

การพัฒนาวิธีตรวจหา integrated HPV16 ใน มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค multiplex quantitative PCR

สุรศักดิ์ แวนรัมย์¹, เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์¹, ชาญวิทย์ สิลายวัฒน์¹, พิสมัย ยืนยาว², สวงนโชค ล้วนรัตนกร², และ พัชรี เจริญนัยกุล^{1*}

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัส Human papilloma ชนิด 16 (HPV16) จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูก โดยเฉพาะหากพบในรูปแบบที่แทรกตัวไปบนจีโนมของเซลล์ปากมดลูก (integrated HPV) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจหาแบบของไวรัส HPV16 ด้วยวิธี multiplex real time PCR โดยทำการหาปริมาณของชิ้นส่วนของ E2 และ E6 ของ HPV16 จีโนม ด้วย Taqman probe ในหลอดเดียวกัน เพื่อนำมาคำนวณอัตราส่วน E2/E6 หากเป็น episomal form จะมีอัตราส่วนของชิ้นทั้งสองเท่ากัน แต่ integrated form มีอัตราส่วน E2 น้อยกว่า E6 พบว่าจำนวนไวรัสต่ำสุดที่วัดได้ มีค่า 103 copies (CV<10%) และเกณฑ์ที่ใช้แปลผลว่าเป็น episomal form มีอัตราส่วน E2/E6 อยู่ระหว่าง 0.83-1.29 ในขณะที่ complete integrated form มีอัตราส่วน E2/E6 เท่ากับ 0 และได้ทดลองนำเทคนิคที่พัฒนานี้ไปตรวจกรองเบื้องต้นในตัวอย่างผู้ป่วย 30 ราย ซึ่งแบ่งเป็นระยะก่อนเป็นมะเร็ง (dysplasia) และระยะมะเร็งลุกลาม (invasive cervical cancer) อย่างละ 15 ราย สามารถตรวจพบ integrated HPV16 ในกลุ่ม invasive cervical cancer 93% (14 ใน 15 ราย) สูงกว่าในกลุ่ม dysplasia 66% (10 ใน 15 ราย) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เทคนิคที่พัฒนานี้มีความไวเพียงพอที่จะใช้ตรวจหาได้ทั้งรูปแบบและจำนวนของไวรัส การศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลนำร่องไปสู่การศึกษาในขั้นต่อไป เพื่อประเมินประโยชน์การตรวจวินิจฉัยไวรัสในรูปแบบ integrated HPV ว่าจะมีศักยภาพใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์การดำเนินโรค ซึ่งจะต้องทำการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นและแปลผลร่วมกับความรุนแรงของโรคต่อไป

คำหัต: แอปปีโลมาไวรัสชนิด 16, integrated HPV, ระยะก่อนเป็นมะเร็ง, multiplex PCR, Taqman probe

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาสำคัญในประชากรหญิงทั่วโลก ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญส่วนหนึ่งมาจากการติดเชื้อดีเอ็นเอไวรัสที่เรียกว่า human papillomavirus (HPV) HPV16 จัดเป็นชนิด high-risk HPV ที่พบในมะเร็ง

ปากมดลูกสูงกว่าชนิดอื่นๆ มากกว่าร้อยละ 50 ขึ้นไป⁽¹⁾ นอกจากชนิดของไวรัสแล้ว ปริมาณไวรัส (viral load) และรูปแบบของไวรัส (physical state) ที่แทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ปากมดลูก (integrated HPV) จัดเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการทำนายการดำเนินโรคและ

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Development of method for integrated HPV16 detection in cervical carcinoma using multiplex quantitative PCR

Surasak Wanrum¹, Temduang Limpaboon¹, Chanvit Leelayuwat¹, Pissamai Yaenyao², Saguanchoke Luanratanakorn², Patcharee Jearanaikoon^{1*}

Abstract

Infection with high-risk HPV has been implicated as one of the major risk factors of cervical cancer. Integration of viral DNA into host DNA is essential for cervical carcinogenesis. This study was aimed to develop a multiplex real-time PCR to quantify Early gene 2 (E2 gene) and Early gene 6 (E6 gene) of HPV16 using Taqman probe. The ratio of E2 and E6 copy number was calculated to determine physical status of HPV16. The pure episomal form was expected to have an equivalent copy number of E2 and E6 gene giving rise to E2/E6 ratio of 1 whereas, viral integration resulted in less E2 than E6. The detection limit as well as precision of this developed method were obtained at 103 copies with CV of less than 10%. Cut off value of E2/E6 ratio for complete episomal form was found more than 0.83, whereas complete integration was expected to 0. This method was further analyzed with DNA from 15 pre-invasive or dysplasia lesions and 15 invasive cervical carcinoma tissues. The percentage of total integration form in invasive cases showed significantly higher than pre-invasive cervical lesions which obtained about 93%(14/15) and 66%(10/15), respectively (p value<0.05). The method described here is sensitive to assess the physical state as well as viral copy numbers, which suggests as a potential marker for disease progression. Furthermore, followed-up cases should be studied in large scale sample sizes in order to evaluate its potential as prognostic marker in cervical cancer.

Key words : HPV16, integrated form, dysplasia, invasive cervical carcinoma, Multiplex quantitative PCR, Taqman probe

ความรุนแรงของมะเร็งปากมดลูกตลอดจนใช้ในการ
ติดตามผลการรักษาได้^(2,3)

โดยทั่วไปรูปแบบของไวรัสที่พบในเซลล์ปากมดลูกมี
2 รูปแบบ คือ episomal form และ integrated form⁽⁴⁾

episomal form เป็นไวรัสที่มีจีโนมสมบูรณ์ อยู่ในระยะ
การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนตามวงจรชีวิตปกติ ในขณะที่
integrated form พบว่ามีการตัดจีโนมของไวรัสส่วน
Early2 (E2 gene) ทั้งหมดทิ้งก่อนที่ไวรัสจีโนมส่วน E6

1 Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University.

2 Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

3 * Corresponding author

และ E7 gene จะแทรกตัวเข้าไปในจีโนมของเซลล์ปากมดลูก โปรตีนที่สร้างจาก E6 และ E7 gene นี้เองที่มีบทบาทในการก่อมะเร็ง โดย E6 เร่งให้จีโนมมะเร็ง p53 สลายตัวด้วยกระบวนการ proteolysis⁽⁵⁾ ส่วน E7 จะจับกับจีโนมมะเร็ง Rb ทำให้ E2F ซึ่งเป็น transcription factor หลุดออกไปกระตุ้นให้เกิด cell proliferation⁽⁶⁾ ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกและตำแหน่งที่แทรกตัวของไวรัส แต่หากการแทรกตัวนี้ไปอยู่ในตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับบริเวณที่มีการควบคุมให้เพิ่มจำนวนจีโนมมะเร็ง เช่น c-myc ก็จะเป็นการเร่งการดำเนินของโรคไปสู่ระยะที่รุนแรงขึ้น^(7,8) การตรวจหารูปแบบของไวรัสในหลายการศึกษา มักรายงานการหาอัตราส่วนระหว่างจีโนม E2 และ E6⁽⁹⁻¹²⁾ โดย episomal form เป็นรูปแบบที่ไวรัสเพิ่มจำนวนใน host cell ตามวงจรชีวิตปกติจะมีจีโนมสมบูรณ์กล่าวคือ ไม่มีการตัดส่วน E2 ทั้ง ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างจีโนม E2 และ E6 เท่ากับ 1 แต่ integrated form จะมีอัตราส่วนระหว่างจีโนม E2 และ E6 เท่ากับ 0^(8,9) อย่างไรก็ตามเราอาจพบรูปแบบผสม (concomitant or mixed form) ของ integrated form กับ episomal form ซึ่งจะมีอัตราส่วนระหว่างจีโนม E2 และ E6 มากกว่า 0 และน้อยกว่า 1

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหารูปแบบของไวรัส ได้แก่ 2D gel electrophoresis⁽¹⁰⁾ และ quantitative PCR^(11,12) เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิค real time PCR ได้มีการนำมาใช้แพร่หลายมากขึ้น และสามารถดัดแปลงเพื่อทดสอบหาปริมาณแทนวิธี conventional PCR เดิมได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเทคนิค การตรวจหา integrated HPV 16 นำร่องโดยวิธี multiplex real time PCR ในส่วนของ E2 และ E6 gene เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้และทำนายการดำเนินโรค (prognostic marker) และติดตามผลในการรักษา มะเร็งปากมดลูกต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. Primers และ probe ที่จำเพาะต่อจีโนม E2 และ E6 ของ HPV16 การหาปริมาณของจีโนมเป้าหมาย ใช้หลักการของ TaqMan probe ชนิด TAMRA โดยดัดแปลง primers และ probe จากการศึกษาของ Pietsaro และคณะ⁽¹²⁾ ตัวบ่งชี้บน probe E2 ใช้ VIC และ probe E6 ใช้ FAM ผลิตภัณฑ์ของ Applied Biosystem สหรัฐอเมริกา แสดงลำดับเบสในตารางที่ 1 โดยมี VIC และ FAM เป็นตัวบ่งชี้ ของ E2 และ E6 probe ตามลำดับ

ตารางที่ 1 Primers และ Probes สำหรับ TaqMan qPCR ออกแบบตามการศึกษาของ Pietsaro และคณะ (12)

Target gene	Name	Sequence (5' → 3')	T _m (°C)	Amplimer length (bp)
E2	Probe 16E2	(VIC)-CACCCCGCCGCGACCCATA-(TAMRA)	70	82
	Forward primer, 16E2F	AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG	59	
	Reward primer, 16E2R	CCAAGGCGACGGCTTTG	60	
E6	Probe 16E6	(6-FAM)-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACC ACAGTT-(TAMRA)	69	81
	Forward primer, 16E6F	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC	59	
	Reward primer, 16E6R	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC	60	

2. พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ HPV จีโนมชนิด 16
clone ชิ้นส่วนของ HPV16 บริเวณ E2 และ E6 ในพลาสมิด pGEMT Easy Vector (ผลิตภัณฑ์ของ Promega) จำนวน 2 clones ได้แก่ clone HPV16E-2 ที่มีส่วน E2 และ clone HPV16E-6 ที่มีส่วน E6 ใช้เป็นแหล่ง DNA ในการสร้างกราฟมาตรฐานการเพิ่มชิ้นส่วนและหาอัตราส่วนของชิ้น E2/E6 ด้วยเทคนิค multiplex qPCR

3. cell lines ของมะเร็งปากมดลูก ที่มี integrated HPV16 ได้แก่ SiHa cell line ที่มี complete integrated virus เท่ากับ 1-2 copies ตามลำดับ⁽⁹⁾ โดยได้รับความอนุเคราะห์ในการเตรียม cell lines จากห้องศาสตราจารย์แพทย์หญิงแจ่มใส เพียรทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สกัดเป็น DNA โดยใช้ Wizard® SV genomic DNA extraction kits (ผลิตภัณฑ์ของ Promega) และใช้ DNA ที่สกัดจาก cell lines นี้ เป็น positive control สำหรับการตรวจ integrated HPV16

4. ชิ้นเนื้อตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ เป็นชิ้นเนื้อสด (tissue biopsy) บริเวณที่เป็นรอยโรค เก็บโดยสูตินรีแพทย์จากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและเข้ารับการรักษาที่ tumor clinic คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE 480227 ผู้เข้าร่วมโครงการได้รับการบอกสิทธิและลงนามยินยอม กลุ่มผู้ป่วยถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (pre-invasive หรือ dysplasia) 15 ราย และกลุ่มเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (invasive carcinoma) 15 ราย ทั้งนี้ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มได้รับการยืนยันผลวินิจฉัยจากผลการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา โดยภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกเก็บแช่แข็งที่ -70 °C จนกว่าจะนำไปสกัด DNA

วิธีการศึกษา

1. การเตรียม DNA จาก ชิ้นเนื้อตัวอย่าง จุ่มตัวอย่าง ชิ้นเนื้อลงใน liquid nitrogen เพื่อให้แข็งและนำไปบดให้ละเอียดด้วยโกรบบดยา นำไปสกัด DNA โดยใช้ Wizard® SV genomic DNA extraction kits (ผลิตภัณฑ์ของ Promega)

2. การพัฒนาเทคนิคการตรวจ integrated HPV 16 DNA

2.1.1 การวัดปริมาณ HPV16-E2 และ HPV16- E6 ด้วยเทคนิค multiplex qPCR

ในการประเมิน integrated HPV 16 DNA โดยวิธีการเพิ่มจำนวน E2 และ E6 โดยใช้ DNA จากพลาสมิด HPV16E-2 และ HPV16E-6 เป็น DNA ต้นแบบในการทำกราฟมาตรฐานโดยเจือจางให้มีจำนวนตั้งแต่ 10-10⁸ copies วิธีการโดยย่อ เติมน้ำ DNA ตัวอย่าง 50 ng ลงในส่วนผสม PCR 25 µL ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer, 200 µM ของ dNTP, 4.0 mM MgCl₂, 300 nM ของ E2 และ E6 ไพรเมอร์, 100 nM ของ E2 และ E6-probe, 2 Units Taq DNA polymerase เพิ่มจำนวน 40 รอบ ในเครื่อง Rotorgene 3000 (CORBETT Research ผลิตภัณฑ์จากประเทศออสเตรเลีย) สภาวะที่ใช้ คือ denaturing ที่ 95 °C เวลา 15 วินาที และ annealing ที่ 60 °C เวลา 1 นาที ตรวจวัดสัญญาณ E2-VIC และ E6-FAM probe ที่ 555 และ 510 นาโนเมตร ตามลำดับ ใช้ DNA จาก SiHa cell line เป็น positive control

2.1.2. การทำ cut off สำหรับการแปลผลการตรวจหา integrated HPV

เนื่องจากการทำ qPCR อาจมีความคลาดเคลื่อนในการหาปริมาณของ E2 และ E6 จึงต้องทำการหาค่า cut off สำหรับการแปลผล integrated HPV ขึ้นเองโดยผสม DNA จาก พลาสมิด HPV16 E-2 และ E-6 ในอัตราส่วน 1: 1 ซึ่งอนุมานว่าเป็น episomal form นำมาเป็นตัวอย่างในการวัดความแปรปรวน (variation) ของการวัดปริมาณ HPV 16 E2/ E6 ซ้ำจำนวน 10 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และ SD ค่า cut off

สำหรับการแปลผลเท่ากับค่าเฉลี่ย + 2.0 SD

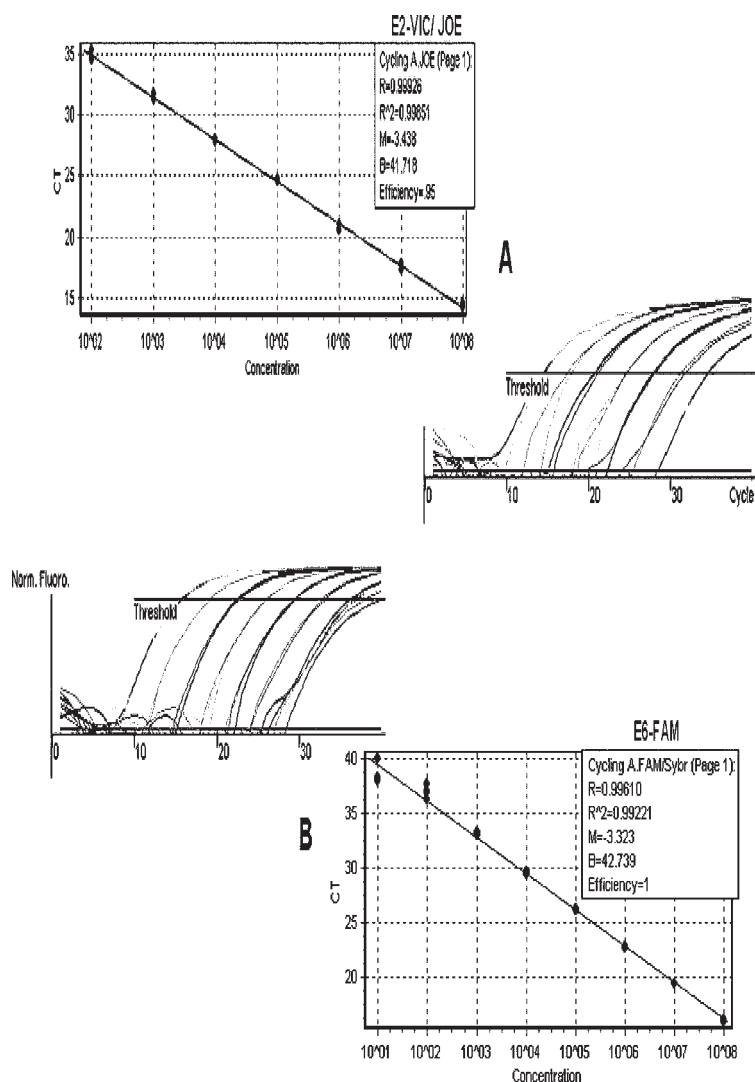
3. การหาอุบัติการณ์ของการพบ integrated HPV 16 ในตัวอย่าง DNA ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ด้วยวิธี multiplex PCR

นำ DNA จากชิ้นเนื้อผู้ป่วยในกลุ่ม pre-invasive และ invasive carcinoma มาทำการทดสอบหาอัตราส่วนของ E2/E6 ตามวิธีข้อ 2.1.1 และ แปลผลตามเกณฑ์ในข้อ 2.1.2 ใช้ DNA จาก SiHa cell line เป็น positive control

ผลการศึกษา

1. การจัดตั้งวิธีวัดปริมาณ HPV16-E2 และ HPV 16- E6 ด้วยเทคนิค multiplex qPCR

วิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสจีโนมของ HPV16 ทั้งส่วน E2 และ E6 ในหลอดเดียวกันแบบ multiplex qPCR แสดงเป็นกราฟมาตรฐานในการเพิ่มขึ้นส่วนของจีน E2 และ E6 ใน **รูปที่ 1** โดยมีค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนทั้ง 2 จีนใกล้เคียงกัน เท่ากับ 1.01 และ 1.04 ตามลำดับ



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานในการตรวจวัดจีน E2 (รูปที่ 1A) และ E6 (รูปที่ 1B) ด้วย multiplex PCR

การประเมินคุณสมบัติในด้านความเป็นเส้นตรง และความแม่นยำ โดยวัดเป็น % CV ของแต่ละค่ามาตรฐาน แสดงใน ตารางที่ 2 พบว่าช่วงค่าการตรวจที่น่าเชื่อถือ (acceptable range) ทั้ง 2 จีนประเมินจากไวรัสต่ำสุด

(lower detection limit) และจำนวนสูงสุด (upper detection limit) ที่ให้ ค่า % CV ไม่เกิน 10% อยู่ระหว่าง 10^3 - 10^8 copies

ตารางที่ 2 แสดงการประเมิน linearity และ reproducibility ของ จีน E2 และ E6

Linearity	E2 (10^2 - 10^8) Mean $\pm$ SD		E6 (10^2 - 10^8) Mean $\pm$ SD	
Slope (n=10)	-3.57 $\pm$ 0.111		-3.35 $\pm$ 0.102	
Efficiency (n=10)	1.01 $\pm$ 0.101		1.04 $\pm$ 0.115	
Y-intercept (n=10)	38.62 $\pm$ 0.709		40.19 $\pm$ 0.733	
R value	0.9989 $\pm$ 0.004		0.9997 $\pm$ 0.003	
R ² value	0.9977 $\pm$ 0.004		0.9994 $\pm$ 0.003	
Standard curve (n=15)	Ct $\pm$ SD	% CV	Ct $\pm$ SD	% CV
10^1	ND		38.97 $\pm$ 1.105	37.54
10^2	34.87 $\pm$ 1.120	26.3	36.95 $\pm$ 1.080	18.2
10^3	31.64 $\pm$ 0.929	10.9	33.33 $\pm$ 0.921	9.2
10^4	27.88 $\pm$ 0.861	6.9	29.48 $\pm$ 0.785	6.3
10^5	24.61 $\pm$ 0.750	4.8	26.16 $\pm$ 0.720	4.1
10^6	20.68 $\pm$ 0.710	5.6	22.62 $\pm$ 0.680	5.0
10^7	17.66 $\pm$ 0.683	5.1	19.26 $\pm$ 0.581	4.3
10^8	14.23 $\pm$ 0.668	3.8	15.81 $\pm$ 0.542	2.3

* ND = not detected

2. การแปลผลการตรวจหา integrated HPV

การตรวจไม่พบ E2 หรืออัตราส่วน E2/E6 เท่ากับ 0 จะหมายถึง ไวรัสที่ E2 ถูกตัดทิ้งอย่างสมบูรณ์ (complete integrated form) ทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณ E2 แปลผลเป็น integrated form ผลการหาเกณฑ์เพื่อแปลผลเป็นจีโนมไวรัสที่สมบูรณ์ (episomal form) วัดได้ อัตราส่วน E2/E6 ที่ 0.83 - 1.29 ถ้าได้ค่าอัตราส่วน E2/E6 ต่ำกว่า 0.83 แปลผลเป็น Mixed integrated HPV คือ มีทั้ง episomal และ integrated form ปนกัน

3. การตรวจพบ integrated HPV 16 ในตัวอย่าง DNA ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

ผลการศึกษาสำรองเพื่อตรวจหา integrated HPV16 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะ pre-invasive ทั้งหมด 15 ราย พบ episomal form 5 ราย และ integrated HPV จำนวน 10 ราย ในจำนวนนี้ 4 รายเป็น complete integrated form และ mixed integrated form 6 ราย ในขณะที่อุบัติการณ์ พบ integrated HPV16 ในผู้ป่วยมะเร็งกลุ่ม invasive carcinoma จำนวน 14 จาก 15 ในจำนวน 14 รายนี้ เป็น complete integrated form

และ mixed integrated form 6 ราย และ 8 ราย ตามลำดับ

และเมื่อจำแนก การพบ integrated HPV 16 ใน กลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง invasive เป็นระยะต่างๆจากระยะ I ถึง III พบ episomal form เพียง 1 ราย และพบ integrated HPV 14 ราย แนวโน้มภาพรวมของ integrated HPV เพิ่มขึ้นตามระยะของโรคที่เพิ่มอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือพบร้อยละรวมของ integrated form (mixed และ complete integrated) ใน แต่ละระยะ mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia, early invasive และ late invasive stage เท่ากับ 13% (2/15), 26%(4/15), 26% (4/15), 87.5% (7/8), และ 100 % (7/7) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 อัตราการพบ integrated HPV16 ในผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็งปากมดลูก (pre-invasive; dysplasia) และ ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (invasive cervical carcinoma)

กลุ่มผู้ป่วย	CIN/ Staging	Physical status of HPV 16 (%)			Total integrated HPV 16 (%) (Mixed + Integrated)
		Episomal form	Mixed form	Completely Integrated	
Pre-invasive (Total cases = 15)	Mild dysplasia; LSIL; CIN I (n=5)	3/5 (60%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	10/15 (66%)
	Moderate dysplasia; HSIL; CIN II (n=5)	1/5 (20%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)	
	Severe dysplasia; HSIL; CIN III/ CIS (n=5)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)	
Invasive cervical carcinoma (Total cases = 15)	Stage I + II (Early invasive) (n=8)	1/8 (12.5%)	5/8 (62.5%)	2/8 (25%)	14/15 (93%) $p < 0.05$
	Stage III (Late invasive) (n=7)	0/7 (0%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)	

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ผลจากการประเมินวิธีการตรวจหาแบบ ไวรัส HPV16 โดยเทคนิค multiplex qPCR จากการศึกษาทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของไวรัส ที่เป็น integrated form และ episomal form หรือ mixed form ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน E2 และ E6 ในหลอดทดลองเดียวกัน หรือ multiplex PCR ปัจจัยสำคัญของผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ด้วย qPCR คือความแปรปรวนจากการตรวจวัด โดยทั่วไปความผิดพลาดที่

ยอมรับคือค่า CV ไม่เกิน 10 % ในการทดลองจะต้องมี internal control sample ที่ทราบจำนวน copy ของ E2 และ E6 เป็นตัวอย่างควบคุมในแต่ละรอบ โดยให้ความเบี่ยงเบนไม่เกิน 2 SD ความแปรปรวนดังกล่าว จึงเป็นที่มาและจำเป็นที่จะต้องกำหนดค่า cut off ของ episomal form เพื่อใช้ในการแปลผล ค่า detection limit ใช้เป็นข้อกำหนดว่าค่าที่วัดได้ต้องไม่ต่ำกว่า 10^3 copies และไม่เกิน 10^5 copies จึงจะให้ค่าที่น่าเชื่อถือ กล่าวคือ ในกรณีที่วัดอัตราส่วน E2/E6 เพื่อสรุปว่าเป็น integrated

HPV อย่างน้อยจะต้องมีปริมาณ E6 ในตัวอย่าง 1000 copies ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในตารางที่ 4 พบว่า ตัวอย่างทุกราย มีจำนวน E2 ในตัวอย่างมากกว่า 2000 copies และ E6 มากกว่า 3500 copies ขึ้นไป นอกจากนี้จะจำแนกรูปแบบได้แล้ววิธีการ qPCR ทำให้เราทราบในเชิงปริมาณหรือ viral load ของ HPV16

ที่มีในตัวอย่างด้วย เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ย viral load ทั้ง E2 และ E6 ของกลุ่ม dysplasia พบว่าน้อยกว่า กลุ่ม invasive carcinoma อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าเฉลี่ยปริมาณ E2 และ E6 ในกลุ่ม pre-invasive เท่ากับ 31,608.15 และ 78,629.93 copies ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลการหา Physical status ของ HPV16 ในผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็งปากมดลูก (pre-invasive; dysplasia) และผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (invasive cervical carcinoma) จำนวนกลุ่มละ 15 ราย

Sample no.	E2	E6	E2/E6	Physical state	CIN/Staging
DS01	21,891.09	13,135.50	1.67	Episomal	CIN III
DS05	25,153.87	31,781.37	0.92	Episomal	CIN I
DS15	2,072.98	3,540.83	0.59	Mixed	CIN II
DS20	6,298.54	5,170.63	1.22	Episomal	CIN I
DS21	41,191.94	126,948.82	0.33	Mixed	CIN III
DS25	35,997.41	21,286.66	1.70	Episomal	CIN I
DS29	54,190.64	28,450.76	1.93	Episomal	CIN II
DS38	23,364.71	33,106.78	0.71	Mixed	CIN II
DS42	255,550.51	349,364.98	0.73	Mixed	CIN III
DS67	3,666.61	11,995.94	0.31	Mixed	CIN I
DS68	4,743.91	13,784.08	0.35	Mixed	CIN II
DS69	0.00	13,571.64	0.00	Integrated	CIN I
DS70	0.00	13,414.65	0.00	Integrated	CIN II
DS73	0.00	16,551.97	0.00	Integrated	CIN III-CIS
DS90	0.00	497,344.38	0.00	Integrated	CIN III
CX08	301,663.81	437,157.91	0.70	Mixed	SCCA IIB
CX09	25,425,099.68	25,862,658.25	1.01	Episomal	SCCA IIB
CX11	53,278,073.95	94,217,142.35	0.57	Mixed	SCCA IIB
CX17	36,416,715.36	53,112,157.03	0.71	Mixed	SCCA IIB
CX24	755,745.30	8,249,628.95	0.09	Mixed	SCCA IB
CX35	0.00	2,500,075.56	0.00	Integrated	SCCA IIB
CX39	519,947,486.34	849,350,003.12	0.61	Mixed	SCCA IIB
CX69	16,672.44	77,847.70	0.21	Mixed	SCCA IIA
CX70	13,938.46	60,873.91	0.23	Mixed	Adenocarcinoma IIB
CX72	79,629,830.96	103,220,855.86	0.77	Mixed	SCCA IIB
CX73	0.00	1,609,325.78	0.00	Integrated	SCCA IIB
CX75	0.00	4,160,477.06	0.00	Integrated	SCCA IIB
CX88	0.00	833,786.92	0.00	Integrated	SCCA IIB
CX90	0.00	2,894,383.79	0.00	Integrated	SCCA IIB
CX97	0.00	5,461,264.46	0.00	Integrated	SCCA IIB
SiHa	0.00	200,000.00	0.00	Integrated	

หมายเหตุ :

1. ค่าเฉลี่ยปริมาณ E2 และ E6 ในกลุ่ม pre-invasive เท่ากับ 31,608.15 และ 78,629.93 copies ตามลำดับ และกลุ่ม invasive cervical carcinoma เท่ากับ 47,719,015.09 และ 76,803,175.91 copies ตามลำดับ ($p\text{-value} < 0.05$)
2. การแปลผล Episomal; $0.83 \leq E2/E6 \leq 1.29$, completely integrated HPV; $E2/E6 = 0$, และ Mixed (episomal + integrated); $0 < E2/E6 < 0.83$
3. คำย่อในตาราง: CX: invasive cervical carcinoma, SCCA; Squamous cell carcinoma, DS; Dysplasia/ Pre-invasive, CIN; Cervical intraepithelial neoplasia, CIS; Carcinoma *In Situ*

และกลุ่ม invasive cervical carcinoma เท่ากับ 47,719,015.09 และ 76,803,175.91 copies ตามลำดับ มีข้อสังเกตในตัวอย่าง pre-invasive จำนวน 3 ราย ที่ให้ค่า E2/E6 มากกว่าค่า cut off ที่ 1.29 และแปลผลเป็น episomal form โดยการที่พบ E2/E6 มากกว่าค่า cut off อาจมาจาก error ในการหาปริมาณ E2 และ E6 แบบหลอดเดียวนั้น มีผลมาจาก efficiency ในการเพิ่มจำนวนของ E2 มากกว่า E6 ดังนั้นการทำ qPCR ทุกครั้ง จำเป็นต้องควบคุมให้การเพิ่มจำนวนขึ้นทั้ง 2 ในปฏิกิริยา multiplex PCR หลอดเดียวให้มี efficiency ใกล้เคียงกันมากที่สุด

แม้ว่าจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษานี้ไม่มากนัก แต่จากข้อมูลในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นแนวโน้มว่า ใน pre-invasive จะพบปริมาณ episomal form (5/15 ราย) มากกว่า invasive carcinoma (1/15 ราย) รวมทั้งการพบ total integrated HPV (complete+mixed integrated form) ในกลุ่ม pre-invasive (66%) น้อยกว่า กลุ่ม invasive carcinoma (93%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากการศึกษานี้ จำนวนตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม มีค่อนข้างน้อย เมื่อกระจายตัวอย่างในแต่ละ stage จะทำให้จำนวนยิ่งน้อยลงและอาจมีผลให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติคลาดเคลื่อน ข้อมูลนี้จึงเป็นเพียงการศึกษานำร่องเพื่อหาแนวโน้ม การพบ integrated HPV16 ในระยะต่างๆ ของกลุ่ม pre-invasive และ invasive carcinoma

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับการศึกษาของ Nagao และคณะ⁽¹¹⁾ ซึ่งทำการศึกษ เฉพาะในกลุ่ม invasive cervical carcinoma โดยพบ total integrated HPV เพียง 58% ในจำนวนนี้เป็น mixed form และ complete integrated form 28% และ 30% เมื่อเทียบกับผลการศึกษานี้พบ total integrated HPV 93% เป็น mixed form และ complete integrated form 53% และ 40% จะเห็นว่าการศึกษานี้ ได้อุบัติการณ์สูงกว่า อาจเนื่องจากการศึกษาของ Nagao ใช้ค่า cut off ในการแปลผลต่ำกว่า คือ 0.6 เพราะมีค่าความคลาดเคลื่อนสูงกว่า ส่วนเมื่อเปรียบเทียบผล

กับการศึกษาของ Peitsaro และคณะ⁽¹²⁾ ซึ่งศึกษาใน มะเร็งปากมดลูกเฉพาะระยะ dysplasia 24 ราย พบ integrated HPV สูงถึง 95% สูงกว่าการศึกษานี้ และของ Nagao ซึ่งได้เท่ากับ 66% และ 36% ตามลำดับ โดยการศึกษา ของ Peitsaro นั้นไม่ได้หาค่า cut off แต่ใช้ค่าที่ 1.0 ดังนั้น การแปลผลที่ใช้ค่า cut off ต่างกันในแต่ละรายงานจึงนับเป็นตัวแปรที่สำคัญที่ทำให้อุบัติการณ์ ต่างกัน

โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นแนวโน้มว่า ทั้ง ปริมาณและรูปแบบ integrated HPV อาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่เป็นประโยชน์ เพราะสะท้อนถึงรูปแบบไวรัสว่าอยู่ในวงจรชีวิตที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน หรือส่งเสริมให้มีการแทรกตัวเข้าไปในจีโนมของเซลล์ปากมดลูก การพบ integrated HPV เพิ่มขึ้น จะส่งเสริมการแสดงออกของ viral oncoprotein E6 และ E7 มากขึ้น อันเป็นผลมาจากการที่ E2 ถูกตัดทิ้ง โดย E2 นี้ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ E6 และ E7 ได้^(13,14) ดังนั้น การตรวจหารูปแบบ integrated HPV จึงมีความสำคัญในการทำนายการดำเนินโรค หรือ prognostic marker ทั้งนี้ น่าจะต้องทำการศึกษากลุ่มตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น เพื่อยืนยันว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ และติดตามผลการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol 2000;19:1-5.
2. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol 1998;17:146-53.

3. Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC. Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 1997;74:50-6.
4. Choo KB, Pan CC, Han SH. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* 1987;161:259-61.
5. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63:1129-36.
6. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002;21:1510-7.
7. Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol* 1991;65:4534-8.
8. Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wong YC, Cheung AL. Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Virol* 2005;32:19-23.
9. Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci US A*. 1987;84:1070-4.
10. Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 1985;66:1515-22.
11. Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, et al. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:863-7.
12. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40:886-91.
13. Lindel K, de Villiers EM, Burri P, Studer U, Altermatt HJ, Greiner RH, et al. Impact of viral E2-gene status on outcome after radiotherapy for patients with human papillomavirus 16-positive cancer of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65:760-5.
14. Lindel K, Burri P, Studer HU, Altermatt HJ, Greiner RH, Gruber G. Human Papillomavirus status in advanced cervical cancer: predictive and prognostic significance for curative radiation treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:278-84.