

บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งระดับที่พบได้สูงในอันดับต้นและยังคงเป็นปัญหาสำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini*^{1,2} ปัจจุบันพบว่าแนวโน้มนับอัตราการของมะเร็งท่อน้ำดีทั่วโลกมีอัตราเพิ่มสูงขึ้นรวมทั้งอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้นด้วย^{3,4} ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมักมาพบแพทย์หรือได้รับการวินิจฉัยในระยะท้าย ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่จะวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีอย่างจำเพาะรวมทั้งวิธีการรักษาที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพทำให้ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำ โดยแนวทางที่ใช้ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีได้แก่ การผ่าตัดตับเพื่อเอาก้อนมะเร็งออก การให้เคมีบำบัดร่วมกับการผ่าตัด หรือการให้เฉพาะเคมีบำบัดในรายที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ซึ่งพบราว 2 ใน 3 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี⁵ สำหรับรายที่ได้รับการผ่าตัดมีโอกาสในการกลับเป็นซ้ำ (recurrence) ในอัตราที่สูงโดยมีอัตราการรอดชีวิตภายในระยะเวลา 5 ปี ประมาณร้อยละ 9-18 สำหรับ proximal biliary lesion และร้อยละ 20-30 สำหรับ distal tumor⁶ การให้เคมีบำบัดหลังการผ่าตัดในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังไม่เห็นผลชัดเจนเมื่อเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งถุงน้ำดี^{7,8} วัตถุประสงค์ของการให้เคมีบำบัดเพื่อควบคุมมะเร็งและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย⁹ ปัจจุบันเคมีบำบัดที่นิยมใช้สำหรับการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ 5-fluorouracil (5-FU) โดยอาจให้แบบเดี่ยว (single agent) หรือร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่น เช่น leucovorin, doxorubicin, mitomycin C, cisplatin, epirubicin และ gemcitabine เป็นต้น¹⁰ ยาเคมีบำบัดออกฤทธิ์ในการกำจัดมะเร็งโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) ส่งผลให้มีการหยุดวงจรเซลล์ (cell cycle arrest) และการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งดื้อต่อยาเคมีบำบัด (acquired anti-cancer drug resistance) หรือตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกันมาจากความบกพร่องหรือมีการยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) การหยุดวงจรเซลล์และการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส¹¹

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นการดัดแปลงจีโนมที่ไม่ทำให้ลำดับเบสมีการเปลี่ยนแปลงและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยเป็นการเติมหมู่เมทิลที่ได้จาก S-adenosylmethionine (SAM) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีนที่เป็น CpG dinucleotides โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) CpG กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมโดยเรียกบริเวณที่มี CpG อยู่หนาแน่นว่า CpG island ซึ่งพบมากบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในเซลล์ปกติจะไม่พบเมทิลเลชันของ CpG island บริเวณโปรโมเตอร์ แต่ในเซลล์มะเร็งกลับพบเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter hypermethylation) และพบภาวะเมทิลเลชันที่กระจายอยู่ทั่วจีโนมในระดับต่ำ (global hypomethylation) กระบวนการเมทิลเลชันในภาวะปกติเพื่อควบคุมการแสดงออกของโครโมโซมเอกซ์ในเพศหญิง (X-chromosome inactivation) ควบคุมการแสดงออกของยีนในแต่ละอัลลีลที่มาจากพ่อและแม่ให้มีการแสดงออกในระดับที่ต่างกัน (gene imprinting) และรักษาเสถียรภาพของจีโนม (genome stability) การพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ในเซลล์มะเร็งทำให้ลดการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง ยีนซ่อมแซมดีเอ็นเอ ยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส (apoptosis related genes) ยีนที่ควบคุมการรุกรานและแพร่กระจาย ยีนที่ควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis) และส่งผลให้เกิด Loss of imprinting (LOI) ความไม่เสถียรของจีโนม (genome instability) และการเพิ่มการแสดงออกของยีนมะเร็ง (oncogenes)^{12,13} ความ

ผิดปกติที่เกิดขึ้นกับยีนดังกล่าวเป็นผลให้เซลล์มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งและส่งเสริมการดำเนินของโรคมะเร็ง รวมทั้งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งต้องยาเคมีบำบัด

Sriraksa และ คณะ¹⁴ ทำการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน 26 ยีนด้วยวิธี methylation specific PCR (MSP) ในชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 102 รายเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อตับบริเวณปกติ (normal adjacent) จำนวน 29 รายโดยศึกษาในยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส ยีนที่ควบคุมวงจรเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ ยีนซ่อมแซมดีเอ็นเอ และยีนที่ควบคุมการรุกรานและแพร่กระจาย ตรวจสอบยืนยันผลดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ selected candidate genes ด้วยวิธี COBRA (Combine bisulfite restriction analysis) และ Pyrosequencing หลังจากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนกับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบยีนที่น่าจะนำมาเพื่อประเมินในการทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ดังนี้คือ *OPCML*, *SFRP-1*, *HIC1*, *PTEN* และ *DcR1* โดยพบความถี่ของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งค่อนข้างสูงและแตกต่างจาก normal adjacent อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความสามารถของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในการเป็นตัวบ่งชี้สำหรับทำนายการตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเคมีบำบัดซึ่งจะช่วยให้แพทย์วางแผนในการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ อันจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

บททวนวรรณกรรม

ยีน *OPCML* (Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like gene) จัดอยู่ใน IgLON family of immunoglobulin (Ig) domain ที่มี glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell adhesion molecules โดยทำหน้าที่ในการยึดเกาะเซลล์ไว้ด้วยกัน¹⁵ นอกจากนี้ *OPCML* ยังเกี่ยวข้องในการเป็น responsive gene ของ p53 ซึ่งการตอบสนองลดลงเมื่อมีเมทิลเลชันของยีน *OPCML* และยังพบว่าเมื่อทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน *OPCML* ในเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนนี้ (ectopic expression) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งแสดงให้เห็นว่า *OPCML* ทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็ง¹⁶ ความผิดปกติของยีน *OPCML* เนื่องจากดีเอ็นเอเมทิลเลชันพบในมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งรังไข่ระยะสุดท้าย¹⁷ มะเร็งเซลล์ตับ¹⁸ มะเร็งปากมดลูก¹⁹ และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง¹⁶ แต่ไม่พบรายงานในมะเร็งท่อน้ำดี

Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) เป็น soluble Wnt antagonist ที่มี cysteine-rich domain ที่คล้ายกับ Frizzled receptor^{20,21} จึงทำให้ SFRP1 สามารถแย่ง Frizzled ในการจับกับ Wnt หรือจับกับ Frizzled receptor ได้โดยตรงเป็นผลให้วิถีสัญญาณ Wnt/ β -catenin ลดลง²² ซึ่งวิถีสัญญาณ Wnt/ β -catenin เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้น SFRP1 จึงเป็นยีนต้านมะเร็งที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ความผิดปกติของ SFRP1 ส่วนมากเป็นแบบเมทิลเลชันโดยพบในมะเร็งท่อน้ำดี²³ มะเร็งหลอดอาหาร²⁴ มะเร็งเต้านม²⁵ และมะเร็งตับ²⁶

ยีน Hypermethylated in cancer 1 (*HIC1*) อยู่บนโครโมโซม 17p13.3 ซึ่งถัดจากยีน p53 มาทางด้านปลาย²⁷ ยีน *HIC1* แปรรหัสได้โปรตีนทำหน้าที่ในการยับยั้งการถอดรหัส (transcriptional repressor) ของ histone deacetylase *SIRT1* ซึ่ง *SIRT1* ทำหน้าที่ในการ deacetylation p53 โดย deacetylated p53 จะไม่สามารถจับกับ responsive element ของยีนเป้าหมายทำให้ไม่เกิดการถอดรหัสของยีนดังกล่าวซึ่งรวมทั้ง *HIC1*²⁸ ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกจึงเป็น *HIC1-SIRT1-p53* circular regulatory loop โดย *HIC1* ยับยั้ง *SIRT1* ทำให้ p53 อยู่ในภาวะ acetylation และสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมายรวมทั้ง *HIC1* จึงเป็นการควบคุมระดับของโปรตีนต่างๆ หาก *HIC1* มีความผิดปกติแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันทำให้ไม่สามารถแสดงออกได้ส่งผลให้ p53 ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เช่นกัน²⁹ ทำให้เซลล์ไม่เกิดอะพอพโทซิสเมื่อมีการทำลายดีเอ็นเอพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *HIC1* ในมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งเต้านม³⁰ มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก³¹ มะเร็งเซลล์ตับ³² และมะเร็งรังไข่³³ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของ *HIC1* เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของมะเร็งและอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำในผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิดซึ่งหากผู้ป่วยมีการแสดงออกของ *HIC1* จะส่งผลให้ผู้ป่วยมีการพยากรณ์โรคที่ดี^{34,35}

Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) มีคุณสมบัติเป็นฟอสฟาเตสที่จำเพาะต่อการกำจัดหมู่ฟอสเฟตตำแหน่งที่ 3 ของ inositol ring ใน phosphatidylinositol-3, 4, 5 triphosphate (PIP3) โดย PIP3 เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งที่ 3 โดย phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)^{36,37} การสูญเสียหน้าที่ของ PTEN เนื่องจากการกลายพันธุ์ การขาดหายไปของยีน หรือการเกิดเมทิลเลชันจะทำให้มีการสะสมของ PIP3 และกระตุ้น Akt/PKB และ mTOR เป็นผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต การรอดชีวิตและมีการเคลื่อนที่ของเซลล์ การศึกษาของ Lee และคณะ³⁸ ในมะเร็งท่อน้ำดีในชาว

เกาหลีไม่พบเมทิลเลชันของ PTEN ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่มีสาเหตุต่างกันมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ต่างกัน

DcR1 เป็น decoy receptor ของ TRAIL ป้องกันเซลล์มะเร็งไม่ให้เกิดอะพอโทซิสเนื่องจากแย่ง TRAILR1 (DR4) และ TRAILR2 (DR5)³⁹ ในการจับกับ TRAIL ดังนั้นการเกิดเมทิลเลชันของ DcR1 ในมะเร็งท่อน้ำดีจึงเป็นผลดีต่อผู้ป่วยเนื่องจากไม่มี DcR1 มาแย่งจับซึ่งจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีเมทิลเลชันของ DcR1 มีอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีเมทิลเลชันของ DcR1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.027$) ซึ่งคล้ายกับมะเร็ง mesothelioma และต่อมลูกหมาก^{40,41}

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP-1*, *HIC1*, *PTEN* และ *DcR1* ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองต่อการรักษา และไม่ตอบสนองต่อการรักษา
2. วิเคราะห์เปรียบเทียบผลของดีเอ็นเอเมทิลเลชันระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มเพื่อประเมินว่าเมทิลเลชันของยีนใดเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำให้ได้ตัวบ่งชี้ชีวภาพที่สามารถใช้ในการทำนายการตอบสนองต่อการรักษาและการดำเนินโรคซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับแพทย์ในการที่จะประเมินการรักษาผู้ป่วยและปรับเปลี่ยนการรักษาเพื่อให้เหมาะกับผู้ป่วยแต่ละราย

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งจำนวน 73 รายรวมทั้งลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย และตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง (normal adjacent tissue) จำนวน 10 รายได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี โดยผ่านความเห็นชอบของกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้ใช้ตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ (HE541019) ผู้ป่วยทั้ง 73 รายเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดนอกเหนือจากการผ่าตัด โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา (มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าค่ามัธยฐาน 29.5 สัปดาห์) จำนวน 35 ราย และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าค่ามัธยฐาน 29.5 สัปดาห์) จำนวน 38 ราย รายละเอียดของลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยสรุปไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 73 ราย

Clinicopathological data	Chemotherapy group		P-value
	Non-response (n=38)	Response (n=35)	
Age (year)			
≤ 55	19 (50%)	18 (51.4%)	0.903 ^a
> 55	19 (50%)	17 (48.6%)	
Gender			
Male	27 (71.1%)	20 (57.1%)	0.215 ^a
Female	11 (28.9%)	15 (42.9%)	
Gross type			
Mass forming	24 (88.9%)	18 (75%)	0.276 ^b
Others	3 (11.1%)	6 (25%)	
Differentiated type			
Well	23 (65.7%)	23 (67.6%)	0.865 ^a
Less	12 (34.3%)	11 (32.4%)	
Staging			
III (a and b)	3 (13%)	4 (18.2%)	0.699 ^b
IV (a and b)	20 (87%)	18 (81.8%)	
Survival time (week)	Mean= 17.8	Mean= 94.5	<0.001 ^c

^aChi-square, ^bFisher's Exact test, ^cT-test

การสกัดดีเอ็นเอและการดัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์

ตัวอย่างชิ้นเนื้อถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hercules, CA) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมมาดัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์โดยใช้ EZ DNA Methylation GoldTM Kit (Zymo Research, Orange, CA) ซึ่งมีหลักการดังนี้ โซเดียมไบซัลไฟต์จะเปลี่ยนไซโทซีนที่ไม่ถูกเมทิลเลต (unmethylated cytosine) ให้เป็นยูเรซิล โดยเมทิลเลตไซโทซีน (methylated cytosine) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ถูกดัดแปลงด้วยไบซัลไฟต์ว่ามีความสมบูรณ์หรือไม่ (complete bisulfite modification) โดยใช้ *calponin*-specific primer sets เนื่องจากหากการดัดแปลงดีเอ็นเอด้วยไบซัลไฟต์ไม่มีความสมบูรณ์จะทำให้เกิดผลบวกปลอม หรือประเมินผลของเมทิลเลชันสูงเกินจริง⁴²

สารควบคุมดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

positive control สำหรับ methylated ใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากเม็ดเลือดขาวนำมา treat ด้วย Sssl methyltransferase ซึ่งมีคุณสมบัติในการเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของไซโทซีนเฉพาะ CpG site เท่านั้น (*in vitro* methylation; IVM) ปฏิบัติการประกอบด้วย 10 µg DNA, 10 units Sssl methyltransferase (New England Biolabs, Ipswich, MA) และ 160 µM S-adenosylmethionine (New England Biolabs) ทำการ incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชม. หลังจากนั้น incubate ที่ 65 °C นาน 20 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา ตกตะกอนด้วย ethanol และละลายดีเอ็นเอในน้ำ ส่วน negative control จะใช้ดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้ treat ด้วย Sssl methyltransferase

Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM)

ตรวจหาระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธี MS-HRM ซึ่งมีหลักการดังนี้ bisulfite modified DNA ที่มี methylated cytosine ที่ CpG site ย่อมมี melting temperature สูงกว่า unmethylated cytosine ด้วยเหตุนี้จึงสามารถแยก methylated ออกจาก unmethylated DNA ได้ โดยสามารถหาปริมาณของ methylated DNA ได้จากการเปรียบเทียบกับ standard curve ที่มี *in vitro* methylation (IVM) เท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100% ซึ่งทำได้โดยผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเม็ดเลือดขาวที่ treat ด้วย Sssl methyltransferase เข้ากับดีเอ็นเอที่ไม่ได้ treat ในอัตราส่วนเพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์ของเมทิลเลชันตามที่กำหนด

ลำดับเบสบริเวณ CpG island ของยีนได้จาก UCSC human genome (<http://genome.ucsc.edu>) ไพรมเมอร์สำหรับ MS-HRM ถูกออกแบบโดย MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ MS-HRM และสภาวะสำหรับ PCR

CpG island	Location	Primer		PCR product		
		Sequence (5'→3')	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM)	CpG sites	Size (bp)
<i>OPCML</i>	11q25	F TTGAGATTTGTTATTTGGGGATA	60	2	10	134
		R CCAACCAAATCCAACCTAAC				
<i>SFRP1</i>	8p12-p11.1	F AAGTTTAAAGGTAAGGTTGTTTT	60	2	13	132
		R AACCTCAATCCCCAACAC				
<i>HIC1</i>	17p13.3	F GGGTAGGGGAGTTTAGGGTT	63	3	11	128
		R AAAAAATTTTCCAACACAAACAA				
<i>PTEN</i>	10q23	F GGGGGAATTTTATAGGTAAAGGTT	60	2	8	142
		R CAAAAAATACCCTCCCCC				
<i>DcR1</i>	8p22-p21	F AGGTGTTAGGGGAGGTTATGTTT	63	3	6	136
		R TCCCACAACACTACCAAAATC				

F = forward; R = reverse; Ta = annealing temperature (According to recommendation of Applied Biosystems, this temperature was also used for extension step)

PCR amplification และ HRM assay วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง ABI 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) ปฏิบัติการ 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1x PCR buffer (67 mM Tris, pH 8.4, 16.6 mM ammonium sulfate และ 0.1% Tween 20), dNTP อย่างละ 200 μ M, ไพรเมอร์อย่างละ 300 nM, 1.5 μ M SYTO[®] 9 (Invitrogen, Carlsbad, CA), Platinum *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.5 unit (Invitrogen), bisulfite modified DNA จำนวน 20 ng และ MgCl₂ ความเข้มข้นตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 1 ขั้นตอนของ PCR ประกอบด้วย 95 °ซ นาน 10 นาทีเพื่อกระตุ้นเอนไซม์ และ 40 รอบของ denaturation ที่ 95 °ซ นาน 15 วินาที annealing และ extension ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 1 เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน HRM ประกอบด้วย denaturation ที่ 95 °ซ นาน 10 วินาที และ reannealing ที่ 60 °ซ นาน 1 นาที จากนั้นค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 1% ramp rate จนอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 95 °ซ โดยทำแบบ triplicate ในแต่ละปฏิกริยา และใช้ 40% IVM เป็นสารควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) และใช้ 7500 software version 2.0.5 (Applied Biosystems) สำหรับ amplification plot และข้อมูลดิบของ MS-HRM ส่วนการวิเคราะห์ MS-HRM ใช้ High resolution melting software version 2.0.1 (Applied Biosystems) และคำนวณโดยใช้ Microsoft Excel 2007

การวิเคราะห์ทางสถิติ

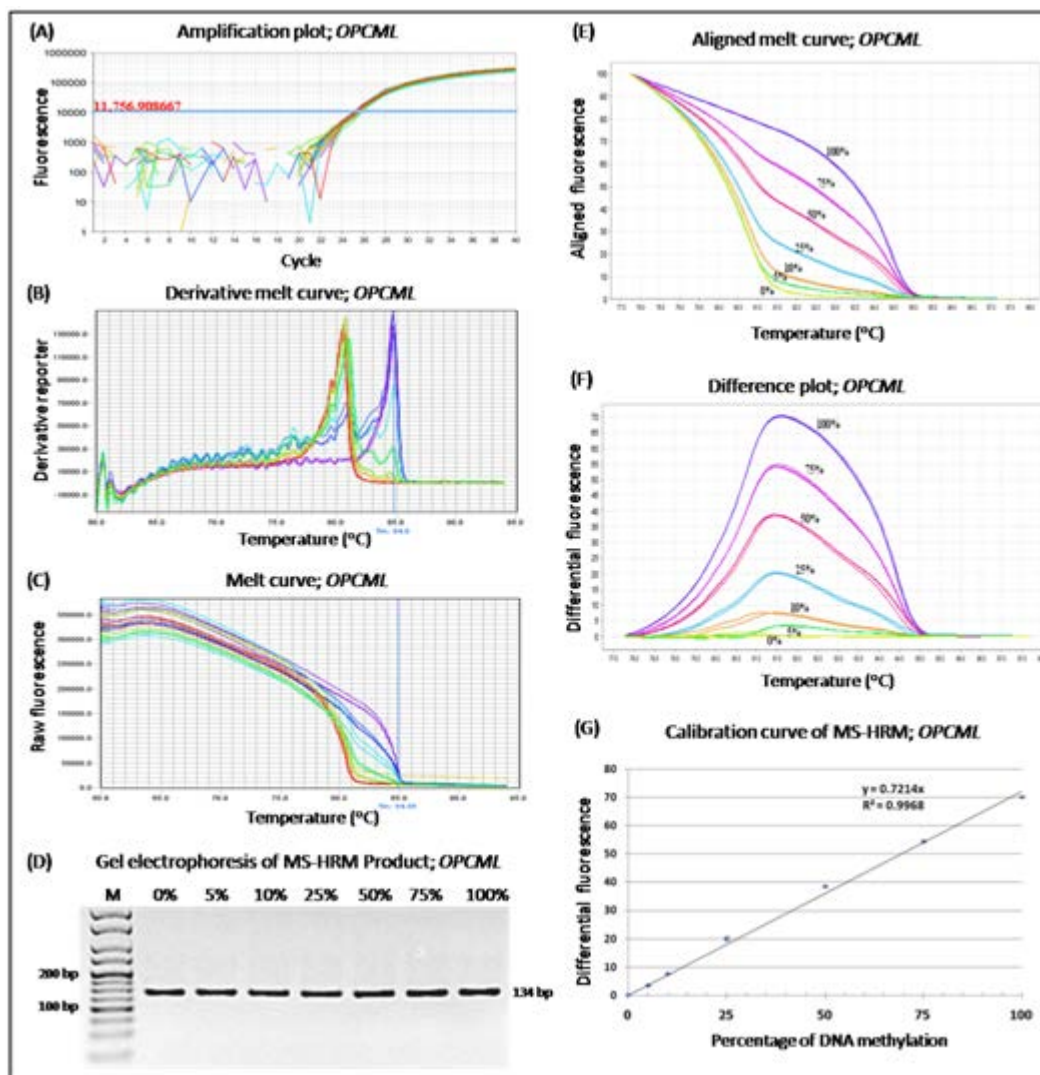
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 15.0 (Chicago, IL) การเปรียบเทียบระดับของ เมทิลเลชันของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันใช้สถิติ T-test หรือ Mann-Whitney test การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลเลชันและลักษณะทางคลินิกใช้สถิติ Mann-Whitney test, Fisher's exact test และ Odds ratio การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลเลชันและอัตราการรอดชีวิตใช้สถิติ Kaplan Meier และ Cox regression

การประเมินความสามารถของเมทิลเลชันในการจำแนกความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยมะเร็งและภาวะปกติวิเคราะห์โดย Receiver operating characteristic (ROC) curve โดยค่า p value < 0.05 จัดว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

การประเมินวิธี Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) สำหรับตรวจวัดระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองนำเอาวิธี MS-HRM มาเพื่อใช้ตรวจวัดระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นครั้งแรก จึงต้องทำการประเมินวิธี MS-HRM ในการวัดระดับเมทิลเลชันในยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC*, *PTEN* และ *DcR1* โดยใช้ in vitro methylation (IVM) ที่ระดับ 100, 75, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 และ 0% เป็นสารมาตรฐาน ตัวอย่างของการหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML* โดยวิธี MS-HRM แสดงไว้ในรูปที่ 1 ซึ่ง amplification plot ของเมทิลเลชันที่ระดับต่างๆ (0-100%) ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นเท่ากัน (20 นาโนกรัม) พบว่ามีค่า Ct ใกล้เคียงกัน (mean = 25.54, SD = 0.23) (รูปที่ 1A) ค่า derivative melt curve (รูปที่ 1B) แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่าง 0% methylation (T_m ต่ำ) และ 100% methylation (T_m สูง) ที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยมี peak ของระดับอื่นๆ อยู่ระหว่าง 2 peak นี้ ข้อมูลดิบของ HRM profile ของ PCR product (รูปที่ 1C) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิค่าการเรืองแสงลดลง โดย IVM ที่มีเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันสูงมีระดับการเรืองแสงที่มากกว่า IVM ที่มีเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันต่ำ ณ จุดที่มีอุณหภูมิเท่ากัน เมื่อนำ PCR product มาแยกโดย agarose gel electrophoresis พบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน และไม่พบ non-specific product (รูปที่ 1D) เมื่อนำข้อมูลดิบของ HRM profile มา normalize โดยใช้ High resolution melting software version 2.0.1 จะแสดงผลในรูปของ aligned melt curve (รูปที่ 1E) หลังจากนั้นวิเคราะห์ difference plot โดยเปรียบเทียบกับ 0% methylation (รูปที่ 1F) และนำค่า differential fluorescence มา plot กับเมทิลเลชันแต่ละระดับจะได้กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 1G) ที่สามารถนำมาหาระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 1 การหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML* ด้วยวิธี MS-HRM โดยใช้ IVM 0-100% เป็นสารมาตรฐาน (A) The amplification plots (B) Derivative melt curve (C) Raw melt curve of HRM (D) Electrophoresis of MS-HRM product; M, HyperLadder™ V DNA marker (E) Aligned melt curve plots (F) The difference plots against unmethylated control (G) A linear calibration curve of *OPCML* MS-HRM

การศึกษาความแม่นยำของวิธี MS-HRM

การหา Precision ของวิธี MS-HRM ทั้ง with-in run และ between run โดยใช้ 40% IVM เป็น internal control พบว่าอยู่ในเกณฑ์ดี และมีความน่าเชื่อถือ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การศึกษาความแม่นยำของวิธี MS-HRM

CpG island	Number of experiment	With-in run			Between run		
		Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
<i>OPCML</i>	6	41.69- 46.09	0.47- 1.36	1.02- 3.09	43.93	1.73	3.94
<i>SFRP1</i>	5	42.48- 45.61	0.71- 1.28	0.41- 2.30	43.95	1.22	2.78
<i>HIC1</i>	4	44.27- 45.16	0.51- 1.55	1.13-3.50	44.91	0.85	1.90
<i>PTEN</i>	3	39.97- 43.33	0.27-1.19	0.69-2.75	41.82	1.72	4.12
<i>DcR1</i>	4	42.68- 45.30	0.24- 1.03	0.57- 2.34	44.09	1.14	2.59

ความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC*, *PTEN* และ *DcR1* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 73 ราย และในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง 10 รายแสดงไว้ในรูปที่ 2 ในการคำนวณความถี่ของความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จะคำนวณจากการใช้ค่า cut-off ของระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง 10 ราย พบว่าร้อยละความถี่ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่พบ hypermethylation ในยีน *OPCML*, *SFRP1* และ *HIC* เท่ากับ 89.0, 83.6 และ 28.8 ตามลำดับ และร้อยละความถี่ที่พบ hypomethylation ในยีน *DcR1* เท่ากับ 68.5 โดยไม่พบความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน *PTEN* (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบความถี่ของการพบความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในยีน *OPCML*, *SFRP1* และ *DcR1* โดยที่ระดับเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* ในมะเร็งท่อน้ำดีมีค่าสูงกว่า ขณะที่ระดับเมทิลเลชันของ *DcR1* ในมะเร็งท่อน้ำดีมีค่าต่ำกว่าในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง (รูปที่ 3)

	Sample Code	OPCML	SFRP1	HIC1	DcR1	PTEN
Cholangiocarcinoma (n= 73)	N135-T	82.15	81.54	49.87	55.3	0
	W093-T	76.67	59.25	38.26	63.01	0
	N013-T	72.6	86.22	66.59	3.43	0
	M043-T	67.32	54.32	37.87	0	0
	X189-T	66.12	56.19	0	3.98	0
	M117-T	64.84	76.45	0	0	0
	R078-T	62.97	65.87	0	18.12	0
	N136-T	61.15	67.08	7.33	51.31	0
	X056-T	58.75	23.77	2.81	5.02	0
	P077-T	57.26	67.21	54.68	7.79	0
	X028-T	57.13	56.23	4.44	2.42	0
	M157-T	56.84	84.38	0	0	0
	Q066-T	55.38	39.12	0	0	0
	W008-T	55.31	50.62	0	8.6	0
	X064-T	52.5	70.3	17.83	5.1	0
	M012-T	51.97	66.55	0	1.96	0
	Q045-T	51.22	81.5	0	2.82	0
	W080-T	51.14	50.39	23.03	54.13	0
	N110-T	50.41	56.43	0	0	0
	W060-T	48.14	25.83	0	0	0
	W046-T	48.03	68.18	45.14	97.89	0
	W036-T	47.98	45.72	0	20.49	0
	X134-T	47.91	36.49	0	5.5	0
	M021-T	45.44	0	0	0	0
	N082-T	45.18	39.94	3.88	4.39	0
	M069-T	45.01	48.78	0	0	0
	M273-T	44.07	43.01	4.83	0	0
	U021-T	44.02	44.29	38.92	25.98	0
	T131-T	41.51	39.45	31.62	6.18	0
	N152-T	40.89	54.65	0	6.34	0
	X030-T	40.32	18.5	0	3.49	0
	R081-T	40.15	36.78	0	4.73	0
	M311-T	39.9	31.48	26.26	0	0
	W027-T	39.59	27.69	0	8.77	0
	P152-T	39.29	49.52	0	33.38	0
	N154-T	38.67	18.12	3.95	8.21	0
	N128-T	38.73	46.19	28.57	31.17	0
	U041-T	38.65	29.12	6.22	9.05	0
	W040-T	38.57	40.72	11.81	5.6	0
	R156-T	37.45	35.54	8.51	15.28	0
	T049-T	36.73	12.99	22.27	25.97	0
	N114-T	35.25	65.97	3.36	0	0
	U034-T	34.35	44.82	35.62	50	0
	Q071-T	30.81	12.17	0	8.52	0
	W025-T	30.26	54.03	0	32.04	0
	N121-T	29.09	14.36	0	0	0
	W095-T	27.76	24.92	0	15.69	0
	N088-T	27.71	29.2	2.81	0	0
	M156-T	26.78	31.24	8.25	29.17	0
	W022-T	23.35	26.07	0	4.37	0
	W068-T	23.14	26.56	0	35.54	0
	X116-T	22.86	15.83	0	5.55	0
	M319-T	22.67	18.62	9.43	18.58	0
	P078-T	22.04	10.34	7.72	3.7	0
	X078-T	21.77	22.59	23.12	6.27	0
	N004-T	21.05	20.59	0	0	0
	M137-T	20.75	33.08	0	2.74	0
	P091-T	16.7	22.53	0	0	0
	W149-T	16.69	21.44	0	2.66	0
	Q013-T	14.09	25.1	9.54	0	0
	P086-T	13.51	13.73	0	0	0
	Q044-T	11.7	14.88	9.5	6.05	0
	Q095-T	9.85	13.89	0	25.73	0
	X196-T	8.42	8.57	0	7.09	0
	N075-T	7.45	7.66	0	3.49	0
	P128-T	5.64	6.36	6.43	5.09	0
	X157-T	4.54	5.3	0	11.07	0
	N127-T	3.28	6.19	0	3.97	0
	P112-T	2.81	7.39	14.73	0	0
	P126-T	0	5.75	0	13.33	0
	M216-T	0	0	55.79	47.79	0
	N142-T	0	0	4.29	0	0
	P055-T	0	0	2.42	24.88	0
Adjacent normal (n= 10)	W060-N	5.87	0	9.31	33.56	0
	W022-N	4.83	0	2.94	9.84	0
	N069-N	4.41	6.03	1.92	20.97	0
	P078-N	3.18	0	0	23.83	0
	N082-N	2.81	5.57	0	26.08	0
	P091-N	2.4	0	3.61	24.55	0
	P077-N	2.39	0	1.98	41	0
	W027-N	2.19	0	0	24.95	0
	P126-N	1.78	0	3.79	31.43	0
	N110-N	0	9.47	5.3	33.14	0

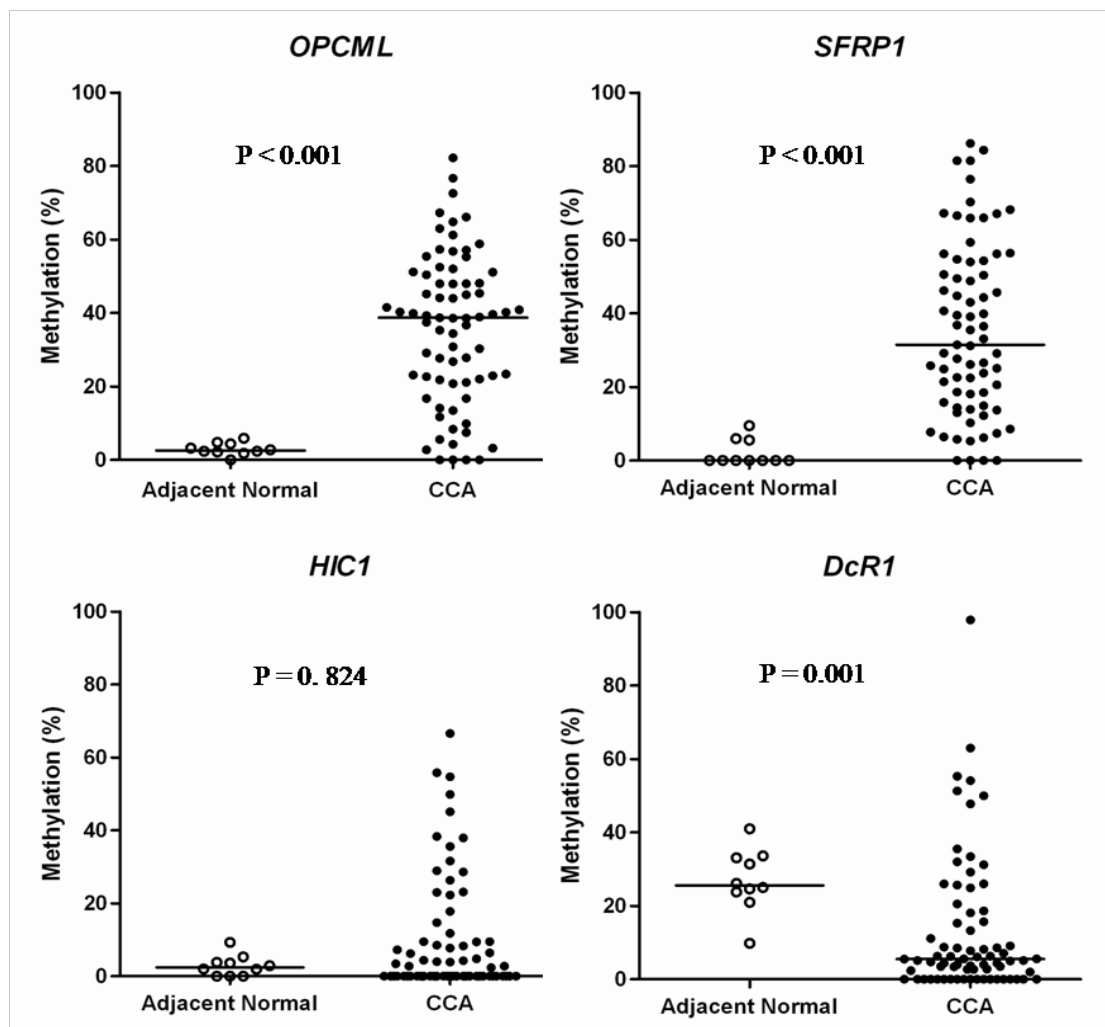
รูปที่ 2 ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 73 ราย และในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง 10 ราย กล่องสีส้ม และกล่องสีขาวแสดงภาวะ hypermethylation และ low methylation ของยีน *OPCML*, *SFRP1* และ *HIC1* ตามลำดับ กล่องสีเขียว และกล่องสีขาวแสดงภาวะ hypomethylation และ normal หรือ high methylation ของยีน *DcR1* ตามลำดับ ตัวเลขภายในกล่องแสดงเปอร์เซ็นต์ของเมทิลเลชัน

ตารางที่ 4 ค่า cut-off และความถี่ของความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

Aberrant methylation	Gene	Methylation cut-off (%)	Frequency of methylation % (n _{pos} /n _{test})		P-value*
			CCA	Adjacent normal	
Hypermethylation	<i>OPCML</i>	6.90 ^a	89.0 (65/73)	0 (0/10)	<0.001
	<i>SFRP1</i>	10.44 ^a	83.6 (61/73)	0 (0/10)	<0.001
	<i>HIC1</i>	8.64 ^a	28.8 (21/73)	10 (1/10)	NS
	<i>PTEN</i>	-	0 (0/73)	0 (0/10)	ND
Hypomethylation	<i>DcR1</i>	10.96 ^b	68.5 (50/73)	10 (1/10)	0.001

^aCut-off > 1.5(IQR)+Q₃, ^bCut-off < Q₁-1.5(IQR), IQR=interquartile range (Q₃-Q₁), Q₃=75 percentile, Q₁=25 percentile

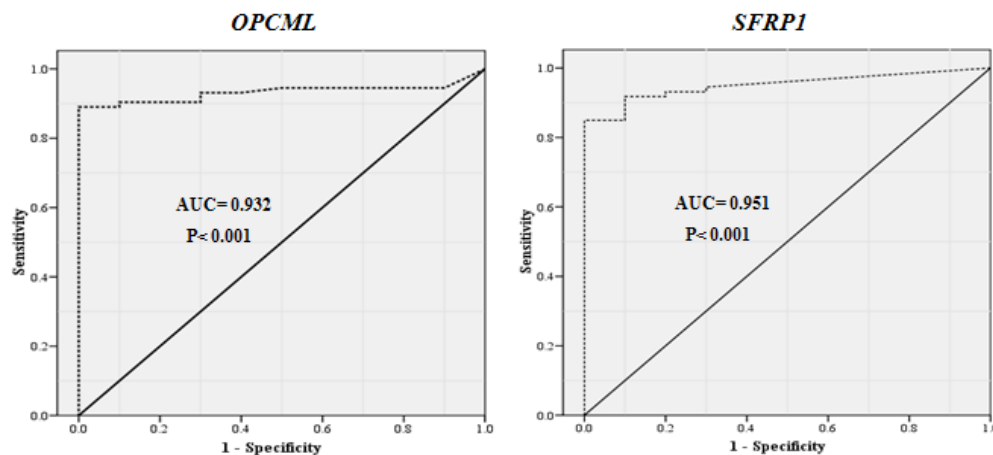
*Fisher's Exact test; NS= no statistical significance; ND= not done



รูปที่ 3 Scatter plot ของระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC* และ *DcR1* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 73 ราย เปรียบเทียบกับตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง 10 ราย ความแตกต่างของค่ามัธยฐานระหว่าง 2 กลุ่มวิเคราะห์โดย Mann-Whitney test

การใช้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* ในการเป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี

จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* ที่พบในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับสูงกว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง ดังนั้นจึงทำการประเมินความสามารถของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* ในการเป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี โดยประเมินจาก receiver operating characteristic (ROC) curve ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายบวก (positive predictive value, PPV) ค่าทำนายลบ (negative predictive value, NPV) และความถูกต้อง (accuracy) (รูปที่ 4 และตารางที่ 5) ผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* มีความเหมาะสมในการเป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี



รูปที่ 4 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis ของเมทิลเลชันของยีน *OPCML* และ *SFRP1* ในการแยกมะเร็งท่อน้ำดีจากตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง (AUC = area under the ROC curve)

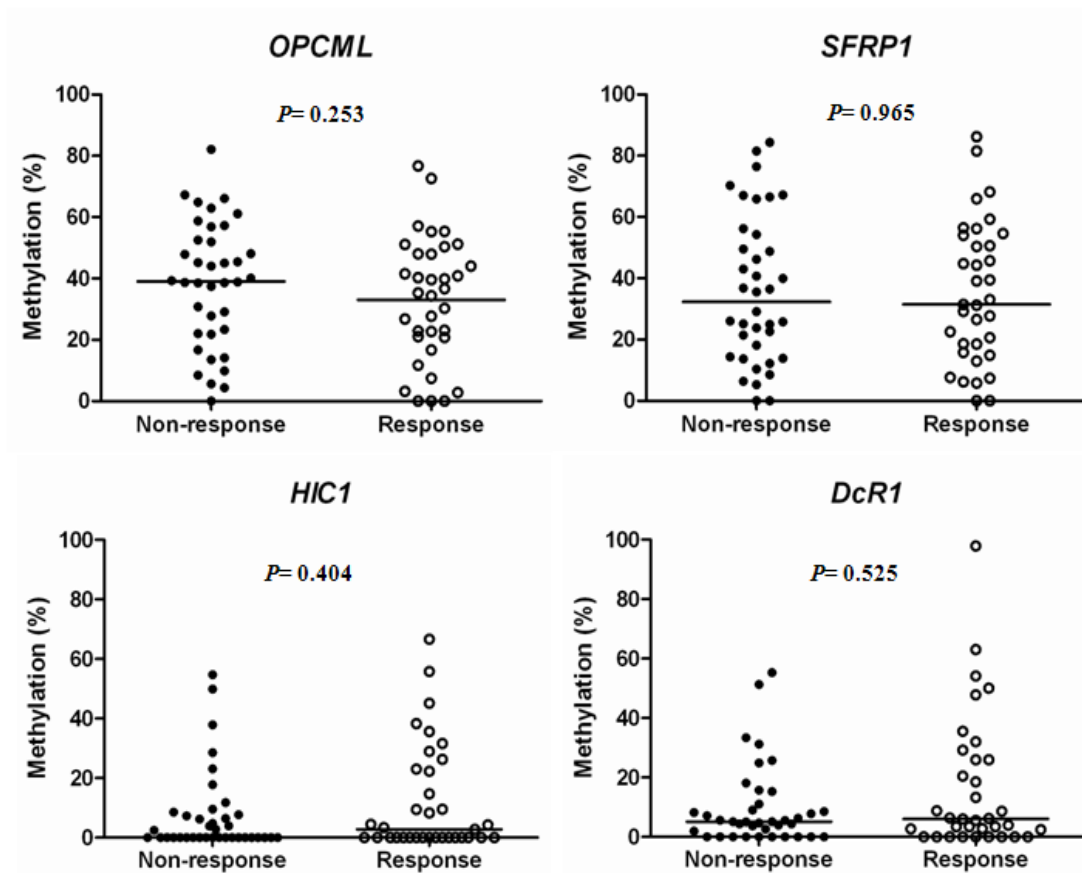
ตารางที่ 5 การประเมินเมทิลเลชันของยีน *OPCML* และ *SFRP1* ในการเป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัย

Gene	AUC (95% CI)	Cut-off value (%)*	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
<i>OPCML</i>	0.932 (0.878- 0.986)	6.90	89.04	100	100	55.56	90.36
<i>SFRP1</i>	0.951 (0.905- 0.996)	10.44	83.56	100	100	45.46	85.54
<i>OPCML</i> or <i>SFRP1</i>	ND	ND	89.04	100	100	55.56	90.36

AUC= area under ROC curve; CI= confidence interval; PPV= positive predictive value; NPV= negative predictive value; * percentage of methylation; ND= not done

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันและการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC* และ *DcR1* ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) และเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา ก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันและอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยเมื่อวิเคราะห์ด้วย Kaplan Meier และ log rank test (รูปที่ 6)

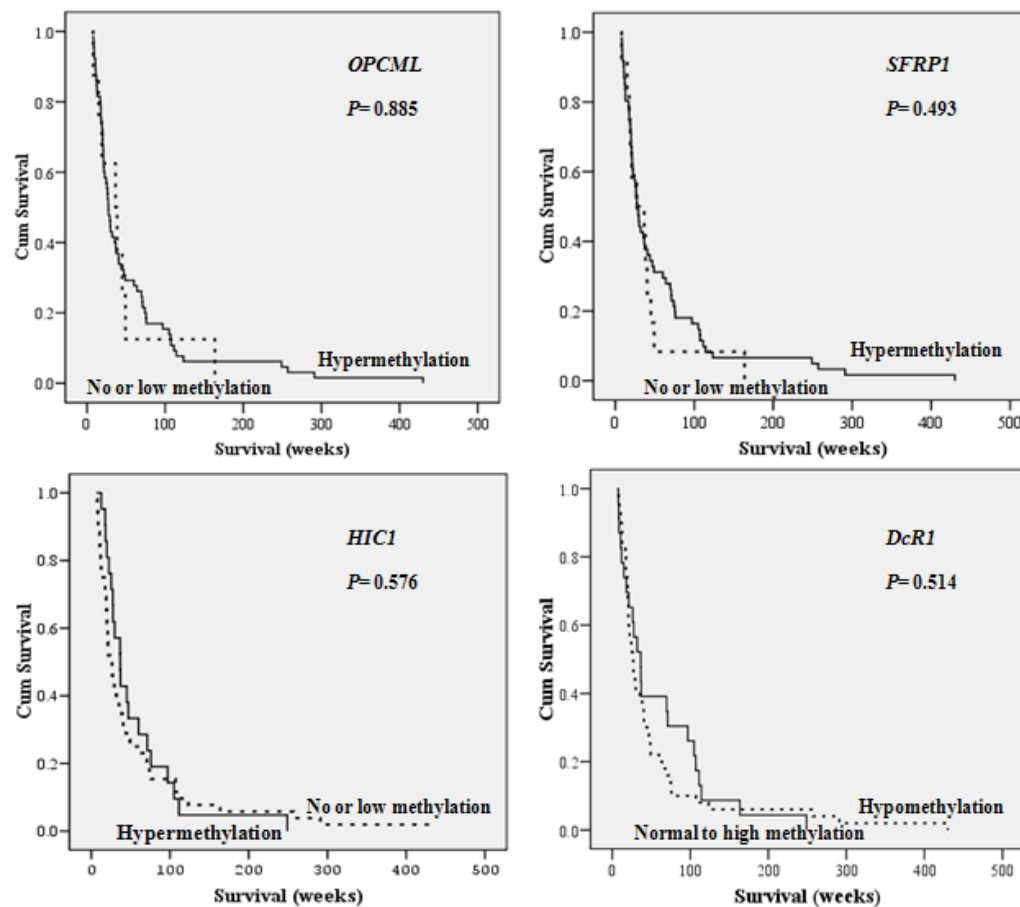


รูปที่ 5 ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC* และ *DcR1* ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 6 ความถี่ของความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา

Aberrant methylation	Gene	Frequency of methylation, %		P-value	OR (95%CI)
		Non-response (n=38)	Response (n=35)		
Hypermethylation	<i>OPCML</i>	92.1 (35)	85.7 (30)	0.468 ^a	1.944 (0.429-8.821)
	<i>SFRP1</i>	84.2 (32)	82.9 (29)	0.876 ^b	1.103 (0.320-3.806)
	<i>HIC1</i>	21.1 (8)	37.1 (13)	0.129 ^b	0.451 (0.160-1.275)
Hypomethylation	<i>DcR1</i>	73.7 (28)	62.9 (22)	0.320 ^b	1.655 (0.611-4.478)

^aFisher's Exact test, ^bChi-square



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเมทิลเลชันและอัตราการรอดชีวิต ดีเอ็นเอเมทิลเลชันไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้นำวิธี MS-HRM มาใช้เพื่อหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC*, *PTEN* และ *DcR1* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 73 ราย และในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง 10 ราย โดยปกติวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันเพื่อหาระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชันคือ pyrosequencing เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถหาเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันของแต่ละ CpG site ในโปรโมเตอร์ของยีนได้ แต่มีข้อเสียคือเครื่องมือมีราคาแพง เมื่อเทียบกับวิธี MS-HRM ที่ใช้เครื่อง real-time PCR โดยอาศัยความแตกต่างของ T_m ระหว่าง unmethylated และ methylated ดังนั้นค่าใช้จ่ายจึงมีราคาถูกกว่า แต่ MS-HRM มีข้อเสียคือไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันของแต่ละ CpG site ในโปรโมเตอร์ของยีนได้ ซึ่งเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่คำนวณได้โดยวิธี MS-HRM เป็นค่าเมทิลเลชันรวมของทุก CpG site ในโปรโมเตอร์ของยีน การศึกษาของ Amornpisutt และคณะ⁴³ พบว่าระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตรวจวัดโดยวิธี MS-HRM มีความสัมพันธ์กับระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตรวจวัดโดยวิธี pyrosequencing ดังนั้นระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตรวจวัดโดย MS-HRM ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความน่าเชื่อถือ ค่า lower detection limit ของวิธี MS-HRM สำหรับ *OPCML*, *SFRP1* และ *HIC* เท่ากับ 5% ส่วนยีน *PTEN* และ *DcR1* มีค่าเท่ากับ 10% methylation

การศึกษานี้พบความถี่ของเมทิลเลชันสูงในยีน *OPCML* (89%) และ *SFRP1* (83.6%) ในมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sriraksa และคณะ¹⁴ ที่ตรวจพบเมทิลเลชันของยีนทั้งสองสูงในมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี methylation-specific PCR (MSP) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความสามารถของเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* ในการเป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัยสำหรับมะเร็งท่อน้ำดี ส่วนการพบระดับเมทิลเลชันของ *DcR1* สูงในเนื้อเยื่อปกติบริเวณใกล้เคียงในการศึกษานี้ อาจเนื่องมาจากการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบจึงทำให้ค่า cut-off สูง ดังนั้นจึงพบภาวะ hypomethylation ของ *DcR1* ในมะเร็งท่อน้ำดี

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาตัวบ่งชี้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แต่ไม่พบเมทิลเลชันของยีนใดที่แตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา จึงทำให้การศึกษาไม่บรรลุวัตถุประสงค์ในการหาตัวบ่งชี้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษา สาเหตุอาจเนื่องมาจากการคัดเลือกกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งใช้คำมัยฐานของอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ารับการผ่าตัดและได้รับเคมีบำบัด 5-fluorouracil (5-FU) โดยอาจได้รับแบบเดี่ยว หรือร่วมกับเคมีบำบัดชนิดอื่น ซึ่งการรักษาด้วยเคมีบำบัดที่หลากหลายนี้อาจมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษานอกเหนือจากการตอบสนองต่อเคมีบำบัดแล้ว การผ่าตัดเพื่อเอาก้อนมะเร็งออกก็มีความสำคัญเป็นอย่างมาก หากทำได้ไม่สมบูรณ์จะส่งผลให้มีเซลล์มะเร็งหลงเหลืออยู่บริเวณเนื้อเยื่อปกติใกล้เคียงและมีโอกาสการกลับเป็นซ้ำ (recurrence) หรือมีการกระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นซึ่งป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตและมีอัตราการรอดชีวิตที่สั้น

โดยสรุปการศึกษานี้เป็นการนำเทคนิค MS-HRM มาใช้ในการหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC*, *PTEN* และ *DcR1* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่ง MS-HRM เป็นเทคนิคใหม่ที่มีความน่าเชื่อถือ ทำได้ง่ายไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถทำในตัวอย่างครวละจำนวนมาก จึงเหมาะที่จะนำมาเพื่อหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีนชนิดอื่นๆ ที่สนใจ นอกจากนี้สามารถนำดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *OPCML* และ *SFRP1* มาใช้สำหรับเป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัยสำหรับมะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากไม่

พบเมทิลเลชันในเนื้อเยื่อปกติ โดยประยุกต์การตรวจวัดในดีเอ็นเอที่สกัดจากซีรัมของผู้ป่วย ซึ่งการตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลชันในซีรัมเป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธี invasive สามารถใช้ติดตามการรักษาผู้ป่วย หรือใช้สำหรับประเมินประสิทธิภาพการรักษา

เอกสารอ้างอิง

1. Vatanasapt V, Sripa B, Sithithaworn P, Mairiang P. Liver flukes and liver cancer. *Cancer Surv* 1999; 33: 313-43.
2. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: Lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24:349-56.
3. Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol*. 2002; 37:806-13.
4. Patel T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer* 2002; 2: 10-9.
5. Khan SA, Davidson BR, Goldin R et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: Consensus document. *Gut* 2002; 51 (suppl VI): 1-9.
6. Mittal B, Deutsch M, Iwatsuki S. Primary cancer of extrahepatic biliary passages. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11: 849-54.
7. Kelley ST, Bloomston M, Serafini F et al. Cholangiocarcinoma: advocate an aggressive operative approach with adjuvant chemotherapy. *Am Surg* 2004; 70: 743-8.
8. Takada T, Amano H, Yasuda H et al. Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma. A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 1685-95.
9. Glimelius B, Hoffman P, Sjoden PO et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 593-600.
10. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16 (Supplement 2): ii93-ii96.
11. Glasspool RM, Teodoridis JM, Brown R. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. *Br J Cancer* 2006; 94: 1087 - 92.
12. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2 Suppl: S4-11.
13. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006; 94: 179-83.
14. Sriraksa R, Zeller C, El-Bahrawy MA, Dai W, Daduang J, Jearanaikoon P, Chau-in S, Brown R, Limpaboon T. CpG-island methylation study of liver fluke-related cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 104: 1313-8.

15. McNamee CJ, Reed JE, Howard MR, Lodge AP, Moss DJ. Promotion of neuronal cell adhesion by members of the IgLON family occurs in the absence of either support or modification of neurite outgrowth. *J Neurochem* 2002;80: 941-8.
16. Cui Y, Ying Y, van Hasselt A, et al. OPCML is a broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation. *PLoS One* 2008;3: e2990
17. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65: 8961-7.
18. Liu WJ, Wang L, Wang JP, et al. Correlations of CpG island methylator phenotype and OPCML gene methylation to carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2006;25: 696-700.
19. Ye F, Zhang SF, Xie X, Lu WG. OPCML gene promoter methylation and gene expression in tumor and stroma cells of invasive cervical carcinoma. *Cancer Invest* 2008;26: 569-74.
20. Finch PW, He X, Kelley MJ, et al. (1997) Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 6770-5.
21. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, et al. SARP: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 13636-41.
22. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* 1999;274: 16180-7.
23. Uhm KO, Lee ES, Lee YM, Kim HS, Park YN, Park SH. Aberrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma. *Oncol Res* 2008;17: 151-7.
24. Zou H, Molina JR, Harrington JJ, et al. () Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer* 2005;116: 584-91.
25. Veeck J, Niederacher D, An H, et al. Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 2006;25: 3479-88.
26. Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, et al. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006;107: 579-90.
27. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1: 570-577
28. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005;123: 437-48.
29. Fleuriel C, Touka M, Boulay G, Guerardel C, Rood BR, Leprince D. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41: 26-33

30. Fujii H, Biel MA, Zhou W, Weitzman SA, Baylin SB, Gabrielson E. Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* 1998;16: 2159-64.
31. Ahuja N, Mohan AL, Li, Q, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57: 3370-4.
32. Kanai Y, Hui AM, Sun L, et al. DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1999;29: 703-9.
33. Strathdee G, Appleton K, Illand M, et al. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol* 2001;158: 1121-7.
34. Hayashi M, Tokuchi Y, Hashimoto T, et al. () Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance. *Anticancer Res* 2001;21: 535-40.
35. Nicoll G, Crichton DN, McDowell HE, Kernohan N, Hupp TR, Thompson AM. Expression of the Hypermethylated in Cancer gene (HIC-1) is associated with good outcome in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001;85: 1878-82.
36. Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol* 2003;13: 478-83.
37. Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit* 2004;10: RA235-44.
38. Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;161: 1015-22.
39. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 2010; 316:887-99.
40. Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer* 2004;109: 786-92.
41. Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, et al. Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer. *Cancer Lett* 2006;242: 222-30.
42. Sriraksa R, Chaopatchayakul P, Jearanaikoon P, Leelayuwat C, Limpai boon T. Verification of complete bisulfite modification using Calponin-specific primer sets. *Clin Biochem* 2010; 43: 528-30.
43. Amornpisutt R, Sriraksa R, Limpai boon T. Validation of methylation-sensitive high resolution melting for the detection of DNA methylation in cholangiocarcinoma. *Clin Biochem* 2012; 45: 1092-4.

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. Amornpisutt R, Sriraksa R, Limpai boon T. Validation of methylation-sensitive high resolution melting for the detection of DNA methylation in cholangiocarcinoma. Clin Biochem 2012; 45: 1092-4.