บทความพิเศษ

การใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง

นรินทร์ วรวุฒิ*
อภิวัฒน์ มุทิรางกูร**

Varavud N. Polymerase chain reaction in oncology. Chula Med J 1994 May;38(5): 243-254

Progress in molecular biology has contributed considerably in the understanding of molecular pathogenesis of cancer development. Discovery of genes involved in carcinogenesis has led to clinical applications for diagnosis and innovative therapies of various malignant diseases. Polymerase chain reaction (PCR) is an ingenious new tool for molecular biology of cancer. The PCR produces sufficient quanitities of amplified DNA to enable molecular analysis of genetic alterations during the tumorigenesis. This technique can be applied clinically for diagnosis of cancer and for basic research to understand the molecular pathogenesis of cancer development. Such knowledge will undoubtedly lead to better diagnostic methods of cancer detection and effective therapeutic approach in the near future.

Key words: *Polymerse chain reaction, Molecular Biology, Diagnosis, Neoplasms.*

Reprint request: Varavud N, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. May 6,1994.

* ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา ความก้าวหน้าทางชีววิทยาโมเลกุล (Molecular Biology) ได้ทำให้เราเริ่มเข้าใจถึงขบวนการพื้นฐานของหน่วยพันธุกรรมต่อการเกิดโรคมะเร็ง และทำให้ค้นพบยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งความรู้ ต่าง ๆ เหล่านี้ที่ได้มาจากงานวิจัยพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้นำไปสู่การประยุกต์ใช้ทางคลีนิคทั้งในด้านการวินิจฉัยโรค การป้องกันโรคและการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ Polymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคที่เพิ่งถูกคิดเมื่อไม่นานมานี้ เทคนิคดังกล่าวเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการได้โดยง่ายและรวดเร็ว ปัจจุบันนี้ในสถาบันทางการแพทย์ทั่วไปทั้งโรงเรียนแพทย์ในประเทศไทย และต่างประเทศ ได้มีการใช้เทคนิคนี้อย่างมากเนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถประยุกต์ใช้กับงานทางชีววิทยาโมเลกุลได้หลายสาขา สำหรับทางด้านโรคมะเร็งเทคนิค PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทั้งในงานวิจัยระดับพื้นฐานและทางงานวิจัยทางคลีนิคต่างๆ ก่อให้เกิดความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรงมะเร็ง และจะนำไปสู่วิธีการวินิจฉัยโรคและการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

The Methods of PCR

PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการสร้างสาย DNA โดยใช้หลักการการแบ่งตัวของสาย DNA (DNA Replication) ในบริเวณที่ต้องการศึกษาหลายๆ ครั้ง ทำให้ปริมาณของ DNA บริเวณ นั้นเพิ่มขึ้นหลายล้านเท่า

องค์ประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการขบวนการ PCR คือ

1. DNA ต้นแบบ (Template)
2. Oligonucleotide (Primer) 2 Primers

โดยที่ Primer จะมี Sequence ที่ Com-plement กับสาย DNA ต้นแบบ ทำให้ Primers ทั้ง 2 สามารถจับกับ DNA ต้นแบบและมีทิศทางจากปลาย 5' สู่ปลาย 3' ที่ชี้เข้าหากัน

3. DNA Polymerase

เป็น Enzyme ที่สร้างสาย DNA จาก Primer โดยสร้างสาย DNA ที่ Compliment กับ DNA ต้นแบบ Polymerase ที่นิยมใช้คือ Tag Polymerase เนื่องจากสามารถทนต่อความร้อนได้สูง (Heat Stable)

4. dNTP สาร Deoxyribonucleotide Triphosphate ซึ่งประกอบด้วย Base 4 ชนิดคือ Adenine, Guanine, Cytosine และ Thymidine ซึ่งเรียกย่อๆ ว่า A,G,C,Tตามลำดับ สาร dNTP นี้เป็นสารองค์ประกอบของสาย DNA

ขบวนการของ PCR นี้ เกิดขึ้นได้โดยอาศัย DNA ต้นแบบ ซึ่งจะจับกับ Primer 2 Primers และมีการขยายต่อของสาย DNA จาก Primers โดยอาศัย DNA Polymerase สร้าง Complementary Strand สาย DNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาหลายล้านเท่าจากของเดิม (Fig.1) โดยทั่วไปเทคนิค PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. Denaturation

คือ การเพิ่มอุณหภูมิสาย DNA ที่ต้องการจะศึกษาออกเป็น Single-stranded DNA เสียก่อน

2. Annealing

เมื่อสาย DNA แยกออกจากกันแล้ว ก็จะมีการลดอุณหภูมิของปฏิกิริยา ลดเพื่อให้ PCR Primers จับกับ Target DNA

3. Synthesis

เมื่อ Primers จับกับ Target DNA แล้วจะมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปในอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้ Taq Polymerase Enzyme ทำงานเพื่อเติม dNTP DNA ที่สร้างจาก Template เกิดสาย DNA ใหม่เป็นการเพิ่มจำนวนของ Target DNA ตามที่ต้องการ

DNA ที่ได้และ DNA ต้นแบบเดิมจะถูกนำสู่ขั้นตอนที่ 1,2 และ 3 ดังกล่าวข้างต้นหลายๆ รอบก็จะเกิดการสร้าง DNA จาก DNA Template เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เป็นแบบ Exponential ซึ่งประโยชน์ที่ได้จากเทคนิค PCR นอกจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการขึ้นอย่างมากมาย ยังสามารถที่จะใช้เพิ่มจำนวน DNA โดยที่ใช้ Target DNA ปริมาณน้อย และอาจทำ ได้ในกรณี ที่มี DNA อื่น ๆ ปะปนอยู่ด้วย เนื่องจาก Primers จะ specific กับ DNA Sequeces ที่ต้องการจะตรวจหาเท่านั้น[1]

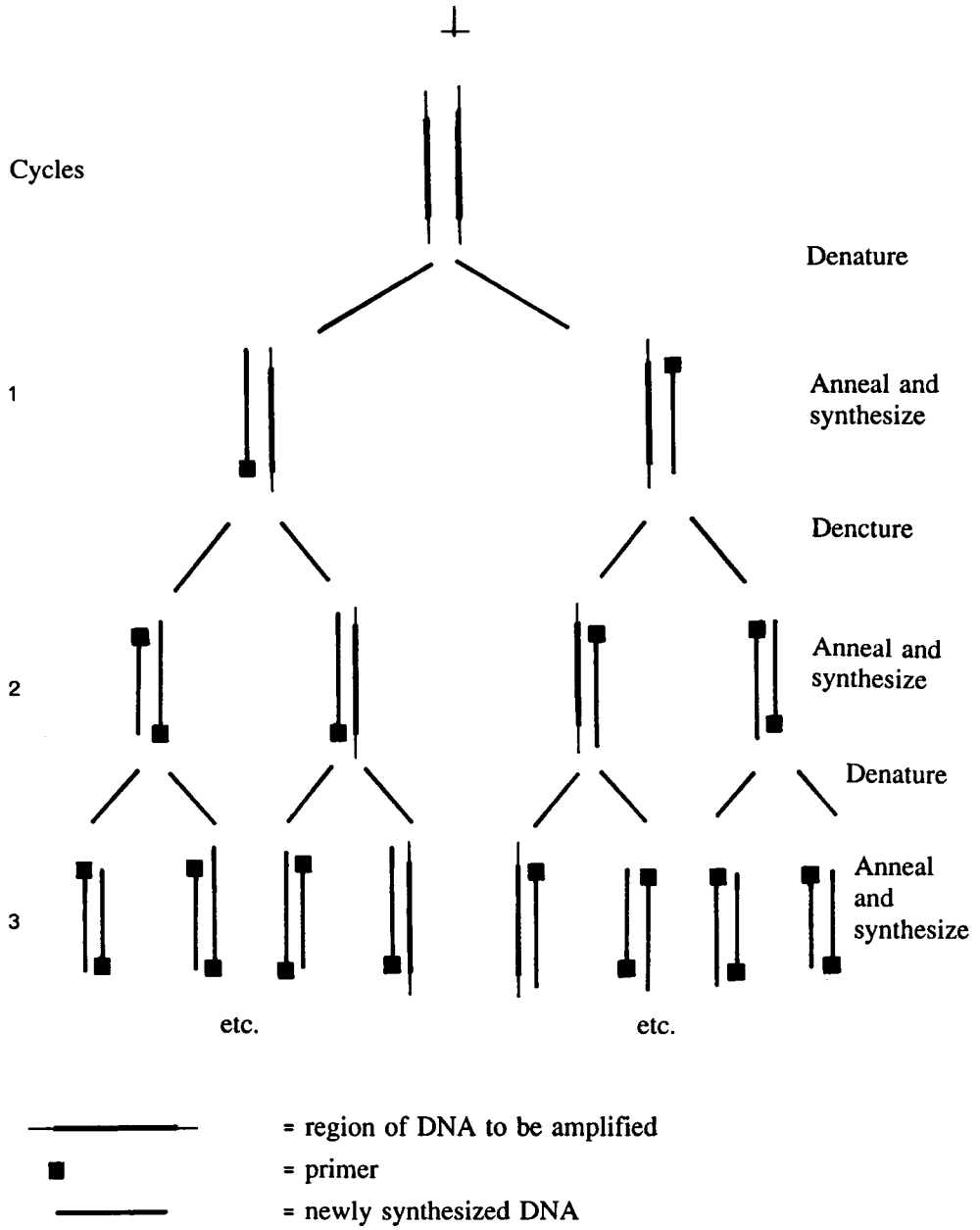

Figure 1. Polymerase chain reaction.

History of PCR

PCR เป็นเทคนิคที่คิดค้นโดยทีมนักวิทยาศาสตร์ที่ Cetus Coporation โดย Kary Mullis[2] ซึ่งจดทะเบียนลิขสิทธิ์เมื่อปี ค.ศ. 1987 (US Patent 4,683,195 และ 4,683,202) ในระยะแรกใช้ Heat-Labile DNA Polymerase Enzyme ในการทำ PCR ซึ่งทำให้ผลไม่ดีนัก เนื่องจากต้องเติม Polymerase Enzyme ทุกๆ cycle ของการทำ PCR และอุณหภูมิในการทำ PCR ต่ำเกินไป ทำให้เกิด Non-Specific Binding ของ PCR Primers ต่อ Target DNA ต่อมาได้มีการใช้ Heat-Stable Taq Polymerase Enzyme ในการทำ PCR ทำให้ไม่จำเป็นต้องเติม Enzyme ใหม่อีกในขณะทำ PCR และสามารถทำปฏิกิริยา ได้ในอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้สามารถลด Non-Specific Binding ได้ เทคนิค PCR ถูกนำมา ใช้ครั้งแรกในการเพิ่มปริมาณของยีน Globin[3] หลังจากนั้นก็มีการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR อย่างกว้างเนื่องจากเทคนิค PCR ให้ความไวสูงในการตรวจหา DNA ในระยะเวลาอันสั้น สามารถเพิ่มปริมาณของ DNA ที่ต้องการศึกษาขึ้นได้เป็นหลายล้านเท่า โดยปริมาณ DNA ที่ตั้นแบบเพื่อเล็กน้อยเท่านั้น จึงทำให้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในงานต่างๆ มาก รวมทั้งงานวิจัยทาง Clinical Oncology การที่กลไกการเกิดโรคมะเร็งเกิดจากความผิดปกติในระดับพันธุกรรม ดังนั้น เทคนิค PCR ซึ่งสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA และ RNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค การวินิจฉัยโรค และการรักษาโรคมะเร็งอย่างกว้างขวาง[4]

Mutation Screening from PCR Products

การเกิดมะเร็งในระดับโมเลกุลนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็ง (ยีนในกลุ่มของ Oncogene และ Tumor Supressor Gene) ในระดับ Somatic Cell ดังนั้นการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนต่างๆ นี้ในเซลล์มะเร็งจึงเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาและเรียนรู้ขบวนการการเกิดมะเร็งในระดับโมเลกุล PCR เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการสร้าง DNA บริเวณที่ต้องการศึกษาของเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย เพื่อนำไปตรวจหาการกลายพันธุ์แบบต่อไป วิธีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่ศึกษาจาก PCR มีหลายวิธีทั้งการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ Point mutation และการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ DNA และ RNA (Quantitative PCR)

การตรวจหา Point Mutation

1. Direct Sequencing[5-9]

PCR Product ที่ได้อาจนำไปตรวจหา DNA Sequence ได้เลยด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น Sanger's Dideoxy Chain Termination, Asymmetric-PCR Sequencing หรือ Solid Phase Technique

2. Dot-Blot Analysis

อาจนำ PCR Products ที่ได้ใส่ลงบน Nylon หรือ Nitrocellulose Filters แล้วยึด DNA ดังกล่าวไว้บน Filters ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การอบแห้งแล้วนำ Labelled Probes มาตรวจสอบหา DNA ที่ต้องการจะตรวจต่อไป เช่น การใช้ DNA Probe ที่จำเพาะต่อ Point Mutation ของ c-RAS Oncogene เพื่อตรวจหาตำแหน่งและชนิดของ Point Mutation ที่เกิดขึ้นใน DNA ของเนื้องอกที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็ง[10]

3. Blot Dot Analysis (Reversed Dot-Blot Analysis)

เป็นวิธีกลับกับ Dot-Blot Analysis กล่าวคือแทนที่จะใส่ PCR Products ลงบน Filter กลับใช้ Oligonucleotide ที่มี Mutation เฉพาะหลายๆ อัน ใส่ลงบน Filter ติดฉลาก PCR Products เพื่อนำมาใช้เป็น Probe วิธีนี้เหมาะกับการ Screen หา Mutation หลายๆ ตำแหน่งในผู้ป่วย[11]

4. Mismatch Analysis (Enzymatic[12] หรือ Chemical[13])

เป็นวิธีการตรวจ PCR Product โดยใช้ Nucleases หรือ Base-Modifying Chemical Reagents เพื่อทำให้เกิดการแยกของสาย DNA Double-Stranded ซึ่งมีการ Mismatched Bases ซึ่งการตัด (Scission) มักจะเกิดที่ตำแหน่ง Mismatched Bases ดังนั้นถ้าใช้ Radio-labelled รวมอยู่ด้วยจะสามารถติดฉลาก Mismatches ของ PCR Product ได้ แล้ว Mismatches ที่ติดฉลากดังกล่าวแล้วสามารถแยกออกตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดยอาศัย High Resolution Polyacrylamide Gel

5. Chemical[13] and Temperature Gradient Gel Electrophoresis[14]

(Single Strand Conformational Polymorphism[15])

เป็นการตรวจ PCR Product โดยตรวจหา Mismatch Base Pair ปกติแล้วเมื่อ Denature DNA Mismatches จะแยกตัวที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือในความเข้มข้นของ Chemical Denaturants ที่ต่ำกว่า Proper Matches ดังนั้นเมื่อ Run บน Gel Mismatched DNA จะ Migrate บน Gel ได้ช้ากว่า ถ้าเป็น Heterozygous Sequences จะพบลักษณะ 4 แบบ ที่เกิดขึ้นจาก Homoduplexes และ Heteroduplexes บน Gel เมื่อตรวจ Gel ด้วยการย้อมด้วย Silver หรือ Ethidium Bromide จะสามารถบอกได้ว่าเกิด Polymorphism หรือ Mutation เกิดขึ้นใน PCR Product หรือไม่

Quantitative PCR

PCR สามารถใช้เพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการและสามารถตรวจหาความผิดปกติของ DNA Base Pair ต่างๆ ได้ดี อย่างไรก็ตาม การจัดจำนวนปริมาณของ DNA,RNA หรือยีนส์ (Gene Dosage) ยังไม่มีวิธีที่ดีเพียงพอ ที่จะใช้เป็นมาตรฐานทั่วไป มีผู้พยายามคิดค้นวิธีการต่างๆ ในการตรวจดังกล่าว ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทาง Oncology ดังนี้

1. Differential PCR[16]

เป็นการวัด Gene Dosage โดยวิธี PCR กล่าวคือ ใช้วิธี PCR เพิ่มจำนวน DNA ของยีนส์ 2 ยีนส์ (Coamplification) โดยที่ยีนหนึ่งเป็นยีนที่รู้จำนวนแน่นอนเป็น Reference Gene บน Agarose หรือ Polyacrylamide Gel

2. Multiplex PCR[17]

เป็นการใช้ PCR ในการตรวจส่วนของยีนที่ขาดหายไป ซึ่งครั้งแรกถูกนำมาใช้ในการการตรวจหาการขาดหายไปของ Exon ของ Dystrophin Gene โดยการเพิ่มจำนวนส่วนต่างๆ ของ DNA ของยีนเมื่อ Run บน Gel ก็สามารถบอกได้ว่ามี DNA บางส่วนขาดหายไปหรือไม่

3. mRNA Quantitation by PCR[18]

วิธีนี้ใช้ตรวจหา mRNA โดยเปรียบเทียบกับ Control ซึ่งใช้ Plasmid pAW 106 cRNA โดยที่ PCR Products จาก mRNA ที่ต้องการทราบจำนวนจะถูก Amplified ร่วมกับ AW 106 cRNA แล้วเปรียบเทียบกันบน Gel เพื่อหาปริมาณ mRNA ที่ต้องการจะทราบจำนวน

4. Competitive PCR for Quantitation of mRNA[19]

เป็นอีกวิธีหนึ่งในการหาปริมาณ mRNA โดยใช้ PCR เพิ่มปริมาณ Target DNA และ Competitive Control แล้วเปรียบเทียบ Ratioของ PCR Products เพื่อหาปริมาณของ mRNA ที่ต้องการ

Clinical Application of PCR

Polymerase Chain Reaction เป็นวิธีการที่มีประโยชน์มากทางงานวิจัยและการวินิจฉัยโรคมะเร็ง เป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่ามะเร็งนั้นมีพยาธิกำเนิดจากความผิดปกติในระดับพันธุกรรมโดยเฉพาะในระดับ Chromosome หรือ DNA การที่ PCR เป็นวิธีการวินิจฉัยตรวจสอบ DNA Sequences ได้แม่นยำและมีความไวสูงมาก ตลอดจนสามารถทำได้โดยใช้เนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กทำให้มีความสะดวกมากในการวิเคราะห์โรค ในปัจจุบันนี้สาเหตุต่างๆ ของโรคมะเร็งไม่ว่าจะเกิดจากไวรัสบางชนิด เช่น Hepatitis B virus ที่ทำให้เกิด Hepatocellular Carcinomam, Epstein-Barr Virus ที่ทำให้เกิด Nasopharyngeal Carcinoma และ Burkitt's Lymphoma ตลอดจนความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่ระดับโครโมโซม เช่น Translocation of Chromosome 8 และ 14 ใน Burkitt's Lymphoma รวมทั้ง การเปลี่ยนแปลงของ Oncogenes และ Tumor Suppressor Genes ต่างๆ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนเซลล์ปกติให้กลายเป็นเซลล์มะเร็ง ทำให้สามารถนำความรู้ต่างๆ เหล่านี้มาประยุกต์ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งและการพยากรณ์โรคมะเร็งให้มีประสิทธิภาพและแม่นยำยิ่งขึ้น ซึ่งจะมีประโยชน์ในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยในอนาคตให้เหมาะสมและตรงกับกลไกการเกิดโรครวมถึงการใช้ในการติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งได้อีกด้วย ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. การวินิจฉัยโรค

การใช้ PCR เพื่อตรวจหา DNA Sequences ที่ต้องการจะมีประโยชน์มาก และมีการนำมาใช้อย่างกว้างในการวินิจฉัยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ดังนี้

1.1 Cancer Screening

ปัจจุบันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งมักจะมีการเปลี่ยนแปลงมาจาก Adenomatous Polyps ซึ่งเป็น Premalignant Lesions และกลายมาเป็นมะเร็งในที่สุดนั้น

มีการเปลี่ยนแปลงที่ระดับพันธุกรรมหลายขั้นตอนที่พบบ่อยคือ การเกิด Mutation ที่ c-Ha-ras Oncogene[20] ซึ่งสามารถที่จะแยก DNA จากอุจจาระของผู้ป่วยที่สงสัยมาตรวจหา c-Ha-ras Oncogene Mutation ได้ด้วยเทคนิคของ PCR[21] ซึ่งจะมีความแม่นยำและมีความไวสูงมากกว่าการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ เช่น Stool Occult Blood การตรวจหา Genetic Changes ใน Premalignant Lesions หรือ Early Cancers อื่นๆ ด้วยวิธี PCR จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำ Cancer Screening ดีมากขึ้นอย่างไร ก็ตามในแง่ราคาต่อ test อาจจะแพงกว่าวิธีอื่นๆ ที่ใช้อยู่ทั่วไปในปัจจุบันนี้

1.2 Metastatic of Unknown Origin

บางครั้งจะพบผู้ป่วยที่มาด้วยเรื่องก้อนมะเร็งที่แพร่กระจายมาจากที่อื่นๆ และตรวจไม่พบ Primary Cancer เช่น มาด้วยเรื่อง Cervical Lymphadenopathy การใช้ PCR เพื่อตรวจหา Markers ต่างๆ เช่น DNA ของ Epstein-Barr Virus ถ้าผู้ป่วยมาด้วยก้อนที่คอ อย่างเดียวและตรวจหามะเร็งที่ตำแหน่งอื่นไม่พบ อาจจะใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าผู้ป่วยนั้นมี Primary Cancer เป็น Naso-pharyngeal Carcinoma และมีการกระจายของมะเร็งมาที่ต่อมน้ำเหลืองที่คอ[22] ทำให้สามารถเลือกวิธีการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสมกับโรคนั้น ๆ ได้

1.3 Detecting of Cancer Cells

ในโรคมะเร็งทราบ Molecular Patology เช่นใน Follicular Lymphoma มี Chromosome Rearrangement ของ Chromosome 14 และ 18 ทำให้ส่วนของ Immunoglobulin Heavy Chain Locus (JH) บน Chromosome 14 q 32 ถูกย้ายไปสู่ Locus ของ BCL-2 Oncogene บน Chromosome 18 q 21 ดังนั้นเมื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมดังกล่าว จึงทำให้สามารถสร้าง PCR Primers ต่อบริเวณรอยต่อของ DNA ดังกล่าวเพื่อตรวจหา Chromosome Translocation t(14;18) (q32;q21)[23] เมื่อเพิ่มปริมาณของ DNA ที่ตำแหน่งของ Translocation ด้วยเทคนิคของ PCR จะทำให้สามารถวิเคราะห์หาเซลล์มะเร็งซึ่งจะมี t(14;18) Translocation ดังกล่าวได้ ซึ่งเทคนิค PCR จะให้ความไวสูงในการวิเคราะห์โรคได้เมื่อมีเซลล์มะเร็งเพียง 1 เซลล์ ในเซลล์ปกติ 1 ล้านเซลล์ ซึ่งโดยปกติถ้าใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น การตรวจหา DNA ด้วย Southern Blotting จะตรวจพบความผิดปกติดังกล่าวได้ เมื่อมีเซลล์มะเร็ง 1 เซลล์ในเซลล์ปกติ 100 เซลล์เท่านั้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค PCR จะให้ความไวในการวิเคราะห์ โรคมะเร็งสูงมากโดยเฉพาะในโรคที่เราทราบ Molecular Pathology แล้วยังสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคทาง PCR ในการวินิจฉัยโรคได้ดี และยังสามารถใช้วิธีตรวจดังกล่าว ในการติดตามการรักษาด้วยเพื่อพิจารณาการหยุดยาเคมีบำบัด หรือฉายแสงรังสี เมื่อตรวจพบว่า เซลล์มะเร็งหมดแล้วหลังการรักษาโรค และใช้ตรวจว่าโรคกำเริบอีกเมื่อไหร่ ซึ่งเทคนิค PCR จะให้ความไวในการตรวจมากกว่าวิธีปกติที่ใช้อยู่ทางคลีนิคหรือทางพยาธิวิทยา เช่น การตรวจหาเซลล์มะเร็งด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.4 Prognosis

การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงในระดับ DNA สามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกการพยากรณ์ของ โรคมะเร็งได้หลายชนิด ทำให้มีประโยชน์ในการพยากรณ์โรคและเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสมกับโรคบางชนิดที่มีพยากรณ์โรคไม่ดี ได้แก่

1.4.1 DNA Amplification Oncogenes หลายชนิดมีการเพิ่มปริมาณของ DNA ของยีนน์นั้นๆ เพิ่มขึ้น และเป็นเครื่องชี้บ่งถึงพยากรณ์โรคที่ไม่ดี เช่น c-erb-B2 Oncogene Amplication ในผู้ป่วยมะเร็งของเต้านมและรังไข่ c-myc Oncogene Amplification ในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและคอ มะเร็งปากมดลูก c-neu Oncogene Amplification ในผู้ป่วย Neuroblastoma เป็นต้น PCR เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจหา Gene Dosage ได้ และใช้พยากรณ์โรคได้[24]

1.4.2 Gene Mutation มะเร็งบางชนิดเมื่อมี Gene Mutation เกิดขึ้นที่ยีนบางชนิด เช่น Kras Oncogene ทำให้โรคลุกลามอย่างรวดเร็ว การใช้ PCR ในการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยเหล่านี้ โดยเฉพาะถ้าชิ้นเนื้อมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถจะวิเคราะห์ ด้วยวิธีอื่นได้ จะใช้ในการตรวจหาการพยากรณ์โรคได้ดีและให้ความไวในการวิเคราะห์สูง[25]

1.4.3 DNA Polymorphism การเปลี่ยนแปลงที่ DNA ที่เรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphism ที่เกิดขึ้นกับ L-myc Oncogene เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงโอกาสที่มะเร็งของปอดและมะเร็งของไตจะกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและไปสู่อวัยวะอื่นได้มากขึ้น[26] การเปลี่ยนแปลงของยีนเหล่านี้สามารถตรวจได้ด้วยเทคนิค PCR

2. งานวิจัยทาง Oncology

ในปัจจุบันนี้ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR มาใช้งานวิจัยทาง Oncology อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นการตรวจหายีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคมะเร็ง และ การดำเนินโรค การเตรียม Probes เพื่อใช้ในงานต่างๆ ทาง ชีววิทยาโมเลกุล อณูเซลล์พันธุศาสตร์ (Molecular Cytogenesis) ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งพอจะสรุปได้ดังนี้

2.1 กลไกการเกิดโรคมะเร็ง

พยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งหลายชนิดได้ถูกค้นพบการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุล และ อณูเซลล์พันธุศาสตร์ เช่น การตรวจพบ Philadephia Chromosome ใน Chronic Myelogenous Leukemia ซึ่งเกิดจาก Translocation ของ Chromosome 9 และ 22 ทำให้ cabl Oncogene จาก Chromosome ที่ 9 มาเชื่อมต่อกับ BCR Gene ของ chromosome 22 ทำให้เกิด Chimeric Oncoprotein ขนาด 210 Kilodallton ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ Tyrosine Phosphorylation และเป็นกลไกการเกิดมะเร็งชนิดนี้ขึ้นได้ เทคนิค PCR สามารถใช้ตรวจสอบหาส่วนของ DNA ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้อย่างแม่นยำ และมีความไวสูง[27] จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการศึกษา และติดตามกลไก การเกิดโรคมะเร็งในระดับ DNA

มะเร็งบางชนิดเกิดจากไวรัส เช่น Hepatitis B, C และ D ใน

Hepatocellular Carcinoma, Estein-Barr Virus ใน Nasopharyngeal

Carcinoma, Human Papilloma Viruses ใน มะเร็งปากมดลูก จากการศึกษาพบว่า ไวรัสหลายชนิดมีส่วนของ DNA ของไวรัส สอดแทรกเข้าไปใน Host Genome ดังนั้นเทคนิค PCR ซึ่งใช้ตรวจหาส่วนของ DNA จึงมีประโยชน์มากในการตรวจหาอุบัติการณ์ของไวรัสซึ่งทำให้เกิดมะเร็งดังกล่าวเมื่อ ต้องการศึกษา Molecular Epidermiology ของโรคเหล่านี้ ตลอดจนศึกษาหาตำแหน่งหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคจากการสอดแทรกของ DNA ของไวรัสเข้าไปใน DNA ของเซลล์ เช่น Insertional Mutagenesis ในมะเร็งปากมดลูกการเกิดมะเร็งจาก Human Papilloma Virus จะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง E6 และ E7 โปรตีนซึ่งสามารถ เปลี่ยนแปลงเซลล์ในเป็นเซลล์ปกติให้เป็นเซลล์มะเร็งได้ (Transforming Proteins)[28] ดังจะเห็นได้ว่าเทคนิค PCR สามารถใช้ตรวจหากลไกการเกิดโรคมะเร็งจากเชื้อไวรัสได้ (Viral Oncogenesis) การเกิดมะเร็งนั้นเป็นการเกิดที่เป็นขั้นตอน (Multistage Carcinogenesis) จากเซลล์ปกติเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่ระดับพันธุกรรม[29] จนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีมีการเกิด Premalignant Lesions เกิดขึ้นและในที่สุดก็มีการเปลี่ยนแปลงจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งใน ที่สุดตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ ได้แก่ ในการเกิดมะเร็งของช่องปากมักจะเกี่ยวข้องกับการที่ผู้ป่วยได้รับสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งมาเป็นเวลานานๆ เช่น กินหมาก ดื่มเหล้า หรือสูบบุหรี่ สารเหล่านี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ระดับ DNA ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวปกติ (Oral Mucosal Epithelial Cells) เปลี่ยนแปลงกลายเป็น Premalignant Cells ที่เรียกว่า Oral Leucoplakia ซึ่งจะเห็นเป็นลักษณะของผ้าที่ขาวอยู่ในปาก ต่อมาบริเวณเหล่านี้จะเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งขั้นตอน โดยมีการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมเกิดขึ้นก่อนแล้วจึงมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง[30] ดังนั้นเทคนิค PCR จึงเป็นวิธีที่ได้ประโยชน์ในการตรวจหาความผิดปกติของยีนส์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เนื่องจากชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยเหล่านี้ โดยเฉพาะที่เป็น Premalignant Lesions มักจะเป็น Biopsy Specimens จะมีขนาดเล็กทำให้วิเคราะห์ทาง DNA ด้วยวิธีอื่นลำบากเพราะมีจำนวนไม่พอใน การตรวจสอบ จึงทำให้เทคนิค PCR ที่ใช้ Samples เพียงเล็กน้อยในการตรวจและมีความไวสูง เป็นวิธีที่เหมาะสม ในการศึกษาพยาธิกำหนด ของ Multistage Tumorigenesis ในมะเร็ง ชนิดต่างๆ

2.2 การเตรียม Probes ต่าง ๆ

โดยปกติแล้วการเตรียม DNA Probes เพื่อใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล หรืออณูพันธุศาสตร์ มักใช้ DNA ที่ได้จาก Molecular Clonging แล้วตัดต่อด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์เข้าไปใน Vestors ชนิดต่าง เช่น Plasmid ของ Bacteria แล้วนำ มาใช้งานเทคนิค PCR เป็นวิธีที่มีผู้นำมาใช้เพิ่มปริมาณของ DNA ที่ต้องการแล้วใช้เป็น Probes ในการตรวจหายีนส์ที่ต้องการหาในมะเร็งชนิดต่างๆ สำหรับงานทาง Cytogenetics การตรวจหา Chromosome ด้วยวิธีธรรมดาที่ใช้อยู่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ระยะสั้น (Short Term Culture) แล้วเตรียม Chromosome เพื่อศึกษา ซึ่งต้องใช้เวลาและอาจ เกิดผล False Positive หรือ Negative จาก Short Term

Culture การเปลี่ยนแปลง Chromosome ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยจริงๆ ปัจจุบันนี้จึงได้มีการใช้เทคนิค ที่เรียกว่า Interphase Cytogenesis[31] เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ Chromosome ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อ โดยตรงโดยไม่ต้องใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยตามวิธีที่ใช้มาตั้งแต่ดั้งเดิม ทำให้สามารถลดปัญหาเรื่อง Artifact ลดได้ เทคนิคเหล่านี้ต้องอาศัย Probes ที่จำเพาะกับ Chromosome ที่ต้องการจะตรวจ ซึ่งการเตรียม DNA Probes เหล่านี้สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค PRN ซึ่งสามารถเพิ่ม DNA Sequences ที่จำเพาะกับ Chromosome นั้น ๆ ได้

2.3 PCR Cloning[32]

PCR สามารถใช้เพิ่มหรือสืบหา DNA ที่ต้องการจะ Clone ได้ในเวลาอันสั้นทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการ Clone DNA ต่างๆ ได้อย่างมาก เช่น การตรวจหายีนจาก cDNA Library อาจทำได้โดยใช้เทคนิคทาง PCR โดยใช้ PCR เพิ่มปริมาณ Probe แล้วนำ มาตรวจหายีนที่ต้องการใน cDNA Library ได้ หรือ เมื่อสามารถตรวจแยก (Purification) โปรตีนชนิดหนึ่งได้ Amino Acid Sequences บางส่วน ก็สามารถที่จะหา Predicted Codons สำหรับ Amino Acids นั้นๆ จากนั้นก็สร้าง PCR Primers ขึ้นมา แล้วใช้เทคนิคทาง PCR เพิ่มขนาดจำนวน Oligonucleotide ดังกล่าว แล้วใช้เป็น Probe ในการตรวจหา cDNA Library เมื่อนำ DNA Sequences ส่วนต่างๆ มาปะติดปะต่อกันก็จะสามารถทราบถึง Sequences ของยีนนั้นๆ ได้

2.4 DNA Sequencing[33]

ผลิตผลจาก PCR สามารถนำมาใช้ตรวจหา Sepuences ได้ทันทีโดยเทคนิค DNA Sequencing ปกติที่ใช้อยู่ทั่วไป เช่น เทคนิคของ Sanger's Dideoxy Chain Termination ซึ่งโดยปกติแล้วผลิตผลจาก PCR จะเป็น Double-Stranded DNA ซึ่งไม่ สะดวกในการหา DNA Sequencing ซึ่งต้องการใช้ Single-Stranded DNA ในการตรวจหา Sequence ของ DNA ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีที่เรียกว่า Asymmetric PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของ Single-Stranded DNA ทำให้สายของ DNA ในปริมาณมากพอที่จะนำมาตรวจหา DNA Sequences ได้เลย สำหรับ Asymmetric PCR นั้นทำได้โดยใช้ PCR Primers 2 Primers ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 100 เท่า ดังนั้นเมื่อเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการด้วยเทคนิคทาง PCR ไประยะหนึ่ง PCR Primer ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าจะถูกใช้หมดไปเหลือ PCR Primer อยู่เพียง Primer เดียวจึงทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นเป็นแบบ Single-Tranded DNA แทนที่จะได้เป็น Double-Stranded DNA ตามที่ควรจะเป็น ถ้าหากให้ Primers ทั้ง 2 Primers ในปริมาณที่พอ single-stranded DNA ที่ได้ จากเทคนิค Asymmetric PCR จะสามารถนำมาใช้หา DNA Sequences ได้ด้วยเทคนิค Sanger's Dideoxy Chain Termination ทำให้ทุ่นระยะเวลาในการเตรียม DNA ตลอดจนเพิ่มความสะดวกในการตรวจหา DNA Sequences นอกจากนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนใน การตรวจลงได้อีกด้วย

2.5 Detection of Human-Specific DNA Sequences[34]

ในงานวิจัยทาง Oncology บางครั้งจำเป็นใช้เซลล์ของสัตว์มาใช้ในการทดลอง เช่น เมื่ออยากทราบว่ามียีนที่ทำให้เกิดมะเร็งในชิ้นเนื้อมะเร็งที่ได้จากผู้ป่วยหรือไม่ วิธีการตรวจที่ ใช้อยู่ เรียกว่า Transfection Assay กล่าวคือจะมีการแยก Genomic DNA จากก้อนมะเร็งแล้วใส่เข้าไปในเซลล์ของหนู NIH 3T3 เซลล์ ด้วยเทคนิค Calcium Phosphate Precipitation แล้วนำ Transfected Cells ที่ได้มาตรวจหาเซลล์ที่มีคุณสมบัติของเซลล์ มะเร็ง (Malignant henotypes) เซลล์ของหนูที่รับ DNA ของมนุษย์เข้าไป ถ้าเป็นยีนที่ทำให้เกิดมะเร็ง (Oncogene) ก็จะมีลักษณะของเซลล์มะเร็งให้ตรวจพบได้ เช่น เมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองจะทำให้เกิดเป็นก้อนมะเร็งขึ้นได้ (Tumorigenesis) การที่ต้องการแยกหรือต้องการจะติดตามหา DNA ของมนุษย์ที่แทรกเข้าไปใน DNA ของเซลล์หนูจากเทคนิคของ Transfection Assay สามารถทำได้โดยการตรวจหา Alu Sequnces Alu Sequences เป็น DNA Sequences ที่พบในมนุษย์เท่านั้น ไม่พบในหนู และเป็น DNA Sequences ที่ อาจพบได้ถึง 900,000 copies ใน Genome ของมนุษย์ ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็น Marker ในการติดตามหา DNA ของมนุษย์ที่ปะปนเข้าไปใน DNA ของหนูจาก Transfection Assay ดังนั้น การหา Alu Repeat สามารถทำได้ด้วยเทคนิคของ Southern Blotting หรืออาจใช้เทคนิคอื่นๆ โดยที่สร้าง PCR Primers ขึ้นมา 2 Primers ต่อ Alu Sequnces แล้วใช้ ในการเพิ่มปริมาณ DNA ที่แยกออกมาจากเซลล์ของหนูที่มีคุณสมบัติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Malignant Transformation) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งจะเป็นเซลล์ของหนูที่ได้รับ Oncogene ของมนุษย์เข้าไปจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้นเมื่อติดตามหา Alu Sequences

ใน DNA ที่แยกจากเซลล์ของหนูหลัง Tranfection Assay ที่ กลายเป็นเซล์มะเร็งก็จะสามารถติดตามหา DNA ของเซลล์หนูได้ และเมื่อตรวจวิเคราะห์ต่อไปก็จะสามารถตรวจหายีนของมนุษย์ที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดมะเร็ง หรือเรียกว่า Oncogene ได้ ทำให้สามารถตรวจพบ Oncogenes ชนิดใหม่ ๆ ขึ้นได้มากมาย ในปัจจุบันนี้มีการตรวจพบ Oncogenes มากกว่า 60 ชนิดแล้ว

3. การรักษาโรคมะเร็ง

PCR มีประโยชน์ในการติดตามการรักษาโรคมะเร็งได้ (Monitoring of Treatment) และสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งว่าโรคที่เป็นกลับเป็นซ้ำ (Detection of Relapse) ก่อนที่มีอาการแสดงที่สามารถพบได้ทางคลีนิค นอกจากนั้นยังใช้เป็นวิธีการตรวจหากลไกการตอบสนองต่อการรักษาโรคได้ (Mechanism of Relapse) รวมทั้งใช้ตรวจหาโอกาสที่โรคจะตอบสนองต่อการรักษา (Predictor of Relapse) ซึ่งการประยุกต์เทคนิคทาง PCR มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการติดตามการรักษาผู้ป่วยได้ดีขึ้น และทำให้เข้าใจถึงกลไกการตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งจะทำให้สามารถพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งให้ได้ผลดีมากยิ่งขึ้น

3.1 การติดตามการรักษาโรคมะเร็ง

เนื่องจากมะเร็งเกิดจากความผิดปกติในระดับพันธุกรรม ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีการรักษาที่มุ่งจะแก้ไขความผิดปกติดังกล่าวที่เรียกว่า Gene Therapy ซึ่งเริ่มมาประมาณ 6 ปีเศษ โดยเริ่มครั้งแรกที่ National Cancer Institue ภายใต้การควบคุมดูแลของนายแพทย์ Steven Rosenberg ในครั้งแรกจำเป็นจะต้องพัฒนาเทคนิควิธีการนำยีนจากภายนอกเข้าไปในตัวผู้ป่วยอย่างปลอดภัยและยีนนั้นต้องทำหน้าที่ได้ด้วย การศึกษาในการใส่ยีนจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ของผู้ป่วยจึงเริ่มด้วย การใช้ Marker Gene ก่อน เพื่อจะได้สามารถติดตามได้ว่าเซลล์ที่รับยีนเหล่านี้ไปอยู่ที่ไหน และมีความปลอดภัยมากน้อยเพียงไรในผู้ป่วยที่ได้รับยีนเหล่านี้ เข้าไป การติดตามว่ายีนที่เข้าไป ไปอยู่ที่ไหน วิธีที่ง่ายและให้ความไวสูงก็คือ เทคนิค PCR เพื่อตรวจหา DNA Sequences ที่ต้องการพบว่า Marker Gene ที่ใช้คือ Neomycin Resistance Gene สามารถคงอยู่ใน Lymphocytes ของผู้ป่วยได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ และไม่มีผลข้างเคียงจากวิธีการใส่ยีนดังกล่าวเข้าไปในตัวผู้ป่วย[35]

3.2 การตรวจการกลับเป็นซ้ำของโรคมะเร็ง

มะเร็งบางชนิดมี Marker ที่สามารถตรวจหาได้ในระดับ DNA เช่น Chronic Myelogenous Leukemia มี c-abl/bcr gene ซึ่งเกิดจาก Translocation ของ Chromosome 9 และ 22 ซึ่งการใช้เทคนิค PCR สามารถตรวจพบยีนนี้ได้ในเลือดและมีความไวสูงกว่าการตรวจ blood smear หรือ bone marrow เพื่อหา Malignant Cells ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการตรวจการกลับเป็นซ้ำของโรคหรือหา Microresidual Disease หลังการรักษา[36]

3.3 การตรวจ Microresidual Disease หลังการรักษา

การที่มะเร็งบางชนิดมี Molecular Marker เช่น Chronic Myelogenous Leukemia ดังกล่าวข้างต้นหรือ Acute Promyelocytic Leukemia ทำให้สามารถตรวจสอบด้วยวิธี PCR ว่าหลังการรักษาครบแล้ว ยังคงมีเซลล์มะเร็งหลงเหลืออยู่หรือไม่ ปกติไขกระดูกจะมี Blast Cells ไม่เกิน 5% ซึ่งจากรูปร่างลักษณะภายนอกจะแยก Normal Blast Cells จาก Leukemic Blast Cells ไม่ได้ ดังนั้นการใช้ CPR ตรวจหา Marker ดังกล่าวจึงมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคหลังจากที่ผู้ป่วยมี Complete Remission แล้ว[36]

3.4 การหากลไกการตอบสนองต่อการรักษาโรคมะเร็ง

PCR สามารถนำมาใช้ศึกษา Molecular Pathogenesis ของโรคมะเร็ง ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหากลไกการตอบสนองต่อการรักษาโรคได้ เช่น เมื่อให้ยาชนิดหนึ่งแล้วผู้ป่วยหายจากโรคที่เป็นและตรวจไม่พบเซลล์มะเร็งอาจเกิดจาก 3 เหตุผลดังนี้คือ อาจเกิดจากการที่ยาทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรงแล้วเซลล์ปกติเพิ่มจำนวนมาแทนที่ หรือเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งถูกยาเปลี่ยนให้กลายเป็นเซลล์ปกติ ได้แก่ การใช้ Differentiation Factors ต่างๆ เปลี่ยนเซลล์มะเร็งให้ Differentiate เป็นเซลล์ปกติหรือเกิด จากทั้ง 2 สาเหตุ การใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจหา Marker ของเซลล์มะเร็งซึ่งแตกต่าง จากเซลล์ปกติ แล้วติดตามว่าหลังการใช้ยารักษาแล้วเซลล์มะเร็ง มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรบ้างจะสามารถตอบคำถามของกลไกการตอบสนองของโรคมะเร็งต่อยาได้ เช่น ใน Acute Promyelocytic Leukemia การตรวจหา Rearrange ของ Chromosome 15 และ 17 ซึ่งทำให้เกิด Rarrangement ของ Retinoic Acid Receptor-Alpha Gene สามารถใช้เป็น

DNA Marker ในการตรวจหากลไก การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา Trans-Retinoic Acid ได้เป็นต้น[37-39]

3.5 การตรวจหาโอกาสของการตอบสนองต่อการรักษา

Molecular Marker บางอย่างสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งถึงการตอบสนองต่อการรักษาโรคได้ เช่น การตรวจพบ Rearrangement ของ Retinoic Acid Receptor ใน Acute Promyelocytic Leukemia จะบ่งถึงโอกาสที่จะตอบสนองต่อการรักษาด้วย Trans-Retinoic Acid เป็นต้น[40]

PCR เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่มีประโยชน์มากสำหรับการวินิจฉัยโรค การศึกษากลไกการเกิดโรคและวิธีการรักษาโรคมะเร็ง การตรวจหา DNA หรือยีนจากเนื้องอกโดยวิธีPCR ร่วมกับการใช้เทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ PCR Products ทำให้ประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก เนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กและลำบากที่จะตรวจด้วยวิธีปกติ เช่น เนื้อเยื่อมะเร็งจาก Find Needle Aspiration สามารถใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นได้อย่างแม่นยำ โดยใช้ Samples เพื่อเล็กน้อยเท่านั้น การที่ทราบถึงกลไกการเกิดโรค และการแพร่กระจาย และเพิ่มจำนวนของโรคมะเร็งอาจนำไปสู่วิธี การรักษาที่เหมาะสมกับพยาธิกำเนิดของโรค เทคนิค PCR ยังสามารถใช้ในการตรวจหายีนใหม่ๆ ที่เกี่ยวกับการเกิดโรคมะเร็ง เช่น Oncogenes และ Tumor Suppressor Genes รวมทั้งใช้ในการตรวจหากลไกการกระตุ้นการทำงานของยีนเหล่านี้ หรือการยับยั้งการทำงานของ Tumor Suppressor Genes เช่น การเกิด Mutation หรือ Loss of Heterozygosity ของ p53 Tumor Suppressor Gene ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทาง PCR ทำให้กลายเป็นวิธีการใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและศึกษาโรคมะเร็งในระดับโมเลกุล ซึ่งจะทำให้สามารถนำความรู้ที่ได้เหล่านี้จากห้องปฏิบัติในระดับงานวิจัยพื้นฐานพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางคลีนิคต่อไปในอนาคตอันใกล้นี้

อ้างอิง

1. Deforges JF. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetic for medical diagnosis. N Engl J Med 1990 Jan 18;322(3):178-83
2. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am 1990 Apr; 246(4): 56-61,64-65
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F,Mullis KB, Horn GT,Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985 Dec 20; 230(4732):1305-4
4. Lyons J. The polymerase chain reaction and cancer diagnosis. Cancer 1991 Mar 15;69(6) Suppl: 1527-31
5. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-standed DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequenc in of the HLA-DQA locus. Proc Natl Acad Sci USA 1988 Oct; 85:(20)7652-6
6. Engelke DR, Hoener PA, Collin FS. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DAN. Proc Natl Acad Sci USA 1988 Jan; 85:(2)544-8
7. Gyllensten UB. PCR and DNA sequencing. Biotechniques 1989; 7: 700-8
8. Hultman T, Stahl S, Hornes E, Uhlen M. Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using wagnetic beads as solid support Nucleic Acids Res 1989 Jul 11; 17(13): 4937-46
9. Ciora T, Denefle P, Mayux JF. Rapid one-step automated sequencing reaction for 16 DNA using Taq polymerase and fluorescent primer. Nucleic Acids Res 1991 Jan 11; 19(1):188
10. Neri A, Knowles DM, Greco A, McCormick Analysis F, Dalla-Favera R. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. Proc Natl Acad Sci USA 1989 Dec;85(23):9268-72

11. Saiki RK, Walsh PS, Livenson CH, Erich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA 1989 Aug; 86(16):6230-4

12. Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA: DNA duplexes. Scienec 1985 Dec 13;230:(4731) 1242-6

13. Grompe M, Muzny DM, Caskey CT. Scanning detection of mutations in human ornithine transcarbamylase by chemical mismatch cleavage. Proc Natl Acad Sci USA 1989 Aug; 86(15):5888-92

14. Riesner D, Steger G, Zimmat R, Owens RA, Wagenhofer M, Hillen W, Vollbach S, Henco K. Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformationa transitions, sequenee variations, and protein-nucleic acid interactions. Electrophoresis 1989 May-Jun; 10(5-6):377-89

15. Orita M, Iwahana H, Kamazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation Polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989 Apr; 86(8):2766-70

16. Liu ET, He M, Rajgopal U. Differential polymerase chain reaction in the analysis of gene dosage Cancer Biology 1993; 4:(1) 47-58

17. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Dughene Muscular Dystrophy. In;Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ,eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Sandiego: Academic Press. 1990;272-81

18. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantition of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1989 Dec; 86(24):9717-21

19. Gilliland G, Perrin S, Bunn HF. Competitive PCR for Quantition of mRNA. In;Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ,eds. PCR Prototal: AGuide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press. 1990;60-9

20. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Vern SE, Preisinger C, Leppert M, Nakamura Y, white R, Smiths MM, Bos JL. Genetic alteration during colorectal-tumor development. N Engl J Med 1988 Sep 1; 319(9):525-32

21. Sidransky D,Tokino T, Hamilton SR, Kingler KW, levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stools of patients with curable colorectal carcinoma. Science 1992 Apr 3; 256(5053): 102-5

22. Feinmesser R, Miyazaki I, Cheug R et al. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification. N Engl J Med 1992 Jan 2; 326(1):17-21

23. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14; 18) by DNA sequence amplification. Science 1987 Jul 10; 237(4811):175-8

24. Voravud N. Molecular Diagnosis and Treatment of cancer. Proceeding of the 9th Annual Meeting Royal College of Physician. 1993; 157-64

25. Voravud N. Oncogenes and Cancer. Proceedings of the 34th Annual Scientific Meeting, Chulalongkorn University, 1993;255-62

26. Kakehi Y, Yoshida O. Restriction fragment length polymorphesm of the L-myc gene and susceptability to metastasis in renal cancer patients. Int J Cancer 1989 Mar; 43(3):931-4

27. Lee MS, Lemaistre A, Kantajian HM, Talpag M, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of two alterative bcr/abl mRNA Junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. Blood 1989 Jun; 73(8):2165-70

28. Munger K, Pheles WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papilloma virus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J Virol 1989 Oct; 63(10):4417-21

29. Wrede D, Tidy JA, Crool T. Expression of RB and p53 protien in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. Molecular carcinogenesis, 1991;171-5

30. Voravud N, Shin DM, Ro JY, et al. Increased polysomies of chromosome 7 and 17 during multistage head and neck carcinogenesis. Cancer Res 1993 (in press)

31. Hopman AHN, Moesker O, Smeets WGB, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramackers FC. Numerical chromosome 1,7,9 and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. Cancer Res 1991 Jan 15; 51(2):644-51

32. Scharf SJ. Cloning with PCR. In:Innis MA, Gelfand DH,Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protools: A Guide to Methods and Applicatins. San Diego:Academic Press, 1993;84-91

33. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequencing analysis of enzymatically amplified genomic sequences. Science 1986 Sep 5; 233(4768):1076-8

34. Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, Victoria MF, Ramireg-Solis R, Webster TD,Ledbetter DH, Caskey CT. Alu polmerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. Proc Natl Acad Sci USA 1989 Sep; 86(17):6686-90

35. Voravud N. Gene therapy of cancer. Rhamathibodi Med J 1994; 17(2) Suppl:129-73

36. Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Ginsburg D. Detection of Philadelphai chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. Blood 1989 Aug; 74(2):882-5

37. de The' H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia uses the retinoic acid receptor & gene to a novel transcribed locus. Nature 1990 Oct 11;347(6293):558-61

38. Rambaldi A, Biondi A, Pandolfi PP. Molecular monitoring of the myl/RAR-α fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. Blood 1991; 78:336a

39. Miller WH Jr, Kakizuka A, Frankel SR, Warrell RP Jr, DeBlasio A, Levine K, Evans RM, Dmitrovsky E. Reverse transcription polymerase chain reaction for the rearranged retinoic acid receptor-α clarifies diagnosis and detects minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 1992 Apr 1; 89(7):2694-8

40. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Huang ME, Krawice I, Castaigne S, Degos L, Fenaux P, Tiollais P, Dijean A. The retinoic acid receptor alpha gene is rearranged in retinoic acid-sensitive promyelocytic leukemias. Leukemia 1990 Dec; 4(12): 802-7