

ความชุกของการเกิด Hypermethylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อ BPH และ
ชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE PREVALENCE OF PROMOTER
HYPERMETHYLATION OF *PAQR3* GENE IN BPH AND PROSTATE CANCER TISSUES

Mr. Kowit Lounglaithong



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของการเกิด Hypermethylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> ในชิ้นเนื้อ BPH และชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก
โดย	นายโกวิท ลวงลายทอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานกุล)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่วงโชติ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. นายแพทย์ อาทิตย์ จินาวัฒน์)

โกวิทย์ ลวงลายทอง : ความชุกของการเกิด Hypermethylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อ BPH และชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก (THE PREVALENCE OF PROMOTER HYPERMETHYLATION OF *PAQR3* GENE IN BPH AND PROSTATE CANCER TISSUES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. พิเชฐ สัมปทานกุล, 59 หน้า.

ที่มาและปัญหา : การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* มีการพบในมะเร็งอวัยวะต่างๆและสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคทางคลินิกของผู้ป่วย แต่ยังไม่เคยมีรายงานในมะเร็งต่อมลูกหมาก

วัตถุประสงค์ : ศึกษาความชุกของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* ในชิ้นเนื้อ BPH และชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยวิธี Methylation-specific PCR และศึกษาความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

วิธีการทดลอง : ศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* ด้วยเทคนิค Methylation-specific PCR ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย BPH จำนวน 62 ราย และชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 92 ราย สุ่มเลือก 12 รายของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากศึกษาเปรียบเทียบผลตรงเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งกับเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง และศึกษาดัชนีพยากรณ์โรคต่างๆ ได้แก่ PSA, Gleason score, Surgical margin, Lymph node metastasis, Seminal vesicle invasion, Perineural invasion, Extraprostatic invasion, pT stage และ Biochemical recurrence ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและกลุ่มที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

ผลการทดลอง : พบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* ในชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก 68 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.9 และในชิ้นเนื้อ BPH 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 25.8 เนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากจำนวน 12 ราย ที่ศึกษาเปรียบเทียบเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง มี 6 รายจาก 7 ราย ที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเฉพาะตรงเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง การเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและกลุ่มที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน พบดัชนีเดียว มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.03$ คือ เซลล์มะเร็งลุกลามรอบเส้นประสาท

สรุปผลการทดลอง : การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* พบได้บ่อย โดยการเกิดมีความจำเพาะตรงตำแหน่งที่มีเซลล์มะเร็ง และอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยรอบเส้นประสาทที่มากขึ้นของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774006030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS:

KOWIT LOUNGLAITHONG: THE PREVALENCE OF PROMOTER HYPERMETHYLATION OF *PAQR3* GENE IN BPH AND PROSTATE CANCER TISSUES. ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON KEELAWAT, M.D., CO-ADVISOR: PROF. PICHET SAMPATANUKUL, M.D., 59 pp.

Background : DNA Methylation in promoter regions of *PAQR3* was found in various cancers and had correlation with clinical prognostications. However, study with prostate cancer was not inspected.

Objective : To investigate the prevalence of promoter methylation of *PAQR3* comparing between BPH and prostate cancer tissues by methylation-specific PCR method and to analyze the association of methylation of this gene with prognostication in cancer patients.

Material and methods : Microdissections on tissues embedded in paraffin blocks were made to investigate promoter methylation of *PAQR3* by methylation-specific PCR method. The studied samples included 62 BPH and 92 prostate cancer tissues. Of the latter, 12 blocks were specifically dissected at area with cancer cells and area without. Univariate testing for prognostic parameters - PSA, Gleason score, Surgical margin, Lymph node metastasis, Seminal vesicle invasion, Perineural invasion, Extraprostatic invasion, pT stage and Biochemical recurrence was performed between methylation group and unmethylation group of the cancer patients.

Results : The promoter methylation of *PAQR3* was observed in 68 (73.9%) prostate cancers and in 16 (25.8%) BPHs. Of the 12 prostate cancers, 6 out of 7 cases that with aberrant methylation was observed in areas of cancer cells only. The index of perineural invasion was the single parameter that correlated with promoter methylation in prostate cancer patients ($p=0.03$).

Conclusion : Promoter methylation of *PAQR3* was prevalent in prostate cancer and observed specifically in cancer cell areas. Its occurrence may correlate with perineural invasion.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของการศึกษาวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.นพ.พิเชฐ สัมปทานุกุล และ รศ. นพ.สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ เป็นอย่างยิ่ง ที่
อนุเคราะห์รับข้าพเจ้าเป็นศิษย์และถ่ายทอดความรู้ ช่วยเหลือ ดูแล และให้คำแนะนำต่างๆตลอด
การศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วิไล โอนมะศิริ ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ เตือนสติ
ให้กำลังใจ และมอบคำแนะนำที่เป็นพลังบวกให้กับข้าพเจ้า ในการฟันฝ่าอุปสรรคและมีกำลังใจใน
การเรียนรู้ หากไม่มีอาจารย์ในวันนั้นคงไม่มีศิษย์ในวันนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณของอาจารย์อย่าง
สุดซึ้ง

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.พญ.วิไล ชินธเนศ ศ.นพ.ชนพ ชวงโชติ ผศ.ดร.ศุภางค์ มณี
ศรี เลอกรองด์ และ ดร.นพ. อาทิตย์ จินาวัฒน์ เป็นอย่างยิ่งที่อนุเคราะห์ให้ความช่วยเหลือ และให้
คำแนะนำต่างๆตลอดการศึกษาที่ผ่านมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณของบิดา นายสำเร็จ ลวงลายทอง มารดานางระวี ลวงลาย
ทอง พี่สาว นางสาวนุกุลรัตน์ ลวงลายทอง ที่คอยให้กำลังใจและอยู่เคียงข้างตลอดระยะเวลาที่
ผ่านมา ขอบคุณพี่สาว นางหนึ่งฤทัย ลวงลายทอง ที่คอยให้คำปรึกษาและคอยเป็นห่วงเรื่อง
สุขภาพของน้องชายคนนี้ตลอดระยะเวลาที่เรายังมีชีวิตอยู่

ขอบคุณ คุณจักกรวิวงศ์ มาอัน คุณวรวิสา ดันติตลธเนศ และคุณอภิวัฒน์ ภูทองไชย ที่
เอื้อเฟื้อดูแล ช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และเป็นທີ່ปรึกษาให้แก่ข้าพเจ้าตลอดการศึกษา

ท้ายนี้ขอขอบคุณร่างกายและจิตใจของข้าพเจ้าที่สามารถต่อสู้และฟันฝ่าอุปสรรคต่างๆ
ได้อย่างสำเร็จ ขอบคุณจิตใจที่เข้มแข็งไม่ย่อท้อตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale).....	1
คำถามงานวิจัย (Research Questions).....	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research Objective)	2
สมมติฐานของงานวิจัย (Research hypothesis).....	2
กรอบแนวคิดในงานวิจัย (Conceptual Framework)	3
ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	4
คำสำคัญ (Key words)	4
ขั้นตอนของการวิจัย.....	5
ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitation)	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of study).....	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)	7
มะเร็งต่อมลูกหมาก	7
ยีนโปรเจสตินแอนนอดีโปกวีรีเซบเตอร์แฟมมิลี 3	10

ยีนโปรเจสทินแอนอติโพคิวรีเซบเตอร์แฟมมีลี 3 กับมะเร็ง.....	12
สภาวะเหนือพันธุกรรม	14
ดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	16
ดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก	16
เทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิคพีซีอาร์	17
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology).....	19
รูปแบบการวิจัย (Research design)	19
การเก็บตัวอย่าง (Sample collection).....	19
เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria).....	19
เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)	19
ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical consideration).....	20
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย	20
สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
วิธีวิจัย/วิธีดำเนินการวิจัย	22
1. ศึกษาการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3	22
2. การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อต่อมลูกหมาก	27
3. การทำปฏิกิริยา Bisulfite conversion	29
4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR).....	30
5. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)	31
วิธีการคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	31
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)	33
การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)	33
บทที่ 4	34

1. ศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> จากชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	34
ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	34
ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i>	35
2. ศึกษาเปรียบเทียบผลการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากระหว่างเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง.....	37
ผลการศึกษาหาตำแหน่งเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็งจากชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	37
ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> จากเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง	39
3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> กับผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	41
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> กับระดับ PSA ผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากก่อนผ่าตัด.....	42
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>PAQR3</i> กับระยะเวลาการกลับมาเกิดซ้ำของค่า PSA ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากหลังผ่าตัด.....	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	45
สรุปผลการวิจัย.....	45
อภิปรายผล.....	45
ข้อเสนอแนะ	48
รายการอ้างอิง	49
ภาคผนวก.....	56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ระดับค่า PSA ปกติในชายของแต่ละเชื้อชาติ.....	8
ตารางที่ 2 เกณฑ์การจำแนกผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	10
ตารางที่ 3 บทบาทและการแสดงออกของโปรตีน PAQR3 ในมะเร็งแต่ละชนิด	14
ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดของไพรมเมอร์	26
ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของสภาวะอุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	30
ตารางที่ 6 สรุปข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	34
ตารางที่ 7 ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 จากชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	36
ตารางที่ 8 ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 จากเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง	40
ตารางที่ 9 สรุปผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ระหว่างเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง	40

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดของ Gleason grade ของมะเร็งต่อมลูกหมาก	9
ภาพที่ 2 แสดงระยะของมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	9
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของโปรตีน PAQR	10
ภาพที่ 4 แสดงรายละเอียดสมาชิกของโปรตีน PAQR.....	11
ภาพที่ 5 แสดงการทำงานของโปรตีน PAQR3.....	12
ภาพที่ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์ DNMT	15
ภาพที่ 7 แสดงกลไกการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน	15
ภาพที่ 8 แสดงปฏิกิริยา Bisulfite conversion	18
ภาพที่ 9 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิค MSP.....	18
ภาพที่ 10 แสดงรายละเอียดข้อมูลสารสนเทศของยีน PAQR3.....	23
ภาพที่ 11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3	23
ภาพที่ 12 แสดงรายละเอียดโปรแกรม MethPrimer.....	24
ภาพที่ 13 แสดงบริเวณเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3	24
ภาพที่ 14 แสดง CpG sites ทั้งหมดบน CpG island 1 ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3.....	25
ภาพที่ 15 แสดงบริเวณไพรเมอร์ที่ครอบคลุมตำแหน่ง CpG sites บน CpG island 1.....	25
ภาพที่ 16 แสดงผลการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อ ผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก	35
ภาพที่ 17 แสดงบริเวณเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง	37
ภาพที่ 18 ลักษณะเซลล์จากเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง.....	38
ภาพที่ 19 แสดงตำแหน่งที่ตัดเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง	38
ภาพที่ 20 แสดงผลการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในเนื้อเยื่อที่มี เซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง	39

ภาพที่ 21 กราฟ Box plot แสดงความสัมพันธ์ของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระดับ PSA ก่อนรับการผ่าตัดของผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก..... 43

ภาพที่ 22 แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระยะเวลาของการกลับมาเกิดซ้ำของค่า BCR ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก.... 44



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
PAQR3	Progestin and adipoQ receptor family 3
RKTG	Raf kinase trapping to Golgi
MAPK	mitogen-activated protein kinase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
MSP	Methylation specific PCR
PCR	Polymerase chain reaction
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCa	Prostate cancer
BPH	Benign prostatic hyperplasia
PSA	Prostate-specific antigen
BCR	Biochemical recurrence
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
H&E	Hematoxylin&Eosin
UV	Ultraviolet
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
rpm	Revolutions per minute
ng	nanogram
μl	microgram
ml	milliliters
bp	Base pair

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale)

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์เกิดสูงเป็นอันดับสองและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ชายทั่วโลก⁽¹⁾ ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่มีรายงานว่า อายุที่สูงขึ้น เชื้อชาติ พันธุกรรมจากคนในครอบครัวเคยมีประวัติการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยง⁽²⁾ ปัจจุบันมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิด DNA methylation ที่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน⁽³⁾ และอาจนำไปสู่การก่อโรคมะเร็ง⁽⁴⁻⁷⁾ ปัจจุบันวิธีการรักษามะเร็งต่อมลูกหมากนั้นเป็นการรักษาด้วยการผ่าตัดออกทั้งต่อม⁽⁸⁾ หรือให้รังสีบำบัดแก่ผู้ป่วย⁽⁹⁾ แต่หลังจากการรักษาพบว่าผู้ป่วยมีข้อบ่งชี้ของการกลับมาเกิดซ้ำของโรค (biochemical recurrence) รวมทั้งมีผลทางคลินิกที่ไม่ดีภายในระยะเวลาเฉลี่ยที่ 10 ปี⁽¹⁰⁾ โดยข้อบ่งชี้ที่นิยมนำมาใช้ในการพยากรณ์เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก คือระดับการ แสดงออกของ Prostate-specific antigen (PSA) ในซีรัมผู้ป่วย แต่พบว่าข้อบ่งชี้นี้ยังขาดความแม่นยำและความจำเพาะต่อโรค⁽¹¹⁾ ดังนั้นจึงทำให้การรักษาและการพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมากนั้นทำได้ยาก

ปัจจุบันมีการศึกษาหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อใช้ศึกษาหาสาเหตุของการก่อโรครวมทั้งใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามการรักษาและการพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยตัวบ่งชี้ที่ได้รับ ความนิยมนำมาศึกษา คือ การเกิดสถานะเหนือพันธุกรรม อาทิ DNA methylation ซึ่งเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน การซ่อมแซมดีเอ็นเอ รวมทั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ กลไกการเกิด DNA methylation มักพบได้ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนหากเกิดกับยีนด้านมะเร็งพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อและดำเนินการของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽⁴⁾ และมีความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็ง⁽¹²⁻¹⁵⁾ ดังนั้นจึงทำให้กลไกการเกิด DNA methylation เป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักสำหรับการนำมาศึกษาถึงสาเหตุของการก่อโรคมะเร็งและนำมาพยากรณ์โรค แต่พบว่ายังมีข้อจำกัดและยังไม่สามารถนำมาใช้ในทางคลินิกได้

ยีนโปรเจสทินแอนอดิโพควิรีเซบเตอร์แฟมมีลี 3 หรือ PAQR3 เป็นยีนที่เพิ่งค้นพบและมี รายงานล่าสุดว่ามีบทบาทเป็นยีนด้านมะเร็ง โดยยีนนี้จะถอดรหัสเป็นโปรตีน PAQR3 โดยโปรตีนนี้จะจับกับโปรตีน Raf ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ควบคุมการเจริญ เพิ่มจำนวน การมีชีวิตรอด

และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จากกลไก Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway ส่งผลทำให้กลไกเหล่านี้ไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้⁽¹⁶⁾ ทั้งนี้โปรตีน PAQR3 มักมีการแสดงออกที่ลดลงในหลายชนิดมะเร็งรวมทั้งในมะเร็งต่อมลูกหมาก การลดลงของโปรตีนนี้ส่งผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากมากขึ้น⁽¹⁷⁾ และสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่ไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งบางชนิด⁽¹⁸⁻²⁰⁾ การแสดงออกที่ลดลงของยีนนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษา ก่อนได้รายงานว่า พบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็ง และสัมพันธ์กับการลดลงของโปรตีนและผลทางคลินิกของผู้ป่วย^(21, 22) แต่ในตัวอย่างมะเร็งต่อมลูกหมากยังไม่เคยมีรายงาน

ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะศึกษาหาความชุกของการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง PAQR3 ด้วยวิธี Methylation-specific PCR ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก และศึกษาความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกเพื่อประกอบใช้ในการตรวจติดตามและรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากต่อไป

คำถามงานวิจัย (Research Questions)

คำถามหลัก : ความชุกของการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อ BPH และชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมากเป็นเท่าใด ?

คำถามรอง : การเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากหรือไม่ ?

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research Objective)

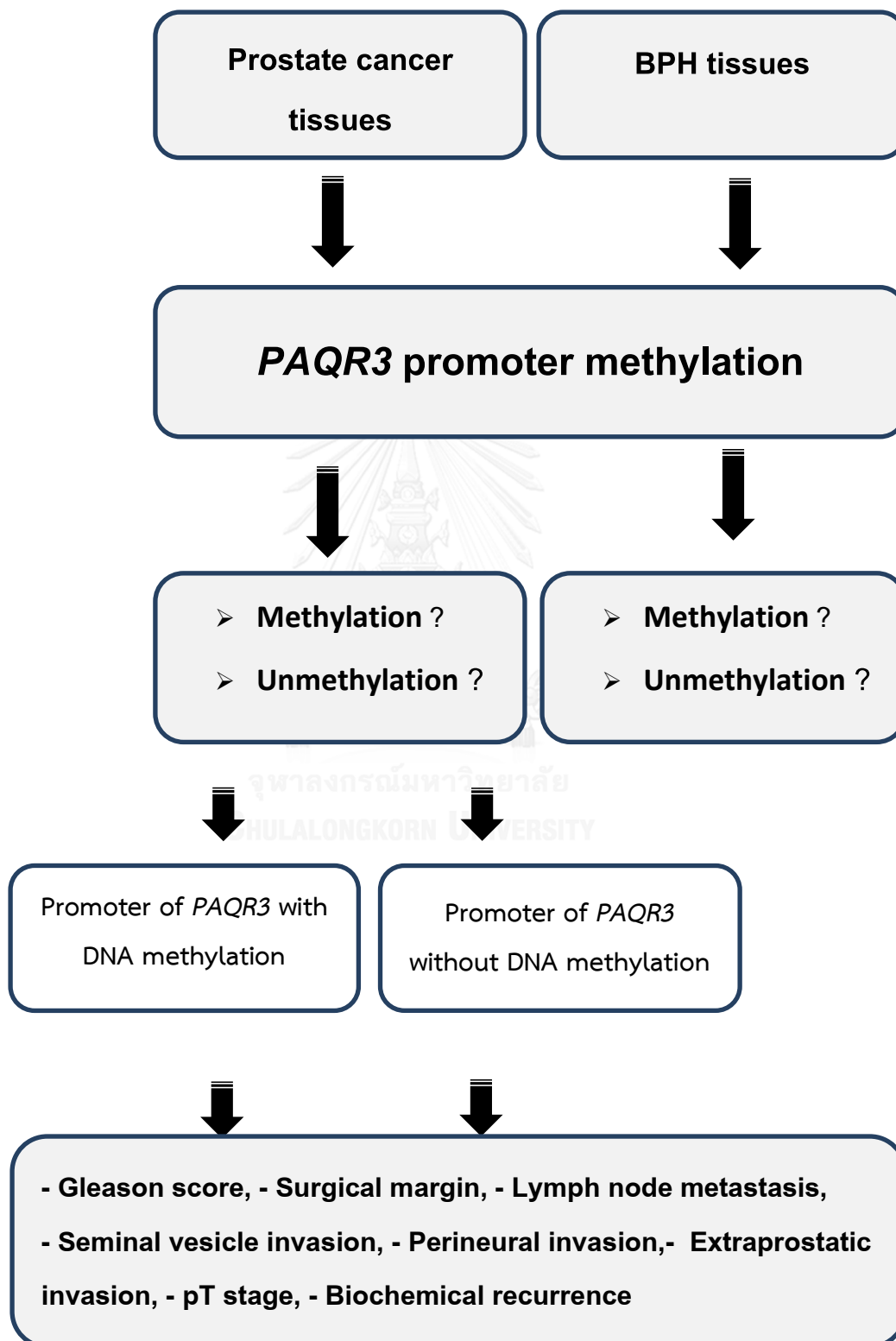
วัตถุประสงค์หลัก : เพื่อศึกษาหาความชุกของการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อ BPH และชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก ด้วยวิธี Methylation-specific PCR

วัตถุประสงค์รอง : เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 กับผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

สมมติฐานของงานวิจัย (Research hypothesis)

การเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมากมีมากกว่าในชิ้นเนื้อ BPH

กรอบแนวความคิดในงานวิจัย (Conceptual Framework)



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

8.1 ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากต้องได้รับการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ โดยอ้างอิงผลการตรวจลักษณะทางจุลพยาธิที่ผ่านการย้อมชิ้นเนื้อด้วย Hematoxylin & Eosin (H&E)

8.2 ประวัติและข้อมูลของผู้ป่วยทั้งหมดจะต้องถูกปิดเป็นความลับห้ามเผยแพร่

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

CpG island คือ บริเวณที่มีเบสคู่ของเบสไซโตซีน (C) และเบสกวานีน (G) อยู่ติดกัน ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ Phosphodiester bond (p) โดยบนสายดีเอ็นเอที่มี CpG อยู่มากกว่าบริเวณอื่นเรียกว่า CpG island ซึ่งมักพบที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน

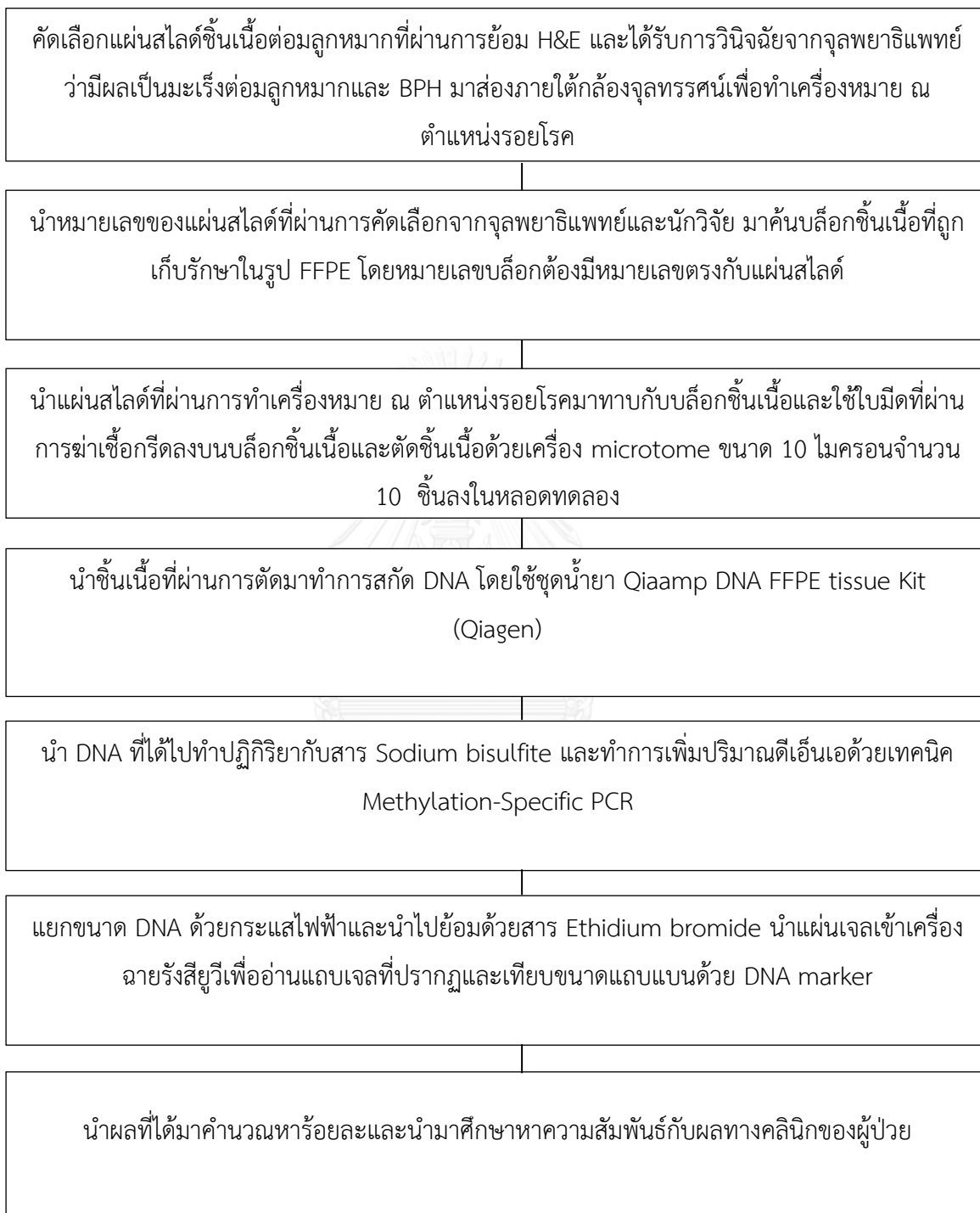
Methylation คือ ภาวะที่มีการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีนมากกว่าปกติ ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน

Benign prostatic hyperplasia (BPH) คือ ภาวะที่ต่อมลูกหมากมีขนาดใหญ่ผิดปกติ หรือเรียกว่า โรคต่อมลูกหมากโต

คำสำคัญ (Key words)

PAQR3, MSP, methylation, partial methylation, BPH, prostate cancer

ขั้นตอนของการวิจัย



ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitation)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาสกัด DNA เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการรักษาสภาพด้วยฟอร์มาลินและถูกตรึงในพาราฟิน และมีอายุของการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างด้วยวิธีนี้ยากต่อการควบคุม ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพและระดับปริมาณของ DNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of study)

1. ทราบถึงความชุกของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อ BPH และชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก และระหว่างเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง
2. ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก
3. สามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับนำมาศึกษาต่อไปในอนาคต ถึงความสำคัญของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก และอาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิเคราะห์ผลเพื่อนำมาประกอบใช้เป็น Biomarker และเป็นแนวทางในการประเมินผลการรักษา ตลอดจนทั้งนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมากในอนาคต

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

มะเร็งต่อมลูกหมาก

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์เกิดที่สูงเป็นอันดับสอง และเป็นอีกสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ชายทั่วโลก⁽¹⁾ ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคมะเร็ง แต่มีรายงานว่า อายุที่สูงขึ้น, เชื้อชาติ, พันธุกรรมจากคนในครอบครัวเคยมีประวัติการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก, การอักเสบ รวมถึงอาหารและความอ้วน ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²⁾ ถึงอย่างไรก็ตามพบว่าร้อยละ 42 ของการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม⁽²⁾ ปัจจุบันวิธีการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมากนั้นเป็นการรักษาด้วยการผ่าตัดออกทั้งต่อม⁽⁸⁾ หรือเป็นการให้รังสีบำบัดแก่ผู้ป่วย⁽⁹⁾ แต่หลังจากการรักษาพบว่าผู้ป่วยมีข้อบ่งชี้ของการกลับมาเกิดซ้ำของโรค รวมทั้งมีผลทางคลินิกที่ไม่ดีภายในระยะเวลาเฉลี่ยที่ 10 ปี⁽¹⁰⁾ ดังนั้นการหา biomarker ที่มีความถูกต้องและแม่นยำต่อการนำมาวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมากจึงมีความสำคัญ โดย biomarker ที่เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้วินิจฉัยและพยากรณ์การกลับมาเกิดซ้ำของโรค ได้แก่

- Prostate-specific antigen (PSA)

PSA เป็น androgen-regulated serine protease ที่สร้างจาก prostate epithelium โดยระดับการแสดงออกของ PSA ใน serum เป็นเกณฑ์ที่ดีที่สุดในการนำมาใช้วินิจฉัยรวมทั้งพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมากในปัจจุบัน โดยในเพศชายปกติจะมีการแสดงออกของ PSA ที่ค่อนข้างต่ำ แต่สามารถเพิ่มขึ้นได้ในกรณีที่เกิดการอักเสบหรือมีภาวะของ BPH หรือเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยค่ามาตรฐานของการแสดงออกของ PSA ใน serum ที่ยอมรับได้คือต้องไม่เกิน 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในเพศชายปกติ และหากมากกว่าหมายถึงมีความเสี่ยงที่จะได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก Ankerst DP และคณะ ในปี 2006⁽¹¹⁾ ได้รายงานว่าการใช้ระดับ PSA ใน serum มาเป็นเกณฑ์มาตรฐานในการวินิจฉัยนั้นพบว่ามี sensitivity ต่อโรคที่ค่อนข้างน้อย โดยพบว่ามีค่าความถูกต้องในการนำมาวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากเพียงร้อยละ 20.5 เท่านั้น ในขณะที่ร้อยละ 80 พบว่าไม่สามารถใช้เกณฑ์ดังกล่าวในการนำมาวินิจฉัยผู้ป่วยได้ นอกจากนี้เกณฑ์ดังกล่าวยังมีความ specificity ต่อโรคที่ค่อนข้างต่ำกล่าวคือ ในร้อยละ 93.6 ของผู้ที่ถูกสงสัยว่าเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก

ปรากฏว่าไม่เป็น ให้ผลเป็น False positive แต่ในขณะที่เดียวกันผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากบางรายจะไม่มีอาการหลัง PSA ออกมาใน serum แต่กลับพบว่าผู้ป่วยนั้นมีการแสดงออกของมะเร็งต่อมลูกหมากในระยะเริ่มต้น และมักมีผลทางพยาธิของเซลล์มะเร็งที่ไม่ดี⁽¹¹⁾ โดยค่าของ PSA ใน serum ยังสามารถใช้พยากรณ์การกลับมาเกิดซ้ำของโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้ โดยหลังการผ่าตัดหากพบว่าผู้ป่วยมีระดับของ PSA เท่ากับหรือมากกว่า 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หมายถึงผู้ป่วยมีความเสี่ยงของการกลับมาเกิดซ้ำของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²³⁾ แต่ถึงอย่างไรก็ตามค่า PSA ยังมีข้อจำกัดและยังขาดความแม่นยำต่อโรค จึงทำให้ยังไม่เพียงพอสำหรับนำมาวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

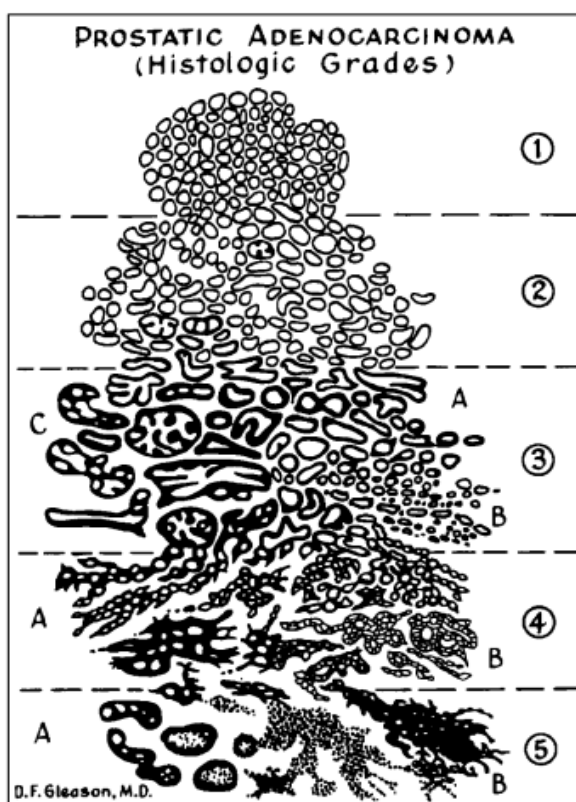
ตารางที่ 1 ระดับค่า PSA ปกติในชายของแต่ละเชื้อชาติ

AGE-SPECIFIC REFERENCE RANGES FOR SERUM PSA			
Age Range (years)	Asian Americans	African Americans	Caucasians
40 to 49	0 to 2.0 ng/mL	0 to 2.0 ng/mL	0 to 2.5 ng/mL
50 to 59	0 to 3.0 ng/mL	0 to 4.0 ng/mL	0 to 3.5 ng/mL
60 to 69	0 to 4.0 ng/mL	0 to 4.5 ng/mL	0 to 4.5 ng/mL
70 to 79	0 to 5.0 ng/mL	0 to 5.5 ng/mL	0 to 6.5 ng/mL

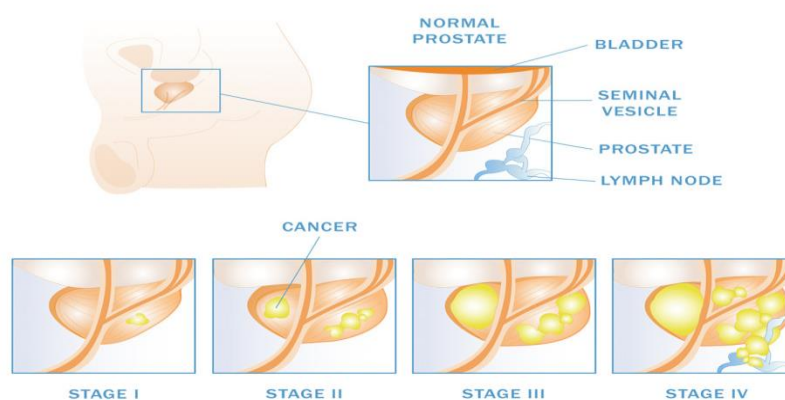
ที่มา : <http://sperlingprostatecenter.com/prostate-cancer-detection/>

- Grading

Gleason grade เป็นหนึ่งในข้อมูลสำหรับนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยค่า grading system จะประเมินจากผลการตรวจทางพยาธิจากชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมด้วย H&E โดยมีเกณฑ์ประเมินจาก Gleason grade 1 ถึง Gleason grade 5 โดยนำค่า Gleason grade ที่พบมากที่สุดรวมกับค่า Gleason grade ที่พบเป็นอันดับสอง โดยรายงานเป็นค่า Gleason score ซึ่งมีค่ารวมกันตั้งแต่ 2 ถึง 10 โดยพบว่า Gleason score ที่มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับผลทางพยาธิคลินิกที่ไม่ดีในผู้ป่วย เช่น tumor size, margin status และ pathologic stage เป็นต้น Gleason grade ยังอาจสัมพันธ์กับค่า clinical stage, progression to metastatic disease, and survival⁽²⁴⁾



ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดของ Gleason grade ของมะเร็งต่อมลูกหมาก



ภาพที่ 2 แสดงระยะของมะเร็งต่อมลูกหมาก

ที่มา : <https://comprehensive-urology.com/how-prostate-cancer-diagnosed/>

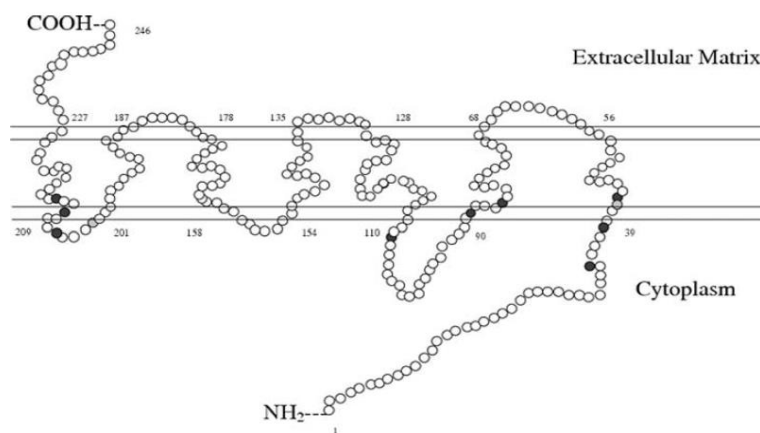
ตารางที่ 2 เกณฑ์การจำแนกผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS ⁶					
Group	T	N	M	PSA	Gleason
I	T1a–c	N0	M0	PSA <10	Gleason ≤6
	T2a	N0	M0	PSA <10	Gleason ≤6
	T1–2a	N0	M0	PSA X	Gleason X
IIA	T1a–c	N0	M0	PSA <20	Gleason 7
	T1a–c	N0	M0	PSA ≥10<20	Gleason ≤6
	T2a	N0	M0	PSA ≥10<20	Gleason ≤6
	T2a	N0	M0	PSA <20	Gleason 7
	T2b	N0	M0	PSA <20	Gleason ≤7
IIB	T2b	N0	M0	PSA X	Gleason X
	T2c	N0	M0	Any PSA	Any Gleason
	T1–2	N0	M0	PSA ≥20	Any Gleason
III	T1–2	N0	M0	Any PSA	Gleason ≥8
	T3a–b	N0	M0	Any PSA	Any Gleason
IV	T4	N0	M0	Any PSA	Any Gleason
	Any T	N1	M0	Any PSA	Any Gleason
	Any T	Any N	M1	Any PSA	Any Gleason

ที่มา : <https://cancerstaging.org>

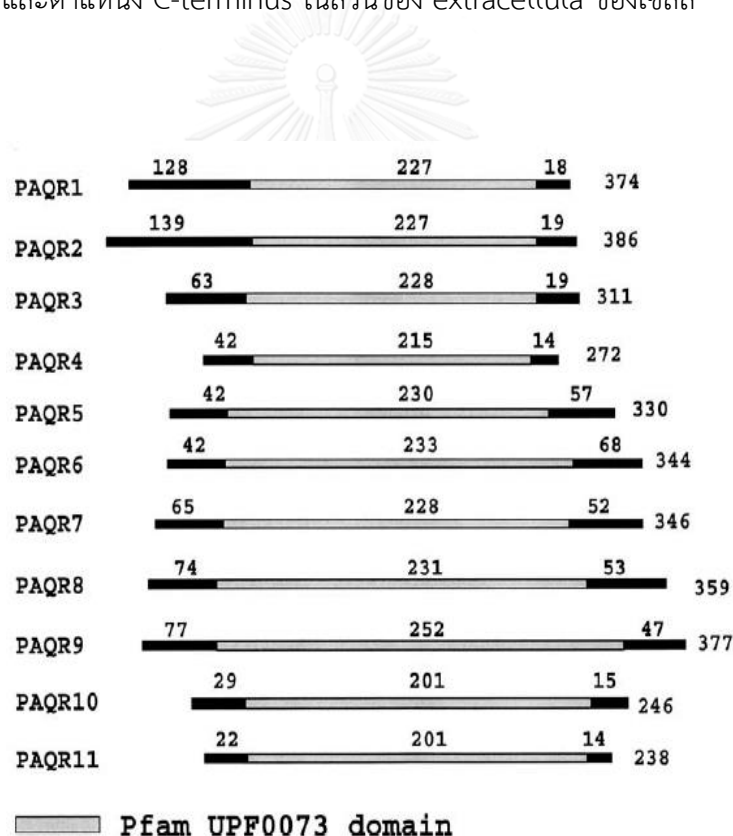
ยีนโปรเจสตินแอนอดิโพควีรีเซบเตอร์แฟมมีลี 3

โปรเจสตินแอนอดิโพควีรีเซบเตอร์ (Progesterin and adipoQ receptor) หรือ PAQR ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ 2005 โดย Tang YT และคณะ⁽²⁵⁾ โปตีนกลุ่มนี้มีโครงสร้างบางส่วนขดตัวไปมาแทรกอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane proteins) มีลักษณะโครงสร้างเป็น 7 Transmembrane (7TM) หรือเรียกว่า PFAM motif (UPF0073 domain) โดยสามารถพบโปรตีนเหล่านี้ได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น แบคทีเรีย (Eubacteria), หนอนตัวกลม (Caenorhabditis elegans) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) เป็นต้น



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของโปรตีน PAQR

สมาชิกของโปรตีนกลุ่มนี้ในจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบถึง 11 สมาชิก โดยมีชื่อเรียกตั้งแต่โปรตีน PAQR1 ถึงโปรตีน PAQR11⁽²⁵⁾ โดยพบว่าในแต่ละสมาชิกนั้นมีโครงสร้างคล้ายกัน แต่มีขนาดและหน้าที่ที่แตกต่างกัน อาทิ PAQR1 และ PAQR2 (or AdipoR1 and AdipoR2) มีบทบาทเป็น receptors ของ adiponectin และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolism ของกลูโคส⁽²⁶⁾ PAQR5, PAQR7 และ PAQR8 ทำหน้าที่เป็น receptors ของ progestin^(27, 28) และ PAQR10 เป็น receptor ของสารในกลุ่ม steroid⁽²⁹⁾ ส่วนโปรตีน PAQR3 นั้นถูกสร้างจากยีน PAQR3 ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ตำแหน่ง q21.21 ประกอบด้วย 13 exon มีความยาวประมาณ 52204 คู่เบส โปรตีน PAQR3 เป็นโปรตีนที่พบที่เยื่อหุ้ม Golgi apparatus โดยมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า Raf kinase trapping to Golgi หรือ RKTG ซึ่งประกอบไปด้วยตำแหน่ง N-terminus ในส่วนของ intracellular หรือ cytosolic และตำแหน่ง C-terminus ในส่วนของ extracellular ของเซลล์⁽³⁰⁾



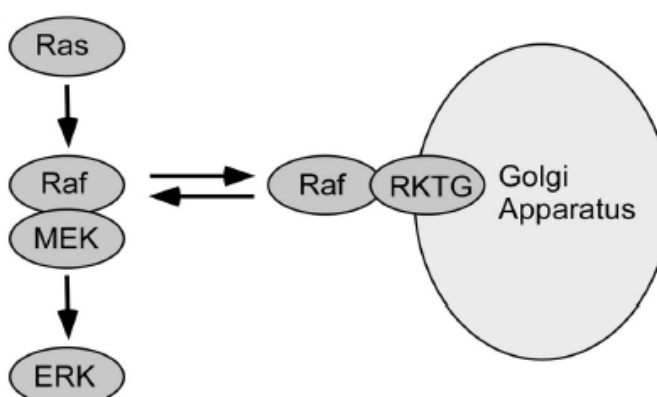
ภาพที่ 4 แสดงรายละเอียดสมาชิกของโปรตีน PAQR

บทบาทการทำงานของโปรตีน PAQR3

การทำงานของโปรตีน PAQR3 พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกที่สำคัญหลายอย่างภายในเซลล์ เช่น การรักษาภาวะสมดุลของระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol homeostasis) ในตับ โดยพบว่าโปรตีน PAQR3 สามารถเข้าจับกับ transcription factors คือ sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) และโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ SREBP cleavage-activating protein (Scap) เกิดเป็นสารประกอบ Scap/SREBP complex และหลั่งสาร peptide ออกมาเพื่อยับยั้งการทำงานของ SREBP ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการลดระดับการสร้างคอเลสเตอรอลได้ (cholesterol biosynthesis)⁽³¹⁾ โดยผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang L และคณะในปี 2013⁽³²⁾ และนอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีน PAQR3 ยังมีบทบาทเป็นตัวกลางในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในเซลล์ โดยจะอาศัยการทำงานร่วมกับยีน nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) ในการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระ⁽³³⁾

ยีนโปรเจสทินแอนอติโพอคิวิรีเซบเตอร์แฟมมีลี 3 กับมะเร็ง

การแสดงออกของยีน PAQR3 นั้นมีบทบาทที่สำคัญต่อการกวดการเจริญของเซลล์มะเร็งเป็นอย่างมาก โดยโปรตีน PAQR3 จะเข้าไปควบคุมกลไกการทำงานของตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านทางกลไก Ras/Raf/MEK/ERK signaling cascade⁽¹⁶⁾ ซึ่งกลไกดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญ, การเพิ่มจำนวน (proliferation), การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (cell differentiation), การรอดชีวิต และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง⁽³⁴⁾



ภาพที่ 5 แสดงการทำงานของโปรตีน PAQR3

ยีน *PAQR3* มักแสดงบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็งในหลายชนิด เริ่มจากการศึกษาของ Wang X และคณะในปี ค.ศ. 2012⁽¹⁸⁾ ที่ได้ทำการศึกษายาทบทนาการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* กับ การเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในหนูทดลอง โดยเปรียบเทียบหนู 2 กลุ่ม คือกลุ่มหนูที่ขาดการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* และกลุ่มหนูที่มีการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* โดยผลจากการทดลองพบว่า ในกลุ่มหนูที่ขาดการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้มีการแพร่กระจายที่มากขึ้น และเซลล์มักแสดงลักษณะที่ไม่ดี (aggravated) ทั้งยังพบว่าหนูในกลุ่มนี้มีช่วงชีวิตที่สั้นกว่าเมื่อเทียบกับ หนูกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทางคณะวิจัยจึงได้สรุป การศึกษาว่า การแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* สามารถยับยั้งการเจริญและการเพิ่มจำนวนของ เซลล์มะเร็งลำไส้ได้⁽¹⁸⁾ ต่อมาในปี 2014 Wu HG และคณะ⁽²⁰⁾ ได้ศึกษายาทบทนาการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* ในเซลล์มะเร็งตับพบว่า การเพิ่มขึ้นของโปรตีน *PAQR3* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการฟอรั่ม ตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep3B cell ได้ โดยในทางกลับกันเมื่อทำการหยุดการแสดงออกของ โปรตีน *PAQR3* พบว่า เซลล์มะเร็งตับมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁰⁾ สอดคล้องกับ การศึกษาของ Wu Q และคณะ ในปี 2016⁽³⁵⁾ ที่รายงานว่า การแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนรวมทั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งกล่องเสียงได้⁽³⁵⁾ โดยนอกจาก บทบาทของการเป็นยีนกดการเจริญของเซลล์มะเร็งดังที่กล่าวมาแล้ว ยังพบอีกว่าการแสดงออกของ โปรตีน *PAQR3* ยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งได้ โดยโปรตีน *PAQR3* เข้าไปควบคุมโปรตีน twist family bHLH transcription factor 1 หรือ Twist1 ให้ไม่ สามารถทำงานได้ โดยโปรตีน Twist1 นั้นเป็น transcription factor ของ epithelial-mesenchymal transition ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การเพิ่มขึ้นของโปรตีน *PAQR3* มีผลทำให้โปรตีน Twist1 ลดลงทำให้ลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้⁽³⁶⁾ นอกจากนั้นการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เต้านมชนิด MCF-7 cells ได้⁽²¹⁾

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีน *PAQR3* สามารถกดการเจริญและการเพิ่มจำนวน และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ จาก การรายงานของ Huang W และคณะในปี 2016⁽¹⁷⁾ ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* ทั้ง ในเซลล์ (in vitro) และสัตว์ทดลอง (in vivo) โดยทางคณะได้รายงานว่า ในส่วนของเซลล์มะเร็งต่อม ลูกหมากพบว่าการแสดงออกของโปรตีน *PAQR3* นั้นสามารถยับยั้งการเจริญ การเพิ่มจำนวน และ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และ DU145 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ขาดการแสดงออกโปรตีนนี้ นอกจากนั้นยังพบว่าในกลุ่ม เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ผ่านการนี้กดดาวน์ (knockdown) ยีน *PAQR3* ออกจากเซลล์ พบว่า เซลล์มะเร็งมีการเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาในหนูทดลอง ที่

พบว่าการแสดงออกของโปรตีนนี้ สามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ ซึ่งทางคณะได้อธิบายว่าในกลุ่มหนูทดลองที่มีการแสดงออกของโปรตีน PAQR3 พบว่าขนาดของก้อนเนื้อมะเร็งมีขนาดเล็ก แต่ในขณะที่กลุ่มหนูทดลองที่ขาดการแสดงออกของโปรตีนนี้ก้อนเนื้อมะเร็งมีขนาดโตกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹⁷⁾ จากความสอดคล้องของรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของโปรตีน PAQR3 มีบทบาทที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการเจริญในหลายชนิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนและ mRNA ของยีน PAQR3 มักมีการแสดงออกที่ลดลงในหลายชนิดมะเร็ง^(17, 18, 20, 21, 35, 36) และมักพบว่าผู้ป่วยที่ขาดการแสดงออกของโปรตีนนี้มีความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่ไม่ดี⁽¹⁸⁻²¹⁾

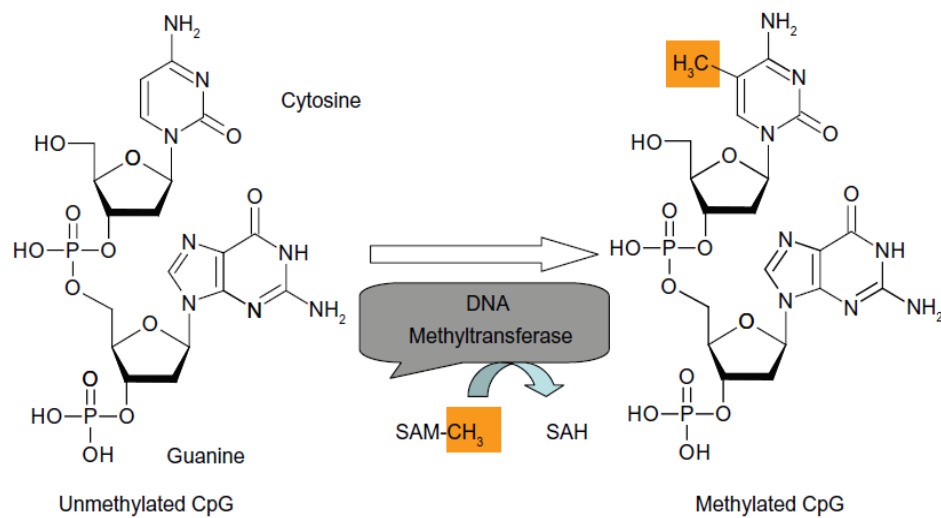
ตารางที่ 3 บทบาทและการแสดงออกของโปรตีน PAQR3 ในมะเร็งแต่ละชนิด

Cancer type	Expression	Role/Function	References
Colorectal cancers	Decreased	Tumor suppressor	(18)
Hepatocellular carcinoma	Decreased	Tumor suppressor	(20)
Laryngeal squamous cell carcinoma	Decreased	Tumor suppressor	(35)
Gastric cancer	Decreased	Tumor suppressor	(19)
Breast cancer	Decreased	Tumor suppressor	(21)
Prostate cancer	Decreased	Tumor suppressor	(17)
Renal cell carcinomas	Decreased	Tumor suppressor	(30)
Osteosarcoma	Decreased	Tumor suppressor	(37)

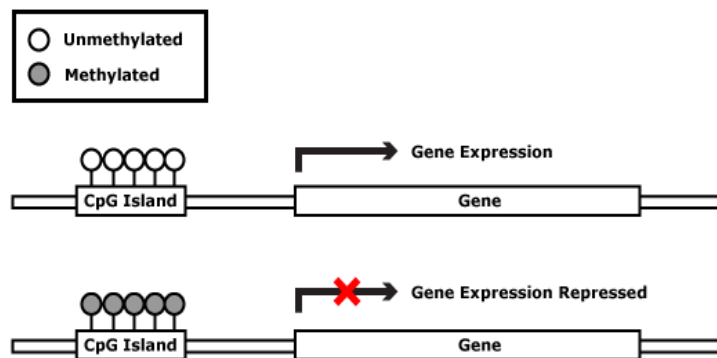
สภาวะเหนือพันธุกรรม

สภาวะเหนือพันธุกรรมหรือ (Epigenetics) เป็นกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) มีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการทำงานของเซลล์ เช่น การพัฒนาตัวอ่อน (embryonic development) การประทับตราทางพันธุกรรม (epigenetic imprinting) เป็นต้น⁽⁶⁾ ซึ่งหากมีความผิดปกติเกิดขึ้นจะเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ โดยสภาวะเหนือพันธุกรรมที่สำคัญของเซลล์ ได้แก่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (Histone modification) และไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA)⁽⁷⁾ โดยเฉพาะการเกิด DNA

methylation เป็นการเติมหมู่เมทิล(-CH₃) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (C) ซึ่งอยู่ติดกับเบสกวานีน (G) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT)^(6, 38) ซึ่งมักเกิดที่บริเวณ CpG island คือบริเวณที่เบสไซโตซีน (C) อยู่ติดกับกวานีน (G) โดยมักมีความยาวประมาณ 200 คู่เบส และมักตั้งอยู่ใกล้หรืออยู่บนโปรโมเตอร์ของยีน⁽³⁹⁾ โดยผลจากการเกิด DNA methylation พบว่าหมู่เมทิลที่ถูกเติมให้กับเบสไซโตซีน (C) จะขัดขวางการทำงานของ Transcription factor ต่างๆ ซึ่งส่งผลทำให้ยีนไม่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ ซึ่งถ้าหากเกิดกับยีนที่ทำหน้าที่ด้านมะเร็ง พบว่ามีส่วนสำคัญต่อการลดการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง และมีผลต่อกระบวนการเจริญและพัฒนาไปสู่ความผิดปกติและกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด⁽⁴⁾



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University
ภาพที่ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์ DNMT



ภาพที่ 7 แสดงกลไกการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

DNA methylation เป็นในกลไกทาง Epigenetic mechanisms ที่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งหากเกิดที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็งหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง มีผลทำให้ยีนมีการแสดงออกที่ลดลงและอาจนำไปสู่การก่อโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้⁽⁴⁻⁷⁾ มีหลายรายงานพบการเกิด DNA methylation บนโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็งชนิดต่างๆ อาทิ

ยีนต้านมะเร็ง *Caveolin-1* หรือ *CAV1* เป็นหนึ่งในยีนนี้มีบทบาทต้านมะเร็งและเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก และหยุดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง^(41, 42) โดยมีรายงานว่า พบการเกิด hypermethylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *CAV1* มากถึงร้อยละ 91 ในมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽⁴²⁾ และสัมพันธ์กับการลดลงของโปรตีน *CAV1* ในมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽⁴³⁾

ยีนต้านมะเร็ง *Death-Associated Protein Kinase* หรือ *DAPK* ยีนนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์⁽⁴⁴⁾ การเพิ่มขึ้นของโปรตีน *DAPK* จะช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis อย่างปกติ⁽⁴⁵⁾ โดยมีการศึกษาของ Yamanaka และคณะในปี 2003 ที่รายงานว่า พบการเกิด hypermethylation บนตำแหน่ง promoter ของยีน *DAPK* ในมะเร็งต่อมลูกหมากประมาณร้อยละ 15⁽⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามทางคณะได้อธิบายว่าการเกิด hypermethylation ยีนเหล่านี้ อาจมีความเกี่ยวข้องต่อการก่อโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้

ยีนต้านมะเร็ง *RAS Association Domain Family Protein 1 Isoform A* หรือ *RASSF1A* นอกจากจะมีบทบาทเป็นยีนต้านการเจริญของมะเร็งแล้วยังพบว่า โปรตีน *RASSF1A* ยังมีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอและเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบ apoptotic ของเซลล์⁽⁴⁶⁾ โดยพบว่ามีการเกิด hypermethylation บน promoter ของยีน *RASSF1A* ในมะเร็งต่อมลูกหมากมากถึงร้อยละ 63 ถึงร้อยละ 99^(14, 46) เป็นต้น

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการพยากรณ์โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

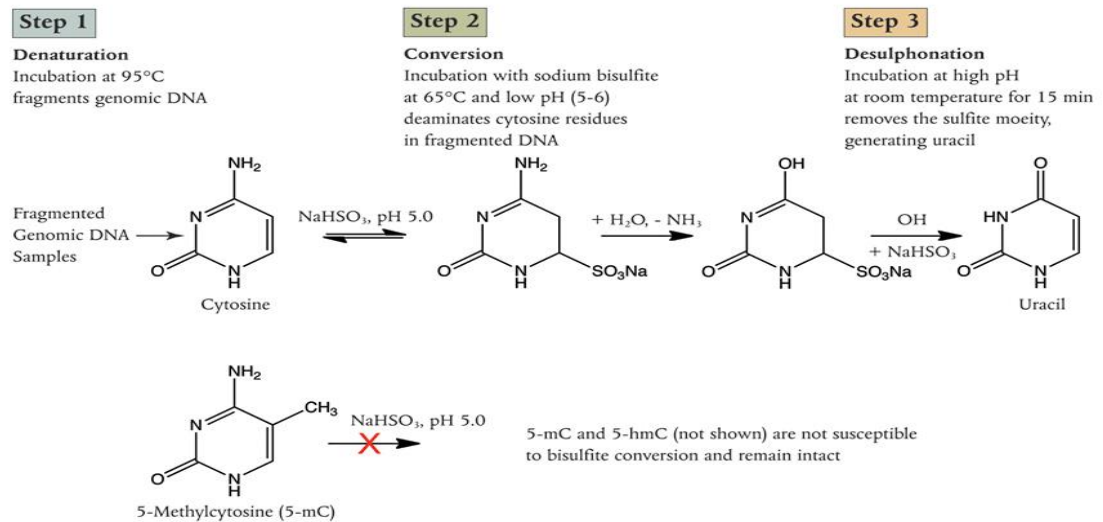
จากความสำคัญดังกล่าวจึงมีการนำกลไกการเกิด DNA methylation ของยีนต้านมะเร็งชนิดต่างๆมาใช้ในการพยากรณ์โรค⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมะเร็งต่อมลูกหมาก เช่น การศึกษาของ Nakayama M และคณะในปี 2004 ที่ศึกษาการเกิด DNA methylation ของยีน glutathione S-transferase pi 1 (*GSTP1*) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ โดยทางคณะพบว่า มีระดับการเกิด hypermethylation ที่ตำแหน่งดปโรโมเตอร์ของยีน *GSTP1* สูงถึงร้อยละ 90 ในชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก ในขณะที่ชิ้นเนื้อปกติและชิ้นเนื้อ benign prostatic hyperplasia (BPH) ปราบกฏว่าไม่พบการเกิด hypermethylation ทางคณะวิจัยได้สรุปว่า สามารถนำการเกิด

DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *GSTP1* มาใช้ในการวินิจฉัยและนำมาคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากได้⁽⁵¹⁾ สอดคล้องกับการรายงานของ Maldonado L และคณะในปี 2014 ที่พบว่าผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากมีระดับการเกิด DNA methylation ของยีน *GSTP1* ในระดับที่สูงและสัมพันธ์กับการกลับมาเกิดซ้ำของโรคในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹²⁾ นอกจากนั้น ยังมีการศึกษาของ Goltz D และคณะ ที่พบว่าสามารถนำการเกิด DNA methylation ของยีน C-X-C motif chemokine ligand 12 หรือ *CXCL12* มาใช้เป็น biomarkers ในการพยากรณ์การกลับมาเกิดซ้ำของโรคได้⁽¹³⁾ นอกจากนั้นการเกิด DNA methylation ของยีน *protocadherin8* พบว่ามีความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่ไม่ดี อาทิเช่น stage และระดับการแสดงออกของ PSA ของโรครวมทั้งสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองและการกลับมาเกิดซ้ำของโรคที่เร็วขึ้น⁽¹⁵⁾

เทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิคพีซีอาร์

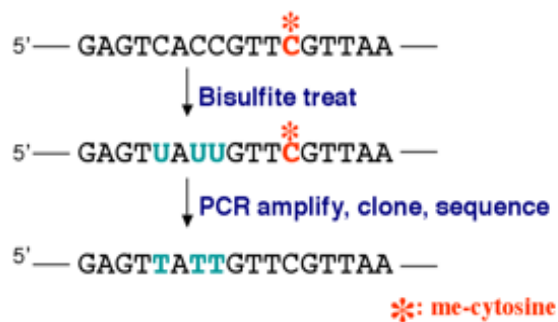
วิธีศึกษาการเกิด DNA methylation ของยีนพบว่า มีหลายวิธีที่สามารถนำมาตรวจสอบการเกิด methylation ของยีนได้ อาทิเช่น วิธี Real-time quantitative MSP (RT-MSP)⁽⁵²⁾, methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)⁽⁵³⁾, bisulfite sequencing⁽⁵⁴⁾, combined bisulfite restriction analysis (COBRA)⁽⁵⁵⁾, pyrosequencing (PSQ)⁽⁵⁶⁾ และ วิธี Methylation-specific PCR หรือ MS-PCR โดยวิธี MS-PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานและได้รับความนิยมสำหรับการนำมาตรวจสอบการเกิด methylation ของยีน โดยเทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ 1996⁽⁵⁷⁾ เทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาศึกษาและอธิบายการเกิด DNA methylation บนตำแหน่ง CpG island ของยีนได้ โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำมาศึกษาต้องผ่านการเปลี่ยนเบสด้วยวิธี Bisulfite conversion โดยมีไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อปฏิกิริยา methylation และ unmethylation ซึ่งใช้หลักการเปลี่ยนเบส Cytosine ที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลเปลี่ยนเป็นเบส Uracil ในขณะที่เบส Cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลจะไม่ถูกเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงทำให้สามารถตรวจสอบการเกิด methylation ของยีนได้ นอกจากนั้นเทคนิคดังกล่าวยังพบว่า มีความไวและจำเพาะต่อการตรวจสอบการเกิด methylation จากตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอปริมาณน้อยได้ ซึ่งถือว่าเทคนิคนี้มีความเหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการเกิด methylation จากตัวอย่างที่ถูกสกัดดีเอ็นเอจาก paraffin-embedded นอกจากนั้นเทคนิคดังกล่าวยังพบว่า มีราคาของน้ำยาทดสอบไม่แพงเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆซึ่งเหมาะสำหรับนำมาศึกษาตัวอย่างที่มีจำนวนมาก โดยข้อดีของเทคนิค Methylation-specific PCR ดังกล่าวที่ยังสะดวกและง่ายต่อการตรวจสอบการเกิด methylation จึง

มักถูกนิยมนำมาใช้ศึกษาการเกิด methylation ของยีนชนิดต่างๆ⁽⁵⁷⁾ ถึงอย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ก็อาจแสดงผลเป็น false-positive ได้เช่นกัน⁽⁵⁸⁾



ภาพที่ 8 แสดงปฏิกิริยา Bisulfite conversion

ที่มา : <https://www.neb.com>



ภาพที่ 9 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิค MSP

ที่มา : <http://www.alphabiolab.com/page2/page2.html>

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive analytic study)

การเก็บตัวอย่าง (Sample collection)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่ถูกเก็บรักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลินและตรึงในพาราฟิน (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) โดยชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากทั้งหมด ผ่านการย้อมด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin (H&E) และได้รับการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาและยืนยันผลโดยพยาธิแพทย์ และถูกเก็บรักษาไว้ยังภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ฝ่ายพยาธิวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย) ตั้งแต่วันที่ พ.ศ. 2549-2557

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากต้องผ่านการวินิจฉัยและยืนยันผลจากพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ
2. ชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากต้องถูกตัดมาทั้งต่อมลูกหมาก ด้วยวิธี Prostatectomy
3. ชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH ถูกตัดด้วยวิธี Transurethral resection
4. ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่ถูกเก็บรักษาในพาราฟินจะต้องมีสภาพที่สมบูรณ์ไม่ชำรุดเสียหาย
5. ชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมากต้องมีผลรายงานทางคลินิกครบ

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่เคยผ่านการรักษาด้วยยา, เคมี หรือได้รับการฉายรังสีก่อนการผ่าตัด
2. ผู้ป่วยเคยมีประวัติของการเป็นโรคมะเร็งชนิดอื่น หรือมีประวัติการแพร่กระจายของมะเร็งชนิดอื่นๆมายังต่อมลูกหมาก
3. ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่มีการแสดงออกของการอักเสบร่วม
4. ชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่มีพื้นที่ที่เป็นมะเร็งน้อยกว่าร้อยละ 5 ของต่อมลูกหมากทั้งหมด

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical consideration)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในเนื้อของผู้ป่วยต่อมลูกหมาก โดยผู้วิจัยได้รับอนุมัติจาก คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยโดยมีหมายเลข IRB No.623/59 ก่อนการศึกษา โดยวิเคราะห์ ตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน 3 ข้อ ได้แก่ หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) คือ การไม่เปิดเผยข้อมูลผู้ป่วยโดยไม่ใช้ชื่อผู้ป่วยในการลงทะเบียนส่งตรวจแต่จะใช้รหัสหมายเลขแทน หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) คือการรักษา ความลับของผู้ป่วยโดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย และหลักความ ยุติธรรม (Justice) คือ มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกันโดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่ม ศึกษา

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

1. Microtome (Thermo electron corporation, USA)
2. Microtome knife
3. Transferpette S Pipette 1, 10, 20, 100, 200, 1000 µl (Germany)
4. Pipette tip 10,200, 1000 µl (Axygen, USA)
5. 1.5 ml microcentrifuge tube (Axygen, USA)
6. 0.2 ml PCR tube (Axygen, USA)
7. Centrifuge Mikro 200 (Hettich, Germany)
8. Microcentrifuge GMC-260 (Daihan Labtech, Korea)
9. Vortex mixture
10. PCR chamber
11. Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA)
12. Power supply (Biored, USA)
13. Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo scientific, USA)
14. -20°C Freezer
15. Autoclave
16. Electrophoresis Cell DYCP-31DN (Beijing Liuyi Biotechnology, China)
17. PowerPac HC Power Supply (Bio-Rad, USA)

18. Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad, USA)
19. Microwave
20. Dry Bath Incubator EL-02 (Major Science, Taiwan)
21. Computer, Quantity One 4.6.9 Software (Bio-Rad, USA)
22. Cylinder 100, 500 ml (Pyrex, USA)
23. Sterilizer Autoclave HVA-85 (Hirayama, Japan)

สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

- 70% Ethanol
- Absolute Ethanol
- Xylene
- QIAamp®DNA FFPE Tissue Kit

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับโซเดียมไบซัลไฟต์

- EZ DNA methylation gold kit (Zymo Research, USA)
- Deionized Water
- Absolute Ethanol (EMSURE, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

- EpiTect[®] PCR Control DNA Set (Qiagen, USA)
- Taq PCR Master Mix (Qiagen, USA)
- Methylation PAQR3 forward primer (Pacific science, Thailand)
- Methylation PAQR3 reverse primer (Pacific science, Thailand)
- Unmethylation PAQR3 forward primer (Pacific science, Thailand)
- Unmethylation PAQR3 reverse primer (Pacific science, Thailand)
- Deionized Water

สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis

- Tris base (Vivantis, USA)
- EDTA, Disodium Salt, Dihydrate (OmniPur, Germany)
- Acetic acid (glacial) (EMSURE, Germany)
- Agarose Powder (Axygen, USA)
- 50 bp DNA Step Ladder (Sigma, USA)
- DNA Loading Dye, 6x (Biotechrabbit, Germany)
- Ethidium Bromide (BioExcellence)
- Deionized Water

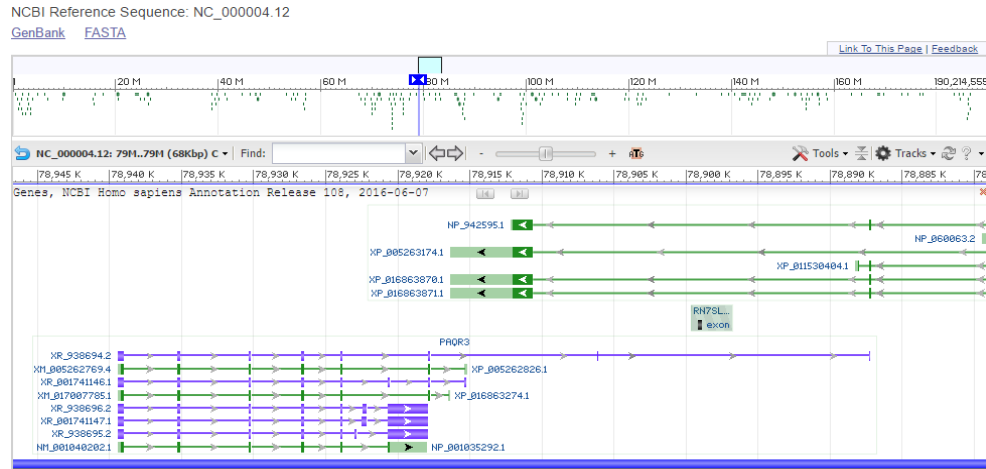
วิธีวิจัย/วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3*

ขั้นตอนที่ 1 การสืบค้นข้อมูลสารสนเทศของยีน *PAQR3*

ทำการสืบค้นข้อมูลสารสนเทศของยีน *Progesterin and adipoQ receptor family member 3 (PAQR3)* ของมนุษย์ โดยอ้างอิงจากเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov โดยพบว่ายีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ตำแหน่งที่ q21.21 (78887225-78939428) ซึ่งมีความยาวประมาณ 52204 คู่เบส ประกอบด้วย 13 exon โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยสนใจตำแหน่ง CpG island ที่ตั้งอยู่บนโปรโมเตอร์ของยีนในช่วงตำแหน่งที่ 78938428 -78940000 โดยอ้างอิงผลการศึกษาของ Chen J และคณะ⁽²¹⁾

Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p7 Primary Assembly



ภาพที่ 10 แสดงรายละเอียดข้อมูลสารสนเทศของยีน PAQR3
ที่มา : www.ncbi.nlm.nih.gov

Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p7 Primary Assembly



ภาพที่ 11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาตำแหน่งของการเกิด methylation

การศึกษานี้ได้ทำการอ้างอิงไพรเมอร์จากการศึกษาของ Li และ chen J ในปี 2016^(21, 22) โดยมีรายละเอียดของไพรเมอร์ แสดงตามตารางที่ 4 และเมื่อทำการค้นหาตำแหน่งปฏิกิริยาของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม MethPrimer⁽⁵⁹⁾ เริ่มจากการนำลำดับเบสของยีน PAQR3 ที่ผู้วิจัยทำการคัดเลือกจากขั้นตอนที่แล้วนำมาใส่ในช่องใส่ sequence และกดค้นหา โดยโปรแกรมจะทำการค้นหาตำแหน่ง CpG island และแสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ทำปฏิกิริยาจากลำดับเบสดังกล่าว

The Li Lab
Peking Union Medical College Hospital (PUMCH), Chinese Academy of Medical Sciences

Home | Research | Publications | **Tools & Databases** | Protocols | People | Contact Us

MethPrimer

Paste an ORIGINAL source sequence. Try this [Sample sequence](#)
You don't need to modify your sequence (e.g. convert 'C' to 'T') before pasting.

Pick primers for bisulfite sequencing PCR or restriction PCR.
 Pick MSP primers.

Use CpG island prediction for primer selection?

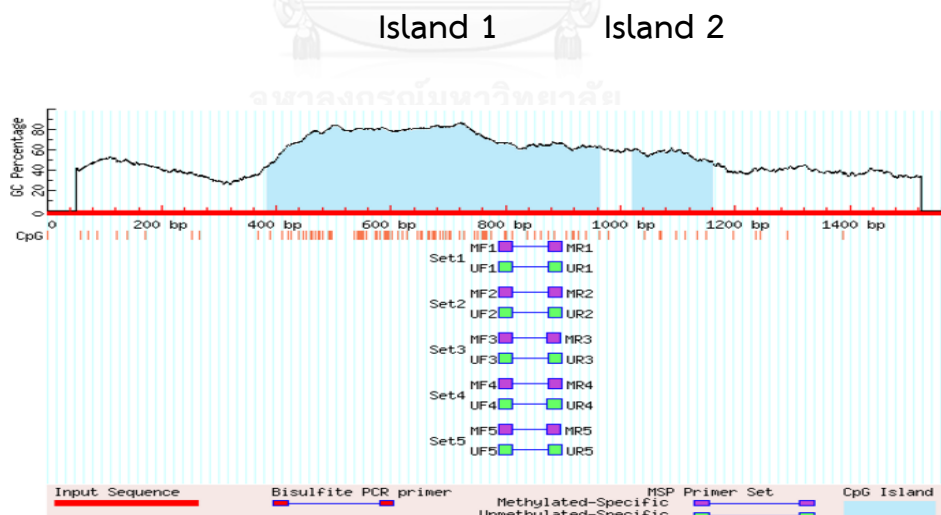
Window: 100 | Shift: 1 | Obs/Exp: 0.6 | GC%: 50

Submit | Reset

ภาพที่ 12 แสดงรายละเอียดโปรแกรม MethPrimer

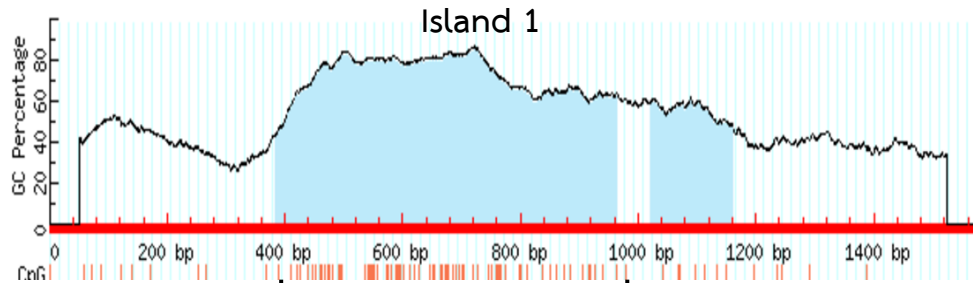
ที่มา : <http://www.urogene.org>

ผลจากการทำนายด้วยโปรแกรม MethPrimer จะพบตำแหน่ง CpG island ทั้งหมด 2 island และพบว่าการทำปฏิกิริยาของคู่ไพรเมอร์ทั้งปฏิกิริยา Methylation และ Unmethylation เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง CpG island ที่ 1 แสดงดังภาพที่ 13



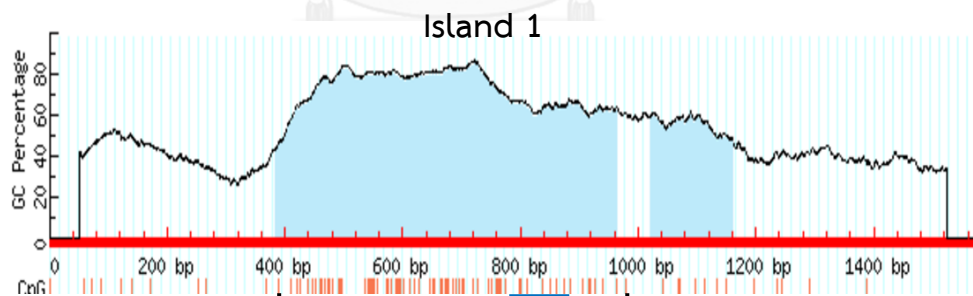
ภาพที่ 13 แสดงบริเวณเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3

โดยพบว่าตำแหน่ง CpG island ที่ 1 มีจำนวน CpG sites ทั้งหมด 68 ตำแหน่ง โดยไพรมอร์ที่นำมาศึกษานั้นมีบริเวณครอบคลุมตำแหน่ง CpG sites ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 14-15



GCTCTTCTCATATGCAAA**CG**AAGACCCCAGG**CG**CGCCAAAACACAG**CG**TGAGAGAG**CG**CC**CG**GGAGCC**CG**GGC**CG**CGCCAG**CG**CA
CGCT**CG**AGCACACC**CG**GG**CG**CGCCAGCACCCCTGCCCTCCAGCTAGGGCTGAGGGG**CG**GGG**CG**CGCGCGCGCTGAG**CG**TCA
 GAGGAGGCTG**CG**AG**CG**CTG**CG**GGT**CG**CGCGCGCGCTGG**CG**GCAGTGG**CG**GTGTGAG**CG**CAGAG**CG**GGCCCTGGGCAGCAG**CG**
 GCAG**CG**CGGTAGGACCT**CG**CGCAG**CG**TC**CG**CGGGCTCCGGGG**CG**GGGG**CG**CCAG**CG**CGAAGCCCCCTCC**CG**GGGAGG**CG**GGAC
 CTGGGGAGCTCC**CG**AG**CG**GGGAG**CG**CGCGCGCG**CG**GAAC**CG**ATGCATCAGAAGCTGCTGAAGAG**CG**CGCATTACAT**CG**AGCTGG
 GCAGCTACCAGTACTGGC**CG**GTCTGGTGCC**CG**TGGCATC**CG**CCTGTACACCTA**CG**AGCAGATCCC**CG**GGTCCCTCAAGGACAACCC
GTACATCAC**CG**AG**CG**GCTAC**CG**GGCCTACCTGC**CG**TCCAGGCTGTGTATCAAAAGGTAC**CG**GTCTG

ภาพที่ 14 แสดง CpG sites ทั้งหมดบน CpG island 1 ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3



GCTCTTCTCATATGCAAA**CG**AAGACCCCAGG**CG**CGCCAAAACACAG**CG**TGAGAGAG**CG**CC**CG**GGAGCC**CG**GGC**CG**CGCCAG**CG**CA
CGCT**CG**AGCACACC**CG**GG**CG**CGCCAGCACCCCTGCCCTCCAGCTAGGGCTGAGGGG**CG**GGG**CG**CGCGCGCGCTGAG**CG**TCA
 GAGGAGGCTG**CG**AG**CG**CTG**CG**GGT**CG**CGCGCGCGCTGG**CG**GCAGTGG**CG**GTGTGAG**CG**CAGAG**CG**GGCCCTGGGCAGCAG**CG**
 GCAG**CG**CGGTAGGACCT**CG**CGCAG**CG**TC**CG**CGGGCTCCGGGG**CG**GGGG**CG**CCAG**CG**CGAAGCCCCCTCC**CG**GGGAGG**CG**GGAC
 CTGGGGAGCTCC**CG**AG**CG**GGGAG**CG**CGCGCGCG**CG**GAAC**CG**ATGCATCAGAAGCTGCTGAAGAG**CG**CGCATTACAT**CG**AGCTGG
GCAGCTACCAGTACTGGC**CG**GTCTGGTGCC**CG**TGGCATC**CG**CCTGTACACCTA**CG**AGCAGATCCC**CG**GGTCCCTCAAGGACAACCC
CGTACATCAC**CG**AG**CG**GCTAC**CG**GGCCTACCTGC**CG**TCCAGGCTGTGTATCAAAAGGTAC**CG**GTCTG

ภาพที่ 15 แสดงบริเวณไพรมอร์ที่ครอบคลุมตำแหน่ง CpG sites บน CpG island 1

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์

1. Methylation primer	Length(bp)	GC%	Tm(°C)	Size(bp)
Forward M primer 5'-TTGTTGAAGAGCGCGTATTATATC-3'	24	54.1	59.7	109
Reverse M primer 5'-TAAAAAACCCGAAAATCTACTCGTA-3'	25	64.0	59.5	
2. Unmethylation primer				
Forward U primer 5'-TTGTTGAAGAGTGTGTATTATATTGA-3'	26	53.8	55.0	110
Reverse U primer 5'-TTAAAAACCCAAAAATCTACTCATA-3'	26	61.5	56.8	

ขั้นตอนที่ 3. หาสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของไพรเมอร์

จากนั้นทำการทดสอบหาสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ โดยเริ่มจากการตั้งค่าอุณหภูมิในช่วงปฏิกิริยา Annealing โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 52,54,56,58,60 และ 62 องศาเซลเซียสตามลำดับ เป็นเวลา 30 วินาที และทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ผลปรากฏว่าช่วงอุณหภูมิที่ 52,54,56 และ 58 องศาเซลเซียสเป็นช่วงที่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น โดยอ้างอิงผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ตามภาคผนวก แต่พบว่าที่อุณหภูมิ 52,56 และ 58 องศาเซลเซียสเป็นช่วงที่แถบดีเอ็นเอของ Unmethylation primer เกิดขึ้นไม่ชัดเจน ในขณะที่ช่วงอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสปรากฏว่ามีแถบดีเอ็นเอ เกิดขึ้นชัดเจนมากที่สุดทั้ง Methylation และ Unmethylation primer ดังนั้นการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงเลือกช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา Annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสเวลา 30 วินาที ที่จำนวน 40 รอบ

2. การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อต่อมลูกหมาก

ขั้นตอนที่ 1 การตัดชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่ถูกรักษา สภาพด้วย Formal in-Fixed Paraffin-Embedded

- นำสไลด์ชิ้นเนื้อทั้งหมดที่ผ่านการย้อมด้วย H&E มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยพยาธิแพทย์และนักวิจัยจะทำการคัดเลือกและทำเครื่องหมายบนสไลด์ให้ตรงกับตำแหน่งของรอยโรค
- หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ผ่านการทำเครื่องหมายจากพยาธิแพทย์ นำไปทาบลงบนบล็อกชิ้นเนื้อที่เป็นรายเดียวกัน โดยหมายเลขบล็อกต้องเป็นหมายเลขเดียวกันกับสไลด์ และนำไปมิดที่สะอาดปราศจากเชื้อ (sterile) กรีดลงบนบล็อกพาราฟินที่ตำแหน่งเดียวกันกับสไลด์ที่มีเครื่องหมายกำหนดไว้ และทำการตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ขนาดความหนา 10 ไมครอน จำนวน 10 ชิ้น ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และทำการปิดฝาเพื่อนำเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 2. การสกัด DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อต่อมลูกหมาก

- การสกัด DNA จากชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่ถูกเก็บรักษาสภาพในพาราฟิน ใช้ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit โดยเริ่มด้วยการนำหลอดทดลองที่มีชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ผ่านการตัด มาทำการ Deparaffinization โดยใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 µl ดูด Xylene ปริมาตร 1 ml ลงในหลายๆหลอด ปั่นหยาบด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 10 วินาที
- จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ ความเร็ว 14000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และดูดสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง (ระวังอย่าโดนชิ้นเนื้อ)
- เติม Absolute ethanol ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดตัวอย่าง และนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 14000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- ดูดสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง (ระวังอย่าโดนชิ้นเนื้อ) และเปิดฝาลอยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- เติมน้ำยาบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 µl และเติม Proteinase K ปริมาตร 20 µl ลงในหลายๆหลอด แล้วนำหลอดตัวอย่างทั้งหมดเข้าเครื่อง Heatbox ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็น

เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ml และปั่นหยาบด้วย vortex ประมาณ 10 วินาที แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 μ l และปั่นหยาบด้วย vortex เป็นเวลา 10 วินาที
- จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดนำมาใส่ใน QIAamp MinElute column และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอด collection tube ที่มีส่วนใสด้านล่างทิ้ง
- นำหลอด collection tube หลอดใหม่ใส่ใน QIAamp MinElute column และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 μ l จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอด collection tube ที่มีส่วนใสด้านล่างทิ้ง
- นำหลอด collection tube หลอดใหม่ใส่ใน QIAamp MinElute column และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอด collection tube ที่มีส่วนใสด้านล่างทิ้ง
- นำ QIAamp MinElute column ใส่ในหลอด collection tube หลอดใหม่และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้งหลอด collection tube
- นำ QIAamp MinElute column มาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATE ปริมาตร 50 μ l และไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที
- นำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano Drop) และเจือจางสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นที่ 25 ng/ μ l ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ด้วยสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นเริ่มต้นของ DNA V_1 = ปริมาตรของ DNA ที่จะใช้เจือจาง

C_2 = ความเข้มข้นสุดท้ายของ DNA คือ 25 ng/ul V_2 = ปริมาตรสุดท้าย

- จากนั้นทำการปิดฝาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3. การทำปฏิกิริยา Bisulfite conversion

- ดูดสารละลาย CT conversion reagent ด้วยเครื่องมือทดลองไมโครปิเปต ลงในหลอด PCR ปริมาตร 130 μl และเติมสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเจือจาง ปริมาตร 20 μl ลงในหลอดทดลอง
- นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 10 นาที และ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 ชั่วโมง
- จากนั้นเติม M-Binding Buffer ปริมาตร 600 μl ลงในหลอด Zymo-Spin™ IC Column และดูดสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดที่ผ่านการบ่ม นำมาใส่ลงใน Zymo-Spin™ IC Column ใช้เครื่องมือไมโครปิเปตดูดขึ้นลง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 14000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที ถอดหลอด collection tube ที่มีส่วนใส่ทิ้ง
- เติม M-Wash Buffer ปริมาตร 100 μl และปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม M-Desulphonation Buffer ปริมาตร 200 μl บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม M-Wash Buffer ปริมาตร 200 μl และปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นทิ้งหลอด collection tube ที่มีส่วนใส่ทิ้ง
- นำ Zymo-Spin™ IC Column มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม M-Elution Buffer ปริมาตร 10 μl และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำสารตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

ขั้นตอนที่ 1. เตรียมสารละลายสำหรับเพิ่มการปริมาณดีเอ็นเอ

สารละลาย	ปริมาณสารต่อ 1 ตัวอย่าง (μl)
Deionized water	8.2
Master mix reagent	10
Forward primer (10x)	0.4
Reverse primer (10x)	0.4
DNA template (25ng/ μl)	1
Total volume	20

ขั้นตอนที่ 2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR Thermal Cycler รุ่น veriti

นำสารที่ถูกเตรียมไว้จากข้อข้างต้นมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR Thermal Cycler เป็นจำนวน 40 รอบ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนดังตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของสภาวะอุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Step 1 - Initial denaturation	94	5
Step 2 - Denature	94	0.30
- Annealing	54	0.30
- Extension	72	0.45
Step 3 - Elongation	72	10

5. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

- นำแผ่นเจลมาวางไว้บนเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และเติม 1xTAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล
- ใช้ไมโครปิเปตดูดสีย้อมดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงบนแผ่นพาราฟิล์มให้เท่ากับจำนวนตัวอย่างที่ใช้ จากนั้นทำการดูดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณจากข้อข้างต้น ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และทำการผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอที่เตรียมไว้โดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงประมาณ 1-2 ครั้ง ทำการโหลดลงในช่องเจลทุกๆช่องจนครบ โดยในช่องแรกนั้นเตรียมไว้สำหรับ DNA Ladder ขนาด 50 คู่เบส และทำการปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยการตั้งค่าที่ 120 โวลต์ ประมาณ 30 นาที
- นำแผ่นเจลออกจากเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องฉายรังสียูวีเพื่ออ่านแถบเจล ด้วยโปรแกรม Quantity one

วิธีการคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

$$n = \frac{Z^2_{\alpha/2} p (1-p)}{d^2}$$

n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่างขึ้นเนื้อต่อมลูกหมาก

Z = ค่าสถิติมาตรฐาน โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกินร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ดังนั้นค่า $Z_{\alpha/2} = 1.96$

p = สัดส่วนของประชากรที่จะทำการศึกษา โดยการวิจัย โดยใช้ค่าความชุกของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 ในชิ้นเนื้อต่อมลูกหมาก

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้คือ 10% = 0.1

ชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

จากการทดลองศึกษาการเกิด methylation ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากทั้งหมด 10 ราย พบการเกิด methylation ทั้งหมด 6 ราย จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ดังนั้น p จึงมีค่าเท่ากับ 0.6 และแทนค่าลงในสมการได้ดังนี้

$$n = \frac{(1.96)^2(0.6)(1-0.6)}{(0.1)^2}$$

$$n = 92.2$$

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ใช้จำนวนชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากทั้งหมดเท่ากับ 92 ราย

ชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH

จากการทดลองศึกษาการเกิด methylation ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH ทั้งหมด 10 รายพบการเกิด methylation จำนวนทั้งหมด 2 ราย ดังนั้น p จึงมีค่าเท่ากับ 0.2 และแทนค่าลงในสมการได้ดังนี้

$$n = \frac{(1.96)^2(0.2)(1-0.2)}{(0.1)^2}$$

$$n = 61.5$$

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ใช้จำนวนชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH ทั้งหมดเท่ากับ 62 ราย

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

- ผลการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* จะถูกนำเสนอเป็นร้อยละในแต่ละชนิดของตัวอย่าง
- ศึกษาความแตกต่างของการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ระหว่างชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก ด้วยสถิติ chi-squared test
- ผลการรายงานทางจุลพยาธิของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากจะถูกนำเสนอข้อมูลเป็นร้อยละ และนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ด้วยสถิติ Fisher's Exact Test
- ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับค่าเฉลี่ย PSA ใช้สถิติ Mann-Whitney U-test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
- ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยใช้สถิติ Student-T-test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
- ค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ยอมรับได้ที่ $p < 0.05$

การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

1. เก็บข้อมูลโดยอ้างอิงผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และทดสอบความถูกต้องของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยการเทียบกับ DNA Ladder และทำการเก็บข้อมูลเป็นภาพถ่าย
2. ข้อมูลประวัติและผลทางคลินิกของชิ้นเนื้อที่ได้จากฐานข้อมูลของภาควิชาพยาธิวิทยา โดยจะทำการขอใช้ข้อมูลดังกล่าวจากหัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา และผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 จากชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

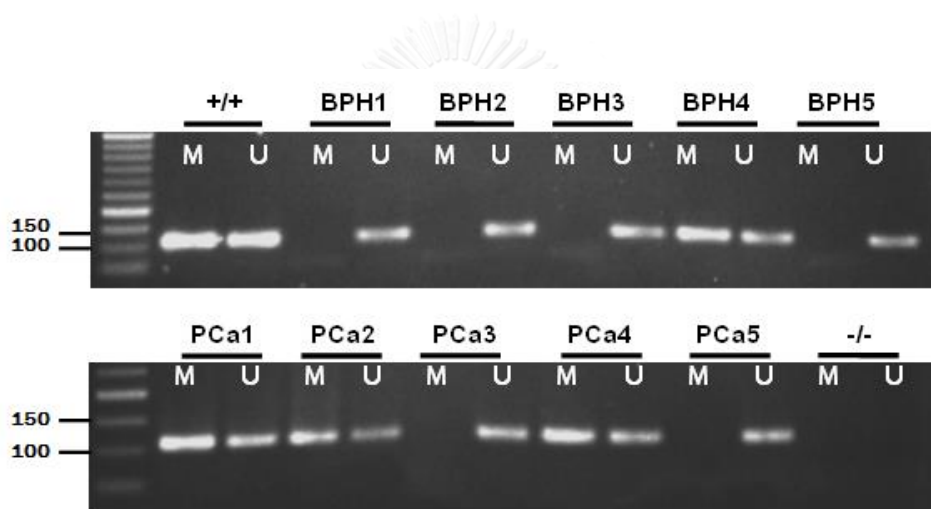
ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 154 ราย แบ่งออกเป็นชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย BPH จำนวน 62 ราย และชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากจำนวน 92 ราย โดยข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย BPH มีอายุเฉลี่ยที่ 69.8 ± 8.2 ปี และมีค่าเฉลี่ย PSA ก่อนรับการผ่าตัดที่ 7.9 ± 7.3 ng/ml และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากมีอายุเฉลี่ยที่ 67.5 ± 6.2 ปี และมีค่าเฉลี่ย PSA ก่อนรับการผ่าตัดที่ 15.4 ± 16.8 ng/ml สามารถสรุปข้อมูลทางคลินิกได้ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

Prostate tissues (n = 154)		
	Prostate cancer (n = 92)	BPH (n = 62)
Surgical method		
Prostatectomy	92 (100%)	
Transurethral resection		62(100%)
Age at surgery, years		
Mean \pm SD	67.5 ± 6.2	69.8 ± 8.2
Range	52 – 81	56 – 86
PSA level, ng/ml		
Mean \pm SD	15.4 ± 16.8	7.9 ± 7.3
Median	9.9	5.8
Range	2.1 – 75.4	1.1 – 50.6
Weight of prostate, g		
Mean \pm SD	44.1 ± 15.7	19.9 ± 13.9
Median	40.5	16.9
Range	13 – 103	1.5 – 53

ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3*

เมื่อนำดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH จำนวน 62 ราย และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 92 ราย ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี bisulfite conversion มาทำการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปฏิกิริยา methylation และ unmethylation ด้วยเทคนิค Methylation-specific PCR และเทียบดีเอ็นเอที่ปรากฏที่ขนาด 109 และ 110 bp ด้วย DNA Ladder ขนาด 50 bp ผลการศึกษาพบการเกิด partial methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH จำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 25.8 และในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 68 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.9 แสดงผลตามภาพที่ 14



ภาพที่ 16 แสดงผลการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

ผลการศึกษาด้วยเทคนิค Methylation-specific PCR แสดงผลการเกิด partial methylation ที่แสดงผลทั้ง methylation band และ unmethylation band ณ ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH4 และในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก PCa1, PCa2 และ PCa4 M หมายถึงปฏิกิริยา Methylation, U หมายถึงปฏิกิริยา Unmethylation, +/+ หมายถึง Positive control และ -/- หมายถึง Negative control

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้จัดกลุ่มการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* จากชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1. ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่แสดงผลเป็น partial methylation จัดเป็น methylation
 กลุ่มที่ 2. ชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่แสดงผลเป็น unmethylation

ดังนั้นจึงสามารถอธิบายได้ว่าในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH พบการเกิด methylation ของยีน *PAQR3* จำนวนทั้งหมด 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 25.8 และพบ unmethylation จำนวน 46 ราย คิดเป็นร้อยละ 74.2 และในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก พบการเกิด methylation ของยีน *PAQR3* ทั้งหมด 68 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.9 และพบ unmethylation จำนวน 24 ราย คิดเป็นร้อยละ 26.1 เมื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ระหว่างในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากด้วยสถิติ chi-squared test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ซึ่งสามารถสรุปผลได้ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* จากชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

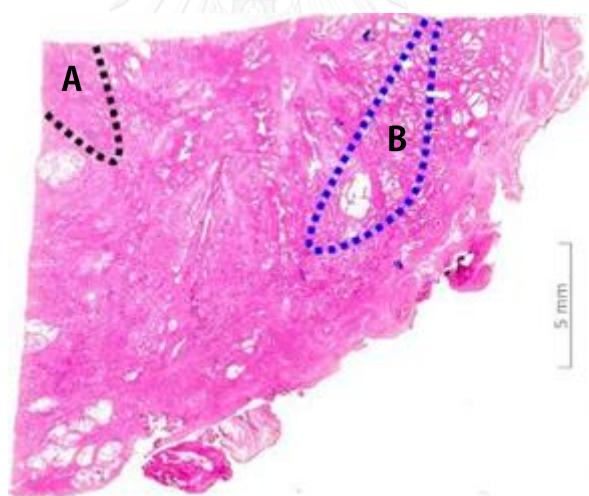
Prostate tissues (n = 154)			
	Prostate cancer (n = 92)	BPH (n = 62)	p value
Promoter methylation status			<0.01 ^a
Methylation	68 (73.9%)	16 (25.8%)	
Unmethylation	24 (26.1%)	46 (74.2%)	

^a statistical analyzes by chi-squared test.

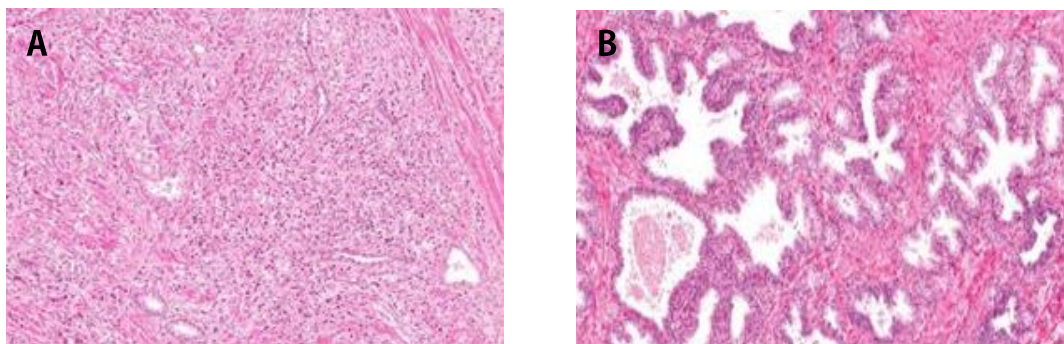
2. ศึกษาเปรียบเทียบผลการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชั้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากระหว่างเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาหาตำแหน่งเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็งจากชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

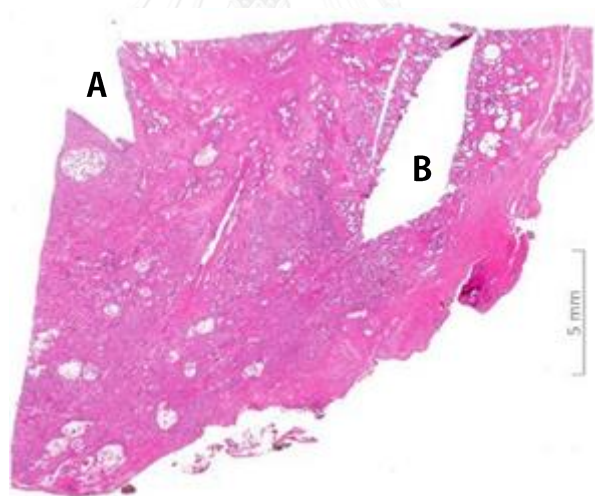
การศึกษานี้ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะศึกษาเปรียบเทียบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ระหว่างเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง (prostatic adenocarcinoma) และเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง (adjacent non-neoplastic) จากชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากชิ้นเดียวกัน โดยผู้วิจัยทำการสุ่มชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 12 ราย มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง โดยผู้วิจัยได้ทำเครื่องหมายลงบนแผ่นสไลด์ให้ตรงกับตำแหน่งที่พบรอยโรค



ภาพที่ 17 แสดงบริเวณเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่แสดงบริเวณเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง (A) และบริเวณเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ขนาดกำลังขยายภาพ 4x



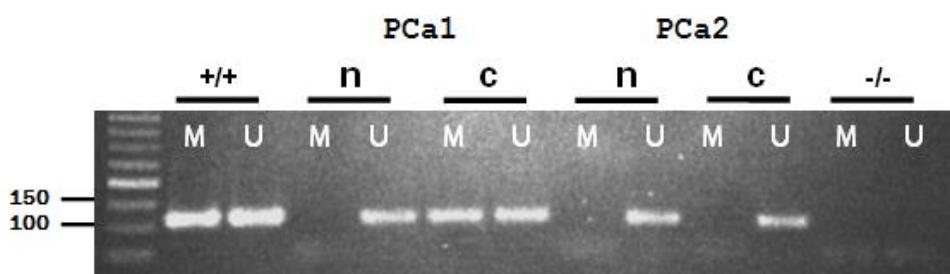
ภาพที่ 18 ลักษณะเซลล์จากเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง จากภาพแสดงลักษณะเซลล์จากเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (A) และเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ขนาดกำลังขยาย 100x จากนั้นนำสไลด์ที่ถูกทำเครื่องหมายทาบลงบน block ชิ้นเนื้อเดียวกันกับสไลด์ และใช้ใบมีดกรีดตรงบริเวณที่ทำเครื่องหมายและตัดด้วยเครื่อง microtomes



ภาพที่ 19 แสดงตำแหน่งที่ตัดเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง จากนั้นนำชิ้นเนื้อจากบริเวณดังกล่าวไปสกัด DNA และศึกษาเปรียบเทียบผลการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3*

ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* จากเนื้อเยื่อที่มี เซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาจากการสุ่มชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก 12 ราย พบการเกิด partial methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 58.3 และพบการเกิด partial methylation ในเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 25 แสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 20 แสดงผลการเกิด Methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในเนื้อเยื่อที่มี เซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาด้วยเทคนิค Methylation-specific PCR แสดงผลการเกิด partial methylation ที่ แสดงผลทั้ง methylation band และ unmethylation band ณ ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง (c) และแสดงผล unmethylation ในเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มี เซลล์มะเร็ง (n) จากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก PCa1 และพบว่าผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก PCa2 แสดงผลการเกิด unmethylation ทั้งในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง (c) และในเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มี เซลล์มะเร็ง (n), M หมายถึงปฏิกิริยา Methylation, U หมายถึงปฏิกิริยา Unmethylation, +/+ หมายถึง Positive control และ -/- หมายถึง Negative control สามารถสรุปผลได้ตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* จากเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง

Prostate cancer tissues (n = 12)		
	Prostatic adenocarcinoma	adjacent non-neoplastic
Promoter methylation status		
Methylation	7 (58.3%)	3 (25%)
Unmethylation	5 (41.7%)	9 (75%)

โดยผลการศึกษาวิจัยยังสามารถจำแนกได้ว่า ชี้นี้เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ทั้งหมด 7 ราย พบว่ามี 6 ราย พบการเกิด methylation เฉพาะในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง และพบว่ามี 1 ราย ที่เกิด methylation ทั้งในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและในเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ในชี้นี้เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก 2 ราย พบการเกิด methylation เฉพาะในเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง และในชี้นี้เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก 3 ราย ไม่พบการเกิด methylation ทั้งในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง โดยสามารถสรุปผลได้ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการศึกษาการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ระหว่างเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง

Prostate cancer (n = 12)	Prostatic adenocarcinoma		adjacent non-neoplastic	
	Methylation	Unmethylation	Methylation	Unmethylation
(6/12)	+	+		+
(1/12)	+	+	+	+
(2/12)		+	+	+
(3/12)		+		+

หมายเหตุ + = มีเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้น

3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 กับผลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

	Patients (n = 92)	PAQR3 promoter methylation		p value ^b
		Methylation (n = 68)	Unmethylation (n = 24)	
Mean age ±SD, years		67.6±6.4	67.1±5.8	0.37 ^c
PSA level ±SD, ng/ml		14.9±16.1	14.2±14.9	0.49 ^d
Gleason score				0.34
< 7	37	26 (70.3%)	11 (29.7%)	
≥ 7	55	42 (76.4%)	13 (23.6%)	
Surgical margin				0.48
Positive	33	25 (75.8%)	8 (24.2%)	
Negative	59	43 (72.9%)	16 (27.1%)	
Lymph node metastasis				0.51
Positive	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	
Negative	86	63 (73.3%)	23 (26.7%)	
Seminal vesicle invasion				0.49
Positive	25	18 (72%)	7 (28%)	
Negative	67	50 (74.6%)	17 (25.4%)	
Perineural invasion				0.03
Positive	66	53 (80.3%)	13 (19.7%)	
Negative	26	15 (57.7%)	11 (42.3%)	
Extraprostatic invasion				0.25
Positive	42	33 (78.6%)	9 (21.4%)	
Negative	50	35 (70%)	15 (30%)	
pT stage				0.35
pT2	41	29 (70.7%)	12 (29.3%)	
pT3 + pT4	51	39 (76.5%)	12 (23.5%)	
Biochemical recurrence				0.40
Yes	23	18 (82.3%)	5 (21.7%)	
No	69	50 (72.5%)	19 (27.5%)	

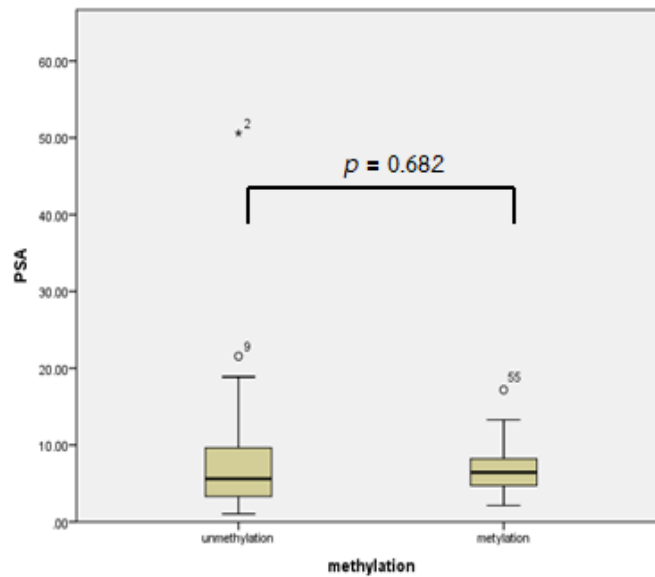
^b Fisher's exact test, ^c t-test, ^d U test

ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิด methylation มีอายุเฉลี่ยที่ 67.6 ± 6.4 ปี และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่ไม่เกิด methylation มีอายุเฉลี่ยที่ 67.1 ± 5.8 ปี เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Student T-test พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.37$ นอกจากนี้เมื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระดับ PSA เฉลี่ยใน serum ผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากก่อนรับการผ่าตัด พบว่าผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิด methylation มีระดับ PSA เฉลี่ยใน serum ที่ 14.9 ± 16.1 ng/ml และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่ไม่เกิด methylation มีระดับ PSA เฉลี่ยใน serum ที่ 14.2 ± 14.9 ng/ml ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.49$ จากนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับดัชนีพยากรณ์โรคต่างๆ ได้แก่ Gleason score, Surgical margin, Lymph node metastasis, Seminal vesicle invasion, Perineural invasion, Extraprostatic invasion, pT stage และ Biochemical recurrence โดยใช้สถิติ Fisher's exact test ในการทดสอบ ผลการศึกษาพบว่า การเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่ามีความสัมพันธ์กับการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยรอบเส้นประสาทในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.03$

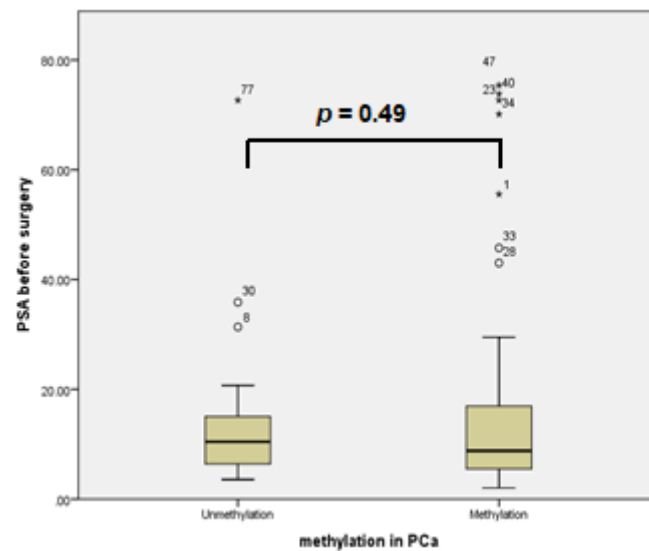
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระดับ PSA ผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากก่อนผ่าตัด

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับค่าเฉลี่ย PSA ใน serum ผู้ป่วย BPH ก่อนรับการผ่าตัดพบว่า ผู้ป่วย BPH ที่เกิด methylation และไม่เกิด methylation มีค่าเฉลี่ย PSA ที่ 7.18 ± 4.0 ng/ml และ 8.07 ± 8.1 ng/ml เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ Mann-Whitney U test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.68$ และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิด methylation และไม่เกิด methylation มีค่าเฉลี่ย PSA ใน serum ที่ 14.9 ± 16.1 ng/ml และ 14.2 ± 14.9 ng/ml และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.49$

(A)



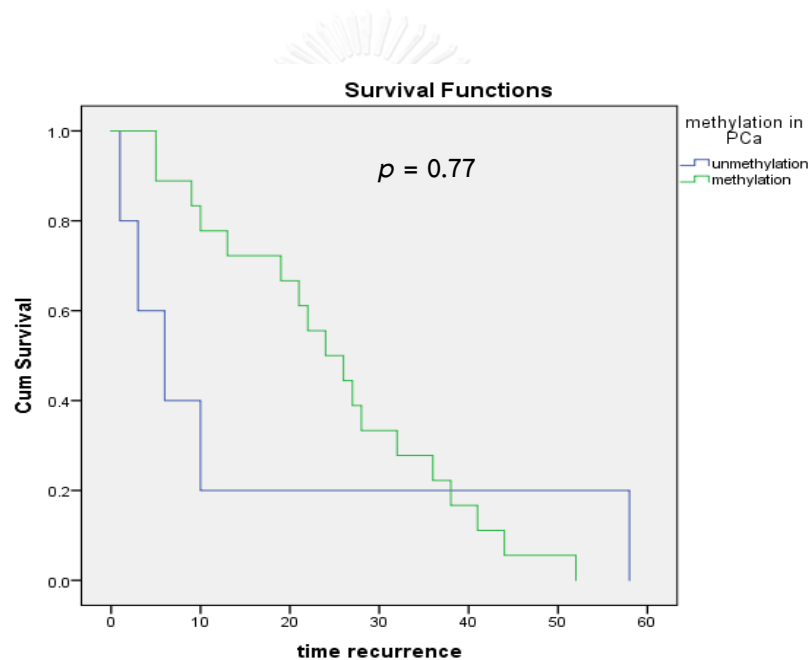
(B)



ภาพที่ 21 กราฟ Box plot แสดงความสัมพันธ์ของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระดับ PSA ก่อนรับการผ่าตัดของผู้ป่วย BPH และผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก (A) กราฟแสดงความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วย BPH ซึ่งมีค่ามัธยฐานในกลุ่ม unmethylation และ methylation เท่ากับ 5.6 ng/ml และ 6.4 ng/ml ตามลำดับ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งมีค่ามัธยฐานในกลุ่ม unmethylation และ methylation เท่ากับ 10.4 ng/ml และ 8.8 ng/ml ตามลำดับ

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระยะเวลาการกลับมาเกิดซ้ำของค่า PSA ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากหลังผ่าตัด

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระยะเวลาของการกลับมาเกิดซ้ำของค่า PSA ใน serum ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากหลังการผ่าตัด โดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival Analysis และ Log-Rank Test ในการวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิด methylation และไม่เกิด methylation มีระยะเวลาของการกลับมาเกิดซ้ำของค่า PSA ในซีรัมที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.77$



ภาพที่ 22 แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* กับระยะเวลาของการกลับมาเกิดซ้ำของค่า BCR ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความชุกของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH จำนวน 62 ราย และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 92 ราย พบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH ทั้งหมด 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 25.8 และชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากทั้งหมด 68 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.9 และในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 12 ราย พบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็ง จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 58.3 และเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 25 และมี 6 ราย ที่พบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* เฉพาะในชิ้นเนื้อที่มีเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษาทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า ชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากมีการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* มากกว่าชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และสัมพันธ์กับการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยรอบประสาทในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.03$

อภิปรายผล

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์เกิดสูงเป็นอันดับสองและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ชายทั่วโลก⁽¹⁾ ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่พบว่า อายุ, เชื้อชาติ รวมทั้งคนในครอบครัวที่เคยมีประวัติเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยง⁽²⁾ อย่างไรก็ตามในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพบว่า การเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิด DNA methylation ที่เป็นหนึ่งในสภาวะเหนือพันธุกรรมที่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน⁽³⁾ หากเกิดที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็งหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อและดำเนินการของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽⁴⁻⁷⁾

โปรเจสตินแอนอติโพควีรีเซปเตอร์ 3 (Progesterin and adipoQ receptor 3) หรือ *PAQR3* เป็นหนึ่งในสมาชิกของโปรตีน Progesterin and adipoQ receptor หรือ *PAQR* โดยมีทั้งหมด 11 สมาชิก⁽²⁵⁾ โปรตีน *PAQR3* ถูกถอดรหัสจากยีน *PAQR3* โดยโปรตีนนี้มีลักษณะเป็น seven-transmembrane protein ที่แทรกอยู่ที่เยื่อหุ้ม Golgi apparatus และมักรู้จักกันในนาม Raf

kinase trapping to Golgi หรือ RKTG⁽³⁰⁾ บทบาทการทำงานของโปรตีน PAQR3 พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกหลายอย่างภายในเซลล์ อาทิ ช่วยรักษาภาวะสมดุลของระดับคอเลสเตอรอลภายในเซลล์ตับ^(31, 32) และช่วยปกป้องเซลล์ไม่ให้ได้รับความเสียหายจากอนุมูลอิสระ เป็นต้น⁽³³⁾ จากบทบาทดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกเป็นโปรตีน PAQR3 นั้นมีส่วนสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ให้ปกติ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *PAQR3* ยังทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็งในหลายชนิด อาทิ มะเร็งลำไส้⁽¹⁸⁾ มะเร็งเต้านม⁽²¹⁾ มะเร็งกระเพาะอาหาร⁽¹⁹⁾ มะเร็งตับ⁽²⁰⁾ มะเร็งกล่องเสียง⁽³⁵⁾ มะเร็งกระดูกอ่อน⁽³⁷⁾ มะเร็งสมอง⁽⁶⁰⁾ มะเร็งหลอดอาหาร⁽⁶¹⁾ และมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹⁷⁾ ซึ่งหลายการศึกษาได้รายงานตรงกันว่า ระดับโปรตีน PAQR3 และ mRNA มักลดลงในหลายชนิดมะเร็ง^(18, 20, 21, 35, 36) รวมทั้งในมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹⁷⁾ การลดลงของโปรตีนนี้พบว่าผู้ป่วยมีผลทางคลินิกที่ไม่ดี^(18-21, 36, 62) และมีชีวิตรอดที่สั้นในผู้ป่วยมะเร็งบางชนิด⁽²⁰⁾ ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ากลไกใดที่มีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน แต่จากการรายงานในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่า การลดลงของโปรตีน PAQR3 สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ microRNA-137⁽⁶³⁾ อย่างไรก็ตามมีรายงานล่าสุดของ Li RH และคณะในปี 2016 ที่รายงานว่าการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ที่สูงในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งลำไส้⁽²²⁾ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen J และคณะที่รายงานว่าการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและสัมพันธ์กับการลดลงของโปรตีน PAQR3⁽²¹⁾ จากความสอดคล้องกันนี้แสดงให้เห็นว่าการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* อาจมีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง และเป็นไปได้ว่าการลดลงของโปรตีน PAQR3 และ mRNA ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน

ดังนั้นการศึกษานี้ผู้วิจัยใช้เทคนิค Methylation-Specific PCR เช่นเดียวกับการศึกษาในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้^(21, 22) เพื่อหาความชุกของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากและชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH โดยเทคนิค Methylation-Specific PCR ที่ผู้วิจัยเลือกใช้นี้เป็นเทคนิคที่มีราคาถูก ง่ายต่อการศึกษา และยังไวต่อการนำมาตรวจสอบการเกิด methylation จากตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอปริมาณน้อย ซึ่งเหมาะสมสำหรับตัวอย่าง FFPE ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้⁽⁵⁷⁾ ผลจากการศึกษาพบว่า ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากพบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ร้อยละ 73.9 และร้อยละ 25.8 จากชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH นอกจากนี้เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* จากชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 12 ราย จากการสุ่ม พบว่าในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งพบการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ร้อยละ 58.3 และพบร้อยละ 25 ในเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง โดยชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 6 ราย ที่เกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* พบเฉพาะใน

เนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งเท่านั้น จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง *PAQR3* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากมากกว่าชิ้นเนื้อผู้ป่วย BPH และพบในเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อใกล้เคียงกันที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการรายงานในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้^(21, 22) จากผลการศึกษาที่เป็นไปในแนวทางเดียวกันนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค Methylation Specific PCR ที่ผู้วิจัยเลือกใช้เป็นเทคนิคที่ได้มาตรฐานและให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน

เป็นที่น่าสนใจว่าพบการเกิด Partial methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ในชิ้นเนื้อต่อมลูกหมาก ซึ่งการเกิด Partial methylation ของยีนนี้อาจเกิดจากความจำเพาะของตำแหน่ง CpG sites ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ที่นำศึกษา หรืออาจเกิดจากธรรมชาติที่มีลักษณะเฉพาะของยีน โดยการศึกษาที่ผู้วิจัยเลือกใช้ตำแหน่งโปรโมเตอร์ที่ -188 ถึง +587 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้^(21, 22) โดยแสดงผลการศึกษาที่มีความสอดคล้องกัน ดังนั้นจึงสามารถอธิบายได้ว่าการเกิด Partial methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* นั้นอาจเกิดจากความจำเพาะของตำแหน่ง CpG site ที่นำมาศึกษาและอาจเป็นลักษณะเฉพาะในการแสดงออกทางธรรมชาติของยีน เป็นที่สนใจว่าการศึกษานี้พบการเกิด partial methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ที่มากในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก อาจเป็นไปได้ว่าการเกิด partial methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* อาจมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน *PAQR3* ในมะเร็งต่อมลูกหมาก Zheng S และคณะในปี 2000⁽⁶⁴⁾ ได้อธิบายว่าการเกิด Partial methylation หรือ intermediate methylation นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกันกับการเกิด extensive methylation โดยทางคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการเกิด methylation ของยีนต้านมะเร็งชนิด *p14^(ARF)* ในเซลล์มะเร็งลำไส้ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิดที่แสดงออกเป็น Partial methylation ส่งผลต่อการลดลงของ mRNA ของยีน *p14^(ARF)* เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็งลำไส้ที่เกิด extensive methylation ดังนั้นในการศึกษานี้และหลายการศึกษาจึงได้จัดผลการเกิด Partial methylation ของยีนต่างๆเป็น methylation^(5, 64-68)

การเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *PAQR3* ที่พบได้มากในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากอาจมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีนและนำไปสู่การก่อมะเร็งในต่อมลูกหมาก เนื่องจากบทบาทของโปรตีน *PAQR3* นอกจากจะเป็นยีนต้านมะเร็งหลายชนิดแล้ว ยังพบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการเจริญของเนื้องอก หรือ tumorigenesis ได้ในหลายชนิดมะเร็ง^(18, 20, 61, 63) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹⁷⁾ ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของโปรตีน *PAQR3* สามารถยับยั้งการเจริญ การเพิ่มจำนวน และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกในหนูทดลองได้ นอกจากนั้นโปรตีน *PAQR3* ยังสามารถยับยั้งกลไกการแสดงออกของ

AKT/ERK phosphorylation และการแสดงออกของโปรตีน EMT ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹⁷⁾ ในระดับกลไกโปรตีน PAQR3 ยังสามารถยับยั้งการทำงานของกลไก Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway ซึ่งเป็นหนึ่งในกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ การเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง^(16, 34) โดยกลไกเหล่านี้มีบทบาทเป็น oncogene ในมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾ ซึ่งหากสูญเสียการทำงานจะสามารถก่อกำเนิดและพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้⁽³⁴⁾ Feng L และคณะในปี 2007 ได้รายงานว่าการยับยั้งกลไก Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway โดยจะจับกับโปรตีน Raf-1 ที่อยู่ใน cytoplasm เข้าสู่ Golgi apparatus และเปลี่ยนโปรตีน Raf-1 ให้อยู่ในรูป inactive forms ทำให้โปรตีน Raf-1 ไม่สามารถไปกระตุ้นกลไกการทำงานของ Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway ได้ ส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญที่ลดลง^(16, 34) นอกจากนี้โปรตีน PAQR3 ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของ EGF/ERK phosphorylation^(17, 18, 35, 37, 72) และลดการแสดงออกของโปรตีน MAPK ส่งผลให้ลดการสร้างหลอดเลือดไปเลี้ยงมะเร็ง⁽⁷³⁾ และยังสามารถทำงานร่วมกับยีนต้านมะเร็ง p53 ในการยับยั้งการก่อมะเร็งได้⁽⁷²⁾ จากผลการรายงานที่สอดคล้องกันนี้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของโปรตีน PAQR3 นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็ง การเกิด methylation ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 อาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีนและอาจเป็นสาเหตุของการก่อโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้

นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังพบว่า การเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 มีความสัมพันธ์กับการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยรอบเส้นประสาทของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาตอนที่พบว่า การเกิด methylation ของยีน PAQR3 มีความสัมพันธ์กับการลุกลามของเซลล์มะเร็ง^(21, 22) ซึ่งผลจากการลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยรอบเส้นประสาทพบว่า ผู้ป่วยมักมีผลพยากรณ์โรคที่ไม่ดี⁽⁷⁴⁾ จากบทบาทที่กล่าวมาข้างต้นที่พบว่าโปรตีน PAQR3 สามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน Twist1⁽³⁶⁾ และลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากจากการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน EMT⁽¹⁷⁾ ดังนั้นการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3 อาจส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน PAQR3 ที่ผิดปกติ และอาจนำไปสู่การลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยรอบเส้นประสาทในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในภายภาคหน้าควรศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง PAQR3 กับการแสดงออกเป็นของโปรตีนและ mRNA ในมะเร็งต่อมลูกหมาก และอาจศึกษาร่วมกับเทคนิคอื่นๆควบคู่

รายการอ้างอิง

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci*. 2006;11:1388-413.
3. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(6):415-28.
4. Yang M, Park JY. DNA methylation in promoter region as biomarkers in prostate cancer. *Methods Mol Biol*. 2012;863:67-109.
5. Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A, Murata T, Takahashi H, et al. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer*. 2003;106(3):382-7.
6. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res*. 2011;21(3):502-17.
7. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
8. Burkhardt JH, Litwin MS, Rose CM, Correa RJ, Sunshine JH, Hogan C, et al. Comparing the costs of radiation therapy and radical prostatectomy for the initial treatment of early-stage prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(12):2869-75.
9. Shipley WU, Thames HD, Sandler HM, Hanks GE, Zietman AL, Perez CA, et al. Radiation therapy for clinically localized prostate cancer: a multi-institutional pooled analysis. *Jama*. 1999;281(17):1598-604.
10. Kupelian PA, Mahadevan A, Reddy CA, Reuther AM, Klein EA. Use of different definitions of biochemical failure after external beam radiotherapy changes conclusions about relative treatment efficacy for localized prostate cancer. *Urology*. 2006;68(3):593-8.

11. Ankerst DP, Thompson IM. Sensitivity and specificity of prostate-specific antigen for prostate cancer detection with high rates of biopsy verification. *Arch Ital Urol Androl.* 2006;78(4):125-9.
12. Maldonado L, Brait M, Loyo M, Sullenberger L, Wang K, Peskoe SB, et al. GSTP1 promoter methylation is associated with recurrence in early stage prostate cancer. *J Urol.* 2014;192(5):1542-8.
13. Goltz D, Holmes EE, Gevensleben H, Sailer V, Dietrich J, Jung M, et al. CXCL12 promoter methylation and PD-L1 expression as prognostic biomarkers in prostate cancer patients. *Oncotarget.* 2016.
14. Vo TT, Ta BT, Ta VT, Vuong DL, Nguyen QU. Promoter methylation profile of GSTP1 and RASSF1A in prostate cancer and benign hyperplasia in Vietnamese men. *Turkish journal of medical sciences.* 2016;46(1):228-35.
15. Niu WB, Gui SL, Lin YL, Fu XL, Ma JG, Li WP. Promoter methylation of protocadherin8 is an independent prognostic factor for biochemical recurrence of early-stage prostate cancer. *Med Sci Monit.* 2014;20:2584-9.
16. Feng L, Xie X, Ding Q, Luo X, He J, Fan F, et al. Spatial regulation of Raf kinase signaling by RKTG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(36):14348-53.
17. Huang W, Guo W, You X, Pan Y, Dong Z, Jia G, et al. PAQR3 suppresses the proliferation, migration and tumorigenicity of human prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2016.
18. Wang X, Li X, Fan F, Jiao S, Wang L, Zhu L, et al. PAQR3 plays a suppressive role in the tumorigenesis of colorectal cancers. *Carcinogenesis.* 2012;33(11):2228-35.
19. Ling ZQ, Guo W, Lu XX, Zhu X, Hong LL, Wang Z, et al. A Golgi-specific protein PAQR3 is closely associated with the progression, metastasis and prognosis of human gastric cancers. *Ann Oncol.* 2014;25(7):1363-72.
20. Wu HG, Zhang WJ, Ding Q, Peng G, Zou ZW, Liu T, et al. Identification of PAQR3 as a new candidate tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Oncology reports.* 2014;32(6):2687-95.
21. Chen J, Wang F, Xu J, He Z, Lu Y, Wang Z. The role of PAQR3 gene promoter hypermethylation in breast cancer and prognosis. *Oncology reports.* 2016;36(3):1612-8.

22. Li RH, Zhang AM, Li S, Li TY, Wang LJ, Zhang HR, et al. PAQR3 gene expression and its methylation level in colorectal cancer tissues. *Oncol Lett*. 2016;12(3):1773-8.
23. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2003;169(2):517-23.
24. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(3):292-306.
25. Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, et al. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol*. 2005;61(3):372-80.
26. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423(6941):762-9.
27. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2237-42.
28. Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2231-6.
29. Gonez LJ, Naselli G, Banakh I, Niwa H, Harrison LC. Pancreatic expression and mitochondrial localization of the progesterin-adipoQ receptor PAQR10. *Mol Med*. 2008;14(11-12):697-704.
30. Luo X, Feng L, Jiang X, Xiao F, Wang Z, Feng GS, et al. Characterization of the topology and functional domains of RKTG. *Biochem J*. 2008;414(3):399-406.
31. Xu D, Wang Z, Zhang Y, Jiang W, Pan Y, Song BL, et al. PAQR3 modulates cholesterol homeostasis by anchoring Scap/SREBP complex to the Golgi apparatus. *Nat Commun*. 2015;6:8100.
32. Wang L, Wang X, Li Z, Xia T, Zhu L, Liu B, et al. PAQR3 has modulatory roles in obesity, energy metabolism, and leptin signaling. *Endocrinology*. 2013;154(12):4525-35.

33. Zhang Y, Hou Y, Liu C, Li Y, Guo W, Wu JL, et al. Identification of an adaptor protein that facilitates Nrf2-Keap1 complex formation and modulates antioxidant response. *Free Radic Biol Med*. 2016;97:38-49.
34. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011;2(3):135-64.
35. Wu Q, Zhuang K, Li H. PAQR3 plays a suppressive role in laryngeal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2016;37(1):561-5.
36. Guo W, You X, Xu D, Zhang Y, Wang Z, Man K, et al. PAQR3 enhances Twist1 degradation to suppress epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2016;37(4):397-407.
37. Ma Z, Wang Y, Piao T, Li Z, Zhang H, Liu Z, et al. The tumor suppressor role of PAQR3 in osteosarcoma. *Tumour Biol*. 2015;36(5):3319-24.
38. Yan MS, Matouk CC, Marsden PA. Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol (1985)*. 2010;109(3):916-26.
39. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 2000;16(4):168-74.
40. Ahmed H. Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomarkers in cancer*. 2010;2010(2):17-33.
41. Patra SK, Bettuzzi S. Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review). *Oncology reports*. 2007;17(6):1279-90.
42. Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T, Brothman AR. Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *The Prostate*. 2001;46(3):249-56.
43. Bachmann N, Haeusler J, Luedeke M, Kuefer R, Perner S, Assum G, et al. Expression changes of CAV1 and EZH2, located on 7q31 approximately q36, are rarely related to genomic alterations in primary prostate carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2008;182(2):103-10.

44. Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A, et al. DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer letters*. 2006;240(1):69-75.
45. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *The EMBO journal*. 1997;16(5):998-1008.
46. Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer research*. 2002;62(12):3498-502.
47. Wang W, Zhang L, Wang Z, Yang F, Wang H, Liang T, et al. A three-gene signature for prognosis in patients with MGMT promoter-methylated glioblastoma. *Oncotarget*. 2016.
48. Guo Q, Wang HB, Li YH, Li HF, Li TT, Zhang WX, et al. Correlations of Promoter Methylation in WIF-1, RASSF1A, and CDH13 Genes with the Risk and Prognosis of Esophageal Cancer. *Med Sci Monit*. 2016;22:2816-24.
49. Shakeri H, Gharesouran J, Fakhrijou A, Esfahani A, Mohaddes Ardebili SM. DNA methylation assessment as a prognostic factor in invasive breast cancer using methylation-specific multiplex ligation dependent probe amplification. *Excli j*. 2016;15:11-20.
50. Sugimachi K, Matsumura T, Shimamura T, Hirata H, Uchi R, Ueda M, et al. Aberrant Methylation of FOXE1 Contributes to a Poor Prognosis for Patients with Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016.
51. Nakayama M, Gonzalzo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2004;91(3):540-52.
52. Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, Migliavacca E, Straub J, Di Stefano I, et al. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):332-7.

53. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(14):e128.
54. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(5):1827-31.
55. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(12):2532-4.
56. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science.* 1998;281(5375):363, 5.
57. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821-6.
58. Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ, Molloy P. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods.* 2002;27(2):114-20.
59. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002;18(11):1427-31.
60. Tang SL, Gao YL, Hu WZ. PAQR3 inhibits the proliferation, migration and invasion in human glioma cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;92:24-32.
61. Zhou F, Wang S, Wang J. PAQR3 Inhibits the Proliferation and Tumorigenesis in Esophageal Cancer Cells. *Oncol Res.* 2017;25(5):663-71.
62. Li Z, Ling ZQ, Guo W, Lu XX, Pan Y, Wang Z, et al. PAQR3 expression is downregulated in human breast cancers and correlated with HER2 expression. *Oncotarget.* 2015;6(14):12357-68.
63. Xiu Y, Liu Z, Xia S, Jin C, Yin H, Zhao W, et al. MicroRNA-137 upregulation increases bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting PAQR3. *PLoS One.* 2014;9(10):e109734.
64. Zheng S, Chen P, McMillan A, Lafuente A, Lafuente MJ, Ballesta A, et al. Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced

mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis*. 2000;21(11):2057-64.

65. Li C, Tang L, Zhao L, Li L, Xiao Q, Luo X, et al. OPCML is frequently methylated in human colorectal cancer and its restored expression reverses EMT via downregulation of smad signaling. *Am J Cancer Res*. 2015;5(5):1635-48.

66. Dong T, Zhang M, Dong Y, Herman JG, van Engeland M, Zhong G, et al. Methylation of RASSF10 promotes cell proliferation and serves as a docetaxel resistant marker in human breast cancer. *Discov Med*. 2015;20(111):261-71.

67. Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:66.

68. Niu H, Jia Y, Li T, Su B. SOX2 Inhibition Promotes Promoter Demethylation of CDX2 to Facilitate Gastric Intestinal Metaplasia. *Dig Dis Sci*. 2017;62(1):124-32.

69. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1263-84.

70. Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF, Jr., Weber MJ. Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer research*. 1999;59(2):279-84.

71. Weber MJ, Gioeli D. Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem*. 2004;91(1):13-25.

72. Jiang Y, Xie X, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Ling ZQ, et al. Functional cooperation of RKTG with p53 in tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research*. 2011;71(8):2959-68.

73. Zhang Y, Jiang X, Qin X, Ye D, Yi Z, Liu M, et al. RKTG inhibits angiogenesis by suppressing MAPK-mediated autocrine VEGF signaling and is downregulated in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29(39):5404-15.

74. Lee JT, Lee S, Yun CJ, Jeon BJ, Kim JM, Ha HK, et al. Prediction of perineural invasion and its prognostic value in patients with prostate cancer. *Korean J Urol*. 2010;51(11):745-51.



1. การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย CT conversion reagent

- เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงในหลอด CT conversion reagent และเติม M-dilution buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- และ M-dissolving buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอด CT conversion reagent ตามลำดับ และปั่นหยาบด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 10 นาที

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TAE buffer (Tris-acetate-EDTA)

- ชั่ง Tris base ปริมาณ 48.5 กรัม
- ชั่ง 0.5M EDTA ปริมาณ 3.72 กรัม ที่ pH 8.0
- เติม Glacial acetic acid ปริมาตร 11.44 มิลลิลิตร
- นำสารทั้งหมดเติมลงในขวดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จะได้สาร 10x TAE buffer และทำการปรับความเข้มข้นเป็น 1x TAE buffer โดยการนำ 10x TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตรละลายด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

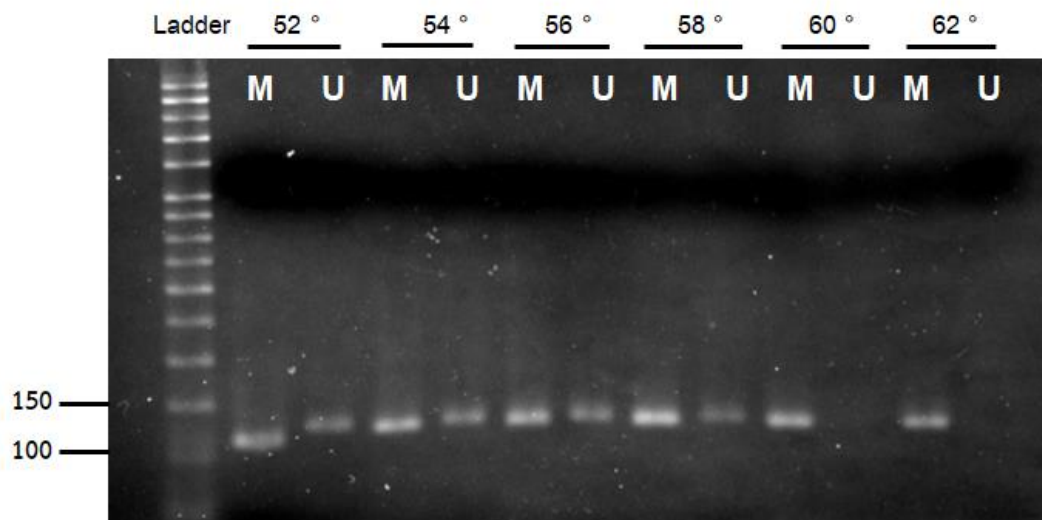
3. การเตรียมเจลอะกาโรส

- ชั่งสาร Agarose ปริมาณ 2 กรัม ละลายด้วย 1xTAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำเข้าเครื่องไมโครเวฟ (Microwave) เพื่อทำการละลาย (Melt) สาร Agarose เป็นเวลา 1-2 นาที
- นำมาเทลงแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ให้เย็น และนำแผ่นเจลไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

2. ลำดับเบสบนตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน PAQR3

GATGCATCAGAAGCTGCTGAAGAGCGCGCATTACATCGAGCTGGGCAGCTACCAGTACTGGCC
GGTCCTGGTGCCCCGTGGCATCCGCCTGTACACCTACGAGCAGATCCCCGGGTCCCTCAAGGA
CAACCCGTACATCACCGACGGCTACCGGGCCTACCTGCCGTCCAGGCTGTGTATCAAAAAGGTAC
GGTCTGGCTGCCTCCGCCTGGAGTGCCCCCTTCTCTCACCTACACCCTTTTTGT

3. แสดงแถบแบนดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม ณ อุณหภูมิต่างๆ



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล : นายโกวิท ลวงลายทอง

วัน เดือน ปีเกิด : 3 ธันวาคม พ.ศ 2533

บิดา : นายสำเร็จ ลวงลายทอง

มารดา : นางระวี ลวงลายทอง

สถานที่ติดต่อ : บ้านเลขที่ 24/3 ต.เนินง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

วุฒิการศึกษา : ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัย

ศิลปากร

ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย

