

การเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันและการลดลง ของจำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในโรคเนื้องอก กระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

มณฑิรา ฐานไพศาลกิจ* ชินดนัย หงสประภาส**
กฤษณ์ เจริญลาภ** สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก***

Tanpaisankit M, Hongsaprabhas C, Charoenlap C, Honsawek S. High oxidative stress and decrease of mitochondrial DNA copies in musculoskeletal tumors. Chula Med J 2017 Nov – Dec; 61(6): 771 - 82

- Background** : Musculoskeletal tumors encounter the complications at the diagnosis, treatment, and monitoring with increased prevalence every year. Recently, several studies have shown the association between the modifications in the number of copies of mitochondrial DNA (mtDNA) with cancer progression. However, few studies report the comparison between neoplastic tissues, non-neoplastic tissues, and peripheral blood leukocytes (PBLs) in musculoskeletal tumors.
- Objectives** : The purpose of this study was to investigate the relationship between the number of copies of mtDNA in neoplastic tissues, non-neoplastic tissues, and PBLs of musculoskeletal tumor patients with PBLs of healthy controls. The second aim was to examine the 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels in neoplastic tissues and non-neoplastic tissues.
- Methods** : Neoplastic tissues, non-neoplastic adjacent tissues, and venous blood samples were obtained from 48 musculoskeletal tumors patients who underwent surgical removal of their tumors. Peripheral blood was also collected from 100 healthy controls. The number of copies of mtDNA was assessed using quantitative real-time polymerase chain reaction and 8-OHdG levels were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay.

* นิสิตปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Results : *The number of mtDNA copies in neoplastic tissues significantly decreased when compared with that in non-neoplastic tissues ($P = 0.018$). In addition, the number of mtDNA copies in PBLs was lower than that in neoplastic tissues ($P < 0.001$) and that in adjacent tissues ($P < 0.001$). The finding showed the number of mtDNA copies in PBLs of the patients was markedly less than that of the controls ($P = 0.039$). Moreover, the number of mtDNA copies in neoplastic tissues was significantly associated with those in PBLs of the individuals ($r = 0.348$, $P = 0.021$). The 8-OHdG levels were increased in neoplastic tissues when compared with those in non-neoplastic tissues as well.*

Conclusion : *The declined number of mtDNA copies in neoplastic tissues and those in PBLs of musculoskeletal tumors patients was observed. The association between the number of mtDNA copies in neoplastic tissues and that in PBLs was also observed in this study. Moreover, 8-OHdG levels in neoplastic tissues were higher than those in non-neoplastic tissues. The results indicate that the increase of oxidative stress in tumor environment may affect the reduction of the number of mtDNA copies. The decrease of the number of mtDNA copies is important event in musculoskeletal tumors progression and might be used as an indicator to identify the tumor development.*

Keywords : *High oxidative stress, number of mitochondrial DNA copies, 8-hydroxydeoxyguanosine levels, musculoskeletal tumors, peripheral blood leukocytes.*

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

Received for publication. June 12, 2017.

มณฑิรา ฐานไพศาลกิจ, ชินดนัย หงสประภาส, กฤษณ์ เจริญลาภ, สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก.
การเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันและการลดลงของจำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอใน
โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน. *จุฬาลงกรณ์เวชสาร* 2560 พ.ย. - ธ.ค.;61(6):
771 - 82

เหตุผลของการทำวิจัย : โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีความซับซ้อนในการวินิจฉัย
การรักษา และติดตามผลการรักษา และพบอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นทุกปี
การศึกษาก่อนหน้าพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไมโทคอนเดรีย
ดีเอ็นเอ (*mtDNA copies*) และการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด แต่พบ
การศึกษาเปรียบเทียบจำนวน *mtDNA copies* ในชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อ
ปกติข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวในโรคเนื้องอกกระดูกและ
เนื้อเยื่ออ่อนจำนวนน้อย

วัตถุประสงค์ : เพื่อวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวน *mtDNA copies*
ในชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาว
ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเทียบกับเซลล์
เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม ร่วมกับการศึกษาเปรียบเทียบระดับ
8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วย

วิธีการทำวิจัย : ผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนที่เข้ารับการรักษามาตัด
เนื้องอก จำนวน 48 ราย ทำการเก็บชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณ
ข้างเคียง และตัวอย่างเลือดร่วมกับเก็บตัวอย่างเลือดในกลุ่มควบคุม
จำนวน 100 ราย นำมาศึกษาจำนวน *mtDNA copies* ด้วยวิธี *real-time*
polymerase chain reaction และวัดระดับ 8-OHdG ด้วยวิธี *enzyme-*
linked immunosorbent assay

ผลการศึกษา : จำนวน *mtDNA copies* ในชิ้นเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมี
จำนวนน้อยกว่าในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติ ($P = 0.018$) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวมีจำนวน *mtDNA copies*
น้อยกว่าทั้งในชิ้นเนื้องอก ($P < 0.001$) และในชิ้นเนื้อปกติบริเวณ
ข้างเคียง ($P < 0.001$) จำนวน *mtDNA copies* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว
ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูก และเนื้อเยื่ออ่อนมีปริมาณน้อยกว่า
ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P = 0.039$) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างจำนวน
mtDNA copies ในชิ้นเนื้องอกและเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย
รายเดียวกัน ($r = 0.348, P = 0.021$) และพบว่าระดับ 8-OHdG
ในชิ้นเนื้องอกมีระดับสูงกว่าในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง ($P < 0.001$)

สรุป : ผลการศึกษาพบการลดลงของจำนวน *mtDNA* copies ในชิ้นเนื้อออก ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย อีกทั้งพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน *mtDNA* copies ในชิ้นเนื้ออก และเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย และพบระดับ 8-OHdG สูงขึ้นใน ชิ้นเนื้ออกเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เนื้ออก กระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น อาจมีส่วน เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจำนวน *mtDNA* copies ให้มีปริมาณ ลดลง ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของการเจริญในโรคเนื้ออกกระดูกและ เนื้อเยื่ออ่อน อาจนำจำนวน *mtDNA* copies มาประยุกต์ใช้เป็นตัว บ่งชี้การเจริญของเนื้ออกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนได้

คำสำคัญ : จำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ, ระดับ 8-OHdG, โรคเนื้ออกกระดูก และเนื้อเยื่ออ่อน, เซลล์เม็ดเลือดขาว.

โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์เกิดเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีความหลากหลายโดยมีมากกว่า 50 ชนิดย่อย แต่ละชนิดมีลักษณะทางคลินิกที่แตกต่างกัน ทำให้มีความซับซ้อนในการวินิจฉัย การรักษา และติดตามผลการรักษา

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA, mtDNA) เป็นสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อ พบว่าโปรตีนบางส่วนซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของ mtDNA ถูกควบคุมโดย DNA ในนิวเคลียส mtDNA สามารถถูกทำลายและเกิดการกลายพันธุ์ได้สูงกว่า nuclear DNA เนื่องจาก mtDNA ไม่มี histone และ intron ร่วมกับกลไกในการซ่อมแซม DNA มีอย่างจำกัด อีกทั้งเกิด reactive oxygen species (ROS) ได้ง่ายที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ด้วยสาเหตุนี้จึงมีการนำจำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA copies) มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดโรคหลายชนิด รวมถึงโรคมะเร็ง การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวน mtDNA copies มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด โดยพบว่าชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร⁽¹⁾ มะเร็งต่อมไทรอยด์⁽²⁾ มะเร็งรังไข่⁽³⁾ มีจำนวน mtDNA copies สูงขึ้นเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติ ในทางกลับกันการศึกษาบางส่วนแสดงให้เห็นถึงการลดลงของจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้อมะเร็งเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงเช่น โรคมะเร็งเต้านม⁽²⁾ มะเร็งไต⁽⁴⁾ มะเร็งตับ⁽⁵⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวน mtDNA copies จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรค มะเร็งอีกด้วยในการศึกษาของเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง⁽⁶⁾ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก⁽⁷⁾ พบการเพิ่มขึ้นของจำนวน mtDNA copies เมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin lymphoma⁽⁸⁾ และมะเร็งไต⁽⁹⁾ กลับมีจำนวน mtDNA copies ลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดจากการเสียสมดุลระหว่างระบบจัดการสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นส่งผลให้มีสารอนุมูลอิสระมากเกินไป สามารถทำลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และ DNA โดยพบว่าเบส guanine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารพันธุกรรม DNA มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมาก ทำให้การเข้าคู่เบสผิดปกติโดยเปลี่ยนเบส guanine เป็นเบส adenine แทน ดังนั้นเมื่อเกิดการกระบวนการจำลอง DNA การจับคู่ของเบส G:C จึงเปลี่ยนเป็น T:A แทน พบว่า 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในโรคมะเร็งหลายชนิด การศึกษาท่อน้ำในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก⁽¹⁰⁾ มะเร็งหลอดอาหาร⁽¹¹⁾ พบการแสดงออกของ 8-OHdG ในชิ้นเนื้ออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติ จึงมีการนำ 8-OHdG มาใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อบ่งชี้ถึงการทำลาย DNA จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตลอดจนใช้ศึกษาความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งด้วย

เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนต่ำ การศึกษาท่อน้ำที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของจำนวน mtDNA copies และระดับ 8-OHdG ในโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีจำนวนน้อย และยังไม่พบการศึกษาเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ระหว่างชิ้นเนื้ออก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างจำนวน mtDNA copies ระหว่างชิ้นเนื้ออก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม ร่วมกับการศึกษาระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้ออก และชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงในผู้ป่วย

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies และระดับของ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคเนื้องอก

กระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนที่เข้ารับการรักษาที่ฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 48 ราย อายุระหว่าง 18 - 80 ปี ผู้เข้าร่วมโครงการไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด หรือรังสีรักษา หรือไม่เคยเข้ารับการรักษาตัดมาก่อน หรือเป็นผู้ป่วยซึ่งเป็นโรคที่ส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และผู้ป่วยโรคเรื้อรังชนิดอื่น ๆ ในการศึกษานี้กลุ่มควบคุมเป็นผู้เข้าร่วมโครงการที่เข้ารับการรักษาสุขภาพประจำปี และผลการตรวจสุขภาพอยู่ในเกณฑ์ปกติ โดยมีอายุและสัดส่วนของเพศใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย และไม่เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับเนื้องอกและเมแทบอลิซึมของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน หรือเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อรังชนิดอื่น ๆ จำนวน 100 ราย ผู้เข้าร่วมโครงการได้รับการชี้แจงข้อมูลโครงการวิจัย และให้ความยินยอมก่อนเข้าร่วมการวิจัยทุกคน การวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการเก็บชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติ บริเวณข้างเคียง ($n = 48$) และตัวอย่างเลือด ($n = 44$) จากผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ตัวอย่างชิ้นเนื้อได้รับการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ประกอบด้วยเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 35 ราย (lipoma 4 ราย schwannoma 3 ราย chondroma 1 ราย desmoids fibromatosis 1 ราย epitheloid hemangioma 1 ราย hibernoma 1 ราย pigmented villonodular synovitis 1 ราย plasma cell neoplasm 1 ราย liposarcoma 11 ราย spindle cell tumor 3 ราย chondrosarcoma 2 ราย malignant peripheral nerve sheath tumor 2 ราย alveolar soft part sarcoma 1 ราย epitheloid hemangioendothelioma 1 ราย epitheloid sarcoma 1 ราย และ Leiomyosarcoma 1 ราย) เนื้องอกกระดูกจำนวน 7 ราย (giant cell tumor 5 ราย osteosarcoma 2 ราย) และมะเร็งกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนชนิดทุติยภูมิ จำนวน 6 ราย รวมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มควบคุมจำนวน 100 ราย ตัวอย่างเลือดที่ได้จากผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมถูกนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm

นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วเซลล์เม็ดเลือดขาวและชิ้นเนื้อถูกนำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA (Vivantis, Malaysia) นำ DNA ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์

การศึกษาจำนวน mtDNA copies ด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ในการศึกษาจำนวน mtDNA copies ด้วยเทคนิค qRT-PCR ทำโดยวัดการแสดงออกของยีน ND1 ในไมโทคอนเดรีย ร่วมกับยีนควบคุม human globulin โดยยีน ND1 และ HGB ที่ใช้ในการศึกษามีลำดับ DNA ดังนี้ ND1-F: 5'CCC-TAA-AAC-CCG-CCA-CAT-CT3' ND1-R: 5'GAG-CGA-TGG-TGA-GAG-CTA-AGG-T3' HGB-F: 5'GTG-CAC-CTG-ACT-CCT-GAG-GAG-A3' HGB-R: 5'CCT-TGA-TAC-CAA-CCT-GCC-CAG3' ส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 10 μl) ประกอบด้วย 1 \times Therm One Premix with SYBR Green (RBC Bioscience, Taiwan) primer ที่มีความเข้มข้นแต่ละคู่เท่ากับ 0.2 μM DNA ตั้งต้น 2 μl โดยใช้สภาวะดังนี้ 95°C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ และทำซ้ำจำนวน 35 รอบที่อุณหภูมิ 94°C 30 วินาทีตามด้วย 58°C 30 วินาที และ 72°C 50 วินาที ทำการวัดการแสดงออกในทุกตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง ด้วยเครื่อง Thermal cycler PCR machine, Master cycler personal (Eppendorf, Germany) โดยใช้ DNA จากกลุ่มควบคุมเป็นตัวเปรียบเทียบ (reference) ในการทำแต่ละรอบ คำนวณค่า $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ จากสมการดังนี้

$$\Delta\text{Ct}_{reference} = \text{Ct}_{ND1, reference} - \text{Ct}_{HGB, reference} \quad (1)$$

$$\Delta\text{Ct}_{unknown} = \text{Ct}_{ND1, unknown} - \text{Ct}_{HGB, unknown} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{unknown} - \Delta\text{Ct}_{reference} \quad (3)$$

เมื่อ Ct คือ Threshold cycle

การศึกษาระดับ 8-OHdG ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การวัดระดับ 8-OHdG (HT 8-oxodG ELISA Kit (Trevigen) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ ทำการเติมตัวอย่าง 25 μ l ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท แล้วเติมสารละลาย anti 8-OHdG monoclonal 25 μ l ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย PBST แล้วเติม Goat anti-Mouse IgG-HRP conjugate 25 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างด้วย PBST แล้วเติม TACS-Sapphire 50 μ l เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม 0.2M HCl 50 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

การวิเคราะห์ข้อมูล

การกระจายตัวของข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ ดังนั้นการเปรียบเทียบความแตกต่างกรณีก่อนตัวอย่าง 2 กลุ่มสัมพันธ์กันใช้สถิติ Wilcoxon signed-rank test การเปรียบเทียบความแตกต่างกรณีก่อนตัวอย่าง 2 กลุ่มไม่สัมพันธ์กันใช้สถิติ Mann-Whitney test

การเปรียบเทียบความแตกต่างกรณีก่อนตัวอย่าง 3 กลุ่มขึ้นไปใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Spearman's correlation coefficient ข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) โดยมีระดับนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

การศึกษาจำนวน mtDNA copies และระดับ 8-OHdG ทำในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 48 ราย เป็นผู้ป่วยเพศชายจำนวน 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.6 และเพศหญิงจำนวน 29 ราย คิดเป็นร้อยละ 60.4 โดยมีอายุเฉลี่ย 50.7 ± 15.5 ปี ร่วมกับกลุ่มควบคุมจำนวน 100 ราย ประกอบด้วยเพศชายจำนวน 33 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.0 และเพศหญิงจำนวน 67 ราย คิดเป็นร้อยละ 67.0 อายุเฉลี่ย 48.5 ± 5.2 ปี เมื่อทดสอบเปรียบเทียบเพศของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ Chi-square test ไม่พบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ($P = 0.432$) ผลการทดสอบทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test ไม่พบความแตกต่างของอายุระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ($P = 0.416$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนกับกลุ่มควบคุม

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	P value
จำนวน (ราย)	48	100	
เพศ			0.432 ^a
- ชาย (%)	19 (39.6%)	33 (33.0%)	
- หญิง (%)	29 (60.4%)	67 (67.0%)	
อายุ (ปี) (mean \pm SD)	50.7 \pm 15.5	48.5 \pm 5.2	0.416 ^b

^aผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Chi-square test

^bผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test

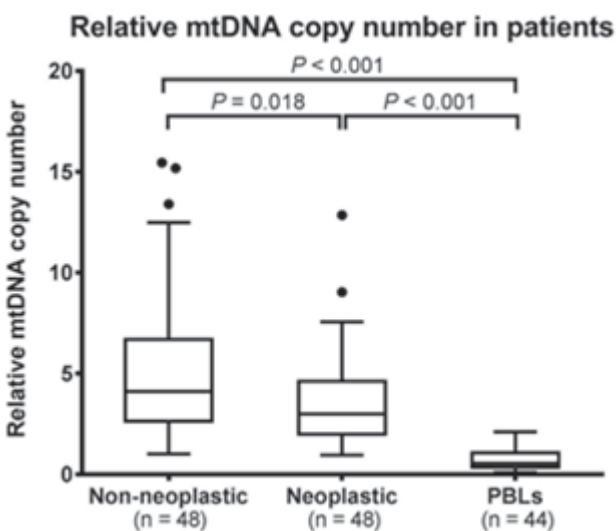
ผลการศึกษาจำนวน mtDNA copies ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

พบว่าจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้องอกมีจำนวนน้อยกว่าในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.018$) โดยมีค่ามัธยฐานของจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้องอกเท่ากับ 2.99 (1.0 - 13.0) และค่ามัธยฐานของจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงเท่ากับ 4.1 (1.0 - 15.5) ผลการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ระหว่างชิ้นเนื้อและเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวมีจำนวน mtDNA copies น้อยกว่าทั้งในชิ้นเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ($P < 0.001$) และในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง ($P < 0.001$) โดยมีค่ามัธยฐานของจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเท่ากับ 0.55 (0.08 - 2.10) ดังแสดงในรูปที่ 1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมีปริมาณน้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.039$) โดยมีค่ามัธยฐาน

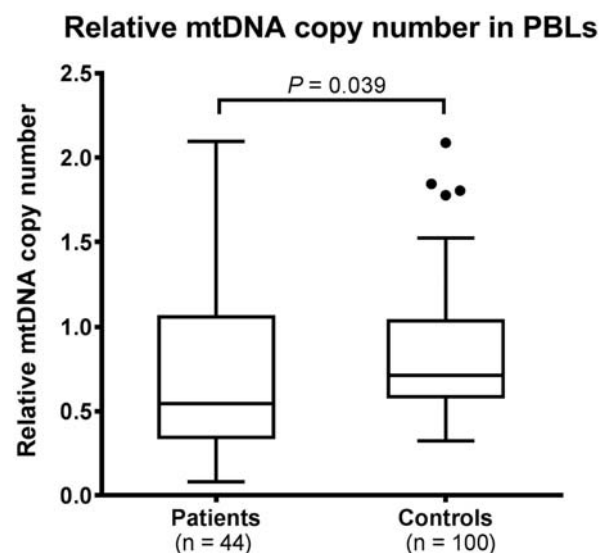
ของจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.72 (0.33 - 2.09) ดังแสดงในรูปที่ 2

ผลการศึกษาเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies จำแนกตามเพศ

เนื่องจาก mtDNA ถ่ายทอดทางแม่ เพศจึงอาจส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของจำนวน mtDNA copies จึงนำจำนวน mtDNA copies จากชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยนำมาแบ่งกลุ่มตามเพศเพื่อทำการวิเคราะห์ พบว่าจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเพศหญิงมีจำนวนมากกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเพศชาย ($P = 0.047$) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศชายและเพศหญิง ในจำนวน mtDNA copies ของชิ้นเนื้องอก ($P = 0.851$) และชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง ($P = 0.967$) เมื่อนำจำนวน mtDNA copies จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มคนปกติมาจำแนกตามเพศ ผลการเปรียบเทียบไม่พบความแตกต่างระหว่างจำนวน mtDNA copies จากเซลล์เม็ดเลือดขาวในเพศชายและเพศหญิง ($P = 0.201$)



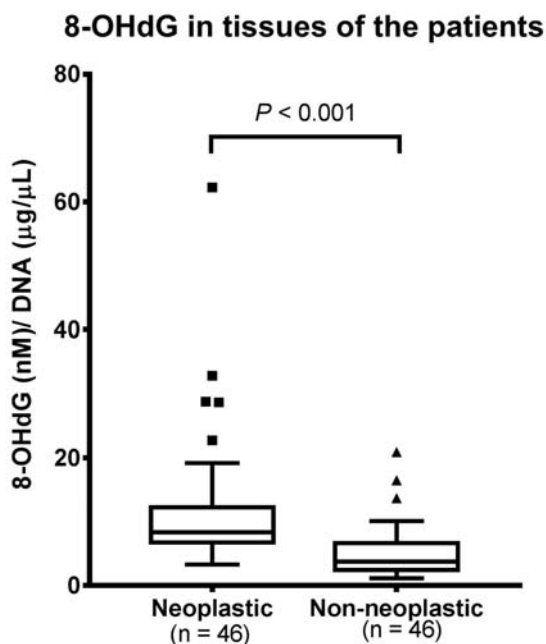
รูปที่ 1. ผลการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ระหว่างชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน



รูปที่ 2. ผลการเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเทียบกับในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาระดับ 8-OHdG ของชิ้นเนื้อในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

เนื่องจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมีจำนวนจำกัด ทำให้ปริมาณ DNA ที่สกัดได้ไม่เพียงพอ การศึกษานี้จึงวัดระดับ 8-OHdG จากชิ้นเนื้ออกและชิ้นเนื้อปกติจากผู้ป่วยได้เพียง 46 ตัวอย่าง ผลการศึกษาระดับ 8-OHdG ของชิ้นเนื้ออกและชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงด้วยเทคนิค ELISA พบว่าชิ้นเนื้ออกมีระดับ 8-OHdG สูงกว่าในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง ($P < 0.001$) โดยมีค่ามัธยฐานของระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้ออกเท่ากับ 8.32 (3.31 - 62.28) nM/ DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และค่ามัธยฐานของระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อปกติเท่ากับ 3.76 (1.15-20.89) nM/ DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3. ผลการเปรียบเทียบระดับ 8-OHdG ระหว่างชิ้นเนื้ออก และชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงในผู้ป่วยรายเดียวกัน

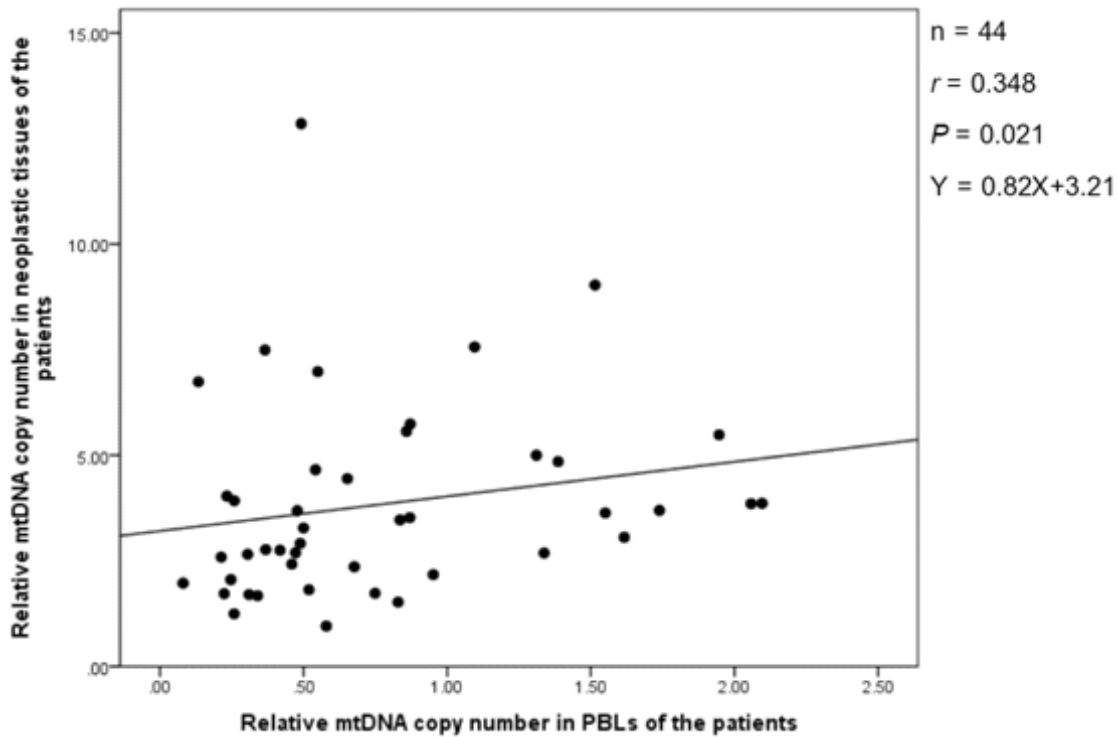
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copies และระดับ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

ผลการศึกษา พบว่าจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกแปรผันตรงกับจำนวน mtDNA copies ใน

เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย ($r = 0.348$, $P = 0.021$) ดังแสดงในรูปที่ 4 ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copies และระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้ออก ($r = 0.013$, $P = 0.930$)

อภิปรายผล

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกมีจำนวนน้อยกว่าในชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในโรคมะเร็งหลอดอาหาร⁽¹⁾ มะเร็งต่อมไทรอยด์⁽²⁾ มะเร็งรังไข่⁽³⁾ แสดงว่าการลดลงของจำนวน mtDNA copies อาจเป็นกลไกสำคัญในการเจริญของเซลล์เนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าจำนวน mtDNA copies จากชิ้นเนื้อ ทั้งชิ้นเนื้ออกและชิ้นเนื้อปกติล้วนมีจำนวน mtDNA copies มากกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาว สอดคล้องกับการศึกษาของ Guo W. และคณะในโรคมะเร็งกล่องเสียง⁽¹³⁾ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากจำนวน mtDNA copies มีความแตกต่างตามชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเซลล์ในชิ้นเนื้อมีการใช้พลังงานสูงกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาว จึงมีจำนวน mtDNA copies สูงกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวตามผลการศึกษาในครั้งนี้ ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยและในกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่า จำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยน้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin lymphoma⁽⁸⁾ มะเร็งไต⁽⁹⁾ และเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษานี้ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออก



รูปที่ 4. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกและในเซลล์เม็ดเลือดขาว

และจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยรายเดียวกัน พบความสัมพันธ์ในทิศทางแปรผกผันตรงกัน ซึ่งการวัดจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถสะท้อนถึงจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกได้

การลดลงของจำนวน mtDNA copies อาจเป็นผลจาก mtDNA ถูกทำลาย ซึ่งอาจมีสาเหตุจากภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นในเนื้ออก ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการวัดระดับ 8-OHdG ซึ่งแสดงถึงการทำลาย DNA จากภาวะเครียดออกซิเดชันในชิ้นเนื้ออกเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชิ้นเนื้ออกมีระดับ 8-OHdG สูงกว่าในชิ้นเนื้อปกติสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก⁽¹⁰⁾ มะเร็งหลอดอาหาร⁽¹¹⁾ แสดงให้เห็นว่าชิ้นเนื้ออกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันในชิ้นเนื้ออกอาจส่งผลต่อการลดลงของจำนวน mtDNA copies ซึ่งทำให้เนื้ออกเกิดการเจริญได้ ถึงแม้ว่าการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA

copies และระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้ออกของผู้ป่วยก็ตามการศึกษาในปีพ.ศ. 2549 Wada T. และคณะทำการศึกษาชิ้นเนื้อผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบการเกิด somatic mutation บริเวณ D-loop ของ mtDNA ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนและการถอดรหัสของ mtDNA โดยพบการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าวในผู้ป่วยมะเร็งไตร้อยละ 23 และในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะร้อยละ 14 ตำแหน่งที่พบมากที่สุดคือ poly (C) mononucleotide ตรงตำแหน่ง 303 ถึง 309 และพบว่าชิ้นเนื้อมะเร็งมีระดับ 8-OHdG สูงกว่าชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง⁽¹³⁾ ในปีพ.ศ. 2559 Nie H. และคณะทำการศึกษาจากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้ออกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่าจำนวน mtDNA copies มีความสัมพันธ์กับการเกิด 4,977 bp deletion และชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีระดับ 8-OHdG สูงกว่าในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยเนื้ออกชนิดไม่ร้ายและคนปกติตามลำดับ โดยอธิบายผลการศึกษาดังนี้ เซลล์มะเร็งเต้านมมีภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเกินกว่าการกำจัดด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดเซลล์

มะเร็งขึ้น ซึ่งส่งผลให้ภาวะเครียดออกซิเดชันสูงขึ้น ทำให้เกิดทำลาย mtDNA มากขึ้น และเมื่อ mtDNA ถูกทำลายจนถึงระดับหนึ่ง เซลล์จะตายแล้วปล่อย DNA เข้าสู่กระแสเลือด⁽¹⁴⁾ ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ให้ผลการศึกษาในทิศทางเดียวกับการศึกษานี้

ทั้งนี้การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเป็นการศึกษาวิเคราะห์ตามขวาง (cross-sectional study) จึงไม่สามารถบอกปัจจัยที่เป็นสาเหตุหรือผลของการเกิดโรคมะเร็งได้ ความหลากหลายของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การแปลผลการวิเคราะห์ทำได้ยาก การศึกษานี้ครั้งนี้ ไม่สามารถเก็บชิ้นเนื้อและเลือดจากกลุ่มผู้ป่วยได้ครบทุกราย ตลอดจนไม่สามารถดำเนินการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่ออ่อนและกระดูกจากกลุ่มคนปกติได้ เนื่องจากการเก็บตัวอย่างทำได้ยากและขัดกับจริยธรรมการทำวิจัยในคน นอกจากนี้การศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาระดับ 8-OHdG ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติได้ ร่วมกับการขาดข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกพร้อมกับผลการศึกษานี้จำนวน mtDNA copies และระดับ 8-OHdG อาจให้ประโยชน์ในทางคลินิกมากขึ้น

ผลการศึกษานี้พบการลดลงของจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกและเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย ดังนั้นจำนวน mtDNA copies ที่ลดลงอาจเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ซึ่งอาจนำจำนวน mtDNA copies มาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนได้ ซึ่งยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนผลการศึกษานี้

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นการลดลงของจำนวน mtDNA copies ในชิ้นเนื้ออกเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติ

บริเวณข้างเคียง สอดคล้องกับการลดลงของจำนวน mtDNA copies ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าชิ้นเนื้ออกมีระดับ 8-OHdG เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง แสดงว่าเซลล์เนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงจำนวน mtDNA copies ให้มีปริมาณลดลง ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการเจริญของเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน อาจนำจำนวน mtDNA copies มาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนได้

ข้อเสนอแนะ

โรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์ต่ำเมื่อเทียบกับโรคเนื้องอกชนิดอื่น ประกอบกับโรคมีความหลากหลาย ทำให้ขนาดของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ในแต่ละชนิดน้อยเกินไป จึงควรเพิ่มขนาดตัวอย่างเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้อาจศึกษาเพิ่มเติม ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยทำการกระตุ้นเซลล์ให้มีภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น แล้ววัดจำนวน mtDNA copies เพื่อสนับสนุนว่าภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการลดลงของจำนวน mtDNA copies ตามผลการศึกษานี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่านที่ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Lin CS, Chang SC, Wang LS, Chou TY, Hsu WH, Wu YC, et al. The role of mitochondrial DNA alterations in esophageal squamous cell carcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139:189-197.
2. Mambo E, Chatterjee A, Xing M, Tallini G, Haugen BR, Yeung SC, et al. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int J Cancer* 2005;116:920-4.
3. Wang Y, Liu VW, Xue WC, Cheung AN, Ngan HY. Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. *Br J Cancer* 2006;95:1087-91.
4. Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, Berger A, Fink K, Schmeller N, et al. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25:1005-10.
5. Vivekanandan P, Daniel H, Yeh MM, Torbenson M. Mitochondrial mutations in hepatocellular carcinomas and fibrolamellar carcinomas. *Mod Pathol* 2010;23:790-8.
6. Hosnijeh FS, Lan Q, Rothman N, San Liu C, Cheng WL, Nieters A, et al. Mitochondrial DNA copy number and future risk of B-cell lymphoma in a nested case-control study in the prospective EPIC cohort. *Blood* 2014; 124:530-5.
7. Qu F, Liu X, Zhou F, Yang H, Bao G, He X, et al. Association between mitochondrial DNA content in leukocytes and colorectal cancer risk: a case-control analysis. *Cancer* 2011; 117:3148-55.
8. Lan Q, Lim U, Liu CS, Weinstein SJ, Chanock S, Bonner MR, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008;112: 4247-9.
9. Purdue MP, Hofmann JN, Colt JS, Hoxha M, Ruterbusch JJ, Davis FG, et al. A case-control study of peripheral blood mitochondrial DNA copy number and risk of renal cell carcinoma. *PLoS One* 2012;7:e43149.
10. Ptachetka A, Adamek B, Strzelczyk JK, Krakowczy kL, Migula P, Nowak P, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in colorectal adenocarcinoma-is it a result of oxidative stress? *Med Sci Monit* 2013;19:690-5.
11. He H, Zhao Y, Wang N, Zhang L, Wang C. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine expression predicts outcome of esophageal cancer. *Ann Diagn Pathol* 2014;18:326-8.
12. Guo W, Yang D, Xu H, Zhang Y, Huang J, Yang Z, et al. Mutations in the D-loop region and increased copy number of mitochondrial DNA in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep* 2013;40:13-20.
13. Wada T, Tanji N, Ozawa A, Wang J, Shimamoto K, Sakayama K, et al. Mitochondrial DNA mutations and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine Content in Japanese patients with urinary bladder and renal cancers. *Anticancer Res* 2006;26:3403-8.
14. Nie H, Chen G, He J, Zhang F, Li M, Wang Q, et al. Mitochondrial common deletion is elevated in blood of breast cancer patients mediated by oxidative stress. *Mitochondrion* 2016;26:104-12.