วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MHC class I ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

พัชรี เจียรนัยกูร[1]* นิลนา กองเมืองปัก[1] อุมาพร ยอดประทุม[1] สุรศักดิ์ แว่นรัมย์[1]
ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์[1] อนุชา พัวไพโรจน์[2] เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์[1]

บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบว่ามะเร็งปากมดลูกมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) โดยเฉพาะชนิด 16 และ 18 ในภาวะปกติ MHC class I molecule ทำหน้าที่นำเสนอไวรัสแอนติเจน หรือ tumor antigen เพื่อเหนี่ยวนำให้ Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) กำจัดเซลล์มะเร็ง แต่เซลล์มะเร็งอาจมีกลไกหลบหลีกการทำลายของ CTLs ด้วยการลดการแสดงออกของ MHC class I การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในการที่จะหลบรอดจากการทำงานของภูมิคุ้มกัน โดยดูการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MHC class I ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกผู้ป่วยมะเร็ง 182 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่มีการดำเนินโรคระยะก่อนเป็นมะเร็ง จำนวน 50 ราย และมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม จำนวน 132 ราย เทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีปากมดลูกปกติ จำนวน 57 ราย ศึกษาด้วยเทคนิค Immunoperoxidase staining ผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ MHC class I ในมะเร็งปากมดลูกไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออก MHC class I กับความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อจำแนกลักษณะการกระจายของ MHC class I molecule บนผิวเซลล์และในไซโตพลาสมของเซลล์ พบว่าลักษณะของ MHC class I ในเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่จะพบการกระจายในไซโตพลาสม ขณะที่ในเซลล์ปากมดลูกปกติจะพบที่ผิวเซลล์ โดยมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.001$, χ^2 test) และความผิดปกตินี้จะเริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะท้ายของกลุ่มก่อนเป็นมะเร็ง แสดงให้เห็นว่าในเซลล์เนื้อเยื่อปากมดลูกก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งนั้น MHC class I จะไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์ได้ ทำให้เซลล์มะเร็งไม่ถูกกำจัดด้วยกลไกของ CTL activity การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่พบว่า ความผิดปกติในการนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์สามารถใช้ช่วยบ่งชี้ระยะการดำเนินโรคในระยะเริ่มต้นของการเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ดีกว่าการตรวจระดับการแสดงออก การศึกษาต่อไปถึงกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวไม่สามารถนำเสนอ MHC class I บนผิวเซลล์ อาจนำไปสู่การหาแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกต่อไป

คำสำคัญ : การแสดงออกของ MHC class I, ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก
Non-surface presenting MHC class I

บทนำ

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นมะเร็งอวัยวะสืบพันธ์ที่พบได้บ่อยที่สุด ในสตรีทั่วโลก[(1)] สถิติจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติพบว่า ประชากรหญิงไทยพบอุบัติการณ์ของการเป็นมะเร็งปากมดลูกอันดับหนึ่งและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญ เป็นที่ทราบว่าการติดเชื้อ human papillomas virus (HPV) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะ cervical neoplasia โดยพบจีโนมของ

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
* ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

The alteration of MHC class I expression in cervical cancer

Patcharee Jearanaikoon[1]*, Nilna Kongmuangpuk[1], Umaporn Yodpratoom[1], Surasak Wanram[1,3], Chanvit Leelayuwat[1,3], Anucha Paupairoj[2], Temduang Limpaiboon[1,3]

Abstract

It was well established that HPV infection, especially type 16 and 18 is the major cause of cervical cancer. Immune evasion of infected cells or tumor cells is also known as one of contributing factors of tumor development caused by down-regulation of MHC class I expression. The aim of this study is to investigate the level and pattern of MHC class I expression in 182 cervical cancerous tissues and 57 normal cervix using immunoperoxidase staining technique. Of 182 cervical cancerous tissues, 50 cases were classified as pre-cancerous lesions whereas, 132 cases were invasive cervical carcinoma. No significant association in grading or intensity of MHC class I was shown between patient and control group. Interestingly, the distribution pattern of MHC class I was significantly shown as non-surface presenting molecules accumulating in cytoplasm of cancerous tissues compared to normal cervix tissues with p-value <0.001 χ^2 test .This result indicates that tumor cells have lost their immune surveillance by reducing their antigen presenting MHC class I molecules at cell surface. Moreover, this alteration can be used as an early marker for cancer prognosis in pre-cancerous group. Therefore, the mechanism of the impairment in antigen presenting of MHC class I molecules should be investigated in further study.

Key words : MHC class I expression, cervical carcinoma, Non-surface presenting MHC class I

HPV ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม ผู้ติดเชื้อบางรายสามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้เอง โดยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย เฉพาะผู้ที่เกิดการติดเชื้อแบบถาวร (persistent infection) ซึ่งไวรัสสามารถหลบรอดจากการรับรู้ และทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเท่านั้นที่มีการดำเนินของโรคต่อจนกลายเป็นมะเร็งปากมดลูก กลไกการหลบหลีกจากการรับรู้การติดเชื้อไวรัส และทำลายไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง โดยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการก่อมะเร็งเนื่องจากไวรัสที่อยู่รอดจะสามารถเพิ่มจำนวนหรือแทรกตัวเข้าไปใน host genome เพื่อผลิต viral protein E6 และ E7 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ก่อมะเร็ง โดยทำลายการทำงานของจีนต้านมะเร็ง p53 และ Rb ทำให้สูญเสียกลไกควบคุม cell cycle และ apoptosis [2-5]

กลไกการรับรู้และทำลายเซลล์มะเร็ง (Immune surveillance) โดย $CD8^+$ T cell (Cytotoxic T Lymphocyte; CTL) และ natural killer cell (NK cell) ซึ่งทำหน้าที่เป็น effector lymphocytes โดยอาศัย

[1] Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences,
[2] Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
* Corresponding author

1) T-cell receptor (TCR) จับกับ tumor antigen ที่ถูกแสดงบนผิวเซลล์มะเร็งด้วย MHC class I molecule[6] และ 2) NKG2D receptor จับกับ NKG2D ligands ที่ถูกแสดงบนผิวเซลล์มะเร็ง และชักนำให้เกิด NKG2D signal โดยยีน Human MHC หรือ Human Leukocyte Antigen (HLA) ตั้งอยู่บนโครโมโซม 6p21.3 ซึ่งแบ่งออกเป็น class I, II และ III สำหรับ MHC class I molecule มีหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์ [7] ผ่านกระบวนการ antigen processing[8] โดยอาศัย TAP (transporter associated with antigen processing) molecules ในภาวะปกติ MHC class I molecules นำเสนอไวรัสแอนติเจน หรือ Tumor antigen เพื่อเหนี่ยวนำ effector lymphocytes ให้กำจัดเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อไวรัส หรือเซลล์มะเร็ง ในทางกลับกันเซลล์มะเร็งอาจมีกลไกที่จะหลบหลีกการทำลายของ effector lymphocytes ด้วยการลดการแสดงออกของ MHC class I ทำให้ปริมาณของ tumor rejection antigen ที่แสดงบนผิวเซลล์น้อยจนกระทั่ง TCR ของ CTL ตรวจไม่พบ และ/หรือ เซลล์มะเร็งลดการแสดงออกของ NKG2D ligands บนผิวเซลล์ให้มีน้อยลงจนไม่สามารถจับกับ NKG2D receptor ได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ในการที่จะหลบรอดจากการทำงานของภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยดูการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ MHC class I ในเซลล์ปากมดลูกผู้ป่วย ทั้งระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก และมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม ที่มีการดำเนินโรคในระยะต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็น normal cervix การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ MHC class I บนผิวเซลล์มะเร็งน่าจะใช้บ่งบอกความรุนแรงของโรค โดยเซลล์มะเร็งที่มีระยะความรุนแรงของโรคมาก น่าจะมีระดับการแสดงออกของ MHC class I ลดลง ข้อมูลที่ได้จะมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง สามารถใช้พยากรณ์ความรุนแรงของโรค และสามารถพัฒนาสู่การวางแผนการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อ paraffin-embedded จากผู้ที่มารับการตรวจรักษา และวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปากมดลูก จำนวน 182 ราย แบ่งเป็นกลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (pre -cancerous lesions) จำนวน 50 ราย และกลุ่มที่เป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (invasive cervical carcinoma) จำนวน 132 ราย อายุเฉลี่ยของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 42 ± 9.9 ปีและ 50 ± 12.1 ปี โดยมีเนื้อเยื่อปากมดลูกปกติที่ได้จากผู้ป่วยเนื้องอกในมดลูก (myoma) ซึ่งเป็นการตัดชิ้นเนื้อแบบ hysterectomy จำนวน 57 รายอายุเฉลี่ยเท่ากับ 47 ± 4.4 ปีเป็นกลุ่มควบคุม ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการตรวจคัดกรองที่คลินิกสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้รับการรับรองทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE480227 โดยชิ้นเนื้อที่จะนำมาศึกษาจะถูกเก็บรักษาอยู่ในรูปของ paraffin-embedded tissue อยู่ใน block พลาสติก และนำ paraffin block ของชิ้นเนื้อ แต่ละรายมาตัด section เป็น ribbons หนา 4 μm และมีผลการตรวจวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยาก่อนทำการศึกษา

วิธีการศึกษา

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาการแสดงออกของ MHC class I โดยเทคนิค Immunoperoxidase staining [9]

การย้อมโปรตีน MHC class I ใช้เทคนิค Immunoperoxidase staining ด้วย anti-HC antibody (a mouse monoclonal antibody) และ anti-β_2M antibody (a mouse monoclonal antibody; L368) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Soldano Ferrone, Roswell Park Center Institute, Buffalo สหรัฐอเมริกา ทำการเจือจาง antibody ที่ dilution ต่างๆ ดังนี้ 1:300, 1:500 และ 1:1000 เพื่อกำหนดหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ตัวอย่างสไลด์จาก normal

cervix จากกลุ่มผู้ป่วย myoma เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม โดยการเจือจาง primary antibody ที่ใช้ในการตรวจหาการแสดงออก โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Deparafinization โดยจุ่มลงใน xylene 3 chamber, 3 นาที

2. Rehydration จุ่มลงใน

Absolute ethanol 3 chamber, chamber ละ 3 นาที

95 % alcohol 3 chamber, chamber ละ 3 นาที

70 % alcohol 1 chamber, chamber ละ 3 นาที

จุ่มในน้ำกลั่น (distilled water) 3 นาที

3. Retrive Ag โดยเครื่อง microwave oven ใน1X citrate buffer pH 6.0 100 power นาน 3 นาที และ 50 power นาน 7 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

4. ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 2 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

5. block endogeneous peroxidase activity : นำ slide ใส่ใน chamber ที่บรรจุ 3% H_2O_2 จนท่วม slide พอดี วางบนเครื่องเขย่า (Shaker) นาน 35 นาที

6. ล้างในน้ำประปานาน 2-5 นาที

7. ล้าง1X PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที บนเครื่องเขย่า ซับ PBS ส่วนเกินออก

8. block non- specific binding โดยเติม 5 % normal horse serum ลงบนชิ้นเนื้อ จำนวน 100 μL นาน30 นาทีใน moist chamber

9. สลัดซีรัมออก เติม Primary antibody (เตรียม Primary antibody เป็นความเข้มข้นต่างๆโดยใช้ 1X PBS with sodium azide ในการเจือจาง) 100 μL ลงบนชิ้นเนื้อ ทำใน moist chamber incubate ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 °C (ห้องเย็น)

10. จากนั้นล้างด้วย 1X PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 7-10 นาที

11. เติมBiotin Goat Anti-mouse IgG 1:300 (dilute in 1X PBS with sodium azide) ลงบนชิ้นเนื้อปริมาตร 100 μL นาน 30 นาที ใน moist chamber

12. จากนั้นล้างด้วย 1X PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. เติม streptavidin-HRP 1:300 (dilute in 1X PBS without sodium azide) ปริมาตร 100 μL ลงบนชิ้นเนื้อนาน 30 นาที ใน moist chamber

14. ล้างด้วย 1XPBS 2 ครั้ง ครั้งละ 7-10 นาที

15 ทำให้เกิดสีโดยการย้อมสไลด์ใน working DAB 0.5mg/ml นาน 5 นาที เขย่า chamber ตลอดเวลา (ทำใน hood และปิดไฟ) เมื่อใช้เสร็จแล้วต้องทำลายฤทธิ์ของ DAB ด้วยน้ำยาซักผ้าขาว (ไฮเตอร์)

16. หยุดปฏิกิริยาใน chamber ที่บรรจุน้ำกลั่น 2-3 นาที

17. Counterstain โดยจุ่มสไลด์ในใน Mayer's Hematoxylene 5-6 ครั้ง (ครั้งละ 2 - 3 วินาที)

18. ล้างสีใน chamber ที่มีน้ำประปาไหลผ่านจนน้ำล้างใน chamber ใส

19. Dehydration ด้วย 70% alcohol 1 chamber, chamber ละ 3 นาที

95% alcohol 3 chamber, chamber ละ 3 นาที

Absolute Ethanol 3 chamber, chamber ละ 3 นาที

Xylene 3 chamber, chamber ละ 3 นาที

20. Mounting โดย permount

****หมายเหตุ**: ทุกขั้นตอนระวังอย่าให้ชิ้นเนื้อบนสไลด์แห้ง

2. การตรวจหาการแสดงออกของ MHC class I ในกลุ่มตัวอย่าง

นำสภาวะเหมาะสมที่ศึกษาได้ดังกล่าวมาตรวจหาการแสดงออกของ MHC class I antigen ในตัวอย่างสไลด์จากกลุ่มผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม เปรียบเทียบกับกลุ่ม normal cervix อัตราการย้อมติดสีของเซลล์

(Percentage of positive cell) โดยเปอร์เซ็นต์การติดสีแบ่งเป็นระดับ (Grading) ตามจำนวนเซลล์ที่ให้ผลการติดสีเป็นบวก ซึ่งประยุกต์ตามวิธีของ Weinman และคณะ [10]

เกรด 0 เท่ากับ ไม่มีการติดสีในเซลล์

เกรด 1^+ เท่ากับ จำนวนเซลล์ที่มีการติดสี 1- 25 %

เกรด 2^+ เท่ากับ จำนวนเซลล์ที่มีการติดสี 26 - 50 %

เกรด 3^+ เท่ากับ จำนวนเซลล์ที่มีการติดสี 50 % ขึ้นไป

หมายเหตุ: ในการเกรดเทียบการติดสีกับ internal positive control คือ กลุ่มของ lymphocytes

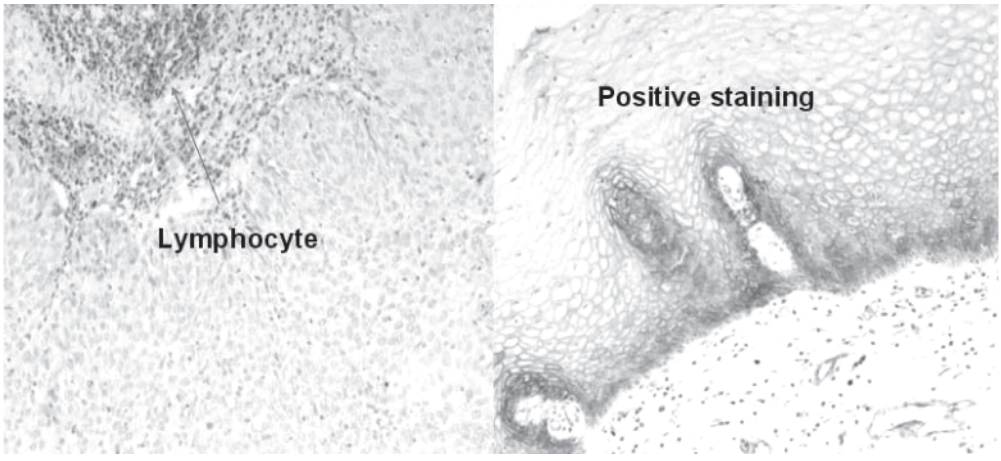
3. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของ MHC class I antigen ที่แสดงออกกับความรุนแรงของเซลล์ที่ผิดปกติ และเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ผลการตรวจหา และเปรียบเทียบการแสดงออกของ MHC class I antigen ชนิดต่างๆ ในตัวอย่างตรวจ โดยใช้สไลด์ชิ้นเนื้อ จากกลุ่มที่มีปากมดลูกปกติ กลุ่มผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็งปากมดลูก และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกกับระยะความรุนแรงของโรคมะเร็งปากมดลูกโดยใช้สถิติ χ^2 for trend และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการติดสีกับระยะความรุนแรงของโรคมะเร็งปากมดลูก ด้วย สถิติ χ^2 test โดยโปรแกรม SPSS version 12.0 กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p-value < 0.05

ผลการศึกษา

1. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primary antibody ที่ใช้ในการตรวจหาการแสดงออกของ MHC class I ด้วยเทคนิค immunoperoxidase staining

ผลการศึกษาได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-HC และ anti B2M เท่ากับ 1:500 โดยสภาวะที่เหมาะสมของการย้อมจะเห็น background ติดสีไม่เข้มหรือไม่จางเกินไป เซลล์ที่ไม่ควรจะติดก็ไม่ติด เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนเซลล์ที่ควรจะติดสีคือ lymphocyte ก็ติดสีน้ำตาล และใช้เป็น internal control **(รูปที่ 1)**

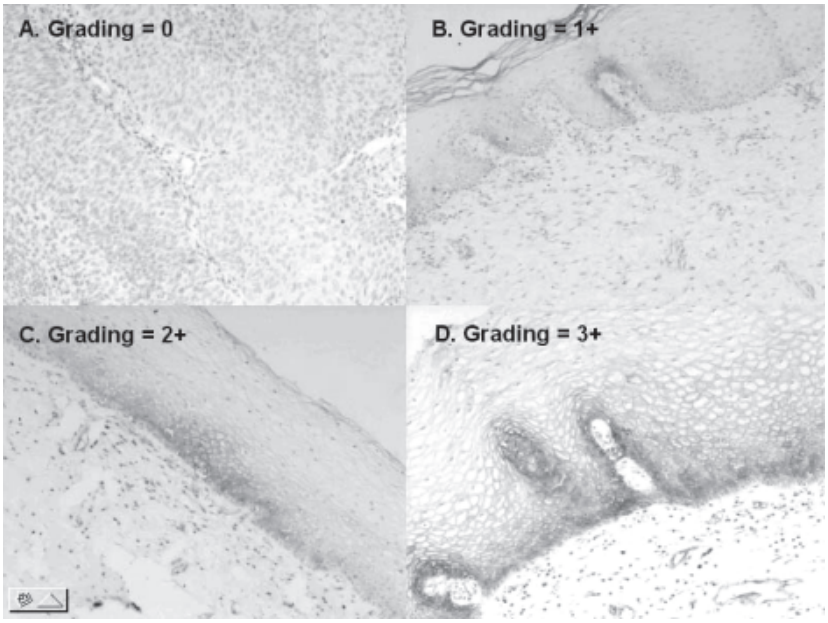


รูปที่ 1 ผลการศึกษาได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti- HC anti B2M เท่ากับ 1:500

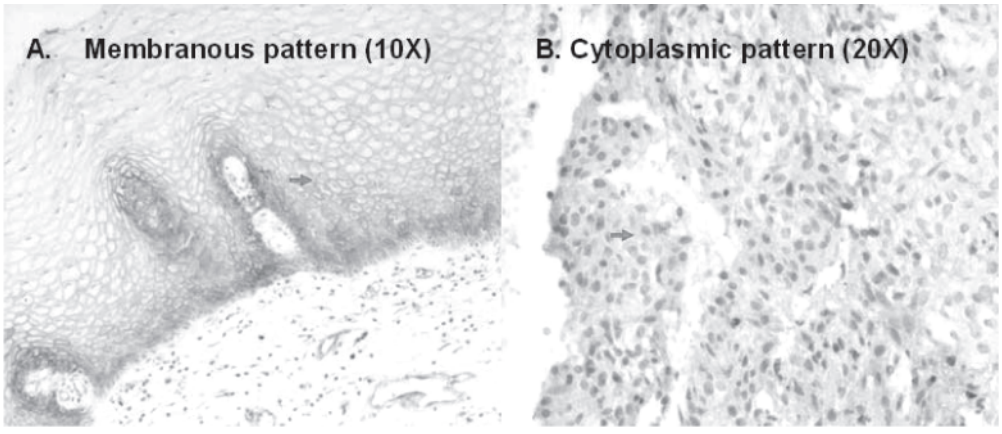
2. ระดับการแสดงออก และรูปแบบการติดสีในกลุ่มตัวอย่าง

อัตราการย้อมติดสีของเซลล์ (percentage of positive cell) โดยให้เปอร์เซ็นต์การติดสีแบ่งเป็นระดับต่างๆ (grading) ตามจำนวนเซลล์ที่ให้ผลการติดสีเป็นบวก และรูปแบบของการติดสี (distribution pattern of expression) จะใช้เป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงปริมาณ และการแสดงออกของ MHC class I บนผิวเซลล์ปาก

มดลูกปกติ เซลล์ผิดปกติในระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก และเซลล์มะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม ตามลำดับ โดยการศึกษาดังกล่าวเป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วย pre-cancerous lesions, invasive cervical carcinoma และกลุ่ม myoma ตัวอย่างระดับการแสดงออกของ MHC class I แบ่งเป็น เกรด 1^+ ถึง 3^+ ดังแสดงใน **รูปที่ 2** นอกจากนี้ยังพบว่ามีรูปแบบการติดสีในตัวอย่างแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ การติดสีกระจายอยู่บนผิวเซลล์ เรียก Membranous staining และแบบที่ติดสีเฉพาะในไซโตพลาสมของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเรียก cytoplasmic staining ดังแสดงใน **รูปที่ 3** ตามลำดับ



รูปที่ 2 ตัวอย่างระดับการแสดงออกของ MHC class I เกรด 1^+ ถึง 3^+



รูปที่ 3 รูปแบบการติดสีกระจายอยู่บนผิวเซลล์แบบ membranous staining (A) และการติดสีเฉพาะในไซโตพลาสมของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ cytoplasmic staining (B)

3. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MHC class I กับความรุนแรงในแต่ละระยะการดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูก

ผลการตรวจหาและเปรียบเทียบการแสดงออกของ MHC class I ในตัวอย่างตรวจจากกลุ่มผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก กลุ่มมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม และกลุ่มปากมดลูกปกติ นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MHC class I กับความรุนแรงในแต่ละระยะการดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูก ผลการวิเคราะห์ใน **ตารางที่ 1** ไม่พบความสัมพันธ์ในระดับการแสดงออก หรือระดับการติดสีในทุกกลุ่มตัวอย่าง ทั้งการย้อมด้วย anti-HC และ anti-β_2M ($p = 0.271$ และ 0.672 ตามลำดับ, χ^2 for trend)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ MHC class I ซึ่งย้อมด้วย anti-HC (1A) และ anti-β_2M (1B) ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกและกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม เปรียบเทียบกับกลุ่มปากมดลูกปกติ (normal cervix)

(A) ย้อมด้วย anti-HC

Group (total N)	ร้อยละของระดับการแสดงออกของ MHC class I (n)				*p*-value*
	0	1	2	3	
ผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (50)	12 (6/50)	76 (38/50)	6 (3/50)	6 (3/50)	0.271
ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (132)	21.2 (28/132)	59.8 (79/132)	12.2 (16/132)	6.8 (9/132)	
Normal cervix (57)	10.5 (6/57)	63.2 (36/57)	21 (12/57)	5.3 (3/57)	

(B) ย้อมด้วย anti-β_2M

Group (total N)	ร้อยละของระดับการแสดงออกของ MHC class I (n)				*p*-value*
	0	1	2	3	
ผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (50)	14 (7/50)	44 (22/50)	36 (18/50)	6 (3/50)	0.672
ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม(132)	0 (0/132)	66.7 (88/132)	33.3 (44/132)	0 (0/132)	
Normal cervix (57)	3.5 (2/57)	57.9 33/57	35.1 (20/57)	3.5 (2/57)	

* สถิติ Chi-square for trend.

ในขณะที่เมื่อจำแนกตามรูปแบบการติดสีพบว่ามีความความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกและเซลล์มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งกับกลุ่มที่มีปากมดลูกปกติ ($p < 0.001$, สถิติ χ^2) ไม่ว่าย้อมด้วย anti-HC และ anti-β_2M **(ตารางที่ 2)** กล่าวคือ ประมาณ 93 % ของชิ้นเนื้อ normal cervix จะพบ membranous pattern แต่พบแนวโน้มการแสดงออกแบบ cytoplasmic pattern ในเซลล์ปากมดลูกผิดปกติระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกสูงขึ้นตามระยะ ของโรคจาก CIN I และ CIN II โดยสูงถึง 45 % โดยเฉพาะกลุ่ม CIN III และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็น 90% ($p<0.001$, สถิติ χ^2) ในกลุ่มที่พัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของรูปแบบการแสดงออกของ MHC class I แบบ membranous pattern และ cytoplasmic pattern ซึ่งย้อมด้วย anti-HC และ anti-β_2M ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (cervical intraepithelial neoplasia) แบ่งเป็น CIN I, CIN II, CIN III และ CIS (carcinoma in situ) กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (CXCA) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มะเร็งลุกลามระยะเริ่มต้น ได้แก่ มะเร็งระยะที่ 1-2; กลุ่มที่ 2 มะเร็งลุกลามระยะสุดท้าย ได้แก่ มะเร็งระยะที่ 3-4 เปรียบเทียบกับกลุ่มปากมดลูกปกติ (normal cervix)

(A) ย้อมด้วย anti-HC

Group (total N)	ร้อยละที่พบรูปแบบการแสดงออกของ MHC class I (n)			*p*-value*
	Membranous staining	Cytoplasmic staining	No expression	
CIN I (21)	100 (21/21)	0 (0/21)	0 (0/21)	<0. 001
CIN II (5)	100 (5/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	
CIN III / CIS (24)	55 (13/24)	45 (11/24)	0 (0/24)	
CXCA stage I and II (72)	7 (5/72)	86 (62/72)	7 (5/72)	
CXCA stage III and IV (60)	5 (3/64)	67 (43/64)	28 (18/64)	
Normal cervix (57)	93 (53/57)	0 (0/57)	7 (4/57)	

(B) ย้อมด้วย anti-β_2M

Group (total N)	ร้อยละที่พบรูปแบบการแสดงออกของ MHC class I (n)			*p*-value*
	Membranous staining	Cytoplasmic staining	No expression	
CIN I (21)	100 (21/21)	0 (0/21)	0 (0/21)	<0. 001
CIN II (5)	100 (5/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	
CIN III/ CIS (24)	38 (9/24)	62 (15/24)	0 (0/24)	
CXCA stage I and II (72)	3 (2/72)	90 (65/72)	7 (5/72)	
CXCA stage III and IV (60)	3 (2/64)	69 (44/64)	28 (18/64)	
Normal cervix (57)	93 (53/57)	0 (0/57)	7 (4/57)	

* สถิติที่ทดสอบใช้ Chi square Test

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ MHC class I หรือ HLA class I พบได้ในมะเร็งหลายชนิด[11] ในมะเร็งปากมดลูกเคยมีรายงานพบการแสดงออกของ HLA class I ลดลง โดยระดับการแสดงออกที่ลดลงนั้นสัมพันธ์กับระยะและความรุนแรงของโรค[12] แต่ไม่สัมพันธ์กับการพบ HPV type 16/18[13] ในขณะที่ Torres และคณะ[14] รายงานว่าการพบ HPV 16 สัมพันธ์กับการแสดงออกของ HLA class I อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้กลับไม่พบความสัมพันธ์ระดับการแสดงออก MHC class I ทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเนื่องจากในภาพรวมการติดสีชิ้นเนื้อมะเร็งระยะลุกลามและระยะก่อนเป็นมะเร็ง มีการแสดงออกค่อนข้างต่ำคืออยู่ระหว่าง 1^+ ถึง 2^+ ตามเกณฑ์การเกรดหมายถึงประมาณ 50% ของเซลล์ที่ย้อมบนสไลด์ หรือต่ำกว่าเท่านั้นที่มีการแสดงออกของ MHC class I สอดคล้องกับ Keating และคณะ[12] ทำให้การตรวจหาระดับการแสดงออกที่ลดลงอาจมีความสามารถในการจำแนกต่ำลง โดยเฉพาะเมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ MHC class I ในกลุ่ม normal cervix พบการติดสีอยู่ระหว่าง 1^+ ถึง 2^+ เช่นกัน จากผลข้างต้นนี้ น่าจะทำให้สรุปว่า การใช้ระดับการติดสี เพื่อบอกระดับ การแสดงออกในมะเร็งระยะต่างๆ อาจไม่เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน นอกจากนั้น การอ่านระดับการติดสี เพื่อสะท้อนถึงระดับการแสดงออกของ MHC class I มีความแปรปรวนตามผู้อ่านและชุดการย้อมแต่ละชุดซึ่งควบคุมได้ยาก

ถึงแม้ว่าการเกรดระดับการแสดงออกไม่เห็นความสัมพันธ์ทางสถิติ แต่ผลที่น่าสนใจคือการพบความสัมพันธ์ของรูปแบบการแสดงออกแบบ non-surface staining หรือ cytoplasmic staining ในชิ้นเนื้อกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง ในขณะที่ normal cervix พบแบบ surface staining แสดงให้เห็นว่า MHC class I ในผู้ป่วยมะเร็งไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์ได้ตามปกติ Cromme และคณะ[13] รายงานพบการลดลงของ TAP-1 ร่วมกับการแสดงออกของ HLA class I ที่ลดลง อย่างไรก็ตามการลดลงของ TAP-1 นั้น พบเฉพาะคนไข้บางรายในกลุ่มที่มี HLA class I down-regulation เท่านั้น ดังนั้นกลไกที่ทำให้ การแสดงออกของ MHC Class I หรือ HLA class I ลดลง (HLA dysregulation) ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ Ryu และคณะ[15] พบว่า HLA class I down-regulation มีความเกี่ยวข้องกับ Tumor progression และการแพร่กระจาย (metastasis) ของมะเร็งปากมดลูก ข้อมูลของการพบ non-surface MHC class I ในการศึกษานี้ น่าจะใช้บ่งชี้ความผิดปกติของ MHC class I ในการนำเสนอแอนติเจนทำให้พบ MHC class I สะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังเห็นได้จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติใน ตารางที่ 1 ที่พบ cytoplasmic staining pattern สูง ทั้งในผู้ป่วย pre-invasive ระยะท้าย (CIN III and CIS) และ invasive cervical carcinoma อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถพบได้ตั้งแต่ระยะ CIN III เป็นต้นไป ทำให้สนับสนุนสมมติฐานว่ากลไกความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เป็นปัจจัยส่งเสริมการก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง และสามารถใช้เป็นตัวช่วยการพยากรณ์โรค โดยเฉพาะในการดำเนินโรคจากระยะก่อนเป็นมะเร็งไปสู่มะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม การตรวจหาความผิดปกติของการนำเสนอแอนติเจนในการศึกษานี้ นับเป็นการนำเสนอ early marker ตัวที่สำคัญและยังอาจใช้ในช่วยการทำนายการตอบสนองต่อการรักษาหากมีการติดตามผลการรักษาในกลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้ต่อไป

นอกจากนี้การวิเคราะห์หาสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติของ MHC class I ในการนำเสนอแอนติเจนอาจนำไปสู่การพบตัวบ่งชี้ที่สำคัญ ในการพัฒนาไปสู่การเป็นมะเร็ง โดยกลไกที่น่าสนใจคือกลไกที่เกี่ยวกับความผิดปกติของการนำเสนอแอติเจนบนผิวเซลล์ (processing antigen) ผ่านโมเลกุลต่าง ๆ ได้แก่ TAP-1, TAP-2 และ Tapasin เป็นต้น ซึ่งการตรวจด้วยการย้อมโปรตีน immunoperoxidase staining สามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไป

เอกสารอ้างอิง

1. Vatanasapt V, Sriamporn S, Vatanasapt P. Cancer control in Thailand. Jpn J Clin Oncol 2002; 32 (Suppl): 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. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. Mol Cell Biol 1993; 13: 4918-27.
4. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. Oncogene 1999; 18: 7690-700.
5. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989; 243: 934-7.
6. Townsen A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren HG, et al. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. Nature 1989; 340: 443-8.
7. Howard MC, Spack EG, Choudhury K, Greten TF, et al. MHC-based diagnosis and therapeutics. Immunol Today 1999; 20: 161-5.
8. Garrido F, Cabrera T Lopez-Nevot MA, Ruiz-Cabello F. HLA class I antigens in human tumors. Adv Cancer Res 1995; 67: 155-95.
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. Schrier PI, Benards R, Vaessen RT, Houwelling A, et al. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. Nature 1983; 305: 771-75.
12. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, et al. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and B allelles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. Br J Cancer 1995; 72: 405-11.
13. Cromme FV, Meijer CJ, Snijders PJ, Uyterlinde A, et al. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. Br J Cancer 1993; 67: 1372-80.
14. Torres LM, Cabera T, Concha A, Oliva MR, et al. HLA class I expression and HPV-16 sequences in premalignant and malignant lesions of the cervix. Tissue Antigens 1993; 41: 65-71.
15. Ryu KS, Lee YS, Kim BK, Park YG, et al. Alterations of HLA class I and II antigen expression in pre-invasive, invasive and metastasic cervical cancers. Exp Mol Med 2001; 33: 136-44.