พลาสมาดีเอ็นเอในผู้ป่วยมะเร็ง
Plasma DNA of Cancer Patients

วชิราวุธ ใจหวัง* สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย** พาชื่น โพทัพ*** อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย**
Watchiravut Jaiwang* Surapon Tangvarasittichai** Pachuen Potup*** Orathai Tangvarasitticahi**
** นิสิตปริญญาโท คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
** ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
*** ภาควิชารังสีเทคนิค คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
*Master degree student, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University
** Medical Technology Department, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University
***Radiological Technology Department, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเป็นภาวะที่เซลล์มีการแบ่งตัวที่ไม่สามารถควบคุมได้และเซลล์เหล่านี้สามารถลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยเจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง (Invasion) หรืออพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกล ๆ (Metastasis) การเจริญเติบโตที่ไม่เป็นระเบียบของเซลล์เหล่านี้อาจมีสาเหตุที่เกิดขึ้นภายหลังหรือจากกรรมพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ของ DNA ภายในเซลล์มีการทำลายข้อมูลของยีน ซึ่งเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเซลล์ การเคลื่อนย้าย และการควบคุมความปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พลาสม่าดีเอ็นเอ มีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ในร่างกายมีความเสียหายเกิดอาการอักเสบหรือภาวะมะเร็ง ปัจจุบันการวิเคราะห์หาปริมาณ plasma DNA สามารถทำได้ง่ายและราคาไม่แพง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยใช้ EDTA blood สกัดปริมาณ พลาสมาดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป จากนั้นนำมาวัดปริมาณ พลาสมาดีเอ็นเอ ด้วยสารฟลูออเรสเซนท์โดยเครื่องวัดปริมาณ พลาสมาดีเอ็นเอชนิดพกพา และทำการศึกษาปริมาณ พลาสม่าดีเอ็นเอ จากผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณพลาสมาดีเอ็นเอ ในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่าง ๆ มีแนวโน้มที่สูงกว่าคนสุขภาพดี โดยกลุ่มคนสุขภาพดีมีปริมาณ พลาสมาดีเอ็นเอ 31.0 (20.0-72.0) ng/ml ส่วนผู้ป่วยมะเร็งมีปริมาณ พลาสมาดีเอ็นเอ 75.0 (25.0-607.0) ng/ml ดังนั้นพลาสมาดีเอ็นเอ น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัย รักษาหรือติดตามผู้ป่วยมะเร็งได้ในอนาคต

คำสำคัญ : พลาสมาดีเอ็นเอ, มะเร็ง

Abstract

Cancer can produce many different symptoms, some subtle and some not at all subtle. Some symptoms develop early in the course of cancer and are therefore important warning signs that should be evaluated by a doctor. Measurement of DNA concentration in the plasma of cancer patients and healthy subjects aimed to screening test for people in risk of cancer.

There were 200 subjects, 100 patients with cancers and 100 healthy subjects. Nucleospin ® XS was used to extract DNA in plasma of both groups, and then Qubit fluorometer was used to measure DNA concentration. Our results show that there were significant associations between plasma DNA concentration of cancer patients. The concentration of plasma DNA in cancer patients; 31.0 (20.0-72.0) ng/ml were higher than plasma DNA concentration of healthy subjects; 75.0 (25.0-607.0) ng/ml. This study may be useful for further investigations in risk of cancer.

Keywords : Plasma DNA, Cancer

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ทำให้เกิดการสูญเสียชีวิตของประชาชนและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมาก ตั้งแต่ปี พ.ศ.2543 มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล (Hospital-based cancer registry) ฉบับที่ 25 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ[1] ได้แสดงข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่มารับบริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2552-31 ธันวาคม 2552 จำนวนทั้งหมด 29,891 ราย เป็นผู้ป่วยรายใหม่ 3,314 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.1 พบว่ามะเร็งที่พบมากในเพศชายคือ มะเร็งปอด ร้อยละ 18.5 ส่วนมะเร็งที่พบในเพศหญิงคือ มะเร็งเต้านม ร้อยละ 37.0

มะเร็งเป็นโรคซึ่งมีการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ สามารถแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออื่น ๆ ผ่านทางกระแสเลือด และน้ำเหลือง การฝังตัวของเซลล์มะเร็ง (Implantation)[2] การจับหรือรวมตัวตามพื้นผิวของผนังเยื่อบุ (Transcoelomic)[3] ผู้ป่วยโรคมะเร็งส่วนมากมาพบแพทย์เมื่อปรากฏอาการชัดหรือมีอาการลุกลามของโรคมากแล้ว ทำให้การรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร

ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม (Deoxy-ribonucleic acid; DNA) เป็นกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต พลาสม่าดีเอ็นเอมีการแตกทำลายและซ่อมแซมอยู่ตลอดเวลาตามภาวะของร่ายกายและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง พลาสม่าดีเอ็นเอ เป็นจึงเป็นตัวบ่งชี้ภาวการณ์แตกทำลายของเซลล์[4] ภาวะอักเสบและภาวะของมะเร็ง[5,6] หากอัตราการทำลายปริมาณพลาสม่าดีเอ็นเอมีปริมาณสูงการว่าการซ่อมแซม ซึ่งในปัจจุบันการหาปริมาณพลาสม่าดีเอ็นเอสามารถทำได้ง่ายและราคาไม่แพง ซึ่งสามารถทำนายภาวะของมะเร็งได้ พลาสม่าดีเอ็นเออาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการทำนายระยะของมะเร็งได้ [7] จากรายงานการศึกษาของ Jahr[8] พบว่า DNA ที่ได้มาจากเซลล์มะเร็ง มีระดับที่เพิ่มขึ้นและมีค่าเฉลี่ยที่สูงกว่าระดับที่มีในคนปกติ ค่าเฉลี่ยของระดับ DNA ในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งมีค่าที่หลากหลายและอยู่ในช่วงที่ห่างกัน และระดับของพลาสมา DNA ไม่สัมพันธ์กับชนิดของมะเร็ง หรืออาการทางคลินิก เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gautschi และคณะ[9] พบว่า การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น DNA มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของเนื้องอก รวมถึงเนื้องอกที่ได้รับเคมีบำบัด และยังพบว่าความเข้มข้นของ DNA ในซีรั่มของผู้ป่วยโรคมะเร็งมีความสัมพันธ์อย่างมากกับจำนวน leucocyte ส่วนงานวิจัยของ Sozzi และคณะ[10] พบว่า DNA ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติ จึงสามารถนำปริมาณ DNA ที่เพิ่มสูงขึ้นมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งปอดได้ การศึกษาของ Silva และคณะ[11] พบว่า

DNA ในพลาสมาของเนื้องอก สามารถเป็น molecular factor ใหม่ ในการพยากรณ์โรคที่ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม และงานวิจัยของ Mueller และคณะ[12] พบว่า Nucleosomal DNA fragments สามารถใช้เป็น marker สำหรับการวินิจฉัยประสิทธิภาพการรักษาเบื้องต้นในผู้ป่วยโรค Acute myeloid leukemia ดังนั้นการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ DNA ในพลาสมา จึงอาจนำมาใช้เพื่อตรวจเบื้องต้นสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งได้

วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมเกี่ยวกับการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 5301010046

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มศึกษา: ผู้ป่วยมะเร็งที่มารับการตรวจเลือดที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 100 ราย

กลุ่มคนสุขภาพดี : ผู้มารับบริการตรวจสุขภาพที่สถานปฏิบัติการส่งเสริมสุขภาพทางเทคนิคการแพทย์ที่มีผลการตรวจเลือดปกติ จำนวน 100 คน

วัสดุ : ชุดสกัดดีเอ็นเอ Nucleospin ® Plasma XS (Macherey-Nagel, Germany), Quant-iT ™ Reagent, Quant-iT ™ buffer, Qubit® Fluorometer

การสกัด ดี เอ็น เอ : ใช้ EDTA blood ปั่นที่ความเร็ว 800 g 10 นาที ดูดพลาสม่าส่วนบนปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 1,600 g 10 นาที นำพลาสม่าส่วนบนใส่ลงใน column เติม Poritenase K incubate ที่ 37 °C 10 นาที เติม Binging buffer ปั่นที่ 2,000 g 30 วินาที ปั่นซ้ำอีกครั้ง ที่ 11, 000 g 5 วินาที เติม wash buffer 500 µl ปั่นที่ 11,000 g 30 วินาที เติม wash buffer 250 µl ปั่นที่ 11,000 g 3 นาที เติม Elution buffer 20 µl ปั่นที่ 11,000 g 30 วินาที นำ microtube ไป incubate ที่ 90° นาน 8 นาที

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ : ผสม Quant-iT™ buffer และ Quant-iT™ Reagent เติมดีเอ็นเอที่สกัดไว้ นำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง Qubit® Fluorometer

ผลการศึกษา

จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 200 ราย ปริมาณความเข้มข้นของ DNA ในพลาสมาของกลุ่มคนสุขภาพดี (Normal) จำนวน 100 ราย มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 31.0 (20.0 - 72.0) ng/ml และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็ง (Cancer) จำนวน 100 ราย มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 75.0 (25.0-607.0) ng/ml ค่ามัธยฐานของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.023) โดยปริมาณความเข้มข้นของ DNA ในพลาสมาแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามการวินิจฉัยโรคได้ 8 ชนิด ได้แก่ โรคมะเร็งปอด 5 ราย พบค่าความเข้นข้นของ DNA = 607.0 (65.0 - 1010.0) ng/ml มะเร็งปากมดลูก 12 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 535.0 (88.0 - 1165.0) ng/ml มะเร็งเต้านม จำนวน 32 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 84 (25.0 -178.0) ng/ml มะเร็งลำไส้ 10 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 58.0 (32.0 -4146.0) ng/ml มะเร็งเม็ดเลือด 31 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 54.0 (20.0 - 80.0) ng/ml มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 3 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 37.0 (35.0 -86.0) ng/ml มะเร็งตับ 4 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 30.0 (28.0 -87.0) ng/ml และมะเร็งเพดานและคอ 3 ราย ความเข้นข้นของ DNA = 30.0 (20.0 - 76 ng/ml ส่วนกลุ่มคนสุขภาพดี 100 ราย พบความเข้นข้นของ DNA = 31.0 (20.0 - 72.0) ng/ml โดยค่าความเข้นข้นของ DNA ของกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามการวินิจฉัยโรคแสดงผลดังตาราง 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้นของ DNA แบ่งตามกลุ่มการวินิจฉัยโรคผู้ป่วยมะเร็ง

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (ราย)	Median (Q1-Q3) ng/ml
มะเร็งปอด	5	607.0 (65.0 - 1010.0)
มะเร็งปากมดลูก	12	535.0 (88.0 - 1165.0)
มะเร็งเต้านม	32	84.0 (25.0 - 178.0)
มะเร็งลำไส้	10	58.0 (32.0 - 4146.0)
มะเร็งเม็ดเลือด	31	54.0 (20.0 - 80.0)
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	3	37.0 (35.0 - 86.0)
มะเร็งตับ	4	30.0 (28.0 - 87.0)
มะเร็งเพดานและคอ	3	30.0 (20.0 - 76.0)
กลุ่มคนปกติ	100	31.0 (20.0 - 72.0)

เมื่อพิจารณาค่ามัธยฐานของปริมาณความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอในพลาสม่าที่แบ่งกลุ่มตามการวินิจฉัย พบว่ามะเร็งปอดมีค่าสูงสุด ตามด้วยมะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ มะเร็งเม็ดเลือด มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ กลุ่มคนปกติ มะเร็งตับ มะเร็งเพดานและคอ

สรุปผลการศึกษา

ผลการวิจัยพบว่าค่ามัธยฐานปริมาณดีเอ็นเอในพลาสม่าของกลุ่มคนปกติ จำนวน 100 ราย มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 31.0 (20.0-72.0) ng/ml และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 100 ราย มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 75.0 (25.0-607.0) ng/ml เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตามการวินิจฉัยโรค พบว่า ค่ามัธยฐานของปริมาณดีเอ็นเอมีค่าสูงสุดในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอด และมีค่าต่ำสุดในผู้ป่วยมะเร็งเพดานและคอซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 607.0 และ 20.0 ng/ml ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาลำดับของค่ามัธยฐานพบว่าค่ามัธยฐานผู้ป่วยมะเร็งทุกชนิดมีค่ามากกว่ากลุ่มคนปกติยกเว้นมะเร็งตับและมะเร็งเพดานและคอ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร และขอขอบคุณ คุณจิราภรณ์ นาดี คุณทิพวัลย์ กันท์ไชย และคุณวนิดา สังฆวดี ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Attasara P, Buasom R. Hospital-Based Cancer Registry. Bangkok : National Cancer Institute, Ministry Of Public Health;2008
2. Macdonald F, Ford C, Casson A. Molecular biology of cancer: BIOS Scientific Publishers; 2004.
3. Cooper G. Elements of human cancer: Jones and Bartlett Publishers; 1992.
4. Rhodes A, Wort S, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. Critical Care. 2006; 10(2):60.

5. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. Clinica Chimica Acta 2009; 404(2): 100-4.
6. Futrea PA, KASprzyk A, Birme E. Nature. 2001: 409.
7. Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, Georgakopoulos E, Georgakopoulou S, Koliopanos A, et al. Cell-free DNA and RNA in Plasma as a New Molecular Marker for Prostate and Breast Cancer. Annals of the New York Academy of Sciences 2006; 1075 (1): 235-43.
8. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. Cancer Research 2001; 61(4): 1659-65.
9. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, et al. Circulating Deoxy ribonucleic Acid As Prognostic Marker in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Under-going Chemotherapy. J Clin Oncol 2004; 22(20): 4157-64.
10. Sozzi G, Conte D, Leon M, Cirincione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. Journal of Clinical Oncology 2003; 21(21): 3902-08.
11. Silva JM, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M, et al. Tumor DNA in Plasma at Diagnosis of Breast Cancer Patients Is a Valuable Predictor of Disease-free Survival. Clinical Cancer Research 2002; 8(12): 3761-66.
12. Mueller S, Holdenrieder S, Stieber P, Haferlach T, Schalhorn A, Braess J, et al. Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukemia by nucleosomal DNA fragments. BMC Cancer 2006; 6(1): 143.