, Ki67 index were not statistically correlated.

Conclusion: The results between hypermethylation of *GSTP1* by MSP and *GSTP1* expression by IHC are correlated, however, there might be technical problems regarding MSP that needs further investigation.

Field of Study : Medical Sciences

Academic Year : 2011

Student's Signature

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์พิเชฐ สัมปทานกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธเนศ พงศ์ธีรรัตน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการทำงาน รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรีชา เรืองวรรณชัย คุณจุฑามาศ วงศ์ภูมิ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่คอยให้คำแนะนำ รวมถึงให้ความช่วยเหลือในด้านเทคนิคต่างๆจนงานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้องครอบครัวรักดีไทย ที่คอยให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
ขั้นตอนของการวิจัย.....	5
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (Epigenetic).....	8
กลุ่มยีนและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง.....	9
หน้าที่และการทำงานของ Glutathione S-transferase.....	10
ความหลากหลายของยีน (Genetic polymorphism).....	12
ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction).....	13

	หน้า
ทฤษฎีและหลักการของ Immunohistochemistry.....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
รูปแบบการวิจัย.....	23
ประชากรศึกษา.....	23
การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.....	23
ประเด็นจริยธรรม.....	24
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย.....	24
สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
การบันทึกข้อมูล.....	34
การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	34
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	34
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
ประชากรตัวอย่าง.....	36
การศึกษาโดยวิธี MSP.....	36
การศึกษาโดยวิธี IHC.....	38
ความสัมพันธ์ของผลระหว่างวิธี MSP กับ IHC.....	39
ความสัมพันธ์ของผล MSP กับดัชนีต่างๆทางคลินิกและพยาธิวิทยา.....	41
ความสัมพันธ์ของผล IHC กับดัชนีต่างๆทางคลินิกและพยาธิวิทยา.....	43
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	45
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR	30
2	แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR	31
3	แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR	32
4	แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นตัวกลาง	33
5	แสดงผลการทดลองทั้งหมด 96 ราย โดยวิธี Methylation specific PCR.....	36
6	ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Methylation status กับการแสดงออกเป็น โปรตีนของยีน GSTP1.....	40
7	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของผลระหว่าง Methylation status กับ clinicopathologic parameter.....	41
8	แสดงความสัมพันธ์ของผลระหว่างการแสดงออกเป็นโปรตีนกับ clinicopathologic parameters.....	43

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงกลไกการเกิดมะเร็งในระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetic events).....	8
2	แสดงการทำงานของ Glutathione S-transferase.....	10
3	แสดง Glutathione S-transferase supergene family	11
4	แสดงขั้นตอนย่อยในแต่ละรอบของกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR.....	14
5	แสดงการเพิ่มของดีเอ็นเอแบบทวีคูณในกระบวนการ PCR	16
6	แสดง method ของ immunohistochemistry ทั้งแบบ direct และ indirect method.....	18
7	แสดงภาพ Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) method.....	19
8	แสดงภาพ Avidin-Biotin Complex (ABC) method.....	20
9	แสดงภาพ Labeled Streptavidin-Biotin Complex (LSAB) method.....	20
10	แสดงภาพ chain polymer-conjugate method.....	21
11	แสดงผลการทดลองโดยวิธีการของ Methylation-specific PCR assay ของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านม.....	37
12	แสดงผลการทดลองโดยวิธีการของ Methylation-specific PCR assay ของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านมที่ขึ้นผลทั้ง 2 band.....	37
13	แสดงถึงการติดสีของเซลล์มะเร็งทั้งหมด (กำลังขยายต้นฉบับ 400X).....	38

ภาพที่		หน้า
14	แสดงถึงการไม่ติดสีของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างผลลบ (กำลังขยายต้นฉบับ 400X).....	38
15	แสดงเซลล์มะเร็งลูกกลมมีกลุ่มติดสีอยู่ติดกับกลุ่มไม่ติดสี (กำลังขยายต้นฉบับ 400X).....	39
16	แสดงถึงการติดสีของเซลล์มะเร็งบางตัว (กำลังขยายต้นฉบับ 400X).....	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ		คำเต็ม
GST	=	Glutathione S-transferase
GSTP1	=	Glutathione S-transferase class P1
MSP	=	Methylation specific PCR
PCR	=	Polymerase chain reaction
IHC	=	Immunohistochemistry
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
FFPE	=	Formalin-fixed paraffin-embeded
H&E	=	Hematoxylin-Eosin
SNP	=	Single nucleotide polymorphism
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytosine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate
dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
UV	=	Ultraviolet
HER2	=	Human epidermal growth factor receptor-2
PAP	=	Peroxidase anti-peroxidase complex
APAAP	=	Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex
ABC	=	Avidin-biotin complex
LSAB	=	Lebeled streptavidin-biotin complex
EDTA	=	Ethylenediamine tetra-acetic acid
DAB	=	3,3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศไทยและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในผู้ชายพบมะเร็งตับมากที่สุด รองลงมาคือมะเร็งปอด ส่วนในผู้หญิงพบมะเร็งเต้านมเป็นอันดับหนึ่งรองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก [1] อัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านม 20.9 คนต่อประชากรสตรี 100,000 คน [2]

โดยทั่วไปยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งมี 4 กลุ่ม [3] ได้แก่ กลุ่ม oncogene เช่น growth factor กลุ่ม tumor suppressor gene เช่น *BRCA1*, *BRCA2*, *p53* [4] กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ กลุ่มยีนอันหลังสุดนี้เป็นกลุ่มยีนที่ผู้วิจัยสนใจ ความรู้ในปัจจุบันทราบว่าธรรมชาติดีเอ็นเอของคนเรามีความเสี่ยงต่อการรับอันตรายจากสารเคมี, รังสี, อาหารที่มี carcinogen และอื่นๆ ที่ทำอันตรายต่อสารพันธุกรรมในเซลล์แต่ไม่ได้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ทุกครั้งเสมอไป ทั้งนี้เพราะเซลล์มียีนกลุ่มนี้ที่คอยทำหน้าที่แก้ไขซ่อมแซมสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอไม่ให้เกิดความผิดปกติ [5] Glutathione S-transferase (GSTs) เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิตที่ทำให้สารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลงและมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้นจึงขับออกจากร่างกายได้ [6, 7]

GSTs (E.C.2.5.1.18) [8] เป็นกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ glutathione S-transferase ซึ่งเป็น phase II metabolic ที่มีความสัมพันธ์ต่อการลดการเกิดพิษจาก metabolites ของสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ตลอดจนยาที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic drug) โดยคอนจูเกตกับ glutathione [9] ในมะเร็งต่อมลูกหมากมีการศึกษาพบ hypermethylation ของยีนนี้สูงถึง 90% จึงอาจเกี่ยวข้องในเชิงเป็นสาเหตุ [3] แต่ในมะเร็งเต้านมพบ hypermethylation ของยีนนี้ 13-30% และอาจมีความเกี่ยวข้องกับการ prognosis จากงานวิจัยชิ้นหนึ่งที่พบว่า อัตราการมีชีพที่ 5 ปีหลังการรักษา ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี methylation แยกกว่ากลุ่มที่เป็น unmethylation [9]

การทดสอบ hypermethylation ใช้วิธี methylation specific PCR (MSP) ซึ่งเมื่อเกิด hypermethylation จะทำให้ ยีนทำหน้าที่ไม่ได้ การตรวจโปรตีนของยีนนี้โดยวิธี Immunohistochemistry (IHC) ควรให้ผลลบ อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสัมพันธ์ของ สอง วิธีการนี้ พบ

ลักษณะความสัมพันธ์ที่ไม่โดยตรง เพราะมี hypermethylation ของยีนส่วนหนึ่ง (ราวร้อยละ 12) ที่พบโปรตีน และ unmethylation ของยีนที่พบผลบวกและผลลบ ของโปรตีน ในสัดส่วนพอๆกัน [9]

ในมะเร็งเต้านมพบว่า GSTP1 มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของมะเร็ง (aggressive tumor) และการตอบสนองกับการรักษา [10] แต่เนื่องจากมีความไม่สอดคล้องของการใช้ผลจาก MSP ซึ่งตรวจหา promoter methylation กับผลจาก IHC ซึ่งตรวจหาโปรตีนของ GSTP1 ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของผลของวิธีการทดสอบ ทั้ง 2 วิธีนี้ เพื่อเป็นข้อมูลของการศึกษาการใช้ประโยชน์ของการตรวจยีนนี้ในทางคลินิกต่อไป

คำถามงานวิจัย

คำถามหลัก: ความสัมพันธ์ระหว่างผลทดสอบ promotor methylation และผลทดสอบโปรตีน ของยีน GSTP1 เป็นอย่างไร

คำถามรอง: อัตราการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีค่าเท่าไร

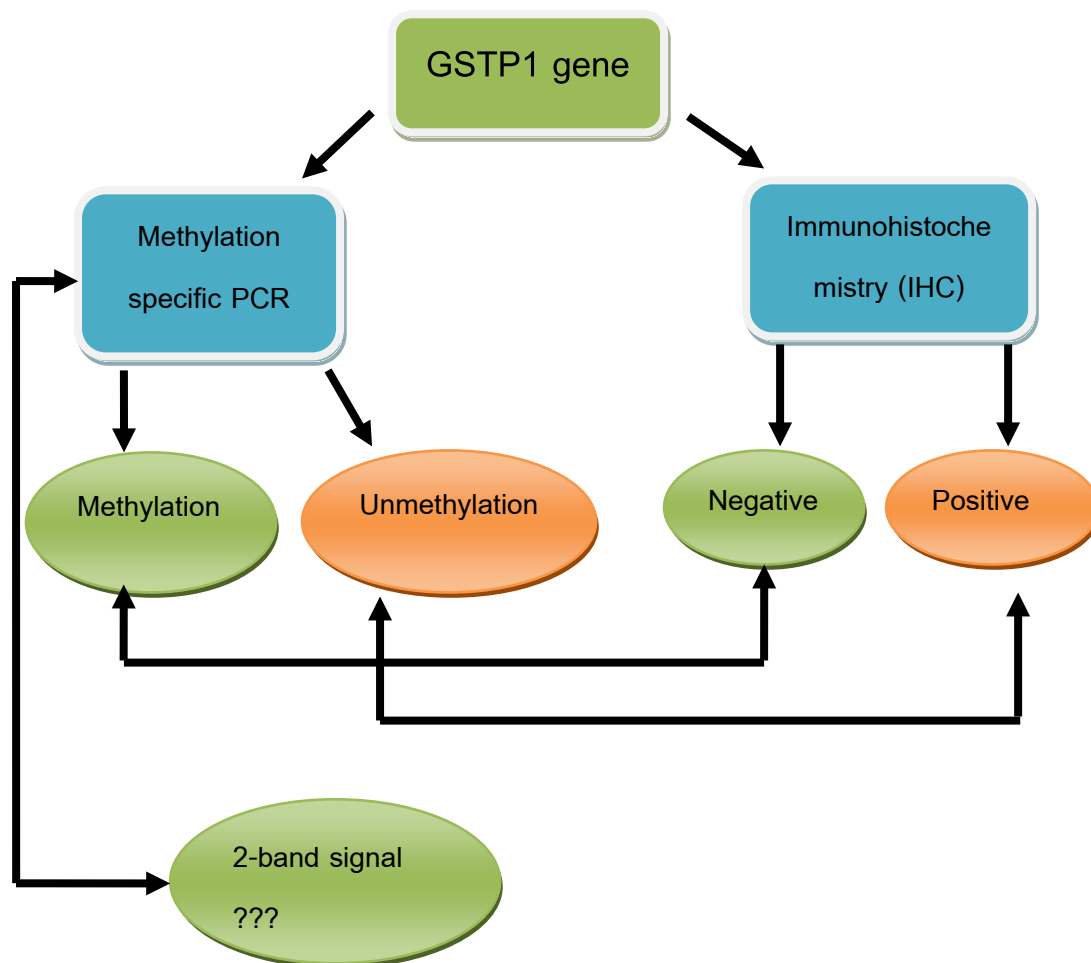
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของผล immunohistochemistry ที่ดู protein expression ของยีน GSTP1 กับเทคนิค methylation specific PCR ที่ดูการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1
2. ศึกษาอัตราของการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

สมมติฐานของการวิจัย

การเกิด methylation ทำให้มีการหยุดการทำงานของยีนหรือทำงานได้น้อยลง การแสดงออกของโปรตีนควรให้ผลเป็นลบ ส่วนการเกิด unmethylation มีผลให้มีการแสดงออกของยีนปกติควรให้ผลเป็นบวก ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความสัมพันธ์นี้ คือ วิธีการตรวจและการแปลผลของแต่ละวิธีการ ถ้ามีขั้นตอนใดไม่สมบูรณ์ อาจมีผลต่อความจริงของผลได้

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



ผล Methylation (1-band signal) สอดคล้องกับผลลบ (negative test) ใน IHC

ผล Unmethylation (1-band signal) สอดคล้องกับผลบวก (positive test) ใน IHC

ผล Methylation และ Unmethylation (2-band signal) แปลผลได้ไม่ชัดเจน อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการ หรืออาจเป็นธรรมชาติของมะเร็ง

IHC ใช้เกณฑ์ตัดสิน (cut off) คือการติดสีมากกว่า 10% ของเซลล์มะเร็งลุกลามในเนื้อเยื่อ ที่ทำการตรวจ เป็นผล บวก (positive test)

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. สำหรับชิ้นเนื้อที่จะใช้ทำ Immunohistochemistry (IHC) block ต้องผ่านเลือกตำแหน่งที่ต้องการศึกษาโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ
2. ชิ้นเนื้อสดที่ใช้ทดสอบโดยวิธี MSP และที่เป็นพาราฟินบล็อกที่ใช้ทดสอบโดยวิธีการ IHC นำมาจากผู้ป่วยคนเดียวกันที่เป็นมะเร็งเต้านมโดยถือว่าไม่ว่าจะบริเวณไหนที่เป็นมะเร็งควรให้ผลเหมือนกัน
3. ข้อมูลตัวอย่างทั้งหมดถูกปิดบังไว้สำหรับผู้ปฏิบัติงานวิจัยเพื่อป้องกันอคติในการวัดผลการทดลอง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Glutathione S- transferase	คือเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase ซึ่งเป็น phase II metabolic ที่มีความสัมพันธ์ต่อการลดการเกิดพิษจาก metabolites ของสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ตลอดจนยาที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic drug) โดยคอนจูเกตกับ glutathione
Immunohistochemistry	คือเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนภายในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะไปจับกับแอนติเจนภายในเนื้อเยื่อ เพื่อให้ทราบว่ามีการแสดงแอนติเจนในเนื้อเยื่อหรือไม่ และถ้ามีอยู่ในตำแหน่งใด

คำสำคัญ

Glutathione S-transferase *P1*, Promoter methylation, Breast cancer

ขั้นตอนของการวิจัย

- การเก็บชิ้นเนื้อสด (tissue bank)

ชิ้นเนื้อสดทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) หลังจากการตรวจตามปกติ
ในภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นำมาสกัด DNA โดยใช้ Qiaamp DNA FFPE tissue Kit (Qiagen)

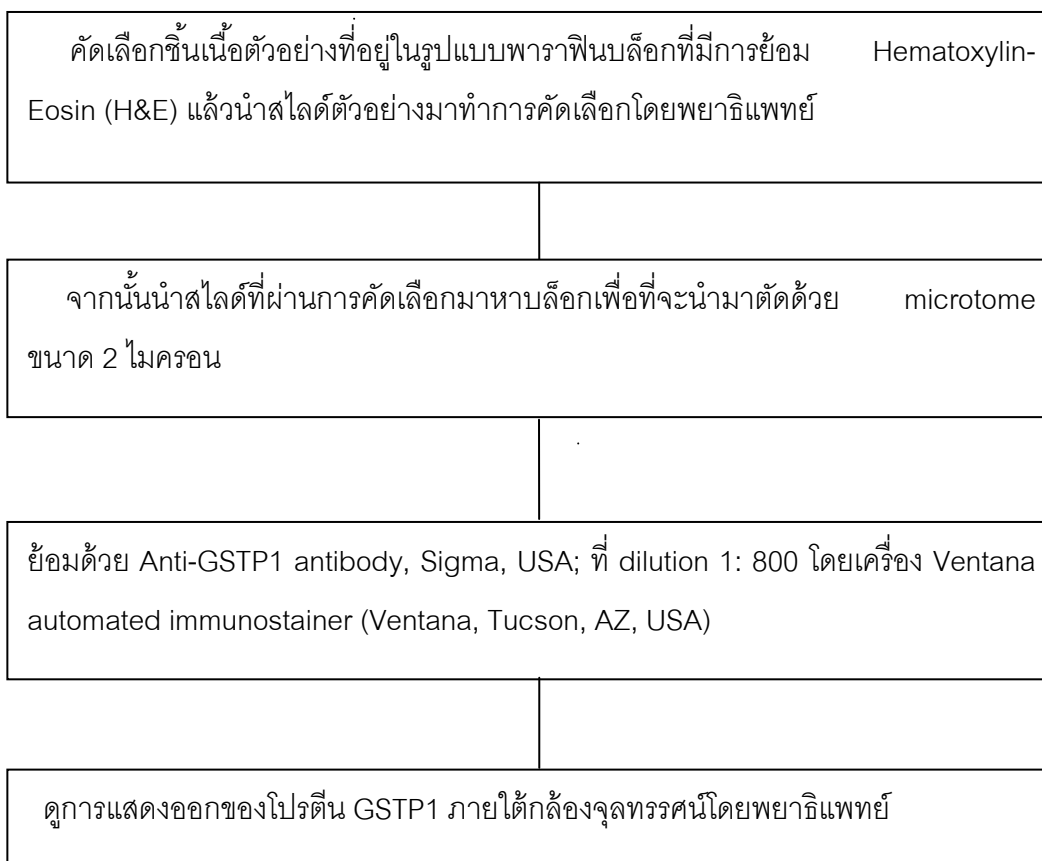
นำ DNA ที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับสาร Sodium bisulfite

เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์เฉพาะตำแหน่งด้วยปฏิกิริยา Methylation Specific
Polymerase chain reaction (MSP)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ MSP แล้วนำไปแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้น
ย้อมด้วยสาร Gel star nucleic acid stain เพื่อดูผลิตภัณฑ์ของ PCR ภายใต้แสง
อัลตราไวโอเล็ต

โดยผลิตภัณฑ์ PCR ของ methylated มีขนาด 91 bp unmethylated GSTP1 มีขนาด
97 bp

- การคัดเลือกชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก



ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ชิ้นเนื้อสดที่เก็บไว้หลังจากการตรวจตามปกติมีจำกัด
2. การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสดนั้นได้ใช้ Kit จากการสกัดจากพาราฟินบล็อก ผลที่ได้จากการสกัดอาจได้ดีเอ็นเอที่ไม่ดีพอ
3. การเลือกเนื้อสดมาสกัดดีเอ็นเอจะให้ผลดีกว่าถ้าเทียบกับพาราฟินบล็อกเมื่อใช้วิธีการ MSP

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

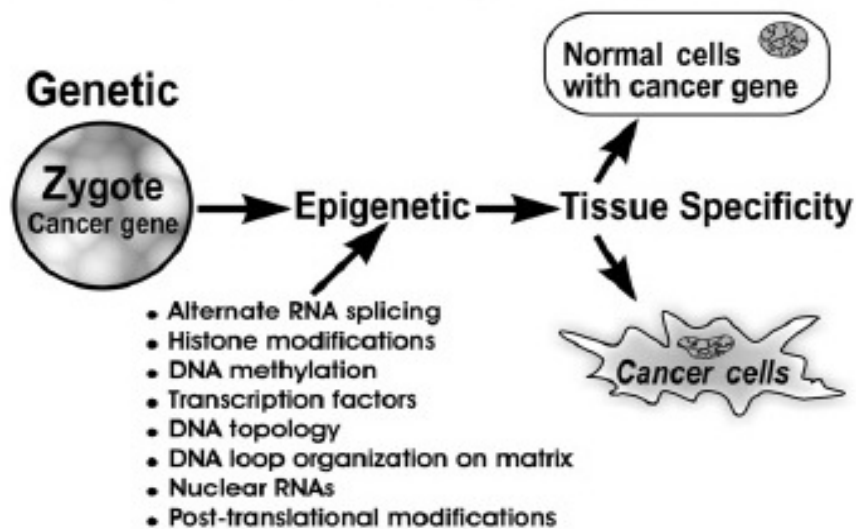
ทราบถึงความชุกการเกิด DNA methylation ของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านมของผู้ป่วยคนไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งความสัมพันธ์ของผล Methylation กับ Immunohistochemistry เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับศึกษาต่อไป ในการใช้เป็นการทดสอบเพื่อประโยชน์ในทางคลินิก ในการพยากรณ์การตอบสนองต่อยาและพยากรณ์ความรุนแรงของโรค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (Epigenetic)

กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (Epigenetic) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสในยีน เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปของฮิสโตนโปรตีน (Histone modification), การเปลี่ยนแปลงรูปแบบต่างๆ ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครมาตินและดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) [11] ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านกลไกดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่พบบ่อยทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง โดยการเติมหมู่เมทิลลงในตำแหน่งของคาร์บอนที่ 5 ของเบสไซโทซีนร่วมพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์กับเบสกวานีน (CpG) กลายเป็นหมู่เมทิลไซโทซีน (5-methylcytosine) ขึ้น โดยตำแหน่งที่อุดมไปด้วย CpG นั้นเรียกว่า CpG island ซึ่งพบมากในบริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory sequence) [11] การที่หมู่เมทิลไปจับกับดีเอ็นเอ ถ้าตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันอยู่บนโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีนใด จะยับยั้งการทำงานของยีนนั้นและทำให้ mRNA ที่เป็นผลผลิตจากยีนนั้นมีจำนวนน้อยลง



ภาพที่ 1. แสดงกลไกการเกิดมะเร็งในระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetic events)

กลุ่มยีนและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม [3] ดังนี้

- ยีนมะเร็ง (oncogene) คือการเปลี่ยนแปลงของยีนปกติที่เรียกว่า proto-oncogene ซึ่งมักทำหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยีนมะเร็งเป็นยีนที่ส่งเสริมโดยตรงให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง [12]
- ยีนที่ยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor gene) คือ ยีนที่ยับยั้งมะเร็งหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์หรือลดการทำงานของกระบวนการเกิดมะเร็งถ้าเกิดความผิดปกติของตัวที่จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่พบได้ในกระบวนการเกิดมะเร็งได้ (carcinogenesis)
- ยีนควบคุมการตายของเซลล์ (apoptosis related gene) คือ ขบวนการที่เซลล์ทำลายตัวเองโดยการควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องเพื่อควบคุมความสมดุลของเซลล์ร่างกาย ซึ่งการอยู่รอดของเซลล์จะขึ้นอยู่กับยีนที่ไปกระตุ้นหรือยับยั้ง apoptosis ดังนั้น การเกิด neoplastic cell ไม่เฉพาะเกิดจากการกระตุ้น oncogene หรือ ยับยั้ง tumor suppressor gene แต่ยังเกิดขึ้นโดยการเกิด mutation ของยีนที่เป็น ยีนควบคุม apoptosis
- ยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene) ในธรรมชาติ อันตรายที่เกิดจากสารเคมี รังสี และอื่นๆ ที่ทำอันตรายต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ ไม่ได้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ทุกครั้งเสมอไป ทั้งนี้เพราะมียีนกลุ่มนี้คอยทำหน้าที่แก้ไขซ่อมแซมสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่สึกหรอ [5]

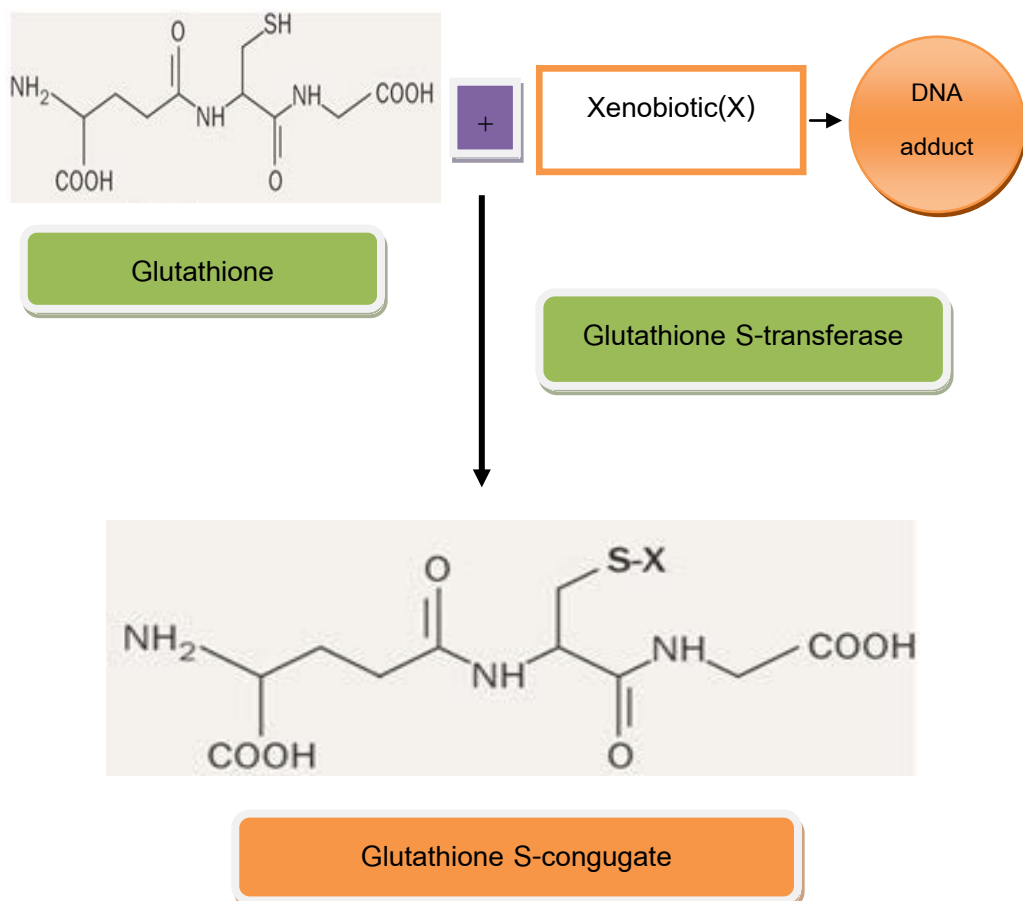
สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (Chemical Carcinogenesis) สารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็งในระยะแรกจัดเป็นสารเคมีอันตรายที่พบได้หลากหลายทั้งที่เป็นสารเคมีตามธรรมชาติและสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมีการจัดกลุ่มของสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็งเป็น 2 กลุ่ม [3]

- Direct-acting compounds เป็นสารเคมีที่ไปมีผลให้เกิดมะเร็งโดยตรงโดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงหรือ metabolism ของสารเคมีก็สามารถที่จะทำให้เกิดมะเร็งได้โดยตรง
- Indirect-acting compounds หรือ procarcinogens ซึ่งสารเคมีกลุ่มนี้จะต้องถูกเปลี่ยนแปลงหรือเข้าสู่กระบวนการ metabolism เพื่อที่จะสร้าง ultimate

carcinogens ซึ่งพร้อมที่จะไปกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง ซึ่งยีน GSTP1 เป็นยีนตัวหนึ่งที่มีความสำคัญที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมทางด้าน biotransformation ที่สร้างเอนไซม์ที่ทำให้สารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีสารพิษน้อยลง เช่น glutathione S-transferase ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ glutathione S-transferase

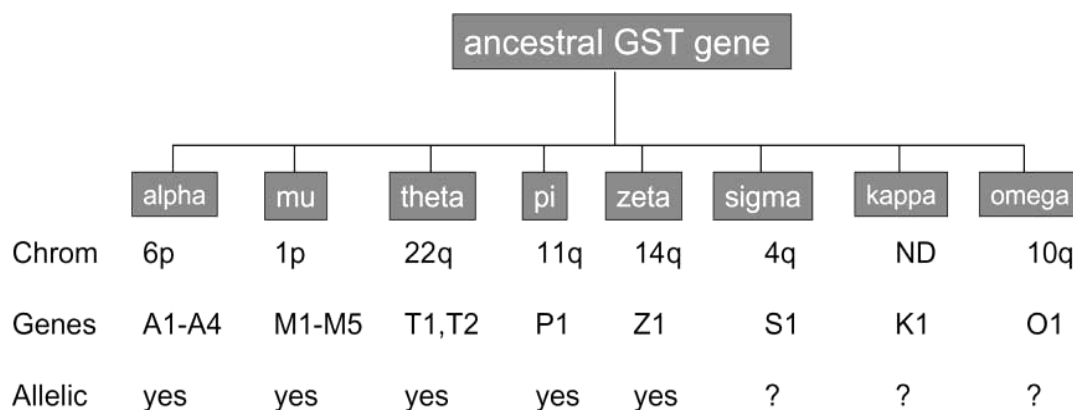
หน้าที่และการทำงานของ Glutathione S-transferase

เอนไซม์ glutathione S-transferase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมทางด้าน biotransformation ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีในสิ่งมีชีวิตที่จะเปลี่ยนคุณสมบัติการละลายของสารที่มีพิษต่อร่างกายหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลงและมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้นจึงสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้



ภาพที่ 2. แสดงการทำงานของ Glutathione S-transferase

โดยปกติเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ biotransformation จะแบ่งการทำงาน 2 ช่วง คือ phase I enzyme ได้แก่ cytochrome P 450 enzyme และ phase II enzyme ได้แก่ glutathione S-transferase [6, 7] จะเกี่ยวข้องกับขบวนการคอนจูเกตของ glutathione กับ สารประกอบเชิงซ้อนที่เป็น electrophilic compound [13] เช่น สารก่อมะเร็ง (carcinogen) ผลผลิตจากภาวะ oxidative stress ตลอดจนยาที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic drug) ที่ใช้ในเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งหลังจากคอนจูเกตแล้วจะทำให้สารมีความเป็นพิษน้อยลงและละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงขับออกจากร่างกายได้ง่าย แต่มีรายงานพบว่า polymorphism ของยีน glutathione S-transferase (GSTs) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิด [8, 14] กลุ่มของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase พบว่ามีทั้งสิ้น 16 ยีน ที่ควบคุมการสร้าง Glutathione S-transferase ในส่วนไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อ และมี 6 ยีน ที่ควบคุมการสร้าง Glutathione S-transferase ในส่วนเมมเบรน ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะยีน ควบคุมการสร้าง Glutathione S-transferase ในส่วนไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อ ซึ่งในมนุษย์พบว่า แบ่งเป็น 8 คลาสใหญ่ๆ ได้แก่



ภาพที่ 3. แสดง Glutathione S-transferase supergene family

1. คลาส Alpha อยู่บน chromosome คู่ที่ 6 (6p) แบ่งเป็น A1-A4
2. คลาส Mu อยู่บน chromosome คู่ที่ 1 (1p) แบ่งเป็น M1-M5
3. คลาส Theta อยู่บน chromosome คู่ที่ 22 (22q) แบ่งเป็น T1 และ T2
4. คลาส Pi อยู่บน chromosome คู่ที่ 11 (11q) แบ่งเป็น P1
5. คลาส Zeta อยู่บน chromosome คู่ที่ 14 (14q) แบ่งเป็น Z1
6. คลาส Sigma อยู่บน chromosome คู่ที่ 4 (4q) แบ่งเป็น S1

7. คลาส Kappa ยังไม่ทราบตำแหน่งแน่ชัด แต่พบว่าอาจควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ K1
8. คลาส Chi หรือ Omega อยู่บน chromosome คู่ที่ 10 (10q) แบ่งเป็น O1 และ O2 [15]

ความหลากหลายของยีน (Genetic polymorphism)

ความหลากหลายของยีน (genetic polymorphism) [16] หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) แตกต่างกันตรงที่ polymorphism ต้องพบได้ไม่น้อยกว่าร้อยละหนึ่งในประชากรปกติ ส่วนใหญ่ของ polymorphism มักจะมีลักษณะเป็น single nucleotide polymorphism (SNPs) ซึ่ง SNPs ที่เป็น homozygote หรือ biallelic polymorphism คือมี polymorphism เกิดในคู่โครโมโซมพบได้บ่อยประมาณว่าพบได้ในทุกๆ 300 bps ในปัจจุบันพบว่า การเกิด polymorphism ในยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึม อาจมีผลต่อการกำจัดสารพิษได้ ดังเช่นที่พบในยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase

Glutathione S-transferase ชนิด P1(GSTP1) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11q13, total range 67,351,066: 67,354,124 (มี 3,059 bases) [17] การศึกษาความสำคัญของยีนนี้ต่อการเกิดโรคมะเร็งคือการมีความหลากหลายของยีนที่ codon ที่ 105 บน exon 5 ของยีนโดยจุดที่สำคัญคือมีการเปลี่ยนจากเบส G เป็นเบส A ซึ่งเป็นตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Isolucine เป็น Valine ซึ่งมีผลทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง [7, 12] ความถี่ของความหลากหลายของยีน GSTP1 นั้น พบว่าชาวตะวันตกมีประมาณ 50% [18] และชาวเอเชียประมาณ 30% [13] สำหรับในเมืองไทยความถี่ของความหลากหลายของยีนในประชากรคิดเป็นประมาณ 40% [14] ผลกระทบของความผิดปกติของยีนนี้จากการศึกษาทั่วโลกพบว่ายีน GSTP1 มีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มความเสี่ยงให้เกิดโรคมะเร็งต่างๆ เช่น มะเร็งลำไส้, มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งเต้านม [19, 20] แต่ก็มีบางรายงานการวิจัยที่พบว่า การมีความหลากหลายของยีน GSTP1 ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเต้านมแต่อย่างใดทั้งในทวีปเอเชียและยุโรป [21] สำหรับการศึกษาลักษณะของยีนนี้กับโรคมะเร็งต่างๆ ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก เช่น มีการศึกษาผลของความหลากหลายของยีน GSTP1 กับมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็กพบว่า ยีนนี้ยังไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งชนิดนี้ [22] และการศึกษาผลกระทบของความ

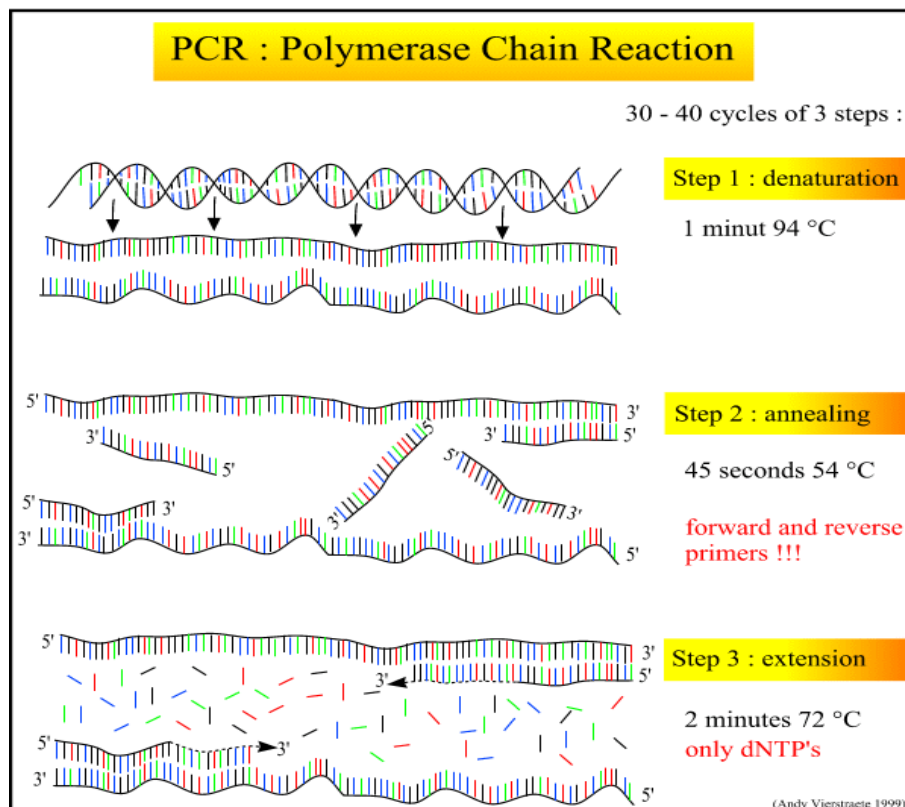
หลากหลายยีนนี้กับมะเร็งเต้านมในหญิงไทยผลที่ได้คือความผิดปกติของยีนนี้ไม่ได้เป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านมแต่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมความรุนแรงของโรคมะเร็งเต้านม [23] ต่อมา มีการศึกษาถึงการเกิด hypermethylation บริเวณ CpG islands ของยีน GSTP1 ซึ่งพบว่า มีผลลดการแสดงออกของยีน GSTP1 ทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมากพบว่า 70-80% ของผู้ป่วยชาวยุโรปเกิดภาวะ hypermethylation ขณะที่เซลล์ปกติกลับเกิดน้อยมาก [13] แต่ในผู้ป่วยเอเชียพบเพียง 30% [24] และ 30 % ของผู้ป่วยมะเร็งผนังมดลูกในหญิงชาวเอเชียเกิดภาวะ hypermethylation และมีผลลดการแสดงออกของยีน GSTP1 [25] สำหรับมะเร็งตับพบว่าผู้ป่วยชาวเอเชียมีภาวะ hypermethylation ประมาณ 50% และภาวะนี้ยังสัมพันธ์กับการสัมผัสสารก่อมะเร็งจากสิ่งแวดล้อมด้วย [26] ส่วนในมะเร็งเต้านมนั้น จากการทดลองมักพบว่าในเซลล์ปกติจะมีการเกิด hypermethylation ของยีนนี้น้อยแต่จะพบมากในเซลล์มะเร็ง [27] มีรายงานในเอเชียพบมีภาวะ hypermethylation เพียงประมาณ 14% และจะพบมากในมะเร็งเต้านมชนิด IDC ประมาณ 40% แต่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด hypermethylation กับขนาดของก้อนมะเร็ง, การแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองและอัตราการอยู่รอดต่ำของผู้ป่วย [9] ปัจจุบันการศึกษาผลของ hypermethylation บริเวณ CpG islands ของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านมยังไม่มีรายงานในประเทศไทย

ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนหรือปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ซึ่งเป็นบริเวณเล็กๆ ในสายดีเอ็นเอ โดยจะเลือกบริเวณใดที่ต้องการก็ได้ ถ้ารู้ขอบเขตของดีเอ็นเอที่จะเพิ่มขยาย การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มได้เป็นจำนวนมากหลายๆ ล้านชิ้น (copies) ภายในระยะเวลาอันสั้นจากดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งอาจเป็น genomic DNA ที่สลับซับซ้อน การที่จำเป็นต้องรู้ขอบเขตและทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวนเนื่องจากการทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้องอาศัยไพรเมอร์หรือ oligonucleotides สายสั้นๆ สองเส้นที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่สนใจจะเพิ่มจำนวน โดยแต่ละไพรเมอร์จะไปจับกับแต่ละเส้นของดีเอ็นเอ โดยมีการทำปฏิกิริยาซ้ำๆ กันต่อเนื่องหลายรอบจนเอนไซม์หมดประสิทธิภาพหรือสารตั้งต้นของปฏิกิริยาหมดลง ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารละลาย ดังต่อไปนี้

1. สารพันธุกรรมตั้งต้น (DNA template)
2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (DNA primer)
3. อนุพันธ์นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotide triphosphate) ประกอบด้วย
 - deoxyadenosine triphosphate (dATP)
 - deoxycytosine triphosphate (dCTP)
 - deoxythymidine triphosphate (dTTP)
 - deoxyguanosine triphosphate (dGTP)
4. Magnesium chloride ($MgCl_2$) ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของ Taq polymerase
5. Taq DNA polymerase

ในปฏิกิริยาของ PCR แต่ละรอบ จะประกอบไปด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

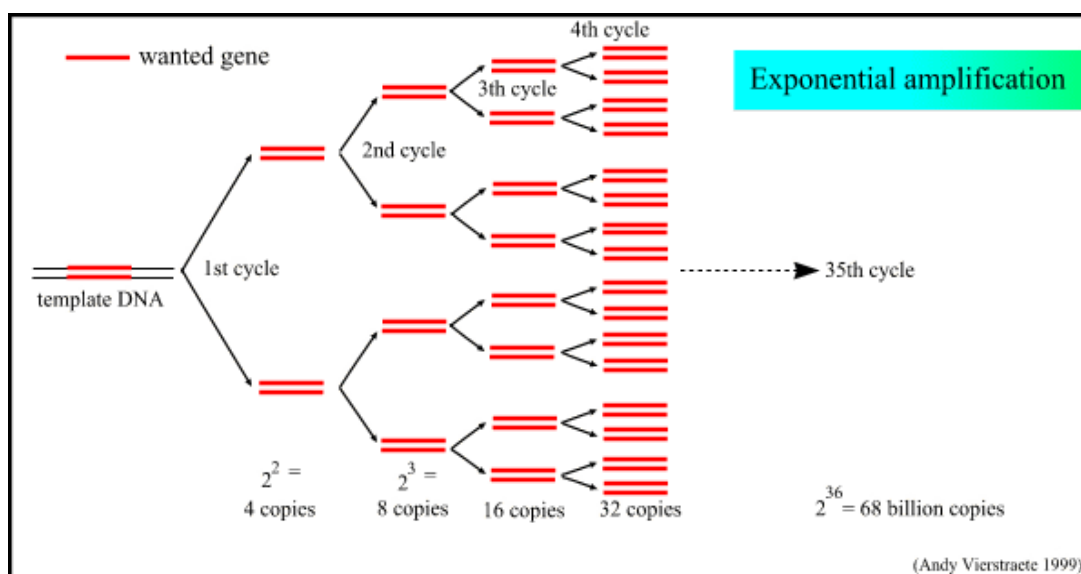


ภาพที่ 4. แสดงขั้นตอนย่อยในแต่ละรอบของกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค

PCR

1. Heat denaturation step ดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งปกติจะเป็น double helix จะถูกความร้อนจนทำให้มันทำให้สายดีเอ็นเอสองสายแยกออกจากกันความร้อนที่ใช้ประมาณ 90-95 °c
2. Primer annealing step เมื่อลดอุณหภูมิลง ไพรมเมอร์ซึ่งเป็น oligonucleotides ขนาดประมาณ 20-30 เบส ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสในดีเอ็นเอต้นแบบ จะเข้ามาจับกับดีเอ็นเอที่แยกเป็นเส้นเดี่ยวทั้งสองเส้น ที่ตำแหน่งที่ตรงข้ามกัน (อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 40-60 °c)
3. Extension step/ DNA synthesis การต่อเติมนิวคลีโอไทด์หรือสายดีเอ็นเอไปในแนวทาง 5' → 3' โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ทนความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 °c จนกระทั่งได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่

เมื่อจบ 1 รอบ หรือ 1 cycle จะได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่จำนวน 2 ชุด ซึ่งจะสามารถใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนในรอบต่อไป โดยเส้นคู่ใหม่จำนวน 2 ชุดจะแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวจำนวน 4 เส้น (denaturation step) เมื่อได้รับความร้อน และเมื่อลดอุณหภูมิลง ไพรมเมอร์ซึ่งมีปริมาณอยู่มากกว่า ก็จะเข้ามาแย่งจับกับดีเอ็นเอคู่เดิม (primer annealing) เมื่อไพรมเมอร์จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวเอนไซม์ DNA polymerase ก็สามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3' end ของไพรมเมอร์ได้ จนเกิดดีเอ็นเอเส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 4 ชุด (extension/ DNA synthesis) เมื่อจบรอบที่ 3 จะได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ชุดใหม่ทั้งหมด 8 ชุด จำนวนการเพิ่มของดีเอ็นเอจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential) และสามารถคำนวณจำนวนเส้นคู่ใหม่ ที่เพิ่มขึ้นได้โดยใช้สูตร 2^n โดย n มีค่าเท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา



ภาพที่ 5. แสดงการเพิ่มของดีเอ็นเอแบบทวีคูณในกระบวนการ PCR

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแล้ว ดีเอ็นเอที่สร้างได้ในหลอดทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ให้ทราบว่าดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่ การวิเคราะห์สามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปคือการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบน agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า (agarose gelelectrophoresis) ดีเอ็นเอที่อยู่บนเจล จะถูกย้อมสีโดยใช้ ethidium bromide และปรากฏให้เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่เรืองแสงเมื่อส่องด้วยแสง UV

ทฤษฎีและหลักการของ Immunohistochemistry

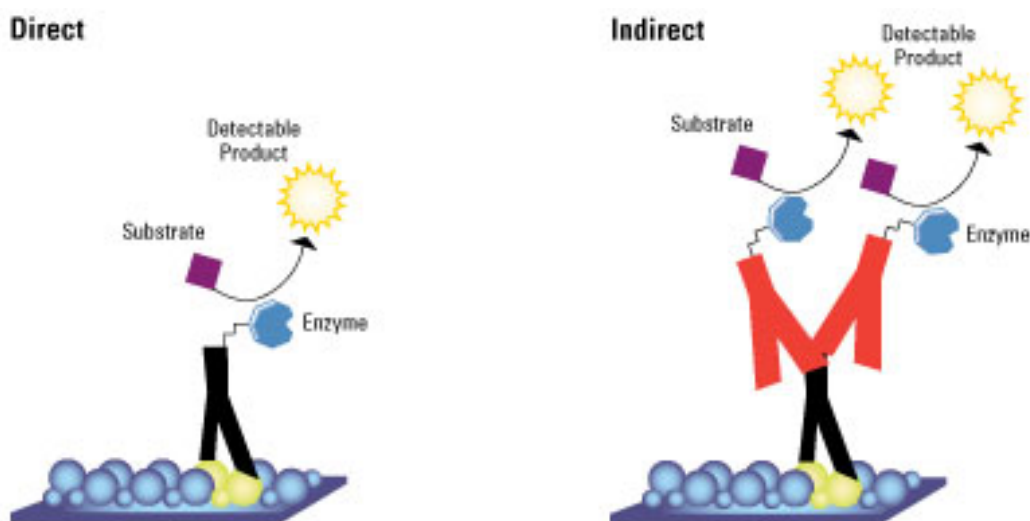
ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางการแพทย์ไปทั่วโลกลำดับต้นๆ การเกิดเป็นโรคมะเร็งนั้นเกิดอย่างเป็นขั้นตอน (multistep tumorigenesis) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่สำคัญ คือ ยีนก่อมะเร็ง (oncogenes) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ซึ่งความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับยีนทั้งสองชนิดนี้ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนซึ่งเป็นผลผลิตของยีนนั้นๆ ด้วย Immunohistochemistry (IHC) เป็นเทคนิคทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สามารถนำมาใช้ตรวจหา antigen ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น จึงถูกนำมาใช้ตรวจหาโปรตีนซึ่งเป็นผลผลิตของยีนเหล่านี้ได้ และเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย

เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นการตรวจหา Antigen ภายในเซลล์โดยที่โครงสร้างของเซลล์ และเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลาย จึงเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาโรคมะเร็งและ ยีนต้านมะเร็งในแต่ละขั้นตอนของการเกิดและดำเนินไปของโรคมะเร็ง การพยากรณ์โรคและความ รุนแรงของโรคมะเร็ง เป็นต้น

1. ใช้วิเคราะห์มะเร็งที่ไม่ทราบมะเร็งปฐมภูมิ (unknown primary origin) หรือ มะเร็งที่มีปัญหาในการจัดแบ่งชนิด โดยวิธี IHC ทำให้สามารถศึกษามะเร็งได้ จากการที่เซลล์มะเร็งมี antigen ต่างๆ กัน ตามเนื้อเยื่อต้นกำเนิด เช่น กลุ่มที่มีกำเนิดจาก epithelial, mesenchymal, neural เป็นต้น
2. ใช้พยากรณ์โรคและความรุนแรงของโรคมะเร็งโดยวิธี IHC การศึกษา antigens ของเซลล์มะเร็งต่างๆ สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรค เช่น การศึกษาโปรตีน p53 โปรตีน HER2 เป็นต้น

หลักการ IHC อาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง antigen ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการจะตรวจหานั้นเอง และ antibody ซึ่งคือภูมิคุ้มกันที่มี ความจำเพาะต่อสิ่งที่ต้องการจะตรวจหานั้น แล้วตรวจหาปฏิกิริยาการจับที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถทำ ได้โดยวิธีทางตรง (direct method) และโดยวิธีทางอ้อม (indirect method)

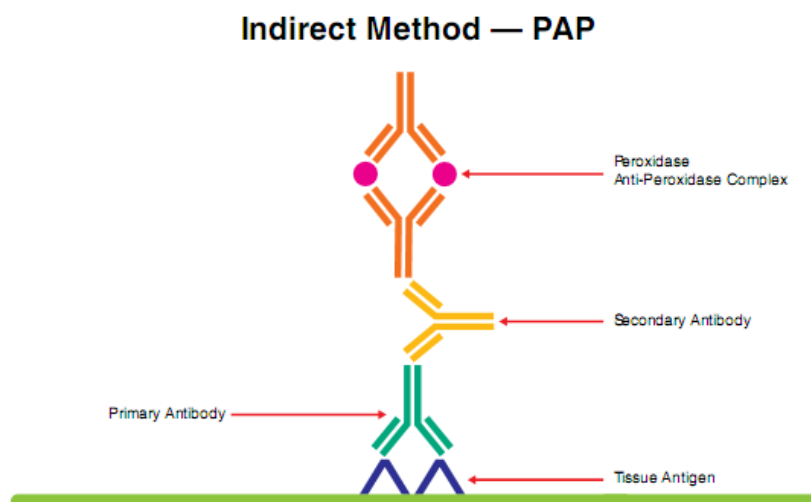
- **วิธีทางตรง (Direct method)** ทำโดยการติดฉลากไว้ที่ antibody (labeled antibody) เมื่อ antibody จับกับ antigen โดยตรงแล้วทำการตรวจหา labeled antibody วิธีทางตรงนี้ง่ายกว่า ใช้เวลาน้อยกว่า มีความจำเพาะสูงกว่า แต่มีความ ไวต่ำ และมีข้อจำกัดในการต้องใช้ lebeled antibody ที่มีความจำเพาะต่อ antigen นั้นๆ เสมอ [31]



ภาพที่ 6. แสดง method ของ immunohistochemistry ทั้งแบบ direct และ indirect method

- **วิธีทางอ้อม (Indirect method)** ใช้ antibody สองชนิด ชนิดแรกคือ Primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งที่ต้องการจะตรวจหา นั้นๆ และชนิดที่สองคือ Secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ primary antibody นั้นๆ และทำการติดฉลากไว้ที่ secondary antibody บางครั้งจึงเรียกว่า labeled antibody แล้วทำการตรวจหา secondary antibody ดังกล่าวนี้ วิธีทางอ้อมนี้จะซับซ้อนมากกว่า ใช้เวลานานกว่า มีความจำเพาะต่ำกว่า แต่มีความไวสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางตรง และไม่มีข้อจำกัดในการต้องใช้ secondary antibody หรือ labeled antibody ที่มีความจำเพาะต่อ primary antibody นั้นๆ วิธีการนี้ทำให้มีความสะดวกในการติดฉลากโดยการติดฉลากไว้ที่ secondary antibody และสามารถนำมาใช้กับ primary antibody ต่างๆ ที่มีความจำเพาะต่อ antigen ต่างๆ ได้มากมาย สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 วิธี ได้แก่

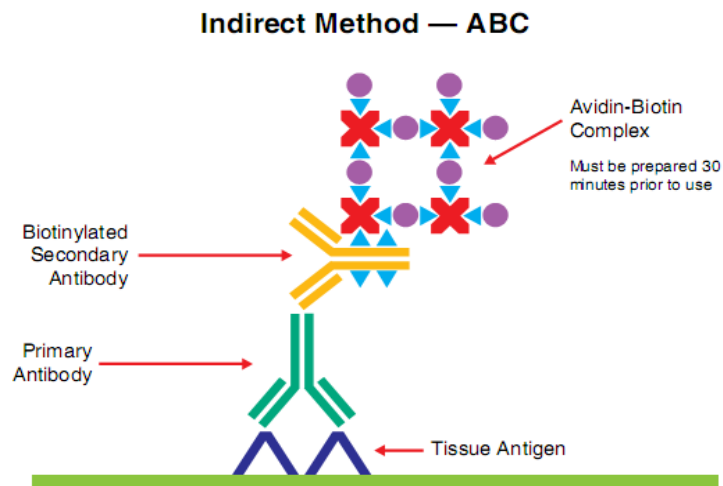
1. **Unlabelled antibody method** เป็นการ ใช้ secondary antibody เป็นสะพานเชื่อมระหว่าง primary antibody กับ tertiary antibody ที่มี enzyme complex conjugate อยู่ วิธีการนี้ได้แก่ Peroxidase antiperoxidase complex (PAP), alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (APAAP) เมื่อ enzyme และ substrate ทำปฏิกิริยากันแล้ว เมื่อหยด chromogen ลงไปก็จะสามารถ detect ตำแหน่งที่ antibody และ antigen จับกันอยู่ได้ [31]



ภาพที่ 7. แสดงภาพ Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) method

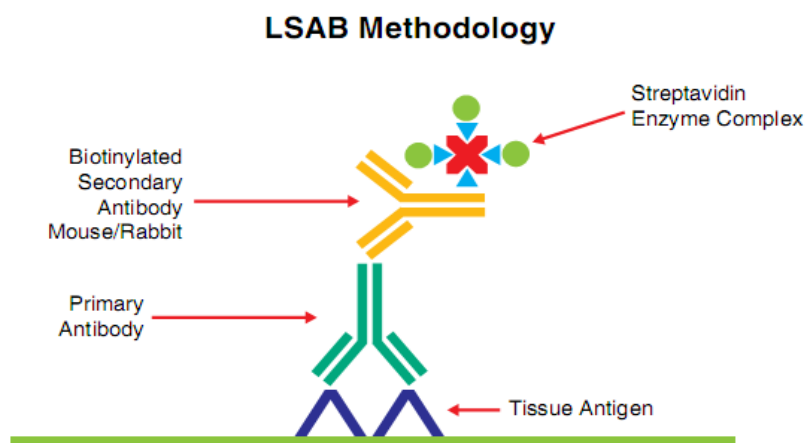
2. (Strept) avidin-biotin technology เทคนิคนี้เป็นการอาศัยคุณสมบัติในการจับกันระหว่าง avidin กับ biotin จะมีการจับกันอย่างหนาแน่นและจำเพาะเจาะจง แบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

2.1 avidin-biotin complex (ABC) method เป็นวิธีการที่อาศัยคุณสมบัติในการจับตัวกันของ avidin และ biotin ที่จะยึดตัวกันอย่างหนาแน่นและจำเพาะเจาะจง avidin เป็นส่วนประกอบของไขดาว structure เป็นรูปสี่เหลี่ยมมี 4 submit ที่จะให้ biotin เกาะได้ ส่วน biotin เป็น low molecular weight vitamin ที่สามารถจะ conjugate กับ antibody และ enzyme ได้ง่าย จึงทำให้สามารถที่จะใช้ biotin conjugate กับ secondary antibody และสร้าง avidin biotin enzyme complex เพื่อใช้แทน PAP or APAAP complex ตัว avidin จะมี oligosaccharide residue ของไขขาวติดมาด้วย [32] สารตัวนี้มักจะไปจับกับ lecithin บนเนื้อเยื่อได้ ทำให้เกิด non-specific staining จึงมีการทดแทน avidin ด้วยสาร strept avidin ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Streptomyces avidinii สารตัวนี้ไม่มี oligosaccharide residue และมีคุณสมบัติในการจับกับ biotin เช่นเดียวกับ avidin



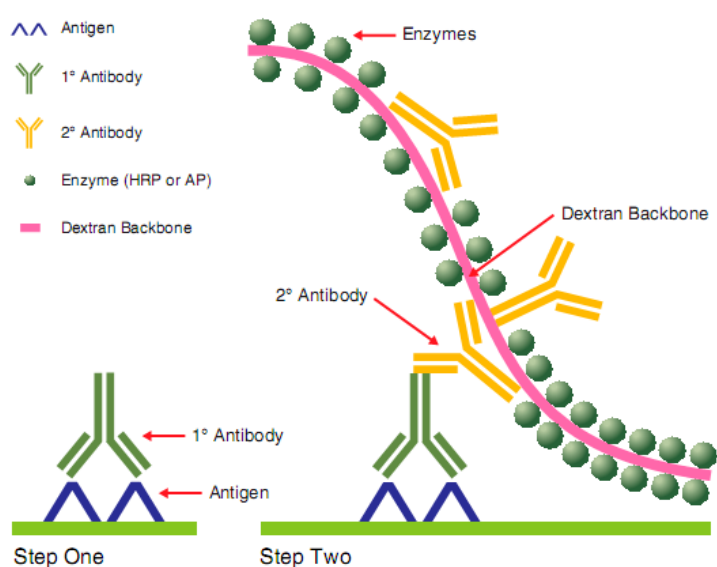
ภาพที่ 8. แสดงภาพ Avidin-Biotin Complex (ABC) method

2.2 labeled streptavidin-biotin (LSAB) method เนื่องจาก avidin เป็นส่วนประกอบของไข่ขาวจึงมี oligosaccharide residue ของไข่ขาวติดมาด้วย และสารดังกล่าวมักจะไปจับกับ non-specific lecitin-like ที่อยู่บนเนื้อเยื่อทำให้เกิดสีที่ไม่จำเพาะ หรือ non-specific staining ต่อมาจึงมีการใช้สาร streptavidin ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces avidinii* ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับ biotin เช่นเดียวกับกับ avidin มาใช้ทดแทน avidin ซึ่งสารตัวนี้จะมีส่วนประกอบที่เป็น carbohydrate moieties น้อยกว่า ทำให้มีการเกิด non-specific staining น้อยกว่าการใช้ avidin [32] ซึ่งทั้ง ABC และ LSAB เป็นเทคนิคที่มี sensitivity ที่เพิ่มสูงขึ้น [32,33]



ภาพที่ 9. แสดงภาพ Labeled Streptavidin-Biotin Complex (LSAB) method

3. Chain polymer-conjugated technology เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ และ antibody (primary, secondary) มาติดบน spine molecule ของ dextran และใน 1 spine molecule ของ dextran สามารถติด enzyme ได้ 70 molecules พร้อมกับ antibody อีก 10 molecules ด้วยเหตุนี้ เทคนิคนี้จึงช่วยเพิ่ม sensitivity ลดเวลาและขั้นตอนในการทำ IHC ได้ ตัวอย่าง เช่น DAKO EPOS, DAKO EnVision เป็นต้น เนื่องจากเทคนิคนี้ไม่มีการใช้ avidin, biotin จึงไม่ทำให้เกิด non-specific staining จาก endogenous biotin [32]



