

อัตราการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน Sex-Determining Region Y (SRY)-Box ชนิด
ที่ 11 (SOX11) ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก



นายอภิวัฒน์ ภูทองไชย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

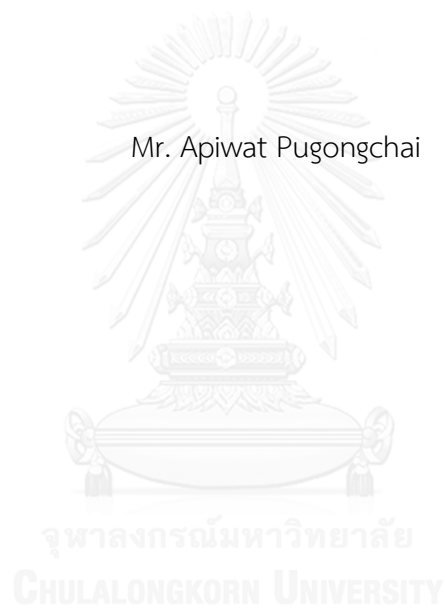
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Methylation status of Sex-Determining Region Y (SRY)-
Box 11 (SOX11) in Human Prostate Tissue

Mr. Apiwat Pugongchai



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	อัตราการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน Sex-Determining Region Y (SRY)-Box ชนิดที่ 11 (SOX11) ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก
โดย	นายอภิวัฒน์ ภูกองไชย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล)

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

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายแพทย์ทรงคุณ วิญญูวรรณ)

อภิวัฒน์ ภูกองไชย : อัตราการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน Sex-Determining Region Y (SRY)-Box ชนิดที่ 11 (SOX11) ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก (Methylation status of Sex-Determining Region Y (SRY)-Box 11 (SOX11) in Human Prostate Tissue) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. พิเชฐ สัมปทานกุล, 73 หน้า.

ที่มาและปัญหา: SOX11 ในมะเร็งต่อมลูกหมากมีบทบาทเป็น tumor suppressor gene และการทดลองในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงพบว่ามี การแสดงออกของยีนลดลง สำหรับการศึกษานี้ในมะเร็งหลายอวัยวะ รายงานว่า การเกิด DNA methylation ของยีน SOX11 ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การเกิด DNA methylation ของยีน SOX11 ยังไม่มีรายงานในมะเร็งต่อมลูกหมาก

จุดประสงค์: ศึกษาอัตราการเกิด DNA methylation ของ SOX11 ในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อของผู้ป่วยต่อมลูกหมากโตที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง และศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด DNA methylation ของ SOX11 กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

วิธีการทดลอง: เลือกตัดชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่รักษาสภาพในบล็อกพาราฟิน เป็นบล็อกชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก 62 รายและบล็อกชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง 81 ราย นำมาศึกษาการเกิด DNA methylation ของ SOX11 โดยใช้เทคนิค methylation-specific PCR (MSP) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่มี และ ไม่มี DNA methylation ของ SOX11 กับลักษณะทางคลินิกต่างๆ ได้แก่ อายุ, Gleason score, ระดับ PSA, lymph node metastasis, seminal vesicle invasion, perineural invasion, extraprostatic invasion, pT stage, surgical margin และ biochemical recurrence status (BCR) โดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลอง: พบร้อยละของการเกิด methylation ของ SOX11 ในกลุ่มมะเร็งต่อมลูกหมาก 80.6% และในกลุ่มต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง 35.8 % มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับดัชนีพยากรณ์โรคระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มี การเกิด methylation ของ SOX11 ของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากพบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ระดับ PSA ที่สูง ($p = 0.01$), Gleason score ที่สูง (≥ 7) ($p < 0.01$) และการลุกลามโดยรอบเส้นประสาท ($p = 0.03$) นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่เกิด methylation ของ SOX11 พบระยะปลอด biochemical recurrence (BCR-free survival) มีระยะเวลาเฉลี่ยที่ 19.8 ซึ่งสั้นกว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่ไม่เกิด methylation ของ SOX11 มีระยะเวลาเฉลี่ยที่ 44.8 เดือน ($p < 0.01$)

สรุปผลการทดลอง: มีการเกิด methylation ของ SOX11 ในอัตราที่สูงในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับ PSA ที่สูง, Gleason score ที่สูง, perineural invasion และ การเกิด BCR เร็ว ในทางคลินิกการตรวจ methylation ของ SOX11 ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากอาจมีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวชี้ร่วมที่จะพยากรณ์พฤติกรรมที่รุนแรงของเซลล์มะเร็งได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ นิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5774111230 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: DNA METHYLATION / SOX11 / PROSTATE CANCER / BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

APIWAT PUGONGCHAI: Methylation status of Sex-Determining Region Y (SRY)-Box 11 (*SOX11*) in Human Prostate Tissue. ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON KEELAWAT, M.D., CO-ADVISOR: PROF. PICHET SAMPATANUKUL, M.D., 73 pp.

Background: *SOX11* has been recently recognized as a potential tumor suppressor and the experiment on prostatic cancer cell line revealed that it was downregulated of this gene expression. DNA methylation of *SOX11* were reported in several human cancers and it's affecting to the gene expression. However, the methylation status of *SOX11* in prostate cancer has never been reported.

Objective: To figure out the rate of DNA methylation status of *SOX11* in prostate cancer tissue comparing with benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue, and to find out correlation of DNA methylation with clinicopathological features of the prostatic cancer patients.

Methods: Samples were formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue obtained from 62 patients with prostate cancer and from 81 patients with BPH. The methylation of *SOX11* were examined using methylation-specific PCR (MSP). Associations between *SOX11* methylation and clinicopathological features such as age, Gleason score, PSA level, lymph node metastasis, seminal vesicle invasion, perineural invasion, extraprostatic invasion, pT stage, surgical margin and biochemical recurrence status (BCR) were assessed by univariate statistics.

Results: *The detection rate of SOX11* methylation in prostate cancer was 80.6% comparing with 35.8% in BPH. The difference of *SOX11* methylation between prostate cancer and BPH was statistically significant ($p < 0.001$). The *SOX11* methylation was significantly correlated with higher prostate-specific antigen level ($p = 0.01$), higher Gleason score (≥ 7) ($p < 0.01$), perineural invasion ($p = 0.03$). Furthermore, the patients with *SOX11* methylation has mean BCR-free survival time shorter, 19.8 months vs. 44.8 months. ($p < 0.01$).

Conclusions: The *SOX11* methylation occurred frequently in prostate cancer and correlated with higher PSA level, higher Gleason score, perineural invasion and association shorter worse BCR-free survival. The *SOX11* methylation may be used as predict aggressive behavior in prostate cancer.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาและช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิเชฐ สัมปทานกุล ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย และได้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการทำงาน และตรวจทานแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อองชัย คุณแม่ยุพิน และน้องสาวครอบครัวภูทองไขย รวมถึงญาติพี่น้อง ที่คอยให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรีชา เรืองวรรณเวชชัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ฝ่ายพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำรวมถึงให้ความช่วยเหลือในด้านเทคนิคต่างๆ จนงานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณวริษา ตันติตลธเนศ คุณจักรีวงศ์ มาอั้น และสมาชิกในห้องปฏิบัติการ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ ให้ข้อคิด และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นปีการศึกษา 2557 ทั้งรุ่นพี่ รุ่นน้อง เพื่อนในมหาวิทยาลัย และเพื่อนต่างมหาวิทยาลัย ตลอดจนคุณอภิญา บุตรลี ที่คอยให้คำปรึกษา และคอยช่วยเหลือทางด้านต่างๆจนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

และขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการศึกษาจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	5
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
คำสำคัญ.....	5
ขั้นตอนของการวิจัย.....	6
ข้อจำกัดของการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer)	8
สภาวะเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)	12

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งต่อมลูกหมาก (DNA methylation in prostate cancer)	15
ยีน Sex-determining region Y (SRY)-box (SOX).....	19
ทฤษฎีและหลักการเทคนิค Methylation-specific PCR (MSP).....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	30
รูปแบบการวิจัย	30
ประชากรศึกษา	30
ชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง	30
เกณฑ์ในการคัดเลือกชิ้นเนื้อเพื่อใช้ในการศึกษา	30
การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.....	31
ประเด็นจริยธรรม	32
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย	33
สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
การเก็บตัวอย่าง.....	35
การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction).....	36
การทำปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์ (bisulfite treatment)	38
การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา methylation-specific PCR (Primer design)	40
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยด้วยเทคนิค methylation-specific PCR (MSP)	45
การแยกสายดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis	46
การดูผลและถ่ายรูปเจลโดยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation System).....	46
การบันทึกข้อมูล	46
การตรวจสอบข้อมูล.....	47

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	47
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
ประชากรตัวอย่าง.....	48
ผลการศึกษาการเกิด methylation ของ SOX11	49
ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยที่เป็น มะเร็งต่อมลูกหมาก	51
ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับ Gleason score	51
ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับระดับ PSA.....	53
ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับการแพร่กระจาย การลุกลาม ระยะของโรค และสถานะ surgical margin	55
ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับสถานะ biochemical recurrence (BCR)	56
ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วย BPH	59
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	60
ข้อเสนอแนะและสรุปผลการทดลอง.....	62
รายการอ้างอิง	64
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	73

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าปกติของ PSA แบ่งตามช่วงอายุและเชื้อชาติ.....	8
ตารางที่ 2 Histopathologic grade.....	9
ตารางที่ 3 ยีนที่มีการเกิด DNA methylation ในเนื้อเยื่อและ cell line มะเร็งต่อมลูกหมาก..	17
ตารางที่ 4 อัตราการเกิด DNA methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากด้วยเทคนิค MSP	19
ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียด SOX family ในกระบวนการ embryonic development	21
ตารางที่ 6 แสดงสารในปฏิกิริยา PCR	26
ตารางที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	43
ตารางที่ 8 แสดงสภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา MSP	45
ตารางที่ 9 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา MSP	45
ตารางที่ 10 คุณสมบัติพื้นฐานของผู้ป่วยที่นำมาศึกษา.....	48
ตารางที่ 11 ผลการศึกษาการเกิด SOX11 methylation.....	49
ตารางที่ 12 ความแตกต่างของการเกิด SOX11 methylation ระหว่างกลุ่มมะเร็งและ BPH ...	50
ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับค่า Gleason score.....	52
ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับการแพร่กระจาย การลุกลาม ระยะของโรค และสถานะ surgical margin.....	56
ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับ biochemical recurrence	57
ตารางที่ 16 สรุปความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับลักษณะทางคลินิก ..	58

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 Gleason grade	9
ภาพที่ 2 ระยะของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	11
ภาพที่ 3 กระบวนการสำคัญของ epigenetics	12
ภาพที่ 4 การเกิด DNA methylation โดยการเติมหมู่ methyl บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine.....	14
ภาพที่ 5 การเกิด methylation กับการเปลี่ยนแปลงของ chromatin.....	14
ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ของการเกิด methylation กับการเกิดมะเร็ง	15
ภาพที่ 7 การเกิด DNA methylation กับการดำเนินของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	16
ภาพที่ 8 โครงสร้างของโปรตีน SOX	20
ภาพที่ 9 ภาพแสดงความเกี่ยวข้องของ SOX gene กับมะเร็งในอวัยวะต่างๆ.....	22
ภาพที่ 10 แสดงกระบวนการ methylation, bisulfite modification และ PCR.....	24
ภาพที่ 11 เทคนิค methylation-specific PCR.....	25
ภาพที่ 12 แสดงขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR.....	27
ภาพที่ 13 แสดงลักษณะการเพิ่มขึ้นของ DNA ในปฏิกิริยา PCR.....	28
ภาพที่ 14 ขั้นตอนการศึกษาการเกิด methylation ด้วยเทคนิค MSP	29
ภาพที่ 15 แสดงข้อมูลของยีน <i>SOX11</i> จากเว็บไซต์ NCBI.....	41
ภาพที่ 16 แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ upstream ความยาว 2,000 คู่เบสจากเว็บไซต์ NCBI.....	42
ภาพที่ 17 แสดงตำแหน่ง CpG islands ของ upstream ของยีน <i>SOX11</i> จากการออกแบบไพรเมอร์.....	43
ภาพที่ 18 การทดสอบไพรเมอร์ โดยใช้ annealing temperature ที่ 50°C, 52°C, 54°C และ 56°C.....	44
ภาพที่ 19 ผลการศึกษา <i>SOX11</i> methylation ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก ด้วยเทคนิค MSP	50

ภาพที่ 20 ภาพกราฟความแตกต่างของการเกิด *SOX11* methylation ในกลุ่มที่มี Gleason score <7, ≥7 และในกลุ่มที่เป็น BPH52

ภาพที่ 21 ภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA.....54

ภาพที่ 22 ภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ BCR-free survival.....57

ภาพที่ 23 ภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วยต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH)59



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
BCR	Biochemical recurrence
bp	Base pair
BPH	Benign prostatic hyperplasia
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
dATP	Deoxyadenosine triphosphates
dCTP	Deoxycytidine triphosphates
dTTP	Deoxythymidine triphosphates
dGTP	Deoxyguanosine triphosphates
DRE	Digital rectal exam
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
g.	Gram(s)
HMG-box	High Mobility Group box DNA-binding domain
MBDs	Methyl-CpG-binding domain proteins
ml	Milliliter
MSP	Methylation-specific PCR
ng	Nanogram
No.	Number
PCa	Prostate cancer
PCR	Polymerase chain reaction
PSA	Prostate specific antigen
pT stage	Pathologic stage

คำย่อ	คำเต็ม
rpm	Revolutions per minute
SD	Standard deviation
SOX	Sex-determining region Y (SRY)-box
TAD	Transactivation domain
TRD	Transrepression domain
TUR	Transurethral resection
WHO	World Health Organization
UV	Ultraviolet
V	Volt
ค.ศ.	คริสต์ศักราช
พ.ศ.	พุทธศักราช

คำอธิบายสัญลักษณ์

สัญลักษณ์	คำเต็ม
M	Methylation
MgCl ₂	Magnesium chloride
U	Unmethylation
μm	Micrometer, micron
μl	Microliter
°C	องศาเซลเซียส
-CH ₃	หมู่เมทิล
%	เปอร์เซ็นต์, ร้อยละ
>	มากกว่า
<	น้อยกว่า
≥	มากกว่าหรือเท่ากับ
≤	น้อยกว่าหรือเท่ากับ

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer; PCa) เป็นมะเร็งในเพศชายที่พบบ่อยเป็นอันดับต้นๆ ของโลก โดยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคและการเสียชีวิตจากโรคแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งยังไม่ชัดเจน แต่พบว่ามีปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคอันได้แก่ อายุ ประวัติการเป็นโรคในครอบครัว เชื้อชาติ ฮอร์โมน อาหาร การใช้ชีวิต การสูบบุหรี่ และอาชีพ⁽¹⁾ การรักษาโรคในผู้ที่เป็นมะเร็งและไม่มีการแพร่กระจายจะรักษาด้วยการตัดต่อมลูกหมากออก (prostatectomy) และมีประมาณ 20% ของผู้ป่วยที่พบว่า biochemical recurrence (BCR) ภายใน 5 ปีหลังการตัดต่อมลูกหมาก โดยส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่มี BCR จะเกิดการแพร่กระจายของโรค (metastatic diseases)^(2, 3) การพยากรณ์โรคในปัจจุบันจะอาศัยลักษณะทางคลินิก เช่น ระดับของ prostate specific antigen (PSA) เกรด Gleason score มาช่วยในการพยากรณ์ แต่ข้อมูลดังกล่าวก็ยังไม่มีความแม่นยำในการพยากรณ์มากเท่าที่ควร^(3, 4) ดังนั้นการหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ตัวใหม่ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะนำมาใช้ในการพยากรณ์โรค เพื่อที่จะวางแผนการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

ปัจจุบันนี้ การศึกษาในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคมะเร็ง พบว่าการเกิดโรคนั้น มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) และส่งผลต่อการแสดงผลที่ลดลงของยีน โดยเฉพาะกลุ่มของยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการต้านเป็นเนื้องอก (tumor suppressor gene) ซึ่งการลดลงของการแสดงออกของยีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดของมะเร็ง (cancer initiation) และการดำเนินของโรคมะเร็ง (cancer progression)^(5, 6) ดังนั้นการศึกษาการเกิด DNA methylation ของยีนกลุ่ม tumor suppressor gene อาจจะช่วยให้ทราบถึงกระบวนการของโรคมะเร็ง รวมทั้งนำมาศึกษากับลักษณะทางคลินิกเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดกรองโรค (screening) การตรวจวินิจฉัย (diagnosis) การติดตามผล และการใช้ประเมินหรือพยากรณ์โรคภายหลังการรักษาได้

ผู้วิจัยสนใจยีน Sex-Determining Region Y (SRY)-box ชนิดที่ 11 (*SOX11*) ซึ่งยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ SOX family ปัจจุบันพบว่ามี 20 ชนิด มีบทบาทเป็น transcription factor เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อน (embryonic development) การพัฒนาระบบประสาท (neural development) และการพัฒนาการของมะเร็ง (cancer development)⁽⁷⁻⁹⁾ ในส่วนของ *SOX11* นั้นพบว่ามียีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ embryonic และ neural development⁽¹⁰⁻¹²⁾ รวมทั้งเป็น tumor suppressor gene ในมะเร็งในหลายอวัยวะ⁽¹³⁻¹⁸⁾ แต่ในด้านบทบาทของ *SOX11* ในมะเร็งต่อมลูกหมากนั้นได้มีรายงานการศึกษาของ Zhiyong Yao และคณะ ในปี ค.ศ.2015 ซึ่งเป็นการศึกษาบทบาทหน้าที่ของ *SOX11* ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก โดยพบว่า *SOX11* มีคุณสมบัติเป็น tumor suppressor gene โดย *SOX11* จะไปยับยั้งการ proliferation ของเซลล์ การ migration ของเซลล์ และการ invasion ของเซลล์ และนอกจากนั้นผลของการศึกษาการแสดงผลพบว่า ในกลุ่มที่เป็นมะเร็ง (PCa) จะมีการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (benign prostatic hyperplasia; BPH)⁽¹⁹⁾ แต่กลไกที่ส่งผลต่อการแสดงออกดังกล่าวนี้ยังไม่ชัดเจน

ในปัจจุบันมีการศึกษามากมายทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล และพบว่ามีการกลไกกระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ที่ประกอบไปด้วย DNA methylation, Histone modification และ microRNA ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญและมีบทบาทสำคัญในการเกิดและการดำเนินของโรคมะเร็ง^(6, 20) การเกิด DNA methylation เป็นขบวนการหนึ่งใน epigenetics ที่มีการศึกษากันมากกับบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งในมนุษย์ เนื่องจากการเกิด DNA methylation อาจส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน (gene expression) และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งในหลายอวัยวะ^(5, 6) รวมทั้งในมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²¹⁻²³⁾ ในส่วนของยีน *SOX11* ได้มีรายงานการศึกษาการเกิด DNA methylation ของยีน *SOX11* ในมะเร็งโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma)⁽¹⁴⁾ มะเร็งเม็ดเลือด (hematopoietic malignancies)⁽¹⁵⁾ มะเร็งเยื่อหุ้มรังไข่ (epithelial ovarian cancer)⁽¹⁷⁾ มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer)⁽¹⁸⁾ รวมทั้งศึกษาในเซลล์ในระบบน้ำเหลือง และในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (lymphoid and several cancer cells)⁽²⁴⁾ แต่การเกิด DNA methylation ของยีน *SOX11* ในมะเร็งต่อมลูกหมากยังไม่มีรายงานมาก่อน

และเนื่องจากยังไม่มีรายงานการเกิด DNA methylation ของยีน *SOX11* ในมะเร็งต่อมลูกหมาก ทางผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาอัตราการเกิด DNA methylation โดยอาศัยเทคนิค methylation-specific PCR (MSP) โดยจะใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก (PCa) และชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากโตไม่เป็นมะเร็ง (BPH) ที่ผ่านการรักษาสภาพโดยการแช่ในฟอร์มาลินและถูกฝังในบล็อกพาราฟินมาใช้ในการศึกษา เพื่อทราบอัตราการเกิด DNA methylation เพื่อจะไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับปัจจัยอื่นๆต่อไป

คำถามงานวิจัย

อัตราการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากและในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็งมีค่าเท่าใด

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

จุดประสงค์หลัก:

เพื่อศึกษาร้อยละของการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากและในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง

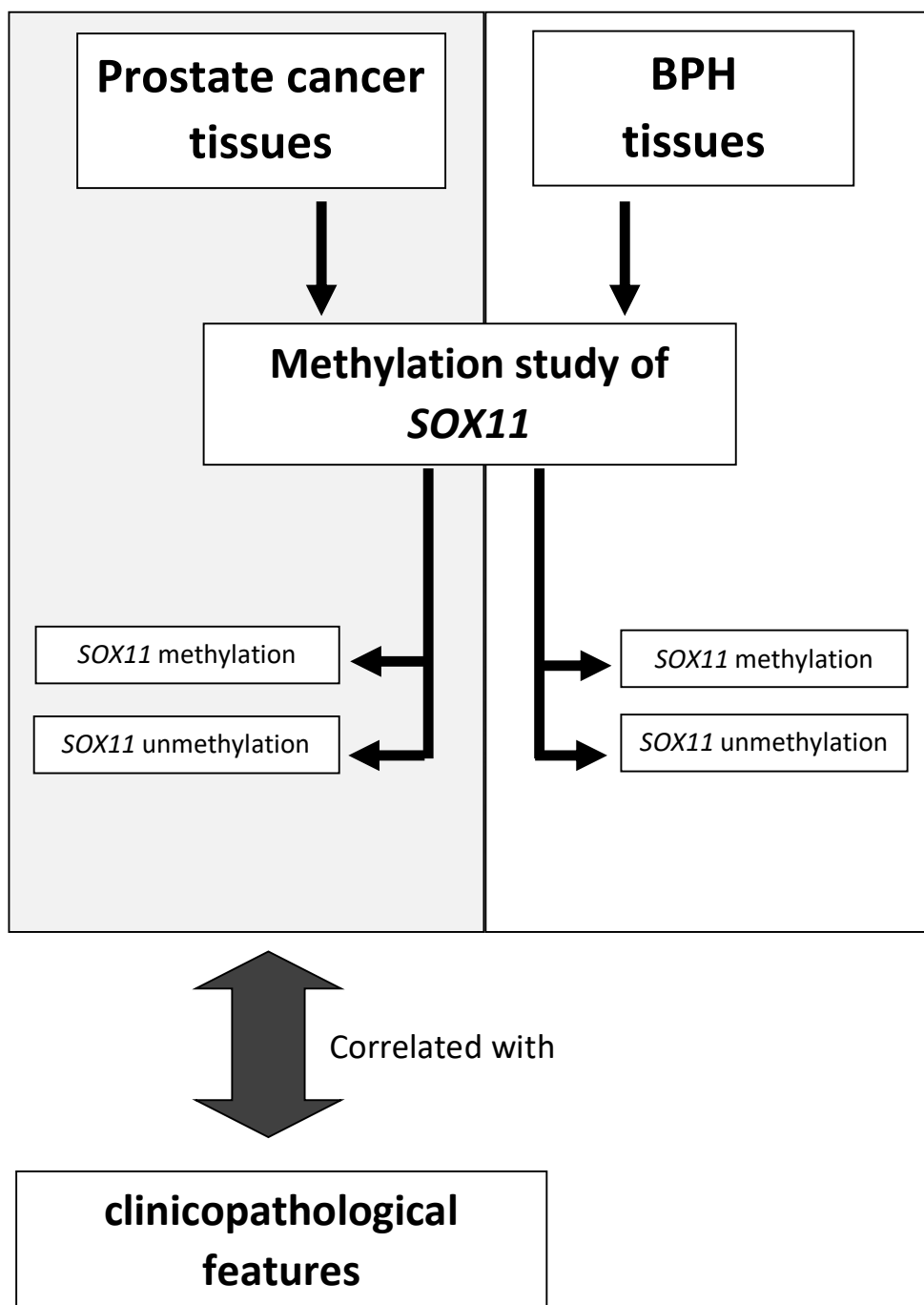
จุดประสงค์รอง:

