

การประเมินระดับการแสดงออก vitronectin ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะต่าง ๆ

จริญญา งามขำ¹

มณีนรัตน์ มัสอูดี¹

สมชาย ธนะสิทธิชัย²

กฤติกา บุญมาก¹

อารีย์ ประสิทธิพยงค์³

เทียนแสง พันธุ์ศรี¹

อนุพงษ์ ไชยมูล³

บทคัดย่อ มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในโลก ในปัจจุบันยังไม่มีสารชีวภาพที่มีความจำเพาะต่อการบ่งชี้การเกิดมะเร็งในระยะเริ่มแรก การค้นหาสารบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพชนิดใหม่ ๆ สำหรับการตรวจคัดกรองในระยะเริ่มแรกจะช่วยในการตรวจวินิจฉัยและเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่ง vitronectin (VN) เป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีความสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ การยึดติดกันและการแพร่กระจายของเซลล์ มีการศึกษาจำนวนหนึ่งพบว่าระดับการแสดงออกของ VN จะเพิ่มสูงขึ้นในมะเร็งระยะเริ่มต้นบางชนิด รวมทั้งมะเร็งเต้านม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพชนิดใหม่สำหรับการตรวจวินิจฉัยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรก โดยดำเนินการตรวจระดับการแสดงออกของ VN ในซีรัมและพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งในระยะต่าง ๆ จำนวน 112 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีจำนวน 13 ราย ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และตรวจหาระดับการแสดงออกของ CEA และ CA15-3 ซึ่งเป็นสารบ่งชี้มาตรฐานของมะเร็งเต้านมด้วยวิธี Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) จากผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของ VN ในซีรัมและพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะที่ II มีปริมาณที่สูงกว่าระยะอื่น ๆ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ CEA และ CA15-3 ในระยะ III-IV สูงกว่าระยะเริ่มแรก (I-II) อย่างไรก็ตามสารบ่งชี้มาตรฐานทั้งสองชนิดคือ CEA, CA15-3 และ VN ในซีรัมของกลุ่มควบคุมมีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ผลการศึกษายังสามารถวิเคราะห์ประสิทธิภาพของ VN ในการเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการแยกผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะเริ่มแรกออกจากระยะแพร่กระจาย จากพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ ROC พบว่า AUC ของระดับการแสดงออกของ VN (0.629) มีความแตกต่างจาก AUC ของ CEA และ CA15-3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า VN เป็นสารบ่งชี้ที่น่าสนใจในการศึกษาต่อเพื่อคัดกรองการตรวจวินิจฉัยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรก ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ CEA และ CA15-3 ในซีรัมก็ยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในการตรวจหรือติดตามความรุนแรงของโรคในระยะลุกลามของโรคมะเร็งได้ (วารสารโรคมะเร็ง 2563;41:24-36)

คำสำคัญ: มะเร็งเต้านม vitronectin CEA CA15-3

¹กลุ่มงานวิจัย ถ่ายทอดและสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, ²สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์, ³กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์, ⁴กลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
วันที่รับบทความ 18/1/2564, วันที่แก้ไข 12/3/2564, วันที่ตอบรับบทความ 22/3/2564

Evaluation of vitronectin expression levels from breast cancer patients with different stages

by Jarunya Ngamkham¹, Somchai Thanasitthichai², Aree Prasitthipayong³, Anupong Chaiyamol³, Maneerut Mas-u-dee⁴, Kittika Boonmark¹, Thainsang Phansri¹

¹Division of Research and Academic Support, National Cancer Institute,

²Institute of Medical Research and Technology Assessment, Department of Medical Service, Ministry of Public Health, ³Pathology and Medical Technology Division,

⁴Anatomical Pathology Division, National Cancer Institute

Abstract Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Currently, there is no specific biomarker for early diagnosis. The identification of potential biomarkers for early detection will ensure a good prognosis and improve the clinical outcome. Vitronectin (VN) is a glycoprotein involved in multifunctional roles in inflammation, cell adhesion, and migration. There are some evidences showed that VN levels were elevated in some cancers, including breast cancer. This study aimed to investigate a new biomarker's efficiency as VN in the early stage of breast cancer. Serum and plasma of VN were collected from 112 breast cancer patients with different stages and 13 healthy women by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The clinical biomarkers of breast cancer as CEA and CA15-3 were used as references. The results showed that serum and plasma VN levels were elevated in breast cancer patients with stage II higher than VN levels in other stages. Whereas serum CEA and CA15-3 levels exhibited higher expression levels in serum from breast cancer patients with advanced-stage (II-IV) than early-stage (0-II). However, both clinical biomarkers, CEA, CA15-3 and VN expression levels from the serum of healthy women, showed low expression levels. The area under the curve (AUC) of ROC was also used to determine the efficiency of VN, found that AUC to be about 0.629 with a $P < 0.05$ in breast cancer with early stage. In conclusion, serum and plasma VN may be promising diagnostic biomarkers that can be detected in the serum and plasma of breast cancer patients with early stage. While serum CEA and CA15-3 were useful markers for predicting aggressive cancer in the advanced stage. (*Thai Cancer J* 2021;41:23-36)

Keywords; breast cancer, vitronectin, CEA, CA15-3

บทนำ

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดใ
ผู้หญิงทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย และมีแนวโน้ม
อุบัติการณ์ของผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มจำนวนขึ้นทุกปี
จากรายงานทางระบาดวิทยาพบอุบัติการณ์การ
เกิดผู้ป่วยรายใหม่และอัตราการตายของผู้หญิงทั่ว
โลกประมาณ 47.8 และ 13.6 ตามลำดับต่อ
ประชากรผู้หญิง 100,000 ราย¹ ในขณะที่ประเทศ
ไทยพบอุบัติการณ์การเกิดผู้ป่วยรายใหม่ในช่วงปี
2556-2558 ประมาณ 31.4 ต่อประชากรผู้หญิงไทย
100,000 ราย² และเพิ่มขึ้นเป็น 37.4 ในปี 2563¹
สาเหตุหลักของการเกิดโรคมะเร็งเต้านมยังไม่
ทราบเป็นที่แน่ชัด แต่พบปัจจัยเสี่ยงที่มี

ความสัมพันธ์กับการก่อโรคหลายปัจจัย เช่น การ
เปลี่ยนแปลงหรือการกลายพันธุ์ของสาร
พันธุกรรม การสัมผัสสารเคมี รังสี หรือสารก่อ
มะเร็งเป็นระยะเวลานาน ระดับฮอร์โมนที่
เปลี่ยนแปลง ฯลฯ ส่งผลให้เซลล์เกิดความผิดปกติ
เกิดการกลายพันธุ์และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจน
กลายเป็นเซลล์มะเร็ง³ อย่างไรก็ตามมะเร็งเต้านม
สามารถป้องกันหรือลดความรุนแรงของโรคได้
หากสามารถตรวจพบในระยะเริ่มแรก ซึ่งการ
ตรวจหาสารทางชีวภาพที่สามารถบ่งชี้หรือ
พยากรณ์โรคในระยะเริ่มแรกจึงมีความสำคัญยิ่ง
เพื่อวางแผนการรักษาที่มีประสิทธิภาพและช่วย
ลดอุบัติการณ์การตายของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ใน

ปัจจุบันสารบ่งชี้ที่ใช้ในการตรวจยืนยันของมะเร็งด้านทางพยาธิวิทยา คือ carcinoembryonic antigen (CEA) และ cancer antigen 15-3 (CA15-3) ที่มักตรวจพบมากในเซลล์มะเร็งด้านที่อยู่ในระยะ late stage (stage III-IV) หรือระยะแพร่กระจาย แต่ตรวจพบค่อนข้างต่ำในมะเร็งด้านระยะเริ่มแรก⁴⁻⁶ ส่งผลให้กลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในบางกลุ่มไม่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาจำนวนมากที่ดำเนินการวิจัยเพื่อค้นหาสารทางชีวภาพที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆ รวมทั้งมะเร็งด้าน โดยสารบ่งชี้ของการก่อโรคที่สามารถตรวจได้จากตัวอย่างที่เป็นซีรัมหรือพลาสมาจากเลือด จะเป็นตัวอย่างที่มีการนำมาศึกษาค่อนข้างมากกว่าตัวอย่างชนิดอื่น ๆ เนื่องจากสามารถจัดเก็บและตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย รวมทั้งสามารถตรวจติดตามผลได้เป็นระยะ ๆ ต่อการเฝ้าระวังการก่อโรค โดยเฉพาะการตรวจคัดกรองหาความเสี่ยงหรือตรวจหามะเร็งในระยะเริ่มแรกเพื่อนำมาพัฒนาต่อยอดในทางคลินิกต่อไป⁶⁻⁷

Vitronectin (VN หรือ VTN) เป็นสารทางชีวภาพอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่งพบว่าระดับการแสดงออกของ VN ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งด้านระยะเริ่มแรกค่อนข้างสูงกว่าระยะอื่น ๆ⁸ ซึ่ง VN เป็นโปรตีนในกลุ่มของ adhesion glycoprotein ขนาด 75 kDa ส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์จากเซลล์ตับสามารถตรวจพบได้ในซีรัม พลาสมา หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ⁹⁻¹¹ โดย VN มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ (inflammation), cell adhesion, wound healing, cell necrosis, blood coagulation รวมทั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งบางชนิด¹²⁻¹⁴ จากผลในศึกษาของ Ortega-Martinez I และคณะ พบ

ปริมาณระดับการแสดงออกของ VN ในมะเร็งผิวหนังชนิด melanoma ของผู้ป่วยระยะเริ่มแรกค่อนข้างสูงและจากผลการติดตามผู้ป่วยในกลุ่มนี้ยังพบว่ามะเร็งสามารถพัฒนาเป็นระยะแพร่กระจายภายในระยะเวลาเพียง 2 ปี¹⁵ และจากผลการวิจัยของ Hao W และคณะ พบว่าปริมาณของ VN มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งด้าน โดยตรวจพบระดับของ VN ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งด้านระยะเริ่มแรก (stage 0-I) ค่อนข้างสูงกว่าระยะแพร่กระจาย และพบปริมาณเพียงเล็กน้อยในซีรัมของกลุ่มผู้เข้าร่วมโครงการที่มีสุขภาพดีหรือกลุ่มควบคุม⁸ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kadowaki M และคณะ ที่พบว่าระดับความเข้มข้นของ VN ในผู้ป่วยมะเร็งด้านชนิด ductal carcinoma in situ (DCIS) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บจากกลุ่มคนปกติ และเมื่อย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC) พบการแสดงออกของ VN จำนวนมากบริเวณ small vessel walls ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์มะเร็งด้านและชั้นของเมมเบรน extracellular matrix (ECM) ของ stroma¹⁶ ในขณะที่บางรายงานก็พบว่า VN กระตุ้นกระบวนการเกิดมะเร็งโดยระดับการแสดงออกของ VN มีผลต่อการควบคุมการทำงานของ VEGF เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง (angiogenesis)^{8,17-19} และทำงานร่วมกับ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) และ urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายผ่าน ECM ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย^{9,20} นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณความเข้มข้นของ VN ยังช่วยส่งเสริมให้ circulating tumor สามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้

เป็นอย่างดี²¹ จากข้อมูลดังกล่าว VN น่าจะเป็นสารบ่งชี้ต่อการเกิดโรคหรือใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับนำมาใช้คัดกรองมะเร็งในระยะเริ่มแรก ซึ่งในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการตรวจหาปริมาณหรือความเข้มข้นของ VN ในซีรัมและพลาสมาที่แยกจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะต่าง ๆ ที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยและรักษา ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติและเปรียบเทียบผลการทดลองกับตัวอย่างที่เก็บจากกลุ่มคนปกติเพื่อประเมินความสัมพันธ์ของ VN และการเกิดมะเร็งเต้านม เพื่อเป็นข้อมูลนำไปศึกษาพัฒนาต่อยอดในทางคลินิกต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้มารับบริการตรวจและรักษา ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติในช่วงปี พ.ศ. 2560-2562 โดยมีผลยืนยันการตรวจทางพยาธิวิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา กายวิภาค ซึ่งกลุ่มตัวอย่างจะแบ่งเป็น กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งประกอบด้วยระยะเริ่มแรกคือ Stage 0-I, stage II จำนวน 36 รายและ 41 ราย ตามลำดับระยะลุกลาม (stage III-IV) จำนวน 35 ราย และกลุ่มควบคุมที่เป็นอาสาสมัครที่สุขภาพดีจำนวน 13 ราย ซึ่งผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมดเป็นเพศหญิงและเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับการรักษาด้วยวิธีใด ๆ มาก่อน (new case) โดยก่อนเข้าร่วมโครงการจะได้รับทราบข้อมูลต่าง ๆ ของโครงการวิจัย มีการซักถามประวัติที่อาจเกี่ยวข้องกับการวิจัย และมีการลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ สำหรับโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการตรวจและรับรองจากคณะกรรมการวิจัยและคณะกรรมการทบทวนวิจัย จริยธรรมการ

วิจัยในมนุษย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (EC COA 027/2016)

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 7 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด แบ่งเป็นหลอดที่ไม่มี EDTA เพื่อเตรียมซีรัมและหลอดที่บรรจุ EDTA (Greiner bio-one, ไทย) สำหรับเตรียมตัวอย่างที่เป็นพลาสมาจากผู้ป่วยและอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ จากนั้นนำหลอดที่เก็บเลือดทั้งสองปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกซีรัมและพลาสมาเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ CEA และ CA15-3

สำหรับการตรวจหาสารบ่งชี้มาตรฐานของมะเร็งเต้านมที่ใช้ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา คือ CEA และ CA15-3 โดยดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ใช้หลักการ electrochemiluminescence immunoassay (sandwich immunoassay, ECLIA) (Roche Diagnostics, สวิตเซอร์แลนด์) และทดสอบด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Roche Diagnostics, เยอรมัน) สำหรับการตรวจ CEA และ CA15-3 นำตัวอย่างซีรัมที่เตรียมจากขั้นตอนแรกมาทำการวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของสารบ่งชี้ทั้งสองชนิดตามขั้นตอนการวิเคราะห์ในเอกสารกำกับของชุดน้ำยาดังกล่าว เครื่องตรวจวิเคราะห์จะคำนวณระดับ CEA และ CA15-3 ที่ได้จากการทดสอบโดยอัตโนมัติจากการเปรียบเทียบกับ calibration curve ซึ่งสัมพันธ์กับความแปรปรวน (CV) ของ within-run และ between-run precision มีค่าไม่เกินร้อยละ 10 และใช้ Elecsys PreciControl Tumor Marker สองช่วงระดับ คือ

ช่วงค่าระดับต่ำ (TM1) และช่วงค่าระดับสูง (TM2) เป็นสารควบคุมคุณภาพ ซึ่งสารควบคุมคุณภาพสามารถเตรียมด้วยการละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องตามปริมาณที่กำหนดในเอกสารประกอบของชุดน้ำยาสำเร็จรูป สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบ

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ vitronectin (VN)

นำตัวอย่างซีรัมและพลาสมาจำนวนตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร มาดำเนินการวิเคราะห์เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ VN ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป ตามหลักการของ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ตามข้อกำหนดและวิธีการที่แนบมากับชุดน้ำยา (Thermal Scientific, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งตัวอย่างที่ทดสอบจะถูกบ่มใน anti-human vitronectin precessed 96-well strip plate เป็นระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้าง plate ที่ทดสอบด้วยน้ำยาล้าง ก่อนเติม 1x biotinylated antibody ที่มีความจำเพาะต่อ VN และ Streptavidin-HRP solution ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะบ่ม plate ที่ทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และล้างสารที่อยู่ใน plate ด้วย wash buffer ทุกครั้งก่อนเติมน้ำยาชนิดถัดไป จากนั้นดูดสารละลายทิ้งอีกครั้งก่อนเติม substrate บ่มตามเวลาที่กำหนดก่อนจะหยุดปฏิกิริยาทั้งหมดด้วย stop solution นำ plate ที่ทดสอบไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วย microplate reader (Biotex, สหรัฐอเมริกา) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ และข้อมูลทางสถิติ ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปคือ SPSS version 23.0 และ Graphpad Prism version 5 โดยคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD), ค่ามัธยฐาน (median) และ ค่าต่ำสุด - สูงสุด (minimum-maximum) และใช้สถิติ One-way ANOVA หรือ kruskal-wallis analysis ในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ CEA, CA15-3 และ VN ในตัวอย่างซีรัมและพลาสมาจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและกลุ่มควบคุม โดยกำหนดให้ข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อค่า $P < 0.05$ สำหรับการคำนวณหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สามารถวิเคราะห์หาจาก receiver operating characteristic curve (ROC) และการประมาณค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟ (area under the curve; AUC) เพื่อแสดงว่ามีความแม่นยำในการนำมาประเมินใช้ประโยชน์ในการเป็นตัวบ่งชี้การเกิดมะเร็งในอนาคต²²

ผลการศึกษา

จากการคัดกรองกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 112 ราย ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการวินิจฉัยในกลุ่มของ stage 0-I จำนวน 36 ราย, stage II จำนวน 41 ราย และ stage III-IV จำนวน 35 ราย โดยแต่ละกลุ่มมีอายุเฉลี่ย 53.72 ± 9.51 ปี (ช่วงอายุ 37-74 ปี), 53.27 ± 12.93 ปี (ช่วงอายุ 25-74 ปี) และ 54.03 ± 9.59 ปี (ช่วงอายุ 29-76 ปี) ตามลำดับ และกลุ่มควบคุมที่เป็นอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 13 ราย ที่มีอายุเฉลี่ย 43.54 ± 16.47 ปี (ช่วงอายุ 23-74 ปี)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณของ CEA และ CA15-3 ที่เป็นสารมาตรฐานในการบ่งชี้ของมะเร็งเต้านมทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ในตัวอย่างซีรัม และปริมาณของ VN ในตัวอย่างซีรัมและพลาสมาจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและกลุ่มควบคุมนั้น จากผลการศึกษานี้ พบว่าการแจกแจงของข้อมูลในแต่ละกลุ่มที่ทำการทดลองมีความแปรปรวนไม่เป็นแบบปกติ (non-normal distribution) จึงดำเนินการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี kruskal-wallis analysis พบว่า ระดับของสาร CEA ในซีรัมของกลุ่มควบคุม, ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม stage 0-I และ stage II มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่

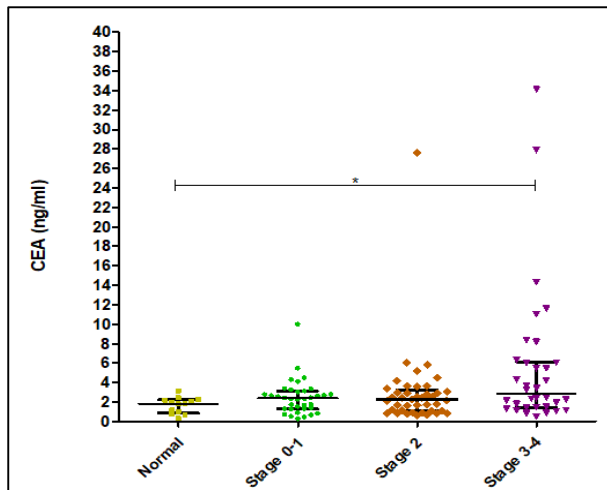
ที่ 1.84 (0.31-3.15), 2.39 (0.28-10.0) และ 2.26 (0.65-27.60) ng/ml ตามลำดับ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ CA15-3 ในซีรัมมีค่ามัธยฐาน 15.03 (3.57-31.90) และ 14.40 (4.31-29.40) IU/ml ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะที่ 0-I และ II ตามลำดับ แต่ระดับการแสดงออกของ CEA และ CA15-3 ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม stage III-IV มีค่า 2.86 (0.49-34.10) และ 21.0 (6.28-114.0) ตามลำดับ ซึ่งถือว่าสูงกว่าระดับที่ตรวจพบในซีรัมหรือพลาสมาของกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1, รูปที่ 1A และ 1B

ตารางที่ 1 ระดับการแสดงออกของ CEA, CA15-3, serum VN และ plasma VN ในตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม (n=125)

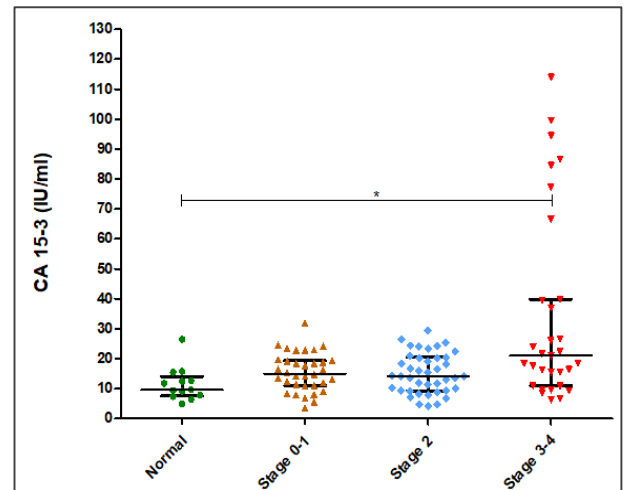
Sample group	Number (%)	CEA (ng/ml) Median (min-max)	CA15-3 (IU/ml) Median (min-max)	Serum VN (ng/ml) Median (min-max)	Plasma VN (ng/ml) Median (min-max)
Normal	13 (10.4)	1.84 (0.31-3.15)	9.67 (5.03-26.50)	0.92 (0.60-3.81)	0.81 (0.62-1.13)
Breast cancer					
Stage 0-I	36 (28.8)	2.39 (0.28-10.0)	15.03 (3.57-31.90)	5.06 (1.02-8.39)	3.32 (0.74-4.35)
Stage II	41 (32.8)	2.26 (0.65-27.60)	14.40 (4.31-29.40)	6.15 (3.99-10.71)	3.56 (2.00-5.03)
Stage III-IV	35 (28.0)	2.86 (0.49-34.10)	21.0 (6.28-114.0)	5.11 (0.94-17.70)	2.66 (0.56-4.12)

สำหรับผลการวิเคราะห์ระดับของปริมาณ VN ที่ตรวจพบในซีรัมและพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะต่าง ๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ปริมาณของ VN ที่ตรวจพบในซีรัมและพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะที่ II สูงกว่าระยะอื่น ๆ นั่นคือมีค่ามัธยฐาน 6.15

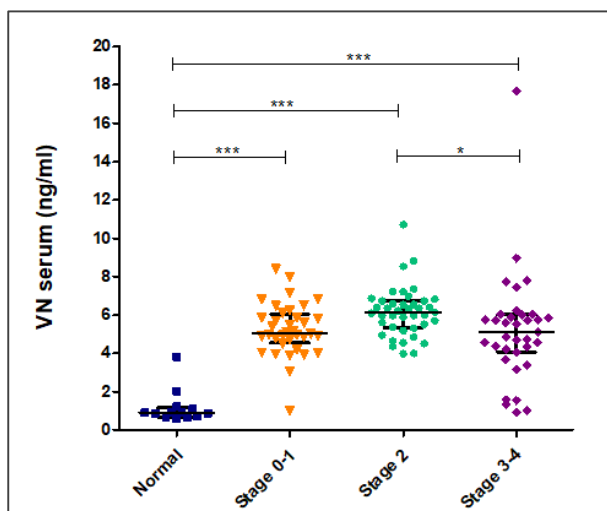
(3.99-10.71) และ 3.56 (2.00-5.03) ng/ml ในซีรัมและพลาสมาตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดลองในตัวอย่างจากคนปกติไม่พบความแตกต่างของ VN ที่ตรวจพบทั้งในตัวอย่างทั้งสองชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1, รูปที่ 1C และ 1D



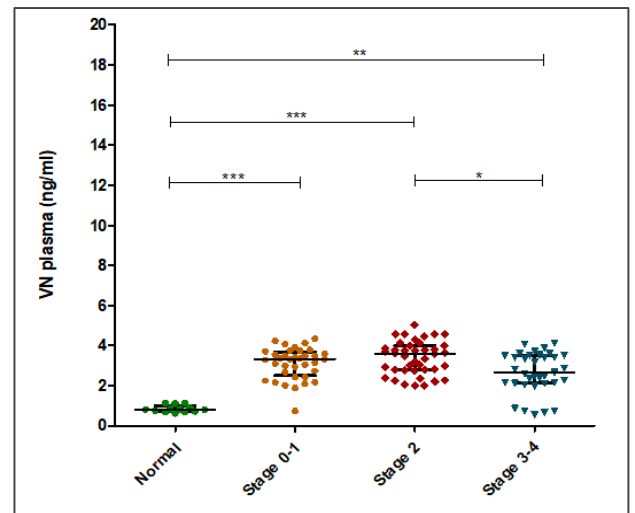
(A) CEA



(B) CA15-3



(C) VN in Serum



(D) VN in Plasma

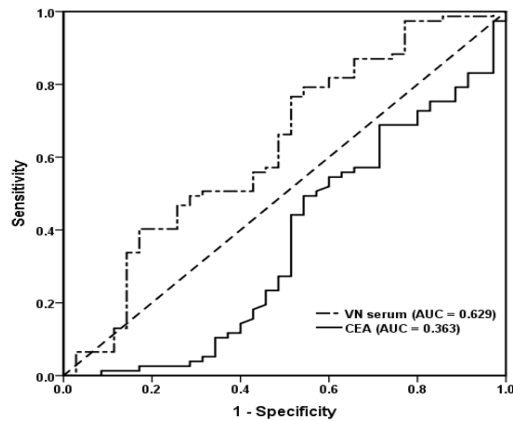
รูปที่ 1 Box graph เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ CEA, CA15-3, serum VN และ plasma VN ในตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม (n=125), โดยมีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95% ซึ่ง * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

จากผลการวิเคราะห์ sensitivity และ specificity ของ VN และสารบ่งชี้มาตรฐาน CEA, CA15-3 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการวินิจฉัยว่าอยู่ในระยะเริ่มต้น (stage 0-II) และระยะลุกลาม (stage III-IV) ด้วย Receiver operating characteristic curve (ROC) เพื่อประเมินค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area under curve; AUC) ซึ่งค่าพื้นที่ที่มีค่าใกล้เคียงกับ 1 จะมีความแม่นยำในระดับสูงต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิก

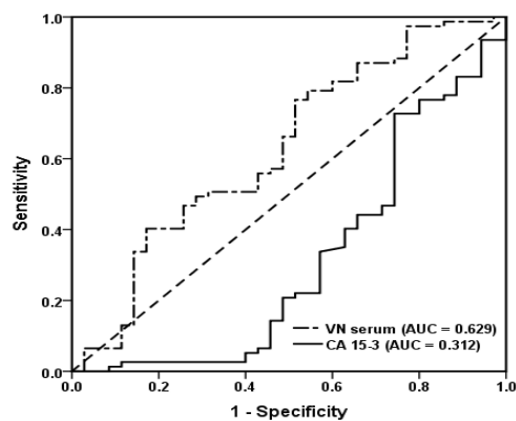
จากผลการวิเคราะห์พบว่า กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกมีค่า AUC หรือพื้นที่ใต้กราฟของ VN สูงกว่า CEA และ CA15-3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นั่นคือ P -value เท่ากับ 0.02 และ 0.01 ตามลำดับ ซึ่ง VN สามารถบ่งชี้ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกได้ดีกว่า โดยมีพื้นที่ใต้โค้ง 0.629 ในขณะที่ CEA และ CA15-3 จะแสดงพื้นที่ใต้โค้งประมาณ 0.363 และ 0.312 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 สำหรับผล

การศึกษาในระยะลุกลาม (stage III-IV) พบว่า สารบ่งชี้มาตรฐาน CEA และ C15-3 มีความแม่นยำมากกว่า VN โดยพื้นที่ใต้กราฟของ CEA

และ CA15-3 เท่ากับ 0.637 และ 0.688 ตามลำดับ ในขณะที่ VN จะอยู่มีค่าพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.371 ดังแสดงในรูปที่ 3

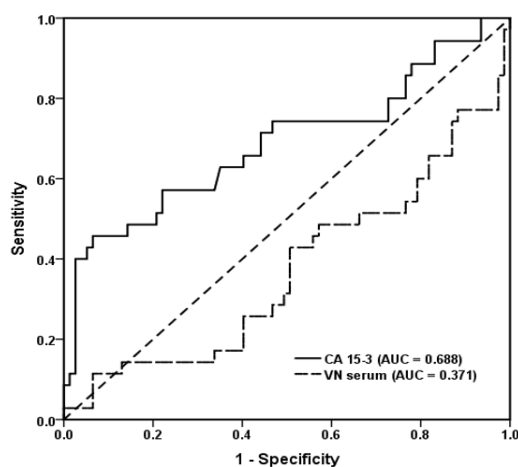


(A) CEA และ VN

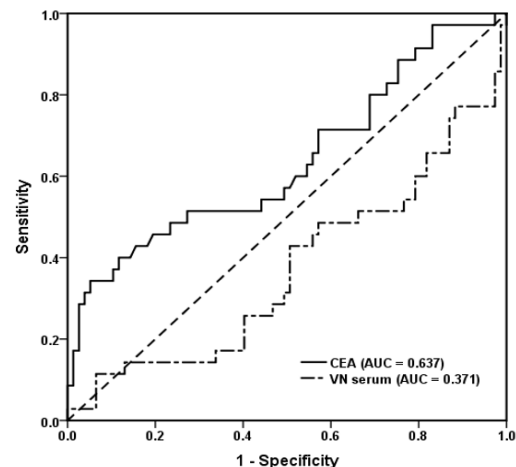


(B) CA15-3 และ VN

รูปที่ 2 Receiver operating characteristic curve (ROC) ของ CEA และ serum VN (A) และ CA15-3 และ serum VN (B) ในการบ่งชี้ sensitivity และ specificity สำหรับการตรวจในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรก (Stage 0-II)



(A) CEA และ VN



(B) CA15-3 และ VN

รูปที่ 3 Receiver operating characteristic curve (ROC) ของ CEA และ serum VN (A) และ CA15-3 และ serum VN (B) ในการบ่งชี้ sensitivity และ specificity สำหรับการตรวจในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะลุกลาม (Stage III-IV)

วิจารณ์และสรุป

จากผลการทดสอบระดับของสาร CEA และ CA15-3 ซึ่งเป็นสารบ่งชี้มาตรฐานของมะเร็งเต้านมที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะ

ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ระดับของ CEA และ CA15-3 ในตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะที่ III-IV มีค่าเกินจากค่าอ้างอิงที่กำหนด โดยเฉพาะผลการตรวจในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะที่ IV จะเพิ่มสูงกว่าที่

ตรวจพบในคนปกติอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Samy N และคณะ²³ และข้อมูลทางพยาธิวิทยาที่มักตรวจพบระดับของ CEA และ CA15-3 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะลุกลามหรือ advance stage สูงกว่าระยะอื่น ๆ มักตรวจพบในระยะเริ่มต้น (stage 0-II) ก่อนข้างต่ำแต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ระดับการแสดงออกของ CEA และ CA15-3 ในกลุ่มที่นำมาทดสอบโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระยะ III-IV พบการกระจายของข้อมูลมาก ส่งผลให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่อนข้างกว้าง หากเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างอาจทำให้การกระจายของกลุ่มข้อมูลลดลง ในขณะที่การตรวจหาระดับการแสดงออกของ VN ในการศึกษานี้จะทำการตรวจทั้งในตัวอย่างซีรัมและพลาสมาที่แยกจากเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการเพื่อประเมินปริมาณของ VN ในตัวอย่างที่ต่างกัน จากผลการทดลอง พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มต้น (stage 0-II) พบปริมาณ VN สูงกว่าของผู้ป่วยระยะ III-IV ทั้งในซีรัมและพลาสมา และพบปริมาณมากที่สุดในระยะที่ II แต่ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับของ VN ในตัวอย่างพลาสมาจะพบผลที่ค่อนข้างแตกต่างจากผลการทดสอบในซีรัมจากผู้ป่วยรายเดียวกัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากชุดน้ำยาลำเร็จรูปที่ผลิตสำหรับการตรวจหา VN และนำมาใช้ในการทดสอบในการศึกษานี้เป็นชุดน้ำยาสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA ที่เหมาะกับการทดสอบในตัวอย่างจากซีรัมมากกว่าพลาสมา รวมทั้งสารอ้างอิง (reference) ที่ใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดสอบก็เป็นซีรัม ดังนั้นอาจมีผลต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์ นอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากวิธีที่ใช้ในการแยกซีรัมและพลาสมามีความแตกต่างกันในการใช้ EDTA มาช่วยยับยั้งการเกิด coagulation หรือ

การแข็งตัวของเลือดส่งผลให้ปริมาณหรือชนิดของโปรตีน (protein composition) บางชนิดที่อยู่ในตัวอย่างทั้งสองมีความแตกต่างกัน¹⁴ ซึ่งตัวอย่างซีรัมน่าจะใช้เป็นตัวที่ดีในการนำมาทดสอบ ทั้งนี้เพราะมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าแต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดสอบในตัวอย่างทั้งสองชนิดก็มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษอื่น ๆ พบว่าผลการทดสอบนี้จะแตกต่างเพียงเล็กน้อยจากผลการทดลองของ Hao W และคณะ⁸ ที่ตรวจพบระดับของ VN ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะที่ 0-I มากที่สุด แต่สอดคล้องผลการศึกษาของ Kadowaki M และคณะ¹⁶ พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน VN ในเซลล์มะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกสูงกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมในระยะลุกลามหรือ advance stage ซึ่งผลที่ดำเนินการทดสอบในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในแต่ละการศึกษาอาจพบความแตกต่างได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบ วิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ ฯลฯ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของ VN ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละการศึกษาจะพบในระยะเริ่มต้น (stage 0-II) มากกว่าระยะลุกลาม (stage III-IV) นอกจากนี้ยังพบผลการศึกษาของ Ortega-Martinez I และคณะ ที่ตรวจพบระดับการแสดงออกของ VN ก่อนข้างสูงในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ได้แก่เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma และปริมาณจะลดลงในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ III-IV โดยเฉพาะในช่วงที่พบการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง¹⁵ และยังพบว่าผู้ป่วยในระยะเริ่มแรกที่ตรวจพบการแสดงออกของ VN ในซีรัมมีปริมาณสูงมากกว่า 2.5 เท่าของปริมาณที่พบในคนปกติจะมีความเสี่ยงหรือโอกาสที่เซลล์มะเร็งจะมีการพัฒนาและแพร่กระจายได้สูงกว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบเพียง

เล็กน้อยหรือไม่พบเลย¹⁵ โดยผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Bera A และคณะ ที่ดำเนินการศึกษาถึงบทบาทของ VN ในเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่า กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ที่ตรวจพบ VN ในระดับสูง จะมีอัตราการรอดชีพ (overall survival rate) ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่พบ ปริมาณ VN เพียงเล็กน้อยหรือไม่พบเลย²⁴ และจากผลการศึกษาของ Schneider G และคณะ พบว่า ระดับการแสดงออกของ VN ที่ลดลงในผู้ป่วยมะเร็งระยะ III-IV อาจมีสาเหตุมาจาก VN เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของสารสังเคราะห์ใน กลุ่ม fibrinogen ที่มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายไปสู่ ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ในการสังเคราะห์ fibrinogen จำเป็นต้องใช้ VN ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ในช่วงแรกของของการเกิดเซลล์มะเร็ง และเมื่อเข้าสู่ระยะที่เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายปริมาณของ VN จึงถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ fibrinogen ส่งผลให้ VN ลดลงในเซลล์มะเร็งระยะนี้¹⁴ นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของ VN ยังมีความสัมพันธ์กับการทำงานของ urokinase-type plasminogen activator (uPA) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis and invasion)^{5,8} และจากผลการทดลองของ Kim BK และคณะ ได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าระดับของ VN ที่ลดลงในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งระยะลุกลามหรือแพร่กระจาย อาจมีสาเหตุมาจากผลสะท้อน (reflect) ของ turnover rate ในเซลล์มะเร็งที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น²⁵

นอกจากนี้จากผลการวิจัยบางส่วนที่ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ VN และปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อการเกิดมะเร็งเต้านม เช่น อายุ ขนาดของก้อนมะเร็ง (tumor size) ระยะของโรค (stage) ฯลฯ พบว่า ระดับของ VN มีความสัมพันธ์

ต่อขนาดของก้อนมะเร็ง, การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymph node status) และระยะของโรค (clinical stage) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับอายุ, การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนชนิดต่าง (hormone receptors), histological grade ฯลฯ⁸ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก VN เป็นสารในกลุ่มของ adhesion molecule ที่มีบทบาทสำคัญต่อการยึดติดกันของเซลล์ใน basement membrane มักไม่ค่อยพบในเลือดหรือในระบบไหลเวียนของร่างกาย แต่มักตรวจพบในเซลล์มะเร็งที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนทำให้เซลล์บางส่วนหลุดจากการเกาะติดบนเมมเบรน ซึ่งเป็นกระบวนการเริ่มต้นของการเกิดการลุกลามของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนต่าง ๆ ภายในร่างกาย จึงทำให้สามารถตรวจพบ VN ในเลือด แต่จะไม่พบในคนที่สุขภาพดี ไม่มีปัญหาสุขภาพอื่น ๆ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับปอด หรือพบในปริมาณที่น้อยมาก^{13,14} ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Kubota K และคณะที่เปรียบเทียบระดับของ VN ในซีรัมและพลาสมาจากเลือดของผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 104 ราย พบว่าระดับของ VN ทั้งในซีรัมและพลาสมาไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ, เพศ หรือชนิดของกลุ่มเลือด²⁶ จากข้อมูลดังกล่าวจะยืนยันผลการศึกษาที่ว่าอายุของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการที่พบค่าเฉลี่ยของอายุต่างกันไม่มีผลต่อการแสดงออกของ VN สำหรับตัวอย่างที่นำมาทดสอบก็ดำเนินการเก็บจากผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่เพิ่งได้รับการตรวจวินิจฉัย และไม่มีประวัติโรคอื่น ๆ ที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของ VN เช่น โรคปอดเช่นกัน ในการศึกษานี้จะพบว่าการกระจายของข้อมูลค่อนข้างมากเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาในแต่ละกลุ่มมีค่อนข้างจำกัด

ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของตัวอย่างที่นำมาศึกษาให้มากขึ้นน่าจะช่วยลดความแปรปรวนของข้อมูล แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากผลการศึกษานี้ก็สามารบ่งชี้ในเบื้องต้นถึงระดับการแสดงออกของ VN ในแต่ละระยะของโรคมะเร็งเต้านมเพื่อนำมาศึกษาต่อหรือวางแผนการรักษาต่อไป

จากผลการศึกษาความไวในการใช้เป็นตัวบ่งชี้กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกและระยะลุกลามด้วยกราฟ ROC และพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ตามเกณฑ์ของ Swet JA ที่กำหนดค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.7-0.9 แสดงความแม่นยำในการนำไปใช้ประโยชน์²² ซึ่งจากผลการศึกษา ค่า AUC ของ VN ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งระยะแรกมีค่าประมาณ 0.629 ในขณะที่ CEA และ CA15-3 มีค่า 0.637 และ 0.688 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่ต่ำกว่ามาตรฐานที่ Swet JA กำหนดเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบในแต่ละกลุ่มมีค่อนข้างน้อยส่งผลให้ค่า AUC ที่ได้ต่ำกว่าที่กำหนด ซึ่งหากเพิ่มจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มในการนำมาทดสอบอาจส่งผลให้ค่า AUC เพิ่มขึ้นและความคลาดเคลื่อนของกลุ่มตัวอย่างจะลดลง แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าระดับการแสดงออกของ CEA สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Li X และคณะ ที่วิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟของ CEA ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้เท่ากับ 0.695²⁷

จากผลการทดลองและรายงานการวิจัยสรุปได้ว่า VN น่าจะเป็นสารบ่งชี้ที่น่าสนใจที่นำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งของการตรวจวิเคราะห์วินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรก (early stage) ควบคู่กับสารบ่งชี้มาตรฐาน CEA และ CA15-3 ที่เหมาะสมกับการบ่งชี้การเกิดมะเร็งระยะ III-IV (advance stage) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

ของการตรวจและวางแผนการรักษาที่มีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่กลุ่มงานศัลยศาสตร์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่อำนวยความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลและคัดกรองกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในโครงการวิจัย ซึ่งโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน (งบบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม) ประจำปี 2561-2562

เอกสารอ้างอิง

1. GLOBOCAN 2020. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. Available at <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Accessed on January 19, 2021.
2. Imsamran W, Pattatang A, Supaattagorn P, Chaiwiriyabunya I, Namthaisong K, Wongsena M et al editors. Cancer in Thailand Vol IX, 2013-2015, Bangkok 2018.
3. Wikipedia. Breast cancer. Available at http://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer. Accessed on January 19, 2021.
4. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. Clinia Chimica Acta 2010;411:1869-74.
5. Lumachi F, Basso SMM. Serum tumor markers in patients with breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2004;4:921-31.
6. Mirabelli P, Incoronato M. Usefulness of traditional serum biomarkers for management of breast cancer patients. Biomed Res Int 2013;2013:685641.
7. Maric P, Ozretic P, Levanat S, Oreskovic S, Antunac K, Beketic-Oreskovic L. Tumor Markers in Breast Cancer-Evaluation of their

- Clinical Usefulness. *CollAntropol* 2011;35: 241-7.
8. Hao W, Zhang X, Xiu B, Yang X, Hu S, Liu Z, et al. Vitronectin: a promising breast cancer serum biomarker for early diagnosis of breast cancer in patients. *Tumor Biol* 2016;37: 8909-16.
9. Aaboe M, Offersen BV, Christensen A, Angreasen PA. Vitronectin in human breast carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638: 72-83.
10. Burgos-Panadero R, Noguera I, Canete A, Navarro S, Noguera R. Vitronectin as a molecular player of the tumor microenvironment in neuroblastoma. *BMC* 2019;19:479.
11. Seiffert D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol Histopathol* 1997;12: 787-97.
12. Chow S, Girolamo ND. Vitronectin: A Migration and Wound Healing Factors for Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:6590-600.
13. Salazer-Pelazar LM, Abraham T, Herrera AM, Correa MA, Ortega JE, Pare PD, et al. Vitronectin Expression in the Airways of Subjects with Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* 2015;10:e0119717.
14. Schneider G, Bryndza E, Poniewierska-Baran A, Serwin K, Suszynska M, Sellers ZP, et al. Evidence that vitronectin is a potent migration-enhancing factor for cancer cells chaperoned by fibrinogen: a novel view of the metastasis of cancer cells to low fibrinogen lymphatics and body cavities. *Oncotarget* 2016;7:69829-43.
15. Ortega-Martinez I, gardeazabal J, Erramuzpe A, Sanchez-Diez A, Cortes J, Garcia-Vazquez MD, et al. Vitronectin and dermcidin serum levels predict the metastatic pregression of AJCC I-II early-stage melanoma. *Int J Cancer* 2016;139:1598-607.
16. Kadowaki M, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Yoshitomi H, Takano S, et al. Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1105-15.
17. Zhu W, Li W, Yang G, Fu C, Jiang G, Hu Q, et al. Vitronectin silencing inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Future Oncol* 2015;11:251-8.
18. Kashyap AS, Hollier BG, Manton KJ, Satyamoorthy K, Leavesley DI, Upton Z. Insulin-like growth factor-I: vitronectin complex-induced changes in gene expression effect breast cell survival and migration. *Endocrinology* 2011;152:1388-401.
19. Li R, Luo M, Ren M, Chen N, Xia J, Deng X, et al. Vitronectin regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Vasc Res* 2014;51:110-7.
20. Pola C, Formenti SC, Schneider RJ. Vitronectin-alpha v beta3 integrin engagement directs hypoxia-resistant mTOR activity and sustained protein synthesis linked to invasion by breast cancer cells. *Cancer Res* 2013;73:4571-8.
21. Gladson CL, Cheresch DA. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism of transformed glial cells. *J Clin invest* 1991;88:1924-32.
22. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988;240:1285-93.
23. Samy N, Ragab HM, Abd El Maksoud N, Shaalan M. Prognosis significance of serum Her2/neu, BCL2, CA15-3 and CEA in breast cancer patients: A short follow-up. *Cancer Biomarkers* 2010;6:63-72.

24. Bera A, Subramanian M, Karaian J, Eklund M, Radhakrishnan S, Gana N, et al. Functional role of vitronectin in breast cancer. PLoS ONE 2020;15:e0242141
25. Kim BK, Lee JW, Park PJ, Shin YS, Lee WY, Lee KA, et al. The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer. Breast Cancer Res 2009;11: R22.
26. Kubota K, Katayama S, Matsuda M, Hayashi M. Three types of vitronectin in human blood. Cell Struct Funct 1988;13:123-8.
27. LI X, DAID ,CHEN B, TANG H, XIE X, WEI W. Determination of the prognostic value of preoperative CA15-3 and CEA in predicting the prognosis of young patients with breast cancer. Oncol Lett 2018;16:4679-88.