รหัสโครงการ SUT1-104-45-12-38

รายงานการวิจัย

การแสดงออกของยีน EGFR และ IGFR ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม

The expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Insulin-like growth factor type I (IGFR) in primary breast cancer tissues

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-45-12-38

รายงานการวิจัย

การแสดงออกของยีน EGFR และ IGFR ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม

The expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Insulin-like growth factor type I (IGFR) in primary breast cancer tissues

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร.น.พ. ชวบูลย์ เดชสุขุม

2. พ.ญ. ศรีลา สำเภา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2545

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2545 งานวิจัยนี้ไม่สามารถประสบความสำเร็จได้หากปราศจากทุนอุดหนุนการวิจัยและความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้ร่วมวิจัยทั้งสองท่านคือ ดร.น.พ. ชวบูลย์ เดชสุขุม และพ.ญ. ศรีลา สำเภา ซึ่งขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือบางส่วนในการวิจัย รศ.หัชชา ศรีปลั่งในการช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และ ผ.ศ. ปลื้มจิต บุณยพิพัฒน์ สำหรับชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมบางส่วนที่ใช้ในงานวิจัยนี้

อ.ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่เป็นปัญหาหลักโรคหนึ่งของประเทศต่างๆทั่วโลก ในประเทศไทย โรคมะเร็งชนิดนี้นับเป็นโรคมะเร็งที่พบในสตรีเป็นลำดับสองของประเทศ สาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความผิดปกติและพัฒนากลายเป็นมะเร็งเต้านมมักจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของยีนชนิด Tumor suppressor genes และ Oncogenes โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนในกลุ่ม receptor tyrosine kinase ได้แก่ Epidermal growth factor (EGFR) และ Insulin-liked growth factor receptor (IGFR) ได้มีการศึกษาเพื่อหาความเป็นไปได้ที่จะใช้ EGFR และ IGFR เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการเป็นโรคมะเร็งเต้านม แต่การศึกษาเท่าที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปได้ว่าใช้ได้หรือไม่ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งสองพร้อมกันร่วมกับข้อมูลทางคลินิกต่างๆในผู้ป่วยรายเดียวกัน เพื่อดูความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งสองในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม เพื่อเป็นแนวทางในการพยากรณ์และวินิจฉัยโรค งานวิจัยนี้ได้ศึกษาในคนไข้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านมในปี 2537 ทั้งนี้เพื่อสามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของยีนดังกล่าวกับการพยากรณ์โรค ขณะเดียวกันสามารถดูความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยได้ด้วย กลุ่มที่สอง คือคนไข้ใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านมในปี 2544 ซึ่งในกลุ่มได้ใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีนทั้งสอง และนำไปวิเคราะห์ดูว่ามีความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิกอื่นๆ หรือไม่ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระดับการทำงานของ IGF-IR ในระดับ mRNA มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งเต้มนม ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญของระดับการทำงานของ IGF-IR ในระดับ mRNA กับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ในกลุ่มผู้ป่วยเก่าซึ่งใช้วิธีการตรวจวัดการทำงานของยีนโดยใช้วิธี Immunohistochemistry ซึ่งเป็นการตรวจหาโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนั้น ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับโปรตีน กับลักษณะทางพยาธิวิทยา และลักษณะทางคลินิกของโรค (tumor grade และ clinical stage) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยหาค่า likelihood ratio พบว่าระดับโปรตีน EGFR มีแนวโน้มแสดงถึงความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคในแง่อัตราการอยู่รอดใน 5 ปีของผู้ป่วยและมีแนวโน้มว่าเป็นตัวแปรในการบอกการพยากรณ์ของโรคได้ การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงถึงข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของยีนซึ่งใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมได้ระดับหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

Abstract

Breast cancer is the major health problem worldwide. In Thailand it is the second most common cancer in female. The tumorigenesis of breast cancer involved the multiple genetic alterations of both tumor suppressor genes and the oncogenes. One of the critical alteration is the aberrant expression of receptor tyrosine kinases especially epidermal growth factor (EGFR) and insulin-liked growth factor receptor (IGFR). The possibility of using the alterations of these genes as a prognostic indicator in breast cancer has been investigated. However, the results of the previous studies showed the inconclusive evidence. In this study, we conducted the expression analysis of both genes in the Thai breast cancer patients to further verify the role of the alterations of these two genes regarding the potential application of them in the molecular classification of this tumor. The archival specimens and the newly collected specimens from Thai breast cancer patients were subjected to the expression analysis of both genes by immunohistochemical study and RT-PCR, respectively. The result showed that the level of IGF-1R mRNA was significantly associated with the node metastasis of the patients. However there was no association between its expression level and histologic grade and other staging parameters. There was also no association between level of EGFR mRNA and the histologic grade or clinical stages. Immunohistochemical study of the archival specimens demonstrated no significant correlation between the level of IGF-1R protein, EGFR protein and the histologic grade, clinical stage and the 5-years survival of the patients. However, statistic analysis of EGFR protein level using the likelihood model showed the trend for the marker for the reduced survival of the patients. This study provides the evidence for potential using the alterations of these genes as the prognostic indicators of the breast cancer particularly node metastasis stage of breast cancer patients.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเก็บตัวอย่าง	4
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	4
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	4
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผล	8
บทที่ 4 บทสรุป	
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	16
บรรณานุกรม	20
ประวัติผู้วิจัย	23

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ผลการตรวจระดับการทำงานของยีนส์ IGF-1R และ EGFR
โดยวิธีการย้อมทาง Immunohistochemistry 9

2. แสดงผลการศึกษาวัดระดับ mRNA ของยีน IGF-1R และ EGFR โดยวิธี RT-PCR 13

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. แสดงผลิตผลของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี RT-PCR ของยีน Epidermal growth factor (EGFR, ความยาว161 bp) และ Insulin-liked growth factor receptor (IGFR, ความยาว 241 bp) จากชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 14

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

EGFR และมะเร็งเต้านม

EGFR เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Tyrosine kinase ที่อยู่บน cell membrane ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นการทำงานโดย growth factor ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ EGF และ TGF$\propto$ การกระตุ้นดังกล่าวจะนำไปสู่การเจริญเติบโตของเซลล์มากขึ้น ในเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์ที่บุท่อน้ำนม (Mammary epithelium) ของมนุษย์ การทำงานที่มากกว่าปกติของ EGFR สามารถนำไปสู่การเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งในเซลล์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการทำงานที่สูงขึ้นของ EGFR ในมะเร็งหลายชนิดด้วย (Klijn et al., 1993; Beckmann et al., 1996; Walker and Deaning 1999) ความผิดปกติของยีน EGFR มีได้หลายแบบ ได้แก่ gene amplificati RNA overeapression increased translation และ post-translational modification ในมะเร็งเต้านมพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของยีน EGFR ที่สูงขึ้นกับภาวะการที่ไม่สามารถตรวจพบ estrogen receptor (Toi et al.,. 1994; Chrysogelos et al., 1994) และภาวะที่ ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย Tamoxifen (Nicholson et al., 1990) การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ EGFR ในมะเร็งเต้านม ยังไม่สามารถสรุปผลได้แน่นอน ด้วยสาเหตุดังกล่าวการตรวจวัดการทำงานของยีน EGFR ร่วมกับยีนสำคัญที่อาจเกี่ยวข้องโดยตรงเช่นยีน IGFR ในชิ้นเนื้อมะเร็งของคนเดียวกัน จะสามารถบอกว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง genes ดังกล่าวกับอาการทางคลีนิกหรือไม่ ซึ่งความรู้ดังกล่าวจะนำไปใช้ในการดูแลและรักษาผู้ป่วยต่อไป

IGF-1R และมะเร็งเต้านม

IGF-1R เป็นโปรตีนในกลุ่ม tyrosine kinase receptor ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์หลายชนิด รวมทั้ง mammary epitheliums มีหลักฐานที่แสดงว่า IGF-1R มีบทบาทในกระบวนการเกิดมะเร็ง คือ

1. สามารถตรวจพบการทำงานที่สูงขึ้นของยีน IGF-1R ในมะเร็งส่วนใหญ่ (Glick *et al.*, 1989; Cullen *et al.*, 1990)
2. การทำงานที่สูงขึ้นของ IGF-1R สามารถทำให้เกิดมะเร็งได้ (Kaleko *et al.*, 1990)
3. การยับยั้งการทำงานของยีน IGF-1R สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้

4. เซลล์ Fibroblast ที่สูญเสียยีน IGF-1R (targeted disruption) ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งได้โดย SV 40 T antigen antigen (Sell *et al.*, 1993)

นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ IGF-1R ยีนในมะเร็งต่อมลูกหมากนำไปสู่การลดการเจริญเติบโตของเซลล์รวมทั้งการสูญเสียความสามารถในการลุกลาม และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Burfeind et al., 1996) การศึกษาในมะเร็งเต้านมบ่งชี้ว่าความผิดปกติของยีน IGF-1R อาจมีความสำคัญในการเกิดมะเร็งชนิดนี้ การตรวจวัดการทำงานของยีน IGF-1R พบว่าในเซลล์มะเร็งมีการทำงานของยีน IGF-1R สูงกว่าในเซลล์ปกติ (Peyrat et al., 1988, 1992; Berns et al., 1992; Railo et al., 1994) ความผิดปกติของยีน IGF-1R ร่วมกับ ความผิดปกติของยีน EGFR จะเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดมะเร็งเต้านมหรือไม่ การศึกษานี้จะได้ทดสอบสมมุติฐานดังกล่าวโดยการตรวจวัดการทำงานของยีน EGFR และ IGF-1R ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมคนเดียวกัน ผลการศึกษาดังกล่าวจะช่วยให้มีความเข้าใจกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมดีขึ้น และสามารถประยุกต์ใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน EGFR และ IGFR ในระดับ RNA และโปรตีน ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมและชิ้นเนื้อปกติที่ได้จากผู้ป่วย
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน EGFR , IGFR และ ข้อมูลทางคลินิกหรือทางพยาธิวิทยา เช่น grading, staging, metastases, hormone status

ขอบเขตงานวิจัย : ศึกษาการแสดงออกของยีน EGFR และ IGFR ระดับ RNA ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมและชิ้นเนื้อเต้านมปกติในผู้ป่วยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 30 ราย

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด

รายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ IEFR และ EGFR ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่ได้จากผู้ป่วยยังมีเพียงจำนวนน้อย ดังนั้นความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถบอกได้ว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง ยีนทั้งสองชนิดดังกล่าวหรือไม่โดยวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางคลินิกและพยาธิวิทยา ซึ่งจะช่วยให้มีความเข้าใจกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมได้ดีขึ้น ความรู้ดังกล่าวจะนำไปใช้ในการดูแลและรักษาผู้ป่วยต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบรูปแบบการแสดงออกของยีน EGFR และ IGFR ในมะเร็งเต้านมและชิ้นเนื้อปกติ
2. ทราบบทบาทของยีน EGFR และ IGFR ต่อกระบวนการเกิดและ/หรือการพัฒนาการของมะเร็งเต้านม โดยวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางคลินิกและพยาธิวิทยา
3. เป็นพื้นฐานในงานวิจัยต่อไป
4. เป็นแนวทางในการบอกพยากรณ์โรคและการรักษา

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 เก็บชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมและชิ้นเนื้อเต้านมปกติจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคดังนี้ จำนวน 30 ราย ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ระหว่างปี ตุลาคม 2544 - กันยายน 2545 และ 58 รายในปี 2537

- in situ ductal carcinoma, infiltrating duct carcinoma, infiltrating lobular carcinoma

2. รวบรวมข้อมูลทางคลินิกและพยาธิวิทยา

รวบรวมข้อมูลต่างๆจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

3. การวิเคราะห์ข้อมูล:

3.1 ข้อมูลเชิงพรรณนานำเสนอในรูป ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน IGFR และ EGFR กับข้อมูลทางคลินิกและพยาธิวิทยา คือ clinical staging, histologic grade, hormonal status คือ estrogen & progesterone receptors, pre or post-menopausal status โดย Chi's square และ logistic regression

<u>วิธีการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง ต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์มะเร็ง และเนื้อปกติ</u>

เก็บชิ้นเนื้อสดดังกล่าวทันทีหลังการผ่าตัด โดยแบ่งเนื้อออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ขนาดไม่น้อยกว่า 3 ลบ.มม. แช่ใน RNA later ซึ่งเป็นน้ำยาที่รักษาสภาพ RNA ให้คงทนไม่ถูกทำลายโดยเอ็นซัยม์ RNase ค้างคืน หลังจากนั้นเทน้ำยา RNA later ออกแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70°C

ส่วนที่ 2 ตัดเป็นแผ่นบางๆ แช่ในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เพื่อศึกษาทาง จุลพยาธิวิทยาและย้อม immunohistochemistry

<u>วิธีการย้อม Immunohistochemistry</u>

ตัดชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ 10% buffered formalin และฝังอยู่ในพาราฟินมีความหนาประมาณ 5 ไมครอน วางบนสไลด์ที่เคลือบไว้ด้วยสาร adhesive อบค้างคืนที่ 45°C และนำมากำจัดพาราฟินออกใน xylene ต่อไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย กู้แอนติเจน

(antigen retreival) ด้วยการต้มชิ้นเนื้อซึ่งแช่ใน 10 mM citrate buffer pH 6 ประมาณ 10 นาที กำจัด endogenous peroxidase ออกโดย 3% H_2O_2, กำจัด non specific background ออกด้วย non-immune serum, อบสไลด์ด้วย EGFR หรือ IGFR primary antibody (1:50 Santa Crutz) ค้างคืน, ย้อมต่อด้วย secondary antibody, avidin-biotin complex และสารก่อสี หลังจากนั้นย้อมบางๆ ด้วย hematoxyllin ปิดสไลด์ด้วย cover slip นำสไลด์มาศึกษาต่อไปได้

วิธีสกัด RNA จากชิ้นเนื้อ

นำชิ้นเนื้อมาบดให้ละเอียดด้วย tissue homogenizer ขณะที่ชิ้นเนื้ออยู่ในสารละลาย RNAwiz ซึ่งมีสารเคมีที่ช่วยรักษาสภาพ RNA ให้คงทนไม่ถูกทำลายโดยเอ็นซัยม์ RNase ตกตะกอน RNA ด้วย isopropanol (ตามไดอะแกรม) หลังจากนั้นทำ RNA ให้แห้งพร้อมที่จะนำไปทำ RT-PCR

tissue disrupted ⟶ add chloroform ⟶ centrifuge ⟶ isopropano ⟶ centrifuge ⟶ dry pellete
by homogenizer+RNAwiz RNA precipitate

Breast cancer tissue was obtained from biopsy or mastectomy specimens from consenting patients undergoing the surgical procedure by physicians of the Songklanagarind hospital, Hatyai, Songkhla. The tissue was acquired under an IRB approval protocol. Tissue received in the pathology laboratory after surgery was immediately frozen in liquid nitrogen followed by storage at -80°C. Pieces of frozen tissue were then pulverized by mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen. The 1ml of Trizol RNA extraction solution was then added to the tissue while it is still frozen. The mixture is then allowed to be equilibrated to the room temperature and transferred into 2 ml centrifuged tubes. The solution was then incubated at room temperature for 5 mins. The 200 µl of chloroform is then added into the mixture followed by shaking for 15 secs. Mixture was then incubated at room temperature for 3 mins followed by centrifugation at 4° C at 12,000 ×g for 10 mins. Aqueous phase was then transferred into the fresh tube and 500µl of isopropanol was then added. After the storage the solution at -20° C for overnight, the RNA was then precipitated by centrifugation at 4° C at 12,000 ×g for 15 mins. The pellet was then washed with 70% ethanol followed by centrifugation at 7,000 ×g for 5 mins. The pellet was dry at room temperature and dissolved in 50 µl of nuclease free water. The RNA concentration was measured by spectrophotometer and the RNA was then stored at -70°C until use.

วิธีการทำ RT-PCR

0.7 μg of RNA will be used in an RT-PCR reaction (24 μl total volume) consisting of 75 mM KCl, 50 mM Tris (pH 8.3), 3.0 mM $MgCl_2$, 500 mM dNTPS and 2 μM primers. The RT step will be performed at 42°C for 1 hour followed by MMLV heat inactivation at 95°C for 5 mins. The total cDNA reaction mixture will then combined with a PCR master mix (76 μl total volume) with a resulting concentration of 56 mM KCl, 19.6 mM Tris (pH 8.3), 1.6 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs and 1μM of primers. Thirty cycles of PCR will be performed, using 95°C for 1 minute for denaturation, 60°C for 30 second for annealing, and extension at 72°C for 1 min. The 10 μl of PCR products will be analyzed by electrophoresis through 10% polyacrylamide gel at 150 V for 3 hr. The gel will then be stained with Ethidium bromide and the PCR product will be detected by UV visualization with the assistance of gel-imaging system.

RNA + primers of EGFR or IGFR or control + Master mix

↓ RT-PCR

42°C, 1 hr (for reverse transcription step)

↓

95°C, 10 min (to activate Tag polymerase)

↓

denaturation (95°C, 15 sec)

↓

annealing (60°C, 60 sec)

↓ 40 cycles

PCR products

↓

Gel Electrophoresis

↓

Ethidium Bromide Staining and Photograph

Primers sequences :

1. EGFR primers: Sense = GGT GAC TCC TTC ACA CAT AC

Antisense = TTG GTC CTG CCG CGT ATG AT

2. IGF-1R primers: Sense = TCC CCG ACC TCG CTG TGG GG

Antisense = GGA ACA GCA GCA AGT ACT C

3. GAPDH (glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase, house keeping gene):

Sense = GAA GGT GAA GGT CGG AGT

Antisense = GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

PCR products :

1. EGFR = 161 bp

2. IGFR = 241 bp

3. GAPDH = 226 bp

Master mix ประกอบด้วยเอ็นไซม์ Reverse transcriptase และ hot start Polymerase และสารอื่นๆที่จำเป็นในการทำ RT-PCR

<u>โดยสรุป</u> ในผู้ป่วย 1 รายทำ RT-PCR = 4 reactions คือ

1. Tumor tissue for EGFR & IGFR
2. Normal tissue for EGFR & IGFR

บทที่ 3

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผล

จากการวิจัยสามารถสรุปผลการศึกษาระดับการทำงานของ IGF-1R และ EGFR ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมได้ใน 2 ส่วนคือ

1. ผลการตรวจระดับการทำงานของยีน IGF-1R และ EGFR โดยวิธีการย้อมทาง Immunohistochemistry ในชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ใน PARAFFIN (PARAFFIN – EMBEDED TISSUE) ซึ่งเป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านม ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในปี 2537

   สรุปข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งหมดดังนี้

   - จำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งสิ้น 47 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 44 คน
   - อายุผู้ป่วยอยู่ระหว่าง 27 ถึง 84 ปี
   - ข้อมูลทางพยาธิวิทยาและระยะของโรค

ชนิดของมะเร็งเต้านม

- ชนิด Invasive ductal carcinoma จำนวน 58 ราย และชนิด in situ carcinoma (ductal type) จำนวน 1 ราย โดยในกลุ่ม invasive ductal carcinoma นั้น แยกเป็น subtype ชนิด invasive ductal carcinoma, non-otherwise specified จำนวน 42 ราย, ชนิด mucinous carcinomar 1 ราย
- ระยะของโรค

  ผู้ป่วยได้แบ่งเป็นระยะของโรคโดยใช้ระบบ TMN classification ซึ่งเสนอโดย Union International Cancer Center (UICC) โดยพิจารณาจากลักษณะทางคลินิกของโรคได้แก่ ขนาดของมะเร็ง, การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง และการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ที่อยู่ไกลออกไป
- GRADING ของ TUMOR

  ได้ใช้ grading system ของ modified Bloom และ Richardson grading system โดยแบ่งเป็น 3 grade โดยพิจารณาจากลักษณะ 3 อย่างคือ nuclear grade, tubule formation และ mitotic rate

ผลการย้อมเพื่อตรวจวัดระดับการทำงานของยีน IGF-1R และ EGFR ใน Breast Cancer

- วิธีการตรวจวัดที่เสนอโดย Mcmelland *et al* โดยมีวิธีการวัดคือ ใช้นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดอย่างน้อย 500 cells และแบ่งระดับการติดสีเป็น 2 ส่วน คือจำนวนเปอร์เซ็นต์ที่ติดสี และความเข้มของสี โดยแบ่งระดับความเข้มเป็น 4 ระดับคือ 0 ถึง 4 หลังจากนั้นจึงคำนวณค่าการติดสีโดยรวม (Staining index) โดยคำนวณจากสูตร

$$SI = (O \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) / 100$$

โดย A = จำนวนเปอร์เซ็นต์ของของเซลล์ที่ไม่ติดสี
B = จำนวนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดสี 1+
C = จำนวนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดสี 2+
D = จำนวนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดสี 3+
ดังนั้น ค่า SI ที่ได้ จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 3

ค่าระดับการติดสีของโปรตีนทั้ง 2 ตัว จะถูกคำนวณแยก และนำมาวิเคราะห์ดูว่ามีความสัมพันธ์กับ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของเซลล์มะเร็ง และลักษณะทางคลินิก รวมถึงอัตราการอยู่รอด 5 ปี (5- year survival) โดยใช้วิธีทางสถิติคือ ANOVA สำหรับดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน EGFR และ IGF-1R และลักษณะทางคลินิก และ COX regression เพื่อวิเคราะห์ดู survival rate ผลการทดลองได้สรุปดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจระดับการทำงานของยีนส์ IGF-1R และ EGFR โดยวิธีการย้อมทาง Immunohistochemistry

Case No	Surg No.	Age	Tumor grade	Pathologic grade	Stage	IGF-1R (SI)	EGFR (SI)	Diag	Last F/U	Status
1	S37-001	40	IDC	3	3	2.46	1	3/1/1994	18/4/2002	ALive
2	S37-042	72	IDC	1	2	2.27	2	4/1/1994	1/3/1999	ALive
3	S37-150	43	IDC	3	2	2.63	2	7/1/1994	13/3/2001	ALive
4	S37-159	49	IDC	3	4	2.48		10/1/1994	1/7/1994	Dead
5	S37-183	50	IDC	3	4	2.23	1	10/1/1994	1/9/1939	LossFU

Case No	Surg No.	Age	Tumor grade	Pathologic grade	Stage	IGF-1R (SI)	EGFR (SI)	Diag	Last F/U	Status
6	S37-217	65	IDC	2	4					
7	S37-218	46	IDC	2	3	2.35	2	12/1/1994	4/9/1995	ALive
8	S37-284	54	IDC	2	3					
9	S37-353	38	IDC	1	4					
10	S37-391	65	IDC	2	4	3	2	11/1/1994	1/1/1995	ALive
11	S37-436	38	IDC	1	3	2.07	1	24/1/1994	1/7/1995	Dead
12	S37-509	31	ISC							
13	S37-591	48	IDC	2	3	2.05	1	31/1/1994	17/4/1944	ALive
14	S37-677	65	IDC	2	3	2.08	1	3/2/1994	1/2/1995	lossFU
15	S37-709	27	IDC	2	4	2.15	0.82	4/2/1994	2/17/96	Dead
16	S37-832	55	IDC	1	4	2.28	1	11/2/1994	1/3/1994	Dead
17	S37-899	51	IDC /sr	1	3	1.18	1	16/2/1994	1/2/1995	Dead
18	S7-924	37	IDC	2	4	2.12	1	16/2/1994	2/11/1996	Dead
19	S37-1416	53	ILC	3						
20	S37-1445	76	IDC	2	2	2.08	1	16/3/1994	1/8/1994	LossFU
21	S37-1446	48	MC8	1	3	2.03	1.08	16/3/1994	27/12/1999	metas
22	S37-1595	49	IDC	3	1	2	2.15	24/3/1994	25/1/2000	ALive
23	S37-1630	42	IDC	1	1	1.15	0.34	28/3/1994	19/3/2002	ALive
24 /25	S37-1688	53	ISC	1	3	1.18	1			
25	S37-1761	53	IDC	1	3	2.13	2	30/3/1994	29/2/02	LossFU
26	S37-1792	50	IDC		4					
27	S37-1872	59	IDC	2	2	2	1.55	8/4/1994	28/2/2002	ALive
28/29	S37-1873	51	IDC	3	2	2.05	1.07	18/4/1994	19/2/2002	ALive
29	S37-1889	51	IDC	2	2	3	0.93			
30/23	S37-1902	48	IDC	2	1	3	1	8/4/1994	19/3/2002	ALive
31	S37-1995	84	IDC	1	4	0.04	0	18/4/1994	11/1/1998	ALive
32	S37-2037	49	IDC	2	2	2.05	1	19/4/1994	22/3/2002	ALive

Case No	Surg No.	Age	Tumor grade	Pathologic grade	Stage	IGF-1R (SI)	EGFR (SI)	Diag	Last F/U	Status
33	S37-2156	31	IDC	2	3	2.06	1	22/4/1994	1/5/1995	Dead
34	S37-2157	84	IDC	2	4	3	1	22/4/1994	1/11/1998	ALive
35	S37-2268		IDC	3	4	2.07		28/4/1994	1/6/1995	Dead
36	S37-2313	82	IDC	3	4	2	1	29/4/1994	1/6/1995	Loss
37	S37-2333	59	IDC		4					
38	S37-2492	57	IDC		4					
39	S37-2605	57	IDC	2	2	0.08	1.08	13/5/1994	7/2/2002	ALive
40	S37-2689	68	IDC	1	1	1.35	0	18/5/1994	18/12/2001	ALive
41	S37-2853	55	IDC	2	2	2.02	1	26/5/1994	1/8/1998	LossFU
42	S37-2981	50	IDC	3	4	1.1	1	1/6/1994	1/8/1996	Dead
43	S37-3033	56	IDC	3	2	1.46	1.07	2/6/1994	1/8/1943	ALive
44	S37-3264	43	IDC	2	2	1		13/6/1994	22/11/2001	ALive
45	S37-3265	47	IDC	3	3	0.18	1	13/6/1994	28/2/2002	ALive
46	S37-3273	50	IDC/sr		3					
47	S37-3481	39	IDC	2	4	3	1	22/6/1994	1/6/1994	Dead
48	S37-3539	57	IDC	2	2	1.13	1	27/6/1994	21/3/2002	ALive
49	S37-4238	45	IDC	3	2	2.24	1	29/7/1994	1/7/1998	LossFU
50	S37-4271	48	IDC	3	4	1.03	1.13	1/8/1994	1/3/1997	Dead
51	S37-4470	36	IDC	3	4	2.3	1.04	10/8/1994	27/4/2002	Dead
52	S37-4513	66	IDC	3	4	2.11	1	15/8/1994	1/6/1997	ALive
53	S37-4802	42	IDC	3	2	1	1	30/8/1994	8/11/2001	ALive
54	S37-4975	49	IDC	3	4	3	1	6/9/1994	1/1/1995	Dead
55	S37-4990	60	IDC	3	4	2.23	1.05	7/9/1994	1/3/1995	Dead
56	S37-5178	36	IDC	2	2	2.1	1.08	14/9/1994	10/9/2001	ALive

IDC = Invasive Ductal Carcinoma ISC = In Situ Carcinoma MC8 = Mucinous Carcinoma 8

sr = signet ring

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

จากผลที่ได้หลังจากวิเคราะห์พบว่า

1. ไม่พบมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับโปรตีนทั้ง 2 ตัว กับลักษณะทางพยาธิวิทยาของโรคคือ Histologic grade และระยะของโรค (Clinical stage)
2. ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับโปรตีน IGF-1R และ EGFR กับอัตราการอยู่รอดใน 5 ปี อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยดูค่า likelihood ratio test พบว่าการตัดผลของโปรตีน EGFR ออกไปจาก MODEL ดังกล่าวเปลี่ยนแปลงค่า likelihood ratio โดยมีนัยสำคัญทางคลินิก ดังนั้นแสดงว่าระดับโปรตีน EGFR อาจมีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดใน 5 ปี ของผู้ป่วย ซึ่งคาดว่าถ้าใช้จำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น อาจเห็นความสัมพันธ์ดังกล่าวได้

2. ผลการศึกษาระดับโปรตีน EGFR และ IFG-1R ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมโดยวิธี RT-PCR ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งในปี 2544

ข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก

- จำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 34 ราย
- อายุอยู่ระหว่าง 34-70 ปี
- ลักษณะทางพยาธิวิทยา และระยะของโรค ใช้ระบบการแบ่ง grade, stage ตามที่กล่าวไว้ในกลุ่มที่กล่าวมาแล้ว

ผลการศึกษาวัดระดับ mRNA ของยีน IGF-1R และ EGFR โดยวิธี RT-PCR

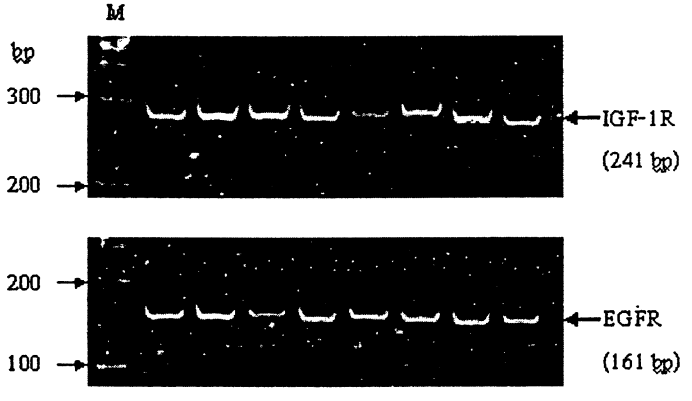
ผลการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีนทั้ง 2 จะแบ่งเป็น 2 ระดับคือ มี mRNA ที่ตรวจวัดได้ และไม่สามารถตรวจวัดได้ โดยพิจารณาจากการสามารถแสดงว่ามี RT-PCR product เกิดขึ้นหรือไม่ ผลการศึกษาเป็นผลจากการตรวจวัดในชิ้นเนื้อมะเร็งทั้งหมด 34 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 34 ราย โดยมีผลการศึกษาในเนื้อเยื่อปกติจำนวน 2 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 2 ราย ผลการทดลองได้สรุปดังตารางที่ 2 และ RT-PCR product ดังภาพที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษาวัดระดับ mRNA ของยีน IGF-1R และ EGFR โดยวิธี RT-PCR

Case No	age	Tumor grade	Patho Grade	Tumor size	nodal status	Stage	EGFR	IGF-1R
1	56	IDC	3	4	19/20	3	+	+
2	45	IDC	3	2	0/14	3	+	+
3	42	IDC	3	2.5	0/13	3	-	-
4	39	IDC	3	2.8			-	+
5	61	ILC		4		4	+	-
6	57	IDC	1	3	4 in 18	3	+	-
7	45	IDC	2	5	0 in 11	3	_	+
8	43	IDC	1	1.5	0in 14	1	+	+
9	45	IDC	2	2	0 in 14	1	-	+
10	52	IDC	1	1	1 in 12	2	+	-
11	70	IDC	1	2.5	1 in 15	3	-	+
12	38	IDC		2	0 in 24	1	-	+
13	41	IDC	2	0.5	0 in 8	1	+	+
14	34	IDC					+	+
15	50	IDC	2	9			+	+
16	56	IDC	2	5	3 in 8	3	+	+
17	46	IDC	3	4	0 in 18	2	+	+
18	49	IDC	3	3	0 in 9	2	+	+
19	45	IDC	2	2	0 in 14	1	+	+
20	46	IDC		1			+	+
21	45	IDC	3	1.5	0 in 12	1	+	+
22	49	IDC			4 in 14		+	+
23	41	IDC				0	+	+
24	50	IDC	2	2	1 in 11	2	+	+
25	42	IDC	3	2.5	1 in 13	3	-	-
26	56	IDC	3	4	0 in 15	2	+	+

Case No	age	Tumor grade	Patho Grade	Tumor size	nodal status	Stage	EGFR	IGF-1R
27	62	IDC	3	1	0 in 5	1	+	+
28	45	IDC	1	2	8 in 13	2	+	-
29	44	IDC	2	1.8			-	-
30	48	IDC	1	6	5 in 12	3	-	-
31	37	IDC	3	4.5	8 in 8	3	+	-
32	47	IDC	2	9		3	+	-
33	50	IDC	3	10		3	+	-
34	49	IDC			1 in 10		-	-
35	53	IDC	2	3	0 in 12	2	-	-

IDC = invasive ductal carcinoma ILC= invasive lobular carcinoma



ภาพที่ 1 แสดงผลิตผลของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี RT-PCR ของยีน Epidermal growth factor (EGFR, ความยาว161 bp) และ Insulin-liked growth factor receptor (IGFR, ความยาว 241 bp) จากชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ระดับของ mRNA ที่วัดได้ จะถูกนำไปวิเคราะห์ดูความสัมพันธ์กับ grading และ staging ของมะเร็งเต้านมโดยมีผลการวิเคราะห์ดังนี้

- พบว่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับ mRNA ของยีนส์ IGF-1R กับภาวะการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองโดย $p = 0.015$
- ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IGF-1R mRNA กับ grading, ขนาดของก้อนมะเร็ง และการมี distant metastasis (การแพร่กระจายไปยังอวัยวะที่อยู่ไกลออกไป)
- ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ EGFR mRNA กับ grading และ staging ของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4
วิจารณ์และสรุป

ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตมากจนผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมได้นั้น มีหลายอย่าง การเปลี่ยนแปลงในการทำงานของยีนที่ควบคุมการแบ่งตัว และการตายของเซลล์ (Apoptosis) เชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็ง ยีนในกลุ่มนี้ที่สำคัญได้แก่ กลุ่ม growth factor และ growth factor receptor เช่น Receptor tyrosine kinase คือ Epidermal growth factor Receptor และ ligands คือ Epidermal growth factor 2 อีกกลุ่มที่มีความสำคัญได้ คือ กลุ่ม Insulin-liked growth factor receptor (IGFR) และ ligand ได้แก่ IGFR1 and IGFR2 การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของยีน และการทำงานของยีนในกลุ่มนี้ในเซลล์มะเร็งของมนุษย์หลายชนิด อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ความรู้ดังกล่าวมาใช้ในทางคลินิก โดยเฉพาะความพยายามที่จะนำรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของยีนดังกล่าวมาใช้เป็นตัวแปรในการพยากรณ์การดำเนินของโรค และเป็นเป้าหมายในการรักษายังมีข้อจำกัด เนื่องจากผลงานวิจัยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของยีนดังกล่าว กับลักษณะทางคลินิก และการพยากรณ์โรคยังได้ผลไม่ตรงกัน สาเหตุที่อาจทำให้เกิดความแตกต่างกันในระหว่างผลงานวิจัยในแต่ละกลุ่ม ได้แก่ จำนวนตัวอย่าง ลักษณะทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรค วิธีการรักษาที่ต่างกันในแต่ละแห่ง วิธีการตรวจวัดการทำงานของยีน ซึ่งมีความหลากหลาย ระบบการติดตามการดำเนินโรคของผู้ป่วย เป็นต้น

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน EGFR ในมะเร็งเต้านมที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วย 6 ใน 11ราย มีการแสดงออกของยีนนี้มากขึ้นควบคู่กับการมีอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยที่ลดลง (reduced patient survival) และเท่าที่ผ่านมาการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน IGF-1R ในมะเร็งเต้านมยังมีไม่มากนัก นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของยีน IGF-1R และ EGFR กับความรุนแรงของโรคในทางคลินิกควบคู่กันไปยังไม่มีผู้ใดศึกษา ดังนั้น โครงการนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งสองพร้อมกันร่วมกับข้อมูลทางคลินิกต่างๆในผู้ป่วยรายเดียวกัน เพื่อดูความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งสองในการบอกการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้

การศึกษานี้ได้ศึกษาในคนไข้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านมในปี 2537 ทั้งนี้เพื่อสามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของยีนดังกล่าวกับการพยากรณ์โรค ขณะเดียวกันสามารถดูความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยได้ด้วย กลุ่มที่สอง คือคนไข้ใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านมในปี 2544 ซึ่งในกลุ่มจะได้ใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจ

วัดระดับ mRNA ของยีนทั้งสอง และนำไปวิเคราะห์ดูว่ามีความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิกอื่นๆ หรือไม่

จากผลการทดลองจะเห็นว่า ในกลุ่มผู้ป่วยเก่าซึ่งใช้วิธีการตรวจวัดการทำงานของยีนโดยใช้วิธี Immunohistochemistry ซึ่งเป็นการตรวจหาโปรตีนทั้ง 2 ชนิด นั้น ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับโปรตีน กับลักษณะทางพยาธิวิทยา และลักษณะทางคลินิกของโรค (tumor grade และ clinical stage) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยหาค่า likelihood ratio พบว่าระดับโปรตีน EGFR อาจมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค (อัตราการอยู่รอดใน 5 ปีของผู้ป่วย) ซึ่งเชื่อว่าถ้าเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นแล้ว อาจจะเห็นความสัมพันธ์ที่ชัดเจนขึ้น ประเด็นที่น่าพิจารณาในการศึกษาคือ ในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มนี้ เป็นผู้ป่วยเก่าในปี 2537 ทำให้ข้อมูลทางคลินิกอาจมีไม่ครบถ้วน เช่น ขนาดของก้อนมะเร็ง ข้อมูลของการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ดูความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลดังกล่าวนี้ กับระดับการทำงานของยีนทั้ง 2 ชนิดได้อย่างชัดเจน การดูความสัมพันธ์กับ staging อย่างเดียวอาจไม่บอกว่าความสัมพันธ์กับตัวแปรย่อยๆ ที่ประกอบในการแบ่ง stage ของผู้ป่วย ดังนั้นข้อด้อยในการศึกษาในกลุ่มนี้จะทดแทนโดยการศึกษาในคนไข้ใหม่ที่จะได้กล่าวต่อไป

การศึกษากลุ่มคนไข้ใหม่ ได้ใช้วิธีตรวจวัดระดับการทำงานของยีนทั้ง 2 ชนิด ในระดับ RNA โดยใช้วิธี Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งสามารถทำได้เนื่องจากมีการเก็บชิ้นเนื้อในรูปแบบแช่แข็งโดยใช้ความเย็น (frozen tissue) ซึ่งสามารถรักษาสภาพ RNA ไว้ได้อย่างดี ข้อดีของการใช้วิธีตรวจวัด RNA คือ มีความจำเพาะสูง และสามารถวัดระดับได้ง่ายกว่า และเที่ยงตรง โดยดูจากปริมาณ RT-PCR ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาในคนไข้ใหม่ ทำให้มีข้อมูลทางพยาธิวิทยา และทางคลินิกที่ครบถ้วน เช่น ขนาดของก้อนมะเร็ง จำนวนต่อมน้ำเหลือง ที่พบมีการแพร่กระจายของโรค รวมถึง Hormone Receptor Status ดังนั้นจึงสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของยีนกับตัวแปรในทางพยาธิวิทยา และทางคลินิกได้ครบถ้วนมากขึ้น

ผลการทดลองในกลุ่มนี้พบสิ่งที่น่าสนใจคือ เมื่อนำข้อมูลทางคลินิกมาวิเคราะห์ เพื่อดูความสัมพันธ์กับการทำงานของยีน IGF-1R พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.015$ โดย Chi-squre Test) โดยแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีการทำงานที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธี RT-PCR มีโอกาสที่จะพบว่ามีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองได้น้อยกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจพบ IGF-1R mRNA ผลการศึกษานี้ต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IGF-1R (Papa V et al, 1993 and Railo MJ, 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษาโดย Papa V et al พบว่าถึงแม้ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IGF-1R และการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง แต่พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีตัวแปรทางพยาธิที่ดีคือในกลุ่มที่มี Estrogen receptor +, diploid DNA และ low S-phase fraction จะพบมีปริมาณ IGF-1R mRNA ที่สูงกว่าในกลุ่มที่มี Estrogen receptor - , aneuploid

และ high S-phase fraction ดังนั้นผลการศึกษามีความสอดคล้องกับผลการศึกษาดังกล่าวในแง่ที่ว่า การมีระดับ IGF-1R ที่สูงขึ้น เป็นตัวบ่งว่ามีความรุนแรงของโรคที่น้อยกว่าในกลุ่มที่ไม่สามารถตรวจพบการทำงานของยีนส์ IGF-1R ลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ในประเด็นที่ว่า เหตุใดมะเร็งที่มีการทำงานของ IGF-1R ยีนสูงขึ้น จึงมีลักษณะทางพยาธิวิทยา และทางคลินิกดีกว่าในกลุ่มที่ไม่พบมีการทำงานของยีนชนิดนี้

มีหลักฐานบางอย่างที่อาจอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าว ได้แก่ผลการศึกษาระดับ IGF-1R ในมะเร็งต่อมลูกหมากโดย Plymate et al โดยพบว่าใน prostate cancer cell lines ที่มีความรุนแรงของโรคต่างๆ กัน จากน้อยถึงมากนั้น พบว่าเซลล์มะเร็งที่มีความรุนแรงมากกว่า จะมีระดับการทำงานของยีน IGF-1R น้อยกว่าใน cell line ที่มีความรุนแรงน้อยกว่า ยิ่งไปกว่านั้นการเพิ่มระดับการทำงานของยีน IGF-1R ใน cell line ที่มีความรุนแรงโดยวิธี transfection เป็นผลทำให้เซลล์ดังกล่าวมีแนวโน้มของความรุนแรงน้อยลง โดยเฉพาะมีการเกิด Apoptosis ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากมะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งเต้านมมีความคล้ายกันในแง่ของการเป็นมะเร็งที่พึ่งพาฮอร์โมนในการเจริญเติบโต (hormone dependent cancer) ดังนั้นจึงอาจคล้ายกันในลักษณะการทำงานของยีน IGF-1R ดังกล่าวด้วย นั่นคือภาวะการทำงานที่น้อยลงของยีน IGF-1R อาจส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งมีความรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis

จากผลการศึกษาระดับโปรตีน EGFR พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของยีนดังกล่าวกับลักษณะของโรคทางพยาธิวิทยาและระยะของโรคมะเร็ง มีข้อมูลในงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีผลการศึกษาที่ต่างกันในประเด็นดังกล่าว โดยเมื่อพิจารณาโดยภาพรวมพบว่า มีงานวิจัยประมาณ 6 ใน 11 งานวิจัย ที่บ่งชี้ว่า การมีระดับการทำงานของยีน EGFR ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ในขณะที่ 5 ใน 11 ผลงาน ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว (Nicholson RI GEE JMW, Harper ME, Review, 2001) ความแตกต่างของผลงานวิจัย อาจมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยเฉพาะลักษณะของผู้ป่วยที่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มวิจัย และวิธีการตรวจวัดระดับการทำงานของยีนที่ต่างกัน ระบบการแบ่งระดับการติดสีของการย้อม Immunochemistry รวมถึงมาตราฐานการวัดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามโดยภาพรวมแล้ว ระดับการทำงานของยีน EGFR ที่สูงขึ้นมีแน้วโน้มที่บ่งว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะของโรคที่รุนแรงกว่ากลุ่มที่พบการทำงานของยีน EGFR น้อยกว่า ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวได้ปรากฏให้เห็นในงานวิจัยนี้เช่นกันถึงแม้ว่าจะไม่ชัดเจนมากนัก แต่หากเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นอาจเห็นความสัมพันธ์ดังกล่าวชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามความรู้ด้านอณูวิทยาของยีน EGER อาจนำมาช่วยอธิบายผลดังกล่าวได้เช่นกัน โดยที่ EGFR เป็นโปรตีนหนึ่งในกลุ่ม EGFR family ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 4 ชนิด คือ HER1, HER2, HER3 และ HER4 จากการศึกษาพบว่าการทำงานของโปรตีนแต่ละชนิดในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กันโดยตรง โดยเฉพาะ HER2 นั้นพบว่ามีการทำงานที่สูงขึ้นในมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะมะเร็งเต้านม HER2 สามารถรวมตัวกับ EGFR เกิดเป็น heterodimer ซึ่งมีการทำงานที่ต่างจาก EGFR homodimur

ดังนั้นเชื่อว่าการวัดระดับ EGFR เพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอที่จะบอกความรุนแรงของโรค ประเด็นอื่น ๆ ที่มีความสำคัญได้แก่ การที่ EGFR สามารถเกิด phosphorylation ได้ ซึ่ง phospharylated form ของ EGFR เป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้น จึงเชื่อว่าการตรวจวัด EGFR โดยรวมอาจไม่ดีเท่ากับการวัดเฉพาะ phospharylated form ของ EGFR ในแง่ที่จะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค

โดยสรุปผลการศึกษาในโครงการนี้ แสดงให้เห็นว่าระดับการทำงานของ IGF-IR ในระดับ mRNA มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งเต้มนม นอกจากนี้ระดับโปรตีน EGFR มีแนวโน้มว่าเป็นตัวแปรในการบอกการพยากรณ์ของโรคได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นจะช่วยให้เห็นได้ชัดเจนขึ้น ดังนั้นการวิจัยในอนาคตจะมีการเพิ่มจำนวนผู้ป่วยในการศึกษามากขึ้นร่วมกับการศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

บรรณานุกรม

1. Beckmann MW, Schnurch HG, Bodden-Heidrich R, Mosny DS, Crombach G, Nitz U, Achnoula M, Bender HG. Early cancer detection programmes for women at high risk for breast and ovarian cancer: a proposal of practical guidelines. Eur J Cancer Prev 1996 Dec;5(6):468-75.
2. Berns EM, Klijn JG, Henzen-Logmans SC, Rodenburg CJ, van der Burg ME, Foekens JA. Receptors for hormones and growth factors and (onco)-gene amplification in human ovarian cancer. Int J Cancer 1992 Sep 9;52(2):218-24.
3. Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translation initiation events generates novel WT1 isoforms. J Biol Chem 1996;271:8646-54.
4. Burfeind P, Chernicky CL, Rininsland F, Ilan J, Ilan J. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1996 Jul9;93(14):7263-8.
5. Chrysogelos SA, Yarden RI, Lauber AH, Murphy JM. Mechanisms of EGF receptor regulation in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 1994;31(2-3):227-36.
6. Cullen KJ, Yee D, Sly WS, Perdue J, Hampton B, Lippman ME, Rosen N. Insulin-like growth factor receptor expression and function in human breast cancer. Cancer Res 1990 Jan 1;50(1):48-53.
7. Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS and Garrett CT. Detection of novel truncated WT1 transcription in human neoplasia. Molec Diagnos 2000;5:1-12.
8. Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Haber DA. Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. Cancer Res 1997;57:1429-34.
9. Fabre A, MacCann AH, Shea DO, Broderick D, Keating G , Tobin B, Gorey T, Dervan PA. Loss of heterozygosity of the Wilms' tumor supressor gene (WT) in in situ and invasive breast carcinoma. Human Pathol1999;30:661-5.
10. FOX SB, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Hastrich D, Harris AL. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients: Breast Cancer Res Treat 1994 Jan;29(1):41-9.
11. Glick RP, Gettleman R, Patel K, Lakshman R, Tsibris JC. Insulin and insulin-like growth factor I in brain tumors: binding and in vitro effects. Neurosurgery 1989 Jun;24(6):791-7.

12. Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD. Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. Mol Cell Biol 1990 Feb;10 (2):464-73.

13. Klijn JG, Berns EM, Foekens JA. Prognostic factors and response to therapy in breast cancer. Cancer Surv; 1993. 18:165-98.

14. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, Hill DF, Haber DA . Physical and functional interation between WT1 and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5100-4.

15. Mansour OA, Zekri AR, Harvey J, el-Ahmady O. Epidermal growth factor receptors: status and effect on breast cancer patients. : Anticancer Res 1997 Jul-Aug;17(4B):3107-10.

16. Nicholson S, Wright C, Sainsbury JR, Halcrow P, Kelly P, Angus B, Farndon JR, Harris AL. Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. J Steroid Biochem Mol Biol 1990 Dec 20;37(6):811-4.

17. Nicholson RI, Gee JMW and Harper ME: EGFR and cancer prognosis. Eup J Cancer, 2001, 37:9-15

18. Peyrat JP, Bonneterre J. Type 1 IGF receptor in human breast diseases. Breast Cancer Res Treat 1992;22(1):59-67.

19. Peyrat JP, Bonneterre J, Laurent JC, Louchez MM, Amrani S, Leroy-Martin B, Vilain MO, Delobelle A, Demaille A. Presence and characterization of insulin-like growth factor 1 receptors in human benign breast disease. Eur J Cancer Clin Oncol 1988 Sep;24(9):1425-31.

20. Pava V; Gliozzo B, Clark GM, McGuire WL, Moore D, Fujita-Yamaguichi Y, Vigneri R, Goldfine ID and Pezzino V: Insulin-liked growth factor receptors overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. Cancer Res 1993, 16:3736-3740

21. Plymate SS, Bae VL, Maddison L, Quinn LS, Ware JL: Type1 insulin-liked growth factor receptor reexpressed in the malignant phenotype of SV40 T –immortalized human prostate epithelial cells enhance apoptosis, Endocrine. 1997, 7:119-124

22. Railo MJ, Smitten KV, Pekonen F. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer patients. Results of a follow-up study on 149 patients. Acta Oncol 1994;33(1):13-7.

23. Railo MJ, von Smitten K, Pekonen F: The prognostic valve of the insulin-liked growth factor receptor-1 in breast cancer patients. Result of the follow-up study on 126 patients. Eur J Cancer. 199430:307-311

24. Schedl A, Hastie N. Multiple roles for the Wilms' tumor supressor gene, WT1 in genitourinary development. Mol Cell Endocrinol 1998;140:65-9.

25. Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1993. Dec 1;90(23):11217-21.

26. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Robert CT Jr, Daniel CW . Altered expression of WT1 Wilms' tumor supressor gene in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:8132-7.

27. Toi M, Tominaga T, Osaki A, Toge T. Role of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer: results of a biochemical study and an immunocytochemical study. Breast Cancer Res Treat 1994 Jan;29(1):51-8.

28. Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 1999 Jan;53(2):167-76.

29. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. J Biol Chem 1993;268:9172-5.

ประวัตินักวิจัย

1. **อ.ดร. วิไลรัตน์ ลี้อนันต์ศักดิ์ศิริ**

ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ประวัติการศึกษา

วทบ. เทคนิคการแพทย์	ปี 2535	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วทม. ชีวเคมีทางการแพทย์	ปี 2538	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Ph.D. Microbioogy and Immunology	ปี 2544	Medical College of Virginia Virginia Commonwealth Univ., USA

2. **ดร.น.พ. ชวบูลย์ เดชสุขุม**

ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิต	ปี 2533	ม. สงขลานครินทร์
วุฒิบัตรฯ พยาธิวิทยากายวิภาค	ปี 2537	แพทยสภา (ศิริราช)
Ph.D. (Pathology)	ปี2543	Medical College of Virginia Virginia Commonwealth Univ., USA
Post-doctoral fellow (Molecular Pathology)	ปี 2543-2544	Medical College of Virginia Virginia Commonwealth Univ., USA

3. พ.ญ. ศรีลา สำเภา

ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำหน่วยศัลยศาสตร์ทั่วไป
ภาควิชาศัลยศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตร์บัณฑิต	ปี 2540	ม.สงขลานครินทร์
วุฒิบัตรฯ ศัลยศาสตร์ทั่วไป	ปี 2544	แพทยสภา (ม.สงขลานครินทร์)