ซีพีจีเมทิลเลชั่นเพื่อการตรวจหาดีเอ็นเอของตับในกระแสเลือด

CpG Methylation for Circulating Liver DNA Detection

ทัชพล เมืองทรัพย์[1]*, จรัญญา สามสุวรรณ[2], สมบูรณ์ คีลาวัฒน์[3], พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์[4], นครินทร์ กิตกำธร[5] และ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร[1]

Tachapol Muangsub[1]*, Jarunya Samsuwan[2], Somboon Keelawat [3], Pisit Tangkijvanich[4], Nakarin Kitkumthorn[5] and Apiwat Mutirangura[1]

[1]ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; [2]กลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเขม่าดินปืน สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ; [3]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; [4]หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330; [5]ภาควิชาพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

[1]Center of Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Diseases, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University; [2]Department of Forensic Biochemistry, Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, Royal Thai Police; [3]Department of Phatology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University; [4]Research Unit of Hepatitis & Liver Cancer Department Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330; [5]Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok 10400

**Corresponding author: nostromo.t@hotmail.com*

บทคัดย่อ

การตรวจหาดีเอ็นเอของเซลล์ตับในกระแสเลือด (Circulating Liver DNA) เป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ (Hepatoma) ซีพีจีเมทิลเลชั่น (CpG methylation) เป็นหลักการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในเทคนิคนี้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการสืบค้นหาซีพีจีเมทิลเลชั่น (CpG methylation) ที่จำเพาะของดีเอ็นเอของเซลล์ตับ และใช้ในการออกแบบสร้างตัวบ่งชี้มะเร็ง (tumor marker) ต่อไป ในงานวิจัยนี้ได้ใช้การรวบรวมข้อมูลทางชีวสารสนเทศของซีพีจีเมทิลเลชั่น เพื่อสร้างฐานข้อมูล แล้วคัดเลือกซีพีจีที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเซลล์ตับ ซึ่งได้แก่ซีพีจีของยีน *DSU* ที่ตำแหน่ง cg12620499 จากการทดลองเบื้องต้นพบความแตกต่างของระดับเมทิลเลชั่นที่ตำแหน่งนี้ในเนื้อเยื่อตับแตกต่างจากเนื้อเยื่ออวัยวะอื่น และเมื่อทำการทดลองเพิ่มในซีรั่มกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มคนปกติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.0002) ซีพีจีที่ตำแหน่งนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองและติดตามการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งตับได้ นอกเหนือจากนี้ฐานข้อมูลของงานวิจัยนี้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ทั้งในการตรวจหาดีเอ็นเอของเซลล์ตับ และงานทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ

ABSTRACT

Circulating liver DNA detection is a technique for liver DNA detection. CpG methylation is notable used for this technique. Therefore, the purpose of this study is to discover the specific CpG methylation for liver DNA and design as a hepatoma marker. In this study, we use the methylation microarray data collection for database creation. After selection the liver specific CpG (*DSU*: cg12620499) from 27,578 CpG position is suitable for this experiment. The result of the preliminary experiments shows the difference between methylation value of liver and other fourteen organs. Interestingly methylation value of serum DNA from hepatoma patient group is higher than healthy group with significant (P = 0.0002). In summary, we expect this CpG can be used for screen and follow up in hepatoma patient. Furthermore, our database prospect to useful not only in liver cell detection but also in the other clinical applications.

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอของตับในกระแสเลือด, ซีพีจีเมทิลเลชั่น, เมทิลเลชั่นไมโครแอเรย์