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก

สมมติฐานของการวิจัย

ในกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากจะมีร้อยละของการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* ที่สูงกว่าในกลุ่มเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เนื้อเยื่อมะเร็งที่ตัดออกมาทำการศึกษาเป็นตัวแทนของมะเร็งทั้งหมดได้ในเรื่องของการศึกษา DNA methylation
2. เนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็งที่ตัดออกมาทำการศึกษาเป็นตัวแทนของเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็งทั้งหมดได้ในเรื่องของการศึกษา DNA methylation

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Sex-Determining Region Y (SRY)-box (SOX)

หมายถึง กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor โดยไปจับกับ DNA บริเวณตำแหน่ง minor groove ในปัจจุบันพบว่า มี 20 ชนิด มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ embryonic development และ carcinogenesis

- DNA methylation

หมายถึง การเติมหมู่ methyl ($-CH_3$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine ที่อยู่ติดกับเบส guanine บนสายของ DNA

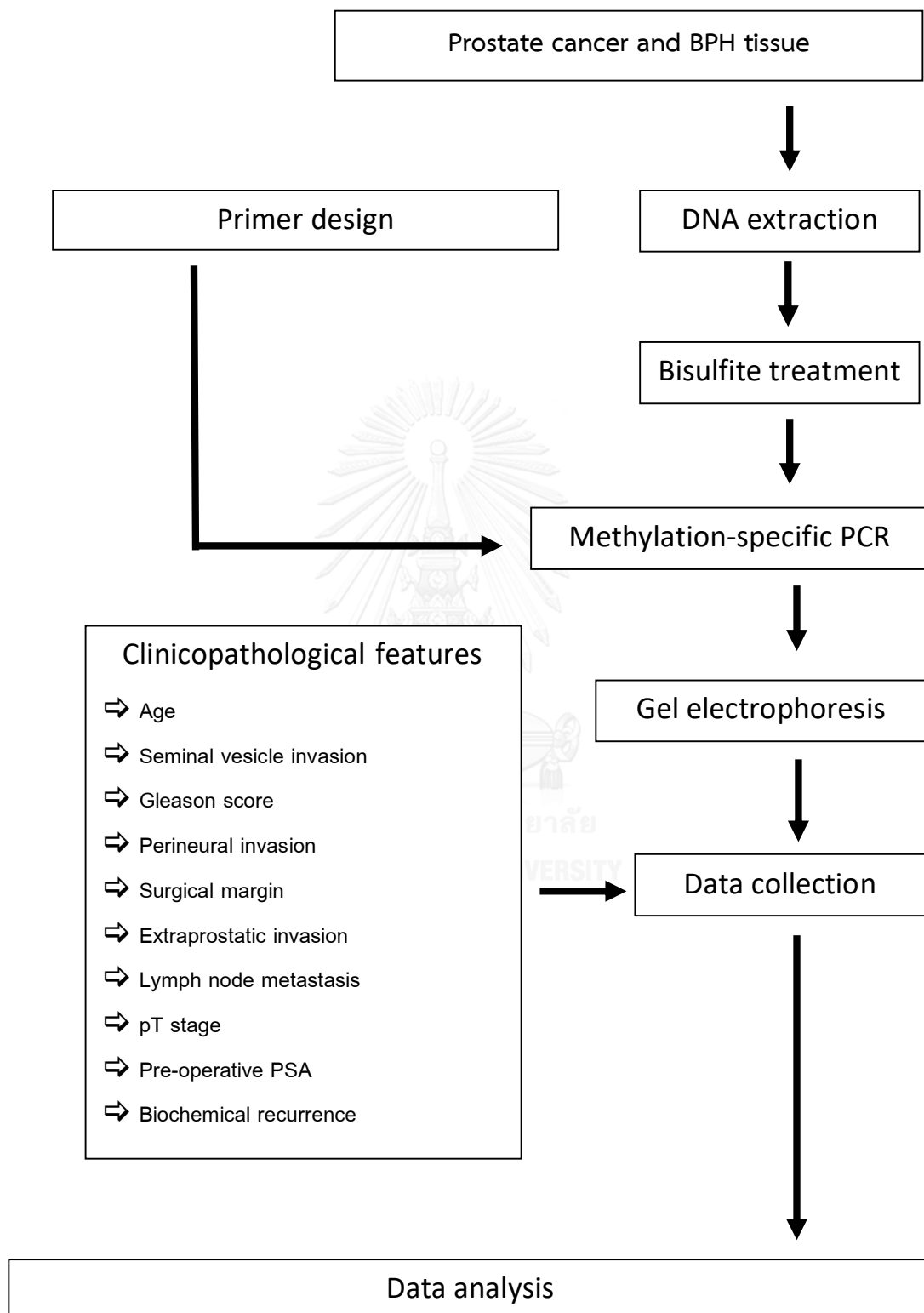
- Methylation-specific PCR (MSP)

หมายถึง เทคนิคในการตรวจสอบการเกิด methylation โดยใช้หลักการ PCR มีการใช้ primer ที่จำเพาะต่อลำดับ nucleotide ที่มีการเกิด methylation

คำสำคัญ

DNA Methylation, *SOX11*, Prostate cancer, Benign prostatic hyperplasia

ขั้นตอนของการวิจัย



ข้อจำกัดของการวิจัย

การสกัด DNA จากชิ้นเนื้อที่ถูกรักษาสภาพโดยการแช่ในฟอร์มาลินและถูกฝังในบล็อกพาราฟิน อาจจะทำให้ผลการสกัด DNA นั้นไม่ดีพอ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ของการศึกษานี้ จะช่วยให้ทราบถึงอัตราการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* และความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ในการศึกษาต่อยอดศึกษาในตัวอย่างรูปแบบอื่นเพื่อนำไปประยุกต์ในการพยากรณ์ (prognosis) โรคมะเร็งต่อมลูกหมากต่อไปในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer)

มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นมะเร็งในเพศชายที่พบมากเป็นอันดับต้นๆของโลก โดยมีอุบัติการณ์ การเกิดโรคและการเสียชีวิตจากโรคแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก สาเหตุของการเกิดโรคมังไม่ ชัดเจน แต่พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคอันได้แก่ อายุ ประวัติการเป็นโรคในครอบครัว เชื้อชาติ ฮอโมน อาหาร การใช้ชีวิต การสูบบุหรี่ และอาชีพ⁽¹⁾ สำหรับผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งและยังไม่มี การแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆจะรักษาด้วยการตัดต่อมลูกหมากออก (prostatectomy) แต่ภายหลัง การรักษาพบว่ามีประมาณ 20-30% จะมีการเกิดการเกิดซ้ำของโรค^(2, 3) ในปัจจุบันจะมีการใช้ระดับ ของ PSA และการตรวจทางทวารหนัก (digital rectal exam, DRE) มาช่วยในการตรวจคัดกรอง เบื้องต้น ซึ่งค่าปกติของ PSA จะแตกต่างกันตามช่วงอายุและเชื้อชาติ ดังตารางที่ 1⁽²⁵⁾ โดยพบว่าใน กลุ่มของผู้ป่วยที่มีระดับของ PSA ที่สูงมากกว่า 4 ng/ml จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยที่เป็น BPH ประมาณ 30-50% จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยที่เป็น BPH ประมาณ 30-50% จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยที่เป็น BPH ประมาณ 30-50% จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้การตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) มาดูลักษณะของเซลล์เพื่อช่วยในการวินิจฉัย^(4, 26) นอกเหนือจากการคัดกรองโรค ระดับ PSA ยังสามารถใช้ติดตามผลการรักษาของผู้ป่วยที่ผ่านการ prostatectomy โดยมีรายงานของสมาคมระบบทางเดินปัสสาวะแห่งสหรัฐอเมริกา (American Urological Association, AUA) กำหนดว่าหากภายหลังการรักษา มีระดับของ PSA เพิ่มขึ้น 0.2 ng/ml จะมีความเสี่ยงในการเกิดซ้ำของโรค และถ้าหากมีเพิ่มขึ้นมากกว่า 0.4 ng/ml จะใช้ในการ ทำนายการเกิดซ้ำของโรคที่มีการแพร่กระจาย (metastatic recurrence)⁽²⁵⁾

ตารางที่ 1 ค่าปกติของ PSA แบ่งตามช่วงอายุและเชื้อชาติ⁽²⁵⁾

Age Range (years)	Asian-Americans	African-Americans	Whites
40-49	0-2.0 ng/ml	0-2.0 ng/ml	0-2.5 ng/ml
50-59	0-3.0 ng/ml	0-4.0 ng/ml	0-3.5 ng/ml
60-69	0-4.0 ng/ml	0-4.5 ng/ml	0-4.5 ng/ml
70-79	0-5.0 ng/ml	0-5.5 ng/ml	0-6.5 ng/ml

การตรวจวินิจฉัยมะเร็งต่อมลูกหมากโดยใช้ชิ้นเนื้อ (biopsy) เพื่อดูลักษณะของเซลล์จะมีการให้เกรดของเซลล์โดยจะแบ่งเกรดเป็น 1-5 เรียกว่า Gleason grade (ภาพที่ 1) โดยผู้วินิจฉัยจะรายงานปริมาณเกรดที่ตรวจพบมากที่สุดสองอันดับแรกแล้วนำผลเกรดมารวมกัน มีค่าตั้งแต่ 2-10 ผลรวมของ Gleason grade จะเรียกว่า Gleason score ซึ่งหากมีค่ามาก ความรุนแรงของมะเร็งก็จะสูงตามไปด้วย⁽²⁷⁾ โดยสามารถแบ่งค่า Gleason score ตาม histopathologic grade ออกได้เป็น 3 เกรดดังตารางที่ 2⁽²⁸⁾

GRADE	DESCRIPTION
1	Small, uniform cells, tightly packed
2	Varied cell sizes and shapes, loosely packed
3	Increased cell size and shape irregularity, less distinction between cells
4	Large, irregular, fused cells
5	Irregular, fused cells that have invaded surrounding connective tissue cells

ภาพที่ 1 Gleason grade⁽²⁷⁾

ตารางที่ 2 Histopathologic grade⁽²⁸⁾

Histopathologic grade	
Gleason ≤ 6	Well differentiated
Gleason 7	Moderately differentiated
Gleason 8-10	Poorly differentiated or undifferentiated

การแบ่งระยะของมะเร็งต่อมลูกหมากในปัจจุบันสามารถแบ่งระยะของโรคตามแนวทางของ The National Comprehensive Cancer Network (NCCN)⁽²⁸⁾ และ American Joint Committee on Cancer (AJCC)⁽²⁹⁾ โดยมีการจัดแบ่งระยะที่เรียกว่า TNM staging system และ pathologic T stage (pT stage) ในการจัดแบ่งระยะแบบ TNM staging system จะอาศัยข้อมูลที่ประกอบไปด้วย T (Tumor); เป็นการตรวจขนาดก้อนเซลล์มะเร็งและตำแหน่งของเซลล์มะเร็ง, N (Lymph nodes); เป็นการตรวจการแพร่กระจายไปยัง lymph nodes และ M (Metastasis); เป็นการตรวจการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ แต่ในส่วนการจัดแบบ pT stage จะดูลักษณะของมะเร็งที่อยู่ในต่อมลูกหมาก รวมทั้งการกระจายตัวและการลุกลามของมะเร็ง โดยสามารถแบ่งได้เป็น pT1-pT4^(28, 29) (รายละเอียดเพิ่มเติมดังภาพที่ 2)



American Joint Committee on Cancer

Prostate Cancer Staging

7th EDITION



Figure A. T4 tumor invading adjacent structures other than seminal vesicles, such as bladder, rectum, levator muscles, and/or pelvic wall.

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS ¹						
Group	T	N	M	PSA	Gleason	
I	T1a-c	NO	MO	PSA <10	Gleason ≤6	
	T2a	NO	MO	PSA <10	Gleason ≤6	
	T1-2a	NO	MO	PSA X	Gleason X	
IIA	T1a-c	NO	MO	PSA <20	Gleason 7	
	T1a-c	NO	MO	PSA ≥10-20	Gleason ≤6	
	T2a	NO	MO	PSA ≥10-20	Gleason ≤6	
	T2a	NO	MO	PSA <20	Gleason 7	
	T2b	NO	MO	PSA <20	Gleason ≤7	
	T2b	NO	MO	PSA X	Gleason X	
IIB	T2c	NO	MO	Any PSA	Any Gleason	
	T1-2	NO	MO	PSA ≥20	Any Gleason	
	T1-2	NO	MO	Any PSA	Gleason ≥8	
III	T3a-b	NO	MO	Any PSA	Any Gleason	
IV	T4	NO	MO	Any PSA	Any Gleason	
	Any T	N1	MO	Any PSA	Any Gleason	
	Any T	Any N	M1	Any PSA	Any Gleason	

Definitions

Primary Tumor (T)

CLINICAL

- TX** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- T1** Clinically inapparent tumor neither palpable nor visible by imaging
- T1a** Tumor incidental histologic finding in 5% or less of tissue resected
- T1b** Tumor incidental histologic finding in more than 5% of tissue resected
- T1c** Tumor identified by needle biopsy (for example, because of elevated PSA)
- T2** Tumor confined within prostate¹
- T2a** Tumor involves one-half of one lobe or less
- T2b** Tumor involves more than one-half of one lobe but not both lobes
- T2c** Tumor involves both lobes
- T3** Tumor extends through the prostatic capsule²
- T3a** Extracapsular extension (unilateral or bilateral)
- T3b** Tumor invades seminal vesicle(s)
- T4** Tumor is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles, such as external sphincter, rectum, bladder, levator muscles, and/or pelvic wall (Figure A)

Pathologic (pT)³

- pT2** Organ confined
- pT2a** Unilateral, one-half of one side or less
- pT2b** Unilateral, involving more than one-half of side but not both sides
- pT2c** Bilateral disease
- pT3** Extraprostatic extension
- pT3a** Extraprostatic extension or microscopic invasion of bladder neck⁴
- pT3b** Seminal vesicle invasion
- pT4** Invasion of rectum, levator muscles, and/or pelvic wall

Regional Lymph Nodes (N)

CLINICAL

- NX** Regional lymph nodes were not assessed
- N0** No regional lymph node metastasis
- N1** Metastasis in regional lymph node(s)

PATHOLOGIC

- pNX** Regional nodes not sampled
- pN0** No positive regional nodes
- pN1** Metastases in regional lymph node(s)

Distant Metastasis (M)⁵

- M0** No distant metastasis
- M1** Distant metastasis
- M1a** Nonregional lymph node(s)
- M1b** Bone(s)
- M1c** Other site(s) with or without bone disease

Notes

- ¹ Tumor found in one or both lobes by needle biopsy, but not palpable or reliably visible by imaging, is classified as T1c.
- ² Invasion into the prostatic apex or into (but not beyond) the prostatic capsule is classified not as T3 but as T2.
- ³ There is no pathologic T1 classification.
- ⁴ Positive surgical margin should be indicated by an R1 descriptor (residual microscopic disease).
- ⁵ When more than one site of metastasis is present, the most advanced category is used. pM1c is most advanced.
- ⁶ When either PSA or Gleason is not available, grouping should be determined by T stage and/or either PSA or Gleason as available.



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society

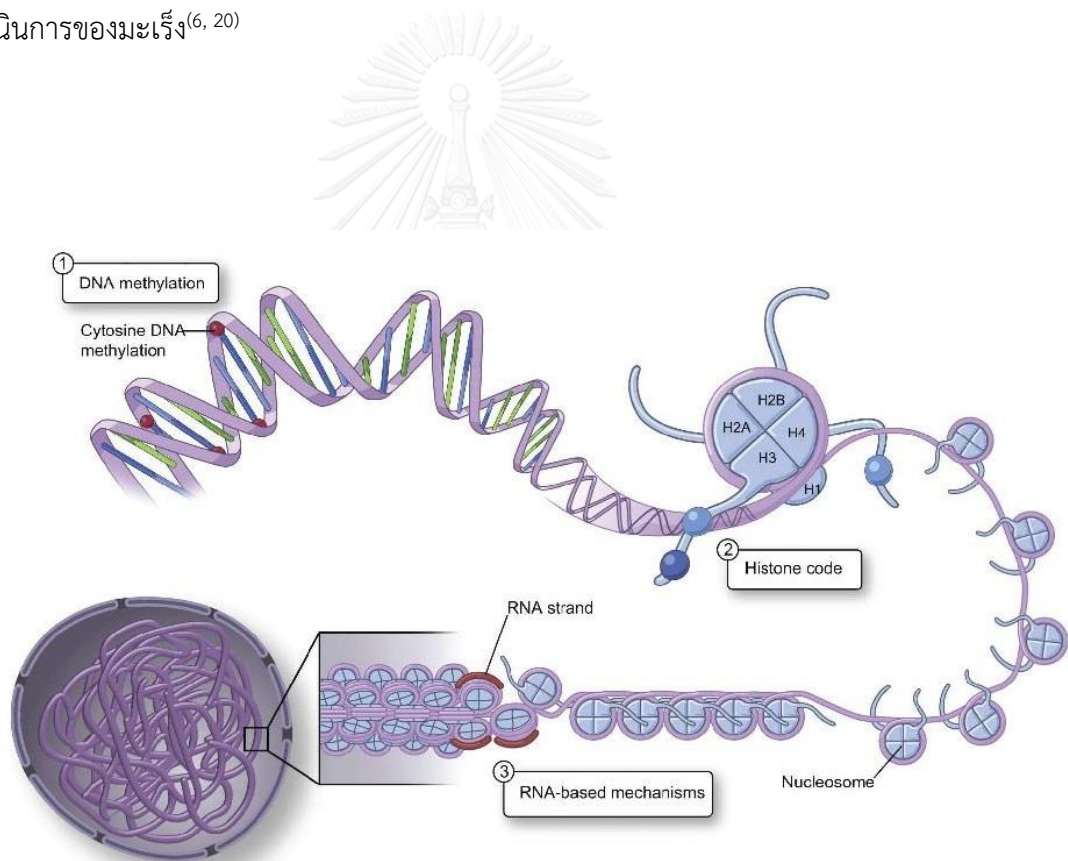


Copyright 2009 American Joint Committee on Cancer. Printed with permission from the AJCC.

