

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาชนิดของยีน PML-RAR α ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิด APL โดยวิธี nested RT-PCR

อรรถัย พรหมสุวิชา^{1,3}, วรรณนา ทองนพคุณ^{2,3}, สมชาย วงศ์ขันตี⁴, จินตนา โตเจริญธนาผล⁵

และ จิรายุ เอื้อวรากุล^{1,3}

¹สาขาวิชาโลหิตวิทยา, ภาควิชาอายุรศาสตร์, ²หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย, ³คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

⁴โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น, ⁵ศูนย์โครโมโซม กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ : ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน APL มีความผิดปกติของโครโมโซมคู่ที่ 15 และ 17 (t(15;17)) ซึ่งทำให้ยีน PML และ RAR α มาเชื่อมต่อกัน โดยที่ยีน PML เกิดรอยขาดได้ 3 ตำแหน่ง คือ intron 6 (bcr1), exon 6 (bcr2) และ intron 3 (bcr3) ส่วนยีน RAR α เกิดรอยขาดที่ intron 2 **วัตถุประสงค์:** เพื่อพัฒนาการตรวจหายีนลูกผสม PML/RAR α ที่เกิดจาก t(15;17) โดยวิธี nested RT-PCR และ ศึกษาชนิดต่างๆ ของยีน PML/RAR α (bcr1, bcr2 และ bcr3) ในคนไทย **วัสดุและวิธีการ:** ตัวอย่างตรวจไขกระดูกหรือเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน APL ที่ได้ผ่านการวินิจฉัยโดยการตรวจอิมมูโนฟิโนทัยป์และการตรวจโครโมโซมตามวิธีมาตรฐาน การตรวจหายีน PML/RAR α ใช้วิธี nested RT-PCR โดยมีเซลล์ไลน์ NB4 ที่มี t(15;17) เป็นตัวเปรียบเทียบ **ผลการศึกษา:** จากการดูลักษณะเซลล์และการตรวจอิมมูโนฟิโนทัยป์ มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว APL ทั้งสิ้น 64 ราย โดยพบ bcr1, bcr2 และ bcr3 ร้อยละ 81.25, 3.125 และ 0 ตามลำดับ ผู้ป่วยที่มี t(15;17) จากการตรวจโครโมโซม (n = 12) พบ bcr1 ร้อยละ 83.33 (10 ใน 12 ราย) และพบ bcr 2 ร้อยละ 16.66 (2 ใน 12 ราย) สำหรับผู้ป่วย APL ที่มีโครโมโซมปกติ (n = 36) หรือตรวจโครโมโซมไม่ได้ (insufficient metaphases) (n = 16) ตรวจพบ PML-RAR α 40 ราย (76.29%) **สรุป:** ตรวจพบยีน PML-RAR α ชนิด bcr1 มากที่สุดในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิด APL และเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการตรวจโครโมโซมวิธีปกติ พบว่าการตรวจหายีน PML-RAR α โดยวิธี nested RT-PCR มีความจำเพาะและความไวมากกว่าโครโมโซมในการยืนยันการวินิจฉัย APL ระดับโมเลกุล

Key Words : ● Acute promyelocytic leukemia ● Chromosome translocation

● PML-RAR α gene variant ● Nested PCR

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2548;15:247-57.

ได้รับต้นฉบับ 22 กรกฎาคม 2548 ให้ลงตีพิมพ์ 9 สิงหาคม 2548

ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ รศ.ดร.พญ.จิรายุ เอื้อวรากุล สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ตึกเฉลิมพระเกียรติขึ้นที่ 12 บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ปีที่ 15 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2548

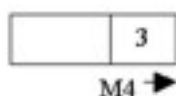
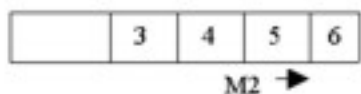
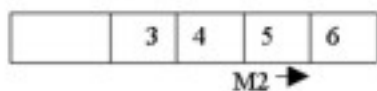
โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิด Acute promyelocytic leukemia (APL) มีลักษณะผิดปกติของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (Pluripotent hematopoietic stem cell) โดยเมื่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดเจริญถึงระยะ Promyelocyte แล้วไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นเม็ดเลือดขาวตัวแก่ที่สมบูรณ์ได้ จึงมีจำนวนเม็ดเลือดขาวระยะ Promyelocyte เพิ่มขึ้นผิดปกติในไขกระดูก^{1,2} จากการศึกษาในระดับโครโมโซมและยีนในเซลล์มะเร็งชนิด APL พบว่ามีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่ที่ 15 และ 17 [t(15;17)(q22;q21)] ทำให้ยีน Promyelocytic leukemia (PML) ซึ่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 15 (15q22) เกิดรอยขาดและมีการย้ายมาต่อกับ Retinoic acid receptor α (RAR α) ซึ่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 17 (17q21) เกิดเป็นยีนลูกผสมที่เรียกว่า *PML-RAR α* ³⁶ ซึ่งจะรบกวนการทำงานของยีนทั้ง PML และ RAR α ทำให้เกิดการส่งสัญญาณที่ผิดปกติในเซลล์เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีการเจริญแก่ตัว

การเกิดยีน *PML-RAR α* พบได้ 3 รูปแบบ โดยโครโมโซมคู่ที่ 15 จะมีตำแหน่งที่เกิดรอยขาดเรียกว่า breakpoint cluster region (bcr) สามแบบ คือ bcr1, bcr2 และ bcr3 ซึ่งอยู่บน intron 6, exon 6 และ exon 3 ตามลำดับ³⁷⁻⁹ ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 17 จะเกิดรอยขาดที่ intron 2 ของยีน RAR α การเชื่อมต่อยีนทั้งสองสามารถเรียกชื่อตามรูปแบบของ mRNA ที่พบคือ Long (L) type, Variant (V) type และ Short (S) type ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรค APL มีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจดูลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดในเลือดและไขกระดูกด้วยการย้อมสีและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์มะเร็ง การตรวจแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์ และการตรวจหายีนที่ผิดปกติของเซลล์มะเร็ง¹⁰⁻¹⁴ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติระดับอนุพันธุศาสตร์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด APL เพื่อตรวจหายีนลูกผสม *PML-RAR α*

Chromosome 15

PML



Chromosome 17

RAR α



รูปที่ 1 แสดงรูปแบบของ *PML-RAR α* transcript ชนิด L type, V type และ S type และแสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

RAR α โดยใช้วิธี nested RT-PCR และค้นหาชนิดต่างๆ ของยีน PML-RAR α ในคนไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิด APL

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจ

ไขกระดูกหรือเลือดของผู้ป่วยไทยที่เป็น APL ที่ได้รับการวินิจฉัยที่โรงพยาบาลศิริราชโดยการดูลักษณะเซลล์จากการย้อมสีมาตรฐาน และการตรวจด้วยฟลูออโรสโตเมตรี

การตรวจแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งด้วยฟลูออโรสโตเมตรี

แยก Mononuclear cells (MNCs) จากไขกระดูกหรือเลือดของผู้ป่วยไทยที่เป็น APL โดยใช้ Ficoll-Hypaque และย้อมด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) และ peridinin chlorophyll protein (PerCP) (BD Biosciences, CA, USA) 15 นาที, เติม FACS™ lysing Solution (BD Biosciences, CA, USA) 10 นาที จากนั้นล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) และเติม 1% paraformaldehyde แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย FACScalibur (BD Biosciences, CA, USA)

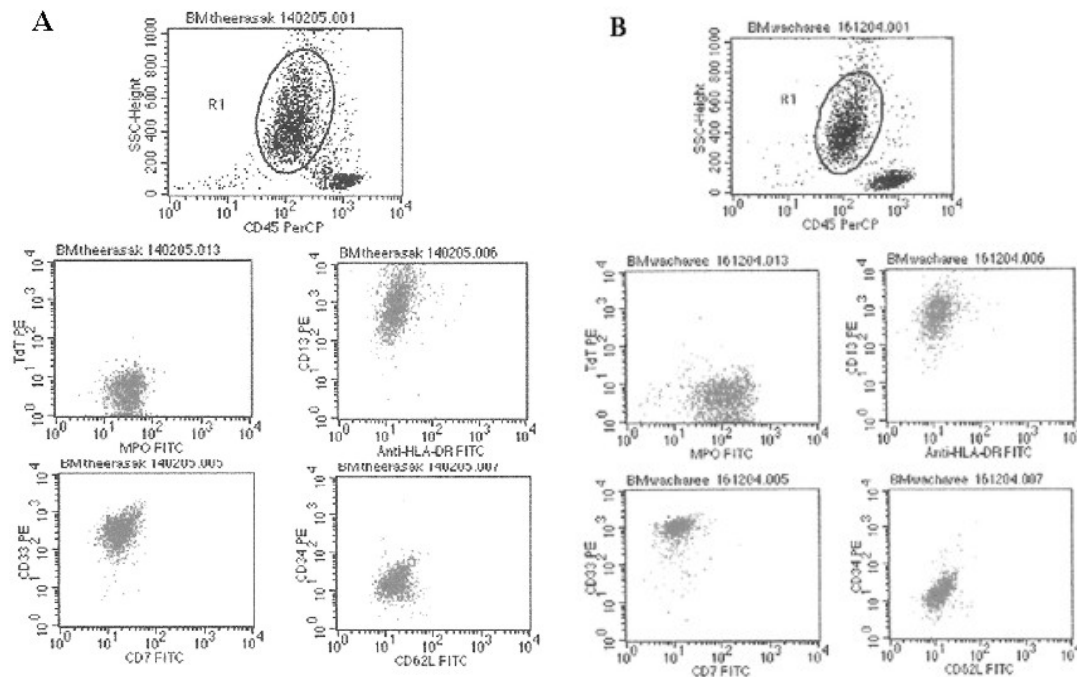
การตรวจหา PML-RAR α ด้วยวิธี nested RT-PCR

สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่แยกจากตัวอย่างตรวจโดยใช้ Trizol® (Invitrogen Corporation, CA, USA) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธีของ Chomczynski P และคณะ¹⁵ นำ RNA ที่ได้ 1 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ AMV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, USA) จากนั้นนำ cDNA 1 ไมโครลิตร มาใส่ในส่วนผสมเพื่อทำพีซีอาร์ (PCR mixture) 24 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย MgCl₂ 1.5 มิลลิโมลาร์, 1X Immolase buffer (Immolase; Bioline, Germany), dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, Taq DNA polymerase 0.625

ยูนิต และ 10 พิโคโมลาร์ของไพรเมอร์ ในการศึกษาในครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ (ดังแสดงในรูปที่ 1)¹³ ไพรเมอร์ที่ใช้คือ M2: 5'-AGTGTACGCCTTCTCCATCA-3', กับ M4: 5'-AGCTGCTGGAGGCTGTGGACGC GCGGTACC-3' เป็น 5' primers; และ R8: 5'-CAG AACTGCTGCT CTGGGTCTCAAT-3'; กับ R5: 5'-CCACTAGTGGTA GCCTGAGGACT-3' เป็น 3' primers และ Internal control β -actin primer คือ Forward: 5'- CCTTCCTGGGCATGGAGT CCTG-3', Reverse: 5'- GGAGCAATGATCTTGAT CTTC -3' นำส่วนผสมของพีซีอาร์ที่ได้เข้าเครื่อง (PCR Sprint Thermal Cycler, CA, USA) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยหลังจาก initial denaturation ที่ 95°C 5 นาที แล้วทำการ denaturation, annealing และ elongation ที่ 95°C 1 นาที, 55°C 1 นาที และ 72°C 1 นาที ตามลำดับจำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลที่ได้จากพีซีอาร์ 1 ไมโครลิตร มาทำการเพิ่มจำนวน อีก 30 รอบโดยใช้ nested primer (R8) นำผลที่ได้จากพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตรไปแยกใน 1.5% LE agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ผลการศึกษา

จากการศึกษาตัวอย่างจากไขกระดูกหรือเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด APL ที่ได้ผ่านการตรวจยืนยันโดยวิธีฟลูออโรสโตเมตรี ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่ามีผู้ป่วยที่มีลักษณะของเซลล์จากการย้อมด้วยสีตามวิธีมาตรฐาน และการศึกษาทางฟลูออโรสโตเมตรีเข้าได้กับ APL จำนวน 64 ราย โดย APL มีลักษณะจำเพาะคือติด CD13, CD33, MPO และมี high side scatter (SSC) แต่ไม่ติด HLA-DR และติด CD34 น้อยมาก ในจำนวนนี้ได้ทำการตรวจทางโครโมโซมร่วมกับการหาชนิดของยีน PML-RAR α ด้วยวิธี nested RT-PCR พบว่ามีผู้ป่วย 12 รายจาก 64 รายที่มีโครโมโซม t(15;17) และ



รูปที่ 2 รูปโฟลไซโตเมทรีแสดงแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย APL ที่มี t(15;17) จากการตรวจโครโมโซม (A) และผู้ป่วย APL ที่พบยีน *PML-RARα* จากการตรวจพีซีอาร์ แต่ไม่พบโครโมโซมผิดปกติ (Normal karyotype) (B) โดยทั้งสองรายมีความผิดปกติทางโฟลไซโตเมทรีเหมือนกัน คือ มี high SSC, MPO+, CD13+, CD33+, CD34- และ HLA-DR-negative

ตรวจพบ *PML-RARα* ทั้ง 12 ราย โดย 10 ราย (15.625%) เป็นยีน *PML-RARα* ชนิด L type และ 2 ราย (3.125%) เป็นชนิด V type ผู้ป่วย APL ที่ได้รับการตรวจยืนยันโดยโฟลไซโตเมทรี แต่โครโมโซมไม่พบ t(15;17) มี 52 ราย โดยแบ่งเป็นผู้ป่วย APL ที่มีโครโมโซมปกติ 36 ราย หรือตรวจโครโมโซมไม่ได้ (insufficient metaphases) 16 ราย ทั้งนี้พบว่า 40 ราย (76.92%) มียีน *PML-RARα* ชนิด L type ส่วนอีก 12 ราย ไม่พบยีน *PML-RARα* นอกจากนี้ยังตรวจผู้ป่วย AML อื่นๆ ที่ไม่ใช่ APL จำนวน 17 ราย และในคนปกติจำนวน 5 ราย ไม่พบยีน *PML-RARα* แม้แต่รายเดียว ดังแสดงในตารางที่ 1

รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจยีน *PML-RARα* ด้วยวิธี nested RT-PCR เลนที่ 1 แสดง 100 bp DNA Ladder, เลนที่ 2 ตรวจพบยีน *PML-RARα* ชนิด L

type มีขนาด 326 bp ในเซลล์ไลน์ NB4, เลนที่ 3 พบยีน *PML-RARα* ชนิด L type ในผู้ป่วย APL และได้ตรวจยืนยันจากการ sequencing, เลนที่ 4 พบยีน *PML-RARα* ชนิด V type มีขนาด 290 bp ในผู้ป่วย APL และได้ตรวจยืนยันจากการ sequencing, เลนที่ 5 ตัวอย่างตรวจจากคนไข้ AML ที่ไม่ใช่ APL, เลนที่ 6 ตัวอย่างตรวจจากคนปกติ และ เลนที่ 7 เป็นน้ำที่ใช้เป็น negative control ในตัวอย่างตรวจจะมี β -Actin เป็น Internal control ทุกสาย รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันในรายที่มียีนผิดปกติ

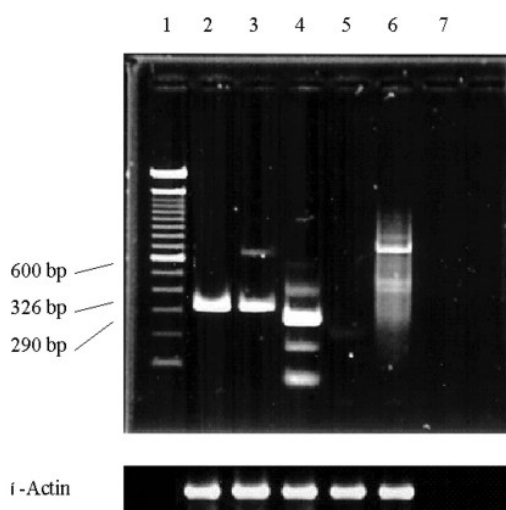
วิจารณ์

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน APL สามารถตรวจวินิจฉัยได้หลายวิธี อาทิ Morphology, Cytochemistry, Immunophenotyping, Karyotyping

ตารางที่ 1 แสดงการตรวจพบรูปแบบต่างๆ ของยีน *PML-RAR α* ในผู้ป่วยที่เป็น APL ทั้งที่มีและไม่มี t(15;17) จากการตรวจโครโมโซมด้วยวิธีมาตรฐาน และผู้ป่วยอื่นๆ ที่ไม่ใช่ APL

RT-PCR	APL with t(15;17) (n=12)	APL without t(15;17) (n=52)	Non-APL ¹ (n=17)	Normal (n=5)
Positive	12	40	0	0
Bcr1	10	40	0	0
Bcr2	2	0	0	0
Bcr3	0	0	0	0
Negative	0	12	17	5

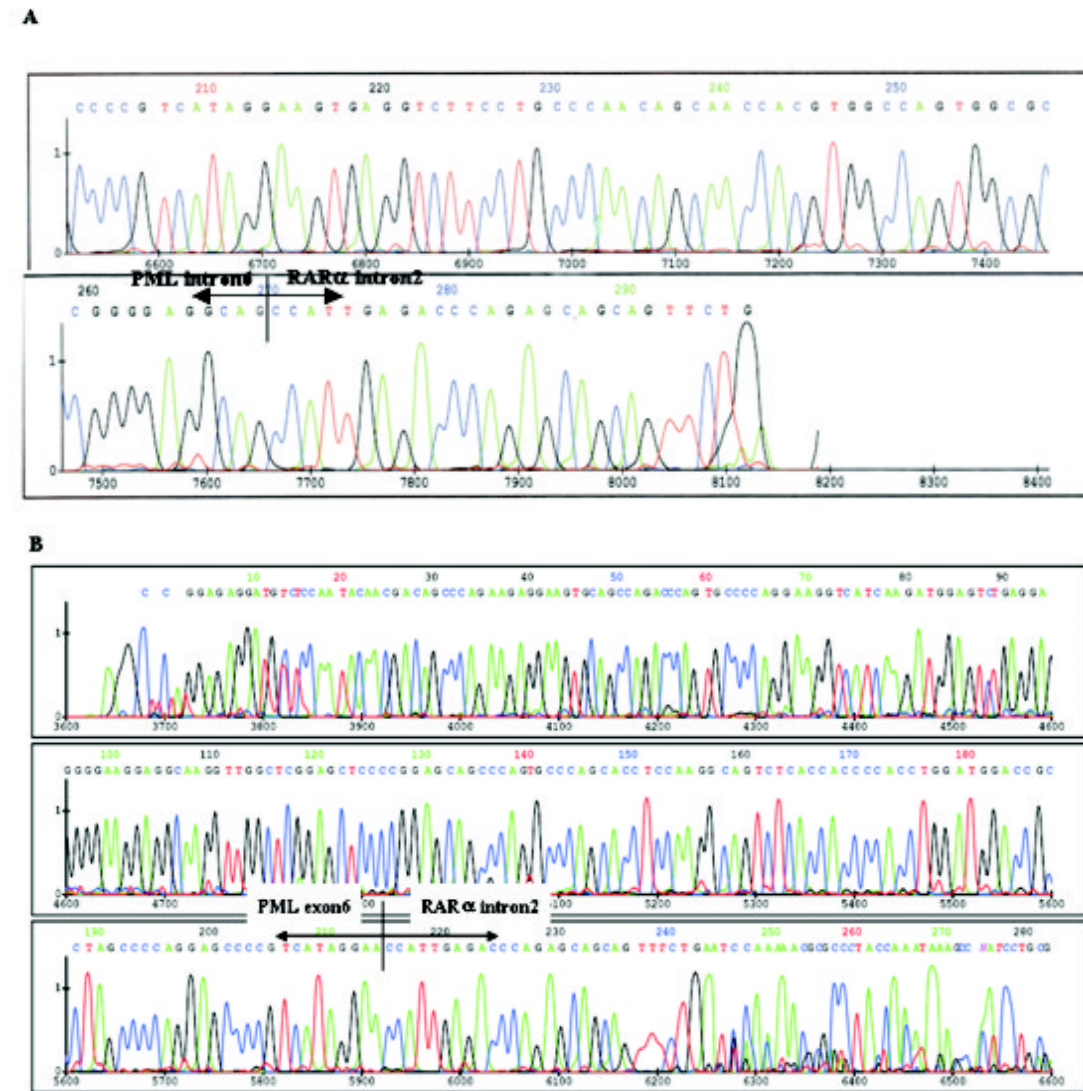
¹Non-APL: AML-M1 6 ราย AML-M2 5 ราย AML-M4 4 ราย
AML-M6 1 ราย ALL 1 ราย



รูปที่ 3 ผลการตรวจยีน *PML-RAR α* ด้วยวิธี nested RT-PCR เลนที่ 1 แสดง 100 bp DNA Ladder, เลนที่ 2 ตรวจพบ *PML-RAR α* ชนิด L type มีขนาด 326 bp ในเซลล์ไลน์ NB4 ที่ใช้เป็น positive control, เลนที่ 3 พบ *PML-RAR α* ชนิด L type ในผู้ป่วย APL, เลนที่ 4 พบ *PML-RAR α* ชนิด V type มีขนาด 290 bp ในผู้ป่วย APL, เลนที่ 5 ตัวอย่างตรวจจากคนไข้ AML ที่ไม่ใช่ APL, เลนที่ 6 ตัวอย่างตรวจจากคนปกติ และ เลนที่ 7 เป็นน้ำที่ใช้เป็น negative control

และการศึกษาในระดับอณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetics) การดูลักษณะเซลล์ด้วยการย้อมสีตามปกติ สามารถช่วยในการวินิจฉัย APL ได้ไม่ยากแม้ว่าจะมีผู้ป่วยส่วนหนึ่งซึ่งไม่ใช่ APL แต่เป็น AML M2 หรือ M4-M5 ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น M3 อยู่บ่อยๆ เนื่องจากบางครั้งเซลล์มะเร็งใน M2 หรือ M4-5 มีลักษณะคล้ายคลึงกับ Promyelocyte การตรวจด้วยฟลูออริสเซนซ์ช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัย APL ยิ่งขึ้นโดย APL จะมีลักษณะที่ต่างจาก AML ชนิดอื่นๆ คือเป็นเซลล์ที่มี high SSC, high MPO, CD33+, CD13+ แต่ไม่ติด HLA-DR และไม่ติด CD34 หรือติดค่อนข้างน้อย ดังแสดงในรูปที่ 2

ในปัจจุบันการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมและยีนมีความสำคัญมากเนื่องจากพบว่าผู้ป่วย APL ที่มีโครโมโซม t(15;17) และมีความผิดปกติของยีนคือมี ยีนหลุมผสม *PML-RAR α* นั้นมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา All-trans-retinoic acid (ATRA) ที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มีการเจริญแก่ตัว โดยมีรายงานครั้งแรกจากเมืองเซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน ในปี ค.ศ. 1987¹⁶ จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับยีน *PML-RAR α* กันอย่างกว้างขวาง รวมทั้งมีการค้นพบเซลล์ไลน์ NB4 ซึ่งมี t(15;17) โดย Lanotte และคณะในปี 1991¹⁷ ซึ่งสามารถ



รูปที่ 4 ตัวอย่างผลการตรวจ sequencing ในรายที่พบยีน *PML-RARα* โดยวิธี nested PCR; L-type (A), V-type (B)

ใช้เป็น positive control ของการศึกษาใน *PML-RARα* ได้ด้วย นอกจากนี้การศึกษาระดับยีนของเซลล์มะเร็งยังได้รับการยอมรับระดับสากล โดยองค์การอนามัยโลก (WHO Classification, ปี 2001) ได้แยกผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวตามลักษณะโครโมโซมและยีนเป็นสำคัญ โดยแยกกลุ่มที่มี recurrent chromosome abnormality ออกมาเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มี t(8;21) หรือมียีน AML1-ETO กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่มี t(15;17)

หรือมียีน PML-RAR? กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มี inv(16) หรือ t(16;16) หรือมียีน *CBFβ/MYH11* และกลุ่มที่ 4 คือกลุ่มที่มีความผิดปกติของ 11q23 หรือยีน MLL¹⁸⁻²⁰ ซึ่งสามชนิดแรกถือว่าเป็นกลุ่มที่มีพยากรณ์โรคดี ในขณะที่กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ไม่ดี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตรวจวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยใช้หลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกฉบับล่าสุดมีความจำเป็นต้องใช้การศึกษาที่ลงลึกในระดับโครโมโซมและยีนของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่ายีนกลุ่ม *PML-RAR α* สร้าง mRNA ได้ 3 รูปแบบ คือ L type (bcr1), V type (bcr2) และ S type (bcr3) ในการศึกษา พบว่าสามารถตรวจพบยีน *PML-RAR α* ทั้งในผู้ป่วย APL ที่มีและไม่มี t(15;17) จำนวนทั้งสิ้น 52 ราย จากผู้ป่วย APL ทั้งหมด 64 ราย (81.25%) ในขณะที่การตรวจโครโมโซมพบความผิดปกติที่เป็น t(15;17) เพียง 12 รายจาก 64 ราย (18.75%) แสดงว่าการตรวจระดับอนุพันธุศาสตร์โดยใช้วิธี nested RT-PCR มีความไวกว่าการทำโครโมโซมตามวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH) ซึ่งมีข้อมูลจากการศึกษาในต่างประเทศว่าอาจช่วยวินิจฉัย t(15;17) ได้ดีกว่าการตรวจโครโมโซมตามปกติ^{9,21} แต่การตรวจด้วย FISH มีราคาแพงและยุ่งยากกว่าการตรวจโครโมโซมปกติ จำเป็นต้องอาศัยห้องปฏิบัติการเฉพาะและผู้อ่านที่มีความชำนาญ รวมทั้งการตรวจมีราคาแพงกว่าการตรวจโครโมโซมตามปกติ จึงไม่ได้ใช้เป็นวิธีตรวจมาตรฐานในทุกครั้งที่ต้องการยืนยันว่าเป็น APL ในประเทศไทย ในขณะที่การตรวจหา ยีน *PML-RAR α* โดยวิธี nested RT-PCR จากการศึกษานี้ ทำได้ง่ายกว่า ได้ผลรวดเร็ว รวมทั้งมีราคาถูกกว่า FISH มาก

ผลจากการวิจัยในคนไทยครั้งนี้พบว่าอุบัติการณ์ของชนิดของยีน *PML-RAR α* ในคนไทยประมาณร้อยละ 81 ซึ่งต่ำกว่ารายงานในต่างประเทศที่พบยีนนี้ในผู้ป่วย APL ได้ถึงร้อยละ 90-100 เป็นไปได้ว่าวิธี nested RT-PCR อาจยังไม่ไวพอที่จะตรวจพบยีน *PML-RAR α* ที่ผิดปกติทุกราย หรือในทางตรงข้าม อาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการดูเซลล์และโพลซัยโตเมทรีว่าเป็น APL โดยดูจาก HLA-DR, CD34, SSC, CD13, CD33, MPO นั้นอาจไม่ใช่ APL แต่เป็น AML-M2 บางรายที่มี high SSC และ HLA-DR negative นอกจากนี้ อาจเป็นไปได้ว่ามีผู้ป่วย APL ในคนไทยส่วนหนึ่งที่ไม่มียีน *PML-RAR α* จริงๆ แต่อาจมีชนิดอื่น

ในเซลล์มะเร็งที่เป็น variant ที่พบได้น้อย เช่น *RAR α -PLZF*, *NUMA-RAR α* , *NPM-RAR α* ซึ่งจะตรวจไม่พบโดยเทคนิคที่รายงานครั้งนี้ เนื่องจากในรายงานนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PML-RAR α* เท่านั้น

จากการตรวจชนิดย่อยของยีน *PML-RAR α* ในคนไทยจากการศึกษาครั้งนี้จะพบ bcr1 (L-type) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งคล้ายคลึงกับในต่างประเทศ ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานจากประเทศไทยหรือภูมิภาคเอเชียอาคเนย์มาก่อนที่จะใช้เปรียบเทียบ โดยในต่างประเทศจะเป็นชนิด bcr1 ร้อยละ 45-75 ของทั้งหมด ตามด้วยชนิด bcr3 ร้อยละ 15-45 และส่วนน้อยร้อยละ 5-10 จะเป็นชนิด bcr2^{3-5,7,9,14,22-25} (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาพบ bcr2 เพียงร้อยละ 4 และไม่พบ bcr3 (S-type) ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการศึกษาที่มีขนาดเล็ก หากศึกษาในประชากรไทยที่มีขนาดใหญ่ขึ้น อาจจะมีโอกาสพบความผิดปกติแบบ bcr2 และ bcr3 ในสัดส่วนที่สูงขึ้นได้ การที่พบอุบัติการณ์ของ bcr3 น้อยอาจถือเป็นสิ่งที่ดีในผู้ป่วยไทย เนื่องจากพยากรณ์โรคของผู้ป่วย APL ที่มี bcr3 จากรายงานในต่างประเทศพบว่ามีการพยากรณ์โรคไม่ดีเมื่อเทียบกับ bcr1 โดยผู้ป่วยที่มี bcr3 จะมีอัตราการเสี่ยงในการเกิด relapse เพิ่มขึ้น^{9,26,27}

สรุป

คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาการตรวจหา ยีน *PML-RAR α* ในคนไทยโดยใช้วิธี nested RT-PCR พบว่ามีความไวและจำเพาะในการยืนยันการวินิจฉัย APL ด้วยการตรวจดูลักษณะเซลล์และโพลซัยโตเมทรี โดยวิธี nested RT-PCR นี้สามารถตรวจพบยีน *PML-RAR α* ได้แม้ในผู้ป่วย APL ที่มีโครโมโซมปกติ หรือทำโครโมโซมแล้วไม่สำเร็จ การใช้วิธีทางอนุพันธุศาสตร์มีประโยชน์ทั้งในด้านการบอกการวินิจฉัย พยากรณ์โรค และการรักษา โดยผลการตรวจสามารถช่วยแพทย์ในการตัดสินใจเลือกการรักษาที่เหมาะสม เช่น การให้ยารับประทาน ATRA ในผู้ป่วยที่มียีน *PML-RAR α* ซึ่ง

ตารางที่ 2 ผลการศึกษานิตของ *PML-RAR α* fusion gene จากประเทศต่างๆ

Reference	Population studied	% <i>ber1</i> (L type) (n)	% <i>ber2</i> (V type) (n)	% <i>ber3</i> (S type) (n)	Total number studied
Grignani F et al. [3]	Italy	45	10	45	N/A
Lo-Coco F et al. [9]	Italy	55	8	35	N/A
van Dongen JJ et al. [14]	Europe	55	5	40	N/A
Chillon CM et al. [23]	Spain	67.5 (23)	6 (2)	26.5 (9)	34
Burnett AK et al. [27]	UK	61 (114)		39 (72)	186
Sucic M et al. [24]	Croatia	61 (5)		39 (3)	8
Naoe T et al. [22]	Japan	70 (84)		30 (36)	120
Slack JL et al. [7]	USA	57 (32)	7 (4)	36 (20)	56
Melnick A and Licht JD [4]	USA	70	10	20	N/A
Ruggero D. Et al [5]	USA	45	10	45	N/A
Douer D et al. [25]	Latin America	75 (39)	10 (5)	15 (8)	52

N/A, data not available

จะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดมากขึ้น และมีผลแทรกซ้อนน้อยลง ในอนาคตการพัฒนากการตรวจหา *PML-RAR α* โดยใช้ Quantitative PCR น่าจะช่วยเพิ่มความไวในการติดตามผู้ป่วย APL ที่มี molecular relapse โดยจะมีประโยชน์ในการตรวจหา *PML-RAR α* ปริมาณน้อยๆ ได้ก่อนที่ผู้ป่วยจะมี hematologic และ cytogenetic relapse

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ในสาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลทุกท่านที่ให้การดูแลผู้ป่วยในการศึกษาครั้งนี้เป็นอย่างดี รศ.ดร.พญ.จิรายุ เอื้อวรากุล ในฐานะหัวหน้าโครงการวิจัย ขอขอบคุณมูลนิธิอานันทมหิดล และทุนเฉลิมพระเกียรติ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลในการให้ทุนสนับสนุนอาจารย์แพทย์ที่อุทิศตนเพื่อการเรียนการสอน

และการวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดลและสภากิจแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวในคนไทยตั้งแต่ปี 2543-2548

เอกสารอ้างอิง

- Warrell RP Jr, de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1993;329:177-89.
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051-62.
- Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994;83:10-25.
- Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: *RARalpha*, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;93:3167-215.
- Ruggero D, Wang ZG, Pandolfi PP. The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of

- cancer. *Bioessays* 2000;22:827-35.
6. Pandolfi PP. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet* 2001;10:769-75.
 7. Slack JL, Arthur DC, Lawrence D, Mrozek K, Mayer RJ, Davey FR, et al. Secondary cytogenetic changes in acute promyelocytic leukemia—prognostic importance in patients treated with chemotherapy alone and association with the intron 3 breakpoint of the PML gene: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 1997;15:1786-95.
 8. Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:12-22.
 9. Lo-Coco F, Breccia M, Diverio D. The importance of molecular monitoring in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:503-20.
 10. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001;86:675-92.
 11. Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, Johnson LR, et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:42-8.
 12. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 2004;58A:62-71.
 13. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 1992;80:492-7.
 14. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-28.
 15. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
 16. Degos L. The history of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;122:539-53.
 17. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 1991;77:1080-6.
 18. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-49.
 19. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.
 20. Paietta E. Comments on the 2001 WHO proposal for the classification of haematopoietic neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:547-59.
 21. Hiorns LR, Min T, Swansbury GJ, Zelent A, Dyer MJ, Catovsky D. Interstitial insertion of retinoic acid receptor-alpha gene in acute promyelocytic leukemia with normal chromosomes 15 and 17. *Blood* 1994;83:2946-51.
 22. Naoe T, Kudo K, Yoshida H, Horibe K, Ohno R. Molecular analysis of the t(15;17) translocation in de novo and secondary acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11(Suppl 3):287-8.
 23. Chillon CM, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Ramos F, Fernandez-Calvo J, Rodriguez MJ, et al. Molecular characterization of acute myeloblastic leukemia according to the new WHO classification: a different distribution in Central-West Spain. *Haematologica* 2001;86:162-6.
 24. Sucic M, Zadro R, Burazer B, Labar B, Nemet D, Masic M, et al. Acute promyelocytic leukemia M3: cytomorphic, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular variants. *J Hematother Stem Cell Res*

- 2002;11:941-50.
25. Douer D, Santillana S, Ramezani L, Samanez C, Slovak ML, Lee MS, et al. Acute promyelocytic leukaemia in patients originating in Latin America is associated with an increased frequency of the *bcr1* subtype of the PML/RARalpha fusion gene. *Br J Haematol* 2003;122:563-70.
26. Benedetti L, Levin AA, Scicchitano BM, Grignani F, Allenby G, Diverio D, et al. Characterization of the retinoid binding properties of the major fusion products present in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1997;90:1175-85.
27. Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood* 1999;93:4131-43.

Molecular Characterization of PML/RAR α Fusion Gene in Thai patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL) by nested RT-PCR

Orathai Promsuwicha^{1,3}, Wanna Thongnoppakhun^{2,3}, Somchai Wongkhantee⁴,
Chintana Tocharoentanaphol⁵ and Chirayu U Auewarakul^{1,3}

¹Division of Hematology, Department of Medicine, ²Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development, ³Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand, ⁴DNA Center, Bangkok

Background: Patients with acute promyelocytic leukemia (APL) generally carry a unique translocation between chromosomes 15 and 17 which generates a characteristic PML/RAR α fusion gene. Chromosome 15 breakpoints fall within the three breakpoint cluster regions (bcr1, bcr2 and bcr3) and chromosome 17 breakpoints occur within intron 2. The bcr1 and bcr3 correspond to PML introns 6 and 3, respectively, whereas bcr2 is located within PML exon 6. **Objective:** To develop a molecular assay for the detection of PML/RAR α fusion gene and to determine the frequency and type of PML-RAR α gene variants (bcr1, bcr2 or bcr 3) and their association with leukemia karyotypes in Thai APL patients.

Materials and Methods: APL was diagnosed using morphologic and immunophenotypic analysis of leukemic cells. Flow cytometry was performed using a cocktail of monoclonal antibodies and CD45/SSC selection gates. Karyotypic analysis was done by conventional G- and Q- banding methods. The breakpoint sites of the PML/RAR α fusion gene were identified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with a nested approach. NB4 leukemic cell line was used as a positive control for PML-RAR α gene. **Results:** The bcr1, bcr2, and bcr3 variants, were detected in 81.25%, 3.125%, and 0%, respectively, of Thai APL patients diagnosed by flow cytometry (n = 64). The majority of cytogenetically confirmed APL cases had bcr1 (10 out of 12 cases) and bcr2 (2 out of 12 cases). In APL patients with a normal karyotype (n = 36) or insufficient metaphases (n = 16), PML-RAR α gene was detected in 40 cases (76.29%). **Conclusion:** bcr1 is the most frequent PML-RAR α gene variant detected in Thai APL patients. Molecular analysis of PML-RAR α appears to be more sensitive than conventional karyotypic analysis for the confirmation of the diagnosis of APL.

Key Words : ● Acute promyelocytic leukemia ● Chromosome translocation
● PML-RAR α gene variant ● Nested PCR

Thai J Hematol Transf Med 2005;15:247-57.

