บทความทั่วไป

Immunohistochemistry เทคนิคสำคัญในมะเร็งวิทยา

Immunohistochemistry: An Important Tool in Oncology

รัตนา ฉัตรศานติกุล * , นวพรรณ จารุรักษ์ *

บทนำ

ปัจจุบันมะเร็งเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางการแพทย์ไปทั่วโลกในอันดับต้น การเกิดเป็นมะเร็งนั้นเกิดอย่างเป็นขั้นตอน (Multistep tumorigenesis) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่สำคัญ คือ ยีนก่อมะเร็ง (Oncogenes) และ ยีนต้านมะเร็ง (Tumor-suppressor genes)[1-2] ซึ่งความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับยีนทั้งสองชนิดนี้ ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนซึ่งเป็นผลิตผลของยีนนั้นๆ ด้วย ในระยะ 15 ปีที่ผ่านมานี้มีการนำ Immuno-histochemistry (IHC) มาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจวินิจฉัยเกี่ยวกับมะเร็ง[3-5] ทั้งนี้เนื่องจาก IHC เป็นเทคนิคทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่สามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติเจน ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น จึงใช้เป็นวิธีตรวจหาโปรตีนซึ่งเป็นผลิตผลของยีนเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะและความไวสูงต่อแอนติเจน ต่างๆ เพิ่มมากขึ้น ทำให้ IHC เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมแพร่หลายอย่างรวดเร็ว และมีการนำมาใช้ศึกษาทางด้านมะเร็งมากขึ้น นอกจากใช้ในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งแล้วยังใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่เกิดเป็นมะเร็ง เนื่องจากวิธีการทาง IHC ไม่ทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตรวจวิเคราะห์ทำให้สามารถนำมาใช้ศึกษาเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากปกติได้ เช่น การศึกษามะเร็งศีรษะและคอ[6] เป็นต้น วิธีการ IHC เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนแต่มีรายละเอียดที่จะต้องทำความเข้าใจให้กระจ่าง

เพื่อให้เกิดความเข้าใจเทคนิค IHC ให้กระจ่างขึ้น บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมรายละเอียดของหลักการ วิธีการ และการนำมาใช้ประโยชน์ในมะเร็งวิทยา

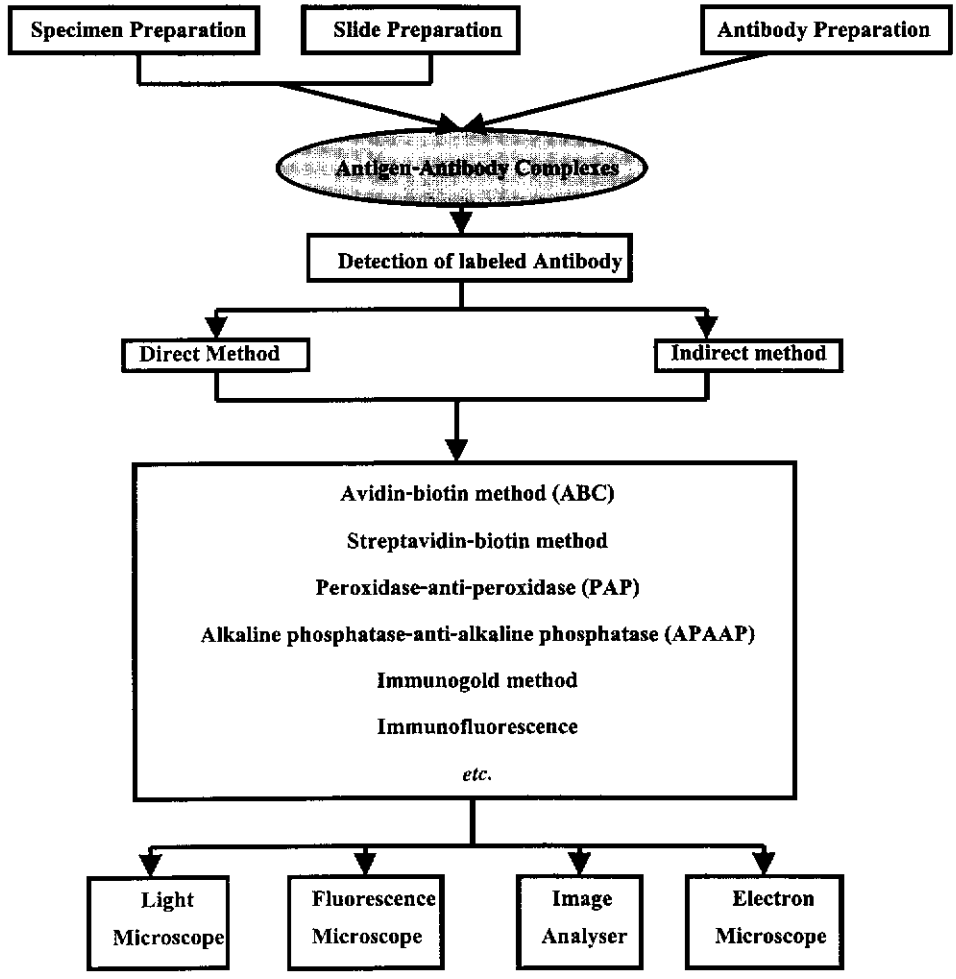
หลักการของ IHC

หลักการ: อาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจน หรือสิ่งที่ต้องการจะตรวจหาได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น กับแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน นั้น แล้วตรวจหาปฏิกิริยาการจับที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยวิธีทางตรง (Direct method) และโดยวิธีทางอ้อม (Indirect method)[3-4] รายละเอียดจะกล่าวต่อไปในวิธีขั้นตอนการทำ

การตรวจหาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี ที่เกิดขึ้นโดยวิธีทางตรง

* ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และวิธีทางอ้อม ทำได้โดยติดฉลาก ได้แก่ สี Fluorescence, เอนไซม์, Colloidal gold เป็นต้น ไว้ที่แอนติบอดี และตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Image analyser กล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ substrate ที่จำเพาะกับเอ็นไซม์นั้นๆ เกิดเป็นสีต่างๆ ตรวจสอบได้โดยกล้องจุลทรรศน์ [3-4]



รูปที่ 1 แสดงแผนผังขั้นตอนของ IHC

สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่สามารถนำมาตรวจด้วยเทคนิค IHC มีหลายชนิด เช่น Fresh frozen sections[3-4], Cytological preparations[3-4,7], Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens[3-4,6,8], และ Fine-needle aspiration (FNA) specimens[3-4,9]

วิธีการ IHC

วิธีการของเทคนิค IHC แบ่งเป็นหลาย ขั้นตอนดังนี้

1. Slide preparation เป็นการเตรียมสไลด์สำหรับใช้ในงาน IHC โดยการเคลือบสไลด์ด้วยสารที่มีคุณสมบัติเป็น Adhesive agent เพื่อป้องกันการ

หลุดหายของเซลล์หรือชิ้นเนื้อในระหว่างขั้นตอนการทำ โดยทั่วไปนิยมเคลือบด้วย Poly-L-lysine[10], Aminoalkylsilane[11] เป็นต้น

2. Specimen preparation การเตรียมสิ่งส่งตรวจสำหรับ IHC ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน กล่าวคือ ต้องรักษาส่วนของ Epitope ให้คงอยู่ สิ่งส่งตรวจสำหรับ IHC อาจเป็นสิ่งส่งตรวจที่เพิ่งได้มาใหม่ๆ ซึ่งอาจจะถูก Fixed หรือยังไม่ถูก Fixed ก็ได้ สิ่งส่งตรวจที่เก็บไว้นานแล้วส่วนใหญ่เป็นชิ้นเนื้อซึ่งถูก Fixed ด้วย Formalin เรียกว่า "Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens" [3-4,6,8] การใช้ Fixative มีผลต่อคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน จึงจำเป็นที่จะต้องเลือกใช้ Fixative ที่ไม่มีผลหรือมีผลน้อยต่อคุณสมบัติดังกล่าว

Fixative ที่นิยมได้แก่ 1) Coagulating fixatives ตัวอย่างของกลุ่มนี้ได้แก่ Ethanol, Methanol, Carnoy's solution เป็นต้น สารเหล่านี้จะเข้าไปแทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ โดยไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน[3-4] 2) Cross-linking fixatives ได้แก่ Formalin นิยมใช้กันแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับชิ้นเนื้อที่เก็บไว้นานๆ เป็น Fixative ที่ก่อให้เกิดการจับตัวกัน (Bridging) ระหว่างกรดอะมิโนภายในโมเลกุลเดียวกันและโมเลกุลข้างเคียงของโปรตีน ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป และมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือบดบัง Antigen determinant เป็นการปิดกั้นไม่ให้แอนติบอดี จับกับแอนติเจน (Masking of antigen)[3-4]

3. Antibody preparation แอนติบอดี ที่นิยมใช้ใน IHC เป็น Monoclonal antibody เพราะมีความจำเพาะสูง และช่วยลดปัญหาจากผลบวกปลอมจาก Non-specific reactions ต่างๆ รวมทั้งลดปัญหารบกวนจาก Background การจับกันของแอนติเจน และแอนติบอดี เป็นปฏิกิริยาแบบ Reversible กล่าวคือการจับกันนี้อาจหลุดออกจากกันได้ หากมีความเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดและด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ความเข้มข้นของเกลือบัฟเฟอร์ หรืออุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆของวิธีทำ ฉะนั้นแอนติบอดี ที่ใช้จึงต้องจับกับแอนติเจน ได้อย่างแข็งแรง นั่นคือ มี "High avidity" หรือ "Good affinity"[3-4] ปฏิกิริยาใน IHC นี้ไม่เกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ Agglutination หรือ Precipitation ของ Antigen- antibody complexes ฉะนั้นการเจือจางแอนติบอดี ที่จะใช้ใน IHC จึงไม่มีปัญหาจากปรากฏการณ์ "Prozone" หรือ "Postzone" ซึ่งเกิดจากการ เจือจางแอนติบอดีน้อยไป หรือมากไป มีผลให้อัตราส่วนของแอนติเจนต่อแอนติบอดี ไม่เหมาะสมต่อการจับกันเพื่อตกตะกอนให้เห็นได้[12] อย่างไรก็ตามการเจือจางปริมาณแอนติบอดี ให้เหมาะสมกับปริมาณแอนติเจน ใน IHC ช่วยลดความสิ้นเปลืองของการใช้แอนติบอดี และระยะเวลาในการ Incubate ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อให้เกิด Antigen-antibody complexes ลง รวมทั้งช่วยลด Background ลง นอกจากนี้ยังช่วยให้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ชัดเจน การใช้แอนติบอดี ปริมาณสูงช่วยลดระยะเวลา Incubation ลง ปกติระยะเวลา Incubation อาจใช้เวลาตั้งแต่เป็นนาทีไปจนกระทั่งนานถึง 48 ชั่วโมง เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นนิยมใช้ที่ 37 ^{0}ซ นาน 30 นาที หรือ 4 ^{0}ซ เป็นเวลาหนึ่งคืน อย่างไรก็ตามเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นมีการปรับใช้ตามสภาพและความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งเป็นสำคัญ อัตราส่วนในการเจือจางแอนติบอดีนั้นแตกต่างกันได้มากมาย ควรเลือกใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต หรือหากเตรียมขึ้นเองก็ต้องทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมทุกครั้ง[4]

4. Pretreatment เป็นขั้นตอนเตรียมสิ่งส่ง

ตรวจให้มีความเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ Antigen-antibody complexes ต่อไป รวมทั้งลดหรือขจัดสิ่งรบกวนที่อาจเกิดขึ้น แบ่งเป็นขั้นตอนย่อยๆดังนี้

4.1. Background staining prevention เพื่อกำจัดและลดสิ่งรบกวนต่อการเกิด Antigen-antibody complexes

4.1.1 Endogenous enzyme inactivation [3-4] เนื่องจากการตรวจหา Antigen-antibody complexes เป็นการตรวจโดยการทำให้เกิดสี และนิยมใช้เอนไซม์ ซึ่งพบได้ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งส่งตรวจ จึงจำเป็นต้อง Inactivate สารจำพวกเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตรวจนั้น (Endogenous enzymes) เช่น ถ้าใช้ Peroxidase นิยมทำ Endogenous enzyme inactivation ด้วย 1% H_2O_2 ใน Methanol นาน 30 นาที ถ้าใช้ Alkaline phosphatase เป็น Hapten นิยมใช้ Levamisole สำหรับทำ Endogenous enzyme inactivation เป็นต้น

4.1.2 Non-specific blocking [3-4] เพื่อลดการรบกวนสัญญาณการตรวจ (Signal-to-noise ratio) ลงจาก Non-specific binding นิยมทำโดยการ Incubate สิ่งส่งตรวจก่อนด้วย Normal horse serum

4.2 Antigen unmasking [4, 13-16] นิยมทำเมื่อมีการใช้ Cross-linking fixative โดยเฉพาะ Formaldehyde หรือ Formalin เพื่อกำจัด Methylene bridges ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ Fixation การทำ Antigen unmasking มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า Antigen retrieval นี้มีหลายวิธี ดังนี้

4.2.1 Enzymatic treatment เป็นวิธีการที่ใช้เอนไซม์ เช่น Trypsin, Protease, Pronase เป็นต้น เพื่อย่อยโปรตีน เป็นวิธีการที่ต้องระมัดระวังค่อนข้างมาก เพราะหากย่อยน้อยไป (Under-digestion) จะทำให้เกิด False negative ได้ แต่หากย่อยนานเกินไป (Over-digestion) เนื้อเยื่อจะถูกทำลายจนเสียหายไป

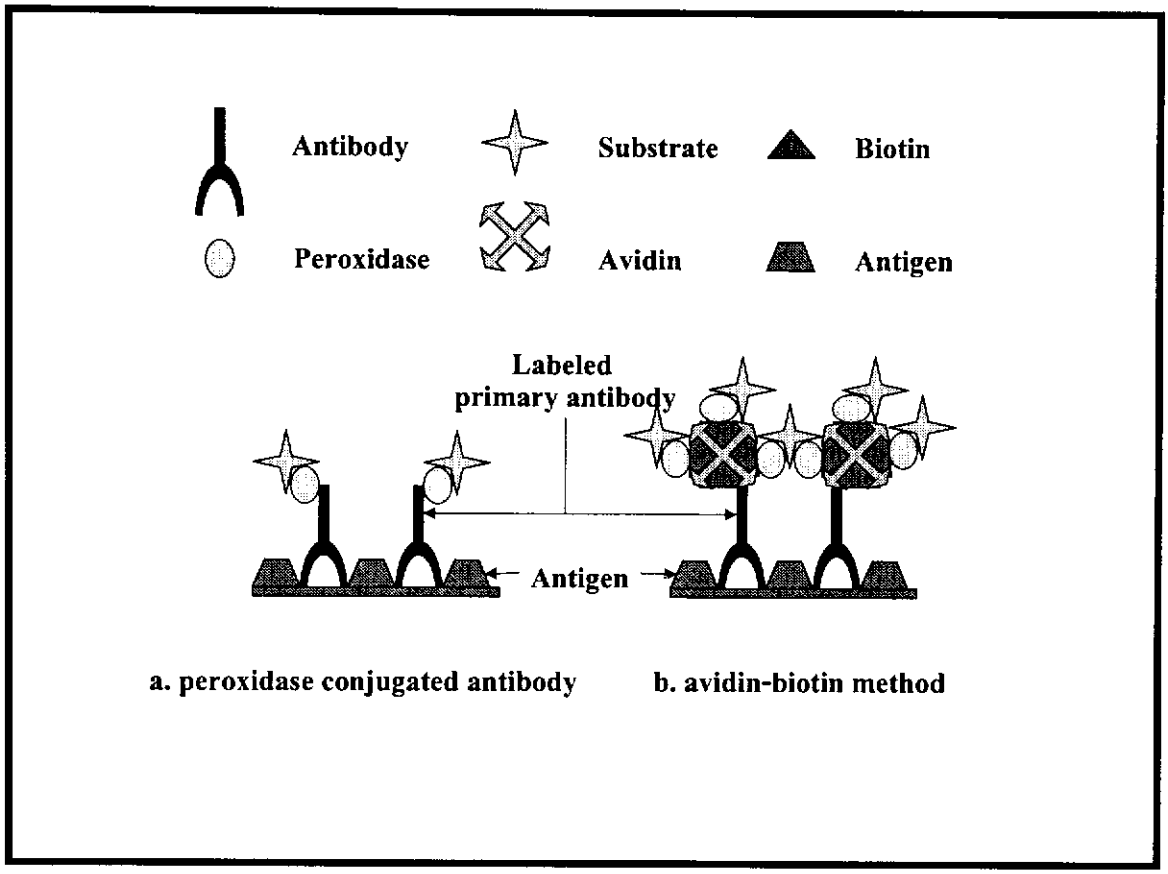
4.2.2 Non-Enzymatic treatment เป็นวิธีการที่ใช้ความร้อน วิธีที่นิยม เช่น การใช้ Microwave ต้มสิ่งส่งตรวจ การต้มสิ่งส่งตรวจใน Pressure cooker การใช้ Hot plates หรือ Dry oven เป็นต้น วิธีการใช้ Microwave นิยมต้มในน้ำกลั่น หรือสารละลายต่างๆ เช่น สารละลาย Carboxylic หรือ Organic เช่น Sodium carbonate, Urea, Citric acid สารละลายเกลือหรือโลหะหนัก เช่น Sodium chloride, Zinc sulphate, Nickel chloride เป็นต้น ส่วนการต้มใน Pressure cooker นั้นพัฒนาขึ้นในระยะต่อมา และพบว่าช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์แอนติเจน

5. Antigen-antibody complexes formation [3-4] เป็นการเกิดปฏิกิริยาจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยต้องมีระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณ หรือชนิดของแอนติเจน และแอนติบอดี ที่เหมาะสม เพื่อให้การจับกัน เกิดความสมบูรณ์และไม่หลุดออกจากกันโดยง่าย

6. Detection [3-4] คือการตรวจหา Antigen-antibody complexes ที่เกิดขึ้นมีได้ทั้งวิธีทางตรงและวิธีทางอ้อม วิธีทางตรงนั้นง่ายกว่า ใช้เวลาสั้นกว่า มีความจำเพาะสูงกว่า แต่มีความไวต่ำกว่า และมีข้อจำกัดในการต้องใช้ Labeled primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน นั้นๆ เสมอ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางอ้อมซึ่งซับซ้อนกว่า ใช้เวลานานกว่า มีความจำเพาะต่ำกว่า แต่มีความไวสูงกว่า และไม่มีข้อจำกัดในการต้องใช้ Labeled secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน แต่ต้องเลือกใช้ Labeled secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ Primary antibody วิธีการนี้ทำให้มีความสะดวกในการติดฉลากโดยการติดไว้ที่

Secondary antibody เท่านั้น และสามารถนำมาใช้กับ Primary antibody ต่างๆที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน ต่างๆได้มากมาย Detection systems ที่นิยมใช้ เช่น

6.1 Direct method วิธีนี้มีการติดฉลากบนแอนติบอดี ที่ใช้สำหรับจับกับแอนติเจน โดยตรง ฉลากที่นำมาติดเป็นได้ทั้งเอนไซม์ เช่น Peroxidase, Alkaline phosphatase, Glucose oxidase หรือสารอื่นที่นิยม เช่น Biotin ถ้าฉลากที่นำมาติดเป็นเอนไซม์ ก็ใช้ Substrates หรือ Chromogens ทำปฏิกิริยาโดยตรง ถ้าเป็น Biotin ก็นิยมใช้ Avidin-biotin technique (รูปที่ 2)

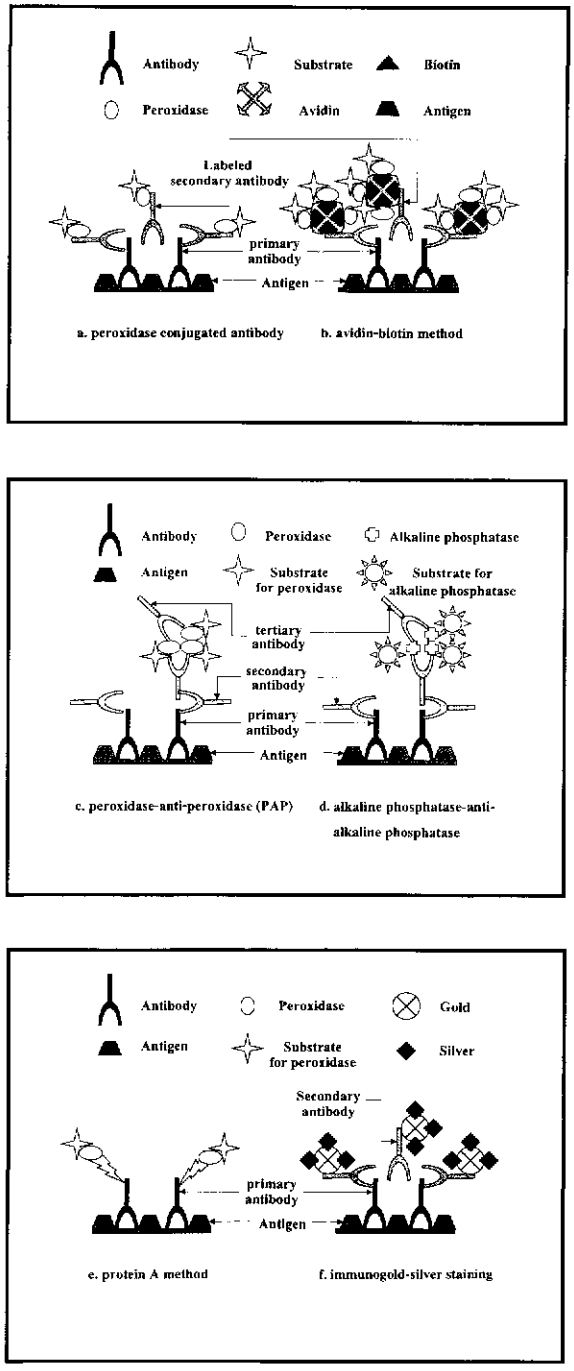


รูปที่ 2 การตรวจหาปฏิกิริยา Antigen-antibody complexes โดยวิธี Direct method

a. Peroxidase conjugated antibody

b. Avidin-biotin method

6.2 Indirect method วิธีนี้มีการใช้แอนติบอดี มากกว่า 1 ชนิด คือ มี Primary antibody ซึ่งจำเพาะ กับแอนติเจน และมี Secondary antibody หรือ tertiary antibody ขึ้นอยู่กับระบบที่เลือกใช้ และอาจมีการติดฉลากหรือไม่ติดฉลากบน Secondary antibody หรือ Tertiary antibody ขึ้นอยู่กับระบบ ที่เลือกใช้ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การตรวจหาปฏิกิริยา Antigen-antibody complexes โดยวิธี Indirect method

a. Peroxidase conjugated antibody
b. Avidin-biotin method
c. Peroxidase-anti-peroxidase
d. Alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase
e. Protein A method
f. Immunogold-silver staining

7. Chromogens[3-4] เป็น substrate และสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพื่อให้ได้สีต่างๆ (ตารางที่ 1)

8. Counterstains[3-4] เป็นการย้อมเนื้อเยื่อที่ไม่ติดสีจากปฏิกิริยา IHC เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสี Counterstain ซึ่งทำให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อชัดเจนและเปรียบเทียบกับส่วนที่ติดสีจากปฏิกริยา IHC จึงสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ สี Counterstain ที่นิยม เช่น Hematoxylin, Methyl green, Nuclear fast red เป็นต้น

ตารางที่ 1 Chromogens ที่นิยมใช้กับเอนไซม์ในวิธี IHC

Enzymes	Chromogens	Color / Detection
1. Peroxidase	H_2O_2/DAB	Brown / Light microscope
	H_2O_2/TMB	Green / Light microscope
	ACE	Red / Light microscope
2. Alkaline phosphatase	BCIP / NBT	Blue / Light microscope
	New fuchsin	Red / Light microscope
3. Glucose oxidase	INT	Red / Light microscope
	NBT	Blue / Light microscope
	TNBT	Brown / Light microscope

DAB = diaminobenzidine ; TMB = tetramethylbenzidine ; ACE = 3-amino-9-ethylcarbazole ; BCIP = bromo-chloro-indolyphosphate ; NBT = nitroblue tetrazolium ; INT = iodophenyl nitrophenyl tetrazolium ; TNBT = tetranitroblue tetrazolium

การอ่านผล

การอ่านผลการตรวจ ขึ้นอยู่กับชนิดของฉลากที่ใช้ติดไว้ที่ Labeled antibody นิยมใช้การนับจำนวนเซลล์ที่เกิดปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาในเนื้อเยื่อบริเวณที่ทำการตรวจนั้นๆ เซลล์ที่ติดสีตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้จะอ่านผลเป็นบวก ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดสีตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้จะอ่านผลเป็นลบ เช่น โปรตีน p53 เป็น Nuclear phosphoprotein สี IHC จะติดที่นิวเคลียสของเซลล์ (รูปที่ 4) หรือ โปรตีน c-erb B2 เป็น Cellular membrane protein สี IHC จะติดที่ผิวหรือผนังของเซลล์ เป็นต้น โดยทั่วไปจะมีการให้คะแนน (Grading scale) หลายวิธี โดยการนับจำนวนเซลล์ที่ให้ปฏิกิริยาบวก หรือลบ เช่น

คะแนนเป็นร้อยละ (0-100%)

ร้อยละ 0 (0%, negative) หมายถึง ไม่มีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจเลย

ร้อยละ 10 (10%) หมายถึงมีเซลล์ที่ติดสี

IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจอยู่ร้อยละสิบ

ร้อยละ 100 (100%) หมายถึงมีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจอยู่ร้อยละร้อย คือ ติดสีทั้งหมด

คะแนนเป็นบวก-ลบ (-, +, ++, +++, ++++)

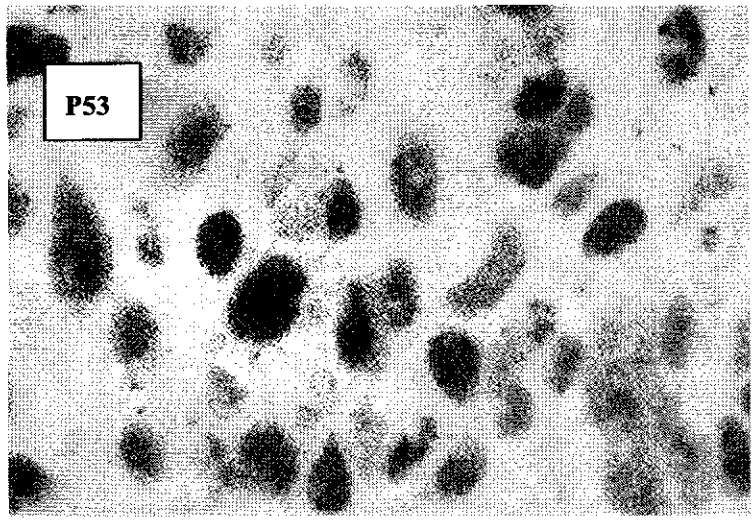
- (Negative) หมายถึง ไม่มีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจเลย

+ (Weakly positive) หมายถึงมีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจอยู่บ้างเล็กน้อย (5-10%)

++ (Positive) หมายถึงมีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจอยู่บ้างพอประมาณ (10-30%)

+++ (Intermediate positive) หมายถึงมีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจอยู่ค่อนข้างมาก (40-60%)

++++ (Strongly positive) หมายถึงมีเซลล์ที่ติดสี IHC ในเนื้อเยื่อบริเวณที่ตรวจอยู่มากกว่า 60% ถึง 100%



รูปที่ 4 ตัวอย่างการตรวจหาโปรตีน p53 ในมะเร็งศีรษะและคอ จากรูปจะเห็นว่าผลการตรวจให้ผลบวกคะแนนร้อยละแปดสิบ (80%) หรือ ++++ (Strongly positive) จะเห็นว่ามีนิวเคลียสของเซลล์จำนวนมากติดสีน้ำตาลของสี IHC

วิธีการนี้ไม่นิยมให้คะแนนตามความเข้มของการติดสี เพราะมีปัจจัยหลายประการ เช่น ทักษะของผู้ย้อม ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยากับสี เป็นต้น เข้ามาเกี่ยวข้อง

ประโยชน์ของ IHC ในโรคมะเร็ง

เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นการตรวจหาแอนติเจนภายในเซลล์ โดยที่โครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลาย จึงเป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาโรคมะเร็ง ใช้วิเคราะห์ต้นกำเนิดของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งจัดแบ่งชนิดของมะเร็งตามต้นกำเนิดเพื่อให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการเกิดและดำเนินโรคของมะเร็ง ความเปลี่ยนแปลงของยีนก่อมะเร็งและยีนต้านมะเร็งในแต่ละขั้นตอน

ของการเกิดและดำเนินโรค การพยากรณ์โรค และความรุนแรงของมะเร็ง ใช้ศึกษาวิเคราะห์การกระจายของมะเร็ง เป็นต้น

1. ใช้วิเคราะห์มะเร็งที่ไม่ทราบสาเหตุหรือมะเร็งปฐมภูมิ (Unknown primary origin) หรือมะเร็งที่มีปัญหาในการจัดแบ่งชนิด [17]

โดยวิธี IHC ทำให้สามารถศึกษามะเร็งได้จากการที่เซลล์มะเร็งมีแอนติเจน ต่างๆกัน ตามเนื้อเยื่อต้นกำเนิด เช่น กลุ่มที่มีกำเนิดจาก Epithelial, Mesenchymal, Neural origins เป็นต้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การตรวจแอนติเจน ของเซลล์มะเร็ง เพื่อแบ่งชนิดตามเนื้อเยื่อต้นกำเนิด[17]

Epithelial tumors			
Breast	***Liver***	***Thyroid***	***Prostate***
Alpha-lactalbumin	Alpha-fetoprotein (AFP)	Thyroglobulin	Prostatic acid phosphate (PAP)
GCDP-15	HBsAg	Calcitonin	Prostate specific antigen (PSA)
Estrogen/progesterone (ER/PR)	Keratin (Cam 5.2)		
Ovary	***Mesothelioma***		
OC 125	Keratins		
Germ cell tumors			
Human chorionic gonadotropin (HCG)			
Alpha-fetoprotein (AFP)			
Mesenchymal tumors			
Myogenous tumors	***Fibrohistiocytic tumors***	***Endothelial tumors***	***Melanomas***
Actin	Lysozyme	Factor VIII	S-100
Smooth muscle-specific actin	HAM 56	Ulex lectin	HIMB 45
Desmin	CD 34		
Myoglobin			
B-cell lymphomas	***T-cell lymphomas***	***Reed-Sternberg cells***	***Histiocytic lymphomas***
LCA, L-26, LN 1, LN 2,	LCA, UCHL-1, L 60,	Ki-1, L-26, Leu-M 1,	KP 1, HAM 56, lysozyme
MB1, MB 2	MT 1		
Immunoglobulins, kappa, lambda			
Neuroendocrine tumors			
Neuron-specific enolase (NSE)	**Pituitary**		**Pancreas**
Chromgranin	ACTH, PRL, GH, LH, FSH, TSH		Insulin, Gastrin,
Symptophysin			Vasoactive intestinal polypeptide,
			Somatostatin, Glucagon

Modified from Taylor CR, Cote RJ. Immunomicroscopy: a Diagnostic Tool for Surgical Pathologist, 2nd ed, Philadelphia: Saunders, 1994

2. ใช้ในการศึกษาพยาธิกำเนิดของมะเร็ง

มีการใช้วิธีการทาง IHC ศึกษาโปรตีนซึ่งเป็นผลิตผลของยีนก่อมะเร็ง และยีนต้านมะเร็ง ทำให้เกิดความเข้าใจในเรื่องพยาธิกำเนิดและกลไกการเกิดมะเร็งมากขึ้น รวมทั้งทำให้การศึกษาเรื่องวัฏจักรของเซลล์และการเกิดมะเร็งมีความกระจ่างขึ้นมาก[18] เช่น ความสำคัญของโปรตีน p53 ต่อการเกิดมะเร็งของศีรษะและคอ บทบาทของโปรตีน Retinoblastoma ต่อการเกิดเป็นมะเร็งหลังโพรงจมูก[19-20] เป็นต้น

3. ใช้พยากรณ์โรค และความรุนแรงของโรคมะเร็ง

การศึกษาแอนติเจน ของเซลล์มะเร็งต่างๆ โดยวิธี IHC สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรค เช่น การศึกษา โปรตีน p53[21-22] โปรตีน c-erb B2[23-25] โปรตีน Rb[26-27] เป็นต้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสำคัญของการตรวจแอนติเจน ของเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค

Markers	Significance in human tumors
c-erb B2	Expression inversely relates to prognosis in breast,[23] bladder,[24] lung cancer[25]
Rb oncoprotein	Altered expression and heterogeneity relate to poor prognosis in sarcomas[27]
p53 protein	Immunoreactivity relates to tumor aggressivity in multiple tumor types[21-22,28]
HLA-DR	Acquired expression is associated with a poor prognosis in melanoma,[29] better prognosis in breast, gastric, colon cancer, and malignant fibrous histiocytoma[30]
Cathepsin D	Expression correlates with prognosis in breast cancer (controversial)[31]
Ki-67	This proliferation marker, analyzed in frozen tissue, has been associated with prognosis in many tumors; *i.e.* colon cancer,[32] breast cancer,[33] T-cell leukemia,[34] lymphoma[35] *etc.*
P-Glycoprotein	Expression is correlated with chemotherapy resistance in many tumors; *i.e.* acute leudemia,[36] breast cancer,[37] lymphoma,[38] ovarian cancer[39] *etc.*

4. ใช้ศึกษาการกระจายของโรค

มะเร็งเป็นโรคที่มีการรุกล้ำและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปได้ทั่วบริเวณที่อยู่รอบๆ เนื้อมะเร็งนั้น และรุกล้ำกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ ระยะเริ่มแรกของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้นยากต่อการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากมีลักษณะ Microinvasion วิธี IHC ช่วยให้การตรวจวิเคราะห์การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในลักษณะดังกล่าวกระทำได้ดีขึ้น ปัจจุบันมีการนำมาตรวจหา Occult micrometastasis ไปยังไขกระดูกและต่อมน้ำเหลืองของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม[40-41] มะเร็งลำไส้ใหญ่[42] มะเร็งรังไข่[43] มะเร็งลูกอัณฑะ[44] มะเร็งปอด[45-46] เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Farber E. The multistep nature of cancer development. Cancer Res 1984; 44: 4217-23.
2. Yuspa SH, Dlugosz AA, Cheng CK. Role of oncogenes and tumor suppressor genes

in multistage carcinogenesis. J Invest Dermatol 1994; 103 (5 Suppl): 90s-95s.

3. Beesley JE. Immunocytochemistry, A Practical Approach. New York: Oxford Univ Press, 1993.
4. Polak JM, Noorden SV. Introduction to Immunohistochemistry. 2nd ed, Oxon: Information Press, 1997.
5. Leong ASY, Wright J. The contribution of immunohistochemistry staining in tumor diagnosis. Histopathol 1987; 11: 1295-305.
6. Charuruks N, Shin DM, Voravud N, RoJY, Hong WK, Hittleman WN. Genetic instabilities of chromosome 9, 17 and accumulation of p53 overexpression during multistage tumorigenesis in head and neck cancer. J Med Assoc Thai 1996; 79 (Suppl 1): s104-s112.
7. Dowell SP, Wilson POG, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. Cancer Res 1994; 54: 2914-8.
8. Kerns BJM, Jordan PA, Moore MBH, *et al.* p53 overexpression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue detected by immunocytochemistry. J Histochem Cytochem 1992; 40: 1047-51.
9. Stephenson TJ, Royds JA, Silcocks PB, *et al.* Diagnostic associations of p53 immunostaining in fine needle aspiration cytology of the breast. Cytopathol 1994; 5: 146-53.
10. Huang WM, Gibson SJ, Facer P, Gu J, Polak JM. Improved section adhesion for immunohistochemistry using molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. Histochemistry 1983; 77: 275-9.
11. Rentrop M, Knapp B, Winter H, Schweizer J. Aminoalkylsilane treated glass slide as support for *in situ* hybridisation of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment condition. Histochem J 1986; 18: 271-6.
12. Ricardo MJ, Tomar RH. Humoral Immunity: Antibodies and Immunoglobulins. In: Henry JB, ed. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods. 18th ed, Philadelphia: WB Saunders Co., 1991: 809-29.
13. Baffifira H, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. J Histochem Cytochem 1986; 34: 1095-100
14. Cuevas EC, Bateman AC, Wilkins BS, *et al.* Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. J Clin Pathol 1994; 47: 448-52.
15. Bankfalv A, Navabi H, Bier B, Bocker W, Jasani B, Schimd KW. Wet heat pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. J Pathol 1994; 174: 223-8.
16. Norton JA, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective

method of antigen retrieval for routinely processed tissues. J Pathol 1994; 173: 371-9.

17. Taylor CR, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool For Surgical Pathologist. 2 ed, Philadelphia: Saunders, 1994.
18. Charuruks N, Sutheesohon J, Voravud N. Cell cycle and tumorigenesis. Chula Med J 1998; 42: 1035-48.
19. Charuruks N, Voravud N. Molecular biology of head and neck tumorigenesis: the role of p53 expression and genetic instability. J Med Assoc Thai 1996; 79 (Suppl 1): s3-s10.
20. Charuruks N, Shuangshoti S, Mutirangura A, Supiyaphan P, Voravud N. Retinoblastoma protein expression in nasopharyngeal carcinoma. Chula Med J 2000; 44: 107-17.
21. Charuruks N, Shin DM, Voravud N, Ro JY, Hong WK, Hittleman WN. P53 expression and polysomies of chromosome 9, 17 and head and neck cancer prognosis. J Med Assoc Thai 1999; 82: 466-76.
22. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. Cancer Res 1992; 52: 4828-31.
23. Wright C, Angus B, Nicholson S, *et al.* Expression of c-erb B-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. Cancer Res 1989; 49: 2087-90.
24. Yu D, Wolf JK, Scanlon M, *et al.* Enhanched c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be supressed by EIA. Cancer Res 1993; 53: 891-8.
25. Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, *et al.* Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell lung cancer. Cancer Res 1989; 49: 4968-71.
26. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, *et al.* Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1992; 84: 1251-6.
27. Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, *et al.* Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. N Engl J Med 1990; 323: 1457-62.
28. Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 1992; 326: 1350-2.
29. Moretti S, Massobrio R, Brogelli L, *et al.* Ki 67 antigen expression correlates with tumor progression and HLA-DR antigen expression in melanocytic lesions. J Invest Dermatol 1990; 95: 320-4.
30. Zehr RJ, Bauer TW, Marks KE, Weltevreden A. Ki 67 and grading of malignant fibrous histocytomas. Cancer 1990; 66: 1984-90.
31. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, *et al.* Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. Cancer Res 1989; 49: 6008-14.
32. Shepherd N, Richman PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. J Pathol 1988; 155: 213-9.

33. Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Mönting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. Cancer 1991 ; 67: 421-8.
34. Yamada Y, Murata K, Kamihira S, *et al.* Prognostic significance of the proportion of Ki-67 positive cells in adult T-cell leukemia. Cancer 1991; 67: 2605-9.
35. Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, *et al.* Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. Hum Pathol 1987; 18: 1155-9.
36. Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S. Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein assessment in multidrug resistant plasma cell myeloma using three antibodies. Cancer 1990; 66: 868-73.
37. Ro J, Sahin A, Ro JY, *et al.* Immunohistochemistry analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy reistance in locally advanced breast cancer. Hum Pathol 1990; 21: 787-91.
38. Salmon SE, Grogan TM, Miller T. Prediction of doxorubicin resistance *in vitro* in myeloma, lymphoma, and breast cancer by P-glycoprotein staining. J Natl Cancer Int 1989; 81: 696-701.
39. Rutledge ML, Cafferty RSS, Silva EG, Bruner JM. Monoclonal antibody C219 detection of the multidrug-resistant protein P-glycoprotein in routinely processed tissues: a study of 36 cases of ovarian carcinoma. Med Pathol 1990; 3: 298-301.
40. Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, *et al.* Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in bone marrow of patients with early stage disease. Am J Surg Pathol 1988; 12: 333-40.
41. Lindemann F, Schlimok G, Dirshedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. Lancet 1992; 340: 685-9.
42. Mansi JL, Berger U, Wilson R, Shearer R, Coombes RC. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with prostatic carcinoma by immunocytochemical techniques. J Urol 1988; 139: 545-8.
43. Cain JM, Ellis GK, Collins C, *et al.* Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by immunohistochemical assessment. Gynecol Oncol 1990; 38: 442-5.
44. Frew AJ, Ralfkiaer N, Ghosh AK, Gatter KC, Mason DY. Immunohistochemistry in the detection of bone marrow metastases in patients with primary lung cancer. Br J Cancer 1986; 53: 555-6.
45. Leonard RCF, Duncan LW, Hay FG. Immunocytological detection of residual marrow disease at clinical remission predicts metastatic relapse in small cell lung cancer. Cancer Res 1990; 50: 6545-8.
46. Nasser IA, Lee AK, Bosari S, Sananich R, Heatley G, Silverman ML. Occult auxillary lymph node metastases in "node-negative" breast carcinoma. Human Pathol 1993; 24: 950-7.