

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 4.1 กลุ่มตัวอย่างและลักษณะทางคลินิกที่ทำการศึกษา

มีผู้เข้าร่วมการวิจัยทั้งหมด 38 คน แบ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทั้งทางคลินิกและจุลพยาธิวิทยาว่าเป็นไลเคนแพลนัสช่องปาก 25 คน และกลุ่มควบคุม 13 คน (ตารางที่ 4.1) ผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปากที่มีอายุตั้งแต่ 19 ถึง 69 ปี และมีอายุเฉลี่ย  $48.76 \pm 14.28$  ปี ซึ่งสูงกว่าอายุของกลุ่มควบคุมซึ่งมีอายุตั้งแต่ 19 ถึง 34 ปี และมีอายุเฉลี่ย  $22.31 \pm 4.19$  ปี พบว่าผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปากเป็นผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย (อัตราส่วน 4: 1) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มอาสาสมัครผู้มีสุขภาพดี (อัตราส่วน 10: 3)

ตารางที่ 4.1 เพศ และ อายุ ของอาสาสมัครทั้งหมด

|           | กลุ่มไลเคนแพลนัสช่องปาก | กลุ่มควบคุม     |
|-----------|-------------------------|-----------------|
| อายุ (ปี) |                         |                 |
| 20-39     | 7 (ร้อยละ28)            | 13 (100)        |
| 40-59     | 12 (ร้อยละ48)           | -               |
| >59       | 6 (ร้อยละ24)            | -               |
| เพศ       |                         |                 |
| ชาย       | 5 (ร้อยละ20)            | 3 (ร้อยละ23.1)  |
| หญิง      | 20 (ร้อยละ80)           | 10 (ร้อยละ76.9) |

#### 4.2 จำนวนกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามชนิดของรอยโรคและเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก

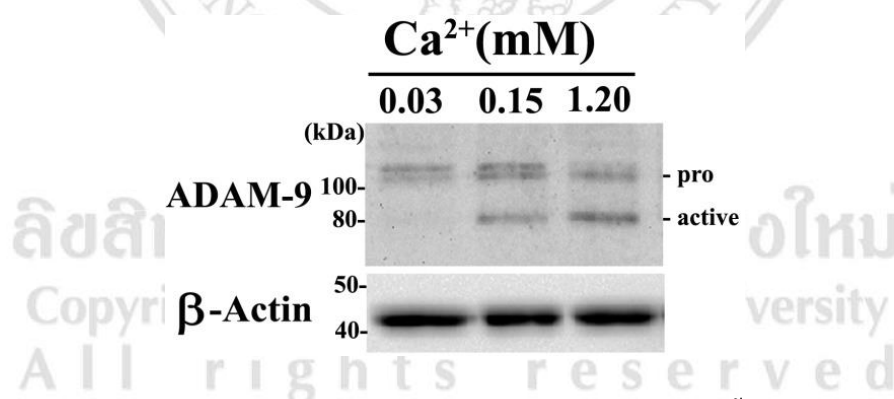
แบ่งกลุ่มตัวอย่างตามชนิดของรอยโรค พบว่ามีผู้ป่วยไลเคนแพลนัสชนิดร่างแห 7 คน ชนิดฟอติบ 13 คนและชนิดแผลถลอก 8 คน ส่วนในกลุ่มอาสาสมัครไม่พบรอยโรคใด เป็นเนื้อเยื่อปกติ ทั้งหมด 13 คน และแบ่งรอยโรคตามเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิกโดยให้กลุ่มขึ้นเนื่องจากอาสาสมัครเป็นตัวแทนในกลุ่มปกติ(คะแนน 0)ได้ดังนี้ คะแนน 0 = 13 คน สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปาก ประกอบด้วย คะแนน 1 = 4 คน คะแนน 2 = 7 คน คะแนน 3 = 6 คน คะแนน 4 = 7 คน และคะแนน 5 = 1 คน (ตารางที่ 4.2) ผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปากเข้ารับการรักษาเนื่องจากมีอาการแสบร้อนร้อยละ 76 พบผู้ป่วยร้อยละ 12 มีอาการเจ็บปวดเนื่องจากมีแผล และร้อยละ 12 ไม่มีอาการใดๆ ค่าคะแนนคะแนนความเจ็บปวดอยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 9.6 โดยมีค่าเฉลี่ย 4.37 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.96

**ตารางที่ 4.2** จำนวนอาสาสมัครและร้อยละของอาสาสมัครทั้งหมด จำแนกตามชนิดของรอยโรคไลเคนแพลนัสช่องปากและเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก

| ชนิดของรอยโรค | เกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก | จำนวนผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปาก (ร้อยละ) |
|---------------|--------------------------|-----------------------------------------|
| ชนิดร่างแห    | 1                        | 4 (ร้อยละ 16)                           |
| ชนิดฟอติบ     | 2                        | 7 (ร้อยละ 28)                           |
|               | 3                        | 6 (ร้อยละ 24)                           |
| ชนิดแผลถลอก   | 4                        | 7 (ร้อยละ 28)                           |
|               | 5                        | 1 (ร้อยละ 4)                            |

#### 4.3 การแสดงออกของADAM9เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคลเซียมใน HOKs

จากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์ HOKs ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะจำลอง (*in vitro*) และทดลองโดยให้ได้รับแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณต่างกัน (0.03 0.15 และ 1.2 มิลลิโมลาร์) ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตหึ่งพบว่า มีการแสดงออกของ ADAM9 โดยตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ (immunoreactive band) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ โปรตีนที่มีขนาด 115 และ 85 กิโลดอลตัน สอดคล้องกับขนาดของโปรตีนที่เป็นตัวแทนของ ADAM9 รูปยังไม่ทำงาน (proform) และ ADAM9 ในรูปพร้อมทำงาน (ภาพที่4.1) สอดคล้องกับรายงานมาแล้วในเซลล์บุผิวมนุษย์ฮาแคต (HaCaT cell line)<sup>(1)</sup> ซึ่งตรวจพบการแสดงออกของ ADAM9 สองรูปแบบเช่นเดียวกันการแสดงออกของ ADAM9 ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นของแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ สังเกตได้จากลักษณะของแถบผลิตภัณฑ์จาก HOKs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียม 0.15 และ 1.20 มิลลิโมลาร์ มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์มากกว่าแถบผลิตภัณฑ์จาก HOKs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า (0.03 มิลลิโมลาร์) (ภาพที่4.1) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ ADAM9 กับการเปลี่ยนสภาพของเยื่อผิว (epithelial differentiation) ด้วยการกระตุ้นจากแคลเซียมความเข้มข้นสูงในขณะที่ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ในตำแหน่ง 42 กิโลดอลตัน ซึ่งเป็นขนาดของบีตา แอคตินซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในมีความเข้มใกล้เคียงกันแสดงถึงปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่เท่ากัน



ภาพที่ 4.1 การแสดงออกของ ADAM9 ใน HOKs แถบแบนของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ความเข้มข้นของแคลเซียม 0.15 และ 1.20 มิลลิโมลาร์ มีความเข้มของแถบแบนมากกว่าแถบแบนที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า (0.03 มิลลิโมลาร์)

#### 4.4 ผลคำนวณร้อยละจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ ADAM9 และ PCNA

ผลคำนวณร้อยละจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกจากแต่ละบริเวณมาหาผลรวมคิดเป็นร้อยละของเซลล์ให้ผลบวกต่อเซลล์ทั้งหมดและให้คะแนนการติดสีของ ADAM9 แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

- คะแนน 0 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 1 (น้อยกว่าร้อยละ 39)
- คะแนน 1 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 2 (ร้อยละ 39 - 45)
- คะแนน 2 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 3 (ร้อยละ 46 - 75)
- คะแนน 3 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 4 (มากกว่าร้อยละ 75)

ผลคำนวณร้อยละจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกจากแต่ละบริเวณมาหาผลรวมคิดเป็นร้อยละของเซลล์ให้ผลบวกต่อเซลล์ทั้งหมดและให้คะแนนการติดสีของ PCNA แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

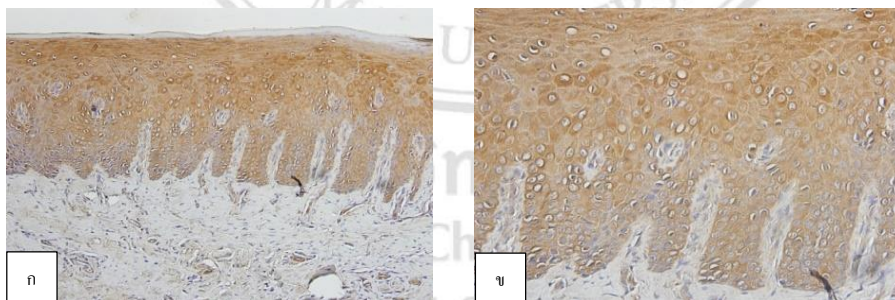
- คะแนน 0 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 1 (น้อยกว่าร้อยละ 11)
- คะแนน 1 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 2 (ร้อยละ 12 - 27)
- คะแนน 2 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 3 (ร้อยละ 28 - 45)
- คะแนน 3 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 4 (มากกว่าร้อยละ 45)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

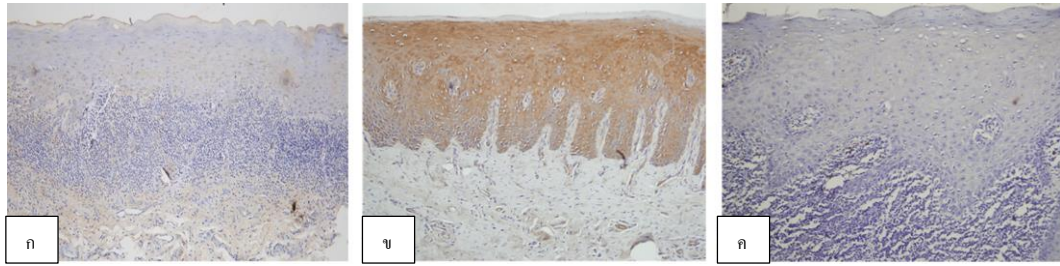
#### 4.5 การแสดงออกของADAM9 ลดลง ในไลเคนแพลนัสช่องปาก

ผลการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยใช้แอนติบอดีของ ADAM9 ในเนื้อเยื่อช่องปาก ปกติพบการแสดงออกของ ADAM9 ในชั้นเยื่อเมือกช่องปากทั้งหมด (ภาพที่ 4.2) มีการติดสีน้ำตาล (brown stain) ซึ่งแปลผลเป็นผลบวกในไซโทพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เยื่อเมือกช่องปาก โดยพบการติดสีเข้มบริเวณชั้นเหนือเบซัลมากกว่าชั้นเบซัล (ภาพที่ 4.2) สำหรับชิ้นเนื้อไลเคนแพลนัส ที่ใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุมผลลบ (negative control) โดยการไม่ใส่แอนติบอดีต่อ ADAM9 พบว่า ให้ผลเป็นลบทั้งหมด ในเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยไลเคนแพลนัสพบว่าการแสดงออกของ ADAM9 ลดลง (ภาพที่ 4.3) และยังพบว่าการแสดงออกของ ADAM9 มีแนวโน้มลดลงเมื่อมีความรุนแรงของโรค (เกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก) เพิ่มขึ้นอย่างมากในผู้ป่วยไลเคนแพลนัสที่รอยโรคอยู่เกณฑ์ ลำดับคะแนนทางคลินิก 3 และ 4 นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยที่รอยโรคอยู่ในเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก 5 มีระดับการแสดงออกของ ADAM9 ลดลงอย่างมากใกล้เคียงกับในชิ้นเนื้อที่เป็นกลุ่มควบคุมผลลบ (ภาพที่ 4.3)

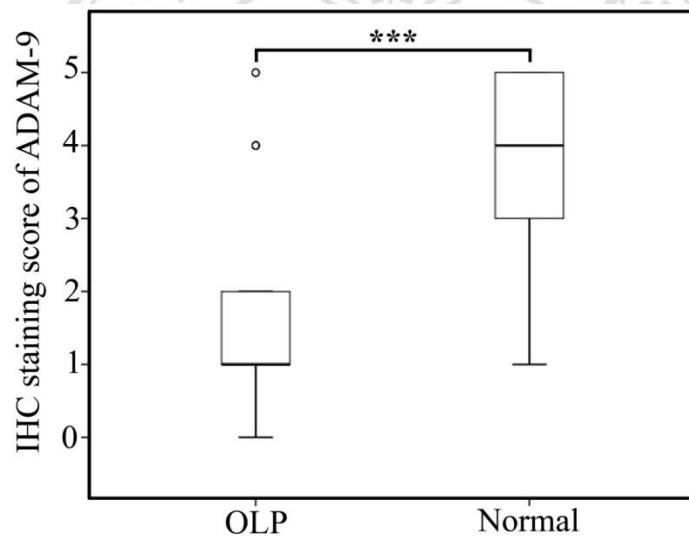
เมื่อเปรียบเทียบคะแนนอิมมูโนฮิสโตเคมีซึ่งคำนวณจากผลบวกของคะแนนความเข้มของการติดสีและคะแนนเซลล์ที่มีผลบวกระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไลเคนแพลนัสกับกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ นอนพาราเมตริก Man-Whitney *U* test พบว่าระดับการแสดงออกของ ADAM9 ในเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปากมีความแตกต่างกับเนื้อเยื่อช่องปากปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) (ภาพที่ 4.4)



**ภาพที่ 4.2** การแสดงออกของ ADAM9 ในเนื้อเยื่อช่องปากปกติ (ก) พบว่ามีการแสดงออกของ ADAM9 ในชั้นเยื่อเมือกทั้งหมด โดยมีการแสดงออกในชั้นเบซัลน้อยกว่าชั้นเหนือชั้นเบซัล (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า) (ข) ลักษณะรูปแบบการแสดงออกของ ADAM9 ในเคอราติโนไซต์ พบมีการแสดงออกของ ADAM9 ในไซโทพลาสซึมของเคอราติโนไซต์ (ภาพกำลังขยาย 400 เท่า)



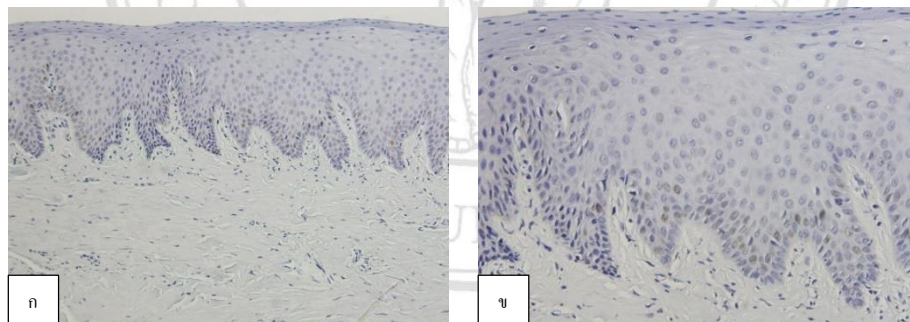
ภาพที่ 4.3 การแสดงออกของ ADAM9 ในไลเคนแพลนัสช่องปาก พบมีการแสดงออกของ ADAM9 ในชั้นเยื่อผิวเช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อปกติ แต่การแสดงออกของ ADAM9 ไลเคนแพลนัสช่องปาก มีน้อยกว่าในเนื้อเยื่อปกติโดยเปรียบเทียบการแสดงออกของ ADAM9 ในไลเคนแพลนัสช่องปาก (ก) เนื้อเยื่อปกติ (ข) และชุดควบคุมผลลบ (ค) (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า)



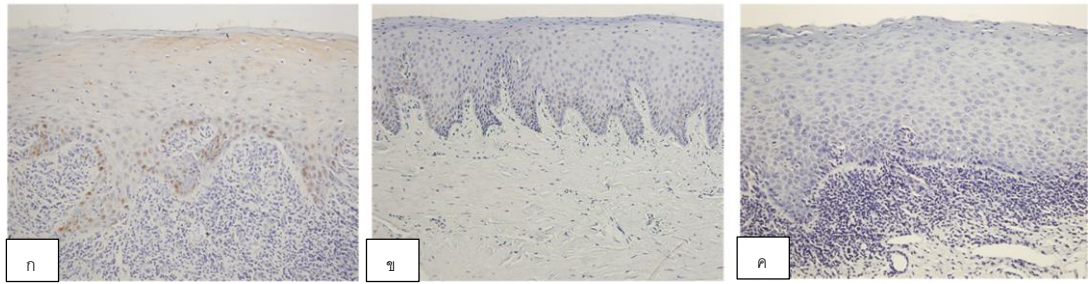
ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบการแสดงออกของ ADAM9 ในเนื้อเยื่อไลเคนแพลนัสช่องปากกับเนื้อเยื่อปกติ พบว่าการแสดงออกของ ADAM9 ในไลเคนแพลนัสช่องปากน้อยกว่าในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญ (\*\*\*) ( $p < 0.001$ )

#### 4.6 การแสดงออกของPCNAเพิ่มขึ้นในไลเคนแพลนัสช่องปาก

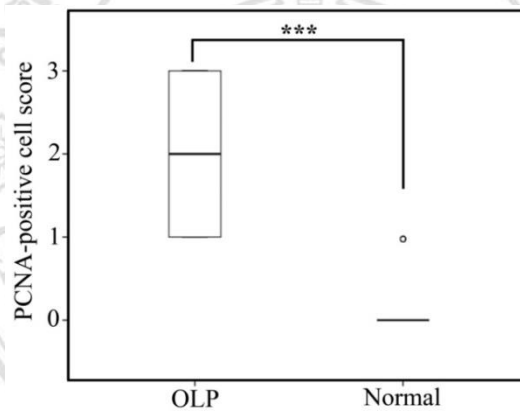
เนื่องจากชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยและอาสาสมัครบางรายมีขนาดเล็กหลังจากเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ ADAM9 แล้วมีชิ้นเนื้อที่มีคุณภาพเพียงพอสำหรับการศึกษา PCNA จำนวน 33 ราย โดยเป็นผู้ป่วยไลเคนแพลนัส 23 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี 10 ราย ในชิ้นเนื้อจากเหงือกปกติ พบการแสดงออกของ PCNA ในลักษณะให้ผลบวกในนิวเคลียสเฉพาะในชั้นเบซัลในปริมาณน้อย (ภาพที่ 4.5) แตกต่างจากในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปาก ซึ่งพบการแสดงออกของ PCNA ที่ให้ผลบวกในนิวเคลียสของเคอราติโนไซต์ ในชั้นเบซัลและชั้นเหนือเบซัล (ภาพที่ 4.6) โดยเห็นได้ชัดเจนในชิ้นเนื้อไลเคนแพลนัสจากผู้ป่วย ในผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปากที่รอยโรคอยู่เกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก 4 และ 5 สำหรับในชิ้นเนื้อไลเคนแพลนัสช่องปากที่ใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุมผลลบโดยการไม่ใส่แอนติบอดีต่อ ADAM9 พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งหมด การแสดงออกของ PCNA ในนิวเคลียสของเคอราติโนไซต์ทั้งในชั้นเบซัลและชั้นเหนือเบซัลเมื่อเปรียบเทียบกับคะแนนเซลล์ที่มีผลบวกต่อ PCNA พบว่าคะแนนการแสดงออกของ PCNA ในชิ้นเนื้อจากไลเคนแพลนัสมีความแตกต่างจากในชิ้นเนื้อในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.5 การแสดงออกของ PCNA ในเนื้อเยื่อช่องปากปกติ (ก) พบว่าการแสดงออกของ PCNA ในชั้นเยื่อบุผิวชั้นเบซัลเท่านั้น (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า) (ข) ลักษณะรูปแบบการแสดงออกของ PCNA ในเคอราติโนไซต์พบมีการแสดงออกของ PCNA ในนิวเคลียสของเคอราติโนไซต์ (ภาพกำลังขยาย 400 เท่า)



**ภาพที่ 4.6** การแสดงออกของ PCNA ในไลเคนแพลนัสช่องปาก พบมีการแสดงออกของ PCNA ในชั้นเยื่อผิวเช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อปกติ แต่การแสดงออกของ PCNA ในไลเคนแพลนัสช่องปากมีมากกว่าในเนื้อเยื่อปกติเปรียบเทียบการแสดงออกของ PCNA ในไลเคนแพลนัสช่องปาก (ก) เนื้อเยื่อปกติ (ข) และหูดควบคุมผลลบ (ค) (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า)

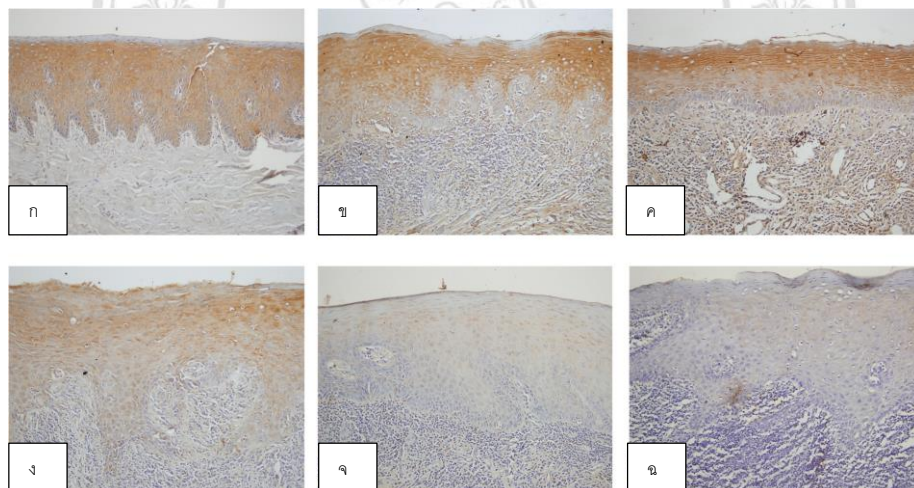


**ภาพที่ 4.7** เปรียบเทียบการแสดงออกของ PCNA ในเนื้อเยื่อไลเคนแพลนัสช่องปากกับเนื้อเยื่อปกติ พบว่าการแสดงออกของ PCNA ในไลเคนแพลนัสช่องปากมากกว่าในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญ (\*\*\*) ( $p < 0.001$ )

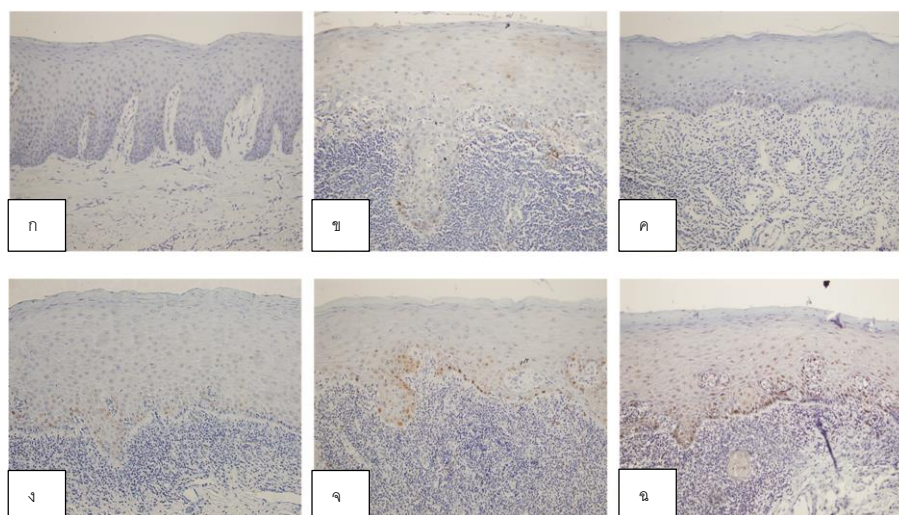
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

#### 4.7 ความสัมพันธ์แบบแปรผกผันระหว่างการแสดงออกของ ADAM9 และการแสดงออกของ PCNA ในไลเคนแพลนัสช่องปาก

จากการตรวจสอบความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Spearman correlation test เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ADAM9 หรือ PCNA กับความรุนแรงทางคลินิกของผู้ป่วยไลเคนแพลนัสช่องปากโดยใช้เกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิกเป็นตัวแทนของอาการทางคลินิกที่ตรวจพบและใช้คะแนนความเจ็บปวดเป็นตัวแทนของอาการของผู้ป่วย พบว่าคะแนนอิมมูโนฮิสโตเคมีของ ADAM9 แปรผกผันกับเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก (ภาพที่ 4.8) และคะแนนความเจ็บปวดอย่างมีนัยสำคัญ (ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ ( $r$ ),  $r = -0.476$ ;  $p < 0.01$ ,  $r = -0.540$ ;  $p < 0.001$  ตามลำดับ) ในขณะที่คะแนนเซลล์ที่มีผลบวกต่อ PCNA แปรผันตามเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก (ภาพที่ 4.9) และคะแนนความเจ็บปวด ( $r = 0.817$ ;  $p < 0.001$ ,  $r = 0.669$ ;  $p < 0.001$  ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าคะแนนอิมมูโนฮิสโตเคมีแปรผกผันกับคะแนนเซลล์ที่มีผลบวกต่อ PCNA ( $r = -0.444$ ;  $p < 0.05$ ) อีกด้วย (ตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของ ADAM9 จำแนกตามเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิกตั้งแต่ 0 ถึง 5 (ภาพ ก ถึง ฉ ตามลำดับ) สังเกตว่าขึ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่มีไลเคนแพลนัสช่องปากเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก 4 และ 5 มีการแสดงออกของ ADAM9 ลดลงอย่างมาก (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า)



**ภาพที่ 4.9** การแสดงออกของ PCNA จำแนกตาม เกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิกตั้งแต่ 0 ถึง 5 (ภาพ ก ถึง ฉ ตามลำดับ) สังเกตว่าชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่มีไลเคนแพลนัสช่องปากเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก 4 และ 5 มีการแสดงออกของ PCNA เพิ่มขึ้นอย่างมาก (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า)

**ตารางที่ 4.3** ความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดทางคลินิกและตัวชี้วัดทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

| ตัวชี้วัดทางคลินิกและ<br>ตัวชี้วัดทางอิมมูโนฮิสโตเคมี |                              | ค่าสัมประสิทธิ์<br>ของสหสัมพันธ์ ( $r$ ) | ระดับนัยสำคัญ ( $p$ ) |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| การแสดงออกของ<br>ADAM9                                | เกณฑ์ลำดับคะแนนทาง<br>คลินิก | $r=-0.476$                               | $p<0.01^*$            |
| การแสดงออกของ<br>ADAM9                                | คะแนนความเจ็บปวด             | $r=-0.540$                               | $p<0.001^*$           |
| การแสดงออกของ<br>PCNA                                 | เกณฑ์ลำดับคะแนนทาง<br>คลินิก | $r=0.817$                                | $p<0.001^*$           |
| การแสดงออกของ<br>PCNA                                 | คะแนนความเจ็บปวด             | $r=0.669$                                | $p<0.001^*$           |
| การแสดงออกของ<br>ADAM9                                | การแสดงออกของ<br>PCNA        | $r=-0.444$                               | $p<0.05^*$            |