

Project Code : RSA5580013

Project Title : LINE-1 Hypermethylation in Tumor Supporting Tissue

Investigator : Dr. Nakarin Kitkumthorn; Faculty of Dentistry, Mahidol University

E-mail Address : Nakarinkit@gmail.com

Project Period : 16th July 2012- 15th July 2015

Abstract:

The objective of this study is to evaluate the LINE-1 methylation status in breast cancer supporting tissue and also assess the potential of LINE 1 hypermethylated genes as a molecular marker for micrometastatic cancer screening. In the beginning, formalin-fixed paraffin-embedded lymph nodes were collected from 70 breast cancer patients and divided into 3 groups 1) lymph nodes of non-metastatic breast cancer (n=12), 2) lymph nodes negative of metastatic breast cancer (n=26), 3) matched lymph nodes positive of metastatic breast cancer (n=26). LINE-1 methylation was measured by qCOBRA-LINE-1 (quantitative COmbine Bisulfited Restriction Analysis-LINE-1) technique. The results showed the percentage of LINE-1 methylation among 3 groups were stepwise increase from group 1, 2, and 3, respectively. Additionally, laser-captured microdissection samples from lymph nodes group 3 (n=6), we found higher level of LINE-1 methylation in adjacent breast cancer stromal cell than matched breast cancer cells significantly. Next, we cocultured MCF-7, HeLa and WSU-HN 17 cell lines with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the Transwell[®] microplate. The percentage of LINE-1 methylation was gained in PBMCs after incubated with MCF-7 only. After that, by using CU-DREAM Ex (Connection Up- or Drown-Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension, website; <http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~achatcha/cu-dream>) program, we evaluated candidate genes and gene containing LINE-1 data from GSE10797, GSE9014, GSE5364 and GSE10810. Afterthat, seven hundred and nine upregulated genes were selected and classified into 3 groups followed their functions; immunological process, inflammation and angiogenesis. Finally, five selected candidate genes were test their expressions by immunohistochemistry technique. Interestingly, MUC-1 was observed to be a promising marker in micrometastasis tumor detection in histologically negative lymph node of breast cancer patient.

Keywords: Breast cancer, LINE-1 hypermethylation, Lymph node, Tumor supporting tissue

รหัสโครงการ: RSA5580013

ชื่อโครงการ: ภาวะเมทิลเลชันระดับสูงของไลน์-1 ในเนื้อเยื่อปกติรอบเซลล์มะเร็ง

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร. นครินทร์ กิตกำธร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : Nakarinkit@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2555 ถึง 15 กรกฎาคม พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ:

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของไลน์-1 ในเซลล์ปกติรอบๆ เซลล์มะเร็งและประเมินการใช้ยีนที่มีไลน์-1 เมทิลเลชันระดับสูงในการตรวจหาเซลล์มะเร็งซ่อนเร้น โดยเริ่มจากนำต่อมน้ำเหลืองผู้ป่วยในบล็อกพาราฟิน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ต่อมน้ำเหลืองในผู้ป่วยที่ไม่มีการแพร่กระจายของมะเร็ง จำนวน 12 ราย, กลุ่มที่ 2 และ 3 เป็นต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่มีมะเร็งแพร่กระจาย โดยกลุ่ม 2 ไม่พบเซลล์มะเร็ง และกลุ่ม 3 เป็นคนไข้คนเดียวที่พบเซลล์มะเร็ง จำนวนกลุ่มละ 26 ราย นำมาตรวจระดับไลน์-1 เมทิลเลชันโดยใช้วิธีการ qCOBRA-LINE-1 (quantitative COmbine Bisulfited Restriction Analysis-LINE-1) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ไลน์-1 เมทิลเลชันมีค่าสูงขึ้นจากกลุ่ม 1 กลุ่ม 2 และ กลุ่ม 3 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จำเพาะในมะเร็งเต้านมเท่านั้น นอกจากนี้ยังทำการทดลองเพิ่มโดยใช้วิธี laser-captured microdissection จำนวน 6 ราย พบว่าระดับไลน์-1 เมทิลเลชันสูงในเซลล์ปกติรอบๆ เซลล์มะเร็งสูงกว่าเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ การทดลองต่อมาเป็นการยืนยันผลโดยการทำ coculture ระหว่างเซลล์ไลน์ MCF-7, HeLa และ WSU-HN 17 กับ blood mononuclear cells (PBMCs) ใน Transwell® microplate พบว่าระดับไลน์-1 เมทิลเลชันมีค่าสูงขึ้นเฉพาะ ในกรณี MCF-7 และลดลง ในกรณี HeLa และ HN 17 จากการศึกษาด้วยโปรแกรม CU-DREAM Ex (Connection Up- or Down- Regulation Expression Analysis of Microarrays Extension) โดยใช้ข้อมูลของ GSE10797, GSE9014, GSE5364 และ GSE10810 สามารถหายีนที่มีไลน์-1 และมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นได้จำนวน 709 ยีน ในจำนวนนี้คัดเลือกยีนที่มีค่าสูงจำนวน 5 ยีน มาทำเทคนิค immunohistochemistry ต่อ จากผลการทดลองพบว่า MUC-1 สามารถนำมาพัฒนาตรวจหาเซลล์มะเร็งซ่อนเร้นในต่อมน้ำเหลืองที่ไม่มีเซลล์มะเร็งจากการดูด้วยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้

คำสำคัญ : มะเร็งเต้านม, ภาวะเมทิลเลชันระดับสูงของไลน์ 1, เนื้อเยื่อรอบเซลล์มะเร็ง