ภาพที่ 10. แสดงภาพ chain polymer-conjugate method

ทั้งวิธีทางตรงและวิธีทางอ้อม ฉลากที่นำมาติดไว้ที่ Labeled antibody ได้แก่ fluorescence, enzyme และ colloidal gold เป็นต้น และตรวจสอบได้โดยกล้องจุลทรรศน์ image analyzer กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันใช้ enzyme ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ substrate ที่จำเพาะกับ enzyme นั้น เกิดเป็นสีต่างๆให้เห็น และตรวจสอบได้โดยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษากาการเกิด hypermethylation ในครั้งนี้จะใช้ 2 วิธี คือ MSP และ IHC ซึ่งการใช้วิธี MSP ก็จะใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอด้วยสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine ปกติไปเป็น uracil ได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยน methylcytosine ได้ หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์สำหรับ cytosine ปกติ และไพรเมอร์สำหรับ methylcytosine แล้วตรวจผลการทดลองด้วย agarose gel electrophoresis [26] : ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ตรงกันจากการศึกษาก่อนหน้านี้มี 4 รายงานด้วยกัน [9, 10, 26, 30] ที่ทดสอบโดยวิธี MSP และวิธี IHC เป็นเทคนิคที่ใช้

ตรวจสอบแอนติเจนหรือการแสดงออก (expression) ของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเข้าไปจับกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ วิธีนี้จะช่วยวินิจฉัยแยกโรคที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันได้ [28] การศึกษาได้ใช้วิธี IHC โดยการใช้อะนติบอดี: anti-GST-pi polyclonal antibody (sigma) โดยมี 2 clone ที่ตรงกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study)

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่างขึ้นเนื้อมะเร็งเต้านมซึ่งอยู่ในรูปแบบของเนื้อสดแช่แข็งและรูปแบบของเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินบล็อก ของ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ฝ่ายพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2554 โดยตัวอย่างทั้งหมดจะถูกวินิจฉัยและคัดเลือกเข้าสู่การศึกษาโดยพยาธิแพทย์

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

$$\text{จากสูตร} \quad n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 PQ}{\Delta^2}$$

เมื่อ n = ขนาดตัวอย่างที่ต้องใช้

$\alpha = 0.05$; $Z_{\alpha/2} = 1.96$ ค่าปกติมาตรฐานที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

P = prevalence (ร้อยละของการพบ hypermethylation ของยีน GSTP1 ซึ่งมีรายงานอยู่ระหว่าง ร้อยละ 14-30)

ในที่นี้ใช้ 20

$$Q = 1 - P$$

Δ = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (acceptable error) = 10%

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } n &= \frac{1.96^2 \times 0.2 \times 0.8}{(0.1)^2} \\ &= 64.47 \end{aligned}$$

ดังนั้น ขนาดตัวอย่างที่ต้องการ คือ 65 ราย

เนื่องจาก คำถามวิจัยหลักคือ ศึกษาความสัมพันธ์ของผลตรวจ methylation ของยีน GSTP1 และผลตรวจการแสดงออกของโปรตีน GSTP1 โดย IHC ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้เคยศึกษา โดยใช้ขนาดตัวอย่างราว 100 ราย

ดังนั้น ขนาดตัวอย่างที่จะใช้ในการวิจัยนี้ จะใช้ทั้งหมด 100 ราย

ประเด็นทางจริยธรรม

การศึกษานี้จะไม่มีเปิดเผยข้อมูลความลับหรือเชื่อมโยงไปถึงข้อมูลส่วนบุคคลของผู้ป่วย และไม่มีผลใดๆ ต่อการดูแลรักษาของผู้ป่วย

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว รหัส IRB No.376/ 54

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

1. Slide superfrost plus (Thermo scientific, USA)
2. Metal rack
3. Cover slide
4. Microtome knife
5. Microtome (Thermo electron corporation, USA)
6. Cold plate

7. Oven
8. Pipette 2.5, 10, 20, 100, 200, 1000 μ l (Eppendorf, Germany)
9. Pipette tip 10, 20, 100, 200, 1000 μ l (Axygen, USA)
10. Automated immunostainer (Ventana, USA)
11. Centrifuge
12. Vortex mixture
13. PCR chamber
14. Thermal cycler (Applied Biosystem, USA)
15. Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo scientific, USA)
16. Power supply (Biored, USA)
17. Strom phosphoimager (Molecular Dynamics, UK)
18. Computer (with ImageQuant software, Molecular Dynamics, UK)
19. 4°C Refrigerator
20. -20 °C Freezer
21. -80 °C Freezer
22. Autoclave

สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

1. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA**
 1. 70% Ethanol
 2. 100% Ethanol
 3. Qiaamp DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, USA)
2. **สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับไซเตียมไบซัลไฟด์**
 1. EZ DNA methylation gold kit (Zymo Research, USA)
 2. Universal methylated DNA (Chemicin International, USA)
 3. Universal unmethylated DNA (Chemicin International, USA)

4. Water

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

1. 10X buffer gold (Applied Biosystem, USA)
2. MgCl₂ solution (Applied Biosystem, USA)
3. dNTPs (Applied Biosystem, USA)
4. Unmethylation GSTP1 forward primer (Pacific science, Thailand)
5. Unmethylation GSTP1 reverse primer (Pacific science, Thailand)
6. Methylation GSTP1 forward primer (Pacific science, Thailand)
5. Methylation GSTP1 reverse primer (Pacific science, Thailand)
6. AmpliTaq gold DNA polymerase (Applied Biosystem, USA)
7. Water

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis

1. 5x Tris-EDTA
2. 40% Acrylamide-bis acrylamide
3. 10% Ammoniumpersulfate
4. Tetramethylethelenediammine
5. Gel star nucleic acid strain (Cambrex bioscience, USA)
6. Water

5. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน Immunohistochemistry

1. Anti-GSTP1 antibody produced in rabbit (Sigma, USA)
2. Diluents (Dako, Denmark)
3. Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, USA)
4. Absoluted alcohol
5. Xylene

4. Water

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

1. 10X buffer gold (Applied Biosystem, USA)
2. $MgCl_2$ solution (Applied Biosystem, USA)
3. dNTPs (Applied Biosystem, USA)
4. Unmethylation GSTP1 forward primer (Pacific science, Thailand)
5. Unmethylation GSTP1 reverse primer (Pacific science, Thailand)
6. Methylation GSTP1 forward primer (Pacific science, Thailand)
5. Methylation GSTP1 reverse primer (Pacific science, Thailand)
6. AmpliTaq gold DNA polymerase (Applied Biosystem, USA)
7. Water

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis

1. 5x Tris-EDTA
2. 40% Acrylamide-bis acrylamide
3. 10% Ammoniumpersulfate
4. Tetramethylethelenediammine
5. Gel star nucleic acid strain (Cambrex bioscience, USA)
6. Water

5. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน Immunohistochemistry

1. Anti-GSTP1 antibody produced in rabbit (Sigma, USA)
2. Diluents (Dako, Denmark)
3. Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, USA)
4. Absoluted alcohol
5. Xylene

6. Permout

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างโดยจะเก็บสองรูปแบบด้วยกันคือรูปแบบของเนื้อสดแช่แข็งและรูปแบบของเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินบล็อก จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ พ.ศ. 2549-2554 จำนวน 100 ราย
2. ตัวอย่างรูปแบบของเนื้อสดจะนำไปเก็บที่ -80°C เพื่อที่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอ
3. ตัวอย่างรูปแบบของพาราฟินบล็อกที่พยาธิแพทย์คัดเลือกสไลด์ที่ทำการย้อม H&E เรียบร้อยแล้วจะนำพาราฟินบล็อกไปตัดด้วย microtome ขนาด 2 ไมครอน เพื่อที่จะเอาไปย้อมด้วยเทคนิค IHC เพื่อการแสดงผลออกเป็นโปรตีนของยีน GSTP1

การสกัดดีเอ็นเอ

1. การสกัดดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ใช้ชุดสกัด Qiaamp DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, USA) มีขั้นตอนดังนี้
 - นำเนื้อสดที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80°C มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปใส่ในหลอด 1.5 microcentrifuge
 - เติม ALT buffer 180 μl , proteinase K 20 μl จากนั้น mix โดยใช้ vortex
 - Incubate ที่ 56°C ซ้ำมคืน
 - Incubate ที่ 90°C 1 ชั่วโมง
 - เติม AL buffer 200 μl ลงในตัวอย่างและผสมรวมกันโดยใช้ vortex จากนั้นเติม Absolute alcohol แล้วผสมรวมกันโดยใช้ vortex แล้วดูดใส่ QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
 - เติม AW1 buffer 500 μl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
 - เติม AW2 buffer 500 μl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 4 นาที

- เปลี่ยนเอาเฉพาะ QIAamp MinElute column มาวางบน หลอด 1.5 microcentrifuge แล้วเติม ATE buffer 100 μ l ตรงกลาง membrane วางทิ้งไว้ ประมาณ 10-20 นาที
 - นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20°C
2. ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด จะถูกแบ่งนำไปวัดปริมาณของดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้ เครื่อง Nanodrop Spectrophotometer ของบริษัท Thermo scientific มีขั้นตอนดังนี้
- ต่อสายไฟและสาย USB ให้เรียบร้อย
 - คลิกโปรแกรม Nano Drop 2000 ที่ PC หรือ Notebook
 - เลือกวิธี (Method) ที่ต้องการจะวัด
 - ทำความสะอาดแท่นวัด (Pedestal) ด้วยน้ำกลั่น
 - หยดสารละลาย Blank ที่แท่นวัดและคลิกที่ปุ่ม Blank หรือ F3 เพื่อวัด Blank
 - หยดสารละลาย Blank และหยด sample ที่แท่นวัดหรือกด F1 เพื่อทำการวัด
 - อ่านผลการวัดที่ Result table
- คำแนะนำ
- ควรทำการ re blank ทุก 30 นาที
 - ทำความสะอาดหัวอ่านด้วย PR1 เป็นประจำหรือเมื่อวัดค่าได้ไม่ถูกต้อง
 - ห้ามนำของแข็งไปชูดที่แท่นวัด
3. ดีเอ็นเอจากตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การทำปฏิกิริยากับไซเตียมไบซัลไฟต์

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอ จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารไซเตียมไบซัลไฟต์เพื่อเปลี่ยนเบสไซโทซีนในสายดีเอ็นเอให้กลายเป็นยูราซิล โดยใช้ชุด EZ DNA methylation gold kit ของบริษัท Zymo Research ประเทศสหรัฐอเมริกา มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียม CT conversion reagent

- เติมน้ำ (DW) 900 μ l + M-dilution buffer 300 μ l + M-dissolving buffer 50 μ l ลงในหลอดของ CT conversion reagent
- Mix โดยการ shake หรือ vortex 10 นาที

ข้อแนะนำ:

- 1 หลอดของ CT conversion reagent ใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอ 10 ราย
- ห้ามโดนแสง
- เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 1 คีน, เก็บที่ 4 °C ได้ 1 สัปดาห์, เก็บที่ -20 °C ได้ 1 เดือน

การเตรียม M-wash buffer

- เติม absolute alcohol 24 ml ลงใน M-wash buffer 6 ml

ขั้นตอนของ DNA bisulfite

- เติม CT conversion reagent 130 μ l ลงใน ตัวอย่างดีเอ็นเอ 20 μ l ใน PCR tube ผสมโดย pipetting up and down และนำมาปั่นเหวี่ยง
- ตั้งโปรแกรม

98 °C 10 นาที

64 °C 2.5 ชั่วโมง

(เก็บสารที่ 4 °C ได้ไม่เกิน 20 ชั่วโมง)

- เติม M-Binding Buffer 600 μ l ลงบน Zymo-spin™ IC column และวาง column ลงใน Collection Tube
- ใส่ตัวอย่างลงบน Zymo-spin™ IC column ซึ่งประกอบด้วย M-Binding Buffer หลังจากนั้นปิดฝาและ กลับหลอดตัวอย่างไปมาหลายครั้ง
- ทำการปั่นตัวอย่าง ที่ความเร็ว ($\geq 10000 \times g$) 30 วินาที และ เททิ้งส่วนที่เป็นของเหลว
- เติม M-Wash Buffer 100 μ l ลงบน column และทำการปั่น 30 วินาที
- เติม M-desulphonation Buffer 200 μ l ลงบน column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที และปั่น 30 วินาที

- เติมน M-Wash Buffer 200 μ l ลงบน column และปั่น 30 วินาที
- เติมน M-Wash Buffer 200 μ l ลงบน column และปั่น 30 วินาที
- ใส่ column ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube เติมน M-Elution Buffer 10 μ l
- ทำการปั่น 30 วินาที เพื่อชะดีเอ็นเอลงสู่ microcentrifuge tube
ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

1. เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ตารางที่ 1. ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

ชื่อสาร	ปริมาตรต่อสาร 1 ตัวอย่าง (μ l)
Water	15.24
10x buffer	2
MgCl ₂	0.8
dNTPs	0.4
Primer F GSTP1	0.2
Primer R GSTP1	0.2
TaqGold	0.16
Total MasterMix volume	19
DNA template	1
Final volume	20

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้อ้างอิงลำดับเบสจากงานวิจัยของ Arai, T., et al. (2006) โดยมีลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 2. ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

Unmethylation GSTP1 forward primer	5'-GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT-3'
Unmethylation GSTP1 reverse primer	5'-CCACCCCAATACTAAATCACAACA-3'
Methylation GSTP1 forward primer	5'-TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC-3'
Methylation GSTP1 reverse primer	5'-GCCCCAATACTAAATCACGACG-3'

- นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง PCR Thermal Cycler ของบริษัท Applied Biosystem ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 3. อุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน		อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลาต่อรอบ (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Initiation step		95	7	1
PCR cycle	Denaturing step	95	1	40
	Annealing step	61	1	
	Extension step	72	1	
Final extension		72	7	1

3. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะถูกเก็บไว้ที่ 4 °C

ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis

การเตรียมสารละลายอะครีลาไมด์ที่ 8 % สำหรับเป็นวุ้นตัวกลางในการแยกสายดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (polyacrylamide gel electrophoresis) ดังนี้

ตารางที่ 4. ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นตัวกลาง

ชื่อสาร	ปริมาตรต่อเจล 1 แผ่น (μl)
Water	4500
5X Tris buffer	1500
40% Acrylamide-bis acrylamide	1500
10% APS	65
TEMED	6.5

- 1) นำดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอน PCR มาหยอดลงวุ้นอะครีลาไมด์ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่างต่อหนึ่งช่องหยอด
- 2) ใส่วุ้นอะครีลาไมด์ให้เคลื่อนโดยการเหนี่ยวนำของกระแสไฟฟ้าที่ขนาด 140 โวลท์, 23-25 แอมป์ (ต่อวุ้น 1 แผ่น) เป็นเวลา 70 นาที
- 3) นำวุ้นอะครีลาไมด์จากข้อ 2 ไปย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ Gelstar nucleic acid stain (Cambrex bioscience, USA) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต
- 4) นำวุ้นอะครีลาไมด์ไปถ่ายรูปดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น คือ 91 bp (methylation) และ 97 bp (unmethylation)

การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

- 1) นำสไลด์ที่ผ่านการอบแล้วไปย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยเครื่องย้อมอัตโนมัติ Ventana automated immunostainer จากบริษัท Ventana ประเทศสหรัฐอเมริกา (ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน) โดยใช้ antibody Anti-GSTP1 antibody produced in rabbit, Sigma, USA) ซึ่ง dilute กับ diluents (Dako, Denmark) ในอัตราส่วน 1:800 และใช้ชุด Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, USA) ในการตรวจสอบ antigen
- 2) นำสไลด์ที่ย้อมเสร็จแล้วไป จุ่ม ใน absolute alcohol 2 โถ และ xylene 2 โถ โถละ 10 ครั้ง จากนั้น mount สไลด์ด้วย permount แล้วปิดทับด้วย cover slide

** สำหรับการย้อม immunohistochemistry นั้น ใช้เนื้อเยื่อของมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็น positive control

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลลง data sheet

การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูล มีการใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลดังต่อไปนี้

- 1) แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถเช็คโดยการย้อมดีเอ็นเอ Gelstar nucleic acid stain (Cambrex bioscience, USA) แล้วดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูป
- 2) SPSS version 17.0 เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับคำนวณข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง GSTP1 methylation status กับการแสดงออกเป็นโปรตีนของ GSTP1 ใช้ chi-square test
- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง GSTP1 methylation status กับ clinicopathological parameter ใช้ Chi-square test

- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกเป็นโปรตีนของ GSTP1 กับ clinicopathological parameter ใช้ Chi-square test

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ก. ประชากรตัวอย่าง

ได้ศึกษาประชากรตัวอย่างทั้งสิ้นจากผู้ป่วย จำนวน 100 ราย อายุผู้ป่วยอยู่ระหว่าง 34-94 ปี อายุเฉลี่ย 58 ปี ผู้ป่วยเป็นเพศหญิงทั้งหมดตัวอย่างประกอบด้วย

ตัวอย่างเนื้อสดแช่แข็ง จำนวน 100 และ

ชิ้นเนื้อฝังในพาราฟิน จำนวน 100

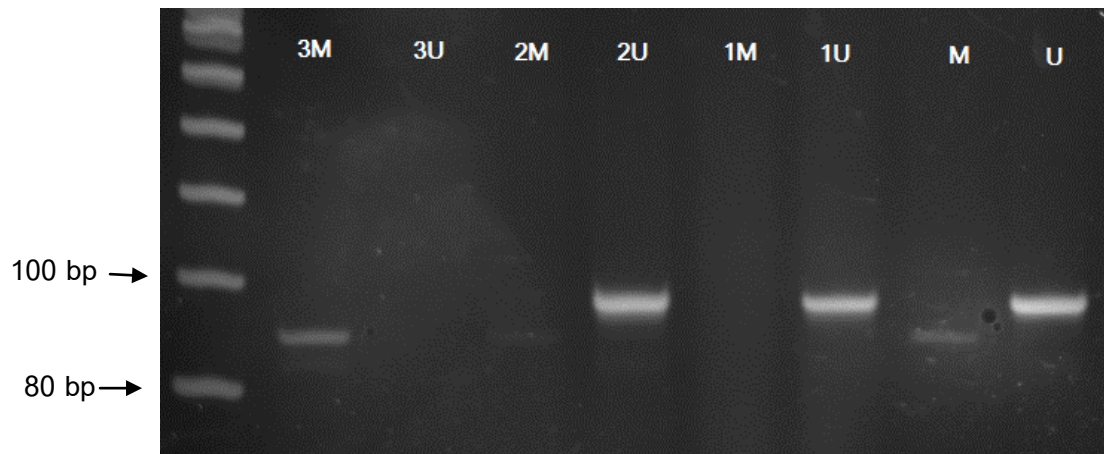
จากการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มี ชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก จำนวน 4 ราย มี เนื้อออกเป็นชนิด มะเร็งไม่ลุกลาม หรือ มีองค์ประกอบใหญ่เป็นชนิด มะเร็งไม่ลุกลาม จึงได้ตัด ออกจากการศึกษา (ตัวอย่างที่คัดออกแสดงผล เป็น unmethylation 3 ราย และเป็น methylation 1 ราย) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีประชากรตัวอย่างที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดลุกลาม จำนวน 96 ราย

ข. การศึกษาโดยวิธี MSP

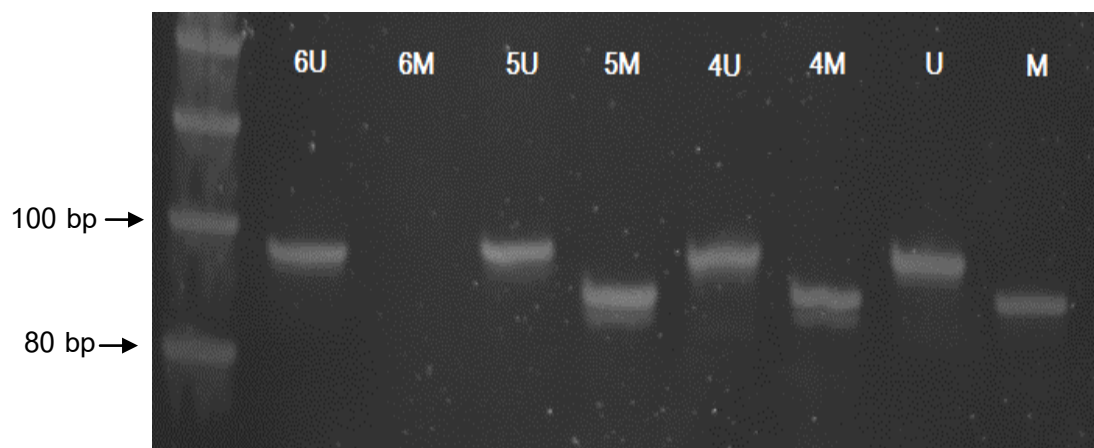
ผลการศึกษาในตัวอย่างทดลองทั้งหมด 96 ราย โดย MSP เป็นดังตารางที่ 5 โดยทั้ง 96 รายพบ band ของดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง unmethylation (97 bp) และหรือ methylation (91 bp) เมื่อให้ตัวอย่าง ผ่านเจลอะครีลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้า (polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE) พบ 88 ราย ที่มี band เดียว ที่ unmethylation (97 bp) หรือ methylation (91 bp) ดังรูปภาพที่ 11 และ พบ 8 ราย ที่มี band คู่ คือ ทั้ง unmethylation (97 bp) และ methylation (91 bp) ดังรูปภาพที่ 12

ตารางที่ 5. ตารางแสดง Methylation status ทั้งหมด 96 ราย

Methylation status	n	%
<i>GSTP1</i> methylated, single band	19	20
<i>GSTP1</i> unmethylated, single band	69	72
<i>GSTP1</i> methylated and unmethylated, double-band	8	8



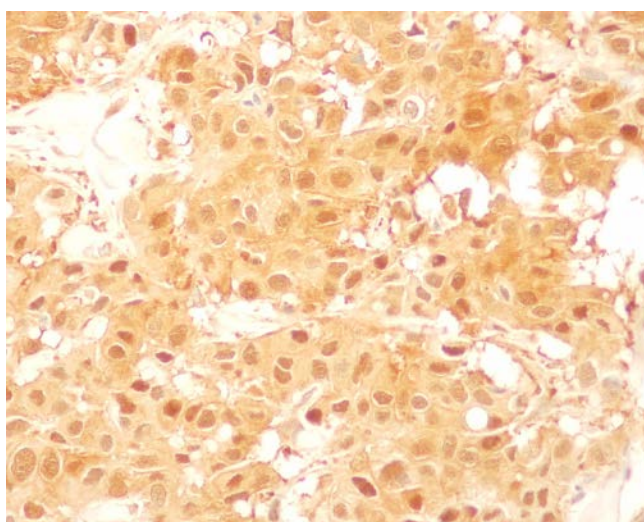
ภาพที่ 11. แสดง Methylation-specific PCR assay ของยีน *GSTP1* ในมะเร็งเต้านม 3 ราย แถบ U และ M แทน unmethylation (97 bp) และ methylation (91 bp) ตามลำดับ ตัวอย่าง 3M+3U มีแถบเดียวขึ้นที่ตำแหน่ง methylation (91 bp) ขณะที่ ตัวอย่าง 2M+2U และ 1M+1U มีแถบเดียวขึ้นที่ตำแหน่ง unmethylation (97 bp)



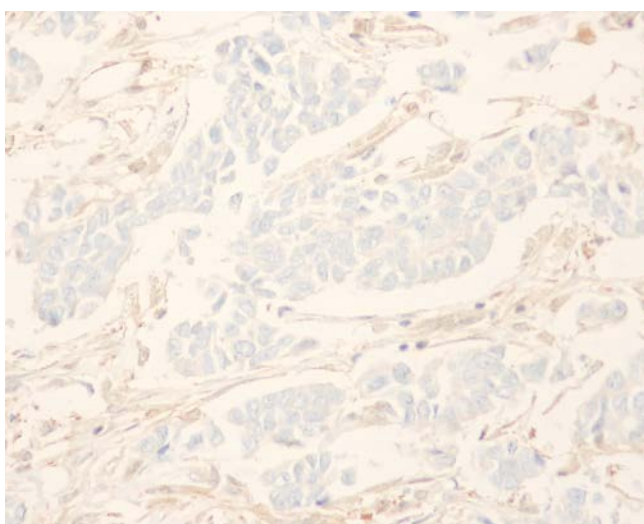
ภาพที่ 12. แสดง Methylation-specific PCR assay ของยีน *GSTP1* ในมะเร็งเต้านม 3 ราย แถบ U และ M แทน unmethylation (97 bp) และ methylation (91 bp) ตามลำดับ ตัวอย่าง 6U+6M มีแถบเดียวขึ้นที่ตำแหน่ง unmethylation (97 bp) ขณะที่ ตัวอย่าง 5U+5M และ 4U+4M มีแถบคู่ขึ้นที่ตำแหน่ง unmethylation (97 bp) และ methylation (91 bp)

ค. การศึกษาโดยวิธี IHC

ผลการศึกษาดังกล่าวที่มีมะเร็งเต้านมลุกลามทั้งหมด 96 ราย พบ positive 52 ราย และ negative 44 ราย การแปลผลเป็นบวก ใช้ดูการติดสีที่นิวเคลียส และหรือ ไซโตพลาสซึม มากกว่าร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็งลุกลาม ซึ่งเกือบทั้งหมดของผลบวกจะให้การติดสีที่สามารถแยกได้เด่นชัด พยาธิแพทย์สองคนอ่านผลแยกกัน มีความสอดคล้องของผลทั้งหมด การติดสีพบการติดสีที่เซลล์มะเร็งทั้งหมด (รูปภาพที่ 13) และตัวอย่างที่เป็นผลลบ เซลล์มะเร็งเกือบทั้งหมดไม่เกิดการติดสี (รูปภาพที่ 14)



ภาพที่ 13. แสดงถึงการติดสีของเซลล์มะเร็งทั้งหมด (กำลังขยายต้นฉบับ 400X)



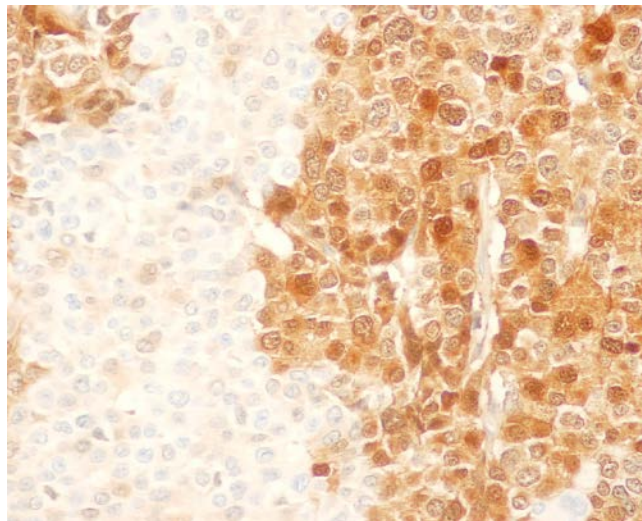
ภาพที่ 14. แสดงถึงการไม่ติดสีของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างผลลบ (กำลังขยายต้นฉบับ 400X)

ง. ความสัมพันธ์ของผลระหว่างวิธี MSP กับ IHC

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจปรากฏการณ์ที่เกิด double band signal ซึ่งมี 8 ราย จึงได้แยกออกมาวิเคราะห์แยกจากกลุ่มที่ให้ single band signal ซึ่งมี 88 ราย

ผลการศึกษากลุ่มที่ให้ double band signal กับการตรวจการติดสี IHC โดยละเอียด พบความสัมพันธ์กัน ของ ตัวอย่างทั้ง 8 ราย ดังนี้

- มีตัวอย่าง 4 ราย ที่พบเซลล์มะเร็งลูกกลม ทั้งติดสีและไม่ติดสี (Heterozygous factor) (รูปภาพที่ 15)
- มีตัวอย่าง 2 ราย ที่พบเซลล์มะเร็งลูกกลมไม่ติดสี แต่พบติดสีในเซลล์มะเร็งไม่ลูกกลมที่มีปนอยู่ (Contaminant factor from associated DCIS component)
- มีตัวอย่าง 2 ราย ที่พบเซลล์มะเร็งลูกกลมทั้งไม่ติดสีและติดสี แต่มีสัดส่วนของอันหนึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 (Minority factor)



ภาพที่ 15. แสดงเซลล์มะเร็งลูกกลมมีกลุ่มติดสีอยู่ติดกับกลุ่มไม่ติดสี (กำลังขยายต้นฉบับ 400X)

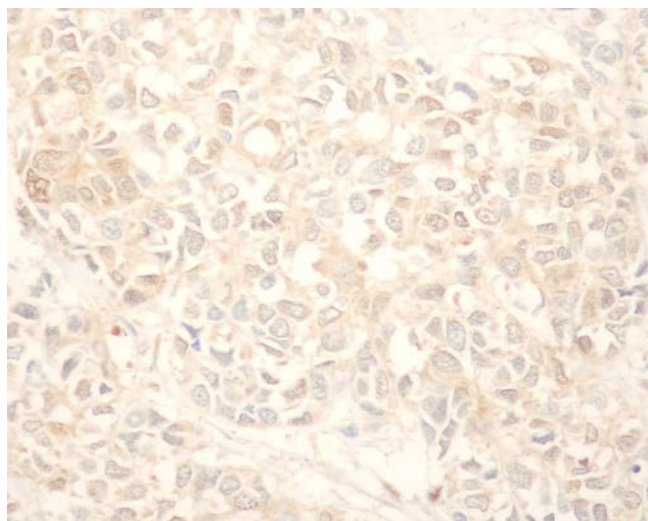
ผลการศึกษากลุ่มที่ให้ single band signal กับการดูการติดสี IHC ของมะเร็งลูกกลม โดยใช้ ร้อยละ 10 ของการติดสีเป็นเกณฑ์ตัดสิน (cut-off) พบความสัมพันธ์กัน ของ ตัวอย่างทั้ง 88 ราย ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6. ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Methylation status กับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน GSTP1

Methylation status	n	GSTP1 expression Negative (40)	GSTP1 expression Positive (48)	P
GSTP1 methylated	19	13	6	0.04*
GSTP1 unmethylated	69	27	42	

ผลจากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง Methylation status กับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน GSTP1 พบว่าเมื่อ GSTP1 methylated แล้วมีการแสดงออกของโปรตีนของยีน GSTP1 ให้ผลบวก (positive) มี 6 ราย ซึ่งการดูรายละเอียดของ IHC อีกครั้ง พบผลดังนี้

- พบ 5 ราย มีมะเร็งลูกกลมติดสีจางแต่ปริมาณติดสีมากกว่าร้อยละ 10 (รูปภาพที่ 16) บางรายติดสีจางกว่าสีที่ติดในเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่อยู่ใกล้เคียง
- พบ 1 ราย เป็นมะเร็งชนิด mucinous carcinoma และแสดงเซลล์ทั้งที่มีโปรตีนและไม่ มีโปรตีน แต่เซลล์ติดสีดูเด่นกว่า เซลล์มะเร็งที่ไม่แสดงโปรตีนถูกบดบังโดยสารโปรตีนที่มีจำนวนมาก



ภาพที่ 16. แสดงถึงการติดสีของเซลล์มะเร็ง บางตัว (กำลังขยายต้นฉบับ 400X)

จ. ความสัมพันธ์ของ MSP-defined Methylation status กับดัชนีต่างๆทางคลินิกและพยาธิวิทยา

การศึกษาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับ Methylation status ได้แสดงผลในตารางที่ 7 พบว่า มีเพียงปัจจัยเดียว คือ PR (ตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน) ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value 0.05

ตารางที่ 7. ตารางแสดงความสัมพันธ์ของผลระหว่าง Methylation status กับ clinicopathologic parameter

Clinicopathologic parameters	Number of patients	GSTP1 methylation (%)	GSTP1 unmethylation (%)	P
Total	88	19	69	
Tumor size				
≤ 2 cm	22	5 (26%)	17 (25%)	0.54
> 2 cm	66	14 (74%)	52 (75%)	

Grade				
I	14	3 (16%)	11 (16%)	0.95
II	27	6 (32%)	21 (30%)	
III	47	10 (52%)	37 (54%)	
ER				
negative	25	3 (16%)	22 (32%)	0.27
positive	63	16 (84%)	47 (68%)	
PR				
negative	38	4 (21%)	34 (49%)	0.05*
positive	50	15 (79%)	35 (51%)	
HER2 IHC-score				
Negative (score 0, 1)	52	13 (68%)	39 (56.5%)	0.64
Equivocal (score 2)	23	4 (21%)	19 (27.5%)	
Positive (score 3)	13	2 (11%)	11 (16%)	
P53 index				
Negative (<10%)	50	8 (42%)	42 (61%)	0.22
Positive (10% or more)	38	11 (58%)	27 (39%)	
Ki67 index				
Negative (<20%)	41	11 (58%)	30 (43%)	0.39
Positive (20% or more)	47	8 (42%)	39 (57%)	

Lymph node status				
negative	59	11 (58%)	48 (70%)	0.49
positive	29	8 (42%)	21 (30%)	

จ. ความสัมพันธ์ของผล IHC กับดัชนีต่างๆทางคลินิกและพยาธิวิทยา

การศึกษาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับ การแสดงออกของโปรตีน GSTP1 ได้แสดงผลในตารางที่ 8 พบว่า มีเพียงปัจจัยเดียว คือ ER (ตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน) ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value 0.001

ตารางที่ 8. ตารางแสดงความสัมพันธ์ของผลระหว่างการแสดงออกเป็นโปรตีนกับ clinicopathologic parameters

Clinicopathologic parameters	Number of patients	GSTP1 Negative (%)	GSTP1 Positive (%)	P
Total	88	40	48	
Tumor size				
≤ 2 cm	22	13 (32.5%)	9 (19%)	0.21
> 2 cm	66	27 (67.5%)	39 (81%)	
Grade				
I	14	6 (15%)	8 (17%)	0.21
II	27	16 (40%)	11 (23%)	
III	47	18 (45%)	29 (60%)	

ER				
negative	25	4 (10%)	21 (44%)	0.001*
positive	63	36 (90%)	27 (56%)	
PR				
negative	38	13 (32.5%)	25 (52%)	0.10
positive	50	27 (67.5%)	23 (48%)	
HER2 IHC-score				
Negative (score 0, 1)	52	25 (62.5%)	27 (56%)	0.71
Equivocal (score 2)	22	10 (25%)	12 (25%)	
Positive (score 3)	14	5 (12.5%)	9 (19%)	
P53 index				
Negative (<10%)	50	22 (55%)	28 (58%)	0.92
Positive (10% or more)	38	18 (45%)	20 (42%)	
Ki67 index				
Negative (<20%)	41	22 (55%)	19 (40%)	0.21
Positive (20% or more)	47	18 (45%)	29 (60%)	
Lymph node status				
negative	59	24 (60%)	35 (73%)	0.29
positive	29	16 (40%)	13 (27%)	

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศไทยและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในผู้หญิงพบมะเร็งเต้านมเป็นอันดับหนึ่ง [1] ปัจจุบัน เชื่อว่า สาเหตุของการเกิดมะเร็งมาจากปัจจัยทางยีนและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมร่วมกัน มียีนหลายตัวที่มีความเกี่ยวข้องกับ ยีน *GSTP1* เป็นยีนหนึ่งซึ่งมีรายงานว่าเมื่อเกิด hypermethylation ทำให้กระทบกับการแปลรหัสและส่งผลให้เกิดมะเร็งขึ้น ตัวอย่างที่พบบ่อยที่สุดคือ มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) ซึ่งมีอัตราการพบ *GSTP1* hypermethylation ถึงร้อยละ 90 สำหรับมะเร็งเต้านม มีรายงานพบ *GSTP1* hypermethylation อยู่ในช่วง 13-30% [34,35,36,37,38] ซึ่งจำนวนการศึกษายังมีน้อยและผลจากการศึกษายังไม่ชัดเจนเพียงพอ ส่วนใหญ่ของการศึกษามุ่งความสำคัญในการพยากรณ์โรค มีรายงานจากคณะนักวิจัยในญี่ปุ่นพบว่า *GSTP1* hypermethylation ในมะเร็งเต้านมโดยวิธี methylation specific PCR (MSP) มีความสัมพันธ์กับอัตราการมีชีวิที่ 5 ปีหลังการรักษา แต่ไม่มีความสำคัญในการพยากรณ์การตอบสนองของการใช้ยากลุ่ม taxane ตรงกันข้ามกับผลการแสดงออกเป็นโปรตีนโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry, IHC) พบว่าผลทางการแสดงออกโปรตีน *GSTP1* ไม่สัมพันธ์กับอัตราการมีชีวิที่ 5 ปีหลังการรักษา แต่มีความสำคัญบ่งชี้การตอบสนองการให้ยา กลุ่ม taxane ได้ ซึ่งในรายงานของคณะนักวิจัยกลุ่มนี้ พบร้อยละ 12 ของ hypermethylation มีการแสดงโปรตีนผลบวก [9] ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของความสัมพันธ์ที่ไม่เหมือนกันกับตัวชี้วัดในทางคลินิกได้ ผู้วิจัยมีความสนใจความไม่สอดคล้องของการที่พบ hypermethylation แต่พบโปรตีน *GSTP1* จึงได้ดำเนินการวิจัยที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ทำการทดลองโดยวิธี methylation specific PCR และ immunohistochemistry เพื่อศึกษาการมี methylation ที่ตำแหน่ง promoter ของยีนและการติดสีที่แสดงว่ามีโปรตีน ตามลำดับ ผลการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ พบร้อยละ 12.5 ของ hypermethylation มีการแสดงโปรตีนผลบวก ซึ่งเป็นตัวเลขเดียวกันกับการศึกษาของคณะญี่ปุ่นก่อนหน้านี้ การศึกษารายละเอียดโดยนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อม immunohistochemistry วิเคราะห์ร่วมกับลักษณะของมะเร็งใน 6 รายที่มีผล immunohistochemistry และ methylation band พบว่า ส่วนใหญ่เซลล์มะเร็งมีการติดสีจาง แต่มีสัดส่วนมากกว่าร้อยละ 10 ของมะเร็งทั้งหมดบนสไลด์ ในบางราย การติดสีจางสามารถเปรียบเทียบได้กับการติดสีของเซลล์ต่อมนมปกติที่อยู่ในบริเวณนั้นที่มีการติดสีที่เข้มกว่าชัดเจน มีตัวอย่าง 1 รายที่เป็นมะเร็งชนิดพิเศษ คือ mucinous carcinoma ที่เซลล์มะเร็งมีการแสดงโปรตีนและไม่แสดงโปรตีน แต่กลุ่มไม่แสดงโปรตีนถูกบดบัง

โดยสารเมือกที่มีปริมาณมาก ขณะเดียวกัน ผู้วิจัยพบว่า มีตัวอย่างราวร้อยละ 8 (จำนวนตัวอย่าง 8 ราย) มีผลแสดง hypermethylation เป็นสองแถบ คือ แถบของ methylation และ แถบของ unmethylation ซึ่งการศึกษาต่างๆก่อนหน้านี้ ได้มีรายงานเช่นกันแต่ไม่ได้กล่าวถึงรายละเอียด ผู้วิจัยจึงได้แยกการวิเคราะห์ผลของ 8 รายนี้ เพื่อศึกษาการแสดงโปรตีนร่วมกับลักษณะของเนื้อเยื่อมะเร็งในสไลด์พบว่า มีตัวอย่าง 4 รายที่เป็น heterozygous factor คือเซลล์มะเร็งมีสองจำพวก มีทั้งกลุ่มที่แสดงและไม่แสดงโปรตีนปนกัน มีตัวอย่าง 2 รายที่เป็น contaminant factor คือพบเซลล์มะเร็งไม่แสดงโปรตีนแต่มีกลุ่มเซลล์มะเร็งไม่ลุกลาม (DCIS) ที่แสดงโปรตีนปะปนในเนื้อเยื่อ และมีตัวอย่าง 2 ราย ที่พบการแสดงโปรตีนของมะเร็งมีสองจำพวกเช่นกัน แต่จำพวกหนึ่งมีน้อยกว่ามาก (น้อยกว่าร้อยละ 10) หรืออาจเรียกเป็น minority factor การอภิปรายผลการศึกษายกตามหัวข้อ จะได้กล่าวต่อไป ข้างล่างนี้

ประชากรตัวอย่าง

ได้ศึกษาประชากรตัวอย่างทั้งสิ้นจำนวน 100 ราย ผู้ป่วยเป็นหญิงทั้งหมดมีอายุเฉลี่ย 58 ปี เนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ เนื้อเยื่อสดที่เก็บแช่แข็งไว้ สำหรับใช้ศึกษาโดยวิธีการ MSP และเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงโดยฟอร์มาลินและฝังอยู่ในพาราฟิน สำหรับใช้ศึกษาโดย IHC ข้อจำกัดหนึ่งของการศึกษานี้คือ ไม่ได้มีการตรวจลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อแช่แข็งเหมือนของเนื้อเยื่อที่เก็บอยู่ในบล็อกพาราฟิน ทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่า เป็นเนื้อเยื่อของมะเร็งลุกลามทั้งหมดหรือไม่ เนื่องจากการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อที่อยู่ในบล็อกพาราฟินพบว่า มี 4 รายที่เนื้อเยื่อส่วนใหญ่หรือทั้งหมดเป็นมะเร็งระยะไม่ลุกลาม ดังนั้นจึงต้องคัด 4 รายนี้ออกไป

การคัดเลือกตัวอย่างในการศึกษานี้เป็นแบบสุ่ม ตามรายการมะเร็งเต้านมที่มีการเก็บเนื้อเยื่อแช่แข็งไว้ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา ตั้งแต่ปี 2549 จำนวน 100 ซึ่งคือใช้รายการทั้งหมดที่มีอยู่ การศึกษารายละเอียดของมะเร็งจากเวชระเบียนและการรายงานผลทางพยาธิวิทยาพบว่า มีความหลากหลายของขนาด เกรด การกระจายไปต่อมน้ำเหลือง และผล biomarkers เช่น ขนาดของก้อน ≤ 2 เซนติเมตร = 21 ราย และขนาดของก้อน > 2 เซนติเมตร = 67 ราย เป็นต้น

การศึกษาโดยวิธี MSP

MSP เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาการเกิด methylation เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมสำหรับการศึกษาและใช้กันทั่วไป [39] อย่างไรก็ตาม ยังมีวิธีการอื่นๆ อีก เช่น Real time PCR [40], Real

time Quantitative MSP [41] HPLC, DNA sequencing [39] เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการเลือกใช้วิธี MSP คือ ทำได้ง่าย, มี sensitivity และ specificity สูง ข้อเสียคือ ไม่สามารถตรวจสอบแบบ base by base และ resolution ที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ sequencing สำหรับ primer ได้เลือกใช้ primer ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ [9,10,42] ซึ่งพบว่ามีการศึกษาในมะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมาก คือจะใช้ primer 2 คู่ คือ methylation primer 1 คู่ และ unmethylation primer 1 คู่ ซึ่งการใช้ primer 2 คู่ ที่มีความ specific กับบริเวณการเกิด methylation และ unmethylation บน promoter การทดลองได้แยกออกเป็น 2 หลอด เพื่อลดความผิดพลาดในการจับระหว่าง primer กับ DNA ผลจากการศึกษา MSP ใน 1 รายควรจะให้ผลอย่างใดอย่างหนึ่งคือไม่ methylation ก็ unmethylation แต่มีส่วนหนึ่ง (8 ราย) ที่ขึ้น 2 band ซึ่งรายละเอียดของการวิเคราะห์ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น การทดสอบในการศึกษานี้ ผลของ MSP ขึ้นผลทุกรายเพราะได้ใช้เนื้อสด ซึ่งให้คุณภาพของสายดีเอ็นเอที่ดีมาก เมื่อเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ใน paraffin การศึกษา MSP ในเนื้อสดจะให้ผลดีกว่า [38]

การศึกษาโดยวิธี IHC

IHC เป็นวิธีที่ พยาธิแพทย์ มีความคุ้นเคยและนิยมใช้ในการวินิจฉัยโรค ผู้วิจัยได้สั่งซื้อ ชุด ย้อม จากบริษัท ซึ่งพบว่ามี 2 clone ของ GSTP1 ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ [43] การศึกษาค้นคว้าได้ เลือก clone ที่มีความเหมาะสมมากกว่าสำหรับมะเร็งเต้านม ในการประเมินผลบวกและผลลบ ใช้ เกณฑ์การติดสีมากกว่า 10% ของ tumor cell ทั้งติด cytoplasmic และหรือ nuclear stain ถือว่า positive เหมือนการศึกษาก่อนหน้านี้ [29] IHC เป็นวิธีการศึกษาที่เหมาะสมที่จะประเมินผลแบบ qualitative หรือ semi-quantitative นอกจากนี้ จุดเด่นของ IHC คือสามารถดูลักษณะของเซลล์ และเนื้อเยื่อพร้อมกันไป ในการศึกษานี้ พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 4 ราย ที่ส่วนใหญ่หรือทั้งหมดเป็น มะเร็งระยะไม่ลุกลาม ซึ่งได้คัดออกไป ขณะเดียวกัน ได้ใช้ในการศึกษารายละเอียดของตัวอย่าง 6 ราย ที่มี hypermethylation แต่การแสดงโปรตีนให้ผลบวก และ ตัวอย่างอีก 8 ราย ที่มี methylation และ unmethylation bands ซึ่งได้กล่าวละเอียดแล้วข้างต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างผลของ MSP และ IHC, MSP และ Clinicopathological parameter, IHC และ Clinicopathological parameter

การศึกษาค้นคว้าได้แยกวิเคราะห์กลุ่มที่ให้ 2 band ออกจากกลุ่มที่ให้ 1 band โดย MSP การวิเคราะห์ผล 2 band ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น สำหรับตัวอย่างมะเร็งเต้านมลุกลามที่มี 1 band ซึ่งมีทั้งหมด 88 ราย กับผลการแสดงออกเป็นโปรตีนได้ใช้วิเคราะห์โดย chi-square พบว่ามี

ความสัมพันธ์กันที่ p-value 0.04 แต่ก็พบว่าส่วนหนึ่งของการศึกษาไม่มีความสัมพันธ์กันคือเกิด methylation แล้วให้ผลลบและเกิด unmethylation แล้วให้ผลลบ ซึ่งการที่เกิด methylation แล้วให้ผลลบสามารถเกิดจากการที่มีการผลิตโปรตีนออกมาแต่โปรตีนนั้นไม่สามารถทำงานได้ หรืออาจผลิตในปริมาณที่ลดลง ซึ่งการวิเคราะห์ที่กล่าวไว้ข้างต้น สนับสนุนว่าน่าจะมีการสร้างที่ลดลง ส่วนที่เกิด unmethylation แล้วไม่มีโปรตีนสามารถอธิบายได้ เพราะการไม่มีผลแสดงโปรตีนของ เซลล์อาจเกิดจากกลไกอื่นๆ นอกจากการเกิด methylation เช่น Gene-gene Interaction และ Genetic polymorphisms gene deletions [44] เป็นต้น

การศึกษานี้ ไม่ได้วางแผนการศึกษาความสัมพันธ์กับตัวชี้วัดทางคลินิกที่สำคัญเหมือน การศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่า *GSTP1* methylation มีความเกี่ยวข้องกับการมีชีพที่ 5 ปีหลังการรักษา กล่าวคือ ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี methylation แยกจากกลุ่มที่เป็น unmethylation [9] และการแสดงออกเป็นโปรตีนของ *GSTP1* มีผลต่อการตอบสนองกับการใช้ยากลุ่ม Taxane [10] อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะดำเนินการศึกษาต่อในการใช้ประโยชน์ในทางคลินิก เมื่อได้ เข้าใจกระบวนการของเครื่องมือแล้ว การศึกษาคั้งนี้ ได้แสดงผลความสัมพันธ์กับตัวชี้วัดเบื้องต้น อันได้แก่ ขนาด เกรด การกระจายไปต่อมน้ำเหลือง และผล biomarkers ซึ่งผลการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่าง MSP กับ clinicopathological parameters และ IHC กับ clinicopathological parameters ไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน เนื่องจากไม่ได้วางแผนอย่างดี และได้ผลที่เทียบเคียงกับรายงานอื่นๆ ยังไม่ได้

ข้อเสนอแนะและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ของผลตรวจ *GSTP1* ระหว่างวิธี MSP กับ วิธี IHC ได้พบความไม่ สอดคล้องของการที่พบ hypermethylation แต่พบโปรตีน *GSTP1* ร้อยละ 12.5 การศึกษา รายละเอียด พบว่า ส่วนใหญ่เซลล์มะเร็งมีการติดสีจาง จึงอาจเป็นไปได้ว่า การเกิด hypermethylation ที่ตำแหน่ง promoter ทำให้การแสดงโปรตีนลดลง แต่ไม่หมด นอกจากนี้ พบ การแสดงแถบคู่ คือมี methylation และ unmethylation bands ในเนื้อเยื่อเดียวกันซึ่งพบราวร้อยละ 8 การศึกษารายละเอียด พบว่า อาจมีปัจจัยของ heterozygous, contaminant และ minority เกี่ยวข้อง ความเข้าใจในเหตุการณ์ทั้งสองนี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

ในส่วนของเทคนิค การตรวจหาเมทิลเลชั่น ควรมีการรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลำดับเบส บนดีเอ็นเอ ข้อมูลการแปลรหัสโปรตีน และข้อมูลเกี่ยวกับเมทิลเลชั่นของยีนนี้ให้ได้มากที่สุด เพื่อ ออกแบบไพรเมอร์ที่ครอบคลุมและเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต้องการศึกษามากที่สุด อีกทั้งการตรวจ

ลำดับเบสจะช่วยตอบคำถามที่ยังไม่เข้าใจเกี่ยวกับกลไกทางชีววิทยาได้ เพราะการเกิดเมทิลเลชั่นถือเป็นกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับลำดับเบส (Epigenetic mechanism) ในส่วนของการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ในระหว่างปฏิกิริยายังมีปัจจัยภายนอกมาเกี่ยวข้องมาก จึงถือเป็นเทคนิคที่ไม่แม่นยำมากพอ การตรวจโปรตีนโดยการตรวจปริมาณ messenger RNA ด้วยวิธี Reverse-transcription PCR จึงเป็นเทคนิคที่จะให้ความถูกต้องได้มากกว่า

โดยสรุป ผลจากการศึกษาระหว่าง hypermethylation ของ *GSTP1* โดย MSP และการแสดงออกเป็นโปรตีนของ *GSTP1* โดย IHC มีความสัมพันธ์กันที่ p -value 0.04 และอัตราการเกิด hypermethylation พบร้อยละ 28 อย่างไรก็ตามยังไม่ชัดเจนในปัญหาของวิธีการของ MSP จึงเสนอแนะว่าควรมีการพิสูจน์ โดยการใช้นเทคนิคอื่นมาทำการตรวจสอบด้วย (verify techniques)

รายการอ้างอิง

- [1] ชีรฤทธิ คุหะเปรมะ. วันมะเร็งโลก ปี 2554 มุ่งเน้นเรื่อง “มะเร็งป้องกันได้”. วารสารโรคมะเร็ง 31(2554) : 1-2.
- [2] Khuhaprema, T., et al., eds. Cancer in Thailand. vol. V. Bangkok, 2010.
- [3] Kumar, V., and Abbas, A.K. Neoplasia Robbins and Corran pathologic basic of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010.
- [4] Easton, D.W., Bishop, D.T., Ford, D., and Crockford, G.P. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: Result from 214 families. Am J Hum Genet. 52 (1993) : 678-701.
- [5] นวพรรณ จารุรักษ์. วิจัยกรของเซลล์และอณูชีววิทยาของการเกิดมะเร็ง. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.
- [6] Kang, D. Genetic polymorphisms and cancer susceptibility of breast cancer in Korean woman. J Biochem Mol Biol. 36 (2003) : 28-34.
- [7] Kim, Su., et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 and breast cancer risk. J Biochem Mol Biol. 37 (2004) : 582-85.
- [8] Vlaykova, T., Miteva, L., Gulubova, M., and Stanibra, S. Ile105Val GSTP1 polymorphism and susceptibility to colorectal carcinoma in Bulgarian population. Int J Colorectal Dis. 22 (2007) : 1209-15.
- [9] Arai, T., et al. Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. Breast Cancer Res Treat. 100 (2006) : 169-76.
- [10] Arai, T., et al. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. Eur J Surg Oncol. 34 (2008) : 734-38.
- [11] Esteller, M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 358 (2008) : 1148-59.
- [12] ภาณุวัฒน์ เลิศสิทธิชัย และคนอื่นๆ. ศัลยศาสตร์มะเร็งวิทยา: การรักษาตามแนวสหสาขาสำหรับโรคมะเร็งที่พบบ่อยทางศัลยกรรม. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพมหานคร, 2552.

- [13] Cho, H.J., Lee, S.Y., Ki, C.S., and Kim, J.W. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in the Korean population. J Korean Med Sci. 20 (2005) : 1089-92.
- [14] Gatedee, J., Pakakassama, S., Muangman, S., and Pongstaporn, W. Glutathione S-transferase P1 genotypes, genetic susceptibility and outcome of therapy in Thai childhood acute lymphoblastic leukemia. Asian Pac J Cancer Prev. 8 (2007) : 294-96.
- [15] Strange, R.C., and Spiteri, M.A. Ramachandran Sudarahan and Fryer Anthony A. Glutathione S-transferase family of enzyme. Mutation Research 482 (2001) : 21-26.
- [16] Lisbeth, E.K., Steffen, H.L., and Herman, A. Risk assessment: the importance of genetic polymorphism in man. Mutation Research 482 (2001) : 83-88.
- [17] แหล่งที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=2950
- [18] Abbas, A., et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. World J Gastroenterol. 10 (2004) : 3389-93.
- [19] Egan, K.M., et al. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 13 (2004) : 197-204.
- [20] Mao, G.E, et al. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer. Cancer Detect Prev. 28 (2004) : 368-74.
- [21] Unlü, A., Ates, N.A., and Tamer, L. Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. Cell Biochem Funct. 26 (2008) : 643-47.

- [22] Allan, J.M., Wild, C.P., and Rollinson, S. Polymorphism in Glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy – induced leukemia. PNAS. 98 (2001) : 11592-97.
- [23] Pongtheerat, T., Tretrisool, M., and Purisa, W. Glutathione S-transferase (GSTs) Polymorphism in breast cancer of Thai patients. Asian Pac J Cancer Prev. 10 (2009) : 127-32.
- [24] Chuang, C.K., et al. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma. Cancer Detect Prev. 31 (2007) : 59-63.
- [25] Chan, Q.K., et al. Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. J Mol Diagn. 7 (2005) : 8-16.
- [26] Zhanga, Y.J., et al. Silencing of glutathione S-transferase P1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. Cancer Letters 221 (2005) : 135–43.
- [27] Krassenstein, R., et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. Clin Cancer Res. 10 (2004) : 28-32.
- [28] O' Leary, T. Advanced diagnostic method in pathology: Principles, practice and protocols. J Clin Pathol : Mol Pathol. 56 (2003): 190.
- [29] Huang, J., Tan, P.H., Thiyagarajan, J., and Bay, B.H. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. Mod Pathol. 16 (2003) : 558-65.
- [30] Esteller, M., et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. Cancer Res. 58 (1998) : 4515-18.
- [31] Timothy, J., and O' Leary. Advanced diagnostic method in pathology: Principles, practice and protocols. Pennsylvania: Saunders, 2003.
- [32] Kumar, G.L., and Rudbeck, L. Immunohistochemical staining methods education guide. 5th ed. pp. 57-60. California: Dako North America, 2009.

- [33] Hsu, S.M., and Raine, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem. 29 (1981) : 1349-53.
- [34] Hoque, M.O., et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. J Clin Oncol. 24 (2006) : 4262-9.
- [35] Parrella, P., et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. Clin Cancer Res. 10 (2004) : 5349-54.
- [36] Lee, J.S. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. Virchows Arch. 450 (2007) : 637-42.
- [37] Esteller, M., et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. Human Mol Genet. 10 (2001) : 3001-7.
- [38] Pongtheerat, T., Pakdeethai, S., Purisa, W., Chariyalertsak, S., and Petmitr, S. Promoter Methylation and Genetic Polymorphism of Glutathione S-Transferase P1 Gene (GSTP1) in Thai Breast cancer Patients. Asian Pacific J Cancer Prev. 12 (2011) : 2731-4.
- [39] Fraga, M.F., and Esteller, M. DNA methylation: A profile of method and application. BioTechniques. 33 (2002) : 632-49.
- [40] Susan, E.C., et al. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucleic Acids Research 32 (2004) : 1-10.
- [41] Jeronimo, C., et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostate tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. Journal of the National Cancer Institute 93 (2001) : 1747-52.
- [42] Gonzalgo, M.L., et al. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimen. Clin Cancer Res. 9 (2003) : 2673-7.
- [43] แหล่งที่มา: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000084207/summary>
- [44] Hui, W.L., and Francis, A.O. Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. Current Opinion in Pharmacology 7 (2007) : 367-74.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 1X Tris/Borate/EDTA (TBE)

Distrill water	9	ลิตร
10X TBE	1	ลิตร

2. 5X Tris/Borate/EDTA (TBE)

Distrill water	8	ลิตร
10X TBE	2	ลิตร

3. Gel star® for nucleic acid stain

Distrill water	100	ไมโครลิตร
Gel star®	5	ไมโครลิตร

4. 75% ethanol

Absolute ethanol	75	มิลลิลิตร
Distilled water	25	มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายศุภฤทธิ ภัคดีไทย เกิดเมื่อวันที่ 7 พฤษภาคม พ.ศ. 2530 มีภูมิลำเนาอยู่ที่สุราษฎร์ธานี ประเทศไทย

ประวัติการศึกษา

- ปีพ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยม โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัยสุราษฎร์ธานี
- ปีพ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
- ปีพ.ศ. 2552 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาพยาธิวิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัย

- Pongthreerat, T., Pakdeethai, S., Purisa, W., Chariyalertsak, S., and Petmitr, S. Promoter Methylation and Genetic Polymorphism of Glutathione S- Transferase P1 Gene (GSTP1) in Thai Breast cancer Patients. Asian Pacific J Cancer Prev. 12 (2011) : 2731-4.