

การประเมินการเติมหมู่เมทิลของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในหลายระยะของการเกิด
มะเร็งปากมดลูก



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF *ALDH3B1* *ASAH2B* AND *FOXC1* METHYLATION IN MULTISTEP
CERVICAL CARCINOGENESIS



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

Department of Botany

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

กาญจนา เอี่ยมสมบูรณ์ : การประเมินการเติมหมู่เมทิลของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในหลายระยะของการเกิดมะเร็งปากมดลูก. (*EVALUATION OF ALDH3B1 ASAH2B AND FOXC1 METHYLATION IN MULTISTEP CERVICAL CARCINOGENESIS*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต

มะเร็งปากมดลูก เป็นโรคที่คร่าชีวิตสตรีเป็นลำดับต้นสามในประเทศไทย มีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อเอชพีวี โดยหนึ่งในยีนที่มีส่วนสำคัญคือยีน *E7* ซึ่งสามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง ร่วมกับเอนไซม์ DNMT1 ชักนำให้เกิดการเติมหมู่เมทิล ทำให้การแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลง นำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูก การศึกษาก่อนหน้าพบว่าในยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* มีการแสดงออกที่ลดลงเนื่องจากการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์สายพันธุ์ SiHa และ HEK293 ที่ถูกกทรานสเฟกต์ด้วย *E7* ใน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเติมหมู่เมทิลของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และยีน *FOXC1* ในหลายระยะของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ตัวอย่างที่ใช้เป็นแบบสเมียร์ และตัวอย่าง ASC-US บริเวณปากมดลูกที่ได้รับการวินิจฉัยแล้ว นำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์ และตรวจการเติมหมู่เมทิลด้วยเทคนิค MSP ผลการศึกษาพบว่า ยีน *ALDH3B1* มีจำนวนตัวอย่างที่มีการเติมหมู่เมทิลในเซลล์ปากมดลูกปกติมากกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อเอชพีวี ในขณะที่ยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* พบการเติมหมู่เมทิลมากขึ้นตามความพัฒนาของเซลล์ที่ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการติดเชื้อเอชพีวีและการเติมหมู่เมทิล อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอย่างที่มีการเติมหมู่เมทิลกลับลดลงในเซลล์มะเร็งปากมดลูกในทุกยีน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามีเพียงยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* ที่อาจพอจะนำมาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับมะเร็งปากมดลูก เพื่อใช้ในการคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในระยะก่อนเกิดมะเร็ง อีกทั้งควรที่จะติดตามข้อมูลและนัดหมายกลุ่มประชากรเสี่ยงที่อยู่ในกลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็งต่อไป

สาขาวิชา พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6072192323 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: Cervical cancer, DNA methylation, *ALDH3B1*, *ASAH2B*, *FOXC1*

Kanjana Iamsomboon : EVALUATION OF *ALDH3B1*, *ASAH2B* AND *FOXC1* METHYLATION IN MULTISTEP CERVICAL CARCINOGENESIS . Advisor: Assoc. Prof. Pattamawadee Yanatatsaneejit, Ph.D.

Cervical cancer is the third most common cancer in Thai women. Most cases are from a human papillomavirus infection. An important HPV oncoprotein called E7, induced *CCNA1* methylation by interacting with DNMT1 and binding at *CCNA1* promoter, resulting in reduction of its expression and leads to carcinogenesis. Previous studies found *ALDH3B1*, *ASAH2B* and *FOXC1* expressions were reduced in SiHa and HEK293 cell lines which transfected with E7. Aim of this study is to investigate the methylation of *ALDH3B1*, *ASAH2B* and *FOXC1* in multistep cervical carcinogenesis. Pap smear samples and ASC-US samples were collected from patients and already diagnosed with pathological basis. Genomic DNA were extracted from tissues, then treated with sodium bisulfite. Methylation were detected by Methylation Specific PCR. Results showed that *ALDH3B1* methylation were found in most normal samples and more than HPV infected samples. *ASAH2B* methylation were increase alongside with cell abnormal development with same pattern with *FOXC1* methylation. There also were significant difference between Normal and HPV infected samples in both *ASAH2B* and *FOXC1*. However, the percentage of methylated in cancer samples were decrease and have no significant difference in any genes. In conclusion, *ASAH2B* and *FOXC1* might be candidate genes for using as molecular marker cervical screening. The precancerous samples following up was also required.

Field of Study: Genetics

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.นครินทร์ กิตกัาธร ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่ต้นตลอดมา รวมทั้งเป็นที่ปรึกษาในการใช้ชีวิตให้ปรับตัวก่อนออกสู่โลกภายนอก แนวคิดต่างๆ รวมทั้งเป็นกำลังใจและอดทนอดกลั้นในยามที่ข้าพเจ้าท้อแท้ หมดหวัง จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตกัาธร ที่กรุณาให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิตราภรณ์ ที่มอบโอกาสเข้ามาทำวิจัยภายในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ รวมถึงอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นต่างๆในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนและทุนวิทยบัณฑิต ที่เป็นแหล่งรายได้ช่วยแบ่งเบาค่าใช้จ่ายในการทำงานวิจัย รวมทั้งคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และอบรมสั่งสอนเพื่อประยุกต์ความรู้ที่ได้มาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาวกัญวลัญญ์ ชเลิศเพ็ชฌ์ นางสาวพิมพ์วิภา สุวรรณภาค นายนิธิพัฒน์ ต้นศิริภักดิ์ธรรม รวมทั้งพี่น้องๆ และบุคลากรภายในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และสอนเทคนิคต่างๆ ในระหว่างดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อธีรศิลป์ เอี่ยมสมบูรณ์ และคุณแม่ศุภวรรณ เอี่ยมสมบูรณ์ และสมาชิกในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนทางการเงิน การเงิน ตลอดจนให้กำลังใจจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กาญจนา เอี่ยมสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตงานวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
มะเร็ง.....	5
ชีววิทยาของการเกิดมะเร็ง	6
มะเร็งปากมดลูก.....	6
เชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมาหรือเชื้อไวรัสเอชพีวี (human papilloma virus: HPV).....	7
การเกิดมะเร็งปากมดลูกเมื่อเกิดการเชื้อเอชพีวี	10
การตรวจคัดกรองและตรวจเพื่อวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูก	12
กระบวนการเหนือระดับพันธุกรรม (Epigenetics).....	16
กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)	16

ความเกี่ยวข้องระหว่างการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และการเกิดมะเร็ง.....	17
Methylation specific-PCR (MSP)	18
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 (ALDH3B1)	19
N-acylsphingosine amidohydrolase (non-lysosomal ceramidase) 2B (ASAH2B).....	19
Forkhead box C1 (FOXC1).....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	22
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	22
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	23
วิธีดำเนินการวิจัย	24
1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	24
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์.....	25
3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแปปสเมียร์ ตัวอย่างเซลล์ไลน์ และตัวอย่าง ASC-US ..	25
4. กระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์ (Bisulfite treatment).....	25
5. คัดเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่สนใจ	26
6. ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ในตัวอย่างแปปสเมียร์ และ ASC-US	27
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	29
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	43
อภิปรายผลการวิจัย.....	43
สรุปผลการวิจัย.....	51
บรรณานุกรม.....	54

ภาคผนวก.....	65
ประวัติผู้เขียน.....	81



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการรายงานผลการตรวจปากมดลูก	14
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิด เมทิลเลชัน	27
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์	30
ตารางที่ 4 ตัวอย่างแปปสเมียร์ของปากมดลูกที่เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> แยกตามการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาและการตรวจเอชพีวี	31
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ	33
ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบความแตกต่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ ...	34
ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความแตกต่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี	35
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบความแตกต่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ ...	36
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกแบบ ASC-US	37
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> <i>ASAH2B</i> และ <i>FOXC1</i> ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ	37
ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์	38
ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ASAH2B</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์	39
ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์	39

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน <i>ASAH2B</i> ร่วมกับยีน <i>FOXC1</i> ในตัวอย่างแปปสเมียร์.....	40
ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> ในตัวอย่าง ASC-US	41
ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ในตัวอย่าง ASC-US.....	41
ตารางที่ 17 ลำดับและความเข้มข้นของสารที่ต้องใช้ในการทำ MSP	74
ตารางที่ 18 สภาวะในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน <i>ALDH3B1</i>	74
ตารางที่ 19 สภาวะในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน <i>ASAH2B</i>	74
ตารางที่ 20 สภาวะในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน <i>FOXC1</i>	75
ตารางที่ 21 ตารางการจรแบบ 2x2	75
ตารางที่ 22 ตารางการจรแบบ 2x2 ที่ใช้ในการกรอกข้อมูลเพื่อคำนวณประสิทธิภาพของวิธีการ ทดลองที่ใช้.....	76
ตารางที่ 23 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน.....	77

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการตรวจสอบยีน	4
รูปที่ 2 ฮิปโปเครติส (Hippocrates).....	5
รูปที่ 3 โรคมะเร็งที่พบในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2557 (ต่อประชากร 100,000 คน).....	7
รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงร้อยละที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกโดยเชื้อเอชพีวีสายพันธุ์ต่างๆ	8
รูปที่ 5 โครงสร้างของเชื้อไวรัสเอชพีวี	10
รูปที่ 6 การติดเชื้อเอชพีวีในรูปแบบ episomal form	10
รูปที่ 7 การติดเชื้อเอชพีวีในรูปแบบ integrate form	11
รูปที่ 8 วัฏจักรชีวิตของเชื้อเอชพีวีบริเวณปากมดลูก.....	12
รูปที่ 9 การตรวจมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีแปปสเมียร์.....	13
รูปที่ 10 การตรวจมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี biopsy	13
รูปที่ 11 การรายงานผลของตัวอย่างด้วยวิธีทางเซลล์วิทยาและพยาธิวิทยา	15
รูปที่ 12 การเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase	16
รูปที่ 13 การทำงานของโปรตีน E7 ที่มีผลต่อการเกิดมะเร็ง	17
รูปที่ 14 การตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยเทคนิค MSP	18
รูปที่ 15 โครงสร้างของยีน FOXC1.....	20
รูปที่ 16 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ALDH3B1 ในตัวอย่างแปปสเมียร์.....	29
รูปที่ 17 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ASAH2B ในตัวอย่างแปปสเมียร์.....	29
รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน FOXC1 ในตัวอย่างแปปสเมียร์.....	30
รูปที่ 19 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการยับยั้งการแสดงออกของยีน.....	43

รูปที่ 20 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> ในเซลล์สายพันธุ์ C33A.....	45
รูปที่ 21 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ASAH2B</i> ในเซลล์สายพันธุ์ HEK293	46
รูปที่ 22 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ในเซลล์สายพันธุ์ HEK293	47
รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ในเซลล์สายพันธุ์ C33A (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561).....	48
รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP.....	66
รูปที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการไม่เกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้	67
รูปที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ALDH3B1</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้	67
รูปที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ASAH2B</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP และเทคนิค CHIP-PCR ที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้	68
รูปที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ASAH2B</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการไม่เกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้	69
รูปที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>ASAH2B</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้	69
รูปที่ 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP และจากวิทยานิพนธ์อ้างอิงและเทคนิค CHIP-PCR ที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้.....	71

รูปที่ 31 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้ 72

รูปที่ 32 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้ 73



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับที่ 2 ของสตรีทั่วโลก รองจากมะเร็งเต้านม โดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่มีรายได้ปานกลางและประเทศที่มีรายได้ต่ำ และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับที่ 3 ของสตรีในประเทศไทย รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งตับและท่อน้ำดี (WHO, 2014; National Cancer Institute of Thailand, 2018) โดยสาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิลโลมาหรือเชื้อเอชพีวี (Human papillomavirus, HPV) โดยเฉพาะชนิด high-risk ไทป์ 16 (HR-HPV type 16) ซึ่งเป็นหนึ่งในชนิดที่พบได้มากที่สุด ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก เชื้อเอชพีวีมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอวงแหวนสายคู่ความยาว 8,000 คู่เบส ประกอบด้วยยีนสองกลุ่มคือ early genes ได้แก่ E1, E2, E3, E4, E5, E6 และ E7 ที่แปลรหัสเป็นโปรตีน early proteins และ late genes ได้แก่ L1 และ L2 ที่แปลรหัสเป็นโปรตีน late proteins ซึ่งยีนทั้งสองกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน (Raybould et al., 2011) โดยยีน E1 และ E2 ทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัส ส่วนยีน E6 และ E7 จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการมีชีวิตรอดและกระบวนการ transformation ภายในเซลล์ ในขณะที่ยีนกลุ่ม late genes จะผลิตโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกหุ้มไวรัส (capsid) (Raybould et al., 2011) โดยปกติการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกจะใช้การตรวจทางเซลล์วิทยาหรือแปปสเมียร์ (pap smear) การตรวจทางพยาธิวิทยาหรือ biopsy และการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวี (HPV DNA genotyping) (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561) แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด เช่น การตรวจด้วยวิธีแปปสเมียร์ มีความไว (sensitivity) ต่ำ ประมาณร้อยละ 40-60 (Chumworathayi and Srisupundit, 2012) หรือวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวีที่มีค่าทำนายผลลบสูง และความจำเพาะ (specificity) ต่ำกว่าวิธีแปปสเมียร์ (Koliopoulos et al., 2007) ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการของโรคมะเร็งปากมดลูกจึงมีความสำคัญ ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าการตรวจสอบการเติมหมู่เมทิลหรือการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับการยอมรับมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากใช้ในคัดกรองความผิดปกติเบื้องต้นและใช้ประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งชนิดต่าง ๆ มากขึ้น เช่น มะเร็งศีรษะและลำคอ และมะเร็งปากมดลูกอีกด้วย (Lim et al., 2016; Dankai et al., 2019) รวมทั้งยังพบความเกี่ยวข้องกับมะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จะตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน APC CDH1 และ RASSF1A เพื่อใช้คัดกรองผู้ป่วย พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน APC (Adenomatous Polyposis Coli) ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งที่มากขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งลำไส้ (Liang et al., 2017; Zhu et al., 2021) การใช้การตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน MGMT (Methyl-Guanine Methyltransferase)

เป็นเครื่องหมายชีวภาพ (bio marker) บ่งชี้การรอดชีวิตและพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งสมองชนิด glioblastoma (GBM) เนื่องจากยีน *MGMT* ผลิตเอนไซม์ชื่อเดียวกันที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ได้รับผลจากปฏิกิริยา alkylation (Gupta et al., 2015)

งานวิจัยหลายฉบับพบว่าการติดเชื่อเอชพีวีมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมแบบเหนือพันธุกรรมหรือเอพิเจเนติกส์ (epigenetics) ในมะเร็งปากมดลูก โดยโปรตีน E7 มีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 (DNMT1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เหนี่ยวนำการเกิดเมทิลเลชันภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีน ที่ตามด้วยเบสกวานีนอยู่อย่างหนาแน่นหรือที่เรียกบริเวณนี้ว่า CpG island โดยทำงานร่วมกับโปรตีน E6 ในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน p53 ที่ถูกแปลรหัสมาจากยีน *p53* ซึ่งทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็งและจับกับโปรตีน Sp1 เพื่อไม่ให้โปรตีนดังกล่าวกระตุ้นการแปลรหัสของเอนไซม์ DNMT1 (Burgers et al., 2007; Sen et al., 2018) ด้วยการหยุดการถอดรหัส (transcription) ส่งผลให้เกิดการขาดตัวของโครมาติน และทำให้ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ต่าง ๆ ไม่สามารถเข้าจับบริเวณโพรโมเตอร์ได้ ทำให้ยีนไม่มีการแสดงออก (จันทนา รักแผน, 2555) นอกจากนี้ที่พบว่าโปรตีน E7 สามารถจับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งร่วมกับเอนไซม์ DNMT1 แล้วชักนำให้เกิดเมทิลเลชันและทำให้การแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลง นำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูก (Chalertpet et al., 2015; Yanatatsaneejit et al., 2011) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้สืบหาอินที่เป็นเป้าหมายของโปรตีน E7 โดยการทำให้ ChIP seq analysis โดยการให้ E7 HPV16 antibody ตกตะกอนดีเอ็นเอที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ได้ และนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถตกตะกอนลงมาได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการ sequencing และวิธีทางชีวสารสนเทศ โดยวิธีทางชีวสารสนเทศนั้นทำได้โดยการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 จับได้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบไปค้นหายีนอื่น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโพรโมเตอร์เหมือนกันในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์ และคัดเลือกยีนที่สามารถจับได้ทั้งทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561; จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี, 2562) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทำการเลือกยีนในแต่ละวิธีมา 1 ยีน ได้แก่ยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* โดยยีน *ASAH2B* (N-acylsphingosine amidohydrolase (non-lysosomal ceramidase) 2B) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างสมดุลแคลเซียม และการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่าน mTOR pathway (Li et al., 2018) ซึ่งโปรตีน E7 สามารถชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของยีนดังกล่าว (ชวิศ พลพงษ์, 2562) ยีน *FOXC1* เป็นหนึ่งในยีนเป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 และจากงานวิจัยหลายฉบับพบว่ายีน *FOXC1* มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและแพร่กระจายของมะเร็ง (Han et al., 2017) นอกจากนี้ จากโครงการวิทยาศาสตร์ของพลวัฒน์ มุงเมือง ได้ศึกษา

ยีน *ALDH3B1* (Aldehyde dehydrogenase 3 family member B1) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษที่เกิดจากสารกลุ่ม aldehyde ซึ่งเกิดจากเมแทบอลิซึมของแอลกอฮอล์และกระบวนการ lipid peroxidation ภายในเซลล์ (Marchitti et. al., 2007) พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ALDH3B1* น้อยกว่าในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่พบการติดเชื้อเอชพีวี ไทป์ 16 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวี อันเนื่องมาจากการเกิดเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้น (พลวัฒน์ มุงเมือง, 2559) ดังนั้นการศึกษานี้จึงตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของ 3 ยีน ได้แก่ *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกทั้งที่เป็นมะเร็งที่พบการติดเชื้อเอชพีวี และเซลล์ปากมดลูกปกติด้วยการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทั้งสามด้วยวิธี Methylation Specific PCR (MSP) โดยใช้ตัวอย่างเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่พบการติดเชื้อเอชพีวี (SiHa) และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวี (C33A) เป็นชุดควบคุม ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้คือ สามารถค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีและใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมันนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูกตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการ เพื่อประโยชน์ต่อการคัดกรอง การวินิจฉัยและการรักษาอย่างทันท่วงทีต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีนของ 3 ยีน คือ *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกทั้งที่เป็นมะเร็งที่พบการติดเชื้อเอชพีวี และเซลล์ปากมดลูกปกติ

ขอบเขตงานวิจัย

พิสูจน์ยีนที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16 จาก 2 วิธีการจากวิทยานิพนธ์ก่อนหน้าก่อนหน้า (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561; จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี, 2562) คือ การทำ Chromatin immunoprecipitation Sequencing ที่มีลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ TFAP2A สามารถจับได้ แล้วนำมาคัดเลือกเฉพาะยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 จากนั้นคัดเลือกยีนที่ได้ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศซึ่งคัดเลือกยีน คือ *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค Methylation specific PCR (MSP)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำข้อมูลการศึกษานี้ไปต่อยอดวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

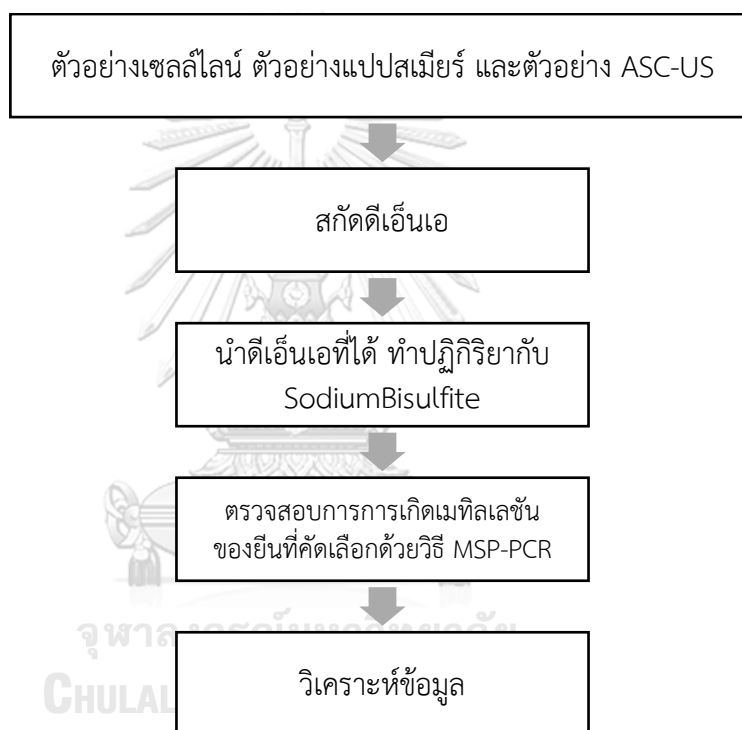
การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ C33A และ SiHa
2. สกัดดีเอ็นเอทั้งจากเซลล์ C33A, SiHa ตัวอย่างแปปสมียร์ และตัวอย่าง ASC-US

3. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้บางส่วนทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite
4. ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่ได้คัดเลือกไว้ และไพรเมอร์จากวิทยานิพนธ์ก่อนหน้า (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561; จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี, 2562)
5. ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกด้วยวิธี methylation specific PCR (MSP-PCR)

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย

การตรวจสอบเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน



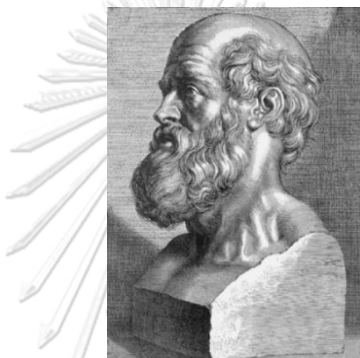
รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการตรวจสอบยีน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็ง

โรคมะเร็ง (Cancer) มีการบันทึกครั้งแรกในหลักฐานกระดาษปาปิรัสของอารยธรรมอียิปต์เมื่อประมาณ 1,500-1,600 ปีก่อนคริสตกาล แต่ได้มีการพูดถึงและการบัญญัติศัพท์ที่อธิบายอาการของโรคมะเร็งอย่างจริงจัง เมื่อ 460-370 ปีก่อนคริสตกาลโดยแพทย์และนักปราชญ์ชาวกรีกชื่อ ฮิปโปเครติส (Hippocrates) หรือบิดาแห่งการแพทย์ตะวันตกสมัยใหม่ดังรูปที่ 2 ที่ได้บัญญัติคำศัพท์ตามลักษณะความผิดปกติของการงอกขึ้นเนื้อเป็นปุ่มปมหรือรยางค์ที่ยื่นออกมาเหมือนกับรยางค์ของปูที่ยื่นยาว ซึ่งภาษาละตินของปูคือ *carcinus* ตามราศีกรกฎ (Faguet, 2015)



รูปที่ 2 ฮิปโปเครติส (Hippocrates)

(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d2/Hippocrates_Light.JPG/443px-Hippocrates_Light.JPG)

