

Original article

LINE-1 methylation levels in synovial fibroblasts of knee osteoarthritis patients

Nipaporn Teerawattanapong¹ Srihatach Ngarmukos²
Wanvisa Udomsinprasert³ Thananya Thongtan¹
Aree Tanavalee² Sittisak Honsawek^{1,*}

Abstract

Background: Alterations of LINE-1 methylation can cause genomic instability and contribute to dysfunction of the innate immune system, leading to inflammatory disorders like osteoarthritis (OA). However, little work has been completed to determine the change of LINE-1 methylation in synovial fibroblasts (SFs) of patients with OA of the knee.

Objectives: The aim of this study was to examine LINE-1 methylation levels, expression of inflammatory cytokine genes and relative telomere length (RTL) in SFs induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α), hydrogen peroxide (H₂O₂) and tocopheryl acetate (TA).

Methods: SFs isolated from 4 knee OA patients were treated with 10 ng/mL TNF- α , 100 μ M H₂O₂ and 50 μ M tocopheryl acetate. LINE-1 methylation levels were assessed by quantitative combined bisulfite restriction analysis. Relative mRNA expression and RTL were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results: LINE-1 methylation levels were significantly decreased in SFs after treatment with TNF- α for 24 hours compared with 7 days ($P = 0.03$). In addition, the relative mRNA expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *MMP-3* and *VEGF* expression was remarkably higher in SFs treated with TNF- α for 3 and 7 days. However, no significant differences in RTL were noted in SFs treated with and without TNF- α . In SFs cultured with 10 ng/mL TNF- α , 100 μ M H₂O₂ and pre-treatment with 50 μ M tocopheryl acetate, LINE-1 methylation levels were found to be reduced, whereas *IL-1 β* , *IL-6*, *MMP-3* and *VEGF* mRNA expression were markedly elevated in TNF- α stimulated SFs for 24 hours.

Conclusion: These findings suggest that LINE-1 hypomethylation might be implicated in inflammatory response, resulting in up-regulated mRNA expression *IL-1 β* , *IL-6*, *MMP-3* and *VEGF* in patients with OA of the knee.

Keywords: LINE-1, methylation, synovial fibroblasts, TNF- α , knee osteoarthritis.

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

Received: June 14, 2018

Revised: July 10, 2018

Accepted: August 15, 2018

¹Master of Science, Medical Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

²Department of Orthopedics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

³Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

นิพนธ์ต้นฉบับ

ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องของผู้ป่วย โรคข้อเข่าเสื่อม

นิภาภรณ์ วีระวัฒน์พงศ์¹ สีหัช งามอุโฆษ²
วันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ³ ธนัญญา ทองตัน¹
อารี ตनावลี² สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก¹

บทคัดย่อ

เหตุผลของการวิจัย: การเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation มีผลต่อการควบคุมความสมดุลของจีโนม และนำไปสู่ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ innate immune system ที่ทำให้เกิดกระบวนการเสื่อมอักเสบ รวมทั้งโรคข้อเสื่อม อย่างไรก็ตามการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องของโรคข้อเข่าเสื่อมยังมีจำนวนน้อย

วัตถุประสงค์: เพื่อตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อบุช่องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับ tumor necrosis factor- α (TNF- α), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ tocopheryl acetate (TA) ตลอดจนการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบและความยาวของเทโลเมียร์บริเวณเยื่อบุช่องของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

วิธีการทำวิจัย: การตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- α , 100 μ M H_2O_2 และ 50 μ M TA จำนวน 4 ราย ด้วยเทคนิค quantitative combined bisulfite restriction analysis และการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและความยาวเทโลเมียร์ด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction

ผลการศึกษา: เซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับ TNF- α เป็นเวลา 1 วันมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่าเซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับ TNF- α ระยะเวลา 7 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.03$) นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-6, MMP-3 และ VEGF ในกลุ่มเซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับ TNF- α เป็นเวลา 3 และ 7 วัน มีระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงกว่ากลุ่มเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับ TNF- α อย่างไรก็ตามความยาวเทโลเมียร์ในกลุ่มเซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับและกลุ่มเซลล์เยื่อบุช่องที่ไม่ได้รับ TNF- α ไม่แตกต่างกัน ระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มต่ำลงในเซลล์เยื่อบุช่องกลุ่มที่ได้รับ TNF- α , H_2O_2 และ TA เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่ระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-6, MMP-3 และ VEGF เพิ่มขึ้นในกลุ่มเซลล์เยื่อบุช่องที่ได้รับ TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สรุป: ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับกระบวนการเกิด LINE-1 hypo-methylation อาจมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ และอาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน IL-1 β , IL-6, MMP-3 และ VEGF ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

คำสำคัญ: LINE-1, methylation, เซลล์เยื่อบุช่อง, TNF- α , โรคข้อเข่าเสื่อม.

โรคข้ออักเสบ (arthritis) คือ โรคที่เกิดจากความผิดปกติบริเวณข้อที่ส่งผลให้ประสิทธิภาพการใช้งานของข้อลดลง โรคข้ออักเสบมีหลายประเภทแบ่งตามสาเหตุการเกิด เช่น โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis, RA) โรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus, SLE) โรคเกาต์ และโรคเกาต์เทียม ปัจจุบันโรคข้อที่พบมากที่สุด คือ โรคข้อเข่าเสื่อม พบได้บ่อยในผู้สูงวัยอายุมากกว่า 60 ปี จากสถิติผู้ป่วยโรคกระดูกและข้อในไทยปี พ.ศ.2553 พบว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีมากกว่า 6 ล้านราย นอกจากนี้สถานการณ์ทางระบาดวิทยาขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO, พ.ศ. 2546) คาดการณ์ว่าผู้ป่วยกระดูกและข้อโดยเฉพาะโรคข้อเข่าเสื่อมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 400 ล้านรายใน พ.ศ.2551 เป็น 570 ล้านรายใน พ.ศ. 2563^(1, 2) โรคข้อเสื่อมบริเวณที่พบได้บ่อยคือ ข้อเข่าและข้อสะโพก โดยโรคข้อเสื่อมแบ่งออกตามสาเหตุการเกิด คือ ข้อเสื่อมปฐมภูมิ เช่น พันธุกรรม ปัจจัยเหนือพันธุกรรม (epigenetics) มักพบในผู้สูงอายุ และข้อเสื่อมทุติยภูมิ เช่น การเกิดอุบัติเหตุ การติดเชื้อมาในข้อ ภาวะอ้วน และเพศ เป็นต้น⁽³⁾ ซึ่งบริเวณที่เกิดพยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อม ตรวจพบการสลายบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อ การอักเสบของเนื้อกระดูกบริเวณข้อบวม และการอักเสบบริเวณเซลล์เยื่อข้อ⁽⁴⁾ ปัจจุบันการประเมินระยะของโรคข้อเสื่อม การถ่ายภาพรังสี (X-rays) การถ่ายภาพด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging, MRI) การเจาะตรวจน้ำไขข้อ และการผ่าตัดส่องกล้องในข้อโดยวิธีการประเมินจากภาพถ่ายรังสีเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมเบื้องต้น

Long interspersed nuclear element (LINE-1) จัดอยู่ในกลุ่มของ non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons พบได้ทั่วไปในจีโนมของยูแคริโอต พบประมาณร้อยละ 17 และมีลำดับที่ซ้ำกันมากกว่า 450,000 ชุด ในจีโนมของมนุษย์ สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้อย่างอิสระ⁽⁵⁾ LINE-1 อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง

จีโนมและควบคุมการทำงานของเซลล์ภายในร่างกายผ่านกลไก epigenetics ซึ่งส่งผลต่อความไม่เสถียรภายในจีโนมและอาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ innate immune systems ที่หลากหลายนอกจากการเกิดโรคมะเร็ง เช่น โรคผิวหนังอักเสบ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁽⁶⁻⁸⁾ รวมถึงโรคข้อเสื่อมที่มีรายงานว่าเป็นโรคที่มีการอักเสบระดับต่ำ ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ innate immune systems^(9, 10)

เทโลเมียร์ (telomere length) คือ ลำดับเบส TTAGGG ที่ซ้ำกันอยู่บริเวณปลายของโครโมโซม ทำหน้าที่ป้องกัน DNA ไม่ให้ถูกทำลาย และกลไกการซ่อมแซมเส้นดีเอ็นเอ รวมถึงการป้องกันการสลายและการรวมกันของปลายโครโมโซม⁽¹¹⁾ การศึกษาก่อนหน้าแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเทโลเมียร์และระดับ LINE-1 hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคไขกระดูกอ่อน⁽¹²⁾ และโรคท่อน้ำดีตีบตัน⁽¹³⁾ อีกทั้งความยาวเทโลเมียร์ลดลงในเซลล์ chondrocytes ของกระดูกอ่อนผิวข้อที่มีพยาธิสภาพในโรคข้อเสื่อมแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความยาวเทโลเมียร์เกิดจากอายุและภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์⁽¹⁴⁾

นอกจากนี้กลไกการอักเสบบริเวณเซลล์เยื่อข้อ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับสารไซโตไคน์ภายในเซลล์เยื่อข้อ เช่น interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำการศึกษามูลของ TNF- α ต่อการกระตุ้นการอักเสบของเซลล์เยื่อข้อ อีกทั้งภาวะเครียดออกซิเดชันจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H₂O₂) ส่งผลต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง ความผิดปกติทางระบบประสาท โรคหลอดเลือดแข็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน เป็นต้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระ tocopheryl acetate (TA) หรือวิตามินอี สามารถลดระดับของสารออกซิเดชันภายในเซลล์ได้

งานวิจัยก่อนหน้า พบว่าเกิดระดับ LINE-1 hypomethylation ในผู้ป่วยโรคข้อรูมาตอยด์⁽¹⁵⁾ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽¹⁶⁾ โรคไขกระดูกอ่อน⁽¹²⁾ โรคสะกดเงิน⁽¹⁷⁾ เป็นต้น

ผลวิจัยดังกล่าวอาจประยุกต์ใช้ในการช่วยวินิจฉัยระยะความรุนแรงของการเกิดโรคจากระดับ LINE-1 methylation นอกจากนี้ LINE-1 hypomethylation ยังพบในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์จากการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน open reading frame1 (ORF1) และการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน DNA methyltransferase 1 (DNMT1) เพื่อแสดง DNA hypomethylation ในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์หลังจากได้รับ TNF- α ^(15, 18) ถึงแม้ว่ามีการศึกษา global hypomethylation ในโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในโรคข้อเข่าเสื่อมยังมีจำนวนน้อย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบระดับ LINE-1 methylation การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α เพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รวมถึงผลของ H₂O₂ และ TA ที่มีผลต่อเซลล์เยื่อข้อในโรคข้อเสื่อม

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการวิจัย (Institutional Review Board) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รูปแบบการวิจัยเป็นชนิดตัดขวาง (cross-sectional study) เพื่อศึกษาระดับ LINE-1 methylation ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 4 ราย

เกณฑ์การคัดเลือก (inclusion criteria) ได้แก่ ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม อายุระหว่าง 50 - 80 ปี ที่เข้ารับการรักษาจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ผู้ป่วยโรคข้อชนิดอื่น เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเอสแอลอี โรคเกาต์ เป็นต้น รวมถึงผู้ป่วยโรคสะกดเจ็บ ผู้ป่วยที่เคยได้รับบาดเจ็บบริเวณเข่า หรือผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อบริเวณข้อและมะเร็ง เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อข้อ (synovial fibroblasts)

นำชิ้นเนื้อเยื่อข้อ (synovial tissue) ที่ได้จากการผ่าตัดผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมาล้างด้วยน้ำเกลือ และตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็ก นำชิ้นเนื้อวางในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (T25 flask) ให้มีระยะห่างที่เท่ากัน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ alpha-minimum essential medium (α -MEM) ซึ่งประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin นำเข้าตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ ทำการเก็บชิ้นเนื้อออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ แยกเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเติมเอนไซม์ทริปซินที่ผสมกับ EDTA เพื่อลอกเซลล์ออกและเพิ่มจำนวนของเซลล์จนถึง passage ที่ต้องการ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน นำเซลล์ synovial fibroblasts ใน passage ที่ 4 - 6 ย้ายลงใน 6-well plate ให้มีปริมาณที่เท่ากัน จำนวน 1.0×10^5 cells/well เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 ml ตั้งไว้ในตู้ incubator 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 10 ng/ml TNF- α เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน ใน 6-well plate ของเซลล์ synovial fibroblasts โดยมีชุดควบคุมที่เติมแต่อาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM ที่ใช้ละลาย 10 ng/ml TNF- α นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเซลล์เยื่อข้อในภาวะที่ได้รับ 100 μ M H₂O₂ และสารต้านภาวะออกซิเดชัน 50 μ M tocopheryl acetate เป็นระยะเวลา 1 วัน ซึ่งเป็นสารที่เติมระยะเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเติมสารกลุ่ม 10 ng/ml TNF- α และ 100 μ M H₂O₂ เมื่อครบระยะเวลาแล้วทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ synovial fibroblasts เพื่อใช้ในการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ระดับการแสดงออกของยีน และวิเคราะห์นับจำนวนเซลล์เยื่อข้อด้วยวิธี trypan blue staining เพื่อดูจำนวนเซลล์มีชีวิต (cell viability)

การสกัดแยก DNA จากเซลล์เยื่อข้อ

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นตกตะกอนมาล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) ปริมาณ

200 μ l ผสมให้เข้ากัน สกัดดีเอ็นเอจากตะกอนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงตามขั้นตอนในคู่มือชุดสกัด (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit, Vivantis) หลังจากนั้นวัดคุณภาพดีเอ็นเอ ที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm และนำดีเอ็นเอที่สกัดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C หรือ -80°C สำหรับการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation

การวัดความยาวเทโลเมียร์ (Relative telomere length, RTL) ด้วยวิธี เทคนิค quantitative real-time PCR

ปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ให้เท่ากับ 1.56 ng/ μ l และวัดความยาวของเทโลเมียร์โดยใช้ quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer⁽¹³⁾ ดังนี้ telomere forward primer 5'-CGGTTTGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT-3' และ telomere reverse primer 5'-GGCTTGCCTTACCCTACCCTACCCTACCCTACCCT-3' และมี internal control คือ 36B4 โดยใช้ primer ดังนี้ 36B4 forward primer 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3' 36B4 reverse primer 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTA CAA-3' เตรียมสารผสม master mix สำหรับทำ quantitative real-time PCR มีส่วนประกอบดังนี้ 2 \times SYBR, 20 μ M primers (forward and reverse) น้ำกลั่น และ 1.56 ng/ μ l DNA template ปริมาตรรวมสุดท้าย 10 μ l ซึ่งสภาวะและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง real-time PCR ทั้งหมด 40 รอบคือ 95°C initial activation เวลา 15 นาที, 95°C denature เวลา 15 วินาที, 54°C annealing เวลา 1 นาที สามารถคำนวณความยาวของเทโลเมียร์ด้วยสูตร $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ โดยมียีน 36B4 เป็นยีน internal control

การวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation ด้วยวิธี quantitative Combined Bisulfite Restriction Analysis (qCOBRA)⁽¹³⁾

ปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เท่ากับ 5 ng/ μ l ปริมาตร 20 μ l (100 ng) นำ DNA ผ่านขั้นตอนด้วย bisulfite treatment โดยใช้ EZ 8 DNA Methylation-

Gold™ Kit (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA) เพิ่มจำนวนของ bisulfited DNA โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ดังนี้ LINE-1 forward primer 5'-GTAAAGAAA GGGGTGAYGGT-3' และ LINE-1 reverse primer 5'-AATACRCCRTTCTTAAACCRATCTA-3' เตรียมผสมสาร master mix สำหรับทำ PCR ของ COBRA LINE-1 มีส่วนประกอบดังนี้ 10X PCR buffer, 200 mM dNTPs, 25 mM MgCl_2 , 20 μ M primers (forward and reverse), 0.5 U HotStar Taq DNA polymerase, น้ำกลั่น และ 100 ng bisulfite-treated DNA ปริมาตรรวมสุดท้าย 10 μ l ซึ่งสภาวะและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง PCR ทั้งหมด 40 รอบคือ 95°C initial activation เวลา 15 นาที, 95°C denature เวลา 45 วินาที, 55°C annealing เวลา 45 วินาที, 72°C extension เวลา 45 วินาที และ 72°C final extension เวลา 7 นาที หลังจากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR แล้ว นำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ คือ LINE-1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 2 U TaqI และ 8 U TasI ในสารละลาย NEBuffer 3 แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C ซ้ำคืน โดยที่ TaqI ตำแหน่ง restriction site คือ 5' TCGA 3' และ 3' AGCT 5' ในส่วนของ TasI มี ตำแหน่ง restriction site คือ 5' AATT 3' และ 3' TTAA 5' แล้วนำมาวิเคราะห์รูปแบบ methylation ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel ย้อมเจดด้วย ethidium bromide และวัดความเข้มของแถบที่ปรากฏ (band intensity) ด้วยเครื่อง Molecular Imager Gel Doc ด้วยโปรแกรม Image Lab (Bio-Rad, Begoniastraat, Belgium) ขนาดของ PCR product เทียบได้จาก 25 bp ladder โดย LINE-1 สามารถแยกออกได้เป็น 5 ส่วน ประกอบด้วยขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

สูตรการคำนวณรูปแบบ LINE-1 methylation

กำหนดให้ A แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 92 คู่เบส หารด้วย 92

B แทน ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 60 คู่เบส หารด้วย 56

C แทน ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 50 คู่เบส หารด้วย 48

D แทน ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 42 คู่เบส หารด้วย 40

E แทน ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 32 คู่เบส หารด้วย 28

F แทน [(D+E) - (B-C)] หารด้วย 2 ร้อยละของ LINE-1 methylation (%^mC) = 100X (A+2C+F)/(2A+2B+2C+2F)

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

ร้อยละของ Partially LINE-1 methylation (%^uC^mC) = 100 X F/[(C/2)+A+B+F]

(%^mC^uC) = 100 X A/[(C/2)+A+B+F]

ร้อยละของ LINE-1 hypomethylation (%^uC^uC) = 100 X B/[(C/2)+A+B+F]

การสกัดแยก RNA จากเซลล์เยื่อบุข้อ

นำตะกอนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปั่นตกตะกอนที่ 1,000 g เวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 350 μ l Buffer TR ในตะกอนของเซลล์ สกัด RNA จากตะกอนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงตามขั้นตอนในคู่มือชุดสกัด RNA (GF-1 Total RNA Extraction Kit, Vivantis) หลังจากนั้นวัดคุณภาพ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm และนำ RNA ที่สกัดเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80°C สำหรับการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค

quantitative real-time PCR

วัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop และนำ RNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5 ng/ μ l เตรียมปฏิกิริยาสำหรับการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วย 10 x Taq buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mixture, random Hexamer, RNase inhibitor, multiscribe reverse enzyme และ RNA template ปริมาตรรวมสุดท้าย

20 μ l โดยสภาวะและเวลาในการทำปฏิกิริยา คือ 25°C incubation เวลา 10 นาที, 48°C reverse transcription เวลา 30 นาที และ 95°C reverse transcription initiation เวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ cDNA มาศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *IL-6*, *IL-1 β* , *ADAMTs5*, *MMP-3* และ *VEGF* (ตารางที่ 1) โดยปฏิกิริยาสำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนมีส่วนประกอบดังนี้ SYBR Green HRox (2x), 20 μ M primers (forward and reverse), น้ำกลั่น และ cDNA template ปริมาตรรวมสุดท้าย 10 μ l ซึ่งมีสภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ quantitative real-time PCR ดังนี้ 95°C initial activation เวลา 10 นาที และทำปฏิกิริยา 40 รอบ 95°C denaturation เวลา 15 วินาที, annealing เวลา 1 นาที และ 72°C extension เวลา 1 นาที สามารถคำนวณค่าความสัมพันธการแสดงออกของ mRNA ในแต่ละยีนด้วยสูตร โดยมี *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ระดับ LINE-1 methylation ค่าความสัมพันธความยาวเทโลเมียร์ จำนวนเซลล์เยื่อบุข้อ และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม ระหว่างเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ TNF- α เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน เป็นข้อมูลที่มีการแจกแจงข้อมูลแบบไม่ปกติใช้สถิติ Mann-Whitney U test และในการเปรียบเทียบข้อมูลในแต่ละวันที่ได้รับ TNF- α ทั้งหมด 3 กลุ่มใช้สถิติ Kruskal-Wallis test เนื่องจากข้อมูลเป็นแบบแจกแจงไม่ปกติ รวมถึงการศึกษา LINE-1 methylation จำนวนเซลล์เยื่อบุข้อ และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม ในกลุ่มของเซลล์เยื่อบุข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ 50 μ M TA เปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อบุข้อที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว เมื่อแบ่งตามกลุ่มของเซลล์เยื่อบุข้อที่อยู่ในภาวะแตกต่างกันใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ซึ่งข้อมูลดังกล่าววิเคราะห์ด้วย SPSS version 22.0 และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการวาดกราฟของข้อมูล โดยในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติถือความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

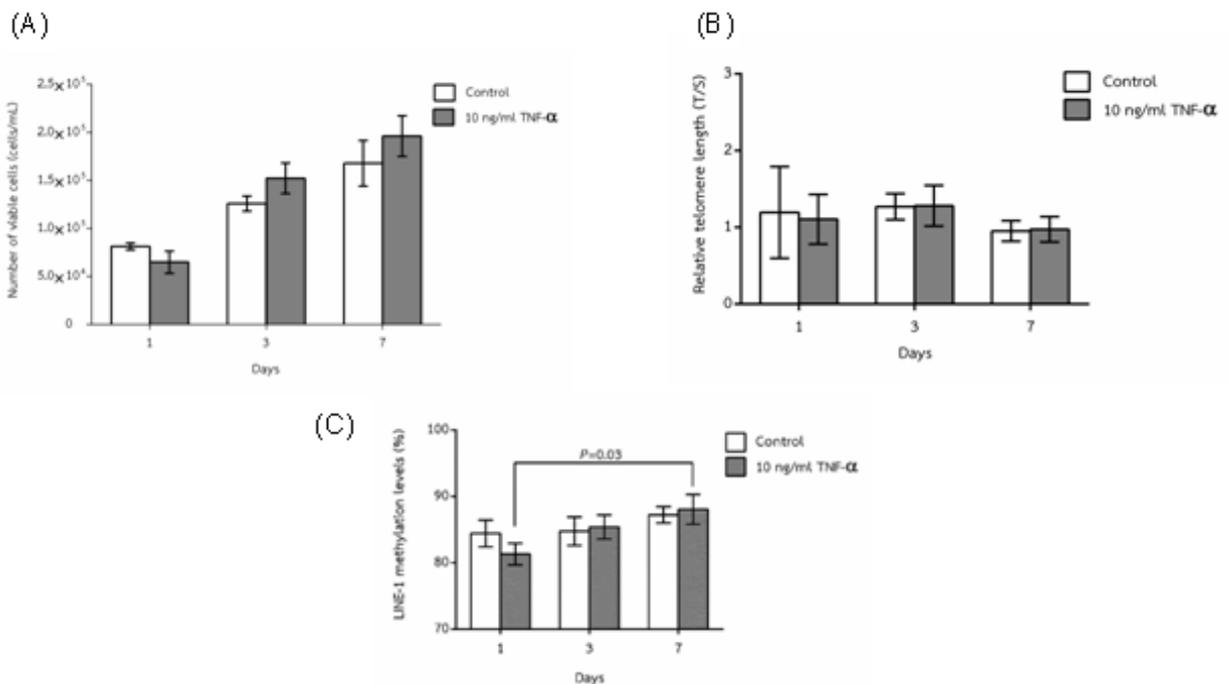
ตารางที่ 1. แสดง primer และสภาวะที่ใช้ในการระดับการแสดงออกของยีน

ชื่อ primer	ลำดับเบส (5' → 3')	ขนาด (bp)	Annealing (°C)	
GAPDH ⁽¹⁹⁾	(forward)	TTCATTGACCTCAACTACAT	467	60
	(reverse)	GAGGGGCCATCCACAGTCTT		
IL-6 ⁽²⁰⁾	(forward)	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC	83	60
	(reverse)	ACATGTCTCCTTTCTCAGGGC		
IL-1β ⁽²⁰⁾	(forward)	GCGGCCAGGATATAACTGACTTC	85	58
	(reverse)	TCCACATTCAGCACAGGACTCTC		
MMP-3 ⁽²¹⁾	(forward)	CTGGACTCCGACACTCTGGA	79	60
ADAMTs5 ⁽²²⁾	(forward)	CCTGCCACCCAATGGTAAATC	218	60
	(reverse)	CGGCCTACATTCAGTGCCATC		
VEGF ⁽²³⁾	(forward)	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA	93	64
	(reverse)	CCTACAGCACAAATGTGAATG		

ผลการวิจัย

จากการวัดจำนวนเซลล์ viability ของเซลล์เยื่อข้อในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันหลังจากเซลล์เยื่อข้อได้รับ 10 ng/ml TNF-α เป็นช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 1, 3 และ 7 วัน พบว่าจำนวนเซลล์เยื่อ

ข้อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับและกลุ่มที่ได้รับ TNF-α มีระดับจำนวนเซลล์ที่ไม่แตกต่างกัน และจำนวนเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังได้รับ TNF-α ต่อเนื่อง 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 1A



รูปที่ 1. การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 10 ng/ml TNF-α ในระยะเวลา คือ 1, 3 และ 7 วัน (A) จำนวนเซลล์มีชีวิต (B) ความยาวเทโลเมียร์ และ (C) ระดับ LINE-1 methylation

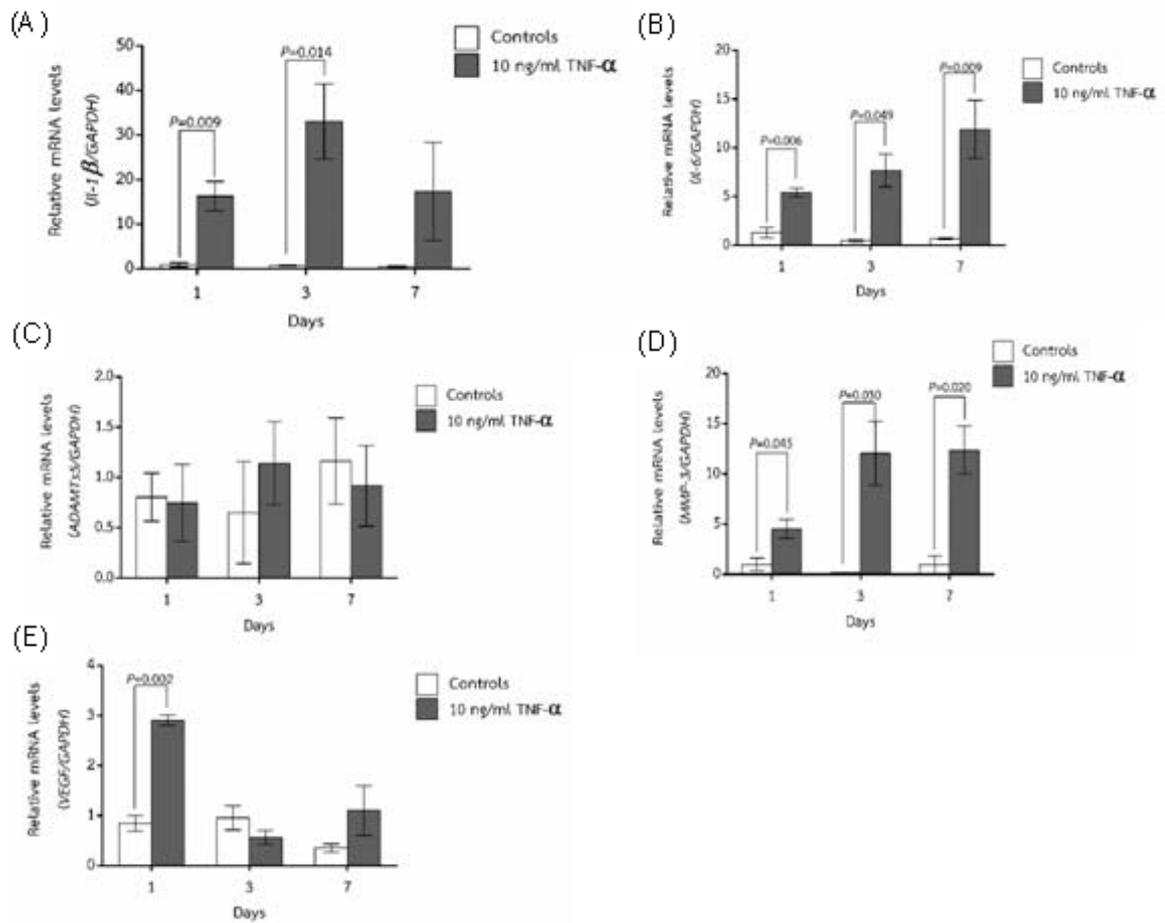
นอกจากนี้ได้ทำการวัดความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3 และ 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 1B พบว่าความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ไม่แตกต่างกันทุกช่วงเวลาเมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อข้อที่ไม่ได้รับ TNF- α อีกทั้งยังทำการวัดระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน 1, 3 และ 7 วัน พบว่า เซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α มีระดับ LINE-1 methylation ที่ต่ำกว่าเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ระยะเวลา 7 วันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.03$) ดังแสดงในรูปที่ 1C แต่ระดับ LINE-1 methylation ในแต่ละช่วงเวลาในกลุ่มเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตามระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มลดลงหลังจากได้รับ TNF- α ระยะเวลา 1 วัน ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบโรคข้อเสื่อม 4 รายที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3 และ 7 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β ในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 2A นอกจากนี้เซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ในเวลา 3 และ 7 วัน ยีน IL-6 มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในรูปที่ 2B และระดับการแสดงออกของยีน ADAMTs5 พบว่าไม่แตกต่างกัน TNF- α ทุกช่วงเวลา เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 2C อีกทั้งมีระดับการแสดงออกของยีน MMP-3 สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน

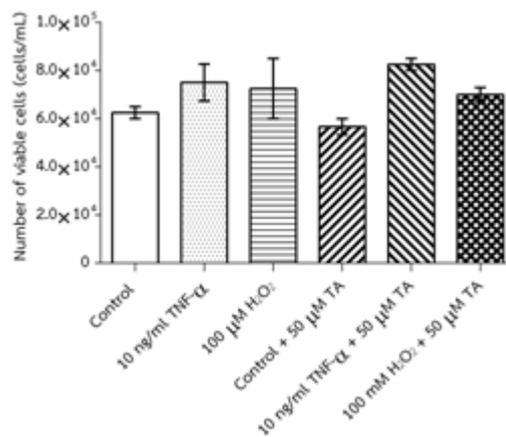
เซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α นาน 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 2D และมีระดับการแสดงออกของยีน VEGF สูงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ที่เวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 2E

นอกจากนี้ทำการวัดจำนวนเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ 100 μ M H₂O₂ และ 50 μ M TA (pre-treatment) เปรียบเทียบกับเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α และเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 1 วัน พบว่าจำนวนเซลล์เยื่อข้อในทุกภาวะที่ได้รับเป็นระยะเวลา 1 วัน ไม่เปลี่ยนแปลงดังแสดง ในรูปที่ 3 และยังคงพบระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เยื่อข้อในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ pre-treatment ด้วย TA กับกลุ่มเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α และ H₂O₂ หลังจาก pre-treatment ด้วย TA ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)

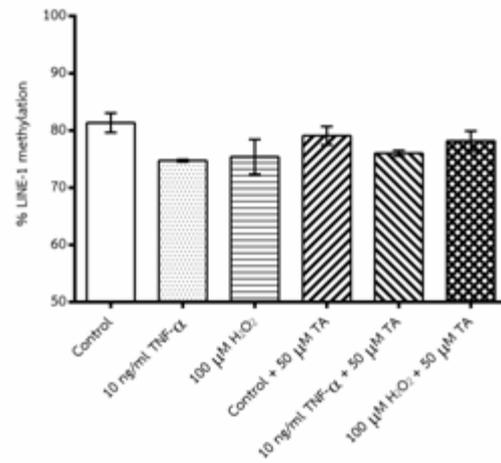
จากการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของโรคข้อเสื่อม พบว่า ยีน IL-1 β , IL-6 และ MMP-3 ของเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α และเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ pre-treatment ด้วย TA ก่อนได้รับ TNF- α ระยะเวลา 1 วัน มีระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงกว่าเซลล์เยื่อข้อกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ระดับการแสดงออกของยีน ADAMTs5 และ VEGF ไม่แตกต่างกันในทุกสภาวะ ยกเว้นระดับการแสดงออกของยีน VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 5)



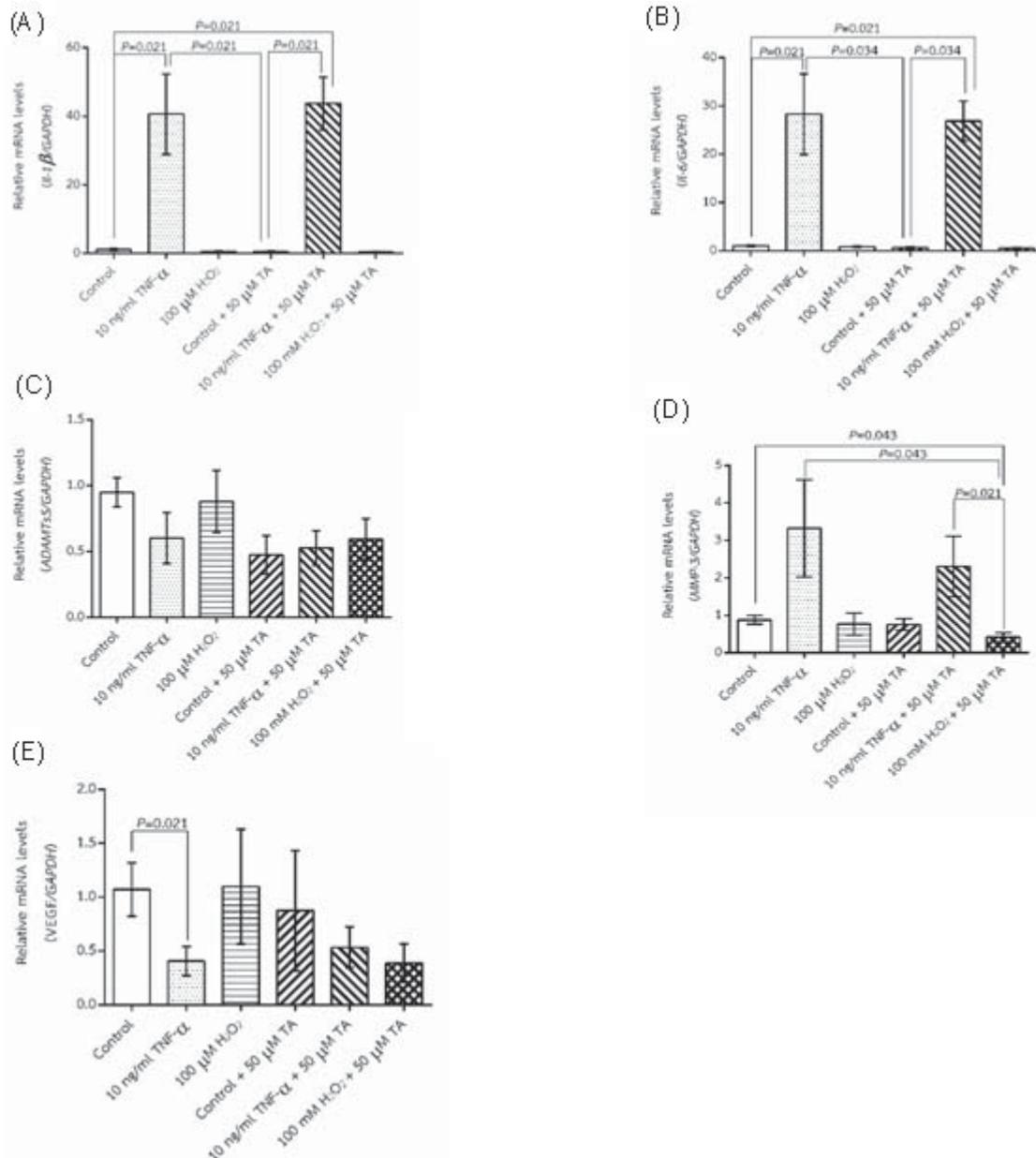
รูปที่ 2. ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ในระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน (A) Relative *IL-1 β* expression (B) Relative *IL-6* expression (C) Relative *ADAMTs5* expression (D) Relative *MMP3* expression และ (E) Relative *VEGF* expression



รูปที่ 3. จำนวนเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ 50 μ M TA ระยะเวลา 1 วัน



รูปที่ 4. ระดับ LINE-1 methylation ของเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ 50 μ M TA ระยะเวลา 1 วัน



รูปที่ 5. ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α , 100 μ M H₂O₂ และ pre-treatment ด้วย 50 μ M tocopheryl acetate (TA) ในระยะเวลา 1 วัน (A) IL-1 β expression (B) IL-6 expression (C) ADAMTS5 expression (D) MMP3 expression และ (E) VEGF expression

อภิปรายผล

จากการศึกษาผลของการอักเสบของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลการอักเสบในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยไซโตไคน์กลุ่ม pro-inflammatory คือ TNF- α ด้วยการวัดระดับ LINE-1 methylation และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเสื่อม พบว่าการเกิดแนวโน้มของ LINE-1 methylation ที่ลดลงในเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ และภาวะเครียดออกซิเดชัน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้พบระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นในยีน *IL-1 β* , *IL-6*, *VEGF* และ *MMP-3* อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์เยื่อข้อกลุ่มที่ได้รับ TNF- α และในผลการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับ TNF- α ผลการวิจัยนี้อาจนำไปสู่สมมติฐานการเกิดโรคข้อเสื่อมที่มีผลมาจากการอักเสบของสารไซโตไคน์ TNF- α และภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation ที่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกการเกิด methylation บริเวณ repetitive elements ส่งผลต่อความไม่เสถียรของจีโนมในร่างกายทำให้เกิดโรคมะเร็ง และโรคความผิดปกติใน innate immune systems ซึ่งโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคความผิดปกติชนิดหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับ innate immune systems เนื่องจากกระบวนการอักเสบเรื้อรังภายในข้อ ดังนั้นโรคข้อเสื่อมจัดอยู่ในกลุ่มโรคที่มีการอักเสบระดับต่ำ⁽⁹⁾ งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าระดับ LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁽⁷⁾ โรคไขกระดูกฝ่อ⁽¹²⁾ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽⁸⁾ และโรคสะกดเงิน⁽¹⁷⁾ เป็นต้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เยื่อข้อจากการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน open reading frame1 (ORF1) ที่มีการแสดงออกในเซลล์เยื่อข้อ

ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมแต่น้อยกว่าเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁽¹⁵⁾ และมีหลักฐานการสนับสนุนของการศึกษา global methylation บริเวณ repetitive elements มีผลต่อการเกิดโรคข้ออักเสบพบว่า global methylation ที่ลดลงในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ที่ได้รับ IL-1 β ระยะเวลา 14 วัน⁽¹⁸⁾ อีกทั้งผลการศึกษาของ LINE-1 methylation ในภาวะเครียดออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระความสัมพันธ์กับการศึกษาระดับ LINE-1 hypomethylation ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้รับ H₂O₂⁽²⁴⁾ และการศึกษาของโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับ LINE-1 methylation ลดลงเมื่อมีระดับ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ที่สูงขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน⁽¹³⁾

นอกจากนี้พบว่าเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α มีระดับการแสดงออกของยีน *IL-1 β* , *IL-6*, *VEGF* และ *MMP-3* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อมเพิ่มสูงขึ้นซึ่งบ่งบอกได้ว่ากระบวนการอักเสบจาก TNF- α มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตไคน์ภายในข้อของผู้ป่วย รวมถึงระดับการแสดงออกของไซโตไคน์เหล่านี้ในเลือดและน้ำไขข้อที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อม^(25 - 29) ส่วนความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อหลังจากได้รับ TNF- α พบว่าความยาวเทโลเมียร์ไม่มีความแตกต่างทุกช่วงเวลา อาจเกิดจากเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α ไม่ได้มีผลต่อความยาวเทโลเมียร์โดยตรง และเป็นการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ในเซลล์เยื่อข้อ passage เดียวกัน จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่ากระบวนการอักเสบภายในข้อมีความเกี่ยวข้องกับ TNF- α ฉะนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α อาจช่วยลดการอักเสบภายในข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม รวมถึงช่วยชะลอการสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ

ข้อจำกัดในการศึกษานี้ คือ ขนาดของตัวอย่างที่นำมาศึกษาระดับ LINE-1 methylation และระดับการแสดงออกของยีนมีจำนวนน้อย และระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อข้อค่อนข้างใช้เวลานานและมี

โอกาสเสี่ยงติดเชื้อแบคทีเรียและราได้ การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมอาจไม่สะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เยื่อข้อของคนสุขภาพแข็งแรง นอกจากนี้หากต้องการยืนยันผลการศึกษาระดับ LINE-1 methylation มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม ในอนาคตควรศึกษาระดับ methylation บริเวณ promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและระดับการแสดงออกของยีนควบคู่กัน

สรุป

การศึกษาระดับ LINE-1 methylation และการแสดงออกของยีนในเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าระดับ LINE-1 methylation มีแนวโน้มต่ำลงในเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับหลังจากได้รับ TNF- α และภาวะเครียดออกซิเดชัน อีกทั้งยังพบระดับการแสดงออกของยีน *IL-1 β* , *IL-6*, *VEGF* และ *MMP-3* เฉพาะกลุ่มเซลล์เยื่อข้อที่ได้รับ TNF- α จึงนำไปสู่สมมติฐานกลไกการเปลี่ยนแปลงด้าน global methylation อาจมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเสื่อม รวมถึงกลไกการควบคุมการอักเสบภายในข้อ

กิตติกรรมประกาศ

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนประเภท (60/40) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์และศูนย์เครื่องมือภาควิชาชีวเคมี และศูนย์เครื่องมือกลาง Chula MRC (Chulalongkorn Medical Research Center) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ* 2006; 332:639-42.
- Nimit-arnun N. The epidemiological situation and risk assessment of knee osteoarthritis among Thai people. *J R Thai Army Nurs* 2014;15: 185-94.
- Kuszel L, Trzeciak T, Richter M, Czarny-Ratajczak M. Osteoarthritis and telomere shortening. *J Appl Genet* 2015;56:169-76.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012;64:1697-707.
- Richardson SR, Doucet AJ, Kopera HC, Moldovan JB, Garcia-Perez JL, Moran JV. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr* 2015; 3:MDNA3-2014.
- Yooyongsatit S, Ruchusatsawat K, Supiyaphun P, Noppakun N, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. Alterations in the LINE-1 methylation pattern in patients with lichen simplex chronicus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2013;31:51-7.
- Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, Li RN, Lin YC, et al. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2011;135:96-9.
- Nakkuntod J, Avihingsanon Y, Mutirangura A, Hirankarn N. Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients. *Clin Chim Acta* 2011;412:1457-61.
- Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:580-92.
- Bhattaram P, Chandrasekharan U. The joint synovium: A critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases.

- Semin Cell Dev Biol 2017;62:86-93.
11. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res* 2013;319:133-41.
 12. Gadalla SM, Katki HA, Shebl FM, Giri N, Alter BP, Savage SA. The relationship between DNA methylation and telomere length in dyskeratosis congenita. *Aging Cell* 2012;11:24-8.
 13. Udomsinprasert W, Kitkumthorn N, Mutirangura A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y, Honsawek S. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Sci Rep* 2016;6:26969.
 14. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 2002;1:57-65.
 15. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2009;60:3613-22.
 16. Mavragani CP, Sagalovskiy I, Guo Q, Nezos A, Kapsogeorgou EK, Lu P, et al. Expression of long interspersed nuclear element 1 retroelements and induction of type I interferon in patients with systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2686-96.
 17. Yooyongsatit S, Ruchusatsawat K, Noppakun N, Hirankarn N, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. Patterns and functional roles of LINE-1 and Alu methylation in the keratinocyte from patients with psoriasis vulgaris. *J Hum Genet* 2015;60:349-55.
 18. Nakano K, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 2013;190:1297-303.
 19. Oguchi T, Ishiguro N. Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta, and TNF-alpha. *Connect Tissue Res* 2004;45:197-205.
 20. Ding L, Hong X, Sun B, Huang Q, Wang X, Liu X, et al. IL-37 is associated with osteoarthritis disease activity and suppresses proinflammatory cytokines production in synovial cells. *Sci Rep* 2017;7:11601.
 21. Wu J, Tao Y, Shang A, Wang W, Zhang Y, Hu L, et al. Effect of the interaction between MiR-200b-3p and DNMT3A on cartilage cells of osteoarthritis patients. *J Cell Mol Med* 2017;21:2308-16.
 22. Gao SG, Zeng C, Song Y, Tian J, Cheng C, Yang T, et al. Effect of osteopontin on the mRNA expression of ADAMTS4 and ADAMTS5 in chondrocytes from patients with knee osteoarthritis. *Exp Ther Med* 2015;9:1979-83.
 23. Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int* 2009;75:1340-8.
 24. Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:3773-8.
 25. Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical

- markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop* 2015;6:95-105.
26. Poonpet T, Saetan N, Tanavalee A, Wilairatana V, Yuktanandana P, Honsawek S. Association between leukocyte telomere length and angiogenic cytokines in knee osteoarthritis. *Int J Rheum Dis* 2018;21:118-25.
27. Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, et al. Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:1441-7.
28. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R187.
29. Honsawek S, Poonphakdi J, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Tantavisut S. Expression of matrix metalloproteinase-1 in knee osteoarthritis: Association with disease severity. *Chula Med J* 2012; 56:265-73.