

บทบาทของระดับ Glypican-3 และ Sulfatase-2 ในเลือดในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ  
ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี



นางสาวพิมพ์ทอง ทวีทองคำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

Diagnostic roles of Glypican-3 and Sulfatase-2 levels  
in Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma

Miss Pimthong Thaweethongkam



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

บทบาทของระดับ Glypican-3 และ Sulfatase-2 ใน  
เลือดในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับที่มีสาเหตุมาจากการติด  
เชื้อไวรัสตับอักเสบบี

โดย

นางสาวพิมพ์ทอง ทวีทองคำ

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร)

.....กรรมการ  
(ดร.นพัต จันทรวิสูตร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์กิตติยศ ภู่วรรณ)

พิมพ์ทอง ทวีทองคำ : บทบาทของระดับ Glypican-3 และ Sulfatase-2 ในเลือดในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Diagnostic roles of Glypican-3 and Sulfatase-2 levels in Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.สัญญา พยุงกร, หน้า.

โรคมะเร็งตับ (HCC) เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์สูงเมื่อเทียบกับโรคมะเร็งชนิดอื่น ในประเทศแถบเอเชียมักพบผู้ป่วยโรคมะเร็งตับซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเอนไซม์ Sulfatase-2 (SULF2) มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในบริเวณเนื้อเยื่อมะเร็งตับ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ผ่านกระบวนการ desulfation ภายในโมเลกุล Glypican-3 (GPC3) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บของลิแกนด์ชนิด Wnt และมีการรายงาน ว่า GPC3 มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในบริเวณเนื้อเยื่อมะเร็งตับเช่นเดียวกับ SULF2 การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินบทบาทในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับของ SULF2 และ GPC3 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผลการวิเคราะห์การแสดงออกที่เปลี่ยนไปในระดับ mRNA ของ *SULF2* และ *GPC3* ด้วยเทคนิค Real-time PCR (RT-PCR) พบว่าในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (N=93) มีระดับ mRNA ของทั้งสองยีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (N=98) และกลุ่มผู้มีสุขภาพดี (N=50) (*SULF2*:  $25.26 \pm 38.10$  และ  $8.74 \pm 17.30$  และ  $5.33 \pm 12.78$ ,  $P < 0.001$ ; *GPC3*:  $32.47 \pm 35.38$  และ  $16.27 \pm 28.30$  และ  $3.67 \pm 4.45$ ,  $P < 0.001$ ) ผลการวิเคราะห์ระดับโปรตีนในซีรัมด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบปริมาณ SULF2 สูงสุดในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (N=146) เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (N=119) และกลุ่มผู้มีสุขภาพดี (N = 50) เช่นกัน ( $27.51 \pm 10.17$  และ  $18.56 \pm 5.21$  และ  $15.81 \pm 4.30$  ng/ml,  $P < 0.001$ ) ขณะที่สามารถตรวจพบ GPC3 ได้มากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพพบว่าระดับ SULF2 และ GPC3 ในซีรัมเพียงชนิดเดียวมีประสิทธิภาพต่อยกกว่า AFP แต่เมื่อนำ AFP ร่วมกับ SULF2 มาพิจารณาร่วมด้วยพบว่า AFP ร่วมกับ SULF2 มีประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งตับจากผู้ไม่ได้เป็นมะเร็งตับได้ดีที่สุด นอกจากนี้ระดับของ SULF2 และ GPC3 ภายในซีรัมสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับอีกด้วย ( $P < 0.001$ ). การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า SULF2 และ GPC3 ภายในซีรัมของผู้ป่วยสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและตัวพยากรณ์โรคมะเร็งตับที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5974037730 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: BIOMARKER / HEPATOCELLULAR CARCINOMA / GLYPICAN-3 / SULFATASE-2

PIMTHONG THAWEETHONGKAM: Diagnostic roles of Glypican-3 and Sulfatase-2 levels in Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. ADVISOR: PROF.PISIT TANGKIJVANICH, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., pp.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the highest incidences among the cancers. In Asia, the arise of HCC usually is found in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) (CHB) disease. Recently, the upregulation of extracellular enzyme, Sulfatase-2 (SULF2) has been found in HCC tissue. SULF2 is able to promote tumor growth via desulfation within Glypican-3 (GPC3). GPC3 is a storage site of Wnt ligand and its expression increases in HCC tissue similar to SULF2. The objectives of this study were to determine the diagnostic roles of SULF2 and GPC3 in HBV-related HCC patients. The expression analysis by Real-time PCR (RT-PCR) of *SULF2* and *GPC3* mRNAs in peripheral blood samples showed significantly higher fold change in HCC patients (N=93) compared to CHB patients (N=98) and healthy group (N=50) (*SULF2*:  $25.26 \pm 38.10$  vs  $8.74 \pm 17.30$  vs  $5.33 \pm 12.78$ ,  $P < 0.001$ ; *GPC3*:  $32.47 \pm 35.38$  vs  $16.27 \pm 28.30$  vs  $3.67 \pm 4.45$ ,  $P < 0.001$ ). For protein level, the results of Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed that the serum levels of SULF2 demonstrated the highest level in HCC patients (N=146) compared to CHB patients (N=119) and healthy group (N=50) ( $27.51 \pm 10.17$  vs  $18.56 \pm 5.21$  vs  $15.81 \pm 4.30$  ng/ml,  $P < 0.001$ ) while detectable GPC3 showed the highest proportion in HCC patients. The evaluation of the diagnostic role found that AFP was better diagnostic biomarker than SULF2 and GPC3 serum levels but was not superior to AFP combined with SULF2. Moreover, serum SULF2 and GPC3 levels also significantly correlated to poor overall survival of patients ( $P < 0.001$ ). Taken together, SULF2 and GPC3 could serve as diagnostic and prognostic markers of patients with HBV-related HCC disease.

Department: Biochemistry

Student's Signature .....

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ไม่อาจเสร็จสมบูรณ์ได้หากขาดการสนับสนุนและคำแนะนำที่ดีจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ รวมไปถึงการถ่ายทอดความรู้และหลักการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดอกเตอร์ สัญชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้โอกาสปฏิบัติงานวิจัย ใช้เครื่องมือวิจัย และสารเคมีต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ 724 ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคการทำวิจัยและการคิดวิเคราะห์ตามหลักวิทยาศาสตร์อันเป็นการปลูกฝังพื้นฐานการทำวิจัยที่ดีให้แก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดอกเตอร์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ประธานกรรมการสอบ ดอกเตอร์นพต จันทรวิสูตร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กิตติยศ ภู่วรรณ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบและช่วยแนะนำแก้ไขตั้งแต่โครงร่างวิทยานิพนธ์จนถึงวิทยานิพนธ์ฉบับจริงให้ม้งานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนปลูกฝังจริยธรรมอันดีให้กับผู้วิจัย ซึ่งส่งผลให้ผู้วิจัยมีฐานความรู้ที่ดีและสามารถเรียนรู้ศาสตร์ชีวเคมีในระดับสูงได้อย่างเข้าใจถ่องแท้

ขอขอบคุณสมาชิกศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ และสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย ข้อมูลทางคลินิกของตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัยนี้ รวมไปถึงความช่วยเหลือและการสนับสนุนด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ผู้วิจัยทำการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ที่มอบทุนการศึกษาและค่าครองชีพตลอดระยะเวลาการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา น้องสาว และสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่เข้าใจ และให้กำลังใจตั้งแต่ตัดสินใจเข้าศึกษาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นลง นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณพยาบาลนิภาภรณ์ ศิริผล ที่คอยช่วยเหลือ ดูแล สนับสนุนทั้งทางด้านขวัญกำลังใจ และทัศนคติที่ดีให้ผู้วิจัยข้ามผ่านอุปสรรคจนลุล่วงด้วยดี



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป .....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย .....	2
วัตถุประสงค์ .....	2
สมมติฐาน.....	3
แผนงานวิจัย .....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
คำสำคัญ.....	4
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย .....	4
ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย .....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma: HCC).....	5
2. ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus: HBV).....	6
3. ระยะของโรคมะเร็งตับและแนวทางการรักษา .....	8
4. การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ.....	9

5. Alpha-fetoprotein (AFP).....	10
6. Sulfatase-2 (SULF2) .....	11
7. Glypican-3 (GPC3) .....	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย.....	18
รูปแบบการวิจัย .....	18
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	18
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	18
สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA (Total RNA extraction) จากตัวอย่างเลือด .....	19
สารเคมีที่ใช้สกัด RNA และโปรตีนจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ .....	19
สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค RT-PCR.....	20
สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกของการตรวจวัดระดับ mRNA.....	20
สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค Western blot.....	21
ชุดน้ำยาสำเร็จที่ใช้ในเทคนิค ELISA .....	22
โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิจัย .....	22
วิธีการดำเนินการวิจัย .....	22
1. การศึกษา GPC3 และ SULF2 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งระดับและบริเวณข้างเคียง .....	22
1.1 การเลือกกลุ่มตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	22
1.2 การสกัด RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งระดับและบริเวณข้างเคียง.....	23
1.3 การกำจัด DNA เจือปน (DNase I treatment).....	23
1.4 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยกระบวนการ Reverse transcription .....	24
1.5 การศึกษาระดับ mRNA ของ SULF2 และ GPC3 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งระดับ .....	25
1.6 การสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกด้วยเทคนิคโคลนนิ่ง .....	27
1.7 Colony PCR.....	29

1.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> .....	30
1.9 การสกัดโปรตีนจากชิ้นเนื้อ .....	30
1.10 เทคนิค Western blot.....	31
2. การศึกษา <i>GPC3</i> และ <i>SULF2</i> ในตัวอย่างเลือด.....	34
2.1 การเลือกกลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างเลือด.....	34
2.2 การคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาการแสดงออกของ <i>GPC3</i> และ <i>SULF2</i> ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย .....	35
2.3 การสกัด RNA.....	36
2.4 การศึกษาระดับ mRNA ของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย .....	37
2.5 การตรวจวัดการแสดงออกระดับโปรตีนของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> ภายในซีรัม .....	37
การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	38
ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม.....	39
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	41
1. การสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกของยีน <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> .....	41
1.1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	41
1.2 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีนที่แทรกใน TA vector และเพิ่มจำนวนใน <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค Colony PCR.....	42
2. ผลการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งระดับและบริเวณข้างเคียงที่ไม่ได้เป็น .....	44
2.1 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งระดับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการผ่าตัดและผ่านเกณฑ์คัดเข้าเพื่อใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อ .....	44
2.2 ระดับ mRNA ของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> .....	46
2.3 ระดับโปรตีน <i>SULF2</i> ในชิ้นเนื้อ .....	47
3. ผลการศึกษาตัวอย่างเลือดส่วน buffy coat และซีรัม .....	48

3.1 ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและใช้ตัวอย่างเลือด .....	48
3.2 ระดับ mRNA ของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> .....	51
3.3 ระดับโปรตีนของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> .....	51
3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mRNA และโปรตีนในเลือดของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> .....	53
4. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ <i>SULF2</i> , <i>GPC3</i> และลักษณะทางคลินิกของ ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี .....	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ .....	59
.....	64
รายการอ้างอิง .....	64
ภาคผนวก.....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	75

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1: พื้นที่อุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและโรคมะเร็งตับชนิด HCC ทั่วโลก..... 6

รูปที่ 2: โครงสร้างของดีเอ็นเอสายบวกและลบของ HBV DNA ..... 7

รูปที่ 3: แผนภูมิหลักเกณฑ์การแบ่งระยะของโรคมะเร็งตับ HCC แบบ BCLC รวมถึงแนวทางการรักษา..... 9

รูปที่ 4: โครงสร้างและตัวอย่างกลุ่มของ HSPGAGs..... 12

รูปที่ 5: การเข้าจับของลิแกนด์บน HSGAGs ..... 12

รูปที่ 6: กลไกการทำงานของ SULF2 ที่กระตุ้นวิถี Wnt/beta-catenin pathway ผ่านการทำงานของ GPC3..... 14

รูปที่ 7: โครงสร้างของ GPC3..... 15

รูปที่ 8: กลไกการทำงานของ GPC3 ในการกระตุ้นวิถี Wnt/beta-catenin pathway..... 16

รูปที่ 9: แผนผังกลุ่มตัวอย่างและเกณฑ์การคัดเลือกที่ใช้ในการศึกษาวิจัย..... 35

รูปที่ 10: แผ่นเจล 2% agarose แสดงขนาดของ PCR product ของ *GPC3* (123 คู่เบส)..... 41

รูปที่ 11 : แผ่นเจล 2% agarose แสดงขนาดของ PCR product ของ *SULF2* (225 คู่เบส) ..... 42

รูปที่ 12: PCR product จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Colony PCR และไพรเมอร์ M13..... 43

รูปที่ 13: ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนทั้งสองที่ได้จากการโคลนนิ่งกับลำดับเบสของยีนทั้งสองที่ปรากฏในฐานข้อมูล NCBI ..... 44

รูปที่ 14: ผลปริมาณ mRNA ของ *SULF2* และ *GPC3* ด้วยเทคนิค RT-PCR..... 47

รูปที่ 15: ผลการศึกษาโปรตีน *SULF2* ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียง ..... 48

รูปที่ 16: ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ของทั้งสองยีนที่สนใจจากตัวอย่างเลือด ..... 51

รูปที่ 17: ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน *SULF2* และ *GPC3* ในซีรัมของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด..... 52

รูปที่ 18: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mRNA และโปรตีนในเลือดของ *SULF2* และ *GPC3* ..... 53

รูปที่ 19: ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง *SULF2* และ *GPC3* กับระดับ AFP และขนาดก้อนมะเร็ง..... 54

รูปที่ 20: ROC curve แสดงผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นตัววินิจฉัยโรค .....	55
รูปที่ 22: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ SULF2 และ GPC3 และระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ .....	57



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1: ส่วนประกอบของ reverse transcription mixture .....	24
ตารางที่ 2: ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ <i>GPC3</i> , <i>SULF2</i> และ <i>Beta-globin</i> .....	25
ตารางที่ 3: ตารางแสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในเทคนิค RT-PCR.....	26
ตารางที่ 4: สารเคมีและปริมาณที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR.....	27
ตารางที่ 5: ส่วนประกอบของ ligation reaction .....	28
ตารางที่ 6: ลำดับเบสไพรเมอร์ M13.....	29
ตารางที่ 7: Condition ที่เหมาะสมสำหรับ primary antibody สองชนิด.....	33
ตารางที่ 8: ผลการสกัดแถบ PCR product จาก 2% agarose gel.....	42
ตารางที่ 9: ความเข้มข้นของ Plasmid ที่สกัดได้จากการเลือก colony number 1, 2 และ 5 .....	43
ตารางที่ 10: ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับ การผ่าตัดและผ่านเกณฑ์คัดเข้าเพื่อใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อในการศึกษาระดับ mRNA .....	45
ตารางที่ 11: ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับ การผ่าตัดและผ่านเกณฑ์คัดเข้าเพื่อใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อในการศึกษาระดับโปรตีน.....	46
ตารางที่ 12: ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างสามกลุ่มย่อยที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและใช้ตัวอย่าง เลือดในงานวิจัยระดับ mRNA .....	49
ตารางที่ 13: ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างสามกลุ่มย่อยที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและใช้เป็น ตัวอย่างเลือดในงานวิจัยระดับโปรตีน.....	50
ตารางที่ 14: ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากผู้ไม่ได้เป็นมะเร็ง ตับ.....	56
ตารางที่ 15: ตาราง Univariate และ Multivariate analysis.....	58
ตารางที่ 16: สรุปผลการศึกษาก่อนหน้าของ <i>SULF2</i> และ <i>GPC3</i> ในมะเร็งตับ .....	62

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) เป็นมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับต้นของโรคมะเร็ง และยังเป็นมะเร็งชนิดที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยในสัดส่วนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งชนิดอื่นๆ ปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งตับนั้น เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การบริโภคแอลกอฮอล์ปริมาณมาก การได้รับสารแอฟลาทอกซิน (Aflatoxins) สภาวะไขมันพอกตับทั้งชนิด Non-alcoholic liver disease (NAFLD) และ Non-alcoholic steatosis (NASH) ความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมรวมถึงเชื้อชาติ จากการรายงานของ American society of cancer พบว่า สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งตับในทวีปเอเชียจะแตกต่างจากทวีปยุโรป โดยในทวีปเอเชีย จะมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากไวรัสตับอักเสบบีและซี แต่ในทวีปยุโรปจะเกิดมากจากโรคอ้วน และสภาวะไขมันพอกตับ

เนื่องจากโรคมะเร็งตับเป็นโรคที่มีความรุนแรง การรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับระยะสุดท้ายมักจะเป็นการรักษาแบบประคับประคองอาการ และมีโอกาสหายจากโรคน้อยกว่าการเริ่มรักษาตั้งแต่ระยะแรกเริ่ม ดังนั้นการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับอย่างแม่นยำ และตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะแรกของโรค จึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการเพิ่มโอกาสให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาเร็วขึ้น ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งตับประกอบไปด้วย การตรวจด้วยเทคนิคจำลองภาพต่างๆ เช่น computerized tomography (CT) หรือ magnetic resonance imaging (MRI) ร่วมกับการตรวจวัดระดับ alpha-fetoprotein (AFP) ในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ของโรคมะเร็งตับที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในคลินิก

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าโรคมะเร็งตับจะเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายและมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคนี้นาน การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีข้างต้นยังไม่สามารถคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งตับจากกลุ่มผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งตับได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อให้สามารถวินิจฉัยโรคมะเร็งตับได้อย่างแม่นยำและจำเพาะมากขึ้น จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องและมีโอกาสหายขาดจากโรคได้ หนึ่งในตัวบ่งชี้ทางชีวภาพตัวใหม่สำหรับโรคมะเร็งตับที่น่าสนใจคือ Sulfatase-2 (SULF2) ซึ่งพบว่ามีหน้าที่ทางชีวภาพในการ



กระตุ้นให้เกิดการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ ร่วมกับการทำงานของ glypican-3 (GPC3) และมีระดับการแสดงออกในเซลล์มะเร็งตับมากกว่าเซลล์ปกติ จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยการใช้ GPC3 เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็งตับนั้นยังมีข้อบกพร่อง คือมีความไวต่อโรค (sensitivity) ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ AFP ดังนั้น การศึกษาระดับการแสดงออกของ SULF2 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับอาจพบตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีความไวและความแม่นยำมากกว่า GPC3 หรือ AFP อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาการแสดงออกของ SULF2 ในเชิงประยุกต์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็งตับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จะศึกษาระดับการแสดงออกของ SULF2 และ GPC3 ในผู้ป่วยกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในประเทศไทย เปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับและประเมินว่า SULF2 และ GPC3 จะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีของโรคมะเร็งตับได้หรือไม่

#### คำถามงานวิจัย

1. SULF2 และ GPC3 จะมีระดับการแสดงออกภายในบริเวณเซลล์มะเร็งตับมากกว่าเซลล์ปกติหรือไม่
2. SULF2 และ GPC3 ในเลือดจะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีของโรคมะเร็งตับได้หรือไม่

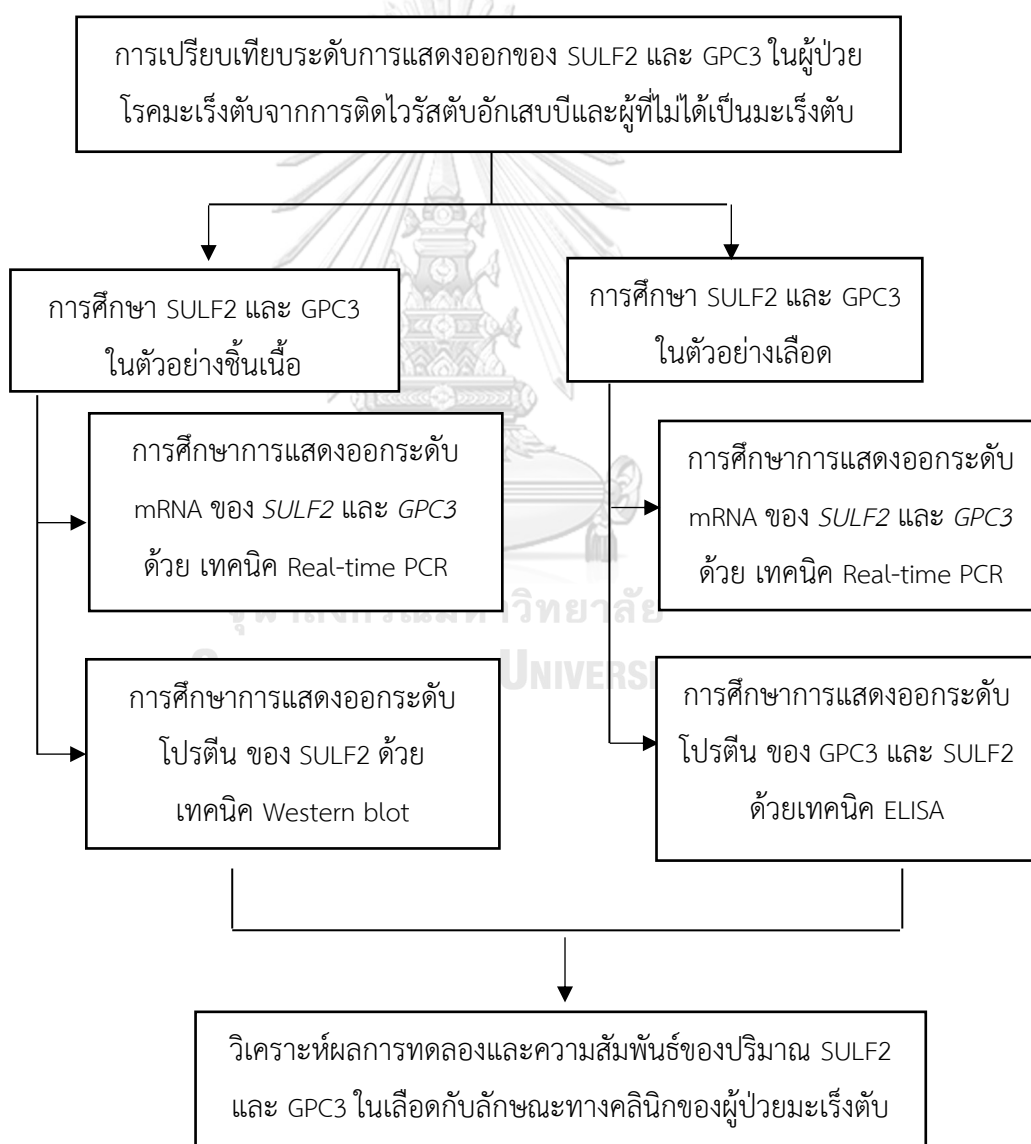
#### วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออก SULF2 และ GPC3 บริเวณชิ้นเนื้อมะเร็งตับเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ SULF2 และ GPC3 ทั้งระดับ mRNA และโปรตีนในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งตับ
3. เพื่อระบุความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ SULF2 และ GPC3 และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

## สมมติฐาน

1. ระดับการแสดงออกของ SULF2 และ GPC3 ภายในชิ้นเนื้อมะเร็งระดับจะสูงกว่าชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง
2. ปริมาณ SULF2 และ GPC3 ในเลือดจะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งระดับที่น่าเชื่อถือได้

## แผนงานวิจัย



## ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

## คำสำคัญ

Hepatocellular carcinoma (HCC)

Sulfatase 2 (SULF2)

Glypican-3 (GPC3)

Biomarker

## การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

Cycle threshold (Ct): จำนวนรอบการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Real-time PCR ที่มีความเข้มแสงจาก sybergreen เท่ากับค่า threshold ที่กำหนดไว้

ตัวอย่างชีวภาพ: สารเคมีหรือสารชีวโมเลกุลบางชนิดที่สามารถตรวจวัดจากของเหลวจากร่างกาย (body fluid) เช่น เลือด ปัสสาวะ และสามารถบ่งบอกถึงสภาวะร่างกาย ณ ช่วงเวลานั้นได้

## ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ SULF2 และ GPC3 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนในผู้ป่วยมะเร็งตับและผู้ที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับได้
2. ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของ SULF2 และ GPC3 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเพื่อตัวอย่างชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

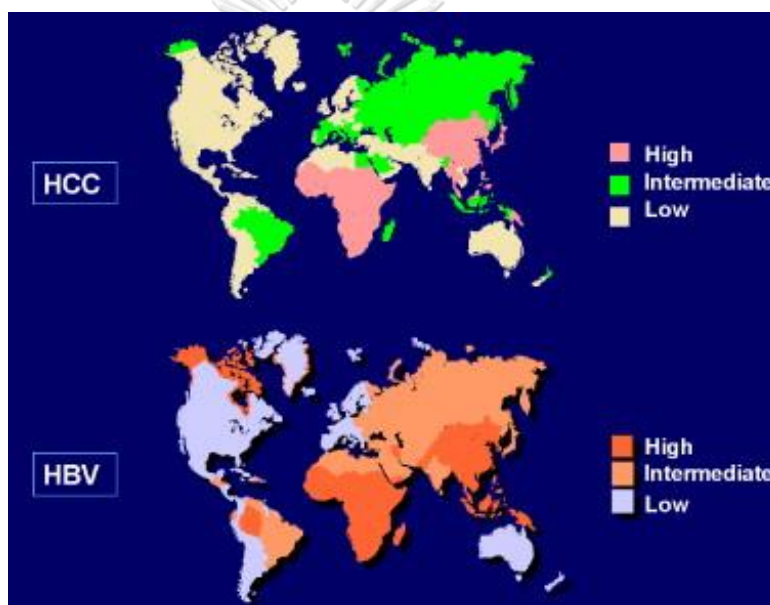
#### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

##### 1. มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma: HCC)

มะเร็งตับชนิด HCC เป็นมะเร็งชนิดปฐมภูมิที่เกิดขึ้นภายในอวัยวะตับตำแหน่งแรก และไม่ได้เกิดขึ้นจากการแพร่กระจายของมะเร็งจากอวัยวะอื่น มีอุบัติการณ์ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับโรคมะเร็งตับชนิดอื่น ซึ่งได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma: ICC), hepatoblastoma และ angiosarcoma (1) โรคมะเร็งตับชนิด HCC นั้น นับเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก และมีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงที่สุดเมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่นๆ ในปี 2017 มีการรายงานอุบัติการณ์โรคมะเร็งตับในประเทศไทยต่อปีเท่ากับ 22 รายต่อประชากร 100,000 ราย และมีอัตราการเสียชีวิตต่อปี 21 รายต่อประชากร 100,000 ราย (2) การเกิดโรคมะเร็งตับชนิดนี้มักจะเป็นอาการต่อเนื่องจากการเกิดความผิดปกติเรื้อรังภายในตับ คือ อาการตับอักเสบ การมีไขมันหรือพังผืดสะสมในตับ และตับแข็ง ซึ่งอาการดังกล่าวข้างต้น มีสาเหตุจากปัจจัยเสี่ยงหลายประการ เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือซี (Hepatitis B virus: HBV หรือ Hepatitis C virus: HCV) การบริโภคแอลกอฮอล์ปริมาณมาก และต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Alcoholic steatohepatitis: ASH) การได้รับเชื้อแอลฟาทอกซิน (Aflatoxin) ภาวะไขมันเกินและคั่งสะสมในตับ (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) หรือ ความผิดปกติทางพันธุกรรมต่างๆ

กลไกการเกิดโรคมะเร็งตับนั้น สืบเนื่องมาจากการทำงานผิดปกติของเซลล์ตับจากการประสบกับปัจจัยเสี่ยงข้างต้น ทำให้เซลล์ตับเหล่านี้เสียหายและเกิดการอักเสบตามมา เมื่อมีความเสียหายเกิดขึ้นที่ตับติดต่อกันเป็นระยะเวลาานมากกว่า 6 เดือน จะทำให้เซลล์ตับไม่สามารถซ่อมแซมตัวเอง (regeneration) ให้กลับเป็นปกติได้ และพัฒนาไปสู่โรคตับอักเสบเรื้อรัง หากยังไม่ได้รับการรักษาหรือหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงต่างๆ จะทำให้ตับไม่สามารถคงรูปร่างเดิมได้ นอกจากนั้นจะมีการสร้างพังผืดขึ้นแทนเนื้อเยื่อ ทำให้เซลล์ตับทำงานได้น้อยลง สูญเสียความยืดหยุ่น เกิดโรคตับแข็ง และพัฒนาเป็นโรคมะเร็งตับในท้ายที่สุด

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้โรคมะเร็งตับมากที่สุดในแถบทวีปเอเชีย รวมถึงประเทศไทย มีการรายงานว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบียังคงเป็นปัญหาและปัจจัยเสี่ยงหลักที่นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งตับมากที่สุด (1, 3) จากการศึกษาของธนกร ประุงวิทยาและคณะ (4) พบว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะเสี่ยงต่อมะเร็งตับมากกว่าผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อ 223 เท่า และยังพบความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่การระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและโรคมะเร็งตับดังแสดงในรูปที่ 1 (5) ดังนั้น การระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจึงสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับอย่างมาก ผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจึงจัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงที่จำเป็นต้องมีการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งตับที่เกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV-related HCC)



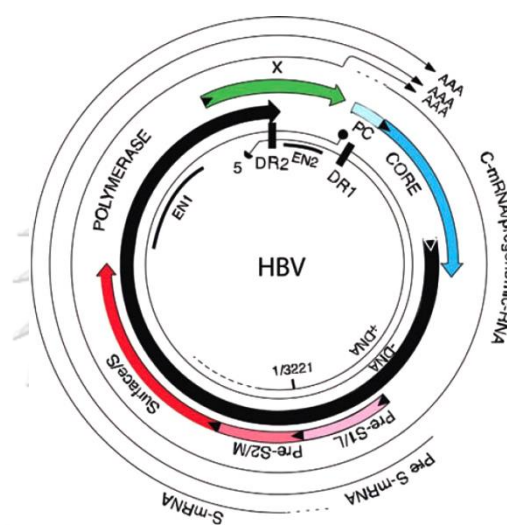
รูปที่ 1: พื้นที่อุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและโรคมะเร็งตับชนิด HCC ทั่วโลก (5)

## 2. ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus: HBV)

ไวรัสตับอักเสบบีจัดอยู่ใน Hepadnaviridae family มีลักษณะเป็น DNA ของไวรัสแบบสายคู่ไม่สมบูรณ์ (partially double-stranded DNA virus) ดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) จึงมีลักษณะเป็นสายลบและสายบวก โดยสายบวกจะมีความยาวไม่แน่นอน ในขณะที่สายลบจะมีขนาด 3,200 นิวคลีโอไทด์และแบ่งออกเป็น 4 open reading frames (ORFs) ดังนี้ (6)

I. S ORF: เป็นส่วนที่เมื่อผ่านกระบวนการแปลรหัส (translation) จะสังเคราะห์โปรตีนบริเวณผิววนอกของไวรัส (hepatitis B surface)

- II. P ORF: ส่วนที่สร้างเอนไซม์ polymerase ซึ่งสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสและเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิด Nucleo(t)side analog
- III. C ORF: ส่วนที่สร้างโปรตีนส่วนแกน (core protein) ของไวรัส
- IV. X ORF: ส่วนที่สร้าง X protein กลไกการทำงานของ X protein ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบว่าโปรตีนชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการพัฒนาไปสู่โรคมะเร็งตับ (7-9)



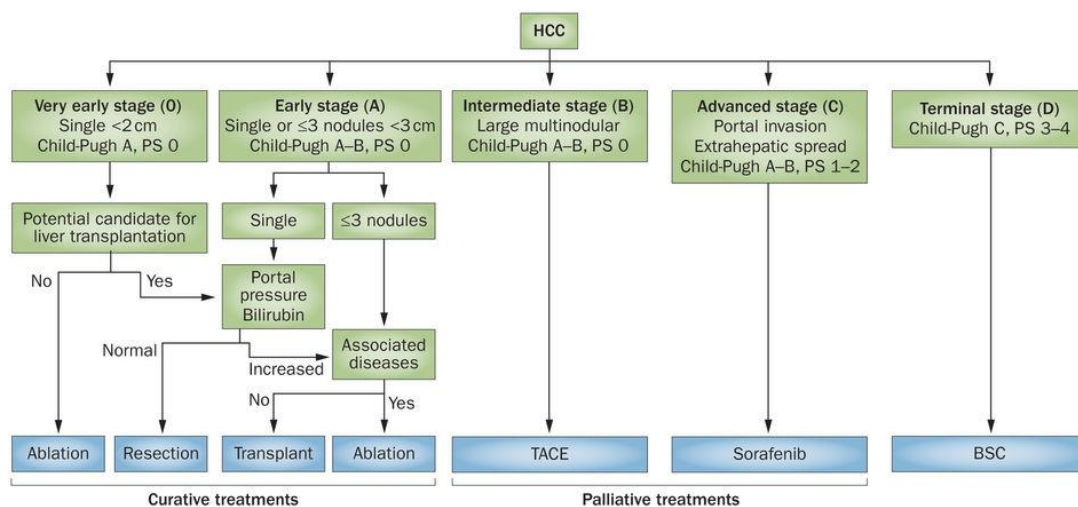
รูปที่ 2: โครงสร้างของดีเอ็นเอสายบวกและลบของ HBV DNA บนสายลบประกอบด้วย S ORF (ชมพู), P ORF (ดำ), C ORF (ฟ้า) และ X ORF (เขียว) (10)

ทั้ง 4 ORFs จะมีลักษณะซ้อนทับกันบางส่วน (overlap) และมีตำแหน่งเชื่อมต่อกับสายบวกบริเวณ direct repeat (DR) นอกจากนี้ HBV DNA โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบียังประกอบด้วยเยื่อหุ้ม nucleocapsid และโปรตีนส่วนแกน ปัจจุบันกลไกและการดำเนินโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่นเดียวกับการพัฒนายารักษาโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี องค์การอนามัยโลก (WHO) จึงตั้งเป้าหมายว่าจะกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีให้หมดไปภายในปี ค.ศ. 2030 (11)

### 3. ระยะของโรคมะเร็งตับและแนวทางการรักษา

โรคมะเร็งตับโดยธรรมชาติจะมีการดำเนินโรคไปสู่ระยะรุนแรงในระยะเวลาสั้นๆ และไม่มีอาการบ่งชี้ชัดเจนในผู้ป่วยระยะเริ่มต้น ส่งผลให้การตรวจพบโรคมะเร็งตับมักจะพบในผู้ป่วยที่มีอาการค่อนข้างรุนแรงและจัดอยู่ในระยะท้ายๆ ของโรค ระยะอาการของผู้ป่วยในช่วงเวลาที่ตรวจพบโรคมะเร็งตับจะสัมพันธ์กับทางเลือกในการรักษา จากหลักเกณฑ์การแบ่งระยะผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและแนวทางการรักษาแบบ Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับและใช้ในการอ้างอิงแนวทางการรักษากันอย่างแพร่หลาย (12, 13) จะแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (14)

- I. กลุ่ม very early stage (0) และ early stage (A) เป็นผู้ป่วยในระยะเริ่มต้น มีก้อนเนื้อไม่เกิน 3 ก้อน ขนาดเล็กกว่า 3 เซนติเมตร อวัยวะตับยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีแนวโน้มจะหายขาดจากโรคได้ด้วยการรักษาแบบการผ่าตัด (surgical resection) การปลูกถ่ายอวัยวะตับ (liver transplantation) หรือการผ่าตัดด้วยคลื่นความถี่วิทยุ (ablation)
- II. กลุ่ม intermediate stage (B) คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีก้อนเนื้อขนาดใหญ่หลายก้อนภายในตับ แต่ยังไม่พบกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) หรือ การแพร่กระจายของก้อนเนื้อไปสู่อวัยวะอื่น (metastasis) ตับยังสามารถทำงานได้อย่างปกติและยังไม่แสดงอาการบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง ผู้ป่วยในระยะนี้จะได้รับการรักษาด้วยวิธี Transarterial chemoembolization (TACE)
- III. กลุ่ม advanced stage (C) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะพบการกระจายของก้อนเนื้อไปยังอวัยวะอื่นๆ พบกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงก้อนเนื้อภายในตับ ผู้ป่วยจะแสดงอาการผิดปกติที่บ่งชี้ถึงโรคมะเร็ง ปัจจุบัน ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักจะรักษาด้วยยา sorafenib ซึ่งเป็นการรักษาที่ช่วยเพิ่มระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยได้เพียงอย่างเดียว
- IV. กลุ่ม terminal stage (D) หรือผู้ป่วยระยะสุดท้าย ในระยะนี้ อวัยวะตับของผู้ป่วยจะไม่สามารถคงสภาพการทำงานแบบปกติได้ มีอาการบ่งชี้ของโรคมะเร็งอย่างชัดเจน แนวทางการรักษาผู้ป่วยในระยะสุดท้ายจะมีน้อยและมีโอกาสหายค่อนข้างต่ำ การรักษาจึงเป็นไปอย่างประคับประคองเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด (19)



รูปที่ 3: แผนภูมิหลักเกณฑ์การแบ่งระยะของโรคมะเร็งตับ HCC แบบ BCLC รวมถึงแนวทางการรักษา (19)

จากข้อมูลดังกล่าวจะพบได้ว่า หากการวินิจฉัยพบโรคมะเร็งตับในระยะท้ายจะส่งผลให้ทางเลือกในการรักษาน้อยและโอกาสหายขาดต่ำ ดังนั้น การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในช่วงระยะแรกเริ่มจึงมีความสำคัญมาก เพื่อเพิ่มทางเลือกในการรักษา รวมถึงเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับชนิด HCC อีกด้วย

#### 4. การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ

การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งตับมักจะทำในกลุ่มผู้มีความเสี่ยง เช่น กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรือกลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของตับเรื้อรัง โดยจะตรวจวินิจฉัยด้วยการประเมินการทำงานของตับและปริมาณ AFP ร่วมกับเทคนิคการสร้างภาพอวัยวะ (imaging test) เช่น การใช้คลื่นแม่เหล็ก การตรวจด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ และสามารถยืนยันการวินิจฉัยได้ด้วยการตรวจทางรังสีวิทยา (15) แต่เทคนิคเหล่านี้อาจเกิดข้อผิดพลาดได้ในกรณีที่ก้อนมีขนาดเล็กมากหรือสภาพร่างกายของผู้ป่วยไม่เอื้อต่อการตรวจ เช่น มีขนาดตับเล็กหรือมีรูปร่างอ้วน (16) อย่างไรก็ตามหากการตรวจด้วยรังสียังไม่สามารถให้ผลได้แน่ชัด การตรวจวินิจฉัยจะทำได้โดยการเจาะชิ้นเนื้อตับไปตรวจสภาพทางพยาธิวิทยาด้วยการตรวจทาง histopathology ซึ่งการเจาะชิ้นเนื้อตับไปตรวจเป็นการตรวจแบบ



รุกรานผู้ป่วย (invasive test) จึงมีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคตรวจวินิจฉัยใหม่เพื่อเพิ่มความแม่นยำ และไม่เป็นการรุกรานผู้ป่วยอีกทางหนึ่ง (non-invasive test)

ปัจจุบันการวินิจฉัยแบบไม่รุกรานผู้ป่วย จะตรวจจากปริมาณสารบ่งชี้ชีวภาพของโรคมะเร็ง (tumor biomarker) จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย ในกรณีโรคมะเร็งตับชนิด HCC นั้น จะใช้ระดับการแสดงออกของ AFP เป็นหลัก แต่การใช้ AFP นั้นก็ยังมีข้อเสียหลายประการ (17) จากการศึกษาพบว่า มี false negative ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยระยะเริ่มต้นมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และในผู้ป่วยระยะรุนแรง 15-30 เปอร์เซ็นต์ (18) นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดอื่น ได้แก่ กรณีที่มีสภาวะตั้งครรภ์หรือผู้ป่วยโรคตับทั่วไป ปริมาณ AFP จะสูงกว่าปกติแม้ว่าจะไม่ได้เป็นโรคมะเร็งตับ HCC เลยก็ตาม (19) ดังนั้น จึงมีงานวิจัยมากมายเพื่อค้นหาและพัฒนาสารบ่งชี้ชีวภาพที่จำเพาะและมีความไวในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยระยะเริ่มต้นเพื่อให้การรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (20-22)

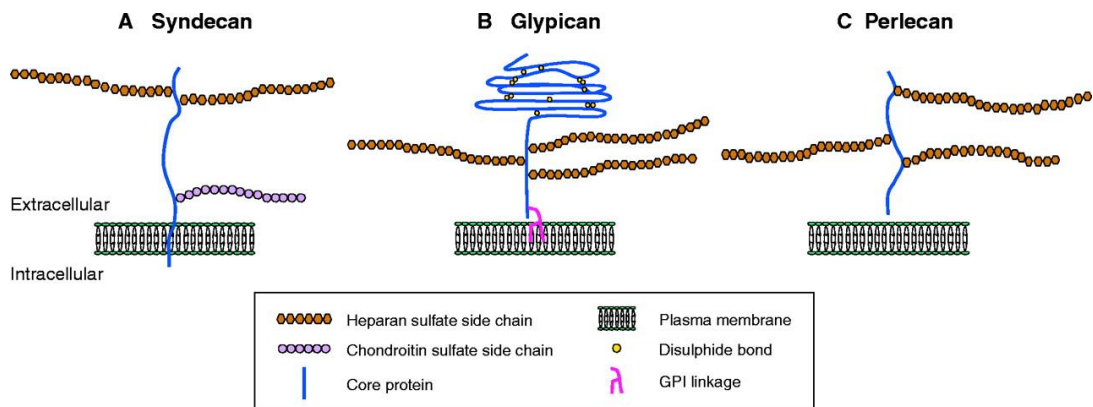
#### 5. Alpha-fetoprotein (AFP)

Alpha-fetoprotein หรือ AFP เป็น glycoprotein ชนิดหนึ่งที่จะมีการแสดงออกภายในเซลล์ตับและเซลล์ชั้น endoderm ของ yolk sac ในช่วงระยะการพัฒนาของตัวอ่อนภายในครรภ์ และจะลดการแสดงออกลงภายหลังการคลอด ในสภาวะร่างกายปกติ ปริมาณของโปรตีนชนิดนี้ภายในเลือดจะเท่ากับ 20 ng/ml แต่ในสภาวะที่เกิดความผิดปกติของตับ ปริมาณ AFP จะสูงขึ้น เช่น การเกิดตับแข็งหรือตับอักเสบ ในกรณีที่มีอาการของโรคมะเร็งตับ HCC ระดับโปรตีน AFP จะเพิ่มขึ้นมาที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาการผิดปกติดังกล่าวข้างต้น ซึ่งจะมีปริมาณมากกว่า 400 ng/ml (16) ซึ่งปริมาณ AFP จะแปรผันตรงกับขนาดของก้อนเนื้อ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ AFP ได้ปริมาณมากในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ หรือการเกิด yolk sac tumor (23) และจากข้อมูลดังกล่าว จึงทำให้ AFP มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ต่อโรคมะเร็งตับไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรค HCC ที่มีก้อนเนื้อขนาดเล็ก ดังนั้น จึงมีการศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยมากขึ้น เช่น การศึกษาอนุพันธ์ของ AFP ชนิด *Lens culinaris*-agglutinin-reactive fraction หรือ AFP-L3 พบว่ามีความจำเพาะต่อโรค HCC และมีความไวสูงแม้ในสภาวะที่มีปริมาณ AFP น้อยกว่า 10 ng/ml (24) insulin-like growth factor,

vascular endothelial growth factor, des- gamma- carboxy prothrombin ( DCP) และ glypican-3 เป็นต้น (25)

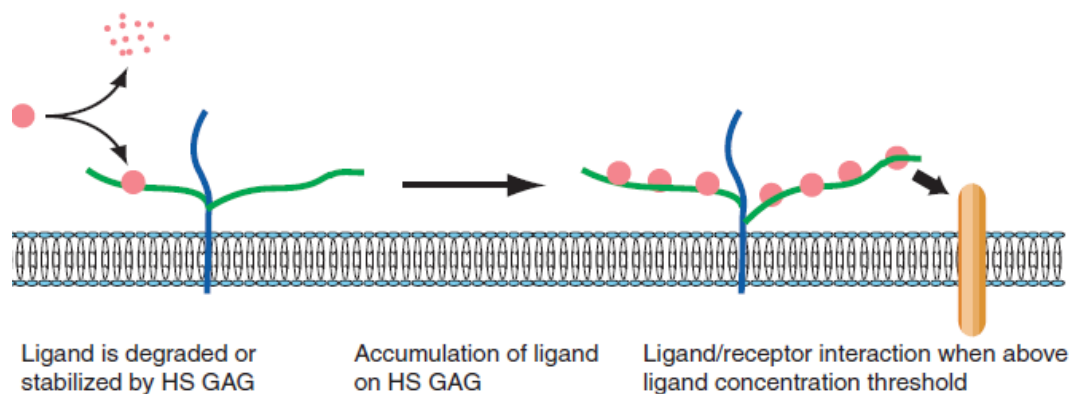
#### 6. Sulfatase-2 (SULF2)

SULF2 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Sulfatase ซึ่งประกอบด้วย Sulfatase-1 (SULF1) และ SULF2 ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีบทบาทในการควบคุมสถานะการตัดหมู่ซัลเฟต (desulfation) จากสับสเตรท (substrate) ที่จำเพาะ ส่งผลให้สับสเตรทนั้น มีรูปแบบการเติมหมู่ซัลเฟต (sulfation state) เปลี่ยนแปลงไป โมเลกุลที่ SULFs นี้สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ ได้แก่ 1) โมเลกุลในกลุ่ม cytosolic steroids เช่น ฮอริโมน 2) complex cell-surface carbohydrates จำพวก glucosaminoglycan (GAGs) หรือ heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (26) รูปแบบการเติมหมู่ซัลเฟตบนโมเลกุลเหล่านี้จะสำคัญต่อการเข้าจับกับโมเลกุลอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุล HSPGs กับ โมเลกุลลิแกนด์ของวิถีส่งสัญญาณ (signaling pathway) ต่าง ๆ เนื่องจากสภาพขั้วเปลี่ยนไปจากการขาดหายของประจุลบจากหมู่ซัลเฟต โมเลกุล Heparan sulfate glycosaminoglycans (HSPGAGs) คือ cell-surface and extracellular matrix (ECM) macromolecules ประกอบด้วย โปรตีนแกนกลาง (core protein) ซึ่งเกาะติดกับสาย HSPGAGs สามารถจำแนกได้หลายชนิดตามโครงสร้างของโปรตีนแกนกลาง เช่น Glypicans, Syndecans และ Perlecanans ชนิดของ HSPGAGs ที่พบได้มากที่สุดบนผิวเซลล์ คือ Glypicans (27) จากการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่า โมเลกุล HSPGAGs สำคัญกับการกระตุ้นวิถีเหล่านี้ โดยสามารถจับกับลิแกนด์บางชนิดที่บริเวณ heparin sulfate (HS) chain ได้ เรียกว่า HSPG-bound proteins ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF), Wnt และ fibroblast growth factor (FGF) ทำให้ลิแกนด์เหล่านี้ไม่ถูกย่อยสลายและเพิ่มปริมาณลิแกนด์ ณ บริเวณใกล้เคียงกับตัวรับจำเพาะ (Receptor) ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นวิถีส่งสัญญาณได้ดีขึ้น หมู่ซัลเฟตที่สำคัญต่อการทำงานของ HSPGAGs ได้แก่ตำแหน่ง N-, 3-O, 6-O ของหมู่ glucosamine และ 2-O ของ iduronic acid เอนไซม์ SULF1 และ SULF2 จะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะบริเวณ 6-O บนอนุพันธ์น้ำตาล glucosamine ผลจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนและตำแหน่งหมู่ซัลเฟตบนโมเลกุลเหล่านี้ ทำให้ความสามารถในการจับกันระหว่าง HSPGAGs และลิแกนด์ควบคุมวิธีการส่งสัญญาณต่างๆ ลดลง การส่งสัญญาณในวิถีจึงเปลี่ยนไปด้วย (28)



รูปที่ 4: โครงสร้างและตัวอย่างกลุ่มของ HSPGAGs โดย Glypican และ Syndecan จะเป็นชนิดที่

พบมากที่สุด (27)



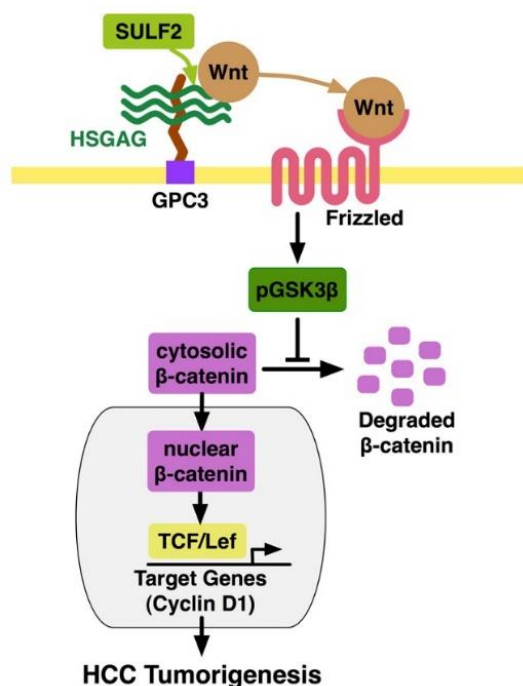
รูปที่ 5: การเข้าจับของลิแกนด์บน HSPGAGs ทำให้มีปริมาณลิแกนด์มากพอในการกระตุ้นวิถีสัญญาณ

ผ่านตัวรับจำเพาะ (27)

แม้ว่า SULF1 และ SULF2 จะมีโครงสร้างและการทำงานที่คล้ายกันในเซลล์ทั่วไป (29, 30) แต่กลับส่งผลต่อเซลล์มะเร็งต่างกัน การศึกษาในเซลล์มะเร็งหลายชนิด พบว่า SULF1 ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (tumor suppressor) ผ่านการยับยั้งการเข้าจับกันระหว่าง HSPG-bound proteins ดังกล่าวกับสาย HSPGAGs ที่ทำหน้าที่เป็นตัวร่วมรับสัญญาณจำเพาะ (coreceptor) (31, 32) แต่การทำงานของ SULF2 จะกระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็ง (oncogenic effect) ผลกระทบจากกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองภายในเซลล์มะเร็งระดับจะสอดคล้องกับผลการศึกษาในมะเร็งอื่น กล่าวคือ SULF1 นั้น จะส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับและลดความรุนแรงของโรคลงได้ และมีระดับการแสดงออกลดลงในเซลล์มะเร็งระดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (33, 34)

สำหรับ SULF2 จากการศึกษาแบบ *in vitro* ในเซลล์ชนิด Hep3B พบว่า SULF2 มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ โดย Hep3B ที่มีการแสดงออกของ SULF2 นั้น มีการเจริญเติบโต, การเพิ่มจำนวน และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งมากกว่า Hep3B ที่ไม่มีการแสดงออกของ SULF2 เนื่องจาก SULF2 สามารถกระตุ้นวิถีส่งสัญญาณ FGF ผ่านการเพิ่มระดับการแสดงออกของ GPC3 นอกจากนี้ ในบริเวณชิ้นเนื้อมะเร็งตับมีการแสดงออกของ *SULF2* ในระดับ mRNA มากกว่าชิ้นเนื้อตับปกติ 57 เปอร์เซ็นต์ (35) การศึกษาในปี 2010 พบความสัมพันธ์ระหว่าง SULF2 และโรคมะเร็งตับชนิด HCC เพิ่มเติม โดยพบว่า SULF2 จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้มากขึ้นผ่านการเพิ่มจำนวนลิแกนด์ Wnt และกระตุ้นการส่งสัญญาณของวิถี Wnt/beta-catenin pathway โดยอาศัยโปรตีน GPC3 ช่วยในการรับสัญญาณ (28) ซึ่งเอนไซม์ SULF2 จะปรับเปลี่ยนรูปแบบการเติมหมู่ซัลเฟตบนสาย HS ของ GPC3 ทำให้ความสามารถในการกักเก็บลิแกนด์ (ligand storage site) ลดลง ดังนั้นจึงเพิ่มประสิทธิภาพการจับของลิแกนด์กับตัวรับสัญญาณที่อยู่ใกล้เคียงให้ดีขึ้นได้ จากการศึกษาข้างต้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่า การแสดงออกของ SULF2 จะสัมพันธ์กับการแสดงออกของ GPC3 ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับชนิด HCC หรือไม่ และหากสัมพันธ์กัน การแสดงออกของทั้งสองจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกรานได้หรือไม่

ด้วยกลไกการทำงานดังกล่าวของ SULF2 จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของ SULF2 และโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ พบว่า SULF2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเต้านม (36) มะเร็งกล่องเสียง (37) มะเร็งตับอ่อน (38) ซึ่ง SULF2 จะมีการแสดงออกมากขึ้นในบริเวณตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งดังกล่าวข้างต้นเปรียบเทียบกับบริเวณเนื้อเยื่อปกติ เช่นเดียวกับการศึกษาในโรคมะเร็งปอดที่นอกจากจะพบการแสดงออกในตัวอย่างชิ้นเนื้อแล้ว ยังตรวจพบ SULF2 ในเลือดส่วนพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดสูงกว่าผู้มีสุขภาพดี และเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์โรคมะเร็งปอดที่น่าสนใจอีกด้วย (39)

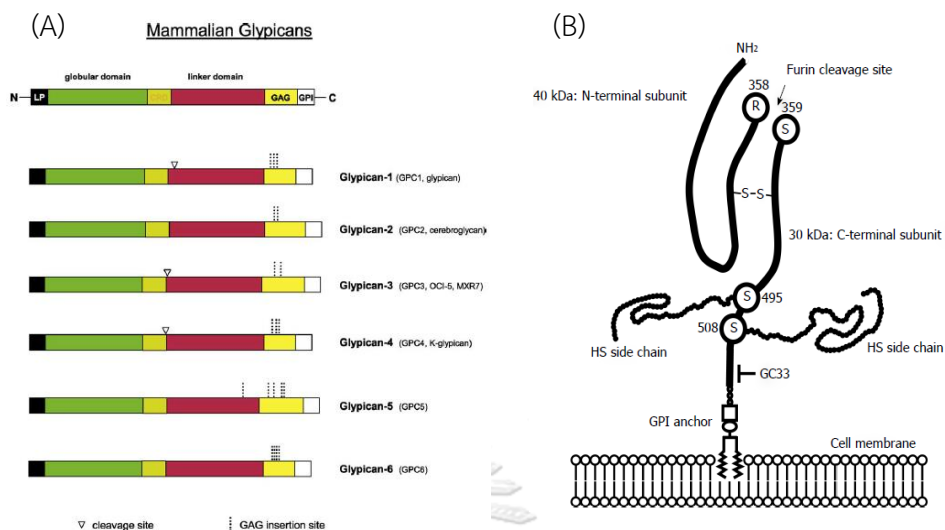


รูปที่ 6: กลไกการทำงานของ SULF2 ที่กระตุ้นวิธี Wnt/beta-catenin pathway ผ่านการทำงานของ GPC3 (28)

## 7. Glypican-3 (GPC3)

Glypican-3 (GPC3) เป็นหนึ่งในสมาชิกของ glypican family ซึ่งมีทั้งหมด 6 ชนิด ประกอบด้วย glypican-1 ถึง glypican-6 มักจะพบอยู่บนผิวของเซลล์ (surface proteins) จัดอยู่ในประเภท HSPGs สามารถยึดเกาะกับผิวเซลล์ได้ด้วย glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) linkage (40) นอกจากนั้นยังมีตำแหน่งอนุรักษ์ในการเติมสาย glycosaminoglycan (GAG) บริเวณใกล้เคียงกับบริเวณยึดเกาะกับผิวเซลล์อีกด้วย (41)

โปรตีน GPC3 มีความยาว 580 กรดอะมิโน มีน้ำหนัก 70 กิโลดาลตัน โปรตีนชนิดนี้จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ชนิด Furin ที่บริเวณ Arg<sup>358</sup> และ Cys<sup>359</sup> เมื่อมีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ โปรตีน GPC3 จะแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ N-terminal subunit และ C-terminal subunit ซึ่งมีน้ำหนัก 40 และ 30 กิโลดาลตันตามลำดับ ทั้งสองส่วนนี้จะยึดกันไว้ด้วยพันธะ disulfide bond ทำให้ GPC3 มีลักษณะเป็น heterodimer และแสดงออกในรูปแบบนี้ที่ผิวเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 4 (41) GPC3 สามารถถูกตัดบริเวณ GPI ที่ใช้ในการยึดเกาะกับเซลล์ และออกสู่ระบบไหลเวียนนอกเซลล์ได้ด้วยกลไกหลายแบบ เช่น การตัดด้วยเอนไซม์ Notum ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ lipase เป็นต้น (41)



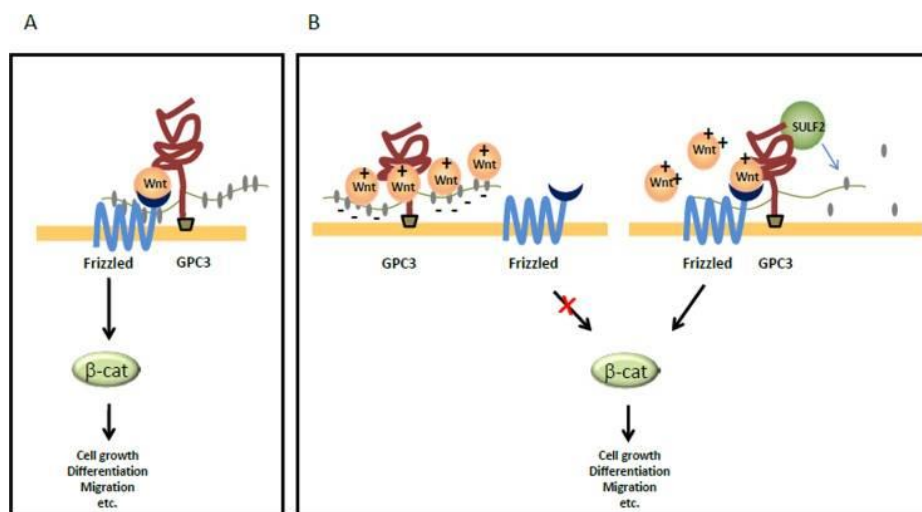
รูปที่ 7: โครงสร้างของ GPC3

A) โครงสร้างของโปรตีน glypican-1 ถึง glypican-6 (41)

B) โครงสร้างจำลองของ glypican-3 บนผิวเซลล์ (42)

GPC3 เป็น oncofetal protein ชนิดหนึ่ง สามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณไปยังวิถีควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) จึงทำให้ GPC3 มีบทบาทสำคัญในช่วงการพัฒนาของตัวอ่อน (development stage) จากการศึกษาของ Bibiana V. I. และคณะในปี 2008 พบว่ามีการแสดงออกของ GPC3 ในหลายอวัยวะของตัวอ่อนมนุษย์ในช่วงการพัฒนารวมถึงอวัยวะตับด้วย (43) อย่างไรก็ตาม จะพบการแสดงของโปรตีนชนิดนี้ในตับของตัวอ่อนเท่านั้น และจะไม่พบเมื่อเจริญเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ที่มีสภาวะร่างกายปกติ

กลไกการกระตุ้นให้เกิดการเจริญของเซลล์จาก GPC3 คือการช่วยจับลิแกนด์หรือสารเคมีส่งสัญญาณ (chemokine) บางชนิดที่สาย HS ให้สารสามารถเข้าจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor) ที่เหมาะสมกับสัญญาณเหล่านั้นได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเกิดการเข้าจับระหว่างตัวรับและตัวสัญญาณแล้ว จะกระตุ้นตัวส่งสัญญาณตัวอื่น ๆ ถัดไปในวิถีการส่งสัญญาณนั้น ให้ทำงานต่อไป วิถีเหล่านั้นได้แก่ Wnt/beta-catenin pathway, fibroblast growth factor (FGF) pathway, hedgehog pathway ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ (44, 45)



รูปที่ 8: กลไกการทำงานของ GPC3 ในการกระตุ้นวิถี Wnt/beta-catenin pathway ด้วยคุณสมบัติในการช่วยดักจับตัวส่งสัญญาณให้สามารถจับกับตัวรับสัญญาณได้ดีขึ้น (A) หรือมีการทำงานร่วมกับ SULF2 เพื่อให้เกิดการรับและส่งสัญญาณในกรณีที่ตัวรับสัญญาณอยู่ห่างออกไป (B) (45)

จากการศึกษาของ Hsu H.C. และคณะในปี 1997 ได้ค้นพบเป็นครั้งแรกว่า มีการแสดงออกของ *GPC3* ในระดับ mRNA ที่บริเวณเซลล์ตับที่เป็นมะเร็งมากถึง 74.8 เปอร์เซ็นต์และพบการแสดงออกภายในเซลล์ตับปกติเพียง 3.2 เปอร์เซ็นต์ (46) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาวิจัยอื่นที่ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่าง *GPC3* และโรคมะเร็งตับในทิศทางเดียวกับการศึกษาข้างต้น (47) ดังนั้น *GPC3* จึงเป็นที่สนใจและมีการศึกษาวิจัยในวงกว้างเพื่อนำมาพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็งตับชนิด HCC และการศึกษาเชิงเปรียบเทียบในเนื้อเยื่อมะเร็งตับและในซีรัม พบว่าระดับโปรตีน *GPC3* เป็นไปในทิศทางเดียวกันโดย Capurro M. และคณะในปี 2003 ได้ศึกษาการแสดงออกของ *GPC3* ในระดับโปรตีนในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับและในซีรัมของผู้ป่วยโรค HCC ด้วยเทคนิค immunohistochemistry (IHC) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า *GPC3* แสดงออกในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ 72 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถตรวจพบ *GPC3* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อตับจากผู้ป่วยโรคตับชนิดอื่น หรือผู้มีสุขภาพดี ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ *GPC3* ในซีรัมที่ตรวจพบได้ 53 เปอร์เซ็นต์ในผู้ป่วยโรค HCC และไม่พบในซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบหรือผู้มีสุขภาพดี (48) เช่นเดียวกับการแสดงออกระดับ mRNA ของ *GPC3* ในเลือด (49) โปรตีนชนิดนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกรานได้ (50-52)

ในการศึกษา GPC3 ในฐานะตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งตับ จะแบ่งออกเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรค (diagnosis biomarker) และ ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์โรค (prognosis biomarker) ซึ่งในการพยากรณ์โรคการศึกษาส่วนมากจะพบว่า GPC3 สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคมะเร็งตับ ระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยลดลง หรือเป็นตัวพยากรณ์ที่ไม่ดี (poor prognosis) (53, 54)

ประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคโดยใช้ GPC3 เป็นตัวบ่งชี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ AFP ซึ่งลักษณะเป็น oncofetal protein เช่นเดียวกัน พบว่ามีจุดด้อย คือ มีเปอร์เซ็นต์ความไวต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตาม จุดเด่นของ GPC3 คือ มีความเฉพาะเจาะจงต่อโรคสูงกว่า และจากการศึกษาในกลุ่มประชากรโรคอื่น ๆ เปรียบเทียบกับโรค HCC พบว่า GPC3 มีความจำเพาะต่อชนิดของโรคมามาก โดยพบการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญในโรคมะเร็งตับเพียงอย่างเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับผู้มีสุขภาพปกติ ผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับเรื้อรัง (chronic hepatitis) โรคตับแข็ง (liver cirrhosis) และโรคมะเร็งอื่น ได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งแพร่กระจาย (metastatic carcinoma: MCA) (55) หรือการศึกษาในตัวอย่างขึ้นเนื้อที่เป็นโรคมะเร็งตับ HCC เปรียบเทียบกับมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ และมะเร็งตับร่วมกับท่อน้ำดี (combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: CHC) จากการศึกษาด้วย immunohistochemistry พบว่า GPC3 จะแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเฉพาะบริเวณที่เป็นมะเร็งตับชนิด HCC เท่านั้น (56) GPC3 จึงสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพได้ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก GPC3 มีความไวต่อโรคต่ำ จึงต้องใช้ร่วมกับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดอื่น เพื่อพัฒนาให้มีความไวมากขึ้น และสามารถใช้ในการวินิจฉัยได้แม่นยำขึ้น เนื่องด้วยลักษณะเด่นของ GPC3 ที่มีความจำเพาะต่อโรคสูง ปัจจุบันจึงมีการศึกษาใช้ GPC3 เป็นโมเลกุลเป้าหมาย (molecular target) ในการรักษาโรคมะเร็งตับ (57, 58)



### บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะมีรูปแบบการวิจัยแบบ case-control study และได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่อ้างอิง IRB No. 725/60

#### อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
2. Centrifuge (Hettich, Germany)
3. Electrophoresis chamber (Biorad, USA)
4. Force Mini (Lio Lab International, Korea)
5. Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
6. Freezer -80°C (Panasonic, Japan)
7. Gel documentation system (Biorad, USA)
8. Hot plate stirrer (JLab technology, USA)
9. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (Axygen, USA)
10. Microwave (Electrolux, Sweden)
11. Multichannel autopipette (Eppendoff, Germany)
12. Multiskan GO microplate spectrometer (Thermo scientific, USA)
13. Nanodrop spectrometer (Thermo scientific, USA)
14. Orbital shaker (Dragonlab, China)
15. PCR ThermoCycler (Eppendoff, Germany)
16. PCR tube ขนาด 0.2 ml (Axygen, USA)

17. Pipette tip ขนาด 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1000  $\mu$ l (Axygen, USA)
18. Polypropylene conical tube ขนาด 15 และ 50 ml (Fisher scientific, USA)
19. qPCR 8-strips with attached flat caps (Kirgen, USA)
20. Reagent bottle ขนาด 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml (Schott Duran, Germany)
21. Semi-dry transfer cell (Biorad, USA)
22. StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)
23. Thermo shaker incubator (Hangzhou MIU Instruments, China)
24. Vortex mixer (Scientific industries, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA (Total RNA extraction) จากตัวอย่างเลือด

1. Guanidium Thiocyanate (GTC) (Merck, Germany)
2. N-lauryl sarcosine sodium salt (Merck, Germany)
3. Beta-mercaptoethanol (Merck, Germany)
4. Sodium acetate (Merck, Germany)
5. Phenol (Amresco, USA)
6. Chloroform (Amresco, USA)
7. Isoamyl alcohol (Merck, Germany)
8. Isopropanol (Merck, Germany)
9. Glycogen (Amresco, USA)
10. Ethanol (Merck, Germany)
11. DNase I (Thermo scientific, USA)
12. Water-DEPC treated (Biobasic science, Canada)

สารเคมีที่ใช้สกัด RNA และโปรตีนจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

1. TRIzol™ Reagent (Thermo scientific, USA)
2. Phenol (Amresco, USA)

3. Chloroform (Amresco, USA)
4. Ethanol (Merck, Germany)
5. DNase I (Thermo scientific, USA)
6. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Biobasic science, Canada)

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค RT-PCR

1. RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo scientific, USA)
2. QPCR Green Master Mix HRox kit (Biotechrabbit, Germany)
3. SULF2, GPC3 และ Beta-globin primers (Integrated DNA Technologies, USA)
4. Distilled water

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกของการตรวจวัดระดับ mRNA

1. *Taq* DNA Polymerase recombinant kit (Biotechrabbit, Germany)
2. Reaction buffer (Cat No.BR0100101, Biotechrabbit, Germany)
3.  $MgCl_2$  (Biotechrabbit, Germany)
4. dATP, dCTP, dGTP, DTTP (Thermo Scientific, USA)
5. Agarose (Vivantis, USA)
6. RedSafe Nucleic acid staining solution (Intron biotechnology, Korea)
7. DNA ladder (Genedirex, USA)
8. TA vector (RBC bioscience, Taiwan)
9. T4 DNA ligase (Thermo scientific, USA)
10. *Escherichia coli* strain JM109 (RBC bioscience, Taiwan)
11. Yeast extract (Himedia, India)
12. Tryptone (Himedia, India)
13. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)
14. Agar (Himedia, India)

15. Isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Amresco, USA)
16. X-Gal (Amresco, USA)
17. Ampicillin (Amresco, USA)
18. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)
19. Plasmid extraction kit (RBC bioscience, Taiwan)
20. M13 primer (RBC bioscience, Taiwan)

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค Western blot

1. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Biobasic science, Canada)
2. Bicinchoninic acid (BCA) assay (Merck, Germany)
3. 40% Bis-acrylamide solution (Himedia, India)
4. Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Himedia, India)
5. Ammonium persulfate (Himedia, India)
6. Bovine serum albumin (Capricon scientific, Germany)
7. Tris, Free base (Himedia, India)
8. Phosphate buffered saline (PBS) (Amresco, USA)
9. Protein ladder (Genedirex, USA)
10. Leammli buffer (Himedia, India)
11. Ponceau S (Merck, Germany)
12. Skim milk (Himedia, India)
13. Tween-20 (Vivantis, USA)
14. Human Sulfatase-2/SULF2 Antibody (R&D systems, USA)
15. Anti-beta Actin antibody (Abcam, USA)
16. Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (HRP) secondary antibody (Abcam, USA)
17. Entry-level peroxidase substrate (ECL) (GE healthcare, USA)
18. Methanol (Merck, Germany)
19. Acetic acid (Merck, Germany)

## 20. Coomassie brilliant blue G-250 (Bioscience, Canada)

### ชุดน้ำยาสำเร็จที่ใช้ในเทคนิค ELISA

1. Human SULF2 ELISA kit (Biomatik, USA)
2. Quantikine Human GPC3 ELISA kit (R&D systems, USA)

### โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิจัย

1. BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.5.3)
2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
3. ImageLab version 5 (Biorad, USA)
4. StepOne Software Version 2.3 (Applied Biosystems, USA)
5. SPSS software for Windows version 22 (SPSS, USA)
6. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA)
7. EndNote X8 (Version 8.2)

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. การศึกษา GPC3 และ SULF2 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียง

##### 1.1 การเลือกกลุ่มตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียงที่ไม่ได้เป็นมะเร็งจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งตับ HCC จากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและเข้ารับการผ่าตัดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยผู้ป่วยในกลุ่มนี้ต้องไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรือเอชไอวีร่วมด้วย และต้องไม่เป็นมะเร็งชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ HCC และเป็นตัวอย่างที่เหลือจากโครงการวิจัยก่อนหน้าซึ่งได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข IRB No. 108/60 ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยจะเก็บรักษาอยู่ในน้ำยา RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo scientific, USA) ก่อนนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ ห้องปฏิบัติการ 725 ชั้น 7 อาคาร แพทย์พัฒนา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้อ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้าที่มีวัตถุประสงค์ และชนิดของตัวอย่างที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Ruan J. และคณะในปี 2014 โดยได้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคมะเร็งตับบริเวณที่เป็นมะเร็งและบริเวณข้างเคียง 13 ราย (59)

### 1.2 การสกัด RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียง

การสกัดตัวอย่าง RNA จากชิ้นเนื้อมะเร็งตับโดยใช้น้ำยาสกัด TRIzol™ Reagent ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- I. บดตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาด 50 – 100 mg ให้ละเอียดก่อนใส่น้ำยา TRIzol™ Reagent ปริมาตร 1 ml บ่มเป็นเวลา 5 นาที
- II. ปิเปต Chloroform ปริมาตร 200  $\mu$ l ต่อปริมาตร TRIzol™ Reagent 1 ml ลงในหลอดบรรจุตัวอย่าง บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที
- III. นำหลอดสารละลายตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- IV. เก็บส่วนใสชั้นบนสุดซึ่งเป็นชั้นของสารละลาย RNA ลงในหลอดทดลองใหม่ และนำไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop
- V. เก็บส่วนใสชั้น phenol-ethanol เพื่อสกัดโปรตีนต่อไป

### 1.3 การกำจัด DNA เจือปน (DNase I treatment)

เนื่องจากในตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างอาจมีส่วนเจือปนของ DNA และอาจส่งผลต่อความคลาดเคลื่อนในการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจในขั้นตอนถัดไป จึงต้องกำจัด DNA เจือปนด้วยเอนไซม์ชนิด DNase I

- I. ผสมเอนไซม์ DNase I และ DNase I buffer อย่างละ 1  $\mu$ l ลงในสารละลาย RNA
- II. บ่ม ณ อุณหภูมิ 37°C 30 นาที

- III. หยุดปฏิกิริยาของ DNase I ด้วยการเติมสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1  $\mu$ l และนำไปบ่ม ณ อุณหภูมิ 65°C 10 นาที

#### 1.4 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยกระบวนการ Reverse transcription

นำตัวอย่าง RNA ที่สกัดจากตัวอย่างของผู้ป่วยมาผ่านการสังเคราะห์ cDNA (coding DNA) ด้วย Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ (template) ในการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วย RT-PCR

ขั้นตอนการ Reverse transcription มีดังนี้

- I. เติมสารละลายไพรเมอร์ชนิด random hexamer ปริมาตร 1  $\mu$ l ในหลอดสารละลายตัวอย่าง RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA เจือปนแล้ว และบ่มที่อุณหภูมิ 65°C 5 นาที
- II. ผสม reverse transcription mixture ลงในหลอด RNA ตัวอย่างปริมาตรรวม 20  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วยสารต่อไปนี้

ตารางที่ 1: ส่วนประกอบของ reverse transcription mixture

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu$ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X reaction buffer	4	1X
10 $\mu$ M dNTPs	2	1 mM
Ribolock enzyme (20U/ $\mu$ l)	1	1U
RevertAid enzyme (200U/ $\mu$ l)	1	20U
RNA sample + random hexamer primer	12	-
ปริมาตรรวม	20	

- III. บ่มที่อุณหภูมิ 25°C 5 นาที
- IV. บ่มที่อุณหภูมิ 42°C 1 ชั่วโมง 30 นาที
- V. บ่มที่อุณหภูมิ 70°C 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

### 1.5 การศึกษาระดับ mRNA ของ SULF2 และ GPC3 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับ

การตรวจสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน *GPC3* และ *SULF2* ด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ มีความจำเพาะ และสามารถทำซ้ำได้ (reproducible) (60) การตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้ มีองค์ประกอบที่สำคัญคือไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายในการศึกษา ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 3 คู่ดังแสดงในตารางที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ของยีนที่สนใจศึกษา คือ *GPC3* และ *SULF2* และไพรเมอร์ของยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุม คือ *Beta-globin*

ตารางที่ 2: ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *GPC3*, *SULF2* และ *Beta-globin*

ยีนเป้าหมาย		ลำดับเบส (5' – 3')	ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาด PCR product (bp)
GPC3 ดัดแปลง จาก (49)	FW	CTGCCTGATTCAGCCTTGGAC	21	66	123
	RE	CCTAGTGACTTGCAGTGACTTG	22	66	
SULF2 (35)	FW	CTGAATCCCCACATCGTCCTC	21	66	225
	RE	GTCCACCTTGTCATTGTCTCTCTTGT	26	76	
Beta-globin	FW	GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA	22	68	102
	RE	CCTTGATACCAACCTGCCAG	21	64	

ในการศึกษานี้ใช้ fluorescence dye ชนิด SYBR green ในการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีนดังกล่าว โดยใช้ชุด QPCR Green Master Mix HRox kit และเครื่อง StepOne plus RT-PCR

การวัดระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดที่สนใจโดยใช้ reaction mixture จากชุด QPCR Green Master Mix HRox kit ดังแสดงในตาราง



ตารางที่ 3: ตารางแสดงสารเคมีและปริมาตรที่ใช้ในเทคนิค RT-PCR

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ )	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X SYBR green master mix	6.25	1X
10 $\mu\text{M}$ Forward primer	0.25	0.2 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ Reverse primer	0.25	0.2 $\mu\text{M}$
cDNA template	1	-
Distilled water	4.75	-
ปริมาตรรวม	12.5	

Cycling condition สำหรับการตรวจวัดปริมาณ mRNA ของยีน *SULF2* และ *GPC3* คือ

- |                 |      |           |          |
|-----------------|------|-----------|----------|
| 1. Holding      | 95°C | 2 นาที    | } 50 รอบ |
| 2. Denaturation | 95°C | 15 วินาที |          |
| 3. Annealing    | 60°C | 20 วินาที |          |
| 4. Extension    | 72°C | 30 วินาที |          |
| 5. Detection    | 76°C | 30 วินาที |          |

Cycling condition สำหรับการตรวจวัดปริมาณ mRNA ของยีน *Beta-globin* คือ

- |                 |      |           |          |
|-----------------|------|-----------|----------|
| 1. Holding      | 95°C | 3 นาที    | } 40 รอบ |
| 2. Denaturation | 95°C | 15 วินาที |          |
| 3. Annealing    | 58°C | 30 วินาที |          |
| 4. Extension    | 72°C | 1 นาที    |          |

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกจะใช้วิธีคำนวณแบบ Relative expression ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{target gene})} - \text{Ct}_{(\text{Beta-globin})}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{(\text{Case})} - \Delta\text{Ct}_{(\text{Control})}$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

### 1.6 การสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกด้วยเทคนิคโคลนนิ่ง

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณ mRNA ของ *SULF2* และ *GPC3* ด้วยเทคนิค RT-PCR จะต้อง มีขั้นตอนการยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณนั้นมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย และมี ลำดับเบสของ PCR product ที่ถูกต้องดังคาดการณ์ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกเปรียบเทียบกับ การทดลองในตัวอย่างจากกลุ่มทดลอง มีขั้นตอนดังนี้

- I. เพิ่มจำนวน amplicon ที่สนใจด้วยไพรเมอร์ของ *SULF2* และ *GPC3* ดังแสดง ในตาราง ด้วยเทคนิค PCR ด้วยชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase recombinant ต่อไปนี้

ตารางที่ 4: สารเคมีและปริมาตรที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ )	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X reaction buffer	2.5	1X
50 mM $\text{MgCl}_2$	0.75	5 mM
10 $\mu\text{M}$ forward primer	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ reverse primer	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
10 mM dNTPs	0.5	0.2 mM
<i>Taq</i> polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.5 U
Template	1	-
ปริมาตรรวม	25	

PCR cycling condition คือ

- |    |                 |      |           |          |
|----|-----------------|------|-----------|----------|
| 1. | Initiation      | 94°C | 3 นาที    | } 40 รอบ |
| 2. | Denaturation    | 94°C | 30 วินาที |          |
| 3. | Annealing       | 60°C | 20 วินาที |          |
| 4. | Extension       | 72°C | 30 วินาที |          |
| 5. | Final extension | 72°C | 5 นาที    |          |

- II. นำ PCR product มาตรวจสอบขนาดบน 2% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis
- III. สกัด PCR product ที่ต้องการจากแผ่นเจลด้วยชุดน้ำยา QIAquick Gel Extraction kit
- IV. วัดความเข้มข้นของ PCR product ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop
- V. นำ PCR product ที่ผ่านการสกัดจากเจลแล้วบ่มร่วมกับ TA vector เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ligation ณ อุณหภูมิ 20°C ซ้ำมคืน โดยคำนวณอัตราส่วนของโมลาร์ (molar ratio) ระหว่าง PCR product และ TA vector ด้วยสูตรต่อไปนี้

(สำหรับอัตราส่วน 1:1 ระหว่าง insert และ vector)

$$\frac{\text{kb of insert}}{\text{kb of vector}} \times \text{ng of vector} = \text{ng of insert}$$

ส่วนผสมของปฏิกิริยา ligation ได้แก่

ตารางที่ 5: ส่วนประกอบของ ligation reaction

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
purified PCR product	7.9	<i>SULF2</i> = 7.74 ng/μl <i>GPC3</i> = 14.50 ng/μl
T4-DNA ligase (3U/μl)	0.1	0.03 U/μl
TA vector (25 ng/μl)	1	2.5 ng/μl
10X ligation buffer	1	1X
ปริมาตรรวม	10	

- VI. นำ ligation reaction ปริมาตร 10 μl ผสมกับ competent cell ชนิด *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ปริมาตร 50 μl
- VII. แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที

- VIII. นำ vector เข้าสู่ competent cell ด้วยวิธี heat shock โดยบ่มที่อุณหภูมิ 42°C ระยะเวลาไม่เกิน 50 วินาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที
- IX. เติม Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium ปริมาตร 950  $\mu$ l
- X. บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
- XI. นำไปเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria-Bertani (LB) ผสมด้วย IPTG และ X-gal บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 °C 16 – 18 ชั่วโมง

### 1.7 Colony PCR

เทคนิค colony PCR เป็นเทคนิคหนึ่งเพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของการ ligation ว่ายีนที่สนใจศึกษานั้น เข้าแทรกใน vector อย่างถูกต้องหรือไม่ ซึ่งตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคดังนี้

- I. ใช้ไพรเมอร์ชนิด M13 ในการตรวจสอบ โดยมีลำดับเบสดังตาราง

ตารางที่ 6: ลำดับเบสไพรเมอร์ M13

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส (5' – 3')		ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาด PCR product (bp)
M13	FW	GTTTTCCAGTCACGAC	17	52	<i>SULF2</i> = 396
	RE	AGTGTGTCCTTTGTCGATACTG	22	64	<i>GPC3</i> = 293

- II. เพิ่มจำนวน amplicon ด้วยไพรเมอร์คู่ดังกล่าว ด้วยเครื่อง PCR โดยมี cycling condition ดังนี้

1. Initiation 94°C 3 นาที

2. Denaturation	94°C	30 วินาที	} 40 รอบ
3. Annealing	58°C	20 วินาที	
4. Extension	72°C	30 วินาที	
5. Final extension	72°C	5 นาที	

- III. ตรวจสอบขนาดของ PCR product บน 2% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ซึ่งควรมีขนาดเท่ากับ ขนาด PCR product ของ *SULF2* หรือ *GPC3* บวกกับ 171 ( 396 และ 294 ตามลำดับ) ซึ่งเป็นส่วนของ vector ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเนื่องจากการใช้ไพรเมอร์ M13

#### 1.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ของ *SULF2* และ *GPC3*

- I. เลือกโคลนของ competent cell ที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อและผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค colony PCR นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด LB ณ อุณหภูมิ 37 °C 16 – 18 ชั่วโมง
- II. นำอาหารเหลวที่มี competent cell เจริญอยู่ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เพื่อกำจัดอาหารเหลวออก
- III. นำตะกอน competent cell ไปสกัด plasmid ด้วยชุดน้ำยา Plasmid extraction
- IV. นำ plasmid ที่ผ่านการสกัดแล้ว ไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

เมื่อนำวิเคราะห์ลำดับเบสแล้ว ลำดับเบสของ PCR product ของ *SULF2* และ *GPC3* เป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ จะนำ plasmid นี้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการศึกษาระดับการแสดงออกของทั้งสองยีนในระดับ mRNA

#### 1.9 การสกัดโปรตีนจากชิ้นเนื้อ

การสกัดโปรตีนจะนำส่วนใสชั้น phenol-ethanol จากการสกัดด้วย TRIzol™ Reagent มาตกตะกอนและล้างตะกอนเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนออกจากโปรตีนที่ต้องการด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

- I. เติม Isopropanol ปริมาตร 1.5 ml ต่อการใช้ TRIzol™ Reagent ตั้งต้น 1 ml
- II. บ่มไว้ ณ อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- III. ปั่นตกตะกอนโปรตีนด้วยความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C 10 นาที และกำจัดส่วนใสออก
- IV. ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 0.3 M guanidine hydrochloride ใน 95% ethanol
- V. บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 20 นาที
- VI. ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 7,500 x g อุณหภูมิ 4°C 5 นาที และกำจัดส่วนใสออก ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ
- VII. เติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากันดี
- VIII. บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 20 นาที
- IX. ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 7,500 x g อุณหภูมิ 4°C 5 นาที และกำจัดส่วนใสออก และผึ่งตะกอนให้แห้ง
- X. ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 1% SDS ปริมาตร 200 µl
- XI. ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4°C 10 นาที และนำส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนไปใช้ต่อ และวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จ BCA assay

#### 1.10 เทคนิค Western blot

ในงานวิจัยนี้สนใจระดับโปรตีนของ SULF2 ในชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งตับเพียงชนิดเดียว เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาที่บ่งชี้อย่างแน่ชัดว่า โปรตีน SULF2 มีการแสดงออกระดับโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งตับ แต่ GPC3 นั้นมีการศึกษาระดับโปรตีนในชั้นเนื้อเยื่อค่อนข้างมาก และสามารถสรุปได้ว่า GPC3 มีระดับโปรตีนภายในชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งตับมากกว่าบริเวณข้างเคียงที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ การศึกษาด้วยเทคนิค Western blot จะมีขั้นตอนดังนี้

- I. เตรียม SDS-PAGE gel ซึ่งประกอบด้วยชั้น 3.75% Stacking gel และ 12% Resolving gel (ข้อมูลเพิ่มเติมในภาคผนวก)

- II. เตรียมตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากขั้นตอนก่อนหน้าด้วยการนำมาผสมกับ loading dye ชนิด Leammli buffer โดยคำนวณปริมาณโปรตีนที่ต้องใช้ให้มีความเข้มข้นโปรตีนภายในหลุมบนแผ่นเจลเท่ากับ 20  $\mu\text{g}$  นำไปต้ม ณ อุณหภูมิ 95°C 5 นาที
- III. นำสารละลายโปรตีนไหลตกลงบนแผ่นเจลพร้อมกับ protein marker และแยกขนาดโปรตีนบนแผ่นเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า 85 โวลต์ ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาทีด้วยเครื่อง Electrophoresis chamber และสารละลาย SDS-PAGE running buffer (ข้อมูลเพิ่มเติมในภาคผนวก)
- IV. ตัดแผ่น SDS-PAGE gel หลังเสร็จสิ้นการแยกขนาดโปรตีน โดยตัดแยกส่วนบริเวณ protein marker ขนาด 75 kD แผ่นเจลที่มีโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 75 kD จะนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน SULF2 ซึ่งมีขนาด 250 kD และแผ่นเจลที่มีโปรตีนขนาดเล็กกว่า 75 kD จะนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน Beta-actin ซึ่งมีขนาด 42 kD
- V. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบน nitrocellulose membrane ด้วยเทคนิค Semi-dry ใช้กระแสไฟฟ้า 20 โวลต์ ระยะเวลา 30 นาที และใช้ Towbin buffer เป็น blotting buffer
- VI. นำ membrane บ่มกับสารละลาย blocking solution เพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะของ antibody ที่ใช้ ซึ่งจะมี 2 ชนิด คือ SULF2 และ Beta-actin เพื่อเป็นโปรตีนควบคุม (internal control) โดย condition ที่ใช้ในขั้นตอน Immunoblotting ของ antibody ทั้งสองชนิดเป็นดังนี้

ตารางที่ 7: Condition ที่เหมาะสมสำหรับ primary antibody สองชนิด

Primary antibody Condition	SULF2	Beta-actin
Blocking solution	5% skim milk in 0.05% Tween-20 in TBS (TBS-T)	5% skim milk in 0.05% Tween-20 in PBS (PBS-T)
Antibody dilution	1:500 in 5% skim milk (บ่ม ณ อุณหภูมิ 4 °Cข้ามคืน)	1:1,000 in PBS-T (บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง)
Washing solution	TBS-T (10 นาที 4 ครั้ง)	PBS-T (15 นาที 5 ครั้ง)
Secondary antibody dilution	1:20,000 in 5% skim milk (บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง)	1:10,000 in PBS-T (บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง)

- VII. ล้างแผ่น membrane ด้วยสารละลาย washing solution
- VIII. บ่มกับ primary antibody
- IX. ล้างแผ่น membrane ซ้ำด้วยสารละลาย washing solution
- X. บ่มกับ secondary antibody ณ อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
- XI. ล้างแผ่น membrane ซ้ำด้วยสารละลาย washing solution
- XII. นำแผ่น membrane บ่มกับสารละลาย ECL ก่อนนำไปตรวจสอบภายใต้เครื่อง Gel documentation system

การวิเคราะห์ผลจากเทคนิค western blot จะใช้โปรแกรม ImageLab V.5 (Biorad, USA) เพื่อวัดความเข้มของแบนโปรตีน SULF2 ของชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งระดับเทียบกับบริเวณที่ไม่ได้เป็น และเปรียบเทียบเป็นอัตราส่วนกับ Beta-actin หรือ internal control ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนดังนี้

$$\text{SULF2/Beta-actin ratio} = \frac{\text{Band intensity of SULF2}}{\text{Band intensity of Beta-actin}}$$



## 2. การศึกษา GPC3 และ SULF2 ในตัวอย่างเลือด

### 2.1 การเลือกกลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างเลือด

กลุ่มตัวอย่างที่ทำการสุ่มเลือกประกอบด้วยสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และกลุ่มผู้ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ ซึ่งแบ่งกลุ่มย่อยออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี และกลุ่มผู้มีสุขภาพดี ซึ่งจะใช้ตัวอย่างที่เหลือจากโครงการวิจัยก่อนหน้าซึ่งได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข IRB No.438/60 โดยจัดเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบบีและมะเร็งตับ ห้องปฏิบัติการ 725 ชั้น 7 อาคารแพทย์พัฒนา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมีเกณฑ์คัดเข้าของตัวอย่างแต่ละกลุ่มดังต่อไปนี้

1. ตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
  - ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
  - มีผล HBsAg เป็นบวก (HBsAg positive)
  - มีตัวอย่างเลือด ณ ช่วงเวลาก่อนได้รับการรักษา
  - ผ่านขั้นตอนการวินิจฉัยด้วยเทคนิคการบันทึกภาพเพื่อวินิจฉัยโรค ได้แก่ Magnetic resonance imaging (MRI), Computerized tomography (CT) หรือ Ultrasound (UT) โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ใช้ขนาดและจำนวนของก้อนเนื้อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยระยะรุนแรงและระยะเริ่มต้น
  - ต้องไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวีร่วมด้วย
  - ต้องไม่เป็นมะเร็งชนิดอื่นที่ไม่ใช่ HCC

### 2. กลุ่มผู้ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

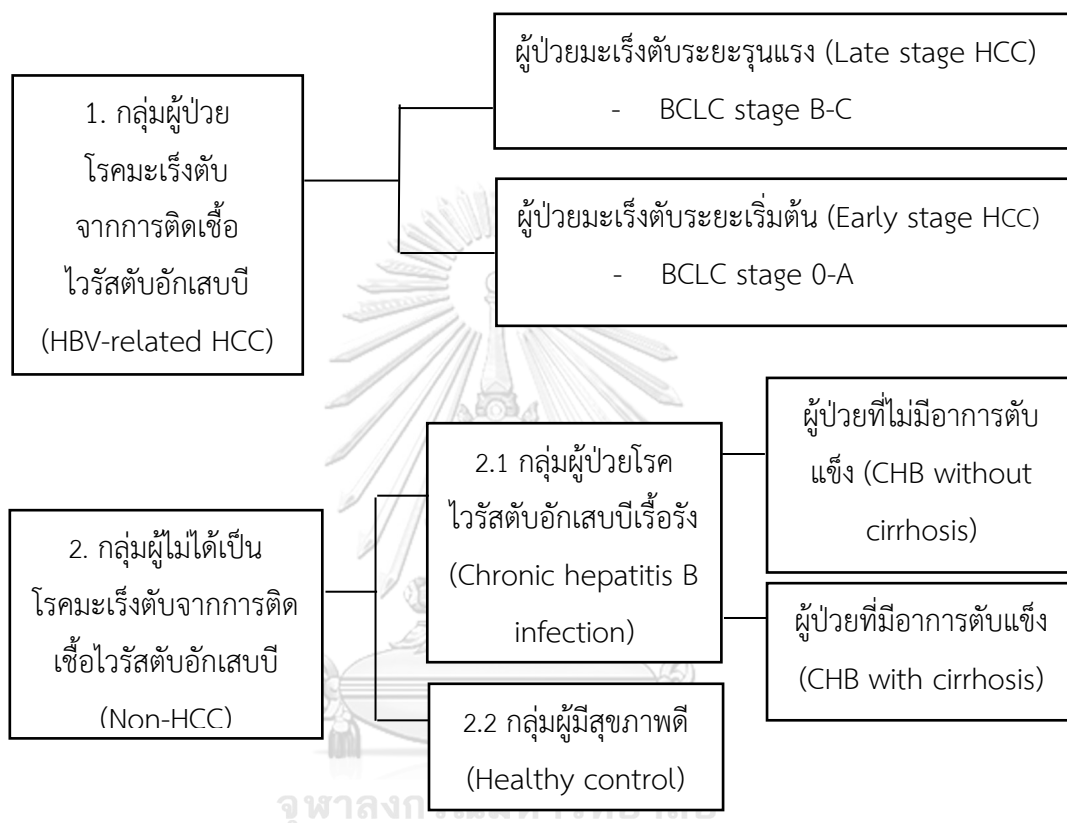
#### 2.1 ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

- ผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- มีผล HBsAg เป็นบวก (HBsAg positive)
- มีตัวอย่างเลือด ณ ช่วงเวลาก่อนได้รับการรักษา
- ต้องไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวีร่วมด้วย

#### 2.2 ตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้มีสุขภาพดี

- นำมาจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ตัวอย่างเลือดจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดผ่านการเก็บเลือดด้วยหลอดเก็บเลือดชนิด EDTA blood และ clotted blood ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นและนำไปใช้เฉพาะส่วน buffy coat และซีรัมตามลำดับ



รูปที่ 9: แผนผังกลุ่มตัวอย่างและเกณฑ์การคัดเลือกที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

2.2 การคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาการแสดงออกของ GPC3 และ SULF2 ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย

ในการศึกษานี้ได้คำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$N = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

โดย  $N =$  จำนวนประชากรที่ศึกษา      odd ratio = 2.19 (56)

$$P = (P_1 + P_2) / 2 \quad P_1 = (P_2 \times \text{odd ratio}) / 1 + P_2 (\text{odd ratio} - 1)$$

$P_2 =$  อัตราการแสดงออกของ GPC3 ในผู้ป่วยโรค HCC มีค่า 0.53 (42)

$Z_{\alpha} =$  ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test โดย  $Z_{\alpha/2} = 1.96$  เมื่อกำหนด  $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} =$  ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 โดย  $Z_{\beta} = 1.28$

เมื่อแทนค่าในสมการ จะได้  $N = 138$  ดังนั้น กลุ่มตัวอย่างที่สนใจศึกษาจึงต้องมีอย่างน้อย 138 รายในการศึกษานี้จึงทำในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และกลุ่มผู้ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งตับ กลุ่มละ 140 ราย

### 2.3 การสกัด RNA

นำตัวอย่างเลือดส่วน buffy coat จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด มาสกัด RNA ด้วยเทคนิค Phenol-Guanidium thiocyanate (GTC) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- I. นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 100  $\mu$ l และสารละลายผสม GTC (สารละลาย GTC 9,000  $\mu$ l และ Beta-mercaptoethanol 70  $\mu$ l) ปริมาตร 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันอย่างแรงด้วยเครื่อง Vortex 10-15 วินาที
- II. นำสารละลาย 2M sodium acetate NaOAc) 50  $\mu$ l, Phenol 500  $\mu$ l และ Choloform:Isoamylalcohol (49:1) 100  $\mu$ l ลงในหลอดตัวอย่างเลือดและผสมให้เข้ากัน
- III. แช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำ  $-20^{\circ}\text{C}$  20 นาที
- IV. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500  $\times$  g อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  30 นาที

- V. ปิเปตสารละลายใส่ส่วนบน ย้ายลงในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube ใหม่ ผสมกับ 20 mg/ml glycogen ปริมาตร 4  $\mu$ l และสารละลาย Isopropanol 600  $\mu$ l พลิกหลอดเบาๆ เพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน
- VI. แช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำ -20°C ซ้ำมคืนเพื่อตกตะกอน RNA
- VII. นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 x g อุณหภูมิ 4°C 30 นาที
- VIII. เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนที่เหลือด้วยสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 500  $\mu$ l
- IX. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 x g อุณหภูมิ 4°C 2 นาที
- X. กำจัดส่วนใสทิ้ง และผึ่งตะกอนให้แห้งสนิท
- XI. ละลายตะกอนด้วย water-DEPC treated ปริมาตร 20  $\mu$ l
- XII. วัดความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop

คุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ สามารถวัดได้จากอัตราส่วนระหว่าง A260/280 ซึ่งควรมีค่าระหว่าง 1.80 – 2.00 และนำ RNA ตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนดังปรากฏในข้อ 1.3 – 1.4

#### 2.4 การศึกษาระดับ mRNA ของ *SULF2* และ *GPC3* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย

ในขั้นตอนนี้จะใช้วิธีการวิจัยดังปรากฏในข้อ 1.5 – 1.7

#### 2.5 การตรวจวัดการแสดงออกระดับโปรตีนของ *SULF2* และ *GPC3* ภายในซีรัม

เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ หรือ secretory protein ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และนิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเลือดส่วนซีรัมของผู้ป่วยเพื่อพัฒนาเป็น biomarker ในการตรวจวัดปริมาณ *GPC3* และ *SULF2* นั้น โดยใช้ชุด ELISA kit ที่จำเพาะกับโปรตีนทั้งสองชนิด อันได้แก่ Quantikine Human Glypican-3 ELISA kit (sensitivity: 20.6 pg/ml, detection range: 78.1 - 5,000 pg/ml) และ *SULF2* ELISA kit (sensitivity: 0.113 ng/ml, detection range: 0.312-20 ng/ml) ซึ่งทั้งสองชุดมีรายละเอียดของขั้นตอนแตกต่างกันตามคู่มือจากผู้ผลิต แต่มีขั้นตอนหลักของชุด kit ร่วมกันดังต่อไปนี้

- I. ปิเปตซีรัมหรือสารละลายตัวอย่างมาตรฐานปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ลงบน microtiter plate ที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GPC3 หรือ SULF2 เคลือบอยู่
- II. ปิเปต horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal antibody ที่จำเพาะกับ GPC3 หรือ SULF2 เพื่อจับอย่างจำเพาะกับโปรตีนทั้งสอง และเกิดลักษณะของ sandwich ELISA
- III. ล้าง microtiter plate ด้วยการเทสารละลายภายใน microtiter plate จากชั้นตอนข้างต้นทิ้ง จากนั้นจึงใส่สารละลาย wash solution และเททิ้ง ทำซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง
- IV. ปิเปตสับเซตรของ HRP enzyme ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ลงในแต่ละหลุม และบ่มเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 30 นาที ในชั้นตอนนี้สารละลายภายในหลุมที่มีโปรตีน GPC3 หรือ SULF2 ปริมาณมากพอจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าใส
- V. ปิเปตสารละลาย stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยาปริมาตร 90  $\mu\text{l}$  ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายสีฟ้าใสจากชั้นตอนก่อนหน้าเป็นสีเหลือง จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันดี เพื่อให้การหยุดปฏิกิริยาสมบูรณ์และสีของสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- VI. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แปรผันตรงกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน GPC3 และ SULF2 ที่มีในตัวอย่างซีรัม และสามารถคำนวณเข้มข้นได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่บรรจุอยู่ในชุด ELISA kit

### การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

การเก็บข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัย จะบันทึกในสมุดบันทึกผลการทดลองและรวบรวมในคอมพิวเตอร์เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

การวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบทางสถิติในการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของ SULF2 และ GPC3 จากตัวอย่างเลือดของกลุ่มตัวอย่างระหว่างกลุ่มผู้มีสุขภาพดี ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากไวรัสตับอักเสบบีจะใช้สถิติแบบ Mann-Whitney test และ Student's *t*-test

ในการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ SULF2 และ GPC3 ระหว่างชั้นเนื้อมะเร็งระดับ เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและชั้นเนื้อบริเวณข้างเคียงที่ไม่เป็นมะเร็งระดับ จะใช้สถิติแบบ Paired *t*-test

การประเมินประสิทธิภาพของ SULF2 และ GPC3 ในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพรวมถึง ความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคด้วย  $\chi^2$  หรือ Fisher's exact test, Kaplan-Meier Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis (log rank test), Pearson and Spearman correlation coefficient, Univariate analysis/Multivariate analysis (Cox regression analysis) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ *P*-value < 0.05

โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดจะใช้ GraphPad Prism V.6 (GraphPad Software, USA) และ SPSS V.22 (SPSS Inc., USA)

### ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

ใช้หลักจริยธรรมการทำวิจัยในคนทั่วไป ประกอบด้วย 3 หลัก ดังนี้

#### หลักความเคารพในตัวบุคคล (Respect of person)

เป็นการเคารพในศักดิ์ศรีความเป็นมนุษย์ โดยมีการให้ข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยแก่ ผู้เข้า ร่วมโครงการโดยไม่ปิดบัง และเคารพการตัดสินใจของผู้เข้าร่วมโครงการ โดยปราศจากการ บังคับหรือโน้มน้าว และเคารพความเป็นส่วนตัวของผู้เข้าร่วมโครงการโดยเก็บรักษาข้อมูลส่วนตัวไว้ เป็นความลับอย่างเคร่งครัด สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณา จริยธรรมในคนเลขที่อ้างอิง IRB No. 725/60 แล้ว และใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อและเลือดที่เก็บจาก โครงการวิจัยเลขที่อ้างอิง IRB No. 108/60 และ IRB No.438/60 ตามลำดับ

#### หลักคุณประโยชน์ ไม่ก่ออันตราย (Beneficence)

จากการประเมินความเสี่ยง/อันตรายที่อาจเกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่าไม่มีผลเสียที่อาจ ส่งผลต่อผู้เข้าร่วมโครงการ โดยถึงแม้ว่าจะไม่มีผลประโยชน์โดยตรงต่อผู้ป่วย แต่งานวิจัยนี้ อาจได้ ขึ้นส่วนของความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และใช้พัฒนาในทางคลินิกในอนาคตต่อไปได้

#### หลักความยุติธรรม (Justice)

การให้ความเป็นธรรม สามารถประเมินได้จากเกณฑ์การคัดเลือกและออกของผู้เข้าร่วม โครงการมีความชัดเจน และไม่ถือคติในการเลือก นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ไม่ได้แสวงหาผลประโยชน์เพื่อ บุคคลใดบุคคลหนึ่ง แต่เป็นการศึกษาที่มุ่งหวังให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ในอนาคต

### ข้อจำกัดในการวิจัย

ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกที่ผู้วิจัยกำหนดมีจำกัด จึงไม่สามารถควบคุมปัจจัยบางประการที่อาจส่งผลกระทบต่อผลการวิจัยได้ เช่น เพศ อายุ ระยะเวลาความรุนแรงของโรคมะเร็งระดับหรืออาการตับแข็งในผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้งานวิจัยนี้ไม่มีตัวอย่างชิ้นเนื้อและเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งระดับรายเดียวกัน จึงไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกและปริมาณ SULF2 และ GPC3 ในชิ้นเนื้อและในเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งระดับได้

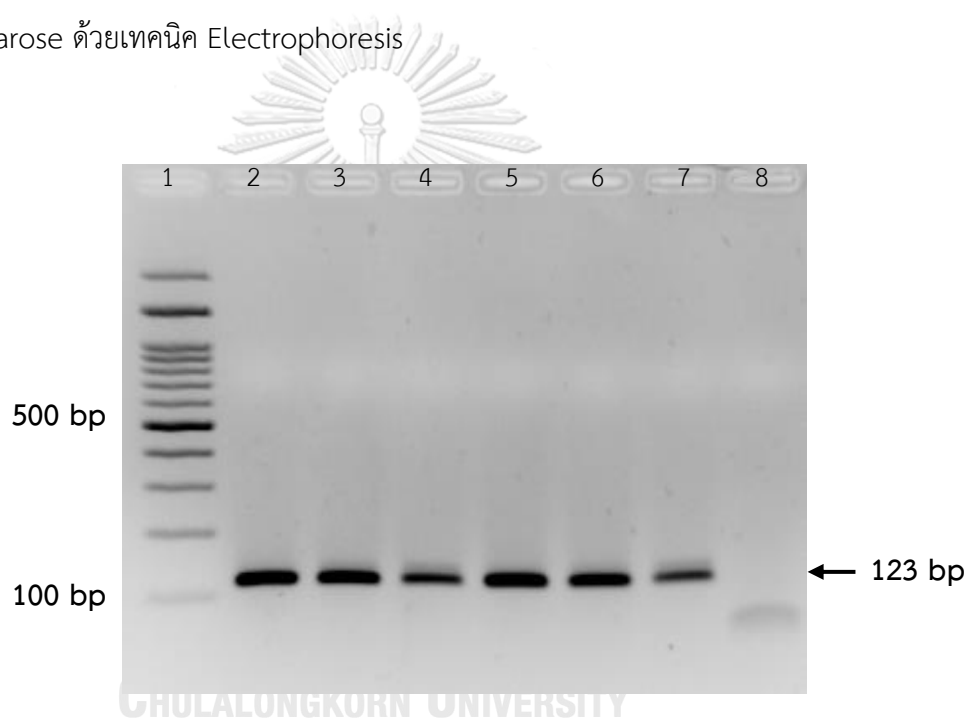


## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 1. การสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกของยีน *SULF2* และ *GPC3*

#### 1.1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน *SULF2* และ *GPC3* ด้วยเทคนิค PCR

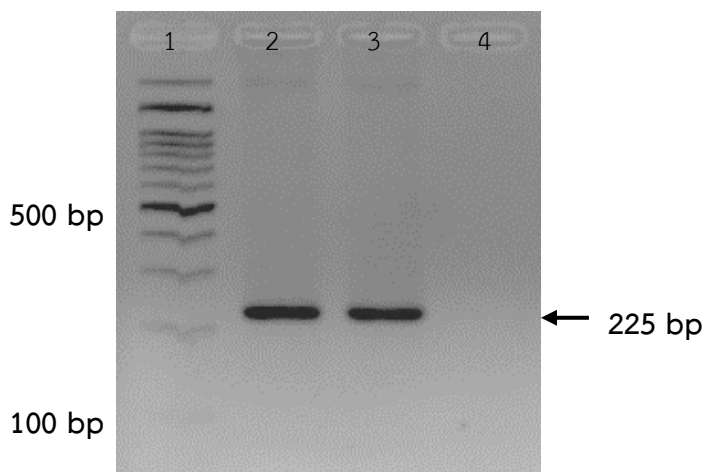
การสังเคราะห์ตัวควบคุมเชิงบวกของทั้งสองยีน จะเริ่มต้นด้วยการใช้ cDNA ที่สกัดจากเซลล์ชนิด HepG2 เป็นต้นแบบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง PCR จะนำมาตรวจสอบบนแผ่นเจล 2% agarose ด้วยเทคนิค Electrophoresis



รูปที่ 10: แผ่นเจล 2% agarose แสดงขนาดของ PCR product ของ *GPC3* (123 คู่เบส)

Lane 1: 100 bp DNA marker, Lane 2-7: PCR product ที่ได้โดยใช้ HepG2 เป็นต้นแบบ, Lane 8: Negative control





รูปที่ 11 : แผ่นเจล 2% agarose แสดงขนาดของ PCR product ของ *SULF2* (225 คู่เบส)  
Lane 1: 100 bp DNA marker, Lane 2-3: PCR product ที่ได้จากการใช้ HepG2 เป็นต้นแบบ,  
Lane 4: Negative control

จากนั้น แยกบนแผ่นเจลที่มีขนาด PCR product ที่ถูกต้องจะนำมาตัด และสกัดเจลออกด้วยเทคนิค Gel extraction ความเข้มข้นของ PCR product บริสุทธิ์ของ *SULF2* และ *GPC3* เป็นดังนี้

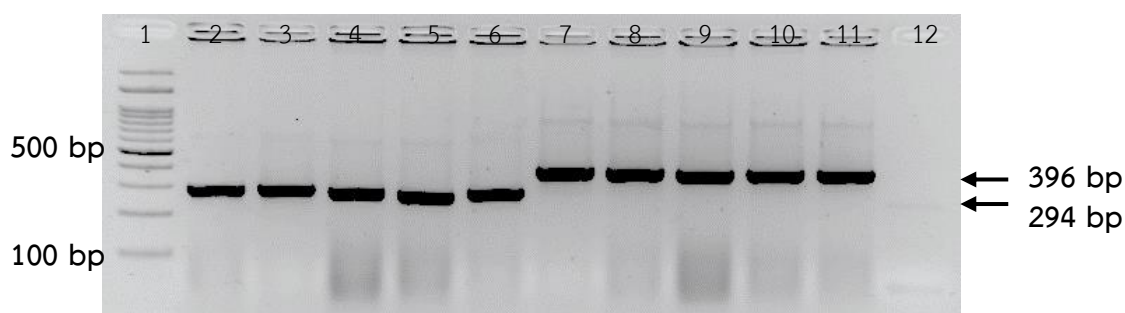
ตารางที่ 8: ผลการสกัดแยก PCR product จาก 2% agarose gel

Target gene	Concentration (ng/ul)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
<i>GPC3</i>	18.35	1.95	0.22
<i>SULF2</i>	9.8	1.70	0.06

## 1.2 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีนที่แทรกใน TA vector และเพิ่มจำนวนใน *E. coli* ด้วยเทคนิค Colony PCR

การตรวจสอบชิ้นส่วนยีนที่แทรกใน TA vector จะตรวจสอบด้วยการเลือกโคลนี *E. coli* สีขาวที่เจริญบน แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB และนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิด LB และผ่านการสกัด Plasmid จากนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ชนิด M13 ที่มีบริเวณจับจำเพาะบน TA vector และครอบคลุมตำแหน่งยีนที่เข้าแทรกบน TA vector ได้ ดังนั้น ไพรเมอร์ชนิดนี้จะสามารถเพิ่มจำนวน vector ส่วนที่มีชิ้นยีนแทรกอยู่ได้ และตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นได้จากขนาดของ PCR product บนแผ่น

เจล 2% agarose ด้วยเทคนิค Electrophoresis ซึ่งควรมีขนาดเท่ากับ 171 คู่เบส บวกกับขนาดชิ้นยีนที่แทรกเข้าสู่ vector ดังนั้น ขนาดของ vector ที่มี *GPC3* และ *SULF2* จะเท่ากับ 294 คู่เบส และ 396 คู่เบส ตามลำดับ



รูปที่ 12: PCR product จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Colony PCR และไพรเมอร์ M13  
Lane 1: 100 bp DNA marker, Lane 2-6: PCR product จาก *GPC3* ใน TA vector (Colony 1-5 ตามลำดับ), Lane 7-11: PCR product จาก *SULF2* ใน TA vector (Colony 1-5 ตามลำดับ), Lane 12: Negative control

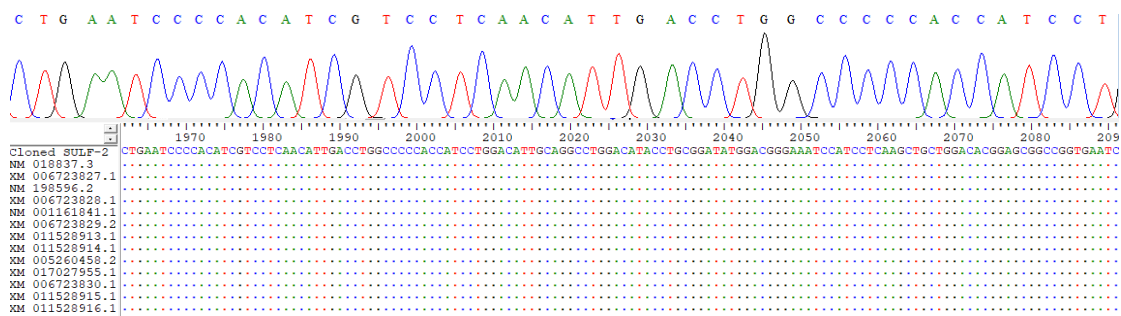
เมื่อได้ colony ที่มีการเพิ่มจำนวนขึ้น insert gene อย่างถูกต้องแล้ว จึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิด LB และสกัด Plasmid เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไปโดยบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี ความเข้มข้นของ Plasmid ที่สกัดได้เป็นดังนี้

ตารางที่ 9: ความเข้มข้นของ Plasmid ที่สกัดได้จากการเลือก colony number 1, 2 และ 5

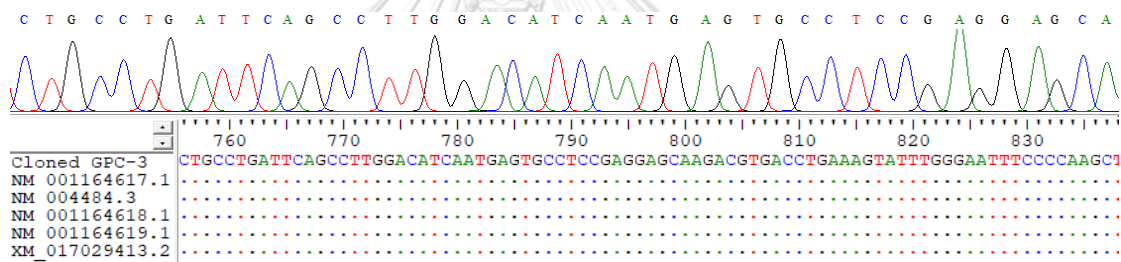
Insert gene	Colony number	Plasmid concentration (ng/ul)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
<i>GPC3</i>	1	229.90	2.03	2.23
	2	210.75	2.01	2.20
	5	199.75	2.03	2.25
<i>SULF2</i>	1	222.65	2.03	2.24
	2	214.10	2.03	2.27
	5	207.45	2.04	2.26

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของทั้งสองยีนด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยสามารถเพิ่มขึ้นยีน *SULF2* และ *GPC3* ได้อย่างถูกต้องและมีความจำเพาะ จึงสามารถนำ plasmid เหล่านี้ไปใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการทดลองได้

#### (A) *SULF2*



#### (B) *GPC3*



รูปที่ 13: ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนทั้งสองที่ได้จากการโคลนนิ่งกับลำดับเบสของยีนทั้งสองที่ปรากฏในฐานข้อมูล NCBI

## 2. ผลการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียงที่ไม่ได้เป็น

2.1 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการผ่าตัดและผ่านเกณฑ์คัดเข้าเพื่อใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อ

การศึกษานี้มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 20 คู่ คือตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งตับและตำแหน่งข้างเคียงที่ไม่ได้เป็น ซึ่งมากกว่าจำนวนตัวอย่างที่อ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้าที่มีรูปแบบการศึกษาใกล้เคียงกัน และใช้จำนวนตัวอย่าง 10 คู่ในการวิจัยด้วยเทคนิค Western blot ซึ่งตัวอย่างทั้งหมด มีลักษณะทางคลินิกเบื้องต้นดังนี้

ตารางที่ 10: ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการผ่าตัดและผ่านเกณฑ์คัดเข้าเพื่อใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อในการศึกษาระดับ mRNA

Characteristic	HCC
Sex	
Male	17 (85%)
Age (years)	59.95 ± 13.22
TB (mg/dl)	1.07 ± 0.78
Albumin (g/dl)	3.12 ± 0.63
AST (U/l)	239.95 ± 170.98
ALT (U/l)	117.15 ± 115.63
AFP (IU/ml)	4,928.93 ± 13,102.55
Tumor size	8.43 ± 6.60
Cirrhosis	
Yes	15 (75%)
No	5 (15%)

\*Total bilirubin, TB; Aspartate transaminase, AST; Alanine aminotransferase, ALT; Alpha-fetoprotein, AFP; Barcelona clinic liver cancer, BCLC.

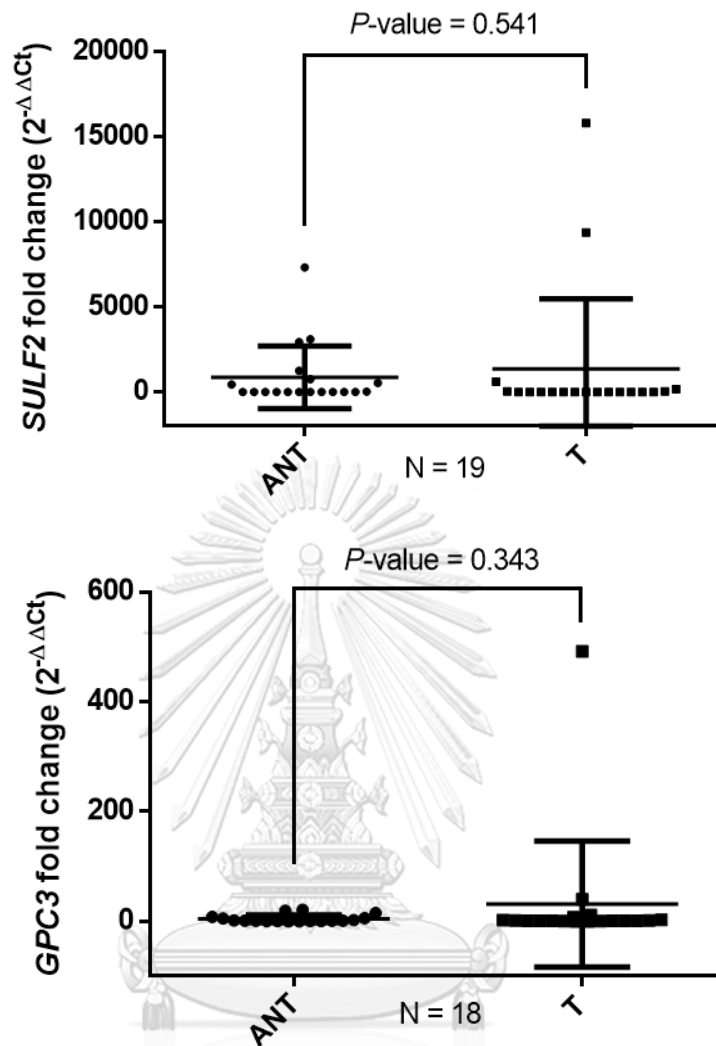
ตารางที่ 11: ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการผ่าตัดและผ่านเกณฑ์คัดเข้าเพื่อใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อในการศึกษาระดับโปรตีน

Characteristic	HCC
Sex	
Male	7 (70%)
Age (years)	57.20 ± 13.26
TB (mg/dl)	1.37 ± 1.01
Albumin (g/dl)	3.04 ± 0.56
AST (U/l)	232.20 ± 190.53
ALT (U/l)	135.10 ± 107.59
AFP (IU/ml)	5,942.67 ± 16,247.51
Tumor size	9.32 ± 8.14
Cirrhosis	
Yes	7 (70%)
No	3 (30%)

\*Total bilirubin, TB; Aspartate transaminase, AST; Alanine aminotransferase, ALT; Alpha-fetoprotein, AFP; Barcelona clinic liver cancer, BCLC.

## 2.2 ระดับ mRNA ของ *SULF2* และ *GPC3*

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายทั้งสองยีนพบว่า ระดับ mRNA ของ *SULF2* บริเวณชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็ง (Tumor tissue) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$ -value = 0.541) เปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงที่ไม่เป็นมะเร็ง (Adjacent non-tumor) แต่มีแนวโน้มจะสูงกว่า โดยมีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนไปเฉลี่ยเท่ากับ  $1,373 \pm 4,100$  เท่า และในบริเวณที่ไม่ได้เป็นมะเร็งมีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนไปเท่ากับ  $864.4 \pm 1,832$  เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของ *GPC3* ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าในบริเวณชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณข้างเคียงที่ไม่ได้เป็น และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $31.55 \pm 115.20$  และ  $4.76 \pm 6.89$  ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$ -value = 0.343)



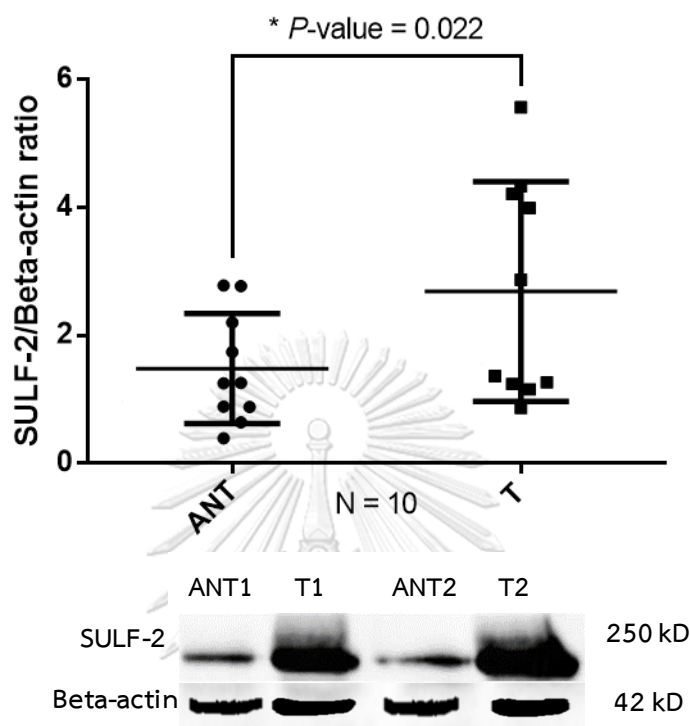
รูปที่ 14: ผลปริมาณ mRNA ของ SULF2 และ GPC3 ด้วยเทคนิค RT-PCR  
ผลการศึกษพบว่ายีนทั้งสองชนิดมีแนวโน้มแสดงออกสูงกว่าในบริเวณชิ้นเนื้อมะเร็งระดับ

\*Adjacent non-tumor; ANT, Tumor; T

### 2.3 ระดับโปรตีน SULF2 ในชิ้นเนื้อ

การศึกษาระดับโปรตีน SULF2 ภายในชิ้นเนื้อ มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่า SULF2 มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นภายในชิ้นเนื้อมะเร็งระดับ และอาจเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกรานผู้ป่วยได้ จากการศึกษาด้วยเทคนิค western blot พบว่า โปรตีน SULF2 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในบริเวณชิ้นเนื้อมะเร็งระดับ เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณปกติข้างเคียง โดยมีโปรตีน Beta-actin เป็นตัวควบคุม อัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบโปรตีน SULF2 และ Beta-actin ของชิ้นเนื้อมะเร็งระดับ

เท่ากับ  $2.67 \pm 1.72$  และบริเวณปกติข้างเคียงเท่ากับ  $1.48 \pm 0.86$  ซึ่งระดับโปรตีน SULF2 ของทั้งสองบริเวณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P$ -value = 0.022)



รูปที่ 15: ผลการศึกษาโปรตีน SULF2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียง แสดงผลด้วยกราฟจุด แกน Y แสดงออกในอัตราส่วนระหว่างความเข้มของแถบโปรตีน SULF2 และ Beta-actin ภาพด้านล่างแสดงตัวอย่างแถบโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose membrane

\*Adjacent non-tumor; ANT, Tumor; T

### 3. ผลการศึกษาตัวอย่างเลือดส่วน buffy coat และซีรัม

#### 3.1 ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและใช้ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดจากกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่ม ประกอบด้วย

- กลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย รวมทั้งหมด 169 ราย
  - กลุ่มผู้มีสุขภาพดี (Healthy) 50 ราย
  - กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (CHB) 119 ราย
- กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
  - กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับจากไวรัสตับอักเสบบี (HCC) 146 ราย

ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 12: ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างสามกลุ่มย่อยที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและใช้ตัวอย่างเลือดในงานวิจัยระดับ mRNA

Characteristic	Healthy	CHB	HCC	P-value
	(n=50)	(n=98)	(n=93)	
Sex				
Male	27 (54.00%)	56 (57.10%)	74 (79.60%)	0.001
Age (years)	48.66 ± 4.90	52.70 ± 13.73	58.78 ± 11.19	<0.001
TB (mg/dl)	NA	1.01 ± 1.74	1.14 ± 0.81	0.587
Albumin (g/dl)	NA	4.84 ± 5.42	3.48 ± 0.63	0.058
AST (U/l)	NA	35.94 ± 3.03	94.76 ± 78.61	<0.001
ALT (U/l)	NA	47.53 ± 50.48	64.56 ± 50.82	0.022
AFP (IU/ml)	2.79 ± 1.53	8.21 ± 22.09	30,343.00 ± 93,587.00	<0.001
Cirrhosis (Yes/No)	NA	23 (23.50%)/ 75 (76.50%)	78 (83.90%)/ 15 (16.10%)	<0.001
Tumor size (cm)	NA	NA	9.41 ± 5.84	NA
Child-Pugh A/B/C/unknown	NA	NA	64 (68.80%)/14 (15.10%) /0 (0.00%)/ 15 (16.10%)	NA
BCLC stage 0-A/B/C-D	NA	NA	17 (18.30%)/ 55 (59.10%)/ 21 (22.60%)	NA

\*Total bilirubin, TB; Aspartate transaminase, AST; Alanine aminotransferase, ALT; Alpha-fetoprotein, AFP; Barcelona clinic liver cancer, BCLC NA, Not available.



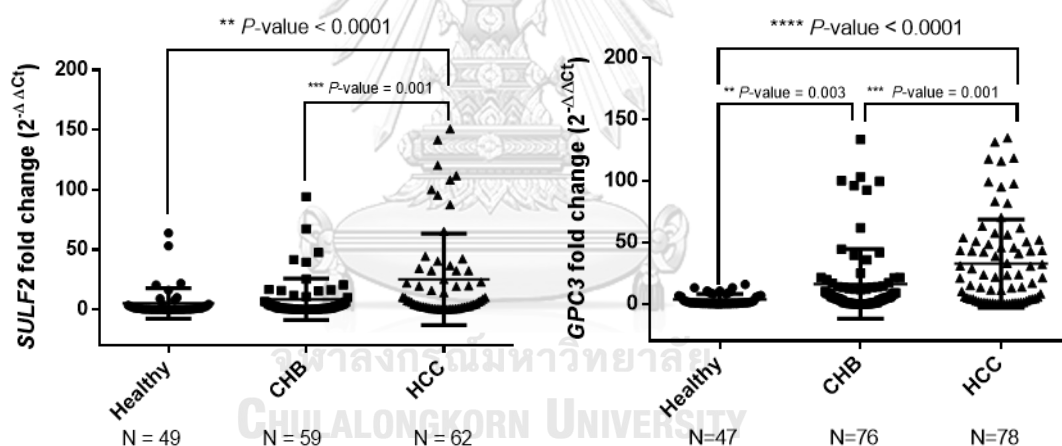
ตารางที่ 13: ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างสามกลุ่มย่อยที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและใช้เป็นตัวอย่างเป็นตัวอย่างเลือดในงานวิจัยระดับโปรตีน

Characteristic	Healthy	CHB	HCC	P-value
	(n=50)	(n=119)	(n=146)	
Sex				
Male	27 (54%)	66 (55.46%)	116 (79.45%)	<0.001
Age (years)	48.66 ± 4.90	53.18 ± 13.04	59.12 ± 10.69	<0.001
TB (mg/dl)	NA	0.98 ± 1.62	1.13 ± 0.77	0.353
Albumin (g/dl)	NA	4.79 ± 5.13	3.52 ± 0.62	0.008
AST (U/l)	NA	34.06 ± 27.85	97.62 ± 101.01	<0.001
ALT (U/l)	NA	44.54 ± 47.58	62.90 ± 52.481	0.004
AFP (IU/ml)	2.79 ± 1.53	7.32 ± 20.25	22,892.67 ± 77,948.05	<0.001
Cirrhosis (Yes/No)	NA	23 (19.33%)/ 96 (80.97%)	121 (82.88%)/ 25 (17.12%)	<0.001
Tumor size (cm)	NA	NA	8.98 ± 5.91	NA
Child-Pugh A/B/C/unknown	NA	NA	97 (66.44%)/24 (16.44%) /1 (0.7%)/ 24 (16.44%)	NA
BCLC stage 0-A/B/C-D	NA	NA	31 (21.2%)/ 75 (51.4%)/ 40 (27.4%)	NA

\*Total bilirubin, TB; Aspartate transaminase, AST; Alanine aminotransferase, ALT; Alpha-fetoprotein, AFP; Barcelona clinic liver cancer, BCLC; NA, Not available.

### 3.2 ระดับ mRNA ของ *SULF2* และ *GPC3*

การศึกษา mRNA ในเลือดของกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มนี้ จะใช้ตัวอย่างเลือดจากส่วน buffy coat หรือชั้นของกลุ่มเม็ดเลือดหลังผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของเลือดในหลอดเก็บเลือดชนิด EDTA tube จากนั้นจึงสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA และนำไปตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเทคนิค RT-PCR ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาในกลุ่มผู้มีสุขภาพดีทั้งหมด 50 ราย และศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 98 ราย และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับกลุ่มละ 93 ราย จากการศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบ *SULF2* และ *GPC3* ได้ทุกกลุ่มตัวอย่าง และมีระดับการแสดงออกของ *SULF2* และ *GPC3* สูงที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ ( $25.26 \pm 38.10$  และ  $32.47 \pm 35.38$ ) รองลงมาได้แก่กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ( $8.74 \pm 17.30$  และ  $16.27 \pm 28.30$ ) และกลุ่มผู้มีสุขภาพดี ( $5.33 \pm 12.78$  และ  $3.67 \pm 4.45$ ) โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติและจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบได้ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16: ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ของทั้งสองยีนที่สนใจจากตัวอย่างเลือด

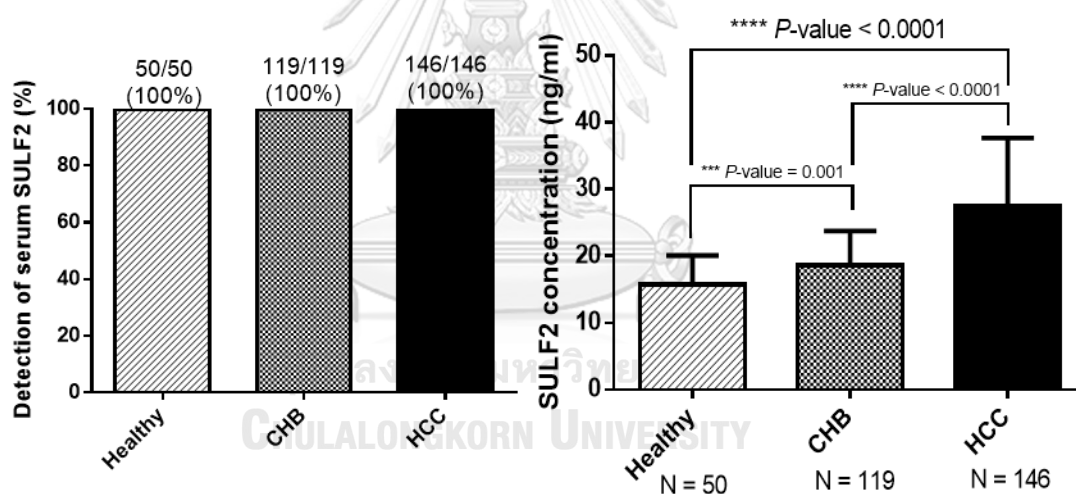
\*Chronic Hepatitis B infection, CHB; HCC, Hepatocellular carcinoma

### 3.3 ระดับโปรตีนของ *SULF2* และ *GPC3*

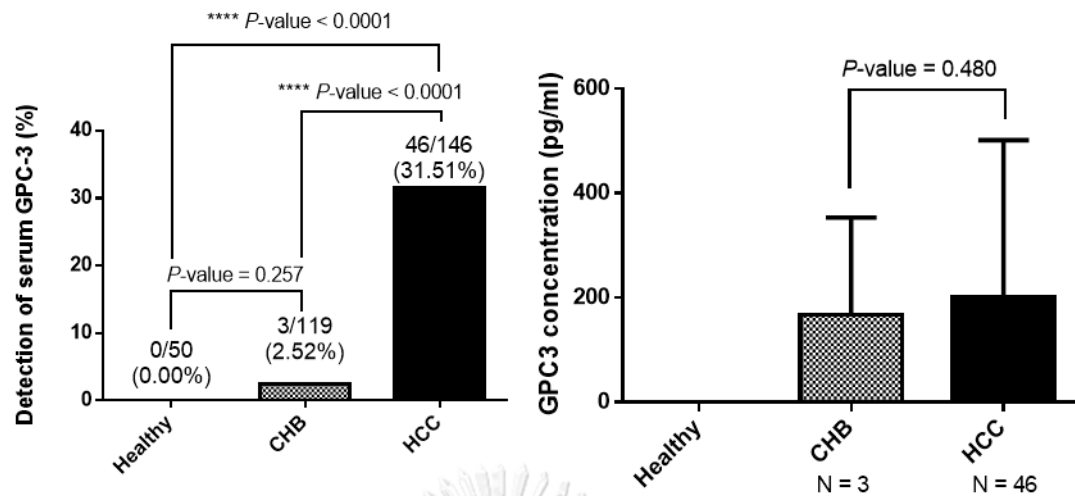
จากการศึกษาระดับโปรตีนทั้งสองชนิดภายในซีรัมของตัวอย่างสามกลุ่มด้วยเทคนิค ELISA พบว่า ปริมาณของ *SULF2* และ *GPC3* เป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งตับจะมีปริมาณ *SULF2* และ *GPC3* มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มผู้มี

สุขภาพดี ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่คาดไว้และมีลักษณะการเพิ่มขึ้นของปริมาณคล้ายกับผลของระดับ mRNA ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า SULF2 สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างเลือดจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดได้ แต่มีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ โรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และผู้มีสุขภาพดีจะมีปริมาณ SULF2 เฉลี่ย  $27.51 \pm 10.17$ ,  $18.56 \pm 5.21$  และ  $15.81 \pm 4.30$  ng/ml ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในรูปที่ 17

ในทางกลับกัน GPC3 ที่ตรวจพบได้มีความจำเพาะกับผู้ป่วยโรคมะเร็งตับค่อนข้างมาก โดยจะพบ GPC3 ในผู้ป่วยกลุ่มนี้มากที่สุด 31.51 เปอร์เซ็นต์พบในผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 2.52 เปอร์เซ็นต์และไม่สามารถพบได้ในตัวอย่างเลือดของผู้มีสุขภาพดีทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ระดับของ GPC3 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับนั้นยังมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ( $201.00 \pm 300.30$  และ  $167.40 \pm 185.90$  pg/ml ตามลำดับ)



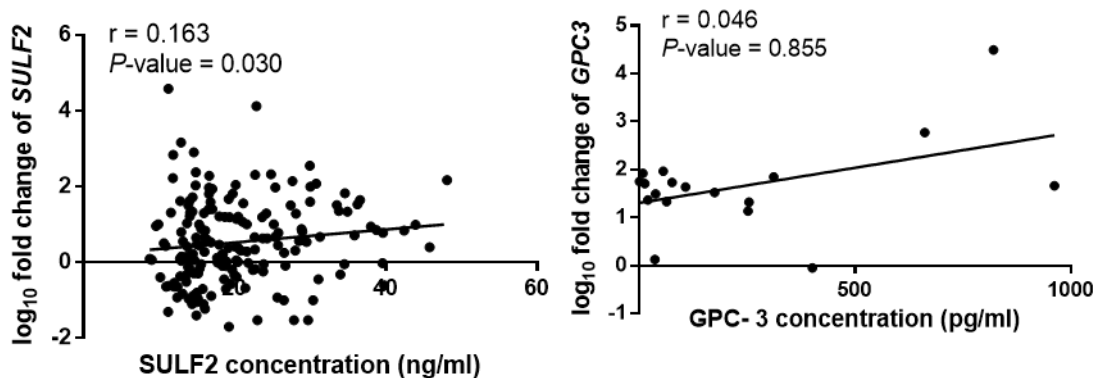
รูปที่ 17: ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน SULF2 และ GPC3 ในซีรัมของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด กราฟทางซ้ายแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่สามารถตรวจพบโปรตีนแต่ละชนิดได้ ภาพทางขวาแสดงถึงปริมาณที่ตรวจพบได้ในแต่ละกลุ่ม ซึ่งจะมีปริมาณมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี \*Chronic Hepatitis B, CHB; HCC, Hepatocellular carcinoma



รูปที่ 17 (ต่อ): ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน SULF2 และ GPC3 ในซีรัมของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด กราฟทางซ้ายแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่สามารถตรวจพบโปรตีนแต่ละชนิดได้ กราฟทางขวาแสดงถึงปริมาณที่ตรวจพบได้ในแต่ละกลุ่ม ซึ่งจะมีปริมาณมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยระดับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี \*Chronic Hepatitis B, CHB; HCC, Hepatocellular carcinoma

### 3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mRNA และโปรตีนในเลือดของ SULF2 และ GPC3

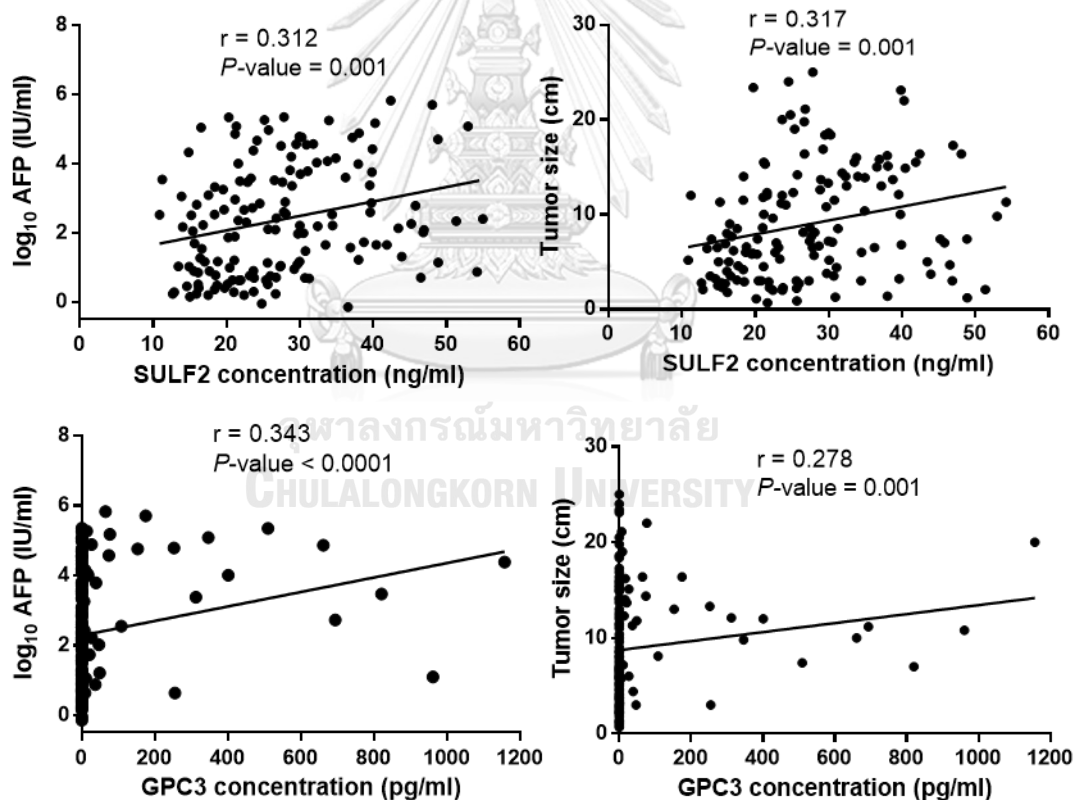
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mRNA และโปรตีนในเลือดของ SULF2 และ GPC3 พบว่ามีเพียง SULF2 เท่านั้นที่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ( $r = 0.163$ ,  $P\text{-value} = 0.03$ ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณ mRNA และโปรตีนในเลือดนั้นอาจไม่มีความเกี่ยวข้องกัน และอาจไม่สามารถใช้ปริมาณทั้งสองรูปแบบนี้เปรียบเทียบกันในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งตับได้



รูปที่ 18: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mRNA และโปรตีนในเลือดของ SULF2 และ GPC3

#### 4. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ SULF2, GPC3 และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

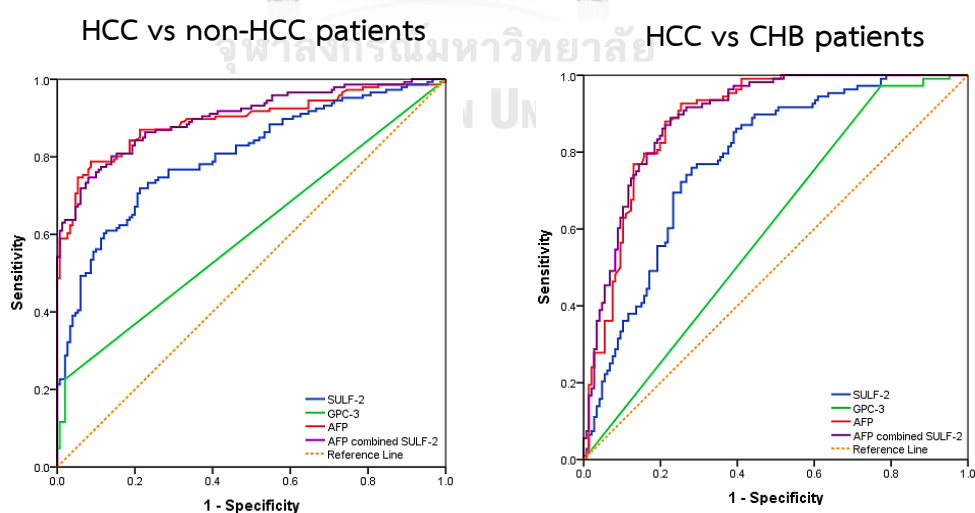
จากการศึกษาทั้งหมด มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ว่า SULF2 และ GPC3 จะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกรานได้หรือไม่ ดังนั้น การศึกษานี้จึงนำผลวิจัยที่ได้จากเลือดเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกต่างๆ ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ จากการศึกษาผลระดับ mRNA ของทั้ง *SULF2* และ *GPC3* พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ AFP ( $P$ -value = 0.961 และ 0.440 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในระดับโปรตีน พบว่า SULF2 และ GPC3 มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า AFP และขนาดของก้อนมะเร็ง ดังแสดงในภาพที่ 18 ดังนั้น จึงเลือกผลการศึกษาระดับโปรตีนของทั้งสองไปวิเคราะห์ว่า จะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกรานด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 19: ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง SULF2 และ GPC3 กับระดับ AFP และขนาดก้อนมะเร็ง

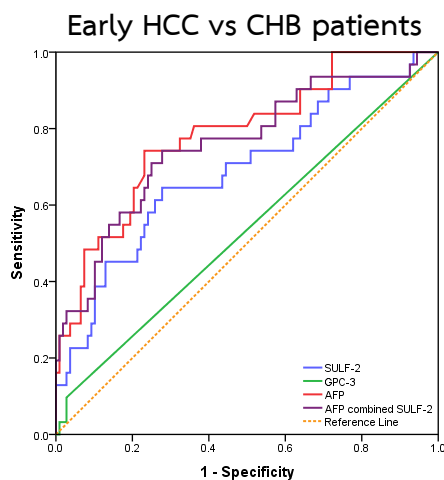
การประเมินความสามารถในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโปรตีนทั้งสองชนิดจะเปรียบเทียบค่า area under curve หรือพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์สถิติ Receiver-operating characteristics (ROC) curves ซึ่งหากพื้นที่ใต้กราฟมีค่าใกล้ 1 สามารถแปลผลได้ว่าโปรตีนที่สนใจนั้น มีประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยที่เป็นโรครอกจากกลุ่มผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคได้ดี หรือมีค่าความไว และค่าความจำเพาะต่อโรคสูง

จากผลการวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบการใช้ปริมาณของโปรตีน AFP SULF2 และ GPC3 จำแนกผู้ป่วยมะเร็งระดับออกจากกลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งระดับ และกลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งระดับระยะแรกเริ่มจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยพบว่า AFP เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ SULF2 หรือ GPC3 เพียงชนิดเดียว แต่เมื่อนำ AFP ร่วมกับ SULF2 มาพิจารณาพร้อมด้วย พบว่าการใช้ AFP ร่วมกับ SULF2 ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งระดับ จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ AFP อย่างใดก็ตาม การประเมินประสิทธิภาพของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งระดับระยะแรกเริ่มและผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่า AFP ยังเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด พื้นที่ใต้กราฟของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่างๆ และค่านัยสำคัญทางสถิติในการใช้จำแนกผู้ป่วยมะเร็งระดับออกจากกลุ่มต่างๆ ดังปรากฏในตารางที่ 14 จากการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า การใช้ AFP ร่วมกับ SULF2 มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีกว่าการใช้ AFP เพียงชนิดเดียว แต่อย่างไรก็ตาม AFP ยังใช้จำแนกผู้ป่วยมะเร็งระดับระยะแรกเริ่มได้ดีกว่า ดังนั้น โปรตีน SULF2 หรือ GPC3 อาจมีบทบาทเป็นตัวพยากรณ์โรคมะเร็งระดับและสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคมะเร็งระดับได้



รูปที่ 20: ROC curve แสดงผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นตัววินิจฉัยโรคระหว่าง

AFP, GPC3 และ SULF2



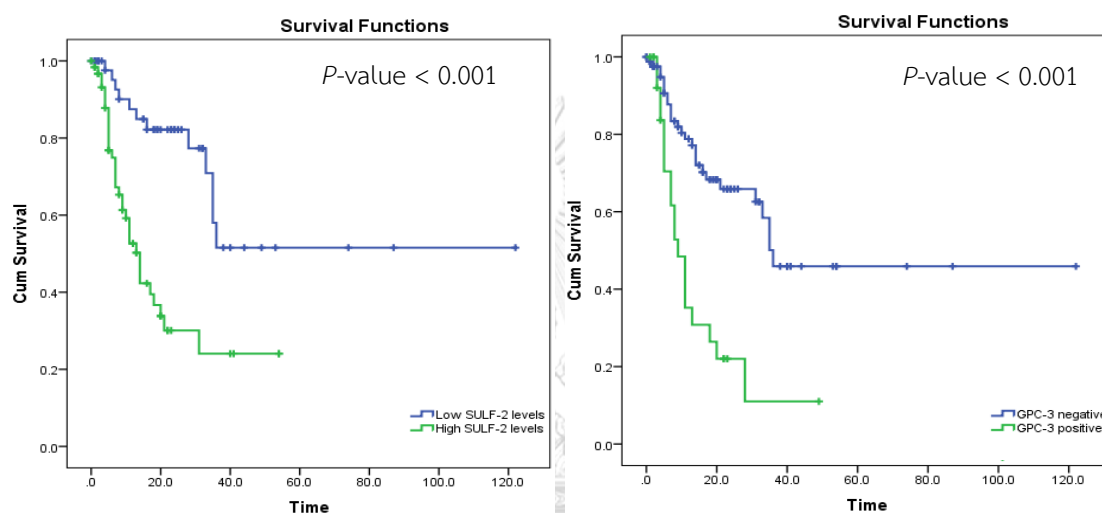
รูปที่ 20 (ต่อ): ROC curve แสดงผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นตัววินิจฉัยโรคระหว่าง AFP, GPC3 และ SULF2

ตารางที่ 14: ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากผู้ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ

Group	Parameter	SULF2	GPC3	AFP	AFP combined SULF2
HCC vs non- HCC patients	AUROC	0.802	0.603	0.894	0.902
	<i>P</i> -value	<0.0001	0.002	<0.0001	<0.0001
	95% CI	0.752-0.852	0.538-0.667	0.855-0.932	0.867-0.937
HCC vs CHB patients	AUROC	0.78	0.599	0.887	0.893
	<i>P</i> -value	<0.0001	0.007	<0.0001	<0.0001
	95% CI	0.724-0.836	0.530-0.668	0.847-0.928	0.854-0.932
Early HCC vs CHB patients	AUROC	0.689	0.534	0.784	0.76
	<i>P</i> -value	0.001	0.567	<0.0001	<0.0001
	95% CI	0.577-0.801	0.415-0.653	0.691-0.878	0.656-0.863

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีการแสดงออกของระดับโปรตีน SULF2 หรือ GPC3 สูงและกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีการแสดงออกของระดับโปรตีน SULF2 หรือ GPC3 ต่ำกับระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยหลังจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งตับ ด้วยสถิติ Kaplan-Meier (Log-rank test) โดยแบ่งกลุ่มจากค่ามัธยฐานของข้อมูล โปรตีน SULF2 จะ

แบ่งเป็นกลุ่มที่มีปริมาณสูง คือมีโปรตีน SULF2 มากกว่าหรือเท่ากับ 25 ng/ml และกลุ่มกลุ่มที่มีปริมาณต่ำ คือมีโปรตีน SULF2 น้อยกว่า 25 ng/ml โปรตีน GPC3 จะแบ่งออกเป็นกลุ่มที่พบและไม่พบ GPC3 พบว่ากลุ่มที่มีปริมาณ SULF2 สูงจะมีระยะเวลาการรอดชีวิตน้อยกว่ากลุ่มที่มีปริมาณ SULF2 ต่ำ ( $P$ -value < 0.001) ซึ่งมีทิศทางเดียวกับ GPC3 กลุ่มที่ตรวจพบ GPC3 จะมีระยะเวลาการรอดชีวิตสั้นกว่ากลุ่มที่ไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในเลือด ( $P$ -value < 0.001) ดังนั้น โปรตีนทั้งสองชนิดนี้จะเป็นตัวพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของโรคมะเร็งตับ



รูปที่ 21: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ SULF2 และ GPC3 และระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

เมื่อนำโปรตีนทั้งสองมาวิเคราะห์ Univariate และ Multivariate analysis ด้วย Cox proportional hazards model เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ต่างๆ และโปรตีนที่สนใจในการศึกษานี้ว่ามีปัจจัยใดบ้างที่สำคัญต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ ผลการวิเคราะห์ใน Multivariate analysis พบว่า GPC3 ไม่มีความสำคัญทางสถิติในการวิเคราะห์นี้ และปริมาณ SULF2 ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 25 ng/ml นั้นจะขึ้นกับขนาดของก้อนมะเร็งเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งแสดงว่า SULF2 สัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์มะเร็งรวมถึงความรุนแรงของโรคมะเร็งตับและเป็นตัวพยากรณ์ที่ไม่ดีโรคมะเร็งตับได้



ตารางที่ 15: ตาราง Univariate และ Multivariate analysis

Factor	Categories	The HCC group			
		Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
Sex	Female or Male	1.253 (0.603-2.604)	0.545	NA	NA
Age (years)	<60 or ≥60	0.640 (0.354-1.157)	0.14	NA	NA
TB (mg/dl)	<0.1 or ≥0.1	1.092 (0.611-1.954)	0.766	NA	NA
Albumin (g/dl)	<3.5 or ≥3.5	0.733 (0.398-1.348)	0.318	NA	NA
ALT (U/ml)	<48 or ≥48	2.040 (1.120-3.716)	0.022	1.431 (0.708-2.893)	0.319
AST (U/ml)	<69.5 or ≥69.5	2.976 (1.590-5.568)	0.001	1.091 (0.515-2.312)	0.820
AFP (IU/ml)	<160 or ≥160	2.383 (1.286-4.414)	0.006	1.645 (0.827-3.273)	0.156
SULF-2 (ng/ml)	<25 or ≥25	3.741 (1.910-7.331)	<0.001	3.035 (1.454-6.335)	0.003
GPC-3 (pg/ml)	Negative or Positive	3.352 (1.840-6.104)	<0.001	1.841 (0.899-3.769)	0.095
Tumor size (cm)	<7.4 or ≥ 7.4	4.818 (2.485-9.342)	<0.001	3.503 (1.530-8.023)	0.003
Child-Pugh	A or B-C	1.825 (0.897-3.713)	0.097	NA	NA
BCLC stage	0-B or C-D	3.381 (1.840-6.215)	<0.001	1.050 (0.482-2.287)	0.903
Cirrhosis	No or Yes	1.120 (0.520-2.411)	0.772	NA	NA

\*Total bilirubin, TB; Aspartate transaminase, AST; Alanine aminotransferase, ALT; Alpha-fetoprotein, AFP; Barcelona clinic liver cancer, BCLC; Not available, NA.

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

#### 1. การศึกษาภายในชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียงที่ไม่ได้เป็น

การศึกษาระดับ mRNA และโปรตีนของ SULF2 และ GPC3 ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งจากการตัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 20 รายที่ใช้ในการศึกษานี้พบว่า ระดับการแสดงออก mRNA ของยีนทั้งสองชนิดนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชิ้นเนื้อมะเร็งตับและบริเวณข้างเคียงที่ไม่เป็น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *SULF2* และ *GPC3* มีแนวโน้มจะแสดงออกสูงขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ ดังนั้น ผลการศึกษานี้จึงมีทิศทางการแสดงออกของทั้งสองยีนสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (35, 49) แม้ไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างกลุ่มชิ้นเนื้อมะเร็งตับและชิ้นเนื้อปกติข้างเคียง

นอกจากนั้น ลักษณะการ normalization ของยีนที่สนใจด้วย housekeeping gene (HKG) หรือยีนที่มีการแสดงออกเท่ากันในทุกสภาวะของเซลล์ที่ต่างชนิดกัน ก็จะทำให้ผลที่แตกต่างกัน ปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปชัดเจนถึง HKG ที่ดีที่สุดที่ควรใช้ในการวิจัย (61-63) HKG ที่นิยมใช้กันทั่วไปในงานวิจัย ได้แก่ *GAPDH*, *Beta-actin*, *Beta-globin*, *Tubulin* เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า การใช้ HKG หลายชนิดประกอบกันจะให้ผลการ normalization ที่ดีกว่าการใช้ HKG เพียงชนิดเดียว (64)

อีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้อันเนื่องมาจากการใช้ตัวอย่างเชิงคลินิก (clinical sample) เนื่องจากตัวอย่างที่ได้จากตัวอย่างแต่ละรายจะมีความหลากหลายจากสภาวะต่างๆ ภายในร่างกายที่ไม่สามารถควบคุมให้เหมือนกันทั้งหมดได้ จึงมีปัจจัยที่กระทบต่อการสรุปผลการวิจัย (confounding factor) ค่อนข้างมาก

การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน SULF2 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ 10 ราย พบว่า SULF2 มีการแสดงออกระดับโปรตีนในชิ้นเนื้อบริเวณมะเร็งตับมากกว่าบริเวณปกติข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการศึกษานี้เป็นการวิจัยแรกที่ยืนยันว่าโปรตีน SULF2 มีปริมาณมากขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งตับของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาใน *in vitro* (28) และยังสามารถอธิบายได้ว่าโปรตีน SULF2 นั้นอาจมีบทบาทสำคัญในการช่วยการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบกันทั้งระดับ mRNA และโปรตีนพบว่า มีแนวโน้มว่าจะเป็นไปในทิศทางเดียวกันโดยเฉพาะใน SULF2 สำหรับ GPC3 นั้น มีการสนใจศึกษาระดับโปรตีนในชิ้นเนื้อ

มะเร็งตับค่อนข้างมากและเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็งตับอย่างจำเพาะ (65, 66) จึงสามารถอนุมานได้ว่าโปรตีนชนิดนี้จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในชั้นเนื้อมะเร็งตับ และมีความเป็นไปได้สูงที่จะสอดคล้องกับผลการศึกษาในระดับ mRNA ในการวิจัยนี้

2. การศึกษาภายในตัวอย่างเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มผู้ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ

การศึกษาระดับ mRNA และโปรตีน *SULF2* และ *GPC3* ในเลือดนี้ เป็นประโยชน์ในการพิสูจน์ว่า *SULF2* และ *GPC3* จะสามารถเป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกรานของโรคมะเร็งตับได้หรือไม่ ซึ่งจากการศึกษาในเลือดสองส่วน คือ buffy coat และซีรัม ทำให้ได้ข้อมูลระดับการแสดงออกของ *SULF2* และ *GPC3* ในระดับ mRNA และโปรตีนตามลำดับ การศึกษานี้เป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของ *SULF2* ในเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ผลของระดับ mRNA และโปรตีนทั้งสองสอดคล้องกันทั้งหมด กล่าวคือ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีปริมาณ *SULF2* และ *GPC3* สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ ซึ่งมีปริมาณ *SULF2* และ *GPC3* รองลงมาในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี และพบในกลุ่มผู้มีสุขภาพดีน้อย

การศึกษาในระดับ mRNA ชี้ให้เห็นว่า แม้จะมีปริมาณ *SULF2* และ *GPC3* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด แต่มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจพบยีนทั้งสองภายในเลือดส่วนนี้ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เกิดการย่อยสลายของ mRNA ขึ้น เนื่องจาก mRNA เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความเสถียรค่อนข้างต่ำ ดังนั้น mRNA ภายในเลือดอาจจะเป็นดัชนีบ่งชี้ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพน้อยกว่า microRNA (miRNA) หรือโปรตีน เนื่องจากความไม่เสถียรของโมเลกุลดังกล่าวข้างต้น

ระดับโปรตีน *SULF2* และ *GPC3* ภายในซีรัมจะมีทิศทางปริมาณที่สอดคล้องกับในระดับ mRNA จากผลการศึกษาจะพบได้ว่า *SULF2* นั้นสามารถตรวจพบได้ในซีรัมของตัวอย่างทุกรายที่ใช้ในการศึกษา และแสดงปริมาณสูงสุดในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ระดับโปรตีน *GPC3* ไม่สามารถตรวจพบได้ทุกราย แต่จะพบได้มากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แสดงให้เห็นว่า *GPC3* นั้นมีความจำเพาะกับโรคมะเร็งตับสูงมาก สามารถพบ *GPC3* ในกลุ่มผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นมะเร็งตับเพียง 3 รายจาก 169 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.78 แต่จะมีความไวค่อนข้างต่ำ คือพบ *GPC3* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติด

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี 46 รายจาก 146 ราย คิดเป็นร้อยละ 31.51 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบการแสดงออกของ GPC3 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับร้อยละ 53 แต่ไม่พบการแสดงออกในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับหรือมะเร็งชนิดอื่นเลย (55)

จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ในเชิงตำแหน่งที่อยู่และสภาพการทำงานในธรรมชาติของโปรตีนทั้งสองชนิด SULF2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิด extracellular enzyme ดังนั้น การตรวจพบได้ในซีรัมครบทุกรายจึงสอดคล้องกับกลไกการทำงานของ SULF2 และเอนไซม์ชนิดนี้จะมีการแสดงออกและทำงานภายในเซลล์ชนิดอื่นทั่วไปที่มีการแบ่งตัวปกติ ดังนั้น จึงเป็นข้อสันนิษฐานว่า SULF2 สามารถตรวจพบได้ในกลุ่มผู้มีสุขภาพดีทุกรายรวมถึงกลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

สำหรับ GPC3 โปรตีนนี้จะสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และวิถีส่งสัญญาณได้ก็ต่อเมื่อแสดงออกอยู่บนผิวเซลล์ (67) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่า จะตรวจพบซีรัมได้น้อยกว่าในชิ้นเนื้อ เนื่องจากเซลล์มะเร็งตับต้องการการแบ่งเซลล์ที่มากและรวดเร็วกว่าเซลล์ทั่วไป ดังนั้นจึงต้องการการแสดงออกของ GPC3 ในรูปของ surface protein มากกว่า secretory protein จึงตรวจพบ GPC3 ในซีรัมได้ไม่ครบทุกราย โดยเฉพาะในกลุ่มผู้มีสุขภาพดี เพราะ GPC3 นั้นมีลักษณะการแสดงออกเป็น HCC specific manner แต่ทั้งนี้ก็ยังมีโอกาสพบ false positive ในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับอื่นๆ ได้

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง mRNA และโปรตีนของ SULF2 และ GPC3 ในเลือดพบความสัมพันธ์ระหว่าง mRNA และโปรตีนของ SULF2 แต่ไม่พบใน GPC3 แสดงให้เห็นว่าอาจไม่มีความสัมพันธ์ในเลือดระหว่างปริมาณ mRNA และโปรตีน จึงอาจใช้ปริมาณเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยและอาจไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้

ตารางที่ 16: สรุปผลการศึกษาก่อนหน้าของ SULF2 และ GPC3 ในมะเร็งตับ

Authors	Year	Target	Type of sample	Technique	Result
Lai <i>et al.</i> (35)	2008	SULF2	Paired HCC and adjacent tissues	Microarray	upregulation in HCC tissues
Lai <i>et al.</i> (28)	2010	SULF2	HCC cell lines	RT-PCR	upregulation in HCC cell lines
Lai <i>et al.</i> (68)	2010	SULF2	Paired HCC and adjacent tissues	WB & IHC	upregulation in HCC tissues
Yang <i>et al.</i> (69)	2011	SULF2	Liver tissues	Microarray	upregulation in HCC tissues
Cupurro <i>et al.</i> (48)	2003	GPC3	Liver tissues	IHC	upregulation in HCC tissues
		GPC3	Serum	ELISA	increase in HCC patients
Suzuki <i>et al.</i> (47)	2010	GPC3	Liver tissues	DNA chips	upregulation in HCC tissues
		GPC3	Liver tissues	IHC	upregulation in HCC tissues
		GPC3	Serum	ELISA	increase in HCC patients
Tangkijvanich <i>et al.</i> (55)	2010	GPC3	Serum	ELISA	increase in HCC patients
Yao <i>et al.</i> (49)	2013	GPC3	Peripheral blood	RT-PCR	increase in HCC patients
Wang <i>et al.</i> (53)	2016	GPC3	Paired HCC and adjacent tissues	WB & IHC	upregulation in HCC tissues

### 3. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ GPC3, SULF2 ในเลือดและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง SULF2 และ GPC3 ในเลือดและลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับพบว่า ปริมาณโปรตีนของทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์เชิงบวกและมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณ AFP และขนาดของก้อนเนื้อมะเร็ง แต่ระดับใน mRNA ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจปริมาณ SULF2 และ GPC3 ในระดับโปรตีนในซีรัมในการประเมินประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับด้วยโปรตีนสองชนิดนี้ เนื่องจาก SULF2 และ GPC3 มีบทบาทในการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณที่ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตมากขึ้น ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่ามีสาเหตุที่ทำให้มีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งตับ และสัมพันธ์กับค่า AFP

การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Receiver operating characteristic curve หรือ ROC curve แสดงให้เห็นว่า SULF2 และ GPC3 ยังมีประสิทธิภาพดีกว่า AFP ในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งระดับออกจากผู้ไม่เป็นมะเร็งระดับ เนื่องจากมีค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ AFP วินิจฉัยโรคมะเร็งระดับร่วมกับ SULF2 พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้ AFP หรือ SULF2 เพียงชนิดเดียว แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยโรคมะเร็งระดับระยะแรกเริ่มจากกลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีพบว่า AFP จะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีที่สุดในการการจำแนกผู้ป่วยสองกลุ่มดังกล่าว นอกจากนั้นปริมาณของโปรตีนทั้งสองชนิดในเลือดในระดับที่สูงเกินค่ามัธยฐาน คือ 25 ng/ml และ 0 pg/ml ของ SULF2 และ GPC3 ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค คือมีระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวิเคราะห์โดยกำจัดปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งระดับด้วย Univariate/ Multivariate analysis พบว่า GPC3 นั้นไม่สามารถเป็นตัวพยากรณ์โรคแบบ independent prognostic marker ได้ แต่ SULF2 นั้นสามารถเป็นตัวพยากรณ์โรคที่ไม่ได้ร่วมกับขนาดของก้อนมะเร็งได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า SULF2 และ GPC3 อาจมีความสำคัญในการดำเนินการของโรคมะเร็งระดับได้

อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยและกลุ่มคนที่มีสุขภาพดีมีจำนวนและปริมาณจำกัด และอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งระดับที่พบได้สูงในเพศชาย ทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถทำให้เพศ และอายุของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ และจากสาเหตุนี้ ทำให้จำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งระดับระยะเริ่มต้นและระยะรุนแรง จำนวนผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีอาการตับแข็งร่วมด้วยและไม่มีอาการตับแข็งร่วมด้วย มีจำนวนแตกต่างกัน ดังนั้น ความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจึงเป็นข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึงในการศึกษาวิจัยโดยใช้ตัวอย่างทางคลินิก

ผลการวิจัยจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสรุปได้ว่า SULF2 และ GPC3 ในซีรัมสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งระดับได้ และการใช้ AFP ร่วมกับ SULF2 ทำให้สามารถวินิจฉัยโรคมะเร็งระดับได้แม่นยำขึ้น นอกจากนี้การศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่า SULF2 และ GPC3 อาจเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการส่งผลกระทบต่อดำเนินโรคไปสู่ระยะรุนแรงได้

### รายการอ้างอิง

1. Zhu RX, Seto W-K, Lai C-L, Yuen M-F. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region. *Gut and Liver*. 2016;10(3):332-9.
2. Chonprasertsuk S, Vilaichone R-k. Epidemiology and treatment of hepatocellular carcinoma in Thailand. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2017;47(4):294-7.
3. Wanich N VR, Chotivitayatarakorn P, Siramolpiwat S. High Prevalence of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Infection in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(6).
4. Prongvitaya T JS, Suwannathada S, Homchampa P, Prongvitaya S. Incidence of hepatitis B and C virus in new cases of hepatocellular carcinoma patients attending at National cancer institute. *J Med Tech Phy Ther*. 2012;24(3):264-71.
5. Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie Biologie*. 2010;58(4):273-77.
6. Liang TJ. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2009;49(5 Suppl):S13-21.
7. Wang D-Y, An S-H, Liu L, Bai S-S, Wu K-X, Zhu R, et al. Hepatitis B virus X protein influences enrichment profiles of H3K9me3 on promoter regions in human hepatoma cell lines. *Oncotarget*. 2016;7(51):84883-92.
8. Tian Y, Xiao X, Gong X, Peng F, Xu Y, Jiang Y, et al. HBx promotes cell proliferation by disturbing the cross-talk between miR-181a and PTEN. 2017;7:40089.
9. Wang M-D, Wu H, Huang S, Zhang H-L, Qin C-J, Zhao L-H, et al. HBx regulates fatty acid oxidation to promote hepatocellular carcinoma survival during metabolic stress. *Oncotarget*. 2016;7(6):6711-26.
10. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015;479-480(Supplement C):672-86.

11. Alliance TWH. Eliminating Viral Hepatitis by 2030 2017 [Available from: <http://www.worldhepatitisalliance.org/eliminating-viral-hepatitis-2030isalliance.org/eliminating-viral-hepatitis-2030>].
12. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.
13. Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Liver Cancer*. 2012;1(3-4):144-58.
14. Forner A, Gilabert M, Bruix J, Raoul J-L. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014;11:525-35.
15. Bodzin AS, Busuttill RW. Hepatocellular carcinoma: Advances in diagnosis, management, and long term outcome. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(9):1157-67.
16. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 2005;7(1):26-34.
17. Lou J, Zhang L, Lv S, Zhang C, Jiang S. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Biomarkers in Cancer*. 2017;9:1-9.
18. Chen DS, Sung JL, Sheu JC, Lai MY, How SW, Hsu HC, et al. Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 1984;86(6):1404-9.
19. Zhao YJ, Ju Q, Li GC. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(4):593-8.
20. Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(8):1175-81.
21. Cai WX, Zheng H, Ye QL. Combined measurement of serum tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 1998;4(2):181-2.
22. Lim TS, Kim DY, Han KH, Kim HS, Shin SH, Jung KS, et al. Combined use of AFP, PIVKA-II, and AFP-L3 as tumor markers enhances diagnostic accuracy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(3):344-53.
23. Guo YL, Zhang YL, Zhu JQ. Prognostic value of serum alpha-fetoprotein in ovarian yolk sac tumors: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(1):125-32.



24. Choi JY, Jung SW, Kim HY, Kim M, Kim Y, Kim DG, et al. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2013;19(3):339-46.
25. Negahdary M, Eftekhari A, Mirzaei S, Basirizadeh M, Ghobadzadeh S. Tumor Markers and Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Biology and Today's World*. 2015;4(6):124-31.
26. Hanson SR, Best MD, Wong C-H. Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angewandte Chemie International Edition*. 2004;43(43):5736-63.
27. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*. 2004;131(24):6009-21.
28. Lai JP, Oseini AM, Moser CD, Yu C, Elswa SF, Hu C, et al. The oncogenic effect of sulfatase 2 in human hepatocellular carcinoma is mediated in part by glypican 3-dependent Wnt activation. *Hepatology*. 2010;52(5):1680-9.
29. Lamanna William C, Baldwin Rebecca J, Padva M, Kalus I, ten Dam G, van Kuppevelt Toin H, et al. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete in vivo activities and functional co-operativity. *Biochemical Journal*. 2006;400(Pt 1):63-73.
30. Kalus I, Salmen B, Viebahn C, von Figura K, Schmitz D, D'Hooge R, et al. Differential involvement of the extracellular 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 in brain development and neuronal and behavioural plasticity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009;13(11-12):4505-21.
31. Lai J-P, Chien J, Strome SE, Staub J, Montoya DP, Greene EL, et al. HSulf-1 modulates HGF-mediated tumor cell invasion and signaling in head and neck squamous carcinoma. *Oncogene*. 2004;23:1439-47.
32. Li J, Kleeff J, Abiatari I, Kayed H, Giese NA, Felix K, et al. Enhanced levels of HSulf-1 interfere with heparin-binding growth factor signaling in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2005;4:14.
33. Mahmoud SA, Ibrahim MM, Musa AH, Huang Y, Zhang J, Wang J, et al. Sulfatase-1 knockdown promotes in vitro and in vivo aggressive behavior of murine hepatocarcinoma Hca-P cells through up-regulation of mesothelin. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2017:1-11.

34. Mahmoud S, Ibrahim M, Hago A, Huang Y, Wei Y, Zhang J, et al. Overexpression of sulfatase-1 in murine hepatocarcinoma Hca-F cell line downregulates mesothelin and leads to reduction in lymphatic metastasis, both in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(46):75052-63.
35. Lai JP, Sandhu DS, Yu C, Han T, Moser CD, Jackson KK, et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(4):1211-22.
36. Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Bistrup A, Lum DH, Egeblad M, Boudreau N, et al. Sulf-2, a Proangiogenic Heparan Sulfate Endosulfatase, Is Upregulated in Breast Cancer. *Neoplasia (New York, NY)*. 2005;7(11):1001-10.
37. Lui NS, van Zante A, Rosen SD, Jablons DM, Lemjabbar-Alaoui H. SULF2 expression by immunohistochemistry and overall survival in oesophageal cancer: a cohort study. *BMJ Open*. 2012;2(6):e001624.
38. Alhasan SF, Haugk B, Ogle LF, Beale GS, Long A, Burt AD, et al. Sulfatase-2: a prognostic biomarker and candidate therapeutic target in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*. 2016;115(7):797-804.
39. Lui NS, Yang Y-W, van Zante A, Buchanan P, Jablons DM, Lemjabbar-Alaoui H. SULF2 Expression Is a Potential Diagnostic and Prognostic Marker in Lung Cancer. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0148911.
40. Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biology*. 2008;9(5):224.1-6.
41. Song HH, Filmus J. The role of glypicans in mammalian development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2002;1573(3):241-6.
42. Haruyama Y, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):275-83.
43. Iglesias BV, Centeno G, Pascuccelli H, Ward F, Peters MG, Filmus J, et al. Expression pattern of glypican-3 (GPC3) during human embryonic and fetal development. *Histol Histopathol*. 2008;23(11):1333-40.
44. Capurro M, Martin T, Shi W, Filmus J. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 7):1565-75.

45. Gao W, Ho M. The role of glypican-3 in regulating Wnt in hepatocellular carcinomas. *Cancer Rep.* 2011;1(1):14-9.
46. Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res.* 1997;57(22):5179-84.
47. Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, et al. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30(12):5055-61.
48. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3 : a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2003;125(1):89-97.
49. Yao M, Yao DF, Bian YZ, Wu W, Yan XD, Yu DD, et al. Values of circulating GPC-3 mRNA and alpha-fetoprotein in detecting patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013;12(2):171-9.
50. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(1):16-25.
51. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, et al. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64(7):2418-23.
52. Liu H, Li P, Zhai Y, Qu CF, Zhang LJ, Tan YF, et al. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010;16(35):4410-5.
53. Wang L, Pan L, Yao M, Cai Y, Dong Z, Yao D. Expression of oncofetal antigen glypican-3 associates significantly with poor prognosis in HBV-related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(27):42150-8.
54. Kaseb AO, Hassan M, Lacin S, Abdel-Wahab R, Amin HM, Shalaby A, et al. Evaluating clinical and prognostic implications of Glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(43):69916-26.
55. Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisedopas N, Pothacharoen P, et al. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating

hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010;25(1):129-37.

56. Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol*. 2009;34(3):649-56.

57. Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Sagliocco F, et al. A functional screening identifies five microRNAs controlling glypican-3: role of miR-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(1):195-204.

58. Miao HL, Lei CJ, Qiu ZD, Liu ZK, Li R, Bao ST, et al. MicroRNA-520c-3p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through induction of cell apoptosis by targeting glypican-3. *Hepatol Res*. 2014;44(3):338-48.

59. Ruan J, Zheng H, Fu W, Zhao P, Su N, Luo R. Increased Expression of Cathepsin L: A Novel Independent Prognostic Marker of Worse Outcome in Hepatocellular Carcinoma Patients. *PLOS ONE*. 2014;9(11):e112136.

60. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005;5(2):209-19.

61. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. 2004;37(1):112-9.

62. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation*. 2004;85:154-9.

63. Janik ME, Szwed S, Grzmil P, Kaczmarek R, Czerwiński M, Hoja-Łukowicz D. RT-qPCR analysis of human melanoma progression-related genes – A novel workflow for selection and validation of candidate reference genes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2018;101:12-8.

64. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002;3(7):research0034.1-11.

65. Yu M, Luo H, Fan M, Wu X, Shi B, Di S, et al. Development of GPC3-Specific Chimeric Antigen Receptor-Engineered Natural Killer Cells for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Therapy*. 2018;26(2):366-78.
66. Feng M, Ho M. Glypican-3 antibodies: A new therapeutic target for liver cancer. *FEBS Letters*. 2013;588(2):377-82.
67. Saad A, Liet B, Joucla G, Santarelli X, Charpentier J, Claverol S, et al. Role of Glycanation and Convertase Maturation of Soluble Glypican-3 in Inhibiting Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biochemistry*. 2018;57(7):1201-11.
68. Lai J-P, Sandhu Dalbir S, Yu C, Moser Catherine D, Hu C, Shire Abdirashid M, et al. Sulfatase 2 protects hepatocellular carcinoma cells against apoptosis induced by the PI3K inhibitor LY294002 and ERK and JNK kinase inhibitors. *Liver International*. 2010;30(10):1522-8.
69. Yang JD, Sun Z, Hu C, Lai J, Dove R, Nakamura I, et al. Sulfatase 1 and Sulfatase 2 in Hepatocellular Carcinoma: Associated Signaling Pathways, Tumor Phenotypes, and Survival. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011;50(2):122-35.



### การเตรียม Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 100 ml

- Yeast extract            0.5 g
- Tryptone                    1.0 g
- NaCl                         0.5 g

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave รอให้สารละลายอุ่นจึงเติมยาปฏิชีวนะชนิด 100 mg/ml Ampicillin ปริมาตร 100 ul

### การเตรียม Luria-Bertani (LB) agar plate ปริมาตร 100 ml

- Yeast extract            0.5 g
- Tryptone                    1.0 g
- NaCl                         0.5 g
- Agar                         1.5 g

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave รอให้สารละลายอุ่นจึงเติมยาปฏิชีวนะชนิด 100 mg/ml Ampicillin ปริมาตร 100 ul และเทใส่จานเพาะเชื้อโดยระวังให้ผิวหน้าเรียบเสมอกัน

### การเตรียม SOC medium ปริมาตร 100 ml

- Yeast extract            0.5 g
- Tryptone                    1.0 g
- NaCl                         0.5 g

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave และเติม 2M Mg<sup>2+</sup> และ 2M glucose อย่างละ 100 ul ก่อนใช้

### การเตรียม 5X Tris Borate buffer (TBE buffer) ปริมาตร 100 ml

- Tris-base                    54 g
- Boric acid                    27.5 g
- EDTA (pH 8.0)            20 ml

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1,000 ml เจือจางด้วย Distilled water ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X ก่อนใช้

**การเตรียม 2% (w/v) Agarose gel ปริมาตร 100 ml**

- Agarose powder            2 g
- 1X TBE buffer            100 ml

**การเตรียม Tris buffered saline (TBS)**

- Tris-base            121 g
- NaCl            1,462 g

ปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 7.5 จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1,000 ml

**การเตรียม Towbin buffer**

- Tris            3.03 g
- Glycine            14.4 g
- SDS            1 g
- Methanol            200 ml

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1,000 ml

**การเตรียม 10X SDS-PAGE running buffer**

- Tris-base            30.3 g
- Glycine            144 g
- SDS            10 g

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1,000 ml

**การเตรียม 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8**

- Tris-base            27.23 g

ปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 8.8 จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 150 ml

**การเตรียม 0.05 M Tris-HCl, pH 6.8**

- Tris-base            6 g

ปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 6.8 จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml



**การเตรียม 12% Resolving gel (ต่อ SDS-PAGE gel จำนวน 1 แผ่น)**

- 40% Acrylamide/Bis-acrylamide 2.250 ml
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 0.938 ml
- 10% SDS 0.075 ml
- Distilled water 4.181 ml
- 10% Ammonium persulfate 0.056 ml
- TEMED 0.004 ml

**การเตรียม 3.75% Stacking gel (ต่อ SDS-PAGE gel จำนวน 1 แผ่น)**

- 40% Acrylamide/Bis-acrylamide 0.154 ml
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 4.000 ml
- 10% SDS 0.016 ml
- Distilled water 1.000 ml
- 10% Ammonium persulfate 0.020 ml
- TEMED 0.002 ml

**การเตรียม Destaining solution I**

- Methanol 200 ml
- Acetic acid 35 ml

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 500 ml

**การเตรียม Destaining solution II**

- Methanol 25 ml
- Acetic acid 35 ml

จากนั้นเติม Distilled water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 500 ml

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล

(ภาษาไทย) นางสาวพิมพ์ทอง ทวีทองคำ

(ภาษาอังกฤษ) Miss Pimthong Thaweethongkam

วันเกิด

17 มิถุนายน พ.ศ. 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน

49 ซอยลาดพร้าว 111 ถนนลาดพร้าว แขวงคลองจั่น เขตบางกะปิ กทม. 10240

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ปี 2559 ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ผลงานวิจัย

ปี 2560 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในหัวข้อ The diagnostic and prognostic roles of serum sulfatase-2 in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma ในงาน The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology 2018 (BMB 2018) ณ โรงแรมระยองรีสอร์ท จังหวัดระยอง