

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งอวัยวะสืบพันธุ์สตรีที่พบได้บ่อยที่สุด ในประเทศไทยมะเร็งปากมดลูกเป็นอันดับหนึ่งที่มีรายงานการตรวจพบในผู้หญิงและยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขอย่างมาก (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2555) พบมากในผู้หญิงช่วงอายุ 35-60 ปี สาเหตุการเกิดมะเร็งปากมดลูกยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนแต่มีปัจจัยหลายอย่างที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค เช่น การมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุยังน้อย มีบุตรมาก มีประวัติเป็นกามโรค การสูบบุหรี่ การมีคู่นอนหลายคน การมีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอ พันธุกรรม การขาดสารอาหารบางชนิด เป็นต้น มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (sexually transmitted cancer) ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าสาเหตุอันหนึ่งของมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงเกิดจากเชื้อ human papilloma viruses (HPVs) ชนิดที่ 16 และ 18 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม papillomaviruses ที่มีมากกว่าร้อยสายพันธุ์ การติดเชื้อของไวรัสแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อชนิดของโฮสต์ เช่น HPVs ก่อโรคในคน bovine papilloma viruses (BPVs) ก่อโรคในวัว ควายและ canine papilloma viruses (CPVs) ก่อโรคในสุนัข โดยไวรัสจะก่อให้เกิดเนื้องอกทั้งชนิดไม่ร้ายแรง (benign) เช่น หูด (wart หรือ papillomas) และชนิดร้ายแรง (carcinoma) เช่น มะเร็ง (cancer) (de Villiers และคณะ, 2004)

HPVs เป็นไวรัสในแฟมิลี *Papovaviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ มีการจัดตัวเรียงเป็นวงกลม เป็นสาเหตุทำให้เกิดรอยโรคบนเยื่อปื้นชนิด squamous โดยทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (proliferation) การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้วิธีทาง immunohistochemistry คือ การตรวจสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยการย้อมสีเฉพาะและการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เนื้อเยื่อโดยตรงผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jenson และคณะ, 1982; Melnick และคณะ, 1992) เพราะเชื้อ HPVs ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง แม้ว่าจะมีความพยายามนำไวรัสฉีดเข้าสู่สัตว์ทดลองแต่ก็พบลักษณะการติดเชื้อและการเกิดโรคมัลักษณะที่แตกต่างจากคน เนื่องจาก HPVs ไม่สามารถทำการเพาะแยกเชื้อได้ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการศึกษาในระยะแรกจึงใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและวิธีทาง immunohistochemistry แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาทางเทคโนโลยีมีเครื่องมือ, อุปกรณ์และวิธีการที่มีความไวและความแม่นยำสูงได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

สำหรับในต่างประเทศมีรายงานการตรวจวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของ HPVs กับการก่อโรคในคนอย่างต่อเนื่องแต่ในประเทศไทยการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับความสำคัญของ HPVs ยังมีน้อย จากการศึกษาวงจรชีวิตและกลไกในการก่อโรคของ papillomavirus พบว่าไวรัสจะเลือกติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ฐาน (basal cells) ของเยื่อปื้น (epithelium) เท่านั้น ซึ่งเซลล์ที่บริเวณนี้ยังมีคุณสมบัติในการแบ่งตัวอยู่ เมื่อเซลล์แบ่งตัวก็จะมีการจำลองยีนของไวรัสไปพร้อมกับเซลล์และยีนของไวรัสจะติดไปกับเซลล์ใหม่ทุกเซลล์ทำให้ไวรัสสามารถติดเชื้อในร่างกายได้นานหลายปีในที่สุดจะพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Zheng และ Baker, 2006)

ยีนของ papillomavirus แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามระยะการแสดงออกในช่วงวงจรชีวิตคือ early genes (E1, E2, E4, E5, E6 และ E7) และ late genes (L1 และ L2) เมื่อไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ฐานของเยื่อปื้น เซลล์ฐานจะมีการแบ่งตัวเป็นสองเซลล์ ในขณะเดียวกันไวรัสจะจำลองยีนไปพร้อมๆ กับโฮสต์ยีนทำให้ทั้งสองเซลล์มียีนของไวรัสติดอยู่โดยที่หนึ่งเซลล์จะเป็นเสมือนแหล่งเก็บยีนของไวรัสสำหรับการแบ่งตัวครั้งต่อไปซึ่งจะทำให้ยีนของไวรัสมีการจำลองและติดไปกับเซลล์ใหม่ทุกเซลล์ ส่วนเซลล์อีกหนึ่งเซลล์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์จะเคลื่อนที่สู่ชั้นบนพร้อมๆ กับการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเซลล์เยื่อปื้น (epithelial differentiation) จากนั้นยีน E1 และ E2 ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ replication และ transcription (zur Hausen, 2002) ของไวรัสยีนจะมีการแสดงออกเป็นอันดับแรก ต่อมา ยีน E6 และ E7 จะมีการแสดงออกเพื่อทำหน้าที่จับตัวกับโปรตีนของเซลล์ที่ควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์และโปรแกรมการตายของเซลล์ (Munger และ Howley, 2002) ซึ่งเป็นการยืดอายุของเซลล์เพื่อให้ไวรัสมีเวลานานพอในการผลิตอนุภาคไวรัสรุ่นลูกหลานและเมื่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคลื่อนที่สู่เซลล์ชั้นกลางๆ ของเนื้อเยื่อจะมีการถอดรหัสของยีน L1 ก่อนที่จะสังเคราะห์โปรตีนแคปซิดแล้วใช้ในการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสต่อไป

ในส่วนของอีโนมไวรัสนั้นนอกจากจะมีบริเวณที่ทำหน้าที่เป็นยีนแล้วยังมีบริเวณของ untranslated region (UTR) ที่ไม่มีการบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมใดๆ แต่มี elements ต่างๆ อยู่มากมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตของไวรัส ดังเช่นการแสดงออกของ late gene หรือยีน L1 ที่ถูกควบคุมโดย elements หลายชิ้นด้วยกันซึ่งปรากฏอยู่ทั้งใน L1 ORF และ 3'UTR ของไวรัสอีโนม (Tan และคณะ, 1995) ทั้งนี้มีหนึ่ง element สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของ L1 คือ late regulatory element (LRE) โดยมีการรายงานเกี่ยวกับ LRE ในอีโนมของ HPV-16 ว่าเป็นตัวสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของแคปซิดโปรตีน (Cumming และคณะ, 2003) จากการศึกษาของ Cumming และคณะ พบการสังเคราะห์โปรตีน L1 ในเซลล์ชั้นที่อยู่ในระยะสุดท้ายของการพัฒนาไปเป็นเยื่อบุผิว (epithelial differentiation) แต่จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค northern blot hybridisation กลับพบ RNA ของยีน L1 ในเซลล์ชั้นกลางๆ ของเนื้อเยื่อ จากผลการทดลองนี้แสดงว่ามีการถอดรหัสของยีน L1 เกิดขึ้นตั้งแต่ในชั้นเซลล์กลางแต่มีการควบคุมไม่ให้มีการแปลรหัสเป็นแคปซิดโปรตีนจนเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเยื่อบุผิวจึงจะมีการแปลรหัสเกิดขึ้น ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของยีน L1 น่าจะถูกควบคุมในระดับ post-transcription หรือในระดับ translation (Stoler และคณะ, 1989) ซึ่งกลไกการยับยั้งและการกระตุ้นของ LRE ในการควบคุมการแสดงออกของยีน L1 ยังไม่ทราบแน่ชัด

ดังที่กล่าวไปข้างต้นว่ากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน L1 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของ element ใน late 3' untranslated region ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมแสดงออกของยีน L1 ใน papillomaviruses 7 ทยิปด้วยกันคือ HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-31, BPV-1, BPV-3 และ BPV-4 ซึ่งมีความรุนแรงในการก่อโรคและมีโฮสต์ที่แตกต่างกันได้แก่ มนุษย์คือ HPVs และวัวคือ BPVs โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จะช่วยให้รู้และเข้าใจถึงกลไกรายละเอียดมากขึ้นและนำมาใช้ประกอบการสร้างแบบจำลองเพื่อการศึกษากลไกของ papillomaviruses ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. การโคลนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV- β -Galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3'UTR จาก papillomavirus 6 ทยิป ได้แก่ HPV6, HPV11, HPV16, HPV31, BPV3 และ BPV4
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของชิ้นส่วนใน late 3'UTR ของ papillomavirus 6 ทยิป โดยใช้ reporter gene system

สมมติฐานของการศึกษา

เนื่องจากว่าชิ้นส่วน element ในไวรัสแต่ละสายพันธุ์มีลำดับเบสที่แตกต่างกันซึ่งน่าจะส่งผลต่อกลไกและประสิทธิภาพของการทำงานที่ต่างกันด้วย

ขอบเขตของการศึกษา

1. เตรียมชิ้นส่วนอีโนมของ papillomavirus ทั้ง 6 ทยิป
2. ออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมชิ้นส่วน late 3'UTR ของ papillomavirus แต่ละทยิป
3. เชื่อมต่อชิ้นส่วน late 3'UTR ใน papillomavirus ทั้ง 6 ทยิป เข้าสู่ pGEM - T Easy Vector
4. เชื่อมต่อชิ้นส่วน late 3'UTR ใน papillomavirus ทั้ง 6 ทยิป เข้าสู่ pSV- β -galactosidase control Vector
5. ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV- β -Galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3'UTR เข้าสู่ HeLa cells
6. ศึกษาการแสดงออกของยีน *lac Z* โดยวิเคราะห์หา RNA ของยีน *lac Z* ด้วยเทคนิค RT-PCR