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรทั่วโลก โดยในปี 2020 พบว่ามีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นประมาณ 19.3 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตสูงถึงเกือบ 10 ล้านคน (Sung et al., 2021) สำหรับประเทศไทย สถิติจากสำนักงานสถิติแห่งชาติพบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 3 รองจากโรคหัวใจและหลอดเลือด (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2550) แต่ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเนื่องจากกระบวนการวินิจฉัย การป้องกัน การรักษา รวมถึงความรู้ความเข้าใจในโรคมะเร็งของประชาชนทั่วไปปัจจุบันยังมีข้อบกพร่อง ทำให้บุคคลที่เข้ารับการตรวจคัดกรองและการรักษาส่วนใหญ่จึงอยู่ในระยะแพร่กระจาย การรักษาจึงเป็นเพียงการยืดเวลาให้กับผู้ป่วยและมีส่วนน้อยที่ได้รับการรักษาจนหายขาด ในที่นี้จึงมุ่งความสนใจไปที่โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของสตรีในประเทศไทยซึ่งหมายถึงมะเร็งปากมดลูก

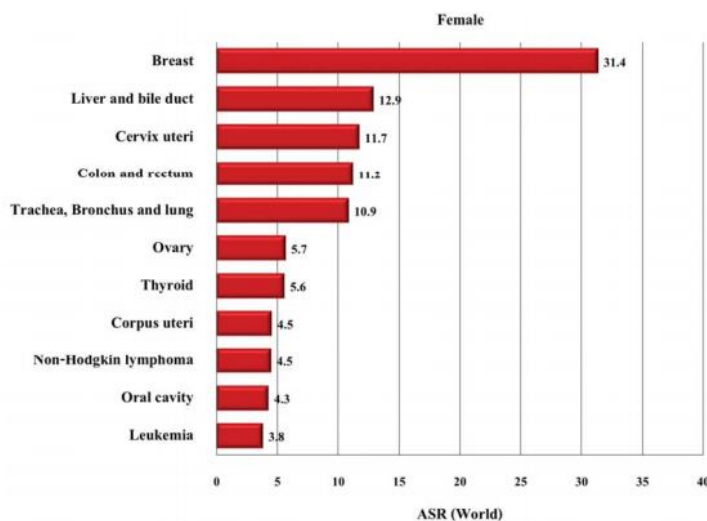
ชีววิทยาของการเกิดมะเร็ง

เซลล์ปกติที่ได้รับปัจจัยทั้งทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมกระตุ้นให้เซลล์เกิดความผิดปกติจนกระทั่งพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งนั้น มีการอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งผ่านกลไกในระดับโมเลกุล หรือ Hallmarks of cancer ซึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ (วิยะดา ปัญจรัก, 2558; Hanahan and Weinberg, 2011)

- 1) ความสามารถต้านทานโปรแกรมการตายของเซลล์ได้ (resisting cell apoptosis)
- 2) ความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อใช้หล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (angiogenesis)
- 3) ความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างไม่จำกัด (enabling replicative immortality)
- 4) ความสามารถในการลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นๆ ได้ (activating invasion and metastasis)
- 5) ความสามารถหลีกเลี่ยงต่อการถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (evading growth suppressors)
- 6) คงสัญญาณเพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ (sustaining proliferative signaling)

มะเร็งปากมดลูก

โรคมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นในบริเวณปากมดลูก และมดลูก เป็นสาเหตุการเสียชีวิตเฉลี่ยเป็นอันดับที่ 2 ของสตรีทั่วโลก โดยเฉพาะในช่วงอายุประมาณ 20-39 ปี (Siegel et al., 2019) และมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและประเทศด้อยพัฒนาที่มีรายได้ปานกลางหรือรายได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้ว สำหรับในประเทศไทย มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับที่ 3 รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งตับและท่อน้ำดี ดังรูปที่ 3 โดยมีอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ (age-standardized incidence rate; ASR) ประมาณ 11.7 คน ต่อประชากรหญิง 100,000 คนต่อปี (National Cancer Institute of Thailand, 2018; WHO, 2014) ใช้เวลาประมาณ 5-10 ปี หลังจากติดเชื้อ ในการดำเนินโรคจาก carcinoma in situ พัฒนาไปเป็น invasive carcinoma โดยจะเริ่มลุกลามจากชั้น basement membrane ไปยังชั้น cervical stroma ก่อนที่จะลุกลามจนสามารถพบความผิดปกติด้วยตาเปล่า อีกทั้งลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงได้โดยสามารถผ่านทางระบบไหลเวียนเลือด หรือระบบน้ำเหลือง เช่น ปอด กระดูก ไส้ตรง หรือกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น (Li et al., 2016)

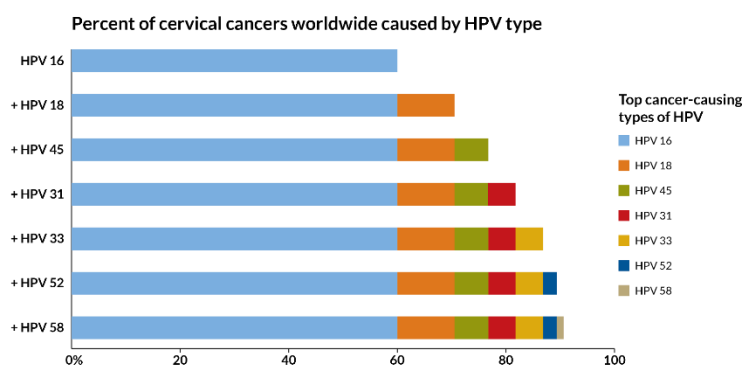


รูปที่ 3 โรคมะเร็งที่พบในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2557 (ต่อประชากร 100,000 คน)
(National Cancer Institute of Thailand, 2018.)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้แก่ อายุที่เพิ่มขึ้น การมีเพศสัมพันธ์ขณะที่อายุน้อย การมีคู่นอนหลายคน มีประวัติว่าเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์หรือโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง การสูบบุหรี่ สมาชิกในครอบครัวมีประวัติเป็นมะเร็งปากมดลูก และการติดเชื้อ โดยเฉพาะ เชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิลโลมาหรือเชื้อไวรัสเอชพีวี (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2547)

เชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิลโลมาหรือเชื้อไวรัสเอชพีวี (human papilloma virus: HPV)

โรคมะเร็งปากมดลูกมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิลโลมาหรือไวรัสเอชพีวี (human papilloma virus: HPV) ซึ่งเชื้อไวรัสดังกล่าวมีหลายสายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความเสี่ยงในการก่อโรคมะเร็งหลังจากติดเชื้อ ได้แก่ สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงต่ำ (low-risk type) เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง แต่ส่วนใหญ่ทำให้เกิดหูดหงอนไก่ บริเวณอวัยวะเพศ ได้แก่สายพันธุ์หรือ ไทป์ 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 73 และ 81 โดยเฉพาะไทป์ 6 และไทป์ 11 พบได้มากที่สุด คิดเป็นประมาณร้อยละ 90 และสายพันธุ์ก่อมะเร็งที่มีความเสี่ยงสูง (high-risk type) ได้แก่ไทป์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68 และ 82 โดยเฉพาะ ไทป์ 16 และไทป์ 18 ซึ่งพบได้มากที่สุด คิดเป็นประมาณร้อยละ 70 ของเชื้อเอชพีวีที่พบในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ดังรูปที่ 4 (Li et. al., 2011; Lowy and Schiller, 2006)



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงร้อยละที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกโดยเชื้อเอชพีวีสายพันธุ์ต่างๆ (Nathan, 2015)

นอกจากนี้เชื้อเอชพีวียังเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งอื่นๆ เช่น มะเร็งช่องคลอด มะเร็งช่องปากและลำคอ มะเร็งทวารหนัก หรือมะเร็งอวัยวะเพศในเพศชาย เป็นต้น (Palefsky, 2010) ในกรณีของมะเร็งปากมดลูก เชื้อเอชพีวีจะเข้าไปที่บริเวณเนื้อเยื่อบุผิวของปากมดลูกผ่านรอยถลอกที่เกิดจากการมีเพศสัมพันธ์ ซึ่งเมื่อติดเชื้อแล้ว เซลล์บริเวณปากมดลูกจะค่อยๆเกิดความผิดปกติ มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้เวลาดำเนินของโรคในการเปลี่ยนจากเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งประมาณ 10-15 ปีหลังจากที่ติดเชื้อ โดยที่ยังไม่แสดงความผิดปกติ ผู้ป่วยมักจะพบแพทย์เมื่อมีอาการรุนแรงซึ่งเข้าสู่มะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามและยากต่อการรักษาให้หายขาดแล้ว (วิยะดา ปัญจรัก, 2558) ดังนั้นการตรวจคัดกรองตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการหรือการตรวจในระยะก่อนเป็นมะเร็งจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เพื่อที่จะหาวิธีรักษาได้อย่างทันท่วงทีและลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกอีกด้วย

เชื้อไวรัสเอชพีวีเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอวงแหวนสายคู่ความยาว 8,000 คู่เบสเรียงตัวเป็นวงกลม (doubled stranded circular DNA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 500 nm แบ่งโครงสร้างของไวรัสออกเป็น 3 ส่วน ดังรูปที่ 5 ดังนี้ (Borruto and Ridder, 2012)

1. Untranslated region (UTR) หรือ Upstream regulatory region (URR) หรือ Long control region (LCR) ไม่ได้เป็นบริเวณที่เกิดการแปลรหัสโปรตีน แต่เป็นบริเวณที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอ เป็นตำแหน่งที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์และโพรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน เช่น E6 และ E7 เข้าจับ รวมทั้งเป็นบริเวณที่มีการควบคุมการแสดงออกของยีนภายในไวรัส (Raybould et al., 2011)

2. Early region (E) ประกอบด้วยยีน E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ที่แปลรหัสเป็น early protein ทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การควบคุมการแสดงออกของยีนภายในไวรัส เกี่ยวข้องกับกระบวนการมีชีวิตรอดและกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกเมื่อมีการติดเชื้อ โดยแต่ละยีนจะมีหน้าที่โดยละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 *E1* แพลลรหัสเป็นโปรตีน *E1* เป็นโปรตีนสำคัญที่ใช้ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ควบคุมการถอดรหัสของยีน (gene transcription)

2.2 *E2* แพลลรหัสเป็นโปรตีน *E2* เป็นโปรตีนสำคัญที่ใช้ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ควบคุมการถอดรหัสของยีน รวมทั้งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และควบคุมการแสดงออกของยีน *E6* และ *E7*

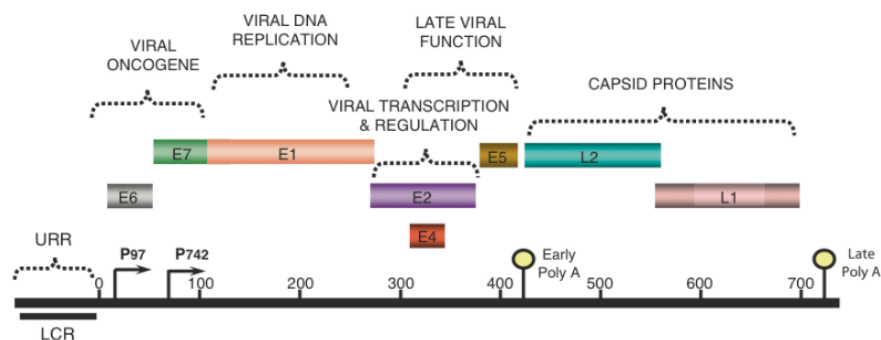
2.3 *E4* แพลลรหัสเป็นโปรตีน *E4* แม้หน้าที่ยังไม่แน่ชัด แต่คาดว่าทำหน้าที่รวมไวรัส และมีส่วนช่วยในการปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อไปยังบริเวณข้างเคียงโดยการจับกับ keratin และ ทำลาย cytotokeratin network อีกทั้งคาดว่าโปรตีน *E4* อาจเข้าจับกับโครงสร้างเชิงซ้อน cdk/cyclin และนำไปสู่การหยุดวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle arrest) ในระยะ G2 (Doorbar et al., 1991; Raybould et al., 2011)

2.4 *E5* แพลลรหัสเป็นโปรตีน *E5* ทำงานร่วมกับโปรตีน *E6* และ *E7* ทำให้เซลล์ไม่ตายและส่งเสริมกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ติดเชื้อทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์เจ้าบ้าน (host) (Prézet et al., 2007.)

2.5 *E6* แพลลรหัสเป็นโปรตีน *E6* ซึ่งเป็นโปรตีนก่อมะเร็ง (oncoprotein) ทำหน้าที่จับและสลายโปรตีน p53 ซึ่งเป็นผลผลิตจากยีนต้านมะเร็งที่มีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์ โดยการจับร่วมกับโปรตีน E6AP หรือ E6-associated protein (E6AP) ทำให้โปรตีน p53 เข้าสู่กระบวนการ ubiquitination และไม่สามารถทำงานได้ เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอชพีวีจึงไม่ถูกทำลายและสามารถเพิ่มจำนวนไวรัสต่อไป (Sen et al., 2018)

2.6 *E7* แพลลรหัสเป็นโปรตีน *E7* ซึ่งเป็นโปรตีนก่อมะเร็งที่สำคัญ โดยจับและสลายโปรตีน pRB ผ่านกระบวนการ phosphorylation และ ubiquitination เพื่อรบกวนการจับกันและการทำงานระหว่างโปรตีน pRB และ E2F ชัดขวางไม่ให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอชพีวีสามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้และนำไปสู่การเกิดมะเร็ง (Senba and Mori, 2012; Sen et al., 2018)

3. Late region (L) ได้แก่ยีน *L1* และ *L2* ที่แปลรหัสเป็น late protein ที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกหุ้มไวรัส (capsid) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในช่วยการจับกับเซลล์เจ้าบ้าน โดย *L1* ทำหน้าที่สร้าง major capsid protein เป็นส่วนหลักของเปลือกหุ้มไวรัส ในขณะที่ *L2* ทำหน้าที่สร้าง minor capsid protein



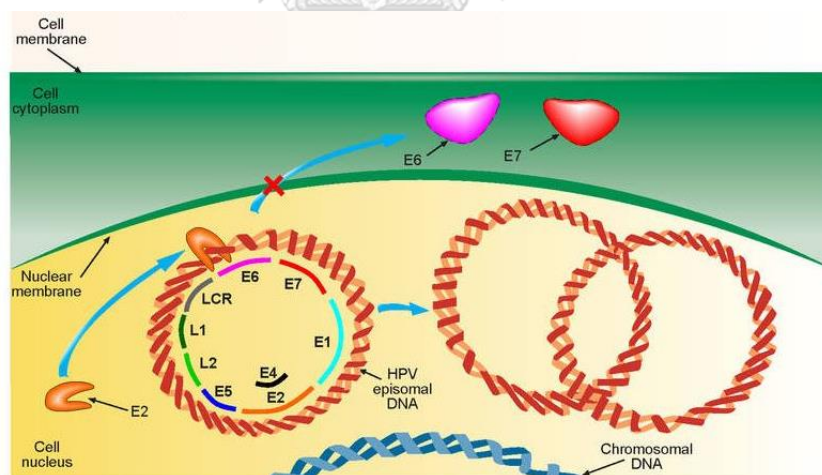
รูปที่ 5 โครงสร้างของเชื้อไวรัสเอชพีวี

(Vega et al., 2017)

การเกิดมะเร็งปากมดลูกเมื่อเกิดการติดเชื้อเอชพีวี

เมื่อร่างกายได้รับเชื้อเอชพีวีจากการเข้ามาทางแผลบริเวณปากมดลูกแล้ว เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายโดยอยู่ใน 2 รูปแบบ คือ

1. episomal form หรือลักษณะเป็นวง ไม่มีการแทรกจีโนมไวรัสเข้าไปในจีโนม แต่จะเข้าอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน (host) โดยจำนวนไวรัสจะเพิ่มขึ้นตามการจำลองตัวของเซลล์เจ้าบ้าน (Stern and Einstein, 2012) ดังรูปที่ 6

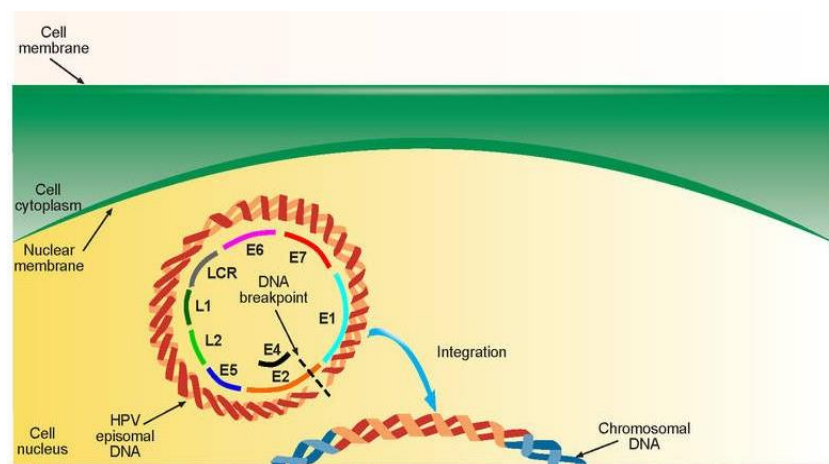


รูปที่ 6 การติดเชื้อเอชพีวีในรูปแบบ episomal form

(<https://www.immunopaedia.org.za/immunology/archive/carcinoma-development/human-papilloma-virus-hpv/>)

2. integrate form หรือเป็นเส้นยาวและแทรกตัวจีโนมไวรัสเข้าไปในจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน ดังรูปที่ 7 ซึ่งสามารถให้ผลได้ 2 ทาง คือขัดขวางหรือหยุดการทำงานของยีนต้านมะเร็งและกระตุ้นให้ยีนก่อมะเร็งมีการแสดงออกมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดความผิดปกติและพัฒนาไปเป็น

เซลล์มะเร็งในเวลาต่อมา โดยบริเวณที่จีโนมเชื้อเอชพีวีแทรกเข้าจีโนมเจ้าบ้านมักเป็นบริเวณที่เกิดกิจกรรมการถอดรหัส (transcription) บ่อยครั้ง หรือบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกัน (translocation point) และมักเป็นเป็นบริเวณที่เปราะบางทำให้จีโนมไวรัสสามารถเข้าแทรกได้ง่าย (Das et al., 2012) โดยเมื่อเกิดการขาดของสายไวรัส ทำให้ยีน E2 ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีน E6 และ E7 ไม่แสดงออก ทำให้ยีน E6 และ E7 แสดงออกมากขึ้นและเป็นสิ่งสำคัญที่นำไปสู่การยับยั้งการทำงานของยีนต้านมะเร็งต่อไป (Collins et al., 2009)



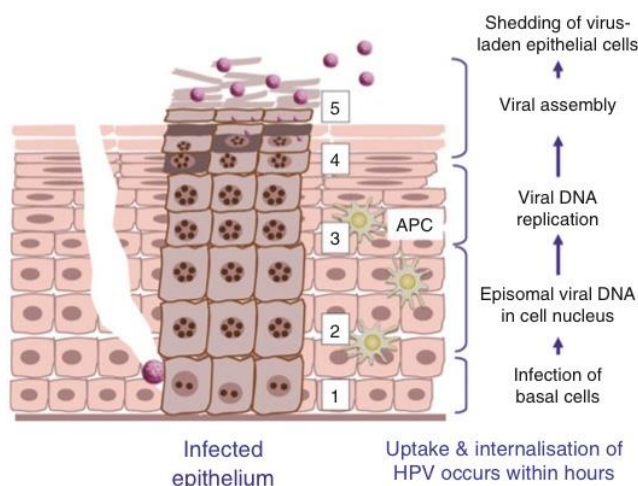
รูปที่ 7 การติดเชื้อเอชพีวีในรูปแบบ integrate form

(<https://www.immunopaedia.org.za/immunology/archive/carcinoma-development/human-papilloma-virus-hpv/>)

เมื่อเชื้อเอชพีวีเข้าสู่เซลล์ชั้น basal ของเซลล์ epithelium ผ่านรอยแผลเกิดจากการมีเพศสัมพันธ์ แล้วระยะหนึ่ง เชื้อเอชพีวีจะเริ่มเข้าสู่วัฏจักรของเชื้อเอชพีวีโดยอธิบายตามรูปที่ 8 ดังนี้ (Conway and Meyers, 2009)

1. เชื้อเอชพีวีที่ติดเชื้อในเซลล์ปากมดลูกชั้น basal ยังมีจำนวนสำเนาของเชื่อน้อย
2. ช่วงแรกของการติดเชื้อเอชพีวี ดีเอ็นเอจะอยู่ในรูปแบบ episomal form และเข้าอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ basal
3. เกิดการจำลองดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส เพื่อเพิ่มจำนวนสำเนาของไวรัส ไปพร้อมกับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ early genes แสดงออก สร้างโปรตีน E1 E2 E4 E5 E6 E7 และ late genes สร้างโปรตีน L1 และ L2
4. โปรตีน L1 และ L2 สร้างเปลือกหุ้มไวรัส (capsid) จากนั้นดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวีจะเปลี่ยนอยู่ในรูปแบบ integrate form เพื่อแทรกอยู่กับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ยีน E2 ไม่แสดงออก ไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน E6 และ E7 ได้ ทำให้ยีน E6 และ E7 มีการแสดงออกที่มากขึ้น หลังจากนั้นดีเอ็นเอของไวรัสและ capsid ประกอบได้เป็นเชื้อเอชพีวีที่สมบูรณ์

5. เชื้อเอชพีวีอยู่ในรูปสมบูรณ์ หลุดออกจากเซลล์ชั้น epithelium และลุกลามไปข้างเคียง



รูปที่ 8 วัฏจักรชีวิตของเชื้อเอชพีวีบริเวณปากมดลูก

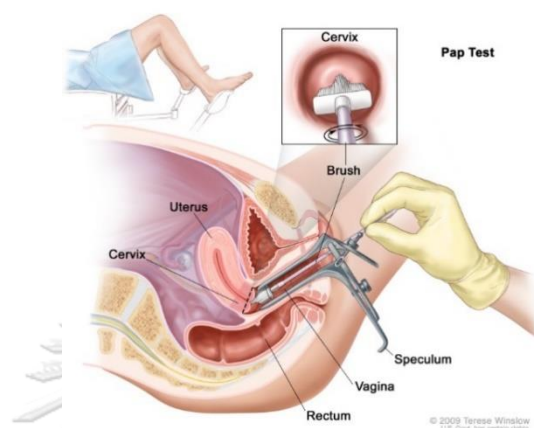
(Stern and Einstein, 2012)

ยีน E6 และ E7 มีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกอย่างมาก เนื่องจากโปรตีนที่สร้างจากยีนทั้งสองสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนต้านมะเร็งที่ถูกสร้างจากยีนต้านมะเร็งได้ โดยโปรตีน E6 จะจับเข้ากับโปรตีน E6AP ทำให้เกิดการย่อยสลายของ p53 ผ่านกระบวนการ ubiquitination ในภาวะปกติ p53 ทำหน้าที่เป็นโปรตีนต้านมะเร็งและเป็น transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมวัฏจักรและการตายของเซลล์ ดังนั้นเมื่อ p53 ลดลง ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตอย่างไร้การควบคุม ไม่มีการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ จนทำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (Sen et. al., 2018) อีกทั้งโปรตีน E6 ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase ซึ่งทำหน้าที่คงสภาพปลาย telomere ของโครโมโซมไม่ให้สั้นลง มีผลทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเอชพีวีมีอายุยืนและไม่เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์ (Ganguly and Parihar, 2009) ในขณะที่โปรตีน E7 ควบคุมการจับเข้ากับระหว่างโปรตีน pRb ซึ่งเป็นโปรตีนต้านมะเร็งที่มีหน้าควบคุมการแบ่งตัวและกระบวนการตายของเซลล์ และทรานสคริปชันแฟคเตอร์ E2F ผ่านกระบวนการ phosphorylation และ ubiquitination ทำให้เซลล์แบ่งตัวอย่างไร้การควบคุม นอกจากนี้โปรตีน E7 ยังกระตุ้นการทำงานของ cyclin A และ cyclin E ซึ่งส่งผลให้เกิดการจำลองตัวของเชื้อเอชพีวีเพิ่มขึ้น และลดการทำงานของโปรตีน p21 และ p27 ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการถอดรหัสของยีนอีกด้วย (Ganguly and Parihar, 2009; Yim and Park, 2005)