Keywords: circulating liver DNA, CpG methylation, methylation microarray

บทนำ

ในปัจจุบัน เทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอในกระแสเลือดเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง ซึ่งในผู้ป่วยมะเร็งตับพบว่ามีการทำลายเนื้อเยื่อของตับ จึงทำให้เซลล์หรือสารพันธุกรรมของเซลล์ตับหลุดลอยเข้าไปในกระแสเลือด ทำให้สามารถตรวจพบดีเอนเอของเซลล์ตับในกระแสเลือดได้มากกว่าคนปกติ หลักการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้ในเทคนิคนี้คือ ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น (DNA methylation) ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อพัฒนาการ หรือการเจริญในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetic) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene) ที่ไม่ขึ้นกับลำดับเบส โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ และมักเกิดขึ้นที่บริเวณโปรโมเตอร์ (Promoter) ของยีน หรือบริเวณที่เป็นซีพีจีไอส์แลนด์ (CpG Island) ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นของแต่ละยีนในเซลล์เนื้อเยื่อแต่ละชนิดนั้น จะมีจำนวนและรูปแบบที่แตกต่างกันอย่างจำเพาะ เพื่อควบคุมระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถนำมาตรวจวัดได้ หลักการนี้จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะได้ รวมถึงตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของเซลล์ ที่เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีน

ในงานวิจัยนี้ได้รวบรวมข้อมูลของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เพื่อนำมาสร้างฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics database) สำหรับใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงในการตรวจยืนยันเนื้อเยื่อหรือเซลล์จากตับ โดยใช้ข้อมูลงานทดลอง (GEO dataset) จาก NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) จำนวน 39 การทดลอง ที่เป็นเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ 18 ชนิด ซึ่งงานทดลองทั้ง 39 การทดลองนี้ใช้เมทิลเลชั่นไมโครแอเรย์ (methylation microarray) ชนิดเดียวกัน คือ Infinium HumanMethylation27 BeadChip Kit ของบริษัทอิลูมิน่า (Illumina®) ที่ประกอบด้วยไปด้วยตำแหน่งของซีพีจีจำนวน 27,578 ตำแหน่ง ทั่วทั้งจีโนมครอบคลุมตำแหน่งของยีนมากกว่า 14,000 ยีน ฐานข้อมูลนี้สามารถอ้างอิงค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นของซีพีจีตำแหน่งต่างๆ บนจีโนมในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้ จึงมีประโยชน์เป็นอย่างมากในการใช้ ระดับของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น เพื่อการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ที่ค้นหาซีพีจีที่จำเพาะต่อเซลล์ตับ และออกแบบตัวบ่งชี้ของมะเร็งตับ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เลือก GEO dataset ของเนื้อเยื่อมนุษย์ชนิดต่างๆ จาก NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/) ที่ใช้ไมโครแอเรย์ Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit (GPL8490-65) เพราะสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM ได้ และมีข้อมูลของ GEO dataset มากถึง 172 งานทดลอง (ข้อมูลตั้งแต่วันที่ 18 สิงหาคม 2552 ถึง วันที่ 31 ธันวาคม 2555)

2. คัดเลือก GEO dataset ทั้งหมด 172 งานทดลอง โดยคัดเลือกเฉพาะงานทดลองที่เป็นเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 39 งานทดลอง นอกจากนี้ทางงานวิจัยยังได้รับข้อมูลของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นของเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ 14 ชนิด จาก HumanMethylation27 BeadChip Kit จากงานวิจัยของบริษัทอิลูมิน่า (Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay)

3. นำ GEO dataset ที่ได้คัดเลือกไว้ ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM เพื่อคำนวณค่า เมทิลเลชั่นเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในแต่ละการทดลอง (ซีพีจี 27,578 ตำแหน่ง บนจีโนม) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มารวบรวมและจัดเรียงลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อสร้างเป็นฐานข้อมูลของอวัยวะต่างๆ แล้วสร้างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชั่นของแต่ละซีพีจีด้วยโปรแกรมอาร์ (R program) ซึ่งจะได้กราฟทั้งหมด 27,578 กราฟตามจำนวนของซีพีจีบนเมทิลเลชั่นไมโครแอเรย์ที่ใช้

4. วิเคราะห์และค้นหากราฟของซีพีจีเมทิลเลชั่น ที่มีความจำเพาะในแต่ละเนื้อเยื่อตับ โดยการเปรียบเทียบค่าเมทิลเลชั่นเฉลี่ยของซีพีจีที่มีค่าสูงอย่างเด่นชัดบนเนื้อเยื่อหรืออวัยวะตับ เมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่น

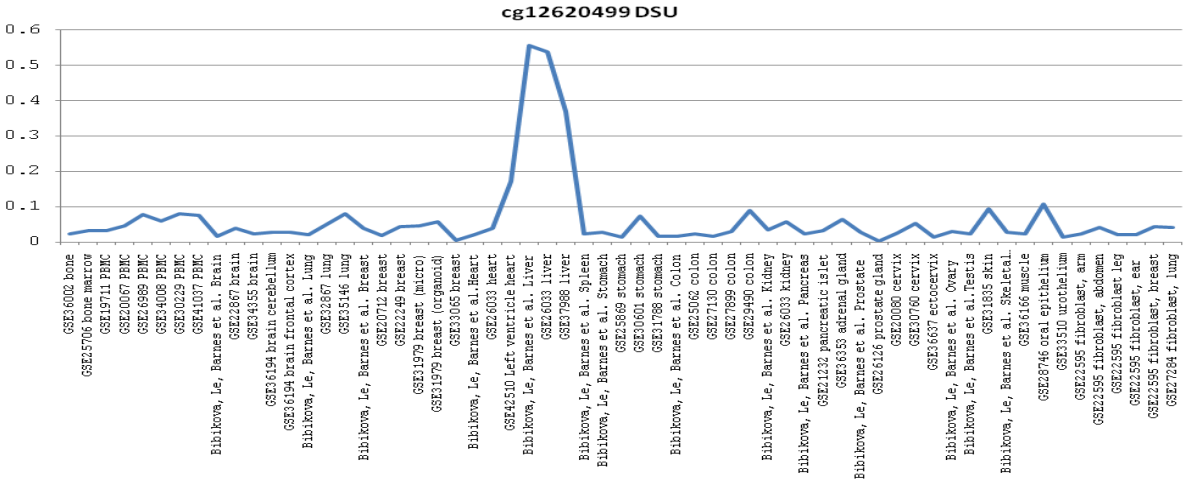
5. ออกแบบไพร์เมอร์ (Primer) สำหรับกระบวนเอ็มเอสพีซีอาร์ (MS-PCR: methylation specific polymerase chain reaction) ณ ตำแหน่ง ดังกล่าว แล้วทำการทดลองกับตัวอย่างเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ จากการตรวจศพ (Autopsy) จำนวน 13 ราย ที่ประกอบด้วยอวัยวะ 14 ชนิด รวมถึงตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัม (Serum) ของคนปกติ จำนวน 24 ราย และซีรัมของและผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (Hepatoma) จำนวน 21 ราย ที่ได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรีเมนท์ (Bisulfite treatment)

6. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชั่นจากพีซีอาร์โปรดักส์ที่เกิดขึ้นทั้งสองการทดลอง โดยใช้สูตร

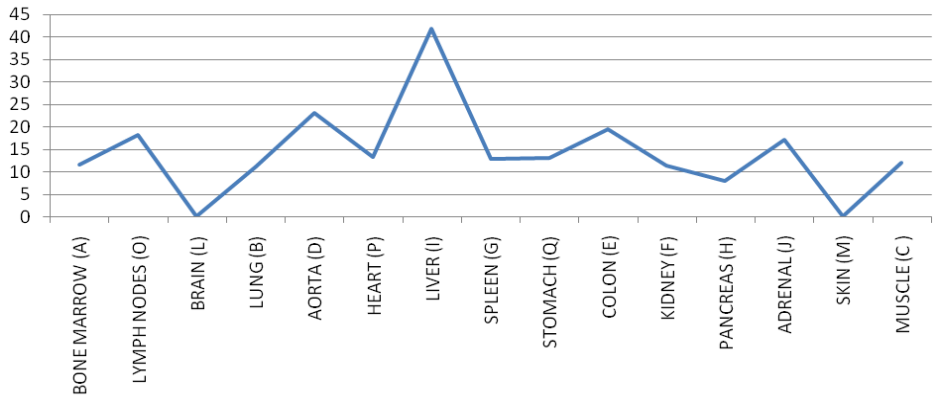
$$\%\text{methylation} = \frac{\text{ความเข้มของ methylation band}}{\text{ความเข้มของ methylation band+unmethylation band}} \times 100$$ แล้ววิเคราะห์ผล

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีจำนวน 27,578 ตำแหน่ง พบว่าตำแหน่งที่มีค่าเมทิลเลชั่นของเซลล์ตับในระดับสูงเมื่อเทียบกับเซลล์จากอวัยวะอื่นๆ และมีค่าที่เหมาะสมจะทำการคัดเลือกมาทำการทดลองคือ ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* ดังแสดงในรูปที่ 1

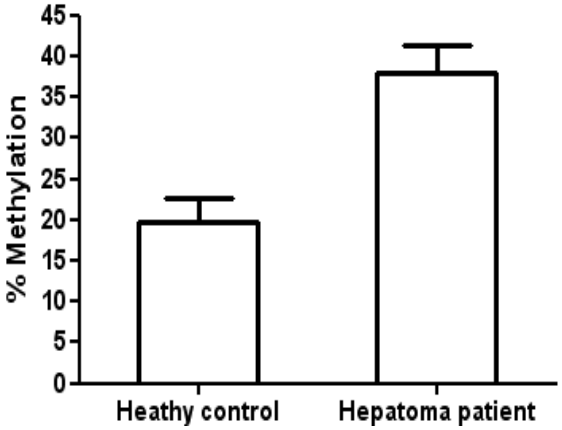


รูปที่ 1 กราฟค่าเมทิลเลชั่นในอวัยวะต่างๆ ของยีน *DSU* จากฐานข้อมูล



รูปที่ 2 กราฟค่าเมทิลเลชั่นที่วัดได้จากอวัยวะต่างๆ ในการทดลอง

ผลทดลองพบว่า เซลล์ตับมีค่าเมทิลเลชั่นเฉลี่ยสูงกว่าอวัยวะชนิดอื่นๆ ทั้ง 14 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2 และผลการทดลองในซีรั่มกลุ่มคนปกติเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งพบว่า ค่าเมทิลเลชั่นในกลุ่มคนปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มคนที่เป็นมะเร็งตับ (ค่าเมทิลเลชั่นเฉลี่ยในซีรัมคนปติ เท่ากับ 19.64±14.44 และค่าเมทิลเลชั่นเฉลี่ยในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับเท่ากับ 37.89±15.87 $P = 0.0002$) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 กราฟค่าเมทิลเลชั่นที่วัดได้จากซีรั่มกลุ่มคนปกติเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าซีพีจีเมทิลเลชั่นของยีน *DSU* ที่ตำแหน่ง cg12620499 มีความจำเพาะต่อเซลล์ตับ และจากผลการทดลองเปรียบเทียบค่าเมทิลเลชั่นระหว่างซีรัมของคนปกติและซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งตับ พบว่าซีพีจีเมทิลเลชั่นนี้สามารถตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งตับ จึงสรุปได้ว่าหลักการและเทคนิคนี้สามารถพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หรือคัดกรองโรคมะเร็งตับได้

เอกสารอ้างอิง

Herman JG. Circulating methylated DNA. Ann N Y Acad Sci2004 Jun;1022:33-9.

Phutikanit, N., et al., Different DNA methylation patterns detected by the Amplified Methylation Polymorphism Polymerase Chain Reaction (AMP PCR) technique among various cell types of bulls. Acta Vet Scand. 52: p. 18.

Sulewska, A., et al., Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. Folia Histochem Cytobiol, 2007. 45(4): p. 315-24.

Brena, R.M., T.H. Huang, and C. Plass, Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. J Mol Med (Berl), 2006. 84(5): p. 365-77.

Zhu, Y., et al., GEOmetadb: powerful alternative search engine for the Gene Expression Omnibus. Bioinformatics, 2008. 24(23): p. 2798-800.

Bibikova, M., et al., Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay. Epigenomics, 2009. 1(1): p. 177-200.