บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีคือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อทางเดินน้ำดีซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรมที่ในปัจจุบันมีการศึกษากันมากที่สุดในการศึกษาเกี่ยวกับโรคมะเร็งและรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดี การเกิดเมทิลเลชันบริเวณ CpG island ส่งผลให้มีการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของมะเร็ง วิธี methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) เป็นวิธีใหม่ที่สามารถตรวจหาระดับเมทิลเลชันได้อย่างรวดเร็วในขั้นตอนเดียว ซึ่งปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้วิธีนี้ในงานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งเพิ่มมากขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้วิธี MS-HRM ในการตรวจหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML, SFRP1, HIC1, PTEN* และ *DcR1* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา เพื่อประเมินความสามารถของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนดังกล่าวในการเป็นตัวบ่งชี้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยตรวจหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดี 73 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อท่อน้ำดีปกติบริเวณข้างเคียง 10 ตัวอย่างโดยวิธี MS-HRM จากการศึกษาพบว่ายีน *OPCML, SFRP1* และ *HIC1* เกิดภาวะไฮเปอร์เมทิลเลชันร้อยละ 89.0, 83.6 และ 28.8 ตามลำดับ และพบการเกิดไฮโปเมทิลเลชันของยีน *DcR1* ร้อยละ 68.5 ขณะที่การศึกษานี้ไม่พบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *PTEN* และเมื่อพิจารณาระดับเมทิลเลชันพบว่า ยีน *OPCML* และ *SFRP1* ในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับเมทิลเลชันสูงกว่าที่พบในตัวอย่างท่อน้ำดีปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$) และยีน *DcR1* มีระดับเมทิลเลชันในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีต่ำกว่าในตัวอย่างท่อน้ำดีปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.001$) แม้ว่าการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนและการตอบสนองต่อการรักษา อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าภาวะไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีน *OPCML* และ *SFRP1* เป็นความผิดปกติทางกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในมะเร็งท่อน้ำดีและอาจจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาแรกที่ประยุกต์ใช้วิธี MS-HRM เพื่อตรวจหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่ง MS-HRM เป็นวิธีที่สามารถทำซ้ำได้โดยให้ผลเหมือนเดิม อีกทั้งยังราคาไม่แพงและผลที่ได้สามารถเทียบได้กับวิธี pyrosequencing ดังนั้น MS-HRM จึงเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาระดับเมทิลเลชันของยีนที่สนใจในตัวอย่างชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of cholangiocytes which remains a major public health problem in Thailand. DNA methylation of CpG dinucleotides is one of the most widely studied epigenetic changes in cancers including CCA. CpG island methylation of important cancer-related genes leads to transcriptional silencing which is involved in tumorigenesis and pathogenesis. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) is a novel close-tube assay for high throughput assessment of methylation level in which the method has been increasing epigenetic application in cancer researches for the past few years. We aimed to establish MS-HRM assay for the detection of DNA methylation levels of *OPCML, SFRP1, HIC1, PTEN,* and *DCR1* in CCA patients with response and nonresponse to therapy and evaluated their potential as a predictive marker for response to therapy. DNA methylation levels of these genes were analyzed using established MS-HRM assays in 73 CCA and 10 adjacent normal samples. In CCA, hypermethylation frequency of *OPCML*, *SFRP1,* and *HIC* was 89.0, 83.6, and 28.8%, respectively and hypomethylation frequency of *DcR1* was 68.5%, whereas that of *PTEN* was null. Methylation level of *OPCML* and *SFRP1* in CCA was higher than that in adjacent normal tissues ($P<0.001$), while in *DcR1* was lower than that in adjacent normal tissues ($P=0.001$). Nevertheless, there is no significant correlation of DNA methylation of candidate genes and therapeutic responsiveness of CCA patients. However, our study clearly illustrated that *OPCML* and *SFRP1* hypermethylation are a common epigenetic change in CCA and might serve as the potential candidate diagnostic biomarkers for this fatal cancer. To our knowledge, this is the first report demonstrating the applicability of MS-HRM to detect DNA methylation in CCA. Due to its reproducibility, cost-effectiveness and comparability to sophisticated bisulfite pyrosequencing, MS-HRM could be potentially facilitated for quantifying DNA methylation at specific loci in clinical samples including CCA.