การตรวจคัดกรองและตรวจเพื่อวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูก

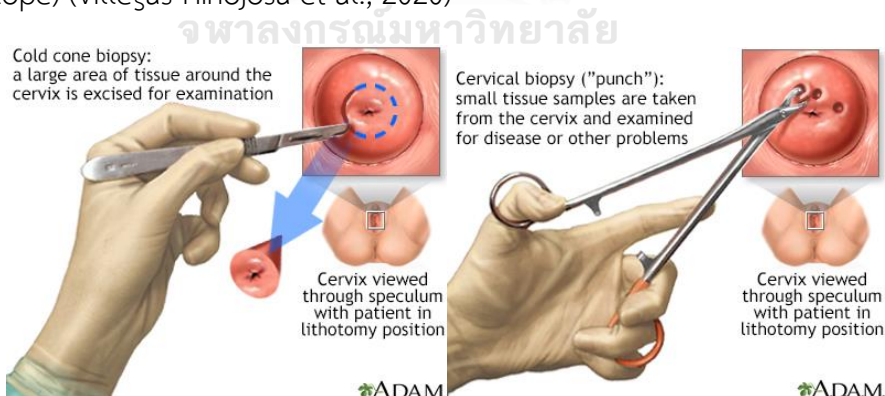
ปัจจุบันวิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยมีหลายวิธี เช่น การตรวจคัดกรองสตรีที่ทั้งที่ยังไม่มีอาการหรือแสดงความผิดปกติเพียงเล็กน้อยของปากมดลูกด้วยการทำแปปสเมียร์ (Papanicolaou smear:

PAP smear) เป็นการตรวจความผิดปกติของเซลล์บริเวณปากมดลูกผ่านการตรวจสอบทางเซลล์วิทยา (cytology) โดยใช้อุปกรณ์คล้ายไม้พายหรือ spatula เก็บเซลล์บริเวณปากมดลูกและรอยต่อของคอมดลูก (squamocolumnar junction) ดังรูปที่ 9 ใสในขวดน้ำยารักษาสภาพเซลล์ และตรวจผ่านกล้อง (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2547)



รูปที่ 9 การตรวจมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีแปปสเมียร์
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65910/>)

หากพบความผิดปกติจากตัวอย่างแปปสเมียร์ จะตรวจสอบเพิ่มเติมเพื่อตรวจวินิจฉัย โดยการตรวจชิ้นเนื้อด้วยวิธี biopsy เพื่อยืนยันผลทางพยาธิวิทยา (histology) ว่ารอยโรคนั้นมีความผิดปกติบริเวณปากมดลูกหรือไม่โดยใช้มีด (cone biopsy) หรือคีบตัดเนื้อเยื่อบริเวณปากมดลูก (punch biopsy) ดังรูปที่ 10 นำมาผ่านการย้อมสีและส่งผ่านกล้องคอลโปสโคป (colposcope) (Villegas-Hinojosa et al., 2020)



รูปที่ 10 การตรวจมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี biopsy

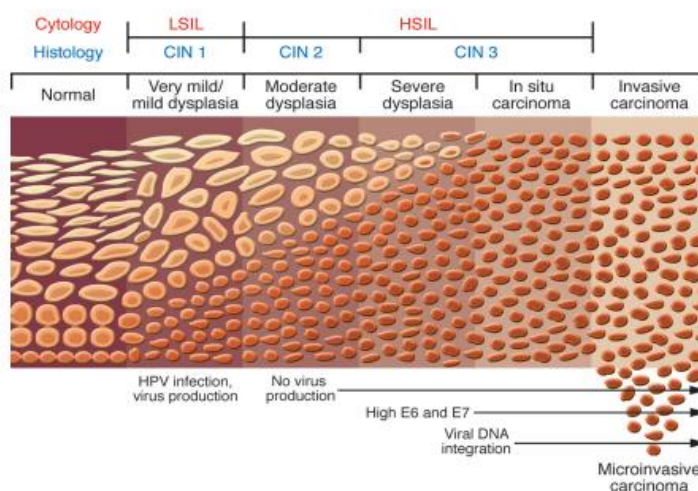
(<http://kingsbrook.adam.com/content.aspx?productid=117&pid=1&gid=000893>)

การรายงานผลแปปสเมียร์มีหลายระบบ แต่นิยมใช้ The Bethesda system (TBS) โดยเฉพาะ TBS 2001 เป็นการแบ่งระยะการเกิดตามความผิดปกติของเซลล์ที่เปลี่ยนไป

ตามเซลล์วิทยา แบ่งออกเป็นเซลล์ปกติ (normal cell) เซลล์รอยโรคระยะก่อนมะเร็งเกรดต่ำ (low-grade squamous intraepithelial lesion: LSIL) ซึ่งมีการแบ่งตัวผิดปกติเฉพาะด้านบนของชั้นเยื่อบุปากมดลูก ประมาณ 1 ใน 3 ของทั้งหมด เซลล์รอยโรคระยะก่อนมะเร็งเกรดสูง (high-grade squamous intraepithelial lesion: HSIL) ซึ่งมีการแบ่งตัวผิดปกติที่ด้านล่างและส่วนกลางของชั้นเยื่อบุปากมดลูก และเซลล์มะเร็ง (squamous cell carcinomas หรือ SCC) รวมทั้งเซลล์ที่ผิดปกติแต่ที่ไม่สามารถระบุระยะของเซลล์ได้อย่างชัดเจน (atypical squamous cell) หรือ ASC-US (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2547; สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561) ขณะที่การรายงานผลตามความผิดปกติของเซลล์ที่เปลี่ยนไปตามพยาธิวิทยา (histology) ใช้ระบบ CIN system เป็นการบ่งบอกรอยโรคที่ปากมดลูกในระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือ Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) เป็นการสะท้อนอัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรคและการติดเชื้อเอชพีวี แบ่งออกเป็นระยะ CIN 1 ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มพบการติดเชื้อเอชพีวี พบเซลล์ที่ผิดปกติประมาณ 1 ใน 3 ของความหนาของเยื่อผิวปากมดลูก ระยะ CIN 2 พบเซลล์ที่ผิดปกติประมาณ 2 ใน 3 ของความหนาของเยื่อผิวปากมดลูก และหากพบเซลล์ที่ผิดปกติมากกว่า 2 ใน 3 ของเยื่อผิวปากมดลูก จะถูกวินิจฉัยว่าอยู่ในระยะ CIN 3 (สมชัย นิรุตติศาสตร์, 2533) โดยมีการเปรียบเทียบกับทั้ง 2 ระบบ ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 11

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการรายงานผลการตรวจปากมดลูก

WHO system	The Bethesda system	CIN system
Normal	Within Normal limits	Normal
Atypical	ASC-US	-No significant cellular changes
Mild dysplasia	LSIL	CIN 1, HPV infection
Moderate dysplasia	HSIL	CIN 2
Severe dysplasia/ Carcinoma In situ	HSIL	CIN 3
Squamous cell carcinoma (SCC)	Squamous cell carcinoma	Squamous cell carcinoma



รูปที่ 11 การรายงานผลของตัวอย่างด้วยวิธีทางเซลล์วิทยาและพยาธิวิทยา
(Lowy and Schiller, 2006.)

ถึงแม้จะเป็นวิธีนิยมใช้อย่างแพร่หลาย แต่การตรวจแปปสเมียร์ เป็นเพียงการคัดกรอง (screening) ไม่ใช่การตรวจวินิจฉัยโรค (diagnostic) ไม่สามารถบอกผลการตรวจได้แม่นยำนัก เป็นการบอกถึงความเสี่ยงเบื้องต้น อีกทั้งมีข้อจำกัดอื่นๆ เช่นมีความไว (sensitivity) ต่ำ ประมาณร้อยละ 40-60 (Chumworathayi and Srisupundit, 2012) ทำให้มีโอกาสที่ได้ผลลบลวง (false negative) หมายถึงผู้เข้าตรวจที่ปากมดลูกผิดปกติแต่ได้รับผลการตรวจเป็นลบ การเตรียมอุปกรณ์เครื่องมือ การเตรียมตัวอย่าง รวมทั้งการอ่านผลต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่ผ่านการอบรม และผลอาจแตกต่างกันต่างระหว่างผู้เชี่ยวชาญแต่ละท่าน (Mishra et al., 2011) ทำให้สามารถเกิดการคาดเคลื่อนและการนัดตรวจติดตามผลที่นานเกินไป ขณะที่การตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยวิธีการตัดชิ้นเนื้อแม้จะเป็นวิธีที่แม่นยำกว่า แต่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและมีการฉีดยาหากต้องการชิ้นเนื้อที่มากพอต่อการวินิจฉัยที่แม่นยำ (Duesing et al, 2012) อีกวิธีที่เป็นที่นิยมตรวจร่วมด้วยคือ การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวี (HPV DNA genotyping) ผ่านเทคนิคพีซีอาร์ เป็นการตรวจระบุสายพันธุ์ของเชื้อเอชพีวี โดยให้ความสำคัญกับเชื้อเอชพีวีสายพันธุ์ความเสี่ยงสูง คือไทป์ 16 และ 18 (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561) วิธีนี้ถึงแม้จะมีความไวในการตรวจพบรอยโรคก่อนมะเร็งสูง แต่กลับมีค่าทำนายผลลบลวงสูง ความจำเพาะต่ำกว่าวิธีแปปสเมียร์ และค่าใช้จ่ายในการตรวจแต่ละครั้งค่อนข้างมาก (Koliopoulos et al., 2007) ซึ่งวิธีที่ใช้ในการค้นหาเซลล์ผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็งตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการเพียงเล็กน้อยจะช่วยลดอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกได้ เพื่อให้แพทย์สามารถรักษาได้อย่างทันท่วงที ซึ่งวิธีที่ดันทันทีจะไม่อันตรายหรือทำให้ผู้เข้ารับการตรวจได้รับผลกระทบจากการตรวจน้อยที่สุด เสียค่าใช้จ่ายไม่มาก ใช้เวลาการตรวจไม่นาน เป็นที่ยอมรับ และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ (Trevethan, 2017)

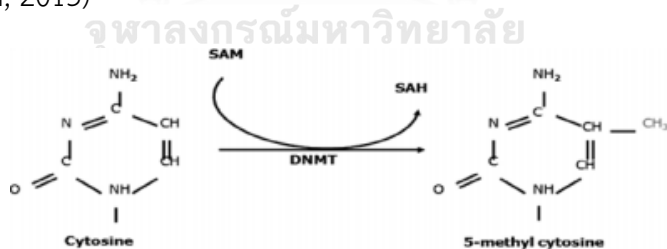
วิธีหนึ่งที่ถูกนำเสนอและได้รับการยอมรับมากยิ่งขึ้นคือการตรวจทางโมเลกุลผ่านกระบวนการเหนือพันธุกรรมกระบวนการหนึ่งๆที่เรียกว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ดังที่จะกล่าวต่อไป

กระบวนการเหนือระดับพันธุกรรม (Epigenetics)

เป็นภาวะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ แต่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน ทำให้โปรตีนหรือทรานสคริปชันแฟกเตอร์ตัวอื่นไม่สามารถเข้ามาจับได้อย่างปกติ ทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนไป (จันทนา รักแผน, 2555) สามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นถัดไปได้ เป็นสาเหตุการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดในสมอง โรคเบาหวาน เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงจาก epigenetics ประกอบด้วย 3 กลไก ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอ (DNA methylation) การปรับแต่งโปรตีนฮิสโตน (Histone modification) และการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) (อินทิวา นาคแย้ม และจินตนาภรณ์ วัฒนธร, 2561) โดยงานวิจัยฉบับนี้ให้ความสนใจที่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกลไกการเติมหมู่เมทิลตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 บนเบสไซโทซีน (cytosine; C) ในบริเวณที่มีเบสไซโทซีน และเบสกวานีน (guanine: G) อยู่เรียงต่อกันหนาแน่น เรียกว่า CpG island โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) โดยโยกย้ายหมู่เมทิลจาก S-adenylmethionine (SAM) ไปยังเบสไซโทซีนได้เป็น 5-methylcytosine (5-mC) และ S-adenosyl homocysteine (SAH) ดังรูปที่ 12 (Moore and Fan, 2013)



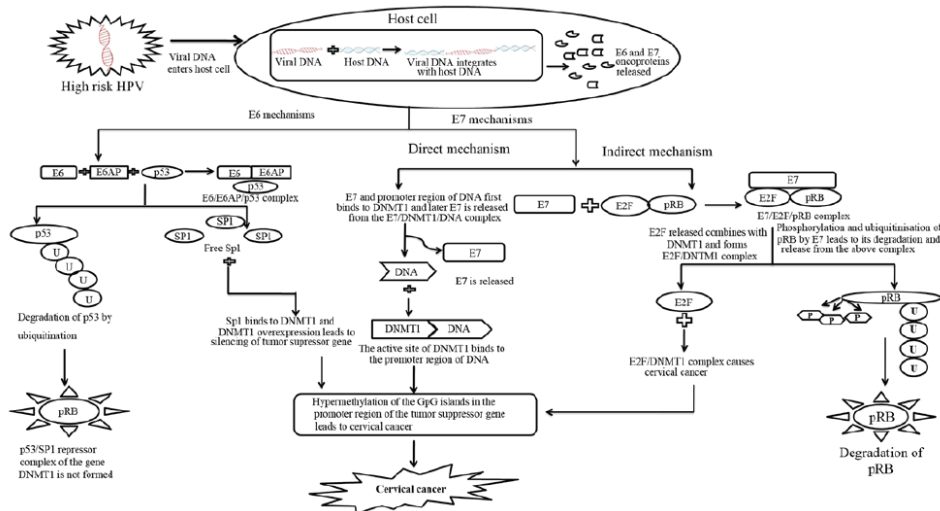
รูปที่ 12 การเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (ฤทัยรัตน์ ศรีรักษา และ เต็มดวง ลีมไพบูลย์, 2555)

สำหรับเอนไซม์ DNMT สามารถแบ่งการทำงานได้ 2 แบบคือ *de novo* DNMT ได้แก่ DNMT3a และ DNMT3b ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลที่เสียไประหว่างเกิดการจำลองดีเอ็นเอ และ maintenance DNMT ได้แก่ DNMT1 ซึ่งมีหน้าที่เติมหมู่เมทิลเพื่อรักษารูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันให้เหมือนกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (Li et al., 1992; Okano et al., 1999)

ในสภาวะปกติ เซลล์ปกติมักพบ CpG island บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนแต่ไม่เกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (unmethylation) แต่บริเวณอื่นในจีโนมจะถูกเมทิลเลชัน เรียกว่า global hypermethylation โดยเฉพาะในโรคมะเร็ง มักพบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูงบริเวณ โปรโมเตอร์ (promoter hypermethylation) ส่งผลต่อการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น ยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ยีนที่ควบคุมกระบวนการตายของเซลล์ หรือยีนต้านมะเร็ง เป็นต้น ในขณะที่เดียวกันจะมีจีโนมบริเวณอื่นที่ลดการเกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชันไป เรียกว่า global hypomethylation (ฟิงค์พร เพ็ชเจริญ, 2558)

ความเกี่ยวข้องระหว่างการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และการเกิดมะเร็ง

นอกจากโปรตีน E7 จะมีผลต่อการเกิดมะเร็งด้วยกลไกทางอ้อมโดยรบกวนการจับเข้าระหว่างโปรตีนต้านมะเร็ง pRb และทรานสคริปชันแฟคเตอร์ E2F สลายโปรตีน pRB ผ่านกระบวนการ phosphorylation และ ubiquitination ทำให้โปรตีนต้านมะเร็ง pRb ไม่ทำงาน และเซลล์แบ่งตัวอย่างไร้การควบคุมแล้ว ยังพบว่ายีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 มีความสัมพันธ์กับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในมะเร็งปากมดลูกซึ่งเป็นกลไกโดยตรง โดยโปรตีน E7 มีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ DNMT1 เหนี่ยวนำให้เกิดการเติมหมู่เมทิลบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน (Ganguly and Parihar 2009; Sen et. al., 2018) ดังรูปที่ 13



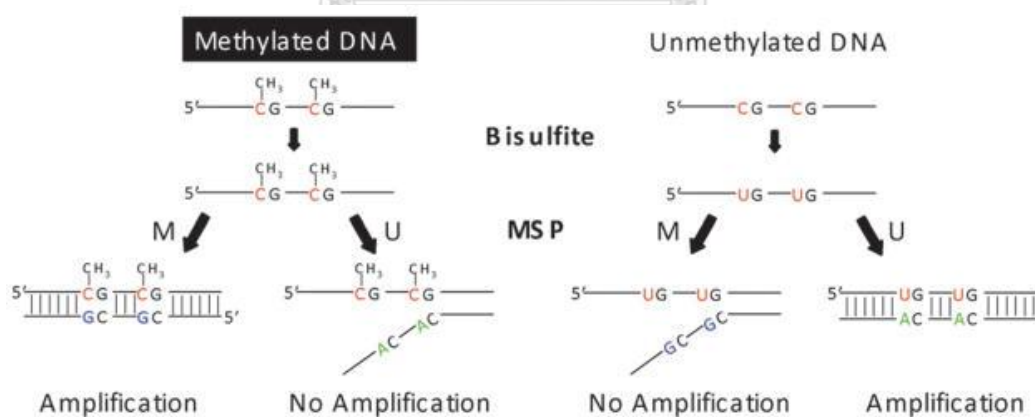
รูปที่ 13 การทำงานของโปรตีน E7 ที่มีผลต่อการเกิดมะเร็ง (Sen et. al., 2018)

นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน E7 จับกับ DNMT1 เหนี่ยวนำให้เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 (Burgers et al., 2007) ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง เนื่องจากทรานสคริปชันแฟคเตอร์ต่าง ๆ ไม่สามารถเข้าจับบริเวณโปรโมเตอร์ได้

และนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวีไพบี 16 (Chalertpet et al., 2015; Yanatatsaneejit et al., 2011) การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างระยะก่อนเป็นมะเร็งและตัวอย่างที่พัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ (Chujan et al., 2014)

Methylation specific-PCR (MSP)

เป็นเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนสายดีเอ็นเอ เพื่อแยกดีเอ็นเอกลุ่มที่ถูกและไม่ถูกเติมหมู่เมทิลออกจากกัน ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรินเมนต์ (Bisulfite treatment) เบสไซโทซีนที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิลจะถูกดิงหมู่เอมีนออกหรือเรียกว่าผ่านกระบวนการ deamination และเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล (uracil: U) ในขณะที่เบสไซโทซีนที่เกิดเมทิลเลชันจะไม่มี การเปลี่ยนแปลง ได้ดีเอ็นเอ 2 กลุ่มที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ทำให้สามารถนำมาตรวจสอบต่อได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่มีการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองกลุ่ม โดยต้องออกแบบ 2 คู่ คู่หนึ่งคือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่เกิดเมทิลเลชัน (methylation primer) และอีกหนึ่งคู่คือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ไม่เกิดเมทิลเลชัน (unmethylation primer) ถ้าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบสไซโทซีนสามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้ แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นเกิดเมทิลเลชัน ในทางกลับกันถ้าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบสยูราซิลสามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้ แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่มีเกิดเมทิลเลชัน (Herman et al., 1996; Zhang et al., 2009) ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 การตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยเทคนิค MSP

(Zhang et al., 2009)

จากวิทยานิพนธ์ของนันทน์ภัส วงศ์มณี ในปี 2561 ได้สืบหาฮัยนที่เป็นเป้าหมายของโปรตีน E7 โดยการทำให้ ChIP seq analysis โดยการใช้ E7 HPV16 antibody ตกตะกอนดีเอ็นเอที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบี 16 ได้ และนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถ

ตกตะกอนลงมาได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการ sequencing และวิธีทางชีวสารสนเทศ โดยวิธีทางชีวสารสนเทศนั้นทำได้โดยการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 จับได้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบไปค้นหายีนอื่น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์เหมือนกัน และคัดเลือกยีนที่สามารถจับได้ทั้ง ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 และ YY1 (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561; จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี, 2562) ซึ่งจากวิทยานิพนธ์ดังกล่าว จึงทำการเลือกยีนในแต่ละวิธีมา 1 ยีน และจากโครงการวิทยาศาสตร์ของ พลวัฒน์ มุงเมือง ได้แก่ยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1*

Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 (*ALDH3B1*)

ยีน Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member B1 (*ALDH3B1*) เป็นยีนหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของ Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) family อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 11q13.2 ซึ่งแปลรหัสได้โปรตีนกลุ่มเอนไซม์ ALDH มีหน้าที่ลดความเป็นพิษของสารกลุ่ม aldehyde ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารประเภทแอลกอฮอล์ (alcohol metabolism) และปฏิกิริยา lipid peroxidation (Marchitti et. al., 2007) มีความเกี่ยวข้องในการปกป้องเซลล์จากภาวะ oxidative stress ไม่ให้เกิดความเสียหายหรือความผิดปกติจนพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งพบได้ในหลายอวัยวะที่สามารถเกิด oxidative stress ได้ เช่น ปอด ไต เป็นต้น (Marchitti et. al., 2010) นอกจากนี้พบว่ายีน *ALDH3B1* ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายชีวภาพในการพยากรณ์โรคมะเร็งปอดชนิด Adenocarcinoma (Sun et al., 2020)

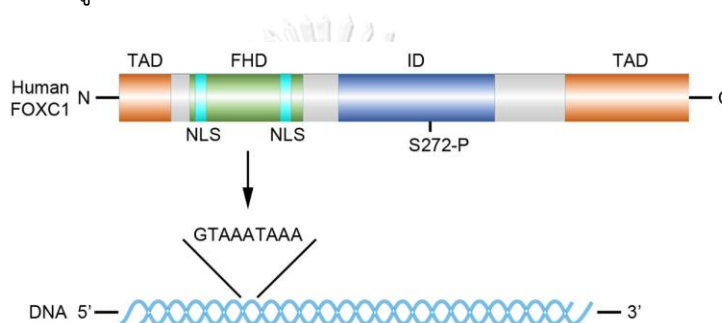
N-acylsphingosine amidohydrolase (non-lysosomal ceramidase) 2B (*ASAH2B*)

ยีน N-acylsphingosine amidohydrolase 2B (*ASAH2B*) อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 10q11.23 ซึ่งแปลรหัสได้โปรตีน ceramidases เป็นเอนไซม์ที่มีความควบคุมกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ เช่น กระบวนการเจริญเติบโต (cell proliferation) การพัฒนาให้มีความจำเพาะของเซลล์ (cell differentiation) การตายของเซลล์ (apoptosis) และกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) งานวิจัยพบว่า long non-coding RNA (lnc) ของยีน *ASAH2B-2* (*lnc-ASAH2B-2*) กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ผ่าน mTOR pathway ทำให้ยาเคมีบำบัด everolimus ซึ่งเป็นยาที่จับกับบริเวณ FKBP12-rapamycin binding (FRB) ของโปรตีน mTOR จับกับโปรตีน mTOR ได้น้อยลง (Li et al., 2018) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ย่อยสลาย ceramide เป็น sphingosine ซึ่ง sphingosine จะถูกย่อยสลายโดย sphingo kinase 2 (Sphk2) ที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุลของการยับยั้งการเจริญเติบโต และการตายของเซลล์ร่วมกับยีน *p21* และยีน *p53* อีกทั้ง Sphk2 ยังมีกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีนที่มีอยู่ใน BH3 ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของ

Pro-apoptotic ของตระกูล Bcl-2 เช่นเดียวกับโปรตีน BH3 ที่ชักนำการเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (Sankala et al., 2007)

Forkhead box C1 (*FOXC1*)

ยีน Forkhead box C1 (*FOXC1*) เป็นยีนหนึ่งในกลุ่มของ Forkhead box (FOX) family ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ เช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์ การมีชีวิตรอด และการตายของเซลล์ เป็นต้น สำหรับยีน *FOXC1* ตั้งอยู่บนตำแหน่ง 6p25 ของโครโมโซมโปรตีน *FOXC1* ที่สร้างจากยีน *FOXC1* ประกอบด้วยโครงสร้างหลักๆ (Han et al., 2017; Yang et al., 2017) ดังรูปที่ 15 ได้แก่



รูปที่ 15 โครงสร้างของยีน *FOXC1*

(Han et al., 2017)

1. Transcription activation domain (TAD) ที่อยู่ทางปลาย N-terminal เป็นบริเวณสำคัญที่กระตุ้นการเกิดการถอดรหัสของยีน

2. Forkhead DNA binding domain (FHD) เป็นบริเวณที่ตีเอ็นเอเกิดการจับ ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ GTAAATAAA ภายใน FHD มีบริเวณที่เรียกว่า nuclear localization signal (NLS) ทั้งปลาย N-terminal และ C-terminal ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสับเปลี่ยน (translocation) ในนิวเคลียสของยีน *FOXC1*

3. Inhibitory domain (ID) หรือ phosphorylation domain เป็นบริเวณที่ยับยั้งการถอดรหัส นอกจากนี้ยังเป็นบริเวณที่เบสเซอร์ีนตำแหน่ง 272 เกิดกระบวนการ phosphorylation

4. Transcription activation domain (TAD) ที่อยู่ทางปลาย C-terminal เป็นบริเวณสำคัญที่กระตุ้นการเกิดการถอดรหัส เช่นเดียวกับ Transcription activation domain (TAD) ที่อยู่ทางปลาย N-terminal

ยีน *FOXC1* มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาอวัยวะ สมอง หัวใจ และตา ในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ (embryogenesis) มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง การบุกรุกไปยังบริเวณข้างเคียงและการแพร่กระจายของมะเร็งหลายชนิด ในมะเร็งเต้านมพบว่ายีน *FOXC1* ถูกใช้เป็นเครื่องหมายชีวภาพในมะเร็งเต้านมชนิด basal-like (basal-like breast cancer: BLBC) เนื่องจากมีแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เต้านมปกติ (Ray et al., 2011) นอกจากนี้ *FOXC1* ยังมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ epithelial ที่ยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียง ไปเป็นเซลล์ mesenchyma (epithelial-mesenchymal transition: EMT) ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ไปยังบริเวณข้างเคียงและเกิดการแพร่กระจายของมะเร็ง เมื่อตรวจสอบจากผู้ป่วยมะเร็งที่มีการแพร่กระจายโดยการเลือกเก็บเซลล์มะเร็งที่ไหลเวียนในกระแสเลือด (circulating tumor cells: CTC) ที่เกิดจาก EMT พบการแสดงออกของยีน *FOXC1* ในขณะเดียวกัน ระดับการแสดงออกของยีน *FOXC1* มีความเกี่ยวข้องกันระหว่างการทนต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดและการเกิด promoter hypermethylation ของยีน จึงทำให้ยีนนี้จึงเป็นเป้าหมายและเป็นอีกแนวทางในการรักษามะเร็งเต้านมชนิด BLBC (Yang et al., 2017) เพื่อให้ผู้ป่วยตอบสนองต่อการรักษาได้มากขึ้นและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย นอกจากมะเร็งเต้านมแล้วยีน *FOXC1* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งในมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกันในมะเร็งตับที่มีการแสดงออกของยีน *FOXC1* ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามีความเสี่ยงที่จะกลับมาเป็นซ้ำ นอกจากนี้เมื่อมีโปรตีน *FOXC1* มากขึ้น *FOXC1* เข้าไปจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน C-X-C motif chemokine receptor 1 (*CXCR1*) ส่งเสริมให้ยีน *CXCR1* แสดงออกมากขึ้นนำไปสู่การกระตุ้นการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วยการกระตุ้นให้เกิด EMT (Huang et al., 2015)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirrer) (Labtech, Korea)
2. เครื่องเขย่าสาร (vortex) (Scientific Industries, USA)
3. เครื่องชั่งสารดิจิตอล (Mettlet Toledo, USA)
4. เครื่องถ่ายภาพและบันทึกภาพเจล (Azure c300 Gel Imaging System) (Azure Biosystems, USA)
5. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (High pressure steam sterilizer, Autoclaves) (Tomy, Japan)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (microcentrifuge) (Thermo Scientific, USA)
7. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultrapure water type I) (Millipore, France)
8. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) (Eppendorf, Germany)
9. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
10. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nano drop) (Thermo Scientific, USA)
11. เครื่องให้ความร้อน (heat blocker) (Stuart, UK)
12. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bio-Rad, USA)
13. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำที่อุณหภูมิ -20°C และ -80°C (Revco, Japan)
14. ตู้ดูดควัน (fume hood) (S.K.Powerable, Thailand)
15. ตู้ปลอดเชื้อ class II (laminar flow cabinet) (Gelman sciences, Singapore)
16. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี CO_2 (CO_2 incubator) (Thermo Scientific, USA)
17. ตู้เย็น (Hitachi, Japan)
18. ไมโครปีเปต (Eppendorf, Germany)
19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกตวง (Witeg, Germany)
2. ขวดดูแรนขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, Germany)
3. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 (Nest, China)
4. ซ้อนตักสาร
5. ถังมือยางพารา (Sritranggroup, Thailand)

6. ทิปสำหรับไมโครปิเปต (Nest, China)
7. ปิเปตแบบฆ่าเชื้อขนาด 2 ml, 5 ml, 10 ml และ 25 ml (Nest, China)
8. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
9. หลอดขนาด 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml และ 2 ml (Nest, China)
10. Cyrovial tube (Corning, USA)
11. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml และ 50 ml (Nest, China)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 1.2 Ammonium acetate (Merck, Germany)
- 1.3 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)
- 1.4 EDTA (USB, Germany)
- 1.5 Hydroquinone (Sigma-Aldrich, USA)
- 1.6 Sodium metabisulfite (Sigma-Aldrich, USA)
- 1.7 Isopropanol (VWR, France)
- 1.8 Proteinase K (USB, USA)
- 1.9 Sodium chloride (Merck, Germany)
- 1.10 SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
- 1.11 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.12 100 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.13 Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

2. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์

- 2.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, USA)
- 2.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)
- 2.3 Anti-anti (100X) antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)
- 2.4 Trypsin EDTA (Gibco, USA)
- 2.5 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, USA)
- 2.6 Tryphan blue (Gibco, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Bisulfite

- 3.1 Hydroquinone (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2 Sodium metabisulfite (Sigma-Aldrich, USA)

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

- 4.1 Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (New England Biolabs, USA)
- 4.2 10X PCR buffer (Qiagen, USA)
- 4.3 Hot start *Taq* DNA polymerase (Qiagen, USA)
- 4.4 Oligonucleotide primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)

5. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

- 5.1 EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, USA)
- 5.2 Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ นพ.ยง ภู่วรวรรณ และรองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตก่าธร ซึ่งได้รับการอนุมัติ จากงานจริยธรรมการวิจัย ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 477/61) ประกอบด้วย

1.1 ตัวอย่างแปปสเมียร์

ประกอบด้วยเซลล์ปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อเอชพีวีจำนวน 14 ตัวอย่าง เซลล์ปากมดลูกปกติที่พบการติดเชื้อเอชพีวีจำนวน 8 ตัวอย่าง เซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง ซึ่งแบ่งออกเป็นระยะ LSIL ที่พบการติดเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และไทม์ 18 จำนวน 8 ตัวอย่าง และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ ระยะ HSIL ที่พบการติดเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และไทม์ 18 จำนวน 21 ตัวอย่าง และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ และเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 20 ตัวอย่าง

1.2 ตัวอย่าง ASC-US

ประกอบด้วยเซลล์ปากมดลูกปกติจำนวน 98 ตัวอย่าง และเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็งซึ่งแบ่งออกเป็นระยะ LSIL จำนวน 33 ตัวอย่าง และระยะ HSIL จำนวน 16 ตัวอย่าง

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ C33A และ SiHa ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อเอชพีวี และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งที่พบการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 ตามลำดับ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมบวกและลบสำหรับขั้นตอนการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนที่คัดเลือก โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Dubbocco's Modified Eagles Medium, Gibco, USA) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (Gibco) และ 1% Anti-anti (100X) antibiotic-antimycotic (Gibco) ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37°C ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแปปสเมียร์ ตัวอย่างเซลล์ไลน์ และตัวอย่าง ASC-US

การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Strauss, 1998 โดยนำตัวอย่างปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 7 นาที เติสารด้านบน (supernatant) ทิ้ง แล้วจึงล้างตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วย PBS ปริมาตร 1 ml จากนั้นใส่ lysis buffer II 10% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ proteinase K ปริมาตร 500 μ l 50 μ l และ 20 μ l ตามลำดับ แล้วนำหลอดบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50°C จนตะกอนของเซลล์ถูกย่อยจนหมด ดูดตัวอย่างใส่หลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นดูด phenol-chloroform-isoamy Alcohol (25:24:1) ใส่ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 21,000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างส่วนบนใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วเติม 100% (v/v) ethanol และ 7.5M ammonium acetate พลิกหลอดไปมาเพื่อให้สารและตัวอย่าง ผสมเข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 21,000 g เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนของดีเอ็นเอกับหลอดด้วย 75% (v/v) ethanol นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 21,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย distilled water ปริมาตร 10 μ l บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้ววัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop (Thermo Scientific, USA)

4. กระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์ (Bisulfite treatment)

เป็นกระบวนการที่นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อที่ 3 มาเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไซโทซีนให้กลายเป็นยูราซิล เพื่อแยกดีเอ็นเอที่เกิดและไม่เกิดกระบวนการเกิดเมทิลเลชันออกจากกัน โดยนำดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 1 μ g บ่มด้วยสาร Sodium Bisulfite และ Hydroquinone เป็นเวลา

16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50°C ก่อนที่แยกให้เหลือเพียงดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเครื่อง Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold (Promega, USA) และชุดสารเคมีสำเร็จรูป Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, USA) โดยเริ่มจากการเติมสาร Wizard DNA clean-up Resin จากชุดสารเคมีสำเร็จรูปปริมาตร 1 ml และดีเอ็นเอที่บ่มครบ 16 ชั่วโมง ปริมาตร 50 µl ลงในหลอดแผ่นกรองและหลอดที่ต่อกับเครื่อง Vacuum ทำการเปิดเครื่อง Vacuum เพื่อให้สารในหลอดถูกดูดออกหมด หลังจากนั้นเติม 80% isopropanol ปริมาตร 2 ml และเปิดเครื่องอีกครั้งจนมั่นใจว่าสารถูกดูดจนหมดและแผ่นกรองแห้งแล้ว จึงนำหลอดแผ่นกรองวางในหลอดปริมาตร 1.5 ml นำหลอดดังกล่าวไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 95°C ปริมาตร 50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 วินาที เติม 3M NaOH ปริมาตร 5.5 µl บ่มต่ออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม 20 ng/µl glycogen ปริมาตร 1 µl 10M NH₄Ac ปริมาตร 17 µl และ 100% ethyl alcohol ปริมาตร 150 µl ผสมให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethyl alcohol ปริมาตร 200 µl นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 µl และบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปใช้ทดลองในขั้นถัดไป

5. คัดเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่สนใจ

เลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเกิดเมทิลเลชัน (methylation primer) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการไม่เกิดเมทิลเลชัน (unmethylation primer) โดยอ้างอิงจากวิทยานิพนธ์ก่อนหน้า (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561; จุฑามาศ สุขพัฒน์ธิ, 2562) ที่ได้จากข้อมูลชีวสารสนเทศที่ศึกษา อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและการศึกษาด้วยเทคนิค ChIP - seq ที่พบว่าโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน และโครงการวิทยาศาสตร์ก่อนหน้า (พลวัฒน์ มุงเมือง, 2559) เป็นจำนวนทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* เพื่อตรวจสอบรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทั้งสาม โดย methylation primer มีขนาดผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ ยีน *FOXC1* มีขนาด 208 bp ยีน *ASAH2B* มีขนาด 125 bp และยีน *ALDH3B1* มีขนาด 128 bp ในขณะที่ unmethylation primer มีขนาดผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ ยีน *FOXC1* มีขนาด 143 bp ยีน *ASAH2B* มีขนาด 125 bp และยีน *ALDH3B1* มีขนาด 128 bp ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชัน

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward <i>FOXC1</i> methylation primer	CGC GCG AGA GAT CGA GAA AA
Reverse <i>FOXC1</i> methylation primer	GCG ACG CAA CTT CCA AAC G
Forward <i>FOXC1</i> unmethylation primer	GGT GTG TGA GAG ATT GAG AAA AGG T
Reverse <i>FOXC1</i> unmethylation primer	CAC CAC ACT ACC TAC ACC TTC
Forward <i>ASAH2B</i> methylation primer	CGG GTA CGG TGA TTT CGG GGT G
Reverse <i>ASAH2B</i> methylation primer	CGC CCT CGC CTT AAT CCT CCG
Forward <i>ASAH2B</i> unmethylation primer	TGG GTA TGG TGA TTT TGG GGT GG
Reverse <i>ASAH2B</i> unmethylation primer	TGG AGG ATT AAG GTG AGG GTG
Forward <i>ALDH3B1</i> methylation primer	GCG TTA AGA GTC GAG TTT TTT GAA AA
Reverse <i>ALDH3B1</i> methylation primer	CAT ACA ACC CCC GAT CAC GT
Forward <i>ALDH3B1</i> unmethylation primer	GTG TTA AGA GTT GAG TTT TTT GAA AA
Reverse <i>ALDH3B1</i> unmethylation primer	CAT ACA ACC CCC AAT CAC AT

6. ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในตัวอย่างแปปสเมียร์ และ ASC-US นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อที่ 4 ที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรีเมนต์ (Bisulfite treatment) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ผ่านขั้นตอน MSP โดยใช้ 10x PCR Buffer HotStarTaq polymerase (QIAGEN, Germany) 10 mM Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (New England Biolabs, USA) และไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อยีนทั้งสาม หลังจากนั้นจึงตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 6% polyacrylamide gel

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* โดย

8.1 คำนวณจำนวนตัวอย่างแปปสเมียร์ และตัวอย่าง ASC-US ที่พบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างแปปสเมียร์ ที่ทดลองในแต่ละกลุ่มและแต่ละยีนในทุกตัวอย่างเป็นร้อยละ

8.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างแปปสเมียร์ ว่ามีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ด้วยการทดสอบของฟิชเชอร์ (The Fisher exact probability test) ในตารางการจรแบบ 2x2 (2x2 Tables) ซึ่งการทดสอบของฟิชเชอร์นั้นเป็นการทดสอบความเป็นอิสระต่อกันระหว่างข้อมูล 2 กลุ่ม และกลุ่มตัวอย่างนั้นมีขนาดเล็ก หรือข้อมูลมีความถี่ในช่องตารางมีค่าน้อยกว่า 5 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($\alpha = 0.05$) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

8.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเกิดเมทิลเลชัน บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน การคำนวณค่าดัชนี 5 ดัชนี ได้แก่ sensitivity specificity PPV NPV และ accuracy

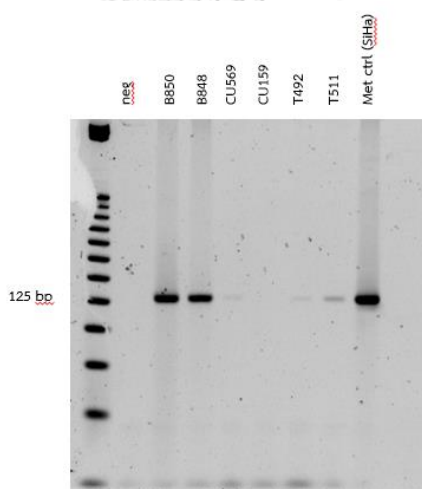


บทที่ 4

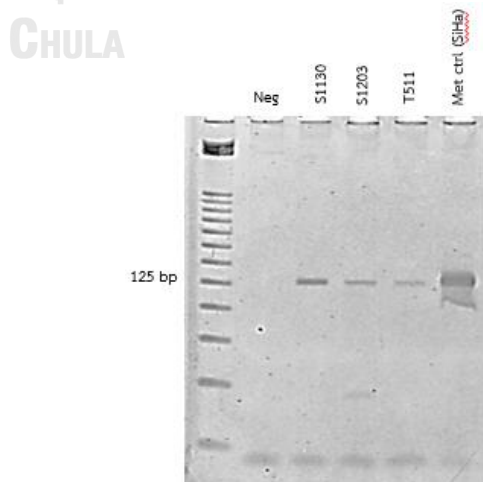
ผลการทดลอง

4.1 การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

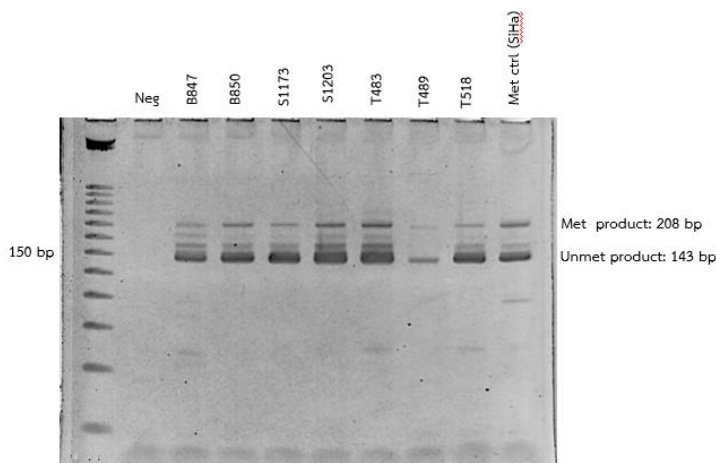
การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่เกิดเมทิลเลชันในตัวอย่างแปปสเมียร์ ด้วยเทคนิค MSP เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ ผลการเกิดเมทิลเลชันในเจลอิเล็กโตรโฟรีสิสได้ผลตามตัวอย่างบางส่วนดังรูปที่ 16 17 และ 18 ตามลำดับ



รูปที่ 16 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์



รูปที่ 17 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ในตัวอย่างแปปสเมียร์



รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1*
ในตัวอย่างแปปสเมียร์

ในการคำนวณครั้งแรกเป็นการเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธีการตรวจสอบทางเซลล์วิทยาซึ่งแบ่งได้เป็นระยะต่างๆคือ เซลล์ปากมดลูกปกติ (normal) เซลล์ระยะก่อนเป็นมะเร็งที่มีความผิดปกติน้อย (LSIL) เซลล์ระยะก่อนเป็นมะเร็งที่มีความผิดปกติมาก (HSIL) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (cancer) ในตัวอย่างแปปสเมียร์ ยีน *ALDH3B1* พบการเกิดเมทิลเลชันในเซลล์ปากมดลูกปกติ 83.33% ใน HSIL 100% และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 71.43% ยีน *ASAH2B* พบการเกิดเมทิลเลชันในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ 23.81% ใน LSIL 83.33% ใน HSIL 82.61% และเซลล์มะเร็งปากมดลูก 30% ยีน *FOXC1* พบการเกิดเมทิลเลชันในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ 9.52% ใน LSIL 58.33% ใน HSIL 56.52% และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 20% ดังตารางที่ 3 ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

	เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน						
	<i>ALDH3B1</i>		<i>ASAH2B</i>		<i>FOXC1</i>		
	จำนวน	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
จำนวน							
ตัวอย่าง							
Pap-smear							
Normal	22	10 ใน 12	83.33	5 ใน 21	23.81	2 ใน 21	9.52
LSIL	12	-	-	10 ใน 12	83.33	7 ใน 12	58.33
HSIL	24	3 ใน 3	100.00	19 ใน 23	82.61	13 ใน 23	56.52
cancer	20	5 ใน 7	71.43	6 ใน 20	30.00	4 ใน 20	20.00

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่าในตัวอย่างแปปสเมียร์ การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* มีมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง ทั้ง LSIL และ HSIL แต่กลับพบการเกิดเมทิลเลชันที่ลดลงในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ดังนั้นจึงคำนวณเพื่อดูความแตกต่างของจำนวนตัวอย่างที่พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์อีกครั้งโดยการแยกกลุ่มตัวอย่างตามการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา ควบคู่กับการตรวจสายพันธุ์เอชพีวี พบว่ายีน *ALDH3B1* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี 100% ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติที่พบการติดเชื้อเอชพีวี 60% ใน HSIL ที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 100% และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 71.43% ยีน *ASAH2B* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี 28.57% เซลล์ปากมดลูกปกติที่พบการติดเชื้อเอชพีวี 14.29% ใน LSIL ที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และไทป์ 18 พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ 75% และ 100% ตามลำดับ ใน HSIL ที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และไทป์ 18 พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ 80% และ 100% ตามลำดับ และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 30% ยีน *FOXC1* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี 14.29% แต่กลับไม่พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์เซลล์ปากมดลูกปกติที่มีการติดเชื้อเอชพีวี ใน LSIL ที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และไทป์ 18 พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ 62.50% และ 50% ตามลำดับ ใน HSIL ที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และไทป์ 18 พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ 60% และ 33.33% ตามลำดับ และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 20% ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างแปปสเมียร์ของปากมดลูกที่เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* แยกตามการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาและการตรวจเอชพีวี

	จำนวน ตัวอย่าง	เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน					
		<i>ALDH3B1</i>		<i>ASAH2B</i>		<i>FOXC1</i>	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	
Pap-smear							
Normal without HPV	14	7 ใน 7	100.00	4 ใน 14	28.57	2 ใน 14	14.29
Normal with HPV	8	3 ใน 5	60.00	1 ใน 7	14.29	0 ใน 7	0.00
LSIL with HPV 16	8	-	-	6 ใน 8	75.00	5 ใน 8	62.50

	เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน						
	จำนวน ตัวอย่าง	ALDH3B1		ASAH2B		FOXC1	
		จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
Pap-smear							
LSIL with HPV 18	4	-	-	4 ใน 4	100.00	2 ใน 4	50.00
HSIL with HPV 16	21	3 ใน 3	100.00	16 ใน 20	80.00	12 ใน 20	60.00
HSIL with HPV 18	3	-	-	3 ใน 3	100.00	1 ใน 3	33.33
cancer	20	5 ใน 7	71.43	6 ใน 20	30.00	4 ใน 20	20.00

จากผลการทดลองในตัวอย่างแปปสเมียร์จากตารางที่ 3 พบว่าหากพิจารณาในตัวอย่างที่วินิจฉัยด้วยวิธีทางเซลล์วิทยา การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ ทั้งเซลล์ระยะก่อนเป็นมะเร็งและเซลล์มะเร็ง เนื่องจากการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนดังกล่าวมีมากขึ้นเมื่อ เซลล์ปากมดลูกเกิดความผิดปกติ แต่เมื่อคำนวณโดยการแยกกลุ่มตัวอย่างตามการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาควบคู่กับการตรวจสายพันธุ์เอชพีวีตามตารางที่ 4 กลับพบว่ายีน *ALDH3B1* ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ปากมดลูกที่มีและไม่มี การติดเชื้อเอชพีวีได้ เนื่องจากพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนดังกล่าวในทุกตัวอย่างของเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี ขณะที่ยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* พบความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์เมื่อมีการติดเชื้อเอชพีวีต่างไพบ โดยยีน *ASAH2B* ใน LSIL และ HSIL มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในตัวอย่างที่ติดเชื้อเอชพีวีไพบ 18 มากกว่า ขณะที่ยีน *FOXC1* ใน LSIL และ HSIL มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในตัวอย่างที่ติดเชื้อเอชพีวีไพบ 16 มากกว่า เมื่อนำผลของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติซึ่งประกอบด้วย LSIL HSIL และเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่ายีน *ALDH3B1* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกปกติ 83.33% ในเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ 80% ยีน *ASAH2B* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ใน เซลล์ปากมดลูกปกติ 23.81% ในเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ 63.64% ยีน *FOXC1* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกปกติ 9.52% และในเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ 43.64% ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ

	เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน						
	<i>ALDH3B1</i>			<i>ASAH2B</i>		<i>FOXC1</i>	
	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
Pap-smear							
Normal	22	10 ใน 12	83.33	5 ใน 21	23.81	2 ใน 21	9.52
Abnormal	56	8 ใน 10	80.00	35 ใน 55	63.64	24 ใน 55	43.64

4.2 การตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวอย่างแปปสเมียร์

จากตารางที่ 3 4 และ 5 นำตัวอย่างแปปสเมียร์หาความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างปกติและไม่ปกติโดยใช้สถิติ Fisher's exact ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($\alpha = 0.05$) ในตารางการจรแบบ 2x2 เพื่อหาค่า P-value แบบ 2 ทาง (P-value, two tailed test) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.2.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ จากการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา

เป็นการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกผิดปกติ ซึ่งแบ่งออกเป็นเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง (LSIL และ HSIL) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากการทดลองพบว่ายีน *ALDH3B1* เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง และการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก ไม่มีความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็งมีความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกกลับไม่พบความแตกต่าง ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบความแตกต่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ

	จำนวนตัวอย่างที่พบเกิด เมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์	P-value*
<i>ALDH3B1</i>		
Normal	10 ใน 12	-
LSIL	-	-
HSIL	3 ใน 3	1.0000
cancer	5 ใน 7	0.6027
<i>ASAH2B</i>		
Normal	5 ใน 21	-
LSIL	10 ใน 12	0.0014*
HSIL	19 ใน 23	0.0002*
cancer	6 ใน 20	0.7337
<i>FOXC1</i>		
Normal	2 ใน 21	-
LSIL	7 ใน 12	0.0046*
HSIL	13 ใน 23	0.0014*
cancer	4 ใน 20	0.4099

4.2.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวีและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ

เนื่องจากตัวอย่างแปปสเมียร์ที่ได้ทดลองนั้นมีการตรวจสายพันธุ์เอชพีวีควบคู่กับวิธีทางเซลล์วิทยา พบว่าจากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติทั้งหมด 22 ตัวอย่าง มี 8 ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อเอชพีวี ดังนั้นจึงเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวีเปรียบเทียบกับเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติซึ่งแบ่งออกเป็น เซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง (LSIL และ HSIL) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากการทดลองพบว่า ยีน *ALDH3B1* เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวีกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก ไม่มีความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ มีความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวีกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก กลับไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความแตกต่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี

	จำนวนตัวอย่างที่พบการเกิด เมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์	P-value*
<i>ALDH3B1</i>		
Normal, without HPV	7 ใน 7	-
LSIL	-	-
HSIL	3 ใน 3	-
cancer	5 ใน 7	0.4615
<i>ASAH2B</i>		
Normal, without HPV	4 ใน 14	-
LSIL	10 ใน 12	0.0079*
HSIL	19 ใน 23	0.0017*
cancer	6 ใน 20	1.0000
<i>FOXC1</i>		
Normal, without HPV	2 ใน 14	-
LSIL	7 ใน 12	0.0375*
HSIL	13 ใน 23	0.0164*
cancer	4 ใน 20	1.0000

4.2.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ

เป็นการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง (LSIL และ HSIL) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก ว่าจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ จากการทดลองพบว่ายีน *ALDH3B1* เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ ไม่มีความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ปากมดลูกปกติกับเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ มีความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบความแตกต่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ

	จำนวนตัวอย่างที่พบเกิด เมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์	P-value*
<i>ALDH3B1</i>		
Normal	10 ใน 12	-
Abnormal	3 ใน 3	>0.9999999
<i>ASAH2B</i>		
Normal	5 ใน 21	-
Abnormal	29 ใน 35	0.00003271*
<i>FOXC1</i>		
Normal	2 ใน 21	-
Abnormal	20 ใน 35	0.0006835*

จากผลการทดลองในตัวอย่างแปปสเมียร์ พบว่าการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASA2B* และ *FOXC1* สามารถใช้แยกความแตกต่างเบื้องต้นระหว่างกลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติ และเซลล์ปากมดลูกที่เกิดความผิดปกติจึงได้ตรวจสอบอีกครั้งในตัวอย่างที่วินิจฉัยทางเซลล์วิทยาว่ามีความผิดปกติแบบกำกวม (Atypical Squamous cells of Undetermined Significance: ASC-US) ร่วมกับการวินิจฉัยโดยการตรวจชิ้นเนื้อ (Biopsy) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากฝ่ายสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

4.3 การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่าง ASC-US

ตรวจสอบความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1*, *ASAH2B* และ *FOXC1* ในเซลล์ปากมดลูก ASC-US ที่ระยะต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์ปากมดลูกปกติ และเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง จากการทดลองพบว่า ยีน *ALDH3B1* พบการเกิดเมทิลเลชันในเซลล์ปากมดลูกปกติ 48.15% ใน LSIL 55.56% และใน HSIL 25% ยีน *ASAH2B* พบการเกิดเมทิลเลชันในเซลล์ปากมดลูกปกติ 27.23% สำหรับเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง ทั้งระยะ LSIL และ HSIL ไม่ได้ทำการตรวจสอบยีน *FOXC1* พบการเกิดเมทิลเลชันในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ 45.71% ใน LSIL 50% และใน HSIL 50% ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกแบบ ASC-US

	การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน						
	<i>ALDH3B1</i>		<i>ASAH2B</i>		<i>FOXC1</i>		
	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน %	จำนวน %	จำนวน %	จำนวน %	จำนวน %	
ASC-US							
Normal	98	13 ใน 27	48.15	3 ใน 11	27.23	16 ใน 35	45.71
LSIL	33	5 ใน 9	55.56	-	-	2 ใน 4	50.00
HSIL	16	1 ใน 4	25.00	-	-	2 ใน 4	50.00

เมื่อนำผลของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติซึ่งประกอบด้วย LSIL และ HSIL ในตัวอย่าง ASC-US พบว่ายีน *ALDH3B1* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกปกติ 48.15% ในเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ 46.15% ยีน *ASAH2B* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกปกติ 23.81% แต่ในเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็งทั้งระยะ LSIL และ HSIL ไม่ได้ทำการตรวจสอบ ยีน *FOXC1* พบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์ปากมดลูกปกติ 45.71% และในเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ 50% ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติ

	เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน						
	<i>ALDH3B1</i>		<i>ASAH2B</i>		<i>FOXC1</i>		
	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน %	จำนวน %	จำนวน %	จำนวน %	จำนวน %	
Pap-smear							
Normal	98	13 ใน 27	48.15	3 ใน 11	27.23	16 ใน 35	45.71
Abnormal	49	6 ใน 13	46.15	-	-	4 ใน	50.00

จากการทดลองพบว่า การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ในตัวอย่าง ASC-US นั้นมีความใกล้เคียงกันระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็ง ในขณะที่การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ในตัวอย่าง ASC-US

มีมากขึ้นในเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็งซึ่งประกอบด้วยระยะ LSIL และ HSIL เปรียบเทียบกับเซลล์ปากมดลูกปกติ ต่อมาจึงทดสอบประสิทธิภาพของการคัดกรองด้วยการเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* และ *FOXC1*

4.4 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1*

การคำนวณหาประสิทธิภาพของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* เพื่อใช้ในการแยกและคัดกรองเซลล์ปากมดลูกว่าเป็นวิธีการตรวจวัดที่สามารถเชื่อถือได้หรือไม่ ซึ่งการคำนวณประสิทธิภาพนั้นจะทำในตารางการจรแบบ 2x2 และคำนวณค่าดัชนีที่ใช้ในการตรวจ 5 ดัชนี ได้แก่ sensitivity specificity PPV NPV และ accuracy ได้ผลดังนี้

4.4.1 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

จากตารางในข้อที่ 4.3 นำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์ เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติประกอบไปด้วยเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็งซึ่งประกอบด้วยระยะ LSIL และ HSIL และเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากการคำนวณพบว่าการคัดกรองด้วยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* มีค่า sensitivity 80% ค่า specificity 17% ค่า PPV และ NPV คือ 44% และ 50% ตามลำดับ โดยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนนี้มีประสิทธิภาพอยู่ที่ 45% ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

	Abnormal (+)	Normal (-)	Total	Performance
Methylation exposure (+)	8	10	18	Sensitivity 80% PPV 44%
Methylation exposure (-)	2	2	4	Specificity 17% NPV 50%
Total	10	12	22	Diagnostic accuracy 45%

ในยีน *ASAH2B* พบว่าการคัดกรองด้วยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* มีค่า sensitivity 64% ค่า specificity 76% ค่า PPV และ NPV คือ 88% และ 44% ตามลำดับ โดยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนนี้มีประสิทธิภาพอยู่ที่ 67% ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

	Abnormal (+)	Normal (-)	Total	Performance
Methylation exposure (+)	35	5	40	Sensitivity 64% PPV 88%
Methylation exposure (-)	20	16	36	Specificity 76% NPV 44%
Total	55	21	76	Diagnostic accuracy 67%

ยีน *FOXC1* พบว่าการคัดกรองด้วยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* มีค่า sensitivity 43% ค่า specificity 90% ค่า PPV และ NPV คือ 92% และ 38% ตามลำดับ โดยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนนี้มีประสิทธิภาพอยู่ที่ 67% ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

	Abnormal (+)	Normal (-)	Total	Performance
Methylation exposure (+)	24	2	26	Sensitivity 43% PPV 92%
Methylation exposure (-)	31	19	50	Specificity 90% NPV 38%
Total	55	21	76	Diagnostic accuracy 57%

จากตารางที่ 12 และ 13 พบว่าการคัดกรองด้วยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* มีประสิทธิภาพมากกว่า 50% จึงได้คำนวณหาประสิทธิภาพของการคัดกรองโดยการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B*

ร่วมกับยีน *FOXC1* มีค่า sensitivity 56% ค่า specificity 93% ค่า PPV และ NPV คือ 95% และ 46% ตามลำดับ โดยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณพรอโมเตอร์ของยีนนี้มีประสิทธิภาพโดยรวมอยู่ที่ 67% ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณพรอโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ร่วมกับยีน *FOXC1* ในตัวอย่างแปปสเมียร์

	Abnormal (+)	Normal (-)	Total	Performance
Methylation exposure (+)	22	1	23	Sensitivity 56% PPV 95%
Methylation exposure (-)	17	15	32	Specificity 93% NPV 46%
Total	39	16	76	Diagnostic accuracy 67%

ผลการคำนวณจากตารางที่ 11 12 13 และ 14 ในตัวอย่างแปปสเมียร์ พบว่าวิธีตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณพรอโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* มีประสิทธิภาพพอจะใช้ในการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกได้มากกว่า 50% โดยยีน *ASAH2B* จะมีประสิทธิภาพโดยรวมในการคัดกรองมากกว่ายีน *FOXC1* แต่หากนำทั้งสองยีนมาใช้ร่วมกัน จะมีประสิทธิภาพในการคัดกรองเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจเมทิลเลชันด้วยยีนใดยีนหนึ่ง หลังจากนั้นจึงยืนยันอีกครั้งโดยการตรวจในตัวอย่าง ASC-US แต่ต่อมาเนื่องจากตัวอย่างที่มีอยู่อย่างจำกัด จึงไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบในยีน *ASAH2B* ทำให้มีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการคำนวณประสิทธิภาพในการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกในยีนดังกล่าว

4.4.2 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเกิดเมทิลเลชันบริเวณพรอโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* และ *FOXC1* ในตัวอย่าง ASC-US

จากตารางที่ 9 นำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณพรอโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* และ *FOXC1* ในตัวอย่าง ASC-US เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปากมดลูกปกติและเซลล์ปากมดลูกระยะก่อนเป็นมะเร็งซึ่งประกอบด้วยระยะ LSIL และ HSIL ขณะที่ยีน *ASAH2B* ไม่ได้ทำการตรวจสอบ จากการคำนวณพบว่าการคัดกรองด้วยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณพรอโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* มีค่า sensitivity 46% ค่า specificity 51% ค่า PPV และ NPV คือ 31% และ 66% ตามลำดับ โดยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันของยีนนี้มีประสิทธิภาพ 50% ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ในตัวอย่าง ASC-US

	Pre-cancerous (+)	Normal (-)	Total	Performance
Methylation exposure (+)	6	13	19	Sensitivity 46% PPV 31%
Methylation exposure (-)	7	14	21	Specificity 51% NPV 66%
Total	13	27	40	Diagnostic accuracy 50%

หลังจากนั้นจึงได้คำนวณต่อในยีน *FOXC1* พบว่าการคัดกรองด้วยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* มีค่า sensitivity 50% ค่า specificity 54% ค่า PPV และ NPV คือ 20% และ 82% ตามลำดับ โดยวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีนนี้มีประสิทธิภาพ 53% ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกด้วยการเปรียบเทียบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ในตัวอย่าง ASC-US

	Pre-cancerous (+)	Normal (-)	Total	Performance
Methylation exposure (+)	4	16	20	Sensitivity 50% PPV 20%
Methylation exposure (-)	4	19	23	Specificity 54% NPV 82%
Total	8	35	43	Diagnostic accuracy 53%

ผลการคำนวณจากตารางที่ 15 และ 16 ในตัวอย่าง ASC-US ถึงแม้วิธีตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* จะมีประสิทธิภาพมากกว่ายีน *ALDH3B1* แต่วิธีตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของทั้งสองยีนไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ในการคัดกรอง เนื่องจากมีค่าดัชนีต่ำ ทั้งค่า specificity ต่ำ หมายความว่าวิธีการตรวจนี้มีโอกาสสูงประมาณ 50% ที่ผลการตรวจที่ออกมาจะเป็นผลบวกลวง คือเซลล์ปากมดลูกปกติอาจพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เจ้าของเซลล์ปากมดลูกกลุ่มนี้จึงต้องทำการตรวจอีกครั้ง

หรือติดตามผลการตรวจประจำปี และค่า sensitivity ต่ำ กล่าวคือวิธีการตรวจการเกิดเมทิลเลชัน บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนมีโอกาสถึงประมาณ 50% ที่เซลล์ที่ผิดปกติจะได้ผลลบลง ทำให้เจ้าของ เซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติพลาดโอกาสในการรักษาได้อย่างทันท่วงที ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งชีวิต และทรัพย์สิน

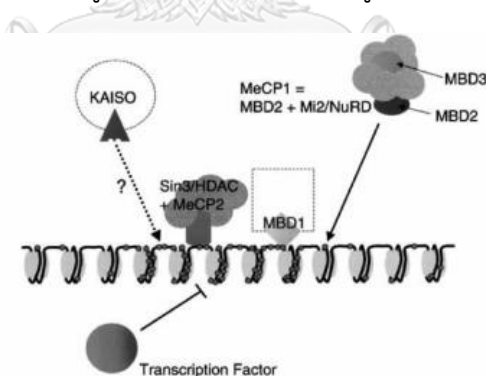


บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

สาเหตุหลักของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวี โดยโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีคือหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการทำให้การเกิดมะเร็งปากมดลูก งานวิจัยหลายฉบับ รายงานว่าโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 สามารถทำให้เกิดการเกิดเมทิลเลชันมากกว่าปกติ ในยีนต้านมะเร็ง เช่น สามารถจับกับเอนไซม์ DNMT1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเกิดเมทิลเลชันภายในเซลล์ให้ทำงานมากยิ่งขึ้น (Sen et. al., 2018) นอกจากนี้ โปรตีน E7 ที่จับกับเอนไซม์ DNMT1 สามารถจับร่วมกับโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณ โปรโมเตอร์ของ ยีน และกระตุ้นโปรตีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการถอดรหัสที่จำเพาะ ได้แก่ methyl-CpG-binding proteins เข้ามาจับ ขัดขวางโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์เพื่อไม่ให้เข้าไปจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ ซึ่งส่งผลต่อ โครงสร้างของสายโครมาติน โดย methyl-CpG-binding proteins ได้แก่ MBD1 MBD2 MBD3 MeCP2 และ KAISO จะกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครมาติน ได้แก่โปรตีน NuRD กลุ่มโปรตีน Sin3a และเอนไซม์ histone deacetylase (HDAC) ทำให้สายโครมาตินหดตัวแน่นและอยู่ในรูปของ heterochromatin และไม่สามารถเกิดการถอดรหัสของยีนได้ การแสดงออกของยีนจึงลดลง นำไปสู่การเป็นมะเร็งต่อไป ดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการยับยั้งการแสดงออกของยีน

(ฤทัยรัตน์ ศรีรักษา และ เต็มดวง ลี้มไพบูลย์, 2555)

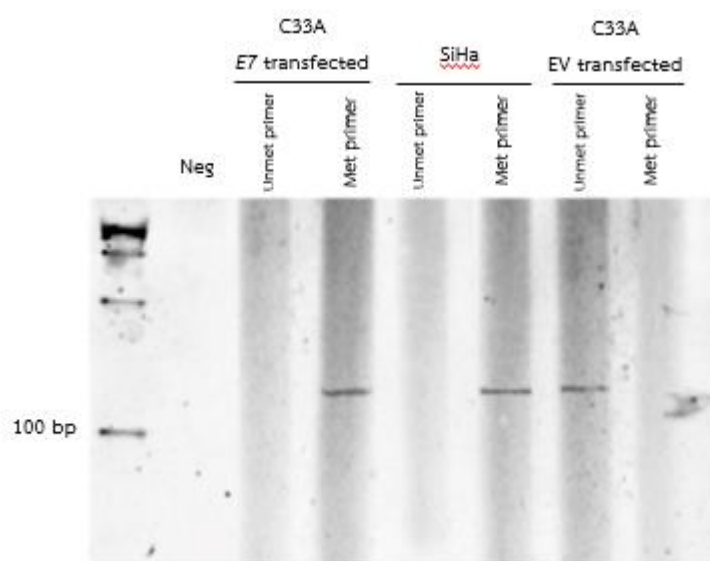
จากงานวิจัยข้างต้น นำมาสู่การหาอื่น ๆ โดยเฉพาะยีนในกลุ่มยีนต้านมะเร็งที่สามารถ ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์และลดการแสดงออกโดยโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวี สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ใน

การตรวจคัดกรองโรคมะเร็งปากมดลูกตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการให้มีความแม่นยำยิ่งขึ้นได้หรือไม่ งานวิจัยหลายฉบับพบว่ามีการนำการตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนมาใช้ในการคัดกรองตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกมากขึ้น เช่น ประเทศจีนและประเทศไต้หวัน พบว่าการคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *EPB41L3* และ *JAM3* สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกตั้งแต่ระยะ CIN2 เป็นต้นไป และให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับวิธี HPV testing (Kong et al., 2020) แต่หากเป็นการตรวจการเกิดเมทิลเลชันในหลายยีนร่วมกัน เช่น *PAX1/SOX1* จะทำให้การตรวจมีความจำเพาะเพิ่มขึ้น เป็นอีกวิธีที่ใช้ในการยืนยันผลอีกครั้งหลังจากการตรวจด้วยวิธีทางเซลล์วิทยา (Lai et al., 2014; Zhang et al., 2020) การตรวจเมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็ง *PAX1* มีประสิทธิภาพในการคัดกรองมะเร็งปากมดลูกที่ดีกว่าการตรวจทางเซลล์วิทยาหรือแปปสเมียร์ (Chang et al., 2021) สามารถคัดกรองและแยกความแตกต่างได้ตั้งแต่เซลล์ปากมดลูกที่ยังมีความผิดปกติเพียงเล็กน้อย ยีน *PAX1* จึงถูกใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดกรองและยืนยันผลการตรวจมะเร็งปากมดลูกควบคู่กับการตรวจด้วยวิธี HPV testing (Huang et al., 2010; Kan et al., 2014) นอกจากนี้ยังมียีนต้านมะเร็งที่มีการศึกษาในมะเร็งอื่นๆ เช่น ยีน *FAM135B* ยีน *RASSF1* ในมะเร็งศีรษะและลำคอ เป็นต้น (Bravo and Felez-Sanchez, 2015; Zhou et al., 2018)

นอกจากนี้ จากวิทยานิพนธ์และโครงการงานวิทยาศาสตร์ก่อนหน้าพบว่ามีการพบโปรตีนทรานสคริปชันที่เป็นตัวพาคอมเพล็กซ์ของโปรตีน E7 และเอนไซม์ DNMT1 เข้าสู่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* และชักนำให้เกิดเมทิลเลชัน ซึ่งโปรตีนทรานสคริปชันที่พบ คือ TFAP2A และ YY1 และได้ตรวจการจับตัวกันของโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวี โปรตีน TFAP2 และโปรตีน YY1 เพื่อหาพื้นที่เป็นไปได้ที่โปรตีนทั้งสามชนิดเข้าจับและชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศและเทคนิค Chromatin immunoprecipitation ซึ่งยีนที่มีความเป็นไปได้ ได้แก่ ยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* (วิชิต พลพงษ์, 2561; นันทน์ภัท วังคณิ, 2561) และยีน *ALDH3B1* ซึ่งจาก GEO database พบว่าในเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีการแสดงออกน้อยกว่าในเซลล์ปกติ (พลวัฒน์ มุงเมือง, 2559)

ยีน *ALDH3B1* ทำหน้าที่ลดความเป็นพิษที่เกิดจากสารกลุ่ม aldehyde ซึ่งเกิดจากเมแทบอลิซึมของแอลกอฮอล์ (Marchitti, 2010) และปกป้องเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากภาวะ peroxidation (Marchitti et al., 2007) อีกยีนมีความสัมพันธ์กับการสร้างฮอร์โมนอินซูลินบริเวณชั้นไขมันหุ้มหน้าท้องของหญิงตั้งครรภ์ (Mahesan et al., 2016) หรือบริเวณเซลล์ตับอ่อนของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ไทป์ 2 (Type 2 diabetes: T2D) โดยพบว่าในเซลล์ตับอ่อนของผู้ป่วยเบาหวานมีการเกิดเมทิลเลชันของยีน *ALDH3B1* ที่ลดลง ทำให้เปลี่ยนสารกลุ่ม acetaldehyde เป็น acetate ในกระบวนการ glycolysis ได้มากขึ้น (Volkmar et al., 2012)

ส่งผลให้ร่างกายผลิตน้ำตาลไปสะสมเพิ่มขึ้น แต่กลับยังไม่มีการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันของยีน *ALDH3B1* ในมะเร็งปากมดลูก จากการตรวจสอบเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* พบการเกิดเมทิลเลชันในเกือบทุกตัวอย่างของเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่พบเชื้อเอชพีวีด้วยการตรวจ HPV testing โดยมีร้อยละมากกว่ากลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติแต่พบเชื้อเอชพีวี ซึ่งขัดแย้งกับโครงการวิทยาศาสตร์ของพลวัฒน์ มุงเมือง ในปี 2559 ที่เมื่อทดสอบเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่มียีน *E7* ของเชื้อเอชพีวีจะเกิดเมทิลเลชันมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อเอชพีวี ดังรูปที่ 20

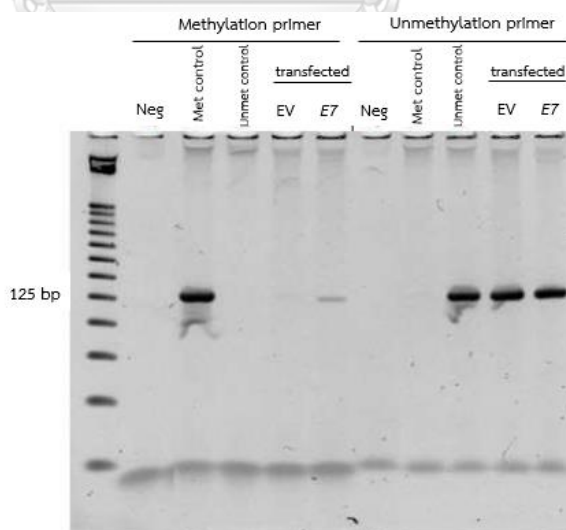


รูปที่ 20 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ในเซลล์สายพันธุ์ C33A

(พลวัฒน์ มุงเมือง, 2559)

เมื่อยืนยันผลด้วยค่าสถิติ จากตารางที่ 5 พบว่าจำนวนตัวอย่างที่เกิดเมทิลเลชันในเซลล์ปากมดลูกที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชพีวีมากกว่าเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อเอชพีวี อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดเมทิลเลชันระหว่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชพีวีกับเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อในตารางที่ 8 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงคาดว่าเชื้อเอชพีวีไม่มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ยีน *ALDH3B1* เนื่องจากยีน *ALDH3B1* มีการแสดงออกเกือบตลอดเวลาในสภาวะที่ร่างกายปกติ และพบมีการทำงานของโปรตีน *ALDH3B1* ในอวัยวะอื่น เช่น สมอง ไต ปอด โดยเฉพาะในตับซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในกระบวนการขับพิษออกจากร่างกายมากที่สุด การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันในยีนนี้หลังจากทดลองกับกลุ่มตัวอย่าง การเกิดเมทิลเลชันของยีน *ALDH3B1* ไม่ได้จำเพาะกับการเกิดมะเร็งปากมดลูก ถึงแม้จะมีการศึกษาพบว่ายีน *ALDH3B1* จะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดกรองมะเร็งปอดได้ (Sun et al., 2020)

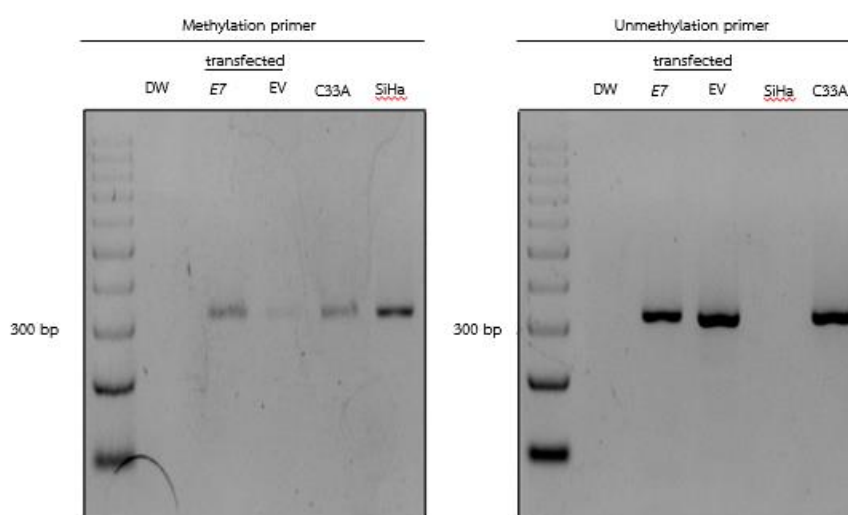
ยีน *ASAH2B* โดยปกติถอดรหัสได้เป็นโปรตีน ceramidases เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ เช่น กระบวนการเจริญเติบโต (cell proliferation) การพัฒนาให้มีความจำเพาะของเซลล์ (cell differentiation) การตายของเซลล์ (apoptosis) และกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ทำหน้าที่ย่อยสลาย ceramide เป็น sphingosine sphingosine ถูกย่อยสลายโดย sphingo kinase 2 (Sphk2) ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมสมดุลของการยับยั้งการเจริญเติบโต และการตายของเซลล์ร่วมกับยีน *p21* และยีน *p53* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (Sankala et al., 2007) อีกทั้งยังมี Sphk2 กรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีนที่มีอยู่ใน BH3 ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของ Pro-apoptotic ของตระกูล Bcl-2 เช่นเดียวกับโปรตีน BH3 ที่ชักนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ ดังนั้นหากมีการเกิดเมทิลเลชันเพิ่มขึ้นบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* จะทำให้ยีนถูกยับยั้งการแสดงออก ส่งผลให้โปรตีน ceramide และ sphingosine ลดลง และนำไปสู่การเกิดกระบวนการตายของเซลล์ผิดปกติที่น้อยลง ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติสามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นและพัฒนาไปเป็นมะเร็งในที่สุด ดังนั้น จำนวนตัวอย่างที่พบเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ยีน *ASAH2B* ควรจะมากขึ้นตามระดับความผิดปกติของเซลล์ แต่จากการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชัน พบว่ายีน *ASAH2B* มีร้อยละที่พบการเกิดเมทิลเลชันมากขึ้นในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงที่มีความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกตามลำดับ ยกเว้นในกลุ่มเซลล์มะเร็งที่พบว่าร้อยละของจำนวนผู้ป่วยที่มีจำนวนลดลง ซึ่งขัดแย้งกับโครงการงานวิทยาศาสตร์ของชีวิต พลพงษ์ในปี 2561 ที่ทดลองในเซลล์สายพันธุ์ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วย *E7* เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วย empty vector พบว่าเซลล์ HEK-293 ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วย *E7* ยีน *ASAH2B* เกิดเมทิลเลชันสูงกว่ายีน *ASAH2B* ในเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วย empty vector ดังรูปที่ 21



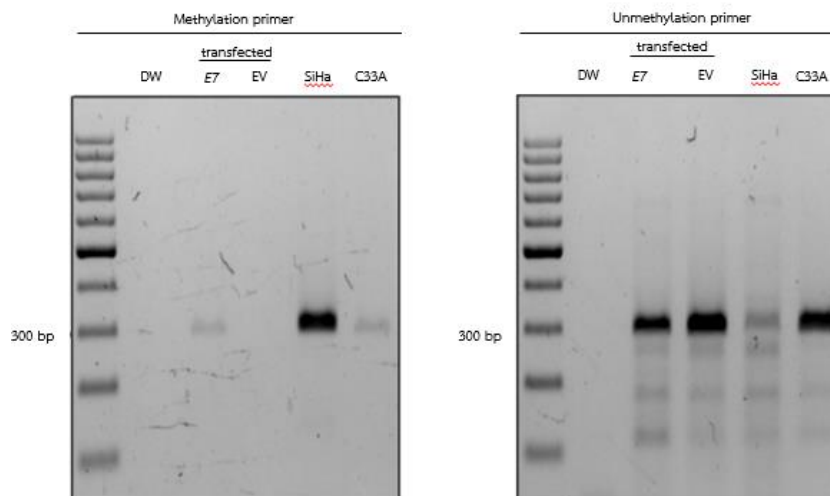
รูปที่ 21 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ในเซลล์สายพันธุ์ HEK293 (ชีวิต พลพงษ์, 2561)

เมื่อตรวจสอบยืนยันผลด้วยค่าสถิติในตัวอย่างแปรสเปียร์จากตารางที่ 4.3 การเกิดเมทิลเลชันมีมากขึ้นเมื่อเซลล์ปากมดลูกติดเชื้อเอชพีวี และพบความแตกต่างระหว่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชพีวีกับเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อเอชพีวีอย่างมีนัยสำคัญดังตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อเอชพีวีมีผลกระตุ้นการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ยีน *ASAH2B* ดังนั้นเมื่อระยะของโรคผิดปกติมากขึ้นจากการติดเชื้อเอชพีวี การเกิดเมทิลเลชันจึงมากขึ้นตาม

ยีน *FOXC1* จากวิทยานิพนธ์ของของนันทน์ภัส วงศ์มณีในปี 2561 ที่ได้ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์สายพันธุ์ พบว่ามีแถบแบนการเกิดเมทิลเลชันในยีน *FOXC1* ในสถานะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเกิดเมทิลเลชันทั้งในเซลล์ปกติสายพันธุ์ HEK293 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวีสายพันธุ์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของไวรัสเอชพีวีเข้าสู่เซลล์เข้มกว่าในสถานะที่ใช้ unmethylation primer ทั้งในเซลล์สายพันธุ์ HEK293 ดังรูปที่ 22 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 23 ตามลำดับ หมายความว่าเมื่อติดเชื้อเอชพีวี ยีน *E7* จะเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่เกิดเมทิลเลชันจึงควรที่มีจะมากขึ้นแปรผันตามความผิดปกติของเซลล์ กล่าวคือ ยิ่งเซลล์ปากมดลูกมีความผิดปกติ จำนวนตัวอย่างที่พบเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ยีน *FOXC1* ควรจะมากตามเนื่องจากยีน *FOXC1* ถูกยับยั้งการแสดงออก และควรมีจำนวนมากที่สุดในตัวอย่างที่เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก



รูปที่ 22 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1*
ในเซลล์สายพันธุ์ HEK293
(นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561)



รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1*
ในเซลล์สายพันธุ์ C33A
(นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561)

จากการตรวจสอบเมทิลเลชัน พบว่าในตัวอย่างที่เซลล์มีความผิดปกติเพิ่มขึ้น ทั้งตัวอย่างระยะก่อนมะเร็ง (LSIL และ HSIL) และตัวอย่าง ASC-US มีจำนวนตัวอย่างที่เกิดเมทิลเลชันมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติที่ไม่พบเชื้อเอชพีวี ยกเว้นกลุ่มเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีจำนวนตัวอย่างที่พบเมทิลเลชันน้อยกว่ากลุ่มตัวอย่างระยะก่อนมะเร็ง แต่เนื่องจากบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *FOXC1* เป็นบริเวณเอ็กซอน 1 ของยีน ซึ่งเป็นคนละบริเวณกับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ทดสอบการจับกันระหว่างทรานสคริปชันแฟคเตอร์ TFAP2A และ YY1 กับยีน *FOXC1* ด้วยเทคนิค CHIP-PCR ซึ่งเป็นบริเวณโปรโมเตอร์ในวิทยานิพนธ์ของนันทน์ภัส วงศ์มณี ในปี 2561 ดังรูปที่ 30 ในภาคผนวก ทำให้ความจำเพาะต่อการเกิดเมทิลเลชันของไพรเมอร์ยีน *FOXC1* ที่ออกแบบนั้นลดลง ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้มีจำนวนตัวอย่างที่เกิดเมทิลเลชันไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่วางไว้

การแสดงออกและบทบาทของยีน *FOXC1* ในมะเร็งชนิดอื่นๆ ไม่ได้อยู่ในฐานะของยีนต้านมะเร็ง แต่จากงานวิจัยหลายฉบับพบว่ายีน *FOXC1* มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เพื่อให้เอื้อต่อการแพร่กระจายของมะเร็ง เช่น ในมะเร็งตับ *FOXC1* จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อมีระดับโปรตีน *FOXC1* สูงขึ้น *FOXC1* เข้าไปจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน C-X-C motif chemokine receptor 1 (*CXCR1*) ส่งเสริมให้ยีน *CXCR1* แสดงออกมากขึ้น

นำไปสู่การกระตุ้นการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Huang et al., 2015) ในขณะที่มะเร็งเต้านมจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Ray et al., 2011) โดยมีงานวิจัยพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมระยะรุนแรงและอยู่ในระยะลุกลามจะพบการเกิดเมทิลเลชันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างมะเร็งเต้านมระยะต้น (Yang et al., 2017) สำหรับในมะเร็งปากมดลูก พบว่าการแสดงออกของยีน *FOXC1* มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของเซลล์ โดยจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่อยู่ในระยะรุนแรง เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *FOXC1* ในเซลล์สายพันธุ์ที่เป็นมะเร็งปากมดลูก พบว่าเซลล์เกิดการตายของเซลล์มากขึ้นและลดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Wang et al., 2018) หลังจากนั้นเมื่อตรวจสอบยืนยันผลด้วยค่าสถิติพบว่า การเกิดเมทิลเลชันมีมากขึ้นเมื่อเซลล์ปากมดลูกติดเชื้อเอชพีวีเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปากมดลูกปกติทั้งในตัวอย่างแปปสเมียร์ และตัวอย่าง ASC-US ดังตารางที่ 4 และ 9 ตามลำดับ พบความแตกต่างระหว่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชพีวีกับเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อเอชพีวีอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างแปปสเมียร์ ดังตารางที่ 6 เชื้อเอชพีวีมีผลกระตุ้นการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ยีน *FOXC1* ทำให้พบความแตกต่างระหว่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชพีวีกับเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อเอชพีวี แต่งานวิจัยบางฉบับที่ตรวจสอบในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมพบว่าให้ผลต่างกัน กล่าวคือพบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* มากขึ้น เพื่อยับยั้งการบุกรุกและแพร่กระจายของมะเร็งในระหว่างการรักษาด้วยเคมีบำบัด (Yang et al., 2017) แต่เนื่องจากชนิดของมะเร็งเต้านมมีลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกัน เช่น การมีอยู่ของ estrogen receptor (ER) ซึ่งพบในเซลล์มะเร็งเต้านมส่วนใหญ่ งานวิจัยที่ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่มี estrogen receptor จะพบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *FOXC1* มาก ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดต่ำลง เนื่องจากยีนถูกยับยั้งการแสดงออก ในขณะที่มะเร็งเต้านมที่ไม่มี estrogen receptor จะพบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *FOXC1* ที่น้อยกว่า ส่งผลให้การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น (Klajic et al., 2013) ทำให้คาดเดาได้ว่า โครงสร้างบางอย่างที่แตกต่างในตัวอย่างแต่ละระยะของเซลล์ปากมดลูกอาจมีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ได้

การที่เซลล์ปากมดลูกปกติแต่พบการติดเชื้อเอชพีวีมีการเกิดเมทิลเลชันน้อยกว่าเซลล์ที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (LSIL และ HSIL) อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าในอนาคต กลุ่มตัวอย่างที่เซลล์ปากมดลูกปกติแต่พบการติดเชื้อเอชพีวีเหล่านี้จะมีโอกาสเป็นมะเร็งปากมดลูกหรือไม่ จึงควรติดตามผลของกลุ่มตัวอย่างนี้ต่อไป สำหรับกลุ่มเซลล์ปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อเอชพีวี แต่พบการเกิดเมทิลเลชันสามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการเกิดเมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องถูกชักนำจากเชื้อเอชพีวี นอกจากนี้การเกิดเมทิลเลชันเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ไม่เฉพาะในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต้านมะเร็งที่ทำให้เกิด

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์มะเร็งเพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่ยังมีหน้าที่ในช่วงการพัฒนาให้มีความจำเพาะของเซลล์ให้ดำเนินไปตามปกติ อีกทั้งมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถอีกด้วย เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ตัวอย่างแปปสเมียร์ ซึ่งเป็นการตรวจทางเซลล์วิทยาและการตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยวิธี biopsy การตรวจด้วยวิธีแปปสเมียร์จะใช้อุปกรณ์ spatula เก็บเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณปากมดลูก ที่แม้จะมีความไวสูง แต่กลับให้ความจำเพาะต่ำ ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะเกิดผลลบลวง เนื่องจากการตัดกรองว่าตัวอย่างที่เก็บได้มานั้นผิดปกติหรือไม่ ขึ้นกับดุลพินิจและความเชี่ยวชาญของเจ้าหน้าที่ตรวจ คุณภาพของตัวอย่าง บริเวณที่เก็บตัวอย่าง เป็น ต้น (Chumworathayi and Srisupundit, 2012 ; Lazcano-Ponce et al., 1994) เนื่องจากเจ้าหน้าที่ตรวจมีโอกาสที่จะวินิจฉัยผิดพลาดหากความผิดปกติของเซลล์เนื้อเยื่อ มีเพียงเล็กน้อยหรือมีสิ่งรบกวนหรือสิ่งแปลกปลอมทำให้มองเห็นเซลล์ได้ไม่ชัดเจน จึงทำการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี biopsy เพื่อยืนยันผลทางพยาธิวิทยา โดยการตัดชิ้นเนื้อหรือใช้เครื่องมือชุดหรือตัดชิ้นเนื้อบริเวณปากมดลูกชั้น basal และ epithelium เพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปด้วยกล้องคอลโปสโคป เพื่อให้เห็นขนาด และตำแหน่งที่ผิดปกติ (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2547) แม้จะเป็นวิธีที่ลดความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัย ให้รอยแผลเล็ก แต่ชิ้นเนื้อที่เก็บก็ต้องมีขนาดใหญ่พอที่จะเห็นความผิดปกติได้ และต้องใช้แพทย์ผู้เชี่ยวชาญในการแปลผล

ผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งส่วนใหญ่มักเกิดความผิดปกติหรือแสดงอาการในระยะที่รุนแรงแล้ว หรือกลุ่มที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปากมดลูกมักแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน จึงข้ามการตรวจคัดกรองส่วนนี้และเข้าสู่กระบวนการรักษามะเร็งปากมดลูก มีส่วนน้อยที่เป็นกลุ่มที่ไม่พบความผิดปกติของปากมดลูก และเข้ารับการตรวจคัดกรองตั้งแต่อายุยังน้อย ดังนั้น การเข้ารับการตรวจเมื่อพบว่าอยู่ในช่วงอายุที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกอย่างสม่ำเสมอจึงเป็นสิ่งสำคัญ จากงานวิจัยการตรวจการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* แม้จะสามารถคัดกรองผู้ที่มีเซลล์ปากมดลูกที่ปกติและผิดปกติได้คร่าวๆ แต่ยังไม่สามารถบอกได้แน่นอนว่าการเกิดเมทิลเลชันของยีนทั้งสองจะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ดีในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากขนาดตัวอย่างประชากรในงานวิจัยในระยะก่อนเป็นมะเร็ง (LSIL และ HSIL) มีขนาดใหญ่กว่าขนาดประชากรที่เป็นมะเร็งปากมดลูกเป็นเกือบ 2 เท่า ดังนั้นโอกาสที่ประชากรตัวอย่างในงานวิจัยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกจะพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของทั้งยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* จึงมีน้อยกว่าตามไปด้วย อีกทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเกิดเมทิลเลชันจากการติดเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และไทม์ 18 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงเหมือนกัน นอกจากนี้โรคมะเร็งเป็นโรคเกิดจากพหุปัจจัย กล่าวคือสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ อาจมาจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่สถานะเหนือพันธุกรรมดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวีได้ เช่น การมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ไม่ว่าจะทั้งจากการใช้ยาหรือเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การมีคู่นอนหลายคน การสูบบุหรี่ มีประวัติบุคคลในครอบครัวที่เป็นโรค เป็นต้น การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเบื้องต้นนั้น หากพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* หรือยีน *FOXC1* เพียงแค่อินเดียหนึ่ง บุคคลนั้นย่อมมีแนวโน้มเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการที่บริเวณปากมดลูกจะพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้แล้ว แต่เนื่องจากประสิทธิภาพที่ไม่สูงมากนัก จึงมีโอกาที่จะพบผลบวกปลอม (false positive) ได้ ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกปกติ ขึ้นต่อไปหากต้องการตรวจยืนยันว่าการตรวจการเกิดเมทิลเลชันของยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ดีหรือไม่ จึงควรติดตามข้อมูลและนัดหมายกลุ่มประชากรที่อยู่ในกลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็งทั้ง LSIL และ HSIL ให้รับการตรวจติดตามผลอย่างสม่ำเสมอ หากประชากรกลุ่มดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง จะตรวจหาในยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* เพิ่มเติมว่ายังคงเกิดเมทิลเลชันในประชากรกลุ่มดังกล่าวอยู่หรือไม่ เนื่องจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกยังสามารถพบเมทิลเลชันได้ โดยเฉพาะยีน *ASAH2B* เนื่องจากมีร้อยละของตัวอย่างที่พบเมทิลเลชันในระยะก่อนมะเร็งทั้ง LSIL และ HSIL มาก

สรุปผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และยีน *FOXC1* เกิดเมทิลเลชันมากขึ้นในยีน *ASAH2B* และ *FOXC1* เมื่อเซลล์ปากมดลูกเริ่มเข้าสู่ระยะก่อนเป็นมะเร็งที่ปากมดลูกเริ่มเกิดความผิดปกติ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ยีน *ASAH2B* และยีน *FOXC1* อาจใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการคัดกรองเบื้องต้น แยกกลุ่มระหว่างผู้ที่ปกติและผู้ที่ปากมดลูกเริ่มมีความผิดปกติหรืออยู่ในระยะก่อนเป็นมะเร็งซึ่งยังไม่แสดงอาการได้ หากพบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *ASAH2B* หรือยีน *FOXC1* บุคคลนั้นมีแนวโน้มสูงที่จะเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปากมดลูกเปรียบเทียบกับบุคคลที่ไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนดังกล่าว จึงต้องมีการติดตามผลบุคคลกลุ่มนี้อย่างสม่ำเสมอ เพื่อที่จะตรวจพบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งตั้งแต่ระยะไม่รุนแรง อีกทั้งสามารถใช้วิธีนี้ตรวจควบคู่กับวิธีตรวจแบบอื่น เช่น HPV testing ที่พบเชื้อเอชพีวี เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจคัดกรองมากยิ่งขึ้น และควรต้องติดตามผลของกลุ่มผู้เข้าตรวจกลุ่มนี้ต่อไปเพื่อเฝ้าระวังและสามารถเข้ารับการรักษาและลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูก

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยครั้งถัดไปผู้วิจัยควรที่จะศึกษาและออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อการเกิดและไม่เกิดเมทิลเลชันของยีนที่ต้องการศึกษาให้ละเอียดก่อนทดลองเสมอ เนื่องจาก methylation primer บริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ควรประกอบด้วยเบสไซโตซีนที่อยู่ติดกับเบสกวานีน ในขณะที่ unmethylation primer บริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ควรประกอบด้วยเบสไทมีนที่อยู่

ติดกับเบสแก้วนีนซึ่งเกิดจากเบสไฮโดรซีนที่ติดกับเบสแก้วนีนและผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้ว เพื่อให้เกิดความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดและไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน อีกทั้งเมื่อออกแบบไพรมอร์ควรรจะครอบคลุมบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่สนใจและอยู่ในบริเวณเดียวกับงานวิทยานิพนธ์ที่ใช้อ้างอิง เพื่อให้เกิดความจำเพาะและผลการทดลองที่แม่นยำยิ่งขึ้น





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางเวชปฏิบัติการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกและการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของปากมดลูก. กรุงเทพมหานคร: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2547.
- จันทนา รักแผน. 2555. Epigenetics and myelodysplastic syndrome. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 22, 141-148.
- จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี. 2562. การระบุยีนที่สามารถจับกับโปรตีนอี 7 เอชพีวี ไทป์ 16 ที่เกี่ยวข้องกับ การเกิด โพรโมเตอร์เมทิลเลชันในเซลล์ไลน์ C33A. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชวิต พลพงษ์. 2561 . กลไกการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน ASAH2B จากการชักนำของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ที่มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งปากมดลูก. โครงการงานวิทยาศาสตร์ปริญญาโท วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฉันทิวา นาคแย้ม และจินตนาภรณ์ วัฒนธร. 2561. บทบาทของอีพีเจเนติกส์ต่อโรคหลอดเลือดสมอง. วารสารสมาคมประสาทวิทยาศาสตร์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 13, 1-6.
- นันทน์ภัส วงศ์มณี. 2561. การระบุโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับเอชพีวี ไทป์ 16 อี 7 และบทบาทในการเกิดมะเร็งปากมดลูก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พลวัฒน์ มุงเมือง. 2559. ความสัมพันธ์ระหว่างอองโคโปรตีน E7 ของฮิวแมนแพปพิลโลมาไวรัสชนิด 16 และการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ALDH3B1 ในมะเร็งปากมดลูก. โครงการงานวิทยาศาสตร์ปริญญาโท วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิงค์พร เพ็ชเจริญ. 2558. การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน 14-3-3 σ ในผู้ป่วยคนไทยด้วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ฤทัยรัตน์ ศรีรักษา และ เต็มดวง ลี้มไพบูลย์. 2555. การควบคุมเหนือพันธุกรรมในมะเร็งท่อน้ำดี. ศรินครินทร์เวชสาร. 27, 381-388.

