

## การแสดงออกของโปรตีน tapasin ในมะเร็งปากมดลูก

พัชรี เจียรนัยกูร<sup>1\*</sup>, ณิชาวีณ์ ญฐศิริกุล<sup>1</sup>, วิภาวี แก้วโพธิ์<sup>1</sup>, สุรศักดิ์ แวนรัมย์<sup>1</sup>, ชาลววิทย์ ลีลาญวัฒน์<sup>1</sup>, อนุชา พัวโพธิ์<sup>2</sup>, เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับต้นในสตรีทั่วโลก การเกิดมะเร็งปากมดลูก นอกจากมีสาเหตุที่สำคัญจากการติดเชื้อไวรัส human papilloma แล้ว เซลล์มะเร็งอาจมีกลไกในการหลบหลีกการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบการ ลดการแสดงออกของ MHC class I ที่ผิวเซลล์มะเร็ง ทำให้ MHC class I ไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการ แสดงออกของโปรตีน tapasin ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ ส่งผ่านแอนติเจนให้โมเลกุลของ MHC class I โดยศึกษาในตัวอย่างมะเร็ง 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็ง (dysplasia) จำนวน 79 ราย และกลุ่มที่เป็นมะเร็งระยะต่างๆ จำนวน 49 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์ปากมดลูกปกติจากผู้ป่วย myoma จำนวน 49 ราย ผลการศึกษาพบการลดลงของระดับการแสดงออกของโปรตีน tapasin สัมพันธ์กับระยะความ รุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.001$ ;  $\chi^2$  for trend) การศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้น ที่สนับสนุนว่าการลดลงของระดับการแสดงออกของโปรตีน tapasin เป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ MHC class I ไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการติดตามการดำเนินโรคโดยเฉพาะในระยะก่อนเป็นมะเร็ง (dysplasia) รวมทั้งควรจะศึกษาเพิ่มเติมในโปรตีนตัวอื่นในกระบวนการส่งผ่านแอนติเจนให้โมเลกุลของ MHC class I ต่อไป

**คำสำคัญ:** การแสดงออกโปรตีน Tapasin, MHC class I, มะเร็งปากมดลูก

### บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งอวัยวะสืบพันธุ์ที่พบได้สูงเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก<sup>(1)</sup> และเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญเป็นที่ทราบกันว่าการติดเชื้อ Human Papillomas Virus (HPV) เป็นสาเหตุหลักของการเกิด cervical neoplasia โดยพบจีโนมของ HPV รวมทั้ง viral protein (E6 และ E7) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกจำนวนมาก<sup>(2)</sup> อย่างไรก็ตามไม่ใช่ผู้ป่วยทุกรายที่ติดเชื้อ HPV จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งจึงเชื่อว่าน่าจะมีปัจจัยอื่นที่สำคัญและส่งเสริมให้เกิดมะเร็งปากมดลูกโดยเฉพาะ

การที่เชื้อ HPV สามารถหลบรอดจากการรับรู้และทำลายเซลล์มะเร็งจากระบบภูมิคุ้มกัน ภาวะการติดเชื้อไวรัส HPV มีอัตราสูงโดยทั่วไปในผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์ แต่ส่วนมากจะเป็นแบบชั่วคราวไม่แสดงอาการและอาจหายได้เองภายใน 8-13 เดือน<sup>(3)</sup> จะมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ยังมีการ ติดเชื้อแบบเรื้อรังซึ่งจะพัฒนาไปเป็น Cervical dysplasia และมะเร็งระยะลุกลาม (Cervical cancer) การเปลี่ยนแปลงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกในปากมดลูกมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของ Cervical dysplasia และมะเร็งปากมดลูกในระดับ

<sup>1</sup> ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

<sup>2</sup> ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

## Tapasin expression in cervical carcinoma

Patcharee Jearanaikoon<sup>1\*</sup>, Nichapawee Nattasirikul<sup>1</sup>, Wipawee Kaewpo<sup>1</sup>, Surasak Wanram<sup>1</sup>, Chanvit Leelayuwat<sup>1</sup>, Anucha Paupairoj<sup>2</sup>, Temduang Limpaiaboon<sup>1</sup>

### Abstract

Cervical cancer is the most common cancer among women worldwide. Even though HPV infection is known as the major risk factor of cervical carcinogenesis, immune evasion of infected cells or tumor cells is also well established as the major contributing factors. Down regulation of MHC class I as well as the presence of non-surface presenting MHC class I molecules have been previously reported. Our aim of this study is to investigate the expression level of tapasin protein which is one of the MHC class I antigen processing proteins in various stages of cancerous tissues. Seventy nine dysplasia and 49 cases of cervical cancer and 49 normal cervix from myoma patients as control were included in this study. The association between the expression level and disease progression was analyzed using  $\chi^2$  for trend. The reduction of tapasin expression is significantly associated with respect to the progression of staging in both dysplasia and cervical cancer group ( $p=0.001$ ;  $\chi^2$  for trend). In conclusion, our study illustrates that the reduction in tapasin expression might exert as one of the mechanism leading to the impairment of antigen presenting of MHC class I in cancerous tissues. Therefore, tapasin staining might be useful as an early prognostic marker in dysplasia. More antigen processing proteins should be also further investigated.

**Key words:** Tapasin expression, MHC class I, cervical cancer

ต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามกลไกการรบกวนภูมิคุ้มกันนี้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสหรือผู้ป่วยมะเร็ง ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด

MHC class I เป็นโมเลกุลที่พบได้บนเซลล์ที่มีนิวเคลียสเกือบทุกชนิด มีหน้าที่ในการนำเสนอโปรตีนแอนติเจนเพื่อให้เกิดการรับรู้และตอบสนองผ่าน CD8+ T lymphocyte<sup>(4)</sup> จากรายงานของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้<sup>(5)</sup> ถึงระดับการแสดงออกของ MHC class I ในมะเร็งปากมดลูกพบว่าการกระจายตัวของ MHC class I molecule จะพบอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่กลุ่ม normal cervix จะพบอยู่บนผิวเซลล์ ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า MHC class I ไม่สามารถนำเสนอ

แอนติเจนบนผิวเซลล์ของมะเร็งปากมดลูกขั้นตอนการเกิด antigen processing<sup>(6)</sup> เริ่มขึ้นจากการสร้าง Heavy chain และ  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ M) โดย polyribosome บน rough endoplasmic reticulum (RER) และเข้าสู่ lumen ของ endoplasmic reticulum (ER) โดยเป็นสายโพลิเปปไทด์ 2 สายที่แยกกันอยู่ ภายใน ER นี้  $\alpha$  chain มีโมเลกุล calnexin และ Bip ช่วยให้เกิดการโค้งงออย่างเหมาะสม และจับกับ  $\beta_2$ M ต่อจากนั้น  $\alpha$  chain- $\beta_2$ M dimers จะเคลื่อนไปภายใน ER ไปตรงตำแหน่งที่มี Transport associated with Antigen Processing (TAP) protein อยู่ โดยมี tapasin เป็นตัวเชื่อม เมื่อมีโปรตีนแอนติเจน (peptide antigen) ที่ถูกย่อย โดย

<sup>1</sup> Centre for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

<sup>2</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

\* Corresponding author

proteasome จาก cytosol ส่งผ่าน TAP molecule เข้ามาใน ER โปรตีนแอนติเจนนั้นก็จะจับกับโมเลกุล MHC class I ที่ประกอบขึ้น การมีโปรตีนแอนติเจนมาจับช่วยให้โมเลกุล MHC class I มีความเสถียร และทำให้โมเลกุล MHC class I หลุดออกจาก TAP molecule ต่อจากนั้น peptide-MHC class I ก็จะเคลื่อนผ่าน golgi apparatus เพื่อส่งออกไปยังผิวเซลล์ทาง exocytic vesicle ในขณะที่เคลื่อนผ่าน golgi apparatus โมเลกุล MHC class I จะมี carbohydrate มาประกอบด้วย Tapasin เป็นไกลโคโปรตีนเมมเบรนชนิด type 1 มีขนาด 48 kDa ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 448 ตัว และ N-linked glycosylation site สายเดี่ยว ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการเกิด complex ระหว่าง TAP และ MHC class I โดยเป็นสะพานเชื่อมให้โมเลกุลมีความเสถียรมากขึ้น<sup>(7,8)</sup>

ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจที่จะตรวจสอบหาความผิดปกติที่เป็นสาเหตุให้ MHC class I ไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์โดยการตรวจหาการแสดงออกของ Tapasin ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ตลอดจนหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Tapasin กับระยะและความรุนแรงของโรค ข้อมูลที่ได้จะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายและนำไปสู่การพยากรณ์ความรุนแรงของโรคและการวางแผนรักษาผู้ป่วยต่อไป

## วัสดุและวิธีการศึกษา

### ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง จำนวน 128 ราย และกลุ่มควบคุม 49 ราย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งผ่านการตรวจกรอง ณ tumor clinic โดยสูตินรีแพทย์ แบ่งเป็นผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็ง (dysplasia) จำนวน 79 ราย และผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม 49 ราย โดยเก็บชิ้นเนื้อแบบ Biopsy ขณะที่กลุ่มควบคุม เป็นชิ้นเนื้อบริเวณ normal cervix ที่ได้จากการผ่าตัดจากผู้ป่วยมดลูกโต (myoma) ซึ่งเป็นการตัดชิ้นเนื้อแบบ hysterectomy

ตัวอย่าง 3 กลุ่มเป็นผู้มารับบริการที่คลินิกสูตินรีเวช โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE 480227

## วิธีการศึกษา

1. การย้อม Tapasin โดยใช้ anti-Tapasin mAbTO-3 ซึ่งเป็น mouse monoclonal antibody ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Soldano Ferrone, Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York สหรัฐอเมริกา โดยใช้ความเข้มข้นที่ 1:500 และย้อมขึ้นเนื้อด้วยเทคนิค Immunoperoxidase staining<sup>(9)</sup> โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Deparaffinization โดยจุ่มสไลด์ลงใน xylene 2 chamber, chamber 1 นาน 30 นาที chamber 2 นาน 5 นาที

2. Rehydration จุ่มลงใน Absolute ethanol 2 chamber, chamber ละ 2 นาที 95 % ethanol 2 chamber, chamber ละ 2 นาที Water 2 chamber, chamber ละ 2 นาที

3. Retrieve Ag โดยวิธี streaming ใน Citrate buffer 20 นาที หลังจากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้องอีก 20 นาทีและล้างออกด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 นาที

4. block endogeneous peroxidase activity ด้วย 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และล้างออกด้วย PBST (PBS ที่มี 0.05% Tween 20) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. Block ด้วย Blocking buffer ( 5% Fetal bovine serum, 30mg% Caseine ใน PBST ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

6. เติม Primary antibody ที่เจือจางด้วย dilution ที่เหมาะสม (1:500) ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

7. เติม Envision ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วล้างออกด้วย PBST 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

8. ทำให้เกิดสีโดยการย้อมใน Working DAB นาน 30 นาทีในที่มืดแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำประปาที่เปิดไหล 3-5 นาที

9. จุ่มในสี Hematoxylin 5 ครั้ง แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดจนกว่าจะสะอาด

10. Dehydration จุ่มลงใน 95% ethanol 2 chamber, chamber ละ 2 นาที Absolute ethanol 2 chamber, chamber ละ 2 นาที Xylene 2 chamber, chamber ละ 2 นาที

11. Mounting โดย permount

12. การอ่านผลและการแปลผล

อัตราการย้อมติดสีของเซลล์ (percentage of positive cell) โดยให้ร้อยละการติดสีแบ่งเป็นระดับต่างๆ (grading) ตามจำนวนเซลล์ที่ให้ผลการติดสีเป็นบวก จะใช้เป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงปริมาณ การแสดงออกของ Tapasin ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วย cervical cancer และกลุ่ม dysplasia กับ normal cervix

13. เกณฑ์ในการเกรด Grading<sup>(10)</sup>

เกรด 0 : ไม่มีการติดสีในเซลล์

เกรด 1 : จำนวนเซลล์ที่มีการติดสี < 50%

เกรด 2 : จำนวนเซลล์ที่มีการติดสี 50 - 75%

เกรด 3 : จำนวนเซลล์ที่มีการติดสี > 75%

หมายเหตุ : ในการเกรดเทียบการติดสีกับ Internal positive control คือกลุ่มของ Lymphocytes

## 2. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Tapasin กับความรุนแรงของมะเร็งปากมดลูก

ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างในกลุ่มก่อนเป็นมะเร็ง และกลุ่มที่เป็นมะเร็ง ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มก่อนเป็นมะเร็ง 79 ราย แบ่งออกเป็น Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) จำนวน 49 ราย และ High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) จำนวน 30 ราย กลุ่มที่เป็นมะเร็ง 49 ราย แบ่งออกเป็น กลุ่มมะเร็งระยะเริ่มต้น (early invasive cervical carcinoma) ซึ่งรวมมะเร็งในระยะที่

1-2 จำนวน 31 ราย และกลุ่มมะเร็งระยะท้าย (late invasive cervical carcinoma) ซึ่งรวมมะเร็งในระยะที่ 3-4 จำนวน 18 ราย

ผลการตรวจระดับการแสดงออกของ tapasin นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Tapasin กับระยะการดำเนินโรคในกลุ่มตัวอย่างของมะเร็งปากมดลูกเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติ  $\chi^2$  for trend test ด้วยโปรแกรม SPSS version 12.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p-value < 0.05

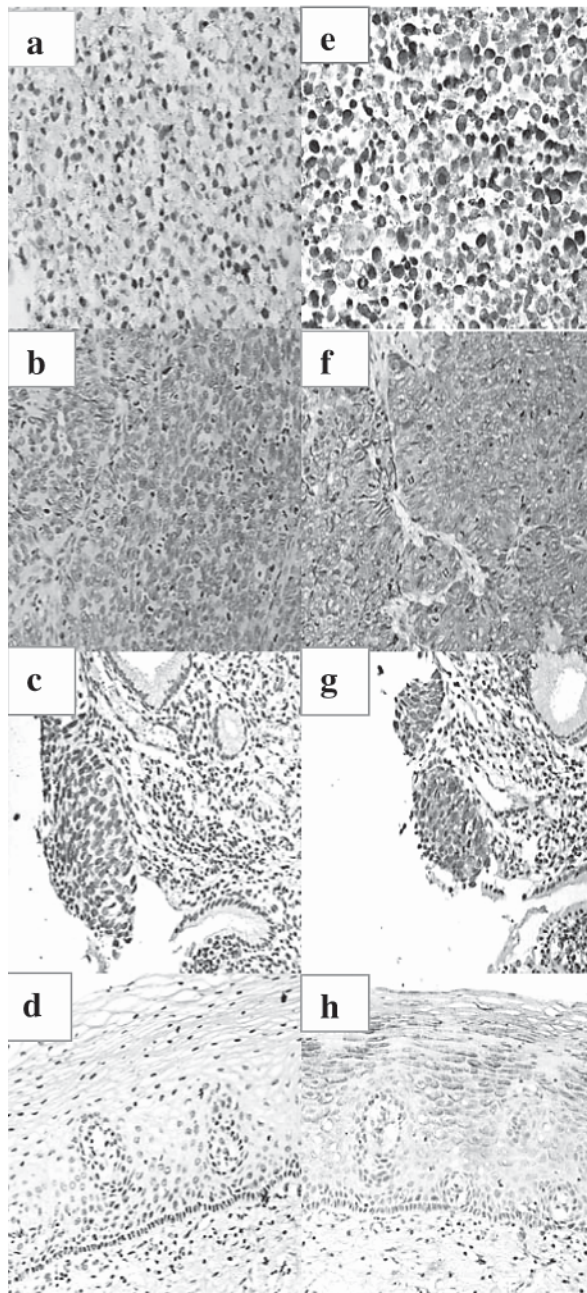
## ผลการศึกษา

รูปที่ 1 แสดงการย้อมโปรตีน Tapasin และตัวอย่างการแบ่งระดับการแสดงออกในในกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับการแสดงออกของ Tapasin ในทุกกลุ่มตัวอย่างได้แก่กลุ่มระยะลุกลามทั้งใน Early (stage I+II) และ Late invasive (III+IV), กลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็ง LSIL, HSIL และ normal cervix มีความสัมพันธ์กันอย่างน้อยมีนัยสำคัญทางสถิติ ( p-value = 0.001,  $\chi^2$  for trend test) ดังแสดงในตารางที่ 1 กล่าวคือ ผลการย้อมโปรตีน Tapasin พบว่าร้อยละ 100 ในกลุ่มปากมดลูกปกติ และกลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็งทั้ง LSIL และ HSIL มีระดับการแสดงออกโปรตีน Tapasin ที่ 2+ ถึง 3+ โดย 98% ของกลุ่ม LSIL จะมีระดับการแสดงออกที่ 3+ มากกว่า HSIL ที่มีระดับการแสดงออกที่ 3+ คิดเป็น 77% และเมื่อเข้าสู่ระยะมะเร็ง ระดับการแสดงออกของโปรตีน Tapasin จะลดลงตามระยะความรุนแรงของโรค และอัตราที่ไม่แสดงออกหรือย้อมไม่พบโปรตีน tapasin เพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 0 ในกลุ่ม LSIL และ HSIL เป็น 12.9% และ 38.9% ใน early และ late invasive ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Tapasin ในกลุ่มตัวอย่างจำแนกตามระยะโรค โดยเทคนิค Immunoperoxidase staining

| Group (n)                      | Grading         |                 |                  |                   |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
|                                | %(n)            |                 |                  |                   |
|                                | 0               | 1+              | 2+               | 3+                |
| LSIL (49)                      | 0%<br>(0/49)    | 0%<br>(0/49)    | 2.04%<br>(1/49)  | 97.96%<br>(48/49) |
| HSIL (30)                      | 0%<br>(0/30)    | 0%<br>(0/30)    | 23.3%<br>(7/30)  | 76.7%<br>(23/30)  |
| Early<br>invasive<br>I+II (31) | 12.9%<br>(4/31) | 29.0%<br>(9/31) | 29.0%<br>(9/31)  | 29.0%<br>(9/31)   |
| Late invasive<br>III+IV (18)   | 38.9%<br>(7/18) | 38.9%<br>(7/18) | 11.1%<br>(2/18)  | 11.1%<br>(2/18)   |
| Normal<br>cervix(49)           | 0%<br>(0/49)    | 0%<br>(0/49)    | 28.6%<br>(14/49) | 71.4%<br>(35/49)  |
| รวม                            | 11              | 16              | 33               | 117               |

สถิติ  $\chi^2$  for trend P = 0.001



**รูปที่ 1** ภาพการติดสีของ tapasin ใน : Hela cell line ที่ไม่ใส่และใส่ tapasin antibody (a,e); invasive carcinoma (d,f); dysplasia (c,g) และ normal cervix (d,h)

## วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจระดับการแสดงออกของโปรตีน Tapasin เพื่อที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับความรุนแรงหรือการดำเนินของโรคมะเร็งปากมดลูก ตั้งแต่ระยะก่อนมะเร็งไปจนถึงมะเร็งลุกลามระยะต่างๆ ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติของกลุ่มมะเร็งเพื่อให้เห็นแนวโน้มในการแสดงออกของโปรตีน tapasin ในกลุ่มตัวอย่างกระจายตามระยะในการดำเนินโรค จึงแบ่งกลุ่มตัวอย่างในระยะก่อนเป็นมะเร็งเป็น LSIL (Low grade of squamous intraepithelial lesions) กับ HSIL (High grade of squamous intraepithelial lesions) โดยมีความสอดคล้องกับการจำแนกตาม cervical intraepithelial neoplasia (CIN) และ squamous intraepithelial lesions (SILs) จำแนกตามลักษณะพยาธิสภาพที่เริ่มมีความผิดปกติของชั้น squamous cell ตั้งแต่ระดับ Atypical ถึงระดับ Mild dysplasia (CIN I) รวมกันเป็นกลุ่ม LSIL และ ตั้งแต่ระดับ Moderate (CIN II) จนถึงระดับ Severe dysplasia (CIN III) รวมกันเป็นกลุ่ม HSIL ส่วนในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ early และ late invasive cervical carcinoma ซึ่งการแบ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้ใช้การลุกลามของเซลล์มะเร็งเป็นเกณฑ์การแบ่ง โดยที่ stage I เป็นเซลล์มะเร็งจะจำกัดอยู่ภายในบริเวณปากมดลูก stage II เป็นเซลล์มะเร็งลุกลามออกนอกปากมดลูกแต่ไม่ถึงผนังด้านข้างของเชิงกราน มะเร็งลุกลามช่องคลอดแต่ลงมาไม่ถึงส่วนล่างหรือ 1 ใน 3 ของช่องคลอด stage III ได้แก่ เซลล์มะเร็งลุกลามถึงผนังด้านข้างของเชิงกราน มะเร็งลุกลามถึง 1 ใน 3 ของช่องคลอด และ stage IV ได้แก่ เซลล์มะเร็งลุกลามออกไปนอกอุ้งเชิงกราน

จากการศึกษาการแสดงออกของ Tapasin ในชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกจำนวน 49 ตัวอย่าง ระดับการติดสีบ่งบอกถึงระดับการแสดงออกของ Tapasin พบว่าระยะความรุนแรงของโรคสัมพันธ์กับระดับการติดสีที่ลดลง หรืออีกนัยหนึ่งคือระดับการแสดงออกลดลงสัมพันธ์กับระยะความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น ในภาพรวมระดับการแสดงออก Tapasin ของชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกกลุ่ม late

invasive ทุกรายตั้งแต่ stage III ถึง IV จะมีการแสดงออกค่อนข้างต่ำ คือมีการแสดงออกอยู่ในช่วง 0 ถึง 1+ ในขณะที่ภาพรวมระดับการแสดงออก Tapasin ของชิ้นเนื้อกลุ่มก่อนเป็นมะเร็ง (dysplasia) จำนวน 79 ตัวอย่างจะมีการแสดงออกค่อนข้างสูง คือมีการแสดงออกอยู่ในช่วง 2+ ถึง 3+

ข้อจำกัดประการสำคัญของการศึกษานี้ คือ การอ่านผล จะต้องให้ความสำคัญกับการเกรตการติดสีของโปรตีน Tapasin ในตัวอย่างที่อาจมีความแตกต่างในการอ่านผลในผู้ทำแต่ละคน เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว การอ่านผลในการศึกษานี้จะใช้ผู้อ่าน 3 คน และ นำเอาผลที่ได้มาเปรียบเทียบโดยดูความสอดคล้องในการอ่านผล 2 ใน 3 เป็นเกณฑ์ตัดสิน ในกรณีที่เกรตต่างกันเกิน 2 เกรดขึ้นไป และเกรตที่ได้ต่ำกว่า 2+ จะนำ slide นั้นมาอ่านผลใหม่หมดพร้อมกันอีกครั้ง

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้กับการศึกษาของผู้วิจัยอื่นที่ผ่านมามีมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับความบกพร่องของการแสดงออกของ MHC class I ว่ามีความสัมพันธ์กับการลดลงของการแสดงออกของ Tapasin ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษานี้ เช่น Ogino และคณะ<sup>(11)</sup> โดยใช้เทคนิค Immunohistochemical staining ศึกษาในผู้ป่วย primary maxillary sinus squamous cell carcinoma 70 ราย ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน 5 ตัว ในกระบวนการ antigen processing ได้แก่ calnexin, Erp57, calreticulin, tapasin และ HLA class I พบ down regulation ของ tapasin สัมพันธ์กับ MHC class I อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.01) การศึกษาของ Seliger และคณะ<sup>(12)</sup> ปี 2001 ศึกษาใน Human tumor cells พบว่า การลดการแสดงออก หรือการลดลงของโปรตีน Tapasin จะทำให้การแสดงออกของ MHC class I ลดลง นอกจากนั้นการศึกษาของ Kajsa และคณะ<sup>(13)</sup> โดยใช้เทคนิค Immunoprecipitation และ Immunoblotting ศึกษาใน Human cell lines พบว่าการลดลงของโปรตีน Tapasin จะทำให้เปปไทด์ของ MHC class I ไม่สามารถ load เข้าไปใน ER ได้ ทำให้ MHC class I ไม่สามารถนำ

เสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์ได้

ดังนั้นผลในการศึกษาครั้งนี้ สนับสนุนผลการงานวิจัยของ Jearanaikoon และคณะ 2007 (in press) ว่าโมเลกุลส่วนใหญ่ของ MHC class I ไม่สามารถแสดงออกได้ที่ผิวของเซลล์มะเร็ง (non-surface presenting MHC class I) โดยพบว่า MHC class I ส่วนใหญ่จะแสดงออกในไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็ง ความบกพร่องที่ทำให้ MHC class I ไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งได้นี้ น่าจะมาจากการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน Tapasin ซึ่งเริ่มพบตั้งแต่กลุ่มตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกทั้งในระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือ Dysplasia โดยเฉพาะการพบการลดระดับของ Tapasin อย่างมีนัยสำคัญปรากฏในกลุ่ม HSIL การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าระดับความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น (staging) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของโปรตีน Tapasin มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญไม่ว่าจะเปรียบเทียบมะเร็งระยะใดกับกลุ่มควบคุมก็ตาม นอกจากนี้ยังสนับสนุนว่าการลดลงของโปรตีน Tapasin น่าจะเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดความบกพร่องที่ MHC class I ไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็ง หลุดรอดการทำลายของ immune cell อย่างไรก็ดีตามควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อทราบถึงความผิดปกติของโปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องในการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์มะเร็ง เช่น TAP 1, TAP 2 , LMP I, LMP II และ Calnexin เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อใช้โปรตีนเหล่านี้เป็นตัวติดตามการดำเนินโรคโดยเฉพาะในสตรีกลุ่มก่อนเป็นมะเร็ง

## เอกสารอ้างอิง

1. Vatanasapt V, Sriamporn S, Vatanasapt P. Cancer control in Thailand. Jpn J Clin Oncol 2002; 32 (Supp 1): S82-91.
2. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. Cancer Surv 1992; 12: 197-217.
3. Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. Int J Cancer 1995;61:306-11.
4. Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Rya BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. Am J Clin Pathol 1994;102:768-74.
5. Jearanaikoon P, Kongmuangpuk N, Yodpratoom U, Wanram S, Leelayuwat C, Paupairoj A, Limpai boon T. The alteration of MHC class I expression in cervical cancer. J Med Tech Phy Ther 2007 (in press)
6. Ortman B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampe R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P. A critical role for tapasin in assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. Science 1997;277:1306-9.
7. Momburg F, Tan P. Tapasin-the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecule in the endoplasmic reticulum. Mol Immunol 2002;39:217-33.
8. Bangia N, Lehner pj, Hughes EA, Surman M, Cresswell P. The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. Eur J Immunol 1999; 29:1858-70.

9. Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Storkel S, Seliger B. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 2004; 171: 885-9.
10. Weinman EC, Roche PC, Kasperbauer JL et al. Characterization of antigen processing machinery and Survivin expression in tonsillar squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2203-11.
11. Ogino T, Bandoh N, Hayashi T, Miyokawa N, Harabuchi, Ferrone S. Association of Tapasin and HLA Class I antigen down-regulation in primary maxillary sinus squamous cell carcinoma lesions with reduced survival of patients. *American Association for Cancer Research* 2003;9:4043-51.
12. Seliger B, Schreiber K, Delp K, Meissner M, Hammers S, Reichert T, Pawlischko K, Tamp R, Huber CH. Down regulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens* 2001;57:39.
13. Paulsson KM, Anderson PO, Chen S, Sjögren HO, Ljunggren HG, Wang P, Li S. Assembly of tapasin-associated MHC class I in the absence of the transporter associated with antigen processing (TAP). *International J Immunol* 2001;13: 23-9.