บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบเซลล์น้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 ด้วยวิธี immunocytochemistry

หลังจากนำเซลล์ไปปั่นตกตะกอนจนได้เป็น cytospin slide แล้วจึงนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีหรือ protein marker ที่จำเพาะเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของแอนติเจนของเซลล์เชื้อสาย เมื่อแอนติบอดีเข้าทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแล้ว จะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้นในบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา โดยความเข้ม (intensity) ของการติดสีสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระดับ (grades) ได้แก่ อ่อน (weak), ปานกลาง (moderate) และเข้ม (strong) นอกจากนี้สามารถให้คะแนน (score) จากจำนวนเซลล์ที่ติดสีได้อีก 4 ระดับ ได้แก่ 5%, 5 ถึง 25%, 26 ถึง 50% และ >50% (Miranda *et al.,* 2000) การให้คะแนนและการประเมินค่าความเข้มของสีนั้นจะวิเคราะห์โดยผู้เชี่ยวชาญ ส่วนเซลล์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี หรือให้ผลเป็นลบจะติดสีน้ำเงินของ hematoxilin

4.1.1 การตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์

เซลล์ที่นำมาตรวจสอบได้แก่ เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2, เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ ซึ่งจะถูกย้อมด้วย cytokeratin AE1&AE3, vimentin และ AFP

4.1.1.1 Cytokeratin AE1&AE3

เป็น protein marker ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิวและเซลล์ที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นกลาง ซึ่งสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อเจริญทั้ง 3 ชั้น เนื่องจาก marker ชนิดนี้จะมีความจำเพาะต่อ cytoskeleton ที่อยู่ภายใน cytoplasm ของเซลล์ ดังนั้นการติดสีจึงเกิดขึ้นที่บริเวณ cytoplasm จากการนำเซลล์มาย้อมพบว่าทั้ง AMC-K46 และ AC-F2 ให้ผลเป็นลบ หมายความว่าเซลล์ทั้งสองเชื้อสายนี้ไม่พบเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิวและเนื้อเยื่อเจริญชั้นกลางปะปนอยู่ ส่วนเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนปกติ และที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติให้ผลเป็นบวก โดยมีค่าความเข้มของการติดสีอยู่ในระดับปานกลางและจำนวนของเซลล์ที่ติดสีมีประมาณร้อยละ 26-50 (ตาราง 4.1) ซึ่งจะเกิดเป็นสีน้ำตาลในบริเวณ cytoplasm (รูป 4.1) แสดงว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุผิวและเนื้อเยื่อเจริญชั้นกลางปะปนอยู่

4.1.1.2 Vimentin

เป็น protein marker ที่จำเพาะต่อเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอก โดยการติดสีจะเกิดใน cytoplasm เช่นเดียวกับ cytokeratin ผลจากการทดลองพบว่าในเซลล์เชื้อสาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

AMC-K46, AC-F2 เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ มีจำนวนเซลล์มากกว่าร้อยละ 50 ที่ให้ผลเป็นบวกและมีระดับการติดสีเข้มมาก เมื่อย้อมด้วย vimentin ซึ่งจะเกิดเป็นสีน้ำตาลใน cytoplasm (รูป 4.2) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเซลล์ทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดสอบนั้นมีเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นนอกปะปนอยู่มากกว่าร้อยละ 50 (ตาราง 4.1, รูป 4.2)

4.1.1.3 AFP

เป็น protein marker ที่จำเพาะต่อเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นใน ซึ่งการติดสีจะเกิดขึ้นบนผิวเซลล์ โดยเซลล์ที่ให้ผลเป็นบวกจะพบสีน้ำตาลบริเวณขอบผิวเซลล์ ผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์มากกว่าร้อยละ 50 ของเซลล์ทุกชนิดที่นำมาตรวจสอบ ให้ผลเป็นบวก โดยเซลล์เชื้อสาย AMC-K46, AC-F2 และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติจะมีความเข้มของการติดสีในระดับปานกลาง ส่วนในเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกตินั้นจะติดสีในระดับเข้มมาก (รูป 4.3) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าในเซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญชั้นในปะปนอยู่ (ตาราง 4.1, รูป 4.3)

4.1.2 การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์

อัตราการแบ่งตัวของเซลล์บ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทั่วไปแล้วในเซลล์มะเร็งจะมีอัตราการแบ่งตัวสูงกว่าเซลล์ปกติ และอัตราการแบ่งตัวที่แตกต่างกันนี้เอง จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการแยกระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์มะเร็ง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา protein marker 2 ชนิด ได้แก่ cyclin D1 และ Ki-67 โดยทำการศึกษาในเซลล์เชื้อสาย AMC-K46, AC-F2 เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (กลุ่มควบคุมของเซลล์ปกติ) ทั้งนี้ ได้ใช้เซลล์มะเร็งผิวหนัง C32 เป็น positive control ต่อคุณลักษณะความเป็นมะเร็ง

4.1.2.1 Cyclin D1

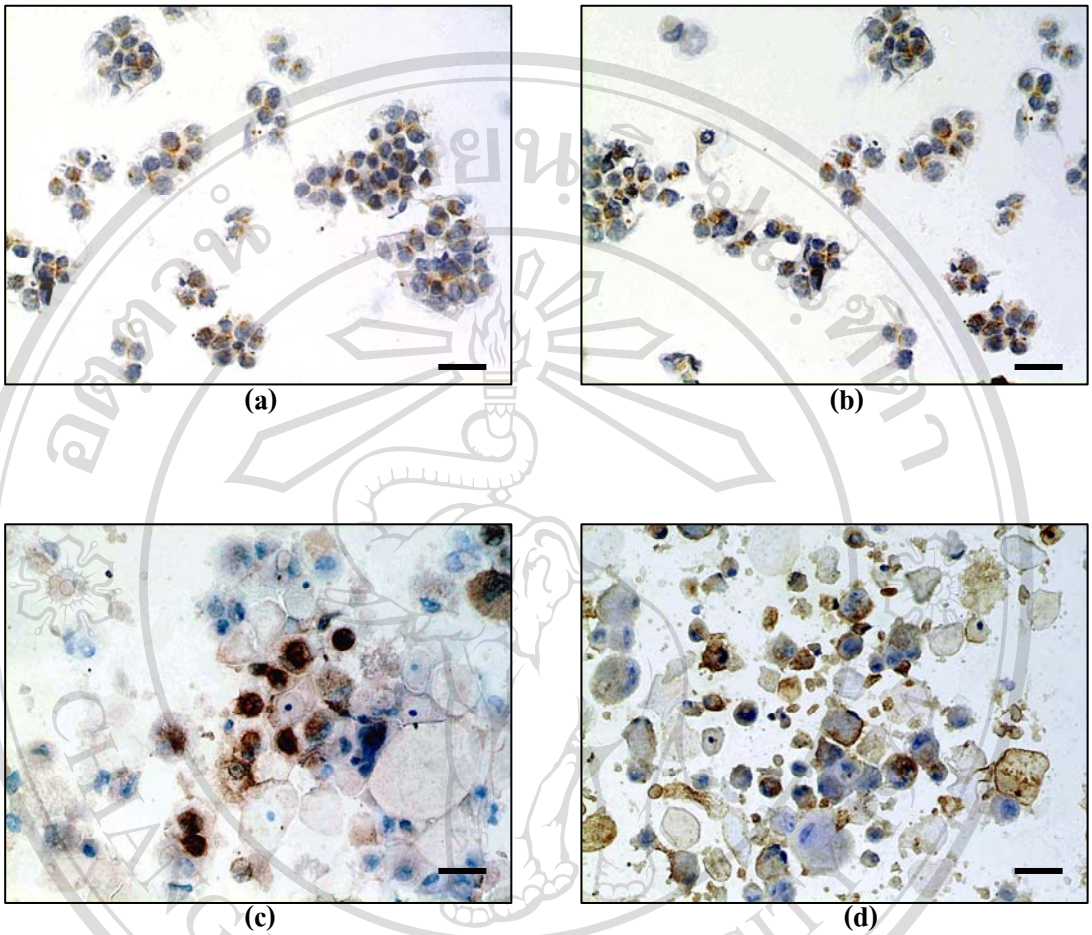
Cyclin D1 เป็น checkpoint protein ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงมีการแสดงออกอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว โดยเซลล์ที่ให้ผลเป็นบวกจะติดสีน้ำตาลของ cyclin D1 ภายในนิวเคลียส ผลจากการทดลองย้อมเซลล์ทั้ง 5 ชนิดที่กล่าวไว้ข้างต้น พบว่ามีเพียงเซลล์มะเร็งผิวหนัง C32 เท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก โดยมีความความเข้มของสีมากและจำนวนเซลล์ที่ติดสีมากกว่าร้อยละ 50 (ตาราง 4.2, รูป 4.4) แสดงว่า เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 มีอัตราการแบ่งตัวสูงกว่าเซลล์เชื้อสาย AMC-K46, AC-F2 เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4.1 ผลการทดลองย้อมเซลล์ด้วย protein marker ที่จำเพาะต่อต้นกำเนิดของเซลล์โดยเกณฑ์การให้คะแนนเป็นไปตามหลักการตัดสินของ Miranda และคณะในปี ค.ศ. 2000

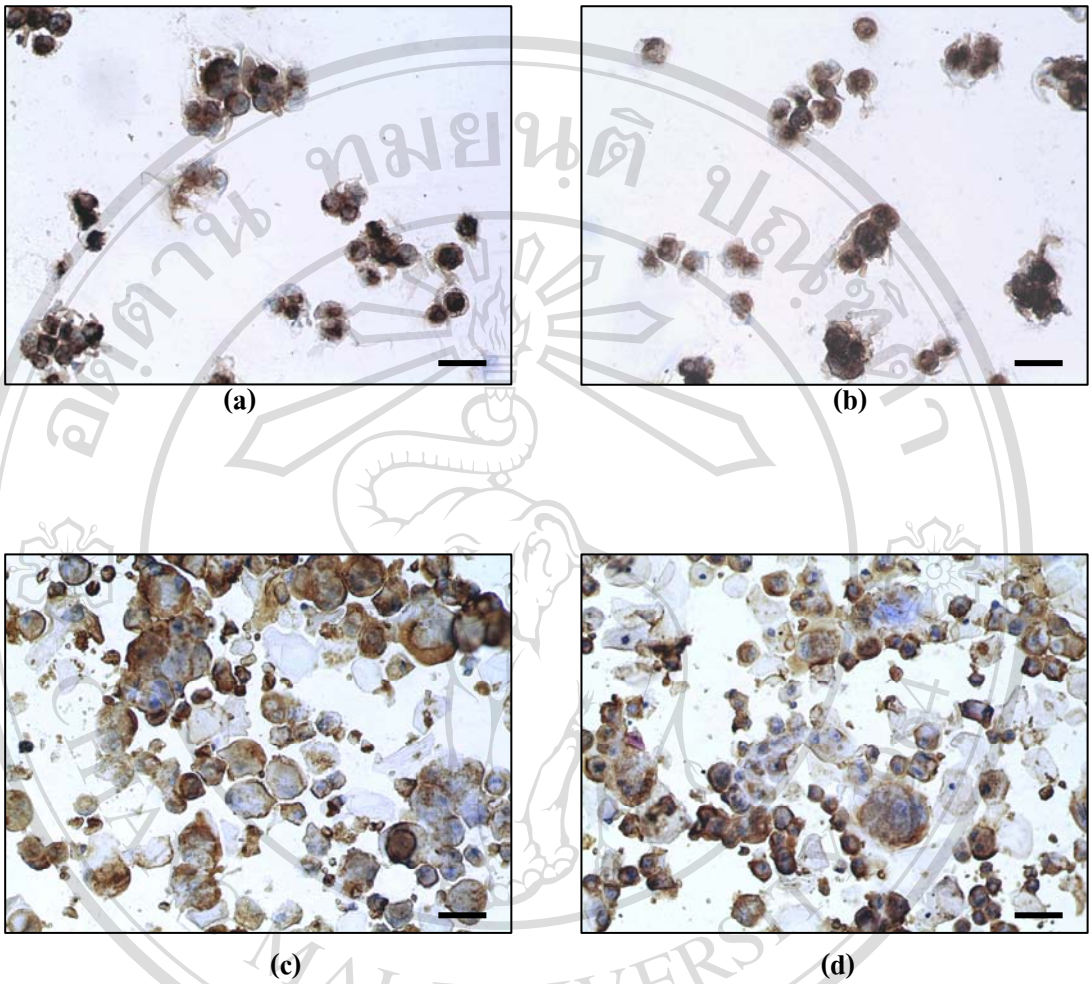
ชนิดของ marker	เซลล์เชื้อสาย	ผล	ระดับความเข้มของสี	จำนวนเซลล์ที่ติดสี	รูป
Cytokeratin	AMC-K46	-	-	-	4.1
AE1&AE3	AC-F2	-	-	-	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ	+	ปานกลาง	26-50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ	+	ปานกลาง	26-50%	
Vimentin	AMC-K46	+	เข้ม	>50%	4.2
	AC-F2	+	เข้ม	>50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ	+	เข้ม	>50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ	+	เข้ม	>50%	
AFP	AMC-K46	+	ปานกลาง	>50%	4.3
	AC-F2	+	ปานกลาง	>50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ	+	เข้ม	>50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ	+	ปานกลาง	>50%	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



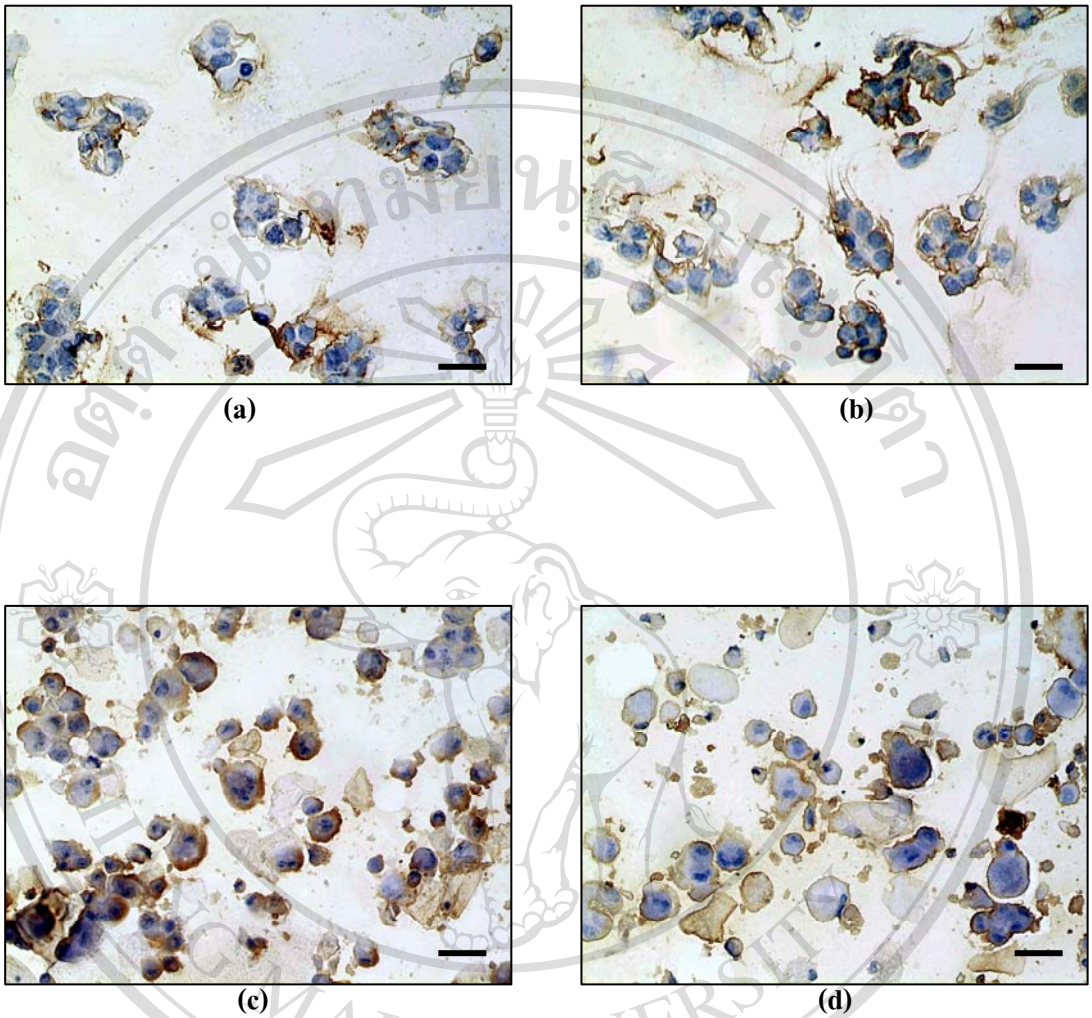
รูป 4.1 ผลจากการย้อมด้วย cytokeratin AE1&AE3 พบว่าเซลล์เชื้อสาย AMC-K46 (a) และ AC-F2 (b) ให้ผลเป็บลบ ส่วนเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (c) และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (d) ให้ผลเป็นบวกโดยการติดสีน้ำตาลเข้ม (scale bar = 100 µm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 4.2 ผลจากการย้อมด้วย vimentin พบว่าเซลล์เชื้อสาย AMC-K46 (a), AC-F2 (b), เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (c) และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (d) ให้ผลเป็นบวกโดยการติดสีน้ำตาลเข้ม (scale bar = 100 μm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 4.3 ผลจากการย้อมด้วย AFP พบว่าเซลล์ทั้งหมดให้ผลเป็นบวกโดยติดสีน้ำตาลเข้ม, เซลล์เชื้อสาย AMC-K46 (a), AC-F2 (b) เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (c) และ เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (d) (scale bar = 100 μm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

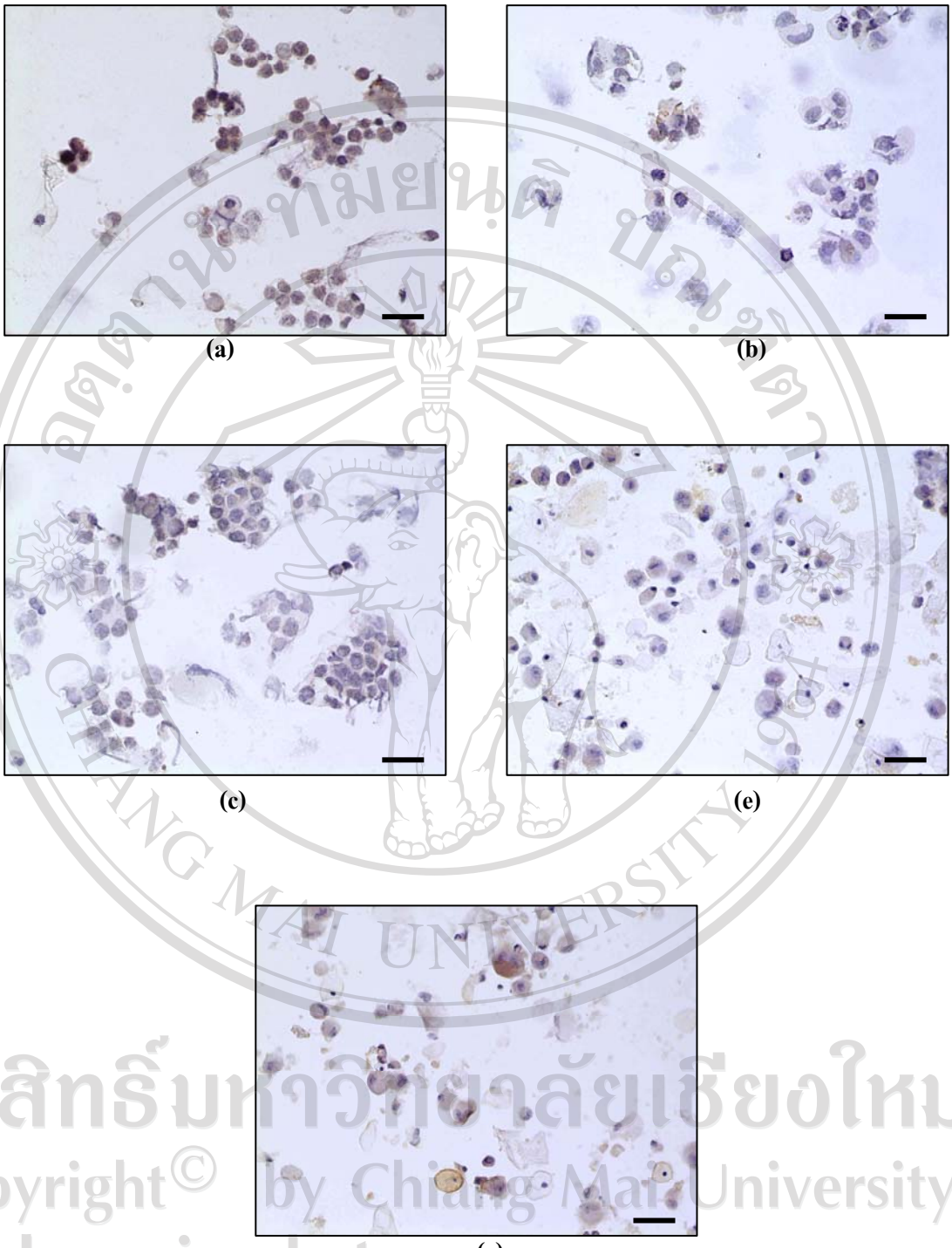
4.1.2.2 Ki-67

Ki-67 เป็น protein marker ที่ใช้ในการตรวจทางคลินิกเพื่อระบุค่า proliferation index ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะมีการแสดงออกในนิวเคลียสของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเช่นเดียวกันกับ cyclin D1 และเซลล์ที่ให้ผลเป็นบวกต่อ Ki-67 จะติดสีน้ำตาลของภายในนิวเคลียส จากการทดลองพบว่าเซลล์ทั้ง 5 ชนิด ให้ผลเป็นบวกต่อ Ki-67 (ตาราง 4.2, รูป 4.5) โดยเซลล์เชื้อสาย AMC-K46, AC-F2 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 มีค่าความเข้มของสีอยู่ในระดับเข้มมาก และจำนวนเซลล์ที่ติดสีเท่ากับร้อยละ 26-50 เท่ากัน ในขณะที่เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกตินั้นมีค่าความเข้มของสีในระดับปานกลางและจำนวนเซลล์ที่ติดสีเท่ากับร้อยละ 26-50 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีอัตราการแบ่งตัวใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็ง

ตาราง 4.2 ผลการทดลองย้อมเซลล์ด้วย protein marker เพื่อตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเกณฑ์การให้คะแนนเป็นไปตามหลักการตัดสินของ Miranda และคณะในปี ค.ศ. 2000

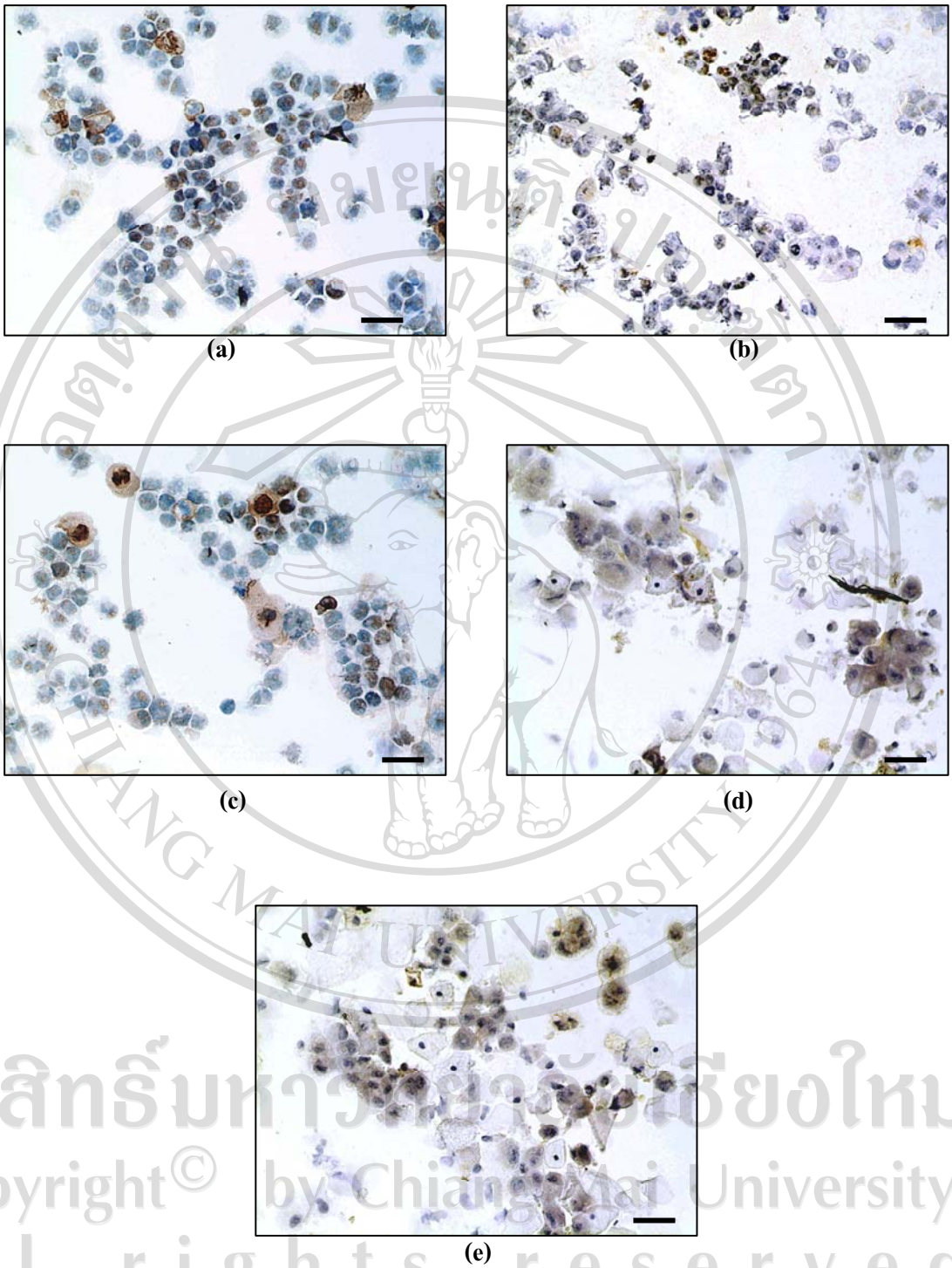
ชนิดของ markers	เซลล์เชื้อสาย	ผล	ระดับความเข้มของสี	จำนวนเซลล์ที่ติดสี	รูป
cyclin D1	C32	+	เข้ม	>50%	4.4
	AMC-K46	-	-		
	AC-F2	-	-		
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ	-	-		
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ	-	-		
Ki-67	C32	+	เข้ม	26-50%	4.5
	AMC-K46	+	เข้ม	26-50%	
	AC-F2	+	เข้ม	26-50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ	+	ปานกลาง	26-50%	
	เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ	+	ปานกลาง	26-50%	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 4.4 ผลจากการย้อมด้วย cyclin D1 พบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 ให้ผลเป็นบวกติดสีน้ำตาลเข้ม (a) ในขณะที่เซลล์เชื้อสาย AMC-K46 (b), AC-F2 (c), เซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (d) และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (e) ให้ผลเป็นลบ (scale bar = 100 µm)



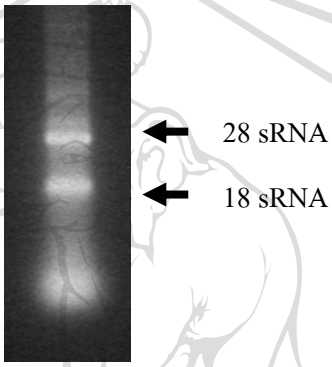
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 4.5 ผลจากการย้อมด้วย Ki-67 พบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (a) เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 (b) และ AC-F2 (c) ให้ผลเป็นบวกโดยติดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (d) และเซลล์น้ำคร่ำที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ (e) ติดสีในระดับปานกลาง (scale bar = 100 μm)

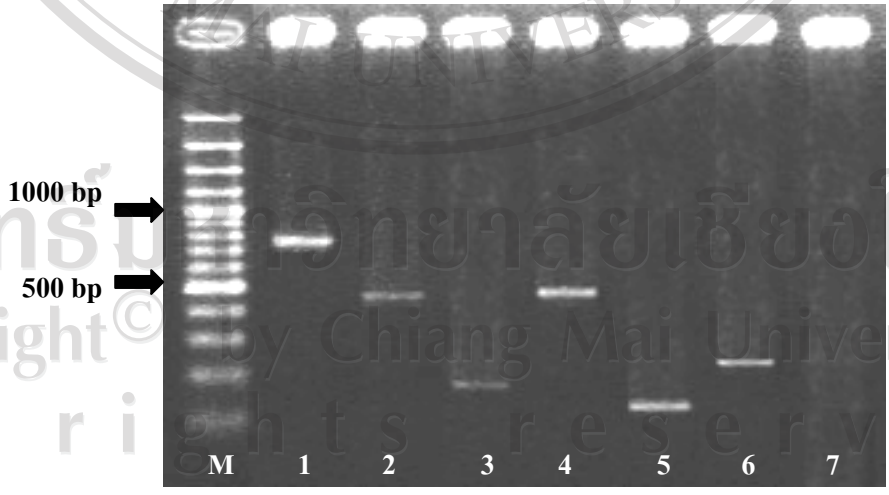
4.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

4.2.1 Semi-quantitaitve reverse transcriptase PCR

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (รูป 4.6) จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นซีดีเอ็นเอเพื่อนำมาศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 2 กลุ่มคือ stem cell related genes ได้แก่ *ITGA6* และ *ITGB1* และกลุ่มของ cancer related genes ได้แก่ *SKI, TGF-β1* และ *hTERT* ภายหลังการทำปฏิกิริยา PCR แล้วจึงตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis (รูป 4.7) โดยขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ (primer) ของแต่ละยีนแสดงในตาราง 4.3



รูป 4.6 การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis



รูป 4.7 ขนาดของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์แต่ละคู่เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus, Fermentas, USA) โดยหมายเลข 1 คือ *GAPDH*, 2 คือ *ITGA6*, 3 คือ *ITGB1*, 4 คือ *SKI*, 5 คือ *TGF-β1*, 6 คือ *hTERT* และ 7 คือ negative control

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4.3 ขนาดของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ของยีนแต่ละคู่

ไพรเมอร์	ขนาดของผลผลิต PCR (bp)
ITGA6	420
ITGB1	153
SKI	450
TGF-β1	101
hTERT	214
GAPDH	750

4.2.2 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม Quantity One V. 4.4.1

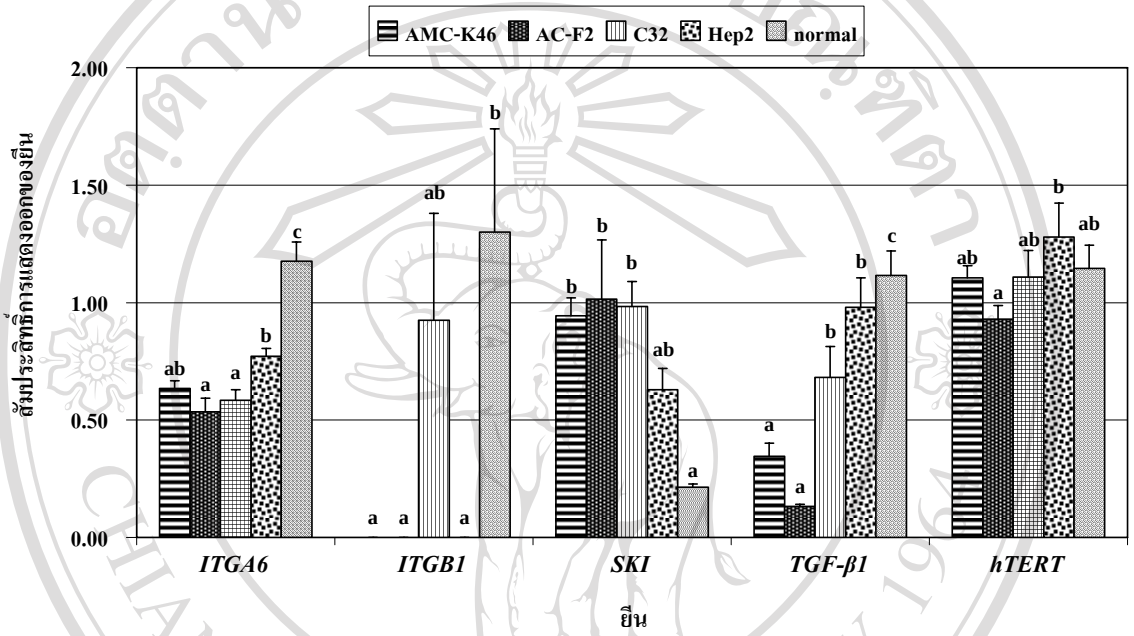
เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม Quantiy One V.4.4.1 โดยวัดจากความเข้มของแถบสว่างในพื้นที่ของแถบดีเอ็นเอหรือผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นทั้งหมด (มีหน่วยเป็น INT*mm^2) ซึ่งตัวบ่งบอกปริมาณนี้จะเรียกว่าค่า volume จากนั้นจึงหาระดับการแสดงออกของยีนโดยการนำค่า volume ของยีนที่ศึกษาหารด้วยค่า volume ของยีน *GAPDH* ในแต่ละเซลล์ (ภาคผนวก ง) จะได้เป็นสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน (รูป 4.8)

จากแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน (รูป 4.8) ด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย volume ของแต่ละยีนกับค่าเฉลี่ย volume ของยีน *GAPDH* พบว่า

- เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.63 ± 0.03, 0, 0.94 ± 0.08, 0.35 ± 0.06 และ 1.10 ± 0.05 ตามลำดับ
- เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.53 ± 0.06, 0, 1.02 ± 0.25, 0.13 ± 0.01 และ 0.93 ± 0.06 ตามลำดับ
- เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.58 ± 0.05, 0.79 ± 0.46, 0.98 ± 0.11, 0.68 ± 0.13 และ 1.11 ± 0.11 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เซลล์เชื้อสายมะเร็งฟารินค์ Hep2 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.77 ± 0.03, 0, 0.63 ± 0.09, 0.98 ± 0.13 และ 1.28 ± 0.14 ตามลำดับ
- เซลล์น้ำคร่ำปกติมีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 1.18 ± 0.08, 1.30 ± 0.44, 0.21 ± 0.01, 1.12 ± 0.10 และ 1.15 ± 0.10 ตามลำดับ



รูป 4.8 แผนภูมิแท่งแสดงสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายแต่ละชนิด จากการศึกษาด้วยเทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR โดยตัวอักษรบนแท่ง (a, b, c) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างเซลล์เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการรูป 4.8 พบว่ากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ ยีน *ITGA6* และ *ITGB1* มีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์น้ำคร่ำปกติสูง (up regulation) และมีระดับการแสดงออกน้อย (down regulation) ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 เซลล์มะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์มะเร็งฟารินค์ Hep2 เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (a) เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (a), AMC-K46 (ab) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟารินค์ Hep2 (b) มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่เซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีระดับการแสดงออกของยีนนี้แตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ (c) ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้ เมื่อนำระดับการแสดงออกของยีน *ITGB1* มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าให้ผลคล้ายกับยีน *ITGA1* คือ เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (a), AMC-K46 (a) เซลล์เชื้อสายมะเร็งฟารินค์ Hep2 (a) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (ab) มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าไม่แตกต่างกัน แต่เซลล์เชื้อสายทั้ง 3 ชนิด (ยกเว้น C32) มีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ (b) ($p \leq 0.05$)

กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์มะเร็ง ได้แก่ *SKI* พบว่า มีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 เพียงเซลล์เดียว แต่เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติกลับพบว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (b), AMC-K46 (b) เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (b) และเซลล์มะเร็งฟาริงค์ Hep2 (ab) มีระดับการแสดงออกของยีนนี้ไม่แตกต่างกัน แต่เซลล์ทั้ง 3 ชนิด (ยกเว้น Hep2) มีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ (a) ($p \leq 0.05$) ในส่วนของยีน *TGF-β1* พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์น้ำคร่ำปกติเพียงเซลล์เดียว ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า เซลล์น้ำคร่ำปกติ (c) มีระดับการแสดงออกของยีนนี้แตกต่างจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (b) เซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 (b) เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 (a) และ AC-F2 (a) ($p \leq 0.05$) และสุดท้ายคือยีน *hTERT* ที่พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนสูงในเซลล์เกือบทุกชนิด ยกเว้นเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 ที่มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำ เพียงเซลล์เดียว แต่เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติกลับพบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนนี้ใกล้เคียงกัน โดยเซลล์มะเร็งฟาริงค์ (b) มีระดับการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกับเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 (ab) เซลล์มะเร็งผิวหนัง C32 (ab) และเซลล์น้ำคร่ำปกติ (ab) แต่แตกต่างจากเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (a) ($p \leq 0.05$)

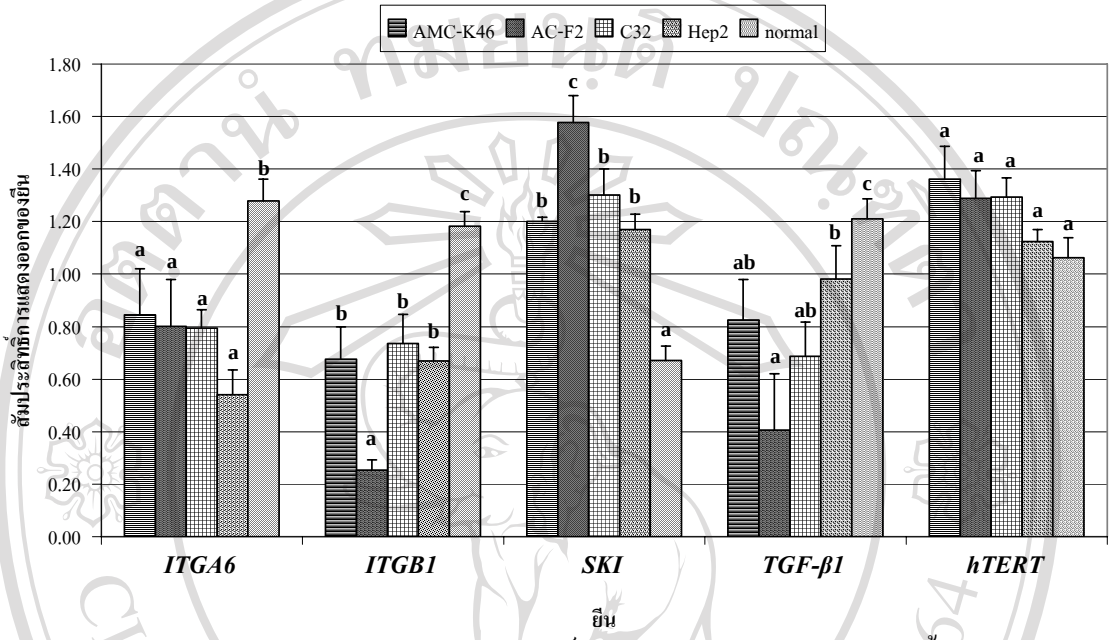
จากผลการทดลองจะพบว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีระดับการแสดงออกของยีน *SKI* และ *hTERT* ไม่แตกต่างจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งทั้งสองชนิดซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมีแบบแผนการแสดงออกของยีนคล้ายกับเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีคุณสมบัติของความเป็นมะเร็งมากกว่าความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อเทียบกับเซลล์น้ำคร่ำปกติ

4.2.3 Real-time PCR

เนื่องจากผลที่ได้จากการทดลองศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการแรกนั้นไม่สามารถหาความแตกต่างทางปริมาณของยีนได้โดยตรงแต่เป็นการวัดค่าความสว่างของแถบดีเอ็นเอและระดับการแสดงออกของยีนบางตัวมีน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการใช้ 1% agarose gel electrophoresis จึงตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนอีกครั้งโดยใช้ real-time PCR ซึ่งจะได้ค่า C_T แต่ละยีนออกมา จากนั้นจึงนำข้อมูลมาคำนวณเพื่อหาค่า relative quantity หรือระดับการแสดงออกของยีน (ภาคผนวก ง) แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของ house keeping gene คือ *GAPDH* จะได้ค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน (relative expression) จากนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จึงนำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำมาสร้างกราฟ (รูป 4.9) และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละเซลล์ (ภาคผนวก จ)



รูป 4.9 แผนภูมิแท่งแสดงค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายแต่ละชนิดจากการศึกษาด้วยเทคนิค real-time PCR โดยตัวอักษรบนแท่ง (a, b, c) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างเซลล์ ($p \leq 0.05$)

จากแผนภูมิ รูป 4.9 แสดงระดับการแสดงออกของแต่ละยีน โดยเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน *GAPDH* พบว่า

- เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.84 ± 0.18, 0.68 ± 0.12, 1.20 ± 0.02, 0.83 ± 0.15 และ 1.36 ± 0.12 ตามลำดับ
- เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.80 ± 0.18, 0.25 ± 0.04, 1.58 ± 0.10, 0.41 ± 0.21 และ 1.29 ± 0.10 ตามลำดับ
- เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.80 ± 0.07, 0.74 ± 0.11, 1.30 ± 0.10, 0.69 ± 0.13 และ 1.29 ± 0.07 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 มีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 0.51 ± 0.09, 0.67 ± 0.05, 1.17 ± 0.06, 0.98 ± 0.13 และ 1.12 ± 0.05 ตามลำดับ
- เซลล์น้ำคร่ำปกติมีระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6*, *ITGB1, SKI, TGF-β1* และ *hTERT* เท่ากับ 1.28 ± 0.08, 1.18 ± 0.05, 0.67 ± 0.06, 1.21 ± 0.08 และ 1.06 ± 0.08 ตามลำดับ

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก จ) พบว่ากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ ยีน *ITGA6* และ *ITGB1* มีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์น้ำคร่ำปกติสูงและมีระดับการแสดงออกน้อย (down regulation) ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46, AC-F2 เซลล์มะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์มะเร็งฟาริงค์ Hep2 เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *ITGA6* ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (a) เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (a), AMC-K46 (a) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 (a) มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ (b) ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้ เมื่อนำระดับการแสดงออกของยีน *ITGB1* มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าให้ผลคล้ายกับยีน *ITGA1* คือ เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (a), AMC-K46 (b) เซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 (b) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (b) มีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ (b) ($p \leq 0.05$)

กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์มะเร็ง ได้แก่ ยีน *SKI* พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (c), AMC-K46 (b) เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (b) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 (b) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์น้ำคร่ำปกติ (a) ที่มีระดับการแสดงออกของยีนนี้ต่ำ ($p \leq 0.05$) ส่วนในยีน *TGF-β1* ซึ่งเป็นยีนที่ทำงานตรงข้ามกับยีน SKI พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนสูงในเซลล์น้ำคร่ำปกติ (c) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AC-F2 (a), AMC-K46 (ab), เซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 (ab) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 (b) ที่มีระดับการแสดงออกของยีนนี้ต่ำ ($p \leq 0.05$) และสุดท้ายคือยีน *hTERT* พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงในเซลล์ทุกชนิดที่นำมาศึกษาและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 มีแบบแผนระดับการแสดงออกของยีนคล้ายกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งผิวหนัง C32 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งฟาริงค์ Hep2 ซึ่งแตกต่างจากเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำปกติ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำทั้งสองมีคุณสมบัติของความเป็นเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved