



**วารสารโรคมะเร็ง**  
THAI CANCER JOURNAL



ISSN 0125-2038

**มูลนิธิวิจัยโรคมะเร็งเพื่อสถาบันมะเร็งแห่งชาติ**

**บรรณาธิการ**

ธีรวุฒิ คุณะเปรมะ

**ผู้ช่วยบรรณาธิการ**

จรัญญา งามขำ

ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง

เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์

**คณะบรรณาธิการ**

กิตติศักดิ์ เทพสุวรรณ

กวิญ ลีละวัฒน์

दनัย ทิวาเวช

ถวิล กลิ่นวิมล

ธนเดช สินธุเสก

ธนู ลอบันดิส

ประเสริฐ เลิศสงวนสินชัย

ประติรพ ปุณโณทก

บัญญัติรัตน์ ลามวงษ์วัฒนา

เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล

วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์

วิสิทธิ์ สุภครพงษ์กุล

วีรวุฒิ อิมสำราญ

วิจิต อภรณ์วิรัตน์

วุฒิ สุเมธโชติเมธา

วสันต์ ลีนะสมิต

สมเกียรติ ลลิตวงศา

สมจินต์ จินดาวิจักษณ์

สมชาย ธนะสิทธิชัย

สุดสวาท เลหาวิณีจ

สุพล มโนรมณ์

สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์

อนันต์ กรลักษณ์

อาคม ชัยวีระวัฒน์

อารีย์ ประสิทธิพงษ์

อรชร เอี่ยมอารีรัตน์

อรรณสิทธิ์ ศรีสุบัติ

**ผู้จัดการ**

วิษณุ ปานจันทร์

**ผู้ช่วยผู้จัดการ**

มลีนี สนธิไชย

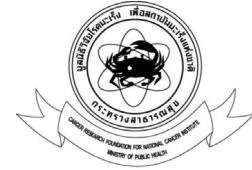
จุฑารัตน์ ไช้ทา

**พิมพ์ที่ บริษัท โฆสิตการพิมพ์ จำกัด**

373 ถ.เจริญสนิทวงศ์ แขวงบางอ้อ เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700 โทร. 0-2424-8715, 0-2433-3011



วารสารโรคมะเร็ง  
THAI CANCER JOURNAL



ISSN 0125-2038

Cancer Research Foundation for National Cancer Institute

### Editor-in-Chief

Thiravud Khuhaprema

### Assistant Editors

Jarunya Ngamkham

Suleeporn Sangrajrang

Saowakon Sukarayodhin

Sunanta Chariyalertsak

### Editorial Board

Kitisak Thepsuwan

Kawin Leelawat

Danai Tiwawech

Tawin Klinvimol

Tanadej Sinthusake

Dhanoo Lawbundis

Prasert Lertsanguansinchai

Pratirop Poonotoke

Punyarat Lapvongwatana

Petcharin Srivatanakul

Vajarabhongsa Bhuddisawasdi

Wisit Supakarapongkul

Weerawut Imsamran

Vichit Arpornwirat

Wutthi Sumetchotimaytha

Vasant Linasmita

Somkiat Lalitwongsa

Somjin Chindavijak

Somchai Thanasitthichai

Sudsawat Laohavinij

Suphon Manoromana

Suwat Chariyalertsak

Anant Karalak

Arkom Chaiwerawattana

Aree Prasitthipayong

Orachorn Aimarreerat

Attasit Srisubat

### Managing Editor

Visnu Panchan

### Assistant Managers

Malinee Sontichai

Chutarat Khaita

**KOSIT PRESS COMPANY LIMITED**

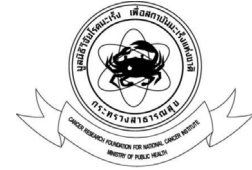
373 Charansanitwong Rd., Bang-ow, Bangplad, Bangkok 10700 Tel. 0-2424-8715, 0-2433-3011



**วารสารโรคมะเร็ง**  
THAI CANCER JOURNAL



- วัตถุประสงค์** เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ ผลงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็ง และอื่นๆที่เกี่ยวข้อง
- สำนักงาน** สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ  
268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400  
โทร. 0-2202-6800 ต่อ 2205  
โทรสาร 0-2644-9097
- เว็บไซต์เผยแพร่** [www.nci.go.th](http://www.nci.go.th), [www.kmnci.com/km/](http://www.kmnci.com/km/),  
<http://thailand.digitaljournals.org/index.php/TCJ>
- กำหนดการตีพิมพ์** กำหนดออกทุก 3 เดือน ปีละ 4 ฉบับ (มกราคม-มีนาคม,  
เมษายน-มิถุนายน, กรกฎาคม-กันยายน, ตุลาคม-ธันวาคม)
- การส่งต้นฉบับ** บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง  
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400  
โทร. 0-2202-6800 ต่อ 2205  
โทรสาร 0-2644-9097  
E - mail : [thaicancerj@gmail.com](mailto:thaicancerj@gmail.com)
- การบอกรับเป็นสมาชิก**
- ห้องสมุดและหน่วยงานราชการแจ้งความจำนงได้ที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็งโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
  - หน่วยงานเอกชนและผู้สนใจส่งแบบฟอร์มสมัครสมาชิกที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง อัตราค่าสมาชิก 200 บาท ต่อปี (4 ฉบับ) รวมค่าจัดส่งและโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาริบัติ เลขที่บัญชี 026-228501-4  
ชื่อบัญชี เงินสำรองจ่ายของมูลนิธิวิจัยโรคมะเร็ง



## สารบัญ Content

ปีที่ 36 ฉบับที่ 3

กรกฎาคม-กันยายน 2559

หน้า

### นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

- การเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสี  
ในโรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชการุณย์ 81  
*กมลรัตน์ ลีดี, วลสุตา โพเย็น, นภาพร ทรัพย์เจริญ, นุชจรี ปลื้มประเสริฐกุล,  
กานจ้พิชชา ชูศรีเลิศ, ภาวินี มหาสิทธิวัฒน์*
- ความสัมพันธ์ทางคลินิกของยีน PIK3CA ที่กลายพันธุ์ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 91  
*อดิศร เจษฎาปิยะวงศ์, สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, อนันต์ กรลักษณ์, อาทิตย์ ทิมอ่วม,  
สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, เพ็ญศรี แซ่หลี่, วิมล สุขตั้งมั่น, สมชาย ธนะสิทธิชัย*
- การตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ในเซลล์ปากมดลูก 104  
ที่พบความผิดปกติในระยะต่าง ๆ  
*จัญญา งามขำ, มณีรัตน์ มัสสุดี, ญัฐพล ลาวจันทร์, กฤติกา บุญมาก,  
เทียนแสง พันธุ์ศรี*

### บทพินิจวิชาการ (Review Articles)

- การแสดงออกของยีนเป้าหมายใหม่ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย 116  
*นันทนา มีศิริพันธุ์*
- คำแนะนำการส่งต้นฉบับ 122
- หนังสือแจ้งความจำนงลงโฆษณาในวารสารฯ 124
- ใบสมัครสมาชิก/ใบต่ออายุสมาชิกวารสารฯ 125

## การเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ได้รับการฉายรังสีในโรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชการุณย์

กมลรัตน์ ลีดี

वलสุตา โพเย็น

นภาพร ทรัพย์เจริญ

นุชจรี ปลื้มประเสริฐกุล

กานัจพิชชา ชุศรีเลิศ

ภาวินี มหาสิทธิวัฒน์

**บทคัดย่อ** การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ retrospective cohort study มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการลดลงของน้ำหนักตัวและปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสีที่โรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชการุณย์ เพื่อนำไปสู่การพัฒนารูปแบบการดูแลผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพต่อไป การศึกษานี้เป็นการศึกษาข้อมูลแบบย้อนหลังระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2559 โดยเก็บข้อมูลน้ำหนักตัวและปัจจัยต่างๆที่อาจเกี่ยวข้อง ตั้งแต่เริ่มทำจำลองการรักษาระหว่างฉายรังสีทุกวัน และหลังฉายรังสีรักษาครบ 1 เดือน มีผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 20 ราย จำแนกตามตำแหน่งก้อนมะเร็งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ nasopharynx 11 ราย และ non-nasopharynx 9 ราย ผลการศึกษาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง (น้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวในวันที่จำลองการรักษา) ได้แก่ 1) ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง พบว่าผู้ป่วยมีน้ำหนักตัวลดลงระดับรุนแรงเมื่อก้อนมะเร็งอยู่บริเวณ nasopharynx 5 ราย จาก 11 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม non-nasopharynx 2 ราย จาก 9 ราย 2) การฉายรังสีร่วมกับการให้รับยาเคมีบำบัด พบน้ำหนักตัวลดลงระดับรุนแรง 7 ราย จาก 18 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มที่ได้รับรังสีรักษาอย่างเดียว 3) การสนับสนุนด้านโภชนาการโดยการทำสายให้อาหารทางหน้าท้อง (percutaneous endoscopic gastrostomy : PEG) ในผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา พบว่าผู้ป่วยที่ทำ PEG มีอัตราการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง 6 ราย จาก 16 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำ PEG และไม่ได้สายให้อาหารทางจมูก (nasogastric tube : NGT) พบ 1 ราย จาก 2 ราย และสภาวะการลดลงของน้ำหนักตัวจะแปรผันตามจำนวนครั้งของการฉายรังสี ซึ่งช่วงเวลาที่มีน้ำหนักตัวลดลงต่ำมากที่สุดคือ หนึ่งเดือนหลังการฉายรังสีครบ (วารสารโรคมะเร็ง 2559;36:81-90)

คำสำคัญ: ภาวะน้ำหนักตัวลด มะเร็งศีรษะและลำคอ การฉายรังสี การฉายรังสีร่วมกับการให้รับยาเคมีบำบัด การทำสายยางให้อาหารทางหน้าท้อง

## Weight Loss in Head and Neck Cancer Patients Undergoing Radiotherapy at Siriraj Piyamaharajkarun Hospital

by Kamolrath Leedee, Walasuda Phoyen, Napaporn Trubcharean,  
Nuchjaree Pleamprasertkun, Karnpicha Chusrilert, Pawinee Mahasittiwat  
Radiation Therapy Center, Siriraj Piyamaharajkarun Hospital, Bangkok

**Abstract** This retrospective cohort study investigated weight-loss status and associated factors in head- and neck-cancer patients undergoing radiotherapy at Siriraj Piyamaharajkarun Hospital, Bangkok. Patient data for the period January 2015 to March 2016 were reviewed. Data regarding weight and associated factors were collected for the date of computer tomography simulation, date of treatment, and one month after completion of radiotherapy. In all, there were 20 head- and neck-cancer patients, who were categorized by cancer site into two groups--11 patients with nasopharynx and 9 patients with non-nasopharynx. The study found that the factors associated with severe bodyweight loss (loss > 5% on CT simulation date) were 1) tumor site; severe bodyweight loss was found in 5 of 11 nasopharynx cases and 2 of 9 non-nasopharynx cases; 2) undergoing concurrent chemo-radiation; severe bodyweight loss was detected in 7 of 18 cases in this group, but not in the "radiation alone" group; 3) nutrition support via percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) in concurrent chemo-radiation patients; severe bodyweight loss was found in 6 of 16 patients who acquired nutrition via PEG and in 1 of 2 patients who did not receive nutrition via nasogastric tube or PEG. Moreover, weight-loss status varied by radiotherapy fraction. The lowest weight loss was found about one month after completion of radiotherapy. (*Thai Cancer J 2016;36:81-90*)

**Keywords:** weight loss, head and neck cancer, radiotherapy, concurrent chemo-radiation, percutaneous endoscopic gastrostomy

### บทนำ

ในแต่ละปีมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอมากกว่า 550,000 รายทั่วโลก<sup>1</sup> จากสถิติขององค์การอนามัยโลก ระบุว่าประเทศไทยมีผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งศีรษะและลำคอมากกว่า 12,000 รายต่อปี นับเป็นอันดับ 4 ในเพศชายและอันดับ 7 ในเพศหญิง<sup>2</sup> ตำแหน่งการเกิดโรคมะเร็งได้แก่ ริมฝีปาก (lip) ช่องปาก (oral cavity) คอหอย (pharynx) กล่องเสียง (larynx) และโพรงข้างจมูก (paranasal sinuses)<sup>3</sup>

การรักษาโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ ได้แก่ การผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัด การฉายรังสี หรืออาจจะเป็นการรักษาาร่วมกัน ซึ่งแต่ละวิธีการรักษาอาจจะมีผลข้างเคียง

กับภาวะโภชนาการได้ เช่น หลังการผ่าตัดอาจทำให้เกิดความเจ็บปวดหรือมีปัญหาเรื่องการเคี้ยวและการกลืนได้ การได้รับยาเคมีบำบัดอาจชักนำให้เกิดเยื่อช่องปากอักเสบ คลื่นไส้ อาเจียน ปากอักเสบ อ่อนเพลีย หรือภาวะเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลต่ำนำไปสู่การติดเชื้อ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของภาวะทุพโภชนาการได้ การฉายรังสีอาจชักนำให้เกิดเยื่อช่องปากอักเสบ การรับรสผิดปกติ ภาวะน้ำลายแห้ง น้ำลายเหนียว ติดเชื้อ อ่อนเพลีย การตีบตัน การรับกลิ่นผิดปกติ ซึ่งทำให้ภาวะโภชนาการลดลงอย่างมาก การรักษาด้วยการให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสีก็ยิ่งทำให้ผลกระทบเหล่านี้เพิ่มขึ้น<sup>4</sup>

การลดลงของน้ำหนักตัวระหว่างการรักษา มากกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนักตัวในช่วง 6 เดือนก่อนรับการฉายรังสี อาจทำให้เกิดภาวะทุพโภชนาการในระดับรุนแรง ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลง<sup>5</sup> อาจต้องหยุดพักการรักษาทำให้ไม่เป็นไปตามแผนที่วางไว้ และส่งผลให้ผลการรักษาไม่มีประสิทธิภาพ<sup>6-8</sup> จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของน้ำหนักตัวกับอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอพบว่า การลดลงของน้ำหนักตัวที่รุนแรงระหว่างได้รับการฉายรังสีสัมพันธ์กับการลดลงของอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ( $P < 0.05$ )<sup>9</sup>

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการลดลงของน้ำหนักตัวและปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสี

## วัตถุประสงค์และวิธีการ

### กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอทุกรายที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีเพื่อหวังผลหายขาดที่โรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชกฤณย์ ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2559 ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ของการศึกษานี้คือผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสีแบบ conventional fractionation (CF) ปริมาณรังสี 2.0-2.12 เกรย์ต่อครั้ง ปริมาณรังสีเมื่อสิ้นสุดประมาณ 60-70 เกรย์ ใช้เวลาในการฉายรังสีประมาณ 6-7 สัปดาห์ครบตามแผนการรักษาของแพทย์ ส่วนเกณฑ์การคัดออกคือผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่มารับการฉายรังสีเพื่อประคับประคอง

หรือได้รับการฉายรังสีไม่ครบตามแผนการรักษาของแพทย์ การศึกษานี้จำแนกกลุ่มตัวอย่างตามตำแหน่งก้อนมะเร็งเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ nasopharynx และ non-nasopharynx (ได้แก่ nasal cavity, oropharynx, hard palate, BOT, supraglottic, tonsil และ larynx) โครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติให้สามารถเก็บข้อมูลได้จากผู้อำนวยการโรงพยาบาลศิริราช ปิยมหาราชกฤณย์แล้ว

ผู้ป่วยทุกรายเข้าร่วมโครงการการให้คำปรึกษาทางโภชนาการสำหรับผู้ป่วยรังสีรักษา ซึ่งมีแนวทางการปฏิบัติดังนี้ ผู้ป่วยจะได้รับการนัดวันและเวลาเพื่อเข้าพบนักกำหนดอาหารภายในสัปดาห์แรกของการฉายรังสีและพยาบาลติดตามประเมินการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของผู้ป่วยวันละหนึ่งครั้ง เปรียบเทียบน้ำหนักผู้ป่วยกับวันที่ทำเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เพื่อจำลองการรักษาและปฏิบัติตามแนวทางดังนี้คือ ถ้าน้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 1 ให้ติดตามปริมาณการรับประทานอาหารของผู้ป่วย และถ้าน้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 2 ให้รายงานแพทย์เจ้าของไข้และประสานงานกับนักกำหนดอาหารเพื่อให้คำปรึกษา

### วิธีการรักษา

ผู้ป่วยทุกรายได้รับการฉายรังสีแบบ conventional fractionation (CF) ปริมาณรังสี 2.0-2.12 เกรย์ต่อครั้ง ปริมาณรังสีเมื่อสิ้นสุดประมาณ 60-70 เกรย์ ใช้เวลาในการฉายรังสีประมาณ 6-7 สัปดาห์ โดยเป็นการฉายรังสีอย่างเดียวหรือการฉายรังสีร่วมกับการใช้ยาเคมีบำบัด (concurrent chemo-radiation) ขึ้นอยู่กับแผนการรักษาของแพทย์

ผู้ป่วยมะเร็งกลุ่ม nasopharynx ได้รับการ

ฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดสูตรยาเคมีบำบัดคือ cisplatin ทุกสามสัปดาห์และเมื่อฉายรังสีครบ ผู้ป่วยได้รับยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริม (adjuvant chemotherapy) โดยมีสูตรยาเคมีบำบัดคือ Cisplatin+5FU อีกสามรอบ

ผู้ป่วยมะเร็งกลุ่ม non-nasopharynx ได้รับการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด สูตรยาเคมีบำบัดคือ Cisplatin ทุกสามสัปดาห์โดยที่ไม่มีการให้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริมภายหลังการฉายรังสีครบ

### การเก็บรวบรวมข้อมูล

การศึกษานี้เป็นการเก็บข้อมูลแบบย้อนหลัง จากแบบบันทึกเวชระเบียนอิเล็กทรอนิกส์ การเก็บข้อมูลน้ำหนักตัวเริ่มตั้งแต่วันที่ผู้ป่วยเริ่มทำการรักษา (CT simulation) ทุกวันที่มารับการฉายรังสี และหลังฉายรังสีครบ 1 เดือน เมื่อได้น้ำหนักตัวในแต่ละวัน นำมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยรายสัปดาห์เพื่อนำมาแสดงเป็นกราฟจนครบตามแผนการรักษา

วิธีการคำนวณน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงคือ

$$\frac{\text{น้ำหนักตัวปัจจุบัน} - \text{น้ำหนักตัวในวันที่จำลองการรักษา}}{\text{น้ำหนักตัวในวันที่จำลองการรักษา}} \times 100\%$$

การลดลงของน้ำหนักตัวในแต่ละวันสามารถจำแนกได้ 2 ระดับ โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวในวันที่จำลองการรักษาได้แก่ระดับไม่รุนแรงคือน้ำหนักตัวลดลงน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวในวันที่จำลองการรักษา และระดับรุนแรงคือน้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวในวันที่จำลองการรักษา<sup>10-11</sup>

### การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาข้อมูลแบบย้อนหลังแบบ retrospective cohort study การวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสีใช้การแจกแจงความถี่ ร้อยละ และกราฟ เพื่อดูสภาวะการลดลงของน้ำหนักตัวว่าอยู่ในระดับใด และมีปัจจัยใดที่มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักตัว

### ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2559 มีผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 20 ราย ลักษณะผู้ป่วยดังตารางที่ 1 โดยเป็นเพศชาย 15 ราย (ร้อยละ 75) เพศหญิง 5 ราย (ร้อยละ 25) อายุระหว่าง 35-77 ปี เฉลี่ย 57.6 ปี พบผู้ป่วยเป็นมะเร็ง nasopharynx 11 ราย (ร้อยละ 55) และ non-nasopharynx 9 ราย (ร้อยละ 45) ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีรักษาอย่างเดียว 2 ราย โดยรังสีรักษาเป็นการรักษาหลัก 1 ราย และได้รับการฉายรังสีหลังการผ่าตัด 1 ราย ผู้ป่วย 18 รายได้รับการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) ได้รับการทำสายให้อาหารทางหน้าท้อง (percutaneous endoscopic gastrostomy : PEG) ก่อนรังสีรักษา โดยผู้ป่วย 2 รายที่ได้รับรังสีรักษาอย่างเดียวไม่ได้รับการทำ PEG และไม่ใส่สายให้อาหารทางจมูก (nasogastric tube : NGT)

กลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง nasopharynx พบการเกิดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงมากกว่ากลุ่ม non-nasopharynx คือ 5/11 ราย (ร้อยละ 45) และ

2/9 ราย (ร้อยละ 22) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดพบมีการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง 7/18 ราย (ร้อยละ 39) แต่ไม่พบในกลุ่มที่ได้รับรังสีรักษาอย่างเดียว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด 2 และ 3 รอบพบผู้ป่วยเกิดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง 3/8 ราย (ร้อยละ 37) และ 4/10 ราย (ร้อยละ 40) ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดกลุ่มที่ทำ PEG มีร้อยละการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงต่ำกว่า

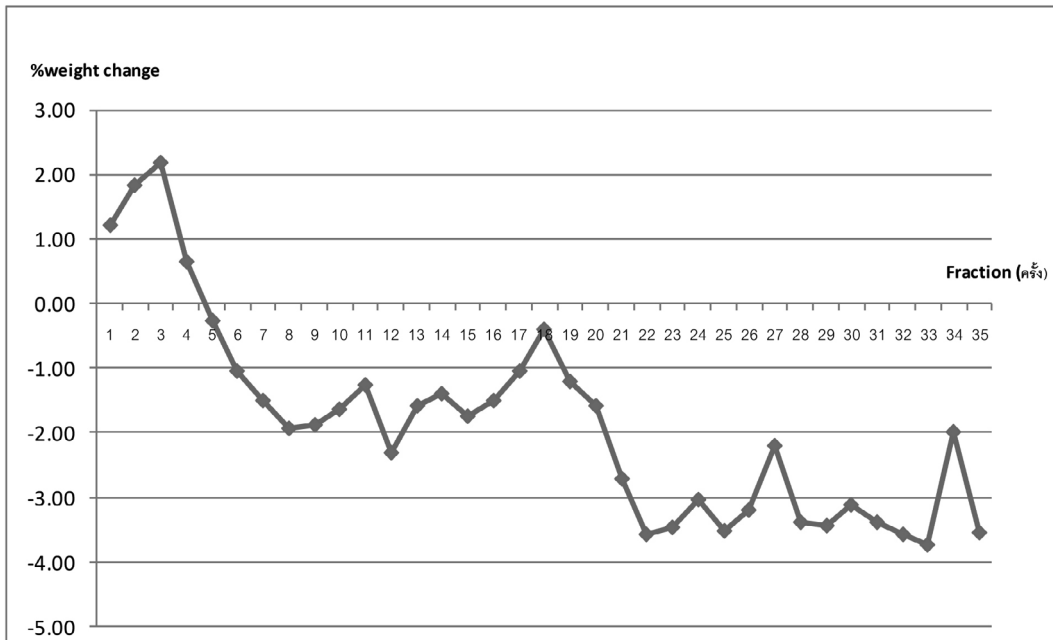
กลุ่มที่ไม่ทำ PEG และไม่ใส่สาย NGT คือ 6/16 ราย (ร้อยละ 37) และ 1/2 ราย (ร้อยละ 50) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว พบว่าสภาวะการลดลงของน้ำหนักตัวแปรผันตามจำนวนครั้งของการฉายรังสี คือ ลดลงมากขึ้นเมื่อได้รับการฉายรังสีมากขึ้น เมื่อติดตามน้ำหนักตัวของผู้ป่วย หลังจากฉายรังสีครบพบว่าช่วงเวลาผู้ป่วยจะมีน้ำหนักตัวลดลงต่ำมากที่สุดคือหนึ่งเดือนหลังการฉายรังสีครบ (รูปที่ 2)

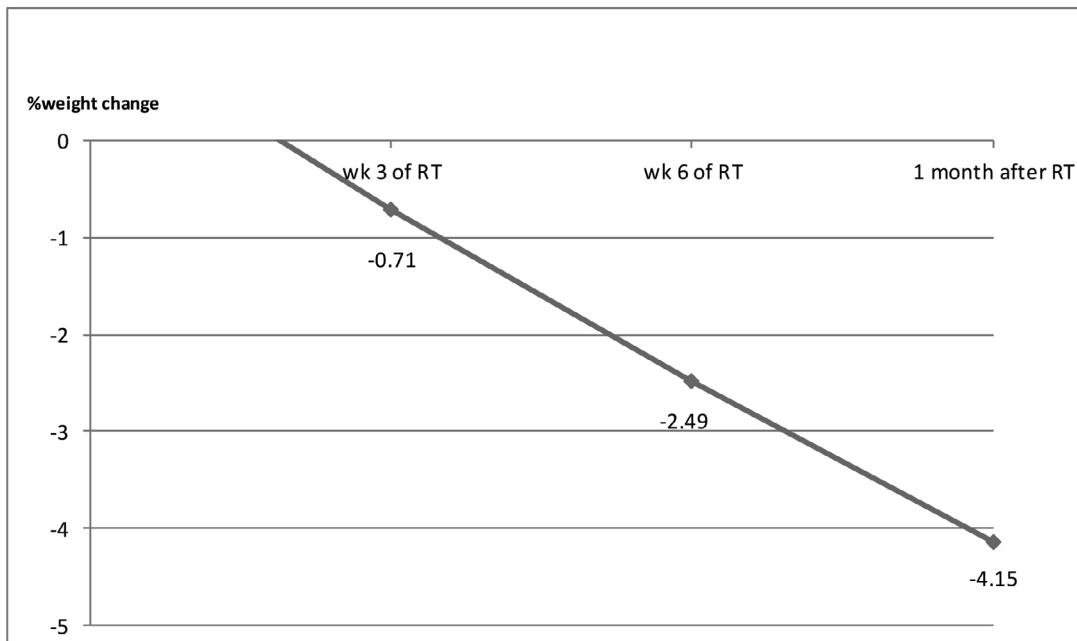
ตารางที่ 1 แสดงลักษณะผู้ป่วยตำแหน่งของก้อนมะเร็ง การทำ PEG และแผนการรักษา

ลักษณะผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด N (%)	น้ำหนักตัวลดลง ระดับรุนแรง N (%)	น้ำหนักตัวลดลง ระดับไม่รุนแรง N (%)
<b>เพศ</b>			
ชาย	15 (75)	6 (40)	9 (60)
หญิง	5 (25)	1 (20)	4 (80)
<b>อายุ</b>			
อายุเฉลี่ย	57.6	60.28	54.76
<b>ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง</b>			
Nasopharynx	11 (55)	5 (45)	6 (55)
Non-nasopharynx	9 (45)	2 (22)	7 (78)
<b>แผนการรักษา</b>			
Radiation therapy + chemotherapy	18 (90)	7 (39)	11 (61)
Radiation therapy alone	2 (10)	0 (0)	2 (100)
- Definitive radiation therapy	1 (5)	0 (0)	1 (100)
- Post operative radiation therapy	1 (5)	0 (0)	1 (100)
<b>จำนวนการให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี</b>			
1 รอบ	0	0 (0)	0 (0)
2 รอบ	8 (44)	3 (37)	5 (63)
3 รอบ	10 (56)	4 (40)	6 (60)
<b>การทำ PEG</b>			
ทำ PEG ก่อนเริ่มฉายรังสี	16 (80)	6 (37)	10 (63)
ไม่ทำ PEG และไม่ใส่สาย NGT	4 (20)	1 (25)	3 (75)
<b>กลุ่มที่ได้ radiation therapy + chemotherapy</b>			
ทำ PEG ก่อนเริ่มฉายรังสี	16 (89)	6 (37)	10 (63)
ไม่ทำ PEG และไม่ใส่สาย NGT	2 (11)	1 (50)	1 (50)
<b>โรคประจำตัว</b>			
เบาหวาน	4 (20)	1 (25)	3 (75)
ไม่เป็นเบาหวาน	16 (80)	6 (37)	10 (63)

PEG: percutaneous endoscopic gastrostomy, NGT: nasogastric tube



รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอตามจำนวนครั้งของการฉายรังสี



รูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอระหว่างฉายรังสี และหลังฉายรังสีครบ

## วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้พบว่าภาวะน้ำหนักตัวลดในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสีเกิดจากปัจจัย 3 อย่างได้แก่ ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง การได้รับยาเคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา และการสนับสนุนด้านโภชนาการโดยการทำสายให้อาหารทางหน้าท้อง (PEG)

จากการศึกษาของ Beaver ME และคณะ<sup>12</sup> พบว่าตำแหน่งของก้อนมะเร็งที่บริเวณ nasopharynx มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก้อนที่ตำแหน่งอื่น สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงในกลุ่มมะเร็ง nasopharynx มากกว่ากลุ่ม non-nasopharynx (ร้อยละ 45 ต่อร้อยละ 22) ซึ่งน่าจะเกิดจากพื้นที่ในการฉายรังสีที่แตกต่างทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ต่างกัน โดยเฉพาะเยื่อช่องปากอักเสบ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ ผู้ป่วยอายุน้อยมีดัชนีมวลกาย (BMI) สูงก่อนการรักษาภาวะของโรคมะเร็งระยะลุกลาม และมีการกระจายที่ต่อมน้ำเหลือง เหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงสูงในการเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดระหว่างการฉายรังสี<sup>13,14</sup>

การศึกษานี้พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่รักษาด้วยการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดมีการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง 7/18 ราย (ร้อยละ 39) ในขณะที่พบว่ากลุ่มที่ได้รับรังสีรักษาอย่างเดียวไม่พบการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chan AT และคณะ<sup>15</sup> ซึ่งศึกษาแบบสุ่มเพื่อเปรียบเทียบวิธีการรักษาผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอระหว่างการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด และการฉายรังสีอย่างเดียว พบการลดลงของน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญ

คือ กลุ่มที่รักษาด้วยการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดมีน้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 10 (ร้อยละ 74) และน้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 20 (ร้อยละ 11) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉายรังสีอย่างเดียวพบร้อยละ 50 และ 6 ตามลำดับ โดยการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง เม็ดเลือดขาวต่ำ เกล็ดเลือดต่ำ คลื่นไส้ อาเจียน และเยื่อช่องปากอักเสบ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปัจจัยที่สามเป็นการสนับสนุนด้านโภชนาการโดยการทำสายให้อาหารทางหน้าท้อง (PEG) จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการทำ PEG ก่อนเริ่มการฉายรังสีสามารถช่วยลดการเกิดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงระหว่างได้รับการฉายรังสีได้<sup>10,16-18</sup> การศึกษาของ Ottosson S และคณะ<sup>18</sup> รายงานว่าผู้ป่วยมีน้ำหนักตัวลดลงถึงร้อยละ 11.3 ในช่วงตั้งแต่เริ่มการฉายรังสีจนถึงห้าเดือนหลังฉายรังสีครบ (acute phase) และพบว่ามี 3 ปัจจัยสำคัญที่คาดการณ์การลดลงของน้ำหนักตัว คือ ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง น้ำหนักตัวเกิน/อ้วน หรือไม่ใส่สายให้อาหารตั้งแต่เริ่มการฉายรังสี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโอกาสน้ำหนักตัวลดลงสูงกว่ากลุ่มอื่น และพบว่าผู้ป่วยที่ทำ PEG มีความถี่การลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ทำ PEG และไม่ใส่สาย NGT โดยพบร้อยละ 37 (6/16 ราย) และร้อยละ 50 (1/2 ราย) ตามลำดับ นอกจากนั้น Salas S และคณะ<sup>19</sup> ยังรายงานด้วยว่าผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่รักษาด้วยการฉายรังสีร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดพบกลุ่มผู้ป่วยที่ทำ PEG สามารถเพิ่มคุณภาพชีวิต

หลังการรักษาที่หกเดือนได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ทำ PEG และไม่ใส่สาย NGT

American Gastroenterological Association ได้แนะนำว่าควรทำ PEG ในผู้ป่วยที่คิดว่าจะต้องได้รับอาหารทางสายนานกว่า 30 วัน<sup>20</sup> รายงาน systemic review ของ Wang J และคณะ<sup>21</sup> พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง PEG และ NGT การให้อาหารทาง PEG มีคุณภาพชีวิตที่ดีกว่ากลุ่มที่ใส่สาย NGT คือ มีความสวยงามทำให้เคลื่อนไหวสะดวก และมีภาวะโภชนาการที่ดีกว่า สอดคล้องกับรายงานของ Chen AM และคณะ<sup>22</sup> ที่รายงานว่ากลุ่มที่ทำ PEG มีการลดลงของน้ำหนักตัวระหว่างรับการฉายรังสีน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ทำ PEG แต่พบการเกิดภาวะหลอดอาหารตีบภายหลังการรักษา (late esophageal stricture) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำ PEG

การศึกษาของ Ottosson S และคณะ<sup>18</sup> พบว่าผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 750 ราย ได้รับการสนับสนุนด้านโภชนาการเมื่อต้องการ โดยหลังจากแพทย์และนักกำหนดอาหารได้ประเมินแล้วและผู้ป่วยยินยอม การสนับสนุนด้านโภชนาการแบ่งเป็นสามระดับคือ สามารถรับประทานทางปากให้อาหารทางสาย (NGT หรือ PEG) และการให้อาหารทางหลอดเลือดดำ ซึ่งวิธีการสนับสนุนด้านโภชนาการไม่ได้มีการอธิบายในรายงานจึงทำให้ไม่สามารถบอกสาเหตุของการลดลงของน้ำหนักตัวได้ เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวระหว่างการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาของ Ottosson S และคณะ<sup>18</sup> พบว่าแนวโน้มในการลดลงของน้ำหนักตัวคล้ายกัน แต่การศึกษานี้พบอัตราการลดลงของน้ำหนักตัวน้อยกว่า คือ อัตรา

การลดลงของน้ำหนักตัวที่สามสัปดาห์หลังเริ่มฉายรังสีเท่ากับร้อยละ -0.71 และที่หนึ่งเดือนหลังฉายรังสีครบเท่ากับร้อยละ -4.15 ในขณะที่การศึกษาของ Ottosson S และคณะ<sup>18</sup> พบน้ำหนักตัวลดลงร้อยละ -3 และร้อยละ -9 ที่สามสัปดาห์หลังเริ่มฉายรังสี และหนึ่งเดือนหลังฉายรังสีครบตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในการศึกษานี้ผู้ป่วยทุกรายได้เข้าร่วมโครงการการให้คำปรึกษาทางโภชนาการและผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการทำ PEG จึงทำให้สามารถดูแลรักษาระดับน้ำหนักตัวได้ดีกว่า

นอกจากนี้การศึกษาของ Ehrsson YT และคณะ<sup>23</sup> พบช่วงเวลาผู้ป่วยเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดต่ำสุดคือหกเดือนหลังฉายรังสีครบใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ottosson S และคณะ<sup>18</sup> ซึ่งพบที่ห้าเดือนหลังฉายรังสีครบส่วนการศึกษานี้มีข้อจำกัดคือใช้เวลาเก็บข้อมูลเพียงหนึ่งเดือนหลังฉายรังสีครบจึงยังไม่สามารถเปรียบเทียบกับรายงานที่เคยมีมาได้ โดยการศึกษานี้พบน้ำหนักตัวลดลงต่ำที่สุดที่หนึ่งเดือนหลังการฉายรังสีครบ

## สรุป

การศึกษานี้พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง nasopharynx เกิดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงมากกว่ากลุ่ม non-nasopharynx กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับยาเคมีบำบัดพบมีการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง แต่ไม่พบในกลุ่มที่ได้รับการรังสีรักษาอย่างเดียว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับยาเคมีบำบัดสองและสามรอบ พบผู้ป่วยเกิดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสีร่วมกับยาเคมีบำบัด กลุ่มที่ทำ PEG มีการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ทำ PEG

และไม่ใส่สาย NGT

เนื่องจากข้อจำกัดของการศึกษานี้คือกลุ่มตัวอย่างมีน้อยจึงไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่า ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง การได้รับยาเคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา และการสนับสนุนด้านโภชนาการโดยการทำสายให้อาหารทางหน้าท้อง เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดน้ำหนักตัวลดลงได้ในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสี

### ข้อเสนอแนะ

1. ผู้ป่วยมะเร็งกลุ่ม nasopharynx และกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา มีโอกาสเกิดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรง ดังนั้นจึงควรให้การดูแลและติดตามผู้ป่วยกลุ่มนี้มากขึ้น
2. การทำ PEG ก่อนเริ่มการฉายรังสีสามารถช่วยลดการลดลงของน้ำหนักตัวระดับรุนแรงระหว่างได้รับการฉายรังสีได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดร่วมด้วย ดังนั้นผู้ป่วยควรได้รับการแนะนำการให้โภชนาการโดยเฉพาะการทำ PEG
3. ผู้ป่วยจะเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดลงหลังจากได้รับการฉายรังสีครบ ดังนั้นการดูแลผู้ป่วยไม่ควรดูแลเฉพาะในช่วงที่ได้รับการฉายรังสีเท่านั้น หลังฉายรังสีครบตามแผนการรักษาควรเฝ้าติดตามน้ำหนักตัวผู้ป่วยอย่างต่อเนื่องเพื่อไม่ให้เกิดภาวะน้ำหนักตัวลดและเพิ่มคุณภาพชีวิตที่ดีแก่ผู้ป่วยต่อไป
4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะน้ำหนักตัวลดในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ได้รับการฉายรังสีในครั้งต่อไปควรมีจำนวนตัวอย่างที่มากเพียงพอเพื่อให้ได้ปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยมีน้ำหนักตัวลดได้ถูกต้องมากขึ้น

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ พิทยภูมิ ภัทรนุภาพร ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการเก็บข้อมูล และการเขียนบทความนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69.
2. การรักษามะเร็งที่ศีรษะและลำคอ. นิตยสารสุขภาพ Hospital & Healthcare 2556;7:14-5.
3. NCCN Guidelines version 2. 2013. Head and Neck Cancer 2014:114-5.
4. Colasanto JM, Prasad P, Nash MA, Decker RH, Wilson LD. Nutritional support of patients undergoing radiation therapy for head and neck cancer. Oncology 2005;19:371-9.
5. Datema FR, Ferrier MB, Baatenburg de Jong RJ. Impact of severe mal nutrition on short-term mortality and overall survival in head and neck cancer. Oral Oncol 2011;47:910-4.
6. Kwong DL, Sham JS, Chua DT, Choy DT, Au GK, Wu PM. The effect of interruptions and prolonged treatment time in radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997;39:703-10.
7. Capuano G, Grosso A, Gentile PC, Battista M, Bianciardi F, Di Palma A, et al. Influence of weight loss on outcomes in patients with head and neck cancer undergoing concomitant chemoradiotherapy. Head Neck 2008;30:503-8.
8. Ghadjar P, Simcock M, Zimmermann F, Betz M, Bodis S, Bernier J, et al. Predictors of severe late radiotherapy-related toxicity after hyperfractionated radiotherapy with or without concomitant cisplatin in locally advanced head and neck cancer. Secondary retrospective analysis of a randomized phase III trial (SAKK 10/94). Radiother Oncol 2012;104:213-8.
9. Langius JA, Bakker S, Rietveld DH, Kruijenga HM, Langendijk JA, Weijs PJ, et al. Critical weight loss is a major prognostic indicator for disease-specific survival in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy. Br J Cancer 2013;109:1093-9.

10. David G, Kie-KianAng, David M Brizel, Barbara A Burtness, Paul M Busse, Jimmy J Caudell, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Head and Neck cancers version 2,2013. Available at <http://oralcancerfoundation.org/treatment/pdf/head-and-neck.pdf>. Accessed February 4, 2016.
11. White JV, Guenter P, Jensen G, Malone A, Schofield M. Consensus statement: Academy of Nutrition and Dietetics and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *J Acad Nutr Diet* 2012;112:730-8.
12. Beaver ME, Matheny KE, Roberts DB, Myers JN. Predictors of weight loss during radiation therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;125:645-8.
13. Patrick Dawson, Amy Taylor, Chris Bragg. Exploration of risk factors for weight loss in head and neck cancer patients. *J Radiother Pract* 2015;14:343-52.
14. Zhao JZ, Zheng H, Li LY, Zhang LY, Zhao Y, Jiang N. Predictors for Weight Loss in Head and Neck Cancer Patients Undergoing Radiotherapy: A Systematic Review. *Cancer Nurs* 2015;38:E37-45.
15. Chan AT, Teo PM, Ngan RK, Leung TW, Lau WH, Zee B, et al. Concurrent chemotherapy-radiotherapy compared with radiotherapy alone in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: progression-free survival analysis of a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2002;20:2038-44.
16. Lee H, Havrila C, Bravo V, Shantz K, Diaz K, Lerner J, et al. Effect of oral nutritional supplementation on weight loss and percutaneous endoscopic gastrostomy tube rates in patients treated with radiotherapy for oropharyngeal carcinoma. *Support Care Cancer* 2008;16:285-9.
17. Jormain Cady. Nutritional support during radiotherapy for head and neck cancer: the role of prophylactic feeding tube placement. *Clin J Oncol Nurs* 2007;11:875-80.
18. Ottosson S, Zackrisson B, Kjellén E, Nilsson P, Laurell G. Weight loss in patients with head and neck cancer during and after conventional and accelerated radiotherapy. *Acta Oncol* 2013;52:711-8.
19. Salas S, Baumstarck-Barrau K, Alfonsi M, Digue L, Bagarry D, Feham N, et al. Impact of the prophylactic gastrostomy for unresectable squamous cell head and neck carcinomas treated with radio-chemotherapy on quality of life: Prospective randomized trial. *Radiother Oncol* 2009;93:503-9.
20. Kirby DF, De Legge MH, Fleming CR. American Gastroenterological Association medical position statement: Guidelines for the use of enteral nutrition. *Gastroenterology* 1995;108:1280-301.
21. Wang J, Liu M, Liu C, Ye Y, Huang G. Percutaneous endoscopic gastrostomy versus nasogastric tube feeding for patients with head and neck cancer: a systematic review. *J Radiat Res* 2014;55:559-67.
22. Chen AM, Li BQ, Lau DH, Farwell DG, Luu Q, Stuart K, et al. Evaluating the role of prophylactic gastrostomy tube placement prior to definitive chemoradiotherapy for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;78:1026-32.
23. Ehrsson YT, Langius-Eklöf A, Laurell G. Nutritional surveillance and weight loss in head and neck cancer patients. *Support Care Cancer* 2012;20:757-65.

# ความสัมพันธ์ทางคลินิกของยีน PIK3CA ที่กลายพันธุ์ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

อดิศร เจษฎาปิยะวงศ์<sup>1</sup>อนันต์ กรลักษ์ณ<sup>3</sup>สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์<sup>1</sup>วิมล สุขตั้งมั่น<sup>3</sup>สิทธิรักษ์ รอยตระกูล<sup>2</sup>อาทิตย์ ทิมอ่วม<sup>4</sup>เพ็ญศรี แซ่หลี่<sup>1</sup>สมชาย ณะสิทธิชัย<sup>1</sup>

**บทคัดย่อ** Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3-kinases) อยู่ในกลุ่มของ lipid kinases เป็นเอ็นไซม์ที่ช่วยในการเติมหมู่ phosphate ให้กับ phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) เปลี่ยนเป็น phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) PIP3 ทำหน้าที่เป็น second messenger ส่งสัญญาณไปควบคุมการทำงานต่างๆของเซลล์ เช่น การแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเคลื่อนที่ การยึดเกาะของเซลล์ การมีชีวิตรอด การตายของเซลล์ รวมทั้งการเกิดมะเร็ง PI3-kinases ประกอบด้วย heterodimers มี catalytic subunits (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  หรือ p110 $\delta$ ) และ regulatory subunits kinases (p85a, p85h หรือ p55y) catalytic subunit PI3-kinases ถูก encode โดย PIK3CA gene การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA เป็น somatic mutation มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของ PI3-kinases พบได้บ่อยในมะเร็งเต้านม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ตรงตำแหน่งที่มักพบบ่อย (hotspot) 2 แห่ง คือที่ exon 9 (codon542 และ codon545) และ exon 20 (codon1047) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ตรวจพบกับอายุของผู้ป่วยขณะวินิจฉัย ผลทางพยาธิวิทยาคลินิกได้แก่ ขนาดก้อนมะเร็ง ระยะโรค (stage) ความรุนแรงของโรค (grade) การกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง ผลการตรวจ estrogen-receptor (ER), progesterone-receptor (PR), HER2, P53 และ Ki67 การศึกษานี้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ด้วยวิธี PNA-mediated real-time PCR clamping ผลการศึกษาพบอัตราการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 35 รายจาก 199 ราย (ร้อยละ 17.58) เป็นการกลายพันธุ์ใน exon 9 (E542, E545 หรือ Q546) ร้อยละ 25.71 โดยพบ 1 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์ที่ E542 อีก 8 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์ที่ E545 หรือ Q546 และเป็นการกลายพันธุ์ใน exon 20 (H1047) ร้อยละ 77.14 นอกจากนั้นพบ 1 ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ทั้ง exon 9 และ exon 20 (E545/Q546 และ H1047) การศึกษานี้ยังพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ไม่มีความสัมพันธ์กับ อายุ ขนาดของก้อนมะเร็ง ระยะโรค ความรุนแรงของโรค การกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง ผลตรวจ ER, PR, HER2, P53 และ Ki67 (วารสารโรคมะเร็ง 2559;36:91-103)

คำสำคัญ: การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มะเร็งเต้านม ผลทางพยาธิวิทยาคลินิก

<sup>1</sup>กลุ่มงานวิจัย, สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

<sup>2</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

<sup>3</sup>กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

<sup>4</sup>สาขาชีวเคมีและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

### Clinical Relevance of PIK3CA Mutations in Breast Cancer

by Adisorn Jedpiyawongse<sup>1</sup>, Sittiruk Roytrakul<sup>2</sup>, Anant Karalak<sup>3</sup>, Arthid Thim-uam<sup>4</sup>, Sunanta Chariyalertsak<sup>1</sup>, Pensri Saelee<sup>1</sup>, Vimol Suktangman<sup>3</sup>, Somchai Thanasitthichai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Division, National Cancer Institute, Bangkok, <sup>2</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani,

<sup>3</sup>Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok, <sup>4</sup>Division of Biochemistry and Nutrition, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao

**Abstract** Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3-kinases) are a family of lipid kinases. The activated kinase catalyses the phosphorylation of phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP3). PIP3 is second messenger that leads to downstream signaling, controlling cell proliferation, cell growth, differentiation, motility, adhesion, survival, apoptosis and carcinogenesis. PI3-kinases consist of heterodimers with catalytic subunits (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  or p110 $\delta$ ) and regulatory subunits (p85a, p85h or p55y). Catalytic subunit PI3-kinases are encoded by the PIK3CA gene. Somatic mutations of PIK3CA have been shown to play an important role in the activation of PI3-kinases. A high frequency of PIK3CA mutations has been reported in human breast cancers. This study investigated the frequency of PIK3CA mutations at two hotspots, exon 9 (codon 542 and codon 545) and exon 20 (codon 1047), in breast-cancer patients. It then analyzed the association between PIK3CA mutations and age at diagnosis, and pathological parameters--tumor size, stage, histological grade, and estrogen-receptor (ER), progesterone-receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), tumor protein P53, and protein Ki67 status. In this study, PIK3CA mutations were examined by PNA (peptide nucleic acid)-mediated real-time PCR clamping. PIK3CA mutations were observed in 35 of 199 breast-cancer cases (17.58%) with 25.71% in exon 9, one sample mutated at E542, and 8 samples mutated at E545 or Q546, and 77.14% in exon 20 (H1047). In addition, one sample mutated at both exons 9 and 20 (E545/Q546 and H1047). This study found that PIK3CA mutations were not associated with age, tumor size, histologic type, stage, histologic grade, lymph node status, ER, PR, HER2, P53, or Ki67 status. (*Thai Cancer J* 2016;36:91-103)

**Keywords:** PIK3CA mutations, breast cancer, pathological parameters

### บทนำ

การศึกษาด้านอณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรม นำมาซึ่งการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมหรือยีน ปัจจุบันมีการคิดค้นการใช้ยากลุ่ม molecular targeted therapy ที่ออกฤทธิ์เฉพาะในระดับโมเลกุล gene หรือกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ในการส่งทอดสัญญาณในการกระตุ้นหรือควบคุมการทำงานของเซลล์ เช่น ควบคุม

การแบ่งตัว การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การรอดชีวิตของเซลล์และการทำงานอื่นๆ ยากลุ่ม molecular targeted therapy สามารถยับยั้งการทำงานของโมเลกุลหรือกระบวนการดังกล่าวอย่างมีเป้าหมายจำเพาะ ส่งผลในการยับยั้งการแบ่งตัว การเติบโต การรอดชีวิต การแพร่กระจายของโรคมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3-kinases) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต

การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง adhesion apoptosis และการมีชีวิตของเซลล์ PI3-kinase จัดเป็น lipid serine/threonine kinase เป็น heterodimer ประกอบด้วย 2 subunit คือ p85 regulatory subunit และ p110 catalytic subunit ในโรคมะเร็งหลายชนิดมักพบมีการกลายพันธุ์ หรือมีการเพิ่มจำนวนของยีนในส่วนของ p110 และ p85 ส่วนของ p110 catalytic subunit จะถูกถอดรหัสจากยีน PIK3CA และส่วนของ p85 regulatory subunit จะถูกถอดรหัสจากยีน PIKR1<sup>1</sup>

PI3-kinase เป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยาการเปลี่ยน phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate (PIP2) เป็น phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate (PIP3) PIP3 ทำหน้าที่เป็น second messenger ส่งสัญญาณต่อไปที่ AKT pathway ไปควบคุมการทำงานต่างๆของเซลล์ เช่น การแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การมีชีวิตรอด การตายของเซลล์ รวมทั้งการเกิดมะเร็ง<sup>2-4</sup> PIK3CA เป็นยีนที่เมื่อถูกถอดรหัสจะได้ส่วนของ catalytic subunit p110 alpha ของ PI3-kinases class IA เป็นยีนที่มีความยาว 34 kb อยู่ที่ chromosome 3q26.3 มี 20 exon ถอดรหัสให้ 1068 amino acids ได้โปรตีนที่มีขนาด 124 kDa จัดเป็น protooncogene PI3-kinase ประกอบด้วย heterodimers มี catalytic subunits (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  หรือ p110 $\delta$ ) และ regulatory subunits (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  หรือ p85 $\delta$ )<sup>5</sup> ส่วนของ catalytic subunits ประกอบด้วยหลาย domains: catalytic lipid kinase domain, helical domain, C2 domain, Ras-binding domain และ NH<sub>2</sub>-terminal domain ที่จะ interact กับ regulatory subunits เมื่อมี growth

factor หรือ ligand อื่นๆ มากระตุ้น receptor tyrosine kinase (RKT) ส่วนของ p85 regulatory subunit จะจับกับส่วนของ p110 catalytic subunit ทำให้ PI3-kinase อยู่ในรูป active และทำให้เกิดการเติมหมู่ phosphate ให้กับ 3-hydroxy group ของ inositol phospholipids ใน PIP2 กลายเป็น PIP3<sup>3-4,6</sup>

ในโรคมะเร็งหลายชนิดเมื่อยีน PIK3CA เกิดการกลายพันธุ์ ยีน PIK3CA จะกลายเป็น oncogene ทำให้มีการเพิ่มการทำงานของ kinase activity ในส่วน of p110 catalytic subunit ของ PI3-kinases<sup>2,6-9</sup> การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA เป็น somatic mutation<sup>10</sup> อาจเกิดจาก amplification, deletion, somatic missense และอื่นๆ การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ทำให้เอนไซม์ PI3-kinases ทำงานเพิ่มขึ้นมีผลทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็นเซลล์มะเร็ง พบมีการกลายพันธุ์ของ PIK3CA ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ และได้ตรงร้อยละ 16-37<sup>11-13</sup> มะเร็งตับร้อยละ 36<sup>14</sup> กระเพาะอาหารร้อยละ 25<sup>11,14</sup> เต้านมร้อยละ 8-40<sup>11,14-16</sup> รังไข่ร้อยละ 6-12<sup>16-17</sup> ปอดร้อยละ 1-4<sup>11,14</sup> และมะเร็งเม็ดเลือดขาวร้อยละ 1<sup>14</sup> ในมะเร็งเต้านมมักพบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในขณะที่การกลายพันธุ์ของ somatic oncogene อื่น เช่น EGFR, KRAS, HRAS, BRAF, BRAF, AKT1 ที่มักพบมีการกลายพันธุ์ในโรคมะเร็งชนิดอื่นมาก แต่กลับพบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีนเหล่านี้ในมะเร็งเต้านม<sup>18-21</sup>

ส่วนใหญ่มักพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 ใน helical domain และ exon 20 ใน kinase domain<sup>11,16,18</sup> การกลายพันธุ์ในส่วน of helical domain อาจมีผลต่อ regulatory protein (p85) ส่วนการ

กลายพันธุ์ของ kinase domain อาจมีผลต่อ specificity และ affinity ของ p110 catalytic subunit ต่อสารตั้งต้น การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในมะเร็งเต้านมประมาณร้อยละ 25-40 พบที่ exon 9 และ exon 20<sup>18,20,22</sup> การกลายพันธุ์แบบ somatic missense ของ PIK3CA มักเกิดที่ codon542 (ทำให้ glutamic acid เปลี่ยนเป็น lysine :E542K) และ codon545 (ทำให้ glutamic acid เปลี่ยนเป็น lysine :E545K) ใน exon 9 ซึ่งเป็นบริเวณ helical domain และที่ codon1047 (ทำให้ histidine เปลี่ยนเป็น arginine :H1047R) ใน exon 20 ซึ่งเป็นบริเวณ kinase domain<sup>4,23</sup> การกลายพันธุ์บริเวณ exon 20 ที่ codon1047 มักเกี่ยวข้องกับส่วน p85 $\alpha$  regulatory subunit ในขณะที่การกลายพันธุ์ของ exon 9 ที่ codons542 และ codon545 จะเกี่ยวข้องกับส่วนของ RAS binding domain<sup>24-26</sup> การกลายพันธุ์ของทั้ง 3 hotspots พบได้บ่อยถึงร้อยละ 80 ของการกลายพันธุ์ทั้งหมด<sup>10,27-30</sup> และยังสามารถพบ frameshift mutation ที่ c.3203dupA ทำให้กรดอะมิโนตัวสุดท้ายที่ C-terminal ของโปรตีน PI3-kinases เปลี่ยนไป (N1068K) และอาจมีกรดอะมิโนตัวอื่นเพิ่มขึ้น<sup>22</sup> ที่ exon 20 ยังมีการกลายพันธุ์ที่ D1029H, H1047R, M1043V, A1066V<sup>22</sup> ปัจจุบันยังพบการกลายพันธุ์ที่ codon อื่น เช่น codon546 และ codon1046<sup>30</sup> รวมทั้งพบ missense mutation แบบใหม่ เช่น N114T ใน exon 1 และ Y698 ใน exon 13<sup>10</sup> อีกทั้งพบ I1022V, L1028S และ nonsense (R992X) mutation ใน exon 20<sup>28</sup>

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม

ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ขนาดของก้อนมะเร็ง hormone receptor และ HER2 status<sup>18,20,22</sup> แต่มีบางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับลักษณะทางพยาธิคลินิกดังกล่าว<sup>10,15,32</sup> การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ตรงตำแหน่งที่มักพบบ่อย (hotspot) 2 แห่ง คือที่ exon 9 (codon542 และ codon 545) และ exon 20 (codon1047) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ตรวจพบกับอายุของผู้ป่วยขณะวินิจฉัย ผลทางพยาธิวิทยาคลินิกได้แก่ ขนาดก้อนมะเร็ง ระยะโรค (stage) ความรุนแรงของโรค (grade) การกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง ผลการตรวจ estrogen-receptor (ER), progesterone-receptor (PR), HER2, P53 และ Ki67

## วัสดุและวิธีการ ผู้ป่วยและตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิงได้รับการผ่าตัดที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 199 ราย อายุระหว่าง 31-82 ปี ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการผ่าตัดระหว่าง พ.ศ. 2551-2556 จำนวน 134 ตัวอย่าง และชิ้นเนื้อสด (fresh tissue) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการผ่าตัดระหว่าง พ.ศ. 2550-2554 จำนวน 65 ตัวอย่าง ผลการตรวจวินิจฉัยลักษณะทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยและผลการตรวจ estrogen-receptor (ER), progesterone-receptor (PR), HER2, P53 และ Ki67 โดยวิธี immunohis-

tochemistry ได้จากผลยืนยันการตรวจวินิจฉัยจาก กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ การศึกษานี้ ได้รับอนุมัติดำเนินโครงการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัย และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบัน มะเร็งแห่งชาติ เลขที่ 011/2556

### วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ผู้วิจัยนำบล็อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue) ของผู้ป่วยมะเร็ง เต้านมมาตัด section ขนาด 10 µm จำนวน 4 แผ่น แผ่นลงบนสไลด์แก้ว ชูดเนื้อส่วนที่เป็นมะเร็งใส่ในหลอด 1.5 ml เติม xylene 300 µl แล้วเขย่าหลอดเป็นเวลา 30 นาที นำหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที แยกส่วนบนออกจากหลอด ล้าง pellet ที่ได้ด้วย absolute ethanol 1 ml แล้ว เขย่าหลอด นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที แล้วล้างด้วย ethanol อีกครั้ง นำตัวอย่างที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin® Tissue XS kit (MACHERY-NAGEL MN, Germany) ตามวิธีการที่แนบมากับชุดน้ำยา หาปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer แล้วนำดีเอ็นเอไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิต่ำ -80°C

สำหรับชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่เป็นชิ้นเนื้อสด (fresh tissue) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัม บดให้ละเอียด โดยใช้กรรไกรชอยชิ้นเนื้อบนกระจกแก้วที่วางบนน้ำแข็ง นำชิ้นเนื้อที่บดละเอียดแล้วใส่ในหลอด 1.5 ml นำ ตัวอย่างที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin® Tissue XS kit (MACHERY-NAGEL MN, Germany) ตามวิธีการที่แนบมากับชุดน้ำยา หาปริมาณดีเอ็นเอ

ที่ได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer แล้วนำดีเอ็นเอ ไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิต่ำ -80°C

### วิธีการทดสอบหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA

การทดสอบหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ ยีน PIK3CA ใช้ชุดน้ำยา PNA Clamp™ PIK3CA Mutation Detection (Panagene, Inc., Daejeon, Korea) ปริมาตรสุดท้าย 20 µl ซึ่งประกอบด้วย template DNA, primer PNA probe set และ SYBR Green PCR master mix เข้มข้น 10-25 ng ตามวิธีการที่แนบมา กับชุดน้ำยา การศึกษานี้ใช้เครื่อง CFX96 (Bio-Rad, USA) ชุดน้ำยานี้ใช้หลักการ peptide nucleic acid (PNA)-mediated real-time PCR clamping โดย PCR cycling condition เริ่มจากอุณหภูมิ 94°C 5 นาที และตามด้วยขั้นตอนต่างๆในแต่ละรอบ (cycle) ซึ่ง ประกอบด้วย denaturation ที่ 94°C 30 วินาที PCR clamping ที่ 70°C 20 วินาที annealing ที่ 63°C 30 วินาที และ extension ที่ 72°C 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ผลการทดลองได้จากค่า threshold cycle (ct) ของ control และ mutation assays ที่ได้จาก SYBR Green amplification แล้ว plots ค่า  $\Delta ct = (\text{Standard ct}) - (\text{Sample ct})$  โดยสามารถหาการกลายพันธุ์ของ ยีน PIK3CA ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง ที่ exon 9 จำนวน 10 ตำแหน่ง (E542K, E542G, E542V, E545K, E545G, E545D, Q546E, Q546K, Q546P, Q546R) และ exon 20 จำนวน 3 ตำแหน่ง (H1047Y, H1047L, H1047R)

หลักการของ PNA-mediated real-time PCR

clamping โดย PNA คือ DNA analog ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้พันธะ peptide ที่จับกันระหว่าง 2-aminoethyl และ glycine โดยจะแทนที่พันธะ phosphodiester PNA เข้าไป hybrid กับเบสคู่สมบน target DNA เกิดเป็น PNA-DNA duplexes ซึ่งจะทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ดีกว่า DNA-DNA duplexes นอกจากนี้ PNA จะไม่จับกับ target DNA ที่มี mismatch 1 ตำแหน่ง ซึ่งต่างจาก DNA ที่ยังคงจับได้ นอกจากนี้ DNA polymerase จะไม่สามารถย่อย PNA probe ได้ ดังนั้น PNA probe จึงเป็นตัวขัดขวางการทำงานของ DNA polymerase ทำให้ไม่เกิด PCR product และ PNA probe ไม่สามารถทำหน้าที่เป็น primer ในปฏิกิริยา real-time ต่อได้ ดังนั้น PNA probe ที่มีความจำเพาะกับ target DNA ที่เป็น wild type จะทำให้ไม่มีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่เป็น wild type ถ้า target DNA เป็น mutant type จะทำให้ PNA probe ไม่สามารถจับกับ target DNA ได้ ดังนั้นจึงเกิด PCR product ขึ้นในปฏิกิริยาได้

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษานี้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับอายุของผู้ป่วยขณะวินิจฉัย ขนาดก้อนมะเร็ง ผลจุลพยาธิวิทยา ระยะโรค (stage) ความรุนแรงของโรค (grade) การกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง estrogen-receptor (ER), progesterone-receptor (PR), HER2, P53 และ Ki67 ด้วยการคำนวณค่า odds ratio (OR) และค่า 95% confidence interval (CI) โดยใช้วิธี binary

logistic regression และกำหนดให้ข้อมูลมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ  $P < 0.05$

### ผลการศึกษา

เมื่อวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในตัวอย่างจำนวน 35 ตัวอย่างจาก 199 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.58) พบการกลายพันธุ์ใน exon 9 จำนวน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.71) โดยพบ 1 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์ที่ E542 อีก 8 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์ที่ E545 หรือ Q546 ส่วนการกลายพันธุ์ใน exon 20 (H1047) พบจำนวน 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 77.14) และมี 1 ตัวอย่างที่พบมีการกลายพันธุ์ทั้ง exon 9 และ exon 20 (E545/Q546 และ H1047) โดยตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เป็นชั้นเนื้อฝักรักษาจำนวน 134 ตัวอย่าง พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.18) ตัวอย่างที่เป็นชั้นเนื้อสดจำนวน 65 ตัวอย่าง มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 24.62)

การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ทั้งที่ exon 9, exon 20 และ exon 9 และ/หรือ exon 20 กับอายุ ขนาดของก้อนมะเร็ง ผลทางพยาธิ ระยะเวลาโรค ความรุนแรงของโรค การกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง และผลตรวจ ER, PR, HER2, P53 และ Ki67 ดังรายละเอียดในตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 กับผลทางพยากรณ์คลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ผลพยากรณ์คลินิก	PIK3CA mutation exon 9		P
	Mutate n (%)	Non-mutate n (%)	
<b>อายุ (ปี)</b>			
≤55	4 (3.4)	113 (96.6)	0.367
>55	5 (6.2)	76 (93.8)	
<b>ขนาดก้อนมะเร็ง (ซม.)</b>			
≤2.5	4 (4.0)	97 (96.0)	0.676
>2.5	5 (5.2)	91 (94.8)	
<b>ระยะโรค</b>			
I-II	8 (6.1)	124 (93.9)	0.181
III	1 (1.5)	65 (98.5)	
<b>Histological grade</b>			
1-2	6 (5.7)	100 (94.3)	0.424
3	3 (3.3)	89 (96.7)	
<b>Lymph node</b>			
Negative	5 (5.1)	93 (94.9)	0.710
Positive	4 (4.0)	96 (96.0)	
<b>ER</b>			
Negative	3 (4.7)	61 (95.3)	0.947
Positive	6 (4.5)	128 (95.5)	
<b>PR</b>			
Negative	3 (3.1)	93 (96.9)	0.360
Positive	6 (5.9)	96 (94.1)	
<b>HER2</b>			
Negative	5 (3.5)	139 (96.5)	0.247
Positive	4 (7.4)	50 (92.6)	
<b>P53</b>			
Negative	2 (6.9)	27 (93.1)	0.658
Positive	5 (4.8)	99 (95.2)	
<b>Ki67</b>			
Negative	2 (4.5)	42 (95.5)	0.705
Positive	4 (6.3)	60 (93.8)	

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 20 กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ผลพยาธิคลินิก	PIK3CA mutation exon 20		P
	Mutate n (%)	Non-mutate n (%)	
<b>อายุ (ปี)</b>			
≤55	14 (12.0)	103 (88.0)	0.412
>55	13 (16.0)	68 (84.0)	
<b>ขนาดก้อนมะเร็ง (ซม.)</b>			
≤2.5	15 (14.9)	86 (85.1)	0.632
>2.5	12 (12.5)	84 (87.5)	
<b>ระยะโรค</b>			
I-II	18 (13.6)	114 (86.4)	1.000
III	9 (13.6)	57 (86.4)	
<b>Histological grade</b>			
1-2	18 (17.0)	88 (83.0)	0.145
3	9 (9.8)	83 (90.2)	
<b>Lymph node</b>			
Negative	14 (14.3)	84 (85.7)	0.792
Positive	13 (13.0)	87 (87.0)	
<b>ER</b>			
Negative	7 (10.9)	57 (89.1)	0.446
Positive	20 (14.9)	114 (85.1)	
<b>PR</b>			
Negative	13 (13.5)	83 (86.5)	0.970
Positive	14 (13.7)	88 (86.3)	
<b>HER2</b>			
Negative	19 (13.2)	112 (77.8)	0.767
Positive	8 (14.8)	46 (85.2)	
<b>P53</b>			
Negative	3 (10.3)	26 (89.7)	0.907
Positive	10 (9.6)	94 (90.4)	
<b>Ki67</b>			
Negative	5 (11.4)	39 (88.6)	0.207
Positive	3 (4.7)	61 (95.3)	

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 และ/หรือ exon 20 กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ผลพยาธิคลินิก	PIK3CA mutation exon 9 and/or exon 20		P
	Mutate n (%)	Non-mutate n (%)	
<b>อายุ (ปี)</b>			
≤55	17 (14.5)	100 (85.5)	0.166
>55	18 (22.2)	63 (77.8)	
<b>ขนาดก้อนมะเร็ง (ซม.)</b>			
≤2.5	19 (18.8)	82 (81.2)	0.694
>2.5	16 (16.7)	80 (83.3)	
<b>ระยะโรค</b>			
I-II	25 (18.9)	107 (81.1)	0.511
III	10 (15.2)	56 (84.8)	
<b>Histological grade</b>			
1-2	23 (21.7)	83 (78.3)	0.115
3	12 (13.0)	80 (87.0)	
<b>Lymph node</b>			
Negative	19 (19.4)	79 (80.6)	0.533
Positive	16 (16.0)	84 (84.0)	
<b>ER</b>			
Negative	9 (14.1)	55 (85.9)	0.359
Positive	26 (19.4)	108 (80.6)	
<b>PR</b>			
Negative	15 (15.6)	81 (84.4)	0.464
Positive	20 (19.6)	82 (80.4)	
<b>HER2</b>			
Negative	24 (16.7)	120 (83.3)	0.544
Positive	11 (20.4)	43 (79.6)	
<b>P53</b>			
Negative	5 (17.2)	24 (82.8)	0.608
Positive	14 (13.5)	90 (86.5)	
<b>Ki67</b>			
Negative	7 (15.9)	37 (84.1)	0.310
Positive	6 (9.4)	58 (90.6)	

## วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาที่พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในตัวอย่างมะเร็งเต้านมจำนวน 35 ตัวอย่าง จาก 199 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.58) ตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เป็นชิ้นเนื้อฝังพยาธิจำนวน 134 ตัวอย่าง พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.18) และตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อสดจำนวน 65 ตัวอย่าง มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 24.62) ซึ่งจากการศึกษา meta-analysis<sup>33</sup> ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 5719 ราย พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 7.1-44.6 มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA โดยในประเทศสหรัฐอเมริการายงานประมาณร้อยละ 14.8-32.5 ออสเตรเลีย 7.1-43.1 เดนมาร์ก 25.7-44.6 ฝรั่งเศส 18.2 อิตาลี 16 บราซิล 30.6 จีน 26.1 ไต้หวัน 19.0-25.7 สิงคโปร์ 38.8 และญี่ปุ่น 28.7<sup>33</sup> และจากรายงานการศึกษาในประเทศเกาหลีพบร้อยละ 27<sup>14</sup> ประเทศบราซิลพบร้อยละ 27<sup>31</sup> สิงคโปร์พบร้อยละ 39<sup>27</sup> ส่วนในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวญี่ปุ่นพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA เป็นชนิด somatic missense mutation โดยพบ 54 รายจากจำนวน 188 ราย (ร้อยละ 29)<sup>10</sup> สำหรับการศึกษานี้พบความถี่การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในตัวอย่างมะเร็งเต้านมอยู่ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะในชิ้นเนื้อฝังพยาธิ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ heterogenous อีกทั้งดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นเนื้อฝังพยาธิมักมีสภาพเสื่อมเนื่องจากผลของฟอร์มาลิน<sup>34-37</sup> ทำให้ตรวจไม่พบบริเวณที่กลายพันธุ์ของยีนที่ต้องการศึกษา

การศึกษานี้พบมีการกลายพันธุ์ที่ exon 9 (helical domain) จำนวน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.71)

และที่ exon 20 (kinase domain) จำนวน 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 77.14) มี 1 ตัวอย่างที่พบมีการกลายพันธุ์ทั้ง exon 9 และ exon 20 (E545/Q546 และ H1047) เช่นเดียวกับการศึกษาอื่นที่มักพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 และ exon 20 โดยพบการกลายพันธุ์ที่ exon 20 ได้บ่อยกว่าที่ exon 9<sup>22,38-40</sup> จากการศึกษาของ Maruyama N และคณะ<sup>10</sup> พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวญี่ปุ่น ส่วนใหญ่ของการกลายพันธุ์ (ร้อยละ 83) เป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 9 และ exon 20 ซึ่งเป็น helical และ kinase domains ตามลำดับ จากการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวสิงคโปร์ พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในตัวอย่างมะเร็งเต้านม 31 ตัวอย่างจาก 80 ตัวอย่าง (ร้อยละ 39) โดย hotspot mutation ของยีน PIK3CA ที่พบเป็นชนิด A3140G (H1047R) substitution ใน exon 20 ซึ่งพบสูงถึงร้อยละ 71 และพบแบบ A1634C (E545A) ใน exon 9 ร้อยละ 13.8 มี 2 ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ทั้งใน exon 9 และ exon 2027 แต่มีบางรายงานพบการกลายพันธุ์ที่ exon 9 มากกว่าใน exon 20 โดยพบการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ร้อยละ 53.6 และ exon 20 ร้อยละ 32.1<sup>16</sup>

จากการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับอายุ ขนาดของก้อนมะเร็ง ระยะโรค ความรุนแรงของโรค การกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง การมี ER, PR, HER2, P53 และ Ki67 สอดคล้องกับการศึกษาของ Campbell IG และคณะ<sup>16</sup> และ Maruyama N และคณะ<sup>10</sup> พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง การกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง

(lymph node status), histological grade, HER2 expression และ p53 mutations และยังมีการศึกษาอื่นที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับผลทางพยาธิคลินิก<sup>27,41,42</sup> แต่จากการศึกษาของ Liang X และคณะ<sup>27</sup> พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ใน exon 20 สัมพันธ์กับอายุและระยะโรคโดยพบในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 50 ปี และพบในระยะ 1 และ 2 มากกว่าระยะ 3 และ 4 และจากการศึกษาอื่นพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในก้อนมะเร็งที่มีขนาดเล็ก<sup>18,22</sup> โดยพบ histological grade 1 มากกว่า grade 2 และ 3<sup>20,22</sup> แต่มีบางการศึกษาที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับ ER และ PR<sup>15,27,40</sup> และยังมีบางการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในมะเร็งเต้านมมีความสัมพันธ์กับการกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง การมี ER และ PR positive และการมี HER2 negative<sup>18-20,22</sup>

จากการศึกษาที่ผ่านมาบางการศึกษาพบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มีค่า Ki67 มากกว่าในตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA<sup>30,43</sup> แต่บางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับ Ki67<sup>44,45</sup> เช่นเดียวกับการศึกษานี้

โดยสรุปการศึกษานี้พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมร้อยละ 17.58 พบที่ exon 9 (E542, E545 หรือ Q546) ร้อยละ 25.71 โดยพบ 1 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์ที่ E542 อีก 8 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์ที่ E545 หรือ Q546 และเป็นการกลายพันธุ์ใน exon 20 (H1047) ร้อยละ 77.14 นอกจากนี้พบ 1 ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ทั้ง

exon 9 และ exon 20 (E545/Q546 และ H1047) นอกจากนี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ไม่มีความสัมพันธ์กับ อายุ ขนาดของก้อนมะเร็ง ระยะโรค ความรุนแรงของโรค การกระจายเซลล์มะเร็ง ไปยังต่อมน้ำเหลือง ผลตรวจ ER, PR, HER2, P53 และ Ki67 อย่างไรก็ตามควรจะศึกษากำหนดตัวอย่างเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำขึ้น อีกทั้งติดตามการรักษาผู้ป่วยต่อไปเพื่อดูว่าผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ช่วยในการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมหรือไม่

### กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี 2557-2559

### เอกสารอ้างอิง

1. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 2007;26:1338-45.
2. Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. *Genomics* 1994;24:472-7.
3. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:481-507.
4. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *BJC* 2006;94:455-9.
5. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999;253:239-54.
6. Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *PNAS* 2006;103:1475-9.
7. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 2000;19:2739-44.

8. Migozuchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* 2004;14:372-7.
9. Pedrero JMG, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242-8.
10. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S. Clinicopathologic Analysis of Breast Cancers with PIK3CA Mutations in Japanese Women. *Clin Cancer Res* 2007;13:408-14.
11. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554.
12. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz J, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:1649-54.
13. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1477-84.
14. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2004;24:1477-80.
15. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004;3:772-5.
16. Campbell IG, Russell SE, Choong DYH, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CSF, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:7678-81.
17. Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:2875-8.
18. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2554-9.
19. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:6084-91.
20. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5049-59.
21. Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:3577-84.
22. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER $\alpha$ , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 2012;14:R28.
23. Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 2008;10:534-41.
24. Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J, Baselga J. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann Onco* 2009;21:683-91.
25. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008;27:5486-96.
26. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$  complex elucidates the effects of oncogenic PI3K $\alpha$  mutations. *Science* 2007;318:1744-8.
27. Liang X, Lau QC, Salto-Tellez M, Putti TC, Loh M, Sukumar S. Mutational hotspot in Exon 20 of PIK3CA in breast cancer among singapore chinese. *Cancer Biol Ther* 2006;5:544-8.
28. Mangone FR, Bobrovnitsha IG, Salaorni S, Manuli E, Nagail MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics* 2012;67:1285-90.
29. Drury SC, Detre S, Leary A, Salter J, Reis-Filho J, Barbashina V, et al. Changes in breast cancer biomarkers in the IGF1R/PI3K pathway in recurrent breast cancer after tamoxifen treatment. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:565-77.

30. López-Knowles E, Segal CV, Gao O, Garcia-Murillas I, Turner NC, Smith I, et al. Relationship of PIK3CA mutation and pathway activity with antiproliferative response to aromatase inhibition. *Breast Cancer Res* 2014;16:R68.
31. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, Kerr L, Gay LJ, Luben R, et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer* 2011;11:123.
32. Michelucci A, Di Cristofano C, Lami A, Collecchi P, Caligo A, Decarli N, et al. PIK3CA in breast carcinoma: a mutational analysis of sporadic and hereditary cases. *Diagn Mol Pathol* 2009;18:200-5.
33. Pang B, Cheng S, Sun S-H, Cheng An, Liu Z-Y, Feng X, et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4: 6255.
34. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Vries MV, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-7.
35. Mittempergher L, de Ronde JJ, Nieuwland M, Kerkhoven RM, Simon I, Rutgers EJ, et al. Gene expression profiles from formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissue are largely comparable to fresh frozen matched tissue. *PLoS One* 2011; 6:e17163.
36. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007;96:1166-9.
37. Domagala P, Hybiak J, Sul yc-Bielicka V, Cybulski C, Rys J, Domagala W. KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: a practical approach. *Pol J Pathol* 2012;63:145-64.
38. Wu G, Xing M, Mabbo E, Huang X, Liu J, Guo Z, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7: R609-16.
39. Li SY, Rong M, Grieu F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96:91-5.
40. Buttitta F, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Paolizzi D, Fresu G, et al. PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: High frequency of mutations in lobular carcinoma. *J Pathol* 2006;208:350-5.
41. Jylling AMB, Rasmussen AA, Jakobsen EH, Christensen RD, Sorensen FB. Are mutations in K-RAS, BRAF and PIK3CA genes critical for response to adjuvant trastuzumab treatment in patients with HER-2 positive breast cancer?. *J Cancer Ther Res* 2014;3:3.
42. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, Grauslund M, Jensen MB, Santoni- Rugiu E, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 2012;23:2034-42.
43. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012;486: 353-60.
44. Loi S, Michiels S, Baselga J, Bartlett JM, Singhal SK, Sabine VS, et al. PIK3CA genotype and a PIK3CA mutation-related gene signature and response to everolimus and letrozole in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS One* 2013;8:e53292.
45. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, Tao Y, Hoog J, Snider J, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase  $\gamma$  catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:379-90.

## การตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่พบความผิดปกติในระยะต่าง ๆ

จรัญญา งามขำ<sup>1</sup>มณีรัตน์ มัสฮูดี<sup>2</sup>ณัฐพล ลาวจันทร์<sup>3</sup>กฤติกา บุญมาก<sup>1</sup>เทียนแสง พันธุ์ศรี<sup>1</sup>

**บทคัดย่อ** การติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมาสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ 16 เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งในผู้หญิงทั่วโลก พบว่ายีนก่อมะเร็ง 3 ชนิดของ HPV16 ได้แก่ E5, E6 และ E7 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคมะเร็ง โดยโปรตีน E6 และ E7 มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ p53 และ pRb ตามลำดับ และบางรายงานพบการทำงานของ E5 ในการเกิดมะเร็งปากมดลูกในหนูทดลองและเซลล์มะเร็งในระดับห้องปฏิบัติการ แต่การศึกษาในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ผ่านมายังมีค่อนข้างจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติในช่วงปี 2554-2557 จำนวน 95 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) และ two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ในการตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสและการตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าอายุเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างคือ 42.16 ปี (SD=10.26) พบการติดเชื้อ HPV16 จำนวน 36 รายจากตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV ทั้งหมด 63 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 57.14 และสามารถตรวจพบการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA จำนวน 19/36 รายคิดเป็นร้อยละ 52.78 ซึ่งผลการตรวจการแสดงผลของ HPV16 E5 mRNA สามารถตรวจพบทั้งในเซลล์ที่พบความผิดปกติเพียงเล็กน้อย CIN I-III จนถึงเซลล์มะเร็ง โดยระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA เพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เท่าในเซลล์ที่เริ่มพบความผิดปกติ และในกลุ่มของ CIN I-II เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกในกลุ่มควบคุม (positive control: SiHa cell line) ( $P < 0.05$ ) และระดับการแสดงออกลดลงเมื่อเซลล์มีความผิดปกติในระยะก่อนเข้าสู่มะเร็ง (CIN III) และเซลล์มะเร็ง ( $P > 0.05$ ) ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกพบระดับการแสดงออกของ HPV16 E6 และ HPV16 E7 mRNA สูงกว่า HPV16 E5 mRNA ( $P > 0.05$ ) ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่า ระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA พบสูงในเซลล์ปากมดลูกที่พบความผิดปกติในช่วงแรกของการติดเชื้อ (CIN I-II) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและลดลงในกลุ่มเซลล์ที่พบความผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็ง (CIN III) และเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจและคาดว่ายีนหรือโปรตีนก่อมะเร็ง E5 น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการนำไปศึกษาต่อเพื่อการคัดกรองเซลล์ปากมดลูกที่พบความผิดปกติในระยะเริ่มแรกและเฝ้าระวังการก่อโรคต่อไป (วารสารโรคมะเร็ง 2559;36:104-115)

คำสำคัญ: เซลล์ปากมดลูก, เซลล์มะเร็งปากมดลูก, HPV16, E5 mRNA

<sup>1</sup>กลุ่มงานวิจัย, <sup>2</sup>กลุ่มงานพยาธิวิทยา, <sup>3</sup>งานคัดกรองโรคมะเร็ง กลุ่มงานพัฒนานโยบายและยุทธศาสตร์การแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

**Evaluation on Human Papillomavirus 16 E5 mRNA Expression in Different Cervical Lesions**by **Jarunya Ngamkham<sup>1</sup>, Maneerut Mus-u-dee<sup>2</sup>, Nattapon Laochan<sup>3</sup>,  
Kittika Boonmark<sup>1</sup>, Thainsang Phansri<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Research Division, <sup>2</sup>Pathology Division, <sup>3</sup>Cancer Screening Section, Policy and Strategy Development Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400

**Abstract** High-risk human papillomavirus, especially HPV 16, infection is the causative agent of cervical cancer among women worldwide. HPV 16 encodes three oncogenes--E5, E6 and E7--of which expression can induce tumorigenesis. E6 and E7 oncoproteins play a major role by inhibiting tumor suppressor p53 and pRb, respectively. Some studies have reported the cervical carcinogenetic E5 action in a transgenic mouse model and cancer cell lines, but limited data exist for cervical tissues from human cases. The aim of this study was to evaluate the HPV16 E5 mRNA expression in 95 cervical tissues from Thai women with abnormal cytology diagnosis between 2011 and 2014. HPV 16 detection and HPV16 E5 expression were performed by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) and two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques, respectively. Our results found that mean age of the patients was 42.16 years (SD=10.26) and HPV16 infection was detected in 36 of 63 HPV-positive samples (57.14%). HPV16 E5 mRNA expression was noted in 19/36 cases (52.78%) and was detected in all cervical abnormal lesions, CIN I-III, and cancer cells groups. HPV16 E5 mRNA showed 2.5-fold expression compared with the positive control (SiHa cell line) in CIN I and CIN II groups ( $P<0.05$ ), and the expression levels were decreased in CIN III and cancer tissues ( $P>0.05$ ), while the other oncogenes--HPV16 E6 and HPV16 E7 mRNA--showed higher expression than HPV16 E5 mRNA in cervical-cancer groups ( $P>0.05$ ). In conclusion, HPV16 E5 mRNA expression was higher in the CIN I-II groups than the positive control. The level decreased in the CIN III and cancer groups. The findings suggested that the E5 oncogene may be an important biomarker for further studies to use as screening target gene for cervical intraepithelial lesions and their progression to cancer. (*Thai Cancer J 2016;36:104-115*)

**Keywords:** human cervical cells, cervical cancer, HPV16, E5 mRNA**บทนำ**

มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นลำดับต้นๆในผู้หญิงทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย จากรายงานอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งทั่วโลก 5 ลำดับแรก ของ International Agency for Research on Cancer (IARC) ในปี พ.ศ. 2555 พบอุบัติการณ์การเกิดผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่มากเป็นลำดับที่ 3 รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้และทวารหนัก และพบอัตราการตายเป็นลำดับที่ 4 รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้และทวารหนัก ตามลำดับ

โดยพบอุบัติการณ์การเกิดผู้ป่วยรายใหม่และอุบัติการณ์การตายประมาณ 14.0 และ 7.5 ต่อประชากรผู้หญิงทั่วโลก 100,000 ราย ตามลำดับ<sup>1</sup> ในขณะที่อัตราการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ของผู้หญิงไทยในปี พ.ศ. 2551 เป็น 16.7 ต่อประชากรหญิงไทย 100,000 รายและพบมากเป็นลำดับที่ 2 รองจากมะเร็งเต้านม<sup>2</sup> ซึ่งสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูกมาจากการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิโลมา (human papillomavirus; HPV) เป็นระยะเวลานาน และพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งมักตรวจพบการติดเชื้อ HPV โดยเฉพาะ

สายพันธุ์ของไวรัสที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค (high-risk type)<sup>3-5</sup> ความเสี่ยงที่สำคัญของการติดเชื้อมีสาเหตุมาจากการถ่ายทอดทางเพศสัมพันธ์ (sexual transmitted disease; STD) ซึ่งมักพบการติดเชื้อในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะสืบพันธุ์ (genital tract) ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย เช่น แคมช่องคลอด (vulva) ช่องคลอด (vagina) ทวารหนัก (anus)<sup>3,6</sup> นอกจากนี้ยังพบปัจจัยอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์ต่อการก่อโรค เช่น การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์และการใช้ยาคุมกำเนิด เป็นระยะเวลานาน เป็นต้น

ไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมาเป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดหูดหรือเนื้องอกทั้งในมนุษย์และสัตว์ มักพบว่ามีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของเซลล์ทั้งในระดับ pre-malignant และ malignant lesion และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ จนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง<sup>8</sup> ส่วนใหญ่พบการติดเชื้อทั้งบริเวณที่เป็น cutaneous (beta-papillomavirus) ซึ่งเป็นการติดเชื้อบริเวณผิวหนังทั่วๆ ไปที่มีไชบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ สายพันธุ์ที่พบมากได้แก่ HPV 1, 4, 5 และ 27 เป็นต้น ในขณะที่บางสายพันธุ์พบการติดเชื้อบริเวณ mucosal epithelial (alpha papillomavirus) โดยเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญต่อการก่อให้เกิดโรคและทำให้เซลล์ที่ระบบอวัยวะสืบพันธุ์เกิดการกลายพันธุ์ เป็นเซลล์มะเร็ง สายพันธุ์ที่พบ เช่น 6, 16, 18 และ 31 เป็นต้น<sup>9-12</sup> สำหรับกลไกการเกิดมะเร็งของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส นั้น ยีนหรือโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญคือ E6 และ E7 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการสังเคราะห์ในช่วงแรกของวงจรชีวิตของไวรัส โดย E6 และ E7 มีคุณสมบัติเป็น oncogenic protein สามารถแทรกเข้าไปรวมกับสาร

พันธุกรรมของสัตว์หรือมนุษย์ (host DNA) ที่มีการติดเชื้อ ส่งผลให้สารพันธุกรรมมีโครงสร้างรวมทั้งการเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติ ซึ่งบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็งของ E6 และ E7 คือ ควบคุมหรือยับยั้งการทำงานของ p53 และ pRb ซึ่งเป็น tumor suppressor genes ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่ผิดปกติ<sup>13</sup> นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยบางส่วนที่ศึกษาบทบาทการทำงานของ E5 พบว่ามีคุณสมบัติเป็น oncoprotein เช่นเดียวกัน แต่มักพบการแสดงออกในช่วงแรกของการติดเชื้อ (early stage) ในขณะที่การตรวจหาการแสดงออกของ E6/E7 จะพบมากหลังจากที่พบการติดเชื้อผ่านไปช่วงระยะหนึ่งแล้ว (late stage) โดยพบว่า E5 มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของเซลล์ภายในร่างกายหลายๆ กลไก ทำให้กลไกเหล่านั้นมีการทำงานแบบผิดปกติและในบางกลไกก็เข้าไปส่งเสริมให้เซลล์มีความผิดปกติเพิ่มมากขึ้น เช่น epidermal growth factor receptor pathway ซึ่งสารพันธุกรรมที่สำคัญของกลไกนี้คือ EGFR, MAP และ ERK1/2 เป็นต้น<sup>14,15</sup> เกิดการกระตุ้นกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่เป็นกระบวนการสำคัญของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) รวมทั้งส่งเสริมการทำงานของสารพันธุกรรมที่ยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่มีความผิดปกติตลอดจนเซลล์มะเร็ง<sup>14</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ E5 มีผลต่อระบบการทำงานของภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย โดยเสริมการทำงานร่วมกับ E6 หรือ E7 ในการกระตุ้นการหลั่ง COX-2 ส่งผลให้เซลล์เกิดการอักเสบเช่นเดียวกัน<sup>14,15</sup> อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่จะดำเนินการศึกษาในโมเดล

จำลองหรือใน cancer cell lines แต่การศึกษาในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ผ่านมายังมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ E5 ของ HPV 16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆจนถึงเซลล์มะเร็งจากตัวอย่างของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและรักษา ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ E5 กับระดับความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกเพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปศึกษาต่อของการคัดกรองเซลล์มะเร็งที่พบความผิดปกติในระยะต่างๆสำหรับการเฝ้าระวังการก่อโรคต่อไป

## วัสดุและวิธีการ

### กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจากเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระยะต่างๆจนถึงเซลล์มะเร็งในบล็อกชิ้นเนื้อพาราฟินที่เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยหรือรักษา ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2557 จำนวน 95 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดมีรายงานผลการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยายืนยันผลการตรวจ การศึกษานี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการวิจัยและคณะกรรมการวิจัยในคน (001/2556) สถาบันมะเร็งแห่งชาติให้สามารถดำเนินโครงการวิจัย

### การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ในการเตรียมตัวอย่างจากบล็อกชิ้นเนื้อเริ่มจากตัดชิ้นเนื้อที่มีความหนาประมาณ 5-10 ไมครอนจำนวน 6 ชิ้นและเก็บในหลอดที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่าง

ที่ตัดมาดำเนินการกำจัดพาราฟินที่ห่อหุ้มชิ้นเนื้อออกโดยเติมไซลีน 1 มิลลิลิตรหรือให้ท่วมชิ้นเนื้อ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่าพาราฟินจะละลายหมด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที ดูดไซลีนทิ้ง จากนั้นล้างชิ้นเนื้อด้วย absolute alcohol 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะเติมแอลกอฮอล์ประมาณ 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาทีประมาณ 10 นาที/ครั้ง ดูดแอลกอฮอล์ทิ้งจนหมดวางให้ตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dried) จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ จนกว่าจะนำไปใช้งาน

### การตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ของ HPV

ผู้วิจัยนำตัวอย่างที่เตรียมมาดำเนินการสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ QIAamp Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนที่แนบมาพร้อมกับชุดสกัด จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาทดสอบด้วย  $\beta$ -globin gene ที่มี primer 2 สายคือ BGPCO3; ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC และ BGPCO5; GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT<sup>16</sup> ด้วยวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain reaction (PCR) ในส่วนผสม 25 ไมโครลิตรของ 5 ไมโครลิตรของ DNA จากตัวอย่าง, 10xPCR buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 20 pmole ของ primer แต่ละสาย Taq polymerase enzyme (QIAGEN, Germany) และน้ำกลั่น นำส่วนผสมทั้งหมดทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มจำนวน PCR (Applied Biosystems, USA) ตามขั้นตอนคือ บ่มที่อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 40 รอบของอุณหภูมิ 94°ซ 1 นาที 58 °ซ 2 นาทีและ 72°ซ

1.30 นาที จากนั้นปั๊มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 4 นาทีเป็นขั้นตอนสุดท้าย ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 2% agarose gel ที่ผสมน้ำย่าย้อม DNA; GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, USA) ตัวอย่างที่ให้ผลลบหรือมี band ปรากฏบนเจลจะนำมาใช้ในการตรวจหา HPV DNA และจำแนกสายพันธุ์

สำหรับการตรวจหา HPV DNA และจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสในการศึกษานี้เป็นการทดสอบตามวิธีของ Jacob MV และคณะ<sup>16,17</sup> ด้วยวิธี polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) โดยใช้ GP5+/bio6+ เป็น specific primers ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจหา HPV DNA ซึ่งตัวอย่างที่มีผลลบจะนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยการเติมใน streptawell plate (Roche, Germany) ที่เคลือบด้วย biotin และเติม 1xSCC, 0.5% Tween 20 นำไปปั๊มที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น hybridize กับ oligoprobe cocktail ของ high risk HPV types (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68) และ low risk HPV types (HPV 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 และ 89) ที่มี digoxigenin labeled (Roche, Germany) เพื่อคัดกรองกลุ่มของสายพันธุ์ นำไปปั๊มที่อุณหภูมิ 55°C 60 นาที จากนั้นดูผลสารละลายที่ก่อก่อนเติม anti-digoxigenin AP conjugate (Roche, Germany) และ p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA) ตามลำดับ ในระหว่างขั้นตอนของการเติมสารแต่ละชนิดจะต้องดูสารเก่าจนหมดและล้างด้วย

1xSCC, 0.5% Tween 20 ประมาณ 3 ครั้ง นำไปปั๊มที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์ผลด้วย microplate reader (Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 405 และ 620 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารพันธุกรรมของไวรัสหรือ HPV DNA สำหรับการทดสอบสายพันธุ์จำเพาะของ HPV ในแต่ละตัวอย่างสามารถดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับการคัดกรองกลุ่มใหญ่ แต่เปลี่ยนชนิดของ oligoprobe ที่นำมาทดสอบจาก oligoprobe cocktail เป็น HPV specific probe ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ HPV 16 จะถูกคัดเลือกสำหรับดำเนินการตรวจหาการแสดงออกของ E5 ต่อไป

### การสกัด total RNA และการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ผู้วิจัยนำตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ HPV16 มาสกัด RNA เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป High Pure FFPE RNA isolation kit (Roche, Germany) ตามขั้นตอนการสกัดที่แนบมากับชุดน้ำยา ซึ่ง total RNA ที่สกัดได้ต้องเก็บไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลาของการทดสอบ เนื่องจากเป็นสารพันธุกรรมที่ถูกทำลายได้ง่ายจากความร้อน แล้วนำไปวัดความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำ total RNA ที่ได้จากการสกัดไปสังเคราะห์สาย complementary DNA หรือ cDNA ด้วยวิธีการสังเคราะห์ของชุดน้ำยา Superscript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase protocol (Invitrogen, USA) ซึ่งจะใช้ total RNA ปริมาณ 11 ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา โดยสาย cDNA ที่ได้จะนำมาใช้

เป็นสายตั้งต้น (template) ในการศึกษาการแสดงผลของ E5 mRNA

### การตรวจหาระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA

การทดสอบใช้วิธี semi-quantitative RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบผลระดับการแสดงออกของ E5 กับ HPV oncogene อีก 2 ชนิดคือ E6 และ E7 ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆ โดยใช้ primers sequence ของ HPV16 E5 ตามวิธีการทดสอบของ Schrevel M และคณะ<sup>18</sup> สำหรับ primers sequence ของ HPV16 E6 และ HPV16 E7 จะเป็นลำดับเบสเช่นเดียวกับการทดสอบของ Meissner JD และคณะ<sup>17</sup> โดยมี  $\beta$ -globin เป็น internal control และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับ positive control คือ ระดับของ HPV16 E6 ที่แยกได้จาก SiHa cell line เริ่มการทดสอบโดยเพิ่มปริมาณของ cDNA ด้วยการผสม cDNA 3 ไมโครลิตรในส่วนผสมของ 10xPCR buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 20 pmole ของ primer แต่ละสาย, Taq polymerase enzyme (QIAGEN, Germany) และน้ำ เริ่มปฏิกิริยาดำเนินการที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 40 รอบของอุณหภูมิ 94°C 1 นาที 55°C 1 นาที และ 72°C 1 นาที จากนั้นบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 4 นาที เป็นขั้นตอนนี้สุดท้าย แล้วนำ PCR product มาแยกด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า และวิเคราะห์ผลภายใต้ UV ด้วยเครื่อง densitometer (SYNGENE, UK) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมแต่ละชนิดด้วย GeneTools program (SYNGENE, UK)

ในการวิเคราะห์ผลการแสดงผลของยีนทั้ง

3 ชนิด โดยการคำนวณค่า normalize เปรียบเทียบค่า band intensity ของ E5, E6 หรือ E7 ต่อ band intensity ของ internal control ในแต่ละตัวอย่าง และคำนวณค่า relative induction เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (positive control) ที่เป็นตัวอย่างจาก SiHa cell line ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV16

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์แบบสถิติพรรณนาแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ความถี่และร้อยละของระดับการแสดงออกของ HPV16 E5/E6 และ E7 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่พบความผิดปกติในระยะต่างๆ และใช้การวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA ในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ในแต่ละกลุ่มเทียบกับการแสดงผลในกลุ่มควบคุม โดยมีระดับความเชื่อมั่นทางนัยสำคัญที่  $P < 0.05$

### ผลการศึกษา

จากผลการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระยะต่างๆและเก็บรักษาในบลิ๊อคพาราฟินจำนวน 95 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากการส่งตรวจปี 2554-2555 และ 2556-2557 จำนวน 5 และ 90 ตัวอย่างตามลำดับ ซึ่งกลุ่มตัวอย่างมีช่วงอายุตั้งแต่ 19-70 ปี (อายุเฉลี่ย $\pm$ SD=42.16 $\pm$ 10.26 ปี) สามารถจัดตามระดับความผิดปกติของเซลล์เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งพบเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับ CIN I -CIN III มากในช่วงอายุ 31-40 ปี ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกพบมากในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 40 ปีดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของกลุ่มศึกษาที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆ แบ่งตามช่วงอายุ (n=95)

ช่วงอายุ (ปี)	ระดับความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก				
	Abnormal lesions	CIN I	CIN II	CIN III	ICC
จำนวน (ร้อยละ)					
≤30	10 (47.62)	6 (20.00)	2 (13.33)	1 (6.25)	-
31-40	7 (33.33)	13 (43.33)	4 (26.67)	8 (50.00)	2 (15.38)
41-50	3 (14.29)	7 (23.33)	5 (33.33)	4 (25.00)	5 (38.46)
51-60	1 (4.76)	1 (3.33)	4 (26.67)	3 (18.75)	6 (46.15)
≥61	-	3 (10.00)	-	-	-
รวม	21	30	15	16	13

Abnormal lesions; inflammation/mild dysplasia etc.

CIN: cervical intraepithelial neoplasia, ICC: invasive cervical cancer

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อ HPV ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆ (n=95)

การติดเชื้อ HPV	ระดับความผิดปกติ				
	Abnormal lesions	CIN I	CIN II	CIN III	ICC
จำนวน (ร้อยละ)					
ผลลบ	10 (47.62)	15 (50.00)	4 (26.67)	2 (12.5)	1 (7.69)
ผลบวก	11 (52.38)	15 (50.00)	11 (73.33)	14 (87.5)	12 (92.31)
พบ HPV16	5	5	8	7	11

Abnormal lesions: inflammation/mild dysplasia etc.

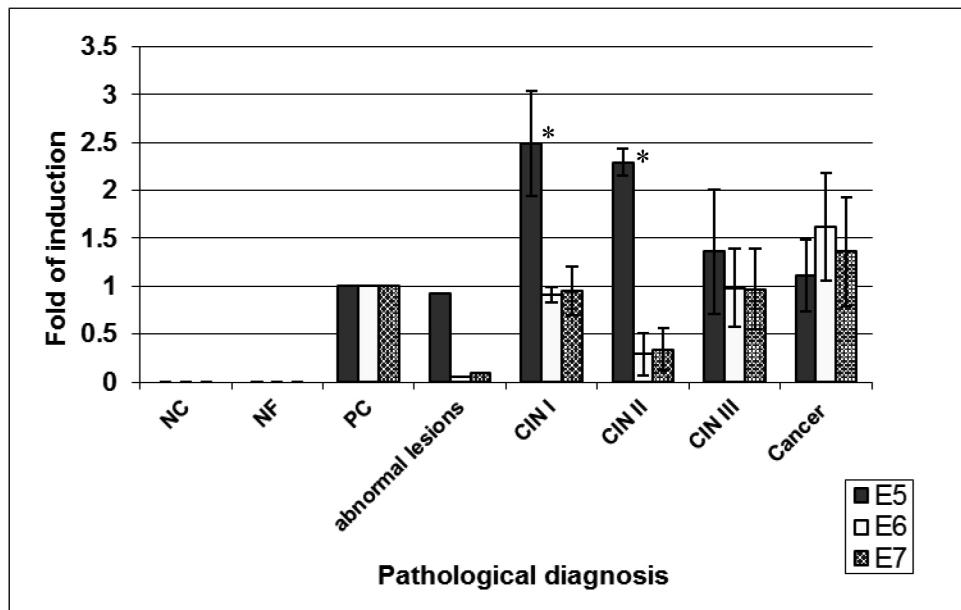
CIN: cervical intraepithelial neoplasia, ICC: invasive cervical cancer

จากผลการตรวจหาการติดเชื้อ HPV ในเซลล์ปากมดลูกด้วยวิธี PCR-EIA พบว่า ประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยที่มีปากมดลูกผิดปกติเพียงเล็กน้อย (abnormal lesions) และ CIN I มีการติดเชื้อ HPV ร้อยละ 52.28 และ 50 ตามลำดับ แต่ผู้ป่วยที่มีเซลล์ผิดปกติเพิ่มมากขึ้นจนเป็นเซลล์มะเร็งพบว่ามี การติดเชื้อไวรัส

เพิ่มมากขึ้นตามระดับความผิดปกติ โดยพบร้อยละ 73.33, 87.5 และ 92.31 ตามลำดับ และจากการตรวจหาตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV 16 พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วย มะเร็ง (ICC) มีการติดเชื้อ HPV 16 มากที่สุดเมื่อ เปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม ดังแสดง ในตารางที่ 2

จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ในตัวอย่างที่ตรวจพบการติดเชื้อ HPV16 และเปรียบเทียบผลการแสดงออกของ HPV oncogenic genes อีก 2 ชนิด คือ HPV16 E6 mRNA และ HPV16 E7 mRNA พบว่า ระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติแบบ abnormal lesions, CIN I และ CIN II มีปริมาณสูงกว่าการแสดงออกของ HPV16 E6 และ HPV16 E7 mRNA และระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติใน

ระดับ CIN I-II สูงกว่าในเซลล์ที่เป็นกลุ่มควบคุม (positive control; SiHa) มากกว่า 2 เท่า ( $P=0.014$  และ  $0.022$  ตามลำดับ) และพบว่าระดับการแสดงออกลดลงเมื่อเซลล์มีความผิดปกติในระยะก่อนเข้าสู่มะเร็ง (CIN III) และเซลล์มะเร็ง ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกพบระดับการแสดงออกของ HPV16 E6 mRNA และ HPV16 E7 mRNA สูงกว่า HPV16 E5 mRNA แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลระดับการแสดงออกของ HPV16 E5, HPV16 E6 และ HPV16 E7 mRNA ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระยะต่างๆ

NC: negative control, NF: Non-HPV infection, PC: positive control (SiHa cell line), abnormal lesions; mild dysplasia/inflammation etc, CIN I-III: cervical intraepithelial neoplasia I-III, \* $P < 0.05$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม: positive control

## วิจารณ์และสรุป

จากผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างจากปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆ จำนวน 95 ตัวอย่าง เป็นผู้ป่วยที่ช่วงอายุ 41-60 ปีมากที่สุด โดยมีความผิดปกติตั้งแต่ในระดับ CIN II จนถึงเซลล์มะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ HPV information center<sup>3</sup> ที่พบผู้ป่วยในช่วงอายุ 40-65 ปีมากที่สุด ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 40 ปี พบเป็นมะเร็งปากมดลูกค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จนวนกลายเป็นเซลล์มะเร็งที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ HPV นั้นจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาอันอาจมากกว่า 10 ปีขึ้นไปในการพัฒนาความผิดปกติของเซลล์และหากผู้ที่พบความผิดปกติไม่ได้เฝ้าระวังหรือรักษาตั้งแต่เริ่มแรกก็มีโอกาสกลายเป็นมะเร็งปากมดลูกได้<sup>3,8,13</sup> จากผลการตรวจหาการติดเชื้อ HPV ในการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีการติดเชื้อ HPV มากถึงร้อยละ 92.3 รองลงมาคือ CIN III (ร้อยละ 87.5) และ CIN II (ร้อยละ 73.3) ซึ่งเป็นความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกก่อนเป็นมะเร็ง โดยผลดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับรายงานอื่นที่พบว่า การติดเชื้อ HPV มีความสัมพันธ์กับระดับความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก<sup>3,5,13</sup>

จากผลการศึกษาโครงสร้างและกระบวนการเกิดมะเร็งในเซลล์ปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV ร่วมด้วย พบว่า HPV มีสารพันธุกรรม 3 ชนิดที่มีบทบาทสำคัญสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ของมนุษย์เกิดความผิดปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ คือ E5, E6 และ E7 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ในช่วงแรกของวงจรชีวิตของไวรัส โดยโปรตีน E6 และ E7 มีบทบาทสำคัญ

ในการยับยั้งการทำงานของ p53 และ pRb ตามลำดับ ส่งผลให้ระบบการทำงานภายในเซลล์เกิดความผิดปกติ โดยทั่วไปมักตรวจพบการแสดงออกของสารพันธุกรรมหรือโปรตีนทั้งสองชนิดในช่วงที่เซลล์มีการติดเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่ง<sup>8,13</sup> ในขณะที่โปรตีน E5 มักตรวจพบในช่วงแรกของการติดเชื้อ HPV แต่การวิจัยบทบาทของโปรตีน E5 ยังพบค่อนข้างจำกัดเมื่อเทียบกับผลการวิจัยในโปรตีน E6 และ E7 ซึ่งมีการศึกษากันมาก จากผลการศึกษาของ Chen JL และคณะ<sup>19</sup> สามารถตรวจพบการแสดงออกของ E5 ใน HPV สายพันธุ์ที่ 16 ของเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระยะต่างๆ ด้วยวิธีการย้อมเซลล์แบบ immunohistochemistry และยังคงพบว่า E5 สามารถเสริมการทำงานของ E6 และ E7 ให้มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น

สำหรับผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ E5 mRNA ในการศึกษาที่เลือกทดสอบในสายพันธุ์ที่ 16 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบมากที่สุดและมีความรุนแรงต่อการก่อโรคค่อนข้างสูง จากผลการวิจัยนี้สามารถตรวจพบตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16 จำนวน 36 ตัวอย่างจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่พบการติดเชื้อ HPV จำนวน 63 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57.14 ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้จะน้อยกว่าการศึกษาทางระบาดวิทยาอย่างมาก แต่ร้อยละที่ตรวจพบการติดเชื้อ HPV16 ค่อนข้างใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นที่มักพบการติดเชื้อ HPV16 ร้อยละ 50 ขึ้นไป<sup>3-6,11-13</sup> โดยตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV16 จะมีทั้งที่พบการติดเชื้อ HPV16 เพียงชนิดเดียวและติดเชื้อ HPV16 ร่วมกับสายพันธุ์อื่นและจากการตรวจระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA พบตัวอย่างที่มี

การแสดงผลของยีนดังกล่าวจำนวน 19/36 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบในกลุ่มเซลล์มะเร็งมากที่สุดจำนวน 8 ตัวอย่างจากทั้งหมด 11 ตัวอย่างที่พบในกลุ่มนี้ คิดเป็นร้อยละ 72.7 ในขณะที่เซลล์ที่พบความผิดปกติแบบ CIN I พบร้อยละ 50 ซึ่งข้อมูลที่ได้แตกต่างกับผลการศึกษาของ Chen JL และคณะ<sup>19</sup> ที่ตรวจการแสดงออกของ HPV16 E5 ด้วยการใช้วิธี immunohistochemistry โดยพบเซลล์ที่ย้อมติด E5 ประมาณร้อยละ 80, 90 และ 60 ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติแบบ LSIL, HSIL และเซลล์มะเร็งตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่จัดเก็บ จำนวนและการเตรียมตัวอย่าง อาจมีความแตกต่างกัน รวมทั้งวิธีการตรวจหาการแสดงออกของสารพันธุกรรม โดยการย้อมเซลล์เป็นการตรวจจบบางชิ้นเนื้อโดยตรง แต่การตรวจด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้ในการศึกษานี้มีขั้นตอนที่ค่อนข้างซับซ้อนและจำเป็นต้องนำเซลล์มาสกัด RNA ก่อน อาจทำให้เกิดการสูญเสียสารพันธุกรรมที่นำมาทดสอบ ในระหว่างขั้นตอนการดำเนินการ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้พบการแสดงออกของ E5 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติแบบ CIN I และ CIN II ค่อนข้างสูงกว่าในกลุ่มอื่น โดยมีระดับการแสดงออกสูงถึงมากกว่า 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (SiHa cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มักนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ HPV16<sup>17</sup> นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของ HPV16 E6 และ HPV16 E7 ในกลุ่มของ CIN II ต่ำกว่าระดับการแสดงออกในกลุ่มของ CIN I ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีจำนวนน้อยและตัวอย่างที่ใช้เป็นชิ้นเนื้อที่เก็บในรูปของพาราฟินบล็อก อาจเป็นสาเหตุให้สาร

พันธุกรรมบางส่วนที่อยู่ในตัวอย่างถูกทำลายและส่งผลให้การทดสอบมีความคลาดเคลื่อนได้ หากเพิ่มจำนวนตัวอย่างหรือเปลี่ยนตัวอย่างเป็นตัวอย่างเซลล์ที่เก็บมาจากผู้ป่วยโดยตรง อาจให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น ในขณะที่กลุ่มที่พบความผิดปกติเพียงเล็กน้อยพบระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ค่อนข้างใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่พบการแสดงออกของ HPV16 E6 และ HPV16 E7 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น<sup>15,20</sup> ที่มักตรวจพบ E5 เมื่อมีการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นและเป็นช่วงที่ไวรัสอยู่เป็นอิสระภายในเซลล์ก่อนแทรกไปรวมตัวกับสารพันธุกรรมของ host cell แต่ระดับการแสดงออกของ E5 เริ่มลดลงเมื่อเซลล์มีความผิดปกติมากขึ้น ในทางกลับกันระดับการแสดงออกของ E6 และ E7 เพิ่มขึ้นตามระดับความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกที่ลดลงและพบเพิ่มสูงสุดในเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นระยะที่สารพันธุกรรมของไวรัสมีการรวมตัวกับสารพันธุกรรมของ host cell เกือบทั้งหมด<sup>14,15,21,22</sup>

จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า ระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA พบมากในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับ CIN I-II ซึ่งเป็นเซลล์ที่เพิ่งมีการติดเชื้อ HPV ไม่นาน ในขณะที่ HPV16 E6 และ HPV16 E7 mRNA พบมากในเซลล์ที่มีความผิดปกติเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะ CIN III จนถึงเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้เหล่านี้เป็นการศึกษาในระดับเบื้องต้นเพื่อประเมินระดับการแสดงออกของ HPV16 E5 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆ และเป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรงมิใช่การจำลองโมเดล ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาพัฒนาต่อยอดเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นถึงระดับความผิดปกติ

ของเซลล์ปากมดลูก รวมทั้งศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่หรือกลไกการทำงานของ HPV เพื่อใช้ประเมินความรุนแรงของการก่อโรค และผลกระทบต่อระบบการทำงานของสารพันธุกรรมอื่นๆที่อยู่ภายในเซลล์ต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่อนุญาติงบประมาณในการดำเนินโครงการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากกลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในการอำนวยความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย และขอขอบคุณ ดร.สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ ในการอนุเคราะห์ช่วยตรวจสอบบทนิพนธ์ต้นฉบับ

### เอกสารอ้างอิง

1. GLOBALCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr/facysheet.asp>. Accessed April 17, 2015.
2. Kruhuprea T, Attasra P, Sriplung H, Wiangnon S, Sangrajrang S, editors. Cancer in Thailand Vol VII, 2007-2008, Bangkok; 2013.
3. HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Disease Report. Available at: [www.hpvcentre.net](http://www.hpvcentre.net). Accessed October 30, 2014.
4. Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah K, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
5. Walboomers M, Jacob MM, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
6. Ramet J, van Esso D, Meszner Z. Position paper-HPV and the primary prevention of cancer: improving vaccine uptake by paediatricians. *Eur J Pediatr* 2011;170:309-21.
7. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9; Role of Mucosal Human Papillomavirus in Nongenital Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:57-65.
8. International Agency for Research on Cancer Monograph on Evaluation of Carcinogen Risks to Humans; Human papillomavirus 1995;64:35-222.
9. Li TT, Zhao LN, Liu ZG, Han Y, Fan DM. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J Gastroenterol* 2005;3:419-34.
10. Sur M, Cooper K. The role of the human papilloma virus in esophageal cancer. *Pathol* 1998;88:63-73.
11. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
12. Smith S, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621-32.
13. zur Hausen H. Papillomavirus and cancer, From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
14. Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, et al. Review article; Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1930-5.
15. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio S, Roberto S, Campo Ms, et al. Review article; Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 2011;10:2-18.
16. Jacob MV, van den Brule AJ, Snijder PJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomer JM. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV-16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol* 1996;49:223-9.
17. Meissner JD. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the Caski, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 1999;80:1725-33.
18. Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, Luthra UK. Analysis of polymerase chain reaction of the physical state of human papilloma type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic region. *J Gen Virol* 1992;73:2327-36.

19. Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplasia changes in the uterine cervix. *J Biomed Sci* 2001;8:206-13.
20. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The Natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Rev* 2007;7:11-22.
21. Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 1995;69:3185-92.
22. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivnen SK, Auvinen P, Auvinen E, et al. Human papillomavirus16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One* 2011;6:e21646.



# การแสดงออกของยีนเป้าหมายใหม่ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ชาวไทย

นันทนา มีศิริพันธุ์

**บทคัดย่อ** มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบมากและเป็นปัญหาสำคัญของผู้หญิงทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในมะเร็งเต้านมโดยเทคนิคทาง microarray ช่วยให้เข้าใจพื้นฐานระดับโมเลกุลของมะเร็งดังกล่าวได้ดีขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบตัวบ่งชี้จำเพาะ (specific makers) เพื่อช่วยในการวินิจฉัย พยากรณ์โรค และการรักษาแบบมุ่งเป้า เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทยโดยเทคนิค Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> จากยีนเป้าหมายทั้งหมด 35,000 ชนิด พบว่ามีการแสดงออกของยีนจำนวน 928 ชนิด แบ่งออกเป็นการแสดงออกแบบเพิ่มขึ้น (up-regulated) 423 ชนิด และการแสดงออกแบบลดลง (down-regulated) 505 ชนิด โดยพบยีนจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ COL10A1 (Collagen, type X alpha 1), INHBA (Inhibin, beta A), CDC45/CDC45L (Cell Division Cycle 45/ Cell Division Cycle 45-Like), EPYC (Epiphycan), และ TMEM8A (Transmembrane protein 8A) ที่ตรวจพบการแสดงออกสูงกว่า 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ และเนื่องจากข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีน 5 ชนิดดังกล่าวพบน้อยมาก จึงเป็นยีนเป้าหมายที่น่าสนใจศึกษาต่อไป ซึ่งในบทความนี้จะกล่าวถึงรายละเอียดข้อมูลเกี่ยวกับยีนทั้ง 5 ชนิดเท่าที่สืบค้นได้ (วารสารโรคมะเร็ง 2559;36:116-121)

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน ยีนเป้าหมาย มะเร็งเต้านม



**Expression of Novel Target Genes in Thai Breast Cancer**by **Nuntana Meesiripan**

Research Division, National Cancer Institute, Bangkok

**Abstract** Breast cancer is the most common cancer affecting women worldwide, including Thailand. Whole transcription profiles of breast cancer obtained by microarray should lead to a better understanding of the molecular basis of cancer, and allow for the determination of specific markers for diagnosis and prognosis, and potentially providing novel targets for therapy. One recent study elucidated the whole transcript expression of ~ 35,000 target genes in Thai breast-cancer patients using Affymetrix GeneChip . The analysis revealed the differential expression profiles of 928 genes, comprising 423 up-regulated and 505 down-regulated genes. Five novel target genes--COL10A1 (Collagen, type X alpha 1), INHBA (Inhibin, beta A), CDC45/CDC45L (Cell Division Cycle 45/ Cell Division Cycle 45-Like), EPYC (Epiphycan), TMEM8A (Transmembrane protein 8A)--were found to be highly expressed (> 2-fold change) when compared with normal tissues. The limited research data on these 5 genes invites suggests a need for study. This article reviewed the information currently available on these 5 genes. (*Thai Cancer J 2016;36:116-121*)

**Keywords:** gene expression, target genes, breast cancer

มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยและเป็นปัญหาสำคัญของผู้หญิงทั่วโลก โดยพบว่าอัตราการเป็นมะเร็งรายใหม่ 1.4 ล้านราย คิดเป็นอัตราการเกิดมะเร็งเต้านม 38.9 ต่อแสนประชากร<sup>1</sup> และยังเป็นสาเหตุการตาย 458,400 รายของผู้หญิงทั่วโลก<sup>2</sup> ในประเทศไทยพบมะเร็งเต้านมมากเป็นอันดับหนึ่งในหญิงไทย โดยมีอัตราการเกิดมะเร็งเต้านมในเพศหญิงเป็น 30.7 ต่อแสนประชากร<sup>3</sup> จากสถิติโรคมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ.2554 พบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เข้ารับการรักษที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวนทั้งหมด 3341 ราย เป็นผู้ป่วยมะเร็ง เต้านม 761 ราย<sup>4</sup> และจากสถิติสาธารณสุขของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข ระบุว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่ง โดยพบอัตราการตายของโรคมะเร็งในปีพ.ศ. 2554 เป็น 95.2 ต่อแสนประชากร ซึ่งเป็นการตายจากมะเร็งเต้านม 8.4 ต่อแสนประชากร<sup>5</sup>

สาเหตุการเกิดมะเร็งเต้านมนั้นยังไม่แน่ชัด แต่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้มีโอกาสเป็นมะเร็งเต้านม เช่น เพศ อายุ ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม ครอบครัวมีประวัติการเป็นมะเร็ง ความเสี่ยงส่วนบุคคล เชื้อชาติและวัฒนธรรม ความหนาแน่นของเนื้อเยื่อเต้านม การดำเนินชีวิตที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ และการสูบบุหรี่<sup>6</sup>

จากการสืบค้นข้อมูลที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งเต้านมจำนวนมากที่พยายามจะค้นหาวิธีการตรวจหา biomarker ใหม่ ๆ เพื่อตรวจหามะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกที่มีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยในการทำนายโรค พยากรณ์โรค และการรักษาที่เหมาะสม มีรายงานพบการแสดงผลแบบเพิ่มปริมาณของยีนในเซลล์มะเร็งหรือการหลังโปรตีนเพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมซึ่งสามารถตรวจได้โดยวิธีที่

ไม่ยุ่งยาก ได้แก่ real-time RT-PCR และ ELISA เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคทาง DNA และ cDNA microarray ได้ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนรวมทั้ง การเพิ่มจำนวนยีน การแสดงออกแบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง และการเปลี่ยนแปลงของยีน ซึ่งเทคนิค microarray สามารถใช้ประเมินการแสดงออกของยีนจำนวนมากได้ ช่วยให้เข้าใจพื้นฐานระดับโมเลกุลของโรคมะเร็งได้ดีขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบตัวชี้จำเพาะ (specific markers) เพื่อช่วยในการวินิจฉัย พยากรณ์โรคและการรักษา แบบมุ่งเป้า<sup>7</sup>

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานล่าสุดพบการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย โดยใช้วิธี Affymetrix GeneChip® พบว่ามีการแสดงออกของยีนจำนวน 928 ชนิด แบ่งออกเป็นการแสดงออกแบบเพิ่มขึ้น (up-regulated) 423 ชนิด และการแสดงออกแบบลดลง (down-regulated) 505 ชนิด<sup>8</sup> ในบทความนี้กล่าวถึงยีนจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ COL10A1 (Collagen, type X alpha 1), INHBA (Inhibin, beta A), CDC45/CDC45L (Cell Division Cycle 45/ Cell Division Cycle 45-Like), EPYC (Epiphycan), และTMEM8A (Transmembrane protein 8A) ที่ตรวจพบการแสดงออกสูง (9.15, 5.95, 5.66, 3.52 และ 2.52 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ) อีกทั้งข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีนทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวพบน้อยมาก จึงเป็นยีนเป้าหมายที่น่าสนใจศึกษาต่อไป ซึ่งในบทความนี้จะป็นรายละเอียดข้อมูลเกี่ยวกับยีนทั้ง 5 ชนิดเท่าที่สืบค้นได้

### COL10A1

ยีน COL10A1 หรือ collagen, type X alpha 1 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ตำแหน่ง 6q21-q22 เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการแปลรหัส collagen ในคนชนิด alpha 1(X) ซึ่งเป็น collagen สายสั้น โดยที่การเกิด point mutation และ deletion ของ COL10A1 มีผลทำให้การแปลรหัสเป็น alpha1(X) carboxyl-terminal (NC1) domain จะทำให้เกิด metaphyseal chondrodysplasia type schmid<sup>9</sup> โดยปกติจะพบการแสดงออกของยีน COL10A1 ในเนื้อเยื่อปกติและพบเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็ง<sup>10</sup> การศึกษามะเร็งเต้านมเพื่อดูการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ matrix modeling และ matrix metalloproteinases ใน CD10+ cell ที่สกัดจากเซลล์เนื้องอกและเนื้อเยื่อปกติ พบว่า การแสดงออกของยีน COL10A1 มีความแตกต่างของระดับการแสดงออกใน CD10+cell ที่สกัดจากเซลล์เนื้องอกและเนื้อเยื่อปกติ ซึ่ง collagen (COL10A1 และ COL11A1) เป็นส่วนหนึ่ง ใน transport barrier ของ extracellular matrix<sup>11</sup> ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง<sup>12</sup> และสามารถใช้เป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการวินิจฉัยและการรักษาพวก solid tumor<sup>13</sup>

### INHBA

ยีน INHBA หรือ inhibin, beta A อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 ตำแหน่ง 7p14-p15<sup>14</sup> ทำหน้าที่ในการแปลรหัสโปรตีน inhibin, beta A<sup>15</sup> inhibin เป็น growth factor ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (differentiation) และการแบ่งตัว (proliferation) ของเซลล์เป็น multifunctional molecule ในการควบคุมการทำงาน

ของ reproductive และ non-reproductive<sup>16</sup> ทั้งในและนอกระบบสืบพันธุ์โดย inhibin หลังออกมาจากต่อม pituitary ทำหน้าที่ในการควบคุมฮอร์โมน follicle-stimulating (FSH) มีหน่วยย่อยคือ inhibin alpha และ beta (A และ B)<sup>17</sup> ในมะเร็งเต้านมมีการตรวจพบทั้ง inhibin alpha, inhibin beta A และ inhibin beta B ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ fibroadenoma และมะเร็งเต้านมโดยเฉพาะการแสดงผลของยีนชนิด beta A พบในมะเร็งเต้านมระยะลุกลามสูงกว่าในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ<sup>18</sup>

### CDC45/CDC45L

ยีน CDC45 หรือ cell division cycle 45/ cell division cycle 45-like อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 22 ตำแหน่ง 22q11.2 ทำหน้าที่แปลรหัสโปรตีน CDC45 และเป็นโปรตีนที่จำเป็นในการเริ่มการจำลองดีเอ็นเอ<sup>19</sup> โดยโปรตีน CDC45 มีบทบาทหลักในการจำลองดีเอ็นเอตั้งแต่วะยะเริ่มต้นจนถึงระยะ elongation ซึ่งโปรตีน CDC45 เป็นส่วนหนึ่งของ CMG (CDC45-mini-chromosome maintenance 2-7-GINS) complex ที่จุดเริ่มต้นใน ระยะ G ของ cell cycle<sup>20</sup> โดยปกติการแสดงผลของยีน CDC45 จะตรวจไม่พบหรือพบในช่วงเวลาที่ cell cycle เข้าสู่ขบวนการแบ่งเซลล์ แต่ระดับโปรตีน CDC45 จะเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมกำเนิดในคนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ<sup>21</sup> และพบว่ายีน CDC45L เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์และมีรายงานพบการแสดงผลของยีนชนิดนี้สูงในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี ER บวก<sup>22</sup>

### EPYC

ยีน EPYC หรือ epiphycan อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ตำแหน่ง 12q21 ทำหน้าที่แปลรหัสโปรตีน dermatan sulfate proteoglycan 3 โดยที่โปรตีนชนิดนี้เป็นสมาชิกของกลุ่ม leucine-rich repeat protein ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้าง fibrillogen โดยทำงานร่วมกับ collagen fibrils และโปรตีน extracellular matrix อื่นๆ<sup>23</sup> มีรายงานพบว่ายีน EPYC เกี่ยวข้องกับการเกิดสายตาสั้น (myopia) ในหนูทดลอง<sup>24</sup>

### TMEM8A

ยีน TMEM8A หรือ transmembrane protein 8A อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ตำแหน่ง 16p13.3 ทำหน้าที่แปลรหัสโปรตีน transmembrane protein 8A หรือ lysosomal protein ซึ่งโปรตีนนี้เป็น cell surface adhesion molecule และเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ T cell resting status ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของ T cell<sup>25</sup>

### สรุป

จากรายงานเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่า ยีนเป้าหมายทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวข้างต้นสามารถตรวจพบการแสดงผลออกในมะเร็งเต้านมของหญิงไทยด้วยเทคนิค Affymetrix GeneChip® โดยพบการแสดงผลแบบเพิ่มขึ้น (up-regulated) จึงเป็นยีนเป้าหมายชนิดใหม่ที่ น่าสนใจศึกษาต่อยอดเพื่อประโยชน์ในการช่วยพยากรณ์โรค และการรักษาแบบมุ่งเป้าในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- Formenti SC, Arslan AA, Love SM. Global breast cancer: the lessons to bring home. *Int J Breast Cancer* 2012;2012:249501.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- International Agency for Research on Cancer. IARC Handbooks of cancer prevention: weight control and physical activity. Vol.6. Lyon:IARC Press; 2002.
- National Cancer Institute. Hospital-based cancer registry. 2011. Available at: [http://www.nci.go.th/th/File\\_download/Nci%20Cancer%20Registry/Hospital%20Based%20Cancer%20Registry2010.pdf](http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/Hospital%20Based%20Cancer%20Registry2010.pdf). Accessed September 1, 2016.
- สถิติสาธารณสุขปี 2554 (2550-2554) สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. เข้าถึงได้จาก: [http://bps.moph.go.th/new\\_bps/sites/default/files/statistic54.pdf](http://bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/files/statistic54.pdf). เข้าถึงเมื่อ 1 ก.ย. 2559.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society; 2012.
- Yuan Y, Failmezger H, Rueda OM, Ali HR, Graf S, Chin SF, et al. Quantitative image analysis of cellular heterogeneity in breast tumors complements genomic profiling. *Sci Transl Med* 2012;4:157ra143.
- Arnutti P, Kotepui M, Asanprakit W, Punyarit P, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Harnroongroj T, et al. Determination of whole transcription profiles and specific pathways in invasive ductal breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6:1112-20.
- Wallis GA, Rash B, Sykes B, Bonaventure J, Maroteaux P, Zabel B, et al. Mutations within the gene encoding the alpha 1 (X) chain of type X collagen (COL10A1) cause metaphyseal chondrodysplasia type Schmid but not several other forms of metaphyseal chondrodysplasia. *J Med Genet* 1996; 33:450-7.
- Chapman KB, Prendes MJ, Sternberg H, Kidd JL, Funk WD, Wagner J, et al. COL10A1 expression is elevated in diverse solid tumor types and is associated with tumor vasculature. *Future Oncol* 2012; 8:1031-40.
- Desmedt C, Majaj S, Kheddoumi N, Singhal SK, Haibe-Kains B, El Ouriaghli F, et al. Characterization and clinical evaluation of CD10+ stroma cells in the breast cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1004-14.
- Ferguson DA, Muenster MR, Zang Q, Spencer JA, Schageman JJ, Lian Y, et al. Selective identification of secreted and transmembrane breast cancer markers using Escherichia coli ampicillin secretion trap. *Cancer Res* 2005;65:8209-17.
- Chapman KB, Prendes MJ, Sternberg H, Kidd JL, Funk WD, Wagner J, et al. COL10A1 expression is elevated in diverse solid tumor types and is associated with tumor vasculature. *Future Oncol* 2012;8: 1031-40.
- Barton DE, Yang-Feng TL, Mason AJ, Seeburg PH, Francke U. Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics* 1989;5:91-9.
- Burger HG, Igarashi M. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinology* 1988;122:1701-2.
- Reis FM, Luisi S, Carneiro MM, Cobellis L, Federico M, Camargos AF, et al. Activin, inhibin and the human breast. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225:77-82.
- Di Loreto C, Reis FM, Cataldi P, Zuiani C, Luisi S, Beltrami CA, et al. Human mammary gland and breast carcinoma contain immunoreactive inhibin/activin subunits: evidence for a secretion into cystic fluid. *Eur J Endocrinol* 1999;141:190-4.
- Reis FM, Cobellis L, Tameirão LC, Anania G, Luisi S, Silva IS, et al. Serum and tissue expression of activin a in postmenopausal women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2277-82.
- Saha P, Thome KC, Yamaguchi R, Hou Z, Weremowicz S, Dutta A. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J Biol Chem* 1998;273:18205-9.
- Broderick R, Ramadurai S, Toth K, Togashi DM, Ryder AG, Langowski J, et al. Cell cycle-dependent mobility of Cdc45 determined in vivo by fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS One* 2012;7:e35537.
- Pollok S, Grosse F. Cdc45 degradation during differentiation and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:910-5.
- Buechler S. Low expression of a few genes indicates good prognosis in estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Cancer* 2009;9:243.
- Wang P, Li S, Xiao X, Guo X, Zhang Q. An evaluation of OPTC and EPYC as candidate genes for high myopia. *Mol Vis* 2009;15:2045-9.

24. Chakravarti S, Paul J, Roberts L, Chervoneva I, Oldberg A, Birk DE. Ocular and scleral alterations in gene-targeted lumican-fibromodulin double-null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2422-32.
25. Motohashi T, Miyoshi S, Osawa M, Eyre HJ, Sutherland GR, Matsuda Y, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel five-span transmembrane protein gene, M83. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:244-50.

## คำแนะนำการส่งต้นฉบับ

วารสารโรคมะเร็งยินดีรับบทความทางวิชาการหรือเรื่องราวที่น่าสนใจเกี่ยวกับโรคมะเร็ง เพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารนี้ สำหรับบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารโรคมะเร็ง และเป็นผลงานวิชาการหรือวิจัยของคณะผู้เขียนไม่ใช่ความคิดเห็นของบรรณาธิการหรือผู้จัดทำ ขอให้ผู้นิพนธ์ส่งต้นฉบับที่จัดเตรียมถูกต้องตามคำแนะนำในเอกสารนี้มายังบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 หรือทาง E-mail: thaicancerj@gmail.com

### ประเภทของบทความ

#### นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

ควรเขียนลำดับเป็นข้อๆ ได้แก่ บทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย) บทนำสั้นๆ (เหตุผลที่ทำการศึกษานี้ รวมทั้งวัตถุประสงค์) วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง

#### รายงานผู้ป่วย (Case Report)

ควรประกอบด้วยบทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษ และภาษาไทย) บทนำ รายงานผู้ป่วย บทวิจารณ์ ข้อคิดเห็น สรุป และเอกสารอ้างอิง

#### บทความทางวิชาการหรือบทพินิจวิชาการ (Review Articles)

ควรเป็นบทความที่ให้ความรู้ รวบรวมสิ่งตรวจพบใหม่ หรือเรื่องที่น่าสนใจที่ผู้อ่านนำไปประยุกต์ได้ ประกอบด้วย บทนำ ความรู้เกี่ยวกับเรื่องที่เขียน และเอกสารอ้างอิง

### การเตรียมต้นฉบับ

- บทความที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ต้องส่งต้นฉบับ 2 ชุด (พร้อมไฟล์) และต้องไม่เคยตีพิมพ์หรือกำลังส่งตีพิมพ์ที่ใด
- บทความที่พิมพ์รับทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ถ้าเป็นภาษาไทยควรหลีกเลี่ยงคำภาษาอังกฤษ ยกเว้นในกรณีจำเป็นเท่านั้น พยายามไม่ใช่คำย่อ นอกจากคำที่ยอมรับกันโดยทั่วไป
- บทคัดย่อ ให้ย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษไม่ว่าเนื้อเรื่องจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ และมีคำสำคัญ (Key words) ด้วย
- ชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน ต้องมีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ พร้อมด้วยสถาบันที่ทำงาน (ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) และระบุผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ (corresponding author)
- ต้นฉบับต้องพิมพ์อย่างชัดเจนมีระยะห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่อง พิมพ์หน้าเดียวในกระดาษ A4 โดยพิมพ์ห่างจากขอบทุกด้าน 1 นิ้ว โดยตลอด และ ใส่เลขหน้าทางมุมขวาบน
- ภาพประกอบ ถ้าเป็นภาพใช้ภาพขาวดำ ขนาดโปสเตอร์ ผิวนำเรียบเป็นมัน หรือพิมพ์จากคอมพิวเตอร์โดยใช้เครื่องพิมพ์เลเซอร์ ใหญ่กว่าขนาดที่จะตีพิมพ์เพื่อให้ได้ภาพชัดเจน กำกับหมายเลขภาพ ชื่อผู้เขียนไว้ด้านหลังภาพทุกภาพ พิมพ์คำบรรยายภาพเป็นลำดับแยกไว้ในกระดาษอีกแผ่น
- ตาราง พิมพ์แยกต่างหากโดยมีหัวข้อ (title) และเชิงอรรถ (foot note) พร้อมทั้งอธิบายตัวย่อในตารางตลอดจนบอกนัยสำคัญทางสถิติอย่างครบถ้วน

8. เอกสารอ้างอิง ใช้ระบบแวนคูเวอร์ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันอยู่ในวารสารทางการแพทย์ชั้นนำในขณะนี้ ให้กำกับกรอ้างอิงด้วยหมายเลขและเรียงลำดับการอ้างอิงเลขที่กำกับในรายชื่อเอกสารอ้างอิงจะต้องตรงกับหมายเลขในเนื้อเรื่องด้วย

## การเขียนเอกสารอ้างอิง

### 8.1 จากวารสาร

วารสารภาษาอังกฤษ ประกอบด้วยชื่อผู้แต่ง (ถ้ามีผู้แต่งไม่เกิน 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคนแต่ถ้ามี 7 คนขึ้นไปให้ใส่เพียง 6 ชื่อแรก แล้วเติม et al.) ชื่อเต็มของบทความ ชื่อย่อวารสาร (ใช้ตาม Index Medicus) ปีที่พิมพ์; ปีที่:หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

วารสารภาษาไทย ให้เขียนแบบเดียวกับภาษาอังกฤษ เว้นแต่ชื่อผู้เขียนใช้ชื่อเต็มโดยใส่ชื่อตัวก่อนแล้วตามด้วยนามสกุลและใช้ปี พ.ศ.

#### ตัวอย่าง

1. Chariyalertsak S, Sirikulchayanonta V, Mayer D, Kopp-Schneider A, Fuerstenberger G, Marks F, et al. Aberrant cyclooxygenase isozyme expression in human intrahepatic cholangio carcinoma. Gut 2001;48:80-6.

2. สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, พงษ์กิตติ ชิษุณกร, สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์. Proliferating Cell Nuclear Antigen ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม: บทบาทในการพยากรณ์โรค.วารสารโรคมะเร็ง 2542;25:1-6.

### 8.2 จากหนังสือและโมโนกราฟอย่างอื่น

8.2.1 ผู้นิพนธ์เป็นบุคคล ตัวอย่างเช่น

Getzen TE. Health economics: fundamental of funds. New York: John Wiley & Sons; 1997.

8.2.2 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประพันธ์ที่เป็นผู้นิพนธ์ ตัวอย่างเช่น

Millares M, editor. Applied drug information: strategies for information management. Vancouver, WA: Applied Therapeutics, Inc.; 1998.

8.2.3 บทหนึ่งในหนังสือหรือตำรา ตัวอย่างเช่น

Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. In: Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology. 6<sup>th</sup> ed. Norwalk, CN:Appleton and Lange; 1995. p. 361-80.

8.2.4 หนังสือที่เป็นชุด (series) ตัวอย่างเช่น

Bennett GL, Horuk R. Iodination of chemokines for use in receptor binding analysis. In:Horuk R, editor. Chemokine receptors. New York: Academic Press; 1997. p. 134-48. (Methods in enzymology; vol 288).

หมายเหตุ : Chemokine receptors = ชื่อหนังสือ  
Methods in enzymology = ชื่อหัวข้อเรื่อง  
ของ series

8.2.5 หนังสือ proceeding ของการประชุม ตัวอย่างเช่น

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

8.2.6 เอกสารหรือแหล่งข้อมูลอื่น

เรื่องจาก หนังสือพิมพ์ ตัวอย่างเช่น

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution : study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A: 3 (col.5).

เรื่องจากวารสารใน internet ตัวอย่างเช่น

Laporte RE, Marler E, Akazawa S, Sauer F. The death of biomedical journals. BMJ [serial online]. 1995;310:1387-90. Available from: <http://www.bmj.com/bmj/archive/6991ed2.htm>. Accessed September 26, 1996.

เรื่องจาก web site ตัวอย่างเช่น

Health on the net foundation. Health on the net foundation code of conduct (HONcode) for medical and health web sites. Available at: <http://www.hon.ch/conduct.html>. Accessed June 30, 1998.

## หนังสือแจ้งความจำนงลงโฆษณา ในวารสารโรคมะเร็ง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เรียน ผู้จัดการวารสารมะเร็ง

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

ในนามของ.....เลขที่.....ถนน.....

ตำบล/แขวง.....อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....

รหัสไปรษณีย์.....โทรศัพท์.....โทรสาร.....

มีความประสงค์ลงโฆษณาในวารสารโรคมะเร็ง

- |                          |           |                         |            |
|--------------------------|-----------|-------------------------|------------|
| <input type="checkbox"/> | ฉบับที่ 1 | เดือน มกราคม - มีนาคม   | ปีที่..... |
| <input type="checkbox"/> | ฉบับที่ 2 | เดือน เมษายน - มิถุนายน | ปีที่..... |
| <input type="checkbox"/> | ฉบับที่ 3 | เดือน กรกฎาคม - กันยายน | ปีที่..... |
| <input type="checkbox"/> | ฉบับที่ 4 | เดือน ตุลาคม - ธันวาคม  | ปีที่..... |

รวม.....ฉบับ

โดยลงโฆษณาในลักษณะ

- |                          |                                     |            |                                  |
|--------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | พิมพ์เนื้อใน 1/2 หน้า               | อัตรา      | 5,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)  |
| <input type="checkbox"/> | พิมพ์เนื้อในเต็มหน้า                | อัตรา      | 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| <input type="checkbox"/> | พิมพ์ปกหลังด้านใน 1/2 หน้า          | อัตรา      | 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| <input type="checkbox"/> | พิมพ์ปกหลังด้านในเต็มหน้า           | อัตรา      | 20,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| <input type="checkbox"/> | พิมพ์ปกหลังด้านนอกเต็มหน้า          | อัตรา      | 35,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| <input type="checkbox"/> | ใบเทรค                              | อัตรา      | 6,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)  |
| <input type="checkbox"/> | พิมพ์สี จ่ายค่าเพลทและค่าพิมพ์เพิ่ม | 10,000 บาท |                                  |

รวมเป็นเงินทั้งสิ้นจำนวน.....บาท

ตัวอักษร (.....) บาท

ลงนาม.....ผู้สั่งโฆษณา

(.....)

### หมายเหตุ

ถ้าลงโฆษณาทั้งปี (4 ฉบับ) จะลดค่าโฆษณาให้ 10 %

ส่งอาร์ตเวิร์ค / ข้อความโฆษณาทาง E-mail : thaicancerj@gmail.com

การชำระค่าโฆษณา ให้เขียนเช็คสั่งจ่ายในนาม "มูลนิธิวิจัยโรคมะเร็งเพื่อสถาบันมะเร็งแห่งชาติ"



## วารสารโรคมะเร็ง

กองบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

ใบสมัครสมาชิก/ใบต่ออายุสมาชิก  
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เรียน ผู้จัดการวารสารโรคมะเร็ง

ข้าพเจ้า.....

ในนาม ส่วนราชการ/ บริษัท/ ส่วนตัว.....

ที่อยู่เลขที่.....ต.รอก/ซอย.....แขวง.....

เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

โทรศัพท์.....โทรสาร.....

E-mail.....

มีความประสงค์สมัครสมาชิกในวารสารโรคมะเร็ง

ปีที่ 36 ฉบับที่ 1-4 (พ.ศ. 2559) รวม 4 ฉบับ เป็นเงิน 200 บาท

ปีที่ 37 ฉบับที่ 1-4 (พ.ศ. 2560) รวม 4 ฉบับ เป็นเงิน 200 บาท

พร้อมกันนี้ได้จัดส่งเงินจำนวน .....บาท (.....) ตัวอักษร

โดยโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาริบดี

เลขที่บัญชี 026-228501-4 ชื่อบัญชี เงินสำรองจ่ายของมูลนิธิวิจัยโรคมะเร็ง

ขอแสดงความนับถือ

ลงนาม.....

(.....)

หมายเหตุ: โปรดส่งสำเนาการโอนเงินผ่านธนาคารพร้อมใบสมัครสมาชิกมายังโทรสาร 02-644-9097

หรือส่งเอกสารทางไปรษณีย์โดยนำส่ง กองบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6

เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

