Chula Med J Vol. 62 No. 1 January-February 2018

ระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน

ธมลวรรณ วรฤทัย* กฤษณ์ เจริญลาภ**
ชินดนัย หงสประภาส** อภิวัฒน์ มุทิรางกูร***
สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก*

Woraruthai T, Charoenlap C, Hongsaprabhas C, Mutirangura A, Honsawek S. LINE-1 hypomethylation level in patients with soft tissue tumor. Chula Med J 2018 Jan – Feb;62(1): 79 - 90

Background : *LINE-1 is a non-long terminal retrotransposon, comprising 17% in human genome. The aberrant methylation of LINE-1 can cause mitotic recombination and genomic instability leading to soft tissue tumor. However, the study of LINE-1 methylation in soft tissue tumor has received little attention.*

Objectives : *To determine LINE-1 methylation level in neoplastic tissues compared with non-neoplastic adjacent tissues of soft tissue tumor patients and to investigate the correlation of LINE-1 methylation between neoplastic tissues and peripheral blood leukocytes.*

Methods : *Thirty-five patients with soft tissue tumor and 107 healthy controls were recruited. LINE-1 methylation level was analyzed by using quantitative combined bisulfite restriction analysis.*

Results : *LINE-1 methylation level was statistically significantly lower ($P = 0.036$) in neoplastic tissues than in non-neoplastic adjacent tissues but there was no significant difference in LINE-1 methylation among benign tumor, malignant tumor, and non-neoplastic adjacent tissues. In addition, LINE-1 methylation was not different in each subgroup of soft tissue tumor. Nevertheless, there was a positive correlation of LINE-1 methylation level between neoplastic tissues and peripheral blood leukocytes ($r = 0.812$, $P < 0.001$).*

* หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
***ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Conclusion : *These findings suggest that there was LINE-1 hypomethylation in soft tissue tumor. Thus, LINE-1 hypomethylation might play a crucial role in the pathogenesis of soft tissue tumor.*

Keywords : *LINE-1, methylation, peripheral blood leukocytes, soft tissue tumor.*

Correspondence to: Honsawek S. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. July 6, 2017.

ธมลวรรณ วรฤทัย, กฤษณ์ เจริญลาภ, ชินดนัย หงสประภาส, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก. ระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2561 ม.ค. – ก.พ.;62(1): 79 – 90

เหตุผลของการวิจัย : *LINE-1 เป็น non-long terminal retrotransposon ที่อยู่ในจีโนมมนุษย์ประมาณร้อยละ 17 โดยกระบวนการ LINE-1 methylation ที่ผิดปกติเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด mitotic recombination และความไม่เสถียรของจีโนมส่งผลต่อการเกิดโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน อย่างไรก็ตามการศึกษากระบวนการ LINE-1 methylation ในโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนยังมีจำนวนน้อยมาก*

วัตถุประสงค์ : *เพื่อตรวจสอบระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกเปรียบเทียบกับในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ตลอดจนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกและเซลล์เม็ดเลือดขาว*

วิธีการศึกษา : *ทำการตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียงและเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 35 ราย รวมถึงกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 107 รายด้วยเทคนิค quantitative combined bisulfite restriction analysis*

ผลการศึกษา : *ระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกมีระดับต่ำกว่าในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.036$) แต่ระดับ LINE-1 methylation ไม่แตกต่างกันทั้งในเนื้องอกชนิดไม่รุนแรงและรุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง นอกจากนี้ระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนแต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง LINE-1 methylation ในเนื้องอกและในเซลล์เม็ดเลือดขาว ($r = 0.812$, $P < 0.001$)*

สรุป : *ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงในเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ดังนั้นกระบวนการ LINE-1 methylation ต่ำลงอาจมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน*

คำสำคัญ : *LINE-1, methylation, เม็ดเลือดขาว, โรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน.*

เนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue tumor) เป็นเนื้องอกที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อในร่างกาย ตำแหน่งส่วนใหญ่ที่พบ คือ บริเวณแขน ขา มือ และเท้า ประมาณร้อยละ 75 และอีกร้อยละ 10 พบที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวและหลังเยื่อบุช่องท้อง (retroperitoneum) ซึ่งเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ในร่างกาย[1] โรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนส่วนมากพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง สามารถเกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในร่างกาย ข้อมูลของประเทศไทยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2555 คาดการณ์ว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 41 ราย[2] โรคที่พบบ่อยได้แก่ เนื้องอกไขมัน (lipoma), fibrous tumor และเนื้องอกหลอดเลือด กลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนพบโรคมะเร็งกล้ามเนื้อลาย (rhabdomyosarcoma) ส่วนกลุ่มผู้ป่วยวัยรุ่นพบโรคมะเร็งเยื่อบุข้อ (synovial sarcoma)[3] และกลุ่มผู้สูงอายุพบโรคมะเร็งไขมัน (liposarcoma) และมะเร็งกล้ามเนื้อเรียบ (leiomyosarcoma) สาเหตุการเกิดโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม การได้รับรังสีหรือสารเคมี การติดเชื้อไวรัส หรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้มีรายงานว่า เนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนเกิดขึ้นบริเวณที่มีแผลเป็น ตรงบริเวณที่มีการหักของกระดูก และใกล้กับบริเวณที่มีการผ่าตัด[4]

Long interspersed nuclear element (LINE-1) คือ non-long terminal retrotransposon มีลำดับเบสเรียงตัวซ้ำกันหลายหน่วย คิดเป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 17 ของจีโนมมนุษย์ทั้งหมด[5] สามารถเพิ่มจำนวนได้เองอย่างอิสระ[6] ในทางกลับกันเซลล์ร่างกายมีการยับยั้ง LINE-1 แบบกระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetics)[7] อย่างไรก็ตามการทำงานของ LINE-1 อาจทำให้ภายในจีโนมมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้จีโนมไม่เสถียร และอาจเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคพันธุกรรมหลายชนิดรวมทั้งโรคมะเร็ง ซึ่งเกิดจากการสะสมของยีนที่เกิดการกลายพันธุ์[8,9] การทำงานของ LINE-1 มีความแตกต่างกันตามประเภทของมะเร็ง และแปรผันระหว่างที่มีการเจริญของมะเร็ง[10] ระดับ LINE-1 methylation อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่ามีการศึกษาระดับ LINE-1 hypomethylation ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมน้ำลาย มะเร็งกล่องเสียง มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น ผลการวิจัยส่วนใหญ่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน พบว่ามะเร็งมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง[11] ผลการวิจัยดังกล่าวเสนอว่า LINE-1 hypomethylation อาจนำมาประยุกต์ช่วยในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง นอกจากนี้ LINE-1 hypomethylation มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญและความรุนแรงของโรคมะเร็ง ถึงแม้ว่ามีการศึกษา global hypomethylation ในโรคมะเร็งอย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาในโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนยังมีจำนวนน้อยมาก การศึกษาระดับรวมถึงรูปแบบของ LINE-1 methylation ในเนื้องอกดังกล่าว อาจนำผลการศึกษาที่ได้มาประยุกต์พัฒนาช่วยในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรครวมถึงติดตามผลการรักษา

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetics อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation[12] กระบวนการ DNA methylation ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลงหรือเพิ่มขึ้น สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ hypermethylation เป็นกระบวนการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนสูงกว่าระดับปกติ และ hypomethylation เป็นกระบวนการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนต่ำกว่าระดับปกติ กลไกทั้ง 2 ประเภทนี้ สามารถพบได้ในโรคมะเร็งของมนุษย์[13] นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลง epigenetics มีส่วนเกี่ยวข้องกับมะเร็งแพร่กระจาย เช่น มะเร็งเต้านม[14] มะเร็งปอด[15] มะเร็งลำไส้ใหญ่[16] เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น[17] อย่างไรก็ตาม การเกิด global DNA hypomethylation ทำให้สูญเสียกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการถอดรหัสในบริเวณที่โดยปกติจะไม่มีการแสดงออกของยีน

ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น เช่น proto-oncogene หลายชนิด[18] วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบระดับและรูปแบบ LINE-1 methylation ในเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกกับเซลล์เม็ดเลือดขาว

วิธีการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย (Institutional Review Board) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รูปแบบการวิจัยเป็นชนิดตัดขวาง (cross-sectional study) เพื่อศึกษาระดับรวมถึงรูปแบบ LINE-1 methylation ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนที่เข้ารับการผ่าตัดในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สามารถจัดจำแนกผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนได้ 35 รายดังนี้ liposarcoma 11 ราย, soft tissue sarcoma with metastasis 6 ราย, spindle cell tumor 4 ราย, sarcoma 4 ราย, chondrosarcoma 2 ราย, schwannoma 2 ราย, leiomyosarcoma 1 ราย, malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) 1 ราย, chondroma 1 ราย, hibernoma 1 ราย, hemangioma 1 ราย และ hemangioendothelioma 1 ราย

เกณฑ์การคัดเข้า ได้แก่ ผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน อายุระหว่าง 18 - 80 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เกณฑ์การคัดออก ได้แก่ ผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดหรือรังสีรักษา หรือเคยเข้ารับการผ่าตัดมาก่อน ผู้ป่วยที่เป็นโรคที่ส่งผลรบกวนต่อเมแทบอลิซึมของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และผู้ป่วยโรคเรื้อรังอื่น ๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น

การสกัดแยก DNA จากชิ้นเนื้อ

นำชิ้นเนื้อน้ำหนักประมาณ 50 mg มาใส่ลงในโกร่งบดที่มีไนโตรเจนเหลว แล้วนำผงที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube สกัด DNA จากชิ้นเนื้อตามขั้นตอนในคู่มือชุดสกัด DNA จากชิ้นเนื้อ (Vivantis Technologies, Malaysia) หลังจากนั้นจึงวัดคุณภาพ DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm หลังจากนั้นจึงทำการเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation

การสกัดแยก DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว

ตัวอย่างเลือดที่เก็บด้วยหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว ethylenediaminetetraacetic acid ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการแยกพลาสมา และส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาวรวมกับเกล็ดเลือด (buffy coat) ออกจากกัน แล้วจึงสกัด DNA ด้วยชุดสกัด DNA (Vivantis Technologies, Malaysia) แล้ววัดคุณภาพ DNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm และทำการเก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation

การวิเคราะห์ LINE-1 methylation ด้วยวิธี quantitative Combined Bisulfite Restriction Analysis (qCOBRA)

ปรับค่าความเข้มข้นของ DNA ให้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 ng/μl ปริมาตร 20 μl (50 ng) แล้วนำ DNA มาทำการเติมสาร bisulfite ด้วย EZ 8 DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA) แล้วทำการเพิ่มจำนวนของ bisulfited DNA ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ดังนี้ LINE-1 forward primer คือ

5'-GTTAAAGAAAGGGGTGAYGGT-3' และ LINE-1 reverse primer คือ

5'-AATACRCCRTTTCTTAAACCRATCTA-3'

ผสมสารที่ใช้สำหรับการทำ PCR โดยมีส่วนประกอบดังนี้ 10X PCR buffer, 200 mM dNTPs, 25 mM $MgCl_2$, 20 μM primers (forward and reverse), 0.5 U HotStar *Taq* DNA polymerase, น้ำกลั่น และ

bisulfite-treated DNA 50 ng ปริมาตรรวม 10 μl หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR โดยใช้สภาวะ 95 °C initial activation เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำซ้ำ 40 รอบด้วย 95 °C denature เป็นเวลา 45 วินาที, 55 °C annealing เป็นเวลา 45 วินาที, 72 °C extension เป็นเวลา 45 วินาที และ 72 °C final extension เป็นเวลา 7 นาที

หลังจากทำการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR แล้ว LINE-1 จึงถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ 2 U *TaqI* และ 8 U *TasI* ในสารละลาย NE Buffer 3.1 แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C ข้ามคืน หลังจากนั้นวิเคราะห์รูปแบบ LINE-1 methylation ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel แล้วจึงนำเจลที่ได้ย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นวัดความเข้มของแถบที่ปรากฏ (band intensity) ด้วยเครื่อง Molecular Imager Gel Doc ด้วยโปรแกรม Image Lab (Bio-Rad, Begoniastraat, Belgium) โดยมีสูตรการคำนวณรูปแบบ LINE-1 methylation ดังนี้

สูตรการคำนวณรูปแบบการเกิด methylation ใน LINE-1

กำหนดให้ A แทน ความเข้มของแถบ DNA ขนาด 92 คู่เบส หารด้วย 92

B แทน ความเข้มของแถบ DNA ขนาด 60 คู่เบส หารด้วย 56

C แทน ความเข้มของแถบ DNA ขนาด 50 คู่เบส หารด้วย 48

D แทน ความเข้มของแถบ DNA ขนาด 42 คู่เบส หารด้วย 40

E แทน ความเข้มของแถบ DNA ขนาด 32 คู่เบส หารด้วย 28

F แทน [(D+E)-(B-C)] หารด้วย 2

ร้อยละของ LINE-1 methylation (% ^{m}C) = 100X (A+2C+F) / (2A+2B+2C+2F)

ร้อยละของ LINE-1 hypermethylation (% $^{m}C^{m}C$) = 100X (C/2)/[(C/2)+A+B+F)]

ร้อยละของ Partially methylation (% $^{u}C^{m}C$) LINE-1 = 100X F/[(C/2)+A+B+F)]

(% $^{m}C^{u}C$) = 100X A/[(C2)+A+B+F)]

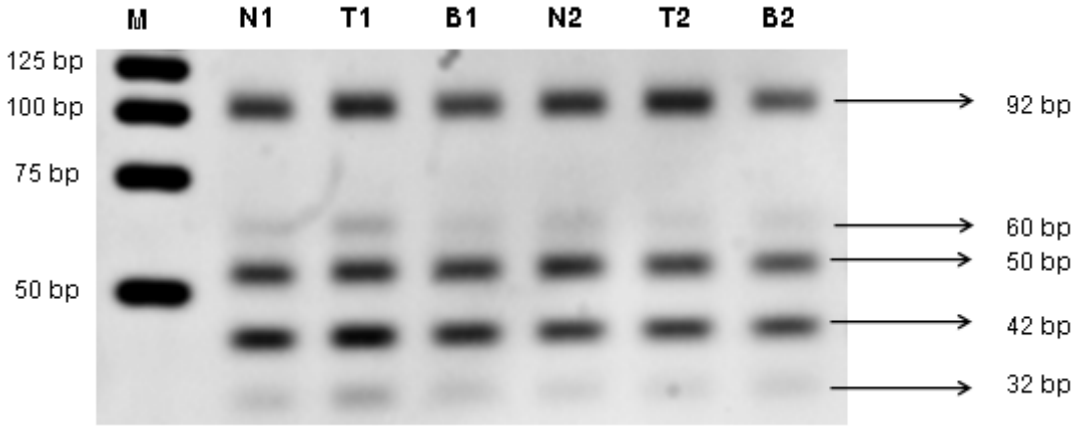
ร้อยละของ LINE-1 hypomethylation (% $^{u}C^{u}C$) = 100XB/[(C/2)+A+B+F)]

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอก (neoplastic tissue) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง (non-neoplastic tissue) รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls) ที่มีการแจกแจงข้อมูลแบบไม่เป็นปกติใช้สถิติ Wilcoxon matched-pairs signed rank test ในกรณีที่วิเคราะห์ข้อมูล 3 กลุ่ม ประกอบด้วยเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง เนื้องอกชนิดไม่รุนแรง (benign tumor) และเนื้องอกชนิดรุนแรงหรือมะเร็ง (malignant tumor) รวมถึงการวิเคราะห์เมื่อแบ่งตามประเภทของโรคใช้สถิติ one-way analysis of variance นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาว ใช้สถิติ Pearson's correlation ข้อมูลดังกล่าววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 22.0 โดยถือว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $P < 0.05$ และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการวาดกราฟข้อมูล

ผลการวิจัย

จากการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนในเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียงและเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยวิเคราะห์ระดับและรูปแบบ LINE-1 methylation ด้วยเทคนิค qCOBRA เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ารูปแบบ LINE-1 methylation สามารถวิเคราะห์ความเข้มของแถบได้ทั้งหมด 5 รูปแบบ ประกอบด้วย $\%C^{u}C^{u}$ (92 คู่เบส), $\%C^{u}C^{m}$ (60 คู่เบส), $\%C^{m}C^{u}$ (50 คู่เบส), $\%C^{m}C^{m}$(42 คู่เบส) และ $\%C^{m}$(32 คู่เบส) ดังแสดงในรูปที่ 1

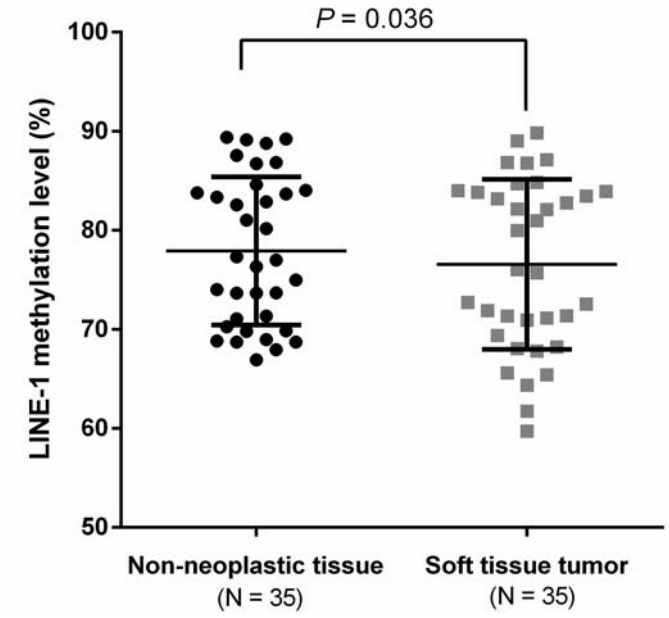


รูปที่ 1. รูปแบบ LINE-1 methylation ของเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาว (M = ขนาด DNA มาตรฐาน, N = เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง, T = เนื้องอก และ B = เซลล์เม็ดเลือดขาว)

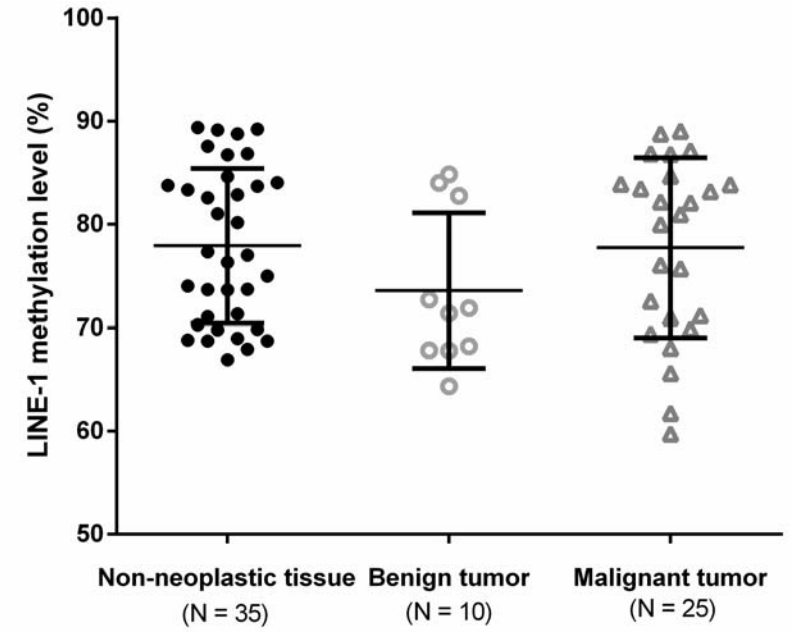
นอกจากนี้ได้ทำการวัดระดับของ LINE-1 methylation ในเนื้องอก และเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกต่ำกว่าในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.036)

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์ตามความรุนแรงของเนื้องอกเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง (non-neoplastic tissue) โดยแบ่งเนื้องอกเป็นกลุ่มเนื้องอกไม่รุนแรง (benign tumor) จำนวน 10 ราย และเนื้องอกรุนแรง (malignant tumor) จำนวน 25 ราย พบว่าระดับของ LINE-1 methylation ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 3)

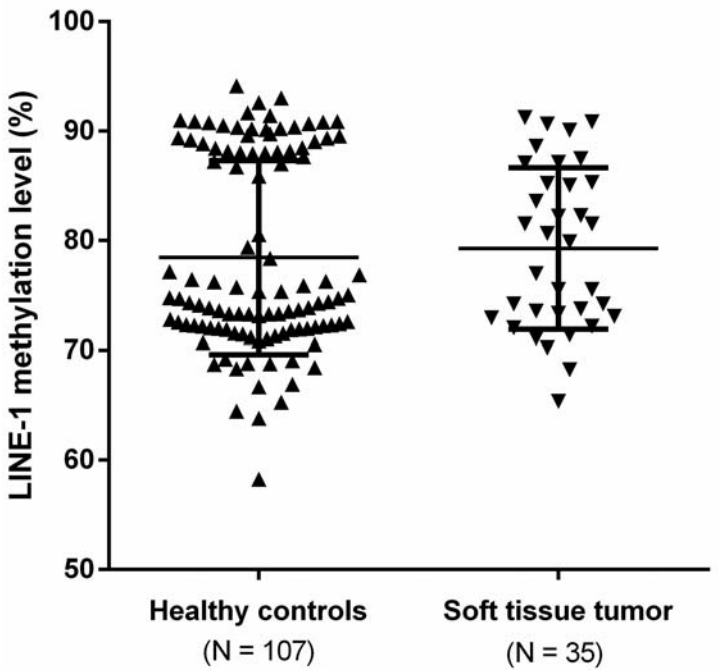
เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับ LINE-1 methylation ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 2. ระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกเปรียบเทียบกับในเนื้อเยื่อปกติข้างเซียง



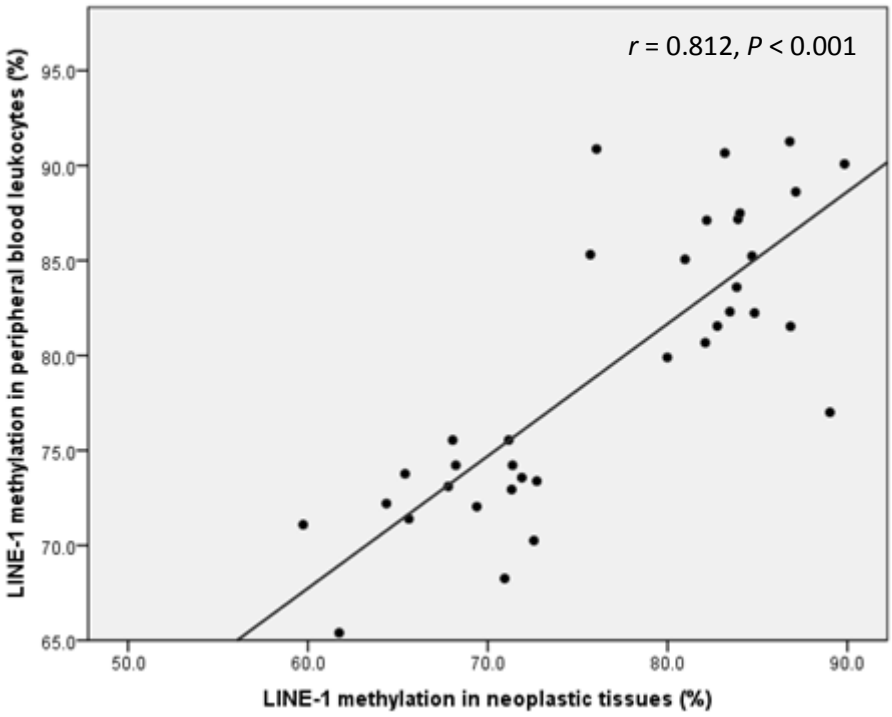
รูปที่ 3. ระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกชนิดไม่รุนแรงและชนิดรุนแรงเปรียบเทียบกับในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง



รูปที่ 4. ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนและกลุ่มควบคุม

ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกและเซลล์เม็ดเลือดขาว

เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกและเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าระดับ LINE-1 methy-lation ในเนื้องอกมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับในเซลล์เม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ (r = 0.812 , P <0.001) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5. ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกและเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน

อภิปรายผล

การศึกษาเปรียบเทียบระดับและรูปแบบ LINE-1 methylation ในเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ด้วยเทคนิค qCOBRA และศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ในเนื้องอกเปรียบเทียบกับในเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าเนื้องอกมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่าเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกและเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ในเนื้องอกมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับในเซลล์เม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิจัยดังกล่าวอาจนำไปสู่สมมติฐานของการเกิดโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ซึ่งอาจเกิดจากกลไก DNA methylation ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมและเกิดโรคมะเร็งในที่สุด

กระบวนการ methylation ของ repetitive elements แต่ละชนิดนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการคงสภาพของจีโนม โดยปกติสามารถเกิดแบบ hypomethylation งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าการเกิด global hypomethylation ของ repetitive elements มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด โดยมีงานวิจัย ที่ศึกษาเกี่ยวกับ LINE-1 methylation ในโรคเนื้องอก ameloblastoma และ keratocystic odontogenic (KCOT) ซึ่งเป็นเนื้องอกที่มีจุดกำเนิดเดียวกัน แต่มีระดับความรุนแรงและการเกิดซ้ำที่ต่างกัน พบว่า LINE-1 methylation ใน KCOT สูงกว่าใน ameloblastoma อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการเกิด global hypomethylation ของ ameloblastoma สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ตับ ต่อมลูกหมาก ปอด กระเพาะอาหาร เป็นต้น[18] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดพลาสมาเซลล์แบ่งตัวผิดปกติ (multiple myeloma) มีระดับ LINE-1 และ Alu methylation ในเนื้องอกหรือเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี [19] แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ในมะเร็งนั้นลดลง สอดคล้องกับงานวิจัย

ที่มีการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่น พบว่าระดับ global hypomethylation นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้องอก จึงแสดงให้เห็นว่า DNA hypomethylation ในโรคมะเร็งอาจทำให้เกิดกระบวนการ mitotic recombination ที่ผิดปกติ ส่งผลให้โครโมโซมเกิดความเสียหาย หรือเกิดการย้ายตำแหน่งของโครโมโซม นอกจากนี้มีหลักฐานที่สนับสนุนว่ากระบวนการ global hypomethylation ของ repetitive elements ในเนื้องอกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดพลาสมาเซลล์แบ่งตัวผิดปกตินั้นอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพและการเจริญของโรค จึงอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งดังกล่าวได้[19] นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมารายงานถึงระดับ LINE-1 methylation ที่ทำการศึกษาในชิ้นเนื้อและตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าระดับ LINE-1 methylation ต่ำลงเฉพาะในชิ้นเนื้อ แต่ระดับ LINE-1 methylation ในเลือดนั้นไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากจากโรคมะเร็งมีการเกิด hypomethylation ที่จำกัดเพียงในชิ้นเนื้อเท่านั้น[20]

นอกจากนี้การศึกษานี้พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ของเนื้องอกมีความสัมพันธ์กับระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นการตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสะท้อนถึงระดับที่เกิดขึ้นในชิ้นเนื้องอก แต่การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีไม่พบความแตกต่างทางสถิติ อาจเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนไม่สมดุลกัน ส่งผลให้การแปลผลอาจไม่สามารถสรุปได้ว่าระดับ LINE-1 methylation มีความแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มหรือไม่

ข้อจำกัดในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มีขนาดของตัวอย่างที่นำมาศึกษาระดับ LINE-1 methylation มีจำนวนน้อย และในการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าจำนวนกลุ่มประชากรในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีความแตกต่างกันมากกับจำนวนผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ประกอบกับเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนที่นำมาศึกษานั้นมีความหลากหลาย จึงยากต่อการแบ่งประเภทให้มีความจำเพาะเจาะจง อีกทั้งไม่สามารถรวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยได้ครบถ้วน ส่งผลให้ทำการวิเคราะห์ผลเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้การศึกษานี้ไม่ได้ตรวจสอบระดับ promoter methylation การศึกษาในอนาคตจึงควรที่จะทำการศึกษาโดยเพิ่มขนาดตัวอย่างให้มากขึ้น และศึกษาระดับ promoter methylation ควบคู่กันด้วย

สรุป

การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 35 ราย จากชิ้นเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าเนื้องอกมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่าเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเนื้องอก พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ จึงนำไปสู่สมมติฐานกลไกการเปลี่ยนแปลงทางด้าน epigenetics อาจมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ศูนย์เครื่องมือภาควิชาชีวเคมี และศูนย์เครื่องมือกลาง ChulaMRC (Chulalongkorn Medical Research Center) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนประเภท (60/40) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. รังสีรักษาและมะเร็งวิทยา ฝ่ายรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ChulaCancer). โรคมะเร็งเนื้อเยื่อ

อ่อน [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [20 ก.พ. 2560]. เข้าถึงได้จาก: http://www.chulacancer.net.

2. National Cancer Institute. Hospital based-cancer registry annual report 2012.Bangkok: National Cancer Institute Department of Medical Services Ministry of Public Health; 2012. p. 34-60.
3. Kirkpatrick CJ, Alves A, Kohler H, Kriegsmann J, Bittinger F, Otto M, et al. Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change. Am J Pathol 2000; 156: 1455-67.
4. Ofluoglu O, Boriani S, Gasbarrini A, De Iure F, Donthineni R. Diagnosis and planning in the management of musculoskeletal tumors: surgical perspective. Semin Intervent Radiol 2010;27:185-90.
5. Kazazian HH Jr, Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. Nat Genet 1998;19:19-24.
6. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921.
7. Brouha B, Meischl C, Ostertag E, de Boer M, Zhang Y, Neijens H, et al. Evidence consistent with human L1 retrotransposition in maternal meiosis I. Am J Hum Genet 2002;71:327-36.
8. van den Hurk JA, Meij IC, Seleme MC, Kano H, Nikopoulos K, Hoefsloot LH, et al. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. Hum Mol Genet 2007;16:1587-92.
9. Kaer K, Speek M. Retroelements in human disease. Gene 2013;518:231-41.
10. Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Ferec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. Hum Genet 2005;117:411-27.
11. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Qi X, Jiang X, Shi-Jie M. LINE-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. Genet Med 2016;18:431-9.
12. Egger G, Liang G, AparicioA, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004;429: 457-63.
13. Soozangar N, Sadeghi MR, Jeddi F, Somi MH, Shirmohamadi M, Samadi N. Comparison of genome-wide analysis techniques to DNA methylation analysis in human cancer. J Cell Physiol 2017 Sep 9. doi:10.1002/jcp.26176.
14. Fang F, Turcan S, Rimner A, Kaufman A, Giri D, Morris LG, et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. Sci Transl Med 2011;3:75ra25.
15. Marsit CJ, Houseman EA, Christensen BC, Eddy K, Bueno R, Sugarbaker DJ, et al. Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors. Cancer Res 2006; 66:10621-9.
16. Samowitz WS. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. J Mol Diagn 2007;9:281-3.
17. Jeong S, Lee K, Wen X, Kim Y, Cho NY, Jang JJ, et al. Tumoral LINE-1 hypomethylation is associated with poor survival of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. BMC

Cancer 2017;17:588.

18. Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. Oral Dis 2010;16:286-91.
19. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, Ronchetti D, Mosca L, Deliliers GL, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. Carcinogenesis 2009;30:1330-5.
20. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. Int J Colorectal Dis 2004;19:95-101.