

การเกิดเมทิลเลชั่นของยีน *RHEB* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตัวบ่งชี้
ในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยวิธี Real – Time PCR



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RHEB methylation in white blood cells as tumor marker
for breast cancer screening by Real – Time PCR



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

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเกิดเมทิลเลชันของยีน <i>RHEB</i> ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยวิธี Real – Time PCR
โดย	น.ส.สุชาสินี อาชายุทธ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์นครินทร์ กิตกำธร)

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

..... กรรมการ
(ดร.เจริญชัย พุฒิปัญญาเลิศ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(เรืออากาศเอก นายแพทย์สมชาย ธนะสิทธิชัย)

สุธาสนี อาษายุทธ์ : การเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยวิธี Real – Time PCR. (*RHEB* methylation in white blood cells as tumor marker for breast cancer screening by Real – Time PCR) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร. นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำธร

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติของเซลล์สโตรมาที่อยู่ล้อมรอบเซลล์มะเร็งเป็นหนึ่งในกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับเหนือพันธุกรรมที่เกิดจากการหลั่งของเซลล์มะเร็ง เราค้นหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกิดจากการหลั่งของเซลล์มะเร็งเต้านมที่จะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมได้ เราระบุยีนที่มีการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสของผู้มีสุขภาพดีร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม 3 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันไมโครแอรีย์ จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ 6 ตำแหน่ง CpG ที่เกิดเมทิลเลชันถูกเลือกนำมาทดสอบเบื้องต้นเพื่อระบุตำแหน่ง CpG ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการตรวจหาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยปฏิกิริยา methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) โดยยีน *RHEB* (cg03998173) ได้รับเลือกเป็นยีนตรวจสอบด้วยผลความไว 100% และความจำเพาะ 80% ต่อมานำตัวบ่งชี้การเกิดเมทิลเลชันนี้ทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 200 ราย และผู้มีสุขภาพดี 200 ราย ด้วยวิธี SYBR green-based real-time MSP (RT-MSP) โดยพบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 188 ราย (94%) และผู้มีสุขภาพดี 59 ราย (29.50%) ด้วยความไวที่สูง 94% และความจำเพาะ 70.50% ($P < 0.0001$) สรุปได้ว่า การเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งเต้านมที่มีความไวและจำเพาะที่สูงจากการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ดังนั้นการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* อาจเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งเต้านมในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5974119530 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: BREAST CANCER, WBCS, RHEB METHYLATION, TUMOR MARKER,
BREAST CANCER SCREENING

Sutasinee Asayut : *RHEB* methylation in white blood cells as tumor marker for breast cancer screening by Real – Time PCR. Advisor: Prof. APIWAT MUTIRANGURA, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Nakarin Kitkumthorn, Ph.D.

Aberrant DNA methylation of tumor surrounding stromal cells is one of epigenetic changes, partly caused by the secretion of tumor cells. We searched the tumor-induced DNA methylation profile in white blood cells (WBCs) caused by the secretion of breast cancer cell, that will be possible marker for breast cancer screening. Using DNA methylation microarray, we identified aberrant DNA methylated genes from co-culture model between healthy controls peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with 3 breast cancer cell lines. From bioinformatics analysis, 6 methylated CpG sites were selected for preliminary test to determine the most effective CpG sites for detection in breast cancer patient WBCs using methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). After test, the cg03998173 of *RHEB* was selected as a validation gene with the result of 100% sensitivity and 80% specificity. Later, this methylation marker determined in the WBCs from 200 breast cancer patients and 200 healthy controls by SYBR green-based real-time MSP (RT-MSP). The *RHEB* methylation were detected in WBCs from 188 (94%) breast cancer patients and 59 (29.50%) healthy controls with high sensitivity of 94% and specificity of 70.50% (P-value<0.0001). In conclusion, the *RHEB* methylation is a new highly sensitivity and specificity tumor marker from DNA methylation change in white blood cells of breast cancer patient blood. Therefore, the *RHEB* methylation may consider as a tumor marker for breast cancer screening.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์นครินทร์ กิตกำธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำทั้งด้านความรู้และประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย ความเมตตา เสียสละเวลา รวมถึงตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร อาจารย์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.เจริญชัย พุดมปัญญาเลิศ ที่เป็นทั้งนักวิจัยผู้เริ่มทำการวิจัยในส่วนของเลี้ยงเซลล์แบบ Co - Culture และดีเอ็นเอเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ ให้ความรู้ และคำปรึกษาในกระบวนการวิจัยในทุกขั้นตอนโดยละเอียด รวมถึงเป็นกรรมการสอบและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ เรืออากาศเอก นายแพทย์สมชาย ธนะสิทธิชัย ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ กรมการแพทย์ ที่ให้โอกาสลาศึกษาต่อ และร่วมวิจัยในฐานะแพทย์เจ้าของไข้ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมดที่เข้าร่วมในการวิจัยนี้ โดยร่วมเก็บตัวอย่างเลือด ให้คำปรึกษาช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ รวมถึงเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. กัญวลัชฎ์ ชเลิศเพ็ชร ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และสละเวลาสอนเทคนิค MSP และ SYBR green-based RT-MSP รวมถึงนักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านภายในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาวศิริพร ขุนศรี สาขามะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และสละเวลาสอนเทคนิค bisulfite conversion และ SYBR green-based RT-MSP

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ผู้สนับสนุนเงินทุนวิจัยในการวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามงานวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานงานวิจัย.....	2
1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	2
2.1 มะเร็งเต้านม.....	2
2.2 การตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านม.....	10
2.3 การหั่นของเซลล์มะเร็ง.....	11
2.4 ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน.....	12
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	15
3.1 กรอบความคิดงานวิจัย.....	15

3.2 รูปแบบการวิจัย	15
3.3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	15
3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง	15
3.3.1.1 ขนาดตัวอย่าง.....	15
3.3.1.2 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง	16
3.3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด	16
3.3.3 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส.....	17
3.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม.....	17
3.3.5 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์มะเร็งเต้านมร่วมกันแบบ Co-culture	18
3.3.6 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว	19
3.3.7 การตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์.....	20
3.3.8 การทำ DNA Methylation Microarray.....	21
3.3.9 การคัดเลือกยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ความจำเพาะต่อมะเร็งเต้านม	21
3.3.10 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X.....	22
3.3.11 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกตำแหน่ง CpG ด้วยวิธี MSP.....	23
3.3.12 การหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี real-time PCR.....	25
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์.....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	26
4.1 การทำ DNA Methylation Microarray	26
4.2 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกตำแหน่ง CpG ด้วยวิธี MSP	32
4.3 ลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมการศึกษา.....	33
4.4 การหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี real-time PCR	35

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	36
บรรณานุกรม.....	40
ประวัติผู้เขียน.....	46



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing และขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของ 3 ยีน..... 24

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ของ DNA methylation profiles..... 28

ตารางที่ 3 40 candidate genes จำแนกตาม Gene Ontology..... 29

ตารางที่ 4 ลักษณะพื้นฐานของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิง จำนวน 200 ราย 33



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะทางกายวิภาคของเต้านม	3
รูปที่ 2 ลักษณะทางกายวิภาคของหลอดเลือดบริเวณเต้านม	5
รูปที่ 3 ลักษณะทางกายวิภาคของต่อมน้ำเหลืองบริเวณเต้านม	7
รูปที่ 4 การเลี้ยงเซลล์แบบ Co-culture.....	19
รูปที่ 5 ผลงานแสดงวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
รูปที่ 6 แถบแบนดีเอ็นเอของ methylated CpG ทั้ง 6 ตำแหน่งใน 3 ยีน ด้วยวิธี MSP.....	32
รูปที่ 7 แผนภาพการกระจาย และกราฟ ROC	36



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มา และความสำคัญของปัญหา

มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งมากที่สุดเป็นอันดับหนึ่งของโรคมะเร็งในเพศหญิง จากข้อมูลอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งของทุกประเทศทั่วโลกซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วยที่จัดทำขึ้นโดยองค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (IARC) ที่เรียกว่า GLOBOCAN ในปี พ.ศ. 2561 พบว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ 2.1 ล้านคน ซึ่งคิดเป็นเกือบ 1 ใน 4 ของผู้ป่วยมะเร็งเพศหญิง มีอัตราการอุบัติการณ์มะเร็งเต้านมปรับมาตรฐานอายุ (Age Standardized Rate หรือ ASR) ทั่วโลกเท่ากับ 46.3 ต่อแสนประชากร และอัตราการตาย 13.0 ต่อแสนประชากร (1) ในประเทศไทยจากสถิติโรคมะเร็งของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2556 - 2558 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบอุบัติการณ์ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิง 31.4 คนต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2557 พบผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่จำนวน 14,804 คน (2) และจากข้อมูลสถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2560 พบการเสียชีวิตจากมะเร็งเต้านมจำนวน 4,177 คน (3)

การตรวจคัดกรองเพื่อค้นหามะเร็งเต้านม (Breast cancer screening) ที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยในปัจจุบันมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่ การตรวจเต้านมด้วยตนเอง (Breast self examination, BSE) การตรวจเต้านมโดยแพทย์หรือบุคลากรทางการแพทย์ที่ได้รับการฝึกอบรม (Clinical breast examination, CBE) และการตรวจด้วยเครื่องถ่ายภาพรังสีเต้านม หรือแมมโมแกรม (Mammography: MM) ร่วมกับการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (Ultrasound) ประกอบกันเพื่อการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำยิ่งขึ้น (4-6) ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจคัดกรองมะเร็งที่ไม่รุกรานร่างกาย ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่มีการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากเลือดที่มีความไวเพียงพอสำหรับการตรวจหามะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกได้ (7) ตัวอย่างเช่น DNA repair associated (*BRCA1*) (8-11), *BRCA2* (9), adenomatous polyposis coli (*APC*) (8, 10), *ATM* (8, 9), *TP53* (9), glutathione S-transferase pi 1 (*GSTP1*), retinoic acid receptor beta 2 (*RARB2*) (8, 11) และ Ras association domain family member 1A (*RASSF1A*) (8, 10, 11)

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า เซลล์มะเร็งเต้านมมีการหลั่งสารสู่เซลล์สโตรมาที่อยู่ล้อมรอบทำให้เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติไปของเซลล์ข้างเคียง (12) ซึ่งทำให้ค่านึงถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากที่ไหลผ่านเซลล์มะเร็งในแต่ละวัน โดยได้รับการกระตุ้นจากเซลล์มะเร็งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ดังนั้นการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันของเซลล์เม็ดเลือดที่เปลี่ยนแปลงไปจากการกระตุ้นของเซลล์มะเร็งน่าจะเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งจากเลือดที่มีความไวและความ

ความจำเพาะที่สูง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีมุ่งหมายในการหาตัวบ่งชี้ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเม็ดเลือดขาว โดยมีความไวและความจำเพาะสูงต่างจากตัวบ่งชี้ที่จากเซลล์มะเร็ง

1.2 คำถามงานวิจัย

เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวได้รับการกระตุ้นด้วยสารที่หลังจากเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นการนำรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เปลี่ยนแปลงไปมาใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้หรือไม่

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

เซลล์เม็ดเลือดขาวได้รับการกระตุ้นด้วยสารที่หลังจากเซลล์มะเร็งเต้านม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งนี้ สามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งในเลือดที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้

1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย

สร้างและพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมจากเลือดวิธีใหม่ โดยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งเต้านม และสามารถนำรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เปลี่ยนแปลงไปนี้มาพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยวิธี real-time PCR ได้

CHULALONGKORN UNIVERSITY

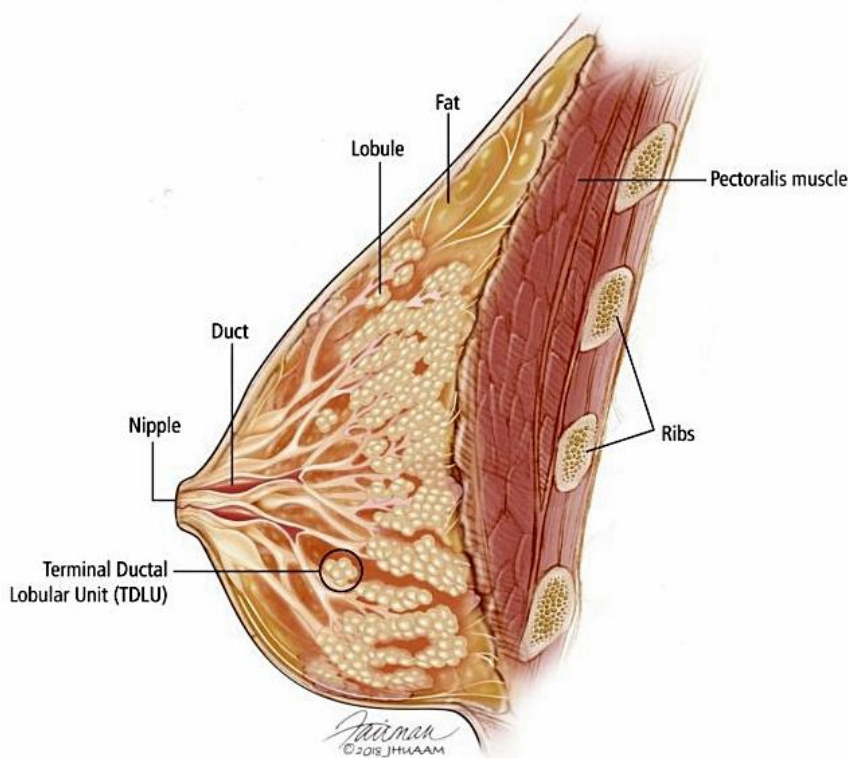
บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเร็งเต้านม

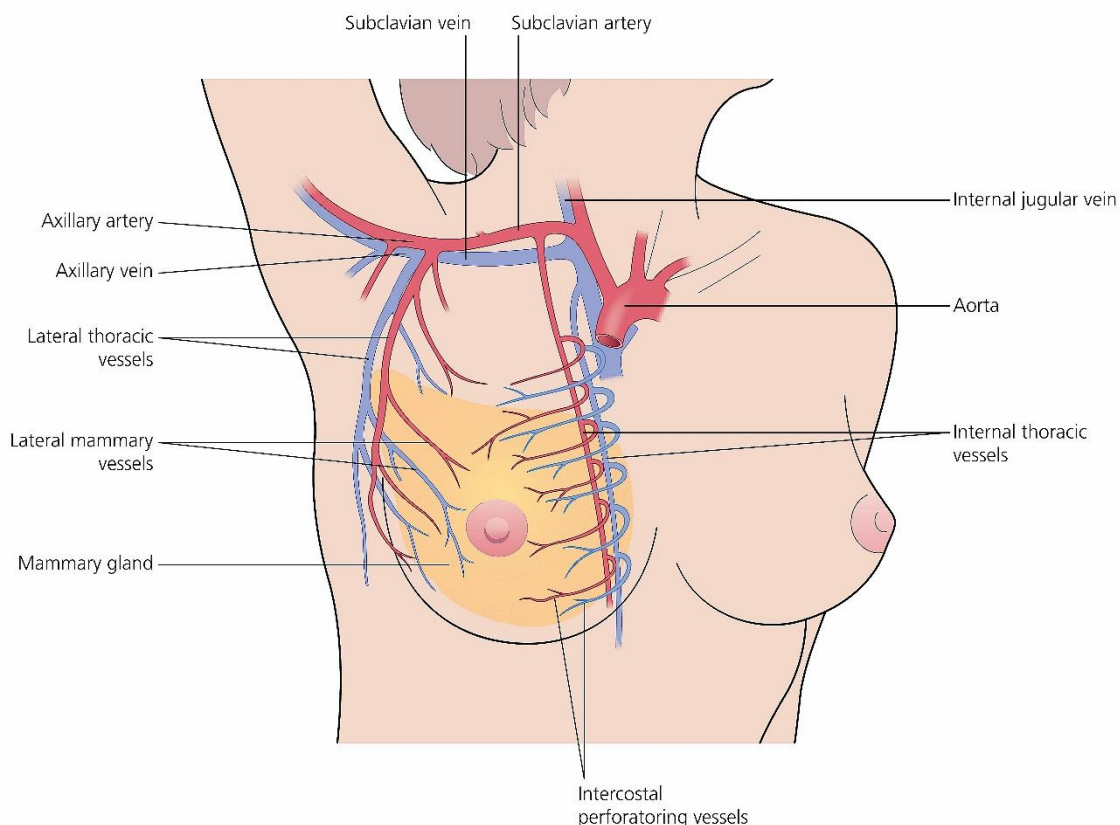
เต้านมเป็นอวัยวะที่มีโครงสร้างสะท้อนถึงการทำงานพิเศษในการผลิตน้ำนมเพื่อให้นมบุตร ประกอบด้วย ต่อมผลิตน้ำนม (lobules) มีหน้าที่ในการผลิตน้ำนมโดยเชื่อมต่อกับท่อน้ำนม (ducts) ในการส่งต่อน้ำนมไปสู่หัวนม โครงสร้างเต้านมของผู้ชายนั้นเกือบจะเหมือนกับเต้านมของผู้หญิง ยกเว้นเนื้อเยื่อเต้านมของผู้ชายนั้นไม่มีต่อมผลิตน้ำนมและมีท่อน้ำนมจำนวนเพียงเล็กน้อยและไม่มีพัฒนาเหมือนในผู้หญิงเนื่องจากผู้ชายไม่มีความจำเป็นทางด้านสรีระในการผลิตน้ำนม นอกจากนี้เต้านมผู้หญิงยังประกอบด้วยเซลล์ไขมันจำนวนมากที่เรียกว่า เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ที่ไล่จาก

กระดูกลิ้นปลาร้าลงใต้วงแขนไปสู่กึ่งกลางของกระดูกซี่โครง เนื้อเยื่อไขมันภายในเต้านมนั้นเป็นโครงข่ายของเอ็น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดเยื่อเหนียว (fibrous connective tissue) เส้นประสาท ท่อน้ำเหลือง ต่อมน้ำเหลืองและหลอดเลือด ระบบน้ำเหลืองเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นโครงข่ายของท่อน้ำเหลืองและต่อมน้ำเหลืองที่ทำงานเชื่อมโยงไปทั่วร่างกาย (13-16) โดยเนื้อเยื่อเต้านมจะถูกล้อมรอบด้วยชั้นบางๆของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า ฟาสเซีย (fascia) โดยชั้นลึกๆจะอยู่บนกล้ามเนื้อหน้าอก (pectoralis muscle) ส่วนชั้นที่อยู่ตื้นจะอยู่ที่ชั้นผิวหนังของเต้านม ผิวหนังที่ต่อหุ้มเต้านมมีต่อมเหงื่อ รูขุมขนและคุณสมบัติอื่นๆเหมือนกับผิวหนังบริเวณอื่นในร่างกาย กายวิภาคของเต้านมในวัยผู้ใหญ่จะอยู่บนกล้ามเนื้อหน้าอกซึ่งอยู่บนโครงกระดูกซี่โครง เนื้อเยื่อเต้านมแผ่ออกในแนวนอนจากขอบของกระดูกอก (sternum) ไปจนถึงเส้นกึ่งกลางรักแร้ (midaxillary line) ส่วนปลายของเนื้อเยื่อเต้านมเรียกว่า “axillary tail of Spence” แผ่ไปถึงบริเวณใต้วงแขน ซึ่งถือว่าเป็นส่วนที่มีความสำคัญมากเนื่องจากมะเร็งเต้านมสามารถพัฒนาจากส่วนปลายนี้ได้ ถึงแม้ว่ามะเร็งเต้านมส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นจากเซลล์ของต่อมผลิตน้ำนมและท่อน้ำนมส่วนปลาย (terminal ducts) เพราะมีการกระจายตัวทั่วทั้งเนื้อเยื่อเส้นใยและเนื้อเยื่อไขมันซึ่งเป็นเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของเต้านมก็ตาม (13) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะทางกายวิภาคของเต้านม (13)

ระบบเลือดของเต้านมเริ่มมารักแร้ หลอดเลือดแดงหลังกระดูกหน้าอก หรือ internal thoracic artery (internal mammary artery, IMA) และ หลอดเลือดแดงระหว่างซี่โครง (intercostal arteries) (13, 16) โดยมีหลอดเลือดแดงหลังกระดูกหน้าอกเป็นหลอดเลือดหลักของระบบไหลเวียนเลือดภายใต้เนื้อเยื่อเต้านมที่แตกสาขาไปตามผนังหน้าอกกินพื้นที่หนึ่งในสี่ของช่องว่างระหว่างซี่โครงเพื่อทำหน้าที่ส่งผ่านเลือดเข้าสู่หลอดเลือดดำใน นอกจากนี้หลอดเลือดแดงหลังกระดูกหน้าอกยังส่งเลือดไปสู่หลอดเลือดแดงระหว่างซี่โครงส่วนปลาย (posterior intercostal arteries) และเส้นเลือดสาขาของหลอดเลือดแดงระหว่างซี่โครงที่อยู่ลึกในพื้นที่ผิวของเต้านม หลอดเลือดแดงรักแร้ (axillary artery) จะเชื่อมไปสู่หลอดเลือดแดงทรวงอกส่วน superior thoracic artery ซึ่งเป็นสาขาบริเวณหน้าอกของหลอดเลือดแดง thoracoacromial artery หลอดเลือดแดงหน้าอกส่วนปลาย (lateral thoracic artery) และหลอดเลือดแดง subscapular artery หลอดเลือดแดง thoracoacromial artery ทะลุผ่านกล้ามเนื้อทั้งหลายเพื่อเป็นช่องทางที่สำคัญเข้าสู่เต้านมจากด้านบน หลอดเลือดแดงหน้าอกส่วนปลายลัดเลาะไปตามขอบของกล้ามเนื้อ pectoralis minor muscle โดยที่ผ่านเข้าสู่หลอดเลือดแดงเต้านม external mammary artery ซึ่งไหลผ่านทางกล้ามเนื้อไปยังส่วนบนด้านนอกของเต้านมอีกด้วย หลอดเลือดแดงทั้งหมดเหล่านี้เชื่อมต่อซึ่งกันด้วยแขนงเส้นเลือดของเต้านมทั้งสองเต้าและบนผิวหนังด้วย โดยรวมแล้วระบบเลือดของเต้านม 60% มาจากหลอดเลือดแดง internal thoracic artery และ 30% มาจากหลอดเลือดแดง lateral thoracic artery และอีก 10% มาจากหลอดเลือดแดง thoracoacromial หลอดเลือดแดง intercostals หลอดเลือดแดง subscapular และหลอดเลือดแดง thoracodorsal ส่วนการระบายเลือดดำเกิดผ่านทาง anastomotic plexus ในเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังที่อยู่ใต้และรอบหลอดเลือดดำ ช่องนี้จะระบายเลือดดำไปสู่ด้านนอกผ่านหลอดเลือดดำ large subcutaneous veins ซึ่งไปตามหลอดเลือดแดงและไหลเข้าสู่เส้นเลือดระหว่างซี่โครง (intercostals) หลอดเลือดดำที่รักแร้ และเข้าสู่เส้นเลือดดำ internal thoracic veins ในที่สุด (16) ดังรูปที่ 2



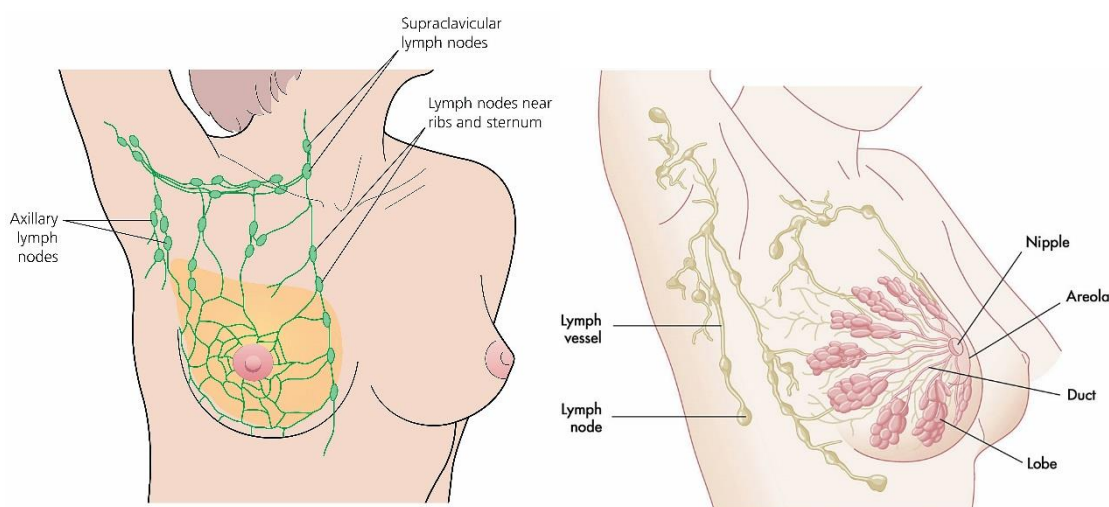
รูปที่ 2 ลักษณะทางกายวิภาคของหลอดเลือดบริเวณเต้านม (16)

ระบบเลือดทำหน้าที่ในการส่งสารอาหารต่างๆ อย่างเช่นออกซิเจนไปสู่เนื้อเยื่อเต้านม ท่อน้ำเหลืองของเต้านมจะไหลไปในทิศทางตรงกันข้ามกับระบบเลือดและไหลเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง ซึ่งท่อน้ำเหลืองเหล่านี้เองที่เป็นช่องทางให้มะเร็งเต้านมลุกลามหรือแพร่กระจายไปตามต่อมน้ำเหลือง ท่อน้ำเหลืองส่วนใหญ่ไหลไปที่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ (axillary lymph nodes) ในขณะที่ท่อน้ำเหลืองจำนวนหนึ่งไหลไปยังต่อมน้ำเหลืองภายในเต้านมที่อยู่ลึกลงไป ในเต้านม ระบบการไหลของน้ำเหลืองนี้มีความสำคัญเนื่องจากการลุกลามของมะเร็งเต้านมมักเกี่ยวข้องกับต่อมน้ำเหลืองต่อมแรกแล้วแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองถัดๆ ไปที่เรียกว่า sentinel lymph node โดยศัลยแพทย์จะนำต่อมน้ำเหลืองเหล่านี้ไปตรวจหาการแพร่กระจายในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (13)

ระบบน้ำเหลืองของเต้านมมีการกระจายตัวไปตามท่อน้ำเหลืองสองส่วน ส่วนที่อยู่ตื้นๆ ที่เรียกว่า subepithelial หรือ subdermal และส่วนที่อยู่ลึกลงไป ในเต้านม ท่อน้ำเหลืองส่วน subepithelial เชื่อมต่อกับท่อน้ำเหลืองใต้ผิวหนังด้วยท่อน้ำเหลือง vertical lymphatics และท่อน้ำเหลืองที่อยู่ในชั้นที่ลึกลงไป ท่อน้ำเหลืองในส่วน subepithelial และ subdermal จะไหลมารวมกันที่บริเวณฐานนม (subareolar) ซึ่งเป็นส่วนที่ท่อน้ำเหลืองของท่อน้ำนม (lactiferous ducts) และท่อน้ำเหลืองของหัวนมและลานนม (nipple-areola complex, NAC) มาบรรจบกัน ในส่วนที่

น้ำเหลืองในส่วนที่อยู่ลึกนั้นน้ำเหลืองจะไหลไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้และต่อมน้ำเหลืองภายในเต้านม (internal thoracic nodes) โดยต่อมน้ำเหลืองที่บริเวณรักแร้มีอยู่ 20 - 30 ต่อมนซึ่งแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามกายวิภาค ต่อมน้ำเหลือง apical nodes รวมกันเป็น subclavian trunk ซึ่งด้านซ้ายจะระบายน้ำเหลืองเข้าสู่ท่อน้ำเหลือง thoracic duct โดยตรง ส่วนด้านขวาเป็นท่อเปล่าที่เชื่อมไปสู่ jugulosubclavian junction หรือต่อกับท่อน้ำเหลืองด้านขวาทั่วไป ในทางคลินิกและพยาธิวิทยา ต่อมน้ำเหลืองรักแร้แบ่งออกเป็น 3 ระดับตามตำแหน่งที่อยู่ที่ยับนกล้ามเนื้อ pectoralis minor ต่อมน้ำเหลืองระดับที่ 1 จะอยู่ใต้หรือระดับเดียวกับขอบด้านล่างของกล้ามเนื้อ pectoralis minor โดยรวมต่อมน้ำเหลือง external mammary ต่อมน้ำเหลือง axillary vein และต่อมน้ำเหลืองกระดูกสะบัก (scapular lymph nodes) ไว้ในกลุ่มนี้ด้วย ต่อมน้ำเหลืองระดับที่ 2 อยู่ลึกลงไปหรืออยู่หลังกล้ามเนื้อ pectoralis minor และรวมถึงกลุ่มต่อมน้ำเหลืองกลาง (central lymph node group) และต่อมน้ำเหลือง subclavicular ต่อมน้ำเหลืองระดับที่ 3 อยู่เหนือขอบบนของกล้ามเนื้อ pectoralis minor และต่อมน้ำเหลืองกลุ่ม subclavicular และ apical (16, 17)

ต่อมน้ำเหลืองภายในทรวงอกจะกระจายไปตามช่องว่างภายในทรวงอกและมีขนาดที่เล็กมาก ทำหน้าที่ในการระบายของเหลวจากภายในต่อมน้ำนม ผังทรวงอกส่วนหน้า (anterior chest wall) กะบังลมส่วนหน้า ส่วนบนและกล้ามเนื้อ rectus sheath รวมถึงกล้ามเนื้อส่วนบนของตับ ส่วนกลุ่มต่อมน้ำเหลืองระหว่างซี่โครง (intercostal nodes) เป็นเพียงส่วนเล็กๆในระบบการระบายน้ำเหลืองในเต้านม โดยเรียงตัวอยู่ใกล้ส่วนหัวของกระดูกซี่โครงและรับน้ำเหลืองมาจากท่อน้ำเหลืองส่วนที่อยู่ลึกกว่าจากด้านหลังของทรวงอกและจากการระบายในส่วนสุดท้ายจากต่อมน้ำนม การระบายน้ำเหลืองจากเต้านมสามารถไหลไปในเส้นทางอื่นก่อนที่จะไหลเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง โดยอาจจะไหลไปด้านข้างไปสู่ส่วนกลาง ส่วน transpectoral และไปสู่ส่วน retropectoral ก็ได้ เส้นทางการระบายน้ำเหลืองในเต้านมที่สำคัญที่สุดคือ 75% ของน้ำเหลืองจะระบายลงสู่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้ ถึงแม้ว่าโดยพื้นฐานแล้วน่าจะเกิดการระบายน้ำเหลืองจากกลุ่มท่อน้ำเหลืองที่อยู่ด้านข้างของเต้านมที่ได้รับน้ำเหลืองจากรักแร้แล้วระบายสู่ทรวงอกส่วนกลางแล้วเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองภายในทรวงอก (internal thoracic lymph nodes) ก็ตาม โดยทุกส่วนของเต้านมสามารถระบายน้ำเหลืองเข้าสู่ท่อน้ำเหลืองในทุกกลุ่มได้ การระบายน้ำเหลืองในส่วน transpectoral เกิดขึ้นผ่านต่อม rotter ที่อยู่ใต้กล้ามเนื้อทรวงอก pectoralis major โดยระบายผ่านท่อน้ำเหลืองตามหลอดเลือดแดง thoracoacromial เข้าสู่กลุ่มท่อน้ำเหลือง subclavicular ในท่อน้ำเหลืองระดับที่ 3 และส่วนสุดท้ายคือการระบายในส่วน retropectoral ที่อยู่ส่วนบนและภายในเต้านม แล้วไหลเข้าสู่กลุ่มท่อน้ำเหลือง subclavicular ในรักแร้ โดยผ่านท่อน้ำเหลืองที่เรียงตัวอยู่ส่วนใต้ของกล้ามเนื้อ pectoralis (16, 17) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะทางกายวิภาคของต่อมน้ำเหลืองบริเวณเต้านม (16, 18)

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่มีลักษณะเฉพาะที่เกิดขึ้นจากการเจริญเติบโตที่ไม่สามารถควบคุมได้ของเซลล์มะเร็งในเนื้อเยื่อบุผิวเต้านมทั้งในผู้หญิงและผู้ชาย โดยพบมะเร็งเต้านมในผู้ชายร้อยละ 1 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมดในสหรัฐอเมริกาและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งในผู้ชายน้อยกว่าร้อยละ 0.1 มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดของผู้หญิงทั่วโลก โดยมีอุบัติการณ์สูงขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น (19)

พยาธิวิทยาทางกายวิภาคของเต้านมมีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยโรคเต้านมทั้งในการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นและการประเมินในการพยากรณ์โรคและการจัดการผู้ป่วยในอนาคต หนึ่งในบทบาทที่สำคัญที่สุดคือใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างโรคมะเร็งเต้านมและโรคเต้านมที่ไม่ใช่มะเร็ง รวมถึงแยกความแตกต่างระหว่างเนื้องอกและมะเร็ง (20) ในกระบวนการวินิจฉัยโรคนั้นนักพยาธิวิทยาจะทำการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากการตัดชิ้นเนื้อ (tissue biopsy) หรือชิ้นเนื้อจากการผ่าตัด การวินิจฉัยโรคจะทำตามพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ชนิดเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological type) เกรดของก้อนมะเร็ง (tumour grade) และระยะโรคมะเร็งตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) มะเร็งเต้านมมีอย่างน้อย 20 ชนิดซึ่งมีความแตกต่างในทางสัณฐานวิทยา (morphology) และรูปแบบการเจริญเติบโต (21)

มะเร็งเต้านมมีหลายชนิดตามบริเวณที่เกิดมะเร็งบนเต้านม ไม่ว่าจะเป็นบริเวณท่อน้ำนมต่อมผลิตน้ำนม และเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆในเต้านม ชนิดของมะเร็งเต้านมจะแบ่งตามประเภทของเซลล์ที่ได้รับผลกระทบจากมะเร็งโดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเซลล์ที่เกี่ยวข้อง มะเร็งเต้านมแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ carcinomas และ sarcomas มะเร็งเต้านม carcinomas เป็นมะเร็งเต้านมที่เกิดขึ้นจากส่วนของเยื่อบุผิวของเต้านมซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงตัวกันของต่อมผลิตน้ำนมและท่อน้ำนมส่วนปลายที่ทำหน้าที่สร้างน้ำนม ส่วนมะเร็งเต้านม sarcomas เป็นมะเร็งเต้านมที่พบได้ยาก

มาก (น้อยกว่าร้อยละ 1 ของมะเร็งเต้านมระยะเริ่มแรก) ที่เกิดจากส่วนของเนื้อเยื่อโครงสร้าง (stromal) ของเต้านมซึ่งรวมถึง myofibroblasts และเซลล์หลอดเลือดด้วย แต่ในบางกรณี ก้อนมะเร็งเต้านมอาจจะมีเซลล์มะเร็งหลายประเภทรวมตัวกันอยู่ (22) ชนิดของมะเร็งเต้านมมีดังต่อไปนี้

1) Fibroadenomas พบได้บ่อยที่สุดในหญิงสาวมีลักษณะเป็นก้อนที่สามารถเคลื่อนที่ได้ การตรวจทางชิ้นเนื้อจะพบรอยโรคแบบ biphasic ประกอบไปด้วยทั้งเซลล์เยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อโครงสร้าง lobular carcinoma in situ อาจจะไม่ค่อยพบบ่อยในส่วนของเยื่อบุผิวแต่รอยโรคของมัน บดบังก้อนเนื้ออกได้ tubular adenomas เป็นมะเร็งชนิด fibroadenomas ที่ไม่ปกติพบในส่วน ของเยื่อบุต่อม intraduct papillomas เกิดการแพร่กระจายไปตามเยื่อบุผิวของท่อน้ำนมที่มีลักษณะ คล้ายใบเฟิร์นในเต้านมซึ่งอาจเป็นก้อนเดียวหรือหลายก้อนก็ได้ papillomas เกิดขึ้นภายในท่อน้ำนม หรือในส่วนที่เป็นกระเปาะท่อน้ำนมใกล้กับลานนม โดยจะไม่พบในสารคัดหลั่งจากหัวนม แต่ใน บางครั้งอาจพบเยื่อบุผิวหลุดออกจากรอยโรคในการเก็บตัวอย่างของเหลวจากเต้านมได้ แม้ว่า โดยทั่วไปแล้ว fibroadenomas มักจะประกอบไปด้วยเนื้องอกและ ductal carcinoma in situ แต่ ในบางครั้งจะพบ myofibroblastoma, myoepithelioma และ adenomyoepithelioma ร่วมอยู่ ด้วย ในปัจจุบันมักพบเซลล์เยื่อบุผิวและเซลล์ myoepithelial รวมถึง duct adenomas ที่มีความ คล้ายคลึงกับ intraduct papillomas แต่มีการเจริญเติบโตในรูปแบบก้อนที่ชัดเจนขึ้นรวมอยู่ด้วย (20)

2) Ductal carcinoma in situ (DCIS) หรือ intraductal carcinoma เป็นมะเร็งเต้านมที่ พบมากที่สุด อาจจะเป็นก้อนในเต้านม ในสารคัดหลั่งจากหัวนม หรือในโรคมะเร็งของหัวนม (Paget's disease) มีการพัฒนาไปตามเยื่อบุผิวชั้นในภายในท่อน้ำนมและถูกกั้นด้วยเนื้อเยื่อฐาน (basement membrane) ของท่อน้ำนม ซึ่งในบางครั้งอาจจะไปถึงส่วนของต่อมน้ำนม โดยเป็น มะเร็งชนิดที่ไม่ลุกลาม (non-invasive หรือ pre-invasive) แต่มีศักยภาพสูงที่จะพัฒนากลายไปเป็น มะเร็งชนิดลุกลาม (20, 22)

3) Invasive / Infiltrating breast cancer เป็นมะเร็งเต้านมประเภทรุกรานหรือแทรกซึม มี เซลล์มะเร็งที่บุกและแพร่กระจายออกสู่ภายนอกท่อน้ำนมและต่อมน้ำนมไปทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ โครงสร้างของเต้านม โดยผู้ป่วยมะเร็งเต้านมร้อยละ 90 - 95% จะเป็นมะเร็งชนิดนี้ สองในสามของ ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดนี้จะมีอายุ 55 ปีขึ้นไป invasive carcinomas มีความสามารถในการ แพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย เช่น ต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะอื่นๆ และก่อให้เกิดมะเร็งเต้านมระยะลุกลาม โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ invasive ductal carcinoma (IDC) เป็นมะเร็งเต้านม ที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 80 ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด ประกอบไปด้วย tubular carcinoma,

medullary carcinoma, mucinous carcinoma, papillary carcinoma และ cribriform carcinoma อีกชนิดหนึ่งคือ invasive lobular carcinoma (ILC) เป็นมะเร็งเต้านมชนิดที่สองที่พบบ่อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 10 - 15 ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด สามารถพบได้ผู้หญิงทุกวัยแต่มักพบในผู้หญิงสูงวัย (22)

มะเร็งเต้านมระยะลุกลามหรือมะเร็งเต้านมระยะที่ 4 เป็นมะเร็งเต้านมระยะสุดท้ายซึ่งมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆในร่างกาย การแพร่กระจายสามารถพบได้ในต่อมน้ำเหลืองในรักแร้ และ/หรือในบริเวณที่ห่างไกล เช่น ปอด ตับ กระดูก และสมอง ถึงแม้ว่ามะเร็งในจุดเริ่มต้นจะถูกกำจัดออกไปแล้ว เซลล์ microscopic tumor หรือ micro-metastases อาจยังคงอยู่ในร่างกายซึ่งทำให้สามารถกลับมาเป็นซ้ำและ มะเร็งสามารถกลับและแพร่กระจายได้ (22)

การแบ่งระยะโรคของมะเร็งเต้านมมีการแบ่งตามระบบที่เรียกว่า TMN ตาม the American Joint Committee on Cancer (AJCC) (23-26) ซึ่งเป็นกลุ่มผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรคมะเร็งที่ควบคุมการจำแนกและการสื่อสารข้อมูลเกี่ยวกับโรคมะเร็ง เพื่อให้แพทย์และโรงพยาบาลอธิบายโรคมะเร็งด้วยวิธีที่เป็นมาตรฐานเดียวกันและสามารถเปรียบเทียบและเข้าใจผลการรักษาได้ (23) โดยในปัจจุบัน AJCC ได้ออกระบบการแบ่งระยะโรคมะเร็งฉบับที่ 8 ในปี พ.ศ. 2560 มีการเพิ่มเติมการแบ่งระยะโรคให้แก่เนื้องอกศีรษะ (25, 26) โดย AJCC ใช้หลักในการแบ่งกลุ่มระยะโรคของมะเร็งตาม 2 หลัก (24) คือ ทางกายวิภาคจะขึ้นอยู่กับขนาดของก้อนเนื้อมะเร็งไม่ว่าจะบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงหรือไม่ก็ตาม (T) จำนวนต่อมน้ำเหลืองที่มะเร็งเข้าไปลุกลามไม่ว่าจะเป็นบริเวณรักแร้ ภายในเต้านม และ ipsilateral supraclavicular (N) และการแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นในร่างกาย (M) (23-26) อีกส่วนคือตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ได้แก่ ตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER) ตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor, PR) และตัวรับเฮอรัททู (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) (24)

นอกจากนี้ยังมีการแบ่งกลุ่มมะเร็งเต้านมตาม molecular subtype โดยขึ้นอยู่กับโปรไฟล์การแสดงออกของยีนมะเร็งเต้านม (extensive profiling) ที่ได้จากผล microarray ของดีเอ็นเอ, microRNA และโปรตีน ตามเกณฑ์ของเครือข่าย Cancer Genome Atlas (TCGA) (27, 28) แต่เนื่องจากการทำโปรไฟล์การแสดงออกของยีนนั้นมีราคาสูงและไม่สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติทางคลินิกเป็นประจำได้ ดังนั้นจึงมีการแบ่งกลุ่ม molecular subtype ตามคุณสมบัติทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry, IHC) แทน (28) ซึ่งแบ่งตามตัวรับฮอร์โมนและโปรตีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ER PR HER2 และโปรตีน Ki-67 ตาม the St. Gallen Consensus 2013 โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม Luminal A มีค่า ER เป็นบวก PR เป็นบวก HER2 เป็นลบ และ Ki-67

น้อยกว่าร้อยละ 14 กลุ่ม Luminal B (HER2 negative) มีค่า ER เป็นบวก PR เป็นลบหรือต่ำ HER2 เป็นลบ และ Ki-67 มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 14 กลุ่ม Luminal B (HER2 positive) มีค่า ER เป็นบวก HER2 เป็นบวก และ Ki-67 กับ PR มีค่าเท่าใดก็ได้ กลุ่ม HER2 มีค่า ER กับ PR เป็นลบ HER2 เป็นบวก และกลุ่ม Basal-like หรือ Triple negative มีค่า ER, PR และ HER2 เป็นลบ (27, 28) โดยในแต่ละกลุ่ม subtype จะมีอุบัติการณ์ การพยากรณ์โรค การตอบสนองต่อการรักษา การแพร่กระจายไปสู่อวัยวะ และการเกิดซ้ำหรือการหายจากโรคที่แตกต่างกัน (27)

2.2 การตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านม

การตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาหามะเร็งเต้านม (Breast cancer screening) ที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยในปัจจุบันมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่ การตรวจเต้านมด้วยตนเอง (Breast self examination, BSE) การตรวจเต้านมโดยแพทย์หรือบุคลากรทางการแพทย์ที่ได้รับการฝึกอบรม (Clinical breast examination, CBE) และการตรวจด้วยเครื่องถ่ายภาพรังสีเต้านมหรือแมมโมแกรม (Mammography: MM) ร่วมกับการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (Ultrasound) ประกอบกันเพื่อการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำยิ่งขึ้น (4-6) จากฐานข้อมูล Cochrane ในปี พ.ศ. 2556 พบว่าการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยแมมโมแกรมเป็นวิธีที่ช่วยลดอัตราการตายจากมะเร็งเต้านมได้ถึงร้อยละ 15 (29) และในปัจจุบันพบว่าช่วยลดอัตราการตายจากมะเร็งเต้านมได้ถึงร้อยละ 60 ภายในระยะเวลา 10 ปีหลังการวินิจฉัยโรคในประเทศสวีเดน (30) ซึ่งถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก อย่างไรก็ตามในประเทศไทยนั้นการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยแมมโมแกรมในระดับประชากรผู้หญิงทุกคนถือว่าค่อนข้างมีข้อจำกัดในด้านการเข้าถึง ด้วยค่าใช้จ่ายในการตรวจเมื่อนำมาประเมินถึงความคุ้มค่าทั้งต่อตัวผู้ป่วยเองและด้านงบประมาณของโรงพยาบาลแล้ว พบว่าไม่มีความคุ้มค่าในบริบทของประเทศไทย (31) และทุกคนไม่สามารถเข้าถึงทรัพยากรด้านการดูแลสุขภาพได้อย่างเท่าเทียมกันถึงแม้จะได้รับความคุ้มครองจากประกันสุขภาพ โดยผู้ที่มีฐานะดีจะสามารถเข้าถึงการตรวจคัดกรองด้วยแมมโมแกรมได้มากกว่ากลุ่มที่มีรายได้ต่ำและอยู่ในพื้นที่ชนบท (32) ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมด้วยวิธีที่มีความจำเพาะสูง เพิ่มความไว ไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด และสามารถเข้าถึงได้ง่าย จึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นและเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

นักวิจัยทั้งหลายจึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาตัวบ่งชี้มะเร็งในตัวอย่างเลือดเป็นวิธีการที่ไม่รุกรานร่างกายและเข้าถึงได้ง่าย (33-36) แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าตัวบ่งชี้มะเร็งเต้านมในเลือดส่วนใหญ่นั้นมีความไวที่ต่ำ เช่น ตัวบ่งชี้มะเร็งในซีรัม (CA15 – 3, CA27.29, CEA), circulating cancer DNA หรือ cell-free DNA (การกลายพันธุ์ของยีน *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA* และการเกิดเมทิลเลชันในส่วนของ promoter ของยีน *APC*, *BRCA1*, *TWIST*) และ circulating tumour cells (CTCs) (37-39)

2.3 การหลั่งของเซลล์มะเร็ง

ก้อนมะเร็งมีโครงสร้างคล้ายอวัยวะที่เกิดจากการวิวัฒนาการร่วมกันของเซลล์มะเร็งและสภาพแวดล้อม โดยสภาพแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง (tumor microenvironment, TME) นั้นหมายรวมถึงโครงสร้างทั้งหมดที่เกิดขึ้นใหม่เนื่องจากก้อนมะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นหลอดเลือด การแทรกแซงระบบภูมิคุ้มกัน (immune infiltrates) ไฟโบรบลาสต์ และแมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix, ECM) โดยการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง การต้านทานต่อการรักษา การรุกราน และการแพร่กระจายเป็นคุณสมบัติที่เกิดขึ้นมาจากปฏิสัมพันธ์แบบสองทิศทางระหว่างเซลล์มะเร็งและสภาพแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง (TME) การที่จะเข้าใจวิวัฒนาการร่วมกันของเซลล์มะเร็ง สภาพแวดล้อมทางกายภาพ และเซลล์ที่แวดล้อมอยู่ร่วมกันทั้งหมดนั้นเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาวิธีการในการรักษาที่มีประสิทธิภาพต่อไป (40)

มะเร็งแต่ละชนิดมีกลไกการปลดปล่อยดีเอ็นเอของมะเร็งเข้าสู่ของเหลวที่เกี่ยวข้องภายในร่างกาย ของเหลวชีวภาพเหล่านี้เป็นแหล่งสำหรับการตรวจหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ชนิดตัวอย่างที่หลากหลายได้รับการประเมินเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอไหลเวียนอิสระเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งจากเลือด เนื่องจากเลือดมีสารพันธุกรรมในปริมาณมาก (41) ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs ได้รับโมเลกุลที่หลังจากเซลล์มะเร็งโดยไม่ขึ้นกับขนาดของก้อนมะเร็ง ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นกับเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสเกิดขึ้นในระดับที่ใกล้เคียงกัน และการแยกเม็ดเลือดขาว WBCs จากเลือดเพื่อนำมาตรวจหาระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นง่ายและเร็วกว่าการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส ดังนั้นจึงใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs แทนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสได้ สารหลังจากเซลล์มะเร็งสามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs ที่ไหลเวียนในกระแสเลือดได้ และการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งที่มีความไวได้ (42)

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับเหนือพันธุกรรมที่เกิดจากการหลั่งของเซลล์มะเร็งสู่เซลล์สโตรมาที่อยู่ล้อมรอบ ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบการเกิดไฮเปอร์เมทิลเลชันของ LINE-1 ในต่อมน้ำเหลืองที่มีการแพร่กระจายแบบ micrometastatic และในเซลล์ล้อมรอบของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม สารที่หลังจากเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มการเกิดเมทิลเลชันของ LINE-1 ในเซลล์สโตรมาที่อยู่ล้อมรอบเซลล์มะเร็ง (12) ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นหนึ่งในเอกลักษณ์ของการเปลี่ยนแปลงระดับเหนือพันธุกรรมที่สำคัญที่สุดของมะเร็ง เนื่องจากมีอิทธิพลต่อกิจกรรม transcriptional ของยีนได้แก่ การเกิด epigenetic silencing ของยีนยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor genes) ผ่านการ

เกิดไฮเปอร์เมทิลเลชันที่บริเวณ CpG และการกระตุ้นการทำงานของยีนก่อมะเร็ง (oncogenes) ผ่านการเกิดไฮโปเมทิลเลชัน (hypomethylation) ทั้งทั้งยีน (7)

2.4 ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเกิดขึ้นโดยการเติมหมู่เมทิล (methyl) ด้วยพันธะโคเวเลนต์ให้กับเบส cytosines ภายใน CpG dinucleotides ที่เรียกว่า CpG Islands (CGIs) ซึ่งบริเวณที่มี CpG อยู่อย่างหนาแน่น การเติมหมู่เมทิลให้กับเบส cytosine นั้น เกิดขึ้นผ่านเอนไซม์ DNA methyl transferases (DNMTs) ที่ประกอบด้วย DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b โดยในขณะที่เอนไซม์ DNMT1 มีหน้าที่หลักในการถ่ายโอนหมู่เมทิล ($-CH_3$) (43, 44) จาก S-adenosylmethionine (SAM) (44) ให้กับ hemimethylated DNA strands แล้วตามด้วย DNA replication ส่วนเอนไซม์ DNMT3a และ DNMT3b ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับ unmodified cytosine residues หรือเรียกว่า novo methylation (43, 44) โดย CGIs ส่วนใหญ่เป็น unmethylated อยู่ในตำแหน่งเริ่มต้นของตำแหน่งการเกิด transcription ของยีนหรือเป็น methylated เมื่อกระจายไปทั่วจีโนมทั้งภายในยีน bodies (intragenic) หรือระหว่างยีน (intergenic) ส่วน CpGs ที่อยู่นอกตำแหน่งเริ่มต้นของกระบวนการ transcription นั้นยังเป็นตำแหน่งในขั้นเริ่มต้นในการเกิด transcriptional ในระหว่างการพัฒนาและกลายเป็น methylated ในภายหลัง การยับยั้ง CGI promoters ด้วยการเกิดปฏิกิริยา methylation และ demethylation มีความไวที่แตกต่างกันตามระยะห่างระหว่าง CpGs (CpG clustering) และการผ่านไปตามความหนาแน่นของ CpG methylation หรือ polycomb ที่เกิดขึ้น ดังนั้น CGIs จึงมีอิทธิพลต่อโครงสร้างโครมาตินและควบคุมกิจกรรมของยีน นอกจากนี้ CGIs ยังถูกพบใน tissue-specific gene promoters และรู้จักในชื่อ tissue-specific differentially methylated regions (T-DMRs) รูปแบบการเกิด tissue-specific DNA methylation เป็นการควบคุมยีนที่สำคัญของยีน tissue-specific gene ซึ่งไม่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อซึ่งเกิดการเมทิลเลชัน แต่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่เป็น unmethylated อย่างไรก็ตามส่วนสำคัญของ T-DMRs คือการส่งเสริมเชิงบวกกับการแสดงออกของยีน เมื่อมีเป็นจำนวนมากในบริเวณโปรโมเตอร์ และเมื่อสร้างพันธะกับตัวควบคุมด้านลบอย่างเช่น ตัวยับยั้งการ transcription (transcriptional repressors) T-DMRs มี 2 ชุดของ DNA sequence motifs ที่ทำให้เกิด 2 กลุ่มของ transcription factors (TFs) ที่แตกต่างกันที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมในทางด้านบวกและด้านลบที่เกิดขึ้นจากดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (44)

มีหลากหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพระดับเนื้อพันธุกรรม เทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นมีข้อดีและข้อจำกัดที่ต่างกัน เทคนิค

genome-wide methylation sequencing หรือเทคนิค microarray-based profiling มักถูกเลือกใช้ในการตรวจหา candidate biomarkers ส่วนการตรวจเช็คประสิทธิภาพของตัวบ่งชี้ที่จำเพาะเจาะจงหรือ panel ที่ใช้ในการตรวจหาตัวบ่งชี้ในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่จะถูกประเมินด้วย locus-specific assays อย่างเช่น quantitative MSP (qMSP) ปฏิบัติการ one-step MSP (OS-MSP) ปฏิบัติการ MethyLight และการตรวจแบบ pyrosequencing ที่สามารถตรวจหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ทราบถึงตำแหน่ง loci แล้วด้วยความจำเพาะและความไวสูงได้ (41)

เทคนิค The HumanMethylation 450 beadchip assay (Illumina) สามารถทำ genome-wide DNA methylation profiling ในตัวอย่างของมนุษย์โดยให้ความละเอียดสูง คลอบคลุมร้อยละ 99 ของยีนอ้างอิง (RefSeq genes) ทั้งหมดและ 450,000 CpGs โดย array ทำการวิเคราะห์ CpG islands ทั้งจากริม (shores) (2 kb ขนาบทั้ง 2 ข้างของ CpG islands) และส่วนที่ยื่นออกไป (2kb ขนาบทั้ง 2 ข้างต่อจากริม (shores)) เช่นเดียวกับส่วน island-independent CpGs ถึงแม้ว่าจะมุ่งเน้นที่บริเวณ gene promoters และ intragenic regions แต่ยังมีการเพิ่มตำแหน่งที่มีความน่าสนใจ อย่างเช่น DNaseI-sensitive และบริเวณ enhancer regions เข้าไปด้วย (45) Restriction enzyme ที่ใช้ในการย่อยในปฏิบัติการ microarray สามารถใช้ในการตรวจจับทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ 2 วิธี โดยวิธีแรกคือ การเกิดปฏิบัติการ oxidation โดยตรงระหว่าง restriction enzyme-digested DNA bases ที่ตำแหน่งที่เกิดการ modified หรือ unmodified electrodes และอีกวิธีคือการเลือกตัดที่ 5mC ด้วยเอนไซม์ methylation sensitive restriction enzymes โดย restriction enzyme ที่มีความไวต่อเมทิลเลชันจะไม่ตัด methylated DNA sequences แต่จะตัด unmethylated DNA sequences ได้อย่างสมบูรณ์ ในขั้นตอนแรก genomic DNA จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ MseI restriction enzyme เพื่อให้เกิดเป็น DNA fragments และส่วน cleaved ends ซึ่งจะเชื่อมด้วย unphosphorylated linkers (ทำหน้าที่เป็น universal PCR primers) จากนั้นนำ ligated DNA ที่ได้ไปย่อยด้วย methylation-sensitive restriction endonuclease BstUI และนำไปเพิ่มจำนวนด้วย PCR amplification จะได้ผลิตภัณฑ์ 2 แบบ คือ unmethylated DNA ที่ไม่ถูกเพิ่มจำนวนจากการย่อยของ BstUI และ amplified methylated DNA ที่ไม่ถูกย่อยด้วย BstUI หลังจากนั้น amplified methylated DNA จะถูกตรวจจับด้วยเทคนิค conventional hybridization (46) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี sequencing แล้วดีเอ็นเอเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์เป็นทางเลือกที่มีต้นทุนต่ำซึ่งให้โปรไฟล์ของตัวอย่างจำนวนมากได้ แม้ว่าจะมีความละเอียดลดลงก็ตาม แม้ว่าดีเอ็นเอไฮโปเมทิลเลชันเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับเหนือพันธุกรรมที่สำคัญในเซลล์มะเร็ง แต่การใช้ที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคนั้นยังมีข้อจำกัดอยู่ เนื่องจากการลดลงของดีเอ็นเอ

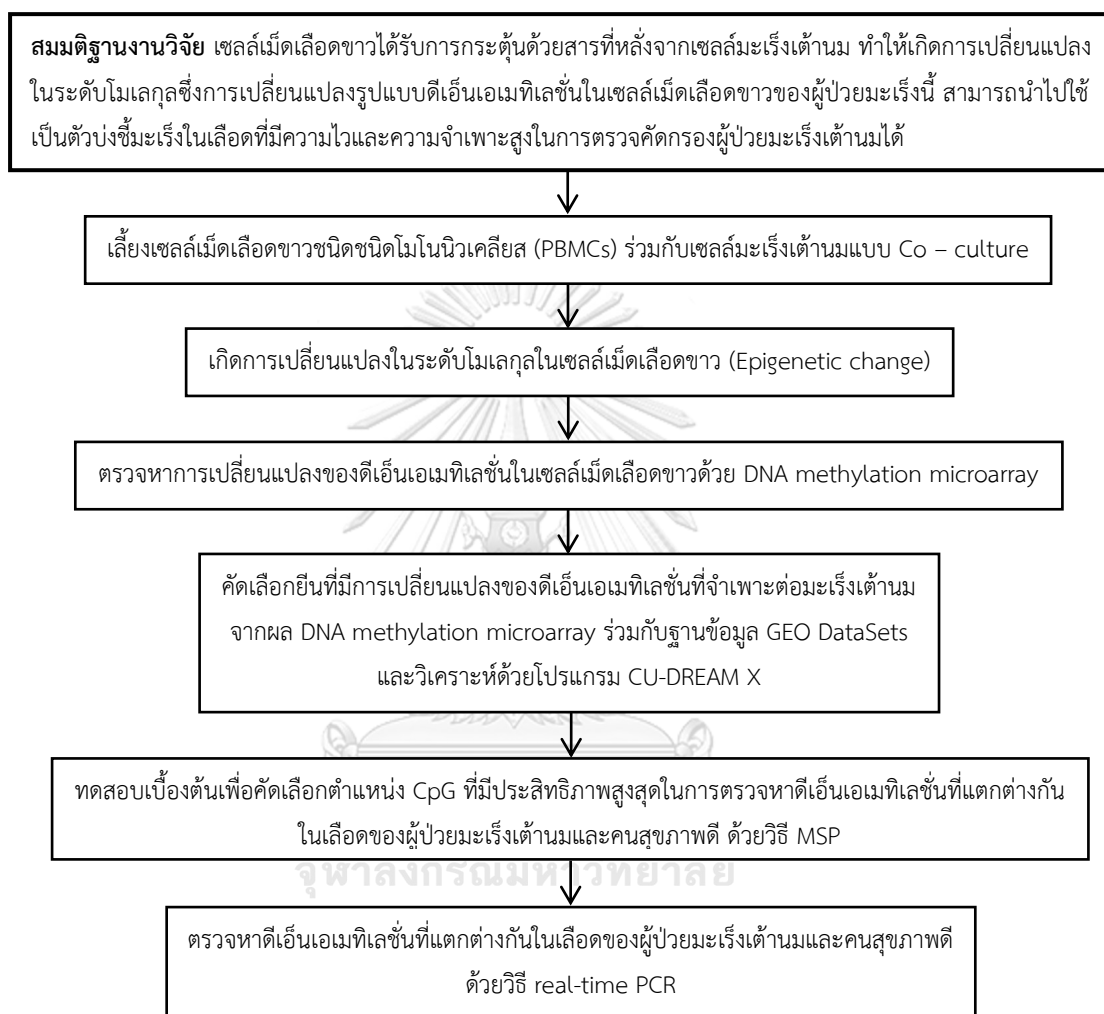
เอมทิเลชั่นนั้นมีความซับซ้อนในทางเทคนิคในการตรวจหาจึงยากต่อการตรวจจับสัญญาณ เทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง อย่างเช่น MSP สามารถตรวจหาไฮเปอร์เมทิเลชั่นได้ แต่ควรมีการตรวจสอบเชิงปริมาณในการวิเคราะห์หาดีเอ็นเอไฮโปเมทิเลชั่นด้วย ซึ่งนั่นถึงเป็นสิ่งที่ท้าทายและยากในการสร้างมาตรฐาน โดยการเกิดดีเอ็นเอไฮโปเมทิเลชั่นซ้ำๆ ในบางส่วน ของ LINE-1 นั้นถูกตรวจพบบ่อยครั้งและมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยา fluoropyrimidines ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก แต่ในปัจจุบันยังไม่มี การตรวจวินิจฉัยโรคทางกระบวนการเหนือพันธุกรรมที่ผ่านการอนุมัติใช้อย่างเป็นทางการ มีเพียงการทดสอบเชิงพาณิชย์สำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการและการทดลองทางคลินิกเท่านั้น (45)

การเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิเลชั่นมีความน่าสนใจด้วยเหตุผล 3 ประการ คือ ดีเอ็นเอเมทิเลชั่นที่แตกต่างกันมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ transcriptional, การเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิเลชั่นถูกเหนี่ยวนำโดยปัจจัยจากภายนอก (exogenous factors) และการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิเลชั่นเกิดขึ้นในระยะเริ่มแรกของการพัฒนาของโรคเรื้อรังต่างๆ (47) การเกิดไฮเปอร์เมทิเลชั่นในยีนต้านมะเร็งและการเกิดไฮโปเมทิเลชั่นในยีนก่อมะเร็งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็ง โดยเกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นของการพัฒนามะเร็ง (43) การเกิดดีเอ็นเอเมทิเลชั่นอย่างผิดปกติสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจหามะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้นได้จากการพบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิเลชั่นใน circulating free DNA (cfDNA) และเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และในการศึกษาจีโนมขนาดใหญ่ได้รายงานการเกิดไฮโปเมทิเลชั่นในส่วนของจีโนมที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมจากดีเอ็นเอในกระแสเลือด (48)

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 กรอบความคิดงานวิจัย



3.2 รูปแบบการวิจัย

การศึกษาที่จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (Cross-sectional study)

3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง

3.3.1.1 ขนาดตัวอย่าง

การศึกษานี้เป็นการทดลองเบื้องต้น (pilot study) ในการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมจากเลือดวิธีใหม่ โดยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ขนาดตัวอย่างคำนวณจากผลการทดสอบยีนตรวจสอบ

เบื้องต้นด้วยวิธี MSP และค่า threshold cycle ของการเกิดเมทิลเลชัน ($C_{T\ Met}$) โดยการใช้การทดสอบสมมติฐาน t-test แบบทางสองทาง (two-tailed) ของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน ด้วยอำนาจการทดสอบ 90% ($Z_\beta = 1.282$) และระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$, $Z_{\alpha/2} = 1.960$) ด้วยสมการ $n/\text{group} = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_\beta)^2 \sigma^2 / (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2$ โดย $\sigma^2 = (n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2 / n_1 + n_2 - 2$ ได้ขนาดตัวอย่างเท่ากับ 4 รายต่อกลุ่ม

3.3.1.2 การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

1) กลุ่มควบคุม

- เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมการวิจัย (Inclusion criteria) คือ อาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดีไม่เคยมีประวัติเป็นมะเร็งเต้านมมาก่อน และไม่มีประวัติครอบครัวเป็นมะเร็งเต้านม

- เกณฑ์การคัดออกผู้เข้าร่วมการวิจัย (Exclusion criteria) คือ เป็นผู้ป่วยมะเร็งชนิดอื่นๆ หรือโรคร้ายแรงชนิดอื่น

2) กลุ่มทดลอง

- เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมการวิจัย (Inclusion criteria) คือ เป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิงรายใหม่ที่ได้รับการรักษา ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านมแล้วแต่ยังไม่เริ่มรับการรักษา ไม่เคยมีประวัติเป็นมะเร็งเต้านมมาก่อนหรือการกลับเป็นซ้ำ (recurrent tumor) และไม่มีประวัติเป็นมะเร็งชนิดอื่น

- เกณฑ์การคัดออกผู้เข้าร่วมการวิจัย (Exclusion criteria) คือ เป็นผู้ป่วยมะเร็งชนิดอื่นๆ หรือโรคร้ายแรงชนิดอื่น

3.3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิงระยะต่างๆ ในความดูแลของเรืออากาศเอก นายแพทย์สมชาย ณะสิทธิชัย (ผู้วิจัยร่วม) ณ คลินิกเต้านม สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 200 ราย และอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดีที่มาทำการตรวจสุขภาพประจำปี ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 200 ราย โดยถูกคัดเลือกเข้าโครงการวิจัยโดยแพทย์เจ้าของไข้และผู้วิจัยหลักระหว่างมีนาคม พ.ศ. 2558 ถึงตุลาคม พ.ศ. 2560 ตามขั้นตอนที่ได้รับอนุมัติให้ดำเนินโครงการจากคณะกรรมการวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และคณะกรรมการทบทวนวิจัย จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เลขที่ 029/2559 และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB No. 562/62 โดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1) การหา Candidated CpGs ด้วยการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) ร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม 3 สายพันธุ์ แบบ Co-culture โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสจากเลือดของอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 9 ราย โดยการเจาะเลือดอาสาสมัครแต่ละรายด้วยหลอดเก็บเลือด EDTA K3 ขนาด 6 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด

2) การหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเลือด โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs จากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิง จำนวน 200 ราย และอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 200 ราย โดยการเจาะเลือดแต่ละรายด้วยหลอดเก็บเลือด EDTA K3 ขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด แล้วปั่นเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยความเร็ว 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสออกจากเลือดด้วยการนำเลือดอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดีมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 g เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ดูดส่วนของพลาสมาซึ่งอยู่ชั้นบนสุดออกไป เติม phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเลือดเติม ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดขึ้นลงซ้ำๆ หลังจากนั้นเตรียมสารละลาย Lymphoprep™ (Isolation of human mononuclear cells) (AXIS-SHIELD, Norway) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ค่อยๆหยดเลือดที่ผสมกับ PBS แล้วลงในหลอด Lymphoprep™ โดยให้ไหลลงตามด้านข้างของหลอดลงบนผิวหน้าของสารละลาย Lymphoprep™ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,800 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ดูดเก็บสารละลายสีขาวชั้นกลางซึ่งเป็นชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนสีขาวก้นหลอด ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนเซลล์กระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยวในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์แบบ Co-culture ต่อไป

3.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม

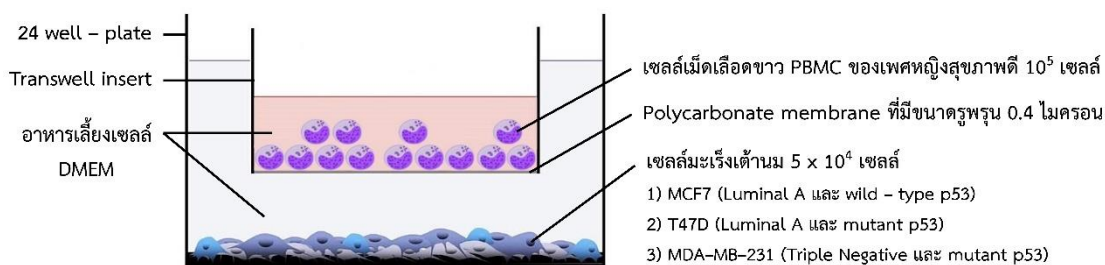
เซลล์มะเร็งเต้านมที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นตัวแทนชนิดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ ในการศึกษา มี 3 สายพันธุ์ โดยแบ่งตามกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีตัวรับฮอร์โมนที่แตกต่างกัน ออกเป็นกลุ่มดังนี้ 1) เซลล์ MCF7 (HTB-22™) (ATCC, USA) ใช้เป็นตัวแทนเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด

Luminal A มีค่า ER+, PR+, HER2- และ wild type p53 2) เซลล์ T47D (HTB-133™) (ATCC, USA) ใช้เป็นตัวแทนเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด Luminal A มีค่า ER+, PR+, HER2- และ mutant p53 3) เซลล์ MDA-MB-231 (HTB-26™) (ATCC, USA) ใช้เป็นตัวแทนเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด Triple negative มีค่า ER-, PR-, HER2- และ mutant p53

เริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Gibco, USA) ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) และ 1% Penicillin (10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) - Streptomycin (10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Gibco, USA) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (Cell Culture Treated Flasks with Filter Caps, T25) (Nunc, Denmark) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ล้างเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ ทำการ subculture ด้วย 0.25% Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, USA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที นับจำนวนเซลล์จากสารละลายเซลล์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 18 ไมโครลิตร และ 0.4% Trypan Blue Stain (Gibco, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนับเซลล์ด้วย Hemacytometer

3.3.5 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์มะเร็งเต้านมร่วมกันแบบ Co-culture

การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์มะเร็งเต้านมร่วมกันแบบ Co-culture ได้ทำการทดลองโดย ดร. เจริญชัย พุฒิปัญญาเลิศ ที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใน พ.ศ. 2559 ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 24 well-plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง ทำการวาง transwell ที่มีขนาดรูพรุน 0.4 ไมครอน (Transwell Polycarbonate membrane cell culture inserts, 24 mm Transwell with 0.4 µm pore polycarbonate membrane insert, 24 well plate, Tissue culture treated, Sterile) (Corning, USA) ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสของอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 100,000 เซลล์ ใส่ลงในแต่ละ transwell แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมและ transwell ให้อยู่ในระดับเดียวกัน บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การเลี้ยงเซลล์แบบ Co-culture

หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่ถูกกระตุ้นโดยเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดต่างๆแล้ว โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใน transwell ขึ้นลงให้เซลล์หลุดออกจากเมมเบรน และกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงแล้วดูดสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 RCF เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ที่กั้นหลอด ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 RCF เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง โดยทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง แล้วเก็บตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนถัดไป

3.3.6 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S) (KURABO, Japan) ด้วยเครื่อง Nucleic Acid Isolation System QuickGene-810 (FUJIFILM, Japan) ในโหมด DNA WHOLE BLOOD เริ่มต้นด้วยการเตรียมสารและเครื่องบ่มก่อนเริ่มต้นทำการสกัด โดยการละลายผง DNA whole blood Protease (EDB-01) ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร แล้วเติม absolute ethanol ปริมาตร 160 มิลลิลิตร ลงในขวด DNA whole blood Wash Buffer (WDB-03) แล้วเติมสารละลาย DNA whole blood Elution Buffer (CDB-02) และ DNA whole blood Wash Buffer (WDB-03) ลงในหลอดในส่วนของ buffer setting unit ของเครื่อง และตั้งอุณหภูมิเครื่องให้ความร้อนหลอด (AccuBlock D1200 digital dry bath, dual block capacity) (Labnet, USA) ที่ 56 องศาเซลเซียส

เริ่มต้นการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยการเติม EDB-01 (Protease) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ LDB-04 (lysis buffer) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร vortex ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 15 วินาที และ spin down จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องให้ความร้อนหลอดที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป vortex ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 15 วินาที และ spin down แล้วเติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 15 วินาที และ spin down หลังจากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน cartridges (CA-01)

แต่ละอัน แล้วบรรจุ holder carriage เข้าไปในส่วนของ sample unit ของเครื่อง Nucleic Acid Isolation System QuickGene-810 เลือกโหมดการทำงาน DNA Whole blood แล้วกดปุ่ม START เพื่อเริ่มต้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

3.3.7 การตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์

ในการศึกษานี้เราต้องการแยกดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลด้วยการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเราจึงนำดีเอ็นเอมาผ่านกระบวนการตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์เพื่อที่จะได้สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือเบสไซโตซีน (cytosine) ที่มีหมู่เมทิล (methyl) ออกจากดีเอ็นเอที่ไม่มีการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือเบสไซโตซีนไม่มีหมู่เมทิลได้ โดยปฏิกิริยาของการตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์ทำให้เกิดการเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ให้กลายเป็นเบสยูราซิล (uracil) และเมื่อผ่านกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) ก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสไทมีน (thymine) ในที่สุด ส่วนเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงยังคงเป็นเบสไซโตซีนเหมือนเดิม

การตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์ด้วย EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (D5006) (Zymo Research, USA) เริ่มต้นด้วยขั้นตอนการเตรียมสารละลาย โดยทำการผสม 100% ethanol ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ลงในขวดสารละลาย M-wash buffer และเตรียมสารละลาย CT conversion reagent ด้วยการเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 900 ไมโครลิตร M-dilution buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ M-dissolving buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดย 1 หลอดใช้ได้กับ 10 ตัวอย่าง แล้วนำไป vortex เป็นเวลา 15 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยาของการตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 750 นาโนกรัม ในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย CT conversion ที่ผสมเสร็จแล้ว ปริมาตร 130 ไมโครลิตร นำไป vortex และ spin down แล้วนำหลอดใส่ลงในเครื่อง Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำหลอดออกจากเครื่อง ทำการเติมสารละลาย M-binding buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ Zymo-Spin™ IC ที่ใส่ในหลอด collection tube แล้วนำดีเอ็นเอที่ออกจากเครื่องผสมลงใน M-binding buffer ในคอลัมน์ Zymo-Spin™ IC ดูดขึ้นลงเพื่อผสม นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอด collection tube ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย M-wash buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และเติมสารละลาย M-desulphonation buffer ปริมาตร

200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้าง 2 รอบด้วยสารละลาย M-wash buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายในหลอด collection tube ที่นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้งเพื่อให้แห้งสนิท จากนั้นใส่คอลัมน์ Zymo-Spin™ IC ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการหยดสารละลาย M-elution buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลาง column matrix บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้ว ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.3.8 การทำ DNA Methylation Microarray

การทำดีเอ็นเอเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ทำการทดลองโดย ดร. เจริญชัย พุฒิปัญญาเลิศ ที่ department of epigenetics ณ National Cancer Center Research Institute (NCCRI) เมืองโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น ใน พ.ศ. 2559 โดยนำดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่ถูกกระตุ้นด้วยเซลล์มะเร็งเต้านมและผ่านการตัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้วไปทำเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ด้วย Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip Kit ซึ่งสามารถตรวจสอบเมทิลเลชันได้มากกว่า 450,000 ตำแหน่งทั่วทั้งจีโนม ทำให้ทราบถึงการเกิดเมทิลเลชันของทุกยีนภายในเซลล์ และวิเคราะห์ข้อมูลหาตัวบ่งชี้การเกิดเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเลือดผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ โดยขั้นตอนการทำ Infinium HD Methylation ตามคู่มือของบริษัท Illumina (USA) 15019519 Revision B สำหรับการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ 96 ตัวอย่าง เพื่อใช้กับเครื่อง Illumina iScan™ และ HiScan™ โดยเลือกประเภทของการทดลองดังนี้ GSE (GEO Series) เป็น DNA Methylation profiling by array จากดีเอ็นเอตัวอย่างเลือดของผู้หญิงที่เป็นมะเร็งเต้านมและผู้มีสุขภาพดี GPL (GEO Platform) เลื่อ ก GPL8 4 9 0 Illumina HumanMethylation2 7 BeadChip (HumanMethylation27_270596_v.1.2) และ GSM (GEO Sample) รูปแบบตัวอย่างเป็น Bisulphite converted DNA from Whole Blood แล้วใช้โปรแกรม Illumina GenomeStudio Methylation Module (Illumina, USA) ในการวิเคราะห์การตำแหน่ง CpG ที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

3.3.9 การคัดเลือกยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ความจำเพาะต่อมะเร็งเต้านม

ทำการสืบค้นข้อมูลเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ โดยการค้นหาซีพีจีเมทิลเลชัน (CpG methylation) จากฐานข้อมูล Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่

สนับสนุนโดยศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information, NCBI) ของหอสมุดแพทย์แห่งชาติสหรัฐอเมริกา (National Library of Medicine, NLM) ที่มีการรวบรวมฐานข้อมูลการทดลองต่างๆ ไว้ที่เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds> โดยทำการเลือกลักษณะการทดลองในหัวข้อต่างๆ ให้ความใกล้เคียงกับการทดลองของเรา ดังต่อไปนี้ GSE (GEO Series) ให้เลือกการทดลองที่เป็นการทำ DNA Methylation profiling by array จากดีเอ็นเอตัวอย่างเลือดของผู้หญิงที่เป็นมะเร็งเต้านมและผู้มีสุขภาพดี GPL (GEO Platform) เป็นรูปแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ เลือก GPL8490 Illumina HumanMethylation27 BeadChip (HumanMethylation27_270596_v.1.2) และ GSM (GEO Sample) เป็นรูปแบบตัวอย่างที่ใช้เลือกเป็น Bisulphite converted DNA from Whole Blood ภายหลังทำการสืบค้นพบการทดลอง 2 การทดลอง ดังนี้

1) GSE32396: Epigenome analysis of white blood cells from healthy women with and without BRCA1 mutation. PMID: 22346766 The dynamics and prognostic potential of DNA methylation changes at stem cell gene loci in women's cancer. มีตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกลุ่มแรกคือ ผู้หญิงที่มียีนกลายพันธุ์ของ *BRCA1* จำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 15 ตัวอย่าง และผู้มีสุขภาพดีจำนวน 15 ตัวอย่าง ส่วนอีกกลุ่มคือผู้มียีน *BRCA1* ชนิด wild type จำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 15 ตัวอย่าง และผู้มีสุขภาพดีจำนวน 15 ตัวอย่าง (49)

2) GSE57285: DNA methylation profiling of whole blood DNA samples from BRCA1 wild types without breast cancer and BRCA1 mutants with and without breast cancer (Prague Set 1). PMID: 25067956 A BRCA1-mutation associated DNA methylation signature in blood cells predicts sporadic breast cancer incidence and survival. มีตัวอย่างทั้งหมด 84 ตัวอย่าง ประกอบด้วยผู้หญิงสุขภาพดีที่มียีน *BRCA1* ชนิด wild type จำนวน 42 ตัวอย่าง ผู้หญิงสุขภาพดีที่มีการเกิดเมทิลเลชันของยีน *BRCA1* จำนวน 7 ตัวอย่าง และผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการเกิดเมทิลเลชันของยีน *BRCA1* จำนวน 35 ตัวอย่าง (50)

3.3.10 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X

เริ่มต้นด้วยการเตรียมไฟล์เทมเพลตของ GSE57285 และ GSE32396 ในรูปแบบ *.xlsx โดยกรอกข้อมูลตามแบบฟอร์ม ใช้การทดสอบสมมติฐาน t-test แบบทางสองทาง (two-tailed) ค่า P-value ที่ 0.05 และระบุ differential methylation เป็น Intragenic Up-Up แล้วนำไฟล์ทั้งหมดที่จะใช้ในการวิเคราะห์ใส่ลงในโพลเดอร์ CU-DREAM X ภายใน drive C ได้แก่ 1) โปรแกรม cu-dreamx.exe 2) ไฟล์ผลการทดลองที่ได้จาก methylation microarray 3) ไฟล์เทมเพลตของ GSE57285 และ GSE32396 4) ไฟล์ GSE series matrix ของ GSE57285 และ GSE32396 5) ไฟล์

เต็มของ platform GPL8490 แล้วเริ่มทำการวิเคราะห์ด้วยการรัน Command Prompt ด้วยคำสั่ง “cd c:\CU-DREAMX” และเริ่มทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ด้วยคำสั่ง “cu-dreamx.exe GSE57285.xls ชื่อไฟล์ผล.txt” และ “cu-dreamx.exe GSE32396.xls ชื่อไฟล์ผล.txt” เมื่อวิเคราะห์เสร็จสิ้นจะได้ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบ *.xlsx ในโฟลเดอร์ CU-DREAM X ภายใน drive C เป็นตาราง intersect กันระหว่าง Up-Up probe sequence Met paracrine กับ Met Blood BRCA1 GSEs

3.3.11 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกตำแหน่ง CpG ด้วยวิธี MSP

ทำการทดสอบเบื้องต้นของตำแหน่ง CpG ที่เกิดเมทิลเลชันทั้งหมดในยีนเพื่อตำแหน่ง CpG และโพรบที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยวิธี MSP ลำดับเบสของไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing และขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของตำแหน่ง CpG ทั้ง 6 ตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันใน 3 ยีน แสดงไว้ในตารางที่ 1 เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำยา QPCR Green Master Mix LRox, 2x (Biotech rabbit GmbH, Germany) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ forward และ reverse ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร น้ำ nuclease free ปริมาตร 8.8 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอ template ที่ผ่านการตัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยใช้หลอด PCR microtube ขนาด 0.2 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มจำนวนในเครื่อง Mastercycler pro S (Eppendorf, Germany) ตามขั้นตอนของปฏิกิริยาดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ, 35 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 - 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ในขั้นตอนสุดท้ายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกรันใน 8% acrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วย GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, USA) เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ EpiTect human control DNA (bisulfite converted) (Qiagen, Germany) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ *annealing* และขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของ 3 ยีน

ยีน	ตำแหน่ง CpG	ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' - 3')	อุณหภูมิ annealing (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
N1M1	cg09088834	methylated	Forward: GGGTATTAGTATTTAGGTACGATC Reward: ACCATATAAAAATCTCTAATCGCG	53	65
		unmethylated	Forward: ATGGGGTATTAGTATTTAGGTATGATT Reward: CACACCATATAAAAATCTCTAATCACA	53	71
	cg17729667	methylated	Forward: CGGTTTTCTGTAATTTTAGGGC Reward: ACTCCGACAAAAACCAACG	58	86
		unmethylated	Forward: AAGGTGGTTTTGTAAATTTTAGGGT Reward: CAAAACTCCAACAAAAACCAACA	58	94
GPR39	cg07785936	methylated	Forward: GTTTTTTTTATGGTTTTATTTAGTTTTCC Reward: AAATAACCACTCAAACTCG	58	92
		unmethylated	Forward: GGTGTTTTTTTATGGTTTTATTTAGTTTTCT Reward: CCAAATAACCACTCAAACTCA	58	97
	cg24659201	methylated	Forward: GGTCTGATTTTTGGAGTAGC Reward: TACCAAAAACAACCTAAACTCTACG	58	56
		unmethylated	Forward: GGGTTGATTTTTGGAGTAGT Reward: ATATTTACCAAAAACAACCTAAACTCTACA	58	62
RHEB	cg03998173	methylated	Forward: CGTTAGTTTTGGTTCGTTTC Reward: CGACGCTATTCAAAAAATACG	58	62
		unmethylated	Forward: GTTTTGTAGTTTTGGTGTGTTTT Reward: CCCCACACTATTCAAAAAATACA	58	69
	cg21134096	methylated	Forward: GTCGAGTTAGTAGAGATTTTCGTC Reward: AACAAAAATAAAAACGAATTCCTCCG	56	51
		unmethylated	Forward: GTATTTGTTGAGTTAGTAGAGATTTTGTT Reward: CCTAAACAAAAATAAAAACAAATTCCTCCA	56	61

3.3.12 การหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี real-time PCR

การหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ถูกวิเคราะห์ในปฏิกิริยา SYBR green-based real-time (RT-MSP) ไพรเมอร์ถูกออกแบบสำหรับดีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้ว โดยมีความจำเพาะต่อการหาปริมาณการเกิดเมทิลเลชัน และใช้ดีเอ็นเอ unmethylation ที่ผ่านการดัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้วเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ไพรเมอร์ (BIONEER, Australia) ที่มีความจำเพาะต่อ methylation และ unmethylation ของยีน *RHEB* ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง cg03998173 ดังนี้ ไพรเมอร์สำหรับ methylation forward คือ 5'-CGTTAGTTTTGGTGTTCGTTTC-3' ไพรเมอร์สำหรับ methylation reward คือ 5'-CGACGCTATTCCAAAAAATACG-3' ไพรเมอร์สำหรับ unmethylation forward คือ 5'-GTTTTGTTAGTTTTGGTGTTCGTTTC-3' และไพรเมอร์สำหรับ unmethylation reward คือ 5'-CCCCAACACTATTCCAAAAAATACA-3' แล้วเริ่มปฏิกิริยาด้วยการเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำยา QPCR Green Master Mix LRox, 2x (Biotechrabbit GmbH, Germany) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward และ reverse ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร น้ำ nuclease free ปริมาตร 8.8 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอ template ที่ผ่านการดัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยลงแยกไพรเมอร์ methylation และ unmethylation คนละหลุม ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในเพลท MicroAmp® optical 96-well reaction plate ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Applied Biosystems, USA) แล้วปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม MicroAmp™ optical adhesive film (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำเพลทเข้าเครื่อง Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) ทำการเลือกประเภทของปฏิกิริยาดังนี้ instrument: fast 96-well (0.1 mL) block, type of experiment: comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$), reagents: SYBR® Green Reagents และ instrument run: standard include melt curve และตั้งขั้นตอนของปฏิกิริยาดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ, 40 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing/extension ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ melt curve ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้ EpiTect human control DNA (bisulfite converted) (Qiagen, Germany) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

การศึกษานี้ใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Science) (IBM, USA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้สถิติ chi-squared test ในการทดสอบความเป็น

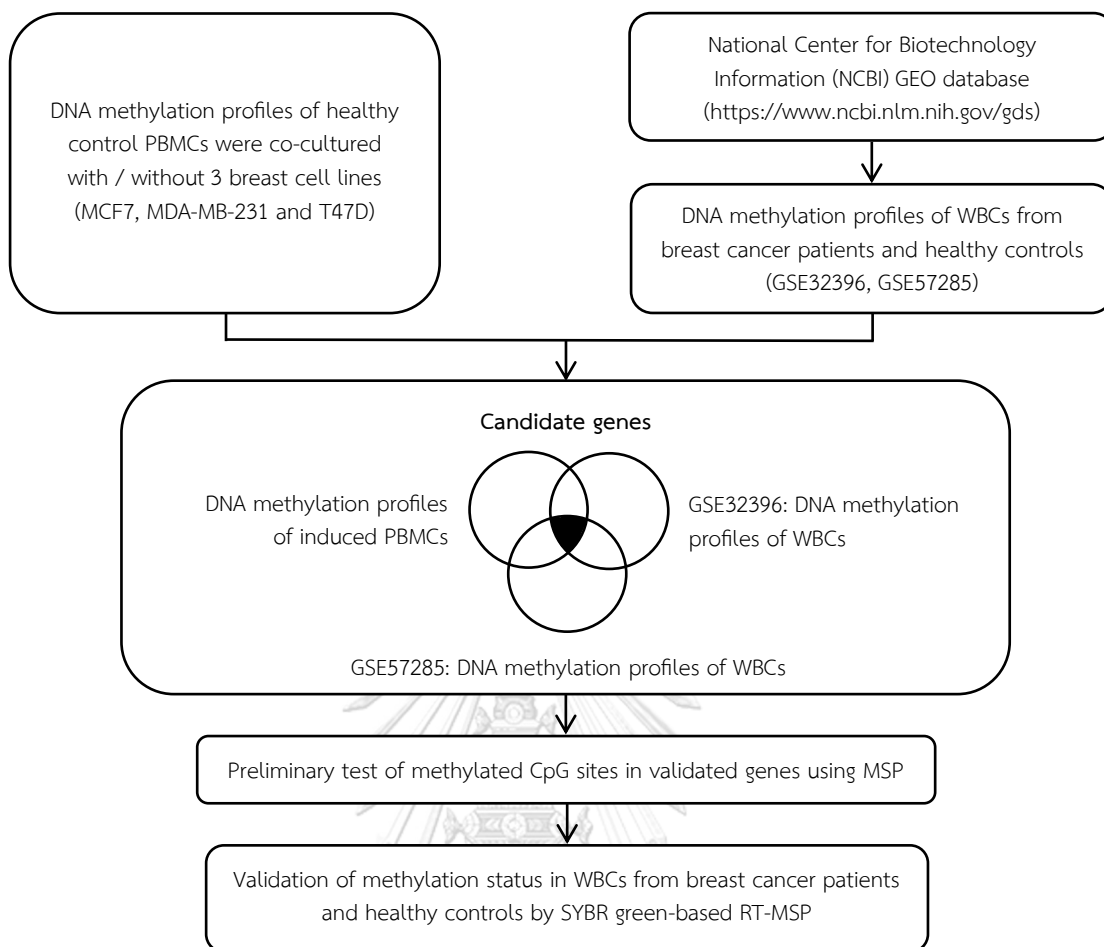
อิสระต่อกันของสองประชากร ซึ่งได้แก่กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและผู้มีสุขภาพดี ใช้การทดสอบสมมติฐาน t-test แบบสองทาง (two-tailed) ในการวิเคราะห์ผล CU-DREAM X และกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและผู้มีสุขภาพดี ค่า P-value ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานแบบสองทาง (two-tailed) อยู่ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ($P\text{-value} > 0.05$) กราฟ Receiver operating characteristic (ROC) ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในการเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งสำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านม

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การทำ DNA Methylation Microarray

หลังจากทำการทดลองตามผังวิธีการดำเนินงานวิจัย ดังแสดงในรูปที่ 5 จนถึงขั้นตอนการทำดีเอ็นเอเมทิลเลชันไมโครแอเรย์แล้ว นำข้อมูล DNA methylation profiles ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) จากผู้มีสุขภาพดี จำนวน 9 ราย หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม 3 สายพันธุ์ (MCF7, MDA-MB-231 และ T47D) และ DNA methylation profiles ของเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมใน 2 GSEs (GSE32396 และ GSE57285) ที่ได้มาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics analyzes) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X เพื่อค้นหายีนที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติในมะเร็งเต้านม โดย candidate genes ถูกเลือกจากยีนที่ซ้อนทับกันในทุกๆ 3 DNA methylation profiling ซึ่งเป็นยีนที่เกิด hypermethylated ที่มีค่า $P < 0.05$ และ $\text{odd ratio} > 1$ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์แสดงไว้ในตารางที่ 2 ประกอบด้วย GSE และประเภทเลือด การทดลอง จำนวนยีน odd ratio (ช่วงความเชื่อมั่น 95%) และค่า P-values โดยยีนทั้งหมดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่ถูกกระตุ้นโดยเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 สายพันธุ์ และจากเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมใน 2 GSEs (GSE32396 และ GSE57285) เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง intragenic เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-values} < 0.05$ และ $\text{odd ratio} > 1$)



รูปที่ 5 ผังงานแสดงวิธีการดำเนินงานวิจัย

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ของ DNA methylation profiles

GSEs และประเภทเลือด	การทดลอง	จำนวนยีน	OR (95% CI)	P-value
GSE57285; MA1: <i>BRCA1</i> mutation with and w/o breast cancer	MCF7_Intragenic_Up_MA1_Up	262	1.53 (1.31 - 1.77)	2.52×10^{-8}
GSE57285; MA2: <i>BRCA1</i> wild type with and w/o breast cancer	MCF7_Intragenic_Up_MA2_Up	265	1.28 (1.11 - 1.48)	9.15×10^{-4}
GSE32396; MA3: <i>BRCA1</i> mutation with and w/o breast cancer	MCF7_Intragenic_Up_MA3_Up	118	1.71 (1.39 - 2.11)	3.78×10^{-7}
GSE32396; MA4: <i>BRCA1</i> wild type with and w/o breast cancer	MCF7_Intragenic_Up_MA4_Up	79	1.85 (1.43 - 2.38)	1.58×10^{-6}
GSE57285; MA1: <i>BRCA1</i> mutation with and w/o breast cancer	M231_Intragenic_Up_MA1_Up	243	1.42 (1.22 - 1.67)	1.19×10^{-5}
GSE57285; MA2: <i>BRCA1</i> wild type with and w/o breast cancer	M231_Intragenic_Up_MA2_Up	258	1.25 (1.07 - 1.46)	4.08×10^{-3}
GSE32396; MA3: <i>BRCA1</i> mutation with and w/o breast cancer	M231_Intragenic_Up_MA3_Up	125	1.62 (1.30 - 2.02)	1.60×10^{-5}
GSE32396; MA4: <i>BRCA1</i> wild type with and w/o breast cancer	M231_Intragenic_Up_MA4_Up	85	1.45 (1.13 - 1.86)	3.68×10^{-3}
GSE57285; MA1: <i>BRCA1</i> mutation with and w/o breast cancer	T47D_Intragenic_Up_MA1_Up	237	1.56 (1.34 - 1.82)	1.05×10^{-8}
GSE57285; MA2: <i>BRCA1</i> wild type with and w/o breast cancer	T47D_Intragenic_Up_MA2_Up	244	1.66 (1.42 - 1.93)	5.44×10^{-11}
GSE32396; MA3: <i>BRCA1</i> mutation with and w/o breast cancer	T47D_Intragenic_Up_MA3_Up	113	1.52 (1.24 - 1.88)	7.57×10^{-5}
GSE32396; MA4: <i>BRCA1</i> wild type with and w/o breast cancer	T47D_Intragenic_Up_MA4_Up	78	1.85 (1.44 - 2.38)	9.12×10^{-7}

คำย่อ MA = microarray; w/o = without; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval

ในแต่ละ GSE ถูกแยกตามประเภทเลือดออกเป็น *BRCA1* mutation และ *BRCA1* wild type

40 candidate genes ถูกเลือกจากยีนที่ทับซ้อนกันในทั้ง 3 DNA methylation profile และจำแนกตามกระบวนการทางชีววิทยา (biological process), องค์ประกอบของเซลล์ (cellular components) และหน้าที่ระดับโมเลกุล (molecular function) ตาม Gene Ontology (GO) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 40 candidate genes จำแนกตาม Gene Ontology

Gene Ontology (GO) terms	Genes
Biological process (GO:0008150)	CSMD2, MIPOL1
Behavior (GO:0007610)	GPR39, SLC16A1
Biological adhesion (GO:0022610)	ADAM17, CLSTN1, PCDHGB4, PCDHGB7, SEMA5A, TGFBI
Biological regulation (GO:0065007)	ADAM17, ATAD3A, CDC42BPB, CLSTN1, CSMD1, DNAJC6, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, PEX14, PPP1R2, PRRX2, QRICH1, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SLC9A8, SLC16A1, SND1, SOX7, STXBP6, SUN1, TBL1X, TMEM132D
Cellular process (GO:0009987)	ADAM17, ATAD3A, CDC42BPB, CLSTN1, CYP2B6, DNAJC6, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, LHPP, MATN3, NINL, OCA2, PCDHGB4, PEX14, PPP1R2, PRRX2, QRICH1, RGS6, RHEB, SEMA5A, SFXN3, SH3GL2, SLC9A8, SLC16A1, SND1, SOX7, SPATA5, STXBP6, SUN1, TBL1X, TGFBI, TMEM132D, TP73
Developmental process (GO:0032502)	ADAM17, CLSTN1, HOXA9, MATN3, OCA2, PRRX2, QRICH1, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SOX7, SPATA5, SUN1, TBL1X, TP73
Growth (GO:0040007)	ADAM17, ATAD3A, CLSTN1, MATN3, SEMA5A, SH3GL2
Immune system process (GO:0002376)	ADAM17, HOXA9, TP73
Interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	ADAM17, TP73
Localization (GO:0051179)	ADAM17, AGAP1, CDC42BPB, CLSTN1, DNAJC6, GPR39, OCA2, PEX14, SEMA5A, SFXN3, SH3GL2, SLC9A8, SLC16A1, STXBP6, SUN1, TP73

Biological Process

Biological Process		Gene Ontology (GO) terms	Genes
	Locomotion (GO:0040011)	ADAM17, CDC42BPB, SEMA5A, SUN1	
	Metabolic process (GO:0008152)	ADAM17, CDC42BPB, CYP2B6, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, LHPP, OCA2, PEX14, PPP1R2, PRRX2, QRICH1, RHEB, SFXN3, SH3GL2, SLC16A1, SND1, SOX7, TBL1X, TMEM132D, TP73	
	Multicellular organismal process (GO:0032501)	ADAM17, CLSTN1, CSMD1, GPR39, HOXA9, MATN3, OCA2, PRRX2, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SOX7, SPATA5, SUN1, TBL1X	
	Multi-organism process (GO:0051704)	HOXA9, OCA2, SPATA5, SUN1	
	Negative regulation of biological process (GO:0048519)	ADAM17, ATAD3A, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, PEX14, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SND1, SOX7, TBL1X, TMEM132D	
	Pigmentation (GO:0043473)	OCA2	
	Positive regulation of biological process (GO:0048518)	ADAM17, CLSTN1, GPR39, HMBOX1, HOXA9, PRRX2, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SOX7, TBL1X	
	Regulation of biological process (GO:0050789)	ADAM17, ATAD3A, CDC42BPB, CLSTN1, DNAJC6, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, PEX14, PPP1R2, PRRX2, QRICH1, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SLC16A1, SND1, SOX7, STXBP6, TBL1X, TMEM132D	
	Reproduction (GO:0000003)	HOXA9, OCA2, SPATA5, SUN1	
	Reproductive process (GO:0022414)	HOXA9, OCA2, SPATA5, SUN1	
	Response to stimulus (GO:0050896)	ADAM17, CDC42BPB, CSMD1, CYP2B6, GPR39, PPP1R2, PRRX2, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SLC16A1, SOX7, TBL1X, TP73	
	Signaling (GO:0023052)	ADAM17, CDC42BPB, CLSTN1, GPR39, PPP1R2, PRRX2, RGS6, RHEB, SEMA5A, SLC16A1, SOX7, TBL1X	

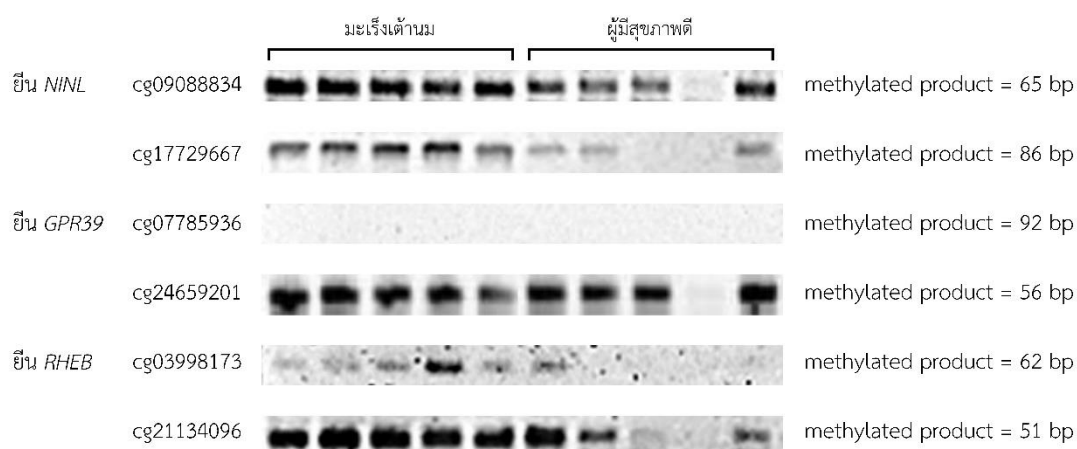
	Gene Ontology (GO) terms	Genes
Cellular Component	Cellular component (GO:0005575)	CSMD2
	Cellular anatomical entity (GO:0110165)	ADAM17, AGAP1, ATAD3A, CDC42BPB, CLSTN1, CSMD1, DNAJC6, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, LHPP, MATN3, MIPOL1, NINL, OCA2, PCDHGB4, PCDHGB7, PEX14, PPP1R2, PRRX2, QRIC1, RGS6, RHEB, SEMA5A, SFXN3, SH3GL2, SLC9A8, SLC16A1, SND1, SOX7, SPATA5, STXBP6, SUN1, TBL1X, TGFB1, TMEM132D
	Intracellular (GO:0005622)	ADAM17, AGAP1, ATAD3A, CDC42BPB, CLSTN1, DNAJC6, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, LHPP, MIPOL1, NINL, OCA2, PEX14, PPP1R2, PRRX2, QRIC1, RGS6, RHEB, SFXN3, SH3GL2, SLC9A8, SLC16A1, SND1, SOX7, SPATA5, STXBP6, SUN1, TBL1X, TGFB1
	Protein-containing complex (GO:0032991)	HOXA9, KDM4B, PEX14, RGS6, RHEB, SND1, SOX7, STXBP6, SUN1, TBL1X
	Molecular function (GO:0003674)	CSMD1, CSMD2, TMEM132D
	Antioxidant activity (GO:0016209)	LHPP
	Binding (GO:0005488)	ADAM17, AGAP1, ATAD3A, CDC42BPB, CLSTN1, DNAJC6, GPR39, HMBOX1, HOXA9, KDM4B, LHPP, MATN3, MIPOL1, NINL, PCDHGB4, PEX14, PPP1R2, PRRX2, RGS6, RHEB, SEMA5A, SH3GL2, SLC16A1, SND1, SOX7, SPATA5, STXBP6, SUN1, TBL1X, TGFB1
	Catalytic activity (GO:0003824)	ADAM17, AGAP1, CDC42BPB, DNAJC6, KDM4B, LHPP, RHEB, SND1, SPATA5
	Molecular function regulator (GO:0098772)	AGAP1, PPP1R2, RGS6
	Molecular transducer activity (GO:0060089)	GPR39, SEMA5A
Molecular Function	Structural molecule activity (GO:0005198)	TGFB1
	Transcription regulator activity (GO:0140110)	HMBOX1, HOXA9, PEX14, PRRX2, QRIC1, SOX7, TBL1X
	Transporter activity (GO:0005215)	SFXN3, SLC9A8, SLC16A1

Validation genes ถูกเลือกจากยีนที่พบบ่อยที่สุดในเลือดประเภทเดียวกัน (*BRCA1* mutation หรือ *BRCA1* wild type) ในทั้งสอง GSEs (GSE32396 และ GSE57285) และเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 สายพันธุ์ (MCF7, MDA-MB-231 และ T47D) ในการทดลองทั้งหมด โดยเลือกจากทั้ง 40 candidate genes จากการทดลองทั้งหมด 12 การทดลองซึ่งมีค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P -values <0.05 และ odd ratio >1)

Ninein Like (*NINL*) ถูกเลือกเป็น validation gene เนื่องจากเป็นยีนที่พบมากที่สุดในการทดลองจากทั้งหมด 12 การทดลองในทั้งสอง GSEs และเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 สายพันธุ์ ส่วน G Protein-Coupled Receptor 39 (*GPR39*) และ Ras Homolog, MTORC1 Binding (*RHEB*) ถูกเลือกเป็น validation gene เนื่องจากเป็นยีนที่พบมากที่สุดในการทดลองของ *BRCA1* wild type ในทั้งสอง GSEs และเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยในแต่ละ validation genes มี methylated CpG 2 ตำแหน่งดังนี้ (1) cg09088834 และ cg17729667 ในยีน *NINL* (2) cg07785936 และ cg24659201 ในยีน *GPR39* และ (3) cg03998173 และ cg21134096 ในยีน *RHEB*

4.2 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกตำแหน่ง CpG ด้วยวิธี MSP

ตำแหน่ง CpG และ probes ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้รับการทดสอบเบื้องต้นด้วย methylated CpG ทั้ง 6 ตำแหน่งใน 3 ยีนด้วยวิธี MSP โดยวิเคราะห์จากแถบแบนของดีเอ็นเอจากผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 5 ราย และอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 5 ราย ซึ่งใช้ตัวอย่างรายเดียวกันในทุกตำแหน่ง methylated CpG ความไวและความจำเพาะของแต่ละ methylated CpG probe คำนวณจากจำนวนแถบแบนของ methylated และ unmethylated ในแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แถบแบนดีเอ็นเอของ methylated CpG ทั้ง 6 ตำแหน่งใน 3 ยีน ด้วยวิธี MSP

ความไวและความจำเพาะของโพรบ methylated CpG probe มีดังนี้ ตำแหน่ง cg09088834, cg24659201 และ cg21134096 มีความไวและความจำเพาะ 100% และ 20% ตามลำดับ cg17729667 มีความไวและความจำเพาะ 100% และ 40% ตามลำดับ cg03998173 มีความไวและความจำเพาะ 100% และ 80% ตามลำดับ และ cg07785936 ไม่สามารถตรวจจับได้ทั้งแถบแบน methylated และ unmethylated ดังนั้นตำแหน่ง cg03998173 ที่อยู่ในยีน *RHEB* จึงเป็น methylated CpG probe ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตีเอ็นเอเมทิลเลชันในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในการศึกษานี้ และถูกเลือกเป็น validation gene ที่จะใช้ในการประเมินการเกิดเมทิลเลชันสำหรับการตรวจหามะเร็งเต้านมในเลือดในขั้นตอนถัดไป

4.3 ลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมการศึกษา

ผู้เข้าร่วมการศึกษาประกอบด้วยผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิงระยะต่างๆ จำนวน 200 ราย มีอายุเฉลี่ย 50.88 ± 10.66 ปี (ค่ามัธยฐานเท่ากับ 51 อายุระหว่าง 26 ถึง 85 ปี) และอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 200 ราย มีอายุเฉลี่ย 39.01 ± 11.32 ปี (ค่ามัธยฐานเท่ากับ 39 อายุระหว่าง 19 ถึง 68 ปี) โดย 65% ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีอายุอยู่ระหว่าง 41 ถึง 60 ปี ชนิดของมะเร็ง (histological type) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเป็นชนิด invasive ductal carcinoma เท่ากับ 77% ระยะโรคของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมตามการจำแนกแบบ Tumor-Node-Metastasis (TNM) แบ่งออกเป็นระยะ IIA และ IIB คิดเป็น 36% (ระยะละ 18%) ระยะ IV คิดเป็น 16% ระยะ IA คิดเป็น 14.5% และระยะอื่นๆ

ลักษณะพื้นฐาน (baseline characteristics) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 200 ราย ประกอบด้วยอายุ ชนิดของมะเร็ง ระยะโรค และ molecular subtype เป็นดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลักษณะพื้นฐานของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิง จำนวน 200 ราย

ลักษณะพื้นฐาน	จำนวน (%)
อายุ (ปี)	
21 – 30	2 (1)
31 – 40	33 (16.5)
41 – 50	64 (32)
51 – 60	66 (33)
61 – 70	29 (14.5)
71 – 80	5 (2.5)
81 – 90	1 (0.5)

ชนิดของมะเร็ง	
Invasive ductal carcinoma	154 (77)
Invasive lobular carcinoma	9 (4.5)
Invasive carcinoma	3 (1.5)
Invasive ductal carcinoma and mucinous carcinoma	2 (1)
Invasive papillary carcinoma	1 (0.5)
Invasive micropapillary carcinoma	1 (0.5)
Ductal carcinoma in situ (DCIS)	11 (5.5)
Mucinous carcinoma	5 (2.5)
Lobular carcinoma	1 (0.5)
Intracystic papillary carcinoma	1 (0.5)
Metaplastic carcinoma with chondroid differentiation	1 (0.5)
Malignant phyllodes tumor	1 (0.5)
Fibroadenoma	1 (0.5)
Unknown	9 (4.5)
ระยะโรค	
Fibroadenoma	1 (0.5)
ระยะ 0	9 (4.5)
ระยะ IA	29 (14.5)
ระยะ IB	1 (0.5)
ระยะ IIA	36 (18)
ระยะ IIB	36 (18)
ระยะ IIIA	20 (10)
ระยะ IIIB	22 (11)
ระยะ IIIC	14 (7)
ระยะ IV	32 (16)
Molecular subtype	
Luminal A	11 (5.5)
Luminal B (Her – 2 Negative)	34 (17)
Luminal B (Her – 2 Positive)	78 (39)
Her – 2 Positive	28 (14)

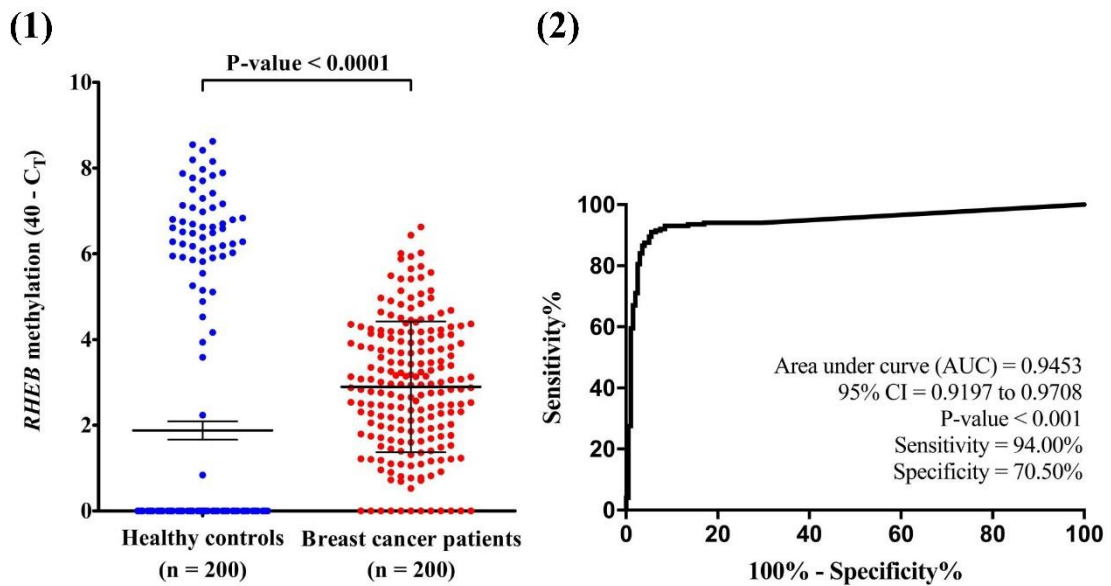
Luminal A or B	3 (1.5)
Triple Negative	20 (10)
Unknown	26 (13)

4.4 การหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี real-time PCR

การเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* (cg03998173) ถูกตรวจสอบในเม็ดเลือดขาว WBCs ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิงระยะต่างๆ จำนวน 200 ราย และอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 200 ราย ด้วยวิธี SYBR green-based RT-MSP โดยเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 188 ราย (94%) และอาสาสมัครเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 59 ราย (29.50%) ด้วยความไว 94% และความจำเพาะ 70.50%

แผนภาพการกระจาย (Scatter plot) และกราฟ Receiver operating characteristic (ROC) ของการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและเพศหญิงสุขภาพดีแสดงในรูปที่ 7 (1) และรูปที่ 7 (2) ตามลำดับ แผนภาพการกระจายแสดงค่าการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ($40 - C_T$) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง พบว่า ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 200 ราย มีค่าเฉลี่ยของการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ($40 - C_T$) และความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) เท่ากับ 2.89 ± 0.11 ส่วนเพศหญิงสุขภาพดี จำนวน 200 ราย ค่าเฉลี่ยของการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ($40 - C_T$) และความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) เท่ากับ 1.88 ± 0.21 ดังรูปที่ 7 (1) โดยค่า $40 - C_T$ ที่สูงกว่าจะแสดงถึงระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ที่สูงกว่า และแสดงค่าเป็น 0 เมื่อไม่สามารถตรวจพบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ภายหลัง 40 รอบของ real-time PCR แต่เนื่องจากค่า $40 - C_T$ ของเพศหญิงสุขภาพดีการกระจายตัวค่อนข้างมากและครอบคลุมบริเวณค่า $40 - C_T$ ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จึงทำให้ไม่สามารถคำนวณค่าจุดตัด (cut off) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและเพศหญิงสุขภาพดีได้ ทั้งนี้ความแตกต่างของอายุไม่มีผลต่อระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB*

กราฟ Receiver operating characteristic (ROC) ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในการเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งสำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านม โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) เท่ากับ 0.9453 (P-value<0.001) ดังแสดงในรูปที่ 7 (2)



รูปที่ 7 แผนภาพการกระจาย และกราฟ ROC

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นหนึ่งในกระบวนการเปลี่ยนแปลงในระดับเหนือพันธุกรรมที่สำคัญที่สุดที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งยีนเป้าหมายและมีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งและการลุกลามของมะเร็ง (7, 51) การดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลเบื้องต้นระหว่างกระบวนการเกิดมะเร็งและมีความเฉพาะเจาะจงต่อสถานะของมะเร็ง (52) ดีเอ็นเอเมทิลเลชันถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการตรวจหาและวินิจฉัยมะเร็งแบบไม่รุกรานร่างกาย ยีนบางตัวที่มีการเกิดเมทิลเลชันในส่วนของโปรโมเตอร์ที่ผิดปกติไปถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านม (*RASSF1A* (8, 10, 11, 51, 52), *BRCA1* (8-11, 51, 52) และ Paired Like Homeodomain 2 (*PITX2*). (51) ดังนั้นการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติจึงถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง (52)

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดจากทั่วโลกเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมมีการพบดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดที่มีข้อมูลระดับเหนือพันธุกรรมที่สามารถนำไปใช้ในการประเมินความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมในแต่ละบุคคลได้ (53) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่เกิดจากการเหนี่ยวนำจากมะเร็งในเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งได้ (42, 53) เราจึงตั้งสมมติฐานว่า การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เกิดจากการ

เหนี่ยวนำจากมะเร็งในเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs ซึ่งเกิดจากการหลั่งของเซลล์มะเร็งเต้านม สามารถเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมได้

เราค้นหายีนที่มีการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติในมะเร็งเต้านมด้วยการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) จากผู้มีสุขภาพดีร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม 3 สายพันธุ์ (MCF7, MDA-MB-231 และ T47D) ซึ่งมักถูกใช้เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ (54-56) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่ถูกกระตุ้นถูกนำเข้าสู่กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ ข้อมูล DNA methylation profiles ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่ถูกกระตุ้นและข้อมูล DNA methylation profiles ของเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมใน 2 GSEs (GSE32396 และ GSE57285) ถูกนำมาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X เพื่อค้นหายีนที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิดปกติในมะเร็งเต้านม ทั้ง 40 candidate genes จากการทดลองทั้งหมด 12 การทดลองให้ค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P -values < 0.05 และ odd ratio > 1) *NINL* ถูกเลือกเป็น validation gene เนื่องจากเป็นยีนที่พบมากที่สุดในการทดลองจากทั้งหมด 12 การทดลองในทั้งสอง GSEs และเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 สายพันธุ์ ส่วน *GPR39* และ *RHEB* ถูกเลือกเป็น validation gene เนื่องจากเป็นยีนที่พบมากที่สุดในการทดลองทั้งหมด 6 การทดลองของ *BRCA1* wild type ในทั้งสอง GSEs และเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยในแต่ละ validation genes มี methylated CpG 2 ตำแหน่งดังนี้ (1) cg09088834 และ cg17729667 ในยีน *NINL* (2) cg07785936 และ cg24659201 ในยีน *GPR39* และ (3) cg03998173 และ cg21134096 ในยีน *RHEB*

ตำแหน่ง methylated CpG ทั้ง 6 ตำแหน่งใน 3 ยีน (*NINL*, *GPR39* และ *RHEB*) ได้รับการเลือกสำหรับการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาตำแหน่ง CpG และโพรบที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยวิธี MSP โพรบ cg03998173 ที่อยู่ในยีน *RHEB* ถูกเลือกเป็น validation gene เนื่องจากเป็นโพรบ CpG ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม หลังจากการทดสอบเบื้องต้นในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 5 ราย และผู้มีสุขภาพดี จำนวน 5 ราย ด้วยความไวและความจำเพาะ 100% และ 80% ตามลำดับ

RHEB เป็นยีนในกลุ่ม GTPases ของกลุ่มยีน *Ras* มีส่วนเกี่ยวข้องกับยีนต่อมะเร็งและอาจเกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมที่ขึ้นกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (57) โพรตีน *RHEB* จับและกระตุ้นตัวควบคุมเมตาบอลิกของ mTORC1 ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในเซลล์มะเร็ง (58) กิจกรรมของ *RHEB* ถูกกระตุ้นด้วยการส่งสัญญาณเอสโตรเจนแบบ non-genomic โดย *RHEB* ที่ถูกกระตุ้นจะไปกระตุ้นการทำงานของ mTOR kinase และเพิ่มการกระบวนการ protein translation และ cell cycle progression (57)

มักพบการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน *RHEB* ในมะเร็งของมนุษย์ (59) การแสดงออกที่สูงขึ้นของ *RHEB* สามารถส่งเสริมการกระตุ้น PI3K/AKT-independent mTORC1 ในมะเร็งของมนุษย์ การแสดงออกที่สูงขึ้นของ *RHEB* ในมะเร็งเต้านมและมะเร็งศีรษะและลำคอเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการลุกลามของมะเร็ง โดยไม่ขึ้นกับการเพิ่มขึ้นของยีน *HER2* หรือการสูญเสียการทำงานของ *PTEN* ในมะเร็งเต้านม หรือการเพิ่มขึ้นหรือการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน *EGFR* ในมะเร็งศีรษะและคอ (58) มีรายงานการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน *RHEB* ในมะเร็งหลายชนิดและเกิดควบคู่กับการกระตุ้น mTORC1 ที่สูงขึ้นรวมในมะเร็งเต้านมของมนุษย์ การแสดงออกของยีน *RHEB* ลดลงเมื่อขาด *FADD* พบในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ MCF-7 และ MDA-MB-231 รวมทั้งการลดลงของกิจกรรมของ mTORC1 ด้วยและเช่นเดียวกับยีน *FADD* การแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน *RHEB* มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคในมะเร็งเต้านมของมนุษย์ (60) *RHEB* มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นใน fibroadenoma เมื่อเทียบกับมะเร็งเต้านมชนิด infiltrating ductal carcinoma และพบโปรตีน *RHEB* ในส่วนประกอบของเยื่อหุ้มของ fibroadenoma (61) ฐานข้อมูลไมโครเอเรย์สนับสนุนความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการสูงขึ้นของ *RHEB* mRNA ในระดับที่สูงและการลุกลามของมะเร็งเต้านม (59) *RHEB* เป็นเป้าหมายในการกระตุ้นที่รู้จักกันดีของ rapamycin (mTOR) protein kinase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (62)

การเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* (cg03998173) ถูกตรวจสอบในเม็ดเลือดขาว WBCs ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิงระยะต่างๆ จำนวน 200 ราย และผู้มีสุขภาพดี จำนวน 200 ราย ด้วยวิธี SYBR green-based RT-MSP โดยเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 188 ราย (94%) และผู้มีสุขภาพดี จำนวน 59 ราย (29.50%) ด้วยความไว 94% และความจำเพาะ 70.50% (P-value<0.0001)

ในส่วนของผลบวกหลง (false positive) ที่มีการเกิดเมทิลเลชันของยีน *RHEB* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเพศหญิงสุขภาพดีนั้น เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุเช่น ในร่างกายมีฮอร์โมนที่สร้างขึ้นจากยีน *RHEB* ที่ทำหน้าที่ที่เหมือนกัน หรือปฏิกิริยาของการตัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์ที่ไม่สมบูรณ์ หรือการเกิดความแปรผันทางพันธุกรรม ทำให้เกิด DNA variation เมื่อผ่านกระบวนการ PCR ทำให้ขึ้นผลบวกทั้งหมดได้ ส่วนผลลบหลง (false negative) ที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมนั้น อาจเกิดจากความผิดพลาดในกระบวนการทำ PCR หรือเป็นผลจากเลือดของคนไข้เอง

สรุปได้ว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาว WBCs ที่เป็นผลมาจากการหลั่งของเซลล์มะเร็งเต้านมสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมได้ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *RHEB* เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งตัวใหม่ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยความไวและความจำเพาะที่สูง ดังนั้นการเกิด

เมทิลเลชั่นของยีน *RHEB* จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งในการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมจากเลือด ด้วยวิธี real-time PCR ได้



บรรณานุกรม

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Imsamran W, Pattatang A, Supattagorn P, Chiawiriyabunya I, Namthaisong K, Wongsena M. *Cancer in Thailand Vol. IX (2013-2015)*2018.
3. Division SaP. *Public Health Statistics A.D.* 20172018.
4. Institute NC. *Recommendations of appropriate breast cancer screening for Thailand: Ministry of Health*2018.
5. Hocaoglu M, Ersahin A, Akdeniz E. Evaluation on the Practice and Behaviour of Women Applied for Gynecology Outpatient Clinics About Screening Methods for Early Diagnosis of Breast Cancer. *Eur J Breast Health.* 2017;13(3):150-5.
6. Coleman C. Early Detection and Screening for Breast Cancer. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(2):141-55.
7. Loke S, Lee A. The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2018;92:54-68.
8. Li L, Choi J, Lee K, Sung H, Park S, Oze I, et al. DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J Epidemiol.* 2012;22(5):384-94.
9. Joo J, Dowty J, Milne R, Wong E, Dugue P, English D, et al. Heritable DNA methylation marks associated with susceptibility to breast cancer. *Nat Commun.* 2018;9(1):867.
10. Salta S, S PN, Fontes-Sousa M, Lopes P, Freitas M, Caldas M, et al. A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *J Clin Med.* 2018;7(11).
11. Cui X, Cao L, Huang Y, Bai D, Huang S, Lin M, et al. In vitro diagnosis of DNA methylation biomarkers with digital PCR in breast tumors. *Analyst.* 2018;143(13):3011-20.
12. 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.
13. Johns Hopkins M, Pathology Overview of the Breast [updated 8 June 2019]. Available from: <https://pathology.jhu.edu/breast/overview/>.
 14. Komen TGNyCAoSG. A short introduction to breast cancer. [Available from: http://www.komennyc.org/site/PageServer?pagename=view_breastcancer&sec=2.
 15. National Breast Cancer Foundation I. Breast Anatomy [Available from: <https://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>.
 16. Farhadieh R, Bulstrode N, Cugno S. *Plastic and Reconstructive Surgery: Approaches and Techniques*. 1st ed. ed2015.
 17. Ellis H, Mahadevan V. *Anatomy and physiology of the breast*. *Surgery (Oxford)*. 2013;31(1):11-4.
 18. Now BC. How breast cancer starts and grows 2016 [Available from: <https://breastcancer.org/about-breast-cancer/have-you-recently-been-diagnosed-with-breast-cancer/how-breast-cancer-starts-and-grows>.
 19. Lukong K. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin*. 2017;7:64-77.
 20. Bateman A. *Breast pathology*. *Surgery (Oxford)*. 2009;28(3):107-13.
 21. Lal S, McCart Reed A, de Luca X, Simpson P. Molecular signatures in breast cancer. *Methods*. 2017;131:135-46.
 22. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018;5(2):77-106.
 23. Breastcancer.org. Breast Cancer Stages 2018 [Available from: <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging>.
 24. Medscape. Breast Cancer Staging 2019 [Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/2007112-overview>.
 25. Koh J, Kim M. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol*. 2019;20(1):69-82.
 26. Foundation NBC. Breast Cancer Stages [Available from: <https://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-stages>.

27. Cho N. Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer. *Ultrasonography*. 2016;35(4):281-8.
28. Yip C, Bhoo-Pathy N, Daniel J, Foo Y, Mohamed A, Abdullah M, et al. Roles of Ki67 in Breast Cancer - Important for Management? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):1077-82.
29. Gotzsche P, Jorgensen K. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013(6):CD001877.
30. Tabar L, Dean P, Chen T, Yen A, Chen S, Fann J, et al. The incidence of fatal breast cancer measures the increased effectiveness of therapy in women participating in mammography screening. *Cancer*. 2019;125(4):515-23.
31. Anothaisintawee T, Tantai N, Teerawattananon Y. Cost-utility of once-in-a-lifetime breast cancer screening with mammography in Thai women. *Journal of Health Systems Research*. 2013;7(3):413-20.
32. Chongthawonsatid S. Inequity of healthcare utilization on mammography examination and Pap smear screening in Thailand: Analysis of a population-based household survey. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173656.
33. Kaiser J. 'Liquid biopsy' for cancer promises early detection. *Science*. 2018;359(6373):259.
34. Holdenrieder S, Pagliaro L, Morgenstern D, Dayyani F. Clinically Meaningful Use of Blood Tumor Markers in Oncology. *Biomed Res Int*. 2016;2016(9795269).
35. Wang R, Li X, Zhang H, Wang K, He J. Cell-free circulating tumor DNA analysis for breast cancer and its clinical utilization as a biomarker. *Oncotarget*. 2017;8(43):75742-55.
36. Kobayashi T. A blood tumor marker combination assay produces high sensitivity and specificity for cancer according to the natural history. *Cancer Med*. 2018;7(3):549-56.
37. Stearns V, Yamauchi H, Hayes D. Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. *Breast Cancer Res*. 1998;52:239-59.
38. Duffy M. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem*. 2006;52(3):345-51.
39. Cohen J, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*.

2018;359(6378):926-30.

40. Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2018;34(4):536-48.

41. Leygo C, Williams M, Jin H, Chan M, Chu W, Grusch M, et al. DNA Methylation as a Noninvasive Epigenetic Biomarker for the Detection of Cancer. *Dis Markers*. 2017;2017:3726595.

42. Boonsongserm P, Angsuwatcharakon P, Puttipanyalears C, Apornthewan C, Kongruttanachok N, Aksornkitti V, et al. Tumor-induced DNA methylation in the white blood cells of patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(3):3039-48.

43. Pan Y, Liu G, Zhou F, Su B, Li Y. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clin Exp Med*. 2018;18(1):1-14.

44. Holubekova V, Mendelova A, Jasek K, Mersakova S, Zubor P, Lasabova Z. Epigenetic regulation by DNA methylation and miRNA molecules in cancer. *Future Oncol*. 2017;13(25):2217-22.

45. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):679-92.

46. Hossain T, Mahmudunnabi G, Masud M, Islam M, Ooi L, Konstantinov K, et al. Electrochemical biosensing strategies for DNA methylation analysis. *Biosens Bioelectron*. 2017;94:63-73.

47. Adams C, Jordahl K, Copeland W, Mirick D, Song X, Sather C, et al. Nightshift work, chronotype, and genome-wide DNA methylation in blood. *Epigenetics*. 2017;12(10):833-40.

48. Yang R, Stocker S, Schott S, Heil J, Marme F, Cuk K, et al. The association between breast cancer and S100P methylation in peripheral blood by multicenter case-control studies. *Carcinogenesis*. 2017;38(3):312-20.

49. Zhuang J, Jones A, Lee S, Ng E, Fiegl H, Zikan M, et al. The dynamics and prognostic potential of DNA methylation changes at stem cell gene loci in women's cancer. *PLoS Genet*. 2012;8(2):e1002517.

50. Anjum S, Fourkala E, Zikan M, Wong A, Gentry-Maharaj A, Jones A. A BRCA1-mutation associated DNA methylation signature in blood cells predicts sporadic breast cancer incidence and survival. *Genome Med*. 2014;6(6).

51. Ye M, Huang T, Ying Y, Li J, Yang P, Ni C. Detection of 14-3-3 sigma (σ) promoter methylation as a noninvasive biomarker using blood samples for breast cancer diagnosis. *Oncotarget*. 2017;8(6):9230-42.
52. Vu T, Nguyen T, Doan V, Vo L. Methylation Profiles of BRCA1, RASSF1A and GSTP1 in Vietnamese Women with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(7):1887-93.
53. Chopra-Tandon N, Wu H, Arcaro K, Sturgeon S. Relationships between Global DNA Methylation in Circulating White Blood Cells and Breast Cancer Risk Factors. *J Cancer Epidemiol*. 2017;2017:2705860.
54. Ronghe A, Chatterjee A, Singh B, Dandawate P, Abdalla F, Bhat N, et al. 4-(E)-{(p-tolylimino)-methylbenzene-1,2-diol}, 1 a novel resveratrol analog, differentially regulates estrogen receptors alpha and beta in breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;301:1-13.
55. Lv W, Chen N, Lin Y, Ma H, Ruan Y, Li Z, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes breast cancer metastasis via activation of HMGB1/TLR4/NF kappa B axis. *Cancer Lett*. 2016;375(2):245-55.
56. Xiang Y, Liao X, Yao A, Qin H, Fan L, Li JP, et al. MRTF-A-miR-206-WDR1 form feedback loop to regulate breast cancer cell migration. *Exp Cell Res*. 2017;359(2):394-404.
57. Hanks A, Der C. The roles of ras family small GTPases in breast cancer. second ed. The Netherlands: Elsevier; 2010.
58. Lu Z, Shvartsman M, Lee A, Shao J, Murray M, Kladney R, et al. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010;70(8):3287-98.
59. Heard J, Fong V, Bathaie S, Tamanoi F. Recent progress in the study of the Rheb family GTPases. *Cell Signal*. 2014;26(9):1950-7.
60. He L, Ren Y, Zheng Q, Wang L, Lai Y, Guan S. Fas-associated protein with death domain (FADD) regulates autophagy through promoting the expression of Ras homolog enriched in brain (Rheb) in human breast adenocarcinoma cells. *Oncotarget*.

2016;7(17):24572-84.

61. Eom M, Han A, Yi S, Shin J, Cui Y, Park K. RHEB expression in fibroadenomas of the breast. *Pathol Int.* 2008;58(4):226-32.

62. Marshall C, Mazhab-Jafari M, Stambolic V, Ikura M. Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 12014.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุธาสินี อาชายุทธ์
วัน เดือน ปี เกิด	2 กุมภาพันธ์ 2528
สถานที่เกิด	ฉะเชิงเทรา
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	3/36 ซีทุคอนโดมิเนียม ซอยลาดพร้าว 7 ถนนลาดพร้าว แขวงจอมพล เขตจตุจักร กทม. 10900
ผลงานตีพิมพ์	<p>1) อติศร เจษฎ์ปิยะวงศ์, สุธาสินี อาชายุทธ์, สุนันทา จรียาเลิศศักดิ์. การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง. วารสารโรคมะเร็ง. 2555;32(4):172-7.</p> <p>2) สุธาสินี อาชายุทธ์, ดนัย ทิวาเวช, เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน, สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย, สมชาย ธนะสิทธิชัย. การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง การแสดงออกของยีน และโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกหลังจากได้รับอะฟลาท็อกซิน B1. วารสารโรคมะเร็ง. 2561;38(4):165-76.</p>
รางวัลที่ได้รับ	<p>1) รางวัลระดับดี ด้านการแพทย์ ในการนำเสนอโปสเตอร์เรื่อง RHEB Methylation as Tumor Marker for Breast Cancer Screening from Blood by Real-Time PCR. ในการประชุมวิชาการโรคมะเร็งแห่งชาติ ครั้งที่ 14 (NCC 14) "Moving Together CANCER 4.0" วันที่ 12 - 14 ธันวาคม 2561 จัดโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติและโรงพยาบาลมะเร็งภูมิภาค กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข</p>