- วียะดา ปัญจรัก. 2558. สรีรวิทยาของมะเร็ง: ทศนมิติมุมมองผ่านศตวรรษที่ 21. ศรีนครินทร์เวชสาร. 30(2), 175-183.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2561. แนวทางการตรวจคัดกรอง วินิจฉัย และรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก. กรุงเทพมหานคร: โฆษิตการพิมพ์.
- สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2550. การสำรวจการเข้าถึงสถานพยาบาลและรายจ่ายด้านสุขภาพของผู้ป่วยที่ตาย พ.ศ. 2548-2549. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานสถิติแห่งชาติ.
- สมชัย นิรุตติศาสตร์. 2533. มะเร็งของปากมดลูกระยะก่อนลุกลาม. จุฬาลงกรณ์เวชสาร. 34(5), 383-398.
- Arnold M. M., Dotun O., Eric K., Anthea B. M. P. and Y.-D. Ida Chen. 2016. Insulin Resistance in Pregnancy Is Correlated with Decreased Insulin Receptor Gene Expression in Omental Adipose: Insulin Sensitivity and Adipose Tissue Gene Expression in Normal Pregnancy. Journal of Diabetes Mellitus 6(1):
- Astudillo-de la Vega, H. Ruiz-Garcia, E., Lopez-Camarillo, C., de la Garza-Salazar, G., Menese-Garcia, A. and Benitez-Briebesca, L, “Malignant transforming mechanisms of human papillomavirus” in Cervical cancer, Garza-Salazar, G., Morales-Vásquez, F. (Cham, CH: Springer, 2017), pp. 35-43.
- Bravo, I.G. and Felez-Sanchez, M. 2015. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. Evolution, Medicine and Public Health. 1: 32–51.
- Borruto F. and Ridder M.D. 2012. HPV and Cervical Cancer: achievements in prevention and prospects. New York: Springer Science+Business Media.
- Burgers, W.A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T. and Fucks, F. 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. Oncogene. 26: 1650-1655.
- Chalertpet, K., Pakdeechaidan, W., Patel, V., Mutirangura, A. and Yanatatsaneejit, P. 2015. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. Cancer Science. 10: 1333-1340.

- Chang, C.L., Ho, S.C., Su, Y.F., Juan, Y.C., Huang, C.Y., Chao, A.S., Hsu, Z.S., Chang, C.F., Fwu, C.W. and Chang, T.C. 2021. DNA methylation marker for the triage of hrHPV positive women in cervical cancer screening: Real-world evidence in Taiwan. *Gynecologic Oncology*. 161(2): 429-435.
- Chujan, S., Kitkumthorn, N., Sirianguk, S. and Mutirangura, A. 2014. *CCNA1* promoter methylation: a potential marker for grading Papanicolaou smear cervical squamous intraepithelial lesions. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*. 15: 7971-7975.
- Chumworathayi, B. and Srisupundit, S. 2012. Cervical cancer prevention in Thailand: limitations and alternatives. *Bulletin of the Department of Medical Services*. 34: 131-141.
- Collins, S.I., Constandinou-Williams, C., Wen, K., Young, L.S., Roberts, S., Murray, P.G. and Woodman C.B. 2009. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Research*. 69: 3828–3832.
- Conway, M.J. and Meyers, C. 2009. Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal of Dental Research*. 88(4): 307-317.
- Dankai, W., Khunamornpong, S., Siraungkul, S., Soongkhaw, A., Janpanao, A., Utaipat, U., Kitkumthorn, N., Mutirangura, A., Srisomboon, J. and Lekawanvijit, S. 2019. Role of genomic DNA methylation in detection of cytologic and histologic abnormalities in high risk HPV-infected women. *Plos one*. 14: e0210289.
- Das, P., Thomas, A., Mahantshetty, U., Shrivastava, S.K., Deodhar, K. and Mulherkar, R. 2012. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. *Plos one*. 7: e41012.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. and Crawford, L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352: 824-827.

- Duesing, N., Schwarz, J., Choschzick, M., Jaenicke, F., Giesecking, F., Issa, R., Mahner, S., and Woelber, L. 2012. Assessment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with colposcopic biopsy and efficacy of loop electrosurgical excision procedure (LEEP). Archives of gynecology and obstetrics. 286(6): 1549–1554.
- Fague, G.B. 2015. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. International Journal of Cancer. 136: 2022–2036.
- Ganguly, N. and Parihar, S.P. 2009. Human papilloma virus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. Journal of Biosciences. 34: 113-123.
- Groves, I.J. and Coleman, N. 2018. Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next-generation sequencing studies taught us? Journal of Pathology. 245: 9–18.
- Gupta, S.K., Kizilbash, S.H., Carlson, B.L., Mladek, A.C., Boakye-Agyeman, F., Bakken, K.K., Pokorny, J.L., Schroeder, M.A., Decker, P.A., Cen, L., Eckel-Passow, J.E., Sarkar, G., Ballman, K.V., Reid, J.M., Jenkins, R.B., Verhaak, R.G., Sulman, E.P., Kitange, G.J. and Sarkaria, J.N. 2015. Delineation of *MGMT* hypermethylation as a biomarker for veliparib-mediated temozolomide-sensitizing therapy of glioblastoma. Journal of the National Cancer Institute. 108(5): <https://doi.org/10.1093/jnci/djv369>.
- Han, B., Bhowmick, N., Qu, Y., Chung, S., Giuliano, A.E. and Cui, X. 2017. *FOXC1*: an emerging marker and therapeutic target for cancer. Oncogene. 36: 3957-3963.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 144(5): 646-674.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B. 1996. 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. 93: 9821-9826.

- Huang, T.H., Lai, H.C., Liu, H.W., Lin, C.J., Wang, K.H., Ding, D.C. and Chu, T.Y. 2010. Quantitative analysis of methylation status of the *PAX1* gene for detection of cervical cancer. International Journal of Gynecological Cancer. 20(4): 513-519.
- Huang, W., Chen, Z., Zhang, L., Tian, D., Wang, D., Fan, D., Wu, K. and Xia, L. 2015. Interleukin-8 Induces expression of *FOXC1* to promote transactivation of *CXCR1* and *CCL2* in hepatocellular carcinoma cell lines and formation of metastases in mice. Gastroenterology. 149: 1053–1067.
- Kan, Y.Y., Liou, Y.L., Wang, H.J., Chen, C.Y., Sung, L.C., Chang, C.F. and Liao, C.I. 2014. *PAX1* methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening. International Journal of Gynecological Cancer. 24(5): 928-934.
- Klajic, J., Fleischer, T., Dejeux, E., Edvardsen, H., Warnberg, F., Bukholm, I., Lønning, P.E., Solvang H., Børresen-Dale, A.L., Tost, J. and Kristensen, V.N. 2013. Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. BMC Cancer. 13: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-456>.
- Koliopoulos, G., Arbyn, M., Hirsch, P.P., Kyrgiou, M., Prendiville, W. and Paraskevaidis, E. 2007. Diagnostic accuracy of Human papillomavirus testing in primary cervical screening: A systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. Gynecologic Oncology. 104: 232–246.
- Kong, L., Linhai W., Ziyun W., Xiaoping X., Yan Y., Huanwen W., Ming W., Pei L. and Lei, L. 2020. DNA methylation for cervical cancer screening: a training set in China. Clinical Epigenetics. 12(91): <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00885-7>.
- Lai, H.C., Ou, Y.C., Chen, T.C., Huang, H.J., Cheng, Y.M., Chen, C.H., Chu, T.Y., Hsu, S.T., Liu, C.B., Hung, Y.C., Wen, K.C., Yu, M.H. and Wang, K.L. 2014. *PAX1/SOX1* DNA methylation and cervical neoplasia detection: a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. Cancer Medicine. 3(4): 1062-1074.
- Lazcano-Ponce, E.C., de Ruiz, P.A., Lopez-Carrillo, L., Vazquez-Manriquez, M.E., and Hernandez-Avila, M. 1994. Quality control study on negative gynecological cytology in Mexico. Diagnostic cytopathology. 10(1): 10–14.

- Li, N., Franceschi, S., Howell, J.R. and Snijders, P.J. 2011. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. International Journal of Cancer. 128(4): 927-935.
- Li, H., Wu, X., and Cheng, X. 2016. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. Journal of gynecologic oncology. 27(4): <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e43>.
- Li, J., Zhang, J., Jin, L., Deng, H., and Wu, J. 2018. Silencing lnc-ASAH2B-2 inhibits breast cancer cell growth via the mTOR pathway. Anticancer research. 38(6): 3427-3434.
- Liang, T.J., Wang, H.X., Zheng, Y.Y., Cao, Y.Q., Wu, X., Zhou, X., and Dong, S.X. 2017. APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: a meta-analysis and literature review. Oncotarget. 8(28): 46468–46479.
- Lowy, D.R. and Schiller, J.T. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. Journal of Clinical Investigation. 116(5): 116-1173.
- Mahesan, A.M., Ogunyemi, D., Kim, E., Paul, A.B.M and Chen, Y.I. 2016. Insulin resistance in pregnancy is correlated with decreased insulin receptor gene expression in omental adipose: Insulin sensitivity and adipose tissue gene expression in normal pregnancy. Journal of Diabetes Mellitus 6(1): 100-111.
- Maniatis T. and Sambrook J. 2001. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol. In J. Argentine (ed.), *Molecular cloning: A laboratory manual*, pp.549-556. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marchitti, S.A., Orlicky, D.J. and Vasiliou V. 2007. Expression and initial characterization of human *ALDH3B1*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 356: 792–798.

- Marchitti, S. A., Orlicky, D. J., Brocker, C., and Vasiliou, V. 2010. Aldehyde dehydrogenase 3B1 (ALDH3B1): immunohistochemical tissue distribution and cellular-specific localization in normal and cancerous human tissues. The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society. 58(9), 765–783.
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Orlicky, D.J., and Vasiliou, V. 2010. Molecular characterization, expression analysis, and role of ALDH3B1 in the cellular protection against oxidative stress. Free radical biology & medicine. 49(9): 1432–1443.
- Mishra, G.A., Pimple, S.A. and Shastri, S.S. 2011. An overview of prevention and early detection of cervical cancers. Indian journal of medical and paediatric oncology. official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology. 32(3): 125–132.
- Moore, L., Le, T. and Fan, G. 2013. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology. 38: 23–38.
- Nathan, S., 2015. New HPV shot fend off more types of the virus. [Online]. Available from: <https://www.sciencenews.org/article/new-hpv-shot-fends-more-typesvirus>. [2018, August 20]
- National Cancer Institute of Thailand. 2015. Cancer in Thailand Vol.VII, 2010-2012. Bangkok: New Thammada Press (Thailand) Co., Ltd.
- National Cancer Institute of Thailand. 2018. Cancer in Thailand Vol.IX, 2013-2015. Bangkok: New Thammada Press (Thailand) Co., Ltd.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell. 99(3): 247–257.
- Palefsky, J. M. 2010. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. Journal of Adolescent Health. 46(4 Suppl): S12–S19.

- Prétet, J.L., Charlot, J.F. and Mougin, C. 2007. Virological and carcinogenic aspects of HPV. Bulletin de l'Académie nationale de médecine. 191: 611-623.
- Ray, P.S., Bagaria S.P., Wang, J., Shamonki, J.M., Ye, X., Sim, M.S., Steen, S., Qu, Y., Cui, X. and Giuliano, A.E. 2011. Basal-like breast cancer defined by *FOXC1* expression offers superior prognostic value: a retrospective immunohistochemical study. Annals of Surgical Oncology. 18: 3839–3847.
- Raybould, R., Alison, F. and Sam, H. 2011. Human papillomavirus integration and its role in cervical malignant progression. The Open Clinical Cancer Journal. 5: 1-7.
- Sankala, H. M., Hait, N. C., Paugh, S. W, Shida, A., Lépine, S., Elmore, L.W., Dent P., Milstien, S., and Spiegel, S. 2007. Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent Induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. Cancer Research. 67(21): 10466-10474.
- Sen, P., Ganguly, P. and Ganguly N. 2018. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. Oncology Letters. 15: 11-22.
- Senba M. and Mori Ni. 2012. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. Oncology Reviews. 6: 135-144.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal A. 2019. Cancer statistics, 2019. A Cancer Journal for Clinicians. 69: 7-34
- Sizemore, G. M., Sizemore, S. T., Pal, B., Booth, C. N., Seachrist, D. D., Fadi W. Karim, A., Kume, T., and Keri, R. A. 2013. *FOXC1* is enriched in the mammary luminal progenitor population, but is not necessary for mouse mammary ductal morphogenesis1. Biology of Reproduction. 89(1): 1–10.
- Stern, P.L. and Einstein, M.H., “The immunobiology of human papillomavirus associated oncogenesis” in HPV and cervical cancer, Borruto, F. and Ridder, D.M. (New York, NY: Springer, 2012), pp. 46-50.

- Steven, T.S. and Keri R.A. 2012. The forkhead box transcription factor *FOXC1* promotes breast cancer invasion by inducing matrix metalloprotease 7(*MMP7*) expression. Journal of Biological Chemistry. 287: 24631-24640.
- Strauss, W. M. 1998. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. Current Protocol in Molecular Biology. 42(1): 2.2.1-2.2.3
- Sun, H., Zhang, M., Li, L., and Huang, Z. 2020. *ALDH3B1* is an independent prognostic biomarker of lung adenocarcinoma. Technology in cancer research & treatment. 19: <https://doi.org/10.1177/1533033820946018>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. 2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 71(3): 209–249.
- Trevethan, R., 2017. Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, plabilities, and pitfalls in research and practice. Frontiers in Public Health. 5: 10.3389/fpubh.2017.00307.
- Villegas-Hinojosa, E., Terán-Figueroa, Y., Gallegos-García, V., Gaytán-Hernández, D., Gutiérrez-Enríquez, S. O., Campuzano-Barajas, A.E. and Alcántara-Quintana, L. E. 2020. Histopathological diagnosis of cervical biopsies: reduction of sampling errors with the evaluation of a third histologic level. Cancer Management and Research. 12: 5100-5104.
- Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D. A., Ndlovu, M. N., Defrance, M., Deplus, R., Calonne, E., Volkmar, U., Igoillo-Esteve, M., Naamane, N., Del Guerra, S., Masini, M., Bugliani, M., Marchetti, P., Cnop, M., Eizirik, D. L. and Fuks, F. 2012. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. The EMBO journal 31(6): 1405–1426.
- World Health Organization (WHO). 2014. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. Geneva, Switzerland: WHO Press.

- Wang, L., Chai, L., Ji, Q., Cheng, R., Wang, J. and Han, S. 2018. Forkhead box protein C1 promotes cell proliferation and invasion in human cervical cancer. Molecular Medicine Reports. 17(3): 4392-4398.
- Yanatatsaneejit, P., Mutirangura, A. and Kitkumthorn N. 2011. Human Papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation in cervical cancer. International Journal of Gynecological Cancer. 21(5): 902-906.
- Yang, Z., Jiang S., Cheng, Y., Li, T., Wei, H., Ma, Z., Chen, F. and Yang, Y. 2017. *FOXC1* in cancer development and therapy: deciphering its emerging and divergent roles. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 9(12): 797-816.
- Yim, E.K. and Park, J.S. 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. Cancer Research and Treatment. 37: 319-324.
- Zhang, Y., Bailey, V., Puleo, C.M., Easwaran, H., Griffiths, E., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Wang, T.H. 2009. DNA methylation analysis on a droplet-in-oil PCR array. Lab on a chip. 9(8): 1059–1064.
- Zhang, L., Yu, J., Huang, W., Zhang, H., Xu, J. and Cai, H. 2020. A sensitive and simplified classifier of cervical lesions based on a methylation-specific PCR Assay: A chinese cohort study. Cancer Management and Research. 12: 2567–2576.
- Zhou, C., Ye, M., Ni, S., Li, Q., Ye, D., Li, J., Shen, Z., and Deng, H. 2018. DNA methylation biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. Epigenetics. 13(4): 398–409.
- Zhu, L., Li, X., Yuan, Y., Dong, C. and Yang, M. 2021. *APC* promoter methylation in gastrointestinal cancer. Frontiers in oncology. 11; <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.653222>.

ภาคผนวก



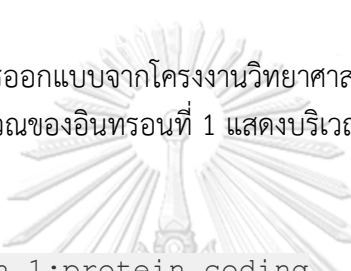
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเกิดเมทิลเลชัน (methylation primer) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการไม่เกิดเมทิลเลชัน (unmethylation primer) โดยอ้างอิงจากวิทยานิพนธ์และโครงการงานวิทยาศาสตร์ก่อนหน้า (พลวัฒน์ มุงเมือง, 2559; นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2561; จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี, 2562; ชวิศ พลพงษ์, 2562) ทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ยีน *ALDH3B1* *ASAH2B* และ *FOXC1* เพื่อตรวจสอบรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทั้งสาม โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ยีน *ALDH3B1*

ไพรเมอร์คู่นี้ได้รับการออกแบบจากโครงการงานวิทยาศาสตร์ของพลวัฒน์ มุงเมืองในปี 2559 ซึ่งคูไพรเมอร์นี้จะครอบคลุมบริเวณของอินทรอนที่ 1 แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยแถบไฮไลต์สีเทาดังรูปที่ 24



```
>ALDH3B1-204 intron 1:protein_coding
GTAGGCAGGGAGCTGGCGGGTGGGGGGGGCCATGATGAGCACCTCCCAGGTGCCACGTTG
GCCAGAGGCCCGGGGCCGGGAGCTACGGAGGCCAGGGCACCAGGGAGATGGTAGCAG
CGGCAGGCCAGGAAGGGGCATAGAGGAGGCTCTTCCTCCACACCTGTCACCCTGTCCCC
TGCTGTCCACACCCACAGCAGCTTGCACATCATCCCCACAGCACGCTGGCTCTGACAGG
TGTATCCGGGGCGGGCTGGGGGCAGGCAGGGACAGGCTTAGGCACAGCTGCCTGTGCCGA
ACTTGAGGAAGATCGGGACTACAGGAACCACCAAGGCGACACGTGGCATCATGACCACGG
TCCTAAGCAGAGAGGCAGGCACTCCTCCTGGGAGGCAGAGGGGACATCCGAAACGGGTGC
AGCCCCAGCTCTGGAGCAAGAAGCTCTGCCACACACACGCCCCATGTTTCACATCCCACCC
CCTCCTGCCCCACTTCCTCGTTTGTAAAATGTTAGATCTGCAGAAAGACAGGCTCTAT
GAATGGGGCGGCCCATGGGGTGGTGTGGAGAACACGGAAGCACAGGGCGCTGGGAGAGG
AGCAGGCATGAGGTATGGTCCCTAAGATGGTATTTCTAGACTCCAGCCACCTTTGGGTCT
GACCTCTTTGTTTTGCAGAAGGGGAAACTGAGTCTTGGGTAGGGTGTAGCAAGACAAGCC
ACAGACAAAACACCTCAGACACTGGATTAAAGAAGGAAGAGGTTTATTTCAGCTGGGAGCA
TCAGCAGACTTGCGTCAAGAGCCGAGCTCCCTGAAAAAGACATTCCTTGGCCTTTTAAAG
GCTTACAACCTTAAAGGGTCCACGTGAAAGGGTTCGTGATAAATCGAGCAAGCTCGGGGAA
CGTGACCGGGGGCTGCATGCGTCAGCTAACAGAACAGAAAGTTTTGCAGTGCTTTCTCAT
ACAAATGTCTGGAATTTACAGATAACACAAGTAGTTTAGGTCAGGGGTTGATATTATTATC
ACTTTTTTTTTAACTACCAGGGCCAGGTGGTGGCGCCAAGGTCCTTCTGGCTATTTCTCTTA
CTTCTGTTTTTTTTCTAACTTTTTGCCTTCTCTCTTTCCTCCTGTCTTGTAACCAGGCAA
GGTGGTAGGAGGAGGGCAGCAGGAGTAGTAGTGGTCTTATTCCTTAGGGGAGGCATTGAG
GGAAGGCTGGGAGTGGGGGGTCGAGACTTCCTTGCTATTCTGGGCCATAACATTCACAT
```

รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP

เมื่อเลือกบริเวณที่ต้องการแล้วจึงทำการออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ALDH3B1* แบ่งออกเป็น

Unmethylation primer ที่จำเพาะต่อยีน *ALDH3B1*

เลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์เปลี่ยนเบสไซโทซีนทุกตัวในบริเวณนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นเบสไทมีน และออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ ซึ่งสามารถออกแบบได้เป็น 5' GTGTTAAGAGTTGAGTTTTTTGAAAA 3' สำหรับไพรเมอร์ Forward มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 26 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 27 และมี annealing temperature 50°C ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ Reverse คือ 5' CATACAACCCCAATCACAT 3' มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 19 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 47 และมี annealing temperature 48.9°C โดยแสดงบริเวณของคู่ไพรเมอร์ด้วยการขีดเส้นใต้ ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 128 bp ดังรูปที่ 25

AGATTTGTGTTAAGAGTTGAGTTTTTTGAAAAAGATATTTTTGGTTTTTTTAAAGGTTTA
TAATTTTTAAGGGTTTTATGTGAAAGGGTTGTGATAAATTGAGTAAGTTTGGGGAATGTGA
TTGGGGTTGTATGTGTTAGTTAATAGAAATAGAAAGTTTTGTAGTGTTTTTTATATAAT

รูปที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการไม่เกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

Methylation primer ที่จำเพาะต่อยีน *ALDH3B1*

คัดเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันและเปลี่ยนเบสเฉพาะเบสไซโทซีนที่ไม่ได้เรียงตัวอยู่กับเบสกวีนีนในบริเวณนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นเบสไทมีน ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ ซึ่งสามารถออกแบบได้เป็น 5' GCGTTAAGAGTCGAGTTTTTTGAAAA 3' สำหรับไพรเมอร์ Forward มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 26 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 35 และมี annealing temperature 53°C ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ Reverse คือ 5' CATACAACCCCGATCACGT 3' มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 20 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 55 และมี annealing temperature 53°C โดยแสดงบริเวณของคู่ไพรเมอร์ด้วยการขีดเส้นใต้ ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 128 bp ดังรูปที่ 26

AGATTTGCGTTAAGAGTCGAGTTTTTTGAAAAAGATATTTTTGGTTTTTTTAAAGGTTTA
TAATTTTTAAGGGTTTTACGTGAAAGGGTCGTGATAAATCGAGTAAGTTTCGGGGAACGTGA
TTCGGGGTTGTATGCGTTAGTTAATAGAAATAGAAAGTTTTGTAGTGTTTTTTATATAAT

รูปที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *ALDH3B1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

ยีน *ASAH2B*

ไพรเมอร์คู่นี้ได้รับการออกแบบจากงานโครงการวิทยาศาสตร์ของชีวิต พลพวงษ์ในปี 2562 โดยจะอยู่ในบริเวณเอ็กซอนที่ 1 ของยีน แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยแถบไฮไลต์สีเทา ซึ่งอยู่ถัดจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการจับกันระหว่างโปรตีน E7, TFAP2A, YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* จากเทคนิค CHIP-PCR ด้วยแถบไฮไลต์สีฟ้า ดังรูปที่ 27

>ENST00000374007.5 ENSG00000204147:ENST00000374007.5

TAATTTTCTTCCTTTCTTTTTTTTCTCCTGCGAGACGGTGGGCGGGGGTATCTCCCTAAGTT
 GCCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGGGCTCAAGCGATCCTCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGG
 GCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCGCTTCTGCCAAAAGAGGGCTTTAGGGCACCCCCA
 GAACCTGAGATCTCCCTCATCTGTCTCTTTAAAGAGAAGGAAGTCGACTCCAGTCGAG
 CCATAGTCCATTTGTCCCAGGACCGGTGACTCCGGGGTGGCCAGGACCAAATGTGTCTCC
 TTCTGGCTTTTGCACCGCACCAACTAATCCGCGGCAGGCCGCACAGCTGCCCTGGCCTTC
 GCGGAGGACTAAGGCGAGGGCGGTGTACGCTGCTCCGGAGTCCCACCGCGGGAGTTGAGG
 CAGCGGATTCCGAGGGCAGGGTGGGGCGGAAATCGGGAGGGATGCGGACCCGGTGGAAACGC
 ACTGCGCAGACGGCGCCGGCGCCCGCACACAGCTGTTGACTAGTCTTCCAGCTCTCCCT
 GGAAGTCGTCCAGGCGCCGGTCTCTTTTTTCTGCCTTTTTGTTTCCCTCCCCGCGAGTCG
 GC GCGACGGTGAATTTCCGTTTCCGGCGGTGTGGAAGCGGACCTGAGGAGTCGCAATTGT

รูปที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP และเทคนิค CHIP-PCR ที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

เมื่อเลือกบริเวณที่ต้องการแล้วจึงทำการออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ASAH2B* แบ่งออกเป็น

Unmethylation primer ที่จำเพาะต่อยีน *ASAH2B*

เลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์เปลี่ยนเบสไซโทซีนทุกตัวในบริเวณนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นเบสไทมีน และออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ซึ่งสามารถออกแบบได้เป็น 5' TGGGTATGGTGATTTTGGGGTG 3' สำหรับไพรเมอร์ Forward มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 22 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 50 และมี annealing temperature 54.8°C ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ Reverse คือ 5' CACCCTCACCTTAATCCTCCA 3' มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 21 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 52 และมี annealing temperature 54.4°C โดยแสดงบริเวณของคู่ไพรเมอร์ด้วยการขีดเส้นใต้ ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 125 bp ดังรูปที่ 28

TTATAGTTTATTTGTTTTGGGTATGGTGATTTTGGGGTGGTTAGGATTAATGTGTTTTT
TTTTGGTTTTTGTATTGTATTAATTAATTTGTGGTAGGTTGTATAGTTGTTTTGGTTTTT
GTGGAGGATTAAGGTGAGGGTGGTGTATGTTGTTTTGGAGTTTTATTGTGGGAGTTGAGG
TA

รูปที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการไม่เกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

Methylation primer ที่จำเพาะต่อยีน *ASAH2B*

คัดเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันกับ unmethylation pprimer และเปลี่ยนเบสเฉพาะเบสไซโทซีนที่ไม่ได้เรียงตัวอยู่กับเบสกวานีนในบริเวณนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นเบสไทมีน ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ ซึ่งสามารถออกแบบได้เป็น 5' CGGGTACGGTGATTCGGGGTG 3' สำหรับไพรเมอร์ Forward มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 22 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 64 และมี annealing temperature 60.4 °C ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ Reverse คือ 5' CGCCCTCGCCTTAATCCTCCG 3' มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 21 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 67 และมี annealing temperature 60.2 °C โดยแสดงบริเวณของคู่ไพรเมอร์ด้วยการขีดเส้นใต้ ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 125 bp ดังรูปที่ 29

TTATAGTTTATTTGTTTTCGGGTACGGTGATTTTCGGGGTGGTTAGGATTAATGTGTTTTT
TTTTGGTTTTTGTATCGTATTAATTAATTCGCGGTAGGTCGTATAGTTGTTTTGGTTTTT
GCGGAGGATTAAGGCGAGGGCGGTGTACGTTGTTTTCGGAGTTTTATCGCGGGAGTTGAGG
TA

รูปที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการจับกันระหว่างโปรตีน E7, TFAP2A, YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีน *ASAH2B* จากเทคนิค CHIP-PCR ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับไพรเมอร์ Forward เป็น 5' ATCCTCCCGCCTCAG CCTCC 3' มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 20 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 64 และมี annealing temperature 60 °C และไพรเมอร์ Reverse คือ 5' GCTCGACTGGG AGTCGACTTCC 3' มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 22 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น และมี annealing temperature 60 °C ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 147 bp โดยบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ Reverse มีการคาบเกี่ยวบริเวณเบสไซโทซีน ของบริเวณที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันจำนวน 1 เบสจากรูปที่ 28

ยีน *FOXC1*

ไพรเมอร์คู่นี้ได้ดัดแปลงโดยอ้างอิงจากวิทยานิพนธ์ของนันท์นภัส วงศ์มณี ในปี 2561 โดยคู่ไพรเมอร์ในวิทยานิพนธ์ที่ใช้อ้างอิงจะอยู่ในบริเวณโปรโมเตอร์ แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยแถบไฮไลต์สีเขียว กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการจับกันระหว่างโปรตีน E7, TFAP2A, YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* จากเทคนิค CHIP-PCR ด้วยแถบไฮไลต์สีฟ้า รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอน 1 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่ออกแบบใหม่ในงานวิจัยฉบับนี้ด้วยแถบไฮไลต์สีเทา ดังรูปที่ 30



>6 dna:chromosome chromosome:GRCh38:6:1607415:1614497:1

AAGAAAAGTGCTTGAAATACAATCAAGCCGCTTACTGGAGGCTTGCTTCCGAGTAAGTTT
 ATAAAACACAAATGCAAATATCTTTTCTGGCGAATATCCAGAGCTAAACCAGTGGAAG
 TTGATCTTGATAAACTACGTCCCTCCATTTTTTCTCGCACGCCAGACACTAATTTTACA
 ACGGCGACTTTTATACCCAAAACGGAGAGCTGAGAACACCGCTGCAGGTCGATTTGCAAT
 TTACATAACAAGCTGTTTACACTTCACTGGGCCGATGGAGGGAGGAGGCAGGGAAGAGCA
 GGAGGCGACAGGCTGGTGGGGGAGGGGCGAGCGGGGCACCATTCCTGTTGCAAACTCG
 GGGCCGAAGGCGTTTCCCGCATTCGGAAAACAAAGCATCCGTAATCGCTGCGTTCATCTC
 CGCGCACCGCTAGCAGTGTAAGGAGCAGCTTCAAGACCGAACTCACCCTTGCAGGTTG
 TTCAGGGAGACCACTTAAATCTCCTCCAGGCTGAAGCCACAGCACTCCTTAAAGCCTCGA
 CCAGGCGGGCTGATAAGACCTTCAAGGCTGCCGGGCTGGGGCTGAACAGGAATTAAGTGT
 TCAGGCTCCTGGGGCTTACCACCACCCTCGCCCTGTCTAGTGTCTTGGCAACCAGCAA
 GTGCTGAGCCTCCTGTTGGTGTCTTCCAACCCACCAGTGACTTGGCCGCAAACCACCT
 GGAAAAGGAGTCTCCAGAGACCCCGGCGCACAGCAGGCCAGGAGGCAGCTGCCCGGGAT
 TCAGAGCAACCTCGGGGCAACCCCTCCCTCCTCCAAAGGCTAATTCTAGAAGAGGCAGGTC
 CTCTTTCTTCGATGTCAATGTCCATTATGAAACAGTAATTTTTTAAATATTCAGGTGACA
 CGGAGATGCGCCTGCTACACGTCAAGCTCCTTACATGTAACAGCCGAAGCTGCAATTTG
 AATTTTCTGCAACGTGAGGAAGCCGGGATTCGAACCGGGGAGACAAAAGGGTCCCGA
 ACATGTCTTGGATTTAATAGATGGTCGGAAATCAGGGGCGAGCGGAGCTGTTAAATGCGT
 CACGCACGCTTCTTCGAGTCTCCTGAGCTCGCCACTTCCCCAGCTTCTAGTGAACGAC
 TTGGGATTGAGCCTCCGGGAGGGTCTCTCCTCAAGTCGCTAAAAATGCAGAATCGCCGTGC
 CGGGGGAGGGAGGCTGGCTCTTCCCGCTCCTTCGTTTCTTCCCTCATTTCTCTTCTT
 CCTGTCCCATCCACCACCCAGCAGCGCGGAATCTCA **GGCGTGTGCACAACGAGCGGGG**
GCCCTTCCGTGCGTGTCCCGGAGAAATCCTTGAACCGCCCTAGGTGCGACCCTGGACG
TTCCCCCAGACACACCCGTTGTCTCTGCGAGCCGGCAGCCCGCGCATGTGGAGATGGAG
ACTGGCCTGGGAAGCGTTAAGCTCTTAGACATATTTATTTGCTTCTTGTTCATCACACCT
GCTAATGTACCCGAGCCCGCAGCCTGACCCCTCATCTGAGCCGAAACGGGGCTGACGGGA
TCAGAGGGGGCGGGCGGGCGAGCCGGTGGGACCCTCGCGGGCGGGCAGGGGAGCGCG
 GGGCAGCAGCCGGGCTCCGGCAGCCCTCGCCGCCCGCACCCTCAGGCCGCAAGGGCCGG
 CCCCCGGGGAGGGGGGCGAGAAGCAGGGCGGCCCGCAGCGGGGCGGGCTCATCTTCGC
 GGGTGAACGGCCGTGCGAAACTCCAGCAGGGCCCCGACCCCTTGCTTTCATTTTCGGCT
 GGGGAGGGGTGATGGAGGGGGGCGAGATGGGCGACGAACCTTCTTCCCACCGCGAGCAG
 GGCCTGGCTGTGACCGAGCCCTCAAATCATGTCTTGTAGCCGAGTTCAGGACAGGAG
 AACCTCCAAGTGGAGAAAAGCCGGAGACGTCAAGTACCCGAGTGAGACTGGCGTTGGAGA
 AGGGAGGGAAGGGGCTGCGGGAGGGGAGAGGCGGGCGGGGAGGAGGCTGGGGCAACCC
 AGCGCTGGCGTGGCGGGGCTGGCGAAGGAATGAGAGCGAGCCAGCACGAGGCGGGGCGG
 AGACGCCAGGGCCACTCGGGAGCCGTGGGCGAAGGAAGGGTCTGCACGGGGTCCCAGGAG
 GACCCAGGAAGTCTGCGGAACGGCGGGGCTGGGTCCGGAGGGCCCCGGGTGGGAGGTC
 GCCGGGCGCCGGCGGCGAGGAGGCTGCGGGGGCGAACCAGCGGGGCGGGGCGGCGC
 CGGCGCGGGCGAGGGCCGGGGCCCGGGCCAGGGCGGCCGGCGCGCTGTGGTCAGCCCC
 GCGGTCTCCGGCCTCCGGGAGCGGGCCGGCAGGGCTCGGCTCCGGCTCATTCGGAGGC
 GGTCTCACCTCCCATTGGCTGCCGCCGCTGGCGGGGCGGGGCTCCGCTGCCCGAAAAA
 AGTGTAAGTGCATAAAAAAGTCTCGCCTGGGTGACGGATGCTCAAAAAGTTCAGAAGTTT
 TCCCAATGCTTCCCTAAGCGGCTGGCGCGGAGAGACCAGAAAAAGGTGACGCGGGGCC
 GGGCAGGCGGGCGGCGCGGGCCCCCCCCCCCCCGCCCTGGTTATTTGGCCGCTTCGC
 CGGCAGCTCAGGGCAGAGTCTCCTGGAAGGCGCAGGCAGTGTGGCGAGAAGGGCGCTGC
 TTGTTCTTTCTTTTGTCTGCTTTCCCCGTTTGCCTGGAAAGCTGCGCCGCGAGTTCC
 TGCAAGGCGG

รูปที่ 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณพรอมอเตอร์ของยีน *FOXC1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบ การเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP และจากวิทยานิพนธ์อ้างอิงและเทคนิค ChIP-PCR ที่ แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไปรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

เมื่อเลือกบริเวณที่ต้องการแล้วจึงทำการออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FOXC1* แบ่งออกเป็น

Unmethylation primer ที่จำเพาะต่อยีน *FOXC1*

เลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์เปลี่ยนเบสไซโทซีนทุกตัวในบริเวณนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นเบสไทมีน และออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ แต่เนื่องจากการออกแบบคู่ไพรเมอร์ของนันทน์ภัส วงศ์มณี นั้นมีขนาด pcr product ขนาดใหญ่จากเดิมคือ 302 bp จึงได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์นี้ใหม่เพื่อให้สามารถตรวจสอบไปพร้อมกับคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับการเกิดเมทิลเลชันได้ ซึ่งสามารถออกแบบได้เป็น 5' GGTGTGTGAGAGATTGAGAAAAGGT 3' สำหรับไพรเมอร์ Forward ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 25 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 44 และมี annealing temperature 56°C ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ Reverse คือ 5' CACCACACTACC TACACCTTC C 3' ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 25 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 55 และมี annealing temperature 56.7°C โดยแสดงบริเวณของคู่ไพรเมอร์ด้วยการขีดเส้นใต้ ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 143 bp ดังรูปที่ 31

GT T T A A A A G T T T A G A A G T T T T T T T A A T G T T T T T T A A G T G G T T G G T G T G T G A G A G A T T G A
G A A A A G G T G A T G T G G G G T T T G G G T A G G T G G T T G G T G T G T G G T T T T T T T T T T T T T T G T T T T
G G T T A T T T G G T T G T T T T T G T T G G T A G T T T A G G G T A G A G T T T T T T G G A A G G T G T A G G T A G T
G T G G T G G A G T T T T T G T A A G G T G G

รูปที่ 31 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ reverse ด้วยการขีดเส้นใต้

Methylation primer ที่จำเพาะต่อยีน *FOXC1*

คัดเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันและเปลี่ยนเบสเฉพาะเบสไซโทซีนที่ไม่ได้เรียงตัวอยู่กับเบสกวีนีนในบริเวณนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นเบสไทมีน เนื่องจากการออกแบบคู่ไพรเมอร์ของนันทน์ภัส วงศ์มณี นั้นมีขนาด pcr product ขนาดใหญ่จากเดิมคือ 302 bp จึงได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์นี้ใหม่เพื่อให้สามารถตรวจสอบไปพร้อมกับคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับการไม่เกิดเมทิลเลชันได้ ซึ่งสามารถออกแบบได้เป็น 5' CGCGCGAGAGATCGAGAAAA 3' สำหรับไพรเมอร์ Forward มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 20 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 55 และมี annealing temperature 58.3°C ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ Reverse คือ 5' GCGACGCAACTTCCAACG 3' ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 19 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เป็น 55 และมี annealing temperature 55.1°C โดยแสดงบริเวณของคู่ไพรเมอร์ด้วยการขีดเส้นใต้ ซึ่งมีขนาด PCR product เป็น 208 bp ดังรูปที่ 32

GTTTAAAAGTTTAGAAGTTTTTTTAAATGTTTTTTAAGCGGTTGGCGCGCGAGAGATCGA
GAAAAGGTGACGCGGGGTTTCGGGTAGGCGGTCGGCGCGCGTTTTTTTTTTTTTCGTTTT
GTTATTTGGTCGTTTTTCGTCGGTAGTTTAGGGTAGAGTTTTTTGGAAGGCGTAGGTAGT
GTGGCGAGAAGGGCGTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTGTTGTTTTTTTTTCGTTTGCGTTT
GAAGTTGCGTCGCGAGTTTTTGTAAGGCGG

รูปที่ 32 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการตรวจสอบ
 การเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ forward และ
 reverse ด้วยการขีดเส้นใต้



ตารางที่ 17 ลำดับและความเข้มข้นของสารที่ต้องใช้ในการทำ MSP

ชนิดของสาร	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR buffer	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 μ M Forward primer	0.15	0.3 μ M
4. 20 μ M Reverse primer	0.15	0.3 μ M
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	0.25 U/reaction
6. น้ำกลั่น	8.4	
7. DNA	1	
ปริมาตรรวม	10.0	

ตารางที่ 18 สภาวะในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *ALDH3B1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	53	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final Extension	72	7 นาที
4. Holding	4	-

ตารางที่ 19 สภาวะในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *ASAH2B*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (32 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	64	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final Extension	72	7 นาที
4. Holding	4	-

ตารางที่ 20 สภาวะในการทำ MSP PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *FOXC1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	58	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final Extension	72	7 นาที
4. Holding	4	-

ตารางที่ 21 ตารางการจรแบบ 2x2

	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	ผลรวม
ลักษณะ +	a	b	a+b = n_1
ลักษณะ -	c	d	c+d = n_2
ผลรวม	a+c = m_1	b+d = m_2	N=a+b+c+d

เมื่อ a, b, c, d

คือ ความถี่ของข้อมูลในแต่ละช่องตาราง

n_1, n_2

คือ ผลรวมความถี่ในแต่ละแถว

m_1, m_2

คือ ผลรวมความถี่ในแต่ละคอลัมน์

N

คือ ผลรวมความถี่ทั้งหมด

สูตรค่า P-value สำหรับการทดสอบของฟิชเชอร์ เป็นดังนี้

$$P = \frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{N! a! b! c! d!}$$

ตารางที่ 22 ตารางการจรแบบ 2x2 ที่ใช้ในการกรอกข้อมูลเพื่อคำนวณประสิทธิภาพของวิธีการทดลองที่ใช้

		ผลวินิจฉัย		
		ลักษณะ +	ลักษณะ -	ผลรวม
ผลที่ได้จากการ ตรวจด้วยวิธีที่ สนใจ	ผลการตรวจ +	TP	FP	TP+FP
	ผลการตรวจ -	FN	TN	FN+TN
ผลรวม		TP+FN	FP+TN	N

เมื่อ	TP	คือ true positive
	FP	คือ false positive
	FN	คือ false negative
	TN	คือ true negative
	N	คือ ผลรวมความถี่ทั้งหมด

โดยการคำนวณค่าดัชนีต่างๆเป็นดังนี้

$$\text{Sensitivity} = 100 \times \text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$$

$$\text{Specificity} = 100 \times \text{TN}/(\text{FP}+\text{TN})$$

$$\text{PPV} = 100 \times \text{TP}/(\text{TP}+\text{FP})$$

$$\text{NPV} = 100 \times \text{TN}/(\text{FN}+\text{TN})$$

$$\text{Accuracy} = 100 \times (\text{TP}+\text{TN})/\text{N}$$

ตารางที่ 23 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน

ตัวอย่าง	ยีน		
	<i>ALDH3B1</i>	<i>ASAH2B</i>	<i>FOXC1</i>
NORMAL WITHOUT HPV			
B835	✓	x	x
B836	✓	x	x
B837	-	✓	x
B838	✓	x	x
B839	-	✓	x
B841	✓	x	x
B842	-	✓	x
B844	-	x	x
B845	-	x	x
B846	-	x	✓
B847	-	x	x
B848	✓	x	x
B849	✓	x	x
B850	✓	✓	✓
NORMAL WITH HPV			
CU124	-	x	x
CU145	-	-	-
CU149	-	x	x
CU159	x	x	x
CU332	x	x	x
CU499	✓	x	x
CU569	✓	x	x
CU584	✓	✓	x
LSIL WITH HPV 16			
AS 103	x	-	-
AS 104	x	-	-
AS 106	✓	-	-
AS 115	✓	-	x
AS 193	-	-	✓

ตัวอย่าง	อื่น		
	<i>ALDH3B1</i>	<i>ASAH2B</i>	<i>FOXC1</i>
AS 226	x	-	✓
S1060	-	✓	✓
S1090	-	✓	✓
S1138	-	✓	✓
S1173	-	✓	✓
S1176	-	✓	x
S1181	-	✓	x
S1193	-	x	✓
S1195	-	x	x
LSIL WITH HPV 18			
S1202	-	✓	x
S1168	-	✓	x
S1127	-	✓	✓
S1057	-	✓	✓
LSIL WITH HPV other			
AS 106	✓	-	-
AS 109	x	-	-
AS 68	x	-	x
AS 73	✓	-	✓
AS 88	✓	-	-
AS 121	-	-	x
AS 122	-	-	x
AS 131	-	-	-
AS 213	✓	-	✓
AS 214	✓	-	✓
AS 75	-	-	x
AS 81	-	-	✓
AS 86	-	-	✓
AS 89	-	-	-
AS 130	-	-	x
AS 154	-	-	✓

ตัวอย่าง	อื่น		
	<i>ALDH3B1</i>	<i>ASAH2B</i>	<i>FOXC1</i>
HSIL HPV 16			
AS101	✓	-	-
AS 128	x	-	-
AS 135	-	-	✓
AS 152	x	-	✓
AS 161	x	-	x
AS 197	x	-	x
AS 59	✓	-	✓
AS 63	x	-	✓
AS 183	✓	-	✓
AS 184	✓	-	✓
AS 102	✓	-	✓
AS 116	x	-	-
AS 144	✓	-	-
AS 171	-	-	x
AS 174	x	-	x
S1059	-	✓	✓
S1064	-	✓	✓
S1082	-	✓	x
S1086	-	✓	✓
S1089	-	✓	✓
S1094	-	✓	x
S1097	-	✓	✓
S1130	-	x	x
S1134	-	✓	✓
S1143	-	✓	x
S1144	-	✓	✓
S1152	-	✓	x
S1161	-	✓	✓
S1174	-	x	x
S1178	✓	x	x
S1185	✓	✓	x

ตัวอย่าง	อื่น		
	<i>ALDH3B1</i>	<i>ASAH2B</i>	<i>FOXC1</i>
S1203	✓	✓	✓
S822	-	x	✓
S823	-	✓	✓
S828	-	-	-
S909	-	✓	✓
HSIL HPV 18			
S924	-	✓	✓
S923	-	✓	x
S914	-	✓	x
CANCER			
T476	✓	x	x
T483	✓	✓	✓
T492	✓	x	x
T495	-	x	x
T499	-	x	x
T501	-	✓	✓
S1192	-	✓	x
T504	-	✓	✓
T513	x	x	x
T514	✓	x	x
T515	x	x	x
T518	✓	x	x
T481	-	x	x
T489	-	✓	✓
T491	-	✓	x
T494	-	x	x
T503	-	x	x
T505	-	x	x
T507	-	x	x
T511	-	✓	x

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	กาญจนา เอี่ยมสมบูรณ์
วัน เดือน ปี เกิด	16 กันยายน 2537
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
วุฒิการศึกษา	วท.บ. วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ที่อยู่ปัจจุบัน	5/2 หมู่ 2 ซอยทองดี ต.ยายชา อ.สามพราน จ.นครปฐม 73110



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY