

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งศีรษะ
และลำคอชนิดสความัสเซลล์



นางสาวอารีญา อารยะทวีกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF MOLECULAR CHANGES IN WHITE BLOOD CELLS FROM PARACRINE
SIGNALING IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Miss Areeya Arayataweegool



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ชนิดความถี่เซลล์
โดย	นางสาวอารียา อารยะทวีกุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. พันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. พันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศิวนนท์ จิรวัดโนทัย)

อารียา อารยะทวีกุล : การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสความัสเซลล์ (STUDY OF MOLECULAR CHANGES IN WHITE BLOOD CELLS FROM PARACRINE SIGNALING IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำธร , 81 หน้า.

มะเร็งศีรษะและลำคอ (Head and Neck cancer) เป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตในประเทศไทย และมักตรวจพบได้ในระยะท้ายของโรคแล้ว อีกทั้งวิธีการตรวจในปัจจุบันยังมีความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ตรวจการเป็นมะเร็งตั้งแต่ในระยะแรกได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจกรองมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลทั้งในสถานะเนื้อพันธุกรรมและในระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติด้วยเทคนิค Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ที่ไลน์วัน (LINE-1s) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติมีระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วันลดลงเมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย จากนั้นทำการศึกษาหา ยีนที่มีอิทธิพล (candidate gene) ต่อโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ จากการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศน์ร่วมกับข้อมูลลำดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งด้วยโปรแกรม Connection Up- and Down- Regulation Expression Analysis of Microarray Extension (CU-DREAMX) และทำการทดสอบการแสดงออกของยีนที่มีอิทธิพลด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ พบว่าการแสดงออกของยีน ZCCHC6 ซึ่งเป็นยีนที่มีอิทธิพลต่อโรคมะเร็งศีรษะและลำคอในเลือดของผู้ป่วยมีมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเลือดของคนปกติ โดยในอนาคตสามารถนำวิธีนี้ไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) สำหรับคัดกรองการเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอในระยะแรกได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774118730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: HEAD AND NECK CANCER / PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL / COBRA LINE-1S / LINE-1S METHYLATION / RNA-SEQUENCING / REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION / ZCCHC6

AREEYA ARAYATAWEEGOOL: STUDY OF MOLECULAR CHANGES IN WHITE BLOOD CELLS FROM PARACRINE SIGNALING IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA. ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NAKARIN KITKUMTHORN, D.D.S., Ph.D., 81 pp.

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is one of cancer-related death in Thailand. Almost the patients usually detected in the late stage of cancer, leading to difficult treatment with reduction of survival rate. Therefore, an early detection of HNSCC is importantly required. This study aims to develop a method of screening for HNSCC by observing molecular change in Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) by cancer paracrine action. PBMC was co-cultured with HNSCC cell lines to test the molecular effect of PBMC in HNSCC cell lines. Then, Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) technique was performed to measure Long Interspersed element-1 (LINE-1) methylation. The PBMC was significantly lower methylation level after co-cultured with all HNSCC cell lines. This is consistent with the results obtained from the patient's white blood cells. By the way, RNA-sequencing data from co-cultured technique was combined with distributed microarray data (GSE 39400) by Connection Up- and Down- Regulation Expression Analysis of Microarray Extension (CU-DREAMX) program. Gene expression was validated by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique. The expression of the ZCCHC6 gene, which is a candidate gene of head and neck cancer, in patients is significantly higher in comparison with normal blood. This epigenomic change may be due to the influence of HNSCC cancer cells to PBMC. We expect to use these finding to develop a biomarker for early detection, and further applications.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรากรอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกัธร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ประธานคณะกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสริมาศพันธุ์ อาจารย์ ดร. ขาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร และอาจารย์ ดร. ศิวนนท์ จิรวัดโนทัยที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ณปฏุล ตั้งจาตุรนต์รัศมี และ แพทย์หญิงภัทรินฤน มหัทธนสกุล อาจารย์ประจำภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ

คุณบุญทิพย์ ปุเรจาริก พยาบาลวิชาชีพ (ปฏิบัติการ 7) ฝ่ายการพยาบาลโสต ศอ นาสิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่อำนวยความสะดวกรวมถึงอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัชวีย์ อภรณ์เทวัญ อาจารย์ประจำศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ ภาควิชาคณิตศาสตร์และวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ รวมทั้งความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ

ขอขอบพระคุณ ดร. รัฐกร ศรีสุทธิ อาจารย์ประจำคณะแพทยศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำดี ๆ ในทุกขั้นตอนของงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณกัญญวลักษณ์ ชเลิศเพ็ชร คุณปพิชญา วัชรานุรักษ์ และนักวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ ทั้งในด้านงานวิจัย และการใช้ชีวิต รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ นักวิจัยหลังปริญญาเอก และ คุณพัทธพล คุณาติเรก นักวิทยาศาสตร์ ประจำหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษารวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีสำหรับการสกัดตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากเลือด

ขอขอบพระคุณ คุณสรารุธ วงษ์พยัคฆ์ ผู้จัดการบริษัท วิซูโอ ไบโอมेटิคอล (ไทยแลนด์) จำกัด ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ

ขอขอบคุณคุณนันทรมน สนธิ และ คุณปภัสนสร บุญส่งเสริม ที่คอยช่วยงานทั้งการเก็บตัวอย่าง และขั้นตอนต่างๆในงานวิจัย รวมถึงเป็นเพื่อนที่คอยให้กำลังใจและฝ่าฟันอุปสรรคในทุก ๆ ครั้งมาด้วยกัน

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บุคคลในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ แรงผลักดัน รวมถึงให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นลงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

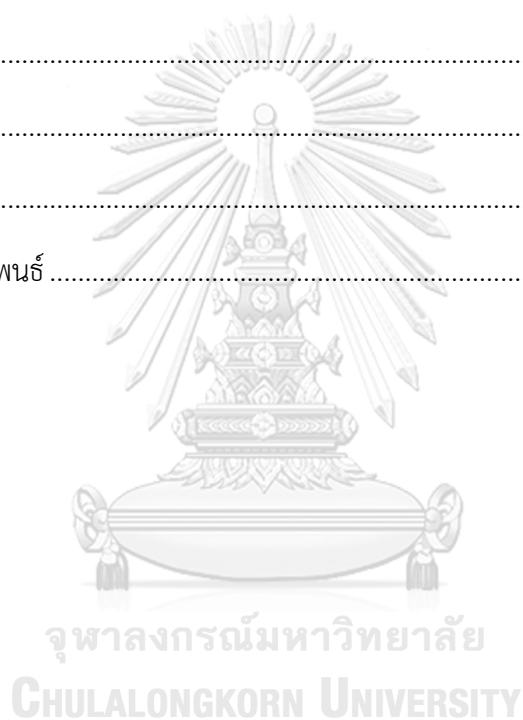
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่ 1	1
คำถามงานวิจัย (Research question).....	2
วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives).....	2
สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	3
กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)	4
บทที่ 2	5
โรคมะเร็ง (Cancer)	5
มะเร็งศีรษะและลำคอ (Head and neck cancer).....	6
Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC).....	10
กลไกระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetics).....	11
กระบวนการเติมหมู่เมทิลที่สารพันธุกรรม (DNA methylation)	12
ไลน์วัน (LINE-1s)	13
เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)	14
Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA).....	15
RNA sequencing.....	16

Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension (CU-DREAMX).....	17
Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	18
บทที่ 3	19
ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม.....	19
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	19
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	21
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
ตัวอย่างที่นำมาศึกษา	24
เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร	25
เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครในกลุ่มควบคุม	25
เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครในกลุ่มทดลอง.....	25
การออกแบบการวิจัย	26
วิธีดำเนินงานวิจัย	27
1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรม โดยใช้ <u>Co-culture model</u>	27
1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนปกติ.....	27
1.2 การแยกเซลล์ PBMC จากเลือด.....	28
1.3 การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง	28
1.4 การเลี้ยงเซลล์แบบเลี้ยงร่วม (Co-culture technique).....	30
1.5 การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMC	31
1.6 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ	31
1.7 Bisulfite treatment.....	31
1.8 การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR))	32

1.9 การแยกรูปแบบของการเกิดหมู่เมทิลโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ	34
1.10 การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis).....	34
1.11 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวัน (% ^m C).....	35
2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ <u>Co-culture model</u>	36
2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจาก PBMC	36
2.2 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ.....	37
2.2.1 การวัดความเข้มข้นอาร์เอ็นเอและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ อาร์เอ็นเอโดยใช้เครื่องQubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)	37
2.2.2 การวัด RNA Integrity Number (RIN score) โดยใช้เครื่อง RNA6000 Nano assay (Agilent Technologies, California, USA) ดังรูปที่ 19.....	38
2.3 RNA-sequencing.....	39
2.4 Bioinformatics	40
2.5 Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension (CU-DREAMX) program.....	41
3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมในสภาวะจริง	42
3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะ และลำคอ	42
3.2 การแยกเซลล์ PBMC จากเลือด.....	43
3.3 การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMC	43
3.4 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ	43
3.5 Bisulfite treatment.....	43

3.6 การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR))	43
3.7 การแยกรูปแบบของการเกิดหมู่เมทิลโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ	43
3.8 การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis).....	43
3.9 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไคนวัน (% ^m C)	43
4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนใน <u>สภาวะจริง</u>	43
4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจาก PBMC	43
4.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)	43
4.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Real-Time Polymerase Chain Reaction	44
4.4 Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction.....	45
4.5 การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis).....	46
4.6 Real-Time Polymerase Chain Reaction	47
4.7 การคำนวณการแสดงออกของ candidate gene ด้วยวิธี $\Delta\Delta$ CT method.	48
5. Statistical Analysis	49
5.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมโดยใช้ <u>Co-culture model</u>	49
5.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ <u>Co-culture model</u>	49
5.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมใน <u>สภาวะจริง</u>	49
5.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนใน <u>สภาวะจริง</u>	49
บทที่ 4	50
1. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรม โดยใช้ <u>Co-culture model</u>	50

2. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้ <u>Co-culture model</u>	53
3. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมใน <u>สภาวะจริง</u>	59
4. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนใน <u>สภาวะจริง</u>	62
บทที่ 5	67
วิเคราะห์ผลการวิจัย	67
สรุปผลการวิจัย.....	70
ข้อเสนอแนะ	70
รายการอ้างอิง	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	81



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เซลล์ไลน์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	24
ตารางที่ 2 ตัวอย่างเลือดจากคนปกติ รวมถึงตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ PCR.....	32
ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับไลน์วัน	33
ตารางที่ 5 สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR.....	33
ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ การแยกรูปแบบของการเกิดหมู่เมทิล	34
ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการเจตริยม acrylamide gel ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์	34
ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ	37
ตารางที่ 9 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA	44
ตารางที่ 10 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	45
ตารางที่ 11 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ในเครื่อง Thermo cycler	46
ตารางที่ 12 สารเคมีที่ใช้ในการเจตริยม acrylamide gel ความเข้มข้น 8%	46
ตารางที่ 13 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR	47
ตารางที่ 14 ผลการหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วันของเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง กับ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุม.....	51
ตารางที่ 15 ผลการวัดความเข้มข้นอาร์เอ็นเอ, การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ RIN score....	53
ตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-sequencing.....	54

ตารางที่ 17	ผลการแสดงออกของยีนที่มากขึ้นจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4.....	56
ตารางที่ 18	ผลการแสดงออกของยีนที่มากขึ้นจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN17.....	56
ตารางที่ 19	ผลการแสดงออกของยีนที่ลดลงจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4.....	56
ตารางที่ 20	ผลการแสดงออกของยีนที่ลดลงจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN17.....	57
ตารางที่ 21	ผลการหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของเลือดคนปกติและเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ.....	59
ตารางที่ 22	ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับยีน ZCCHC6 และยีน GAPDH	62
ตารางที่ 23	ผลการนำค่า threshold cycle (Ct) ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ และตัวอย่างเลือดจากคนปกติมาคำนวณหาการแสดงออกของยีน ZCCHC6 ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ method	64
ตารางที่ 24	ข้อมูลระยะของโรคมะเร็งและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ	77
ตารางที่ 25	ชื่อยีนจากกระบวนการ RNA-sequencing ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกยีนที่พบการแสดงออกในกลุ่มทดลองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และมีระดับนัยสำคัญที่ 0.05.....	78
ตารางที่ 26	ชื่อยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในข้อมูลของ RNA-sequencing และข้อมูลของ Expression array.....	80

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1	สมมติฐานงานวิจัย	3
รูปที่ 2	กลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะ หรือ ตำแหน่งอื่นๆ	5
รูปที่ 3	การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศชาย (A) และเพศหญิง (B) ปี พ.ศ. 2551 (ต่อประชากร 100,000 คน)	6
รูปที่ 4	ตำแหน่งที่สามารถเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอได้ ได้แก่ paranasal sinuses, nasal cavity, oral cavity, tongue, salivary glands, larynx และ pharynx ซึ่งเป็นบริเวณที่รวมทั้ง nasopharynx, oropharynx และ hypopharynx	7
รูปที่ 5	เซลล์มะเร็งที่ถูกตรวจสอบด้วยวิธี exfoliative cytology	8
รูปที่ 6	มะเร็งชนิดเยื่อเมือกบริเวณใต้ลิ้นที่ถูกย้อมด้วย toluidine blue เพื่อดูบริเวณที่ต้องสงสัยว่าเป็นมะเร็ง	8
รูปที่ 7	การย้อมเซลล์ด้วยน้ำส้อมสายชูบริเวณพื้นปาก (floor of mouth)	9
รูปที่ 8	การแยกเซลล์ PBMC ออกจากเลือดทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิทีเกรดิเอนต์	10
รูปที่ 9	กระบวนการทาง Epigenetics	11
รูปที่ 10	กลไกการเติมหมู่เมทิลที่เบส cytosine โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase	12
รูปที่ 11	กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยการลดเมทิลที่ไลนวันท์แทรกตัวอยู่ในยีน	13
รูปที่ 12	กลไกการเกิดปฏิกิริยา COBRA	15
รูปที่ 13	กระบวนการทำ RNA-sequencing	16
รูปที่ 14	สัญลักษณ์โปรแกรม CU-DREAM	17
รูปที่ 15	แสดงค่า Threshold Cycle (Ct) ในปฏิกิริยา Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	18
รูปที่ 16	สูตรการคำนวณหาจำนวนของเซลล์โดยใช้ Haemocytometre	29
รูปที่ 17	Co-culture technique	30

รูปที่ 18	สูตรแสดงการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวน	35
รูปที่ 19	ขั้นตอนการเติมสารต่างๆใน RNA Nano chip	39
รูปที่ 20	ขั้นตอนการพิมพ์คำสั่งการใช้งานโปรแกรม CU-DREAMX ในหน้าต่างคำสั่ง Command prompt	41
รูปที่ 21	สูตรคำนวณหาค่า $\Delta\Delta CT$	48
รูปที่ 22	สูตรคำนวณหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน	48
รูปที่ 23	การเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวน ของเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง กับ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุม	52
รูปที่ 24	ขั้นตอนการหา candidate gene	58
รูปที่ 25	ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวน ระหว่างเลือดจากคนปกติจำนวน 42 คน และเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 23 คน	60
รูปที่ 26	ผลการคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity)	61
รูปที่ 27	ผลการหา Melting Temperature ของยีน ZCCHC6 ด้วยกระบวนการ Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์มะเร็ง HeLa	63
รูปที่ 28	ผลการหา Melting Temperature ของยีน GAPDH ด้วยกระบวนการ Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์มะเร็ง HeLa	63
รูปที่ 29	ผลการหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (fold change) ของกลุ่มตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ และตัวอย่างเลือดจากคนปกติ	65
รูปที่ 30	ผลการคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity) ของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ZCCHC6 โดยการสร้างกราฟเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve)	66
รูปที่ 31	ขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด	76

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
NCBI	National Center for Biotechnology Information
CU-DREAMX	Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
5mC	5-methylcytosine
DNMT	DNA methyltransferase
L1s	Long Interspersed Element-1s
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
COBRA	Combine Bisulfite Restriction Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT- PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
SAM	S-adenosylmethionine
UTR	Untranslated region
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate-Buffered Saline
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal bovine serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
rcf	Relative Centrifugal Force
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
cDNA	Complementary DNA
GO	Gene ontology
T _m	Annealing Temperature
Ct	Threshold cycle
GEO datasets	Gene Expression Omnibus repository
CI	Confidence interval
AUC	Area Under Curve
bp	Base pair
ROC curve	Receiver Operator Characteristic

ZCCHC6

Zinc Finger CCHC-Type Containing 6



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

ที่มา และความสำคัญของปัญหา (Background and rational)

มะเร็งศีรษะและลำคอ (head and neck cancer) เป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตในประเทศไทย จากทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2557 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข (1, 2) พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ รายใหม่เพิ่มขึ้นทั้งเพศหญิง และเพศชาย คิดเป็น 1.41 เปอร์เซ็นต์ และ 1.71เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยผู้ที่เป็นมะเร็งชนิดนี้จะมีอาการหลายอย่าง เช่น กลืนอาหารลำบาก มีแผ่นสีขาวในช่องปาก เจ็บคอ และหายใจลำบาก เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดมะเร็งศีรษะและลำคอก็คือ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และกิจกรรมทางเพศ (3)

การตรวจมะเร็งชนิดนี้มีหลายวิธี เช่น การตรวจด้วยตาจากแพทย์ผู้ชำนาญ การส่งตรวจทางเซลล์วิทยาจากเซลล์หลุดลอก (exfoliative cytology) (4) การย้อมเซลล์ด้วยสีโทลูอิดีนบลู (toluidine blue) (5) และในปัจจุบันมีการพัฒนาน้ำส้มสายชู (5% acetic acid) มาใช้ในการตรวจซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจมะเร็งด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจมะเร็งที่เป็นที่ยอมรับ และใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจมะเร็งหลายชนิด (6)

ถึงแม้ว่าการตรวจมะเร็งศีรษะและลำคอจะมีหลายวิธีแต่ทุกวิธีจะตรวจต่อเมื่อเกิดอาการของโรคขึ้นแล้ว (6) ซึ่งอาการของโรคนั้นมักจะแสดงออกในระยะท้ายของการเป็นมะเร็ง อีกทั้งวิธีการตรวจในปัจจุบันยังมีความไวและความจำเพาะไม่เพียงพอที่จะใช้ตรวจการเป็นมะเร็งในระยะแรกได้ และจากงานวิจัยก่อนหน้า (7) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วัน (LINE-1s) รวมถึงระดับการแสดงออกของโปรตีนในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่าในต่อมน้ำเหลืองที่เกิดการแพร่กระจายมะเร็งแต่ไม่สามารถตรวจพบด้วยตาเปล่านั้นมีระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันสูงขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติ และสามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน Mucin 1 (MUC-1) ที่พลาสมาเซลล์ในต่อมน้ำเหลืองนั้นได้ ซึ่งวิธีการตรวจโปรตีนนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมในระยะแรกได้ (micrometastasis)

จากที่กล่าวมาข้างต้น คณะวิจัยจึงตระหนักถึงความสำคัญของโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ และมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจกรองมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งทั้งในสภาวะเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) และในระดับการแสดงออกของยีน โดยมีสมมติฐานว่า เซลล์มะเร็งจะหลั่งสัญญาณพาราไครน์ (paracrine action) ออกมาสู่เซลล์ข้างเคียง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของเซลล์ข้างเคียงได้ ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เดินทางมายังบริเวณมะเร็งนั้นน่าจะได้รับสัญญาณและเกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้เช่นกัน โดยการตรวจโมเลกุลที่เปลี่ยนไปที่เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ที่มีความไวและความจำเพาะสูงได้

คำถามงานวิจัย (Research question)

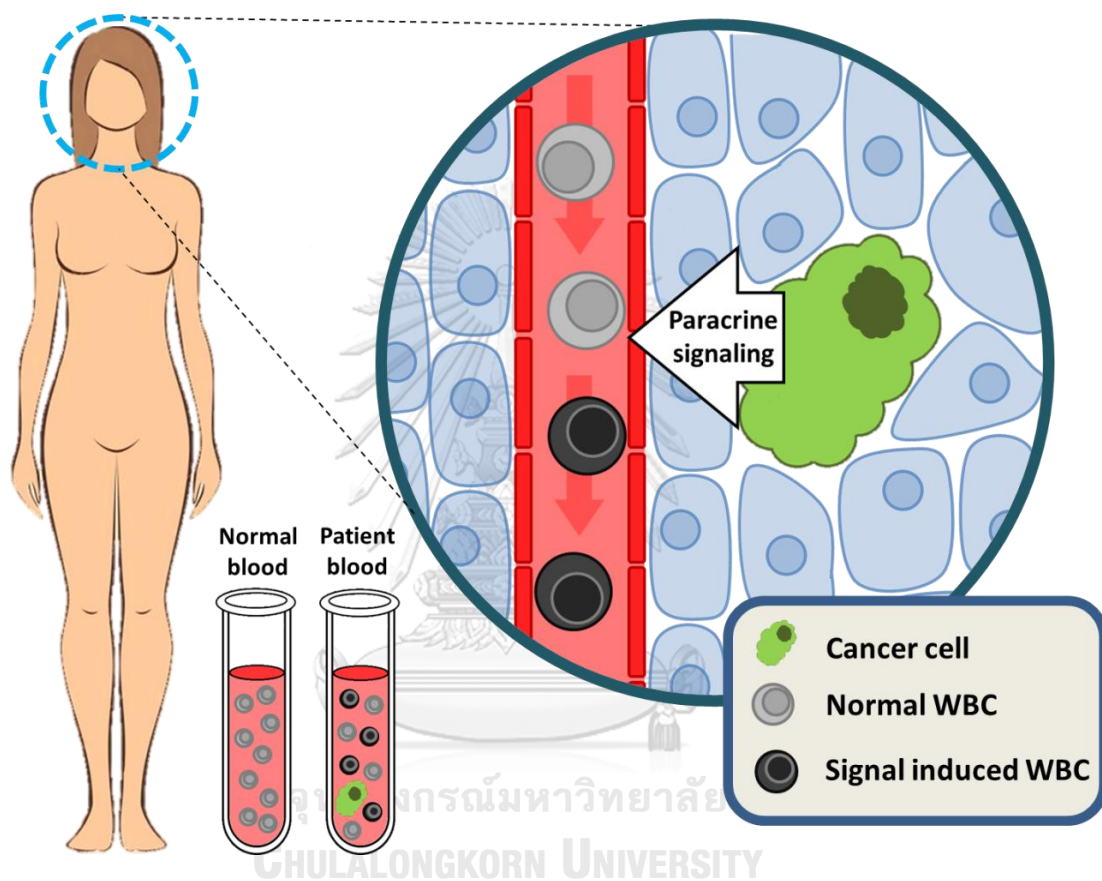
เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคามีสัญญาณพาราไครน์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรม รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวหรือไม่?

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives)

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะ และลำคอ
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับ สัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะ และลำคอ

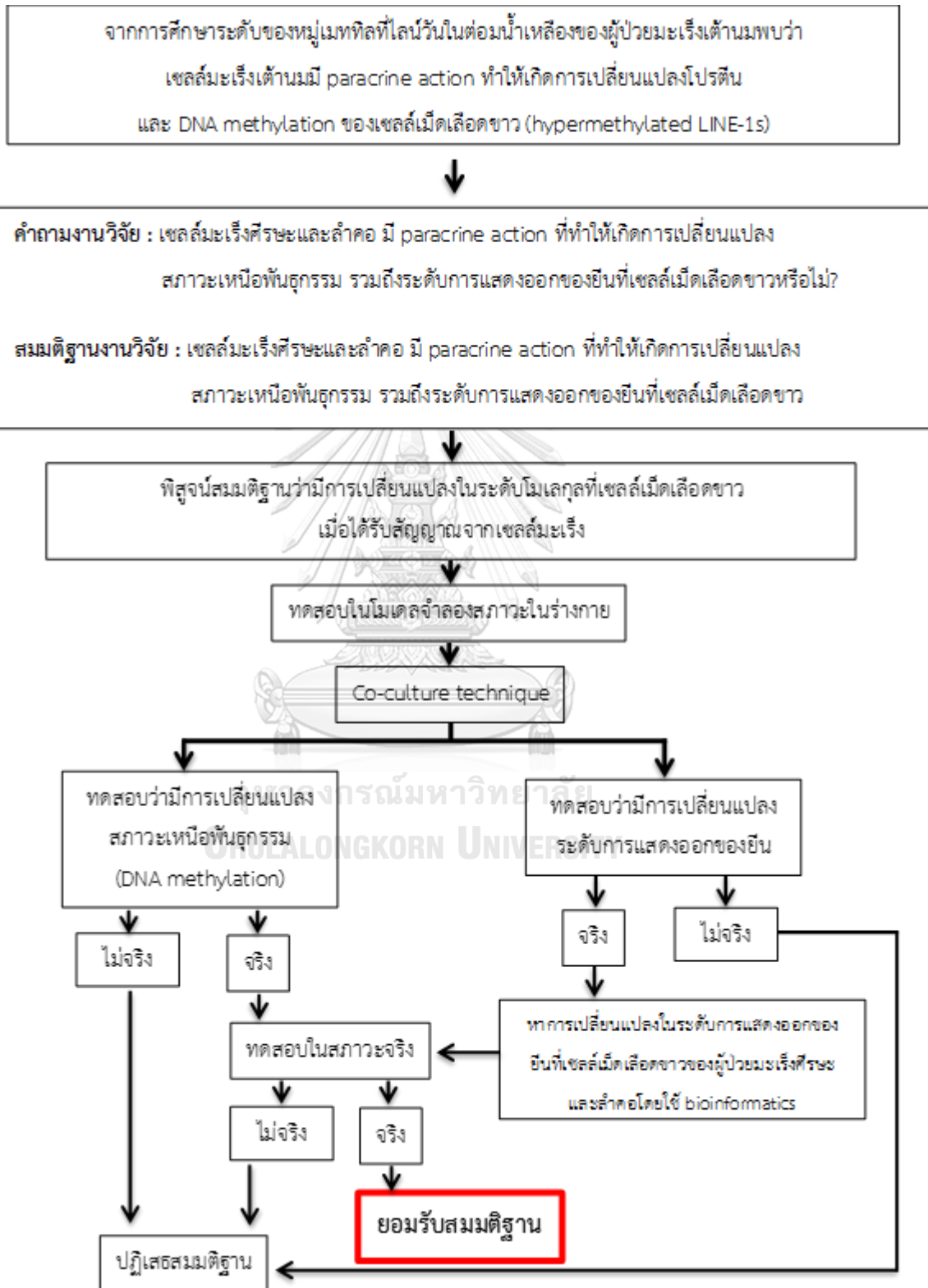
สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอหลังสัญญาณพาราไครน์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะเนื้อพันธุกรรม รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวได้



รูปที่ 1 สมมติฐานงานวิจัย

กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



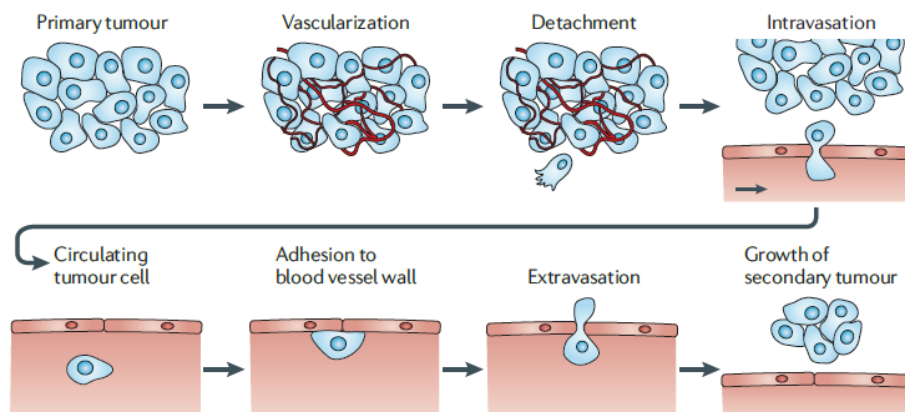
บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

(Literature review)

โรคมะเร็ง (Cancer)

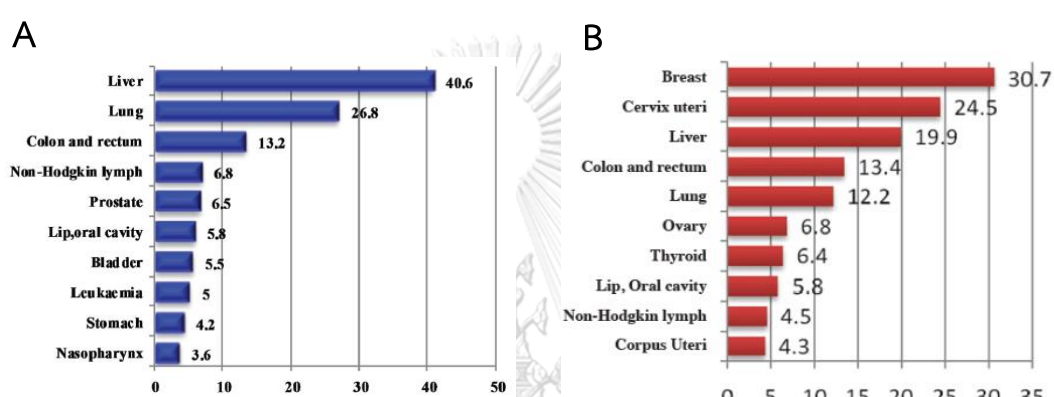
โรคมะเร็ง คือ โรคที่เกิดจากเซลล์ที่มีความผิดปกติที่สารพันธุกรรม ทำให้เกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ และสามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วเข้าไปในส่วนอื่น ๆ ของร่างกายรวมถึงแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ได้ โดยกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเรียกว่า metastasizing ผ่านระบบหลอดเลือดและระบบน้ำเหลือง ซึ่งมักเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต (8, 9) โดยองค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2030 จะมีผู้ป่วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 21.4 ล้านคน และคาดว่าจะมีผู้เสียชีวิตราว 13 ล้านคน และประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของผู้เสียชีวิตจะอยู่ในประเทศที่มีรายได้ปานกลางถึงต่ำ (10) จากข้อมูลของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ รายงานว่าในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณ 61,082 คน เป็นเพศชาย 35,437 คนและเพศหญิง 25,645 คน ซึ่งถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ



รูปที่ 2 กลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะ หรือ ตำแหน่งอื่นๆ (9)

มะเร็งศีรษะและลำคอ (Head and neck cancer)

มะเร็งศีรษะ และลำคอ (head and neck cancer) เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์ประมาณ 5.8 เปอร์เซ็นต์ต่อประชากร 1 แสนคนในเพศชายของประเทศไทย และมีอุบัติการณ์ประมาณ 5.8 เปอร์เซ็นต์ต่อประชากร 1 แสนคนในเพศหญิงของประเทศไทย ซึ่งคิดเป็นอันดับที่เจ็ดในประชากรไทย แบ่งเป็นอันดับที่หกในเพศชาย และอันดับที่แปดในเพศหญิง โดยอ้างอิงจากแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ พ.ศ.2556-2560 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข (10) และทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2555 ดังรูปที่ 3 (2)

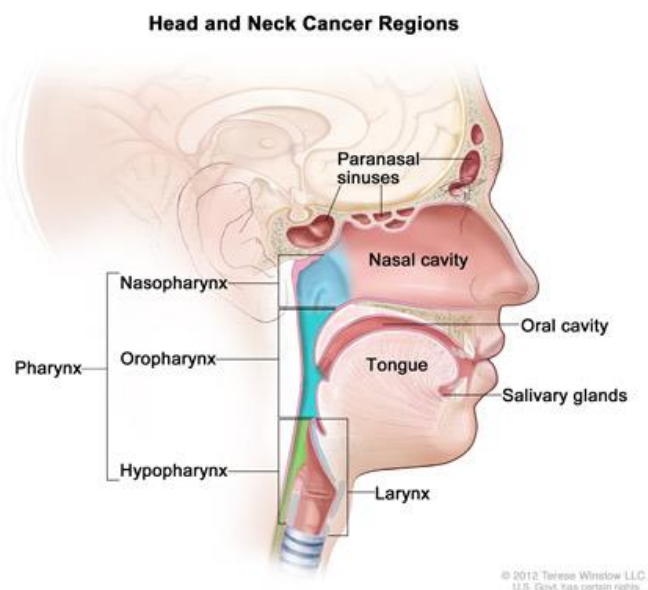


รูปที่ 3 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศชาย (A) และเพศหญิง (B)

ปี พ.ศ. 2551 (ต่อประชากร 100,000 คน) (10)

มะเร็งศีรษะและลำคอ เป็นการรวมกันของมะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่อทางกายวิภาคหลายชนิด เช่น กระดูกกะโหลกศีรษะ (craniofacial bones) เนื้อเยื่ออ่อน (soft tissues) ต่อม้ำลาย (salivary glands) และผิวหนังและเยื่อเมือก (mucosal membranes) ซึ่ง 90 เปอร์เซ็นต์ของมะเร็งชนิดนี้มักเกิดจากเซลล์เยื่อบุผิวชนิดสความัส เรียกว่า squamous cell carcinomas (11) โดยมะเร็งศีรษะและลำคอแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด ตามบริเวณและตำแหน่งของการเกิด (12) ดังนี้

1. มะเร็งกล่องเสียงและคอหอยส่วนล่าง (Laryngeal and Hypopharyngeal Cancer)
2. มะเร็งโพรงจมูกและโพรงอากาศข้างจมูก (Nasal Cavity and Paranasal Sinus Cancer)
3. มะเร็งหลังโพรงจมูก (Nasopharyngeal Cancer)
4. มะเร็งช่องปาก (Oral and Oropharyngeal Cancer)
5. มะเร็งต่อม้ำลาย (Salivary Gland Cancer)



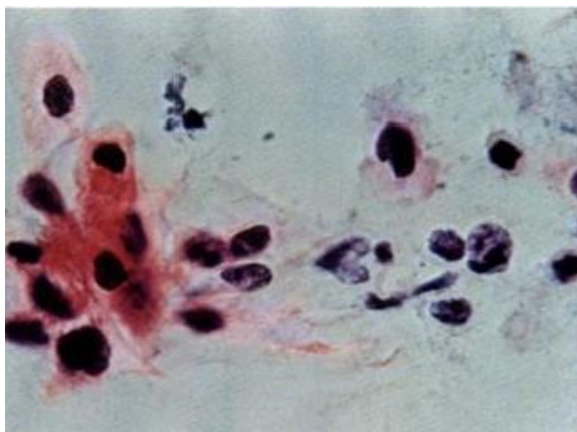
รูปที่ 4 ตำแหน่งที่สามารถเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอได้ ได้แก่ paranasal sinuses, nasal cavity, oral cavity, tongue, salivary glands, larynx และ pharynx ซึ่งเป็นบริเวณที่รวมทั้ง nasopharynx, oropharynx และ hypopharynx (12)

โดยผู้ที่เป็นมะเร็งชนิดนี้จะแสดงอาการหลายอย่าง เช่น กลืนอาหารลำบาก มีแผ่นสีขาวในช่องปาก เจ็บคอ และหายใจลำบาก เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดมะเร็งศีรษะและลำคอก็คือ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) (3)

การตรวจมะเร็งชนิดนี้มีหลายวิธี เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การตรวจด้วยตาจากแพทย์ผู้ชำนาญ โดยการสังเกตลักษณะของแผล หรือก้อนที่มีรูปร่าง สี รวมถึงพื้นผิวที่ผิดปกติจากบริเวณอื่น ๆ หรือผิดปกติ
2. การตรวจด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา (histopathology) เป็นวิธีการตรวจมะเร็งที่เป็นที่ยอมรับ และใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจมะเร็งหลายชนิด โดยการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) ที่ต้องสงสัยมะเร็งมาผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อและย้อมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา จากนั้นนักพยาธิวิทยา (pathologist) จะตรวจสอบชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscope) โดยสังเกตเซลล์เยื่อเมือกที่ผิดปกติ เช่น มีการเรียงตัวของเซลล์ไม่เป็นระเบียบ มี mitotic activity มากขึ้น มีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นของนิวเคลียส และการรุกรกล้ำลงไปในพื้นที่เยื่อเกี่ยวพัน (11)
3. การส่งตรวจทางเซลล์วิทยาจากเซลล์หลุดลอก (exfoliative cytology) คือการ smear เซลล์จากแผลที่ต้องการตรวจสอบมาป้ายบนสไลด์แล้วย้อมสีเพื่อดูรูปร่างของเซลล์ โดยสังเกตจากลักษณะต้องสงสัยของเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับการตรวจมะเร็งด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ดังรูปที่ 5 (4)



รูปที่ 5 เซลล์มะเร็งที่ถูกตรวจสอบด้วยวิธี exfoliative cytology (4)

4. การย้อมเซลล์ด้วยสีโทลูอิดีนบลู (toluidine blue) เพื่อดูบริเวณที่ต้องสงสัยว่าจะเป็นมะเร็ง โดยอาศัยหลักการที่กล่าวว่า เซลล์มะเร็งจะมีสารพันธุกรรมที่มากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่ง toluidine blue เป็นสีย้อมประเภท acidophilic dye หรือ สีย้อมที่ชอบความเป็นกรด ทำให้ย้อมติดเซลล์ที่มีองค์ประกอบของกรดอยู่มาก เช่น เซลล์มะเร็งได้ โดยบริเวณที่ต้องสงสัยเมื่อย้อมสีแล้วจะได้สีน้ำเงินเข้มดังรูปที่ 6 (5, 13)

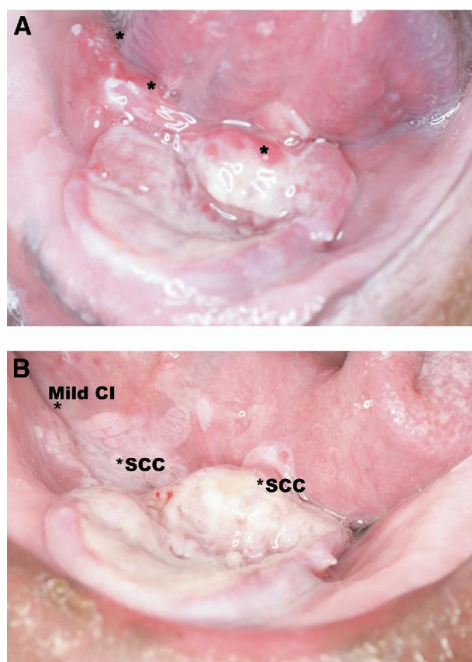
Squamous cell carcinoma under the tongue



APPEARANCE OF LESION IN INCANDESCENT LIGHT MARKED WITH TOLUIDINETM

รูปที่ 6 มะเร็งชนิดเยื่อเมือกบริเวณใต้ลิ้นที่ถูกย้อมด้วย toluidine blue เพื่อดูบริเวณที่ต้องสงสัยว่าเป็นมะเร็ง (13)

5. การย้อมเซลล์ด้วยน้ำส้มสายชู (5% acetic acid) เป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ให้มีความจำเพาะ (specificity) ที่มากขึ้น อีกทั้งยังสะดวกและประหยัดมากกว่าการย้อมเซลล์ด้วยสีโทลูอิดีนบลูดังรูปที่ 7 (6)

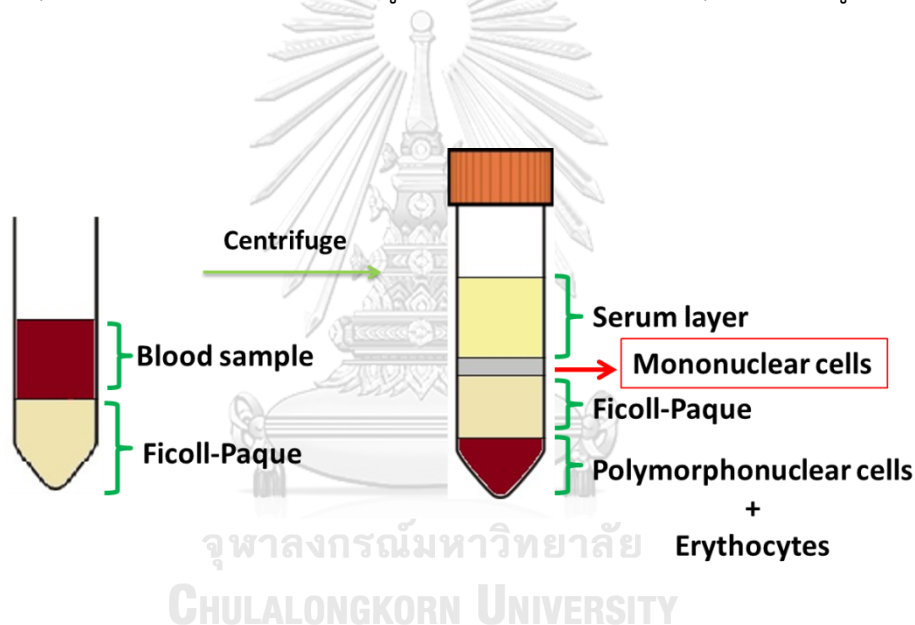


รูปที่ 7 การย้อมเซลล์ด้วยน้ำส้มสายชูบริเวณพื้นปาก (floor of mouth) ระหว่างก่อนย้อม (A) กับหลังย้อม (B) (Mild CI, mild chronic inflammation; SCC, squamous cell carcinoma) (6)

วิธีการรักษามะเร็งศีรษะ และลำคอในปัจจุบันนิยมอยู่สามวิธี คือ การผ่าตัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด การฉายด้วยแสงรังสี และการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) ถึงแม้ว่าการตรวจมะเร็งศีรษะและลำคอจะมีหลายวิธี แต่ทุกวิธีจะตรวจต่อเมื่อเกิดอาการของโรคขึ้นแล้วซึ่งอาการของโรคนั้นมักจะแสดงออกในระยะท้ายของการเป็นมะเร็ง อีกทั้งวิธีการตรวจในปัจจุบันยังมีความไวและความจำเพาะไม่เพียงพอที่จะใช้ตรวจการเป็นมะเร็งในระยะแรกได้ (7) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจมะเร็งศีรษะและลำคอให้สามารถตรวจการเป็นมะเร็งได้ตั้งแต่ในระยะแรกของการเป็นมะเร็ง

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)

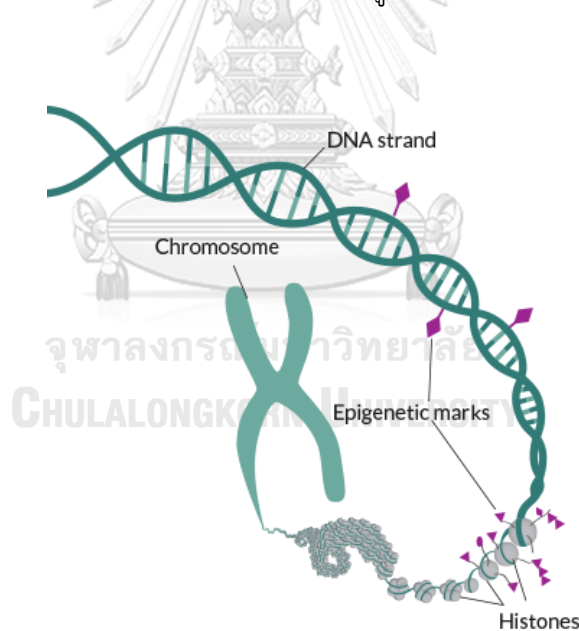
PBMC คือเซลล์เม็ดเลือดที่มีนิวเคลียสรูปปร่างกลมซึ่งประกอบด้วย T lymphocyte คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ B lymphocyte คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ Natural Killer cell คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ monocyte คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และ dendritic cell คิดเป็น 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดย T lymphocyte จะประกอบด้วยสองส่วนคือ CD4+ T cell และ CD8+ T cell คิดเป็นอัตราส่วน 2:1 ซึ่งการแยกเซลล์ PBMC ออกจากเลือดทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิทีเกรเดียนต์ (Density Gradient centrifugation) บนสาร Ficoll Paque ซึ่งมีความหนาแน่นเท่ากับ 1.077 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งโมเลกุลที่มีความหนาแน่นมากกว่า 1.077 กรัมต่อมิลลิลิตร จะตกลงด้านล่างส่วนโมเลกุลที่เบากว่า 1.077 กรัมต่อมิลลิลิตร จะอยู่ด้านบน เมื่อทำการแยกเลือดด้วยสาร Ficoll Paque แล้วเซลล์เม็ดเลือดแดง และเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลายนิวเคลียสเช่นอีโอซิโนฟิล และนิวโทรฟิลจะอยู่ด้านล่างของสาร Ficoll Paque ในขณะที่เซลล์ PBMC จะอยู่ด้านบนของสาร Ficoll Paque (14) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 การแยกเซลล์ PBMC ออกจากเลือดทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิทีเกรเดียนต์

กลไกระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)

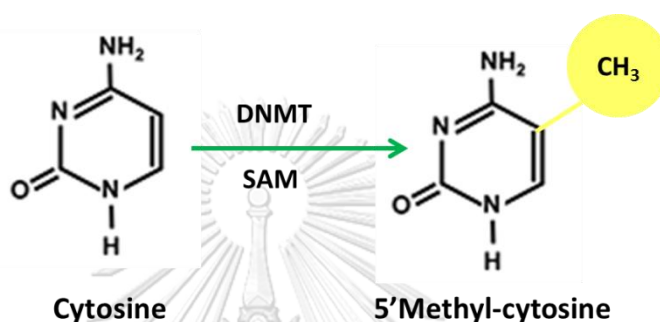
กลไกระดับเหนือพันธุกรรม คือ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการลำดับเบสของสารพันธุกรรม ซึ่งกลไกนี้สามารถถูกปรับแต่งและเปลี่ยนแปลงได้ รวมถึงสามารถส่งต่อลักษณะนั้นไปสู่รุ่นลูกได้ กระบวนการทาง epigenetics มีความสำคัญกับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ดังนั้นเมื่อกระบวนการนี้มีความผิดปกติ จะส่งผลทั้งในด้านร่างกายและพฤติกรรมได้ ตัวอย่างของกลไกระดับเหนือพันธุกรรม เช่น กระบวนการขดม้วนของโครมาติน (chromatin modification) และกระบวนการเติมหมู่เมทิลที่สารพันธุกรรม (DNA methylation) โครมาติน คือ องค์ประกอบที่รวมกันระหว่างโปรตีนที่เรียกว่า ฮิสโตน (histone) กับสารพันธุกรรม (DNA) ขดม้วนมีลักษณะเป็นก้อนอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงการขดม้วนของโครมาตินเกิดได้จากหมู่อะซิetyl (acetyl groups) ผ่านกลไกการเติม หรือถอนหมู่อะซิetyl (acetylation) ที่โปรตีนฮิสโตน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลต่อรูปร่างของโครมาติน ทำให้ระดับการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป โดยการขดตัวแน่นของโครมาตินจะทำให้การแสดงออกของยีนลดลง หรือยับยั้งการแสดงออก ส่วนการคลายโครมาติน จะทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีนได้ ส่วน DNA methylation เป็นการเติมหมู่เมทิลบนลำดับสารพันธุกรรม ซึ่งตำแหน่ง กลไกการเติม หรือถอนหมู่เมทิล จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกับกระบวนการขดม้วนของโครมาตินดังรูปที่ 9 (15)



รูปที่ 9 กระบวนการทาง Epigenetics (16)

กระบวนการเติมหมู่เมทิลที่สารพันธุกรรม (DNA methylation)

DNA methylation เป็นกระบวนการทาง Epigenetic ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของยีน genomic imprinting การแสดงออกของเซลล์มะเร็ง และควบคุมความเสถียรของรหัสพันธุกรรม (17, 18) เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ย้ายหมู่เมทิล (-CH₃) จาก S-adenosylmethionine (SAM) ไปสู่ตำแหน่ง 5' ของเบส cytosine (C) ที่ติดกับเบส guanine (G) (5'-CG-3') มักเกิดใน CpG islands (CGI) ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 กลไกการเติมหมู่เมทิลที่เบส cytosine โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase

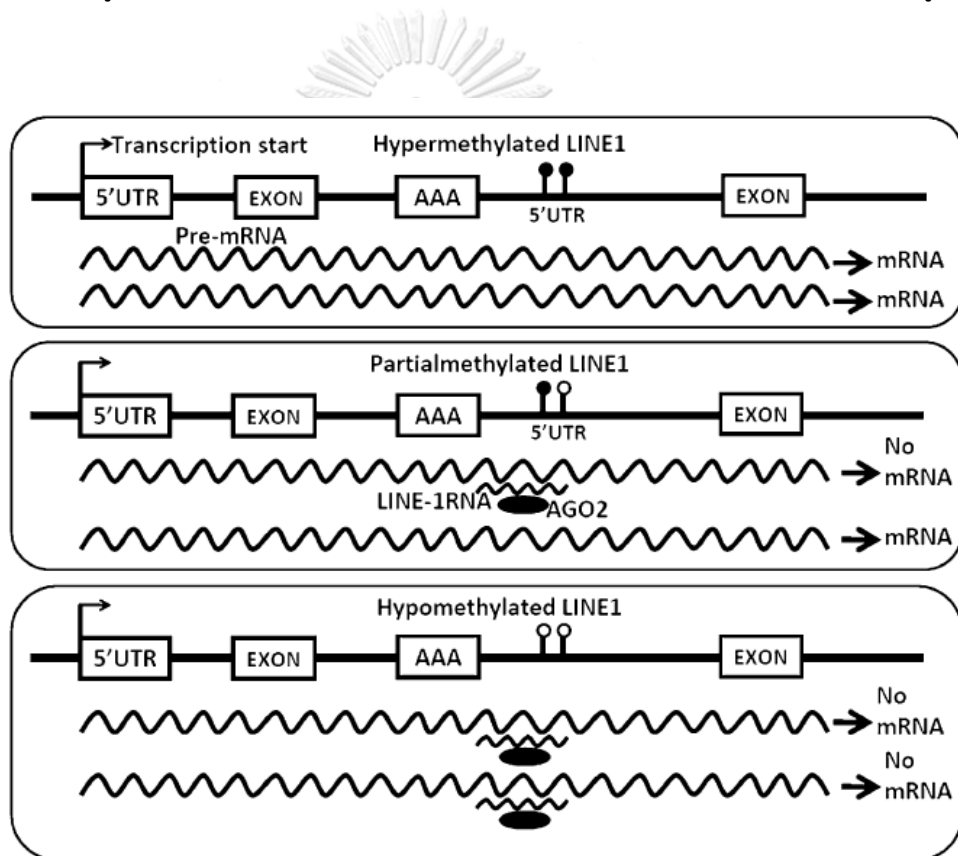
ตำแหน่งของการเกิด methylation จะควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเฉพาะบริเวณ promoter เมื่อเกิด methylation จะทำให้ยีนลดการแสดงออก และทำให้โครมาตินเกิดการขดม้วน เรียกว่า Heterochromatin ในทางตรงข้ามกัน การเกิด methylation ที่ตำแหน่ง gene body จะทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีนนั้นได้ โดยในแต่ละอวัยวะจะมีรูปแบบของการเกิด methylation ที่แตกต่างกัน เรียกว่า tissue specific methylation และรูปแบบนี้จะเปลี่ยนแปลงตามกระบวนการพัฒนาของร่างกายตั้งแต่ระยะ embryo fetus adult และ aging (19) ในเซลล์มะเร็งมักพบระดับของหมู่เมทิลต่ำกว่าในเซลล์ปกติ (hypomethylation) (20, 21)

บทบาทของ DNA methylation มีสามอย่าง (17) คือ

- รักษาสมดุลการแสดงออกของยีนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมในขณะแบ่งเซลล์
- ควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านการเติม หรือลดหมู่เมทิลที่ promoter
- ควบคุมการขดม้วนของโครมาตินให้ถูกต้อง

ไลน์วัน (LINE-1s)

ไลน์วัน (LINE-1s) หรือ Long Interspersed Element-1s เป็น repetitive DNA sequence ชนิดหนึ่ง พบกระจายอยู่ทั่วจีโนม แทรกอยู่ทั้งภายในและภายนอกยีน โดยคิดเป็น 17 เปอร์เซ็นต์ของ จีโนมทั้งหมด (22) ซึ่งการเกิดเมทิลที่ไลน์วัน จะส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในด้าน ที่ทำให้การแสดงออกเพิ่มขึ้น และยับยั้งการแสดงออกของยีน ขึ้นกับการเกิดเมทิลที่ไลน์วัน ในตำแหน่งไหนของยีน โดยการเกิดเมทิลที่ไลน์วันในตำแหน่งภายนอกยีน หรือตำแหน่งควบคุม การแสดงออกของยีนจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ในทางตรงข้ามการเกิดเมทิลที่ไลน์วัน ในตำแหน่งภายในยีนจะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน แต่ถ้าเกิดการดั่งหมู่เมทิลที่ไลน์วัน ที่แทรกตัวอยู่ในยีนจะทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ (21) ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยการลดเมทิลที่ไลน์วันที่แทรกตัวอยู่ในยีน ทำให้เกิดการสร้าง mRNA ของไลน์วัน ซึ่งจะมีลำดับเบสที่สามารถจับกับ mRNA ของยีนได้ โดยมีโปรตีน AGO2 เป็นตัวพาไปจับ ทำให้ mRNA ของยีนถูกยับยั้งการแสดงออกได้ (21)

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

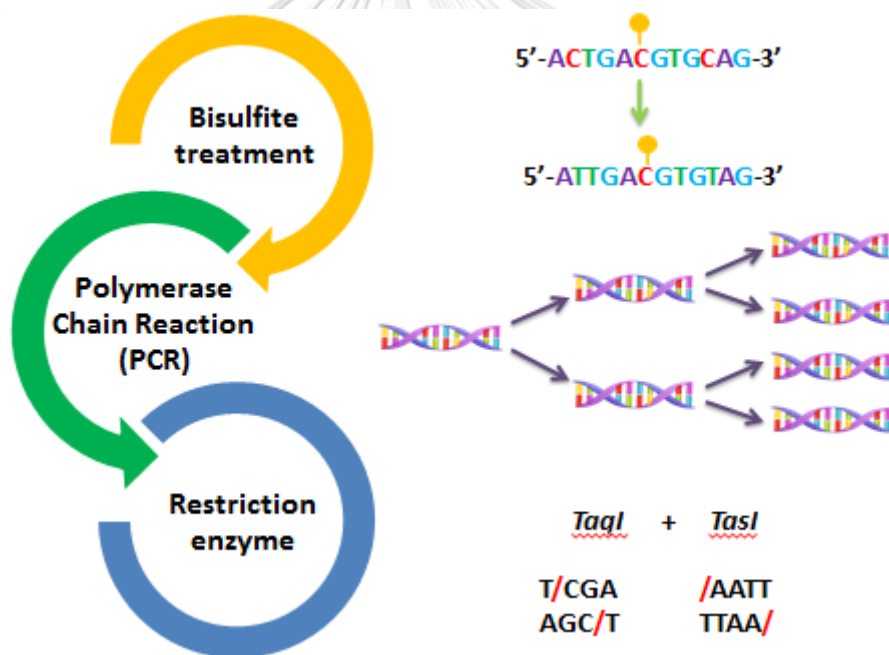
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติของเซลล์ โดยเทคนิคนี้อาศัยการเข้าจับอย่างจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวยาว 18-25 เบส กับดีเอ็นเอแม่แบบในอุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำหน้าที่เลือกนิวคลีโอไทด์มาต่อสายไพรเมอร์ให้เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยนิวคลีโอไทด์ที่ใช้มี 4 ชนิดคือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมีน (thymine, T) กัวนีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีขั้นตอน 3 ขั้นตอนคือ

1. การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) โดยใช้อุณหภูมิ ประมาณ 95 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิจะทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว
2. การเข้าจับอย่างจำเพาะระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) โดยใช้อุณหภูมิ ประมาณ 50-62 องศาเซลเซียส
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq* DNA polymerase เมื่อเอนไซม์ทำการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จนครบตามแม่แบบแล้ว ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 2^n เท่า โดย n คือจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา (23)

Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

COBRA เป็นวิธีการวัดระดับของหมู่เมทิลที่จีโนมโดยอนุมานจากระดับของหมู่เมทิลที่ไลนั้ว (22) โดย COBRA ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ

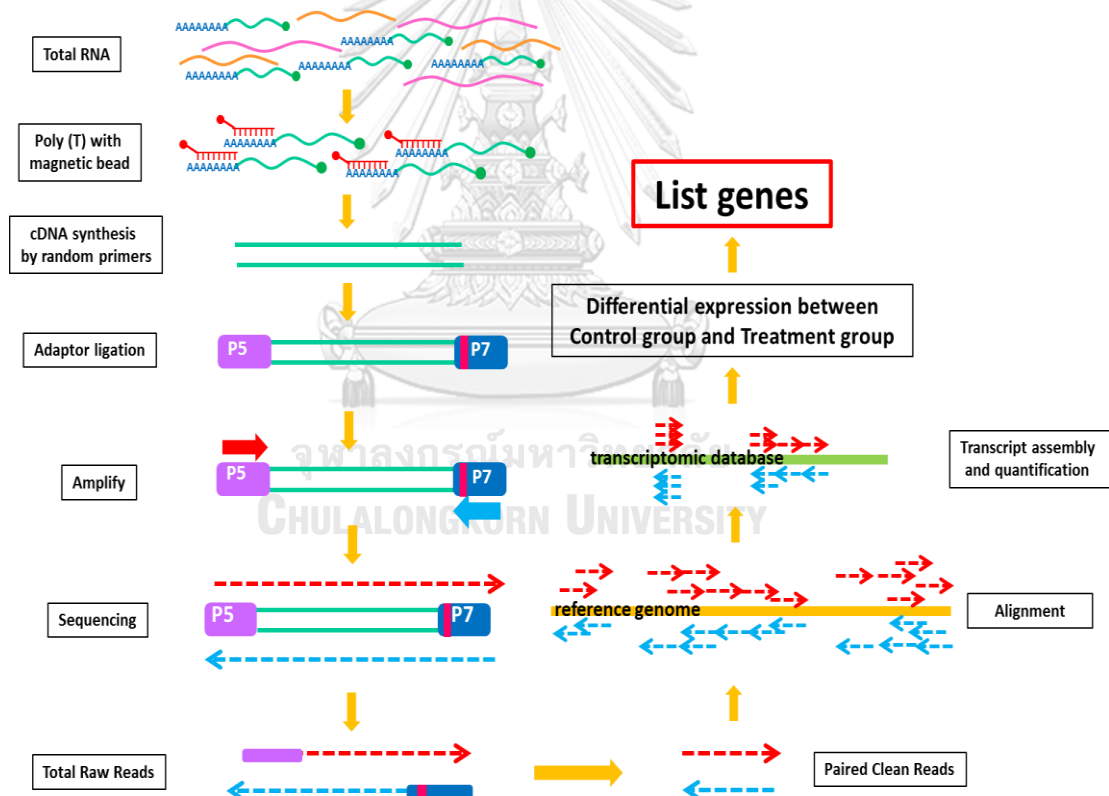
- Bisulfite treatment เป็นวิธีการที่จะเปลี่ยนเบสไซโทซีนให้เป็นเบสยูราซิลโดยเบสไซโทซีนที่มีหมู่เมทิลจะไม่ถูกเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิลในขณะที่เบสไซโทซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสยูราซิล เพื่อแยก CpG ที่มีหมู่เมทิลกับไม่มีหมู่เมทิลออกจากกัน
- Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณของไลนั้ว
- Restriction enzyme เป็นขั้นตอนที่ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *TaqI* กับ *TasI* เพื่อแยกรูปแบบของการเกิดเมทิลที่ไลนั้ว



รูปที่ 12 กลไกการเกิดปฏิกิริยา COBRA

RNA sequencing

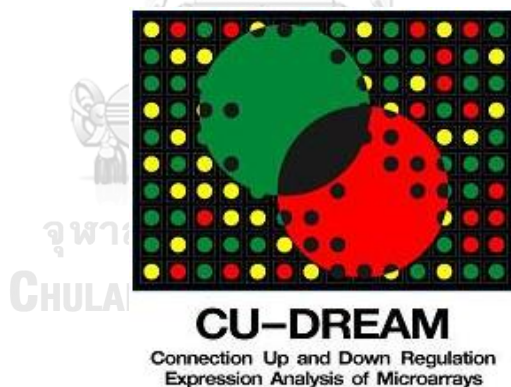
การหาลำดับอาร์เอ็นเอ (RNA sequencing) คือการประยุกต์ใช้เทคนิค next-generation sequencing ซึ่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างแม่นยำ รวดเร็ว และทำได้พร้อมกันหลายตัวอย่างในคราวเดียว โดย RNA sequencing จะเป็นการหาลำดับเบสโดยใช้ mRNA เป็นแม่แบบในการสร้าง complementary DNA (cDNA) จากนั้นสร้าง library โดยการต่อ adaptor เข้ากับชิ้น cDNA และเริ่มหาลำดับเบสจากชิ้น adaptor จากนั้นนำลำดับเบสไปเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง (reference genome) เพื่อหาลำดับเบสที่ได้นั้นเป็นยีน หรือ transcript ใด เนื่องจากวิธีนี้ใช้ mRNA เป็นแม่แบบ ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นปราศจาก intron หรือบริเวณที่ไม่สร้างโปรตีน โดยจะพบแค่ส่วน exon หรือส่วนที่สามารถใช้เป็นแม่แบบสร้างโปรตีน ดังนั้นเทคนิค RNA sequencing สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ อีกทั้งยังสามารถหา transcript assembly, alternatively spliced transcript, novel transcript discovery และ transcript quantitation ได้อีกด้วยดังรูปที่ 13 (24)



รูปที่ 13 กระบวนการทำ RNA-sequencing

Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension (CU-DREAMX)

CU-DREAMX เป็นโปรแกรมที่ถูกสร้างขึ้นโดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อใช้เปรียบเทียบข้อมูลจาก microarray กับข้อมูลยีนที่ต้องการ เพื่อวิเคราะห์กระบวนการเปลี่ยนแปลงของจีโนม และการแสดงออกของยีน โดยจะใช้ข้อมูลจาก Gene Expression Omnibus (GEO) ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใน GEO จะประกอบไปด้วย GSE หรือรหัสของการทดลอง GPL หรือรหัสของ Chip microarray และ GSM หรือรหัสของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนั้น ๆ ซึ่งฐานข้อมูลนี้ประกอบไปด้วยข้อมูลมากกว่า 10,000 การทดลอง โดยการใช้โปรแกรม CU-DREAM นั้นสามารถป้อนคำสั่งลงใน command prompt บนระบบปฏิบัติการ Windows operating system ผู้ใช้สามารถกำหนดการเปรียบเทียบข้อมูลจากทั้งสองแหล่งให้ออกมาเป็น ระดับของการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น หรือระดับของการแสดงออกของยีนที่ลดลงได้ รวมทั้งสามารถกำหนดค่านัยสำคัญ และค่าสถิติที่ต้องการทดสอบได้อีกด้วย จากนั้นข้อมูล out put จะออกมาในรูปแบบ Microsoft Excel ที่บอกถึงจำนวนยีนในกลุ่มที่ต้องการ รายชื่อยีนในกลุ่มนั้น ๆ ค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ และสามารถบอกได้ว่ายีนนั้นมาจากโพรบ (probe) เลขอะไรใน chip microarray อีกด้วย โดยโปรแกรมสามารถดาวน์โหลดได้จาก <http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~achatcha/cu-dream> ดังรูปที่ 14 (25)

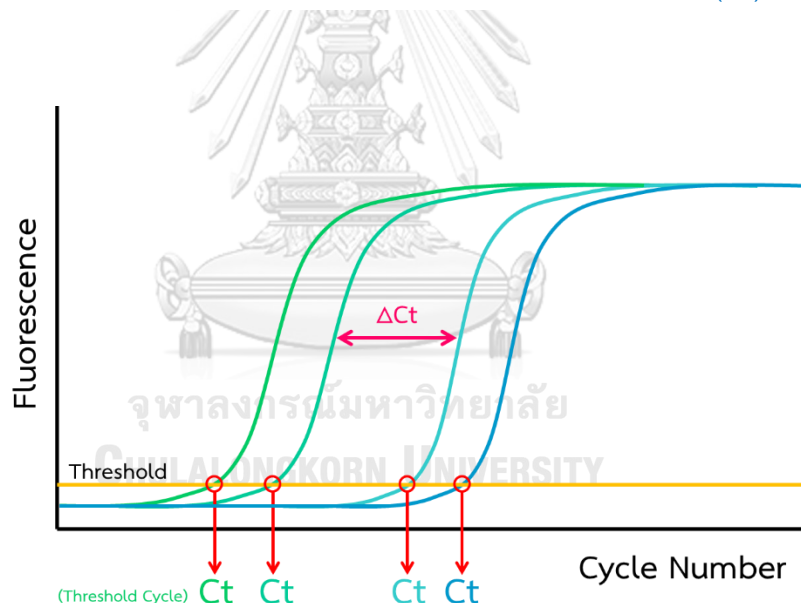


รูปที่ 14 สัญลักษณ์โปรแกรม CU-DREAM

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากเทคนิค ปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) โดยเป็นการรวมขั้นตอนการเพิ่มขยายปริมาณผลิตภัณฑ์ และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไว้ด้วยกัน ทำให้ลดเวลา และจำนวนอุปกรณ์ รวมถึงสารเคมีที่ใช้ในการปฏิบัติการลง โดยเทคนิคนี้มีความจำเพาะและความไวสูง ทำให้สามารถใช้สารพันธุกรรมตั้งต้นปริมาณน้อยได้ และเนื่องจากเทคนิคนี้มีการรวมการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไว้ด้วยกันทำให้สามารถติดตามผลการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมได้ในขณะเกิดขึ้นจริง แต่ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ราคาของเครื่องมือที่สูง และจำเป็นต้องใช้ประสบการณ์ของผู้วิจัยเพื่อให้ผลที่ได้มีค่าการกระจายน้อยที่สุดและแม่นยำที่สุด

หลักการของเทคนิคนี้ คือการผสมสารพันธุกรรมตั้งต้นกับสารเรืองแสง (fluorescence dye) จากนั้นทำการเพิ่มขยายปริมาณผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารเรืองแสงจะเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนรอบของการทำปฏิกริยาจนกระทั่งมีการสะสมสารเรืองแสงมากพอจนค่าการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์มากกว่าค่าการเรืองแสงเริ่มต้น (Threshold) เรียกจุดนั้นว่า Threshold Cycle (Ct) หรือ crossing point โดยค่าที่จุดนี้สามารถนำมาคำนวณหาจำนวนของผลิตภัณฑ์ หรือ ค่าการแสดงออกของยีนได้ (26)



รูปที่ 15 แสดงค่า Threshold Cycle (Ct) ในปฏิกริยา Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

(Research methodology)

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

งานวิจัยนี้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข IRB 239/59

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. ตู้ปลอดเชื้อ classII (Biosafety cabinet classII) (Gelman science, Singapore)
2. ตู้ปลอดเชื้อ classI (S.K. Powerable, Thailand)
3. ตู้ดูดควัน (S.K. Powerable, Thailand)
4. ตู้อบ (Memmert, Germany)
5. ตู้เลี้ยงเซลล์ในสถานะที่มี 5% CO₂ (Shel lab, USA)
6. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Japan)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
8. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Biobase, China)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
12. กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ชนิด 2 ตา (Nikon, Japan)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
14. เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 10 ไมโครลิตร (Transferpette, Germany)
15. เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
16. เครื่องควบคุมการดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Pipette boy) (Integra Biosciences, Switzerland)
17. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Denver Instrument, USA)

18. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Millipore, France)
19. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
20. เครื่องซั่งสารดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
21. เครื่องเขย่าสาร (Scientific Industries, USA)
22. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Hirayama, Japan)
23. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nano drop) (Thermo Scientific, USA)
24. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo cycle) (Eppendorf, Germany)
25. เครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับสารพันธุกรรม (Perkin elmer, USA)
26. เครื่องอเล็กโทรโพรชีซิส (Bio-RAD, USA)
27. เครื่องถ่ายภาพเจล (Image scanner (STROM)) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
28. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสถานะจริง (QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR) (Thermo Scientific, USA)
29. เครื่องวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ (Qubit® Fluorometer) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
30. เครื่องวัด RNA Integrity Number (RNA6000 Nano assay) (Agilent Technologies, California, USA)
31. เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส (Illumina HiSeq. X10 sequencing) (Illumina, USA)
32. ถังไนโตรเจนเหลว
33. แทงค์ CO₂

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Transwell® Permeable Support (Corning, USA)
2. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (Costar, USA)
3. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร (Corning, USA)
4. กล่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Cryobox) (Nalgene labware, USA)
5. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) (Boeco, Germany)
6. เครื่องนับจำนวนอนุภาค (Arrow, Thailand)
7. แผ่นรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (Thermo Scientific, USA)
8. Syringe 6 มิลลิลิตร (Nipro, Belgium)
9. Hypodermic needle (Nipro, Belgium)
10. สำลีทำแผล (Evergreen, Thailand)
11. plaster (nexcare, Thailand)
12. Vacuette® Blood Collection Tube 6 มิลลิลิตร (Santa Cruz, USA)
13. Cryovial tube (Corning, USA)
14. ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (Sri Trang Gloves, Thailand)
15. ไมโครปิเปตทิปขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
16. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
17. หลอดเซนตริฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร (Corning, USA)
18. แท่นวางหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ และ เซนตริฟิวก์ (Autopack, USA)
19. กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Vitlab, Germany)
20. ปีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
21. ถาดเตรียมเจลพร้อมหัว (Bio-Rad, USA)
22. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
23. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
24. optical adhesive film (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
25. Real-Time PCR 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และ Co-culture technique
 - 1.1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)
 - 1.2 Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)
 - 1.3 Anti-anti (100x) antibiotic-antimitotic (Gibco, USA)
 - 1.4 Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA)
 - 1.5 Tryphan blue (Gibco, USA)
2. สารเคมีที่ใช้ในการแยกเซลล์ PBMC จากเลือด
 - 2.1 ficoll hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
 - 3.1 absolute ethanol (Merck, Germany)
 - 3.2 sodium chloride (Merck, Germany)
 - 3.3 sodium dodecyl sulfate (Calbiochem, Japan)
 - 3.4 proteinase K (USB, USA)
 - 3.5 phenol (USB, USA)
 - 3.6 chloroform (Merck, Germany)
 - 3.7 ammonium acetate (Merck, Germany)
4. สารเคมีที่ใช้ในการทำไบซัลไฟต์ทรีเมนต์
 - 4.1 EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo research, USA)
5. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR
 - 5.1 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
 - 5.2 25mM magnesium chloride (Qiagen, Germany)
 - 5.3 10mM deoxynucleotide triphosphates (Promega, USA)
 - 5.4 oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)
 - 5.5 hot start Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany)
6. สารเคมีที่ใช้ในการตัดชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเพื่อแยกรูปแบบของการเกิดเมทิลเลชัน
 - 6.1 10x BSA (New England Biolabs, Ontario, Canada)
 - 6.2 NEB buffer 3 (New England Biolabs, Ontario, Canada)
 - 6.3 Enzyme *TasI* (2U) (New England Biolabs, Ontario, Canada)

- 6.4 Enzyme *TaqI* (2U) (New England Biolabs, Ontario, Canada)
- 6.5 Mineral oil
7. สารเคมีใช้ในการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis)
 - 7.1 40% acrylamide (Bio-Rad, USA)
 - 7.2 tris (Affymetrix, USA)
 - 7.3 boric acid (Affymetrix, USA)
 - 7.4 EDTA (Affymetrix, USA)
 - 7.5 TEMED (Merck, Germany)
 - 7.6 ammonium peroxodisulfate (Affymetrix, USA)
 - 7.7 10 base pair DNA ladder (Promega, USA)
 - 7.8 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
 - 7.9 6X bromophenol blue loading dye (Promega, USA)
 - 7.10 SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
8. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ
 - 8.1 TRIzol LS reagent (Invitrogen, California, USA)
 - 8.2 chloroform (Merck, Germany)
 - 8.3 Isopropanol (Merck, Germany)
 - 8.4 75% ethanol (Merck, Germany)
 - 8.5 type I water
9. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ
 - 9.1 Qubit® RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
 - 9.2 Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, California, USA)
10. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)
 - 10.1 Oligo (dT)₁₈ primer (Qiagen, Germany)
 - 10.2 5x Reaction buffer (Qiagen, Germany)
 - 10.3 20 U/ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor (Qiagen, Germany)
 - 10.4 10 mM dNTP Mix (Qiagen, Germany)
 - 10.5 200 U/ไมโครลิตร ReverstAid M-Mul VRT (Qiagen, Germany)

11. สารเคมีใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสถานะจริงด้วยวิธี real-time PCR

11.1 oligonucleotide primers (Ward medic, Thailand)

11.2 2x Power SYBR buffer (Ward medic, Thailand)

ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย เซลล์ไลน์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอ 4 ชนิด และตัวอย่างเลือดจากคนปกติ รวมถึงตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ดังตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 เซลล์ไลน์สายพันธุ์มะเร็งศีรษะและลำคอทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (27)

เซลล์ไลน์	ตำแหน่งการเกิดมะเร็ง	Clinical stage
WSU-HN4	Base of tongue	T ₄ N ₁ M ₀
WSU-HN17	Neck dissect	T ₂ N ₂ M ₀
WSU-HN30	Pharynx	T ₃ N ₀ M ₀
WSU-HN31	Lymph node	T ₃ N ₀ M ₀

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเลือดจากคนปกติ รวมถึงตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ใช้ในงานวิจัย

การทดลอง	รวม (N)	ผู้ชาย (N)	ผู้หญิง (N)	อายุ (mean ± S.D.)	
Co-culture model	Normal blood	18	9	9	-
COBRA-L1 in patient blood	Normal blood	42	28	14	58.68 ± 7.00
	Patient blood	23	16	7	56.22 ± 17.33
RT-PCR	Normal blood	24	11	13	57.28 ± 6.30
	Patient blood	24	17	7	56.04 ± 15.00

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครในกลุ่มควบคุม

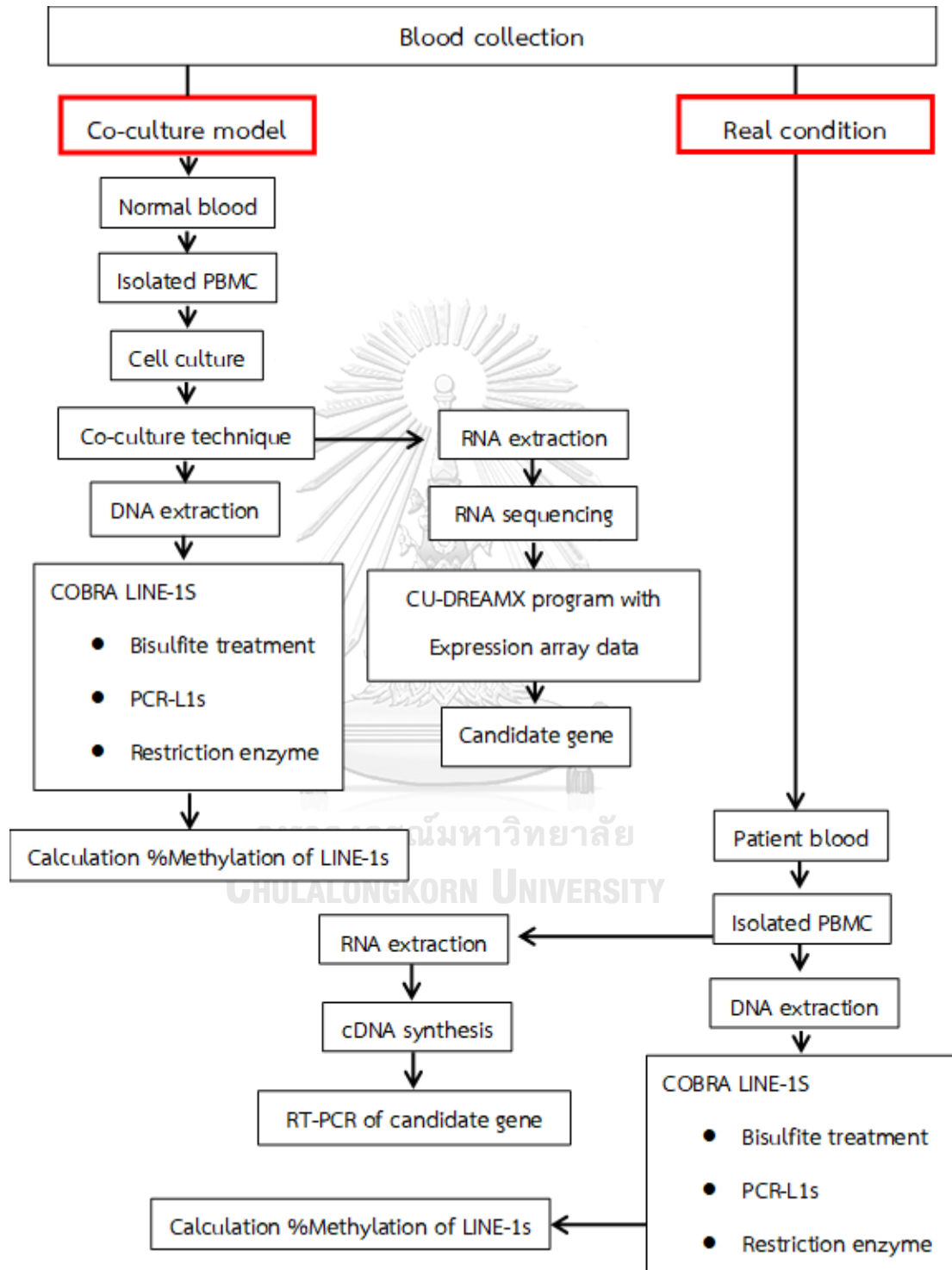
อาสาสมัครต้องเป็นผู้ที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง และไม่มีโรคประจำตัวใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ
ความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครในกลุ่มทดลอง

อาสาสมัครต้องเป็นผู้เป็นโรคมะเร็งศีรษะ และลำคอ และไม่มีโรคประจำตัวใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ
ความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน



การออกแบบการวิจัย



เพื่อทดสอบว่า เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ มีสัญญาณพาราไครน์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรม รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวหรือไม่ งานวิจัยนี้จึงแบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือ

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรม รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ในโมเดลจำลองสถานะในร่างกาย เรียกว่า Co-culture model (วิธีดำเนินงานวิจัยข้อที่ 1 และ 2)
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรม รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอในสภาวะจริง (วิธีดำเนินงานวิจัยข้อที่ 3 และ 4)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรม โดยใช้ Co-culture model

ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วัน เปรียบเทียบระหว่าง Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็ง กับ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุมโดยใช้วิธีดังนี้

1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนปกติ

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจากคนปกติ เพื่อนำมาทำ co-culture technique โดยก่อนที่จะเริ่มกระบวนการดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือด ผู้เข้าร่วมทุกคนจะต้องลงนามในเอกสารแสดงความยินยอม และทำแบบสอบถามด้วยตนเอง เพื่อใช้ในการเก็บรวบรวมประวัติทางการแพทย์ หลังจากเสร็จสิ้นการตอบแบบสอบถามแล้วผลการตรวจทางคลินิกจะถูกบันทึก โดยการเก็บเลือดนั้นจะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร (ประมาณ 1 ซ้อนชา) ใส่หลอดสำหรับเก็บเลือดที่มีสาร EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด สามารถเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ และหลังจากเสร็จโครงการหากมีตัวอย่างเลือดเหลือ ตัวอย่างเหล่านั้นจะจัดเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส โดยแยกเก็บในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากตัวอย่างอื่น ๆ และหากต้องการใช้ตัวอย่างนี้เพื่อการศึกษาในขั้นตอนละเอียดหรือเพื่อการศึกษาในโครงการอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต ผู้วิจัยจะยื่นโครงการวิจัยให้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยพิจารณาให้การรับรองทุกครั้ง

1.2 การแยกเซลล์ PBMC จากเลือด

1. ผสมเลือดและสาร PBS (pH 7.2 – 7.4) อัตราส่วน 1:1 ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
2. แยกเซลล์ PBMC ด้วยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation โดยค่อย ๆ หยดตัวอย่างในข้อ 1 ลงในสารละลาย ficoll hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) (Ficoll sol: sample = 1:1) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที โดยตั้งค่าการหยุดเครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบ BRAKE-OFF
3. ดูดสารละลายสีขาวขุ่นชั้นกลางระหว่าง ficoll และซีรัม ซึ่งเป็นชั้นของ PBMC ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร และเติมสาร PBS ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
4. ทำให้ตะกอน PBMC ฟุ้งแล้วล้างตะกอน PBMC ด้วยสาร PBS 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
5. เติมสาร PBS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำ PBMC ไปเลี้ยงต่อ

1.3 การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เซลล์ไลน์มะเร็งศีรษะและลำคอ (HNSCC cell line) 4 ชนิด ได้แก่ WSU-HN4, WSU-HN17, WSU-HN30 และ WSU-HN31 โดยแบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ในกลุ่มทดลองนั้นจะทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในพลาสติกขนาด 25 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ผสม Anti-anti (100x) (antibiotic-antimitotic) 1% และ Fetal bovine serum (FBS) 10% จนมีการเจริญเติบโตประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่พลาสติก จากนั้นใส่สารละลาย Trypsin-EDTA ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในพลาสติกเพื่อย่อย adhesion molecule ระหว่างเซลล์กับเซลล์ และ ระหว่างเซลล์กับพื้นของ พลาสติก แล้วนำไปบ่มเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3-5 นาที จนกว่าเซลล์จะเริ่มหลุดลอยออกจากพื้นของพลาสติก ให้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณสามเท่าของสารละลาย Trypsin-EDTA เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา จากนั้นทำการดูดเซลล์จากพลาสติก แล้วล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้เซลล์กระจายตัวออกด้วย PBS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแบ่งเซลล์ 20 ไมโครลิตรออกมานับเซลล์ในสไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) โดยผสมกับ Tryphan

blue ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ชนิด 2 ตา ตามช่องที่ต้องการ และใช้เครื่องนับจำนวนอนุภาคประสงค์ เป็นตัวช่วยในการนับเซลล์ เพื่อป้องกันการนับผิดพลาด โดยวิธีการคำนวณจำนวนเซลล์ดังรูปที่ 16

$$\text{จำนวนเซลล์ (cell/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{dilution factor ของเซลล์กับ tryphan blue} \times \text{ปริมาตรของ Haemocytometre} \times \text{dilution factor ของเซลล์กับ PBS (ในกรณีที่เซลล์มีจำนวนมาก)}$$

รูปที่ 16 สูตรการคำนวณหาจำนวนของเซลล์โดยใช้ Haemocytometre

ตัวอย่าง เซลล์ที่ได้จากฟลาสค์มีจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อทำการแบ่งเซลล์ 20 ไมโครลิตร ออกมาแล้วจึงทำให้เจือจางด้วยสาร PBS อีก 10 เท่า จากนั้นผสมกับ Tryphan blue ในอัตราส่วน 1:1 นับเซลล์ในสไลด์นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้เท่ากับ 150 เซลล์ ภายใต้กล้อง โดยนับทั้งหมด 4 ช่อง

วิธีคำนวณ จำนวนเซลล์ที่นับได้ เท่ากับ 150 เซลล์

จำนวนช่องที่นับ เท่ากับ 4 ช่อง

Dilution factor ของเซลล์กับ tryphan blue เท่ากับ 2

Dilution factor ของเซลล์กับ PBS เท่ากับ 10

ปริมาตรของ Haemocytometre เท่ากับ 10^4 (เป็นค่าคงตัว)

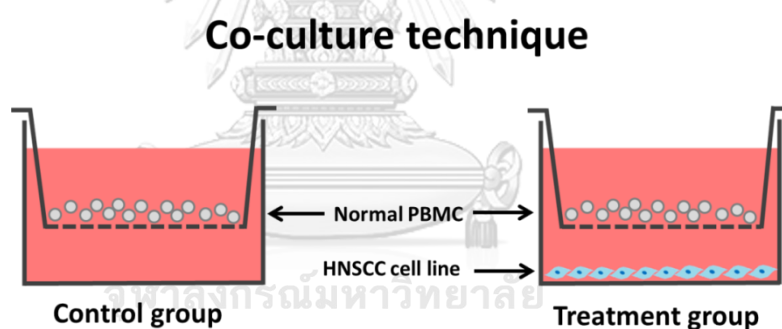
ดังนั้น จำนวนเซลล์ = $(150/4) \times 2 \times 10^4 \times 10$

$= 7.5 \times 10^6$ cells / มิลลิลิตร

ทำการนับจำนวนเซลล์แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อใน 24 well-plate 50,000 เซลล์ต่อหลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ส่วนในกลุ่มควบคุมจะไม่ใส่เซลล์มะเร็งในหลุมมีเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 500 ไมโครลิตรต่อหลุมเท่านั้น จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาเลี้ยงเซลล์มะเร็ง 1 วันก่อนการทำการเลี้ยงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อให้เซลล์มะเร็งเกาะ plate

1.4 การเลี้ยงเซลล์แบบเลี้ยงร่วม (Co-culture technique)

ประกอบ transwell (Transwell® Permeable Support, 6.5mm insert, 24 well plate, 0.4 μm Polycarbonate membrane, Tissue culture treated, Polystyrene, Corning Incorporated) ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนับเซลล์ PBMC จำนวน 100,000 เซลล์ใส่ลงใน transwell จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใน transwell ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลุมด้านล่างที่เลี้ยงเซลล์มะเร็งอีก 200 ไมโครลิตร เพื่อให้ระดับของอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เลี้ยงเซลล์มะเร็งเท่ากับระดับอาหารเลี้ยงเซลล์ใน transwell ดังรูปที่ 17 จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และการทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ เมื่อครบเวลา 4 ชั่วโมง ให้ทำการปิเปตต์ PBMC จาก transwell ขึ้นมาทั้งหมด นำมาแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 2 หลอด เพื่อแบ่งสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์



รูปที่ 17 Co-culture technique

1.5 การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMC

1. ทำการล้าง PBMC โดยใส่สาร PBS 1 มิลลิลิตร ในหลอดและทำการผสมให้เซลล์กระจายทั่ว จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วน PBS ที่ทิ้ง ให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์
2. ใส่ Lysis buffer II 500 ไมโครลิตร และ Proteinase K (PK) 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนเพื่อย่อยเซลล์
3. สกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่
4. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 100% EtOH ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 75% EtOH ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วเทส่วนน้ำด้านบนทิ้ง
5. ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำละลายดีเอ็นเอด้วย dH₂O 20 ไมโครลิตร

1.6 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometry ซึ่งจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

1.7 Bisulfite treatment

1. เจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เหลือ 750 นาโนกรัม ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร
2. เตรียมสารทำ Bisulfite treatment ตาม protocol ของ EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, ZYMO RESEARCH CORP, Orange, CA, USA) โดยผสม CT conversion 130 ไมโครลิตร กับดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นแล้วปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียสอีก 2.5 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาให้เตรียม Zymo-spin™ IC Column โดยใส่ M-Binding buffer 600 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ และใส่ดีเอ็นเอที่บ่มแล้วลงไปผสมในหลอด
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง

5. ใส่ M-Wash buffer 100 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที
6. ใส่ M-Desulphonation buffer 200 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง
7. ใส่ M-Wash buffer 200 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
8. ย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วใส่ M-Elution buffer 20 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที

1.8 การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR))

1. ผสมสารตามตารางที่ 3 ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรสำหรับทำ PCR โดยมีลำดับเบสของไพรเมอร์ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ PCR

สารเคมี	ปริมาณสาร (1x) (ไมโครลิตร)
10 mM dNTP	0.2
10x buffer	1.0
2.5 mM MgCl ₂	0.4
LINE-1s Forward primer	0.15
LINE-1s Reverse primer	0.15
<i>Taq</i> polymerase	0.1
dh ₂ o	7.0
Bisulfited DNA	1.0
รวม	10.0

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับไลน์วัน

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	T _m (°C)	ความยาว (คู่เบส)
LINE-1s_forward	5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT-3'	50.0	23
LINE-1s_reverse	5'-RTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA-3'	50.0	26

2. นำหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตรสำหรับทำ PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo cycle) (Eppendorf, Germany) โดยใช้อุณหภูมิ และเวลา ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR

สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denature	95°C	15 นาที	} 30 รอบ
denature	95°C	45 วินาที	
annealing	50°C	45 วินาที	
extension	72°C	45 วินาที	
Post-extension	72°C	10 นาที	
Hold	4°C	∞	

1.9 การแยกรูปแบบของการเกิดหมู่เมทิลโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

- นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* และ *TasI* โดยใช้สารตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ การแยกรูปแบบของการเกิดหมู่เมทิล

สารเคมี	ปริมาณสาร (1x) (ไมโครลิตร)
10x BSA	0.1
NEB buffer 3	1.0
<i>TasI</i> (2U)	0.2
<i>TaqI</i> (2U)	0.2
dh ₂ o	0.5
รวม	2.0

- หยด mineral oil หลอดละ 1 หยด ด้านบนของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการระเหยของดีเอ็นเอ จากนั้นปิดฝาและนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 16 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอ

1.10 การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis)

- เตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระจกหนา 1.5 มิลลิเมตร ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

สารเคมี	ปริมาณ
40% acrylamide	2 มิลลิลิตร
10X TBE	1 มิลลิลิตร
dh ₂ o	7 มิลลิลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร
10% APS	100 ไมโครลิตร

2. ทำการหยอดดีเอ็นเอลงเจลโดยผสมกับ 6X bromophenol blue loading dye 2.5 ไมโครลิตร และใช้ ladder 25 คู่เบส
3. เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bio-RAD, USA) จ่ายกระแสไฟ 120 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที
4. เมื่อครบเวลา ให้แกะเจลออกจากกระจกและแช่ในอ่างที่มีสารละลาย SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที
5. ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Image scanner (STROM)) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) เพื่อนำรูปเจลไปเข้าโปรแกรม 1D component of Image Quant TL

1.11 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วัน (%^mC)

1. วัดเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วันด้วยโปรแกรม 1D component of Image Quant TL โดยเลือกวัดแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 160, 97, 80 และ 62 คู่เบส ตามลำดับ
2. นำค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่วัดได้เข้าสู่สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลดังรูปที่ 18

$$\%{}^m\text{C} = \frac{C + A}{C + 2A + B + D} \times 100$$

โดย A = ความเข้ม band ที่ขนาด 160 bp / 160

B = ความเข้ม band ที่ขนาด 98 bp / 94

C = ความเข้ม band ที่ขนาด 80 bp / 78

D = ความเข้ม band ที่ขนาด 62 bp / 62

รูปที่ 18 สูตรแสดงการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วัน

3. เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วันระหว่าง PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ เซลล์มะเร็งและ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุม

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ Co-culture model

ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน โดยศึกษาจากอาร์เอ็นเอเปรียบเทียบกับระหว่าง PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งกับ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุมโดยใช้วิธีดังนี้

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจาก PBMC

1. ใส่สาร TRIzol LS reagent (Invitrogen, California, USA) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดที่มี PBMC อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน
2. ทำการบ่ม PBMC ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
3. ใส่สาร chloroform ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จ สารละลายจะแยกชั้นเป็น 3 ส่วน
6. ดูดส่วนใสด้านบนสุดปริมาณ 400 ไมโครลิตรใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นหลอดสำหรับงานอาร์เอ็นเอโดยเฉพาะ จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยสาร Isopropanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร โดยบ่มสารบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนสารละลายทิ้ง
8. ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% EtOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง โดยทำซ้ำจำนวนสองรอบ
9. ทำตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อแห้งแล้วละลายอาร์เอ็นเอด้วย type I water 30 ไมโครลิตร จากนั้นทำการแบ่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอออกมาเพื่อตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอก่อนเริ่มกระบวนการ RNA-sequencing

2.2 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

2.2.1 การวัดความเข้มข้นอาร์เอ็นเอและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

1. เตรียมสาร working solution โดยเจือจาง Qubit® RNA Reagent ใน Qubit® RNA Buffer อัตราส่วน 1:200 โดยใช้ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ในแต่ละตัวอย่าง ดังตารางที่ 8 โดยใส่หลอดสำหรับงานอาร์เอ็นเอ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ

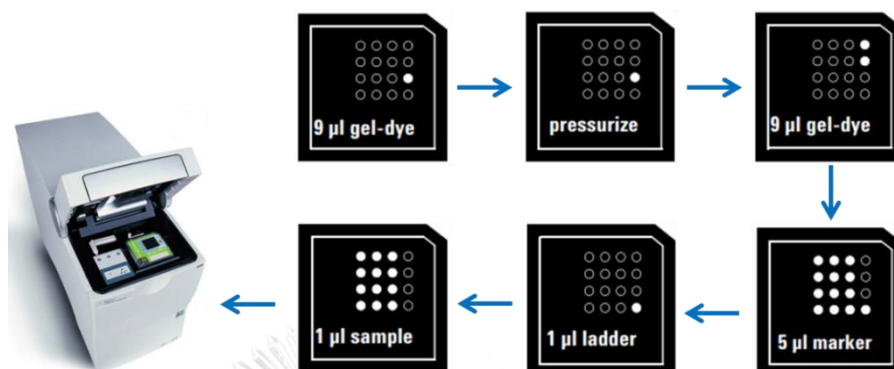
สารเคมี	ปริมาณสำหรับ กลุ่มมาตรฐาน (ไมโครลิตร)	ปริมาณสำหรับ กลุ่มตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
working solution	190	199
Standard	10	-
Sample	-	1
รวม	200	200

2. ผสมสาร 2-3 นาที จากนั้นบ่มสารที่อุณหภูมิห้องอีก 2 นาที
3. นำหลอดที่บ่มแล้วเข้าเครื่อง Qubit® Fluorometer โดยวัดค่าจากหลอดมาตรฐานก่อนจนครบทั้งสองหลอด จากนั้นจึงนำหลอดตัวอย่างวัดค่าเทียบกับค่ามาตรฐาน

2.2.2 การวัด RNA Integrity Number (RIN score) โดยใช้เครื่อง RNA6000 Nano assay (Agilent Technologies, California, USA) ดังรูปที่ 19

1. นำสารเคมีจากชุดสำเร็จรูปมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มีด
2. เตรียม Agilent RNA 6000 Nano gel matrix ปริมาณ 550 ไมโครลิตร โดยใส่ใน spin filter จากนั้นนำ spin filter ใส่ในหลอดสำหรับงานอาร์เอ็นเอ ขนาด 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ filtered gel
3. แบ่ง filtered gel ปริมาณ 65 ไมโครลิตร ใส่หลอดสำหรับงานอาร์เอ็นเอขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน
4. เติม RNA 6000 Nano dye concentrate 1 ไมโครลิตร ลงใน filtered gel จากนั้นผสมให้เข้ากันจะได้ Gel-dye mix เก็บในที่มืด
5. เตรียม RNA Nano chip วางบน chip priming station
6. เติม Gel-dye mix 9 ไมโครลิตร ที่ฐานของหลุมใน chip ที่ตำแหน่ง G จากนั้นปิดฝาของ chip priming station
7. กดเข็มฉีดยาที่อยู่ที่ฝาของ chip priming station ลงจนสุด แล้วค้างไว้ 30 วินาทีเพื่อดันให้เจลแพร่เต็ม chip
8. ปลดเข็มฉีดยาให้กลับสู่ตำแหน่งเดิมจนสุด จากนั้นเปิดฝาของ chip priming station ออก
9. เติม Gel-dye mix 9 ไมโครลิตรที่ฐานของหลุมใน chip อีกสองหลุมที่กำหนด
10. เติม RNA 6000 Nano marker 5 ไมโครลิตรที่ฐานหลุมของทุกหลุมที่เหลืออยู่บน chip
11. เตรียม RNA ladder โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที เพื่อป้องกัน secondary structure ของอาร์เอ็นเอ
12. เติม RNA ladder 1 ไมโครลิตร ในหลุมที่ตำแหน่ง ladder
13. เติมตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ลงในหลุม (1 chip สามารถวัดได้ 12 ตัวอย่าง)
14. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ chip เข้าเครื่อง IKA vortex mixer
15. ปั่นเหวี่ยงที่ 2,400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที

16. นำ chip เข้าเครื่อง RNA6000 Nano assay จากนั้นปิดฝาเครื่องแล้วกด Start โดยเครื่องจะใช้เวลาในการอ่านค่าประมาณ 30 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง



รูปที่ 19 ขั้นตอนการเติมสารต่างๆใน RNA Nano chip

2.3 RNA-sequencing

หลังจากตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการส่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ไปบริษัท Vishuo Biomedical (Thailand) LTD เพื่อนำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการ RNA-sequencing โดยเริ่มจากการแยก mRNA ออกจาก Total RNA โดยใช้ NEB Next Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) (NEB Next® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina®) จับสาย poli A tail ของ mRNA แล้วใช้แม่เหล็กดึงคอมเพล็กซ์ของ สาย mRNA กับ magnetic bead ออกจาก Total RNA จากนั้นสาย cDNA เส้นแรกจะถูก สังเคราะห์ขึ้น โดยใช้ NEB Next Random Primers จับสายแม่แบบ RNA เพื่อเป็น จุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ cDNA และใช้ ProtoScript II Reverse Transcriptase เป็น เอนไซม์ในการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA หลังจากได้ cDNA เส้นแรกแล้ว จะทำการ สังเคราะห์ cDNA เส้นที่สองด้วย Second Strand Synthesis Enzyme Mix จากนั้นปลาย ทั้งสองข้างของ cDNA จะถูกเติมเบสให้เต็มกลายเป็นปลายทู่ (blunt end) ด้วย End Prep Enzyme Mix เติมเบส A จำนวน 1 เบสที่ปลายของ cDNA ด้วย dA-tailing เพื่อใช้เป็นจุด เชื่อมต่อกับ P5 adaptor และ P7 adaptor โดยอาศัยปฏิกิริยา T-A ligation โดย P7 adaptor จะมีส่วนประกอบที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงที่มาของ cDNA เรียกว่า Index ซึ่ง index นี้เอง ที่ทำให้สามารถแยกได้ว่า cDNA นี้เป็นของตัวอย่างใด เมื่อติด adaptor แล้วจึงทำการเพิ่ม ปริมาณผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จับกับบริเวณของ adaptor ทั้งสอง จากนั้นจึงใช้ cDNA ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์แล้วเป็นแบบในการทำ

RNA-sequencing โดยใช้เครื่อง Illumina HiSeq. X10 sequencing ในการวิเคราะห์ ลำดับเบสของอาร์เอ็นเอ โดยจะวิเคราะห์สาย cDNA จากทั้งสองด้าน ด้านละ 150 คู่เบส (2x150 bp paired-end (PE)) เมื่อได้ผลการวิเคราะห์แล้วนำมาเข้าโปรแกรม HISAT version 2.1.0 เพื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกับลำดับเบสของมนุษย์ (GRCh38.p10) เรียกว่า Read alignment นำข้อมูลเข้าโปรแกรม StringTie version 1.3.3b เพื่อทำ Transcript assembly และ quantification คือการนำข้อมูลจาก Read alignment มาเชื่อมโยงกันโดยเปรียบเทียบจาก Transcriptomic Database ในฐานข้อมูล Ensembl genome browser 90 เพื่อบ่งบอกว่าลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้นั้นเป็น transcript ของยีนใด มีจำนวนเท่าใด จากนั้นจึงใช้โปรแกรม DESeq2 version 1.16.1 เพื่อคำนวณหาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม

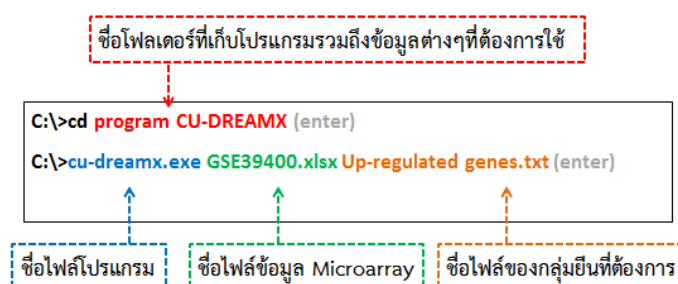
2.4 Bioinformatics

ค้นหาข้อมูลการแสดงออกของยีนในเลือดผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยทำการสืบค้นจากข้อมูลของ Gene Expression Omnibus repository (GEO datasets) ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้คำค้นว่า “blood”, “PBMC”, “Head and Neck squamous cell carcinoma” และ “HNSCC” จากนั้นทำการคัดเลือกข้อมูลโดยสังเกตจากชนิดของตัวอย่าง รวมถึงลักษณะของข้อมูล แล้วทำการคัดเลือกข้อมูลชุดนั้นเข้าโปรแกรม CU-DREAMX

2.5 Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension (CU-DREAMX) program

1. ดาวน์โหลดตัวโปรแกรม CU-DREAMX และ template ของโปรแกรม CU-DREAMX จาก <http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~achatcha/cu-dream>
2. ดาวน์โหลดรหัสการทดลอง (GSE) ของข้อมูลที่ต้องการ รหัสของ Chip microarray (GPL) ของข้อมูลที่ต้องการจาก GEO datasets ในฐานข้อมูล NCBI โดยเก็บข้อมูลไว้ในโฟลเดอร์เดียวกัน และเก็บโฟลเดอร์นี้ไว้ใน Drive C
3. กรอกข้อมูล GSE GPL รหัสของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (GSM) ให้ถูกต้องทุกตัวอักษร รวมถึงกำหนดค่าการกระจายของข้อมูล และระดับนัยสำคัญ
4. เปิดหน้าต่างคำสั่ง Command prompt จากนั้นพิมพ์คำสั่งใช้งานโปรแกรม โดยจะต้องพิมพ์ชื่อไฟล์ให้ครบทุกตัวอักษรรวมถึงนามสกุลไฟล์นั้น ๆ ด้วย ซึ่งคำสั่งแรกให้พิมพ์ cd เว้นวรรค แล้วตามด้วยชื่อโฟลเดอร์ที่เก็บโปรแกรม จากนั้นกด enter (cd คือการ change drive จากหน้าต่าง ๆ ที่เปิดอยู่ไปสู่หน้าต่างโฟลเดอร์ที่เราต้องการ) คำสั่งที่สองคือชื่อโปรแกรม เว้นวรรค ตามด้วยชื่อไฟล์ข้อมูล Microarray เว้นวรรค แล้วตามด้วยชื่อไฟล์ของกลุ่มยีนที่เราต้องการนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูล Microarray จากนั้นกด enter ตามรูปที่ 20 โปรแกรมจะทำงานโดยโหลดค่าจาก Microarray มาเปรียบเทียบกับกลุ่มยีนที่สนใจ เพื่อหา candidate gene ที่ผ่านเงื่อนไขที่กำหนดไว้ เมื่อโปรแกรมทำงานเรียบร้อย ในช่องที่ให้พิมพ์คำสั่งจะมีเคอร์เซอร์กระพริบอยู่สามารถพิมพ์คำสั่งต่อไปได้ และข้อมูลที่ได้รับจากโปรแกรมนี้อาจจะบันทึกอยู่ในโฟลเดอร์เดียวกับข้อมูลอื่น ๆ ที่บันทึกไว้ (ในที่นี้ ข้อมูลจะถูกบันทึกอยู่ในโฟลเดอร์ชื่อ program CU-DREAMX)

CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 20 ขั้นตอนการพิมพ์คำสั่งการใช้งานโปรแกรม CU-DREAMX
ในหน้าต่างคำสั่ง Command prompt

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมในสถานะจริง

การศึกษาในสถานะจริง คือ การศึกษาในเลือดของผู้ป่วยว่ามีผลแตกต่าง หรือเป็นไปในทางเดียวกับผลจาก Co-culture model หรือไม่ อย่างไร โดยขั้นตอนการทดลองจะเป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาในสถานะจำลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะ และลำคอ

ก่อนที่จะเริ่มกระบวนการดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือด ผู้เข้าร่วมทุกคนจะต้องลงนามในเอกสารแสดงความยินยอม และทำแบบสอบถามด้วยตนเอง เพื่อใช้ในการเก็บรวบรวมประวัติทางการแพทย์ หลังจากเสร็จสิ้นการตอบแบบสอบถามแล้วผลการตรวจทางคลินิกจะถูกบันทึก โดยการเก็บเลือดนั้น จะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขน ปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร (ประมาณ 1 ซ้อนชา) ใส่หลอด EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด สามารถเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ หลังจากเสร็จโครงการหากมีตัวอย่างเลือดเหลือ ตัวอย่างเหล่านั้นจะจัดเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส โดยแยกเก็บในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากตัวอย่างอื่น ๆ และหากต้องการใช้ตัวอย่างนี้เพื่อการศึกษาในขั้นตอนละเอียด หรือเพื่อการศึกษาในโครงการอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต ผู้วิจัยจะยื่นโครงการวิจัยให้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยพิจารณาให้การรับรองทุกครั้ง โดยหลังจากได้เลือดมาแล้ว ผู้วิจัยจะแบ่งตัวอย่างเลือดในแต่ละตัวอย่างออกเป็นสองส่วนสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมในสถานะจริง และสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนในสถานะจริง

3.2 การแยกเซลล์ PBMC จากเลือด

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMC

3.4 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.5 Bisulfite treatment

3.6 การเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR))

3.7 การแยกรูปแบบของการเกิดหมู่เมทิลโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.8 การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis)

3.9 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วัน (%^mC)

วิธีการทดลองในข้อ 3.2 ถึง 3.9 จะทำตามวิธีดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น

4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนในสภาวะจริง

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจาก PBMC

จะทำตามวิธีดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น

4.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

1. ทำการเจือจางความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอให้เหลือ 500 นาโนกรัม ปริมาณ 11 ไมโครลิตร ในหลอดสำหรับทำ PCR ของอาร์เอ็นเอ
2. เติม 0.5 ไมโครกรัม Oligo (dT)₁₈ primer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ในอาร์เอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นแล้ว จากนั้นผสมให้เข้ากัน
3. บ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง Thermo cycler
4. ระหว่างที่อาร์เอ็นเอถูกบ่มอยู่นั้น ให้เตรียมสารเพื่อสังเคราะห์ cDNA ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

สารเคมี	ปริมาณสาร (1x) (ไมโครลิตร)
5x Reaction Buffer	4.0
20 U/ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor	1.0
10 mM dNTP Mix	2.0
200 U/ไมโครลิตร ReverstAid M-Mul VRT	1.0
RNA + Oligo (dT) mixed	12.0
รวม	20.0

- เมื่ออาร์เอ็นเอถูกบ่มจนครบเวลาให้นำออกจากเครื่อง Thermo cycler จากนั้นนำมาเติมสารเพื่อสังเคราะห์ cDNA
- บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีและ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง Thermo cycler
- cDNA ที่สังเคราะห์ได้สามารถเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในงานต่อไปได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Real-Time Polymerase Chain Reaction

- ดาวน์โหลดลำดับเบส cDNA ของ candidate gene และ housekeeping gene จากฐานข้อมูล Ensembl genome browser 90
- ออกแบบไพรเมอร์ให้จับคร่อมบริเวณเอกซอน (exon) ของยีน โดยให้ค่า annealing Temperature (T_m) ของทั้งสองยีนใกล้เคียงกัน

4.4 Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction

เป็นวิธีการหาค่า Melting Temperature (T_m) สำหรับการทำ Real-Time PCR ของ candidate gene และ housekeeping gene ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ยีน glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็น reference gene โดยเตรียม Master mix ตามตารางที่ 10 จากนั้นบ่มในเครื่อง Thermo cycler โดยใช้ อุณหภูมิ และเวลา ตามตารางที่ 11

ตารางที่ 10 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สารเคมี	ปริมาณสาร (1x) (ไมโครลิตร)
2x Power SYBR Buffer.	5.0
Forward primer	0.05
Reverse primer	0.05
dH ₂ O	3.9
cDNA	1.0
รวม	10.0

ตารางที่ 11 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ในเครื่อง Thermo cycler

สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลา	
Pre-denature	95°C	15 นาที	} 40 รอบ
denature	95°C	45 วินาที	
annealing	50°C-64°C	45 วินาที	
extension	72°C	45 วินาที	
Post-extension	72°C	10 นาที	
Hold	4°C	∞	

4.5 การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (acrylamide gel electrophoresis)

- เตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 8% โดยใช้กระจกหนา 1.5 มิลลิเมตรตามตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 8%

สารเคมี	ปริมาณสาร
40% acrylamide	2 มิลลิลิตร
10X TBE	1 มิลลิลิตร
dh ₂ O	7 มิลลิลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร
10% APS	100 ไมโครลิตร

- ทำการหยอดดีเอ็นเอลงเจลโดยผสมกับ 6X bromophenol blue loading dye 2.5 ไมโครลิตร และใช้ ladder 25 คู่เบส
- เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bio-RAD, USA) จ่ายกระแสไฟ 120 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที
- เมื่อครบเวลา ให้แกะเจลออกจากกระจก และแช่ในอ่าง SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที
- ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Image scanner (STROM)) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)

4.6 Real-Time Polymerase Chain Reaction

1. เตรียม Master mix ตามตารางที่ 10
2. แบ่ง Master mix ใส่แต่ละหลุมของ Real-Time PCR 96-well plate
3. เติม cDNA ของตัวอย่างลงในแต่ละหลุมปริมาณ 1 ไมโครลิตร จากนั้นทำผสมให้เข้ากัน
4. ติด optical adhesive film โดยใช้ applicator กดและรัด optical adhesive film ให้แน่น จากนั้นขูดขอบที่ช่องว่างระหว่างหลุมแต่ละหลุมบน Real-Time PCR 96-well plate
5. ปั่นตกรสาร และไล่ฟองอากาศออกจากฐานหลุม
6. นำ Real-Time PCR 96-well plate เข้าเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR
7. กำหนดตำแหน่งของตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่าง และจำนวนรอบการทำ PCR จากนั้นกด Start RUN เครื่องจะทำงานตามโปรแกรมดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลา	
holding stage	50°C	2 นาที	} 40 รอบ
	95°C	10 นาที	
PCR stage	95°C	15 วินาที	
	59°C	1 นาที	
Melt curve stage	95°C	15 วินาที	
	64°C	1 นาที	
	95°C	15 วินาที	

8. เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำผล threshold cycle (Ct) ที่ได้มาคำนวณค่าการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $\Delta\Delta Ct$ method โดยเปรียบเทียบกับยีน *GAPDH* ซึ่งเป็น reference gene และในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

4.7 การคำนวณการแสดงออกของ candidate gene ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ method

$\Delta\Delta CT$ method เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยอาศัยค่า threshold cycle (Ct) ของ candidate gene ในกลุ่มทดลอง (test) คือ เลือดผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ เทียบกับกลุ่มควบคุม (control) คือ เลือดจากคนปกติ โดยทั้งสองกลุ่มจะต้องตัดค่าการแสดงออกของยีนพื้นฐาน (housekeeping gene) คือยีน *GAPDH* ออกก่อน โดยสูตรคำนวณหาค่า $\Delta\Delta CT$ เป็นดังรูปที่ 21 ซึ่งจากการแปลงสูตรของ Livak, K.J. *et al.* (2001) การแสดงออกของยีนที่ได้จะเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (fold change) ดังรูปที่ 22

$$\Delta\Delta CT = (Ct \text{ of target} - Ct \text{ of reference})_{\text{test}} - (Ct \text{ of target} - Ct \text{ of reference})_{\text{control}}$$

รูปที่ 21 สูตรคำนวณหาค่า $\Delta\Delta CT$

โดย

Ct of target ของ test คือ ค่า Ct ของ candidate gene ของเลือดผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ
 Ct of target ของ control คือ ค่า Ct ของ candidate gene ของเลือดจากคนปกติ
 Ct of reference ของ test คือ ค่า Ct ของ *GAPDH* gene ของเลือดผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ
 Ct of reference ของ control คือ ค่า Ct ของ *GAPDH* gene ของเลือดจากคนปกติ

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

รูปที่ 22 สูตรคำนวณหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน

5. Statistical Analysis

5.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมโดยใช้ Co-culture model

นำค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์ มะเร็ง และ PBMC mock ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ การทดสอบแบบ Paired sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วย โปรแกรม GraphPad Prism 5

5.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ Co-culture model

ใช้สถิติ Student's T-Test สำหรับเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมของข้อมูลจาก Expression array ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI และ chi-squared test เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างข้อมูลจาก Expression array และข้อมูลจาก RNA-sequencing โดยสถิติทั้งสองชนิดคำนวณโดยใช้โปรแกรม CU-DREAMX ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมในสถานะจริง

นำเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของ PBMC จากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะ และลำคอ เปรียบเทียบกับ PBMC จากคนปกติ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ แบบ Unpaired sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

5.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนในสถานะจริง

นำค่า Ct จากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ และค่า Ct จากคนปกติ ที่ได้จากการ ทดลองจำนวน 2 ซ้ำ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ Unpaired sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

บทที่ 4

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรม โดยใช้ Co-culture model

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะ และลำคอ ในโมเดลจำลองสถานะในร่างกาย เรียกว่า Co-culture model โดยทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวในภาชนะเดียวกัน ให้เซลล์ทั้งสองชนิดมีการรับ-ส่งสารระหว่างกันแต่ไม่เซลล์สัมผัสกันโดยตรงด้วยการกั้นด้วย transmembrane โดยทำการทดลองจากเลือดคนปกติจำนวน 9 คน และทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ หลังจากเลี้ยงเซลล์มะเร็งร่วมกับเซลล์ PBMC เป็นเวลาสี่ชั่วโมง ทำการดูด PBMC ออกมาทั้งหมดแล้วแบ่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ Co-culture model และส่วนที่สองใช้เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอในขั้นตอนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ Co-culture model ต่อไป โดยหลังจากที่นำ PBMC ส่วนแรกมาสกัดดีเอ็นเอแล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเข้าสู่กระบวนการ Combine Bisulfite Restriction Analysis of LINE-1s (COBRA-L1s) หลังจากนั้นจึงตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งในขั้นนี้สามารถแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอได้ขนาดต่างๆ โดยขนาดที่ผู้วิจัยสนใจ คือ ขนาด 160 คู่เบส 98 คู่เบส 80 คู่เบส และ 62 คู่เบส

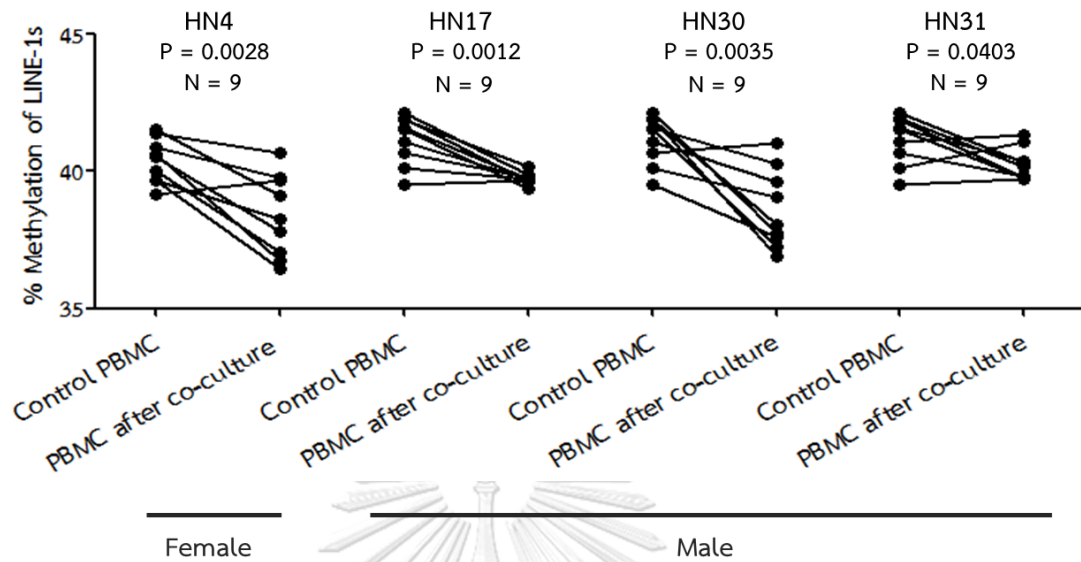
จากนั้นทำการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่กำหนดโดยใช้โปรแกรม 1D component of Image Quant TL แล้วจึงนำค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอเข้าสู่ตรรกาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วัน โดยเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลน์วันของเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง และ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุมมีผล ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวนของเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ เซลล์ไลน์มะเร็ง กับ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุม

เซลล์ไลน์	การทดลอง	เปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวน (Mean \pm SD.)
WSU-HN4	กลุ่มควบคุม (N = 9)	40.39 \pm 1.47
	กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วม (N = 9)	38.39 \pm 2.45
WSU-HN17	กลุ่มควบคุม (N = 9)	41.17 \pm 1.72
	กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วม (N = 9)	39.74 \pm 0.58
WSU-HN30	กลุ่มควบคุม (N = 9)	41.17 \pm 1.72
	กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วม (N = 9)	38.62 \pm 1.79
WSU-HN31	กลุ่มควบคุม (N = 9)	41.17 \pm 1.72
	กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วม (N = 9)	40.27 \pm 1.14

หลังจากคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวนของทั้งสองกลุ่มการทดลอง แล้วจึงทำการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวนระหว่างกลุ่ม PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง และกลุ่ม PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุมพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวนของกลุ่มที่เลี้ยง PBMC ร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งมีระดับต่ำ (hypomethylated) กว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ เมื่อใช้สถิติวิเคราะห์แบบ Paired sample T-Test ดังรูปที่ 23

PBMC co-culture with HNSCC cell lines



รูปที่ 23 การเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนัวนของเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง กับ PBMC ที่เป็นกลุ่มควบคุม

2. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้ Co-culture model

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะ และลำคอ ในโมเดลจำลองสภาวะในร่างกาย เรียกว่า Co-culture model โดยจะใช้เซลล์ PBMC ในส่วนที่สองที่แบ่งมาจากขั้นตอนการศึกษากการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเลือกการทดลองที่เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4 และ WSU-HN17 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยการวัดความเข้มข้นอาร์เอ็นเอและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ รวมถึงการวัด RNA Integrity Number (RIN score) ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการวัดความเข้มข้นอาร์เอ็นเอ, การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ RIN score

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/μl)	ความบริสุทธิ์		RIN score
		OD _{260/280}	OD _{260/230}	
Control male 1	1,042.50	2.11	0.38	9.10
Control male 2	468.75	2.01	0.44	9.00
Control male 3	501.25	2.10	0.32	9.20
Control female 1	571.25	2.08	0.36	9.00
Control female 2	440.00	2.06	0.38	9.00
Control female 3	1,101.25	2.11	0.32	9.00
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17-1	1,565.00	2.12	0.36	9.40
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17-2	1,488.75	2.10	0.37	9.10
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17-3	938.75	2.11	0.34	9.30
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN4-1	828.75	2.05	0.55	9.20
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN4-2	620.00	2.08	0.59	8.70
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN4-3	1,243.75	2.13	0.29	9.30

หลังจากตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการส่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอไปบริษัท Vishuo Biomedical (Thailand) LTD เพื่อนำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการ RNA-sequencing สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบสของกลุ่มทดลองที่เป็นเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง และ กลุ่มควบคุม ซึ่งผลการตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-sequencing ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-sequencing

ตัวอย่าง	Total Raw Reads per Sample	Paired Clean Reads	Clean Base (Gb)	Effective Rate (%)	Error Rate (%)	Q30 (%)	GC Content (%)
Control male 1	58,748,716	28,311,501	8.493	96.38	0.03	91.16	48.27
Control male 2	33,443,243	32,041,186	9.612	95.81	0.04	87.31	45.57
Control male 3	55,364,144	26,603,013	7.981	96.1	0.03	91.06	48.82
Control female 1	63,941,442	30,743,533	9.223	96.16	0.03	91.58	47.82
Control female 2	50,138,644	24,115,234	7.235	96.19	0.03	90.69	47.77
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17-1	56,638,136	27,217,407	8.165	96.11	0.03	90.53	47.87
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17-2	29,066,563	27,755,866	8.327	95.49	0.04	88.41	45.89
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17-3	56,685,130	27,284,296	8.185	96.27	0.03	90.85	47.59
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN4-1	64,328,140	30,899,844	9.27	96.07	0.03	91.15	47.91
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN4-2	50,872,814	24,471,862	7.342	96.21	0.03	90.51	47.56

เมื่อผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-sequencing สำเร็จเรียบร้อย จึงทำการคัดเลือกยีนที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยีนคัดกรองการเป็นมะเร็งได้โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือกยีนที่พบการแสดงออกในกลุ่มทดลองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และมีระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ผู้วิจัยได้ทำการสืบค้นข้อมูลของการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจาก Gene Expression Omnibus repository (GEO datasets) ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นเลือกข้อมูลที่ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้การทดลองรหัส GSE39400 เป็นการทดลองหาการแสดงออกของยีนที่เซลล์ PBMC ของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอเพื่อใช้ในงานวินิจฉัยระดับโมเลกุล (Expression signature in peripheral blood cells for molecular diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma) โดยมีรหัสของ Microarray chip คือ GPL4133 (Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Feature Number version)) ซึ่งในการทดลองนี้มีกลุ่มทดลองที่เป็นเซลล์ PBMC ของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ 28 ตัวอย่าง และกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์ PBMC ของคนปกติ 11 ตัวอย่าง รวมเป็น 39 ตัวอย่าง จากนั้นนำรหัสตัวอย่าง (GSM) ของทั้งสองกลุ่มมาเติมลงใน template ของโปรแกรม CU-DREAMX โดยเติมรหัสให้ถูกต้องว่าเป็นกลุ่มทดลอง (Experimental group) หรือกลุ่มควบคุม (Control group)

เมื่อได้ข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI เรียบร้อย ผู้วิจัยจึงนำข้อมูลยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่เป็นเซลล์ PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง และกลุ่มควบคุมมาทำการคัดเลือกยีนที่มีค่าการแสดงออกในกลุ่มทดลองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยข้อมูลที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกในกลุ่มทดลองมากกว่าการแสดงออกในกลุ่มควบคุม (up-regulated genes) โดยมีระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกในกลุ่มทดลองต่ำกว่าการแสดงออกในกลุ่มควบคุม (down-regulated genes) โดยมีระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ มาเข้าโปรแกรม CU-DREAMX กับข้อมูล Microarray ที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อหา candidate gene โดยเลือกค่าต่างๆใน template ของโปรแกรม CU-DREAMX ดังนี้ เลือก T-test parameter (tail) เป็น Two-tailed distribution เพื่อบอกความแตกต่างของข้อมูล, เลือก T-test parameter (type) เป็น 2 Series with unequal standard deviation, เลือก Differential expression เป็น Up หรือ Down และเลือก P-value threshold เป็น 0.05 จากนั้นเปิดหน้าต่างคำสั่ง Command prompt แล้วพิมพ์คำสั่งใช้งานโปรแกรม CU-DREAMX เมื่อโปรแกรมทำงานเรียบร้อยแล้วจะได้ข้อมูลในรูปแบบของ Excel file

ผลการวิเคราะห์สถิติจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก RNA-sequencing และจากข้อมูล Microarray เป็นดังตารางที่ 17, 18, 19 และ 20 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 ผลการแสดงผลของยีนที่มากขึ้นจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4

		GSE39400		P-value	0.01
		Up (0.05)	Not up	Odds Ratio	0.55
RNA-sequencing	WSU-HN4_UP0.05	20 (a)	190 (b)	Lower 95% CI	0.35
	No WSU-HN4_UP0.05	3,129 (c)	16,410 (d)	Upper 95% CI	0.88

ตารางที่ 18 ผลการแสดงผลของยีนที่มากขึ้นจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN17

		GSE39400		P-value	0.23
		Up (0.05)	Not up	Odds Ratio	0.82
RNA-sequencing	WSU-HN17_UP0.05	41 (a)	264 (b)	Lower 95% CI	0.59
	No WSU-HN17_UP0.05	3,108 (c)	16,336 (d)	Upper 95% CI	1.14

ตารางที่ 19 ผลการแสดงผลของยีนที่ลดลงจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4

		GSE39400		P-value	0.62
		Down (0.05)	Not down	Odds Ratio	0.92
RNA-sequencing	WSU-HN4_Dn0.05	42 (a)	155 (b)	Lower 95% CI	0.65
	No WSU-HN4_Dn0.05	4,457 (c)	15,095 (d)	Upper 95% CI	1.29

ตารางที่ 20 ผลการแสดงผลของยีนที่ลดลงจากโปรแกรม CU-DREAMX ระหว่างข้อมูลจาก Microarray (GSE39400) และข้อมูลจาก RNA-sequencing ของการทดลองเลี้ยงร่วมเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN17

		GSE39400		P-value	1.25×10^{-10}
		Down (0.05)	Not down	Odds Ratio	2.22
RNA-sequencing	WSU-HN17_Dn0.05	104 (a)	161 (b)	Lower 95% CI	1.73
	No WSU-HN17_Dn0.05	4,395 (c)	15,089 (d)	Upper 95% CI	2.84

โดย ช่อง a คือ จำนวนยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (ตารางที่ 17, 18), ลดลง (ตารางที่ 19, 20) ทั้งข้อมูล RNA-sequencing และข้อมูล Microarray

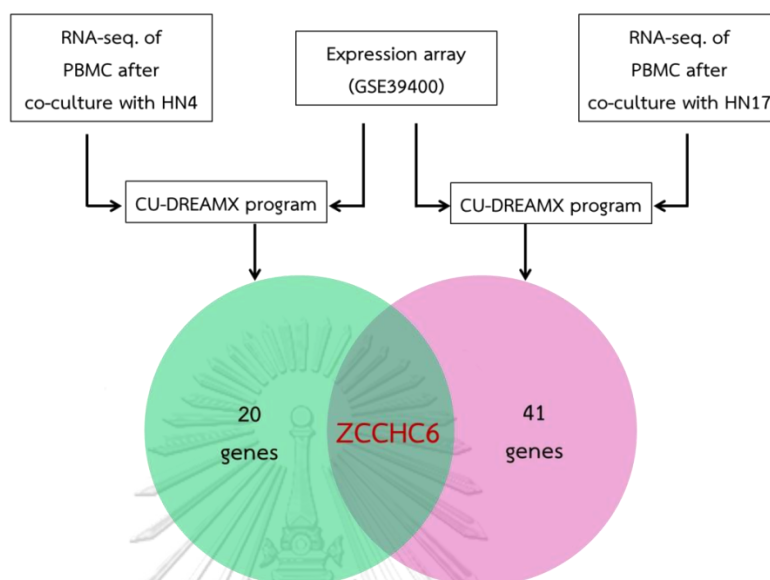
ช่อง b คือ จำนวนยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (ตารางที่ 17, 18), ลดลง (ตารางที่ 19, 20) เฉพาะในข้อมูล RNA-sequencing

ช่อง c คือ จำนวนยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (ตารางที่ 17, 18), ลดลง (ตารางที่ 19, 20) เฉพาะในข้อมูล Microarray

ช่อง d คือ จำนวนยีนที่ไม่มีการแสดงออกสูงขึ้น (ตารางที่ 17, 18), ลดลง (ตารางที่ 19, 20) ทั้งข้อมูล RNA-sequencing และข้อมูล Microarray

เมื่อได้ข้อมูล จำนวนยีน พร้อมทั้งชื่อยีนจากโปรแกรม CU-DREAMX ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์ทั้งสองแล้ว ผู้วิจัยจึงทำการคัดเลือกยีนที่สามารถเป็น candidate gene ที่ใช้สำหรับการคัดกรองการเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอได้จากข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งการทดลองเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง WSU-HN4 พบ 20 ยีนและการทดลองเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับเซลล์ไลน์

มะเร็ง WSU-HN17 พบ 41 ยีน โดยเลือกยีนที่พบจากทั้งสองการทดลองคือยีน *ZCCHC6* ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 ขั้นตอนการทำ candidate gene

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมในสภาวะจริง

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะ และลำคอ ในสภาวะจริง โดยการทดลองเริ่มจากการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 23 คน และตัวอย่างเลือดจากคนปกติจำนวน 42 คน เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดแล้วจึงทำการแยกเซลล์ PBMC แล้วแบ่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือ

พันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในสภาวะจริง และส่วนที่สองใช้เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอในขั้นตอนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในสภาวะจริงต่อไป โดยหลังจากที่นำ PBMC ส่วนแรกมาสกัดดีเอ็นเอแล้วจะเข้าสู่กระบวนการ COBRA-L1s หลังจากนั้นจึงตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส ซึ่งในขั้นนี้สามารถแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอได้ขนาดต่างๆ โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอจะเหมือนกับผลที่ได้ใน co-culture model จากนั้นทำการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่กำหนดโดยใช้โปรแกรม 1D component of Image Quant TL แล้วจึงนำค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอเข้าสู่ตรรกานวนหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวัน โดยเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของเลือดคนปกติและเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ มีผลดังตารางที่ 21

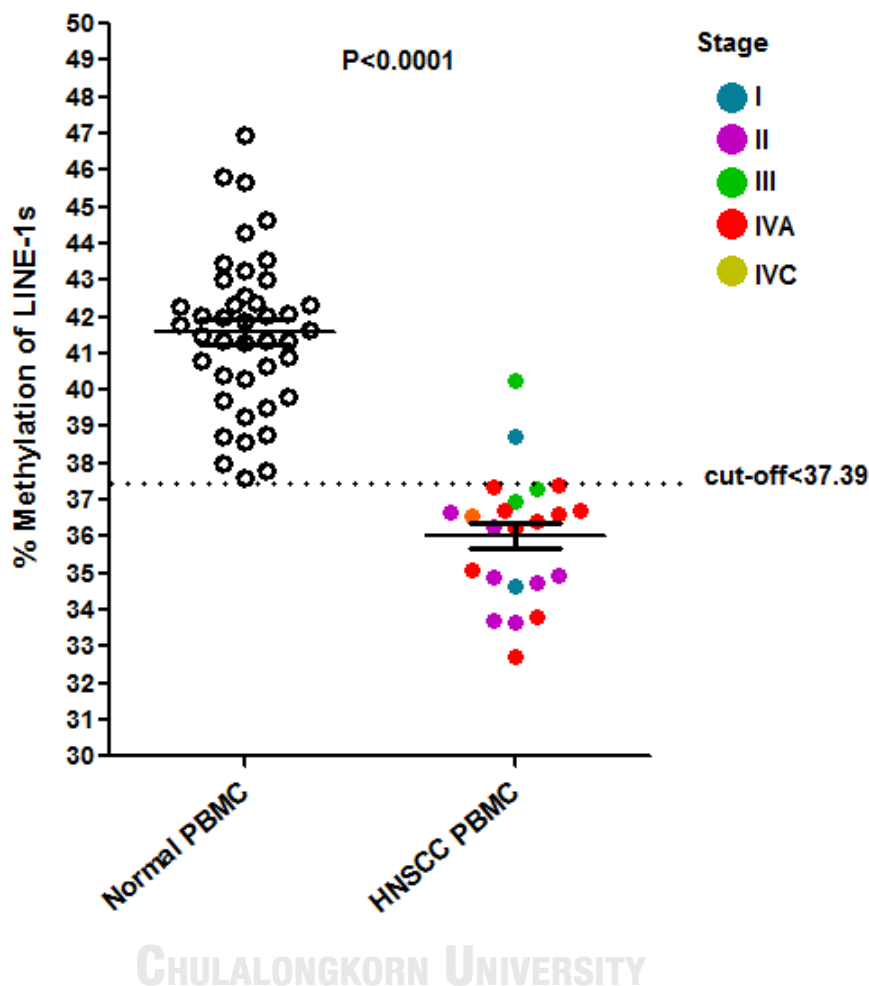
ตารางที่ 21 ผลการหาเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของเลือดคนปกติและเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวัน (Mean \pm SD.)
เลือดคนปกติ (N = 42)	41.58 \pm 2.15
เลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ (N = 23)	36.02 \pm 1.74

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

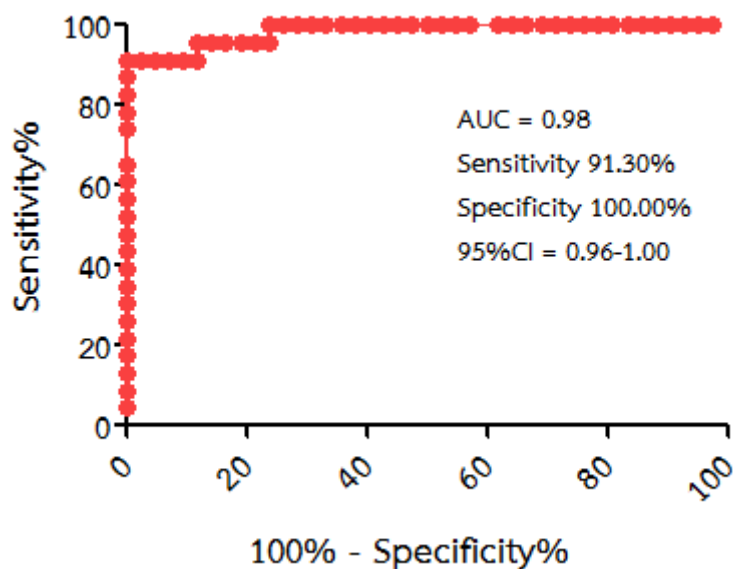
หลังจากคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของทั้งสองกลุ่มการทดลองแล้วจึงทำการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันระหว่างเลือดจากคนปกติ เลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ พบว่า เปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคามีระดับต่ำ (hypomethylated) กว่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนวันของเลือดจากคนปกติ โดยมีค่าจุดตัด (cut-off point) น้อยกว่า 37.39 อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.0001$ เมื่อใช้สถิติวิเคราะห์แบบ Unpaired sample T-Test และเมื่อศึกษา

ระยะของโรคมะเร็งพบว่า ระยะของโรคมะเร็งไม่สัมพันธ์กับระดับของหมู่เมทิลที่ไลนีนวัน ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนีนวัน ระหว่างเลือดจากคนปกติจำนวน 42 คน และเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 23 คน

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ของระดับหมู่เมทิลที่ไลนีนวันของทั้งสองกลุ่มการทดลองไปคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity) โดยการสร้างกราฟเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve) จะได้ค่า Sensitivity เท่ากับ 91.30 เปอร์เซ็นต์ Specificity เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ และ 95%CI เท่ากับ 0.96-1.00 ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 ผลการคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity) ของการตรวจสอบระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันโดยการสร้างกราฟเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve)



4. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนในสภาวะจริง

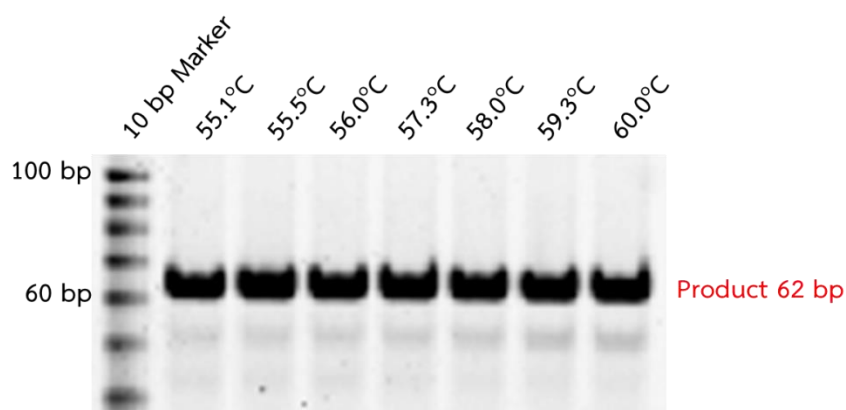
การศึกษากการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะ และลำคอ ในสภาวะจริงจะใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 24 คน และตัวอย่างเลือดจากคนปกติจำนวน 24 คน โดยจะใช้เซลล์ PBMC ในส่วนที่สองที่แบ่งมาจากขั้นตอนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในสภาวะจริง แล้วนำมาสกัดอาร์เอ็นเอจากนั้นสังเคราะห์ cDNA และออกแบบไพรเมอร์ของยีน *ZCCHC6* เพื่อใช้ในกระบวนการ RT-PCR โดยเริ่มจาก ดาวันโหลด

ลำดับเบส cDNA ของยีน *ZCCHC6* ซึ่งเป็น candidate gene และดาวน์โหลด์ลำดับเบส cDNA ของยีน *GAPDH* ซึ่งเป็น housekeeping gene จากฐานข้อมูล Ensembl genome browser 90 จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ให้คร่อมตำแหน่งที่สามารถเป็นแม่แบบของการแปลรหัสเป็น โปรตีน (Translation) ได้ เรียกว่า Exon ของยีน จำนวน 2 exon เพื่อตรวจสอบการแสดงออก ของยีนโดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อยีนเกิดกระบวนการถอดรหัส (Transcription) ขึ้น จะเกิดการ ตัดส่วนของยีนที่ไม่สามารถเป็นแม่แบบของการแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ หรือที่เรียกว่า Intron ออก ซึ่งบริเวณ intron นี้จะแทรกตัวอยู่ในยีนระหว่าง exon แต่ละบริเวณ เมื่อตัดบริเวณ intron ออกแล้ว เซลล์จะดึงส่วนของ exon ทั้งสองขึ้นมาเชื่อมต่อกัน ดังนั้นบริเวณที่ exon ทั้ง 2 ขึ้น เชื่อมกัน จึงเป็นบริเวณที่ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน นั้นๆได้ โดยลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับยีน *ZCCHC6* และยีน *GAPDH* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดัง ตารางที่ 22

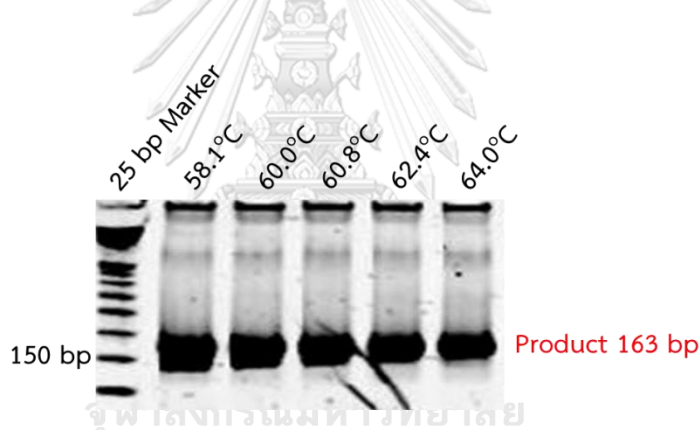
ตารางที่ 22 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับยีน *ZCCHC6* และยีน *GAPDH*

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	T _m (°C)	ความยาว (คู่เบส)
ZCCHC6_forward	5'GAAGAGAAGGGCACATTA AAAAAGG 3'	58.3	24
ZCCHC6_reverse	5'GGAAAGGCTACCTGAAGAGC 3'	58.0	20
GAPDH_forward	5'TGGAAGGACTCATGACCACAG 3'	58.4	21
GAPDH_reverse	5'TTCAGCTCAGGGATGACCTT 3'	57.3	20

เมื่อได้ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับยีนทั้งสองแล้วจึงทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สาย ดีเอ็นเอแยกจากกันเป็นครั้งหนึ่ง (50%) และไพรเมอร์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่าง เหมาะสม เรียกว่า Melting Temperature (T_m) ด้วยกระบวนการ Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก ชื่อ HeLa เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิและ เวลาตามที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยผลการหา T_m ของยีน *ZCCHC6* และยีน *GAPDH* เป็นดังรูปที่ 26 และรูปที่ 27 ตามลำดับ



รูปที่ 27 ผลการหา Melting Temperature ของยีน ZCCHC6 ด้วยกระบวนการ Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์มะเร็ง HeLa



รูปที่ 28 ผลการหา Melting Temperature ของยีน GAPDH ด้วยกระบวนการ Gradient Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์มะเร็ง HeLa

จากผลการหา T_m ของทั้งสองยีนพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของยีน ZCCHC6 คือช่วงอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส - 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมของยีน GAPDH คือช่วงอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส - 64 องศาเซลเซียส ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกอุณหภูมิที่ 59 องศาเซลเซียส เป็น T_m ที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ของทั้งสองยีน

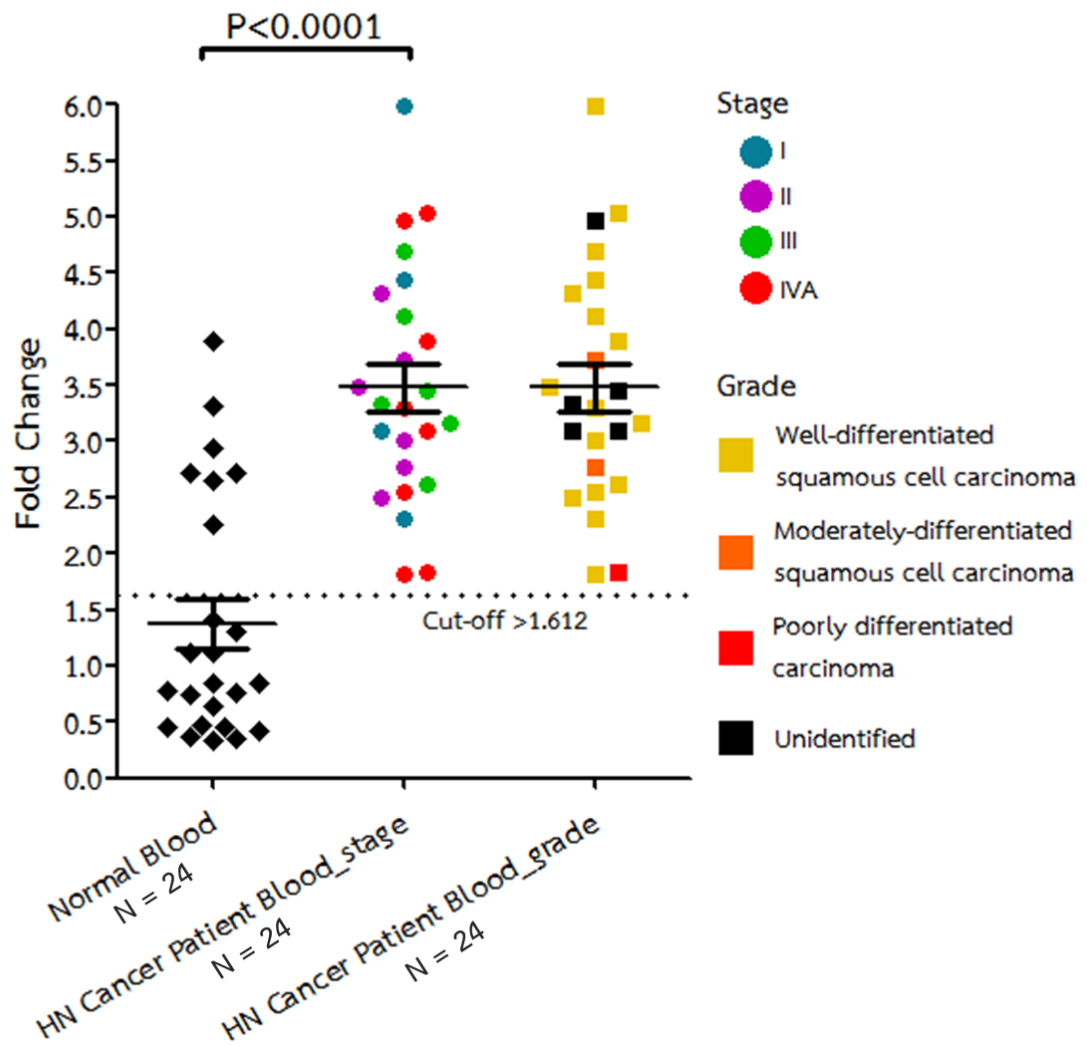
เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแล้ว ผู้วิจัยจึงนำ cDNA ของตัวอย่างเลือดที่ได้สังเคราะห์ไว้แล้วก่อนหน้านี้มาเข้ากระบวนการ RT-PCR โดยใช้ Internal control เป็นดีเอ็นเอจากเลือดคนปกติ และใช้ Endogenous DNA control เป็นยีน GAPDH จากนั้นจึงนำค่า

threshold cycle (Ct) ที่ได้มาคำนวณค่าการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $\Delta\Delta\text{CT}$ method ได้ผลดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลการนำค่า threshold cycle (Ct) ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ และตัวอย่างเลือดจากคนปกติมาคำนวณหาการแสดงออกของยีน *ZCCHC6* ด้วยวิธี $\Delta\Delta\text{CT}$ method

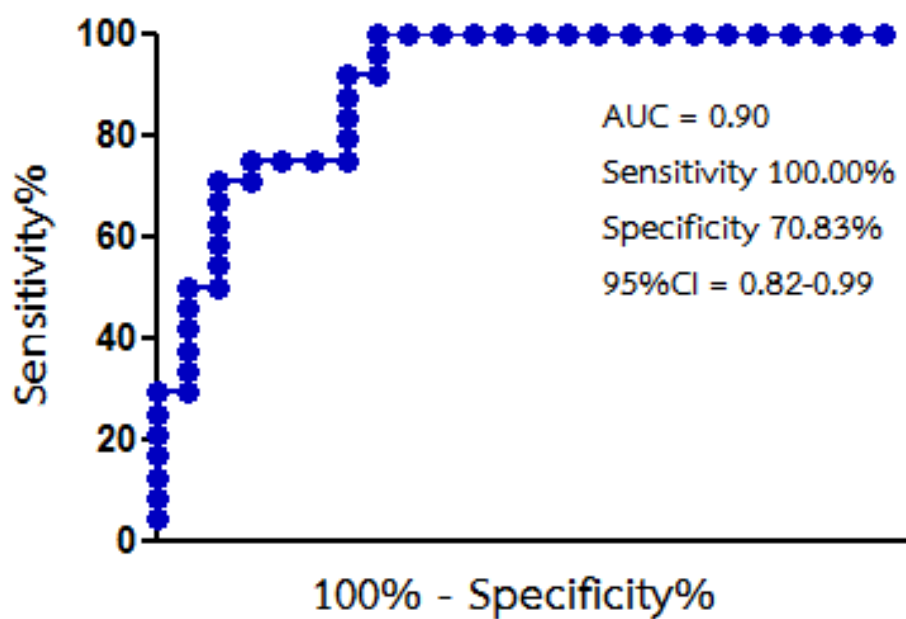
	ค่า Ct เฉลี่ยของยีน <i>ZCCHC6</i>		ค่าเฉลี่ยของ $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$	Relative of $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
	ยีน <i>ZCCHC6</i>	ยีน <i>GAPDH</i>		
เลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ (N=24)	27.69 ± 2.21	21.79 ± 2.06	3.48 ± 1.25	2.54
เลือดคนปกติ (N=24)	28.41 ± 2.81	20.80 ± 2.40	1.37 ± 1.15	

เมื่อนำค่า threshold cycle (Ct) ของทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (fold change) จะได้ค่าจุดตัด (cut-off point) มากกว่า 1.612 และมีนัยสำคัญที่ $P < 0.0001$ เมื่อใช้สถิติวิเคราะห์แบบ Unpaired sample T-Test และเมื่อศึกษาระยะของโรคมะเร็งและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า ระยะของโรคมะเร็งและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาไม่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน ดังรูปที่ 28



รูปที่ 29 ผลการหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (fold change) ของกลุ่มตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ และตัวอย่างเลือดจากคนปกติ

เมื่อนำค่า Ct ของทั้งสองกลุ่มไปคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity) โดยการสร้างกราฟเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve) จะได้ค่า Sensitivity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ Specificity เท่ากับ 70.83 เปอร์เซ็นต์ และ 95%CI เท่ากับ 0.82-0.99 ดังรูปที่ 29



รูปที่ 30 ผลการคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity) ของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ZCCHC6 โดยการสร้างกราฟเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve)

บทที่ 5

วิเคราะห์ผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Discussion, Conclusion and Suggestion)

วิเคราะห์ผลการวิจัย

ในปัจจุบันวิธีการตรวจมะเร็งศีรษะและลำคอจะตรวจได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคขึ้นแล้ว และมีจุดอ่อนในกลุ่มผู้ป่วยที่รอยโรคยังไม่เด่นชัด หรือตรวจสอบด้วยตาเปล่ายาก ดังนั้นจึงต้องตรวจด้วยการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) ซึ่งวิธีนี้ทำได้ยาก และสร้างความเจ็บปวดให้แก่ผู้ป่วยมาก อีกทั้งวิธีการตรวจดังที่กล่าวมาล้วนจำเป็นต้องใช้ความเชี่ยวชาญจากแพทย์เฉพาะทางในการระบุโรคโดยผู้ป่วยที่ตรวจพบการเป็นมะเร็งมักถูกรักษาด้วยการผ่าตัด ซึ่งจะทำให้คุณภาพชีวิตลดลง ดังนั้นการคัดกรองการเป็นมะเร็งตั้งแต่ระยะแรกจึงมีความจำเป็นทั้งในด้านการรักษา และความอยู่รอดของผู้ป่วย โดยจุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาวิธีการตรวจกรองมะเร็งศีรษะและลำคอ เพื่อให้สามารถตรวจการเป็นมะเร็งได้ตั้งแต่ในระยะแรก โดยตรวจการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งแทนการตรวจการเป็นมะเร็งที่เซลล์มะเร็ง เนื่องจากเซลล์มะเร็งมักพบได้น้อยในกระแสเลือดจึงทำให้ตรวจพบได้ยาก ดังนั้นวิธีการตรวจการเปลี่ยนแปลงที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจึงมีความไวสูงกว่าเนื่องจากในกระแสเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาวมีมากกว่าเซลล์มะเร็ง

เซลล์ที่สนใจศึกษาคือเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Peripheral blood Mononuclear Cell (PBMC) เนื่องจาก 90 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC นั้นประกอบไปด้วยเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocyte และ T lymphocyte ซึ่งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดนี้มีหน้าที่ในการจดจำและทำลายสิ่งแปลกปลอมซึ่งรวมถึงแอนติเจนของเซลล์มะเร็งด้วย (14, 28)

ดังนั้นจากคุณสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิด ผู้วิจัยจึงสนใจนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่เซลล์ โดยมีสมมติฐานว่า เซลล์มะเร็งจะเกิดการหลังสัญญาณพาราไครน์ออกมา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทั้งการเปลี่ยนแปลงในสถานะเหนือพันธุกรรม หรือระดับของหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ และในระดับการแสดงออกของยีน โดยผู้วิจัยสนใจศึกษาระดับของหมู่เมทิลที่ไลนวัน เนื่องจาก ไลนวันเป็น repetitive DNA sequence ชนิดหนึ่ง พบกระจายอยู่ทั่วจีโนมโดยคิดเป็น 17% ของจีโนมทั้งหมด (22) ดังนั้นผู้วิจัยจึงตรวจสอบระดับของหมู่เมทิลที่ไลนวัน

ซึ่งสามารถเทียบเคียงกับการตรวจสอบระดับของหมู่เมทิลทั้งจีโนมได้ (Genome-wide Methylation Status)

โดยงานวิจัยเริ่มจากการใช้แบบจำลองสภาพในร่างกายที่เรียกว่า co-culture model เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็ง เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยใช้จำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็ง และจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว 1 ต่อ 2 จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาสกัดดีเอ็นเอ แล้ววัดระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันด้วยกระบวนการ Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA-L1s) พบว่าระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งทั้งสี่ชนิดต่ำกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ โดยการลดลงของหมู่เมทิลที่ไลน์วันของเซลล์เม็ดเลือดขาวในแต่ละการทดลองจะแตกต่างกันขึ้นกับเซลล์ไลน์ที่เลี้ยงร่วม ซึ่งเซลล์ไลน์ทั้งสี่ชนิดมีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอบริเวณต่างกัน และเลือดของคนปกติที่นำมาเลี้ยงร่วมมีพื้นฐานของสถานะเหนือพันธุกรรมแตกต่างกันตั้งแต่แรกซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Puttipanyalears, C. *et al.* (2015) (7) ระบุว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันได้ โดยเกิดจากสัญญาณพาราไครน์เมื่อมีการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม อีกทั้งผลการศึกษากการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในสถานะจริง หรือในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ยังมีระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันต่ำกว่าในเลือดของคนปกติ ซึ่งสอดคล้องกับระดับของหมู่เมทิลที่ไลน์วันในโมเดลจำลองสภาพในร่างกาย แสดงว่าเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอมีการหลั่งสัญญาณพาราไครน์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะเหนือพันธุกรรมที่เซลล์เม็ดเลือดขาวได้ อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าโมเดลจำลองสภาพในร่างกาย รวมถึงจำนวนเซลล์ที่ผู้วิจัยใช้ในงานนี้สามารถจำลองการเกิดปฏิกิริยารับ-ส่งสารคล้ายคลึงกับในร่างกายมนุษย์ได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ito, A. *et al.* (1995) (29)

จากนั้นจึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน เพื่อนำข้อมูลยีนที่ได้มาพัฒนาเป็นยีนสำหรับการตรวจกรองการเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอในระยะแรก โดยศึกษาทั้งในโมเดลจำลองสภาพในร่างกายและในสถานะจริง โดยระดับการแสดงออกของยีนในโมเดลจำลองจะใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งเป็นเวลาสี่ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการส่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอไปบริษัท Vishuo Biomedical (Thailand) LTD เพื่อนำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการ RNA-sequencing แต่เนื่องจากกระบวนการขนส่งใช้เวลานาน อีกทั้งตัวอย่างอาร์เอ็นเอถูกทำลายได้ง่ายถ้าสถานะแวดล้อมไม่เหมาะสม จึงทำให้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอเสียหาย 1 การทดลองคือ การทดลองเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4 ดังนั้นจึงใช้ตัวอย่างเพียงแค่ 5 การทดลอง คือ

การทดลองเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN17 จำนวน 3 การทดลอง และ การทดลองเลี้ยงร่วมระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด WSU-HN4 จำนวน 2 การทดลอง มาเข้ากระบวนการวิเคราะห์ลำดับเบสของอาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค RNA-sequencing เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ พบว่าระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งนั้นแตกต่างจากระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Weinhold, B (2006) (15) และ Kitkumthorn, N. *et al.* (2012) (22) กล่าวถึงกระบวนการเพิ่มหรือลดของหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอสัมพันธ์กับการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสัญญาณพาราไครน์ของเซลล์ไลน์มะเร็งนอกจากจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของหมู่เมทิลที่เซลล์เม็ดเลือดขาวแล้ว ยังสามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน

โดยข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสอาร์เอ็นเอเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะสามารถระบุได้ว่ายีนที่คัดเลือกมานั้นมีความแม่นยำเพียงพอที่จะนำมาพัฒนาเป็นยีนสำหรับการตรวจกรองการเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอในระยะแรกได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากกระบวนการวิเคราะห์ลำดับเบสของอาร์เอ็นเอ ร่วมกับข้อมูลการแสดงออกของยีนในเลือดผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension (CU-DREAMX) โดยข้อมูลที่ได้จากโปรแกรมนี้อัปโหลดชื่อและจำนวนของยีนที่มีการแสดงออกในกลุ่มทดลองมากกว่ากลุ่มควบคุม (Up-regulated gene) และจำนวนของยีนที่มีการแสดงออกในกลุ่มทดลองน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (Down-regulated gene) ซึ่งผู้วิจัยเลือกใช้ข้อมูลยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมาวิเคราะห์หา candidate gene เนื่องจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น สามารถตรวจได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถตรวจการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคทางพยาธิวิทยาได้อีกด้วย โดยผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบข้อมูลจากสองแหล่งข้อมูลแล้วจึงคัดเลือกยีน Zinc Finger CCHC-Type Containing 6 (*ZCCHC6*) มาตรวจสอบระดับของการแสดงออกของยีนในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ เปรียบเทียบกับเลือดของคนปกติด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ZCCHC6* ในตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอสูงกว่า ตัวอย่างเลือดของคนปกติ 2.54 เท่า

ยีน *ZCCHC6* มีหน้าที่เกี่ยวกับการเติมเบสยูราซิล (U) ที่ปลาย 3' ของ mRNA เพื่อเป็นตำแหน่งจดจำสำหรับการย่อยสลายสาย mRNA (30) นอกจากนี้โปรตีนที่ผลิตได้จากยีน *ZCCHC6* ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งหลายชนิดโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของ RNA-binding protein ชื่อ Lin28 ในการเติมเบสยูราซิลที่ปลาย 3' ของ let-7 miRNA ซึ่งเป็น Tumor suppressors gene ทำให้มีการแสดงออกของ let-7 miRNA ลดลง (31) โดยการลดลงของ let-7 miRNA พบได้ในหลายมะเร็ง เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งรังไข่ มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งศีรษะและลำคอ และมะเร็งปอด (32-37) อีกทั้งการเพิ่มการแสดงออกของ Lin28 และการลดลงของ let-7 miRNA นี้ยังสัมพันธ์กับการลดลงของความอยู่รอดของผู้ป่วยอีกด้วย (38-40)

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีความไวของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ZCCHC6* สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะ 70.83 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในอนาคตสามารถนำผลการวิจัยนี้ไปพัฒนาการตรวจกรองมะเร็งศีรษะและลำคอที่มีความไว และความจำเพาะสูงได้

สรุปผลการวิจัย

จากผลของงานวิจัยสามารถสรุปได้ว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอแล้ว เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะเนื้อพันธุกรรม โดยทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมีระดับของหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอลดลง และทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *ZCCHC6* เพิ่มขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการศึกษา ควรเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอเพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ผล
2. ในงานวิจัยนี้ควรศึกษาสารที่เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอหลั่งออกมา เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่า สารชนิดใดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลที่เซลล์เม็ดเลือดขาว
3. ในอนาคตสามารถนำผลการวิจัยนี้ไปพัฒนาการตรวจกรองมะเร็งศีรษะและลำคอที่มีความไว และความจำเพาะสูงได้

รายการอ้างอิง

1. W.imsamran Ac, S wiangnon, et al. Cancer in thailand. New Thammada Press (Thailand) Co., Ltd.2015.
2. Information Technology Division Nci. HOSPITAL-BASED CANCR REGISTRY. Eastern Printing Public Company Limited PCL. 2014.
3. Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16(1):108-14.
4. Rickles NH. Oral exfoliative cytology: an adjunct to biopsy. CA Cancer J Clin. 1972;22(3):163-71.
5. Martin IC, Kerawala CJ, Reed M. The application of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of epithelial dysplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(4):444-6.
6. Bhalang K, Suesuwan A, Dhanuthai K, Sannikorn P, Luangjarmekorn L, Swasdison S. The application of acetic acid in the detection of oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106(3):371-6.
7. Puttipanyalears C, Mutirangura A, Kitkumthorn N. LINE-1 HYPERMETHYLATION IN BREAST CANCER STROMAL CELLS. Epigenomis. 2016;8(4):475-86.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015;136(5):E359-86.
9. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson P. The Physics of Cancer: The Role of Physical Interactions and Mechanical Forces in Metastasis2011. 512-22 p.
10. Thailand NCI. National Cancer Control Programes. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด2013-2017.
11. Pai SI, Westra WH. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. Annual review of pathology. 2009;4:49-70.

12. Institute NC. Head and Neck Cancers [updated March 29, 2017; cited 2017 October 15]. Available from: <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>.
13. Glenn R, Foreman D. OraRisk HPV and Oral Cancer Testing [cited 2017 October 15]. Available from: <http://www.drforeman.com/orarisk-testing>.
14. Miyahira A. Types of immune cells present in human PBMC [updated November 22, 2012; cited 2017 October 30]. Available from: <https://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>.
15. Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change. Environmental Health Perspectives. 2006;114(3):A160-A7.
16. SAEY TH. Epigenetic marks may help assess toxic exposure risk — someday. sciencenews. 2016 December 24, 2016:p. 12.
17. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science. 2001;293(5532):1068-70.
18. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet. 2012;13(7):484-92.
19. Muangsub T, Samsuwan J, Tongyoo P, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Analysis of methylation microarray for tissue specific detection. Gene. 2014;553(1):31-41.
20. Kitkumthorn N, Keelawat S, Rattanatanyong P, Mutirangura A. LINE-1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(9):4469-75.
21. Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. Clin Epigenetics. 2011;2(2):315-30.
22. Kitkumthorn N, Tuangsintanakul T, Rattanatanyong P, Tiwawech D, Mutirangura A. LINE-1 methylation in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. Clin Chim Acta. 2012;413(9-10):869-74.
23. Hurley T, Alba J, Williams G. THE POLYMERASE CHAIN REACTION. Sumanas, Inc.; 2007.

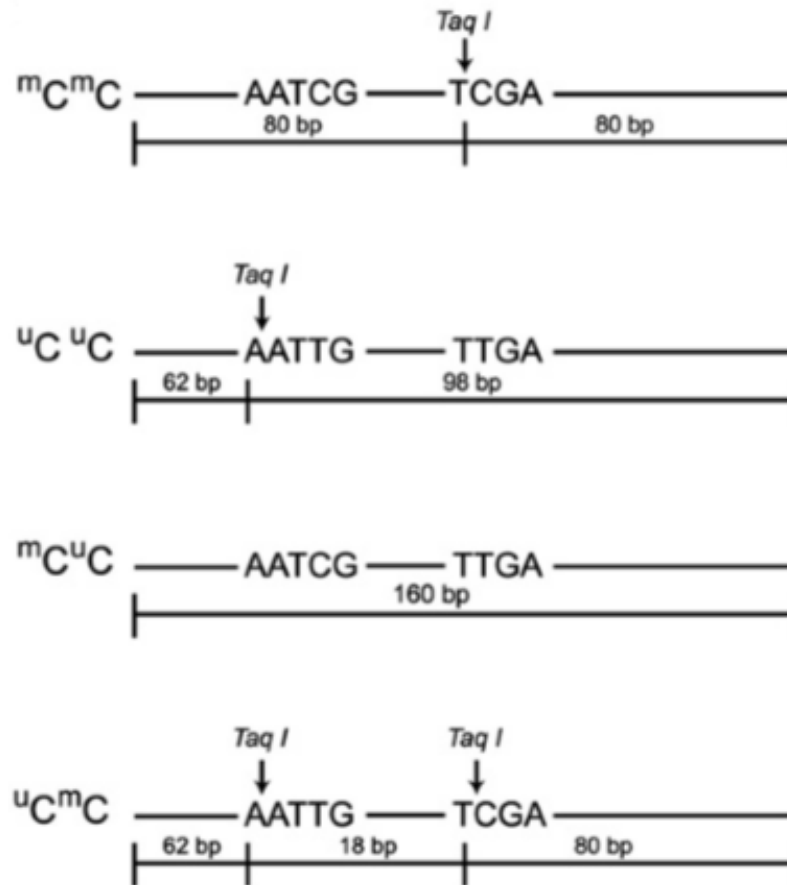
24. Chu Y, Corey DR. RNA Sequencing: Platform Selection, Experimental Design, and Data Interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2012;22(4):271-4.
25. Apornwewana.C, Mutirangura.A. Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays (CU-DREAM): A physiogenomic discovery tool: *Asian Biomedicine*; 2011 [Available from: <http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~achatcha/CU-DREAM/>].
26. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clinical chemistry*. 2002;48(8):1178-85.
27. Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *International journal of cancer*. 1995;61(1):98-103.
28. Mohammadi H, Mohammadnejad J, Yavari K. Human peripheral blood derived hematopoietic stem cell: history, the isolation methods and investigation of different parameters effects on their differentiation to the body cells. *Int J Stem Cell Res Transplant*. 2014;2(02):59-62.
29. Ito A, Nakajima S, Sasaguri Y, Nagase H, Mori Y. Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. *British Journal of Cancer*. 1995;71(5):1039-45.
30. Lim J, Ha M, Chang H, Kwon SC, Simanshu DK, Patel DJ, et al. Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation. *Cell*. 2014;159(6):1365-76.
31. Lin S, Gregory RI. Identification of small molecule inhibitors of Zcchc11 TUTase activity. *RNA biology*. 2015;12(8):792-800.
32. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(5):903-6.
33. Qin R, Zhou J, Chen C, Xu T, Yan Y, Ma Y, et al. LIN28 is involved in glioma carcinogenesis and predicts outcomes of glioblastoma multiforme patients. *PLoS One*. 2014;9(1):e86446.

34. Cai W-Y, Wei T-Z, Luo Q-C, Wu Q-W, Liu Q-F, Yang M, et al. The Wnt- β -catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *J Cell Sci.* 2013;126(13):2877-89.
35. Dahiya N, Morin PJ. MicroRNAs in ovarian carcinomas. *Endocrine-related cancer.* 2010;17(1):F77-F89.
36. Alajez NM, Shi W, Wong D, Lenarduzzi M, Waldron J, Weinreb I, et al. Lin28b promotes head and neck cancer progression via modulation of the insulin-like growth factor survival pathway. *Oncotarget.* 2012;3(12):1641.
37. Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Frontiers in Genetics.* 2017;8(31).
38. Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in molecular medicine.* 2008;14(9):400-9.
39. Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Sugimura K, Tanaka K, Kurokawa Y, et al. High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(8):1415-23.
40. Molenaar JJ, Domingo-Fernandez R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nature genetics.* 2012;44(11):1199-206.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 31 ขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด (22)

ตารางที่ 24 ข้อมูลระยะของโรคมะเร็งและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย
มะเร็งศีรษะและลำคอ

รหัส	เพศ	อายุ	ระยะของโรคมะเร็ง	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา
1	M	35	IVA	poorly-differentiated squamous cell carcinoma
2	M	29	IVC	moderately-differentiated squamous cell carcinoma
3	M	70	III	well-differentiated squamous cell carcinoma
4	F	80	IVA	unidentified
5	F	43	IVA	well-differentiated squamous cell carcinoma
6	F	69	II	well-differentiated squamous cell carcinoma
7	M	83	II	well-differentiated squamous cell carcinoma
8	F	51	II	well-differentiated squamous cell carcinoma
9	M	47	III	well-differentiated squamous cell carcinoma
10	M	59	II	well-differentiated squamous cell carcinoma
11	M	22	I	well-differentiated squamous cell carcinoma
12	M	55	IVA	well-differentiated squamous cell carcinoma
13	F	57	I	moderately-differentiated squamous cell carcinoma
14	M	70	II	well-differentiated squamous cell carcinoma
15	M	83	IVA	unidentified
16	M	45	IVA	well-differentiated squamous cell carcinoma
17	M	72	III	well-differentiated squamous cell carcinoma
18	M	71	IVA	well-differentiated squamous cell carcinoma
19	M	45	IVA	well-differentiated squamous cell carcinoma
20	M	45	IVA	well-differentiated squamous cell carcinoma
21	F	35	I	well-differentiated squamous cell carcinoma
22	M	62	IVA	unidentified
23	F	65	III	well-differentiated squamous cell carcinoma
24	M	58	II	unidentified

ตารางที่ 25 ซื่อยีนจากกระบวนการ RNA-sequencing ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกยีนที่พบการ แสดงออกในกลุ่มทดลองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และมีระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ระดับการ แสดงออก ของยีน	การทดลอง	ซื่อยีน
PBMc ที่เลี้ยง ร่วมกับ WSU-HN4	PBMc ที่เลี้ยง ร่วมกับ WSU-HN4	TMEM245, TMEM251, AL110118.2, UBR7, IGHV4-61, SLC04A1, INPP5D, RN7SL32P, MINOS1, MINOS1-NBL1, NBL1, RALB, SPTAN1, TRBV19, =IGLV1-40, IGLV1-36, IGLV2-34, ENSG00000207834, IGLV2-28, IGLV3-25, IGLV2-23, ENSG00000207830, IGLV3-21, IGLV3-19, ENSG00000207835, IGLV2-14, ENSG00000207833, IGLV2-11, IGLV2-8, ENSG00000207836, IGLV3-1 //, RNF25, SLA, MIR7848, CABIN1, AC253536.3, KLHL21, ARFIP2, SNRNP200, ANKRD27, AL021707.8, SF3B3, THYN1, AC067852.2, RASGRP1, NOP2, CHD4, UBR1, RAB15, NRDC, ENSG00000212076, COQ10B, RRP8, AC091564.2, TAF10, AC091564.3, PHF13, ARFRP1, IL2RB, STK17B, IGHV3-21, CTR9, PHF10, AL354892.2, RPLP2, SNORA52, SH2D1B, SLC38A5, MSTRG.15257, CHSY1, GOLGA1, SCAI, TPP2, AGER, AL662884.1, PEX2, GPM3, NOTCH4, TRIP12, CEP192, AP451, ICAM3, CXCR5, AFF4, JOSD1, CNOT3, TP53INP1, AP000254.1, PCNT, SKI, ANKRD44, ANKRD44-IT1, NSD2, SRSF4, uc_338, ZDHHC7, ZCCHC11, SCCPDH, YTHDC2, NAA25, DDIT4, HELZ, UTS2, TNFRSF9, NKTR, CALM1, CHD7, IGHV1-46, MRPL14, GAL3S14, GPC2, GATS, ENSG00000281555, CUL1, CD2AP, AKIRIN1, TMEM173, TRBV6-1, AC245088.3, TRBV6-4, ICOS, HSP90AB1, CCAR1, JAML, PUM2, PHYHD1, AL672142.1, NUP188, HLA-DQB1, HLA-DQB2, HNRNP, TRBV7-3, MFSD12, PPP1R16B, AC015849.3, NR1D2, HTT, MSANTD1, MSTRG.40471, PAX5, BLK, TMEM181, MIR7161, HECTD1, FPR1, AP005202.1, TOR3A, EMB, CHMP7, ROCK2, IL3RA, PPWD1, PDE4D, IGLV1-44, SRSF10, SLC30A6, STAG3L1, Y_RNA, TRIM73, NSUN5P1, MRPS2, UBE3C, CAMLG, CTNNA1, CYFIP2, GOS2, ADIPOR2, HECA, PLAU, YWHAB, PABPC1L, FYN, RNF40, HTRA2, FURIN, IKZF5, DDX58, TOPORS, ENOPH1, CNOT1, PRPF4B, AC132872.3, C6orf106, AC004552.1, FMNL1, SS18L1, UBD, GABBR1, WDT1, AACS, PEBP1, ZNF518B, PDPR, EIF5B, ARHGFB6, BAZ1B, RAD18, RNF169, ETS1, NCL, SNORA75, PLA2G6, CSNK1E, Z98749.2, CCSER2, NUP160, RNA5SP340, Y_RNA, NUCB1, MYCBP2, TBC1D13, C7orf49, WDR91, PHIP, PTAR1, AL355916.2, SOD1, RNA5SP317, FAM222B, MSTRG.28962, GDF11, DCTPP1, SETDB2, NIN, AL606834.3, CYLD, MIR3181, MIB1, GLE1, LOXL2, ENTPD4, ZCCHC6, RASA3, TRBV27, SLC6A6, CDK8, PAOX, AL360181.3, MTG1, PI4KA, RERE, UBE2R2, BDP1, IL1RL1, IL18R1, SDR42E1P5, IL18RAP, ABHD2, COO9, AC090952.1, POLR2C, OGT, SOD1P3, ATG2A, MIR6749, TCF3, SP1, ZNHIT6, SGS2, CLASP1, HDGF, GCNA, TGFA, SMC1A, SCSD, CHRAC1, MTR, CCDC94, EFTUD2, IL21R, HP1BP3, PATL1, MAEA, STAT3, TATDN2P2, USP15, ENSG00000276811, RABGAP1, GPR21, PAOR8, BRAT1, MARCH7, MRPL23, TOP2B, ENSG00000264219, EBLN3P, EMP1, BET1L, SCML1, TMX3, NPIPA5, P2RY10, MTERF4, PASK, ZNF189, SLC38A2, GATA3, TP53BP1, MAN1C1, MSTRG.45844, STOM, CTPS1, NIPBL, NUFIP2, SURF6, MED22, ERN1, LONRF3
		MRPL34, MIR324, MSTRG.32325, PGS1, ENSG00000281727, SUN1, GET4, ZFC3H1, NR2C1, UBE4A, USPL1, RAD51-AS1, UBA5, GPR65, WDR75, PHC3, SNORD19, AL365330.1, P2RX4, LINC00641, SF3B1, PTGES, AC079594.2, IFT80, TRIM59, KIAA0141, RNF14, PPP6R3, JMJD6, uc_338, SRSF2, ENSG00000207556, MALTI1, AC107959.1, TNFRSF10B, GJB2, NDUFA10, AL121987.2, DCAF8, AL139011.2, PEX19, RNY4P10, MORC2-AS1, TUG1_1, TUG1_2, TUG1_3, TUG1_4, ZNF655, AC005020.2, TMEM225B, AK4, HGS, ATR13A3, AC108676.1, POGU11, EIF4A2, SNORD2, SNORA63, ENSG00000281017, SNORA81, SNORA4, SAP25, AC069281.2, LRCH4, VP552, AL139396.1, PHF1, ZC3H11A, ZBED6, NAMPT, LDB1, TSEN34, PSTPIP2, LDLRAP1, AL606491.1, DDX3Y, MSTRG.20793, SERPINB9, BCLAF1, AC115618.2, MTHFS, ST20, MTHFS, ST20, BCL2A1, ACADM, RABGGTB, SNORD45C, SNORD45A, SNORD45B, METTL3, DHRS3, AL355816.2, DENND2D, RIFK2, AL022328.3, AC005104.1, HP1BP3, SEPSecs, TMEM259, CTPS1, SLC35A3, MFSD14A, CXCL5, KPNAS, VPS13C, SNRNP70, TTC13, PI4KB, DPP3, AP002748.4, BBS1, AC136475.3, PGGHG, PHLDA1, DDX17, USP48, MSL3, AC010889.1, KDM5D, SRSF10, FAM91A1, TAF7, DHX58, AC132872.3, Cxor40B, AP3M2, TNRC6C-AS1, TMC6, INO80D, DGKA, INPP5F, AL133461.1, PHC1, TBC1D20, AC015871.3, TRPM7, ACTR8, ZNF814, AC010326.2, ZNF417, ZNF292, AL645939.2, AL158163.1, KLRA1P, MARCH7, CGGBP1, RAB3GAP1, COQ4, AC037198.3, GAB3, EIF2B5, ARFGAP3, PACSIN2, AC020907.4, RNF216, KLHL17, ENSG00000277294, BTG3, NXF1, STX5, UBR5, TNF22, DENND3, NAA40, DDX3X, STAT6, DLG3, SPN, AC009086.2, OPR1, PDE4B, ZBTB34, CCNT1, AL356273.3, IVNS1ABP, INTS10, INTS6L, CD27-AS1, VAMP1, SAMD8, PGBD2, C18orf8, CD44-AS1, UNC119, CCDC92, AC079315.1, AC068790.7, AC068790.4, GCSAM, CLCN7, RANBP6, CREBZF, ZNF430, AC012368.2, PELI1, CCPG1, DNAAF4-CCPG1, ENSG00000207964, DNAAF4, LINC02210, LINC02210-CRH1, ENSG00000282774, ENSG00000273917, CRHR1, DDIT4, GBP3, Y_RNA, MARS, ENSG00000275657, MBDO, BTBD1, HIF1A, AL137129.1, SNAPC1, STARDA4, MSTRG.7546, MSTRG.29712, CD84, C2orf49, C18orf25, HECW1, STK17A, CD80, CEP85L, CD55, AL391597.1, TRIB2, RPS6KB1, AC005702.2, AC005702.1, NAP1L4, CHST15, SLC9B2, BDH2, AC087222.1, TP53INP1, ASB3, GPR75-ASB3, MIR3682, GPR75, PSME4, CLK4, RN7SKP70, JMJD1C, MSTRG.49837, NBPF10, AC239799.1, NOTCH2NL, ATG16L1, ZNF266, CASP10, CD93, PAPD7, MSTRG.2998, PCSK7, CSGALNACT2, CHTOP, P4HA1, AL731563.3, ATM, TNFRSF10A, ABCA10, ABCA5, SLC30A7, AC093157.2, PTC3, NXPE3, NFKBIZ, ABCA7, AL031600.1, SNORA66, TNFAIP3, DDX398, ATP6V1G2- DDX398, ENSG00000276877, SNORD84, ATP6V1G2, TOGARAM2, ZNF143, MSTRG.11610, FCHSD1, LPCAT4, IL6ST, ZNF830, TEPsin, PTAR1, RGPD6, SNORA26, BIRC3, BIRC2, HNRNP, AL049840.5, MSTRG.18132, KANSL3, MSTRG.10329, SMARCA2, ZNF562, TBGR1, GOLT1B, CD69, ELOVL5, ZMYM2, SMG1, CNOT11, YOD1, ORC2, RBM33, BUB3, RPP30, TNFSF15, UPRT, UQCRC2, PLAC8, MAPK6, DENND6A, AC015726.1, AKAP10, VEZT, CCNL2, EREG, OCIAD1, AC022239.2, AC012181.3, AC012181.2, HAUS6, SCARNAB, TMEM199, AC002094.1, ENSG00000264302, SARMI1, SIN3B, ZAP70, MIAT, MIAT_exon1, MIAT_exon5_1, MIAT_exon5_2, MIATNB, MIAT_exon5_3, STAT4, C2orf42, TIA1, MSTRG.45434, CDK10, AC096586.2, AC127070.1, B3GNT9, TRADD, ZNF121, AC037198.2, AMPD3, ENSG00000281108, SH2B1, ATL2, WASHC4, RBL2, AC067945.3, CTNNA1, DDX23, NDUFAF7, CHD1, GABPB1, RNU6-94P, LIMK2, ACADVL, C2orf68, TNFAIP6, ZCCHC6, EZH1, SIKE1, RAN, LMF2, FAM208B, AC135983.4, AC135983.3, AC135983.2, RUBCNL, PPP1R2P4, GPD2, NBEAL2, FAM3C, NAT9, HSF2, RGPD8, ALCAM, SNHG1, SNORD22, SNORD30, SNORD28, SNORD27, SNORD26, SNORD25, VPS13B, SOD1P3, GNL3, SNORD19B, SNORD19, DNPEP, TMEM156, CAND1, CD200R1, DDX21, USP53, M6PR, INSI3, CENPV, VPS29, SNORD50, PPTC7, MDM4, ZCCHC8, ATP2B1, GOS2, AL662797.2, DMTF1, uc_338, SS18, CNOT9, GRPEL1, PHF10, AL354892.2, MSTRG.40471, NABP1, uc_338, AC018638.5, MARCH9, SRSF3, NMRK1, ZRANB2, MIR186, ENSG00000266347, REV1, MSTRG.7720, AC010186.2, GOT2P3, AC010186.4, AC010186.3, CLEC2D, AC007068.1, LINC02390, MSL1, HNRNPDL, UGCG, MIR4668, SLC13A3, TP53RK, AKAP17A, MIR3671, SLC39A8, AC098487.1, PITPNB, MRE11, AP000786.1, TBC1D4, NUP54, TTC37, UBTD2, ZFYVE27, B3GNT5, NSUN3, AL122035.2, ZBTB25, AL049869.3, CCL20, PRKD3, MED28, AL390728.6, AL390728.4, ENSG00000263568, AL390728.5, MSTRG.15274, AL662797.3, FLOT1, IER3, CD83, TMEM181, MIR7161, CLK2, CALM2P2, TAZ, AC083837.1, IRF3, ZNF76, DEF6, SGK1, TAF2, C9orf72, MSTRG.48976, AP1G1, GIPR, MIR642A, TOPBP1, CRTCC, MCOLN2, GFR1OP2, PANK3, SLC2A3P1, ACSL5, TPR, RNU6-1240P, LIG4, PSMD6, AC012645.3, DPP8, SLC20A1, RN7SL124P, TMEM39A, PCF11, AP000873.4, MTMR2, UBD, GABBR1, VAV1, TRIP10, FAM229A, BSDC1, METTL6, EAF1-AS1, COLQ, SQUPTL7, OSSEP, AL163051.2
กลุ่ม ทดลอง มากกว่า กลุ่ม ควบคุม	PBMc ที่เลี้ยง ร่วมกับ WSU-HN17	

ระดับการ แสดงออกของยีน	การทดลอง	ชื่อยีน
	PBMC ที่เลี้ยง ร่วมกับ WSU- HN4	<p>PLEKHF1, SERTAD3, TRAM1, XRCC5, LYN, ATP6AP1, DHX40, PPP1R12C, SCARB2, EMLIN2, AP000919.4, ZNF394, FAM107B, GMPR, PTBP3, CCDC58, ZC3H10, ESYT1, MYL6B, MYL6, HSPB1, TKT, MYD88, AC005776.2, AKAP8, CERS4, LAP3, SPC35, NFE2L3, MRPL20, RN7SL657P, SLC7A1, GFER, PCNA, ZKSCAN8, SSSCA1, FAM89B, EHBPL11, SIPA1, MIR4489, KLHL9, TNRC18, NDUFA8, SGK1, ATP6V0B, RPL9, DCTN3, CD86, COMMD7, DIAPH1, HDAC3, NCF1, RBX1, PPM1F, NDE1, ENSG00000272213, AC026401.3, AF001548.2, AF001548.1, ENTDP7, CUTC, COX4I1, YKT6, SYMPK, HSD17B10, ADM, CYB5R1, CCDC28A, NUBP2, HACE1, PSMD4, CYP27A1, AC009974.1, PRDX5, KLRB1, C5AR1, MRM3, AC087392.5, IFI6, CAPN10, GPR35, JPT1, SUMO2, ANAPC13, C11orf21, RHOB, COX6A1, AL021546.1, GATC, MIR4645, SERPINB9P1, POLB, COX8A, AP000721.1, OTUB1, LAPTM4A, PARP8, CAVIN2, SDHD, TEX12, BCO2, AP002884.2, DONSON, AP000311.1, ATP5O, SEC22B, AC245100.8, ZFYVE21, CLTA, EIF4EBP1, UBE2E1, NEU1, CDVL, GF1B, STXBP3, ATF1, PHF5A, ZMIZ2, ERH, UBE2A, ATP6V1F, HLA-F, PRKCB, KCTD14, NDUFC2-KCTD14, NDUFC2, TNFAIP8L2, SCN1M1, ISG15, USMG5, ENSG00000221767, C19orf38, ZNF551, AC003006.1, ZNF776, ALKBH5, AC037198.3, SCAMP4, ADAT3, ALOX5, PEX16, CD244, L3MBTL2, PDZK1IP1, CSF3R, UNG, PECAM1, UBTDO, AC037198.2, PTGR2, AC005520.1, ZNF410, ELK3, NDUFS4, GABARAP, AC120057.3, CTDNEP1, AC003688.1, ENSG00000281419, CLDN7, CXCL10, BORCS8-MEF2B, MEF2B, BORCS8, NUTF2, LYPD3, RNPEPL1, ZNF830, NECAP2, LINC01772, PPP2R5D, CEBPZOS, AC007390.2, AKIRIN2, ZNF114, CARD8-AS1, FOPNL, TMEM14A, RPSAP9, GHITM, RSPH10B, PMS2, VDACA, AC005912.1, PPP2R3C, PSMD8, GAPT, POLR2K, ICAM2, MSTRG.5405, SESN1, KIAA0391, AL121594.3, PSMA6, UBA1, INE1, DNTTIP1, SUV39H1, LSP1, AC051649.1, ENSG00000273848, C12orf29, GZMA, TAR5, JARID2, MAV5, DNAJA1, CD48, C11orf68, ATP5J, CYC1, MIR4435-2HG, GTPBP2, IFIT2, AC109583.2, CCDC12, AC026271.1, PSMA4, CHRNA5, SFMBT2, CWC15, INTS4, MSTRG.14036, PPP1R21, PHACTR1, RAPGEF1, AP3S1, FAM198B, PMAIP1, ZC3H12C, AC010980.2, HMG2, PSMB3, DAPK1, PINK1-AS, DDOST, RNU2-38P, HDAC5, ENSG00000274433, G6PD, PRDX4, LAMAS, ENSG00000265329, RAB8A, HSH2D, TRIM13, KCNKG, SSR3, PPP6C, ASB6, RAB11B, DAPP1, RIC8A, ENSG00000274298, LINC01011, NQO2, CCNY, SCAND1, MSTRG.15734</p>
กลุ่มทดลอง น้อยกว่า กลุ่มควบคุม	PBMC ที่เลี้ยง ร่วมกับ WSU- HN17	<p>APOBR, NPIPBT7, AC138894.1, CLN3, RAB1F, AL133375.1, DNPH1, ZNF708, AC010620.1, VNIR83P, RPSAP12, TBC1D25, GLUL, F11R, AL591806.3, TSTD1, ECHS1, BTBD2, AC004678.1, EIF4EBP1, COPRS, NDUFS7, PHF23, MLYCD, AC009119.2, OSGIN1, NUBP1, KLF7, OAS1, PTPRCAP, CORO1B, UBE2L3, CELF1, KBTBD4, RGS19, RNF220, PNKD, AP1M1, C3orf62, USP4, TMEM101, CD99, C12orf10, DAP3, TTC1, CORO1A, PLP2, ZNF622, DIRA51, AC006538.2, SLC39A3, EIF3G, SLC43A1, PPP1CA, PRADC1, CNPY3, AL035587.1, GNM1, ELOVL1, ENSG00000277622, C14orf1, DIABLO, AC048338.1, VP53A, NDUFB5, SWI5, SNX3, TMEM54, RNF19B, PFN1, ZFP36L1, C19orf43, AC010809.1, AVEN, IFI35, PEBP1, PHAX, RMNDA5, AC083899.1, FAM43A, DDHD2, IFIT2, SH3BGR1, IFI6, BST2, POP7, COL7A1, ENSG00000215355, UQCRC1, CITED2, PRAF2, WDR45, MCRS1, ZFPL1, CDK19, KRTP2, AL713999.1, MUC1, HMOX1, LITAF, ZC3H10, ESYT1, MYL6B, MYL6, ATP5B, CCDC85B, DRAP1, NOL12, Z83844.1, TRIBOP, XXYLT1, GABARAP, AC120057.3, CTDNEP1, AC003688.1, ENSG00000281419, CLDN7, VRK3, GZMM, PSMD8, ELAVL3, AC008481.3, ZNF653, ECTS1, ELOF1, INPP5K, SNF8, ENSG00000275783, UBE2V2, ORAI2, LRWD1, ENSG00000266715, ENSG00000264471, ASH2L, SLC25A38, PSMC3, MRPS18B, MSTRG.25673, PARK7, BCAP31, CETN2, AL450405.1, GOT1, CYBA, NMT1, RHOA, MED27, PMVK, COP53, MSTRG.31368, KIAA0930, FAM46A, DDRGK1, ZNF282, BORCS6, GNAI2, UNC93B1, LAPTM4A, MPG, CUX1, AC005072.1, PCSK1N, NDFIP1, NDUFS8, ENSG00000277703, ENSG00000266737, RGL1, PMAIP1, MSRB1, MARCKSL1, AQP3, TADA3, BAG1, ZNHIT1, TMEM43, AC090004.1, AC093495.1, HHEX, TNFRSF1A, DENR, CALM1, IL17RA, C9orf16, CST3, AP001972.5, SRXN1, AL121758.1, SCRT2, PEF1, NR1R, CMPK2, IFIT3, GTF2H3, AC117503.3, PGD, AGAP3, AC245100.8, ACP5, FUBP3, PPP1R7, HSPA1A, HSPA1B, C6orf48, SNORD48, SNORD52, AIP, ADRM1, C7orf50, NUDC, SNRPD2, EIF4A3, CP5F3, SGF29, PPP3CA, UBE2R2, TAF3, ARHGAP30, ARL2, ARL2-SNX15, SNX15, APBB1IP, NFKBIB, MRPS12, LSP1, AC051649.1, ENSG00000273848, SLC37A2, SEMA4A, CMTM3, RBM22, LAMTOR1, ISG20, RPIA, SNRPB, AL049650.1, ZNF343, MSTRG.49764, AC090498.1, ATP6V0D1, PDLIM1, ISOC1, RALBP1, ORC5, TEX45, AC008878.1, ZNF358, RNASEH2A, NCOR1, PLD3, AC118344.2, MED24, ENSG00000275267, ATP5G2, AC073594.1, PRDM1, RPL14, SNM11B, B3GALT4, AHDC1, GCLM, SRPRB, DGCR6L, AGPAT2, PITPNA, SLC43A2, RN7SL105P, TNFAIP8L1, GPR68, SNRPN, SNURF, AC124312.1, SNHG14, SNORD107, AC124312.4, PWAR5, SNORD64, SNORD108, AC124312.5, ARL4C, ERP27, ARHGDB, CXCL10, COA3, SSR2, PLEKHF1, HSD17B10, AC104662.3, AC104662.2, PI4K2B, MRPS24, URGCP-MRPS24, URGCP, HLA-C, HLA-B, HLA-S, ZBTB22, HDGF, HENMT1, BEST1, AP003733.4, RPL3, SNORD83B, ENSG00000280859, SNORD43, HIST1H2AE, SEC14L5, NAGPA-AS1, ALG1, FTH1P8, MMP24-AS1, AL121753.1, EIF6, MED21, AC092747.4, MPC2, CENPB, C9orf172, PHPT1, MAMDC4, LENG1, ANAPC2, GSR, MRPL24, SLC25A39, RNF5, MT1F, ENO1, CCNI, ENG, Y_RNA, ENSG00000280697, RNA5SP296, PAF1, PGLS, UROD, ERGIC3, RPL28, ENSG00000277326, CYB5R1, SEPHS2, SEPT11, MSTRG.49780, JADE1, ZNF34, RPL8, ENSG00000274673, ARPC1A, ARPC1B, RAP2B, ACP2, PRPF31, NDUFA8, TMEM160, SNAPIN, CYB561A3, GPX4, HSPA8, SNORD14E, SNORD14D, SNORD14C, UFSP2, WDR34, ERP29, EZR, MT-TK, ABHD4, RAP1GDS1, AC119396.1, AC008878.3, ARHGEF18, ST13, ZGPAT, AL121845.3, LIME1, AL121845.2, SLC2A4RG, SMARCAL1, HEBP1, RPL15, DONSON, AP000311.1, ATP5O</p>

ตารางที่ 26 ชื่อยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในข้อมูลของ RNA-sequencing และข้อมูลของ Expression array

การทดลอง	ชื่อยีน
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN4	STOM, CEP192, AKIRIN1, SLCO4A1, ZCCHC6, NIN, NOTCH4, ROCK2, STK17B, ANKRD44, RERE, IL18R1, SCCPDH, WDTA1, SLC30A6, STAG3L1, LONRF3, ERN1, CXCR5, FURIN
PBMC ที่เลี้ยงร่วมกับ WSU-HN17	GJB2, P2RX4, CD80, PSTPIP2, CCPG1, CCL20, HIF1A, ZNF143, TNFAIP3, CTNNA1, PANK3, LIG4, C9orf72, ZCCHC6, CD93, CD55, PRKD3, GIPR, TBC1D20, PGS1, INO80D, SERPINB9, CAND1, B3GNT9, CSGALNACT2, PHC3, NAMPT, CGGBP1, RIPK2, SMG1, FAM91A1, ZNF562, ZNF430, CXCL5, CRHR1, GPD2, B3GNT5, GPR65, BCL2A1, TNFAIP6, MSL3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1. ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ นางสาวอารีญา อารยะทวีกุล
 เพศ หญิง
 วัน/เดือน/ปี 2 เมษายน 2535
 ที่อยู่ 114 ซ.สุขสวัสดิ์26 แขวงบางปะกอก เขตราชบุรีบูรณะ
 กรุงเทพฯ 10140
 เบอร์โทรศัพท์ 0891041694
 อีเมล milk_draco@hotmail.com

2. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 – 2560 วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
 สาขาวิทยาศาสตรการแพทย์
 แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์
 คณะแพทยศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY
 พ.ศ. 2553 – 2557 วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต
 เกียรตินิยมอันดับ 1
 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY