

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของ p63 และ p73 ไอโซฟอร์มในมะเร็งปากมดลูก

อินทรา ทศกร¹ เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์¹ ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์¹ ชนิตรา ฐวจิตต์² อนุชา พัวไพโรจน์³
พัชรี เจริญนัยกุล^{1*}

บทคัดย่อ

ในมะเร็งปากมดลูกจีนต้านมะเร็งจะถูกรบกวนจากการจับของโปรตีนก่อมะเร็ง E6 จากเชื้อ humanpapilloma virus ส่งผลให้ p53 ถูกนำไปทำลายโดยกระบวนการสลายโปรตีนผ่าน ubiquitin pathway ถึงแม้ว่าจะมีสมาชิกที่มีโครงสร้างและหน้าที่ที่เหมือนกับ p53 คือจีน p63 และ p73 แต่กลับมีรายงานพบโปรตีนจากจีนทั้งสองว่าตรงปลายด้านอะมิโนมีการขาดหายไปจึงเรียกว่า delta-N ไอโซฟอร์ม (Δ Np63 และ Δ Np73) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของไอโซฟอร์มปกติ (TAp63 และ TAp73) ดังนั้นการแสดงออกที่มากเกินไปของ Δ N ไอโซฟอร์ม จึงเป็นอีกกลไกหนึ่งในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนปกติ แบบ epigenetic ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อตรวจหารูปแบบการแสดงออกของจีน p63 และ p73 ไอโซฟอร์ม เพื่อประเมินว่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำนายการดำเนินโรค จากระยะก่อนมะเร็งไปสู่มะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามโดยทำการวัดปริมาณการแสดงออกของไอโซฟอร์มด้วยเทคนิค real time reverse transcription-PCR ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด SCCA 66 ราย กลุ่มก่อนมะเร็ง 64 ราย โดยแบ่งเป็นระยะ LSIL 31 ราย HSIL 33 ราย และกลุ่มปากมดลูกปกติ 31 ราย ผลการศึกษาพบว่า TAp73 มีการแสดงออกมากขึ้นตามระยะการดำเนินโรคที่เพิ่มขึ้นจาก LSIL ไปถึง HSIL และ SCCA ขณะที่ Δ Np63 และ Δ Np73 มีการแสดงออกมากขึ้นเฉพาะในกลุ่ม SCCA เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ($P < 0.005$, Mann-Whitney test) นอกจากนั้น ระดับของ Δ Np63 ไอโซฟอร์ม ใน SCCA มีการแสดงออกมากกว่ากลุ่มปากมดลูกปกติ, LSIL, และ HSIL อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.003, < 0.001, = 0.002$ ตามลำดับ) ผลจากค่าทางสถิติบ่งชี้ว่า Δ Np63 สามารถใช้ทำนายการดำเนินโรคมะเร็งจากระยะก่อนเป็นมะเร็งถึงระยะรุนแรงของมะเร็งได้ดีกว่า Δ Np73 และเมื่อประเมินการใช้สัดส่วนระหว่าง Δ N และ TA ไอโซฟอร์ม ของ p63 และ p73 เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การดำเนินโรคของมะเร็ง จะพบว่าสัดส่วนของ TA กับ Δ N ไอโซฟอร์ม ของจีน p73 ให้ความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคตั้งแต่ระยะต้นๆคือจาก LSIL ไปสู่ HSIL และ SCCA ในขณะที่สัดส่วนของ p63 ไอโซฟอร์ม จะใช้ในการทำนายจากระยะ HSIL ไปสู่ SCCA ดังนั้นการหาอัตราส่วนรูปแบบการแสดงออกของ p73 ไอโซฟอร์ม จึงมีศักยภาพในการบ่งชี้การพัฒนาของมะเร็งในระยะเริ่มต้นดีกว่า p63 ไอโซฟอร์ม ในขณะที่การใช้รูปแบบ p63 ไอโซฟอร์มร่วมด้วยจะช่วยทำนายการลุกลามของโรคเข้าสู่ระยะ SCCA

คำสำคัญ: มะเร็งปากมดลูก p63 ไอโซฟอร์ม p73 ไอโซฟอร์ม

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Expression pattern of p63 and p73 isoforms in cervical carcinoma

Inthira Tussakhon¹, Temduang Limpai boon¹, Chanvit Leelayuwat¹, Chanitra Thuwajit²,
Anucha Puapairoj³, Patcharee Jearanaikoon^{1*}

Abstract

Tumor suppressor p53 function is downregulated in most cervical cancers because of its binding to humanpapilloma virus oncoprotein E6 targeting to degradation via ubiquitin proteolysis. Even though, both p63 and p73 share significant homology in structure and function to p53, p63 and p73 encode truncated N-terminal or delta-N isoforms (Δ Np63 and Δ Np73) which can inhibit trans-activation of full length isoforms (TAp63 and TAp73). Therefore, overexpression of Δ N isoforms can exert as epigenetic inhibitor of wild type proteins. The aim of this study was to determine whether expression profile of p63 and p73 isoforms are useful markers for predicting tumor progression in cervical cancer. All transcripts were measured using real-time RT-PCR in 66 squamous cell carcinoma (SCCA), 64 cervical dysplasia (31 low grade squamous intra-epithelial lesion; LSIL and 33 high grade squamous intra-epithelial lesion; HSIL) and 31 normal cervix. TAp73 but not TAp63 was significantly up-regulated with respect to the progression from LSIL to HSIL and SCCA whereas, both Δ Np73 and Δ Np63 were up-regulated in SCCA comparing to normal ($P < 0.05$, Mann-Whitney test). Moreover, Δ Np63 transcripts in SCCA show a significant up-regulation than normal, LSIL, and HSIL with P value = 0.003, < 0.001 , and = 0.002, respectively. This data indicated that Δ Np63 rather than Δ Np73 could predict cancer progression from dysplasia to more advance stage. The ratio of isoforms fraction was further evaluated as potential marker to predict cancer progression. Significant P value was earlier obtained at LSIL to HSIL when using the ratio between TAp73 and Δ Np73 isoforms. In conclusion, p73 isoforms ratio is considered as an early potential marker to predict cancer progression from LSIL to HSIL and SCCA.

Key words: Cervical cancer, p63 isoforms, p73 isoforms

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

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

³ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

* Corresponding author (patjea@kku.ac.th)

บทนำ

มะเร็งปากมดลูก (CXCA) เป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสองในผู้หญิงประเทศกำลังพัฒนา⁽¹⁾ และพบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้หญิงไทย มีอุบัติการณ์ 23.4/100,000 ประชากร⁽²⁾ การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า การติดเชื้ออหิวาต์ไวรัส human papilloma virus ชนิดเสี่ยงสูง (high risk HPV) เป็นเวลานานเป็นสาเหตุหลักของการพัฒนาไปเป็น CXCA ในเวลาต่อมา⁽³⁻⁵⁾ โดยโปรตีนที่ผลิตจากจีโนมของไวรัส E6 และ E7 ใน high risk HPV นั้นสามารถรบกวนการทำงานของโปรตีน p53 และ pRb ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ^(6,7)

p63 และ p73 เป็นยีนในตระกูลเดียวกับ p53⁽⁸⁾ ที่พบว่านอกจากมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันแล้วยังสามารถยับยั้ง cell cycle และกระตุ้นให้เซลล์ที่ผิดปกติเกิด apoptosis จึงเกิดสมมติฐานว่าโปรตีนทั้งสองน่าจะสามารถทดแทนการทำงานของ p53 ในกรณีของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อ high risk HPV และ p53 ถูกทำลายโดยโปรตีนของไวรัส ได้^(6,7) แต่ต่อมากลับมีรายงานพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ p63 และ p73 ในมะเร็งหลายชนิด นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองยังสัมพันธ์กับการมีชีวิตรอดที่น้อยลงของผู้ป่วย^(9,10) หลักฐานเหล่านี้เป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้ค้นพบต่อมาว่า ในเซลล์มะเร็งมีการสร้างโปรตีน p63 และ p73 ที่ผิดปกติ คือมีการขาดหายไปของโปรตีนด้านปลายอะมิโนเรียกว่า ΔN ไอโซฟอร์ม ในขณะที่ไอโซฟอร์มที่ปกติเรียก TA ไอโซฟอร์ม ปลายอะมิโนที่ขาดหายไปเกิดจากการใช้ alternative splicing และ alternative promoter ระหว่างการถอดรหัสเพื่อสร้าง mRNA⁽¹¹⁾ ΔN ไอโซฟอร์ม นี้มีคุณสมบัติตรงข้ามกับ TA

ไอโซฟอร์ม เนื่องจากปลายด้านอะมิโนที่ขาดหายนี้มีหน้าที่กระตุ้น (transactivate) การแสดงออกของยีนเป้าหมายใน cell cycle และ apoptosis ของ p53 นอกจากจะทำให้โปรตีนสูญเสียคุณสมบัติดังกล่าวแล้วยังพบว่า ΔN ไอโซฟอร์มนี้สามารถรบกวนการทำงานของ TA ไอโซฟอร์ม โดยการแย่งจับกับยีนเป้าหมาย^(12,13) หลักฐานอื่นๆ ที่สนับสนุนบทบาทของ ΔN ไอโซฟอร์ม ที่กล่าวมานี้ได้แก่ การพบ over-expression ของ $\Delta Np63$ ในมะเร็งรังไข่⁽¹³⁾ และมะเร็ง head neck squamous cell carcinoma⁽¹⁴⁾ พบ $\Delta Np73$ ในมะเร็ง neuroblastoma⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงาน รูปแบบการแสดงออกของ ΔN ไอโซฟอร์มของทั้ง p63 และ p73 พร้อมกันในมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของ ΔN และ TA ไอโซฟอร์มของทั้ง p63 และ p73 ในมะเร็งปากมดลูก ตั้งแต่ในระยะก่อนเป็นมะเร็ง (pre-cancerous) และมะเร็งระยะลุกลาม และทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแต่ละไอโซฟอร์มกับระยะการดำเนินโรคเพื่อดูความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ เริ่มต้นในมะเร็งระยะแรกหรือใช้เพื่อทำนายการดำเนินโรค เป็นต้น

วัสดุและตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

1. ไพรมเมอร์ (primers) ที่ใช้ตรวจหาระดับการแสดงออกของ ΔN และ TA ไอโซฟอร์ม ของยีน p63 และ p73

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ TAp63, $\Delta Np63$ ไอโซฟอร์ม ใช้ไพรมเมอร์จากการศึกษาของ Lin และคณะ⁽¹⁶⁾ สำหรับ TAp73, $\Delta Np73$ ไอโซฟอร์ม และ GAPDH ซึ่งเป็นยีนควบคุมใช้ไพรมเมอร์จากการศึกษาของ Stiewe และคณะ⁽¹⁷⁾ (ไพรมเมอร์ทุกตัวสังเคราะห์จากบริษัทแปซิฟิกไบโอแอนซ์ ประเทศไทย) รายละเอียดของลำดับเบสแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ real time RT-PCR

primers	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Products size (bp)
TAp63	GTC CCA GAG CAC ACA GAC AA	GAG GAG CCG TTC TGA ATC TG	266
Δ Np63	CTG GAA AAC AAT GCC CAG AC	GGG TGA TGG AGA GAG AGC AT	197
TAp73	GGC TGC GAC GGC TGC AGA GC	GCT CAG CAG ATT GAA CTG GGC CAT G	257
Δ Np73	CAA ACG GCC CGC ATG TTC CC	TGG TCC ATG GTG CTG CTC AGC	256
GAPDH	TCA TCA GCA ATG CCT CCT GCA	TGG GTG GCA GTG ATG GCA	118

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการทำ real time RT-PCR ของจีน p63 และ p73 โดยเครื่อง Rotor Gene 3000

Reagent and condition	TAp63*	Δ Np63	TAp73	Δ Np73	GAPDH
Total volume (μ L)	20	25	25	25	25
PCR buffer (X)		1	1	1	1
DNTPs (μ M)		100	100	100	100
MgCl ₂ (mM)		4	2	4	4
Primer (Pmole)	10	5	10	5	5
SYBR Green I (X)		0.6	0.6	0.6	0.6
Taq polymerase (unit)		3	3	3	3
DMSO (%)	-	-	-	6	-
10ng/ μ L cDNA (μ L)	5	5	5	5	5
PCR cycle	1 cycle at 95°C 300 s				
	40 cycle at 95°C 30 s				
	Annealing temperature (°C) 30 s				
	63	64	68	68	54
	Extension at 72°C 30 s				
	Detection (°C) 15 s				
	85	89	90	88	86
	1 cycle at 72°C 300 s				

2. พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ TAp63, Δ Np63, TAp73, Δ Np73 ไอโซฟอร์มและ GAPDH

ทำการ clone ชิ้นส่วนของ TAp63 และ Δ Np63 ในพลาสมิด Topo-4 PCR vector (ผลิตภัณฑ์ของ Invitrogen) และชิ้นส่วนของ TAp73, Δ Np73 และ GAPDH ในพลาสมิด pGEM-T[®] vector (ผลิตภัณฑ์ของ Promega) ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อยืนยันความถูกต้อง(ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ใช้พลาสมิดเหล่านี้เป็นแหล่ง DNA ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อตรวจหาระดับการแสดงออกด้วยเทคนิค real time reverse transcription-PCR (real time RT-PCR)

3. ชิ้นเนื้อตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้เป็นชิ้นเนื้อสด (fresh tissue biopsy) บริเวณที่เป็นรอยโรคและผ่านการแช่น้ำยา RNA later (ผลิตภัณฑ์ของ Ambion) เพื่อรักษาสภาพ RNA ชิ้นเนื้อเก็บโดยสูตินรีแพทย์จากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและเข้ารับการตรวจรักษาที่คลินิกโรคมะเร็ง ภาควิชาสูติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE 480227 โดยผู้เข้าร่วมโครงการทุกรายได้รับการบอกสิทธิและลงนามยินยอม กลุ่มผู้ป่วยถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก (pre-invasive หรือ dysplasia) 64 ราย โดยแบ่งเป็นระยะ LSIL (low grade squamous intra-epithelial lesion) 31 ราย ระยะ HSIL (high grade squamous intra-epithelial lesion) 33 ราย และกลุ่มเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม (invasive carcinoma) ชนิด squamous cell carcinoma (SCCA) 67 ราย และกลุ่มควบคุมได้แก่ปากมดลูกปกติ (normal cervix) 31 ราย ผู้ป่วยทุกกลุ่มได้รับการยืนยันผลวินิจฉัยจากการตรวจการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกเก็บแช่

แข็งที่ -70 °C จนกว่าจะนำไปสกัด RNA

วิธีการศึกษา

1. การเตรียม RNA จากชิ้นเนื้อตัวอย่าง

บดชิ้นเนื้อขนาดไม่เกิน 30 มิลลิกรัมให้ละเอียดด้วย tissue homogenizer (ผลิตภัณฑ์ของ OMNI International ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำไปสกัด RNA และทำลาย genomic DNA ด้วย RNA easy kit และ RNase-free DNase Set (ผลิตภัณฑ์ของ QIAGEN ประเทศเยอรมัน) RNA ที่ได้เปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ยาสำเร็จรูป ImPromt-II kit (ผลิตภัณฑ์ของ Promega ประเทศ สหรัฐอเมริกา) เก็บ cDNA ไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะทำการตรวจด้วยเทคนิค real time RT-PCR

2. การตรวจหาปริมาณการแสดงออกของ Δ N และ TA ไอโซฟอร์มด้วยเทคนิค real time RT-PCR

2.1 เตรียมกราฟมาตรฐาน

เจือจาง DNA จากพลาสมิดของ TAp63, Δ Np63, TAp73, และ Δ Np73 ให้มีจำนวนตั้งแต่ 30-300,000 copies นำไปเพิ่มจำนวนในเครื่อง real-time PCR (CORBETT Research, ประเทศออสเตรเลีย) และติดตามปฏิกิริยาด้วย SYBR Green I dye

2.2 การวัดปริมาณของ p63 และ p73 ไอโซฟอร์มในตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่าง cDNA จำนวน 50 นาโนกรัม ทำการตรวจวัดปริมาณ copy number ของ TAp63, Δ Np63, TAp73 และ Δ Np73 ไอโซฟอร์มเปรียบเทียบกับปริมาณการแสดงของ GAPDH ในตัวอย่างเดียวกัน เพิ่มจำนวนในปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยรายละเอียดดังตารางที่ 2 ในเครื่อง Real time PCR จำนวน 40 รอบ

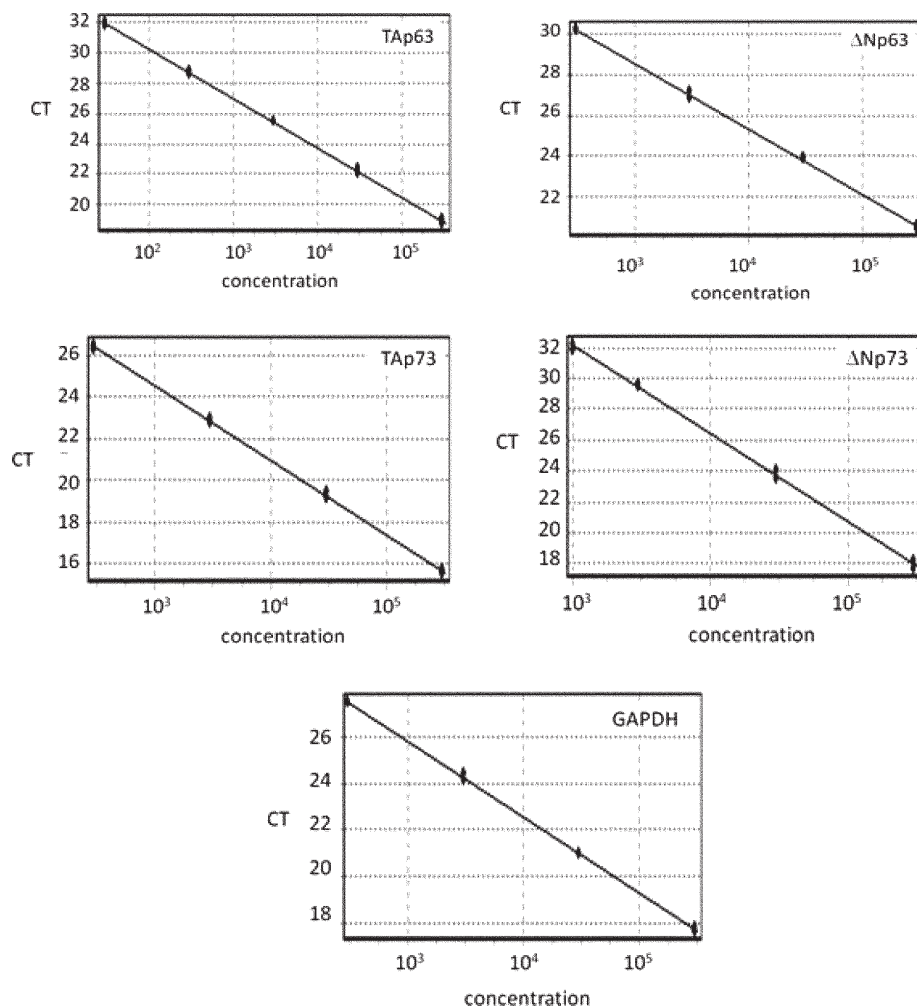
ทุกตัวอย่างตรวจซ้ำ 3 ครั้ง นอกจากนี้ในทุกรอบของการทำ qPCR มีการควบคุมคุณภาพโดยทำการตรวจวัดตัวอย่างควบคุมซึ่งเตรียมจากพลาสมิดของทุกไอโซฟอร์ม และนำมาหาค่าเฉลี่ยและ SD (จากการทำ

ซ้ำ 20 ครั้ง) ตรวจสอบคู่ไปกับตัวอย่างถูกรอบโดยต้องให้ค่าที่วัดได้ในตัวอย่างควบคุมอยู่ในช่วง $\text{mean} \pm 2\text{SD}$

ผลการศึกษา

1. การจัดตั้ง real time RT-PCR เพื่อวัดปริมาณ TAp63, ΔNp63 , TAp73, และ ΔNp73 ไอโซฟอร์ม คุณสมบัติในการตรวจวัดปริมาณของ TAp63, ΔNp63 , TAp73, ΔNp73 ไอโซฟอร์ม และ GAPDH

แสดงเป็นช่วงค่าของการตรวจวัดจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 1) พบว่าค่าต่ำสุดการตรวจวัดในการเพิ่มขึ้นส่วนของแต่ละไอโซฟอร์มเท่ากับ 30, 300, 300, 1000 และ 300 copies ตามลำดับ และสูงสุดที่ตรวจได้ (upper detection limit) คือ 300,000 copies ในทุกไอโซฟอร์ม และมีค่า %CV อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับ⁽¹⁸⁾ ในการทำ qPCR คือไม่เกิน 15% และ PCR efficiency ไม่ต่ำกว่า 0.85

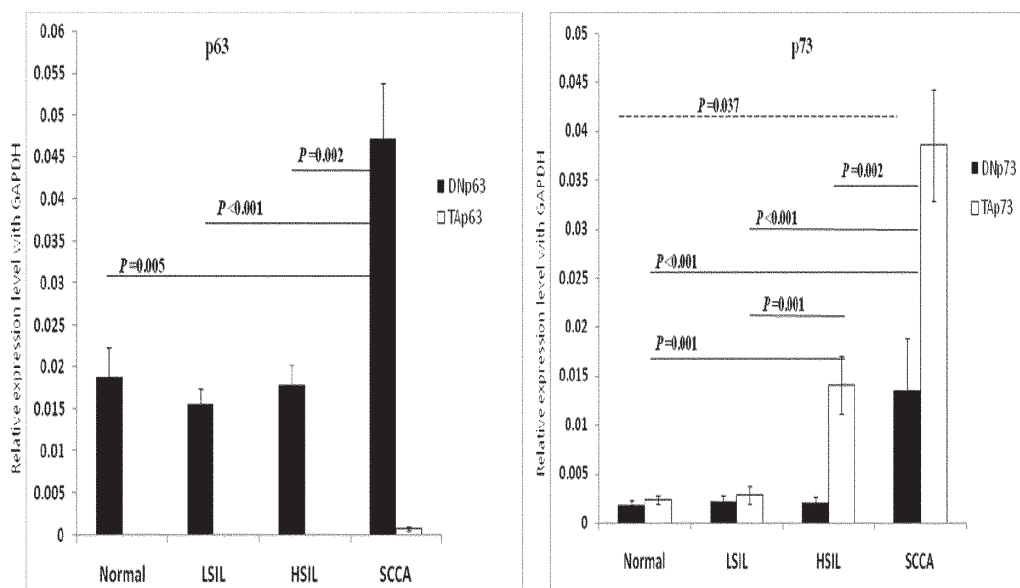


รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานและช่วงค่าที่ตรวจวัด TAp63, ΔNp63 , TAp73, ΔNp73 ไอโซฟอร์มและ GAPDH ด้วย real time RT-PCR

2. การเปรียบเทียบระดับและรูปแบบการแสดงออกของ TAp63, Δ Np63, TAp73, และ Δ Np73 ไอโซฟอร์มในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

การแสดงออกเป็นหน่วยจำนวน copy ของแต่ละไอโซฟอร์มพบว่า ในกลุ่มปากมดลูกปกติมีการแสดงออกของทุกไอโซฟอร์มอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำคือไม่เกิน 1,000 copies ยกเว้น Δ Np63 ซึ่งพบสูงได้ถึง 10,000 copies เพื่อให้เห็นการเปรียบเทียบในเชิงปริมาณของการแสดงออกของแต่ละไอโซฟอร์มและวิเคราะห์ทางสถิติระดับการแสดงออกจะถูกแปลงเป็น relative copy number ต่orange GAPDH transcript ดังใน รูปที่ 2

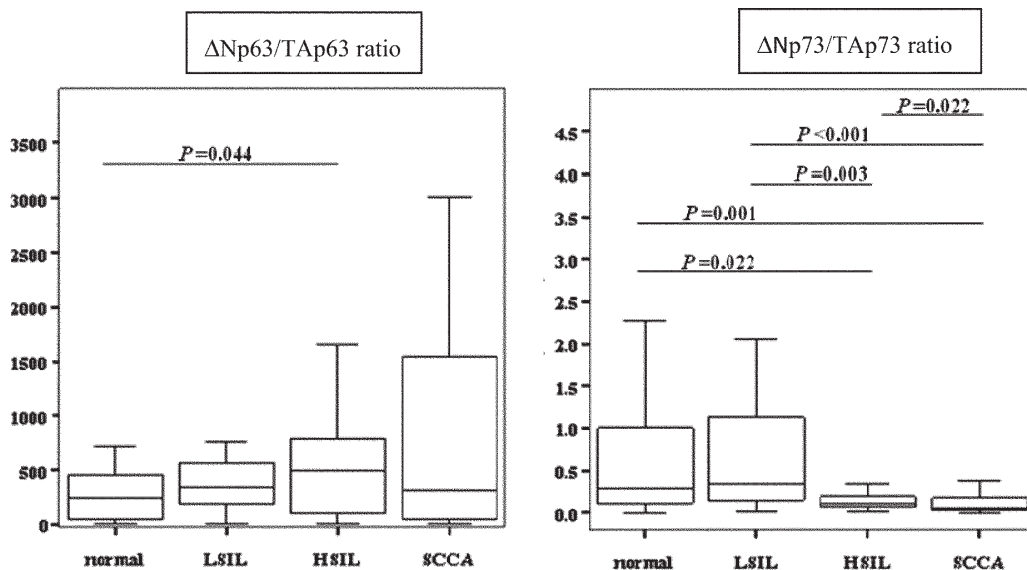
ผลการศึกษาแสดงแนวโน้มการพบระดับเพิ่มขึ้นของไอโซฟอร์มปกติคือทั้ง TAp63 และ TAp73 เมื่อมีการพัฒนาโรคเข้าสู่ระยะมะเร็งลูกกลาม (SCCA) โดยเฉพาะ TAp73 นั้นเริ่มพบ up-regulation อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ระยะ HSIL ($P = 0.001$) และ SCCA ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มปากมดลูกปกติ เป็นที่น่าสังเกตว่า ขณะที่มีการ up-regulate ให้มีการเพิ่มระดับของ TAp63 และ TAp73 จะพบการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกทั้ง Δ Np63 และ Δ Np73 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งลูกกลาม ($P = 0.005$ และ $P = 0.037$ ด้วย สถิติ Mann-Whitney)



รูปที่ 2 เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของแต่ละไอโซฟอร์ม p63 and p73 ในรูปของอัตราส่วนกับ GAPDH ในกลุ่มตัวอย่างระยะก่อนมะเร็ง (LSIL และ HSIL) กลุ่มเป็นมะเร็ง (SCCA) เทียบกับกลุ่มปากมดลูกปกติ

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้อัตราส่วนการ แสดงออกระหว่างไอโซฟอร์มที่ส่งเสริมมะเร็ง (ΔN) ต่อ ไอโซฟอร์มปกติ (TA) ของจีนสองทั้งในแต่ละกลุ่ม ตัวอย่างพบว่าอัตราส่วนของ $\Delta N/TA$ ไอโซฟอร์มของ p63 เพิ่มขึ้นเมื่อมีการดำเนินโรคไปสู่ระยะที่รุนแรงเพิ่มขึ้น โดยมีแนวโน้มว่าเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเริ่ม

ตั้งแต่ระยะก่อนเป็นมะเร็งคือ HSIL ($P = 0.044$) แต่ พบว่าอัตราส่วนดังกล่าวของ p73 จะมีแนวโน้มลดลง เมื่อโรครุนแรงขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนมะเร็งคือ HSIL และ SCCA และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะ ที่รุนแรงน้อยกว่า ($P < 0.05$) ดังแสดงใน **รูปที่ 3**



รูปที่ 3 แสดงสัดส่วน box plot ระหว่าง DN and TA ของ p63 และ p73 ใน normal cervix, pre-invasive, และ SCCA เส้นตรงในแนวนอนของ box แสดงถึง median ขอบบนสุดของ box แสดงถึง 75 percentile และ ขอบล่างสุดของ box แสดงถึง 25 percentile

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้พัฒนาการตรวจหาระดับการแสดงออก ของ TA และ ΔN ไอโซฟอร์ม ของจีน p63 และ p73 ด้วยเทคนิค real time RT-PCR ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูล ด้านปริมาณระหว่างไอโซฟอร์มที่สามารถยับยั้งมะเร็ง กับไอโซฟอร์มที่ส่งเสริมการเติบโตของมะเร็ง และอาจ ใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้ที่สำคัญในการพัฒนามะเร็งปากมดลูก ในการจัดตั้งและทดสอบคุณสมบัติวิธีการตรวจวัดจึงมี

ความสำคัญเป็นอันดับแรกที่จะมั่นใจว่าค่าที่ได้มีความน่า เชื่อถือ ซึ่งในทุกรอบการตรวจวัดมีการกำหนดค่าความ แปรปรวนและ PCR efficiency ตามมาตรฐานที่ให้การ ยอมรับในการทำ real time RT-PCR รวมทั้งการทำ ควบคุมคุณภาพด้วยการทำ control ควบคุมในทุกรอบ การวิเคราะห์

ผลการจัดทำกราฟมาตรฐานการตรวจวัดในแต่ละ ไอโซฟอร์มให้ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้แตกต่างกัน โดย

เรียงจากน้อยไปหามาก คือ TAp63 เท่ากับ 30 copies TA p73, Δ Np63 และ GAPDH เท่ากับ 300 copies และ Δ Np73 เท่ากับ 1000 copies ตามลำดับ ถึงแม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้^(12, 19) ได้อ้างถึง ค่า detection limit ที่ค่อนข้างต่ำคือเพียง 2 copies อาจเนื่องจากใช้เครื่อง ABI รุ่น 7900 ซึ่งมีความไวในการตรวจจับสัญญาณมากกว่าเพราะทำการตรวจอ่านสัญญาณจากปฏิกิริยาโดยตรงจากด้านบน ในขณะที่การศึกษานี้เครื่องที่ใช้ (CORBETT Research) จะใช้การอ่านสัญญาณผ่านผนังหลอด PCR ความหนาของผนังหลอด PCR สามารถรบกวนการตรวจวัดได้ อย่างไรก็ตามช่วงค่าที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างส่วนใหญ่มีระดับเกินค่า detection limit

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ตรวจหาการแสดงออกของ p63 และ p73 ไอโซฟอร์มพร้อมกันในกลุ่มตัวอย่างระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและระยะเป็นมะเร็งลูกกลามชนิด SCCA เปรียบเทียบกับกลุ่มปากมดลูกปกติ เมื่อพิจารณาจากระดับการแสดงออกของ p63 และ p73 ไอโซฟอร์ม ในกลุ่มปากมดลูกปกติพบว่าทุกไอโซฟอร์มยกเว้น Δ Np63 มีการแสดงออกในระดับต่ำสำหรับการที่พบ Δ Np63 สูงในเนื้อเยื่อปากมดลูกมาจากหน้าที่ของ Δ Np63 ที่กระตุ้นให้เยื่อมดลูกเกิดการแบ่งตัว (proliferation) แต่ขณะที่ TAp63 ทำหน้าที่กระตุ้น differentiation ในเยื่อผิวปกติชนิด squamous cell⁽²⁰⁾

ผลจากการศึกษารูปแบบในการแสดงออกของไอโซฟอร์มสนับสนุนสมมติฐานว่าเกิดการ up-regulation ของ TAp63 และ TAp73 ไอโซฟอร์มเพื่อตอบสนอง (compensate) การถูกทำลายของ p53 โดยไวรัสโปรตีนนั้น จะยังไม่พบในระยะ LSIL แต่จะเริ่มพบ up-regulation มากขึ้นในระยะ HSIL และ SCCA ทั้งนี้เพราะอุบัติการณ์ที่พบ high risk HPV ในกลุ่ม SCCA พบได้สูงเกือบร้อยละ 99-100⁽³⁾ ในขณะที่กลุ่ม LSIL และ HSIL พบได้เพียงร้อยละ 40-50⁽²¹⁾

จากผลการศึกษานี้ที่พบว่า Δ Np63 และ Δ Np73 ไอโซฟอร์มมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเฉพาะในกลุ่ม SCCA

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติและกลุ่มอื่นๆสอดคล้องกับการศึกษาในมะเร็งรังไข่⁽¹²⁾ และมะเร็ง neuroblastoma⁽¹⁵⁾ ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นของ Δ N ไอโซฟอร์มสัมพันธ์กับอัตรารอดชีวิต

เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการศึกษานี้พบ TAp73 แสดงออกเพิ่มขึ้นได้ตั้งแต่ระยะก่อนเป็นมะเร็งคือ HSIL และ SCCA โดยจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกในระยะ SCCA ต่อยะยะปากมดลูกปกติและระยะ HSIL คิดเป็น 16.5 และ 2.7 เท่าตามลำดับ ส่วนจำนวนเท่าของ Δ Np73 ที่เพิ่มขึ้นเพียง 7.8 และ 1.2 เท่าตามลำดับ การที่พบระดับของ TAp73 สูงกว่า Δ Np73 นั้นสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ในมะเร็งรังไข่และมะเร็งในระบบสืบพันธุ์สตรี^(19, 22) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการใช้ประโยชน์จากอัตราส่วนระหว่าง Δ N และ TA ไอโซฟอร์ม ของจีนทั้งสองเพื่อทำนายการพัฒนาของโรคมะเร็งปากมดลูก ผลการวิเคราะห์ในการศึกษานี้โดยใช้อัตราส่วน Δ N/TA ไอโซฟอร์มของ p63 ที่เพิ่มขึ้นอาจใช้เป็นตัวทำนายการดำเนินโรคระยะปากมดลูกปกติไปสู่ HSIL และ SCCA อย่างไรก็ตามอัตราส่วน Δ N/TA ของ p73 กลับมีทิศทางตรงข้ามคือลดลงเมื่อโรครุนแรงขึ้น อาจมาจากการพบระดับ up-regulation ของ TAp73 ที่สูงกว่า Δ Np73 ไอโซฟอร์ม ซึ่งทำให้เห็นอัตราส่วนที่ลดลงเมื่อโรครุนแรงขึ้น ทั้งนี้อาจอธิบายกลไกในการ up-regulation ของ Δ Np73 เป็นผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเกิด up-regulate ของ TAp73 เนื่องจากรายงานก่อนหน้านี้⁽²³⁾ พบว่า TAp73 สามารถเกิด auto-regulation โดยการกระตุ้น Δ N โปรโมเตอร์ ทำให้เกิด up-regulate ของ Δ N ไอโซฟอร์มตามมา ที่น่าสนใจคืออัตราส่วนดังกล่าวอาจมีความไวในการทำนายดีกว่า p63 ไอโซฟอร์ม เนื่องจากอัตราส่วนที่ลดลงให้นัยสำคัญเมื่อโรครุนแรงตั้งแต่ระยะ HSIL และ SCCA

ดังนั้นการวัดระดับของทั้ง TA และ Δ N ของ p63 และ p73 น่าจะให้ข้อมูลบ่งชี้ดีกว่าการวัดตัวใดตัวหนึ่ง การศึกษาที่น่าจะทำต่อจากนี้คือการศึกษากการแสดงออกในระดับโปรตีนในแต่ละไอโซฟอร์ม และการใช้อัตราส่วน

ดังกล่าวเพื่อทำนายและพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาและการกลับเป็นซ้ำของมะเร็งเนื่องจากการรักษา มะเร็งด้วยรังสีรักษาหรือเคมีบำบัดต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนตระกูล p53 เพื่อตอบสนองต่อการรักษา ผ่านการเกิด apoptosis ความสมดุลย์ระหว่างระดับของ ไอโซฟอร์มทั้งสองที่ทำงานตรงข้ามกันน่าจะใช้เป็น molecular markers ที่สำคัญต่อการผลักดันเซลล์หรือ ยับยั้งเซลล์ในการตอบสนองการรักษาทางคลินิก

เอกสารอ้างอิง

1. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 3-13.
2. Vatanasapt V, Sriamporn S, Vatanasapt P. Cancer control in Thailand. Jpn J Clin Oncol 2002; 32: 82-91.
3. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348: 518-27.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, 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.
5. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002; 5: 342-50.
6. 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; 636: 1129-36.
7. 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.
8. Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. Trends Genet 2002; 18: 90-5.
9. Cho NH, Kim YB, Park TK, Kim GE, Park K, Song KJ. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. Gynecol Oncol 2003; 91: 346-53.
10. Liu SS, Chan KY, Cheung AN, Liao XY, Leung TW, Ngan HY. Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2006; 12: 3922-7.
11. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. Cell Death Differ 2001; 8: 1213-23.
12. Marchini S, Marabese M, Marrazzo E, Mariani P, Cattaneo D, Fossati R, et al. DeltaNp63 expression is associated with poor survival in ovarian cancer. Ann Oncol 2008; 19: 501-7.
13. Stiewe T, Theseling CC, Putzer BM. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. J Biol Chem 2002; 277: 14177-85.
14. Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. Cancer Cell 2006; 9: 45-56.
15. Casciano I, Mazzocco K, Boni L, Pagnan G, Banelli B, Allemanni G, et al. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. Cell Death Differ 2002; 9: 246-51.
16. Lin Z, Nan Y, Zhang X, Zhao Y, Kim C, Kim I. Reverse transcription-polymerase chain reaction and western blotting analysis for

- detection of p63 isoforms in uterine cervical cancers. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1643-7.
17. Stiewe T, Tuve S, Peter M, Tannapfel A, Elmaagacli AH, Putzer BM. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 626-33.
 18. Muenphon K, Limpai boon T, Jearanaikoon P, Pairojkul C, Sri pa B, Bhudhisawasdi V. Amplification of chromosome 21q22.3 harboring trefoil factor family genes in liver fluke related cholangiocarcinoma is associated with poor prognosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4143-8.
 19. Marabese M, Marchini S, Marrazzo E, Mariani P, Cattaneo D, Fossati R, et al. Expression levels of p53 and p73 isoforms in stage I and stage III ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44: 131-41.
 20. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 494-501.
 21. Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Kucukali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract* 2007; 203: 445-9.
 22. Becker K, Pancoska P, Concin N, Vanden Heuvel K, Slade N, Fischer M, et al. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int J Oncol* 2006; 29: 889-902.
 23. Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe Ki K, Todo S, Mizuguchi H, et al. Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2575-85.