

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเบื้องต้นของโพลีมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวไทย

รุจิณี ปดิฐพร¹ มหัทธนา กมลศิลป์² ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร³ ไพบุลย์ ปญญฤทธิ์⁴ อนันต์ กรลักษณะ⁵
พาณี จักรแสงชัยโชติ⁴ วณิดา พงศ์สถาพร⁶ และ ภัสรา อาณัติ¹

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ³ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ⁴โรงพยาบาลบำรุงราษฎร์ ⁵สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ⁶ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

บทนำ มะเร็งปากมดลูกพบมากเป็นลำดับสองในสตรีไทย โดยพบว่า Glutathione S-transferase (GST) family เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง GST omega (GSTO) ยังมีการศึกษากันน้อยและไม่เคยมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปากมดลูก **วัตถุประสงค์** ศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปากมดลูกในไทย **วิธีศึกษา** วิเคราะห์โพลีมอร์ฟิซึม *GSTO1**A140D และ *GSTO2**N142D โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymerase chain (RFLP) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวไทย 50 ราย และหญิงสุขภาพดี 33 ราย **ผลการศึกษา** ไม่พบความแตกต่างของความถี่ของยีนในโพลีมอร์ฟิซึม *GSTO1**A140D และ *GSTO2**N142D กับความเสี่ยงต่อมะเร็งปากมดลูกในสตรีไทย และไม่มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ทางคลินิก แต่โพลีมอร์ฟิซึม *GSTO2**N142D มีแนวโน้มสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกชนิด adenocarcinoma ($p = 0.063$) และมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 1 (Ib) ($p = 0.061$) **สรุป** การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของ *GSTO1**A140D และ *GSTO2**N142D กับความเสี่ยงต่อมะเร็งปากมดลูกในสตรีไทย

Keywords: ● โพลีมอร์ฟิซึม ● *GSTO1* ● *GSTO2* ● มะเร็งปากมดลูก

เวชสารแพทย์ทหารบก 2558;68:155-64.

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสองในสตรีไทยรองจากมะเร็งเต้านม โดยทั่วไปมะเร็งเป็นโรคที่มีสาเหตุจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม และด้วยความแตกต่างทางพันธุกรรมในมนุษย์ ทำให้ความสามารถในการ متابอไลต์สารก่อมะเร็ง (carcinogen) ที่เข้าสู่ร่างกายในมนุษย์แตกต่างกัน ความแตกต่างทางพันธุกรรมในมนุษย์แต่ละคนนี้เรียกว่า โพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) เป็นความแตกต่างในลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA) นั้นๆ ในจีโนม (genome) ของมนุษย์ ความแตกต่างของลำดับเบสในจีโนมนี้มีอยู่หลายล้านตำแหน่งซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดการกลายพันธุ์ที่ลำดับเบส (point

mutation) การแทนที่ของเบส (base substitution) รวมถึงการขาดหายไปในบางส่วนของยีน (gene deletion) หรือการเพิ่มเบสเข้าไปในยีนนั้น ตำแหน่งที่เกิดโพลีมอร์ฟิซึมนั้น อาจเกิดในบริเวณของยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีน หรือเกิดขึ้นในบริเวณที่ไม่มีรหัสของยีนก็ได้ ลำดับเบสซึ่งแตกต่างกัน (โดยทั่วไปเป็นการเปลี่ยนแปลงเบสคู่เดียว) ในแต่ละคน โดยที่ความแตกต่างในลำดับเบสนี้จะเกิดในบางส่วนของจีโนมเท่านั้น แต่ในส่วนนั้น คนแต่ละคนจะมีคู่เบสบางคู่เบสที่แตกต่างกันเสมอ

Glutathione S - transferase (GSTs) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ Phase II detoxification enzymes ที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการ conjugation ของ glutathione (GSH) เพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษ หรือสารก่อมะเร็งต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายในมนุษย์ เช่น polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)¹ และพวกไฮโดรคาร์บอนในควันบุหรี่² เป็นต้น นอกจากนี้

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 12 มิถุนายน 2558 ได้ตีพิมพ์เมื่อ 5 สิงหาคม 2558

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พ.ท.หญิง รุจิณี ปดิฐพร ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

นี้ GSTs ยังทำตัวเสมือน เป็น inhibitor ของ MAP kinase pathway³ อีกด้วย human cytosolic GST superfamily ประกอบด้วยยีนอย่างน้อย 16 ยีน ซึ่งยังแบ่งแยกย่อยได้อีก 8 คลาส ได้แก่ alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta, zeta, และ omega^{4,5} GSTs ทำหน้าที่หลากหลายเกี่ยวเนื่องกับประสิทธิภาพของการล้างพิษ (detoxification) ต่อสารก่อมะเร็ง หรืออาจจะมีส่วนร่วมในการเพิ่มความไวต่อการเกิดโรคมะเร็ง (cancer susceptibility) ก็ได้⁶ เช่น เคยมีการศึกษาความสัมพันธ์ของ GST gene polymorphism กับความไวต่อการเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ เช่น มะเร็งเต้านม^{7,8} มะเร็งปอด⁹⁻¹² และมะเร็งลำไส้ใหญ่¹³ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโพลีมอร์ฟิซึมของ Glutathione S - transferase Theta (GSTT1), Glutathione S - transferase Mu1 (GSTM1) และ Glutathione S - transferase P1 (GSTP1) มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในมนุษย์¹⁴

ส่วนคลาส Glutathione S - transferase Omega (GSTO) ซึ่งเป็นคลาสที่เพิ่งพบภายหลังมี active site เป็น cysteine ซึ่งสามารถสร้างพันธะ disulfide กับ GSH ได้ ในมนุษย์ Omega class GST จะมียีนที่แสดงออกอยู่ 2 ยีน คือ *hGSTO1* และ *hGSTO2* กับ pseudo gene *hGSTO3p* ยีน *hGSTO1* และ *hGSTO2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมตำแหน่งที่ 10q24.3 ซึ่งอยู่ระหว่าง markers D10S603 และ D10S597 โพลีมอร์ฟิซึมของยีน *hGSTO* ที่พบในประชากรมนุษย์ ได้แก่ *hGSTO1*A140D*, *hGSTO1*E155del* และ *hGSTO2*N142D*¹⁵

คลาส Glutathione S - transferase Omega (GSTO) ถูกนำมาศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมถึงมนุษย์ด้วย¹⁶ มี poor activity กับ common GST substrate โดยมี noval glutathione-dependent thiotransferase, dehydroascorbate reductase และ monomethylarsonate reductase activity และ modulate Ca²⁺ release โดย ryanodine receptors¹⁷ GSTO class แบ่งเป็น 2 class ย่อย คือ *GSTO1* และ *GSTO2* ทั้ง *GSTO1* และ *GSTO2* ประกอบด้วย 6 เอกซอน (exons) ขนาด 7.5 kb อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 10q24.3 *GSTO2* มีการดอมีโนที่เหมือนกับ *GSTO1* ถึงร้อยละ 64 ถึงแม้ว่าเราจะไม่ทราบกลไกการทำงานของ *GSTO2* ดีนัก แต่พบว่ามีการแสดงออกของยีน *GSTO2* ในเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ของมนุษย์โดยพบสูงในอัณฑะ แต่พบต่ำในปาล์มดลูก รังไข่ และต่อมลูกหมาก ในทางตรงกันข้ามไม่พบการแสดงออกของยีน *GSTO1* ในอัณฑะ

แต่กลับสูงในปาล์มดลูก รังไข่ มดลูก และต่อมลูกหมาก¹⁶

มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* พบมีการแสดงออกของยีน *GSTO1* อย่างกว้างขวางในเนื้อเยื่อปกติทั่วไป เช่น ตับ ลำไส้ใหญ่ หัวใจ รังไข่ ตับอ่อน ต่อมลูกหมาก และ ม้าม^{16,18} ทำให้เราทราบว่ายีนนี้ น่าจะมีความสำคัญในการทำงานทางชีวภาพ (biological functions) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า glutathione-dependent dehydroascorbate-reductase และ thiol-transferase activity ของ *GSTO1* อาจมีความจำเป็นต่อกิจกรรมต่างๆ ไปในเซลล์ปกติ⁵ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *GSTO* มีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) มะเร็งเต้านม (breast cancer) และมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer)^{1,15,19} แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ในมะเร็งปาล์มดลูกในผู้ป่วยสตรีไทยมาก่อนเลย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาโพลีมอร์ฟิซึมในยีน *GSTO* ซึ่งประกอบด้วยยีนย่อย 2 ยีน คือ *GSTO1*A140D* และ *hGSTO2*A142D* ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปาล์มดลูกชาวไทยและในกลุ่มคนปกติไม่เป็นมะเร็งปาล์มดลูก โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) และสำรวจความเกี่ยวข้องระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีนทั้ง 2 ชนิดนี้ กับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งปาล์มดลูกชาวไทย

วิธีดำเนินการ

ชิ้นเนื้อมะเร็งปาล์มดลูกจากผู้ป่วยหญิงไทยจำนวน 50 ราย ซึ่งได้รับจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ผ่านการเซ็นยินยอม และผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยกรมแพทยทหารบก (No.S006h/51) และเซลล์เม็ดเลือดขาวจากอาสาสมัครหญิงไทยที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปาล์มดลูก (normal control) จำนวน 33 ราย

การสกัด ดีเอ็นเอ

ชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งปาล์มดลูก เก็บด้วยน้ำแข็งแห้ง แล้วนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ หนาชิ้นละประมาณ 5-10 ไมโครมิเตอร์ (μm) ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ cryostat microtome และเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้หญิงไทยที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปาล์มดลูกใช้เป็น normal

control จากนั้นนำขึ้นห่อมะเร็ง และเซลล์เม็ดเลือดขาว มาสกัด ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี salting-out²⁰

การวิเคราะห์จีโนไทป์ (Genotype Analysis)

การศึกษานี้วิเคราะห์โพลีมอร์ฟิซึม 2 ตัวคือ *GSTO1***A140D* และ *GSTO2***N142D*²⁰ โดยการทำ Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

สำหรับการวิเคราะห์ *GSTO1***A140D* gene polymorphism โดยการทำ PCR เพื่อตรวจ transversion จาก C เป็น A ของลำดับเบสที่ codon 140 ใน Exon 4 ของยีน *GSTO1* โดยที่ปฏิกิริยา PCR นี้มี primer คือ Forward primer 5' GAA CTT GAT GCA CCC TTG GT 3' และ Reverse primer 5' TGA TAG CTA GGA GAA ATA ATT AC 3' ส่วนการวิเคราะห์ *GSTO2***N142D* gene polymorphism จะทำ PCR เพื่อตรวจ transition จาก A เป็น G ของลำดับเบสที่ codon 142 ใน Exon 4 ของยีน *GSTO2* โดยมี primer คือ Forward primer 5' AGG CAG AAC AGG AAC TGG AA 3' และ Reverse primer 5' GAG GGA CCC CTT TTT GTA CC 3'¹⁵

ปฏิกิริยา PCR ทำในหลอดทดลอง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 100 นาโนกรัม (ng), 10 mM Tris-Cl, pH9.0, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 20 μM ของแต่ละ primer, 200 μM ของแต่ละ dNTP และเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 Unit (Pharmacia Biotech, USA) ส่วนปฏิกิริยา PCR ทำในเครื่อง Gene Amp PCR System 9700 จำนวน 30 รอบ (cycles) แต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ ขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที ขั้นตอน Annealing ใช้อุณหภูมิ 60 °C นาน 1 นาที และขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมดนี้ทำซ้ำ 30 รอบ

จากนั้นนำผลผลิต PCR ของ *GSTO1***A140D* gene polymorphism มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *Cac81* 10 Unit (Biolabs, Frances) และผลผลิต PCR ของ *GSTO2***N142D* gene polymorphism มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo1* 10 Units (Biolabs, Frances) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง ตรวจผลด้วยการทำ Electrophoresis ใน 2% Agarose gel โดยมี 50 base pairs ladder (Fermentas, USA) เป็น DNA marker

RFLP product ของ *GSTO1***A140D* gene polymorphism จะแสดงลักษณะที่ต่างกัน 3 ลักษณะได้แก่ C/C คือ wild type homozygote (186, 68 bp fragments), A/A คือ polymorphic homozygote (254 bp), C/A คือ heterozygote (254, 186, 68 bp) ส่วนการวิเคราะห์ *GSTO2***N142D* gene polymorphism มี RFLP product แสดงลักษณะที่ต่างกัน 3 ลักษณะได้แก่ A/A คือ wild type homozygote (185 bp fragment), G/G คือ polymorphic homozygote (122, 63 bp), A/G คือ heterozygote (185, 122, 63 bp)

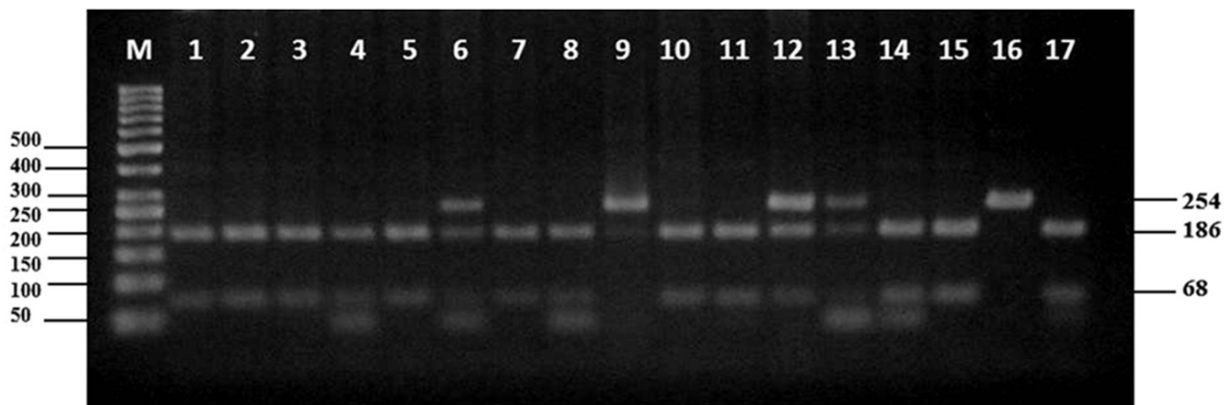
ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาผู้ป่วยหญิงไทยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกจำนวน 50 ราย พบว่ามีผลการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเป็นชนิด squamous cell carcinoma 40 ราย และเป็นชนิด adenocarcinoma 10 ราย

ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์รูปแบบแผนของดีเอ็นเอ (genetic patterns) ของ RFLP product ของ *GSTO1***A140D* gene polymorphism แสดงในรูปที่ 1 ผลที่ได้คือมีจำนวน wild type homozygote 39 ราย polymorphic homozygote 3 ราย และ heterozygote 8 ราย ส่วน RFLP product ของ *GSTO2***N142D* gene polymorphism มีรูปแบบแผนของดีเอ็นเอ แสดงในรูปที่ 2 ผลที่ได้คือมีจำนวน wild type homozygote 33 ราย polymorphic homozygote 2 ราย และ heterozygote 15 ราย

ผลการศึกษาความถี่ของอัลลีล (allele) ของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกหญิงไทยเทียบกับกลุ่มคนปกติ แสดงผลในตารางที่ 1 ในยีน *GSTO1* พบความถี่ของอัลลีล wild type A140 allele มีค่า 0.86 และ 0.88 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวไทยเทียบกับกลุ่มคนปกติตามลำดับ และพบความถี่ของอัลลีล *GSTO1***A140D* polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยมีค่า 0.14 และในคนปกติมีค่า 0.12 ส่วนใน *GSTO2* ความถี่ของอัลลีล wild type N142 allele มีค่า 0.81 ในผู้ป่วยมะเร็ง และ 0.80 ในกลุ่มคนปกติ ส่วนความถี่ของโพลีมอร์ฟิซึม อัลลีล D142 ในกลุ่มของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 0.19 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับในกลุ่มคนปกติคือมีค่า 0.20 การศึกษาความถี่ของยีนทั้งสองนี้ เป็นไปตามกฎเกณฑ์ของ Hardy-Weinberg equilibrium (ตารางที่ 1)

และผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายความถี่ของโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* ในผู้ป่วยมะเร็ง

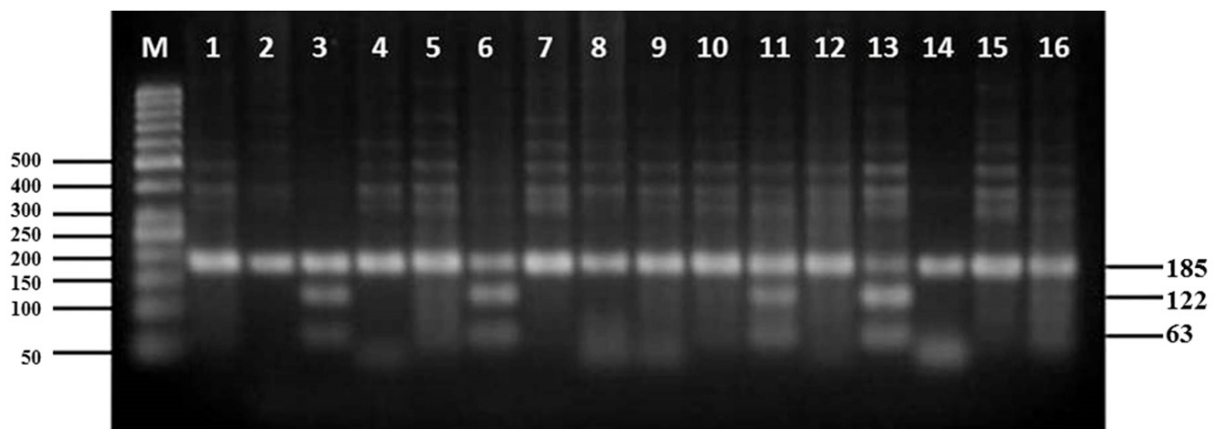


GSTO1 gene analysis

The PCR product was digested by *Cac8I* restriction enzyme, electrophoresed in 2% agarose gel, and stained with ethidium bromide.

- DNA molecular weight marker : Lane M
- Wild type : Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 17
- Heterozygote polymorphism : Lanes 6, 12, 13
- Homozygote polymorphism : Lanes 9, 16

รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ PCR-RFLP ของ *GSTO1* genotype ในผู้ป่วยมะเร็งปอดมดลูก



GSTO2 gene analysis

The PCR product was digested by *MboI* restriction enzyme, electrophoresed in 2% agarose gel, and stained with ethidium bromide.

- DNA molecular weight marker : Lane M
- Wild type : Lanes 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16
- Heterozygote polymorphism : Lanes 3, 6, 11
- Homozygote polymorphism : Lanes 13

รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์ PCR-RFLP ของ *GSTO2* genotype ในผู้ป่วยมะเร็งปอดมดลูก

ตารางที่ 1 : การกระจายโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *GSTO1* และ *GSTO2* ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวไทย เทียบกับหญิงไทยปกติ

Genotypes	Cervical cancer (n = 50)	Control (n = 33)	OR, 95%CI	p-value
<i>GSTO1</i>^a				
A140/A140	39	26	1.00 (reference)	
A140/D140	8	6	1.125 (0.285-4.197)	0.843
D140/D140	3	1	0.500 (0.009-6.682)	0.551
Allele Frequency of <i>GSTO1</i>^c				
A140	0.86	0.88		
D140	0.14	0.12		
<i>GSTO2</i>^b				
N142/N142	33	21	1.00 (reference)	
N142/D142	15	11	1.152(0.395-3.296)	0.770
D142/ D142	2	1	0.785 (0.012-16.048)	0.847
Allele Frequency of <i>GSTO2</i>^d				
N142	0.81	0.80		
D142	0.19	0.20		

^a For *GSTO1*, odd ratio (OR) were calculate by comparison of control individuals and cervical carcinoma groups for *GSTO1**A140/D140 versus *GSTO1**A140/A140.

^b For *GSTO2*, odd ratio (OR) were calculate by comparison of control individuals and cervical carcinoma groups for *GSTO2**D142/D142 or *GSTO2**N142/D142 versus *GSTO2**N142/N142.

^c For *GSTO1*, the frequency of D140 polymorphism in the cervical cancer cases was 0.14.

^d For *GSTO2*, the frequency of D142 polymorphism in the cervical cancer cases was 0.19. All the polymorphisms were in agreement of Hardy-Weinberg equilibrium.

ปากมดลูกชาวไทยเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติหญิงไทย ไม่พบความแตกต่างของการกระจายของโพลีมอร์ฟิซึมของยีนโดยมีค่า $p = 0.93$ ใน *GSTO1* และ $p = 0.82$ ใน *GSTO2* ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ในตารางที่ 2 จากการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *GSTO* เทียบกับลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกหญิงไทย พบว่าการมีโพลีมอร์ฟิซึมของยีนนี้ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ทางคลินิก แต่พบว่าโพลีมอร์ฟิซึมของยีน *GSTO2**N142D มีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับชนิดของ มะเร็งปากมดลูกชนิด adenocarcinoma ($p = 0.063$) และระยะที่ 1 (Ib) ของมะเร็งปากมดลูก ($p = 0.061$)

วิจารณ์

การเกิดมะเร็งมีกระบวนการเกิดในลักษณะที่ซับซ้อน อาจเกิดจากพฤติกรรมการใช้ชีวิตของผู้ป่วย และปัจจัยเสี่ยงประกอบกัน

สำหรับมะเร็งปากมดลูกนั้นมีรายงานมากมายบ่งชี้ว่าการมีปัจจัยร่วมคือการติดเชื้อ Human Papilloma Virus (HPV) จะนำไปสู่การเป็นมะเร็งมากขึ้น แต่ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกบางรายก็ไม่พบการติดเชื้อ HPV ดังนั้นจึงอาจมีสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ โดยเริ่มตั้งแต่เป็นรอยโรคก่อนมะเร็ง (precancerous lesions) ของปากมดลูกที่เรียกว่า Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) แล้วพัฒนาไปจนเป็นมะเร็ง ปัจจัยร่วมที่เข้ามามีบทบาทกับการพัฒนาไปจนเกิดเป็นมะเร็งไม่เพียงแต่ปัจจัยความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อมเท่านั้น แต่อาจเนื่องจากมีพันธุกรรมเอื้อต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูก (genetics susceptibility) ซึ่งอาจจะแตกต่างกันไปในแต่ละยีน²¹ ตัวอย่างเช่น ยีนหลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับ การย่อยสลายพวกสารก่อมะเร็ง (metabolizing carcinogens) และโพลีมอร์ฟิซึมของยีนเหล่านี้ อาจส่งผลให้ metabolic pathways มีประสิทธิภาพน้อยลง หรือมากเกินไปได้ ซึ่งอาจเป็นจุดที่นำไปสู่การพัฒนาเป็นมะเร็ง สำหรับการศึกษาค้นคว้านี้ได้เลือกยีน

ตารางที่ 2 : ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกและข้อมูลของ *GSTO* genotypes

	GSTO1			p-value	GSTO2			p-value
	C/C (n = 39)	C/A (n = 8)	A/A (n = 3)		A/A (n = 33)	G/A (n = 15)	G/G (n = 2)	
ระยะของมะเร็ง CACX								
Ib	9(64.3)	4(28.6)	1(7.1)	0.644	7(50)	7(50)	0(0)	0.061
IIb	17(85)	2(10)	1(5)		16(80)	2(10)	2(10)	
IIIb	13(81.3)	2(12.5)	1(6.3)		10(62.5)	6(37.5)	0(0)	
HPV infection								
negative	10(76.9)	2(15.4)	1(7.7)	0.956	8(61.5)	5(38.5)	0(0)	0.556
positive	29(78.4)	6(16.2)	2(5.4)		25(67.6)	10(27)	2(5.4)	
Histopathology								
Squamous cell CA	32(80)	7(17.5)	1(2.5)	0.107	29(72.5)	9(22.5)	2(5)	0.063
Adenocarcinoma	7(70)	1(10)	2(20)		4(40)	6(60)	0(0)	
Cell differentiation								
Well	7(100)	0(0)	0(0)	0.091	4(57.1)	3(42.9)	0(0)	0.783
Moderate	5(62.5)	1(12.5)	2(25)		5(62.5)	3(37.5)	0(0)	
Poor	27(77.1)	7(20)	1(2.9)		24(68.6)	9(25.7)	2(5.7)	
ประวัติการสูบบุหรี่								
ไม่สูบ	23(76.7)	4(13.3)	3(10)	0.660	18(60)	10(33.3)	2(6.7)	0.954
เคยสูบ-เลิกแล้ว	2(66.7)	1(33.3)	0(0)		2(66.7)	1(33.3)	0(0)	
สูบบุหรี่อยู่	4(100)	0(0)	0(0)		3(75)	1(25)	0(0)	
ประวัติการดื่มสุรา								
ไม่ดื่ม	21(77.8)	4(14.8)	2(7.4)	0.844	17(63)	8(29.6)	2(7.4)	0.739
ดื่มไม่เกินสัปดาห์ละคร้ง	2(66.7)	1(33.3)	0(0)		1(33.3)	2(66.7)	0(0)	
ดื่มมากกว่าสัปดาห์ละคร้ง	2(100)	0(0)	0(0)		2(100)	0(0)	0(0)	
เคยดื่มประจำปัจจุบันหยุดแล้ว	4(100)	0(0)	0(0)		3(75)	1(25)	0(0)	
มีประวัติคนในครอบครัวเป็นมะเร็ง								
ไม่มีประวัติ	24(77.4)	5(16.1)	2(6.5)	0.940	20(64.5)	9(29)	2(6.5)	0.653
มีประวัติ	8(72.7)	2(18.2)	1(9.1)		7(63.6)	4(36.4)	0(0)	

a Chi-square test

GSTO ซึ่งเป็นยีนที่เพิ่งพบใหม่ และมีรายงานพบความเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ หลายชนิด²² อันอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งปากมดลูกในสตรีไทย

การศึกษาของ Kleine JP ปี 2015 ในผู้ป่วยชาวบราซิลพบว่า โพลีมอร์ฟิซึมของยีน *CYP1A1* อาจมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์ลักษณะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการพัฒนาไปเป็น intraepithelial neoplasia ในมะเร็งปากมดลูก แสดงให้เห็นว่ายีนสามารถเกี่ยวข้อง

กับกระบวนการเกิดมะเร็งโดยเริ่มต้นจาก Intraepithelial neoplastic type แล้วพัฒนาไปเป็นมะเร็งต่อไป²¹ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในโพลีมอร์ฟิซึมของยีนอื่นในมะเร็งปากมดลูก และพบว่ามีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก เช่น โพลีมอร์ฟิซึมของ *p21Ser31tabArg* ในผู้ป่วยชาวบราซิล²³ โพลีมอร์ฟิซึมของ *MTHFR A1298C* ในผู้ป่วยชาวจีน²⁴ และศึกษา โพลีมอร์ฟิซึมของ *IL-27 2905T/G* พบว่ามีความเกี่ยวข้อง

สัมพันธ์ในลักษณะไปลดการเกิดมะเร็งปากมดลูกในผู้ป่วยชาวจีนเชื้อสายฮั่น (Chinese Han Population)^{25,26} แต่ยังไม่พบมีการศึกษาความสัมพันธ์ของมะเร็งปากมดลูกกับโพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO1 และ GSTO2 มาก่อนเลย

การศึกษาการกระจายความถี่ของจีโนไทป์โพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO1 และ GSTO2 ในกลุ่มประชากรต่างๆ พบว่าสำหรับ GSTO1 ความถี่ของอัลลีล D140 เป็นดังนี้คือ ในประชากรยุโรป ออสเตรเลียน $f = 0.34$ และจะต่ำลงในชาวจีน $f = 0.17$ ชาวบราซิล $f = 0.16$ ชาวแม็กซิกัน $f = 0.12$ ชาวญี่ปุ่น $f = 0.12$ และชาวแอฟริกัน $f = 0.08$ ²⁷ สำหรับการศึกษาความถี่ของอัลลีล D140 ในชาวไทย คือ $f = 0.13$ ¹⁵ $f = 0.13$ ²⁰ $f = 0.12$ ²⁷ ส่วน GSTO2 ความถี่ของอัลลีล D142 เป็นดังนี้คือ ในประชากรชาวแอฟริกัน $f = 0.86$ ชาวออสเตรเลียน $f = 0.31$ ชาวจีน $f = 0.27$ และชาวไทย $f = 0.22$ ¹⁵ $f = 0.22$ ²⁰ และ $f = 0.23$ ²⁷ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ได้ความถี่ของอัลลีล D140, $f = 0.12$; D142, $f = 0.23$ ซึ่งจะมีค่าใกล้เคียงกันกับกลุ่มประชากรไทย และประชากรแถบเอเชีย

การศึกษาความสัมพันธ์ของโพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO1 และ GSTO2 กับมะเร็งชนิดอื่นๆ ทั้งในกลุ่มประชากรชาวต่างชาติและในกลุ่มประชากรชาวไทย เช่นการศึกษาความสัมพันธ์ของมะเร็งชนิด pre-B-cell lymphoblastic leukemia (pre-B-ALL) ในเด็กชาวอิหร่าน พบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของ GSTO1*A140D และ GSTO2*N142D ไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งชนิดนี้²² และพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างมะเร็งกระเพาะอาหารกับโพลิมอร์ฟิซึมของ GSTO2 N142D²⁸ การศึกษาความสัมพันธ์ของ Thyroid Nodules กับโพลิมอร์ฟิซึมของ GSTO1*A140D ในกลุ่มชาวบราซิลพบว่าไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดไปเป็นมะเร็ง²⁹ การศึกษาในชาวเยอรมัน ไม่พบความสัมพันธ์ของมะเร็งเต้านม กับโพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO1 (GSTO1_-1242_G>A กับ GSTO1_419_A>C) และ GSTO2 (GSTO2_-183_A>G กับ GSTO2_342_A>G) เลย³⁰ แต่บางรายงานรวบรวมงานวิจัยศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO1 และ GSTO2 มาวิเคราะห์ด้วย meta-analysis จำนวน 20 งานวิจัย พบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO2*N142D เท่านั้นที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งเต้านมในกลุ่มคนผิวขาว (Caucasian) ขณะที่ GSTO1*A140D และ GSTO1*E155del ไม่พบความสัมพันธ์เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด

มะเร็งเลย³¹ มีรายงานศึกษาความสัมพันธ์ของมะเร็งเต้านมในสตรีไทย พบว่า wild-type ของยีน GSTO1 (A140/A140) สัมพันธ์กับมะเร็งเต้านมระยะท้ายๆ (advance stage) ส่วนโพลิมอร์ฟิซึมของยีน GSTO1 และ GSTO2 ไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งเต้านมในสตรีไทยเลย²⁷ นอกจากนี้มีการศึกษาอื่นในกลุ่มประชากรชาวไทย พบว่ามะเร็งเต้านมมีความเกี่ยวข้องกับโพลิมอร์ฟิซึมของ GSTO1*A140D¹⁵ และมะเร็งรังไข่มีความเกี่ยวข้องกับโพลิมอร์ฟิซึมของ GSTO2*N142D¹⁹

จากการศึกษาที่ตรวจหาความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันระหว่างจีโนไทป์ GSTO1*A140D และ GSTO2*N142D กับพารามิเตอร์ทางคลินิก (Clinical parameters) ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวไทย เช่น staging histopathology การติดเชื้อ HPV การดื่มสุรา การสูบบุหรี่ และการมีประวัติพบบุคคลในครอบครัวเป็นมะเร็ง ไม่พบความสัมพันธ์ของยีน GSTO1*A140D และ GSTO2*N142D กับพารามิเตอร์ทางคลินิก (Clinical parameters) แต่มีแนวโน้มว่าจะมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างโพลิมอร์ฟิซึมของ GSTO2*N142D กับชนิดของมะเร็ง adenocarcinoma ($p = 0.063$) ส่วน staging หรือระยะของมะเร็งปากมดลูกนั้นโพลิมอร์ฟิซึม GSTO2*N142D กลับไปมีแนวโน้มสัมพันธ์กันในระยะที่ 1 (Ib) เสียมากกว่า ($p = 0.061$) ซึ่งระยะ Ib นี้เป็นระยะที่มะเร็งเริ่มมีการลุกลาม สามารถมองเห็นการลุกลามด้วยตาเปล่าโดยมะเร็งลามออกไปในทางลึกมากกว่า 3 มม. ทางกว้างเกิน 7 มม. แต่มองด้วยตาเปล่ามะเร็งยังจำกัดอยู่ในปากมดลูกเท่านั้น³² อย่างไรก็ตามเนื่องจากกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อย คาดว่าหากเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นอาจทำให้ค่าทางสถิติชัดเจนยิ่งขึ้น

สรุป

การศึกษาโพลิมอร์ฟิซึม GSTO1*A140D และ GSTO2*N142D ของยีน GSTO ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวไทยในเบื้องต้นนี้ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแง่ของการกระจายของโพลิมอร์ฟิซึมของยีนกับการเกิดมะเร็งปากมดลูก แต่พบว่าโพลิมอร์ฟิซึม GSTO2*N142D มีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด adenocarcinoma และระยะที่ 1 (Ib) ของมะเร็งปากมดลูก

เอกสารอ้างอิง

- Guengerich FP, Thier R, Persmark M, Taylor JB, Pemble SE, Ketterer B. Conjugation of carcinogens by theta class glutathione S-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics* 1995;5 Spec No:S103-7.
- To-Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Pique E, Borrego N, Marfany G, et al. Polymorphism of glutathione S-transferase M3: interaction with glutathione S-transferase M1 and lung cancer susceptibility. *Biomarkers* 2000;5:73-80.
- Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione S-transferases in anticancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22:7369-75.
- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical. Res* 1999;31:273-300.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastel S, Jermini LS, Schulte GK, et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 2000;275:24798-806.
- Townsend DM, Tew KD. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione -S-transferases gene family. *Am J Pharmacogenomics*. 2003;3:157-72.
- Zheng T, Holford TR, Zahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, alcohol consumption and breast cancer risk. *Br J Cancer* 2003;88:58-62.
- Smith RA, Curran JE, Weinstein SR, Graffiths LR. Investigation of glutathione -S-transferases zeta and the development of sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2001;3:409-11.
- Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992;98:87-94.
- Lewis SJ, Cherry NM, McNiven R, Barber PV, Povey AC. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Letter* 2002;180:165-71.
- Miller DP, Liu G, De Vivo I, Lynch TJ, Wain JC, Su L, et al. Combinations of the variant genotypes of GSTP1, GSTM1, and p53 are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res* 2002;62:2819-23.
- Stücker I, Hirvonen A, de Waziers I, Cabelguenne A, Mitrinen K, Cénée S, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2002;23:1475-81.
- Loktionov A, Watson MA, Gunter M, Stebbings WS, Speakman CT, Bingham SA. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor. *Carcinogenesis* 2001;22:1053-60.
- Strange RC, Fryer AA. The glutathione -S-transferases: influence of the polymorphisms in cancer susceptibility: *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*, IARC Scientific Publications no. 148, Lyon, IARC 1999:231-49.
- Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett* 2006;236:276-81.
- Whitbread AK, Tetlow N, Eyre HJ, Sutherland GR, Board PG. Characterization of the human Omega class glutathione transferases gene and associated polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2003;13:131-44.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastel S, Jermini LS, Schulte GK, et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 2000;275:24798-806.
- Yin ZL, Dahlstrom JE, Le Couteur DG, Board PG. Immunohistochemistry of Omega class glutathione -S-transferases in human tissues. *J Histochem Cytochem* 2001;49:983-8.
- Pongstaporn W, Rochanawutanon M, Wilailak S, Linasamita V, Weerakiat S, Petmitr S. Genetic alterations in chromosome 10q24.3 and glutathione S-transferase omega 2 gene polymorphism in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:107-14.
- Pongstaporn W, Pakakasama S, Sanguansin S, Hongeng S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase Omega gene: association with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:673-8.
- Kleine JP, Camargo-Kosugi CM, Carvalho CV, Silva FC, Silva ID. Analysis of CYP1A1 and COMT polymorphisms in women with cervical cancer. *Genet Mol Res* 2015;14:18965-73.
- Rezazadeh D, Moradi MT, Kazemi A, Mansouri K. Childhood Pre-B acute lymphoblastic leukemia and glutathione S-transferase omega 1 and 2 polymorphisms. *Int J Lab Hematol*. 2015;37:530-5.
- Lima G, Santos E, Angelo H, Oliveira M, Heráclio S, Leite F, et al. Association between p21 Ser31Arg polymorphism and the development of cervical lesion in women infected with high risk HPV. *Tumour Biol. /first online* 17 February 2016.
- Yi K, Yang L, Lan Z, Xi M. The association between MTHFR polymorphisms and cervical cancer risk: a system review and meta analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016 Feb 15.
- Wang GQ, Zhao WH, Zhao XX, Zhang J, Nan KJ. Association between IL-27 2905T/G genotypes and the risk and survival of cervical cancer: a case-control study. *Biomarkers*. 2016:1-4.

26. Shi J, Yuan M, Liu S, Duan X, Chen J. Correlation of IL-27 genetic polymorphisms with the risk and survival of cervical cancer in a Chinese Han population. *Tumour Biol* 2015 Dec 11.
27. Chariyalertsak S, Purisa W, Sangrajrang S. Role of glutathione S-transferase omega gene polymorphisms in breast-cancer risk. *Tumori* 2009;95:739-43.
28. Masoudi M, Saadat I, Omidvari S, Saadat M. Genetic polymorphisms of GSTO2, GSTM1, and GSTT1 and risk of gastric cancer. *MolBiol Rep* 2009;36:781-4.
29. Granja F, Morari EC, Assumpção LV, Ward LS. GSTO polymorphism analysis in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy. *Eur J Cancer Prev* 2005;14:277-80.
30. Andonova IE, Justenhoven C, Winter S, Hamann U, Baisch C, Rabstein S, et al. No evidence for glutathione S-transferases GSTA2, GSTM2, GSTO1, GSTO2, and GSTZ1 in breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:497-502.
31. Xu YT, Wang J, Yin R, Qiu MT, Xu L, Wang J, et al. Genetic polymorphisms in Glutathione S-transferase Omega (GSTO) and cancer risk: a meta-analysis of 20 studies. *Sci Rep* 2014;4:6578.
32. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Obstet* 2009;105:107-8.

The Preliminary Study of Polymorphism of *GSTO1* and *GSTO2* Genes in Cervical Cancers among Thai Patients

Rujinee Paditaporn¹, Mahattana Kamolsilp², Songsak Petmitr³, Phaibul Punyarit⁴, Anant Karalak⁵, Wanida Pongstaporn⁶ and Passra Arnutti¹

¹Department of Pathology, Phamongkutklao College of Medicine; ²Armed Forces Research Institute of Medical Sciences;

³Department of Molecular Tropical Medicine and Genetics Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University; ⁴Bumrungrad Hospital;

⁵National Cancer Institute; ⁶Department of Pathology, Rungsit University

Abstract:

Introduction: Cervical cancer is the second most common malignancy among Thai women. The glutathione S-transferase (GST) family have been identified as risk factor for cancer. GST omega (GSTO) has been found in a very limited number of studies, and there was no reported about genetic polymorphisms of GSTO1 and GSTO2 gene in cervical cancer risk in Thai women. **Objective:** The aim of this study was to investigate the influence of GSTO1 and GSTO2 gene in cervical cancer risk in Thai patients. **Materials and Methods:** This case-control study analyzed GSTO1*A140D and GSTO2*N142D gene polymorphisms using a Restriction fragment length Polymerase chain method (RFLP). In 50 Thai female patients and 33 Thai female healthy controls. **Results:** The genotype frequencies were not significantly different between GSTO1*A140D and GSTO2*N142D polymorphisms and the risk of Thai cervical cancer patients. The presence of the genotype did not correlate with clinicopathological parameter but GSTO2*N142D polymorphisms trend to associated with adenocarcinoma histopathology type ($p = 0.063$) and first staging (Ib) of cervical cancer ($p = 0.061$). **Conclusions:** This study found no significant association between GSTO1*A140D and GSTO2*N142D polymorphisms and risk of cervical cancer among Thai women.

Keywords: ● Polymorphisms ● GSTO1 ● GSTO2 ● Cervical cancer

RTA Med J 2015;68:155-64.