ภาพที่ 2 ระยะของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²⁹⁾

สภาวะเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)

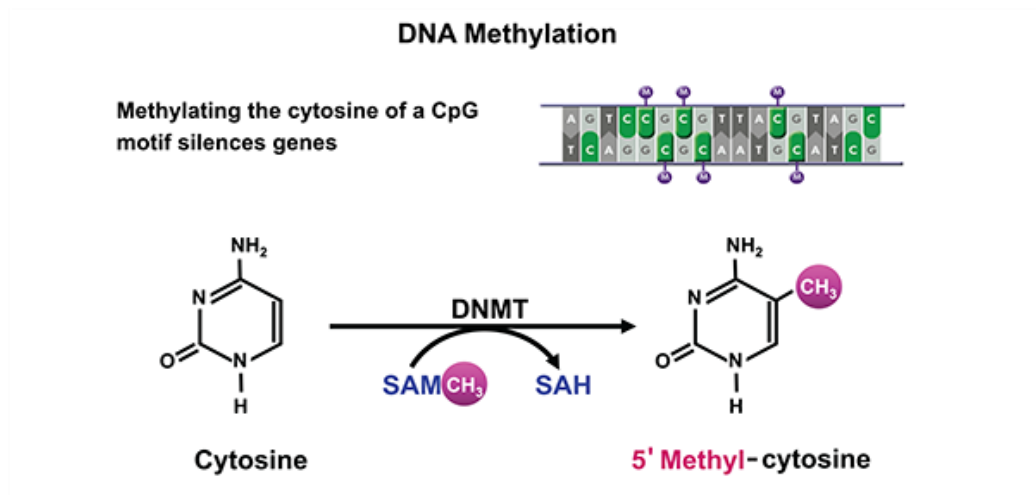
Epigenetics เป็นกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA การเกิด epigenetics จะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำงานของเซลล์ไม่ว่าจะเป็น การควบคุม การพัฒนาตัวอ่อน (embryonic development) การประทับตราทางพันธุกรรม (genetic imprinting) และการหยุดการทำงานของโครโมโซม X (X-chromosome inactivation) การทำงานผิดปกติของสิ่งเหล่านี้ก็ส่งผลต่อการเกิดโรคหลายโรครวมทั้งการเกิดโรคมะเร็ง กระบวนการสำคัญของ epigenetics ประกอบด้วย DNA methylation, Histone modification และ microRNA ซึ่งทำให้ยีนที่สำคัญสูญเสียการทำงาน ส่งผลต่อการเกิด การพัฒนาการและการ ดำเนินการของมะเร็ง^(6, 20)



ภาพที่ 3 กระบวนการสำคัญของ epigenetics⁽²⁰⁾

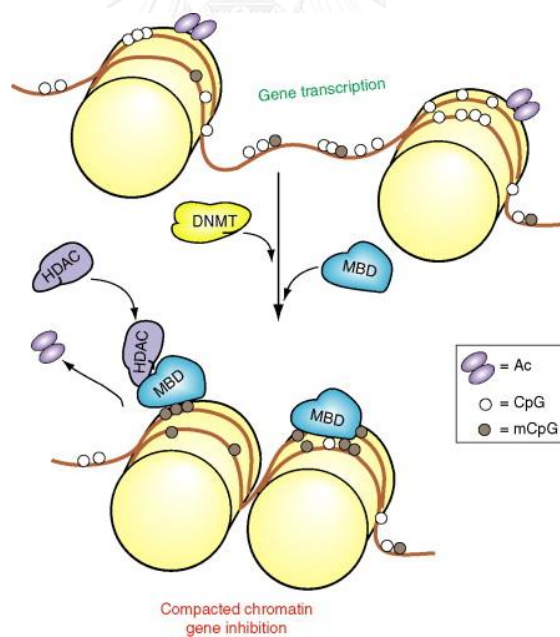
ในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะในส่วนของ DNA methylation ซึ่งเป็นกระบวนการทาง epigenetics ที่นิยมศึกษากันมากในบทบาทต่อ gene expression และโครงสร้างของโครมาติน (chromatin) การเกิด DNA methylation เป็นการเติมหมู่เมทิล (methyl; $-CH_3$) บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine ที่อยู่ติดกับเบส guanine เรียกตำแหน่งนี้ว่า CpG islands จะพบมากบริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) การเติมหมู่ methyl จะทำงานโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ซึ่งมีสาร S-adenosyl methionine เป็นสารให้หมู่ methyl (ภาพที่ 4) โดยหมู่ methyl จะไปการขัดขวางการจับของ transcription factor บนตำแหน่งของ promoter ทำให้การแสดงออกของยีนนั้นลดลง นอกจากนั้น หมู่ methyl ที่ถูกเติมไปจะกลายเป็นตำแหน่งจดจำของโปรตีนจำพวก methyl-CpG-binding domain proteins (MBDs) ซึ่ง MBDs จะทำให้โปรตีนที่หน้าที่เกี่ยวข้องกับการขดของสาย DNA กับ histone ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งโดยปกติแล้ว chromatin ที่มีการแสดงออกของยีนจะอยู่ในรูป euchromatin หากมีการขดสาย DNA กับ histone อย่างหนาแน่น ทำให้เปลี่ยนรูปแบบเป็น heterochromatin การเข้าไปจับของ transcription factor ลดลง การแสดงออกของยีนในบริเวณนั้นจึงลดลง^(5, 6) (ภาพที่ 5)

รูปแบบการเกิด methylation สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือการเกิดที่มีการเกิด methylation มาก (hypermethylation) และการขาดหายไปของการเกิด methylation (hypomethylation) ในส่วนของการเกิด hypermethylation จะเกี่ยวข้องกับยีนที่มีบทบาทในการต้านเนื้องอก (tumor suppressor gene) ที่อยู่ในกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ ได้แก่ การตอบสนองต่อฮอร์โมน (hormonal responses) การบุกรุกของเซลล์เนื้องอก (tumor-cell invasion) การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle control) และการซ่อมแซม DNA (DNA damage repair) ซึ่งในการศึกษาในมะเร็งก็พบว่ายีนเหล่านี้มีการ hypermethylation ทำให้ยีนอยู่ในสถานะไม่ทำงาน (inactive) มีการแสดงออกที่ลดลง และสูญเสียการทำงาน ในทางตรงกันข้าม การเกิด hypomethylation จะเกิดมากในยีนมะเร็ง (oncogene) การเกิด hypomethylation ในยีนเหล่านี้ทำให้มีการแสดงออกของยีนที่มากเกินไป และไปมีผลต่อการเกิดและการดำเนินของโรคมะเร็ง^(5, 6) (ภาพที่ 6)

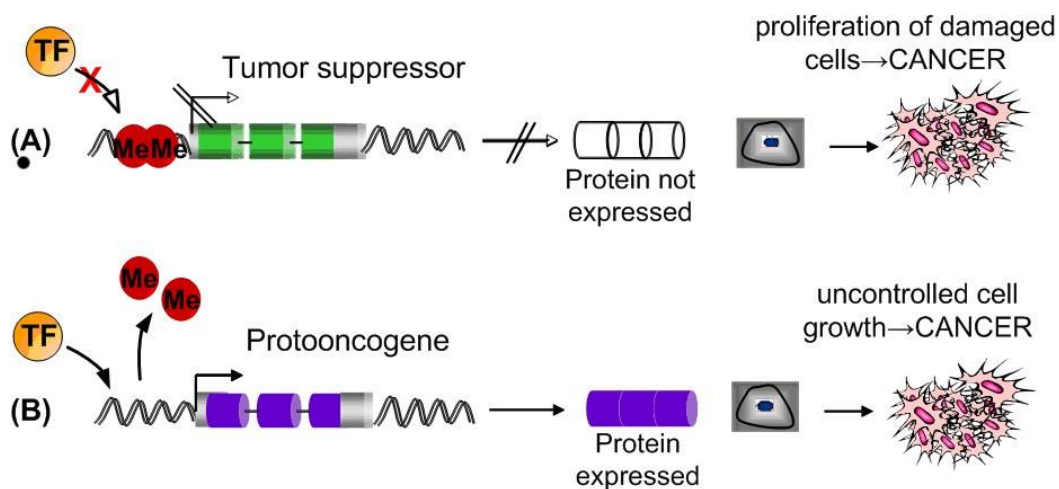


ภาพที่ 4 การเกิด DNA methylation โดยการเติมหมู่ methyl บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine

(ที่มา : <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/images/zakhari01.png>)



ภาพที่ 5 การเกิด methylation ก็กับการเปลี่ยนแปลงของ chromatin⁽⁵⁾



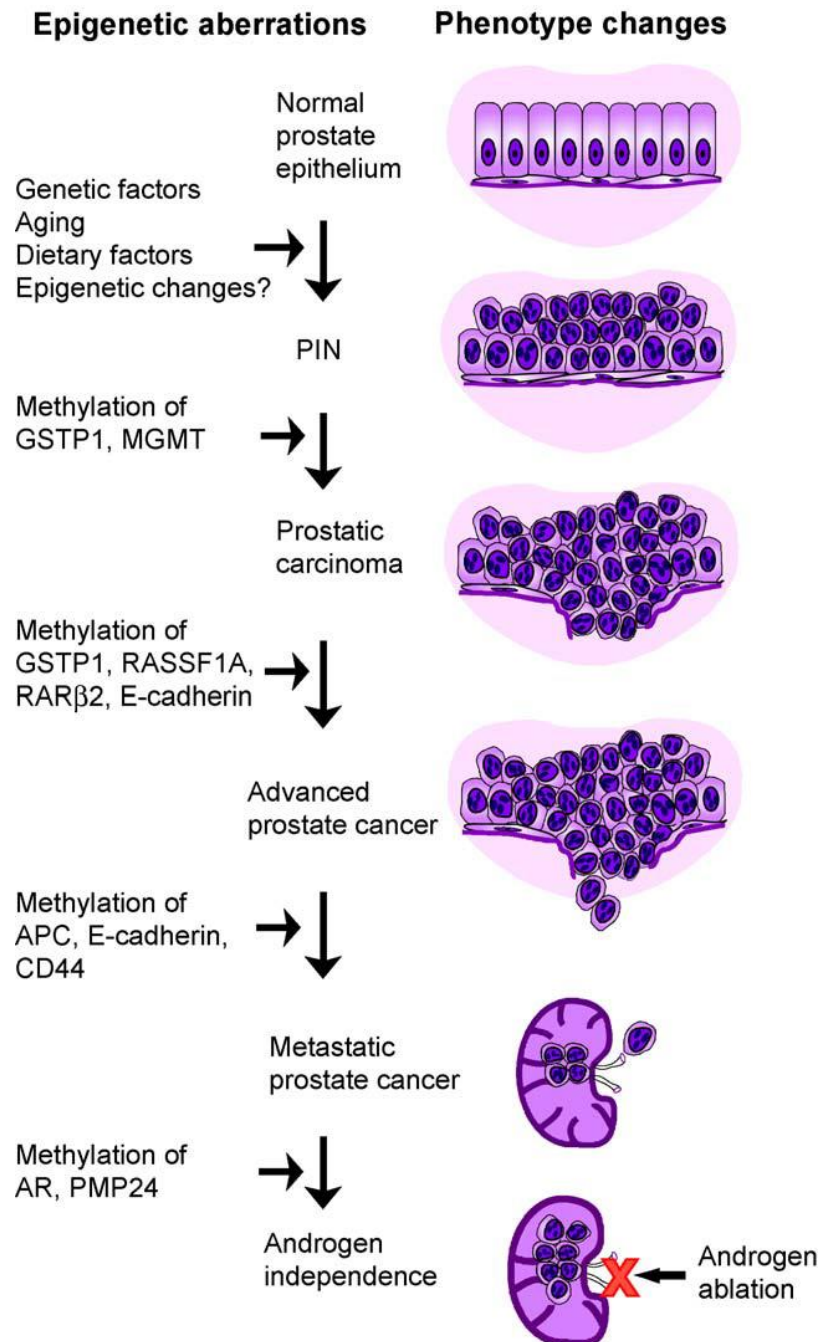
ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ของการเกิด methylation กับการเกิดมะเร็ง

(ที่มา : http://www.nature.com/scitable/content/24705/nelson_figure1_CMH_FULLL.jpg)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งต่อมลูกหมาก (DNA methylation in prostate cancer)

การเกิด DNA methylation ในมะเร็งพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการหยุดการทำงานของ promoter ทำให้มีการลดหรือการขาดหายไปของการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นยีนที่ทำงานในกระบวนการต่างๆของเซลล์ (cellular processes) ไม่ว่าจะเป็น DNA damage repair, hormonal responses, tumor-cell invasion หรือ metastasis, cell cycle control และ tumor suppressor จากรายงานการเกิด DNA methylation ในมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าการเกิด DNA methylation ในแต่ละยีนนั้นจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก ตั้งแต่ cancer initiation, progression และ metastasis (ภาพที่ 7) และยังมีความสัมพันธ์กับ histopathological grade, clinical stage, invasion, metastasis, androgen independence และ recurrence ของโรค⁽²¹⁻²³⁾ นอกจากนี้มีการรายงานการเกิด DNA methylation ในหลายยีนของ Tawnya C. McKee and James V. Tricoli ในปี ค.ศ. 2015 โดยพบว่าในมะเร็งต่อมลูกหมากมีการเกิด DNA methylation ในหลายยีน ซึ่งในแต่ละยีนจะมีบทบาทหน้าที่ที่ที่แตกต่างกันไป⁽²¹⁾ (ตารางที่ 3) โดยในปัจจุบันก็ได้มีการศึกษาที่ยีนที่หลากหลายเพิ่มมากขึ้น อัตราการเกิด DNA methylation ในแต่ละยีนก็แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ซึ่งการเกิด DNA methylation ในบางยีนอาจจะช่วยในการเพิ่มความไวและความ

ความจำเพาะในการวินิจฉัยและการพยากรณ์ของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²²⁾ อย่างไรก็ตามการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* ในมะเร็งต่อมลูกหมากยังไม่มีรายงานมาก่อน



ภาพที่ 7 การเกิด DNA methylation กัับการดำเนินของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²³⁾

ตารางที่ 3 ยีนที่มีการเกิด DNA methylation ในเนื้อเยื่อและ cell line มะเร็งต่อมลูกหมาก⁽²¹⁾

ยีน	บทบาทสำคัญ
<i>ABCB1</i>	ATP-dependent transporter
<i>AMT</i>	Glycine cleavage pathway
<i>AOX1</i>	Superoxide formation
<i>APC</i>	Tumor suppressor
<i>BNC1</i>	Transcription factor
<i>C14orf159</i>	Unknown
<i>CALM3</i>	Ion channel control
<i>CAV1</i>	Scaffolding protein
<i>CCDC181</i>	Unknown
<i>CDH1</i>	Cell-cell adhesion
<i>CDKN2A</i>	Cell cycle control
<i>CHMP4A</i>	Endosomal protein sorting / transport
<i>CRIP1</i>	Zinc transport
<i>CXXC5</i>	NF-kappa-B / MAPK pathways
<i>CYB5R2</i>	Drug metabolism / elongation of fatty acids
<i>DAPK1</i>	Apoptosis
<i>FGFR2</i>	FGF pathway signaling
<i>FLNC</i>	Membrane-anchoring protein
<i>FZD1</i>	Wnt pathway signaling
<i>GPRC5B</i>	Unknown
<i>GSTP1</i>	Detoxification
<i>HAAO</i>	Quinolinic acid synthesis
<i>HAPLN3</i>	Cell adhesion
<i>HIF3A</i>	Transcription factor
<i>HS3ST2</i>	Glucosamine sulfonation
<i>KCTD1</i>	Transcriptional repressor
<i>KDM1A</i>	Histone deacetylation

มีต่อหน้าถัดไป

ตารางที่ 3 (ต่อ)

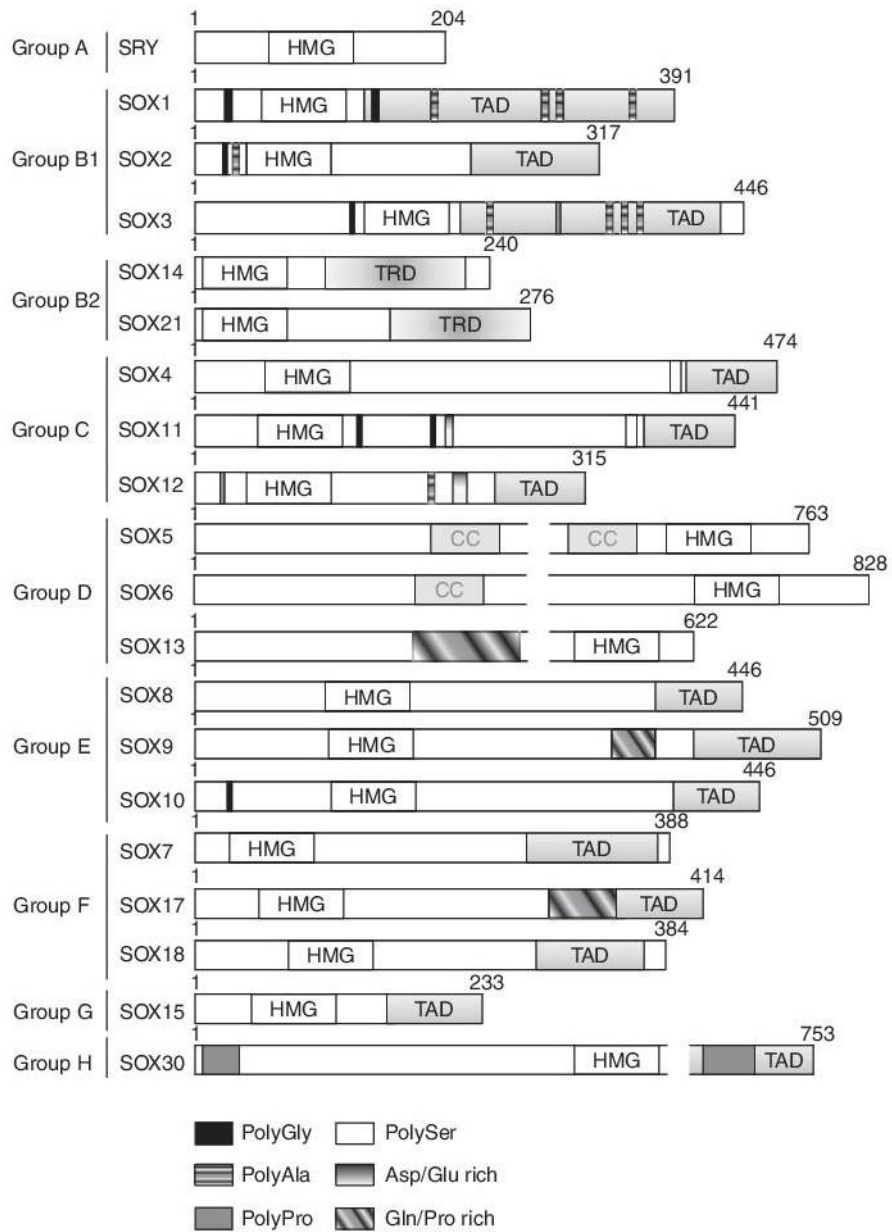
ยีน	บทบาทสำคัญ
<i>KDM4C</i>	Histone demethylase
<i>LAMC2</i>	Cell adhesion
<i>LMX1B</i>	Transcription factor
<i>MAGI2</i>	Interacts with atrophin 1
<i>MEIS2</i>	Transcription factor
<i>MGMT</i>	DNA repair of alkylated guanine
<i>NTN4</i>	Unknown
<i>PITX2</i>	Transcription factor
<i>PPARGC1A</i>	Energy metabolism
<i>PPP1P3C</i>	Regulates protein phosphatase activity
<i>PTGS2</i>	Deoxygenase / peroxidase
<i>PYCARD</i>	Apoptosis
<i>RARB</i>	Transcriptional regulator
<i>RASSF1A</i>	Tumor suppressor
<i>RASGRF2</i>	Calcium-regulated nucleotide exchange factor
<i>RPL39L</i>	Ribosomal protein
<i>RUNX3</i>	Transcription factor
<i>S100A16</i>	Calcium binding
<i>SHC1</i>	Signaling adapter protein
<i>SPON2</i>	Cell adhesion
<i>SYN2</i>	Regulates neurotransmitter release
<i>TINAGL1</i>	Adrenocortical zonation
<i>THBS1</i>	Cell cell/cell matrix adhesion
<i>TMEM 246</i>	Unknown
<i>TSPAN1</i>	Mediates signal transduction
<i>VAMP5</i>	Vesicle and cell membrane fusion
<i>WFDC2</i>	Protease inhibitor
<i>ZNF783</i>	Transcriptional regulation

ตารางที่ 4 อัตราการเกิด DNA methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากด้วยเทคนิค MSP⁽²²⁾

ยีน	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ร้อยละการเกิด methylation
<i>APC</i>	5p21	27 – 78
<i>AR</i>	Xq12	8 – 25
<i>CD44</i>	11p13	22 – 72
<i>CDH1</i>	16q22.1	4 – 61
<i>CDKN2A</i> (p16 ^{INK4a})	9p21	0 – 69
<i>CDKN2A</i> (p14 ^{ARF})	9p21	3 – 36
<i>GSTP1</i>	11q13	36 – 100
<i>MGMT</i>	10q26	2 – 76
<i>RARB</i>	3p24.2	40 – 84
<i>RASSF1A</i>	3p21.3	34 – 100

ยีน Sex-determining region Y (SRY)-box (SOX)

Sex-Determining Region Y (SRY)-Box (SOX) เป็นยีนที่แสดงออกเป็นโปรตีน SOX มีบทบาทเป็น transcription factor ทำงานเป็นตัวกระตุ้นการทำงาน (activator) และตัวกดการทำงาน (repressor) ในกระบวนการ transcription ปัจจุบันพบว่ามี 20 ชนิด จัดออกเป็นกลุ่มย่อย A-H โดยอาศัยลักษณะความคล้ายคลึงของโครงสร้างของโปรตีน ได้แก่ตำแหน่งที่จับกับ DNA (High Mobility Group box DNA-binding domain; HMG-box) ตำแหน่งในการกระตุ้นการแสดงออก (Transactivation domain; TAD) และ ตำแหน่งการกดการแสดงออก (Transrepression domain; TRD) เป็นต้น (ดังภาพที่ 8) นอกจากนี้ SOX ยังมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อน (embryonic development) ซึ่งกระบวนการหลักของ SOX จะเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ (sex determination) การสร้างเซลล์ประสาท (neurogenesis) การพัฒนาการของ neural crest cell (neural crest development) การสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) และการสร้างกระดูก (skeletogenesis)^(7, 9-11) (ตารางที่ 5)



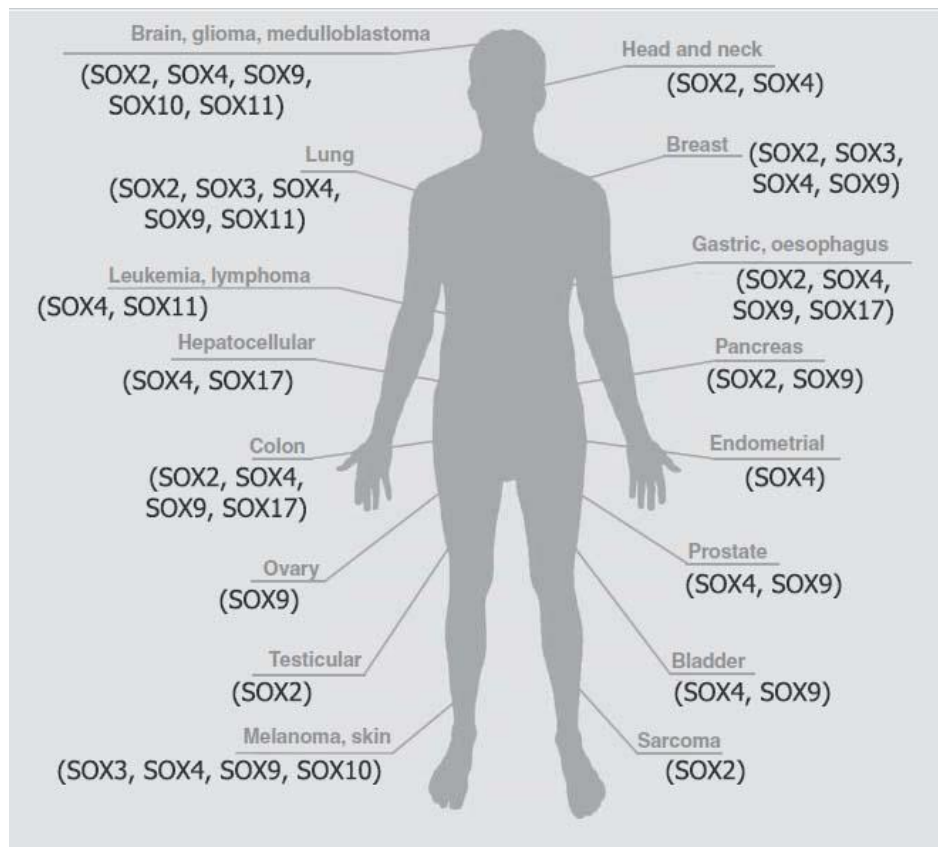
ภาพที่ 8 โครงสร้างของโปรตีน SOX⁽⁷⁾

(HMG: high mobility group DNA-binding domain,

TAD: Transactivation domain, TRD: Transrepression domain)

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียด SOX family ในกระบวนการ embryonic development⁽⁹⁾

กลุ่ม SOX	ยีน SOX	บทบาทสำคัญในการพัฒนาของตัวอ่อน (ได้ข้อสรุปแล้ว)	ตำแหน่งบนโครโมโซม
SOXA	Sry	Testis determination	Yp11.3
SOXB1	SOX1	Lens development, (neural determination)	13q34
	SOX2	Neural induction, (lens induction, pluripotency)	3q26.3
	SOX3	(Neural determination, lens induction)	Xq27
SOXB2	SOX14	(Interneuron specification, limb development)	3q22
	SOX21	(CNS patterning)	13q32
SOXC	SOX4	Heart, lymphocyte, thymocyte development	6q22.3
	SOX11	(Neuronal, glial maturation)	2p25
	SOX12	(Development of many tissues)	20p13
SOXD	SOX5	Chondrogenesis	12p11.1
	SOX6	Chondrogenesis, (cardiac myogenesis)	11p15.3
	SOX13	(Development of arterial walls, pancreatic islets)	1q31
SOXE	SOX8	(Development of many tissues)	16p13.3
	SOX9	Chondrogenesis, sex determination	17q25
	SOX10	Neural crest specification	22q13
SOXF	SOX7	(Development of vascular and many other tissues)	8p22
	SOX17	Endoderm specification	8q11.2
	SOX18	Vascular and hair follicle development	20p13.3
SOXG	SOX15	(Myogenesis)	17p13
SOXH	SOX30	(Male germ cell maturation)	5q35



ภาพที่ 9 ภาพแสดงความเกี่ยวข้องของ SOX gene กับมะเร็งในอวัยวะต่างๆ⁽⁷⁾

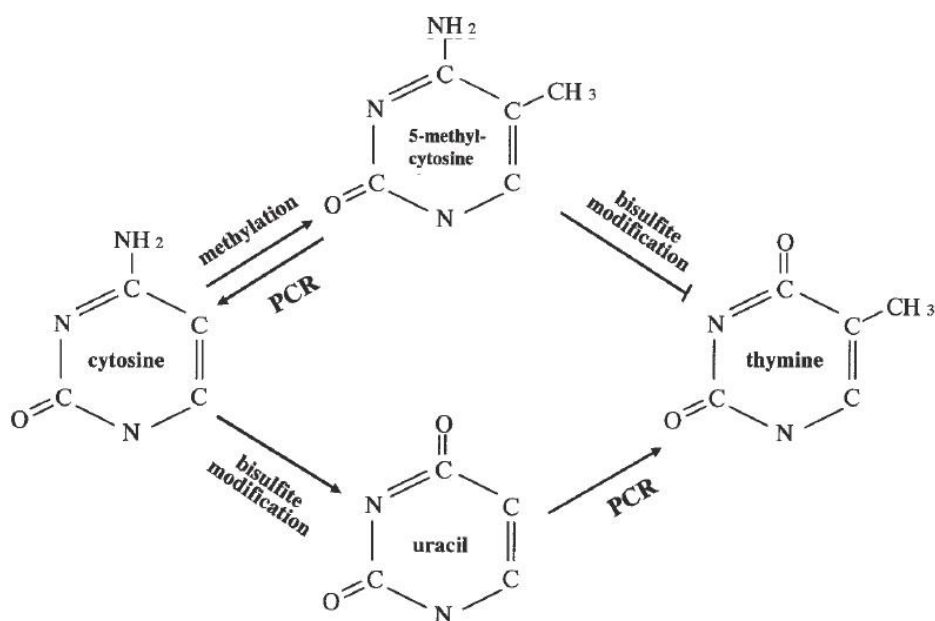
นอกจากนั้น SOX gene แต่ละชนิดจะมีความเกี่ยวข้องกันกับมะเร็งในหลายอวัยวะ ดังภาพที่ 9 โดยในส่วนนี้จะขอกล่าวถึงการศึกษา SOX gene ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาใน SOX หลายชนิด, SOX2 มีรายงานว่าเป็นตัวกระตุ้นและเพิ่ม cell proliferation, cell survival, cell metastasis, cell migration และยังไปลด cell apoptosis ของเซลล์มะเร็ง⁽³⁰⁾ SOX4 นั้นเกี่ยวข้องกับ tumorigenesis ของต่อมลูกหมาก และการแสดงออกที่มากเกินไปมีความเกี่ยวข้องกับ progression ของมะเร็ง.^(31, 32) SOX9 และ SOX10 พบว่ามีการแสดงออกที่ผิดปกติในมะเร็ง โดยทั้งการแสดงออกที่มากเกินไปของ SOX9 และการแสดงออกที่น้อยเกินไปของ SOX10 นั้นมีความเกี่ยวข้องกับ aggressive progression ของโรค⁽³³⁾ SOX15 พบว่ามีการแสดงออกที่ลดลงในกลุ่มมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่กลไกในมะเร็งต่อมลูกหมากยังไม่มีรายงาน อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานใน testicular embryonic carcinoma พบว่า SOX15 จะไปยับยั้ง proliferation ของ cancer cells.⁽³⁴⁾ SOX7 ได้มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์เป็น tumor suppressor gene โดยการแสดงออกที่มากเกินไปของ SOX7 จะไปยับยั้ง cell proliferation และ colony formation ซึ่งการแสดงออกที่ลดลงของ SOX7

นั้นมีความเกี่ยวข้องกับ aggressive progression ของมะเร็ง และนอกจากนั้นการแสดงออกที่ลดลงของ SOX7 เป็นผลมาจากการเกิด promoter methylation^(33, 35)

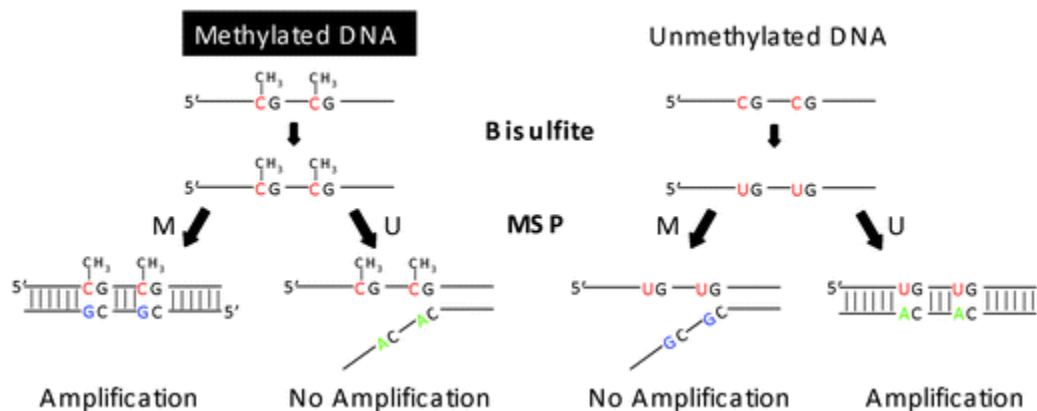
ในส่วนของยีน SOX11 มีรายงานว่า SOX11 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาทและกระบวนการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ (Adult neurogenesis)^(7, 9-12) รวมทั้งมีบทบาทเป็น oncogene⁽³⁶⁾ และ tumor suppressor gene⁽¹³⁻¹⁹⁾ ในเนื้องอกและมะเร็งในหลายอวัยวะ มีรายงานบทบาทในมะเร็งต่อมลูกหมากของ Zhiyong Yao และคณะ ในปี ค.ศ.2015 โดยศึกษาคุณสมบัติของ SOX11 พบว่ามีคุณสมบัติเป็น tumor suppressor gene โดยการยับยั้งการ proliferation ของเซลล์ การ migration ของเซลล์ และการ invasion ของเซลล์⁽¹⁹⁾ ในปัจจุบันมีการศึกษาการเกิด methylation ของ tumor suppressor gene ในหลายมะเร็ง ซึ่งการเกิด methylation อาจเกี่ยวข้องกับดำเนินโรคหรือเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน ซึ่งในยีน SOX11 ได้มีการศึกษาและรายงานการเกิด methylation ในหลายมะเร็ง ได้แก่ nasopharyngeal carcinoma พบว่าการเกิด methylation 67.4% ในกลุ่มมะเร็ง และไม่พบการ methylation ในกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็ง ซึ่งการเกิด DNA methylation ของ SOX11 อาจจะมีบทบาทในการเจริญและการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง⁽¹⁴⁾ รายงานใน hematopoietic malignancies พบว่าการเกิด methylation นั้นผกผันกับการแสดงออกของ SOX11⁽¹⁵⁾ สำหรับใน epithelial ovarian cancer มีรายงานว่า การเกิด methylation มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ mRNA และโปรตีน นอกจากนี้ในกลุ่มที่มีการแสดงออกโปรตีนที่ลดลงน้อยกว่า 10% จะมีอัตราการอยู่รอดต่ำกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกมากกว่า 10%⁽¹⁷⁾ ใน gastric cancer มีรายงานพบว่าในกลุ่มมะเร็งมีการเกิด methylation ถึง 55.1% และ 7.9% ในกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยการเกิด methylation มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี โดยในกลุ่มที่มีการเกิด methylation จะมีอัตราการอยู่รอดต่ำกว่ากลุ่มที่เกิด unmethylation⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Lena Nordström และคณะ โดยได้ศึกษาใน cancer cell lines หลายชนิด ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าการเกิด methylation ของ SOX11 ในกลุ่มของเซลล์ Burkitt's lymphomas, follicular lymphomas และ diffuse large B-cell lymphomas และไม่พบการเกิด methylation ในกลุ่มเซลล์ mantle cell lymphomas, brain cancer และ neuroblastoma แต่ในกลุ่มเซลล์ ovarian cancer, breast cancer และ lung cancer พบว่าการเกิด methylation ของ SOX11 ในเซลล์บางชนิดของ cancer cell⁽²⁴⁾ แต่ในปัจจุบันการศึกษการเกิด methylation ของ SOX11 ในมะเร็งต่อมลูกหมากนั้นยังไม่มีรายงาน

ทฤษฎีและหลักการเทคนิค Methylation-specific PCR (MSP)

เทคนิค Methylation-specific PCR (MSP) ถูกพัฒนาโดย Herman และคณะในปี ค.ศ.1996 โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)^(37, 38) ในส่วนของเทคนิค MSP นั้นจะใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือคู่ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิด methylation (methylated sequence) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกิด methylation (unmethylated sequence) การเตรียม DNA เพื่อทำปฏิกิริยา MSP ต้องมีการทำ bisulfite modification เพื่อทำให้เกิดความแตกต่างระหว่าง sequence ที่มีเบส cytosine มีการเกิด methylation กับไม่เกิด methylation โดยภายหลังการทำ bisulfite modification จะเปลี่ยนเบส cytosine ที่ไม่เกิด methylation เป็นเบส uracil และจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นเบส thymine ภายหลังการทำปฏิกิริยา PCR แต่ในบริเวณเบส cytosine ที่มีการเกิด methylation นั้นเมื่อผ่านปฏิกิริยา bisulfite modification ไปแล้วจะยังคงเป็น cytosine เช่นเดิม⁽³⁸⁾ ดังภาพที่ 10 และภาพที่ 11



ภาพที่ 10 แสดงกระบวนการ methylation, bisulfite modification และ PCR⁽³⁸⁾



ภาพที่ 11 เทคนิค methylation-specific PCR

(ที่มา : <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/ArticleImage/2009/LC/b821780g/b821780g-f1.gif>)

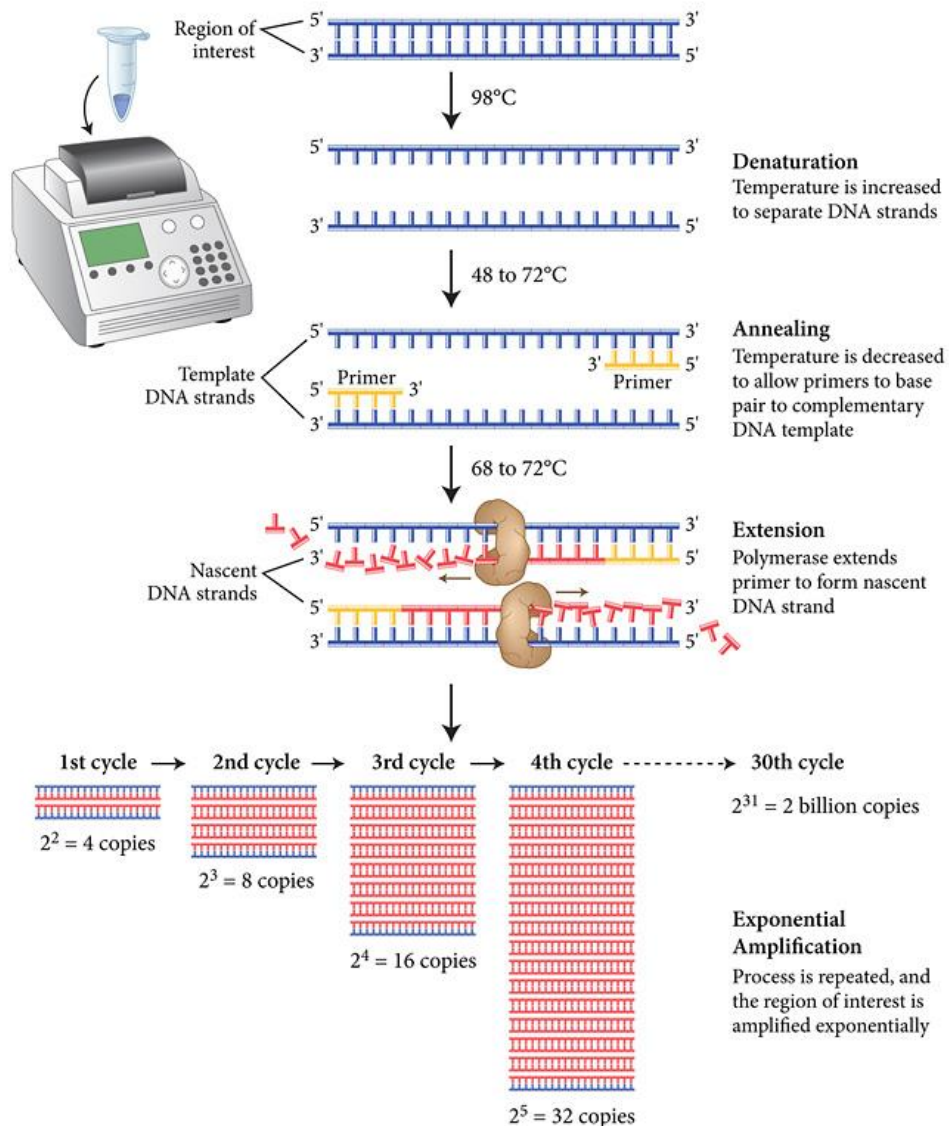
Polymerase chain reaction (PCR) เป็นหลักการที่ใช้ในขั้นตอนของการศึกษา MSP โดยเทคนิค PCR นี้เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ให้ได้ DNA ที่มีปริมาณมากขึ้น ถูกพัฒนาในปี ค.ศ.1984 โดย Kary Mullis นักชีวเคมีชาวอเมริกัน⁽³⁹⁾

หลักการของ PCR คือการเพิ่มจำนวนของ DNA เป็นการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จาก DNA ต้นแบบ (template) ที่มีอยู่ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase การสังเคราะห์จะใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ในการทำปฏิกิริยา และมีสารในปฏิกิริยาดังตารางที่ 6 โดยขั้นตอนของ PCR นั้นมีอยู่ 3 ขั้นตอนในแต่ละรอบคือ denaturation, annealing และ extension โดยมีรายละเอียดดังนี้⁽⁴⁰⁾ (ภาพที่ 11)

- Denaturation เป็นขั้นตอนการใช้ความร้อนในการแยก DNA สายคู่ให้แยกออกเป็นสายเดี่ยว เพื่อเหมาะแก่การเข้ามาจับของ primer
- Annealing เป็นขั้นตอนที่คู่ของ primer จะมาจับกับ DNA template ที่แยกเป็นสายเดี่ยวทั้ง 2 เส้น โดยจะไปจับในตำแหน่งที่ตรงข้ามกัน และมีความจำเพาะกับตำแหน่งของ nucleotide บริเวณนั้น
- Extension เป็นขั้นตอนต่อเติม nucleotide เพื่อสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยเริ่มสังเคราะห์จากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อน

ตารางที่ 6 แสดงสารในปฏิกิริยา PCR

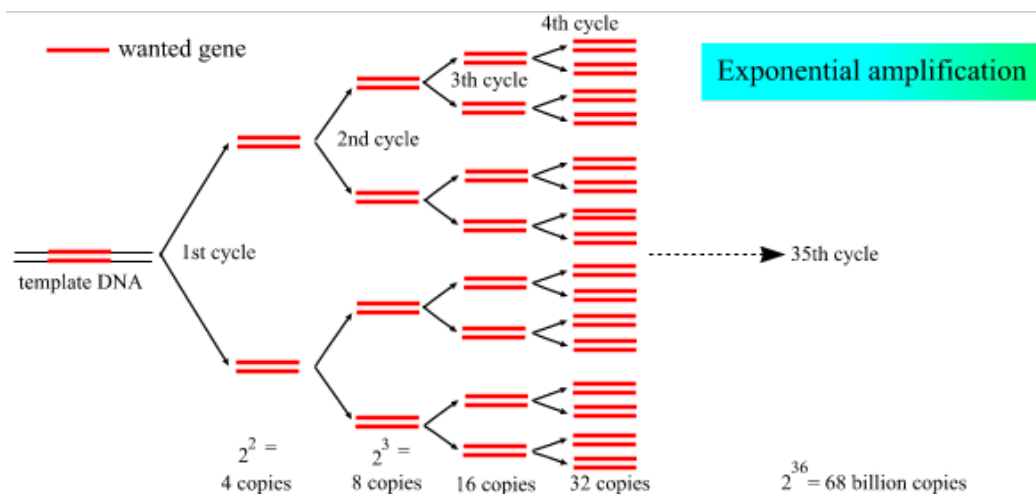
สารในปฏิกิริยา PCR	คำอธิบาย
สารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template)	เป็น DNA template ในปฏิกิริยา
ไพรเมอร์ (Primer) <ul style="list-style-type: none"> - Forward primer - Reverse primer 	จับกับ DNA template เพื่อเริ่มการสังเคราะห์ DNA สายใหม่
อนุพันธ์นิวคลีโอไทด์อิสระ (deoxynucleotide triphosphates; dNTP) <ul style="list-style-type: none"> - deoxyadenosine triphosphates (dATP) - deoxycytidine triphosphates (dCTP) - deoxythymidine triphosphates (dTTP) - deoxyguanosine triphosphates (dGTP) 	เป็นเบสเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่
Magnesium chloride ($MgCl_2$)	เป็นโคเอนไซม์ของ Taq DNA polymerase
Taq DNA polymerase	เป็นเอนไซม์ในการต่อเติม dNTP เพื่อสังเคราะห์ DNA สายใหม่



ภาพที่ 12 แสดงขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR

(ที่มา : <https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Applications/DNA%20Amplification%20and%20PCR/pcr.jpg>)

ปฏิกิริยาจะหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปจนครบปฏิกิริยาที่ได้กำหนดไว้ ซึ่งในทุกๆรอบจะมี DNA เพิ่มขึ้นเป็นลักษณะ exponential ดังภาพที่ 13 กล่าวคือจาก DNA ต้นแบบ 1 คู่ เมื่อครบปฏิกิริยา 1 รอบ จะได้เป็น 2 คู่ จากนั้นเป็น 4 คู่ และ 8 คู่ และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเป็นแบบทวีคูณ โดยสามารถคำนวณจำนวนเส้นคู่ใหม่ที่เพิ่มขึ้นด้วยสูตร 2^n กำหนดให้ n คือจำนวนรอบของปฏิกิริยา (cycle)



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะการเพิ่มขึ้นของ DNA ในปฏิกิริยา PCR

(ที่มา : http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/images/clip_image003.gif)

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้ว ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) จะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ดังนั้นการวิเคราะห์ผล PCR product จะต้องมาวิเคราะห์โดยการใช้การแยกขนาดของ DNA บนวุ้น โดยใช้กระแสไฟฟ้า เรียกว่า gel electrophoresis โดย DNA จะเคลื่อนที่บนวุ้น ซึ่งการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA จึงสามารถแยก DNA ในแต่ละขนาดได้ หลังจากนั้นนำไปย้อมด้วย Gelstar nucleic acid stain หรือ ethidium bromide แล้วจึงนำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) หรือนำไปดูโดยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation System) ซึ่งเมื่อนำหลักการทาง PCR มาใช้ในเทคนิค MSP แล้วสามารถสรุปขั้นตอนของ MSP ได้ดังภาพที่ 14

Sample gDNA : 5'-CATGCGGTCGACCT-3'

STEP 1 Sodium Bisulfite Treatment Modification

After Bisulfite treatment, all unmethylated Cytosine (C) is changed to Uracil (U).

• Unmethylated sample : 5'- UATGUGGTUGAUGT-3'

• Methylated sample : 5'- UATGMGGTMGACMT-3'

The conversion process of a DNA sample is performed in the bisulfite reaction. All unmethylated Cytosines are converted into Uracil, while methylated Cytosines remain unaltered. DNA purification step is followed.









STEP 2 MSP with Unmethyl (U) & Methyl (M) primer

U Primer : 3'-ATACACCAACTACA-5'

M Primer : 3'-ATACGCCAGCTGCA-5'

The PCR primer sets (Unmethylated & Methylated) are designed to distinguish methylated from unmethylated DNA for MSP (methylation-specific PCR).

STEP 3 Gel electrophoresis and Analysis

Primer U		Primer M		Primer U		Primer M	
							
PCR Product	No Band	No Band	PCR Product	PCR Product	PCR Product	PCR Product	PCR Product
Complete unmethylated sample		Complete methylated sample		Mixture of unmethylated and methylated sample			

After PCR amplification, you can discriminate between methylated and unmethylated DNA sequences of interest by gel electrophoresis.

