

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF PARACRINE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL FROM EPITHELIAL
OVARIAN CANCER CELL LINES

Miss Natthamon Sonthi



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณ จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว
โดย	นางสาวนัทธมน สนธิ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

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

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

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

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

นัทธมน สนธิ : การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว (EFFECT OF PARACRINE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL FROM EPITHELIAL OVARIAN CANCER CELL LINES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: ศ. ดร. นพ.อภิวัฒน์ มุทิรากร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำธร, 72 หน้า.

สัญญาณพาราไครน์ (paracrine signal) เป็นการสื่อสารระหว่างเซลล์ 2 เซลล์ที่อยู่ใกล้กัน ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ได้รับสัญญาณได้ มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านมมีการส่งสัญญาณไปยังเซลล์เม็ดเลือดขาวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจโรคจากการตรวจเลือด และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้กับโรคมะเร็งชนิดต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็งรังไข่ที่มีความหลากหลายของเซลล์ และวิธีการตรวจคัดกรองยังมีประสิทธิภาพไม่มากพอ ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ยังมีอัตราการเสียชีวิตสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ โดยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว 2 ประเภท เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติกลุ่มควบคุม ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RNA-sequencing (RNA-seq) พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มทดลองมีการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำผล RNA-seq มาคัดเลือกยีนที่สนใจร่วมกับการทดลอง expression array (GSE31682) พบว่า ยีน *CDKN1B* *GIMAP8* และ *SNN* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว เปรียบเทียบกับคนปกติ ด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) พบว่า ยีน *GIMAP8* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p -value < 0.0001 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุลเมื่อได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว ซึ่งการแสดงออกของยีน *GIMAP8* ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถนำไปใช้ตรวจโรคมะเร็งรังไข่ได้ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังเป็นพื้นฐานที่สามารถศึกษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรอง การวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5874096630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: PARACRINE / OVARIAN CANCER / PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL / CO-CULTURE / RNA-SEQ / EXPRESSION ARRAY

NATTHAMON SONTI: EFFECT OF PARACRINE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL FROM EPITHERIAL OVARIAN CANCER CELL LINES. ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NAKARIN KITKUMTHORN, D.D.S., Ph.D., 72 pp.

Paracrine is substance that communicates between nearby cells. The effect of paracrine is able to change target cell properties. Our previous study demonstrated breast cancer cells can modify molecular properties of surrounding peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by their paracrine signals. These features might be applied for blood-based cancer detection. At present, ovarian cancer is one of heterogeneous tumor with no screening test is satisfying, leading to high mortality outcome of patients. The aim of this study was to discover novel biomarker for epithelial ovarian cancer in patients' PBMCs. Normal PBMCs was co-cultured with two ovarian cancer cell lines. Transcriptome analysis was performed by RNA-sequencing (RNA-seq) technique. The results of gene expression changes were then combined with distributed microarray data (GSE31682) from GenBank. Three highest upregulated genes including *CDKN1B*, *GIMAP8* and *SNN* were selected. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed subsequently in validation step using PBMCs from 16 ovarian cancer patients compared with 15 healthy controls. Increase of *GIMAP8* expression level was exhibited in ovarian cancer patient significantly (p -value < 0.0001). We summarized that PBMCs were changed their expression as a result of paracrine signals from ovarian cancer cells. Furthermore, the distinguish expression level of *GIMAP8* could be applied for cancer screening and other medical purposes.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกัธร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร อาจารย์ ดร. นริศร คงรัตนโชค และอาจารย์ ดร. ศิวนนท์ จิรวัดโนทัย ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบพระคุณ แพทย์หญิงชินา โอบารัตน์พันธ์ แพทย์หญิงธาริณี แม่นชนะ และแพทย์หญิงณัฐชา พูลเจริญ อาจารย์ประจำภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านตัวอย่างที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

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

ขอขอบพระคุณ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ นักวิจัยหลังปริญญาเอก และ คุณพัทธ์พล คุณาติเรก นักวิทยาศาสตร์ประจำหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสรารุช วงษ์พยัคฆ์ ผู้จัดการบริษัท วิซูโอ โบโอเมดิคอล (ไทยแลนด์) จำกัด ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ

ขอขอบพระคุณ ดร. รัฐกร ศรีสุทธิ อาจารย์ประจำคณะแพทยศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ ในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณกัญวลัญญ์ ชเลิศเพ็ชร คุณปพิชญา วัชรานุรักษ์ คุณปภัสสร บุญส่งเสริม คุณอารีญา อารยะทวีกุล และนักวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจिरายู เอื้อวรกุล รองอธิการบดีวิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ และนางสาวมณีนพ ยิ้มยิ้ม หัวหน้างานห้องปฏิบัติการสนับสนุนงานวิจัย โรงพยาบาลจุฬาภรณ ที่ให้โอกาสศึกษาต่อในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณ ทนุอุตทนาการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงพระเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บุคคลในครอบครัว และเพื่อนๆ ที่คอยเป็นแรงผลักดัน รวมถึงให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นลงได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฑ
บทที่ 1	1
ที่มา และความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย	2
สมมติฐานงานวิจัย	2
วัตถุประสงค์การวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	3
บทที่ 2	4
การส่งสัญญาณพาราไครน์ (paracrine signaling).....	4
เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells	5
มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer).....	6
การแสดงออกของยีน (gene expression).....	10
เทคนิค expression array	11
เทคนิค next generation sequencing	12
Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAM X)	14

การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนจากชีวสารสนเทศ	15
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction).....	16
อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางเป็นเจล (gel electrophoresis).....	17
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเรียลไทม์ (real-time polymerase chain reaction)	17
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบย้อนกลับ (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction : RT-qPCR)	18
บทที่ 3	20
กรอบความคิดงานวิจัย	20
รูปแบบการวิจัย	21
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	21
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
ระเบียบวิธีวิจัย	25
1. ตัวอย่างในงานวิจัย.....	25
2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว จากแบบจำลอง paracrine action	27
3. การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ จาก แบบจำลอง paracrine action และ expression array	31
4. การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ.....	32
5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิวเปรียบเทียบกับคนปกติ.....	32
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์.....	37

บทที่ 4	38
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับ สัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่ออุ้งฉี่ จากแบบจำลอง paracrine action.....	38
ผลการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ จากแบบจำลอง paracrine action และ expression array.....	39
ผลการวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ.....	41
ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็ง รังไข่ชนิดเยื่ออุ้งฉี่เปรียบเทียบกับคนปกติ.....	43
บทที่ 5	47
รายการอ้างอิง	50
ภาคผนวก.....	55
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	72

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	ตารางผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X แสดงจำนวนยีนในแต่ละกลุ่ม.. 32
ตารางที่ 2	ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 33
ตารางที่ 3	สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 33
ตารางที่ 4	สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 34
ตารางที่ 5	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอะคริลามัดเจล 34
ตารางที่ 6	สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ 35
ตารางที่ 7	สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ 35
ตารางที่ 8	ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 36
ตารางที่ 9	สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 36
ตารางที่ 10	ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกเพิ่มขึ้น 39
ตารางที่ 11	ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกเพิ่มขึ้น 40
ตารางที่ 12	ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกลดลง..... 40
ตารางที่ 13	ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกลดลง..... 40
ตารางที่ 14	รายละเอียดของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GIMAP8</i> 46
ตารางที่ 15	ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มควบคุม 56
ตารางที่ 16	ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มทดลอง..... 57

ตารางที่ 17	จำนวนตัวอย่างเลือดแบ่งตามประเภทของมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว	58
ตารางที่ 18	ข้อมูลปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอจากแบบจำลอง paracrine action สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq.....	58
ตารางที่ 19	ข้อมูลผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq	59
ตารางที่ 20	ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการ ทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq	59
ตารางที่ 21	ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการ ทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq	61
ตารางที่ 22	ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการ ทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq	63
ตารางที่ 23	ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการ ทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq	65
ตารางที่ 24	ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ร่วมกับ expression array ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X.....	66
ตารางที่ 25	ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกลดลงจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ร่วมกับ expression array ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X.....	67
ตารางที่ 26	ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่สนใจจาก expression array	67
ตารางที่ 27	ข้อมูลค่าการแสดงออกของยีน <i>SNV</i>	68
ตารางที่ 28	ข้อมูลค่าการแสดงออกของยีน <i>GIMAP8</i>	69

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การสื่อสารระหว่างเซลล์แบบ paracrine signaling.....	4
รูปที่ 2 ลักษณะสภาพแวดล้อมของมะเร็ง (tumor microenvironment) ประกอบด้วย เซลล์มะเร็ง cancer-associated fibroblasts (CAFs) เซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน และ extracellular matrix.....	5
รูปที่ 3 ลักษณะทางกายวิภาคของรังไข่.....	6
รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งรังไข่ ซึ่งประกอบด้วยมะเร็งรังไข่ชนิดเซลล์เยื่อบุผิว 4 ชนิดหลัก คือ serous endometrioid mucinous และ clear cell.....	8
รูปที่ 5 การควบคุมการแสดงออกของยีนหลังการ transcription หรือ post-transcriptional controls	11
รูปที่ 6 การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค expression array.....	12
รูปที่ 7 การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค RNA sequencing.....	13
รูปที่ 8 ปฏิกริยาลูกลูโซไฟฟอสเฟอเรส	16
รูปที่ 9 การทำงานของสี SYBR Green I.....	18
รูปที่ 10 ปฏิกริยาลูกลูโซไฟฟอสเฟอเรสแบบย้อนกลับ	19
รูปที่ 11 แบบจำลอง paracrine action.....	28

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1	จำนวนยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment).....	38
แผนภูมิที่ 2	จำนวนยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment).....	39
แผนภูมิที่ 3	การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ตามหน้าที่การทำงานของยีน	41
แผนภูมิที่ 4	การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ตามหน้าที่การทำงานของยีน	42
แผนภูมิที่ 5	การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ตามการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) และกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment).....	43
แผนภูมิที่ 6	การแสดงออกของยีน <i>SNW</i> ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่.....	44
แผนภูมิที่ 7	การแสดงออกของยีน <i>GIMAP8</i> ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ตามประเภทของมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว	44
แผนภูมิที่ 8	การแสดงออกของยีน <i>GIMAP8</i> ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ตามระยะของมะเร็งรังไข่	45
แผนภูมิที่ 9	ROC curve การแสดงออกของยีน <i>GIMAP8</i> ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่	45

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
APS	Ammonium peroxodisulfate
bp	Base pair
CA-125	Carbohydrate antigen 125
<i>CDKN1B</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B
cDNA	Complementary DNA
CU-DREAM X	Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays extension
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FIGO	Federation of Gynecology and Obstetrics
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GEO	Gene Expression Omnibus
<i>GIMAP8</i>	GTPase, IMAP Family Member 8
GPL	GEO platform
GSE	GEO experiment series
GSM	GEO sample
HISAT	Hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts
IAN	Immuno-associated nucleotide
mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next generation sequencing
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative PCR
RIN	RNA integrity number
RMI	Risk of malignancy index
RNA-seq	RNA deep-sequencing
ROC	Receiver-operating characteristic
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
<i>SNW</i>	Stannin
TBE	Tris-borate-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine



บทที่ 1

บทนำ

ที่มา และความสำคัญของปัญหา

เซลล์มะเร็งมีการสร้างสัญญาณพาราไครน์ในการติดต่อสื่อสารกับเซลล์ข้างเคียง เพื่อสร้างสภาพแวดล้อม (tumor microenvironment) ที่เหมาะสมในการอยู่รอด (survival) และการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง (cancer progression)¹⁻⁵ โดยสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะภายนอก (phenotypic alteration) สารพันธุกรรม (genetic alteration) และสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetic alteration) ในเซลล์ข้างเคียง⁴ ซึ่งเซลล์ข้างเคียงที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์ส่วนใหญ่ คือ สโตรมอลเซลล์ (stromal cell)³ มีงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะเหนือพันธุกรรมจากสัญญาณพาราไครน์ของเซลล์มะเร็ง พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านมส่งสัญญาณพาราไครน์ให้กับสโตรมอลเซลล์ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับเมทิลที่ไลน์วัน (LINE-1) และเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีไลน์วันแทรกอยู่ นอกจากนี้ยังตรวจพบการแสดงออกระดับโปรตีนในพลาสมาเซลล์ (plasma cell) ในต่อมน้ำเหลืองระยะแพร่กระจายที่ตรวจไม่พบเซลล์มะเร็งเต้านมภายใต้กล้องจุลทรรศน์⁶ ซึ่งการงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องมือในการตรวจคัดกรองมะเร็งหรือติดตามผลการรักษาได้

มะเร็งรังไข่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของมะเร็งในเพศหญิง ซึ่งปี พ.ศ. 2559 มะเร็งรังไข่จัดอยู่อันดับที่ 5 ของมะเร็งในเพศหญิงในสหรัฐอเมริกา^{7, 8} และสถิติโรคมะเร็งในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2557 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระบุว่ามะเร็งรังไข่จัดอยู่อันดับที่ 7 ของมะเร็งในเพศหญิง⁹ มะเร็งรังไข่เป็นโรคที่มีความหลากหลายของลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็ง ลักษณะทางชีวภาพ และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม¹⁰ โดยมะเร็งรังไข่ชนิดเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ถึงร้อยละ 90 ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ตรวจพบมะเร็งรังไข่เป็นผู้หญิงสูงอายุ มีอายุโดยเฉลี่ยประมาณ 63 ปี^{7, 11} และตรวจพบว่าเป็นมะเร็งระยะหลังที่มีการแพร่กระจายมากกว่าระยะแรก นอกจากนี้อาการของโรคมะเร็งนี้แสดงออกไม่ชัดเจน¹² และยังไม่มียาเครื่องมือในการตรวจที่จำเพาะ ทำให้ตรวจพบมะเร็งรังไข่ระยะแรกได้น้อย เพียงร้อยละ 20 ซึ่งระยะนี้ผู้ป่วยสามารถตอบสนองต่อการรักษาได้ดีถึงร้อยละ 70 ขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ระยะหลังที่ตรวจพบเป็นส่วนใหญ่ตอบสนองต่อการรักษาได้ไม่ดี ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ¹³

การตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ในปัจจุบัน ใช้การตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงผ่านทางช่องคลอด (transvaginal ultrasonography) สามารถตรวจพบความผิดปกติของก้อนเนื้อได้ แต่ไม่ค่อยจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ และมีค่าใช้จ่ายสูง การตรวจวัดระดับ carbohydrate antigen 125 (CA-125) ในซีรัมสามารถใช้ตรวจมะเร็งรังไข่ระยะแรกได้เพียงร้อยละ 50-60 เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของระดับ CA-125 ไม่ได้จำเพาะกับมะเร็งรังไข่เท่านั้น^{13, 14} และการตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น BRCA mutation สามารถตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ คิดเป็นร้อยละ 10 ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ทั้งหมด ซึ่งให้ผลดีเฉพาะกับผู้หญิงที่มีประวัติครอบครัวเป็นมะเร็งเต้านมหรือมะเร็งรังไข่¹⁵ ดังนั้นเครื่องมือที่สามารถตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ด้วยความจำเพาะ มีความไวสูง ตรวจง่าย และไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บปวด จึงมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับผู้ป่วย

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว และทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ เพื่อพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ที่มีความไว และความจำเพาะสูงในตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ ซึ่งจะนำไปสู่การวินิจฉัยและการรักษามะเร็งได้ในอนาคต

คำถามงานวิจัย

- 1) เซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิวส่งสัญญาณพาราไครน์ให้กับเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุลหรือไม่
- 2) การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิวมะเร็งรังไข่ สามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ได้หรือไม่

สมมติฐานงานวิจัย

เซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิวส่งสัญญาณพาราไครน์ให้กับเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอมีความจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ สามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ ด้วยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

การศึกษานี้ทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้ม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอมีความจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ได้

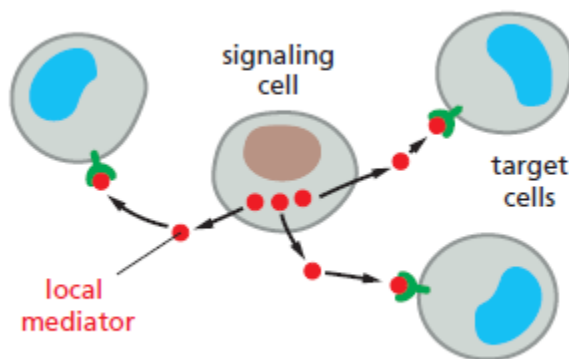


บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

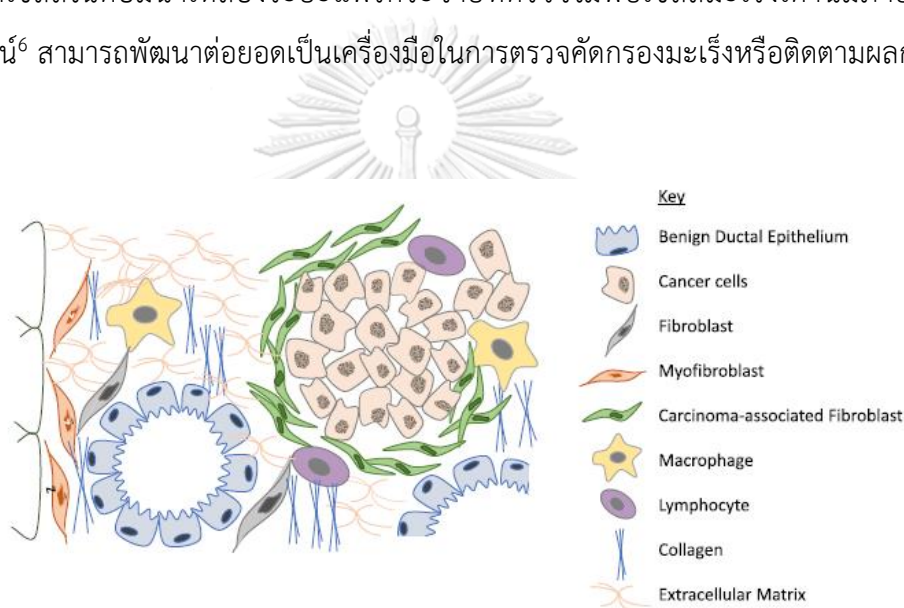
การส่งสัญญาณพาราไครน์ (paracrine signaling)

สัญญาณพาราไครน์เป็นการสื่อสารระหว่างเซลล์รูปแบบหนึ่ง โดยเซลล์หนึ่ง (signaling cell) สร้างสัญญาณพาราไครน์ เช่น cytokines chemokines หรือ intermediate metabolites¹ หลั่งออกสู่ extracellular space ไปมีผลต่อเซลล์ข้างเคียง (target cells) ซึ่งเป็นเซลล์ต่างชนิดกัน¹⁶ ดังรูปที่ 1 โดยเซลล์มะเร็งมีการสร้างสัญญาณพาราไครน์¹⁶ ออกสู่สโตรมา (stroma) ไปมีอิทธิพลกับเซลล์ต่างๆ ที่อยู่รอบข้าง คือ endothelial cells mesenchymal stem cells (MSCs)¹⁷ และสโตรมอลเซลล์ที่ประกอบด้วยเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เซลล์ myofibroblast และเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell) รวมถึง extracellular matrix³ ดังรูปที่ 2 ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อการสร้างสภาพแวดล้อม (tumor microenvironment) ให้เหมาะสมกับเซลล์มะเร็ง การอยู่รอด การเพิ่มจำนวน (proliferation)¹⁶ การเจริญเติบโตของมะเร็ง (tumor growth)¹ การสร้างเส้นเลือดมาเลี้ยง (angiogenesis)² migration การรุกราน (invasion) และการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis)^{1, 3-5} โดยที่สัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งสามารถกระตุ้นสโตรมอลเซลล์ (stromal activation) ด้วย cancer-promoting pathway ผ่านทาง mRNA จาก exosomal transformation ของเซลล์มะเร็ง หรือด้วยกลไกเหนือพันธุกรรม (epigenetic mechanism) เช่น ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน³ ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะภายนอก สารพันธุกรรม และสภาวะเหนือพันธุกรรม⁴



รูปที่ 1 การสื่อสารระหว่างเซลล์แบบ paracrine signaling¹⁶

งานวิจัยก่อนหน้าพบว่า pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) และ cancer-associated fibroblasts (CAFs) มีการสื่อสารกันด้วยสัญญาณพาราไครน์ โดยอาศัย cytokines เช่น GM-CSF และ IL-6 ผ่านทาง pathway ต่างๆ คือ JAK/STAT mTOR sonic hedge hog (SHH) และ NFkB ซึ่งมีบทบาทในการพัฒนาของมะเร็งและการต่อต้านการรักษา³ และการศึกษาบทบาทของสัญญาณพาราไครน์ในการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะเหนือพันธุกรรม โดยเซลล์มะเร็งเต้านมส่งสัญญาณพาราไครน์ให้กับสโตรมอลเซลล์ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับเมทิลที่ไลนัว้น และเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีไลนัว้นแทรกอยู่ โดยเฉพาะ *MUC-1* ซึ่งตรวจพบการแสดงออกระดับโปรตีนในพลาสมาเซลล์ในต่อมน้ำเหลืองระยะแพร่กระจายที่ตรวจไม่พบเซลล์มะเร็งเต้านมภายใต้กล้องจุลทรรศน์⁶ สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องมือในการตรวจคัดกรองมะเร็งหรือติดตามผลการรักษาได้



รูปที่ 2 ลักษณะสภาพแวดล้อมของมะเร็ง (tumor microenvironment) ประกอบด้วย เซลล์มะเร็ง cancer-associated fibroblasts (CAFs) เซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน และ extracellular matrix³

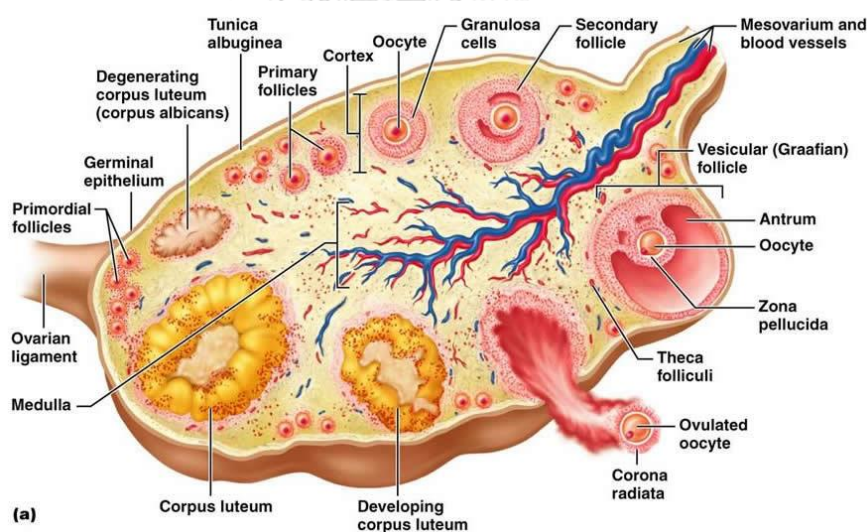
เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells หรือ PBMCs เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีนิวเคลียสกลม ประกอบด้วย lymphocytes (T cell, B cell และ NK cell)¹⁸ monocyte และ dendritic cells¹⁹ ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดและป้องกันสิ่งแปลกปลอม การติดเชื้อ หรือโรคร้ายแรง เช่น โรคมะเร็ง¹⁸ ซึ่งจำนวนเซลล์ PBMC แตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยจากจำนวน PBMC ทั้งหมด แบ่งสัดส่วนตามชนิดของเซลล์ ได้เป็น dendritic cells ร้อยละ 1-2 monocyte ร้อยละ 10-30 และ lymphocyte ร้อยละ 70-90 ซึ่งสัดส่วนของเซลล์ lymphocyte แบ่งเป็น CD3+ T cell ร้อยละ 70-85 (คิดเป็นร้อยละ 45-70 จากจำนวน PBMC

ทั้งหมด) B cell ร้อยละ 5-20 (คิดเป็นร้อยละ 15 จากจำนวน PBMC ทั้งหมด) NK cell ร้อยละ 5-20 (คิดเป็นร้อยละ 15 จากจำนวน PBMC ทั้งหมด)¹⁹ สำหรับงานวิจัย PBMC สามารถนำมาใช้ในการศึกษาโรคมะเร็งหรือโรคทางภูมิคุ้มกัน หรือประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการรักษาได้¹⁸ โดยสามารถสกัด PBMC ได้จาก whole blood ด้วยวิธี density gradient centrifugation

มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer)

รังไข่ เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศหญิง ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศหญิง²⁰ ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของรังไข่ ปกคลุมด้วยเซลล์เยื่อบุผิวชนิดคิวบอยดัล (cuboidal epithelial cells) สามารถแบ่งรังไข่ได้เป็น 2 ชั้น คือ ชั้นคอร์เทกซ์ด้านนอก (cortex) ประกอบด้วย فولลิคูล (follicles) และเซลล์ไข่ (oocytes) ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสโตรมาและชั้นเมดัลลา ด้านใน (medulla) ซึ่งเป็นบริเวณของหลอดเลือดและเนื้อเยื่อสโตรมา²¹ ดังรูปที่ 3 ความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่รังไข่พบได้ตั้งแต่ ซีสต์ (ovarian cysts) รังไข่บิดขั้ว (ovarian torsion) จนถึงมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer)²¹

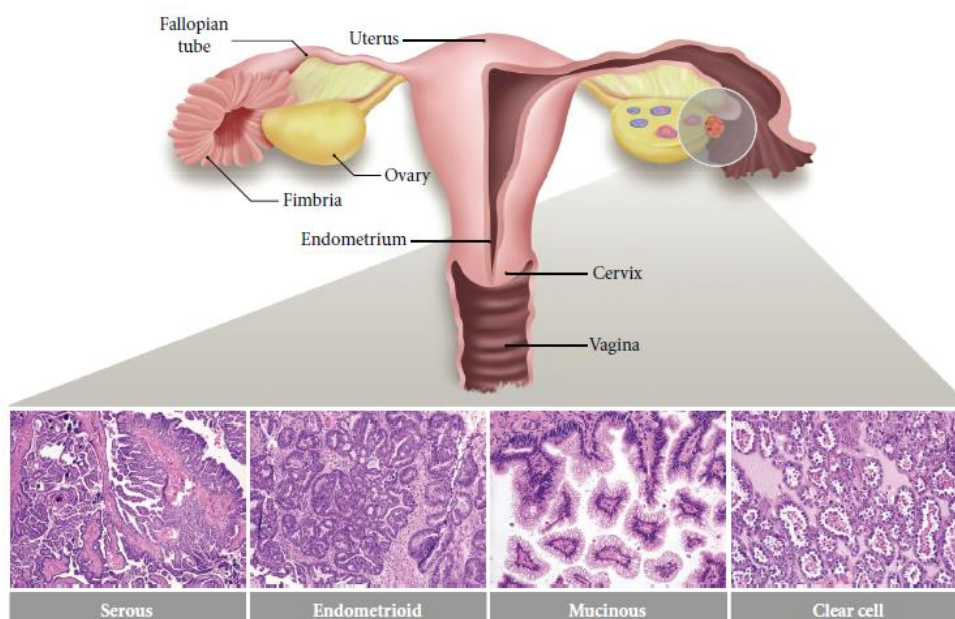


รูปที่ 3 ลักษณะทางกายวิภาคของรังไข่²²

มะเร็งรังไข่จัดเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับ 5 ของมะเร็งในเพศหญิง^{7, 8} และลำดับที่ 17 ของมะเร็งชนิดต่างๆ¹¹ โดยในปี พ.ศ. 2559 สหรัฐอเมริกามีผู้ป่วยมะเร็งรังไข่รายใหม่ประมาณ 22,280 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.3 อายุโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ตรวจพบมะเร็งรังไข่ ประมาณ 63 ปี อัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 2.4 หรือ 14,240 ราย และอัตราการรอดชีวิต 5 ปี ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2555 เท่ากับร้อยละ 46.2¹¹ แบ่งตามระยะของโรค ออกเป็น 4 ระยะคือ ระยะแรกไม่

แพร่กระจาย ตรวจพบร้อยละ 15 ระยะที่มีการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองใกล้ๆ ร้อยละ 19 ระยะที่มีการแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น ร้อยละ 60 และไม่สามารถระบุระยะได้ ร้อยละ 6 ซึ่งพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 92.1, 73.1, 28.8 และ 24.2 ตามลำดับ¹¹ สถิติผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ใหม่ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2557 มะเร็งรังไข่จัดอยู่ในอันดับที่ 12 ของมะเร็งชนิดต่างๆ คิดเป็นร้อยละ 2.07 และจัดอยู่อันดับ 7 ของมะเร็งในเพศหญิง คิดเป็นร้อยละ 3.46⁹

มะเร็งรังไข่เป็น heterogeneous disease ซึ่งเป็นโรคที่มีความหลากหลายของลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็ง ลักษณะทางชีวภาพ และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม¹⁰ โดยกลุ่ม hereditary ovarian cancer หรือมะเร็งรังไข่ที่มีความผิดปกติจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม เช่น *BRCA1*- และ *BRCA2* mutation และ Lynch syndrome ตรวจพบร้อยละ 10 ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยหญิงอายุน้อยและมี *BRCA* mutation ถึงร้อยละ 90¹⁵ ขณะที่กลุ่ม sporadic ovarian cancer เป็นมะเร็งรังไข่ที่ไม่ได้เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม แต่เกิดจากเซลล์ที่ผิดปกติหนึ่งเซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งตรวจพบในผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่¹³ มะเร็งรังไข่สามารถแบ่งตามต้นกำเนิดของเซลล์ได้ 4 ชนิดคือ ชนิดเซลล์เยื่อบุผิว เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุด ถึงร้อยละ 90 ชนิดเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (sex-cord stromal) หรือ granulosa tumour พบน้อยกว่าร้อยละ 5 ชนิดเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) หรือ teratoma เป็นชนิดที่พบน้อย มักเกิดกับผู้หญิงอายุต่ำกว่า 20 ปี^{23, 24} และ mixed-cell type สำหรับมะเร็งรังไข่ชนิดเซลล์เยื่อบุผิว สามารถแบ่งประเภทตามลักษณะทางพยาธิวิทยาได้เป็น 8 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 serous พบบ่อยที่สุด ถึงร้อยละ 68-71 และส่วนใหญ่เป็นระยะ high grade แต่ตอบสนองการรักษาได้ดี ชนิดที่ 2 endometrioid พบร้อยละ 9-11 ส่วนใหญ่เป็นระยะ low grade และสัมพันธ์กับการเป็นโรคเยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดที่ (endometriosis) ชนิดที่ 3 clear cell พบร้อยละ 12-13 สัมพันธ์กับการเป็นโรคเยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดที่ ไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษาและมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ชนิดที่ 4 mucinous พบร้อยละ 3 ส่วนใหญ่เป็นระยะ low grade ชนิดที่ 5 transitional cell ชนิดที่ 6 squamous cell ชนิดที่ 7 mixed epithelial และชนิดที่ 8 undifferentiated^{23, 25, 26} โดยชนิดที่ 1 – 4 เป็นชนิดหลักของมะเร็งรังไข่ชนิดเซลล์เยื่อบุผิว 4 ชนิด²³ ดังรูปที่ 4 นอกจากนี้ยังมีการแบ่งระยะของมะเร็งรังไข่ตามระบบ Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) ประกอบด้วย ระยะที่ 1 มะเร็งจำกัดอยู่ที่รังไข่และท่อนำไข่ ระยะที่ 2 มะเร็งจากรังไข่ 1 หรือ 2 ข้าง หรือ ท่อนำไข่ มีการขยายไปกระดูกเชิงกราน (pelvic brim) หรือเป็น primary peritoneal cancer ระยะที่ 3 มะเร็งจากรังไข่ 1 หรือ 2 ข้าง หรือ ท่อนำไข่ หรือ primary peritoneal cancer มีการกระจายไปด้านนอก peritoneum หรือแพร่กระจายไป retroperitoneal lymph nodes และระยะที่ 4 เป็นระยะแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นๆ¹⁰



รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งรังไข่ ซึ่งประกอบด้วยมะเร็งรังไข่ชนิดเซลล์เยื่อบุผิว 4 ชนิดหลัก คือ serous endometrioid mucinous และ clear cell²³

ปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งรังไข่ ประกอบด้วย มีประวัติครอบครัวเป็นมะเร็งรังไข่และมะเร็งเต้านม เป็นมะเร็งเต้านม อายุมากกว่า 65 ปี ไม่เคยรับประทานยาคุมกำเนิด ไม่เคยมีบุตร มีระดูตั้งแต่อายุยังน้อย หมดระดูช้า ภาวะมีบุตรยาก ได้รับการรักษาด้วยฮอร์โมน โรควุ้น และเยื่อโพรงมดลูกเจริญผิดที่^{13, 27} อาการที่พบในมะเร็งรังไข่ระยะแรก คือ ปวดท้อง ปวดหลัง อาหารไม่ย่อย จุกเสียด รับประทานอาหารได้น้อย ชักถ่ายไม่เป็นปกติ เมื่อมีการพัฒนาของมะเร็งมากขึ้น อาจพบอาการ คลื่นไส้ น้ำหนักลด หายใจลำบาก อ่อนเพลีย และเบื่ออาหาร²⁷ ซึ่งอาการเหล่านี้แยกได้ยากจากอาการของระบบย่อยอาหาร ทำให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งรังไข่ได้ช้า¹²

การตรวจคัดกรองมะเร็งรังไข่ในปัจจุบัน ใช้การตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงผ่านทางช่องคลอด (transvaginal ultrasonography) ซึ่งเป็นการตรวจลักษณะและขนาดของก้อนเนื้อภายในอุ้งเชิงกราน สามารถตรวจพบความผิดปกติของก้อนเนื้อ แต่ระบุไม่ได้แน่ชัดว่าเป็นมะเร็งรังไข่ แต่การตรวจวิธีนี้ มีค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะกับการตรวจคัดกรองมะเร็งเป็นประจำ การตรวจวัดระดับ carbohydrate antigen 125 (CA-125) ในซีรัม โดยผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ส่วนใหญ่มีระดับ CA-125 ที่เพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นของระดับ CA-125 อาจไม่ได้เป็นผลมาจากมะเร็งรังไข่ เนื่องจากโรคเยื่อโพรงมดลูกเจริญผิดที่ (endometriosis) โรคเยื่อโพรงมดลูกเจริญผิดที่ชนิด adenomyosis ซีสต์ (ovarian cysts) เนื้องอกมดลูก (uterine fibroids) โรคไต (renal dysfunction) และโรคตับ ก็มีการเพิ่มขึ้นของระดับ CA-125 เช่นกัน ซึ่งมีความไวและความจำเพาะไม่เพียงพอ ทำให้สามารถใช้ตรวจ

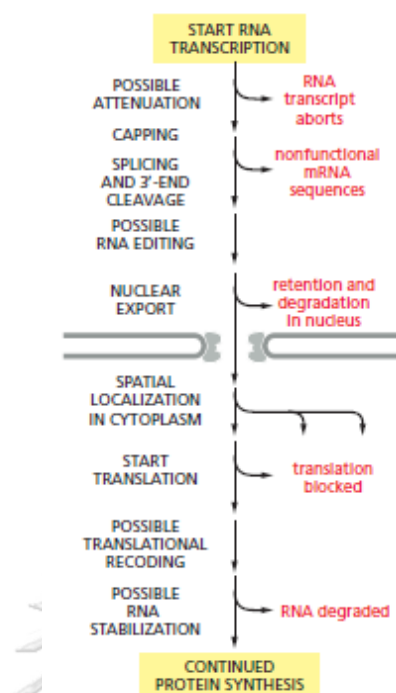
มะเร็งรังไข่ระยะแรกได้เพียงร้อยละ 50-60¹³ นอกจากนี้ยังมีการคำนวณความเสี่ยงมะเร็งรังไข่ หรือ risk of malignancy index (RMI) เป็นการแยกก้อนเนื้อปกตออกจากก้อนเนื้อที่สงสัยว่าเป็นมะเร็ง ด้วยการคำนวณจากสมการ $RMI = U \times M \times CA125$ โดยที่ U คือ คะแนนจากผลการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง หากพบ multiloculation หรือ evidence of solid areas หรือ evidence of metastases หรือ ascite หรือ bilateral lesion ให้หัวข้อละ 1 คะแนน M คือ สถานภาพการมีระดู หากยังมีระดูให้ 1 คะแนน ไม่มีระดูให้ 3 คะแนน และ CA125 คัดตามค่าจริงที่ตรวจได้ ซึ่งค่า RMI ที่มากกว่า 200 จะมีความไวในการตรวจพบมะเร็งร้อยละ 85 และจำเพาะร้อยละ 97¹²

วิธีการรักษาโรคมะเร็งรังไข่ เริ่มจากการผ่าตัดนำก้อนมะเร็งออก หากผู้ป่วยเป็นมะเร็งรังไข่แค่ 1 ข้าง แพทย์ทำการผ่าตัดเฉพาะรังไข่ข้างนั้นและท่อนำไข่ข้างเคียง เพื่อให้ผู้ป่วยยังสามารถตั้งครรภ์ได้ แต่หากเป็นมะเร็งรังไข่ทั้ง 2 ข้าง ต้องถูกผ่าตัดออกทั้งหมด กรณีผู้ป่วยที่ใกล้หมดระดูสามารถทำการผ่าตัดแบบ bilateral salpingo-oophorectomy ซึ่งเป็นการผ่าตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้างออก หรือผ่าตัดแบบ total hysterectomy โดยผ่าตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง รวมทั้งท่อนำไข่ (fallopian tubes) มดลูก (uterus) ต่อม้ำเหลืองข้างเคียง (lymph nodes) และเยื่อช่องท้อง (omentum)²⁷ การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นการรักษาโดยใช้สารเคมีกลุ่ม platinum ร่วมกับ taxane¹² ซึ่งมีคุณสมบัติทำลายเซลล์มะเร็ง ป้องกันไม่ให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งที่ไม่สามารถผ่าตัดออกได้ แต่การรักษาแบบนี้มีผลข้างเคียงจากการรักษาค่อนข้างมาก โดยมีการทำลายเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็ว เช่น เซลล์เม็ดเลือด เซลล์ขน (hair follicles) และอาการข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ผอมร่วง เบื่ออาหาร ภาวะโลหิตจาง (anemia) และติดเชื้อได้ง่าย²⁷ การรักษาแบบ targeted therapy เป็นการรักษาที่จำเพาะกับการทำงานของเซลล์มะเร็ง เช่น ยา bevacizumab (Avastin) และ olaparib (Lynparza) ซึ่งช่วยลดอาการข้างเคียงจากการใช้ยาได้ การรักษาด้วยฮอร์โมน (hormone Therapy) โดยการควบคุมฮอร์โมน estrogen เพื่อให้เซลล์มะเร็งโตช้าลง²⁷

การแสดงออกของยีน (gene expression)

เซลล์แต่ละเซลล์ในร่างกายมีสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่เหมือนกัน แต่กลับมีลักษณะรูปร่างการทำงานของเซลล์ การแสดงออกของยีนหรือการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนที่แตกต่างกัน ซึ่งสัญญาณจากภายนอก (external signal) เป็นสาเหตุหนึ่งที่สามารถทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนได้ การควบคุมการแสดงออกของยีนสามารถเกิดขึ้นได้ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจากดีเอ็นเอ เช่น การควบคุมขั้นตอน transcription ด้วย sequence-specific DNA-binding protein หรือโปรตีน activator หรือโปรตีน repressor กลไกทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) ที่สร้างและรักษาสภาพของเซลล์ชนิดต่างๆ กลไกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) การควบคุมหลังการ transcription (post-transcriptional controls) และการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย noncoding RNA¹⁶

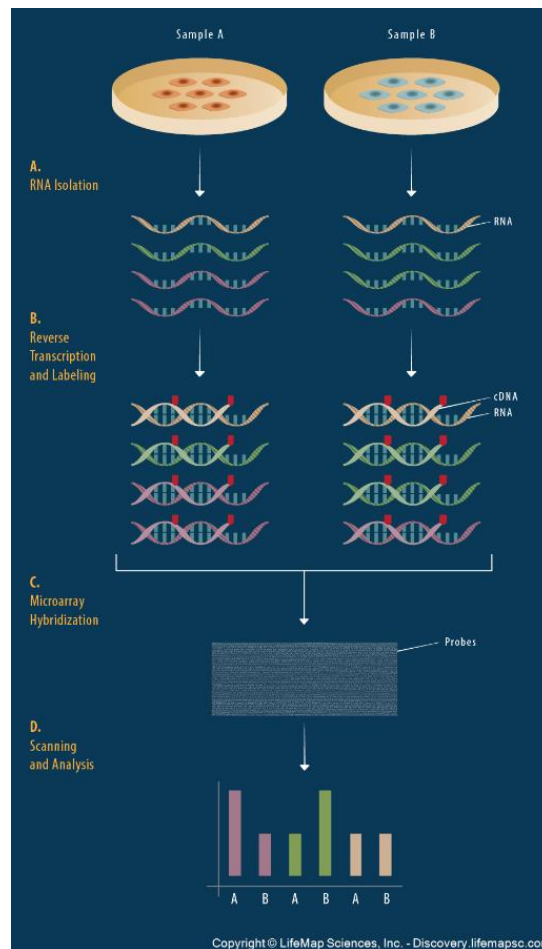
การควบคุมหลังการ transcription หรือ post-transcriptional controls เกิดขึ้นหลังจาก RNA polymerase จับกับ promoter ของยีน และสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ประกอบด้วย การลดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (attenuation) การ capping การ splicing การตัดที่ปลายด้าน 3' (3'-end cleavage) การปรับแต่งอาร์เอ็นเอ (RNA editing) การขนส่งอาร์เอ็นเอออกจากนิวเคลียส (nuclear export) การเคลื่อนย้ายไปตำแหน่งที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (spatial localization in cytoplasm) การควบคุมการ translation (translational controls) การ translational recoding และการเกิดเสถียรภาพอาร์เอ็นเอ (RNA stabilization) โดยที่การเกิด RNA splicing RNA editing และ translation recoding สามารถทำให้เกิดความหลากหลายของโปรตีนจากยีนเดียวกัน¹⁶ ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การควบคุมการแสดงออกของยีนหลังการ transcription หรือ post-transcriptional controls¹⁶

เทคนิค expression array

ไมโครอะเรย์ (microarray) ประเภท expression array เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนหลายๆ ยีนพร้อมๆ กัน การวิเคราะห์จำแนกโรค pathway หรือ แผนที่โลคัสลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณการแสดงออก (expression-based quantitative trait loci (eQTL) mapping)²⁸ โดยอาศัยการติดโมเลกุลดีเอ็นเอสายสั้นที่ทราบลำดับเบสไว้บนแผ่นชิป หรือเรียกว่า probe ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน หรือ transcriptome หรือ messenger RNA (mRNA) โดยวิเคราะห์กลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตัวอย่างเช่น กลุ่มทดลองคือ mRNA ของผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มควบคุม คือ mRNA ของคนปกติ ซึ่งตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม จะถูกเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) และติดฉลากด้วย fluorescent probe ที่มีสีแตกต่างกัน เมื่อนำทั้ง 2 กลุ่มผสมกันใส่บนชิป ทำให้เกิดปฏิกิริยา hybridization ระหว่าง cDNA และ DNA probe และวัดการแสดงออกของแต่ละยีนจากสี fluorescent²⁹ ดังรูปที่ 6

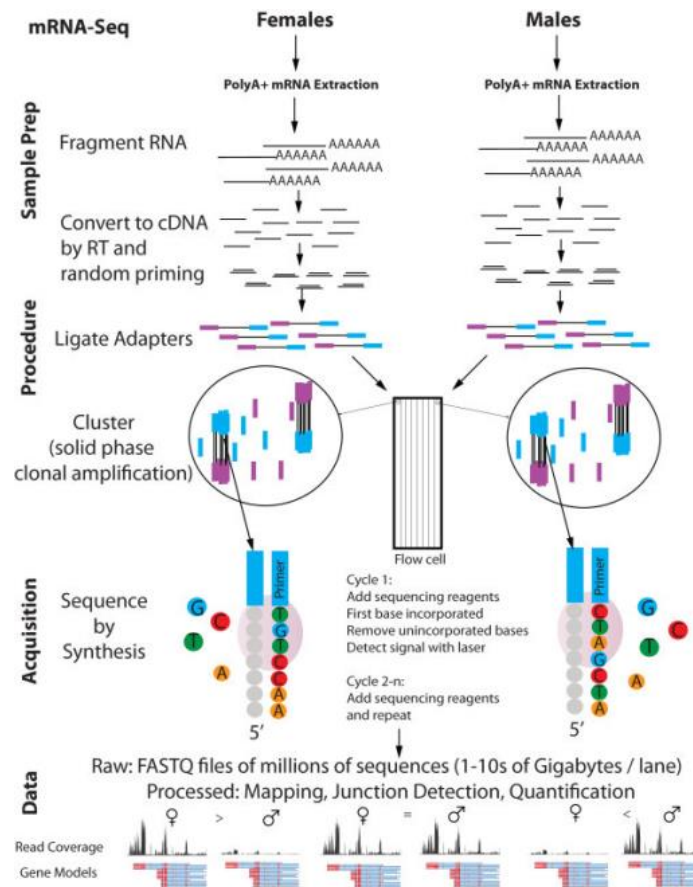


รูปที่ 6 การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค expression array³⁰

เทคนิค next generation sequencing

next generation sequencing (NGS) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ใช้ในการศึกษา de novo sequencing target resequencing RNA sequencing และ metagenomics เป็นต้น³¹ การศึกษาในระดับ transcriptome หรือ RNA deep-sequencing (RNA-seq) เป็นการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกที่สามารถค้นพบยีนใหม่ alternative transcript variants, chimeric transcripts, และ allele-specific expression ได้³² ซึ่งแตกต่างจาก expression array โดยมีความไวและแม่นยำมากกว่า ได้ข้อมูลทั้งที่ทราบอยู่แล้วและข้อมูลใหม่ ประยุกต์ใช้ได้หลายสปีชีส์ ราคาใกล้เคียงกับ microarray แต่ได้ผลลัพธ์มากกว่า³³ หลักการวิเคราะห์ RNA-seq เริ่มจากขั้นแรกคือ การเตรียมต้นแบบ (library preparation) โดยการคัดเลือก mRNA เตรียมให้เป็น mRNA เป็นสายสั้นๆ (fragmentation) จากนั้นสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription) ต่อ adaptor เพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอแบบกลุ่มด้วยวิธี bridge amplification ขั้นต่อมาคือ การหาลำดับเบสจากการทำ sequencing

และขั้นสุดท้ายคือการวิเคราะห์รูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น (reads) และจำนวนของข้อมูล reads ที่ออกมาแตกต่างกัน³¹ ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค RNA sequencing³⁴

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ RNA-sequencing ได้มาจาก total RNA ของตัวอย่างที่สนใจ ซึ่งปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอมีความสำคัญในการวิเคราะห์ ประกอบด้วย ความบริสุทธิ์ (purity) ของอาร์เอ็นเอพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 โดยต้องมีค่ามากกว่า 1.8 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Nanodrop ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fluorometer (Qubit) โดยอาศัยการจับกันของสีฟลูออเรสเซนต์กับสารพันธุกรรม และวัดความเข้มข้นจากการเปล่งแสงออกมาของสีฟลูออเรสเซนต์ โดยต้องมีความเข้มข้นมากกว่า 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นอกจากนี้ยังสามารถทราบความเข้มข้นโดยประมาณจากเครื่อง Nanodrop และความสมบูรณ์ของอาร์เอ็นเอ (integrity) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง bioanalyzer โดยการแยก RNA fragment ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า อาร์เอ็นเอที่จะวิเคราะห์ RNA-seq ต้องมีค่า RNA integrity number (RIN) มากกว่า 7

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-seq เป็นไฟล์ประเภท fastq format หรือ PE data ซึ่งเป็นข้อมูลดิบขนาดใหญ่ที่ยังไม่สามารถแปลผลได้ ต้องมีการจัดการและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ ขั้นตอนการวิเคราะห์ประกอบด้วย การออกแบบการทดลอง (experimental design) การควบคุมคุณภาพข้อมูล (quality control) การระบุตำแหน่งของข้อมูล (read alignment) การวัดปริมาณของยีน และทรานสคริปต์ (quantification of gene and transcript levels) การแสดงผล (visualization) การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (differential gene expression) รูปแบบการแสดงออกของยีน (alternative splicing) การวิเคราะห์หน้าที่การทำงาน (functional analysis) การตรวจสอบยีนฟิวชัน (gene fusion detection) และแผนที่โลคัสลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณการแสดงผล (eQTL mapping)³⁵ ในการวิเคราะห์ผล RNA-seq คุณภาพของข้อมูลมีความสำคัญอย่างมากในการประมวลผล ซึ่งคุณภาพของข้อมูลคิดได้จากค่า Qscore ดังนั้นข้อมูล raw data จึงต้องผ่านการกรองข้อมูลเพื่อกำจัดข้อมูลรบกวนออก เช่น adapter ข้อมูลที่มีเบส N มากกว่าร้อยละ 10 หรือข้อมูลคุณภาพต่ำ ($Q < 20$) ได้เป็นข้อมูล clean read โดยใช้โปรแกรม FastQC³⁶ ในการกรองและตรวจสอบคุณภาพข้อมูล แนวทางการประมวลผลข้อมูล RNA-seq มีหลายรูปแบบตามวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยแนวทางการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ใช้โปรแกรม HISAT (hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts) StringTie และ Ballgown³⁷ ซึ่งโปรแกรม HISAT ใช้ในการระบุตำแหน่งข้อมูลลำดับเบสจากผล RNA-seq (read alignment) เทียบกับจีโนมต้นแบบ (reference genome) โปรแกรม StringTie ใช้ในการนำข้อมูลที่ระบุตำแหน่งแล้วมารวมกันเป็นทรานสคริปต์ (transcript) และหาปริมาณแต่ละทรานสคริปต์ และโปรแกรม Ballgown ใช้ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนและทรานสคริปต์ทั้งหมด นอกจากนี้สามารถใช้โปรแกรม DESeq2 วิเคราะห์แทนโปรแกรม Ballgown ได้³⁸

Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAM X)

CU-DREAM เป็นโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลไมโครอะเรย์ 2 ชุด การทดลอง วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของแต่ละยีนระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ขณะที่โปรแกรม CU-DREAM X พัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอะเรย์กับชุดข้อมูลสัญญาณยีนที่สนใจได้ ข้อมูล microarray สามารถนำมาจาก Gene Expression Omnibus (GEO) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) หรือ GenBank ที่เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds> โดย GEO ประกอบด้วย experiment series

(GSE) หรือ การทดลอง platform (GPL) หรือชื่อของ chip microarray และ sample (GSM) หรือ ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง การทำงานของโปรแกรมอาศัยการป้อนคำสั่งลงใน command prompt บนระบบปฏิบัติการ Windows operating system ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ดาวโนโหลดจากฐานข้อมูล GEO ประกอบด้วย series matrix file และ annotation file ของแต่ละการทดลอง และข้อมูลที่กรอกลงในไฟล์ต้นแบบ Microsoft excel ซึ่งมีการกำหนดค่านัยสำคัญ ค่าสถิติ และรูปแบบการแสดงผลของยีนที่ต้องการทดสอบ ผลการวิเคราะห์จะอยู่ในไฟล์ Microsoft excel แสดงจำนวนและรายชื่อยีนแต่ละกลุ่มตามรูปแบบการแสดงผล และค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ ซึ่งทำให้สามารถหา ยีนจาก 2 การทดลองที่ไม่สัมพันธ์กันได้ สามารถระบุการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ isoform และสามารถระบุการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพ โปรแกรม CU-DREAM และ CU-DREAM X สามารถดาวโนโหลดได้จาก <http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~achatcha/CU-DREAM/>³⁹

การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนจากชีวสารสนเทศ

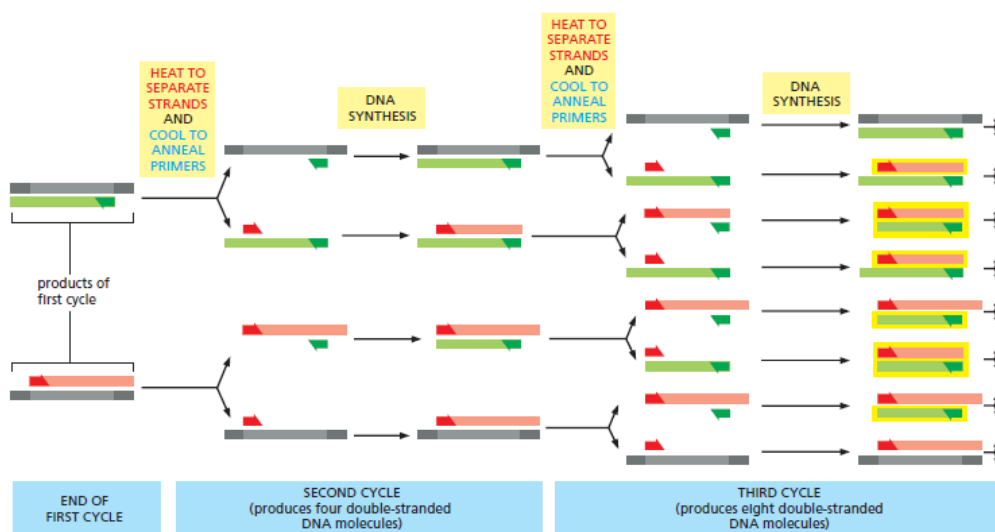
protein analysis through evolutionary relationships classification system หรือ Panther เป็นเว็บไซต์ที่ใช้ในการจัดประเภทโปรตีนหรือยีนจำนวนมาก วิเคราะห์ได้จากเว็บไซต์ <http://pantherdb.org/> ซึ่งจัดประเภทได้ดังนี้⁴⁰

1. family และ subfamily เป็นการจัดกลุ่มโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กันทางวิวัฒนาการหรือการทำหน้าที่เหมือนกัน
2. molecular function เป็นการจัดกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่การทำงานของโปรตีนนั้นหรือการทำงานร่วมกันของโปรตีนที่ระดับชีวเคมี
3. biological process เป็นการจัดกลุ่มโปรตีนตามการทำงานร่วมกันของโปรตีนในระดับเซลล์หรือระบบในร่างกาย
4. pathway เป็นการจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ที่จำเพาะระหว่างโมเลกุล

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนบริเวณที่สนใจในหลอดทดลอง ในระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งเป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ (DNA replication) ส่วนประกอบในการเกิดปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กที่มีลำดับเบสจำเพาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ เรียกว่า ไพรมเมอร์ (primer) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หรือ dNTP ที่มีเบส 4 ชนิด คือ อะดีนีน (adenine, A) กัวนีน (guanine, G) ไทมีน (thymine, T) และไซโตซีน (cytosine, C) บัฟเฟอร์ (buffer) ที่มี magnesium chloride เป็นส่วนประกอบ และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerase) ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน 1 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

ขั้น denaturing เป็นขั้นตอนที่มีการเพิ่มอุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เพื่อแยกดีเอ็นเอสายเกลียวคู่ (double helix) ให้เป็นสายเดี่ยว ขั้น annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาให้อยู่ในช่วง 50-65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรมเมอร์จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยเบสที่เป็นคู่สมกัน (complementary) และขั้น extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการต่อยนิวคลีโอไทด์จากไพรมเมอร์ในทิศทาง 5' ไป 3' ด้วยเอนไซม์พอลิเมอเลสที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายใหม่จะเป็นคู่สมกับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวในลักษณะ antiparallel การเพิ่มจำนวนในแต่ละรอบของปฏิกิริยาจะมีดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ (exponential rate) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ดีเอ็นเอเท่ากับ 2^n โดย n เท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา⁴¹ ดังรูปที่ 8



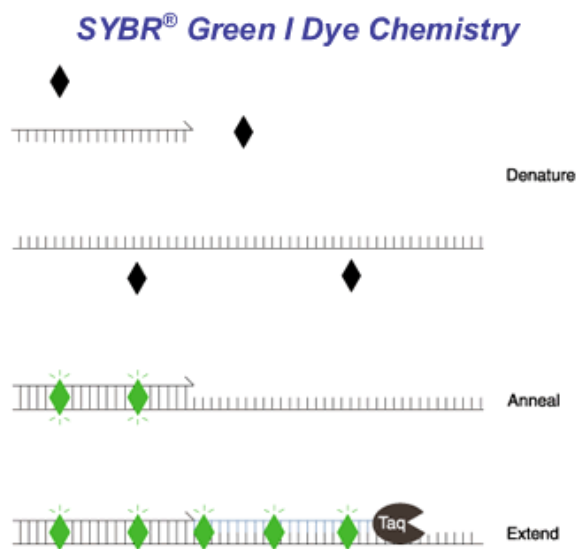
รูปที่ 8 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส¹⁶

อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางเป็นเจล (gel electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นการแยกหรือวิเคราะห์สารที่มีประจุด้วยการใช้สนามไฟฟ้า ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า เครื่องกำเนิดไฟฟ้า บัฟเฟอร์หรือตัวกลาง และสารที่ต้องการแยก เมื่อสนามไฟฟ้าครบวงจร สารที่มีประจุบวก (cation) จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ (cathode) ขณะที่สารที่มีประจุลบ (anion) จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode) สารแต่ละชนิดจะแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิ ขนาด และรูปร่างโมเลกุล ประเภทของอิเล็กโทรโฟรีซิสมี 2 ระบบ คือ ระบบอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะของเหลว และระบบอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะที่มีตัวกลาง (ของแข็งและเจล) โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางเป็นเจล ใช้ตัวกลางเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเจล เช่น แป้ง อะกาโรส หรือพอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งเจลที่เกิดจากสารประกอบพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นร่างแหสามมิติที่มีรูพรุนขนาดเหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก และอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เหมาะสม นิยมใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน หรือ กรดนิวคลีอิก เมื่อสนามไฟฟ้าครบวงจร สารที่มีประจุจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วที่มีประจุตรงข้าม หากสารมีประจุสุทธิต่อโมเลกุลเท่ากัน และรูปร่างเหมือนกัน สารจะแยกออกจากกันตามขนาด สารที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนได้ดีกว่าและระยะในการเคลื่อนที่จึงมากกว่าสารขนาดใหญ่⁴²

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ (real-time polymerase chain reaction)

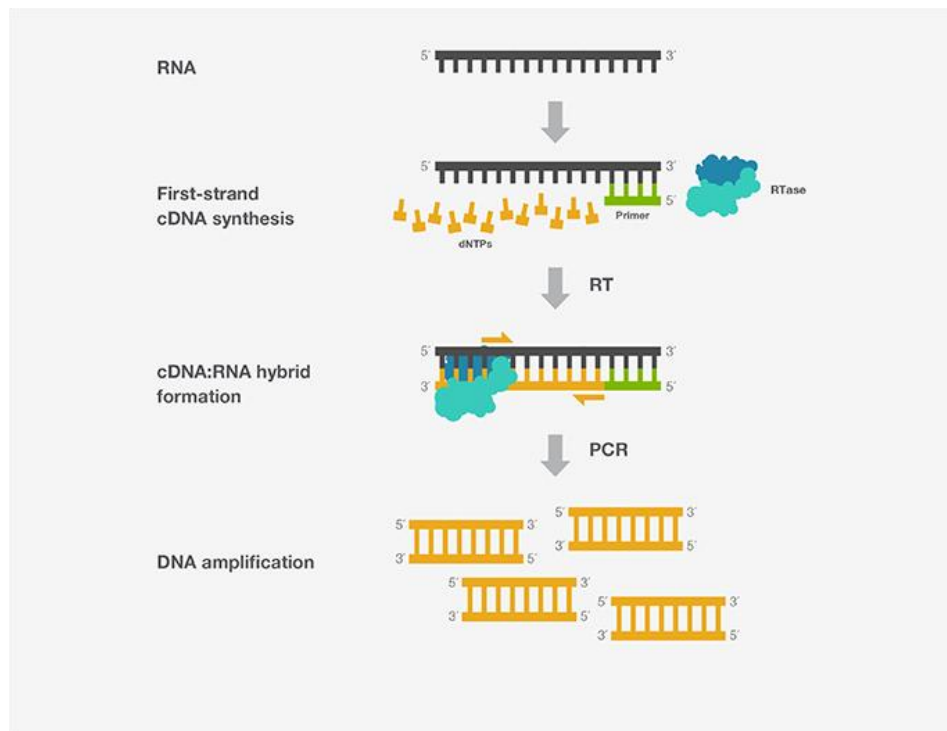
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ (real-time polymerase chain reaction) หรือ quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนบริเวณที่สนใจที่สามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ระหว่างเกิดปฏิกิริยา โดยใช้การติดตามด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที การตรวจสอบทางเคมีของ real-time PCR แบ่งออกเป็น การใช้สีที่สามารถแทรกจับกับเส้นดีเอ็นเอ การใช้ probe ที่ติดตามด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ และการใช้ hybridization probe หรือ fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe ตัวอย่างสีที่สามารถแทรกจับกับเส้นดีเอ็นเอ คือ SYBR Green I dye ซึ่งสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ในขั้นตอน annealing และ extension และเปล่งแสงในช่วงคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร⁴³



รูปที่ 9 การทำงานของสี SYBR Green I⁴³

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction : RT-qPCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) หรือ RT-qPCR เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนบริเวณที่สนใจจากอาร์เอ็นเอต้นแบบ ซึ่งต่างจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสปกติ โดยเพิ่มขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ในกระบวนการ reverse transcription อาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ไพรเมอร์ oligo dT ที่จำเพาะกับ poly A RNA หรือไพรเมอร์แบบสุ่ม และนิวคลีโอไทด์ในการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้น cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอต้นแบบ จะถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบตั้งต้นในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสปกติ⁴⁴



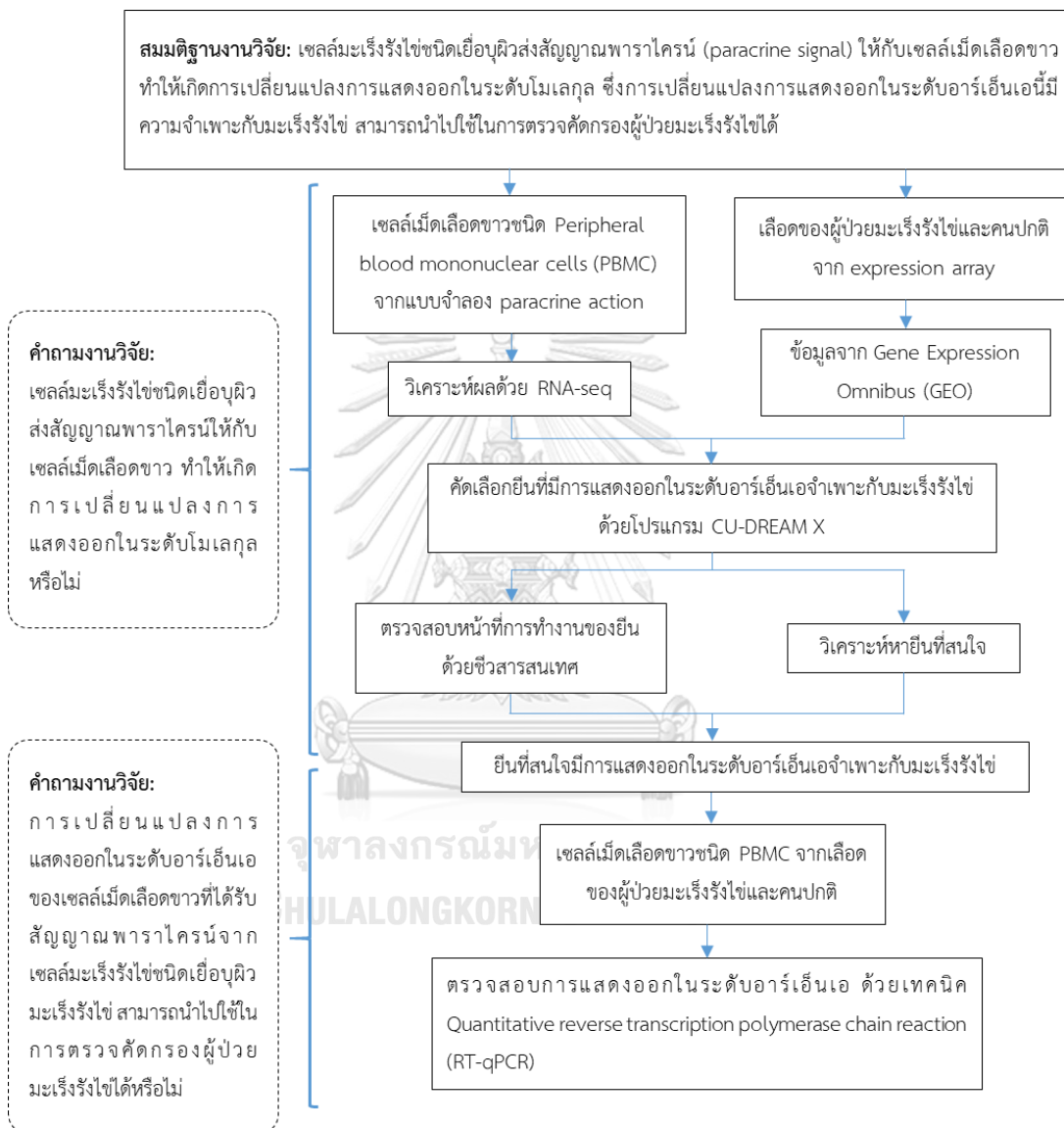
รูปที่ 10 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ⁴⁵

สำหรับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่สนใจ หรือ relative quantification เป็นการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจในกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม ได้เป็นค่า relative expression ของยีนที่สนใจ ซึ่งคำนวณได้จากสมการ $2^{-\Delta\Delta CT}$ โดยค่า ΔCT เท่ากับ ค่า CT ของยีนที่สนใจ - ค่า CT ของยีนอ้างอิง (endogenous reference gene) เช่น *GAPDH* และค่า $\Delta\Delta CT$ เท่ากับ ค่า ΔCT ของแต่ละตัวอย่าง - ค่าเฉลี่ย ΔCT ของกลุ่มควบคุม⁴⁶

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

กรอบความคิดงานวิจัย



รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยโดยการสังเกตเชิงวิเคราะห์ (analytical research)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Zeiss, Germany)
2. เครื่องเย่าสาร (Scientific Industries, USA)
3. เครื่องควบคุมการดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Integra Biosciences, Switzerland)
4. เครื่องชั่งดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
5. เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 10 ไมโครลิตร (Transferpette, Germany)
6. เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 20 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
7. เครื่องถ่ายภาพเจล (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
8. เครื่องนิ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Hirayama, Japan)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดเลือด (MSE, UK)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
13. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Millipore, France)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Eppendorf, Germany)
15. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
16. เครื่องวัดค่า pH (Clean L'eau, Taiwan)
17. เครื่องวัดคุณภาพสารพันธุกรรม Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)
18. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA)
19. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA)
20. เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสสารพันธุกรรม Illumina HiSeq4000 (Illumina, USA)
21. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Enduro, USA)
22. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Thermo Fisher Scientific, USA)
23. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
24. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Japan)

25. ตู้ดูดควัน (S.K. Powerable, Thailand)
26. ตู้ปลอดเชื้อ (S.K. Powerable, Thailand)
27. ตู้ปลอดเชื้อ BH200 class II (Clyde-Apac, Australia)
28. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Shel lab, USA)
29. ตู้อบ (Mettler, Germany)
30. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกบอทวงขนาด 20 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Vitlab, Germany)
2. กล่องแช่แข็ง freezing Container (Thermo Fisher Scientific, USA)
3. เข็มสำหรับเจาะเลือด (Nipro, Japan)
4. ขวดใส่สารขนาด 100 200 และ 500 มิลลิลิตร (Duran, Germany)
5. เครื่องนับเซลล์ hemacytometer (Band, Germany)
6. ชุดเตรียมเจล (Bio-Rad, USA)
7. ทรานส์เวล Transwell® Permeable Support, 24 mm insert, 6 well plate, 0.4 µm Polycarbonate membrane, Tissue culture treated, Polystyrene, (Corning, USA)
8. ปีกเกอร์ขนาด 50 100 และ 250 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
9. ปิเปต ชนิด serological pipette ขนาด 2 5 10 และ 25 มิลลิลิตร (Corning, USA)
10. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
11. ฟิลเตอร์กรองสารสำหรับขวดขนาด 150 มิลลิลิตร (Corning, USA)
12. ภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ ชนิด flask 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร (Thermo Fisher Scientific, USA)
13. ภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ ชนิด plates 6 หลุม (Corning, USA)
14. ภาชนะสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง ชนิด plate 96 หลุม (Thermo Fisher Scientific, USA)
15. ไมโครปิเปตขนาด 10 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
16. หลอดขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Corning, USA)
17. หลอด cryogenic vial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร (Corning, USA)
18. หลอด EDTA ขนาด 3 และ 6 มิลลิลิตร (greiner bio-one, Austria)

19. หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 0.2 0.5 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร (Axygen, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาว
 1. Lymphocyte separation medium (Lymphoprep, Norway)
 2. Potassium chloride (Amresco, USA)
 3. Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
 4. Sodium chloride (Merck, Germany)
 5. Sodium hydrogen phosphate (Merck, Germany)
2. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง
 1. 0.05% Trypsin (Gibco, USA)
 2. Absolute ethanol (Merck, Germany)
 3. Antibiotic-antimycotic 100X (Gibco, USA)
 4. Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
 5. Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Sigma Aldrich, USA)
 6. Fetal bovine serum, FBS (Gibco, USA)
 6. Potassium chloride (Amresco, USA)
 7. Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
 8. Sodium bicarbonate (Merck, Germany)
 9. Sodium chloride (Merck, Germany)
 10. Sodium hydrogen phosphate (Merck, Germany)
 11. Trypan blue solution (Sigma-Aldrich, USA)
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ
 1. Absolute ethanol (Merck, Germany)
 2. Absolute isopropanol (Merck, Germany)
 3. Chloroform (Rci labscan, Thailand)
 4. Diethyl pyrocarbonate, DEPC (Thermo Fisher Scientific, USA)
 5. Glycogen (Thermo Fisher Scientific, USA)
 6. TRIzol LS reagent (Invitrogen, USA)

4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอ
 1. 1% Agrose gel (Cambrex, USA)
 2. ชุดสารเคมี Agilent RNA 6000 Nano Kit สำหรับ Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)
 3. ชุดสารเคมี Qubit® RNA HS Assay Kit สำหรับ Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA)
5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ RNA sequencing
 1. Absolute ethanol (Merck, Germany)
 2. AxyPrep Mag PCR Clean-up (Axygen® scientific, USA)
 3. Sodium acetate (Sigma-Aldrich, USA)
 4. ชุดสารเคมี NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA)
6. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ
 1. ชุดสารเคมี RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania)
7. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสถานะจริงด้วยวิธี real-time PCR
 1. ชุดสารเคมี PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
 2. Oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)
8. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis
 1. 25 basepair DNA ladder (Promega, USA)
 2. Acrylamide (Bio-Rad, USA)
 3. Ammonium peroxodisulfate, APS (Affymetrix, USA)
 4. Boric acid (Affymetrix, USA)
 5. Bromophenol blue (Merck, Germany)
 6. Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA (Affymetrix, USA)
 7. Ficoll (Sigma-Aldrich, USA)
 8. SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
 9. Tetramethylethylenediamine, TEMED (Merck, Germany)
 10. Tris (Affymetrix, USA)

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

1. Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays extension, CU-DREAM X (Chulalongkorn University, Thailand)
2. DESeq2 version 1.16.1 (Johns Hopkins University Center for computational biology, USA)
3. FastQC (Andrews S., 2010)
4. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA)
5. HISAT version 2.1.0 (Pertea, 2016)
6. HiSeq Control Software (HCS) + RTA 2.7 (Illumina, USA)
7. IBM SPSS Statistics 22 (IBM, USA)
8. Storm865 Scanner control (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
9. StringTie version 1.3.3b (Pertea, 2016)
10. QuantStudio™ Real-Time PCR Software (Thermo Fisher Scientific, USA)

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างในงานวิจัย

1.1. การกำหนดขนาดตัวอย่างในการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการทดลองเบื้องต้น (pilot study) ในการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรอง มะเร็งรังไข่ ด้วยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว ดังนั้นจึงไม่มีการคำนวณขนาดตัวอย่างในการทดลอง

1.2. กลุ่มตัวอย่างและเกณฑ์การคัดเลือกในการทดลอง

1. กลุ่มควบคุม

- เกณฑ์การคัดเลือกเข้า คือ ผู้หญิงสุขภาพดีที่มีร่างกายแข็งแรงผ่านเกณฑ์การบริจาคเลือดของสภาอากาศ ไม่มีโรคประจำตัวใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน และไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคมะเร็งรังไข่
- เกณฑ์การคัดเลือกออก คือ เป็นโรคมะเร็งรังไข่ หรือเป็นโรคทางโลหิตวิทยา

2. กลุ่มทดลอง

- เกณฑ์การคัดเลือกเข้า คือ ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ไม่มีโรคประจำตัวใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน
- เกณฑ์การคัดเลือกออก คือ ไม่เป็นโรคมะเร็งรังไข่ หรือเป็นโรคทางโลหิตวิทยา

1.3. การเก็บตัวอย่างเลือด

งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ในการวิเคราะห์ โดยมีการรวบรวมตัวอย่างเลือดจากผู้หญิงสุขภาพดีตาม กระบวนการขอความยินยอมเข้าร่วมวิจัย ซึ่งได้รับอนุมัติเอกสารรับรองโครงการวิจัย เลขที่ IRB no. 313/60 จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และรวบรวมตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อぶผิวที่ ได้รับอนุญาตจากโครงการวิจัยเรื่อง การสร้างเทคโนโลยีใหม่ที่ไวและจำเพาะในการตรวจ กรองมะเร็งรังไข่ ซึ่งได้รับอนุมัติเอกสารรับรองโครงการวิจัย เลขที่ IRB no. 396/59 โดย เก็บตัวอย่างเลือดจากภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559-2560

แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. ใช้สำหรับทดลองในแบบจำลอง paracrine action เพื่อหาพื้นที่สนใจ

ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้หญิงสุขภาพดี ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ประมาณ 5 ซ้อนชา ใส่หลอด EDTA 6 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด จำนวน 3 ราย

2. ใช้สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจ

ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้หญิงสุขภาพดี 15 ราย และตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็ง รังไข่ชนิดเยื่อぶผิว 16 ราย ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ซ้อนชา

1.4. การสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาว

1. ปั่นเลือดด้วยความเร็ว 1,000 xg เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. ตูดเก็บพลาสมา (plasma) ใส่หลอด 2 มิลลิลิตร
3. เติมนสารละลาย Phosphate-buffered saline (PBS) 1 เท่าของปริมาตรเลือดใน หลอดเลือด และผสมให้เข้ากัน
4. ค่อยๆ หยดตัวอย่างในข้อ 3 ลงบนสารละลาย lymphocyte separation medium ในอัตราส่วน 1:1 ในหลอด 15 มิลลิลิตร

5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส (BRAKE-OFF)
6. ตูดสารละลายสีขาวชั้นกลาง (PBMC) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
7. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 xg เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส
8. ตูดของเหลวด้านบนทิ้ง
9. ละลายตะกอน PBMC ด้วยสารละลาย PBS 1 มิลลิลิตร
10. สำหรับการเก็บรักษา PBMC ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 xg เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ตูด PBS ทิ้ง เขย่าตะกอน PBMC ให้ฟุ้ง แล้วค่อยๆ หยด Cold Freezing media (FBS + 10% DMSO) ในอัตราส่วน PBMC 10 ล้านเซลล์ต่อ media 1 มิลลิลิตร และเก็บ PBMC ในหลอด cryotube ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว จากแบบจำลอง paracrine action

2.1. การเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็ง

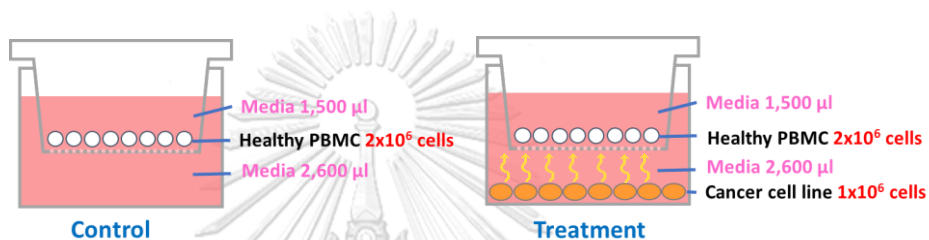
เซลล์ไลน์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิวที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ เซลล์ OVICE (JCRB1043) และ OVKATE (JCRB1044) ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท clear cell และ serous ตามลำดับ ซื้อมาจากบริษัท JCRB cell bank เซลล์ทั้ง 2 ประเภทเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 89 เปอร์เซ็นต์ Fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์ และ antibiotic-antimycotic 100X 1 เปอร์เซ็นต์ ใน flask 25 มิลลิลิตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.2. การสร้างแบบจำลอง paracrine action ด้วยเทคนิค co-culture

การสร้างแบบจำลอง paracrine action ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย กลุ่มทดลองคือ การเลี้ยงเซลล์ PBMC ร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งรังไข่ กลุ่มทดลองที่ 1 คือ กลุ่ม OVICE และ กลุ่มทดลองที่ 2 คือ กลุ่ม OVKATE และกลุ่มควบคุม คือ ไม่เลี้ยงเซลล์ PBMC ร่วมกับเซลล์ไลน์มะเร็งรังไข่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่ม

เซลล์ไลน์มะเร็ง OVICE และ OVKATE ถูก subculture ด้วย Trypsin 500 ไมโครลิตร ปั่นตกเซลล์ด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที และละลายตะกอนเซลล์ด้วย

สารละลาย PBS 1 มิลลิลิตร จากนั้นนับเซลล์ แล้วแบ่งเซลล์จำนวน 1 ล้านเซลล์ต่อหลุม ใส่ plate 6 well-plate เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 2,000 ไมโครลิตร และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำทรานส์เวล (transwell) ประกอบลงในแต่ละหลุม นับเซลล์ PBMC ของคนปกติ จำนวน 3 ราย แล้วแบ่งเซลล์จำนวน 2 ล้านเซลล์ต่อหลุม ใส่ทรานส์เวลแต่ละหลุม เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ทรานส์เวลให้ได้ปริมาตรสุทธิ 1,500 ไมโครลิตร และเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลุมด้านล่างปริมาตร 600 ไมโครลิตร ดังรูปที่ 11 บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บ PBMC จากทรานส์เวลมา สกัดอาร์เอ็นเอ



รูปที่ 11 แบบจำลอง paracrine action

2.3. การสกัดอาร์เอ็นเอ

1. ดูด PBMC ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
2. ปั่นเหรียญด้วยความเร็ว 500 xg เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส
3. ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ให้เหลือประมาณ 100 ไมโครลิตร
4. เติม Trizol-LS 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
6. เติม Chloroform 200 ไมโครลิตร และเขย่าด้วยมือ 15 วินาที
7. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
8. ปั่นเหรียญด้วยความเร็ว 8,760 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
9. ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่
10. เติม 100% Isopropanol 500 ไมโครลิตร และ glycogen 4 ไมโครลิตร
11. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
12. ปั่นเหรียญด้วยความเร็ว 8,760 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
13. เทของเหลวด้านบนทิ้ง
14. เติม 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร
15. ปั่นเหรียญด้วยความเร็ว 7,500 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

16. เทของเหลวด้านบนทิ้ง และทำให้แห้งโดยเครื่องปั๊มสุญญากาศเป็นเวลา 8 นาที
 17. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC water 30 ไมโครลิตร
- 2.4. การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ
1. แบ่งอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร สำหรับวัดความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop โดยค่า 260/280 ต้องมากกว่า 1.8 และมีความเข้มข้นมากกว่า 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
 2. แบ่งอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร สำหรับวัด integrity ด้วยเครื่อง Bioanalyzer โดยค่า RIN ต้องมากกว่า 7
 3. แบ่งอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร สำหรับวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit Fluorometer โดยมีความเข้มข้นมากกว่า 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
- 2.5. การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RNA-seq
1. การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq

ตกตะกอนตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 25 ไมโครลิตร ด้วย 3M Sodium acetate (0.1 เท่า) 2.5 ไมโครลิตร และ 100% Ethanol (5 เท่า) 137.5 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงส่งไปวิเคราะห์ผลที่บริษัท วิชูโอ ไบโอมेटิคอล (ไทยแลนด์) จำกัด
 2. การเตรียม library

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของตัวอย่าง total RNA ด้วยเครื่อง Bioanalyzer NanoDrop และ 1% agarose gel จากนั้นจึงเตรียม library โดยใช้ total RNA 1 ไมโครกรัม ตามวิธีการ NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® โดยคัดเลือก poly(A) mRNA ด้วย NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module จากนั้นเตรียม mRNA เป็นสายสั้นๆ (fragmentation) ด้วย NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer และ NEBNext Random Primers แล้วสังเคราะห์ cDNA สายแรกและสายต่อไป ด้วย ProtoScript II Reverse Transcriptase และ Second Strand Synthesis Enzyme Mix ตามลำดับ และทำให้ปราศจากสิ่งรบกวนด้วย AxyPrep Mag PCR Clean-up จากนั้นปรับแต่งส่วนปลายทั้ง 2 ด้านของ double-stranded cDNA ด้วย End Prep Enzyme Mix แล้วจึงเติม dA-tailing และ T-A ligation เพื่อเติม adaptor ที่ด้านปลายทั้ง 2 ด้าน จากนั้นคัดเลือก Adaptor-ligated DNA ที่มีขนาดประมาณ 360 bp ด้วย AxyPrep

Mag PCR Clean-up เพิ่มจำนวนแต่ละตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR 11 รอบ โดยใช้ไพร์เมอร์ P5 และ P7 สำหรับ bridge PCR และ ไพร์เมอร์ P7 มี six-base index สำหรับระบุตัวอย่าง และทำให้ปราศจากสิ่งรบกวนด้วย AxyPrep Mag PCR Clean-up แล้วจึงตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Bioanalyzer และ Qubit Fluorometer

3. การวิเคราะห์ลำดับเบส

ตัวอย่างที่เตรียม library เรียบร้อยแล้ว สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq4000 ใช้โปรแกรม HiSeq Control Software (HCS) + RTA 2.7 โดยวิเคราะห์เป็น 2x150 bp paired-end (PE) configuration มีขนาดไฟล์ raw data ขั้นต่ำประมาณ 6.0 Gb ต่อตัวอย่าง หรือ raw reads ประมาณ 40 ล้าน PE ต่อตัวอย่าง

2.6. การวิเคราะห์ผล RNA-seq ด้วยชีวสารสนเทศ

นำผลการวิเคราะห์ RNA-seq ที่เป็นข้อมูลดิบมากรองข้อมูลและตรวจสอบคุณภาพด้วยโปรแกรม FastQC จากนั้นนำข้อมูลที่มีคุณภาพ ($Q > 20$) ไปวิเคราะห์ผลตามแนวทางการประมวลผลของโปรแกรม HISAT, StringTie, และ DESeq2 โดยโปรแกรม HISAT version 2.1.0 ใช้ในการระบุตำแหน่งข้อมูลลำดับเบสจากผล RNA-seq (read alignment) เทียบกับจีโนมต้นแบบของมนุษย์ (reference human genome) รหัส GRCh38.p10 จากนั้นนำข้อมูลที่ระบุตำแหน่งแล้วมารวมกันเป็นทรานสคริปต์และหาปริมาณด้วยโปรแกรม StringTie version 1.3.3b และวิเคราะห์การแสดงออกที่แตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม DESeq2 version 1.16.1

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกที่แตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ได้เป็นไฟล์ excel ที่แสดงค่า fold change และ p -value ของแต่ละยีน นำมาจัดเรียงข้อมูลตามค่า fold change ซึ่งสามารถแบ่งข้อมูลได้ 2 กลุ่ม คือ upregulated gene (fold change > 1) และ downregulated gene (fold change < 1) และคัดเลือกยีนที่มีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) รวบรวมเป็นไฟล์ txt เพื่อนำไปวิเคราะห์ร่วมกับ expression array ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ในขั้นต่อไป

3. การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ จากแบบจำลอง paracrine action และ expression array

3.1. การรวบรวมการทดลอง expression array

ค้นหาข้อมูลการทดลอง expression array จากฐานข้อมูล Gene Expression Omnibus (GEO) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) หรือ GenBank ที่เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds> ซึ่งมีเกณฑ์การคัดเลือกเข้า คือ ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นเลือดของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ใช้รูปแบบการวิเคราะห์แบบ Expression profiling by array และเกณฑ์การคัดเลือกออก คือ ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็น cell line หรือชิ้นเนื้อ ใช้รูปแบบการทดลองแบบ Genome profiling methylation profiling Non-coding RNA profiling Protein profiling หรือ SNP genotyping

ในการศึกษานี้ได้เลือก GSE31682 ที่ใช้ GPL2986 (ABI Human Genome Survey Microarray Version 2) ตัวอย่างในการทดลอง คือ peripheral blood leukocytes ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมคือ เลือดคนปกติ 20 ราย และกลุ่มทดลองคือ เลือดผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ 48 ราย

3.2. การใช้งานโปรแกรม CU-DREAM X

1. เตรียมไฟล์ txt จากผลการวิเคราะห์ RNA-seq ประกอบด้วย upregulated gene และ downregulated gene แยกตามกลุ่มทดลอง OVIS และ OVKATE ตัวอย่างไฟล์ เช่น exp01_genes_up.txt
2. เตรียมไฟล์ template ตั้งชื่อเป็น GSE31682.xls โดยระบุข้อมูล GSE file annotation file และตัวอย่างในการทดลองของ expression array ตั้งค่า T-test parameter เป็น two-tailed distribution และ 2 series with unequal standard ตั้งค่า p-value threshold ที่ 0.05 และระบุ differential expression เป็น up หรือ down ตามการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง
3. รวบรวมไฟล์ในการวิเคราะห์ ไว้ในแฟ้ม CU-DREAMX ที่ไดรฟ์ C ประกอบด้วย ไฟล์โปรแกรม cu-dreamx.exe ไฟล์ txt จากผลการวิเคราะห์ RNA-seq ไฟล์ template GSE31682 ไฟล์ Series Matrix และ ไฟล์ full table ของ platform
4. เริ่มการวิเคราะห์ด้วย Command Prompt
5. เปลี่ยนเส้นทางในการวิเคราะห์ด้วยคำสั่ง "cd c:\CU-DREAMX"

6. วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ด้วยคำสั่ง “cu-dreamx.exe GSE31682.xls exp01_genes_up.txt”
7. หลังจากวิเคราะห์เสร็จ ไฟล์ excel ผลการวิเคราะห์ ถูกจัดเก็บไว้ในแฟ้ม CU-DREAMX ที่ไดรฟ์ C โดยชีทที่ 1 เป็นค่าการแสดงออกที่วิเคราะห์ได้จาก expression array และชีทที่ 2 เป็นตาราง intersection การวิเคราะห์ร่วมกันระหว่าง RNA-seq และ expression array ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X แสดงจำนวนยีนในแต่ละกลุ่ม

	Up- or down- regulated genes of expression array	Not up- or not down- regulated genes of expression array
Up- or down- regulated genes of RNA-seq	Number of genes in the 1 st group (A)	Number of genes in the 2 nd group (B)
Not up- or not down- regulated genes of RNA-seq	Number of genes in the 3 rd group (C)	Number of genes in the 4 th group (D)

4. การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ

4.1. การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนด้วย Panther bioinformatics

1. รวบรวมรายชื่อยีนในคอลัมน์ A จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X โดยที่เป็นกลุ่มยีนที่มีนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 (p -value < 0.05) และ odd ration มากกว่า 1
 2. ไปยังเว็บไซต์ <http://pantherdb.org/>
 3. อัปโหลดรายชื่อยีนในเว็บไซต์ และเลือกประเภทเป็น ID List
 4. เลือกวิเคราะห์ใน Homo sapiens
 5. เลือกการวิเคราะห์แบบ Functional classification viewed in gene list
 6. เลือกแสดงผลใน BP Pie Chart (biological process)
5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ชนิดเยื่อหุ้มไขว่เปรียบเทียบกับคนปกติ

ยีนที่สนใจ คือ *SNV* และ *GIMAP8* ซึ่งพบซ้ำกันในผลการวิเคราะห์ RNA-seq ทั้งสองกลุ่ม ทดลองที่วิเคราะห์ร่วมกับ expression array ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X

5.1. การออกแบบไพรเมอร์และการหาสภาวะในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

1. ดาวน์โฮลด์ลำดับเบสของยีนที่สนใจ จากเว็บไซต์

<http://www.ensembl.org/index.html>

2. เลือก exon ที่เป็นบริเวณของ probe จาก expression array

3. ออกแบบไพรเมอร์ด้านหนึ่งคร่อม 2 exon ที่ใกล้กัน จากเว็บไซต์

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> ได้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูคิโซฟอลิเมอเรส

Gene	Primer	ลำดับเบส (5' → 3')	PCR product (bp)
SNN	Forward	GCGCCATGGACTCCCG	71
	Reverse	GGCTGGCAGCACTTTGG	
GIMAP8	Forward	CAGAGAAAAAGAAACCCTGAAC	84
	Reverse	CTCCCCAGGATAGAGTTCC	

4. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณยีนที่สนใจ โดยใช้สารเคมีและสภาวะ ดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูคิโซฟอลิเมอเรส

สารเคมี	สูตร 1	สูตร 2
	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	5.0	5.0
20 μM forward primer	0.05	0.1
20 μM reverse primer	0.05	0.1
dH ₂ O	3.9	3.8
cDNA	1.0	1.0
Total	10.0	10.0

ตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	รอบ
Pre-denature	95	15 นาที	35 รอบ
Denature	95	45 วินาที	
Annealing	55-65	45 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Post-extension	72	7 นาที	
Hold	4	∞	

5. เตรียมอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในกระบอกที่มีความหนา 1.5 มิลลิเมตร โดยใช้สารเคมี ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอะคริลาไมด์เจล

สารเคมี	ปริมาณ
40% acrylamide	2 มิลลิลิตร
10X Tris-borate-EDTA (TBE)	1 มิลลิลิตร
dH ₂ O	7 มิลลิลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร
10% ammonium peroxydisulfate (APS)	100 ไมโครลิตร
Total	10 มิลลิลิตร

6. ผสม PCR product กับ 6X loading dye 2.5 ไมโครลิตร และลงในเจล
7. ตรวจสอบขนาด PCR product โดยเปรียบเทียบกับ 25 bp ladder
8. จ่ายกระแสไฟ 120 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที
9. ย้อมเจลด้วย SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที
10. ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Image scanner (STROM)

5.2. การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

1. สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ PBMC จากตัวอย่างเลือดของผู้หญิงสุขภาพดี และผู้ป่วย มะเร็งรังไข่
2. เตรียมอาร์เอ็นเอ ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ปริมาณ 11 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร
3. เติม oligo dT 1 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง
4. ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
5. เตรียมสารเคมีในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X reaction buffer	4
10 nM dNTP mix	2
RiboLock RNase inhibitor (20 U/ μ l)	1
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ l)	1
Total	8

6. สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอตามสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
cDNA synthesis	42	60
Terminate	70	5
Hold	4	∞

5.3. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงด้วยวิธี real-time PCR

1. เตรียมสารเคมีในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนที่สนใจ โดย ยีน *SNN* ใช้สูตร 1 และ ยีน *GIMAP8* ใช้สูตร 2 ตามตารางที่ 3

2. เตรียมสารเคมีในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *GAPDH* เพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิง โดยใช้สูตร 1 ตามตารางที่ 3 และใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Gene	Primer	ลำดับเบส (5' → 3')	PCR product (bp)
<i>GAPDH</i>	Forward	TGGAAGGACTCATGACCACAG	163
	Reverse	TTCAGCTCAGGGATGACCTT	

3. เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงด้วยเครื่อง Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System โดยใช้สภาวะ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	รอบ	
Hold stage	step 1	50	2 นาที	35 รอบ
	step 2	95	10 นาที	
PCR stage	step 1	95	15 วินาที	
	step 2	58 และ 60	1 นาที	
Melt curve stage	step 1	95	15 วินาที	
	step 2	58 และ 60	1 นาที	
	step 3	95	15 วินาที	

หมายเหตุ

- ยีน *SNN* ใช้ PCR stage และ melt curve step 2 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
- ยีน *GIMAP8* ใช้ PCR stage และ melt curve stage step 2 อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส
- นำค่า CT ที่ได้มาคำนวณตามสมการดังนี้
 - ΔCT เท่ากับ ค่า CT ของยีนที่สนใจ - ค่า CT ของยีนอ้างอิง
 - $\Delta\Delta CT$ เท่ากับ ค่า ΔCT ของแต่ละตัวอย่าง - ค่าเฉลี่ย ΔCT ของกลุ่มควบคุม
 - relative expression เท่ากับ $2^{-\Delta\Delta CT}$
- นำค่า relative expression มาวิเคราะห์ความสามารถในการแยกความแตกต่างของค่าการแสดงออกของยีนที่สนใจ หรือ Receiver-operating characteristic (ROC) curve และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจ

ประกอบด้วย ค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) จากเว็บไซต์ https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว จากแบบจำลอง paracrine action

ตรวจสอบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วยเทคนิค RNA-seq จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วยชีวสารสนเทศ และคัดเลือกยีนที่มีนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$)
2. การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ จากแบบจำลอง paracrine action และ expression array

นำผลการวิเคราะห์ RNA-seq มาวิเคราะห์ร่วมกับการทดลอง expression array จากฐานข้อมูล GenBank รหัสการทดลอง GSE31682 ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X โดยใช้สถิติ Pearson's chi-squared test และ T-test (Two-tailed distribution, type: 2 Series with unequal standard deviation) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05
3. การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ

นำยีนที่สนใจที่มีนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 มาวิเคราะห์หน้าที่การทำงานด้วย Panther bioinformatics
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิวเปรียบเทียบกับคนปกติ

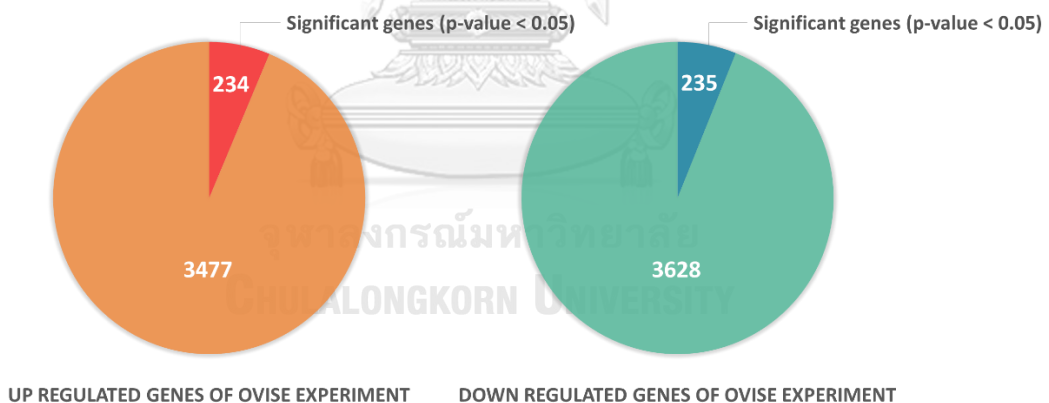
ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิค RT-qPCR จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าการแสดงออก (relative expression) ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่กับคนปกติด้วยโปรแกรม SPSS version 22 โดยใช้สถิติ Unpaired t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 วิเคราะห์ความสามารถในการแยกความแตกต่าง (ROC curve) และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

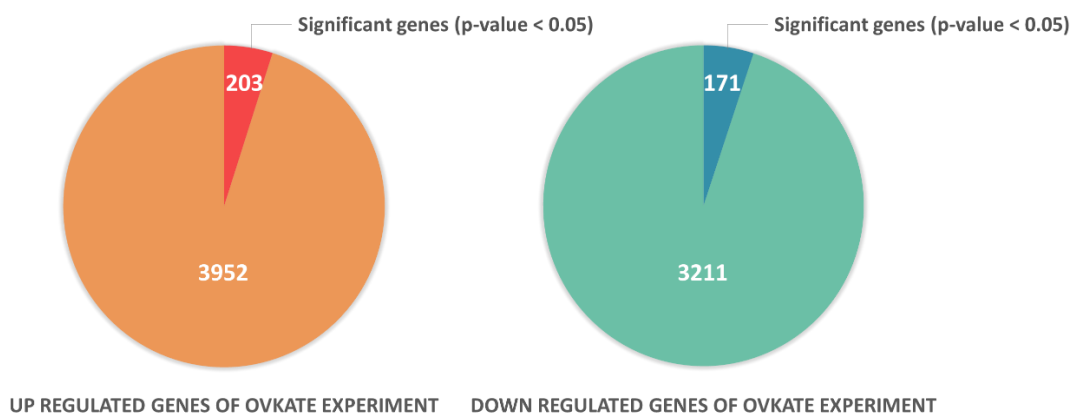
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว จากแบบจำลอง paracrine action

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของอาร์เอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ จากแบบจำลอง paracrine action ด้วยเทคนิค RNA sequencing (RNA-seq) และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกที่เป็นผลมาจากสัญญาณพาราไครน์ของมะเร็ง พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเลี้ยงร่วมกับเซลล์ OVISE (การทดลองกลุ่มที่ 1 OVISE experiment) มียีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up regulated gene) เท่ากับ 3,711 ยีน โดยยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) มีจำนวน 234 ยีน ขณะที่ยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down regulated gene) เท่ากับ 3,863 ยีน โดยยีนที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) มีจำนวน 235 ยีน ดังแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 จำนวนยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment)

และการทดลองกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับเซลล์ OVKATE มียีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up regulated gene) เท่ากับ 4,155 ยีน โดยยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) มีจำนวน 203 ยีน ขณะที่ยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down regulated gene) เท่ากับ 3,382 ยีน โดยยีนที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) มีจำนวน 171 ยีน ดังแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 จำนวนยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment)

ผลการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ จากแบบจำลอง paracrine action และ expression array

จากการรวบรวมการทดลอง expression array จากฐานข้อมูลที่ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเลือดผู้ป่วยมะเร็งรังไข่เปรียบเทียบกับเลือดคนปกติ พบว่า ข้อมูลของการทดลอง GSE31682 สามารถนำมาวิเคราะห์ร่วมกับผลการวิเคราะห์ RNA-seq จากแบบจำลอง paracrine action ได้ โดยผู้วิจัยได้ใช้โปรแกรม CU-DREAM X ในการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ ซึ่งพบว่า มียีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากการวิเคราะห์ expression array และ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ร่วมกันเท่ากับ 56 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05 และ odd ratio > 1) และมี 42 ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 10 และ 11 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกเพิ่มขึ้น

GSE31682 with OVISE experiment	Up regulated genes of array	Not up regulated genes of array	Odds Ratio = 1.46 p -value = 2.13×10^{-2}
Up regulated genes of RNA-seq	56	114	
Not up regulated genes of RNA-seq	4125	12232	

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกเพิ่มขึ้น

GSE31682 with OVKATE experiment	Up regulated genes of array	Not up regulated genes of array	Odds Ratio = 1.64 <i>p</i> -value = 9.83×10^{-3}
Up regulated genes of RNA-seq	42	76	
Not up regulated genes of RNA-seq	4139	12270	

เมื่อวิเคราะห์หายีนที่มีการแสดงออกลดลง พบว่า มี 29 ยีนจากการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ขณะที่ผลจากการวิเคราะห์ expression array กับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) พบว่ามี 18 ยีนที่มีการแสดงออกลดลง ดังตารางที่ 12 และ 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกลดลง

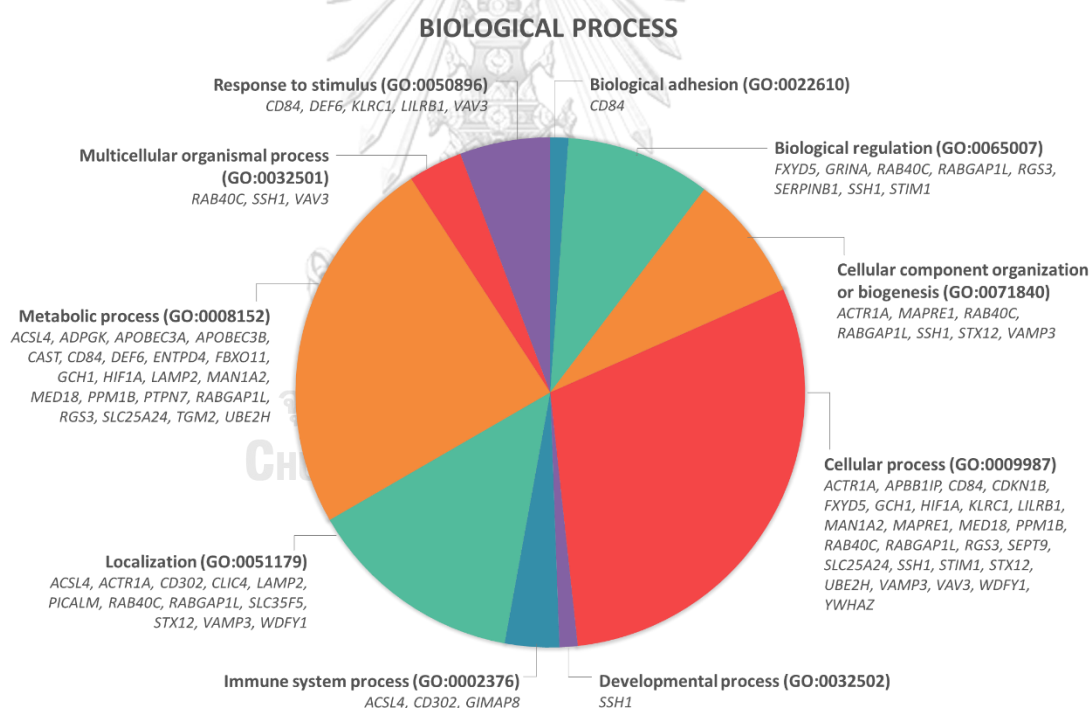
GSE31682 with OVISE experiment	Down regulated genes of array	Not down regulated genes of array	Odds Ratio = 0.83 <i>p</i> -value = 3.75×10^{-1}
Down regulated genes of RNA-seq	29	133	
Not down regulated genes of RNA-seq	3394	12971	

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ตามทิศทางการแสดงออกลดลง

GSE31682 with OVKATE experiment	Down regulated genes of array	Not down regulated genes of array	Odds Ratio = 0.83 <i>p</i> -value = 4.72×10^{-1}
Down regulated genes of RNA-seq	18	83	
Not down regulated genes of RNA-seq	3405	13021	

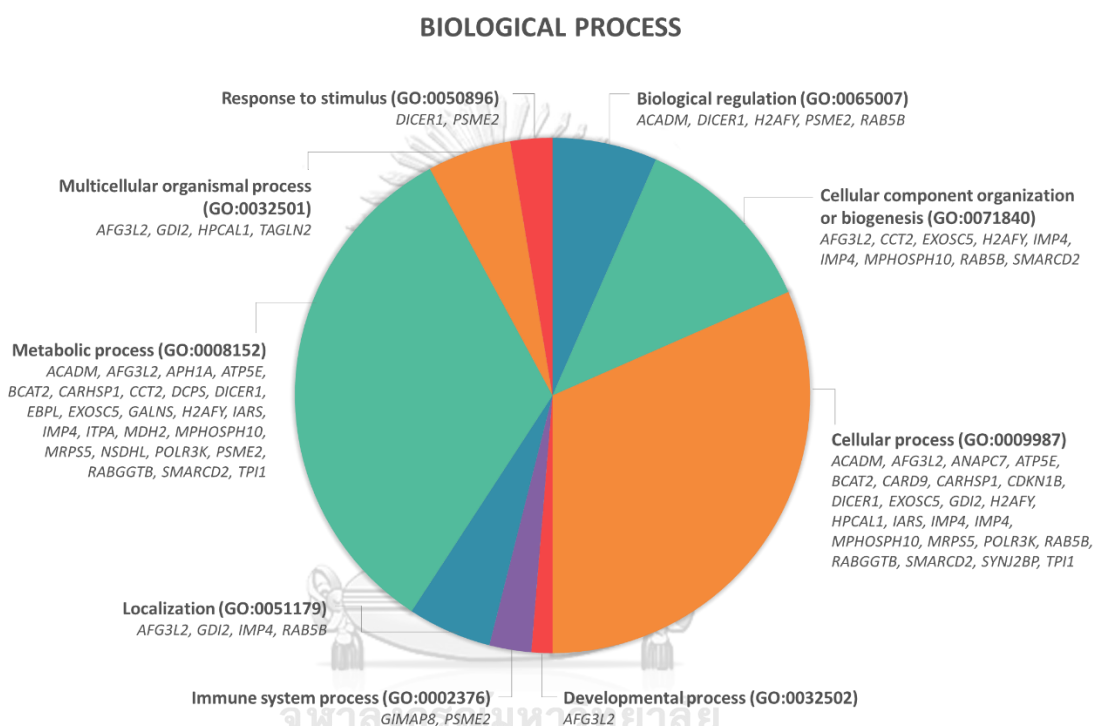
ผลการวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ

หลังจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ PBMC เมื่อได้รับสัญญาณพาราไครน์จากมะเร็งรังไข่ และมีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่กับคนปกติ ผู้วิจัยนำยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ มาวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนแบ่งตามกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) พบว่า ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 56 ยีน จากการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ถูกจัดกลุ่มเป็น Developmental process 1 ยีน Biological adhesion 1 ยีน Multicellular organismal process 3 ยีน Immune system process 3 ยีน Response to stimulus 5 ยีน Cellular component organization or biogenesis 7 ยีน Biological regulation 8 ยีน Localization 12 ยีน Metabolic process 21 ยีน Cellular process 26 ยีน ดังแผนภูมิที่ 3



แผนภูมิที่ 3 การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) ตามหน้าที่การทำงานของยีน

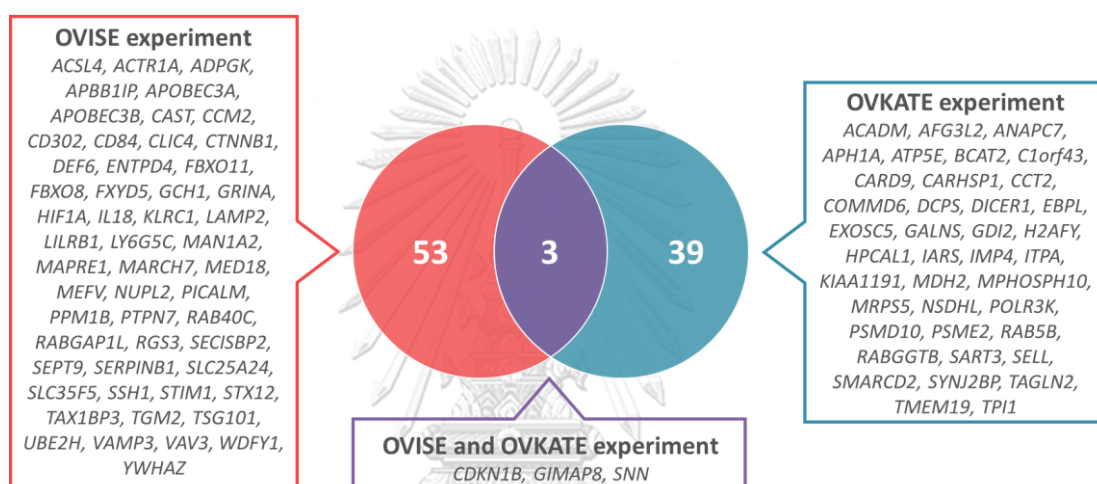
และยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 42 ยีน จากการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ถูกจัดกลุ่มเป็น Developmental process 1 ยีน Response to stimulus 2 ยีน Immune system process 2 ยีน Multicellular organismal process 4 ยีน Localization 4 ยีน Biological regulation 5 ยีน Cellular component organization or biogenesis 9 ยีน Cellular process 24 ยีน Metabolic process 25 ยีน ดังแผนภูมิที่ 4



แผนภูมิที่ 4 การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากผลการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ตามหน้าที่การทำงานของยีน

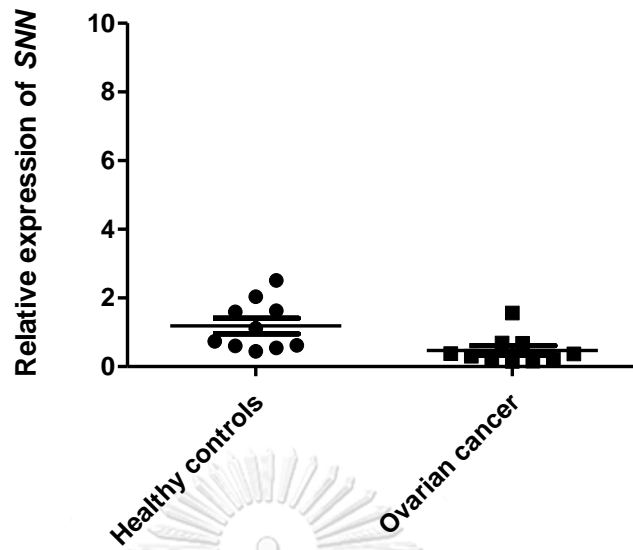
ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้มเปรียบเทียบกับคนปกติ

จากผลการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในเซลล์ PBMC จำเพาะกับมะเร็งรังไข่ ผู้วิจัยได้นำยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จำนวน 56 และ 42 ยีน จากการวิเคราะห์ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) และ RNA-seq ของการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) ร่วมกับ expression array มาวิเคราะห์หาที่ยีนที่ซ้ำกัน พบว่า มี 3 ยีน คือ *CDKN1B*, *GIMAP8* และ *SNN* ดังแผนภูมิที่ 5



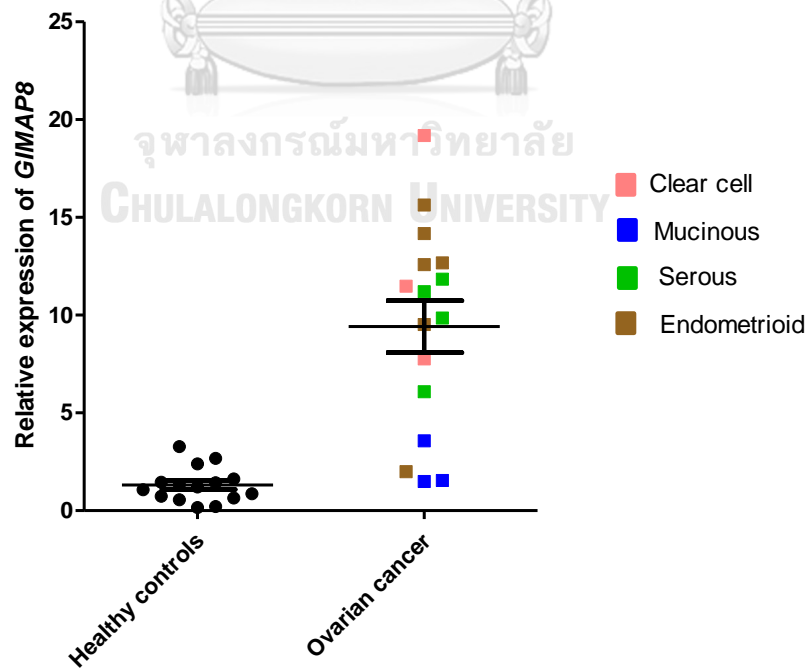
แผนภูมิที่ 5 การจัดกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ expression array ร่วมกับ RNA-seq ตามการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) และกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *CDKN1B*, *GIMAP8* และ *SNN* จาก expression array พบว่าค่าผลต่างการแสดงออกของยีนของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่กับคนปกติ มีค่าเท่ากับ 1.030, 1.140 และ 1.050 ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกยีนที่สนใจ คือ *GIMAP8* และ *SNN* เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้มเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยใช้เทคนิค RT-qPCR คำนวณหาค่า relative expression ของการแสดงออกของยีนที่สนใจ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SNN* ในตัวอย่างเซลล์ PBMC ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่และคนปกติ กลุ่มละ 10 ราย พบว่า ค่า relative expression โดยเฉลี่ยของการแสดงออกของยีน *SNN* ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ เท่ากับ 0.475 ± 0.136 ขณะที่กลุ่มคนปกติ เท่ากับ 1.185 ± 0.228 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} = 0.0154$ ดังแผนภูมิที่ 6



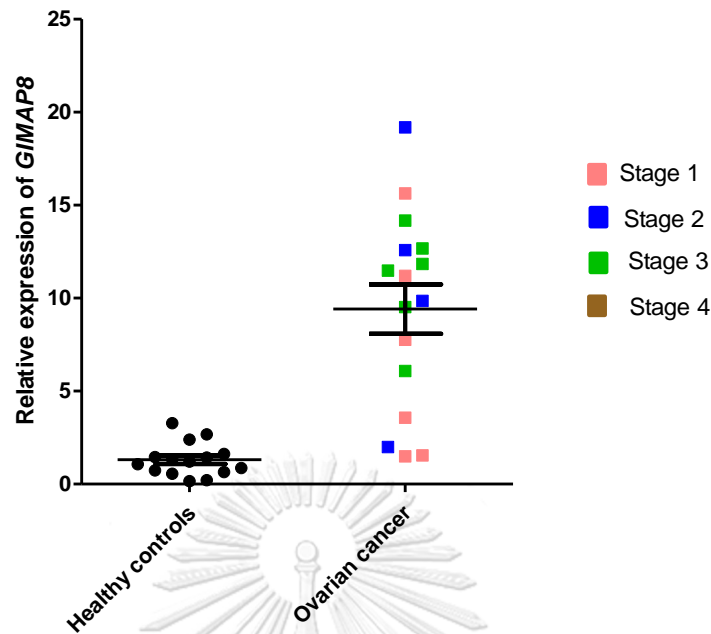
แผนภูมิที่ 6 การแสดงออกของยีน *SNN* ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GIMAP8* ในตัวอย่างเซลล์ PBMC ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ 16 รายและคนปกติ 15 ราย พบว่าค่า relative expression โดยเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ เท่ากับ 9.410 ± 1.321 ขณะที่กลุ่มคนปกติ เท่ากับ 1.310 ± 0.230 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.0001$ ดังแผนภูมิที่ 7 และ 8



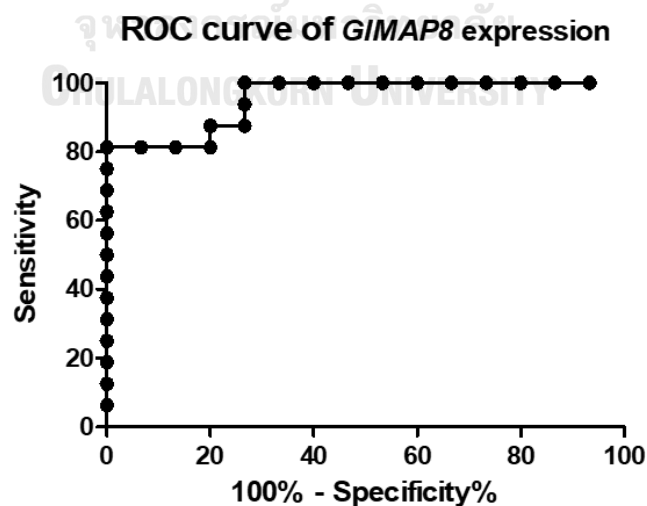
แผนภูมิที่ 7 การแสดงออกของยีน *GIMAP8* ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่

ตามประเภทของมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว



แผนภูมิที่ 8 การแสดงออกของยีน *GIMAP8* ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่
ตามระยะของมะเร็งรังไข่

เมื่อวิเคราะห์ receiver-operating characteristic (ROC) curve เพื่อตรวจสอบความสามารถในการแยกความแตกต่างของค่าการแสดงออกของยีน *GIMAP8* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่และคนปกติ พบว่า พื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 0.954 ± 0.033 (95% CI = 0.8892 - 1.019) ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.0001$ ดังแผนภูมิที่ 9



แผนภูมิที่ 9 ROC curve การแสดงออกของยีน *GIMAP8* ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งรังไข่

เมื่อกำหนดค่า cut off ของ relative expression ของการแสดงออกของยีน *GIMAP8* เท่ากับ 1.472 สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งรังไข่และคนปกติได้ ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 รายละเอียดของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GIMAP8*

<i>GIMAP8</i> expression test	Ovarian cancer	
	positive	negative
positive (relative expression ≥ 1.472)	16	4
negative (relative expression < 1.472)	0	11

และจากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GIMAP8* ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่า ค่าความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (95% CI = 79.41 – 100.00) และ 73.33 เปอร์เซ็นต์ (95% CI = 44.90 - 92.21) ตามลำดับ และมีค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบ เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (95% CI = 63.35 - 90.25) และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว เพื่อการพัฒนานิเวศวิทยาการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งรังไข่ ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RNA sequencing (RNA-seq) และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมจากแบบจำลอง paracrine action พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งรังไข่ทั้ง 2 การทดลองมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งรังไข่สามารถส่งสัญญาณพาราไครน์ให้กับเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนได้ แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ได้ี้มาจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับเซลล์มะเร็งรังไข่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการส่งสัญญาณเพียงช่วงเวลาระยะสั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอื่นที่แตกต่าง เมื่อสภาวะการส่งสัญญาณเปลี่ยนไป นอกจากนี้แบบจำลอง paracrine action เป็นการจำลองการส่งสัญญาณโดยตรงระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งผลที่ได้อาจแตกต่างไปจากสถานการณ์ที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย ดังนั้นเพื่อการพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ร่วมด้วย โดยเลือกใช้การทดลอง expression array จากฐานข้อมูล นำข้อมูลการแสดงออกของยีนต่างๆ มาวิเคราะห์ร่วมกับยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกจากแบบจำลอง paracrine action ทั้ง 2 การทดลอง เพื่อคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอจำเพาะกับมะเร็งรังไข่ พบว่า การทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) และการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) มียีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05 และ odd ratio > 1) จำนวน 56 และ 42 ยีนตามลำดับ และมียีนที่มีการแสดงออกลดลง จำนวน 29 และ 18 ยีนตามลำดับ ซึ่งข้อดีของการนำการทดลอง expression array มาวิเคราะห์ร่วมด้วย คือ ตัวอย่างในการทดลอง expression array เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่ใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับคนปกติ ดังนั้นจึงได้ผลการเปลี่ยนแปลงที่มาจากสถานการณ์ที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยอาจไม่ได้เป็นผลมาจากสัญญาณพาราไครน์ของเซลล์มะเร็งรังไข่เพียงอย่างเดียว โดยที่ปัจจัยอื่นๆ ในร่างกาย เช่น การติดเชื้อโรค หรือภาวะอักเสบ ก็อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวเช่นกัน นอกจากนี้การ

วิเคราะห์ผลของ expression array เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงของยีน โดยพิจารณาจาก probe ซึ่งเกิด hybridization จำเพาะกับตำแหน่งบางตำแหน่งบนยีน ดังนั้นผลที่ได้ อาจไม่ครอบคลุมมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RNA-seq

จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ร่วมกับ expression array เมื่อนำยีนที่มีการแสดงออก เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญมาวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนแบ่งตามกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) พบว่า ยีนส่วนใหญ่ทำงานเกี่ยวข้องกับ cellular process และ metabolic process แสดงให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานภายในเซลล์ เมื่อได้รับ สัญญาณพาราไครน์จากเซลล์มะเร็งรังไข่ นอกจากนี้พบว่ายีน *CDKN1B* *GIMAP8* และ *SNW* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผลการวิเคราะห์ RNA-seq จาก 2 การทดลองร่วมกับ expression array ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็งรังไข่ ด้วยการตรวจสอบ การแสดงออกของยีนในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาว

งานวิจัยนี้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีน *GIMAP8* และ *SNW* ที่มีผลต่อการแสดงออกของ ยีนมากที่สุดจาก expression array ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือด ขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้มเปรียบเทียบกับคนปกติ พบว่า การแสดงออกของยีน *SNW* ใน ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่น้อยกว่าคนปกติ และไม่สอดคล้องกับผลการทดลอง RNA-seq และ expression array ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากบริเวณที่ตรวจสอบมีรูปแบบการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น รูปแบบ isoform รวมทั้งการทดลอง expression array จากฐานข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ เป็นการทดลองในกลุ่มตัวอย่างชาวยุโรป ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มตัวอย่างชาวไทย ทำให้ผลการ ตรวจสอบไม่สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น อย่างไรก็ตามผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GIMAP8* พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่มีการแสดงออกมากกว่าคนปกติอย่างมี นัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.0001$ พื้นที่ใต้กราฟ ROC เท่ากับ 0.9542 โดยที่ ค่า cut off ของ relative expression การแสดงออกของยีน *GIMAP8* เท่ากับ 1.472 ประสิทธิภาพในการตรวจสอบการ แสดงออกของยีน *GIMAP8* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อแยกโรคมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้ม มีความไวและ ความจำเพาะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 73.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบ เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการ แสดงออกของยีน *GIMAP8* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้มแต่ละประเภท พบว่า มะเร็งรังไข่ ประเภท serous clear cell และ endometrioid มีการแสดงออกของยีนที่ต่างจากคนปกติชัดเจน แต่มะเร็งรังไข่ประเภท mucinous มีการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างจากคนปกติ และเมื่อพิจารณา

การแสดงออกของยีนตามระยะของมะเร็งรังไข่ พบว่า การแสดงออกของยีนไม่สัมพันธ์กับระยะของโรค

ยีน *GIMAP8* หรือ GTPase, IMAP Family Member 8 หรือ Immune-Associated Nucleotide-Binding Protein 9 อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 7q36.1 ถอดรหัสเป็นโปรตีนในกลุ่ม GTP-binding superfamily และ immuno-associated nucleotide (IAN) subfamily โปรตีน *GIMAP8* มี 3 GTP-binding domain มีมวลโปรตีน 77 kDa ทำหน้าที่เกี่ยวกับ anti-apoptotic effect ในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับควบคุมการรอดหรือการตายของเซลล์ และตอบสนองต่อการติดเชื้อ⁴⁷⁻⁴⁹ พบการแสดงออกของ *GIMAP8* ในเนื้อเยื่อ lymphoid แต่ยีนไม่ได้มีหน้าที่ในขั้นตอนการพัฒนา lymphocyte⁴⁸ และงานวิจัยของ Shiao และคณะ พบว่า กลุ่มยีน *GIMAP* มีการแสดงออกลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดเซลล์ตัวโต (non small cell lung cancer) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *GIMAP8* ที่มีการแสดงออกลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็ง แต่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติในเนื้อเยื่อปกติรอบข้างมะเร็ง⁴⁹ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Puttipanyalears และคณะ ที่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สโตรมอล โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับมะเร็งเต้านม⁶ แสดงให้เห็นว่า มะเร็งมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *GIMAP8* ในเซลล์ข้างเคียงของมะเร็ง ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการวิจัยของยีน *GIMAP8* ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งรังไข่

ข้อดีของงานวิจัยนี้คือ เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากสัญญาณของเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวมีจำนวนมากเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งในเลือด ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้มได้ตั้งแต่เนิ่นๆ นอกจากนี้การตรวจวิธีนี้ยังเป็นวิธีการที่ตรวจได้ง่าย มีค่าใช้จ่ายไม่แพง ทราบผลการตรวจเร็ว จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งกับผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงเป็นมะเร็งรังไข่ เนื่องจากผู้ป่วยที่ตรวจพบก้อนเนื้อที่ผิดปกติในอุ้งเชิงกราน ไม่มีการทำ biopsy ก่อนการผ่าตัด ดังนั้นจึงสามารถจำแนกมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้ม และผู้ป่วยเนื้องอกที่ไม่เป็นมะเร็ง ได้จากผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาหลังการผ่าตัด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ทั้งนี้การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจสนับสนุนกระบวนการวินิจฉัยของแพทย์ ทำให้สามารถดำเนินการวินิจฉัยและการรักษาในขั้นถัดไปได้อย่างรวดเร็ว

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับโมเลกุลเมื่อได้สัญญาณจากเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อหุ้ม ซึ่งการแสดงออกของยีน *GIMAP8* ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถนำไปใช้เป็นวิธีการหนึ่งในการตรวจโรคมะเร็งรังไข่ได้ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังเป็นพื้นฐานที่สามารถศึกษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองการวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

รายการอ้างอิง

1. Xing Y, Zhao S, Zhou BP, Mi J. Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment. *FEBS Journal*. 2015;282:3892-8.
2. Morrison C, Mancini S, Cipollone J, Kappelhoff R, Roskelley C, Overall C. Microarray and proteomic analysis of breast cancer cell and osteoblast co-cultures: role of osteoblast matrix metalloproteinase (MMP)-13 in bone metastasis. *J Biol Chem*. 2011;286(39):34271-85.
3. Ahrens DV, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):76-83.
4. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1): 27–34.
5. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(1):229-36.
6. 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.
7. What are the key statistics about ovarian cancer? [Internet]. American cancer society's cancer statistics center. 2017 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>.
8. Ovarian cancer statistics [Internet]. Centers for disease control and prevention. 2016 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/cancer/ovarian/statistics/>.
9. NCI. Hospital based cancer registry annual report 2014: Pornsup printing; 2016.
10. Prat J. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol*. 2015;26(2):87-9.

11. Cancer stat facts: ovarian cancer [Internet]. Surveillance, epidemiology, and end results program. [cited 2017 Apr 9]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
12. Buhachat R. Current status of ovarian cancer. *Songkla Med J*. 2007;25(6):537-47.
13. Das PM, Bast RC, Jr. Early detection of ovarian cancer. *Biomark Med*. 2008;2(3):291-303.
14. Coticchia CM, Yang J, Moses MA. Ovarian cancer biomarkers: current options and future promise. *J Natl Compr Canc Netw*. 2008;6(8):795–802.
15. Ramalingam P. Morphologic, immunophenotypic, and molecular features of epithelial ovarian cancer. *Oncology*. 2016.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell*. 6 ed: Garland science, Taylor & Francis group; 2015.
17. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer*. 2017;16(1):31-40.
18. How to prepare whole blood samples for PBMC isolation [Internet]. Conversant Bio. 2014 [cited 2017 Oct 25]. Available from: <http://www.conversantbio.com/blog/how-to-prepare-whole-blood-samples-for-pbmc-isolation>.
19. Types of immune cells present in human PBMC [Internet]. Sanguine Biosciences. 2012 [cited 2017 Oct 25]. Available from: <https://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>.
20. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1127:1-9.
21. Ovary anatomy [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1949171-overview>.
22. The reproductive system [Internet]. Midlands technical college. [cited 2017 Apr 9]. Available from: http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/Chap27/Reproductive_System.html.

23. Karst AM, Drapkin R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *J Oncol*. 2010;2010(932371):1-10.
24. Ovarian cancer [Internet]. Cancer research UK. [cited 2017 Apr 9]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/ovarian-cancer/types>.
25. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2113):1-23.
26. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs: IARC Press; 2003.
27. Ovarian cancer: causes, symptoms, and treatments [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/159675.php>.
28. Solutions for expression array experiments [Internet]. Illumina. 2017 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <https://www.illumina.com/techniques/microarrays/gene-expression-arrays.html>.
29. Microarray [Internet]. Nature education. 2014 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <http://www.nature.com/scitable/definition/microarray-202>.
30. LifeMap Discovery® as a novel gene expression database [Internet]. Lifemap discovery. [cited 2017 Apr 9]. Available from: <http://discovery.lifemapsc.com/gene-expression-signals>.
31. Wilantho A, Praditsup O, Charoenchim W, Kulawongnunchai S, Assawamakin A, Tongshima S. Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. *Thai J Genet*. 2012;5(2):104-29.
32. Zhang W, Yu Y, Hertwig F, Thierry-Mieg J, Zhang W, Thierry-Mieg D, et al. Comparison of RNA-seq and microarray-based models for clinical endpoint prediction. *Genome Biol*. 2015;16(133):1-12.
33. Study gene expression using RNA sequencing [Internet]. Illumina. 2017 [cited 2017 Apr 9]. Available from: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing.html>.
34. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. [Internet]. National institutes of health. 2011 [cited 2017 Oct 25]. Available

from: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3104486_1741-7007-9-34-2&req=4.

35. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Cabrero DG, Cervera A, Pherson AM, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*. 2016;17(13):1-19.
36. Andrews S. FastQC. version 0.11.5 ed: Babraham Bioinformatics; 2010.
37. Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *nature protocols*. 2016;11(9):1650-67.
38. StringTie [Internet]. Johns Hopkins university center for computational biology. [cited 2017 Oct 25]. Available from: <http://ccb.jhu.edu/software/stringtie/index.shtml?t=manual>.
39. Apornthewan C. Connection up-and down-regulation expression analysis of microarrays. *Asian Biomedicine*. 2011;5(2): 257-62.
40. PANTHER [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 8]. Available from: <http://pantherdb.org/>.
41. Juansamrit A, Sura T. Polymerase chain reaction. *hematology and transfusion medicine*. 1991;4:469-77.
42. Electrophoresis. Available from: [e-book.ram.edu/e-book/c/CM457\(L\)\(47\)/CM457\(L\)-9.pdf](http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM457(L)(47)/CM457(L)-9.pdf).
43. Real-time PCR technology [Internet]. Gibthai. 2015 [cited 2017 Oct 25]. Available from: http://www.gibthai.com/service/note_detail/12.
44. Polymerase chain reaction: Gibthai. Available from: dmsc2.dmsc.moph.go.th/brdfiles/PCR%20ก๊ิบไทย.pdf.
45. Reverse transcription—six most common applications [Internet]. Thermofisher scientific. [cited 2017 Oct 25]. Available from: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>.

46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
47. *GIMAP8* gene [Internet]. The genecards human gene database. 2017 [cited 2017 Oct 25]. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=gimap8>.
48. Webb LM, Pascall JC, Hepburn L, Carter C, Turner M, Butcher GW. Generation and characterisation of mice deficient in the multi-GTPase domain containing protein, *GIMAP8*. *PLoS One*. 2014;9(10):1-12.
49. Shiao YM, Chang YH, Liu YM, Li JC, Su JS, Liu KJ, et al. Dysregulation of *GIMAP* genes in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;62(3):287-94.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 15 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มควบคุม

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	หมายเหตุ
1	F1	หญิง	25	paracrine action
2	F2	หญิง	25	paracrine action
3	F3	หญิง	25	paracrine action
4	F4	หญิง	65	validation
5	F5	หญิง	61	validation
6	F6	หญิง	61	validation
7	F7	หญิง	60	validation
8	F8	หญิง	60	validation
9	F9	หญิง	44	validation
10	F10	หญิง	61	validation
11	F11	หญิง	58	validation
12	F12	หญิง	74	validation
13	F13	หญิง	65	validation
14	F14	หญิง	70	validation
15	F15	หญิง	68	validation
16	F16	หญิง	59	validation
17	F17	หญิง	69	validation
18	F18	หญิง	51	validation

ตารางที่ 16 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างในกลุ่มทดลอง

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา	ระยะของโรค
1	OVC1	หญิง	78	well differentiate mucinous adenocarcinoma	IC2
2	OVC2	หญิง	44	well differentiate endometrioid adenocarcinoma	IIIC
3	OVC3	หญิง	65	well differentiate mucinous adenocarcinoma	IA
4	OVC6	หญิง	54	moderate differentiate endometrioid adenocarcinoma	IA
5	OVC8	หญิง	56	well differentiate serous adenocarcinoma	IA
6	OVC9	หญิง	57	clear cell adenocarcinoma	IIA
7	OVC10	หญิง	65	well differentiate mucinous adenocarcinoma	IA
8	OVC11	หญิง	43	well differentiate endometrioid adenocarcinoma	IIIA1(i)
9	OVC12	หญิง	57	clear cell adenocarcinoma	IIIA1(ii)
10	OVC15	หญิง	81	well differentiate serous adenocarcinoma	IIA
11	OVC16	หญิง	57	well differentiate endometrioid adenocarcinoma	IIIB
12	OVC17	หญิง	61	moderate differentiate endometrioid adenocarcinoma	IIIC
13	OVC18	หญิง	64	well differentiate endometrioid adenocarcinoma	IIA
14	OVC22	หญิง	30	well differentiate serous adenocarcinoma	IIA
15	OVC23	หญิง	80	poorly differentiate serous adenocarcinoma	IIIC
16	OVC25	หญิง	72	clear cell adenocarcinoma	IC2

ตารางที่ 17 จำนวนตัวอย่างเลือดแบ่งตามประเภทของมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว

ประเภทของมะเร็งรังไข่ชนิดเยื่อบุผิว	จำนวน (ราย)
clear cell	3
endometrioid	6
mucinous	3
serous	4
รวม	16

ตารางที่ 18 ข้อมูลปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอจากแบบจำลอง paracrine action สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง RNA-seq	ตัวอย่าง PBMC	กลุ่ม	Bioanalyzer	Qubit	Nanodrop		
				RIN value	ความเข้มข้น (ng/μl)	260/280	ความเข้มข้น (ng/μl)	Total Amount (μg)
1	RCF04	F1	control	8.4	32.5	2.046	249.48	6.237
2	RCF05	F2	control	8.9	41.2	2.033	409.48	10.237
3	RCF06	F3	control	8.5	55.8	2.089	277.08	6.927
4	TO1	F1	OVISE experiment	8.3	67	2.089	252.64	6.316
5	TO2	F2	OVISE experiment	8.6	74.5	2.062	261.80	6.545
6	TO3	F3	OVISE experiment	9.2	96.8	2.032	373.52	9.338
7	TO4	F1	OVKATE experiment	8.4	160	2.058	373.72	9.343
8	TO5	F2	OVKATE experiment	8.5	20.4	2.100	172.08	4.302
9	TO6	F3	OVKATE experiment	9.2	42.2	2.085	361.04	9.026

ตารางที่ 19 ข้อมูลผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq

Sample	Paired Raw Reads	Paired Clean Reads	Clean Base (G)	Effective Rate (%)	Error Rate (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC Content (%)
RCF4	22,289,246	21,236,070	6.371	95.27	0.05	93.75	85.66	47.67
RCF5	36,365,463	34,535,357	10.361	94.97	0.05	93.94	86.08	46.79
RCF6	31,226,322	29,661,034	8.898	94.99	0.04	94.21	86.61	47.22
TO1	33,341,541	31,869,106	9.561	95.58	0.04	94.52	87.19	46.19
TO2	29,117,904	27,707,469	8.312	95.16	0.04	94.28	86.65	46.36
TO3	29,547,732	28,118,615	8.436	95.16	0.05	93.97	86.1	46.47
TO4	28,556,217	27,346,798	8.204	95.76	0.04	94.66	87.47	46.13
TO5	28,709,280	27,082,727	8.125	94.33	0.04	95.28	88.86	47.23
TO6	40,472,220	38,573,590	11.572	95.31	0.04	95.62	89.59	46.39

ตารางที่ 20 ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVISE	Up regulation	RAD51-AS1, HIC1, MSTRG.434, CCR4, RAB40C /// WFIKKN1, HIF1A /// AL137129.1 /// SNAPC1, CD300LB, APBB1IP, MSTRG.12627, SYN1, STK24, CXCL9, TGM2, RFLNB, AF127577.4 /// LINC02246 /// NRIP1, CMTM6, PTGES, FXYD5, HNRNPLL, VPREB3, UBE2J1, NUPL2, PPM1B, ZC4H2, FBXO28, TAX1BP3 /// P2RX5-TAX1BP3 /// P2RX5, HLA-DPA1, FBXO8, LYRM7, SEPT9 /// Y_RNA /// AC111170.2, WDFY1, ZNF264 /// ZNF805 /// AC005261.4, FAM169A, SAMD8, MSTRG.29760, KCNE5 /// ACSL4, BCL10, SKIL, CAST, C21orf91-OT1 /// C21orf91, AC017074.1 /// SLC35F5, DENND6A, LAMP2, SEMA4D, CYP4V2 /// KLKB1, OGFOD1, HNRNPA3P2, EPB41L2, LINC00996 /// GIMAP8, SERINC1, VAV3, AL022328.3, ANAPC1P1 /// RGPDP1, MYO15B, ADAMTSL4-AS1 /// MCL1, DRAM1, CDKN2AIP, RNU6ATAC18P, PLA2G16, MIR6730, MSTRG.5973, TXNIP, SNX18, SNW1, CCDC71L, FASN, MAN1A2,

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVISE	Up regulation	EIF4EBP2, KANSL3, ARL8A, COL4A3BP, PLEKHA2, ZNF76 /// DEF6, DHRS3, AC024940.5 /// FAM60A, THBD, USP8, AL031428.1 /// LUZP1, TMED5, ENSG00000264918, MSTRG.3045, STARD4, GIPR /// MIR642A, CCND2, FBXO11, MSTRG.3492, MBD4, TMEM131, CDH23, SLC25A24, ZSWIM6, IL18, MAP3K1, RP2, TSPAN17, HERPUD2, PDIA6, IL10, HCLS1, LILRB1, FOXJ3, FAM120A, ERCC6L2, FCGR1A, TM2D2, CTNNB1, AC254633.1, ERGIC1 /// RPL26L1, MAGT1, STX12, SEMA3C, KLF3, STIM1 /// AC090587.2 /// ENSG00000263421, YWHAZ, SRPK1, CDKN1B, SMIM25, LYSMD3, FCGR3A /// FCGR3B, MAPRE1, CCM2L, TNIP3, SCML1, SNRK, PHC3, RELT, ABCB1, PTPN7, VAMP3, HIST3H2A, CFAP97, TMEM199 /// AC002094.1 /// ENSG00000264302 /// SARM1, RBM15, TXNL1, MTRF1L, SPPL2A, LILRB3 /// LILRA6 /// LILRB2 /// AC245884.12 /// LILRA5 /// AC245884.11 /// VN1R104P /// AC245884.6 /// LILRA4, STXBP5, PICALM, CD302 /// LY75- CD302 /// LY75, ENSG00000278219 /// LINC00674 /// AC005332.9 /// AC005332.6 /// AC005332.8, TIMP1, AHS2A /// ENSG00000280672, GFER, MSTRG.31319, ARRDC1-AS1, FAM172A /// ENSG00000251725 /// NPM1P27 /// POU5F2, RNF216, CC2D1B, ARRDC1, CDK5RAP2, GSAP, CLIC4, MTFR1, ATF6 /// AL391825.1, TOR1AIP2, AC012254.1 /// HDHD2 /// AC012254.2 /// IER3IP1, TSPYL2, ACTR3, WARS, MSTRG.4334, STK3, RGS3, SNORA40 /// SSH1, KLRK1 /// KLRC4-KLRK1 /// KLRC4 /// KLRC3 /// AC068775.2 /// KLRC2 /// KLRC1, GRINA, GCH1, PMAIP1, CSDE1, NUP58, SAT1, ATP6AP2, CD84, MARCH7, UBE2H, LAMTOR3, NLRP3, SECISBP2, PJA2, SERPINB1, B3GNT5, ZNF235, MED18, SMAD5 /// SMAD5-AS1_2 /// SMAD5-AS1_3, DDHD1 /// ENSG00000266552, FAM49A, ZFAND5, MSTRG.3018, FAM219B, ITCH /// ITCH-IT1 /// DYNLRB1, AC005224.4, RAP1GAP2, YBX3, APOBEC3A /// APOBEC3B, DCTN4, LRRC8B /// AC093423.2 /// LRRC8C /// AC093423.3 /// LRRC8D, ADGRE1 /// AC020895.1, HNRNPC, HNRNPA3 /// ENSG00000263721, CTSB, WNT5A, FGL2, FAM91A1, PRCP, C14orf37 /// PSMA3-AS1, LOXL2 /// ENTPD4, HBEGF, OGFRL1, LY6G5C /// ABHD16A /// AL662899.1 /// LY6G6E, ARF4, FAM3C, TBRG1, CHST7, CCM2 /// ENSG00000280981, RUFY3,

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVISE	Up regulation	RABGAP1L /// CACYBP, ADPGK, SNN, IKZF5, MOB1A, CLASP2, STAT4, ACTR1A, SDC2, PPP1CB /// SPDYA, TSG101 /// YWHABP2, ABCB7, EIF1B, RCBTB2, TLR8, P2RY6, XRCC5, DUSP4, MICALL1 /// ENSG00000280527, MEFV, SMAD3, PSMD7, SEH1L, AC012486.1 /// PGAP1, LY86, HELZ, ACBD3

หมายเหตุ

1. /// แทน รหัสยีนอื่นๆ
2. MSTRG. แทน รหัสยีนที่โปรแกรมสร้างขึ้น

ตารางที่ 21 ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการทดลองกลุ่มที่ 1 (OVISE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVISE	Down regulation	SPARC, ZNF786, RSU1, MSTRG.39297, ENSG00000281035 /// SNORD20, RASGRP2 /// MAP4K2, RN7SL473P, TMEM214, SOX7 /// AC105001.2 /// PINX1, GNPTG, C1orf35, GSDMB /// ORMDL3, PTCRA, HPS6, KCTD12 /// ENSG00000264908, PRPF6, TAF6L, SMG6, EID3, MSTRG.39044, CYHR1, MSTRG.29761, PDCD6 /// AHRR, PPM1A, AC046185.3, AC020571.1, POLR2E, DHX37, FASTK, ZNF512 /// AC074091.1 /// GPN1, NOL6, AC008758.4 /// AC008758.3 /// ZNF799 /// AC008758.5 /// ZNF443 /// AC008758.6 /// ZNF709 /// AC008758.1 /// ZNF564 /// AC010422.6 /// ZNF490 /// RPL10P16 /// AC010422.3 /// MAN2B1 /// AC010422.5 /// WDR83OS /// DHPS, RING1, CCND3 /// RNU6-761P, CIRBP-AS1, AC025165.5, EDEM2, FBXW5, RUVBL2, COPS7B, SCAMP2, ABCA7, ACAT2, LINC01963, MATN1-AS1, AC240274.1, ASCC2, PDRG1, ASPRV1 /// PCBP1-AS1, AHDC1, VNN2, KIAA1683 /// JUND, IPO13, CARN1 /// RPS6KB2, ITGA2B, MSTRG.8289, SBNO2, NOC4L, CPNE1 /// AL109827.1 /// RBM12 /// NFS1, MRPL46 /// AC013489.1 /// ENSG00000271997 /// DET1, DGCR2 /// DGCR11, IDS /// AC244197.3 /// AC244197.2 /// LINC00893, MED19, AC004477.3 /// CBX1 /// RNU6-1201P, KATNA1, ZMYM4, ITGA10 /// PEX11B /// RBM8A, LONP1, PUF60, SNX16,

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVISE	Down regulation	<p>WWP2, NOTCH1 /// MIR4673, PAM16 /// CORO7-PAM16 /// CORO7, OSBPL5, CHMP6, MSTRG.41330, TSC22D1, SAFB2, AL137058.2 /// MRPS31P4 /// HNRNPA1L2, NOC2L, MSTRG.44382, TMEM128, CASS4 /// RTFDC1 /// FAM209A /// AL109806.1 /// FAM209B, ACADVL, SRP68, FAM118B, SLC25A39, DHRSX /// ZBED1, COMMD3 /// COMMD3-BMI1 /// BMI1, RIC8A /// ENSG00000274298, IDH3G, RCOR1, CHD3, SH3GLB2, PINK1 /// ENSG00000273695, PIM1, AC078883.3 /// AC078883.1, SLC30A6, SEPHS2, LINC00998, MIB2, IL27RA, SSBP4, AC007998.3 /// AC007998.2 /// INO80C /// ENSG00000277489, TFPC2 /// PHBP19, GNAS, KLF7, RRP7A /// RRP7BP /// RNU6-513P, EIF2B2, PRPF4, BAP1, GLIPR2, BOP1 /// ENSG00000277158, QTRT1, GFOD2, TMEM251 /// AL110118.2 /// UBR7, C11orf68, JAG2 /// AL512356.1 /// NUDT14, NOA1, ATG101, RPS19BP1, HSD17B10, MLST8, AC004520.1, B9D2, AAAS, HSPBP1, KIAA0355, RAD9A, PRKCQ-AS1 /// AL158210.1, TBPL1, Metazoa_SRP, ECHS1, BEX3, KAT7 /// AC027801.5, DCAF15, MRPS7, RGS18, RBM23, ZNF202, IMP4, KRTCAP2 /// AL713999.1 /// MUC1, ARL2 /// ARL2-SNX15 /// SNX15, RNU6-288P, PARD6A, AVIL /// RNU6-1083P /// CTDSP2, DHX16, MFSD10, RSAD1, NDUFAF3, KPNA1, AC018738.1, MED16, MRPL37, SON /// ENSG00000275224, DPP9, IDH3B, SMARCD1, YDJC, RAB11FIP3, TRMT11, HOPX, B3GALT6, DCAF7 /// TACO1, SP2, JADE1, ATG4B, ARFGAP2 /// AC090589.3, VPS51 /// TM7SF2, MCRS1, CXCL6 /// PPBPP1 /// PF4V1, ZNF770, HIST1H2AC, ZNF687, MRPL22, YPEL3, CLCN7, LINC00969 /// SDHAP2 /// ENSG00000276635 /// MIR570 /// MUC20, GTPBP6, PMM2 /// AC022167.2 /// AC022167.1, NDFIP2, LIMD2, NAGLU /// AC067852.1 /// COASY, FRMD8 /// NEAT1 /// NEAT1_1 /// NEAT1_2 /// NEAT1_3 /// ENSG00000273834 /// AP000769.1 /// MALAT1 /// mascRNA-menRNA, AKR1B1, PF4 /// PPBP, PSD /// ENSG00000275957, RCHY1, SURF2, MRPL12 /// AC139530.2 /// SLC25A10, ARAF, NRG1, PIGH, GP9, UBALD1, POLDIP2, TRIM25 /// ENSG00000265238, DTX2 /// DTX2P1 /// DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11 /// UPK3BP1 /// PMS2P11 /// PMS2P9 /// AC007000.3 /// CCDC146, TRAM2, TRIM28 /// MIR6807,</p>

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVISE	Down regulation	AC068025.2 /// TAOK1 /// ENSG00000263719, GABPB1-AS1 /// ENSG00000264109, CISH, IDUA, MRPL15, ABT1, DNASE1L1 /// LAGE3, HMG20B, ENSG00000275684, LIX1L-AS1 /// AC243547.3 /// POLR3GL, ADO, GLOD4, U2AF1, CLU /// ENSG00000273705, CCDC124, HPCAL1, ANAPC2, ZNF879, DCUN1D2, LINC00094, MSTRG.34212, STAM2, BAD, ZNF592, HEXIM1, CRIP1 /// AL928654.4 /// C14orf80, SNAPIN

หมายเหตุ

1. /// แทน รหัสยีนอื่นๆ
2. MSTRG. แทน รหัสยีนที่โปรแกรมสร้างขึ้น

ตารางที่ 22 ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVKATE	Up regulation	ERBIN, MSTRG.18242, SIMC1, CCDC43, INTS4, MED10, MCU, LARP7, HNRNPA0, SETMAR, THAP2 /// AC073612.1 /// TMEM19, FCGR3A /// FCGR3B, NSDHL, LINC00959, COA6, MPHOSPH10, AC084033.3, MED25 /// ENSG00000277609, IGLV10-54, SNORD15B, DNLZ /// CARD9, TAF7, STPG4 /// CALM2, NFYC, ZNF567, CKS1B, TGFBR1, CDKN2AIPNL, LLPH /// AC078927.1 /// TMBIM4 /// ENSG00000282031, THOC5 /// NIPSNAP1, RAB5B /// SUOX, CARHSP1, NIT2, IMP4, AIDA, MT-TF, ATF7IP, SF3B3, ANAPC7 /// AC144548.2 /// ARPC3, ARHGEF7, NAT9, TMEM131, HABP4, ADTRP, HERC2P2, ATXN1L /// IST1, H2AFY, NSA2 /// RNU6-1330P, AC012254.1 /// HDHD2 /// AC012254.2 /// IER3IP1, CREM, MRPS5 /// ZNF514, KIAA1191, SLC38A9, BTLA, SNORD19, APH1A, PXMP2 /// AC135586.2 /// PGAM5, NUBP1, SIGMAR1, MFSD1 /// AC080013.1, GHITM, PKIG, AFG3L2, SEC31A /// THAP9-AS1, GGTA1P, IARS, MIR6797, CNIH4, ADIPOR2, RNGTT, HAT1, IDI1, PSMD10, ERAL1, NUP58, COMMD6, ZNF185, RAD1, CDKN1B, CKAP2, INO80B /// INO80B-WBP1 /// WBP1, SELL, RPF1, SNORA26, SLC8B1, MYL9, CHCHD1, TTC9C, NEMP1,

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVKATE	Up regulation	ARL8A, NHP2, SMARCD2, VCL, C2orf68, PEX13, LAG3, RCC1 /// SNHG3 /// SNORA73A /// SNORA73B, BEST1 /// AP003733.4, NELFCD, CFAP97, USP8, PIAS1, CD55 /// AL391597.1, FAM96A, ETV7, WASH4P /// MIR6859-4 /// Z84723.1 /// IL9RP3 /// POLR3K, INTS8, ACLY, PRDX4, CCDC17 /// GPBP1L1 /// RPS15AP10 /// AL604028.2, MDH2, AP003068.2, BCAT2, MBD4, ENSG00000278219 /// LINC00674 /// AC005332.9 /// AC005332.6 /// AC005332.8, DARS, ISCA2, TPI1, KCMF1, CCDC65, DEF8, GEMIN8, JKAMP, IGHV1-3, ACADM /// RABGGTB /// SNORD45C /// SNORD45A /// SNORD45B, CCT2, XRCC5, SRRD, OPA1, FYTTD1, EBPL, FAM192A, DDX23, SNN, ZKSCAN8, HPCAL1, ZC3H15, TAGLN2, HNRNPF, MRPL11, THRAP3, SMIM11A, MSTRG.41321, ATP6AP2, ITGB3 /// AC068234.1 /// EFCAB13, STRIP1, ALDH9A1 /// Y_RNA, C1orf43, EEF1D, TRAPPC2L, EXOSC5, AP000223.1 /// MRPL39, C14orf166, COQ10B, HADH, GDI2, GALNS, ESD, MAP3K7CL, AGPAT5, CDKN2AIP, E4F1, CCDC51 /// AC134772.1, POMP, F13A1, GALNT1, ITPA, MSTRG.49764, GLUD1, VILL, ATP5E /// PRELID3B, PSME2 /// ENSG00000276511, CFAP206 /// AL049697.1 /// SLC35A1, SMARCE1 /// AC073508.2 /// KRT222, CISD2, DICER1, NR3C1, IGHV6-1, PDIA6, AC233755.1, LINC00996 /// GIMAP8, EIF1AX, UBXN2B, IGKV2-29, DCPS, RPAIN, HPRT1, COX16 /// SYNJ2BP-COX16 /// SYNJ2BP, AP001628.1 /// WDR4, MSTRG.21022, SMIM5, LINC00623, ZNF143, CKS2, SRPRA, SART3, ZNF639, PPP1R11, H2AFZ, UTP18, MSTRG.21472, GID8, INTS7

หมายเหตุ

1. /// แทน รหัสยีนอื่นๆ
2. MSTRG. แทน รหัสยีนที่โปรแกรมสร้างขึ้น

ตารางที่ 23 ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ในการทดลองกลุ่มที่ 2 (OVKATE experiment) จากการวิเคราะห์ผล RNA-seq

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVKATE	Down regulation	TOM1, PLXNA1, TIMM8B, STX10, RAB11FIP3, ZNF428 /// CADM4, TOM1L2, PHF2, TPGS1, CTNNAL1, CC2D1B, MSTRG.29712, UGGT1, MFSD10, AP5Z1, STAT4, RBM22, IER5L, FAM172A /// ENSG00000251725 /// NPM1P27 /// POU5F2, CCDC88B, KIF21B, RTL5, MIB2, AL031670.1 /// RNF24, ASMTL, FYN, CALCOCO1, CENPB, LONP1, CDK2, SNHG22 /// SCARNA17 /// SCARNA18, FRMD8 /// NEAT1 /// NEAT1_1 /// NEAT1_2 /// NEAT1_3 /// ENSG00000273834 /// AP000769.1 /// MALAT1 /// mascRNA-menRNA, GNPTG, POFUT2, ZFAND5, SIRT7 /// MAFG, MSTRG.14034, BTN3A2 /// BTN2A2 /// BTN3A1 /// BTN3A3 /// BTN2A1, NBPF19, AC084117.1, ZC3H12C, ZNF420, VDR, TMEM94 /// ENSG00000265636 /// ENSG00000276372, PHYKPL, SEC23B, TKT, SLC25A25, SH3GLB2, SLCO3A1, TECRP1, MSTRG.5129, MSTRG.22918, FAM83D, SS18L1, ZNF337, VPS52, SLC41A2, RN7SL473P, FTH1P2, ITGA10 /// PEX11B /// RBM8A, TJAP1, PXN, TCF25 /// AC092143.4 /// MC1R /// AC092143.1 /// TUBB3 /// AFG3L1P, TRIM25 /// ENSG00000265238, PINK1 /// ENSG00000273695, KCTD18, MSTRG.49693, GNPAT, CIRBP, LEMD2, KRIT1 /// AC000120.1, SLC37A3, JADE1, MSTRG.6233, FASTK, AC092316.1, ARNTL, RAB5A, TCIRG1 /// MIR6753 /// AP002807.1, POP1, KLF6, ENSG00000281035 /// SNORD20, FUS, PAFAH1B1 /// RN7SL608P, CSNK1D, LINC00094, ACAD10 /// AC002996.1 /// ALDH2, WWP2, DPP9, WSB2, GPR68, HPSE, ABCC1, TMEM175, PAFAH2, CHTF8, SHOC2, EXOC5, ZNF786, TMEM52B, CASS4 /// RTFDC1 /// FAM209A /// AL109806.1 /// FAM209B, MSTRG.45365, TBC1D13, ADGRG5 /// AC018552.3 /// ADGRG1, PNPO /// AC018521.1 /// CDK5RAP3, C8orf44-SGK3 /// C8orf44 /// SGK3, SPI1 /// AC090559.1, PCNX3 /// MIR4690, AL121761.1 /// RIN2, PAM16 /// CORO7-PAM16 /// CORO7, MSTRG.28525, ABCA10 /// ABCA5, AC004847.1, EZH1, ALOX5, PIH1D1, EPHA1, ZYX, IL1R1, RN7SL600P, ENSG00000254667 /// GRAMD1B, NLRC3, PLXNB2, ZNF808 /// ZNF701 /// RPL39P34 /// ZNF137P, SUPT6H, RNU4ATAC18P, H3F3B /// ENSG00000263565,

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq
OVKATE	Down regulation	ARHGAP9, CYP20A1, MTRNR2L8, MYO1G /// SNHG15 /// SNORA9, GMPT2, MYSM1, AC020916.1 /// ENSG00000276797 /// MIR27A /// MIR23A, AC018638.5, TREM1, EPB41L3, AC006128.1, MSTRG.43238, CDKN1A, TRAF3 /// RNU6-1316P, JAML, GTF2H3 /// AC117503.3, JAK3, SOS2, CAPN15 /// MIR5587 /// MIR3176, NFIL3, MSTRG.38436, CPNE1 /// AL109827.1 /// RBM12 /// NFS1, VCP, AC008770.1, HM13 /// MCTS2P, MSTRG.29996, GUF1, AC037198.3, SYF2 /// RSRP1 /// AL031432.2 /// SDHDP6 /// AL928711.1, GOLGA8A /// GOLGA8B, INTS3 /// SLC27A3, PSMA3 /// AL132989.1, ANKRD13D, CLEC7A, GYG1, SMPD2, GNE, DNAJC11, KCTD20, FAM208A, TMEM214, GRB2, CBX7 /// COX5BP7

หมายเหตุ

1. /// แทน รหัสยีนอื่นๆ
2. MSTRG. แทน รหัสยีนที่โปรแกรมสร้างขึ้น

ตารางที่ 24 ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ร่วมกับ expression array ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผลร่วมกับ expression array	หมายเหตุ
OVISE	Up regulation	MEFV, SLC35F5, FBXO11, CD84, LAMP2, NUPL2, WDFY1, FXYD5, SNN, ACSL4, MAPRE1, TAX1BP3, CDKN1B, SERPINB1, RABGAP1L, PTPN7, GRINA, IL18, PICALM, FBXO8, APOBEC3B, HIF1A, RGS3, LY6G5C, YWHAZ, DEF6, CLIC4, GCH1, SEPT9, APOBEC3A, STIM1, VAMP3, RAB40C, MAN1A2, UBE2H, LILRB1, KLRC1, TSG101, MED18, CAST, GIMAP8, STX12, APBB1IP, ACTR1A, SECISBP2, PPM1B, CCM2, TGM2, VAV3, SLC25A24, CTNNB1, MARCH7, SSH1, ADPGK, CD302, ENTPD4	Odds Ratio = 1.46 p -value = 2.13×10^{-2}

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผลร่วมกับ expression array	หมายเหตุ
OVKATE	Up regulation	ANAPC7, PSME2, SYNJ2BP, DCPS, MPHOSPH10, SNN, PSMD10, MRPS5, POLR3K, ITPA, CDKN1B, SART3, HPCAL1, SMARCD2, GDI2, AFG3L2, C1orf43, CARHSP1, TPI1, NSDHL, APH1A, KIAA1191, GALNS, MDH2, IARS, TMEM19, EXOSC5, BCAT2, EBPL, DICER1, H2AFY, TAGLN2, IMP4, CCT2, RAB5B, COMMD6, SELL, GIMAP8, ATP5E, RABGGTB, ACADM, CARD9	Odds Ratio = 1.64 p -value = 9.83×10^{-3}

ตารางที่ 25 ข้อมูลรหัสยีนที่มีการแสดงออกลดลงจากการวิเคราะห์ผล RNA-seq ร่วมกับ expression array ด้วยโปรแกรม CU-DREAM X

การทดลอง	ทิศทางการแสดงออก	รหัสยีนจากการวิเคราะห์ผลร่วมกับ expression array	หมายเหตุ
OVISE	Down regulation	BAP1, KRTCAP2, SON, ITGA10, TAF6L, RBM8A, SAFB2, KIAA0355, SLC25A10, GTPBP6, IL27RA, TM7SF2, ABT1, GNAS, PIGH, JUND, CTDSP2, IDS, PTCRA, DTX2, AAAS, RING1, CXCL6, PARD6A, RCOR1, RAB11FIP3, TRIM25, NOL6, RBM12	Odds Ratio = 0.83 p -value = 3.75×10^{-1}
OVKATE	Down regulation	RIN2, ITGA10, RBM8A, CIRBP, CDKN1A, PLXNA1, DNAJC11, TREM1, BTN2A1, TBC1D13, WSB2, SLC25A25, H3F3B, RAB11FIP3, ALOX5, GNE, TRIM25, RBM12	Odds Ratio = 0.83 p -value = 4.72×10^{-1}

ตารางที่ 26 ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่สนใจจาก expression array

Probe ID	Gene Symbol	Mean1	Mean2	Fold change	Mean1 - Mean2	p -value
198312	<i>GIMAP8</i>	10.26521	9.016	1.138555	1.249208	1.66E-05
113157	<i>SNN</i>	14.72313	14.081	1.045602	0.642125	0.000915
121695	<i>CDKN1B</i>	15.55563	15.087	1.031062	0.468625	0.011033

ตารางที่ 27 ข้อมูลค่าการส่งออกของยีน SNV

กลุ่ม	รหัสตัวอย่าง	ΔCT	ค่าเฉลี่ย ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
ควบคุม	F04	5.529323578	5.534264565	0.725413565	0.604823702
	F04	5.539205551			
	F05	6.005893707	5.972708702	1.163857702	0.446317551
	F05	5.939523697			
	F06	3.798072815	3.780118942	-1.02873206	2.040230572
	F06	3.76216507			
	F07	3.438539505	3.479951859	-1.32889914	2.512109391
	F07	3.521364212			
	F08	3.949192047	4.10179615	-0.70705485	1.632468322
	F08	4.254400253			
	F09	4.138780594	4.132160187	-0.67669081	1.598469216
	F09	4.12553978			
	F10	5.26461792	5.25372982	0.44487882	0.734646096
	F10	5.242841721			
	F11	5.677215576	5.680547714	0.871696714	0.5465038
	F11	5.683879852			
	F12	4.641256332	4.654940605	-0.15391039	1.11258113
	F12	4.668624878			
	F13	5.21746254	5.498292923	0.689441923	0.620093737
	F13	5.779123306			
ทดลอง	OVC01	3.970460892	4.162716866	-0.64613413	1.564969219
	OVC01	4.354972839			
	OVC02	6.875972748	6.965470314	2.156619314	0.224281236
	OVC02	7.05496788			
	OVC03	6.257883072	6.193501472	1.384650472	0.382982314
	OVC03	6.129119873			
	OVC08	6.231719971	6.25216198	1.44331098	0.367722451
	OVC08	6.272603989			
	OVC09	5.30405426	5.369973183	0.561122183	0.677774829
	OVC09	5.435892105			
	OVC10	6.967124939	6.992133141	2.183282141	0.220174303
	OVC10	7.017141342			

กลุ่ม	รหัสตัวอย่าง	ΔCT	ค่าเฉลี่ย ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
ทดลอง	OVC12	5.395772934	5.342165947	0.533314947	0.690965316
	OVC12	5.28855896			
	OVC15	7.433586121	7.511804581	2.702953581	0.15357833
	OVC15	7.590023041			
	OVC18	7.270227432	7.442383766	2.633532766	0.161149027
	OVC18	7.6145401			
	OVC22	6.516439438	6.515769005	1.706918005	0.306313773
	OVC22	6.515098572			

ตารางที่ 28 ข้อมูลค่าการแสดงออกของยีน *GIMAP8*

กลุ่ม	รหัสตัวอย่าง	ΔCT	ค่าเฉลี่ย ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
ควบคุม	F04	10.09942	10.15331	0.452473	0.730789
	F04	10.20721			
	F05	9.845175	9.906095	0.205253	0.867387
	F05	9.967014			
	F06	12.29253	12.31167	2.610825	0.163706
	F06	12.33081			
	F07	11.85181	11.90378	2.202935	0.217195
	F07	11.95575			
	F08	9.189306	9.287636	-0.41321	1.331642
	F08	9.385965			
	F09	9.366913	9.419754	-0.28109	1.215111
	F09	9.472595			
	F10	9.544249	9.609518	-0.09132	1.065348
	F10	9.674788			
	F11	9.957298	10.53561	0.834765	0.560674
	F11	11.11392			
	F12	7.860907	7.98928	-1.71156	3.275154
	F12	8.117653			
	F13	10.9213	10.32154	0.620695	0.650358
	F13	9.721773			
F14	8.305563	8.28129	-1.41955	2.675025	
F14	8.257017				

กลุ่ม	รหัสตัวอย่าง	ΔCT	ค่าเฉลี่ย ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
ควบคุม	F15	8.916698	9.001368	-0.69947	1.623913
	F15	9.086037			
	F16	9.179945	9.186992	-0.51385	1.427856
	F16	9.194038			
	F17	9.119059	9.161194	-0.53965	1.453618
	F17	9.203329			
	F18	8.461927	8.443605	-1.25724	2.390375
	F18	8.425283			
ทดลอง	OVC01	7.717573	7.864373	-1.83647	3.571349
	OVC01	8.011173			
	OVC02	6.770733	7.096913	-2.60393	6.0794
	OVC02	7.423094			
	OVC03	9.044615	9.077044	-0.6238	1.540927
	OVC03	9.109472			
	OVC06	5.710215	5.734171	-3.96667	15.63461
	OVC06	5.758127			
	OVC08	6.196272	6.215334	-3.48551	11.20063
	OVC08	6.234396			
	OVC09	5.433151	5.438512	-4.26233	19.19063
	OVC09	5.443872			
	OVC10	9.093645	9.124772	-0.57607	1.490783
	OVC10	9.155899			
	OVC11	6.032543	6.037125	-3.66372	12.67328
	OVC11	6.041706			
	OVC12	6.162027	6.180422	-3.52042	11.47499
	OVC12	6.198816			
	OVC15	6.376968	6.400814	-3.30003	9.849348
	OVC15	6.42466			
	OVC16	5.650167	5.876269	-3.82457	14.16809
	OVC16	6.102371			
	OVC17	6.409744	6.449903	-3.25094	9.519856
	OVC17	6.490061			
OVC18	8.684774	8.707211	-0.99363	1.99119	
OVC18	8.729649				

กลุ่ม	รหัส ตัวอย่าง	ΔCT	ค่าเฉลี่ย ΔCT	$\Delta \Delta CT$	$2^{-\Delta \Delta CT}$
ทดลอง	OVC22	5.980906	6.046908	-3.65393	12.58762
	OVC22	6.112911			
	OVC23	6.137178	6.135937	-3.56491	11.83433
	OVC23	6.134695			
	OVC25	6.733898	6.744637	-2.95621	7.760802
	OVC25	6.755375			



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1. ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ นางสาวนัทธมนสนธิ
 เพศ หญิง
 วัน/เดือน/ปี 4 พฤศจิกายน 2534
 ที่อยู่ บ้านเลขที่ 24 หมู่ 13 ต.บางเสาธง อ.บางเสาธง
 จ.สมุทรปราการ 10540
 เบอร์โทรศัพท์ 0863342405
 อีเมล h2o_nam_ns@hotmail.com

2. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558 – 2560 วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์
 แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 พ.ศ. 2553 – 2557 วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต
 เกียรตินิยมอันดับ 1
 สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์
 มหาวิทยาลัยบูรพา

3. ประสบการณ์การทำงาน

16 มิ.ย. 2557 – ปัจจุบัน ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ หน่วยคลังเนื้อเยื่อ
 โรงพยาบาลจุฬารณณ์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY