

การตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยใช้เทคนิค

CMST Real-Time PCR

SHP1-P2 methylation detection in lymph nodes of colorectal cancer patients by using CMST

Real-Time PCR technique

ประกาศิต รัตนตันหยง (Prakasit Rattanatanyong)* สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ (Somboon Kelawat)**

นกรินทร์ กิตกำจร (Nakarin Kitkumthorn)*** อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร (Apiwat Mutirangura)****

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งในระยะแรกนั้นมักเกิดความคิดพลาดในการตรวจสอบ ทำให้การกำหนดแนวทางการรักษาล่าช้าได้ เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่กลายพันธุ์มาจากเซลล์เยื่อและจากรายงานการศึกษา ก่อนหน้านี้พบว่า SHP1-P2 มีระดับเมทิลเลชันสูงในเซลล์ชนิดเยื่อเท่านั้น ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิค CMST Real-time PCR ขึ้นมาเพื่อวัดระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 จากต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 76 คนแบ่งเป็นต่อมน้ำเหลืองที่มีการแพร่กระจายและไม่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยนักพยาธิวิทยา ผลการ ทดลองพบว่าระดับเมทิลเลชันของกลุ่มที่มีการแพร่กระจายสูงกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลของ ROC curve analysis ได้ค่าความไว ความจำเพาะ และ likely hood ratio ที่ระดับร้อยละของเมทิลเลชัน 55.44 คือ 78.79% 97.67% และ 33.88 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิคนี้สามารถแยกต่อมน้ำเหลืองที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

ABSTRACT

Detection of micrometastases tumor is the problem in misinterprets tumor staging and leads to improper therapeutic management. SHP1-P2 has been proved for specific hypermethylated CpGs in epithelial cell. We used SHP1-P2 methylation to detect the DNA of colon cancer in the lymph nodes by performing CMST Real-Time PCR. 76 colon cancer patients were selected from histologically positive lymph nodes and compared with histologically negative lymph nodes. The methylation level in the selected group was significantly higher than the control group. By performing assessments by the ROC curve analysis, the area under the curve was 0.9605. At the cut-off of 54.44%, sensitivity, specificity and likelihood ratio were 78.79%, 97.67%, and 33.88 respectively. In summary, the CMST Real-Time PCR has a potential value to differentiate between positive and negative lymph nodes.

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โปรโมเตอร์ที่ 2 ของยีนชิววัน การแพร่กระจายของมะเร็งไปที่ต่อมน้ำเหลือง

Key Words: DNA Methylation, SHP1-P2, Lymph node metastases

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (Medical science) สาขาอนุชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**** ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

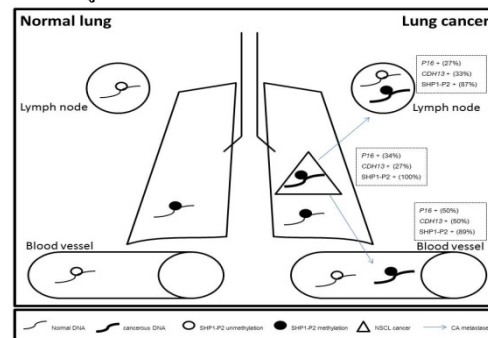
บทนำ

ปัจจุบันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นโรคที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตผู้คนเป็นอันดับต้นๆจากการรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติปี 2554 การตรวจวินิจฉัยส่วนใหญ่จะต้องอาศัยความรู้และความเชี่ยวชาญของผู้วินิจฉัยอย่างสูงเช่นการคัดกรองมะเร็งลำไส้ใหญ่มักจะใช้วิธีการตรวจสอบกล้องลำไส้ใหญ่ (Colonoscopy) ส่องหาก้อนเนื้อออกที่ผิดปกติ (Polyp) (Attasara and Buasom, 2012) เป็นต้น หลังจากตรวจคัดกรองเบื้องต้นแล้วพบก้อนเนื้อที่สงสัยว่าผิดปกติ แพทย์จะทำการตัดชิ้นเนื้อที่ผิดปกติบางส่วนนั้นไปตรวจ (Incisional biopsy) ถ้าผลการตรวจว่าเป็นก้อนเนื้อมะเร็ง แพทย์จะทำการผ่าตัดใหญ่เพื่อตัดก้อนเนื้อมะเร็งทั้งหมดและต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียง (Excisional biopsy) มาตรวจสอบทางพยาธิวิทยาเพื่อยืนยันความผิดปกติของเนื้องอกและวินิจฉัยถึงสภาวะของการแพร่กระจาย (Metastases) ของเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ประกอบในการระบุระยะของมะเร็งโดยใช้มาตรฐาน Union for International Cancer Control (UICC) ในการจัดเกรดของมะเร็งเป็นแบบ TNM Classification (Ludwig and Weinstein, 2005) เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาเซลล์มะเร็งนั้นจะใช้เทคนิคของทางพยาธิวิทยาซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัย ซึ่งวิธีนี้มีโอกาสผิดพลาดเนื่องจากการเลือกส่วนของต่อมน้ำเหลืองที่ปราศจากเซลล์มะเร็งเป็นต้น ปัจจุบันนี้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลได้พัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบได้เช่นการตรวจสอบโปรตีนหรือดีเอ็นเอที่ผิดปกติของเซลล์มะเร็งได้แก่การตรวจหาโปรตีนก่อมะเร็ง (Oncoprotein) หรือการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งมะเร็ง (Tumor suppressor gene) (Patel et al., 2008) เป็นต้น

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นหนึ่งในกระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetic) มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene expression) หรือปรากฏการณ์ทางพันธุกรรมต่างๆ ซึ่งความจำเพาะของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนต่างๆในเซลล์แต่ละชนิดนั้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดเพื่อจำแนกชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Cell and tissue specific methylation)

หรือใช้ในการตรวจสอบเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติ (Patel et al., 2003) เป็นต้น

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าการโปรโมเตอร์ที่สองของยีน *SHP1* (*SHP1-P2*) นั้นเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชัน (Hypermethylation) เฉพาะในเซลล์เยื่อบุ (Epithelial cell) เท่านั้นส่วนในเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์เยื่อบุ (Non-epithelial cell) จะเป็นไฮโปเมทิลเลชัน (Hypomethylation) ทั้งหมด (Ruchusatsawat et al., 2006) ดังนั้นจึงมีการศึกษาประยุกต์นำเมทิลเลชันของ *SHP1-P2* มาตรวจสอบวินิจฉัยและพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด Non-small cell lung cancer (NSCLC) พบว่าสามารถนำเมทิลเลชันของ *SHP1-P2* ไปใช้ในการตรวจสอบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่น้อยมาก (micro-metastases) (Vinayanuwattikun et al., 2013a) ได้และเมื่อเปรียบเทียบกับผลสำเร็จของการใช้เมทิลเลชันของ *SHP1-P2* กับเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีนยับยั้งมะเร็ง (Tumor suppressor gene) เช่นยีน *p16* หรือ *CDH13* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้มะเร็ง (Tumor marker) ปอดที่ได้รับการนิยามมาก พบว่าผลสำเร็จน้อยกว่าการใช้เมทิลเลชันของ *SHP1-P2* (Vinayanuwattikun et al., 2013b) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *SHP1-P2* ในเซลล์

ปอดและเซลล์มะเร็งปอด ซึ่งดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปอดยังสามารถแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและในกระแสเลือดได้ ทำให้สามารถตรวจสอบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *SHP1-P2* และผลสำเร็จของการวัดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *p16* (ผลสำเร็จ = 27%) และ *CDH13* (ผลสำเร็จ = 33%) น้อยกว่าของ *SHP1-P2* (ผลสำเร็จ = 87%) อีกด้วย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำหลักการของดีเอ็นเอเมทิลเลชันมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาหรือสร้างเทคนิคใหม่ในการตรวจคัดกรอง วินิจฉัยหรือพยากรณ์โรค โดยตรวจหาดีเอ็นเอของมะเร็งซ่อนเร้น (Occult tumor DNA) ในต่อมน้ำเหลือง (Lymph node) ของผู้ป่วยมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เยื่อต่างๆเพื่อใช้วินิจฉัยการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้น โดยใช้หลักการตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์มะเร็งที่ปนเปื้อนในต่อมน้ำเหลือง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในต่อมน้ำเหลืองจากผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทยในการศึกษา

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สร้างเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูงในการตรวจหาเซลล์เยื่อ เพื่อใช้ในการคัดกรอง วินิจฉัย และพยากรณ์โรคมะเร็ง
2. นำเทคนิคที่ได้ไปใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่

วิธีการวิจัย

ออกแบบเทคนิค Combined Methylation Specific primers and Taqman probes Real-time PCR (CMST-Realtime-PCR) ศึกษาตำแหน่งเมทิลเลชันของซีพีจีบนโปรโมเตอร์ที่สองของยีน *SHP1* (*SHP1*-P2) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งที่แสดงในรูปที่ 2 และออกแบบไพรเมอร์และโพรบโดยเลือกตำแหน่งซีพีจีที่อยู่ติดกันสี่ตำแหน่ง ซีพีจีทั้งสี่ตำแหน่งนี้ต้องมีเมทิลเลชันทั้งหมดในเซลล์เพาะเลี้ยง HepII ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงประเภทเซลล์เยื่อและอันเมทิลเลชันทั้งหมดในเซลล์เพาะเลี้ยง Daudi ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงประเภทเม็ดเลือดขาว ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับเทคนิคเมทิลเลชันสเปคิฟิคแทกแมนเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม OligoCalc บนเว็บไซต์ [<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>] เพื่อกำหนดอุณหภูมิ และเทียบค่า GC content ของไพรเมอร์และโพรบแต่ละเส้น ของแต่ละตำแหน่ง ซึ่ง

ออกแบบทั้งหมดสามชุดคือ 1) ชุดเมทิลเลชัน (Methylation set) ซึ่งซีพีจีทั้งสี่ตำแหน่งนี้มีเมทิลเลชันทั้งหมด 2) ชุดอันเมทิลเลชัน (Unmethylation set) ซึ่งซีพีจีทั้งสี่ตำแหน่งนี้ไม่มีเมทิลเลชันทั้งหมด และ 3) ชุดควบคุมภายใน (Internal control set) ซึ่งใช้ลำดับเบสของยีนเบต้าแอกติน (*ACTB* gene) ที่ผ่านกระบวนการคัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์เป็นต้นแบบในการออกแบบ โดยออกแบบให้ไม่มีตำแหน่งซีพีจีบนไพรเมอร์และโพรบดังรูปที่ 2

A) AGGATTATTTCGATGATAGTTGTTATCGTTATTATTGTTATTAGCGTGGGTAGGGA GGGTTGCGTAAAGTAGTTGGTGGAG	
Met_Forward	5' AGGATTATTTCGATGATAGTTGTTATCGTT 3'
Met_Reverse	5' CTCACCAACTACTTTTACGCAAC 3'
RMetprobe	5' FAM-CTAACCCACGCTAATAA-MGB 3'

B) GTAGGATTATTTCGATGATAGTTGTTATCGTTATTATTGTTATTAGTGGGTAGGGA AGGTTGCGTAAAGTAGTTGGTGGAGGA	
Unmet_Forward	5' GTAGGATTATTTCGATGATAGTTGTTATCGTT 3'
Unmet_Reverse	5' TCCTCCACCAACTACTTTTACGCAAC 3'
RUnmetprobe	5' VIC-CCCTAACCCACACTA-MGB 3'

C) GTGTATTGATTTTGGAGGAGAAGTTTGTGCTATTGTTTGTGGGGTAAGGTGAA CGTGGATGAAGTTGGTGGTGGAGTTTGGGTAGGTTGGTATTAAAGG	
BS. B-actin Forward	5' GTGTATTGATTTTGGAGGAGA 3'
BS. B-actin Rev	5' CCTTAATACCACTTACCTCAAA 3'
BS. B-actin probe	5' Flu-AAGGTGAAYGTGGATGAAGTTGGTGGTGGG-BHQ 3'

รูปที่ 2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบของยีน *SHP1* ที่โปรโมเตอร์ที่ 2 และยีนเบต้าแอกตินที่ผ่านกระบวนการคัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้ว A) ลำดับเบสของเมทิลเลดีเอ็นเอ, B) ลำดับเบสของอันเมทิลเลดีเอ็นเอของ *SHP1*-P2 ตามลำดับและ C) ลำดับเบสของเมทิลเลดีเอ็นเอของยีนเบต้าแอกติน (CG และ CT ที่ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งซีพีจีที่ศึกษา)

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ทั้งสองชุดไปทำพีซีอาร์ โดยชุดเมทิลเลชันจะใช้ดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยง HepII เป็นตัวควบคุม และชุดอันเมทิลเลชันจะใช้ดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยง Daudi เป็นตัวควบคุม ซึ่งดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอที่ผ่านการคัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์แล้ว จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำการหาลำดับเบสด้วยวิธีโคลนนิ่ง (Clone sequencing) โดยใช้พลาสมิดในระบบของ pGem®-T Easy Vector System I (Promega, USA)

ทดสอบความเที่ยงตรงและทดสอบความแม่นยำ (Precision and Accuracy) ทดสอบความเที่ยงตรงของการทดลองโดยการทำการทำเมทิลเลชันสเปคตริกฟลักแทนเมทิลเลชันรีปรีเซนต์ทั้งชุดเมทิลเลชันและแอนเมทิลเลชันของซีเรียลไดลูชัน (Serial dilution) ของดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยง HepII และ Daudi ในชุดเมทิลเลชันและแอนเมทิลเลชันตามลำดับ ทดสอบความแม่นยำของการทดลองโดยการทำการทำเมทิลเลชันสเปคตริกฟลักแทนเมทิลเลชันรีปรีเซนต์ของทั้งสองชุดโดยใช้ดีเอ็นเอที่มีสัดส่วนผสมของดีเอ็นเอระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยง HepII และ Daudi ที่ต่าง ๆ กัน

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง การศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เลขที่ IRB No. 476/56 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้อ้างอิงมาจากการศึกษาที่คล้ายกันก่อนหน้านี้ (Kitkumthorn et al., 2012) ซึ่งพบว่าใช้จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อต่อม้ามเนื้อทั้งหมด 20 ตัวอย่างก็สามารถหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้จำนวนเนื้อเยื่อต่อม้ามเนื้อที่มากกว่าในการศึกษาวิจัยนี้ กลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยนี้เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อต่อม้ามเนื้อที่เก็บไว้ในพาราฟินบล็อกด้วยเทคนิค Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) ที่ได้มาจากการตรวจพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่งทางงานวิจัยได้รับอนุญาตเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่านการตรวจยืนยันซ้ำทางกล้องจุลทรรศน์ โดยผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยา เพื่อตรวจยืนยันเนื้อเยื่อต่อม้ามเนื้อในทุกกลุ่ม ซึ่งงานวิจัยนี้จะแบ่งกลุ่มเนื้อเยื่อต่อม้ามเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 (-LN) เป็นกลุ่มที่ไม่มีเซลล์มะเร็งในต่อม้ามเนื้อจำนวนอย่าง 43 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 (+LN) มีเซลล์มะเร็งไปที่ต่อม้ามเนื้ออย่างน้อยกลุ่มละ 33 ตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอและกระบวนการไบซัลไฟต์ที่รีเมนท์ นำชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดมาตัด section โดยความหนาของชิ้นเนื้อเยื่อประมาณ 5 ไมครอนต่อสไลด์จำนวนไม่น้อยกว่า 20 ชิ้นจากนั้นนำพาราฟินออกด้วยไซลีน (Xylene) และนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มมาตรฐาน (Standard phenol chloroform) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเข้ากระบวนการไบซัลไฟต์ที่รีเมนท์ของชุดสำเร็จรูป EZ DNA Methylation ของบริษัท Zymo research เพื่อเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลให้กลายเป็นเบสที่คล้ายยูราซิล นำดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ที่รีเมนท์ไปทำเมทิลเลชันสเปคตริกฟลักแทนเมทิลเลชันรีปรีเซนต์ โดยใช้ซินเบต้าแอกตินเป็นตัวแทนอีเอ็มแอลไอส์

การวิเคราะห์ข้อมูล งานวิจัยนี้ได้คำนวณระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 โดย

$$((\text{ปริมาณเมทิลเลทที่ดีเอ็นเอ} / \text{ปริมาณซินเบต้าแอกติน}) \times 100) / ((\text{ปริมาณเมทิลเลทที่ดีเอ็นเอ} / \text{ปริมาณซินเบต้าแอกติน}) + (\text{ปริมาณแอนเมทิลเลทที่ดีเอ็นเอ} / \text{ปริมาณซินเบต้าแอกติน}))$$

ใช้ค่าสถิติในการวิเคราะห์ดังนี้ ค่า Co-efficiency of variation (C.V.) ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเที่ยงตรงของเทคนิค ค่า Pearson's correlation ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของเทคนิค ค่า T test analysis ใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระดับเมทิลเลชันในกลุ่มของต่อม้ามเนื้อโดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p value = 0.05) ค่า ROC curve analysis ใช้ในการหาความจำเพาะและความไวในการตรวจวัด

ผลการทดลองและอภิปรายผลการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มมาตรฐานนั้นได้ดีเอ็นเอในปริมาณ 100 ถึง 120 ng ต่อ 1 ul (50 ul) จากเซลล์เพาะเลี้ยงประมาณ 1,000,000 เซลล์ และ 9 ถึง 10 ng ต่อ 1 ul (50 ul) จากชิ้นเนื้อต่อม้ามเนื้อ (FFPE) ขนาด 100,000 ตารางไมครอน โดยแต่ละต่อม้ามเนื้อจะมีความหนาประมาณ 3 – 5 ไมครอน หลังจากผ่านกระบวนการดัดแปลงด้วยไบ

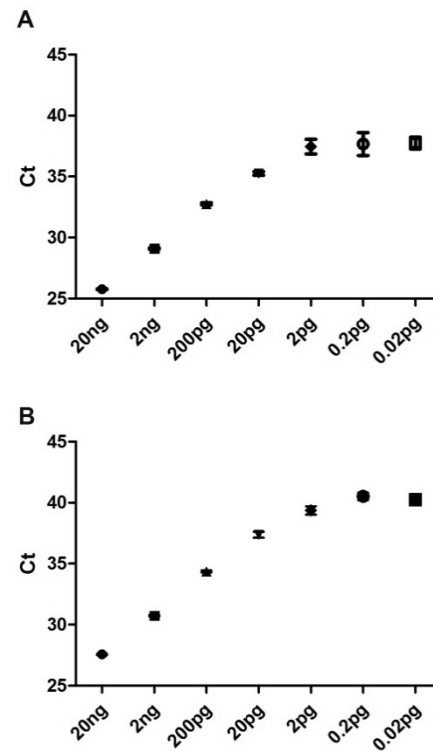
ซัลไฟด์แล้วปริมาณดีเอ็นเอที่เหลือจะลดลงจากตั้ง
ต้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ผลการทดลองแบ่งออกเป็นสองส่วนคือส่วนที่เป็น
การศึกษาในหลอดทดลอง (In vitro) เพื่อทดสอบความ
เที่ยงตรงและความถูกต้องของเทคนิค CMST Real-time
PCR และการศึกษาในสิ่งมีชีวิต (In vivo) เพื่อศึกษาความ
แตกต่างของระดับร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2
ระหว่างกลุ่ม -LN และ +LN ดังนี้

การศึกษาในหลอดทดลอง (In vitro study)

1. ทดสอบความเที่ยงตรงของเทคนิคโดยการวัดค่า
Threshold cycle (Ct) ของเซตดีเอ็นเอเมทิลเลชันและอัน
เมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepII และ
Daudi ตามลำดับแบบซีเรียลไดลูชัน (Serial dilution) 10
เท่า ตั้งแต่ 20 ng ถึง 0.02 pg จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ผลที่
ได้คือค่า C.V. ของทั้ง 2 เซต อยู่ในช่วง 0.38 - 4.99 และ
0.5 - 0.67 ตามลำดับ ดังรูปที่ 3A และ 3B

จากรูปแสดงว่าเทคนิคนี้มีความเที่ยงตรงสูงมาก
เนื่องจากค่า C.V.ของแต่ละตัวอย่างมีค่าน้อยมาก แต่เมื่อ
พิจารณาค่า Ct ของทั้ง 2 เซตที่ปริมาณดีเอ็นเอ 2 pg – 0.02
pg พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยมาก แต่ด้วยปริมาณดีเอ็นเอ
ที่มากกว่า 2 pg เทคนิคนี้สามารถหาความแตกต่างได้ดี
นั่นหมายความว่าข้อจำกัดในเรื่องปริมาณดีเอ็นเอที่น้อย
ที่สุดที่เทคนิคนี้จะทำการวัดได้อย่างเที่ยงตรงคือมากกว่า
2 pg ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยกว่าดีเอ็นเอในเซลล์มนุษย์ 1
เซลล์ (6.667 pg) นั่นหมายความว่าเซลล์เพียงหนึ่งเซลล์ก็
เพียงพอในการตรวจพบ

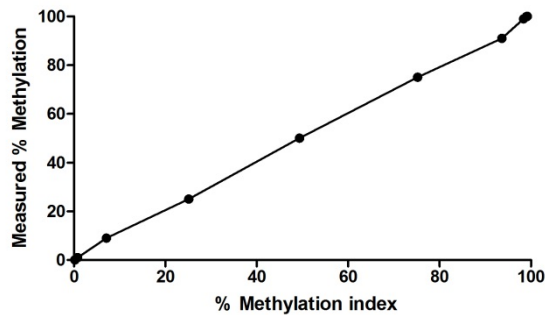


รูปที่ 3 แสดงค่า Ct ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่างๆ โดย A) ค่า Ct
ของเซตเมทิลเลชัน B) ค่า Ct ของเซตอันเมทิลเลชัน

2. ทดสอบความถูกต้องของเทคนิคโดยการผสมพ
ลาสมิดที่มีลำดับเบสของ SHP1-P2 เป็นเมทิลเลชันกับ
ผสมพลาสมิดที่มีลำดับเบสของ SHP1-P2 เป็นอันเมทิล
เลชัน ซึ่งพลาสมิดถูกสกัดมาจากโคโลนีที่ได้รับการยืนยัน
ลำดับเบสจากการหาลำดับเบสด้วยวิธีโคลนนิ่งว่าลำดับ
เบสแบบเมทิลเลชันและโคโลนีที่มีลำดับเบสเป็นอันเมทิล
เลชัน ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Ruchusatsawat และคณะที่
ได้รายงานว่าลำดับเบสของ SHP1-P2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง
HepII ทุกซีพีจีเป็นเมทิลเลชันทั้งหมดและในเซลล์
เพาะเลี้ยง Daudi ทุกซีพีจีเป็นอันเมทิลเลชันทั้งหมด
(Ruchusatsawat et al., 2006)

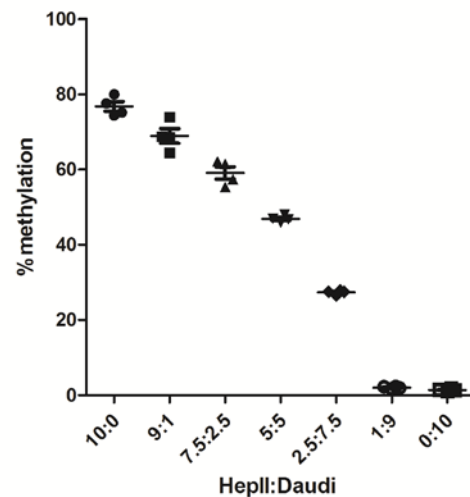
อัตราส่วนผสมของพลาสมิดทั้งสองนั้นผสมใน
อัตราส่วนร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ตั้งแต่ 0 –
100 แล้วทำการวัดระดับเมทิลเลชันของตัวอย่างทั้งหมด 7
ซ้ำ ผลที่ได้คือค่า Pearson's correlation $r^2 = 0.9994$ ($p <$
0.0001) ดังรูปที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้นอกจาก
จะมีความเที่ยงตรงในการวัดแล้วยังมีความถูกต้องสูงอีก

ด้วยเพราะสามารถวัดระดับของเมทิลเลชันของตัวอย่างที่กำหนดได้อย่างแม่นยำ



รูปที่ 4 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของ เมทิลเลชันของ SHP1-P2 ที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค CMST Real-time PCR

เมื่อนำเทคนิค CMST Real-time PCR ไปวัดระดับร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในสัดส่วนผสมต่างๆ ระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยง HepII และ Daudi ดังรูปที่ 5 พบว่าค่าเฉลี่ยระดับร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepII และ Daudi คือ 76.77 ± 1.264 และ 1.400 ± 0.1353 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ที่สัดส่วนผสมของเซลล์ต่อเนื่องทั้งสอง (HepII : Daudi) พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับร้อยละเมทิลเลชันของ SHP1-P2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆ คู่ของสัดส่วนผสมที่ติดกันโดยค่า P value ที่ได้อยู่ระหว่าง < 0.0001 ถึง 0.0205 โดยเฉพาะค่าเฉลี่ยของระดับเมทิลเลชันระหว่างสัดส่วนผสมที่ 10:0 (76.77 ± 1.264) เทียบกับ 9:1 (68.94 ± 1.957) และ 1:9 (2.045 ± 0.1562) เทียบกับ 0:10 (1.400 ± 0.1353) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ P value = 0.0152 และ 0.0205 ตามลำดับ แสดงว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจวัดความแตกต่างของระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในสัดส่วนผสมของเซลล์ต่อเนื่องทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



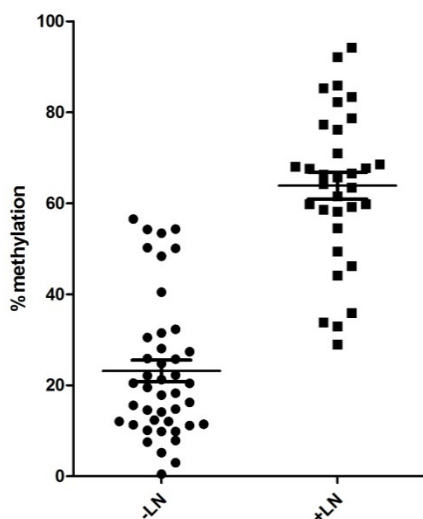
รูปที่ 5 แสดงค่าร้อยละเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในสัดส่วนผสมต่างๆระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยง HepII และ Daudi

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Vinayanuwattikun และคณะได้นำเสนอเทคนิค Absolute quantitative analysis of methylated alleles (AQAMA) PCR ในการตรวจวัดระดับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอด (Vinayanuwattikun et al., 2011) ผลที่ได้คือความไวในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่า 0.2 ng ขึ้นไปแต่เทคโนโลยีนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอได้น้อยถึง 2 pg เนื่องจากโดยเทคนิค AQAMA PCR เป็นเทคนิค Taqman probe Real-time PCR เหมือนกับเทคนิค CMST Real-time PCR แต่หลักการต่างกันคือเทคนิค AQAMA PCR ใช้ไพรเมอร์คู่เดียวในการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และให้โพรบที่จำเพาะกับเมทิลเลชันและอันเมทิลเลชันแย่งกับจับและสังสัญญาณ ซึ่งตำแหน่งเมทิลเลชันที่ใช้ในการตรวจสอบมีเพียงตำแหน่งเดียว ในขณะที่เทคนิค CMST Real-time PCR นี้จะแบ่งชุดพีซีอาร์เป็นสองชุดที่มีไพรเมอร์และโพรบจำเพาะกับตำแหน่งเมทิลเลชันและอันเมทิลเลชันรวมกันถึงสี่ตำแหน่ง (ตำแหน่งเดียวกันทั้งสองชุด) และนอมอลไลซ์ปริมาณเมทิลเลทดีเอ็นเอและอันเมทิลเลทดีเอ็นเอด้วยอินเบต้าแอกติน ดังนั้นเทคนิคใหม่นี้จึงมีความจำเพาะในการตรวจวัดสูงกว่าเทคนิคเดิมและเนื่องจากเทคนิค

แก่นัน้ใช้การแย่งจับกันของโพรบสองชนิดทำให้ประสิทธิภาพและความไวในการตรวจวัดไม่สูง แต่เทคนิคใหม่นี้ได้ให้โพรเมอร์และโพรบทำงานแยกกันตรวจวัดปริมาณเมทิลเลติเอ็นเอและอันเมทิลเลติเอ็นเออย่างอิสระต่อกันทำให้ความไวในการตรวจวัดสูงขึ้น

การศึกษาในสิ่งมีชีวิต (In vivo)

3. ค่าเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในกลุ่มต่างๆพบว่ากลุ่ม -LN ซึ่งเป็นกลุ่มที่ผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยายืนยันว่าไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยที่ 23.17 ± 2.362 และ +LN ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่แพร่กระจายอยู่อย่างน้อยตั้งแต่ร้อยละ 70 ของต่อมน้ำเหลืองทั้งหมดมีค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยที่ 63.89 ± 2.928 ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ของกลุ่มต่อมน้ำเหลืองปกติ (-LN) กับ กลุ่มต่อมน้ำเหลืองที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (+LN)

เมื่อวิเคราะห์ความต่างระหว่างกลุ่ม -LN กับกลุ่ม +LN พบว่า กลุ่ม -LN มีค่าเฉลี่ยเมทิลเลชันน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือมีค่าเฉลี่ยเมทิลเลชันต่างกัน 40.73 ± 3.721 ($p < 0.0001$) สอดคล้องกับผลทางพยาธิวิทยาว่ากลุ่ม +LN มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างน้อยร้อยละ 70 ซึ่งกลุ่ม -LN นั้นไม่พบเซลล์มะเร็งปนเปื้อน

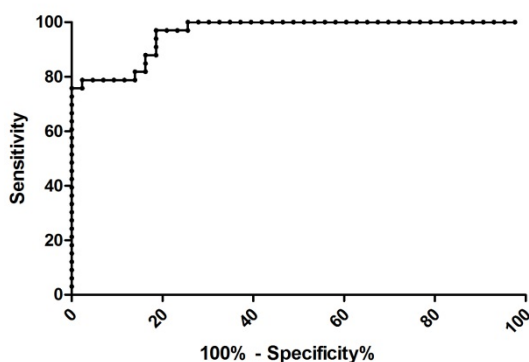
จากการศึกษาใน in vivo พบว่ามีต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่บางรายในกลุ่ม +LN มีระดับเมทิล

เลชันของ SHP1-P2 สูงกว่าค่าเฉลี่ยของเซลล์เพาะเลี้ยง HepII มากและระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่บางรายในกลุ่ม -LN มีระดับเมทิลเลชันต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของเซลล์เพาะเลี้ยง Daudi แสดงว่าระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ใน in vitro ไม่เหมือนกับใน in vivo เนื่องจากใน in vitro นั้นเป็นการศึกษาจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเดียวปราศจากการรบกวนจากปัจจัยอื่นแต่ใน in vivo นั้น ในต่อมน้ำเหลืองประกอบไปด้วยเซลล์ประสาท (Nerve cell) และหลอดเลือด (Blood vessel) ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (Endothelial cell) ทำให้ระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยง

ต่อมน้ำเหลืองของคนปกตินี้จะมีค่าเมทิลเลชันของ SHP1-P2 ประมาณ 11.96 ± 1.327 (ไม่ได้แสดงในรูป) จากการใช้เทคนิค CMST Real-time PCR ซึ่งค่าเมทิลเลชันในกลุ่ม -LN นั้นมีค่าเมทิลเลชันที่สูงกว่าต่อมน้ำเหลืองของคนปกติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่มีการแพร่กระจายเข้ามาของเซลล์มะเร็งเพียงแต่แพร่กระจายเข้ามาในปริมาณที่น้อยมากจนนักพยาธิวิทยาไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคการย้อม Immunohistochemistry และ Hematoxylin & Eosin

ปริมาณการแพร่กระจายมีผลต่อระดับเมทิลเลชันของ SHP1-P2 เนื่องจากเมื่อทางคณะผู้วิจัยได้นำต่อมน้ำเหลืองที่ไม่มีเซลล์มะเร็งปนเปื้อนของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ในกลุ่ม +LN ไปทำการตัดสไลด์เพิ่มมาทำการตรวจวัดระดับร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 พบว่าค่าเฉลี่ยระดับร้อยละของเมทิลเลชันนั้นต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่ม +LN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ยังคงสูงกว่ากลุ่ม -LN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน จากที่ได้กล่าวมานั้นพบว่าระดับร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย ดังนั้นต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยบางรายในกลุ่ม -LN นั้นอาจจะไม่มีเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ซ่อนเร้นอยู่เนื่องจากค่าร้อยละของเมทิลเลชันของ SHP1-P2 นั้นสูงกว่าค่าเฉลี่ยของต่อมน้ำเหลืองของคนปกติ

4. ทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคต่อ ค่อมน้ำเหลืองของกลุ่ม -LN และ +LN โดยใช้ค่า ROC curve analysis ดังรูปที่ 7 พบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟ = 0.9605 ($p < 0.0001$) แสดงว่าเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มี ประสิทธิภาพสูงในการคัดกรองค่อมน้ำเหลืองที่มีการ แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีมาก และเมื่อ พิจารณาถึงค่า likelihood ratio พบว่าที่ร้อยละของระดับ เมทิลชั้น 54.44 มีค่า likelihood ratio = 33.88 ความไวและ ความจำเพาะมีค่าเท่ากับ 78.79 และ 97.67 ตามลำดับ



รูปที่ 7 แสดงความไวและความจำเพาะของเทคนิค CMST Real-time PCR

สรุปผลการวิจัย

เทคนิค CMST Real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความเที่ยงตรง ถูกต้อง และแม่นยำสูงโดยสรุปจากค่า C.V. ที่น้อยมาก (น้อยกว่า 5) และค่า Pearson's coloration r^2 ที่สูงมาก ($r^2 = 0.9994$)

และเมื่อนำเทคนิคนี้มาใช้ตรวจคัดกรองค่อม น้ำเหลืองที่ถูกวินิจฉัยด้วยนักพยาธิวิทยาว่ามีและไม่มี การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่า เทคนิคนี้สามารถใช้แยกค่อมน้ำเหลืองทั้งสองกลุ่มนี้ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ต่างกัน 40.73 ± 3.721 , $p < 0.0001$) โดยมีความไวและความจำเพาะสูงมาก (78.79 และ 97.67 ที่ระดับเมทิลชั้น = 54.44)

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถประยุกต์เทคนิคนี้ในการตรวจหาดีเอ็น เอของเซลล์มะเร็งซ่อนเร้น (Occult tumor DNA) ใน

ค่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพและความถูกต้องในการวินิจฉัยและรักษา ผู้ป่วยได้

2. นอกจากการคัดกรองค่อมน้ำเหลืองที่มีการ แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่แล้ว ยังสามารถ ประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองค่อมน้ำเหลืองที่มีการ แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอื่นๆที่กลายพันธุ์มาจาก เซลล์เยื่อหรือบริเวณอื่นที่ไม่มีเซลล์เยื่อได้เช่นการ ตรวจหาการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปที่น้ำเลี้ยงใน สมองและไขสันหลัง (Cerebrospinal fluid) ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรของหลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนด้านต่างๆในการทำงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและบุคลากรภาควิชาพยาธิ วิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันต แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่สนับสนุนในการ คัดเลือกและเตรียมตัวอย่างค่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วย มะเร็งลำไส้ใหญ่ และขอบคุณสำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) สำหรับ ทุนวิจัย TRF-MRG young scientific researcher grant เลขที่ MRG53800100

เอกสารอ้างอิง

- Attasara P and Buasom R. (2012) Hospital-based cancer registry. Thailand: NCI, thailand.
- Kitkumthorn N, Keelawat S, Rattanatanyong P, et al. (2012) LINE-1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 4469-4475.
- Ludwig JA and Weinstein JN. (2005) Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5: 845-856.

- Patel A, Groopman JD and Umar A. (2003) DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. *Ann N Y Acad Sci* 983: 286-297.
- Patel V, Hood BL, Molinolo AA, et al. (2008) Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res* 14: 1002-1014.
- Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Shuangshoti S, et al. (2006) SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med (Berl)* 84: 175-182.
- Vinayanuwattikun C, Chantranuwat P, Sriuranpong V, et al. (2013a) Erratum to: The role of SHP-1 promoter 2 hypermethylation detection of lymph node micrometastasis in resectable stage I non-small cell lung cancer as a prognostic marker of disease recurrence. *Int J Clin Oncol*.
- Vinayanuwattikun C, Sriuranpong V, Tanasanvimon S, et al. (2011) Epithelial-specific methylation marker: a potential plasma biomarker in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6: 1818-1825.
- Vinayanuwattikun C, Winayanuwattikun P, Chantranuwat P, et al. (2013b) The impact of non-tumor-derived circulating nucleic acids implicates the prognosis of non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139: 67-76.