ภาพที่ 14 ขั้นตอนการศึกษาการเกิด methylation ด้วยเทคนิค MSP

(ที่มา : http://www.komabiotech.com/product/plimages/methylation_principle.gif)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง
(Cross-sectional descriptive study)

ประชากรศึกษา

ชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้จะใช้จำนวนชิ้นเนื้อตัวอย่างที่เป็นมะเร็ง (PCa) จำนวน 62 ตัวอย่าง โดยมาจากการตัดชิ้นเนื้อด้วยวิธี prostatectomy และชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH) จำนวน 81 ตัวอย่าง โดยมาจากการตัดชิ้นเนื้อด้วยวิธี transurethral resection (TUR) ซึ่งชิ้นเนื้อจะถูกรักษาสภาพโดยการแช่ฟอร์มาลินและถูกฝังในพาราฟินบล็อก (paraffin block) ในรูปแบบของ Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) block จากฝ่ายพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ.2549 - พ.ศ.2556 ชิ้นเนื้อทั้งหมดจะต้องผ่านการวินิจฉัยโดยพยาธิแพทย์

เกณฑ์ในการคัดเลือกชิ้นเนื้อเพื่อใช้ในการศึกษา

เกณฑ์การคัดเลือกชิ้นเนื้อเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. เป็นชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมากที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากพยาธิแพทย์
2. เป็นชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น BPH โดยการยืนยันจากพยาธิแพทย์
3. เป็นชิ้นเนื้อที่อยู่ในรูปแบบของ paraffin block จากภาคพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ฝ่ายพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย)
4. เป็นชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยในปี พ.ศ.2549 - พ.ศ.2556
5. ชิ้นเนื้อ paraffin block ที่ใช้ในการศึกษา จะต้องมีความสมบูรณ์ไม่ชำรุดเสียหาย

เกณฑ์การคัดเลือกชิ้นเนื้อออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. เป็นชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็งชนิดอื่นๆร่วมด้วย
2. เป็นชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่มีประวัติการรักษาด้วยรังสี (radiation therapy)
3. เป็นชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่มีประวัติการรักษาด้วยฮอร์โมน (hormonal therapy)
4. เป็นชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่มีเซลล์มะเร็งน้อยกว่า 5% บนสไลด์เนื้อเยื่อ
5. ข้อมูลลักษณะทางคลินิกที่ใช้ในการศึกษาไม่ครบถ้วน

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

ในการคำนวณหาขนาดกลุ่มตัวอย่างจะใช้วิธีคำนวณจากสูตรหาขนาดตัวอย่างสำหรับการประมาณค่าสัดส่วนหรือร้อยละของกลุ่มเมื่อไม่ทราบจำนวนประชากรหรือประชากรมีขนาดใหญ่

$$\text{จากสูตร } n = \frac{Z^2 \alpha_2 PQ}{d^2}$$

คำนวณหาขนาดกลุ่มตัวอย่างในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็ง

n = จำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้

$Z\alpha = Z_{0.05} = 1.96$ (two tail) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (95% confidence interval)

P = อัตราการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* ในชิ้นเนื้อ PCa = 0.8

(ค่าที่ได้มาจาก pilot study ที่ทำการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 10 ราย พบว่ามีการเกิด methylation ของ *SOX11* จำนวน 8 ราย)

$$Q = 1 - P = 0.2$$

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ 10% = 0.1

ดังนั้น จำนวนตัวอย่างในกลุ่มชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งจะได้เท่ากับ

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.8)(0.2)}{(0.1)^2} = 62 \text{ ตัวอย่าง}$$

คำนวณหาขนาดกลุ่มตัวอย่างในกลุ่มชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH)

n = จำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้

$Z_{\alpha} = Z_{0.05} = 1.96$ (two tail) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (95% confidence interval)

P = อัตราการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* ในชิ้นเนื้อที่ BPH = 0.3

(ค่าที่ได้มาจาก pilot study ที่ทำการศึกษาในเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH) จำนวน 10 ราย พบว่ามีการเกิด methylation ของ *SOX11* จำนวน 3 ราย)

$Q = 1 - P = 0.7$

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ 10% = 0.1

ดังนั้น จำนวนตัวอย่างในกลุ่มชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็งจะได้เท่ากับ

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.3)(0.7)}{(0.1)^2} = 81 \text{ ตัวอย่าง}$$

ในการศึกษานี้กลุ่มตัวอย่างที่เป็นมะเร็ง (PCa) จำนวน 62 ตัวอย่าง และชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH) จำนวน 81 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 143 ตัวอย่าง

ประเด็นจริยธรรม

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการขอความยินยอมผู้เข้าร่วมในการวิจัย แต่การวิจัยนี้เป็นการศึกษาจากชิ้นเนื้อและข้อมูลจากเวชระเบียนของผู้ป่วย ซึ่งมีอยู่แล้ว ตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัย โดยไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้เข้าร่วมในการวิจัย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับจากผู้เข้าร่วมในการวิจัย โดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวผู้เข้าร่วมในการวิจัย

2. หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) ผู้เข้าร่วมในการวิจัยจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ อาจเกิดความเสียหายต่อตัวผู้เข้าร่วมในการวิจัยเพียงเล็กน้อย คือ ความลับของผู้เข้าร่วมในการวิจัยอาจถูกเปิดเผย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้เข้าร่วมในการวิจัย

3. หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์การตัดเข้าและออกชัดเจน เมื่อพิจารณาถึงความเสี่ยงประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้เข้าร่วมในการวิจัย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

4. โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากสำนักงานจริยธรรมวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รหัส IRB No.440/59

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

1. Microtome (Thermo electron corporation, USA)
2. Microtome knife
3. Cold plate
4. Surgical Blade (Swann-Morton, England)
5. 1.5 ml microcentrifuge tube (Axygen, USA) และ Microtube Rack
6. 0.2 ml PCR tube (Axygen, USA) และ PCR tube Rack
7. Dry Bath Incubator EL-02 (Major Science, Taiwan)
8. Microcentrifuge GMC-260 (Daihan Labtech, Korea)
9. Analytical Balance SI-4002 (Denver Instrument, USA)
10. Centrifuge Mikro 200 (Hettich, Germany)
11. Vortex mixture VM-300 (Gemmy, Taiwan)
12. Cryotube Box
13. 4°C Refrigerator (Sanden Intercool)
14. -20°C Freezer (Sanyo)
15. Transferpette S Pipette 1, 10, 20, 100, 200, 1000 µl (BRAND, Germany)
16. Pipette tip 10, 200, 1000 µl (Axygen, USA) และ Pipette tip box
17. Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo scientific, USA)
18. Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA)
19. PowerPac HC Power Supply (Bio-Rad, USA)
20. Electrophoresis Cell DYCP-31DN (Beijing Liuyi Biotechnology, China)

21. Barnstead MicroPure Water Purification System (Thermo scientific, USA)
22. 70°C Incubator (Mettler, Germany)
23. Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad, USA)
24. Computer with Quantity One 4.6.9 Software (Bio-Rad, USA)
25. Sterilizer Autoclave HVA-85 (Hirayama, Japan)
26. 70°C Incubator (Mettler, Germany)
27. Microwave R-250 (Sharp)
28. Examination glove (Megaglove)
29. Face Mask (Welcare)
30. Barnstead MicroPure Water Purification System (Thermo scientific, USA)
31. 10 ml Serological Pipets (Falcon, USA)
32. Pipette controller (Eppendorf)
33. 100, 500 ml Cylinder (Pyrex, USA)

สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

- 1) Absolute Ethanol (EMSURE, Germany)
- 2) 70% ethanol
- 3) Xylene (DaeJung Chemicals & Metals, Korea)
- 4) Qiaamp DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, USA)

2. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา bisulfite treatment

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

3. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา methylation-specific PCR (MSP)

- 1) EpiTect® PCR Control DNA Set (Qiagen, USA)
- 2) Taq PCR Master Mix (Qiagen, USA)
- 3) Methylation *SOX11* forward primer (Pacific science, Thailand)
- 4) Methylation *SOX11* reverse primer (Pacific science, Thailand)
- 5) Unmethylation *SOX11* forward primer (Pacific science, Thailand)
- 6) Unmethylation *SOX11* reverse primer (Pacific science, Thailand)
- 7) Deionized Water

4. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา gel electrophoresis

- 1) Tris base (Vivantis, USA)
- 2) EDTA, Disodium Salt, Dihydrate (OmniPur, Germany)
- 3) Acetic acid (glacial) (EMSURE, Germany)
- 4) 50 bp DNA Step Ladder (Sigma, USA)
- 5) DNA Loading Dye, 6x (Biotechrabbit, Germany)
- 6) Agarose Powder (Axygen, USA)
- 7) Ethidium Bromide (BioExcellence)
- 8) Deionized Water

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่อยู่ในรูปแบบของพาราฟินบล็อก (FFPE) จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ฝ่ายพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย) ตั้งแต่ปี พ.ศ.2549 - พ.ศ.2556 จำนวน 143 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมาก จำนวน 62 ตัวอย่าง และชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH) จำนวน 81 ตัวอย่าง

2. ผู้วิจัยนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อม hematoxylin และ eosin (H&E) มาคัดเลือกตำแหน่งบนเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาร่วมกับอาจารย์ที่ปรึกษา

3. นำสไลด์ตัวอย่างชิ้นเนื้อไปตัดด้วยเครื่อง microtome ขนาด 10 μm จำนวน 5-10 sections ใส่ในหลอด 1.5 microcentrifuge เพื่อนำไปสกัด DNA

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

1. การสกัด DNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Qiaamp DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, USA)

การเตรียมสารละลายก่อนการใช้งาน

- เติม Absolute ethanol 25 ml ใน AW1 buffer 19 ml
- เติม Absolute ethanol 30 ml ใน AW2 buffer 13 ml

ขั้นตอนการสกัด DNA

- นำเนื้อเยื่อที่ตัดด้วยเครื่อง microtome ขนาด 10 ไมครอน จำนวน 10 sections ใส่ในหลอด 1.5 microcentrifuge
- เติม xylene 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง
- เติม Absolute ethanol 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง
- เปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 20 นาที
- เติม ALT buffer 180 μl และ proteinase K 20 μl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture
- Incubate ด้วยเครื่อง heat block ที่ 54°C เป็นเวลาข้ามคืน (16 ชั่วโมง)
- Incubate ด้วยเครื่อง heat block ที่ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติม AL buffer 200 μl ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture หลังจากนั้นเติม Absolute ethanol 200 μl และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture

- ดูดสารละลายที่อยู่ในหลอดตัวอย่าง มาใส่ใน QIAamp MinElute column (ที่อยู่ในหลอด 2 ml collection tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งหลอด collection tube ที่มีส่วนใสอยู่
- เติม AW1 buffer 500 μ l ใส่ใน QIAamp MinElute column (ใส่ในหลอด 2 ml collection tube หลอดใหม่) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งหลอด collection tube ที่มีส่วนใสอยู่
- เติม AW2 buffer 500 μ l ใส่ใน QIAamp MinElute column (ใส่ในหลอด 2 ml collection tube หลอดใหม่) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งหลอด collection tube ที่มีส่วนใสอยู่
- นำ QIAamp MinElute column (ใส่ในหลอด 2 ml collection tube หลอดใหม่) ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้งหลอด 2 ml collection tube
- นำ QIAamp MinElute column มาใส่ในหลอด 1.5 microcentrifuge แล้วเติม ATE buffer 50 μ l จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- DNA ที่สกัดได้จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20°C

2. วัดปริมาณของ DNA โดยใช้เครื่อง Nanodrop Spectrophotometer

- เข้าโปรแกรม NanoDrop 2000 ในคอมพิวเตอร์
- เลือกการวัด Nucleic Acid หลังจากนั้นสังเกตว่าเป็นการวัด DNA ในหน้าจอ
- หยดสารละลาย ATE buffer เพื่อใช้ในการวัด blank แล้วคลิกปุ่ม Blank ในโปรแกรม
- หยด DNA แล้วคลิกปุ่ม Measure
- อ่านผลปริมาณของ DNA ได้ที่ Result table

คำแนะนำในการวัดปริมาณ DNA

- ทำความสะอาดหัวอ่านด้วย deionized water ก่อนการใช้งาน
- หากมีการวัดค่าไม่ถูกต้องให้ทำความสะอาดหัวอ่านด้วย deionized water และทำการวัด blank ใหม่

3. การเจือจางปริมาณ DNA ให้เท่ากันทุกตัวอย่าง (DNA dilution)

- เจือจาง DNA ให้ได้ความเข้มข้น 25 ng/μl โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$
 - C_1 = ความเข้มข้นเริ่มต้นของ DNA ที่วัดได้
 - V_1 = ปริมาตรของ DNA ที่ใช้ในการเจือจาง
 - C_2 = ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 25 ng/ul
 - V_2 = ปริมาตรสุดท้าย
- ทำการเจือจาง DNA ด้วย deionized water

การทำปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์ (bisulfite treatment)

1. ทำปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, USA)

การเตรียมสารละลายก่อนการใช้งาน

- เติม Absolute ethanol 96 ml ใน M-Wash Buffer 24 ml
- เตรียม CT Conversion Reagent โดยการเติม DW 900 μl เติม M-Dilution Buffer 300 μl และเติม M-Dissolving Buffer 50 μl จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์

- เติม CT conversion reagent 130 μl และ DNA ที่สกัดได้ 20 μl มาใส่ในหลอด PCR และผสมโดยการดูด pipet ขึ้น-ลง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง

- นำหลอด PCR มาใส่ในเครื่อง Thermal Cyclers (Applied Biosystems, USA) โดยมีสภาวะอุณหภูมิ และเวลา ดังนี้
 - 98°C เป็นเวลา 10 นาที
 - 64°C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง
- Incubate ที่ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 20 ชั่วโมง)
- เติม M-Binding Buffer 600 μ l ใส่ใน Zymo-Spin™ IC Column (ที่อยู่ในหลอด collection tube) จากนั้นนำสารละลายที่อยู่ในหลอด PCR (ที่นำออกมาจากเครื่อง Thermal Cyclers) มาใส่ใน Zymo-Spin™ IC Column ที่มี M-Binding Buffer บรรจุอยู่ และผสมโดยพลิกหลอด ขึ้น-ลง
- นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสที่อยู่ในหลอด collection tube ทิ้ง
- เติม M-Wash Buffer 100 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม M-Desulphonation Buffer 200 μ l ปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม M-Wash Buffer 200 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม M-Wash Buffer 200 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งหลอด collection tube
- นำ Zymo-Spin™ IC Column มาใส่ในหลอด 1.5 microcentrifuge แล้วเติม M-Elution Buffer 10 μ l จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- DNA ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

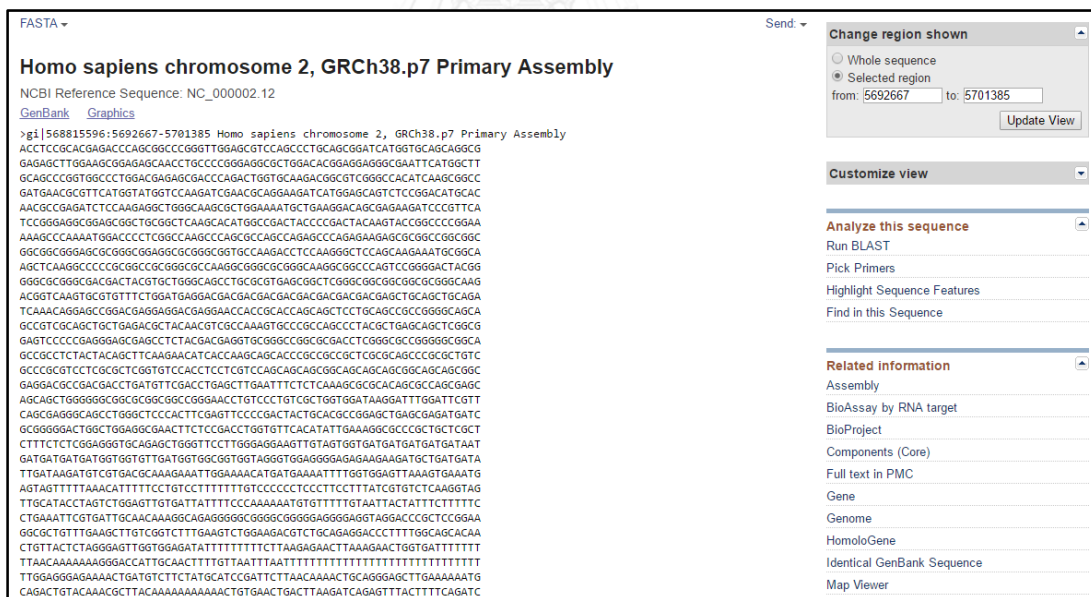
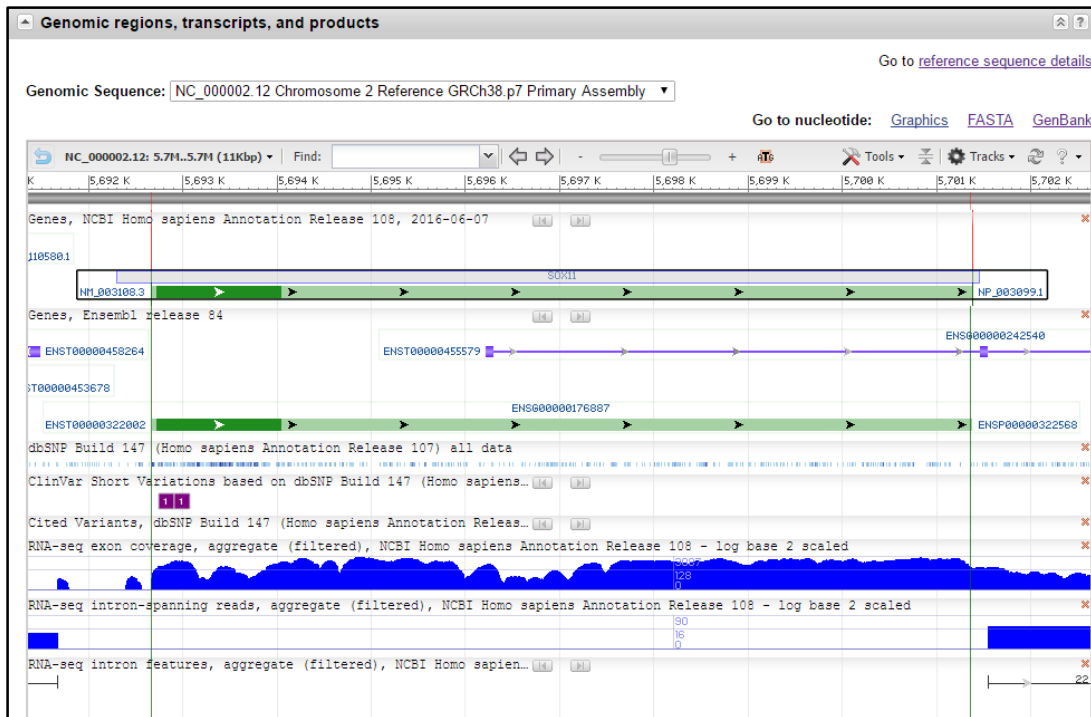
คำแนะนำในการใช้ CT conversion reagent

- CT conversion reagent 1 หลอด สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาได้ 10 ปฏิกิริยา
- CT conversion reagent เป็นสารที่ไวต่อแสง
- CT conversion reagent สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 1 คีน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ได้ 1 สัปดาห์ และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ได้ 1 เดือน
- ภายหลังจากเก็บ สามารถนำมาอุ่นได้ที่อุณหภูมิ 37°C และนำไปผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex mixture ก่อนการใช้งาน

การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา methylation-specific PCR (Primer design)

1. การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *SOX11* ในฐานข้อมูลเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)⁽⁴¹⁾ พบว่ายีน *SOX11* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 (2p25) ประกอบด้วย 1 exon ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาว 8,719 คู่เบส จากนั้นดูข้อมูลยีนในรูปแบบของ FASTA จะพบว่าตำแหน่งยีนของ *SOX11* เริ่มตั้งแต่ลำดับที่ 5692667 – 5701385 ดังภาพที่ 15 แต่ผู้วิจัยสนใจตำแหน่งของโปรโมเตอร์ซึ่งอยู่ในส่วนของ upstream ประมาณ 2,000-3,000 คู่เบสก่อนนิวคลีโอไทด์ของยีน^(13, 15) ทางผู้วิจัยจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ upstream 2,000 คู่เบสมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเริ่มตั้งแต่ลำดับที่ 5690667 – 5692666 ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 15 แสดงข้อมูลของยีน SOX11 จากเว็บไซต์ NCBI⁽⁴¹⁾

FASTA ▾ Send ▾

Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p7 Primary Assembly
 NCBI Reference Sequence: NC_000002.12
[GenBank](#) [Graphics](#)

>gl|568115596:5690667-5692666 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p7 Primary Assembly
 CGGGAAAGTGGGGACGGGGGCGGGAAATGGCTATCGCAATGGCGGTAAATTTTCAATCATGATCTGT
 GTAAACACGGTATTATTTTATGATTTAGATCTCCAGAGAGGATCGAACTTAGAAATGTGATATT
 AATTGCAGGAGGGCACCTGAAGGAGGAGATCGGATAATTTCCAGTCTACACGGCTGATTTCTCT
 GGTGAAGGGATCCGGGCAAGTCTTATGGAAGTCTCAAAAGTTCCAGATACCCAGTCTGGGGGGTGTGG
 AGAAGGCGAGGGTGGGACAGACCAATACCTATGAAGCGGTGATTTTCTTAAATGGCCCCAGAAATCCG
 TAGAGGTAGTGGACTCAATAAGAAACAAAGAGAGACGAACACGACGATCGCCCCGGGTCCTCCGCG
 TGCTCTGGAGGCCAGCGGCCCAAGTCCGGCTCCCGGGCCGACGCGACTTTTCATCTCCAGGG
 AAAATATTAGAGGGAAACTCGAGTGCACCTATTTCTCTTGGTTATGAGTACCCAGAAAGGCTTC
 TAGCTCACAAATCGACGATTTCAAGACGAGGCTCCGGAGAAAGCGTGGCGACGAGGATGGGGGAGGA
 CAAAGAGGAAAGAGGGCTGGGAAAGGAAAGGAGCGCGGAGGGGCGGGGAGAGGAGCGGGCGGGAG
 AGGAGGGGCGGGAGCAGAGGGGAGAGGGAGGGGCGCGGGCCCTCGAGGGACCGGGCGGGGCGGGG
 GCGGGCTTGTGGAGCTGTGGAGCCAGAGCCCGCTCCGGAGCAAGCCCTGGAGTGGCAGCTTGAAC
 CCGAGGGCCCCGAGACGTTACTTCCGGCCCCCGCGGGGGCGGGGGGGCGGGGCGAGGCCA
 ACCGACACAGCGCTCCCAAAACACCGGAGGGGAGAAACAGACGGAGAAAGGACAAACAGAAA
 AATGCAAAACGGGGAGGGAGCTCACCGCTCTCGAGCTTAAATGTATTTTTCCTTACAAAAGGG
 AGAAGGGAAAGGAGAGCAGAGCCACGCTGCGGGAGGTTGCTGTCTTCAAGCGCACCTCCGTCGG
 CCAAGGGCCGCGGGGCTACCGGGGGGCTGGGGGGGGGAGCCCGGGGGAGCGGGCGGGCCGCGAGGG
 GGGCTCGGGGGAGCAGCTGCGCCACCCCGGGGAGCGGGGGGGGGTGAACCGGAGCCGGGGGGGG
 CCGCGTCTCAGGGTGGGGGGTGGCCGAGTGTGACCCGGGGAGTGAAGCGGGCGCTCGCTGTGCG
 CGCTCGGGCTCCGGGGACTGGGCAAAAGGGCGCGGGGGCTCTCCGGAGCCCGGTCTCGGTTAGC
 GCGGGCGCCGAACATCCCGGTTGCGCCCGGGCCCGCCGCTCCCGTGGTGGCGGGCGCTCCGAG
 CATCCGGGAAACAGCGCATCTGTGACACACGCGGATTTTAAAAATACATATTTTAGACATGCT
 CCTCTCCCCACCCCTTTTGCAGAGCAGCCCGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 ATAAAGGAAGATGGGGGAGCCCGCCCGCATTTGGCTGAGTGGGGAGTGAATGACCATATGACA
 CCTGATAACTAGTTGAGAGAGAGACTCAACTTTTTCAGAGAGAGCGCGCGCTGGGAGAGCTCGG
 GGTCGGCGCTTGGGTAGAGAGCAGCGGGGGAGAGGGGTCCCGGGTGGCTGACCGCGCTCGCCA
 CCGCTCTCTGTGCGACCGCAGCTCCACCGCGCGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TGTGTGACGCTGGAAGGG
 AACTGCCAGGAGGTGGAGGGGTGGGAGGGGAGGGGG

Change region shown ▾

Whole sequence
 Selected region

from: 5690667 to: 5692666

Customize view ▾

Analyze this sequence ▾

Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence

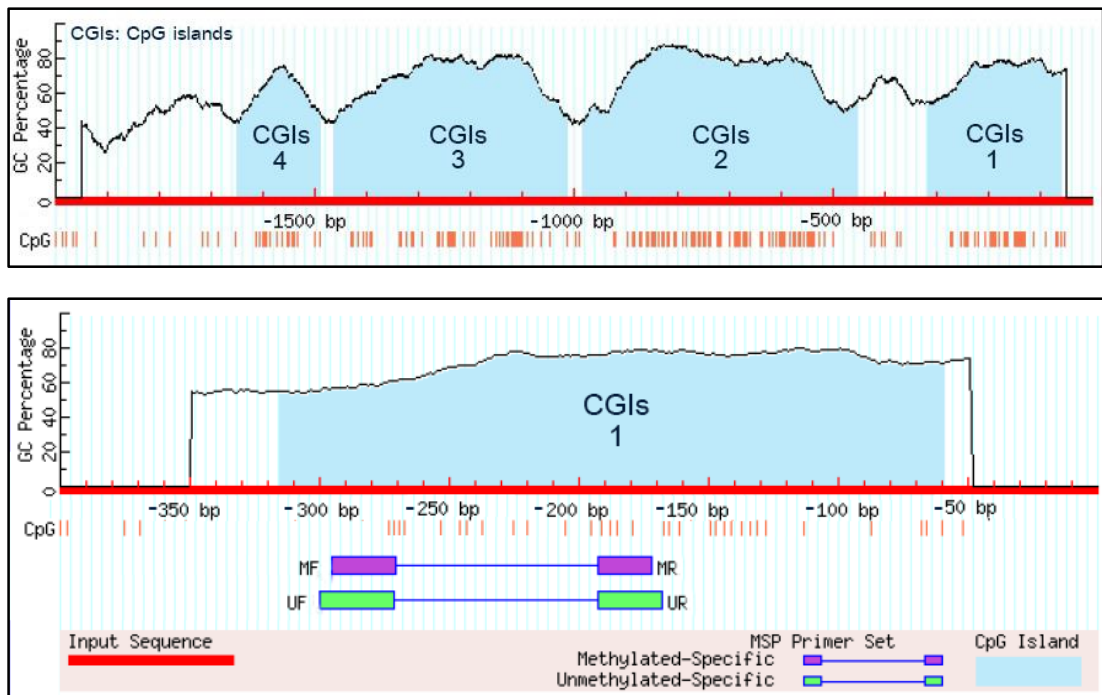
Related information ▾

Assembly
 BioAssay by RNA target
 BioProject
 Components (Core)
 Full text in PMC
 Gene
 Genome
 HomoloGene
 Identical GenBank Sequence
 Map Viewer

ภาพที่ 16 แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ upstream ความยาว 2,000 คู่เบสจากเว็บไซต์ NCBI⁽⁴¹⁾

2. การออกแบบไพรเมอร์

ในการออกแบบไพรเมอร์จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ upstream ที่ค้นหาในขั้นตอนข้างต้นจำนวน 2,000 คู่เบส มาใช้ในการวิเคราะห์ผล โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)⁽⁴²⁾ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์พบว่า มี CpG islands ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 17 และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาในมะเร็งอื่นได้เลือก CpG islands ตำแหน่งที่ 1 มาใช้ในการศึกษาเนื่องจากมีรายงานว่า CpG islands ตำแหน่งที่ 1 มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออก⁽¹⁵⁾ ทางผู้วิจัยจึงเลือก CpG islands ตำแหน่งที่ 1 มาใช้ในการออกแบบและได้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษารายละเอียดดังตารางที่ 7 โดยไพรเมอร์นี้จะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplify) ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ -302 ถึง -169 ครอบคลุม CpG site ทั้งหมด 16 ตำแหน่ง



ภาพที่ 17 แสดงตำแหน่ง CpG islands ของ upstream ของยีน SOX11 จากการออกแบบไพรเมอร์⁽⁴²⁾

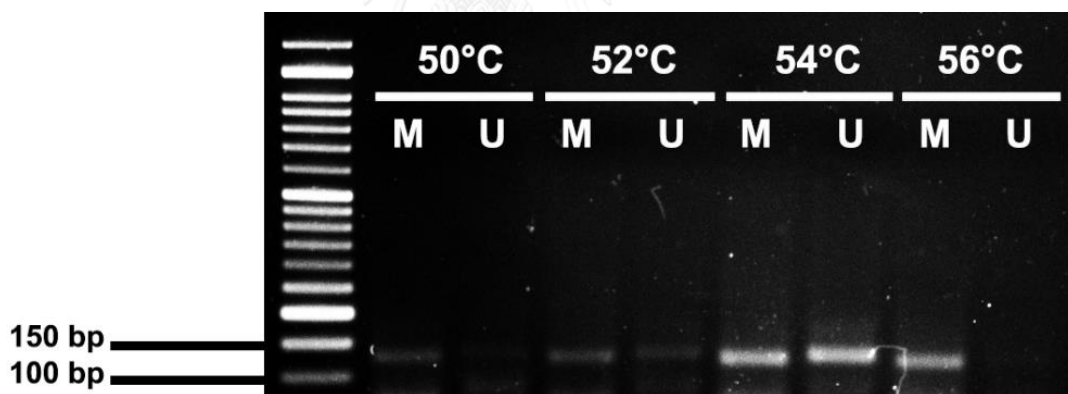
ตารางที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา⁽⁴²⁾

Primer	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (bp)
Methylated sequence			124
- Forward primer	ATTTTAATTTTTGTAGAAGGAGCG	58.52	
- Reverse primer	AAAAACGATAACGACGACGAT	58.64	
Unmethylated sequence			133
- Forward primer	GAGAGATTTTAATTTTTGTAGAAGGAGT	58.58	
- Reverse primer	CAAAAAACAATAACAACAACAAT	56.61	

bp: base pairs

3. การทดสอบไพรเมอร์

เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกออกแบบมาเป็นครั้งแรกจึงจำเป็นต้องทำการทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิในการจับกับ DNA ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา (annealing temperature) โดยการอ้างอิงอุณหภูมิของ Step I, Step II (ยกเว้น annealing) และ Step III จากการศึกษาท่อน (รายละเอียดดังตารางที่ 8)⁽¹⁸⁾ โดยมีการทดสอบ annealing temperature ที่ 50°C, 52°C, 54°C และ 56°C ในการทดลองได้ใช้ชุดสารละลายสำเร็จรูป Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, USA) ในการทดลองโดยมีสารในปฏิกิริยาดังตารางที่ 9 และใช้ชุด methylated, unmethylated DNA control เป็น DNA template (EpiTect Control DNA and Control DNA Set, Qiagen, USA) ตรวจสอบผลโดยการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ผลการทดลองพบว่า มีลักษณะของแบน (Band) ของการเกิด methylation และ unmethylation เกิดขึ้นอย่างชัดเจนที่อุณหภูมิ 54°C (ดังภาพที่ 18) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ annealing temperature ที่ 54°C



ภาพที่ 18 การทดสอบไพรเมอร์ โดยใช้ annealing temperature ที่ 50°C, 52°C, 54°C และ 56°C

ตารางที่ 8 แสดงสภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา MSP⁽¹⁸⁾

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส, °C)	เวลา
Step I		
	94	5 นาที
Step II		
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing	54	30 วินาที
Extension	72	45 วินาที
Step III		
Elongation	72	10 นาที
		X40 cycles

ตารางที่ 9 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา MSP

สารในปฏิกิริยา	ปริมาณ ต่อ 1 ปฏิกิริยา (µl)
Taq PCR Master Mix	10
Forward primer	0.4
Reverse primer	0.4
DNA template	1
Distilled Water	8.2
Total volume	20

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยด้วยเทคนิค methylation-specific PCR (MSP)

เตรียมสารละลายดังตารางที่ 9 โดยรายละเอียดของ primer อยู่ในตารางที่ 7 จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว มาทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้เครื่อง PCR Thermal Cyclers (Applied Biosystems, USA) โดยมีสภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา MSP ดังตารางที่ 8 ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว ให้นำ DNA ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเรียบร้อยแล้ว (MSP product) ไปตรวจสอบ DNA ด้วยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis)

การแยกสายดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis

เตรียม 2% agarose gel ใน 1X TAE buffer โดยใช้อัตราส่วนผง agarose ปริมาตร 2 g. ต่อ 1X TAE buffer ปริมาตร 100 ml จากนั้นทำการละลายโดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟ และนำมาเทลงใน gel chamber ที่เตรียมไว้ รอให้ gel แข็งตัวมีลักษณะเป็นวุ้น และเมื่อ gel มีลักษณะเป็นวุ้นแล้วให้นำมาวางไว้ในเครื่อง run gel จากนั้นนำ DNA ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนมาแล้วมาไหลลงลงใน agarose gel ปริมาตร 8 μ l โดยผสมกับ DNA Loading Dye, 6x (Biotech rabbit, Germany) และไหล 50 bp DNA Step Ladder (Sigma, USA) ปริมาตร 5 μ l เปิดเครื่อง power supply ให้กระแสไฟฟ้าที่ 150 V เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเสร็จแล้วให้นำมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปดูผลและถ่ายรูปเจลโดยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation System)

คำแนะนำการเตรียม 1X TAE buffer (ภาคผนวก ข)

- เตรียม 10X TAE buffer ปริมาตร 1000 ml
- เตรียม 1X TAE buffer ปริมาตร 1000 ml โดยการเติม 10X TAE buffer 100 ml ผสมกับ deionized water 900 ml

การดูผลและถ่ายรูปเจลโดยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation System)

วางแผ่นเจลเข้าไปในเครื่อง Gel Doc XR+ แล้วเข้าโปรแกรม Quantity One ในคอมพิวเตอร์ จากนั้นกดเลือกเครื่อง Gel Doc XR+ เพื่อต้องการดูผล จากนั้นคลิกปุ่ม Epi White เพื่อให้มองเห็นแผ่นเจลในโปรแกรม และปรับตำแหน่งเจลให้พอดีกับมุมมองในจอคอมพิวเตอร์ หลังจากนั้นคลิกปุ่ม Trans UV และ Auto Expose ตามลำดับเพื่อวิเคราะห์ผล และกดบันทึกไฟล์ภาพเจล

การบันทึกข้อมูล

ดูผลการเกิด methylation จากไฟล์ภาพเจลที่ถ่ายด้วยเครื่อง Gel Doc XR+ ด้วยโปรแกรม Quantity One โดยบันทึกข้อมูลลง data sheet

การตรวจสอบข้อมูล

1. ข้อมูลการเกิด methylation ของ *SOX11* จะเก็บข้อมูลโดยการนับตัวอย่างขึ้นเนื้อที่มีการเกิด methylation หรือ unmethylation หรือ partial methylation จากการทดลองด้วยเทคนิค MSP และตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis
2. ลักษณะทางคลินิกจะเก็บข้อมูลมาจากผลการตรวจจากพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. คุณลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยที่นำมาศึกษา จะนำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าพิสัย และข้อมูลร้อยละ(%)
2. ข้อมูลอัตราการเกิด *SOX11* methylation จะนำเสนอข้อมูลในรูปแบบร้อยละ(%)
3. ข้อมูลลักษณะทางคลินิก จะนำเสนอข้อมูลในรูปแบบร้อยละ(%)
4. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิด *SOX11* methylation ระหว่างชั้นเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมากกับชั้นเนื้อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง จะใช้ Pearson's Chi-square Test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
5. ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับลักษณะทางคลินิก (ข้อมูลเชิงกลุ่ม) จะใช้ Fisher's Exact Test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
6. ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับอายุ หรือ ระดับ PSA (ข้อมูลเชิงปริมาณ) จะใช้สถิติ Student's t-test หรือ Mann-Whitney U-test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
7. ความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงกลุ่มอื่นๆ จะใช้ Pearson's Chi-square Test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
8. การศึกษาระยะปลอด BCR (BCR-free survival) จะใช้ Kaplan-Meier Survival Analysis และ Log-Rank Test ในการวิเคราะห์ข้อมูล
9. ข้อมูลที่นำมาศึกษาจะวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 23.0 โดยค่าที่ยอมรับได้จะมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \text{ value} < .05$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ประชากรตัวอย่าง

ได้ศึกษาประชากรตัวอย่างจากชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากของผู้ป่วยจำนวน 143 ราย ที่อยู่ในรูปแบบของ paraffin block ที่ผ่านการวินิจฉัยและรักษามาแล้ว ประกอบไปด้วย กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากจำนวน 62 ราย มีอายุเฉลี่ย 66 ปี มีระดับ PSA เฉลี่ย 17.4 ng/ml ชิ้นเนื้อที่ใช้ศึกษาเก็บโดยวิธี prostatectomy ในส่วนของกลุ่มผู้ป่วยต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง จะผ่านการวินิจฉัยเป็น BPH มีจำนวน 81 ราย มีอายุเฉลี่ย 70 ปี มีระดับ PSA เฉลี่ย 7.7 ng/ml ชิ้นเนื้อที่ใช้ศึกษาจะเก็บโดยวิธี transurethral resection (TUR) (รายละเอียดเพิ่มเติมดังตารางที่ 10) การคัดเลือกตำแหน่งบนสไลด์ที่ใช้ในการศึกษา จะดูเนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมด้วย H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 10 คุณลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยที่นำมาศึกษา

Variables	Prostate cancer	BPH
Age at surgery, years		
- Mean \pm SD	66.2 \pm 5.7	70.2 \pm 7.5
- Range	52-76	56-86
PSA level, ng/ml		
- Mean \pm SD	17.4 \pm 18.2	7.7 \pm 6.5
- Median	10.3	6.2
- Range	3.6-75.4	1.0-50.6
Weight of prostate specimen, g		
- Mean \pm SD	43.0 \pm 15.6	20.2 \pm 14.1
- Median	40	17
- Range	13-103	2-63
Source of tissue, %		
- TUR	-	81 (100%)
- Prostatectomy	62 (100%)	-

TUR: Transurethral resection

ผลการศึกษาการเกิด methylation ของ SOX11

การศึกษานี้มีจุดประสงค์หลักในการศึกษาอัตราการเกิด SOX11 methylation โดยผลการศึกษาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากทั้งหมดจำนวน 143 ราย ที่ผ่านการศึกษาดังกล่าวโดยวิธี MSP และดูผลโดยวิธี gel electrophoresis เทียบกับ DNA Ladder ซึ่ง DNA ที่มีการเกิด SOX11 methylation หรือมีการเกิด SOX11 unmethylation จะมี band เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 124 หรือ 133 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 19) จากผลการทดลองพบว่าในเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก จะมีอัตราการเกิด complete methylation 72.6% โดยพบจำนวน 45 รายใน 62 ราย มีการเกิด partial methylation 5 ราย คิดเป็น 8.1% และมีการเกิด unmethylation 19.4% แต่ในส่วนของเนื้อเยื่อ BPH มีอัตราการเกิด complete methylation 25.9% โดยพบจำนวน 21 รายใน 81 ราย มีการเกิด partial methylation 8 ราย คิดเป็น 9.9% และมีการเกิด unmethylation 64.2% (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลการศึกษาการเกิด SOX11 methylation

Methylation status	No. of PCa (%)	No. of BPH (%)
Methylation	50 (80.6)	29 (35.8)
- Complete	45 (72.6)	21 (25.9)
- Partial	5 (8.1)	8 (9.9)
Unmethylation	12 (19.4)	52 (64.2)

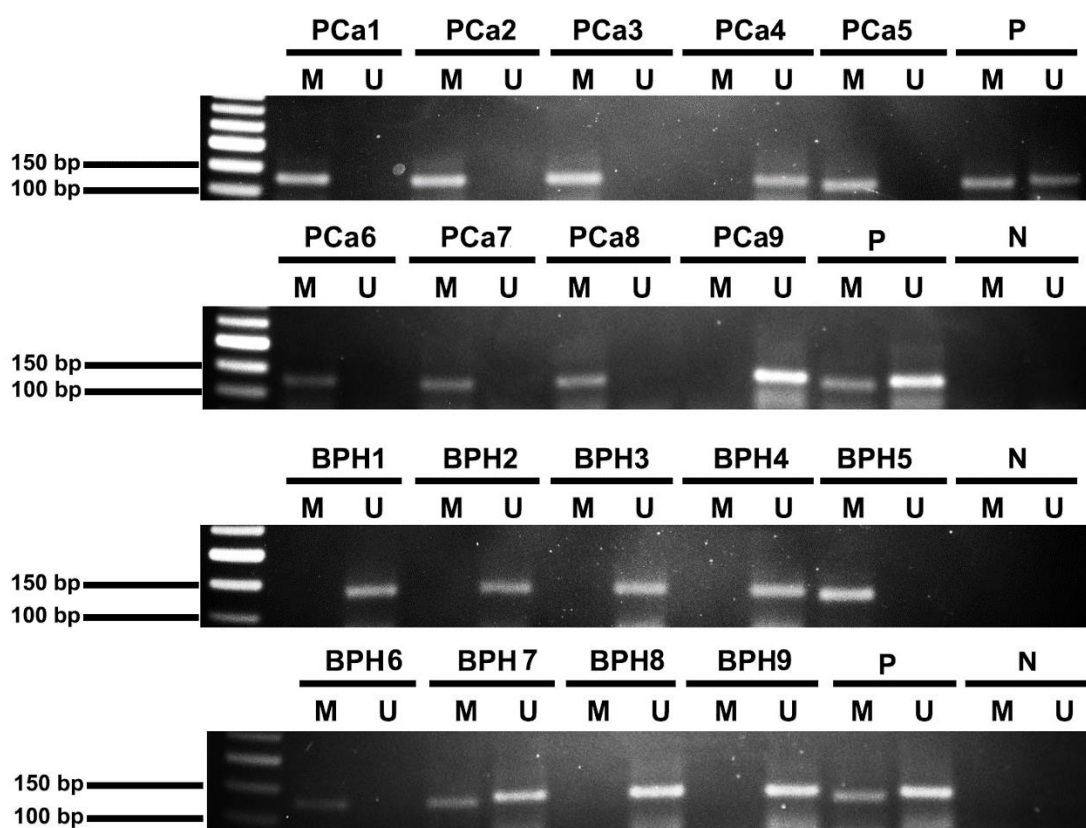
จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิด SOX11 methylation ในกลุ่มเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งและในกลุ่มเนื้อเยื่อ BPH โดยจากการศึกษา SOX11 methylation จะพบว่ามี การเกิด partial methylation ทางผู้วิจัยจึงแบ่งศึกษาเป็น 2 รูปแบบ คือ 1. คัดแยกกลุ่ม partial methylation ออกไปและนำผลที่เกิดเฉพาะ complete methylation หรือ unmethylation มาใช้ในศึกษา ซึ่งพบว่า การเกิด methylation ในกลุ่มของเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งมีความแตกต่างกับการเกิด methylation ของกลุ่มเนื้อเยื่อ BPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ และในส่วนรูปแบบที่ 2 เนื่องจาก partial methylation เป็นการเกิด methylation บางส่วน และเมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิค MSP จะมีลักษณะเกิดขึ้น 2 band จึงได้นำกลุ่ม partial methylation มารวมกับกลุ่ม complete methylation แล้วนำมาศึกษา ผลที่ได้พบว่าเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งมีความแตกต่างกับการ

เกิด methylation ของกลุ่มเนื้อเยื่อ BPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ (ตารางที่ 12) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ทั้ง 2 รูปแบบไม่แตกต่างกัน ทางผู้วิจัยจึงได้จัดกลุ่มที่มีการเกิด partial methylation เป็นกลุ่ม methylation และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิก

ตารางที่ 12 ความแตกต่างของการเกิด *SOX11* methylation ระหว่างกลุ่มมะเร็งและ BPH

Methylation status	No. of PCa (%)	No. of BPH (%)	<i>p</i> value
Complete Methylation	45 (78.9)	21 (28.8)	<0.001
Unmethylation	12 (21.1)	52 (71.2)	
Complete Methylation+partial methylation	50 (80.6)	29 (35.8)	<0.001
Unmethylation	12 (19.4)	52 (64.2)	

ใช้ Pearson's Chi-square Test ในการวิเคราะห์



ภาพที่ 19 ผลการศึกษา *SOX11* methylation ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก ด้วยเทคนิค MSP

จากภาพที่ 19 แสดงการเกิด *SOX11* methylation ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก 18 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมาก 9 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อ BPH 9 ตัวอย่าง ตามลำดับ, แถบ M แทนปฏิกิริยา methylation และแถบ U แทนปฏิกิริยา unmethylation เปรียบเทียบกับ 50 bp DNA Ladder ผลการศึกษาการเกิด *SOX11* methylation จะมี band เกิดขึ้นขนาด 124 bp และ *SOX11* unmethylation จะมี band เกิดขึ้นขนาด 133 bp โดยตรวจสอบผลร่วมกับ positive control (P) และ negative control (N)

ในกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมาก มีการเกิด *SOX11* methylation ที่ตัวอย่าง PCa1-3, PCa5-8 และมีการเกิด *SOX11* unmethylation ที่ตัวอย่าง PCa4, PCa9 ในส่วนของกลุ่มเนื้อเยื่อ BPH มีการเกิด *SOX11* methylation ที่ตัวอย่าง BPH5-6 มีการเกิด *SOX11* partial methylation ที่ตัวอย่าง BPH7 และมีการเกิด *SOX11* unmethylation ที่ตัวอย่าง BPH1-4, BPH8-9

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับลักษณะทางคลินิก เพื่อดูความสัมพันธ์ของการเกิด *SOX11* methylation กับดัชนีความรุนแรงต่างๆของโรคในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยลักษณะทางคลินิกจะประกอบไปด้วย Gleason score, ระดับ PSA ก่อน prostatectomy (Pre-operative PSA), lymph node metastasis, seminal vesicle invasion, perineural invasion, extraprostatic invasion, pT stage, surgical margin และ biochemical recurrence status (BCR)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับ Gleason score

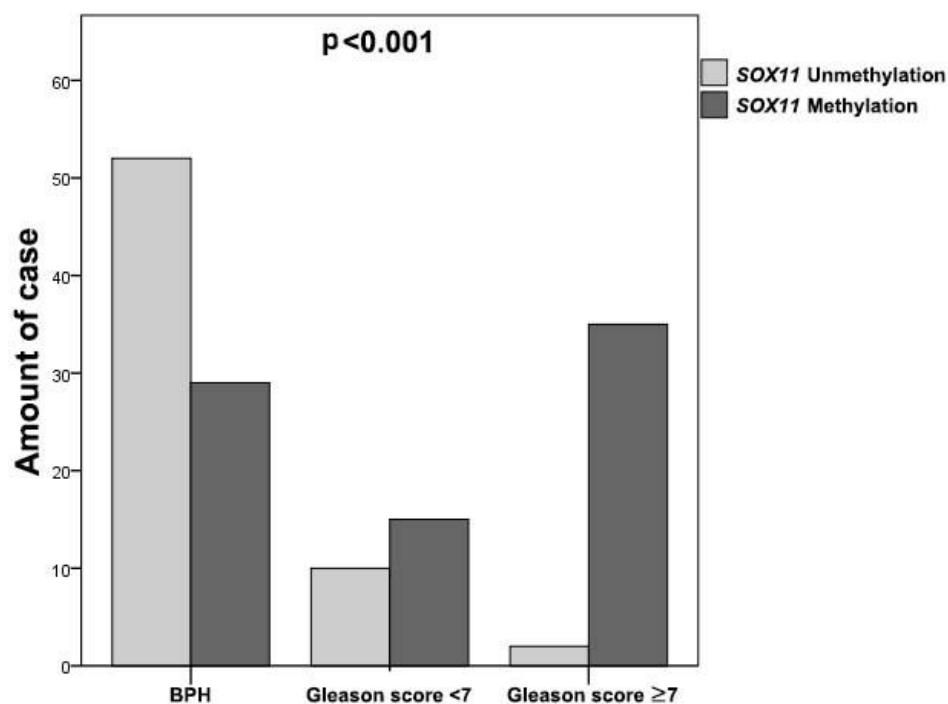
ค่า Gleason score เป็นค่าที่เป็นผลรวมของ Gleason grade ที่พบมากที่สุดและที่พบรองลงมาบนสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อม H&E โดยค่า Gleason score จะบ่งบอกถึงความรุนแรงของเซลล์มะเร็งและความรุนแรงของโรค โดยเมื่อถ้าหากมีค่าที่สูง ความรุนแรงก็จะสูงตามไปด้วย ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับค่า Gleason score จากผลการวิเคราะห์พบว่าการเกิด *SOX11* methylation มีความสัมพันธ์กับค่า Gleason score ในกลุ่มที่มีค่า ≥ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ โดยผลการศึกษานี้บ่งบอกถึงความเกี่ยวข้องระหว่างการเกิด

methylation กับลักษณะของเซลล์ที่ความรุนแรง (ตารางที่ 13) นอกจากนั้นทางผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบการเกิด *SOX11* methylation ในกลุ่มที่ค่ามี Gleason score <7, ≥7 และในกลุ่มที่เป็น BPH โดยผลการศึกษาแสดงถึงการเกิด *SOX11* methylation นั้นมีความแตกต่างกัน ทั้ง 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับค่า Gleason score

	No. of Methylation	No. of Unmethylation	<i>p</i> value
Gleason score (%)			<0.01
- < 7	15 (60)	10 (40)	
- ≥ 7	35 (94.6)	2 (5.4)	

ใช้ Fisher's Exact Test ในการวิเคราะห์



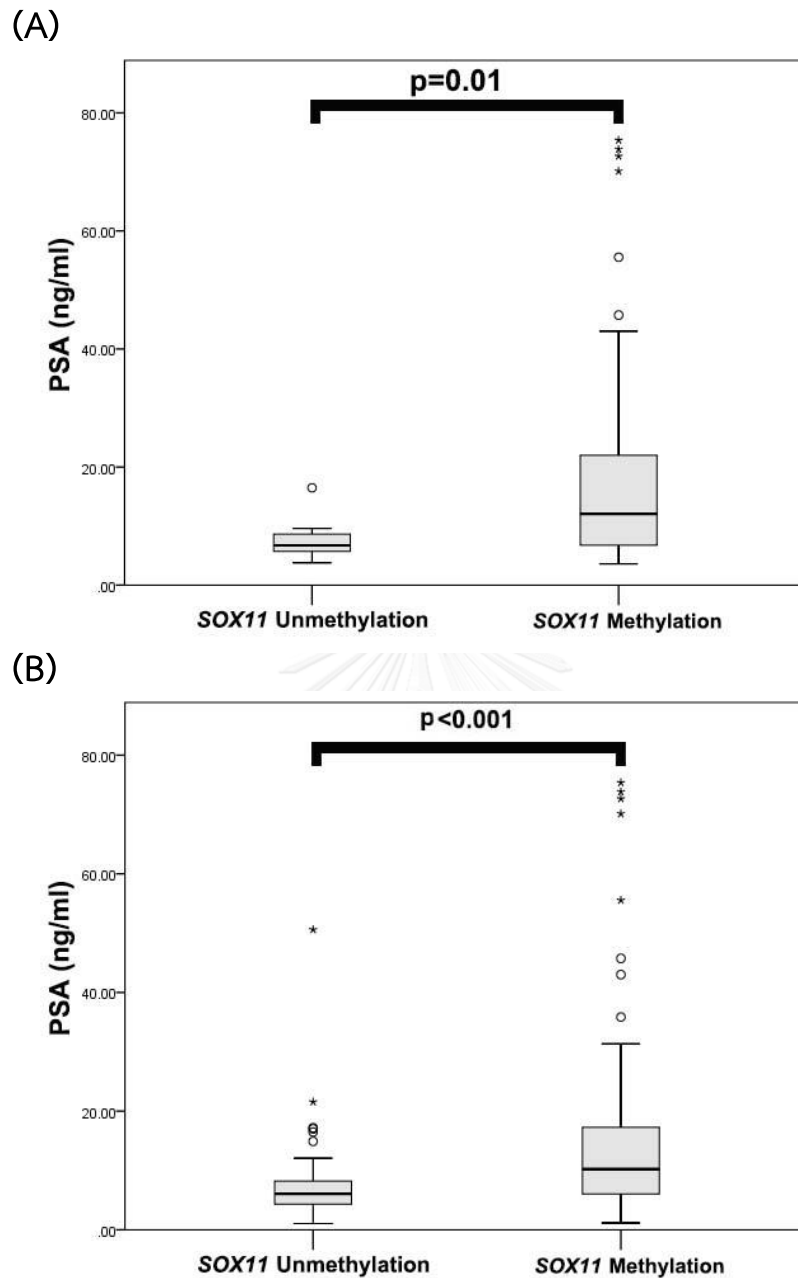
ภาพที่ 20 ภาพกราฟความแตกต่างของการเกิด *SOX11* methylation ในกลุ่มที่มี Gleason score <7, ≥7 และในกลุ่มที่เป็น BPH

(ใช้ Pearson's Chi-square Test ในการวิเคราะห์)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA

ระดับของ PSA เป็นดัชนีค่าหนึ่งที่ใช้มาช่วยในการตรวจคัดกรองมะเร็งต่อมลูกหมากเบื้องต้น โดยพบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยที่มีระดับของ PSA ที่สูง ทางผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการเกิด methylation มีความสัมพันธ์กับระดับ PSA ที่สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.01$ (ภาพที่ 21A) นอกจากนี้ทางผู้วิจัยสนใจศึกษาระดับของ PSA กับการเกิด *SOX11* methylation โดยรวมทั้งในกลุ่มที่เป็นมะเร็งและในกลุ่มที่เป็น BPH เพื่อศึกษาดูความสัมพันธ์ ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเกิด *SOX11* methylation นั้นมีความสัมพันธ์กับระดับ PSA ที่สูงเช่นเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.001$ (ภาพที่ 21B)





ภาพที่ 21 ภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA

(A) ภาพกราฟความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก

โดยค่ามัธยฐานในกลุ่ม unmethylation และ methylation เท่ากับ 6.7 ng/ml และ 12.1 ng/ml ตามลำดับ

(B) ภาพกราฟความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากร่วมกับผู้ป่วย BPH

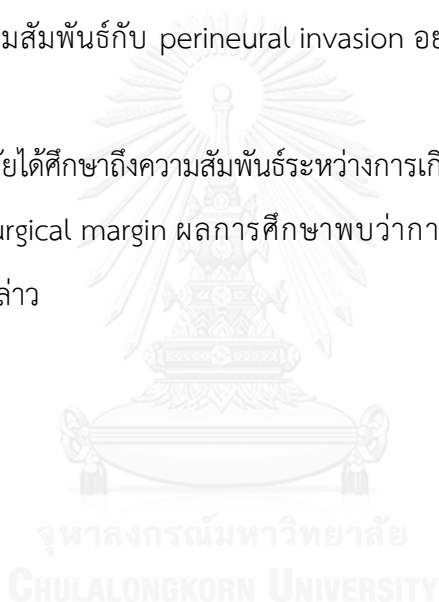
โดยค่ามัธยฐานในกลุ่ม unmethylation และ methylation เท่ากับ 6.1 ng/ml และ 10.2 ng/ml ตามลำดับ

(ใช้ Mann-Whitney U-test ในการวิเคราะห์)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับการแพร่กระจาย การลุกลาม ระยะของโรค และสถานะ surgical margin

การแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็งเป็นความรุนแรงหนึ่งของมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยจะมีการแพร่กระจายหรือลุกลามไปยังหลายส่วน ไม่ว่าจะเป็นเส้นประสาท (perineural invasion) หรือไปยัง lymph node หรือแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ เช่น ต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicle) เป็นต้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับการแพร่กระจายและการลุกลาม ผลการศึกษาพบว่า การเกิด *SOX11* methylation ไม่มีความสัมพันธ์กับ lymph node metastasis, seminal vesicle invasion และ extraprostatic invasion แต่พบว่ามีความสัมพันธ์กับ perineural invasion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.03$ (ตารางที่ 14)

นอกจากนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระยะของโรค และสถานะ surgical margin ผลการศึกษาพบว่า การเกิด *SOX11* methylation ไม่มีความสัมพันธ์กับดัชนีดังกล่าว



ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับการแพร่กระจาย การลุกลาม ระยะของโรค และสถานะ surgical margin

	No. of Methylation	No. of Unmethylation	<i>p</i> value
Lymph node metastasis (%)			0.59
- Positive	3 (75)	1 (25)	
- Negative	47 (81)	11 (19)	
Seminal vesicle invasion (%)			0.12
- Positive	15 (93.8)	1 (6.3)	
- Negative	35 (76.1)	11 (29.9)	
Perineural invasion (%)			0.03
- Positive	38 (88.4)	5 (11.6)	
- Negative	12 (63.2)	7 (36.8)	
Extraprostatic invasion (%)			0.35
- Positive	25 (86.2)	4 (13.8)	
- Negative	25 (75.8)	8 (24.2)	
pT stage (%)			0.11
- pT2	21 (72.4)	8 (17.6)	
- pT3+pT4	29 (87.9)	4 (12.1)	
Surgical margin (%)			0.62
- Positive	16 (80)	4 (20)	
- Negative	34 (81)	8 (19)	

ใช้ Fisher's Exact Test ในการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับสถานะ biochemical recurrence (BCR)

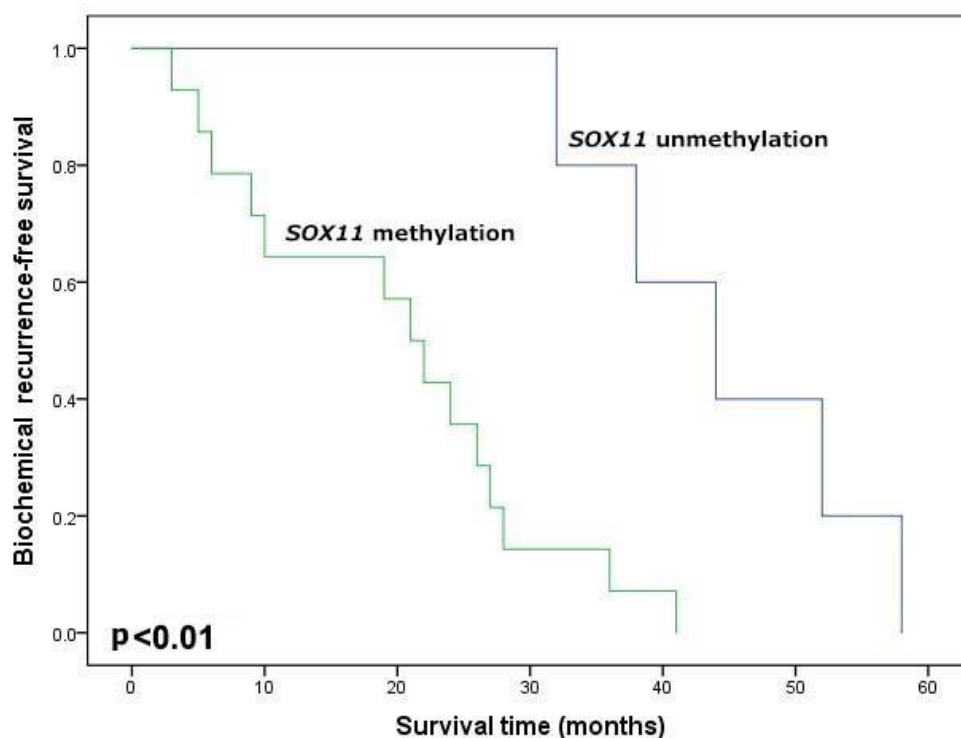
Biochemical recurrence (BCR) เป็นการตรวจระดับของ PSA ภายหลังจากการรักษาด้วยวิธี prostatectomy ซึ่งหากภายหลังจากการรักษามีระดับของ PSA เพิ่มขึ้น 0.2 ng/ml จะมีความเสี่ยงในการเกิดซ้ำของโรคได้ ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับ BCR status พบว่าการเกิด *SOX11* methylation ไม่มีความสัมพันธ์กับ BCR status (ตารางที่ 15) แต่เนื่องจากมีผู้ป่วยที่มี BCR จำนวน 19 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่มีการเกิด *SOX11* methylation จำนวน 14 ราย และในกลุ่ม *SOX11* unmethylation จำนวน 5 ราย ทางผู้วิจัยจึงได้นำผู้ป่วยทั้ง 19 รายมาศึกษาระยะปลอด BCR (BCR-free survival) โดยติดตามผลภายในระยะเวลา 5 ปี (60 เดือน) ผลที่ได้

พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังต่อมลูกหมากที่เกิด methylation ของ *SOX11* พบระยะปลอด BCR-free survival มีระยะเวลาเฉลี่ยที่ 19.8 ซึ่งสั้นกว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังต่อมลูกหมากที่ไม่เกิด methylation ของ *SOX11* โดยมีระยะเวลาเฉลี่ยที่ 44.8 เดือน และ BCR-free survival ในทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ (ภาพที่ 22)

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับ biochemical recurrence

	No. of Methylation	No. of Unmethylation	<i>p</i> value
Biochemical recurrence (%)			0.28
- Yes	14 (73.7)	5 (26.3)	
- No	36 (83.7)	7 (16.3)	

ใช้ Fisher's Exact Test ในการวิเคราะห์



ภาพที่ 22 ภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ BCR-free survival

(ใช้ Kaplan-Meier Survival Analysis และ Log-Rank Test ในการวิเคราะห์)

ตารางที่ 16 สรุปความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด SOX11 methylation กับลักษณะทางคลินิก

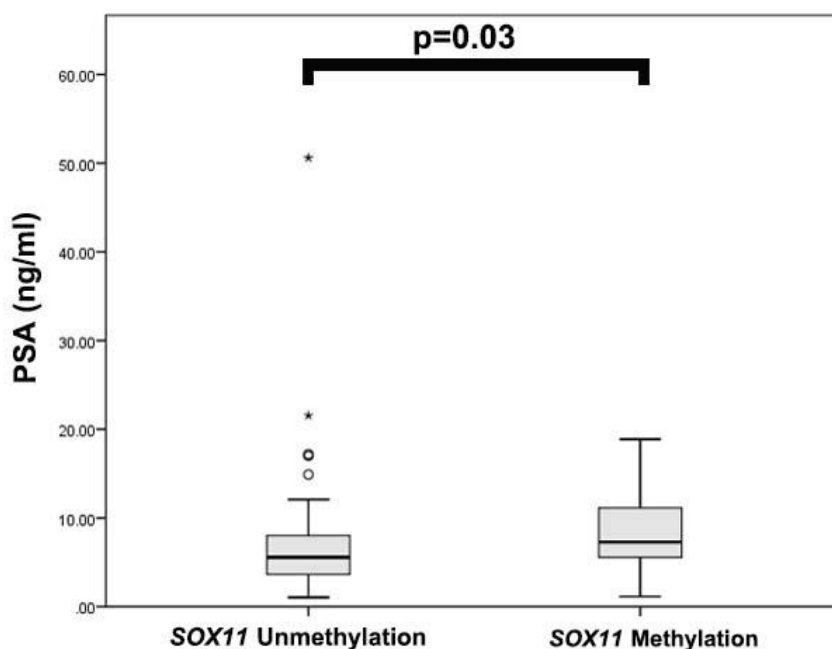
Clinicopathological parameters	No. of patients	SOX11 methylation		p value
		Methylation	Unmethylation	
Mean age \pm SD, years		66.2 \pm 5.8	66.3 \pm 5.8	0.94 ^S
Gleason score (%)				<0.01
< 7	25	15 (60)	10 (40)	
\geq 7	37	35 (94.6)	2 (5.4)	
Surgical margin (%)				0.62
Positive	20	16 (80)	4 (20)	
Negative	42	34 (81)	8 (19)	
Lymph node metastasis (%)				0.59
Positive	4	3 (75)	1 (25)	
Negative	58	47 (81)	11 (19)	
PSA level (%)				0.03
< 20 ng/ml	48	36 (75)	12 (25)	
\geq 20 ng/ml	14	14 (100)	0 (0)	
Seminal vesicle invasion (%)				0.12
Positive	16	15 (93.8)	1 (6.3)	
Negative	46	35 (76.1)	11 (29.9)	
Perineural invasion (%)				0.03
Positive	43	38 (88.4)	5 (11.6)	
Negative	19	12 (63.2)	7 (36.8)	
Extraprostatic invasion (%)				0.35
Positive	29	25 (86.2)	4 (13.8)	
Negative	33	25 (75.8)	8 (24.2)	
pT stage (%)				0.11
pT2	29	21 (72.4)	8 (17.6)	
pT3 + pT4	33	29 (87.9)	4 (12.1)	
Biochemical recurrence (%)				0.28
Yes	19	14 (73.7)	5 (26.3)	
No	43	36 (83.7)	7 (16.3)	

ใช้ Fisher's Exact Test ในการวิเคราะห์

^Sใช้ Student's t-test ในการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วย BPH

เนื่องจากพบว่าในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง มีการเกิด *SOX11* methylation อยู่ 35.8% โดยจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากพบว่าการเกิด *SOX11* methylation อาจจะเกี่ยวข้องกับระดับ PSA ที่สูง ทางผู้วิจัยจึงสนใจความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น BPH ผลการศึกษาพบว่าการเกิด *SOX11* methylation มีความสัมพันธ์กับระดับ PSA ที่สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.03$ (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด *SOX11* methylation กับระดับ PSA ในกลุ่มผู้ป่วยต่อมลูกหมากโตที่ไม่เป็นมะเร็ง (BPH) โดยค่ามัธยฐานในกลุ่ม unmethylation และ methylation เท่ากับ 5.6 ng/ml และ 7.3 ng/ml ตามลำดับ (ใช้ Mann-Whitney U-test ในการวิเคราะห์)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งที่พบในเพศชาย มีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงเป็นลำดับต้นๆของโลก สาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่ชัดเจน ซึ่งมีทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางยีนที่มีผลต่อการเกิดโรคร่วมด้วย⁽¹⁾ โดยการเกิด DNA methylation เป็นหนึ่งปัจจัยทางยีนที่มีส่วนในการเกิดโรค โดยการเกิด DNA methylation จะมีผลกับการแสดงออกของยีนและเกี่ยวข้องกับการหยุดการทำงานของ promoter ทำให้มีการลดหรือการขาดหายไปของการแสดงออกของยีน จึงมีผลไปสู่กระบวนการการเกิดโรค⁽²¹⁻²³⁾ เทคนิคในการตรวจสอบการเกิด DNA methylation ที่ใช้ในปัจจุบันมีหลากหลายเทคนิคได้แก่ MSP, Real-time PCR, Real-time Quantitative MSP, HPLC, DNA sequencing ซึ่ง MSP เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย มีความจำเพาะ ใช้งบประมาณไม่สูง และเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสำหรับในการศึกษาและใช้งานทั่วไป^(43, 44)

ในการศึกษานี้ ทางผู้วิจัยสนใจศึกษา ยีน *SOX11* โดย *SOX11* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 2p25 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อนและการพัฒนาของระบบประสาท^(7, 9-12) โดยใน ส่วนการพัฒนาของตัวอ่อนพบว่า *SOX11* จะไปกระตุ้นการส่งต่อสัญญาณต่างๆ (signal transduction) ในหลาย pathway เช่น NLK, Wnt/ β -catenin, TGF- β , and FGF^(10, 19, 45) และใน ส่วนการพัฒนาของระบบประสาท *SOX11* มีบทบาทเป็นตัวเร่งกระบวนการ nerve regeneration ผ่านทางการควบคุมการ transcription ของยีน *Sprr1a*⁽¹²⁾ แต่อย่างไรก็ตาม จากรายงานก่อนหน้านี้นี้ รายงานว่า *SOX11* เป็น tumor suppressor gene และมีการแสดงออกที่ลดลง ในมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่กลไกการกดการแสดงออกยังไม่ชัดเจน⁽¹⁹⁾ ซึ่งได้มีรายงานใน tumor suppressor gene หลายยีนที่พบว่าเกิดการเกิด DNA methylation มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่ลดลง โดยการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* เนื้อเยื่อต่อมลูกหมากนั้นยังไม่มีรายงาน

การศึกษาการเกิด DNA methylation ของ *SOX11* โดยใช้เทคนิค MSP ได้มีรายงานใน มะเร็งอื่นๆ ได้แก่ nasopharyngeal carcinoma พบว่ามีการเกิด methylation 67.4% ในกลุ่ม มะเร็ง และไม่พบการ methylation ในกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็ง⁽¹⁴⁾ ใน gastric cancer มีรายงานพบว่าใน กลุ่มมะเร็งมีการเกิด methylation ถึง 55.1% และ 7.9% ในกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็ง⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ยังมี การศึกษาของ Lena Nordström และคณะ ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่ามีการเกิด methylation ของ

SOX11 ในกลุ่มของเซลล์ Burkitt's lymphomas, follicular lymphomas และ diffuse large B-cell lymphomas และพบการเกิด methylation ในเซลล์บางชนิดของเซลล์มะเร็ง ovarian cancer, breast cancer และ lung cancer⁽²⁴⁾

การศึกษาในมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการเกิด methylation (รวม partial methylation) ในกลุ่มที่เป็นมะเร็ง 80.6% และ 35.8% ในกลุ่มที่เป็น BPH โดยทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในการศึกษาในหลายมะเร็งพบว่าการเกิด methylation จะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกทั้งในระดับของ mRNA และโปรตีน^(14, 15, 17, 18) โดยจากการศึกษาของ Zhiyong Yao และคณะ พบว่าในกลุ่มทั้งเป็นมะเร็งจะมีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็ง⁽¹⁹⁾ ซึ่งในมะเร็งต่อมลูกหมากนั้นยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation กับการแสดงออกทั้งในระดับของ mRNA และโปรตีน อย่างไรก็ตาม การศึกษาชิ้นนี้เป็นการศึกษาแรกที่ได้อธิบายอัตราการเกิด methylation ในเนื้อเยื่อของต่อมลูกหมากทั้งในกลุ่มที่เป็นมะเร็งและในกลุ่มที่เป็น BPH ซึ่งการเกิด methylation อาจจะมีความสอดคล้องกับการแสดงออก ทางผู้วิจัยจึงแนะนำควรศึกษาเพิ่มเติม โดยศึกษาดูลักษณะความสัมพันธ์ของการเกิด methylation กับการแสดงออกทั้งในระดับของ mRNA และโปรตีน

ในการศึกษาครั้งนี้ ทางผู้วิจัยได้พบว่ามี การเกิด partial methylation ในกลุ่มที่เป็นมะเร็ง 8.1% และ 9.9% ในกลุ่มที่เป็น BPH ซึ่งผลที่ได้ อาจเกิดจากการที่มีเซลล์ปกติปะปนอยู่หรืออาจเกิดจากธรรมชาติของเซลล์มะเร็ง โดยอ้างอิงการศึกษาของ Xiaoyang Xu และคณะ ซึ่งได้ศึกษาการเกิด methylation ของ *SOX11* ในเนื้อเยื่อ gastric cancer ซึ่งพบว่ามี การเกิด partial methylation ในกลุ่มที่เป็นมะเร็งและในกลุ่มที่ไม่ใช่มะเร็งอยู่ 24.7% และ 11.2% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามรายงานของ Xiaoyang Xu และคณะ ยังไม่มีคำอธิบายรายละเอียดของการเกิด partial methylation ที่ชัดเจน⁽¹⁸⁾ ซึ่งความสำคัญของการเกิด partial methylation ของ *SOX11* ในมะเร็งต่อมลูกหมากนั้น ยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม

ในปัจจุบันการพยากรณ์โรคในปัจจุบันจะอาศัยข้อมูลลักษณะทางคลินิกที่ประกอบไปด้วยระดับของ PSA และ Gleason score มาช่วยในการพยากรณ์โรค ทางผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ของ *SOX11* กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก และจากผลการศึกษา ทางผู้วิจัยสังเกตเห็นว่าการเกิด methylation ของ *SOX11* มี

ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับที่สูงขึ้นของ PSA และสัมพันธ์กับ Gleason score ที่สูง ซึ่งโดยทั่วไปปัจจัยเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมและความรุนแรงของมะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้ในกลุ่ม BPH การเกิด methylation ยังมีความสัมพันธ์กับระดับ PSA ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการเกิด methylation ของ *SOX11* อาจจะเกี่ยวข้องกับระดับ PSA ที่สูงขึ้นในผู้ป่วย และจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า การเกิด methylation มีความสัมพันธ์กับ perineural invasion ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Zhiyong Yao และคณะ ถึงบทบาทของ *SOX11* ที่เกี่ยวข้องกับการ invasion ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹⁹⁾ และจากรายงานของ DeLancey JO และคณะ พบว่า perineural invasion นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยภายหลังการตัดต่อมลูกหมากออก⁽⁴⁶⁾ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเกิด methylation ของ *SOX11* ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากอาจจะเป็นข้อมูลหนึ่งที่จะใช้พิจารณาในการใช้ในการพยากรณ์โรคได้ นอกจากนี้ได้ศึกษาความเกี่ยวข้องของการเกิด methylation ของ *SOX11* กับระยะปลอด BCR (BCR-free survival) ซึ่งผลพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการเกิด methylation จะมี BCR-free survival ที่สั้นกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการเกิด unmethylation ซึ่งการเกิด methylation ของ *SOX11* อาจจะเป็นใช้เป็นค่าบ่งชี้ของการเกิด biochemical recurrence ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากได้ อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาความสัมพันธ์พบว่า การเกิด methylation ของ *SOX11* นั้นไม่มีความสัมพันธ์กับ BCR status ซึ่งอาจเกิดกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา (sample size) ที่มีขนาดเล็ก ผู้วิจัยจึงแนะนำให้ศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรผู้ป่วยที่มีขนาดใหญ่มากขึ้น

ข้อเสนอแนะและสรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาการเกิด methylation ของ *SOX11* จากการทดลองพบว่ามีทั้งการเกิดทั้งที่เกิด methylation, unmethylation และ partial methylation ทั้งในกลุ่มเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากและกลุ่มที่เป็น BPH ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจจะมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจเกิดจากมีเซลล์ปกติเข้าไปรวมกับเซลล์ที่เป็นมะเร็ง และนอกจากนั้น เนื้อเยื่อนำมาศึกษาเป็นเนื้อเยื่อที่ถูกเก็บรักษาสภาพโดยการแช่ฟอร์มาลินและถูกฝังในพาราฟินบล็อก มีอายุการเก็บเป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจมีผลต่อการสกัด DNA มาใช้ในการศึกษา จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างอื่น ไม่ว่าจะเป็น cell line มะเร็งต่อมลูกหมาก หรือ ชิ้นเนื้อสด หรือ ซีรัม เพื่อดูลักษณะของการเกิด methylation

โดยสรุป ผลการศึกษาพบว่าในชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากมีอัตราการเกิด methylation ที่สูง โดยคิดเป็น 80.6% และในเนื้อเยื่อที่เป็น BPH พบว่ามีอัตราการเกิด methylation คิดเป็น 35.8% โดยทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ และเมื่อนำการเกิด methylation ในกลุ่มที่เป็นที่เป็นมะเร็งไปศึกษาความสัมพันธ์กับ ลักษณะทางคลินิกพบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับ PSA, Gleason score และ perineural invasion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value = 0.01, <0.01, 0.03 ตามลำดับ ซึ่งการเกิด methylation ของ *SOX11* ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมลูกหมากอาจจะใช้พิจารณาในการใช้ในการพยากรณ์โรคได้ อย่างไรก็ตามวิธี MSP ยังมีบางผลการทดลองที่ยังไม่ชัดเจน จึงเสนอแนะให้ใช้เทคนิคอื่นมาทำการตรวจสอบ เพื่อยืนยันผล และศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีขนาดตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น



รายการอ้างอิง

1. Bashir MN. Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16:5137-41.
2. Chao C, Chi M, Preciado M, Black MH. Methylation markers for prostate cancer prognosis: a systematic review. *Cancer Causes & Control*. 2013;24:1615-41.
3. Lin YL, Xie PG, Wang L, Ma JG. Aberrant methylation of protocadherin 17 and its clinical significance in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *Medical Science Monitor*. 2014;20:1376-82.
4. Dimakakos A, Armakolas A, Koutsilieris M. Novel Tools for Prostate Cancer Prognosis, Diagnosis, and Follow-Up. *BioMed Research International*. 2014;2014:9.
5. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*. 2010;70:27-56.
6. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell research*. 2011;21:502-17.
7. Castillo SD, Sanchez-Cespedes M. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012;16:903-19.
8. Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenetic and genome research*. 2004;105:442-7.
9. Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental Cell*. 2002;3.
10. Hyodo-Miura J, Urushiyama S, Nagai S, Nishita M, Ueno N, Shibuya H. Involvement of NLK and Sox11 in neural induction in *Xenopus* development. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2002;7:487-96.
11. Wang Y, Lin L, Lai H, Parada LF, Lei L. Transcription factor Sox11 is essential for both embryonic and adult neurogenesis. *Developmental Dynamics*. 2013;242:638-53.

12. Jing X, Wang T, Huang S, Glorioso JC, Albers KM. The transcription factor Sox11 promotes nerve regeneration through activation of the regeneration-associated gene Sprr1a. *Experimental neurology*. 2012;233:221-32.
13. Qu Y, Zhou C, Zhang J, Cai Q, Li J, Du T, et al. The metastasis suppressor SOX11 is an independent prognostic factor for improved survival in gastric cancer. *International journal of oncology*. 2014;44:1512-20.
14. Zhang S, Li S, Gao J-L. Promoter methylation status of the tumor suppressor gene SOX11 is associated with cell growth and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell International*. 2013;13:109.
15. Gustavsson E, Sernbo S, Andersson E, Brennan DJ, Dictor M, Jerkeman M, et al. SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies. *Molecular Cancer*. 2010;9.
16. Hide T, Takezaki T, Nakatani Y, Nakamura H, Kuratsu J, Kondo T. SOX11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer Research*. 2009;69.
17. Sernbo S, Gustavsson E, Brennan DJ, Gallagher WM, Rexhepaj E, Rydnert F, et al. The tumour suppressor SOX11 is associated with improved survival among high grade epithelial ovarian cancers and is regulated by reversible promoter methylation. *BMC Cancer*. 2011;11:405.
18. Xu X, Chang X, Li Z, Wang J, Deng P, Zhu X, et al. Aberrant SOX11 promoter methylation is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2015;38:183-94.
19. Yao Z, Sun B, Hong Q, Yan J, Mu D, Li J, et al. The role of tumor suppressor gene SOX11 in prostate cancer. *Tumor Biology*. 2015;36:6133-8.
20. Yan MS, Matouk CC, Marsden PA. Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2010;109:916-26.
21. McKee TC, Tricoli JV. Epigenetics of prostate cancer. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1238:217-34.
22. Park JY. Promoter Hypermethylation as a Biomarker in Prostate Adenocarcinoma. In: Verma M, editor. *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis*. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 607-25.

23. Li LC, Okino ST, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1704:87-102.
24. Nordstrom L, Andersson E, Kuci V, Gustavsson E, Holm K, Ringner M, et al. DNA methylation and histone modifications regulate SOX11 expression in lymphoid and solid cancer cells. *BMC Cancer*. 2015;15:273.
25. Greene KL, Albertsen PC, Babaian RJ, Carter HB, Gann PH, Han M, et al. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *The Journal of urology*. 2009;182:2232-41.
26. Rigau M, Oliván M, García M, Sequeiros T, Montes M, Colas E, et al. The present and future of prostate cancer urine biomarkers. *International journal of molecular sciences*. 2013;14:12620-49.
27. PROSTATE.COM. Diagnosing prostate cancer [cited 2016 10 Sep]. Available from:
<http://www.prostate.com/patient/DiagnosisAndTreatment/ProstateCancerDiagnosis.aspx>.
28. Reza Ghavamian. Prostate Cancer Staging [cited 2016 10 Sep]. Available from:
<http://emedicine.medscape.com/article/2007051-overview>.
29. AJCC. Quick References - Cancer Staging Posters [cited 2016 10 Sep]. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Pages/default.aspx>.
30. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and translational medicine*. 2014;3:19.
31. Wang L, Zhang J, Yang X, Chang YW, Qi M, Zhou Z, et al. SOX4 is associated with poor prognosis in prostate cancer and promotes epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2013;16:301-7.
32. Bilir B, Osunkoya AO, Wiles WGT, Sannigrahi S, Lefebvre V, Metzger D, et al. SOX4 Is Essential for Prostate Tumorigenesis Initiated by PTEN Ablation. *Cancer Research*. 2016;76:1112-21.
33. Zhong W-d, Qin G-q, Dai Q-s, Han Z-d, Chen S-m, Ling X-h, et al. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer*. 2012;12:248.

34. Thu KL, Becker-Santos DD, Radulovich N, Pikor LA, Lam WL, Tsao MS. SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. *Oncoscience*. 2014;1:326-35.
35. Stovall DB, Cao P, Sui G. SOX7: from a developmental regulator to an emerging tumor suppressor. *Histology and histopathology*. 2014;29:439-45.
36. Ferrando AA. SOX11 is a mantle cell lymphoma oncogene. *Blood*. 2013;121:2169-70.
37. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:9821-6.
38. Ohashi H. Methylation-Specific PCR. In: Chen B-Y, Janes HW, editors. *PCR Cloning Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2002. p. 91-7.
39. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*. 2003;226:3-6.
40. Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction : basic protocols. *Methods in Molecular Biology*. 1993;15:1-29.
41. NCBI. SOX11 SRY-box 11 [Homo sapiens (human)] [cited 2016 19 May]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6664>.
42. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2002;18(11):1427-31.
43. Wang L, Lin Y-L, Li B, Wang Y-Z, Li W-P, Ma J-G. Aberrant promoter methylation of the cadherin 13 gene in serum and its relationship with clinicopathological features of prostate cancer. *Journal of International Medical Research*. 2014;42:1085-92.
44. Huang Z, Bassil CF, Murphy SK. Methylation-Specific PCR. In: Malek A, Tchernitsa O, editors. *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 75-82.
45. Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Developmental Dynamics*. 2010;239:56-68.

46. DeLancey JO, Wood DP, Jr., He C, Montgomery JS, Weizer AZ, Miller DC, et al. Evidence of perineural invasion on prostate biopsy specimen and survival after radical prostatectomy. *Urology*. 2013;81:354-7.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

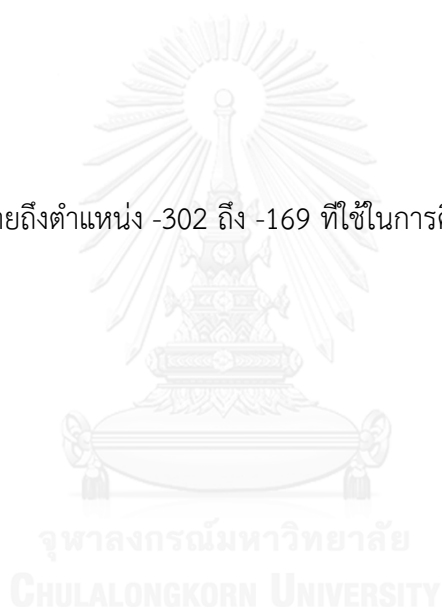
รายละเอียด 2,000 คู่เบสของ upstream region (promoter) ของยีน *SOX11*

CGGGGAAGTGGGGGACGGGGGCGGGAATGGCTTATCGCAATGGCGGTAATTTTTTCAAATCAT
 GATCTGTGTAAAACACGGTATTATTTTATGATATTAGAATCCTCAGAGAAGATCCAATACTTAAG
 AAATGTAGTATTAATTGCAGGAGGGCACCTGAAAGGAAGCAGATTCCGATAATTTTCCCAGTCC
 TACACGGCTGATTTCTCTGGTGAAGGGATCCGGGCAGTGTCTTAGGAACTGCTCAAAGTTCCCA
 GATACCCAGTGCTGGGGGGTGTGGAGAAGGCGAGGGTGGCGACAGACCATACTATGAAGCGG
 TGATTTTCTTTAATTGCCCCAGAATATCCGTAGAGGTAGTAGGGACTCAATAAAGAAACACAA
 AGGAGACGAACACGGCACGATCGCCGGGTCCGCGGCTGCTCTGCGAGGCCAGCGCGCCCCA
 GGTGCGGGCTCCCCGGCCGCCAGCGCACCTTTCCATCTCCAGGGAAAATATTTAGACGGGAAAC
 TCGAGTGCACCTTATTTTCTCTTTGGTTTATGAGTGACCCAGAAGGCTTCTAGCTCACAATCGCA
 CGATTTACAGGACGAGGCTGCCGGAGAAGCGCTGGCGACCGAGGATGGGGGAAGGACAAAGAGG
 AAGAGGAGGCCTGGGAAGGAGAAAGGAGCGGCGGAGGGGCGGGGAGAGGACGGGGCGGGGAG
 AGGAGGGGCGGGGAGCAGAGGGAGAAGGAAGGAGGGCGCCGGGCCCTCGCAGGGACGCCG
 GCGGGGGCGGGGCTTGCTGGAGCCTGCGGGACCCAGAGCCCGCTCCGGAGCCAGCCCTGGGA
 GTGGCCAGCTTGAACCCGAGGGCCCCGACACCGTTACTCCGGCCCCCGCCGGGGCGGGGCG
 CGCGGGGGCGCGGCGCAGCCCAACCCGCACAGCCGCGTCCCCAACACCACCGAGGAGGGAAA
 ACAGACGGAGAAAAAGGACAAAACAGAAAATGCAAAACGGGGGAGGGAGCTCACCGCCTCTC
 GAGCTTTAAATTGATTTCTTTGCCTTACAAAAGGGAGAAAGGGAAAAGGAGAGCAGAGCCAC
 GTGCCGGGAAGGTTGCTGTCTTCAAGCGCCACCTTCCGTCGGCCAGGGCCGCGCGGGGCTAC
 CGGGCGGGCTCGGGGCGGCGACCCGGGGGAGCGGCCGAGCCCCGCGAGGGGCTCGCCGGGGA
 GCAGCTGCGCCACCCCGGGCAGGCCGGGCGCGGCTGACCGCGAGCCGGGCGGAGGCCGCC
 GTCTCAGGCTGGGCGCGTGCCCCGAGTGTGTGACCCGGGGAGTGAGCGCGCGCCGTCCGCTGT
 CGCCGTGCGGCTCCCGGGGACTGGGCACAAAGGCGCGCGGGGCTCTCCCGGGACCCGGTCC
 TCGTTAGCGCCGGCGCCGAACCATCCCGGTTCCGCCCGGGCCGCCCGCTCCCGTGTTGCC
 GCGCGCCGCTTCCGAGCATCCCGGAACAGGCGCATCTGTGCACACACGCGGATTTTTTAAAAA

TAACATATTTCTAGACATGCCTCCTCTCCCCCACCCCATCTTTGCAAAGCAGCCCGGAGGGC
GGGGTGGAGGGGCGGGCCTCCGAGTTAATAAAGGAAGATGGGCGGAGCCGGCCCCAGCCAT
TGGCTAGCTGGGGGAGTGATGTCACCCATATGACACCCTGATAACTAGTTGAGAGAGACCTC
AACTTTTTGCAGAAGGAGCGCGCGCCTGGGAGAGCTCGGGGTCCGGCGCTTGCGGTAGGAG
CCACGAGCCGGAGAGAGGGGTCCCAGGGCTGCCTCGACCGCCGTCGCCACCGCCTCTCCTGTCG
CGACCGCAGCTCCCACCGCGCCGGCGGCCGTCGTCGCCGAAGCCACCACAGCCGCTGTGTGCA
GCCTGGAAGGGGGGGCGGGGGGGAGGGGGGGAGCCGCGAAAGCGGGGTGCCGAGGACTTTGC
AACTTGCCCAGGAAGGTGGAGGGGTGGGAGGGGGAGGGGG

หมายเหตุ

ลำดับเบสที่คลุมแถบ หมายถึงตำแหน่ง -302 ถึง -169 ที่ใช้ในการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ DNA



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารละลายที่ใช้ในงานวิจัย

1. 10X TAE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	48.4	กรัม
EDTA, Disodium Salt	3.7	กรัม
Acetic acid (glacial)	11.4	มิลลิลิตร
เติม Distilled Water ให้ได้ปริมาตร 1		ลิตร

2. 1X TAE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

10X TAE buffer	100	มิลลิลิตร
Distilled Water	900	มิลลิลิตร

3. เตรียม 70% ethanol ปริมาตร 1 ลิตร

Absolute ethanol	700	มิลลิลิตร
Distilled Water	300	มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอภิวัฒน์ ภูกองไชย เกิดเมื่อวันอังคารที่ 10 กันยายน พ.ศ.2534

- ภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดมหาสารคาม
- ที่อยู่ปัจจุบัน: 151/270 หมู่บ้านวนารมย์ ซอยฉลองกรุง24 ถนนฉลองกรุง
แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
- ที่อยู่ตามบัตรประชาชน: 58 หมู่ 2 ตำบลนาตุน อำเภอนาตุน จังหวัดมหาสารคาม 44180
- อีเมลล์: pu.apiwat@hotmail.com
- โทรศัพท์ 092-554-9614

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.2552 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยม โรงเรียนพรตพิทยพยัต กรุงเทพมหานคร
- พ.ศ.2556 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
- พ.ศ.2557 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย