

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 72603  
วันเดือนปี... 20 ส.ย. 2550

b. 117 ๕๑๑20  
i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

**Study on Genetics Abnormality in Colorectal Cancer**



**A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for  
the Degree of Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology**

**Faculty of Science**


**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**Academic Year 2006**

โครงการพิเศษ                      การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก  
 นักศึกษา                            นายกรณ์ต์ โสห์มณีรัตนา  
    นางสาวอิสรา ส้งมหาชัย  
 ภาควิชา                                ชีววิทยาประยุกต์  
 สาขาวิชา                            เทคโนโลยีชีวภาพ  
 อาจารย์ที่ปรึกษา                    ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์	
กรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

  
 (รศ.ดร. นวลพรรณ ฒ ระนอง)  
 หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงการพิเศษเรื่อง	การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก
นักศึกษา	นายกรัณต์ โสฬ่มณีรัตนา นางสาวอิสรา ส่งมหาชัย
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

### บทคัดย่อ

การเกิดมะเร็งเกิดจากความผิดปกติของยีนหลายยีน โดยเฉพาะยีนที่ควบคุมการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor gene: TSG) ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมี TSG หลายชนิดที่เกี่ยวข้อง เช่น *p53*, *DPC4*, *APC*, *MCC*, *nm23-H* และ *DCC* เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งของยีน *p53*, *DPC4* exon 2 และ 11 และ Microsatellite marker บริเวณ D18S363 ที่อยู่บริเวณข้างเคียงยีน *DPC4* โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยทำการศึกษาในดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเปรียบเทียบการหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งของดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยคนเดียวกันจำนวน 26 ราย โดยแบ่งเป็นระยะ Dukes' A จำนวน 1 ราย Dukes' B จำนวน 14 ราย Dukes' C จำนวน 8 ราย และ Dukes' D จำนวน 3 ราย จากการศึกษาพบว่าการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งของยีน *p53* คิดเป็นร้อยละ 77, ยีน *DPC4* exon 2 คิดเป็นร้อยละ 52.4, ยีน *DPC4* exon 11 คิดเป็นร้อยละ 28.8 และบริเวณ D18S363 คิดเป็นร้อยละ 50 โดยพบความผิดปกติในเพศชายมากกว่าเพศหญิง แสดงให้เห็นว่าการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งในตำแหน่งต่างๆ นี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

<b>Special Project Title</b>	Study on genetics abnormality in colorectal cancer
<b>Name</b>	Karan Lohmaneeratana Isara Songmahachai
<b>Department</b>	Applied Biology
<b>Program</b>	Biotechnology
<b>Academic Year</b>	2006
<b>Special Project Advisor</b>	Asst. Prof. Dr.Supattar Poeaim

### ABSTRACT

Cancer are characterized by multiple genetic aberrations that occur during tumorigenesis. Several tumor suppressor genes associated with colorectal carcinoma have been identified: *p53*, *DPC4*, *APC*, *MCC*, *nm23-H1* and *DCC*. In this study, We investigated the allelic losses of *p53*, *DPC4* exon 2 and 11 and microsatellite markers (D18S363) which surround the *DPC4* gene by polymerase chain reaction technique (PCR) with DNA which extract from colorectal cancer tissues compare with normal tissues from the same patient. We were investigated the allelic losses in the colorectal cancer tissues from 26 patients (1 Dukes' A stage, 14 Dukes' B stage, 8 Dukes' C stage and 3 Dukes' D stage). Four markers in all patients were found to be heterozygous for loss of heterozygosity (LOH) analysis. LOH at the *p53* was detected in 77%, *DPC4* exon 2 52.4%, *DPC4* exon 11 28.8% and D18S363 50%. The majority of gene LOH was observed in male. These results showed that allelic losses of those genes involved in the colorectal tumorigenesis

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชา วิศวกรรมพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยโครงการพิเศษนี้ไม่สามารถลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัชรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำและข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลอง และตรวจแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นจนกระทั่งโครงการพิเศษนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร. อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม กรรมการโครงการพิเศษที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมการสอบโครงการพิเศษนี้ รวมทั้งคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์แก่ผู้จัดทำเป็นผลให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ธุรการ แม่บ้าน พี่ๆ นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน จนโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงการพิเศษนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานที่ได้จัดทำขึ้นฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงการพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายกรัณต์ โส้ห่มฉัตรณา

นางสาวอิสรา ส้มมหาชัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	3
2.2 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer : CRC)	4
2.3 อาการของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	5
2.4 ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	5
2.5 วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค	6
2.6 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	8
2.7 วิธีการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	9
2.8 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง	10
2.9 กระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	17
2.10 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR)	18
2.11 Variable Number Tandem Repeats (VNTRs)	19
2.12 Loss of Heterozygosity (LOH)	21
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	24
3.1 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	24
3.2 ตำแหน่งยีนที่ต้องการศึกษา	24
3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	24
3.4 วิธีการทดลอง	27
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
4.1 การศึกษาดำเน่งยีน <i>p53</i>	31

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาบริเวณขึ้น <i>DPC4</i> exon 2 และ 11	35
4.3 การศึกษาบริเวณ D18S363	38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	46



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	25
3.2	26
3.3	28
4.1	31
4.2	34
4.3	35



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	ส่วนต่างๆของลำไส้ใหญ่	3
2.2	แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Sigmoidoscope	6
2.3	แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Colonoscope	7
2.4	แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Barium enema	7
2.5	แสดงระยะต่างๆ ของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	8
2.6	กระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน	17
2.7	แสดงขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
2.8	แสดงตำแหน่ง VNTRs บนโครโมโซม ซึ่งแต่ละคนอาจมีการซ้ำกันของ repetitive sequence ไม่เท่ากัน เมื่อตัดดีเอ็นเอด้วย restriction endonuclease ชนิดเดียวกัน ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกัน	20
2.9	แสดงตำแหน่งบนโครโมโซม (loci) ของบุคคลที่มีจำนวนครั้งที่ซ้ำของ Repetitive sequence แตกต่างกัน	20
2.10	แสดงการเกิด LOH ในมะเร็งที่ไม่ได้เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและที่เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม	22
4.1	แสดงผลการ LOH บนยีน <i>p53</i>	32
4.2	แสดงผลการ LOH บนยีน <i>DPC4</i> exon 2	36
4.3	แสดงผลการ LOH บนยีน <i>DPC4</i> exon 11	37
4.4	แสดงผลการ LOH บนบริเวณ D18S363	38

# บทที่ 1

## บทนำ

โรคมะเร็ง คือ โรคที่มีการแบ่งตัวของเซลล์ผิดปกติ ร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ อาจมีการลุกลามเฉพาะที่หรือแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ มะเร็งเกิดขึ้นได้กับทุกอวัยวะของร่างกาย มะเร็งมีสาเหตุทั้งจากสภาพแวดล้อม การติดเชื้อและความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งนั้นเกิดความผิดปกติจะส่งผลให้มีการควบคุมการแบ่งเซลล์ผิดปกติไป ซึ่งความผิดปกติอาจเกิดขึ้นเอง หรืออาจถ่ายทอดทางพันธุกรรมก็ได้ ปัจจุบันนักอณูชีววิทยากำลังศึกษาในกระบวนการเกิดมะเร็ง โดยมะเร็งส่วนใหญ่ไม่ได้มีเหตุมาจากความผิดปกติของยีนเพียงยีนเดียว โดยยีนที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ tumor suppressor genes และ oncogenes (Hisamuddin และคณะ, 2004)

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Colorectal cancer) คือ มะเร็งที่เกิดในส่วนหนึ่งส่วนใดของลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก ซึ่งถือเป็นส่วนประกอบที่ใหญ่และสำคัญในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ มีรายงานข้อมูลของประเทศไทยถึงอุบัติการณ์และการตายจากโรคมะเร็งซึ่งเป็นลำดับ 2 รองจากโรคหัวใจ (พ.ศ. 2544) (<http://hpc4.anamai.moph.go.th/Articles/abstract/2549/pattaya.pdf>) โดยตำแหน่งที่พบมะเร็งบ่อยเรียงลำดับจากมากไปน้อย 5 อันดับแรก คือ มะเร็งตับ มะเร็งปอดและหลอดลม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งเต้านม (<http://202.28.94.56/webproj/disease/cancer/001.html>) อัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเกิดในเพศชายเท่ากับเพศหญิง ([http://www.elib-online.com/doctors/cancer\\_breast.html](http://www.elib-online.com/doctors/cancer_breast.html)) ซึ่งเกิดบริเวณทวารหนักและลำไส้ใหญ่ส่วนซิกมอยด์รวมกันประมาณ 75 % และที่ลำไส้ใหญ่ส่วนอื่นๆ คือ ลำไส้ใหญ่ด้านขวาและลำไส้ใหญ่ส่วนขวางอีก 25 % อุบัติการณ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบเพิ่มมากขึ้นทุกๆ ปี ([http://www.sirirajmedj.com/journal\\_files/content\\_pdf/pdf\\_73](http://www.sirirajmedj.com/journal_files/content_pdf/pdf_73))

สาเหตุของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง แต่มีปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ ประวัติของการผ่าตัดลำไส้ ประวัติการเป็นเนื้องอก การมีติ่งเนื้อ ประวัติของการเป็นโรคริดสีดวงทวารเรื้อรัง ประวัติของการเกิดฝีหนองที่ทวารหนัก (anal abscess) ลักษณะของอุจจาระ นิสัยในการรับประทานเนย เบคอน ไก่ คริมเทียม การเกิดแผลเปื่อยและอักเสบในลำไส้ใหญ่ ประวัติการเป็นมะเร็งในครอบครัว ประวัติของการท้องผูกและเวลาในการนั่งทำงาน (วัลภา, 2532) ความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นทั้งในผู้หญิงและผู้ชายเมื่ออายุเกิน 30 ปี แต่จะเริ่มถือว่ามีความเสี่ยงสูงเมื่ออายุเกิน 50 ปีขึ้นไป อายุที่เริ่มเป็นโดยเฉลี่ยคือ 60-65 ปี (<http://www.surgeons.or.th/public/colorectalcaner.pdf>)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งลำไส้ใหญ่ ได้แก่ *MCC*, *APC*, *p53*, *nm23-H1*, *DCC* และ *DPC4* เป็นต้น (Kapitanovic และคณะ, 2004) Hadzija และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองกับมะเร็งลำไส้ใหญ่จากผู้ป่วยชาวโครเอเชีย จำนวน 60 คน โดยศึกษา ยีน *DPC4* (exon 1-11) ด้วยเทคนิค Loss of heterozygosity (LOH) และ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) พบ single nucleotide เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ restriction site โดยเฉพาะที่ exon 2, 8, 10 และ 11 โดยใช้เทคนิค RFLP และหาการ mutation อื่นๆ ด้วยเทคนิค Single strand conformation polymorphism ผลการทดลองพบว่า การหายไปของอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งของยีน *DPC4* เกี่ยวข้องกับขนาดของก้อนมะเร็ง ก้อนมะเร็งขนาดเล็กกว่า 5 เซนติเมตร จะมีความถี่ที่พบมากกว่าก้อนมะเร็งขนาดใหญ่

เทคนิค Loss of heterozygosity คือ การศึกษาการกลายของยีน หรือการกลายของดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกันระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งกับเนื้อเยื่อปกติของคนๆ เดียวกันว่ามี การขาดหายไปของอัลลีล ใดหรือไม่ หรือเป็นการศึกษาการกลายของยีนหรือดีเอ็นเอนั้นเอง โดยหลักการมาจากเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

โดยในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อ 1. ศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *p53* และ *DPC4* และบริเวณ D18S363 ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของคนไทย 2. ศึกษาการออกแบบไพเมอร์ 3. ศึกษาความรู้และข้อมูลเกี่ยวกับมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก รวมถึงเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ([http://www.elibonline.com/doctors2/cancer\\_colon4.html](http://www.elibonline.com/doctors2/cancer_colon4.html))

ลำไส้ใหญ่ และทวารหนักเป็นอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งลำไส้ใหญ่เป็นอวัยวะส่วนท้ายสุดของทางเดินอาหาร ทำหน้าที่เก็บเศษอาหาร ที่ผ่านการย่อยและดูดซึมมาแล้ว เพื่อเตรียมการขับออกจากร่างกายในรูปของอุจจาระ ลำไส้ใหญ่มีความยาวต่อเนื่องราว 4-6 ฟุต ประกอบขึ้นด้วยลำกล้ามเนื้อโดยรอบ แบ่งตามลักษณะที่ตั้งออกได้เป็น 5 ส่วน ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ส่วนต่างๆของลำไส้ใหญ่

ที่มา: <http://www.elib-online.com>

1. ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (ascending colon) ซึ่งอยู่ทางด้านขวาของช่องท้อง
2. ลำไส้ใหญ่ส่วนขวาง (transverse colon) ซึ่งผ่านจากด้านขวาไปยังด้านซ้ายเพื่อไปต่อกับส่วนที่ 3 คือ
3. ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (descending colon) อยู่ทางด้านซ้ายของช่องท้อง ซึ่งพอลงมาถึงบริเวณท้องน้อยจะหด เป็นรูป S เรียกว่า
4. ลำไส้ใหญ่ส่วนซิกมอยด์ (sigmoid colon) ซึ่งจะไปต่อกับลำไส้ใหญ่ส่วนท้ายคือ
5. ลำไส้ตรง (rectum) ส่วนนี้จะเปิดออกสู่โลกภายนอก โดยต่อกับทวารหนัก (anus) ([http://www.elib-online.com/doctors2/cancer\\_colon4.html](http://www.elib-online.com/doctors2/cancer_colon4.html))

## 2.2 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer : CRC)

เนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติบริเวณลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เรียกว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer : CRC) มะเร็งชนิดนี้สามารถแพร่กระจายออกไปด้านนอกลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงและอวัยวะอื่นๆ ได้ เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์แบบผิดปกติขึ้น แพทย์อาจประเมินว่าเป็นก้อนเนื้อเยื่อที่แบ่งเซลล์แบบผิดปกติ (benign tumor) หรือเนื้อร้าย (malignant tumor) โดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (biopsy) ไปตรวจทางพยาธิ ด้วยวิธีย้อมสีชิ้นเนื้อที่ตัดเป็นแผ่นบางบนแผ่นแก้ว และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในเนื้อเยื่อมะเร็งมีลักษณะที่ผิดปกติ เช่น การเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ เซลล์มีขนาดใหญ่รูปร่างของเซลล์ต่างจากเซลล์ปกติ เนื้อเยื่อชนิดนี้สามารถลุกล้ำไปอวัยวะใกล้เคียงและกระจายไปอวัยวะอื่นได้ โดยผ่านระบบหลอดเลือดและต่อมน้ำเหลือง เรียกมะเร็งที่แพร่กระจายนี้ว่า metastasis

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามการถ่ายทอดทางพันธุกรรม คือ

2.2.1 Sporadic colorectal cancer เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้น โดยที่ไม่มีความสัมพันธ์ หรือประวัติการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการกลายของยีนในตัวผู้ป่วยเอง

2.2.2 Hereditary colorectal cancer เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผู้ที่มีความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมีโอกาสเป็นมะเร็งสูงกว่าคนปกติตั้งแต่แรกเกิด แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.2.2.1 Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่ถ่ายทอดผ่านทางพันธุกรรมชนิดที่มีตั้งเนื้อออกจำนวนไม่มาก อัตราการเกิดคิดเป็นร้อยละ 2 ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด (Jass และคณะ, 1994)

2.2.2.2 Familial adenomatous polyposis (FAP) เป็นมะเร็งชนิดที่พบตั้งเนื้อออกจำนวนมาก คิดเป็นน้อยกว่าร้อยละ 1 ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด (Campbell และคณะ, 1994)

สมาชิกครอบครัวของคนที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็งทั้งชนิด HNPCC และ FAP มีการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีความเกี่ยวข้อง สำหรับผู้ที่มีการเปลี่ยนแปลงในยีนนั้น ได้รับคำแนะนำในการลดความเสี่ยงที่เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

## 2.3 อาการของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

อาการระยะแรกๆ มักจะไม่ปรากฏให้เห็น ถ้าพบว่ามีเปลี่ยนแปลงของระบบขับถ่าย เช่น อุจจาระเป็นมูกเลือด คลำพบก้อนในบริเวณท้อง มักเป็นระยะลุกลามแล้ว นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการอื่นๆ เช่น น้ำหนักลด อ่อนเพลีย ซีด หรือโลหิตจางโดยหาสาเหตุไม่ได้ ท้องผูก อุจจาระลำเล็กลง ปวดท้อง ท้องอืด (<http://www.dailynews.co.th>)

## 2.4 ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

([http://www.elib-online.com/doctors2/cancer\\_colon4.html](http://www.elib-online.com/doctors2/cancer_colon4.html))

ปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมีดังนี้

2.4.1 อายุ โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมากกว่าร้อยละ 90 มีอายุมากกว่า 50 ปี

(Fuchs และคณะ, 1994)

2.4.2 สมาชิกในครอบครัวมีประวัติเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

2.4.3 การมีติ่งเนื้อออกในลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal polyps) เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะไม่กลายเป็นมะเร็ง แต่ถ้าทิ้งไว้ให้มันเจริญเติบโต บนผนังของลำไส้ใหญ่ไปนานๆ แล้วบางอันก็จะกลายเป็นเนื้อร้ายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีขนาดใหญ่กว่า 1 เซนติเมตร จะมีโอกาสกลายได้มากกว่าที่มีขนาดเล็กกว่านั้นได้ โดยเฉพาะชนิด villous adenoma จะกลายเป็นมะเร็งได้ง่าย อาการแสดงออกขึ้นอยู่กับตำแหน่งของมะเร็งที่เป็นกว่าร้อยละ 50 อยู่ที่ rectum ร้อยละ 20 อยู่ที่ sigmoid colon ร้อยละ 15 อยู่ที่ right colon ร้อยละ 6-8 อยู่ที่ transverse colon ร้อยละ 6-7 อยู่ที่ descending colon และร้อยละ 1 อยู่ที่ anus

2.4.4 การบริโภคอาหารที่มีไขมัน คอเลสเตอรอล (cholesterol) และโปรตีนสูง การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ และการไม่ออกกำลังกาย มีส่วนเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรค

2.4.5 การมีประวัติเป็นโรคลำไส้ใหญ่อักเสบเรื้อรัง (chronic ulcerative colitis หรือ Crohn's disease) (Ribcero และคณะ, 1996)

2.4.6 ผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้ใหญ่อักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ (inflammatory bowel disease) มีโอกาสสูงในการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งความเสี่ยงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เป็น ความรุนแรง และระดับความผิดปกติของเยื่อลำไส้ (mucosal dysplasia)

จากปัจจัยเสี่ยงดังกล่าวควรมีการป้องกัน แม้จะยังไม่มียวิธีกำจัดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 100 แต่ก็มีวิธีลดความเสี่ยงลงได้ เช่น บริโภคอาหารที่อุดมด้วยผักและผลไม้ เพื่อให้มีเส้นใยหรือกากอาหารมากขึ้น อุจจาระจะมีขนาดโตขึ้น จนขับถ่ายง่ายขึ้น ไม่คั่งค้างในลำไส้ใหญ่นานเกินไป จนปล่อยสารเคมีที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ของเซลล์เยื่อลำไส้ใหญ่

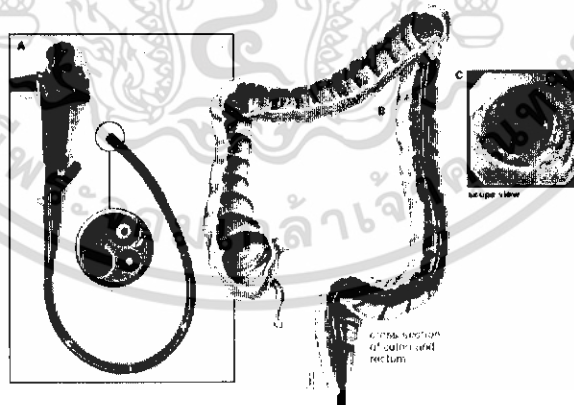
ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอจะได้ทั้งการลดความเสี่ยงต่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ และยังช่วยลดความอ้วน การใช้ฮอร์โมนเสริมในหญิงวัยหมดประจำเดือน ปัจจุบันนี้วงการแพทย์แนะนำให้คนที่มียุ 50 ปีขึ้นไปปรึกษาคุณหมอ เพื่อช่วยพิจารณาความเสี่ยงแล้วให้รับการส่องกล้องตรวจดูลำไส้ใหญ่ปีละครั้ง เพื่อตรวจคัดว่ามีมะเร็งหรือติ่งเนื้องอกหรือไม่เพื่อจะได้วินิจฉัยและรักษาให้หายขาดได้แต่เนิ่นๆ

## 2.5 วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค ([http://www.elib-online.com/doctors/cancer\\_colon.html](http://www.elib-online.com/doctors/cancer_colon.html))

การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งก่อนการเกิดอาการช่วยให้แพทย์สามารถป้องกันและรักษาได้อย่างทันท่วงที และเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดได้ยาวนานขึ้นได้ การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติในลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วิธีที่ใช้ในการตรวจหาโรคนี้นี้ (Levin, 2001)

**2.5.1 Fecal occult blood test (FOBT)** เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณเลือดน้อยๆ ที่ปนมากับอุจจาระ ในกรณีตรวจพบเลือดใช้วิธีอื่นร่วมในการหาแหล่งที่ทำให้เกิดเลือดด้วย

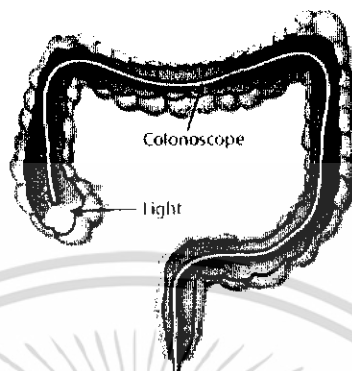
**2.5.2 Sigmoidoscopy** เป็นการตรวจโดยใช้กล้องขนาดเล็กที่เรียกว่า sigmoidoscope สอดเข้าไปดูลักษณะภายในของทวารหนักและลำไส้ใหญ่ส่วนที่เรียกว่า sigmoid เวลาสอดเข้าไปทางทวารหนัก ส่วนใหญ่จะไม่เจ็บ แต่จะรู้สึกอึดอัดอยากถ่ายอุจจาระ ก่อนส่องจะต้องสวนอุจจาระออกให้หมดจึงจะตรวจดูได้ตลอดลำไส้ตรง และลำไส้ใหญ่ส่วนซิกมอยด์ ถ้าพบติ่งเนื้องอกแพทย์ทำการผ่าตัดออก เรียกการผ่าตัดนี้ว่า polypectomy ซึ่งนำชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวไปตรวจลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อต่อไป ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Sigmoidoscope

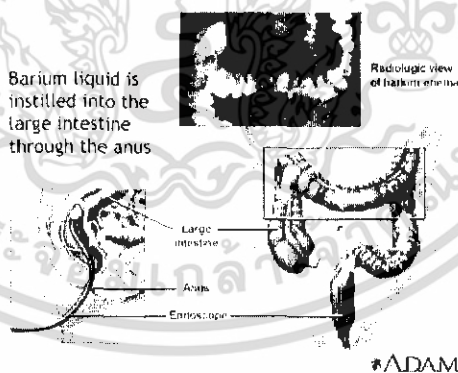
ที่มา: <http://hopskin.gi.nts.jhu.edu>

**2.5.3 Colonoscopy** เป็นการตรวจโดยใช้หลอดแสงแบบยาวที่เรียกว่า colonoscope สอดเข้าไปดูลักษณะของทวารหนักและส่วนของลำไส้ใหญ่ทั้งหมด หากพบติ่งเนื้อออกจึงทำการผ่าตัดออกเพื่อนำไปวินิจฉัยต่อไปเช่นกัน (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Colonoscope  
ที่มา: <http://gslc.genetics.utah.edu>

**2.5.4 Barium enema** การสวนแป้งแบเรียมเข้าไปฉายลำไส้ใหญ่แล้วถ่ายภาพเอกซเรย์ใช้เวลาตรวจประมาณ 30 นาที ซึ่งถ้าหากรังสีแพทย์ให้เทคนิคสวนแป้งแบเรียมร่วมกับแก๊ส คือลมเข้าไปด้วยแล้วจะเรียกว่า Double Contrast Barium Enema โดยรังสีแพทย์บางท่านบอกว่า ทำให้ภาพที่เห็นช่วยการวินิจฉัยที่แม่นยำขึ้น (รูปที่ 2.4)

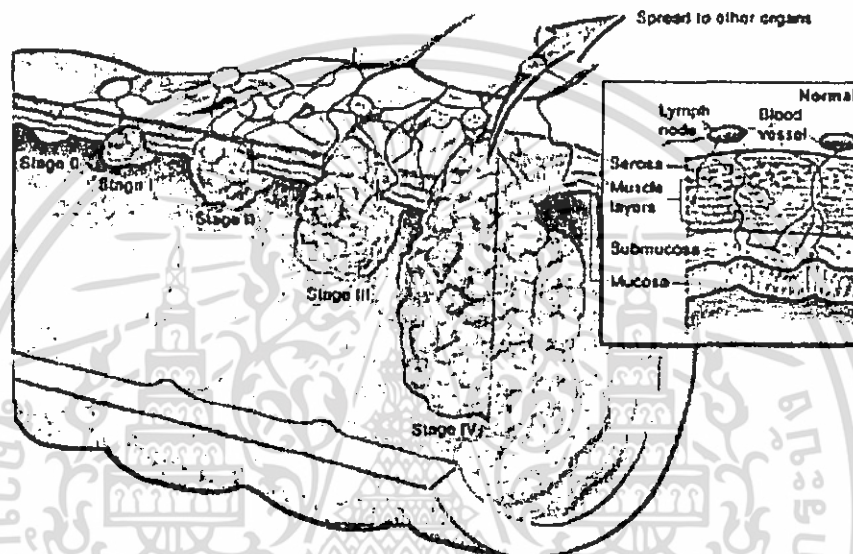


รูปที่ 2.4 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Barium enema  
ที่มา: <http://www.nlm.nih.gov>

**2.5.5 digital rectal exam (DRE)** เป็นการตรวจสอบลำไส้ใหญ่โดยตรงแพทย์ใช้นิ้วที่ใส่ถุงมือยางสอดเข้าไปในทวารหนักส่วนล่างเพื่อตรวจหาบริเวณที่ผิดปกติ จัดเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ราคาถูกและไม่เจ็บ ([http://www.elib-online.com/doctors/cancer\\_colon.html](http://www.elib-online.com/doctors/cancer_colon.html))

## 2.6 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

การแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก การจัดจำแนกแบบ Duke (Dukes' classification) คิดค้นโดย Cuthbert Duke (1930) แบ่งตามระยะการแพร่กระจายของโรค เช่นเดียวกับ The American joint committee for cancer staging and end result reporting (AJC) แบ่งระยะตามการแพร่กระจายของโรค ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงระยะต่างๆ ของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ที่มา: [www.mcb.uni-bonn.de](http://www.mcb.uni-bonn.de)

Stage 0 (Carcinoma in situ) เซลล์มะเร็งพบบริเวณผิวหนังด้านในสุดของลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก

Stage I (Dukes' A colon cancer) เซลล์มะเร็งแพร่กระจายเข้าไปในผนังชั้นในของลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก

Stage II (Dukes' B colon cancer) เซลล์มะเร็งแพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นกลางของลำไส้ใหญ่หรือแพร่กระจายเข้าไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ ลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก

Stage III (Dukes' C colon cancer) เซลล์มะเร็งแพร่กระจายจากเนื้อเยื่อชั้นในสุดของลำไส้ใหญ่ไปสู่เนื้อเยื่อชั้นกลางและกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่ใกล้เคียง

Stage IV (Dukes' D colon cancer) ระยะนี้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองไกลๆ และแพร่ไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกาย เช่น ตับหรือปอด

ระยะต่างๆ ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการดำเนินของโรค และผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากการผ่าตัด 5 ปีเป็นเท่าใด โดยในสหรัฐอเมริกาอัตราการรอดชีวิตหลังจากการผ่าตัด 5 ปีของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Gatta และคณะ, 2003) ดังนี้

Stage I	มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 96
Stage II	มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 87
Stage III	มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 55
Stage IV	มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 5

## 2.7 วิธีการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักขึ้นอยู่กับขนาดของมะเร็ง ตำแหน่ง การลุกลามของก้อนมะเร็ง และสภาวะทั่วไปของคนไข้ มีรูปแบบต่างๆ ดังนี้

**2.7.1 การผ่าตัด (Surgery)** เพื่อเอาก้อนมะเร็งออกจากร่างกายผู้ป่วย โดยจะทำการผ่าตัดเอาลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เป็นมะเร็งออกพร้อมต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้เคียง

**2.7.2 การให้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy)** โดยให้ยาต้านมะเร็งเข้าไปในกระแสเลือดเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งหรือควบคุมการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งหรือบรรเทาอาการของโรคมะเร็ง การบำบัดทางเคมีอาจใช้ร่วมกับการผ่าตัด เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็งที่หลงเหลืออยู่หลังการผ่าตัด

**2.7.3 การรักษาโดยการฉายแสง (Radiotherapy)** เป็นการรักษาเฉพาะที่จะมีผลเฉพาะบริเวณที่ได้รับรังสีเท่านั้น บ่อยครั้งที่มีการฉายแสงในคนไข้ที่เป็นโรคมะเร็งบริเวณลำไส้ตรงและทวารหนัก แพทย์อาจจะให้การฉายแสงก่อนการผ่าตัด เพื่อให้ก้อนมะเร็งมีขนาดลดลงทำให้ผ่าตัดได้ง่ายขึ้นหรือบางครั้งฉายหลังการผ่าตัดเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งที่ยังเหลือตกค้างอยู่

**2.7.4 การรักษาโดยวิธีชีววิทยา** บางครั้งเรียกว่าการรักษาด้วยการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อพบเซลล์มะเร็งในร่างกายจะทำลายเซลล์มะเร็งเหล่านั้น การรักษาด้วยวิธีนี้เพื่อซ่อมแซม กระตุ้น หรือผลักดันให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำหน้าที่ในการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยธรรมชาติ การรักษาอาจทำร่วมกับการให้เคมีบำบัดหรือการฉายแสง ส่วนใหญ่การรักษาด้วยวิธีชีววิทยามักให้โดยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ

## 2.8 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง

ในการเกิดมะเร็งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

**2.8.1 ยีนก่อมะเร็ง (Proto-oncogene)** เป็นยีนที่ทำงาน โดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้แสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดแสดงออกทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัว ดังนั้นหากเกิดการกลายพันธุ์จนยีนแสดงออกมาตลอดเวลา เซลล์จึงแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด

Oncogene เป็นยีนกลุ่มแรกๆ ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ยีนนี้พบครั้งแรกในไวรัสก่อมะเร็ง ตัวอย่างของไวรัสพวกนี้คือ Rous sarcoma virus (RSV) เมื่อเข้าไปในเซลล์แล้วใช้เอนไซม์ reverse transcriptase สร้างดีเอ็นเอขึ้นจากอาร์เอ็นเอดีเอ็นเอ นี้เรียกว่า provirus สามารถแทรกตัวเข้ากับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ ในธรรมชาติพบ RSV สองกลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า non acute virus กับกลุ่มที่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งได้เรียกว่า acute transforming virus (Klein และคณะ, 1985) จีโนมของไวรัสพวก acute transforming virus มียีนที่แตกต่างจากพวก non acute virus 1 ยีนที่ทำให้เซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งได้เรียกว่า viral oncogene หรือ v-oncogene

เมื่อศึกษาลึกลงไปพบว่า v-oncogene มีลักษณะคล้ายกับ proto-oncogene มาก มีเพียงบางส่วนของยีนที่แตกต่างกันออกไป เชื่อกันว่า v-oncogene นี้มาจาก proto oncogene ซึ่งกลายพันธุ์แล้วไวรัสนำออกจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง proto-oncogene ที่กลายพันธุ์อยู่ในเซลล์แล้วทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า cellular oncogene หรือ c-oncogene กลไกการเปลี่ยนจาก proto-oncogene เป็น oncogene นั้นเกิดขึ้นได้หลายแบบ คือ point mutation เช่นกรณีของยีน *ras* ทำให้เป็นโรคมะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ใหญ่ (<http://www2.unescobkk.org/eubios/OBN/OBNGDM.htm>) การเกิด translocation เช่นกรณีของยีน *abl* ที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (<http://www.champa.kku.ac.th/som-song/file/GenesAndCancer456-4.ppt>) overexpression of gene product สืบเนื่องจากการแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิดโปรโมเตอร์ใหม่ เช่นในยีน *mos* การแทรกตัวเข้ามาของไวรัสทำให้เกิด enhancer รวมทั้งการเพิ่มจำนวนมากๆ ของ proto-oncogene เช่นในยีน *myc* ทำให้เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อม้าน้ำเหลือง (Collier และคณะ, 2006) เป็นต้น

**2.8.2 ยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene)** เป็นยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่สำคัญคือ ยีนหยุดการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์และเมื่อใดก็ตามที่ยีนทำงานทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัว ถ้ายีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่ไม่สามารถแสดงออกได้เซลล์แบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด ตัวอย่างของยีนในกลุ่มนี้คือ ยีน *p53* พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ในระยะแรกๆ ของการเกิดมะเร็งในเนื้อเยื่อบางชนิด เช่น มะเร็งปอด หลอดอาหาร ช่องปาก ปากมดลูก เต้านม และ กระเพาะอาหารแต่ น่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลง ในระยะหลังในเนื้อเยื่อสมอง ตับ และ รังไข่ (Thongsuksai, 1999) โดยยีน *p53* เป็น tumor suppressor gene ยีนหนึ่งซึ่งสร้าง

transcription factor แสดงออกเมื่อเซลล์ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ ยีน *p53* ทำงานโดยหยุดเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายก่อนที่เข้าสู่ระยะ S ซึ่งใช้ดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหายนั้นเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ในกรณีที่ดีเอ็นเอแตกหักเสียหายจนไม่อาจซ่อมแซมให้กลับดังเดิมได้ *p53* กำหนดให้เซลล์ตาย (apoptosis) (Vogelstein และ Kinzler, 1992)

### 2.8.2.1 ยีน *p53* (<http://medinfo.psu.ac.th/smj2/171/smj1719.htm>)

การเกิดมะเร็ง เกี่ยวข้องหรือเป็นผลมาจากความผิดปกติของยีน ความผิดปกติ ของยีนอาจเกิดจากสารก่อมะเร็งภายนอกหรือเกิดจากกระบวนการภายในร่างกายเอง การศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า สารก่อ มะเร็งบางชนิดทำให้เกิดรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ค่อนข้างจำเพาะ การกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *p53* นับเป็นความผิดปกติของยีนที่พบบ่อยที่สุดชนิดหนึ่งของมะเร็ง พบประมาณร้อยละ 50 ของมะเร็งหลายชนิด โปรตีน *p53* ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนมีหน้าที่ในการควบคุมการเติบโตของเซลล์รักษาความคงสภาพของดีเอ็นเอและป้องกันการเกิดมะเร็ง การกลายพันธุ์ของยีน ทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่ดังกล่าวและมีดีเอ็นเอที่ผิดปกติสะสมมากขึ้นจนกลายเป็นมะเร็งในที่สุด ยีน *p53* เป็นยีนต้านมะเร็งที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางเป็นเวลาติดต่อกันมาหลายปีจนก่อให้เกิดฐานข้อมูลของการกลายพันธุ์ขนาดใหญ่ การวิเคราะห์ฐานข้อมูลเหล่านี้ ทำให้ความรู้ด้านอนุชีววิทยาของมะเร็งมีมากขึ้น บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพรรณนาชนิดตำแหน่งและความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *p53* และรวบรวมองค์ความรู้ด้านอนุชีววิทยาของมะเร็งที่เกิดจากการศึกษาวิเคราะห์ยีน *p53* เป็นยีนขนาด 16-20 กิโลเบส อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 17 ที่ตำแหน่ง 17p13.1 ประกอบด้วย 11 exon ผลิตภัณฑ์ของยีนคือฟอสโฟโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 393 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 53 กิโลดาลตัน ยีน *p53* เป็นยีนที่ถูกสงวนไว้ในวิวัฒนาการเนื่องจากผลการเปรียบเทียบระหว่างสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ พบว่า มีกรดอะมิโนที่เหมือนกันใน 5 บริเวณ ได้แก่ กรดอะมิโนลำดับที่ 13-19, 117-142, 171-181, 234-258, และ 270-286 ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้มีความสำคัญในการ ทำหน้าที่ของโปรตีนโครงสร้างของโปรตีน *p53* อาจแบ่งได้เป็น 3 โดเมนตามหน้าที่คือ transactivation, sequence specific binding และ oligomerization และ nuclear localization domain ยีน *p53* ถูกจัดไว้ในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง มีหน้าที่ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทำให้เซลล์หยุดวงจร (cell cycle) อยู่ที่ระยะ G1 ก่อนเข้าสู่ระยะ S ชั่วคราวเพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ได้รับอันตรายและทำให้เซลล์ตายแบบที่เรียกว่า apoptosis หากอันตรายนั้นรุนแรงเกินกว่าที่จะแก้ไขได้ การควบคุมเหล่านี้ผ่านการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *p53* กับลำดับดีเอ็นเอที่จำเพาะเป็นการควบคุมยีนเป้าหมายในระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (transcription) ยีนที่เป็นเป้าหมาย ได้แก่ *GADD45*, *MDM2*, *WAF1/Cip1* การสูญเสียหน้าที่ของ *p53* ทำให้เซลล์มีดีเอ็นเอหรือยีนที่ผิดปกติสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ จนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด *p53* gene เป็น tumor suppressor gene อีกยีนหนึ่ง ยีนนี้สร้าง transcription factor จะแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ต

โอเลต ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ขึ้น *p53* จะทำงานโดยหยุดเซลล์ไว้ที่ระยะ *G<sub>1</sub>* เพื่อซ่อมแซม ดีเอ็นเอ ที่แตกหักเสียหาย ก่อนที่จะปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะ *S* ซึ่งมีการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ ใหม่ในภาวะที่เซลล์ขาด *p53* เซลล์ไม่สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะ *G<sub>1</sub>* เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอ ที่เสียหายก่อนที่จะเข้าสู่ระยะ *S* ซึ่งใช้ ดีเอ็นเอ ที่แตกหักเสียหายนั้นเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ภาวะขาด *p53* จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังในผู้นิยมอาบแดดก็เป็นได้ เพราะ *p53* หยุดวัฏจักรเซลล์เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอไม่ยอมปล่อยให้ดีเอ็นเอที่เสียหายกลายพันธุ์ เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ บางคนจึงเรียก *p53* ว่า ผู้พิทักษ์พันธุกรรม (guardian of the genome) (<http://www.thirawat.com/ge/gecancer.html>)

### 2.8.2.1.1 โครงสร้างและหน้าที่ของยีนและโปรตีน *p53*

#### รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ในมะเร็ง

ยีน *p53* ประกอบด้วย 11 exon exon 2-11 เป็นบริเวณ ที่กำหนดรหัสของ โปรตีน ร้อยละ 95 ของการกลายพันธุ์พบอยู่บน exon 5-8 และในอินตรอนที่อยู่ระหว่างนี้ อย่างไรก็ตามตัวเลขนี้อาจสูงเกินความจริง เพราะว่าการศึกษาระยะแรกๆ รายงานว่าการกลายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่อยู่บน exon 5-8 จากข้อมูลนี้ ทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่จำกัดการศึกษาเฉพาะกับ exon 5-8 หรือ 4-9 ในการรวบรวมฐานข้อมูล โดย Greenblatt และคณะ ในปี พ.ศ. 2537 ซึ่งทำการวิเคราะห์ผลการวิจัย 50 การศึกษาที่มีการศึกษา ทุก exon พบว่า ในจำนวน 560 การกลายพันธุ์ที่พบ ร้อยละ 87 อยู่บน exon 5-8 ที่เหลือร้อยละ 8 อยู่บน exon 4 และร้อยละ 4 อยู่บน exon 10 ปัจจุบันข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ที่มีรายงานจากการศึกษาทั่วโลกถูกรวบรวมเป็นฐานข้อมูลขนาดใหญ่ บรรจุไว้ในอินเทอร์เน็ต จนบัดนี้มีข้อมูลกว่า 7,000 การกลายพันธุ์แล้ว ฐานข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์อย่างยิ่งที่จะนำไปวิเคราะห์ศึกษาทาง molecular epidemiology เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสัมผัสจากสิ่งแวดล้อมกับรูปแบบการกลายพันธุ์ที่จำเพาะ website ที่มีฐานข้อมูลเหล่านี้ได้แก่ <http://perso.curie.fr/tsoussi>, <http://www.iarc.fr> การกลายพันธุ์ที่เกิดในยีนต้นมะเร็งส่วนใหญ่เป็นชนิด nonsense, deletion หรือ insertion การกลายพันธุ์เหล่านี้ทำให้สร้างโปรตีนไม่ได้หรือได้โปรตีนที่สั้นกว่าปกติ (truncated) และสูญเสียหน้าที่ในการต้านการเกิดเนื้องอก แต่ในยีน *p53* การกลายพันธุ์ที่พบมีรูปแบบที่ต่างออกไปคือส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์ชนิด missense การกลายพันธุ์แบบนี้ยังทำให้ได้โปรตีน *p53* ขนาดเท่าเดิมแต่มีชนิดกรดอะมิโนเปลี่ยนไป กลายพันธุ์ชนิด missense พบมากในส่วนกลางของยีนมากกว่าส่วนอื่น และมีบางตำแหน่งพบมากอย่างเด่นชัดเรียกได้ว่าเป็น hot spots ซึ่งพบใน 6 ตำแหน่งคือ ที่โคดอน 175, 245, 248, 249, 273 และ 282 การกลายพันธุ์ใน 6 ตำแหน่งเหล่านี้รวมกันคิดเป็นสัดส่วนถึงร้อยละ 23 ของการกลายพันธุ์ที่พบทั้งหมด นอกจากนี้รูปแบบของการกลายพันธุ์ยังแตกต่างกันไปตามอวัยวะ ตามชนิดทางจุลพยาธิวิทยา และตามปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้อง ยีน *p53* เป็นยีนที่มีความเหมาะสมมากในการที่จะวิเคราะห์ รูปแบบการกระจายของการกลายพันธุ์

มีเหตุผลหลายประการที่เป็นเช่นนั้น ประการแรก *p53* เป็นยีนที่พบความผิดปกติได้บ่อยในมะเร็งหลายชนิด ทำให้มีข้อมูลสะสมจำนวนมากพอที่จะทำการวิเคราะห์และทดสอบทางสถิติ ประการที่สอง *p53* เป็นยีนที่มีขนาดปานกลาง ทำให้สามารถทำการศึกษาค้นคว้าได้ทั้งยีน ประการที่สาม *p53* เป็นยีนที่ถูกรักษาไว้ในวิวัฒนาการของสัตว์ชั้นสูง ทำให้สามารถศึกษาและนำผลการศึกษามาใช้กับสัตว์ทดลองไปอธิบายในคน และประการที่สี่การกลายพันธุ์ของ *p53* กระจายไปทั่วยีนโดยเฉพาะบริเวณส่วนกลางของโมเลกุลซึ่งพบว่าเป็นส่วนสำคัญในการทำหน้าที่ของยีน ดังนั้นตำแหน่งและชนิดของการกลายพันธุ์อาจมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน การวิเคราะห์รูปแบบการกลายพันธุ์จะทำให้เข้าใจความสัมพันธ์นี้มากขึ้น

#### 2.8.2.1.2 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *p53* กับอณูชีววิทยาของมะเร็ง

##### การสังเคราะห์และซ่อมแซมดีเอ็นเอ

เนื่องจากสิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องเผชิญกับสารที่อาจทำอันตรายดีเอ็นเอทั้งจากภายนอกและจากกระบวนการภายในร่างกายตลอดเวลา เซลล์จึงต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอดโดยมีกลไกในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า (1) การซ่อมแซมดีเอ็นเอ ในยีนที่มีกิจกรรมมากหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนอื่นเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่ายีนอื่น เช่น พบว่ายีน *p53* ถูกซ่อมแซมเร็วกว่ายีน *dhfr* (2) การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่ใช้อ่านเป็นแม่พิมพ์โปรตีน (transcribed หรือ template strand) เป็นไปอย่างรวดเร็วกว่าสายดีเอ็นเอที่ไม่ถูกอ่าน (nontranscribed หรือ coding strand) และ (3) ผลการศึกษาในเซลล์และสัตว์ทดลองพบว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารก่อมะเร็งภายนอกมักจะเกิดบนสาย nontranscribed เช่นที่พบในยีน *dhfr*, *hprt*, และ *p53* ความลำเอียงนี้น่าจะเป็นผลจากวิวัฒนาการการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด โดยพยายามที่จะรักษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนที่สำคัญให้ยังคงอยู่ระยะหนึ่ง ส่วนการซ่อมแซมความผิดปกติบนสาย nontranscribed รอไว้ทีหลัง

รูปแบบการแทนที่ของเบสที่มักพบความลำเอียงที่จะเกิดบนสาย nontranscribed ได้บ่อยได้แก่ G->T, T->G, nonCpG G->A, และ A->G3 รูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *p53* ก็สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า มะเร็งที่สัมพันธ์กับสารก่อมะเร็งภายนอกมีส่วนของการกลายพันธุ์บนสาย nontranscribed มากกว่ามะเร็งชนิดอื่น จะเห็นว่ามะเร็งปอด หลอดอาหาร และมะเร็งของศีรษะและคอซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่ และมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma ซึ่งสัมพันธ์กับ aflatoxin B1 มีสัดส่วนการกลายพันธุ์บนสาย nontranscribed มากกว่ามะเร็งอื่นๆ และผูกพันกับสัดส่วนการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง CpG dinucleotide ซึ่งบ่งว่าเป็นผลจากการกลายพันธุ์ที่เกิดจากกระบวนการภายในร่างกาย

### 2.8.2.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของ โปรตีน p53

จากผลการศึกษาที่เพิ่มพูนขึ้น ทำให้เกิดข้อสังเกตว่าการกลายพันธุ์บางชนิดและบางตำแหน่งโดยเฉพาะการกลายพันธุ์ชนิด missense ที่เกิดในบริเวณส่วนกลางของยีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ (conformation) ของโปรตีน ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงาน ทำให้อาจมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง hot spots พบว่าเกิดตรงตำแหน่ง CpG ที่โคดอนซึ่งกำหนดกรดอะมิโน arginine ตำแหน่งเหล่านี้มีความสำคัญในการรักษาพื้นผิวของโมเลกุลที่เป็นที่เกาะของโปรตีน p53 กับดีเอ็นเอเป้าหมายความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่นี้ได้รับการสนับสนุนให้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางผลึกของโปรตีนกับการกระจายของการกลายพันธุ์

นอกจากนี้ความสำคัญของโครงสร้างทุติยภูมิต่อหน้าที่ของ p53 ยังแสดงให้เห็นจากผลการศึกษาซึ่งใช้เซลล์ที่มีโปรตีน p53 ที่เกิดจากยีนกลายพันธุ์ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยจะเปลี่ยนโครงสร้างทุติยภูมิจากโมเลกุลปกติที่ 32 องศาเซลเซียสไปเป็นโมเลกุลกลายพันธุ์ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าโมเลกุลที่ 37 องศาเซลเซียส สูญเสียหน้าที่ในการจับกับลำดับจำเพาะบนดีเอ็นเอเป้าหมาย

### 2.8.2.1.4 รูปแบบการกลายพันธุ์กับวิวัฒนาการของยีน p53

การศึกษาเปรียบเทียบโปรตีน p53 ในสัตว์ชั้นสูงพบว่า มีกรดอะมิโน 96 ใน 393 ตัวของโปรตีนจากคน พบเหมือนกันกับสัตว์อื่น และส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนในลำดับที่ 97-2933 ดังนั้น กรดอะมิโนในบริเวณนี้ น่าจะมีความสำคัญต่อหน้าที่การทำงานของโปรตีน จึงยังคงสงวนไว้ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ผลการวิเคราะห์รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน p53 ก็สนับสนุนสมมุติฐานนี้ โดยพบว่าการกลายพันธุ์ชนิด missense เป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ ที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 80 ในบริเวณ exon 5-8 ซึ่งกำหนด กรดอะมิโนลำดับที่ 100-293 แต่พบเพียงร้อยละ 46 ในช่วง exon 2-4 และร้อยละ 23 ในช่วง exon 9-114 การพบสัดส่วน การกลายพันธุ์ชนิด missense ได้น้อยใน 2 ปลายนี้สนับสนุนว่า ในบริเวณนี้การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวไม่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่หรือโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน นอกจากนี้กรดอะมิโนในช่วง exon 5-8 ที่ไม่มีการสงวนไว้ในวิวัฒนาการ พบว่ามีการกลายพันธุ์ชนิด missense ได้น้อยด้วย

นอกจากนี้ความสำคัญของกรดอะมิโนในบริเวณที่สงวนไว้ ในวิวัฒนาการได้รับการยืนยันจากผลการศึกษาหลายๆ ทางว่า บริเวณนี้มีหน้าที่เกี่ยวกับการจับกับลำดับจำเพาะบนดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งเป็นหน้าที่หลัก และจำเพาะของ p53 ส่วนปลายด้าน NH<sub>2</sub> และ carboxy ซึ่งมีความสำคัญในวิวัฒนาการน้อยกว่า มีหน้าที่เกี่ยวกับ transcription, nuclear localization และ oligomerization ซึ่งเป็นหน้าที่ที่ไม่จำเพาะ และไม่มีผลกระทบต่อหน้าที่ไปมากนักเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนไปเพียงตัวเดียว

### 2.8.2.1.5 p53 กับกระบวนการเกิดมะเร็ง

รูปแบบการกระจาย และความถี่ของการกลายพันธุ์ของ ยีน p53 ในตำแหน่งต่างๆทำให้เกิดคำถามในแง่ กระบวนการเกิดมะเร็งหลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงในเส้นทางการทำงานของ p53 เป็นสิ่งจำเป็น ก่อนการกลายเป็นเซลล์มะเร็งหรือไม่ คำถามนี้เกิดเพราะ ถึงแม้จะพบการกลายพันธุ์ของยีน p53 ใน มะเร็งเกือบทุกชนิด ทุกอวัยวะ แต่สัดส่วนที่พบก็อยู่ในช่วงร้อยละ 30-50 เท่านั้น ก่อให้เกิดคำถามตามมา เกี่ยวกับความสำคัญและความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน p53 ในตำแหน่งที่ไม่ค่อยได้รับ การศึกษา หรือความผิดปกติของยีนหรือโปรตีนอื่นในเส้นทางการทำงานของยีน p53 หรือยีน p53 เป็นแค่หนึ่งในหลาย กลไกที่จำเป็นต่อการกลายเป็นมะเร็ง ดังเช่นการที่พบการกลายพันธุ์ของ ยีน *ras* ได้บ่อยเช่นกันในเนื้องอก โดยไม่ได้สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน p53 ถ้าเป็นดังนั้นจริง แสดงว่าการเกิดมะเร็งต้องอาศัย ความผิดปกติหลายๆ ประการและประการหนึ่งคือ การกลายพันธุ์ของยีน p53

#### Multistep carcinogenesis

มีเนื้องอกหลายชนิดที่เกิดผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นขั้นตอน โดยแสดงเป็นลักษณะทางพยาธิสภาพ ที่แตกต่างกันเป็นระยะต่างๆ เช่น adenoma ไปเป็น carcinoma ของลำไส้ใหญ่ หรือ dysplasia ไปเป็น carcinoma ของเยื่อช่องปากและหลอดลม ทำให้เราสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน p53 เป็นระยะ พบว่า การกลายพันธุ์ของยีน p53 น่าจะเกิดในระยะแรกๆ ของการเกิดมะเร็งในเนื้องอกบางชนิด เช่น มะเร็งปอด หลอดอาหาร ช่องปาก ปากมดลูก เต้านม และกระเพาะอาหารแต่น่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลง ในระยะหลังในเนื้องอกสมอง ตับ และ รังไข่

ตัวอย่างการศึกษาเหล่านี้ได้แก่ การไม่พบการแสดงออกของโปรตีน p53 ที่ผิดปกติในเยื่อหลอดลมที่ปกติ แต่พบการแสดงออกร้อยละ 7 ในเซลล์เยื่อหลอดลมที่เปลี่ยนไปเป็น ชนิด squamous ร้อยละ 25 ในเยื่อที่ผิดปกติระดับต้น (mild dysplasia) ร้อยละ 57 ในเยื่อที่เป็นมะเร็งระดับต้น (carcinoma in situ) ร้อยละ 70 ในมะเร็งเริ่มลุกลาม และร้อยละ 76 ในเซลล์มะเร็งที่มีการลุกลามชัดเจน ผลการศึกษานี้ สนับสนุน multistage model ของการเกิดมะเร็งปอดชนิด squamous cell carcinoma การศึกษาใน ทำนองเดียวกันในหลอดอาหาร และช่องปาก ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ความรู้เหล่านี้ อาจนำมาซึ่งการ ใช้การเปลี่ยนแปลงของยีน p53 ในการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง การป้องกันและการตรวจหา มะเร็งระยะเริ่มแรก

#### Tumor progression and prognosis

ลักษณะของเนื้องอกทางจุลพยาธิวิทยาและเซลล์วิทยาเช่น การแบ่งระดับทางจุลพยาธิวิทยา และการแสดงออกของ แอนติเจนบางชนิด เป็นปัจจัยที่ใช้บอกพฤติกรรม และพยากรณ์ของมะเร็งได้ การศึกษาต่อมาพบว่า ปัจจัยเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของยีน p53 และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่ กระจาย เช่นยีน *nm23*, ยีน *RB* และยีน *ras* ทำให้ความเข้าใจในเรื่อง

พฤติกรรมการเติบโตและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระดับยีนมีมากขึ้น ความรู้นี้ก็นำมาซึ่งแนวทางใหม่ ในการประเมินพยากรณ์โรค และการตอบสนองต่อการรักษาของมะเร็งได้

เนื้องอกที่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *p53* กับมะเร็ง ในระยะลุกลาม ได้แก่ เนื้องอกของเยื่อโพรงมดลูก รังไข่ ตับ กระเพาะปัสสาวะ ต่อมลูกหมาก และสมอง แสดงว่าในเนื้องอกเหล่านี้ความผิดปกติของ *p53* อาจเกิดในระยะหลัง และเป็นปัจจัย ที่ทำให้มะเร็งเติบโตมากขึ้น การศึกษาในเนื้องอกสมอง เป็นต้น แบบชัดเจนที่แสดงถึงบทบาทของ *p53* ใน tumor progression และ clonal differentiation โดยพบว่า low grade glioma ซึ่งเป็นเนื้องอกที่โตช้า อาจเปลี่ยนไปเป็น high grade glioma ซึ่งเป็นเนื้องอกที่โตเร็ว และทำให้ตายเร็ว เมื่อมีการกลายพันธุ์ของ ยีน *p53*

#### **p53 mutations as mutagen fingerprint**

ผลการศึกษาจากแบบทดลองในสัตว์พบว่า สารก่อมะเร็งบางชนิด ทำให้เกิดรูปแบบการกลายพันธุ์ที่จำเพาะเสมือนหนึ่งเป็นการประทับรอยนิ้ว (fingerprint) เอาไว้บนดีเอ็นเอ รูปแบบการกลายพันธุ์ในเนื้อเยื่อมะเร็งจากคนที่พบลักษณะดังกล่าวในมะเร็ง บางชนิดที่ชัดเจนมากที่สุดคือมะเร็งปอดที่เกิดจากบุหรี่ มะเร็งตับที่เกิดจาก aflatoxin B1 และมะเร็งผิวหนังที่เกิดจากแสงอาทิตย์ อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ที่พบในเนื้องอก ส่วนใหญ่มีรูปแบบที่ซับซ้อนและค่อนข้างหลากหลาย ไม่จำเพาะเจาะจงเหมือนที่พบในมะเร็งทั้งสาม ชนิดนี้ ที่เป็นเช่นนี้ ประการหนึ่งน่าจะเป็นเพราะความซับซ้อนและหลากหลายของสิ่งสัมผัสในสิ่งแวดล้อม (<http://medinfo.psu.ac.th/smj2/171/smj1719.htm>)

#### **2.8.2.2 DPC4**

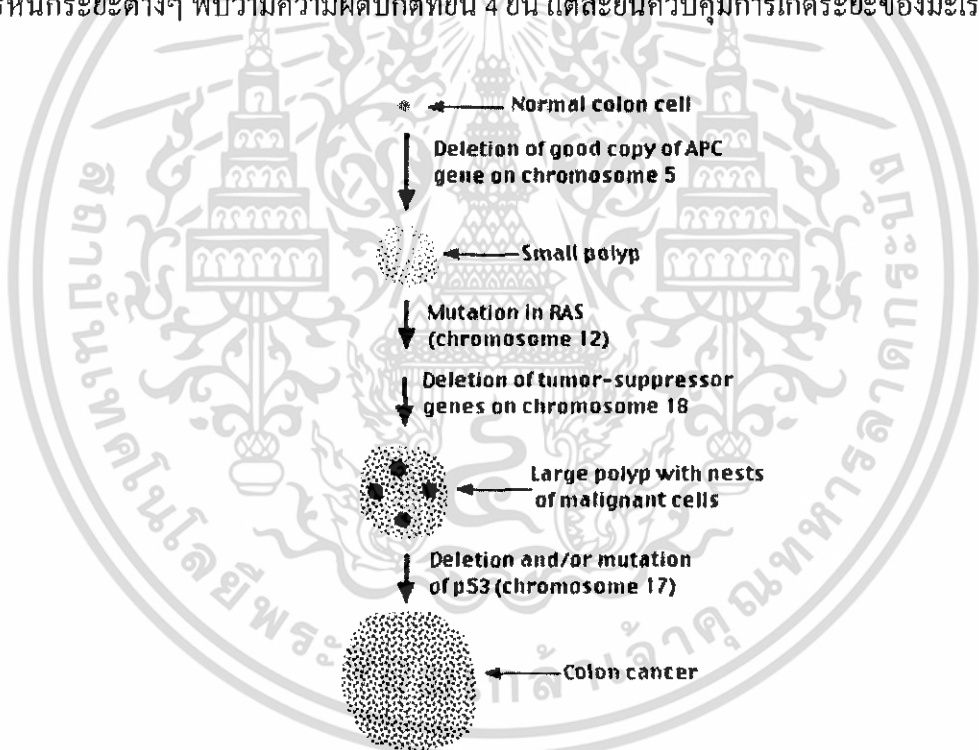
ชื่อเต็มคือ Deleted in pancreatic carcinoma ตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง 18q21 มีความสามารถในการยับยั้งการกลาย (mutation) ในการเกิดมะเร็งตับอ่อน พบว่ายีน *DPC4* เกิดการไม่แสดงออก 55% ในมะเร็งตับอ่อน และพบในมะเร็งลำไส้ใหญ่ประมาณร้อยละ 10-20 ยีน *DPC4* เป็นสมาชิกของ SMAD family ซึ่งเป็น downstream mediator ใน transforming growth factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) signaling pathway ซึ่งเป็นวิถีที่ควบคุมการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์หลายชนิด ในการเกิดมะเร็ง การเกิดการกลายจะทำให้เซลล์ไม่ตอบสนองกับวิถี TGF-  $\beta$  signaling pathway ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ และทำให้เป็นมะเร็งมากขึ้น การขาดหายไปของยีน *DPC4* เป็นขั้นตอนหลักในการพัฒนาของมะเร็ง การกลายมักเกิดขึ้นใน 6 จาก 11 exon และการกลายมักเกิดขึ้นต่างกันไปในแต่ละบุคคล แต่การกลายจำนวนมากไม่ใช่การถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Hadzija และคณะ, 2003)

2.8.2.3 D18S363

เป็น microsatellite markers ตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง 18q21 ใกล้กับยีน *DPC4* มีขนาด 177-247 คู่เบส ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล (Hadzija และคณะ, 2003)

2.9 กระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

เซลล์มะเร็งมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ คือมีความสามารถแพร่กระจายจากแหล่งกำเนิดไปยังอวัยวะที่อยู่ห่างไกลได้ มะเร็งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ โดยต้องมีการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ครั้ง โดยการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อ Fearon และ Vogelstein (1990) เสนอกลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน (A genetic model for colorectal tumorigenesis) จากการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะต่างๆ พบว่ามีความผิดปกติที่ยีน 4 ยีน แต่ละยีนควบคุมการเกิดระยะของมะเร็งที่



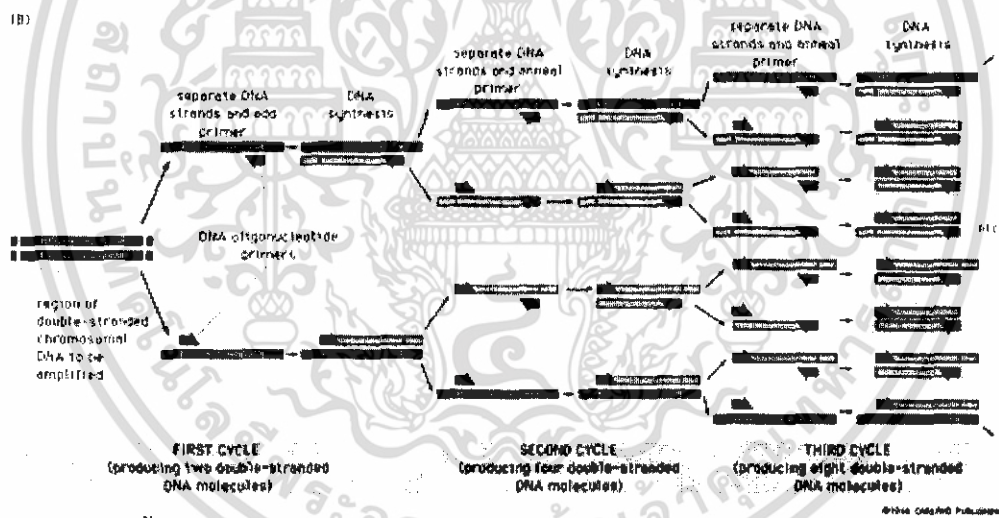
รูปที่ 2.6 กระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ที่มา: [www.cancersupportivecare.com](http://www.cancersupportivecare.com)

แตกต่างกัน เริ่มจากการกลายพันธุ์ของยีน *APC* (adenomatous polyposis coli) ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 5 ทำให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติเกิดเป็นก้อนเนื้องอกแบบไม่ร้ายแรง (benign adenoma) ต่อมาเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *k-ras* ซึ่งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 12 ก้อนเนื้องอกเปลี่ยนเป็นแบบที่ดูร้ายแรงขึ้น และเมื่อมีการสูญเสียการ

ทำงานของยีน *DCC* (deleted in colorectal cancer) ซึ่งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 18 ก่อนเนื้องอกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้องอกที่มีผิวยื่นขรุขระของ villi ซึ่งเป็นลักษณะที่ร้ายแรงขึ้นมาอีก จนกระทั่งมีการสูญเสียการทำงานของยีน *p53* บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 17 (Isobe และคณะ, 1986) ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเปลี่ยนสถานะ G1/S transition ของวัฏจักรเซลล์ก่อนเนื้องอกนั้นจึงกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (รูปที่ 2.6)

**2.10 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR)**

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นเทคนิคใหม่ทางทางด้านอณูชีววิทยาโมเลกุล เป็นวิธีเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง (in vitro) เนื่องจากยีนแต่ละชนิดมีจำนวนน้อยในจีโนม ดังนั้นถ้าศึกษายีนใดๆ ต้องมีวิธีเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอชิ้นนั้นให้มากขึ้นเพื่อให้มีปริมาณที่พอเพียงในการนำมาทำการทดลองต่างๆ ได้ วิธีปกติที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการคือ การโคลนนิ่งซึ่งทำได้ยาก มีหลายขั้นตอน และใช้เวลานาน แต่วิธีพีซีอาร์สามารถทำให้ศึกษาชิ้นต่างๆ ได้ง่ายขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างไม่จำกัดจำนวน (ทวิศักดิ์, 2541)



รูปที่ 2.7 แสดงขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ที่มา: [http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA technology.htm](http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA%20technology.htm)

วิธีการพีซีอาร์คิดค้นโดย Kary B. Mullis นักเคมีวิเคราะห์ชาวอเมริกัน ในปี ค.ศ. 1985 โดยพีซีอาร์มีทฤษฎีคล้ายกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในเซลล์ (DNA replication) กล่าวคือ เป็นวิธีการที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) สร้างดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบโดยการต่อสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (oligonucleotide primer) แต่กระบวนการพีซีอาร์อาศัย oligonucleotide primer 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจับกัน (anneal) กับดีเอ็นเอเส้นตรงข้าม เนื่องจากมีเบสคู่สมกัน (complementary) โดยไพร์เมอร์หันปลายด้าน 3'-OH ของไพร์เมอร์เข้าหากัน ถ้ามีเอนไซม์ดี

เอ็นเอโพลีเมอร์สทำให้เกิดการสร้างดีเอ็นเอขึ้นโดยการต่อปลายจากไพรเมอร์ทั้งสองเส้น ตามดีเอ็นเอต้นแบบจนกระทั่งสุดปลายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการสร้างดีเอ็นเอทำได้ในทิศทางเดียว คือ จาก 5' ไปยัง 3' ผลที่ได้คือดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ที่เกิดจากดีเอ็นเอต้นแบบ การสร้างดีเอ็นเอซ้ำอีกได้โดยการนำปฏิกิริยามาทำที่ร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นการแยกดีเอ็นเอเส้นคู่ที่ได้ใหม่ให้เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ถ้าลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสม คือ ที่อุณหภูมิซึ่งไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งเส้นเก่าและเส้นที่สร้างใหม่ จากนั้นดีเอ็นเอโพลีเมอร์สสร้างดีเอ็นเอขึ้นมาโดยอาศัยวิธีการเป็นรอบๆ ซ้ำๆ กัน (รูปที่ 2.7) กล่าวคือทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบกลายเป็นเส้นเดี่ยวให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอและการสร้างดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์สในที่สุดได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็นทวีคูณ ถ้าทำแบบนี้ 20 รอบได้ดีเอ็นเอจำนวนประมาณ 1 ล้านเท่า นั่นคือสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการได้ เอนไซม์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์นั้นต้องทนความร้อนได้คือนั่นคือ Taq polymerase ในอดีตการทำพีซีอาร์ใช้อ่างน้ำ 3 ใบ ปัจจุบันนี้การทำพีซีอาร์ใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถตั้งโปรแกรมการทำงานให้เป็นรอบๆ ได้ การทำพีซีอาร์ทำได้โดยการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนเป็นที่เรียบร้อยแล้วซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ dNTP บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แมกนีเซียมคลอไรด์ และเอนไซม์ Taq polymerase

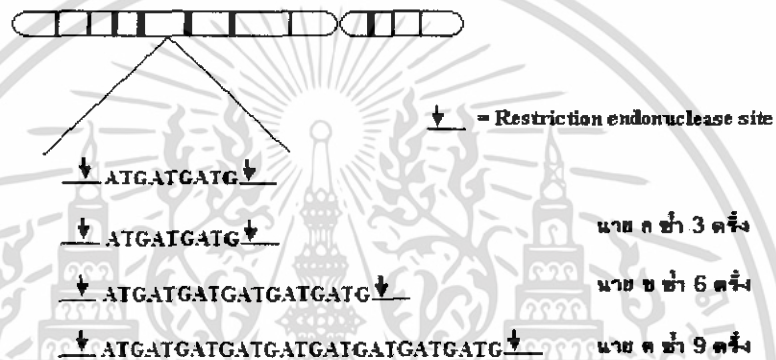
## 2.11 Variable Number Tandem Repeats (VNTRs) (<http://www.thirawat.com/ge/DNAevid.html>)

คนแต่ละคนมีลักษณะเฉพาะตัวที่ไม่เหมือนกับใครในโลก เว้นไว้ก็แต่กรณีที่เป็นแฝดเหมือนกัน (Identical twin) เท่านั้น ลักษณะต่าง ๆ ของคนถูกกำหนดขึ้นโดยยีน หรือข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งก็คือ ดีเอ็นเอที่แต่ละคนได้รับมาในสัดส่วนครึ่งหนึ่งจากพ่อ และอีกครึ่งหนึ่งมาจากแม่ เซลล์ร่างกาย (Somatic cell) ทุกเซลล์มีดีเอ็นเอที่เหมือนกันและเท่ากัน เมื่อพิจารณาโมเลกุลของดีเอ็นเอแล้ว พบว่าเนื้อหาลำดับของดีเอ็นเอมนุษย์ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีเพียงสามล้านคู่เบส หรือร้อยละ 0.10 ของดีเอ็นเอทั้งหมดเท่านั้น ที่มีความแตกต่างกันอันเป็นลักษณะเฉพาะบุคคล และตรงส่วนที่แตกต่างกันนี้เองมีความสำคัญ เพราะสามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นวัตถุพยาน (DNA evidence) เพื่อการพิสูจน์บุคคลในทางนิติวิทยาศาสตร์ได้บริเวณของดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันเรียกว่า Polymorphic regions แบ่งออกได้เป็นสองแบบคือ

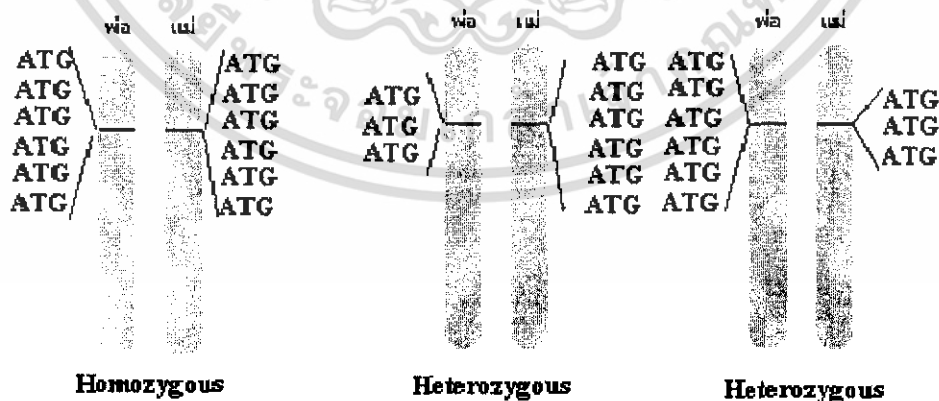
1. **Sequence polymorphisms** หมายถึงความแตกต่างกันหนึ่งหรือสองเบสภายในเนื้อยีน เนื้อหาลำดับนี้เป็นข้อมูลสำหรับการสร้างโปรตีน โดยผ่านกระบวนการ transcription และ translation เนื้อยีนมีสัดส่วนเพียงร้อยละ 5 ของดีเอ็นเอทั้งหมดเท่านั้น Sequence polymorphism ไม่ค่อยมีประโยชน์สำหรับการพิสูจน์บุคคลในทางนิติวิทยาศาสตร์

2. Length polymorphisms หมายถึงส่วนของดีเอ็นเออยู่ในบริเวณ non-coding region เป็นช่วงดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกัน เนื่องจากภายในส่วนนี้มีลำดับเบสซ้ำๆ (repetitive sequence) แทรกอยู่ในเนื้อดีเอ็นเอต่อเนื่องกันเป็นแถว ตั้งแต่ 2 ถึง 30 ครั้ง ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดีเอ็นเอบริเวณนี้เรียกว่า variable number tandem repeats (VNTRs) ซึ่งอาจพบตรงที่ได้ก็ได้ในเนื้อโครโมโซม และแต่ละบุคคลอาจมีจำนวนการซ้ำไม่เท่ากันก็ได้ (รูปที่ 2.8)

ชิ้น DNA ที่ตัดออกมาด้วย restriction endonuclease ชนิดเดียวกัน มีความยาวแตกต่างกัน ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอขึ้นกับจำนวนครั้งการซ้ำของ repetitive sequence ซึ่งอยู่ระหว่างตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ VNTRs ที่พึงประสงค์ในฐานะวัตถุพยานคือ VNTRs ที่ตรงตำแหน่งจำเพาะบนโครโมโซม (loci) ของแต่ละคนมีจำนวนครั้งการซ้ำไม่เท่ากัน



รูปที่ 2.8 แสดงตำแหน่ง VNTRs บนโครโมโซม ซึ่งแต่ละคนอาจมีการซ้ำกันของ repetitive sequence ไม่เท่ากัน เมื่อตัดดีเอ็นเอด้วย restriction endonuclease ชนิดเดียวกัน ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกัน



รูปที่ 2.9 แสดงตำแหน่งบนโครโมโซม (loci) ของบุคคลที่มีจำนวนครั้งการซ้ำของ repetitive sequence แตกต่างกัน

คนแต่ละคนมีดีเอ็นเออยู่สองชุด ทั้งนี้เป็นเพราะเราเป็นสิ่งมีชีวิตประเภท diploid ดีเอ็นเอทั้งสองชุดนั้นชุดหนึ่งได้มาจากพ่อโดยฝากมากับตัวอสุจิ ส่วนอีกชุดหนึ่งได้มาจากแม่ซึ่งก็คือโครโมโซมชุดที่อยู่ในไข่ ดังนั้นเมื่อพิจารณาแต่ละ locus บน homologous chromosome แล้ว มนุษย์มีจำนวน VNTRs อยู่สองชุด ซึ่งอาจเหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ หากทั้งสองชุดนั้นเหมือนกันเรียกว่าเขาเป็น homozygote สำหรับ locus นั้น แต่ถ้าแตกต่างกันเป็น heterozygote ดังนั้น VNTRs จึงเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อแม่สู่ลูกหลานได้เหมือนกับยีนอื่นๆ

(<http://www.thirawat.com/ge/DNAevid.html>)

## 2.12 Loss of Heterozygosity (LOH)

จีโนไทป์เป็นรูปแบบของอัลลีลที่อยู่ด้วยกันเป็นคู่ๆ ชนิดของจีโนไทป์มี 2 แบบ

1. Homozygous อัลลีลทั้งสองเหมือนกัน ซึ่งอาจแบ่งย่อยเป็น Homozygous dominant เมื่ออัลลีลทั้งสอง เป็นลักษณะข่มหรือ Homozygous recessive เมื่ออัลลีลทั้งสอง เป็นลักษณะด้อย

2. Heterozygous เมื่ออัลลีลทั้งสองต่างกัน (พรธณี, 2545)

ยีนต้านมะเร็งเป็นกลุ่มยีนซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และการกระตุ้นให้เซลล์มีการพัฒนาเฉพาะ (differentiation) เมื่อยีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่การทำงานของทั้งสองอัลลีล ก็จะทำให้การยับยั้งการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และการกระตุ้นให้เซลล์มีการพัฒนาเฉพาะที่เสียไปจนเกิดมะเร็งขึ้น ในการสูญเสียหน้าที่ทั้งสองอัลลีล มีลักษณะเป็น 2 ขั้นตอน โดยที่ขั้นตอนที่ 2 เป็นการสูญเสียโครโมโซมที่ปกติในลักษณะต่างๆ เช่น deletion, chromosome loss, mitotic recombination, gene conversion เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ shot tandem repeats ข้างเคียงยีนนั้นๆ เสียอัลลีลไป 1 อัลลีล จึงทำให้เดิมที่เป็น heterozygote จะเหลือเพียง 1 อัลลีล เป็น hemizygote หรือ homozygote เรียกว่าเกิด LOH ขึ้น ดังรูปที่ 2.10 (อภิวัฒน์, 2539)

### กลไกการเกิด LOH

1. การขาดหายไป (deletion)

- การขาดหายไปของอัลลีลที่ปกติ
- การขาดหายไปของแขนของโครโมโซมที่มีอัลลีลที่ปกติ
- การหายไปทั้งแห่งของโครโมโซมที่มีอัลลีลที่ปกติ

2. X-inactivation ในผู้หญิงที่โครโมโซม X ที่มีอัลลีลปกติ

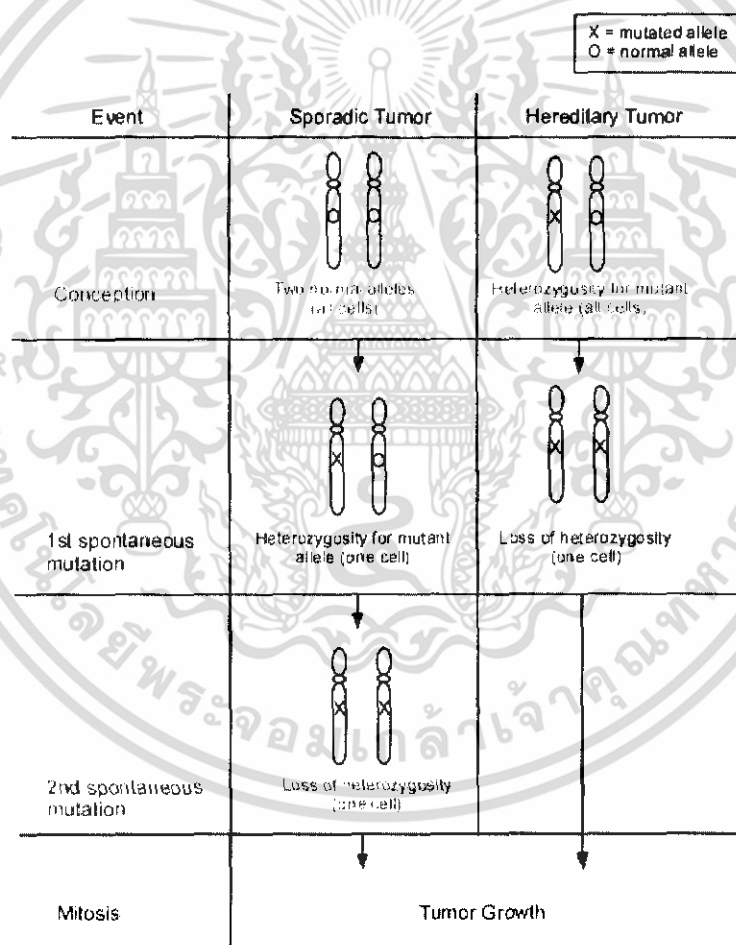
3. การหายไปของโครโมโซมที่มีอัลลีลปกติแล้วเกิดการจำลองตัวของโครโมโซมที่มีอัลลีลที่เกิดการกลาย

4. Mitotic recombination การเกิด crossing over ของ sister chromatid ในการแบ่งเซลล์

แบบ Mitosis อาจเกิดการแลกเปลี่ยนอัลลีล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์

ผลจากข้อ 3 และ 4 ทำให้เซลล์มียีนที่เกิดจากการกลายทั้งสองอัลลีล ซึ่งเรียกว่า reduction to homozygosity การเกิดการกลายไม่ใช่วิถีเดียวที่จะทำให้ tumor suppressor gene ไม่ทำงานการทำงานของยีนสามารถถูกขัดขวางได้โดยการเติมหมู่เมทิล (methylation) ที่โปรโมเตอร์ของยีน (<http://users.rcn.com>)

การเกิด LOH สามารถเห็นได้ชัดเจนในมะเร็ง โดยจะพบ heterozygosity ที่ตำแหน่งของสารพันธุกรรมในดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับมาจากพ่อแม่ และพบการขาดหายไปของตำแหน่งของสารพันธุกรรมในเซลล์มะเร็ง มักใช้ polymorphic marker เช่น microsatellites หรือ single nucleotide polymorphism ในยีนที่เป็น heterozygosity (อภิวัฒน์, 2539)



รูปที่ 2.10 แสดงการเกิด LOH ในมะเร็งที่ไม่ได้เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและที่เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

ที่มา: <http://www.genetests.org/query?iglossid=117>

## 2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Poeaim และคณะ (2005) ได้ศึกษาถึงความผิดปกติหรือตำแหน่งที่มีโอกาสเกิดการกลายทั้งจีโนมนิยมศึกษาด้วยเทคนิค Comparative Genomic Hybridization (CGH) สำหรับประเทศไทยนั้นมีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าโครโมโซมแท่งที่ 20q, 8q, 19q และ 19p มีการเพิ่มขึ้นของโครโมโซม ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 18q (25%), 4q (20%) มีการขาดหายไปของโครโมโซม จะเห็นว่าการขาดหายไปของคู่โครโมโซม 18q มีถึง 25% จึงน่าจะมียีนเอหรือยีนที่มีความสำคัญอยู่ เช่น *DPC4*, *DCC* และ *APC* เป็นต้น โดยยีน *DPC4* (Deleted in Pancreatic Cancer locus 4) Barbera และคณะ (2000) และ Koyama และคณะ (1999) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาการกลายของยีน *DPC4* และหรือยีนหรือตำแหน่งของดีเอ็นเอบนโครโมโซม 18 ด้วยเทคนิค LOH Kapitanovic และคณะ (2004) ได้ศึกษาดำแหน่งของยีน *APC* ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 73 ตัวอย่าง พบว่าเกิด LOH ใน Dukes' B ร้อยละ 55.6% และเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งร้อยละ 42.9

โดย Hadzija และคณะ (2003) ได้ศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชาวโครเอเชียจำนวน 60 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์พบความผิดปกติของโครโมโซมโดยที่มีการขาดหายไปทั้งแท่งหรือบางส่วนของแขนโครโมโซมคู่ที่ 1p, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10, 17p และ 18q ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

Woodford-Richens และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ ด้วยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) พบการหายไปของอัลลีลที่บริเวณ *SMAD4* บนโครโมโซมแท่งที่ 18q ในเนื้อเยื่อซึ่งได้จาก Juvenile Polyposis Syndrome

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยคนเดียวกันในประเทศไทย จำนวน 26 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศชาย 14 ตัวอย่าง และหญิง 12 ตัวอย่าง กระจายโดยเพศ อายุ และระยะ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

#### 3.2 ตำแหน่งยีนที่ต้องการศึกษา

3.2.1 *p53*

3.2.2 *DPC4* exon 2

3.2.3 *DPC4* exon 11

3.2.3 D18S363

โดยใช้ไพรเมอร์ของ Invitrogen (*DPC4* exon 2, *DPC4* exon 11 และ D18S363) ซึ่งได้จากการทดลองของ Hadzija และคณะ (2003) และ Prologo (*p53*) ซึ่งได้จากการทดลองของ กฤตพงศ์ และคณะ (2547) ดังตารางที่ 3.3

#### 3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin

3.3.1.1 หลอดทดลอง ขนาด 1.5 ไมโครลิตร

3.3.1.1 Buffer T1

3.3.1.2 Proteinase K

3.3.1.3 Buffer B3

3.3.1.4 Ethanol

3.3.1.5 Nucleospin tissue column

3.3.1.4 Buffer BW

3.3.1.5 Buffer B5

3.3.1.6 Buffer BE

3.3.1.7 งานเพาะเชื้อ

3.3.1.8 ไขมีด โคน

### 3.3.2 การทำปฏิกิริยาอุกโซ่โพลีเมอเรส

ใน PCR reaction mixture ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

#### 3.3.2.1 สารเคมี

#### ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาอุกโซ่โพลีเมอเรส

Stock Reaction	volume (μl)
10X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.0
1.25 mM dNTP	4.0
forward Primer 20 pM/μl	1.0
reverse Primer 20 pM/μl	1.0
Taq polymerase 1U/ ml	0.2
DNA template 300 นาโนกรัม/มิลลิลิตร	**
H <sub>2</sub> O	**
Total	25

\*\* คำนวณให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

#### 3.3.2.2 อุปกรณ์

##### 3.3.2.2.1 PCR thermal cycler Eppendorf®

ตารางที่ 3.2 แสดงตัวอย่างผู้ป่วย เพศ อายุ และระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ตัวอย่างผู้ป่วย	เพศ	อายุ(ปี)	ระยะ
12	หญิง	63	Dukes' C
13	ชาย	73	Dukes' A
14	ชาย	55	Dukes' C
15	หญิง	61	Dukes' C
16	หญิง	36	Dukes' B
17	ชาย	25	Dukes' C
18	ชาย	86	Dukes' B
20	หญิง	62	Dukes' D
21	หญิง	77	Dukes' B
22	ชาย	54	Dukes' B
23	หญิง	60	Dukes' D
24	ชาย	70	Dukes' B
25	หญิง	24	Dukes' C
26	หญิง	32	Dukes' C
27	ชาย	57	Dukes' B
28	ชาย	64	Dukes' B
29	ชาย	51	Dukes' C
30	ชาย	62	Dukes' B
31	หญิง	82	Dukes' B
32	หญิง	59	Dukes' C
33	ชาย	60	Dukes' B
34	ชาย	66	Dukes' B
37	หญิง	62	Dukes' B
38	ชาย	51	Dukes' B
39	ชาย	78	Dukes' D
40	หญิง	51	Dukes' B

### 3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อประมาณ 25 มิลลิกรัม โดยใบมีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. หั่นเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม Buffer T1 180 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย protinase 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
5. ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม Buffer B3 200 ไมโครลิตรแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
6. นำส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.0 มิลลิลิตร หลอดใหม่
7. เติมเอทานอล ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 100 ปริมาณ 210 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน
8. ย้ายไปใส่ Nucleospin tissue column ด้านบนที่มี membrane จับกับดีเอ็นเอไปวางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. เติม Buffer BW 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
10. เติม buffer B5 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
11. เทส่วนที่อยู่ล่าง column ทั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
12. ย้าย Nucleospin tissue column ที่ด้านบนมี membrane ไปวางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
13. เติม Buffer BE ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร คือดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอ ที่สกัดได้มาทำการเจือจาง และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยความเข้มข้นดีเอ็นเอ หาได้จาก

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร) = A X 50 (นาโนกรัม/ไมโครลิตร) X B

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง (เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm/ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm

ค่าที่ได้ ควรมีค่าระหว่าง 1.65 - 1.85

ถ้าค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่า มีอาร์เอ็นเอเจือปน

ถ้าค่าสูงกว่า 1.85 แสดงว่า มีโปรตีนหรือสารละลายฟีนอลเจือปนอยู่

3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาแลงโซโพลีเมอเรส

เพิ่มปริมาณของ ดีเอ็นเอ เป้าหมายของยีน *p53*, *DPC4* ตำแหน่ง exon 2 และ exon 11 และ D18S363 โดยใช้ PCR reaction mixture ผสมกับดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอย่าง และ น้ำ โดยใช้ดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ ใช้น้ำปรับปริมาตรให้สารละลายทั้งหมด เป็น 25 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (Hadzija และคณะ, 2003)

ยีน	ชนิดของไพรเมอร์	ความยาว(คู่เบส)	T <sub>m</sub>	% GC content	Primer sequence
<i>p53</i>	Forward	20	63	60	5' GCTGTCCCCGGACGATATTG 3'
	Reverse	20	60	55	5' AATGCAAGAAGCCCAGACGG 3'
D18S363	Forward	20	58	45	5' TTGGGAAGTCTCTACATTC 3'
	Reverse	20	58	45	5' GCTTCATTCTCTCACTGGAT 3'
<i>DPC4</i> exon 2	Forward	21	58	43	5' TGTATGACATGGCCAAGTTAG 3'
	Reverse	20	58	40	5' CAATACTCGTTTTAGCAGTC 3'
<i>DPC4</i> exon 11	Forward	20	58	55	5' TCTGTCAGCTGCTGCTGGAA 3'
	Reverse	20	58	60	5' GGTGTGGGTCTGCAATCGG 3'

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับยีน *p53* ดังนี้

Denature (step 1)	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 30 รอบ
Annealing (step 2)	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	54 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที	
Extension (step 3)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับยีน *DPC4* exon 2 และ 11 และ *D18S363* ดังนี้

Denature (step 1)	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 30 รอบ
Annealing (step 2)	96 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	74 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension (step 3)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

#### 3.4.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณของยีน *p53*, *DPC4* ตำแหน่ง exon 2 และ exon 11 และ *D18S36* นำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามความเหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *p53*, *DPC4* และ *D18S363* ระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งกับเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 50 โวลต์ แล้วข้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องด้วยกล้องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต มีขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. เตรียมอะกาโรสเจล โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสมใน 1X TBE buffer ใส่ลงในขวดดูแรนหรือฟาล์ก เขย่าให้เข้ากัน
2. ปิดฝา อย่าย่ำแน่น เข้าไมโครเวฟ 2 นาที จนเจลอะกาโรสละลายเป็นสารละลายเนื้อเดียวและใส
3. ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทลงในถาดใส่เจลขนาดที่ต้องการที่มีหิวเสียบไว้แล้ว
4. เมื่อเจลแข็ง ดึงหรือออก แล้วนำเจลที่ได้ไปใส่ในอ่างที่ใช้ทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เท 1X TBE buffer ลงไปให้ท่วมเจลประมาณ 2-3 มิลลิลิตร

5. หยอดดีเอ็นเอ ลงในช่องของเจลที่เกิดจากหัว โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 5 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร ส่วน DNA marker ระยะห่างขนาด 50 หรือ 100 คู่เบส ตามความเหมาะสม ใช้ 1 ไมโครลิตร

6. หยดลงในหลุมตามที่กำหนด โดยให้ DNA marker อยู่ในหลุมแรก ดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อ มะเร็ง หลุมถัดไปและ ดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยคนเดียวกันในหลุมถัดจากนั้นไป ต่อสายขั้วบวกและขั้วลบ ตั้งความต่างศักย์ไว้ที่ 50 โวลต์ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง 20 นาที โดยให้แถบสีวิ่งไปประมาณร้อยละ 80 ของความยาวเจล แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 3 นาที ล้างน้ำกลั่น 15 นาที แล้วนำไปถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง genesnap<sup>®</sup>

#### 3.4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันในยีน *p53*, *DPC4* ตำแหน่ง exon 2 และ exon 11 และ D18S363 ของดีเอ็นเอในเซลล์ปกติที่ใช้เป็นตัวควบคุม เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง โดยดูความสัมพันธ์ในการเกิดแถบดำแถบเข้มน้อยกว่าตัวควบคุมแสดงว่าเกิดการขาดหายไปของยีน

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาตำแหน่งยีน *p53*

จากการศึกษาด้วยเทคนิค LOH ในตำแหน่งยีน *p53* ในตัวอย่างจำนวน 26 ตัวอย่าง แบ่งเป็นบริเวณที่เป็นมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน ได้ผลผลิตของพีซีอาร์ขนาด 235 คู่เบส โดยพบว่ามีอัตราการเกิด LOH ที่ร้อยละ 77 ดังตารางที่ 4.1 และยกตัวอย่างผู้ป่วยดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 26 ตัวอย่าง

ตัวอย่างผู้ป่วย	<i>p53</i>	D18S363	<i>DPC4</i> exon 2	<i>DPC4</i> exon 11
12	@	\$	@	@
13	@	@	@	@
14	@	@	@	@
15	@	\$	\$	\$
16	@	@	@	@
17	@	@	@	@
18	@	\$	\$	\$
20	@	@	-	-
21	@	@	@	-
22	@	@	\$	\$
23	\$	\$	@	\$
24	@	@	@	\$
25	@	-	-	-
26	@	@	-	-
27	@	\$	@	-
28	\$	@	@	\$
29	\$	@	\$	\$
30	@	@	\$	\$
31	@	\$	\$	\$
32	@	\$	\$	\$

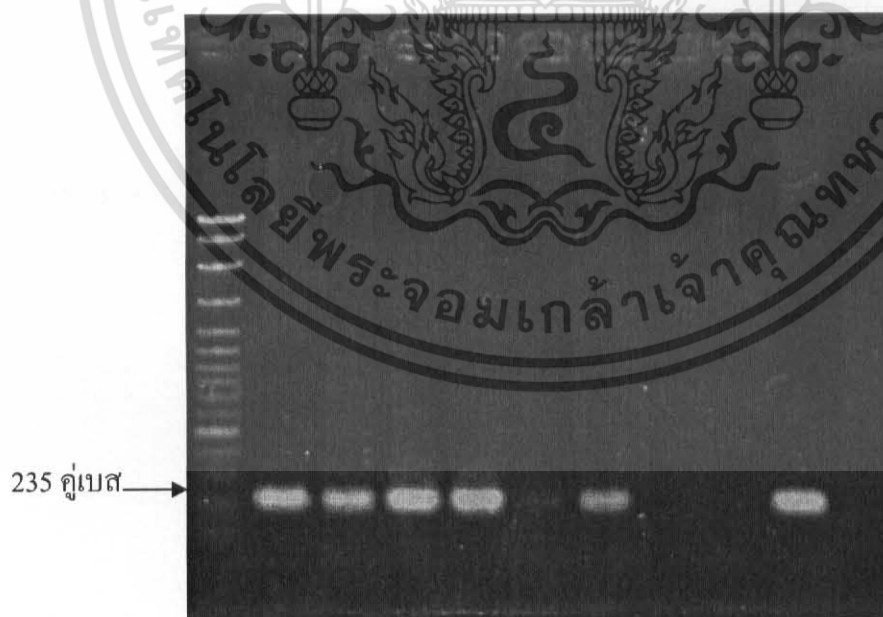
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่างผู้ป่วย	<i>p53</i>	D18S363	<i>DPC4</i> exon 2	<i>DPC4</i> exon 11
33	\$	\$	\$	-
34	@	@	-	-
37	@	\$	\$	\$
38	@	\$	-	-
39	\$	\$	\$	\$
40	\$	\$	@	\$
LOH				
n	20/26	13/26	11/21	5/18
%	77	50	52.4	28.8

## หมายเหตุ

- @ หมายถึง เกิดการ LOH ของตำแหน่งนั้นๆ ในโครโมโซม  
 \$ หมายถึง ไม่เกิดการ LOH ของตำแหน่งนั้นๆ ในโครโมโซม  
 - หมายถึง ไม่ปรากฏข้อมูล

42 12 46 16  
 M T N T N T N T N p n



รูปที่ 4.2 แสดงผลการ LOH บนยีน *p53* โดย M = Marker 100 bp, p = Positive control, n = Negative control, T = เนื้อเยื่อมะเร็ง, N = เนื้อเยื่อปกติ; 42, 12, 46, 16 = ตัวอย่างผู้ป่วย

จากรูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ขนาด 235 bp ยกตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 4 ราย (รายที่ 46, 12, 46 และ 16) จากผู้ป่วยทั้งหมด เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อมะเร็ง (T) และเนื้อเยื่อปกติ (N) ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ในตัวอย่างที่ 42 และ 12 ไม่ปรากฏการ LOH เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อทั้งที่เป็นมะเร็งและที่ปกติ ในตัวอย่างที่ 46 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าเกิดแถบที่จางกว่าแสดงให้เห็นว่าเกิดการ LOH ของตัวอย่างนี้ ในตัวอย่างที่ 16 ปรากฏการ LOH มาจากพันธุกรรมหรือมีมาตั้งแต่กำเนิดเนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่เกิดขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีเกิดการ LOH ของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 20 ราย จากทั้งหมด 26 ราย คิดเป็นร้อยละ 77 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยพบการเกิด LOH ของยีน *p53* ในผู้ป่วยระยะ Dukes' A ซึ่งมี 1 ราย และในผู้ป่วยระยะ Dukes' B จำนวน 11 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 78.6 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' C จำนวน 7 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 87.5 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' D จำนวน 1 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 34 ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งเมื่อแบ่งการเกิด LOH ของยีน *p53* ตามเพศพบว่าเกิดในเพศชาย (ร้อยละ 71.4) มากกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 67) ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Campo และคณะ (1994) ที่ทำการศึกษาความผิดปกติของตำแหน่งยีน *p53* ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบว่ามีเกิดการเกิดของยีน *p53* คิดเป็นร้อยละ 63 ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยเกิดในเพศชาย (ร้อยละ 58) มากกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 42) เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนตัวอย่างที่มีการขาดหายไปของอัลลีลโคอัลลีลหนึ่งของยีน โดยแบ่งตาม  
ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

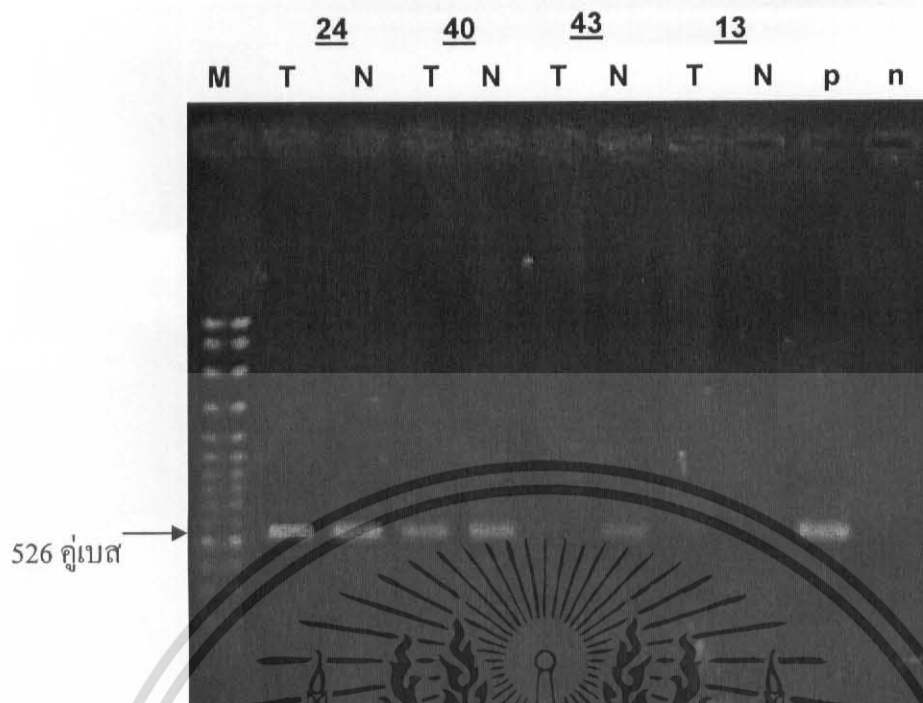
ตำแหน่ง	ระยะ	จำนวนตัวอย่าง (ราย)	จำนวนตัวอย่างที่แสดงการขาดหายไป ของอัลลีลของยีน(ร้อยละ)
p53	Dukes' A	1	100 (1/1)
	Dukes' B	14	78.6 (11/14)
	Dukes' C	8	87.5 (7/8)
	Dukes' D	3	34 (1/3)
D18S363	Dukes' A	1	100 (1/1)
	Dukes' B	14	50 (7/14)
	Dukes' C	8	50 (4/8)
	Dukes' D	3	34 (1/3)
DPC4 exon 2	Dukes' A	1	100 (1/1)
	Dukes' B	12	50 (6/12)
	Dukes' C	7	85.7 (6/7)
	Dukes' D	2	100 (2/2)
DPC4 exon 11	Dukes' A	1	100 (1/1)
	Dukes' B	9	11.1 (1/9)
	Dukes' C	6	67 (4/6)
	Dukes' D	2	0 (0/2)

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนตัวอย่างที่มีการเกิด LOH ของยีน โดยแบ่งตามเพศของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ตำแหน่ง	เพศ	จำนวนตัวอย่าง(ราย)	จำนวนตัวอย่างที่แสดงการขาดหายไปของอัลลีลของยีน(ร้อยละ)
<i>p53</i>	ชาย	14	71.4 (10/14)
	หญิง	12	67 (8/12)
D18S363	ชาย	14	64.3 (9/14)
	หญิง	12	34 (4/12)
<i>DPC4</i> exon 2	ชาย	12	58.3 (7/12)
	หญิง	10	41.7 (5/12)
<i>DPC4</i> exon 11	ชาย	10	30 (3/10)
	หญิง	8	25 (2/8)

#### 4.2 การศึกษาบริเวณยีน *DPC4* exon 2 และ 11

จากการศึกษาด้วยเทคนิค LOH ในตำแหน่งยีน *DPC4* exon 2 ในตัวอย่างจำนวน 22 ตัวอย่าง แบ่งเป็นบริเวณที่เป็นมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน ได้ผลผลิตของพีซีอาร์ ขนาด 526 คู่เบส โดยพบว่ามีอัตราการเกิด LOH ที่ร้อยละ 57.1 ดังตารางที่ 4.1 และยกตัวอย่างผู้ป่วย ดังรูปที่ 4.2

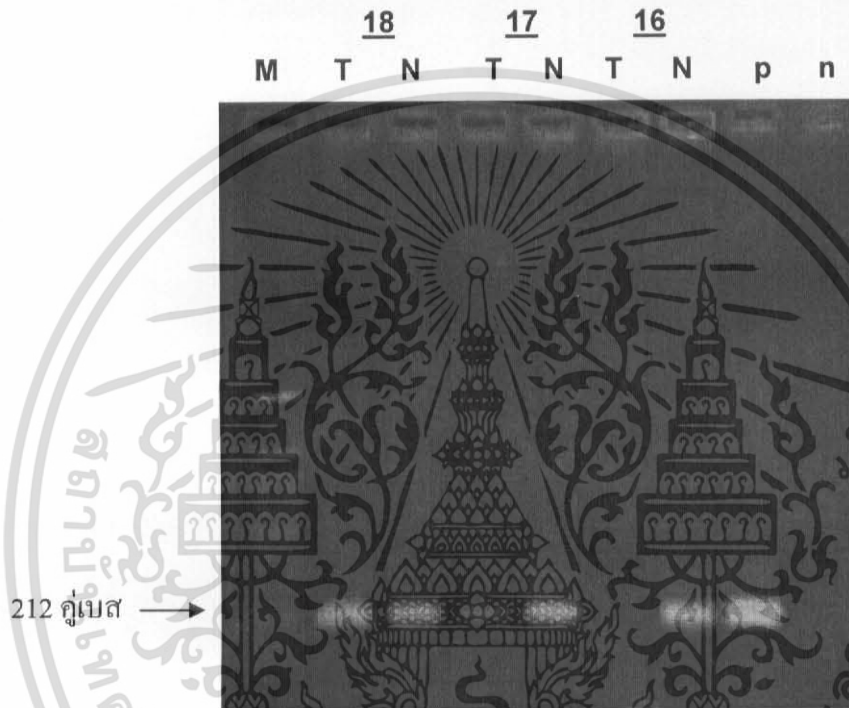


รูปที่ 4.2 แสดงผลการ LOH บนยีน *DPC4* exon 2 โดย M = Marker 100 bp, p = Positive control, n = Negative control, T = เนื้อเยื่อมะเร็ง, N = เนื้อเยื่อปกติ; 24, 40, 43, 13 = ตัวอย่างผู้ป่วย

จากรูปที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ขนาด 526 bp ยกตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 4 ราย (รายที่ 24, 40, 43, 13) จากผู้ป่วยทั้งหมด เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อมะเร็ง (T) และเนื้อเยื่อปกติ (N) ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ในตัวอย่างที่ 24 ไม่ปรากฏการ LOH เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อทั้งที่เป็นมะเร็งและที่ปกติ ในตัวอย่างที่ 40 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าการหายไปหนึ่งอัลลีลทำให้แถบจางกว่าแสดงให้เห็นว่าเกิดการ LOH ของตัวอย่างนี้ ส่วนในตัวอย่างที่ 43 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าการหายไปทั้งอัลลีลทำให้ไม่เกิดแถบแสดงให้เห็นว่าเกิดการ LOH ของตัวอย่างนี้ ในตัวอย่างที่ 13 ปรากฏการ LOH มาจากพันธุกรรมหรือเกิดมาตั้งแต่แรกเกิดเนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่เกิดขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีเกิดการ LOH ของยีน *DPC4* exon 2 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 12 ราย จากทั้งหมด 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 57.1 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยพบการเกิด LOH ของยีน *DPC4* exon 2 ในผู้ป่วยระยะ Dukes' A ซึ่งมี 1 ราย และในผู้ป่วยระยะ Dukes' B จำนวน 6 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' C จำนวน 6 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 85.7 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' D จำนวน 2 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 ดัง

ตารางที่ 4.2 ซึ่งเมื่อแบ่งการเกิด LOH ของยีน *DPC4* exon 2 ตามเพศพบว่าเกิดในเพศชาย (ร้อยละ 58.3) มากกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 41.7) ดังตารางที่ 4.3

จากการศึกษาด้วยเทคนิค LOH ในตำแหน่งยีน *DPC4* exon 11 ในตัวอย่างจำนวน 18 ตัวอย่าง แบ่งเป็นบริเวณที่เป็นมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน ได้ผลผลิตของพีซีอาร์ ขนาด 212 คู่เบส โดยพบว่ามีอัตราการเกิด LOH ที่ร้อยละ 28.8 ดังตารางที่ 4.1 และยกตัวอย่างผู้ป่วย ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงผลการ LOH บนยีน *DPC4* exon 11 โดย M = Marker 50 bp, p = Positive control, n = Negative control, T = เนื้อเยื่อมะเร็ง, N = เนื้อเยื่อปกติ; 18, 17, 16 = ตัวอย่างผู้ป่วย

จากรูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ขนาด 212 bp ยกตัวอย่าง 3 ราย (รายที่ 18, 17, 16) จากผู้ป่วยทั้งหมด เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อมะเร็ง (T) และเนื้อเยื่อปกติ (N) ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ในตัวอย่างที่ 18 ไม่ปรากฏการ LOH เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ เกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อทั้งที่เป็นมะเร็งและที่ปกติ ในตัวอย่างที่ 17 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าเกิดการหายไปหนึ่งอัลลีลทำให้แถบจางกว่าแสดงให้เห็นว่าเกิดการ LOH ของตัวอย่างนี้ ส่วนในตัวอย่างที่ 16 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าเกิดการหายไปทั้งอัลลีลทำให้ไม่เกิดแถบแสดงให้เห็นว่าเกิดการ LOH ของตัวอย่างนี้ จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีเกิด LOH ของยีน *DPC4* exon 11 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

จำนวน 10 ราย จากทั้งหมด 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 28.8 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยพบการเกิด LOH ของยีน *DPC4* exon 11 ในผู้ป่วยระยะ Dukes' A ซึ่งมี 1 ราย และในผู้ป่วยระยะ Dukes' B จำนวน 1 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.1 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' C จำนวน 4 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 67 แต่ไม่เกิด LOH ในผู้ป่วยระยะ Dukes' D ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งเมื่อแบ่งการเกิด LOH ของยีน *DPC4* exon 11 ตามเพศพบว่าเกิดในเพศชาย (ร้อยละ 30) น้อยกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 25) ดังตารางที่ 4.3

ซึ่งจากการทดลองในยีน *DPC4* exon 2 และ 11 ได้สอดคล้องกับรายงานของ Hadzija และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาความผิดปกติของตำแหน่งยีน *DPC4* ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของผู้ป่วยชาวโครเอเชียพบว่าการ LOH ของยีน *DPC4* คิดเป็นร้อยละ 45 ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยเกิดในเพศชาย (ร้อยละ 46.7) มากกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 42.8)

#### 4.3 การศึกษาบริเวณ D18S363

จากการศึกษาด้วยเทคนิค LOH ในตำแหน่ง D18S363 ในตัวอย่างจำนวน 26 ตัวอย่าง แบ่งเป็นบริเวณที่เป็นมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน ได้ผลผลิตของพีซีอาร์ขนาด 177-247 คู่เบส โดยพบว่ามีอัตราการเกิด LOH ที่ร้อยละ 50 ดังตารางที่ 4.1 และยกตัวอย่างผู้ป่วยดังรูปที่ 4.4

40
34
26
25
23
28

M T N T N T N T N T N p n

177-247 คู่เบส {



รูปที่ 4.4 แสดงผลการ LOH บนบริเวณ D18S363 โดย M = Marker 50 bp, p = Positive control, n = Negative control, T = เนื้อเยื่อมะเร็ง, N = เนื้อเยื่อปกติ; 40, 34, 26, 25, 23, 28 = ตัวอย่างผู้ป่วย

จากรูปที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ขนาด 177-247 bp ยกตัวอย่างผู้ป่วย 6 ราย (รายที่ 40, 34, 26, 25, 23, 28) จากผู้ป่วยทั้งหมด เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อมะเร็ง (T) และเนื้อเยื่อปกติ (N) ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ซึ่งจะมีการเกิดแถบ 2 แถบเนื่องในคนจะมีอัลลีล 2 อัลลีล อัลลีลหนึ่งได้จากเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อและอีกอันหนึ่งได้จากเซลล์สืบพันธุ์ของแม่ซึ่งบริเวณนี้เรียกว่า Microsatellite ซึ่งถ้า 2 อัลลีลมีเท่ากันจะเกิดลักษณะที่เรียกว่า Homozygous แต่ถ้า 2 อัลลีลไม่เท่ากันจะเกิดลักษณะที่เรียกว่า Heterozygous ในตัวอย่างที่ 40, 34 และ 25 ไม่ปรากฏการ LOH เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อทั้งที่เป็นมะเร็งและที่ปกติ ในตัวอย่างที่ 26 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าในเนื้อเยื่อปกติมีการเกิดแถบ 2 แถบ แต่ในเนื้อเยื่อมะเร็งมีเกิดแถบเดียวแสดงว่าเกิด LOH ไป 1 อัลลีล ส่วนในตัวอย่างที่ 23 ปรากฏการ LOH เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติพบว่าไม่เกิดแถบแสดงให้เห็นว่าเกิดการ LOH ของตัวอ่อนนี้ ในตัวอย่างที่ 28 ปรากฏการ LOH มาจากพันธุกรรมเนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่เกิดขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามีเกิดการ LOH ของตำแหน่ง D18S363 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 13 ราย จากทั้งหมด 26 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยพบการเกิด LOH ของตำแหน่ง D18S363 ในผู้ป่วยระยะ Dukes' A ซึ่งมี 1 ราย และในผู้ป่วยระยะ Dukes' B จำนวน 7 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' C จำนวน 4 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 และในผู้ป่วยระยะ Dukes' D จำนวน 1 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 34 ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งเมื่อแบ่งการเกิด LOH ของตำแหน่ง D18S363 ตามเพศพบว่าเกิดในเพศชาย (ร้อยละ 64.3) มากกว่าเพศหญิง (ร้อยละ 34) ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hadzija และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาความผิดปกติของตำแหน่งข้างเคียงของยีน *DPC4* ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักบริเวณตำแหน่ง D18S474, D18S363 และ D18S46 พบว่ามีเกิดการ LOH ของตำแหน่ง D18S474 ร้อยละ 48, D18S363 ร้อยละ 24 และ D18S46 ร้อยละ 16

ในการศึกษาความผิดปกติของตำแหน่งยีน *p53*, *DPC4* และ D18S363 ในเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดอื่นๆ ให้ผลที่สอดคล้อง ดังรายงานของ Olumi และคณะ (1990) พบว่าการ LOH ในโครโมโซมคู่ที่ 17 ซึ่งมียีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะเกิดในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งในระยะที่รุนแรงคิดเป็นร้อยละ 64.5 ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Fujimoto และคณะ (1992) ซึ่งศึกษาการกลายของยีน *p53* ในผู้ป่วย 23 ราย พบว่าจะเกิดการกลายของยีน *p53* ในมะเร็งระยะที่แพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นหรือระยะที่รุนแรงมากกว่าในระยะต้นๆ หรือระยะที่ไม่รุนแรง จากการศึกษาของ Koyama และคณะ (1999) ทำการศึกษาการ LOH ในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นจำนวน 73 ราย ซึ่งเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในระยะ Dukes' B และ Dukes' C พบว่าเกิด LOH เป็นร้อยละ 78 ของผู้ป่วยทั้งหมด ต่อมา Barbera และคณะ (2000) พบว่าการ LOH ของยีน *DCC* และ *DPC4*

เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและมะเร็งตับอ่อน โดยศึกษาพบว่าร้อยละ 65 ของมะเร็งตับอ่อนเกิดจากการที่ยีน *DPC4* ไม่ทำงานและเกิดจากการขาดหายไปของยีนทั้งสองนี้ และมีการศึกษาของ Woodford-Richens และคณะ (2001) พบว่าการ LOH ของยีน *DPC4* ร้อยละ 50-60 ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักโดยทำการศึกษาในตำแหน่งยีน *p53*, *DPC4* exon2 และ 11 และบริเวณ Microsatellite ตำแหน่ง D18S363 ซึ่งอยู่ข้างเคียงยีน *DPC4* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก จำนวน 26 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LOH พบว่าให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไพรเมอร์ *p53*, *DPC4* exon 2, *DPC4* exon 11 และ D18S363 เป็นขนาด 235, 526, 212 และ 177-247 คู่เบสตามลำดับ

ผลการศึกษาพบว่าตำแหน่งยีน *p53* เกิด LOH ร้อยละ 77 ตำแหน่งยีน *DPC4* exon 2 เกิด LOH ร้อยละ 52.4 ตำแหน่งยีน *DPC4* exon 11 เกิด LOH ร้อยละ 28.8 และ D18S363 เกิด LOH ร้อยละ 50 และพบว่าในทุกตำแหน่งที่ศึกษาเกิด LOH ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง จึงอาจกล่าวได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

#### ข้อเสนอแนะ

- 5.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาควรมีจำนวนมากกว่านี้เพื่อว่าในการวิเคราะห์จะมีความน่าเชื่อถือของข้อมูลเพิ่มมากขึ้น
- 5.2 ควรทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction fragment length polymorphism: RFLP) ด้วย เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น
- 5.3 ควรมีการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้งเพื่อเพิ่มความแม่นยำของข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์

## เอกสารอ้างอิง

- กฤตพงศ์ อรชัยพันธ์ลาภ, ชลทิพย์ วุฒิเลิศอนันต์ และ วิวัฒน์ ถั่วพฤษ์พันธ์. 2547. การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส. ครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ทวิศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. อนุมัติวิทยาทงการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัททีเคซีแอนด์เจอร์นัลพับลิชชั่น จำกัด.
- พรรณณี ฐิตาพิชิต. 2545. หลักพันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ: โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 26.
- วสันต์ จันทราทิตย์และคณะ. 2544. ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics). การใช้บริการค้นหาและวิเคราะห์ข้อมูลด้านอนุชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต, 71-104.
- วัลภา สุนทรนัญ. 2532. ปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในคนไทย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล, 116.
- อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. การประยุกต์ใช้ Microsatellite ในทางการแพทย์. เชียงใหม่. โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์, 22-6.
- Barbera M.V., Martin M., Marinosa L., Munne A., Carrato A., Real F.X. and Fabre M. The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of *DCC* and *DPC4* expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1502: 283-296.
- Campbell W.J., Spence R.A.J. and Parks T.G. 1994. Familial adenomatous polyposis. *Br. J. Surg.* 81: 1722-1733.
- Campo E., Miquel R, Jares P., Bosch F., Juan M., Leone A., Vives J., Cardesa A. and Yague J. 1994. Prognostic significance of Loss of heterozygosity of *Nm23-H1* and *p53* gene in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 73: 2013-2921.
- Collier L.S. and Largaespada D.A. 2006. Transforming science: cancer gene identification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 23-29.
- Dukes C.E. 1930. The spread of cancer of the rectum. *Br. J. Surg.*, 12: 643-648.
- Fearon E.R. and Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759-767.
- Fuchs C.S., Gionvannucci E.L. and Colditz G.A. 1994. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 331: 1669-1674.
- Fujimoto K., Yamada Y., Okajima E., Kakizoe T., Sasaki H., Sugimura T. and Terada M. 1992.

- Frequent association of *p53* gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 52: 1393-1398.
- Gatta G., Ciccolallo L., Capocaccia R., Colemar M.P., Hakulinen T., Moller H., Berrino F. and EUROCORE Working Group. 2003. Differences in colorectal cancer survival between European and US populations: the importance of sub-site and morphology. *Eur. J. Cancer.* 39: 2214-2222.
- Hadzija M.P., Radosevic S., Kovacevic D., Lukac J., Hadzija M., Spaventi R., Pavelic K. and Kapitanovic S. 2004. Status of the *DPC4* tumor suppressor gene in sporadic colon adenocarcinoma of Croatian patients: identification of a novel somatic mutation. *Mutat. Res.* 548: 61-73.
- Hisamuddin M.I. and Yang W.V. 2004. Genetics of colorectal Cancer. *Med. Gen. Med.* 6: 13.
- Isobe M., Emanuel B.S., Givol D., Oren M. and Croce C.M. 1986. Localization of gene for human *p53* tumour antigen to band 17p13. *Nature.* 320: 84-85.
- Jass J.R., Smyrk T.C., Stewart S.M. and Lane M.R. 1994. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res.* 14: 1631-1635.
- Klein G. and Klein E. 1985. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature.* 315: 215-221.
- Kapitanovic S., Cacev T., Radosevic S., Spaventi S., Spaventi R. and Pavelic K. 2004. *APC* gene loss of heterozygosity, mutations E1317Q, and I1307K germ-line variants in sporadic colon cancer in Croatia. *Exper. Mol. Patho.* 77: 193-200.
- Koyama M., Ito M., Nagai H., Emi M. and Moriyama Y. 1999. Inactivation of both alleles of the *DPC4*/*SMAD4* gene in advanced colorectal cancers: identification of seven novel somatic mutations in tumors from Japanese patients. *Mutat. Res. Gen.* 406: 71-77.
- Levin B., 2001, Overview of colorectal cancer screening in the United States. *Journal of Psychological Oncology.* 19: 9-19.
- Lichun Y., Tang C.M.C., Lau W.K. and Lung L.M. 2004. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 9 in Chinese esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 203: 71-77.
- Nishikawa T., Maemura K., Hirata I., Matsuse R., Morikawa H., Toshina K., Murano M., Hashimoto K., Nakagawa Y., Saitoh O., Uchida K. and Katsu K. 2002. A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using

onestep polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis.  
*Clinica Chimica Acta*. 318: 107-112.

Olumi A. F., Tsai Y. C., Nichols P. W., Skinner D. G., Cain D. R., Bender L. I. and Jones P. A.  
 1990. Allelic Loss of Chromosome 17p Distinguishes High Grade from Low Grade  
 Transitional Cell Carcinomas of the Bladder. *Cancer Res*. 50: 7081-7083.

Poeaim S., Rerkamnuaychoke B., Jesdapatarakul S. and Campiranon A. 2005. Chromosome  
 alterations in colorectal cancer in Thai patients. *Cancer. Genet. Cyto*. 160: 152-159.

Ribeiro M.B., Greenstein A.J. and Sachar D.B. 1996. Colorectal adenocarcinoma in Crohn's  
 disease. *An.n Surg*. 223: 186-193.

Thongsuksai P. 1999. Pattern of mutations in p53 gene: an insight into cancer molecular biology.  
*Songkla. Med. J*. 1999. 17: 63-71.

Vogelstein B., Eric R., Fearon B.A., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M.,  
 Nakamura Y., White R., Smith A.M.M. and Bos J.L. 1988. Genetic alterations during  
 colorectal-tumor development. *N. Eng. J. Med*. 319: 525-532

Woodford-Richens K., Williamson J., Bevan S., Young J., Leggett B., Frayling I., Thway Y.,  
 Hodgson S., Kim C.J., Iwama T., Novelli M., Sheer D., Poulson R., Wright N., Houlston  
 R. and Tomlinson N. 2000. Allelic Los at *SMAD4* in Polyps from Juvenile Polyposis  
 Patients and Use of Fluorescence *in Situ* Hybridization to Demonstrate Clonal Origin of  
 the Epithelium . *Cancer Res*. 60: 1477-2482.

[http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA technology.htm](http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA%20technology.htm)

<http://cropthai.ku.ac.th/biotech/abs/mole.html>

<http://www.aseanbiotechnology.info/Abstract/21018446.pdf>

<http://gslc.genetics.utah.edu>

<http://hopskin.gi.nts.jhu.edu>

<http://www.dms.moph.go.th/dms>

<http://www.elib-online.com>

<http://www.howstuffworks.com/dna-evidence.htm>

<http://www.lbrcc.in.th/Album01/Album11/index.html>

<http://www.lerneronline.com>

<http://www.meb.uni-bonn.de>

<http://www.nlm.nih.gov>

<http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm>

[http://www.sirirajmedj.com/journal\\_files/content\\_pdf/pdf\\_73.pdf](http://www.sirirajmedj.com/journal_files/content_pdf/pdf_73.pdf)

<http://www.surgeons.or.th/public/colorectalcancer.pdf>

<http://www.thirawat.com/ge/DNAevid.html>

<http://www.thirawat.com/ge/gecancer.html#oncogene>

<http://www2.unescobkk.org/eubios/OBN/OBNGDM.htm>

<http://hpc4.anamai.moph.go.th/Articles/abstract/2549/pattaya.pdf>

<http://www.genetests.org/query?iglossid=117>

<http://202.28.94.56/webproj/disease/cancer/001.html>

<http://www.dailynews.co.th>

<http://www.champa.kku.ac.th/som-song/file/GenesAndCancer456-4.ppt>

<http://medinfo.psu.ac.th/smj2/171/smj1719.htm>

<http://www.cancersupportivecare.com>



## ภาคผนวก

### สารเคมีสำหรับการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

#### 1. 10X TBE buffer (tris-borate EDTA)

Tris-base	108	กรัมต่อลิตร
Boric acid	55	กรัมต่อลิตร
EDTA pH 8.0	20	มิลลิลิตรต่อลิตร

เมื่อนำมาใช้ให้นำมาเจือจาง 10 เท่า ให้เป็น 1X TBE buffer

#### 2. Loading dye

Sucrose	40 %
Bromophenol blue	0.25 %
TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า	

#### 3. Ethidium bromide

Ethidium bromide	20 ไมโครลิตร
1X TBE buffer	200 มิลลิลิตร

#### 4. Agarose gel

- ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

หึ่งเจลอะกาโรส 0.4 กรัม เติม 1 X TBE buffer 40 มิลลิลิตร นำไปอุ่นจนเจลละลาย

- ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

หึ่งเจลอะกาโรส 1.2 กรัม เติม 1 X TBE buffer 40 มิลลิลิตร นำไปอุ่นจนเจลละลาย