

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การศึกษาการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน Glutathione --S- transferase
ชนิด P1 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย

โดย

ผศ.ดร. ธเนศ พงศ์ธีรรัตน์

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ชื่อเรื่อง : การศึกษาการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน Glutathione -S- transferase ชนิด P1
ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย

ผู้วิจัย : ศศ.ดร.ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์

สถาบัน : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

จำนวนหน้างานวิจัย : 28 หน้า

: สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

คำสำคัญ : กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส, CpG islands hypermethylation, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, มะเร็งเต้านม

บทคัดย่อ

ยีน *GSTP1* เป็นยีนที่มีรหัสการสร้างเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษเพื่อปกป้องเซลล์ร่างกายจากสารก่อมะเร็ง สำหรับมะเร็งเต้านมจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการแปรผันหลากหลายของยีน *GSTP1* มีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์ *GSTP1* นี้ลดลงและขณะเดียวกันการเกิด hypermethylation บริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนนี้ก็มีผลให้การแสดงออกของยีนลดลงด้วย

คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าทั้งการแปรผันหลากหลายของยีนและการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1* มีส่วนร่วมส่งเสริมความรุนแรงของมะเร็งเต้านม ดังนั้นเพื่อศึกษาผลกระทบของการแปรผันหลากหลายของยีนและการเกิด CpG-island hypermethylation ของยีน *GSTP1* ที่มีผลต่อผู้ป่วยมะเร็งเต้านม คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการเกิดการแปรผันหลากหลายของยีนโดยวิธี PCR-RFLP และศึกษาการเกิด CpG-island hypermethylation โดยวิธี methylation-specific PCR จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย 41 ราย จากนั้นจึงหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการแปรผันหลากหลายของยีนและการเกิด CpG-island hypermethylation กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จากการศึกษาพบว่ามีภาวะการเกิด hypermethylation ของยีนร้อยละ 26 ของผู้ป่วยและมีการเกิดการแปรผันหลากหลายของยีนร้อยละ 14 ของผู้ป่วย ค่าสถิติพบว่าเกิดการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง ($P = 0.02$) ขณะที่การเกิดการแปรผันหลากหลายของยีนมีความสัมพันธ์กับโปรตีน progesterone receptor ($P = 0.04$)

จากการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแปรผันหลากหลายของยีนและการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1* จึงสันนิษฐานได้ว่าการเกิด CpG-island hypermethylation ของยีนนี้อาจมีส่วนทำให้โรคมะเร็งเต้านมมีความรุนแรงมากขึ้นแต่ไม่เกี่ยวข้องกับการแปรผันหลากหลายของยีนนี้ในกลุ่มผู้ป่วยเดียวกัน

Title : Detection of DNA-hypermethylation of Glutathione –S- transferase Genes Class *P1* in Thai Breast Cancer Patients.

Researcher : Asst. Prof . Dr. Tanett Pongtheerat

Institution : Rangsit University

Sources : Research Institute Rangsit University

No. of Page : 28 pages

Keyword : Glutathione S-Transferase P1, CpG islands hypermethylation, Genetic Polymorphism, Breast Cancer

Abstract

The GSTP1 gene encodes for the detoxification enzyme involved in protecting cells from carcinogens. In breast cancer, GSTP1 polymorphism may produce lower effective enzyme detoxification properties and GSTP1 promoter hypermethylation may result in inactivation of GSTP1 expression. We hypothesized that the polymorphism and hypermethylation of GSTP1 promote the progression of breast cancer. To study the effect of GSTP1 polymorphism and CpG-island hypermethylation on GSTP1 promoter, PCR-RFLP and methylation-specific PCR techniques were used with 41 Thai breast-cancer patients. The associations between genetic polymorphisms, CpG-island hypermethylation, and clinico-pathological parameters, were analyzed. GSTP1 hypermethylation was found in 26% of cases and GSTP1 polymorphism in 14%. GSTP1 hypermethylation was significantly associated with breast cancer; lymph-node metastasis ($P = 0.02$) and GSTP1 polymorphism status was significantly different with progesterone receptor ($P = 0.04$). No association was found between GSTP1 polymorphism and methylation status. The results indicated that CpG-island hypermethylation of GSTP1 promoter was associated with a biologically aggressive phenotype, but may not be related to gene polymorphism in breast-cancer patients.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้จะไม่อาจสำเร็จได้ถ้าไม่ได้รับความร่วมมือจากหมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชา
วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในการให้ความอนุเคราะห์ในการใช้
สถานที่และเครื่องมือต่างๆ และขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ได้อนุเคราะห์
ตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และงานวิจัยนี้สำเร็จได้โดยได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจาก
สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับการตีพิมพ์ผลงานวิจัยนี้ในวารสาร Asian Pacific Journal of
Cancer Prevention ในหัวข้อเรื่อง Promoter Methylation and Genetic Polymorphism of Glutathione
S-Transferase P1 Gene (*GSTP1*) in Thai Breast-cancer patients ได้แทรกไว้ในภาคผนวกเพื่อความ
สมบูรณ์ของงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	A
สารบัญตาราง	C
สารบัญรูปภาพ	D
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ทบทวนเอกสารวรรณกรรมทางวิชาการ	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	7
การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ	7
การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) สำหรับยีน GSTP1 เพื่อดูการเกิด DNA-hyper methylation	8
การหาลำดับเบสของ PCR product	9
การทำ PCR-RFLP สำหรับยีน GSTP1 เพื่อดูความหลากหลายของยีน	9
การวิเคราะห์ข้อมูล	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
การสกัดดีเอ็นเอจากบล็อกริซอมเนื้อพาราฟิน	11
การเตรียมดีเอ็นเอด้วยวิธี bisulfite และ การทำ PCR และการยืนยันเบสที่เกิด methylation	11
การทำ PCR-RFLP ของยีน GSTP1 เพื่อดูความหลากหลายของยีน	15
ผลพยาธิสภาพของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	18
การวิเคราะห์ข้อมูล	20

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	
การตีพิมพ์ผลงานวิจัย	

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงผลการทำ MSP-PCR ของผู้ป่วยจำนวน 100 ราย	12
2 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ <i>GSTP1</i> ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	17
3 ผลพยาธิสภาพของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	18
4 ตารางแสดงค่าทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน <i>GSTP1</i> กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	20
5 ตารางแสดงค่าทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน <i>GSTP1</i> กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	21
6 ตารางแสดงค่าทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน <i>GSTP1</i> กับความหลากหลายของยีน <i>GSTP1</i> ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	22

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การทำ MSP-PCR หับยีน GSTP1 จากดีเอ็นเอผู้ป่วย	12
2 การทำ DNA sequencing เพื่อยืนยันผล methylation ด้วยการสุ่มนำ PCR product ของดีเอ็นเอผู้ป่วย	15
3 แสดงผลผลิต PCR ของ <i>GSTP1</i>	15
4 แสดงผลการทำ PCR-RFLP ของยีน <i>GSTP1</i> ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ <i>BsmA1</i>	16

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการตายของสตรีทั่วโลกเป็นอันดับหนึ่งโดยเฉพาะประเทศตะวันตก มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในระดับสูงคือ 99.4 คนต่อประชากรสตรี 100,000 คนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สำหรับในประเทศไทยพบอัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านม 20.5 คนต่อประชากรสตรี 100,000 คน เป็นโรคมะเร็งที่เกิดกับสตรีไทยสูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปากมดลูกและมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งสูงในจังหวัดที่มีความเจริญเช่น กรุงเทพมหานคร, เชียงใหม่เป็นต้น โดยอายุเฉลี่ยที่มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งสูงที่สุดอยู่ที่ 45 ปี

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในหญิงไทย ผู้หญิงทุกคนมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านม มักเกิดในหญิงอายุ 50 ปีขึ้นไป ผู้ที่มีอายุสูงขึ้นจะมีอัตราเสี่ยงสูงขึ้น สาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านมมีหลายสาเหตุที่สำคัญคือเกิดจากการใช้ชีวิตประจำวันเช่นการบริโภคอาหารที่มีสารก่อมะเร็งหรือสารที่มีไขมันสูง, การออกกำลังกาย, การอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ, ความผันแปรของฮอร์โมนเพศและประมาณร้อยละ 30 เกิดจากภาวะทางพันธุกรรมหรือความผิดปกติของยีน ภาวะที่เกิดความผิดปกติของยีนในมะเร็งเต้านมพบว่ามาจากหลายกลุ่มยีนสำคัญเช่น tumor suppressor gene เช่น BRCA1, BRCA2, P53 และกลุ่มยีนที่สำคัญอีกกลุ่มคือ carcinogen metabolism genes ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่สร้างเอ็นไซม์ที่ทำให้สารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลง ยีนกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 ประเภทคือยีนสร้าง phase I enzyme ได้แก่ยีน CYP1A1 และ phase II enzyme ได้แก่ยีน GSTs ยีนกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญต่อการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งด้วยการลดความสามารถของสารก่อมะเร็งต่างๆ ฉะนั้นการศึกษาลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเต้านมหรือเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมความรุนแรงของโรคจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง และลักษณะทางพันธุกรรมของชนชาติต่างๆมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมในสตรีไทยจึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อช่วยในการตรวจหาโรคระยะแรกเริ่มและวางแผนการรักษาให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

GSTs (E.C.2.5.1.18) เป็นกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ glutathione S-transferase ที่มีความสัมพันธ์ต่อการลดการเกิดพิษจากการ metabolites ของสารก่อมะเร็ง มีการศึกษาพบว่า polymorphism ของยีน glutathione-S-transferase (GSTs) มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์และอาจจะเกี่ยวข้องกับความไวในการเกิดมะเร็งต่างๆ สำหรับมะเร็งเต้านมกลุ่มยีนที่มีการศึกษาความ

หลากหลายที่เกิดความผิดปกติของยีนมากที่สุดคือ GSTT1, GSTM1, GSTP1 และ GSTA1 แต่ผลการศึกษาพบว่าความหลากหลายของยีนทั้ง 4 ชนิดไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในหญิงไทยแต่กลับพบว่าความหลากหลายของยีน GSTP1 (Ile/Val genotype) เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมความรุนแรงของโรคมะเร็งเต้านม และต่อมา มีรายงานว่านอกจากการมีความหลากหลายของยีน GSTP1 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่างๆแล้วการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1 ที่บริเวณ CpG islands ของยีน GSTP1 ก็มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่างๆ รวมทั้งมะเร็งเต้านมด้วย โดยพบว่ามีการเกิด DNA-hypermethylation เฉพาะในเซลล์มะเร็งและมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของมะเร็งต่างๆและอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยด้วย แต่การเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1 ในเซลล์มะเร็งยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยเลย

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยใดที่สรุปแน่ชัดถึงสาเหตุของมะเร็งเต้านม จึงยังไม่สามารถคัดค้นหาวิธีป้องกันได้ แต่การตรวจพบมะเร็งเต้านมในระยะแรกขณะที่ยังไม่แพร่กระจายทำให้โอกาสในการรักษาหายขาดจากโรคได้มากขึ้น การหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1 กับพยาธิสภาพและความรุนแรงของมะเร็งเต้านมยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน โครงการนี้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายและการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน GSTP1 กับมะเร็งเต้านมของสตรีไทย และถ้าศึกษาพบความหลากหลายของยีนมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคมะเร็งเต้านมก็จะเป็นพื้นฐานความรู้ให้ศึกษาความสำคัญของยีนนี้ และมีประโยชน์ช่วยในการประเมินความเสี่ยงของสตรีไทยต่อการเกิดโรคทั้งยังช่วยป้องกันและตรวจสอบการเกิดมะเร็งเต้านมได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความถี่ของการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม
2. หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* และความหลากหลายของยีน *GSTP1* กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเช่น อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง โปรตีน ER, โปรตีน HER-2 และระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง
3. หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับความหลากหลายของยีน *GSTP1* ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บททวนเอกสารวรรณกรรมทางวิชาการ

องค์การอนามัยโลก (WHO) รายงานว่ามะเร็งเต้านม เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในหญิงชาวตะวันตก ไม่ว่าจะเป็นในยุโรป หรือสหรัฐอเมริกา ขณะนี้โรคมะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการป่วยและเสียชีวิตอันดับ 1 ของผู้หญิงทั่วโลก ปัจจุบันพบผู้ป่วยรายใหม่ปีละ 910,000 ราย เสียชีวิตปีละ 502,000 ราย เฉลี่ยนาทีละประมาณ 1 คน ส่วนในประเทศไทย มะเร็งเต้านมเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตที่พบบ่อยที่สุดเมื่อเทียบกับ โรคมะเร็งชนิดอื่น ตามอุบัติการณ์ของมะเร็งเต้านมในผู้หญิงไทยเมื่อเทียบกับประเทศตะวันตกแล้วยังถือว่าน้อยกว่ามาก โดยประเทศในอเมริกาเหนือ สหราชอาณาจักร ออสเตรเลีย และไทย มีผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 82.5, 62.5 และ 69.2 ต่อประชากร 100,000 คน ตามลำดับ (1) สำหรับในประเทศไทยพบอัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านม 20.5 คนต่อประชากรสตรี 100,000 คน เป็นโรคมะเร็งที่เกิดกับสตรีไทยสูงเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปากมดลูกและมีอัตราการเกิดโรคสูงในจังหวัดที่มีความเจริญเช่น กรุงเทพมหานคร, เชียงใหม่ เป็นต้น โดยอายุเฉลี่ยที่มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งสูงที่สุดอยู่ที่ 45 ปี (1)

มะเร็งเต้านมเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของเต้านมมีการแบ่งตัวโดยไม่สามารถควบคุมได้ มีการเบียดบังเนื้อเยื่อข้างเคียงและแพร่ขยายไปทั่วร่างกาย โดยเซลล์มะเร็ง จะเพิ่มจำนวนและแบ่งตัวได้ด้วยตนเอง มันจะแย่งสารอาหารจากเซลล์ปกติ และเข้าไปแทนที่เซลล์ปกติของเต้านม หากปล่อยไว้ เซลล์ปกติเหล่านี้จะไม่สามารถเติบโตได้ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้ต้องใช้เวลาหลายเดือนหรือหลายปี

มะเร็งเต้านม (breast Cancer) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในหญิงไทย ผู้หญิงทุกคนมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านม มักเกิดในหญิงอายุ 50 ปีขึ้นไป อายุที่ตรวจพบเป็นมะเร็งมากที่สุดคือช่วงระหว่าง 45-50ปี ผู้ที่มีอายุสูงขึ้นจะมีอัตราเสี่ยงสูงขึ้น ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยใดที่สรุปแน่ชัดถึงสาเหตุของมะเร็งเต้านม จึงยังไม่สามารถคัดค้านหาวิธีป้องกันได้ แต่การตรวจพบมะเร็งเต้านมในระยะแรก และยังไม่แพร่กระจายทำให้โอกาสในการรักษาหายขาดจากโรคได้ (2) สาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านมยังไม่ทราบแน่ชัดแต่พบว่ามีหลายปัจจัย (Risk Factors) ที่เชื่อว่าเป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านม คือ

1. เพศ พบมากในเพศหญิง แต่ก็สามารถพบได้ในบุรุษเช่นกัน คือ ประมาณร้อยละ 1
2. อายุ โอกาสเกิดมะเร็งเพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีอายุมากกว่า 50 ปี
3. ประวัติครอบครัว

- ถ้าแม่เป็นมะเร็งเต้านม ลูกสาวหรือพี่สาว น้องสาว ก็มีความเสี่ยงต่อโรค และจะยังมี

ความเสี่ยงสูงขึ้น ถ้ามีประวัติการเป็น cyst ของเต้านม

- ความเสี่ยงอาจเกิดขึ้น ถ้าพ่อก็มีประวัติเป็นมะเร็งด้วย

- มีกรรมพันธุ์ร่วมประมาณร้อยละ 5-10 (3) โดยเฉพาะความบกพร่องของยีนในโครโมโซมที่ เรียกว่า ยีน BRCA1 และ BRCA2 นอกจากนี้ อาจบกพร่องในยีนที่ควบคุมมะเร็งคือ p53 tumor suppressor gene

4. ประวัติการมีลูก

- ผู้หญิงที่ไม่เคยมีลูก จะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น

- ผู้หญิงที่มีลูกหลังจากอายุ 30 ปี จะมีความเสี่ยงเพิ่มมากกว่าผู้หญิงที่ไม่มีลูก

5. ประวัติการมีประจำเดือน ความเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นในผู้หญิงที่มีประจำเดือนเร็ว หรือหมดประจำเดือนช้า (4)

6. อาหาร อาหารไขมันสูง เนื้อที่ย่างเกรียม หรืออาหารแปรรูปจะเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง และมีหลักฐานชัดเจนว่าการรับประทานอาหารพวกผัก ผลไม้ และธัญพืชช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้

7. เชื้อชาติ คนผิวขาวมีโอกาสมากกว่า

จะเห็นได้ว่าสาเหตุของการเกิดมะเร็งเต้านมมีหลายสาเหตุและมีสาเหตุที่สำคัญคือเกิดจากการใช้ชีวิตประจำวันเช่นการบริโภคอาหารที่มีสารก่อมะเร็งหรือสารที่มีไขมันสูง, การออกกำลังกาย, การอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ, ความผันแปรของฮอร์โมนเพศและประมาณ 30% เกิดจากภาวะทางพันธุกรรมหรือความผิดปกติของยีน (5) ภาวะที่เกิดความผิดปกติของยีนในมะเร็งเต้านมพบว่ามาจากหลายกลุ่มยีนสำคัญเช่น Tumor suppressor gene เช่น BRCA1, BRCA2, P53 (6) และกลุ่มยีนที่สำคัญอีกกลุ่มคือ Carcinogen metabolism genes ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่สร้างเอ็นไซม์ที่ทำให้สารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลง

เอ็นไซม์ glutathione S-transferase เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมทางด้าน biotransformation (7) ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีในสิ่งมีชีวิตที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติการละลายของสารที่เป็นสารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลงและมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้นจึงสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ โดยปกติเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ biotransformation จะแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ phase I enzyme ได้แก่ cytochrome P 450 enzyme และ phase II enzyme ซึ่ง ได้แก่ เอ็นไซม์ glutathione S-transferase (GSTs) จะเกี่ยวข้องกับขบวนการคอนจูเกชันของ glutathione กับสารประกอบเชิงซ้อนที่

เป็น electrophilic compound (8,9) เช่น สารก่อมะเร็ง (carcinogen) ผลผลิตจากภาวะ Oxidative stress ตลอดจนยาที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic drug) ที่ใช้ในเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งหลังจากคอนจูเกตแล้วจะทำให้สารมีความเป็นพิษน้อยลง และละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงขับออกจากร่างกายได้ง่าย แต่มีรายงานพบว่า Polymorphism ของยีน glutathione-S-transferase (GSTs) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และเกี่ยวข้องกับกำเริบมะเร็งหลายชนิด (10, 11)

กลุ่มของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase พบว่ามีทั้งสิ้น 16 ยีน ที่ควบคุมการสร้าง Glutathione S-transferase ในส่วนไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อ และมี 6 ยีน ที่ควบคุมการสร้าง Glutathione S-transferase ในส่วนเมมเบรน (12) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะยีนควบคุมการสร้าง Glutathione S-transferase ในส่วนไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อ ซึ่งในมนุษย์พบว่าแบ่งเป็น 8 คลาสใหญ่ๆ (9) ได้แก่

1. คลาส Alpha อยู่บน chromosome คู่ที่ 6 (6p) แบ่งเป็น A1-A4
2. คลาส Mu อยู่บน chromosome คู่ที่ 1 (1p) แบ่งเป็น M1-M5
3. คลาส Theta อยู่บน chromosome คู่ที่ 22 (22q) แบ่งเป็น T1 และ T2
4. คลาส Pi อยู่บน chromosome คู่ที่ 11 (11q) แบ่งเป็น P1
5. คลาส Zeta อยู่บน chromosome คู่ที่ 14 (14q) แบ่งเป็น Z1
6. คลาส Sigma อยู่บน chromosome คู่ที่ 4 (4q)
7. คลาส Kappa ยังไม่ทราบตำแหน่งแน่ชัด แต่พบว่าอาจควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ K1
8. คลาส Chi หรือ Omega อยู่บน chromosome คู่ที่ 10 (10q) แบ่งเป็น O1 และ O2

ความหลากหลายของยีน (Genetic Polymorphism) (13) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการกลายพันธุ์ของยีน (Gene mutation) แตกต่างกันตรงที่ Polymorphism สามารถพบได้อย่างต่ำ 1% ของคนปกติ ส่วนใหญ่ของ Polymorphism มักจะมีลักษณะเป็น single nucleotide polymorphism หรือที่เรียกว่า SNPs SNPs ที่เป็น homozygote จะมีลักษณะเป็น biallelic polymorphism marker คือมี polymorphism ในทั้งสองอัลลีลของโครโมโซม พบว่าความถี่ในการเกิด SNPs จะสูง โดยจะพบการเกิด SNPs ได้ในทุกๆ 300 bps ในปัจจุบันพบว่า การเกิด polymorphism ในยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึม อาจมีผลต่อการกำจัดสารพิษได้ ดังเช่นที่พบในยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase

glutathione S-transferase ชนิด P1 (GSTP1) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11q13 การศึกษาความสำคัญของยีนนี้ต่อการเกิดโรคมะเร็งคือการมีความหลากหลายของยีนที่ Codon ที่ 105 บน exon 5 ของยีน โดยจุดที่สำคัญคือมีการเปลี่ยนจากเบส G เป็นเบส A ซึ่งเป็นตำแหน่ง active site ของ

เอ็นไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Isolucine เป็น Valine ซึ่งมีผลทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ลดลง (3) ความถี่ของความหลากหลายของยีน GSTP1 นั้น พบว่าชาวตะวันตกมีประมาณร้อยละ 50 (8) และชาวเอเชียประมาณร้อยละ 30 (9) สำหรับในเมืองไทยความถี่ของความหลากหลายของยีนในประชากรคิดเป็นประมาณร้อยละ 40 (10) ผลกระทบของความผิดปกติของยีนนี้จากการศึกษาทั่วโลกพบว่ายีน GSTP1 มีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มความเสี่ยงให้เกิดโรคมะเร็งต่างๆ มากเช่น มะเร็งลำไส้, มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งเต้านม (11,14,15) แต่ก็มีบางรายงานการวิจัยที่พบว่ากรรมมีความหลากหลายของยีน GSTP1 ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเต้านมแต่อย่างใดทั้งในทวีปเอเชียและยุโรป (16,17) สำหรับการศึกษาผลกระทบของยีนนี้กับโรคมะเร็งต่างๆ ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก เช่น มีการศึกษาผลของความหลากหลายของยีน GSTP1 กับมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็กพบว่ายีนนี้ยังไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งชนิดนี้ (18) และการศึกษาผลกระทบของยีนนี้กับมะเร็งเต้านมในหญิงไทยผลที่ได้คือความผิดปกติของยีนนี้ไม่ได้เป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านมแต่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมความรุนแรงของโรคมะเร็งเต้านม (19)

ต่อมาเมื่อมีการศึกษาถึงการเกิด hypermethylation บริเวณ CpG islands ของยีน GSTP1 ซึ่งพบว่ามีผลลดการแสดงออกของยีน GSTP1 ทำให้ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์ได้และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งต่อมลูกหมากพบว่าร้อยละ 70-80 ของผู้ป่วยชาวยุโรปเกิดภาวะ hypermethylation ขณะที่เซลล์ปกติกลับเกิดน้อยมาก (20, 21) แต่ในผู้ป่วยเอเชียพบเพียงร้อยละ 30 (22) และร้อยละ 30 ของผู้ป่วยมะเร็งผนังมดลูกในเอเชียเกิดภาวะ hypermethylation และมีผลลดการแสดงออกของยีน GSTP1 (23) สำหรับมะเร็งตับพบว่าผู้ป่วยชาวเอเชียมีภาวะ hypermethylation ประมาณ 50% และภาวะนี้ยังสัมพันธ์กับการสัมผัสสารก่อมะเร็งจากสิ่งแวดล้อมด้วย (24) ส่วนในมะเร็งเต้านมนั้น จากการทดลองมักพบว่าในเซลล์ปกติจะไม่ค่อยพบการเกิด hypermethylation ของยีนนี้แต่จะพบมากในเซลล์มะเร็ง (25) มีรายงานในเอเชียพบมีภาวะ hypermethylation เพียงประมาณร้อยละ 14 และจะพบมากในมะเร็งเต้านมชนิด IDC ประมาณร้อยละ 40 แต่พบว่ามี ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด hypermethylation กับขนาดของก้อนมะเร็ง, การแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองและอัตราการอยู่รอดต่ำของผู้ป่วย (26,27) ปัจจุบันการศึกษาผลของ hypermethylation บริเวณ CpG islands ของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านมยังไม่มียาในประเทศไทย การศึกษาการเกิด hypermethylation ก็จะใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอด้วยสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine ปกติไปเป็น uracil ได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยน methylcytosine ได้ หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR ด้วยไพรเมอร์สำหรับ cytosine ปกติ และ ไพรเมอร์สำหรับ methylcytosine แล้วตรวจผลการทดลองด้วย agarose gel electrophoresis หรืออาจเพิ่มการหาลำดับเบสเข้าไปด้วย (24)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

คณะผู้วิจัยใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจากชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในปี 2546 จำนวนประมาณ 100 รายโดยคำนวณจากสูตรของ

$$\text{Taro Yamane } n = \frac{N}{1+N(e)^2}$$

n = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

N = จำนวนประชากรทั้งหมด (ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมปี 2546 คือ 633 ราย)

e = ความคลาดเคลื่อน (0.1)

$$\text{แทนค่า } n = \frac{633}{1+633(0.1)^2} = 87$$

พร้อมทั้งข้อมูลทางพยาธิสภาพของผู้ป่วยคือ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง โพรตีน ER, โพรตีน HER-2 และระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จะนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยนำบล็อกชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมาตัด section หนา 10 ไมครอน ประมาณ 3-4 แผ่น จากนั้นนำ sections ที่ได้ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม xylene 1 ml (1000 μ l) ลงในหลอดเพื่อให้ละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ จากนั้นเขย่าด้วย vortex อย่างแรงและปั่น 5 นาที เพื่อให้ชิ้นเนื้อตกลงไปที่ก้นหลอด ดูด xylene ออกให้หมด เติม 95% alcohol 1 ml เขย่าด้วย vortex อย่างแรงและปั่น 5 นาที เพื่อกำจัด xylene ที่ค้างอยู่ออกไป เท 95% alcohol ออกอย่างระวังจนหมด นำหลอดชิ้นเนื้อที่เปิดฝาไว้ไปผ่านลมใน hood จนชิ้นเนื้อในหลอดแห้งจึงเติมสารละลาย genomic DNA lysis 600 μ l และ proteinase K 3 μ l (20mg/ml) เขย่าด้วย vortex อย่างแรงให้เข้ากัน (หรืออาจใช้ pestle ช่วยบดก็ได้) นำไปบ่มที่ 55 $^{\circ}$ C ใน shaking incubator ค้างคืนจนกว่าเนื้อจะย่อยสลายหมด

ต่อมานำหลอดมาเขย่าด้วย vortex และเติม RNase A 3 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำหลอดชิ้นลง ประมาณ 20-25 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที เติมสารละลาย protein precipitation 200 μ l ผสมให้เข้ากันพร้อมเขย่าด้วย vortex อย่างแรงอย่างน้อย 20 วินาที และนำไปปั่น 5 นาที ที่ 13,000 g ดูดส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วเติม

isopropyl alcohol 600 μ l ลงในหลอดที่มี supernatant อยู่ ผสมให้เข้ากัน โดยปิดฝาและคว่ำหลอดขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 50 ครั้ง centrifuge 1 นาที ที่ 13,000 -16,000 g ค่อยๆ เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เติม 70% alcohol 600 μ l แล้วปั่น 3 นาที ที่ 13,000 g เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป เปิดฝาหลอดแล้วคว่ำลงบนกระดาษซับประมาณ 30 นาทีจนตะกอนที่ก้นหลอดแห้ง จากนั้นเติมสารละลาย DNA hydration 50-100 μ l ที่ตั้งคืนที่อุณหภูมิห้อง นำมาเขย่าด้วย vortex เป็นระยะและทิ้งไว้จน DNA ละลายหมดจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) สำหรับยีน GSTP1 เพื่อดูการเกิด DNA-hyper methylation

1. การเตรียมดีเอ็นเอด้วยสาร sodium bisulfite ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป EZ DNA Methylation-Gold Kit ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine ปกติไปเป็น uracil ได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยน cytosine ที่อยู่ในรูป methylcytosine ได้ ตามด้วยการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2. ดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) สำหรับการทำ PCR ของ unmethylated GSTP1 คือ 5'-GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT-3' และ 5'-CCACCCCAATACTAAATCACAACA-3' ดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) สำหรับ methylated GSTP1 คือ 5'-TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC-3' และ 5'-GCCCAATACTAAATCACGACG-3'

3. การทำ PCR

นำดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาทำ PCR โดยมีองค์ประกอบใน 50 μ l ดังนี้ 1.5 mM MgCl₂, 150 mM dNTPs, และ 0.6 mM ของแต่ละ primer โดยหนึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอต้องทำ 2 หลอดคือทั้ง unmethylated GSTP1 และ methylated GSTP1 หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งมีขั้นตอนคือกำหนดอุณหภูมิ 94 °C เวลา 5 นาที, หลังจากนั้นโปรแกรมเครื่องกำหนด 40 รอบการทำ PCR ดังนี้ 94 °C เวลา 60 วินาที; 64 °C เวลา 60 วินาที, 72 °C เวลา 60 วินาทีและสุดท้าย 72 °C เวลา 5 นาที เมื่อได้ PCR product แล้วนำไปตรวจสอบโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เสร็จแล้วย้อมด้วยสาร ethidium bromide เพื่อดู PCR product ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดย PCR product ของ unmethylated GSTP1 มีขนาด 97 bp และ PCR product ของ methylated GSTP1 มีขนาด 91 bp

การหาลำดับเบสของ PCR product

ผู้นำ PCR product ของดีเอ็นเอผู้ป่วยชนิด unmethylated GSTP1 และ methylated GSTP1 บางรายมาหาลำดับเบสด้วยวิธีหาลำดับแบบมาตรฐาน โดยใช้ primer ของ unmethylated GSTP1 คือ 5'-GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT-3' และ 5'-CCACCCCAATACTAAAT CACAACA-3' และ primer สำหรับ methylated GSTP1 คือ 5'-TTCGGGGTGTAG CGGTCGTC-3' และ 5'-GCCCAATACTAAATCACGACG-3'

การทำ PCR-RFLP สำหรับยีน *GSTP1* เพื่อดูความหลากหลายของยีน (gene polymorphism)

ดีเอ็นเอเริ่มต้น (Primer) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน *GSTP1* คือ 5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3' และ 5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3' มี PCR product ขนาด 224 bp การทำ PCR 50 μ l จะใช้น้ำยาสำเร็จรูปมีส่วนผสมดังนี้ ดีเอ็นเอ 0.1 μ g, dNTPs 1.25 mmol/l, 0.4 μ mol/l ของแต่ละ primer, MgCl₂ 1.5 mmol/l, Taq polymerase 2.5 unit ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งมีขั้นตอนคือกำหนดอุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที, หลังจากนั้นโปรแกรมเครื่องกำหนด 30 รอบการทำ PCR ดังนี้ 94°C เวลา 30 วินาที, 55°C เวลา 30 วินาที, 72°C เวลา 30 วินาทีและสุดท้าย 72°C เวลา 7 นาที

เมื่อได้ PCR product แล้วนำไปตรวจสอบโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้อมด้วยสาร ethidium bromide เพื่อตรวจสอบ PCR product ขนาด 176 bp ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต หลังจากนั้นนำ PCR product ปริมาณ 2 μ l ไปตัดด้วยเอนไซม์ *BsmAI* 10 unit ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำไปตรวจสอบโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นย้อมด้วยสาร ethidium bromide เพื่อดูชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 3 แบบหลังการตัดด้วยเอนไซม์คือถ้าตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์ปกติจะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 176 bp ชิ้นเดียว แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนจาก A เป็นเบส G แบบ heterozygous ก็จะสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *BsmAI* จะมีชิ้นดีเอ็นเอ 3 ขนาดคือ 176 bp, 91 bp และ 85 bp แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนจาก A เป็นเบส G แบบ homozygous จะมีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 91 bp และ 85 bp

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* และความหลากหลายของยีน *GSTP1* กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเช่น อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง โปรตีน ER, โปรตีน HER-2 และระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง โดยใช้สถิติ chi-square test ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยมีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

2. หาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับความหลากหลายของยีน *GSTP1* ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม โดยใช้สถิติ chi-square test ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยมีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอจากบไลอ์ซันเนื้อพาราฟิน

จากการหาปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งหมด 100 ราย โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm. และวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm. พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากชิ้นเนื้อผู้ป่วยจากสูตร $[DNA] = (OD_{260}) \times 100 \times 50 \times 10^{-3} \mu g/ml$ ได้ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 5-15 μg DNA และผลจากการหาสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm / 280 nm พบว่าอยู่ในช่วง 1.5-1.7

2. การเตรียมดีเอ็นเอด้วยวิธี bisulfite และ การทำ PCR และการยืนยันเบสที่เกิด methylation

จากผลการทดลองทำ MSP-PCR รั่วยีน GSTP1 เพื่อดูการเกิด DNA-hypermethylation ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผู้ป่วยจำนวน 100 ราย พบว่ามีตัวอย่างดีเอ็นเอที่สามารถเกิด PCR product ได้จากผู้ป่วย 41 รายเท่านั้น ดังตัวอย่างในรูปที่ 1 ผลการศึกษาพบว่าการเกิด DNA-hypermethylation 11 ราย หรือ 26 % ของผู้ป่วย และไม่มีเกิดการเกิด DNA-hypermethylation 30 ราย (74%) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นยืนยันผล methylation ด้วยการสู่มนำ PCR product ของดีเอ็นเอผู้ป่วยชนิด unmethylated GSTP1 คือตัวอย่างที่ 3 และ methylated GSTP1 ตัวอย่างที่ 5 มาหาลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าตัวอย่าง methylated GSTP1 ยังคงเป็นเบส "C" และ unmethylated เปลี่ยนเป็นเบส "T" ที่ตำแหน่ง CpG ของยีนตามทฤษฎี



รูปที่ 1 การทำ MSP-PCR สำหรับยีน GSTP1 จากดีเอ็นเอผู้ป่วยพบว่า มีทั้งรูปแบบ complete unmethylation ในผู้ป่วยเลขที่ 13, 15 และ complete methylation ในผู้ป่วยเลขที่ 93 และ partial methylation ในผู้ป่วยเลขที่ 18 และที่ไม่มี PCR product ในผู้ป่วยเลขที่ 63, 64, 65 เลน M คือ 50 bp marker

ตารางที่ 1 แสดงผลการทำ MSP-PCR ของผู้ป่วยจำนวน 100 ราย

Sample NO.	Methylation	UnMethylation	Sample NO.	Methylation	UnMethylation
1	-	+	51	N	N
2	-	+	52	-	+
3	-	+	53	N	N
4	-	+	54	N	N
5	+	-	55	N	N
6	-	+	56	N	N
7	-	+	57	N	N

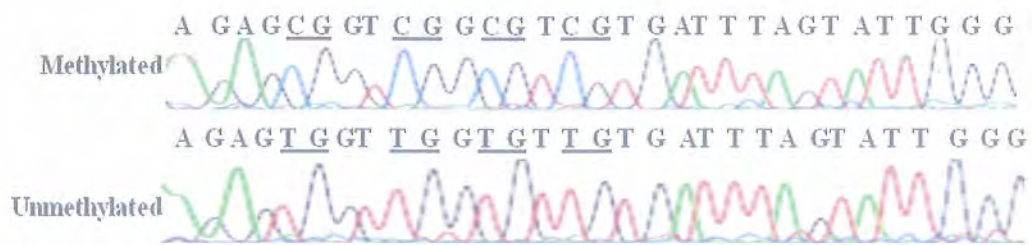
Sample NO.	Methylation	UnMethylation	Sample NO.	Methylation	UnMethylation
8	+	-	58	N	N
9	+	-	59	N	N
10	+	-	60	N	N
11	-	+	61	-	+
12	-	+	62	N	N
13	-	+	63	N	N
14	+	+	64	N	N
15	-	+	65	N	N
16	+	+	66	-	+
17	-	+	67	N	N
18	+	+	68	N	N
19	-	+	69	N	N
20	N	N	70	+	-
21	N	N	71	-	+
22	N	N	72	N	N
23	N	N	73	N	N
24	N	N	74	N	N
25	N	N	75	N	N
26	N	N	76	-	+
27	N	N	77	-	+
28	N	N	78	-	+
29	N	N	79	-	+
30	+	-	80	N	N
31	N	N	81	N	N
32	N	N	82	-	+
33	N	N	83	N	N
34	N	N	84	N	N

Sample NO.	Methylation	UnMethylation	Sample NO.	Methylation	UnMethylation
35	N	N	85	N	N
36	N	N	86	-	+
37	N	N	87	N	N
38	-	+	88	-	+
39	N	N	89	-	+
40	N	N	90	+	-
41	N	N	91	N	N
42	N	N	92	N	N
43	N	N	93	+	-
44	N	N	94	-	+
45	N	N	95	N	N
46	N	N	96	-	+
47	N	N	97	-	+
48	N	N	98	-	+
49	N	N	99	-	+
50	N	N	100	N	N
รวม	8	13	รวม	3	17

Remark: + = Positive

- = Negative

N = Not detected

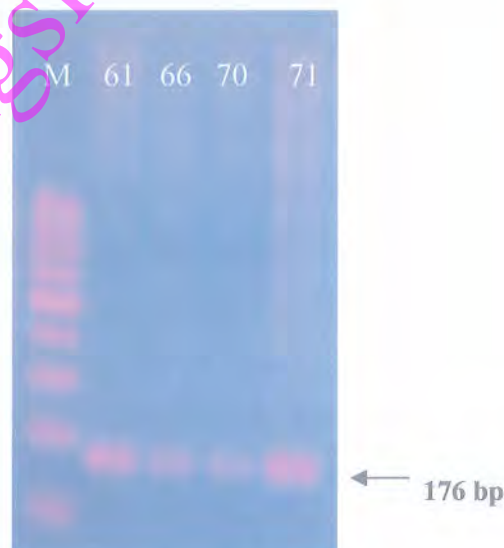


รูปที่ 2 การทำ DNA sequencing เพื่อยืนยันผล methylation ด้วยการสู่มนำ PCR product ของจีเอ็นเอผู้ป่วยชนิด unmethylated GSTP1 คือตัวอย่างที่ 3 (ล่าง) และ methylated GSTP1 ตัวอย่างที่ 5 (บน) พบว่าตัวอย่าง methylated GSTP1 ยังคงเป็นเบส "C" และ unmethylated เปลี่ยนเป็นเบส "T"

3. การทำ PCR-RFLP ของยีน *GSTP1* เพื่อดูความหลากหลายของยีน

3.1 การทำ PCR ของยีน *GSTP1*

จากการทดลองการทำ MSP-PCR หารับยีน *GSTP1* สามารถเกิด MSP-PCR product ได้จากผู้ป่วย 41 ราย นำมาทำการเพิ่มปริมาณของยีน *GSTP1* เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีน โดยการทำ PCR จากจีเอ็นเอของตัวอย่าง 41 รายดังกล่าวและตรวจสอบ PCR product โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จแล้วย้อมด้วยสาร ethidium bromide จะได้ PCR product ขนาด 176 bp ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลผลิต PCR ของ *GSTP1* ของตัวอย่างหมายเลข 61, 66, 70 และ 71 บน 2.0% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide เลน M คือ 100 bp marker

3.2 การทำ PCR-RFLP ของยีน *GSTP1*

การหาความหลากหลายของยีน *GSTP1* แบบ Ile¹⁰⁵Val โดยวิธี PCR-RFLP ได้โดยหลังการทำ PCR จนได้ PCR product ขนาด 176 bp แล้วจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *BsmA1* ผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับความหลากหลายของยีน *GSTP1* ที่ตำแหน่งโคดอน 105 ดังรูปที่ 4 และสรุปผลการทดลองของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ดังตารางที่ 2



รูปที่ 4 แสดงผลการทำ PCR-RFLP ของยีน *GSTP1* ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *BsmA1* บน 3.0% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide เลน M คือ 50 bp marker ตัวอย่างหมายเลข 79 คือ Wild type (A/A) ของ *GSTP1* ตัวอย่างหมายเลข 78 คือ Homozygous (G/G) ของ *GSTP1* ตัวอย่างหมายเลข 77, 99 คือ Heterozygous (G/A) ของ *GSTP1* เลน M คือ 50 bp marker

ตาราง 2 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ *GSTP1* ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

Sample	PCR-RFLP result	Sample	PCR-RFLP result
1	A/A	61	A/A
2	A/A	66	G/A
3	A/A	70	G/A
4	A/A	71	A/A
5	A/A	76	A/A
6	A/A	77	G/A
7	A/A	78	G/G
8	A/A	79	A/A
9	A/A	82	A/A
10	A/A	86	A/A
11	A/A	88	AA
12	N	89	A/A
13	A/A	90	A/A
14	A/A	93	G/A
15	A/A	94	A/A
16	A/A	96	A/A
17	A/A	97	A/A
18	A/A	98	A/A
19	A/A	99	G/A
30	N		
38	N		
52	N		

Remark: Wild type (A/A) , Homozygous (G/G) และ Heterozygous (G/A) , N = Not detected

4. ผลพยาธิสภาพของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

พยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 41 ราย แสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 ผลพยาธิสภาพของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ผู้ป่วย	LYMP	ER	PR	HER	SIZE (cm)	AGE
1	-	+1	+1	+2	1.3	39
2	-	-	-	+1	2.5	48
3	-	-	-	+3	2.5	45
4	+10	+1	+1	+1	2.7	60
5	-	+1	+1	+2	1.5	45
6	-	+1	+1	-	3.0	48
7	+13	+1	-	+2	3.3	40
8	-	-	-	+1	0.7	34
9	+2	+1	-	+3	1.8	38
10	+6	+1	+1	+3	3.5	60
11	-	-	-	+1	3.0	47
12	+12	+1	+1	+3	5.5	40
13	+1	-	-	+3	1.6	56
14	+1	+1	-	+1	2.0	57
15	+18	+1	+1	+1	1.5	34
16	+2	-	-	+2	6.5	40
17	-	+1	+1	+1	2.0	69
18	N	N	N	N	N	N
19	-	+1	+1	+3	2.5	61
30	+1	+1	+1	+1	2.0	49
38	-	-	-	+3	2.5	58
52	-	+1	-	+1	2.2	41



ผู้ป่วย	LYMP	ER	PR	HER	SIZE (cm)	AGE
61	-	-	-	+3	2.0	51
66	-	-	-	-	6.5	79
70	-	-	+2	+2	2.5	48
71	2	-	-	-	3.2	42
76	-	-	-	+3	3.0	40
77	+9	-	-	-	2.3	62
78	N	N	N	N	N	N
79	-	-	-	+3	14.3	54
82	-	-	-	+3	2.5	52
86	-	-	-	+2	2.7	84
88	+31	-	-	+3	0.7	45
89	+5	-	-	+3	2.0	46
90	N	N	N	N	N	N
93	+4	+3	+3	+1	3.5	55
96	-	+1	-	-	3.5	85
97	-	+1	+1	+2	3.0	49
98	-	-	-	-	1.5	44
99	+5	+3	+3	+3	5.0	58

Remark: LYM = การแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง
ER = โปรตีนตัวรับเอสโตรเจน
PR = โปรตีนตัวรับโปรเจสโทโรน
HER = โปรตีน HER-2
N = Not detected

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การหาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้แก่ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง โปรตีน ER, โปรตีน HER-2 โดยใช้สถิติ chi-square test ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยมีค่า *P-value* น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่ามีความความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับอัตราการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลืองในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในประเทศไทย

ตาราง 4 ตารางแสดงค่าทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

Parameter	Methylation status		P-value
	U n(%)	M n(%)	
Lymph node			0.02*
+	10(59)	7(41)	
-	19(90)	2(10)	
Estrogen receptor			0.16
+	12(67)	6(33)	
-	18(86)	3(14)	
Progesterone receptor			0.18
+	9(64)	5(36)	
-	20(83)	4(17)	
HER-2			0.61
+	16(57)	12(43)	
-	12(80)	3(20)	
Tumor size (cm.)			0.80
≤3	22(79)	6(21)	
>3	9(75)	3(25)	
Age			0.54
≤45	10(71)	4(29)	
>45	20(80)	5(20)	

* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

5.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *GSTP1* (Ile/Val genotype) กับ พยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ได้แก่ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลือง โปรตีนER, โปรตีน HER-2 และระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง โดยใช้สถิติ chi-square test ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยมีค่า *P-value* น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญโดยผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่าพบความหลากหลายของยีน *GSTP1* (Ile/Val genotype) มีความสัมพันธ์กับ Progesterone expression ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ตาราง 5 ตารางแสดงค่าทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *GSTP1* กับ พยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

Parameter	Polymorphism		P-value
	wild type n(%)	mutant n(%)	
Lymph node			0.43
+	14(82)	3(18)	
-	19(90)	2(10)	
Estrogen receptor			0.72
+	17(85)	3(15)	
-	16(89)	2(11)	
Progesterone receptor			0.04*
+	11(73)	4(27)	
-	12(92)	1(8)	
HER-2			0.87
+	21(86)	3(14)	
-	12(86)	2(14)	
Tumor size (cm.)			0.95
≤3	26(87)	4(13)	
>3	7(88)	1(12)	
Age			0.10
≤45	12(36)	21(64)	
>45	0(0)	5(100)	

* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

5.3 หาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับความหลากหลายของยีน *GSTP1* ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม โดยใช้สถิติ chi-square test ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยมีค่า *P-value* น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญโดยผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่าไม่มีความความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับความหลากหลายของยีน *GSTP1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในประเทศไทย

ตาราง 6 ตารางแสดงค่าทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-hypermethylation ของยีน *GSTP1* กับความหลากหลายของยีน *GSTP1* ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

Methylation status	Polymorphism		Odds ratio	P-value
	wild type n(%)	mutant n(%)		
U	26(87)	4(13)	0.06	0.69
M	9(82)	2(18)		

บทที่ 5

สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

Glutathione S-transferase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษและปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระของสารก่อมะเร็ง มีการศึกษาเป็นจำนวนมากที่ชี้ให้เห็นว่าการเกิด hypermethylation บริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์หรือที่เรียกว่าตำแหน่ง CpG-islands ของยีนนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ได้ (28,29) ขณะเดียวกันก็มีรายงานว่า การไม่แสดงออกของยีน *GSTP1* ในมะเร็งเต้านมนั้นเกิดจากภาวะ CpG-island hypermethylation ของยีนซึ่งพบประมาณร้อยละ 13-30 ของมะเร็งเต้านม (30,31) ในการวิจัยครั้งนี้เราได้ศึกษาหาความถี่ของการเกิด CpG-island hypermethylation จากตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจากจีน เนื้อที่ฝังพาราฟินและพบว่ามีความถี่ในการเกิด CpG-island hypermethylation ร้อยละ 26 ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยได้ทำการตรวจสอบยืนยันการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่เกิด methylation ดังกล่าว โดยวิธีการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

จากผลการวิจัยพบว่ามีความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมกับการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยซึ่งทำให้เราสันนิษฐานได้ว่าการเกิด CpG-island hypermethylation ของยีน *GSTP1* มีส่วนทำให้มะเร็งเต้านมมีความรุนแรงมากขึ้นซึ่งตรงกับผลงานวิจัยที่เคยรายงานมาแล้วทั้งในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวเอเชียและชาวตะวันตก (30,32) และเคยมีรายงานซึ่งตรงกันจากมะเร็งชนิดอื่นๆ ด้วยเช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก (33) มะเร็งรังไข่ (34) แต่ก็มียางานวิจัยรายงานว่า การเกิด CpG-island hypermethylation ของยีน *GSTP1* ไม่ได้เกี่ยวข้องแต่อย่างใดกับการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยทั้งในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวเอเชียและชาวตะวันตก (35)

นอกจากนี้จากการศึกษาการเกิดการแปรผันหลากหลายของยีน *GSTP1* (Ile105Val) ก็พบว่า มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพลดลง (18) แต่ก็ยังไม่มีรายงานว่า การเกิดการแปรผันหลากหลายของยีนนี้ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด (14, 36) และจากการศึกษาวิจัยครั้งก่อนของผู้วิจัยก็ได้รายงานแล้วว่า การเกิดการแปรผันหลากหลายของยีน *GSTP1* ไม่เกี่ยวข้องกับความถี่ในการเกิดมะเร็งเต้านมพบแต่เพียงว่าการเกิดการแปรผันหลากหลายของยีน *GSTP1* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับโปรตีน progesterone receptor (19) ซึ่งตรงกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าการเกิดการแปรผันหลากหลายของยีน *GSTP1* ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงและขณะเดียวกันการเกิด *GSTP1* hypermethylation จะ

เกี่ยวข้องหรือทำให้การแสดงออกของยีนนี้ลดลง ซึ่งมักพบในมะเร็งเต้านมที่มีการดำเนินของโรครุนแรง จากการศึกษาที่ผ่านมาดังกล่าวทำให้คาดว่าเกิดการแปรผันหลากหลายของยีน *GSTP1* น่าจะมีส่วนส่งเสริมหรือเกี่ยวข้องกับการเกิด *GSTP1* hypermethylation ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม แต่จากการศึกษาครั้งนี้ผลที่ได้พบว่าไม่มีความเกี่ยวข้องกันระหว่างการแปรผันหลากหลายของยีนและการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1* ซึ่งตรงกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาแล้วในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก (37)

ผลการศึกษารูปได้ว่ามีความถี่ของการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทยร้อยละ 26 และการเกิด hypermethylation นี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการแพร่กระจายสู่ต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยซึ่งสามารถเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงในการเกิดความรุนแรงของโรคมะเร็งเต้านมได้ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแปรผันหลากหลายของยีนและการเกิด hypermethylation ของยีน *GSTP1*

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บรรณานุกรม

1. Khuhaprema T, Srivatanakul P, Sriprung H et al. editors. **Cancer in Thailand. Vol VI**, 1998-2000. Bangkok; 2007.
2. Parkin D.M. Epidemiology of breast cancer: global pattern and trends. **Toxicol Lett** 1998; 102-103:227-234.
3. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP et al. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev** 1999; 8: 843-54.
4. Mitrunen K., Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer, the role of polymorphism gene involved in estrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat Res** 2003; 9-41.
5. มะเร็งเต้านม (2551) [online]. <http://www.thaiclinic.com/cabreast2.html>. (20 กรกฎาคม 2551)
6. Easton DF, Bishop DT, Ford D et al. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: result from 214 families. **Am J Hum Genet** 1993; 52: 678-701.
7. Smit G., Stanley LA., Dim E., et al. Metabolic polymorphism and cancer susceptibility. **Cancer Surv** 1995; 25: 27-65.
8. Ketterer B. Glutathione-S-transferase and prevention of cellular. **Free Radic Res** 1998; 28: 647-58.
9. Grmbsen M.J.A.L., Nagengast F.M., Katan M.B. et al. The glutathione Biotransformation system and colorectal cancer risk in humans. **Scand J Gastroenterol** 2001 (Suppl 234): 68-67.
6. Kang D. Genetic polymorphism and cancer susceptibility of breast cancer in Korean women. **J Biochem Mol Biol** 2003; 36: 28-34.
7. Kim SU, Lee KM, Park SK et al. Genetic polymorphism of Glutathione S-transferase P1 and breast cancer risk. **J Biochem Mol Biol** 2004; 37: 582-5.
8. Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **World J Gastroenterol** 2004; 10: 3389-93.
9. Cho HJ, Lee SY, Ki CS et al. . GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in the Korean population. **J Korean Med Sci** 2005; 20: 1089-92.

10. Gatedee J, Pakakassama S, Muangman S et al. Glutathione S-transferase P1 genotypes, genetic susceptibility and outcome of therapy in thai childhood acute lymphoblastic leukemia. **Asian Pac J Cancer Prev** 2007; 8: 294-6.
11. Vlaykova T, Miteva L, Gulubova M et al. Ile105Val GSTP1 polymorphism and susceptibility to colorectal carcinoma in Bulgarian population. **Int J Colorectal Dis** 2007; 22: 1209-15.
12. Strange R.C., Spiteri M.A. Ramachandran Sudarahan et al. Glutathione S-transferase family of enzyme. **Mutation Research** 2001; 482: 21-31.
13. Lisbeth E, Knudsen, Steffen H., Loft et al. Risk assessment: the importance of genetic polymorphism in man. **Mutat Res** 2001, 83-88.
14. Egan KM, Cai Q, Shu XO et al. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13: 197-204.
15. Mao GE, Morris G, Lu QY et al. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer. **Cancer Detect Prev** 2004; 28: 368-74.
16. Unlü A, Ates NA, Tamer L et al. Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. **Cell Biochem Funct** 2008 26, 643-647.
17. Samson M, Swaminathan R, Rama R, et al. Role of GSTM1 (Null/Present), GSTP1 (Ile105Val) and P53 (Arg72Pro) genetic polymorphisms and the risk of breast cancer: a case control study from South India. **Asian Pac J Cancer** 2007, 8, 253-7.
18. Allan JM, Wild CP, Robinson S et al. Polymorphism in Glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy – induced leukemia. **PNAS** 2001; 98: 11592-7.
19. Pongtheerat T, Tretrisool M, Purisa W. Glutathione S-transferase (GSTs) Polymorphism in breast cancer of Thai patients. **Asian Pac J Cancer Prev** 2009; 10: 127-32.
20. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R et al. Quantitation of GSTP1 methylation in nonneoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93: 1747–52.
21. Florl AR, Steinhoff C, Müller M et al. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. **Br J Cancer** 2004; 91: 985-94.

22. Chuang CK, Chu DC, Tzou RD et al. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma. **Cancer Detect Prev** 2007; 31: 59-63.
23. Chan QK, Khoo US, Chan KY et al. Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. **J Mol Diagn** 2005; 7: 8-16.
24. Zhanga YJ, Chena Y, Ahsana H et al. Silencing of glutathione S-transferase P1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters** 2005; 221: 135-43.
25. Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. **Clin Cancer Res** 2004; 10: 28-32.
26. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ et al. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. **Eur J Surg Oncol** 2008; 34: 734-8.
27. Lee JS. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. **Virchows Arch** 2007; 450:637-42.
28. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum Mol Genet** 2001; 10, 687-92.
29. Widschwendter M and Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. **Oncogene** 2002; 21, 5462-82.
30. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clin Cancer Res** 2005; 11, 2156-62.
31. Esteller M, Corn PG, Urena, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Res** 1998; 58, 4515-8.
32. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, et al. Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 100, 169-76.
33. Bernardini S, Miano R, Iori R, et al. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker? **Clin Chim Acta** 2004; 350, 181-8.
34. Chan QK, Khoo US, Chan KY, et al. Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. **J Mol Diagn** 2005; 7, 8-16.

35. Lee JS, Lo PK, Fackler MJ, et al. A comparative study of Korean with Caucasian breast cancer reveals frequency of methylation in multiple genes correlates with breast cancer in young, ER, PR-negative breast cancer in Korean women. **Cancer Biol Ther** 2007; 6, 1114-20.
36. Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, et al. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90, 512-8.
37. Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, et al (2002). I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2002; 11, 445-50.

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก

RESEARCH COMMUNICATION

Promoter Methylation and Genetic Polymorphism of Glutathione S-Transferase P1 Gene (GSTP1) in Thai Breast-cancer Patients

Tanett Pongtheerat^{1*}, Supparit Pakdeethai¹, Wichai Purisa², Sunanta Chariyalertsak², Songsak Petmitr³

Abstract

The GSTP1 gene encodes for a detoxification enzyme involved in protecting cells from carcinogens. In breast cancer, GSTP1 polymorphisms may produce lower effective enzyme detoxification properties and GSTP1 promoter hypermethylation may result in inactivation of GSTP1 expression. We therefore hypothesized an influence on progression of breast cancer. To study the effect of GSTP1 polymorphisms and CpG-island hypermethylation on GSTP1 promoter, PCR-RFLP and methylation-specific PCR techniques were used with 41 Thai breast-cancer patients. Associations between the codon 105 (A to G) genetic polymorphism, CpG-island hypermethylation, and clinico-pathological parameters were analyzed. GSTP1 hypermethylation was found in 26% of cases and the GSTP1 polymorphism in 14%. GSTP1 hypermethylation was significantly associated with breast cancer; lymph-node metastasis ($P = 0.02$) while GSTP1 polymorphism status significantly varied with progesterone receptor positivity ($P = 0.04$). No association was found between the GSTP1 polymorphism and methylation status. The results indicated that CpG-island hypermethylation of the GSTP1 promoter is associated with a biologically aggressive phenotype, but may not be related to the codon 105 (A to G) gene polymorphism in breast-cancer patients.

Keywords: Glutathione S-transferase P1 - CpG-island hypermethylation - genetic polymorphism - breast cancer

Asian Pacific J Cancer Prev, 12, 2731-2734

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy of women. In Thailand, the incidence is 20.9/100,000 population. Among Thai women, the incidence of breast cancer is now higher than cervical cancer (Khuhaprema et al., 2010). Many genetic alterations are involved in the development of breast cancer, such as mutation, deletion, gene polymorphism and CpG-island hypermethylation, leading to gene inactivation and affecting protein function.

Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) is in a superfamily of enzymes involved in the detoxification of reactive carcinogen metabolites. GSTP1 is an important anti-carcinogenic protein (Ramos-Gomez et al., 2001). A single nucleotide polymorphism at codon 105 (A to G) in exon5 of the GSTP1 gene causes the substitution of isoleucine with valine (Allan et al., 2001); the valine allele may affect the enzyme function and be associated with susceptibility to breast (Kim et al., 2004) and prostate cancers (Cairns et al., 2001).

The hypermethylation of the CpG islands located in the promoter region of genes may result in decrease gene expression, including GSTP1 (Lin et al., 2001). GSTP1

methylation is most commonly found in prostate, liver, and breast cancers (Esteller et al., 2001). Recent studies have reported that GSTP1 down-regulation in breast cancers is related to CpG-island hypermethylation (Parrella et al., 2004). In addition, breast cancers with GSTP1 CpG-island hypermethylation show an aggressive phenotype (Shinozaki et al., 2005), with a poor prognosis (Arai et al., 2006). Thus, we hypothesized that this GSTP1 polymorphism would support GSTP1 CpG-island hypermethylation and therefore significantly impact on clinicopathological parameters in Thai breast cancer cases.

This study used methylation-specific PCR to examine CpG-island hypermethylation of the GSTP1, and to determine GSTP1 gene polymorphism in breast-cancer patients by PCR-RFLP. The correlation between GSTP1 hypermethylation and GSTP1 polymorphism was observed, and the association between GSTP1 hypermethylation and gene polymorphism with the clinicopathological features of breast cancers was analyzed by Chi-square test (significance set at P -value < 0.05). The results of this research may be used to assess the correlation of this gene and the incidence of breast cancer among Thai patients.

¹Unit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Patumthani, ²Research Division, National Cancer Institute of Thailand, ³Department of Molecular Tropical Medicine and Genetics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand *For correspondence: dtanett@yahoo.com

Materials and Methods

Sample collection and DNA isolation

DNA samples were extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, breast-cancer samples obtained from 41 Thai breast-cancer patients. The samples were collected from the National Cancer Institute of Thailand. DNA was isolated as previously described (Chariyalertsak et al., 2007).

Methylation analysis

Genomic DNA sample was subjected to sodium bisulfite modification using an EZ DNA Methylation Gold kit (Zymo Research, Orange, CA). Methylated cytosine and unmethylated cytosine in the GSTP1 alleles were detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and unmethylation-specific polymerase chain reaction (USP). The primers used for the amplification of methylated alleles were 5'-TTCGGGGGTAGCGGTCGTC-3' and 5'-GCCCCAATACTAAATCACGACG-3'. The primers used for the amplification of unmethylated alleles were 5'-GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3' and 5'-CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3' (Gonzalzo et al., 2003).

DNA was amplified by PCR in a 25 µl mixture containing 20 pmol primer, 5 µl of 10x buffer, 4 µl 1.25 mM of dNTPs, 2.5 mM of MgCl₂, 1U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 2-4 µl of bisulfite template DNA. Following initial denaturation at 94°C for 5 minutes, amplification conditions comprised strand separation at 94 °C for 1 min; the primer annealing temperature used for MSP and USP was 64°C for 1 min, polymerization at 72°C for 1 min, 40 PCR cycles were conducted, with a final elongation step of 72°C for 5 minutes. Universal methylated and unmethylated human DNA standard were used as positive and negative controls for the methylated GSTP1 alleles (Zymo Research, Orange, CA). PCR products were observed on 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide staining. Amplification resulted in a 93 bp band for methylated alleles and 97 bp band for unmethylated alleles, visualized by ethidium bromide staining.

DNA sequencing analysis

Direct bisulfite DNA sequencing of the PCR product using methylation and unmethylation-specific primers were conducted using a thermal sequencing system (Bio Basic Inc., Canada).

PCR and RFLP detection of GSTP1 polymorphism

PCR primers for the GSTP1 5' region (5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'), and the 3' region (5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3'), were used to amplify a 176 bp fragment. DNA was PCR-amplified in a 50 µl mixture containing 20 pmol primer, 5 µl of 10x buffer, 8 µl 1.25 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, 2.5 U of Taq polymerase and 100 ng of template DNA. Following initial denaturation at 94°C for 5 minutes, amplification conditions comprised strand separation at 94 °C for 30 seconds, primer annealing at 55°C for 30 seconds, polymerization at 72°C for 30 seconds, 30 PCR cycles

were performed, with a final elongation step of 72°C for 5 minutes. The amplification band was visualized by ethidium bromide staining (Jerónimo et al., 2002).

The exon 5 polymorphic site in the GSTP1 locus (Ile-105-Val) was detected by restriction fragment length polymorphism of the PCR product (PCR-RFLP). The A to G polymorphism of GSTP1 introduces a restriction site recognized by the Alw26I (BsmA1) restriction enzyme. The PCR products are digested with 1 U Alw26I in 20 µl volume for 18 h at 37°C, which results either in retention of the 176 bp product or complete digestion to 91 bp and 85 bp fragments corresponding to individuals homozygous for the Ile or Val alleles, respectively. The presence of all three fragments corresponds with individuals heterozygous at codon 105. Different detected alleles were separated on 3.5% agarose gel, and visualized by ethidium bromide staining.

Statistical analysis

The association between GSTP1 polymorphism and methylation status, as well as any correlation between clinico-pathological parameters (lymph node, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER-2, tumor size, and age at diagnosis) of the patients with GSTP1 polymorphism and methylation status were examined by Chi-square test. A P-value < 0.05 was considered significant.

Results

Methylation analysis

The GSTP1 methylation status was analyzed by methylation-specific PCR technique for 41 breast-cancer patients' DNA samples (Figure 1). Eleven (26%) samples were positive for methylation status and 30 (74%) negative for unmethylation status. The methylation study was confirmed by DNA sequencing (Figure 2). Completely methylated(CG) sites were observed in sample 5, with no

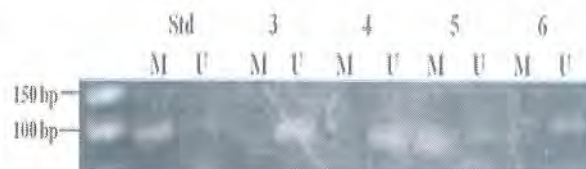


Figure 1. MSP of GSTP1 in Breast-cancer Tissues were Detected by 2.0% Agarose Gel and Visualized by Ethidium Bromide Staining. Universal methylated human DNA standard (Std) as a positive control; M, methylated; U, unmethylated

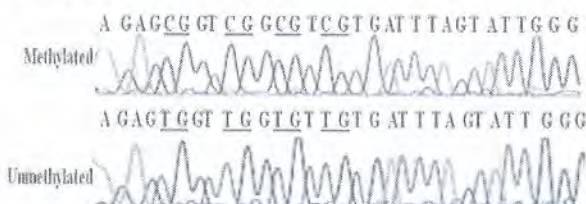


Figure 2. Bisulfite DNA Sequencing of Methylated (top), Unmethylated (bottom) Samples. There was a "C" peak and "T" peak at the CpG sites in methylated and unmethylated samples, respectively



Figure 3. PCR-RFLP product for GSTP1 was detected by 2.0% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining; lane 1, 4 are heterozygous genotype(C/T), lane 2 is homozygous mutant genotype (T/T), lane 3 is wild homozygous genotype (C/C)

Table 1. GSTP1 Methylation Status and Clinico-Pathological Parameters of Breast- Cancer Patients

Parameter	Methylation status		P-value *significant
	U (%)	M (%)	
Lymph node			0.02*
+	10(59)	7(41)	
-	19(90)	2(10)	
Estrogen receptor			0.16
+	12(67)	6(33)	
-	18(86)	3(14)	
Progesterone receptor			0.18
+	9(64)	5(36)	
-	20(83)	4(17)	
HER-2			0.61
+	16(57)	12(43)	
-	12(80)	3(20)	
Tumor size (cm.)			0.80
<3	22(79)	6(21)	
>3	9(75)	3(25)	
Age			0.54
≤45	10(71)	4(29)	
>45	20(80)	5(20)	

Table 2. GSTP1 Gene Polymorphism and Clinico-Pathological Parameters of Breast- cancer Patients

Parameter	Polymorphism		P-value *significant
	wild type n(%)	mutant n(%)	
Lymph node			0.43
+	14(82)	3(18)	
-	19(90)	2(10)	
Estrogen receptor			0.72
+	17(85)	3(15)	
-	16(89)	2(11)	
Progesterone receptor			0.04*
+	11(73)	4(27)	
-	12(92)	1(8)	
HER-2			0.87
+	21(86)	3(14)	
-	12(86)	2(14)	
Tumor size (cm.)			0.95
<3	26(87)	4(13)	
>3	7(88)	1(12)	
Age			0.10
≤45	12(36)	21(64)	
>45	0(0)	5(100)	

Table 3. GSTP1 Gene Polymorphism and Methylation Status Among Breast-cancer Patients

Methylation status	Polymorphism		Odds ratio	P-value
	Wild type n(%)	Mutant n(%)		
U	26(87)	4(13)	0.06	0.69
M	9(82)	2(18)		

MSP the CpG sites were completely unmethylated (TG) in sample 3. The correlations between GSTP1 methylation status and patients' clinico-pathological parameters are shown in Table 1. Patients' methylation status was significantly associated with lymph-node metastasis ($P = 0.02$), whereas no significant differences were found for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER-2, tumor size, or age at diagnosis.

RFLP Detection of GSTP1 genes polymorphisms

GSTP1 genetic polymorphisms were detected by PCR-RFLP technique; the results showed 3 types of polymorphism among breast-cancer patients (Figure 3). The overall frequency of mutant GSTP1 among the cases was 14%. The association between GSTP1 genetic polymorphism and patients' clinico-pathological parameters is shown in Table 2. The results showed that GSTP1 polymorphisms were only significantly associated with progesterone receptor ($P = 0.04$). No statistically significant correlation was observed between GSTP1 polymorphisms and methylation status (Table 3).

Discussion

Glutathione S-transferase is a detoxification enzyme that protects cells from the reactive metabolites of carcinogens. Several studies have indicated that hypermethylation of the CpG-islands located in the GSTP1 promoter region are involved in carcinogenesis (Baylin et al., 2001; Widschwendter and Jones 2002). It has been reported that the silencing of GSTP1 gene expression in breast cancer is induced by CpG-island hypermethylation, observed in 13-30% of breast cancers (Esteller et al., 1998; Shinozaki et al., 2005). In the present study, we investigated the frequency of GSTP1 CpG-island hypermethylation using formalin-fixed, paraffin-embedded breast-cancer samples, and found that 26% of patients showed CpG-island hypermethylation; we confirmed the methylated nucleotides by DNA sequencing technique.

GSTP1 hypermethylation was found to be significantly associated with lymph-node metastasis. These observations indicated that breast tumors with GSTP1 CpG-island hypermethylation may possess have a biologically aggressive phenotype, as suggested in previous studies that reported this condition in Asian and Caucasian breast cancers (Shinozaki et al., 2005; Arai et al., 2006), and other cancers, such as prostate (Bernardini et al., 2004) and endometrial cancer (Chan et al., 2005). However, some research reports have concluded that GSTP1 hypermethylation was not associated with lymph-node metastasis in breast cancers of Asian and Caucasian women (Lee et al., 2007).

GSTP1 (Ile105Val) polymorphism may affect the function of enzymes and decreased enzyme activity (Allan et al., 2001). No previous studies showed that GSTP1 polymorphism was associated with an elevated risk of breast cancer (Helzlsouer et al., 1998; Egan et al., 2004). Our previous study reported that GSTP1 polymorphism was unrelated to increased risk of breast cancer, but found a relationship between GSTP1 genotype and progesterone

receptor protein (Pongtheerat et al., 2009). These results agreed with the results of the current study, which showed a relationship between GSTP1 genotype and progesterone receptor (P = 0.04).

Previous findings indicated that, GSTP1 polymorphism was associated with decreased protein function and that GSTP1 hypermethylation correlated with lack of protein expression, and was found in aggressive-phenotype breast cancer. Thus, it was suspected that the polymorphism may be promoted or linked with GSTP1 hypermethylation status. However, the results of this study showed no association between GSTP1 hypermethylation and GSTP1 polymorphism, agreeing with a previous reported on prostate cancer (Jerónimo et al., 2002).

In conclusion, it was found that 26% of Thai breast cancers had GSTP1 CpG-island hypermethylation. This hypermethylation is associated with lymph-node metastasis, and may be used as an aggressive biological marker in breast cancer. No association was found between GSTP1 hypermethylation and GSTP1 (Ile105Val) polymorphism.

Acknowledgements

Thank to the Rangsit University Research Fund and the Faculty of Science, Rangsit University, Thailand.

References

- Allan JM, Wild CP, Rollinson S, et al (2001). Polymorphism in Glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *PNAS*, **98**, 11592-7.
- Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, et al (2006). Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, **100**, 169-76.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*, **10**, 687-92.
- Bernardini S, Miano R, Iori R, et al (2004). Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker? *Clin Chim Acta*, **350**, 181-8.
- Cairns P, Esteller M, Hennan JG, et al (2001). Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res*, **7**, 2727-30.
- Chan QK, Khoo US, Chan KY, et al (2005). Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. *J Mol Diagn*, **7**, 8-16.
- Chariyalertsak S, Purisa W, Thisuphakorn P, et al (2007). Real-time quantitative PCR analysis of amplified DNA on chromosomes 4p15.2 and 6q23-24 from formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev*, **8**, 561-6.
- Egan KM, Cai Q, Shu XO, et al (2004). Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**, 197-204.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, **61**, 3225-9.
- Esteller M, Corn PG, Urena, et al (1998). Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*, **58**, 4515-8.
- Gonzalzo ML, Pavlovich CP, Lee SM, et al (2003). Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res*, **9**, 2673-7.
- Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, et al (1998). Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 512-8.
- Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, et al (2002). I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 445-50.
- Khuhaprema T, Srivatanakul P, Attasara P, et al (eds.) (2010). Cancer in Thailand. Vol V, Bangkok, Bangkok medical publisher, National Cancer Institute.
- Kim SU, Lee KM, Park SK, et al (2004). Genetic polymorphism of Glutathione S-transferase P1 and breast cancer risk. *J Biochem Mol Biol*, **37**, 582-5.
- Lee JS, Lo PK, Fackler MJ, et al (2007). A comparative study of Korean with Caucasian breast cancer reveals frequency of methylation in multiple genes correlates with breast cancer in young, ER, PR-negative breast cancer in Korean women. *Cancer Biol Ther*, **6**, 1114-20.
- Lin X, Tascilar M, Lee WH, et al (2001). GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol*, **159**, 1815-26.
- Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, et al (2004). Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clin Cancer Res*, **10**, 5349-54.
- Pongtheerat T, Tretrisoo M, Purisa W (2009). Glutathione s-transferase polymorphisms in breast cancers of Thai patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, **10**, 127-32.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, et al (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3410-5.
- Shinozaki M, Hoon DS, Ginliano AE, et al (2005). Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res*, **11**, 2156-62.
- Widschwendter M and Jones PA (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, **21**, 5462-82.