บทคัดย่อ

243134

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับ 2 ในผู้หญิงทั่วโลกรองจากมะเร็งเต้านม สำหรับประเทศไทยมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุด 20.9 ต่อ 100,000 คน และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ 19.5 คนต่อ 100,000 คน สาเหตุของมะเร็งปากมดลูกคือ human papillomavirus (HPV) แต่ใช่ว่าผู้ติดเชื้อ HPV จะเป็นมะเร็งปากมดลูกทุกคน มีการศึกษามากมายเพื่อบ่งบอกความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ HPV กับการเพิ่มความรุนแรงในการเกิดมะเร็งปากมดลูก พบว่า HPV16 เป็นชนิดที่พบได้บ่อยทั้งในการติดเชื้อในเซลล์ปกติและในเซลล์มะเร็งปากมดลูก การศึกษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยคณะผู้วิจัยก็พบว่าเชื้อ HPV16 เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ และสัมพันธ์กับการที่ผู้ติดเชื้อ HPV16 พัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก และการเกิด intratypic variation โดยเฉพาะ variation ในส่วนของจีน E6 ซึ่งเป็น oncoprotein มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็ง เมื่อจีนนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปทำให้โปรตีนที่ถูกสร้างออกมามีคุณสมบัติในการทำงานเปลี่ยนแปลงไปโดยอาจมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน E6

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในจีน E6 ในกลุ่มประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบ HPV16 As variants ร้อยละ74 และสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นในการวิจัยนี้จะทำการศึกษาบทบาทของ HPV16 As variants E6 ว่าทำให้เกิดโรคที่รุนแรงกว่า HPV 16 prototype หรือไม่ ข้อมูลที่ได้จะสามารถอธิบายบทบาทของ HPV16 As variants ในการก่อโรคในประชากรไทย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาและหาแนวทางป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูก และศึกษาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับประชากรไทย การศึกษาวิจัยเรื่องนี้แบ่งออกเป็น 3 ระยะ ๆ ละ 1 ปี รายงานการวิจัยฉบับนี้เป็นผลการทำวิจัยปีที่ 1 ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6-prototype สำหรับใช้ศึกษาวิจัยในโครงการปีต่อไป

ในการสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 E6-prototype ได้ใช้วิธี PCR ทำการเพิ่มปริมาณ E6 gene ของ HPV16 E prototype จาก HPV16 reference plasmid ส่วนการสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants ใช้วิธี PCR ทำการเพิ่มปริมาณ E6 gene ของ HPV16 As variants จาก DNA ที่สกัดจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ (paraffin embedded biopsies) ที่มีผล pathology เป็น squamous cell carcinomas ซึ่งทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจากการทำ sequencing การทำ PCR นี้ได้ออกแบบ primers ที่มีตำแหน่งจำเพาะกับลำดับ nucleotide ของ E6 gene ช่วงที่ 83-559 (ข้อมูลจาก GeneBank: K02718) และเหมาะสมกับการต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO® (Invitrogen) แล้วทำการเพิ่มจำนวนจีน E6-prototype และ จีน E6-As variants ด้วยวิธี PCR ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ดังกล่าว นำ PCR product ไป purify แล้วต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO® เพื่อสร้าง recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 แล้ว transformation เข้าไปใน competent cells *E. coli* และคัดเลือกโคลนโดย Ampicillins นำ

โคลนที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยทำการเลี้ยงใน LB broth ที่มี Ampicillins จากนั้นสกัด DNA ใช้เป็น template ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาจีน E6 คัดเลือกโคลนที่มีจีน E6 ไปสกัด plasmid เพื่อตรวจสอบ E6 expression vector ที่สร้างขึ้นโดยการนำไปตัดด้วย restriction enzyme และทำ sequencing

ผลการทดลองได้ primers ที่ออกแบบซึ่งมีความจำเพาะกับ E6 gene ของ HPV16 E prototype และ HPV16 As variants มีลำดับเบสเป็น Forward: 5'- CACCATGCACCAAAAGAGAACTGC-3' และ Reward: 5'- GAGCAGCTGGGTTTCTCTACGT-3' และให้ PCR product ขนาด 480 bp

เมื่อนำโคลนที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีจีน E6 จากการทำ PCR มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ Quick Plasmid Miniprep kit แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถตัดพลาสมิดที่สร้างขึ้นได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตรงบริเวณพลาสมิด 1 ตำแหน่ง และบริเวณจีนที่เชื่อมใส่เข้าไปอีก 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อตัดพลาสมิดที่มีจีนที่สนใจแล้วนำไปแยกโดยการ run ด้วย 0.7% agarose gel พบ DNA 2 ขนาด ได้แก่ 5340 bp และ 669 bp แสดงว่าสามารถสร้างโคลนที่มีพลาสมิดที่ต้องการได้ และเมื่อทำ sequencing ของ E6 gene ใน E6 expression vector ที่สร้างขึ้นพบว่ามีลำดับเบสถูกต้องตามที่คาด

จากผลการทดลองสามารถสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6-prototype ได้ตามวัตถุประสงค์ เพื่อนำไปใช้ศึกษาวิจัยในโครงการปีต่อไป โดยศึกษาทดสอบคุณสมบัติของ E6 ว่ามีผลต่อการทำงานของโปรตีน p53 และเอนไซม์ telomerase เปลี่ยนไปอย่างไรโดยเปรียบเทียบระหว่าง HPV16 As variants และ HPV16 E6-prototype