

การศึกษาเปรียบเทียบภาวะการสูญเสียเฮเทอร์โรไซโกทของโครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 8, 16, 18
ระหว่างมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น

นางสาว เอี่ยมแข สุขประเสริฐ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-258-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARATIVE LOSS OF HETEROZYGOTE STUDY OF CHROMOSOME 1, 4, 8, 16, 18
BETWEEN PRIMARY HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND METASTATIC
ADENOCARCINOMA OF THE LIVER

Miss Aumkhae Sookprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-258-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเปรียบเทียบภาวะการสูญเสียเฮเทอร์โรไซโกทของโครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 8, 16, 18 ระหว่างมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น

โดย นางสาว เอี่ยมแซ สุขประเสริฐ

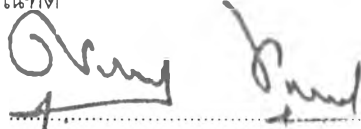
ภาควิชา อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ นรินทร์ วรุฒิ


อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร

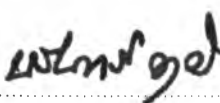
 อาจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์

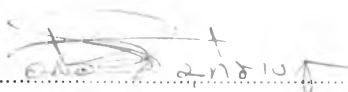
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุวัฒน์ ชุตินวงศ์)

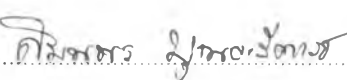
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชานินทร์ อินทรกำธรชัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ นรินทร์ วรุฒิ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์)


..... กรรมการ
(อาจารย์ แพทย์หญิง สมนพร บุญยะรัตเวช)

เอี่ยม แซ่ สุขประเสริฐ : การศึกษาเปรียบเทียบภาวะการสูญเสียเฮเทอโรไซโกทของโครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 8, 16, 18 ระหว่างมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น (COMPARATIVE LOSS OF HETEROZYGOTE STUDY OF CHROMOSOME 1, 4, 8, 16, 18 BETWEEN PRIMARY HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND METASTATIC ADENOCARCINOMA) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. นรินทร์ วรุณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. นพ. อภิวัฒน์ มุทิตรากร, อจ. นพ. สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์ ; 64 หน้า. ISBN 974-332-258-2.

การค้นหามะเร็งสูญเสียเฮเทอโรไซโกทโดยวิธีไมโครแซทเทลไลท์ เป็นวิธีการที่ใช้ค้นหาบริเวณที่เป็นที่อยู่ของ ยีนต้านมะเร็งถูกนำมาใช้ศึกษามะเร็งตับสองชนิดคือมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมา โดยเลือกศึกษา ในโครโมโซม 5 คู่ และใช้ข้อแทนแอมริฟิเคชันพอลิเมอร์เฟอไรท์ (เอสทีอาร์พี) ทั้งหมด 9 ตำแหน่ง ทำการศึกษาในกลุ่ม มะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ 25 ชิ้นเนื้อ และมะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมา 24 ชิ้นเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งและ เนื้อเยื่อปกติ โดยมีวัตถุประสงค์จะเปรียบเทียบความแตกต่างของอุบัติการณ์ของภาวะการสูญเสียเฮเทอโรไซโกทระหว่าง มะเร็งทั้งสองชนิด ผลการทดลอง มะเร็งตับชนิดปฐมภูมิพบภาวะแอลโอเอสบนโครโมโซมคู่ที่ 1 มากที่สุดโดยพบที่ 1 พีและ 1 คิว 38.5% และ 25% ตามลำดับ โครโมโซม 18 คิวตรงตำแหน่ง 18เอส57 พบภาวะแอลโอเอส 36.4% โครโมโซม 16 คิว พบ 25% ส่วนโครโมโซม 4 คิวและ 16 คิว พบในสัดส่วนไม่มากนัก ในกลุ่มมะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมา พบภาวะแอลโอเอส มากที่สุดบนโครโมโซม 18 คิว ตำแหน่ง 18เอส55 และ 18 เอส70 45.5% และ 25% ตามลำดับ และไม่พบภาวะแอลโอเอส บนโครโมโซม 1 พีตำแหน่ง เอเอ็มวายทูบีและโครโมโซม 4 คิว ทั้งสองตำแหน่งที่ทำการศึกษา และจากการเปรียบเทียบ สัดส่วนของภาวะแอลโอเอสในตำแหน่งต่างๆระหว่างมะเร็งทั้งสองกลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างของอัตราการพบภาวะแอลโอ เอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของโครโมโซม 1 พี ตำแหน่งเอเอ็มวายทูบีที่ค่าความเชื่อมั่น 95% ระหว่างมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ และมะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมา

จากการศึกษานี้พอจะสรุปได้ว่า มะเร็งตับชนิดปฐมภูมิมิแนวโน้มที่จะพบภาวะแอลโอเอสบนโครโมโซม 1พี, 4คิว ในขณะที่มะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมามีแนวโน้มที่จะพบภาวะแอลโอเอสบนโครโมโซม 18 คิว และไม่พบภาวะแอลโอเอสบน โครโมโซม 1 พีและ 4 คิว ดังนั้นในการที่จะใช้ภาวะการสูญเสียเฮเทอโรไซโกทในการแยกชนิดมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและ มะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโนมา ควรเลือกใช้เอสทีอาร์พีบนโครโมโซม 1 พีและโครโมโซม 4 คิว โดยถ้าพบภาวะแอลโอเอสบน โครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่ง บ่งบอกว่าชิ้นเนื้อนั้นมีโอกาสที่จะเป็นมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิมากกว่ามะเร็งตับชนิดดื้อโนคาร์ซีโน มา ในขณะที่การไม่พบภาวะแอลโอเอสบนโครโมโซมทั้งสองนี้ ชิ้นเนื้อนั้นยังมีโอกาสที่จะเป็นมะเร็งตับได้ทั้งสองชนิด กล่าวคือ ประโยชน์ของการศึกษาแอลโอเอสจะมีต่อเมื่อมีการค้นพบภาวะแอลโอเอสในชิ้นเนื้อ ดังนั้นจึงควรที่จะใช้เอสทีอาร์พีหลายๆ ตำแหน่งบนโครโมโซม 1 พีและ 4 คิว เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสในการพบภาวะแอลโอเอส

ภาควิชา อายุรศาสตร์
สาขาวิชา อายุรศาสตร์ / โรคกระเพาะ
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4075274130 : MAJOR MEDICINE (ONCOLOGY)

KEY WORD: LOH / TUMOR SUPPRESSOR GENE / PRIMARY HEPATOCELLULAR CARCINOMA / METASTATIC ADENOCARCINOMA AUMKHAE SOOKPRASERT : COMPARATIVE LOSS OF HETEROZYGOTE STUDY OF CHROMOSOME 1, 4, 8, 16, 18 BETWEEN PRIMARY HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND METASTATIC ADENOCARCINOMA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NARIN VORAVUD, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D. Ph.D., SOMBOON KELAWAT, M.D. 64 pp. ISBN 974-332-258-2.

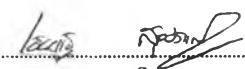
The loss of heterozygote study, a method to identify the genomic regions containing candidate tumor suppressor genes was performed in primary hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma of the liver. LOH were tested on 5 chromosome arms using 9 short tandem repeated polymorphic markers (STRPs). Twenty-five hepatocellular carcinoma and twenty-four metastatic adenocarcinoma of the liver were examined and compared between primary tumor samples and normal tissue samples. The objective of the study is to determine and to compare the incidences of LOH between primary hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma of the liver. The most frequent LOH in primary hepatocellular carcinoma was on chromosome 1 both 1p and 1q, 38.5% and 25% respectively. The next most common site was chromosome 18q, D18S57, 36.4%. LOH was found on chromosome 16q 25%. LOH study on chromosome 4q and 8q were found infrequently. In metastatic adenocarcinoma group, the most frequent site was on chromosome 18q, D18S55 and D18S70, 45.5 and 25% respectively. We did not found any LOH on chromosome 1p, AMY-2B and chromosome 4q, D4S192 and D4S194, in metastatic adenocarcinoma of the liver. The chi-square test was performed to compare the proportion of LOH study and yielded a 95% significant difference of the proportion of the LOH on chromosome 1p at AMY-2B loci between primary hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma of the liver.

From this study, it may conclude that there is a trend to find the LOH on chromosome 1p, 1q and 4q in primary hepatocellular carcinoma. But in metastatic adenocarcinoma of the liver, there is a trend to find the LOH on chromosome 18q and were not found any LOH on chromosome 1p and 4q. Therefore the polymorphic markers that appropriate to differentiate these two types of liver cancers should be on chromosome arm 1 and 4. and if either of the two chromosome is positive for LOH, the tested tissue should be primary hepatocellular carcinoma. But the chance is equal between primary hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma if the tested yield negative results. Therefore only the positive results can be used to differentiate the two types of liver malignancy. So many STRPs markers on chromosome arm 1 and 4 should be used to increase the chance of positive results.

ภาควิชา..... อายุรศาสตร์.....

สาขาวิชา..... อายุรศาสตร์ / โรคกระเพาะ.....

ปีการศึกษา..... 2541.....

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ อย่าง ยิงและช่วยเหลือผู้วิจัยในด้านต่างๆด้วยดีเสมอมา และรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ นรินทร์ วรภูมิ อาจารย์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาแนะนำแนวทางและชี้ให้เห็นถึงประโยชน์และความสำคัญของความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในขบวนการทางคลินิกในการดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็ง ให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น และทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ อาจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าและทบทวนสไลด์ขึ้นเนื้อทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ งานวิจัยนี้จะไม่สำเร็จลงได้เลยถ้าไม่ได้รับความช่วยเหลือจากคุณวิชัย พรธนะเกษม และคุณสายรุ้ง คักติกุล ซึ่งเป็นผู้สอนเทคนิคและวิธีการที่ใช้ในส่วนที่เป็นงานทางห้องปฏิบัติการและช่วยเหลือผู้วิจัยมาโดยตลอด และนางสาวจิรนนท์ วราชิต ที่ได้ช่วยเป็นที่ปรึกษาทางด้านความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยและเป็นผู้ช่วยเรียบเรียงสำนวนภาษาที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเพื่อนแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกคนในหน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนผู้วิจัยในด้านต่างๆด้วยดีเสมอมา

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ซึ่งเป็นผู้ที่สนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ฅ
สารบัญคำย่อ.....	ญ
บท	
1. บทนำ.....	1
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	8
3. ระเบียบวิธีวิจัย.....	22
4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	25
5. วิธีทำ.....	29
6. ผลการวิจัย.....	36
7. วิจารณ์.....	47
8. สรุปผลการวิจัย.....	53
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	61
ประวัติผู้เขียน.....	64

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	ตำแหน่งของยีนต้านมะเร็งที่จำเพาะในมะเร็งชนิดต่างๆ.....2
ตารางที่ 2	ตารางแสดงสัดส่วนของภาวะ LOH ในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้.....3-5
ตารางที่ 3	ตารางเปรียบเทียบระยะเวลาต่างๆของการเกิดมะเร็งกับพยาธิสภาพของเซลล์ และลักษณะการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล.....11
ตารางที่ 4	ตารางแสดงคุณสมบัติของยีนก่อมะเร็งและยีนต้านมะเร็ง.....12
ตารางที่ 5	ตารางแสดงตำแหน่งของ STRPs loci ที่ใช้ในการศึกษา.....32
ตารางที่ 6	แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับ ชนิดดื้อดีโนคาร์ซิโนมาแยกตามตำแหน่ง loci ที่ใช้ในการศึกษา.....36
ตารางที่ 7	ตารางแสดงผลการศึกษา LOH ในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิในแต่ละ loci บนโครโมโซมทุกคู่ที่ทำการศึกษา.....37
ตารางที่ 8	ตารางแสดงผลการศึกษา LOH ในมะเร็งตับชนิดดื้อดีโนคาร์ซิโนมา ที่แพร่กระจายมาในแต่ละ loci บนโครโมโซมทุกคู่ที่ทำการศึกษา.....38
ตารางที่ 9	แสดงผลการศึกษาภาวะ LOH ในมะเร็งตับปฐมภูมิแยกตามโครโมโซม ที่ทำการศึกษา.....39
ตารางที่ 10	แสดงผลการศึกษาภาวะ LOH ในมะเร็งตับชนิดดื้อดีโนคาร์ซิโนมา แยกตามโครโมโซมที่ทำการศึกษา.....40
ตารางที่ 11	แสดงสัดส่วนของภาวะ LOH เฉพาะ informative case ตาม โครโมโซมที่ศึกษาเฉพาะในมะเร็งตับปฐมภูมิ.....41
ตารางที่ 12	แสดงสัดส่วนของภาวะ LOH เฉพาะ informative case ตาม โครโมโซมที่ศึกษาเฉพาะในมะเร็งตับชนิดดื้อดีโนคาร์ซิโนมา.....42
ตารางที่ 13	สัดส่วนของภาวะ LOH ที่พบในตำแหน่งต่างๆในแต่ละกลุ่ม ของมะเร็งตับและผลการทดสอบ chi-square test.....45

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	กราฟแสดงอัตราการตรวจพบภาวะ LOH บนโครโมโซมทุกคู่ในมะเร็ง ตับชนิดปฐมภูมิ.....	7
รูปที่ 2	กราฟแสดงอัตราการตรวจพบภาวะ LOH บนโครโมโซมทุกคู่ในมะเร็ง ลำไส้ใหญ่ชนิดดีโนคาร์ซิโนมา.....	7
รูปที่ 3	รูปแสดงขบวนการเกิดมะเร็งที่เป็นขั้นตอน (multistage carcinogenesis).....	10
รูปที่ 4	ลำดับขั้นของความผิดปกติในระดับโมเลกุลในขั้นตอนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	11
รูปที่ 5	รูปจำลองของการศึกษาของ Harris ในการผสมเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ.....	14
รูปที่ 6	รูปแสดงลักษณะที่แตกต่างกันของขบวนการเกิดมะเร็งจอตตาในเด็กระหว่าง กลุ่มที่ถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์และกลุ่มที่เกิดภายหลัง.....	15
รูปที่ 7	รูปแสดงกลไกที่ทำให้เกิดการเสียหายครั้งที่สองของยีนต้านมะเร็ง.....	17
รูปที่ 8	แสดงลักษณะของ DNA polymorphisms ที่อยู่ในรูปของ STRPs.....	19
รูปที่ 9	แสดงลักษณะของแถบที่เกิดขึ้นหลังจากการนำ polymorphic probes จับ DNA และทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	19
รูปที่ 10	แสดงการใช้ polymorphic probes เป็น marker ในการค้นหาที่อยู่ของ ยีนต้านมะเร็ง.....	20
รูปที่ 11	แสดงลักษณะของภาวะ LOH เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ.....	20
รูปที่ 12	แสดงขั้นตอนที่สำคัญของปฏิกิริยา polymerase chain reaction.....	31
รูปที่ 13	แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่เป็น uninformative case.....	34
รูปที่ 14	แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่เป็น retain heterozygote.....	35
รูปที่ 15	แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีภาวะ LOH.....	35
รูปที่ 16	แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่เป็นลักษณะของ MSI.....	35
รูปที่ 17	กราฟเปรียบเทียบสัดส่วนภาวะ LOH ที่พบในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับ ชนิดดีโนคาร์ซิโนมา แยกตามโครโมโซมเฉพาะ informative case.....	43
รูปที่ 18	กราฟแสดงสัดส่วนภาวะ LOH ที่พบในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็ง ตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมา แสดงรายละเอียดเฉพาะโครโมโซม 18q.....	43
รูปที่ 19	รูปแสดงผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ในกลุ่มมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ โดยใช้ STRPs loci ที่ตำแหน่งD4S192.....	44
รูปที่ 20	รูปแสดงผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ในกลุ่มมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมา โดยใช้ STRPs loci ที่ตำแหน่งD18S55.....	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	Base pair
°C	Degree Celsius
Ci	Curie
cm	Centimetre
CML	Chronic myelogenous leukemia
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOP	Degenerated oligonucleotides primers
FNA	Fine needle aspiration
g	Gram
I	Microsatellite instability
LOH	Loss of heterozygosity
L	Litre
M	Molar
µg	Microgram
µl	Microlitre
µM	Micromolar
ml	Millilitre
mM	Millimolar
Max	Maximum
MSI	Microsatellite instability
ng	Nanogram
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
PCR	Polymerase chain reaction
STRPs	Short tandem repeated polymorphic markers
U	Uninformative case