

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมา สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค

จรัญญา งามขำ¹
พล กองจันทร์²

อุษณีย์ พรหมประกอบ²
เทียนแสง พันธุ์ศรี¹

บทคัดย่อ การติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมาสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค (HR HPV) เป็นระยะเวลานาน เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยโปรตีน E6 ของไวรัสดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ p53 นอกจากนี้บางการศึกษาคาดว่าโปรตีน E6 อาจมีผลต่อการทำงานของยีน/โปรตีนในกระบวนการตายแบบ apoptosis การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสายพันธุ์ของ HPV และระดับการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการ apoptosis ได้แก่ p53, Bcl-2 และ Bax รวมทั้งการแสดงออกของ HPVE6 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่พบการติดเชื้อ HR HPV เปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจำนวน 50 ตัวอย่างใน liquid based และมีผลการตรวจทางเซลล์วิทยาในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน ปีพ.ศ. 2559 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2560 การตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสใช้วิธี polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) และสุ่มตัวอย่างจำนวน 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ซึ่งในจำนวน 15 ตัวอย่าง พบ 14 ตัวอย่างเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อยจนถึง low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) และอีกหนึ่งตัวอย่างพบความผิดปกติแบบ high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) นำผลการตรวจเชื้อ HPV มาแบ่งกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV, พบการติดเชื้อ HPV16, พบการติดเชื้อ HPV18, พบการติดเชื้อ HR HPV อื่น และกลุ่มที่พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPV16/18 และ HR HPV อื่น กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง และ ตรวจหาระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 mRNA ด้วยวิธี two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการศึกษาพบ HPV สายพันธุ์ที่ 52 มากที่สุดตามด้วย HPV 16 และ 18 ตามลำดับ และพบว่าการแสดงออกของ p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV มีระดับสูงกว่าเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ HPVE6 mRNA พบสูงสุดในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น จากการศึกษาสรุปได้ว่า การติดเชื้อ HR HPV อาจมีผลต่อการทำงานของกระบวนการตายแบบ apoptosis ถึงแม้ว่าระดับการแสดงออกของยีนที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ยังให้ผลไม่แน่ชัด แต่ก็เป็นข้อมูลที่น่าสนใจในการนำไปศึกษากระบวนการเกิดมะเร็งปากมดลูกในระดับโมเลกุลในอนาคตต่อไป (วารสารโรคมะเร็ง 2560;37:94-104)

คำสำคัญ: p53, Bcl-2, Bax ไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมา เซลล์ปากมดลูก

¹กลุ่มงานวิจัย ²กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

Investigation of HPVE6, p53, Bcl-2 and Bax mRNA Expression Levels in Cervical Tissues with High Risk-Human Papillomavirus Infection

by Jarunya Ngamkham¹, Usanee Promprakob², Phon Kongkaew²,
Thainsang Phansri¹

¹Research Division, ²Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400

Abstract Persistent high-risk human papillomavirus (HR HPV) infection is the major cause of cervical cancer development, in which oncogenic protein; E6 plays an important role by activating tumor suppressor gene p53. Some studies have suggested that E6 oncoprotein may affect some of the genes/protein in the apoptotic pathway. This study aimed to detect the HPV genotype and investigate the mRNA expression of the gene-related apoptotic pathway p53, Bcl-2 and Bax, as well as the expression of HPVE6 mRNA in cervical samples with HR HPV infection compared with HPV-negative cervical samples. A total of 50 liquid-based cervical samples with diagnostically confirmed cytology were collected between June 2016 and May 2017. HPV DNA detection and genotyping were performed by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA). Of 50 cervical samples, 15 were randomly selected for study, of which 14 samples were cytologically diagnosed negative for intraepithelial lesion/malignancy (NILM) or low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); the other was a high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). The samples were divided into 5 groups according to HPV findings:- no HPV infection, HPV 16, HPV 18, the other HR HPV and multiple infections between HPV16/18 and the other HR-HPV groups, with three samples per group. Two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to investigate p53, Bcl-2, Bax and HPVE6 mRNA expression levels. Our results showed that HPV52 was the most frequent type, followed by HPV 16, 18, respectively. p53, Bcl-2 and Bax mRNA expression levels in cervical samples with HPV infection showed slightly higher expression than without HPV infection. HPVE6 mRNA expression in the HPV16 infection group was highest compared with the other groups. In conclusion, HR HPV may possibly affect the process in the apoptotic pathway, although the expression of these genes in this study was still unclear. These data could be used for further molecular-level studies of cervical carcinogenesis. (*Thai Cancer J* 2017;37:94-104)

Keywords: p53, Bcl-2, Bax, human papillomavirus, cervical tissues

บทนำ

ไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมา (human papillomavirus; HPV) เป็นไวรัสขนาดเล็ก มีขนาดของ genome ประมาณ 7000-8000 คู่เบส โดยสารพันธุกรรมหรือ DNA เป็นสายคู่ที่มีลักษณะเป็นวงกลม (circular double-stranded) ซึ่งการติดเชื้อ HPV ในเซลล์เป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เซลล์เกิดความผิดปกติและเป็นสาเหตุของการเกิด pre-malignant และ malignant lesions^{1,2} มักพบการติดเชื้อบริเวณที่เป็น cutaneous หรือ epithelial cell ก่อให้เกิดหูดทั้งในมนุษย์และสัตว์^{3,4}

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของ HPV พบว่าสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในมนุษย์ประมาณ 35 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามความรุนแรงของการก่อโรคคือ กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค (high risk types; HR) และกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ (low risk types; LR) สำหรับกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 และ 82 ซึ่งมากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกสามารถตรวจพบการติดเชื้อของ HPV ในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะ HPV 16 และ 18⁵⁻⁷

โดยโปรตีนหรือสารพันธุกรรม (gene) ของไวรัสที่มีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ คือ E5, E6 และ E7 ด้วยการยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในเซลล์หลายชนิด ส่งผลให้ระบบการทำงานภายในเซลล์เกิดความผิดปกติ ซึ่งโปรตีน E6 และ E7 จะรบกวนการทำงานของ tumor suppressor genes p53 และ phosphorylated retinoblastoma (pRb) ตามลำดับ^{2,4,8,9} ในขณะที่ E5 ยังไม่พบกลไกที่แน่ชัด แต่มีรายงานพบว่ามีบทบาทเสริมในการกระตุ้นกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่เป็นกระบวนการสำคัญของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) และส่งเสริมการทำงานของสารพันธุกรรมที่ยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่มีความผิดปกติตลอดจนเซลล์มะเร็ง¹⁰

กระบวนการตายของเซลล์ (programmed cell death หรือ apoptosis) มีความสำคัญ เนื่องจากระบบการทำงานของร่างกายในการกำจัดเซลล์ที่มีความผิดปกติหรือเสื่อมสภาพรวมทั้งเซลล์มะเร็ง โดยทำให้เซลล์ที่ต้องการกำจัดเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพ ชีวภาพ รวมทั้งสารทางชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์ ก่อนจะถูกล่อยสลายด้วยกระบวนการ phagocytosis ด้วยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย^{11,12} จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า HPV สามารถยับยั้งและควบคุมการทำงานของ tumor suppressor ในวงจรชีวิตของเซลล์และยับยั้งการเกิด apoptosis ส่งผลให้เซลล์ที่มีความผิดปกติไม่สามารถถูกกำจัดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง และยังมีเยื่อหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis เช่น ยีนในกลุ่มที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการตาย หรือ

pro-apoptotic genes ได้แก่ Bax, Bak ฯลฯ หรือ ยีนในกลุ่มที่ยับยั้งการตายของเซลล์ในกระบวนการ apoptosis หรือ anti-apoptotic genes ได้แก่ Bcl-2, Bcl-xL ฯลฯ ถูกยับยั้งหรือถูกกระตุ้นการทำงานอย่างผิดปกติ¹³⁻¹⁶ อย่างไรก็ตามการวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของ HPV และระดับการแสดงของยีนที่สำคัญในกระบวนการตายแบบ apoptosis ยังมีค่อนข้างจำกัดและส่วนใหญ่จะศึกษาใน cancer cell lines ในระดับหลอดทดลองเท่านั้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการแสดงออก mRNA ของยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ apoptosis คือ tumor suppressor gene; p53, anti-apoptotic gene; Bcl-2 และ pro-apoptotic gene; Bax ร่วมกับการแสดงออกของ oncogenic gene; E6 ของ HPV ในเซลล์ปากมดลูกของผู้หญิงไทย ที่เข้ารับการตรวจคัดกรองหรือตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ ณ กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจากเซลล์ปากมดลูกที่เก็บจากผู้เข้ารับการตรวจคัดกรอง ตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์และตรวจหาการติดเชื้อ HPV จากงานเซลล์วิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในช่วงเดือนมิถุนายน ปีพ.ศ.2559 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560 จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดมีผลการตรวจและรายงานผลทางเซลล์วิทยาประกอบ งานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เอกสารรับรองเลขที่ 069/2558

การเตรียมตัวอย่างและตรวจหาการติดเชื้อ HPV

ในการเตรียมตัวอย่างจากเซลล์ปากมดลูกของผู้หญิงโดยการ swab และเก็บในน้ำยา Thinpap (HOLOGIC®, USA) เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ก่อนนำมาทดสอบภาชนะที่ปราศจากเชื้อ เริ่มทดสอบโดยการนำตัวอย่างจำนวน 200 ไมโครลิตร มาสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ QIAamp Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนที่แนบมาพร้อมกับชุดสกัด จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาทดสอบด้วยยีน β -globin ที่มี primer 2 สายคือ BGPCO3; ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC และ BGPCO5; GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT¹⁷ ด้วยวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain reaction (PCR) ในส่วนผสม 25 ไมโครลิตรของ 5 ไมโครลิตรของ DNA จากตัวอย่าง 10xPCR buffer, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 20 pmole ของ primer แต่ละสาย Taq polymerase enzyme (QIAGEN, Germany) และน้ำกลั่น นำส่วนผสมทั้งหมดทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มจำนวน PCR (Applied Biosystems, USA) ตามขั้นตอนดังนี้คือ บ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 40 รอบของอุณหภูมิ 94°C 1 นาที 58°C 2 นาที และ 72°C 1.5 นาที จากนั้นบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 4 นาทีเป็นขั้นตอนสุดท้ายตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 2% agarose gel ที่ผสมน้ำยาย้อม DNA; GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, USA) นำตัวอย่างที่ให้

ผลบวกหรือมี band ปรากฏบนเจลมาใช้ในการตรวจหา HPV DNA และจำแนกสายพันธุ์

สำหรับการตรวจหา HPV DNA และจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสในการศึกษานี้เป็นการทดสอบตามวิธีของ Jacob MV และคณะ¹⁷ ด้วยวิธี polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) โดยใช้ GP5+/bioGP6+ เป็น specific primers ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจหา HPV DNA ซึ่งตัวอย่างที่มีผลบวกจะนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยการเติมใน streptawell plate (Roche, Germany) ที่เคลือบด้วย biotin และเติม 1xSCC, 0.5% Tween 20 นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น hybridize กับ oligo-probe cocktail ของ high risk HPV types (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68) และ low risk HPV types (HPV 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 และ 89) ที่มี digoxigenin labeled (Roche, Germany) เพื่อคัดกรองกลุ่มของสายพันธุ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C 60 นาที จากนั้นดูผลการละลายยั้งก่อนเติม anti-digoxigenin AP conjugate (Roche, Germany) และ p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA) ตามลำดับ ในระหว่างขั้นตอนของการเติมสารแต่ละชนิดจะต้องดูผลการละลายยั้งและล้างด้วย 1xSCC, 0.5% Tween 20 ประมาณ 3 ครั้ง นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์ผลด้วย microplate reader (Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 405 และ 620 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารพันธุกรรมของไวรัสหรือ HPV DNA สำหรับการทดสอบสายพันธุ์จำเพาะของ HPV ในแต่ละตัวอย่างสามารถ

ดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับการคัดกรองกลุ่มใหญ่ แต่เปลี่ยนชนิดของ oligoprobe ที่นำมาทดสอบจาก oligoprobe cocktail เป็น HPV specific probe ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจในแต่ละสายพันธุ์

การทดสอบระดับการแสดงออก mRNA ของสารพันธุกรรมที่สำคัญในกระบวนการ apoptosis

สำหรับการทดสอบนี้จะประเมินระดับการแสดงออกของยีน 4 ชนิดและมี primers สำหรับเพิ่มจำนวนดังนี้ HPVE6: for 5'-ATGCACAAAAGA GAACTGCAAT-3'; rev 5'-TTACAGCTGGTTTC TCTACGTG-3'¹⁸, p53: for 5'-TCAGTCTACCTCCC GCCATAA-3'; rev 5'-TTTCTTACATCTCCCAAA CATCC-3', Bcl-2: for 5'-TTGCCACGGTGGTGGG GGAC-3'; rev 5'-GAGACAGCCAGGAGAAA TCAAACAG-3', Bax: for 5'-AGGATCGAGCA GGGCGAATG-3'; rev 5'-AGGGCCTTGAGCA CCAGTTT-3' และมี internal control gene คือ actin: for 5'-GACCTTCAACACCCCAGCCA-3'; rev 5'-AGGCTGGAAGAGTGCCTCAG-3' จากตัวอย่างที่นำมาทดสอบการติดเชื้อ HPV จำนวน 50 ตัวอย่าง เลือกตัวอย่างมาทำการทดสอบระดับการแสดงของ mRNA ของยีนต่าง ๆ ข้างต้นจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบการติดเชื้อและไม่พบการติดเชื้อ HPV

การสกัด total RNA และการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ผู้วิจัยนำตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจำนวน 15

ตัวอย่างมาสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RNA isolation kit (Roche, Germany) ตามขั้นตอนการสกัดที่แนบมากับชุดน้ำยา ซึ่ง total RNA ที่สกัดได้ต้องเก็บไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลาของการทดสอบ เนื่องจากเป็นสารพันธุกรรมที่ถูกทำลายได้ง่ายจากความร้อน แล้วนำไปวัดความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำ total RNA ที่ได้จากการสกัดไปสังเคราะห์สาย complementary DNA หรือ cDNA ด้วยขั้นตอนที่มากับชุดน้ำยา Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase protocol (Invitrogen, USA) โดยใช้ total RNA ปริมาณ 11 ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา สาย cDNA ที่ได้นำมาใช้เป็นสายตั้งต้น (template) ในการศึกษาการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 mRNA ต่อไป

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 mRNA

การทดสอบใช้วิธี semi-quantitative RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบผลระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนทั้ง 4 ชนิดในเซลล์ปากมดลูก โดยมี actin เป็น internal control ในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อ HPV และไม่พบการติดเชื้อ HPV เริ่มการทดสอบด้วยการผสม cDNA 2 ไมโครลิตรในส่วนผสมของ 10xPCR buffer, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 10 pmole ของ primer แต่ละสาย, Taq polymerase enzyme (QIAGEN, Germany) และน้ำ เริ่มปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของอุณหภูมิ 95°C 30 วินาที 58°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที จากนั้นบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

เป็นขั้นตอนสุดท้าย แล้วนำ PCR product มาแยกด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าและวิเคราะห์ผลภายใต้ UV ด้วยเครื่อง densitometer (SYNGENE, UK) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมแต่ละชนิดด้วย GeneTools program (SYNGENE, UK)

ในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด โดยการคำนวณค่า normalize เปรียบเทียบค่า band intensity ของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 ต่อ band intensity ของ internal control ในแต่ละตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์แบบสถิติพรรณนาในการคำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่พบความผิดปกติในระยะต่าง ๆ เพื่อดูความแตกต่าง

ผลการศึกษา

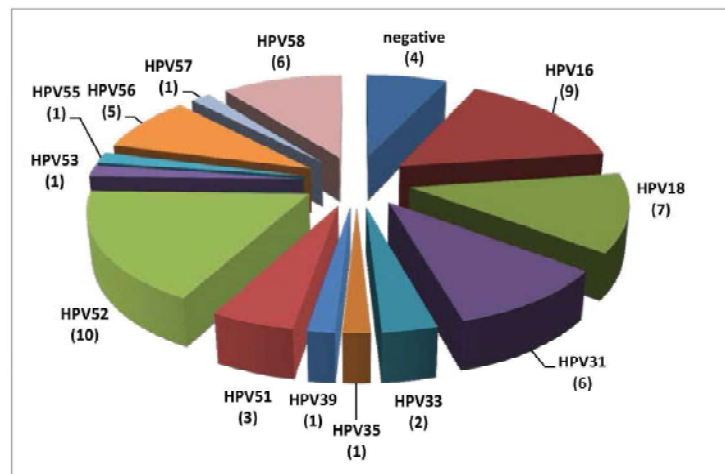
จากการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกของผู้ที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งในระยะเริ่มแรก/ตรวจวินิจฉัยเพื่อหาความผิดปกติของเซลล์และส่งตรวจเพื่อหาการติดเชื้อ HPV จำนวน 50 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างทั้งที่พบและไม่พบความผิดปกติของเซลล์ แต่ยังไม่พบมะเร็ง โดยกลุ่มตัวอย่างมีช่วงอายุตั้งแต่ 27-73 ปี (อายุเฉลี่ย $\pm$ SD=43.48 $\pm$ 10.78 ปี) และมีผลการตรวจเซลล์ทางห้องปฏิบัติการ พบกลุ่ม negative for

intraepithelial lesion หรือ malignancy (NILM) จำนวน 14/50 ราย (ร้อยละ 28) สำหรับกลุ่มที่พบความผิดปกติแบบ atypical squamous cells of undetermined (ASCUS), atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H), endocervical adenocarcinoma in situ (AIS) จำนวน 8/50, 2/50 และ 1/50 ราย คิดเป็นร้อยละ 16, 4 และ 2 ตามลำดับ ในขณะที่ความผิดปกติของเซลล์แบบ low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) และ high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) พบจำนวน 19/50 (ร้อยละ 38) และ 6/50 (ร้อยละ 12) รายตามลำดับ และจากการตรวจการติดเชื้อทั้งแบบติดเชื้อเดี่ยว (single type infection) และติดเชื้อร่วมหลายสายพันธุ์ (multiple types infection) สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ HPV 52 รองลงมาคือ HPV 16 และ 18 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

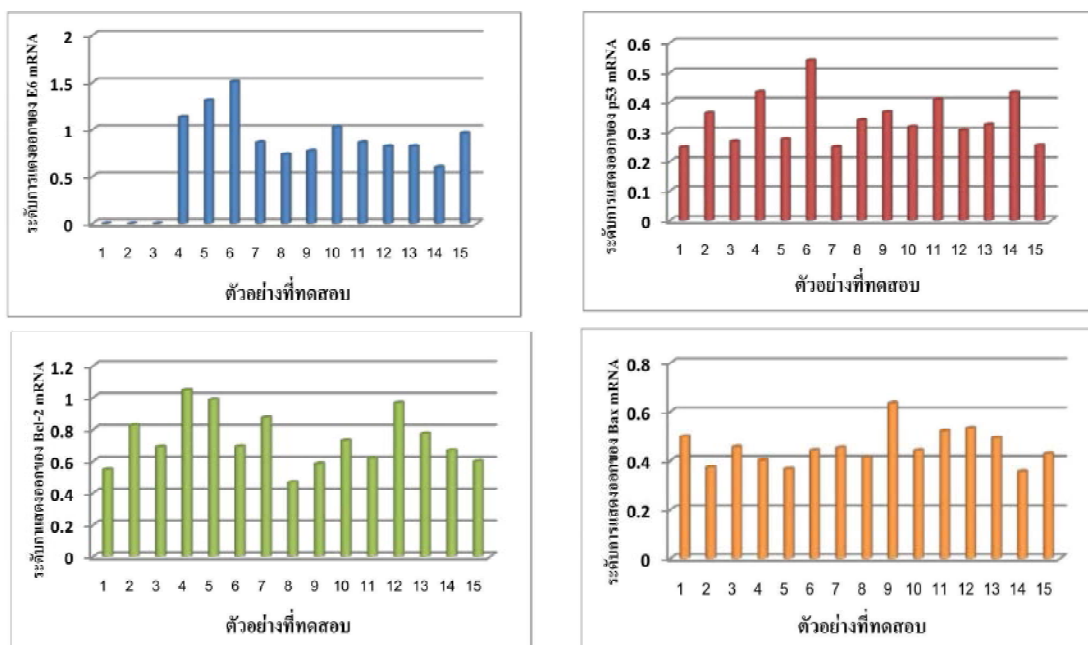
จากการตรวจหาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน 4 ชนิดคือ oncogenic gene; HPVE6, tumor suppressor gene; p53, anti-apoptotic gene; Bcl-2 และ pro-apoptotic gene; Bax โดยแบ่งกลุ่มศึกษาเป็นผู้ที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV กลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 กลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV 18 กลุ่มที่พบการติดเชื้อ HR HPV แต่ไม่ใช่ 16 หรือ 18 และกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16/18 ร่วมกับ HR HPV อื่น ซึ่งในแต่ละกลุ่มได้สุ่มตัวอย่างนำมาทดสอบกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบ 14 ตัวอย่างมีความผิดปกติของเซลล์แบบ LSIL หรือ NILM ยกเว้นเพียง 1 ตัวอย่างในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 มีความผิดปกติของเซลล์ระดับ HSIL

จากผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ HPVE6 และ Bcl-2 mRNA ในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 มีระดับสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น และไม่สามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของ HPVE6

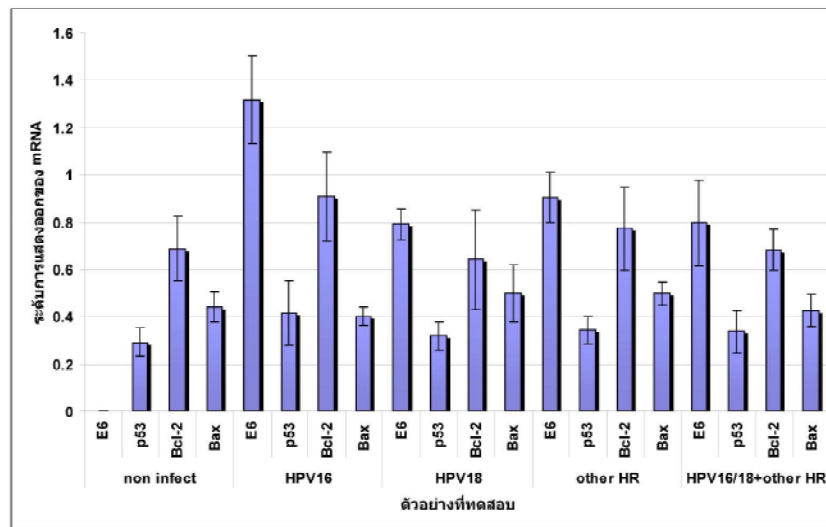
mRNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV (ตัวอย่างที่ 1-3) ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ p53 และ Bax mRNA ของแต่ละกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อและจำแนกสายพันธุ์ของ HPV จากเซลล์ปากมดลูก (n=50) ซึ่งแสดงผลรวมจากตัวอย่างที่พบการติดเชื้อเดี่ยว (single type) และติดเชื้อร่วม (multiple types)



รูปที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกของตัวอย่างในกลุ่มต่าง ๆ (n=15): 1-3 ไม่พบการติดเชื้อ HPV; 4-6 พบการติดเชื้อ HPV 16; 7-9 พบการติดเชื้อ HPV 18; 10-12 พบการติดเชื้อ HR HPV ที่มี HPV16/18 และ 13-15 พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPV 16/18 และ HR HPV อื่น



รูปที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ HPV E6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV และพบการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ต่าง ๆ (n=15)

วิจารณ์และสรุป

ในการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งหรือการกลายพันธุ์ของเซลล์ รวมทั้งการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์หรือเภสัชศาสตร์นั้น กระบวนการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติแบบ apoptosis และสารพันธุกรรม/โปรตีนที่เกี่ยวข้องมักเป็นกลไกแรกที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นการบ่งชี้ถึงการตายหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติและ signal transduction pathway ต่าง ๆ ที่ทำงานผิดปกติไป รวมทั้งอาจมีความสัมพันธ์ (crosstalk) หรือก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบการทำงานส่วนอื่น ๆ ภายในเซลล์ เช่น DNA repair, cell cycle เป็นต้น¹¹ โดยกลุ่มของยีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเกิด apoptosis มีหลายกลุ่ม เช่น tumor suppressor gene เช่น p21, p53 มีความสำคัญในการตรวจสอบเซลล์ที่ผิดปกติและส่งสัญญาณให้กลไกอื่น ๆ ทำงานต่อไป กลุ่มยับยั้งการตายของเซลล์ เช่น Bcl-2, Bcl-xL เป็นกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อ

การยับยั้งการตายของเซลล์ที่ผิดปกติและกลุ่มของยีนที่กระตุ้นให้เซลล์ที่ผิดปกติถูกทำลาย เช่น Bax, Bak เป็นต้น ซึ่งการศึกษากลไกหรือระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นของการยับยั้งหรือกระตุ้นความผิดปกติของเซลล์ ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนมีหลายปัจจัย ทั้งสภาพแวดล้อม รังสี สารเคมี รวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสเป็นระยะเวลานาน ๆ^{2,11,12}

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยตรวจหาการติดเชื้อและสายพันธุ์ของ HPV ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกของผู้ที่เข้ารับการคัดกรองหรือตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์จำนวน 50 ราย พบว่าสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ HPV 52 ตามด้วย HPV 16, 18, 58 และ 31 ตามลำดับ ซึ่งลำดับที่ตรวจพบแตกต่างจากรายงานอื่นเพียงเล็กน้อยที่มักพบการติดเชื้อ HPV 16 มากที่สุด^{1,5-7} ซึ่งเป็นผลการศึกษากลุ่มประชากรในแถบยุโรปหรืออเมริกาเป็นส่วนใหญ่ จำนวนที่ตรวจพบระหว่าง HPV 16 และ

HPV 52 มีความใกล้เคียงกันมาก และผลการศึกษาพบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Kantathavon N และคณะ¹⁹ และ Marks MA²⁰ พบการติดเชื้อ HPV ในคนไทย โดยพบ HPV สายพันธุ์ที่ 52 มากกว่าสายพันธุ์ที่ 16 เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบมากที่สุดในคนไทยหรือในกลุ่มประชากรในประเทศแถบเอเชีย บางประเทศอาจมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในกลุ่มประชากรของภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก¹ นอกจากนี้ การสุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา วิธีการเก็บตัวอย่างและการทดสอบที่แตกต่างกันก็อาจมีผลต่อการวิเคราะห์เช่นกัน^{1,5-7,21} อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่ตรวจพบในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งของกลุ่มประชากรทั่วโลกมักเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์ที่รุนแรงและมีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรคทั้งหมด^{1,5-7}

สำหรับการตรวจหาระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis คือ p53, Bcl-2, Bax ร่วมกับการตรวจหาการแสดงออกของ HPVE6 ในเซลล์ปากมดลูกพบว่า ระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV โดยกลุ่มที่พบการติดเชื้อจะสูงกว่าเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นเซลล์ที่พบการติดเชื้อ แต่ยังไม่พบความผิดปกติของเซลล์หรือพบความผิดปกติในระดับ LSIL เท่านั้น จึงอาจทำให้ผลจากการติดเชื้อไวรัสมีผลต่อระบบการทำงานของกลไกการป้องกันหรือการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากภาวะปกติที่ร่างกายมีการกำจัดเซลล์ที่เสื่อมสภาพ

อยู่แล้ว^{2,12,22} เช่นเดียวกับผลการวิจัยของ Ayatollahi H และคณะ¹⁴ ที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ p53, Bcl-2 และ Bax ในภาวะเซลล์ปกติ และเพิ่มระดับการแสดงออก เมื่อเซลล์มีการติดเชื้อ HPV โดยวิธีการย้อม immunohistochemistry ในขณะที่จะระดับการแสดงออกของ HPVE6 mRNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ไวรัสสร้างขึ้นและมีบทบาทสำคัญต่อการก่อกลายพันธุ์ของเซลล์ จะไม่พบในกลุ่มตัวอย่างที่ปกติและไม่พบการติดเชื้อ HPV^{2,22} และจากผลการศึกษานี้ยังพบว่ากลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV 16 มีระดับการแสดงออกของ HPVE6 สูงกว่าระดับการแสดงออกในกลุ่มที่ติดเชื้อ HR HPV สายพันธุ์อื่น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก HPV 16 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่อการก่อโรคสูงและเป็นสายพันธุ์ที่พบมากในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จึงมีระดับการสังเคราะห์ของสารพันธุกรรมที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น นอกจากนี้ 1/3 ตัวอย่างในกลุ่มของผู้ที่พบการติดเชื้อ HPV 16 ที่สุ่มมาทดสอบครั้งนี้พบความผิดปกติของเซลล์ในระดับ HSIL โดยเป็นความผิดปกติที่ยีนก่อมะเร็งของไวรัส (oncogenic genes) ได้แก่ E6 และ E7 มีจำนวนมากกว่าเซลล์ที่มีความผิดปกติในระดับ LSIL^{2,22} ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่เสริมให้ระดับการแสดงออกของ HPVE6 mRNA ในกลุ่มของผู้ที่ติดเชื้อ HPV 16 สูงกว่ากลุ่มอื่น แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเหตุใดกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16/18 ร่วมกับ HR HPV สายพันธุ์อื่น (ตัวอย่างที่ 13-15) มีระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax mRNA รวมทั้ง HPVE6 mRNA ค่อนข้างต่ำกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อ HPV 16 เพียงชนิดเดียว ทั้งนี้อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาครั้งนี้มี

จำนวนน้อย นอกจากนี้ลักษณะการแสดงออกของยีนในแต่ละบุคคลหรือแต่ละตัวอย่างอาจมีความเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเฉพาะ HPV E6 ที่พบน้อยกว่าเห็นได้อย่างชัดเจน

จากผลการศึกษาที่สรุปได้ว่าการตรวจหาการติดเชื้อและจำแนกสายพันธุ์ของ HPV ที่ตรวจพบในกลุ่มประชากรที่ต่างกัน อาจมีผลการตรวจที่ต่างกัน ซึ่งลักษณะเฉพาะของแต่ละบุคคลก็ยังมีผลต่อระดับการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ รวมทั้งระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมภายในร่างกาย ถึงแม้ว่าจะพบการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์เดียวกัน แต่ก็มีระดับการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญต่อการนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาในระดับโมเลกุลของเซลล์เพื่อนำไปพัฒนาหรือศึกษาต่อยอดถึงกลไกการทำงานของไวรัสต่อระบบต่าง ๆ ภายในเซลล์ และเป็นแนวทางวางแผนในการเฝ้าระวัง ติดตาม และตรวจวินิจฉัยในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Disease Report. Available at: www.hpvcentre.net. Accessed on October 30, 2014.
2. zur Hausen H. Papillomavirus and cancer, From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
3. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9; Role of Mucosal Human Papillomavirus in Nongenital Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:57-65.
4. International Agency for Research on Cancer Monograph on Evaluation of Carcinogen Risks to Humans; Human papillomavirus 1995;64:35-222.
5. Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah K, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
6. Walboomers M, Jacob MM, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
7. Ramet J, van Esso D, Meszner Z. Position paper - HPV and the primary prevention of cancer: improving vaccine uptake by paediatricians. *Eur J Pediatr* 2011;170:309-21.
8. Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhnn YS, Song YS. Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis* 2009;30:753-7.
9. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10:550-60.
10. Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, et al. Review article; Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1930-5.
11. Malaguarnera L. Implication of apoptosis regulators in tumorigenesis. *Cancer and Metastasis Rev* 2004; 33:367-87.
12. Zhivotovsky B, Kroemer G. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev* 2004;5:752-62.
13. Liao S, Deng D, Hu X, Wang W, Li L, Li W, et al. HPV16/18 E5, a promising candidate for cervical cancer vaccines, affects SCPs, cell proliferation and cell cycle, and forms a potential network with E6 and E7. *Int J Mol Med* 2013;31:120-8.
14. Ayatollahi H, Sharifi N, Sadeghian MH, Alenabi A, Ghasemian-Moghadam HR. Immunohistochemical Expression of Apoptosis Regulators in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix and Their Association with Human Papillomavirus 16/18 Subtypes. *Balkan Med J* 2014;31:202-7.
15. Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj S, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003;91:51-8.
16. Klapsinou E, Argyri E, Panotopoulou E, Daskalopoulou D, Patsouris E, Nonni A, et al. Bax and Bak expression in cervical smears of women with low- and high-risk HPV types: a study of 120 cases. *J Cytol* 2015;32:223-9.

17. Jacob MV, van den Brule AJ, Snijder PJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomer JM. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV-16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol* 1996;49:223-9.
18. Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhn YS. Human papillomavirus type 16E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cells. *Carcinogenesis* 2010;31:402-10.
19. Kantathavon N, Mahidol C, Sritana N, Sricharunrat T, Phoolcharoen N, Auewarakul C, et al. Genotypic distribution of human papillomavirus (HPV) and cervical cytology finding in 5,906 Thai women undergoing cervical cancer screening programs. *Infect Agent Cancer* 2015;10:7.
20. Marks MA, Gupta S, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, Phongnarisorn C, et al. Prevalence and correlated of HPV among women attending family-planning clinics in Thailand. *BMC Infect Dis* 2015;15:159.
21. Bharti A, Shukla S, Mahata S, Hedau S, Das BC. Human papillomavirus and control of cervical cancer in India. *Expert Rev Obstet* 2010;5:329-46.
22. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7:11-22.