

การศึกษาอัลลีโลพาธีของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก โดยใช้ชื่อแทนเคมีพีท โพลีเมอร์ฟิคมาร์กเกอร์

นางสาวจันทร์ทรา คณิตย์ุทวงศ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-278-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1700973x

ALLELOTYPE OF NASOPHARYNGEAL CANCER STUDIED BY  
USING SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHIC MARKERS (STRP)

MISS CHANTRA TANUNYUTTHAWONGSE

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Medical Science

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-278-3

Thesis Title ALLELOTYPE OF NASOPHARYNGEAL CANCER STUDIED BY  
USING SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHIC MARKERS(STRP)  
By Miss Chantra Tanunyutthawongse  
Programme Medical Science  
Thesis Advisor Associated Professor Dr. Tada Sueblinvong, M.D.  
Thesis coadvisor Dr. Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D


---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Master's Degree.


  
----- Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

  
----- Chairman

(Associate Professor Dr. Bungorn Chomdej, M.D., Ph.D.)

  
----- Thesis Advisor

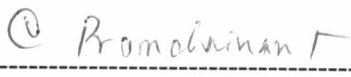
(Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong, M.D.)

  
----- Thesis co-advisor

(Dr. Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

  
----- Member

(Assistant Professor Wilai Anomasiri, M. Sc, Ph.D.)

  
----- Member

(Associate Professor Chinavorn Promchainant, DVM, M.Sc)

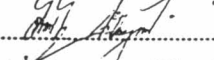
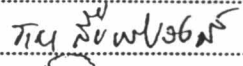
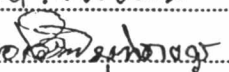
พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

จันทร์ทรา คณันท์อุทรวงศ์ : การศึกษาอัลลีโลไทป์ของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก โดยใช้รีพีทแทนแควม-รีพีทโพลีมอร์ฟิกมาร์กเกอร์ (NASOPHARYNGEAL CANCER STUDIED BY USING SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHIC MARKERS (STRP)) อ.ที่ปรึกษา: รศ.พญ.ธาดา สิบหลินวงศ์ อ.ที่ปรึกษาร่วม : คร.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร. 103 หน้า ISBN 974-633-278-3

การวิเคราะห์อัลลีโลไทป์ เป็นวิธีการที่ใช้สืบหาบริเวณของหน่วยพันธุกรรมที่มียีนตำแหน่งเรียงอยู่ ถูกนำมาศึกษาในมะเร็งหลังโพรงจมูกชนิดที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอปสไตน์บาร์ไวรัส การสูญเสียของเฮเทอโรไซโกทอัลลีลบีนแกนของโครโมโซม (แอลโอเอช) ทุกๆ โครโมโซมโดยใช้รีพีทแทนแควมรีพีทโพลีมอร์ฟิกมาร์กเกอร์ (เอสทีอาร์พี) ถูกทดสอบหลังจากเพิ่มขยายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจดีเอ็นเอจากผู้ป่วย 23 คนเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็ง และมีคัดเลือกจากผู้ป่วยรายเดียวกัน คัดเลือกเอสทีอาร์พีจำนวน 89 มาร์กเกอร์ที่กระจายอยู่ทั่วไปบนทุกๆ แกนของโครโมโซม ผลการทดลองทั้ง 23 รายพบแอลโอเอชบนโครโมโซม 3 พี และ 9 พี 65.20% และ 77% ตามลำดับ ขณะที่โครโมโซม 11 คิว, 13 คิว, 14 คิว และ 20 คิว พบแอลโอเอชเกิดขึ้น 36.40%, 38%, 37% และ 30% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแกนของโครโมโซม 1 พี, 6 พี, และ 17 พี แสดงแอลโอเอชระหว่าง 20-30%

การศึกษาในครั้งนี้พอจะสรุปได้ว่า แอลโอเอชเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญบนแกนของโครโมโซมอย่างน้อย 9 ตำแหน่งระหว่างกระบวนการเกิดมะเร็งหลังโพรงจมูก แสดงว่าน่าจะมียีนตำแหน่งเรียงอย่างน้อย 9 ยีนอยู่บนแกนของโครโมโซมทั้ง 9 แกน ดังกล่าว ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งหลังโพรงจมูกในระดับอนุ.

ภาควิชา .....  
สาขาวิชา ..... วิทยาศาสตร์การแพทย์ .....  
ปีการศึกษา ..... 2538 .....

ลายมือชื่อนิสิต   
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา   
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

## C645018 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHIC MARKERS/LOSS OF HETEROZYGOSITY /  
ALLELOTYPE/TUMOR SUPPRESSOR GENE/NASOPHARYNGEAL CANCER

CHANTRA TANUNYUTTHAWONGSE : ALLELOTYPE OF NASOPHARYNGEAL CANCER

STUDIED BY USING SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHIC MARKERS (STRP)..

THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.DR.TADA SUEBLINVONG, M.D., M.Sc.,

THESIS CO-ADVISOR : DR.APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D. 103 pp.

ISBN 974-633-278-3

An allelotype analysis, a method to identify the genomic regions containing candidate tumor suppressor genes was performed in Epstein-Barr-Virus-associated nasopharyngeal carcinoma (NPC). The losses of heterozygosity (LOH) on all autosomal arms using short tandem repeat polymorphic markers (STRPs) were tested after DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR). Twenty three NPC patients were examined for DNA from 23 primary tumor samples copaired with their own leukocytes. Eighty nine STRP markers distributed through all autosomal chromosome arms were used. In all 23 cases, chromosome arms 3p and 9p were demonstrated LOH 65.20% and 77%, while of 11q, 13q, 14q, and 20q were 36.40%, 38%, 37%, and 30%, respectively. In addition, chromosome arms 1p, 6p, and 17p exhibited LOH between 20-30%.

From this study, it may conclude that LOH occures significantly at least 9 loci during NPC carcinogenesis. Thus, at least 9 tumor suppressor genes are possibly involved with the evolution of NPC.

ภาควิชา.....

ลายมือชื่อนิติ..... 

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ทน สุวพงศ์

ปีการศึกษา..... 2538.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 



## ACKNOWLEDGEMENT

This thesis will never be successful without the valuable helps and understanding of the following persons whom I would like to express my deep gratitude to :

My advisor, Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong, the Department of Biochemistry and my Coadvisor Dr. Apiwat Mutirangura, the Department of Anatomy for their valuable advice, helpful guidances, suggestions, frank, keen interest and constant encouragement throughout the course of this study.

I am also deeply grateful to Associated Dr. Narin Voravud, Medical Oncology unit, Department of Medicine, Chulalongkorn University for his suggestion and permission to use his laboratory space. In addition, I am grateful to Associated Professor Dr. Bungorn Chomdaj, Assistant Professor Wilai Anomasiri and Associated Professor Chinvorn Promchainant for serving as my committee and for their valuable discussions and suggestions.

I also wish to express my special thanks to Mr. Anucha Karnthaworn, Miss Sanegsoon Tirekapan, Scientist and Technician and Mr. Nonnarit Tanulanon, Miss Khaunta Panluksa and my friends, whose names can not be fully listed for their helps and cheerfulness.

Finally, I would also like to give extra special thanks to my parents and friends for their infinite love, understanding and cheerfulness given to me through my graduate study.

## TABLE OF CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	IV
ABSTRACT (ENGLISH).....	V
ACKNOWLEDGEMENT.....	VI
CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	VIII
LIST OF FIGURES.....	IX
LIST OF ABBREVIATIONS.....	X
 CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. BACKGROUND.....	7
III. MATERIALS AND EQUIPMENTS.....	32
IV. METHODS.....	37
V. RESULTS.....	48
VI. DISCUSSION.....	63
VII. CONCLUSION.....	73
REFERENCES.....	74
APPENDIX.....	93
AUTHOR BIBLIOGRAPHY.....	103

## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Two classes of genes involved in carcinogenesis.....	19
2. Some proto-oncogenes and their modes of action.....	22
3. Cloned familial cancer genes.....	27
4. Unclassified but mapped familial cancer genes.....	27
5. Exhibited LOH in some human tumours.....	31
6. List of STRP loci for allelotyping study.....	45
7. Patient details : Age, sex, presence of EBV genome, EBV type, tumour histology type, and TNM stage.....	49
8. Allelotyping results for all tumours at all loci.....	53



## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. Trends of cancer patients in Thailand during 1970 - 1993.....	2
2. Leading cancer in male at Chulalongkorn hospital 1993.....	10
3. The 10 leading site of cancer in male in Bangkok 1993.....	11
4. Multistep process involving in carcinogenesis.....	16
5. An example of multistep model of colorectal carcinogenesis.....	18
6. A schematic representation of event leading to loss of heterozygosity (model of two hit hypothesis proposed by Knudson).....	25
7. Variation in length of the number of STRP.....	29
8. The analysis of LOH pattern in tumor specimen by using STRPs.....	30
9. Percentage of loss of heterozygosity on individual chromosome arms.....	59
10. An example of autoradiograms of LOH.....	60
11. An example of autoradiograms of multiplex PCR .....	61
12. An example of autoradiograms of microsatellite instability (MSI) .....	62

## LIST OF ABBREVIATIONS

bp	Base pair
°C	Degree Celsius
Ci	Curie
cm	Centimetre
cm <sup>3</sup>	Cubic centimetre
EBER	Epstein-Barr virus encoded RNAs
EBNA	Epstein-Barr virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr virus
g	Gram
L	Litre
LOH	Loss of heterozygosity
M	Molar
µg	Microgram
µl	Microlitre
µM	Micromolar
mg	Milligram
ml	Millilitre
mmole	Millimole
mM	Millimolar
MW	Molecular weight
NKC	Nonkeratinizing carcinoma
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NPC	Nasopharyngeal carcinoma
OD	Optical density
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
rpm	Revolution per minute
SCC	Squamous cell carcinoma
STRP	Short tandem repeat polymorphic marker
UC	Undifferentiated carcinoma
UNCT	Undifferentiated carcinoma of the nasopharyngeal type
W	watt
WHO	World Health Organization