

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเก็บเนื้อเยื่อ การสกัด การวัดปริมาณ และการตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวม

1.1 การเก็บเนื้อเยื่อ การสกัดและการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอรวม

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งจากก้อนเนื้อซึ่งจำเป็นต้องผ่าตัดออกจากผู้ป่วยโรคมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปากจำนวน 18 ราย ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้ได้ลงนามในใบยินยอมให้ทำวิจัย (ภาคผนวก ก) รายละเอียดตารางที่ 2

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อโดยใช้สารละลาย Guanidinium Thiocyanate และ Phenol เป็นวิธีที่ให้ผลผลิตอาร์เอ็นเอสูง เนื่องจากสารละลาย Phenol ที่อยู่ในสภาพต่างสามารถทำลายผนังเซลล์และพลาสมาเมมเบรน นอกจากนี้ Guanidinium Thiocyanate สามารถยับยั้งฤทธิ์ของไรโบนิวคลีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายอาร์เอ็นเอ (Chomczynski และ Sacchi, 1987) ปริมาณอาร์เอ็นเอจากการสกัดเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเบสที่เป็นองค์ประกอบของสายอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะดูดกลืนแสงได้ดีที่ 260 นาโนเมตร ส่วนสารละลายโปรตีนจะดูดกลืนแสงได้ดีที่ 280 นาโนเมตร ดังนั้นอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร จึงสามารถบอกความบริสุทธิ์ของสารละลายอาร์เอ็นเอได้

สารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อ 2 ชนิด ในผู้ป่วย 18 ราย แบ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติปริมาณ 0.49-6.85 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อัตราส่วน 260 ต่อ 280 = 1.52-2.10 เนื้อเยื่อมะเร็งปริมาณ 2.07-8.64 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อัตราส่วน 260 ต่อ 280 = 1.52-2.08 ดังแสดงในตารางที่ 3

1.2 การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายอาร์เอ็นเอรวม

เนื่องจากปริมาณอาร์เอ็นเอและอัตราส่วนซึ่งได้จากการทดสอบค่าการดูดกลืนแสงไม่สามารถแสดงถึงความสมบูรณ์ของสายของอาร์เอ็นเอ จึงต้องทดสอบแยกสารละลายอาร์เอ็นเอออกตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 2.2 โมลาร์ สารละลายอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะสามารถแยกแถบของอาร์เอ็นเอไรโบโซมขนาด 28 S และ 18 S ได้ชัดเจน แสดงในรูป 7 (ก-ญ) แต่เนื่องจากสารละลายอาร์เอ็นเอถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์อาร์เอ็นเอส พบว่าเนื้อเยื่อของผู้ป่วยบางรายไม่สามารถแยกแถบอาร์เอ็นเอไรโบโซมออกมาได้อย่างชัดเจน ได้แก่ เนื้อเยื่อปกติและมะเร็งของผู้ป่วยรายที่ 3 4 11 14 16 และ 17 และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยรายที่ 8 และ 22 ไม่มี

ผลการทดสอบแยกอาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อปกติผู้ป่วยรายที่ 9 เนื่องจากสกัดอาร์เอ็นเอได้ในปริมาณน้อย แต่สามารถสร้างซีดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อทุกชิ้น ที่แสดงในตารางที่ 3



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ข้อมูลผู้ป่วยโรคมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปากจำนวน 18 ราย

ผู้ป่วย หมายเลข	วันเดือนปี เก็บชิ้นเนื้อ	เพศ	อายุ	ชนิดของ มะเร็ง	TNM	บริเวณที่ เกิดมะเร็ง	ระดับการ เปลี่ยนแปลง ของเนื้อเยื่อ	ระยะ ของ มะเร็ง	สูบบุหรี่	ดื่ม สุรา	หมาก พลู
1	6/06/02	ชาย	40	SCCA	T ₁ N ₀ M ₀	Tn	ND	1	ND	ND	ND
3	18/06/02	ชาย	62	SCCA	T ₄ N ₁ M ₀	Tn	1	4A	ND	ND	ND
4	26/06/02	ชาย	53	SCCA	T ₄ N ₀ M _x	FM, BTn	1	4A	+	+	-
5	27/06/02	หญิง	23	SCCA	T ₂ N ₀ M ₀	P	3	2	-	-	-
6	27/06/02	หญิง	73	SCCA	T ₃ N _{2b} M ₀	Tn	1	4B	-	-	+
7	22/07/02	ชาย	44	SCCA	T ₁ N ₀ M ₀	Tn	3	1	-	-	-
8	13/08/02	ชาย	69	SCCA	T ₂ N ₀ M ₀	Tn	2	2	-	-	-
9	22/08/02	ชาย	70	SCCA	T ₄ N ₁ M ₀	Tn	2	4A	-	+	-
10	11/09/02	หญิง	73	Verrucus	ND	rt-B	ND	ND	ND	ND	ND
11	16/09/02	ชาย	57	SCCA	T ₃ N ₀ M ₀	Tn	2	3	-	+	-
12	11/12/02	หญิง	79	Verrucus	T ₄ N ₀ M ₀	rt-B	1	4A	-	-	+
14	12/12/02	ชาย	54	SCCA	T ₄ N ₃ M ₀	BTn	1	4B	+	-	-
15	19/12/02	ชาย	69	SCCA	T ₄ N ₁ M ₀	Tn&B	2	4A	+	+	-
16	7/01/03	ชาย	65	SCCA	T ₂ N _{2b} M ₀	I-G	1	4B	+	+	-
17	20/02/03	ชาย	60	SCCA	T ₃ N _{2c} M _x	FM	1	4B	+	+	-
19	25/03/03	หญิง	67	SCCA	T ₃ N ₀ M ₀	rt-uL	1	3	-	-	+
20	28/03/03	ชาย	64	SCCA	T ₁ N ₀ M ₀	Tn	ND	1	+	-	-
22	24/11/03	ชาย	34	SCCA	T ₂ N ₀ M ₀	Tn	1	2	+	+	-

TNM ระยะของมะเร็ง = ดูตารางที่ 1

+ = มีพฤติกรรม

- = ไม่มีพฤติกรรม

B = Buccal (กระพุ้งแก้ม)

P = Palate (เพดานปาก)

BTn = Base of tongue (โคนลิ้น)

rt-B = Right buccal (กระพุ้งแก้มด้านขวา)

FM = Floor of mouth (พื้นช่องปาก)

rt-uL = Right upper lip (ริมฝีปากบนด้านขวา)

I-G = Lower gum (เหงือกล่าง)

SCCA = Squamous cell carcinoma (มะเร็งสความัสเซลล์)

ND = No data (ไม่มีข้อมูล)

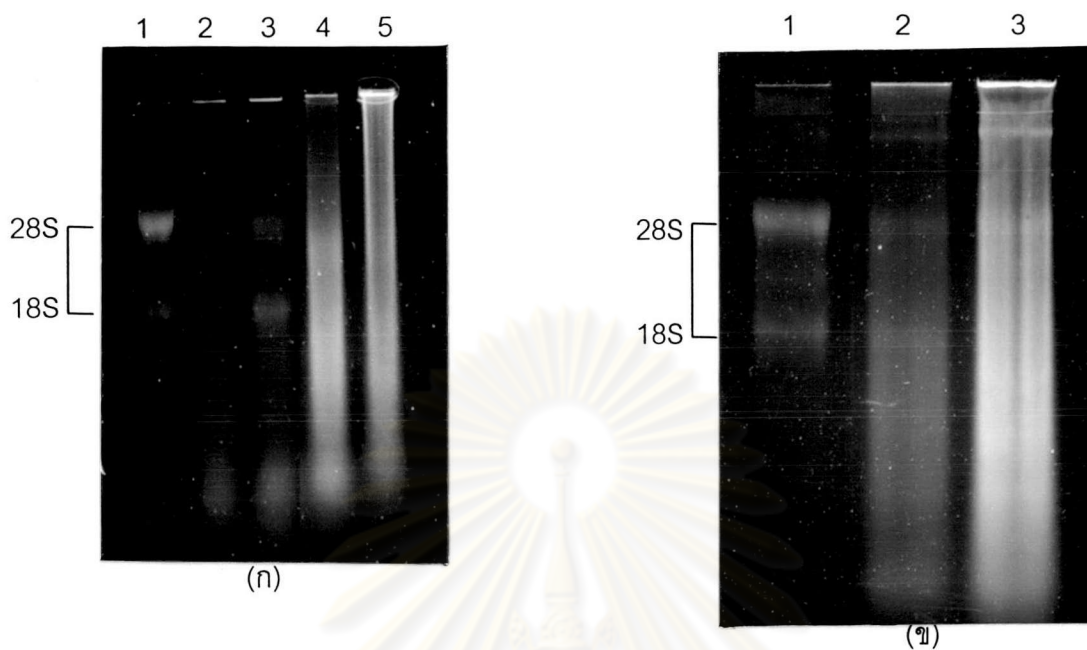
Tn = Tongue (ลิ้น)

X = ไม่ระบุ

ระดับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ	ความหมาย
1	well differentiation
2	moderately differentiation
3	poorly differentiation

ตารางที่ 3 ปริมาณและอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่ 280 ของอาร์เอ็นเอสสกัดได้จากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดของผู้ป่วยจำนวน 18 ราย

ผู้ป่วยหมายเลข	เนื้อเยื่อปกติ		เนื้อเยื่อมะเร็ง	
	ปริมาณ (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วน	ปริมาณ (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วน
1	2.92	2.02	2.07	2.00
3	6.85	1.89	5.80	1.71
4	4.69	2.10	7.44	2.04
5	1.56	2.02	7.76	1.96
6	5.79	1.72	3.24	1.72
7	2.68	1.70	6.38	1.67
8	3.40	1.88	6.13	2.08
9	2.46	1.70	6.42	1.91
10	1.21	1.84	5.93	1.67
11	2.19	1.92	8.64	1.67
12	0.49	1.60	3.01	1.90
14	6.02	1.71	6.18	1.91
15	2.58	1.94	3.97	1.60
16	3.34	1.97	4.99	1.71
17	6.66	1.66	4.94	1.60
19	2.37	1.60	2.14	1.52
20	1.55	1.58	4.37	1.54
22	1.00	1.52	7.90	1.66

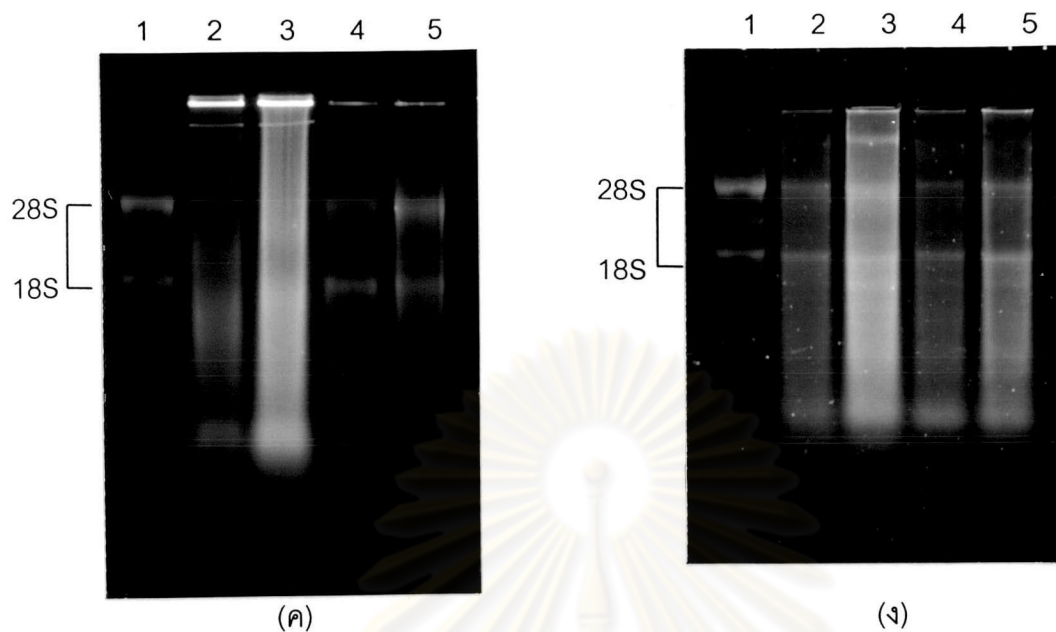


รูปที่ 7 อิเล็กโตรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งจากผู้ป่วย 18 ราย แสดงแถบของอาร์เอ็นเอไรโบโซมขนาด 28S และ 18S โดยมีอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ปฐมภูมิ PDLF₃P₅ และเซลล์ไลน์ U2OS เป็นตัวควบคุมบวก ตามรูป ก-ญ

ก	ช่องที่ 1	เซลล์ปฐมภูมิ PDLF ₃ P ₅	ข	ช่องที่ 1	เซลล์ปฐมภูมิ PDLF ₃ P ₅
	ช่องที่ 2	N 1		ช่องที่ 2	N 3
	ช่องที่ 3	T 1		ช่องที่ 3	T 3
	ช่องที่ 4	N 14			
	ช่องที่ 5	T 14			

N = Normal

T = Tumor

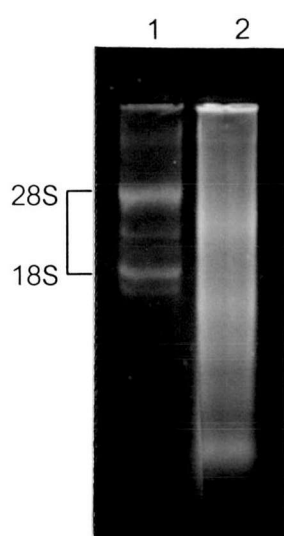


ค	ช่องที่ 1	เซลล์ปฐมภูมิ PDLF ₃ P ₅	ง	ช่องที่ 1	เซลล์ปฐมภูมิ PDLF ₃ P ₅
	ช่องที่ 2	N 4		ช่องที่ 2	N 6
	ช่องที่ 3	T 4		ช่องที่ 3	T 6
	ช่องที่ 4	N 5		ช่องที่ 4	N 7
	ช่องที่ 5	T 5		ช่องที่ 5	T 7

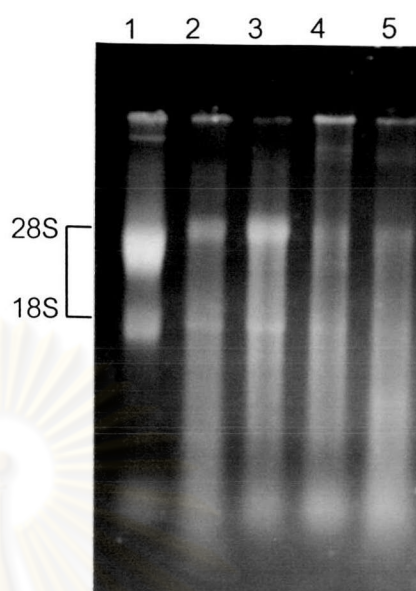
N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(จ)



(ข)

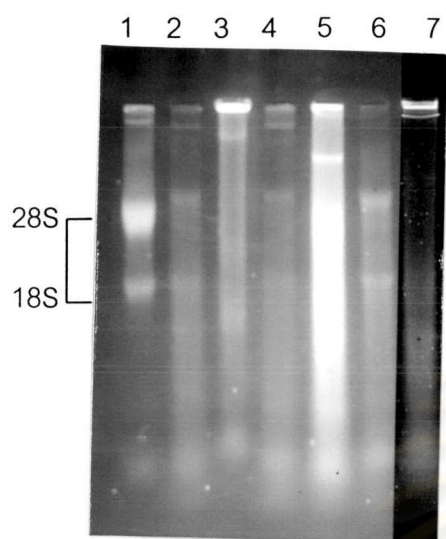
จ ช่องที่ 1 เซลล์ไลน์ U2OS
 ช่องที่ 2 T 9

ข ช่องที่ 1 เซลล์ไลน์ U2OS
 ช่องที่ 2 N 10
 ช่องที่ 3 T 10
 ช่องที่ 4 N 15
 ช่องที่ 5 T 15

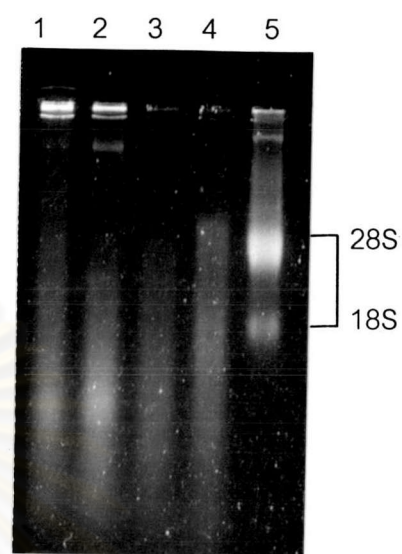
N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ข)



(ค)

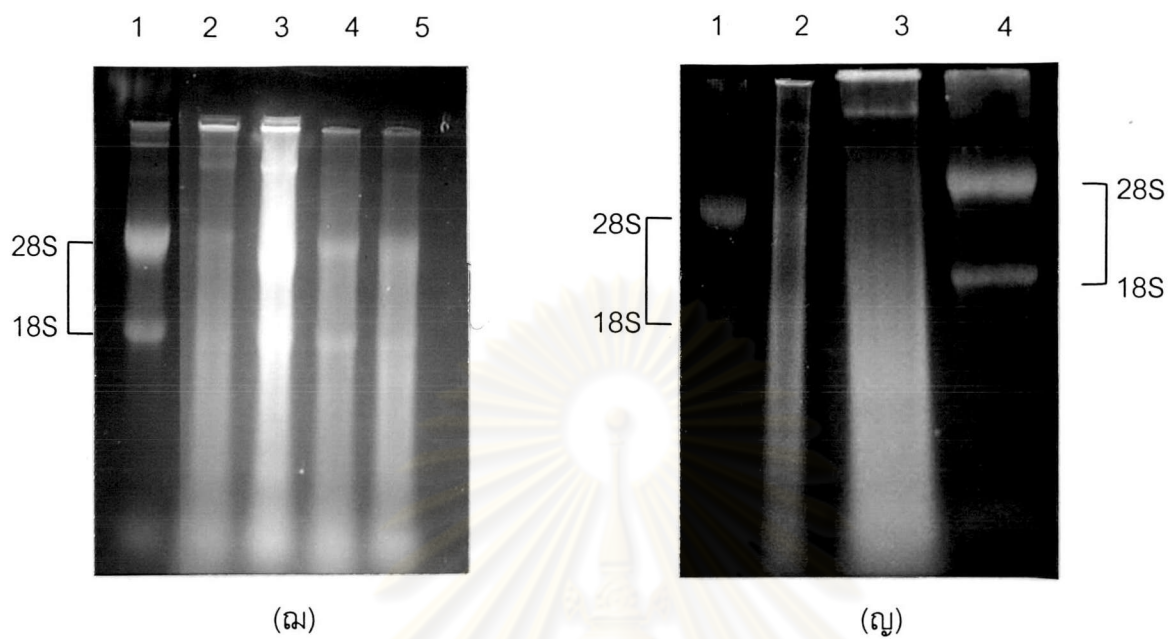
ข	ช่องที่ 1	เซลล์ไลน์ U2OS
	ช่องที่ 2	N 8
	ช่องที่ 3	T 8
	ช่องที่ 4	N11
	ช่องที่ 5	T11
	ช่องที่ 6	N12
	ช่องที่ 7	T12

ข	ช่องที่ 1	N16
	ช่องที่ 2	T16
	ช่องที่ 3	N17
	ช่องที่ 4	T17
	ช่องที่ 5	เซลล์ไลน์ U2OS

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ฉ	ช่องที่ 1	เซลล์ไลน์ U2OS	ญ	ช่องที่ 1	เซลล์ไลน์ U2OS
	ช่องที่ 2	N 19		ช่องที่ 2	N 22
	ช่องที่ 3	T 19		ช่องที่ 3	T 22
	ช่องที่ 4	N 20		ช่องที่ 4	เซลล์ไลน์ U2OS
	ช่องที่ 5	T 20			

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การทดสอบการแสดงออกของยีนเฮพทาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและวิเคราะห์ความเข้มข้นแถบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

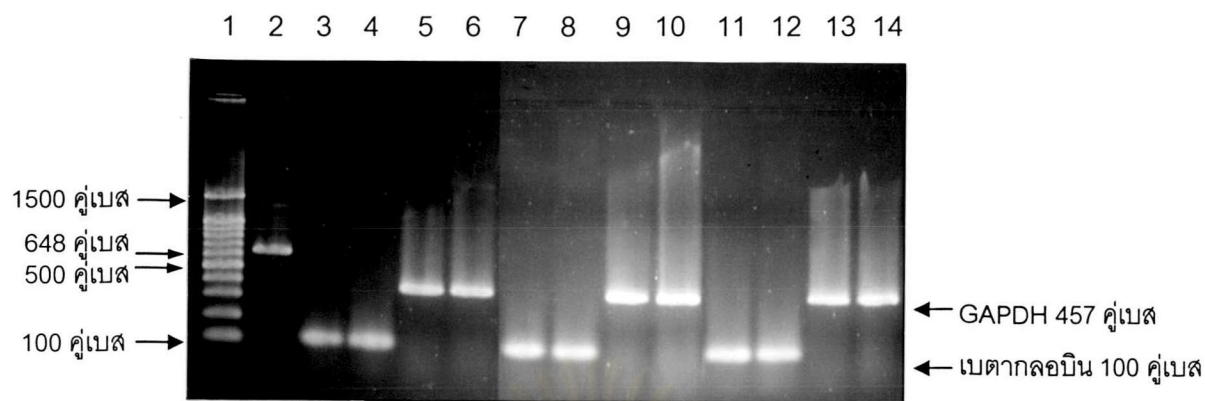
2.1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอผลผลิต GAPDH และ ดีเอ็นเอผลผลิตเบตากลอบินในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฮพทาแรนเนสโดยใช้ดีเอ็นเอ GAPDH เป็นดีเอ็นเออ้างอิงปริมาณเนื่องจากยีน GAPDH เป็น "Housekeeping gene" ดังนั้นโปรตีนจากยีนชนิดนี้จึงมีความสำคัญและจำเป็นในการดำรงชีวิตของเซลล์ จึงพบการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในระดับสูงในเนื้อเยื่อหลายชนิด (Pfaffl, 2001) แต่ในขบวนการสัคตอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่ออาจทำให้ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอรวมไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงวัดการแสดงออกของยีน GAPDH เปรียบเทียบกับยีนเบตากลอบินซึ่งเป็นยีนที่มีเพียงชุดเดียวซึ่งได้ผลใกล้เคียงกันตามตารางที่ 4 และรูปที่ 8 ยีน GAPDH จึงเป็นยีนที่แสดงออกเท่ากันในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด

ตารางที่ 4 ความเข้ม (OD/ตารางมิลลิเมตร) ของแถบดีเอ็นเอเบตากลอบินและแถบดีเอ็นเอ GAPDH ในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยรายเดียวกันเมื่อปรับปริมาณดีเอ็นเอให้เท่ากัน

ผู้ป่วย หมายเลข	ความเข้มเบตากลอบิน OD/ตารางมิลลิเมตร				ความเข้ม GAPDH OD/ตารางมิลลิเมตร			
	เนื้อเยื่อ ปกติ	เนื้อเยื่อ มะเร็ง	ความ แตกต่าง	ร้อยละความ แตกต่าง	เนื้อเยื่อ ปกติ	เนื้อเยื่อ มะเร็ง	ความ แตกต่าง	ร้อยละความ แตกต่าง
1	7.98	8.29	-0.31	3.88	13.24	13.74	-0.50	3.78
3	17.41	18.45	-1.04	5.97	24.13	24.80	-0.67	2.78
4	17.36	17.09	0.27	1.56	15.82	15.79	0.03	0.19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 อิเล็กโตรโฟรีซิสของแถบดีเอ็นเอผลผลิต GAPDH และเบตากลอบินของเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยรายที่ 1 3 และ 4 โดยมีดีเอ็นเอเฮฟพาเรนเนสเพิ่มปริมาณจากซีดีเอ็นเอซึ่งบรรจุในเวกเตอร์บลูสคริปท์ขนาด 648 คู่เบส เป็นตัวควบคุมบวก

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100-1500 คู่เบส

ช่องที่ 2 ตัวควบคุมบวกขนาด 648 คู่เบส

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเบตากลอบิน N 1

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเบตากลอบิน T 1

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอ GAPDH N 1

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอ GAPDH T 1

ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเบตากลอบิน N 3

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเบตากลอบิน T 3

ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอ GAPDH N 3

ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอ GAPDH T 3

ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเบตากลอบิน N 4

ช่องที่ 12 ดีเอ็นเอเบตากลอบิน T 4

ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอ GAPDH N 4

ช่องที่ 14 ดีเอ็นเอ GAPDH T 4

N = Normal

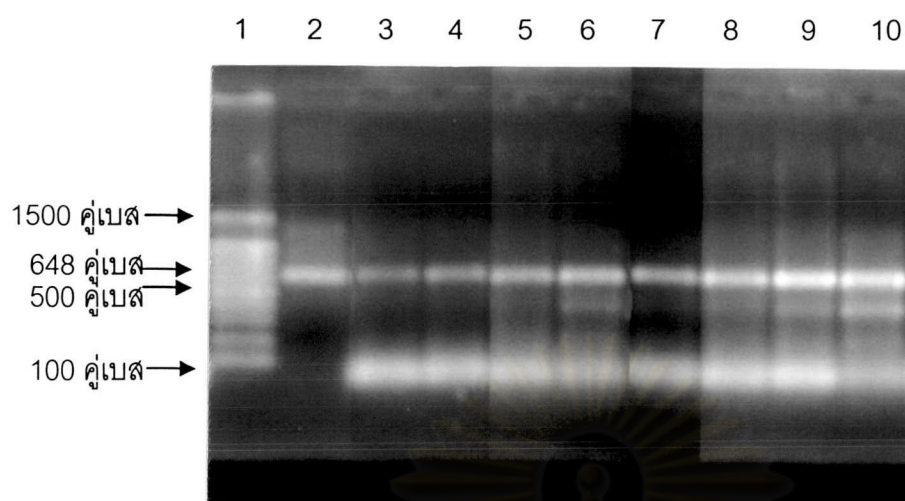
T = Tumor

2.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตเฮฟฟาแรนเนสสร้างจาก ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสในจำนวนรอบต่างกัน

การทดสอบการแสดงออกของเฮฟฟาแรนเนสจากเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วย
โรคมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปากโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ด้วยการสร้างดีเอ็นเอเฮฟฟาแรน
เนสจากปฏิกิริยาดังกล่าวและไพรเมอร์เฉพาะ ต้องวัดความเข้มแถบดีเอ็นเอที่สร้างในช่วงที่ปฏิกิริยายัง
ไม่เข้าสู่ระยะคงที่ เนื่องจากจะทำให้เห็นความแตกต่างของความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตเฮฟฟาแรน
เนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด ดังนั้นจึงสร้างดีเอ็นเอเฮฟฟาแรนเนสด้วยจำนวนรอบ 26 27 28 29 30
31 32 และ 33 ตามลำดับ และวัดความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตเฮฟฟาแรนเนสด้วยเครื่องเดนซิโต
มิเตอร์ พบว่าที่จำนวนรอบ 31 32 และ 33 รอบ ความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตเฮฟฟาแรนเนสมีค่า
ใกล้เคียงกันแสดงว่าปฏิกิริยาเข้าสู่ระยะคงที่ ดังนั้นการสร้างดีเอ็นเอเฮฟฟาแรนเนสด้วยจำนวนรอบ 30
รอบ จึงเป็นจำนวนรอบสูงสุดที่ปฏิกิริยายังไม่เข้าสู่ระยะคงที่ แสดงตารางที่ 5 รูปที่ 9 และ 10

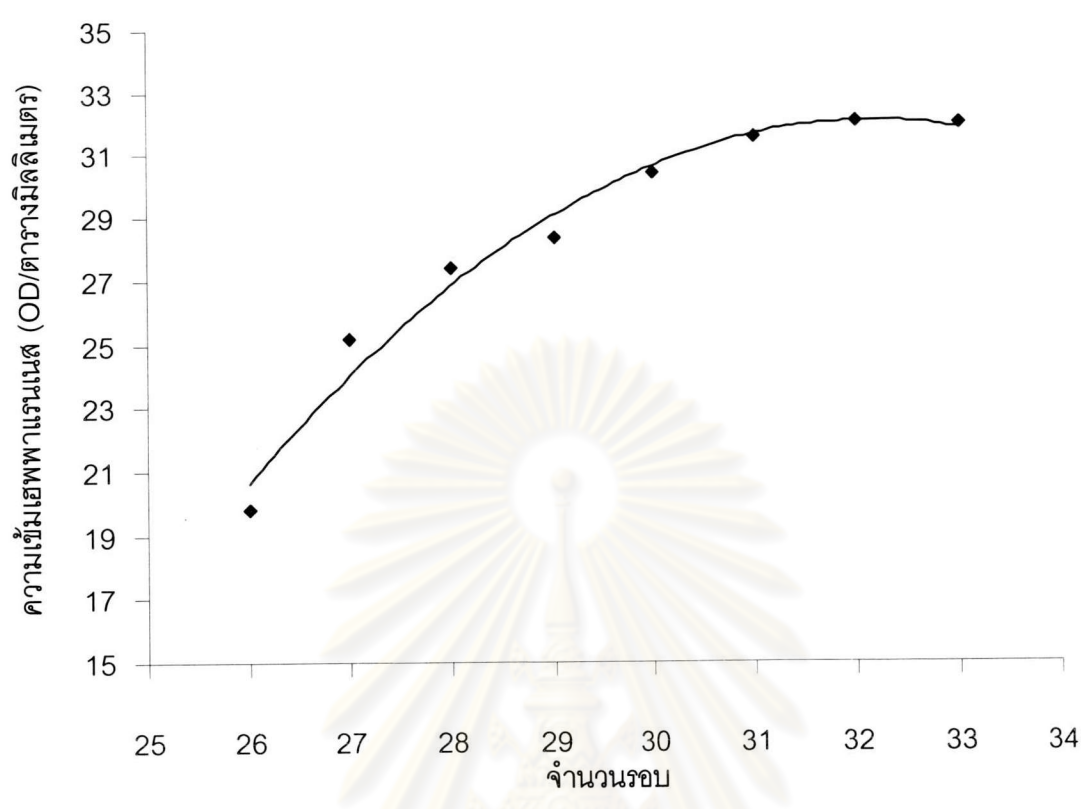
ตารางที่ 5 ความเข้ม(OD/ตารางมิลลิเมตร) ของแถบดีเอ็นเอผลผลิตเฮฟฟาแรนเนสสร้างจากปฏิกิริยา
ลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจำนวน 26 27 28 29 30 31 32 และ 33 รอบ

จำนวนรอบ	ความเข้มเฮฟฟาแรนเนส OD/ตารางมิลลิเมตร
26	19.80
27	25.13
28	27.39
29	28.31
30	30.37
31	31.55
32	32.06
33	31.98



รูปที่ 9 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสสร้างจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จำนวนรอบ 26 27 28 29 30 31 32 และ 33 รอบ ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 648 คู่เบส และดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100–1500 คู่เบส

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน
 ช่องที่ 2 ตัวควบคุมบวกขนาด 648 คู่เบส
 ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 26 รอบ
 ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 27 รอบ
 ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 28 รอบ
 ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 29 รอบ
 ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 30 รอบ
 ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 31 รอบ
 ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 32 รอบ
 ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่จำนวนรอบ 33 รอบ



รูปที่ 10 ความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตเฮฟฟาแรนเนสสร้างจากปฏิกิริยาลูกลูโซไฟลิเมอร์เรสจำนวนรอบต่างๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอผลผลิต GAPDH และดีเอ็นเอผลผลิต เฮพพาแรนเนสด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

การทดสอบการแสดงออกของยีนเฮพพาแรนเนสโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา
ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จำเป็นต้องใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากันระหว่างเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในผู้ป่วย
รายเดียวกัน จึงต้องปรับปริมาณซีดีเอ็นเอเริ่มต้นของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดด้วยการสร้างดีเอ็นเอ GAPDH
ให้มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน จากนั้นใช้ซีดีเอ็นเอที่ปรับปริมาณนี้สร้างดีเอ็นเอ
เฮพพาแรนเนส วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสของเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งของ
ผู้ป่วยทั้ง 18 ราย แสดงในตารางที่ 6 ก และ ข และรูปที่ 11 (ก-ข) จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ
เฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด ผู้ป่วยรายที่ 1 8 9 10 11 14 17 19 และ 22 มีการ
แสดงออกของเฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ ($T:N > 1.05$) โดยมีอัตราส่วนความ
เข้มแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งต่อความเข้มแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อ
ปกติ $T:N = 1.11-6.52$ ผู้ป่วยรายที่ 7 มีการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อมะเร็งแต่ไม่มี
การแสดงออกในเนื้อเยื่อปกติ ผู้ป่วยรายที่ 3 5 12 15 16 และ 20 มีการแสดงออกของเฮพพาแรน
เนสในเนื้อเยื่อปกติมากกว่าเนื้อเยื่อมะเร็ง ($N:T > 1.05$) โดยมีอัตราส่วนความเข้มแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรน
เนสจากเนื้อเยื่อปกติต่อความเข้มแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็ง $N:T = 1.10-4.69$
ส่วนผู้ป่วยรายที่ 4 และ 6 มีการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสใกล้เคียงกันในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด ($T:N$ อยู่
ระหว่าง 0.96 และ 1.04) โดยมีอัตราส่วน $N:T = 0.99$ และ 1.01 เมื่อนำข้อมูลความเข้มแถบดีเอ็นเอ
เฮพพาแรนเนสของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดจากผู้ป่วยมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ paired T-test พบว่าการ
แสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
($p > 0.05$) ค่าความแตกต่างของความเข้มแถบดีเอ็นเอ GAPDH ระหว่างเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดจากผู้ป่วย
ทั้ง 18 รายมีค่าร้อยละ 0.53-6.27 เฉลี่ยร้อยละ 3.88 แสดงตาราง 9 ภาคผนวก จ

การสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดจากผู้ป่วย ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่ที่ 1 ให้
ผลผลิตดีเอ็นเอ 648 คู่เบส และคู่ที่ 2 ให้ผลผลิตดีเอ็นเอ 216 คู่เบส ผู้ป่วยทุกรายยกเว้นผู้ป่วยรายที่ 22
ใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 สร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส ส่วนผู้ป่วยรายที่ 22 ใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ไพรเมอร์ทั้งสองคู่
ถูกออกแบบให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสโดยใช้ซีดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสส่วนรหัส
(coding region) เป็นแม่แบบได้ ดังนั้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ จึงเป็นดีเอ็นเอ
เฮพพาแรนเนสเช่นเดียวกัน (รายละเอียดของซีดีเอ็นเอและไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ แสดงภาคผนวก ข ค
และ ง)

ตารางที่ 6 ก ความเข้มข้นดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ในผู้ป่วยที่มี การแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ

ผู้ป่วย หมายเลข	เพศ	อายุ	ระยะ/ระดับ มะเร็ง	TNM	ความเข้มข้นดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส (OD/ตารางมิลลิเมตร)		ความเข้มข้น ดีเอ็นเอ (T:N)
					เนื้อเยื่อปกติ	เนื้อเยื่อมะเร็ง	
1	ชาย	40	1/ND	T ₁ N ₀ M ₀	28.35	40.28	1.42
7	ชาย	44	1/3	T ₁ N ₀ M ₀	0	5.40	5.4:0.0
8	ชาย	69	2/2	T ₂ N ₀ M ₀	12.26	41.45	3.38
9	ชาย	70	4A/2	T ₄ N ₁ M ₀	9.94	25.56	2.57
10	หญิง	73	ND	ND	6.79	32.50	4.79
11	ชาย	57	3/2	T ₃ N ₀ M ₀	8.06	38.78	4.81
14	ชาย	54	4B/1	T ₄ N ₃ M ₀	7.91	17.58	2.22
17	ชาย	60	4B/1	T ₃ N _{2c} M _x	4.39	28.62	6.52
19	หญิง	67	3/1	T ₃ N ₀ M ₀	7.46	23.15	3.10
22	ชาย	34	2/1	T ₂ N ₀ M ₀	28.30	31.41	1.11

ตารางที่ 6 ข ความเข้มข้นดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ในผู้ป่วยที่มี การแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อปกติมากกว่าและเท่ากับเนื้อเยื่อมะเร็ง

ผู้ป่วย หมายเลข	เพศ	อายุ	ระยะ/ระดับ มะเร็ง	TNM	ความเข้มข้นดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส (OD/ตารางมิลลิเมตร)		ความเข้มข้น ดีเอ็นเอ (N:T)
					เนื้อเยื่อปกติ	เนื้อเยื่อมะเร็ง	
3	ชาย	62	4A/1	T ₄ N ₁ M ₀	29.17	17.06	1.71
4	ชาย	53	4A/1	T ₄ N ₀ M _x	30.75	31.06	0.99
5	หญิง	23	2/3	T ₂ N ₀ M ₀	45.02	23.66	1.90
6	หญิง	73	4B/1	T ₃ N _{2b} M ₀	17.80	17.60	1.01
12	หญิง	79	4A/1	T ₄ N ₀ M ₀	22.69	7.70	2.95
15	ชาย	69	4A/2	T ₄ N ₁ M ₀	15.96	3.40	4.69
16	ชาย	65	4B/1	T ₂ N _{2b} M ₀	16.60	15.10	1.10
20	ชาย	64	1/ND	T ₁ N ₀ M ₀	29.04	7.99	3.63

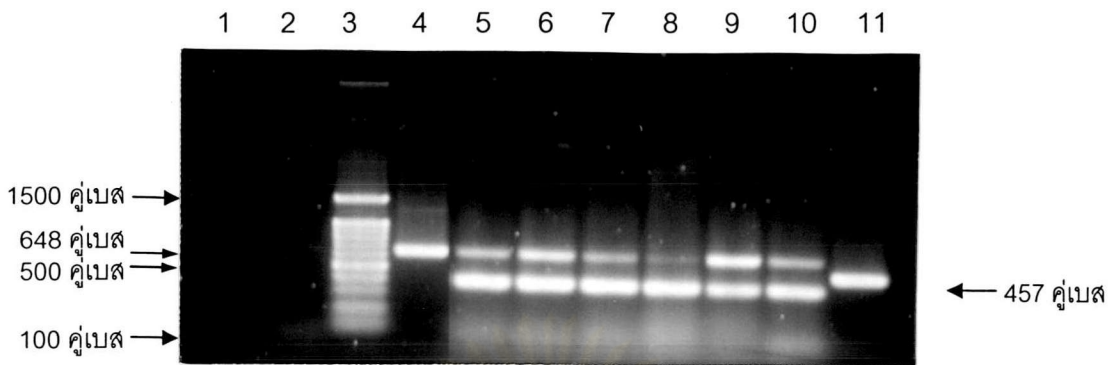
T = Tumor
N = Normal

TNM ระยะมะเร็ง
ระดับมะเร็ง

ดูตารางที่ 1
ดูตารางที่ 2

ND = No data

X = ไม่ระบุ



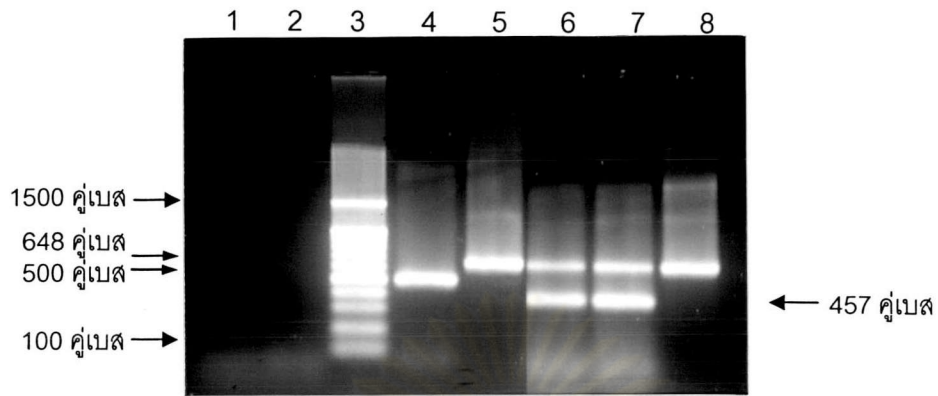
(ก)

รูปที่ 11 อิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสและ GAPDH ของเนื้อเยื่อปกติและมะเร็ง จากผู้ป่วย 18 ราย ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1 500 คู่เบส ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 648 คู่เบส หรือ 216 คู่เบส ตัวควบคุมลบชนิดที่ 1 ตัวควบคุมลบชนิดที่ 2 และดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100-1500 คู่เบส (รูป ก-ข)

- | | | |
|---|------------|-----------------------|
| ก | ช่องที่ 1 | ตัวควบคุมลบชนิดที่ 1 |
| | ช่องที่ 2 | ตัวควบคุมลบชนิดที่ 2 |
| | ช่องที่ 3 | ดีเอ็นเอมาตรฐาน |
| | ช่องที่ 4 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 |
| | ช่องที่ 5 | N 1 |
| | ช่องที่ 6 | T 1 |
| | ช่องที่ 7 | N 3 |
| | ช่องที่ 8 | T 3 |
| | ช่องที่ 9 | N 5 |
| | ช่องที่ 10 | T 5 |
| | ช่องที่ 11 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1 |

N = Normal

T = Tumor



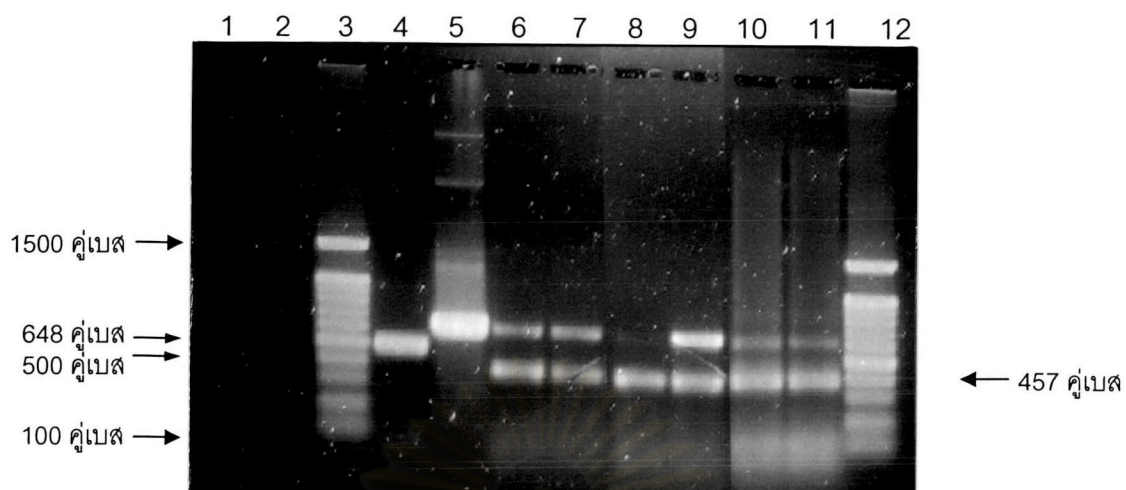
(ข)

- ข
- | | |
|-----------|-----------------------|
| ช่องที่ 1 | ตัวควบคุมลบชนิดที่ 1 |
| ช่องที่ 2 | ตัวควบคุมลบชนิดที่ 2 |
| ช่องที่ 3 | ดีเอ็นเอมาตรฐาน |
| ช่องที่ 4 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1 |
| ช่องที่ 5 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 |
| ช่องที่ 6 | N 4 |
| ช่องที่ 7 | T 4 |
| ช่องที่ 8 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 |

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



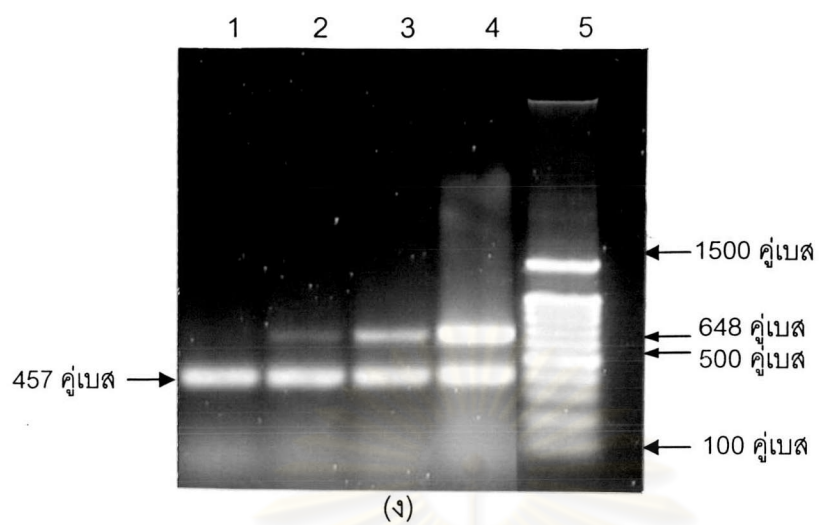
(ค)

- ค
- | | |
|------------|-----------------------|
| ช่องที่ 1 | ตัวควบคุมลบชนิดที่ 1 |
| ช่องที่ 2 | ตัวควบคุมลบชนิดที่ 2 |
| ช่องที่ 3 | ดีเอ็นเอมาตรฐาน |
| ช่องที่ 4 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1 |
| ช่องที่ 5 | ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 |
| ช่องที่ 6 | N 6 |
| ช่องที่ 7 | T 6 |
| ช่องที่ 8 | N 10 |
| ช่องที่ 9 | T 10 |
| ช่องที่ 10 | N 16 |
| ช่องที่ 11 | T 16 |
| ช่องที่ 12 | ดีเอ็นเอมาตรฐาน |

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



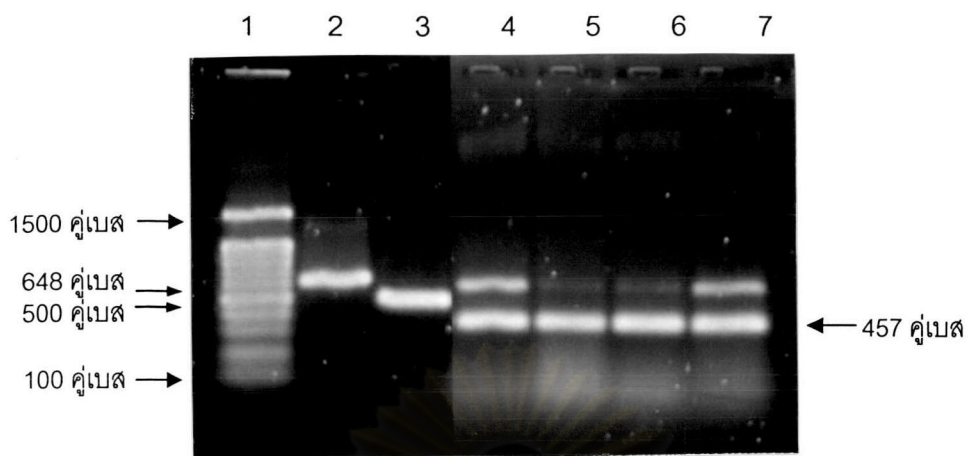
(ง)

ง	ช่องที่ 1	N 7
	ช่องที่ 2	T 7
	ช่องที่ 3	N 8
	ช่องที่ 4	T 8
	ช่องที่ 5	ดีเอ็นเอมาตรฐาน

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



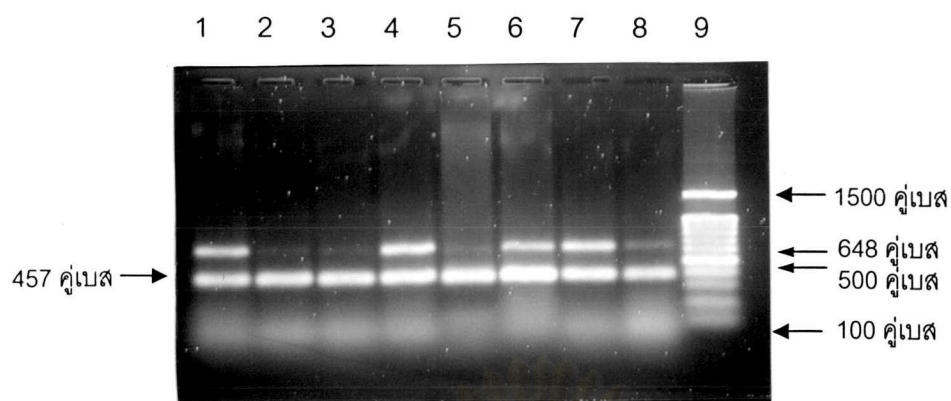
(จ)

- จ ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน
 ช่องที่ 2 ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2
 ช่องที่ 3 ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1
 ช่องที่ 4 N 12
 ช่องที่ 5 T 12
 ช่องที่ 6 N 14
 ช่องที่ 7 T 14

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



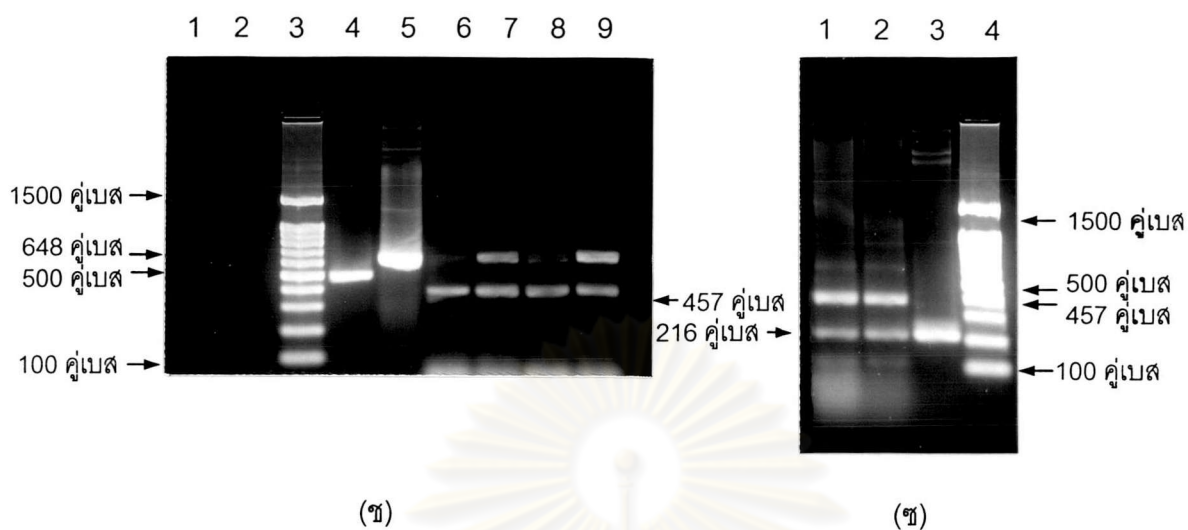
(ข)

ข	ช่องที่ 1	N 15
	ช่องที่ 2	T 15
	ช่องที่ 3	N 17
	ช่องที่ 4	T 17
	ช่องที่ 5	N 19
	ช่องที่ 6	T 19
	ช่องที่ 7	N 20
	ช่องที่ 8	T 20
	ช่องที่ 9	ดีเอ็นเอมาตรฐาน

N = Normal

T = Tumor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ช	ช่องที่ 1	ตัวควบคุมลบชนิดที่ 1
	ช่องที่ 2	ตัวควบคุมลบชนิดที่ 2
	ช่องที่ 3	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
	ช่องที่ 4	ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1
	ช่องที่ 5	ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2
	ช่องที่ 6	N 9
	ช่องที่ 7	T 9
	ช่องที่ 8	N 11
	ช่องที่ 9	T 11

N = Normal

T = Tumor

ช	ช่องที่ 1	N 22
	ช่องที่ 2	T 22
	ช่องที่ 3	ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2
	ช่องที่ 4	ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดสอบการแสดงออกของยีนเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณ

การวัดปริมาณดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณเป็นการติดตามดีเอ็นเอผลผลิตที่เพิ่มขึ้น โดยการวัดความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ซึ่งแปรตรงตามปริมาณดีเอ็นเอ ถ้าจำนวนซีดีเอ็นเอแม่แบบเฮพพาแรนเนสเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณดีเอ็นเอผลผลิตจะต่างกันด้วย จึงสามารถเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งในผู้ป่วยรายเดียวกันได้ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้ซีดีเอ็นเอรวมซึ่งสร้างจากอาร์เอ็นเอনারหัสที่สกัดจากเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งเป็นแม่แบบสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส การสร้างเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกันต้องใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอรวมจำนวนเท่ากัน ในงานวิจัยนี้ใช้ยีน GAPDH สำหรับอ้างอิงปริมาณดังกล่าวจึงต้องเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน GAPDH และยีนเบตาไกลอบินจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในผู้ป่วยรายที่ 1 ผลการทดสอบค่า cp ของดีเอ็นเอเบตาไกลอบินในเนื้อเยื่อปกติและมะเร็ง (รูปที่ 12 ก) พบว่า cp เนื้อเยื่อปกติ = 25.37 และ cp เนื้อเยื่อมะเร็ง = 24.28 และเมื่อนำปริมาณซีดีเอ็นเอที่เท่ากันนี้มาสร้างดีเอ็นเอ GAPDH พบว่าค่า cp ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันกล่าวคือ cp เนื้อเยื่อปกติ = 21.01 และ cp เนื้อเยื่อมะเร็ง = 20.70 ซึ่งแสดงว่า GAPDH มีการแสดงออกเท่ากันในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด ส่วนเฮพพาแรนเนสค่า cp ของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อปกติ = 34.96 และ cp ของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็ง = 33.21 ของผู้ป่วยรายที่ 1 (รูปที่ 13 ก) ดังนั้นในผู้ป่วยรายอื่นๆ จึงใช้การแสดงออกของ GAPDH สำหรับอ้างอิงปริมาณของเฮพพาแรนเนส (แสดงค่า cp GAPDH ตารางที่ 10 ภาคผนวก จ)

การหาปริมาณดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสจากปฏิกิริยาด้วยค่า cp ในกาวิเคราะห์ค่า cp นั้นใช้วิธีอนุพันธ์อันดับสองมากที่สุด (the second derivative maximum method) เป็นวิธีวิเคราะห์ข้อมูลตั้งแต่เริ่มสร้างดีเอ็นเอ (log phase) จนถึงก่อนเข้าระยะคงที่ (plateau phase) ของปฏิกิริยา ดังนั้นตัวเลขค่า cp ที่คำนวณได้ จึงเป็นค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาทั้งหมด ค่า cp ของดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด แสดงในตารางที่ 7 ก และ ข

การทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนสจากปฏิกิริยา โดยการทดสอบอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอจำนวนครึ่งหนึ่งแยกเป็นสายเดี่ยวเรียกอุณหภูมินี้ว่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature หรือ T_m) ดีเอ็นเอแต่ละชนิดจะมีค่า T_m ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีนรวมทั้งความยาวของสายดีเอ็นเอ ในการทดลองหาค่า T_m ของดีเอ็นเอนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเกลียวคู่ของดีเอ็นเอจะแยกออกจากกัน โมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนส์ที่จับอยู่ในช่องเล็ก (minor groove) ของเกลียวดีเอ็นเอจะหลุดออกมา สัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะต่ำลงจนถึงเมื่อดีเอ็นเอแยกสายถึงกึ่งกลางสายอุณหภูมิที่จุดนั้นคือค่า T_m ซึ่งขึ้นกับชนิดของดีเอ็นเอ จากนั้นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะลดลงอย่างรวดเร็วเพราะดีเอ็นเอทั้งสองสายแยกออกจากกัน ผลการทดลองพบว่า

T_m ของดีเอ็นเอเบตาไกลอบิน = 87°C (รูป 12 ข) ดีเอ็นเอ GAPDH มีค่า $T_m = 89.9^\circ\text{C}$ และดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสมีค่า $T_m = 90.3^\circ\text{C}$ (รูป 13 ข)

จากการทดสอบค่า T_m ของ GAPDH และเฮพพาแรนเนสใกล้เคียงกันมากจึงแยกดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดบนวุ้นอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้าโดยมีดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากซีดีเอ็นเอในเวกเตอร์บลูสคริปท์เป็นตัวควบคุมบวก และไม่ใส่แม่แบบในปฏิกิริยาเป็นตัวควบคุมลบ (รูปที่ 14) แแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดแยกจากกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 15 ก-ข) ยกเว้นผู้ป่วยรายที่ 20 และ 22 ดีเอ็นเอซึ่งเพิ่มปริมาณจากแม่แบบซีดีเอ็นเอเนื้อเยื่อปกติและไฟโรเมอร์เฮพพาแรนเนสมีหลายแถบ คาดว่าอาจเกิดจากอาร์เอ็นเอ นำรหัสที่ไม่สมบูรณ์ของเนื้อเยื่อดังกล่าว จึงสร้างซีดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ เมื่อสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว จึงปรากฏแถบดีเอ็นเออื่นๆนอกจากแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส

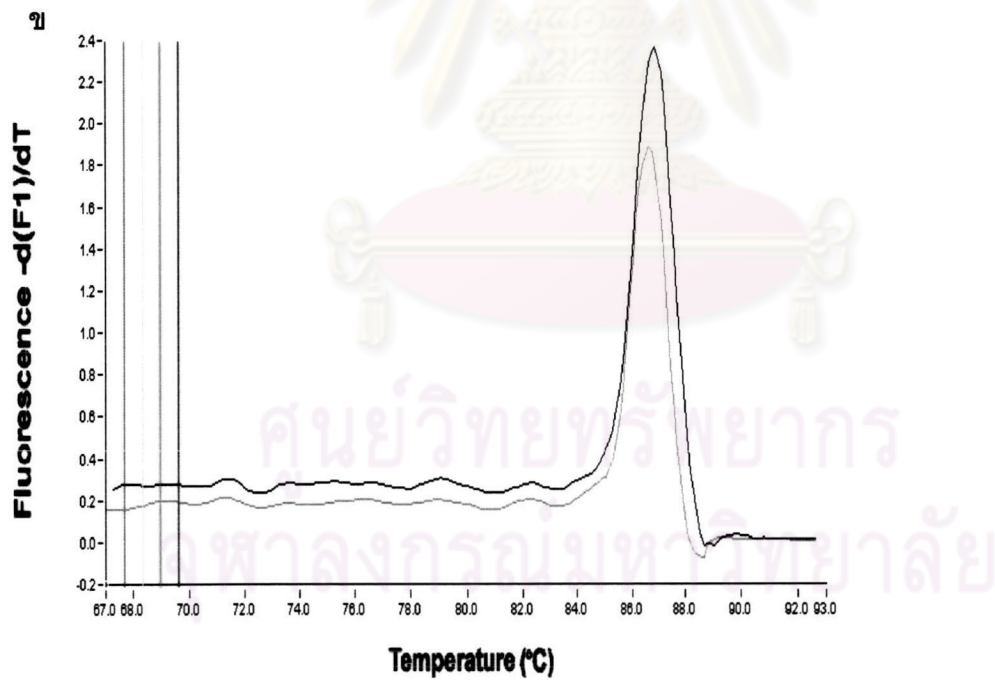
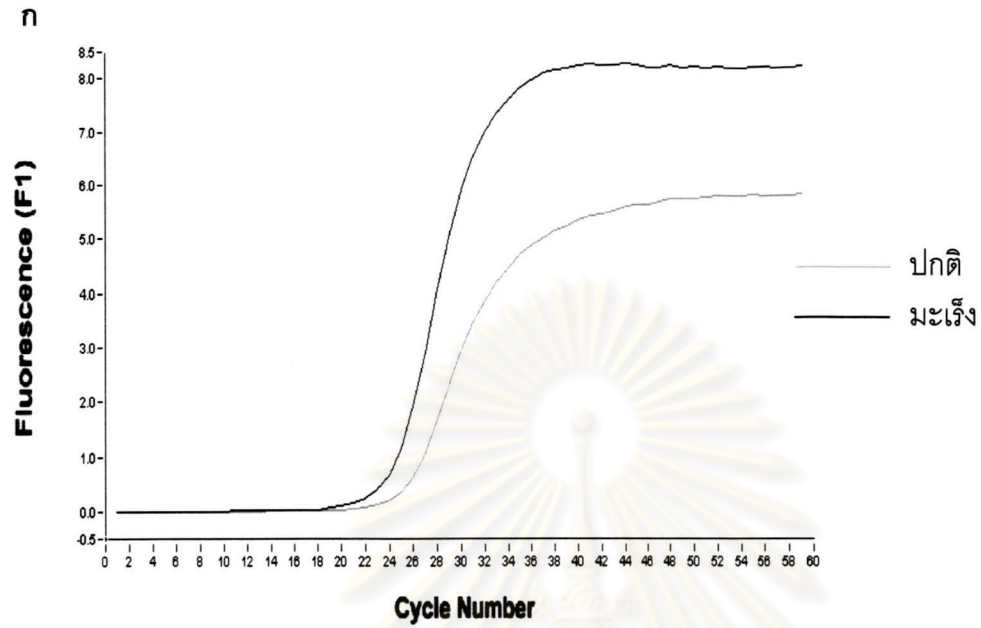
การคำนวณเปรียบเทียบอัตราส่วนความสัมพันธ์การแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติโดยมีการแสดงออกของยีน GAPDH เป็นยีนอ้างอิงปริมาณ ใช้รูปแบบทางคณิตศาสตร์แสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณในการแสดงออกของยีนเป้าหมายจากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนอ้างอิง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{อัตราส่วนความสัมพันธ์การแสดงออก} = 2^{-(\Delta\text{cp}_{\text{เฮพพาแรนเนส}} - \Delta\text{cp}_{\text{GAPDH}})} \quad (\text{Bernard และ Wittwer, 2002; Pfaffl, 2001})$$

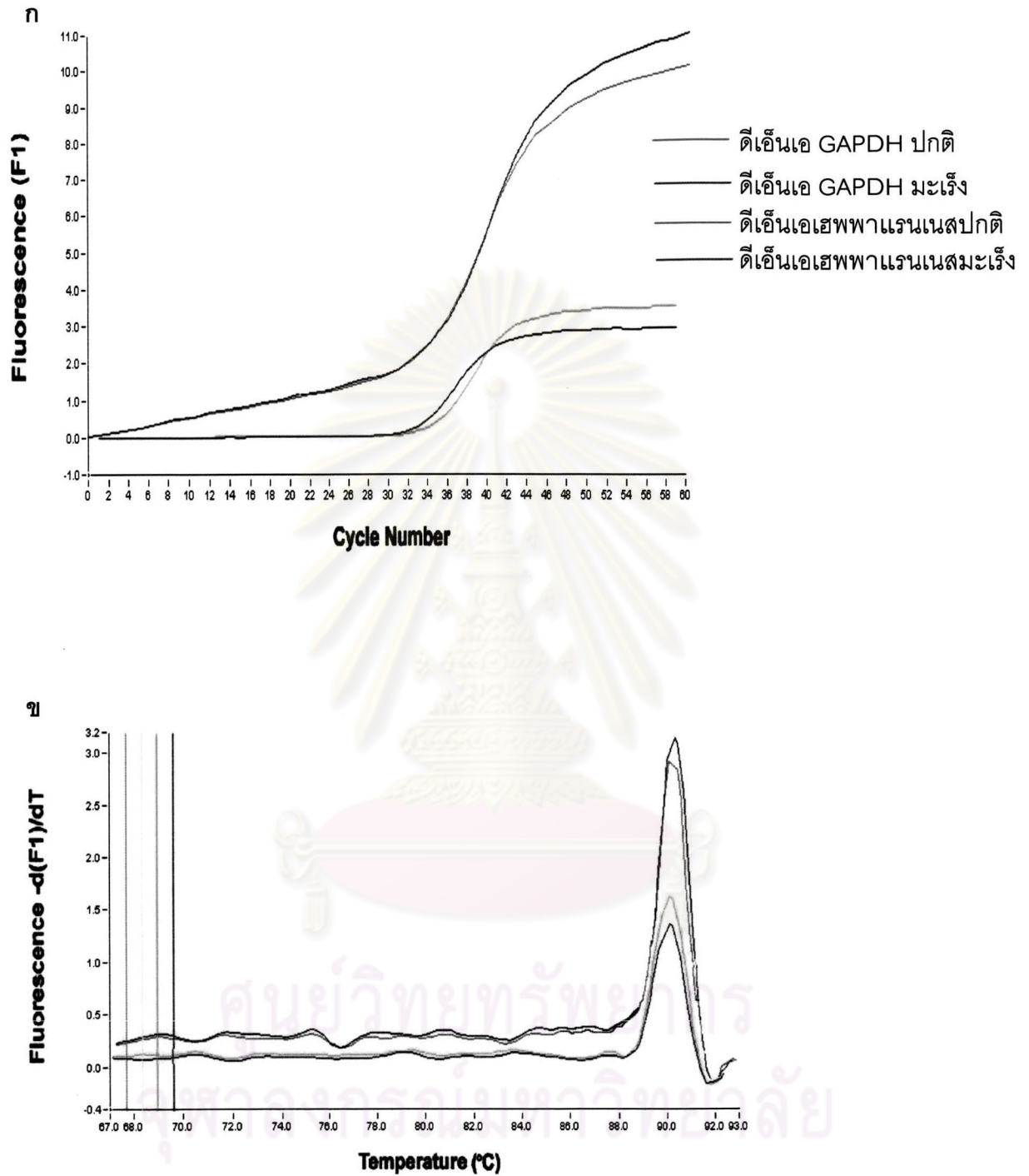
(relative expression ratio หรือ fold)

