

รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่
สัญญาเลขที่ BRG/03/2540

โครงการ:
การศึกษาการทำงานของทีโลเมอเรสในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็ง
และเนื้อเยื่อมะเร็งแบบสความัส

Title:
Study of Telomerase Activity in Premalignant and
Malignant Lesions of Squamous Cell Carcinoma

โครงการ : การศึกษาการทำงานของทีโลเมอร์เรสในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็ง และเนื้อเยื่อมะเร็งแบบสความัส

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของโครงการนี้เพื่อที่จะศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรส และ/หรือ ไวรัส ฮิวแมนแพปพิโลมา (HPV) ในเนื้อเยื่อบุผิวแบบสความัสที่ปกติ ไม่รุนแรง ก่อนเกิดมะเร็งและมะเร็ง โดยเฉพาะจากช่องปากและปากมดลูก เอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสถูกพบว่าแสดงออกใน 80-90 % ของมะเร็ง ในขณะที่ประมาณ 50% ในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็ง ขณะที่เนื้อเยื่อบุผิวปากมดลูกพบการติดเชื้อ HPV ได้บ่อย การติดเชื้อของไวรัสนี้พบได้น้อยในเนื้อเยื่อของช่องปากของการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามความถี่ของการพบการทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสไม่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม HPV บวกและลบ ที่น่าสนใจคือการแสดงออกของทีโลเมอร์เรสพบได้ ถึง 46% ในเนื้อเยื่อไม่รุนแรงของปากมดลูกโดยไม่ขึ้นกับการติดเชื้อ HPV และนอกจากนี้ยังพบในไลเคนพลาเนียในช่องปากถึง 70% โดยสรุปเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสน่าจะมีความสำคัญในเนื้อเยื่อพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบุผิวแบบสความัสทั้งปากมดลูกและช่องปาก โดยแบบแรกพบในเนื้อเยื่อพยาธิสภาพที่ไม่รุนแรง ในขณะที่แบบที่ 2 พบมีความสัมพันธ์กับการเกิดและพัฒนาของมะเร็ง โดยพบทำงานในระยะท้าย ๆ ของการเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอน

การศึกษาทีโลเมอร์เรสเพื่อเติมอีก 2 เรื่องคือในครรภ์ใช้ปลาอุกและน้ำในช่องท้อง การศึกษานี้เพื่อจะพิสูจน์ว่าการทำงานของเอ็นไซม์นี้สามารถตรวจพบและนำไปใช้ทางการวินิจฉัยทางคลินิกได้หรือไม่ การศึกษาในครรภ์ใช้ปลาอุกพบการแสดงออกของทีโลเมอร์เรสให้ผลบวก 57% แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามการศึกษาน้ำในช่องท้องอาจนำไปใช้ทางคลินิกได้ พบว่าการตรวจการทำงานของทีโลเมอร์เรสให้ผลไวกว่าการตรวจเซลล์ตามปกติ การทำงานของทีโลเมอร์เรสพบ 76% ในน้ำในช่องท้องที่เกิดจากมะเร็งในขณะที่การตรวจพยาธิวิทยาของเซลล์พบเพียง 40%

คำสำคัญ เอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรส การเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอน มะเร็งเซลล์สความัส
ไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมา

Title: Study of Telomerase Activity in Premalignant and Malignant lesions of Squamous Cell Carcinoma

Abstract

The purpose of this project was to elucidate the correlation between telomerase activity and/or human papillomavirus (HPV) in normal, benign, premalignant and malignant squamous epithelial lesions, especially derived from the oral cavity and the cervix. Telomerase was found expressed at a 80-90% frequency among invasive cancers, compared with a mere 50% prevalence in premalignant lesions. Whereas cervical lesions were frequently infected with HPV, in oral lesions the virus was rarely identified in the present study. Nevertheless, the frequency of telomerase activity did not exhibit any difference between HPV positive and negative groups. Interestingly, telomerase expression was detectable in 46% of benign cervical lesions regardless of the presence of HPV and moreover, 70% of oral lichen planus were also positive. In conclusion, telomerase may play two different roles in squamous epithelial lesions, both cervical and oral. The first one would be expressed in benign lesions, whereas the second one would be associated with cancer development and hence activated during the late stage of multistep carcinogenesis.

Additional two telomerase studies were performed in hydatidiform mole and ascites. This is to prove whether the activity was detectable and applicable for clinical diagnosis. Study in moles showed positive telomerase expression in 57% of cases but no obvious clinical correlation identified. Nevertheless, study in ascites indicated future clinical application. Higher sensitivity of TRAP assay over routine cytology was noticed. Telomerase activity was found in 76% of malignant associated ascites while cytology was positive only 40%.

Key Words: Telomerase, Multistep Process Carcinogenesis, Squamous Cell Cancer, Human Papillomavirus

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. บทนำ	4
2. วิธีการศึกษา	6
3. ผลการทดลองและบทวิจารณ์	9
4. หนังสืออ้างอิง	11
5. ผลงานวิจัย (output)	12
6. ภาคผนวก	13

บทนำ

ในปี 1994 Kim, N.M. และคณะได้คิดค้นวิธีการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ telomerase โดยวิธี PCR เรียกว่า Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) และได้ใช้วิธีการนี้ตรวจสอบเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดต่าง ๆ พบว่า telomerase เป็นเอนไซม์ที่จะทำงานในเนื้อเยื่อมะเร็งเกือบทุกชนิดโดยพบประมาณ 90% ของเนื้อเยื่อมะเร็งทั้งหมดแต่จะไม่พบการทำงานของเอนไซม์นี้ในเนื้อเยื่อปกติเลยยกเว้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์ต้นแบบ (stem cells) เช่น ลูกอ้นทะ รังไข่ เป็นต้น¹ TRAP จึงเป็น universal marker ที่สำคัญของการตรวจเนื้อเยื่อมะเร็ง นอกจากนี้การที่เซลล์ปกติจะกลายเป็มะเร็งในกระบวนการกลายพันธุ์ในลักษณะหลายขั้นตอน (multistep process) นั้น telomerase น่าจะมีบทบาททั้งในทางตรงและทางอ้อม จึงเป็นที่น่าสนใจว่า การกระตุ้นการทำงานของ telomerase เกิดขึ้นได้อย่างไร มีกระบวนการอย่างไร มีปัจจัยอะไรเกี่ยวข้อง เมื่อไรและจะทำให้เกิดผลเช่นใด

Telomerase เป็นเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย RNA และโปรตีนที่มีหน้าที่สร้าง telomere (telomere เป็นส่วนปลายของโครโมโซมซึ่งประกอบด้วย การเรียงตัวแบบซ้ำ ๆ ของกรดนิวคลีอิก TTAGGG)² โดยปกติเซลล์ทั่วไป (ซึ่งไม่มีการทำงานของ telomerase) จะแบ่งตัวได้ในจำนวนครั้งที่มีการเพิ่มจำนวนของสาย DNA จะทำให้เกิด end replication problem คือส่วนต้นของสาย DNA ที่เกิดจาก DNA replication จะสร้างไม่ได้ทำให้ DNA สายใหม่ขาดส่วนปลาย ดังนั้นเมื่อเซลล์ปกติแบ่งตัวหลาย ๆ ครั้งก็จะมี telomere หรือส่วนปลายของโครโมโซมสั้นลงจนเกิดการสูญเสียความสามารถในการรักษาสสมดุลในการแบ่งเซลล์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ (aging) ในทางตรงกันข้ามเซลล์ที่มีการทำงานของ telomerase เช่น เซลล์มะเร็ง และเซลล์ต้นแบบจะสามารถแบ่งตัวได้โดยไม่จำกัด เนื่องจาก telomerase จะทำให้ telomere ยาวขึ้นเป็นการทดแทน end replication problem ภาวะที่เซลล์สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่มีขีดจำกัดและยังส่งผลทางอ้อมต่อการเพิ่มจำนวนของการกลายพันธุ์ในเซลล์นั้น ๆ มีการพัฒนาของมะเร็งเกิดขึ้น^{3,4}

จากการศึกษาถึงกระบวนการเกิดและพัฒนาของมะเร็งเป็นที่ยอมรับกันว่า การเกิดและพัฒนาของมะเร็งนั้นเกิดจากการสะสมของการกลายพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์นั้นจะเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว (clonality) และทำให้คุณสมบัติต่าง ๆ ของเซลล์เปลี่ยนไป เซลล์เพียงเซลล์เดียวที่เกิดมีการกลายพันธุ์นั้นจะแบ่งตัวให้เซลล์ลูกหลานที่จะได้รับการกลายพันธุ์ครั้งต่อไป ลักษณะการกลายพันธุ์ตามลำดับนี้เรียกว่าการกลายพันธุ์อย่างเป็นขั้นเป็นตอน (multistep process) ซึ่งจะสะสมการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ ไว้ ทำให้คุณสมบัติต่าง ๆ ของเซลล์เปลี่ยนไป เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การพัฒนาไปเป็นเซลล์เฉพาะ (differentiation) การเกิดภาวะไม่ตาย และการยับยั้งภาวะโปรแกรมการตาย (inhibition of apoptosis) ลักษณะ multistep process ของกระบวนการเกิดมะเร็งนั้นสังเกตได้จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ จากเนื้อเยื่อปกติเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็ง (pre-malignant) และเนื้อเยื่อมะเร็งตามลำดับ (malignant lesion) นอกจากนี้ multistep process ยังเป็นกระบวนการต่อเนื่องในการพัฒนาของมะเร็งจาก Stage น้อย เช่น Stage I ไปสู่มะเร็งในระยะท้ายๆ อีกด้วย⁵

เนื่องจากภาวะไม่ตายเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของมะเร็งการศึกษาถึงกระบวนการของภาวะนี้จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อความเข้าใจพื้นฐานต่อกระบวนการเกิดและพัฒนาของมะเร็ง ความรู้

ความเข้าใจนี้ก็น่าที่จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการพัฒนาการวินิจฉัยดูแลรักษาผู้ป่วยในอนาคต คำตามพื้นฐานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับภาวะนี้และเอนไซม์ telomerase ยังมีอยู่อีกมาก เช่น การกระตุ้น telomerase เกิดขึ้นได้อย่างไร เกิดขึ้นเมื่อใดในกระบวนการ multistep process มีภาวะใดบ้างที่เป็นตัวกำหนดการทำงานของเอนไซม์ telomerase ยังมีอยู่อีกมาก และ เมื่อเกิดภาวะไม่ตายแล้วจะส่งผลที่แตกต่างจากเนื้อเยื่อที่ไม่มีภาวะนี้ในการเกิดและพัฒนาจะเป็นอย่างไรร สำหรับการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ telomerase ว่าเกิดขึ้นในระยะใดในการเกิดมะเร็งแบบเป็นขั้นเป็นตอนโดยใช้การศึกษา squamous cell cancer ของมนุษย์เป็นแบบ และยิ่งศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการทำงานของ telomerase กับ สารก่อมะเร็งโดยเฉพาะซึ่งเป็นสาเหตุของมะเร็ง ลักษณะทางพยาธิและลักษณะทางคลินิก

Squamous cell carcinogenesis เป็นต้นแบบที่ดีในการศึกษากระบวนการเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอน เพราะ เป็นเนื้อเยื่อที่พบเกิดมะเร็งได้บ่อยและตรวจพบเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งได้ด้วยโดยเฉพาะมะเร็งปากมดลูก มะเร็งในช่องปาก เนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งในปากมดลูก (cervical intraepithelial neoplasia) ซึ่งพบจากการสืบหามะเร็งด้วยการตรวจแบบ papsmea⁵ หรือเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งในช่องปาก เช่น oral leukoplakia⁷ นอกจากนี้ถึงแม้มะเร็งทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีพยาธิสภาพที่คล้ายคลึงกัน พบว่าสาเหตุการเกิดจะต่างกันโดยพบว่ามะเร็งปากมดลูกจะเกิดจากการติดเชื้อ Human Papilloma Virus (HPV) มากกว่า 90%⁸ ในขณะที่มะเร็งในช่องปากพบเกิดจากการติดเชื้อ HPV ได้บ้าง 20-30% แต่โดยส่วนใหญ่จะพบว่าเกิดจากสารก่อมะเร็งอื่น ๆ เช่น บุหรี่ หรือเหล้า⁹ นอกจากนี้ทั้งในช่องปากและปากมดลูก จะพบพยาธิสภาพอื่น ๆ ได้อีกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งค่อนข้างน้อย เช่น benign polyp, lichen planus, chronic inflammation ฯลฯ ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในเนื้อเยื่อของช่องปาก และปากมดลูก เมื่อดูความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพ และกระบวนการเกิดมะเร็ง

เนื่องจากเอนไซม์ telomerase เป็น universal marker ของการตรวจหามะเร็ง โครงการวิจัยนี้จึงได้ขยายการศึกษาวิจัยเพื่อ ศึกษาว่าสามารถใช้การตรวจการทำงานของ telomerase ในการวินิจฉัยโรคได้หรือไม่¹⁰ โดยศึกษาถึง การทำงานของ telomerase ในควาร์กใส่ปาลูก และ telomerase ในเซลล์ของน้ำในช่องท้อง

วิธีการศึกษา

Specimens

Samples were, after obtained, snap frozen, and stored at -80°C for subsequent TRAP analysis. Histologic examinations of each types of all samples were performed by one pathologist.

TRAP Assay

TRAP was performed as previously described^{1,11}. Briefly, each sample was first centrifuged and washed in 500 μ l ice-cold PBS, then homogenized in 20–200 μ l of ice-cold CHAPS lysis buffer according to the sample size with a manual homogenizer. The collagenase treated specimens were washed with ice-cold PBS and treated with lysis buffer without homogenization. After 30 minutes incubation on ice, the lysate was centrifuged at 14,000 $\times$ g for 30 minutes at 4°C. The supernatant was divided into aliquots, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis. Epstein-Barr virus-transformed human lymphocytes (American Type Culture Collection Cell Line, B958) were used as positive controls.

An aliquot of 1 μ g of TS substrate primer was end-labeled in a 10 μ l reaction mixture with 10 μ Ci [γ -³²P]-dATP (3000 Ci/mmol). The PCR-based assay was carried out in a 25- μ l reaction mixture containing 1XTRAP buffer (17), 50 mM dNTPs, 0.1 μ g of labeled TS primer, 0.005 μ mol TSNT internal control, 0.005 μ g of NT primer, 2 u of Taq polymerase, and DEPC H₂O in a 0.5 ml tube, containing 0.1 μ g ACX sealed at the bottom by a wax barrier (25).

After a 10-minute incubation at 23°C to allow telomerase-mediated extension of the TS primer, the reaction mixture was subjected to 31 PCR cycles at 94°C for 1 minute, 50°C 1 minute, and 72°C for 1 minute. Aliquots (5 μ l) of the PCR products were analyzed on an 8% non-denaturing poly-acrylamide gel. The gel was subsequently exposed to a phosphorus screen and the bands were visualized on a PhosphorImager using Image Quant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Duplicate assays were performed on all samples with RNAase pretreatment at a final concentration of 0.05 mg/ml for 10 minutes at room temperature.

The samples exhibiting negative internal control were subjected to 2-step TRAP (Shay, personal communication). The first part consisted of TS primer extension in a 25- μ l reaction mixture containing 1XTRAP buffer, 50 mM dNTPs, 0.1 μ g of TS, and DEPC H₂O. The reaction mixture was incubated in the thermocycler at 23°C for 15 min. The product was then subjected to standard phenol-chloroform DNA extraction and ethanol precipitation. The precipitate was dissolved in DEPC H₂O and amplified in the second round. The second round reaction mixture was identical to the described TRAP, but omitting the NT primer, TSNT internal control and incubation at 23°C for 15 min. The amplification cycle was the same as in the original protocol.

HPV PCR

Pellets of cervical or head and neck samples derived from the previous extraction with CHAPS lysis buffer were subjected to standard DNA extraction¹². The DNA was used for subsequent HPV PCR. Control HPV DNA used in the amplification was obtained from Hela cell lines.

L1 and E6 amplification were performed as previously described^{13,14} with 1 μ l of each specimen in a 50- μ l reaction mixture. Each L1 amplification reaction contained 25 pmol each of the L1 degenerate primers MY11 and MY09, 2.5 pmol each of β globin primers GH20 and PC04. The E6 reactions contained 5 pmol of WD72, WD66, and WD154, 20 pmol of WD67 and WD76. Both reactions were performed in a buffer containing 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 4 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, and 1.25 u of Taq polymerase and subjected to 40 amplification cycles. Each cycle was performed at 95°C for 1 minute, at 55°C for 1 minute, and at 72°C for 2 minutes. An additional 5-minute final elongation cycle at 72°C was included. The PCR reactions were then separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualized under UV illumination after ethidium bromide staining.

Dot Hybridization Of PCR Products

L1 and E6 type specific probes and consensus L1 probes were used for HPV typing. Positive controls of HPV type 6, 11, 16, 18, 31, and 33 from each PCR amplification were included. Products obtained from each PCR reaction were heated to 95°C and thereafter 1 volume of 20 x SSC was added. Two microliters of aliquots were applied to a Hybond-N+® nylon membrane (Amersham, Life Science) pre-wetted in denaturing solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH). The membranes were transferred to a filter paper soaked in neutralizing solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH7.2, 0.001 M EDTA) for 1 minute. The membranes were air-dried at room temperature, soaked in 0.4 M NaOH for 20 minutes for fixation, and washed with 5 x SSC. Prehybridization at 65°C for 1 hour was carried out using 6 x SSC, 5 x Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100 μ g of single stranded sheared salmon sperm DNA per milliliter. Replicate membranes were separately hybridized with denatured ³²P-labeled, type specific probes in pre-hybridizing solution for 1 hour at 55°C. Probes WD170 required hybridization at 45°C. Filters were rinsed briefly in 2 x SSC and 0.1% SDS at room temperature and then twice for 10 minutes at 45°C (WD170), 50-52°C (WD132, RR1, and RR2), 55-56°C (WD103, WD165, and WD166), 56-57°C (consensus L1, MY12/13, WD126, WD128, MY16, and WD133/134), or 58-59°C (MY14 and WD74). The membranes were subjected to

autoradiography using a Kodak XAR-5 film. Results of L1 and E6 dot blots were scored independently. Duplicate filters were prepared for all specimens.

Data And Statistical Analysis

Data in each part, histology, TRAP assay, HPV PCR and typing, were collected in a double-blind fashion until further analysis. The chi-square test was used to compare the results obtained from telomerase analysis with those of HPV and pathological parameters.

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การศึกษาการทำงานของ telomerase ในเซลล์เนื้อเยื่อแบบสความัส

การศึกษานี้แบ่งการศึกษาเป็น 2 เรื่องใหญ่ ๆ คือการศึกษาเปรียบเทียบพยาธิสภาพในช่องปาก และปากมดลูก สำหรับการศึกษาในช่องปากนั้นตีพิมพ์ผลงานวิจัยใน Mutirangura และคณะ Cancer Research 56, 3530-3, 1996 (Out Put #1) และ Thongprasom คณะ J Oral Pathol Med 27,9339-9,1998 (Out Put #3) ส่วนการศึกษาในปากมดลูกตีพิมพ์ใน Mutirangura และคณะ British Journal of Cancer 78,933-9,1998 (Out Put #2)

โดยสรุปการศึกษา ในช่องปากนั้นเปรียบเทียบการทำงานของ telomerase ใน oral lichen planus (OLP), oral leukoplakia (OL) และ head & neck squamous cell cancer (HNSCC) โดยศึกษา OLP 20 ราย OL 26 รายและ HNSCC 16 ราย นอกจาก telomerase และยังศึกษาหา HPV ด้วยแต่พบ HPV ใน HNSCC เพียง 1 ราย (unpublished)

OLP เป็นพยาธิสภาพในลักษณะมีอาการอักเสบในช่องปากที่มีลักษณะเฉพาะในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดของ OLP ชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่ามีประมาณ 0.4 - 2.6% ของ OLP จะสามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้จากการศึกษา telomerase พบว่า สามารถตรวจพบการทำงานของ telomerase ในระดับต่ำได้ใน OLP 14 จาก 20 รายโดยไม่ขึ้นกับว่าเป็นพยาธิสภาพแบบ erosive หรือ atrophic (ตารางที่ 1 ของ Out Put #3) ดังนั้น OLP สามารถตรวจพบการทำงานของ telomerase ได้แต่ไม่บ่งบอกถึงความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง การที่สามารถตรวจพบ telomerase ใน OLP มีลักษณะคล้ายกับการตรวจพบการทำงานของ telomerase ในผิวหนังที่อักเสบ ซึ่งอาจจะมีความสัมพันธ์กับการแบ่งตัวที่รวดเร็วหรือการอักเสบของเนื้อเยื่อนั้น ๆ

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งในช่องปากกับการทำงานของ telomerase พบว่า telomerase สามารถตรวจพบได้ใน 38% ของ hyperplasia OL, 83% ของ dysplastic OL และ 87.5% ของ HNSCC (ตารางที่ 2 ของ Out Put #1) ดังนั้น telomerase จะพบมีความสัมพันธ์กับขบวนการเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอนของ HNSCC และสามารถใช้เป็น marker ในการสืบหาหรือบ่งบอกโอกาสในการเกิดมะเร็ง HNSCC

สำหรับการศึกษาพยาธิสภาพต่าง ๆ ในปากมดลูกนั้นศึกษารวมทั้งหมด 103 ราย โดยศึกษาเปรียบเทียบ พยาธิสภาพ การทำงานของ telomerase และการติดเชื้อรวมทั้งชนิดของ HPV (ตารางที่ 1,2 ของ Out Put #2) โดยพบว่าสามารถพบ telomerase ในระดับต่ำได้ 1 ใน 9 รายของเนื้อเยื่อปกติ และ 46% ในเนื้อเยื่อ benign เมื่อเปรียบเทียบเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งทั้ง

squamous intraepithelial lesions (SILs) ทั้ง low grade และ high grade กับเนื้อเยื่อมะเร็งทั้ง microinvasive (MIC) และมะเร็งแบบสความัส พบว่า การทำงานของ telomerase สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 40% ใน high grade SILs ไปเป็น 83% ใน MIC ดังนั้น telomerase จึงมีความสัมพันธ์ในการเกิดมะเร็งปากมดลูกนอกจากนี้ไม่พบมีความแตกต่างของการทำงานของ telomerase ในกลุ่มที่ติดเชื้อ HPV และไม่ติดเชื้อในพยาธิสภาพทุกชนิด แสดงว่าถึงแม้การทำงานของยีน E6 ในเซลล์ที่ถูกละเมิดในหลอดทดลองจะสามารถกระตุ้นการทำงานของ telomerase โดยตรง แต่การติดเชื้อของ HPV ไม่ใช่ปัจจัยโดยตรงที่ทำให้เกิดการทำงานของ telomerase ในเนื้อเยื่อของปากมดลูกในผู้ป่วย

ดังนั้นการศึกษาในช่องปากและในปากมดลูกสามารถสรุปได้ว่าการทำงาน telomerase จะเกิดขึ้นใน 2 ลักษณะคือในการทำงานตามปกติ โดยพบมากขึ้นในระดับที่ตรวจพบได้ในเทคนิคมาตรฐานเพื่อเกิดการแบ่งตัวของเซลล์มากขึ้นหรือการอักเสบ อีกลักษณะที่สำคัญคือจะตรวจพบเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เนื่องจากตรวจพบในระยะท้าย ๆ ของการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการทำงานของ telomerase ในลักษณะนี้น่าจะมีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของเซลล์ในขบวนการเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอน

การศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้ในทางคลินิก

การศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้ในทางคลินิกของการทำงานของ telomerase ได้ตีพิมพ์ 1 ฉบับคือ Sukcharoen และคณะ The Journal of Reproductive Medicine (in the press) (Out Put #4) และส่งตีพิมพ์ที่ Clinical Cancer Research โดย Tankijvanich (Out Put #5) อีกหนึ่งฉบับ

การศึกษาที่ตีพิมพ์ใน The Journal of Reproductive Medicine เป็นการศึกษาการทำงานของ telomerase ใน ครรภ์ไข่ปลาอุก ครรภ์ไข่ปลาอุกนี้เรียกว่า hydatidiform mole ซึ่งสามารถพัฒนาเป็น persistent gestational trophoblastic tumors ได้ซึ่งในปัจจุบันจะต้องติดตามผู้ป่วยด้วยการตรวจหาค่า β -human chorionic gonadotropin (β -HCG) เพื่อดูว่า invasive mole เกิดขึ้นหรือไม่ ในการศึกษานี้ตรวจหาการทำงานของ telomerase และเปรียบเทียบกับพยาธิสภาพและ β -HCG เพื่อดูว่าสามารถตรวจพบและใช้การทำงานของ telomerase ในการพยากรณ์โรคได้หรือไม่ จากตารางที่ 1 ของ Out Put #4 พบว่าสามารถตรวจพบ การทำงานของ telomerase ใน mole ได้ 12 ใน 21 ราย แต่ยังไม่พบความสำคัญในการทำนายโรคที่ชัดเจน

การศึกษาที่ส่งตีพิมพ์ที่ Clinical Cancer Research (Out Put #5) เป็นการศึกษาเซลล์จากน้ำในช่องท้องเพื่อที่จะดูว่าสามารถแยกสาเหตุของน้ำในช่องท้องระหว่างน้ำในช่องท้องที่เกิดจากมะเร็ง และน้ำในช่องท้องที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ ได้หรือไม่ จากการศึกษาพบว่าการตรวจด้วย telomerase เป็นวิธีการที่มีความไวกว่า การตรวจเซลล์ตามปกติ โดยสามารถตรวจให้ผลบวกในกลุ่มที่เป็นมะเร็งของเยื่อช่องท้องถึง 81.3% ในขณะที่การตรวจเซลล์พบเพียง 56.3% ส่วนการตรวจในกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับพบ 66.7% ในขณะที่การตรวจเซลล์พบเพียง 11.1% อย่างไรก็ตามก็ตีกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งพบการทำงานของ telomerase ได้ 2 ใน 47 ราย โดยทั้ง 2 รายนี้เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งการให้ผลบวกของ telomerase นี้จะเกิดจาก activated lymphocyte (ตารางที่ 2 ของ Out Put #5).

สรุป โครงการได้รับตีพิมพ์ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ 4 ฉบับและส่งเพื่อพิจารณาตีพิมพ์อีก 1 ฉบับ โดยที่ศึกษาพบความสัมพันธ์ของการทำงานของ telomerase ในเนื้อเยื่อแบบสความัสกับพยาธิสภาพต่าง ๆ และตั้งสมมุติฐานต่อเนื่อว่า น่าจะเกิดการทำงานจาก การทำงานตามปกติและการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่าจะสามารถตรวจพบการทำงานของ telomerase ในเนื้อเยื่อชนิดอื่น และประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้หรือไม่

หนังสืออ้างอิง

1. Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266:2011-5, 1994.
2. Morin, G.B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 59:521-529,1989.
3. Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D., and Blackburn, E.H. In vivo alteration of telomerase sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*, 344:126-132,1990.
4. Rhyu, M.S. Telomeres, telomerase, and immortality. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 87: 884-894,1995.
5. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Presingee, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M., and Bos, J. L., Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 319: 523-532, 1988.
6. Lundberg, G.D., The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 262: 931-934, 1989.
7. Silverman, S., Gorsky, M., and Lozada, F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer (Phila.)*, 53:563-568, 1984.
8. Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K.V., and International Biological Study on Cervical Cancer Study Group., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87: 796-802, 1995.
9. Brachman, D.G. Molecular biology of head and neck cancer. *Semin. Oncol.*, 21: 320-329, 1994.
10. Kim, N.W. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur. J. Cancer.*, 33: 781-786,1997.
11. Kim, N.W., and Wu, F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic. Acids. Res.*, 25: 2595-2597,1997.

12. Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY
13. Bauer, H.M., Ting, Y., Greer, C.E., Chambers, J.C., Tashiro, C.J., Chimera, J., Reingold, A., and Manos, M.M., Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. JAMA 265: 472-477, 1991.
14. Resnick, R.M., Cornelissen, M.T.E., Wright, D.K., Eisinger, G.H., Fox, H.S., and Manos, M.M., Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. J Natl Cancer Inst 82: 1477-1484, 1990.

ผลงานวิจัย (output)

1. **Mutirangura A**, Supiyaphun P, Triekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S and Voravud N. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Research 56: 3530-3533 (1996).
2. **Mutirangura A**, Sriuranpong V, Termrungruangler W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai P, Voravud N, Niruthisard S. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. British Journal of Cancer 78: 933-9 (1998).
3. Thongprasom K, **Mutirangura A** and Cheerat S. Telomerase activity in oral lichen planus. Journal of Oral Pathology & Medicine 27: 395-8 (1998).
4. Sukcharoen N, **Mutirangura A** and Limpongsanurak S. Telomerase Activity in Complete Hydatidiform Mole. The Journal of Reproductive Medicine (In the Press)
5. Tankijvanich P, Tresukosol D, Sumpathanukul, Sakdikul S, Voravud N, Mahachai V, and **Mutirangura A**. Telomerase Activity for the Differentiation between Malignancy-related and Non-malignant Ascites. (Submitted)

ภาคผนวก
สำเนา ผลงานวิจัย (output)



The Journal of Reproductive Medicine

P.O. Drawer 12425 • 8342 Olive Blvd. • St. Louis, MO 63132-2814 • Tel: (314) 991-4440 • FAX: (314) 991-4654

George L. Wied, M.D., *Editor-in-Chief*
Donna Kessel, *Publisher*

www.jreprodmed.com

FAX TRANSMITTAL FORM

TO: NARES SUKCHAROEN, M.D.

CO/DEPT: CHULALONGKORN UNIVERSITY

FROM: THE EDITORIAL OFFICE

DATE: MARCH 30, 1999

Total pages in this transmission: 10

If there is a problem with transmission, please call (314) 991-4440.

Message:

PLEASE FILL OUT AND SIGN THE FINANCIAL DISCLOSURE.
PLEASE RETURN THESE PAGES BY FAX TO (314) 991-4654
WITHIN 48 HOURS. THANK YOU.

RECEIVED

THE JOURNAL OF
REPRODUCTIVE MEDICINE

P. O. BOX 12425
ST. LOUIS, MISSOURI 63132

Telomerase Activity in Complete Hydatidiform Mole

Nares Sukcharoen, M.D., Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D., and
Sompop Limpongsanurak, M.D.

OBJECTIVE: To investigate whether telomerase is activated in complete hydatidiform mole and whether it could predict the development of persistent gestational trophoblastic tumors (GTTs).

STUDY DESIGN: For this prospective study, 21 patients with complete hydatidiform mole were recruited.

Molar tissue was obtained for telomerase activity measurement using the telomeric repeat amplification protocol assay. Patients' clinical characteristics, telomerase activity and subsequent clinical outcome were analyzed.

RESULTS: Telomerase activity was detected in 12 cases (57.1%) with varied intensity. Two of four patients who had telomerase activity, uterine size larger than expected and prevacuation serum β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) levels $>10^6$ mIU/mL developed persistent GTT.

CONCLUSION: Telomerase activity is detectable in some complete hydatidiform moles and might be useful for predicting persistent GTT when combined with uterine size and prevacuation serum β -hCG level. (J Reprod Med 1999;44:0000-0000)

Keywords: telomerase, hydatidiform mole, trophoblastic neoplasms.

Introduction

Telomeres are repeated DNA sequences (TTAGGG_n in humans) found at the ends of chromosomes and that become shorter with each cell division.¹ A certain length of the telomere is important for cell division and has been implicated as a mechanism of monitoring cellular proliferative capacity, with critical short-

ening of telomeres signalling cell cycle arrest and senescence.² Telomeres lost during DNA replication can be added back by the activity of telomerase, a ribonucleoprotein DNA polymerase, which is found in normal germline tissues, most tumor cells and immortal single-cell eukaryotes.³ Normal human somatic cells express low or undetectable telomerase activity and progressively lose telomeric sequences with cell division.^{4,5} In immortal eukaryotic cells, such as cancer cells, augmentation of telo-

The expression of telomerase activity is found in some complete hydatidiform moles and may play a role in progression.

From the Department of Obstetrics and Gynecology and Genetics Unit, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Dr. Sukcharoen is

Dr. Mutirangura is

Dr. Limpongsanurak is

Address reprint requests to: Nares Sukcharoen, M.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand (fmednsc@md2.md.chula.ac.th).

Supported by the Molecular Biology Project, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Thailand Research Funds.

Financial Disclosure: The authors have no connection to any companies or products mentioned in this article.

0024-7758/99/4400-0000/\$15.00/0 © The Journal of Reproductive Medicine, Inc.

Journal of Reproductive Medicine

merase activity is apparently necessary to balance telomere loss with *de novo* synthesis of telomeric DNA so as to maintain sufficient length of the telomere to ensure proliferation.^{6,7}

Recently, telomerase activity has been detected frequently in primary human tumors and tumor-derived cell lines, including hematologic malignancies; neuroblastoma; and gastric, lung, head and neck, liver, colorectal, brain, prostate and breast cancers.⁸ Telomerase activation has also been reported in association with immortalization of normal cells.⁹ High levels of telomerase activity were also found to be associated with an unfavorable prognosis in some cancers, such as neuroblastoma and gastric carcinomas.^{10,11} The expression of telomerase activity was also demonstrated in premalignant lesions, such as oral leukoplakias, which might serve as a biomarker for cancer risk assessment.¹² Therefore, it is possible that telomerase activation would be a useful marker in hydatidiform mole for prediction of the development of persistent gestational trophoblastic tumor (GTT).

Approximately 20% of complete hydatidiform moles progress to persistent GTT. Clinical prognostic characteristics of persistent GTT, such as maternal age, presence of bilateral theca lutein cysts, a uterus larger than expected for dates, ABO blood group, parity, presence of preeclampsia and pre-evacuation serum β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) level, have been studied but have not reliably predicted the development of persistent GTT.¹³ Early prediction of persistent GTT has obvious clinical significance since these patients can be identified and may benefit from prophylactic chemotherapy. To date, no previous study has specifically addressed telomerase activity in hydatidiform mole. It may be useful as a prognostic indicator of subsequent clinical outcome of complete hydatidiform mole. The aim of this study was to investigate whether telomerase is activated in complete hydatidiform mole and to determine whether it could predict the development of persistent GTT.

Materials and Methods

Twenty-one patients with complete hydatidiform mole diagnosed at the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, between January 1995 and May 1997, were recruited for this prospective study. Ethical approval for the study was given by the local ethics committee, and all patients gave in-

formed consent. An initial workup was carried out, including chest roentgenography, liver and renal function tests, and thyroid hormonal profiles. Patient data included age, gravidity, parity, uterine size at the time of evacuation, method of termination, preevacuation serum β -hCG level, radiologic findings, histologic evaluation and laboratory findings. Sixteen patients were treated with suction curettage, while three were treated with hysterectomy, one with suction curettage with hysterectomy, and one with sharp curettage. All samples were analyzed by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay. Clinical data and TRAP assay results were collected in a double-blind fashion until analysis at the end of the study. One patient was administered prophylactic chemotherapy. The patients were followed weekly after evacuation until three consecutive negative serum β -hCG levels were observed, then at one-month intervals for the first six months and thereafter bimonthly up to at least one year. Patients with a β -hCG plateau over three weeks or an elevation over two weeks were diagnosed as having persistent GTT. Women with persistent GTT were evaluated for metastatic disease before initiation of chemotherapy and then were followed with weekly serum β -hCG measurements until normal for 3 weeks and then monthly serum β -hCG levels until normal for 12 months.

TRAP was performed as described previously.^{14,15} Briefly, each frozen tissue was first washed in 500 μ L PBS (calcium and magnesium free), then homogenized in 20–200 μ L of ice-cold CHAPS lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]), 1 mM EGTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM β -mercaptomethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol and diethylpyrocatechol (H_2O), depending on the size of the sample, using a manual homogenizer. After 30 minutes of incubation on ice, the lysate was centrifuged at 14,000 g for 30 minutes at 4°C. The supernatant was aliquoted, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

Epstein-Barr virus-transformed human lymphocytes (American Type Culture Collection cell line B958) were used as positive controls and cultured normal fibroblasts as negative controls. The polymerase chain reaction (PCR)-based assay was carried out in 50 μ L of reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.3); 1.5 mM $MgCl_2$; 63 mM KCl; 0.005% Tween-20; 1 mM EGTA; 50 μ M dGTP, dATP and dTTP; 5 μ M dCTP; 0.1 μ g of the deoxy-

oligonucleotide primer TS (5'-AATCCGTC-GAGCAGAGTT-3'); 1 µg of T4g32 protein (Boehringer Mannheim); 4 µL of [α - 32 P] dCTP (10 µCi/µL, 3,000 Ci/mmol); 2 units of Taq polymerase and diethylpyrocarbonate H₂O in a 0.5-mL tube. The tube contained 0.1 µg of the deoxyoligonucleotide CX (5'-CCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') sequestered at the bottom by a wax barrier (Ampliwax, Perkin-Elmer Cetus).

After 10 minutes of incubation at 23°C to allow telomerase-mediated extension of the TS primer, the reaction tube was subjected to 30 PCR cycles at 94°C for one minute, 50°C for one minute and 72°C for one minute. Aliquots (5 µL) of the PCR mixture were analyzed on 8% nondenaturing polyacrylamide gel in 0.6× Tris-borate EDTA buffer until the xylene cyanol had migrated 17 cm from the origin (gel size, 20×40 cm). The gels were then exposed to Kodak XAR-5 x-ray film at -70°C with an intensifying screen. Duplicate assays were performed on all samples with and without RNase pretreatment to a final concentration of 0.05 mg/mL for 10 minutes at room temperature. Data were collected blindly and decoded later. The positive results were correlated with telomerase activity of 10, 100, 1,000 and 10,000 cells of B958.

The samples exhibiting the negative internal telomerase assay standard were subjected to two-step TRAP (Shay, personal communication). The first part consisted of TS primer extension with a 50-µL reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.005% Tween-20, 1 mM DTT, 50 µM of each dNTP, 0.1 µg of TS, 1 µg of T4g32 protein and DEPC H₂O. The reaction tube was incubated in a thermocycler at 23°C for 15 minutes. The product was then subjected to standard phenol-chloroform DNA extraction and ethanol precipitation. The precipitate was dissolved in DEPC H₂O and amplified in the second part. The second part of the reaction mixture was the same as in the nonmodified TRAP without incubation at 23°C for 15 minutes. The amplification cycle was similar to the original protocol.

Descriptive statistical methods were used to examine patients' clinical data, including mean and range of the variables.

Results

Telomerase Activity and Clinical Data on Complete Hydatidiform Mole

The results of the TRAP assay and clinical data on the patients are summarized in Table I.

Telomerase Activity in Complete Hydatidiform Mole

In the present study, we analyzed 21 samples of complete hydatidiform mole (Table I). B958 cells were used as positive controls and cultured normal fibroblasts as negative controls (Figure 1). Telomerase activity was detected in 12 cases. Because of the variation in intensity of the TRAP signals, we compared the intensity of the ladder signals with serial dilution of cell line B958—10, 100, 1,000, 10,000 cells. A gradually increasing increment in TRAP intensity was observed and varied directly with the number of immortal cells tested. We then semiquantitatively correlated the density of each positive TRAP result with the serially diluted B958 cell line. The dosage of telomerase activity was then recorded as <10, 10–100, 101–1,000, 1,001–10,000 or >10,000, indicating whether the intensity of those bands was less than the numbers of B958 cells (Figure 1). Among 12 positive samples, 7 (58.3%) were compatible with 10–100, 2 (16.7%) with 101–1,000 and 3 (25%) with 1,001–10,000 B958 cells, respectively (Table I).

Clinical Presentation

The mean age of the patients at diagnosis was 26.4 years (range, 15–49). The mean estimated gestational age at evacuation was 14.5 weeks (range, 12–21). Nineteen patients (90.5%) had serum β -hCG levels that returned spontaneously to normal following molar evacuation. Two patients developed persistent GTT. One patient was diagnosed from a plateau of serum β -hCG levels over three weeks, and one patient had a hysterectomy, and the histopathologic diagnosis was invasive mole. Both patients exhibited low telomerase activity (Table I).

There was no apparent association between age, gravidity and subsequent disease course. All patients had a uterus between 10 and 24 weeks' size. When the uterine size was correlated with "gestational age," it was smaller than expected in six cases, larger than expected in seven and equal to expected in eight. Uterine size larger than expected appeared to predict the subsequent clinical course. Two patients had persistent GTT (Table I).

The initial preevacuation serum β -hCG values ranged from 0.07×10^5 to 105.6×10^5 . The initial serum β -hCG levels appeared to predict the clinical course. There were seven cases with initial serum β -hCG levels > 10^6 ; two of them had persistent GTT (Table I). The intensity of telomerase activity did not correlate with the preevacuation serum β -hCG levels.

Table 1 Telomerase Activity and Clinical Data on Hydatidiform Mole Patients

Patient no.	Age (yr)	Expected uterine size	Preevacuation β -hCG (mIU/mL)	Complications	Treatment	Follow-up	Telomerase activity	
							+	-
1	15	>	10.2×10^5	—	SC	CR	+	10^3-10^4
2	18	<	10.0×10^5	—	SC	CR	+	—
3	22	>	12.0×10^5	—	SC	PGTD	+	10^3-10^4
4	19	<	1.0×10^5	—	SC	CR	+	—
5	19	=	2.1×10^5	—	SC	CR	+	—
6	23	<	2.6×10^5	—	D&C	CR	+	10^3-10^4
7	33	>	3.5×10^5	—	SC	CR	+	—
8	30	<	0.1×10^5	—	SC	CR	+	—
9	27	=	2.9×10^5	—	SC	CR	+	10^3-10^4
10	40	=	16.1×10^5	—	TAH&BSO	CR	+	10^3-10^4
11	35	>	105.6×10^5	—	TAH&BSO	Invasive mole	+	10^3-10^4
12	24	>	8.1×10^5	Severe preeclampsia	SC & chemotherapy	CR	+	10^3-10^4
13	18	=	14.5×10^5	—	SC	CR	+	10^3-10^4
14	22	=	1.0×10^5	—	SC	CR	+	—
15	44	=	2.1×10^5	—	SC and TAH	CR	+	10^3-10^4
16	20	=	1.0×10^5	—	SC	CR	+	—
17	18	=	4.1×10^5	—	SC	CR	+	10^3-10^4
18	25	<	1.0×10^5	—	SC	CR	+	—
19	45	>	10.3×10^5	—	TAH&BSO	CR	+	—
20	15	<	5.6×10^5	Mild preeclampsia	SC	CR	+	10^3-10^4
21	33	>	29.4×10^5	Hypothyroidism Severe preeclampsia	SC	CR	+	10^3-10^4

SC = suction curettage, CR = complete resolution, PGTD = persistent gestational trophoblastic disease, TAH = total abdominal hysterectomy, D&C = dilation and curettage, BSO = bilateral salpingo oophorectomy.

There were four cases with telomerase activity, uterine size larger than expected and preevacuation β -hCG levels $> 10^5$ mIU/mL: two of them high (50%) in patients with telomerase activity, uterine size larger than expected and preevacuation β -hCG levels $> 10^6$ mIU/mL. In contrast, patients without these combined conditions did not develop persistent GTT.

Discussion

Telomerase activity is expressed in most human tumor tissue (about 85%) but not in normal tissues, except those of the germline (testes and ovaries) and rare hematopoietic stem cells, which express very low levels.¹⁶ Telomerase activity seems to be necessary for the sustained proliferation of most cancer cells. Therefore, telomerase activity may be useful for cancer diagnosis and serve as a prognostic indicator of clinical outcome. Assays for telomerase activity may also be very useful as screening for the detection of early cancer or early metastasis.¹⁴

These findings have led to increasing interest in studies related to various aspects of telomerase production in cancer. A sensitive and reliable procedure material and small tissue samples obtained from tumor biopsies was developed. Telomerase chain extraction and detection of telomerase activity using the TRAP assay result in an estimated 10^4 -fold improvement in detection as compared with previous methods.¹⁴ It is a sensitive and reliable telomerase activity assay. The simplicity and 10^4 -increased sensitivity of this assay has resulted in a dramatic increase in investigations of telomerase expression. This method makes it possible to detect enzyme activity in a very small number of cells, a major advantage for examining clinical specimens. Therefore, this method was selected for use in this study to analyze telomerase activity in hydatidiform mole.

In previous studies, telomerase activity in cancers varied from 70% to 95%, depending on cell types and proliferation activity. Telomerase activity in be-

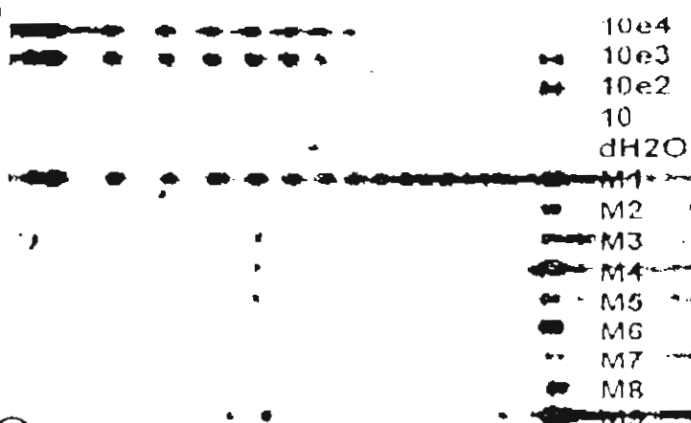


Figure 1 Telomerase activity of 21 molar tissues assessed by the PCR-based TRAP assay. Extracts of Epstein-Barr virus-transformed human lymphocyte cell lines were used as positive controls. Serial dilution of 10^4 , 10^3 , 10^2 and 10 cells represented levels of activity of the enzyme. Samples M2, M4, M5, M7 and M9 exhibited negative telomerase activity. Positive telomerase in hydatidiform mole specimens (M1, M3, M6 and M8) was detected.

nign tumors and premalignant tissues varies from 0% to 60%.¹⁶ In a recent study, chorions from placentas at various weeks of gestation were examined for telomerase activity using the TRAP assay. Seventy-six percent of normal early chorions at 5–9 weeks' gestation were telomerase positive. Chorions from early spontaneous abortions also exhibited telomerase activity but at a low level. In contrast, only 4% of late chorions at 34–41 weeks' gestation expressed telomerase activity. Significant telomerase activity was observed in trophoblast cell fractions of chorion, demonstrating trophoblast to be the source of the activity.¹⁷

Our study demonstrated that telomerase activity was detected in 12 cases (57.1%) of complete hydatidiform mole. The intensity of telomerase activity detected in hydatidiform mole varied widely. Correlation between the intensity of telomerase activity and estimated gestational age of a hydatidiform mole cannot be demonstrated. Two cases of persistent GTT exhibited low telomerase activity. These data indicate that telomerase is activated in about half of hydatidiform moles and also in all persistent GTTs. Our results provide insight into the biologic role of telomerase in the proliferating potential of trophoblastic cells. The clinical characteristics and basic laboratory investigation that demonstrated the high proliferation rate are uterine size larger than expected and high preevacuation serum β -

hCG levels. In a previous study, trophoblastic proliferation was one of the most powerful indicators of GTTs.¹⁸ Therefore, complete hydatidiform moles that demonstrate clinical or laboratory evidence of excessively abnormal proliferative activity, as indicated by these features, are more likely to develop persistent GTT.

In general, approximately 80% of molar gestations resolve spontaneously after evacuation, whereas nearly 20% of patients will have persistent GTT.^{19,20} With prophylactic chemotherapy, 10% developed persistent GTT as compared with 31% of those who are not treated. In the treated group, the disease is diagnosed later and requires more courses of chemotherapy until complete remission than in the nontreated group.²¹ Therefore, the administration of prophylactic chemotherapy to decrease the incidence of persistent cases has gained wide acceptance.^{21,22} However, employing chemotherapy for all patients, of whom the majority will have a benign course, has been questioned in recent years. Identification of patients at high risk for the development of persistent GTT will reveal a subgroup of patients who could benefit from close follow-up and prophylactic chemotherapy.

The diagnosis of persistent GTT is limited by the currently accepted method of following persistently elevated or rising postevacuation β -hCG titers, leading to a delay in diagnosis and treatment of up to two months after evacuation. Various clinical prognostic risk factors have been investigated in an effort to define a group of patients with an extreme risk for persistent GTT. These risk factors include age > 40 years, ovarian enlargement (bilateral theca lutein cysts), larger uterine size than expected, blood group, parity, pre-eclampsia, previous history of molar pregnancy and preevacuation serum β -hCG levels. However, the data are still unrefined, and there are no available clinical, histologic, cytogenetic or immunohistochemical factors that provide early detection and prediction of those patients who will have persistent GTT.^{13,23} In this study, the combination of the presence of telomerase activity, preevacuation serum β -hCG levels > 10^6 mIU/mL and uterine size larger than expected seemed to be useful in prediction of clinical outcome.

Gestational trophoblastic disease is a complex and challenging area. Currently there are still no reliable genetic markers for predicting which subset of moles will behave aggressively. In this study, telomerase activity in complete hydatidiform mole was analyzed for the first time. We conclude that

the expression of telomerase activity is found in some complete hydatidiform moles and may play a role in progression. Intensity of telomerase activity did not correlate with preevacuation serum β -hCG levels, estimated gestational age or clinical outcome. However, hydatidiform moles that demonstrate clinical or laboratory evidence of excessively abnormal proliferative activity, as indicated by the presence of telomerase activity, uterine size larger than expected and preevacuation serum β -hCG level $> 10^6$ mIU/mL, are more likely to develop persistent GTN. Before these prognostic factors can be used clinically, however, larger, prospective studies need to be performed to better address the sensitivity and specificity of these prognostic factors.

References

- Blackburn DH: Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350:569-573
- Harley CB, Vaziri H, Counter CM, et al: The telomere hypothesis of cellular ageing. *Exp Gerontol* 1992;27:375-384
- Feng JL, Funk WD, Wang SS, et al: The RNA component of human telomerase. *Science* 1995;269:1236-1241
- Vaziri H, Schachter F, Wei L, et al: Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993;52:661-667
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, et al: Telomerase reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346:866-869
- Counter CM, Avilion AA, Lefevre CE, et al: Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO* 1992;11:1921-1929
- Counter CM, Botelho FM, Wang P, et al: Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 1994;68:3410-3414
- Bacchetti S, Counter CM: Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 1995;7:423-432
- Zheng P-S, Iwasaka T, Yamasaki F, et al: Telomerase activity in gynecologic tumors. *Gynecol Oncol* 1997;64:171-175
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al: Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Natl Med J* 1995;1:249-255
- Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, et al: Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995;55:3258-3262
- Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirakapan S, et al: Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3530-3533
- Parazzini F, Mangili G, Belloni C, et al: The problem of identification of prognostic factors for persistent trophoblastic disease. *Gynecol Oncol* 1988;30:57-62
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015
- Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA: Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) resulted in increased reliability, linearity, and sensitivity. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3794-3795
- Shay JW, Wright WE: Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 8:66-71
- Kyo S, Takakura M, Tanaka M, et al: Expression of telomerase activity in human chorion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:498-503
- Ayhan A, Tuncer ZS, Halilzade H, et al: Predictors of persistent disease in women with complete hydatidiform mole. *J Reprod Med* 1996;41:591-594
- Schlaerth JB, Morrow CP, Kletzky OA, et al: Prognostic characteristics of serum human chorionic gonadotropin titer regression following molar pregnancy. *Obstet Gynecol* 1981;58:478-482
- Lurain JR, Brewer JJ, Torek EE, et al: Natural history of hydatidiform mole after primary evacuation. *Am J Obstet Gynecol* 1983;145:591-595
- Kim DS, Moon IL, Kim KT, et al: Effects of prophylactic chemotherapy for persistent trophoblastic disease in patients with complete hydatidiform mole. *Obstet Gynecol* 1986;67:690-694
- Goldstein DP: Prevention of gestational trophoblastic disease by use of actinomycin D in molar pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1974;43:475-479
- Goldstein DP, Berkowitz RS, Bernstein MR: Management of molar pregnancy. *J Reprod Med* 1981;26:208-210