

สัญญาเลขที่ MRG4680122

รายงานฉบับสมบูรณ์
(1 กรกฎาคม 2546 – 30 มิถุนายน 2548)

โครงการ

‘Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in
Early Diagnosis of Head and Neck Cancer’

อ.ทพ.ดร. อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

รศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภูวสันต์

รศ.ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค

PROF. JOHJI INAZAWA

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานฉบับสมบูรณ์
(1 กรกฎาคม 2546 – 30 มิถุนายน 2548)

โครงการ

**‘Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in
Early Diagnosis of Head and Neck Cancer’**

อ.ทพ.ดร. อาทิจันท์ พิมพ์ขาว	คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์	คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.ดร. บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
PROF. JOHJI INAZAWA	TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Chromosome aberration in oral squamous cell carcinoma

อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาว^๑ สมจินต์ จินดาวิจักษ์^๒ ประสิทธิ์ ภูวสันต์^๓ โจจิ อินาซาวา^๓

๑ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ประเทศไทย

๒ สถาบันมะเร็ง กรุงเทพฯ ประเทศไทย

๓ มหาวิทยาลัยแพทย์และทันตแพทย์แห่งโตเกียว

บทคัดย่อ

ความไม่เสถียรภาพของโครโมโซมในการเกิดมะเร็งหมายถึงการมีการเพิ่มหรือการลดของบางส่วนหรือทั้งหมดของโครโมโซม Comparative genomic hybridization (CGH) เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์เซลล์หรือยีนในระดับโมเลกุลที่มีประโยชน์ในการใช้ตรวจหาการเพิ่มหรือการลดของบางส่วนหรือทั้งหมดของโครโมโซม วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อที่จะหาความผิดปกติของการเพิ่มหรือการลดของยีนหรือสารพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมในมะเร็งช่องปากโดยใช้เทคนิค CGH วัสดุและวิธีการ เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากที่ได้รับการผ่าตัดรักษาจำนวน ๓๐ ตัวอย่าง จากนั้นทำการแยกสารดีเอ็นเอจากทั้งตัวอย่างมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ เพื่อใช้ย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ โดยดีเอ็นเอของมะเร็งจะย้อมสีเขียวส่วนดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อปกติจะย้อมสีแดง แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ย้อมสีแล้วทำการ hybridized ร่วมกัน วิเคราะห์ค่าสัดส่วนสีเขียวต่อแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับ CCD camera และโปรแกรม digital image analysis system ผลการศึกษา พบการลดลงของบางส่วนของโครโมโซม ในตำแหน่ง 4p15-16, 5q, 8p22-23, 9p, และ 11q23-25 ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของบางส่วนของโครโมโซมในตำแหน่ง 8q21-24, Xp, 3q26, 6p, 7p14-15, 1q31-32, 2p, 5p14-15, 11q13, 13q, 15q, และ 20q12-13 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่มีการเพิ่มบางส่วนของโครโมโซมจำนวนมากกว่าปกติในตำแหน่ง 3q26 and 8q24 สรุป จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าความไม่เสถียรภาพของโครโมโซมในการเกิดมะเร็งที่แตกต่างกันอาจผลต่ออภินิหารสำคัญในการเกิดและโตขึ้นของมะเร็งช่องปาก

Chromosome aberration in oral squamous cell carcinoma

Atiphan Pimkhaokham^{a*}, Somjin Chindavijak^b, Prasit Pavasant^a, Johji Inazawa^c

*Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
National Cancer Institute, Bangkok, Thailand
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

Abstract— Chromosome aberration in cancers means either gains (gene amplifications) or losses (gene deletions) of part/whole chromosome. Comparative genomic hybridization (CGH) is a powerful technique for molecular cytogenetic analysis of chromosome gains and losses. The aim of this study is to identify the genetic alterations in oral squamous cell carcinomas (OSCs) using CGH analysis. **Material and method:** Thirty OSCs samples from 30 patients were collected. High molecular weight DNA was extracted from cancer and normal samples, labeled in different colors (cancer:green while normal:red) and co-hybridization on metaphase chromosome slide. The green to red ratio was detected by using epifluorescence microscope, CCD camera and digital image analysis system. **Result:** The result showed losses at chromosome 4p15-16, 5q, 8p22-23, 9p, and 11q23-25, while chromosome gains were demonstrated at 8q21-24, Xp, 3q26, 6p, 7p14-15, 1q31-32, 2p, 5p14-15, 11q13, 13q, 15q, and 20q12-13. The smallest regions of high-level gains (HLGs) were seen at 3q26 and 8q24. **Conclusion:** These results suggest that different chromosomal aberrations may play an important role in the development and/or progression of OSCs.

Keywords CGH, oral squamous cell carcinoma, chromosome aberration

Output

1. A Pimkhaokham, S Chindavijak, P Pavasant, J Inazawa, in preparation.

* Corresponding author. Tel.: 66-2218-8587; fax: 66-2218-8581; e-mail: atiphan.p@chula.ac.th.

รายงานฉบับสมบูรณ์ (Executive Summary)

June 30, 2005

ชื่อโครงการ Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in Early
Diagnosis of Head and Neck Cancer

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาและสร้างฐานข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลในมะเร็ง
ศีรษะและคอ
2. เพื่อประยุกต์การใช้เทคนิค CGH ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งศีรษะและคอ

การดำเนินงานวิจัย

- | | |
|-------------|------------------------------------|
| Quarter 1&2 | Sample collection (Series I) |
| | Clinical database preparation |
| Quarter 3&4 | Sample collection (Series II) |
| | DNA, RNA isolation (Series I) |
| | Normal metaphase slide preparation |
| Quarter 5&6 | DNA, RNA isolation (Series II) |
| | CGH hybridization |
| | CGH analysis and interpretation |

ผลการดำเนินงานวิจัย

1. เก็บชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากจำนวน 30 ชิ้น
2. สร้างฐานข้อมูลทางคลินิก
3. สกัด DNA จากเลือดของ Healthy donor และชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก
4. เมตาเฟสสไลด์
5. CGH Hybridization
6. Data analysis
7. Manuscript preparation

สัญญาเลขที่ MRG4680122

โครงการ: Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in Early
Diagnosis of Head and Neck Cancer

สรุปรายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in Early Diagnosis
of Head and Neck Cancer

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ทพ.ดร. อาทิตันท์ พิมพ์ขาวขำ

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา 1. รศ.ดร. บุญบา อุทัยอำนวยโชค

2. PROF. JOHJI INAZAWA

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2546 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2548

1. การดำเนินงาน

- ☒ ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้
- ☐ ได้ดำเนินงานล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้
- ☐ ได้เปลี่ยนแผนงานที่วางไว้ดังนี้ _____

2. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

2.1 ผลงานวิจัยที่ทำประกอบด้วย

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาและสร้างฐานข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลในมะเร็งศีรษะและคอ
- เพื่อประยุกต์การใช้เทคนิค CGH ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งศีรษะและคอ

2. การดำเนินงานวิจัย

I. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและตัวอย่างส่งตรวจ(Isolation of genomic DNA)

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและตัวอย่างส่งตรวจทำโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป
จากเลือดของอาสาสมัครเพศชายที่มีสุขภาพสมบูรณ์ดีไม่ป่วยเป็นโรค จำนวน

10 ตัวอย่าง และตัวอย่างส่งตรวจที่มีความผิดปกติของโครโมโซมจำนวน
อย่างน้อย 30 ตัวอย่าง จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปตรวจสอบ
ปริมาณและคุณภาพ ด้วยเทคนิควิธี Agarose gel electrophoresis และ
วิธีการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สารละลายดีเอ็น
เอที่บริสุทธิ์มีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.7-1.8 นำดีเอ็น
เอที่ได้มาใช้เป็นตัวติดตามชนิด Reference DNA (ดีเอ็นเอของคนปกติ)
หรือ ตัวติดตามชนิด Test DNA (สำหรับดีเอ็นเอของตัวอย่างส่งตรวจที่มี
ความผิดปกติของโครโมโซม) ในขั้นตอนต่อไป

II. การเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (Preparation of metaphase chromosome)

การเตรียมเมตาเฟสโครโมโซมซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) ต้อง
ได้เมตาเฟสโครโมโซมที่มีคุณภาพ โครโมโซมมีความยาวพอเหมาะ ไม่
ซ้อนทับกัน และไม่มีส่วนของไซโตพลาสซึม ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของคน
ปกติเพศชาย มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1. การเตรียมเลือด เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของบุคคลตัวอย่างแต่ละคนประมาณ
10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารเฮปาริน (heparin) เขย่าเบาๆ ให้
เลือดกับเฮปารินเข้ากันโดยใช้เฮปาริน 50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อ
ป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว แล้วนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นเม็ดเลือดขาว
2. การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่ง
ประกอบด้วย RPMI medium 80% และ Fetal bovine serum 20% และ
phytohemagglutinin(PHA) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัว ใส่เลือดที่ดูดจาก
ชั้นเม็ดเลือดขาวและบริเวณซีรัม นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 72 ชั่วโมง ในทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
3. การเก็บเกี่ยวเซลล์ ก่อนครบชั่วโมงที่ 72 ประมาณ 30 นาที หยดคอร์เซมิด
(corcemid) เพื่อหยุดเซลล์ที่ระยะเมตาเฟสโดยการยับยั้งการเกิดเส้นใยสปิน

เจล แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 1 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการทำให้เซลล์บวมโดยบ่มเซลล์ใน Hypotonic solution ซึ่งเป็นสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลต่อลิตร ตามด้วยการคงสภาพเซลล์ด้วยน้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ที่ประกอบด้วยเมทานอล 3 ส่วน และกรดอะซิติก 1 ส่วน

4. การเตรียมสไลด์โดยการหยดโครโมโซมในระยะเมตาเฟสซึ่งเตรียมได้ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด นำมาตรวจดูลักษณะและการกระจายตัวของโครโมโซม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast เลือกสไลด์ที่มีโครโมโซมกระจายโครโมโซมทุกแท่งไม่ควรซ้อนทับกัน ปล่อยให้แห้ง แล้วนำสไลด์ที่เลือกไว้แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้สภาพของโครโมโซมเหมาะต่อการไฮบริไดซ์
5. ทำคอมพาราทีฟ จีโนมิกไฮบริไดเซชัน โดยทำการย้อมสี ดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยสีเขียว และย้อมสีดีเอ็นเอจากเลือดด้วยสีแดง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ย้อมสีแล้วมาผสมกันร่วมกับ Cot 1 DNA แล้วทำการDenature ใน 50%Formaldehyde/2xSSC ก่อนที่จะนำไป Hybridize บนเมตาเฟสโครโมโซมที่ทำการ Denature แล้ว ทิ้งไว้ที่ตู้อบ 37 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำสไลด์มาล้างด้วย 4xSSC/0.01%triton X และ 2xSSC ตามลำดับ หลังจากทิ้งไว้ให้สไลด์แห้งมาดๆ จึงหยด DAPI และปิดด้วย cover slide เก็บไว้ที่ 4 C 30 นาที
6. วิเคราะห์ข้อมูล โดยการนำสไลด์ที่ได้มาดูด้วยกล้อง Fluorescence Microscope แล้วบันทึกภาพที่ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Quip) บน Macintosh operating system พร้อมทั้งทำการวิเคราะห์อัตราส่วนของfluorescenceเขียวต่อแดง (Green-red ratio)
7. เริ่มเตรียม manuscript เสร็จ

3. ผลการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บชิ้นเนื้อ: ได้ทำการเก็บชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก จากทั้งสถาบันมะเร็งแห่งชาติ และคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ขนาด 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 20 ชิ้น นำมาเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งการเริ่มเก็บชิ้นเนื้อเป็นไปได้เนื่องจากต้องรอผลการตรวจจริยธรรมการวิจัยที่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
2. การเตรียมฐานข้อมูล: ได้ออกแบบฐานข้อมูลบนโปรแกรม Excel เพื่อใช้สร้างความสัมพันธ์ของข้อมูลทางคลินิกกับข้อมูลทาง genetics
3. การสกัด DNA: ได้ทำการสกัด DNA จากเลือดของ Healthy donor และชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก
4. เตรียมเมตาเฟสไลด์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติเพศชาย เพื่อใช้สำหรับไฮบริไดเซชัน
5. ผลการทำคอมพาราทีฟ จีโนมิกไฮบริไดเซชันและผลการวิเคราะห์ข้อมูล
6. ดำเนินการเขียน manuscript เสร็จเตรียมส่งให้กับวารสาร

2.2 ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Recurrent chromosome alterations in Head and Neck cancer detected by comparative genomic hybridization ในวารสาร *Gene Chromosome Cancer* ปี 2548

2.3 กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

1. วิทยากรบรรยายหัวข้อ Molecular Genetics in Oral Cancer ณ สถาบันทันตกรรม
2. แลกเปลี่ยนวิชาการเกี่ยวกับ Microarray Technic กับ Professor Rick Thompson ณ St. Vincent Institute เมืองเมลเบิร์น ประเทศออสเตรเลีย
3. ฝึกเทคนิค DNA microarray และ DNA methylation ณ Lab ของ Prof Inazawa, Tokyo Medical and Dental University ภายใต้โปรแกรม Fellowship Training ของ JICA
4. ร่วมเสนอผลงานด้วยวาจา ณ งานประชุม ของ สกว รร รีเจนท์ ชะอำ 13-15 ตค 48

2.4 ปัญหาและอุปสรรค

ภาระงานการเรียนการสอนที่มากอาจเป็นอุปสรรคในการดำเนินงาน อาจารย์ท่านอื่นๆใน

ภาควิชาไม่มีใครทำงานวิจัยจึงไม่มีใครยอมที่จะลดภาระงานให้

2.5 ความเห็นและข้อเสนอแนะ

สกว. ควรมีส่วนช่วยในการที่จะผลักดันให้ อาจารย์ท่านอื่นๆทำงานวิจัยและถือเป็นภาระงานที่เท่าเทียมกับภาระงานสอน

2.6 งานที่จะทำในปีต่อไป ตามแผนงานเดิมคือ

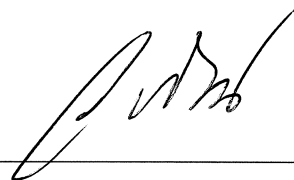
1. Investigation of cancer related genes in the most frequency aberration area such as 8q and 3q.

3 Output ที่ได้จากโครงการ

ได้ประสบการณ์การทำงานวิจัยในประเทศไทยนั้นยังมีอุปสรรคอีกมากมายที่จะต้องค่อยๆฟันฝ่า ไม่ว่าจะเป็นเรื่อง เครื่องมือ สถานที่ คน ซึ่งทั้งหมดนี้มีความแตกต่างจากการทำงานในต่างประเทศมาก แต่อย่างไรก็ตามคงต้องช่วยกันพัฒนาให้เกิดการทำงานวิจัยที่ราบรื่นและต่อเนื่องต่อไป

สิ่งสำคัญที่ได้จากผลการศึกษาแล้วยังบอกให้ทราบถึงตำแหน่งของความไม่เสถียรภาพของโครโมโซมในการเกิดมะเร็งไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มหรือการลดของบางส่วนหรือทั้งหมดของโครโมโซมในมะเร็งช่องปาก ยังมีตำแหน่งอีกหลายตำแหน่งที่น่าจะมีขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดและโตของมะเร็งช่องปากที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

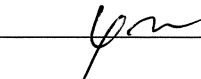
ลงนาม



อ.ทพ.ดร. อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวจำ

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

ลงนาม



รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค

(นักวิจัยที่ปรึกษา)