fold ของผู้ป่วยทั้ง 16 รายแสดงดังตารางที่ 7 ก และ ข

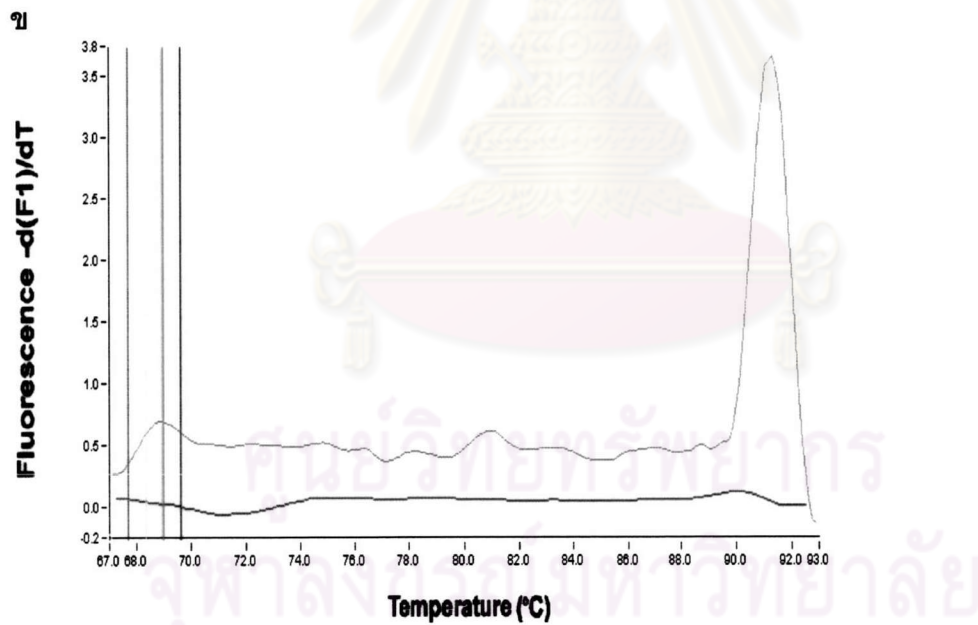
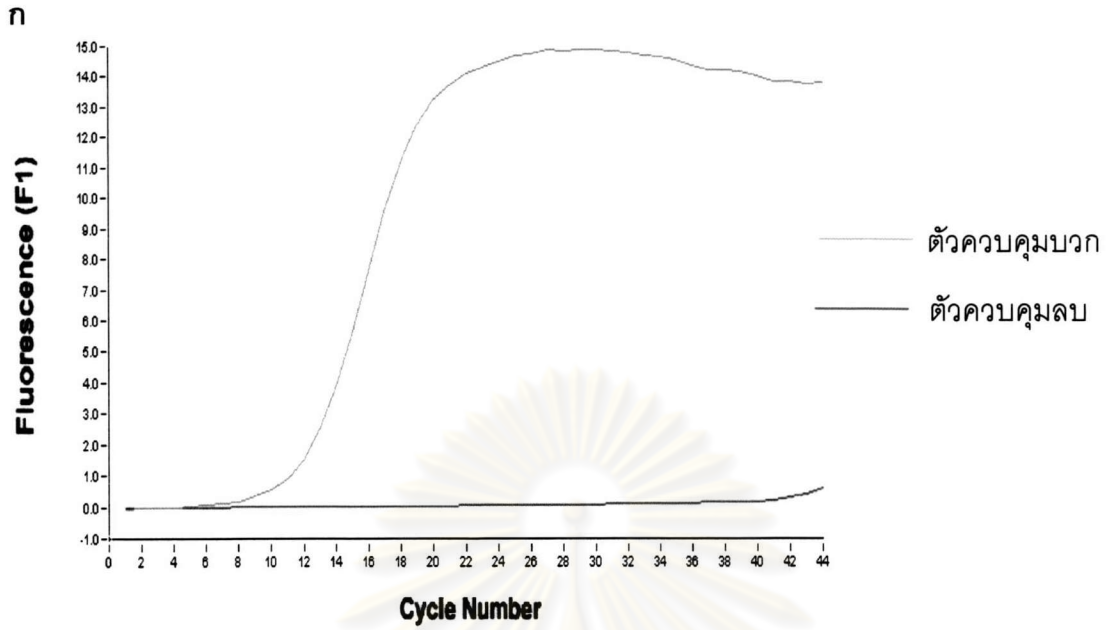
ผู้ป่วยจำนวน 9 ราย มีอัตราส่วนการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ ได้แก่ รายที่ 1 7 8 9 10 11 14 17 และ 22 (ตารางที่ 7 ก) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซ (ผู้ป่วยรายที่ 16 และ 19 ไม่มีผลการทดสอบจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณ) ผู้ป่วยจำนวน 7 รายมีอัตราส่วนการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อมะเร็งน้อยกว่าเนื้อเยื่อปกติ ได้แก่ รายที่ 3 4 5 6 12 15 และ 20 (แสดงตารางที่ 7 ข) ปริมาณดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณแสดงได้ด้วยค่า cp เมื่อนำข้อมูลค่า cp ของดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ paired T-test พบว่าการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired T-test $p > 0.05$)



รูปที่ 12 ค่า cp จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณ ของดีเอ็นเอเบตากลอบิน (ก) และค่า T_m ของดีเอ็นเอเบตากลอบินในผู้ป่วยรายที่ 1 (ข)



รูปที่ 13 ค่า c_p จากปฏิกิริยาอุกไซโพลิเมอร์ไรเซชันชนิดบอกรปริมาณ ของดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนส (ก) และค่า T_m ของดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนส (ข) ในผู้ป่วยรายที่ 1



รูปที่ 14 ค่า c_p จากปฏิกิริยาถูกไซโทลีเมอร์เรชันชนิดบอกปริมาณ ของดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส (ตัวควบคุมบวก) และตัวควบคุมลบ (ก) และค่า T_m ของดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส (ตัวควบคุมบวก) และตัวควบคุมลบ (ข)

ตารางที่ 7 ก ค่า cp ดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสสร้างจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ

ผู้ป่วย หมายเลข	เพศ	อายุ	ระยะ/ระดับ มะเร็ง	TNM	cp เนื้อเยื่อปกติ	cp เนื้อเยื่อมะเร็ง	real PCR fold
1	ชาย	40	1/ND	T ₁ N ₀ M ₀	34.96	33.21	2.7132
7	ชาย	44	1/3	T ₁ N ₀ M ₀	46.64	42.26	5.5021
8	ชาย	69	2/2	T ₂ N ₀ M ₀	47.84	40.26	221.32
9	ชาย	70	4A/2	T ₄ N ₁ M ₀	50.27	46.73	11.081
10	หญิง	73	ND	ND	60.00	34.76	1.85E+07
11	ชาย	57	3/2	T ₃ N ₀ M ₀	60.00	45.92	12245
14	ชาย	54	4B/1	T ₄ N ₃ M ₀	44.19	43.63	2.4116
17	ชาย	60	4B/1	T ₃ N _{2c} M _x	49.20	38.12	1016.9
22	ชาย	34	2/1	T ₂ N ₀ M ₀	45.88	39.68	79.8932

ตารางที่ 7 ข ค่า cp ดีเอ็นเอผลผลิตเฮพพาแรนเนสสร้างจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อปกติมากกว่าเนื้อเยื่อมะเร็ง

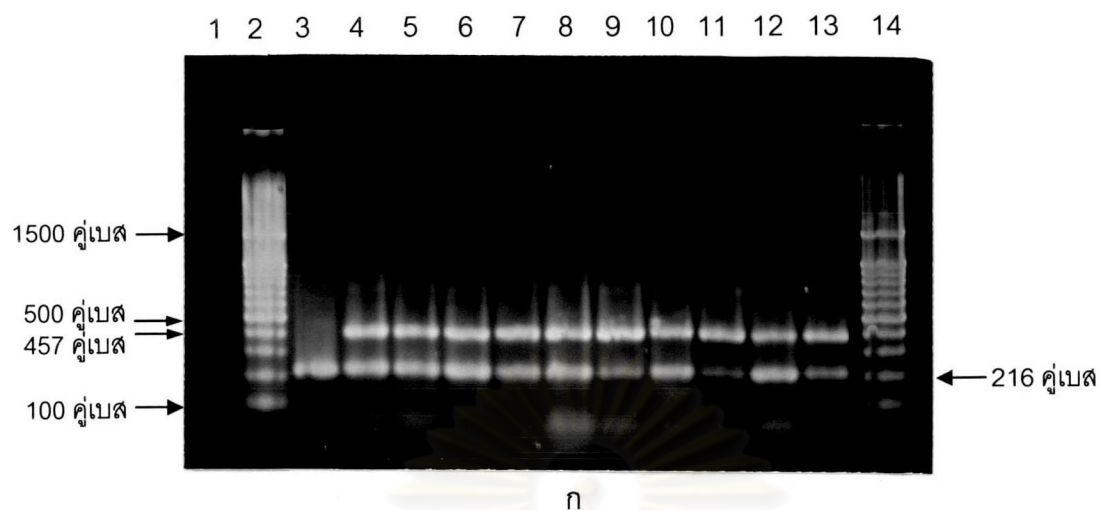
ผู้ป่วย หมายเลข	เพศ	อายุ	ระยะ/ระดับ มะเร็ง	TNM	cp เนื้อเยื่อปกติ	cp เนื้อเยื่อมะเร็ง	real PCR fold
3	ชาย	62	4A/1	T ₄ N ₁ M ₀	37.57	51.07	0.0001
4	ชาย	53	4A/1	T ₄ N ₀ M _x	37.09	42.52	0.0117
5	หญิง	23	2/3	T ₂ N ₀ M ₀	38.39	44.08	0.0095
6	หญิง	73	4B/1	T ₃ N _{2b} M ₀	41.64	53.36	0.0001
12	หญิง	79	4A/1	T ₄ N ₀ M ₀	44.95	46.45	0.5510
15	ชาย	69	4A/2	T ₄ N ₁ M ₀	40.20	48.59	0.0032
20	ชาย	64	1/ND	T ₁ N ₀ M ₀	43.73	45.28	0.6643

T = Tumor ND = No data

N = Normal X = ไม่ระบุ

TNM ระยะมะเร็ง ดูตารางที่ 1

ระดับมะเร็ง ดูตารางที่ 2

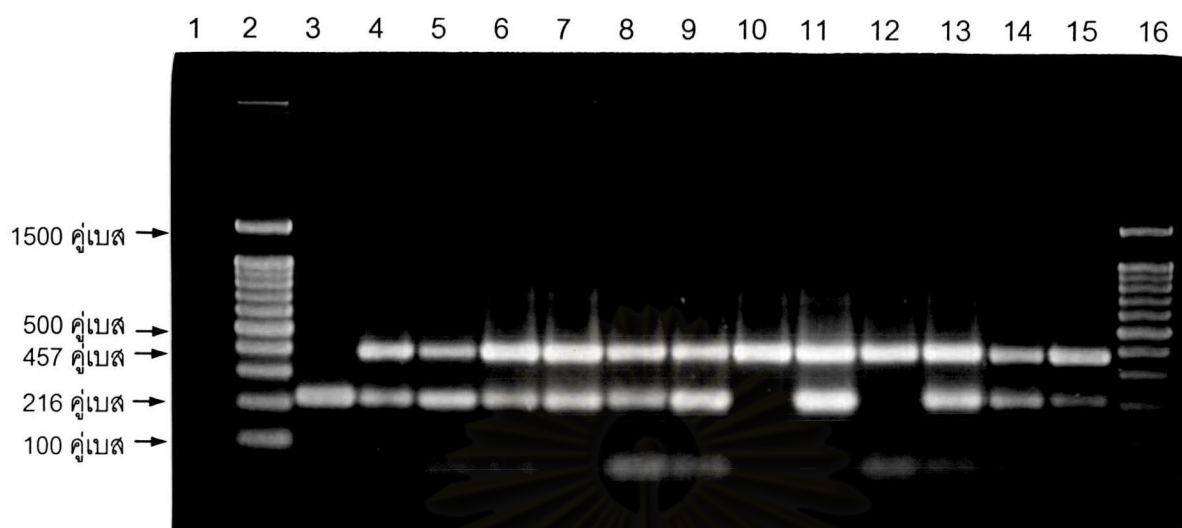


รูปที่ 15 อิเล็กโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอผลผลิต GAPDH เฮพพาแรนเนส และเบตาไกลอบินของเนื้อเยื่อ ปกติและมะเร็งจากผู้ป่วย 16 ราย ตัวควบคุมบวกขนาด 216 คู่เบส ตัวควบคุมลบและ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100-1500 คู่เบส (ก-จ)

ก	ช่องที่ 1	ตัวควบคุมลบ
	ช่องที่ 2	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
	ช่องที่ 3	ตัวควบคุมบวก
	ช่องที่ 4	N 1
	ช่องที่ 5	T 1
	ช่องที่ 6	N 3
	ช่องที่ 7	T 3
	ช่องที่ 8	N 4
	ช่องที่ 9	T 4
	ช่องที่ 10	N 5
	ช่องที่ 11	T 5
	ช่องที่ 12	N 6
	ช่องที่ 13	T 6
	ช่องที่ 14	ดีเอ็นเอมาตรฐาน

N = Normal

T = Tumor

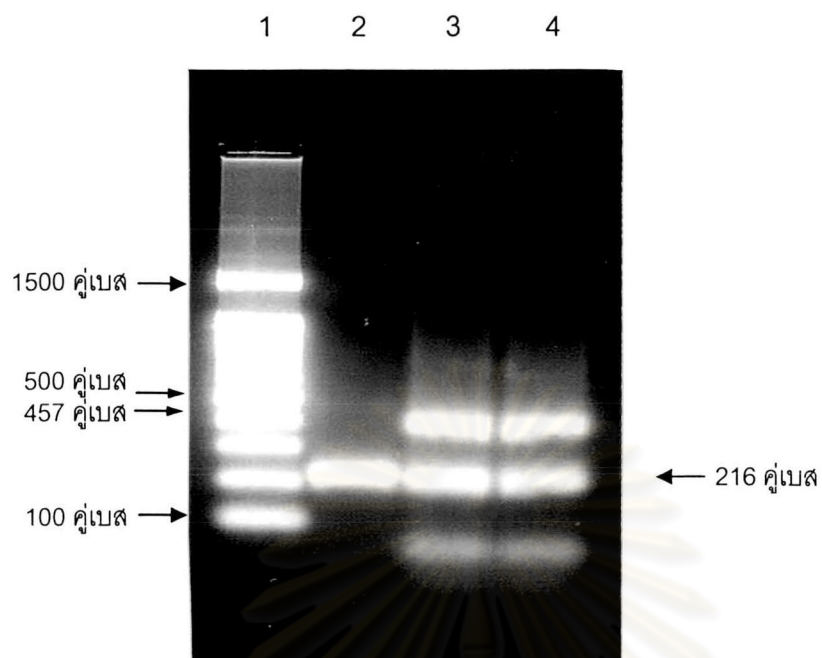


๗

๗	ช่องที่ 1	ตัวควบคุมลบ
	ช่องที่ 2	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
	ช่องที่ 3	ตัวควบคุมบวก
	ช่องที่ 4	N 7
	ช่องที่ 5	T 7
	ช่องที่ 6	N 8
	ช่องที่ 7	T 8
	ช่องที่ 8	N 9
	ช่องที่ 9	T 9
	ช่องที่ 10	N 10
	ช่องที่ 11	T 10
	ช่องที่ 12	N 11
	ช่องที่ 13	T 11
	ช่องที่ 14	N 14
	ช่องที่ 15	T 14
	ช่องที่ 16	ดีเอ็นเอมาตรฐาน

N = Normal

T = Tumor



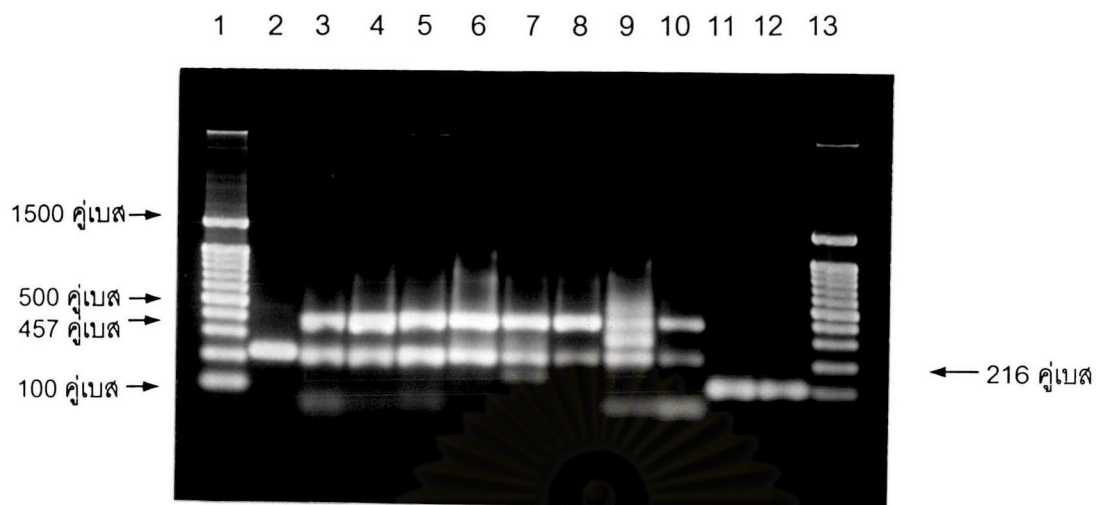
ค

- ค ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน
 ช่องที่ 2 ตัวควบคุมบวก
 ช่องที่ 3 N 15
 ช่องที่ 4 T 15

N = Normal

T = Tumor

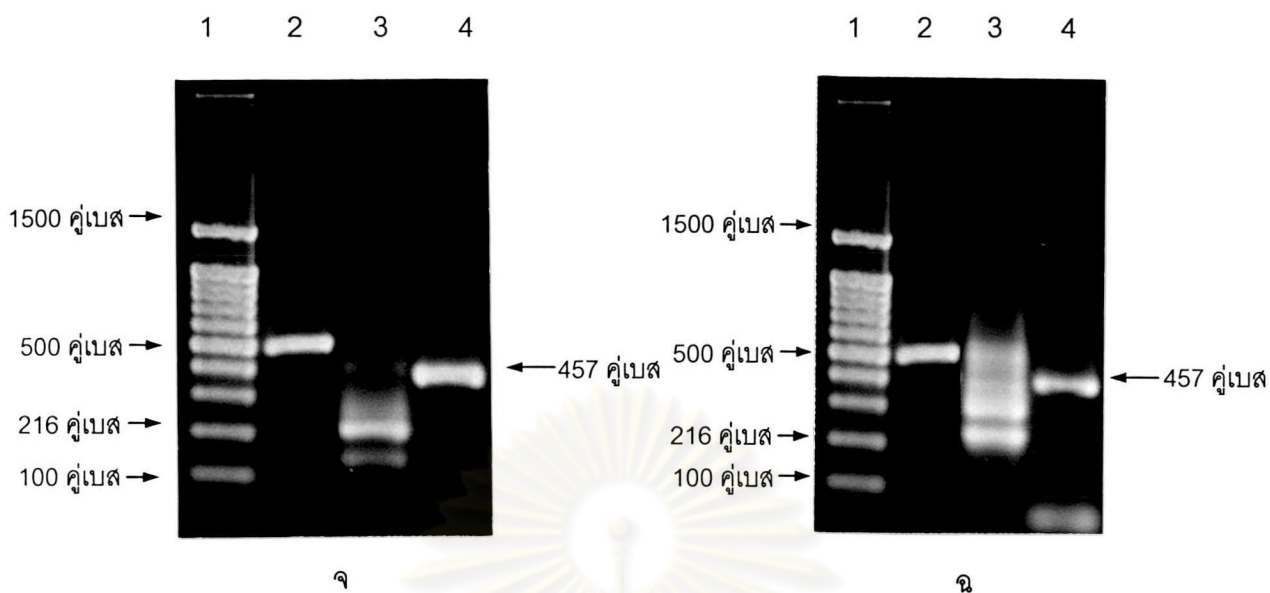
ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ช่องที่ 1	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
ช่องที่ 2	ตัวควบคุมบวก
ช่องที่ 3	N 12
ช่องที่ 4	T 12
ช่องที่ 5	N 17
ช่องที่ 6	T 17
ช่องที่ 7	N 20
ช่องที่ 8	T 20
ช่องที่ 9	N 22
ช่องที่ 10	T 22
ช่องที่ 11	ดีเอ็นเอเบตาไกลอบินของ N 1
ช่องที่ 12	ดีเอ็นเอเบตาไกลอบินของ T 1
ช่องที่ 13	ดีเอ็นเอมาตรฐาน

N = Normal

T = Tumor



จ	ช่องที่ 1	ดีเอ็นเอมาตรฐาน	ฉ	ช่องที่ 1	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
	ช่องที่ 2	ดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส		ช่องที่ 2	ดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส
	ช่องที่ 3	ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสเนื้อเยื่อ ปกติผู้ป่วยรายที่ 20		ช่องที่ 3	ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสเนื้อเยื่อ ปกติผู้ป่วยรายที่ 22
	ช่องที่ 4	ดีเอ็นเอ GAPDH เนื้อเยื่อปกติ ผู้ป่วยรายที่ 20		ช่องที่ 4	ดีเอ็นเอ GAPDH เนื้อเยื่อปกติ ผู้ป่วยรายที่ 22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสและพฤติกรรมของผู้ป่วย

เมื่อนำข้อมูลพฤติกรรมการสูบบุหรี่และดื่มสุราของผู้ป่วยโรคมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปากและข้อมูลการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรซชนิดบอกปริมาณ มาวิเคราะห์ด้วยสถิติไคสแควร์ (chi-square test) พบว่าการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อปกติมากกว่ามะเร็ง และจากเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าปกติ ไม่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ และดื่มสุราของผู้ป่วย ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การทดสอบไคสแควร์ระหว่างการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสกับพฤติกรรมการสูบบุหรี่และดื่มสุราของผู้ป่วยโรคมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปาก

พฤติกรรมผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วย		รวม	P-value
	N>T	T>N		
สูบบุหรี่				
-	3	4	7	0.81
+	3	3	6	
ดื่มสุรา				
-	4	3	7	0.41
+	2	4	6	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย