

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่



นางสาวปภัศสร บุญสงเสริม

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

EFFECT OF PARACRINE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL FROM COLON
CANCER CELL LINES

Miss Papatson Boonsongserm



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	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่
โดย	นางสาวปภัสสร บุญส่งเสริม
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร)

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

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.นริศร คงรัตน์โชค)

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

ปภัสสร บุญส่งเสริม : การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจาก เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (EFFECT OF PARACRINE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL FROM COLON CANCER CELL LINES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: ศ. ดร. นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกัธกร, 64 หน้า.

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยและยังทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้สูงเป็นอันดับต้นๆ ของโลก จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารพาราไครน์ที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติได้ จึงนำมาสู่การศึกษาในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยมีสมมติฐานที่ว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถหลั่งสารพาราไครน์ออกมาและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้เช่นกันผ่านเทคนิคการจำลองสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ของคนปกติ และเมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่ได้จากการทดลองมาตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลนวันพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลนวันทั้งแบบเพิ่มขึ้นและลดลงในเซลล์มะเร็งลำไส้แต่ละชนิด จนนำไปสู่การทดลองโดยใช้เทคนิคไมโครแอเรย์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลของยีนทั่วทั้งจีโนมจากการจำลองสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์นำมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกของยีนจากเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยโปรแกรม CU-DREAM และข้อมูลยีนที่ได้มาวิเคราะห์ต่อร่วมกับการแสดงออกในระดับโปรตีน จากการวิเคราะห์พบว่าที่ยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* มีการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลเพิ่มขึ้นในตัวอย่างเลือดและมีการแสดงออกในระดับโปรตีนเพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ จึงสรุปได้ว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถหลั่งสารพาราไครน์ออกมาได้และสารนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้อาจนำไปสู่งานวิจัยอื่นๆ เพื่อใช้ค้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งและสามารถใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5874097230 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: COLON CANCER / PARACRINE / CO-CULTURE / LINE-1 METHYLATION / CU-DREAM

PAPATSON BOONSONGSEEM: EFFECT OF PARACRINE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL FROM COLON CANCER CELL LINES. ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NAKARIN KITKUMTHORN, D.D.S., Ph.D., 64 pp.

Colon cancer is the third most commonly diagnosed cancers and the second leading causes of mortality worldwide. A previous study from our laboratory discovered effect of paracrine from breast cancer that caused epigenetic changes in peripheral blood mononuclear cells or PBMCs. Thus leading to this hypothesis is colon cancer can releases paracrine that causes epigenetic changes in PBMCs as well. Then we performed co-culture technique which represents paracrine action model between cancer cell lines and normal PBMCs. The results displayed LINE-1 methylation differences in individual colon cancer cell lines, which were determined decrease and increase. CU-DREAM program analyzed between methylation microarray from paracrine action model and expression microarray from blood of colon cancer patients. Tissue microarray continues to analyze the data from the results of CU-DREAM analysis. *MMP9* gene and *PLOD1* gene displayed methylation level increase from blood of colon cancer patients and protein level increase from tissue and lymph node of colon cancer patients. In summary, we demonstrated both of the epigenetic and protein level changes in white blood cells by paracrine action that influence from colon cancer cells. This study leads us to further experiments that search for tumor markers for colon cancer screening.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกัธธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ, อาจารย์ ดร.ศิวนท์ จิรวัดโนทัย, อาจารย์ ดร.นริศร คงรัตนโชค และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์นายแพทย์พรเทพ อังศุวิซรากร อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์นายแพทย์สุภกิจ ชมวิสัย อาจารย์ประจำภาควิชา ศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการค้นหาตัวอย่างเลือดทั้งหมดสำหรับใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาทย์ อารมณ์เทวัญ อาจารย์ประจำศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิิกส์และชีวสารสนเทศ ภาควิชาคณิตศาสตร์และวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ รวมทั้งความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์คมกฤต เรืองฤทธิ์ชาญกุล อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการค้นหาตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งหมดสำหรับใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ปรีชา เรืองเวชวรชัย, คุณเทียมจิต ไชยชนะ, คุณจุฑามาศ วงศ์ภูมิ และคุณจุฑามาศ มากอยู่ อาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการอิมมูโนฮิสโตเคมี ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการย้อมชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก

ขอขอบพระคุณ อาจารย์โสภณ สุวรรณโสภณ อาจารย์ ประจำห้องสื่อการสอน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการสแกนสไลด์งานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นายประกาศิต รัตนตันหยง และนักวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

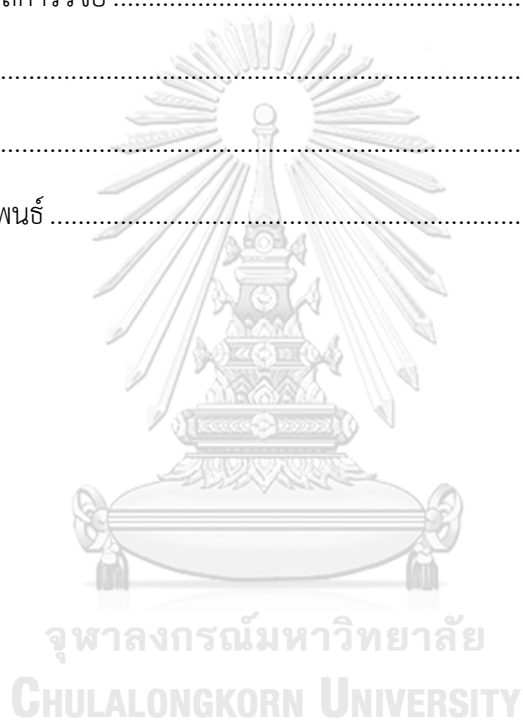
ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาค, ภาควิชาพยาธิวิทยา, ภาควิชาชีวเคมี และคณาจารย์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ต
บทที่ 1	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rational).....	1
คำถามงานวิจัย (Research question).....	3
สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	3
วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives).....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2	4
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature).....	4
โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colorectal cancer หรือ Colon cancer).....	4
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation).....	8
COBRA (Combine bisulfite restriction analysis).....	10
เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR).....	11
CU-DREAM program	13
จุลพยาธิวิทยา (Histopathology).....	14
บทที่ 3	17

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม.....	17
กรอบความคิดงานวิจัย	17
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	18
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	19
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	19
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
ข้อมูลเทคโนโลยีไมโครแอรีย์.....	21
การคัดเลือกตัวอย่าง	22
การสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์.....	23
การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง	23
การจำลองสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์	24
การสกัดเซลล์ดีเอ็นเอ	25
การทำไบซัลไฟต์ทรีเมนต์.....	25
การทำ COBRA LINE-1.....	26
การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR.....	27
การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	30
การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลือง	31
การย้อมชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E).....	31
การย้อมชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองด้วยเทคนิค Immunohistochemistry	32
บทที่ 4	33
ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลเบื้องต้น	33
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล Microarray	35
ผลการจัดกลุ่มข้อมูลยีนที่ถูกคัดเลือก	36

ผลการวิเคราะห์ยีนที่ถูกคัดเลือกด้วย Tissue microarray	37
การทดสอบแอนติบอดีในตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อ	38
การทดสอบแอนติบอดีในตัวอย่างต่อมน้ำเหลือง	41
ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลในตัวอย่างเลือด	45
บทที่ 5	47
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	47
รายการอ้างอิง	50
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	64



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	ตารางแสดงลักษณะการวิเคราะห์ร่วมกันของข้อมูล Microarray ที่มาจากการใช้โปรแกรม CU-DREAM 13
ตารางที่ 2	ตารางแสดงชื่อ ลำดับเบส และความยาวของ Primer ที่ใช้ในการทดลองการระดับหมู่เมทิลของยีน <i>MMP9</i> และ <i>PLOD1</i> 28
ตารางที่ 3	ตารางแสดงลักษณะการวิเคราะห์ร่วมกันของข้อมูลยีนระหว่าง Methylation microarray และ Expression microarray ที่มาจากการใช้โปรแกรม CU-DREAM.. 36
ตารางที่ 4	ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มชิ้นเนื้อ 55
ตารางที่ 5	ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มต่อมน้ำเหลือง 55
ตารางที่ 6	ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ 55
ตารางที่ 7	ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ 56
ตารางที่ 8	ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันด้วยเซลล์ HCT116 57
ตารางที่ 9	ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันด้วยเซลล์ SW620 57
ตารางที่ 10	ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันด้วยเซลล์ SW480 57
ตารางที่ 11	ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันด้วยเซลล์ HT29 57
ตารางที่ 12	ข้อมูลจำนวนโปรตีน <i>MMP9</i> ที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวในชิ้นเนื้อเยื่อที่กำลังขยาย 200 เท่า 58
ตารางที่ 13	ข้อมูลจำนวนโปรตีน <i>MMP9</i> ที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวในต่อมน้ำเหลืองที่กำลังขยาย 200 เท่า 58
ตารางที่ 14	ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน <i>MMP9</i> 58

ตารางที่ 15	ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน <i>MMP9</i>	58
ตารางที่ 16	ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน <i>PLOD1</i>	59
ตารางที่ 17	ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน <i>PLOD1</i>	59
ตารางที่ 18	ตารางแสดงลักษณะการวิเคราะห์ร่วมกันของข้อมูลยีนทั้งหมดระหว่าง Methylation microarray และ Expression microarray ที่มาจากการใช้โปรแกรม CU-DREAM	60
ตารางที่ 19	ข้อมูลการจัดกลุ่มยีนที่มีทั้งระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น	61



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1	ส่วนของลำไส้ใหญ่ที่สามารถเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้..... 5
รูปที่ 2	กลไกการเติมหมู่เมทิลที่เบส C ด้วยเอนไซม์ DNA methyltransferase 8
รูปที่ 3	กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด DNA methylation 9
รูปที่ 4	กลไกควบคุมการแสดงออกบริเวณ Intragenic ของยีนผ่านลำดับเบสของ LINE-1..... 10
รูปที่ 5	รูปแบบขนาดแบนจากการทำ COBRA LINE-1 11
รูปที่ 6	ขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอจากบริเวณที่ต้องการ 12
รูปที่ 7	ลักษณะของการย้อมสีโครงสร้างของเซลล์แบบ H&E staining..... 15
รูปที่ 8	แผนผังแสดงการย้อม Immunohistochemistry (IHC) แบบ Polyclonal 16
รูปที่ 9	ภาพจำลองลักษณะของการทำ Co-culture ระหว่างเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์เม็ดเลือดขาว..... 24
รูปที่ 10	เปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันเปรียบเทียบกันระหว่างเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการ Co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116, SW620, SW480 และ HT29 ตามลำดับ และกลุ่มทดสอบที่ผ่านการ Co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116, SW620, SW480 และ HT29 ตามลำดับ..... 34
รูปที่ 11	กลุ่มยีนของข้อมูลจาก Methylation microarray และ Expression microarray ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM และถูกจัดกลุ่มยีนแบบ Biological Process ด้วย Gene ontology (GO) 37
รูปที่ 12	นำกลุ่มยีนที่ได้จาก Methylation microarray และ Expression microarray มาวิเคราะห์ต่อยด้วย Tissue microarray โดยใช้ข้อมูลแอนติบอดีจาก The Human Protein Atlas 37
รูปที่ 13	ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อลำไส้ปกติที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า..... 39
รูปที่ 14	ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า 40

รูปที่ 15	ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อลำไส้ปกติที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า.....	40
รูปที่ 16	ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า	40
รูปที่ 17	ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N0 ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า.....	42
รูปที่ 18	ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N- ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า	42
รูปที่ 19	ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N+ ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า	43
รูปที่ 20	ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N0 ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า.....	43
รูปที่ 21	ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N- ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า	44
รูปที่ 22	ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N+ ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า	44
รูปที่ 23	กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลและกราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน <i>MMP9</i> ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบผ่านเทคนิค Real-time PCR	46
รูปที่ 24	กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลและกราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน <i>PLOD1</i> ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบผ่านเทคนิค Real-time PCR.....	46

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
NCBI	National Center for Biotechnology Information
CU-DREAM	Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays
CTC	Computed Tomographic Colonography
gFOBT	Guaiaac Fecal Occult Blood Test
FIT	Fecal Immunochemical Test
FS	Flexible Sigmoidoscopy
DNMT	DNA methyltransferase
TF	Transcription factor
TE	Transposable element
UTR	Untranslated region
COBRA	Combine bisulfite restriction analysis
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
H&E	Hematoxylin & Eosin
IHC	Immunohistochemistry
HRP	Horseradish peroxidase
DAB	Diaminobenzidine
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
rpm	Revolutions per minute
rcf	Relative Centrifugal Force
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
cDNA	Complementary DNA
GO	Gene ontology
ECM	Extracellular matrix

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rational)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้(1) ได้มีการนำเอาข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของเซลล์สโตรมา (stromal cell) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจากศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information หรือ NCBI) มาวิเคราะห์ร่วมกับยีนที่มีการแสดงออกของไลน์วัน (LINE-1) ผ่านโปรแกรมที่มีชื่อว่า CU-DREAM-Extension (Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays-extension) และผลที่ได้พบว่ายีนมัลวัน (*MUC-1*) เป็นยีนหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกบริเวณ LINE-1 สูงและนำไปสู่การทดสอบด้วยอิมมูโนพยาธิวิทยาที่บริเวณต่อมน้ำเหลือง (lymph node) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ในพลาสมาเซลล์ (plasma cell) สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งใน ระยะแพร่กระจาย (metastasis marker) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ นอกจากนี้ยังทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 ของต่อมน้ำเหลืองและเซลล์รอบๆ (surrounding cell) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่สถานะแพร่กระจายจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับ หมู่เมทิลบริเวณ LINE-1 เพิ่มสูงกว่าในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ยังไม่เข้าสู่สถานะแพร่กระจายหรือที่ เรียกว่า LINE-1 hypermethylation จึงนำไปสู่สมมติฐานที่ว่าเซลล์มะเร็งเต้านมสามารถหลั่งสารเคมี ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า สารพาราไครน์ ออกมาได้และสารนี้ยังไปเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ หมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 ของเซลล์สโตรมาของผู้ป่วยได้ ซึ่งผลที่ได้จะสอดคล้องกับผลการทดลอง การจำลองสถานะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์หรือที่เรียกว่า co-culture technique ซึ่งในที่นี้จะ เป็นการจำลองการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ปกติของเพศหญิงกับ เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติของเพศหญิงกับเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านม นั้นจะหลั่งสารพาราไครน์ออกมาและเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ปกติของเพศหญิง และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติของเพศหญิงให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 ได้ จากการศึกษาครั้งนั้นจึงนำมาสู่การศึกษาในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในครั้งนี้ เนื่องจากโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer หรือ colon cancer) คือโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย โดยโรคมะเร็งชนิดนี้มักพบได้บ่อยและพบได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง และจะพบในเพศชาย มากกว่าเพศหญิง(2) นอกจากนี้โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ยังเป็นโรคมะเร็งที่ทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงที่จะเสียชีวิตได้ สูงเป็นอันดับต้นๆของโลกอีกด้วย โดยส่วนใหญ่แล้วโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มักเกิดขึ้นในช่วงที่อายุ 50 ปี ขึ้นไปและจะมีความเสี่ยงเพิ่มมากขึ้นถ้าตรวจพบว่าคนในครอบครัวมีประวัติเป็นโรคร่วมด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะการใช้ชีวิต การใช้ยารักษาโรค การสูบบุหรี่และโรคอ้วน ก็เป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคได้อีกด้วย(3) ซึ่งในปัจจุบันนั้นได้มีการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่อยู่หลายวิธี เช่น การตรวจเลือดที่ปนมากับอุจจาระ (stool blood test) การตรวจโดยใช้เทคนิคการส่องกล้อง (colonoscopy) และการตรวจด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computed tomographic colonography หรือ CTC) เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เข้ามาใช้ร่วมกับการวินิจฉัยโรค พยากรณ์โรคหรือแม้กระทั่งนำเข้ามาใช้ร่วมกับการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่(4) โดยแต่ละวิธีนั้นจะมีความแม่นยำ ความจำเพาะ ความยากง่าย ความสะดวกและความรวดเร็วรวมทั้งราคาในการตรวจที่แตกต่างกันไป และการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับผลกระทบจากสารพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่นี้มีสมมติฐานที่ว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จะมีการปลดปล่อยสารเคมีพาราไครน์ออกมาซึ่งสารนี้สามารถเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ได้แก่ เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลและ/หรือการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ส่งผลให้สามารถนำการเปลี่ยนแปลงนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และจากความแตกต่างนั้นๆ จะสามารถนำไปสู่การค้นพบตัวบ่งชี้มะเร็งและพัฒนาการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยในขั้นตอนแรกจะเป็นการศึกษาผ่านการจำลองสถานะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ปกติกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ จากนั้นทำการขยายผลการศึกษการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลของทุกๆ ยีนทั่วทั้งจีโนมผ่านเทคนิค microarray เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับแหล่งข้อมูลอื่นๆ เพื่อให้ได้ยีนที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งร่วมในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไปได้ ซึ่งความคาดหวังจากผลของการศึกษาครั้งนี้คือสามารถพิสูจน์สมมติฐานการหลั่งสารพาราไครน์ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ โดยใช้เทคนิคการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetic) ที่สามารถตรวจผ่านเลือดของผู้ป่วยได้โดยตรง ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะมีความแม่นยำสูง สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็ว สามารถช่วยลดความเจ็บปวดที่ผู้ตรวจคัดกรองต้องพบเจอและยังสามารถลดค่าใช้จ่ายของผู้ที่ทำการตรวจคัดกรองได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการเฝ้าติดตามอาการของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในผู้ป่วยได้อีกด้วย

คำถามงานวิจัย (Research question)

การเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดจากการชักนำของสารพาราไครน์ที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้หรือไม่

สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

การเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถเกิดได้จากการชักนำของสารพาราไครน์ที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives)

1. เพื่อทำการพิสูจน์เบื้องต้นว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถหลั่งสารพาราไครน์และสารนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้
2. เพื่อทำการพิสูจน์ว่าสารพาราไครน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้
3. เพื่อนำแหล่งข้อมูลต่างๆ มาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อค้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งลำไส้ใหญ่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. สามารถนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับแหล่งข้อมูลอื่นๆ เพื่อใช้ในการค้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งลำไส้ใหญ่
2. สามารถนำผลของงานวิจัยในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ในอนาคต

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

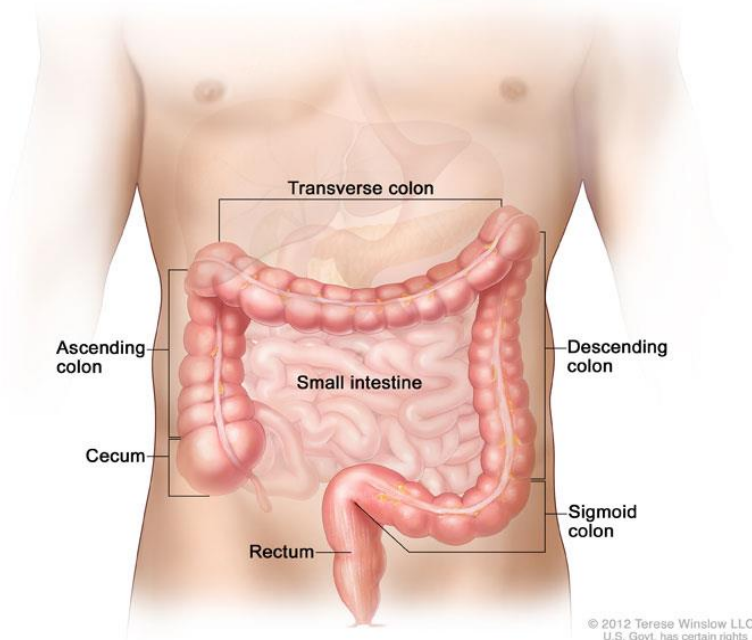
จากการศึกษาการเพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลบริเวณ LINE-1 บริเวณเนื้อเยื่อเซลล์สโตรมาในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม เพื่อพิสูจน์สมมติฐานเกี่ยวกับการหลังของสารพาราโครินจากเซลล์มะเร็งเต้านมและพบว่าสารพาราโครินสามารถทำให้ระดับหมู่เมทิลเพิ่มสูงขึ้นได้ที่บริเวณ LINE-1 หรือที่เรียกว่า LINE-1 hypermethylation และได้มีการทดสอบเพื่อเป็นการยืนยันทั้งแบบ *In Vitro* และ *In Vivo* ว่าเซลล์มะเร็งเต้านมสามารถหลังสารพาราโครินออกมาได้ นอกจากนั้นจากการศึกษายังพบอีกว่าที่ยีน *MUC-1* ยังเป็นยีนหนึ่งที่มีการแสดงออกสูงใน plasma cell บริเวณต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่อยู่ในระยะแพร่กระจาย จึงนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่าเซลล์มะเร็งเต้านมสามารถส่งสัญญาณพาราโครินไปยังเซลล์สโตรมาและส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมได้ และยีน *MUC-1* ยังสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งระยะแพร่กระจายได้อีกด้วย(1) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาการเพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลบริเวณ LINE-1 บริเวณเนื้อเยื่อเซลล์สโตรมาในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางเพื่อค้นหาสารบ่งชี้มะเร็งในการการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคมะเร็งอื่นๆ ได้อีกด้วย จึงเป็นผลให้นำมาสู่งานวิจัยในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ครั้งนี้

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colorectal cancer หรือ Colon cancer)

ลำไส้ใหญ่ (colorectal หรือ colon) มีลักษณะเป็นกระพุ้งและเป็นปล้องๆ มีความยาวที่สั้นกว่าลำไส้เล็ก โดยที่จะมีความยาวประมาณ 150 เซนติเมตร ลำไส้ใหญ่จะทำหน้าที่ขับของเสียออกจากร่างกายและที่บริเวณผนังภายในของลำไส้ใหญ่จะสามารถผลิตสารเมือกออกมาได้ นอกจากนี้ลำไส้ใหญ่ยังสามารถดูดซึมสารจำพวกของเหลวหรือเกลือที่เหลืกลับเข้าสู่ร่างกายได้อีกด้วย ซึ่งลำไส้ใหญ่จะแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ได้ดังนี้ รูปที่ 1

- กระเพาะลำไส้ใหญ่ หรือ ซีกัม (caecum) เป็นส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนแรกที่อยู่ติดกับลำไส้เล็ก และจะถูกปิดกั้นด้วยส่วนที่เรียกว่า วาล์ว ileocecal ซึ่งสามารถป้องกันการไหลย้อนของของเสียที่อยู่บริเวณของลำไส้ใหญ่ได้
- ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (ascending colon) เป็นส่วนลำไส้ใหญ่ที่อยู่ทางด้านขวาของช่องท้อง
- ลำไส้ใหญ่ส่วนขวาง (transverse colon) เป็นส่วนที่ผ่านจากลำไส้ใหญ่ด้านขวาไปยังด้านซ้าย
- ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (descending colon) เป็นส่วนของลำไส้ใหญ่ที่อยู่ทางด้านซ้ายของช่องท้อง
- ลำไส้ใหญ่คด (sigmoid colon) เป็นส่วนของลำไส้ใหญ่บริเวณท้องน้อย ซึ่งมีลักษณะการขดตัวเป็นรูปตัวเอส (S)

- ลำไส้ตรง (rectum) เป็นส่วนที่ต่อจากลำไส้ใหญ่ส่วนคดและเป็นส่วนสุดท้ายของลำไส้ใหญ่ที่ต่อกับทวารหนัก (anus) หากของเสียยังไม่ถูกขับออกจากร่างกายก็จะสะสมอยู่ที่ส่วนของลำไส้ตรง (5, 6)



รูปที่ 1 ส่วนของลำไส้ใหญ่ที่สามารถเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ ได้แก่ caecum, ascending colon, transverse colon, descending colon, sigmoid colon และ rectum(7)

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ คือโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก โดยโรคมะเร็งชนิดนี้มักพบได้บ่อยและถูกจัดอยู่ในโรคมะเร็งที่มีผู้ป่วยมากที่สุด 5 อันดับแรกในโลก ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งต่อมลูกหมาก และโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ยังเป็นโรคมะเร็งที่ทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงที่จะเสียชีวิตได้สูงเป็นอันดับต้นๆ ของโลกอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ยังเป็น โรคมะเร็งที่พบมาก 5 อันดับแรกทั้งในเพศชายและเพศหญิง(8) แต่อัตราการเป็นโรคมะเร็งพบได้สูงในเพศชายมากกว่าเพศหญิงทั้งในประเทศไทย(2) และทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศไทยนั้นพบว่าในเพศชายจะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มากกว่าในเพศหญิงอยู่ประมาณ 1.4 เท่า(9) โดยส่วนใหญ่แล้วโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มักเกิดขึ้นในช่วงที่อายุ 50 ปีขึ้นไปและจะมีความเสี่ยงเพิ่มมากขึ้นถ้าตรวจพบว่าคนในครอบครัวมีประวัติเป็นโรคร่วมด้วย และลักษณะการใช้ชีวิต การใช้อาหารรักษาโรค การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์และโรคอ้วน ก็ยังเป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคได้อีกด้วย(3)

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถแบ่งเป็นระยะตั้งแต่ระยะ 0 ถึง 4 ตามการเจริญเติบโตของเนื้อมะเร็งจากผนังลำไส้ใหญ่ไปยังต่อมน้ำเหลือง และอวัยวะอื่นๆ โดยแบ่งเป็น

ในระยะ 0 นี้เซลล์ที่ผิดปกติจะพบเฉพาะบริเวณชั้นผิวเยื่อบุด้านในของลำไส้ใหญ่เท่านั้น ซึ่งหากปล่อยทิ้งไว้ก็จะมีอาการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ในระยะถัดไป ซึ่งระยะ 0 นี้เรียกอีกอย่างว่า มะเร็งระยะต้น (carcinoma in situ)

ในระยะ 1 นี้เซลล์มะเร็งจะมีการลุกลามจากเนื้อเยื่อชั้นในสุดของผนังลำไส้ใหญ่ ไปยังเนื้อเยื่อในชั้นกลางหรือบริเวณชั้นกล้ามเนื้อ ซึ่งระยะ 1 หรือ stage I หรือเรียกอีกอย่างว่า “Dukes’ A colon cancer”

ในระยะที่ 2 นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น ระยะ 2A, 2B และ 2C หรือ stage IIA, stage IIB และ stage IIC บางครั้งอาจเรียกว่า “Dukes’ B colon cancer”

- ระยะ 2A: เซลล์มะเร็งมีการลุกลามผ่านเนื้อเยื่อชั้นกลางไปยังชั้นด้านนอกของผนังลำไส้ใหญ่ หรือไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้ลำไส้ใหญ่ และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

- ระยะ 2B: เซลล์มะเร็งมีการลุกลามทะลุไปยังเนื้อเยื่อชั้นด้านนอกของผนังลำไส้ใหญ่ แต่ยังไม่ลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงลำไส้ใหญ่

- ระยะ 2C: เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงลำไส้ใหญ่ และ/หรือ ไปยังเยื่อในช่องท้อง

ในระยะที่ 3 นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น ระยะ 3A, 3B และ 3C หรือ Stage IIIA, stage IIIB และ stage IIIC หรืออาจเรียกว่า “Dukes’ C colon cancer”

- ระยะ 3A: เซลล์มะเร็งมีการลุกลามจากเนื้อเยื่อชั้นในสุดของผนังลำไส้ใหญ่ ไปยังเนื้อเยื่อในชั้นกลางร่วมกับการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงไม่เกิน 3 ต่อมน

- ระยะ 3B: เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงไม่เกิน 3 ต่อมนร่วมกับการลุกลามผ่านเนื้อเยื่อชั้นกลางของผนังลำไส้ใหญ่ หรือมีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้ลำไส้ใหญ่และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย หรือมีการลุกลามไปยังอวัยวะใกล้ลำไส้ใหญ่ และ/หรือ ไปยังเยื่อในช่องท้อง

- ระยะ 3C: เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงตั้งแต่ 4 ต่อมนขึ้นไปร่วมกับการลุกลามผ่านเนื้อเยื่อชั้นกลางของผนังลำไส้ใหญ่ หรือมีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้ลำไส้ใหญ่และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย หรือมีการลุกลามไปยังอวัยวะใกล้ลำไส้ใหญ่ และ/หรือ ไปยังเยื่อในช่องท้อง

ในระยะที่ 4 หรือ stage IV คือเซลล์มะเร็งจะมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียงและมีการกระจายไปยังอวัยวะอื่นที่อยู่ห่างไกลออกไป เช่น ตับหรือปอด ในระยะนี้บางครั้งอาจเรียกว่า “Dukes’ D colon cancer” (10-12)

การตรวจคัดกรองโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มีอยู่หลายวิธีและแตกต่างกันไปทั้งในเรื่องของราคา และลักษณะการตรวจ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจหรือวินิจฉัยได้ตั้งแต่ระยะต้นโดยวิธีต่างๆ ได้อีกด้วย ได้แก่

Guaiac Fecal Occult Blood Test (gFOBT) เป็นวิธีการตรวจเลือดจากอุจจาระ ที่ง่าย สะดวก และมีราคาไม่แพง เพราะในคนที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มักจะมีเลือดออกปนมากับอุจจาระด้วย แต่การตรวจประเภทนี้จะไม่จำเพาะกับเลือดของมนุษย์ ถ้าผลของการตรวจให้ผลบวกก็ต้องทำการตรวจโดยใช้การส่องกล้องตรวจลำไส้ใหญ่ (colonoscopy) ต่อไป จึงถือว่าการตรวจด้วยวิธีนี้เป็น การตรวจแบบเบื้องต้น

Fecal Immunochemical Test (FIT) เป็นการตรวจเลือดจากอุจจาระที่จำเพาะกับเลือดของมนุษย์โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของมนุษย์ และถ้าผลของการตรวจให้ผลบวกก็ต้องทำการตรวจโดยใช้ colonoscopy ต่อไปเช่นเดียวกับการตรวจด้วย gFOBT

Flexible Sigmoidoscopy (FS) เป็นการตรวจโดยใช้กล้องส่องเฉพาะในลำไส้ใหญ่ส่วน sigmoid และ rectum ซึ่งกล้องที่ใช้จะเป็นกล้องขนาดเล็ก บาง ยืดหยุ่นได้และเมื่อพบสิ่งผิดปกติก็สามารถตัดชิ้นเนื้อมาทำการตรวจได้เลย นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธีนี้ยังสามารถเตรียมตัวและทำได้ง่ายกว่าการส่องกล้องแบบ colonoscopy

Colonoscopy เป็นการตรวจลำไส้ใหญ่ทั้งหมดโดยใช้กล้องส่องลำไส้ใหญ่ สามารถตรวจพบติ่งเนื้อและเซลล์มะเร็งได้ และยังสามารถตัดชิ้นเนื้อและติ่งเนื้อออกมาทำการตรวจได้เลย จึงถือว่าการตรวจแบบนี้สามารถทำให้การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ตั้งแต่ระยะต้นได้ แต่เนื่องจากการส่องกล้องแบบนี้มีวิธีการเตรียมตัวรวมถึงวิธีการทำที่ยุ่งยาก ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญสูงในการส่องกล้อง เพราะการส่องกล้องแบบนี้อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่ออวัยวะและมีความเสี่ยงสูงที่ลำไส้ใหญ่จะได้รับอันตรายมากกว่าวิธีอื่น

Fecal DNA เป็นการตรวจดีเอ็นเอจากเลือดที่ปนมากับอุจจาระของผู้ป่วย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงมาก แต่อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีนี้ก็ยังไม่ใช่วิธีหลักของการตรวจโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และการตรวจด้วยวิธีนี้ยังคงต้องมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นต่อไป

Computed Tomographic Colonography (CTC) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับลำไส้ใหญ่ด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ชนิดที่มีหัววัดรังสีหลายชิ้น โดยการใส่ลมหรือฟองแก๊สผ่านลำไส้ใหญ่ทางทวารหนักร่วมกับการฉายรังสีเอกซ์ แล้วใช้ระบบปฏิบัติการของเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีประสิทธิภาพและความเร็วสูงในการประมวลผลและสร้างภาพออกมา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเป็นภาพ 3 มิติซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่มีการสร้างภาพเสมือนจริงของลำไส้ใหญ่ขึ้นมา สามารถให้ภาพที่มีลักษณะคล้ายกับภาพที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีการส่องกล้อง แต่วิธีนี้จะไม่สามารถทำการตัดชิ้นเนื้อและติ่งเนื้อออกมาทำการตรวจได้(3) นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เข้ามาใช้ร่วมกับการวินิจฉัยโรค พยากรณ์โรคหรือแม้แต่กระทั่งนำเข้ามาใช้ร่วมกับการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่(4) โดยแต่ละวิธีนั้นจะมีความแม่นยำ ความจำเพาะ ความยากง่าย ความสะดวกและความรวดเร็วรวมทั้งราคาในการตรวจที่แตกต่างกันไป

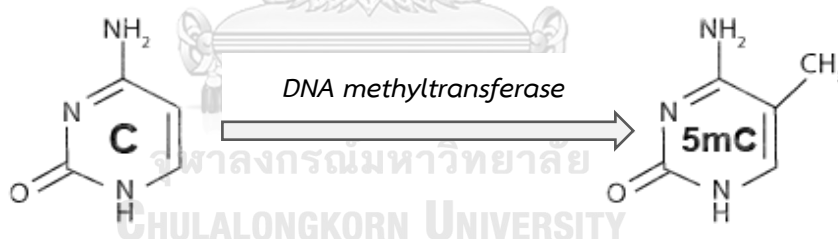
การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นขึ้นอยู่กับระยะของโรคและตำแหน่งของลำไส้ใหญ่ที่ผู้ป่วยเป็น ได้แก่ การผ่าตัด, การฉายรังสี, เคมีบำบัด, การให้ยารักษาตรงเป้าและการรักษาแบบอาศัยภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย เป็นต้น ซึ่งการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกเหมาะสำหรับผู้ป่วยระยะแรก (ระยะที่ 0-3) และรักษาเสริมด้วยการใช้เคมีบำบัดในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะที่ 3 และระยะที่ 2 บางรายเพื่อป้องกันการกลับมาของโรค เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่แม้จะได้รับการผ่าตัดก้อนมะเร็งออกทั้งหมดแต่มีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำอีกสูง และรักษาด้วยเคมีบำบัดสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายหรือระยะที่ 4 ที่มีร่างกายแข็งแรงพอ ซึ่งอาจสามารถทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น แต่รักษาผู้ป่วยในระยะที่ 4 จะเป็นการรักษาแบบประคับประคองอาการของโรค เช่น รักษาด้วยการฉายรังสีและการให้ยา เพื่อควบคุมอาการปวดและบรรเทาอาการอื่นๆ โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นถือว่าเป็นโรคที่มีความรุนแรงแต่ก็มีโอกาสรักษาให้หายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะของโรคและสุขภาพโดยรวม

ของผู้ป่วยเป็นสำคัญ(3, 11) และหากตรวจพบโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้เร็วตั้งแต่ในระยะแรกๆ จะเป็นการเพิ่มโอกาสให้ผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตและหายจากโรคได้

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการเกิดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั่วโลก ถึงแม้จะมีวิวัฒนาการการรักษาหรือการตรวจคัดกรองที่ดีขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน แต่อัตราการเป็นโรครก็ยังไม่ลดลงมากเท่าที่ควร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทำการศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาต่อไปไม่ว่าจะเป็นในด้านของวิธีการตรวจคัดกรอง วิธีการรักษา รวมถึงการให้ความรู้เกี่ยวกับโรคนี้อีกเพิ่มขึ้น เพื่อที่จะป้องกันและลดอัตราการเป็นโรครวมไปถึงลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นี้ด้วย

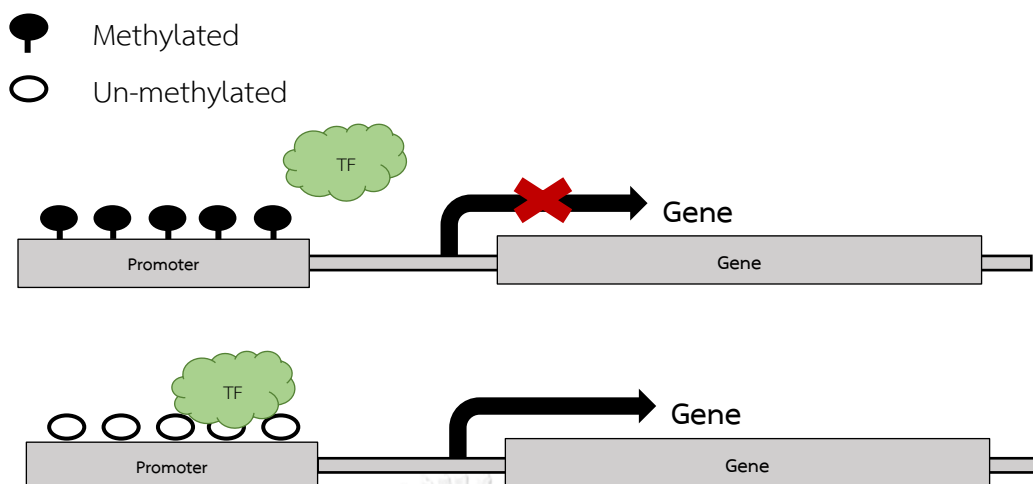
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

เอพิเจเนติก (epigenetic) คือการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสดีเอ็นเอ ซึ่ง DNA methylation ถือว่าเป็นกระบวนการทาง epigenetic ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากที่สุดในปัจจุบันและมีความเกี่ยวข้องกับกลไกต่างๆ ในร่างกาย เช่น การแสดงออกของยีน การเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์ การปรับตัวทางพันธุกรรม รักษาสมดุลการแสดงออกของยีน และควบคุมความเสถียรของรหัสพันธุกรรม เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการทาง epigenetic ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญและเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคมะเร็งอีกด้วย(13) ซึ่ง DNA methylation คือการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอของเบสไซโทซีน (cytosine, C) ตำแหน่งที่ 5 หรือที่เรียกว่า 5-methylcytosine(5mC) สามารถเกิดได้จากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) family รูปที่ 2



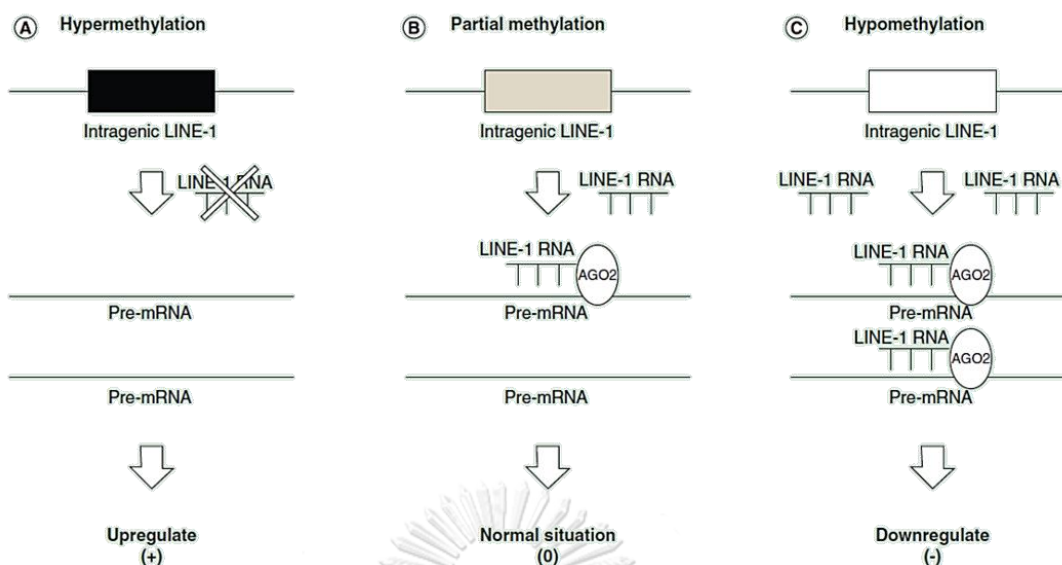
รูปที่ 2 กลไกการเติมหมู่เมทิลที่เบส C ด้วยเอนไซม์ DNA methyltransferase เกิดเป็น 5mC

โดยเฉพาะบริเวณที่เรียกว่า CpG island เป็นบริเวณที่มีพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ต่ออยู่ระหว่างเบส C และเบส G (guanine) ซึ่งพบได้ตลอดทั้งยีน โดยการแสดงออกของยีนจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ CpG หรือตำแหน่งของการเกิด DNA methylation ของยีนด้วย แต่ส่วนมากมักพบอยู่ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน การเกิด 5-methylcytosine จะเข้าไยับยั้งการถอดรหัสของสายดีเอ็นเอ (transcription) ของยีนด้วยการป้องกันการจับของ transcription factor หรือควบคุมผ่านทาง chromatin environment ให้อยู่ในรูปของ heterochromatin เพราะฉะนั้นบริเวณนี้จึงเป็นบริเวณหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีน (14) รูปที่ 3



รูปที่ 3 กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด DNA methylation ที่ CpG island บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เมื่อบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนถูกเติมหมู่เมทิลจะส่งผลให้ยีนไม่มีการแสดงออกและเมื่อบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนไม่ถูกเติมหมู่เมทิลจะส่งผลให้ยีนมีการแสดงออก

โดยทั่วไปแล้วในเซลล์มะเร็งจะมีการแสดงออกระดับการเติมหมู่เมทิลได้อยู่ 2 แบบที่บริเวณ CpG island ได้แก่แบบที่มีการเติมหมู่เมทิลต่ำ (hypomethylation) ซึ่งจะพบได้ตลอดทั้งยีน และแบบที่มีการเติมหมู่เมทิลสูง (hypermethylation) ซึ่งจะพบได้ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลก็จะส่งผลต่อความเสถียรของยีนและสามารถนำไปสู่การพัฒนาและส่งผลให้เกิดการพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้(15) ซึ่งหนึ่งในตัวแปรของการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลที่สำคัญก็คือไลน์วัน (LINE-1) หรือ long interspersed nuclear element-1 เพราะในจีโนมของมนุษย์ประมาณ 45% ของลำดับเบสของดีเอ็นเอจะประกอบด้วยกลุ่มของ transposable element (TE หรือ transposon) ซึ่งเป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สามารถย้ายตำแหน่งหรือแทรกไปที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งในจีโนมได้และเข้ามามีบทบาทอย่างมากเกี่ยวกับเรื่องของการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต(16) ดังนั้น LINE-1 จึงถือเป็นหนึ่งใน transposable element และมีลักษณะของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กันและพบได้หลายชุดและกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม โดย LINE-1 จะพบได้ประมาณ 17% ของลำดับเบสดีเอ็นเอในจีโนมของมนุษย์และสามารถผลิตโปรตีนได้ด้วยตัวเอง ซึ่งโปรตีนส่วนหนึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการและแทรกส่วนดีเอ็นเอของตัวเองได้(17) โดยส่วนมากพบว่า LINE-1 จะอยู่ที่บริเวณ 5'-untranslated region (UTR) ของยีนมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบได้ที่บริเวณ open-reading frames ที่ 1, 2 และบริเวณ 3'-UTR (18) รวมไปถึงบริเวณส่วนกลางของยีนที่เรียกว่า intragenic โดยในปัจจุบันพบว่ามียีนที่มีลำดับเบสของ LINE-1 มากกว่า 2,000 เส้นที่พบบริเวณ intragenic ของยีนมากกว่า 1,000 ยีน(19) ซึ่งบริเวณดังกล่าวถือว่าเป็นบริเวณที่สำคัญและสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้ โดยเฉพาะยีนที่อยู่ในกลุ่มของ oncogene และ tumor suppressor gene ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งต่างๆ อีกด้วย รูปที่ 4



รูปที่ 4 กลไกควบคุมการแสดงออกบริเวณ intragenic ของยีนผ่านลำดับเบสของ LINE-1 โดยที่ LINE-1 จะสามารถคัดลอกลำดับเบสของตัวเองได้เป็น LINE-1 RNA และจะมีโปรตีน AGO2 มาจับกับสาย LINE-1 RNA กับเข้าคู่กับสาย Pre-mRNA เพื่อนำไปสู่กระบวนการย่อยสลายสายอาร์เอ็นเอเพื่อไม่ให้เกิดการแสดงออกของยีน (A) มีระดับของหมู่เมทิลที่ intragenic LINE-1 สูง ทำให้ LINE-1 ไม่สามารถคัดลอกเกิดเป็นสาย LINE-1 RNA ได้ ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น (B) มีระดับของหมู่เมทิลที่ intragenic LINE-1 ไม่สูงมาก ทำให้ LINE-1 สามารถคัดลอกเกิดเป็นสาย LINE-1 RNA ได้ แต่จะไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (C) มีระดับของหมู่เมทิลที่ intragenic LINE-1 ต่ำ ทำให้ LINE-1 สามารถคัดลอกเกิดเป็นสาย LINE-1 RNA ได้ ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนลดลง(1)

COBRA (Combine bisulfite restriction analysis)

COBRA หรือ Combine bisulfite restriction analysis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดปริมาณความเข้มข้นหรือวัดระดับของ DNA methylation ที่ตำแหน่งที่จำเพาะในจีโนม เช่น LINE-1 (COBRA LINE-1) โดยวิธีการจะแบ่งเป็น 4 กระบวนการหลัก ได้แก่

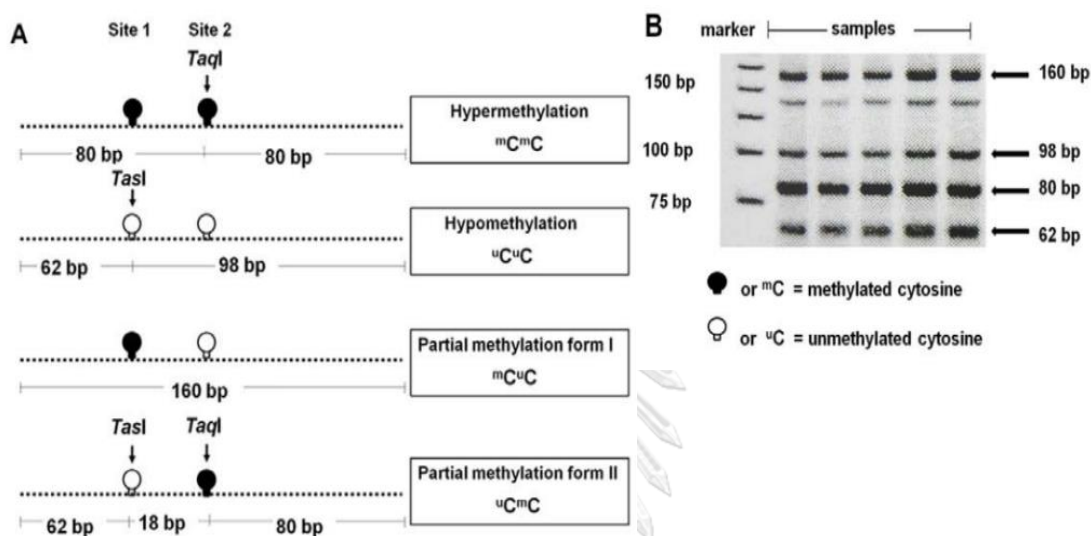
- Bisulfite treatment คือการเปลี่ยน unmethylated cytosine ให้เป็น uracil ด้วยการใส่สารเคมี sodium bisulfite ขณะที่ 5-methylcytosine จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

- PCR amplification คือการเพิ่มจำนวนบริเวณหรือตำแหน่งที่ต้องการวิเคราะห์จากสายจีโนมที่ผ่านการทำ bisulfite treatment แล้ว เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบต่อไป

- Restriction digest คือขั้นตอนที่ตัดสายดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแล้ว ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น ในกรณี COBRA LINE-1 จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ชื่อว่า *TaqI* กับ *TasI* เพื่อให้สามารถแยกรูปแบบของ non-CpG methylation และ CpG methylation ได้

- Quantification คือขั้นตอนของการตรวจวัดปริมาณผลจาก 3 ขั้นตอนก่อนหน้าหรือเป็นขั้นตอนสำหรับแยกรูปแบบของการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกขนาดแบนด์ที่ตัดได้ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารด้วยประจุไฟฟ้าโดยที่สารนั้นจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกัน และในกรณีนี้เป็นการแยกแบนด์ของดีเอ็นเอที่ขนาดต่างๆ ที่ได้จากการทดลองและจะทำการแยกแบนด์ดีเอ็นเอด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้สารฟอลิอะคริลลาไมค์หรือที่เรียกว่า

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) เนื่องจากสารพอลิอะคริลาไมด์เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ที่ใช้ในการเตรียมเจลแล้วจะทำให้เจลมีรูพรุนที่ละเอียดและขนาดเล็กจึงสามารถใช้แยกสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กออกจากกันได้(20, 21) และในที่นี้จะใช้ PAGE แยกขนาดและจำนวนแบนด์เอ็นเอที่ได้เพื่อนำไปวัดปริมาณหรือความเข้มข้นของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ methylation ต่อไป เช่น การคำนวณเปอร์เซ็นต์ methylation จากการทำ COBRA LINE-1 จากแบนขนาด 160, 98, 80 และ 62 bp ดังรูปที่ 5 (22)

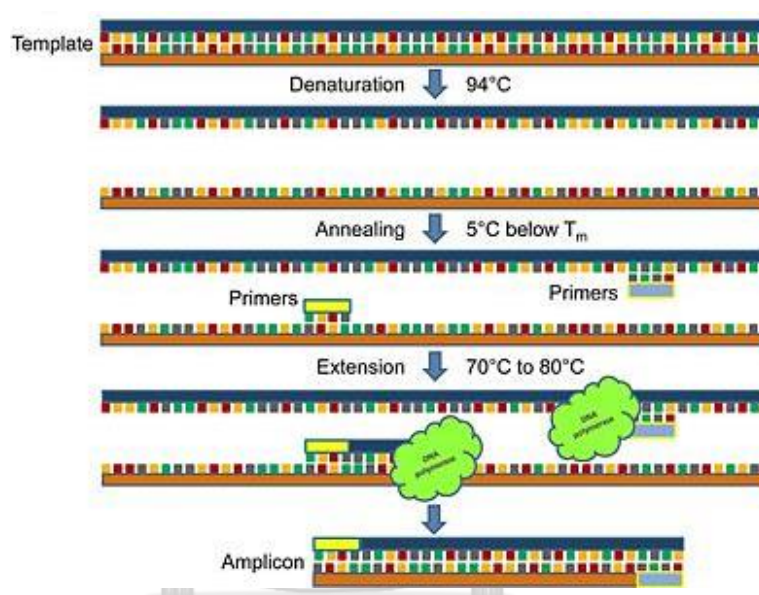


รูปที่ 5 รูปแบบขนาดแบนจากการทำ COBRA LINE-1 (A) รูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* และ *TasI* เพื่อให้เกิดแบนขนาด 160, 98, 80 และ 62 bp ซึ่งเอนไซม์ *TaqI* จะตัดสายดีเอ็นเอได้ในลักษณะ sticky end และเอนไซม์ *TasI* จะตัดสายดีเอ็นเอได้ในลักษณะ blunt end (B) ลักษณะของแบนที่เกิดขึ้นจริงจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* และ *TasI* เพื่อนำความเข้มข้นของแบนขนาด 160, 98, 80 และ 62 bp ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ methylation(22)

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มาจากสายดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ มีลำดับเบสเป็นสายคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบผ่านการทำงานของเอนไซม์ *DNA polymerase* และนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด (A T C และ G) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยที่ปฏิกิริยาทั้งหมดจะถูกละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาผ่านเครื่อง PCR machine หรือ thermal cycler ซึ่งเทคนิคนี้ถือว่าเป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจหรือสายดีเอ็นเอเป้าหมายในปริมาณหลายเท่าตัวในหลอดทดลองด้วยเวลารวดเร็วและเป็นการจำลองมาจากกระบวนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอนดังนี้(23, 24) รูปที่ 6

- Denaturing เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ ด้วยช่วงอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส
 - Annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอสายต้นแบบ
 - Extension เป็นขั้นตอนของการทำงานของเอนไซม์ *DNA polymerase* เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่หรือเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดที่ช่วงอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส
- หลังจากถึงขั้นตอนสุดท้ายจะได้เป็นสายดีเอ็นเอใหม่เกิดขึ้นและกระบวนการปฏิกิริยาทั้งหมด จะเริ่มขึ้นใหม่อีกครั้งหนึ่งต่อกันหลายๆ รอบเพื่อให้ได้ปริมาณของสายดีเอ็นเอสายใหม่ตามขนาดที่ต้องการ(25)



รูปที่ 6 ขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอจากบริเวณที่ต้องการ มีหลักๆ ทั้งหมด 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบคลายเกลียว, ขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ และขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายใหม่(24)

โดยในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR หรือ qPCR) มาร่วมในการทดลองด้วย ซึ่งเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ยังคงอาศัยพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่เทคนิคทั้งสองจะมีความแตกต่างกันที่เทคนิคพีซีอาร์ปกติจะตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อให้เห็นแบนดีเอ็นเอแสดงออกมาให้รูปของภาพเสมือนจริงได้ แต่เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์จะอาศัยการติดตามด้วยสารเรืองแสง และใช้สารเรืองแสงนั้นๆ เป็นตัววัดปริมาณของสายดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการทำปฏิกิริยา โดยที่สายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่นั้นจะถูกติดตามเรืองแสงและเมื่อถูกตรวจสอบด้วยแสงเลเซอร์จะถูกวัดปริมาณ รวมถึงวิเคราะห์และแสดงผลออกมาเป็นค่าทางสถิติได้เลย นอกจากนี้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ยังถูกพัฒนาให้สามารถทำการตรวจสอบได้แม้ว่าจะมีจำนวนของดีเอ็นเอต้นแบบน้อยมาก ซึ่งเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์จะมีลักษณะการตรวจสอบหรือวัดปริมาณของสาร

เรืองสารอยู่ 2 แบบ ได้แก่ การใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือที่เรียกว่า non-specific fluorescent dyes จะอาศัยหลักการการแทรกตัวของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สายดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ถือเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบหรือเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอใหม่ได้แม้จะมีสายดีเอ็นเอต้นแบบน้อยมาก อีกทั้งยังมีความจำเพาะ แม่นยำ และแสดงผลออกมาได้รวดเร็วกว่าเทคนิคเทคนิคพีซีอาร์ปกติ(26, 27)

CU-DREAM program

CU-DREAM หรือ Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศที่สามารถใช้ประเมินความสัมพันธ์และสามารถใช้เปรียบเทียบข้อมูลจาก microarray ของแต่ละชุดข้อมูลได้ โดยทั่วไปแล้วมักจะใช้ประเมินความสัมพันธ์กันของข้อมูล expression microarray แต่ก็ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับข้อมูลของ DNA methylation microarray ได้อีกด้วย โดยที่โปรแกรมนี้ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางจีโนมเพราะ microarray นั้นคือเทคโนโลยีขั้นสูงที่อาศัยหลักการของไฮบริไดเซชัน (hybridization) เข้ามาเกี่ยวข้องและสามารถใช้ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการต่างๆได้ เช่น ศึกษาสายดีเอ็นเอทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต ศึกษาการแสดงออกของยีนหรือสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของยีนได้ เป็นต้น(28) ซึ่งเทคโนโลยีนี้จะเป็นการนำเอาโมเลกุลของดีเอ็นเอมาหยอดเรียงกันอยู่บนแผ่นแก้วบางๆ โดยแต่ละชนิดของโมเลกุลจะมีตำแหน่งที่แน่นอน ดังนั้นในแผ่นแก้วบางแผ่นเดียวสามารถบรรจุโมเลกุลของดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวแทนของยีนนับพันได้ในพื้นที่จำกัด จากนั้นเมื่อนำสายอาร์เอ็นเอที่เป็นบริเวณที่สนใจมาติดฉลากด้วยสีและนำมาจับกับแผ่นแก้วและทำการตรวจพร้อมวิเคราะห์ผลจากสีที่ปรากฏขึ้น ลักษณะการวิเคราะห์ข้อมูล microarray สองชุดข้อมูลด้วยโปรแกรม CU-DREAM จะแสดงออกมดังตารางที่ 1 โดยที่ช่อง a จะแสดงจำนวนยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกทั้งสองชุดข้อมูล ช่อง b จะแสดงจำนวนยีนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกชุดที่ 1 แต่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกชุดที่ 2 ช่อง c จะแสดงจำนวนยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกชุดที่ 1 แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกชุดที่ 2 และช่อง d จะแสดงจำนวนยีนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกทั้งสองชุดข้อมูล

ตารางที่ 1 ตารางแสดงลักษณะการวิเคราะห์ร่วมกันของข้อมูล microarray ที่มาจากการใช้โปรแกรม CU-DREAM

	Up- or Down-regulated genes of microarray1	Not up- or down-regulated genes of microarray1
Up- or Down-regulated genes of microarray2	Number of genes in the 1 st group (a)	Number of genes in the 2 nd group (b)
Not up- or down-regulated genes of microarray2	Number of genes in the 3 rd group (c)	Number of genes in the 4 th group (d)

* มีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05, 0.01 และ 0.001

นอกจากนี้แล้วยังมีโปรแกรมพิเศษที่ถูกพัฒนามาจากโปรแกรม CU-DREAM ที่ชื่อว่า CU-DREAM extension ซึ่งเป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศที่สามารถใช้ประเมินความสัมพันธ์เฉพาะยีน

ที่มาจากกลุ่มข้อมูลสองชุดได้ โดยทั่วไปแล้วมักใช้ประเมินความสัมพันธ์ของยีนกลุ่มที่หนึ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล microarray สองชุดด้วยโปรแกรม CU-DREAM แล้วนำข้อมูลจากกลุ่มที่หนึ่งมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม CU-DREAM extension กับข้อมูล microarray อีกชุดหนึ่งเพื่อให้ได้เฉพาะข้อมูลยีน หรืออีกรูปแบบหนึ่งคือการใช้ประเมินความสัมพันธ์ของยีนสองกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล microarray ด้วยโปรแกรม CU-DREAM แล้วนำข้อมูลยีนจากทั้งสองกลุ่มมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม CU-DREAM extension เพื่อให้ได้เฉพาะข้อมูลยีน(29) ทั้งโปรแกรม CU-DREAM และ CU-DREAM extension นั้น เมื่อผู้ใช้มีข้อมูลของ microarray แล้ว ผู้ใช้สามารถกำหนดการเปรียบเทียบข้อมูลจากแหล่งข้อมูลให้ออกมาเป็นระดับของการแสดงออกของยีนหรือระดับหมู่เมทิลที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ รวมทั้งยังสามารถกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ต้องการใช้ในการทดสอบได้ ซึ่งจะทำให้ง่ายและสะดวกต่อการแปลผลหรือการนำข้อมูลมาใช้วิเคราะห์ต่อในอนาคต

จุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

จุลพยาธิวิทยา หรือ Histopathology เป็นการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ผ่านตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัด (biopsy) และกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อบนสไลด์ หลังจากนั้นจะนำสไลด์ที่ได้ไปย้อมด้วยวิธีการหลากหลายรูปแบบให้เกิดสีในแบบต่างๆ เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างเซลล์และเนื้อเยื่อที่ปกติกับผิดปกติได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งในปัจจุบันจะพบว่าเทคนิคการตรวจแบบจุลพยาธิวิทยาเป็นเทคนิคการตรวจมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็ง เช่น สามารถตรวจลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อมะเร็งได้, สามารถตรวจชนิดของมะเร็งและใช้บอกระยะของมะเร็งได้ เป็นต้น(30) โดยในการศึกษาครั้งนี้จะเกี่ยวข้องกับการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ถือว่าเป็นการย้อมพื้นฐานทางจุลพยาธิวิทยาและการย้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดี (antibody) โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Immunohistochemistry ซึ่งเป็นการย้อมแบบพิเศษที่จะใช้แอนติบอดีเข้ามาช่วยในการย้อมกระบวนการในการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อประกอบด้วย

- Fixation หรือการคงสภาพของชิ้นเนื้อ ขั้นตอนนี้จะช่วยป้องกันการเสื่อมสลายและช่วยคงสภาพส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ของชิ้นเนื้อนั้นๆ ได้ด้วย สารที่ใช้ในการคงสภาพโดยทั่วไปคือฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กทำให้สามารถเข้าไปแทรกในเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว เมื่อฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยาเคมีกับเนื้อเยื่อจะทำให้เนื้อเยื่อเกาะกันและสามารถคงสภาพเนื้อเยื่อไว้ได้

- Dehydration หรือการดึงน้ำออก ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการคงสภาพแล้ว โดยทั่วไปแล้วมักใช้ เอทานอล (ethanol) ที่ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง จะทำให้น้ำค่อยๆ ออกจากเนื้อเยื่ออย่างมีประสิทธิภาพ

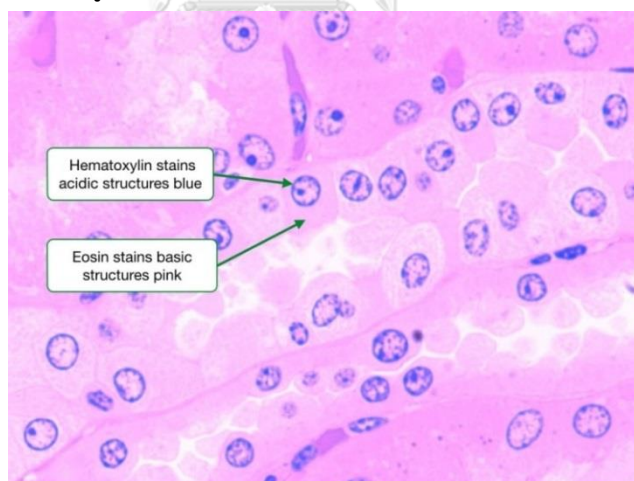
- Clearing หรือการดึงแอลกอฮอล์ออก ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการดึงเอาแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อด้วยสาร clearing โดยทั่วไปแล้วมักใช้สารไซลีน (xylene) เนื่องจากไซลีนมีคุณสมบัติเป็นไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อยมาและยังเป็นตัวทำละลายในไขมัน

- Infiltration หรือการแทนที่สาร clearing ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการแทรกซึมหรือการแทนที่สาร clearing ด้วยสารพาราฟิน (paraffin) ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีความแข็งมากขึ้น

- Embedding ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการนำเอาชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้เข้าแม่พิมพ์ ซึ่งแม่พิมพ์ที่ใช้ควรเลือกให้เหมาะสมกับการใช้งานหรือเพื่อให้ง่ายต่อการตัดเอาชิ้นเนื้อเยื่อไปใช้งานต่อ จากนั้นนำไปขึ้นรูปด้วยสารขึ้นรูป โดยทั่วไปมักใช้สาร paraffin wax ในการทำบล็อกหรือที่เรียกว่าบล็อกพาราฟิน (paraffin block) ซึ่งแม่พิมพ์ที่ใช้ควรเลือกให้เหมาะสมกับการใช้งานหรือเพื่อให้ง่ายต่อการตัดเอาชิ้นเนื้อเยื่อไปใช้งานต่อ

- Staining หรือการย้อม ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ ซึ่งก่อนจะทำการย้อมได้นั้นจะต้องกำจัดพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อก่อนด้วยการใช้ไซลีน จากนั้นทำการเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นจากสูงไปต่ำหรือที่เรียกว่า hydration

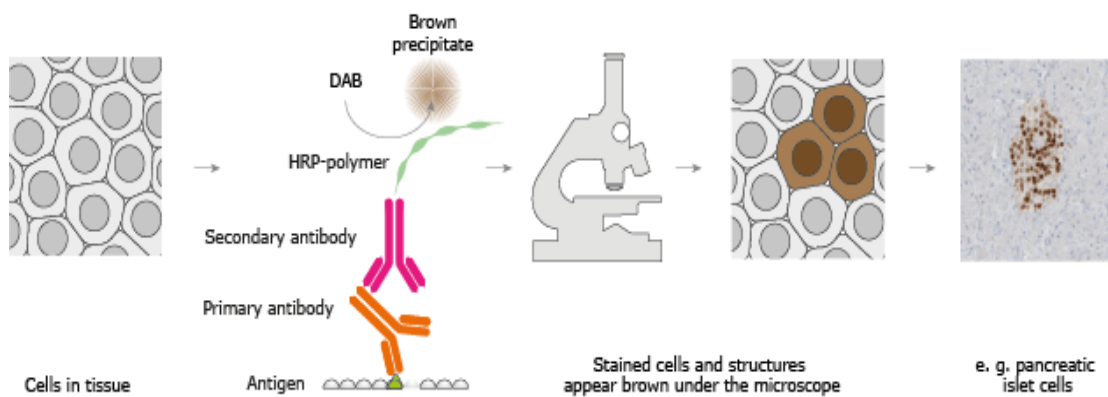
การย้อมชิ้นเนื้อเยื่อโดยใช้สี hematoxylin และ eosin หรือที่เรียกว่า H&E staining เพื่อใช้แยกองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ โดยที่สี hematoxylin จะแสดงออกเป็นเฉดสีน้ำเงิน ซึ่งจะย้อมติดส่วนประกอบของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดหรือจับกับโครงสร้างของเซลล์ที่เป็นประจุลบและจะย้อมติดในส่วนของนิวเคลียส (nucleus) เช่น nuclear chromatin, vesicular nuclei และ nuclear membrane แต่จะย้อมไม่ติดในส่วนของ nucleoplasm และสี eosin จะแสดงออกเป็นเฉดสีชมพูไปจนถึงเฉดสีแดง ซึ่งจะย้อมติดส่วนประกอบของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเบสหรือจับกับโครงสร้างโครงสร้างของเซลล์ที่เป็นประจุบวกและจะย้อมติดส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และส่วนของ connective tissue(31, 32) รูปที่ 7



รูปที่ 7 ลักษณะของการย้อมสีโครงสร้างของเซลล์แบบ H&E staining โดยที่สี Hematoxylin จะย้อมติดบริเวณโครงสร้างของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดซึ่งจะแสดงออกมาเป็นเฉดสีน้ำเงิน และสี Eosin จะย้อมติดบริเวณโครงสร้างของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเบสซึ่งแสดงออกมาเป็นเฉดสีชมพู(32)

การย้อมเนื้อเยื่อแบบพิเศษด้วยแอนติบอดี (antibody) ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Immunohistochemistry (IHC) ซึ่งเป็นเทคนิคการย้อมที่จำเพาะเจาะจงเพื่อใช้ในการค้นหาหรือตรวจวัดระดับโปรตีนที่สนใจได้โดยตรง โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์หรือที่เรียกว่า แอนติเจน (antigen) กับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะกัน IHC โดยทั่วไปจะมีลักษณะของการติดฉลากสีอยู่ 2 แบบ แบบแรกคือการติดฉลากสี

ไว้ที่แอนติบอดีจำเพาะเพียงตัวเดียว และเมื่อแอนติบอดีเข้าจับกับแอนติเจนภายในเซลล์จะทำให้เกิดสี เรียกลักษณะการติดฉลากสีแบบนี้ว่า monoclonal แต่การย้อมรูปแบบนี้จะไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเมื่อย้อมแล้วมักเกิดการติดสีบริเวณที่ไม่ต้องการและเกิดการย้อมติดสีบริเวณพื้นหลัง และแบบที่สองคือการใช้แอนติบอดีสองตัว โดยที่แอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) จะมีความจำเพาะกับแอนติเจนและจะเข้าจับกันภายในเซลล์ หลังจากนั้นจะมีแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) เข้าจับกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองจะถูกติดฉลากสีหรือเอนไซม์ไว้ เรียกลักษณะการติดฉลากสีแบบนี้ว่า polyclonal โดยทั่วไปจะนิยมใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) เมื่อเอนไซม์นี้ทำปฏิกิริยากับสาร diaminobenzidine (DAB) จะแสดงออกมาเป็นสีน้ำตาลอยู่บริเวณหรือตรงตำแหน่งของโปรตีนที่สนใจภายในเซลล์(33, 34) รูปที่ 8



รูปที่ 8 แผนผังแสดงการย้อม Immunohistochemistry (IHC) แบบ polyclonal โดยการนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการในการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์มาทำการย้อมครั้งแรกด้วย primary antibody เพื่อให้เข้าจับกับโปรตีนที่สนใจ จากนั้นทำการย้อมครั้งที่สองด้วย secondary antibody ที่ถูกติดฉลากด้วย HRP-polymer และทำให้เกิดสีได้ด้วยสาร DAB เมื่อนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการย้อม IHC ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วจะพบว่าโปรตีนที่สนใจแสดงออกเป็นสีน้ำตาล(33)

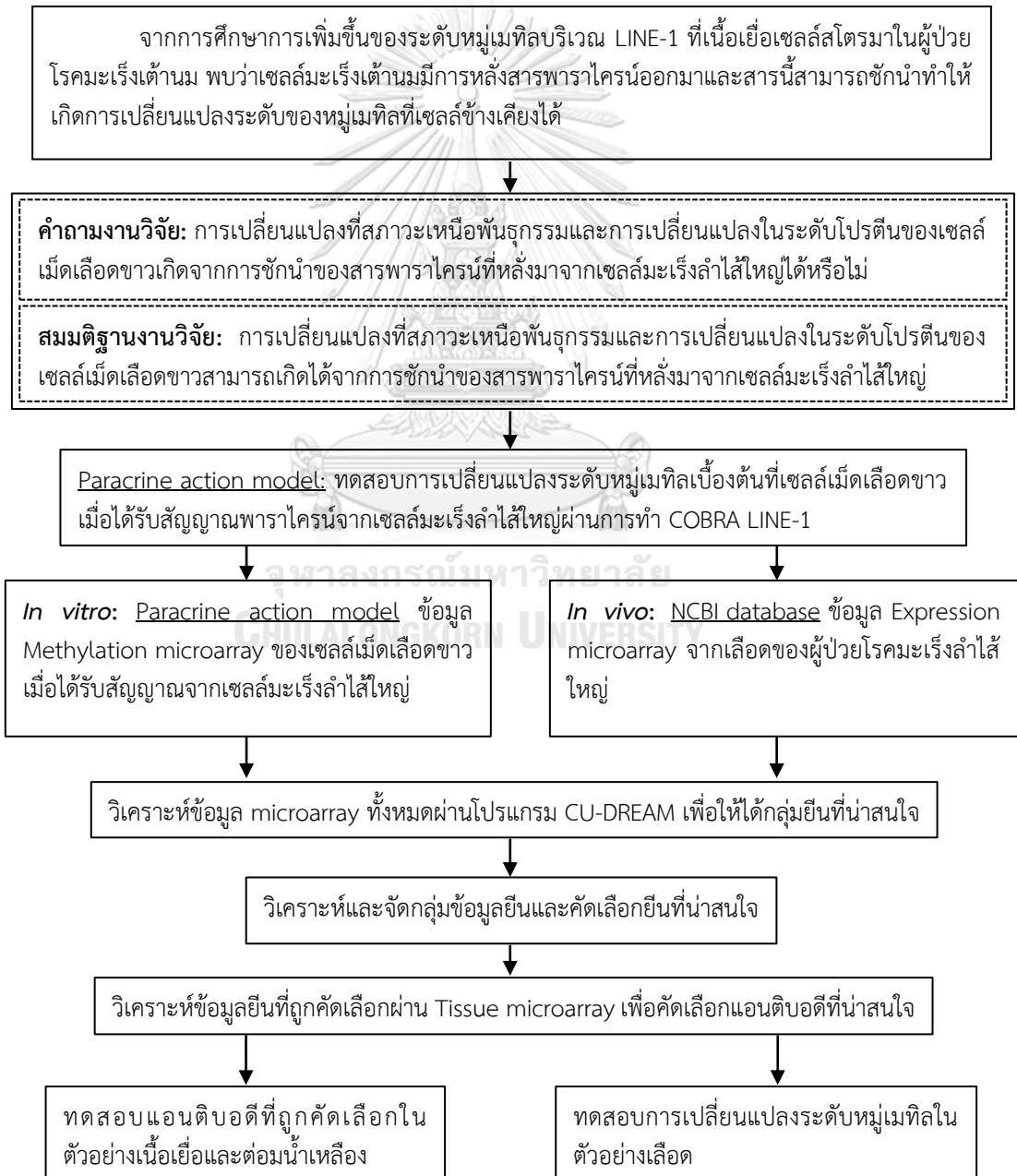
บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

งานวิจัยนี้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข IRB 326/60

กรอบความคิดงานวิจัย



รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงวิเคราะห์ (Analytical Research)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) ตู้ปลอดเชื้อ classI (S.K. Powerable, Thailand)
- 2) ตู้ปลอดเชื้อ classII (Biosafety cabinet classII) (Gelman science, Singapore)
- 3) ตู้ดูดควัน (S.K. Powerable, Thailand)
- 4) ตู้อบ (Mettler, Germany)
- 5) ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 5% CO₂ (Shel lab, USA)
- 6) ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Japan)
- 7) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ ต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
- 8) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ ต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
- 9) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ น้ำ (Mettler, Germany)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Biobase, China)
- 11) เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
- 12) เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
- 13) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Hirayama, Japan)
- 14) เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific, USA)
- 15) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Eppendorf, Germany)
- 16) เครื่องซังสารดีเจิตอล (Precisa, Switzerland)
- 17) เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
- 18) เครื่องรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bio-RAD, USA)
- 19) เครื่องถ่ายภาพเจล (Storm Scanner) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
- 20) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะเหมือนจริง (QuantStudio™ 6 Flex Real-time PCR machine) (Thermo Scientific, USA)
- 21) เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 10 ไมโครลิตร (Transferpette, Germany)
- 22) เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
- 23) เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Integra Biosciences, Switzerland)
- 24) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Hirayama, Japan)
- 25) เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Thermo Electron Corporation, USA)
- 26) เครื่องย้อมสีส่งตรวจทาง Immunohistochemistry (BenchMark XT) (Ventana, USA)
- 27) เครื่องสแกนสไลด์ (Leica, Germany)

28) กล้องจุลทรรศน์ phase contrast (Nikon, Japan)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (Sri Trang Gloves, Thailand)
- 2) ไมโครปิเปตทิปขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
- 3) หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
- 4) หลอดเซนตริฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- 5) แท่นวางหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ และ เซนตริฟิวก์ (Autopack, USA)
- 6) Cryovial tube (Corning, USA)
- 7) กล่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Cryobox) (Nalgene labware, USA)
- 8) กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Vitlab, Germany)
- 9) ปีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
- 10) ถาดเตรียมเจลพร้อมหวี (Bio-Rad, USA)
- 11) พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
- 12) กระจกสไลด์ (Marienfeld, Germany)
- 13) กระจกปิดสไลด์ (Thermo Scientific, Germany)
- 14) Vacuette® Blood Collection Tube 6 มิลลิลิตร (Santa Cruz, USA)
- 15) 24-well culture plate (Costar, USA)
- 16) Transwell® culture plate (Corning, USA)
- 17) ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- 18) สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) (Boeco, Germany)
- 19) แผ่นกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (Thermo Scientific, USA)
- 20) Real-Time PCR 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
- 2) Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA)
- 3) Tryphan blue (Gibco, USA)
- 4) Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)
- 5) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)
- 6) Anti-anti (100x) antibiotic-antimitotic (Gibco, USA)
- 7) TRIzol LS reagent (Invitrogen, California, USA)

- 8) Proteinase K (USB, USA)
- 9) Sodium Dodecyl Sulfate (Calbiochem, Japan)
- 10) Phenol (USB, USA)
- 11) Chloroform (Merck, Germany)
- 12) Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 13) Isopropanol (Merck, Germany)
- 14) น้ำกลั่น (Distilled water)
- 15) EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, USA)
- 16) Enzyme *TaqI* (2U) (New England Biolabs, Ontario, Canada)
- 17) Enzyme *TasI* (2U) (New England Biolabs, Ontario, Canada)
- 18) NEB buffer 3 (New England Biolabs, Ontario, Canada)
- 19) 10x BSA (New England Biolabs, Ontario, Canada)
- 20) Acrylamide (Bio-Rad, USA)
- 21) Tris (Affymetrix, USA)
- 22) Boric acid (Affymetrix, USA)
- 23) EDTA (Affymetrix, USA)
- 24) TEMED (Merck, Germany)
- 25) Ammonium Peroxodisulfate (Affymetrix, USA)
- 26) 10 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 27) 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 28) 6X bromophenol blue loading dye (Promega, USA)
- 29) SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
- 30) 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
- 31) 25mM Magnesium Chloride (Qiagen, Germany)
- 32) 10mM Deoxynucleotide Triphosphates (Promega, USA)
- 33) Oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)
- 34) Hot start *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Germany)
- 35) Oligo (dT)₁₈ primer (Qiagen, Germany)
- 36) 5x Reaction buffer (Qiagen, Germany)
- 37) 20 U/μl RiboLock RNase inhibitor (Qiagen, Germany)
- 38) 10 mM dNTP Mix (Qiagen, Germany)

- 39) 200 U/μl ReverstAid M-Mul VRT (Qiagen, Germany)
- 40) 2x Power SYBR buffer (Ward medic, Thailand)
- 41) Modifide Hematoxylin solution (C.V. Laboratories, Thailand)
- 42) Eosin solution (C.V. Laboratories, Thailand)
- 43) Xylene (Merck, Germany)
- 44) Mounting medium (Thermo Scientific, USA)
- 45) ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, USA)
- 46) Anti-MMP9 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich, USA)
- 47) Anti-PLOD1 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich, USA)

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) Storm865 Scanner control (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
- 2) ImageQuant TL 1D Gel Analysis software (GE Healthcare Life Sciences, USA)
- 3) ImageScope (Leica, Germany)
- 4) QuantStudio™ Real-Time PCR Software (Thermo Scientific, USA)
- 5) GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA)
- 6) IBM SPSS Statistics 22 (IBM, USA)
- 7) CU-DREAM program (Chulalongkorn University, Thailand)

ข้อมูลเทคโนโลยีไมโครแอรเรย์

- 1) Methylation microarray
 - Paracrine action model: MethylationEPIC BeadChip microarray (Illumina, USA)
- 2) Expression microarray
 - GSE10715: GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, USA)(35)
 - GSE11545: GPL2986 ABI Human Genome Survey Microarray Version 2 (Applied Biosystem, USA)(36)
- 3) Tissue microarray
 - HPA001238 Anti-MMP9 (Sigma-Aldrich, USA)
 - HPA055799 Anti-PLOD1 (Sigma-Aldrich, USA)

การคัดเลือกตัวอย่าง

การวิจัยนี้จะใช้ตัวอย่างอยู่ 2 ประเภท คือ ตัวอย่างทางพยาธิวิทยาและตัวอย่างเลือด ซึ่งตัวอย่างทางพยาธิวิทยา ได้แก่ ตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองในพาราฟินบล็อก และตัวอย่างเลือด ได้แก่ ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครปกติที่ไม่ใช่ผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

ตัวอย่างทางพยาธิวิทยา

การคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองในพาราฟินบล็อก จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาระบุไว้แล้วในตัวอย่างชิ้นเนื้อ และต่อมน้ำเหลืองประเภทต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย

1) normal tissue	5	ราย
2) colon cancer tissue	5	ราย
3) lymph node ระยะ 0	5	ราย
4) lymph node ระยะ -	5	ราย
5) lymph node ระยะ +	1	ราย

ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครปกติซึ่งเป็นผู้ที่มีร่างกายแข็งแรงผ่านเกณฑ์การบริจาคเลือดของสภากาชาดและไม่มีโรคประจำตัวใดๆที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน และตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นผู้ที่ไม่มีโรคประจำตัวใดๆที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้ในขั้นตอนของการทดสอบตัวบ่งชี้ที่ได้จากการทดลองในตัวอย่างจากเลือด โดยในการวิจัยครั้งนี้จะขออนุญาตใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากโครงการวิจัยเรื่อง “การสร้างเทคโนโลยีใหม่ที่ไวและจำเพาะในการตรวจกรองมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งปอดจากเลือด” เลขที่ IRB No. 034/59 ซึ่งจะมีขั้นตอนของการจัดเก็บตัวอย่างเลือดดังนี้

1. ผู้วิจัยขอเก็บตัวอย่างเลือด 6 - 10 มิลลิลิตร (1 - 2 ซ้อนชา) ในหลอดเก็บเลือดที่ผสมสาร EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด
2. ผู้วิจัยจะขอบันทึกหมายเลขประจำตัวในการบริจาคเลือดครั้งที่ทำการเก็บ
3. ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครปกติและตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เหลือจากงานวิจัยเลขที่ IRB No. 034/59 จะถูกนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งหากมีตัวอย่างเลือดเหลือจากงานวิจัย ตัวอย่างเหล่านั้นจะถูกจัดเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส โดยแยกเก็บในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกัน การปนเปื้อนจากตัวอย่างอื่นๆ โดยตัวอย่างเลือดที่เหลือทั้งหมดจะถูกจัดเก็บอยู่ที่ห้องปฏิบัติการ 713 ชั้น 7 อาคารแพทย์พัฒนา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหากต้องการใช้ตัวอย่างนี้เพื่อการศึกษาในขั้นตอนอื่นๆ หรือเพื่อการศึกษาในโครงการอื่นๆต่อไปในอนาคต ผู้วิจัยจะยื่นโครงการวิจัยให้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยพิจารณาให้การรับรองทุกครั้ง

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเลือด

1. กลุ่มของอาสาสมัครปกติ

ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครปกตินั้นจำเป็นต้องเป็นเลือดที่มาจากผู้ที่มีร่างกายแข็งแรงผ่านเกณฑ์การบริจาคเลือดของสภากาชาดและไม่มีโรคประจำตัวใดๆที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน

2. กลุ่มของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นจำเป็นต้องเป็นเลือดที่มาจากผู้ป่วยที่ไม่มีโรคประจำตัวใดๆที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน

การสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์

1. นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลาย Phosphate-Buffered Saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นผสมให้เข้ากันเบาๆ

2. ค่อยๆ หยดตัวอย่างสารละลายเลือดที่เจือจางแล้ว ลงในสารละลาย Ficoll-Paque ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm เป็นเวลา 15 นาที (BRAKE-OFF) เพื่อให้สารละลายเลือดเกิดการแยกชั้นตามความหนาแน่นด้วยวิธี Ficoll-Paque gradient

3. ดูดสารละลายสีขาวชั้นกลางซึ่งเป็นชั้นของ PBMC ใส่หลอดใหม่ขนาด 15 ml แล้วเติมสารละลาย PBS อัตราส่วน 1:1 กับสารละลาย PBMC ที่ดูดมาได้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายใสด้านบนทิ้ง

4. เขย่าตะกอน PBMC ให้ฟุ้งเพื่อให้ง่ายต่อกลางตะกอน จากนั้นล้างตะกอน PBMC ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 5-10 ml จากนั้นนำสารละลายปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายใสด้านบนทิ้ง

5. เขย่าตะกอน PBMC ให้ฟุ้งอีกครั้งแล้วนำไปเก็บรักษาเซลล์ด้วยสารละลาย cold freezing media (10% DMSO ใน 90% FBS) ในอัตราส่วน PBMC 10 ล้านเซลล์ต่อสารละลาย cold freezing media ปริมาตร 1 ml โดยค่อยๆ หยดสารละลาย cold freezing media ทีละหยดลงไปที่หลอดเพื่อให้ PBMC ค่อยๆ ปรับตัวกับสารละลายและเป็นการป้องกัน PBMC ตาย และสุดท้ายเก็บรักษาไว้ในหลอด cryotube ที่ -80 องศาเซลเซียส

การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ขั้นตอนแรกของการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลในระดับโมเลกุลที่เซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่คือการจำลองสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์หรือที่เรียกว่า co-culture technique โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูก co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะไม่มีการเลี้ยงเซลล์มะเร็งภายใน plate และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูก co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะมีการเลี้ยงเซลล์มะเร็งให้เกาะอยู่ที่พื้นผิว plate

ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อานวน 4 ชนิด ได้แก่

- SW480 (มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด adenocarcinoma, เพศชาย, 50 ปี, เชื้อชาติ Caucasian, Dukes' type B, มะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแรก)

- HT29 (มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด adenocarcinoma, เพศหญิง, 44 ปี, เชื้อชาติ Caucasian, Dukes' type B, มะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแรก)
- SW620 (มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด adenocarcinoma, เพศชาย, 51 ปี, เชื้อชาติ Caucasian, Dukes' type C, มะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจาย)
- HCT116 (มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด carcinoma, เพศชาย, เชื้อชาติ Caucasian, Dukes' type D, มะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจาย)

1. ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดใน 24-well culture plate (5×10^4 cells/well) ในอาหารที่ประกอบไปด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และ Fetal bovine serum (FBS) 10% ปริมาตร 500 μ l

2. นำ culture plate บ่มเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และใช้เวลาเลี้ยงเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการ co-culture เพื่อให้เซลล์มะเร็งเกาะพื้นผิว plate ได้ดีและหลังสารพาราไครน์ออกมา

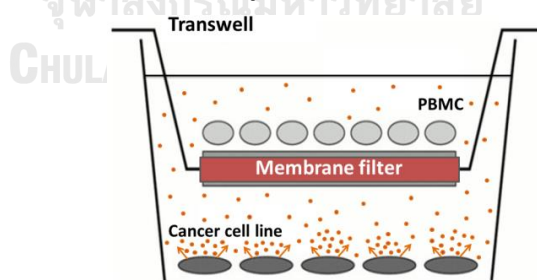
การจำลองสถานะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์

1. เมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งใน culture plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำ transwell culture plate มาใส่ในแต่ละหลุมของ culture plate ทั้งใน plate ที่มีเซลล์มะเร็งเพื่อให้เป็นกลุ่มทดสอบ และใน plate ที่ไม่มีเซลล์มะเร็งเพื่อให้เป็นกลุ่มควบคุม

2. นำ PBMC มานับจำนวนเซลล์ให้ได้ประมาณ 100,000 cells/well

3. เติมน้ำอาหารที่ประกอบด้วย 10% FBS ใน 90% DMEM ปริมาตร 100 μ l ลงบน transwell culture plate พร้อมกับเติมน้ำอาหารอีกครั้งในแต่ละหลุมของ culture plate ด้านล่างอีก ปริมาตร 200 μ l เพื่อปรับระดับของ media ใน culture plate

4. นำไปเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง รูปที่ 9



รูปที่ 9 ภาพจำลองลักษณะของการทำ co-culture ระหว่างเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์เม็ดเลือดขาว

การทำ co-culture ในงานวิจัยนี้จะทำทั้งหมด 2 ครั้ง ได้แก่ co-culture สำหรับตรวจสอบ วัดระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 หรือ % LINE-1 methylation และ co-culture สำหรับส่ง สารละลายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบผ่าน methylation microarray ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูก co-culture ร่วมเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำและเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูก co-culture กับร่วมเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาใช้ในการวิเคราะห์ในงานวิจัยต่อไป

การสกัดเซลล์ดีเอ็นเอ

1. นำ PBMC หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml แล้วใส่สารละลาย PBS เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 1 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 rcf เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง
2. เขย่าตะกอน PBMC ให้ฟุ้งแล้วล้างตะกอน PBMC ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 rcf เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง
3. นำตะกอน PBMC มาย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย lysis buffer II ปริมาตร 500 μ l proteinase K ปริมาตร 20 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. สกัดดีเอ็นเอด้วย phenol : chloroform : isoamyl-alcohol (25:24:1) ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารละลายส่วนใสด้านบนลงสู่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่
5. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ หรือ isopropanol ปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง
6. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol หรือ 70% ethanol จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol หรือ 70% ethanol ซ้ำอีกจำนวน 1 รอบ
7. ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ ethanol ระเหยให้หมด เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้ว ทำการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตรประมาณ 20 μ l
8. นำเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวัดปริมาณสารดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโนโดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสง (nanodrop spectrophotometer)

การทำไบซัลไฟต์ทรีเมนท์

1. นำเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการวัดปริมาณสารดีเอ็นเอมาทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นให้เหลืออยู่ที่ 750 ng ในสารละลายปริมาตร 20 μ l หรือ 37.5 ng/ μ l
2. เตรียมสารที่ใช้ในการทำ bisulfite treatment ตามวิธีการของ EZ DNA Methylation-Gold™ Kit
3. ผสม CT conversion 130 μ l กับสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 μ l รวมทั้งหมดเป็นปริมาตร 150 μ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วย 64°C อีกเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง
4. เตรียม Zymo-spin™ IC column โดยใส่ M-binding buffer ปริมาตร 600 μ l จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่บ่มแล้วจากข้อ 3. มาผสมกับสารที่เตรียมไว้ให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rcf เป็นเวลา 30 วินาที
5. ล้างด้วย M-wash buffer ปริมาตร 100 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rcf เป็นเวลา 30 วินาที

6. ใส่ M-desulphonation buffer ปริมาตร 200 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rcf เป็นเวลา 30 วินาที

7. ล้างด้วย M-wash buffer ปริมาตร 200 μ l จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rcf เป็นเวลา 30 วินาที ในขั้นตอนล้างควรทำซ้ำสองรอบ

8. นำ Zymo-spin™ IC column มาละลายด้วย M-elution buffer ปริมาตร 20 μ l ใส่ในหลอด 1.5 ml หลอดใหม่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rcf เป็นเวลา 30 วินาที จะได้เป็นสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ bisulfite treatment โดยที่เบส cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลจะไม่มีการเปลี่ยนไปเป็นเบส uracil แต่เบส cytosine ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิลจะมีการเปลี่ยนไปเป็นเบส uracil

การทำ COBRA LINE-1

1. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ bisulfite treatment แล้วไปทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ LINE-1

2. ทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* และ *TasI* จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลาไม่เกิน 16 ชั่วโมง

solution	volume 1x (μ l)
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
Total	2.0

3. ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* และ *TasI* ผ่านการทำ 8% acrylamide gel electrophoresis ผ่านเครื่องจ่ายกระแสไฟ 120 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำทำการย้อมเจลด้วยสาร SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที

4. นำเจลที่ได้จากการย้อมไปสแกนให้เกิดเป็นภาพด้วยเครื่อง Image scanner (STROM) ยี่ห้อ GE Healthcare

5. จากนั้นตรวจสอบและเปรียบเทียบความเข้มแบนที่เกิดขึ้นหรือวัด % LINE-1 methylation ด้วยโปรแกรม 1D component of Image Quant TL ที่แบนขนาด 160, 98, 80 และ 63 bp ตามลำดับ แล้วนำค่าที่ได้เข้าสู่สูตรคำนวณ % methylation ดังนี้

$$(%^mC) = 100 \times (C+A) / (C+2A+B+D)$$

$$\%160/160 = A, \%98/94 = B, \%80/78 = C, \%62/62 = D$$

โดย A = ความเข้มแบนที่ขนาด 160 bp / 160, B = ความเข้ม band ที่ขนาด 98 bp / 94
C = ความเข้ม band ที่ขนาด 80 bp / 78, D = ความเข้ม band ที่ขนาด 62 bp / 62

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในงานวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่จะใช้หาปริมาณสารเคมี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR รวมไปถึงใช้ทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและ primer ได้ โดยในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนทั้งหมด ได้แก่ LINE-1 สำหรับการตรวจวัดระดับหมู่เมทิล, *MMP9* และ *PLOD1* สำหรับหาสถานะที่เหมาะสมเพื่อการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลและการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน

1. การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากทำ bisulfite treatment ด้วยคู่ primer

LINE-1 forward primer (5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT-3')

LINE-1 reverse primer (5'-RTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA-3')

- สารเคมีที่ใช้ในการใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

Solution	Volume 1x (μl)
dNTP	0.2
10x buffer	1.0
MgCl ₂	0.4
L1 forward primer	0.15
L1 Reverse primer	0.15
Taq polymerase	0.1
dh ₂ o	7.0
DNA	1.0
Total	10.0

- อุณหภูมิและเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายใต้เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ thermal cycler หรือ PCR machine

Pre-denature	95°C	15 min	} 30 cycles
denature	95°C	45 sec	
annealing	50°C	45 sec	
extension	72°C	45 sec	
Post-extension	72°C	10 min	
Hold	4°C	∞	

2. การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บริเวณสำหรับการทดสอบการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มขั้นระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* ด้วย ตารางที่ 2
 ตารางที่ 2 ตารางแสดงชื่อ ลำดับเบส และความยาวของ primer ที่ใช้ในการทดลองการระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* และ *PLOD1*

Primer name	Sequence (5'-3')	Length(bp)
MMP9_Met forward	TTGTTATTTTTTTTTATTTTCGAGGGTC	29
MMP9_Met reverse	GTAATACTACACCAAAAACAAACCG	24
MMP9_Unmet forward	GTTTGTTATTTTTTTTTATTTTGGAGGGTT	31
MMP9_Unmet reverse	TTTTTCATAATACTACACCAAAAACAAACCA	30
PLOD1_Met forward	TAAAAGGTTATTTGATTTTTGATGTC	26
PLOD1_Met reverse	TCAAAAAACAAAAAACCTACG	23
PLOD1_Unmet forward	TTGTAAAAGGTTATTTGATTTTTGATGTT	29
PLOD1_Unmet reverse	TTTTTCTCAAAAAACAAAAAACCTACA	29

- สารเคมีที่ใช้ในการใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

Solution	Volume 1x (μl)
dNTP	0.2
10x buffer	1.0
Forward primer	0.1
Reverse primer	0.1
<i>Taq</i> polymerase	0.1
dh ₂ O	7.3
bisulfite DNA	1.0
Total	10.0

- อุณหภูมิและเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายใต้เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ thermal cycler หรือ PCR machine

Pre-denature	95°C	15 min	} 35 cycles
denature	95°C	45 sec	
annealing	54°C	45 sec	
extension	72°C	45 sec	
Post-extension	72°C	10 min	
Hold	4°C	∞	

3. ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้จากการทำ PCR ด้วย 8% acrylamide gel electrophoresis ผ่านเครื่องจ่ายกระแสไฟ 120 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

Solution	Volume(ml)
40% acrylamide	2
10X TBE	1
dh ₂ o	7
TEMED	0.01
10% APS	0.1
Total	10.11

4. นำเจล acrylamide มาทำการย้อมด้วยสาร SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที

5. นำเจลที่ผ่านการย้อมแล้วสแกนด้วยเครื่องสแกนเจลให้เกิดเป็นภาพด้วยเครื่อง Image scanner (STROM) ยี่ห้อ GE Healthcare

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Real-time PCR

ในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *MMP9* และ *PLOD1* สำหรับการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลและการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน

1. การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* และ *PLOD1* ด้วยกลุ่ม primer เดียวกับการทำ PCR

- สารเคมีที่ใช้ในการใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR

Solution	Volume 1x (μl)
MasterMix SYBR Green buffer	5
Forward primer	0.1
Reverse primer	0.1
<i>Taq</i> polymerase	0.05
dh ₂ o	3.75
cDNA	1
Total	10

- อุณหภูมิและเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายใต้เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Real-time PCR machine

Stage	Temperature	Time	
holding stage	50°C	2 min	} 35 cycles
	95°C	10 min	
PCR stage	95°C	15 sec	
	62°C	1 min	
Melt curve stage	95°C	15 sec	
	64°C	1 min	
	95°C	15 sec	

การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลือง

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองมาในลักษณะของบล็อกพาราฟิน (paraffin block) เรียบร้อยแล้ว จึงจะเริ่มขั้นตอนของการเตรียมสไลด์ตั้งแต่ขั้นตอนการตัดชิ้นเนื้อเป็นต้นไป

1. นำ paraffin block มาทำการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) เพื่อให้ได้แผ่นชิ้นเนื้อที่มีความหนา 2 ไมโครเมตร
2. เมื่อได้แผ่นชิ้นเนื้อที่ผ่านการตัดแล้ว นำลอยบน 70% ethanol จากนั้นนำไปลอยต่อบนฝืนน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส
3. นำกระจกสไลด์ที่เตรียมไว้มาค่อยๆ ซ้อนแผ่นชิ้นเนื้อให้ติดอยู่บนกระจกสไลด์ แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้แผ่นชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์แห้งสนิท
4. ทำการกำจัดสาร paraffin ในแผ่นชิ้นเนื้อออกด้วยสาร xylene อย่างละ 3 ครั้ง รวมเป็นเวลา 10 นาที และทำการเติมน้ำด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นสูงไปต่ำ อย่างละ 10 ครั้ง
5. นำแผ่นกระจกสไลด์ชิ้นเนื้อผ่านน้ำเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

การย้อมชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

1. นำแผ่นกระจกสไลด์ชิ้นเนื้อหลังกำจัดสาร paraffin มาย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
2. นำแผ่นกระจกสไลด์ชิ้นเนื้อที่ย้อมสี hematoxylin แล้วล้างผ่านน้ำเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออก และจากนั้นล้างผ่าน 95% ethanol ขึ้น-ลง เป็นจำนวน 10 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำส่วนเกินออก
3. นำแผ่นกระจกสไลด์ชิ้นเนื้อมาย้อมต่อด้วยสี eosin เป็นเวลา 5 นาที

4. ล้างผ่าน 95% ethanol ตามด้วย absolute ethanol ขึ้น-ลง อย่างละ 2 ครั้ง ตามลำดับ เพื่อล้างสี eosin และดึงน้ำส่วนเกินออก

5. กำจัด ethanol และทำให้แผ่นกระจกสไลด์ขึ้นเนื้อใสขึ้นด้วยสาร xylene ขึ้น-ลง อย่างละ 10 ครั้ง

6. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ขึ้นเนื้อให้แห้ง จากนั้นนำ mounting medium มาหยดลงบริเวณ ขึ้นเนื้อและนำกระจกปิดสไลด์มาปิดทับที่บริเวณขึ้นเนื้อ จากนั้นปล่อยให้แห้งและเมื่อแห้งแล้ว สามารถนำไปส่องดูลักษณะต่างๆ ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้

การย้อมขึ้นเนื้อและต้อมน้ำเหลืองด้วยเทคนิค Immunohistochemistry

1. ในขั้นตอนนี้จะทำการย้อมแอนติบอดีด้วยเทคนิค immunohistochemistry ผ่านเครื่อง ย้อมสิ่งส่งตรวจ ตั้งแต่ขั้นของการกำจัดสาร paraffin จนถึงเสร็จสิ้นกระบวนการย้อม IHC ภายใน เครื่องด้วยโปรแกรมอัตโนมัติ ซึ่งในขั้นตอนแรกจะนำแผ่นกระจกสไลด์ขึ้นเนื้อมาทำการกำจัดสาร paraffin

2. จากนั้นทำการย้อมขึ้นเนื้อด้วยสี hematoxylin เป็นเวลา 8 นาที และทำการล้างกำจัดสี ส่วนเกินออก

3. นำ primary antibody มาทำการย้อมต่อ โดยที่แอนติบอดี MMP9 จะใช้อัตราส่วนเจือจางอยู่ที่ 1:500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแอนติบอดี PLOD1 จะใช้อัตราส่วนเจือจางอยู่ที่ 1:50 เป็น เวลา 32 นาที

3. จากนั้นทำการย้อมต่อด้วย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) และปล่อยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสาร diaminobenzidine (DAB) ซึ่งโปรตีน ที่ถูกย้อมจะแสดงออกมาเป็นสีน้ำตาล โดยในการย้อมจะใช้สารเคมีทั้งหมดจาก ultraView Universal DAB Detection Kit

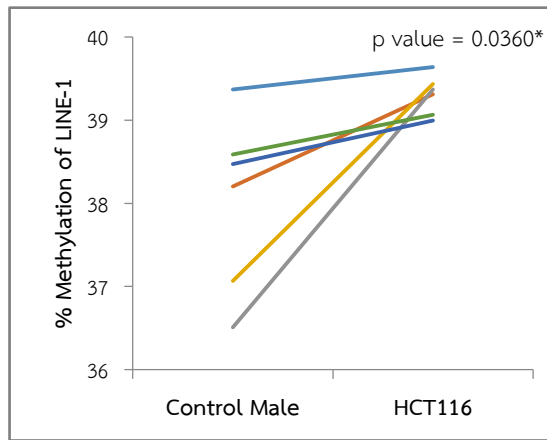
บทที่ 4

ผลการวิจัย

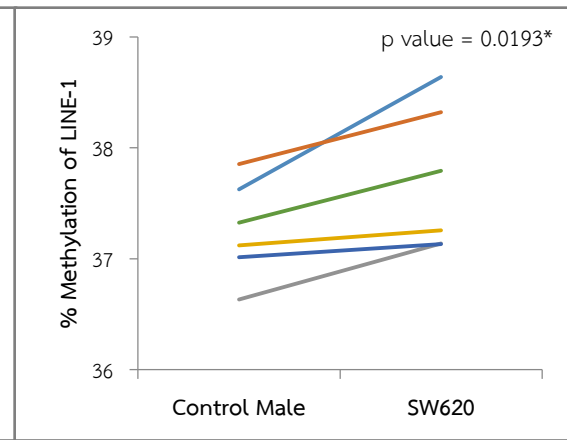
ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลเบื้องต้น

การทดลองแบบ *In vitro* (Paracrine action model) เป็นการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับหมู่เมทิลในระดับโมเลกุลที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (PBMC) เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 4 ชนิด ได้แก่ SW480 (Male, Dukes' type B), SW620 (Male, Dukes' type C), HCT116 (Male, Dukes' type D) และ HT29 (Female, Dukes' type B) ผ่านการจำลองสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์กับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ หรือที่เรียกว่าเทคนิค co-culture หลังจากนั้นจะทำการตรวจวัดระดับหมู่เมทิลด้วยเทคนิค COBRA LINE-1 โดยเปรียบเทียบระดับของหมู่เมทิลสองกลุ่มตัวอย่างการทดลอง ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูก co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ให้เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูก co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ให้เป็นกลุ่มทดสอบ และใช้สถิติวิเคราะห์ทางสถิติแบบ unpaired t-test โดยในกลุ่มควบคุมของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38.03 ± 0.43 และในกลุ่มทดสอบของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.30 ± 0.10 ซึ่งถือว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลน์วันเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 หรือมีการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลแบบ LINE-1 hypermethylation รูปที่10A ในกลุ่มควบคุมของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.26 ± 0.18 และในกลุ่มทดสอบของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.71 ± 0.27 ซึ่งถือว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลน์วันเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 หรือมีการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลแบบ LINE-1 hypermethylation รูปที่10B ในกลุ่มควบคุมของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW480 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.46 ± 0.48 และในกลุ่มทดสอบของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW480 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 40.58 ± 0.34 ซึ่งถือว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลน์วันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 หรือมีการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลแบบ LINE-1 hypomethylation รูปที่10C และในกลุ่มควบคุมของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 40.13 ± 0.27 และในกลุ่มทดสอบของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.01 ± 0.68 ซึ่งถือว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลน์วันเพิ่มสูงขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 หรือมีการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลแบบ LINE-1 hypermethylation รูปที่10D

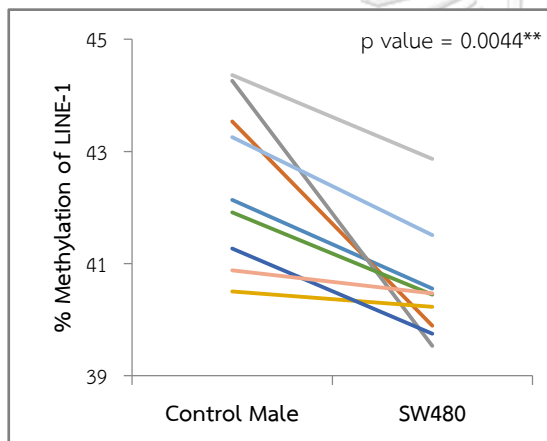
(A) PBMC co-cultured with HCT116



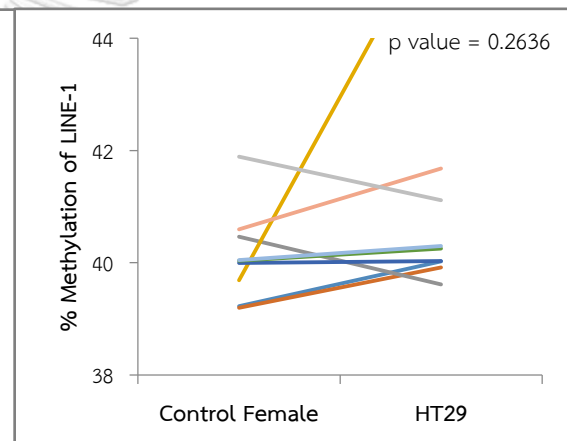
(B) PBMC co-cultured with SW620



(C) PBMC co-cultured with SW480



(D) PBMC co-cultured with HT29



รูปที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันเปรียบเทียบกับระหว่างเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการ co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116, SW620, SW480 และ HT29 ตามลำดับและกลุ่มทดสอบที่ผ่านการ co-culture ร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116, SW620, SW480 และ HT29 ตามลำดับ ซึ่งทำการ co-culture เป็นเวลาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (A) ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนวันระหว่างเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบเพศชายแสดงผลเป็น LINE-1 hypermethylation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (B) ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลนวันระหว่างเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบเพศชายแสดงผลเป็น LINE-1 hypermethylation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (C) ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลนวันระหว่างเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบเพศชายแสดงผลเป็น LINE-1 hypomethylation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (D) ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณไลนวันระหว่างเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบหญิงแสดงผลเป็น LINE-1 hypermethylation อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล Microarray

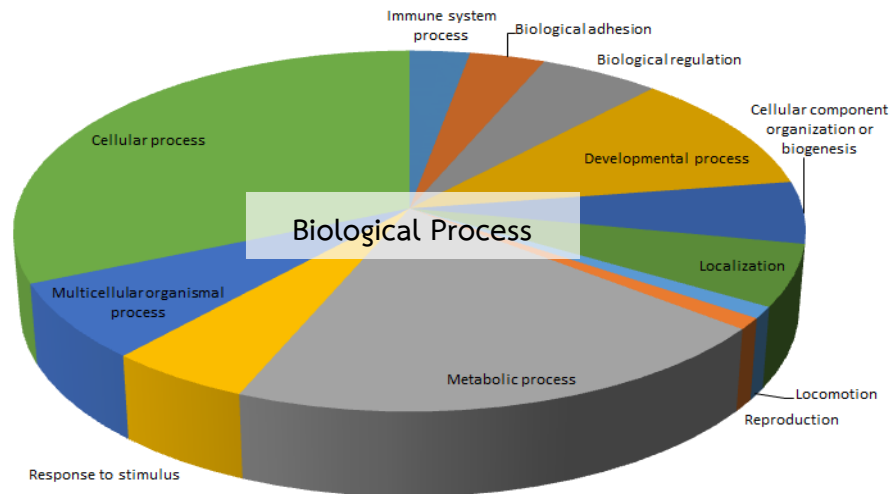
การวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันระหว่างข้อมูลของ *In vitro* (paracrine action model) ที่แสดงข้อมูลในรูปของ methylation microarray ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากการทดลองผ่านเทคนิค co-culture มาวิเคราะห์ร่วมกับผลข้อมูลของ *In vivo* (NCBI database) ที่แสดงข้อมูลในรูปของ expression microarray ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม CU-DREAM เพื่อหากลุ่มยีนที่น่าสนใจ โดยผลการวิเคราะห์ทั้งหมดจะประกอบไปด้วย 48 ผลการวิเคราะห์ และการวิเคราะห์ที่ถูกคัดเลือกจะเป็นการวิเคราะห์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณต่างๆ ของยีนและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของแต่ละยีนที่มีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญน้อยกว่า 0.01 และมีอัตราส่วนสมมติฐานหรือ odds ratio (95%CI) มากกว่า 1 โดยผลการวิเคราะห์ที่ถูกเลือกนำมาวิเคราะห์ต่อมี 6 ผลการวิเคราะห์ประกอบไปด้วยข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ intragenic ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE11545, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ intragenic ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE10715, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ downstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE11545, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ downstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE10715, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ upstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE11545 และการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ upstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE10715 โดยที่ช่อง a จะแสดงจำนวนยีนที่มีระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น ช่อง b จะแสดงจำนวนยีนที่มีระดับหมู่เมทิลไม่เพิ่มสูงขึ้นแต่ระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น ช่อง c จะแสดงจำนวนยีนที่มีระดับหมู่เมทิลเพิ่มสูงขึ้นแต่ระดับการแสดงออกที่ไม่เพิ่มสูงขึ้น และช่อง d จะแสดงจำนวนยีนที่ทั้งระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกไม่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะนำข้อมูลกลุ่มยีนเฉพาะช่อง a คือกลุ่มยีนที่มีระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นไปวิเคราะห์ต่อ โดยที่การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ intragenic ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE11545 จะมีจำนวนยีนที่ช่อง a อยู่ 760 ยีน, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ intragenic ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE10715 จะมีจำนวนยีนที่ช่อง a อยู่ 1,273 ยีน, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ downstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE11545 จะมีจำนวนยีนที่ช่อง a อยู่ 448 ยีน, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ downstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE10715 จะมีจำนวนยีนที่ช่อง a อยู่ 282 ยีน, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ upstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE11545 จะมีจำนวนยีนที่ช่อง a อยู่ 824 ยีนและการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ upstream ของยีนและระดับการแสดงออกที่ GSE10715 จะมีจำนวนยีนที่ช่อง a อยู่ 489 ยีน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตารางแสดงลักษณะการวิเคราะห์ร่วมกันของข้อมูลยีนระหว่าง methylation microarray และ expression microarray ที่มาจากการใช้โปรแกรม CU-DREAM

Experiments	a	b	c	d	Lower 95% CI	Upper 95% CI	OR	P-value
Intragenic_Met_up & GSE11545_up	760	7,252	292	5,369	1.68	2.22	1.93	8.52E-21
Intragenic_Met_up & GSE10715_up	1,273	8,994	636	6,609	1.33	1.63	1.47	3.70E-14
Downstream_Met_up & GSE10715_up	448	2,140	1,103	7,505	1.26	1.61	1.42	6.37E-09
Downstream_Met_up & GSE11545_up	282	2,124	604	6,346	1.20	1.62	1.39	1.21E-05
Upstream_Met_up & GSE10715_up	824	5,556	1,064	9,971	1.26	1.53	1.39	2.17E-11
Upstream_Met_up & GSE11545_up	489	5,297	561	7,295	1.06	1.36	1.20	4.54E-03

ผลการจัดกลุ่มข้อมูลยีนที่ถูกคัดเลือก

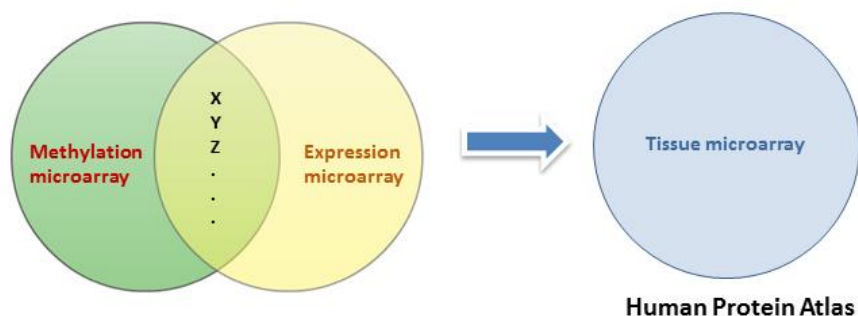
เมื่อได้ข้อมูลยีนที่มีระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นทั้งหมดที่มาจาก การวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดขาวผ่านโปรแกรม CU-DREAM ระหว่างข้อมูลจากการทำ co-culture หรือ paracrine action model (methylation microarray) และข้อมูลจากเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็ง ลำไส้ใหญ่ (expression microarray) จากนั้นนำข้อมูลยีนจากผลการวิเคราะห์ทั้ง 6 ผลการวิเคราะห์ ในช่อง a ดังตารางที่ 3 มาวิเคราะห์ต่อ โดยเรียงลำดับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลแบบ เพิ่มขึ้นและระดับการแสดงออกของยีนแบบเพิ่มขึ้น จากจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง (fold change) และค่าความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลง (mean1-mean2) ที่มีค่าความแตกต่างทางสถิติ น้อยกว่า 0.05 นำมารวมกับข้อมูลยีนที่มีระดับหมู่เมทิลแบบเพิ่มขึ้นและระดับการแสดงออกของยีน แบบเพิ่มขึ้นที่ซ้ำกันระหว่าง 2 การทดลองในกลุ่ม expression microarray ซึ่งจะได้ยีนที่จะนำไปทำ การทดลองต่อในงานวิจัยนี้ทั้งหมดจำนวน 118 ยีน จากนั้นทำการจัดกลุ่มยีนตามหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนหรือที่เรียกว่า Gene ontology (GO) ผ่านโปรแกรม DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>) รูปที่ 11



รูปที่ 11 กลุ่มยีนของข้อมูลจาก methylation microarray และ expression microarray ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM และถูกจัดกลุ่มยีนแบบ Biological Process ด้วย Gene ontology (GO)

ผลการวิเคราะห์ยีนที่ถูกคัดเลือกด้วย Tissue microarray

เมื่อได้ยีนที่ถูกคัดเลือกทั้งหมด 118 ยีน ไปวิเคราะห์ต่อด้วยข้อมูลจาก tissue microarray ผ่านเว็บไซต์ The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) รูปที่ 12 ซึ่งเป็นเว็บไซต์ที่เก็บรวบรวมข้อมูลของการแสดงออกของโปรตีนหรือแอนติบอดีในเนื้อเยื่อที่อวัยวะทั่วร่างกายรวมถึงในเนื้อเยื่อมะเร็งและต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ อีกด้วย ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนที่จะถูกคัดเลือกคือโปรตีนที่ไม่แสดงออกหรือแสดงออกน้อยมากในส่วนของเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และแสดงออกสูงในเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์บริเวณ surrounding ที่อยู่ใกล้หรืออยู่บริเวณเดียวกับเซลล์มะเร็งในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งผลที่ได้จากการทำ tissue microarray จะพบว่าแอนติบอดี MMP9 และ PLOD1 เป็นแอนติบอดีที่น่าสนใจในการนำมาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนรวมถึงการแสดงออกของการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในงานวิจัยครั้งนี้



รูปที่ 12 นำกลุ่มยีนที่ได้จาก methylation microarray และ expression microarray มาวิเคราะห์ต่อด้วย tissue microarray โดยใช้ข้อมูลแอนติบอดีจาก The Human Protein Atlas

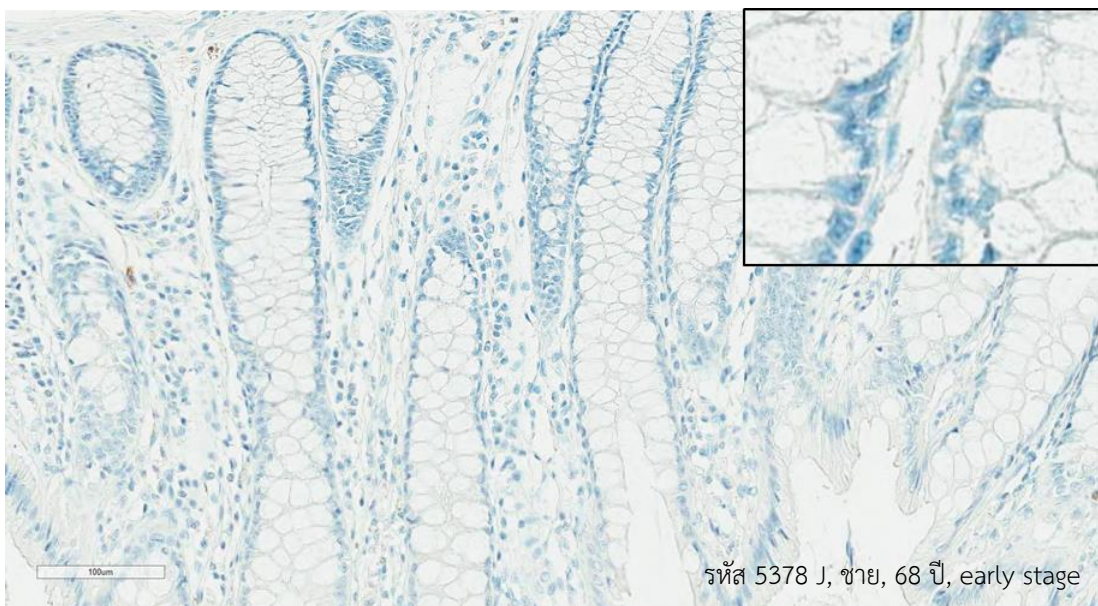
โดยที่ยีน *MMP9* มีชื่อเต็มว่า matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92-kDa gelatinase, 92-kDa type IV collagenase) เมื่อมีการแปลงเป็นโปรตีนแล้ว โปรตีนนี้จะทำหน้าที่

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย collagen ชนิด IV และ V หรือ extracellular matrix (ECM) ได้ ซึ่งบริเวณนี้ถือได้ว่าเป็นบริเวณที่มีส่วนช่วยในเรื่องของการค้าจุนโครงสร้างของเซลล์ และถ้าเกิดความผิดปกติอาจทำให้นำไปสู่การเกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *MMP9* เข้ามามีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการพัฒนาของตัวอ่อนหรือที่เรียกว่า embryonic development และกระบวนการพัฒนาของกระดูกหรือที่เรียกว่า bone development เป็นต้น และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ซึ่งได้แก่ กระบวนการการสร้างเส้นเลือดใหม่หรือที่เรียกว่า angiogenesis และกระบวนการรุกรานของเซลล์มะเร็งหรือที่เรียกว่า invasion(37) นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการเกิดและการดำเนินไปของโรคมะเร็งเต้านม ที่ยีน *MMP9* จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในรูปของโปรตีนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil), แมกโครเฟจ (macrophage) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte)(38) ยีน *PLOD1* มีชื่อเต็มว่า procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase1 เมื่อมีการแปลงเป็นโปรตีนแล้ว โปรตีนนี้จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ lysyl hydroxylase1 สำหรับปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิด lysine ให้เป็น hydroxylysine ซึ่ง hydroxylysyl group จะไปจับกับสายคาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) และใช้เป็นองค์ประกอบในการสร้างสายเปปไทด์ของ collagen ที่เกี่ยวข้องกับการค้าจุนโครงสร้างของเซลล์และยังถือได้ว่า hydroxylysine ช่วยทำให้โมเลกุลภายในที่เป็นองค์ประกอบของ collagen เกิดความเสถียรมากขึ้น(39, 40)

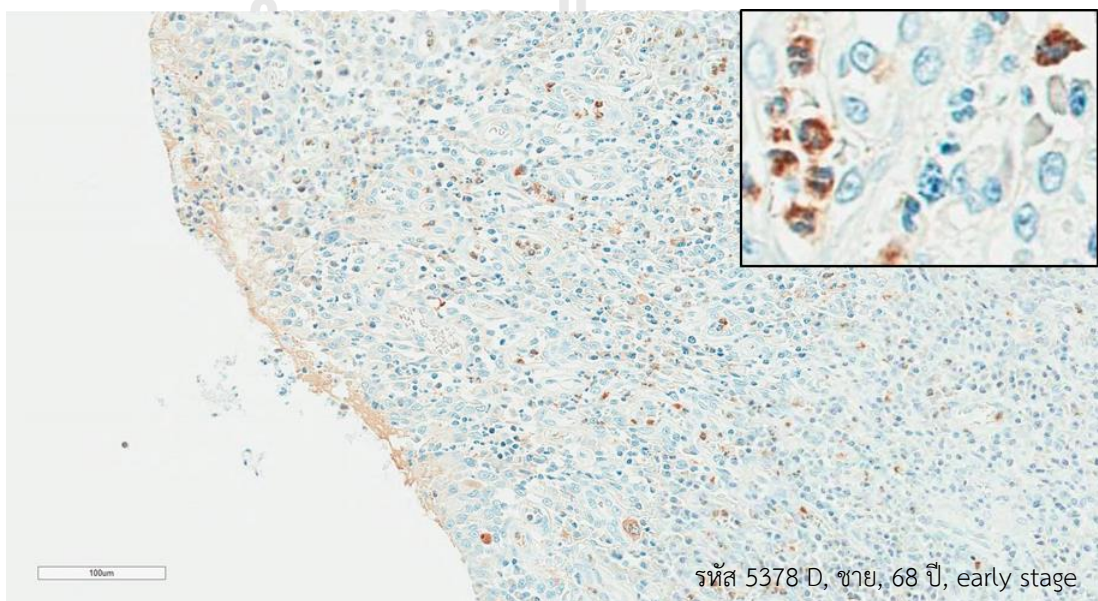
การทดสอบแอนติบอดีในตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อ

หลังจากทำการคัดเลือกโปรตีนและแอนติบอดีที่น่าสนใจจากการทำ tissue microarray แล้ว ซึ่งได้แก่แอนติบอดี *MMP9* และ *PLOD1* เมื่อทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E stain) เพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกความแตกต่างของเนื้อเยื่อและใช้เป็นตัวควบคุมแบบ internal ซึ่งในการทดลองนี้คือการแยกความแตกต่างของชิ้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พร้อมกับการย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีจำเพาะด้วยเทคนิค immunohistochemistry (IHC) เพื่อใช้ค้นหาหรือตรวจวัดระดับโปรตีนที่สนใจแบบจำเพาะเจาะจง เมื่อทำการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี *MMP9* ในชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมากประมาณ 2.47% จากการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* ทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดขาว รูปที่ 13 และเมื่อทำการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี *MMP9* ในชิ้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวประมาณ 97.53% จากการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* ทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดขาว และมีการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของชิ้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มากกว่าในชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อยู่ประมาณ 40 เท่า ซึ่งการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* จะมีทั้งการแสดงออกบริเวณผิวเซลล์ (cell surface) และการแสดงออกบริเวณไซโทพลาซึม (cytoplasm) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน *MMP9* จะแสดงออกมากที่สุด ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดพลาสมาเซลล์ (plasma) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) รูปที่ 14 และเมื่อทำการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี *PLOD1* ในชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของ

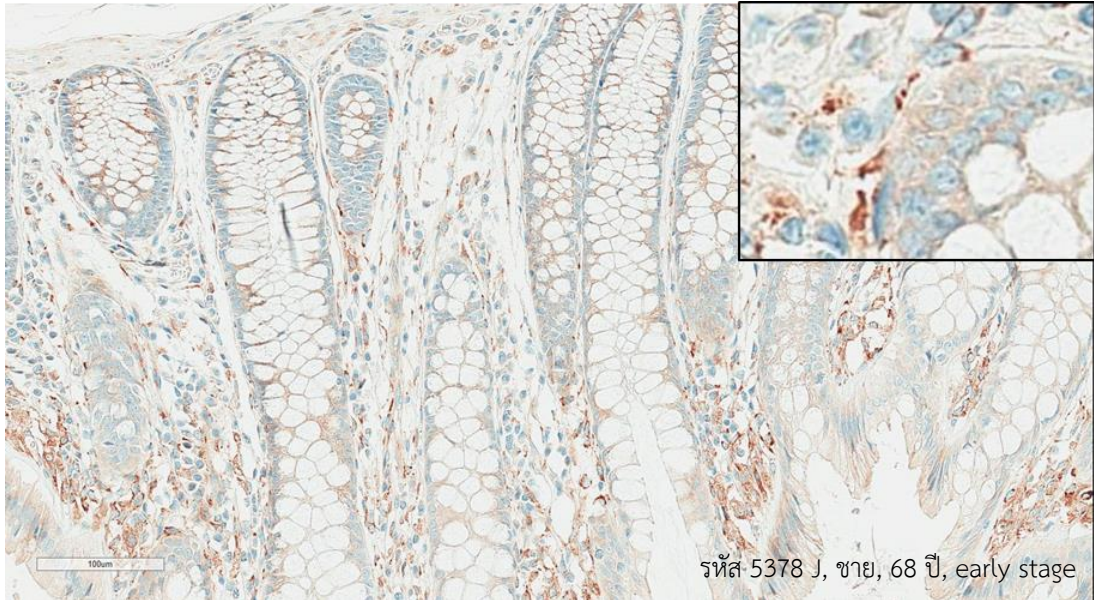
โปรตีน PLOD1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมาก รูปที่ 15 และชั้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่าในเนื้อเยื่อปกติ รูปที่ 16 แต่ก็ถือว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี MMP9 และไม่สามารถนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ได้เนื่องจากผลการแสดงออกที่ได้ยังไม่มี ความชัดเจน โดยที่ส่วนมากโปรตีน PLOD1 จะแสดงออกในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (cancer cell), ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) โดยจะแสดงออกที่บริเวณผิวเซลล์ (cell surface) และไซโทพลาซึม (cytoplasm) แต่โดยภาพรวมแล้วโปรตีน PLOD1 จะแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมากและจะแสดงออกทั้งในเซลล์ของเนื้อเยื่อปกติและในเซลล์ของเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่จนทำให้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อได้



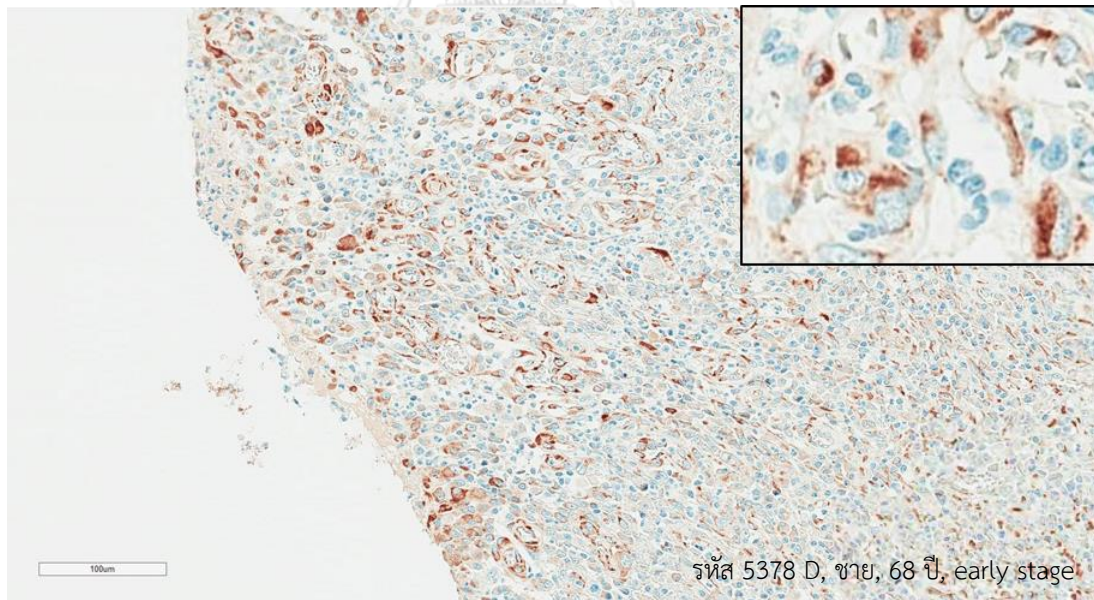
รูปที่ 13 ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อลำไส้ปกติที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



รูปที่ 14 ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



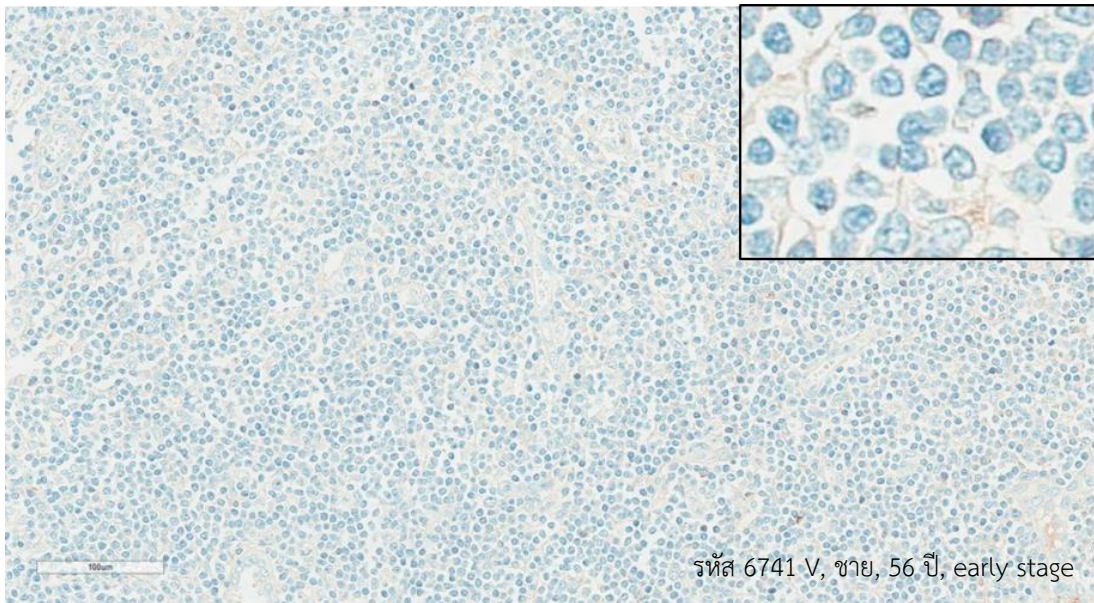
รูปที่ 15 ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อลำไส้ปกติที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



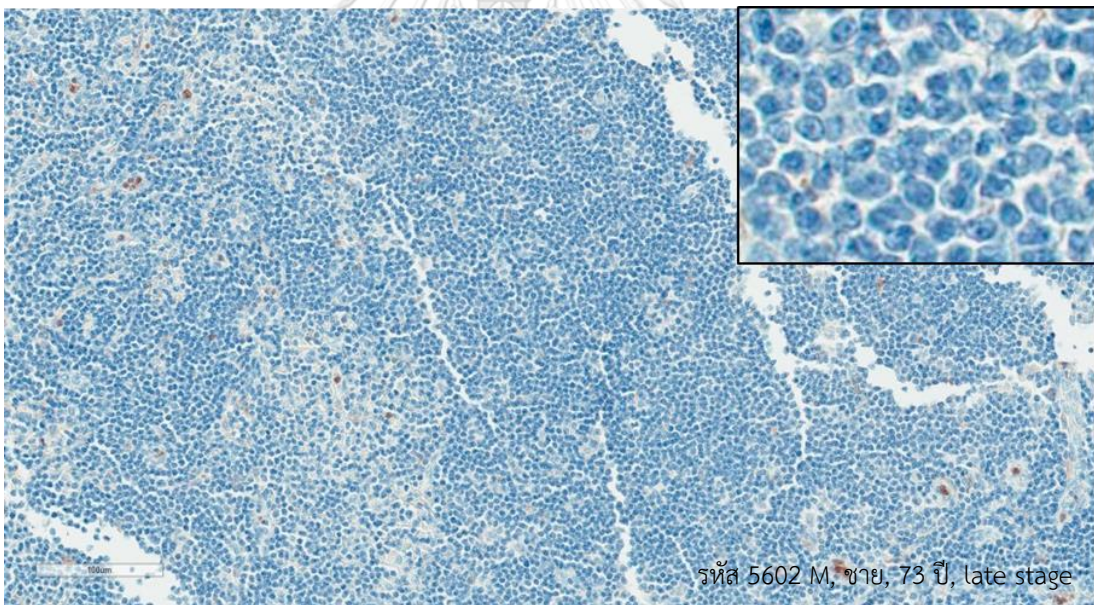
รูปที่ 16 ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า

การทดสอบแอนติบอดีในตัวอย่างต่อมน้ำเหลือง

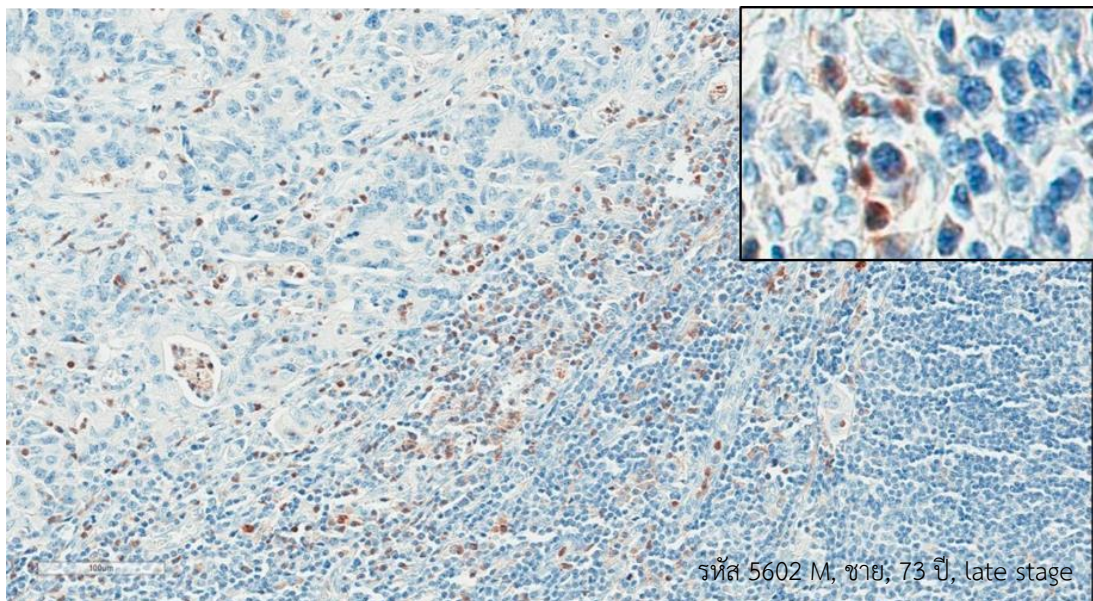
หลังจากทำการย้อมแอนติบอดีในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่แล้ว จากนั้นนำแอนติบอดี MMP9 และ PLOD1 มาทำการย้อมต่อในต่อมน้ำเหลืองหลายๆ ชนิด ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองที่ยังไม่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (NO) และในต่อมน้ำเหลืองที่มีการแพร่กระจายบางต่อม ได้แก่ ต่อมที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (N-) และต่อมที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (N+) ด้วยเทคนิค H&E stain และย้อมแอนติบอดีจำเพาะผ่านเทคนิค IHC อีกครั้งเพื่อค้นหาหรือตรวจวัดระดับโปรตีนที่สนใจแบบจำเพาะเจาะจง เมื่อทำการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี MMP9 ในต่อมน้ำเหลืองที่ยังไม่มีการแพร่กระจาย (NO) ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมากประมาณ 2.21% จากการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดขาว รูปที่ 17 ในต่อมน้ำเหลืองที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่แต่ผู้ป่วยอยู่ในระยะการแพร่กระจาย (N-) ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่าในต่อมน้ำเหลืองระยะ NO แต่น้อยกว่าในต่อมน้ำเหลืองระยะ N+ โดยที่ต่อมน้ำเหลืองระยะ N- มีการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ประมาณ 9.23% จากการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดขาว รูปที่ 18 และในต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และผู้ป่วยอยู่ในระยะการแพร่กระจาย (N+) ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมากประมาณ 88.56% จากการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ที่ ต่อมน้ำเหลืองระยะ N+ จะมากกว่าต่อมน้ำเหลืองระยะ N- ประมาณ 10 เท่าและมากกว่าต่อมน้ำเหลืองระยะ NO ประมาณ 40 เท่า ตามลำดับ และการแสดงออกของโปรตีน MMP9 จะแสดงออกมากที่สุดที่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดพลาสมาเซลล์ (plasma) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน MMP9 สูงมากที่บริเวณรอยต่อหรือบริเวณระหว่างเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ของต่อมน้ำเหลืองอีกด้วย รูปที่ 19 และเมื่อทำการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ในต่อมน้ำเหลืองที่ยังไม่มีการแพร่กระจาย (NO) ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมาก รูปที่ 20 ในต่อมน้ำเหลืองที่ไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่แต่ผู้ป่วยอยู่ในระยะการแพร่กระจาย (N-) ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยมากเช่นกัน รูปที่ 21 และในต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และผู้ป่วยอยู่ในระยะการแพร่กระจาย (N+) ผลปรากฏว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่าต่อมน้ำเหลืองระยะ N- และต่อมน้ำเหลืองระยะ NO รูปที่ 22 แต่ก็น้อยมากเมื่อเทียบกับการย้อม IHC ด้วยแอนติบอดี MMP9 แต่ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ได้เนื่องจากผลการแสดงออกที่ได้ยังไม่มีควมชัดเจน โดยที่ส่วนมากโปรตีน PLOD1 จะให้ผลการแสดงออกของโปรตีนที่คล้ายกับผลที่ได้จากการย้อมในเนื้อเยื่อและผลที่ได้ทำให้นำไปวิเคราะห์ต่อได้ยาก



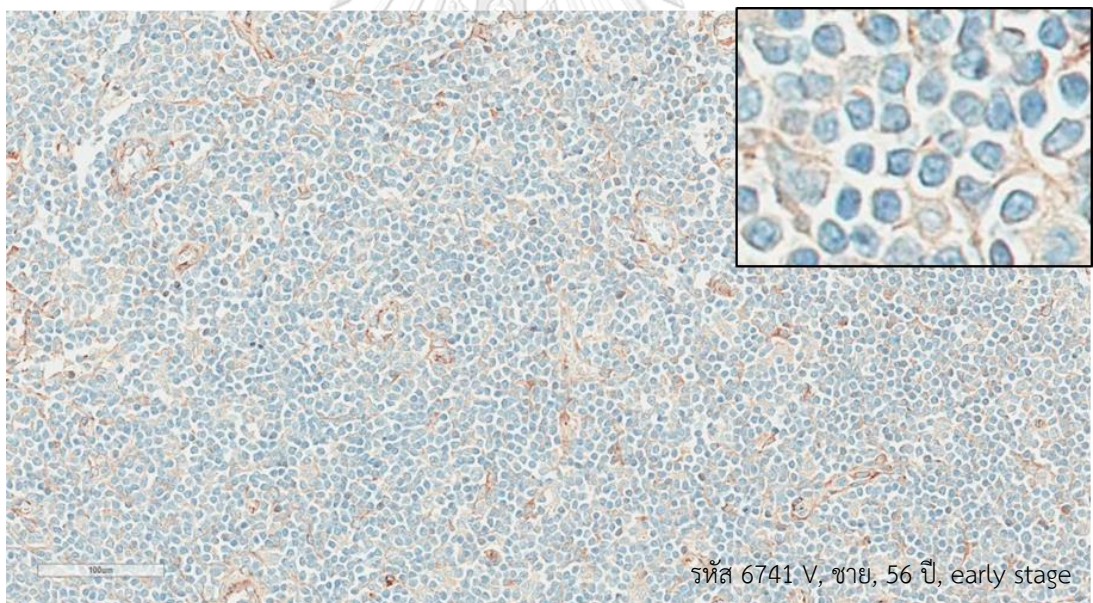
รูปที่ 17 ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ NO ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



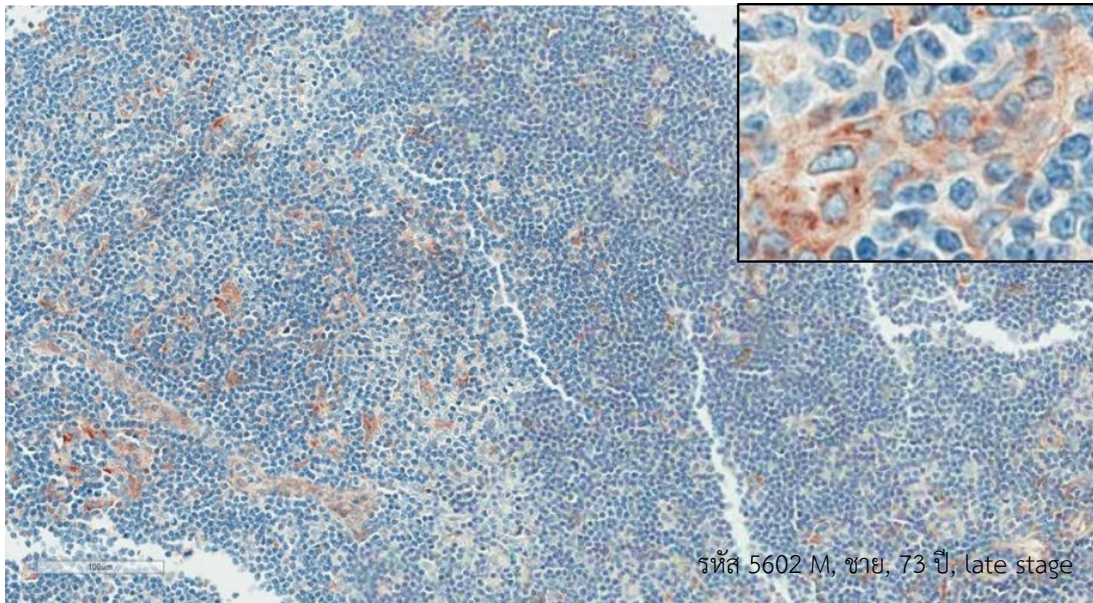
รูปที่ 18 ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N- ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



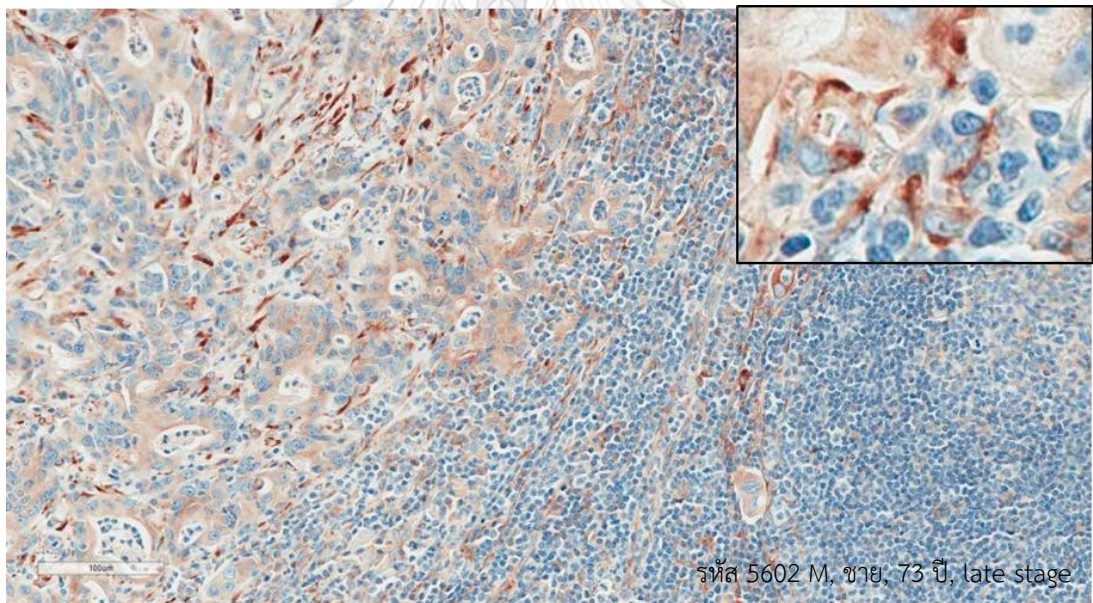
รูปที่ 19 ผลจากการย้อมโปรตีน MMP9 ด้วยแอนติบอดี MMP9 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N+ ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



รูปที่ 20 ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N0 ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



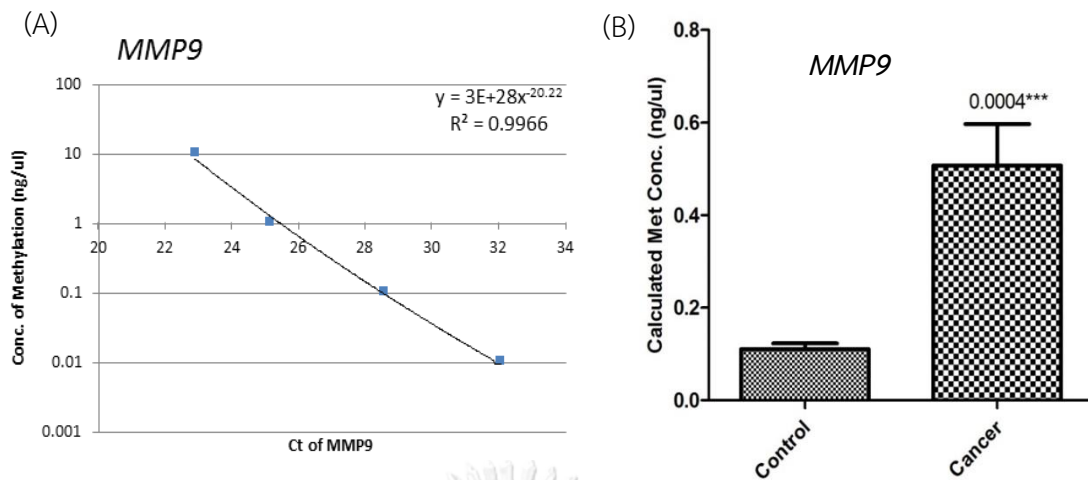
รูปที่ 21 ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N-ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า



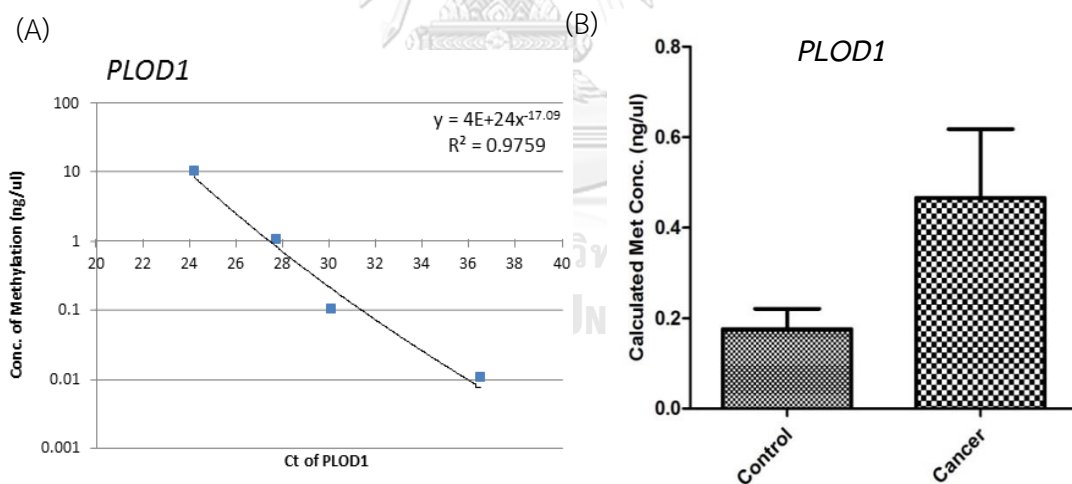
รูปที่ 22 ผลจากการย้อมโปรตีน PLOD1 ด้วยแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค IHC ในต่อมน้ำเหลืองที่ระยะ N+ที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า

ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลในตัวอย่างเลือด

นอกจากการทดสอบลักษณะการแสดงออกของโปรตีน MMP9 และ PLOD1 ด้วยแอนติบอดีผ่านเทคนิค IHC ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ เนื้อเยื่อมะเร็ง ในต่อมน้ำเหลืองแล้ว จากนั้นทำการทดสอบระดับหมู่เมทิลในตัวอย่างเลือดจากตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่กำหนดให้เป็นกลุ่มควบคุม และเลือดจากผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่กำหนดให้เป็นกลุ่มทดสอบ ผ่านเทคนิค Real-time PCR ในยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบข้อมูลทั้งสองกลุ่มจากค่าความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยจะเปรียบเทียบความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ในยีน (methylated) จากค่า cycle threshold (Ct) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก positive methylation control และใช้การไม่เปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิล (un-methylated) ณ ตำแหน่งนั้นๆ ในยีนเป็น internal control ในแต่ละกลุ่ม โดยในขั้นแรกจะต้องทำการสร้างกราฟสมการเส้นตรงของระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ในยีนจากการใช้ความเข้มข้นของ positive methylation control ที่ระดับความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/ μ l ตามลำดับ จากนั้นนำดีเอ็นเอเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Real-time PCR จะทำให้ได้ค่า Ct ที่ตำแหน่งระดับหมู่เมทิลของยีนนั้นๆ ในแต่ละความเข้มข้นของ positive methylation control และนำค่า Ct ที่ได้มาทำการสร้างกราฟเส้นตรงและสมการเส้นตรงเพื่อใช้คำนวณความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของแต่ละตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลองในแต่ละกลุ่ม โดยในที่นี้จะสร้างกราฟเส้นตรงและสมการเส้นตรงจากยีน *MMP9* รูปที่ 23A และยีน *PLOD1* รูปที่ 24A เพื่อใช้คำนวณหาค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ จากค่า Ct ของแต่ละตัวอย่างเลือดและนำค่าที่ได้มาคำนวณแปลงเป็นค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลจากสมการเส้นตรงของแต่ละยีน ได้แก่ ที่ยีน *MMP9* มีสมการเส้นตรงคือ $y = 3E+28x^{-20.22}$ และที่ยีน *PLOD1* มีสมการเส้นตรงคือ $y = 4E+24x^{-17.09}$ โดยแทนค่า x จากค่า Ct ของระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ในแต่ละตัวอย่างเลือดที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR คำนวณเพื่อให้ได้ค่า y คือค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของแต่ละตัวอย่างเลือด ขั้นที่สองจะเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ในยีน *MMP9* และ *PLOD1* ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ เมื่อทำการทดสอบในยีน *MMP9* พบว่าค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ของยีน *MMP9* ที่กลุ่มควบคุมคือ 0.111 ng/ μ l จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 18 คน และค่าเฉลี่ยของค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ของยีน *MMP9* ที่กลุ่มทดสอบคือ 0.507 ng/ μ l ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 23 คน ซึ่งมีความแตกต่างกันอยู่ 4.587 เท่า และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 รูปที่ 23B และเมื่อทำการทดสอบในยีน *PLOD1* พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ของยีน *PLOD1* ที่กลุ่มควบคุมคือ 0.176 ng/ μ l จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 10 คน และค่าเฉลี่ยของค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งนั้นๆ ของยีน *PLOD1* ที่กลุ่มทดสอบคือ 0.466 ng/ μ l ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 9 คน ซึ่งมีความแตกต่างกันอยู่ 2.650 เท่า รูปที่ 24B



รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลและกราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบผ่านเทคนิค Real-time PCR (A) ผลของกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* โดยเทียบระหว่างค่า cycle threshold (Ct) จากเทคนิค Real-time PCR กับค่าความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ของ positive methylation control เพื่อสร้างสมการเส้นตรงสำหรับคำนวณหาความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* (B) กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* ที่กลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มทดสอบอยู่ 4.587 เท่า และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 0.0004***



รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลและกราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน *PLOD1* ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบผ่านเทคนิค Real-time PCR (A) ผลของกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน *PLOD1* โดยเทียบระหว่างค่า cycle threshold (Ct) จากเทคนิค Real-time PCR กับค่าความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ของ positive methylation control เพื่อสร้างสมการเส้นตรงสำหรับคำนวณหาความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของยีน *PLOD1* (B) กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างความเข้มข้นของระดับหมู่เมทิลของยีน *PLOD1* ที่กลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มทดสอบอยู่ 2.650 เท่า

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลเบื้องต้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ด้วยเทคนิคการจำลองสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างเซลล์สองชนิด (co-culture) ผ่านการตรวจวัดระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 ด้วยเทคนิค COBRA LINE-1 ซึ่งเป็นการทดลองแบบ *In vitro* (paracrine action model) เมื่อนำระดับหมู่เมทิลระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบมาเปรียบเทียบกัน พบว่าระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 ของกลุ่มทดสอบมีค่าเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุม และมีทิศทางการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลอง จึงสันนิษฐานได้ว่าเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดอาจมีการหลั่งสารพาราไครน์คนละกลุ่มกันและทำให้สารพาราไครน์ชนิดนั้นๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่สภาวะเหนือพันธุกรรมบริเวณ LINE-1 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้ และทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเซลล์มะเร็งที่นำมาใช้ในการทดลอง เช่น ชนิดของเซลล์มะเร็ง ระยะของมะเร็ง เพศ อายุ เชื้อชาติ ของผู้ป่วยที่เป็นเจ้าของเซลล์มะเร็งนั้นๆ และกลุ่มประชากรของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นำมาทำการทดลอง แต่จากการทดลองนี้ก็สามารถสรุปได้ว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถหลั่งสารพาราไครน์ออกมาและสารนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณ LINE-1 ด้วยของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้

จากนั้นได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระดับทั่วทั้งจีโนมพบว่านอกจากบริเวณ LINE-1 แล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลที่บริเวณอื่น ๆ อีกด้วย และเมื่อนำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากการทดลองระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูก co-culture ด้วยเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่กับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูก co-culture ด้วยเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งถือได้ว่าเป็นข้อมูลมาจากการทดลองแบบ *In vitro* (paracrine action model) มาวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม CU-DREAM ร่วมกับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากการทดลองระหว่างเลือดของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่กับเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งถือได้ว่าเป็นข้อมูลมาจากการทดลองแบบ *In vivo* (NCBI database) จะทำให้ได้ข้อมูลยื่นออกมา จากนั้นนำผลข้อมูลยื่นที่ได้มาจากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกแบบเพิ่มขึ้นมาวิเคราะห์ต่อด้วยข้อมูลการแสดงออกของโปรตีนหรือแอนติบอดีในเนื้อเยื่อของอวัยวะและมะเร็งชนิดต่างๆ และจากผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้พบว่าแอนติบอดี MMP9 และ PLOD1 ที่จัดอยู่ในกลุ่ม biological adhesion ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่น่าสนใจที่พบว่ามีแสดงออกของโปรตีนสูงบริเวณเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่บริเวณเดียวกันกับเซลล์มะเร็งและที่เหมาะสมสำหรับนำไปทำการทดลองจริงในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

เริ่มการทดสอบแอนติบอดีหรือการตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน MMP9 และ PLOD1 จากชิ้นเนื้อเยื่อของผู้ป่วยทั้งในส่วนที่มีเซลล์มะเร็งและไม่มีเซลล์มะเร็งตามต่อด้วยการ

ทดสอบในต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ในระยะต่างๆ ด้วยการย้อมแอนติบอดี MMP9 และแอนติบอดี PLOD1 ผ่านเทคนิค Immunohistochemistry (IHC) ซึ่งจะพบว่าที่ชั้นเนื้อเยื่อของผู้ป่วยทั้งในส่วนที่มีเซลล์มะเร็งและไม่มีเซลล์มะเร็งเมื่อผ่านการย้อมด้วยแอนติบอดี MMP9 จะมีการแสดงออกของระดับโปรตีน MMP9 ที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยที่ชั้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งจะมีการแสดงออกของระดับโปรตีน MMP9 สูงมากที่บริเวณเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) อาจเนื่องจากในร่างกายมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้เยอะที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ และอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบร่วมอยู่ด้วยภายในสภาวะการเป็นมะเร็ง เช่นเดียวกับผลที่ได้จากการย้อมแอนติบอดี MMP9 ในต่อมน้ำเหลืองชนิดต่างๆ จะมีการแสดงออกของระดับโปรตีน MMP9 ที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน โดยที่ต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ในระยะแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (N+) จะพบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน MMP9 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว สูงมาก โดยเฉพาะบริเวณรอยต่อหรือบริเวณระหว่างเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่กับเซลล์เม็ดเลือดขาวในต่อมน้ำเหลือง โดยเฉพาะในเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) อาจเนื่องจากในต่อมน้ำเหลืองมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้เยอะที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโปรตีนที่โปรตีน MMP9 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถเกิดขึ้นได้จากการชักนำของสารพาราไครน์ที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และการแสดงออกของโปรตีน MMP9 ทั้งในเนื้อเยื่อและต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยจากการทดลองจะพบว่ามี การแสดงออกสูงอย่างชัดเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณผิวเซลล์ (cell surface) และบริเวณไซโทพลาซึม (cytoplasm) เนื่องจากในสภาวะการเป็นมะเร็งนั้นจะมีการกระตุ้นให้โปรตีน MMP9 มีการแสดงออกมากขึ้นที่บริเวณดังกล่าวเพื่อเอื้ออำนวยต่อการดำเนินไปของการเป็นมะเร็ง เพราะตามรายงานพบว่าโปรตีน MMP9 จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย collagen ได้และเกี่ยวข้องกับกระบวนการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (invasion) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน MMP9 จะไม่แสดงออกสูงในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดแต่จะแสดงออกสูงในเซลล์เม็ดเลือดขาวบางส่วนเท่านั้น เนื่องจากสารพาราไครน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็งอาจชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวบางกลุ่มที่อยู่ในสภาวะเหมาะสมเท่านั้น และการย้อมแอนติบอดี PLOD1 ในชั้นเนื้อเยื่อของผู้ป่วยทั้งในส่วนที่มีเซลล์มะเร็งและส่วนที่ไม่มีเซลล์มะเร็งรวมทั้งในต่อมน้ำเหลืองชนิดต่างๆ พบว่ามีการแสดงออกของระดับโปรตีน PLOD1 ที่แตกต่างกัน แต่ผลการย้อมที่ได้ยังไม่ชัดเจนต่อแยกชนิดของเซลล์ที่มีโปรตีน PLOD1 แสดงออกและไม่สามารถทำการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 หรือไม่สามารถนำผลการย้อมที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อ ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณแอนติบอดีที่ใช้ในการย้อมมีความเข้มข้นเกินไปจนทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 ในเซลล์อื่นๆ ได้ถึงแม้ว่าในเซลล์อื่นๆ นั้นจะมีปริมาณโปรตีน PLOD1 ที่น้อยก็ตาม หรืออาจเป็นเพราะในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโปรตีน PLOD1 น้อยอยู่แล้วจากผลการวิเคราะห์ผ่าน tissue microarray และเมื่อนำแอนติบอดี PLOD1 มาย้อมจริงในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จึงทำให้เห็นถึงการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยด้วยเช่นกัน

จากนั้นทำการทดสอบค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นการทดลองแบบ *In vivo* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยจะทำการเปรียบเทียบด้วยค่าความแตกต่างของความเข้มข้นระดับ

หมู่เมทิล (methylated) ณ ตำแหน่งนั้นๆ ของยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* และใช้การไม่เปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิล (un-methylated) ณ ตำแหน่งนั้นๆ ของทั้งสองยีนเป็น internal control ตามด้วยการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลระหว่างตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่กับเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่คำนวณมาจากสมการเส้นตรงของยีนนั้นๆ ซึ่งจากผลที่ได้จะพบว่าที่ยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* มีความแตกต่างกันของค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม โดยที่ค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จะมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งถือได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลหรือค่าความเข้มข้นที่สถานะเหนือพันธุกรรมของยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของยีน *PLOD1* ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มยังไม่มีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลองในยีน *PLOD1* นั้นยังมีจำนวนน้อยเกินไปและยังติดปัญหาทางด้านคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอจึงทำให้ค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันแต่ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลของทั้งสองยีนก็สามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลเกิดขึ้นได้จากการชักนำของสารพาราโครินที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และผลที่ได้ยังมีความสอดคล้องกับผลของการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของโปรตีน *MMP9* และโปรตีน *PLOD1* ที่ได้จากการย้อมด้วยแอนติบอดีผ่านเทคนิค IHC อีกด้วย ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารพาราโครินที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สถานะเหนือพันธุกรรมที่ยีน *MMP9* และ *PLOD1* จนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของโปรตีน *MMP9* และ *PLOD1* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ โดยเฉพาะในยีนและโปรตีน *MMP9* จะสามารถแยกความแตกต่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวของทั้งสองกลุ่มตัวอย่างได้อย่างชัดเจน ซึ่งในอนาคตอาจมีการขยายจำนวนตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองที่ใช้ในการทดสอบการแสดงออกระดับโปรตีน *MMP9* เพื่อนำไปพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน *MMP9* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อและต่อมน้ำเหลืองได้ และอาจมีการขยายจำนวนตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ใช้ในการทดสอบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลของยีน *MMP9* และยีน *PLOD1* รวมไปถึงการนำข้อมูลอื่น ๆ จากการทดลองที่วิเคราะห์แล้วพบว่าเป็ยีนที่น่าสนใจทั้ง 118 ยีน ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกของยีนแบบเพิ่มขึ้นเพื่อร่วมค้นหาและพัฒนาเป็นสารบ่งชี้มะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไปในอนาคต

จากงานวิจัยในครั้งนี้จึงสรุปผลได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่สถานะเหนือพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถเกิดได้จากการชักนำของสารพาราโครินที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และนอกจากนั้นยังพบอีกว่าสารพาราโครินที่หลั่งมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สถานะเหนือพันธุกรรมจนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้

รายการอ้างอิง

1. Puttipanyalears C, Kitkumthorn N, Buranapraditkun S, Keelawat S, Mutirangura A. Breast cancer upregulating genes in stromal cells by LINE-1 hypermethylation and micrometastatic detection. *Epigenomics*. 2016;8(4):475-86.
2. Imsamran W, Chaiwerawattana A, Wiangnon S, Pongnikorn D, Suwanrungrung K, Sangrajrang S, et al. *Cancer in Thailand: Vol. VIII, 2010–2012*. National Cancer Institute, Thailand. 2015.
3. Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S. *Disease Control Priorities, (Volume 3): Cancer: World Bank Publications*; 2015.
4. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer research*. 2016;36(3):1093-102.
5. Britannica TEOE. Colon ANATOMY. Internet.2017 [cited 2017 October 31]. Available from: <https://www.britannica.com/science/colon-anatomy>.
6. ศิริธรรมานุกูล ว. รู้เท่าทันมะเร็งลำไส้ใหญ่. Internet.: โรงพยาบาลจุฬารัตน์.; 2009 [cited 2017 March 27]. Available from: <http://www.cccthai.org/l-th/index.php/2009-06-13-08-51-38/2010-05-26-10-22-55/54-2009-07-14-07-23-29.html>.
7. Institute NC. Tests to Detect Colorectal Cancer and Polyps. Internet.2016 [cited 2017 March 27]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/screening-fact-sheet>.
8. Khuhaprema T, Attasara P, Sriplung H, Wiangnon S, Sangrajrang S. *Cancer in Thailand vol VII, 2007-2009*. Bangkok: National Cancer Institute. 2013.
9. กระทรวงสาธารณสุข คค. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ (พ.ศ. 2556 - 2560). สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2013 [cited 2017 Oct. 31].
10. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
11. MedThai. มะเร็งลำไส้ อากาการ สาเหตุ การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ 5 วิธี. Internet.2017 [updated 21 July 2017; cited 2017 November 1]. Available from: <https://medthai.com/diseases/cancer/>.
12. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(19):1420-5.

13. Luczak MW, Jagodzinski PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2006;44(3):143-54.
14. Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie*. 2012;94(11):2202-11.
15. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, et al. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2013;109(2):408-15.
16. Anthony JF Griffiths JHM, David T Suzuki, Richard C Lewontin, and William M Gelbart. *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th edition: WH Freeman and Company.; 2000.
17. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2011;12:187-215.
18. Hur K, Cejas P, Feliu J, Moreno-Rubio J, Burgos E, Boland CR, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2014;63(4):635-46.
19. Apornthewan C, Phokaew C, Piriyaongsa J, Ngamphiw C, Ittiwut C, Tongsimma S, et al. Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2. *PloS one*. 2011;6(3):e17934.
20. Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science (New York, NY)*. 1971;172(3982):440-51.
21. วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. อีเล็กโตรโฟรีซิส. Internet.2017 [updated 2017 August 26; cited 2017 November 1]. Available from: <https://th.wikipedia.org/wiki/อีเล็กโตรโฟรีซิส>.
22. Wangsri S, Subbalekha K, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Patterns and possible roles of LINE-1 methylation changes in smoke-exposed epithelia. *PloS one*. 2012;7(9):e45292.
23. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology* 4th edition. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf. 2000.
24. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012(63).
25. อัครอารีย์ น. PCR คืออะไร Internet.: สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี; 2014 [updated July 29, 2014.; cited 2017 November 3]. Available from: <http://biology.ipst.ac.th/?p=830>.

26. Adams ER. Molecular Diagnostics—current Research and Applications. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(12):1877.
27. Gibthai. Technical Note Internet.: Gibthai Co.; 2015 [cited 2017 November 3]. Available from: http://www.gibthai.com/service/note_detail/12.
28. Aporn Dewan C, Mutirangura A. Connection up-and down-regulation expression analysis of microarrays (CU-DREAM): a physiogenomic discovery tool. *Asian Biomedicine*. 2011;5(2):257-62.
29. Wanichnopparat W, Suwanwongse K, Pin-on P, Aporn Dewan C, Mutirangura A. Genes associated with the cis-regulatory functions of intragenic LINE-1 elements. *BMC genomics*. 2013;14(1):205.
30. Gurcan MN, Boucheron LE, Can A, Madabhushi A, Rajpoot NM, Yener B. Histopathological image analysis: A review. *IEEE reviews in biomedical engineering*. 2009;2:147-71.
31. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Histopathology: Methods and Protocols*. 2014:31-43.
32. Takizawa P. The Cell Internet.: Yale school of medicine; 2016 [cited 2017 November 4]. Available from: http://histology.med.yale.edu/histological_features_of_cells/histological_features_of_cells_reading.php.
33. project THPA. Immunohistochemistry Internet. [cited 2017 November 4]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>.
34. Taylor CR. Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice. *Histopathology: Methods and Protocols*. 2014:81-109.
35. Galamb O, Sipos F, Solymosi N, Spisak S, Krenacs T, Toth K, et al. Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign, and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(10):2835-45.
36. Stathopoulos GP, Armakolas A. Differences in gene expression between individuals with multiple primary and single primary malignancies. *International journal of molecular medicine*. 2009;24(5):613-22.
37. Victor A. McKusick, O'Neill MJF. MATRIX METALLOPROTEINASE 9; MMP9 Internet.: OMIM; 1991 [updated 2015 March 17; cited 2017 November 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/120361#geneFunction>.

38. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(3):161-74.
39. McKusick VA. PROCOLLAGEN-LYSINE, 2-OXOGLUTARATE 5-DIOXYGENASE; PLOD1 Internet.: OMIM; 1992 [updated 2005 March 23; cited 2017 November 8]. Available from:
<https://www.omim.org/entry/153454?search=PLOD1%20&highlight=plod1>.
40. Reference GH. PLOD1 gene Internet.: National Library of Medicine (NLM); 2015 [updated 2017 November 7 cited 2017 November 8]. Available from:
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PLOD1>.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มชิ้นเนื้อ

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	วันที่เก็บ
1	4491 D	ชาย	71	Colon cancer (pT4aN2aMx)	-
2	5378 D	ชาย	68	Colon cancer – Sigmoid (pT2N0Mx)	-
3	7106 A	หญิง	59	Colon cancer – Ascending (pT3N2aMx)	-
4	7141 C	ชาย	76	Colon cancer – Cecum (pT3N1bMx)	-
5	10555 E	ชาย	61	Colon cancer (pT4bN2bMx)	-
6	4491 F	ชาย	71	Colon cancer (pT4aN2aMx)	-
7	5378 J	ชาย	68	Colon cancer – Sigmoid (pT2N0Mx)	-
8	7106 H	หญิง	59	Colon cancer – Ascending (pT3N2aMx)	-
9	7141 K	ชาย	76	Colon cancer – Cecum (pT3N1bMx)	-
10	10555 L	ชาย	61	Colon cancer (pT4bN2bMx)	-

ตารางที่ 5 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มต่อมน้ำเหลือง

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	วันที่เก็บ
1	1866 L	ชาย	87	Colon cancer (pT3N0Mx)	-
2	2272 AA	ชาย	80	Colon cancer (pT3N0Mx)	-
3	5639 Y	หญิง	49	Colon cancer (pT3N0Mx)	-
4	6741 V	ชาย	56	Colon cancer (pT3N0Mx)	-
5	7651 AD	ชาย	74	Colon cancer - Descending (pT3N0Mx)	-
6	311989 P	หญิง	59	Gallbladder – 1 benign lymph node	-
7	312525 AC	หญิง	70	Colon cancer (pT4aN1aMx)	-
8	312597 P	หญิง	73	Colon cancer (pT3N1bMx)	-
9	2114 Y	ชาย	83	Colon cancer (pT3N1aMx)	-
10	5602 M	ชาย	73	Colon cancer (pT3N2aMx)	-

ตารางที่ 6 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	วันที่เก็บเลือด
1	900	หญิง	57	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	7/6/2560
2	904	หญิง	55	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	7/6/2560
3	908	หญิง	60	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	8/6/2560
4	909	หญิง	64	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	8/6/2560
5	911	หญิง	57	Inflammation - Colon	8/6/2560
6	912	หญิง	80	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	8/6/2560
7	914	หญิง	58	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	9/6/2560
8	1171	หญิง	52	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	15/8/2560
9	1172	หญิง	40	Acute ulcer	15/8/2560
10	1175	หญิง	63	Villous adenoma	15/8/2560
11	1189	หญิง	34	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	18/8/2560
12	1190	หญิง	53	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	18/8/2560
13	1206	หญิง	55	Tubular adenoma - Sigmoid	22/8/2560
14	1285	ชาย	77	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	5/9/2560
15	1292	ชาย	61	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	7/9/2560
16	1309	ชาย	57	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	11/9/2560

17	1313	ชาย	55	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	12/9/2560
18	1318	ชาย	54	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	12/9/2560
19	1324	ชาย	63	Inflammation - Sigmoid	13/9/2560
20	1325	ชาย	52	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	13/9/2560
21	1327	ชาย	43	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	14/9/2560
22	1342	ชาย	36	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	19/9/2560
23	1346	ชาย	54	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	26/9/2560
24	1347	ชาย	-	Active colitis	20/9/2560
25	1348	ชาย	44	Active colitis	25/9/2560
26	1349	ชาย	51	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	25/9/2560
27	1354	ชาย	54	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	25/9/2560

ตารางที่ 7 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	วันที่เก็บเลือด
1	CRC69	ชาย	80	Colon cancer - Sigmoid (pT3N0Mx)	2/2/2560
2	CRC70	หญิง	80	Colon cancer - Sigmoid (1/18 nodes)	7/2/2560
3	CRC71	ชาย	68	Colon cancer - Rectum (pT3N0Mx)	10/2/2560
4	CRC72	ชาย	56	Colon cancer - Descending (pT3N0Mx)	20/3/2560
5	CRC73	ชาย	57	Colon cancer - Ascending	12/4/2560
6	CRC74	หญิง	67	Colon cancer - Rectosigmoid (pT4aN2Mx)	4/5/2560
7	CRC75	ชาย	62	Colon cancer - Transverse, Sigmoid	12/7/2560
8	CRC76	ชาย	65	Colon cancer - Descending (pT4bN0Mx)	14/7/2560
9	CRC78	ชาย	60	Colon cancer - Rectum	8/10/2560
10	CRC79	หญิง	83	Colon cancer - Descending	22/8/2560
11	CRC80	หญิง	-	Colon cancer - Rectum (pT2N0Mx)	1/9/2560
12	CRC81	หญิง	46	Colon cancer - Rectum	7/9/2560
13	CRC83	ชาย	-	Colon cancer - Rectum	20/9/2560
14	CRC84	ชาย	78	Colon cancer - Sigmoid	29/9/2560
15	CRC85	หญิง	61	Colon cancer - Ascending	4/10/2560
16	CRCO22	ชาย	79	Colon cancer - Rectum (1/22 nodes)	30/1/2560
17	CRCO24	ชาย	82	Colon cancer - Rectum (pT3N0Mx)	19/6/2560
18	CRC-BB1	ชาย	62	Colon cancer - Sigmoid	-/10/2560
19	CRC-BB2	ชาย	60	Colon cancer - Sigmoid	-/10/2560
20	CRC-BB3	ชาย	65	Colon cancer - Sigmoid (6/12nodes)	-/10/2560
21	CRC-BB4	หญิง	66	Colon cancer - Sigmoid (6/20nodes)	-/10/2560
22	CRC-BB5	ชาย	-	Colon cancer - Sigmoid (8/28nodes)	-/10/2560
23	CRC-BB6	ชาย	-	Liver resection - Metastatic colonic cancer	-/10/2560
24	CRC-BB7	ชาย	73	Colon cancer - Sigmoid (pT4bN0Mx)	-/10/2560
25	CRC-BB8	หญิง	42	Colon cancer	-/10/2560
26	CRC-BB9	ชาย	69	Colon cancer - Descending	-/10/2560
27	CRC-BB10	หญิง	70	Colon cancer	-/10/2560
28	CRC-BB11	หญิง	43	Colon cancer	-/10/2560

ตารางที่ 8 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนัวนด้วยเซลล์HCT116

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	กลุ่มควบคุม (%methylation)	กลุ่มทดสอบ (%methylation)
1	M1	ชาย	39.4	39.6
2	M2	ชาย	38.2	39.3
3	M3	ชาย	36.5	39.4
4	M4	ชาย	37.1	39.4
5	M5	ชาย	38.5	39.0
6	M6	ชาย	38.6	39.1

ตารางที่ 9 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนัวนด้วยเซลล์SW620

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	กลุ่มควบคุม (%methylation)	กลุ่มทดสอบ (%methylation)
1	M1	ชาย	37.6	38.6
2	M2	ชาย	37.9	38.3
3	M3	ชาย	36.6	37.1
4	M4	ชาย	37.1	37.3
5	M5	ชาย	37.0	37.1
6	M6	ชาย	37.3	37.8

ตารางที่ 10 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนัวนด้วยเซลล์SW480

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	กลุ่มควบคุม (%methylation)	กลุ่มทดสอบ (%methylation)
1	M1	ชาย	42.1	40.6
2	M2	ชาย	43.5	39.9
3	M3	ชาย	44.3	39.5
4	M4	ชาย	40.5	40.2
5	M5	ชาย	41.3	39.7
6	M6	ชาย	41.9	40.4
7	M7	ชาย	43.3	41.5
8	M8	ชาย	40.9	40.5
9	M9	ชาย	44.4	42.9

ตารางที่ 11 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ของผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหมู่เมทิลบริเวณไลนัวนด้วยเซลล์HT29

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	กลุ่มควบคุม (%methylation)	กลุ่มทดสอบ (%methylation)
1	F1	หญิง	42.1	40.6
2	F2	หญิง	43.5	39.9
3	F3	หญิง	44.3	39.5
4	F4	หญิง	40.5	40.2
5	F5	หญิง	41.3	39.7
6	F6	หญิง	41.9	40.4
7	F7	หญิง	43.3	41.5
8	F8	หญิง	40.9	40.5

9	F9	หญิง	44.4	42.9
---	----	------	------	------

ตารางที่ 12 ข้อมูลจำนวนโปรตีน MMP9 ที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวในชิ้นเนื้อเยื่อที่กำลังขยาย 200 เท่า

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณที่ 1 (cell)	บริเวณที่ 2 (cell)	บริเวณที่ 3 (cell)	บริเวณที่ 4 (cell)	บริเวณที่ 5 (cell)	เฉลี่ย (cell)	% เฉลี่ยจาก cell ทั้งหมด
1	4491 F	3	2	0	2	3	4	2.47
2	4491 D	156	104	322	110	96	158	97.53

ตารางที่ 13 ข้อมูลจำนวนโปรตีน MMP9 ที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวในต่อมน้ำเหลืองที่กำลังขยาย 200 เท่า

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณที่ 1 (cell)	บริเวณที่ 2 (cell)	บริเวณที่ 3 (cell)	บริเวณที่ 4 (cell)	บริเวณที่ 5 (cell)	เฉลี่ย (cell)	% เฉลี่ยจาก cell ทั้งหมด
1	6741 V	9	2	3	8	7	6	2.21
2	5602 M	37	28	19	18	21	25	9.23
3	5602 M	237	249	201	228	285	240	88.56

ตารางที่ 14 ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน MMP9

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	Calculated Met Conc. (ng/ul)
1	909	หญิง	64	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.13
2	911	หญิง	57	Inflammation - Colon	0.05
3	912	หญิง	80	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.15
4	914	หญิง	58	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.12
5	1171	หญิง	52	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.12
6	1172	หญิง	40	Acute ulcer	0.14
7	1175	หญิง	63	Villous adenoma	0.18
8	1189	หญิง	34	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.06
9	1206	หญิง	55	Tubular adenoma - Sigmoid	0.05
10	1309	ชาย	57	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.08
11	1313	ชาย	55	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.21
12	1318	ชาย	54	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.16
13	1324	ชาย	63	Inflammation - Sigmoid	0.17
14	1325	ชาย	52	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.06
15	1347	ชาย	-	Active colitis	0.09
16	1348	ชาย	44	Active colitis	0.12
17	1349	ชาย	51	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.07
18	1354	ชาย	54	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.04

ตารางที่ 15 ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน MMP9

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	Calculated Met Conc. (ng/ul)
1	CRC69	ชาย	80	Colon cancer - Sigmoid (pT3N0Mx)	0.41
2	CRC70	หญิง	80	Colon cancer - Sigmoid (1/18 nodes)	0.11
3	CRC71	ชาย	68	Colon cancer - Rectum (pT3N0Mx)	0.90
4	CRC72	ชาย	56	Colon cancer - Descending (pT3N0Mx)	0.28
5	CRC73	ชาย	57	Colon cancer - Ascending	0.21

6	CRC78	ชาย	60	Colon cancer - Rectum	0.22
7	CRC79	หญิง	83	Colon cancer - Descending	0.10
8	CRC81	หญิง	46	Colon cancer - Rectum	1.73
9	CRC83	ชาย	-	Colon cancer - Rectum	0.98
10	CRC84	ชาย	78	Colon cancer - Sigmoid	0.55
11	CRC85	หญิง	61	Colon cancer - Ascending	1.36
12	CRCO22	ชาย	79	Colon cancer - Rectum (1/22 nodes)	0.27
13	CRCO24	ชาย	82	Colon cancer - Rectum (pT3N0Mx)	0.69
14	CRC-BB1	ชาย	62	Colon cancer - Sigmoid	0.21
15	CRC-BB2	ชาย	60	Colon cancer - Sigmoid	0.23
16	CRC-BB3	ชาย	65	Colon cancer - Sigmoid (6/12nodes)	0.34
17	CRC-BB4	หญิง	66	Colon cancer - Sigmoid (6/20nodes)	0.27
18	CRC-BB6	ชาย	-	Liver resection - Metastatic colonic cancer	0.26
19	CRC-BB7	ชาย	73	Colon cancer - Sigmoid (pT4bN0Mx)	0.10
20	CRC-BB8	หญิง	42	Colon cancer	0.22
21	CRC-BB9	ชาย	69	Colon cancer - Descending	0.86
22	CRC-BB10	หญิง	70	Colon cancer	0.91
23	CRC-BB11	หญิง	43	Colon cancer	0.45

ตารางที่ 16 ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน *PLOD1*

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	Calculated Met Conc. (ng/ul)
1	911	หญิง	57	Inflammation - Colon	0.28
2	912	หญิง	80	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.52
3	914	หญิง	58	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.09
4	1175	หญิง	63	Villous adenoma	0.21
5	1206	หญิง	55	Tubular adenoma - Sigmoid	0.07
6	1309	ชาย	57	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.06
7	1324	ชาย	63	Inflammation - Sigmoid	0.07
8	1347	ชาย	-	Active colitis	0.17
9	1348	ชาย	44	Active colitis	0.13
10	1349	ชาย	51	ไม่มีผลส่งตรวจทางพยาธิวิทยา	0.17

ตารางที่ 17 ข้อมูลค่าความเข้มข้นระดับหมู่เมทิลในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของยีน *PLOD1*

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัย	Calculated Met Conc. (ng/ul)
1	CRC69	ชาย	80	Colon cancer - Sigmoid (pT3N0Mx)	1.48
2	CRC70	หญิง	80	Colon cancer - Sigmoid (1/18 nodes)	0.78
3	CRC71	ชาย	68	Colon cancer - Rectum (pT3N0Mx)	0.44
4	CRCO22	ชาย	79	Colon cancer - Rectum (1/22 nodes)	0.68
5	CRCO24	ชาย	82	Colon cancer - Rectum (pT3N0Mx)	0.06
6	CRC-BB3	ชาย	65	Colon cancer - Sigmoid (6/12nodes)	0.22
7	CRC-BB4	หญิง	66	Colon cancer - Sigmoid (6/20nodes)	0.22

8	CRC-BB7	ชาย	73	Colon cancer - Sigmoid (pT4bN0Mx)	0.22
9	CRC-BB9	ชาย	69	Colon cancer - Descending	0.10

ตารางที่ 18 ตารางแสดงลักษณะการวิเคราะห์ร่วมกันของข้อมูลยีนทั้งหมดระหว่าง methylation microarray และ expression microarray ที่มาจากการใช้โปรแกรม CU-DREAM

Experiment	a	b	c	d	Lower 95% CI	Upper 95% CI	OR	P-value
Intragenic_Met_up_GSE11545_up	760	7,252	292	5,369	1.68	2.22	1.93	8.52E-21
Intragenic_Met_up_GSE10715_up	1,273	8,994	636	6,609	1.33	1.63	1.47	3.70E-14
Downstream_Met_up_GSE10715_up	448	2,140	1,103	7,505	1.26	1.61	1.42	6.37E-09
Downstream_Met_up_GSE11545_up	282	2,124	604	6,346	1.20	1.62	1.39	1.21E-05
Upstream_Met_up_GSE10715_up	824	5,556	1,064	9,971	1.26	1.53	1.39	2.17E-11
Upstream_Met_up_GSE11545_up	489	5,297	561	7,295	1.06	1.36	1.20	4.54E-03
Intragenic_Met_dn_GSE11545_up	699	7,928	353	4,693	1.03	1.34	1.17	1.91E-02
Intragenic_Met_up_GSE31023_up	75	6,778	48	5,001	0.80	1.66	1.15	4.44E-01
Downstream_Met_dn_GSE47756_up	561	2,809	1,574	8,927	1.02	1.26	1.13	2.03E-02
Downstream_Met_up_GSE31023_up	22	2,178	56	6,238	0.69	1.85	1.13	6.41E-01
Downstream_Met_dn_GSE11545_up	252	2,231	634	6,239	0.95	1.30	1.11	1.77E-01
Downstream_Met_dn_GSE10715_up	372	2,138	1,179	7,507	0.98	1.26	1.11	1.11E-01
Downstream_Met_up_GSE47756_up	542	2,759	1,593	8,977	1.00	1.23	1.11	6.09E-02
Upstream_Met_up_GSE47756_up	1,236	6,826	1,888	11,332	1.01	1.17	1.09	3.58E-02
Downstream_Met_up_GSE31023_dn	91	2,109	242	6,052	0.84	1.38	1.08	5.44E-01
Upstream_Met_dn_GSE10715_up	679	5,343	1,209	10,184	0.97	1.18	1.07	1.80E-01
Intragenic_Met_up_GSE47756_up	1,800	10,126	1,341	8,064	0.99	1.15	1.07	8.76E-02
Intragenic_Met_dn_GSE47756_up	1,934	10,983	1,207	7,207	0.97	1.14	1.05	2.06E-01
Upstream_Met_dn_GSE10715_dn	1,174	4,848	2,171	9,222	0.95	1.11	1.03	4.84E-01
Upstream_Met_dn_GSE11545_up	458	5,410	592	7,182	0.90	1.17	1.03	6.80E-01
Upstream_Met_up_GSE31023_dn	175	4,592	261	6,858	0.82	1.22	1.00	9.89E-01
Upstream_Met_dn_GSE31023_up	50	4,814	73	6,949	0.69	1.42	0.99	9.51E-01
Intragenic_Met_dn_GSE10715_up	1,162	9,632	747	5,971	0.87	1.06	0.96	4.65E-01
Downstream_Met_up_GSE47756_dn	582	2,719	1,921	8,649	0.87	1.07	0.96	4.79E-01
Upstream_Met_dn_GSE47756_up	1,159	6,912	1,965	11,246	0.89	1.04	0.96	3.04E-01
Upstream_Met_dn_GSE11545_dn	372	5,496	515	7,259	0.83	1.10	0.95	5.04E-01
Intragenic_Met_dn_GSE10715_dn	2,027	8,767	1,322	5,396	0.87	1.02	0.94	1.41E-01
Intragenic_Met_up_GSE47756_dn	2,165	9,761	1,809	7,596	0.87	1.00	0.93	4.41E-02
Intragenic_Met_dn_GSE31023_dn	256	6,947	180	4,519	0.76	1.12	0.93	4.32E-01
Upstream_Met_dn_GSE47756_dn	1,419	6,652	2,524	10,687	0.84	0.97	0.90	5.50E-03
Upstream_Met_up_GSE47756_dn	1,410	6,652	2,533	10,687	0.83	0.96	0.89	2.34E-03
Upstream_Met_dn_GSE31023_dn	167	4,697	269	6,753	0.73	1.09	0.89	2.57E-01
Intragenic_Met_dn_GSE31023_up	71	7,132	52	4,647	0.62	1.27	0.89	5.24E-01
Downstream_Met_dn_GSE47756_dn	556	2,814	1,947	8,554	0.78	0.96	0.87	7.30E-03
Intragenic_Met_dn_GSE47756_dn	2,280	10,637	1,694	6,720	0.79	0.91	0.85	5.36E-06
Upstream_Met_up_GSE31023_up	44	4,723	79	7,040	0.57	1.20	0.83	3.24E-01
Downstream_Met_dn_GSE31023_dn	73	2,086	260	6,075	0.63	1.07	0.82	1.35E-01
Intragenic_Met_up_GSE10715_dn	1,829	8,438	1,520	5,725	0.76	0.88	0.82	1.55E-07

Upstream_Met_up_GSE10715_dn	1,088	5,292	2,257	8,778	0.74	0.87	0.80	4.08E-08
Downstream_Met_up_GSE10715_dn	358	2,230	1,468	7,140	0.69	0.88	0.78	1.01E-04
Intragenic_Met_up_GSE31023_dn	225	6,628	211	4,838	0.64	0.94	0.78	1.01E-02
Upstream_Met_up_GSE11545_dn	309	5,477	578	7,278	0.62	0.82	0.71	2.34E-06
Downstream_Met_up_GSE11545_dn	106	2,300	427	6,523	0.57	0.88	0.70	1.52E-03
Downstream_Met_dn_GSE10715_dn	319	2,191	1,507	7,179	0.61	0.79	0.69	2.98E-08
Intragenic_Met_dn_GSE11545_dn	461	8,166	425	4,621	0.54	0.70	0.61	1.70E-12
Intragenic_Met_up_GSE11545_dn	409	7,603	477	5,184	0.51	0.67	0.58	7.82E-15
Downstream_Met_dn_GSE31023_up	13	2,146	65	6,270	0.32	1.06	0.58	7.45E-02

ตารางที่ 19 ข้อมูลการจัดกลุ่มยีนที่มีทั้งระดับหมู่เมทิลและระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น

Biological Process	Gene			
Biological adhesion (GO:0022610)	<i>PLOD1</i>	<i>ITGA2B</i>	<i>VCAN</i>	<i>MMP9</i>
	<i>ICAM1</i>	<i>CENTB1</i>	<i>ICAM3</i>	
	<i>ITGA5</i>	<i>PLXND1</i>	<i>ITGA2B</i>	
Biological regulation (GO:0065007)	<i>JUND</i>	<i>CAPZB</i>	<i>ECE1</i>	<i>TNFRSF1B</i>
	<i>P4HB</i>	<i>ECE1</i>	<i>LPPR2</i>	<i>ZFPM1</i>
	<i>RRAGC</i>	<i>NUCB1</i>	<i>SSH2</i>	<i>PLXND1</i>
	<i>STAT5B</i>	<i>STK24</i>	<i>TYK2</i>	<i>TNFRSF1A</i>
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	<i>ATG7</i>	<i>CAPZB</i>	<i>ATXN2</i>	<i>ATG9A</i>
	<i>VPS4A</i>	<i>BAP1</i>	<i>CLN6</i>	<i>STK24</i>
	<i>FLII</i>	<i>VAMP2</i>	<i>TBL1X</i>	<i>CFL1</i>
	<i>SSH2</i>	<i>PLXND1</i>	<i>TRIP6</i>	<i>COTL1</i>
Cellular process (GO:0009987)	<i>ACRBP</i>	<i>CAPZB</i>	<i>ADRBK1</i>	<i>JUND</i>
	<i>ECE1</i>	<i>ACTR1A</i>	<i>ARF1</i>	<i>MAP1S</i>
	<i>EXOC3</i>	<i>ARF3</i>	<i>ARHGAP27</i>	<i>NPLOC4</i>
	<i>LPP</i>	<i>ARHGDB</i>	<i>PXN</i>	<i>RRAGC</i>
	<i>ATG7</i>	<i>SSH2</i>	<i>ATXN2</i>	<i>HIRA</i>
	<i>ATG9A</i>	<i>STK24</i>	<i>B3GNT8</i>	<i>TNFRSF1A</i>
	<i>TCF7L2</i>	<i>BAP1</i>	<i>CBL</i>	<i>PXN</i>
	<i>TYK2</i>	<i>CAPZB</i>	<i>CENTB1</i>	<i>SPEN</i>
	<i>VCAN</i>	<i>SLC16A3</i>	<i>SPEN</i>	<i>SLC16A3</i>
	<i>SSH1</i>	<i>OTUD5</i>	<i>TEX261</i>	<i>LILRB2</i>
	<i>STAT5B</i>	<i>STXBP2</i>	<i>TBL1X</i>	<i>ICAM3</i>
	<i>TCF7L2</i>	<i>TIMP2</i>	<i>TYK2</i>	<i>PGS1</i>
	<i>UBA7</i>	<i>TRIP6</i>	<i>WDR42A</i>	<i>TNFRSF1B</i>
	<i>ZFPM1</i>	<i>ZNF672</i>	<i>UBE2R2</i>	<i>EMILIN2</i>
	<i>RRAGC</i>	<i>RNF24</i>	<i>TYK2</i>	<i>FMNL1</i>
	<i>CLN6</i>	<i>ZFPM1</i>	<i>CFL1</i>	<i>GDI1</i>
	<i>CTSD</i>	<i>VAC1</i>	<i>CKAP4</i>	<i>PLP2</i>
	<i>DGAT1</i>	<i>UQCRC1</i>	<i>CLN6</i>	<i>GNB2</i>
	<i>EMILIN2</i>	<i>STXBP2</i>	<i>COTL1</i>	<i>PLXND1</i>

	<i>FLII</i>	<i>MTRF1L</i>	<i>CTSD</i>	<i>GPSM3</i>
	<i>FOXD3</i>	<i>PARVG</i>	<i>DDEF1</i>	<i>ICAM1</i>
	<i>GNB2</i>	<i>LRRC4</i>	<i>DGAT1</i>	<i>ELL</i>
	<i>P4HB</i>	<i>ECE1</i>	<i>LPPR2</i>	
Developmental process (GO:0032502)	<i>ACRBP</i>	<i>ANKRD11</i>	<i>ACRBP</i>	<i>ADAM8</i>
	<i>FGD3</i>	<i>B3GNT8</i>	<i>LPP</i>	<i>FGD3</i>
	<i>PXN</i>	<i>ZFPM1</i>	<i>EFHD2</i>	<i>TRIP6</i>
	<i>FOXD3</i>	<i>SSH2</i>	<i>FGD2</i>	<i>JUND</i>
	<i>STK24</i>	<i>FGD3</i>	<i>P4HB</i>	<i>TNFRSF1A</i>
	<i>PLXND1</i>	<i>SSH2</i>	<i>TRIOBP</i>	<i>PXN</i>
	<i>STAT5B</i>	<i>TYK2</i>	<i>SSH1</i>	<i>WDR42A</i>
	<i>VCAN</i>	<i>TNFRSF1B</i>	<i>ZFPM1</i>	
Immune system process (GO:0002376)	<i>AZU1</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>GBP2</i>	<i>ZFPM1</i>
	<i>TNFRSF1B</i>	<i>TYK2</i>	<i>IRF9</i>	<i>STAT5B</i>
Localization (GO:0051179)	<i>ARF1</i>	<i>EXOC3</i>	<i>SORL1</i>	<i>SLC35A4</i>
	<i>RIN3</i>	<i>ARF3</i>	<i>EXOC7</i>	<i>VAMP2</i>
	<i>SEC61A1</i>	<i>TYK2</i>	<i>PRAF2</i>	<i>TEX261</i>
	<i>EHD1</i>	<i>SLC16A3</i>	<i>STXBP2</i>	<i>PLXND1</i>
Locomotion (GO:0040011)	<i>TYK2</i>	<i>PLXND1</i>	<i>SEMA4A</i>	
Metabolic process (GO:0008152)	<i>ATG7</i>	<i>ECE1</i>	<i>AZU1</i>	<i>SPEN</i>
	<i>ATG9A</i>	<i>GALNT2</i>	<i>B3GNT8</i>	<i>STAT5B</i>
	<i>PRAF2</i>	<i>MXD4</i>	<i>BAP1</i>	<i>TIMP2</i>
	<i>CAPN1</i>	<i>SND1</i>	<i>CAPN1</i>	<i>UQCRC1</i>
	<i>CTSD</i>	<i>SORL1</i>	<i>CDA</i>	<i>ZFPL1</i>
	<i>DGAT1</i>	<i>STK24</i>	<i>CKAP4</i>	<i>ZNF335</i>
	<i>IRF9</i>	<i>TBL1X</i>	<i>CLPTM1</i>	<i>UBA7</i>
	<i>JUND</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>DGAT1</i>	<i>SLC35A4</i>
	<i>NPLOC4</i>	<i>TYK2</i>	<i>DRAP1</i>	<i>RYBP</i>
	<i>PCGF1</i>	<i>ZFPL1</i>	<i>ECE1</i>	<i>RNF24</i>
	<i>PGS1</i>	<i>ZFPM1</i>	<i>ELL</i>	<i>PLXND1</i>
	<i>PI4KB</i>	<i>ZNF672</i>	<i>GTPBP1</i>	<i>PCGF1</i>
	<i>RRAGC</i>	<i>WDR42A</i>	<i>IRF9</i>	<i>LPPR2</i>
	<i>SLC2A4RG</i>	<i>VPS4A</i>	<i>LCAT</i>	<i>LRRC4</i>
	<i>MED16</i>	<i>MTRF1L</i>	<i>NADK</i>	
Multicellular organismal process (GO:0032501)	<i>ACRBP</i>	<i>ANKRD11</i>	<i>ADAM8</i>	<i>SSH1</i>
	<i>STXBP2</i>	<i>C9orf167</i>	<i>SSH2</i>	<i>TNFRSF1B</i>
	<i>ECE1</i>	<i>EHD1</i>	<i>GDI1</i>	<i>ZFPM1</i>
	<i>GPSM3</i>	<i>ATXN7L1</i>	<i>PLXND1</i>	<i>TNFRSF1A</i>
	<i>GNB2</i>	<i>STK24</i>	<i>BAP1</i>	<i>VCAN</i>
Reproduction (GO:0000003)	<i>ADAM8</i>	<i>B3GNT8</i>	<i>ACRBP</i>	

Response to stimulus (GO:0050896)	<i>ATG7</i>	<i>STK24</i>	<i>LPPR2</i>	<i>STAT5B</i>
	<i>JUND</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>LRRC4</i>	<i>TIMP2</i>
	<i>P4HB</i>	<i>RRAGC</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>TNFRSF1B</i>
	<i>PGS1</i>	<i>TYK2</i>	<i>SEMA4A</i>	



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1. ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ	นางสาวปภัศสร บุญสงเสริม
เพศ	หญิง
วัน/เดือน/ปี	22 ตุลาคม 2533
ที่อยู่	1/3 ถนนเทศบาล2 ซอย2 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร 6200
เบอร์โทรศัพท์	0877305997
อีเมล	papatsonyok16@gmail.com

2. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558 – 2560	วุฒิกการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรการแพทย แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2552 – 2556	วุฒิกการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต(ชีววิทยา) สาขาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2556 – 2556	นักนิเวศวิทยาศาสตร์ ศูนย์บริหารจัดการวัตถุพยาน สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม
พ.ศ. 2556 – 2558	นักวิชาการวิทยาศาสตรการแพทย หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตรศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY