

วารสารโรคมะเร็ง

THAI CANCER JOURNAL



วารสารโรคมะเร็ง ปีที่ 30 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2553 • Thai Cancer Journal Vol. 30 No. 3 July-September 2010

ปีที่ 30 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม-กันยายน 2553

- Cervical Cancer Survival at the National Cancer Institute, Thailand
- การพัฒนาวิธีการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* Polymorphisms ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกด้วยวิธี multiplex PCR
- การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา *HER-2/neu* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยวิธี Real-Time Quantitative PCR กับวิธี immunohistochemistry
- กรดเอลลาจิกและฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Vol. 30 No. 3
July-September 2010

ISSN 0125-2038



บรรณาธิการ

ธีรวุฒิ คุหะเปรมะ

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

จรัญญา งามขำ

วิโรจน์ เหล่าสุนทรศิริ

นงพงา สุวัฒนานันท์

ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง

เพ็ญศรี แซ่หลี่

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์

คณะบรรณาธิการ

กนกพร ใจสถาพร

ฉันทนา หมอกเจริญพงศ์

ธิดา ปัญจพันธ์พงศ์

วีรวุฒิ อิมสำราญ

วสันต์ ลิณะสมิต

สายพิน ตั้งศรีชาติ

สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์

อัศรียา สมรรคบุตร

อารีย์ ประสิทธิ์พิพงค์

กิติ จินดาวิจักษณ์

ชนินทร์ อภิวานิชย์

ปัญญารัตน์ ลาภวงศ์วัฒนา

วิจิต อภรณ์วิรัตน์

วรรณเพ็ญ เบ็ญจชัย

สุพล มโนรมณ์

อนงค์ เทพสุวรรณ

อนันต์ กรลักษ์ณ์

อรชร เขียมอารีรัตน์

กวิญ ลีละวัฒน์

दनัย ทิวาเวช

เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล

วุฒิ สุเมธโชติเมธา

สมจินต์ จินดาวิจักษณ์

สุเมธ วินสุรงค์วงศ์

อมรรัตน์ วิจิตรลีลา

อารยะ อุดลยพันธ์

ผู้จัดการ

อาคม ชัยวีระวัฒน์

ผู้ช่วยผู้จัดการ

อุมานาฏ อุณอนันต์

วาริพร ศักดิ์สมบูรณ์

พรนภา จันทร์วีระกุล

เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน

มลินี สนิธิไชย

พิมพ์ที่ บริษัท โฆสิตการพิมพ์ จำกัด

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



วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL



ISSN 0125-2038

The National Cancer Institute Foundation

Editor-in-Chief

Thiravud Khuaprema

Assistant Editors

Jarunya Ngamkham

Nongpanga Suwattananand

Pensri Saelee

Wirote Lausoontornsiri

Suleeporn Sangrajrang

Sunanta Chariyalertsak

Editorial Board

Kanokporn Jaisathaporn

Kiti Chindavijak

Kawin Leelawat

Chantana Morkchareonpong

Chanin Apiwanich

Danai Tiwawech

Thida Panchaphanpong

Punyarat Lapvongwatana

Petcharin Srivatanakul

Weerawut Imsamran

Vichit Arpornwirat

Wutthi Sumetchotimaytha

Vasant Linasmita

Wanpen Benjachai

Somjin Chindavijak

Saipin Tangkarat

Suphon Manoromana

Sumate Rinsurongkawong

Suwat Chariyalertsak

Anong Tepsuwan

Amornrat Vijitleela

Akariya Samakhaputra

Anant Karalak

Araya Adulbhan

Aree Prasitthipayong

Orachorn Aimarreerat

Managing Editor

Arkorn Chaiwerawattana

Assistant Managers

Aumanad Aunan

Pornnapa Jantaraweragul

Malinee Sontichai

Wareeporn Saksomboon

Saowakon Sukarayodhin

KOSIT PRESS COMPANY LIMITED

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



- วัตถุประสงค์** เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ ผลงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็ง และอื่นๆที่เกี่ยวข้อง
- สำนักงาน** สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2354-7025 ต่อ 2205
โทรสาร 0-2644-9097
- เว็บไซต์เผยแพร่** www.nci.go.th, www.kmnci.com
- กำหนดการตีพิมพ์** กำหนดออกทุก 3 เดือน ปีละ 4 ฉบับ
- การส่งต้นฉบับ** บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2354-7025 ต่อ 2205
โทรสาร 0-2644-9097
E - mail : nci_journal@hotmail.com
- การบอกรับเป็นสมาชิก**
- ห้องสมุดและหน่วยงานราชการแจ้งความจำนงได้ที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็งโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
 - หน่วยงานเอกชน และผู้สนใจส่งแบบฟอร์มสมัครสมาชิกที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง อัตราค่าสมาชิก 200 บาท ต่อปี (4 ฉบับ) รวมค่าจัดส่งและโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาริบดี เลขที่บัญชี 026-2-27518-2
ชื่อบัญชี มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ



สารบัญ Content

ปีที่ 30 ฉบับที่ 3

กรกฎาคม-กันยายน 2553

	หน้า
บทบรรณาธิการ	85
Cervical Cancer Survival at the National Cancer Institute, Thailand	87
<i>Sukumam Sanersak Swangvaree, Nithinai Tangprasert, Araya Adulbhan, Sujira Foongfaung, Siriporn Talacheep, Orawan Muangsamran, Daoroon Thepsuwan, Chariya Sanguansai, Kanokwan Tabtimsri, Pentipy Chaowalit, Porntip Boonpen, Paranee Ratanaphasura, Watchraporn Boonrung, Lumyong Krairittichai, Ousa Naksuwan</i>	
การพัฒนาวิธีการตรวจหา <i>GSTM1</i> และ <i>GSTT1</i> Polymorphisms ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกด้วยวิธี multiplex PCR	94
<i>दनัย ทิวาเวช, สมจินต์ จินดาวิจักษณ์, ญาณิณี จรัสวีศรุตพร, Takafumi Ishida</i>	
การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหายีน <i>HER-2/neu</i> ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ด้วยวิธี Real-Time Quantitative PCR กับวิธี Immunohistochemistry และ Chromogenic <i>In Situ</i> Hybridization	104
<i>ปรีชา เรืองเวชวรชัย, สุนันทา จรียาเลิศศักดิ์, วิชัย ปุริสา, ทรงคุณ วิญญูวรรณ</i>	
กรดเอลลาจิกและฤทธิ์ต้านมะเร็ง	112
<i>วรางคณา จุ่งลก</i>	

บทบรรณาธิการ

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer Stem Cells)

ทฤษฎีเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่ยอมรับกันทั่วไปคือสมมติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cells hypothesis) ซึ่งมีมาเกือบ 50 ปีแล้วโดยกล่าวไว้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นเมล็ดพันธุ์ไม่ดี (bad seeds) ที่เพิ่มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ความรุนแรงและการดื้อต่อการรักษาในเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาหาวิธีการรักษาโรคมะเร็งโดยมุ่งไปที่การฆ่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรค

ในช่วงระยะเวลา 50 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาจำนวนมากที่พยายามค้นหาเซลล์ต้นกำเนิดในมะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งของสมอง เต้านม และลำไส้ และเมื่อเร็วๆ นี้มีนักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มพบว่าการเกิดความรุนแรงของมะเร็งนั้นไม่ได้เกิดจากเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเพียงอย่างเดียว^{2,3}

กลุ่มผู้บุกเบิกการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้กำหนดลักษณะเฉพาะของเซลล์เหล่านี้ว่าเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่มี CD133 (CD133 expressing cells) ซึ่งจะแสดงลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิด เช่น ความสามารถในการเจริญเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม (spheres) ในอาหารเพาะเลี้ยง (suspension culture) สิ่งสำคัญก็คือ เซลล์ที่มี CD133 positive เหล่านี้สามารถก่อให้เกิด (initiate) ก้อนเนื้อออกได้⁴ จึงให้ชื่อว่าเซลล์เริ่มต้นของเนื้องอก (tumor-initiating cells)

อย่างไรก็ตามการศึกษาในระยะต่อมาพบว่ามีกลุ่มเซลล์ที่ไม่มี CD133 (CD133 negative cells) ก็สามารถก่อให้เกิดเนื้องอกได้ด้วย

ความคิดเห็นของนักวิทยาศาสตร์แบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่เห็นด้วยกับสมมติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และกลุ่มที่ไม่เชื่อสมมติฐานนี้ กลุ่มที่สนับสนุนก็ยังคงเชื่อว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุของการเริ่มต้นการเกิดมะเร็ง ความรุนแรงและการกลับคืนของโรคตลอดจนการดื้อต่อการรักษาที่ใช้รักษา นักวิจัยบางกลุ่มเชื่อว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งไม่ได้ประกอบด้วยเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่เป็น CD133+ แต่ยังมีเซลล์บางกลุ่มที่เป็น CD133- ซึ่งแสดงตัวบ่งชี้ (markers) จำนวนมาก³ การศึกษาล่าสุดพบว่ามีการจัดเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งออกเป็นสามลำดับชั้น (3-tiered hierarchy) เซลล์ชั้นสูงสุดเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) สามารถเจริญเติบโตเป็นกลุ่มเซลล์ชั้นถัดลงมาจนเป็นเซลล์บรรพบุรุษ (progenitor cells) ในลำดับล่างสุด และยังคงพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชั้นสูงสุดเป็นเซลล์รูปร่างกลมที่มีการแบ่งตัวช้า แต่ให้ก้อนเนื้อออกที่โตเร็วในสัตว์ทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ high tumor grade ส่วนกลุ่มเซลล์ที่อยู่ลำดับชั้นล่างสุดจะแบ่งตัวเร็วแต่ให้ก้อนเนื้อออกที่โตช้าในสัตว์ทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ low tumor grade⁵ จากการศึกษา³ นี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้น

กำเนิดมะเร็งแบ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer Stem Cells) ที่อยู่ลำดับชั้นสูงสุดสามารถพอร์มเซลล์รูปร่างกลม (spheres) ได้⁴ และเซลล์บรรพบุรุษมะเร็ง (cancer progenitor cells) ในลำดับชั้นล่างที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ที่มี CD15+ ซึ่งไม่สามารถพอร์มเซลล์รูปร่างกลมได้ แต่ยังคงสามารถ initiate ให้เกิดเนื้องอกได้²

กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ที่ไม่เชื่อสมมติฐานของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง ได้เสนอสมมติฐานอีกข้อคือสมมติฐานการวิวัฒนาการของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาไปจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว (clonal evolution hypothesis) โดยเชื่อว่าเซลล์มะเร็งทุกเซลล์สามารถกระตุ้นการเกิดเนื้องอกได้ (initiate tumor formation) และเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นเพียงผลผลิตของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genomic instability) ของเซลล์มะเร็ง การกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดจากความผิดปกติ (dysfunction) ของการซ่อมแซมดีเอ็นเอและจุดตรวจการแบ่งเซลล์ (mitotic checkpoints) ในเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการผ่าเหล่าของสารพันธุกรรม Liang และคณะ⁶ ได้รายงานการค้นพบเป็นครั้งแรกว่าการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์มะเร็งที่เกิดจากยาสามารถกระตุ้นการปรากฏตัว (emergence) ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มี CD133+ ในทำนองเดียวกัน การศึกษาของ Sharma และคณะ⁷ พบว่ากลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งไม่ได้เป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่คงที่แต่สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic instability) ของเซลล์มะเร็ง เช่นการเกิด DNA methylation ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีนทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาเคมี

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบหลักฐานแน่ชัดที่สนับสนุนทั้งสมมติฐานเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและ

สมมติฐานการวิวัฒนาการของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาไปจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว จึงควรจะมีการศึกษาทฤษฎีทั้งสองดังกล่าวร่วมกันไป โดยค้นหาบทบาทของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในการเจริญเติบโตไปเป็นก้อนมะเร็ง รวมทั้งการพัฒนาของก้อนมะเร็งให้ต้องต่อการรักษา การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ต่อไปในอนาคตควรมุ่งเน้นไปที่การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรมของเซลล์มะเร็งมากกว่าที่จะไปเจาะจงเฉพาะตัวเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

1. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:460-6.
2. Read TA, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, et al. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell* 2009;15:135-47.
3. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene* 2009;28:3949-59.
4. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
5. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 2010;17:362-75.
6. Liang Y, Zhong Z, Huang Y, Deng W, Cao J, Tsao G, et al. Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. *J Biol Chem* 2010;285:4931-40.
7. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010;141:69-80.

บรรณาธิการ



Cervical Cancer Survival at the National Cancer Institute, Thailand

Sukumarn Sanersak Swangvaree¹
Araya Adulbhan³
Siriporn Talacheep⁴
Daorong Thepsuwan⁴
Kanokwan Tabtimsri⁴
Porntip Boonpen⁴
Watchraporn Boonrung⁴
Ousa Naksuwan⁴

Nithinai Tangprasert²,
Sujira Foongfaung⁴,
Orawan Muangsamran⁴
Chariya Sanguansai⁴
Pentipya Chaowalit⁴
Paranee Ratanaphasura⁴
Lumyong Krairittichai⁴

Abstract This retrospective descriptive study assessed cervical-cancer patient survival at the National Cancer Institute (NCI) of Thailand. All patients with cervical cancer, admitted to the NCI during the period 1987-2005, were included in the study. A total of 318 patients who met the study criteria were selected. The mean age of the patients was 52.24 years. Most of the cervical cancers were FIGO stage IIB. Our findings revealed that the 5-year overall survival rate for patients who received treatment at the NCI was 64.9%. The 5-year survival rates were 88.6% for stage I, 63.7% for stage II, 41.2% for stage III, and 33.3% for stage IV. In conclusion, we found that the survival rates of cervical-cancer patients who received treatment at the NCI were comparable to, or better than, those in other Asian countries. (*Thai Cancer J* 2010;30: 87-93.)

Keywords: cervical cancer, long-term morbidity, survival

¹ Gynecological Oncology Division, ² Radiation Therapy Division, ³ Medical Oncology Division,

⁴ Oncology Nursing Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand

อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

โดย สุขุมลย์ (เสนอศักดิ์) สว่างวาริ¹, นิธิชัย ตั้งประเสริฐ², อารยะ อุดลยพันธ์³, สุจิรา พุ่งเฟื่อง⁴, ศิริพร ตาละชีพ⁴, อรรรณณ เมืองสำราญ⁴, ดาวรุ่ง เทพสุวรรณ⁴, จริญญา สงวนไพร⁴, กนกวรรณ ทับทิมศรี⁴, เพ็ญทิพย์ ชาววลิต⁴, พรทิพย์ บุญเพ็ญ⁴, ปารณิ รัตนภาสุระ⁴, วัชรพร บุญรุ่ง⁴, ล้ำยอง ไกรฤทธิชัย⁴, อุษานา นาคสุวรรณ⁴

¹กลุ่มงานมะเร็งนรีเวช, ²กลุ่มงานรังสีรักษา, ³กลุ่มงานเคมีบำบัด, ⁴กลุ่มภาควิชาการศึกษารังสีวิทยา, สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบบรรยายย้อนหลังเพื่อหาอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2530 ถึง ปี พ.ศ. 2548 มีผู้ป่วย 318 รายที่มีข้อมูลครบที่จะใช้ในการศึกษานี้ ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 52.24 ปี และส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่ IIB สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบอัตราการรอดชีวิตรวม (overall survival) ที่ 5 ปี ร้อยละ 64.9 โดยพบอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5-year survival) ในระยะที่ 1 ร้อยละ 88.6 ในระยะที่ 2 ร้อยละ 63.7 ในระยะที่ 3 ร้อยละ 41.2 และระยะที่ 4 ร้อยละ 33.3 โดยสรุปการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกหลังการรักษาในสถาบันมะเร็งแห่งชาติมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อเทียบกับประเทศอื่นในเอเชีย (วารสารโรคมะเร็ง 2553;30:87-93.)

Introduction

Globally, cervical cancer is the second most common cancer in women with approximately 500,000 new cases and 280,000 deaths each year¹. An estimated age-adjusted incidence rate of cervical cancer is 48 per 100,000 women^{1,2}. It is estimated to account for 18.6% of female cancers and 80% of these occur in developing countries. During 1998 to 2000, it was the second most common cancer among women in Thailand, with an age-adjusted of incidence rate is 24.7 per 100,000 women³.

The mortality rate of cervical cancer is approximately 40% to 50%⁴, since most patients present with an advanced-stage and the cervical cancer is still limited for screening. Treatment of this cancer comprises surgery, concurrent chemoradiation and radiotherapy. The National Cancer Institute is the largest cancer center in Thailand and started

treating this cancer in 1987. However, no data of survival of the patients with cervical cancer at our institute were previously reported. Therefore, in this study, the 5-year overall survival rate for patients with cervical cancer who received treatment at the National Cancer Institute, Thailand was assessed using data from the registry.

Materials and Methods

This retrospective descriptive study assessed cervical-cancer patient survival at the National Cancer Institute (NCI) of Thailand. All patients with cervical cancer, admitted to the NCI during the period 1987-2005, were included in the study and their survival was analyzed up to 2010. This study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Institute.

The patients' clinical and pathological data were collected from the medical records.

A total of 318 patients with histologically confirmed cervical cancer were identified in 2005. The staging of cervical cancer was done using the International Federation of Obstetrics and Gynecology (FIGO) 1997 staging system. The patients' data including age, marital status, parity, occupation, underlying disease, stage, histological types (from the histological report), and treatment modality were collected. The following dates were recorded: first diagnosis of cervical cancer, initial treatment, treatment completion, recurrence, last visit and death. The main outcome was 5-year overall survival.

A follow-up examination was performed at the Gynecological Oncology Unit and Radiation Therapy Unit. Patients were scheduled for follow-up every two months in the first year, every three months during the second year and every six months thereafter. Follow-up data such as date of last visit and disease status at the time of the last contact were also noted. All patients were followed until death or lost to follow up. The overall survival was defined as the time from first diagnosis to death or the date of last follow up.

The descriptive statistics were used for demonstrating demographic data results, expressing as mean, and range. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test by univariate analysis. A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

From 1987 to 2005, a total of 3563 patients with cervical cancer were registered at the Gynecological Oncology Unit, National Cancer Institute, representing 74.9 percent of the gynecological cancer registry at the National Cancer Institute. Among these patients, 318 cases met the study criteria and were the core data set for the analysis. The patients' general characteristics are shown in Table 1. The mean age of the patients was 52.24 years, ranging 27 to 82 years. Most cases (50.7%) aged 31 to 50 years. Majority of the patients were housewives. Most of them (69.18%) were married. The mean parity was 3.35, ranging from 0 to 10. The patients mainly had no underlying disease.

Stage and cell types are shown in Table 2. Most of the cervical cancers (53.77%) were stage II. Squamous cell carcinoma was the most common histological cell types (79.56%). Other cell types were clear cell carcinoma (two cases) and endometrioid carcinoma (one case). The main treatment modality (53.77%) was radiotherapy with or without concurrent chemotherapy.

The 5-year overall survival was 51.2% when analyzed in all 318 patients. Among these, 35% of cases had not received any treatments at our institute because some patients declined radiotherapy and some moved to receive treatment at other cancer centers. However, the 5-year overall survival rate for the rest of the patients who received treatment at the National Cancer Institute was 64.9%. The survival rates were significantly different for each stage ($p < 0.001$), they were

88.6% for stage I, 63.7 % for stage II, 41.2% for stage III, and 33.3% for stage IV (Figure 1). Approximately a half of the patients (154/318) died between 2005 and 2010, and cervical cancer was the cause of death in 77.27% (Table 2).

Late complications of the treatment comprised hemorrhagic cystitis (8.9%), hemorrhagic proctitis (8.9%), vaginal stenosis (4.4%), chronic bone pain (6.7%), but no cases of chronic leg edema were found at five years after the treatment.

Table 1 General characteristics of the patients (n=318)

Characteristics	Number of patients	Percent
Age (years)	318	Mean 52.24 Range 27-82
Occupation		
Farmer	43	13.52
Sales	41	12.89
Housewife	119	37.42
Employee	109	34.28
Other	6	1.89
Marital status		
Single	9	2.83
Married	220	69.18
Divorce	89	27.99
Parity	318	Mean 3.35 Range 0-10
Underlying disease		
No	218	68.55
Yes	100	31.45

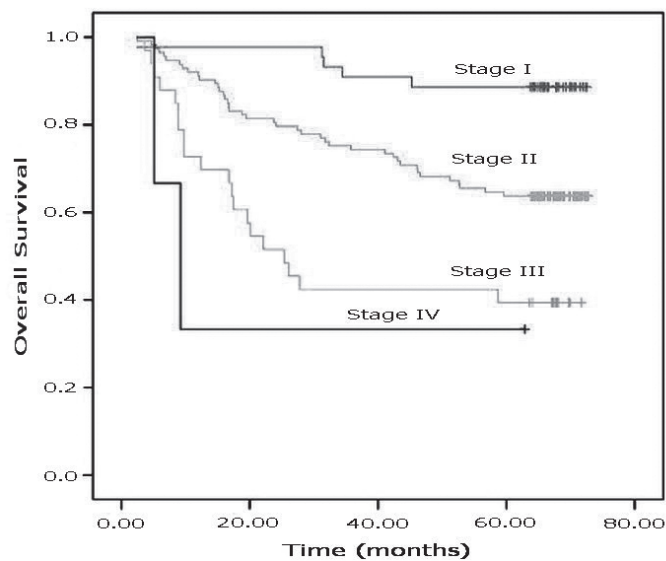


Figure 1 Overall survival in cervical cancer by stage

Table 2 Stage, cell type, treatment and course of death in the cervical cancer (n=318)

Characteristics	Number of patients	Percent
Stage		
I	56	17.61
-IA1	11	3.46
-IA2	2	0.63
-IB1	39	12.26
-IB2	4	1.27
II	171	53.77
-IIA	11	3.46
-IIB	160	50.31
III	84	26.42
-IIIA	9	2.83
-IIIB	75	23.58
IV	7	2.20
-IVA	4	1.26
-IVB	3	0.94
Cell type		
Squamous cell carcinoma	253	79.56
Adenocarcinoma	46	14.47
Adenosquamous cell CA	13	4.09
Small cell neuroendocrine	3	0.94
Others	3	0.94
Primary treatment		
Surgery	31	9.75
Radiotherapy	171	53.77
Chemotherapy	4	1.26
No treatment in NCI	112	35.22
Course of Death		
Disease related	119	37.42
Non - disease related	35	11.01
Alive	164	51.57

Discussion

A total of 3563 patients with cervical cancer had visited the National Cancer Institute for over 18 years (1987-2005), with the 300 to 400 new cases per year. The mean age of cervical cancer patients was 52 years, ranging 27 to 82 years. Most cases aged 31 to 50 years old that was younger

than those in the FIGO 1985 report⁵. Since women of this age-group are working, cervical cancer has a significant economic impact in Thailand. Fijuta M, et al⁶ presented hospital-based data of cervical cancer, of which the mean age was 58.7 years. These findings, together with our data, suggest that age at first diagnosis of cervical cancer in Asia is

younger than that in the Western countries. This may be explained by factors that increase the risk of HPV infection and progression to cervical cancer such as differences in sexual behavior, age at first sexual intercourses and number of sexual partners along with limited cervical cancer screening coverage in these countries.

Most cervical cancer patients were married (69.18%) which is consistent with the etiology of cervical cancer through HPV infection. Nevertheless, about 2.83% of our cohorts of cervical cancer patients were single. This finding was unexpected because HPV is a sexually-transmitted disease^{7,8}. Surprisingly, the Japanese study had a similar finding; 8% of their cohorts of cervical cancer patients were single. A possible explanation is that single women may be afraid of vaginal examination and may avoid cervical cancer

screening, thereby increasing their risk for cervical cancer.

The mean parity was 3.35, ranging from 0 to 10. High parity is associated with increased risk for cervical cancer. Misra JS et al⁹ demonstrated that the frequency of cervical cancer progressively rose with increasing parity and became statistically significant in women who had more than three children.

The 5-year overall survival rate for cervical cancer patients who received treatments at our institute in 2005 was 64.9%. The survival for early stage was better than that for advanced stage. Our study data were comparable to, or better than, those in other Thai institutions or other Asian countries, except South Korea¹⁰⁻¹² (Table 3). The late complications of treatments in this study were comparable to other studies^{13,14}.

Table 3 The 5-year survival rate of cervical cancer by extension of disease.

Countries	Overall survival rate (%)
National Cancer Institute, Thailand	64.9
The Gambia, Africa ¹⁰ 2010	22
Uganda, Africa ¹⁰ 2010	13
China ¹⁰ 2010	67
India ¹⁰ 2010	46
Philippines ¹⁰ 2010	37
Singapore ¹⁰ 2010	66
South Korea ¹⁰ 2010	79
Turkey ¹⁰ 2010	63
Costa Rica ¹⁰ 2010	53
Germany ¹¹ 2007	63.1
Thailand ¹⁰ (Chiang Mai, Khon Kaen, Lumpang, and Songkhla) 2010	61
Thailand ¹² Ramathibodi Hospital 1990	53.49

Conclusion

The 5-year overall survival rate for cervical cancer patients who received treatment at the National Cancer Institute was 64.9%, comparable to, or better than, those in other Asian countries. The 5-year survival rates were higher for the cases treated at early stages compared to those treated at advanced stages.

Acknowledgement

The authors are grateful to all members of the Expert Care Team (Cervix), Quality Center and the National Cancer Institute. This study was supported by grants from the National Cancer Institute, Thailand. The authors are very grateful to Miss Catherine Rees, Instructor of Scientific Writing Training Program for reading of this manuscript.

References

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide* [database on CD-ROM]. Lyon: IARC Press; 2004. [IARC Cancer base No.5, version 2.0.].
2. Hacker N, Friedlander. *Cervical Cancer in Berek & Hacker's Gynecologic Oncology* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2010. p. 341-95.
3. Attasara P and Bausom R. editor. *Hospital-based cancer registry: cervix cancer*. Bangkok: Medical Publisher; 2007. p. 35-37.
4. Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, et al. *Carcinoma of the cervix uteri: annual report on the results of treatment in gynecological cancer*. *Int J Gynecol Obstet* 2006;95:S43-103.
5. International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Annual report on the result of treatment in gynecological cancer*, 1985;19:27-121.
6. Fujita M, Tase T, Kakugawa Y, Hoshi S, Nishino Y, Nagase S, et al. Smoking, earlier menarche and low parity as independent risk factors for gynecologic cancer in Japanese: a case-control study. *Tohoku J Exp Med* 2008;216:297-307.
7. Hirose K, Tajima K, Hamajima N, Takezaki T, Inoue M, Kuroishi T, et al. Subsite (cervix/ endometrium)-specific risk and protective factors in uterus cancer. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:1001-9.
8. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. *Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiologic studies*. *Int J Cancer* 2006;119:1108-24.
9. Misra JS, Srivastava S, Singh U, Srivastava AN. Risk-factors and strategies for control of carcinoma cervix in India: hospital based cytological screening experience of 35 years. *Indian J Cancer* 2009;46:155-9.
10. Sankaranarayanan R, Swaminathan R, Brenner H, Chen K, Chia KS, Chen JG, et al. *Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study*. *Lancet Oncol* 2010;11:165-73.
11. Gondos A, Arndt V, Holleczeck B, Stegmaier C, Ziegler H, Brenner H. *Cancer survival in Germany and the United States at the beginning of the 21st century: an up-to-date comparison by period analysis*. *Int J Cancer* 2007;121:395-400.
12. Srisupundit S, Kraiphikul P, Tangtrakul S, Bhamarapavati Y. *Cervical cancer survival at Ramathibodi Hospital 1979-1983*. *J Med Assoc Thai* 1990;73:15-19.
13. Hamberger AD, Unal A, Gershenson DM, Fletcher GH. *Analysis of the severe complications of irradiation of carcinoma of the cervix: whole pelvis irradiation and intracavitary radium*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983;9:367-71.
14. Lee JE, Huh SJ, Park W, Lim do H, Ahn YC, Park CS, et al. *Radical radiotherapy for locally advanced cancer of uterine cervix*. *Cancer Res Treat* 2004;36:222-7.

การพัฒนาวิธีการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* Polymorphisms ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูก ด้วยวิธี multiplex PCR

दनัย ทิวาเวช¹

สมจินต์ จินดาวิจักษณ์²

ญานินี จรัสวีศรุตพร³

Takafumi Ishida⁴

บทคัดย่อ มะเร็งโพรงหลังจมูก (nasopharyngeal carcinoma, NPC) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขโรคหนึ่งของประเทศไทย มีรายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน glutathione S-transferase Mu1 และ Theta1 (*GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอ็นไซม์ในการทำลายพิษของสารก่อมะเร็งเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างหนึ่งต่อการเกิดโรคมะเร็ง และสามารถชี้ *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms นี้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งได้ แต่การตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms โดยทั่วไปด้วยวิธี conventional polymerase chain reaction (C-PCR) นั้นมีความซับซ้อน และต้องใช้เวลาานาน จึงไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจตัวอย่างครั้งละจำนวนมากได้ ในปัจจุบันได้มีผู้พัฒนาวิธีการตรวจเพื่อให้อวดเร็วขึ้นด้วยการใช้วิธีการตรวจแบบ multiplex PCR (M-PCR) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ในผู้ป่วย NPC ด้วยวิธี M-PCR แล้วเปรียบเทียบกับผลการตรวจที่ได้กับผลการตรวจด้วยวิธี C-PCR โดยใช้ DNA ซึ่งสกัดได้จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วย NPC จำนวน 80 รายเพื่อตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms [*GSTM1* normal genotype (*GSTM1*+), *GSTM1* null genotype (*GSTM1*-), *GSTT1* normal genotype (*GSTT1*+)] และ *GSTT1* null genotype (*GSTT1*-)] ด้วยวิธี M-PCR และวิธี C-PCR ผลการศึกษาพบว่าผลการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR ในผู้ป่วย NPC ทุกรายให้ผลตรงกับวิธี C-PCR ($K = 1.0$) นอกจากนี้ยังพบว่าผลการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR ไม่มีความซับซ้อน รวดเร็ว และประหยัดกว่าวิธี C-PCR อีกด้วย จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR น่าเชื่อถือ และมีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็นกลุ่มเสี่ยงของ NPC ได้ (วารสารโรคมะเร็ง 2553;30:94-103.)

¹กลุ่มงานวิจัย ²กลุ่มงานโลหิต ศอ นาสิก และ ³กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

⁴Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Detection of *GSTM1* and *GSTT1* Polymorphisms in Nasopharyngeal Carcinoma Patients by Multiplex PCR Assayby **Danai Tiwawech¹, Somjin Chindavijak², Yaninee Jarratwisarutporn³ and Takafumi Ishida⁴**¹Research, ²Otolaryngology and ³Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand. ⁴Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Abstract Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a common cancer and a serious public-health problem in Thailand. Glutathione S-transferase Mu1 and Theta1 gene (*GSTM1* and *GSTT1*) are involved in the prevention of cancer, by encoding *GSTM1* and *GSTT1* enzymes to detoxify various electrophiles derived from environmental carcinogens. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms are reportedly associated with several malignancies and can be used as a genetic risk marker for cancer. Nevertheless, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism detection using the conventional polymerase chain reaction (C-PCR) assay is complicated and time-consuming, and thus unsuitable for mass screening. A faster multiplex PCR (M-PCR) assay has been developed to help overcome these problems. The present study aimed to establish the M-PCR assay for *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism detection in NPC patients, and confirm the results of the new assay with the C-PCR assay. Eighty DNA samples, extracted from the peripheral blood leukocytes of Thai NPC patients, were examined for *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism [*GSTM1* normal genotype (*GSTM1*+), *GSTM1* null genotype (*GSTM1*-), *GSTT1* normal genotype (*GSTT1*+), and *GSTT1* null genotype (*GSTT1*-)] by M-PCR and C-PCR assays. The *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism-detection results in all NPC cases by M-PCR assay agreed with the C-PCR assay ($\kappa = 1.0$). In addition, the M-PCR assay was a simple, faster, and less costly method for *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism detection than the C-PCR assay. The present study suggests that *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism detection by M-PCR assay is a reliable and suitable tool for screening high-risk NPC groups. (*Thai Cancer J* 2010;30:94-103.)

Keywords: glutathione S-transferase M1, glutathione S-transferase T1, polymorphisms, nasopharyngeal carcinoma, multiplex PCR

บทนำ

มะเร็งโพรงหลังจมูก (nasopharyngeal carcinoma, NPC) เป็นโรคมะเร็งที่มีอัตราการเกิดสูงในประเทศไทยจีนตอนใต้และประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย^{1,2} โดยพบว่า NPC ในประชากรไทยมีอัตราการเกิด (age-standardized incidence rate) ประมาณ 4.3 ราย/แสนประชากร/ปี มีอัตราส่วน ชาย:หญิงเท่ากับ 2.5:1 และมีช่วงของการเกิดโรคสูงสุดที่อายุระหว่าง 50-60 ปี^{3,4} NPC เป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัยโดยอาจเกิดจากปัจจัยเดี่ยวๆหรือหลายปัจจัยร่วมกันเช่น Epstein-Barr virus (EBV)⁵⁻⁹ สารก่อมะเร็ง¹⁰ และพันธุกรรมที่ไวต่อการ

เกิดมะเร็ง (genetic susceptibility)^{11,12} แต่กลไกของการเกิด NPC นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด NPC เป็นโรคที่รักษาให้หายขาดได้ถ้าตรวจพบตั้งแต่ระยะแรกเริ่มเนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ตอบสนองต่อการรักษาดี ผู้ป่วย NPC ระยะที่ I และ IV เมื่อได้รับการรักษามีอัตราอยู่รอด 5 ปี ประมาณร้อยละ 70-80 และร้อยละ 20-30 ตามลำดับ^{13,14} แม้ว่า NPC เป็นโรคที่รักษาให้หายได้แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักได้รับการวินิจฉัยเมื่อเป็นโรคในระยะลุกลามแล้วซึ่งยากที่จะรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นการตรวจหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงเพื่อจะได้พบผู้ป่วย NPC ในระยะเริ่มแรกได้เร็วและ

ติดตามรักษาผู้ป่วยดังกล่าวได้ทันท่วงที พร้อมทั้งมีการเฝ้าติดตามผลการรักษาอย่างต่อเนื่องจึงเป็นเรื่องจำเป็นเร่งด่วนในการป้องกันและควบคุมโรคร้ายนี้

ในปัจจุบันความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) ทำให้มีการค้นพบว่ามนุษย์มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ที่มีผลทำให้แต่ละคนมีความไวต่อการเกิดโรคมะเร็งแตกต่างกัน¹⁵ (cancer susceptibility) ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค้นพบเหล่านี้ นักวิทยาศาสตร์สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ในการทำนายและค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งต่างๆ ได้แก่ โรคมะเร็งของปอด¹⁶ กระเพาะอาหาร¹⁷ ลำไส้ใหญ่¹⁸ โพร่งหลังจมูก¹⁹ กระเพาะปัสสาวะ²⁰ เต้านม²¹ และตับ²² เป็นต้น

ผลจากการศึกษาด้านระบาดวิทยา และในสัตว์ทดลองที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าการได้รับสารก่อมะเร็งหลายชนิด เช่น ไนโตรซามีน และโพลีไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนส์ (PAHs) จากอาหารหมักดองที่ใส่ดินประสิว และจากควันบุหรี่ หรือควันไอเสียจากรถยนต์ อาจเป็นปัจจัยในการทำให้เกิด NPC ในคนได้²³⁻²⁵ และพบว่า *GSTM1* gene และ *GSTT1* gene มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดซึ่งมีสาเหตุมาจากสารก่อมะเร็งดังกล่าวโดยการผลิตเอนไซม์ *GSTM1* และ *GSTT1* ไปทำลายพิษของสารก่อมะเร็งเหล่านั้น โดยทั่วไป *GSTM1* และ *GSTT1* ในแต่ละบุคคลจะมีความแตกต่างกัน หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphisms) ได้ 2 แบบคือ แบบที่มี *GSTM1* และ *GSTT1* เป็นปกติ (normal genotype หรือ *GSTM1+* และ *GSTT1+*) และแบบที่ไม่มี *GSTM1* และ *GSTT1* (null genotype หรือ *GSTM1-* และ *GSTT1-*) ซึ่งสาเหตุของการเกิด *GSTM1-* และ *GSTT1-* นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์ของบิดาหรือ

มารดา ทำให้ *GSTM1* และ *GSTT1* หลุดหายไปก่อนเกิดการปฏิสนธิ หรือมีการกลายพันธุ์ของเซลล์ตัวอ่อนในขณะที่มีการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ทำให้ *GSTM1* และ *GSTT1* หลุดหายไปหลังจากเกิดการปฏิสนธิ (germline mutation) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ที่มีพันธุกรรมชนิด *GSTM1-* และ *GSTT1-* นี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ *GSTM1* และ *GSTT1* ขึ้นในทุกส่วนของร่างกายเพื่อไปทำลายพิษของสารก่อมะเร็งได้ และมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งมากกว่าผู้ที่มี *GSTM1+* และ *GSTT1+* นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าผู้ที่มีพันธุกรรมชนิด *GSTM1-* และ *GSTT1-* มีความเสี่ยงต่อการเกิด NPC เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มีพันธุกรรมชนิด *GSTM1+* และ *GSTT1+* อีกด้วย^{19,26}

โดยทั่วไปการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี conventional polymerase chain reaction (C-PCR) ที่ใช้ย้อมย้อมนั้นไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากได้ เนื่องจากมีความซับซ้อน และใช้เวลานาน คือจะต้องมีการทำ PCR และ gel electrophoresis ของ *GSTM1* และ *GSTT1* แยกจากกัน (ต้องทำแยก 2 ครั้ง) ปัจจุบันพบว่าได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจแบบ multiplex PCR (M-PCR) ขึ้นเพื่อใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้เป็นอย่างดี ด้วยการทำ PCR และ gel electrophoresis ของ *GSTM1* และ *GSTT1* ไปพร้อมกัน (ทำเพียงครั้งเดียว) โดยวิธีนี้จะใช้ primers ทั้ง 2 ชุดของ *GSTM1* และ *GSTT1* ในการทำ PCR ร่วมกันในหลอดทดลองเดียวกัน เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาวิธีการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR นี้มาก่อน ด้วยเหตุนี้การพัฒนาวิธีการตรวจแบบ M-PCR เพื่อใช้ตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ในผู้ป่วย NPC จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและควรนำมาประยุกต์ใช้ในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการ

ตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR ในผู้ป่วย NPC ให้มีความน่าเชื่อถือ ไม่ซับซ้อน สะดวก รวดเร็ว และประหยัด โดยมีการเปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้กับผลการตรวจด้วยวิธี C-PCR

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ศึกษา

การศึกษานี้ใช้เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes) ของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิแล้วว่าเป็น NPC และอยู่ระหว่างการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 80 ราย คณะผู้วิจัยได้ขอความยินยอมจากผู้ป่วยทุกรายก่อนที่จะเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่าง EDTA blood จำนวน 3 มิลลิลิตร จากนั้นแยกเม็ดเลือดขาวออกจาก EDTA blood ด้วยการนำไปปั่นที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 20 นาที และนำเม็ดเลือดขาวที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำไปใช้

การสกัด DNA

นำเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย NPC ทุกรายมาสกัด DNA ด้วยการใช้น้ำยาสำเร็จรูป QuickGene DNA whole blood kit S และเครื่องสกัด DNA รุ่น QuickGene-810 (FUJIFILM Corporation, ญี่ปุ่น) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำที่แนบมากับชุดน้ำยา ความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 40 ng/μl จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้ทั้งหมดไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำไปศึกษา

การตรวจหา *GSTM1* polymorphisms ด้วยวิธี

C-PCR

การทำ C-PCR เพื่อตรวจหา *GSTM1* polymorphisms ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nazar-Stewart และคณะ²⁷ โดยใช้ primers 2 เส้น คือ 5'-GAA CTC

CCT GAA AAG CTA AAG C-3' และ 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3' โดยมีการทำ co-amplification ของ human beta-globin gene (*beta-globin*) ร่วมไปด้วยโดยใช้ primers 2 เส้น คือ 5'-AAC TTC ATC CAC GTT CAC C-3' และ 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

นำ PCR reaction mixture 50 μl [37.7 μl ของน้ำกลั่นสองครั้ง+5 μl ของ PCR buffer ที่มี MgCl₂+5 μl ของ dNTP+1 μl ของ 20 pmole ของ primers แต่ละเส้น+0.3 μl ของ Taq DNA polymerase+1 μl ของ DNA template] ไป incubate ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที ก่อนการทำ PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ตามโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 94°C นาน 10 วินาที, 58°C นาน 20 วินาที และ 72°C นาน 45 วินาทีจำนวนทั้งหมด 40 รอบ ตามด้วยการทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที

PCR product ของ *GSTM1* ที่ได้จะมีขนาด 215 base pair (bp) เมื่อผ่านการทำ gel electrophoresis ใน agarose gel (2.5%) และย้อม DNA ด้วยน้ำยา Gel Star® Nucleic Acid Gel Stain (1:4000, Lonza, สหรัฐอเมริกา) ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ *beta-globin* เป็น internal positive control (PCR product มีขนาด 268 bp), ใช้ DNA ของผู้ที่มี *GSTM1*+ เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นสองครั้งเป็น negative control (รูปที่ 1)

การตรวจหา *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี

C-PCR

การทำ C-PCR เพื่อตรวจหา *GSTT1* polymorphisms ดัดแปลงมาจากวิธีของ Abdel-Rhman และคณะ²⁸ โดยใช้ primers 2 เส้น คือ 5'-TCT CCT TAC TGG TCC TCA CAT CTC-3' และ 5'-TCA CCG

GAT CAT GGC CAG CA-3' โดยมีการทำ co-amplification ของ *beta-globin* ร่วมไปด้วยโดยใช้ primers 2 เส้น คือ 5'-AAC TTC ATC CAC GTT CAC C-3' และ 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

นำ PCR reaction mixture 50 μ l [37.7 μ l ของน้ำกลั่นสองครั้ง+5 μ l ของ PCR buffer ที่มี $MgCl_2$ +5 μ l ของ dNTP+1 μ l ของ 20 pmole ของ primers แต่ละเส้น+0.3 μ l ของ Taq DNA polymerase+1 μ l ของ DNA template] ไป incubated ที่ 94°C นาน 5 นาทีก่อนการทำ PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ตามโปรแกรมเหมือนกับการทำ C-PCR ของ *GSTM1*

PCR product ของ *GSTT1* ที่ได้จะมีขนาด 480 bp เมื่อผ่านการทำ gel electrophoresis ใน agarose gel (2.5%) และย้อม DNA ด้วยน้ำยา Gel Star® Nucleic Acid Gel Stain (1:4000, Lonza, สหรัฐอเมริกา) ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ *beta-globin* เป็น internal positive control (PCR product มีขนาด 268 bp), ใช้ DNA ของผู้ที่มี *GSTT1+* เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นสองครั้งเป็น negative control (รูปที่ 2)

การตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR

ในการทำ M-PCR ใช้น้ำยาสำเร็จรูป REExtract-N-Amp™ Blood PCR kit (Sigma, ประเทศเยอรมันนี) เป็น master mixture reagent และใช้ primers 4 เส้น คือ 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' และ 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3' (สำหรับตรวจหา *GSTM1*)²⁷ และ primers: 5'-TCT CCT TAC TGG TCC TCA CAT

CTC-3' และ 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3' (สำหรับตรวจหา *GSTT1*)²⁸ โดยมีการทำ co-amplification ของ *beta-globin* ร่วมไปด้วยโดยใช้ primers 2 เส้น คือ 5'-AAC TTC ATC CAC GTT CAC C-3' และ 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

นำ PCR reaction mixture 20 μ l [6 μ l ของน้ำกลั่น สองครั้ง+10 μ l ของ master mixture reagent+0.5 μ l ของ 20 pmole ของ primers แต่ละเส้น+1 μ l ของ DNA template] ไป incubated ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาทีก่อนการทำ PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ตามโปรแกรมเหมือนกับการทำ C-PCR ของ *GSTM1*

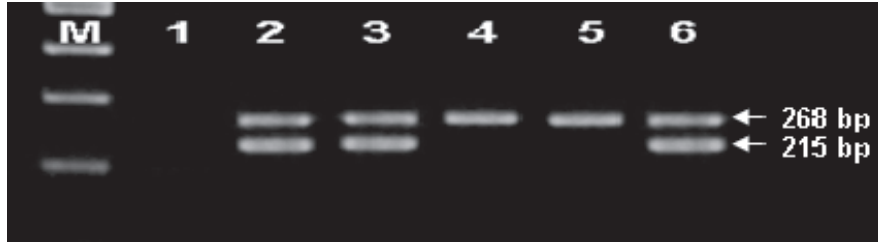
PCR product ของ *GSTM1* และ *GSTT1* ที่ได้จะมีขนาด 215 bp และ 480 bp เมื่อผ่านการทำ gel electrophoresis ใน agarose gel (2.5%) และย้อม DNA ด้วยน้ำยา Gel Star® Nucleic Acid Gel Stain (1:4000, Lonza, สหรัฐอเมริกา) ในการทำ M-PCR ทุกครั้งใช้ *beta-globin* เป็น internal positive control (PCR product มีขนาด 268 bp), ใช้ DNA ของผู้ที่มี *GSTM1+/GSTT1+* (double normal genotype) เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นสองครั้งเป็น negative control (รูปที่ 3)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

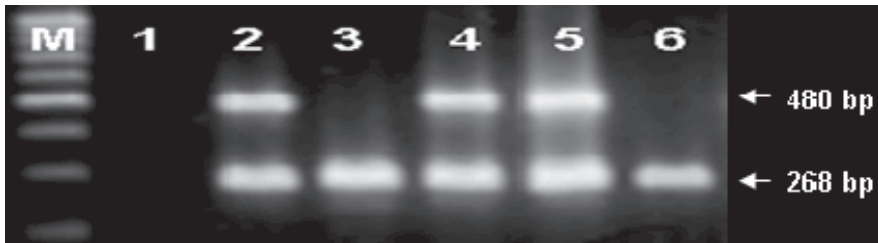
สถิติที่ใช้วิเคราะห์ในการศึกษานี้ด้วยการหาค่า kappa (κ) เพื่อประเมินความเหมือนกัน (agreement) ระหว่างวิธีการตรวจแบบ M-PCR และ C-PCR การคำนวณหาค่า κ และ 95% confidence interval (95% CI) นั้นใช้สมการดังนี้ $\kappa = (Po - Pe) / (1 - Pe)$ และ $95\% CI = \kappa \pm [1.96 \times \text{standard error ของค่า } \kappa \text{ หรือ SE } (\kappa)]$ ทั้งนี้เมื่อ $Po =$ สัดส่วนของการยอมรับที่ได้จากการสังเกต (observed agreements), $Pe =$ สัดส่วนของ

การยอมรับที่ได้จากการคาดการณ์ไว้ (agreements expected by chance) และ $SE(k) = \text{square root of } [Po(1-Po) / n(1-Pe)^2]$ หากค่า $k = 0.0-0.4$ คือ ไม่ยอมรับในความเหมือนกันของ 2 วิธี หากค่า $k = 0.41-$

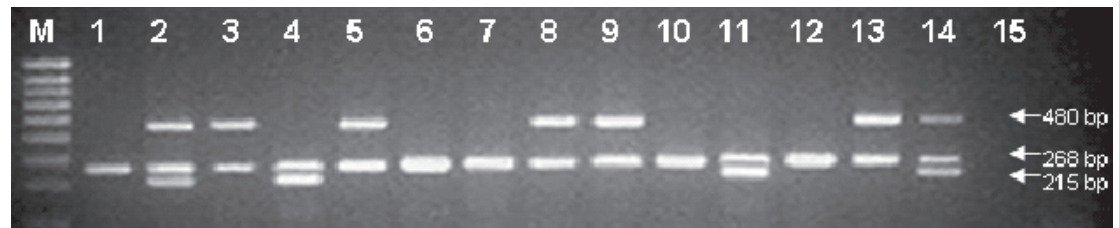
0.8 คือ ยอมรับได้ปานกลาง ถึง ควรยอมรับในความเหมือนกันของ 2 วิธี และหากค่า $k = 0.81-1.0$ คือ ยอมรับในความเหมือนกันเป็นอย่างดีของทั้ง 2 วิธี²⁹



รูปที่ 1 การตรวจหา *GSTM1* polymorphisms ด้วยวิธี C-PCR ในผู้ป่วย NPC PCR product ของ *GSTM1* และ *beta-globin* ที่ตรวจพบมีขนาด 215 และ 268 bp ตามลำดับ ผลการตรวจที่ได้ในช่องที่ 1 คือ negative control (น้ำกลั่นสองครั้ง), ช่องที่ 2 คือ positive control (*GSTM1+*), ช่องที่ 3 และ 6 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTM+*, ช่องที่ 4 และ 5 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTM1-* และ M คือ 100 bp size marker



รูปที่ 2 การตรวจหา *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี C-PCR ในผู้ป่วย NPC PCR product ของ *GSTT1* และ *beta-globin* ที่ตรวจพบมีขนาด 480 และ 268 bp ตามลำดับ ผลการตรวจที่ได้ในช่องที่ 1 คือ negative control (น้ำกลั่นสองครั้ง), ช่องที่ 2 คือ positive control (*GSTT1+*), ช่องที่ 3 และ 6 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTT1-*, ช่องที่ 4 และ 5 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTT1+* และ M คือ 100 bp size marker



รูปที่ 3 การตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms พร้อมกัน ด้วยวิธี M-PCR ในผู้ป่วย NPC PCR product ของ *GSTM1*, *GSTT1* และ *beta-globin* ที่ตรวจพบมีขนาด 215, 480 และ 268 bp ตามลำดับ ผลการตรวจที่ได้ในช่องที่ 1, 6, 7, 10 และ 12 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTM1-/GSTT1-*, ช่องที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTM1+/GSTT1+*, ช่องที่ 3, 5, 8, 9 และ 13 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTT1+*, ช่องที่ 4 และ 11 คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ genotype เป็น *GSTM1+*, ช่องที่ 14 คือ positive control (*GSTM1+/GSTT1+*), ช่องที่ 15 คือ negative control (น้ำกลั่นสองครั้ง) และ M คือ 100 bp size marker

ผลการศึกษา

ค่าความถี่ของ *GSTM1* และ *GSTT1* genotypes ที่ตรวจพบ และเวลาที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี M-PCR และวิธี C-PCR ในผู้ป่วย NPC 80 รายได้ แสดงไว้ในตารางที่ 1 ผลจากการศึกษาพบว่าทั้งวิธี M-PCR และวิธี C-PCR สามารถตรวจพบความถี่ของ *GSTM1* และ *GSTT1* genotypes ในผู้ป่วย NPC ทุกรายให้ผลเหมือนกันทั้งสองวิธี คือพบ *GSTM1+* จำนวน 17 ราย, *GSTT1+* จำนวน 21 ราย, *GSTM1+/GSTT1+* จำนวน 13 ราย และ *GSTM1-/GSTT1-* จำนวน 29 และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีค่า

$\kappa = 1.0$ และ 95% CI มีค่าระหว่าง 1.0-1.0 ซึ่งหมายความว่าให้การยอมรับในความเหมือนกันเป็นอย่างดีของวิธีการตรวจทั้งสองวิธีดังกล่าว

ในการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 4 ชั่วโมง ส่วนวิธี C-PCR ใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมงหลังจากสกัด DNA เสร็จสิ้นลง แสดงให้เห็นว่าวิธี M-PCR ช่วยลดเวลาการทำงานวิจัยลงได้มาก นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี M-PCR มีการใช้น้ำยาและวัสดุวิจัยน้อยกว่าวิธี C-PCR ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจได้มากขึ้นอีกด้วย

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความถี่ของ *GSTM1* และ *GSTT1* genotypes ในผู้ป่วย NPC โดยการตรวจด้วยวิธี M-PCR และวิธี C-PCR

วิธีตรวจ	จำนวน (ราย)	<i>GSTM1</i> และ <i>GSTT1</i> genotypes ^a				κ (95%CI)	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)
		M1+	T1+	M1+T1+	M-T1-		
M-PCR	80	17	21	13	29	1.0 (1.0-1.0)	4
C-PCR	80	17	21	13	29		8

^a, *GSTM1* และ *GSTT1* genotypes ตรวจด้วยวิธี M-PCR และวิธี C-PCR จากตัวอย่างของผู้ป่วยรายเดียวกัน M1+= *GSTM1+*, T1+= *GSTT1+*, M1+T1+= *GSTM1+/GSTT1+*, M-T1-= *GSTM1-/GSTT1-*, κ = kappa, CI= confidence interval

วิจารณ์และสรุป

NPC เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้^{1,2,30} เซลล์มะเร็งชนิดนี้มีคุณสมบัติเจริญเติบโตที่รวดเร็วและแพทย์มักตรวจวินิจฉัยโรคได้เมื่อเซลล์มะเร็งมีการกระจายตัวไปยังต่อมน้ำเหลืองและส่วนอื่นๆของร่างกายแล้ว มีรายงานว่า การติดเชื้อ EBV, การสูบบุหรี่ และการดื่มสุรา รวมทั้งการได้รับสารเคมีที่มีอยู่ในมลภาวะ และสารก่อมะเร็งต่างๆ ในสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยเสี่ยงทำให้เกิด NPC^{5-9,31,32} อย่างไรก็ตามพบว่าถึงแม้จะมีผู้ที่ได้รับปัจจัยเสี่ยง

เหล่านี้เป็นจำนวนมากกลับพบคนเพียงส่วนน้อยเท่านั้นในกลุ่มของผู้ที่ได้รับปัจจัยเสี่ยงที่เป็น NPC จึงเชื่อว่าปัจจัยทางพันธุกรรมของมนุษย์น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด NPC ในปัจจุบันมีหลักฐานแสดงว่าสารก่อมะเร็งเมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์จะถูกทำลายการออกฤทธิ์ได้โดย phase II enzymes เช่น *GSTM1* และ *GSTT1* ซึ่งมีความสามารถในการทำลายการออกฤทธิ์ของสารไนโตรซามีน, PAHs และเบ็นโซไพรีน^{23-25,33} มีรายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเหล่านี้อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการ

เกิด NPC ดังนั้นจึงมีนักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms กับความเสี่ยงต่อการเกิด NPC ซึ่งผลของการศึกษาที่ผ่านมายังคงมีข้อโต้แย้งกันอยู่บ้างไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า *GSTM1* หรือ *GSTT1* polymorphism เป็นปัจจัยเสี่ยงของ NPC ที่แท้จริง Deng และคณะ¹⁹ รายงานว่าทั้ง *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด NPC ในขณะที่ Zhuo และคณะ³⁴ พบเพียง *GSTM1* polymorphisms เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด NPC สำหรับในประเทศไทย มีรายงานว่า *GSTM1* polymorphisms มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด NPC³⁵ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวใน *GSTT1* polymorphisms (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) นอกจากนี้ Guo และคณะ²⁶ ได้ศึกษาในผู้ชายชาวจีนตอนใต้ของประเทศพบว่าผู้ที่มียีน *GSTM1*- หรือ *GSTT1*- เพียงชนิดเดียวไม่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด NPC แต่ผู้ที่มียีน *GSTM1*-/*GSTT1*- (double null genotype) จึงจะเสี่ยงต่อการเกิด NPC ด้วยเหตุนี้การตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ควบคู่กันในแต่ละบุคคลจึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็นกลุ่มเสี่ยงของ NPC ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ให้ได้ผลพร้อมกันด้วยวิธี M-PCR ซึ่งช่วยลดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายลงจึงเป็นเรื่งน่าสนใจที่ศึกษาเพื่อนำไปใช้รองรับงานวิจัยหรืองานบริการที่จะมีเพิ่มขึ้นในอนาคต

การศึกษานี้ได้มีการพัฒนาการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ในผู้ป่วย NPC ด้วยวิธี M-PCR ขึ้นใหม่โดยเปรียบเทียบกับวิธี C-PCR และแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าทั้งสองวิธีดังกล่าวให้ผล

การตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* genotypes สอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งวิธี M-PCR ที่ใช้ในการศึกษานี้พัฒนาจากวิธีของ Ueda และคณะ³⁶ โดยใช้ primers ที่ให้ PCR products ของ *GSTM1*, *GSTT1* และ *beta-globin* เหมือนกัน แต่ปรับเปลี่ยนการใช้ น้ำยา PCR reaction mixture และโปรแกรมในการทำ PCR ให้เหมาะสม วิธี M-PCR ใหม่สามารถลดขั้นตอน ความซับซ้อน เวลา และแรงงานในการตรวจลงได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี C-PCR เนื่องจากมีขั้นตอนการทำ PCR และ gel electrophoresis ของ *GSTM1* และ *GSTT1* พร้อมกันในครั้งเดียวทำให้การทำงานสะดวก และรวดเร็วขึ้น อีกทั้งวิธี M-PCR มีการใช้ reaction mixture reagent และวัสดุวิจัยในการทำ PCR น้อยลงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อน้ำยาและวัสดุดังกล่าวได้ครึ่งหนึ่ง ปัจจุบันการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี real time PCR กำลังเริ่มมีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้แทนที่วิธี M-PCR³⁷⁻³⁹ เนื่องจากวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน และใช้เวลาน้อยกว่า แต่ต้องมีการลงทุนค่อนข้างสูง เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ในการทำ real-time PCR ยังมีราคาแพง ส่วนวิธี M-PCR นั้นใช้เครื่องมือ PCR ธรรมดาซึ่งมีราคาถูกกว่า นอกจากนี้ น้ำยาที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ยังมีราคาสูงกว่าวิธี M-PCR อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเพื่อตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในหน่วยงานที่มีงบประมาณจำกัด

จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms ด้วยวิธี M-PCR ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีความน่าเชื่อถือ ไม่ซับซ้อน สะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นการตรวจหา *GSTM1* และ *GSTT1* polymorphisms

ด้วยวิธี M-PCR น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็กลุ่มเสี่ยงของ NPC ในประเทศไทยได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินบำรุงของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2552 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานวิจัย กลุ่มงานพยาธิวิทยา กลุ่มงานโสต ศอ นาสิก กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ และกลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ซึ่งทำให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- McDermott AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 2001;26:82-92.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay JR, Young J, editors. Cancer incidence in five continents. Vol. VI, Lyon: IARC Scientific Publications No. 143; 1997,814-5.
- Khuhaprema T, Srivatanakul P, Attasara P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, editors. Cancer in Thailand Vol. V 2001-2003, Bangkok; 2010,16-7.
- Attasara P, Buasom R. editors. Hospital-Based Cancer Registry 2008, National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Thailand, Bangkok; 2009,5.
- Young LS, Dawson CW, Clark D, Rupani H, Busson P, Tursz T, et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1988;69:1051-65.
- Raab-Traub N, Hood R, Yang CS, Henry B 2nd, Pagano JS. Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 1983;48:580-90.
- Pearson GR. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:150-4.
- Niemhom S, Kitazawa S, Murao S, Kunachak S, Maeda S. Co-expression of p53 and bcl-2 may correlate to the presence of epstein-barr virus genome and the expression of proliferating cell nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 2000;160:199-208.
- Kottaridis SD, Panotopoulou E, Diamantis I, Goula I, Danilidis J, Fountzilias G. Nasopharyngeal carcinoma: Epstein-Barr Virus significance. *Anticancer Res* 1996;16:785-9.
- Zheng YM, Tuppin P, Hubert A, Jeannel D, Pan YJ, Zeng Y, et al. Environmental and dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Zangwu County, Guangxi, China. *Br J Cancer* 1994;69:508-14.
- Lu SJ, Day NE, Degos L, Lepage V, Wang PC, Chan SH, et al. Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* 1990;346:470-1.
- Golovleva I, Birgander R, Sjlander A, Lundgren E, Beckman L. Interferon-alpha and p53 alleles involved in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis* 1997;18:645-7.
- Lee AW, Poon YF, Foo W, Law SC, Cheung FK, Chan DK, et al. Retrospective analysis of 5037 patients with nasopharyngeal carcinoma treated during 1976-1985: overall survival and patterns of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:261-70.
- Sham JS, Choy D. Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: a review of 759 patients. *Br J Radiol* 1990;63:51-8.
- Palli D, Saieva C, Gemma S, Masala G, Gomez-Miguel MJ, Luzzi I, et al. GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and gastric cancer in a high-risk italian population. *Int J Cancer* 2005;115:284-9.
- Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, White E, Homung SK, Leng ZT, et al. The glutathione S-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2313-8.
- Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk gastric cancer: a case-control study. *World J Gastroenterol* 2001;7:506-9.
- Ates NA, Tamer L, Ates C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet* 2005;43:149-63.
- Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Frequent genetic deletion of detoxifying enzyme GSTM1 and GSTT1 genes in nasopharyngeal carcinoma patients in Guangxi

- Province, China. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26:598-600.
20. Song DK, Xing DL, Zhang LR, Li ZX, Liu J, Qiao BP. Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China. *Cancer Detect Prev* 2009;32: 416-23.
 21. Syamala VS, Sreeja L, Syamala V, Raveendran PB, Balakrishnan R, Kuttan R, et al. Influence of germline polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and GSTP1 in familial versus sporadic breast cancer susceptibility and survival. *Fam Cancer* 2008;7:213-20.
 22. Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Polymorphism of glutathione S-transferase mu 1 and theta 1 genes and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *World J Gastroenterol* 2005;11:272-4.
 23. Fong YY, Chan WC. Bacterial production of dimethyl nitrosamine in salted fish. *Nature* 1973;243:421-2.
 24. Fong YY, Walsh EO. Carcinogenic nitrosamines in Cantonese salt-dried fish. *Lancet* 1971;2:1032.
 25. Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab* 2006;7:613-28.
 26. Guo X, O'Brien SJ, Zeng Y, Nelson GW, Winkler CA. GSTM1 and GSTT1 gene deletions and the risk for nasopharyngeal carcinoma in Han Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:1760-3.
 27. Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Burt RD, Chen C, Berwick M, Swanson GM. Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:547-51.
 28. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107:229-33.
 29. Quick Calcs online calculators for scientists. Available at: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>. Accessed November 15, 2008.
 30. Lin CL, Lo WF, Lee TH, Ren Y, Hwang SL, Cheng YF, et al. Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8+ T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:6952-8.
 31. O'Neil JD, Owen TJ, Wood VH, Date KL, Valentine R, Chukwuma MB, et al. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 modulates the AP-1 transcription factor pathway in nasopharyngeal carcinoma cells and enhances angiogenesis in vitro. *J Gen Virol* 2008;89:2833-42.
 32. Cheng YJ, Hildesheim A, Hsu MM, Chen IH, Brinton LA, Levine PH, et al. Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Cancer Causes Control* 1999;10:201-7.
 33. Schneider J, Bernges U, Philipp M, Weitowitz HJ. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Lett* 2004;208:65-74.
 34. Zhuo X, Cai L, Xiang Z, Li Q, Zhang X. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and nasopharyngeal cancer risk: an evidence-based meta-analysis. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:46.
 35. Tiwawech D, Srivatanakul P, Karalak A, Ishida T. Glutathione S-transferase M1 Gene polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005;6:270-5.
 36. Ueda M, Hung YC, Terai Y, Saito J, Nunobiki O, Noda S, et al. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2005;96:736-40.
 37. Tiwawech D, Chindavijak S, Karalak A, Ishida T. Real-time PCR assay for rapid detection of GSTM1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008;9:233-7.
 38. Tiwawech D, Chindavijak S, Sornprom A, Sumetchotimaytha W, Prasitthipayong A, Jarratwisarutporn Y et al. Detection of GSTT1 Polymorphisms in Cancer Patients by Real-Time PCR. *Thai Cancer J* 2008;28:172-83.
 39. Mar n F, Garcia N, Muñoz X, Capell G, González CA, Agudo A, et al. Simultaneous genotyping of GSTT1 and GSTM1 null polymorphisms by melting curve analysis in presence of SYBR Green I. *J Mol Diagn* 2010;12:300-4.

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหายีน *HER-2/neu* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยวิธี Real-Time Quantitative PCR กับวิธี Immunohistochemistry และ Chromogenic *In Situ* Hybridization

ปรีชา เรืองเวชวรชัย¹
สุนันทา จริญญาเลิศศักดิ์²
วิชัย ปุริสา²
ทรงคุณ วิญญูวรรณ³

บทคัดย่อ ยีน *HER-2/neu* เป็นตัวบ่งชี้ที่ช่วยทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Herceptin การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้ quantitative real-time PCR (qPCR) ในการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี qPCR, chromogenic *in situ* hybridization (CISH) และ immunohistochemistry (IHC) ในตัวอย่างเดียวกันของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 30 ราย จากการศึกษาพบว่าก่อนมะเร็งที่มีผล IHC เป็น 2+ และ 3+ มี 22 ราย อีก 8 รายมีผล negative (0) หรือ 1+ นอกจากนั้นยังพบว่าผลที่ได้จากวิธี CISH และ qPCR ใกล้เคียงกันโดยพบ positive 15 รายและ negative 12 ราย เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี CISH และ qPCR กับวิธี IHC พบว่าวิธี qPCR สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ได้มากกว่าวิธี CISH ในชิ้นเนื้อมะเร็งที่มีผล IHC 2+ โดยสรุปวิธี qPCR น่าจะใช้สำหรับตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมแทนวิธี CISH ที่ใช้ในงานประจำ (วารสารโรคมะเร็ง 2553;30:104-111.)

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²งานพันธุศาสตร์ กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

³สถาบันพยาธิวิทยา กรุงเทพฯ

Determination of *HER-2/neu* Gene Amplification in Breast Cancer Using Real-Time Quantitative PCR and Comparison with Immunohistochemical and Chromogenic *In-Situ* Hybridization Results

by Preecha Ruangvejvorachai¹, Sunanta Chariyalertsak², Wichai Purisa², Songkhun Vinyuvat³

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, ²Genetics Section, Research Division, National Cancer Institute, ³Institute of Pathology, Bangkok, Thailand

Abstract *HER-2/neu* status is used as a marker for Herceptin[®] therapy. The aim of this study was to evaluate the usefulness of quantitative real-time PCR (qPCR) in determining the *HER-2/neu* amplification status of breast cancer, by comparing qPCR, chromogenic *in-situ* hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) results from the same samples. Thirty breast carcinomas were examined using the three methods. Twenty-two tumors were 2+ or 3+ with IHC, while eight samples were either completely negative or 1+. Fifteen positive and twelve negative cases were detected by both CISH and qPCR, which led to similar results. Comparison of CISH and qPCR together with IHC showed that qPCR was more sensitive in detecting *HER-2/neu* gene amplification in tumors scored as 2+ with IHC. In conclusion, qPCR may serve as useful alternative to CISH for detecting *HER-2/neu* gene amplification in breast-cancer patients. (*Thai Cancer J* 2010;30:104-111.)

Keywords: *HER-2/neu* gene, real-time quantitative PCR, chromogenic *in-situ* hybridization, breast cancer

บทนำ

มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้หญิงไทยช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2544-2546 โดยพบผู้ป่วยรายใหม่ 21,967 ราย¹ และเสียชีวิต 4607 ราย² การควบคุมโรคมะเร็งชนิดนี้ นอกจากการป้องกันแล้ว การพัฒนาวิธีการตรวจรักษาให้มีประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่องก็เป็นสิ่งสำคัญ ในระยะสิบกว่าปีที่ผ่านมา มีรายงานการตรวจพบการแสดงออก (overexpression) ของ *HER-2/neu* oncoprotein รวบรวม 20-30 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมซึ่งส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 90) มาจากการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ผู้ป่วยที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของยีนชนิดนี้ แม้จะพบการแสดงออก (overexpression) ของโปรตีน ก็ยังมีการพยากรณ์โรคที่ดี³ การเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีหรือไม่มีกระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง พบว่าเกี่ยวข้องกับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis) ระยะการอยู่รอดและปลอดโรคสั้น นอกจากนั้น

การเพิ่มจำนวนยีน *HER-2/neu* ยังเป็นตัวทำนาย (predictive factor) การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมี, anti-estrogen, Herceptin[®] (Trastuzumab)⁴⁻⁷ ดังนั้นการตรวจหาสภาพของ *HER-2/neu* ที่แม่นยำจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการวางแผนการรักษาที่เหมาะสม การตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC) และการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาสภาพของ *HER-2/neu* ในปัจจุบัน แต่วิธี IHC เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สามารถตรวจได้ในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาทั่วไป และมีราคาถูก ในขณะที่วิธี FISH นั้น ใช้เวลานาน วิธีการยาก ต้องใช้บุคลากรที่ได้รับการฝึกมาเฉพาะ ต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซนส์ชนิดพิเศษ และใช้ probe ที่มีราคาแพง อีกทั้งต้องอ่านผลในสภาพแวดล้อมที่มีดี วิธีการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* อีกวิธีหนึ่ง

คือวิธี chromogenic *in situ* hybridization (CISH) ซึ่งใช้ peroxidase reaction เพื่อให้เกิดสีเช่นเดียวกับวิธี IHC ทำให้มองเห็นยีนที่เพิ่มขึ้นอยู่ภายในนิวเคลียสบน sections ที่ย้อมด้วยสี hematoxylin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) และเมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานพบว่าผลที่ได้จากวิธี CISH และวิธี FISH มีความสอดคล้องกันดี^{8,9}

การตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีนด้วยวิธี quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) เป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะและความแม่นยำสูง อีกทั้งมีราคาถูกลง และยังมีรายงานพบว่าสามารถใช้ตรวจหาปริมาณ DNA หรือ RNA ในชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินได้ด้วย¹⁰

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมโดยใช้วิธี CISH และ real-time PCR แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากทั้งสองวิธี และนำผลการตรวจหายีน *HER-2/neu* เปรียบเทียบกับผลการตรวจโปรตีน *HER-2/neu* โดยวิธี IHC ด้วย

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากก้อนมะเร็งเต้านมและเนื้อเยื่อปกติที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยจำนวน 30 ราย ที่ได้รับการผ่าตัดที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติในปีพ.ศ. 2547 ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมทั้ง 30 ราย ได้รับการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา และตรวจหาโปรตีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี IHC จากกลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ คณะผู้วิจัยได้นำเนื้อเยื่อฝังพาราฟินส่วนที่เหลือมาตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี CISH และ qPCR ซึ่งตัวอย่างก้อนมะเร็งที่นำมาวิเคราะห์หายีนดังกล่าวด้วยวิธี qPCR ต้องมีเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 80

Immunohistochemistry

การตรวจหาโปรตีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี IHC มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ นำบล็อกชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินมาตัด section ขนาด 4 μm วางบนสไลด์ที่เคลือบด้วย silane หลังจาก deparaffinize และ rehydrate sections แล้ว นำไปแช่ใน citrate buffer pH 7.3 อบให้ร้อนด้วยไมโครเวฟ ย้อม sections ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *HER-2/neu* (Dako, Denmark) แล้วใช้เทคนิค avidin-biotin ในการทำให้เกิดสีใช้ diaminobenzidine (DAB) และย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสี hematoxylin

การอ่านผล *HER-2/neu* โดยดูการติดสีบริเวณเซลล์มะเร็งดังนี้ ถ้าไม่พบการติดสีหรือติดสีที่ผนังเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็ง อ่านผลเป็น 0 ถ้าติดสีบางหรือติดสีที่ผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ (incomplete) มากกว่าร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็ง ให้เป็น 1+ ถ้าติดสีที่ผนังเซลล์โดยมีความสมบูรณ์น้อยจนถึงปานกลาง (weak to moderate complete membrane staining) และพบมากกว่าร้อยละ 10 ของเซลล์ ให้เป็น 2+ ถ้าติดสีเข้มและติดสีที่ผนังเซลล์อย่างสมบูรณ์มากกว่าร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็ง อ่านผลเป็น 3+

Chromogenic *In Situ* Hybridization

การตรวจหายีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี CISH ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยใช้ชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูป Spot-Light *HER2*CISH Kit (Zymed, Invitrogen, CA, USA) ด้วยการทำตามคำแนะนำที่แนบมากับชุดน้ำยาซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ นำบล็อกชิ้นเนื้อมะเร็งที่ฝังพาราฟินมาตัด section ขนาด 3 μm วาง section บน superfrost-plus slide ทิ้งให้แห้งแล้วนำไป deparaffinize และ rehydrate แช่สไลด์ใน CISH heat treatment solution แล้ว incubate ที่ 98°C ใน waterbath

นาน 15 นาที หลังจาก preheat แล้ว นำ section มาย่อยโปรตีนด้วย proteinase K ตามด้วย dehydrate ขึ้นตอนต่อไปเป็นการ denature ดีเอ็นเอที่ 94-95°C และ hybridize กับ *HER-2* probe โดยใช้เครื่อง Hybridizer (Dako, Denmark) แล้วทิ้งค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ล้าง section แล้วทำปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้ Polymerized Horse Radish Peroxidase technique ตามด้วยการย้อมสีด้วย diaminobenzidine นำสไลด์มา counterstain ด้วย hematoxylin

การอ่านผลการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ทำตามคำแนะนำ (Test Interpretation Guide) ที่แนบมากับชุดน้ำยา ดังนี้ diploid: นับได้ 1-2 จุด (dots) ต่อนิวเคลียสในเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 50 polysomy: พบ 3-5 จุด ต่อนิวเคลียสในเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 50 low amplification: พบ 5-10 จุดหรือจุดที่รวมกันเป็นกลุ่มเล็กๆ (small cluster) หรือพบทั้งจุดหลายจุดและกลุ่มเล็กๆรวมกันอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 50 high amplification: พบมากกว่า 10 จุด หรือเป็นกลุ่มใหญ่ (large cluster) หรือมีทั้งจุดหลายจุดและกลุ่มขนาดใหญ่ปนกันอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 50 สำหรับ diploid และ polysomy ให้แปลผลเป็น negative หรือไม่มีการเพิ่มจำนวนของยีน (non-amplified) ส่วน low amplification และ high amplification ถือว่ามี การเพิ่มจำนวนของยีน (amplified)

การตรวจหา ยีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี Real-time qPCR จากชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน

การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษานี้สกัดจากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในรายเดียวกัน ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ นำบล็อกชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin-

embedded tissue) ของผู้ป่วยมาตัด section ขนาด 10 μm จำนวน 2-4 แผ่นใส่ในหลอด 1.5 ml เดิม xylene 1.2 ml แล้วเขย่าหลอด นำหลอดที่ได้ไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที แยกส่วนบนออกจากหลอด ล้าง pellet ที่ได้ด้วย absolute ethanol 1.2 ml แล้วเขย่าหลอด นำไปปั่นอีกครั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที แล้วล้างด้วย ethanol อีกครั้ง นำตัวอย่างที่ได้มาผสมกับ Cell Lysis Solution 600 μl และ Proteinase K solution 3 μl (Bio-Rad) นำส่วนผสมไป incubate ที่ 55°C พร้อมเขย่าเบาๆ ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วเติม RNase A Solution (Bio-Rad) 3 μl incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แยกดีเอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้ AquaPure DNA Isolation Kit (Bio-Rad) ตามคำแนะนำที่แนบมากับชุดน้ำยาหาปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer แล้วนำดีเอ็นเอไปเก็บที่ตู้เย็น -40°C จนกว่าจะใช้

Real-Time Quantitative PCR

การตรวจหา ยีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี Real-time qPCR ใช้ น้ำยาสำเร็จรูป iQTM Supermix และเครื่อง Real-time qPCR (Bio-Rad, CA, USA) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ ปริมาตรสุดท้ายที่จะใช้ในการ run PCR คือ 25 μl ประกอบด้วย iQTM Supermix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) ซึ่งมี reaction buffer, nucleotides, และ Taq polymerase โดยเตรียมตามคำแนะนำที่แนบมากับชุดน้ำยา เดิม forward และ reverse primers, probes, น้ำกลั่น และดีเอ็นเอลงใน reaction mixture (ตารางที่ 1 แสดงลำดับ nucleotide และความเข้มข้นของ primers และ probes ที่ใช้) การตรวจหาปริมาณยีนจะเริ่มด้วยขั้นตอนต่างๆในแต่ละรอบ (cycle) ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่ 95°C 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ

58°C 1 นาที จำนวนทั้งหมด 50 รอบ แล้วทิ้งไว้ให้ อุณหภูมิลดลงที่ 40°C

การอ่านผลการเพิ่มจำนวนของยีน HER-2/neu โดยวิธี qPCR ในการศึกษานี้เป็นแบบ relative quantification¹¹ ใช้การคำนวณหาปริมาณ (copy

number) ของยีน ด้วยวิธี delta-delta-Ct¹² ซึ่งเป็น การเปรียบเทียบค่า Ct ของยีนเป้าหมาย (HER-2/neu) กับ reference gene (RNase P) ถ้าค่าที่ได้ > 2 fold ถือว่าเป็น amplified (positive) ถ้า ≤ 2 fold เป็น non-amplified (negative)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับ nucleotide และความเข้มข้นของ primers และ probes ที่ใช้

Oligonucleotide	Sequence
HER-2 FP(5 pmol)	5'-CCA GGA CCT GCT GAA CTG GT-3'
HER-2 RP(5 pmol)	5'-TGT ACG AGC CGC ACA TCC -3'
HER-2 Probe(5 pmol)	HEX-CAG ATT GCC AAG GGG ATG AGC TAC CTG-BHQ
RNaseP FP(2.5 pmol)	5'- AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'
RNaseP RP(2.5 pmol)	5'- GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'
RNaseP Probe(2.5 pmol)	Cy5- TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG -BHQ

FP = forward primer, RP = reverse primer

ผลการศึกษา

จากการตรวจหายีน *HER-2/neu* โดยวิธี IHC, CISH และ qPCR ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 30 ราย พบว่าวิธี IHC มี score 0 หรือ 1+ จำนวน 8 ราย 2+ จำนวน 9 ราย และอีก 13 รายมีผลเป็น 3+ สำหรับผลที่ได้จากวิธี CISH พบการเพิ่มจำนวน (amplified) ของยีน *HER-2/neu* ในผู้ป่วยจำนวน 16 ราย และ non-amplified 14 ราย ซึ่งผลที่ได้นี้ใกล้เคียง

กับวิธี qPCR คือพบ amplified 17 ราย และ non-amplified 13 ราย

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบผลการหา ยีน *HER-2/neu* ที่ได้จากวิธี CISH และ qPCR กับผลที่ได้จากวิธี IHC พบว่า ที่ score 2+ โดยวิธี IHC วิธี qPCR ให้ผล amplified จำนวนมากกว่าวิธี CISH (4 ราย และ 3 ราย ตามลำดับ) ส่วนที่ score 0 หรือ 1+ และ 3+ ให้ผลเหมือนกันทั้งสองวิธี

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหา *HER-2/neu* โดยวิธี IHC, CISH และ qPCR

Score	IHC จำนวน	qPCR		CISH	
		Non-amplified	Amplified	Non-amplified	Amplified
0 หรือ 1+	8	7	1	7	1
2+	9	5	4	6	3
3+	13	1	12	1	12

วิจารณ์

ในระยะสองทศวรรษที่ผ่านมา มีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับยีน *HER-2/neu* และผลผลิตที่เป็นโปรตีนคือ *HER-2/neu receptor* พบว่ามีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนและการลุกลามของเซลล์มะเร็ง¹³⁻¹⁷ ต่อมาเมื่อมีการนำ Herceptin® มาใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งเต้านมพบว่าผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Herceptin® ได้ดีมักเป็นผู้ที่มีการแสดงออกของ *HER-2/neu protein* สูงหรือมีการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ดังนั้นการตรวจหาสถานะของ *HER-2/neu* ที่แม่นยำจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในปัจจุบันวิธีการตรวจหา *HER-2/neu* ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือวิธี immunohistochemistry (IHC) ใช้ในการตรวจหาการแสดงออกของ *HER-2/neu protein* และวิธี FISH สำหรับใช้ในการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu*^{18,19} ทั้งวิธี IHC และวิธี FISH ได้ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยา (FDA) ของสหรัฐอเมริกาให้ใช้ในการตรวจหาสถานะของ *HER-2/neu* เพื่อช่วยในการเลือกผู้ป่วยที่จะได้รับการรักษาด้วย Herceptin® CISH ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ FDA ของสหรัฐอเมริการับรองเมื่อกลางปีค.ศ. 2008 ให้ใช้ตรวจหายีน *HER-2/neu* ทดแทนวิธี FISH ได้²⁰ แม้ว่าวิธี FISH จะเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการตรวจหายีน *HER-2/neu* แต่วิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง อีกทั้งบุคลากรที่ปฏิบัติงานต้องได้รับการฝึกเป็นอย่างดี นอกจากนั้นสไลด์ที่ย้อมด้วยวิธี FISH ไม่สามารถเก็บไว้ได้นานเกิน 2-3 สัปดาห์ เนื่องจากสียฟลูออเรสเซนต์เสื่อมสภาพ เพื่อขจัดปัญหาต่างๆ เหล่านี้จึงมีผู้เสนอวิธี CISH ในการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ทดแทนวิธี FISH โดยที่สไลด์ที่ย้อมด้วยวิธี CISH นั้นสามารถเก็บได้ถาวร และอ่านผลด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) ในการศึกษา นี้คณะผู้วิจัยจึงใช้วิธี CISH ในการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* แทนวิธี FISH

วิธี quantitative real-time PCR (qPCR) เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูง แม้ปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่อยู่ในเนื้อเยื่อฝังพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue) มีเพียงเล็กน้อยก็สามารถใช้ตรวจหาได้โดยวิธีนี้²¹ qPCR จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีผู้พยายามศึกษาที่จะนำมาใช้ในการตรวจหายีน *HER-2/neu*²²⁻²⁶ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี (nonradioactive) จึงเหมาะที่จะใช้ในการปฏิบัติงานประจำ (routine laboratory) ในการศึกษา นี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหายีน *HER-2/neu* ด้วยวิธี qPCR แบบ relative quantification

ในปัจจุบันการตรวจหา *HER-2/neu* มักเริ่มด้วยวิธี IHC ถ้าผลเป็น 3+ แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ด้วย จึงไม่จำเป็นต้องทดสอบด้วยวิธี FISH¹⁸ แต่ถ้าผลการย้อมเป็น 2+ ต้องทดสอบยืนยันด้วยวิธี FISH มีรายงานพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันค่อนข้างสูง^{27,28} แต่การตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีนมีความน่าเชื่อถือ (reliable) มากกว่าการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน (protein overexpression) ซึ่งเป็นเพียง semiquantitative method เมื่อมีผู้นำวิธี CISH มาใช้ในการตรวจหายีน *HER-2/neu* แล้วเปรียบเทียบผลกับวิธี IHC พบว่ามีความสอดคล้องกันค่อนข้างสูงเช่นกัน^{29,30} ในการศึกษา นี้พบความสอดคล้องกันในการตรวจหา *HER-2/neu* ระหว่างวิธี IHC และ CISH โดยพบว่าที่ 2+ และ 3+ มีความสอดคล้องกันร้อยละ 44 และ 92 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานอื่น^{29,30}

ในการศึกษาที่คณะผู้วิจัยพบว่าวิธี qPCR สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ได้มากกว่าวิธี CISH ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีผล IHC 2+ และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจระหว่างวิธี CISH และ qPCR พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลตรงกันร้อยละ 90 (27/30) โดยมีผล amplified (positive) 15 ราย และ non-amplified (negative) 12 ราย ซึ่งผลที่ได้ คล้ายกับ รายงานของ Kulka J และคณะ³¹

สรุป

เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษานี้เชื่อว่าวิธี qPCR เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของยีน *HER-2/neu* ในงานประจำ (routine detection) ทดแทนวิธี FISH หรือ CISH

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประจำปีพ.ศ. 2552-2553

เอกสารอ้างอิง

1. Kluhnaprema T, Srivatanakul P, Attasara P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, editors. Cancer in Thailand. Vol V, 2001-2003. Bangkok; 2010.
2. สถิติสาธารณสุขพ.ศ. 2546 สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก
3. Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karsen R. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? APMIS 2003;111:444-50.
4. Formenti SC, Spicer D, Skinner K, Cohen D, Groshen S, Bettini A, et al. Low HER2/neu gene expression is associated with pathological response to concurrent paclitaxel and radiation therapy in locally advanced breast cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002;52:397-405.
5. Gasparini G, Longo R, Torino F, Morabito A. Therapy of breast cancer with molecular targeting agents. Ann Oncol 2005;16:iv28-36.
6. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sve-S derborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. J Clin Oncol 1992;10:1049-56.
7. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. Breast Cancer Res Treat 1998;52:65-77.
8. Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. Am J Clin Pathol 2003;119:381-7.
9. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, et al. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. Br J Cancer 2003;88:1587-91.
10. Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexø E, Hamilton-Dutoit SJ, Sorensen BS. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. J Mol Diagn 2003;5:34-41.
11. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. Methods 2001;25:409-18.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. Methods 2001;25:402-8.
13. Esteva FJ, Sahin AA, Smith TL, Yang Y, Pusztai L, Nahta R, et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. Cancer 2004;100:499-506.
14. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Pollak M. Overexpression of ErbB2 receptor inhibits IGF-I-induced Shc-MAPK signaling pathway in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2004;313:709-15.
15. Seshadri R, Fergaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu

- oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1993;11:1936-42.
16. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
 17. Woods Ignatoski KM, Grewal NK, Markwart S, Livant DL, Ethier SP. p38MAPK induces cell surface alpha4 integrin downregulation to facilitate erbB-2-mediated invasion. *Neoplasia* 2003;5:128-34.
 18. Bilous M, Ades C, Armes J, Bishop J, Brown R, Cooke B, et al. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. *Breast* 2003;12:92-8.
 19. Lopez-Guerrero JA, Navarro S, Noguera R, Almenar S, Pellin A, Vazquez C, et al. Histological tumor grade correlates with HER2/c-erbB-2 status in invasive breast cancer: a comparative analysis between immunohistochemical (CB11 clone and Herceptest), FISH and differential PCR procedures. *Arch Pathol* 2003;65:50-5.
 20. FDA Grants Invitrogen Premarket Approval of Breast Cancer Test: HER2 Gene Amplification Test Will Aid in Assessing Breast Cancer Patient Candidacy for Herceptin(R) Treatment. Available at: <http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=61498&p=irol-newsArticle&ID=1172652&highlight=>. Accessed August 23, 2010.
 21. Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexø E, Hamilton-Dutoit SJ, Sorensen BS. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. *J Mol Diagn* 2003;5:34-41.
 22. Merkelbach-Bruse S, Wardelmann E, Behrens P, Losen I, Buettner R, Friedrichs N. Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1565-70.
 23. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn* 2004;6:42-51.
 24. Millson A, Sulis A, Hartung L, Kunitake S, Bennett A, Nordberg MC, et al. Comparison of two quantitative polymerase chain reaction methods for detecting HER2/neu amplification. *J Mol Diagn* 2003;5:184-90.
 25. Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, Dawson A, Myal Y. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol* 2006;6:2-10.
 26. Suo Z, Daehli KU, Lindboe CF, Borgen E, Bassarova A, Nesland JM. Real-time PCR quantification of c-erbB-2 gene is an alternative for FISH in the clinical management of breast carcinoma patients. *Int J Surg Pathol* 2004;12:311-8.
 27. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000;13:37-45.
 28. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001;19:354-63.
 29. Mayr D, Heim S, Weyrauch K, Zeindl-Eberhart E, Kunz A, Engel J, et al. Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Histopathology* 2009;55:716-23.
 30. Singh P, Smith CL, Cheetham G, Dodd TJ, Davy ML. Serous carcinoma of the uterus-determination of HER-2/neu status using immunohistochemistry, chromogenic in situ hybridization, and quantitative polymerase chain reaction techniques: its significance and clinical correlation. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:1344-51.
 31. Kulka J, Tóth AM, Kaposi-Novák P, Udvarhelyi N, Keller A, Schaff Z. Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR - a comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathol Oncol Res* 2006;12:197-204.

กรดเอลลาจิกและฤทธิ์ต้านมะเร็ง

วราภรณ์ จุ่งลก

โรคมะเร็งเกิดจากความผิดปกติของยีนซึ่ง ยีนผิดปกติเหล่านั้นเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนของเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์ทำให้ เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างไม่หยุดยั้ง เซลล์มะเร็ง สามารถที่จะไปเบียดบังการทำงานของเนื้อเยื่อข้างเคียง และแพร่กระจายไปทั่วร่างกายได้ สาเหตุของโรคมะเร็ง ส่วนใหญ่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกและส่วนน้อยเกิด จากปัจจัยทางพันธุกรรม ในปัจจุบันนี้สารเคมีหรือ สิ่งเจือปนต่างๆในอาหารที่ผู้ประกอบการเติมแต่งใส่ลง ไปแล้วแต่ก่อให้เกิดโทษต่อผู้บริโภคมีความเป็น พิษต่อเซลล์และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง การรับประทานอาหารที่ดีมีประโยชน์ต่อร่างกาย รวมไปถึงการไม่สูบบุหรี่ ดื่มแอลกอฮอล์ หรือปัจจัย เสี่ยงอื่นๆ สามารถลดการเกิดมะเร็งได้ รายงานการ วิจัยที่ผ่านมาเป็นที่ยอมรับกันว่ากลไกการเกิดมะเร็ง นั้นเกิดจากการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายใน เซลล์มากเกินไปที่สารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถ กำจัดได้ จึงทำให้สารอนุมูลอิสระหรือเมทาบอลิท์ที่เป็น พิษเหล่านั้นทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆที่มีความ

สำคัญภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก เอนไซม์ โปรตีน และไขมัน ทำให้เกิดการทำลายเซลล์และนำไปสู่ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็ง ในที่สุด¹ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีอยู่ในผักและ ผลไม้จึงมีความสำคัญในการที่จะช่วยป้องกันการ เกิดมะเร็ง จากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีความ พยายามศึกษาค้นคว้าเพื่อสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ทาง ชีวภาพ (bioactive compounds) หลายชนิดจากผัก และผลไม้ต่างๆ เพื่อพัฒนาและใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์ มะเร็ง² สารโพลีฟีนอลตัวหนึ่งซึ่งมีความสำคัญและ พบได้ในพืชผักผลไม้หลายชนิดคือกรดเอลลาจิก (ellagic acid) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นทั้งสารต้านอนุมูล อิสระ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ อะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบหลายชนิด³⁻⁴ ซึ่งการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารดังกล่าวเป็น ข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนายาต้านมะเร็งรวมถึง ใช้เป็นข้อมูลในการเลือกบริโภคอาหารเพื่อป้องกัน หรือรักษาโรคมะเร็งต่อไป

กรดเอลลาจิก (ellagic acid)

กรดเอลลาจิกจัดเป็นสารโพลีฟีนอลตัวหนึ่ง ที่พบได้ในผลไม้หลายชนิดเช่นในผลทับทิม ถั่ว อะโวคาโด เบอร์รี่แดง องุ่น สตรอเบอร์รี่ และราสเบอร์รี่ จากรายงานการวิจัยพบว่ากรดเอลลาจิกนั้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารเอลลาจิกแทนนิน (ellagitannin) ซึ่งอยู่ในอาหาร สารเอลลาจิกแทนนินนั้น ไม่สามารถที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ แต่จะสามารถ ผ่านลงมาถึงลำไส้ก่อนที่จะถูกแบคทีเรียในลำไส้ เมแทบอลิไตไปเป็นกรดเอลลาจิก⁴ การศึกษาโดยให้อาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงรับประทาน 800 mg ของผลทับทิมสกัด (pomegranate extract) ซึ่งประกอบด้วยเอลลาจิกแทนนิน 330.4 mg และกรดเอลลาจิก 21.6 mg แล้ววัดระดับของกรดเอลลาจิกในพลาสมาพบว่าระดับของกรดเอลลาจิกที่มีความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมาคือที่ 33 ng/ml ในเวลานานที่สุดคือ 1 ชั่วโมง จากการศึกษาดังกล่าวพบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้กรดเอลลาจิกเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อศึกษาเกี่ยวกับระดับของเอลลาจิกแทนนินที่ได้รับจากอาหาร⁵⁻⁶ รายงานการวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อให้สัตว์ทดลองกินกรดเอลลาจิกซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี [¹⁴C] และตรวจวัดระดับสารดังกล่าวในเซลล์ของหลอดอาหารและในเซลล์ของลำไส้เล็กหลังจากรับประทานไป 30 นาที จะพบว่ามีปริมาณสารดังกล่าวที่สูงและจะพบสารดังกล่าวสะสมอยู่ในเซลล์ของลำไส้ใหญ่เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อวัดระดับสารดังกล่าวในพลาสมา และในเนื้อเยื่อ (peripheral tissues) พบปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากรดเอลลาจิกสามารถเข้าสู่เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells) ได้ จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่ากรดเอลลาจิกเป็นสารที่มีความสำคัญเนื่องจากถูกสะสม

อยู่ในเซลล์เยื่อ (epithelial cell) ของอวัยวะต่างๆ ในระบบย่อยอาหารตลอดทั้งระบบจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและติดตามดูว่ากรดเอลลาจิกที่สะสมอยู่ในเซลล์ของระบบย่อยอาหารนั้นมีหน้าที่และประโยชน์อย่างไรต่อเซลล์

กรดเอลลาจิกและฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องในสัตว์ทดลองพบว่ากรดเอลลาจิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งการจับกันของสารก่อมะเร็งคือ benzo (a) pyrene (BP) และ benzo (a) pyrene-trans-7,8-diol (BP 7,8-DHD) กับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA) ได้ร้อยละ 46-50 และร้อยละ 60-70 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของทั้ง BP และ BP 7,8-DHD ทำให้ตรวจพบสารเมแทบอลิต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์น้อยลง จากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงฤทธิ์ของกรดเอลลาจิกในการยับยั้งการเกิดและ/หรือการกำจัดสารพิษก่อนที่จะจับกับดีเอ็นเอ⁸ อีกรายงานการศึกษาหนึ่งพบว่ากรดเอลลาจิกนอกจากจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งสารเมแทบอลิต์ของ BP แล้วยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P-450-dependent monooxygenases aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) และเอนไซม์ 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารพิษต่างๆ ในเซลล์เคราติโนไซต์ของหนู⁹ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารก่อมะเร็งอีกชนิดหนึ่งคือ methylbenzyl nitrosamine (MBN) โดยการยับยั้งเอนไซม์ microsomal cytochrome P-450 ของเซลล์หลอดอาหารของสัตว์ทดลองแต่ไม่มีผลยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ตับของสัตว์ทดลอง¹⁰ อย่างไรก็ตามมีรายงานที่ขัดแย้งกับผลการศึกษาดังกล่าว

ที่พบว่ากรดเอลลาจิกสามารถยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของ 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นและไม่สามารถลดการเกิดเนื้องอกได้ในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งดังกล่าว¹¹ นอกจากนี้บทบาทของกรดเอลลาจิกในการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารก่อมะเร็งโดยการไปยับยั้งเอนไซม์แล้ว ยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่ากรดเอลลาจิกสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutamate-cysteine ligase (GLCL) และเอนไซม์ glutathione synthetase ในตับของสัตว์ทดลองด้วย ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้ทำหน้าที่ในการสร้างสารกลูตาไทโอน (glutathione) เพื่อกำจัดสารพิษ¹² รายงานการวิจัยที่สนับสนุนงานดังกล่าวพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถลดการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และไปเพิ่มระดับของกลูตาไทโอนได้เช่นเดียวกัน¹³ ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากรดเอลลาจิกนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง (anticarcinogenic property)

ฤทธิ์ของกรดเอลลาจิกในการต้านสารก่อมะเร็งได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในสัตว์ทดลอง โดยการทำให้เซลล์ปกติเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายระยะจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (multistep carcinogenesis) จากผลการศึกษาพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้อมะเร็งได้หลายชนิด เช่น สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งของหลอดอาหารที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)¹⁴ ยับยั้งการเกิดมะเร็งของลิ้นที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)¹⁵ ยับยั้งการเกิดมะเร็งปอดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)¹⁶ และยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร 3-methylcholanthrene (MCA)¹⁷

นอกจากนั้นยังพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกและมะเร็งได้เมื่อใช้สารที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็ง (tumor promoter) คือ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)¹⁸ อย่างไรก็ดีตามได้มีรายงานการวิจัยที่ขัดแย้งกันโดยพบว่าการให้กรดเอลลาจิกในสัตว์ทดลอง 1 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบด้วยสารก่อมะเร็ง 3-methylcholanthrene สองครั้งต่อสัปดาห์พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเกิดก้อนเนื้องอกได้¹⁹ งานวิจัยที่สนับสนุนการทดลองดังกล่าวนี้พบว่ากรดเอลลาจิกไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร azoxymethane²⁰ ข้อมูลจากเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองที่ขัดแย้งกันนี้น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างในแต่ละการทดลองไม่ว่าจะเป็นปริมาณความเข้มข้นของสารหรือเซลล์เป้าหมายที่ใช้ และระยะเวลาที่ทดสอบที่มีความแตกต่างกัน

กรดเอลลาจิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านฤทธิ์ของสารก่อมะเร็งแล้วกรดเอลลาจิกยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งเซลล์มะเร็งซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยพบว่ากรดเอลลาจิกที่ความเข้มข้น 10 µg/ml มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน และกรดเอลลาจิกที่ให้ในช่วงความเข้มข้น 12.5-100 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในช่องปากคือเซลล์ KB และเซลล์ CAL27 ได้ตั้งแต่ร้อยละ 26-88 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29, HCT116, SW480 และ SW620 ได้ตั้งแต่ร้อยละ 1-87 และยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (22Rv1) ได้ตั้งแต่ร้อยละ 64-94 โดยที่

ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะมากขึ้นตามความเข้มข้นของกรดเอลลาจิกที่ให้ นอกจากนี้ยังพบว่ากรดเอลลาจิกที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 และ HCT116 ตายแบบอะพอพโทซิสเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์ 2 ชนิดนี้³ รายงานการศึกษาหนึ่งพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถเลือกทำลายเฉพาะเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells) โดยไม่ทำลายเซลล์ปกติและมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสจากภายในเซลล์ (intrinsic pathway) จากการศึกษาโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องพบว่ากรดเอลลาจิกจะไปกุดการแสดงออกของ cyclin A, cyclin B1, Bcl-X_L และเหนี่ยวนำให้มีการปล่อย cytochrome c ในไซโตพลาสซึม ในทางตรงข้ามกรดเอลลาจิกสามารถเหนี่ยวนำให้วงจรชีวิตของเซลล์หยุดอยู่ในระยะ S phase และยังไปกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ caspase 9 และ caspase 3⁴ งานวิจัยที่ทำในลักษณะเดียวกันคือการใช้สารสกัดจากองุ่นมัสคาดีน (muscadine grapes) พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells) ตายแบบอะพอพโทซิสทำให้เซลล์ลดจำนวนลง รวมถึงการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ ซึ่งจะสัมพันธ์กันกับส่วนประกอบของสารสกัดที่นำมาใช้ทดสอบซึ่งก็เป็นส่วนที่มีกรดเอลลาจิกเป็นองค์ประกอบหลัก²¹ นอกจากนี้งานวิจัยหนึ่งในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (T24) พบว่ากรดเอลลาจิกทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G0/G1 นอกจากนี้ยังกระตุ้นการแสดงออกของยีน p21 และ p53 มีผลลดการแสดงออกของยีน Cyclin dependent kinase 2 และเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ caspase 8²² มีรายงานที่เกี่ยวข้องพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), catalase

(CAT) และ glutathione peroxidase (GPX) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูแฮมสเตอร์ (V79-4 chinese hamster fibroblasts) ในขณะที่กรดเอลลาจิกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งกระดูก (human osteogenic sarcoma; HOS) โดยกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Bax และเอนไซม์ caspase 3²³ จากรายงานการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของกรดเอลลาจิกในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส

ผลของกรดเอลลาจิกต่อการทำงานของกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่สื่อสารภายในเซลล์ (cell signaling proteins) ก็พบว่ามีรายงานเช่นกัน การศึกษาหนึ่งพบว่าเมื่อใช้น้ำจากผลทับทิมซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือสารเอลลาจิกแทนนินที่มีความเข้มข้น 50 mg/L ทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells) พบว่าน้ำจากผลทับทิมสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (COX-2) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ได้ถึงร้อยละ 79 นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน p65 subunit และลดการจับกันกับส่วนของ NF-kappaB response element ได้ 6.4 เท่า ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยกรดเอลลาจิกเพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีผลใดๆ²⁴ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าผลทับทิมสกัดซึ่งมีองค์ประกอบของกรดเอลลาจิกร่วมกับสารอื่นๆสามารถยับยั้งฟอสฟาทีดิลอินโนซิทอล 3-ไคเนส (PI3K) ยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน MAPK, Akt, NF-kappaB, IKK-alpha เพิ่มการทำลาย I-kappaB-alpha ยับยั้ง Ki-67 และ proliferating cell nuclear antigen (PCNA)²⁵ อีกรายงานวิจัยหนึ่งพบว่ากรดเอลลาจิกนั้นช่วยเสริมฤทธิ์ของเคออสตินโดยเพิ่มกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน mitogen-

activated protein (MAP) kinases, c-jun N-terminal (JNK)1,2 และ p38 ซึ่งผลเหล่านี้ไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส²⁶

นอกจากกรดเอลลาจิกจะมีความสำคัญดังที่ได้กล่าวมาแล้วก็ยังมีรายงานพบว่ายูโรลิทิน (uroolithins) ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์จากกรดเอลลาจิกโดยแบบที่ละลายในน้ำได้ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเอลลาจิกแทนนิน และกรดเอลลาจิก²⁷ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ายูโรลิทินยังสามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์อะโรมาเตส (aromatase) และยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้อีกด้วย²⁸

กรดเอลลาจิกและการเสริมฤทธิ์ของยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง

นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด (chemoresistance) และที่ดื้อต่อรังสีรักษา (radiore-sistance) ทำให้เซลล์ดังกล่าวไวต่อการถูกทำลายด้วยยาเคมีและรังสีรักษา เช่นในงานวิจัยหนึ่งพบว่ากรดเอลลาจิกและเคอร์คูมิน (curcumin) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutathione s-transferases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและพบว่าจะเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด²⁹ การทดลองหนึ่งในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) พบว่ากรดเอลลาจิกที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{mol/L}$ ร่วมกับรังสีแกมมา (gamma radiation 6 Gy) สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้นในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม³⁰ กรดเอลลาจิกที่ให้ร่วมกับกรดเรตินอยด์สามารถเสริมฤทธิ์กันโดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 acute myeloid leukemia cells)

ตายแบบอะพอพโทซิสและสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของสารที่บ่งชี้ถึงเซลล์ตัวแก่ (differentiation markers) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดดังกล่าว³¹ สำหรับการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ให้กรดเอลลาจิกจะพบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิด ROS สูงในเซลล์ก่อนเนื้องอกนั้น โดยที่ ROS จะเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบร่วมกับการใช้สารรังสีรักษาและยังมีผลทำให้เซลล์ก่อนเนื้องอกนั้นตาย นอกจากนี้ยังพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถป้องกันภาวะ oxidative stress ในเซลล์ลิพโซโซมจากม้ามซึ่งถูกกระตุ้นด้วยสารรังสีในสัตว์ทดลองที่นำเอาเซลล์มะเร็งไปปลูกถ่ายไว้ในงานวิจัยดังกล่าวได้ตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) และ glutathione reductase (GR) พบว่าลดลงในก้อนเนื้องอกนั้น หลังจากทดสอบด้วยกรดเอลลาจิกร่วมกับการใช้สารรังสีรักษา³⁰ อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาหนึ่งพบว่ากรดเอลลาจิกนั้นไม่ได้มีผลในการเพิ่มหรือลด ROS เมื่อให้ร่วมกับเคอควิเซติน (quercetin) ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลอีกชนิดหนึ่ง²⁶ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยการนำกรดเอลลาจิกมาช่วยในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมากโดยให้ร่วมกับยาเคมีบำบัดพบว่ากรดเอลลาจิกจะช่วยลดความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยลดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) ในผู้ป่วย ถึงแม้ว่าการรอดชีวิตของผู้ป่วย (overall survival) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ยาเคมีบำบัดอย่างเดียวแล้วนั้นจะไม่มีแตกต่างกัน³²

กรดเอลลาจิกและฤทธิ์ด้านอื่น ๆ

ผลการวิจัยหนึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของกรดเอลลาจิกในการต้านการอักเสบ (anti-inflamma-

tory activity) โดยพบว่ากรดเอลลาจิกสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ prostaglandin E2 ได้แก่ cyclo-oxygenase-2 (COX-2), microsomal PGE synthase-1 (mPGEs-1) และ cytosolic phospholipase A2 alpha (cPLA2 alpha) ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ในเซลล์โมโนไซต์³³ และจากข้อมูลในสัตว์ทดลองยังพบอีกว่าสัตว์ทดลองที่กินผงเบอร์รี่แห้งซึ่งประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ทั้งวิตามินและโพลีฟีนอลอื่นๆ รวมทั้งกรดเอลลาจิกหลังจากการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเป็นมะเร็งหลอดอาหารด้วยสารก่อมะเร็ง N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) พบว่าผงเบอร์รี่แห้งสามารถยับยั้งก้อนเนื้องอกได้ที่ร้อยละ 24-56 และสามารถยับยั้งก้อนมะเร็งได้ถึงร้อยละ 31-64 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลไกการยับยั้งเป็นผลมาจากการไปลดการสร้าง DNA adduct ลดระดับ cyclooxygenase-2 และ inducible nitric oxide synthase³⁴ นอกจากนี้กรดเอลลาจิกยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (antiangiogenic property) บริเวณก้อนเนื้องอกนั้นโดยการไปยับยั้งการทำงานของ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ platelet-derived growth factor (PDGF) receptors³⁵

สรุปและอภิปราย

จากข้อมูลต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วแสดงให้เห็นว่ากรดเอลลาจิกมีคุณสมบัติในการต้านฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง ด้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสลดความเป็นพิษและเสริมฤทธิ์ของยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งด้านการอักเสบ และยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

1. Hwang ES, Kim GH. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* 2007;229:1-10.
2. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1397-421.
3. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 2005;16:360-7.
4. Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2006;17:611-25.
5. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem* 2006;54:8956-61.
6. Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta* 2004;348:63-8.
7. Whitley AC, Sweet DH, Walle T. Site-specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract. *J Pharm Pharmacol* 2006;58:1201-9.
8. Dixit R, Teel RW, Daniel FB, Stoner GD. Inhibition of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-trans-7,8-diol metabolism and DNA binding in mouse lung explants by ellagic acid. *Cancer Res* 1985;45:2951-6.
9. Mukhtar H, Del Tito BJ Jr, Marcelo CL, Das M, Bickers DR. Ellagic acid: a potent naturally occurring inhibitor of benzo[a]pyrene metabolism and its subsequent glucuronidation, sulfation and covalent binding to DNA in cultured BALB/C mouse keratinocytes. *Carcinogenesis* 1984;5:1565-71.

10. Barch DH, Fox CC. Dietary ellagic acid reduces the esophageal microsomal metabolism of methylbenzyl-nitrosamine. *Cancer Lett* 1989;44:39-44.
11. Singletary K, Liao CH. Ellagic acid effects on the carcinogenicity, DNA-binding and metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). *In Vivo* 1989;3:173-5.
12. Shepherd AG, Manson MM, Ball HW, McLellan LI. Regulation of rat glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) subunits by chemopreventive agents and in aflatoxin B(1)-induced preneoplasia. *Carcinogenesis* 2000;21:1827-34.
13. Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol* 1999;37:313-8.
14. Siglin JC, Barch DH, Stoner GD. Effects of dietary phenethyl isothiocyanate, ellagic acid, sulindac and calcium on the induction and progression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1995;16:1101-6.
15. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzui M, Okamoto K, et al. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis* 1993;14:1321-5.
16. Boukharta M, Jalbert G, Castonguay A. Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutr Cancer* 1992;18:181-9.
17. Mukhtar H, Das M, Del Tito BJ Jr, Bickers DR. Protection against 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenesis in Balb/C mice by ellagic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;119:751-7.
18. Gali HU, Perchellet EM, Klish DS, Johnson JM, Perchellet JP. Antitumor-promoting activities of hydrolyzable tannins in mouse skin. *Carcinogenesis* 1992;13:715-8.
19. Smart RC, Huang MT, Chang RL, Sayer JM, Jerina DM, Wood AW, Conney AH. Effect of ellagic acid and 3-O-decylellagic acid on the formation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in vivo and on the tumorigenicity of 3-methylcholanthrene in mice. *Carcinogenesis* 1986;7:1669-75.
20. Rao CV, Tokumo K, Rigotty J, Zang E, Kelloff G, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, alpha-difluoromethylornithine, 16 alpha-fluoro-5-androsten-17-one, and ellagic acid individually and in combination. *Cancer Res* 1991;51:4528-34.
21. Mertens-Talcott SU, Lee JH, Percival SS, Talcott ST. Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). *J Agric Food Chem* 2006;54:5336-43.
22. Li TM, Chen GW, Su CC, Lin JG, Yeh CC, Cheng KC, et al. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res* 2005;25:971-9.
23. Han DH, Lee MJ, Kim JH. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anticancer Res* 2006;26:3601-6.
24. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J Agric Food Chem* 2006;54:980-5.
25. Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis* 2007;28:163-73.
26. Mertens-Talcott SU, Bomser JA, Romero C, Talcott ST, Percival SS. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J Nutr* 2005;135:609-14.
27. Sharma M, Li L, Cerver J, Killian C, Kooroor A, Seeram NP. Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. *J Agric Food Chem* 2010;58:3965-9.
28. Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit

- antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2010;3:108-13.
29. Hayeshi R, Mutingwende I, Mavengere W, Masiyanise V, Mukanganyama S. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food Chem Toxicol* 2007;45:286-95.
30. Bhosle SM, Huilgol NG, Mishra KP. Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cells by ellagic acid. *Clin Chim Acta* 2005;359:89-100.
31. Hagiwara Y, Kasukabe T, Kaneko Y, Niitsu N, Okabe-Kado J. Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Int J Hematol* 2010;92:136-43.
32. Falsaperla M, Morgia G, Tartarone A, Ardito R, Romano G. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. *Eur Urol* 2005;47:449-54.
33. Karlsson S, N nberg E, Fjaeraa C, Wijkander J. Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in human monocytes. *Br J Nutr* 2010;103:1102-9.
34. Stoner GD, Chen T, Kresty LA, Aziz RM, Reinemann T, Nines R. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries:potential mechanisms. *Nutr Cancer* 2006;54:33-46.
35. Labrecque L, Lamy S, Chapus A, Mihoubi S, Durocher Y, Cass B, et al. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogenesis* 2005;26:821-6.

คำแนะนำการส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารโรคมะเร็ง

วารสารโรคมะเร็งยินดีรับบทความทางวิชาการ หรือเรื่องราวที่น่าสนใจเกี่ยวกับโรคมะเร็ง เพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารของเรา โดยคณะผู้จัดทำวารสารโรคมะเร็งขอให้ผู้นิพนธ์ส่งต้นฉบับ ซึ่งจัดเตรียมถูกต้องตามคำแนะนำในเอกสารนี้ มาถึง

บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง

กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี

กรุงเทพฯ 10400

หรือทาง E-mail : nci_journal@hotmail.com

ประเภทของบทความ

นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

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

รายงานผู้ป่วย (Case Report)

ควรประกอบด้วยบทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษ และภาษาไทย) บทนำ รายงานผู้ป่วย บทวิจารณ์ ข้อคิดเห็น สรุป และเอกสารอ้างอิง

บทความทางวิชาการหรือบทฟื้นฟูวิชาการ (Review Articles)

ควรเป็นบทความที่ให้ความรู้ รวบรวมสิ่งตรวจพบใหม่ หรือเรื่องที่น่าสนใจที่ผู้อ่านนำไปประยุกต์ได้ ประกอบด้วย บทนำ ความรู้เกี่ยวกับเรื่องที่เขียน และเอกสารอ้างอิง

การเตรียมต้นฉบับ

1. บทความที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ต้องส่งต้นฉบับ 2 ชุด (พร้อมไฟล์) และต้องไม่เคยตีพิมพ์หรือกำลังส่งตีพิมพ์ที่ใด

2. บทความที่พิมพ์รับทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ถ้าเป็นภาษาไทยควรหลีกเลี่ยงคำภาษาอังกฤษ ยกเว้นในกรณีจำเป็นเท่านั้น พยายามไม่ใช้คำย่อ นอกจากคำที่ยอมรับกันโดยทั่วไป

3. บทคัดย่อ ให้ย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษไม่ว่าเนื้อเรื่องจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ และมีคำสำคัญ (Key words) ด้วย

4. ชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน ต้องมีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ พร้อมด้วยสถาบันที่ทำงาน (ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) และระบุผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ (corresponding author)

5. ต้นฉบับต้องพิมพ์อย่างชัดเจนมีระยะห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่อง พิมพ์หน้าเดียวในกระดาษ A4 โดยพิมพ์ห่างจากขอบทุกด้าน 1 นิ้ว โดยตลอด และใส่เลขหน้าทางมุมขวามือ

6. ภาพประกอบ ใช้ภาพขาวดำ ขนาดโปสเตอร์ ผิวน้ำเรียบเป็นมัน กำกับหมายเลขภาพ ชื่อผู้เขียนไว้ด้านหลังภาพทุกภาพ พิมพ์คำบรรยายภาพเป็นลำดับแยกไว้ในกระดาษอีกแผ่น หรือเป็นรูปดิจิทัลไฟล์ .jpeg ความละเอียด 600 dpi กำกับ หมายเลขภาพ และคำบรรยายส่งเป็นไฟล์แยกต่างหากจากเนื้อเรื่อง

7. ตาราง พิมพ์แยกต่างหากโดยมีหัวข้อ (title) และเชิงอรรถ (foot note) พร้อมทั้งอธิบายตัวย่อในตารางตลอดจนบอกนัยสำคัญทางสถิติอย่างครบถ้วน

8. เอกสารอ้างอิง ใช้ระบบแวนคูเวอร์ ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันอยู่ในวารสารทางการแพทย์ชั้นนำในขณะนี้ ให้กำกับการอ้างด้วยหมายเลขและเรียงลำดับการอ้างหมายเลขที่กำกับในรายชื่อเอกสารอ้างอิง จะต้องตรงกับหมายเลขในเนื้อเรื่องด้วย

การเขียนเอกสารอ้างอิง

8.1 จาการวารสาร

วารสารภาษาอังกฤษ ประกอบด้วยชื่อผู้แต่ง (ถ้ามีผู้แต่งไม่เกิน 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคนแต่ถ้ามี 7 คนขึ้นไปให้ใส่เพียง 6 ชื่อแรก แล้วเติม et al.) ชื่อเต็มของบทความ ชื่อยอวารสาร (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. สุพันธ์ จริยาเลิศศักดิ์, พงษ์กิตติ วิสุศุกร, 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 บรรณานิการ 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. 6th 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 10th 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"/> | ใบแทรก | 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 : nci_journal@hotmail.com

การชำระค่าโฆษณา ให้เขียนเช็คสั่งจ่ายในนาม "มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ"



วารสารโรคมะเร็ง

กองบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

ใบสมัครสมาชิก/ใบต่ออายุสมาชิก

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เรียน ผู้จัดการวารสารโรคมะเร็ง

ข้าพเจ้า.....

ในนาม ส่วนราชการ/ บริษัท/ ส่วนตัว.....

ที่อยู่เลขที่.....ตรอก/ซอย.....แขวง.....

เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

โทรศัพท์.....โทรสาร.....

E-mail.....

มีความประสงค์ลงโฆษณาในวารสารโรคมะเร็ง

ปีที่ 30 ฉบับที่ 1-4 (พ.ศ. 2553) รวม 4 ฉบับ เป็นเงิน 200 บาท

ปีที่ 31 ฉบับที่ 1-4 (พ.ศ. 2554) รวม 4 ฉบับ เป็นเงิน 200 บาท

พร้อมกันนี้ได้จัดส่งเงินจำนวนบาท (.....) ตัวอักษร

โดยโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาริบัติ

เลขที่บัญชี 026-2-27518-2 ชื่อบัญชี มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ขอแสดงความนับถือ

ลงนาม.....

(.....)

หมายเหตุ: โปรดส่งสำเนาการโอนเงินผ่านธนาคารพร้อมใบสมัครสมาชิกมายังโทรสาร 02-644-9097

หรือส่งเอกสารทางไปรษณีย์โดยนำส่ง กองบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6

เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

