บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

2.1 เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ AMC-K46 และ AC-F2

จากตัวอย่างน้ำคร่ำที่ส่งตรวจ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์มนุษย์และสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สามารถสร้างเป็นเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ได้ 2 เชื้อสาย ได้แก่ AMC-K46 มีโครโมโซมเป็น XY และ AC-F2 มีโครโมโซมเป็นแบบ XX (Wisedkaew, 2004; Dasa, 2005) โดยเซลล์ทั้งสองเชื้อสายนี้เกิดจากการกลายพันธุ์แบบเกิดขึ้นเอง จึงส่งผลให้เซลล์มีลักษณะการแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัด หรือเรียกว่า continuous cell lines นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Sangngam, 2005) พบว่า เซลล์เชื้อสายทั้งสองยังมีความหลากหลายของชนิดของเซลล์ (heterogeneity) โดยมีเซลล์อย่างน้อย 3 แบบปะปนกันอยู่ และจำนวนของเซลล์แต่ละแบบก็จะเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละรุ่น (passage) แต่ส่วนใหญ่แล้วทั้ง AMC-K46 และ AC-F2 จะประกอบไปด้วยเซลล์ 3 ชนิดคือ เซลล์รูปร่างคล้ายไฟโบรบลาส (fibroblast like cells) เซลล์รูปร่างคล้ายเซลล์บุผิว (epithelial like cells) และเซลล์ยักษ์ (giant cells) (Sangngam, 2007) โดยเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์บุผิวนั้นจะพบได้มากกว่าร้อยละ 95 ของการเพาะเลี้ยงในทุกๆ รุ่น เมื่อเซลล์ลงเกาะกับพื้นผิววัสดุเลี้ยง พบว่าเซลล์มีการเรียงตัวแบบชั้นเดียว (monolayer) และมีการแสดงออกของลักษณะ contact inhibition คือ เซลล์มีการหยุดการแบ่งตัวเมื่อเซลล์อยู่ชิดกัน เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมทั้ง AMC-K46, AC-F2 และ sub-clone ของ AC-F2 พบว่ามีค่ากลาง (modal number) ของจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 52-67 แท่ง และเมื่อตรวจสอบความผันแปรของโครโมโซมด้วยวิธี spectral karyotype analysis (SKY) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นแบบ aneuploidy และมี translocation ที่มีแบบแผนไม่แน่นอน ซึ่งลักษณะทั้งสองนี้จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละรุ่นของเซลล์ นอกจากนี้ผลจากการตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยการย้อมด้วย protein marker ที่จำเพาะ ได้แก่ alkaline phosphatase, Oct-4, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 และ TRA-1-81 พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งใน AMC-K46 และ AC-F2 (Sangngam, 2007)

2.2 เซลล์น้ำคร่ำเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิด

มีรายงานหลายฉบับกล่าวว่า ภายในน้ำคร่ำของมนุษย์นั้น จะประกอบไปด้วยเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิดและได้มีการศึกษาคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และเซลล์ตั้งต้นในเซลล์-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำคร่ำกันอย่างกว้างขวาง เช่น เซลล์บุผิวที่พบในน้ำคร่ำนั้นสามารถถูกชักนำให้กลายเป็นเซลล์ของระบบประสาทได้หลายชนิด ได้แก่ neurons, astrocytes และ oligodendrocytes โดยเซลล์ทั้ง 3 แบบนี้ยังสามารถนำไปปลูกถ่ายทดแทนให้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคระบบประสาทผิดปกติได้ด้วย (Kakishita *et al*., 2003) ในปี ค.ศ. 2004 Fauza ได้รายงานว่า ภายในน้ำคร่ำนั้นประกอบไปด้วยเซลล์เยื่อบุถุงน้ำคร่ำ (amnion epithelial cells) เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ค้ำจุน (mesenchymal stem cells) และเซลล์ที่คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic like stem cells) โดยเซลล์แต่ละชนิดนั้นสามารถตรวจสอบได้ด้วย marker ที่จำเพาะ ได้แก่ Oct-4, stem cell factor, vimentin, alkaline phosphatase, CD34, CD105 และ cKit ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Copi และคณะได้ทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำของมนุษย์และสัตว์ฟันแทะ เมื่อนำเซลล์ที่ได้มาตรวจสอบพบว่ามีการแสดงออกของ protein marker ที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย จากนั้นจึงชักนำ (induce) ให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการใช้ retrovirus พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่พบได้ในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญของตัวอ่อน เช่น เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ประสาทและเซลล์ตับ จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากน้ำคร่ำนั้นมีความสามารถในการเจริญที่หลากหลาย (multipotency) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elias ในปี ค.ศ. 2007 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากน้ำคร่ำนั้นสามารถพัฒนาให้กลายเป็นเซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กระดูก เซลล์ประสาทและเซลล์อื่นๆ ได้ในห้องทดลอง

จากข้อมูลข้างต้นอาจสรุปได้ว่าเซลล์น้ำคร่ำสามารถถูกชักนำให้กลายไปเป็นเซลล์อื่นๆ ได้หลายชนิด และเซลล์เหล่านี้อาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ เช่น วิศวกรรมเนื้อเยื่อ การปลูกถ่ายเซลล์และการรักษาด้วยยีน (Kakishita, 2003; Tsai *et al.,* 2005; Delo *et al.,* 2006) นอกจากนี้ยังคาดว่าการรักษาด้วยเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดนั้นอาจแทนที่การรักษาด้วยยา จึงได้มีการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากน้ำคร่ำกันอย่างแพร่หลายเพราะมีข้อจำกัดน้อยทางด้านจริยธรรม (ethical concern) ที่เกี่ยวข้องกับการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาใช้ (Kim *et al.,* 2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์น้ำคร่ำ

เซลล์น้ำคร่ำประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิดที่มีต้นกำเนิด มาจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ซึ่งตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา มีการศึกษาความหลากหลายของเซลล์น้ำคร่ำมนุษย์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญทั้ง 3 ชั้น ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญชั้นนอก ชั้นกลางและชั้นใน (Hoenh and Salk, 1982; Gosden, 1983) ถึงแม้ว่าเซลล์น้ำคร่ำจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ ในด้านการตรวจสอบหาความผิดปกติของโครโมโซมในทารกก่อนคลอดกันอย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาถึงต้นกำเนิดของเซลล์นั้นยังไม่มีความชัดเจน (Prusa and Hengstschläger, 2002) จนกระทั่งเมื่อไม่นาน

มานี้ ได้มีการรายงานว่าภายในน้ำคร่ำนั้นประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิดซึ่งเป็นเซลล์ที่มาจากส่วนของตัวอ่อนและส่วนนอกร่างกายของตัวอ่อน (extra-embryonic) ซึ่งคาดว่าเซลล์เหล่านี้หลุดออกมาระหว่างกระบวนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนไปเป็นทารก (Prusa *et al.,* 2003; Fauza, 2004; Tsai *et al.,* 2004) และเนื่องจากเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเซลล์ที่มีความหลากหลายของชนิดของเซลล์ (Sangngam, 2007) ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับต้นกำเนิดและแหล่งที่มาของเซลล์จึงมีความสำคัญต่อการนำเซลล์ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรืองานวิจัยอื่นๆ ได้ในอนาคต

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค immunocytochemistry เพื่อตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้แอนติบอดีในการตรวจสอบโปรตีนหรือแอนติเจน (antigen) ของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ตัวจับสัญญาณ (receptors) บนเยื่อหุ้มเซลล์และภายในเซลล์ (Burry, 2000) ถึงแม้ว่า protein marker ที่ใช้ในการตรวจสอบเนื้อเยื่อเจริญนั้นจะมีอยู่จำนวนมาก (ตาราง 2.1) แต่ในงานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์ด้วย protein marker ที่จำเพาะเพียง 3 ชนิด ได้แก่ cytokeratin AE1&AE3, vimentin และ AFP โดยที่ cytokeratin นั้น จะจำเพาะต่อเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิวและเซลล์ที่เป็นเซลล์เชื้อสายที่มาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นกลาง (mesothelial linage) (Brouty-Boýe *et al.,* 1992; Freshney, 2004) ส่วน vimentin นั้นจะจำเพาะต่อเซลล์ที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอก และ AFP จะจำเพาะต่อเซลล์ที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นใน (Turnpenny *et al.,* 2003; Li *et al.,* 2005; Strulovici *et al.,* 2007)

2.4 การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

การวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง สามารถตรวจสอบได้จากความสมดุลระหว่างการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis โดยทั่วไปแล้ว การวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีการที่ง่ายและน่าเชื่อถือมากที่สุด คือ การย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย marker ที่เหมาะสมและนับปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติด protein marker นั้น (Jenner *et al.,* 1996) ในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค immunocytochemistry เช่นเดียวกับการตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์ โดยได้เลือก protein marker 2 ชนิด เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ได้แก่ cyclin D1 และ Ki-67 โดย cyclin D1 มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์ในช่วงระยะ G1 ถึงระยะ S ในวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) (รูป 2.1) (Alao, 2007) และยังมีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิดอีกด้วย จากงานวิจัยพบว่าในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งหลอดลม มะเร็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งปอด มักจะมีระดับการแสดงออกของยีน *cyclin D1* ที่มากกว่าปกติ (overexpression) (Gillett *et al.,* 1996; Musgrove, 2006; Yamamoto *et al.,* 2006)

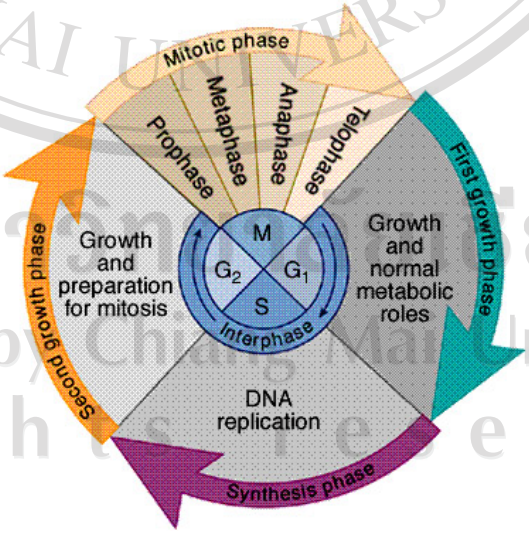
ตาราง 2.1 รายชื่อ markers ที่ใช้ตรวจสอบแหล่งที่มาหรือต้นกำเนิดของเซลล์ที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี PCR และ immunocytochemistry (ดัดแปลงมาจาก Strulovici *et al.,* 2007)

เนื้อเยื่อเจริญ	ชนิดของเซลล์	Markers
เนื้อเยื่อชั้นนอก	เซลล์ประสาท	- brain glutamic acid decarboxylase - keratin - microtubule-associated protein2 (MAP2) - nestin - neural cell adhesion molecule (NCAM) - neurofilament (NF-H) - neurogenin - neuron-specific enolase - paired box gene 6 (Pax-6) - sex-determining region Y (SRY)-box 1 (Sox-1) - synaptophysin - vimentin - β-tubulin III (Tuj1)
เนื้อเยื่อชั้นกลาง	เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์กล้ามเนื้อโครงร่าง	- bone morphogenic protein 4 (BMP4) - cardiac specific troponin - cardio-atrial naturietic factor (ANF) - desmin - enolase - myoglobin - smooth muscle actin (SMA) - α-Cardiac actin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.1 (ต่อ) รายชื่อ markers ที่ใช้ตรวจสอบแหล่งที่มาหรือต้นกำเนิดของเซลล์ที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี PCR และ immunocytochemistry (ดัดแปลงมาจาก Strulovici *et al.*, 2007)

เนื้อเยื่อเจริญ	ชนิดของเซลล์	Markers
เนื้อเยื่อชั้นใน	เซลล์ตับ เซลล์ตับอ่อน	- Albumin - glucagon - insulin - Nk1 transcription factor related locus 1 (Nkx 6.1) - paired box gene 4 (Pax 4) - pancreatic amylase - somatostatin - α -1 anti-trypsin - α -fetoprotein



รูป 2.1 แสดงวัฏจักรของเซลล์

(ที่มา Krupnov and De Ranieri, 2008)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วน Ki-67 นั้นถือได้ว่าเป็น protein marker ที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดอัตราการแบ่งเซลล์ (proliferation index) อย่างกว้างขวางในการตรวจทางคลินิก โดย protein marker ชนิดนี้จะจำเพาะต่อทุกๆ เซลล์ที่มีการแบ่งตัว ยกเว้นเซลล์ที่อยู่ในช่วงระยะ G0 ในวัฏจักรของเซลล์ ดังนั้น Ki-67 จึงจัดว่าเป็น protein marker ที่มีศักยภาพในการตรวจสอบเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวได้ดี (Gimotty *et al.,* 2005) และยังเป็นตัวชี้วัดที่ดีในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิด (Akedo *et al.,* 2001)

2.5 การตรวจสอบความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์มะเร็งในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ

ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 นั้น เป็นเซลล์ที่มีลักษณะบางประการคล้ายเซลล์มะเร็ง เช่น การมีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติและมีการแบ่งตัวได้ไม่หยุด แต่เนื่องจากเซลล์ทั้งสองนี้เป็นเซลล์น้ำคร่ำจึงอาจจะยังคงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดเอาไว้ ซึ่งจากงานวิจัยของ Prusa และคณะในปี ค.ศ. 2003 พบว่าเซลล์ที่ได้มาจากน้ำคร่ำของมนุษย์นั้นมีการแสดงออกของยีน *Oct-4* ซึ่งเป็นยีนที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อนและยังพบว่ามีการแสดงออกของยีนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด เช่น ยีน *stem cell factor, alkaline phosphatase, CD34* และ *CD105* (Fauza, 2004) เมื่อนำเซลล์น้ำคร่ำมาเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสจะมีการแสดงออกของยีน *Oct-4* และ *Rex1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ (pluripotency) และเมื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะ (selective media) พบว่าเซลล์น้ำคร่ำสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทได้และมีการแสดงออกของยีน *Gap-43, NF-M, tau* และ *synaptosin* ซึ่งเป็นยีนที่พบในเซลล์ประสาท (Woodbury *et al.,* 2006) จากการแยกเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสจากน้ำคร่ำ พบว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะคล้ายกับ mesenchynal stem cells ที่ได้จากไขกระดูก (bone marrow) และเมื่อนำมาศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี reverse transcriptase PCR พบการแสดงออกของยีน *Rex1, SCF, GATA-4, vimentin, CK18, FGF-5* และ *HLA ABC* (Kim *et al.,* 2007) นอกจากเซลล์น้ำคร่ำจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อนแล้ว ยังพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดของตัวเต็มวัยด้วย (Copi *et al.,* 2007) เช่นยีน *EN-1, c-RET, PTX3* และ *NURR1* ที่พบในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำที่ถูกเพาะเลี้ยงจนถึง 36 รุ่น ซึ่งยีนทั้งหมดเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทของสมองส่วนกลาง (midbrain dopaminergic neurons) (McLaughlin *et al.,* 2006)

จะเห็นได้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในเซลล์น้ำคร่ำ แต่ไม่มีงานวิจัยใดที่กล่าวถึงเซลล์น้ำคร่ำที่ผิดปกติเลย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่มีการศึกษาในเซลล์น้ำคร่ำของมนุษย์ที่เกิดจากการกลายพันธ์แบบเกิดเอง โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์มะเร็ง โดยจะทำการเปรียบเทียบยีนทั้งสองกลุ่มในเซลล์น้ำคร่ำที่ผิดปกติและเซลล์น้ำคร่ำปกติ และใช้ยีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *(GAPDH)* เป็นยีนควบคุมหรือ housekeeping geneในงานวิจัยนี้

2.5.1 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

จากการศึกษาของ Wachtel และคณะในปี ค.ศ. 1969 พบว่าภายในน้ำคร่ำนั้นจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของทารก เช่น เซลล์บุผิวบริเวณผิวหนัง ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจและทางเดินปัสสาวะ จากข้อมูลที่ได้จึงสันนิษฐานได้ว่า เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบได้ในน้ำคร่ำน่าจะเป็นเซลล์ที่มาจากบริเวณผิวหนังของทารก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาในกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนัง (skin stem cell related genes) ได้แก่ integrin alpha 6 (*ITGA6*) และ integrin beta 1 (*ITGB1*) โดยพบว่ามีการแสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์หลายชนิดที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัยและเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและยังถือว่ายีนทั้งสองนี้เป็น gene marker ของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนัง (Ivanova *et al.,* 2002; Ramalho-Santos *et al.,* 2002) นอกจากนี้ ยังพบว่าในเซลล์ต้นกำเนิดมีการแสดงออกของ *ITGA6* ในระดับสูง และมีระดับการแสดงออกของ *ITGB1* สูงเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ transcient-amplifying cells (TA cells) การแสดงออกร่วมกัน (co-expression) ของ *ITGA6* และ *ITGB1* ยังควบคุมการสร้างโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะ (adhesion molecules) และส่งสัญญาณ (signal transduction) ในเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังชั้นนอก (epidermal stem cells) เซลล์ keratinocytes ของมนุษย์และเซลล์รากขน (bulge cells) (Barthel and Aberdam, 2005)

2.5.2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นมะเร็ง

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic alteration) รวมทั้งการทำงานที่ผิดปกติของ oncogenes, tumor suppressor genes และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกในการเกิดเป็นมะเร็ง งานวิจัยนี้ได้เลือกตัวแทนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งผิวหนังมาทำการศึกษา เพราะสันนิษฐานว่าเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในน้ำคร่ำ น่าจะเป็นเซลล์ที่หลุดออกมาจากส่วนผิวหนังของทารก ซึ่งเมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปอาจมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ โดยจะทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 3 ชนิด ได้แก่ homo sapiens v-ski sarcoma viral oncogene homolog *(SKI)*, transforming growth factor beta 1 (*TGF-β1*) และ human telomerase reverse transcriptase *(hTERT)* โดย *SKI* และ *TGF-β1* นั้นจะเกี่ยวข้องกับการเกิดเป็นมะเร็งบริเวณผิวหนังและจะทำงานตรงข้ามกัน ซึ่ง *SKI* จะทำหน้าที่ในการส่งเสริมและกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง ส่วน *TGF-β1* จะช่วยในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่จะป้องกันไม่ให้เกิดเป็นมะเร็ง (Chen *et al.,* 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2.1 *SKI*

ยีน *SKI* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของ oncogene หรือยีนทำให้เกิดเป็นมะเร็ง ซึ่งพบได้ในมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะมะเร็งผิวหนัง (melanomas) (Kaghad *et al.,* 1997; Colmenares *et al.,* 2001) ยีน *SKI* ที่พบในมนุษย์นั้นมีลำดับเบสคล้ายกับยีน *v-ski* ที่พบใน Sloan Kettering virus ซึ่งเกิดจากกระบวนการส่งถ่ายยีน (transformation) (Nomura *et al.,* 1989) นอกจากนี้ ระดับการแสดงออกของ *SKI* ที่สูงขึ้นสามารถสร้างโมเลกุลที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ *TGF-β1* ได้ (Reed *et al.,* 2001) ดังนั้นกระบวนการยับยั้งที่เกิดจากการทำงานของยีน *SKI* จึงสามารถควบคุมการแบ่งเซลล์และการเจริญของเซลล์ได้ (Chen *et al.,* 2003)

2.5.2.2 *TGF- β1*

ยีน *TGF-β1* มีหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์และการทำงานของ TGF-β signaling pathway ในกระบวนการเจริญของก้อนมะเร็ง (Fukuchi *et al.,* 2004) โดยพบว่า *TGF-β1* ชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์หลายชนิด เช่นเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด melanomas เซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือด (hematopoietic stem cells) และเซลล์มะเร็งเยื่อบุหลอดอาหาร เป็นต้น (Francis *et al.,* 2000; Chen *et al.,* 2003; Fukuchi *et al.,* 2004)

2.5.2.3 *hTERT*

ยีน *hTERT* ทำหน้าที่ถอดรหัสได้เป็นส่วนของ catalytic protein ที่มีส่วนของเอนไซม์ telomerase reverse transcriptase อยู่ด้วย ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว เอนไซม์เทโลเมอเรส (telomerase) จะถูกกดการทำงานในเซลล์ปกติและพบว่าจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ไม่หยุด (immortal cells) (Avilion *et al.,* 1996; Cong *et al.,* 2002) จากงานวิจัยในปัจจุบันทำให้ทราบว่า เกือบร้อยละ 90 ของเซลล์มะเร็ง จะตรวจพบเอนไซม์เทโลเมอเรส (Kim *et al.,* 1994) นอกจากนี้ *hTERT* ยังสามารถทำงานร่วมกับ oncogene และยับยั้งการทำงานของ tumor suppressor gene ในกระบวนการชักนำให้เซลล์บุผิวและเซลล์ไฟโบรบลาสเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งที่พบได้ในมนุษย์ (Hahn *et al.,* 1999)

2.5.3 ยีนควบคุม

ยีนควบคุมหรือ housekeeping gene คือยีนที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละเซลล์ โดยจะต้องเป็นยีนที่มีการแสดงออกในทุกเซลล์หรือทุกเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา และระดับการแสดงออกของยีนควบคุมต้องคงที่หรือมีความผันแปรน้อยในแต่ละตัวอย่างที่นำมาศึกษาหรือแม้แต่ในสภาวะการทดลองต่างๆ (Thellin *et al.,* 1999; Dheda *et al.,* 2004) ยีนที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับงานวิจัยนี้คือยีน *GAPDH* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ที่พบได้ในเซลล์ทุกชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และมีรายงานว่า *GAPDH* เป็นยีนควบคุมที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR) และการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี ΔC_T method (Silver *et al.,* 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved