

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน E4 ใน Human Papillomavirus (HPV)

กับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปากมดลูก



นาย เอกรัฐ ทรัพย์โชคพูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The Relationship between E4 Expressions of Human Papillomavirus (HPV) in Different  
Cervical Cytologic Categories



Mr. Akerat Supchokpul

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry  
Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University



เอกรัฐ ทรัพย์โชคพูล: ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน E4 ใน Human Papillomavirus (HPV) กับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปากมดลูก (The Relationship between E4 Expressions of Human Papillomavirus (HPV) in Different Cervical Cytologic Categories)  
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, 78 หน้า

การติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HPV ชนิด 16 ยังไม่เป็นที่แน่ชัดในกลไกที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก แต่เชื่อว่าการเกิดมะเร็งได้ไวรัสต้องมีการการแทรกตัวเข้าสู่ยีนของเจ้าบ้าน จากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันพบว่า เมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวน จะพบการแสดงออกของยีน E4 และยีน E4 จะมีปริมาณมากในระยะก่อนมะเร็ง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน E4 ของ HPV16 ในระยะต่างๆ ตั้งแต่รอยโรคปกติจนถึงรอยโรคมะเร็ง ด้วยการตรวจหา mRNA โดยเทคนิค single-step Real-Time RT-PCR จากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV16 ทั้งหมด 80 ตัวอย่างและมีผลตรวจทาง cytology เป็น normal, LSIL, HSIL และ cancer จำนวนอย่างละ 20 ตัวอย่าง พบว่าการแสดงออกของยีน E4 พบได้ ทุกระยะของรอยโรค ยกเว้นเซลล์ปกติ โดยที่มีการแสดงออกของยีน E4 ในระยะ LSIL , HSIL และ cancer เท่ากับ  $1.30 \times 10^5$ ,  $1.38 \times 10^7$ , และ  $1.19 \times 10^4$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ (ตามลำดับ) ซึ่งการแสดงออกของแต่ละรอยโรคก็มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) นอกจากนี้ผลของการตรวจหาการแสดงออกของยีน E4 เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธีป้ายเซลล์ (Pap smear) และ วิธีตัดชิ้นเซลล์ (biopsy) ในตัวอย่างเดียวกันไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.396$ ) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการใช้ยีน E4 ของ HPV16 ในการตรวจคัดกรองหรือการตรวจเสริมเพื่อยืนยันรอยโรคก่อนมะเร็งของปากมดลูกต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ชีวเคมี.....  
 สาขาวิชา..... ชีวเคมีทางการแพทย์  
 ปีการศึกษา ..... 2553.....

ลายมือชื่อนิสิต..... เอกวิจ ทรัพย์โชคพูล  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... อ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... อ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ



# #527 48544 30 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

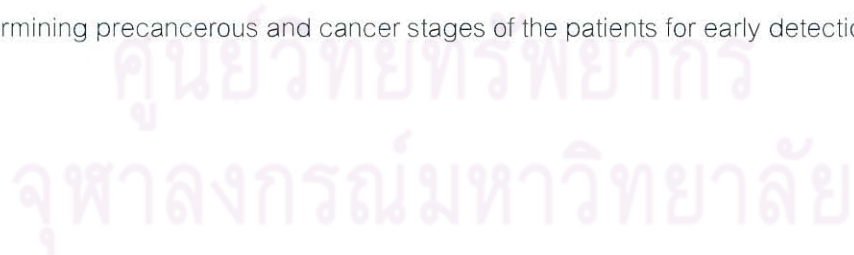
KEYWORDS: HPV, E4, mRNA expression, Real-Time RT-PCR, cervical cytology

AKERAT SUPCHOKPUL: The Relationship between E4 Expressions of Human Papillomavirus (HPV) in Different Cervical Cytologic Categories. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.

NUANTHIP KAMOLVARIN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PROF. YONG

POOVORAWAN, M.D., 78 pp.

The infections of Human Papillomavirus (HPV), especially HPV type 16 (HPV16) in some unclear circumstances progress to cervical cancer. The viral infections may result in latent stage or integration into host gene to develop viral carcinogenesis. E4 expression reflects the viral replication and translation. Twenty samples with proven HPV16 infection of each cytologic category; low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), squamous carcinoma (SCC) and negative for intraepithelial lesion (NIL) were investigated by single-step Real-time RT PCR. It was found that the E4 mRNA of HPV16 was highly expressed in the HSIL, which increased  $1.38 \times 10^7$  fold as compared to the NIL ( $P < 0.01$ ), whereas LSIL and SCC were increased  $1.30 \times 10^5$  fold ( $P < 0.01$ ) and  $1.19 \times 10^4$  fold ( $P < 0.01$ ), respectively. E4 mRNA expression of Pap smear and biopsy sample were compared by this technique and found that there was no difference in mean expression ( $P = 0.396$ ). From these results, determination of E4 expression could be performed on Pap smear samples or biopsy samples. The authors speculate that E4 expression assay may be useful in determining precancerous and cancer stages of the patients for early detection and treatment.



Department: ..... Biochemistry.....

Field of Study: .....Medical Biochemistry...

Academic Year: ....2010.....

Student's Signature..... *เอกวิทย์ ทัศนวิทย์กุล*.....

Advisor's Signature..... *Dr. Kamlin*.....

Co-advisor's Signature..... *Yong Pong*.....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ (HR1155A) ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัย ในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ทั้งความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็น และความช่วยเหลือต่างๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ นอกจากนี้ยังให้คำแนะนำในการเขียนรายงานทุกฉบับ ตลอดจนแนวทางในการรายงานทุกๆ ครั้งมาโดยตลอด จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภูววรรณ หัวหน้าศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ แนวทาง ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องสถานที่ เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับทำงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งบุคลากรทุกท่านในศูนย์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แนะนำในการดำเนินงานวิจัย ให้ความเป็นมิตรมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ และให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ตลอดโครงการ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สัจชัย พงษ์ภร และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านเป็นอย่างยิ่งที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และการอบรมสั่งสอนเรื่อยมาตลอดการเรียนในภาควิชาชีวเคมี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไพโรจน์ จรรย์ยงค์ดีกุล โรงพยาบาลสมิติเวช และแพทย์หญิง สุขุมาลัย สว่างวาริ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ ข้อคิดเห็นต่างๆ และให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ตลอดโครงการ รวมทั้งกรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างที่ใช้สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรประจำภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ช่วยให้ความสะดวกมาตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาที่เป็นในให้กำลังใจในการทำงานวิจัยที่ดีเยี่ยมในครั้งนี้อย่างเต็มที่ตลอดทำให้ข้าพเจ้าสามารถข้ามผ่านอุปสรรคต่างๆ ไปได้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ลักษณะของ Human Papillomavirus (HPV) และการจัดกลุ่ม.....	5
โครงสร้างจีโนมของ HPV.....	5
วงจรชีวิตของ HPV และ HPV สายพันธุ์ 16 กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรี.....	7
ความสัมพันธ์ของยีน E4 และการเกิดมะเร็งปากมดลูก.....	9
ระบาดวิทยาของการติดเชื้อ HPV และมะเร็งปากมดลูก.....	10
สาเหตุและปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HPV ในสตรี.....	11

	หน้า
ภูมิคุ้มกันวิทยาของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV.....	12
เซลล์วิทยาและพยาธิวิทยาของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV.....	12
วัคซีนที่ใช้ในการป้องกันเชื้อ HPV.....	16
การตรวจหาการติดเชื้อ HPV ทางอนุชีววิทยาในปัจจุบัน.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
รูปแบบการวิจัยและระเบียบวิธีวิจัย.....	22
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	43
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	59
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	78



## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	Icosahedra capsid ของ Human Papillomavirus (HPV).....	5
2	โครงสร้าง Genome ของ Human Papillomavirus (HPV).....	6
3	เซลล์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV.....	7
4	วงจรชีวิตของ HPV.....	8
5	แสดงส่วนประกอบและขนาดของ E4 ยีน.....	9
6	แสดงความสัมพันธ์ของโปรตีน E4 และวงจรชีวิตของไวรัส.....	9
7	แสดงความสัมพันธ์ของเปลี่ยนแปลงของรอยโรค ก่อนมะเร็งจนถึงระยะมะเร็งที่บริเวณ เซลล์ปากมดลูกและการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆ ของไวรัส.....	10
8	แสดงเซลล์ของเยื่อบุสควมัสของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV.....	14
9	แสดงเซลล์ของเยื่อบุต่อมของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV.....	15
10	แสดงการผลิตวัคซีน HPV และการทำงานของ HPV วัคซีน.....	17
11	ตารางที่ใช้สำหรับกำหนดขนาดตัวอย่าง.....	24
12	แสดงตำแหน่งของ Primer ที่ออกแบบขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16.....	30
13	pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector circle map.....	32
14	ผล PCR ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) จาก plasmid.....	43
15	แสดงตัวอย่าง chromatogram ของยีน HPV16 E4.....	44
16	ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast จากการทดสอบ positive control.....	44
17	ตัวอย่างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Blast.....	44
18	แสดงตัวอย่างผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของ สิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Blast.....	45
19	ตัวอย่างผล PCR จากการกำจัด genomic DNA.....	45
20	ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Normal.....	46
21	ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการแสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Normal.....	46
22	ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Abnormal.....	46

รูปที่	หน้า
23 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการแสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Abnormal.....	47
24 การแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV.....	52
25 ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี Pap smear.....	54
26 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการแสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี Pap smear.....	54
27 ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี biopsy.....	54
28 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการแสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี biopsy.....	54
29 การแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV....	57

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตารางสรุปขนาดและการทำงานของยีนต่างๆของ HPV.....	6
2 ตารางที่ใช้สำหรับการคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	23
3 แสดงลำดับเบสของ Primer ออกแบบขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16.....	30
4 แสดงลำดับเบสของ Primer ออกแบบขึ้นเพื่อตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH).....	31
5 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อสร้าง positive control ด้วยเทคนิค PCR จากยีน HPV E4.....	31
6 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อสร้าง positive control ด้วยเทคนิค PCR จากยีน HPV E4.....	32
7 แสดงส่วนผสมของ Ligation buffer.....	32
8 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ Plasmid.....	36
9 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อตรวจสอบ Plasmid.....	36
10 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ genomic DNA... ..	39
11 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ Genomic DNA.....	39
12 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยาเพื่อหาการแสดงออกของยีน HPV E4 ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Single-Step Real-Time RT-PCR.....	40
13 แสดงอุณหภูมิและเวลาเพื่อหาการแสดงออกของยีน HPV E4 ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Single-Step Real-Time RT-PCR.....	40
14 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา Single-Step Real-Time RT-PCR เพื่อตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH).....	41
15 แสดงอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยา Single-Step Real-Time RT-PCR เพื่อตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH).....	41
16 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม Normal.....	48
17 แสดง ผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม LSIL.....	49
18 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม HSIL.....	50
19 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม cancer.....	51

ตารางที่	หน้า
20	แสดงตัวอย่างในระยะต่างๆ ที่มีการติดเชื้อ HPV ผลทางเซลล์วิทยา ชนิด HPV ค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วย และค่าการแสดงออกของยีน E4..... 53
21	แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม cancer ที่เก็บด้วยวิธี Pap smears..... 55
22	แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม cancer ที่เก็บด้วยวิธี Biopsy tissue..... 56
23	แสดงตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV ผลทางเซลล์วิทยา ชนิด HPV ค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วย และค่าการแสดงออกของยีน E4..... 58
24	แสดงความหมายของสัญลักษณ์ของการกำหนด Degenerate Primers..... 77



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
Ab	Antibody
ADP	Adenosine diphosphate
AGC	Atypical glandular cells
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ANOVA	Analysis of Variance Program
ASC	Atypical squamous cells
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adenosine triphosphatase
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
CD 4+, 8+	Cluster of differentiation 4+, 8+
CBP	CREB-binding protein
Cdk	Cyclin-dependent kinases
cDNA	Complementary deoxyribonucleic Acid
CDH	E-cadherin
CI	Confidence interval
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CMI	Cell-mediated immunity
CR domain	Cysteine-rich domain
CREB	cAMP-response element-binding protein
CRPV	Cottontail rabbit papillomavirus
Ct	cycle threshold
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
Cys	Cysteine
DAPK	Death-associated protein kinase



DBD	DNA-binding domain
DEAD box RNA helicase	(Asp-Glu-Ala-Asp) box RNA helicase
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
E	Early gene
E6-AP	E6-associated protein
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic Acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethidium bromide
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GP-PCR-EIA	general primer PCR-enzyme immunoassay
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
HC2	Hybrid capture 2
HDACs	Histone deacetylases
HGL	High grade lesion
HHV	Human herpesvirus
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
HPV	Human papillomavirus
HRP	Horseradish peroxidase
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
hSNF5	human Sucrose NonFermentable 5
Hsp 70	Heat-shock protein 70
HSPA	Heat shock 70kDa protein 2
HSV	Herpes simplex virus
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
ICTV	International Committee on the Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin

IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
ISH	<i>in-situ</i> hybridization
kDa	Kilo Dalton
L	Late gene
LCR	Long control region
LGL	Low grade lesion
LIPA	Reverse-hybridization line probe assay
LNA	lock nucleic acid
LLXLL	Leucine Leucine X Leucine Leucine
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
LXCXE	Leucine X Cysteine X Glutamic acid
NBT	Nitro blue tetrazolium
MHC	Major histocompatibility complex
mL	Milliliter ( $10^{-3}$ L)
MLH1	MutL homolog 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NF-kappaB	Nuclear factor-kappaB
NFX	Nuclear transcription factor, X-box binding 1Mus musculus
NLS	Nuclear localization signal
nt	Nucleotide
ORF	Open-reading frame
p300/CBP	P300/CREB-binding protein
Pap smear	Papanicolaou smear
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-beta R	Beta-type platelet-derived growth factor receptor
PDZ	PSD-95/Disc-large/ZO1 protein
pRb	Retinoblastoma tumor-suppressor protein
P-value ( <b>p</b> )	Probability Value
pg	Picograms ( $10^{-12}$ grams)

Rb	Retinoblastoma
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RLB	Reverse line blotting
RLU	Relative light unit
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCC	Squamous-cell carcinoma
SIL	Squamous intraepithelial lesion
SOCS 1, 2	Suppressor of cytokine signaling 1, 2
SP1	Specificity Protein 1
Swi/snf complex	SWItch/sucrose non-fermentable complex
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
TLR	Toll-like receptor
T <sub>m</sub>	Melting temperature
TMB	3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
TNF	Tumor necrosis factor
μL	Microliter (10 <sup>-3</sup> L)
UNG	uracil-N-glycosylase
URR	Upstream regulatory region
UV	Ultraviolet
V-ATPase	Vacuolar H <sup>+</sup> adenosine triphosphatase
VLP	Virus-like particle
Zn <sup>2+</sup>	Zinc

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale)

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นประมาณ 5 แสนคนทั่วโลก โดยร้อยละ 80 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา และในจำนวนนี้จะมีอัตราการเสียชีวิตประมาณครึ่งหนึ่ง โดยจากการศึกษาที่ผ่านพบว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในสตรีทั่วโลก และเป็นสาเหตุให้เกิดการเสียชีวิตเป็นอันดับ 3 ของมะเร็งในสตรีทั่วโลก นอกจากนี้จากการสำรวจมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทยในปี 2010 พบว่ามะเร็งปากมดลูกมีอัตราการติดเชื้อเป็นอันดับ 1 ของสตรีไทย โดยมีอุบัติการณ์การติดเชื้อมากที่สุดในประเทศไทยประมาณ 19.2 ต่อแสนคนต่อปี [1, 2]

มะเร็งปากมดลูก มีสาเหตุหลักจากไวรัสชนิด Human Papillomavirus (HPV) [3] (รูปที่ 1) HPV เป็นไวรัสที่พบได้ทั่วไป เชื้อ HPV นี้มีมากกว่า 100 ชนิดที่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อที่บริเวณต่างๆ ของร่างกาย ส่วนใหญ่ไม่ค่อยเป็นอันตราย เช่น ชนิดที่ทำให้เกิดหูดที่มือ และเท้า แต่ HPV บางชนิด ได้แก่ HPV genotype 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 พบได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก แต่จากการศึกษาที่ผ่านมามาพบว่า HPV genotype 16 เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ในทุกระดับของรอยโรคของเซลล์ และสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณอวัยวะเพศจนนำไปสู่การพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกสูงที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบการเกิดมะเร็งปากมดลูกในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ เพื่อให้การรักษาได้อย่างทันท่วงที

การติดเชื้อ HPV แบบคงอยู่นานเกิน 6-12 เดือน ถือเป็นขั้นตอนสำคัญ ที่จะทำให้เกิดเยอบุผิวปากมดลูกเปลี่ยนแปลงสู่ระยะก่อนมะเร็ง และมะเร็งปากมดลูก โดยทั่วไปจะพบความผิดปกติของผลการตรวจทางเซลล์วิทยา ได้ประมาณร้อยละ 25-40 ภายในระยะเวลา 1-3 ปี หลังจากเริ่มตรวจพบเชื้อ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เริ่มจากเกิดความผิดปกติเล็กน้อย คือระยะก่อนมะเร็ง (Preneoplastic lesion) ชนิด CIN1 (cervical intra-epithelial neoplasia หรือ low – grade lesion, LGL) ไปเป็นความผิดปกติที่ร้ายแรงมากกว่า ได้แก่ CIN2 และ CIN3 (high – grade lesion, HGL) จากนั้นจะเปลี่ยนแปลงไปเป็น carcinoma *in situ* และ invasive carcinoma ตามลำดับ แต่การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้จะเกิดกับผู้ที่ติดเชื้อ HPV แบบคงอยู่นานบางรายเท่านั้น เนื่องจากสตรีที่ได้รับ HPV ส่วนใหญ่รอยโรคจะหายได้เองภายในระยะ 1-2 ปี ระยะเวลาเฉลี่ยของการเกิด CIN3 หลังจากได้รับ HPV ครั้งแรกประมาณ 7-15 ปี นอกจากนี้ระหว่างขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงยังพบว่าความรุนแรงของรอยโรคมีการย้อนกลับสู่ระดับที่เบาลงก็เป็นได้ แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ได้อย่างชัดเจน [3-5]

การศึกษาในครั้งนี้เลือกตรวจหา ยีน E4 ของไวรัสเนื่องจากการทำงานของโปรตีน E4 สามารถจับและทำให้เกิดความเสียหายกับ cytokeatin ใน keratinocyte ของเซลล์ปากมดลูกซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดรอยโรคที่ปากมดลูก นอกจากนี้เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ HPV DNA ของไวรัสและเซลล์มีความผิดปกติมากขึ้นจะพบการ transcription ของยีน E4 มากขึ้น [6, 7]

การศึกษาในปัจจุบันได้มีการหาบริเวณยีนที่มีการ transcription ของไวรัส HPV จากยีนต่างๆ ของไวรัส HPV พบว่ามีบริเวณของยีน E4 เกี่ยวข้องด้วย [8] ความสัมพันธ์ของยีน E4 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกพบระดับการแสดงออกมากกว่ายีนอื่นของ HPV ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง (LSIL) และบริเวณผิวของปากมดลูก โดยที่การแสดงออกในแต่ละ genotype มีการแสดงออกที่ต่างกันเนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ทำให้การวิเคราะห์ผลในครั้งนี้เลือก HPV ชนิด 16 ซึ่งมีอัตราการติดเชื้อสูงสุดมากกว่า HPV อื่นๆ ในประเทศไทย และมีโอกาสพบในทุกระยะของรอยโรค [9,10] โดยการศึกษาที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามแนวโน้มความเสี่ยงของผู้ป่วยต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำความรู้ด้านการแสดงออกของยีน E4 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกมาอธิบายหาความสัมพันธ์ของการเกิด oncogenesis ได้ต่อไปในอนาคต [11, 12]

จากข้อมูลความรู้ที่กล่าวมาข้างต้นของการเกิดมะเร็งปากมดลูกจากการติดเชื้อ HPV ประกอบกับเทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้เกิดการพัฒนาเทคนิคในการตรวจการแสดงออกของยีน E4 ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ มีความจำเพาะสูงในการตรวจวัด และสามารถวัดเชิงปริมาณได้ การแสดงออกของยีน E4 ในระดับ transcription ของ HPV genome หลังจากเข้าไปยัง Host cell ซึ่งจะพบเมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ปากมดลูก ทำให้สามารถวินิจฉัยได้ว่ามีการติดเชื้อ HPV และมีการทำงานของไวรัสในเซลล์ ถ้าพบว่ายีนไวรัสมีการแสดงออกในระดับ mRNA นอกจากนี้ยีน E4 ยังสามารถพบการแสดงออกของไวรัสได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง (LSIL) จนถึงระยะที่เป็นมะเร็ง ทำให้บอกแนวโน้มของผู้ป่วยว่ามีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูกโดยไม่ต้องตรวจยีนอื่นอีก และยีน E4 อาจสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งโดยปริมาณการแสดงออกของยีน E4 ที่เพิ่มขึ้นยังสัมพันธ์กับยีนมะเร็งของไวรัส E6, E7 [13] แต่เนื่องจากการแสดงออกของยีน E6, E7 จะมีการแสดงออกมากในช่วงการเกิดมะเร็งและมักจะมีที่ชั้นเซลล์ที่ลึกกว่ายีน E4 ดังนั้นยีน E4 จึงมีความน่าสนใจมากกว่าที่จะนำมาใช้ในการติดตามหาแนวโน้มของการเกิดมะเร็ง

#### คำถามงานวิจัย (Research question)

1 ผลการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน E4 ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV genotype 16 จากตัวอย่างที่รู้ผลทางทางเซลล์วิทยา (Cytology) แล้วว่าอยู่ในระดับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระยะ normal, LSIL, HSIL และ cervical cancer เป็นอย่างไร โดยใช้ตัวควบคุมคือเซลล์ปกติที่มีการติดเชื้อ HPV

2 ผลของการตรวจสอบสวนการแสดงออกของยีน E4 ในการเก็บด้วยวิธี Pap smear เปรียบเทียบกับวิธีเก็บชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy มีความใกล้เคียงกันหรือไม่

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

1 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน E4 ของตัวอย่างจากคนที่มีลักษณะทางเซลล์วิทยา (cytology) ปกติกับตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPV genotype 16 ในระยะ normal, LSIL, HSIL และ cervical cancer



2 เพื่อเปรียบเทียบผลของการตรวจสอบการแสดงออกของยีน E4 ในการเก็บด้วยวิธี Pap smear เปรียบเทียบกับวิธีเก็บชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy

### สมมุติฐาน (Hypothesis)

1 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPV genotype 16 ในแต่ละระยะของรอยโรคจะมีการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน E4 ที่แตกต่างกัน

2 ผลของการตรวจสอบการการแสดงออกของยีน E4 ในการเก็บด้วยวิธี Pap smear เปรียบเทียบกับวิธีเก็บชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy มีความใกล้เคียงกันในระยะ cancer

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

mRNA Expression คือการแสดงออกของยีนในระดับการ transcription

Cervical cytology คือพยาธิสภาพของปากมดลูก

Real-Time PCR คือ PCR ที่สามารถติดตามผลิตภัณฑ์ขณะที่กำลังเกิดขึ้นจริง ในช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งนำไปสู่การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนได้

### ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากสารตัวอย่างมีปริมาณจำกัดและ mRNA ที่สกัดได้จากไวรัสไม่มีความเสถียรทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานได้จึงไม่สามารถทดลองซ้ำได้ หรือไม่สามารถทดลองเพิ่มเติมในบางส่วนได้

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 การแสดงออกของยีน E4 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกสามารถมีการแสดงออกได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง นอกจากนี้ยังเป็นการตรวจหาการแสดงออกในระดับ mRNA หรือสภาพที่ไวรัสยังมีการทำงานอยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งสามารถนำประโยชน์นี้ไปใช้ในการติดตามแนวโน้มความเสี่ยงของผู้ป่วยต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูกต่อไป

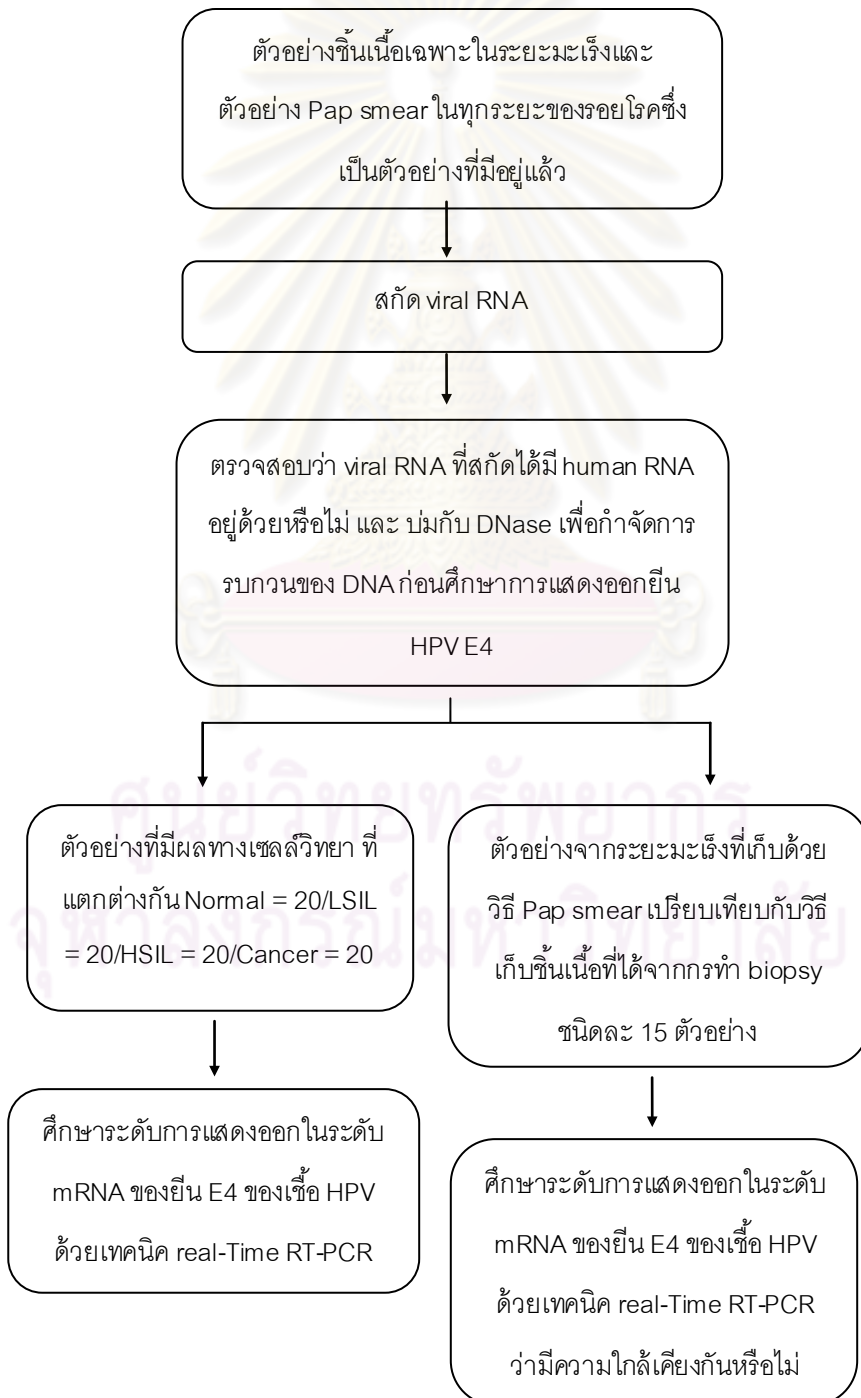
2 สามารถนำความรู้ด้านการแสดงออกของยีน E4 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการดำเนินรอยโรคของปากมดลูกเมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ปากมดลูกของมนุษย์

3 สามารถนำความรู้ที่ได้ไปวิจัยและพัฒนา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการติดตามเชื้อ HPV ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก

## กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)

ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV genotype 16 จากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธี Pap smear ในทุกระยะของรอยโรคกับวิธีเก็บชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกจะใช้เฉพาะในระยยะมะเร็งเท่านั้น ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวนำมาจากที่ผ่านการศึกษหา genotype ของไวรัส HPV และคัดแยกเฉพาะตัวอย่างที่มีการติดเชื้อที่มี genotype 16 ไว้แล้วจากนั้นทำการศึกษหาการแสดงออกของยีน E4 จากเชื้อ HPV เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง

### การทดลอง (Experiment)

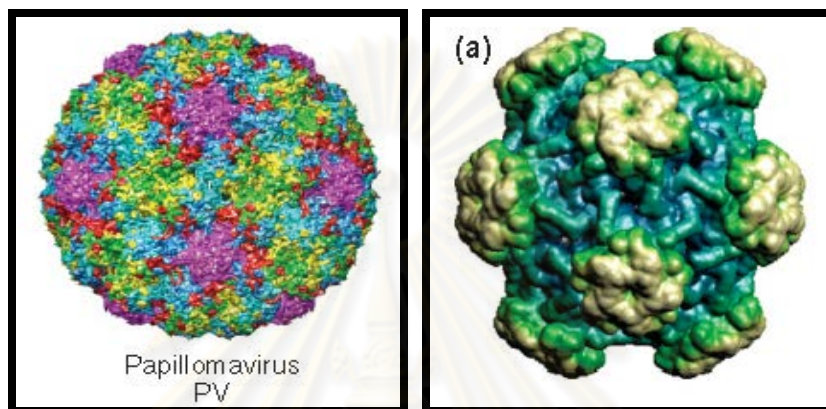


## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ลักษณะของ Human Papillomavirus (HPV) และการจัดกลุ่ม

Human Papillomavirus (HPV) (รูปที่ 1) อยู่ใน Family Papovaviridae, Genus Papillomavirus มี capsid เป็นแบบ Icosahedra capsid (50-60nm) ไม่มี envelope capsid [14, 15]



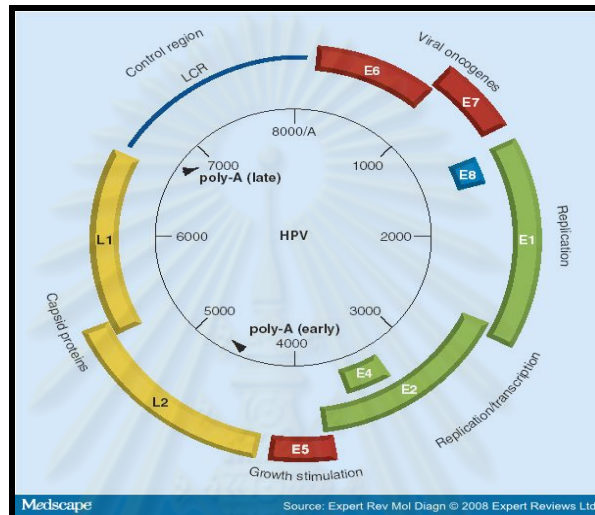
รูปที่ 1 Icosahedra capsid ของ Human Papillomavirus (HPV) [16]

Papillomaviruses สามารถจำแนกชนิดออกเป็น genus โดยใช้ภาษากรีกเช่น alpha, beta, gamma เป็นต้น โดยแต่ละ genus จะแบ่งเป็น species ซึ่งในมนุษย์สามารถพบได้ 5 genus และ species ที่มีความสำคัญทางคลินิกโดยเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูกคือ species 5, 7, และ 9 ซึ่งทั้ง 3 species จัดอยู่ใน genus alpha-papillomavirus [14, 17] และเมื่อจำแนกกลุ่มของ alpha-papillomavirus ปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มเสี่ยงต่ำ (low-risk) กลุ่มที่อาจเป็นกลุ่มเสี่ยงสูง (probably high-risk) และกลุ่มเสี่ยงสูง (high-risk) ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะจำแนกตามความสามารถของโปรตีนไวรัส E6 และ E7 ในการจับ (binding capacity) กับ tumor suppressor gene โดยพบว่ากลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงมีความสามารถสูงในการจับกับ tumor suppressor gene ซึ่งยีนที่มีความเกี่ยวข้องคือ retinoblastoma tumor suppressor gene (*Rb*) และ *p53* gene ส่วนกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำไม่สามารถจับตัวกับ tumor suppressor gene ได้ ตัวอย่างของ HPV ในกลุ่มเสี่ยงต่ำ ได้แก่ HPV genotype 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108 เป็นต้น พบได้ในการเกิดหูด (wart) และหูดหงอนไก่ (condyloma acuminata) ตัวอย่างของ HPV ในกลุ่มเสี่ยงสูง ได้แก่ HPV genotype 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 เป็นต้น พบได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก และตัวอย่างของกลุ่มที่อาจเป็นกลุ่มเสี่ยงสูง (Probably high-risk) ได้แก่ HPV genotype 26, 53, 66, 68, 73, 82 [18]

#### โครงสร้างจีโนมของ HPV

HPV genome ประกอบด้วยสายโมเลกุลของ DNA ประมาณ 8,000 คู่เบส เป็นแบบ circular supercoiled double strand DNA สามารถแบ่งเป็น 3 ส่วนในขนาดที่ต่างกัน (รูปที่ 2) ส่วนแรกคือ upstream regulatory region

(URR) หรือ long control region (LCR) ซึ่งมีสัดส่วนเป็นร้อยละ 10 ของจีโนม อีกสองส่วนคือ early gene (E) และ late gene(L) ซึ่งมีขนาดคิดเป็นร้อยละ 50 และ 40 ตามลำดับ ของจีโนม โดยยีน L เป็นส่วนรหัส สำหรับการสร้างโปรตีนในส่วนของ viral capsid ส่วนยีน E เป็นส่วนรหัส สำหรับการสร้างโปรตีนในส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการทำงานของไวรัส [19, 20] ปัจจุบันสามารถจำแนกโปรตีนที่แปลรหัสจาก early gene (E)และ late gene(L) ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไวรัสได้เป็นโปรตีน E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 และ L2 ซึ่งคุณสมบัติและการทำงานของแต่ละโปรตีนมีความแตกต่างกันดังตารางที่ 1



รูปที่ 2 โครงสร้าง Genome ของ Human Papillomavirus (HPV) [11]

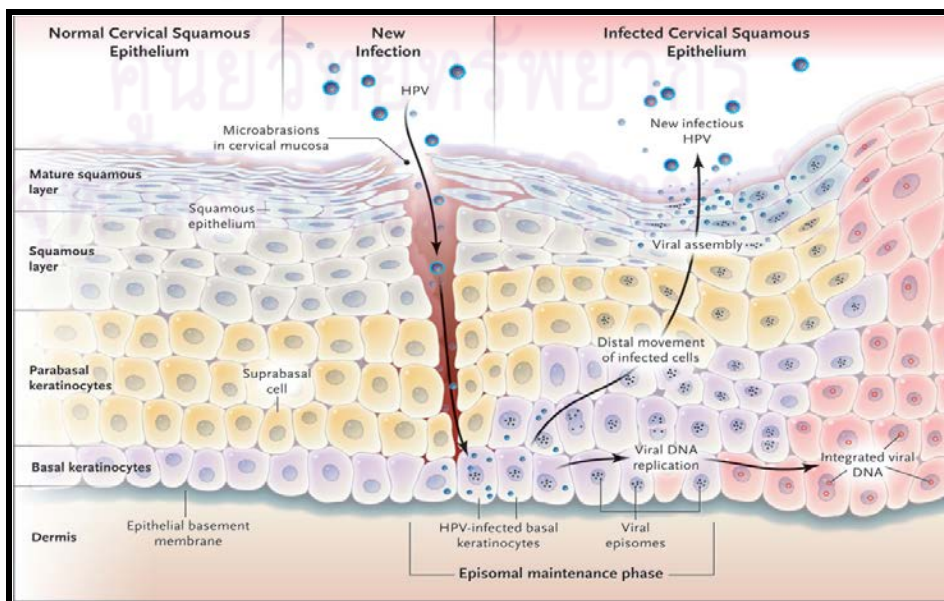
ตารางที่ 1 สรุปลักษณะและการทำงานของยีนต่างๆของ HPV

โปรตีน HPV	ขนาดของโปรตีน	หน้าที่
E1	70-80 kDa	ควบคุมการแบ่งตัวของไวรัส (viral replication) [21-22]
E2	42 kDa	เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) และการแบ่งตัวของไวรัส (viral replication) [24, 25]
E4	92 amino acid	สร้างความเสียหายให้กับ keratinocyte ของเซลล์ปากมดลูกซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดรอยโรคที่ปากมดลูก [6,26]
E5	16 kDa	ทำให้เซลล์ keratinocytes มีการเพิ่มจำนวน (cell proliferation) โดยกระตุ้นการทำงานของ epidermal growth factor (EGF) [27-30]
E6	151 amino acid	ขัดขวางการทำงานของ tumor suppressor gene ชนิด p53 ทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติไม่ได้รับการซ่อมแซมความเสียหายส่งผลให้เซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็ง [31, 32]
E7	100 amino acid	ขัดขวางการทำงานของ tumor suppressor gene ในกลุ่ม

		Retinoblastinoma (Rb) family ส่งผลให้เซลล์ที่เกิดความผิดปกติยังคงเพิ่มจำนวนได้และให้เกิดเป็นมะเร็งได้ในที่สุด [33, 34]
L1	55 kDa	โปรตีนหลักที่สร้างขึ้นเพื่อห่อหุ้มไวรัส, มีส่วนช่วยในการเข้าสู่เซลล์ผ่าน integrin heterodimer alpha6beta4 ที่ผิวเซลล์ปากมดลูก [35-37]
L2	70 kDa	ช่วยในการผลิต, ประกอบอนุภาคไวรัส, มีส่วนช่วยในการเข้าสู่เซลล์ผ่านการจับกับ beta-actins ของเซลล์ [38-40]

### วงจรชีวิตของ HPV และ HPV สายพันธุ์ 16 กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรี

เมื่อมีการการติดเชื้อ (รูปที่ 3) ไวรัสจะเข้าไปที่เซลล์ basal epithelium ในชั้น epidermal suprabasal เมื่อเกิดรอยถลอกขนาดเล็กที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ (microtrauma) ในการติดเชื้อระยะแรกจีโนมของไวรัสจะคงสภาพตัวเองเป็น episome ในเซลล์ basal epithelium โดยที่ยังไม่มีการรวมตัวเข้ากับ genome ของเซลล์เจ้าบ้าน และมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในปริมาณต่ำๆ ในชั้น suprabasal และ basal ส่งผลให้การติดเชื้อมักจะไม่แสดงอาการในระยะเริ่มต้นและสามารถแฝงตัวอยู่ได้เป็นเวลานาน การเพิ่มจำนวนของไวรัสในปริมาณสูงสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ที่เยื่อบุผิวในรูปแบบต่างๆ เช่น papillomatosis, parakeratosis และ koilocytosis นอกจากนี้ HPV ยังมีความสามารถในการก่อมะเร็ง "Oncogenicity" ในบริเวณปากมดลูก ซึ่งการเกิดมะเร็งนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อไวรัสอยู่ในสภาพ transformation หรือ integration ซึ่งอาจต้องอาศัยปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น สารก่อมะเร็ง(เคมีและกายภาพ), ไวรัสชนิดอื่น และระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า HPV 16 มีความสามารถสูงกว่า HPV ชนิดอื่นๆ ในการ integrate เข้าสู่ DNA ของ host cell แล้วส่งผลให้ host cell กลายเป็นมะเร็ง [13, 41, 42] ส่วนไวรัสที่ไม่ได้มีการ integrate เข้ากับ host DNA ไวรัสที่ถูกผลิตขึ้นมาใหม่จะถูกปล่อยออกในเซลล์ชั้นบนสุด เรียกว่า ชั้น สตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) หรือชั้น Cornified เพื่อให้มีการแพร่กระจายไวรัสต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง ซึ่งกระบวนการต่างๆ ของไวรัสกล่าวโดยละเอียดได้ดังนี้ [15, 43]



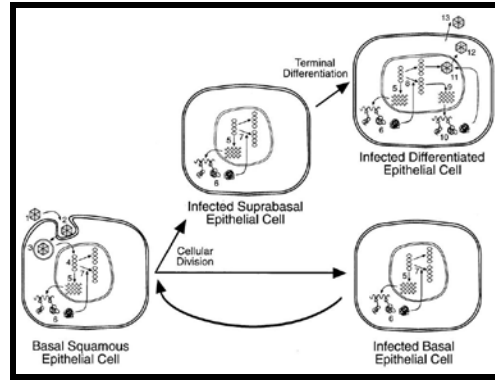


### รูปที่ 3 เซลล์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV [43]

วงจรชีวิตของ HPV (รูปที่ 4) [44] การดำเนินโรคของไวรัสหลังจากที่เข้าเซลล์ผ่านบริเวณที่ผิวหนังชั้น Basal ของเยื่อบุผิว การเข้าสู่เซลล์ไวรัสจะเกาะติดเซลล์ผ่าน receptor ซึ่ง receptor ที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเข้าไปยังเซลล์ของ Host คือ furin และ heparan sulfate proteoglycans [45, 46] ซึ่งเป็นบริเวณที่ไวรัสเข้าจับก่อนเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ alpha6 integrin ก็เป็นอีก receptor หนึ่งที่มีการศึกษาว่าเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส [47, 48] หลังจากเกาะติดกับ receptor แล้วไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (receptor-mediated endocytosis) ซึ่งจะทำให้หน้าทีคล้ายไวรัสเข้าสู่เซลล์ ไวรัสที่ถูกกลืนเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีนี้จะต้องมีความจำเพาะในการจับกับโปรตีนตัวรับ ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์จึงจะสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ หลังจากนั้น เยื่อหุ้มเซลล์จึงเว้าเป็น vesicle หลุดเข้าสู่ภายในเซลล์ (1,2) เมื่อเข้าสู่เซลล์วงจรชีวิตของ HPV ในร่างกายก็จะเริ่มขึ้น และแพร่กระจายไปทั่วชั้น basal [49] (3) เริ่มจากอนุภาคของไวรัสจะถูกส่งไปยังนิวเคลียสและเอา capsid protein ที่ห่อหุ้มไวรัสออก (4) ซึ่งในระยะนี้ minor capsid protein (L2) [50, 51] มีส่วนช่วยให้ genomic DNA เข้าสู่ nucleus ได้

หลังจากที่เข้าไปในนิวเคลียสจะเกิดการ transcription ของ early gene ได้แก่ E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 (5) และจากนั้น mRNA ของไวรัสจะถูกแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีนในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ที่ใช้ในกระบวนการทำงานของไวรัส (6) หลังจากนั้นจะเกิดการจำลองดีเอ็นเอและการเพิ่มจำนวนของไวรัส (7) กระบวนการทั้งหมดเกิดขึ้นในเซลล์ basal และในเซลล์เยื่อบุ suprabaasal ที่ติดเชื้อ การผลิตอนุภาคไวรัสจะเกิดขึ้นใน keratinocyte ที่เกิดการแบ่งเซลล์ระยะสุดท้าย ซึ่งในระยะนี้จะเกิดการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส (DNA replication) (8) จากนั้นจะเกิดการ transcription ของ late gene ได้แก่ L1 และ L2 (9) แล้ว mRNA ของไวรัสจะถูกแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีนในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ซึ่งจะกลายเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (capsid) ชนิด L1 และ L2 (10) เมื่อการสร้างโปรตีนห่อหุ้มเสร็จสิ้นจะเกิดการรวมอนุภาค virion ของไวรัสภายในนิวเคลียส โดยเริ่มจาก E4 เหนียวนาให้มีการรวมตัวของอนุภาคไวรัสโดย L2 จะเป็น capsid protein ตัวแรกที่เริ่มประกอบอนุภาคไวรัสและตามด้วย L1 [38, 52] และการสังเคราะห์ capsid protein จะเกิดที่ชั้นผิวของ epithelial cell [53, 54] (11)

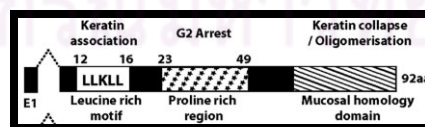
เมื่อมีการรวมตัวของไวรัสเป็นจำนวนมากจะส่งผลให้นิวเคลียสแตกออก (12) และทำให้ไวรัสถูกปล่อยออกไปยังเซลล์อื่นต่อไปได้ (13) การปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์เพื่อไปยังเซลล์ข้างเคียงเป็นระยะสุดท้ายของวงจรชีวิตไวรัส ซึ่งจะถูกเหนียวนาโดยโปรตีน E4 จาก HPV ชนิดความเสี่ยงสูง ซึ่งโปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของอนุภาคไวรัสก่อนปล่อยออกจากเซลล์ด้วย [55, 56]



รูปที่ 4 วงจรชีวิตของ HPV [44]

### ความสัมพันธ์ของยีน E4 และการเกิดมะเร็งปากมดลูก

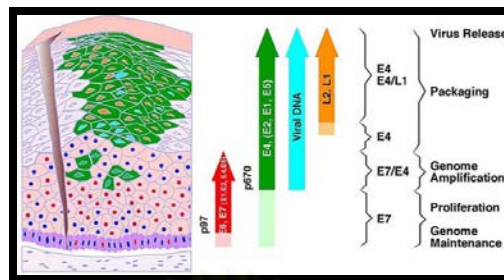
ตามปกติจะสามารถพบการแสดงออกของ E4 ได้มาก ระหว่างที่ไวรัสกำลังมีการดำเนินชีวิตรวมทั้งระหว่างการเพิ่มจำนวนไวรัส [57, 58] นอกจากนี้เมื่อศึกษาใน cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) ยังพบว่า E4 มีความสำคัญอย่างมากในระหว่างการผลิตอนุภาคไวรัสขึ้นมาใหม่ [59] E4 สามารถแบ่งการทำงานได้เป็นสามส่วน (รูปที่ 5) ที่ปลาย N-terminal ประกอบด้วย leucine-rich motif (LLKLL) ส่วนกลางเป็นบริเวณที่มี proline-rich charged และที่ C-terminal เป็นบริเวณที่บรรจุ mucosal homology motif ซึ่งรวมความยาวทั้งสามส่วนได้เท่ากับ 92 amino acids [26] ส่วนแรกปลาย N-terminal ช่วยทำให้ E4 โปรตีนสามารถทำให้เกิดความเสียหายที่ keratinocytes ใน epithelial cell ส่งผลให้เกิดรอยโรคก่อนมะเร็งขึ้น โดยการกระทำนี้มักพบแต่ใน HPV กลุ่มความเสี่ยงสูง นอกจากนี้ยังพบว่าที่ปลาย C-terminal มีส่วนช่วยดังกล่าวด้วย [6] คุณสมบัติที่สองคือความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิด G2/M cell cycle arrest ใน keratinocytes ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ cyclin B/Cdk1 complexes [60, 61] คุณสมบัติที่สามคือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ซึ่งความสัมพันธ์ของ mitochondria กับโปรตีน HPV16 E4 เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิด apoptosis [62] นอกจากนี้ใน HPV กลุ่มความเสี่ยงต่ำ เช่น HPV6 สามารถจับกับ DEAD box RNA helicase (E4-DEAD box protein) ผ่านบริเวณปลาย C-terminal [63] แต่จากการศึกษาล่าสุดพบว่ายีน E4 ไม่มีความสัมพันธ์กับ cyclin B ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิด G2/M cell cycle arrest นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนและเซลล์มีความผิดปกติมากขึ้นจะพบการ transcription ของยีน E4 มากขึ้น [7]



รูปที่ 5 แสดงส่วนประกอบและขนาดของ E4 ยีน [26]

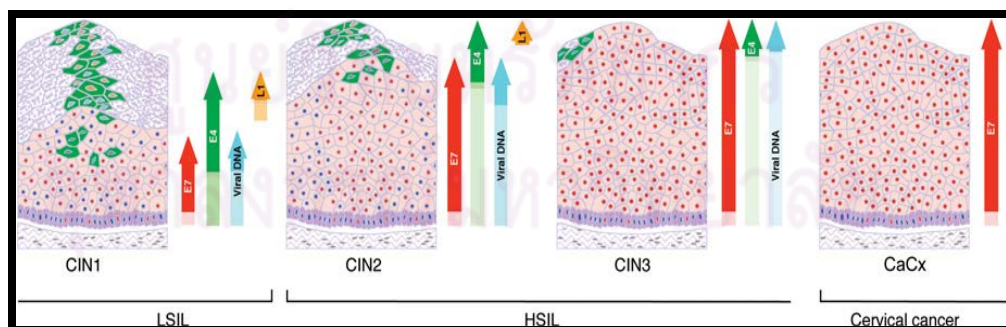
การแสดงออกของโปรตีน E4 (รูปที่ 6) มี promoter P970 เป็นตัวเริ่มต้นของการ transcription ใน HPV genotype 16 และจะมีแสดงออกในบริเวณผิวของปากมดลูก การแสดงออกของยีน E4 สามารถติดตามได้ด้วยการเกิด early transcription รวมถึงการเพิ่มจำนวนของไวรัส นอกจากนี้การแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (L1, L2)

จะเกิดขึ้นเมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนเสร็จสมบูรณ์และเกิดการรวมอนุภาคของไวรัสนอกนิวเคลียสซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการแสดงออกยีน E4 [10, 64]



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของโปรตีน E4 และวงจรชีวิตของไวรัส [64]

เมื่อพิจารณาวงจรชีวิตของเชื้อ HPV ในรอยโรคก่อนมะเร็งและมะเร็งปากมดลูก พบการแสดงออกของ โปรตีน E4 ดังรูปที่ 7 การแสดงออกของโปรตีน E4 ของไวรัสพบได้สูงมากในระยะ CIN1 (LSIL) และที่บริเวณผิวของเซลล์ปากมดลูก แต่โปรตีน E4 จะเริ่มหายไปพร้อมกับ episome ของไวรัสเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะมะเร็งเนื่องจาก genome ของไวรัสเริ่มมีการรวมตัวเข้ากับ genome ของ host [13] ดังนั้นการตรวจหาการติดเชื้อ HPV สามารถพบการแสดงของ protein E4 ได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง และบริเวณผิวของปากมดลูก [10, 65, 66] ซึ่งการพบโปรตีน E4 ที่รอยโรคก่อนมะเร็งเนื่องมาจาก E4 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ที่ epithelial cell โดยทำให้เกิดความเสียหายที่ keratinocytes ในเซลล์ปากมดลูก [6, 67] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า E4 มีการแสดงออกได้ทั้งในระดับ transcription และ translation [6, 64, 66] เนื่องจากพบ mRNA ที่เกิดการ splicing ของยีน E4 และพบว่าบริเวณ Downstream 3'exon ที่ทำหน้าที่ transcription ของยีน E ของเชื้อ HPV ประกอบด้วย E2C/E4/E5a/E5b Open reading frame (ORFs) ในขณะที่ยีน L ของเชื้อ HPV มีบริเวณ downstream 3'exon ที่ทำหน้าที่ transcription โปรตีนห่อหุ้มหลัก โดย HPV16 มี promoter 2 ชนิดเริ่มมีการ Transcription คือ p97 และ p670 ดังรูปที่ 6



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของเปลี่ยนแปลงของรอยโรคก่อนมะเร็งจนถึงระยะมะเร็งที่บริเวณเซลล์ปากมดลูกและการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆ ของไวรัส [13]

ระบาดวิทยาของการติดเชื้อ HPV และมะเร็งปากมดลูก

HPV เป็นสาเหตุของโรคที่ก่อให้เกิดโรคได้หลากหลายและเป็นสาเหตุหลักของมะเร็งปากมดลูกโดยสามารถติดได้กับบริเวณเยื่อเมือกต่างๆของร่างกาย [68] จากการสำรวจในสตรีทั่วโลกมะเร็งปากมดลูกพบเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านมและมีการเสียชีวิตเป็นอันดับ 3 รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอดโดยมีอัตราการติดเชื้อ 15.3 ต่อแสนคนต่อปีและมีอัตราการเสียชีวิต 7.8 ต่อแสนคนต่อปี [1] การติดเชื้อ HPV ชนิด 16 สามารถพบได้มากที่สุดและผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV และสามารถพบได้ในทุกระยะของรอยโรค นอกจากนี้สามารถพบได้ในระยะมะเร็งมากที่สุด [2-5] ความชุกของการติดเชื้อ HPV ที่อวัยวะเพศในสตรีที่ไม่พบความผิดปกติทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก การติดเชื้อ HPV เป็นภาวะที่พบได้ในสตรีกลุ่มวัยรุ่นหรือวัยเจริญพันธุ์ที่มีเพศสัมพันธ์แล้ว การติดเชื้อ HPV ส่วนใหญ่มักจะเป็นแบบติดเชื้อชั่วคราว หรือผู้ป่วยสามารถหายเองได้ การติดเชื้อสามารถติดพร้อมกันครั้งละหลายสายพันธุ์ได้ สายพันธุ์ที่สามารถพบได้บ่อยในกลุ่มความเสี่ยงต่ำได้แก่ชนิด 6 และ 11 ส่วนกลุ่มความเสี่ยงสูงที่พบได้แก่ชนิด 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58 สัดส่วนของเชื้อ HPV ในระยะที่เซลล์ปกติจะสามารถตรวจพบเชื้อ HPV16 ได้ร้อยละ 2.6-2.7 ของ HPV ทั้งหมด ในรอยโรคชั้นต่ำ (LSIL) จะสามารถตรวจพบเชื้อ HPV16 ได้ประมาณร้อยละ 18.5 ในขณะที่รอยโรคชั้นสูง (HSIL) จะพบการติดเชื้อ HPV16 ร้อยละ 44.1-45.4 และรอยโรคมะเร็งชนิดสแควมัสจะพบ HPV16 ร้อยละ 54.4 [1, 69]

จากการศึกษาในกลุ่มสตรีที่มีการติดเชื้อ HPV แต่ไม่พบความผิดปกติที่เซลล์ปากมดลูก โดยศึกษาในทวีปต่างๆ ทั่วโลก พบว่าทวีปแอฟริกามีการตรวจพบการติดเชื้อ HPV ประมาณร้อยละ 21.3 ซึ่งเป็นทวีปที่มีการติดเชื้อสูงสุดในจำนวนนี้มีการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 ประมาณร้อยละ 4.5 ทวีปที่มีการติดเชื้อรองลงมาคือทวีปอเมริกา เอเชีย และยุโรป โดยพบการติดเชื้อร้อยละ 14.5, 10.9 และ 9.7 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความชุกของ HPV สายพันธุ์ 16 พบว่ามีอัตราการติดเชื้อร้อยละ 6.3, 3.5 และ 3.3 ตามลำดับ [1]

เมื่อมีการสำรวจในประเทศไทยพบว่าอัตราการพบเป็นอันดับหนึ่งและมีอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งเป็นอันดับ 3 โดยมีอัตราการติดเชื้อ 19.2 ต่อแสนคนต่อปีและมีอัตราการเสียชีวิต 8.1 ต่อแสนคนต่อปี [2] เมื่อพิจารณาใน South-Eastern Asia พบว่า ประเทศไทยมีการติดเชื้อเป็นอันดับ 5 รองจาก กัมพูชา, พม่า, ฟิลิปปินส์ และเวียดนาม ตามลำดับ และอัตราการเสียชีวิต พบว่าประเทศไทยมีการเสียชีวิตเป็นอันดับ 7

### สาเหตุและปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HPV ในสตรี

การติดเชื้อ HPV ชนิดความเสี่ยงสูงเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูกซึ่งการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งอาจใช้เวลานานหลาย 10 ปี [68] นอกจากนี้ปัจจัยต่อเชื้อไวรัส HPV แล้วนั้นยังต้องมีปัจจัยอื่นร่วมด้วยเพื่อก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะกระตุ้นให้เชื้อ HPV สามารถทำงานส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง โดยปัจจัยต่างๆ ต่อความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกมีดังนี้

ปัจจัยของไวรัสพบว่าในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสอื่นร่วมด้วยเช่น HIV และ Herpes simplex virus type 2 (HSV) จะมีโอกาสเป็นมะเร็งปากมดลูกสูงขึ้น [70, 71] นอกจากนี้ยังพบว่ามีการติดเชื้อ HPV หลายสายพันธุ์ในผู้ชาย อาจก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรีได้ [72] ซึ่งประวัติการมีเพศสัมพันธ์ก็มีผลต่อความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเช่นกัน



โดยความเสี่ยงนั้นขึ้นกับจำนวนคู่นอนและความถี่ของการมีเพศสัมพันธ์ของทั้งฝ่ายชายและหญิง [73, 74] และในสตรีที่มีอายุน้อยจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HPV ชนิดความเสี่ยงสูงมากกว่าปกติ [75, 76] การตั้งครรภ์และการคลอดอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูกได้เนื่องจากในระหว่างตั้งครรภ์ระดับภูมิคุ้มกันในร่างกายต่ำทำให้เชื้อ HPV มีความสามารถเพิ่มขึ้นในการก่อให้เกิดมะเร็ง [77] นอกจากนี้ยังพบว่า ในสตรีที่มีการติดเชื้อ HPV ระหว่างตั้งครรภ์มีโอกาสที่บุตรในครรภ์จะติดเชื้อ HPV นั้นด้วย [78] การเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เช่น การติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* serotype G และ bacterial vaginosis ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ โดยทำให้เซลล์ที่เสียหายจากผลของ HPV มีการแบ่งตัวต่อไปจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง [79, 80]

นอกจากนี้แล้วภาวะทุโภชนาการยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ โดยพบว่าสตรีที่ขาดวิตามินเออาจมีความเสี่ยงต่อการมะเร็งปากมดลูกภายหลังจากการติดเชื้อ HPV ได้ [81, 82] นอกจากนี้จากการศึกษาในสตรีที่มีภาวะอ้วน ก็มีแนวโน้มที่จะเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกมากกว่าผู้หญิงผอม [83, 84] และในสตรีที่สูบบุหรี่ สามารถเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้เนื่องจากในควันบุหรี่ มีสารก่อมะเร็งอยู่หลายชนิด เช่น นิโคติน เป็นต้น [85] การดื่ม alcohol อาจส่งผลให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้เนื่องจาก alcohol สามารถกระตุ้นฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงบริเวณปากมดลูกทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อ HPV [86, 87]

### ภูมิคุ้มกันวิทยาของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV

ร่างกายของมนุษย์มีภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อมีอยู่ 2 ระบบ คือ 1) แบบ innate immunity เป็นภูมิคุ้มกันที่มนุษย์สร้างขึ้นมาตั้งแต่กำเนิดโดยจะสร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านการติดเชื้อทันทีและเป็นภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ โดยอาศัยการทำงานของ phagocytes จับกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammatory) และ 2) แบบ adaptive immunity เป็นภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นใหม่เพื่อต่อต้านการติดเชื้อ ซึ่งภูมิคุ้มกันชนิดนี้เป็นภูมิคุ้มกันที่พบมากกว่าเมื่อมีการติดเชื้อ HPV [88, 89]

เมื่อมีการติดเชื้อ HPV จะเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ cell-mediated immunity (CMI) ให้มีการสร้างเม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes เพื่อกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ ในการศึกษาเซลล์หูดที่มีการติดเชื้อและหายเองได้พบว่า มี T cells อยู่จำนวนมากทั้งชนิด CD4+, CD8+ และ macrophage ภายในหูดนั้น [90, 91] เมื่อมีการติดเชื้อ HPV ร่างกายจะกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response ของร่างกายมากขึ้น เช่น antibody IgG, IgA เป็นต้น [92, 93]

เนื่องจากการติดเชื้อ HPV มักเป็นแบบไม่แสดงอาการหรือคงสภาพอยู่ในปริมาณต่ำ ดังนั้นจึงทำให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายผู้ติดเชื้อมีน้อย ด้วยเหตุนี้ระดับภูมิคุ้มกันของผู้ที่เคยได้รับเชื้อจึงอยู่ในระดับต่ำ เป็นผลให้ผู้ที่เคยติดเชื้อ HPV และรอยโรคหายไปแล้ว สามารถติดเชื้อสายพันธุ์เดิมซ้ำได้ใหม่นี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการติดเชื้อแบบคงอยู่นาน ประกอบกับ HPV มีกลไกในการหลีกเลี่ยงภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้ ซึ่งเมื่อมีการติดเชื้อ HPV ส่วนใหญ่มักไม่มีการหลั่งสารจำพวก cytokines ที่กระตุ้นการอักเสบ ทำให้ภูมิคุ้มกันในร่างกายไม่มีตัวบ่งชี้ในการ



กำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น [94] นอกจากนี้ HPV ยังมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ interferon (IFN) ที่มีคุณสมบัติในการต้านไวรัส (antiviral) และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory) [95, 96] โดยโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV ในกลุ่มความเสี่ยงสูงจะขัดขวางการส่งสัญญาณของ interferon ทำให้ interferon ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้กลไกป้องกันของร่างกายไม่ถูกกระตุ้น และไม่มีการนำพา effectors cell ที่จำเพาะไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อ HPV ส่งผลให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนและคงอยู่ในเซลล์ได้ [97]

### เซลล์วิทยาและพยาธิวิทยาของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV

การติดเชื้อ HPV จะเกิดขึ้นได้ในบริเวณที่ผิวหนังเกิดการถลอก และมีบาดแผลของชั้น Basal ของเยื่อบุผิว การติดเชื้อมักจะไม่มีแสดงอาการในระยะเริ่มต้นและสามารถแฝงตัวอยู่ได้เป็นเวลานานผ่านทางรอยแผลเล็กๆ ที่เยื่อบุผิวชั้นนอกของอวัยวะ [15]

เริ่มแรกของการติดเชื้อ basal DNA replication มีการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสจำนวนไม่มาก ภายในเซลล์เยื่อบุผิว และการติดเชื้อเป็นแบบคงอยู่นาน (persistent infection) ซึ่งภูมิคุ้มกันของร่างกายจะพยายามตรึงเชื้อ HPV ให้สงบอยู่เช่นนี้ไปได้นาน แม้จะไม่สามารถกำจัดเชื้อออกได้หมดก็ตาม ระยะที่สองเมื่อเซลล์เยื่อบุผิวชั้นล่างที่ติดเชื้อถูกดันขยายตัวขึ้นในแนวตั้งสู่ชั้นผิวหนังด้านบนตามการแบ่งตัวตามธรรมชาติของเซลล์ปากมดลูกทำให้เกิดรอยโรคและมะเร็งที่ปากมดลูก

ปัจจุบันเราสามารถจำแนกรอยโรคก่อนมะเร็งและมะเร็งได้เป็น 3 ประเภทคือรอยโรคก่อนมะเร็งและมะเร็งของเยื่อบุสแควมัส (precancerous squamous lesions), รอยโรคก่อนมะเร็งและมะเร็งของเยื่อบุต่อม (precancerous glandular lesions) และรอยโรคที่ไม่สามารถแปลผลได้

รอยโรคก่อนมะเร็งของเยื่อบุสแควมัส (precancerous squamous lesions) (รูปที่ 8) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทจำแนกตามเซลล์วิทยา (cytology) หรือระบบปีเทสตา และพยาธิวิทยา (histology) ซึ่งจำแนกตามระดับของความผิดปกติของเซลล์และนิวเคลียส [98] สามารถจำแนกได้เป็น

**Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL)** เป็นการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุชนิด สแควมัสในชั้นเริ่มต้น ซึ่งเกิดได้จากการติดเชื้อ HPV ทั้งในกลุ่มความเสี่ยงต่ำและความเสี่ยงสูง [99, 100] โดยที่นิวเคลียสของเซลล์ขยายโตขึ้นมีลักษณะผิดปกติไปอาจพบมากกว่าหนึ่งนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์เนื่องจากกระบวนการแบ่งเซลล์ถูกรบกวน ลักษณะของไซโทพลาซึม (cytoplasm) เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น พบช่องใสรอบนิวเคลียส (perinuclear halo) เซลล์เยื่อบุชั้นบนและชั้นกลางจะมีลักษณะของ koilocytosis ซึ่งเกิดจากความผิดปกติในระดับโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeletal abnormality) [101-103] กลุ่มของรอยโรคที่จัดอยู่ในกลุ่มของ LSIL คือหูด (flat condyloma) หรือรอยโรคเพียงเล็กน้อย (mild dysplasia) และสามารถจำแนก LSIL ตามพยาธิวิทยาได้เป็น cervical intraepithelial neoplasia I (CIN1) [98, 104]

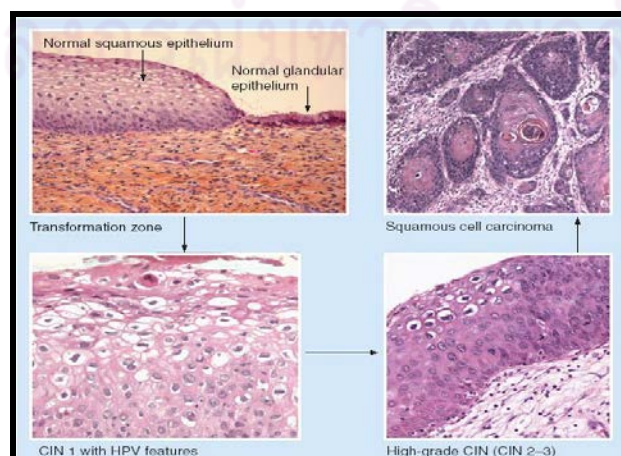
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในผู้ป่วยที่มีรอยโรคอยู่ในระยะ LSIL มีโอกาสตรวจพบ HPV DNA ได้มากกว่าร้อยละ 71.1 ถ้าติดเชื้อในกลุ่มความเสี่ยงสูงสามารถหายเองได้ประมาณร้อยละ 32.9 และถ้าติดเชื้อในกลุ่มความ

เสี่ยงต่ำสามารถหายเองได้ประมาณร้อยละ 55.2 นอกจากนั้นรอยโรคก็จะดำเนินรอยโรคต่อไปเป็นระยะที่รุนแรงขึ้น ประมาณร้อยละ 13.6 เฉพาะในกลุ่มความเสี่ยงสูง แต่โอกาสที่รอยโรคในระยะ LSIL จะมีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งนั้น มีเพียงร้อยละ 3 เท่านั้น [4, 105]

**High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL)** เป็นการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุชนิดสแควมัสใน ระยะสุดท้ายก่อนที่จะเป็นมะเร็ง ซึ่งส่วนใหญ่เกิดได้จากการติดเชื้อ HPV ในกลุ่มความเสี่ยงสูง [100, 106] ในระยะนี้ นิวเคลียสจะมีขนาดโตขึ้นมากในขณะที่เซลล์มีขนาดเล็กส่งผลให้มี nuclear-cytoplasmic ratio สูงกว่าปกติ เซลล์ ชั้นบนของเยื่อบุมี maturation น้อยลง เซลล์เยื่อบุมีความผิดปกติ โดยพบ nuclear atypia ชัด ลักษณะของไซโทพลาซึม (cytoplasm) เซลล์มีขนาดเล็กสามารถพบเซลล์ในระยะแบ่งตัวหรือ mitosis ได้มากโดยพบได้บริเวณส่วนบนของเยื่อบุ [101-103] นอกจากนี้ HSIL เป็นรอยโรคที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียว (monoclonal) ซึ่งเป็นลักษณะ หลักการการเกิดเนื้องอก [107] เมื่อจำแนก HSIL ตามจุลพยาธิวิทยา (Histology) สามารถจำแนกได้เป็น Cervical intraepithelial neoplasia II (CIN2) และ cervical intraepithelial neoplasia III (CIN3) [104] แต่เนื่องจากระหว่าง ความแตกต่างของ CIN2 กับ CIN3 อาจมีความแตกต่างของการวินิจฉัยระหว่างแพทย์ได้ค่อนข้างมาก ทำให้ปัจจุบัน มีการรวมกลุ่มรอยโรคเข้าเป็น HSIL จึงน่าจะลดความแตกต่างของการวินิจฉัยลงได้ [98]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในผู้ป่วยที่มีรอยโรคอยู่ในระยะ HSIL มีความเสี่ยงสูงกว่า LSIL โดยมีความเสี่ยงประมาณร้อยละ 4-30 ในการพัฒนารอยโรคเป็นมะเร็ง และสามารถ พบ HPV DNA ได้มากกว่าร้อยละ 85 และ พบ HPV ชนิด 16 ได้มากที่สุด [4, 108]

**Squamous cell carcinoma (SCC)** มะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม เซลล์มะเร็งสามารถพบเป็นเซลล์เดี่ยว หรือจับกันเป็นกลุ่ม เซลล์มะเร็งชนิด keratinizing มักมีขนาดและรูปร่างที่หลากหลาย และพบเซลล์ที่มี keratinization และพบลักษณะของเซลล์ที่มีความผิดปกติไปเช่น เซลล์รูปลูกช็อค เซลล์รูปกระสวย เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบ nucleolus ขนาดใหญ่และมีไซโทพลาซึม (cytoplasm) ขนาดเล็กทำให้มีปริมาณ nuclear-cytoplasmic ratio สูงกว่าปกติ พื้นหลังของสเมียร์มักจะมีเศษเซลล์ที่ตาย และ fibrin ซึ่งเกิดจากผิวของมะเร็งที่มีเนื้อ เน่าตายและหลุดออกเป็นแผล นอกจากนี้ในมะเร็งชนิด non-keratinizing จะพบลักษณะของ tumor diathesis โดย เซลล์ในระยะนี้จะมีลักษณะคล้าย HSIL [3, 109]



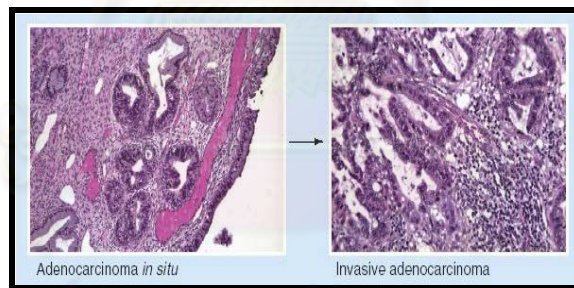
### รูปที่ 8 แสดงเซลล์ของเยื่อบุสแควมัสของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV [11]

รอยโรคก่อนมะเร็งและมะเร็งของเยื่อบุต่อม (Precancerous Glandular lesions) (รูปที่ 9)

**Adenocarcinoma in Situ (AIS)** เยื่อบุต่อมภายในปากมดลูกผิดปกติ โดยที่นิวเคลียสจะเกิด nuclear atypia นอกจากนี้ยังพบไซโทพลาซึม (cytoplasm) ในปริมาณน้อยทำให้มีปริมาณ nuclear-cytoplasmic ratio สูงกว่าปกติ และเซลล์เยื่อบุมีการเรียงตัวซ้อนกันหลายชั้นเกิดเป็น papillary structure หรือ cribriform pattern บริเวณขอบของกลุ่มเซลล์พบ palisading และ feathering ของนิวเคลียส และยังสามารถพบการเกิด mitosis หรือ apoptosis ร่วมด้วย การเกิดรอยโรคประเภทนี้มักพบว่าเกิดร่วมระยะ squamous intraepithelial lesion (SIL) [110] แต่ในปัจจุบันการเรียกชื่อในระบบนี้ยังไม่ค่อยเป็นที่แพร่หลายเนื่องจากรอยโรคชนิดนี้พบได้น้อยกว่ารอยโรคของเยื่อบุต่อมมาก และยังมีข้อมูลที่ใช้สำหรับการวินิจฉัยน้อยมาก [111, 112]

**Endocervical Adenocarcinoma** ลักษณะความผิดปกติทางเซลล์วิทยามากกว่า AIS ในระยะนี้จะสามารถพบเซลล์มะเร็งได้อย่างชัดเจนโดยพบเซลล์มะเร็งเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น บริเวณขอบของกลุ่มเซลล์พบ palisading และ feathering ของนิวเคลียส ในระยะนี้จะพบนิวเคลียสขนาดใหญ่และสามารถสังเกตเห็น nucleolus ได้ชัดเจน [110]

**Small Cell Carcinoma** ลักษณะความผิดปกติของเซลล์มีขนาดเล็กเนื่องจากมีไซโทพลาซึม (cytoplasm) อยู่่น้อยมากหรือแทบไม่มี พบการเรียงตัวของนิวเคลียสจับตัวเป็นกลุ่ม [113, 114]



รูปที่ 9 แสดงเซลล์ของเยื่อบุต่อมของมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อ HPV [11]

รอยโรคที่ไม่สามารถแปลผลได้ สามารถจำแนกได้เป็น atypical squamous cells และ atypical glandular (Endocervical) cells [115]

**Atypical Squamous Cells (ASC)** เซลล์เยื่อบุชนิดสแควมัสมีความผิดปกติทางเซลล์วิทยาแต่ไม่สามารถที่จะแปลผลเป็น SIL ได้เนื่องจากมีจำนวนเซลล์หรือหรือคุณลักษณะทางเซลล์วิทยาไม่เพียงพอที่จะแปลผลได้

**Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US)** นิวเคลียสมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ 1-1.5 เท่า และมักพบการเกิด keratinization ของไซโทพลาซึม (cytoplasm) ร่วมกับลักษณะความผิดปกติของนิวเคลียส

Atypical Squamous Cells, cannot Exclude High-Grade Squamous Intraepithelial lesion (ASC-H) นิวเคลียสมีขนาดโตขึ้น 1.5-2.5 เท่า มีลักษณะของเซลล์โดยรวมคล้ายกับ HSIL นิวเคลียสมีรูปร่างไม่เป็นระเบียบ

Atypical Glandular Cells (AGC) เซลล์เยื่อบุโพรงมดลูก หรือเซลล์เยื่อต่อมปากมดลูก มีความผิดปกติแต่ไม่สามารถที่จะแปลผลเป็น AIS หรือ adenocarcinoma มีจำนวนเซลล์หรือหรือคุณลักษณะทางเซลล์วิทยาไม่เพียงพอที่จะแปลผลได้อย่างมั่นใจ โดยที่เซลล์มีนิวเคลียสโตขึ้นและมีรูปร่างที่ผิดปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าไซโทพลาซึม (cytoplasm) มีขนาดเล็กลง รูปแบบของ chromatin มีความผิดปกติ [116, 117] สามารถแบ่งได้ดังนี้

Atypical Endometrial Cells เซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกผิดปกติแต่ไม่สามารถแปลผลได้

Atypical Endocervical Cells, not otherwise Specified/ Atypical Endocervical cells, Favor reactive และ Atypical Endocervical cells, Favor Neoplasia คือเซลล์เยื่อต่อมมีความผิดปกติแต่ไม่สามารถแปลผลได้

### วัคซีนที่ใช้ในการป้องกันเชื้อ HPV

ในปัจจุบันการติดเชื้อ HPV เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสามารถก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ จึงทำให้นักวิจัยมากมายมีความสนใจที่จะป้องกันการติดเชื้อจาก HPV โดยการคิดค้นวัคซีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของมนุษย์ให้สามารถสามารถต่อต้านการติดเชื้อ HPV แบบทั้งชนิดความเสี่ยงสูงและความเสี่ยงต่ำ ที่สามารถพบได้บ่อยในการติดเชื้อ จากการสำรวจทั่วโลก พบชนิดของ HPV ที่พบบ่อยทั้งสิ้น 12 ชนิด ได้แก่ HPV16 (57%), 18 (16%), 58, 33, 45, 31, 52, 35, 59, 39, 51 และ 56 [118, 119] ดังนั้นจากการสำรวจ ถ้าให้วัคซีนที่มีความจำเพาะกับ HPV 16/18 จะสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกทั่วโลกได้ประมาณร้อยละ 70-76 ทำให้ในปัจจุบันวัคซีนถือว่าเป็นสิ่งสำคัญต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้วิธีหนึ่ง

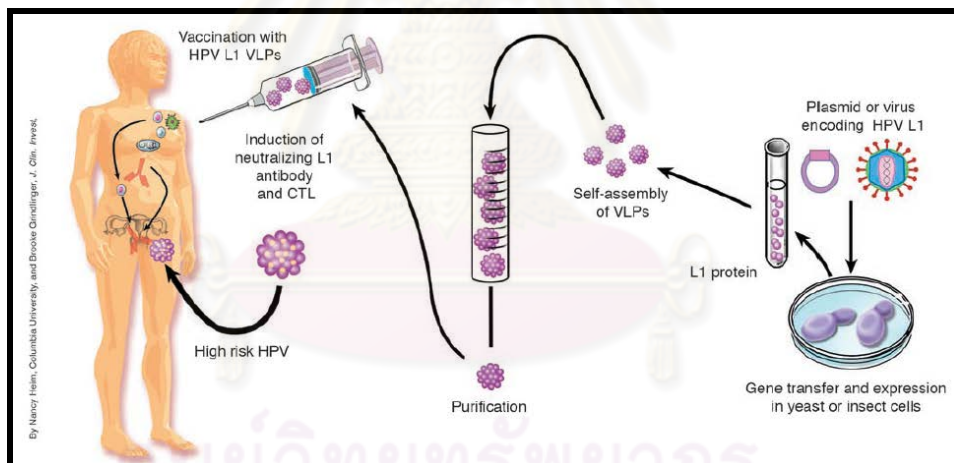
ส่วนประกอบของ HPV วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันนิยมนำเปลือกหุ้มโปรตีนของเชื้อ HPV หรือ capsid protein โดยนำไปโปรตีนห่อหุ้มหลัก L1 protein มาทำเป็นวัคซีน โดยที่ไม่มีโปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง การผลิตวัคซีนจะนำมาทำให้เกิดไวรัสลูกผสม (recombinant) ในเซลล์ baculovirus หรือ เซลล์ยีสต์ เพื่อเพิ่มจำนวนโปรตีน L1 คุณสมบัติพิเศษเมื่อมีปริมาณมากโปรตีน L1 จะสามารถประกอบตัวกันเอง (self-assemble) เป็นอนุภาคที่มีลักษณะคล้ายไวรัส virus-like particles (VLP) และมีคุณสมบัติทาง antigen คล้ายกับเชื้อ HPV ชนิดที่มาทำเป็นวัคซีนทุกประการ แต่ไม่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ โดยวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบัน จะมีลำดับ นิวคลีโอไทด์เหมือนกับโปรตีน L1 ของเชื้อ HPV ที่นำมาเป็นสารตั้งต้นในการสร้างวัคซีน [120, 121] แอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีน HPV L1 VLPs เป็นชนิดที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ HPV ที่นำมาผลิตเท่านั้น [122]

ปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิตวัคซีน HPV อยู่ 2 บริษัท คือ GlaxoSmithKline ผลิตวัคซีนที่ชื่อว่า Cervarix สามารถป้องกันได้ 2 สายพันธุ์ bivalent (16, 18) ซึ่งป้องกันมะเร็งปากมดลูกได้มากกว่า 70% และ MSD Pharmaceuticals Private Limited ผลิตวัคซีนที่ชื่อว่า Gardasil สามารถป้องกันได้ 4 สายพันธุ์ Quadrivalent (6, 11, 16, 18) ซึ่งป้องกันมะเร็งปากมดลูกได้มากกว่า 90% และยังช่วยป้องกันหูดหงอนไก่ได้ด้วย จากการศึกษาวัดขึ้น Cervarix ในหญิงวัยรุ่นและวัยเจริญพันธุ์ โดยการฉีดวัคซีน 3 ครั้ง ในเดือนที่ 0, 1 และ 6 และวัคซีน Gardasil ใน



หญิงวัยรุ่นและวัยเจริญพันธุ์ โดยการฉีดวัคซีน 3 ครั้ง ในเดือนที่ 0, 2 และ 6 พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HPV 16, 18 ได้เป็นอย่างดี จากรายงานพบว่าวัคซีนทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงถึงร้อยละ 99.7 ในการป้องกันการติดเชื้อ HPV ชนิด 16, 18 นอกจากนี้ยังทำให้ไม่เกิดสภาวะผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก (cervical dysplasia) หลังจากที่ได้รับการฉีดวัคซีนเลย [123, 124] ในปัจจุบันมีการปรับปรุงรูปแบบของวัคซีนให้สามารถป้องกันเชื้อ HPV แบบ trivalent หรือ pentavalent โดยเพิ่มความจำเพาะต่อการติดเชื้อ HPV ชนิด 58 เข้าไปด้วย [125] และมีการใช้ L2 เป็นส่วนประกอบร่วมกับ L1 ของเชื้อ HPV ในการผลิตวัคซีนเพื่อเพิ่มความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ HPV [126] เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวัคซีนผลิตจากโปรตีน L2 ป้องกันการติดเชื้อ HPV ได้มากกว่า L1 - VLPs ของ HPVs เนื่องจากบริเวณโปรตีน L2 มีความจำเพาะกับ HPV หลายชนิดมากกว่าบริเวณโปรตีน L1 [124] แต่ก็ยังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาก่อนที่จะนำมาใช้ในการรักษาจริง

การทำงานของ HPV วัคซีนในการป้องกันมะเร็งปากมดลูก VLP สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง neutralizing antibody (IgG) ต่อต้านเชื้อ HPV โดยแอนติบอดีนี้จะออกจากกระแสเลือดเข้าสู่ปากมดลูกในบริเวณ transformation zone ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการติดเชื้อของไวรัสทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ [127, 128] และยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune response เช่น cytotoxic T cell (CTL) response ได้ด้วย [129]



รูปที่ 10 แสดงการผลิตวัคซีน HPV และการทำงานของ HPV วัคซีน [129]

### การตรวจหาการติดเชื้อ HPV ทางอณูชีววิทยาในปัจจุบัน

การตรวจหา HPV DNA เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ HPV ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ทำให้ต้องการมีตรวจหา HPV DNA จากเซลล์ที่มีการติดเชื้อซึ่งในปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีหลัก [130]

Non-Amplified Methods เป็นการตรวจหา HPV DNA โดยไม่ผ่านการเพิ่มจำนวนไวรัสก่อนการตรวจวัด ยกตัวอย่างเช่น *in situ* hybridization (ISH), Immunohistochemistry ซึ่งเทคนิคเหล่านี้สามารถตรวจ HPV DNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ก็ได้แต่มี sensitivity ต่ำและไม่สามารถจำแนกชนิดของ HPV ได้ นอกจากนี้ ยังมีเทคนิค

Southern blot ซึ่งในอดีตใช้เป็น gold standard ของการตรวจหาการติดเชื้อแต่ข้อเสียของวิธีนี้คือความยุ่งยาก ต้องใช้ความชำนาญสูงในการตรวจ และใช้ปริมาณตัวอย่างมากสำหรับการวิเคราะห์

Signal Amplification Method เป็นการขยายสัญญาณด้วยวิธี RNA-DNA hybridization ไม่ได้เป็นการเพิ่มจำนวน HPV DNA วิธีนี้จะใช้ HPV RNA probes เข้าไปจับคู่กับ DNA ของ HPV เป้าหมาย นำไปทำปฏิกิริยากับ monoclonal antibody และสารเคมีเรืองแสง แล้วนำไปวัดปริมาณแสงที่ปล่อยออกมา แสดงผลเป็น relative light unit (RLU) เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงมาตรฐาน ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ HPV DNA ในเซลล์ตัวอย่าง ระบบที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เรียกว่า Hybrid Capture 2 (HC2) มีความไวในการตรวจหาเชื้อ HPV ประมาณ 1 พิโคกรัม ต่อมิลลิลิตร(pg/mL) หรือต่ำกว่า และจะให้ผลบวก เมื่อมีเชื้อมากกว่า 5,000 สำเนา/ตัวอย่าง ( 5,000 copies/sample ) วิธีนี้มีใช้ในทางคลินิกทั่วไปเนื่องจาก สามารถให้ผลได้รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก และมีความแม่นยำสูงแต่ไม่สามารถที่จะวิเคราะห์แยกชนิดของ HPV ได้ ทำได้แค่แยกกลุ่มความเสี่ยงสูงหรือต่ำเท่านั้น นอกจากนี้ Signal amplified methods Signal Amplification method ยังสามารถจำแนกเป็นเทคนิคต่างๆได้ดังนี้

Target Amplification Methods เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือการเพิ่มจำนวน DNA ไวรัสก่อนการตรวจวัด ซึ่งมีความไวในการตรวจหาเชื้อในระดับสูงและมีความจำเพาะสูงกว่า โดยจะให้ผลบวกเมื่อ HPV มากกว่า 100-480 สำเนา/มิลลิลิตร (100-480 copies/mL) ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธีนี้ได้ เช่น เนื้อเยื่อสด เนื้อเยื่อใน paraffin หรือเซลล์จากการ Pap smear เนื้อเยื่อใน paraffin อาจทำให้ชนิด DNA แตกเป็นชิ้นย่อยๆ ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้ ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องมีการควบคุมคุณภาพของการทดลองอย่างเข้มงวด เพราะมีโอกาสปนเปื้อนได้ และอาจใช้เวลานานในการตรวจวัด

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และใช้เอนไซม์ restriction endonuclease ตัดผลผลิตของ PCR เพื่อแยกชนิดของเชื้อ HPV ที่แตกต่างกัน เนื่องจาก HPV แต่ละชนิดก็จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันทำให้มีจุดตัดของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

General primer PCR-Enzyme immunoassay (GP-PCR-EIA) เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุม HPV 20 สายพันธุ์ด้วยการทำ PCR โดยใช้ universal primer GP5+/GP6+ (primer 1 คู่) และได้ PCR product ขนาด 150 คู่เบสในบริเวณยีน L1 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสร็จสิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV ด้วยวิธี enzyme immunoassay หรือ ELISA ซึ่งอาศัย probe ที่จำเพาะกับ HPV แต่ละชนิด [131, 132]

Linear array HPV genotyping test เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุมกับ HPV 37 สายพันธุ์แบ่งเป็นกลุ่มความเสี่ยงสูง 16 สายพันธุ์ กลุ่มความเสี่ยงต่ำ 21 สายพันธุ์ ด้วยการทำ multiplex PCR โดยใช้ PGMY primer และได้ PCR product ขนาด 450 คู่เบสในบริเวณยีน L1 ในขั้นตอนการทำ PCR จะมี  $\beta$ -globins เป็น internal control และมี uracil-N-glycosylase (UNG) สำหรับใช้ทำลายผลผลิตของ PCR อื่นที่อาจมาปนเปื้อนในขั้นตอน



การเตรียม PCR ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนได้ เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสิร์จิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV ด้วยวิธี hybridization ซึ่งอาศัย probe ที่จำเพาะกับ HPV แต่ละชนิด [133, 134]

AMPLICOR® HPV Test เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุม HPV ความเสี่ยงสูง 13 สายพันธุ์ด้วยการทำ multiplex PCR โดยใช้ Roche Amplicor primer และได้ PCR product ขนาด 170 คู่เบสในบริเวณยีน L1 ในขั้นตอนการทำ PCR จะมี  $\beta$ -globins เป็น internal control และมี uracil-N-glycosylase (UNG) สำหรับใช้ทำลายผลผลิตของ PCR อื่นที่อาจมาปนเปื้อนในขั้นตอนการเตรียม PCR ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนได้เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสิร์จิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV ด้วยวิธี hybridization ซึ่งอาศัย probe ที่จำเพาะกับ HPV แต่ละชนิด การอ่านผลจะใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่ง primer จากการทำ PCR มีการติดฉลากด้วย biotin ทำให้ผลผลิตของ PCR มี biotin ติดอยู่จากนั้นจะนำผลิตภัณฑ์ PCR hybridization ลงบน microtiter plate ที่มี cocktail probe ติดอยู่ และเมื่อเติม streptavidin ที่ติดอยู่กับเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) streptavidin จะจับกับ biotin ที่ติดอยู่กับผลิตภัณฑ์ PCR ทำให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับ cocktail probe ที่อยู่บน microtiter plate ได้ซึ่งเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน substrate เช่น 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) ส่งผลให้เกิดสีบน microtiter plate ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถให้ผลได้รวดเร็วในการวิเคราะห์ผล และมีความไว (sensitivity) และความแม่นยำในการตรวจหาเชื้อในระดับสูง แต่วิธีการตรวจนี้ไม่สามารถที่จะจำแนกแต่ละสายพันธุ์ได้ เพียงแต่บอกได้ว่าการติดเชื้อ HPV ในกลุ่มความเสี่ยงสูงหรือไม่ [130, 135]

Line probe assay (LiPA) HPV assay เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุม HPV 25 สายพันธุ์ด้วยการทำ multiplex PCR โดยใช้ SPF<sub>10</sub> PCR primer set และได้ PCR product ขนาด 65 คู่เบสในบริเวณยีน L1 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสิร์จิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV ด้วยวิธี hybridization ซึ่งอาศัย probe ที่จำเพาะกับ HPV แต่ละชนิด โดยมี probe ทั้งหมด 25 ชนิดถูกเคลือบอยู่บนแผ่น membrane การอ่านผลจะใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่ง primer จากการทำ PCR มีการติดฉลากด้วย biotin ทำให้ผลผลิตของ PCR มี biotin ติดอยู่จากนั้นจะนำผลิตภัณฑ์ PCR hybridization ลงบน membrane และเมื่อเติม streptavidin ที่ติดอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase streptavidin จะจับกับ biotin ที่ติดอยู่กับผลิตภัณฑ์ PCR ทำให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับ membrane ได้ ซึ่งเอนไซม์ alkaline phosphatase จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน substrate ส่งผลให้เกิดเป็นแถบสีม่วงน้ำตาลบน membrane จากการเปลี่ยนสีของ chromogen เช่น 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) ตรงกับตำแหน่งที่ผลผลิตของ PCR จับกับ probe แต่ละสายพันธุ์ของ HPV [136, 137] ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถให้ผลได้รวดเร็วในการวิเคราะห์ผล และมีความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อในระดับสูง [138]

DNA Microarray เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุม HPV 53 สายพันธุ์ด้วยการทำ multiplex PCR โดยใช้ type-specific primer และได้ PCR product ขนาดตั้งแต่ 105-258 คู่เบสขึ้นกับชนิดของ HPV ในบริเวณ 3' ของยีน E1 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสิร์จิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV โดยใช้หลักการ

microarray โดยมี probe ทั้งหมด 53 ชนิดถูกเคลือบอยู่บนแผ่น microarray การอ่านผลจะใช้การเรืองแสงของสาร fluorescence ซึ่ง primer จากการทำ PCR มีการติดฉลากด้วย digoxigenin-labeled ทำให้ผลผลิตของ PCR มี digoxigenin-labeled ติดอยู่จากนั้นจะนำผลิตภัณฑ์ PCR hybridization ลงบน microarray แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 635 นาโนเมตร จะได้การเรืองแสงสีแดงที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของ HPV [139]

Kurabo GeneSquare Microarray Assay เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุม HPV 23 สายพันธุ์ด้วยการทำ multiplex PCR โดยใช้ type-specific primer และได้ PCR product ขนาดตั้งแต่ 130-492 คู่เบสขึ้นกับชนิดของ HPV ในบริเวณยีน L1 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสร็จสิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV โดยใช้หลักการ microarray โดยมี probe ทั้งหมด 25 ชนิดถูกเคลือบอยู่บนแผ่น microarray การอ่านผลจะใช้การเรืองแสงของสาร fluorescence ซึ่ง primer จากการทำ PCR มีการติดฉลากด้วย biotin และ cyanine 3 ทำให้ผลผลิตของ PCR มี biotin และ cyanine 3 ติดอยู่จากนั้นจะนำผลิตภัณฑ์ PCR hybridization ลงบน microarray แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร จะได้การเรืองแสงสีเขียวที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของ HPV [140]

PapilloCheck test เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ซึ่งครอบคลุม HPV 24 สายพันธุ์ด้วยการทำ multiplex PCR โดยใช้ type-specific primer และได้ PCR product ขนาด 350 คู่เบสขึ้นกับชนิดของ HPV ในบริเวณยีน E1 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเสร็จสิ้นจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ HPV โดยใช้หลักการ microarray โดยมี probe ทั้งหมด 25 ชนิดถูกเคลือบอยู่บนแผ่น DNA chip การอ่านผลจะใช้การเรืองแสงของสาร fluorescence ซึ่ง primer จากการทำ PCR มีการติดฉลากด้วย biotin และ Cy5-labelled oligoprobe ทำให้ผลผลิตของ PCR มี biotin และ Cy5-labelled oligoprobe ติดอยู่จากนั้นจะนำผลิตภัณฑ์ PCR hybridization ลงบน DNA chip แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 532-635 นาโนเมตร และวิเคราะห์ผลที่ได้ผ่าน CheckReport™ Software [141]

การตรวจหา HPV Viral load เป็นการหาปริมาณของไวรัส HPV ที่มีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก โดยออกแบบ primer และ probe ให้มีความจำเพาะกับ HPV โดยใช้เทคนิค real-time quantitative PCR ซึ่งเป็นการวัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้เครื่อง thermal cycler real-time PCR ที่สามารถวัดปริมาณ DNA จากหลอดทดลองโดยตรง และเป็นการทำในระบบปิดจึงสามารถช่วยลดการปนเปื้อนซึ่งเป็นปัญหาหลักของการทำ PCR ได้ [142, 143]

การตรวจหา HPV integration เป็นการหาการรวมตัวของจีโนมไวรัสเข้ากับ host โดยศึกษาจาก บริเวณ E2 ของไวรัสเนื่องจากพบว่าเมื่อมีการรวมตัวเข้ากับ host E2 จะเสียดหายไป [144, 145] และถ้าหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี viral load จากยีน E6 และ E2 พบว่าถ้าอัตราส่วน copy number ของ E6 ต่อ E2 มากกว่า 2 เท่าก็บ่งชี้ได้ว่าจีโนมไวรัสมีการรวมตัวเข้ากับ host ซึ่งเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง [143, 146, 147]

การตรวจหา HPV methylation เป็นการหา DNA methylation เกิดขึ้นได้หลายตำแหน่งในกระบวนการเกิดมะเร็งที่บริเวณยีนต้านมะเร็งหรือยีนของไวรัส ได้แก่ DNA methylation ของ E2, E6 และ E7 ของ HPV หรือยีน SOCS1, CDH1, TIMP3, GSTP1, DAPK, hTERT, CDH13, HSPA2, MLH1, RASSF1A และ SOCS2 ในเนื้อเยื่อปากมดลูก ซึ่งในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งมักจะเกิด global hypomethylation ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในการเกิดมะเร็งปากมดลูก [148] ตัวอย่างของเทคนิคที่สามารถใช้หาการเกิด DNA methylation เช่น

Sanger DNA sequencing, methylation-specific PCR และ chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays เป็นต้น [149, 150]

การตรวจหา mRNA จาก HPV โดยอาศัยหลักการ reverse transcriptase PCR (RT-PCR) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหา messenger RNA (mRNA) โดยทำการเปลี่ยน mRNA ของเชื้อ HPV ให้เป็น complementary DNA (cDNA) ก่อนแล้วจึงทำการเพิ่มจำนวน DNA ในการตรวจวัด ซึ่งก็อาจใช้หลักการ PCR หรือ real-time PCR ก็ได้ ในปัจจุบันนิยมตรวจหาในบริเวณ E6 และ E7 ของไวรัส HPV เนื่องจากเป็นยีนมะเร็งของไวรัส ซึ่งการพบปริมาณ E6 และ E7 สูงสามารถใช้เป็นตัวทำนายการเกิดมะเร็งได้ [151, 152]

PreTect HPV Proofer (NorChip) ใช้ในการตรวจหา E6/E7 mRNA เพื่อหาความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกและการตรวจหามะเร็ง ซึ่งมีความจำเพาะสูง แต่ด้วยวิธีการนี้ครอบคลุม HPV ชนิดก่อมะเร็งเพียงแค่ 5 สายพันธุ์ HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 และ HPV45 และมีความไว (sensitivity) ในการตรวจวิเคราะห์ต่ำ

NucliSens Easy-Q HPV (bioMérieux) ใช้ในการตรวจหา E6/E7 mRNA เพื่อหาความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกและการตรวจหามะเร็ง ซึ่งมีความจำเพาะสูง แต่ด้วยวิธีการนี้ครอบคลุม HPV ชนิดก่อมะเร็งเพียงแค่ 5 สายพันธุ์ HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 และ HPV45 และมีความไว (sensitivity) ในการตรวจวิเคราะห์ต่ำ [153]

Aptima HPV-Test from GenProbe ใช้ในการตรวจหา E6/E7 mRNA เพื่อหาความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกและการตรวจหามะเร็ง ครอบคลุม HPV ในกลุ่มความเสี่ยงสูงเพิ่มขึ้นเป็น 14 สายพันธุ์ และมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้นกว่าวิธีของ PreTect HPV Proofer และ NucliSens Easy-Q HPV [154]

เนื่องจากข้อมูลความรู้ที่กล่าวมาข้างต้นของการเกิดมะเร็งปากมดลูกจากการติดเชื้อ HPV ประกอบกับเทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้เกิดการพัฒนาเทคนิคในการตรวจการแสดงออกของยีน E4 ด้วยเทคนิค single step Real-time RT-PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ มีความจำเพาะสูงในการตรวจวัด และสามารถวัดเชิงปริมาณได้ การแสดงออกของยีน E4 ในระดับ transcription ของ HPV genome หลังจากที่เข้าไปยัง Host cell ซึ่งจะพบเมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ปากมดลูก ทำให้สามารถวินิจฉัยได้ว่าการติดเชื้อ HPV และมีการทำงานของไวรัสในเซลล์ ถ้าพบว่ายีนไวรัสมีการแสดงออกในระดับ mRNA นอกจากนี้ยีน E4 ยังสามารถพบการแสดงออกของไวรัสได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง (LSIL) จนถึงระยะที่เป็นมะเร็ง ทำให้บอกแนวโน้มของผู้ป่วยว่ามีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูกโดยไม่ต้องตรวจยีนอื่นอีก

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงการทดลอง (Experimental Research, Analytic Study, Cross-sectional) โดยการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee), EC 381/2010 และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (National Cancer Institute of Thailand Ethics Committee), EC 136/2009

#### ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ในเชื้อ Human papillomavirus จากผู้ป่วยที่มีผลทางเซลล์วิทยา (cytology) ภาวะ Normal, LSIL, HSIL และ cervical carcinomas ในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค Real-Time RT-PCR

##### การคัดเลือกตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน E4

การทดลองนี้ได้นำตัวอย่างจากการศึกษาความชุกและจีโนไทป์ของการติดเชื้อไวรัส HPV ของมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทย [9, 10] ที่ทราบ genotype แล้วมาวิเคราะห์ผลการแสดงออก โดยการทดลองดังกล่าวได้ทำการหาจีโนไทป์จากบริเวณยีน E1 ของ HPV เนื่องจากครอบคลุมชนิดของไวรัส HPV มากกว่าชุดตรวจที่ใช้กันในปัจจุบัน และจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการติดเชื้อ HPV genotype 16 เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไปในทุกระยะของการเป็นมะเร็งปากมดลูก ซึ่งมีโอกาสพบได้มากที่สุดในประเทศไทย และยังมีโอกาสพบสูงในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกอีกด้วย [9]

##### การศึกษาการแสดงออกของยีน E4

เก็บตัวอย่างจากประชากรที่มาทำการตรวจมะเร็งปากมดลูก โดยสุ่มตัวอย่างจากสตรีที่เข้ารับการตรวจจากทางโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลสมิติเวช และ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

##### การคำนวณขนาดตัวอย่าง

คำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อหาว่าโอกาสที่จะตรวจพบระดับการแสดงออกยีน HPV E4 genotype 16 ของมะเร็งปากมดลูกในระยะ Normal, LSIL, HSIL และ cervical carcinomas ที่มีโอกาสพบมีจำนวนเท่าใด โดยใช้ข้อมูลจากการทำ pilot study มาคำนวณเพื่อกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้การวิเคราะห์อำนาจการทดสอบ (power analysis) [155] และกำหนดอำนาจการทดสอบ (power) เท่ากับ 0.99 ที่ระดับความเชื่อมั่น .05

การกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างกรณีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ขนาดผลการทดลอง (ES) สำหรับการกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่าง มีสูตรการคำนวณและมีขนาดต่าง ๆ ดังนี้

$$f = \frac{\sigma_m}{\sigma}$$

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\sigma = SD$$

เมื่อ  $\bar{x}_i$  = ค่าเฉลี่ยของกลุ่ม

$\bar{x}$  = ค่าเฉลี่ยรวมของทุกกลุ่ม

n = จำนวนกลุ่ม

ต้องการหาปริมาณตัวอย่างที่เพียงพอต่อการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน HPV E4 โดยทำการ pilot study จากเซลล์ที่แตกต่างกัน 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ตารางที่ใช้สำหรับการคำนวณขนาดตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง	1	2	3	4	ค่าเฉลี่ย
	5.15	6.19	5.79	15.88	
	7.89 □	4.38	2.95	17.9	
	1.34	5.14	-0.34	14.98	
	5.86	5.47 □	5.37	12.91	
(ค่าเฉลี่ย)	5.06	5.30	3.44	15.42	7.31

$$SD = 5.3$$

$$f = \frac{\sigma_m}{\sigma}$$

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{(5.06 - 7.31)^2 + \dots + (15.42 - 7.31)^2}{4}} = \sqrt{22.46} = 4.74$$

$$\sigma = 5.3$$

$$f = 4.74/5.3 = 0.9$$



จากนั้นนำค่าที่ได้เทียบกับในตารางของ Cohen's (รูปที่ 11) [155] โดยกำหนดอำนาจการทดสอบ (Power) เท่ากับ 0.99 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % พบว่าขนาดตัวอย่างที่ต้องทำการศึกษาจากกลุ่ม Normal, LSIL, HSIL และ cervical carcinomas เท่ากับกลุ่มละอย่างน้อยจำนวน 10 ตัวอย่าง

### 384 8 F TESTS ON MEANS IN THE ANALYSIS OF VARIANCE AND COVARIANCE

Table 8.4.4  
n to detect f by F test at  $\alpha = .05$   
for  $u = 1, 2, 3, 4$

Power	$\frac{u}{f} = 1$											
	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.50	.60	.70	.80
.10	84	22	10	6	5	4	3	3	2	--	--	--
.50	769	193	86	49	32	22	17	13	9	7	5	4
.70	1235	310	138	78	50	35	26	20	13	10	7	6
.80	1571	393	175	99	64	45	33	26	17	12	9	7
.90	2102	526	234	132	85	59	44	34	22	16	12	9
.95	2600	651	290	163	105	73	54	42	27	19	14	11
.99	3675	920	409	231	148	103	76	58	38	27	20	15

Power	$\frac{u}{f} = 2$											
	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.50	.60	.70	.80
.10	84	22	10	6	5	4	3	3	2	--	--	--
.50	662	166	74	42	27	19	15	11	8	6	5	4
.70	1028	258	115	65	42	29	22	17	11	8	6	5
.80	1286	322	144	81	52	36	27	21	14	10	8	6
.90	1682	421	188	106	68	48	35	27	18	13	10	8
.95	2060	515	230	130	83	58	43	33	22	15	12	9
.99	2855	714	318	179	115	80	59	46	29	21	16	12

Power	$\frac{u}{f} = 3$											
	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.50	.60	.70	.80
.10	79	21	10	6	4	3	3	2	2	--	--	--
.50	577	145	65	37	24	16	13	10	7	5	4	3
.70	881	221	99	56	36	25	19	15	10	7	6	5
.80	1096	274	123	69	45	31	23	18	12	9	7	5
.90	1415	354	158	89	58	40	30	23	15	11	8	7
.95	1718	430	197	108	70	49	36	28	18	13	10	8
.99	2353	589	262	148	95	66	49	38	24	17	13	10

รูปที่ 11 ตารางที่ใช้สำหรับกำหนดขนาดตัวอย่าง

#### วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย (Materials)

สถานที่และอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง : ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### 1. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

- 1.1 LBC (Thin Prep<sup>®</sup>, Hologic, West Sussex, UK)
- 1.2 Phosphate Buffered Saline (PBS Tablets) (Bio Basic Inc., Cat no. D0435)
- 1.3 Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml) (GIBCO, Cat no.15140-122)



## 2. สารเคมีสำหรับสกัด nucleic acid

- 2.1 Sodium acetate anhydrous (SIGMA, Cat no. S-2889)
- 2.2 Sodium chloride (BDH Laboratory Supplies, Cat no. 102415K)
- 2.3 EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Cat no. 15700)
- 2.4 Tris, Ultrapure, Molecular Biology Grade (Research Organics, Cat no. 9680T)
- 2.5 Boric acid, ACS Reagent (Research Organics, Cat no. 1748B)
- 2.6 Chloroform (SIGMA, Cat no. C-2432)
- 2.7 TRIZMA Hydrochloride (SIGMA, Cat no. T-7149)
- 2.8 Iso-amyl alcohol (BDH Laboratory Supplies, Cat no. 27212)
- 2.9 Phenol, Saturated (PIERCE, Cat no. 17914)
- 2.10 Glycogen (USB, Cat no. 16445)
- 2.11 Mercaptoethanol (Pharmacia Biolab, Cat no. 17-1317-01)
- 2.12 Ethanol (BDH Laboratory Supplies, Cat no. 10107)
- 2.13 Isopropanal (SIGMA, Cat no. I-9516)
- 2.14 Guanidine Thiocyanate Ultrapure (USB, Cat no. 75818)
- 2.15 SDS (Pharmacia Biotech, Cat no. 17-1313-01)
- 2.16 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Cat no.)

## 3. สารเคมีที่ใช้ในการกำจัด genomic DNA

- 3.1 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Cat no. M6101)

## 4. สารเคมีสำหรับการทำ PCR และ Real-Time PCR

- 4.1 2X Reddy MIX PCR Master Mix (Thermo scientific industry, Cat no.)

- 4.1 RealMasterMix RT-PCR Probe (5Prime, Cat no.)
- 4.2 TaqMan probe (Oligo company)
- 4.3 SYBR Green I dry (Applied Biosystems, Cat no. 4309155)

#### 5. สารเคมีสำหรับการทำ agarose gel electrophoresis และการย้อม DNA

- 5.1 GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Cat no. SM0321)
- 5.2 Agarose, low EEO, Molecular Biology Grade (Research Organics, Cat no. 1170A)
- 5.3 SeaKem LE agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Cat no. 50004)
- 5.4 Ethidium bromide (SIGMA, Cat no. E-1510)

#### 6. สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR บริสุทธิ์

- 6.1 HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Cat no.)

#### 7. วัสดุและสารเคมีสำหรับการ cloning และ transformation ใน *E.coli*

- 7.1 pGEM-T Easy Vector System for T/A cloning strategy (Promega, Cat no. A1360)
- 7.2 One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen, Cat no. C4040-03)
- 7.3 X-Gal (Promega, Cat no. V3941)
- 7.4 IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoide) (Eppendorf, Cat no. 0032006.353)
- 7.5 Tryptone powder (BIO BASIC INC., Cat no. G211)
- 7.6 Yeast Extract (GIBCO, Cat no. 20047-056)
- 7.7 Agar Bacteriological (GIBCO, Cat no. 20001-020)
- 7.8 FastPlasmid Mini (Eppendorf, Cat no. 955150601)

#### 8. อุปกรณ์ทั่วไป

- 8.1 MicroAmp PCR tube (Perkin Elemer)
- 8.2 Pipet tip: 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1,000  $\mu$ l (AxyGen<sup>®</sup> Scientific)

- 8.3 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml และ 2.0 ml (AxyGen<sup>®</sup> Scientific)
- 8.4 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (AxyGen<sup>®</sup> Scientific)
- 8.5 Glassware : Beaker, Flask, Reagent bottles และ Cylinder (Pyrex)
- 8.6 Parafilm (American Nation Can)
- 8.7 Stirring-magnetic bar

## 9. เครื่องมือ

- 9.1 Automatic adjustable micropipette (Eppendorf)
- 9.2 Vortex mixer (Scientific industry)
- 9.3 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne)
- 9.4 Centrifuge (Beckman GS-6R)
- 9.5 Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich)
- 9.6 Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf)
- 9.7 Power supply model 250 (Giboco BRL)
- 9.8 Multi-block heater (Lab-line)
- 9.9 Gel Transilluminator (Biogenomed)
- 9.10 Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf)
- 9.11 Thermal paper (Bio-RAD, USA)
- 9.12 Refrigerator 4°c (Mitsubishi)
- 9.13 Freezer -20°c (Philco)
- 9.14 Freezer -70°c (Forma Scientific)
- 9.15 Water Purification equipment (Water pro Ps)
- 9.16 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey)

- 9.17 Balance (PB1502 Mettler Toledo)
- 9.18 Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research)
- 9.19 PCR Cabinet (Augusta)
- 9.20 Microwave oven (Sanyo)
- 9.21 Class II Microbiological Safety Cabinet (Envair)
- 9.22 Orbital incubator S150 (Stuart)
- 9.23 Hot air oven (Mettler)
- 9.24 ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

#### 10. โปรแกรมสำหรับ bioinformatics และการวิเคราะห์ข้อมูล

- 10.1 CLUSTAL X program (version 1.8)
- 10.2 OLIGOS primer design software (version 9.1)
- 10.3 BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1)
- 10.4 FastPCR (version 3.8.20)
- 10.5 Chromas Lite (version 2.01)
- 10.6 Rotor-Gene 3000 (version 6.0; Corbett Research)
- 10.7 SPSS for Windows (version 16.0)

#### วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

##### ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิจัยมะเร็งปากมดลูกเพื่อนำความรู้ที่ได้ไปวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการติดตามเชื้อ HPV ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกในการตรวจผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก รวมทั้งเป็นการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ HPV ที่สะดวก รวดเร็ว มีความไว และความแม่นยำ เพื่อช่วยในการวินิจฉัยอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยในการทดลอง กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ ผู้เข้ารับการตรวจรักษาโดยแพทย์มะเร็งนรีเวช สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยได้ผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ และตัวอย่างที่มีอยู่แล้วที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิกคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย โดยแพทย์จะเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก ตั้งแต่ครั้งแรกที่มาตรวจ ในการทดลองจะไม่มีเปิดเผยชื่อหรือข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้ารับการรักษา และมีการขออนุญาตผู้ร่วมการวิจัยและผู้อำนวยการสถาบันมะเร็งแห่งชาติหรือผู้เกี่ยวข้องเป็นลายลักษณ์อักษรก่อนนำเสนอ

### การเก็บตัวอย่าง

การแสดงผลของยีน HPV E4 ผู้วิจัยจะใช้ตัวอย่างที่เก็บจากการ Biopsy และ Pap smear เฉพาะตัวอย่างในระยะมะเร็งปากมดลูกบางตัวอย่างเท่านั้นเนื่องจากเป็นระยะที่สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งแบบ Biopsy และ Pap smear ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีการวิเคราะห์หา HPV genotype 16 ไว้แล้ว และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่  $-196^{\circ}\text{C}$  การใช้จะตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ  $1.0\text{ mm}^3$  ใส่ในหลอดทดลองขนาด 2 ml ส่วนตัวอย่างที่ทำการเก็บแบบ Pap smear ถูกเก็บใน phosphate buffer saline ที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้งาน

ตัวอย่างเซลล์ในระยะ Normal, LSIL, HSIL และ มะเร็งบางส่วนเป็นตัวอย่างที่มีอยู่แล้วและผ่านการวิเคราะห์หาชนิดของ HPV แล้ว ซึ่งเป็นเซลล์ตัวอย่างที่ได้จากการเก็บจากแพทย์ผู้ชำนาญการทางด้านสูติ-นรีเวชซึ่งมีอยู่แล้วที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิกคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [9, 10] โดยถูกเก็บในสารละลาย Thin Prep ที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้งาน

การเรียกชื่อรอยโรคในการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลในครั้งนี้ ใช้การเรียกชื่อในระบบบีเทสดา (Bethesda) หรือชื่อ SIL โดยการเรียกชื่อด้วยวิธีนี้สามารถจำแนกระดับความรุนแรงของรอยโรคชนิดสแควมัส โดยดูระดับความผิดปกติของ maturation และระดับความผิดปกติของนิวเคลียส โดยจำแนกความผิดปกติของรอยโรคเป็น 3 ระดับ คือ LSIL, HSIL และ cervical carcinomas

### Positive control สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

Positive control ของ HPV E4 ได้จากการสุ่มเลือกตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจหา HPV เป็นผลบวกจากการศึกษาก่อนหน้านี้ มาทำเป็น positive control

จากนั้นนำตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 ที่มีการสกัด DNA ไว้เรียบร้อยแล้วมาทำ PCR ตามวิธีจนได้ตัวอย่างที่ให้ผลบวก หลังจากนั้นนำผลที่ได้มา clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม [www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) เมื่อได้ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น HPV E4 แล้วจึงนำตัวอย่างนั้นเป็น positive control

### Negative control สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ของ HPV เพราะฉะนั้น Negative control คือน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ย่อย DNA (DNase) และเอนไซม์ย่อย RNA (RNase) คือ Diethyl pyrocarbonate treated water ที่มีปริมาตรเท่ากับ RNA ที่ใช้ในการทดลอง

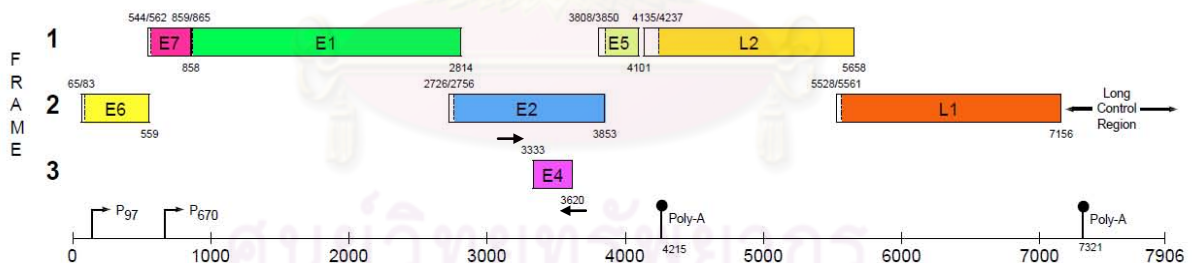
### Internal control สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16 [156]

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถสกัด RNA ได้จริงในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ RNA ที่มีอยู่ในเซลล์ปกติทุกเซลล์ เพื่อเป็นการยืนยันผลการสกัดว่าการให้ผลลบกับการทำ Single-Step Real-Time RT-PCR ของ HPV E4 ให้เป็นผล

ลบจริง ไม่ใช่จากการสกัด RNA ไม่ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ RNA ในส่วน GAPDH ของมนุษย์ เพราะเซลล์ทุกเซลล์ของมนุษย์ จะมี GAPDH อยู่ในปริมาณมากเพื่อทำหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ในกรณีของ HPV จะติดเชื้อแบบแอมแปงอยู่ในเซลล์ชั้นฐาน (basal cell) ในบริเวณ transformation zone หรือ immature metaplastic squamous cell ที่บริเวณปากมดลูก ซึ่งเซลล์เหล่านี้สามารถพบ GAPDH ได้เช่นกัน เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ GAPDH ที่เป็น RNA เป็น internal control เพื่อยืนยันว่าสามารถสกัด RNA ได้จริง จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณ RNA ของ GAPDH ด้วยวิธี Single-Step Real-Time RT-PCR ซึ่งต้องให้ผลบวกเสมอ หากการเพิ่มปริมาณ RNA ของ HPV E4 ให้ผลลบ และการเพิ่มปริมาณ RNA ของ GAPDH ให้ผลบวกเช่นกันจะต้องทำการสกัด RNA ใหม่เพราะแสดงว่าไม่สามารถสกัด RNA ได้

### การออกแบบ Primers

ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส HPV ยีน E4 จีโนไทป์ 16 ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ทั้งหมด เพื่อใช้สำหรับออกแบบ primer สำหรับทำ single-step real-time RT-PCR เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไวรัส จากนั้นใช้โปรแกรม CLUSTAL X, BioEdit Sequence Alignment Editor ในการ alignments ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอยู่ในตำแหน่งเดียวกันเพื่อที่จะกำหนดบริเวณที่เหมาะสมในการใช้ออกแบบ primer สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ นอกจากนี้ยังใช้ OLIGOS primer design software และ FastPCR software ในการวิเคราะห์ primer เพื่อให้ได้ primers ที่มี %G+C content ที่เหมาะสม โดยไม่มี dimerization, cross-linking และ secondary structure



รูปที่ 12 แสดงตำแหน่งของ Primer ที่ออกแบบขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของ Primer ออกแบบขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

Primer Name	Sequence	Length (Base)
HPV_E4_F3566	5'AAG CCG TSK CCK TGG GC A C 3'	19
HPV_E4_R3732	5'TAT RGG YGT AGT GTT ACY AYT ACA G 3'	25

\*R = (A/G) K = (G/T) Y = (C/T) S = (G/C)



ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของ Primer เพื่อตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH) [156]

Primer Name	Sequence	Length (Base)
F85_GAPDH	5'GTGAAGGTCGGAGTSAACGG 3'	20
R191_GAPDH	5' CCATCAATGACCCCTTCATTGA 3'	22
Probe_GAPDH	5'HEX-CGCCTGGTCA+CCAGGGCTGC-BHQ1 3'	20

\*+ = lock nucleic acid (LNA)

#### สร้าง Positive control ด้วยเทคนิค PCR จากยีน HPV E4

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่มี Positive control ของ HPV E4 เพราะฉะนั้นจึงต้องทำการสุ่มเลือกตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจหา HPV เป็นผลบวกจากการศึกษาก่อนหน้านี้ มาเพื่อเตรียมเป็น positive control

โดยนำตัวอย่าง DNA ที่มีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 ที่มีอยู่แล้วมาทำ PCR โดยใส่สารตามตารางที่ 5 จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมดใส่เครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยมีอุณหภูมิตามตารางที่ 6 และดูผลผลิตจากการทำ PCR ได้โดยการนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ marker ขนาด 100 bp จากนั้นนำ gel แช่ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ เลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวก และมีขนาดยีนเท่ากับที่ได้กำหนดไว้มา clone เพื่อใช้เป็น positive control

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อสร้าง positive control ด้วยเทคนิค PCR จากยีน HPV E4

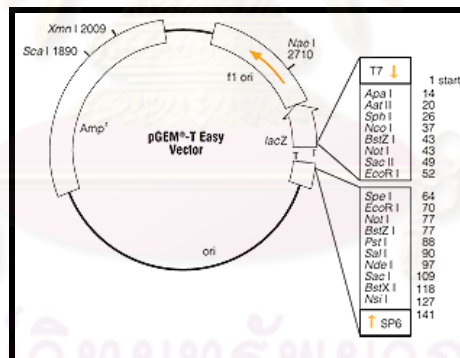
สารละลาย	HPV E4 gene (volume/tube)
	1°PCR
2X Reddy MIX PCR Master Mix	5.00 µl
Distilled water	6.00 µl
HPV_E4_F3566 (10 µM)	0.25 µl
HPV_E4_R3732 (10 µM)	0.25 µl
DNA template	1 µl
Total volume	12.5 µl

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อสร้าง positive control ด้วยเทคนิค PCR จากยีน HPV E4

PCR Cycle	HPV E4 gene
	1°PCR
Pre-denaturation	94°C 5 min
1) Denaturation	94°C 30 sec
2) Annealing	56°C 30 sec
3) Extension	72°C 45 min
1)-3)	40 cycles
Post-extension	72°C 7 min

เพิ่มจำนวนยีน HPV E4 product (PCR product) ใน bacterial culture โดยใช้ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector เพื่อเก็บเป็น Positive control

พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนเป็นชนิด pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ T7 และ SP6 มีการควบคุมการแสดงออกของยีน Lac Z และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin ดังแสดงในรูปที่ 13 โดยที่ \*soc media ใช้ในการทำให้อินดิเคเตอร์เพิ่มจำนวนก่อน



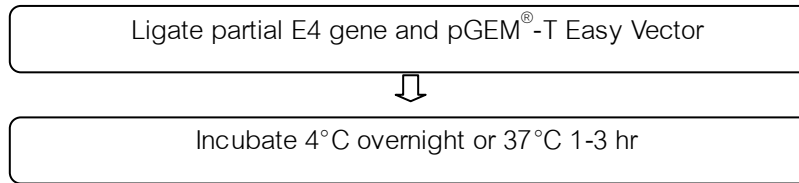
รูปที่ 13 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector circle map [157]

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมของ Ligation buffer

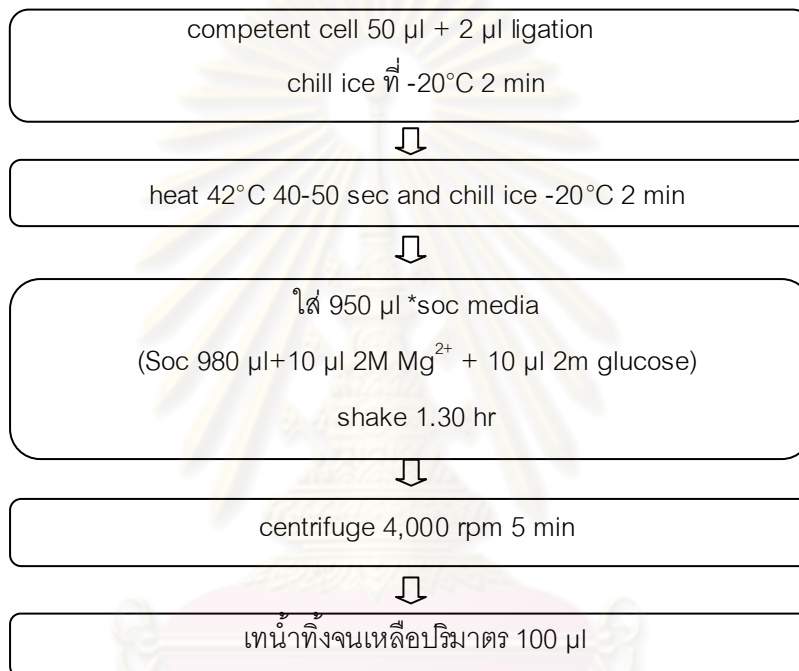
สารละลาย	Reaction
	(volume/tube)
2x buffer	5.00 $\mu$ l
T4 DNA ligase	1.00 $\mu$ l
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector	1.00 $\mu$ l
PCR product	3.00 $\mu$ l

## แผนภาพแสดงขั้นตอนการโคลน

### ขั้นตอนการ Ligation



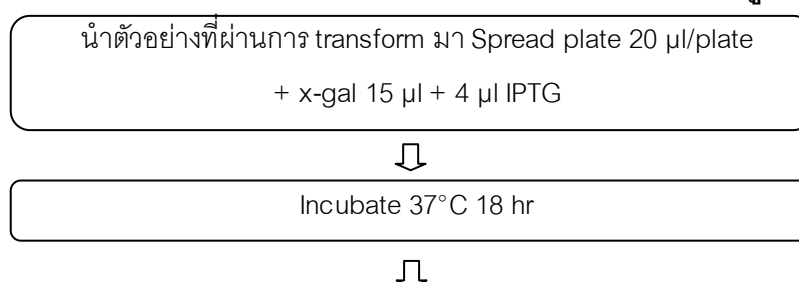
### ขั้นตอนการ Transformation

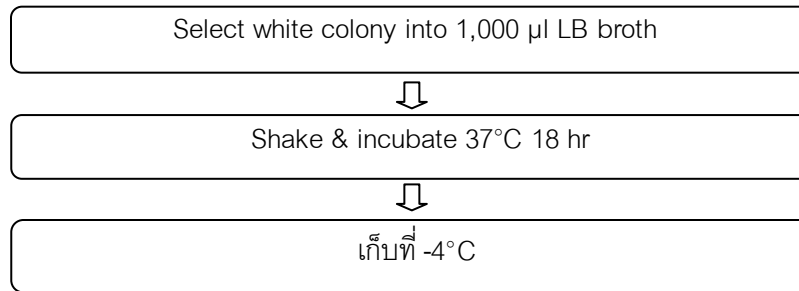


### ตรวจสอบการ Transformation HPV E4 DNA เข้าสู่ DNA พาหะ (cloning vector)

เนื่องจากบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน Lac Z มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ T4 DNA ligase ทำให้สามารถแทนที่ชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการได้ เมื่อเกิดการแทนที่จะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถใช้ substrate (x-gal) ได้จึงเกิด colony สีขาวขึ้นกับพลาสมิดที่มีการแทนที่ด้วยชิ้น DNA ที่ต้องการ

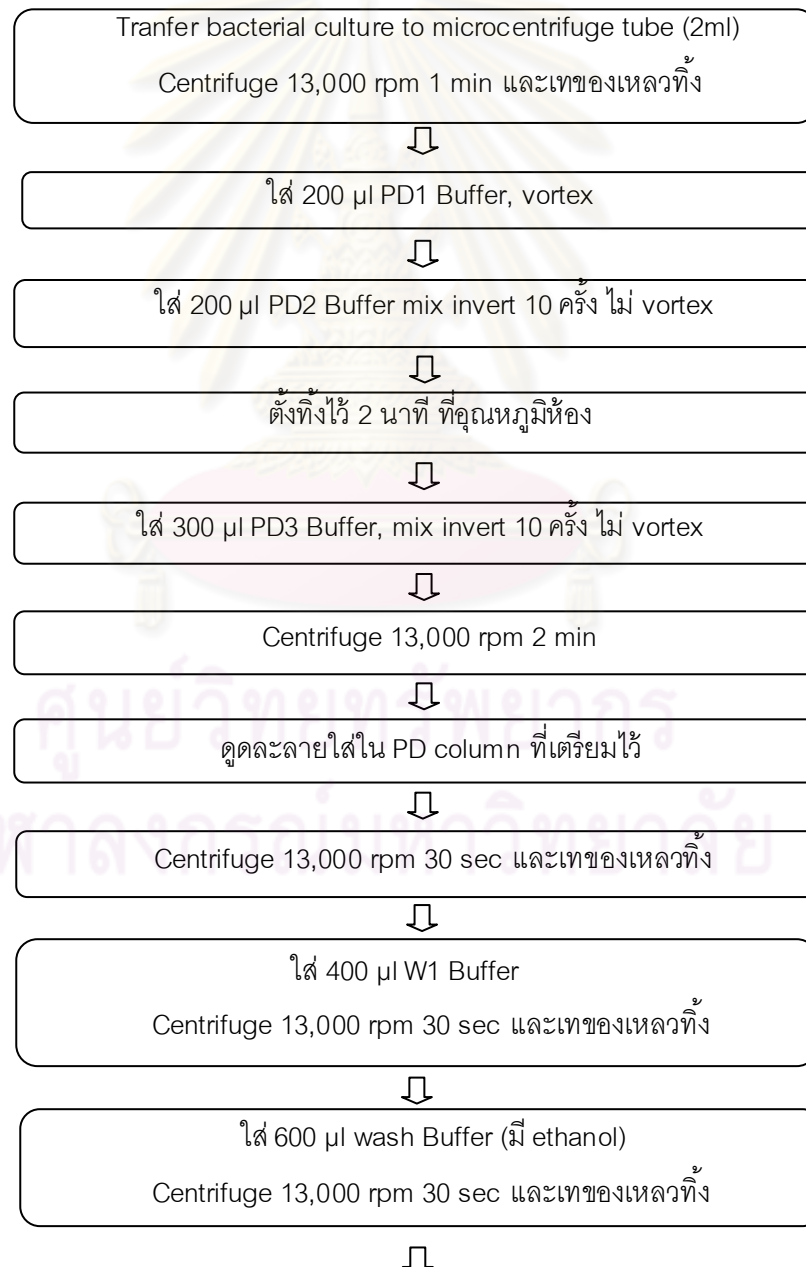
### แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจสอบการ Transformation HPV E4 DNA เข้าสู่ DNA พาหะ

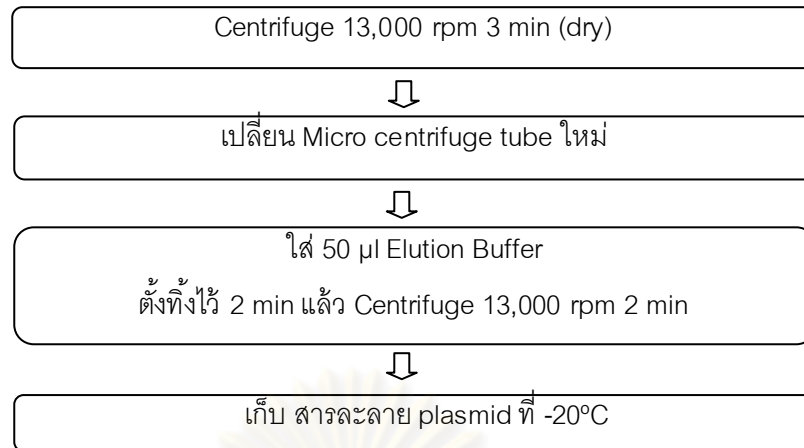




สกัด Plasmid ออกจาก bacterial culture โดยใช้ HiYield™ plasmid Mini Kit เพื่อเก็บเป็น positive control

แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด Plasmid ออกจาก bacterial culture





### ตรวจสอบ plasmid ด้วยวิธี spectrophotometry, polymerase chain reaction (PCR) และการทำ direct sequencing

นำ Plasmid ที่ผ่านการสกัดออกจาก bacterial culture แล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อหาค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายพลาสมิด จากความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 ควรีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0

A260 = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ DNA/RNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm

A280 = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm

ตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใส่สารตามตารางที่ 8 จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมดใส่เครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยมีอุณหภูมิตามตารางที่ 9 และดูผลผลิตจากการทำ PCR ได้โดยการนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดใส่ลงในหลุมของ 2% agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ marker ขนาด 100 bp จากนั้นนำ gel แช่ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ เลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวก นำผลผลิตที่ผ่านการตรวจสอบแล้วส่ง sequencing บริษัท first base เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ sequencing ตรวจสอบกับโปรแกรม [www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) เมื่อได้ตัวอย่างที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์เป็น HPV E4 แล้วจึงนำตัวอย่างนั้นมาใช้เป็น positive control ต่อไป



ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ Plasmid

สารละลาย	HPV E4 gene (volume/tube)
	1°PCR
2X Reddy MIX PCR Master Mix	5.00 $\mu$ l
Distilled water	6.00 $\mu$ l
HPV_E4_F3566 (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
HPV_E4_R3732 (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
DNA template	1 $\mu$ l
Total volume	12.5 $\mu$ l

ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อตรวจสอบ Plasmid

PCR Cycle	HPV E4 gene
	1°PCR
Pre-denaturation	90°C 5 min
1) Denaturation	94°C 30 sec
2) Annealing	56°C 30 sec
3) Extension	72°C 45 min
1)-3)	45 cycles
Post-extension	72°C 7 min

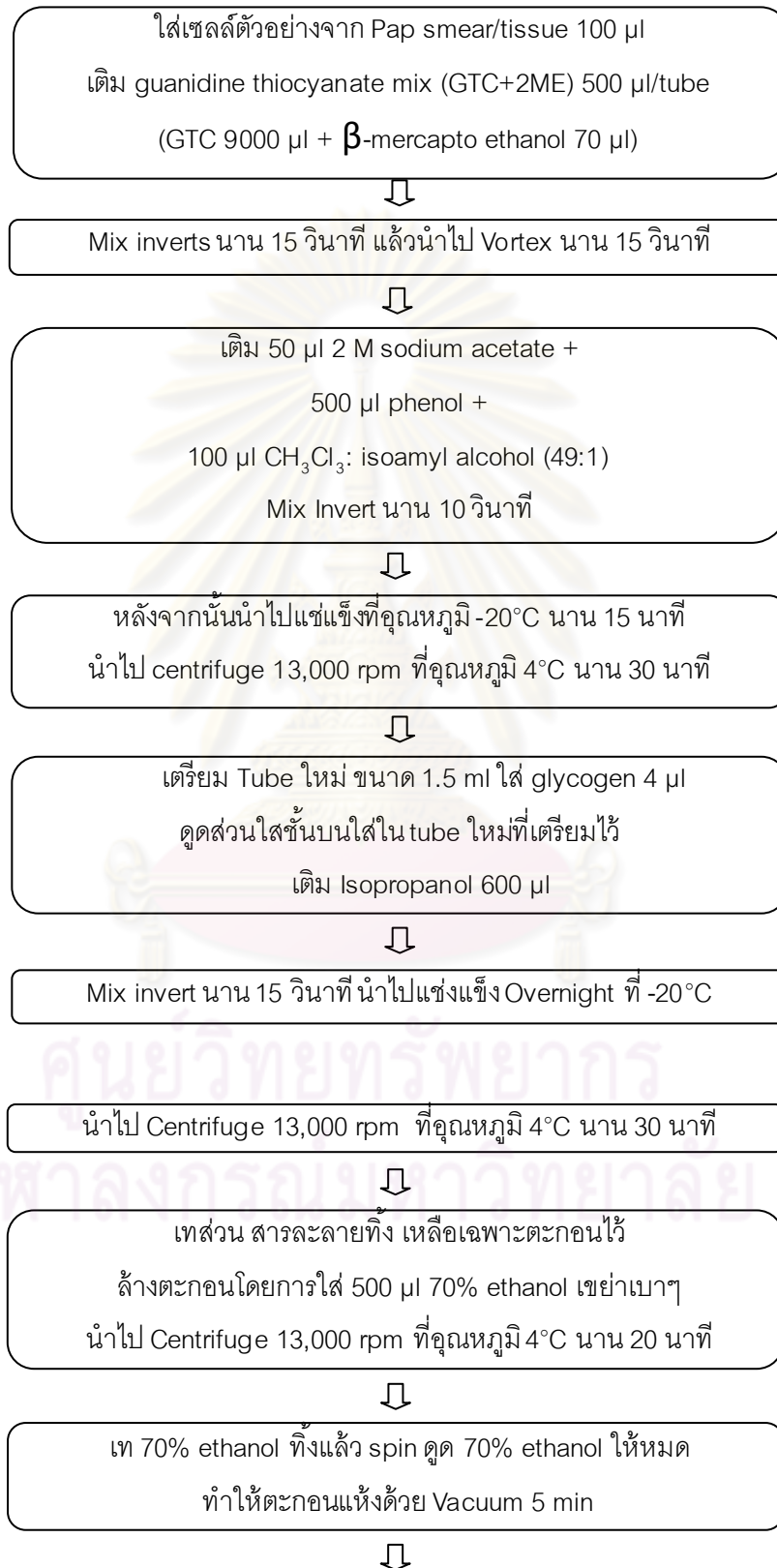
### การแสดงผลของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

#### การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

นำเซลล์ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV genotype 16 ระยะการติดเชื้อตั้งแต่ในระยะ normal, LSIL, HSIL และ Cancer ตามลำดับมาสกัด viral RNA ด้วยวิธี phenol/chloroform หลังจากสกัดแล้วจะได้ปริมาณ RNA ที่ละลายน้ำปริมาณ 20  $\mu$ l จากนั้นจึงนำไปใช้เป็น RNA เริ่มต้นศึกษาการแสดงผลของยีน E4 ใน HPV ชนิด

## แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด Viral RNA

### วันที่ 1



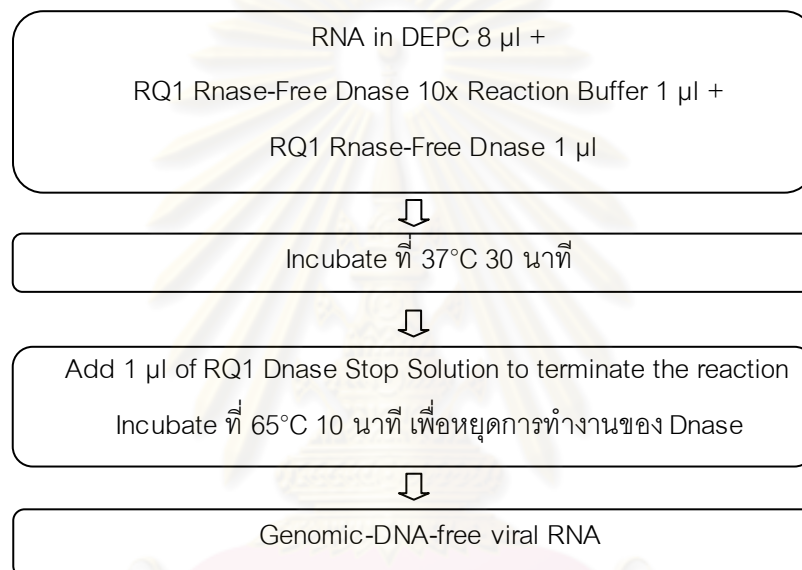
### วันที่ 2

ละลายตะกอนด้วย DEPC Water 20  $\mu$ l  
Mix ให้ละลายแล้วเก็บที่  $-70^{\circ}\text{C}$

### กำจัด Genomic DNA ก่อนศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

นำ Viral RNA ที่สกัดได้มาทำการกำจัด Genomic DNA ด้วยการย่อยด้วย DNase จากนั้นจึงนำไปใช้เป็น RNA เริ่มต้นในการศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

### แผนภาพแสดงขั้นตอนการกำจัด Genomic DNA



### ตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ Genomic DNA ด้วยเทคนิค PCR จากยีน E4 ใน HPV ชนิด 16

นำ Genomic-DNA-free viral RNA มาตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ genomic DNA ก่อนทำการศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ใน HPV ชนิด 16 ด้วยวิธี PCR โดยใส่สารตามตารางที่ 10 จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมดใส่เครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยมีอุณหภูมิตามตารางที่ 11 และดูผลผลิตจากการทำ PCR ได้โดยการนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ marker ขนาด 100 bp จากนั้นนำ gel แช่ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้

ตารางที่ 10 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ genomic DNA

สารละลาย	HPV E4 gene (volume/tube)
	1°PCR
2X Reddy MIX PCR Master Mix	5.00 $\mu$ l
Distilled water	6.00 $\mu$ l
HPV_E4_F3566 (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
HPV_E4_R3732 (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
RNA template	1 $\mu$ l
Total volume	12.5 $\mu$ l

ตารางที่ 11 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ genomic DNA

PCR Cycle	HPV E4 gene
	1°PCR
Pre-denaturation	94°C 5 min
1) Denaturation	94°C 30 sec
2) Annealing	56°C 30 sec
3) Extension	72°C 45 min
1)-3)	45 cycles
Post-extension	72°C 7 min

**ศึกษาการแสดงออกของยีน HPV E4 ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Single-Step Real-Time RT-PCR และ ความคุมการทดลองโดยการตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH)**

โดยการทดลองนี้ต้องการทดสอบค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีน E4 ในเชื้อ Human Papillomavirus จากผู้ป่วยในระดับการลุกลามของมะเร็งปากมดลูกในระยะ Normal, LSIL, HSIL และ cervical carcinomas ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน E4 ในตัวอย่างระยะมะเร็งทั้งแบบวิธีการเก็บด้วยวิธี Pap smear กับวิธีเก็บชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy โดยใช้เทคนิค Single-Step Real-Time RT-PCR

**ตารางที่ 12** แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยาเพื่อหาการแสดงออกของยีน HPV E4 ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Single-Step Real-Time RT-PCR

สารละลาย	HPV E4 gene (volume/tube)
	1°PCR
Master mix	4.00 µl
RT mix	0.06 µl
DEP C Water	4.43 µl
HPV_E4_F3566 (10 µM)	0.25 µl
HPV_E4_R3732 (10 µM)	0.25 µl
SYBR Green	0.10 µl
RNA template	1 µl
Total volume	10 µl

**ตารางที่ 13** แสดงอุณหภูมิและเวลาเพื่อหาการแสดงออกของยีน HPV E4 ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Single-Step Real-Time RT-PCR

PCR Cycle	HPV E4 gene
	1°PCR
Reverse transcription	42°C 30 min
Pre-denaturation	90°C 5 min
1) Denaturation	94°C 10 sec
2) Annealing	56°C 30 sec
3) Extension	72°C 20 min
1)-3)	45 cycles



ตารางที่ 14 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา Single-Step Real-Time RT-PCR เพื่อตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH)

สารละลาย	HPV E4 gene (volume/tube)
	1°PCR
Master mix	4.00 $\mu$ l
RT mix	0.06 $\mu$ l
DEP C Water	4.43 $\mu$ l
F_ GAPDH (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
R_ GAPDH (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Taq Man Probe	0.10 $\mu$ l
RNA template	1 $\mu$ l
Total volume	10 $\mu$ l

ตารางที่ 15 แสดงอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยา Single-Step Real-Time RT-PCR เพื่อตรวจสอบ Housekeeping gene (GAPDH)

PCR Cycle	HPV E4 gene
	1°PCR
Reverse transcription	42°C 30 min
Pre-denaturation	90°C 5 min
1) Denaturation	94°C 10 sec
2) Annealing	56°C 30 sec
3) Extension	72°C 20 min
1)-3)	45 cycles

## การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล (Data collection and Data analysis)

ผู้วิจัยจะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการวิจัย และบันทึกข้อมูลลงใน Data sheet เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวใช้ในการทดสอบว่าค่าเฉลี่ยในเรื่องที่ต้องการศึกษาของประชากร แต่ละกลุ่มแตกต่างกันหรือไม่ โดยการทดลองนี้ต้องการทดสอบค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีน E4 ในเชื้อ Human Papillomavirus จากผู้ป่วยในระดับการลุกลามของมะเร็งปากมดลูกในระยะ Normal, LSIL, HSIL และ cervical carcinomas ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน E4 ทั้งแบบวิธีการเก็บด้วยวิธี Pap smear กับวิธีเก็บชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy โดยที่การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงกำหนดระดับนัยสำคัญของการทดสอบสมมติฐานที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 % แปลผลสถิติแบบ one-way ANOVA ซึ่งการทดลองนี้มีการคำนวณขนาดตัวอย่างที่เพียงพอต่อการทำการทดลองโดยพิจารณา Power ของ Cohen ร่วมด้วย [155, 158]



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

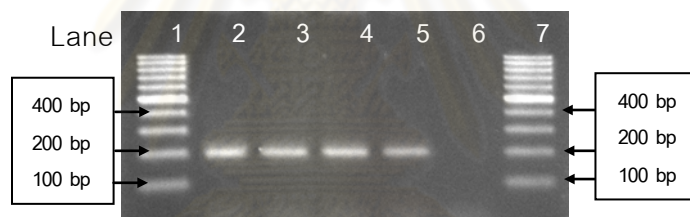
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก HPV16 E4 mRNAกับการรอยโรคที่เซลล์ปากมดลูก จากตัวอย่างที่มีการติดเชื้อในระยะต่าง ๆ

#### การสร้าง Positive control

ทำการสกัดแถบ DNA จากการทำ PCR ที่ต้องการจากเจลโดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit แล้วนำมารวมกัน เพื่อนำมาเพิ่มจำนวนเก็บเป็น positive control โดยการ cloning เมื่อตรวจจสอบขนาด plasmid DNA band ที่มีชิ้นส่วนของ partial HPV E4 พบว่ามีขนาดเท่ากับ 191 bp ตามที่ได้กำหนดไว้ ดังรูปที่ 16 และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้มีค่าการดูดกลืนแสง A260/A280 เท่ากับ 1.86 และทำการส่งชิ้นส่วนดังกล่าวเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการ sequencing และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อยืนยันว่า positive control ที่ได้เป็น HPV16 E4



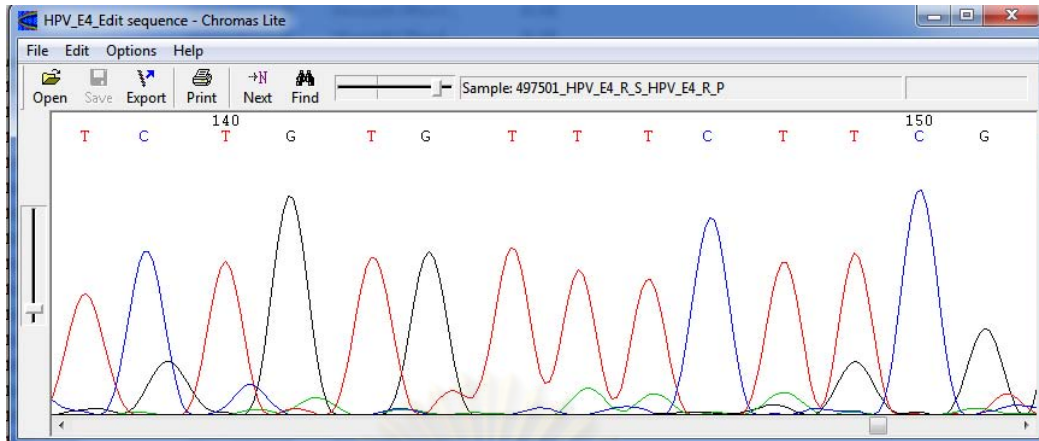
รูปที่ 14 ผล PCR ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) จาก plasmid

Lane 1, 7 = DNA Marker, Lane 2-5 = จากเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV E4,

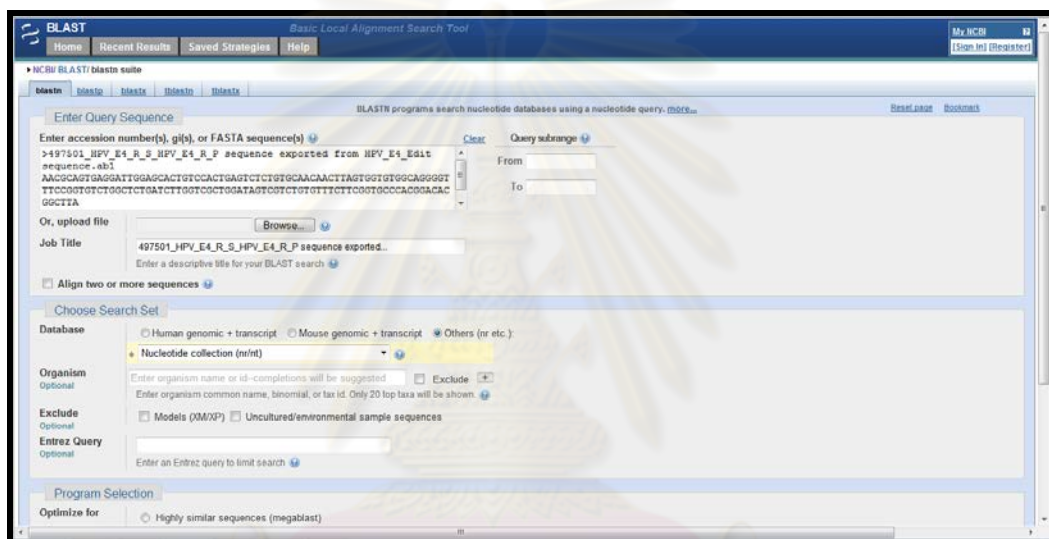
Lane 6 = negative control

#### ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Positive control

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Positive control โดยได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas lite version 2.01 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPV16 E4 ทั้งหมด



รูปที่ 15 แสดงตัวอย่าง chromatogram ของยีน HPV16 E4



รูปที่ 16 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast จากการทดสอบ positive control

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">FJ610152.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU7, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">FJ610151.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU6, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">FJ610149.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU4, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">FJ610148.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU3, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">FJ610147.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU2, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">FJ610146.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU1, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">EU918764.1</a>	Human papillomavirus type 16 isolate LZcc11-16, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">FJ006723.1</a>	Human papillomavirus type 16, complete genome	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>
<a href="#">EU430684.1</a>	Human papillomavirus type 16 isolate CNE-q E4 protein (E4) gene, p2	233	233	81%	2e-58	97%	<a href="#">G</a>

รูปที่ 17 ตัวอย่างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัส

พันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Blast

```
>|gb|FJ610151.1| G Human papillomavirus type 16 strain CU6, complete genome
Length=7906

GENE ID: 1489076 E4 | E4 ORF from 3332 to 3619; putative
[Human papillomavirus type 16] (10 or fewer PubMed links)

Score = 233 bits (258), Expect = 2e-58
Identities = 135/139 (97%), Gaps = 0/139 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 32 aaCGCAGTGAGGATTGGAGCACTGTCCACTGAGTCTCTGTGCAACAACCTAGTGGTGTGG 91
||| |
Sbjct 3567 AATGCAGTGAGGATTGGAGCACTGTCCACTGAGTCTCTGTGCAACAACCTAGTGGTGTGG 3508

Query 92 CAGGGGTTCCGGTGTCTGGCTCTGATCTTGGTCGCTGGATAGTCGTCGTGTCTCTTCG 151
||| |
Sbjct 3507 CAGGGGTTCCGGTGTCTGGCTCTGATCTTGGTCGCTGGATAGTCGTCGTGTCTCTTCG 3448

Query 152 GTGCCACGGACACGGCTT 170
||| |
Sbjct 3447 GTGCCAAGGCGACGGCTT 3429
```

รูปที่ 18 แสดงตัวอย่างผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Blast

RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกทำการกำจัด genomic DNA ด้วยการใส่ DNase จากนั้นผลิตสำเนาที่ผ่านการใส่ DNase มาทำ PCR เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน genomic DNA ซึ่งพบว่าสามารถกำจัด genomic DNA ได้ดังรูปที่ 19 ที่ไม่ปรากฏการปนเปื้อนของ genomic DNA เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control



รูปที่ 19 ผล PCR จากการกำจัด genomic DNA

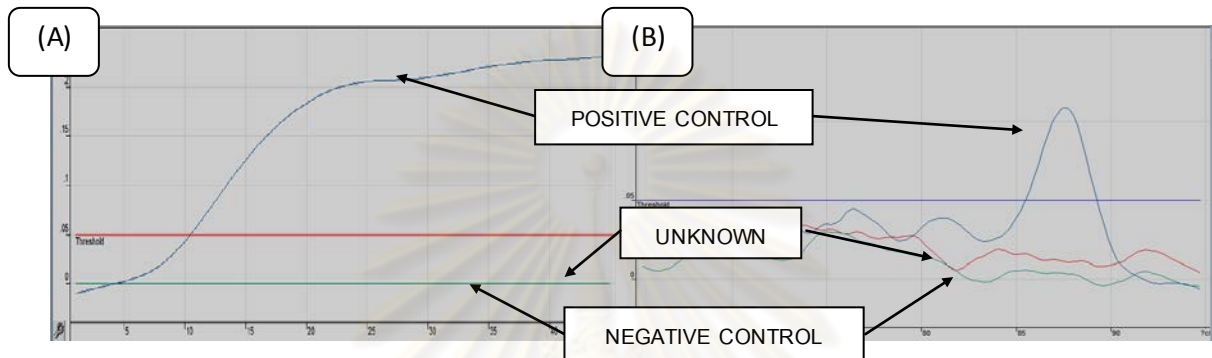
Lane 1, 10 = DNA Marker, Lane 2-7 = RNA, Lane 8 = negative control, Lane 9 = positive control

เมื่อนำ mRNA ของ Human Papillomavirus (HPV) มาทำ REAL-TIME RT-PCR ด้วย primer HPV\_E4\_F3566 / HPV\_E4\_R3732 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน HPV E4 ระหว่าง ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV (Cytology normal) แต่มีลักษณะเซลล์ปกติ และผู้ป่วยที่มีผลทางเซลล์วิทยาผิดปกติ (Cytology abnormal) โดยใช้ Housekeeping gene (GAPDH) เป็น internal control พบว่าในผู้ป่วยที่มีผลทาง cytology เป็น normal ไม่มีการแสดงออกของเชื้อ HPV E4 ในระดับ mRNA แต่ผู้ป่วยที่มีผลทาง cytology เป็น abnormal มีการแสดงออกของเชื้อ HPV E4 ในระดับ mRNA ดังรูปที่ 20-23

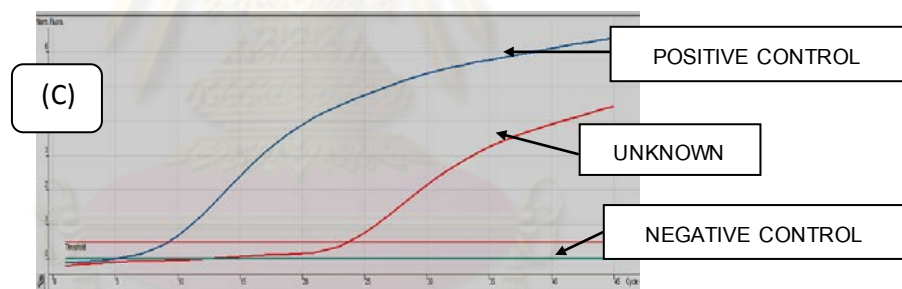
เมื่อนำผลจากการทดลองมาวิเคราะห์แบบ Relative quantitation by delta Ct method โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน HPV E4 ระดับ mRNA ในเซลล์ที่ปกติและเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากการติดเชื้อ พบว่า



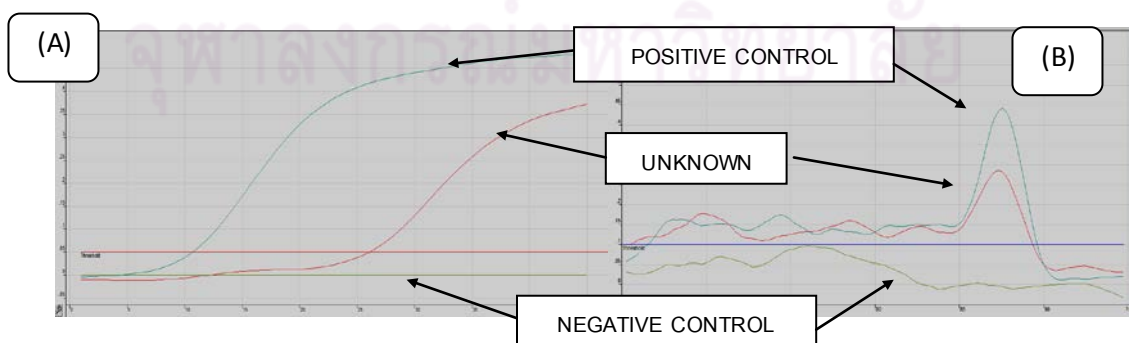
การแสดงออกของเซลล์ที่มีการติดเชื้อแบ่งเป็น LSIL, HSIL และ cancer จำนวนอย่างละ 20 ตัวอย่างและมีการเปลี่ยนแปลงโดยจะมีการแสดงออกในรอบของการเพิ่มจำนวนยีน HPV E4 ที่ประมาณรอบที่ 20 จนถึงรอบที่ 45 แต่ในการแสดงออกของเซลล์ที่มีการติดเชื้อแต่เซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะไม่มีแสดงออกในรอบของการเพิ่มจำนวนยีน HPV E4 โดยใช้ Housekeeping gene (GAPDH) เป็น internal control ดังแสดงในตารางที่ 15-18



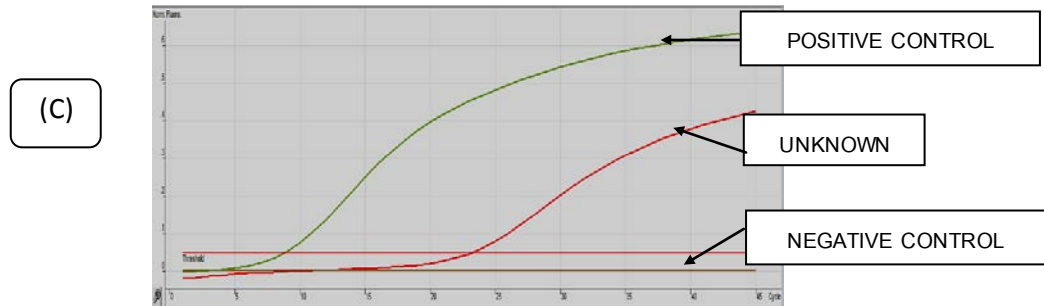
รูปที่ 20 ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Normal (A) ผล Real-Time RT-PCR และ (B) ผล melting curve analysis



รูปที่ 21 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการแสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Normal (C) ผล Real-Time RT-PCR



รูปที่ 22 ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Abnormal (A) ผล Real-Time RT-PCR และ (B) ผล melting curve analysis



รูปที่ 23 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการ แสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Abnormal (C) ผล Real-Time RT-PCR

### การคำนวณ Relative quantitation by Delta Ct method

Ct = Cycle number at which the F signal is greater than threshold level

$\Delta Ct$  (Abnormal) = Ct (target gene of Abnormal) - Ct (reference gene of Housekeeping gene)

$\Delta Ct$  (normal) = Ct (target gene of normal) - Ct (reference gene of Housekeeping gene)

$\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  (Abnormal) -  $\Delta Ct$  (normal)

Ratio of Abnormal: normal =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

\*Ct = Cycle number at which the Fluorescence signal is greater than threshold level

\*C<sub>T</sub> value of 45 or more means no amplification and cannot be included in the calculations

\*45 cycle is good condition for statistic analysis

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม Normal

Normal samples	E4*		GAPDH(HG)*	
	AGE	Ct	Ct	$\Delta$ Ct
N1	39	NEG(45)	23.83	21.17
N2	36	NEG(45)	25.38	19.62
N3	23	NEG(45)	24.52	20.48
N4	35	NEG(45)	25.95	19.05
N5	50	NEG(45)	23.49	21.51
N6	26	NEG(45)	23.25	21.75
N7	43	NEG(45)	23.5	21.5
N8	33	NEG(45)	25.68	19.32
N9	28	NEG(45)	24.68	20.32
N10	32	NEG(45)	23.05	21.95
N11	43	NEG(45)	24.48	20.52
N12	45	NEG(45)	23.6	21.4
N13	41	NEG(45)	25.58	19.42
N14	57	NEG(45)	24.55	20.45
N15	64	NEG(45)	26.32	18.68
N16	27	NEG(45)	23.04	21.96
N17	31	NEG(45)	27.84	17.16
N18	57	NEG(45)	24.46	20.54
N19	28	NEG(45)	20.37	24.63
N20	35	NEG(45)	24.14	20.86
MEAN	39	45	24.39	20.61

\*Ct detect at Threshold 0.05

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 20.61 - 20.61 = 0$$

ตารางที่ 17 แสดง ผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม LSIL

LSIL samples	E4*		GAPDH(HG)*	
	AGE	Ct	Ct	$\Delta$ Ct
L1	35	26.17	23.39	2.78
L2	40	26.58	27.32	-0.74
L3	38	32.28	23.61	8.67
L4	27	25.81	24.09	1.72
L5	40	23.56	20.21	3.35
L6	32	30.57	21.57	9
L7	19	20.6	25.57	-4.97
L8	25	27.29	23.22	4.07
L9	30	20.85	24.41	-3.56
L10	26	26.71	26.05	0.66
L11	22	25.83	24.55	1.28
L12	27	24.45	24.66	-0.21
L13	32	27.23	23.22	4.01
L14	39	29.43	27.09	2.34
L15	31	27.74	27.01	0.73
L16	29	33.13	26.42	6.71
L17	35	30.23	25.41	4.82
L18	39	41.06	30.46	10.6
L19	26	33.52	26.17	7.35
L20	30	38.23	24.34	13.89
MEAN	31	28.56	24.93	3.63

\*Ct detect at Threshold 0.05

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 3.63 - 20.61 = -16.99$$

LSIL Expression =  $1.30 \times 10^5$  เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

ตารางที่ 18 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม HSIL

HSIL samples	E4*		GAPDH(HG)*	
	AGE	Ct	Ct	$\Delta$ Ct
H1	37	21.62	27.71	-6.09
H2	31	23	27.73	-4.73
H3	33	23.96	29.02	-5.06
H4	41	23.68	30.03	-6.35
H5	39	23.83	23.12	0.71
H6	38	24.07	22.89	1.18
H7	25	28.24	29.19	-0.95
H8	42	30.21	33.21	-3
H9	29	23.84	27.75	-3.91
H10	57	22.69	23.14	-0.45
H11	34	23.01	30.99	-7.98
H12	51	26.56	30.02	-3.46
H13	48	24.09	25.05	-0.96
H14	41	23.47	26.73	-3.26
H15	44	23.1	23.04	0.06
H16	41	22.06	24.44	-2.38
H17	42	23.23	24.32	-1.09
H18	54	21.49	26.47	-4.98
H19	43	23.68	24.83	-1.15
H20	35	23.5	31.72	-8.22
Mean	40	23.97	27.07	-3.10

\*Ct detect at Threshold 0.05

$$\Delta\Delta\text{Ct รวม} = -3.10 - 20.61 = -23.71$$

HSIL Expression =  $1.38 \times 10^7$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ



ตารางที่ 19 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม cancer

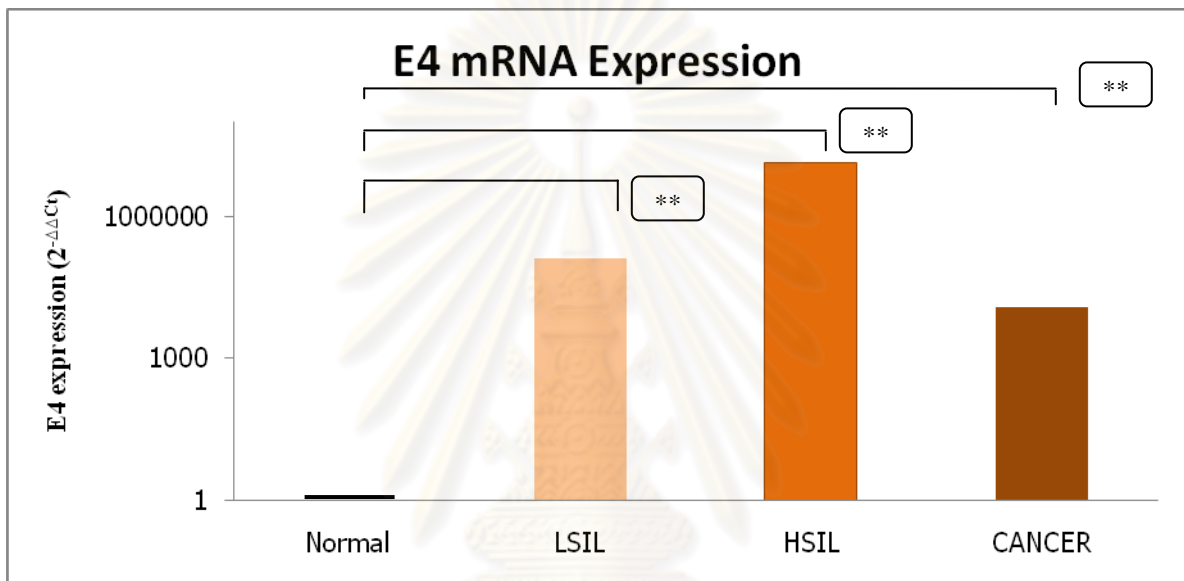
Cancer samples	E4*		GAPDH(HG)*	
	AGE	Ct	Ct	$\Delta$ Ct
CA1	36	31.82	26.14	5.68
CA2	61	30.41	23.15	7.26
CA3	43	22.17	21.5	0.67
CA4	30	NEG(45)	26.69	-
CA5	59	43.78	26.09	17.69
CA6	45	29.42	24.14	5.28
CA7	34	NEG(45)	29.65	-
CA8	41	30.83	22.81	8.02
CA9	57	35.77	24.11	11.66
CA10	37	33.13	26.36	6.77
CA11	47	32.32	23.92	8.4
CA12	49	28.64	23.45	5.19
CA13	26	NEG(45)	31.15	-
CA14	40	30.28	24.39	5.89
CA15	55	27.95	23.2	4.75
CA16	48	NEG(45)	25.88	-
CA17	70	NEG(45)	28.37	-
CA18	61	27.92	21.93	5.99
CA19	54	28.5	24.62	3.88
CA20	60	29.81	20.84	8.97
Mean	48	30.85	23.78	7.07

\*Ct detect at Threshold 0.05

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 7.07 - 20.61 = -13.54$$

Cervical cancer Expression =  $1.19 \times 10^4$  เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

การแสดงออกของยีน E4 ไม่พบการแสดงออกในทุกตัวอย่างที่มีผลตรวจทางเซลล์วิทยาปกติ และไม่พบการแสดงออกจำนวน 6 ตัวอย่างในเซลล์มะเร็ง ค่าเฉลี่ยของอายุผู้ป่วยและค่าการแสดงออกของยีน E4 ในแต่ละกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติจะถูกแสดงในตารางที่ 19 ซึ่งการแสดงออกของยีน E4 จะมีการแสดงออกได้มากที่สุดที่ระยะรอยโรคก่อนมะเร็ง HSIL โดยพบการแสดงออกเพิ่มขึ้น  $1.38 \times 10^7$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ( $P < 0.01$ ) ระยะ LSIL พบการแสดงออกเพิ่มขึ้น  $1.30 \times 10^5$  เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ( $P < 0.01$ ) และในระยะ มะเร็งเพิ่มขึ้น  $1.19 \times 10^4$  เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ( $P < 0.01$ ) ทุกตัวอย่างทำการ normalized ด้วย Housekeeping gene (GAPDH) รูปที่ 24



รูปที่ 24 การแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV; แกน x แสดงกลุ่มทางเซลล์วิทยาที่แตกต่างกัน (Normal, LSIL, HSIL, และ Cancer); แกน y แสดงการแสดงออกของ E4 mRNA ซึ่งถูก normalized ด้วย Housekeeping gene (GAPDH) การแสดงออกยีน E4 mRNA พบใน LSIL, HSIL และ cancer เท่ากับ  $1.30 \times 10^5$ ,  $1.38 \times 10^7$ , และ  $1.19 \times 10^4$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ (\*\* $P < 0.01$ )

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 แสดงตัวอย่างในระยะเวลาต่างๆ ที่มีการติดเชื้อ HPV ผลทางเซลล์วิทยา ชนิด HPV ค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วย และค่าการแสดงออกของยีน E4

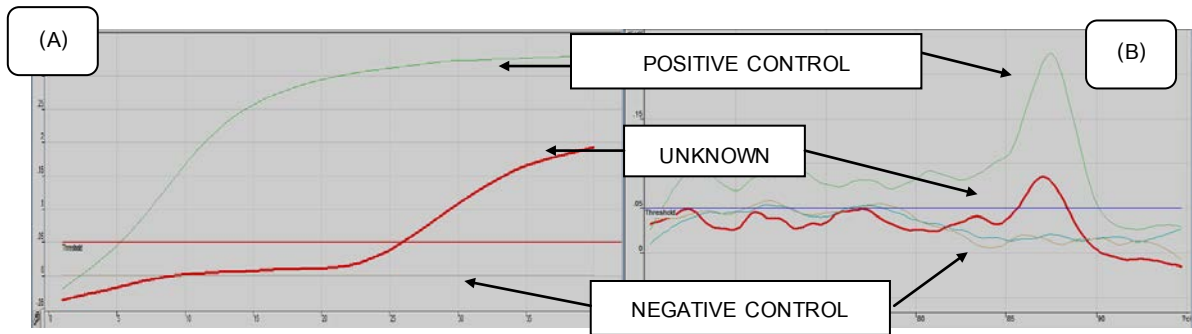
Cytology	HPV TYPE	MEAN (AGE)	Sample (N)	E4 Expression (N)	Normalize E4 expression ( $-\Delta\Delta Ct$ ) $\pm$ SD	95% CI		p-value
						min	max	
Normal	16	39	20	0	0	-	-	.000
LSIL	16	31	20	20 (100%)	16.99 $\pm$ 4.71**	14.14	19.84	.000
HSIL	16	40	20	20 (100%)	23.71 $\pm$ 2.79**	20.87	26.56	.000
Cancer	16	48	20	15(75%)	13.54 $\pm$ 3.85**	10.46	16.62	.000

\*\* ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่  $P < 0.01$

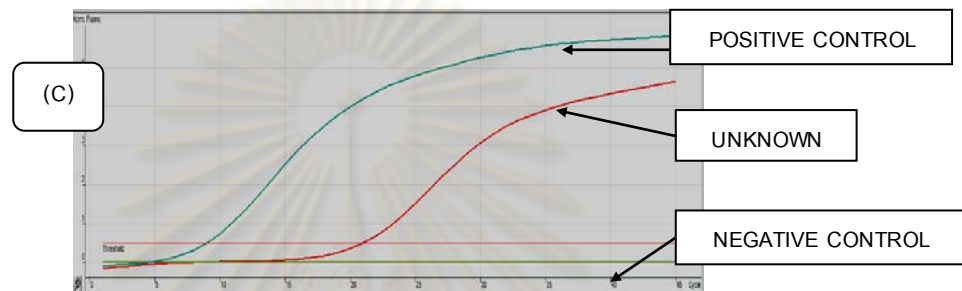
ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก HPV16 E4 mRNA จากตัวอย่างที่มีการติดเชื้อในระยะมะเร็งจากตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธี Pap smear และ biopsy

เมื่อนำ mRNA ของ Human Papillomavirus (HPV) มาทำ REAL-TIME RT-PCR ด้วย primer HPV\_E4\_F3566 / HPV\_E4\_R3732 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน HPV E4 ระหว่างการเก็บด้วยวิธี Pap smear และ biopsy จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV และมีผลทางเซลล์วิทยาอยู่ในระยะมะเร็ง โดยใช้ Housekeeping gene (GAPDH) เป็น internal control พบว่า ผู้ป่วยที่มีผลทางเซลล์วิทยาอยู่ในระยะมะเร็งมีการแสดงออกของเชื้อ HPV E4 ในระดับ mRNA ดังรูปที่ 25-28

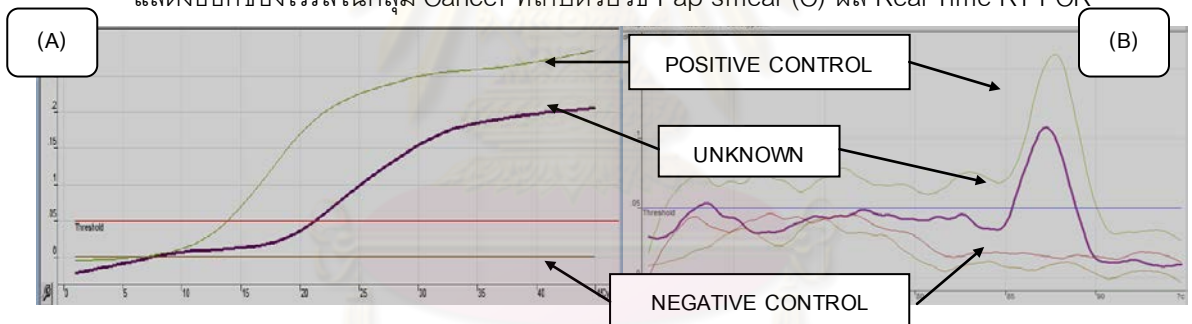
เมื่อนำผลจากการทดลองมาวิเคราะห์แบบ Relative quantitation by delta Ct method โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน HPV E4 ระดับ mRNA ในการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Pap smear และ biopsy เซลล์จากตัวอย่างที่อยู่ในระยะมะเร็ง พบว่าการแสดงออกของเซลล์ที่เก็บตัวอย่างด้วยวิธี Pap smear และ biopsy tissue จำนวนอย่างละ 15 ตัวอย่างซึ่งมีการติดเชื้อในระยะมะเร็ง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงโดยจะมีการแสดงออกในรอบของการเพิ่มจำนวนยีน HPV E4 ที่ประมาณรอบที่ 22 จนถึงรอบที่ 45 แต่ในการแสดงออกของเซลล์ที่มีการติดเชื้อแต่เซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะไม่มีแสดงออกในรอบของการเพิ่มจำนวนยีน HPV E4 โดยใช้ Housekeeping gene (GAPDH) เป็น internal control ดังแสดงในตารางที่ 20, 21



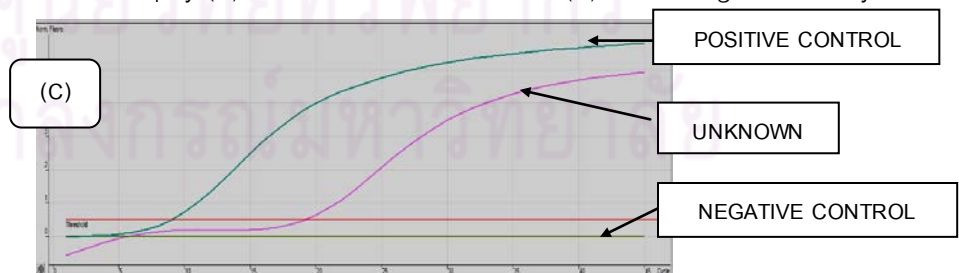
รูปที่ 25 ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี Pap smear (A) ผล Real-Time RT-PCR และ (B) ผล melting curve analysis



รูปที่ 26 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการ แสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี Pap smear (C) ผล Real-Time RT-PCR



รูปที่ 27 ผล Real-Time RT-PCR และ melting curve analysis ของยีน E4 จาก Human Papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี biopsy (A) ผล Real-Time RT-PCR และ (B) ผล melting curve analysis



รูปที่ 28 ผล Real-Time RT-PCR ของยีน GAPDH จากตัวอย่างเพื่อใช้เป็น internal control ในการควบคุมการ แสดงออกของไวรัสในกลุ่ม Cancer ที่เก็บด้วยวิธี biopsy (C) ผล Real-Time RT-PCR

ตารางที่ 21 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม cancer ที่เก็บด้วยวิธี Pap smear

Pap smear	AGE	E4* Ct	GAPDH(HG)* Ct	$\Delta$ Ct
TP1	55	NEG(45)	24.71	-
TP2	58	23.99	19.6	4.39
TP3	57	NEG(45)	22.48	-
TP4	47	28.44	24.82	3.62
TP5	45	29.42	24.14	5.28
TP6	30	NEG(45)	26.69	-
TP7	34	NEG(45)	29.65	-
TP8	76	37.77	25.09	12.68
TP9	41	30.83	22.81	8.02
TP10	57	35.77	24.11	11.66
TP11	37	33.13	26.36	6.77
TP12	47	32.32	23.92	8.4
TP13	51	35.93	25.98	9.95
TP14	51	30.4	25.58	4.82
TP15	49	28.64	23.45	5.19
Mean	49	31.51	24.17	7.34

\*Ct detect at Threshold 0.05

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 7.34 - 20.61 = -13.27$$

Cervical cancer Expression =  $9.88 \times 10^3$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

ศูนย์วิจัยทันตสุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 22 แสดงผลการแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในกลุ่ม cancer ที่เก็บด้วยวิธี biopsy tissue

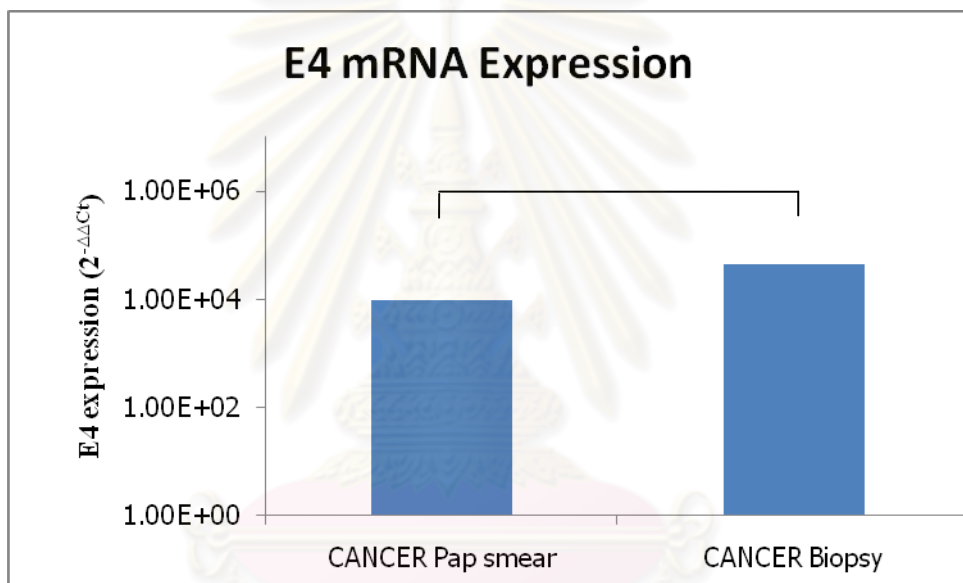
Biopsy tissue	E4*		GAPDH(HG)*	
	AGE	Ct	Ct	$\Delta$ Ct
T1	55	NEG(45)	29.05	-
T2	58	37.91	30.18	7.73
T3	57	NEG(45)	30.45	-
T4	47	21.4	19.29	2.11
T5	45	NEG(45)	34.22	-
T6	30	33.14	24.93	8.21
T7	34	NEG(45)	31.21	-
T8	76	24.89	21.48	3.41
T9	41	NEG(45)	28.82	-
T10	57	33.57	27.09	6.48
T11	37	NEG(45)	28.75	-
T12	47	NEG(45)	25.66	-
T13	51	NEG(45)	34.14	-
T14	51	24.86	20.64	4.22
T15	49	28.43	24.56	3.87
Mean	49	29.17	24.02	5.15

\*Ct detect at Threshold 0.05

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 5.15 - 20.61 = -15.46$$

Cervical cancer Expression =  $4.5 \times 10^4$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

เมื่อเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ระหว่างการเก็บตัวอย่างกับการแสดงออกของยีน HPV E4 mRNA โดยใช้ ตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกมาทำการศึกษาด้วยเทคนิค Single step REAL-TIME RT-PCR และเปรียบเทียบการ แสดงออกด้วยวิธี delta พบว่า HPV E4 mRNA จากการเก็บด้วยวิธี Pap smear พบการแสดงออกทั้งสิ้น 11 จาก 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 73.33 และการเก็บด้วยวิธี biopsy พบการแสดงออกทั้งสิ้น 7 จาก 15 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 46.66 และการแสดงออกของยีน E4 จากการเก็บด้วยวิธี Pap smear และ biopsy มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.396$ ) ตารางที่ 22 โดยการเก็บด้วยวิธี Pap smear พบการแสดงออกเท่ากับ  $9.88 \times 10^3$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ และการเก็บด้วยวิธี biopsy พบการแสดงออกเท่ากับ  $4.5 \times 10^4$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ทุกตัวอย่างทำการ normalized ด้วย Housekeeping gene (GAPDH) รูปที่ 29



รูปที่ 29 การแสดงออกของ HPV 16 E4 mRNA ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV; แกน x แสดงกลุ่มของการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน (Pap smear และ Biopsy); แกน y แสดงการแสดงออกของ E4 mRNA ซึ่งถูก normalized ด้วย Housekeeping gene (GAPDH) การแสดงออกของ E4 mRNA พบในการเก็บตัวอย่างแบบ Pap smear และ biopsy เท่ากับ  $9.88 \times 10^3$  และ  $4.5 \times 10^4$  เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ (ตามลำดับ) ( $P = 0.396$ )

ตารางที่ 23 แสดงตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV ผลทางเซลล์วิทยา ชนิด HPV ค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วย และค่าการแสดงออกของยีน E4

Clinical group	HPV TYPE	MEAN (AGE)	Sample (N)	Normalize E4 expression ( $-\Delta\Delta Ct$ ) $\pm$ SD	E4 Expression (N)	p-value
Cancer pap smear	16	49	15	13.27 $\pm$ 3.06	11(73.33%)	0.125
Cancer biopsy	16	49	15	15.46 $\pm$ 2.33	7(46.66%)	0.105



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวินิจฉัย HPV ทางอณูชีววิทยาในปัจจุบันสามารถใช้การตรวจหายีนต่างๆ ของไวรัส เช่น L1, E1, E4, E6, E7 เป็นต้น เพื่อที่จะระบุความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรี ซึ่งมีสาเหตุหลักจากการติดเชื้อ HPV ดังนั้นการตรวจหาการติดเชื้อ HPV ชนิดความเสี่ยงสูงและยีนของ HPV ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเพิ่มขึ้นของความเสี่ยงต่อการเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกจึงมีความสำคัญยิ่งนักในการวินิจฉัยโรค [130]

การศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มผู้วิจัยเกี่ยวกับงานทางด้าน HPV DNA และการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ HPV ชนิด 16 แสดงให้เห็นว่าการตรวจบริเวณยีน E1 ของไวรัสสามารถตรวจพบ HPV ชนิดความเสี่ยงสูงได้ดีกว่าการตรวจหาการติดเชื้อ HPV ที่บริเวณยีน L1 ของไวรัสเนื่องจากมีความไวในการตรวจวัดมาก (sensitive) จึงน่าจะเป็นตัวเลือกหนึ่งที่เหมาะสมจะนำมาทำการจำแนกสายพันธุ์ของ HPV [10] แต่ด้วยเทคนิค nested-PCR มีความไวในการตรวจวัดมากจึงส่งผลให้การวิเคราะห์หาความชุกและชนิดของ HPV จากสตรีในประเทศไทยพบการติดเชื้อ HPV ในกลุ่มเซลล์ปกติด้วย [9] ดังนั้นการตรวจหา HPV DNA อาจนำไปสู่การรักษาเกินความจำเป็น สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และเพิ่มความวิตกกังวลกับสตรีที่เข้ารับการรักษาได้

เพื่อที่จะตรวจหาการทำงานของไวรัสโดยการตรวจหาการแสดงออกของ mRNA ของไวรัส สิ่งสำคัญในการตรวจวัดในระดับ mRNA คือการคงอยู่ของ mRNA ในเซลล์ตัวอย่างที่จะทำการตรวจวัดและขนาดของยีนที่ต้องการศึกษา ซึ่งตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ถูกเก็บในสารละลาย thin prep ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ [9, 10] และการเลือกใช้นิวคลีโอไทด์ E4 เนื่องจากการแสดงออกของยีน E4 ในระดับ mRNA สามารถพบได้เมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนมากในเซลล์เจ้าบ้าน [26] นอกจากนี้โปรตีน E4 สามารถสร้างความเสียหายให้กับ keratinocytes ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง [6] ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าการตรวจหาการแสดงออกของ E4 mRNA น่าจะมีประโยชน์ในการใช้ติดตามการติดเชื้อ HPV ในสตรีต่อไปในอนาคต

การกำหนดขนาดตัวอย่างกำหนดโดยการทำ Pilot study และคำนวณตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ผลด้วย one-way anova ที่ power เท่ากับ 0.99 [155] พบว่าจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมคือต้องใช้ตัวอย่างน้อยกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง แต่สุดท้ายเพิ่มตัวอย่างสำหรับการทดลองเป็นกลุ่มละ 20 ตัวอย่างเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

จากผลของ REAL-TIME RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน E4 ใน Human Papillomavirus (HPV) มีการแสดงออกเฉพาะคนที่ติดเชื้อ HPV อย่างชัดเจนโดยยีน HPV E4 ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งในเซลล์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพจะไม่มีการแสดงออกในระดับ mRNA ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา [8] แต่ไม่พบการแสดงออกในเซลล์ปกติ ซึ่งข้อเสียของการตรวจหาการแสดงออกของ ยีน HPV ในระดับ mRNA ที่ผ่านมาสามารถตรวจพบที่มีการแสดงออกได้ตั้งแต่ในระยะที่เซลล์ยังปกติซึ่งจะส่งผลให้เกิดปัญหา “false-positive” ดังนั้นการตรวจการแสดงออกของยีน HPV ในระดับ mRNA ที่ผ่านมาอาจนำไปสู่การรักษาเกินความจำเป็น สูญเสียค่าใช้จ่าย และทำให้เกิดความกังวลใจต่อผู้ป่วยด้วย แต่การตรวจการแสดงออกของยีน E4 ด้วยวิธีนี้สามารถพบการแสดงออกได้ตั้งแต่ในระยะก่อนมะเร็งแต่ไม่มีการแสดงออกในกรณีที่เซลล์ยังปกติอยู่นอกจากนี้ยังได้กำจัด genomics DNA ด้วยการใช้ DNase ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถใช้กำจัด genomics DNA ได้จริง [159] จึงลดปัญหา “false-positive” ได้วิธีนี้จึงมีความน่าสนใจมากกว่าที่จะนำมาใช้ในการติดตามหาแนวโน้มของการเกิดมะเร็ง

การศึกษานี้หลีกเลี่ยงการเกิด “false-negative” ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสลายตัวของ RNA โดยการตรวจหา RNA internal control (GAPDH) ในทุกตัวอย่างเมื่อมีการศึกษาการแสดงออกของยีน E4 ซึ่งให้ผลบวกทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา

เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV และมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพพบที่มีการแสดงออกของยีน E4 ในกลุ่ม LSIL HSIL Cancer พบการแสดงออกประมาณ  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.2 \times 10^7$  และ  $2.26 \times 10^3$  เท่าของเซลล์ปกติตามลำดับจากการทดลองจะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีน E4 จะสามารถสังเกตเห็นได้ตั้งแต่ในระยะ LSIL ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา [13] โดยงานวิจัยนี้พบการแสดงออกในระดับ mRNA มากที่สุดที่ระยะ HSIL โดยระยะนี้เป็นระยะที่มีความเสี่ยงมากที่สุดก่อนจะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งถ้าไม่ได้รับการรักษา [4] และจากผลการศึกษานี้จะสามารถใช้เทคนิคนี้ในการบ่งบอกว่าผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ดังนั้นการทดลองนี้ควรได้รับการต่อยอดต่อไปเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไปในอนาคต

จากนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน E4 ในเซลล์ที่อยู่ในระยะมะเร็งที่เก็บด้วยวิธีที่ Pap smear และ biopsy พบว่าการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในกรณีที่เก็บตัวอย่างแบบ Pap smear จำนวนตัวอย่างที่พบการแสดงออกของยีน E4 ในระดับ mRNA มีมากกว่าในกรณีที่เก็บด้วยวิธี biopsy ซึ่งสอดคล้องการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน E4 ในระดับ protein จะมีมากกว่าผิวของเซลล์ปกติ [65] จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเก็บ ตัวอย่าง แบบ Pap smear และแบบ biopsy

สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน E4 ได้เช่นกัน แต่จำนวนตัวอย่างที่มี การแสดงออกของยีน E4 ที่เก็บแบบ Pap smear พบได้มากกว่าการเก็บแบบ biopsy ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการแยกสารพันธุกรรมออกจากชิ้นเนื้อ มีขั้นตอนที่ยุงยากกว่าและอาจทำให้มีการสูญเสียสารพันธุกรรมระหว่างขั้นตอนการทำงานได้ ซึ่งสอดคล้องกับ ตัวอย่างที่เก็บแบบ biopsy โดยที่ในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลการแสดงออกของยีน E4 เป็นลบจะพบการแสดงออกของ internal control (GAPDH) ในรอบของ cycle threshold สูงกว่าปกติ ซึ่งสูงกว่าการเก็บแบบ Pap smear ดังนั้นใน อนาคตอาจเลือกใช้การเก็บตัวอย่างแบบ Pap smear และไม่จำเป็นต้องทำการเก็บตัวอย่างแบบ biopsy ซึ่งจะ ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ช่วยลดขั้นตอนการสกัด RNA ซึ่งเป็นผลให้ลดการสูญเสียสารพันธุกรรมก่อนที่จะนำมาตรวจสอบ และไม่จำเป็นต้องตัดชิ้นเนื้อบริเวณปากมดลูกของผู้ป่วย

การแสดงออกของ HPV16 E4 ในระดับ mRNA จากเซลล์ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV ที่อยู่ในระยะมะเร็งมีการ แสดงออกน้อยกว่าในระยะอื่นๆ อาจเนื่องมาจากธรรมชาติของยีน E4 ในเซลล์เจ้าบ้านที่มีการแสดงออกลดลงใน ระยะมะเร็ง [13] ซึ่งยังคงต้องหาคำอธิบายเพิ่มเติมเพื่อกำจัดข้อสงสัยดังกล่าว นอกจากนี้ตัวอย่างในระยะมะเร็งที่ใช้ ในการศึกษาเป็นการเก็บจากต่างที่และใช้สารละลายในการเก็บที่แตกต่างกัน (Thin Prep และ PBS) ซึ่งอาจส่งผล ให้การแสดงออกของยีน E4 ระยะมะเร็งไม่พบในทุกตัวอย่างเหมือนในระยะ LSIL และ HSIL ที่เก็บตัวอย่างใน สารละลาย Thin Prep เท่านั้น เพราะฉะนั้นขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและสารละลายที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างก็มี ความสำคัญต่อการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีน E4 ในการติดตามการเกิดมะเร็งปากมดลูก ต่อไป ใน อนาคต

โดยสรุปเราสามารถพบความสัมพันธ์ของการแสดงของ HPV16 E4 ด้วยการตรวจหา mRNA กับการรอยโรค ที่เซลล์ปากมดลูกเมื่อมีการติดเชื้อ HPV ดังนั้นการแสดงออก HPV16 E4 น่าจะมีความสัมพันธ์กับเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ปากมดลูก ซึ่งเราสามารถพบการแสดงออกของยีน E4 ได้ตั้งแต่รอยโรคก่อนมะเร็งจนถึงระยะมะเร็งแต่ไม่พบใน เซลล์ปกติ โดยที่เชื่อว่าการแสดงออกของไวรัสในรูปที่มีการรวมตัวกับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้านทำให้พบการ transcription ได้ ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการพัฒนารอยโรคที่รุนแรงมากขึ้นจนถึงขั้นที่เป็นมะเร็งได้ นอกจากนี้เทคนิคนี้อาจใช้สำหรับการคัดกรองปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งปากมดลูกต่อไปในอนาคต



## รายการอ้างอิง

- [1] World Health Organization, WORLD: Human Papilloma virus and Related Cancers Summary Report Update. 15 (2010).
- [2] World Health Organization, THAILAND: Human Papilloma virus and Related Cancers Summary Report Update. 29 (2010).
- [3] Walboomers JM, *et al.* Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 189 (1999): 12-19.
- [4] Insinga RP, Dasbach EJ, and Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. BMC Infect Dis. 9 (2009): 119.
- [5] Cuzick J, *et al.* A systematic review of the role of human papilloma virus testing within a cervical screening programme. Br J Cancer. 83 (2000): 561-565.
- [6] McIntosh PB, *et al.* E1<sup>+</sup>E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. J Cell Sci. 123 (2010): 2810-2822.
- [7] Chow LT, Duffy AA, Wang HK, and Broker TR. A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus. Cell Cycle. 8 (2009): 1319-1323
- [8] Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, and Pawlita M. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. Cancer Res. 70 (2010): 249-256.
- [9] Chansaenroj J, *et al.* Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women. Asian Pac J Cancer Prev. 11 (2010):117-122.
- [10] Lurchachaiwong W, *et al.* Relationship between hybrid capture II ratios and DNA amplification of E1, E6 and L1 genes used for the detection of human papillomavirus in samples with different cytological findings. Asian Pac J Allergy Immunol. 27 (2009): 217-224.
- [11] A Kathrine Lie, and Gunnar Kristensen. Human Papilloma virus E6/E7 mRNA Testing as a Predictive Marker for Cervical Carcinoma. Expert Review of Molecular Diagnostics. 8 (2008): 405-415.
- [12] H. Griesser, H. Sander, and R. Hilfrich. Immunochemical HPV L1 capsid detection in gynecological smear preparation: Prognostic marker for mild/moderate dysplasia. Cyto-Info issue. 1 (2007).
- [13] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond). 110 (2006): 525-541.
- [14] Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, and de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology. 401 (2010): 70-79.
- [15] Conway MJ, and Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. J Dent Res. 88 (2009): 307-317.

- [16] Plummer EM, and Manchester M. viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 3 (2011): 174-196.
- [17] Bravo IG, de Sanjosé S, and Gottschling M. Papillomaviruses and Darwinian classification: response to Van Doorslaer et al. Trends Microbiol. 19 (2010): 50-51.
- [18] Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, and Gissmann L. Chaptetr 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 24 (2006): S31-10.
- [19] DiMaio D, and Liao JB. Human papillomaviruses and cervical cancer. Adv Virus Res. 66 (2006): 125-159.
- [20] McLaughlin-Drubin ME, and Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. Virus Res. 143 (2009): 195-208.
- [21] Ustav M, and Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. EMBO J. 10 (1991): 449-457.
- [22] Sedman J, and Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. J Virol. 72 (1998): 6893-6897.
- [23] Lee D, Sohn H, Kalpana GV, Choe J, and Choe J. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. Nature. 339 (1999): 487-491.
- [24] Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 31 (2002): 343-360.
- [25] Antson AA, *et al*. Structure of the intact transactivation domain of the papillomavirus E2 protein. Nature. 403 (2000): 805-809.
- [26] Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, and Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. J Virol. 79 (2005): 13150-13165.
- [27] Suprynowicz FA, *et al*. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. J Virol. 84 (2010): 10619-10629.
- [28] Fehrmann F, Klumpp DJ, and Laimins LA. Human Papillomavirus Type 31 E5 Protein Supports Cell Cycle Progression and Activates Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation. J Virol. 77 (2003): 2819-2831.
- [29] Crusius K, Auvinen E, and Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. Oncogene. 15 (1997): 1437-1444.
- [30] Hwang ES, Nottoli T, and Dimaio D. The HPV16 E5 Protein: Expression, Detection, and Stable Complex Formation with Transmembrane Proteins in COS Cells. Virology. 211 (1995): 227-233.
- [31] Nominé Y, *et al*. Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain. Biochemistry. 42 (2003): 4909-4917.
- [32] Li X, and Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. J Virol. 70 (1996): 4509-4516.

- [33] Wang J, Zhou D, Prabhu A, Schlegel R, and Yuan H. The canine papillomavirus and gamma HPV E7 proteins use an alternative domain to bind and destabilize the retinoblastoma protein. PLoS Pathog. 6 (2010): e1001089.
- [34] Edmonds C, and Vousden KH. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. J Virol. 63 (1989): 2650-2656.
- [35] Joyce JG, *et al.* The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. J Biol Chem. 274 (1999): 5810-5822.
- [36] Yoon CS, Kim KD, Park SN, and Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. Biochem Biophys Res Commun. 283 (2001): 668-673.
- [37] de Witte L, *et al.* Binding of human papilloma virus L1 virus-like particles to dendritic cells is mediated through heparan sulfates and induces immune activation. Immunobiology. 212 (2007): 679-691.
- [38] Ishii Y, Ozaki S, Tanaka K, and Kanda T. Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. Virus Genes. 31 (2005): 321-328.
- [39] Zhou J, Sun XY, Louis K, and Frazer IH. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. J Virol. 68 (1994): 619-625.
- [40] Yang R, Yutzy WH, Viscidi RP, and Roden RB. Interaction of L2 with beta -Actin Directs Intracellular Transport of Papillomavirus and Infection. J Biol Chem. 278 (2003): 12546-12553.
- [41] Vinokurova S, *et al.* Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. Cancer Res. 68 (2008): 307-313.
- [42] Ijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, and van de Wijkert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. Lancet Infect Dis. 10 (2010): 862-874.
- [43] Kahn JA. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. N Engl J Med. 361 (2009): 271-278.
- [44] Knipe DM, and Howley PM. Fields Virology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, (2001): 65-66.
- [45] Day PM, and Schiller JT. The role of furin in papillomavirus infection. Future Microbiol. 4 (2009): 1255-1262.
- [46] Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, and Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. J Virol. 83 (2009): 2067-2074.
- [47] McMillan NA, Payne E, Frazer IH, and Evander M. Expression of the alpha6 Integrin Confers Papillomavirus Binding upon Receptor-Negative B-Cells. Virology. 261 (1999): 271-279.

- [48] Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, and McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. J Virol. 71 (1997): 2449-2456.
- [49] Sapp M, and Day PM. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. Virology. 384 (2009): 400-409.
- [50] Day PM, Lowy DR, and Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. Virology. 307 (2003): 1-11.
- [51] Day PM, Baker CC, Lowy DR, and Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. Proc Natl Acad Sci USA. 101 (2004): 14252-14257.
- [52] Florin L, Sapp C, Streeck RE, and Sapp M. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. J Virol. 76 (2002): 10009-10014.
- [53] Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY, and Frazer I. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. J Virol. 73 (1999): 4972-4982.
- [54] Day PM, Roden RB, Lowy DR, and Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription replication protein, E2, to PML oncogenic domains. J Virol. 72 (1998): 142-150.
- [55] Bryan JT, and Brown DR. Association of the human papillomavirus type 11 E1<sup>E4</sup> protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. Virology. 277 (2000): 262-269.
- [56] Lehr E, Hohl D, Huber M, and Brown D. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. J Med Virol. 72 (2004): 478-483.
- [57] Doorbar J, *et al.* Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. Virology. 238 (1997): 40-52.
- [58] Middleton K, *et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. J Virol. 77 (2003): 10186-10201.
- [59] Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, and Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. J Virol. 78 (2004): 2142-2151.
- [60] Davy CE, *et al.* Human papillomavirus type 16 E1<sup>E4</sup>-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. J Virol. 79 (2005): 3998-4011.
- [61] Knight GL, Grainger JR, Gallimore PH, and Roberts S. Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis. J Virol. 78 (2004): 13920-13933.
- [62] Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, and Beard P. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. J Virol. 78 (2004): 7199-7207.
- [63] Doorbar J, *et al.* The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. J Virol. 74 (2000): 10081-10095.

- [64] Zheng ZM, and Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. Front Biosci. 11 (2006): 2286-2302.
- [65] Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. Dis Markers. 23 (2007): 297-313.
- [66] Wilson R, Ryan GB, Knight GL, Laimins LA, and Roberts S. The full-length E1<sup>E4</sup> protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. Virology. 362 (2007): 453-460.
- [67] Wang Q, *et al*. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1<sup>E4</sup> protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. J Virol. 78 (2004): 821-833.
- [68] Hoory T, Monie A, Gravitt P, and Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. J Formos Med Assoc. 107 (2008): 198-217.
- [69] Bosch FX, *et al*. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26S10 (2008): K1-16.
- [70] Anastos K, *et al*. Risk factors for cervical precancer and cancer in HIV-infected, HPV-positive Rwandan women. PLoS One. 5 (2010): e13525.
- [71] Daling JR, *et al*. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 5 (1996): 541-548.
- [72] Nielson CM, *et al*. Multiple-type human papillomavirus infection in male anogenital sites: prevalence and associated factors. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18 (2009): 1077-1083.
- [73] Shew ML, *et al*. Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. Arch Pediatr Adolesc Med. 160 (2006): 151-156.
- [74] Parada R, Morales R, Giuliano AR, Cruz A, Castellsagué X, and Lazcano-Ponce E. Prevalence, concordance and determinants of human papillomavirus infection among heterosexual partners in a rural region in central Mexico. BMC Infect Dis. 10 (2010): 223.
- [75] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, and Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 338 (1998): 423-428.
- [76] Peyton CL, *et al*. Determinants of Genital Human Papillomavirus Detection in a US Population. J Infect Dis. 183 (2001): 1554-1564.
- [77] Domīa G, Gudleviciene Z, Didīapetriene J, Valuckas KP, Kazbariene B, and Drasutiene G. Human papillomavirus infection in pregnant women. Arch Gynecol Obstet. 18 (2010).
- [78] Smith EM, Parker MA, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, and Turek LP. Evidence for Vertical Transmission of HPV from Mothers to Infants. Infect Dis Obstet Gynecol. (2010): 3263-3269.
- [79] Anttila T, *et al*. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA. 285 (2001): 47-51.



- [80] Gillet E, *et al.* Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. BMC Infect Dis. 11 (2011): 10.
- [81] Shannon J, *et al.* Dietary risk factors for invasive and in-situ cervical carcinomas in Bangkok, Thailand. Cancer Causes Control. 13 (2002): 691-699.
- [82] González CA, *et al.* Dietary factors and in situ and invasive cervical cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. Int J Cancer. (2010).
- [83] Lacey JV Jr, *et al.* Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Cancer. 98 (2003): 814-821.
- [84] Lundell LR. Etiology and risk factors for esophageal carcinoma. Dig Dis. 28 (2010): 641-644.
- [85] Mayer DK, and Carlson J. Smoking patterns in cancer survivors. Nicotine Tob Res. 13 (2011): 34-40.
- [86] Remoue F, Jacobs N, Miot V, Boniver J, and Delvenne P. High intraepithelial expression of estrogen and progesterone receptors in the transformation zone of the uterine cervix. Am J Obstet Gynecol. 189 (2003): 1660-1665.
- [87] Weiderpass E, *et al.* Alcoholism and risk for cancer of the cervix uteri, vagina, and vulva. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 10 (2001): 899-901
- [88] Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine. 24 (2006): S16-22.
- [89] Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. Nat Rev Cancer. 2 (2002): 59-65.
- [90] Steele JC, *et al.* T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. Br J Cancer. 93 (2005): 248-259.
- [91] Man S, and Fiander A. Immunology of human papillomavirus infection in lower genital tract neoplasia. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 15 (2001): 701-714.
- [92] de Gruijl TD, *et al.* Immunoglobulin G Responses Against Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in a Prospective Nonintervention Cohort Study of Women With Cervical Intraepithelial Neoplasia. J Natl Cancer Inst. 89 (1997): 630-638.
- [93] Bierl C, *et al.* Correlates of cervical mucosal antibodies to human papillomavirus 16: results from a case control study. Gynecol Oncol. 99 (2005): S262-268.
- [94] Kupper TS, and Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nat Rev Immunol. 4 (2004): 211-222.
- [95] Le Bon A, and Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. Curr Opin Immunol. 14 (2002): 432-436.
- [96] Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, and Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. Annu Rev Immunol. 23 (2005): 307-336.



- [97] Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, and Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. J Virol. 75 (2001): 4283-4296.
- [98] Solomon D, *et al*. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. JAMA. 287 (2002): 2114-2119.
- [99] Richart RM. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. Cancer. 60 (1987): 1951-1959.
- [100] Lungu O, Sun XW, Felix J, Richart RM, Silverstein S, and Wright TC Jr. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. JAMA. 267 (1992): 2493-2496.
- [101] Bollmann M, Bánkfalvi A, Trosic A, Speich N, Schmitt C, and Bollmann R. Can we detect cervical human papillomavirus (HPV) infection by cytomorphology alone? Diagnostic value of non-classic cytological signs of HPV effect in minimally abnormal Pap tests. Cytopathology. 16 (2005): 13-21.
- [102] Cho NH, *et al*. Multinucleation of koilocytes is actually multilobation. Int J Gynecol Cancer. 16 (2006): 686-689.
- [103] Sherman ME, Dasgupta A, Schiffman M, Nayar R, and Solomon D. The Bethesda Interobserver Reproducibility Study (BIRST): a web-based assessment of the Bethesda 2001 System for classifying cervical cytology. Cancer. 111 (2007): 15-25.
- [104] Park J, Sun D, Genest DR, Trivijitsilp P, Suh I, and Crum CP. Coexistence of low and high grade squamous intraepithelial lesions of the cervix: morphologic progression or multiple papillomaviruses?. Gynecol Oncol. 70 (1998): 386-391.
- [105] Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, and Pimenta JM. Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14 (2005): 1157-1164.
- [106] Winer RL, *et al*. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. J Infect Dis. 191 (2005): 731-738.
- [107] Ueda Y, *et al*. Monoclonal Expansion with Integration of High-Risk Type Human Papillomaviruses Is an Initial Step for Cervical Carcinogenesis: Association of Clonal Status and Human Papillomavirus Infection with Clinical Outcome in Cervical Intraepithelial Neoplasia. Lab Invest. 83 (2003): 1517-1527.
- [108] Clifford GM, Smith JS, Aguado T, and Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. Br J Cancer. 89 (2003): 101-105.
- [109] Ng WK. Thin-layer (liquid-based) cytologic findings of papillary squamotransitional cell carcinoma of the cervix. Review of cases over a 4-year period with emphasis on potential diagnostic pitfalls. Acta Cytol. 47 (2003): 141-148.
- [110] Ruba S, Schoolland M, Allpress S, and Sterrett G. Adenocarcinoma in Situ of the Uterine Cervix Screening and Diagnostic Errors in Papanicolaou Smears. Cancer. 102 (2004): 280-287.

- [111] Fregnani JH, Soares FA, Novik PR, Lopes A, and Latorre MR. Comparison of biological behavior between early-stage adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 136 (2008): 215-223.
- [112] Kalir T, Simsir A, Demopoulos HB, and Demopoulos RI. Obstacles to the Early Detection of Endocervical Adenocarcinoma. Int J Gynecol Pathol. 24 (2005): 399-403.
- [113] Zhou C, Hayes MM, Clement PB, and Thomson TA. Small cell carcinoma of the uterine cervix: cytologic findings in 13 cases. Cancer. 84 (1998): 281-288.
- [114] Crapanzano JP, Cardillo M, Lin O, and Zakowski MF. Cytology of desmoplastic small round cell tumor. Cancer. 96 (2002): 21-31.
- [115] Nayar R, and Tabbara SO. Atypical squamous cells: update on current concepts. Clin Lab Med. 23 (2003): 605-632.
- [116] Krane JF, Lee KR, Sun D, Yuan L, and Crum CP. Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance Outcome Predictions Based on Human Papillomavirus Testing. Am J Clin Pathol. 121 (2004): 87-92.
- [117] Chhieng DC, Elgert P, Cohen JM, and Cangiarella JF. Clinical Implications of Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance, Favor Endometrial Origin. Cancer. 93 (2001): 351-356.
- [118] Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, and Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. Int J Cancer. 128 (2011): 927-935.
- [119] Berkhof J, and Bogaards JA. Vaccination against human papillomavirus types 16 and 18: the impact on cervical cancer. Future Oncol. 6 (2010): 1817-1821.
- [120] Park MA, Kim HJ, and Kim HJ. Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Expr Purif. 59 (2008): 175-181.
- [121] Senger T, Schädlich L, Gissmann L, and Müller M. Enhanced papillomavirus-like particle production in insect cells. Virology. 388 (2009): 344-353.
- [122] Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. Indian J Med Res. 130 (2009): 266-276.
- [123] Einstein MH, *et al.* Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. Hum Vaccin. 5 (2009): 705-719.
- [124] Stanley M. Prospects for new human papillomavirus vaccines. Curr Opin Infect Dis. 23 (2010): 70-75.
- [125] Zhang T, *et al.* Trivalent Human Papillomavirus (HPV) VLP vaccine covering HPV type 58 can elicit high level of humoral immunity but also induce immune interference among component types. Vaccine. 28 (2010): 3479-3487.
- [126] Jagu S, Kwak K, Garcea RL, and Roden RB. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. Vaccine. 28 (2010): 4478-4486.

- [127] Yeager MD, *et al.* Neutralization of Human Papillomavirus (HPV) Pseudovirions: A Novel and Efficient Approach to Detect and Characterize HPV Neutralizing Antibodies. Virology. 278 (2000): 570-577.
- [128] Frazer IH. Measuring serum antibody to human papillomavirus following infection or vaccination. Gynecol Oncol. 118 (2010): S8-11.
- [129] Berzofsky JA, *et al.* Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. J Clin Invest. 114 (2004): 450-462.
- [130] Molijn A, Kleter B, Quint W, and van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol. 32 (2005): S43-51.
- [131] Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, and Walboomers JM. A general primer GP5+/ GP6 (+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. J Clin Microbiol. 35 (1997): 791-795.
- [132] Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, and Walboomers JM. Group-Specific Differentiation between High- and Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes by General Primer-Mediated PCR and Two Cocktails of Oligonucleotide Probes. J Clin Microbiol. 33 (1995): 901-905.
- [133] Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, and Wheeler CM. Genotyping of 27 Human Papillomavirus Types by Using L1 Consensus PCR Products by a Single-Hybridization, Reverse Line Blot Detection Method. J Clin Microbiol. 36 (1998): 3020-3027.
- [134] Gravitt PE, *et al.* Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. J Clin Microbiol. 38 (2000): 357-361.
- [135] Iftner T, and Villa LL. Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies. J Natl Cancer Inst Monogr. (2003): 80-88.
- [136] Kleter B, *et al.* Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses. Am J Pathol. 153 (1998): 1731-1739.
- [137] Kleter B, *et al.* Development and Clinical Evaluation of a Highly Sensitive PCR-Reverse Hybridization Line Probe Assay for Detection and Identification of Anogenital Human Papillomavirus. J Clin Microbiol. 37 (1999): 2508-2517.
- [138] Snijders PJ, van den Brule AJ, and Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. J Pathol. 201 (2003): 1-6.
- [139] Klaassen CH, Prinsen CF, de Valk HA, Horrevorts AM, Jeunink MA, and Thunnissen FB. DNA Microarray Format for Detection and Subtyping of Human Papillomavirus. J Clin Microbiol. 42 (2004): 2152-2160.
- [140] Ermel A, *et al.* Human papillomavirus detection and typing in thin prep cervical cytologic specimens comparing the Digene Hybrid Capture II Assay, the Roche Linear Array HPV Genotyping Assay, and the Kurabo GeneSquare Microarray Assay. J Virol Methods. 169 (2010): 154-161.

- [141] Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, and Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. J Virol Methods. 156 (2009): 77-83.
- [142] Yoshida T, *et al.* Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. Int J Gynecol Cancer. 18 (2008): 121-127.
- [143] Ramanakumar AV, *et al.* Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. BMC Infect Dis. 10 (2010): 326.
- [144] Peitsaro P, Johansson B, and 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. 40 (2002): 886-891.
- [145] Thiery F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. Virology. 384 (2009): 375-379.
- [146] Fontaine J, *et al.* High levels of episomal and integrated HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. AIDS. 19 (2005): 785-794.
- [147] Azizi N, *et al.* Influence of HPV-16 E2 polymorphism on quantitation of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. J Gen Virol. 89 (2008): 1716-1728.
- [148] Widschwendter A, *et al.* Analysis of Aberrant DNA Methylation and Human Papillomavirus DNA in Cervicovaginal Specimens to Detect Invasive Cervical Cancer and Its Precursors. Clin Cancer Res. 10 (2004): 3396-3400.
- [149] Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H, and Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. Virology. 361 (2007): 185-193.
- [150] de la Cruz-Hernández E, *et al.* The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. Virol J. 4 (2007): 18.
- [151] Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, and Hagmar B. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. Gynecol Oncol. 100 (2006): 95-100.
- [152] Castle PE, *et al.* A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. Clin Cancer Res. 13 (2007): 2599-2605.
- [153] Cattani P, *et al.* Clinical Performance of Human Papillomavirus E6 and E7 mRNA Testing for High-Grade Lesions of the Cervix. J Clin Microbiol. 47 (2009): 3895-3901.

- [154] Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonego J, and Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. J Clin Virol. 45 (2009): 55-61.
- [155] Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2<sup>nd</sup> ed. Hillsdale (NJ): Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, 1988.
- [156] Sunchai Payungporn. Molecular characterization and molecular diagnosis of recently emerged influenza A viruses (H5N1&H3N8). Ph.D. Thesis. Faculty of Medicine Chulalongkorn University 2006.
- [157] Liz Marcus, Jim Hartnett and Douglas R. The pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Promega Notes Magazine. 58 (1996): 36.
- [158] Keppel G., and Wickens T. D. Design and analysis: A researcher's handbook. 4<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, (2004).
- [159] Martel F, Gründemann D, and Schömig E. A simple method for elimination of false positive results in RT-PCR. J Biochem Mol Biol. 35 (2002): 248-250.
- [160] Cornish-Bowden A. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. Nucleic Acids Res. 13 (1985): 3021-3030.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

## การเตรียมสารเคมี

## 1. 3.5 M Guanidine thiocyanate

Guanidine thiocyanate	18.75 กรัม
0.75M Sodium Acetate	1.32 มิลลิลิตร
30% (w/v) Sodium-N-lauryl sarcosine	0.66 มิลลิลิตร

จากนั้นเติม DEPC water จนมีปริมาตรเป็น 45 มิลลิลิตร แล้วอุ่นที่ 60°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

## 2. 0.05 M Lysis buffer

Tris-HCl	0.105 กรัม
EDTA	0.1245 กรัม
SDS	0.335 กรัม

จากนั้นเติม Autoclave distilled water จนมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 3. 5x Tris borate buffer (5x TBE)

Tris-base	54.0 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
EDTA (pH 8.0)	20.0 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 4. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4 กรัม
1x TBE	200 มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

## 5. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30 ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่น	300 มิลลิลิตร

## 6. Loading dye

0.25% Bromphenol blue
40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C

## 7. DEPC water

Diethyl pyrocarbonate	0.1 มิลลิลิตร
Autoclave distilled water	100.0 มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำไป incubate ที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

## 8. Soc media 100 มิลลิลิตร

Tryptone	2.00	กรัม
Yeast	0.50	กรัม
1 M NaCl	1.00	มิลลิลิตร
1 M KCl	0.25	มิลลิลิตร
Distilled water	100.00	มิลลิลิตร
นำไป Autoclave		
2 M Mg <sup>2+</sup>	1.00	มิลลิลิตร
2 M glucose	1.00	มิลลิลิตร

## 9. LB Agar 100 มิลลิลิตร

Agarose gel	1.50	กรัม
Peptone	1.00	กรัม
Yeast	0.50	กรัม
NaCl	0.50	มิลลิลิตร
Distilled water	100.00	มิลลิลิตร
นำไป Autoclave		
10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ampicillin	10.00	ไมโครลิตร

## 10. LB broth 100 มิลลิลิตร

Peptone	1.00	กรัม
Yeast	0.50	กรัม
NaCl	0.50	มิลลิลิตร
Distilled water	100.00	มิลลิลิตร
นำไป Autoclave		
10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ampicillin	10.00	ไมโครลิตร

## 11. 10xPBS (pH7.4) 400 มิลลิลิตร

NaCl	32.00	กรัม
KCl	0.80	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.76	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.96	กรัม
H <sub>2</sub> O	~ 400.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย NaOH แล้วนำไป Autoclave

## ภาคผนวก ข

### หลักการออกแบบ Primer

การออกแบบ Primer จะต้องเลือกออกแบบให้เหมาะสมกับงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของ cDNA กับ primer ที่ถูกสร้างขึ้น การออกแบบ primer จะอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส HPV ที่สนใจจากฐานข้อมูลต่างๆ เช่น ฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เป็นต้น เพื่อให้ primer ที่เราออกแบบขึ้นมีความจำเพาะสูงที่สุด เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งที่เราต้องการจะศึกษาแล้ว ก็จะต้องนำลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมาเลือกและทำการออกแบบ primer ซึ่งมีหลักการดังนี้

1. ความยาวของ primer ควรมีความยาวประมาณ 15-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
2. ควรเลือก primer ที่มีค่า GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% และไม่ควรรเลือก primer ที่มีค่า GC-content สูงเกินไป
3. Primer ควรมีความจำเพาะกับลำดับเบสของ DNA เป้าหมาย (target sequence) โดยเฉพาะด้านปลาย 3' ของ primer และด้าน 3' end ควรเป็น C,G,CG หรือ GC เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับ DNA แม่แบบ และต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสาย DNA ต้นแบบเพื่อหลีกเลี่ยงการเพิ่มปริมาณของ cDNA ในส่วนที่ไม่ต้องการ (non-specific product)
4. หลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์บน primer ที่สามารถจับกันเองหรือเป็นคู่สม (primer dimer)
5.  $T_m$  (melting temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )) ควรอยู่ระหว่าง  $55-80^{\circ}\text{C}$  ซึ่งสูตรที่ปัจจุบันใช้ในการคำนวณค่า  $T_m$  มีอยู่ 2 วิธีขึ้นกับความยาวของ primer โดยที่ primer ที่มีขนาดไม่เกิน 14 นิวคลีโอไทด์จะคำนวณค่า  $T_m$  ได้จาก  $T_m = 4^{\circ}\text{C} (G+C) + 2^{\circ}\text{C} (A+T)$  สำหรับ primer ที่มีความยาวมากกว่า 14 นิวคลีโอไทด์ จะคำนวณค่า  $T_m$  ได้จาก  $T_m = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times ((G+C) - 16.4)/N$

\*A, T, C, G แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดบน primer และ N แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ primer

### การกำหนด Degenerate Primers

เนื่องจากเชื้อไวรัสแต่ละชนิดหรือแม้แต่นิวคลีโอไทด์เดียวกันก็สามารถพบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับ amino acid ที่แตกต่างกันได้เพราะฉะนั้นการ degenerate primer จึงช่วยให้การทดลองครอบคลุมกับชนิดของไวรัสมากขึ้นซึ่งสามารถกำหนดได้ดังนี้ [160]

ตารางที่ 24 แสดงความหมายของสัญลักษณ์ของการกำหนด Degenerate Primers

Symbol	Description	Bases represented			
A	Adenosine	A			
C	Cytidine		C		
G	Guanosine			G	
T	Thymidine				T
U	Uridine				U
W	Weak	A			T
S	Strong		C	G	
M	Amino	A	C		
K	Keto			G	T
R	Purine	A		G	
Y	Pyrimidine		C		T
B	Not A (B comes after A)		C	G	T
D	Not C (D comes after C)	A		G	T
H	Not G (H comes after G)	A	C		T
V	Not T (V comes after T (and U))	A	C	G	
N	Any base (not a gap)	A	C	G	T

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ (ภาษาไทย) นายเอกรัฐ ทรัพย์โชคพูล  
 (ภาษาอังกฤษ) Mr. Akerat Supchokpul

เกิดวันที่ 14 มกราคม 2530

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

สถานภาพ โสด

E-mail address: akerat\_sth@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 101/72 หมู่ 2 ถนนสายใหม่ เขตสายไหม กรุงเทพมหานคร 10220  
 โทรศัพท์ 0-2532-3917

การศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 พ.ศ. 2547-2551

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2551-2554

### การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานในหัวข้อเรื่อง : E4 Expression of Human Papillomavirus in Cervical Cytological

Samples: Discrepancy among Different Cytology Categories

เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and  
 Public Health