



## บรรณาธิการ

ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ

## ผู้ช่วยบรรณาธิการ

นางพาง สุวัฒนานันท์

ศุติพร แสงกระจ่าง

เพ็ญศรี แซ่หลี่

สุนันทา จรียาเลิศศักดิ์

วิโรจน์ เหล่าสุนทรศิริ

## คณะบรรณาธิการ

กนกพร ใจสถาพร

ฉันทนา หมอกเจริญพงศ์

ธิดา ปัญจพันธ์พงศ์

วีรวุฒิ อิ่มสำราญ

วสันต์ ลีนะสมิต

สายพิน ตั้งศรีชต์

สุวัฒน์ จรียาเลิศศักดิ์

อรุณลักษณ์ โคมินทร์

อารยะ อุดุลพันธ์

อรชร เอี่ยมอารีรัตน์

กิติ จินดาวิจักษณ์

ชนินทร์ อภิวานิชย์

ผ่องพรรณ ศิริพงษ์

วิจิต อาภรณ์วิรัตน์

วรรณเพ็ญ เบ็ญจชัย

สุพล มโนรมณ์

อนงค์ เทพสุวรรณ

อัคริยา สมรรคบุตร

อารีย์ ประสิทธิ์พงษ์

กวิญ ลีละวัฒน์

คณัย ทิวาเวช

เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล

วุฒิ สุเมธ โชติเมธา

สมจินต์ จินดาวิจักษณ์

สุเมธ รินสุรวงศ์

อมรรัตน์ วิจิตรลีลา

อนันต์ กรลักษ์ณ์

อรสา อัครวัชรางกูร

## ผู้จัดการ

อาคม ชัยวีระวัฒน์

## ผู้ช่วยผู้จัดการ

หทัยทิพย์ เชื้อสอน

วาริพร ศักดิ์สมบูรณ์

พรนภา จันทร์วีระกุล

เสาวคนธ์ สุกรโยธิน

มลณี สนั่นไชย



วารสารโรคมะเร็ง  
THAI CANCER JOURNAL



ISSN 0125-2038

The National Cancer Institute Foundation

---

### Editor-in-Chief

Thiravud Khuhaprema

### Assistant Editors

Nongpanga Suwattananand

Suleeporn Sangrajrang

Pensri Saelee

Sunanta Chariyalertsak

Wirote Lausoontornsiri

### Editorial Board

Kanokporn Jaisathaporn

Chantana Morkchareonpong

Thida Panchaphanpong

Weerawut Imsamran

Vasant Linasmita

Saipin Tangkarat

Suwat Chariyalertsak

Arunluck Komindr

Araya Adulbhan

Orachorn Aimarreerat

Kiti Chindavijak

Chanin Apiwanich

Pongpun Siripong

Vichit Arpornwirat

Wanpen Benjachai

Suphon Manoromana

Anong Tepsuwan

Akariya Samakhaputra

Aree Prasitthipayong

Kawin Leelawat

Danai Tiwawech

Petcharin Srivatanakul

Wutthi Sumetchotimaytha

Somjin Chindavijak

Sumate Rinsurongkawong

Amornrat Vijitleela

Anant Karalak

Orasa Akkarawacharangkul

### Managing Editor

Arkom Chaiwerawattana

### Assistant Managers

Hathaitip Chuasorn

Wareeporn Saksomboon

Pornnapa Jantaraweragul

Saowakon Sukarayodhin

Malinee Sontichai

---

Greatinterprint Limited Partnership



วารสารโรคมะเร็ง  
THAI CANCER JOURNAL



- วัตถุประสงค์** เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ และผลงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็ง
- สำนักงาน** สำนักงานวารสาร โรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ  
268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400  
โทร. 0-2354-7025 ต่อ 2205  
โทรสาร 0-2644-9097
- เว็บไซต์เผยแพร่** [www.kmnci.com](http://www.kmnci.com)
- กำหนดการตีพิมพ์** กำหนดออกทุก 3 เดือน ปีละ 4 ฉบับ
- การส่งต้นฉบับ** บรรณาธิการวารสาร โรคมะเร็ง  
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400  
โทร. 0-2354-7025 ต่อ 2205  
โทรสาร 0-2644-9097  
E – mail : [nci\\_journal@hotmail.com](mailto:nci_journal@hotmail.com)
- การบอกรับเป็นสมาชิก**
- ห้องสมุดและหน่วยงานราชการแจ้งความจำนงได้ที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็งโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
  - หน่วยงานเอกชน อัตราค่าสมาชิก 200 บาท ต่อปี (4 ฉบับ) รวมค่าจัดส่ง โดยสมัครสมาชิกผ่านเว็บไซต์ [www.kmnci.com](http://www.kmnci.com) และโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาริบัติ เลขที่บัญชี 026-2-27518-2  
ชื่อบัญชี มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ



## สารบา- Content

ปีที่ 29 ฉบับที่ 2

เมษายน-มิถุนายน 2552

	หน้า
บทบรรณาธิการ	44
การย้อมชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากด้วยเทคนิคอิมมูโน- ฮิสโตเคมี แบบ Multiplex Staining เพื่อแยก Benign Lesions กับ Carcinoma	พัทรินทร์ หอมชะเอม อนันต์นุช ศักดิ์อภิภูวนันท์ มณีนีรัตน์ มัสอูดี วิจิตรา เหมศรีชาติ อนันต์ กรลักษ์ณัฏ
การตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในประชากรกลุ่มเสี่ยงของมะเร็งปอด จังหวัดลำปาง	สุรทัสน์ พงษ์นิกร คณัย ทิวาเวช สุภมาส ลายเงิน ศุริยา ฟองมูล วิชิต สุวรรณ
การตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction-SimpleProbe Probe ในผู้ป่วยมะเร็งปอด	คณัย ทิวาเวช สุรทัสน์ พงษ์นิกร อดิศักดิ์ ศรีพรหม อนันต์ กรลักษ์ณัฏ Takafumi Ishida
การตรวจหา DNA methylation ของ p16 <sup>INK4a</sup> ในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับโดยวิธี Methylation Specific-Polymerase Chain Reaction	เพ็ญศรี แซ่หลี ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร โสพิศ วงศ์คำ สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ พัชรินทร์ หอมชะเอม
การศึกษาทางชีวโมเลกุลของมะเร็งเต้านมในสตรีไทย	ธเนศ พงศ์ธีรรัตน์



## คำแนะนำการส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารโรคมะเร็ง

วารสารโรคมะเร็งยินดีรับบทความทางวิชาการ หรือเรื่องราวที่น่าสนใจเกี่ยวกับโรคมะเร็งเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารฯ โดยคณะผู้จัดทำวารสารโรคมะเร็งขอให้ผู้พิมพ์ส่งต้นฉบับ ซึ่งจัดเตรียมถูกต้องตามคำแนะนำในเอกสารนี้ มาถึง

บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง  
กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ  
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์  
ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี  
กรุงเทพฯ 10400  
หรือทาง E-mail : nci\_journal@hotmail.com

### ประเภทของบทความ

**นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)** ควรจะเขียนลำดับเป็นข้อๆ ได้แก่ เรื่องย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย) บทนำสั้นๆ (เหตุผลที่ทำการศึกษานี้ รวมทั้งวัตถุประสงค์) วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง

**รายงานผู้ป่วย (Case Report)** ควรประกอบด้วยเรื่องย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย) บทนำ รายงานผู้ป่วย บทวิจารณ์ ข้อคิดเห็น สรุป และเอกสารอ้างอิง

**บทความทางวิชาการหรือบทปริทัศน์วิชาการ (Review Articles)** ควรเป็นบทความที่ให้ความรู้ รวบรวมสิ่งตรวจพบใหม่ หรือเรื่องที่น่าสนใจที่ผู้อ่านนำไปประยุกต์ได้ ประกอบด้วย บทนำ ความรู้เกี่ยวกับเรื่องที่เขียนและเอกสารอ้างอิง

### การเตรียมต้นฉบับ

1. บทความที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ต้องส่งต้นฉบับ

2 ชุด (พร้อมไฟล์) และต้องไม่เคยตีพิมพ์หรือกำลังส่งตีพิมพ์ที่ใด

2. บทความที่พิมพ์ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ถ้าเป็นภาษาไทยควรหลีกเลี่ยงคำภาษาอังกฤษ ยกเว้นในกรณีจำเป็นเท่านั้น พยายามไม่ใช้คำย่อ นอกจากคำที่ยอมรับกันโดยทั่วไป

3. บทความย่อ ให้ย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ว่าเนื้อเรื่องจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษและมีคำสำคัญ (Key words) ด้วย

4. ชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน ต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พร้อมด้วยสถาบันที่ทำงาน (ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) และระบุผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ (corresponding author)

5. ต้นฉบับต้องพิมพ์อย่างชัดเจนมีระยะห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่อง พิมพ์หน้าเดียวในกระดาษ A4 โดยพิมพ์ห่างจากขอบทุกด้าน 1 นิ้ว โดยตลอดและใส่เลขหน้าทางมุมขวาบน

6. ภาพประกอบ ใช้ภาพขาวดำ ขนาดโปสเตอร์ ผิวหน้าเรียบเป็นมัน กำกับหมายเลขภาพ ชื่อผู้เขียนไว้ด้านหลังภาพทุกภาพ พิมพ์คำบรรยายภาพเป็นลำดับแยกไว้ในกระดาษอีกแผ่น หรือเป็นรูปดิจิทัลไฟล์ .jpeg ความละเอียด 600 dpi กำกับหมายเลขภาพ และคำบรรยาย ส่งเป็นไฟล์แยกต่างหากจากเนื้อเรื่อง

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

8. เอกสารอ้างอิง ใช้ระบบแวนคูเวอร์ ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันอยู่ในวารสารทางการแพทย์ชั้นนำ ในขณะนี้ให้กำกับการอ้างอิงด้วยหมายเลขและเรียงลำดับการอ้างหมายเลขที่กำกับในรายชื่อเอกสารอ้างอิงจะต้องตรงกับหมายเลขในเนื้อเรื่องด้วย

## การเขียนเอกสารอ้างอิง

### 8.1 จากวารสาร

**วารสารภาษาอังกฤษ** ประกอบด้วย ชื่อผู้แต่ง (ถ้ามีผู้แต่งไม่เกิน 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคนแต่ถ้ามี 7 คนขึ้นไป ให้ใส่เพียง 6 ชื่อแรก แล้วเติม et al.) ชื่อเต็มของบทความ ชื่อวารสาร (ใช้ตาม Index Medicus) ปีที่พิมพ์; ปีที่: หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

**วารสารภาษาไทย** ให้เขียนแบบเดียวกับ ภาษาอังกฤษ เว้นแต่ชื่อผู้เขียนใช้ชื่อเต็มโดยใส่ชื่อตัว ก่อนแล้วตามด้วยนามสกุลและใช้ปี 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 cholangiocarcinoma. Gut 2001; 48: 80-6.

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

### 8.2 จากหนังสือและโมโนกราฟอย่างอื่น

#### 8.2.1 ผู้นิพนธ์เป็นบุคคล ตัวอย่างเช่น

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

#### 8.2.2 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประธาน ที่เป็น ผู้นิพนธ์ ตัวอย่างเช่น

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

#### 8.2.3 บทหนึ่งในหนังสือหรือตำรา ตัวอย่าง เช่น

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

#### 8.2.4 หนังสือที่เป็นชุด (series) ตัวอย่าง เช่น

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 = ชื่อ หนังสือ  
Methods in enzymology = ชื่อ หัวข้อ เรื่อง  
ของ series

#### 8.2.5 หนังสือ proceeding ของการประชุม

##### ตัวอย่างเช่น

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

#### 8.2.6 เอกสารหรือแหล่งข้อมูลอื่น เรื่องจากหนังสือพิมพ์ 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

เขียนที่.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

ในนามของ.....เลขที่.....ถนน.....

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

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

มีความประสงค์ลงโฆษณาในวารสารโรคมะเร็ง

- ฉบับที่ 1 เดือน มกราคม-มีนาคม
- ฉบับที่ 2 เดือน เมษายน-มิถุนายน
- ฉบับที่ 3 เดือน กรกฎาคม-กันยายน
- ฉบับที่ 4 เดือน ตุลาคม-ธันวาคม

รวม.....ฉบับ

โดยลงโฆษณาในลักษณะ

- พิมพ์เนื้อใน ½ หน้า อัตรา 5,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- พิมพ์เนื้อในเต็มหน้า อัตรา 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- พิมพ์ปกหลังด้านใน ½ หน้า อัตรา 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- พิมพ์ปกหลังด้านในเต็มหน้า อัตรา 20,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- พิมพ์ปกหลังด้านนอกเต็มหน้า อัตรา 35,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- โบนแทรก อัตรา 6,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม)
- พิมพ์สี จ่ายค่าเพลทและค่าพิมพ์เพิ่ม 10,000 บาท

รวมเป็นเงินทั้งสิ้นจำนวน.....บาท

ตัวอักษร(.....) บาท

ลงนาม.....ผู้สั่งโฆษณา

(.....)

**หมายเหตุ** ถาลงโฆษณาทั้งปี (4 ฉบับ) จะลดค่าโฆษณาให้ 10 %

ส่งอาร์ตเวิร์ค/ข้อความโฆษณาทาง E-mail : nci\_journal@hotmail.com

การชำระค่าโฆษณา ให้เขียนเช็คส่งจ่ายในนาม “มูลนิธิสถาบันมะเร็งแห่งชาติ”



## บทบรรณาธิการ

### การจัดทำทะเบียนมะเร็งประชากรในประเทศไทย

การทำทะเบียนมะเร็งแบบ Population – Based Cancer Registry หรือทะเบียนมะเร็งประชากรคือการรวบรวมและจำแนกข้อมูลของผู้ป่วยโรคมะเร็งทั้งหมดในจังหวัดใด จังหวัดหนึ่ง หรือในชุมชนใดชุมชนหนึ่งทะเบียนมะเร็งของจังหวัดใดจะต้องเก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดนั้นไม่ว่าจะได้รับการวินิจฉัยหรือรักษาพยาบาลในโรงพยาบาลใดๆ ก็ตามที่อยู่ในจังหวัดหรือนอกจังหวัดนั้นๆ เพื่อนำมาคำนวณหาค่าสถิติ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการวางแผน และประเมินผลการดำเนินการป้องกัน และควบคุมโรคมะเร็ง ทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็ง (incidence rate) และอัตราการตายของโรคมะเร็ง (mortality rate) ในประชากรที่กำหนดและสามารถทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดโรคมะเร็งกับภูมิภาคอื่นๆ ของประเทศหรือกับประเทศต่างๆ ในโลก ถ้ามีการศึกษาอย่างต่อเนื่องจะทราบแนวโน้มของอุบัติการณ์และอัตราการอยู่รอด (survival rate) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งในชุมชนนั้นๆ ทำให้ทราบถึงสาเหตุ (risk factors) ของการเกิดโรคมะเร็งในระหว่างอาชีพ ศาสนา เศรษฐฐานะทางสังคม และอื่นๆ โดยสามารถนำข้อมูลที่ได้มาวางแผนในการศึกษาวิจัยแบบ analytical studies เพื่อหา potential risk factors ของโรคมะเร็งที่พบบ่อยในชุมชนและนำผลการศึกษาที่ได้มาวางแผนการดำเนินงานป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งทั้งด้าน primary prevention, secondary prevention และ tertiary prevention ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ มีความสำคัญในการวางแผนและติดตามผลการดำเนินงานตามแผน

การป้องกันและควบคุมโรคมะเร็ง และเป็นตัวชี้วัดถึงความสำคัญของปัญหาที่จะต้องมีการดำเนินการอย่างเร่งด่วนของแต่ละท้องถิ่นให้เหมาะสมกับสภาพของสิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจ สังคม วัฒนธรรม ค่านิยม และพฤติกรรมของประชาชนในแต่ละท้องถิ่นที่ไม่เหมือนกัน

ในประเทศไทย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีหน้าที่ในการรวบรวมสถิติโรคมะเร็งทั่วประเทศ ในการรวบรวมสถิติโรคมะเร็งในประเทศไทยเป็นสถิติคาดประมาณการเกิดโรคมะเร็งที่ได้จากตัวแทนจังหวัดทั้งสี่ภาคของประเทศที่สามารถให้ข้อมูลครบถ้วนสมบูรณ์ที่จะเผยแพร่ได้ สถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ดำเนินการไปแล้วจำนวนสี่ฉบับ ฉบับแรก<sup>1</sup> เป็นสถิติในช่วงปี พ.ศ.2531-2534 ซึ่งคาดประมาณจากการเกิดโรคมะเร็งของ 4 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงใหม่ ขอนแก่น กรุงเทพฯ และสงขลา ต่อมาฉบับที่สอง<sup>2</sup> เป็นสถิติโรคมะเร็งในช่วงปี พ.ศ.2535-2537 โดยคาดประมาณจาก 5 จังหวัด เพิ่มจากเดิมมาหนึ่งจังหวัด คือ ลำปาง สำหรับสถิติโรคมะเร็งฉบับที่สาม<sup>3</sup> เป็นสถิติในช่วงปี พ.ศ. 2535-2537 ซึ่งเป็นสถิติที่คาดประมาณจากห้าจังหวัดเหมือนเดิม ในสถิติโรคมะเร็งฉบับที่สี่<sup>4</sup> เป็นสถิติในช่วงปี พ.ศ. 2538-2540 ได้ข้อมูลจากแปดจังหวัด โดยเพิ่มอีกสามจังหวัดคือ นครพนม ระยอง และประจวบคีรีขันธ์

การขยายพื้นที่ (จังหวัด) ที่สามารถให้ข้อมูลสถิติโรคมะเร็งที่ครบถ้วนสมบูรณ์จะทำให้ได้สถิติโรคมะเร็งของประเทศไทยที่สมบูรณ์และถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวางแผนการดำเนินงาน การป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งของประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลเพิ่มขึ้น

**เอกสารอ้างอิง**

1. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipong S, Sriamporn, et al. editors. Cancer in Thailand. Vol I, 1988-1991. Lyon; 1993.
2. Deerasamee S, Martin N, Sontipong S, Sriamporn S, Sriplung H, Srivatanakul P, et al. editors. Cancer in Thailand. Vol II, 1992-1994. Lyon; 1999.
3. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, et al. editors. Cancer in Thailand. Vol III, 1995-1997. Bangkok; 2003.
4. Khuhaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, Attasara P, et al. editors. Cancer in Thailand. Vol IV, 1998-2000. Bangkok; 2007.

**บรรณาธิการ**



# การย้อมชิ้นเนื้อต่อมลูกหมากด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี แบบ Multiplex Staining เพื่อแยก Benign Lesions กับ Carcinoma

พัชรินทร์ หอมชะเอม\*

อนันท์นุช สักคิอภิญญนันท์\*

มนีรัตน์ มัสสูดี\*

วิจิตรา เหมศรีชาติ\*

อนันต์ กรลักษณ์\*

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการใช้วิธี multiplex staining ในการย้อมชิ้นเนื้อแทนวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ใช้ประจำ จากการวินิจฉัยผลทางพยาธิวิทยาของต่อมลูกหมากจากเข็มเจาะชิ้นเนื้อ (core needle biopsy) ของผู้ป่วยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 158 ราย ที่มีอาการผิดปกติ พบว่ามีจำนวน 49 ราย (ร้อยละ 31) ที่ส่งตรวจย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อแยกชนิด benign lesion กับ malignant tumor แต่มีผลการตรวจอยู่ถึง 20 ราย (ร้อยละ 12.7) ที่ไม่สามารถยืนยันผลการตรวจที่แน่นอนได้ เนื่องจากชิ้นเนื้อไม่เพียงพอต่อการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ทำให้ต้องมีการตัดชิ้นเนื้อใหม่จากผู้ป่วยและเกิดการล่าช้าในการรักษาผู้ป่วย แต่การย้อมแบบ multiplex stain จะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้ นอกจากนี้ยังช่วยให้พยาธิแพทย์สามารถประหยัดเวลาในการดูสไลด์และง่ายต่อการเปรียบเทียบความแตกต่างในการที่จะวินิจฉัยผลได้ดียิ่งขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการแยกโรคของต่อมลูกหมากที่ยากสรุปได้ว่าวิธีการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี แบบ multiplex stain เป็นวิธีการที่สามารถช่วยแก้ไขปัญหาชิ้นเนื้อไม่เพียงพอต่อการย้อม เพื่อยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยได้ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ให้ผลรวดเร็วและลดค่าใช้จ่าย และยังช่วยให้พยาธิแพทย์เห็นความแตกต่างได้ชัดเจน ง่ายต่อการวินิจฉัยผล จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในงานประจำวัน เป็นการพัฒนาคุณภาพสู่มาตรฐานสากล (วารสารโรคมะเร็ง 2552;29:46-52.)

**Abstract** Multiplex stain for differentiation of benign lesions, PIN from prostate carcinoma

by Patcharin Homcha-em\*, Anantnuch Sakapibunnant\*, Maneerut Mus-u-dee\*, Vichitra Hemsrichart\*, Anant Karalak\*  
Department of Pathology, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand.

The aim of this study is to evaluate the multiplex stain for replacement of the conventional method and solving the problem of inadequacy of tissue sections. Pathological reports of 158 cases with prostate

\*กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

core biopsies at the National Cancer Institute between June 2007 and October 2008 were made. Immunohistochemistry (IHC) tests were needed in 49 cases (31%) for differentiation of benign lesions from prostate cancer. Of these 49 cases, 20 cases (12.7 %) had inadequate specimen for IHC staining and rebiopsies were needed. Formerly, P504S IHC was stained together with 2-3 basal cell markers (p63, 34BE12, CK5, CK14). In problematic cases, at least 3-4 tissue sections were needed for IHC stains. In order to save tissue sections for adequate stains, a new method of staining was taken into use. Multiplex staining method stains one slide with a mixture of four antibodies including three basal epithelial markers (p63, CK5, CK14) and one tumor marker of glandular epithelium (P504S or AMACR).

In conclusion, multiplex stain is superior to conventional technique especially in term of laboratory time and interpretation time. It can replace the conventional technique and it can solve the problem of inadequate tissue sections. (*Thai Cancer J 2009;29:46-52.*)

## บทนำ

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 7 ในชายไทยและพบบ่อยในผู้ชายที่มีอายุมากกว่า 50 ปี ขึ้นไป<sup>1</sup> ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะมาพบแพทย์ในระยะลุกลาม จึงทำให้ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ สำหรับผู้ป่วยที่ไม่มีอาการสามารถตรวจพบได้จากการตรวจร่างกายประจำปี โดยการเจาะเลือดเพื่อหาสารบ่งชี้มะเร็ง prostatic specific antigen (PSA) ในชายสูงวัยทุกราย หากพบค่า PSA สูงมาก แสดงว่าผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงของมะเร็งต่อมลูกหมาก<sup>2</sup> ซึ่งแพทย์จะต้องทำการตรวจชิ้นต่อไป โดยแพทย์จะใช้เข็มเจาะชิ้นเนื้อต่อมลูกหมาก (core needle biopsy) ไปตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคยืนยันผล และระยะของโรคต่อไป

การตรวจทางพยาธิวิทยาโดยวิธีการย้อม hematoxylin and eosin (H&E) สามารถวินิจฉัยผลได้แน่นอนในรายที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นลักษณะของมะเร็งอย่างชัดเจน สำหรับรายที่แปลผลได้ยาก ต้องอาศัยการตรวจย้อมพิเศษทาง อิมมูโนฮิสโตเคมี (IHC) ซึ่งได้พัฒนาปรับปรุงเทคนิคการย้อมเพื่อให้ผลรวดเร็ว ลดความยุ่งยากของกระบวนการย้อมลง และมีคุณภาพดียิ่งขึ้น ช่วยในการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ

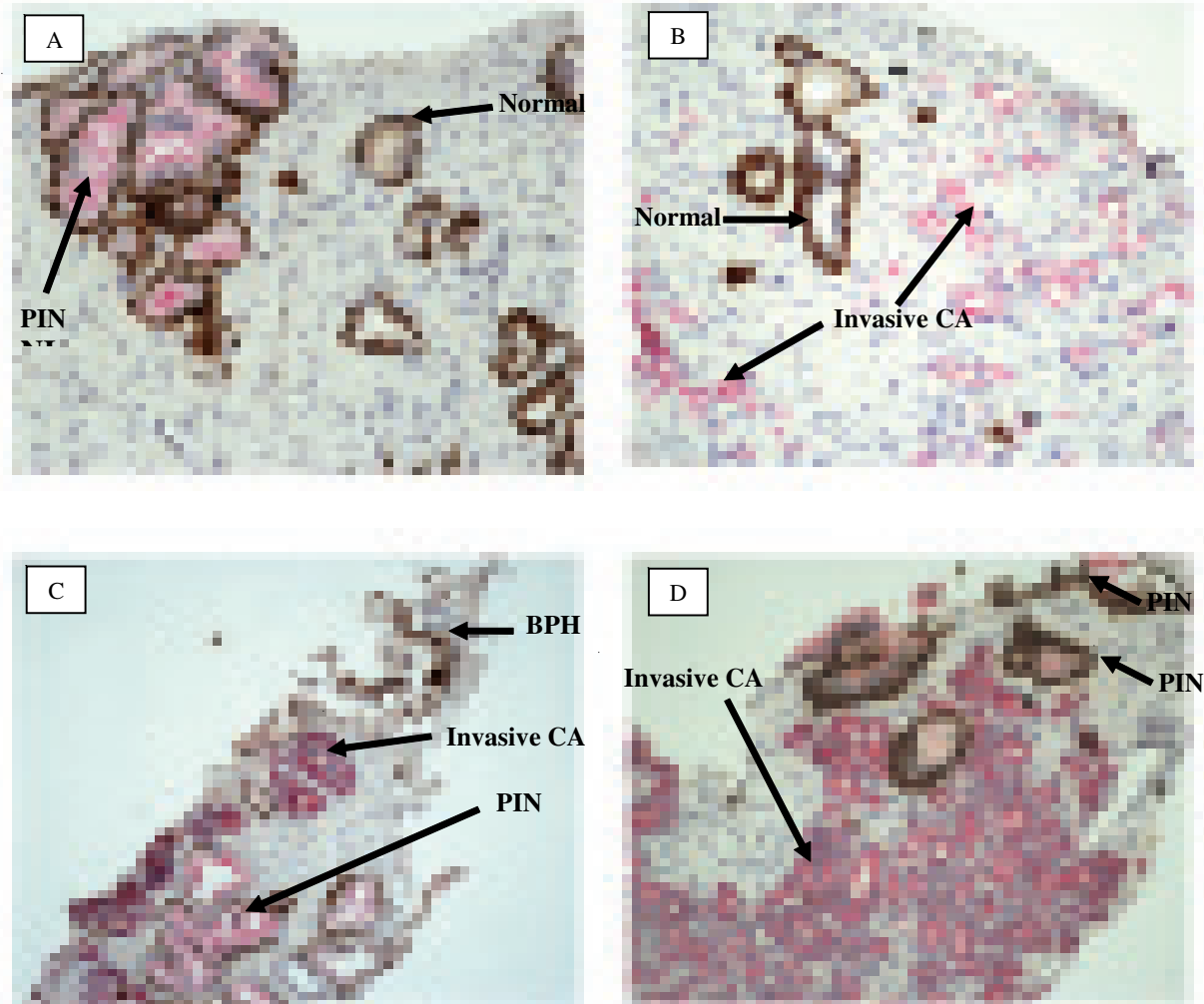
ในการศึกษานี้กล่าวถึงวิธีการตรวจย้อมด้วยเทคนิค IHC แบบใหม่ คือ multiplex staining<sup>3,4</sup> ซึ่งเหมาะสำหรับการวินิจฉัยผลทางพยาธิวิทยาของต่อมลูกหมาก เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพของการ

ตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาว่าเป็นวิธีการที่เชื่อถือได้ และมีความเหมาะสมในงานประจำวันที่ปฏิบัติอยู่

## วัสดุและวิธีการ

ในการย้อมหา marker 4 ชนิด : CK5, CK14, p63 และ P504S<sup>5</sup> ถ้าใช้วิธีย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ที่ใช้ย้อมเดิมจะต้องย้อมบนสไลด์ที่แยกแผ่น แล้วจึง incubate ด้วย secondary antibodies ที่ conjugate ด้วยเอ็นไซม์ horseradish peroxidase (HRP) สำหรับการย้อม CK5, CK14, p63 และเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (AP) สำหรับการย้อม P504S<sup>6,7</sup>

Multiplex staining ที่ใช้ในการวินิจฉัยแยกโรคของต่อมลูกหมากเป็นการย้อมหา markers หลายชนิดพร้อมกันบนสไลด์ชิ้นเนื้อแผ่นเดียวกันซึ่งประกอบด้วย primary antibodies (PIN-4 cocktail) 2 กลุ่ม คือ mouse monoclonal antibodies ใช้การตรวจหา CK5, CK14, p63 และ rabbit polyclonal antibodies ใช้ตรวจหา P504S<sup>8,9</sup> และใช้ secondary antibodies cocktail (Biocare's Double Stain kit#2) เป็น double stain polymer detection<sup>7</sup> คือมีทั้ง conjugated goat anti-mouse polymer HRP และ conjugated goat anti-rabbit polymer AP รวมกันโดย secondary antibodies จะทำปฏิกิริยากับทั้ง heavy and light chains บน mouse and rabbit IgG และไม่จำเป็นต้องใช้ avidin-biotin blocking เพราะมีคุณสมบัติเป็น rapid double stain



รูปที่ 1 แสดงผลการย้อม IHC (multiplex staining) เพื่อแยก normal, BPH, PIN และ invasive adenocarcinoma A, B และ C บริเวณ normal และ BPH เห็น basal epithelium ติดสีน้ำตาล ( p63, CK5, CK14 ) และ glandular epithelium ไม่ติดสี A, C และ D บริเวณ PIN เห็น basal epithelium ติดสีน้ำตาล (p63, CK5, CK14) และ glandular epithelium ติดสีแดง ( P504S) ใน cytoplasm B, C และ D บริเวณ invasive adenocarcinoma เห็น glandular epithelial cytoplasm ติดสีแดง (P504S) แต่ไม่ติดสีที่ basal epithelium.

และใช้ chromogen 2 ชนิด ในการทำให้เกิดสี คือ DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) จะติดสีในกลุ่มของเอ็นไซม์ HRP คือ CK5, CK14, P63 และ Fast Red จะติดสีในกลุ่มของเอ็นไซม์ AP คือ P504S ซึ่งจะทำให้ติดสีเฉพาะที่ของเซลล์ตามคุณสมบัติของแต่ละ marker และสามารถแยกชนิดของเซลล์ได้ คือ HMW Cytokeratins (CK5 and CK14) จะติดสีใน normal basal epithelia ของ prostate glands ที่ cytoplasm เป็นสีน้ำตาลของ DAB สำหรับ p63 จะติดสีใน normal basal epithelia ของ prostate glands ที่ nucleus เป็นสีน้ำตาลของ DAB สำหรับ P504S จะติดสีใน malignant และ premalignant cells ที่ cytoplasm เป็นสีแดงของ Fast Red ใน glandular epithelium (รูปที่ 1)

### วิธีการย้อมแบบ multiplex staining

ในการศึกษานี้ ใช้ตัวอย่างตรวจที่เป็น formalin-fixed, paraffin- embedded tissue sections จำนวนทั้งหมด 49 ราย พร้อมทั้ง positive และ negative controls หลังจากนำ blocks ที่ได้มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาที่ 3 ไมครอน ตรึงชิ้นเนื้อลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วย (3-aminopropyl) triethoxysilane นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้ว deparaffinize 20 นาที ด้วย xylene และ rehydration ด้วย absolute alcohol นำสไลด์แช่ในน้ำกลั่น ก่อนย้อมและ block endogenous enzyme ด้วย 3% hydrogen peroxide ในน้ำกลั่น นาน 30 นาที retrieval antigens โดยการให้ความร้อนจาก pressure cooker เป็นเวลา 2 นาที แล้ว block non-specific protein binding ด้วย 3% normal serum 30 นาที ก่อนนำสไลด์ไปย้อมต่อ incubate ด้วย primary antibodies (PIN-4cocktail ได้แก่ CK5+CK14+p63+P504S) นาน 40 นาที ล้างออกด้วย TBST (tris-buffer saline, 0.005 M, pH 7.6, 0.1% Tween20) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้น incubate ด้วย secondary antibodies (Biocare's Double Stain kit # 2) นาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วทำให้เกิดสีด้วยสีที่ 1 โดย incubate ด้วย DAB 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างน้ำกลั่น และ incubate

สีที่ 2 คือ red substrate chromogen (fast red) 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างน้ำกลั่น และ counterstain ด้วย Mayer's hematoxylin 5 นาที<sup>10</sup> และ mount ด้วย permount ปิด cover slip แล้วติด label นำส่งพยาธิแพทย์เพื่ออ่านและแปลผล

### การวินิจฉัยผลทาง IHC ของ ต่อมลูกหมาก

Normal prostate glands มี glandular epithelium และ basal epithelium เมื่อย้อม basal marker p63 จะติดสีน้ำตาลที่ nuclei และ CK5, CK14 จะติดสีน้ำตาลใน cytoplasm ส่วนการย้อม tumor marker P504S จะไม่ติดสีใน glandular epithelium บริเวณที่เป็น prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) มี basal epithelium ติดสีน้ำตาลของ p63, CK5, CK14 และมี abnormal glandular epithelium ติดสีแดงของ P504S ใน cytoplasm สำหรับใน prostate carcinoma (invasive adenocarcinoma) ไม่ติดสีที่ basal epithelium แต่ abnormal glandular epithelium เห็นติดสีแดงของ P504S ใน cytoplasm (รูปที่ 1)

### ผลการศึกษา

การศึกษานี้ข้อมูลที่ได้จากผลการตรวจทางพยาธิวิทยาจาก core needle biopsy ของต่อมลูกหมากในงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างเดือน มิถุนายน 2550 ถึง เดือน ตุลาคม 2551 จำนวน 158 ราย พบว่าเป็น benign prostatic tissue 66 ราย benign prostatic hyperplasia (BPH) 29 ราย, Chronic prostatitis 4 ราย, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) 4 ราย, invasive prostatic carcinoma 35 ราย และมีตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ไม่เพียงพอสำหรับการตรวจเพิ่มเติมอีก 20 ราย เนื่องจากสาเหตุดังนี้ คือ มีอยู่ 1 ราย ที่ชิ้นเนื้อไม่เพียงพอตั้งแต่การย้อม H&E, มี 1 ราย ที่ชิ้นเนื้อไม่พอในขั้นตอนย้อม IHC, มี 11 ราย ที่ชิ้นเนื้อเหลืออยู่น้อยมากเมื่อนำมาย้อม IHC จึงไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัยผล, มี 3 ราย ที่ชิ้นเนื้อไม่สามารถสรุปผลการวินิจฉัยได้และมีอีก 4 ราย ที่ผลชิ้นเนื้อเป็น suggestive of BPH, PIN, carcinoma เนื่องจากมี atypical small gland in one core or small

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการย้อม single stain และ multiplex stain PIN-4

	Single stain			Multiplex stain PIN-4		
	P504S	Cytokeratins	p63	Total	PIN-4	Total
จำนวนสไลด์	4	38	31	113	49	49
ปริมาณ diluted primary & secondary antibodies (μ) ที่ใช้	8800	7600	6200	22600	9800	9800
จำนวนชิ้นเนื้อ (tissue sections)	44	38	31	113	49	49
ระยะเวลาในการอ่าน สไลด์ ( นาที )	88	76	62	226	98	98

area เมื่อเปรียบเทียบวิธีการย้อมแบบ single และ multiplex พบว่าการย้อมแบบ multiplex ใช้จำนวนสไลด์ ชิ้นเนื้อ จำนวนชิ้นเนื้อ ปริมาณน้ำยาต่างๆ ที่ใช้ในการย้อม และเวลาที่ใช้ในการอ่านสไลด์ชิ้นเนื้อ น้อยกว่าวิธี single มาก (ตารางที่ 1)

### วิจารณ์

Prostate gland ประกอบด้วย cells 2 ชนิด คือ luminal epithelial cells และ basal epithelial cells<sup>11</sup> prostate gland เมื่อเปลี่ยนเป็นมะเร็ง luminal epithelial cells จะเปลี่ยนเป็น malignant cells, architecture จะเปลี่ยนไปและ basal epithelial cells จะหายไป<sup>12</sup>

ในการวินิจฉัย prostate cancer โดยการตรวจทางจุลพยาธิ อาจไม่สามารถยืนยันได้แน่นอนในบางราย โดยเฉพาะ needle biopsy ที่บางครั้งมีเพียง 2-3 glands ที่สงสัยว่าจะเป็นมะเร็งหรือ benign mimics ของ prostate cancer อาจให้การวินิจฉัยได้แค่ atypical small acinar proliferation suspected to be but not diagnosed as malignant<sup>12</sup> ในกรณีนี้การใช้ IHC เพื่อ

พิสูจน์ absence of basal epithelium จะมีความจำเป็นต่อ basal markers ที่ใช้อยู่ได้แก่ high molecular weight cytokeratins(CK5, CK14, 34BE12) ซึ่งสีย้อมจะติดอยู่ใน cytoplasm และ p63 ซึ่งสีจะติดใน nucleus<sup>13</sup> sensitivity และ specificity ของ basal markers จะต่างกัน โดย 34BE12 มี sensitivity 40%<sup>14</sup> CK5/6 มี sensitivity 97-100%<sup>14,15</sup> และ specificity 57% p63 sensitivity 100% specificity 87%<sup>15</sup>

Marker อีกชนิดหนึ่ง คือ  $\alpha$  naphthylacetyl coenzyme racemase (AMCR, P504) ซึ่งเป็น enzyme ที่ express โดยเฉพาะใน neoplastic glandular epithelium marker นี้สามารถย้อมได้โดยวิธี IHC และเป็น positive marker สำหรับ prostate cancer มี sensitivity 80-100% ของ prostate cancer และ 21% ติดสี weak, focal ใน benign glands<sup>4</sup>

Cocktails ส่วนใหญ่ประกอบด้วย AMACR และ basal markers 1-3 ชนิด เช่น AMACR/p63, AMACR/p63/34BE12, AMACR/CK5/CK14/p63 จากการศึกษาของ Molinie et al<sup>15</sup> พบว่า sensitivity ของ CK5/6 = 56.9%

p63 = 86.3% p63/P504 cocktail = 95.2% negative และ positive predictive value ( NPV , PPV ) ของ p63/P504 cocktail = 96.8% และ 96.3% ตามลำดับ ซึ่งดีกว่า CK5/6 และ p63 เดียวๆ (CK5/6 NPV = 60.4% PPV = 86.2% p63 NPV = 86.2% PPV = 94.8% )

จากผลการตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยการย้อม H&E ในผู้ป่วยที่มีอาการผิดปกติของต่อมลูกหมาก จำนวนทั้งหมด 158 ราย พบว่าจะต้องส่งย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อวินิจฉัยหรือยืนยันผล ให้ได้ผลการตรวจที่แน่นอนถูกต้องจำนวน 49 ราย (ร้อยละ31) แต่มีผลการตรวจจำนวน 20 ราย (ร้อยละ12.7) ที่ไม่สามารถยืนยันผลการตรวจที่แน่นอนได้ เนื่องจากชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ core needle biopsy จะได้ชิ้นเนื้อน้อยมากถ้ามีการส่งตรวจย้อมพิเศษหลายครั้งและหลาย markers ที่จะต้องใช้ differentiation จึงพบปัญหาว่า ชิ้นเนื้อไม่เพียงพอต่อการตรวจ ปัจจุบันการตรวจย้อมพิเศษได้มีวิธีการย้อมแบบใหม่คือ multiplex stain สำหรับใช้ย้อมชิ้นเนื้อใน section เดียวแต่ได้หลาย markers ซึ่งทำให้ปัญหาที่พบสำหรับกรณีที่ชิ้นเนื้อมีน้อยและจำกัดนั้นหมดไป อีกทั้งช่วยให้พยาธิแพทย์ประหยัดเวลาการดูสไลด์และง่ายต่อการเปรียบเทียบความแตกต่างในการที่จะวินิจฉัยได้ดียิ่งขึ้นโดยเฉพาะในกรณีของการ differentiation lesions ของ prostate glands ที่ยากในการอ่านและแปลผล เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น จะพบว่า มีบาง series ที่พบ lesion ที่น่าสงสัย แต่มีจำนวน glands น้อย จำเป็นต้องศึกษาด้วย IHC ถึงร้อยละ 49 ของ cases<sup>9</sup>

จากการศึกษาผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาของต่อมลูกหมาก จำนวน 158 ราย ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 49 ราย (ร้อยละ31) ที่ส่งย้อมพิเศษทาง IHC เมื่อนำเทคนิคใหม่ด้วยการย้อมแบบ IHC เป็น multiplex staining สามารถทำให้พยาธิแพทย์ใช้เวลาในการวินิจฉัยได้รวดเร็วยิ่งขึ้น จากการต้องเสียเวลาดูสไลด์ในแต่ละ marker คือ CK5, CK14, p63, P504S ผู้ป่วย 1 รายต้องดูถึง 4 สไลด์วิธีใหม่จะเหลือเพียงสไลด์เดียวเท่านั้น พร้อมทั้งเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน เปรียบเทียบและแปลผลได้ง่ายขึ้น ปัญหาจากชิ้น

เนื้อไม่เพียงพอของ core needle biopsy ซึ่งวิธีเดิมที่มีอยู่ร้อยละ12.7 ต้องตัดชิ้นเนื้อถึง 6 section (รวม negative และ positive control) แต่วิธีใหม่ เหลือเพียง 1 section เท่านั้น การย้อมวิธีใหม่ใช้ control ในตัว จึงไม่มีปัญหาชิ้นเนื้อไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัย อีกทั้งลดจำนวนวัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้เช่น สไลด์, cover slip รวมทั้งปริมาณ antibodies, diluent และ reagents ต่างๆที่ใช้ลดจำนวนลงได้มากกว่าเท่าตัว การศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Molinie et al<sup>15</sup> ซึ่งรายงานว่าการใช้ p63/AMACR cocktail จะช่วย improved diagnostic performance, ช่วยหลีกเลี่ยงการ biopsy ใหม่ และดีกว่าการย้อม 34BE12 หรือ p63 อย่างเดียว และค่าใช้จ่ายในการย้อม IHC ถูกกว่าการทำ biopsy ใหม่

## สรุป

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นชัดเจนว่าการย้อมพิเศษ IHC แบบ multiplex stain เป็นวิธีการย้อมที่ง่ายกว่า รวดเร็ว ลดต้นทุนค่าน้ำยา โดยเฉพาะปริมาณ antibodies และจำนวน tissue sections ลดขั้นตอนและเวลาการย้อม ลดเวลาการวินิจฉัย ซึ่งคิดว่ามีประโยชน์ต่อการนำไปใช้พัฒนาปรับปรุง เทคนิคการย้อมพิเศษ IHC ในงานประจำให้มีมาตรฐานพัฒนาคุณภาพงานให้ดียิ่งขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัท แอดวานซ์ เมดิคอล ไซยน์ จำกัด ที่ได้เชื้อเพื่อ primary antibodies (PIN-4 cocktail) และ secondary antibodies cocktail (Biocare's Double Stain kit#2) ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาครั้งนี้ พร้อมทั้งสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการพิมพ์ภาพสี ขอขอบคุณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับใช้ดำเนินงานวิจัย และ ดร. สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ งานพันธุศาสตร์ กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการเขียนงานวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Kuhuaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, Attasara P, editors. Cancer in Thailand. Vol IV 1998-2000. Bangkok; 2007.
2. Srinualand S, Charoenkraikamol C, Toraksa S, Uprasertkul M, Amornvesukit T, Taweemonkongsap T, et al. Prevalence of prostate cancer in aging males received PSA (Prostate Specific Antigen) screening test (a campaign for celebration of Siriraj established day). J Med Assoc Thai 2006;89 : 3742.
3. Van Hecke D. Sequential immunohistochemical Double staining using Envision polymer technology. Histotech 2001; 24 : 107-11.
4. Jiang Z, Woda BA, Wu CL, and Yang XJ. Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker, Am J Clin Pathol 2004;122: 275-89.
5. Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. Cancer Res 2002 ; 62 : 2220-6.
6. Beach R, Gown AM, de Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG, Grignon DJ, Fanger GR, Arnin MB. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 37618-gauge needle biopsies. Am J Surg Pathol 2002 ; 26 : 1588-96.
7. Mason DY, Samumous R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labeling of cellular constituents. J Clin Pathol 1978; 31 : 454-60.
8. Tacha DE, Miller RT. Use of p63/P504S monoclonal antibody cocktail in immunohistochemical staining of prostate tissue. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004 ; 12 : 75-8.
9. Wojno KJ, Epstein JI. The utility of basal cell-specific anticytokeratin antibody (34 beta E 12) in the diagnosis of prostate cancer : a review of 228 cases. Am J Surg Pathol 1995; 19: 251-60.
10. Key M. Immunohistochemical Staining Methods. In : Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition. California 2006: 47-54. Available at : [http : // www.dako.com](http://www.dako.com). Accessed June 20,2009.
11. Wang Y, Hayward S, Coa M, Thayer K, Cunha G. Cell differentiation lineage in the prostate. Differentiation 2001 ; 68 : 270-9.
12. Humphrey PA. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. J Clin Pathol 2007; 60: 35-42.
13. Hameed O, Humphrey PA. Immunohistochemistry in the diagnosis of minimal prostate cancer. Currdiagn Pathol 2006; 12: 279-91.
14. Abrahams NA, Ormsby AH, Brainard J. Validation of Cytokeratin 5/6 as an effective substitute for keratin 903 in the differentiation of benign from malignant glands in prostate needle biopsies. Histopathology 2002; 41: 35-41.
15. Molinie V, Fromont G, Sibony M, Vieillefond A, Vassiliu V, Cochand-Priollet B, et al. Diagnostic utility of a p63/ $\alpha$ -methyl-CoA-racemase (p504s) cocktail in atypical foci in the prostate. Modern Pathology 2004; 17: 1180-90.



# การตรวจหา *P53* Codon 72 Polymorphism ในประชากรกลุ่มเสี่ยงของมะเร็งปอด จังหวัดลำปาง

สุรทัศน์ พงษ์นิกร\*

दनัย ทิวเวระ\*\*

สุภมาศ ถายเงิน\*

ศรียา ฟองมูล\*

วิจิต สุวรรณ\*

**บทคัดย่อ** *P53* tumor suppressor gene (*P53*) เป็นยีนสำคัญในการต้านการเกิดโรคมะเร็งโดยผลิตโปรตีน *P53* เข้ายับยั้งการแบ่งตัว และเร่งการทำลายตัวเองของเซลล์มะเร็ง การกลายพันธุ์ของ *P53* แบบ germline mutation หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) เกิดขึ้นที่ codon 72 บน exon 4 ทำให้ *P53* มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สร้างโปรตีน *P53* ได้ต่างกัน 2 ชนิด คือ Arginine (Arg, CGC เป็น wild type) หรือ Proline (Pro, CCC เป็น mutant type) โดยทั่วไป *P53* codon 72 polymorphism มี 3 genotypes คือ Arg/Arg (A/A), Arg/Pro (A/P) และ Pro/Pro (P/P) genotypes มีรายงานว่าโปรตีน *P53* ที่มี Arg สามารถทำให้เซลล์ตายได้ดีกว่าโปรตีน *P53* ที่มี Pro และพบว่าผู้ที่มี P/P genotype มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งปอดสูงกว่าผู้ที่มี A/A genotype ด้วยเหตุนี้ P/P genotype จึงเป็นยีนเสี่ยงที่น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมของการเกิดโรคมะเร็งปอดในคนไทยได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจคัดกรองหาความถี่ของผู้ที่มี P/P genotype ของ *P53* codon 72 polymorphism ในคนปกติที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในจังหวัดลำปางจำนวน 850 ราย ด้วยการตรวจหา A/A, A/P และ P/P genotypes ของ *P53* codon 72 polymorphism โดยใช้วิธี real-time polymerase chain reaction-SimpleProbe probe พบว่าความถี่ของผู้ที่มี A/A, A/P และ P/P genotypes ของ *P53* codon 72 polymorphism จากผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมดมีค่าเท่ากับร้อยละ 23.1, 52.7 และ 24.2 ตามลำดับ โดยมีค่าความถี่ของ Arg allele และ Pro allele เท่ากับ 0.49 และ 0.51 ตามลำดับ ผู้ที่เข้าร่วมโครงการนี้ทั้งหมดเป็นเพศชาย 559 ราย และเพศหญิง 291 ราย พบว่าความถี่ของผู้ที่มี A/A, A/P และ P/P genotypes ของ *P53* codon 72 polymorphism ในเพศชาย มีค่าเท่ากับร้อยละ 22.5, 55.5 และ 22.0 ตามลำดับ ขณะที่ในเพศหญิงมีค่าเท่ากับร้อยละ 24.1, 47.4 และ 28.5 ตามลำดับ เมื่อแบ่งผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 586 ราย และ กลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูง

\* ศูนย์มะเร็งจังหวัดลำปาง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดลำปาง 52000

\*\* กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ 10400

จำนวน 264 ราย พบว่าความถี่ของผู้ที่มี A/A, A/P และ P/P genotypes ของ P53 codon 72 polymorphism ในกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่มีค่าเท่ากับร้อยละ 23.2, 53.6 และ 23.2 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูงมีค่าเท่ากับร้อยละ 22.7, 50.8 และ 26.5 ตามลำดับ ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism ระหว่างเพศชายกับเพศหญิง และระหว่างผู้ที่สูบบุหรี่กับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูง แต่พบว่าในเพศหญิงมีแนวโน้มตรวจพบความถี่ของ P/P genotype ได้สูงกว่าในเพศชาย ในทำนองเดียวกันไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism ระหว่างเพศชายกับเพศหญิงในกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่ ส่วนในกลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่พบว่าความถี่ของ P/P genotype ที่พบในเพศหญิงมีค่าสูงกว่าในเพศชายอย่างชัดเจน นอกจากนี้ผลจากการศึกษานี้ยังพบว่าความถี่ของผู้ที่มี P/P genotype ของ P53 codon 72 polymorphism ในประชากรจังหวัดลำปางมีค่าสูงกว่าที่พบในประชากรจังหวัดกรุงเทพฯ ซึ่งได้จากการศึกษาครั้งที่แล้ว และเพศหญิงตรวจพบ variant genotype P/P ได้มากกว่าในเพศชาย ดังนั้นการศึกษาติดตามให้คำปรึกษา และเฝ้าระวังการเกิดโรคมะเร็งปอดในประชากรจังหวัดลำปางที่มี P/P genotype ของ P53 codon 72 polymorphism เพื่อการป้องกัน และค้นหาโรคมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกจึงควรมีการดำเนินต่อไป (วารสารโรคมะเร็ง 2552; 29:53-62.)

*Abstract* **Detection of P53 Codon 72 Polymorphism in Lung Cancer High-Risk Subjects in Lampang Province**

by Surathat Pongnikorn\*, Danai Tiwawech\*\*, Supumas Laingoen\*, Duriya Fongmoon\* and Wichit Suwan\*

\* Lampang Cancer Center, Division of Medical Services, Ministry of Public Health, Lampang Province 52000

\*\*Research Division, National Cancer Institute, Division of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok 10400

The P53 tumor suppressor gene (P53) encodes for P53 protein to inhibit cell proliferation and induce apoptosis of cancer cell. P53 is one of the most commonly mutated genes (somatic mutation) in all types of human cancer. Actually, the P53 exhibits germ-line mutation or polymorphism at the codon 72 on the 4th exon, which produces 2 different proteins (variants) with an arginine amino acid (Arg, CGC: wild type) or proline amino acid (Pro, CCC: mutant type). In general, there are 3 genotypes of the P53 codon 72 polymorphism: Arg/Arg (A/A), Arg/Pro (A/P) and Pro/Pro (P/P) genotypes. It has been reported that P53 variant with an Arg induced cell death more effectively than those with the Pro. Individuals with P/P genotype have been reported to be at higher risk for lung cancer compared to those with A/A genotype. It is suggested that P/P genotype of the P53 codon 72 polymorphism is the risk genotype. Therefore, it may be used as a genetic risk marker for lung cancer in Thai population. The purpose of the present study is to detect the frequency of individuals with P/P genotype of the P53 codon 72 polymorphism in 850 healthy subjects in Lampang province by detecting A/A, A/P and P/P genotypes of the P53 codon 72 polymorphism using the Real-Time Polymerase Chain Reaction-Simple Probe assay. The frequencies of individuals with A/A, A/P and P/P genotypes of the P53 codon 72 polymorphism were 23.1% (196/850), 52.7% (448/850) and 24.2% (206/850), respectively. The allele frequencies of Arg and Pro were 0.49 and 0.51, respectively. Among all subjects, there were 559 males and 291 females. The frequencies of A/A, A/P and P/P genotypes of the P53 codon 72 polymorphism in males were 22.5% (126/559), 55.5% (310/559) and 22.0% (123/559), respectively, whereas in females were 24.1% (70/291), 47.4% (138/291) and 28.5% (83/291), respectively. When all subjects were divided into 2 groups of 586 smokers and 264 non smokers with the occupational high-risk, the frequencies of A/A, A/P and P/P genotypes of the P53 codon 72 polymorphism in smokers were 23.2% (136/586), 53.6% (314/586) and 23.2% (136/586), whereas in non smokers, but with the occupational high-risk, there were 22.7% (60/264), 50.8% (134/264) and 26.5% (70/264), respectively. Among all subjects, there were no significant differences of the

frequency of P53 codon 72 polymorphisms between males and females and between smokers and non-smokers who work in the high-risk factory. However, females seem to have a higher frequency of P/P genotype than males. In addition, no significant difference of the frequency of P53 codon 72 polymorphisms was observed between males and females in smokers group. On the other hand, there were significant differences of the frequency of P53 codon 72 polymorphisms between males and females in the non-smoker group who work in the high-risk factory and females had higher frequency of P/P genotype than males. The results of this study showed that the frequency of individuals with P/P genotype of the P53 codon 72 polymorphism in healthy subjects in Lampang province was higher than in Bangkok from the previous study and females had tendency to have higher frequency of P/P genotype than males. Further study on the intensive follow-up, counseling and surveillance in these P/P genotype carriers for prevention and early detection of lung cancer is needed. (*Thai Cancer J 2009;29: 53-62.*)

## บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและทำลายชีวิตของประชากรไทยปีละมากมาย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขปี พ.ศ. 2545 ถึง พ.ศ. 2549 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายสูงเป็นอันดับที่ 1 ของสาเหตุการตายทั่วประเทศ และอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งนี้ยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี มีรายงานว่าเป็นปี พ.ศ. 2542 โรคมะเร็งปอดมีอัตราการเกิดสูงเป็นอันดับที่ 2 ของโรคมะเร็งที่พบในชายไทย (20.6 ต่อแสนประชากร) และพบเป็นอันดับที่ 4 ในหญิงไทย (9.3 ต่อแสนประชากร) โดยมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดในชายมากกว่าหญิง 2.2 เท่า เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ตรวจพบในประเทศไทยนั้นประมาณร้อยละ 80.0 เป็นชนิด non small cell lung cancer<sup>2</sup> ซึ่งเป็นมะเร็งที่มีการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ดี ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักเสียชีวิตภายในหนึ่งปีหลังการตรวจพบมะเร็งหากไม่ได้รับการรักษาที่ดี แต่อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ I และ II นั้น การรักษาด้วยการผ่าตัดและรังสีรักษาสามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ และในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ III และ IV การรักษาด้วยวิธีผ่าตัดรวมกับเคมีบำบัดหรือรวมกับรังสีรักษามีโอกาสรักษาผู้ป่วยให้มีระยะปลอดโรค 2-5 ปี ได้มากขึ้น<sup>3,4</sup> นอกจากนี้มีรายงานว่าในประชากรทางภาคเหนือของประเทศไทยนั้น มะเร็งปอดเป็นโรคที่พบในอัตราสูงสุดของผู้ป่วยใหม่ที่เป็นโรคมะเร็งทั้งหมด จากรายงานของศูนย์มะเร็งจังหวัด

ลำปางพบว่าอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดสูงที่สุดในผู้ป่วยใหม่อยู่ที่จังหวัดลำปางทั้งในเพศชายและเพศหญิงคิดเป็น 50.1 และ 26.7 ต่อประชากรแสนคนตามลำดับ<sup>5</sup> โรคมะเร็งปอดยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย และมีอัตราการเกิดเพิ่มขึ้นทุกปี แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดในระยะเริ่มแรกมีโอกาสรักษาให้หายขาดได้สูงมาก จึงนับได้ว่าโรคมะเร็งปอดเป็นโรคซึ่งควรได้รับความสนใจที่จะป้องกันและควบคุมอย่างจริงจังเนื่องจากเป็นโรคที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุการตายที่ค่อนข้างสูงโรคหนึ่ง ดังนั้นการตรวจหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงให้พบโดยเร็วด้วยการใช้ตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic risk marker) และตามด้วยการตรวจของแพทย์อย่างละเอียดเพื่อค้นหาผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกให้พบแต่เนิ่นๆ ก่อนมีอาการของโรคในคนที่เป็นกลุ่มเสี่ยงเหล่านี้ พร้อมทั้งการให้การรักษาที่ถูกต้องโดยรวดเร็วและให้ความรู้ในการป้องกันตัวเองจากปัจจัยเสี่ยงจึงเป็นกลยุทธ์สำคัญและเป็นเรื่องจำเป็นเร่งด่วนในการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งชนิดนี้

การสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งปอด และความเสี่ยงดังกล่าวนี้จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และปริมาณของควันบุหรี่ที่ได้รับ<sup>6</sup> ในควันบุหรี่ประกอบด้วยสารเคมีมากกว่า 1000 ชนิด และประมาณ 50 ชนิดที่เป็นสารก่อมะเร็ง เช่น สารไนโตรซามีน และสาร polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)<sup>7-10</sup> แต่สารก่อมะเร็ง (carcinogens) ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป pro-carcinogens ซึ่งจำเป็นต้องถูกกระตุ้นโดย phase I

enzymes [cytochrome 450 super gene family] เพื่อกลายเป็นสาร ultimate carcinogens และเข้าจับกับ DNA (DNA adducts) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutations) ของยีนบน DNA และมีการเริ่มต้นของการเกิดโรคมะเร็ง (initiating carcinogenesis) ขึ้น โดยเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์จะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และไม่สิ้นสุดติดตามมาจนกระทั่งกลายเป็นโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าโรคมะเร็งปอดมีสาเหตุเกิดจากการสูบบุหรี่สูงถึงร้อยละ 90 จากการสัมผัสกับสารก่อมะเร็งร้อยละ 9-15 จากกัมมันตรังสีของ radon ร้อยละ 10 และจากมลพิษร้อยละ 2<sup>11,12</sup> ในระยะสิบปีที่ผ่านมาพบว่าการความหลากหลายทางพันธุกรรมของมนุษย์ เช่น P53 tumor suppressor gene (P53) อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งปอดอีกด้วย<sup>13-17</sup>

P53 เป็นยีนต้นกำเนิดโรคมะเร็งซึ่งอยู่บน chromosome 17p13.1 ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน P53 เข้าไปยับยั้งการแบ่งตัว และกระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็ง มีรายงานว่ามีการกลายพันธุ์ของ P53 แบบ somatic mutation พบได้ในมะเร็งทุกชนิด<sup>18-22</sup> และในคนปกติทั่วไป P53 codon 72 บน exon 4 จะมีการกลายพันธุ์แบบ germline mutation หรือเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ขึ้น ทำให้ P53 มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotypes) ในการสร้างโปรตีน P53 หลักได้ 2 ชนิดแตกต่างกัน (variants) คือ ชนิดที่สร้าง Arginine amino acid (Arg, CGC เป็น wild type) และชนิดที่สร้าง Proline amino acid (Pro, CCC เป็น variant type) ดังนั้นจึงพบว่าในประชากรทั่วไปมี P53 codon 72 polymorphism ได้ 3 รูปแบบ คือ Arg/Arg (A/A), Arg/Pro (A/P) และ Pro/Pro (P/P) genotypes<sup>23-28</sup> ในแต่ละบุคคล อาจจะมี P53 genotype ที่ไม่เหมือนกันจึงทำให้มีความไวในการเกิดโรคมะเร็งแตกต่างกันไป จากการศึกษาพบว่าผู้ที่มี A/A genotype มีโอกาสเป็นโรคมะเร็งปากมดลูก<sup>29</sup> และเต้านม<sup>30</sup> มากกว่าผู้ที่มี P/P genotype ในขณะที่ผู้ที่มี P/P genotype จะมีโอกาสเป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ<sup>31</sup> และปอด<sup>14-17</sup> มากกว่าผู้ที่มี A/A genotype คณะผู้วิจัยได้ศึกษา genotypes ดังกล่าวในคนไทยโดยใช้รูปแบบ case-control study พบว่า P53

codon 72 polymorphism โดยเฉพาะ genotype ชนิด P/P มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอด (ยังไม่ตีพิมพ์ผลการวิจัย) ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่าการตรวจหา variant genotype ชนิด P/P ของ P53 codon 72 polymorphism นี้จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาความเสี่ยงที่จะเป็นโรคมะเร็งในคนปกติที่อยู่ ในสภาพแวดล้อมเหมือนกันกับผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ เช่น ผู้ที่มีประวัติการสูบบุหรี่ และผู้ที่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูง เช่นทำงานในโรงงานผลิตเครื่องปั้นดินเผาเซรามิค

จากข้อมูลการวิจัยซึ่งพบว่า การได้รับสารก่อมะเร็งสารไนโตรซามีน และสาร PAHs ในควันบุหรี่ และมลพิษ อาจเป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญในการทำให้เกิดมะเร็งปอดในคน<sup>32,33</sup> และคนไทยก็มีพฤติกรรมเสี่ยงในการได้รับสารก่อมะเร็งเหล่านี้ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบว่า P53 codon 72 polymorphism มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งปอดในคนไทยด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงเชื่อว่าการศึกษาเพื่อตรวจหาคนกลุ่มเสี่ยงของมะเร็งปอดโดยการตรวจหา variant genotype ชนิด P/P ของ P53 codon 72 polymorphism นี้มีความสำคัญมาก และเนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มียุทธศาสตร์การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าว ฉะนั้นการศึกษาหาความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism ที่ได้ในรายงานนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ในการติดตามค้นหาผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกในกลุ่มผู้ที่มีความเสี่ยงสูง พร้อมทั้งการให้ความรู้ในการป้องกันตนเองจากปัจจัยเสี่ยงและการหมั่นออกกำลังกายเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน การติดตามส่งต่อเพื่อตรวจหาโรคมะเร็งปอดระยะเริ่มแรก และการติดตามส่งต่อเพื่อการรักษาให้หายขาดทันท่วงที นับว่าเป็นการทำงานเชิงรุกแบบครบวงจรที่น่าจะเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการทำให้อัตราการเกิดและอัตราการตายจากโรคมะเร็งปอดในประชากรไทยลดลงได้

อนึ่งการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ที่ใช้กันโดยทั่วไปในปัจจุบันไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างที่มีจำนวนมากในแต่ละครั้งได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน (มากกว่า 16 ชั่วโมง) และต้องเสี่ยงกับการ

ได้รับสารก่อมะเร็งในระหว่างการตรวจ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction-SimpleProbe Probe (R-PCR-SP) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อย (ประมาณ 2 ชั่วโมง) และไม่ต้องเสี่ยงกับการได้รับสารก่อมะเร็งขึ้นมาใช้เป็นครั้งแรกเพื่อทดแทนวิธี PCR-RFLP โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความถี่ของผู้ที่มี P/P genotype ของ P53 codon 72 polymorphism ในประชากรกลุ่มเสี่ยงของมะเร็งปอดที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดลำปาง

### วัสดุและวิธีการ

#### การเก็บข้อมูลพื้นฐานของมะเร็งจังหวัดลำปาง

เก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์ ประวัติ การศึกษา การเจ็บป่วย การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา อาชีพ สภาพแวดล้อมของการทำงาน ภาวะมลพิษและอื่นๆ จากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในจังหวัดลำปาง โดยผู้ช่วยนักวิจัยที่ผ่านการฝึกอบรม จากนั้นนักวิจัยจะสุ่มสัมภาษณ์ร้อยละ 5 ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดเพื่อทดสอบความถูกต้องของข้อมูล

#### การเก็บตัวอย่างเลือดที่ศูนย์มะเร็งจังหวัดลำปาง

เจาะเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในจังหวัดลำปาง ซึ่งเป็นผู้มารับการตรวจร่างกายที่ศูนย์มะเร็งจังหวัดลำปางและไม่พบโรคมะเร็งจำนวน 850 รายๆ ละ 7 มิลลิลิตร ใส่ใน EDTA tube (EDTA blood 7 ml) จากนั้นปั่นแยกเม็ดเลือดขาวที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 20 นาที แล้วเก็บเม็ดเลือดขาวที่ได้ทั้งหมดไว้ที่  $-40^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปใช้

#### การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว

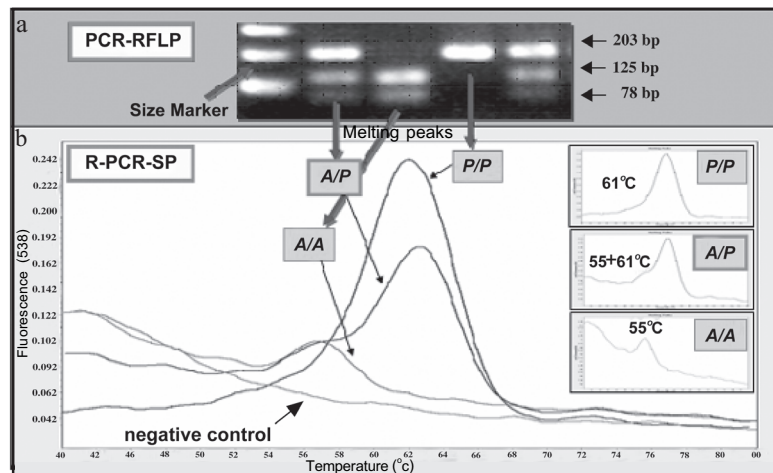
ใช้น้ำยาสำเร็จรูป QuickGene DNA whole blood kit S และเครื่อง QuickGene-810 (FUJIFILM Corporation, Japan) สกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวที่กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ ใส่ protease 30  $\mu\text{l}$ , buffy coat 50  $\mu\text{l}$ , phosphate buffer saline 150  $\mu\text{l}$  และ lysis buffer 250  $\mu\text{l}$  ตามลำดับ ลงใน sterile micro tube 1.5 ml และผสมให้เข้ากันด้วย vortex

mixer จากนั้นนำ sterile micro tube ไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ  $56^{\circ}\text{C}$  นาน 3 นาที เมื่อบ่มเสร็จแล้วใส่ 100% ethanol 250  $\mu\text{l}$  และผสมให้เข้ากัน ดูดสารทั้งหมดใส่ใน filter column ที่อยู่ภายในเครื่อง nucleic acid isolation system QuickGene-810 (เป็นเครื่อง Automate) นานประมาณ 8 นาที ซึ่งจะเกิดกระบวนการ binding process (pressurization), washing process และ elution process ขึ้นภายในเครื่อง QuickGene-810 ตามโปรแกรมที่ได้ตั้งไว้ และในที่สุดจะได้ DNA ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายใสใน collecting tubes ต่อจากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-40^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปใช้

#### การตรวจหา P53 codon 72 polymorphism โดยวิธี R-PCR-SP

ในการตรวจด้วยวิธี R-PCR-SP ใช้ forward primer 5'-GATGCTGTCCCCGACGA-3', reverse primer 5'-AGGGGCCCGCGGTGTAG-3' และ SimpleProbe<sup>®</sup> probe 5'-TCCCCCGTXXCCCCCTG CACC P-3' (TIB MOLBIOL, Germany) และใช้เครื่อง LightCycler<sup>®</sup> model 1.5 และน้ำยาสำเร็จรูป The LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA HybProbe (Roche, Germany) เป็น master mix

นำ PCR reaction mixture 20  $\mu\text{l}$  [double distilled water 13.1  $\mu\text{l}$  + master mix 2.0  $\mu\text{l}$  +  $\text{MgCl}_2$  1.0  $\mu\text{l}$  + 20 pmole forward primer 1.0  $\mu\text{l}$  + 20 pmole reverse primer 0.7  $\mu\text{l}$  + SimpleProbe probe 0.2  $\mu\text{l}$  + DNA template 2.0  $\mu\text{l}$ ] ซึ่งอยู่ในหลอด capillary ใส่ในเครื่อง LightCycler<sup>®</sup> model 1.5 ที่ตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ pre-incubate ที่  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที, R-PCR จำนวน 40 รอบ เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ที่  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 10 วินาที,  $61^{\circ}\text{C}$  15 วินาที และ  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 6 วินาที, ทำ melting curve ที่  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 0 วินาที [ramp rate = 20.0],  $40^{\circ}\text{C}$  30 วินาที [ramp rate = 20.0] และ  $80^{\circ}\text{C}$  นาน 0 วินาที [ramp rate = 0.15] ผลที่ได้จาก R-PCR-SP จะแสดงออกมาในลักษณะของ melting peak ที่มีอุณหภูมิต่างๆดังนี้ melting peak ที่มีอุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$  สำหรับ A/A genotype,  $61^{\circ}\text{C}$  สำหรับ P/P genotype และ  $55+61^{\circ}\text{C}$  สำหรับ A/P



รูปที่ 1 ผลการตรวจหา A/A, A/P และ P/P genotype ของ *P53* codon 72 polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP (a) และ R-PCR-SP (b) พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลเหมือนกัน ตัวอย่างที่เป็น A/A genotype ในวิธี PCR-RFLP ซึ่งมี 2 DNA-band (78 และ 125 bp) จะมี melting peak ที่ 55°C ในวิธี PCR-RFLP, ตัวอย่างที่เป็น A/P genotype ในวิธี PCR-RFLP ซึ่งมี 3 DNA-band (78, 125 และ 203 bp) จะมี melting peak ที่ 55+61°C ในวิธี R-PCR-SP และตัวอย่างที่เป็น P/P genotype ในวิธี PCR-RFLP ซึ่งมี 1 DNA-band (203 bp) จะมี melting peak ที่ 61°C ในวิธี PCR-RFLP ตามลำดับ ส่วน negative control ไม่พบ DNA-band ในวิธี PCR-RFLP และไม่พบ melting peak ในวิธี R-PCR-SP.

genotype ในการทำ R-PCR-SP ทุกครั้งใช้ double distilled water เป็น negative control ซึ่งตรวจไม่พบ melting peak ใดๆ คณะผู้วิจัยได้ทดสอบผลการตรวจหา *P53* codon 72 polymorphism ที่ได้จากวิธี PCR-RFLP และ R-PCR-SP ของตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเหมือนกัน (รูปที่ 1, 1a และ 1b)

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษานี้ ใช้ Chi-square test วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ของ A/A, A/P และ P/P genotypes ของ *P53* codon 72 polymorphism ระหว่างเพศชายกับเพศหญิงจากตัวอย่างทั้งหมด และระหว่างกลุ่มของผู้ที่มีพฤติกรรมการสูบบุหรี่กับกลุ่มของผู้ที่มีพฤติกรรมไม่สูบบุหรี่แต่คัดเลือกเฉพาะผู้ที่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูง (โรงงานผลิตเครื่องปั้นดินเผาเซรามิค) รวมทั้งระหว่างเพศชายกับเพศหญิงในกลุ่มของผู้ที่สูบบุหรี่ และกลุ่มของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูง และกำหนดค่า  $P$  ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ

### ผลการศึกษา

ผู้เข้าร่วมโครงการนี้ทั้งหมดมีอายุระหว่าง 20-93 ปี ประกอบด้วย 2 กลุ่มดังนี้คือ ผู้ที่มีประวัติสูบบุหรี่จำนวน 586 ราย และผู้ที่ไม่ประวัติสูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูงของโรคมะเร็งปอด (ทำงานในโรงงานผลิตเครื่องปั้นดินเผาเซรามิค) 264 ราย

สำหรับผลของการตรวจหา *P53* codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1b โดยพบว่าตัวอย่าง genomic DNA ของผู้ที่มี A/A, A/P และ P/P genotype แสดงค่าของ melting peak ที่อุณหภูมิ 55°C, 55+61°C และ 61°C ตามลำดับ ส่วน double distilled water หรือ negative control ไม่พบ melting peak นอกจากนี้ยังพบว่าผลการตรวจหา *P53* codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP และ PCR-RFLP จากตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกัน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1

ผลการตรวจหา *P53* codon 72 polymorphism ในคนปกติที่ภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดลำปางจำนวน 850 ราย ด้วยวิธี R-PCR-SP ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 พบว่าความถี่ของผู้ที่มี A/A, A/P และ P/P genotype ของ *P53*

ตารางที่ 1. ความถี่ของ P53 genotypes และ P53 allele ในคนปกติที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดลำปาง

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวน	P53 genotypes จำนวน (ร้อยละ)			Allele frequency		
		ตัวอย่าง	A/A	A/P	P/P	Arg	Pro
ผู้รวมโครงการ	850		196 (23.1)	448 (52.7)	206 (24.2)	0.49	0.51
ชาย	559		126 (22.5)	310 (55.5)	123 (22.0)		
หญิง	291		70 (24.1)	138 (47.4)	83 (28.5)		
ผู้ที่สูบบุหรี่	586		136 (23.2)	314 (53.6)	136 (23.2)		
ชาย	488		109 (22.3)	267 (54.7)	112 (23.0)		
หญิง	98		27 (27.6)	47 (48.0)	24 (24.4)		
ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูง	264		60 (22.7)	134 (50.8)	70 (26.5)		
ชาย	71		17 (23.9)	43 (60.6)	11 (15.5)		
หญิง	193		43 (22.3)	91 (47.2)	59 (30.5)*		

\*,  $P=0.042$ , A/A = Arginine/Arginine genotype, P/P = Proline/Proline genotype, A/P = Arginine/Proline genotype, Arg = Arginine allele, Pro = Proline allele.

codon 72 polymorphism มีค่าเท่ากับร้อยละ 23.1 (196/850 ราย), 52.7 (448/850 ราย) และ 24.2 (206/850 ราย) ตามลำดับ และพบว่าค่าความถี่ของ Arg allele และ Pro allele ในคนปกติที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดลำปางมีค่าเท่ากับ 0.49 และ 0.51 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Hardy-Weinberg equilibrium model

ในจำนวนผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมด 850 ราย ประกอบด้วยเพศชาย 559 ราย และเพศหญิง 291 ราย พบว่าโดยรวมไม่พบความแตกต่างของความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism ระหว่างเพศชายกับเพศหญิง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.053$ ) แม้ว่าความถี่ของผู้ที่มี P/P genotype ในเพศหญิง (ร้อยละ 28.5) มีค่าสูงกว่าในเพศชาย (ร้อยละ 22.0) เมื่อแบ่งผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 586 ราย และกลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูงจำนวน 264 ราย พบว่าโดยรวมความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism ระหว่างกลุ่มผู้สูบบุหรี่กับกลุ่มไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูงไม่มีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.57$ ) สำหรับในกลุ่มผู้สูบบุหรี่จำนวน 586 ราย ประกอบด้วยเพศชาย 488 ราย และเพศหญิง 98 ราย พบว่าโดยรวมความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism ระหว่างเพศชายกับเพศหญิงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.42$ ) เช่นกัน ส่วนในกลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่ทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูงจำนวน 264 ราย ประกอบด้วยเพศชาย 71 ราย และเพศหญิง 193 ราย พบว่าเพศหญิงมีความถี่ของ P/P genotype สูงกว่าในเพศชาย (ร้อยละ 30.5 และ 15.5 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.042$ ) (ตารางที่ 1)

## วิจารณ์และสรุป

การศึกษานี้ นับเป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ A/A, A/P และ P/P genotype ของ P53 codon 72 polymorphism จาก genomic DNA ที่สกัดมาจากเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี R-PCR-SP ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และปลอดภัยกว่า วิธี PCR-RFLP แบบดั้งเดิม

โดยให้ผลในการตรวจที่เหมือนกัน คณะผู้วิจัยเชื่อว่าการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP นี้ น่าจะมีประโยชน์ในทางคลินิก และนิยมใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็กลุ่มเสี่ยงของมะเร็งปอด และโรคมะเร็งอื่นๆ ต่อไป

จากผลการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในคนปกติที่ภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดลำปางจำนวน 850 ราย ด้วยวิธี R-PCR-SP พบว่าความถี่ของผู้ที่มี A/A, A/P และ P/P genotypes มีค่าเท่ากับร้อยละ 23.1 (196/850 ราย), 52.7 (448/580 ราย) และ 24.2 (206/850 ราย) ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกับในคนปกติที่ภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดกรุงเทพฯ (A/A, A/P และ P/P genotypes มีค่าเท่ากับร้อยละ 33.8, 47.3 และ 18.9 ตามลำดับ)<sup>34</sup> อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P=0.017$ ) ความแตกต่างของความถี่ที่พบระหว่างคนปกติในจังหวัดลำปางกับในจังหวัดกรุงเทพฯ นี้ อาจเกิดจากตัวอย่างของคนปกติที่ภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดกรุงเทพฯ นั้นมีความหลากหลายของประชากรมากกว่า เนื่องจากมีการย้ายถิ่นฐานของประชากรมาจากส่วนภูมิภาคต่างๆ ของประเทศเข้ามาอยู่รวมกัน ส่วนประชากรในจังหวัดลำปางนั้นประชากรทั้งหมดเป็นคนในท้องถิ่นที่มีความหลากหลายของประชากรน้อยมาก มีรายงานว่า P53 codon 72 polymorphism มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติของมนุษย์ โดยพบว่าความถี่ของ Arg allele จะพบได้เด่นชัดในประชากรที่อยู่ห่างไกลจากบริเวณเส้นศูนย์สูตร<sup>35</sup> และพบว่าแม้เป็นชาว Cau-casians ด้วยกันแต่อยู่คนละประเทศก็มีความถี่ของ Pro allele ต่างกัน<sup>18,27</sup> ดังนั้นในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาและระบาดวิทยาโมเลกุล การคัดเลือกตัวอย่างให้มีเชื้อชาติใกล้เคียงกันมากที่สุด จึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญมากและควรให้ความระมัดระวังเป็นอย่างยิ่งในการคัดเลือกตัวอย่างที่มีเชื้อชาติแตกต่างกันไปใช้ในการศึกษาเดียวกัน เพราะจะทำให้ผลของการศึกษานั้นคลาดเคลื่อนได้

จากผลการศึกษานี้พบว่าการสูบบุหรี่ไม่มีผลต่อการตรวจพบความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism และเมื่อแยกศึกษาระหว่างเพศในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่พบว่าในกลุ่มผู้สูบบุหรี่ไม่มีความแตกต่างกัน

ของ genotype ดังกล่าวในระหว่างเพศชายและหญิง แต่ในกลุ่มผู้ไม่สูบบุหรี่ซึ่งทำงานในที่ที่มีความเสี่ยงสูงพบว่าเพศหญิงมี genotype ชนิด P/P สูงกว่าเพศชาย ซึ่งผลที่ได้นี้น่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปติดตามค้นหาผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกต่อไป

การศึกษาแบบต่อเนื่องเพื่อติดตามให้คำปรึกษาและเฝ้าระวังการเกิดโรคมะเร็งปอดในประชากรจังหวัดลำปางที่มี P/P genotype ของ P53 codon 72 polymorphism เพื่อการป้องกัน และค้นหามะเร็งปอดระยะเริ่มแรกจึงควรมีการดำเนินการต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี พ.ศ. 2550-2551

### เอกสารอ้างอิง

1. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2549 กองสถิติสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข
2. Kruhuprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, and Attasara P. editors. Cancer in Thailand. Vol IV, 1998-2000. Bangkok; 2007.
3. Limsila T. The role of surgery and adjuvant chemotherapy for advanced stage (IIIA,B and IV) non-small cell lung cancer (NSCLC). Thai Cancer J 1993;19:75-9.
4. Tourani JM, Timsit JF, Delaisement C, Balzon JC, Caubarrere I, et al. Two cycles of Cisplatin-Vindesine and radiotherapy for localized nonsmall cell carcinoma of the lung (stage III). Results of a prospective trial with 149 patients. Cancer 1990; 65:1472-7.
5. Pongnikom S, Martin N, Pomruangwong W, Daoprasert K. Cancer incidence and mortality in lampang. Vol III, 1998-2002, Lampang; 2004.
6. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R and Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. Br Med J 1994;309:901-11.
7. Hoffmann D, Rivenson A and Amin S. Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines in F344 rat. J Cancer Res Clin Oncol 1984;108:81-6.

8. Hecht SS, Trushin N, Castonguay A. Comparative tumorigenicity and DNA methylation in F344 rats by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res* 1986;46:498-502.
9. Mitacek EJ, Brunnemann KD, Hoffmann D, Limsila T, Suttajit M, Martin N, Caplan LS. Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and suspected risk factor for liver cancer in Thailand. *Carcinogenesis* 1999;20:133-7.
10. Joneneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci Total Environ* 1997;199:141-9.
11. National Research Council (NRC), Committee on Health Risks of Exposure to Radon, Board on Radiation Effects Research. Health effects of exposure to radon (BEIR VI). Washington, DC: National Academy Press, 1998.
12. Samet JM, Cohen AJ. Air pollution and lung cancer. In: Holgate ST, Samet JM, Koren HS, et al, eds. Air pollution and health. San Diego, CA: Academic Press, 1999:841-64.
13. Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environmental Health Perspect* 1996;104:569-77.
14. Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wlencke JK, Christiani DC. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1037-42.
15. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:129-34.
16. Szymanowska A, Jassem E, Dziadziuszko R, Borg A, Limon J, Kobińska-Gulida G, et al. Increased risk of non-small cell lung cancer and frequency of somatic TP53 gene mutations in Pro72 carriers of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Lung Cancer* 2006;52:9-14.
17. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, Fontanini G. Prognostic impact of p53 Pro72 homozygous genotype in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep* 2008;19:771-3.
18. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4961.
19. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science (Washington DC)* 1991;253:49-53.
20. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1993;70:523-6.
21. Jensen RA and Page DL. p53: the promising story continues to unfold. *Hum Pathol* 1993;24:455-6.
22. Harris CC. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science (Washington DC)* 1993;262:1980-1.
23. Oka K, Ishikawa J, Bruner JM, Takahashi R, Saya H. Detection of loss of heterozygosity in the p53 gene in renal cell carcinoma and bladder cancer using the polymerase chain reaction. *Mol Carcinog* 1991;4:10-3.
24. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987;7:961-3.
25. Weston A, Perrin LS, Forrester K, Hoover RN, Trump BF, Harris CC, Caporaso NE. Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1992;1:481-3.
26. Miller C, Mohandas T, Woff D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986;319:783-4.
27. De la Calle-Martin O, Fabregat V, Romero M, Soler J, Vives J, Yague J. AccII polymorphism of the p53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4963.
28. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type human p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999;19:1092-100.
29. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;393:229.
30. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:389-92.
31. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW. Distributions of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer—proline form is prominent in invasive tumor.

- Urol Res 2000;28:293-6.
32. Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. J Toxicol Environ Health. 1997;50:307-64.
33. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst 1999; 91:1194-210.
34. Tiwawech D, Srivatanakul P, Karaluk A, Ishida T. The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett 2003;198:69-75.
35. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? Hum Hered 1994;44:266-70.



# การตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction-Simple Probe ในผู้ป่วยมะเร็งปอด

दनัย ทิวาเวช\*  
สุรทัสน พงษ์นิกร\*\*  
อดิศักดิ์ สรพรหม\*\*\*  
อนันต์ กรดักฤษณ+  
Takafumi Ishida++

**บทคัดย่อ** P53 tumor suppressor gene (P53) เป็นยีนควบคุมโรคมะเร็งโดยทำหน้าที่สร้างโปรตีน P53 เพื่อหยุดการเพิ่มจำนวนและช่วยเร่งการตายของเซลล์มะเร็ง มีรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ที่ codon 72 บน exon 4 ของ P53 ทำให้มนุษย์แต่ละคนมีลักษณะทางพันธุกรรมของ P53 ที่ต่างกันได้ 3 ชนิด (genotypes) คือ Arginine/Arginine (Arg/Arg), Arginine/Proline (Arg/Pro) และ Proline/Proline (Pro/Pro) และพบว่าผู้ที่มี Pro/Pro ของ P53 codon 72 polymorphism มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งปอด กระเพาะปัสสาวะและโพรงหลังจมูกสูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg ในการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) นั้นไม่เหมาะที่จะใช้เป็นการตรวจคัดกรองสำหรับตัวอย่างจำนวนมากได้เนื่องจากมีขั้นตอนซับซ้อนยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้องเสี่ยงต่อการสัมผัสกับสารก่อมะเร็งในขณะที่ตรวจ ปัจจุบันมีรายงานว่าการตรวจแบบใหม่ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction-SimpleProbe probe (R-PCR-SP) เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการตรวจคัดกรองหาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีตัวอย่างจำนวนมากได้โดยไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว และไม่ต้องเสี่ยงต่อการสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในผู้ป่วยมะเร็งปอดโดยใช้วิธี R-PCR-SP และเปรียบเทียบผลที่ได้กับผลการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP ในการศึกษาใช้ DNA ที่สกัดจาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยมะเร็งปอดจำนวน 70 ราย เพื่อตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP และวิธี PCR-RFLP ผลการศึกษาพบว่าการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี PCR-RFLP ( $K = 1.0, 95\%CI = 1.0-1.0$ ) คือให้ผลตรงกันทุกราย โดยพบ genotype ชนิด Arg/Arg จำนวน 12 ราย Arg/Pro จำนวน 41 ราย และ Pro/Pro จำนวน 17 ราย นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP นั้นทำได้รวดเร็ว และมีความปลอดภัยมากกว่าวิธี PCR-RFLP อีกด้วย ผลจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงว่าวิธี R-PCR-SP ซึ่งใช้ SimpleProbe probe ตามด้วยการวิเคราะห์ melting curve สามารถใช้ตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในผู้ป่วยมะเร็งปอดได้และวิธีการตรวจแบบใหม่นี้ให้ผลการตรวจสอบสอดคล้องกับวิธี PCR-RFLP เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธี R-PCR-SP น่าจะนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองหา P53 codon 72 polymorphism ของผู้ที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งปอดในคนไทยได้ (วารสารโรคมะเร็ง 2552; 29:63-71.)

\* กลุ่มงานวิจัย, \*\*\*กลุ่มงานศัลยกรรม \*กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ 10400  
\*\* ศูนย์มะเร็งจังหวัดลำปาง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดลำปาง 52000  
++ Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

**Abstract** Detection of *P53* Codon 72 Polymorphism in Lung Cancer Patients by Real Time Polymerase Chain Reaction - SimpleProbe Probe Assay

by Danai Tiwawech\*, Suratat Pongnikorn\*\*, Adisak Sornprom\*\*\*, Anant Karalak† and Takafumi Ishida\*\*

\*Research Division, \*\*\*Surgery Division, †Pathology Divisions, National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok 10400 \*\*Lampang Province Cancer Center, Division of Medical Services, Ministry of Public Health, Lamphang Province 52000 \*\*Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

The *P53* tumor suppressor gene (*P53*) is a key gene involved in cancer control by producing *P53* protein to inhibit proliferation and enhance apoptosis of cancer cells. It has been reported that the polymorphism at the codon 72 on the exon 4 of *P53* resulted in 3 different genotypes of the *P53*: Arginine/Arginine (Arg/Arg), Arginine/Proline (Arg/Pro) and Proline/Proline (Pro/Pro) genotypes, and found that individual with Pro/Pro of *P53* codon 72 polymorphism had a higher risk for lung, bladder and nasopharyngeal cancers than those with Arg/Arg. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay used to detect *P53* codon 72 polymorphism is not suitable for a mass screening since it is complicated, time-consuming and at risk for carcinogen exposure. Recently, real-time polymerase chain reaction-SimpleProbe probe (R-PCR-SP) assay has been suggested to be suitable for a mass screening of various genetic polymorphisms with a faster and safer way. The aim of this study is to detect *P53* codon 72 polymorphism in Thai patients with lung cancer by the R-PCR-SP assay using SimpleProbe probe and melting curve analysis and the PCR-RFLP assay. The findings from these two methods were then comparable. Seventy DNA samples from peripheral blood leukocyte of lung cancer cases were recruited in this study. The results of *P53* codon 72 polymorphism detected by the R-PCR-SP and the PCR-RFLP assays were completely accordant ( $K=1.0$ , 95%CI = 1.0-1.0). The findings demonstrated 12 individuals with Arg/Arg, 41 cases with Arg/Pro and 17 cases with Pro/Pro. In addition, we found that the R-PCR-SP assay was a faster and safer method for detection of *P53* codon 72 polymorphism than the PCR-RFLP assay. Results of the present study suggest that the R-PCR-SP assay with SimpleProbe probe and melting curve analysis may be a useful screening tool for detection of *P53* codon 72 polymorphism in the high risk group of lung cancer in Thais. (*Thai Cancer J* 2009;29:63-71.)

## บทนำ

มะเร็งปอดเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 2 ในประเทศไทยรองจากมะเร็งตับ โรคนี้เป็นปัญหาใหญ่ที่ยังคงทำความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และทำลายชีวิตประชากรไทยเป็นจำนวนมากในแต่ละปี อุบัติการณ์เกิด (age-standardized incidence rate: ASR) ของมะเร็งปอดในชายไทย 20.6 ต่อประชากรแสนคน โดยมีค่าสูงกว่าหญิงไทย (ASR=9.3ต่อประชากรแสนคน) ประมาณ 2.2 เท่า และจังหวัดที่ตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งปอดสูงสุดคือจังหวัดลำปาง (ASR=80.6 ต่อประชากรแสนคน) ส่วน

จังหวัดที่ตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งปอดต่ำสุดคือจังหวัดสงขลา (ASR=18.4 ต่อประชากรแสนคน) เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดมากกว่าร้อยละ 80 เป็นชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) และส่วนใหญ่มักจะมาพบแพทย์เมื่อเป็นระยะสุดท้ายขณะที่มีการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาไม่ดีซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มักเสียชีวิตในที่สุด อย่างไรก็ตามการรักษาดังกล่าวนี้มักสามารถรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกได้ผลดี<sup>2,3</sup> ดังนั้นการค้นหาผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกให้พบโดยเร็วและส่งต่อให้แพทย์ทำการรักษาได้อย่างทันที่จึงมี

ความสำคัญมาก ด้วยเหตุนี้การศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่บอกความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งปอด (genetic risk marker for lung cancer) เพื่อช่วยค้นหาผู้ที่กำลังเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปอดและช่วยวินิจฉัยโรคมะเร็งปอดให้ได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกในผู้ที่เป็นกลุ่มเสี่ยงจะทำให้การรักษาโรคมะเร็งปอดมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลดียิ่งขึ้น

P53 tumor suppressor gene (P53) เป็นยีนที่มีความสำคัญและน่าสนใจมากเนื่องจาก P53 ซึ่งอยู่บน chromosome 17p13 นี้สามารถควบคุมการเกิดโรคมะเร็งได้ โดยทั่วไป P53 (Wild type) จะทำหน้าที่สร้างโปรตีน P53 ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งไม่ให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นและกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งทำลายตัวเองขึ้น ในปัจจุบันมีรายงานว่ codon 72 polymorphism บน exon 4 ของ P53 ทำให้เกิดการสร้างโปรตีน P53 ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือมี arginine (Arg, CGC) หรือ proline (Pro, CCC) และทำให้มนุษย์แต่ละคนมี genotype ของ P53 แตกต่างกันได้ 3 ชนิด คือ Arginine/Arginine (Arg/Arg), Arginine/Proline (Arg/Pro) และ Proline/Proline (Pro/Pro) genotype<sup>4-8</sup> จากรายงานที่ผ่านมามีการศึกษาพบว่าผู้ที่มี genotype ชนิด Pro/Pro จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งปอด<sup>9, 10</sup>, กระเพาะปัสสาวะ<sup>11</sup> และโพรงหลังจมูก<sup>12</sup> สูงกว่าผู้ที่มี genotype ชนิด Arg/Arg ดังนั้นการตรวจหา Pro/Pro ของ P53 codon 72 polymorphism จึงน่าจะมีประโยชน์ในการค้นหาผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งปอดในอนาคตในกลุ่มคนปกติที่ยังไม่มีอาการของโรคซึ่งอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเสี่ยงเหมือนกับผู้ป่วยมะเร็งปอด อย่างไรก็ตามการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ที่ใช้กันอยู่เดิมนั้นไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้เพราะว่าเป็นวิธีที่มีความซับซ้อนยุ่งยาก ใช้เวลานาน และเสี่ยงต่อการได้รับสารก่อมะเร็งในระหว่างการย่อย DNA บน gel ที่ผ่านการทำ gel electrophoresis เพื่อตรวจหาแถบ DNA ของ PCR และ RFLP product ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าการตรวจแบบใหม่ที่มี

มีชื่อว่า real-time polymerase chain reaction-SimpleProbe probe assay (R-PCR-SP) เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการตรวจคัดกรองหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่บอกความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งซึ่งมีตัวอย่างจำนวนมากได้โดยไม่ยุ่งยากรวดเร็ว และไม่ต้อเสี่ยงต่อการได้รับสารก่อมะเร็ง<sup>13-18</sup> แต่ยังไม่มียางานการนำวิธี R-PCR-SP ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในผู้ป่วยมะเร็งปอดโดยวิธี R-PCR-SP ซึ่งใช้ SimpleProbe probe ตามด้วยการวิเคราะห์ melting curve และวิธี PCR-RFLP แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากทั้ง 2 วิธี

## วัสดุและวิธีการ

### การเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดขาว

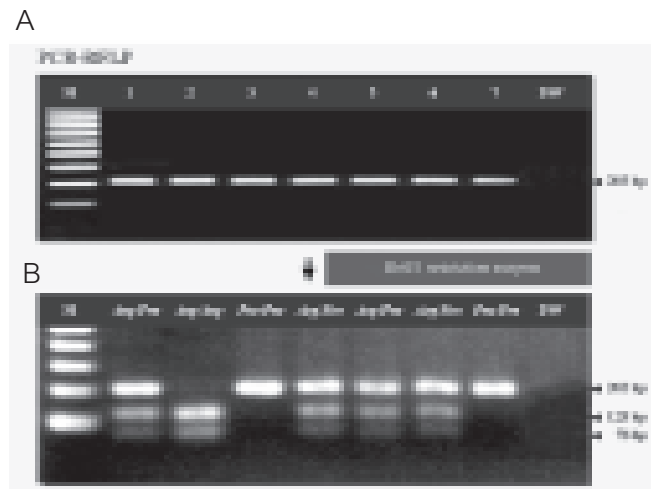
เจาะเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มารับการตรวจและรักษาในสถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 70 รายๆ ละ 7 มิลลิลิตรใส่ใน EDTA tube (EDTA blood 7 ml) จากนั้นปั่นแยกเม็ดเลือดขาวด้วยความเร็ว 2500 rpm นาน 20 นาทีและเก็บเม็ดเลือดขาวที่ได้ทั้งหมดไว้ที่ -40°C จนกว่าจะนำไปใช้

### การสกัด DNA

นำเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปอดทุกรายมาสกัด DNA ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QuickGene DNA whole blood kit S และใช้เครื่องสกัดรุ่น QuickGene-810 (FUJIFILM Corporation, Japan) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำที่มากับชุดน้ำยา DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 ng/ml จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้ไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำไปใช้

### การตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP

การตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP ใช้ primer 5'CCC GGA CGA TAT TGA ACA-3' และ 5'-AGA AGC CCA GAC GGA AAC-3' เพื่อเพิ่มจำนวนของ P53 exon 4 โดย



**รูปที่ 1** แสดงผลการตรวจหา *P53* codon 72 polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP ในผู้ป่วย 7 ราย (เลข 1-7) หลังจากการทำ PCR จะได้ PCR product ขนาด 203bp เหมือนกันทุกรายใน agarose gel (2.5%) electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide (A) แต่เมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปทำ RFLP โดยการย่อยด้วย *BstU1* restriction enzyme ที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup> นาน 10 ชั่วโมง จะได้ DNA product เป็น 3 ชนิด คือ ขนาด 125 และ 78 bp (Arg/Arg รายที่ 2), 203 bp (Pro/Pro รายที่ 3 และ 7) และ 203, 125 และ 78 bp (Arg/Pro รายที่ 1, 4, 5 และ 6) (B) ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ double distilled water (DW) เป็น negative control, M=DNA size marker

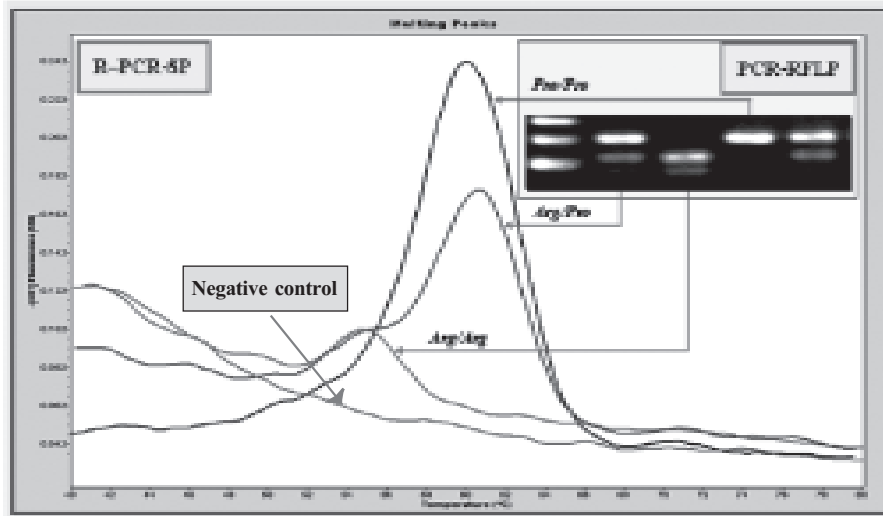
นำ PCR reaction mixture 50  $\mu$ l [double distilled water 32.8  $\mu$ l + PCR buffer 5  $\mu$ l + 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l + 2 mM dNTP 5  $\mu$ l + 20 pmole of each primer 1  $\mu$ l + 5 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase 0.2 Unit + DNA template 1  $\mu$ l] ไป incubate ที่ 95<sup>o</sup> นาน 9 นาที ก่อนการทำ PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยการทำ PCR ตามโปรแกรมดังต่อไปนี้ 94<sup>o</sup> นาน 1 นาที, 63<sup>o</sup> นาน 1 นาที และ 72<sup>o</sup> นาน 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบแล้วตามด้วย 72<sup>o</sup> นาน 4 นาที PCR product ที่ได้จะมีขนาด 203 base pair (bp) เมื่อ run electrophoresis บน 2.5% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ double distilled water เป็น negative control จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำ RFLP โดยย่อยด้วย *BstU1* enzyme (enzyme จะตัด DNA เฉพาะบริเวณที่มี sequence เป็น CGC) ที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup> นาน 10 ชั่วโมง ในที่สุดจะได้ DNA product ใหม่ที่เป็น Arg/Arg มีขนาด 125 และ 78 bp ส่วน Pro/Pro จะไม่ถูก enzyme ตัดทำให้ได้ DNA product มีขนาด 203 bp เท่าเดิม สำหรับ Arg/Pro นั้น PCR product จะถูก enzyme ตัดที่ DNA เส้นใด

เส้นหนึ่งซึ่งเป็น CGC ทำให้ได้ DNA product ใหม่ที่มีขนาด 203, 125 และ 78 bp (รูปที่ 1)

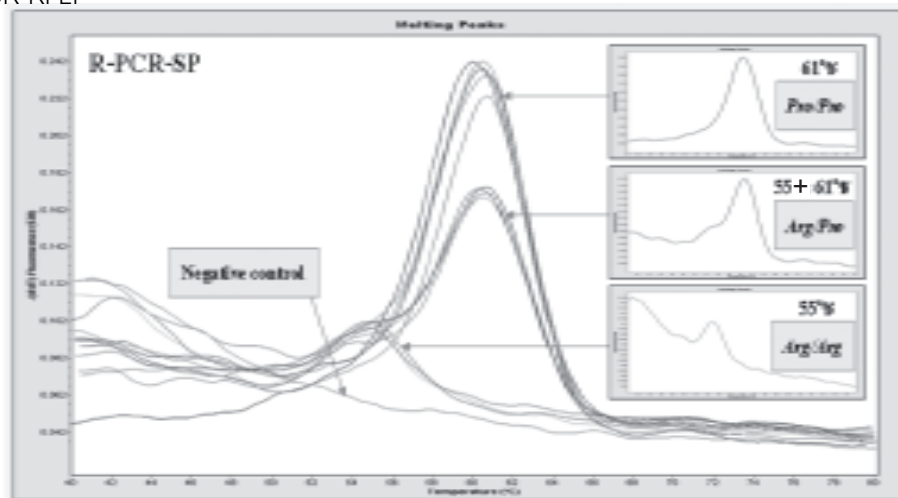
### การตรวจหา *P53* codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP

การตรวจด้วยวิธี R-PCR-SP ใช้ forward primer 5'-GATGCTGTCCCCGGACGA-3', reverse primer 5'-AGGGGCCGCGGTGTAG-3', SimpleProbe<sup>®</sup> probe 5'-TCCCCCGT XI ICCCTGCACC P-3' (TIB MOLBIOL, Germany) และน้ำยา master mix สำเร็จรูป The LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA HybProbe (Roche, Germany) สำหรับเครื่องที่ใช้ตรวจคือ LightCycler<sup>®</sup> model 1.5 (Roche, Germany)

นำ PCR reaction mixture 20  $\mu$ l [double distilled water 13.1  $\mu$ l + master mix 2.0  $\mu$ l + 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.0  $\mu$ l + 20 pmole forward primer 1.0  $\mu$ l + 20 pmole reverse primer 0.7  $\mu$ l + SimpleProbe probe 0.2  $\mu$ l + DNA template 2.0  $\mu$ l] ซึ่งอยู่ในหลอด capillary ใส่ในเครื่อง LightCycler<sup>®</sup> model 1.5 และเพิ่มจำนวน



รูปที่ 2 แสดงความสอดคล้องระหว่างผลของการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP และ PCR-RFLP ผู้ที่เป็น Arg/Arg ซึ่งมี melting point ที่ 55°C ในวิธี R-PCR-SP ตรวจพบแถบ DNA 2 แถบ ของ Arg/Arg (78 และ 125 bp) ในวิธี PCR-RFLP ส่วนผู้ที่เป็น Arg/Pro ซึ่งมี melting point ที่ 55 และ 61°C ในวิธี R-PCR-SP ตรวจพบแถบ DNA 3 แถบของ Arg/Pro (78, 125 และ 203 bp) ในวิธี PCR-RFLP สำหรับผู้ที่เป็น Pro/Pro ซึ่งมี melting point ที่ 61°C ในวิธี R-PCR-SP ตรวจพบแถบ DNA 1 แถบของ Pro/Pro (203 bp) ในวิธี PCR-RFLP



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP ผลที่ได้มี melting curves 3 ชนิด คือชนิดที่มี melting point ที่อุณหภูมิ 55°C (Arg/Arg), 55 และ 61°C (Arg/Pro) และ 61°C (Pro/Pro) ในการตรวจด้วยวิธี R-PCR-SP มีการทำ positive controls ที่เป็น Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro และ negative control (double distilled water) ร่วมด้วยทุกครั้ง

DNA ที่ต้องการตามโปรแกรมดังต่อไปนี้คือ ทำ pre-incubate ที่ 95°C นาน 10 นาที ตามด้วยการทำ R-PCR จำนวน 40 รอบ ที่ 95°C นาน 1 นาที, 61°C 15 วินาที และ 72°C นาน 6 วินาที และทำ melting curve ที่ 95°C นาน

0 วินาที [ramp rate =20.0], 40°C 30 วินาที [ramp rate=20.0] และ 80°C นาน 0 วินาที [ramp rate=0.15] ผลที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี R-PCR-SP จะแสดงเป็น melting curve ที่มีอุณหภูมิต่างกัน 3 ชนิด คือ มี melting

point ที่มีอุณหภูมิ 55°C, 55°C, และ 61°C และ 61°C ตามลำดับ โดยพบว่า melting curve ชนิดที่มี melting point ที่อุณหภูมิ 55 °C ให้ผลตรงกับ Arg/Arg (ตรวจพบแถบ DNA 2 แถบที่ 125 และ 78 bp) ในวิธี PCR-RFLP ส่วน melting curve ชนิดที่มี melting point ที่อุณหภูมิ 55 และ 61 °C ให้ผลตรงกับ Arg/Pro (ตรวจพบแถบ DNA 3 แถบที่ 203, 125 และ 78 bp) ในวิธี PCR-RELP สำหรับ melting curve ชนิดที่มี melting point ที่อุณหภูมิ 61 °C ให้ผลตรงกับ Pro/Pro (ตรวจพบแถบ DNA 1 แถบที่ 203 bp) ในวิธี PCR-RFLP (รูปที่ 3)

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้ใช้โปรแกรม The Quick Cals online calculators for scientists<sup>19</sup> ในการคำนวณหาค่าของ Kappa ( $K$ ) ซึ่งค่าของ  $K$  นี้ใช้ในการบอกถึงระดับการยอมรับในความสอดคล้องของวิธีที่ทำการศึกษา 2 วิธีได้โดยกำหนดให้เมื่อค่าของ  $K$  อยู่ระหว่าง 0-0.4 แสดงว่าเห็นด้วยน้อยมากถึงค่อนข้างเห็นด้วย เมื่อค่าของ  $K$  อยู่ระหว่าง 0.4-0.8 แสดงว่าเห็นด้วยปานกลางถึงเห็นด้วย และเมื่อค่าของ  $K$  อยู่ระหว่าง 0.8-1.0 แสดงว่าเห็นด้วยอย่างมาก

### ผลการศึกษา

ผู้ป่วยมะเร็งปอดที่เข้าร่วมในการศึกษานี้มีอายุระหว่าง 31-90 ปี ประกอบด้วยผู้ป่วยชาย 51 ราย และผู้ป่วยหญิง 19 ราย ผลของการกระจายความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism เวลาที่ใช้การย้อมสีสารก่อมะเร็ง (ethidium bromide) และค่าของ  $K$  ในการตรวจด้วยวิธี

R-PCR-SP และ PCR-RFLP ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism พบว่าการตรวจด้วยวิธี R-PCR-SP กับวิธี PCR-RFLP ในผู้ป่วยมะเร็งปอด 70 รายนั้นทั้ง 2 วิธี ตรวจพบผู้ที่มี P53 codon 72 polymorphism เป็น genotype ชนิด Arg/Arg จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 22.86) ชนิด Arg/Pro จำนวน 41 ราย (ร้อยละ 48.57) และชนิด Pro/Pro จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 28.57) เมื่อคำนวณทางสถิติแล้วได้ค่าของ  $K = 1$  และค่าของ 95% confidence interval = 1.0-1.0 แสดงว่าทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลตรงกันทุกราย

หลังจากการสกัด DNA พบว่าใช้เวลาในการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี R-PCR-SP ประมาณ 2 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี PCR-RFLP ต้องใช้เวลานานประมาณ 18 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี R-PCR-SP มีความปลอดภัยมากกว่าวิธี PCR-RFLP อีกด้วยเนื่องจากไม่ต้องใช้สารก่อมะเร็ง (ethidium bromide) ในการย้อม DNA เพื่อตรวจหาแถบของ DNA บน agarose gel

### วิจารณ์และสรุป

มะเร็งปอดยังเป็นปัญหาใหญ่ด้านสาธารณสุขของประเทศไทย การตรวจวินิจฉัยให้พบผู้ป่วยตั้งแต่ระยะเริ่มแรกและให้การรักษาที่ถูกต้องทันเวลาที่จะช่วยให้อายุมีระยะการอยู่รอดนานขึ้น ระบบการเฝ้าระวังการเกิดของโรคมะเร็งปอดตามด้วยให้การรักษาที่รวดเร็วนับว่ามีความสำคัญมากในการควบคุมและป้องกันโรคนี้ ด้วยเหตุดังกล่าวแพทย์จึงจำเป็นต้องมี genetic risk factor เพื่อช่วยตรวจคัดกรองและค้นหาผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดระยะเริ่มแรกให้พบโดยเร็วก่อนที่จะมีการแพร่กระจาย

ตารางที่ 1 ความถี่ของ P53 codon 72 polymorphism เวลาที่ใช้ และสารก่อมะเร็งที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี R-PCR-SP และ PCR-RFLP

วิธีการตรวจ	P53 codon 72 polymorphism			เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	สารก่อมะเร็งที่ใช้ (ethidium bromide)	K (95%CI)
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro			
R-PCR-SP	12	41	17	2	ไม่ใช้	1.0 (1.0-1.0)
PCR-RFLP	12	41	17	18	ใช้	

ของโรค รวมทั้งใช้ช่วยในการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งจะทำให้ผลการรักษาของแพทย์มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากพบว่า P53 codon 72 polymorphism เกี่ยวข้องกับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด แพทย์อาจจะนำไปใช้ตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็กลุ่มเสี่ยงและช่วยค้นหาผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกอีกทั้งช่วยในการวางแผนการรักษาให้กับผู้ป่วยมะเร็ง เนื่องจากพบว่า P53 codon 72 gene polymorphism มีความสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็งหลายชนิดด้วย<sup>20-26</sup> ผู้ที่มี P53 codon 72 gene polymorphism ชนิด Pro/Pro พบว่ามีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งสูงกว่าผู้ที่เป็ Arg/Arg ประมาณ 2-3 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่มี Pro/Pro มักมีการพยากรณ์โรคไม่ดี ดังนั้นการตรวจหา P53 codon 72 gene polymorphism จึงมีประโยชน์ทางคลินิกต่อผู้ป่วยมะเร็ง

โดยทั่วไปในการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ในห้องปฏิบัติการนั้นนิยมใช้วิธี PCR-RFLP ซึ่งมี 2 ขั้นตอนหลักโดยย่อๆดังนี้คือ ขั้นตอนแรกเป็นการทำ PCR ตามด้วย gel electrophoresis และการย้อม DNA ส่วนขั้นตอนที่สองเป็นการทำ RFLP (ใช้ *Bst*U1 restriction enzyme) ตามด้วย gel electrophoresis และการย้อม DNA โดยใช้เวลาในการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP ทั้งหมดประมาณ 18 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการตรวจหา P53 codon 72 polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP มีความซับซ้อนยุ่งยาก ใช้เวลานานและเสี่ยงต่อการได้รับสารก่อมะเร็งในระหว่างการย้อม DNA บน gel ที่ผ่านการทำ electrophoresis เพื่อตรวจหาแถบ DNA ของ PCR- และ RFLP-products ดังนั้นวิธี PCR-RFLP จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรองสำหรับตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ปัจจุบันพบว่ามีวิธี R-PCR-SP ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่าเหมาะกับการใช้ตรวจคัดกรองหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่บอกความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งอีกทั้งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายได้ผลเร็วโดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง และไม่ต้องเสี่ยงต่อการได้รับสารก่อมะเร็งเนื่องจากไม่มีขั้นตอนการย้อมแถบ DNA ใน agarose gel ซึ่งต้องใช้สารเรืองแสง(ethidium bromide)ที่เป็นสารก่อมะเร็ง<sup>13-18</sup>

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธี R-PCR-SP ขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในการตรวจหา Arg/Arg, Arg/Pro และ Pro/Pro ของ P53 codon 72 polymorphism ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชาวไทยซึ่งวิธีนี้ใช้หลักการ Simple Probe<sup>®</sup> genotyping analysis assay ของ Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) โดยมีการออกแบบสังเคราะห์ fluorescent oligonucleotide probe ขึ้นมา 1 เส้นสำหรับตรวจหา single-nucleotide polymorphism (SNP) 1 ตำแหน่งของ mutant-type(Pro/Pro) บน codon 72 ใน exon 4 ของ P53 ซึ่ง probe นี้มีการติดฉลากไว้ด้วย reporter dye และ linker เพื่อให้ไปจับกับ DNA sequence เป้าหมายที่อยู่ล้อมรอบ SNP ของ variant ที่เป็น mutant-type ที่ต้องการตรวจหา แต่จะไม่ไปจับกับ variant อื่นๆ และมีการออกแบบ primer 1 คู่ที่เหมาะสมกับการใช้ probe ดังกล่าว ในระหว่างการทำ PCR ขณะที่ probe เข้าจับกับ DNA sequence เป้าหมายในช่วงการเกิด annealing (61°C) จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ reporter dye และ linker ทำให้ reporter dye เรืองแสงออกมาในช่วงคลื่น 530 นาโนเมตรได้ (ถ้า probe อยู่อย่างอิสระ reporter dye จะไม่เรืองแสง) เทคนิค R-PCR-SP นี้สามารถใช้แยกผู้ที่มี alleles แตกต่างกันออกจากกันได้โดยอาศัยความแตกต่างของ melting temperature ( $T_m$ ) โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ ในระหว่างการทำ melting curve analysis นั้น เมื่อ PCR product ถูก denature ที่อุณหภูมิ 95°C จนกลายเป็น single stranded DNA แล้ว probe จะแยกออกเป็นอิสระและไม่เรืองแสง จากนั้นทำการลดอุณหภูมิเป็น 40°C แล้วค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างช้าๆที่ละน้อยจนเป็น 95°C อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งในช่วงของการเพิ่มอุณหภูมินี้ขณะที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 61°C จะทำให้ single stranded DNA จับคู่กันเป็น double stranded DNA และทำให้ probe สามารถเข้าจับกับ PCR product และเรืองแสงออกมาได้อีก (ในตอนนี probe จะจับกับ PCR product ทั้งที่เป็น wild-type และ mutant-type) และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นต่อไปที่ละน้อยจาก 61°C เป็น 95°C จะทำให้ probe ค่อยๆหลุดออกจาก PCR product ซึ่งการหลุดของ probe ที่จับแน่นกับ SNP บน mutant-type sequence จะใช้ ( $T_m$ )ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการหลุดของ

probe ออกจาก wild-type sequence การรายงานนี้ นับว่าเป็นครั้งแรกที่แสดงว่าสามารถใช้วิธี S-PCR-SP ในการตรวจหา Arg/Arg, Arg/Pro และ Pro/Pro ของ P53 codon 72 polymorphism ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย มะเร็งปอดได้ และความถี่ของการตรวจพบ P53 codon72 polymorphism ด้วยวิธี S-PCR-SP นี้ให้ ผลเหมือนกับวิธี PCR-RFLP ทุกอย่าง สรุปผลของการ ศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการตรวจหา Arg/Arg, Arg/Pro และ Pro/Pro ของ P53 codon 72 gene polymorphism ด้วยวิธี S-PCR-SP ทำได้ง่าย ให้ผลเร็ว และให้ผลตรงกับวิธี PCR-RFLP ที่นิยมใช้กันแต่เดิม ดังนั้นวิธี S-PCR-SP จึงเหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรองในคนกลุ่มเสี่ยง ที่มีจำนวนมาก

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี พ.ศ. 2550-2551

### เอกสารอ้างอิง

1. Kuhuaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, and Attasara P. Cancer in Thailand, Vol IV, 1998-2000, Bangkok, Thailand, 2007.
2. Limsila T. The role of surgery and adjuvant chemotherapy for advanced stage (IIIA,B and IV) non-small cell lung cancer (NSCLC). Thai Cancer J 1993;19:75-9.
3. Tourani JM, Timsit JF, Delaisement C, Balzon JC, Caubarrere I, Darse J, Gerrads A, Lebas FX, Andrieu JM. Two cycles of Cisplatin-Vindesine and radiotherapy for localized nonsmall cell carcinoma of the lung (stageIII). Results of a prospective trial with 149 patients. Cancer 1990; 65:1472-7.
4. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. Mol Cell Biol 1987;7:961-3.
5. Miller C, Mohandas T, Woff D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. Nature 1986;319:783-4.
6. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. Nucleic Acids Res 1990;18:4961.
7. de la Calle-Martin O, Fabregat V, Romero M, Soler J, Vives J, Yague J. AcclI polymorphism of the p53 gene. Nucleic Acids Res 1990;18:4963.
8. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L and Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type human p53 differ biochemically and biologically. Mol Cell Biol 1999;19:1092-100.
9. Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9:1037-42.
10. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. Clin Cancer Res 1999;5:129-34.
11. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW. Distributions of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer—proline form is prominent in invasive tumor. Urol Res 2000;28:293-6.
12. Tiwawech D, Srivatanakul P, Karaluk A, Ishida T. The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett 2003;198:69-75.
13. Stahberg A, Zoric N, Aman P, Kubista M. Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. Expert Rev Mol Diagn 2005;5:221-30.
14. Grannemann S, Landt O, Breuer S, Blomeke B. LightTyper Assay with locked-nucleic-acid-modified oligomers for genotyping of the Toll-Like receptor 4 polymorphisms A896G and C1196T. Clinical Chemistry 2005;51:1523-5.
15. Ware MD, DeSilva D, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Tavtigian SV, Mazoyer S. Does nonsense-mediated mRNA decay explain the ovarian cancer cluster region of the BRCA2 gene. Oncogene 2006;25: 323-8.
16. Debniak T, Scott RJ, Gorski B, Cybulski C, van de Wetering T, Serrano-Fernandez P, et al. Common variants of DNA repair genes and malignant melanoma. Eur J Cancer 2008;44:110-4.
17. Valles-Ayoub Y, Saechao C, Haghghatgoo A, Neshat MS, Esfandiari S, Pietruszka M, Darvish D. Validation of GNE:p.M712T identification by melting curve analysis. Genetic Testing 2008;12:101-9.
18. Jakubowska A, Jaworska K, Cybulski C, Janicka A, Pasternak

- JS, Lener M, et al. BRCA1 modifiers also affect the risk of breast cancer in non-carriers. *J Eur Cancer* 2009;45:837-42.
19. The QuickCals online calculators for scientists. Available at: [http:// graphpad.com/quickcalcs/Kappa1.sfm](http://graphpad.com/quickcalcs/Kappa1.sfm). Accessed June 15,2009.
20. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;393:229.
21. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:389-92.
22. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW. Distributions of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer—proline form is prominent in invasive tumor. *Urol Res* 2000;28:293-6.
23. Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1037-42.
24. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:129-34.
25. Bau DT, Tsai MH, Lo YL, Hsu CM, Tsai Y, Lee CC, Tsai FJ. Association of p53 and p21 (CDKN1A/WAF1/CIP1) polymorphisms with oral cancer in Taiwan patients. *Anticancer Res* 2007;27:1559-64.
26. Tiwawech D, Chindavijak S, Karaluk A, Ishida T. Detection of p53 codon 72 polymorphism in patients with oral cancer. *Thai Cancer J* 2008;28:24-33.



# การตรวจหา DNA methylation ของ $p16^{INK4a}$ ในผู้ป่วย มะเร็งเซลล์ตับโดยวิธี Methylation Specific-Polymerase Chain Reaction

เพ็ญศรี แซ่หลี่\*

ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร\*\*

โสพิศ วงศ์คำ\*\*\*

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์\*

พัชรินทร์ หอมชะเอม\*\*\*\*

**บทคัดย่อ** ดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน  $p16^{INK4a}$  พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความผิดปกติของยีนดังกล่าวในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับด้วยวิธี methylation specific-PCR (MS-PCR) โดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์มะเร็งตับและเซลล์ตับปกติบริเวณข้างเคียงจำนวน 29 ราย นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มา modified ด้วย sodium bisulfite และเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์  $p16^{INK4a}$  methylation และ  $p16^{INK4a}$  unmethylation แล้วเปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วย ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน  $p16^{INK4a}$  ในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับ ร้อยละ 41.4 และเนื้อเยื่อตับปกติบริเวณข้างเคียง ร้อยละ 6.9 การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน  $p16^{INK4a}$  กับผลทางพยาธิคลินิก และอัตราการรอดของผู้ป่วย ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอ methylation ของยีน  $p16^{INK4a}$  ในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย ดังนั้นการเกิดดีเอ็นเอ methylation ดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีน  $p16^{INK4a}$  (วารสารโรคมะเร็ง 2552;29: 72-79.)

**Abstract** Detection of DNA methylation of  $p16^{INK4a}$  in hepatocellular carcinoma by methylation specific-polymerase chain reaction

by Pensri Saelee\*, Songsak Petmitr\*\*, Sopit Wongkham\*\*\*, Sunanta Chariyalertsak\*, Patcharin Homcha-cm\*\*\*\*

\* Research Division, \*\*\*\*Pathology Division, National Cancer Institute,\*\*Department of Tropical Nutrition and Food Science, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. \*\*\* Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

\* กลุ่มงานวิจัย,\*\*\*\* กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ,\*\* ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400,\*\*\* ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002.

The purpose of this study is to investigate aberrant methylation of  $p16^{INK4a}$  in hepatocellular carcinoma (HCC). We determined the methylation status of CpG island of  $p16^{INK4a}$  in 29 HCC and corresponding normal liver tissues by methylation specific-PCR method. Aberrant methylation status was detected in 41.4% of tumors and 6.9% of corresponding normal liver tissues. No significant correlations between methylation status and clinico-pathological data were found. In addition, survival analysis by multivariate Cox regression analysis showed that aberrant methylation status of  $p16^{INK4a}$  was not an independent prognostic factor for poor survival among HCC patients. Our findings demonstrated that methylation of  $p16^{INK4a}$  were detectable in HCC tissues of Thai patients and suggested that hypermethylation of  $p16^{INK4a}$  may contribute to the hepatocellular carcinogenesis. (*Thai Cancer J 2009:29:72-79.*)

**Key words:** DNA methylation, methylation specific-PCR, Hepatocellular carcinoma

## บทนำ

มะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้ชายไทยและอันดับสามในผู้หญิงไทย<sup>1</sup> โรคมะเร็งชนิดนี้ประกอบด้วยมะเร็งท่อน้ำดีตับ (cholangiocarcinoma) และมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) สาเหตุสำคัญของโรคมะเร็งเซลล์ตับเกิดจากหลายปัจจัยซึ่งมีผลเกื้อหนุนกัน ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี, ไวรัสตับอักเสบบี, ภาวะตับแข็ง<sup>2</sup>, การได้รับสาร aflatoxin B1 ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร<sup>3</sup>, ฮอร์โมน, และภาวะภูมิคุ้มกันของบุคคลนั้นๆ<sup>4</sup>

ยีนต้านมะเร็ง  $p16^{INK4a}$  พบอยู่บนโครโมโซม 9p21 ผลิตโปรตีน CDKN2A (cyclin dependence kinase inhibitor)<sup>5</sup> ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนระยะของวงจรเซลล์ (cell cycle) จากระยะ G1 เป็นระยะ S (DNA synthesis) โดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน p53 และ retinoblastoma (Rb) การเปลี่ยนแปลงของยีน  $p16^{INK4a}$  เกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ เช่น homozygous deletion, point mutation และการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter)<sup>6</sup> ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆได้ การเกิด DNA methylation บริเวณ CpG-rich หรือ CpG island บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีน  $p16^{INK4a}$  เกิดขึ้นจากการเติมหมู่-methyl ที่เบส cytosine โดยเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs)<sup>7</sup> แต่ปฏิกิริยานี้สามารถย้อนกลับได้ (reversible)<sup>8</sup> การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้เรียกว่าการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรม (epigenetic

changes) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสบนลำดับนิวคลีโอไทด์<sup>9</sup> การเกิดดีเอ็นเอ methylation พบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งยีน  $p16^{INK4a}$  ทำให้ยีนเหล่านี้ถูกยับยั้งการถอดรหัส (transcriptional-inactivation) ส่งผลให้เกิด gene silencing ซึ่งมีผลต่อการสูญเสียหน้าที่<sup>10</sup>

การตรวจหาดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน  $p16^{INK4a}$  โดยวิธี methylation specific-polymerase chain reaction (MS-PCR) อาศัยหลักการออกแบบไพรเมอร์ที่แยกความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิด methylation (methylated allele) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบ unmethylation (unmethylated allele) ที่จำเพาะบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งมีรายงานการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของยีน  $p16^{INK4a}$  ในลักษณะดังกล่าวแล้วในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งลำไส้<sup>11</sup>, มะเร็งปอด<sup>12</sup>, มะเร็งเต้านม<sup>13</sup>, มะเร็งตับอ่อน<sup>14</sup>, มะเร็งหลอดอาหาร<sup>15</sup>, รวมทั้งมะเร็งตับ<sup>16-17</sup> แต่ยังไม่มียางานในผู้ป่วยไทย คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอ methylation ของยีน  $p16^{INK4a}$  แล้วเปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้กับผลทางพยาธิคลินิกและอัตราการรอดของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเซลล์ตับที่นำมาศึกษาเป็นเนื้อเยื่อผู้ป่วยส่วนที่เป็นมะเร็งเซลล์ตับและเนื้อเยื่อตับ

ปกติจากผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 29 ราย ที่มารับการตรวจและรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2549 โดยเก็บเนื้อเยื่อที่ได้จากห้องผ่าตัดไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °ซ จนกว่าจะใช้

### การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นเนื้อมะเร็งเซลล์ตับและเนื้อเยื่อตับปกติประมาณ 10 g มาบดให้ละเอียดแล้วนำเซลล์ที่บดละเอียดใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ proteinase K ที่อุณหภูมิ 56 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี salting out<sup>18</sup> ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

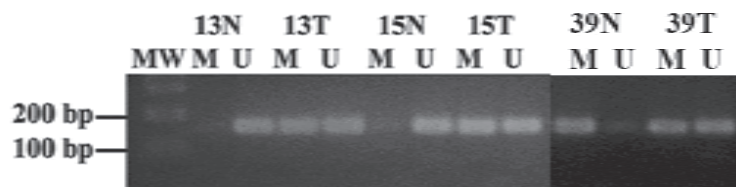
### Modified ดีเอ็นเอด้วย sodium bisulfite

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มา modified เพื่อเปลี่ยน unmethylated cytosine เป็น uracil ส่วน methylated cytosine จะคงสภาพเดิมโดยใช้ชุดน้ำยา EZ DNA Methylation-Gold Kit™ (Zymo Research, Orange, CA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เติม CT conversion reagent (ประกอบด้วยน้ำ 700  $\mu$ l, M-dilution buffer 300  $\mu$ l และ M-dissolving buffer 50  $\mu$ l) 110  $\mu$ l ลงในหลอดที่มีดีเอ็นเอปริมาณ 1  $\mu$ g เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปวางในเครื่อง PCR โดยการปรับอุณหภูมิที่ 98 °ซ 10 นาที และที่อุณหภูมิ 64 °ซ 2½ ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดมาใส่ลงใน Zymo-Spin IC™ column ซึ่งอยู่บน collection tube ที่มี M-binding buffer 600  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm

30 วินาที แล้วเติม M-wash buffer 100  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 30 วินาที เติม M-desulphonation buffer 200  $\mu$ l ลงใน column แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 30 วินาที นำมาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย M-wash buffer 200  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 30 วินาที แล้วละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย M-elution buffer จำนวน 20  $\mu$ l นำไปเก็บที่ตู้แช่แข็ง -20 °ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

### ตรวจหาดีเอ็นเอ methylation ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* โดยวิธี methylation specific-PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์ *p16<sup>INK4a</sup>* methylation (forward: 5'-TTATTAA GGGTGGGGCGGATCGC-3', reverse: 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3') กับ *p16<sup>INK4a</sup>* unmethylation (forward: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT, reverse: 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3')<sup>19</sup> ด้วยวิธี methylation specific-PCR (MS-PCR) โดยนำ reaction mixture ปริมาตร 25  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 ng, PCR buffer (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0), 200  $\mu$ M ของ dNTP แต่ละชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U ของ Taq DNA polymerase และ 20 pM ของไพรเมอร์แต่ละชนิด แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมดังนี้ ที่อุณหภูมิ 95 °ซ 5 นาที ตามด้วย denaturation 95 °ซ นาน 1 นาที, annealing ที่ 65 °ซ (*p16<sup>INK4a</sup>* methylation) และ 62 °ซ (*p16<sup>INK4a</sup>* unmethylation) 30 วินาที และ extension ที่ 72 °ซ 30 วินาที รวม 36 รอบ และตามด้วย final extension



รูปที่ 1 methylation-specific PCR บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* ในมะเร็งเซลล์ตับ (T) และเนื้อเยื่อตับปกติบริเวณข้างเคียง (N) ดีเอ็นเอ methylation ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* พบในตัวอย่างหมายเลข 13T, 15T, 39N และ 39T (M = methylation, U = unmethylation)

ที่ 72<sup>0</sup>ซ 7 นาที่ นำ PCR product ที่ได้ไปทำ electrophoresis ใน 2% agarose gel อ่านผลโดยการย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดด้วยแสงอุลตราไวโอเลต โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ methylation กับ unmethylation ที่มีขนาด 150 และ 151 bases pair (bp) ตามลำดับ โดยทั่วไปมักพบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากทั้งสองไพรเมอร์ในส่วนที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับ เนื่องจากการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อตับปกติ (รูปที่ 1)

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการศึกษาโดยใช้ Fisher's exact test เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่าง *p16<sup>INK4a</sup>* methylation กับผลทางพยาธิคลินิก (อายุ, เพศ, histological type, tumor size, metastasis, treatment, HBsAg, anti-HCV) และวิเคราะห์ผลของ *p16<sup>INK4a</sup>* methylation ต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย โดยใช้ Kaplan-Meier และ log-rank test นอกจากนี้ใช้ Cox regression analysis วิเคราะห์หาตัวพยากรณ์โรคที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอ methylation ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ

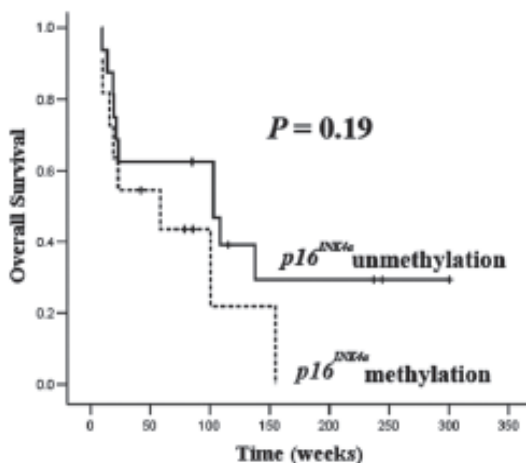
Parameter	<i>p16<sup>INK4a</sup></i>		Odds ratio, (95%CI)	P
	U, n (%)	M, n (%)		
Gender			0.42, (0.04-4.66)	0.62
Male	14(56)	11(44)		
Female	3(75)	1(25)		
Age (years)			2.86, (0.61-13.34)	0.26
<50	10(71)	4(29)		
≥50	7(47)	8(53)		
Histological type			0.80, (0.04-17.20)	1.00
MD	4(44)	5(56)		
PD	1(50)	1(50)		
Unknown	12(67)	6(33)		
Tumor size (cm)			1.09, (0.23-5.19)	1.00
≤5	6(60)	4(40)		
>5	11(58)	8(42)		
Metastasis			0.89, (0.20-3.90)	1.00
Negative	8(57)	6(43)		
Positive	9(60)	6(40)		
Treatment			0.23, (0.05-1.18)	0.13
No CMT	7(44)	9(56)		
CMT	10(77)	3(23)		
HBsAg			1.29, (0.24-6.83)	1.00
Negative	6(60)	4(40)		
Positive	7(54)	6(46)		
Unknown	4(67)	2(33)		
Anti-HCV			3.60,(0.26-50.33)	0.54
Negative	9(64)	5(36)		
Positive	1(33)	2(67)		
Unknown	7(58)	5(36)		

M = methylation; U = unmethylation, CI = confidence interval, MD = moderately differentiated, PD = poorly differentiated, CMT = chemotherapeutic treatment, HBsAg = hepatitis B virus surface antigen, anti-HCV = antibody to hepatitis C virus

มะเร็งเซลล์ตับ และใช้ค่า  $P$  ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ ผู้ป่วยที่ใช้ในการวิเคราะห์หัตถการการอยู่รอดในการศึกษานี้มีจำนวน 27 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการติดตามผลการรักษาอย่างน้อย 300 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งเสียชีวิต และไม่รวมผู้ป่วย 2 ราย โดย 1 ราย เสียชีวิตภายใน 4 สัปดาห์และอีก 1 ราย ขาดการติดตามการรักษา (lost to follow-up)

### ผลการศึกษา

จากการตรวจหาดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน  $p16^{INK4a}$  ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์ตับปกติบริเวณข้างเคียงของผู้ป่วยจำนวน 29 ราย พบดีเอ็นเอ methylation ของยีน  $p16^{INK4a}$  ในมะเร็งเซลล์



รูปที่ 2 เส้น curve แสดงอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับแบ่งตามผลการเกิด  $p16^{INK4a}$  methylation กับ  $p16^{INK4a}$  unmethylation

ตับ 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.4 และในเนื้อเยื่อตับปกติ 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.9 การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน  $p16^{INK4a}$  กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยที่ศึกษา (ตารางที่ 1) จากการวิเคราะห์ผลของ  $p16^{INK4a}$  methylation ต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ พบว่าผู้ป่วยที่มี  $p16^{INK4a}$  methylation มีระยะเวลาการอยู่รอดสั้นกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี  $p16^{INK4a}$  methylation (ค่ามัธยฐานของการอยู่รอด 58 สัปดาห์ และ 103 สัปดาห์ ตามลำดับ) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.19$ ) ดังรูปที่ 2 เมื่อใช้ multivariate Cox regression model ในการวิเคราะห์หา prognostic factor (tumor size, metastasis, treatment,  $p16^{INK4a}$  methylation) ที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ พบว่าไม่มี prognostic factor ใดที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

### วิจารณ์

Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นโรคที่พบได้ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในประชากรกลุ่ม Asian และ African มีสาเหตุสำคัญจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิด B (hepatitis B virus; HBV) และไวรัสตับอักเสบนชนิด C (hepatitis C virus; HCV)<sup>20</sup> อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับในประเทศโลกตะวันตกพบว่าเพิ่มขึ้นในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาสืบเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนเพิ่มจำนวนมากขึ้น<sup>21-22</sup> แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการเกิดมะเร็งเซลล์ตับกัน

ตารางที่ 2 วิเคราะห์หาตัวพยากรณ์โรคที่มีผลต่อการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ โดยใช้ multivariate Cox regression analysis

Variable	Hazard ratio	95%CI	P
Tumor size; ≥5 vs <5	3.01	0.65-13.89	0.158
Metastasis; positive vs negative	1.32	0.43-4.06	0.628
Treatment; CMT vs no.CMT	0.86	0.24-3.09	0.812
$p16^{INK4a}$ methylation; M vs U	1.87	0.59-5.87	0.282

CI = confidence interval, CMT = chemotherapeutic treatment, M = methylation; U = unmethylation

อย่างกว้างขวาง แต่กลไกการเกิดมะเร็งเซลล์ตับยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาของเซลล์มะเร็งเพื่อให้ทราบถึงกลไกและขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องและเป็นต้นเหตุให้เซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งรวมถึงการศึกษาการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* จะมีประโยชน์อย่างมากที่จะทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับได้ดียิ่งขึ้น

การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมชนิดการควบคุมโดยระบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic changes) เช่นดีเอ็นเอ methylation ที่เกิดขึ้นจากการเติมหมู่เมทิล (-methyl) ในเบส cytosine ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 โดยเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) บริเวณ CpG-rich หรือ CpG island บริเวณโปรโมเตอร์ หรือบริเวณ exon 1 ของยีน ซึ่งมีความยาวประมาณ 1-2 กิโลเบส<sup>23</sup> เป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังคงปกติเหมือนเดิม พบได้ในมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งเซลล์ตับ<sup>16-17</sup> การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการถอดรหัสของยีนต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น กลุ่มยีนที่ควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (*Retinoblastoma; RB, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2B; CDKN2B*) กลุ่ม transduction gene (*RAS association domain family 1A; RASSF1a, LKB1/STK11* และ adenomatous polyposis coli; *APC*) ยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมในการกำจัดสารพิษ (glutathione S-transferase *P1; GSTP1*) กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์ (death associated protein kinase; *DAPK* และ caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase; *CASP8*) กลุ่มยีนที่เป็นตัวรับฮอร์โมน (estrogen receptor; *ER, progesterone receptor; PGR, androgen receptor; AR* และ retinoic receptor; *RAR*) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดแดง (thrombospondin 1; *THBS1*)<sup>24</sup> นอกจากนี้การเกิดดีเอ็นเอ methylation ยังยับยั้งการถอดรหัสของ imprinted genes, repetitive elements ด้วย<sup>25</sup>

การศึกษานี้ตรวจพบดีเอ็นเอ methylation บริเวณ

โปรโมเตอร์ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* ของเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับร้อยละ 41.4 และ ยังพบในเนื้อเยื่อตับปกติบริเวณข้างเคียง ร้อยละ 6.9 จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความถี่ของการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* พบร้อยละ 0-91.7 และพบสูงในมะเร็งเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบในชาวเอเชีย ความถี่ของการเกิดดีเอ็นเอ methylation ที่แตกต่างกันอาจมีสาเหตุมาจากสภาพทางภูมิศาสตร์ เชื้อชาติและสาเหตุการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับที่ต่างกันในแต่ละบุคคล<sup>26</sup> นอกจากนี้ อาจเกิดจากขั้นตอนเทคนิคที่ใช้ตรวจต่างกัน<sup>27</sup> Kaneto และคณะ<sup>28</sup> พบการเกิดดีเอ็นเอ methylation ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* ร้อยละ 72.7 ในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบชนิด B หรือ C Shim และคณะ<sup>29</sup> ได้รายงานว่าการเกิดดีเอ็นเอ methylation ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* ใน HCC มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HBV นอกจากนี้มีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอ methylation ในเนื้อเยื่อระยะก่อนกลายเป็นมะเร็ง (pre-malignant stage) แสดงให้เห็นว่าการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* เกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดมะเร็งเซลล์ตับตั้งแต่ระยะแรก<sup>17</sup> และยังมีรายงานพบความสัมพันธ์กับ poor prognosis, เพศหญิง และอายุที่เพิ่มขึ้นของผู้ป่วย<sup>30,31</sup>

นอกจากในมะเร็งเซลล์ตับแล้วยังมีรายงานพบดีเอ็นเอ methylation ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* ในโรคมะเร็งชนิดอื่น เช่นในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้พบว่ามีสัมพันธ์กับ tumor differentiation, Dukes' staging, poor prognosis และ lymphatic invasion<sup>32-34</sup> นอกจากนี้ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด non-small cell พบ *p16<sup>INK4a</sup>* methylation เกี่ยวข้องกับ advanced TNM staging และ การสูบบุหรี่รวมทั้ง poor survival<sup>35-36</sup>

## สรุป

จากผลการศึกษา พบว่าการเกิดดีเอ็นเอ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *p16<sup>INK4a</sup>* สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย ดังนั้น *p16<sup>INK4a</sup>* methylation น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเซลล์ตับ

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2549-2550 จากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

## เอกสารอ้างอิง

1. Kluhnaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, Attasara P, editors. Cancer in Thailand Vol. IV, 1998-2000. Bangkok; 2007.
2. Marcellin P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int* 2009; 29:1-8.
3. Montesano R, Hainaut P, Wild CP. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1844-51.
4. Villa E, Melegari M, Scaglioni PP, Trande P, Cesaro P, Manenti F. Hepatocellular carcinoma: risk factors other than HBV. *Ital J Gastroenterol* 1991; 23:457-60.
5. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378:115-77.
6. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38:285-303.
7. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:253-66.
8. Karpf AR, Jones DA. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* 2002; 21:5496-503.
9. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:4632-42.
10. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1:633-4.
11. Lee M, Sup Han W, Kyoung Kim O, Hee Sung S, Sun Cho M, Lee SN, et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract* 2006; 202:415-24.
12. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11891-6.
13. Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:115-27.
14. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res* 1998; 58:4740-4.
15. Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K, Gregor M, Porschen R. Hypermethylation of the CDKN2/p16 promoter during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1998; 115:1381-6.
16. Hsu LS, Lee HC, Chau GY, Yin PH, Chi CW, Lui WY. Aberrant methylation of EDNRB and p16 genes in hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan. *Oncol Rep* 2006; 15:507-11.
17. Fukai K, Yokosuka O, Imazeki F, Tada M, Mikata R, Miyazaki M, et al. Methylation status of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25:1209-16.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
19. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:9821-6.
20. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-17.
21. El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340:745-50.
22. Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, Yeo AE, Shih JW, Gojobori T, et al. Inaugural Article: A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11891-6.
23. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990; 62:503-14.
24. Kopelovich L, Crowell JA, Fay JR. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1747-57.
25. Li E, Beard C, Forster AC, Bestor TH, Jaenisch R. DNA

- methylation, genomic imprinting, and mammalian development. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1993; 58:297-305.
26. Zhu R, Li BZ, Li H, Ling YQ, Hu XQ, Zhai WR, et al. Association of p16INK4 A hypermethylation with hepatitis B virus X protein expression in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Pathol Int* 2007; 57:328-36.
  27. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 163:1101-7.
  28. Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, et al. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut* 2001; 48:372-7.
  29. Shim YH, Yoon GS, Choi HJ, Chung YH, Yu E. p16 Hypermethylation in the early stage of hepatitis B virus associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2003; 190: 213-9.
  30. Ko E, Kim Y, Kim SJ, Joh JW, Song S, Park CK, et al. Promoter hypermethylation of the p16 gene is associated with poor prognosis in recurrent early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2260-7.
  31. Li X, Hui AM, Sun L, Hasegawa K, Torzilli G, Minagawa M, et al. p16INK4A hypermethylation is associated with hepatitis virus infection, age, and gender in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 15:7484-9.
  32. Lee M, Sup Han W, Kyoung Kim O, Hee Sung S, Sun Cho M, Lee SN, et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract* 2006; 202:415-24.
  33. Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 2003; 10:935-8.
  34. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, et al. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29:275-7.
  35. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, et al. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3419-24.
  36. Ng CS, Zhang J, Wan S, Lee TW, Arifi AA, Mok T, et al. Tumor p16M is a possible marker of advanced stage in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2002; 79:101-6.



# การศึกษาทางชีวโมเลกุลของมะเร็งเต้านมในสตรีไทย

ชนก พงศ์ธีรตัน

มะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการตายของสตรีทั่วโลกเป็นอันดับหนึ่งโดยเฉพาะประเทศตะวันตกมีอัตราการเกิดมะเร็งเต้านมในระดับสูงคือ 99.4 ต่อประชากรสตรี 100 000 คนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น<sup>1</sup> สำหรับในประเทศไทยพบอัตราการเกิดมะเร็งเต้านม 20.5 คนต่อประชากรสตรี 100 000 คน และเป็นโรคมะเร็งที่เกิดกับสตรีไทยสูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปากมดลูกโดยส่วนใหญ่พบในจังหวัดที่มีความเจริญเช่น กรุงเทพมหานคร, เชียงใหม่ เป็นต้น อายุเฉลี่ยที่มีอัตราการเกิดมะเร็งเต้านมสูงสุดอยู่ที่ 45 ปี<sup>2</sup> สาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านมมีหลายปัจจัยได้แก่การบริโภคอาหารที่มีไขมันสูง, การอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ, ความผันแปรของฮอร์โมนเพศและที่สำคัญประมาณร้อยละ 15-20 เกิดจากการถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรม<sup>3</sup> ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีนักวิจัยไทยได้ศึกษาทางชีวโมเลกุลในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะเป็นแนวทางในการตรวจพบโรคตั้งแต่ระยะแรกเริ่มและช่วยในการพยากรณ์โรคตลอดจนวางแผนการรักษาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นซึ่งจะกล่าวถึงในบทความนี้

ยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในมะเร็งเต้านมมีหลายกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ tumor suppressor gene, oncogene และกลุ่มยีนอื่นๆ<sup>4</sup> ฉะนั้นการศึกษาลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมหรือเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมความรุนแรงของโรคจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง และลักษณะทางพันธุกรรมของชนชาติต่างๆมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับ

มะเร็งเต้านมในสตรีไทยจึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจหาโรคระยะแรกเริ่มและวางแผนการรักษาให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

## 1. กลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes)

### 1.1 ยีน *BRCA 1* และ *BRCA 2*

ยีน *BRCA 1* และ *BRCA 2* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 และ 13 ตามลำดับ<sup>5,6</sup> การถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบผ่าเหล่าของยีนดังกล่าวเป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านมโดยพบร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด<sup>7</sup> และพบว่ามะเร็งเต้านมที่เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจะเกี่ยวข้องกับยีนสองชนิดนี้ถึงร้อยละ 65 จากการศึกษากับสตรีที่มีการผ่าเหล่าของยีนคู่นี้จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้นโดยเฉพาะเมื่อมีอายุ 70 ปีขึ้นไปจะมีความเสี่ยงเป็นมะเร็งเต้านมร้อยละ 50-85 ในประเทศตะวันตกพบว่าการผ่าเหล่าของยีนนี้พบในอัตราส่วน 1: 800<sup>8</sup>

สำหรับการศึกษากการผ่าเหล่าของยีน *BRCA1* และ *BRCA 2* ครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2545 ที่คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยศึกษาจากครอบครัวผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ที่มีการถ่ายทอดการผ่าเหล่าของยีนคู่นี้ พบรูปแบบของการผ่าเหล่าหลายแบบ เช่น แบบ frame deletion, missense mutation, intronic alteration และ silent mutation และพบว่าการผ่าเหล่าบางจุดบนยีนคู่นี้ของคนไทยแตกต่างจากชาวตะวันตกและชาวเอเชียชาติอื่นๆที่เคยมีการศึกษามา<sup>9</sup>

หมอดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000

ปัจจุบันพบว่าสตรีที่มียีน *BRCA 1* และ *BRCA 2* ประกติ แต่ยีน *BRCA1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ที่บริเวณปลาย 3' หรือ 3' untranslated region ที่ตำแหน่ง 5711+421 โดยที่เบส G เปลี่ยนไปเป็น T และที่ตำแหน่ง 5711+1286 เบส C เปลี่ยนไปเป็น T พบว่ามีผลทำให้ลดการแสดงออกของยีน *BRCA1* และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมด้วย<sup>10</sup>

## 1.2 ยีน *p53*

*p53* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (17p13.1)<sup>11</sup> มีหน้าที่ในการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ จากการศึกษาพบว่ายีนชนิดนี้มีการผ่าเหล่าแบบ point mutation และมักพบได้ในโรคมะเร็งหลายชนิดโดยพบในอัตราร้อยละ 20-40 ในการตรวจหาการผ่าเหล่าของยีน *p53* โดยทั่วไปมักจะใช้วิธีการหาลำดับเบส (sequencing) หรือใช้วิธี immunohistochemistry เพื่อดูภาวะการแสดงออก (over expression) ของปริมาณโปรตีนที่เกิดจากยีน *p53* ที่ผ่าเหล่า<sup>7</sup>

เมื่อปี พ.ศ. 2541 Chariyalertsak และคณะ<sup>12</sup> ที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ตรวจหาโปรตีน *p53* จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าร้อยละ 38.7 ของชิ้นเนื้อที่ศึกษามีโปรตีน *p53* บวก และยังพบว่าผู้ป่วยที่มีทั้ง *p53* และ *HER-2* บวกมีอัตราการอยู่รอดต่ำที่สุด ต่อมาปี พ.ศ. 2546 Sangrajang และคณะ<sup>13</sup> ได้ศึกษา *p53* แอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมโดยใช้เทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับโปรตีน *p53* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย พบว่าร้อยละ 19 ของซีรัมผู้ป่วยมี *p53* แอนติบอดีบวกและพบมีความสัมพันธ์กับระยะของโรคที่มีความรุนแรงสูง (stage IV) ขณะที่ร้อยละ 43.8 ของชิ้นเนื้อพบโปรตีน *p53* บวก เมื่อดูความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีพบว่าซีรัมของผู้ป่วยที่มี *p53* แอนติบอดีบวกมักตรวจพบโปรตีน *p53* ในชิ้นเนื้อด้วยโดยพบถึงร้อยละ 71.4 ในปี พ.ศ. 2550 Soontrapornchai และคณะ<sup>14</sup> ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ตรวจปริมาณโปรตีน *p53* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เซลล์มะเร็งยังไม่ลุกลามไปที่ต่อมน้ำเหลือง (node-negative) พบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้มีโปรตีน *p53* บวกเพียงร้อยละ 17 เท่านั้นและไม่มี ความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรค

## 2. กลุ่มยีนมะเร็ง (oncogenes) ยีน *HER-2*

*HER-2* หรือ *c-erbB-2* หรือ *neu* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17q21<sup>15</sup> เป็นกลุ่มยีน human epidermal growth factor receptor ทำหน้าที่ช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์และยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis โปรตีนหรือผลผลิตของยีนชนิดนี้อยู่บนผนังเซลล์ ซึ่งถ้ามีการแสดงออกมากเกินไปจะทำให้เซลล์แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว การศึกษา *HER-2* ส่วนใหญ่ใช้วิธีหาปริมาณโปรตีนด้วย วิธี immunohistochemistry โดยพบประมาณร้อยละ 25-30 ของมะเร็งเต้านม และพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี estrogen receptor (ER) บวกถ้ามียีน *HER-2* บวกด้วยมักจะไม่นับตอบสนองต่อการรักษาด้วยฮอร์โมน นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วยที่มี *HER-2* บวก มีอัตราการอยู่รอดต่ำด้วย<sup>7</sup>

ในประเทศไทยมีการศึกษาการแสดงออกของยีนชนิดนี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 โดยนักวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ตรวจหาการแสดงออกของ *HER-2* ในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่างๆคือมะเร็งเต้านม, ลำไส้, ภาวะเพาะอาหาร, ทางเดินอาหาร, ปอดและตับ จากการศึกษาพบผลบวกของโปรตีน *HER-2* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมร้อยละ 41 และมะเร็งลำไส้ร้อยละ 12.5 ส่วนโรคมะเร็งชนิดอื่นให้ผลเป็นลบ<sup>16</sup> และต่อมาในปี พ.ศ. 2544 คณะวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ยังได้รายงานการแสดงออกของ *HER-2* ในกลุ่มมะเร็งเต้านม โดยใช้ชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินจำนวนกว่า 500 ราย พบว่าร้อยละ 32 ของผู้ป่วยมีโปรตีน *HER-2* บวกและพบความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง, การกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง และ estrogen receptor negative<sup>17</sup> ในปี พ.ศ. 2539 คณะวิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้ตรวจหาโปรตีน *HER-2* ในชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมพบว่ามีโปรตีน *HER-2* บวกและพบว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วยที่มีโปรตีน *HER-2* บวกมีอัตราการอยู่รอดต่ำกว่าผู้ป่วยที่โปรตีน *HER-2* ลบ<sup>18</sup> ในปี 2540 มีรายงานการตรวจหาการเพิ่มจำนวน (gene amplification) ของ *HER-2* โดยใช้เทคนิค polymerase chain

reaction (PCR) ในการศึกษาดังกล่าวคณะผู้วิจัยได้ตรวจหายีน *HER-2* ทั้งในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและเนื้องอกธรรมดา (benign) ในเต้านมจากการศึกษาพบการเพิ่มของยีน *HER-2* ร้อยละ 28.8 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งแต่ไม่พบการเพิ่มจำนวนของยีนชนิดนี้ในผู้ป่วยเนื้องอกธรรมดา<sup>19</sup>

### 3. กลุ่มยีน hormone receptor

ฮอร์โมนเพศหญิงที่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์เต้านมคือเอสโตรเจน (estrogen) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) โดยที่เซลล์มีตัวรับฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้ได้แก่ ตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor; ER) ซึ่งสร้างจากยีน *alpha-ER* บนโครโมโซมคู่ที่ 6q25.1<sup>20</sup> และ ตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor; PR) สร้างจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11q22-23<sup>21</sup> จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาตรวจหาโปรตีน ER และ PR ช่วยทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วยฮอร์โมนได้

เมื่อปี พ.ศ. 2541 คณะผู้วิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ตรวจหาปริมาณตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดดังกล่าวพบว่าร้อยละ 36.1 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมี ER บวกและร้อยละ 45.8 มี PR บวก นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มี ER ลบ จะพบอัตราการอยู่รอดต่ำ<sup>22</sup> ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 คณะผู้วิจัยดังกล่าวยังได้ศึกษาเทคนิคการตรวจหา ER โดยใช้วิธี immunohistochemistry (IHC) เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธี biochemistry ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันมานาน ผลจากการศึกษาพบว่าการตรวจหา ER โดยวิธี IHC พบ ER บวกร้อยละ 44.6 ของผู้ป่วยที่ศึกษาและยังพบความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดต่ำ และเมื่อใช้วิธี biochemistry พบ ER บวกร้อยละ 36.1 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย ดังนั้นการใช้เทคนิค IHC จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาโปรตีน ER และยังช่วยในการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม<sup>23</sup> ในปีพ.ศ.2541 คณะผู้วิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลได้ศึกษาทั้งโปรตีน ER โดยวิธี IHC และ *ER* mRNA โดยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 314 ราย พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 53 มีโปรตีน ER บวกและมีเพียงร้อยละ 37.6 ที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจ

ด้วยวิธี RT-PCR และพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลบวกตรงกันถึงร้อยละ 71.8 นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีโปรตีน ER บวกมักจะมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองและมี *HER-2* ลบ ผลจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการหาปริมาณโปรตีน ER ช่วยในการพยากรณ์ได้ดีกว่าการหา *ER* mRNA ของผู้ป่วย<sup>24</sup> ในปี พ.ศ. 2545 คณะผู้วิจัยที่คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ตรวจหา ER และ PR ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด invasive ductal carcinoma พบว่าร้อยละ 53.4 ของผู้ป่วยมีโปรตีน ER บวกและร้อยละ 42.1 มี PR บวกและยังพบว่าผู้ป่วยที่มี ER และ PR ลบมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค, ก้อนมะเร็งขนาดใหญ่ และมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง<sup>25</sup>

### 4. กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมทางด้าน biotransformation

ยีนในกลุ่มนี้เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเคมีในสิ่งมีชีวิตที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติการละลายของสารที่เป็นสารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลงและมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้นจึงสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้

#### 4.1 ยีนกลุ่ม *CYP1*

*CYP1* นอกจากจะช่วยในการกำจัดสารพิษในร่างกายแล้วยังเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของเอสโตรเจนด้วย จึงคาดว่ายีนชนิดนี้จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเต้านม โดยปรกติยีนกลุ่มนี้มีหลายชนิดและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือมี SNP หลายแห่ง จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติพบว่าผู้ที่มียีน *CYP1A2* และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จุด SNP rs762551(A>C) มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม<sup>26</sup>

#### 4.2 ยีนกลุ่ม glutathione S-transferase (*GSTs*)

ยีนในกลุ่ม *GST* มีหลายชนิดและมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น คณะผู้วิจัยที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (polymorphism) *GST* ชนิด *O1* และ

ตารางที่ 1 สรุปผลการศึกษาด้านชีวโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในสตรีไทย

ยีนที่เกี่ยวข้อง	ความผิดปกติที่ศึกษา	ระดับชีวโมเลกุลที่ศึกษา
BRCA1, 2	การผ่าเหล่า	ดีเอ็นเอ
	SNP หรือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน	ดีเอ็นเอ
p53	Over expression	โปรตีน
HER-2	Over expression	โปรตีน
	Gene amplification	ดีเอ็นเอ
ER, PR	Over expression	โปรตีน
		เอ็มอาร์เอ็นเอ
CYP1, GST XRCC, OGG, APEX	SNP หรือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน	ดีเอ็นเอ

O2 กับมะเร็งชนิดต่างๆพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *GSTO1*\**A140D* เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมแต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *GSTO2*\**N142D* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรค<sup>27</sup> และมีรายงานจากคณะผู้วิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติพบว่า *GSTO1* ชนิด wild-type (A140/A140) พบสูงในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะรุนแรง<sup>28</sup> ขณะเดียวกันก็มีการศึกษาใน *GST* ชนิดอื่นๆ คือ *T1*, *M1*, *P1* และ *A1* ซึ่งผลการศึกษาพบว่ายีนทั้ง 4 ชนิดไม่เกี่ยวข้องกับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในสตรีไทย แต่เมื่อศึกษาดูความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *GST* ทั้ง 4 ชนิดกับลักษณะทางพยาธิคลินิกพบว่ามีเพียง *GSTP1* เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค<sup>29</sup>

### 5. กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ

ความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเออาจจะส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อมะเร็งเต้านมได้ เช่น ยีน *XRCC3* ซึ่งปกติจะสร้างเอ็นไซม์ขึ้นมาซ่อม

แซมดีเอ็นเอที่เกิด double-strand breaks ในปี พ.ศ. 2550 มีรายงานพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนชนิดนี้ที่ตำแหน่ง rs861529 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมของสตรีไทย<sup>30</sup> และในปี พ.ศ. 2551 มีการศึกษายีนในกลุ่มนี้อีก 3 ชนิด คือ *OGG1*, *XRCC1* และ *APEX1* พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมด้วย<sup>31</sup>

ผลสรุปจากการศึกษาด้านชีวโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมในสตรีไทยที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นแสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งผลการศึกษาต่างๆที่ได้จะทำให้เราสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับทำนายความเสี่ยงในการเกิดโรคและหาวิธีการรักษามะเร็งเต้านมที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อให้เหมาะกับสตรีไทย แต่รายงานการศึกษาเรื่องนี้ยังมีอยู่น้อยในประเทศไทย อาจเป็นเพราะเทคนิคต่างๆที่ใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุลยังมีค่าใช้จ่ายสูง

## เอกสารอ้างอิง

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
2. Kluhaphrema T, Srivatanakul P, Sriprung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, Attasara P editors. *Cancer in Thailand. Vol VI, 1998-2000.* Bangkok; 2007.
3. Nathanson KN, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Medicine* 2001; 7, 552 – 6.
4. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer : result from 214 families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678-701.
5. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Henry B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-9.
6. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-92.
7. Sunpaweravong S, Sunpaweravong P. Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer. *Asian J Surg* 2005; 28: 71-5.
8. Carroll JC, Cremin C, Allanson J, Blaine SM, Dorman H, Gibbons CA, et al. Hereditary breast and ovarian cancers. *Can Fam Physician* 2008; 54: 1691-2.
9. Patmasiriwat P, Bhothisuwan K, Sinilnikova OM, Chopin S, Methakijvaroon S, Badzioch M, et al. Analysis of breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 in Thai familial and isolated early-onset breast and ovarian cancer. *Hum Mutat* [DOI:10.1002/humu.9049]. 2002: 20. Available from: <http://www.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/98015717/PDFSTART>. Accessed June 11, 2009.
10. Pongsavee M, Yamkamon V, Dakeng S, O-charoenrat P, Smith DR, Saunders GF, et al. The BRCA1 3'-UTR: 5711+421T/T\_5711+1286T/T genotype is a possible breast and ovarian cancer risk factor. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009; 13: 307-17.
11. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 130-4.
12. Chariyalertsak S, Chariyalertsak S, Cheirsilpa A, Chindavijak K. Prognostic importance of p53 and c-erbB-2 oncoproteins overexpression in patients with breast cancer. *J Med Assoc Thai* 1998; 81: 698-704.
13. Sangrajrang S, Arpornwirat W, Cheirsilpa A, Thisuphakorn P, Kalalak A, Sornprom A. Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 182-6.
14. Soontrapornchai P, Chanvitan A, Koontongkaew S, Sunpaweravong S. The prognostic value of p53 immunostaining in node-negative breast carcinoma. *J Med Assoc Thai* 2007; 90: 1833-8.
15. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-9.
16. Suwanagool P, Parichatikanond P, Maeda S. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in primary human tumors: an immunohistochemistry study. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1993; 11: 119-22.
17. Chearskul S, Onreabroi S, Churintrapun M, Semprasert N, Bhothisuwan K. Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in primary breast cancer. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19: 197-205.
18. Chariyalertsak S, Chariyalertsak S, Cheirsilpa A, Sugano K, Ohkura H. Immunohistochemical detection of c-erbB-2 oncoprotein in patients with breast cancer. *J Med Assoc Thai* 1996; 79: 715-21.
19. Supanaranond K, Sukarayodhin S, Tanyakaset M, Balachandra K, Jullaksorn D, Rienkijarn M, et al. The significance of HER-2/neu/c-erbB-2 gene amplification in benign and malignant breast disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28: 631-40.
20. Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 1993; 17: 263-5.
21. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet* 1987; 77: 280-2.
22. Chariyalertsak S, Chariyalertsak S, Ruangvejvorachai P.

- Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1998; 16: 161-6.
23. Chariyalertsak S, Thisuphokorn P, Ruangvejvorachai P. Correlation between immuno histochemical and biochemical estrogen receptors in the prognosis of patients with breast cancer. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1999;17: 107-12.
24. Chearskul S, Bhothisuwan K, Churintrapun M, Semprasert N, Onreabroi S. Estrogen receptor-alpha mRNA in primary breast cancer: relationship to estrogen and progesterone receptor proteins and other prognostic factors. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2002; 20: 13-21.
25. Lertsanguansinchai P, Chottetanaprasith T, Chatamra K, Sampatanukul P, Wannakrairot P, Rojpornpradit P, et al. Estrogen and progesterone receptors status in Thai female breast cancer patients: an analysis of 399 cases at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 Suppl 1: S193-202.
26. Sangrajrang S, Sato Y, Sakamoto H, Ohnami S, Laird NM, Khuhaprema T, et al. Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women. *Int J Cancer* [DOI: 10.1002/ijc.24434]. 2009; 19. Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/122267066/abstract>. Accessed June 11, 2009.
27. Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett* 2006; 236: 276-81.
28. Purisa W, Chariyalertsak S, Sangrajrang S. Association between GSTO1 polymorphism and clinicopathological features of patients with breast cancer. *Thai Cancer J* 2008; 28: 184-9
29. Pongtheerat T, Tretrisool M, Purisa W. Glutathione S-transferase (GSTs) Polymorphism in breast cancer of Thai patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10: 127-32.
30. Sangrajrang S, Schmezer P, Burkholder I, Boffetta P, Brennan P, Woelfelschneider A, et al. The XRCC3 Thr241Met polymorphism and breast cancer risk: a case-control study in a Thai population. *Biomarkers*. 2007; 12: 523-32.
31. Sangrajrang S, Schmezer P, Burkholder I, Waas P, Boffetta P, Brennan P, et al. Polymorphisms in three base excision repair genes and breast cancer risk in Thai women. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111: 279-88.