

การระบุยีนมะเร็งลำไส้ตรง โดยการใช้ไมโครอาร์เรย์

Identification of Rectal Cancer Genes by Microarray Analysis

นิภาพร ทิพย์มะณี¹, ผศ.ดร.สุคนธ์ ประสิทธิ์วัฒนเสรี², รศ.ดร.จีระยุทธ ไชยจากรุณี³,
ดร.นิตา ชวพันธ์⁴, ผศ.นพ. ธเนศ ชิตาพนารักษ์⁵, รศ.พญ. อัมใจ ชิตาพนารักษ์⁶

¹ สาขาชีวสารสนเทศศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ ภาควิชาคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

^{4,6} ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

⁵ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

In northern part of Thailand, cancer is a leading cause of death and colorectal cancer is ranked the third among different fatalities in this region. The purpose of this study is to use a cDNA microarray to analyze the difference in gene expression profiles between normal and tumor tissue in 6 stage III rectal cancer patients who were treated at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital (Suandok) between December 2009 - April 2010.

Microarray analysis for rectal cancer genes was completed using the R program, which is a program for statistical and graphical computation. To measure gene expression we used the linear model statistics function provided by the limma package in R. This approach included three main steps. First, the cDNA microarray data was imported into R. cDNA preprocessing steps including background correction, normalization and summarization were performed. Normalization involved both within-array and between-array normalization. Second, the linear model function was used to analyze the cDNA gene expression and classify different gene expressions of rectal cancer. Using fold change value of 2 ($=2$) and a p-value less than 0.005 (<0.005) for t-test, the differences in the gene expressions between normal and tumor tissue were obtained. Finally, from TNM staging we found common rectal cancer genes in T3 stage differentiated from normal tissue. After intensive analysis, three genes were identified, named CDC4 gene, placenta growth factor precursor (PlGF) and CD27-binding protein.

Key words : Rectal cancer, Gene expression, Microarray

บทคัดย่อ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งในภาคเหนือและโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นมะเร็งที่อยู่ในอันดับที่สามของการเสียชีวิตจึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือใช้ cDNA ไมโครอะเรย์วิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ตรงระยะ III จำนวน 6 คน ซึ่งเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ระหว่างเดือนธันวาคมปี 2552 ถึงเดือน เมษายนปี 2553

การวิเคราะห์ไมโครอะเรย์ของยีนมะเร็งลำไส้ตรงได้ใช้โปรแกรม R การวัดการแสดงออกของยีนจะใช้แบบจำลองเชิงเส้น กระบวนการวิเคราะห์หมี 3 ขั้นตอนหลักดังนี้

1) นำข้อมูล cDNA microarray เข้าโปรแกรม R หลังจากนั้นเตรียมข้อมูลโดยปรับแก้พื้นที่หลังให้ถูกต้องทำข้อมูลให้เป็นบรรทัดฐานเดียวกันและรวบรวมผลที่ได้

2) วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของ cDNA ยีน โดยใช้สมการเส้นตรง และจัดกลุ่มยีนตามการแสดงออกที่ต่างกันของยีนมะเร็งลำไส้ตรง

3) ใช้การทดสอบทางสถิติ แบบ t-test ที่ p-value น้อยกว่า 0.005 และค่า fold change เท่ากับ 2 ในการบอกความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่าง เนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็ง ผลการวิจัยพบกลุ่มยีนทั่วไปที่พบในมะเร็งระยะ III และยังพบกลุ่มยีนที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ระยะของโรคตาม TNM staging ได้หลังการวิเคราะห์โดยละเอียดแล้วพบว่ายีนที่มีความเกี่ยวข้องของ กับการเป็นมะเร็งลำไส้ตรงคือ CDC4, placenta growth factor precursor (PIGF) และ CD27-binding protein

คำสำคัญ : มะเร็งลำไส้ตรง, การแสดงออกของยีน, cDNA ไมโครอะเรย์

บทนำ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งในภาคเหนือ⁽¹⁾ และโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่อยู่ในอันดับที่สามของการเสียชีวิตและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น⁽²⁾ สาเหตุสำคัญส่วนหนึ่งของการเกิดมะเร็ง มาจากความผิดปกติของการแสดงออกของยีนส์ ทำให้ผลิตโปรตีนที่สำคัญบางชนิดมากเกินไปหรือน้อยเกินไปจนทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโต และมีการแบ่งตัวมากผิดปกติได้

การใช้เทคโนโลยีไมโครอะเรย์เป็นการนำเอายีนที่สนใจจำนวนมากนับพันถึงหมื่นยีนมาหยดลงบนสไลด์หรือแผ่นค่าจุนทำให้สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้ได้ในเวลาเดียวกันในหนึ่งการทดลอง ซึ่งไม่สามารถทำได้ในอดีต ด้วยเทคนิคนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นภาพรวม เห็นแบบแผนการแสดงออกของยีน นำไปสู่ความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิก

ความรู้ที่ได้จากเทคนิคไมโครอะเรย์ในการศึกษาเกี่ยวกับโรคมะเร็ง ได้แก่ การวิเคราะห์หา mutation, polymorphism และ tumor marker การศึกษากลไกและ pathway ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง การจำแนกชนิดของโรคมะเร็งการทำนายผลการรักษาและการพยากรณ์โรค การพิสูจน์หาสารก่อมะเร็งหรือสารต้านมะเร็ง ทำให้แพทย์สามารถเลือกวิธีการรักษาที่ให้การตอบสนองสูงในผู้ป่วยรายนั้นๆ เป็นการลดค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้น โดยคำนึงถึงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นสำคัญ

การศึกษาย้อนหลัง(Retrospective study) นี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการวิเคราะห์หากกลุ่มของยีนในมะเร็งลำไส้ตรงที่มีการแสดงออกแตกต่างไปจากชั้นเนื้อปกติ โดยใช้ cDNA ไมโครอะเรย์รวมทั้งเพื่อระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ตรง

ผู้ป่วยและวิธีการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนมะเร็งลำไส้ตรงโดยเทคนิคไมโครอะเรย์

ผู้ป่วยกลุ่มที่ศึกษานี้ คือ ผู้ป่วยที่ได้เข้ามาทำการตรวจในหน่วยระบบทางเดินอาหารภาควิชาอายุรศาสตร์และรับการรักษาในหน่วยรังสีรักษาและมะเร็งวิทยาภาควิชารังสีวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาสารคาม เชียงใหม่ ในช่วงปี 2552 ถึง 2553 โดยชิ้นเนื้อตัวอย่างได้มาจากชิ้นเนื้อปกติและชิ้นเนื้อมะเร็งลำไส้ตรงในผู้ป่วยรายเดียวกันจำนวน 6 ราย ดังแสดงในตารางที่ 1 ชิ้นเนื้อทั้งหมดจะถูกเก็บในน้ำยารักษาสภาพของ RNA (RNA later[®]) ที่อุณหภูมิ -80 °C จากชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ได้นำไปสกัด RNA โดยใช้ RNA Mini Spin kit (Illustra Tissue Mini Spin kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต แล้วทดสอบคุณภาพของ RNA ที่ได้โดยวิธี Gel Electrophoresis และวัด

ความเข้มข้นหรือปริมาณของ RNA โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV spectrophotometer จากนั้นนำ RNA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยใช้เทคนิคไมโครอะเรย์ โดยนำไปติดสลากระหว่างสายเรียงแสงแล้ว hybridize กับ probe บนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ซึ่งการวิจัยนี้จะใช้สไลด์สำเร็จรูปของ Human Genome opArray[™] (Operon) โดยเนื้อเยื่อปกติจะถูกติดฉลากด้วย Alexa Fluor[®] 555 และเนื้อเยื่อมะเร็งจะถูกติดฉลากด้วย Alexa Fluor[®] 647 จากนั้นนำสไลด์ไปอ่านด้วยเครื่อง microarray scanner การตรวจสอบนี้จะเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งกับเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งติดสลากระหว่างสายเรียงแสงที่สีไม่เหมือนกันซึ่งจะทำให้ค่าการแสดงออกของยีนออกมาในรูปแบบของค่าอัตราส่วนความเข้มของแสงหลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากเครื่อง microarray scanner เข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ตรง

Code	Age	Tumor site	Pathologic	Stage
1	55	Lower Rectum	Adeno CA, WD	T3N0M0
2	62	Rectum	Adeno CA, PD	T3N1M0
3	76	Rectum	Adeno CA, WD	T3N1M1
4	50	Rectum	Adeno CA, WD	T3N1M0
5	66	Rectum	Adeno CA, PD	T3N0M0
6	63	Rectum	Adeno CA, WD	T3N1M1

การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอะเรย์

จากกระบวนการเบื้องต้นจะได้ข้อมูลค่าการแสดงออกของยีนจากเครื่อง microarray scanner จากนั้นนำข้อมูลเข้าสู่โปรแกรมการคำนวณวิเคราะห์ทางสถิติและกราฟิก ซึ่งเรียกว่าโปรแกรม R version 2.12.0 (2010-10-15) และใช้ Limma (Linear Models for Microarray Data) package และ Limma: Linear Models for Microarray Data User's Guide(3) ในกระบวนการปรับข้อมูลให้เป็นบรรทัดฐานและการวิเคราะห์

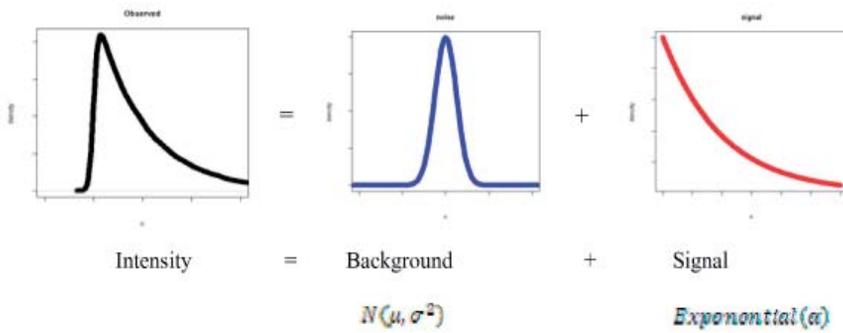
ข้อมูลไมโครอะเรย์ โดยใช้วิธีการปรับค่าพื้นหลังของการแสดงออกของยีนแต่ละยีนในไมโครอะเรย์ (Background correction) การปรับข้อมูลภายในอะเรย์และข้อมูลระหว่างอะเรย์ให้เป็นบรรทัดฐาน (Within and Between-array Normalization)

วิธีการปรับค่าพื้นหลังเป็นวิธีการที่มีเป้าหมายเพื่อทำการปรับค่าความเข้มแสงของพื้นหลังให้มีความถูกต้อง เพื่อที่จะสามารถมองเห็นจุดการแสดงออกของยีน

ในไมโครอะเรย์ได้อย่างชัดเจน โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า normexp(4) ซึ่งเป็นวิธีการค่อยๆ ปรับค่าความเข้มแสงจนสุดท้ายได้ค่าความเข้มแสงที่ดีที่สุด (adaptive method) โดยวิธีการ normexp เป็น convolution model โดยค่าความเข้มพื้นหลังและสัญญาณมีรูปแบบการแจกแจงแบบปกติและเอ็กซ์โพเนนเชียล โดยมีค่าเฉลี่ย(μ)และค่าความแปรปรวน(σ^2)ของกลุ่มข้อมูลค่าความเข้มพื้นหลัง และค่าเฉลี่ยของกลุ่มข้อมูลค่าสัญญาณ (α) เป็นพารามิเตอร์ของรูปแบบการแจกแจงแบบปกติ

และเอ็กซ์โพเนนเชียลตามลำดับโดยมีสูตรการคำนวณค่าความเข้มพื้นหลังจากการสังเกต (Observed Intensity) เป็นดังนี้

Intensity = Background (B) + Signal (S) โดยที่ $B \sim N(\mu, \sigma^2)$ และ $S \sim \text{Exponential}(\alpha)$ นั่นคือ B มีรูปแบบการแจกแจงเป็นแบบปกติโดยมี μ เป็นค่าเฉลี่ยของกลุ่มข้อมูล B, σ^2 เป็นค่าความแปรปรวนของกลุ่มข้อมูล B และ α เป็นค่าเฉลี่ยของกลุ่มข้อมูล S ซึ่งมีการแจกแจงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล



รูปที่ 1 แสดงรูปแบบการแจกแจงของข้อมูลค่าความเข้มพื้นหลังและค่าสัญญาณ และการคำนวณหาค่าความเข้มด้วยวิธีการ normexp

ถ้า $S > 0$ จะทำการหาค่าความเข้มพื้นหลังที่ถูกตัด (Background corrected intensity) จากสูตรค่าคาดหวังแบบมีเงื่อนไข (Condition expectation) ของการแจกแจงแบบปกติ ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้ Background corrected intensity = E (Signal|Observed Intensity) = $E(S|I)$ (4) หรือ $E(S|I) = \delta + \frac{\sigma^2 \alpha (0; \delta, \sigma^2)}{\Phi(0; \delta, \sigma^2)}$ โดยที่ $\delta = I - \mu - \sigma^2 / \alpha$ และ $I = R_f - R_b$ หรือ $I = G_f - G_b$ ขึ้นอยู่กับว่าจะใช้ตัวแบบ normexp ในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มของสีเขียวหรือแดง จากนั้นจะทำการประมาณค่า maximum likelihood estimation (MLE) (6) ของพารามิเตอร์ ใน normexp โมเดลโดยใช้วิธีการ Saddle-point approximation (6) หลังจากนั้นจะนำข้อมูลเข้าสู่กระบวนการทำข้อมูลให้อยู่ในบรรทัดฐานเดียวกันโดยทำการปรับข้อมูลภายในอะเรย์หรือการปรับค่าการแสดงผลออกของยีนใน

แต่ละจุด การปรับข้อมูลภายในอะเรย์พิจารณาค่าล็อกฐานสิบของความแตกต่างของความเข้มแสง (M-value) ของแต่ละอะเรย์ ด้วยวิธีการ Loess method ซึ่งมีสมมติฐานตั้งต้นว่ายีนที่มาจากชิ้นเนื้อปกติและชิ้นเนื้อมะเร็งไม่มีความแตกต่างกันและมีความสัมพันธ์กันแบบเชิงเส้นซึ่งในความเป็นจริงแล้วยีนเหล่านั้นมีความแตกต่างกันดังนั้นจึงต้องทำการปรับค่าน้ำหนักหรือค่าความผิดพลาด (error) ในแต่ละจุดมีค่าน้อยที่สุดหรือเท่ากับ 0 (3) โดยอาศัยแบบจำลองการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression model) (7) สมการโมเดลคือ $Y = f_i(X) + \epsilon$ หรือเขียนได้อีกแบบเป็น $M = f_i(A) + \epsilon$ เมื่อ $M = \log(R) - \log(G) = \log(R/G)$, $A = \log(R) + \log(G) = \log(RG)$ และค่าความผิดพลาด $\epsilon = M - f_i(A)$ (7) หลังจากนั้นทำการปรับข้อมูลระหว่างอะเรย์พิจารณาค่าล็อกฐานสิบของผลบวก

ของความเข้มแสง (A-value) โดยใช้วิธีการ Aquantile ซึ่งเป็นกระบวนการปรับค่า A-value การแสดงออกของแต่ละจุดในแต่ละสไลด์ให้มีค่าเหมือนกันหรือการปรับให้รูปแบบการกระจายของค่า A-value ในแต่ละสไลด์เป็นการกระจายแบบปกติเหมือนกัน⁽³⁾

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

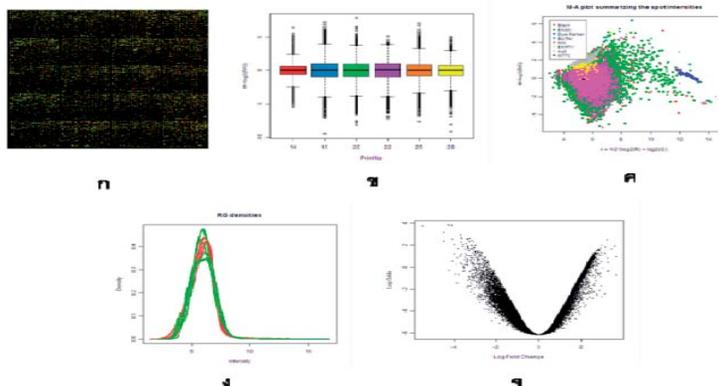
หลังจากกระบวนการปรับข้อมูลให้เป็นบรรทัดฐานแล้วทำการแบ่งกลุ่มสไลด์ไมโครอะเรย์โดยใช้แบบการทดลองเชิงแฟกเทอเรียล (Factorial design)⁽³⁾ และใช้สถิติทดสอบแบบ t-test⁽⁸⁻⁹⁾ ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างชั้นเนื้อปกติและชั้นเนื้อที่เป็นมะเร็งโดยมีสูตรการคำนวณเป็น ดังนั้นกำหนดให้ x_{ij} และ y_{ij} แทนค่าลึกลับฐานสองของระดับการแสดงออกของยีนที่ i ในการทำซ้ำที่ j ของยีนในชั้นเนื้อปกติและชั้นเนื้อมะเร็งตามลำดับสูตรการคำนวณ $T_i = \frac{x_i - y_i}{s_i}$ เมื่อ s_i คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำสำหรับยีนที่ i ⁽⁸⁻⁹⁾ และวิเคราะห์ว่ายีนที่มีความแตกต่างของการแสดงออกเป็นแบบ down - regulate หรือ up-regulate โดยใช้ค่า fold change⁽⁸⁻⁹⁾ ซึ่งมีสูตรการคำนวณ $FC_i = \frac{x_i}{y_i}$ เมื่อกำหนดให้ x_{ij} และ y_{ij} เป็นค่าระดับ

การแสดงออกของยีนที่ i ในการทำซ้ำที่ j ของยีนในชั้นเนื้อปกติและชั้นเนื้อมะเร็งตามลำดับ⁽⁸⁻⁹⁾

ค่าการตัดสินใจที่ p-value ของการทดสอบ t-test ที่น้อยกว่า 0.005 และค่า fold change ที่ 2 หลังจากนั้นจะใช้ฟังก์ชันทางคณิตศาสตร์คัดกรองยีนที่พบว่าเหมือนและแตกต่างกันระหว่างกลุ่มของสไลด์ที่ถูกแบ่งตามระยะของโรคมะเร็งลำไส้ตรงและทำการคัดกรองยีนเพื่อค้นหายีนที่สามารถระบุความแตกต่างของระยะของโรคมะเร็งลำไส้ตรงได้และมีความหมายทางชีววิทยาและคลินิก

ผลการศึกษา

จากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอะเรย์ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ตรงระยะ III จำนวน 6 คน จากยีนจำนวนหลายหมื่นยีนทำการคัดกรองยีนโดยฟังก์ชันทางคณิตศาสตร์พบว่ามียีนเหมือนและแตกต่างกันระหว่างกลุ่มของสไลด์ที่ถูกแบ่งตามระยะของโรคมะเร็งลำไส้ตรงหลายร้อยยีน จากยีนที่ให้ความแตกต่างจะถูกนำมาคัดกรองอีกครั้ง และพบว่ามียีนจำนวน 3 ยีนที่มีความสำคัญทางชีววิทยาและคลินิก คือ CDC4, placenta growth factor precursor (PIGF) และ CD27-binding protein



รูปที่ 2 แสดงภาพกราฟิกบางขั้นตอนในระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูล :

- (ก) ความเข้มจุดในสไลด์ไมโครอะเรย์ ภาพ ข-จ เป็นภาพหลังจากการปรับข้อมูลให้เป็นบรรทัดฐานแล้ว
- (ข) Box-plot ของข้อมูลไมโครอะเรย์ทั้ง 6 สไลด์
- (ค) MA-plot สรุปค่าความเข้มของจุดใน ไมโครอะเรย์
- (ง) Density-plot สรุปการกระจายของความเข้มหลังการปรับข้อมูล
- (จ) Volcano-plot แสดงความแตกต่างของแสดงยีน

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของ 3 ยีนที่มีความสำคัญทางชีววิทยาและคลินิก

Gene ID	Gene symbol	Gene description	Gene function	P-value	Log Fold Change	Fold Change	Up or Down-regulation
ENSG00000109670	FBXW7	F-box/WD-repeat protein 7 (hCdc4)	tumor suppressor	0.00000628	-3.686469393	0.078	Down
ENSG00000119630	PGF	Placenta growth factor precursor (PIGF)	proliferation and migration	0.00000143	-2.886234249	0.135	Down
ENSG00000184990	SIVA_HUMAN	Apoptosis regulatory protein Siva (CD27-binding protein)	Apoptosis	0.00000154	-3.042650738	0.121	Down

อภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนมะเร็งลำไส้ตรงในไมโครอะเรย์จำนวน 6 สไลด์ในผู้ป่วยเพียง 6 ราย แต่ได้ทำการควบคุมตัวแปรของยีนในกลุ่มขึ้นเนื้อปกติและขึ้นเนื้อมะเร็งโดยการนำเอาชิ้นเนื้อทั้งสองมาจากผู้ป่วยคนเดียวกันซึ่งสามารถควบคุมการแปรปรวนของข้อมูลการแสดงออกของยีนทั้งสองกลุ่มได้ และการทำไมโครอะเรย์แบบสองสีนั้นสามารถลดความแปรปรวนของข้อมูลในสไลด์ได้เนื่องจากการติดฉลากสีเขียวและแดงทำในช่วงระยะเวลาเดียวกันภายใต้สภาวะเดียวกันและค่าการแสดงออกของยีนทั้งสองนั้นออกมาในรูปแบบของสัดส่วนซึ่งย่อมดีกว่าการทำไมโครอะเรย์แบบสีเขียว ซึ่งการติดสีอาจจะต้องทำคนละช่วงเวลา และอาจจะมีการบิดเบือนเรื่องสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลนี้เป็นฟรีโปรแกรม จากการทบทวนวรรณกรรมจะเห็นว่ายีนที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นเป็นกลุ่มยีนที่มีความสำคัญกับการเกิดเป็นมะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับงานศึกษาวิจัยอื่น

ยีน CDC4 หรือ FBXW7 เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 การเกิด mutation ของยีน CDC4/FBXW7 ทำให้เกิด chromosomal instability และทำให้เกิดมะเร็ง CDC4/FBXW7 เป็นยีนในบริเวณ conserved SCF มีชื่อเรียกว่า SCFFBW7 โดย SCFFBW7 เป็นตัวทำให้ proto-onco-

genes ลดลง ซึ่ง proto-oncogenes ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์ใน pathways MYC, cyclin E, Notch and JUN (10) การแสดงออกของยีน CDC4/FBXW7 แบบ down regulation สามารถพบได้ในมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น breast cancer, glioma cancer, gastric cancer และ colorectal cancer⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ในงานวิจัยที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับ cell cycle regulatory gene ของยีน CDC4/FBXW7 ใน c-Myc and cyclin E ของชิ้นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่า การเปลี่ยนแปลงของยีน CDC4/FBXW7 นั้นสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้⁽¹²⁾

Placenta growth factor (PIGF) เป็นยีนในกลุ่มของ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งยีน PIGF เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิกระบวนการเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็งและการสร้างเส้นเลือดในก้อนมะเร็ง จากงานวิจัยล่าสุดในปี 2553(13) ได้ทำการศึกษายีน PIGF ด้วยวิธี immunohistochemical method และ real time quantitative PCR เพื่อประเมินความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน PIGF และผลทางคลินิกในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งผลการวิจัยนั้น สามารถสรุปได้ว่าระดับการแสดงออก PIGF มีความสัมพันธ์กับ lymph node metastases, tumor stages และ patient survival นอกจากนี้ การ

แสดงออก PIGF มีความสัมพันธ์กับ disease progression ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็น tumor marker สำหรับ colorectal cancer ได้ต่อไปในการศึกษาแบบการ แสดงออกของยีน PIGF ในเนื้อเยื่อของมะเร็ง มะเร็ง ปอดระยะ I-III และมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะ III เทคนิคที่ใช้ ในการวิเคราะห์การ แสดงออกทั้งหมด 3 เทคนิค คือ cDNA microarray, immunohistochemistry และ Northern blot ยีน PIGF มีรูปแบบการ แสดงออกเป็น แบบ Down regulate โดยผลการวิจัยพบว่า ค่าระดับ การแสดงออกของยีน PIGF ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดและ ลำไส้ตรงนั้นมีค่าระดับการ แสดงออกที่ต่ำกว่าปกติ⁽¹⁴⁾

CD27 เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของ tumor necrosis factor receptor (TNFR) มีการแสดงบน discrete sub-populations ของ T และ B เซลล์ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ proliferation,

Ig production และยังสามารถทำให้เกิด apoptosis โดยโปรตีน Siva ในยีน CD27 นี้มีความเกี่ยวข้องใน CD27-transduced apoptotic pathway⁽¹⁵⁾ ยีน CD27 ถูกค้นพบว่ามี ความสำคัญในมะเร็งเม็ดเลือดขาวและ มะเร็งลำไส้ใหญ่ ตัวอย่างเช่น ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว multiple myeloma (MM) ยีน CD27 ถูกนำมาใช้เป็น marker สำหรับ memory B cells⁽¹⁶⁾ และในมะเร็งลำไส้ ใหญ่ ยีน CD27 ถูกค้นพบว่ามี การแสดงออกเป็นแบบ down-regulate จากเทคนิคไมโครอะเรย์ ซึ่งศึกษา รูปแบบการ แสดงออกของยีนมะเร็งลำไส้ใหญ่ในวิธีที่ต่าง กัน คือ ศึกษาใน SW620 cell line⁽¹⁷⁾ และเนื้อเยื่อ มะเร็งลำไส้ใหญ่โดยตรง¹⁷ แต่ผลของการ แสดงออก

ของยีนเป็นแบบเดียวกัน นอกจากนี้ นักวิจัยเสนอแนว ทางในการพัฒนา ยีน CD27 ในการเป็น marker เพื่อใช้ ในการวินิจฉัยและใช้เป็นตัวบ่งชี้พยากรณ์โรคมะเร็ง ลำไส้ใหญ่ในอนาคต⁽¹⁸⁾

จะเห็นว่าในงานวิจัยอื่นก่อนหน้านี้อาจมีการรายงาน ยีนทั้ง 3 ซึ่งพบในงานวิจัยนี้เช่นเดียวกัน ซึ่งเทคนิคที่ใช้ ในแต่ละงานวิจัยมีทั้งเหมือนและแตกต่างจากงานวิจัย นี้ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูล ไมโครอะเรย์ในงานวิจัยก่อน หน้าได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางการค้า ซึ่งแตกต่าง จากงานวิจัยนี้ ถึงแม้ในงานวิจัยนี้จะใช้ฟรีโปรแกรม R ในการวิเคราะห์ข้อมูล แต่สิ่งที่ได้เหมือนกันคือการ แสดง ออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งลำไส้ตรง ดังนั้น งานวิจัยนี้สามารถช่วยลดต้นทุนในส่วนของการ วิเคราะห์ ซึ่งให้ผลการวิจัยมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับ โปรแกรมสำเร็จรูปทางการค้า

สรุป

ยีนในมะเร็งลำไส้ตรงที่พบว่ามี การแสดงออกแตกต่างไปจากชิ้นเนื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ ตรงในระยะ III คือ CDC4, placenta growth factor precursor (PIGF) และ CD27-binding protein ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการกระบวนการที่ทำให้เกิดมะเร็งคือ tumor suppressor, กระบวนการ proliferation และ migration รวมไปถึงกระบวนการเกิด apoptosis ซึ่งการ แสดงออกของทั้ง 3 ยีนนี้เป็นแบบ down regulation

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. 2552. "จำนวนการตาย จำแนกตามสาเหตุการ ตายและเพศ ภาคเหนือ พ.ศ. 2545 – 2552" [Online]. Available: http://service.nso.go.th/nso/nsopublish/BaseStat/tables/30000_Northern%20Region/deaths-45-52.xls (29 มีนาคม 2554).
2. Khuhaprema T, Srivatanakul P. Colon and Rectum Cancer in Thailand: An Overview. Japanese Journal of Clinical Oncology. 2008; 38(4): 237 -43.

3. Smyth, G. K. 2010. "Limma: Linear Models for Microarray Data User's Guide." [Online]. Available. <http://bioconductor.org/packages/2.6/bioc/vignettes/limma/inst/doc/usersguide.pdf> (2011 Mar 28).
4. Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, Holloway A, et al. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 2007; 23(20): 2700 -07.
5. Mark D. Robinson. 2009. "Linear models and Limma." [Online]. Available. http://www.math.ku.dk/~richard/courses/bioconductor2009/handout/19_08_Wednesday/KU-August2009-LIMMA/PPT-PDF/Robinson-limma-linear-models-ku-2009.ppt (2011 Mar 29).
6. Silver JD, Ritchie ME, Smyth GK. Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*. 2009; 10(2): 352 -63.
7. Anja VL. 2003. "Normalization of microarray data." *Verarbeitung von DNA-Microarray-Daten WiSe 2003/2004* [Online]. Available. http://lectures.molgen.mpg.de/Microarray_WS0304/anja_VL_25_11_2003.pdf (2011 Mar 28).
8. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(9):5116-21.
9. Tibshirani R. 2007. "A comparison of fold-change and the t-statistic for microarray data analysis." *Analysis* [Online]. Available. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.78.9531&rep=rep1&type=pdf> (2011 Mar 28).
10. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(2): 83-93.
11. Akhoondi S, Lindstrom L, Widschwendter M, Corcoran M, Bergh J, Spruck C, et al. Inactivation of FBXW7/hCDC4-beta expression by promoter hypermethylation is associated with favorable prognosis in primary breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2010; 12(6): R105(1-13).
12. Iwatsuki M, Mimori K, Ishii H, Yokobori T, Takatsuno Y, Sato T, et al. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int. J. Cancer*. 2010; 126(8): 1828-37.
13. Baek M, Bae S, Cho S, Jeong D, Kim C. 2010. "Role and prognostic value of placenta growth factor (PIGF) in colorectal carcinomas." (abstract). *American Society of Clinical Oncology 2010 ASCO Annual Meeting* [Online]. Available. http://www.asco.org/ascov2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=74&abstractID=41841 (2011 Mar 29).
14. Xu L, Jain RK. Down-Regulation of Placenta Growth Factor by Promoter Hypermethylation in Human Lung and Colon Carcinoma. *Molecular Cancer Research*. 2007; 5(9): 873 -80.
15. Prasad KVS, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(12): 6346-51.
16. Katayama Y, Sakai A, Oue N, Asaoku H, Otsuki T, Shiomomura T, et al. A possible role for the loss of CD27-CD70 interaction in myelomagenesis. *Br J Haematol*. 2003; 120(2): 223-34.
17. Futschik et al. Gene Expression Profiling of Metastatic and Nonmetastatic Colorectal Cancer Cell Lines. *Genome Letters* 2002; 1: 26-34.
18. Okuno K, Yasutomi M, Nishimura N, Arakawa T, Shiomi M, Hida J, Ueda K, Minami K. Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 295-99.

