วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การจำแนกการแสดงออกของจีนในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา

มณฑิรา สกุลเจีย[1], พัชรี เจียรนัยกูร[2], พิสมัย ยืนยาว[3], อินทิรา ทัศคร[4], เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์[2]*

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยในผู้หญิงทั่วโลก สาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนแปปิโลมาไวรัสชนิดกลุ่มเสี่ยงสูง ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกโดยวิธีมาตรฐานพบภาวะการกลับเป็นซ้ำหรือการไม่ตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยหนึ่งในสาม ดังนั้นความรู้และความเข้าใจถึงกลไกการพัฒนาของมะเร็งในระดับโมเลกุลอาจจะช่วยลดโอกาสการพัฒนาและการดำเนินโรคของมะเร็งและพัฒนาวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นซึ่งจะช่วยลดอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการหาจีนที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากลูกระยะที่ IIIB ที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยใช้เทคนิคไมโครอาเรย์ที่ครอบคลุมจีโนมของมนุษย์ทั้งหมด ผลการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาพบจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 167 จีนและแสดงออกลดลง 146 จีน จีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณ (*CXCL10, ERBB2, TRAF5, FPRL1, IL1B, FGFBP1* และ *SCTR*) การเจริญเติบโต (*REG1A, AREG, TGFBI, ERBB2, PIM2, EIF5A* และ *ISG20*) การย่อยสลายโปรตีน (*PLAU, CRADD, C1R, KLK14, TMEM27, ICEBERG, BF และ ADAMTS8*) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (*ERBB2, IL8, IL1B* และ *FPRL1*) ส่วนจีนที่แสดงออกลดลงมีหน้าที่เกี่ยวกับการถอดรหัสดีเอ็นเอ (*GLIS1, ZNF337, SOX4, PITX1, LASS4, GRHL3, CRABP2, SUHW3, TLE2* และ *KLF8*) การเกาะของเซลล์ (*PCDHB6, TRO, MAGI1, PVRL4, SLURP1* และ *MUC4*) และการส่งสัญญาณ (*CD38, CXCL14, HTR2B, CEACAM6, DPYSL3, NCR1, CRABP2, CLIC3, TLE2* และ *PLXNA2*) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีจีนจำนวนมากที่มีบทบาทแตกต่างกันในการส่งผลให้ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษา

คำสำคัญ: มะเร็งปากมดลูก, การแสดงออกของจีน, ไมโครอาเรย์, การตอบสนองต่อการรักษา

[1] นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3] ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[4] กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลนครพนม
* ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Differential expression of gene profiling in therapeutic response and non-response cervical carcinoma

Montira Sakunjia[1], Patcharee Jearanaikoon[2], Pisamai Yuenyao[3], Inthira Tussakhon[4], Temduang Limpaiboon[2]*

Abstract

Cervical carcinoma is one of the most common malignancies in women worldwide. Persistent infection with high risk human papillomavirus is the most significant factor for carcinogenesis of cervical cancer. Therapeutic modalities of cervical carcinoma are not efficiently controlling the progression of cancer in one third of patients. Therefore, understanding of molecular mechanisms in cancer progression is important to prevent disease progression and improve treatment efficacy leading to the reduction of incidence and mortality rate. We investigated genes differentially expressed in therapeutic response and non-response cervical carcinoma stage IIIB using the human whole genome microarrays. The differential expression of genes in each group was constructed for the network by IPA software. Differentially expressed genes in non-responses compared with responses were identified, which were 167 up-regulated and 146 down-regulated genes. The up-regulated genes have biological functions involved in signal transduction (*CXCL10, ERBB2, TRAF5, FPRL1, IL1B, FGFBP1* and *SCTR*), cell proliferation (*REG1A, AREG, TGFBI, ERBB2, PIM2, EIF5A* and *ISG20*), proteolysis (*PLAU, CRADD, C1R, KLK14, TMEM27, ICEBERG, BF* and *ADAMTS8*), and cell migration (*ERBB2, IL8, IL1B,* and *FPRL1*). The down-regulated genes have biological functions involved in transcription (*GLIS1, ZNF337, SOX4, PITX1, LASS4, GRHL3, CRABP2, SUHW3, TLE2* and *KLF8*), cell adhesion (*PCDHB6, TRO, MAGI1, PVRL4, SLURP1* and *MUC4*), and signal transduction (*CD38, CXCL14, HTR2B, CEACAM6, DPYSL3, NCR1, CRABP2, CLIC3, TLE2* and *PLXNA2*). Our study indicates that multiple genes play distinct roles in response or non-response to therapy in cervical carcinoma.

Keywords: Cervical cancer, Gene expression, Microarray, Response to therapy

[1] Student of the Master of Science Program in Medical Sciences,
[2] Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences,
[3] Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University,
[4] Nakhonphanom Hospital, Nakhonphanom
*Corresponding author: (e-mail: temduang@kku.ac.th)

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของสตรีทั่วโลก[1] สำหรับประเทศไทยในปี 2002 มีผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 6,243 รายและมีผู้เสียชีวิตประมาณ 2,620 ราย[2] เป็นที่ทราบกันดีว่าการติดเชื้อ human papillomas virus (HPV) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยพบจีโนมของ HPV รวมทั้ง viral protein (E6 และ E7) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกจำนวนมาก โดย viral protein E7 สามารถจับกับ Rb protein ใน cell cycle ส่งผลให้เซลล์เกิดกระบวนการ transcription ของจีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ตลอดเวลา เนื่องจาก E2F protein ที่ทำหน้าที่ transcription factor เป็นอิสระไม่ถูกจับและถูกควบคุมด้วย Rb นอกจากนี้ viral protein E6 ยังสามารถจับกับ p53 protein ทำให้ p53 protein ถูกทำลายโดย proteosome ผ่านกระบวนการ ubiquitination เมื่อไม่มี p53 protein ซึ่งทำหน้าที่เป็น cell cycle check point และ cell cycle arrest จะทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมไม่สามารถหยุดเพื่อซ่อมแซม DNA ได้ และก่อให้เกิดการสะสมความผิดปกติของจีนภายในเซลล์มากขึ้น เซลล์จึงกลายเป็นมะเร็งในที่สุด[3] การบำบัดรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในระยะลุกลามโดยวิธีรังสีรักษาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าผู้ป่วยบางส่วนตอบสนองต่อการรักษาและบางส่วนไม่ตอบสนองต่อการรักษาและมีแนวโน้มการดำเนินโรครุนแรงมากขึ้น การใช้เคมีบำบัดควบคู่กับรังสีรักษาพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตมากกว่าการรักษาตามวิธีเดิมที่ใช้รังสีรักษาอย่างเดียว โดยสามารถลดอัตราการตายได้ร้อยละ 20-50[4, 5] อย่างไรก็ตามการให้เคมีบำบัดควบคู่กับรังสีรักษาพบว่ายังมีผู้ป่วยบางส่วนที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาและมีการดำเนินของโรคต่อไป ดังนั้นการเข้าใจถึงความรู้พื้นฐานในระดับโมเลกุลของมะเร็งปากมดลูกที่ส่งผลให้ผู้ป่วยตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาจึงมีความสำคัญในการวางแผนการรักษาที่มีประสิทธิภาพตลอดจนวางแผนการป้องกันการพัฒนาของโรคมะเร็ง (disease progression)

เทคนิค oligonucleotide array เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของจีนเป็นจำนวนมากในคราวเดียวกัน (high throughput) เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างปกติและตัวอย่างที่ผิดปกติจะทำให้สามารถจำแนกจีนที่มีการแสดงออกในระดับที่แตกต่างกันได้ซึ่งการแสดงออกของจีนที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์ที่ผิดปกติจะทำให้เข้าใจกลไกและ signaling pathway ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการดำเนินรอยของโรคการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาหาจีนที่แสดงออกที่แตกต่างกันในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อได้จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่มารับการตรวจรักษาที่คลินิกเนื้องอกและมะเร็ง หน่วยสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2550 และได้รับการรับรองทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE 510653 โดยชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษามีผลการตรวจยืนยันทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะที่ IIIB หลังจากเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ ผู้ป่วยแต่ละรายได้รับการรักษาโดยวิธีมาตรฐานซึ่งได้แก่รังสีรักษาหรือรังสีรักษาร่วมกับเคมีบำบัดและถูกติดตามการรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือนโดยการตรวจปากมดลูก (pelvic examination) การตรวจเช็คผล pap smear และ colposcopy เพื่อประเมินผลการรักษา ซึ่งผู้ป่วยถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามหลักเกณฑ์ดังนี้ (1) กลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาคือกลุ่มที่ไม่พบรอยโรคระหว่างการรักษาและไม่พบการกลับเป็นซ้ำภายในระยะเวลา 3 เดือนและ (2) กลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาคือกลุ่มที่พบรอยโรคระหว่างการรักษาและพบการกลับเป็นซ้ำภายในระยะเวลา 3 เดือน สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อถูกถนอมไว้ใน RNA Later (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) ก่อนเก็บรักษาที่ -80°ซ

วิธีการศึกษา

1. การเลือกตัวอย่าง total RNA ที่เหมาะสม

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกถูกนำมาสกัด total RNA โดยใช้ RNeasy RNA isolation system (QIAGEN, Hilden, Germany) วัดปริมาณและคุณภาพของ total RNA โดยใช้ Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA) โดย total RNA ของตัวอย่างใดที่มีค่า RNA integrity number; RIN > 7 ถูกเลือกนำไปรวม (pool) ในปริมาณที่เท่ากันๆ (500 ng/ตัวอย่าง) ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง total RNA ที่นำมา pool ในกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษาเท่ากับ 7 และ 8 ตัวอย่างตามลำดับ หลังจากนั้นนำ pooled total RNA ทั้งสองกลุ่มไปวัดหาปริมาณโดยใช้เครื่อง NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี MOPs Denaturing agarose gel electrophoresis ก่อนทำไมโครอาเรย์

2. การหาจีนที่แสดงออกแตกต่างกันโดยวิธีไมโครอาเรย์ (microarray)

การหาจีนที่แสดงออกแตกต่างกันในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาใช้ CodeLink Human Whole Genome Bioarray (Applied Microarrays, Inc., Tempe, AZ) ที่ประกอบด้วยจีนจำนวน 54,841 จีนโดยทำการศึกษาแบบ duplicate ปริมาณ pooled total RNA 1 μg ถูกนำมาสังเคราะห์และติดฉลากเป็น biotin-labeled amplified RNA (aRNA) โดยใช้ MessageAmp II-Biotin Enhanced kit (Biosystems/Ambion, Austin, TX) จากนั้น aRNA ถูกนำไป hybridization บนไมโครอาเรย์โดยใช้ CodeLink™ Expression Assay Reagent Kit (Applied Microarrays, Inc., Tempe, AZ) และไมโครอาเรย์ถูกนำไป scan ภาพโดยใช้เครื่อง ArrayWoRx scanner (Applied Precision, Issaquah, WA) หลังจากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CodeLink expression analysis software version 5.0 (Amersham Bioscience, Pittsburgh, PA) เพื่อเปลี่ยนเป็นค่าความเข้มของแสงของแต่ละจีน

3. การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาจีนที่แสดงออกแตกต่างกันและ signaling network

ค่าความเข้มแสงที่ได้จากโปรแกรมเป็นค่าที่โปรแกรมได้คำนวณหักล้าง (normalized) จากความเข้มแสงของพื้นหลังแล้ว (background) ดังนั้นคณะผู้ศึกษาจึงนำค่าความเข้มแสง (normalized intensity) ดังกล่าวมาใช้ขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์คือการเลือกจีนที่เหมาะสมโดยมีขั้นตอนดังนี้ ในสไลด์ที่เป็น duplicate กันจีนเดียวกันที่มีค่าอัตราส่วนของความเข้มแสงทั้งสองสไลด์แตกต่างกัน > 2 หรือ < 0.5 เท่า ถูกตัดทิ้งเนื่องจากมี reproducibility ที่ต่ำ หลังจากนั้นทำการเลือกเฉพาะจีนที่มีค่าคุณภาพของจุดบนสไลด์เป็น good เท่านั้น โดยค่าดังกล่าว เป็นค่าคุณภาพที่โปรแกรมแสดงไว้แล้ว ดังนั้นจีนที่มี reproducibility ดีและมีคุณภาพเท่านั้นที่ถูกนำมาวิเคราะห์หาจีนที่แสดงออกแตกต่างกัน

การวิเคราะห์หาจีนที่แสดงออกแตกต่างกันในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาทำได้โดยนำค่าความเข้มแสงของจีนในสองกลุ่มมาหาอัตราส่วนโดยใช้โปรแกรมเอกเซลล์ จีนใดที่มีค่าอัตราส่วนมากกว่าหรือเท่ากับ 2 แสดงว่ามีการแสดงออกที่แตกต่างกัน ดังนั้นสามารถแยกจีนที่แสดงออกแตกต่างกันได้สองกลุ่มคือ จีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นได้แก่จีนที่มีค่าความเข้มแสงในกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษามากกว่าหรือเท่ากับ 2 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา และจีนที่แสดงออกลดลงได้แก่จีนที่มีค่าความเข้มแสงในกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 เทียบกับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา แต่เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไปจึงใช้ส่วนกลับในการแสดงผลของจีนที่แสดงออกลดลงแทน (≥ 2) จีนที่มีแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงจะถูกนำไปสร้าง signaling network โดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathways Analysis (IPA) เพื่อสร้าง network โดยใช้ฐานข้อมูลของ IPA

ผลการศึกษา

1. ปริมาณและคุณภาพของ pooled total RNA

เพื่อให้ผลการศึกษาด้วยวิธีไมโครอาเรย์มีความน่าเชื่อถือ pooled total RNA ได้ถูกนำไปวัดปริมาณและคุณภาพก่อน ซึ่งผลการศึกษาพบว่า pooled total RNA ทั้งสองกลุ่มมีความบริสุทธิ์ที่ดี คือมีค่าอัตราส่วนของ 260/280 เฉลี่ยประมาณ 1.97 และนอกจากนี้เมื่อทดสอบคุณภาพด้วย denaturing agarose gel electrophoresis พบว่า pooled total RNA ทั้งสองกลุ่มมี 18s และ 28s bands RNA ที่ชัดเจนและไม่มีลักษณะเป็น smear ดังนั้น pooled total RNA นี้จึงเหมาะที่จะนำไปศึกษาต่อด้วยวิธีไมโครอาเรย์

2. จีนที่แสดงออกแตกต่างกันในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา

จากการศึกษาพบจีนที่แสดงออกแตกต่างกันอยู่ 313 จีน โดยเป็นจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวน 167 จีน และจีนที่แสดงออกลดลงจำนวน 146 จีน จีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเป็นจีนที่ทราบหน้าที่แล้วจำนวน 67 จีน โดย **ตารางที่ 1** แสดงจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและทราบหน้าที่แล้ว 10 อันดับแรกซึ่งส่วนมากเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (*CXCL10, ERBB2, TRAF5, FPRL1, IL1B, FGFBP1* และ *SCTR*) การเจริญเติบโตของเซลล์ (*REG1A, AREG, TGFBI, ERBB2, PIM2, EIF5A* และ *ISG20*) การย่อยสลายโปรตีน (*PLAU, CRADD, C1R, KLK14, TMEM27, ICEBERG, BF* และ *ADAMTS8*) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (*ERBB2, IL8, IL1B* และ *FPRL1*) โปรแกรม IPA สร้าง network ของจีนที่แสดงออกเพิ่มมากขึ้นได้ 6 network **(ตารางที่ 2)** โดย network 1 เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการ การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ และจีนส่วนมากใน network อยู่รอบๆ จีน NFkB และ IL1 จีนใน network 2 เกี่ยวข้องกับ ERK และทำหน้าที่หลักเกี่ยวกับการอักเสบและโรคของกล้ามเนื้อเกี่ยวพัน ส่วน network 3 เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของจีน การตายของเซลล์และโรคทางระบบประสาท

ตารางที่ 1 จีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 10 อันดับแรกในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาเทียบกับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา

Gene name	Symbol	Fold change (NR/RIII)*	Function
Regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein)	*REG1A*	423.696	Cell proliferation
Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	*PLA2G2A*	26.535	Metabolic process
Serum amyloid A2	*SAA2*	10.967	Apoptosis, Chemotaxis Inflammatory response
Lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)	*LGALS4*	8.635	Cell adhesion
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1, transcript variant 1	*IGLL1*	6.985	Immune response
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	*CXCL10*	6.031	Cell proliferation, cell-cell signaling
Fc fragment of IgG binding protein	*FCGBP*	5.853	Cell adhesion
Interleukin 1, beta	*IL1B*	5.196	Inflammatory response, cell-cell signaling
Ovo-like 1(Drosophila)	*OVOL1*	5.065	Epidermis development
Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	*CHI3L1*	*3.564*	*Metabolic process*

*NR, Non-response; RIII, response stage IIIB

ตารางที่ 2 จีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในแต่ละ network

ID	Molecules in Network*	Top functions
1	**C1R, CD55, CD180, CD79B, CDK4, CFB, CRADD, CTLA4,** Cyclin A, Cyclin E, **DYRK3, ERBB2, FCGBP,** FSH, **FST, HLA-A,** Hsp70, **ICEBERG,** IgG, **IGLL1, IL1B,** Interferon alpha, **ISG20, LTF,** NF-κB, NFkB, **PIM2** (includes EG:11040), **PLAC8,** Proteasome, **PSMB8,** RNA polymerase II, **SUMO1, TGFBI, TNFRSF10D, TRAF5**	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function
2	Ap1, **AREG, CHI3L1,** Creb, **CXCL10,** ERK, ERK1/2, ETS, **FPR2,** hCG, IFN Beta, IL1, **IL8,** IL12, **IL8RA,** Jnk, LDL, Mek, Mmp, **MS4A1,** P38 MAPK, **PADI4,** Pdgf, Pkc(s), **PLA2G2A, PLAU,** Pld, Ras, Rsk, **SAA2,** SAA@, **SOD2, SPIB,** Tgf beta, **TNFAIP6**	Connective Tissue Disorders, nflammatory Disease, I Skeletal and Muscular Disorders
3	beta-estradiol, **CCL18, CD300E,** COL16A1, cyclic AMP, dihydrotestosterone, **FGFBP1, GLUL,** IL2, **IL21R,** KLK3, KLK11, **KLK14,** LGALS4, MAP3K1, MSMB, Nfat, NNMT, **NOVA1, OVOL1,** PARP1, **PDLIM5,** psychosine, **PUS1,** RYR2, **SCTR,** SLCO1A1, **SPOCK2, STEAP4,** TGFB1, TNF, Trypsin, TSPAN5, TYMP, UGDH	Gene Expression, Cell Death, Neurological Disease
4	**AFAP1L1,** Akt, ALOX12, ARRB1, ASAH2, **AURKB,** BAX, CD4, CD24, **CLECL1, CMBL,** Cpla2, D-glucose, **EIF5A,** F2, GBP2, Histone h3, **HLA-DMA,** HLA-DOA, **HLA-DPA1, HSH2D** (includes EG: 84941), IER2, IL4, Insulin, Mapk, MYH11, NR4A3, PARP1, PDGF BB, PI3K, PLA2G1B, **PLA2G2A,** PLA2G4A, **PLEK,** TERT	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry
5	Actin, ACTR8, **ACY3, AKR1C1,** ANG, ASGR2, **C1ORF176, CD55,** CPB2, CTSZ (includes EG:1522), CYP2A2, FLJ20309, **FOXA3,** G0S2, **GABRR1,** GBE1, GLA, HNF1A, HNF4A, IGF1, MCCC1, NR1D1, PARP1, **REG1A,** RHPN2, RUVBL2, SLC10A1, SLC37A4, SREBF2, **SUPT7L,** TADA1L, **TCAG7.1177,** TMEM33, Trypsin, UGT1A1	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry
6	**SLC9A7**	Molecular Transport, Cell Morphology

*Overexpressed genes are presented in bold, genes derived from IPA are presented in normal type.

จีนที่แสดงออกลดลงที่ทราบหน้าที่แล้วมีจำนวน 71 จีน (**ตารางที่ 3** แสดงจีน 10 อันดับแรก) ส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสดีเอ็นเอ *(GLIS1, ZNF337, SOX4, PITX1, LASS4, GRHL3, CRABP2, SUHW3, TLE2* และ *KLF8*) การเกาะของเซลล์ (*PCDHB6, TRO, MAGI1, PVRL4, SLURP1* และ *MUC4*) และการส่งสัญญาณ (*CD38, CXCL14, HTR2B, CEACAM6, DPYSL3, NCR1, CRABP2, CLIC3, TLE2* และ *PLXNA2*) นอกจากนี้ IPA สามารถสร้าง networks ได้จำนวน 11 networks **(ตารางที่ 4)** โดย network 1 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ การพัฒนาของเซลล์และโรคของกระดูกและกล้ามเนื้อ network 2 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และโรคของระบบประสาท จีนส่วนมากจะอยู่รอบๆ จีน Akt และ Pkc นอกจากนี้จีนใน network 3 อยู่รอบๆ HNF4A และมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์และ cellular assembly and organization

ตารางที่ 3 จีนที่แสดงออกลดลง 10 อันดับแรกในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาเทียบกับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา

Gene name	**Symbol**	**Fold change (RIII/NR)***	**Function**
Involucrin	*IVL*	18.298	Keratinocyte differentiation
Late cornified envelope 3D	*LCE3D*	15.437	Keratinization
Small proline-rich protein 3	*SPRR3*	14.991	Keratinization
Secreted LY6/PLAUR domain containing 1	*SLURP1*	14.729	Cell activation, Cell adhesion
Keratin 4	*KRT4*	9.824	Epithelial cell differentiation
Cornifelin	*CNFN*	6.997	Keratinization
Chloride intracellular channel 3	*CLIC3*	6.649	Transport
Small proline-rich protein 2A	*SPRR2A*	6.572	Epidermis development, Keratinocyte differentiation
KIPV467	*UNQ467*	6.398	Keratinocyte differentiation
Rhesus blood group, C glycoprotein	*RHCG*	6.266	Transport, Epithelial cell differentiation

*NR, Non-response; RIII, response stage IIIB

ตารางที่ 4 จีนที่มีการแสดงออกลดลงในแต่ละ network

ID	Molecules in Network*	Top functions
1	beta-estradiol, **BEX2,** BYSL, CCDC85B, **CD38,** CEBPD, **CRABP2,** DDIT3, **DPYSL3,** DSP, DYRK2, **EVPL,** FOSL2, **FXYD6, HTR2B,** IGF1, **IVL,** JUND, KLF6, LOR, **LYPD3,** MAP2K3, MAP2K6, NOS2A, PIK3C2B, PLG, **SERPINB13, SPRR3** (includes EG:6707), **TACSTD2,** thymidine, TP53, **TRO,** WWOX, ZAP70, **ZNF337**	Cell Death, Skeletal and Muscular Disorders, Cellular Development
2	ADCY6, Akt, **ANXA1,** APOL1, Camk, **CEACAM6** (includes EG:4680), **CLIC3,** DDIT3, DDX39, DNM1, DNMBP, gamma-linolenic acid, **HBB** (includes EG:3043), HLTF, ITSN1, KLC2, **KRT16, MAGI1, MAPT,** MARK2, MUC4, OR5H6, PICK1, Pka, Pkc(s), PLA2G1B, PLN, PPP1R3A, PVRL1, PVRL3, **PVRL4, S100A1,** S100A8, **SORBS2, TIAM1**	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Compromise, Neurological Disease
3	ACTN4, **AHNAK, ALDH3A1,** ANXA5, AP1M1, ATP2B2, CDH1, CLTCL1, **CNFN,** CRB3, CTSB, DLG1, **DSC2,** DSG1, **ERO1L,** EXO1, HNF4A, **KLF8, LASS4,** LIN7C, LMO7, LPCAT3, MAPK14, MPP5, **MPP7,** palmitic acid, **PDSS2,** PODXL, RUNDC3A, **SLC9A3R2,** SQRDL (includes EG:58472), TBC1D10A, TFPT, TMEM43, XPNPEP3	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance
4	**ABTB2, CLASP2,** CNGB1, **CXCL14,** DDIT3, DYRK1A, EGR2, ERG, F2RL3, FGF2, FOSL1, FOSL2, GP1BB, GUSB, HIF1A, **HIG2,** HOXA13, JUND, **KIAA1853,** KLF6, **KRT4,** MAP2K1, **NCR1,** NOTCH1, NOVA1, PDC, PRKCD, Ras, RBL2, **SLC1A2, SOX4, SPARC,** TNF, VWF, YWHAG	Cancer, Cellular Development, Gene Expression
5	AHR, Ca2+, **CALML3,** CARD6, CASP8AP2, CRH, DDIT3, FOSL2, GLI2, **HLA-DRB5,** IFNB1, IL22, IL1B, IVL, JUN, JUND, LOR, MAP2K3, MAP2K6, **MAP3K9,** MAPK8, MAPK13, MYO10, **NLRP1,** NLRP2, NOTCH1, **PITX1, PLXNA2, RASD2, SBSN,** SMAD3, **SPRR2A,** TIFA, TRAF2, **USP53**	Gene Expression, Cellular Growth and Proliferation, Cell Cycle
6	ABL1, **AIM1,** CDKN1A, **CES1** (includes EG:1066), Cyclin E, **EMP1,** ERBB2, FOS, **FXYD1, GPX3,** H3F3A, HRAS, Hsp70, JUP, MTA1, MYC, PABPC1, PAK2, PIN1, PLAT, PPIA, PRDM1, PRKCA, PTGES, PTGS2, Ras, RB1, RBL2, RPS6KB1, SCARB1, **SPARC,** SQRDL (includes EG:58472), TLE1, **TLE2,** TXN	Cellular Growth and Proliferation, Cell Cycle, Cancer
7	**GRHL3**	Embryonic Development, Tissue Development, Organismal Functions

ID	Molecules in Network*	Top functions
8	H+, **SLC15A2**	Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry, Amino Acid Metabolism
9	DPEP, **DPEP3**	Protein Degradation
10	Gli, **GLIS1**	
11	Dopamine beta-monooxygenase, **MOXD1**	

*Under expressed genes are presented in bold, genes derived from IPA are presented in normal type.

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

1. การรวมกลุ่ม total RNA เพื่อศึกษาด้วยวิธีไมโครอาเรย์

เนื่องจากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกที่ได้จากผู้ป่วยแต่ละรายมีขนาดเล็กซึ่งเมื่อสกัด RNA แล้วได้ปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการศึกษาด้วยไมโครอาเรย์ ดังนั้นจึงได้ทำการรวมกลุ่ม RNA ในแต่ละตัวอย่างก่อน เพื่อให้มีปริมาณที่มากเพียงพอต่อการทำไมโครอาเรย์ ซึ่งข้อดีของการรวมกลุ่ม RNA นี้ช่วยลดความแตกต่างในด้านชีวภาพของแต่ละตัวอย่างส่งผลให้ได้การศึกษาที่สามารถสะท้อนถึงจีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างกันในผู้ป่วยส่วนใหญ่ซึ่งช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย[6] แต่อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการรวมกลุ่มเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่น่าเชื่อถือยังไม่มีผู้ทำการศึกษาที่ชัดเจน Glass และคณะ 2005[7] ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของจีนในตัวอย่างแบบเดี่ยว (individual sample) กับแบบรวมกลุ่ม (5 ตัวอย่าง/กลุ่ม) พบว่าจำนวนจีนที่แสดงออกในแบบรวมกลุ่มคิดเป็นร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับแบบเดี่ยว Agrawal และคณะ 2002 พบว่าเมื่อรวมกลุ่ม RNA จำนวน 5 ถึง 10 ตัวอย่างต่อกลุ่มทำให้ได้ตัวบ่งชี้มะเร็งและตัวบ่งชี้การดำเนินโรค (tumor markers and progression markers) ที่เหมือนกับการทำไมโครอาเรย์ที่ไม่ได้รวมกลุ่ม[8] ดังนั้นการรวมกลุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาโดยไมโครอาเรย์จึงสามารถใช้เพื่อหาจีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ของผลการศึกษาที่ได้ก่อนการนำผลการศึกษาไปใช้ประโยชน์ โดยทำการตรวจสอบในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ได้นำมาศึกษาไมโครอาเรย์ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

2. จีนบ่งชี้ในการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

จากการศึกษาหาจีนเพื่อบ่งชี้ว่าผู้ป่วยตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาพบว่าจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์และการย่อยสลายโปรตีน โดยจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นที่น่าสนใจคือ Regenerating islet-derived 1 alpha หรือ REG1A โดยเป็นจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษามากที่สุดคือ 423.696 เท่า จากหลายการศึกษาพบ REG1A แสดงออกในมะเร็งหลายชนิด[9-12] Sekikawa และคณะ (2005 และ 2008) รายงานว่าโปรตีน REG1A สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและยับยั้งการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ (anti-apoptotis) โดยกระตุ้นการทำงานของ Akt กระตุ้นกระบวนการฟอสฟอลิเลชันของ Bad และเพิ่มการแสดงออกของ Bcl-xL[12, 13] นอกจากนี้ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ REG1A ต่ำพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตในช่วง 10 ปี (10-year disease-specific survival rate) สูงกว่าผู้ป่วยที่มี REG1A สูง[10] แต่ในผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารที่มีการแสดงออกของ REG1A กลับพบตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีรังสีบำบัด[14] Phospholipase A2, group IIA หรือ PLA2G2A เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งพบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งหลายชนิดได้แก่ มะเร็งต่อมลูกหมาก[15] มะเร็งลำไส้[16] และมะเร็งกระดูกที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด[17]

จีนที่แสดงออกลดลง 10 จีนแรกส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermal differentiation) คือ *IVL, LCE3D, SPRR3, SLURP1, KRT4, CNFN* และ *UNQ467* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Okada และคณะ 2002 ซึ่งรายงานว่ามะเร็งที่มีการพัฒนาเพื่อจำแนกหน้าที่มีอัตราการตอบสนองต่อรังสีรักษามากกว่ามะเร็งที่ไม่มีการพัฒนาเพื่อจำแนกหน้าที่[18] ดังนั้นการแสดงออกของจีนเหล่านี้อาจบ่งชี้ถึงการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาได้ Involucrin (IVL) คือจีนที่แสดงออกลดลงแตกต่างกันมากที่สุดในสองกลุ่มการศึกษา IVL แสดงออกลดลงในมะเร็งหลอดลม[19] มะเร็งปากมดลูกและภาวะก่อนมะเร็งปากมดลูก[20, 21] รวมทั้งพบการแสดงออกที่ลดลงในผู้ป่วยมะเร็งช่องปากที่มีการพยากรณ์โรคไม่ดีอีกด้วย[22]

นอกจากนี้ยังมีจีนที่ไม่ทราบหน้าที่จำนวนหนึ่งที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่ม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งจีนเหล่านี้อาจเป็นกลไกสำคัญในการทำให้ผู้ป่วยตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษา โดยจีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงมากที่สุดคือ CA431156.1 และ AA147817.1 ตามลำดับ โดยสรุปแล้วพบว่าการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกเกี่ยวข้องกับจีนจำนวนมาก โดยผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษามักมีจีนที่เกี่ยวข้องกับเจริญเติบโตของเซลล์

และการย่อยสลายโปรตีนแสดงออกเพิ่มขึ้นแต่มีจีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพื่อจำแนกหน้าที่ (cellular differentiation) และการเกาะติดของเซลล์ลดลง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคุณดวงใจ แสงสะคู ศูนย์จีโนมิค สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในความกรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการตรวจคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

1 Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, et al. Global cancer facts & figures 2007. American Cancer Society 2007:23.

2 World Health Organization and Information Centre on HPV and Cervical Cancer. Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Thailand. HPV Information Centre [serial online] 2007 [cited 2008 Jun 25]. Available from: URL: http://www.who.int/hpvcentre.

3 Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002; 55: 244-65.

4 Monk BJ, Tewari KS, Koh WJ. Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinoma: state of the art and future directions. J Clin Oncol 2007; 25: 2952-65.

5 Mitra D, Ghosh B, Kar A, Basu S, Deb AR, Sur PK. Role of chemoradiotherapy in advanced carcinoma cervix. J Indian Med Assoc 2006; 104: 432-6.

6 Kendziorski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. Biostatistics 2003; 4: 465-77.

7 Glass A, Henning J, Karopka T, Scheel T, Bansemer S, Koczan D, et al. Representation of individual gene expression in completely pooled mRNA samples. Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69:1098-103.

8 Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, et al. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. J Natl Cancer Inst 2002; 94: 513-21.

9 Sasaki Y, Minamiya Y, Takahashi N, Nakagawa T, Katayose Y, Ito A, et al. REG1A expression is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with breast cancer. Ann Surg Oncol 2008; 15: 3244-51.

10 Minamiya Y, Kawai H, Saito H, Ito M, Hosono Y, Motoyama S, et al. REG1A expression is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2008; 60: 98-104.

11 Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Takeda J, Nanakin A, Hisatsune H, et al. REG I alpha protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer. Gastroenterology 2005;128: 642-53.

12 Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, et al. Possible role of REG I alpha protein in ulcerative colitis and colitic cancer. Gut 2005; 54:1437-44.

13 Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, et al. REG Ialpha protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. Carcinogenesis 2008; 29: 76-83.

14 Hayashi K, Motoyama S, Sugiyama T, Izumi J, Anbai A, Nanjo H, et al. REG Ialpha is a reliable marker of chemoradiosensitivity in squamous cell esophageal cancer patients. Ann Surg Oncol 2008; 15: 1224-31.

15 Mirtti T, Laine VJ, Hiekkanen H, Hurme S, Rowe O, Nevalainen TJ, et al. Group IIA phospholipase A as a prognostic marker in prostate cancer: relevance to clinicopathological variables and disease-specific mortality. Apmis 2009; 117: 151-61.

16 Mounier CM, Wendum D, Greenspan E, Flejou JF, Rosenberg DW, Lambeau G. Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate. Br J Cancer 2008; 98:587-95.

17 Mintz MB, Sowers R, Brown KM, Hilmer SC, Mazza B, Huvos AG, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. Cancer Res 2005; 65:1748-54.

18 Okada S, Tsuda H, Ohmi K, Kasamatsu T, Yamada T, Tsunematsu R, et al. Immature glandular features in squamous cell carcinoma of the uterine cervix as an independent indicator of resistance to radiotherapy. Int J Gynecol Cancer 2002;12: 277-85.

19 Wang M, Li JT, Zeng YX, Hou JH, Lin QQ. Expression and significance of Notch 1, P21WAF1 and involucrin in nasopharyngeal carcinoma. Ai Zheng 2005; 24:1230-4.

20 Nobre RJ, Herraez-Hernandez E, Fei JW, Langbein L, Kaden S, Grone HJ, et al. E7 oncoprotein of novel human papillomavirus type 108 lacking the E6 gene induces dysplasia in organotypic keratinocyte cultures. J Virol 2009; 83: 2907-16.

21 Nair SA, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK, Pillai MR. Involucrin and tumor progression in the uterine cervix. Pathobiology 1996; 64:333-8.

22 Oda N, Ono Y. Significance of the Yamamoto-Kohama mode of invasion in the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma: relationship with reduced expression of involucrin protein. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi. 2004; 101: 591-7.