

การศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในโรคมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับ
ระหว่างผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและผู้ป่วยที่มี
ภูมิลำเนาในภาคอื่นๆ นอกจากภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ



นายวฤทธิ ลอยวิรัตน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556


ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

Comparative study of microRNA-200c expression between cholangiocarcinoma
from Thai native in northeastern regions and cholangiocarcinoma from Thai
patients native in outside the north and northeast



Mr. Warit Loywirat

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ใน
โรคมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับกัน ระหว่างผู้ป่วยที่มี
ภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
และผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาในภาคอื่นๆ นอกจากภาคเหนือ
และตะวันออกเฉียงเหนือ

โดย

นายวฤทธิ์ ลอยวิรัตน์

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ นายแพทย์ สืบพงศ์ ธารสารวิมล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภากาศ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ธนิษฐ์ อัครวิเชียรจินดา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ นายแพทย์ สืบพงศ์ ธารสารวิมล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เจตทะนง แก้วสงคราม)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เอกภพ สิริชัยนันท์)

วฤทธิ ลอยวิรัตน์ : การศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในโรคมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับ ระหว่างผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาในภาคอื่นๆ นอกจากภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ. (Comparative study of microRNA-200c expression between cholangiocarcinoma from Thai native in northeastern regions and cholangiocarcinoma from Thai patients native in outside the north and northeast) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:อ.นพ.สืบพงศ์ ธารสารวิมล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, 64 หน้า.

ที่มา โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประเทศไทยซึ่งมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับโอพิสธอร์คิสทิวเวอริณี ไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ซึ่งเป็นไมโคร อาร์เอ็นเอที่ควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งหลายชนิดและบอกการพยากรณ์โรครวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีความแตกต่างของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอชนิดนี้

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความแตกต่างของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ของผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับ ภาคอื่นๆในประเทศไทยและความสัมพันธ์กับ ลักษณะทางคลินิก

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา เก็บข้อมูลทั่วไปหลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อพาราฟินมาสกัดไมโครอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Germany และวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้โดยเครื่อง NanoDrop 2000C, Thermo Scientific, USA จากนั้นสังเคราะห์ cDNA และวัดปริมาณโดยใช้ชุด taqMan® MicroRNA Assay, Applied biosystems, USA ด้วยเครื่อง real-time PCR รุ่น 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied biosystems, USA โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับ ยู 6 แล้วนำมาคำนวณหาค่า $2^{-\Delta\Delta CT}$ โดยใช้ค่า cut off ที่ 2.0

ผลการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา 31 ราย มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 20 รายและภาคอื่นๆ 11 ราย ไม่พบความแตกต่าง ของลักษณะทางคลินิกรวมทั้งการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c โดยมีค่าเฉลี่ยของ ΔCT เท่ากับ 4.6682 (± 2.6406) และ 4.8796 (± 3.395) ตามลำดับ $p = 0.370$ มีความชุกของการเพิ่มการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ร้อยละ 22.5 และเมื่อแยกระหว่างผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ ไมโครอาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของลักษณะทางคลินิก และมีค่า มัชยฐานการรอดชีวิตที่ 22.6 เดือน (0.9 – 44.4) และ 13.6 เดือน (4.3 – 22.9) ตามลำดับ, $p = 0.923$

สรุปผลการศึกษา ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีของประเทศไทย

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5574158630 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: CHOLANGIOCARCINOMA / LIVER FLUKE / MICRORNA-200C

WARIT LOYWIRAT: COMPARATIVE STUDY OF MICRORNA-200C EXPRESSION BETWEEN CHOLANGIOCARCINOMA FROM THAI NATIVE IN NORTHEASTERN REGIONS AND CHOLANGIOCARCINOMA FROM THAI PATIENTS NATIVE IN OUTSIDE THE NORTH AND NORTHEAST. ADVISOR: SURBPONG TANASANVIMON, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. VIROTE SRIURANPONG, M.D.,Ph.D., 64 pp.

Background: Cholangiocarcinoma (CCA) is a common cancer in Thailand, where it was uniquely associated with *Opisthorchis viverrini* (OV) infection. MiRNA 200c is a miRNA involving in carcinogenesis especially epithelial mesenchymal transition. Its prognostic value has been demonstrated in several cancers. Previous study reported the aberration of miR-200c expression in CCA.

Objective: The aim of this study is to explore miR-200c expression and its clinical correlation in Thai CCA patients.

Patients and Methods: Patient who was diagnosed cholangiocarcinoma treated in King Chulalongkorn Memorial Hospital were collected. After, RNA extraction using miRNeasy FFPE kit, quantitative reverse-transcription polymerase chain reactions (RT-qPCR) using Taqman MicroRNA Assay were performed to quantitate the miRNA-200c expression. Using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of 2.0 as the cut off for miR-200c overexpression, we analysed the clinical correlation by chi-square test or Fisher exact test and Kaplan Meier method.

Results: 31 archival formalin-fixed paraffin embedded tissues (FFPE) CCA in King Chulalongkorn Memorial Hospital were collected. 20 were in northeastern region, 11 were in other regions. Baseline characteristics were balanced. Average ΔCt in northeastern region group and other regions group was 4.6682 (± 2.6406) and 4.8796 (± 3.395) respectively, $p = 0.370$. Prevalence of microRNA 200c overexpression was 22.5%. No difference in overall survival between both lower and overexpression of microRNA 200c, median overall survival was 22.6 months (0.9 – 44.4) and 13.6 months (4.3 – 22.9), $p = 0.923$.

Conclusion : There were no difference of miR-200c expression or as the predictive factor in our study.

Department: Medicine

Student's Signature

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย
สาขาวิชามะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. อ. นพ. สืบพงศ์ ธารสารวิมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
2. รศ. นพ. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
3. อ. พญ. ปิยะดา สิทธิเดชไพบูลย์ ให้คำปรึกษาการวิเคราะห์ข้อมูล

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. รศ. พญ. นฤมล วิเศษโอภาส(คล้ายแก้ว) เอื้อเพื่อให้ใช้ชิ้นเนื้อ
2. น.ส. ศิริรัตน์ สีขุนทด ตัดแบ่งชิ้นเนื้อจาก paraffin blocks

ผู้ช่วยนักวิจัย หน่วยมะเร็งวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. น.ส. ศิริพร ขุนศรี ตรวจ RT-PCR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale).....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research question).....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective).....	4
1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis).....	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)	5
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)	5
1.7 คำสำคัญ (Key word).....	5
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition).....	6
1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation).....	6
1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to solve the problems).....	7
1.11 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration).....	7
1.12 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits & Application).....	7
บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review Literatures).....	8
2.1 พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี.....	8

2.2 บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA: miRNA) ต่อพยาธิกำเนิดของมะเร็งท่อน้ำดี.....	10
2.3 บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอต่อการเกิดโรคมะเร็ง	12
2.4 การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอ.....	14
2.5 หลักการพื้นฐานของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	14
2.6 การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Real-time reverse treanscription PCR (qRT-PCR)	15
2.7 หลักการและการแปลผล Taqman qRT-PCR.....	15
2.8 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในมะเร็งท่อน้ำดี	18
2.9 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับมะเร็งท่อน้ำดี.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการการวิจัย	23
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research methodology)	23
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology).....	23
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง(Sample size determination)	23
3.4 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement).....	24
3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)	26
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	26
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	27
4.1 ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา (Baseline characteristics)	27
4.2 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200C	31
4.3 ลักษณะพื้นฐานของประชากรระหว่างกลุ่มที่มีการลดลงและการเพิ่มขึ้นของการแสดงออก ของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c.....	32
4.4 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับการพยากรณ์โรค	33
บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	35
รายการอ้างอิง	39
ภาคผนวก.....	43

ภาคผนวก ก.....	44
ภาคผนวก ข.....	59
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	64



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในมะเร็งท่อน้ำดี (microRNAs profiling) 19

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา 31 คน (Baseline characteristics) 29

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะพื้นฐานระหว่างประชากรที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ
ภาคอื่นๆ 30

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยที่มีการลดลงและการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ
miRNA200c 32



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี..... 2

รูปที่ 2 แสดงการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี..... 9

รูปที่ 3 การสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ..... 11

รูปที่ 4 miRNA-mRNA base pairing และ seed sequence..... 12

รูปที่ 5 การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ..... 12

รูปที่ 6 ความบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอต่อการเกิดมะเร็ง..... 13

รูปที่ 7 แสดงภาพขั้นตอนการทำ RT-PCR..... 17

รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างการวัดค่าระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอจากขั้นตอนการทำ qRT-PCR..... 18

รูปที่ 9 แสดงระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม 31

รูปที่ 10 แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการเพิ่มขึ้นและลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c..... 34

รูปที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบค่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ระหว่างตัวอย่างชิ้นเนื้อ ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในการศึกษานี้กับชิ้นเนื้อที่ได้จาก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น..... 36

รูปที่ 12 แสดงจังหวัดที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ ในตับ Opisthorchis viverrini..... 38

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย..... 5

แผนภูมิที่ 2 แสดงขั้นตอนการคัดเลือกผู้ปวยในการศึกษา 28



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AJCC	American Joint Committee and Cancer
CA19-9	Cancer Antigen 19-9 or Carbohydrate Antigen 19-9
CCA	Cholangiocarcinoma
COX2	Cyclooxygenase 2
CT	Computed tomography
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMT	Epithelial mesenchymal transition
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue
iNOS	inducible form of nitric oxide synthase
LVI	Lymphovascular invasion
MCL-1	Myeloid cell leukemia protein 1
miR/miRNA	Micro-ribonucleic acid
mRNA	Messenger-ribonucleic acid
MRI	Magnetic resonance imaging
MRCP	Magnetic resonance cholangiopancreatography
OV	Opisthorchis viverrini
NO	Nitric oxide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET scan	Positron emission tomography
Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primary miRNA
PSC	primary sclerosing cholangitis
RNA	Ribonucleic acid
ZEB	Zinc-finger E-box binding homeobox

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่พบได้บ่อยในประเทศไทยต่างกับประเทศในแถบตะวันตกที่พบน้อยมาก สำหรับประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วย primary liver cancer สูงที่สุดในโลกช่วงระหว่าง ปีพ.ศ. 2531-2532 ที่จังหวัดขอนแก่น โดยมีอุบัติการณ์ 90 ต่อประชากร 100,000 คน⁽¹⁾ รายงานที่ประเทศสหรัฐอเมริกา มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดี จาก 0.13 ในปี พ.ศ. 2516 เพิ่มขึ้น เป็น 0.67 ต่อ 100000 ของประชากรในปี พ.ศ. 2540 และมีอัตราการตายมากขึ้นจาก 0.07 เป็น 0.69 ต่อ 100000⁽²⁾ โดยเป็นโรคมะเร็งที่มีการพยากรณ์โรคที่แย่มากและมีอัตราการตายที่สูงมาก

อาการและอาการแสดงส่วนใหญ่เกิดจากมีการอุดตันของทางเดินน้ำดี ได้แก่ ตัวเหลือง ตาเหลือง อุจจาระมีสีซีด ปัสสาวะสีเข้ม คันตามตัว หรืออาการที่ไม่จำเพาะ เช่น เบื่ออาหาร น้ำหนักลด แต่ผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์เมื่อโรคได้ลุกลามหรือมีการแพร่กระจายไปแล้ว

การรักษาในปัจจุบันต้องอาศัยการรักษาพร้อมกันทั้งการผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัดและอาจใช้การรักษาด้วยรังสีรักษา สำหรับการผ่าตัดอาจทำได้ยากเนื่องจากตำแหน่งของเนื้องอก และผู้ป่วยมักมาพบแพทย์เมื่อโรคมะเร็งมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะข้างเคียงแล้ว จึงจำเป็นต้องรักษาแบบประคับประคองด้วยการใช้ยาเคมีบำบัด ทั้งนี้เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและลดอัตราการกลับเป็นซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเยื่อบุท่อน้ำดี (bile duct epithelium) โดยแบ่งตามตำแหน่งได้เป็น⁽³⁾

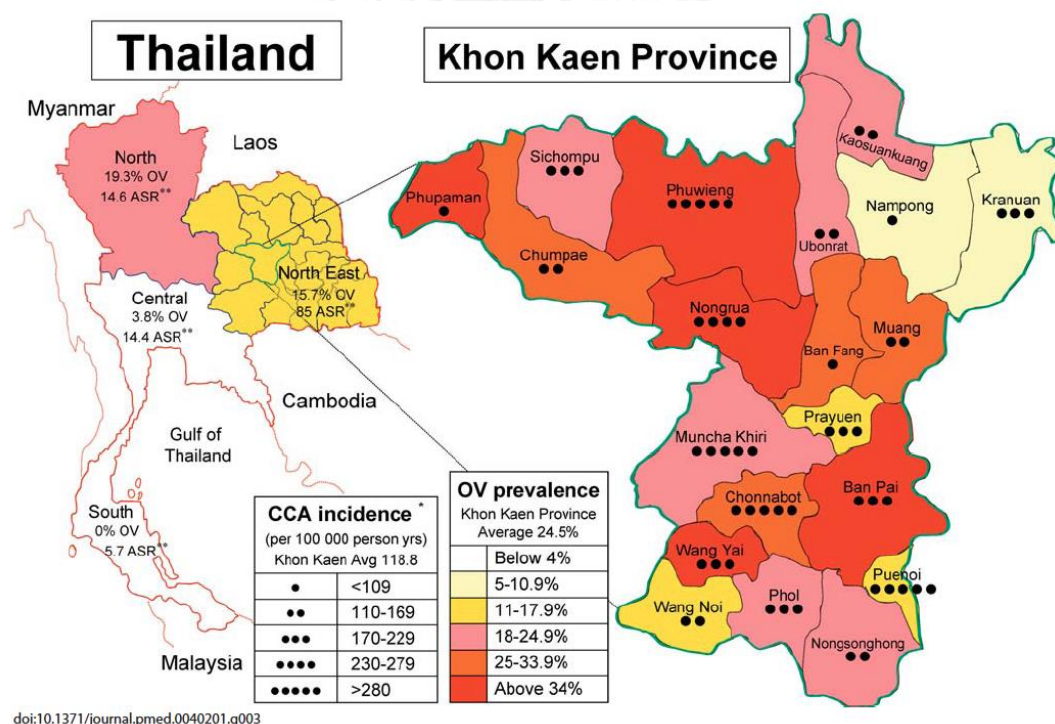
- 1) Intrahepatic cholangiocarcinoma (Peripheral cholangiocarcinoma)
- 2) Hilar cholangiocarcinoma (Klastskin's tumor)
- 3) Extrarhepatic cholangiocarcinoma (Distal cholangiocarcinoma)

โดยตำแหน่งที่พบบ่อยที่สุดคือ บริเวณ hilar ประมาณร้อยละ 50 - 70 รองลงมาคือ extrahepatic ประมาณร้อยละ 20 - 40 ที่เหลือประมาณร้อยละ 5 - 10 พบใน intrahepatic bile duct^(4, 5) ซึ่ง intrahepatic cholangiocarcinoma พบเป็น primary hepatic tumor ที่พบเป็นอันดับสองรองจาก hepatocellular carcinoma

ประเทศไทยร้อยละ 40 - 60 เป็นชนิด intrahepatic cholangiocarcinoma ซึ่งต่างจากประเทศในแถบตะวันตกที่พบว่าเป็น intrahepatic cholangiocarcinoma เพียงร้อยละ 5 - 10

เท่านั้น ส่วนที่เหลือร้อยละ 90 – 95 จะเป็น extrahepatic cholangiocarcinoma⁽⁶⁾ และเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าโรคมะเร็งท่อน้ำดีพบได้บ่อยทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้น สัมพันธ์กับการ ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ โดยเฉพาะ *Opisthorchis viverrini* (OV) จากการกินอาหารสุกๆดิบๆ เช่น ลาบ ก้อย ปลา ร้า ที่ได้จากการหมัก ปลาน้ำจืด ซึ่งปลาเหล่านั้นติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ จากการที่ปลาไปกิน *Bithynia* snails ที่เป็น intermediate host ของ *Opisthorchis viverrini* แตกต่างจากประเทศแถบตะวันตกที่มีปัจจัยเสี่ยงจากโรค primary sclerosing cholangitis (PSC) เป็นส่วนใหญ่^(1, 6-8)

สำหรับความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับนั้น Sripa และคณะ⁽⁹⁾ ได้มีการรายงานข้อมูลของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2533 - 2534 ซึ่งตรวจการติดเชื้อพยาธิด้วยการตรวจ anti-O. Viverrini antibody พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค โดยพบมากที่สุดใภาคเหนือร้อยละ 19.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือร้อยละ 15.7 ซึ่งมีความชุกมากเมื่อเทียบกับภาคกลางและภาคใต้ พบเพียงร้อยละ 3.8 และ 0 ตามลำดับ ส่วนอุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีก็ยังคงพบมากที่สุด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยพบมากที่สุดที่จังหวัดขอนแก่นเช่นเดิม ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

ปัจจุบันยังไม่มี การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่จำเพาะสำหรับมะเร็งท่อน้ำดี แต่มักมีค่า serum total, direct bilirubin และ serum alkaline phosphatase สูงกว่าค่าปกติ จากภาวะอุดตัน ทางเดินน้ำดี (obstructive jaundice)⁽¹⁰⁾

สำหรับ tumor marker นั้นยังไม่มีตัวไหนที่จำเพาะกับโรคมะเร็งท่อน้ำดี การใช้ CA 19-9 อาจพอมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วย PSC โดยจากการศึกษาของ Eduardo และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่าถ้าเอาค่า CA 19-9 สูงกว่า 180 U/ml พบว่ามี sensitivity และ specificity สูงถึงร้อยละ 68 และ 98 ตามลำดับ แต่ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่พบ PSC ร่วมจะมี sensitivity เพียงร้อยละ 53 โดยเอาที่ค่า CA 19-9 > 100 U/L⁽¹²⁾ นอกจากนี้ CA 19-9 ก็ยังสามารถตรวจพบมีค่าสูงกว่าปกติได้ในบางภาวะอื่นด้วย เช่น มะเร็งตับอ่อน, มะเร็งกระเพาะ, การติดเชื้อมะเร็งท่อน้ำดี หรือมีการอุดตันของท่อน้ำดีเป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยด้วยการตรวจทางรังสีวิทยา⁽¹³⁾

Ultrasound มีประโยชน์ในการวินิจฉัย โดยใช้เป็นเครื่องมือแรกในการหาสาเหตุ วินิจฉัยและประเมินผู้ป่วยที่มาด้วยอาการเหลือง สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีอาจพบเป็น intrahepatic mass หรือพบมีการขยายตัวของท่อน้ำดี ทั้งในตับหรือนอกตับ (intra or extrahepatic duct dilatation) และช่วยวินิจฉัยแยกสาเหตุจากนิ่วในท่อน้ำดีด้วย นอกจากนี้ การใช้ Doppler เพื่อช่วยในการประเมิน vascular invasion และช่วยคัดแยกแพทย์ในการประเมินว่า สามารถทำการผ่าตัดได้หรือไม่ ข้อเสียคือ extrahepatic lesion ได้ไม่ชัดและเป็น operator dependent

MRI/MRCP จะเห็นเป็น heavily T2-weight lesion สามารถแสดงภาพ biliary tree ทั้งหมด, liver parenchyma และ vascular structure เป็นภาพ 3 มิติ (three-dimensional images) ทำให้เห็นลักษณะ และขอบเขตของก้อนมะเร็งและการลุกลามเข้าไปในเส้นเลือดได้ดี และเป็น non invasive study แต่มีข้อเสียคือ ไม่มีใช้ในทุกรัฐพยาบาล และมีราคาแพง

A triple phase helical CT scan พบลักษณะเป็น high density ใน delay phase สำหรับ intrahepatic cholangiocarcinoma มักจะพบลักษณะเป็น hypodense mass, irregular margins, มี satellite tumor และมี capsular retraction ส่วน extrahepatic cholangiocarcinoma จะเห็น การหนาตัวของท่อน้ำดีและการขยายตัวของท่อน้ำดีส่วนที่อยู่เหนือระดับที่ถูกอุดตันและยังใช้ดูการลุกลามของเส้นเลือด portal vein ได้ดี โดยมีความไวและ ความจำเพาะถึงร้อยละ 100 และ ร้อยละ 90 ตามลำดับ

PET scan (Positron emission tomography) ช่วยในการวินิจฉัยแยกรอยโรคระหว่าง benign และ malignancy มีความไวประมาณร้อยละ 80 แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถวินิจฉัยรอยโรคที่มีขนาดเล็กกว่า 1 เซนติเมตรได้

จะเห็นได้ว่าปัจจุบันโรคมะเร็งท่อน้ำดียังคงมีปัญหาทั้งในด้านการวินิจฉัย การรักษา รวมทั้งการพยากรณ์โรค เนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่ทำในประเทศแถบตะวันตก ซึ่งมีสาเหตุและ ปัจจัยเสี่ยง ที่ต่างจากเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีสาเหตุหลักจากพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchis viverrini

1.2 คำถามของการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (primary research question)

การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีความแตกต่างกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากภาคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีค่าเฉลี่ยการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอต่างกันมากกว่า 9 หรือไม

คำถามรอง (secondary research question)

การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c มีผลต่อลักษณะทางคลินิกและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

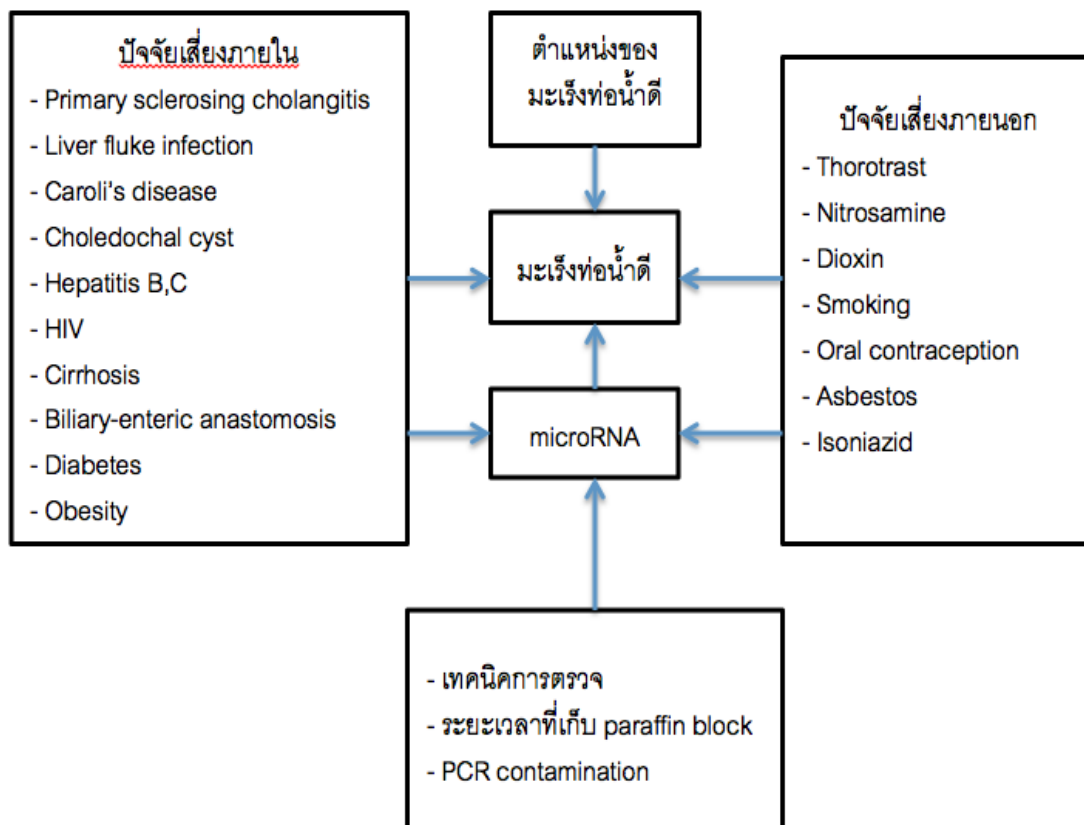
เพื่อทราบความแตกต่างของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในโรคมะเร็งท่อน้ำดีระหว่างภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและภาคอื่นๆ นอกจากภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ

1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis)

Ho : การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีการแสดงออกไม่ต่างจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากภาคอื่นๆ นอกจากภาคเหนือและ ตะวันออกเฉียงเหนือ

Ha : การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วยจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการแสดงออกต่างจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากภาคอื่นๆ นอกจาก ภาคเหนือและ ตะวันออกเฉียงเหนือ

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ไม่มี

1.7 คำสำคัญ (Key word)

Cholangiocarcinoma

Liver fluke

microRNA-200c

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition)

มะเร็งท่อน้ำดี หมายถึง Intrahepatic, Extrahepatic และ Hilar cholangiocarcinoma

ภูมิภาคของประเทศไทยแบ่งตามการปกครอง ตามคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ

ภาคเหนือ หมายถึง 17 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง ลำพูน ตาก อุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร นครสวรรค์ และ อุทัยธานี

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หมายถึง 19 จังหวัด ได้แก่ หนองคาย นครพนม สกลนคร อุตรธานี หนองบัวลำภู เลย มุกดาหาร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ ยโสธร ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี

ภาคอื่นๆ หมายถึง จังหวัดอื่นๆ ที่ไม่ได้อยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

สำหรับภูมิลำเนาที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จะได้จากเวชระเบียนและโทรศัพท์สอบถามโดยตรงอีกครั้ง โดยผู้ป่วยที่เคยอาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเกินสิบปีขึ้นไป แม้ว่าจะมีการย้ายที่อยู่ก็ให้ถือว่ามีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากระยะเวลาของการเกิดมะเร็งหลังติดเชื้อ ยังไม่มีรายงานว่าจะต้องใช้เวลาานเท่าใด แต่เชื่อว่าต้องใช้เวลาในการติดเชื้อซ้ำๆ เป็นสิบปีขึ้นไป⁽¹⁴⁾

1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

- 1) การตรวจสถานะไมโครอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ชั้นเนื้อพาราฟิน ที่ทำการเก็บไว้นาน อาจให้ผลลบลวงจากการตรวจได้เนื่องจากการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ
- 2) เนื่องจากการศึกษาแบบย้อนหลัง โดยได้ประวัติจากเวชระเบียน ทำให้เราไม่สามารถทราบ ประวัติได้ครบถ้วน โดยเฉพาะอุปนิสัยในการกินเนื่องจากปัจจุบันอาหารอีสานก็ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย
- 3) ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จะมีผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในทุกภูมิภาคของ ประเทศไทย แต่ส่วนใหญ่จะเป็นผู้ป่วยที่ส่งตัวมารักษาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนผู้ป่วยจาก ภาคอื่นจะมีจำนวนน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นปัญหาในการเก็บรวบรวมข้อมูลได้

1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to solve the problems)

อาจมีปัญหามาจากการสกัดไมโครอาร์เอ็นเอจากชิ้นเนื้อที่เก็บไว้นานทำให้ได้ข้อมูลไม่ครบ ซึ่งต้องแก้ ปัญหาด้วยการเก็บชิ้นเนื้อเพิ่มเติมในคนไข้ที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีรายใหม่

1.11 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)

1) หลักความเคารพในบุคคล (respect of person) โดยการขอความยินยอมเข้าร่วมในงานวิจัย แต่การวิจัยนี้เป็นการศึกษาจากเวชระเบียนและไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจึงต้องการขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย โดยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อใช้เวชระเบียนและตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย

2) หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) ผู้ป่วยจะไม่รับ ประโยชน์ใดๆ โดยอาจเกิดความเสียหายต่อตัวผู้ป่วยเพียงเล็กน้อย คือ ความลับของผู้ป่วยอาจถูกเปิดเผยแต่ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้ป่วยโดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มีตัวระบุ(identifier) ที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย

3) หลักความยุติธรรม (Justice) โดยผู้วิจัยมีเกณฑ์การคัดเลือกและคัดออกที่ชัดเจน

1.12 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits & Application)

- ทราบถึงความแตกต่างของกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยงจากพยาธิใบไม้ในตับและ ปัจจัยอื่นโดยผ่านทางไมโครอาร์เอ็นเอ ซึ่งอาจเป็นจุดเริ่มในการเปลี่ยนแปลงวิธีการรักษาให้เหมาะสม ในอนาคตต่อไป

- ช่วยยืนยันผลการศึกษาที่ได้ก่อนหน้านี้ว่าความแตกต่างของผลการศึกษาที่ได้ว่าไม่ได้เกิดจากความ แตกต่างของเชื้อชาติ

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review Literatures)

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากพบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) ซึ่งสัมพันธ์กับพฤติกรรมการบริโภคของประชาชนในภูมิภาค นอกจากนี้อุบัติการณ์การเกิดโรคที่สูงแล้ว มะเร็งท่อน้ำดียังมีปัญหาทั้งในแง่การขาดเครื่องมือวินิจฉัยที่รวดเร็ว ผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ และตรวจพบเมื่อมีอาการ และการกระจายของโรคมามากแล้ว รวมทั้งยังขาดการพัฒนาการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ทำให้มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีนัก ทั้งนี้ทั้งนั้นส่วนหนึ่ง เป็นเพราะแพทย์และนักวิทยาศาสตร์ ยังขาดความรู้ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของมะเร็งท่อน้ำดี อย่างถ่องแท้ และการแปลผลการศึกษาจากประเทศมีข้อจำกัดในการนำมาใช้สำหรับผู้ป่วยของ ประเทศไทย เนื่องจากความเสี้ยว และสาเหตุของโรคต่างกัน

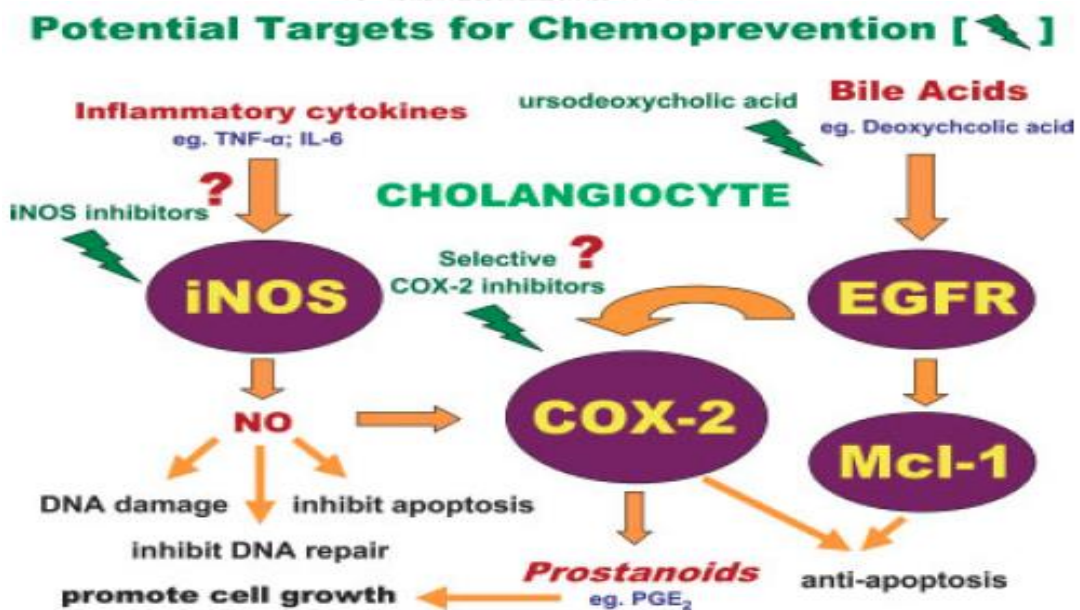
การศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA: miRNA) ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการแสดงของ ยีน สามารถนำมาซึ่งความเข้าใจเพิ่มเติมของพยาธิกำเนิดของมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้^(15, 16) สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีก็เช่นกัน ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามี การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c แตกต่างกันระหว่าง ผู้ป่วยต่างประเทศกับผู้ป่วยของประเทศไทย และสามารถเป็นตัวทำนายการพยากรณ์โรคได้ด้วย⁽¹⁷⁾ การศึกษานี้จึงมุ่งหมายที่จะทำความเข้าใจการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในผู้ป่วยชาวไทย โดยเฉพาะจากกลุ่มที่มีความเสี่ยงคือจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ว่ามีความแตกต่างจากผู้ป่วย ภูมิภาคอื่นอย่างไร เพื่อจะนำมาซึ่งการพัฒนาเครื่องมือในการวินิจฉัย การพยากรณ์ หรือแม้กระทั่ง การรักษาที่มีประสิทธิภาพต่อไป

2.1 พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี

การอักเสบเรื้อรังของท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง^(18, 19) จากรูปที่ 2 ภาวะที่มีการอักเสบ Inflammatory cell และ cholangiocyte จะมีการหลั่งสาร cytokine จำนวนมาก เช่น TNF-alpha, IL-6 โดย cytokine เหล่านี้จะไปกระตุ้นให้ cholangiocyte ผลิต inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็น potent form ของ nitric oxide (NO) ทำให้เกิด direct DNA damage อีกทั้งยังไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DNA base ของ cholangiocyte นอกจากนี้ iNOS ยังจะทำให้เกิดกระบวนการ nitrosylation และไป inactivate DNA repair protein ทำให้มีการสะสมของ damaged DNA base มากขึ้น ก่อให้เกิดกระบวนการ mutagenesis ในที่สุด

Bile acid ทำให้เกิดการกระตุ้น epidermal growth factor receptor ใน cholangiocyte และ เหนี่ยวนำให้เกิด cyclooxygenase (COX)-2 expression และ myeloid cell leukemia protein 1 (MCL-1) ซึ่ง COX-2 ไปยังยับยั้งขบวนการ apoptosis และไปกระตุ้นขบวนการ angiogenesis ส่วน MCL-1 เป็น potent antiapoptotic จึงมีผลทำให้เพิ่มการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของ cholangiocarcinoma cell

สำหรับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับซึ่งเป็นสาเหตุของการมะเร็งท่อน้ำดี ตั้งอยู่บนสมมติฐานของการอักเสบของท่อน้ำดีจากการระคายเคืองในท่อน้ำดีที่เกิดจากการเคลื่อนตัวของพยาธิ ทำให้มีการอักเสบและหลุดลอกของเยื่อบุผิวทางเดินน้ำดี เหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทน และยังกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระจำนวนมาก เช่น nitric oxide ซึ่งนำไปสู่การเกิดมะเร็งต่อไป ระยะเวลาของการเกิดมะเร็งหลังติดเชื้อยังไม่มีรายงานว่าต้องใช้เวลานานเท่าใด แต่เชื่อว่าจะต้องใช้เวลาในการติดเชื้อซ้ำๆ เป็นสิบปีขึ้นไป^(20, 21)



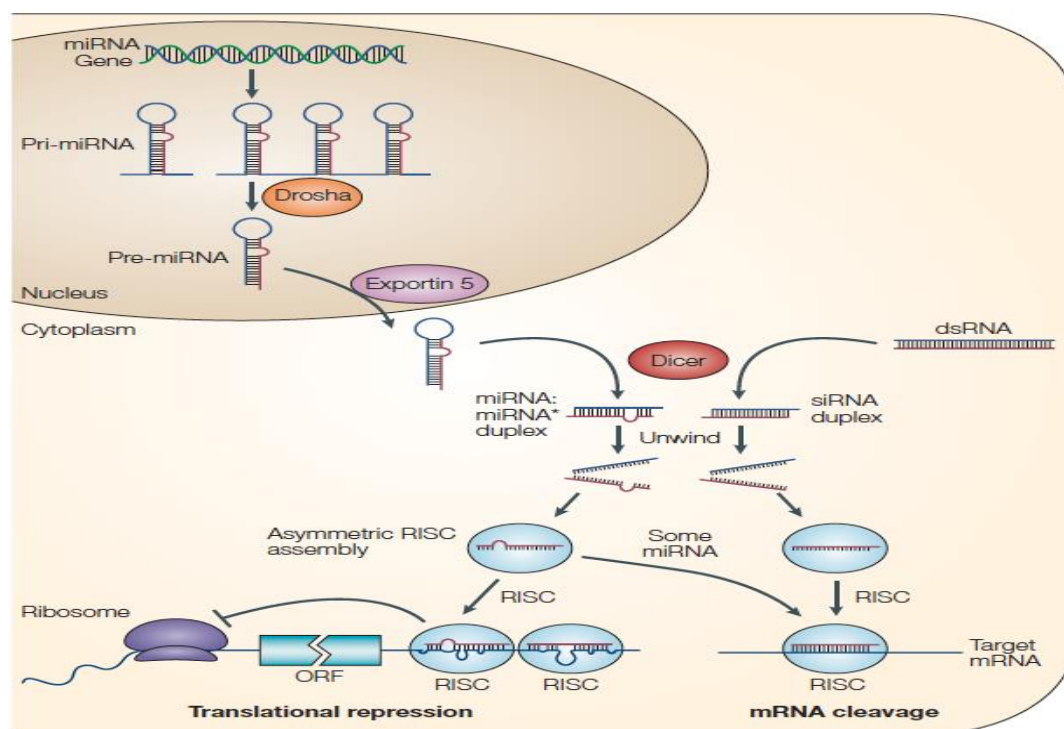
รูปที่ 2 แสดงการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

2.2 บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA: miRNA) ต่อพยาธิกำเนิดของมะเร็งท่อน้ำดี

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA)

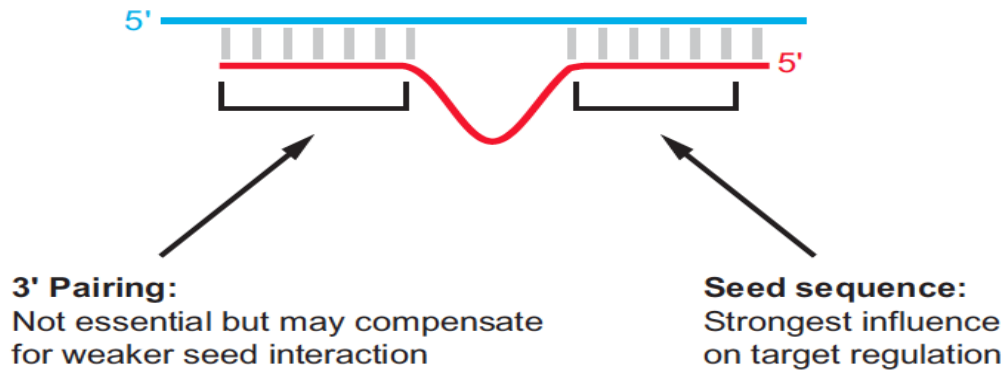
ไมโครอาร์เอ็นเอเป็น non-coding RNA สายเดี่ยวขนาดสั้น ๆ ประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนภายหลังกระบวนการสร้างแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) แล้ว (post-transcriptional gene expression) จึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA sequence เดิมของจีโนม (epigenetic regulation)⁽²²⁾

การสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ⁽²²⁾ (รูปที่ 3) เกิดขึ้นในนิวเคลียสโดยการ transcription ของ miRNA gene ซึ่งโดยมากอยู่บริเวณที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (intron) ของจีโนมโดยเอนไซม์ RNA polymerase II ทำการสร้างโมเลกุลที่เป็น precursor ได้แก่ pri-miRNA ซึ่งมีขนาดยาว และมีลักษณะคล้ายก๊อบิตติดม (hairpin-structured) ต่อมา pri-miRNA ถูกตัดโดยเอนไซม์ในกลุ่ม RNase III ได้แก่ Drosha ซึ่งทำงานร่วมกับ DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) cofactor ได้เป็น pre-miRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 70 นิวคลีโอไทด์ และถูกส่งออกมายัง ไซโตพลาสซึมโดยโปรตีน exportin-5 หลังจากนั้นเอนไซม์ Dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์อีกตัวในกลุ่ม RNase III จะทำหน้าที่ตัด pre-miRNA เกิดเป็นไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า miRNA-miRNA* duplex ซึ่งจะถูกแยกโดยเอนไซม์ RNA helicase โดยที่สายหนึ่ง (ที่มักจะเป็นสายที่มีปลายด้าน 5' ที่เสถียรน้อยกว่า) จะไปรวมกับโปรตีนในกลุ่ม Argonaute (Ago) family เกิดเป็น miRNA-Induced Silencing Complex (miRISC) ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอต่อไป ในขณะที่อีกสายหนึ่งจะสลายไป

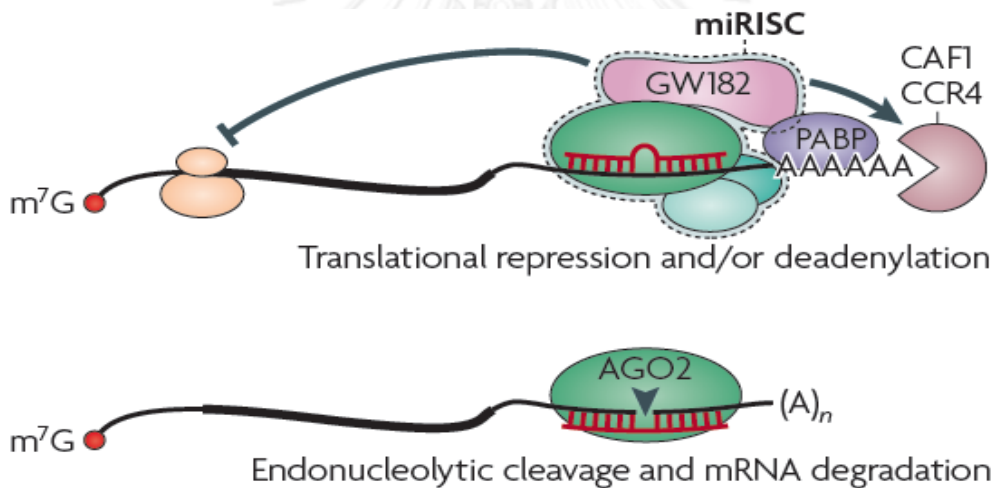


รูปที่ 3 การสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

กลไกการยับยั้งการสร้างโปรตีนของไมโครอาร์เอ็นเอ เกิดโดยมีการจับกันของเบสคู่สมบน ไมโครอาร์เอ็นเอกับแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (miRNA-mRNA base pairing) โดยตำแหน่งที่สำคัญได้แก่ ปลายทางด้าน 5'UTR ของไมโครอาร์เอ็นเอประมาณ 2-8 นิวคลีโอไทด์ ที่เรียกว่า seed sequence ทำให้ไมโครอาร์เอ็นเอสามารถจับกับเบสทางด้าน 3'UTR ของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเป้าหมายได้⁽²⁴⁾ (รูปที่ 4) ถ้าการจับของเบสเป็นไปอย่าง สมบูรณ์โดยเฉพาะที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 10 และ 11 (perfectly complementary) จากทางด้าน 5' end ของไมโครอาร์เอ็นเอ จะทำให้เกิดการสลายของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอโดยการ endonucleolytic cleavage โดยโปรตีน Ago2 ซึ่งมี slicer activity อย่างไรก็ตามการจับกันของไมโครอาร์เอ็นเอกับแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอในสัตว์มักเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ (imperfect base-pairing) แต่ไมโครอาร์เอ็นเอก็สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีน โดยสามารถกดกระบวนการ translation (translational repression) และ/หรือ ทำให้เกิด deadenylation⁽²²⁾ (รูปที่ 5) ขบวนการทั้งหมดนี้เกิดขึ้นที่บริเวณเฉพาะในไซโตพลาสซึม ที่เรียกว่า processing body (P-bodies หรือ GW-bodies) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเอ็นไซม์สำคัญ ในการสลายแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอหรือการยับยั้งการสร้างโปรตีนรวมทั้ง Ago proteins จำนวนมากมารวมกัน^(25, 26)



รูปที่ 4 miRNA-mRNA base pairing และ seed sequence

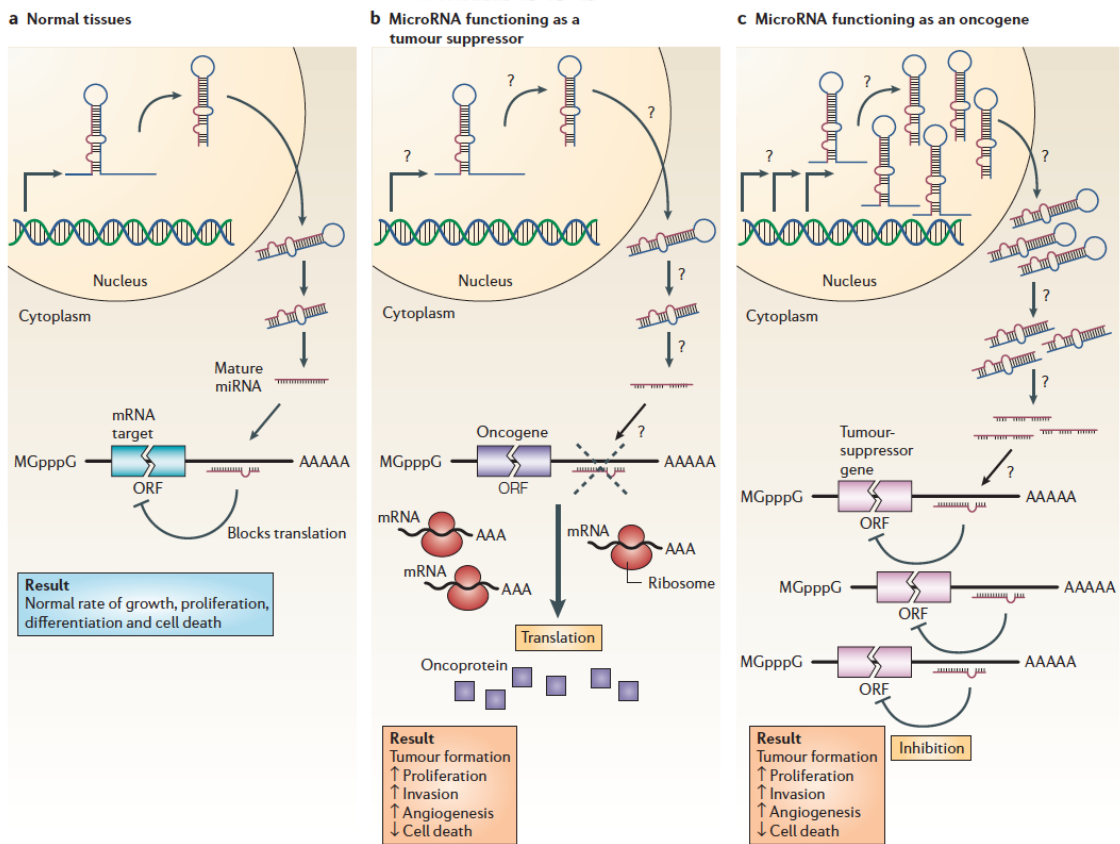


รูปที่ 5 การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ

2.3 บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอต่อการเกิดโรคมะเร็ง

จะเห็นได้ว่าไมโครอาร์เอ็นเอมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ดังนั้นหากแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเป้าหมาย (target mRNA) ถอดรหัส (transcription) มาจากยีนด้านการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor gene) การแสดงออกที่มากผิดปกติของไมโครอาร์เอ็นเอนั้นก็จะมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดมะเร็ง หรืออาจเรียกว่า ไมโครอาร์เอ็นเอก่อมะเร็ง (oncogenic miRNA) ในขณะที่ mRNA เป้าหมายที่ถอดรหัสมาจากยีนก่อมะเร็ง (oncogene) การแสดงออกผิดปกติของไมโครอาร์เอ็นเอเหล่านี้ย่อมจะมีผลต่อต้านการเกิดมะเร็งได้ หรืออาจเรียกว่า ไมโครอาร์เอ็นเอต้านมะเร็ง (tumor

suppressor miRNA) ดังนั้นการแสดงออกที่ผิดปกติของไมโครอาร์เอ็นเอ จึงมีส่วนเกี่ยวกับการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ได้^(15, 16) (รูปที่ 6) มีการศึกษามากมายแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอกับมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น miR-15a, miR-16-1 ในโรค B-cell chronic lymphocytic leukemia , miR-143, miR-145 ใน colorectal,breast,prostate และ cervical cancer miR-21 ใน glioblastoma เป็นต้น^(16, 27, 28)



รูปที่ 6 ความบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอต่อการเกิดมะเร็ง

2.4 การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอ

การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอสามารถทำได้โดยวิธีทั่วไปที่ใช้ในการตรวจหาแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอแต่เนื่องจากไมโครอาร์เอ็นเอมีขนาดเล็กกว่าแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอมาก ทำให้มีเสถียรภาพมากกว่า จึงสามารถตรวจพบได้ง่ายกว่า ทั้งในชิ้นเนื้อ, เซรั่ม, หรือสารน้ำต่าง ๆ ในร่างกายได้^(29, 30)

วิธีการดั้งเดิมในการตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอ ได้แก่ นอร์เทิร์นบลอต (Northern blots) แต่ก็เป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในด้านความไวและจำเป็นต้องใช้อาร์เอ็นเอจำนวนมาก จึงได้มีการพัฒนาวิธี การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอที่มีปริมาณน้อย มีความไวเพิ่มขึ้น รวมทั้งยังสามารถแยก mature miRNAs จาก precursors และแยกความแตกต่างระหว่าง highly homologous mature miRNAs ได้ วิธีเหล่านี้ ได้แก่ real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (realtime RT-PCR, qRT-PCR), modified invader assay และ confocal laser-induced fluorescence detection การเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับความถนัดและอุปกรณ์ที่หาได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการและจุดประสงค์ของ การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอที่ต้องการ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการตรวจหาแบบ large-scaled screening โดยการทำให้ miRNA microarrays และการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ บนเนื้อเยื่อโดย in situ hybridization อีกด้วย⁽²⁷⁾

2.5 หลักการพื้นฐานของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ (amplification) ของส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่⁽³¹⁾

- ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Template DNA) ที่ต้องการเพิ่มจำนวน
- Thermostable DNA polymerase ส่วนใหญ่สกัดจากแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง
- ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) ที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์
- ดิวอกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP
- บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม
- Thermal cycler เครื่องสำหรับปรับเปลี่ยนอุณหภูมิตามโปรแกรมที่ตั้งไว้

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรถูกโซ่ ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3

ขั้นตอน

1. ขั้นตอนการสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (Denaturation)

เป็นการแยกสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่พันกันเป็นเกลียวแยกออกจากกัน โดยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงเพียงพอที่จะทำให้ดีเอ็นเอตั้งต้น เกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติ ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจแตกต่างกันตาม องค์ประกอบของเบส

2. ขั้นตอนการเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอตั้งต้นกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ (Annealing)

เมื่อดีเอ็นเอมีการแยกเป็นสายเดี่ยวแล้ว จะทำให้เกิดการเข้าคู่ระหว่างไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ทั้งสองสาย โดยการปรับอุณหภูมิลงให้เหมาะสม ทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ ประมาณ 50-58 องศาเซลเซียส

3. ขั้นตอนการต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Extension)

หลังจากดีเอ็นเอไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์แล้ว เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) จะทำการเลือกนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ยาวขึ้น ซึ่งจะใช้อุณหภูมิประมาณ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส

2.6 การตรวจหาไมโครอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Real-time reverse treanscription PCR (qRT-PCR)

Real-time reverse treanscription PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอ เนื่องจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสปกติสามารถทำการศึกษได้เฉพาะดีเอ็นเอ เพราะฉะนั้นจึงต้องเพิ่มขั้นตอนการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complimentary DNA (cDNA) โดยอาศัยเอนไซม์ รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) เสียก่อนจึงจะทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ต่อไปได้

Quantitative PCR (qPCR) เป็นวิธีการทางชีวโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อลดข้อจำกัดของ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) ที่ไม่สามารถแสดงผลการทดสอบเป็นตัวเลขเพื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ๆ ได้ โดยงานวิจัยนี้ใช้ชุดทดสอบเฉพาะของบริษัท taqMan® MicroRNA Assay, Applied biosystems, USA ซึ่ง Taqman assay นั้น เป็นการพัฒนา qPCR ไปอีกขั้นหนึ่ง เพื่อเพิ่มความจำเพาะของการศึกษา เนื่องจาก qPCR โดยใช้สีย้อม SYBR Green นั้นจับกับ DNA แบบไม่จำเพาะ ได้แสดงขั้นตอนในภาคผนวก

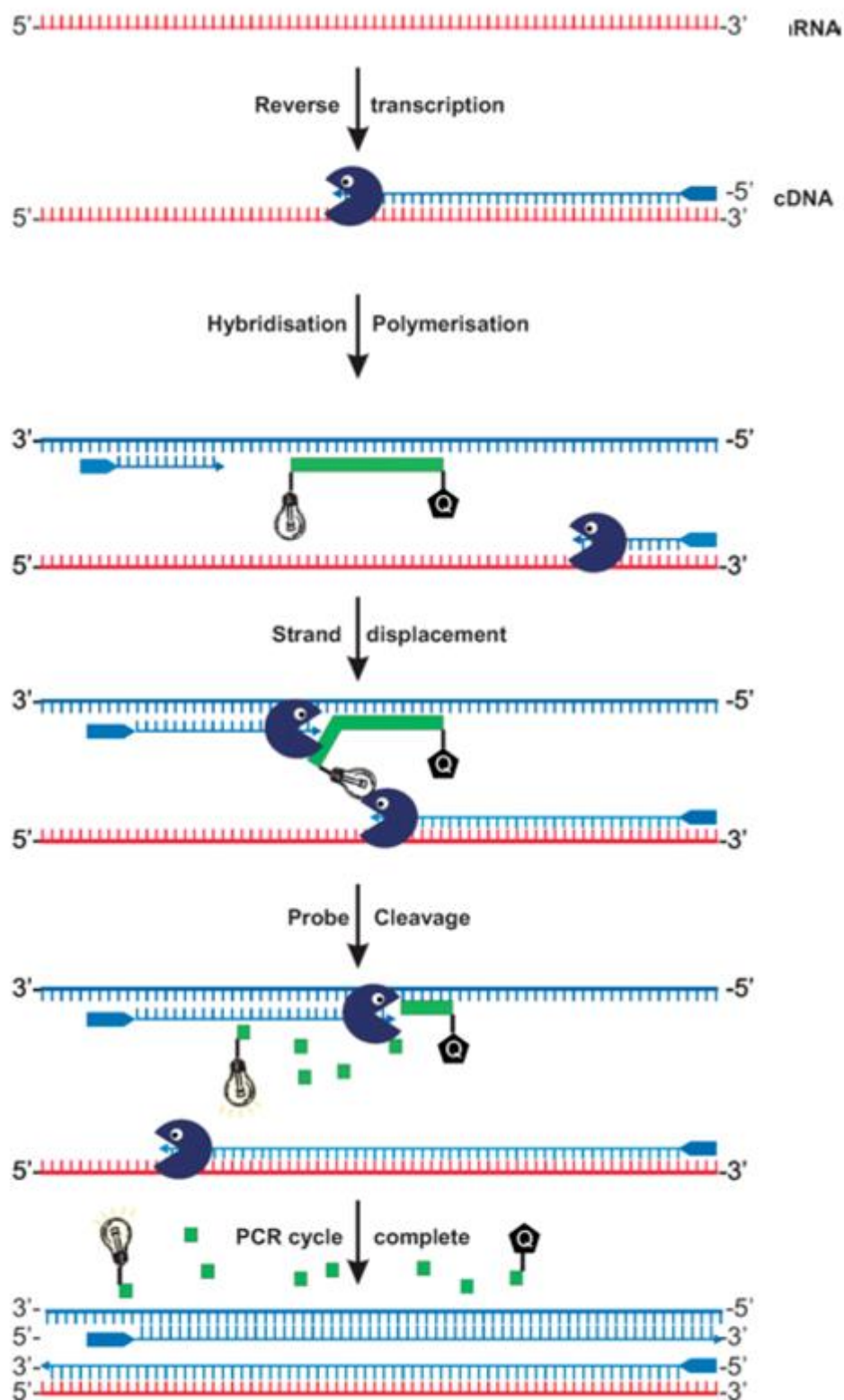
2.7 หลักการและการแปลผล Taqman qRT-PCR

หลักการของ Taqman assay⁽³¹⁾ นั้นใช้ประโยชน์จากการออกแบบ probe โดยที่ปลายด้าน 5' ของ probe นั้นประกอบด้วย fluorophore และปลายด้าน 3' ประกอบด้วยโมเลกุลที่เรียกว่า quencher ซึ่งตรงเท่าที่ quencher อยู่ในระยะทางที่ใกล้กับ fluorophore จะยับยั้งการปล่อยสัญญาณ fluorescent signal จาก fluorophore โดย fluorescent resonance energy transfer (FRET) และถ้าเมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอเกิดขึ้น DNA polymerase จะย่อย probe ทำให้ quencher

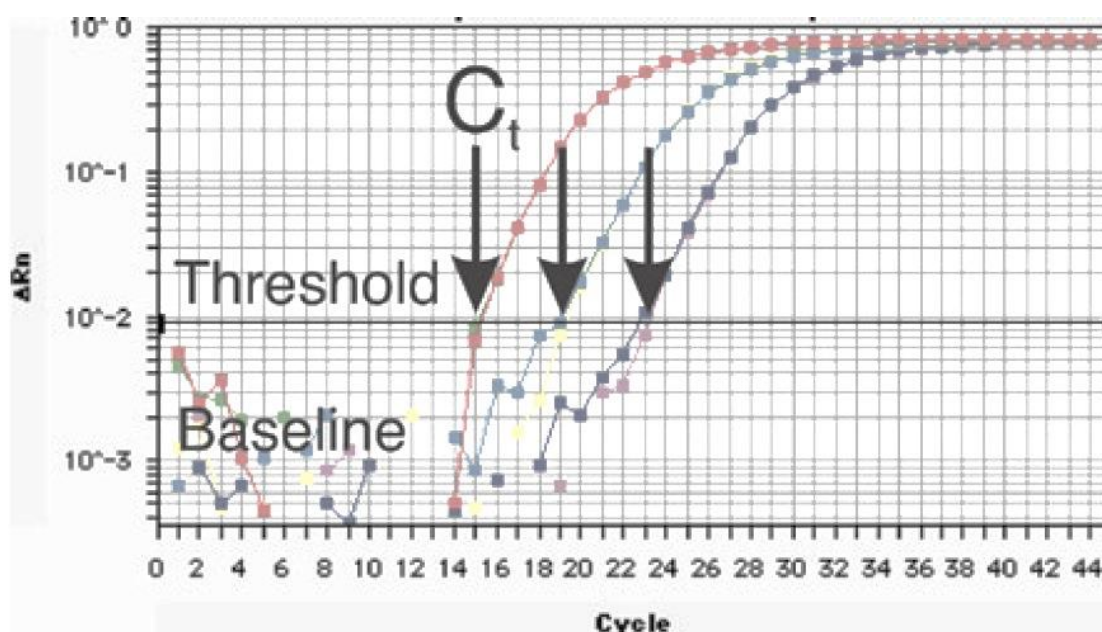
อยู่ห่างจาก fluorophore และสามารถวัดความเข้มของสัญญาณ fluorescent ได้ การออกแบบ probe นี้เองเป็นการช่วยเพิ่มความจำเพาะของการทดสอบ เนื่องจาก probe ต้องสามารถจับกับ DNA สายเดี่ยวได้ นอกจากนี้ taqman assay ยังช่วยในการทำ multiplex PCR โดยการเปลี่ยนชนิดของ probe และ fluorophore ได้อีกด้วย สรุปหลักการการทำ Taqman qRT-PCR ดังรูปที่ 7

ซึ่งผลลัพธ์จะแสดงออกมาเป็นความสัมพันธ์ของสัญญาณ fluorescent กับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส จากรูปจะเห็นว่าในระยะแรกสัญญาณ fluorescent ไม่สามารถถูกวัดได้จนต่อเมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้น สัญญาณ florescent จะเพิ่มขึ้นแบบ exponential และ เข้าสู่ระยะคงที่ในที่สุด ค่า end-point ที่ต้องการจากการทำ qPCR นั้นเรียกว่า threshold cycle (CT value) ซึ่งก็คือ รอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส ที่ปริมาณสัญญาณ เข้าสู่ threshold ที่กำหนดโดยผู้ทำการทดสอบหรือเครื่องมือทำปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเลส ดังรูปที่ 8

ค่า CT นี้เป็นค่าที่นำไปใช้ในการแปลผลการทดสอบ โดยคร่าว ๆ นั้น ถ้าค่า CT มากแสดงว่าการปริมาณสารพันธุกรรมน้อย (จึงต้องใช้เวลามากกว่าถึงจะถึง (threshold) ในทางคลินิก นั้นนิยม นำค่า CT แปลผลกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ได้ผลเป็นปริมาณของสารพันธุกรรม ที่ต้องการตรวจสอบ (copies/volume) แต่สำหรับการวิจัยทางชีวโมเลกุลทั่วไปนั้นไม่สามารถทำกราฟมาตรฐานได้สำหรับทุกชนิดของสารพันธุกรรม จึงนิยมวัดการแสดงออกของยีนแบบสัมพันธ์แทน (relative gene expression) ไม่ว่าจะโดยวิธี efficiency correction method, sigmoid curve fitting หรือ comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) โดยแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียต่างกันไป โดยสำหรับการศึกษาของเราเลือกใช้ comparative CT method เนื่องจากทำได้ง่ายและสามารถแสดงผลแบบ fold change เทียบระหว่างสองตัวอย่างได้และเป็นแบบแผนเดียวกับการรายงานผลในการศึกษาก่อนหน้าโดยใช้สมการ $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$ โดย $\Delta\Delta CT = (\text{CT gene of interest} - \text{CT internal control sample A}) - (\text{CT gene of interest} - \text{CT internal control sample B})$ จะเห็นว่าถ้าสองตัวอย่าง มีการแสดงออกของยีนไม่ต่างกัน จะได้ผลเท่ากับ $2^0 = 1$ ⁽³³⁾



รูปที่ 7 แสดงภาพขั้นตอนการทำ RT-PCR



รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างการวัดค่าระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอจากขั้นตอนการทำ qRT-PCR

2.8 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในมะเร็งท่อน้ำดี

มีหลายการศึกษาที่ศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในมะเร็งท่อน้ำดีสรุปได้ดังตารางที่ 1 โดยประโยชน์ของการศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอ โดยเฉพาะไมโครอาร์เอ็นเอที่เป็นลักษณะเฉพาะ (signature microRNA) ของมะเร็งแต่ละชนิดนั้น นอกจากจะช่วยให้เข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของมะเร็ง แล้ว ยังจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการช่วยวินิจฉัยโรค การตรวจคัดกรองโรค การบอกพยากรณ์โรค และการผลิตยารักษาโรคมะเร็งขนานใหม่ ๆ อีกด้วย

ตารางที่ 1 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอในมะเร็งท่อน้ำดี (microRNAs profiling)

miRNA	Target gene(s)	Functions of targeted genes
Tumor suppressor miRNAs		
let-7a (↓)	H-RAS, HMGA2, LIN28, PEBP1	Tumorigenesis, invasion and metastasis
let-7b (↓)	MT1-MMP,	Tumor cell invasion
miR-15a (↓)	BCL2, CCND1, CCND2, CCNE1, WNT3A, p53, Cyclin E	Cell cycle, proliferation, apoptosis
miR-15b (↓)	Cyclin E, Bcl-w, BCL2	Proliferation, apoptosis
miR-17-3p (↓)	E-selectin, ICAM-1	Tumor growth and invasion
miR-19a (↑)	TNF- α , Cyclin D1	TGF- α pathway, proliferation
miR-23b (↑)	Smad3, c-met, uPA, POX	c-Met pathway, TGF- β -Smad3 pathway, invasion factor uPA, redox balance POX
miR-30c (↑)	PAI-1, B-MyB	Tumor angiogenesis, Oncogenesis
miR-34a (↓)	MYC, p53, Notch-1, Notch-2	Regulation of G1/S transition
miR-103 (↑)	Dicer	Key RNAi enzyme
miR-106a (↑)	IL-10	Inflammatory pathway
miR-126 (↑)	SOX2, VEGFA, PIK3R2	Reprogramming, VEGF/PI3K/AKT signaling pathway
miR-142-3p (↑)	RAC1, (AC)9	Invasion, migration
miR-145 (↓)	c-Myc, Mucin1	Proliferation, apoptosis
miR-184 (↓)	AKT2	Oncogenesis
miR-185 (↓)	RhoA, Cdc42	Proliferation
miR-195 (↑)	Cyclin E1, cyclin D1, CDK6, E2F3	Proliferation
miR-198 (↓)	Cyclin T1	Proliferation
miR-199a (↑)	Axl, Met	Proliferation
miR-199b (↑)	Dyrk1a, SET	Cell cycle

miRNA	Target gene(s)	Functions of targeted genes
miR-222 (↓)	Kit, PUMA, p21	Proliferation, apoptosis
miR-223 (↑)	CDKN1B, CDKN1C, AKT	Proliferation
miR-224 (↑)	Smad4, API-5	TGF- β pathway
miR-302b (↓)	Cylin D2	Proliferation
miR-331-3p (↑)	E2F1	Proliferation
Oncogenic miRNAs		
miR-17-5p (↑)	Stat3, type II TGF β receptor, p21, BIM	TGF- β pathway, proliferation
miR-20a (↑)	type II TGF- β receptor	TGF- β pathway
miR-21 (↑)	WNT1, PTEN, TGF β RII, Tap63, p12/CDK2AP1, PDCD4	WNT pathway
miR-25 (↑)	NOX4, TP53	Suppression of tumor suppressor TP53 and oncogenic gene NOX4
miR-98 (↓)	EZH2	Methylation
miR-130b (↑)	TA63, RUNX3	Proliferation, apoptosis
miR-141 (↓)	ZEB1, ZEB2	Epithelial to mesenchymal transition, metastasis
miR-182 (↓)	FOXO3	Tolerogenic programming
miR-197 (↓)	FUS1	Apoptosis
miR-200a (↓)	β -catenin	WNT pathway
miR-200b (↑)	PTPN12	WNT pathway
miR-200c (↓)	ZEB1	Epithelial to mesenchymal transition, metastasis
miR-204 (↓)	FOXC1, Runx2	Invasion, migration
miR-210 (↑)	Mnt	Proliferation, apoptosis
miR-214 (↓)	TFAP2C	Metastasis
MiR-370 (-)	MAP3K8	Methylation

2.9 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับมะเร็งท่อน้ำดี

เป็นที่ทราบกันดีว่าไมโครอาร์เอ็นเอ 200c มีบทบาทสำคัญในการยับยั้ง epithelial-mesenchymal transition โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของยีน Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) ส่งผลให้มีการลดการยึดเหนี่ยวของเซลล์ ทำให้มีการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยัง อวัยวะอื่น ๆ⁽³⁷⁻³⁸⁾

มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ก่อนหน้านี้ที่บอกถึงความสัมพันธ์และการพยากรณ์โรคของมะเร็งท่อน้ำดี โดย Chen และคณะ⁽³⁴⁾ ได้ทำการศึกษาเพื่อดูความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอกับมะเร็งท่อน้ำดีจากทั้งหมด 27 ราย พบว่าการลดลงของระดับการแสดงออกไมโครอาร์เอ็นเอ 200c และเป็นตัวที่บอกถึงการพยากรณ์โรค โดยในภาวะที่มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c เพิ่มขึ้นจะพบว่ามี ความรุนแรงของโรค มากกว่า คือ มีจำนวนของรอยโรคและมีการลุกลามของมะเร็งไปยังเส้นเลือดมากกว่ากลุ่มที่มีการลดลงของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Oishi และคณะ⁽³⁶⁾ ที่ทำในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับจาก ประเทศจีนและญี่ปุ่น ที่ได้รับการผ่าตัดจำนวน 23 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c มีผลกับการพยากรณ์โรค โดยกลุ่มตัวอย่างที่มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่เพิ่มขึ้นจะมีอัตราการของการกลับเป็นซ้ำของโรค และอัตราการรอดชีวิตที่ยาวนานกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p = 0.047$ และ 0.023 ตามลำดับ) ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Kasakatsanis และคณะ⁽⁴⁰⁾ ที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับการผ่าตัด 21 รายจากประเทศกรีซ พบว่าผู้ป่วยมะเร็ง ท่อน้ำดีที่นำมาศึกษามีการลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ($2^{-\Delta\Delta CT} = 0.005 \pm 0.002$) แต่ไม่พบว่ามี ความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง, histologic grading และ การพยากรณ์โรค

อย่างไรก็ดี จากการศึกษาโดยสืบพงศ์และคณะ⁽¹⁷⁾ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ global miRNA expression ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีจากจังหวัดขอนแก่น จำนวน 50 ชิ้นเนื้อซึ่งเป็นตัวแทนของมะเร็ง ท่อน้ำดีที่เกิดจากพยาธิใบไม้ในตับ (Opisthochis viverini: OV-CCA) กับมะเร็งท่อน้ำดี จากรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 16 ชิ้นเนื้อซึ่งเป็นตัวแทนของมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากพยาธิใบไม้ในตับ (non-OV CCA) โดยการทำให้ microRNA microarray, qRT-PCR และ in situ hybridization พบว่า มีการเพิ่มการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม OV-CCA($p=0.02$) แต่มี การลดลงของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในกลุ่ม non-OV CCA($p=0.006$) โดยมี ค่าเฉลี่ยของ ΔCT ในกลุ่ม OV-CCA และ non-OV CCA = $-6.008 (\pm 2.276)$ และ $3.18 (\pm 3.634)$ ตามลำดับ และกลุ่ม OV-CCA มีความชุกของการเพิ่มระดับการแสดงออกของ ไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ด้วยวิธี qRT-PCR สูงถึงร้อยละ 76 ร่วมกับมีแนวโน้มที่จะมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ได้นาน

กว่า โดยมีค่ามัธยฐานการรอดชีวิตในกลุ่ม OV-CCA เท่ากับ 9.5 เดือน และกลุ่ม non-OV CCA เท่ากับ 5.2 เดือน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ , $p = 0.08$

เนื่องจากไมโครอาร์เอ็นเอ 200c มีบทบาทสำคัญในการยับยั้ง epithelial-mesenchymal transition(36) การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่ต่างกันในช่วง non-OV CCA และ OV-CCA อาจช่วยให้เข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคที่ต่างกันและอธิบายการพยากรณ์โรคที่แตกต่าง กันได้

การศึกษานี้ได้ช่วยจุดประกายคำถามของการวิจัยนี้ โดยต้องการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในมะเร็งท่อน้ำดีของประชากรไทยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ ที่มาจกต่างภูมิภาคกันจะมีความแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร

บทที่ 3 วิธีดำเนินการการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research methodology)

เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบย้อนหลังโดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ต้องการศึกษาและกลุ่มควบคุม (Case control Study)

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ประชากร (population) และตัวอย่าง (sample)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีของประเทศไทย

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Sample population) คือ ผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มารับการรักษาที่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion Criteria)

- 1) ผู้ป่วยอายุมากกว่า 15 ปี
- 2) ได้รับการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี
- 3) มีผลชิ้นเนื้อที่ได้รับการตรวจทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีชนิด adenocarcinoma

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

- 1) เคยได้รับการรักษาด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดหรือฉายแสงรังสีรักษามาก่อน
- 2) มีภูมิคุ้มกันอยู่ในภาวะอ่อนแอ

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sample technique)

ไม่สุ่ม โดยเลือกจากจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มารับบริการในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากการที่มีก่อนหน้าส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในประเทศแถบตะวันตก ส่วนประเทศในแถบตะวันออกยังมีน้อย สำหรับประเทศที่กำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา โดยเฉพาะประเทศในตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทยที่พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีมาก และการศึกษาก่อนหน้านี้ของสืบพงศ์และคณะ⁽¹⁷⁾ ก็ทำการศึกษาระหว่างประชากรของไทยกับสหรัฐอเมริกา ยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำเฉพาะในคนไทย การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษานำร่อง (pilot study) เพื่อทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีของประเทศไทย

โดยการศึกษาจะทำการเก็บข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้าเกณฑ์การศึกษาย้อนหลังเป็นเวลา 6 ปี และให้มีตัวอย่างที่ในการเปรียบเทียบ (reference) ซึ่งใช้ normal bile duct ที่ได้ขึ้นเนื้อจากการผ่าตัดในผู้ป่วยรายอื่นที่ไม่ใช่โรคมะเร็งท่อน้ำดี โดยขึ้นเนื้อท่อน้ำดีปกติจากการผ่าตัดในการเปลี่ยนถ่ายตับหรือผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีอีก 5 ตัวอย่าง

3.4 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

ตัวแปรการวิจัย

- ระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ค่า ΔCT คือค่าความแตกต่างของ cycle threshold (CT) ของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับอาร์เอ็นเออ้างอิง (reference RNA)

- เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c โดยใช้ค่า $\Delta\Delta CT$ คือนำค่า ΔCT ของขึ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างอิงท่อน้ำดีปกติ (reference sample) ค่า ΔCT ที่แตกต่างกัน คือ ค่า $\Delta\Delta CT$ และแสดงข้อมูลด้วยค่า comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

วิธีวิจัย (methods)

1) ข้อมูลจากเวชระเบียน เก็บข้อมูลของผู้ป่วยด้วยใบบันทึก (Record Form)

โดยคัดกรองผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มตามภูมิลำเนา คือ

- 1.1) กลุ่มที่มีภูมิลำเนาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
- 1.2) กลุ่มที่มีภูมิลำเนาจากภาคอื่นๆ

โดยการสำรวจจากการบันทึกประวัติในเวชระเบียนและใช้วิธีการโทรศัพท์ไปสอบถามข้อมูลภูมิลำเนาผู้ป่วยทุกคน

2) เตรียมชิ้นเนื้อพาราฟินจากภาควิชาพยาธิวิทยาเพื่อนำมาเข้าสู่กระบวนการ PCR

2.1) ตรวจสอบความถูกต้องของการวินิจฉัยโรคว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีจริงหรือไม่ โดยพยาธิแพทย์

2.2) พยาธิแพทย์วาดขอบเขตตำแหน่งของมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อลดการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ เช่น เนื้อเยื่อของตับข้างเคียง, เส้นเลือดแดงและดำ เป็นต้น ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการตรวจวัดระดับไมโครอาร์เอ็นเอจากการทำ PCR ได้

2.3) ตัดเอาเฉพาะส่วนที่ระบุตำแหน่งว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (macrodissection) เพื่อนำมาทดสอบต่อไป

2.4) กำหนดชิ้นเนื้อที่จะใช้เพื่อเป็น reference ในการเปรียบเทียบระดับของไมโครอาร์เอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ qRT-PCR โดยใช้ตัวอย่างอิงท่อน้ำดีปกติ (reference sample) ที่ได้จากชิ้นเนื้อจากการผ่าตัดในผู้ป่วยรายอื่นที่ไม่ใช่โรคมะเร็งท่อน้ำดี เช่น จากชิ้นเนื้อท่อน้ำดีปกติจากการผ่าตัดในผู้ป่วยที่ได้รับ การวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีอีกเสบ เป็นต้น

2.5) ทำการสกัดเอาอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) เพื่อนำไปเข้าสู่กระบวนการ qRT-PCR โดยใช้ชุดสกัด miRNeasy FFPE Kit, QIAGEN, Germany

2.6) วัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้โดยเครื่อง NanoDrop 2000C, Thermo Scientific, USA ให้แต่ละตัวอย่างชิ้นเนื้อพยาธิวิทยา ต้องมีปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มากพอ โดยมีปริมาณระหว่าง 10 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม จึงจะถือว่าปริมาณเพียงพอที่จะนำไปสู่กระบวนการ qRT-PCR

2.7) นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาเข้าสู่กระบวนการ qRT-PCR โดยใช้ชุดทดสอบเฉพาะ (commercial kit) และวัดปริมาณโดยใช้ชุด taqMan® MicroRNA Assay, Applied biosystems, USA ด้วยเครื่อง real-time PCR รุ่น 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied biosystems, USA สำหรับตรวจไมโครอาร์เอ็นเอ 200c แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ต่อโดยค่าที่ได้จะเป็น ΔCT ของแต่ละกลุ่มแล้วนำมาเทียบกับ reference คือ ท่อน้ำดีปกติ และนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม โดยจะทำการทำ qRT-PCR ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ทบทวนเวชระเบียนผู้ป่วยและบันทึกลงใน case record form ดังตัวอย่างในภาคผนวก ข

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c โดยใช้ค่า ΔCT ใช้วิธี Unpaired T-Test

2. กำหนดให้การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่ค่า $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ มากกว่า 2.0 ถือว่ามี การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c มากผิดปกติ การวิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะทาง คลินิก และระยะเวลาการรอดชีพรวม โดยใช้ Unpaired T-Test และ Chi-square test, และ Kaplan-Meier test

บทที่ 4 ผลการศึกษา

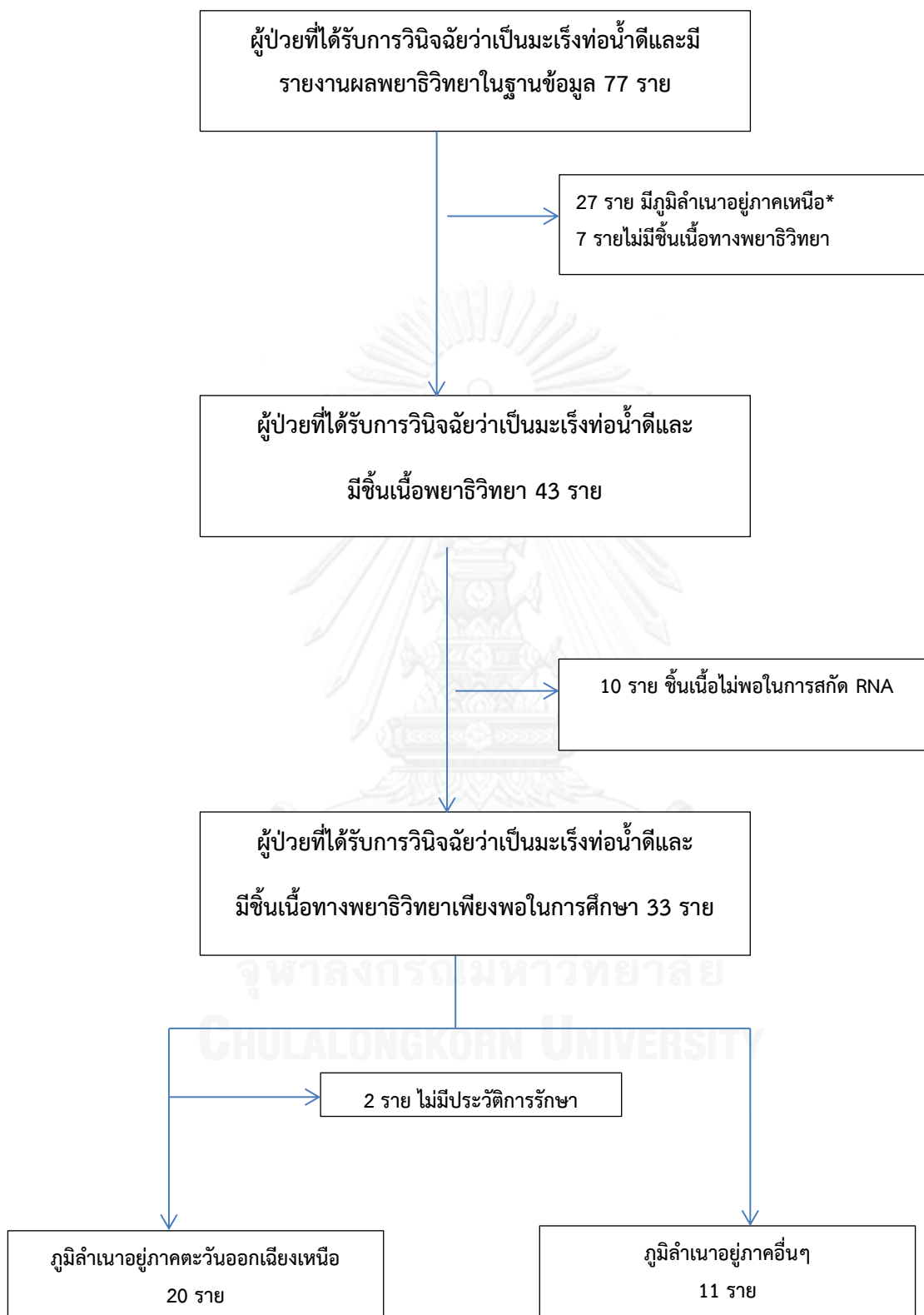
4.1 ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา (Baseline characteristics)

จากการเก็บข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดหรือได้รับการตัดชิ้นเนื้อ เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ 1 มกราคม พ.ศ. 2550 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 จากฐานข้อมูลของภาควิชาพยาธิวิทยามีจำนวนทั้งสิ้น 77 คน แต่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือกศึกษา 43 คน โดยผู้ป่วยที่คัดออกจากการศึกษา 34 คน ด้วยเหตุผลคือ 27 คนมีภูมิคุ้มกันอยู่ในภาคเหนือและ 7 คนไม่สามารถหาชิ้นเนื้อทางพยาธิเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา ได้

จากผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาทั้งหมด 43 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 29 คนและภาคอื่นที่ไม่ใช่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ 14 คน และมีชิ้นเนื้อทางพยาธิเพียงพอในการนำไปสกัดหาอาร์เอ็นเอต่อได้เพียง 33 คน นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยอีก 2 คนจากกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือไม่สามารถหาประวัติจากเวชระเบียนได้ จึงเหลือผู้ป่วยที่เข้ารับการศึกษานี้ 31 คน โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 20 คน และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอยู่ในภาคอื่นๆ 11 คน ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษาทั้ง 31 คน มีค่ามัธยฐานของอายุที่ 60 ปี (มีช่วงอายุ ตั้งแต่ 39 ถึง 85 ปี) มีเพศชาย 13 คน (ร้อยละ 41.9) เพศหญิง 18 คน (ร้อยละ 58.1) และร้อยละ 51.6 ไม่สูบบุหรี่

โดยมีระยะของโรคตาม TNM staging (AJCC 7th) ระยะที่ 1, 2, 3, 4 เป็นร้อยละ 24.2, 12.1, 3 และ 54.5 ตามลำดับ มีตำแหน่งของมะเร็งอยู่ที่ Intrahepatic 25 คน (ร้อยละ 83.3) และ hilar 5 คน (ร้อยละ 16.7) มี histologic grading เป็น well – moderate differentiated 26 คน (ร้อยละ 92.9) และ poorly differentiated 2 คน (ร้อยละ 7.1), มี lymphovascular invasion ร้อยละ 38.7 และพบว่าส่วนใหญ่ ร้อยละ 74.2 มี T stage เป็น T1-2 และพบมะเร็งแพร่กระจายไปที่ ต่อม้ำเหลืองใกล้เคียงร้อยละ 48.4 ส่วนอวัยวะที่พบมีการแพร่กระจายมากที่สุดคือตับ ร้อยละ 85.7 รองลงมาคือปอด ร้อยละ 14.3 ดังแสดงในตารางที่ 2



* ภูมิลำเนา จะทำการค้นประวัติจากเวชระเบียนและโทรศัพท์สอบถามโดยตรง

แผนภูมิที่ 2 แสดงขั้นตอนการคัดเลือกผู้ป่วยในการศึกษา

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา 31 คน (Baseline characteristics)

Baseline characteristics	Overall population (N = 31)
Median age, year (range)	60 (39 - 85)
Sex, n (%)	
Male	13 (41.9)
Female	18 (58.1)
Smoking n, (%)	
Yes	3 (9.7)
No	16 (51.6)
Not available	12 (38.7)
Site, n (%)	
Intrahepatic	25 (80.6)
Hilar	5 (19.4)
Histologic grading, n (%)	
Well- moderate differentiated	26 (92.3)
Poorly differentiated	2 (7.7)
Lymphovascular invasion, n (%)	
Yes	12 (38.7)
No	4 (12.9)
Not available	15 (48.4)
T-staging, n (%)	
T 1-2	23 (74.2)
T 3-4	8 (25.8)
N-staging, n (%)	
N0	16 (51.6)
N1	15 (48.4)
Pathological TNM staging, n (%)	
I-II	12 (38.7)
III-IV	19 (61.3)
Median survival, month (range)	13.4 (0.36 – 78.32)

สำหรับลักษณะพื้นฐานของประชากรและลักษณะทางพยาธิวิทยาระหว่างผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มีภูมิำเนาอยู่ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือในการศึกษานี้ 20 คนและภาคอื่นๆจำนวน 11 คน ก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3

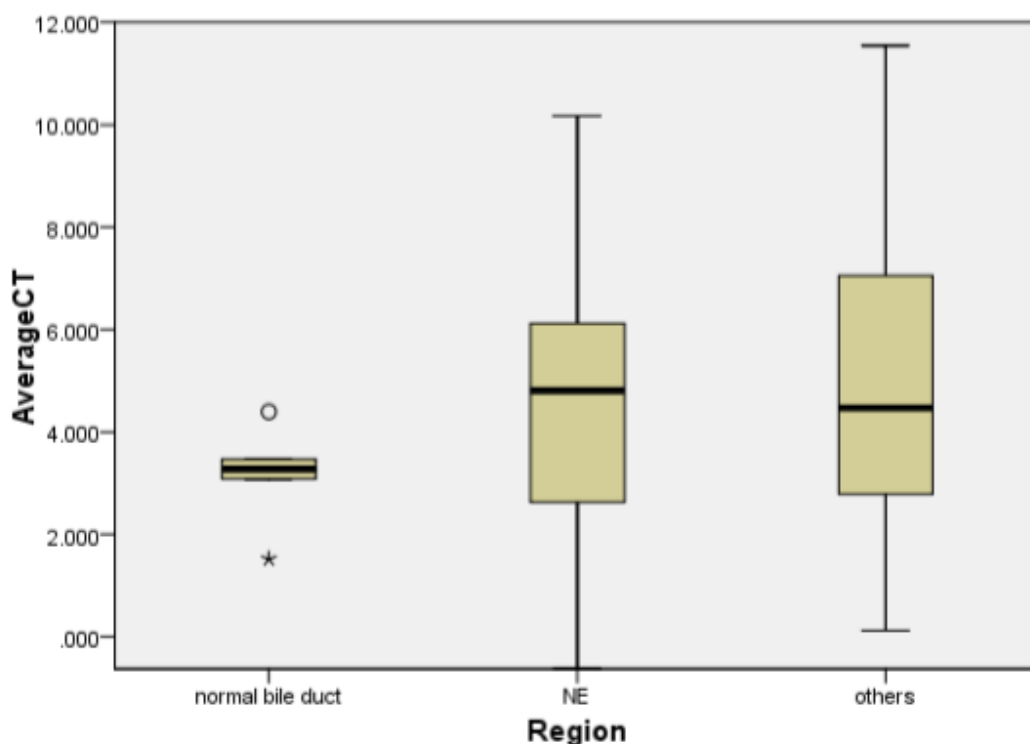
ตารางที่ 3 แสดงลักษณะพื้นฐานระหว่างประชากรที่มีภูมิำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคอื่นๆ

Factors	Northeastern region N = 20	Other region N = 11	P value
Median age,years (range)	59.5 (39-85)	64 (42-78)	0.894
Sex			
Male, n (%)	11 (55)	2 (18.18)	0.052
Female, n (%)	9 (45)	9 (81.82)	
Smoking n,(%)			
Yes	8 (40)	8 (72.72)	0.157
No	3 (15)	0 (0)	
Not available	9 (45)	3 (27.28)	
Primary site			
Intrahepatic, n (%)	14 (70)	11 (100)	0.053
Hilar, n (%)	6 (30)	0 (0)	
Histologic grading			
Well – moderate differentiated	16 (80)	8 (72.73)	0.138
Poorly differentiated	0 (0)	2 (18.18)	
Not available	4 (20)	1 (9.09)	
T satge, n (%)			
T1-2	14 (70)	9 (81.82)	0.394
T3-4	6 (30)	2 18.18)	
Nodal metastases, n (%)			
Positive	8 (40)	7 (63.64)	0.189
Neative	12 (60)	4 (36.36)	
TMN staging, n (%)			
I-II	9 (45)	3 (27.27)	0.282
III-IV	11 (55)	8 (72.73)	
Median survival, month (range)+	13.77 (0.36 – 76.94)	7.98 (3.52-78.32)	0.537

4.2 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200C

จากการศึกษาในกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้จากตัวอย่างท่อน้ำดีปกติมีระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200C โดยวัดค่า ΔCT ได้เท่ากับ 3.1714 และพบว่าค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ระหว่างผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มีภูมิลำเนาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคอื่นๆนอกจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือแตกต่างกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยของ ΔCT เท่ากับ 4.6682 (± 2.6406) และ 4.8796 (± 3.395) ตามลำดับ $p = 0.370$ ดังแสดงในรูปที่ 9

เมื่อใช้ค่า cut off ของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 200c จากตัวอย่างท่อน้ำดีปกติที่ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ เท่ากับ 2.0 พบว่ามีความชุกของการเพิ่มการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c (miRNA 200c overexpression) จำนวน 7 คนจากทั้งหมด 31 คน คิดเป็นร้อยละ 22.5 โดย 5 คน (ร้อยละ 25) มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและ 2 คน (ร้อยละ 18.2) มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคอื่นๆ



รูปที่ 9 แสดงระดับของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม

4.3 ลักษณะพื้นฐานของประชากรระหว่างกลุ่มที่มีการลดลงและการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c

เมื่อทำการศึกษาแยกระหว่างประชากรในกลุ่มที่มีการลดลงของการแสดงออกไมโครอาร์เอ็นเอ 200c เทียบกับกลุ่มที่มีการเพิ่มขึ้นของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c พบว่าลักษณะทางคลินิก และทางพยาธิวิทยาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งอายุและเพศ และพบว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c จะมีแนวโน้มของตำแหน่งของโรคอยู่ที่บริเวณ hilar, มี histologic grading เป็น well – moderate differentiated, มี T stage เป็น T 3-4, มี nodal metastases , มี lymphovascular invasion และมีระยะของโรคตาม TNM stage เป็นระยะ 3 ถึง 4 มากกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4

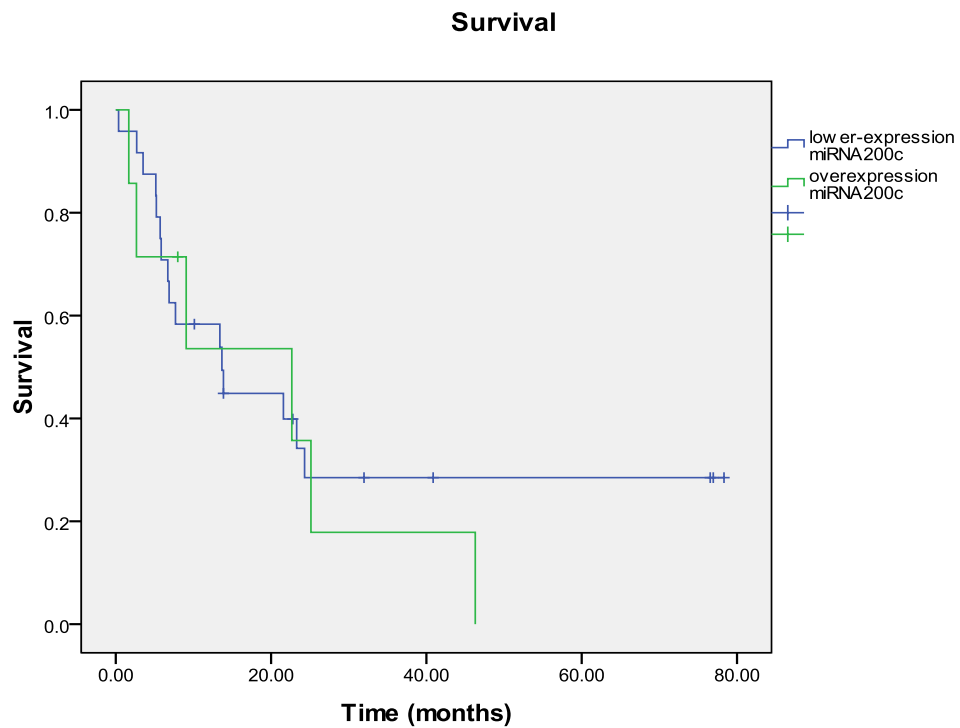
ตารางที่ 4 แสดงลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยที่มีการลดลงและการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ miRNA200c

Factors	Lower-expression group N = 24	Overexpression group N = 7	P value
Median age,years (range)	61 (42 - 85)	59 (39 - 76)	0.570
Sex, n (%)			0.642
Male	10 (41.67)	3 (42.86)	
Female	14 (58.33)	4 (57.14)	
Primary site, n (%)			0.476
Intrahepatic	20 (83.3)	5 (71.43)	
Hilar	4 (16.7)	2 (28.57)	
Histologic grading, n (%)			0.646
Well – moderate differentiated	19 (79.17)	5 (71.43)	
Poorly differentiated	2 (8.33)	0 (0)	
Not available	3 (12.50)	2 (28.57)	
Lymphovascular invasion, n (%)			0.509
Yes	9 (37.50)	3 (42.86)	
No	4 (16.67)	0 (0)	
Not available	11 (45.83)	4 (57.14)	
T satge, n (%)			0.053
T1-2	20 (83.33)	3 (42.86)	
T3-4	4 (16.67)	4 (57.14)	

Factors	Lower-expression group N = 24	Overexpression group N = 7	P value
Nodal metastases, n (%)			
Positive	10 (41.67)	5 (71.43)	0.170
Neative	14 (58.33)	2 (28.57)	
TMN staging, n (%)			
I-II	11 (45.83)	1 (14.29)	0.143
III-IV	13 (54.17)	6 (85.71)	
Median survival, month (range)	13.6 (4.3 – 22.9)	22.6 (0.9 – 44.4)	0.923

4.4 การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับการพยากรณ์โรค

เมื่อดูโดยรวม ประชากรที่ทำการศึกษา 31 ราย เสียชีวิตแล้ว 22 ราย มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต 13.4 เดือน (ค่าพิสัย 0.36 – 78.32 เดือน) และเมื่อแยกระหว่างผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ ไมโครอาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่ามัธยฐานการรอดชีวิตที่ 22.6 เดือน (ค่าพิสัย 0.9 – 44.4 เดือน) และ 13.6 เดือน (ค่าพิสัย 4.3 – 22.9 เดือน) ตามลำดับ, $p = 0.923$ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการเพิ่มขึ้นและลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c

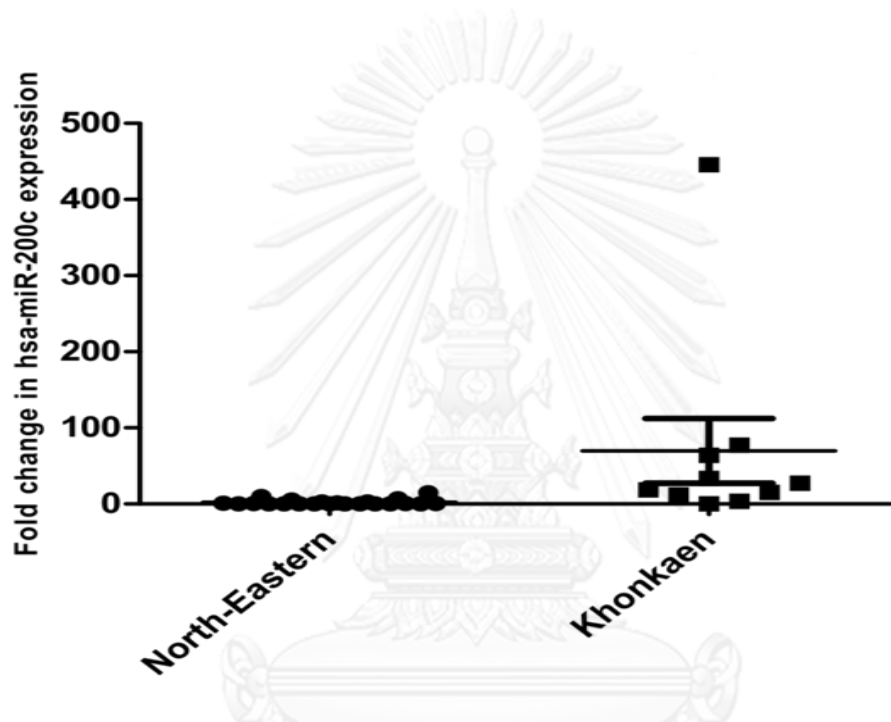
บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่าระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ระหว่างภาค ตะวันออกเฉียงเหนือกับภาคอื่นๆที่ไม่ใช่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือไม่แตกต่างกัน โดย กลุ่มที่มีการเพิ่มการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c มีแนวโน้มว่ามี T satge เป็น 3 - 4 มีการ แพร่ กระจายของโรคไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงและมี lymphovascular invasion มากกว่า เหมือนการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chen และคณะ⁽³⁴⁾ ที่พบว่าในภาวะที่มีการแสดงออกของ ไมโคร อาร์เอ็นเอ 200c เพิ่มขึ้นจะพบว่ามี ความรุนแรงของโรคมมากกว่า คือ มีจำนวนของรอยโรคและมีการ ลุกลามของมะเร็งไปยังเส้นเลือดมากกว่ากลุ่มที่มีการลดลงของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็น เอ 200c และเมื่อดูโดยรวมเทียบกับระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ของท่อน้ำดีปกติก็ พบว่ามีความชุกของการเพิ่มการแสดงออกน้อยเพียงร้อยละ 22.5 ต่างกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ของ สืบพงศ์และคณะ ที่พบความชุกของการเพิ่มการแสดงออกถึงร้อยละ 76⁽¹⁷⁾

สำหรับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c กับอัตราการรอดชีวิต ในการศึกษาไม่พบ ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c แต่มีแนวโน้มว่ากลุ่ม ที่มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c จะมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าแม้ว่าจะไม่มี ความ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งของสืบพงศ์ และคณะ⁽¹⁷⁾ ที่พบว่า กลุ่มที่มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c จะมีแนวโน้มของอัตรา การรอดชีวิต ดีกว่าเช่นกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Oishi และคณะ⁽³⁵⁾ ที่ทำในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับ จากประเทศจีนและญี่ปุ่นที่ได้รับการผ่าตัดจำนวน 23 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าการแสดงออกของไมโครอาร์ เอ็นเอ 200c มีผลกับการพยากรณ์โรค โดยกลุ่มตัวอย่างที่มีการแสดงออก ของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่เพิ่มขึ้นจะมีอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคและอัตราการรอดชีวิตที่ดี กว่าอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ

ทั้งนี้ความแตกต่างของระดับการแสดงออกและความชุกของการเพิ่มการแสดงออกของไมโคร อาร์เอ็นเอ 200c กับการศึกษาก่อนหน้านี้ของสืบพงศ์และคณะ⁽¹⁾ ที่เกิดขึ้นนั้น เมื่อดูจากข้อมูลที่ได้ ก็ ยังไม่สามารถบอกได้ว่าข้อสันนิษฐานที่บอกว่าความแตกต่างนี้เป็นผลจากความแตกต่างของเชื้อชาติ เนื่องจากระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในการศึกษาต่างกันเพราะการศึกษาก่อน นี้ มีความชุกของการเพิ่มขึ้นของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ในกลุ่มที่ได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น มากกว่าของการศึกษานี้คือ ร้อยละ 76 และ 22.5 ตามลำดับ หากดูในแง่ทางเทคนิค ที่ทำให้มีผลต่างกันนั้น แม้จะเป็นการศึกษาที่ใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่างกันแต่ก็ ใช้ชุดทดสอบเฉพาะของ

บริษัทเดียวกัน จึงได้มีการนำชิ้นเนื้อที่ใช้ศึกษาในการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ได้มาจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่นมาทำการทดสอบซ้ำ โดยใช้อุปกรณ์และ protocol เดียวกันนี้ก็พบว่าผลที่ได้เหมือนกับการศึกษาก่อนคือ ชิ้นเนื้อที่นำมาจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น มีการเพิ่มการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c เหมือนเดิมซึ่งต่างกับ ชิ้นเนื้อที่ใช้ในการศึกษานี้จริง , $p = 0.1502$ ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบค่าการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ระหว่างตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในการศึกษานี้กับชิ้นเนื้อที่ได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น

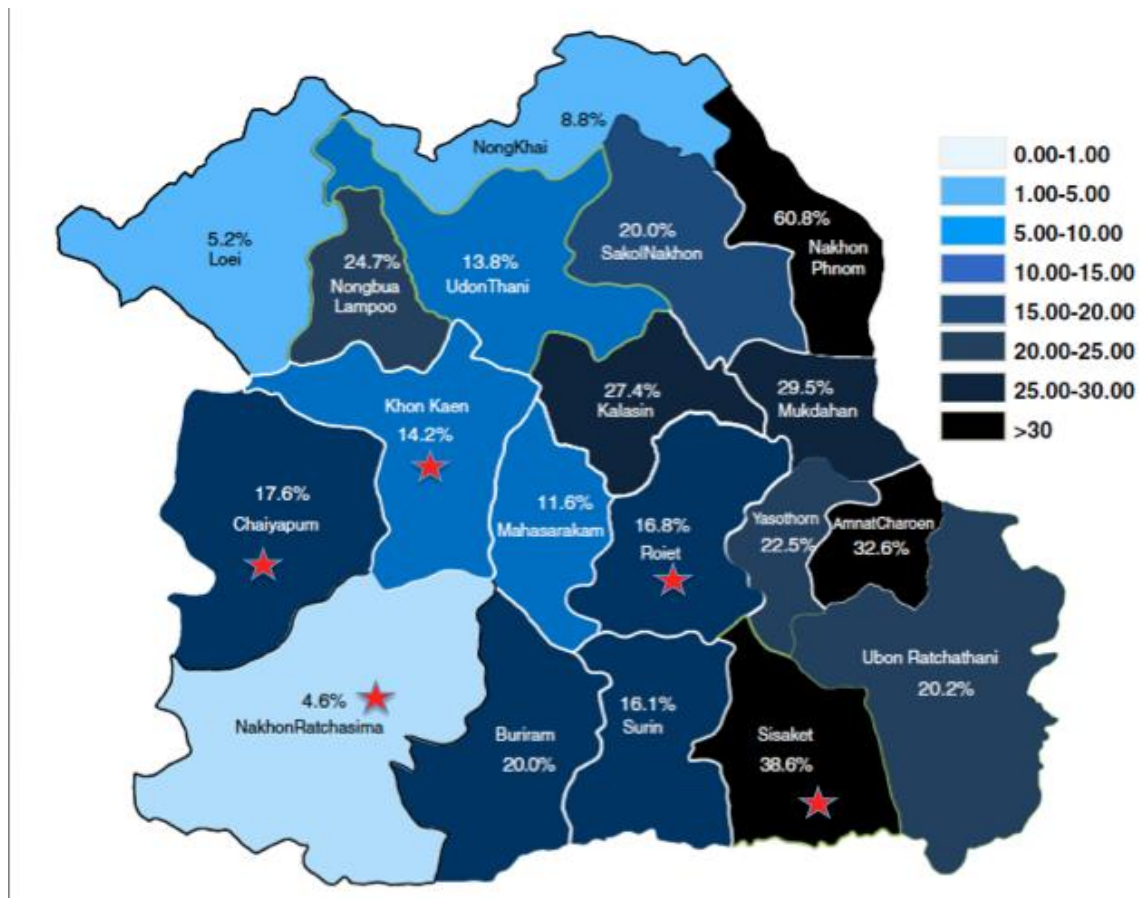
อาจมีผลเนื่องจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาระหว่าง 2 การศึกษานี้ เนื่องจากการศึกษาแรกนำชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่รักษาที่ขอนแก่น ซึ่งก็เป็นผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเหมือนกันกับการศึกษานี้ แต่เราไม่สามารถทราบลงไป ในรายละเอียดของประชากรแต่ละคนที่นำเข้ามาศึกษา เพราะข้อมูลลักษณะพื้นฐานต่างๆที่ได้จากการศึกษาแรกมีน้อย เนื่องจากการศึกษาย้อนหลังเช่นเดียวกัน

สำหรับในแง่ของการติดตามไปไม่ในดับที่สันนิษฐานว่าสัมพันธ์กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นั้นในการศึกษานี้ซึ่งเป็นการศึกษาย้อนหลังทำให้มีข้อจำกัด

ในการตรวจยืนยันว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับจริงหรือไม่ อีกทั้งในแง่ของภูมิลำเนาที่อยู่ของผู้ป่วย เนื่องจากมีผู้ป่วยบางคนที่มีการย้ายที่อยู่อาจส่งผลกับการสัมผัสหรือติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับนั้นในการศึกษานี้ในขั้นแรกได้ทำการสืบค้นประวัติจากเวชระเบียนและมีการยืนยันอีกครั้งด้วยการโทรศัพท์ไปสอบถามผู้ป่วยหรือญาติ จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ย้ายเข้าหรือออกจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับผู้ป่วยที่มีการย้ายที่อยู่ในการศึกษานี้มี 7 คนเท่านั้น โดยเข้าเกณฑ์การศึกษา 6 คน แต่ระยะเวลาที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทุกคนนั้นอาศัยอยู่นานมากกว่า 20 ปี ซึ่งคิดว่าเพียงพอต่อการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม รวมทั้งวัฒนธรรมการกินโดยเฉพาะอาหารสุกๆ ดิบๆ ได้โทรสอบถามจากตัวผู้ป่วยและญาติว่ามีการกินอาหารสุกๆ ดิบๆ จริง

ส่วนสาเหตุอื่นที่อาจทำให้ผลของการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาก่อนอีกสาเหตุหนึ่ง คือ การจัดเก็บชิ้นเนื้อว่ามีความแตกต่างในแง่ของการเก็บชิ้นเนื้อหรือไม่ ซึ่งต้องสอบถามวิธีการเก็บจากทั้ง 2 สถาบันต่อไป

นอกจากนี้เมื่อดูเฉพาะผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่มี ภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้ง 5 คน พบว่าจะอยู่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง โดยไม่พบว่ามีผู้ป่วยที่อยู่บริเวณตอนบนและเมื่อเทียบกับความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* ที่มีในรายงานของ Sithithaworn และคณะ⁽⁴⁰⁾ ที่มีการสำรวจในปี พ.ศ. 2552 ก็ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ของการแสดงออกของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ดังแสดงรูปที่ 12 แต่คงต้องอาศัยการศึกษาที่มีประชากรที่มากขึ้นและลงลึกในรายละเอียดของผู้ป่วยแต่ละจังหวัด รวมทั้งทำการตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับอีกครั้ง



รูปที่ 12 แสดงจังหวัดที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกไมโครอาร์เอ็นเอ 200c ที่มี
 ภูมิสำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ ในตับ
Opisthorchis viverrini

การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอเหมือนที่คาดคิดไว้
 และยังไม่พบว่ามีปัจจัยใดที่มีผลต่อการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 200c คงทำการศึกษาต่อ โดย
 ทำการศึกษาไปข้างหน้าเพื่อจะได้เก็บข้อมูลรายละเอียดให้ได้ครบถ้วน และควรทำการตรวจ ยืนยัน
 การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับในผู้ป่วยทุกรายเพื่อที่ต้องการศึกษา

รายการอ้างอิง

1. Watanapa P, Watanapa WB. Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2002;89:962-70.
2. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 2001;33:1353-7.
3. Gatto M, Bragazzi MC, Semeraro R, Napoli C, Gentile R, Torrice A, et al. Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Dig Liver Dis* 2010;42:253-60.
4. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg* 2007;245:755-62.
5. Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Oncologist* 2004;9:43-57.
6. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:349-56.
7. Suzuki H, Isaji S, Pairojkul C, Uttaravichien T. Comparative clinicopathological study of resected intrahepatic cholangiocarcinoma in northeast Thailand and Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7:206-11.
8. Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop* 2011;120 Suppl 1:S158-68.
9. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* 2007;4:e201.
10. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012;61:1657-69.
11. Siqueira E, Schoen RE, Silverman W, Martin J, Rabinovitz M, Weissfeld JL, et al. Detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastrointest Endosc* 2002;56:40-7.

12. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:204-7.
13. Bartlett DL, Ramanathan RK, Ben-Josef E. Cancer of the biliary tree . In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 1019-47.
14. นิมิตร มรกต. พยาธิใบไม้ในตับ. In: นิมิตร มรกต, คม สุคนธสรทรัพย์, editors. *ปรสิตวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2554. p. 183-206.*
15. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006;94:776-80.
16. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-69.
17. Tanasanvimon S, Asif Rashid SW, Churi C, Tong Z, Fogelman DR, Silsirivanit A, et al. Comparison of microRNA (MiRNA) expression profiles between opisthorchis viverrini -associated cholangiocarcinoma (OV-CCA) and non- opisthorchis viverrini-associated cholangiocarcinoma (non-OV CCA). - ASCO [Internet]. 2012 [cited 2013 Jan 26]. Available from: http://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=133&abstractID=106115.
18. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 2005;41:5-15.
19. Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 2003;37:961-9.
20. Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J, Laha T, Smout MJ, Mairiang E, et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*--multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol* 2012;28:395-407.
21. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11:597-610.

22. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522-31.
23. Chang TC, Mendell JT. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:215-39.
24. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 2005;7:1261-6.
25. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 2006;125:1111-24.
26. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 2007;171:728-38.
27. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer* 2007;43:1529-44.
28. Ko KS, Peng H, Tang H, Cho ME, Peng J, Aller M-A, et al. Recent advances of miRNA involvement in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Open Journal of Internal Medicine* 2012;2:135-62.
29. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011;717:85-90.
30. รัตน์วรชัย ต. อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้น มหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ. พิมพ์ครั้งที่ 1: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2009
31. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:365-79.
32. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-8.
33. Chen L, Yan HX, Yang W, Hu L, Yu LX, Liu Q, et al. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2009;50:358-69.
34. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog* 2011.

35. Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, et al. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012;56:1792-803.
36. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008;9:582-9.
37. Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, Zaccagnini G, Greco S, Sarra-Ferraris G, et al. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differ* 2011;18:1628-39.
38. Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008;283:14910-4.
39. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog* 2013;52:297-303.
40. Sithithaworn P, Andrews RH, Nguyen VD, Wongsaroj T, Sinuon M, Odermatt P, et al. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. *Parasitol Int* 2012;61:10-6.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อใช้ในการศึกษา

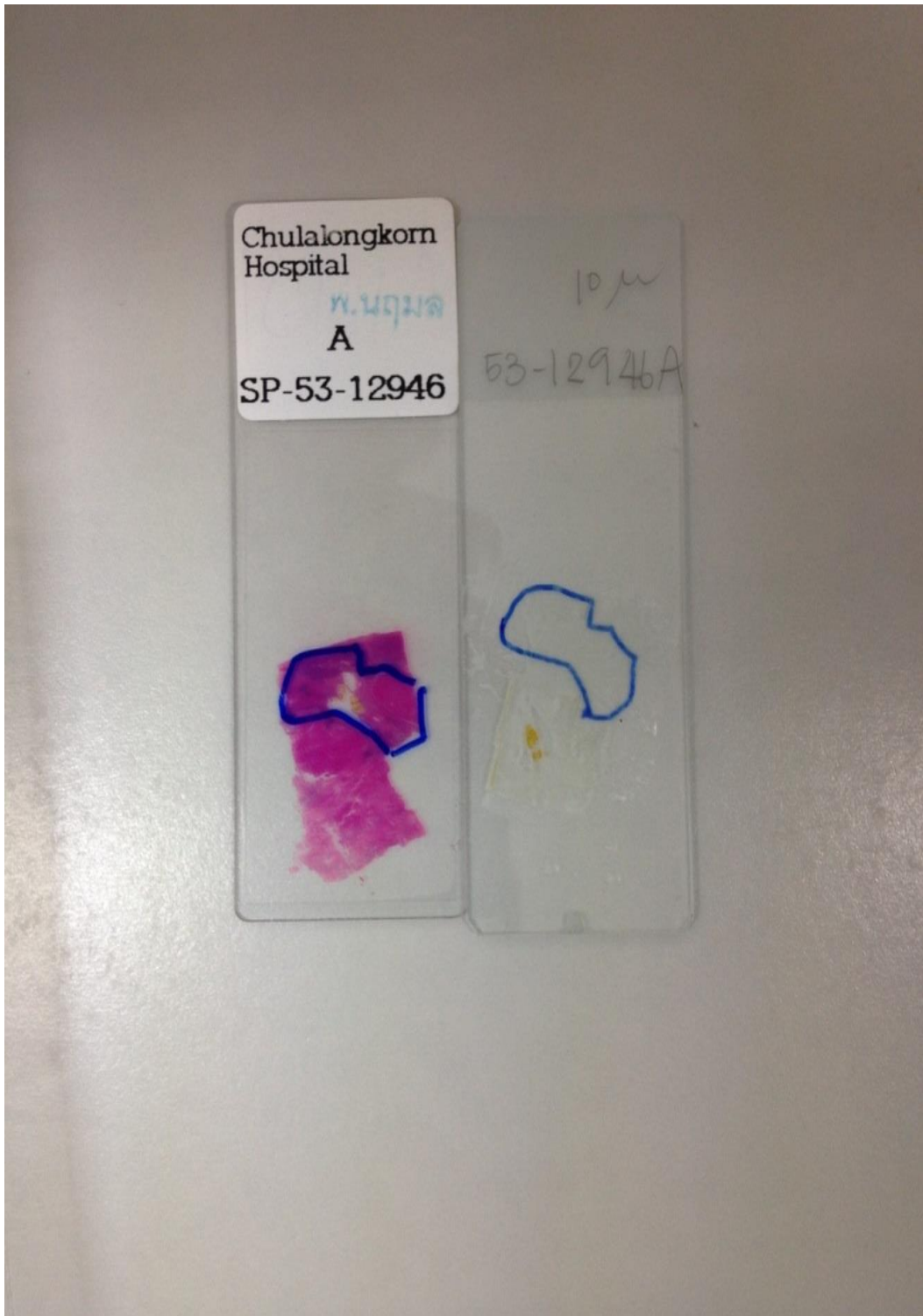
1. การสกัด Fresh specimen ออกจากพาราฟิน

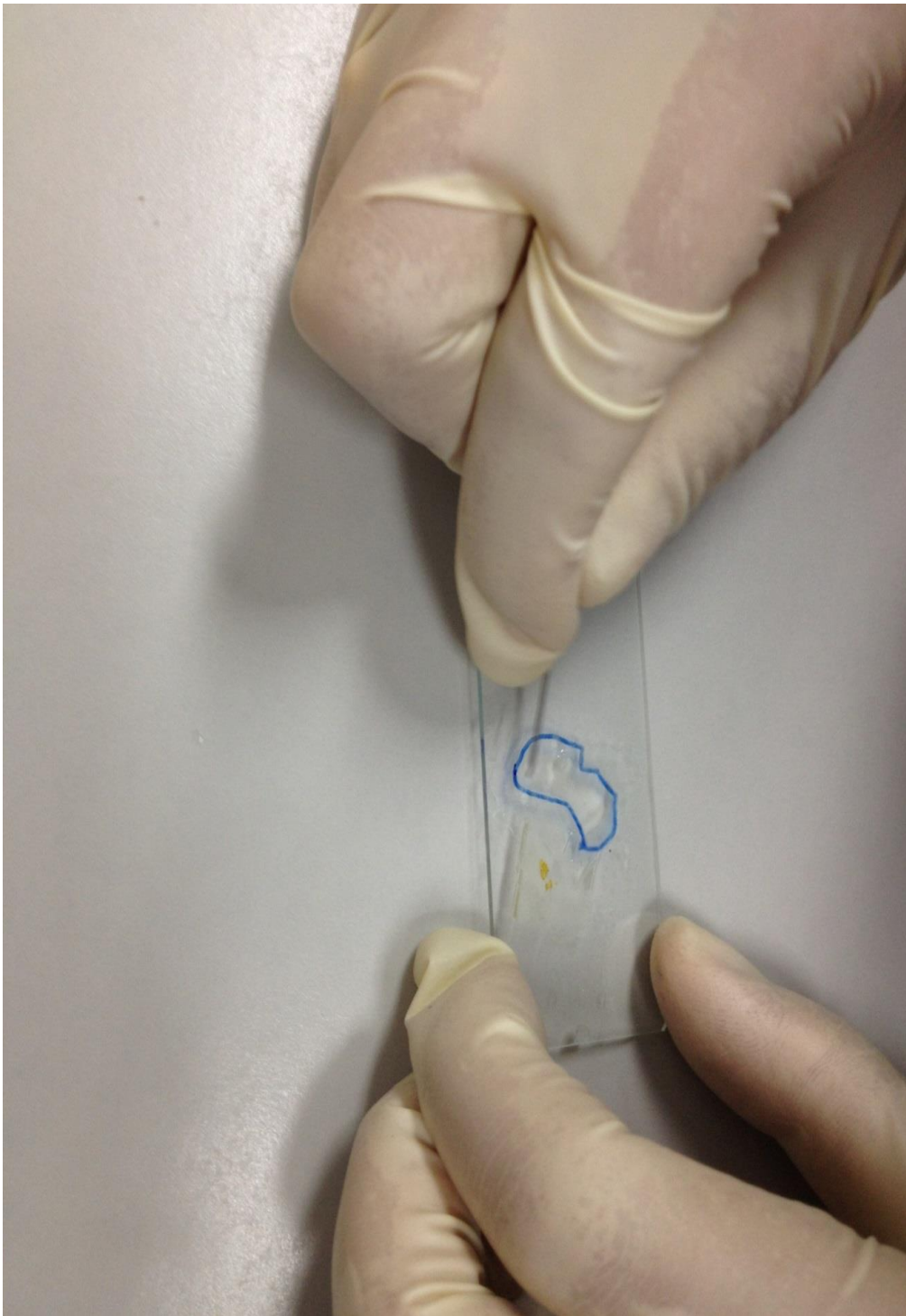
1.1 ตรวจสอบตำแหน่งของ specimen กับทางพยาธิวิทยา โดยวางตำแหน่งเฉพาะส่วนที่เป็นมะเร็ง ท่อน้ำดี ดังรูปที่ 12

1.2 ตัดชิ้นเนื้อส่วนที่ต้องการด้วยวิธี macro dissection โดยใช้ใบมีดชุดส่วนที่ต้องการ ดังรูปที่ 9

รูปที่ 12 แสดงการสกัดชิ้นเนื้อส่วนที่ต้องการ







1.3 จากนั้นชิ้นเนื้อจะถูกนำไปแยกออกจากพาราฟิน (Deparaffinization) และทำการสกัดสารพันธุกรรม (microRNA extraction) ต่อไป โดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ซีซี ดังรูปที่ 13

รูปที่ 13 แสดงชิ้นที่แยกจากพาราฟินลงใน microcentrifuge tube



2. ขั้นตอนการแยกพาราฟินออกจากชั้นเนื้อ (Deparaffinization) โดยใช้สารละลาย xylene

2.1 หลังจากใส่ชิ้นเนื้อที่ตัดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ซีซี และเติมสารละลาย 100% xylene 1 ซีซี, ปิดฝาและเขย่าประมาณ 10 วินาที

2.2 ทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 12000g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (15-25 องศาเซลเซียส)

2.3 ทำการดูดเฉพาะสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ใช้ pipette

2.4 เติม 100% ethanol 1 ซีซีลงในตะกอนส่วนที่เหลือ (pellet) ทำการเขย่าจนเข้ากันดี (ethanol จะทำการแยก xylene ส่วนที่ยังตกค้างออกจากตะกอนที่ต้องการตรวจ)

2.5 ทำการปั่นอีกครั้งโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 1200g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.6 เติมสารละลาย 100% xylene 1 ซีซี, ปิดฝาและเขย่าประมาณ 10 วินาที

2.7 ทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 12000g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.8 ทำการดูดเฉพาะสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ใช้ pipette

2.9 เติม 100% ethanol 1 ซีซีลงในตะกอนส่วนที่เหลือ (pellet) ทำการเขย่าจนเข้ากันดี

2.10 ทำการดูดเฉพาะสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ใช้ pipette หลังจากนั้นเปิดฝาทิ้งไว้ และทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่าสารละลาย ethanol จะระเหยออกหมด

2.11 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PKD ปริมาณ 240 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.12 เติมสารละลาย proteinase K 10 ไมโครลิตรลงในตะกอนส่วนที่เหลือ จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

2.13 Incubate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งตะกอนส่วนที่เหลือ ละลายหมด

2.14 Incubate ต่อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.15 Incubate ต่อที่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 1200g เป็นเวลา 15 นาที

3. ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ

3.1 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ DNase Booster ลงใน microcentrifuge tube ที่ได้ 25 ไมโครลิตร และ สารละลาย DNase I stock จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

3.2 Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ RBC 500 ไมโครลิตร และ 100% ethanol 1750 ไมโครลิตร ลงใน tube และผสมสารละลายทั้งหมดโดยใช้ pipette

3.4 ดูดสารละลายที่ได้ 700 ไมโครลิตรลงใน RNeasy MinEute spin column tube ขนาด 2 ซีซี จากนั้นปิดฝา แล้วนำไปปั่นโดยใช้ centrifuge ในขนาดความแรง 1200g เป็นเวลา 30 วินาที

3.5 ปั่นซ้ำจนกว่าจะกรองส่วนที่เป็นของเหลวผ่าน column จนหมด และเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง

3.6 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy MinEute spin column tube เติมที่มีส่วนตะกอนค้างอยู่ จากนั้นปิดฝาและนำไปปั่น centrifuge ในขนาดความแรง 1200g เป็นเวลา 30 วินาที จนกว่าจะกรองส่วนที่เป็นของเหลวผ่าน column จนหมด

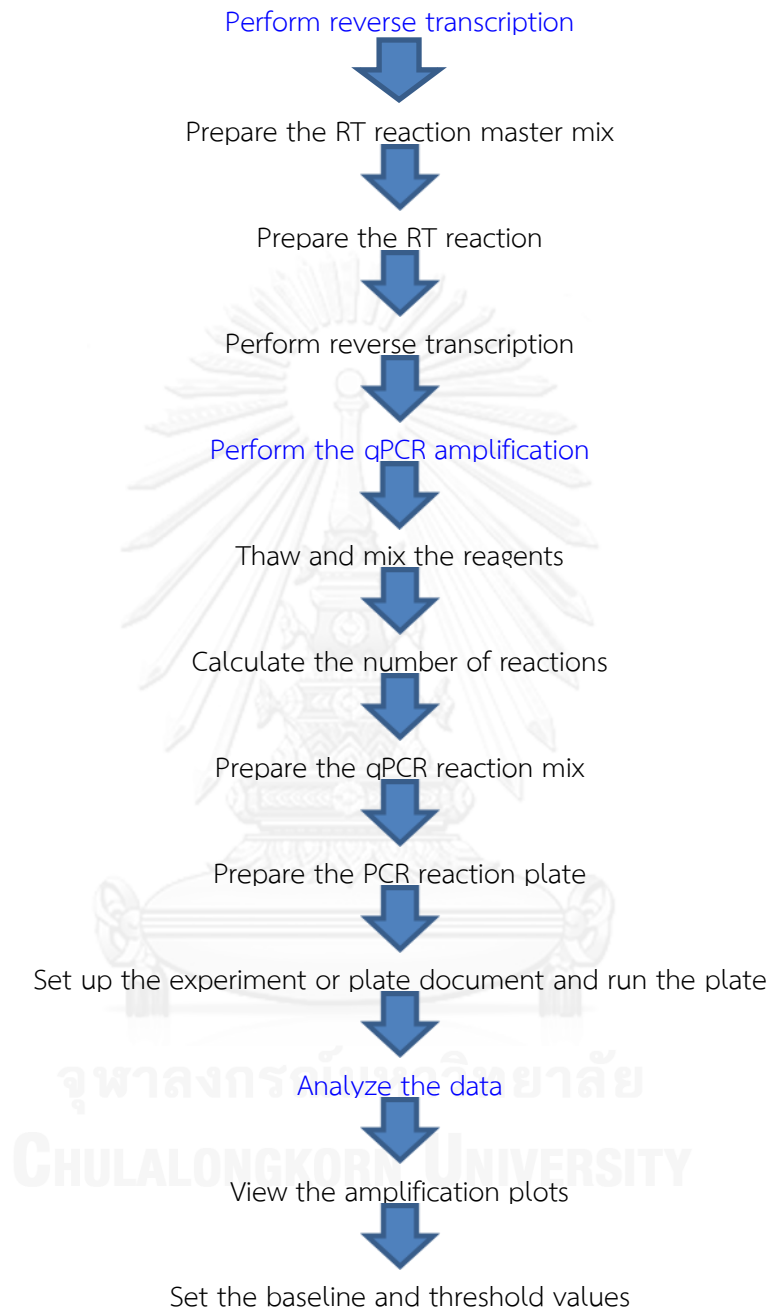
3.7 ทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 3.6 จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งให้หมด

3.8 จากนั้นเติมน้ำที่ปราศจาก DNase และ Rnase ลงไปปริมาณ 30 ไมโครลิตร และ Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปปั่นด้วย centrifuge ในขนาดความแรง 1200g เป็นเวลา 5 นาที

4. ขั้นตอนการทำการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์ (qRT-PCR)

ในงานวิจัยนี้ใช้ชุด taqMan® MicroRNA Assay, Applied biosystems, USA ด้วยเครื่อง real-time PCR รุ่น 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied biosystems, USA ซึ่งจะทำตาม protocol ดังนี้

Procedure overview



Perform reverse transcription

4.1 Prepare the RT reaction master mix เพื่อเตรียมสังเคราะห์ cDNA

To prepare the RT master mix using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit components:

- 1) Allow the kit components to thaw on ice.
- 2) (Medium- or large-scale orders only) Dilute the 20 \times or 60 \times RT primer to a 5 \times working stock solution using 0.1 \times TE buffer.
- 3) In a polypropylene tube, prepare the RT master mix on ice by scaling the volumes listed below to the desired number of RT reactions. We recommend adding 10 to 20% excess volume to compensate for losses that occur during pipetting.

component	Master mix volume per 15-uL reaction
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15 μ L
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50U/uL	1.00 μ L
10X Reverse Transcription Buffer	1.50 μ L
Inhibitor, 20 U/uL	0.19 μ L
Nuclease-free water	4.16 μ L
Total volume	7.00 μ L

4) Mix gently. Centrifuge to bring the solution to the bottom of the tube.

5) Place the RT master mix on ice until you prepare the RNA reaction

4.2 Prepare the RT reaction

1) Thaw the 5 \times RT primer and RNA template on ice. Before use, vortex the RT primer tubes to mix, then centrifuge briefly.

2) If you are performing quantitation of:

- Ambion Silencer® Select siRNAs, go to step 3.
- All other templates, go to step 4.

3) If you are performing Ambion Silencer® Select siRNAs quantitation, denature and prepare the double-stranded template:

a. For each 15- μ L RT reaction, combine 3 μ L of 5 \times RT primer and 5 μ L of double-stranded template in a 0.2-mL polypropylene reaction tube (the RT reaction tube) or in a well of a 96-well reaction plate.

b. Incubate the tube or plate at 85 °C for 5 minutes, then at 60 °C for 5 minutes.

c. Place the denatured template on ice.

d. For each 15- μ L RT reaction, combine the RT master mix to the tube or well containing denatured RNA and RT primer (from step 3c) in the ratio of:

7 μ L RT master mix : 8 μ L denatured RNA and RT primer (1 to 10 ng of RNA per reaction)

e. Go to step 5.

4) If you are preparing single-stranded RNA, prepare the total RNA template:

- a. For each 15- μ L RT reaction, combine RT master mix with total RNA in the ratio of: 7 μ L RT master mix : 5 μ L total RNA (1 to 10 ng per reaction)
 - b. Mix gently. Centrifuge to bring the solution to the bottom of the tube.
 - c. Before opening the RT primer tubes, thaw the tubes on ice and mix by vortexing, then centrifuge them.
 - d. For each 15- μ L RT reaction, add 12.0 μ L of RT master mix containing total RNA (from step 4b) into a 0.2-mL polypropylene reaction tube(the RT reaction tube) or into a well of a 96-well reaction plate.
 - e. Add 3 μ L of 5 \times RT primer from each assay set into the corresponding RT reaction tube or plate well.
 - f. Go to step 5.
- 5) Seal the tube or reaction plate and mix thoroughly by inverting the solution. Centrifuge to bring the solution to the bottom of the tube or well.
 - 6) Incubate the tube on ice for 5 minutes and keep it on ice until you are ready to load the thermal cycler.

4.3 Perform reverse transcription

Note: If applicable to your thermal cycler or real-time PCR system, perform the reverse transcription in Standard mode.

- 1) Use the following parameter values to program the thermal cycler:

Step	Time	Temperature
Hold	30 minutes	16°C
Hold	30 minutes	42°C
Hold	5 minutes	85°C
Hold	∞	4

- 2) Set the reaction volume to 15.0 μL .
- 3) Load the reaction tube or plate into the thermal cycler.
- 4) Start the RT run.

Perform the qPCR amplification

4.4 Thaw and mix the reagents

1) Thaw on ice, resuspend completely by gently vortexing, then centrifuge briefly:

- TaqMan® Assay (20 \times)
- Complementary DNA (cDNA) samples

2) Mix the master mix reagent by gently swirling the bottle.

4.5 Calculate the number of reactions

Calculate the number of reactions that you need for each assay. We recommend performing three replicates of each reaction. Be sure to include on each plate:

- A small RNA assay for each cDNA sample
- Endogenous control assay(s)

- No template controls (NTCs) for each assay on the plate

4.6 Prepare the qPCR reaction mix

The recommended reaction volume is 20 μL . Prepare the plate so that each qPCR reaction contains the components as listed below.

To prepare the qPCR reaction mix:

- 1) Obtain a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube for each sample (to be run in triplicate).
- 2) Pipet the following components into each tube:

component	Volume per 20-uL Reaction	
	Single reaction	Three replicates
TaqMan® Small RNA Assay (20 \times)	1.00 μL	3.60 μL
Product from RT reaction*	1.33 μL	4.80 μL
TaqMan(R) Universal PCR Master Mix II (2 \times), no UNG†	10.00 μL	36.00 μL
Nuclease-free water	7.67 μL	27.61 μL
Total volume	20.00 μL	72.01 μL

- 3) Cap the tube and invert several times to mix.
- 4) Centrifuge the tube briefly.

4.7 Prepare the PCR reaction plate

- 1) Transfer 20 μL of the complete qPCR reaction mix (including assay and

RT product) into each of three wells on a 48-, 96-, or 384-well plate.

- 2) Seal the plate with the appropriate cover.
- 3) Centrifuge the plate briefly.
- 4) Load the plate into the instrument.

4.8 Set up the experiment or plate document and run the plate

1) In the real-time PCR system software, create an experiment or plate document on your real-time PCR system using the following parameters:

- Run Mode: Standard
- Sample Volume: 20 μ L
- Thermal Cycling Conditions:

Step	optionalAmpErase	Enzyme	PCR	
	UNG activity	activation		
	HOLD	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
			Denature	Anneal/extend
temperature	50oC	95oC	95oC	60oC
Time	2 minutes	10 minutes	15 seconds	60 seconds

2) If the reaction plate is not already loaded, load the plate into the instrument.

- 3) Start the run.

Analyze the data

Refer to the appropriate instrument user guide for instructions on how to analyze your data.

General process

The general process for analyzing the data from gene expression assays involves the following procedures:

1. View the amplification plots.
2. Set the baseline and threshold values.

Tools for data analysis

We recommend the following software for analyzing data generated using TaqMan® Small RNA Assays.

DataAssist™ Software

DataAssist™ Software is a simple, powerful data analysis tool for sample comparison when using the comparative CT ($\Delta\Delta$ CT) method for calculating relative quantitation of gene expression. The software uses a filtering procedure for outlier removal and various normalization methods based on lists of single or multiple genes. It provides relative quantification analysis of gene expression through a combination of statistical analysis and interactive visualization. DataAssist™ Software provides a function-rich graphic user interface (GUI) for easy data importation, experimental design setup, and interactive, high-throughput data analysis. DataAssist™ Software is free and can be downloaded from the Applied Biosystems website at: www.appliedbiosystems.com/dataassist

RealTime StatMiner® Software

RealTime StatMiner® Software from Integromics is a software analysis package for qPCR experiments that is compatible with all Applied Biosystems instruments. RealTime StatMiner® Software uses a step-by-step analysis workflow guide that includes parametric, non-parametric, and paired tests for relative quantification of

gene expression, as well as 2-way ANOVA for two-factor differential expression analysis. For more information, visit: www.integromics.com/StatMiner



ภาคผนวก ข

แบบฟอร์มการบันทึกข้อมูลผู้ป่วยในงานวิจัย(Case record form)

Comparative study of microRNA-200c expression in cholangiocarcinoma from northeastern Thailand and regions other than the north and the northeast

Patient Code _ _ _

Part A: Demographic characteristics at the first visit

Date of birth (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

Gender Male Female

Place of birth North Northeast West East Central South

Smoking Yes No

Part B: Diagnosis of cholangiocarcinoma

Date of 1st diagnosis cholangiocarcinoma (1st pathology date)

Date (dd/mm/yyyy) __/__/__

Histology of primary site Histology of metastasis site (LN, other)

Primary site:

Intrahepatic Hilar Extrahepatic

Grade:

well diff moderate diff poorly diff not available

Perineural/lymphovascular invasion : Yes No

Final surgical Margin Positive Close Negative

T stage ____ N stage ____ M stage ____

If M1: specify site of metastasis

Bone Lung Liver Brain Bone other.....

AJCC stage _____

Part C: cholangiocarcinoma treatment

1) Surgery Yes No **if no, skip to 2) Radiation**

First surgery Date (dd/mm/yyyy) : _ _ / _ _ / _ _ _ _

2) Radiation Yes No **if no, skip to 3) chemotherapy**

Adjuvant radiation Concurrent chemoradiation

Total dose given _____ cGy/ Gy/ rads

3) Chemotherapy Yes No **if no, skip to Part D**

Adjuvant chemotherapy regimen First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _

Cisplatin Carboplatin 5FU Gemcitabine

Xeloda Cisplatin/Gemcitabine Other specify.....

Concurrent chemoradiation First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _

Cisplatin Carboplatin 5FU Gemcitabine

Xeloda Cisplatin/Gemcitabine Other specify.....

Maximum response CR PR SD PD Not available

Date of progression (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ No progression

Part D: Recurrence/Progressive disease

Yes No **if no skip to Part E**

First recurrence Second recurrence Third recurrence

Date of recurrence/progressive disease (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _

Locoregional recurrence Distant metastasis Second primary cancer

1) Surgery Yes No **if no, skip to 2) Radiation**

Date (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _

2) Radiation Yes No **if no, skip to 3) Chemotherapy**

Palliative radiation Concurrent chemoradiation

Total dose given ___ cGy/ Gy/ rads

3) Chemotherapy Yes No **if no, skip to Part D**

Concurrent chemoradiation First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _

Cisplatin Carboplatin 5FU Gemcitabine

Xeloda Cisplatin/Gemcitabine Other specify.....

Palliative chemotherapy First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _

Cisplatin Carboplatin 5FU Gemcitabine

Xeloda Cisplatin/ Other specify.....

Date of progression (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _ No progression

Reason for stopping treatment PD Complete Intolerant; specify

Other.....

Part E: Last visit

Date of assessed (dd/mm/yyyy) _ / _ / _ _ _ _

- Status
- Death
- Cause of death
- 1) from cholangiocarcinoma
- 2) Others.....
- Alive with disease
- Alive without disease
- Lost to follow up
- Other, specify

Date of completion of this CRF (dd/mm/yyyy) _ / _ / _ _ _ _

Part F: Laboratory testing for microRNA 200CmicroRNA status Δ CT

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นพ. วฤทธิ์ ลอยวิรัตน์

วัน เดือน ปี เกิด 28 มีนาคม พ.ศ. 2522 จังหวัดนครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นักศึกษาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2540-2546

แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ 2546-2547

แพทย์ใช้ทุน โรงพยาบาลสุโขทัย 2547-2548

แพทย์ใช้ทุน โรงพยาบาลลานสกา 2548-2549

แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 2549-2552

แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชามะเร็งวิทยา รพ.จุฬาฯ 2555-ปัจจุบัน

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2546

ประกาศนียบัตรบัณฑิต วิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์ 2550

ประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูง วิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์ 2552

วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์ 2552

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกวิทยาลัยสมาคมมะเร็งแห่งประเทศไทย