



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

“Integration site ของ HPV 16 และ HPV 58 DNA และปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของ HPV16 oncogene”

“Integration site of HPV16/58 and factors influence on HPV16 oncogene expression”

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.พญ. ทิพย์ เอกลักษณานันท์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.พญ. พิสมัย ยืนยาว คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “บทบาทของการติดเชื้อ human papillomavirus
ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก และการหาแนวทางการรักษาเบื้องต้น”

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2554

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “บทบาทของการติดเชื้อ human papillomavirus ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก และการหาแนวทางการรักษาเบื้องต้น” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2554 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การทำวิจัยสำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ รวมถึงผู้ป่วยที่อาสาสมัครเข้าร่วมในโครงการ และยินยอมให้ใช้ตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้งานวิจัยยังได้ดำเนินการเพิ่มเติมจากแผนงานวิจัยที่วางไว้โดย นายอาคม ไชยวงศ์คต ซึ่งเป็นนักศึกษาปริญญาเอก ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ทำการศึกษาวิจัยที่ Department of Applied Tumor Biology, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld, Heidelberg ประเทศเยอรมันนี ภายใต้การดูแลของ Professor Magnus von Knebel Doeberitz และ Dr. Svetlana Vinokurova คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมมา ณ ที่นี้

รศ.แจ่มใส เพียรทอง
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นสาเหตุของการตายที่พบได้มากที่สุดของโรคมะเร็งในผู้หญิงในประเทศกำลังพัฒนา และเป็นโรคที่สามารถรักษาให้หายได้หากตรวจพบตั้งแต่ระยะแรก สาเหตุสำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูกคือการติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) โดยตรวจพบ HPV DNA ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้สูงถึงร้อยละ 99.7 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก อย่างไรก็ตามผู้ที่ติดเชื้อ HPV ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูกทุกราย และตรวจพบ HPV DNA ได้ทั้งในเซลล์ปากมดลูกที่มีและไม่มีรอยโรคผิดปกติ (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) ดังนั้นปัญหาที่สำคัญคือยังไม่มี marker ชนิดใดที่ใช้บ่งบอกว่าผู้ที่ติดเชื้อ HPV รายใดจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ติดเชื้อไปเป็นเซลล์มะเร็ง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษากลไกของการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่มีสาเหตุจาก HPV

มีข้อมูลสนับสนุนว่ามะเร็งเกิดจาก viral genome integration เข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์ และเป็นจุดเริ่มต้นที่ส่งผลให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนผิดปกติ (monoclonal nature of HPV integration) แล้วจึงเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งปากมดลูก และการศึกษาในผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า HPV16 เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติและแบบไม่รุนแรง (ASCUS/LSIL) ตามด้วย HPV 58 ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือเพื่อศึกษา integration site ของ HPV16 และ HPV58 DNA และปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการแสดงออกของ HPV16 oncogene ได้แก่ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} และ HPV physical status ศึกษา DNA methylation เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ HPV16 mRNA E6/E7 กับภาวะ episomal และ integrated form และความสัมพันธ์กับภาวะของ DNA methylation ที่พบ ศึกษาเปรียบเทียบผลของการเกิด methylation บน HPV long control region (LCR) ต่อ HPV16 oncogenes promoter activity ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณ E2 binding site บน HPV LCR รวมทั้งศึกษาผลของ DNA methylation และโครงสร้างของโครมาตินต่อ viral oncogenes promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษานี้ได้ใช้ fresh tissue biopsy ของเนื้อเยื่อปากมดลูกทั้งสิ้น 344 ราย โดยมีผลการตรวจทาง histology เป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC จำนวน 65, 167, 75 และ 37 รายตามลำดับ จากการสกัด DNA จาก fresh tissue biopsy และตรวจหา HPV DNA โดยวิธี PCR พบ HPV DNA ร้อยละ 43.6 (150/344) โดยมีความชุกเพิ่มขึ้นตามระดับความผิดปกติของเซลล์ดังนี้ พบร้อยละ 27.7 (18/65), 35.3 (59/167), 57.3 (43/75), 81.1 (30/37) ในตัวอย่าง no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC ตามลำดับ การตรวจจำแนก HPV genotype โดยวิธี reverse line blot hybridization พบ HPV16 ทั้ง single infection และ multiple infections ร้อยละ 42 (63/150) ของผู้ติดเชื้อ HPV อันดับรองลงมาคือ HPV58 และ HPV18 พบร้อยละ 13.3 (20/150) และ 11.3 (17/150) ตามลำดับ และเชื้อ HPV ชนิดอื่นๆ ได้แก่ HPV6, 11, 31, 33, 35, 39, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 59, 66, 67 และ 70 และไม่ทราบชนิดมี 17 ตัวอย่าง

ในการศึกษา physical status และ chromosomal site of integration ของ HR-HPV ที่สำคัญ ได้แก่ HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 ได้สกัด RNA จาก fresh tissue biopsy ทั้งหมด แต่ได้ RNA ที่มี

คุณภาพดี ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบได้จำนวน 99 ตัวอย่าง โดยแยกเป็น HPV แต่ละไทป์ จำนวน 53, 10, 3, 4, 1 และ 28 ตัวอย่างตามลำดับ ผลการศึกษาโดยวิธี amplification of papillomavirus oncogene transcripts (APOT) assay พบ HPV integration เฉพาะตัวอย่างที่มีความผิดปกติในระดับ CIN II-III และ SCC แต่ไม่พบในระดับ no CIN และ CIN I โดยพบ HPV16, 18, 58 และ 45 integration ในตัวอย่าง SCC ได้ร้อยละ 40, 100, 25 และ 100 ตามลำดับ และพบ HPV16 และ 58 integration ในตัวอย่าง CIN II-III ได้ร้อยละ 5 และ 16 ตามลำดับ

ผลจากการตรวจหา chromosomal site of integration จากตัวอย่างที่มี viral genome integration พบ HPV16 integration ในโครโมโซม 2, 4, 5, 8, 11, 16 และ 17 พบ HPV18 integration ในโครโมโซม 1, 6, 8 และ 19 พบ HPV58 integration ในโครโมโซม 4, 12 และ 18 และพบ HPV45 integration ในโครโมโซม 6

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ใน formalin-fixed paraffin-embedded cervical tissue ที่เป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC จำนวน 7, 31, 47 และ 9 ตัวอย่างตามลำดับ พบว่าในกลุ่ม no CIN ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในขณะที่พบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ใน CIN I และ CIN II-III ร้อยละ 16 และ 89 ตามลำดับ และพบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ใน SCC ทุกราย สรุปได้ว่าการตรวจหาโปรตีน p16^{ink4a} ในเซลล์ปากมดลูกสามารถช่วยวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกได้

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} และ HPV physical status พบว่าในตัวอย่างที่ p16^{ink4a} negative ทุกรายจะมีเชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ในกลุ่ม p16^{ink4a} positive CIN I เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 100 ในกลุ่ม p16^{ink4a} positive CIN II-III เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 95 และ integration ร้อยละ 5 ในขณะที่กลุ่ม p16^{ink4a} positive SCC เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 50 และ integration ร้อยละ 50 สรุปได้ว่าการแทรกจีโนมของไวรัสเข้าสู่จีโนมของโฮสต์เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่เกิดความไม่เสถียรของโครโมโซม (chromosomal instability) ทำให้ DNA มีการแตกหัก (double strand break) ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของไวรัสโปรตีนคือ E6 และ E7 ออกมามากซึ่งไปรบกวนการทำงานของโปรตีนของโฮสต์ เช่น p53 และ pRb ทำให้เซลล์มีความผิดปกติไปและการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ที่มากขึ้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์ได้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส และการเกิด DNA methylation ในตำแหน่ง E2 binding site (E2BS) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส แต่พบว่าที่ตำแหน่ง E2BS3 และ E2BS4 มีการเกิด DNA methylation มากกว่าร้อยละ 10 ซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะพบการเกิด DNA methylation ที่หลากหลายแตกต่างกันไปในแต่ละตำแหน่ง จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเกิด DNA methylation ในตำแหน่ง E2BS3 และ E2BS4 อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการแสดงออกของ โปรตีน E6 และ E7 และสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกได้

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการแสดงออกของ โปรตีน E6 และ E7 ในเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อ HPV16 คือการเกิด DNA methylation ในตำแหน่ง E2BS3 และ E2BS4 ของ LCR เมื่อมีการแสดงออกที่มากเกินไปของ viral oncoprotein คือ E6 และ E7 จะไปรบกวนการทำงานของ tumor suppressor protein ของโฮสต์ เช่น p53 และ pRb เป็นผลให้เกิดการแสดงออกที่มากเกินไปของโปรตีน p16^{ink4a} ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติ ในขณะที่ p53 และ pRb ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติก็จะทำให้เกิดความไม่เสถียรของโครโมโซม (chromosomal instability) และการแตกหักของ DNA (double strand break) จากนั้นจึงมีการแทรกจีโนมของไวรัสเข้าสู่จีโนมของโฮสต์

สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	4
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีดำเนินการวิจัย	15
ผลการวิจัย	27
อภิปรายผล/วิจารณ์	46
สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	52
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	59

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นสาเหตุของการตายที่พบได้มากที่สุดของโรคมะเร็งในผู้หญิงในประเทศกำลังพัฒนา ทั้งๆที่เป็นโรคที่สามารถรักษาให้หายได้หากตรวจพบตั้งแต่ระยะแรก human papillomavirus (HPV) เป็นเชื้อสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก และมีรายงานว่าสามารถตรวจพบ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้สูงถึงร้อยละ 99.7 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ HPV ไม่ได้ทำให้ผู้ติดเชื้อทุกรายเป็นมะเร็งปากมดลูก และสามารถตรวจพบการติดเชื้อ HPV ได้ทั้งในผู้ที่มีเยื่อปากมดลูกปกติและผิดปกติ ปัญหาที่สำคัญของการติดเชื้อ HPV นี้คือยังไม่มี marker ชนิดใดที่ใช้บ่งบอกว่าผู้ติดเชื้อ HPV จะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ติดเชื้อและกลายเป็นเซลล์มะเร็งเมื่อไร

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผู้หญิงในกลุ่มอายุมากกว่า 35 ปี ที่มีการติดเชื้อยืดยื้อ (persistent infection) จาก high risk (HR) HPV และมีผลการตรวจคัดกรองเซลล์ปากมดลูกพบ koilocyte หรือมีลักษณะของเยื่อเป็น mild dysplasia หรือ low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกเพราะถ้ามีภาวะส่งเสริมร่วมกัน oncoproteins ทำให้เซลล์ติดเชื้อเกิดมี chromosome instability จากผลของ E6/E7 oncoproteins ร่วมกับมีปัจจัยของโฮสต์ส่งเสริม ทำให้เกิด viral genome integration ในโครโมโซมของโฮสต์ หรือเรียกว่ามีการติดเชื้อเป็น integration form ในขณะที่กลุ่มการติดเชื้อที่ไม่เกิด viral genome integration หรือเรียก การติดเชื้อแบบ episomal form จะเกิด spontaneous regression ไปได้ขณะที่ในกลุ่มการติดเชื้อแบบ integration form มีผลการศึกษาพบว่า การเกิด integration โดย viral genome เป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและเซลล์กลายเป็นมะเร็งได้ โดยมีปัจจัยส่งเสริมจากทั้งไวรัสและโฮสต์โดยเฉพาะไวรัสเมื่อเกิด viral genome integration พบว่าการแตกหักของ viral genome ที่ตำแหน่ง E2/E1 (ที่พบได้บ่อยที่สุด) จะทำให้สูญเสียการควบคุมการแสดงออกของ E6/E7 oncogenes มีการแสดงออกได้มากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษายังพบว่าภาวะ viral integration จะสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคโดยพบร้อยละ 70-100, 25-100 และ 0-54 ของเนื้อเยื่อปากมดลูกผิดปกติชนิด cervical intraepithelial neoplasia grade III (CIN III), CIN II และ CIN I (LSIL) ตามลำดับ [1]

อย่างไรก็ตามการศึกษาวินิจฉัย viral integration ยังมีปัญหาอยู่ ถึงแม้จะพบว่าภาวะดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค แต่ยังคงพบว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละกลุ่มยังมีความแตกต่างกันเนื่องจากยังไม่มี gold standard method ทำให้มีการใช้วิธีการตรวจที่หลากหลาย และได้ข้อมูลที่แตกต่างกันในเซลล์ผิดปกติแต่ละกลุ่ม โดยเฉพาะเซลล์ผิดปกติชนิด LSIL ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ระหว่างการที่จะเปลี่ยนแปลง (precancerous lesion) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่ศึกษาการมี viral integration น้อยมาก การศึกษา viral integration ในเซลล์ผิดปกติในกลุ่ม LSIL นี้ น่าจะได้ข้อมูลบ่งบอกถึงจุดเริ่มต้นของเซลล์ที่ติดเชื้อและเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

จากรายงานการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ E6/E7 mRNA สัมพันธ์กับความผิดปกติของเซลล์ โดยพบว่าการแสดงออกน้อยมากในระดับเซลล์ผิดปกติระยะแรกและพบในทุกสายที่เป็นมะเร็งที่มี viral integration แสดงถึงความสัมพันธ์ของการเกิด viral integration และมีการแสดงออกของ E6/E7 mRNA ในปัจจุบันจึงพยายามตรวจหาการแสดงออกของ E6/E7 mRNA เพื่อใช้บ่งบอกถึงภาวะการติดเชื้อ HPV ที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ผิดปกติในระยะรุนแรง แต่อย่างไรก็ตามในรายงานการศึกษาดูตามผู้ที่ติดเชื้อ HPV พบว่าระยะเวลาในการพัฒนาทำให้เกิดเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็น HSIL และ มะเร็ง จะใช้เวลาแตกต่างกัน โดยพบได้ตั้งแต่ 2-10 ปี ซึ่งเป็นปัญหาที่พบและยังไม่มีกลไกใดที่จะอธิบายได้ แต่ได้มีรายงานการศึกษาพบว่า DNA methylation ซึ่งเป็นกระบวนการป้องกันของโฮสต์เซลล์โดยพบว่าถ้าเกิดบน viral genome บริเวณ LCR โดยเฉพาะบริเวณ E2 binding site จะมีผลขัดขวางหรือกระตุ้นการแสดงออกของ E6/E7 oncogenes ได้ในขณะที่ถ้าพบบน host gene เช่น tumor suppressor gene จะพบในผู้ที่เป็มะเร็งได้บ่อยแสดงให้เห็นถึงภาวะ DNA methylation น่าจะเป็นปัจจัยในโฮสต์ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ E6/E7 ใน HPV integrant และมีผลทำให้ระยะเวลาของการเกิดโรคแตกต่างกันได้ ขณะเดียวกันปัจจัยจากสภาพภายนอกที่มีหลายชนิดก็มีรายงานว่าเป็นส่วนหนึ่งที่กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ E6/E7 oncogenes โดยพบว่า progesterone เป็นสารตัวหนึ่งที่มีรายงานว่ากระตุ้นการแสดงออกของ HPV E6/E7 promoter เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า ปัจจัยจากทั้งที่เกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์จากสารทั้งสองชนิดดังกล่าวยังมีข้อมูลน้อยในการศึกษาถึงผลต่อการแสดงออกของ HPV E6/E7 promoter

เนื่องจากเชื่อว่าการมี viral integration น่าจะเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้เกิด over expression ของ viral oncoprotein E6/E7 มีผลทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลง จึงได้มีการศึกษามากมายเพื่อหา integration status และ integration site และมีรายงานพบว่ามี viral integration เกิดขึ้นเกือบทุก chromosome ของโฮสต์ และตำแหน่งที่พบเป็น common fragile site (CFS) ในตำแหน่งดังกล่าวยังไม่มีผลการศึกษายืนยันว่าทำให้เกิดเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งแต่อาจจะช่วยให้อัตราการเปลี่ยนแปลงเร็วขึ้น แต่ยังเชื่อว่่าจะมีจุดเริ่มต้นที่ส่งผลให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนผิดปกติ (monoclonal) โดยมีผลจาก E6/E7 protein ที่มีการกระตุ้นให้เพิ่มมากขึ้น นอกจากภาวะ integration แล้ว ยังมีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ระหว่างการติดเชื้อ โดยพบว่ามี transcriptional activating factor หลายชนิดมีการแสดงมากขึ้นโดยเฉพาะ AP1 จากการศึกษาพบว่า มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ oncogenes ของเชื้อ HPV ทุก types ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีความสนใจศึกษา physical status ของ HR-HPV ได้แก่ HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 ในตัวอย่างเซลล์และเนื้อเยื่อปากมดลูกที่ปกติหรือ no CIN และเนื้อเยื่อปากมดลูกที่ผิดปกติชนิด LSIL (CIN I), HSIL (CIN II-III) และมะเร็งปากมดลูก (squamous cell carcinoma, SCC) โดยนำวิธี amplification of papilloma virus oncogene transcripts (APOT) assay มาตรวจหา physical status ของเชื้อ HPV และตรวจหา integration site ด้วย นอกจากนี้ได้ทำการตรวจ DNA methylation เพื่อทราบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ HPV16 mRNA E6/E7 กับภาวะ episomal และ integrated form และความสัมพันธ์กับภาวะของ DNA methylation ที่พบ และยังทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเกิด

methylation บน HPV LCR ต่อ HPV16 oncogenes promoter activity นอกเหนือจากปัจจัยทาง epigenetic แล้วโครงการวิจัยนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยทาง viral genetic คือการเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตรงบริเวณ E2 binding site บน HPV LCR ด้วย

จากข้อมูลที่น่าสนับสนุนสมมติฐานว่าการเกิดมะเร็งเกิดจาก viral genome integration เข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์ และเป็นจุดเริ่มต้นที่ส่งผลให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนผิดปกติ (monoclonal nature of HPV integration) แล้วจึงเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งปากมดลูก โครงการวิจัยนี้จึงได้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของโครงสร้างโครโมโซมบน HPV LCR ต่อการแสดงออกของ HPV E6 และ E7 oncogenes และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น progesterone และ dexamethasone โดยนำมาใช้ในการศึกษาบทบาทของปัจจัยร่วมในการกระตุ้นการแสดงออกของ HPV E6/E7 promoter โดยสร้าง expression vector ที่มี HPV16 E6/E7 promoter และ reporter gene คือ luciferase และนำมาศึกษาบทบาทของโครงสร้างโครโมโซมและโปรตีน E2 ในการกระตุ้น HPV16 E6/E7 promoter โดยเติมสาร Trichostatin A (TSA) ในเซลล์เพาะเลี้ยงและดูการแสดงออกของ luciferase รวมทั้งดูผลของปัจจัยจากสถานะแวดล้อมเช่น progesterone และ dexamethasone ที่อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของ promoter ดังกล่าวด้วย

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาเอก ซึ่งได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากแผนงานวิจัยที่วางไว้แต่เดิม จึงได้เพิ่มวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย และรวบรวมผลงานวิจัยทั้งหมดไว้ในรายงานฉบับนี้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความชุก (prevalence) และการกระจาย (distribution) ของ HPV จีโนไทป์ต่าง ๆ ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก (fresh tissue biopsy) ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC
2. เพื่อตรวจ physical status ของ HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก (fresh tissue biopsy) ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC โดยวิธี Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts (APOT)
3. เพื่อตรวจตำแหน่ง integration site ของ HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 DNA ในโครโมโซมของโฮสต์โดยวิธี APOT
4. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ HPV16 E6 และ E7 mRNA กับการเกิด integration ของ HPV16 DNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก (fresh tissue biopsy) ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC โดยเปรียบเทียบกับแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a}
5. ศึกษาการเกิด DNA methylation และลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปในตำแหน่ง E2 binding site ในเซลล์ปากมดลูกผิดปกติชนิด CIN II-III และ SCC
6. เพื่อศึกษาผลของ DNA methylation และโครงสร้างของโครมาตินต่อ viral oncogenes promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมเป็น stable transfection (มีการแทรกจีโนมของ vector เข้าสู่โครโมโซม) และ transient transfection (ไม่มีการแทรกจีโนมของ vector เข้าสู่โครโมโซม) โดยนำ expression vector ที่มี HPV16 E6/E7 promoter และ reporter gene คือ luciferase มาใส่เซลล์ C33A เพื่อให้มีการแทรกจีโนมของ vector เข้าสู่โครโมโซม (integration form) และ แบบไม่มีการแทรกจีโนม (episomal form) ของ HPV16 DNA
7. เพื่อศึกษาการเป็นปัจจัยร่วมของ progestogen และ dexamethasone ต่อ viral oncogene promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมเป็น stable transfection และ transient transfection

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

Human papillomavirus (HPV) เป็น DNA virus อยู่ในกลุ่ม *Papillomaviridae* เป็นไวรัสชนิดที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-enveloped หรือ naked virus) เปลือกนอกเป็น capsid ที่ประกอบด้วย 72 capsomer ภายใน capsid ประกอบด้วยจีโนมที่มีลักษณะเป็น DNA วงกลมสายคู่ ซึ่งมีความยาวประมาณ 8,000 เบส [2] โครงสร้างของ capsid ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 2 ชนิดคือ โปรตีน L1 ซึ่งมีขนาด 57 กิโลดาลตัน และเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 80 ของ capsid และโปรตีน L2 ซึ่งมีขนาด 43-53 กิโลดาลตัน

HPV สามารถติดเชื้อในคนได้ทางผิวหนัง และเยื่อเมือก ก่อให้เกิดโรคหูดหรือเนื้องอก ปัจจุบันพบ HPV มากกว่า 130 types แยกตามลำดับเบสที่แตกต่างกันในบริเวณจีโนม E6, E7 และ L1 โดยมี HPV ประมาณ 40 types ที่สามารถติดเชื้อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของมนุษย์ และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ high risk HPV (HR-HPV) และ low risk HPV (LR-HPV) ตามความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก HR-HPV ที่พบบ่อย ได้แก่ HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, และ 82 ส่วน LR-HPV ที่พบบ่อย ได้แก่ HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 และ 81 [3]

จีโนมของเชื้อ HPV มีขนาด 8,000 เบส มี 8-10 open reading frame (ORF) ซึ่งอยู่บนเส้นเดียวของจีโนม และจีโนมของเชื้อแบ่งเป็น 3 ส่วนคือ upstream regulatory region (URR) หรือ long control region (LCR) หรือ non coding region (NCR) และอีก 2 ส่วนเรียกตามระยะของการติดเชื้อและการแสดงออกของจีโนม ได้แก่ บริเวณ early (E) และ late (L)

LCR เป็นบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของจีโนม โดยมีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการจับของโปรตีน E2 และจาก host protein เพื่อกระตุ้นหรือควบคุมการแสดงออกของจีโนมอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ หรือการก่อโรค โปรตีน E1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ helicase ที่จะทำหน้าที่ในการแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โปรตีน E2 ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของจีโนม โดยการจับกับ E2 binding sites ที่อยู่บน LCR โปรตีน E3 และ E8 ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน โปรตีน E4 จะจับกับโปรตีนฟิลาเมนต์ (filament) ในเซลล์ ทำให้เชื้อไวรัสสามารถเคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ได้ การสร้างโปรตีน E4 จะสร้างในช่วงท้ายของการติดเชื้อ โปรตีน E5 จะไปจับกับผนังเซลล์ตรงบริเวณ platelet derived growth factor (PDGF receptor) ทำให้มีการกระตุ้นเซลล์ให้มีการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงได้

โปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อในกลุ่ม HR-HPV เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเรียกว่า oncoprotein โปรตีน E6 ไปจับกับโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมไม่ให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็ง (tumor suppressor protein) และทำให้โปรตีน p53 ถูกทำลายผ่านทาง ubiquitin pathway โดยทำงานร่วมกับโปรตีน E6 associated protein (E6AP) ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 ลดลงจาก 3 ชั่วโมง เป็น 20 นาที และยังพบว่า โปรตีน E6 ยังไปกระตุ้นเอนไซม์ telomerase ทำให้เซลล์มีอายุนานขึ้น โปรตีน E7 ไปจับกับ โปรตีน retinoblastoma (pRB) ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมไม่ให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็ง (tumor suppressor protein) ทำให้โปรตีน E2F ซึ่งจับกับโปรตีน retinoblastoma (pRB) หลุดออกมา โปรตีน E2F ที่หลุดออกมาจะทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของจีโนมที่จำเพาะและ DNA ให้มีการ replication และ

transcription ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น โปรตีน L1 และโปรตีน L2 ทำหน้าเป็น capsid หุ้มจีโนมของไวรัสโดยโปรตีน L1 เป็นโปรตีนหลักและพบมาก บริเวณจีน L1 เป็นบริเวณที่มีความคล้ายกันมากที่สุดในกลุ่มเชื้อ HPV

HPV เข้าสู่เซลล์บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกที่ฉีกขาด และเข้าไปติดเชื้อที่เซลล์ basal เพราะว่าเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ โดยตัวเชื้อไวรัสจับกับ receptor บนผิวเซลล์คือ $\alpha 6$ integrin family และ heparin sulphate [4] ทำให้มีการ endocytosis เป็นแบบ clathrin coated vesicles และจีโนมของเชื้อหลุดออกจาก capsid เข้าสู่นิวเคลียส [5] แล้วเกิดกระบวนการ replication และ transcription โดยปริมาณของเชื้อในเซลล์ในระยะเริ่มต้นคือ 50-100 genome copies ต่อ 1 เซลล์ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่มีการสร้างอนุภาคของไวรัส (non productive infection) ในช่วงนี้โปรตีนบางตัวจะถูกสร้างขึ้นได้แก่ โปรตีน E1, E2, E6 และ E7 ซึ่งมีการแสดงออกในระดับต่างๆ [6] โดยโปรตีน E1 จับกับโปรตีน E2 และไปยังบริเวณ origin of replication ทำให้ไวรัสเกิดการ replication ได้ และโปรตีน E1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ helicase ที่ทำหน้าที่ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โปรตีน E2 ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของจีนโดยไปจับที่ E2 binding site บน LCR และเมื่อเซลล์ที่มีการติดเชื้อมีการแบ่งตัว และเคลื่อนตัวขึ้นสู่ suprabasal layer เซลล์ที่มี differentiation จะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของจีน และสร้างโปรตีนแคปซิดมาหุ้มจีโนมของเชื้อไวรัส และสร้างโปรตีน E4 และ E5 ทำให้ได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ การแสดงออกของ E6 และ E7 oncoproteins ออกมานอกจากจะมีผลใน viral life cycle แล้วในบางสภาวะอาจจะ มีผลทำให้การควบคุมการแสดงออกของ host cell genes เปลี่ยนแปลงไปและมี genetic instability เกิดขึ้น นอกจากนี้ E6, E7 oncoproteins ยังมีคุณสมบัติทำให้เกิด malignant transformation และ cell apoptosis ได้นอกเหนือจากการทำให้ไวรัสคงอยู่ภายใน host cell ได้ [7]

การติดเชื้อ HPV มี physical status 2 รูปแบบคือ episomal (viral genome อยู่เป็นอิสระโดยไม่ได้แทรกในโครโมโซมของโฮสต์) และ integrated form (viral genome แทรกในโครโมโซมของโฮสต์) ในปัจจุบันมีข้อมูลทำให้เชื่อว่าการติดเชื้อ HR-HPV ที่มี physical status แบบ integrated form เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นมะเร็ง เนื่องจากการตรวจพบ HPV physical status แบบ integrated form พบได้ร้อยละ 0-54, 5-100 และ 80-100 ในเซลล์ผิดปกติแบบ LSIL, HSIL และ SCC ตามลำดับ ซึ่งพบได้ร้อยละที่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มจะขึ้นกับวิธีตรวจที่ต่างกัน [1] ซึ่งภาวะที่กล่าวข้างต้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การที่เซลล์จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกเมื่อมีการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV และประมาณว่าร้อยละ 12 ของ HSIL ถ้าไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาจะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ ดังนั้นการเกิด integration ของไวรัสจีโนมในโฮสต์จึงได้รับการพิจารณาว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่จะทำให้เซลล์ติดเชื่อยึดเยื้อที่บริเวณปากมดลูกเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติที่รุนแรงขึ้น การเกิด integration ของจีโนมของเชื้อ HPV16 พบมากที่สุดในกลุ่ม SCC และ HSIL [8-12] และ 54% ใน LSIL [11, 13]

มีการศึกษาพบว่าการเกิด HPV16 integration และปริมาณของไวรัสที่เกิด integration สัมพันธ์กับความรุนแรงของเซลล์ปากมดลูกผิดปกติและเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งปากมดลูก [8, 9, 12, 14] การศึกษาในเชื้ออื่นๆเช่น HPV52 และ 58 พบการ integration ในกลุ่มเซลล์มะเร็งและ HSIL ร้อยละ 25.0 , 12.5 และ 92.3 , 12.5 ตามลำดับ [10] จากข้อมูลดังกล่าว พบว่าเชื้อ HPV แต่ละชนิดมีความสัมพันธ์ในการก่อโรคได้ต่างกัน HPV58 เป็นชนิดที่พบได้บ่อยเป็นอันดับ 3 ของจาก HPV16 และ HPV18 ในประเทศไทยและในเอเชีย

เพื่อหาความสัมพันธ์ในการก่อโรค การตรวจหา physical status ของ HPV ในเซลล์ติดเชื้อจึงได้รับความสนใจมากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาแตกต่างกันเช่น Southern blot analysis of restriction enzyme digestion [15, 16], 2D agarose gel electrophoresis [15, 17], PCR analysis of E2 region integration [13, 18, 19], RT-PCR analysis of E6/E7 transcript [19, 20] and real time quantitative PCR [21] อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษา HPV physical status ยังพบได้แตกต่างกันมาก เช่นในกลุ่ม HSIL พบร้อยละ 5-100 ซึ่งอาจจะเนื่องจากวิธีที่แตกต่างกัน หรือความผิดพลาดที่เกิดจากการจำแนกชนิดของตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีใดที่เป็น gold standard การตรวจหา HPV integration

มีการศึกษาพบว่าการเกิด viral integration จะส่งผลให้มีความผิดปกติทั้ง HPV genome และ host gene ที่อยู่รอบๆบริเวณที่ถูกแทรกจากการศึกษา in vitro Duensing และคณะ [22] พบว่า episomal derived oncoprotein (ePOTs) จะมีความสามารถเพียงพอในการทำให้เกิด chromosomal instability แล้วส่งผลสนับสนุนการเกิดภาวะ integration ของ HPV genome โดย over expression E6 และ E7 โปรตีนนี้จะไปรบกวน mitotic apparatus ในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวส่งผลให้เกิด multiple centrosomes และ multipolar mitosis ทำให้เซลล์มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติไปและเกิดภาวะ aneuploidy ส่วน Hopman และคณะ [23] พบว่าภาวะ episomal ของ HPV สามารถทำให้เกิดโครโมโซมความผิดปกติแบบ tetrasomies และ single trisomies ในขณะที่ HPV integration จะทำให้โครโมโซมเกิดภาวะ aneusomies และ polysomies การศึกษาข้างต้นสนับสนุนว่าการติดเชื้อ HR-HPV ที่มีการแสดงออกของ E6 E7 โดยเฉพาะการเกิด integration ของ HPV16/18 DNA ที่สูญเสียการควบคุมการแสดงออกของ E6 E7 เป็นขั้นตอนสำคัญในการส่งเสริมจากเซลล์ผิดปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก [20]

Pett และคณะ [24] ได้ทำการศึกษาพบว่าการแทรกตัวของ HPV16 ใน W12 cell line ทำให้มีการขาดออกของ 3' ของจีน E2 ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน E7 มากขึ้น Kalantari และคณะ [25] ทำการศึกษาลักษณะการแตกหักของ HPV16 พบว่าบริเวณที่มีการแตกหักคือ E2 open reading frame บริเวณที่เรียกว่า 'hinge' region และ HPV18 integration ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกจะพบการแตกหักตรงบริเวณ E1/E2 gene ทำให้ขาดจีน E2 ORF ไปบางส่วนหรือทั้งหมด และการเกิด HPV integration ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของ E6 และ E7 mRNA โดยมีการศึกษาพบว่าการแทรกตัวของ viral genome นอกจากจะส่งผลทำให้มีการควบคุมการแสดงออกของ viral gene ผิดปกติเพราะ E2/E1 ขาดไป ยังมีปัจจัยซึ่งอาจกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ E6/ E7 gene ได้ต่อเนื่องเช่น viral gene ถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมน glucocorticoid ซึ่งทำหน้าที่เป็น cis-acting elements [26] และตรงปลาย 3' ซึ่งจะเป็นบริเวณ AU rich region จะถูกแทนที่

ด้วยดีเอ็นเอของโฮสต์ ทำให้ปริมาณของไวรัสโปรตีน E6 and E7 เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้เร็วขึ้น [27, 28] การเกิด HPV integration และการเกิดภาวะ DNA aneuploidy พบว่าทั้งสองสภาวะสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์ผิดปกติในระดับรุนแรง [27]

การตรวจ HPV16 และ HPV18 integration พบร้อยละ 48 และ 63 ตามลำดับ [29, 30] จะเกิดในบริเวณที่มีการแตกหักง่ายของ host chromosome (common fragile site, CFS) ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการขาดหาย (deletion) การย้ายที่ (translocation) และมีการแสดงออกของจีนผิดปกติซึ่งพบบ่อยในเซลล์มะเร็ง [29] บริเวณ CFS ที่พบบ่อยคือ FRA 3B (3p14.2) ซึ่งพบว่ามีเปลี่ยนแปลงในเซลล์มะเร็งหลายชนิด FRB 3B เป็นจีนที่มีขนาด 4 เมกะเบส ซึ่งอยู่ใกล้กับจีน *FHIT* ซึ่งมีขนาด 1.5 เมกะเบส ที่เป็นกลุ่มจีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) [31] นอกจากนี้ยังพบบริเวณส่วนอื่นๆ เช่น HPV18 จะเข้าไปแทรกในบริเวณ *MYC* oncogene ที่ 8q24.2 ซึ่งถูกขนาบข้างด้วย 2 CSF region *FRA 8C* (8q24.1) และ *FRA8D* (8q24.3) [29] การแทรกตัวของเชื้อ HPV16 และ 18 ยังพบได้ในบริเวณ promoter region ของ human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene [29] และยังมีการศึกษาที่พบว่าเชื้อ HPV ยังสามารถแทรกตัวเข้าสู่บริเวณ HLA loci ได้ซึ่งทำให้หลบหลีกภูมิคุ้มกันได้และส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง [32]

มีการศึกษาพบว่า E6 และ E7 oncoproteins ของไวรัสสามารถทำปฏิกิริยากับ c-Myc บนโปรโมเตอร์ (promoter) และกระตุ้นการแสดงออกของจีน *hTERT* [33, 34] Durst M และคณะแสดงให้เห็นว่าเซลล์ HeLa และ C4-1 ซึ่งติดเชื้อ HPV18 และเซลล์ Caski ซึ่งติดเชื้อ HPV16 มีการแทรกตัวของไวรัสเข้าสู่โครโมโซม 8q ใกล้กับจีน *c-MYC* และทำหน้าที่เป็น cis-acting element ในการส่งเสริมการแสดงออกของจีน *c-MYC* โดยตรวจพบการแสดงออกของจีน *c-MYC* เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่กล่าวมา แต่ในเซลล์ SiHa ที่ HPV16 integration ที่โครโมโซม 13 จะไม่พบการแสดงออกของจีน *c-MYC* [35] Couturier J และคณะพบว่า HPV16 และ HPV18 มีการแทรกจีโนมเข้าสู่บริเวณใกล้กับ *c-MYC* และ *n-MYC* proto-oncogene (8q24.12 และ 2p24 ตามลำดับ) และส่งผลให้โครงสร้างของจีนดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงไปและทำให้การแสดงออกของโฮสต์จีนบริเวณนั้นเพิ่มมากขึ้นอันเป็นผลมาจาก cis activation ของ *c-MYC* หรือ *n-MYC* จากการแทรกตัวของเชื้อไวรัส [36, 37] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าไวรัสที่ก่อมะเร็งจะมีการแทรกจีโนมเข้าสู่ดีเอ็นเอของโฮสต์ใกล้กับบริเวณ nuclear matrix attachment regions (MARs) ซึ่งเป็นลำดับดีเอ็นเอที่โปรตีน nuclear matrix มาทำปฏิกิริยาและส่งผลให้มีการแสดงออกของไวรัส oncogenes [38] ซึ่งข้อมูลที่ได้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า การแทรกตัวของไวรัสเข้าสู่โฮสต์จีโนมมีบทบาทในการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกผ่านการกระตุ้น proto-oncogenes ของโฮสต์

การตรวจหาบริเวณของโฮสต์จีนที่ถูกไวรัสแทรกตัว (viral cellular flanking sequence) ทำได้หลายวิธีเช่น restriction enzyme cleavage, self-ligation, and inverse polymerase chain reaction (rli PCR)[39] detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DCIPS-PCR)[40] restriction site PCR [41] amplification of viral oncogene transcripts (APOT) [42] random PCR[43] และ fluorescent in situ hybridization [36] บริเวณโครโมโซมที่เกิดไวรัส

integration ที่ตรวจพบโดยวิธีต่างๆ มีดังนี้ โดยวิธี rli PCR เพื่อตรวจ HPV16 integration ในตัวอย่างมะเร็งปากมดลูก 5 ตัวอย่างพบว่า HPV16 integration พบบน chromosome 1q25, 3q28, 6p25, 11p13, และ 18q22 [39] โดยวิธี DCIPS-PCR ตรวจในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกพบว่า HPV18 integration ตรวจเจอในโครโมโซม 8 และ HPV16 integration ตรวจเจอในโครโมโซม 3 และ 17 เมื่อตรวจในตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่า HPV16 integration บนโครโมโซม 14 พบร้อยละ 22 และโครโมโซมอื่นเช่น บริเวณ 1q41 2q22 7q31 และ 17q22 และ HPV18 integration พบที่โครโมโซมบริเวณ 7q31 8p11.2 14 และ 17 [40] และจากการศึกษาโดยใช้วิธี DCIPS-PCR ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกแบบ LSIL ของการติดเชื้อ HPV16 พบว่า HPV16 integration ที่โครโมโซม 14 และ 13 ซึ่งการเกิดแทรกตัวของไวรัสที่โครโมโซม 13 นั้นพบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก SiHa [44] โดยใช้วิธี restriction site PCR พบว่า HPV16 integration ตรวจพบที่บริเวณ *FHIT/FRA3B* ที่โครโมโซม 3p14.2 บริเวณ promoter ของ *TERT* gene ที่บริเวณโครโมโซม 5p15, 13q21, 11q21 และ 6q21 ส่วน HPV18 integration พบในบริเวณ CFS ซึ่งพบร้อยละ 63 [41] การตรวจโดยวิธี APOT พบ HPV16 และ 18 integration ในทุกโครโมโซมยกเว้นโครโมโซม 11, 18, 22 และ X [42] การตรวจโดยวิธี random PCR พบว่า HPV16 integration ที่โครโมโซม 2 ซึ่งเป็นตำแหน่งของจีน microtubule-associated protein (MAP-2) และตำแหน่งที่ยังไม่ทราบแน่ชัดตั้งชื่อว่า papillomavirus integration-disrupted (PID) ที่โครโมโซม 9 (PID-1), 1 (PID-2) และ 8 (PID-3) ซึ่งโครโมโซมที่กล่าวมานี้เป็นตำแหน่ง chromosomal fragile sites และ myc oncogenes [43] การตรวจโดยวิธี FISH พบว่า HPV16 และ 18 integration ที่โครโมโซม 8q24.1 ซึ่งเป็นบริเวณของ *c-MYC* gene และที่โครโมโซม 2p24 ซึ่งเป็นบริเวณ *n-MYC* gene [36]

จากการศึกษาในผู้ติดเชื้อ HPV พบว่ามีการแสดงออกของ HPV E6 และ E7 mRNA สัมพันธ์กับภาวะการเกิด HPV-DNA integration โดยพบว่าการแสดงออกของ E6 และ E7 mRNA ของ HPV16/18 สัมพันธ์กับภาวะการเกิด integration และจะพบการแสดงออกของ HPV E2 mRNAs ในไวรัสที่พบในรูป episome [17, 19] Klaes R และคณะ [20] ใช้เทคนิค APOT ศึกษาในตัวอย่าง 155 ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16 จำนวน 143 ตัวอย่าง หรือ HPV18 จำนวน 12 ตัวอย่าง จากการศึกษพบว่าในกลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติหรือ LSIL จะไม่พบมีการแสดงออก HPV mRNA จาก HPV ที่มีการเกิดภาวะ integration แต่สามารถตรวจพบได้ร้อยละ 5 ในกลุ่ม CIN II ร้อยละ 16 ในกลุ่ม CIN III และร้อยละ 88% ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก การแสดงออกของ HPV mRNA E6/E7 มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค จากการตรวจพบดังกล่าวแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ HPV E6 และ E7 mRNA กับ physical status ของ HPV DNA ในเซลล์ ([17, 45] ซึ่งเชื่อในกลุ่ม HR-HPV ที่มีการ integration เข้าสู่โฮสต์จีโนมจะทำให้มีการแสดงออกของ HPV oncogenes E6 และ E7 เพิ่มขึ้นผิดปกติไป [46])

ในปัจจุบันเชื่อว่าการติดเชื้อไวรัสในกลุ่ม HR-HPV แบบยืดเยื้อมีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งปากมดลูก [47] อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าในผู้หญิงกลุ่มอายุ 20-35 ปีประมาณร้อยละ 70 จะมีการติดเชื้อ HPV ทางเพศสัมพันธ์เกิดขึ้นแบบแบบชั่วคราว (transient infection) [48] และจะพบภาวะผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกแบบ LSIL มีส่วนน้อยที่เกิดการติดเชื้อแบบยืดเยื้อขึ้น โดยประมาณร้อยละ 20-40 ของกลุ่ม LSIL ที่

มีการติดเชื้อยัดเยียดจะพัฒนาไปเป็น HSIL และร้อยละ 50-60 ของกลุ่ม LSIL จะมีการหายไปของเชื้อได้เอง (spontaneous regression) Schlecht และคณะ [49] ศึกษาในกลุ่มผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์พบว่าเวลาเฉลี่ยในการพัฒนาจาก LSIL ไปเป็น HSIL ใช้เวลา 85.7 เดือน และแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแทรกตัวของไวรัสเข้าสู่โฮสต์กับการเปลี่ยนแปลงจาก LSIL ไปเป็น HSIL และมะเร็งในที่สุดโดยมีการศึกษาที่บ่งชี้ว่าการเกิด integration ของไวรัสเข้าสู่โฮสต์จึงมีเกิดขึ้นแบบ polyclonal แต่จะมีเพียง monoclonal ในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเกิดเซลล์ผิดปกติ [50]

บริเวณ LCR ของ HPV เป็นบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของจีโนมโดยโปรตีน E2/E1 ใน episomal form และจะเป็นบริเวณที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเพื่อหาปัจจัยที่มากกระตุ้นในบริเวณดังกล่าวในการแสดงออกของ viral oncogenes ในกลุ่ม integrated HPV การศึกษาใน HPV16 การแสดงออกของ HPV16 E6 และ E7 oncogenes อยู่ภายใต้การควบคุมของ promoter (P97) ที่พบตรงบริเวณปลายสุด 3' end ของ LCR ซึ่งบริเวณ HPV16 LCR ประกอบด้วย transcription factor-binding sites จำนวนมากเช่น E2 binding sites 4 ตำแหน่ง บริเวณให้โปรตีน E1 มาจับได้ 1 ตำแหน่ง และตำแหน่งอื่นๆ อย่างน้อย 12 ตำแหน่งที่สามารถทำปฏิกิริยากับ cellular transcription factors ได้เช่น AP-1, cEBP, glucocorticoid receptor, progesterone receptor, NF1, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2, Sp1 และ YY1 [51, 52] โปรตีนของโฮสต์ดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นและยับยั้ง ซึ่งบริเวณ E2-binding sites 2 ตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันที่พบตรงบริเวณ upstream ของ P97 และอยู่ติดกับบริเวณ 5' ของ Sp1-binding site และ 3' ใกล้กับ P97 TATA box เมื่อโปรตีน E2 มาจับตรงบริเวณนี้ที่ promoter-proximal sites จะไปยับยั้งการจับของโปรตีน Sp1 และโปรตีน TATA box-binding factor (TBP) ตรงบริเวณนี้ทำให้โปรตีน E2 ไปยับยั้งการแสดงออกของ HPV oncogenes แต่ถ้าโปรตีน E2 ไปจับตรงบริเวณ promoter-distal sites จะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ HPV oncogenes ได้ [51]

การเกิด HPV DNA methylation เป็นกลไกที่โฮสต์ใช้ป้องกันดีเอ็นเอของไวรัสไม่ให้มีการแสดงออกของจีโนมแต่อาจส่งผลดีต่อไวรัสทำให้ไวรัสสามารถหลบอยู่ในเซลล์ได้นานแต่ไม่มีการแสดงออกของไวรัส oncogenes (gene silencing) และไวรัสยังสามารถเกิดการแสดงออกของ oncogenes ได้ในภายหลัง การเกิด DNA methylation ที่ส่วน HPV LCR ทำให้เกิด chromatin conformation สามารถควบคุมการแสดงออกของไวรัส oncogenes E6 และ E7 ได้ มีการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก Caski และ SiHa พบว่ามีการเกิด methylation ที่ส่วน promoter บริเวณ LCR ตำแหน่ง 31, 37, 43, 52 และ 58 จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยง Caski แต่ไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง SiHa และอัตราส่วนการแสดงออกของ E6/E7 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caski และ SiHa คือ 0.11 และ 12.23 ตามลำดับในเซลล์เพาะเลี้ยง [53]

จากการศึกษาการทำให้เกิด DNA methylation ที่บริเวณ HPV18 LCR ในหลอดทดลอง พบว่าทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของจีโนมลดลง [54] ซึ่งการลดการแสดงออกของจีโนมอาจเกิดจาก 2 สาเหตุหลัก คือ 1) การเกิด DNA methylation บริเวณดีเอ็นเอที่โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factors มาจับไม่ได้ (DNA binding site) 2) มีโปรตีนตัวอื่นมาจับตรงที่เกิด DNA methylation อย่างแน่นและทำให้ไม่สามารถรวมกับโปรตีนอื่นในการกระตุ้นการแสดงออกของจีโนมได้ เช่น methyl CpG-binding proteins (MeCPs) ทำ

ให้ส่วนประกอบของ nucleoproteins มีความเสถียรภาพมากขึ้น และมีการศึกษาพบว่าในกลุ่มเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV physical status แบบ episomal พบว่ามีการเกิด DNA methylation ที่บริเวณ E2 binding site ใกล้กับบริเวณ p97 promoter ทำให้โปรตีน E2 ของ HPV16 ไปจับบริเวณ E2 binding site ไม่ได้จึงไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของไวรัสได้ [55, 56] บริเวณของ HPV16 LCR มี 19 CpGs ซึ่ง 3 CpGs อยู่บริเวณ ส่วนท้าย 3' ของจีน L1 (ตำแหน่ง 7091, 7136 และ 7145) 5 CpGs อยู่บริเวณ LCR (ตำแหน่ง 7270 ถึง 7461) 6 CpGs อยู่บริเวณ transcriptional enhancer (ตำแหน่ง 7535 ถึง 7862) และ 5 CpGs อยู่บริเวณ E6 promoter (ตำแหน่ง 31 ถึง 58) และการเกิด DNA methylation จะพบมากใน asymptomatic women โดยตรวจพบ CpGs ที่ตำแหน่ง 7091, 7136, 7428, 7434, 7535 ถึง 7695 และ 31 ถึง 43 และตำแหน่ง 58 ซึ่งพบร้อยละ 6 ที่ตำแหน่ง 37 และ ร้อยละ 33 ที่ตำแหน่ง 7091 ในกลุ่ม CIN ตรวจเจอ DNA methylation ที่ตำแหน่ง 7145 ร้อยละ 33 ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก พบตำแหน่ง DNA methylation ที่ตำแหน่ง 7136 และ 7145 ร้อยละ 42 และพบที่ตำแหน่ง 31, 37, 52, และ 58 ซึ่งพบว่าในกลุ่ม CIN พบ DNA methylation น้อยซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของไวรัสและการพัฒนาของเซลล์ไปสู่เซลล์ที่ผิดปกติมากขึ้น ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกซึ่งมีการตรวจพบ DNA methylation บริเวณ promoter แต่ไวรัสยังคงมีการแสดงออกของ HPV oncogenes ได้เนื่องจากพบว่า integrated HPV DNA เรียงตัวซ้ำๆ ต่อเนื่องกันไป (tandem array) ซึ่งมีบริเวณที่ไม่เกิด DNA methylation [57] อีกการศึกษาพบว่ามีการเกิด DNA methylation ตรงบริเวณ LCR และ E6 gene ของ HPV16 DNA พบร้อยละ 52 ในกลุ่ม asymptomatic smears พบร้อยละ 21.7 ในกลุ่ม precursor lesions และร้อยละ 6.1 ในกลุ่ม invasive carcinomas ซึ่งบ่งชี้ว่าการเกิด DNA methylation จะช่วยลดการเกิดเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ผิดปกติได้จากผลการควบคุมการแสดงออกของ E6 E7 gene [58] มีการศึกษาพบว่าการตรวจ DNA methylation ของ L1 gene ของ HPV18 มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ [59] และเมื่อมีการทดลองใส่ DNA methylation inhibitor พบว่ามีการแสดงออกของ viral E6 และ E7 genes [60]

จากการศึกษาพบว่าใน HPV infected immortalized cervical cells บริเวณ HPV promoter จะพบ AP-1 complex ประกอบด้วยโปรตีน c-jun/c-fos heterodimers เป็นส่วนมาก และเมื่อเติมโปรตีน TNF alpha จะพบโปรตีน c-jun/fra heterodimers เพิ่มขึ้น และส่งผลยับยั้งการแสดงออกของ HPV E6/E7 และในเซลล์มะเร็งจะพบโปรตีน c-jun/c-fos heterodimers เพิ่มขึ้นมาก จากการแสดงออกของโปรตีน c-fos เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงบทบาทสำคัญของ c-jun/c-fos heterodimers ในการเปลี่ยนแปลง immortalized cells ไปเป็น malignant cells ดังนั้นเชื่อว่าโปรตีน Transcription factor AP-1 มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของ HPV oncogenes [61] โปรตีน AP 1 ประกอบด้วย homodimers ระหว่าง c-Jun, JunB และ JunD หรือพบเป็น heterodimers กับโปรตีนในกลุ่ม Fos-family (c-Fos, FosB, Fra-1 และ Fra-2) โดยทำปฏิกิริยากันตรงบริเวณ intramolecular 'leucine zipper' region [62]

ในบริเวณ upstream ของ c-fos promoter จะประกอบด้วย 2 growth factor regulated promoter elements คือ serum response element เป็นส่วนประกอบของ serum response factor

(SRF) และ ternary complex factor (TCF) อีก 1 element คือ sis-inducible element (SIE) ซึ่งจะจับและถูกกระตุ้นโดย STAT transcription factors ได้ [63] โดยเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสจะทำให้เซลล์ที่มีการติดเชื้อมีการแสดงออกของ type I และ type II interferons และ interferons สามารถกระตุ้นผ่าน receptor และมีผลกระตุ้นโปรตีน STAT ในกระบวนการของ signal transducing pathway ส่งผลให้ STAT ทำให้กระตุ้นส่วน cis-inducible element (SIE) กระตุ้นการสร้าง โปรตีน c-fos ได้ [64, 65] โปรตีน c-fos ที่เกิดขึ้นจะไปจับกับโปรตีนในตระกูล Jun เป็น heterodimer และจะไปควบคุมการแสดงออกของโฮสต์จีนอื่นๆ โดยปกติแล้วระดับ c-fos mRNA จะพบในระดับต่ำๆ ซึ่งการเพิ่มการแสดงออกของ c-fos mRNA มากขึ้นอาจเกิดจากการกระตุ้นผ่านทางตัวกระตุ้นภายนอกเช่น epidermal growth factor (EGF) และ platelet-derived growth factor (PDGF) และโปรตีน c-Jun จะพบเป็นส่วนประกอบของโปรตีน AP-1 และมีส่วนให้เซลล์เกิดการเจริญและแบ่งตัวเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) โดยการแสดงออกของโปรตีน c-jun และ c-fos จะพบในช่วงแรกเมื่อมีตัวกระตุ้นจากภายนอกมากระตุ้น มีการศึกษาพบว่าโปรตีน E5 ของ HPV16 และ 11 สามารถทำปฏิกิริยากับ epidermal growth factor receptor (EGFR) [66] ซึ่งส่งผลทำให้มีการแสดงออกของจีนที่หลากหลายนรวมทั้ง *c-jun* และ *c-fos* และพบว่ากระตุ้นการแสดงออกของจีน *c-jun* เกิดจากการกระตุ้นผ่านทาง AP-1 binding site and NF-1 binding element [61, 67]

มีการศึกษาพบว่าบริเวณ LCR ของ HPV16 และ 18 ประกอบด้วย Progesterone/glucocorticoid responsive element (PRE/GRE) และพบว่าสาร estriol, 17 beta-estradiol, and several progestins including pregnenolone, 17 alpha-hydroxy-progesterone, norethynodrel and cyproterone acetate ปริมาณ 10^{-7} M สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ HPV16-LCR เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า แต่มีผลเล็กน้อยหรือไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ HPV18 E6 และ E7 oncogenes ผ่านทาง HPV18-LCR ทำให้สามารถแบ่ง HPV ได้เป็น 2 กลุ่มคือ HPV-enhancing และ HPV-nonenhancing และบ่งชี้ถึงบทบาทของสารประกอบในยาคุมกำเนิดในการส่งเสริมให้เกิดภาวะมะเร็งปากมดลูกโดยการกระตุ้นแสดงออกของ E6 และ E7 oncogenes ซึ่งกลไกการถูกกระตุ้นโดย progesterone หรือ dexamethasone เป็นดังนี้ ฮอร์โมนไปจับกับ progesterone receptor (PR) หรือ glucocorticoidreceptor (GR) และเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสแล้วไปจับกับ PRE/GRE บน HPV-LCR และยังมีการศึกษาพบว่าใน HPV transformed cell lines ที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน v-fos และ EJ-ras พร้อมทั้งมี dexamethasone และ progestogen ซึ่งผลที่ได้คือเซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นโดยพบว่าสาร dexamethasone ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้เร็วกว่า progestogen [68, 69]

จากผลของการติดเชื้อในบริเวณปากมดลูกเชื้อกลุ่ม HR-HPV และ LR-HPV สามารถทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นจะมีลักษณะนิวเคลียสที่โตขึ้นและมีวงขาวใสรอบนิวเคลียส ลักษณะดังกล่าวเรียกว่า koilocytic atypia ซึ่งเป็นผลจากโปรตีน E6 และ E7 และหรือที่เรียกว่า LSIL, mild dysplasia หรือ CIN I และจัดเป็นกลุ่ม pre-cancerous cells ซึ่งจะพบมากที่สุดในกลุ่มผู้หญิงอายุน้อยกว่า 30 ปีที่มีการติดเชื้อ โดยพบว่าอัตราการเกิด LSILจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น (58-16.1%) [70] และอัตราการตรวจพบ HPV

ในกลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติ LSIL และมะเร็งปากมดลูกพบร้อยละ 6.6-22.9 [71] , 28.8 -80.2 [70, 72, 73] และ 54-100 [74, 75] ตามลำดับ ในผู้หญิงอายุน้อย 20-35 ปีที่มีการติดเชื้อจะพบว่าการหายไปของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV ได้เองหรือเรียกว่า spontaneous regression ได้ร้อยละ 70-80 ภายใน 2-3 ปี แต่ร้อยละ 20 จะมีการติดเชื้อแบบยืดเยื้อ โดยจะพบว่าผู้หญิงที่มีการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV ร้อยละ 15-30 เซลล์ติดเชื้อดังกล่าวจะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ผิดปกติแบบ CIN II และ CIN III ได้ภายในเวลา 4 ปี สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ติดเชื้อ HR-HPV ที่มีความผิดปกติระยะแรกไปเป็นมะเร็งปากมดลูกนั้นพบว่าผู้หญิงที่มีความผิดปกติของเซลล์ในระยะ CIN II/CIN III หรือ HSIL จะเป็นความผิดปกติที่ถือว่าเป็นจุดเริ่มของการที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก หรือเรียกว่า true cervical cancer precursor การศึกษาพบว่าผู้หญิงกลุ่ม LSILที่มีการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV จะมีการพัฒนาไปเป็น HSILโดยใช้เวลาเร็วกว่าในกลุ่มที่มีการติดเชื้อในกลุ่ม LR-HPV และไม่มีการติดเชื้อ แต่จะใช้เวลานานกว่าในการเกิด regression [76] เมื่อคำนวณค่า odds ratio (OR) ของการติดเชื้อ HR-HPV กับการเกิดภาวะ LSIL และ มะเร็งปากมดลูกพบว่าในกลุ่ม HR-HPV ให้ค่าที่สูงกว่าการติดเชื้อในกลุ่ม LR-HPV (4.64 versus 1.81 ใน LSIL และ 10.53 versus 0.77 ใน HSIL/มะเร็งปากมดลูก)

สำหรับการศึกษาในผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีภาวะมะเร็งปากมดลูกพบค่า OR คือ 130.6 (95% CI 11.7–1457.0) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV ค่า ORs ของการติดเชื้อ HPV16, 18 and 16/18 กับการมีภาวะมะเร็งปากมดลูกคือ 12.3, 3.2 and 15.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV [77] ซึ่งเมื่อคำนวณค่า OR ในกลุ่มที่ติดเชื้อ HPV16 กับการเกิดภาวะ LSIL และ HSIL/ มะเร็ง ได้เท่ากับ 1.67 และ 8.67 ตามลำดับ ค่า OR ของการติดเชื้อ HPV52 และ 58 ในกลุ่ม LSIL คือ 2.17 และ 1.40 ตามลำดับ ในกลุ่ม HSIL/มะเร็ง คือ 3.04 และ 5.22 ตามลำดับ [70] ซึ่งข้อมูลข้างต้นบ่งชี้ว่าเชื้อ HPV ชนิดต่างๆมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้แตกต่างกัน และการตรวจการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV และการดู HPV DNA integration ในตัวอย่าง LSIL จึงมีความสำคัญในการพยากรณ์โรคมะเร็งปากมดลูก

ในกลุ่มเชื้อ HPV ที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้สูงพบว่า HPV 16 เป็นชนิดที่พบได้มากที่สุด [3, 78] ในกลุ่มที่มีเซลล์ปากมดลูกปกติพบร้อยละ 2.5 [71] ในกลุ่ม LSIL พบร้อยละ 26.3 และในมะเร็งปากมดลูกพบร้อยละ 46-63 HPV ชนิดที่พบได้รองลงมาในกลุ่ม LSIL เรียงตามลำดับดังนี้คือ HPV 31, 51, 53, 56, 52, 18, 66, 58, 6, 39, 33, 59, 35 และ 45. นอกจาก HPV16 และ 18 ในกลุ่มความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกแบบไม่รุนแรงพบว่ามีการตรวจพบ HPV58 มากในเอเชียร้อยละ 14.4 ในขณะที่ HPV31 พบมากในยุโรปร้อยละ 15.3 และ HPV33 พบมากในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ร้อยละ 11.8 [72] ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก HPV ชนิดอื่นที่พบได้นอกเหนือจาก HPV16 ดังนี้ HPV18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 และ 70 ยังพบว่า HPV58 พบมากในเอเชียในขณะที่ HPV31, 33, 45 พบมากในภูมิภาคอื่น ๆ [74] ในกลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติจะพบ HPV16, 18, 31, 58 และ 52 [71] ซึ่งในการศึกษาในผู้หญิงเม็กซิกันตรวจพบว่า HPV58 พบมากสุดในกลุ่ม LSIL, HSIL และ SCC โดย HPV58 พบร้อยละ 28.5 ในผู้หญิงที่มีการติดเชื้อ HPV [73]

สำหรับการศึกษาในเอเชียพบว่า HPV16 and 58 พบมากที่สุดในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกซึ่งเป็นผลจากการศึกษาในประเทศไต้หวัน เกาหลี เวียดนามและญี่ปุ่น [10, 70, 79-81] และยังพบ HPV16, 52, 58 ซึ่งพบบ่อยในกลุ่ม LSIL และ HSIL การศึกษาในผู้หญิงไทยพบว่าการรายงานการติดเชื้อ HR-HPV ร้อยละ 57-100 ในกลุ่ม HSIL และมะเร็งปากมดลูก แต่พบเพียงร้อยละ 27.3 ในกลุ่ม LSIL และร้อยละ 3-20 ในกลุ่มเซลล์ปากมดลูกปกติ HPV16 พบมากที่สุดในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก (ร้อยละ 38.4-65) ตามด้วย HPV18, 58, 52 และ 31 [82-85] การศึกษาในกลุ่มผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า HPV16 เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่มผู้หญิงที่มีเซลล์ปากมดลูกปกติและแบบไม่รุนแรง (ASCUS/LSIL) ตามด้วย HPV58 [86] ข้อมูลดังกล่าวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคที่มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาไปเป็นเซลล์ผิดปกติในระดับรุนแรง (HSIL) ได้แตกต่างกัน

3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

3.1 กลุ่มประชากรศึกษา

กลุ่มผู้หญิงที่เข้ารับการตรวจความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกโดยวิธี colposcopy โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น (344 ราย) ระหว่างช่วงเวลาปี 2547-2551 และได้รับการวินิจฉัยโดย histology เป็น no cervical intraepithelial neoplasia (no CIN), CIN grade I (CIN I), CIN II-III และมะเร็งปากมดลูก (squamous cell carcinoma, SCC)

3.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและจำนวน (Sample size)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ ชิ้นเนื้อปากมดลูก (fresh cervical biopsy) จำนวน 344 ราย และได้รับการวินิจฉัยโดย histology เป็น no CIN จำนวน 65 ตัวอย่าง, CIN I จำนวน 167 ตัวอย่าง, CIN II-III จำนวน 75 ตัวอย่าง และ SCC จำนวน 37 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกไว้ใน RNA-later solution ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาสกัด DNA และ RNA เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในเซลล์ปากมดลูกได้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกแบบ formalin-fixed paraffin-embedded tissue จำนวน 94 ตัวอย่าง แบ่งเป็น no CIN จำนวน 7 ตัวอย่าง, CIN I จำนวน 31 ตัวอย่าง, CIN II-III จำนวน 47 ตัวอย่าง และ SCC จำนวน 9 ตัวอย่าง

3.3 การสกัด DNA และ RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

การสกัด DNA และ RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกใช้น้ำยา AllprepDNA/RNA (QIAGEN) โดยนำชิ้นเนื้อปากมดลูกที่เก็บใน RNA-later solution ที่อุณหภูมิ -80°C ออกมาใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml และวางไว้บนน้ำแข็งแห้งประมาณ 1 นาที แล้วทำการบดชิ้นเนื้อให้ละเอียดโดยแท่งเหล็ก แล้วเติม buffer RTL plus จำนวน 350 μ l ใช้ autopipette ดูดขึ้นดูดลงจนชิ้นเนื้อถูกย่อยหมด ทำการปั่น 3 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm แล้วดูดส่วน supernatant มาใส่ใน AllPrep DNA spin column ที่วางบน 2 ml collection tube แล้ว ปิดฝา นำมาปั่น 30 วินาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm นำ AllPrep DNA spin column ไปวางบน 2 ml collection tube อันใหม่แล้วแช่ในน้ำแข็งก่อนเพื่อที่จะนำไปสกัด DNA ต่อไป และนำ 2 ml collection tube อันเก่ามาสกัด RNA

3.3.1 การสกัด RNA

นำ 2 ml collection tube อันเก่ามาเติม 70% ethanol จำนวน 350 μ l ใช้ autopipette ดูดขึ้นดูดลง ดูดมา 700 μ l ใส่ใน RNeasy spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันใหม่แล้วปั่น 15 วินาที ที่ 10,000 rpm ทั้ง flowthrough แล้วเติม Buffer RW1 700 μ l ใส่ใน RNeasy spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันเก่า แล้วปั่น 15 วินาที ที่ 10,000 rpm เพื่อล้าง RNeasy spin column ทั้ง flowthrough แล้วเติม Buffer RPE 500 μ l ใส่ใน RNeasy spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันเก่า แล้วปั่น 15 วินาที ที่ 10,000 rpm เพื่อล้าง RNeasy spin column ทั้ง flowthrough แล้วเติม Buffer RPE 500 μ l ใส่ใน RNeasy spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันเก่า แล้วปั่น 2 นาที ที่ 10,000 rpm เพื่อล้าง RNeasy spin column แล้วนำ RNeasy spin column ไปวางบนหลอดพลาสติก

ขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้วเติม RNase free water 50 μ l แล้วปั่น 1 นาที ที่ 10,000 rpm เพื่อล้างเอา RAN ออกมาแล้วนำ RNA ไปเก็บที่ -70°C

3.3.2 การสกัด DNA

เติม Buffer AW1 500 μ l ใส่ใน AllPrep DNA spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันใหม่ แล้วปั่น 15 วินาที ที่ 10,000 rpm ทิ้ง flowthrough แล้วเติม Buffer AW2 500 μ l ใส่ใน AllPrep DNA spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันเก่า แล้วปั่น 2 นาที ที่ 10,000 rpm นำ AllPrep DNA spin column ไปวางบนหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้วเติม Buffer EB 100 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาทีแล้วนำมาปั่น 1 นาที ที่ 10,000 rpm เพื่อล้างเอา DNA ออกมาแล้วนำ DNA ไปเก็บที่ -70°C

3.4 การทดสอบคุณภาพของ DNA และ RNA

3.4.1 การทดสอบคุณภาพของ DNA

ทำการเพิ่มปริมาณของจีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GAPDH1/GAPDH2 ที่สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของจีน GAPDH ของ DNA ที่สกัดได้ โดยมีส่วนประกอบของน้ำยาในปริมาตร 50 μ l ดังนี้คือ 2.5 mmole MgCl_2 , 0.2 mmole dNTP, 1XPCR buffer, 10 pmole forward primer และ 10 pmole reverse primer, 1.25 U Taq DNA polymerase, PCR grade water และ DNA 5 μ l โดยมีจำนวนรอบของการทำ PCR ดังนี้ช่วงแรก denature 94°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยแต่ละรอบจำนวน 40 รอบดังนี้ 94°C เป็นเวลา 1 นาที 50°C เป็นเวลา 1 นาทีและ 72°C เป็นเวลา 1 นาทีและช่วงสุดท้าย 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR products ปริมาณ 5 μ l ถูกนำมาตรวจโดย 1.5 % agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย EtBr และดูผ่าน UV transilluminator และถ่ายรูป

3.4.2 การทดสอบคุณภาพของ RNA

ทำการตรวจวัดการแสดงออกของจีน GAPDH โดยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ Superscript II (Invitrogen) ทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยมีส่วนประกอบดังนี้ RNA 1000 ng และ frohman primer (GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT) นำมาบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันทีและเติมส่วนผสมอื่นๆ ดังนี้ 1Xbuffer, 0.1 DTT, 0.2 mM dNTP และ RT Superscript II และทำการบ่มเป็นเวลา 50 min ที่ 42°C ตามด้วย 90°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และนำ cDNA มาเป็น template ในการตรวจ GAPDH โดยมีส่วนประกอบของน้ำยาในปริมาตร 50 μ l ดังนี้คือ 2.5 mmole MgCl_2 , 0.2 mmole dNTP, 1XPCR buffer, 10 pmole forward primer และ 10 pmole reverse primer, 1.25 U Taq DNA polymerase, PCR grade water และดีเอ็นเอ 5 μ l โดยมีจำนวนรอบของการทำ PCR ดังนี้ช่วงแรก denature 94°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยแต่ละรอบจำนวน 40 รอบดังนี้ 94°C เป็นเวลา 1 นาที 50°C เป็นเวลา 1 นาทีและ 72°C เป็นเวลา 1 นาทีและช่วงสุดท้าย 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR products

ปริมาณ 5 μ l จะถูกนำมาตรวจโดย 1.5 % agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย EtBr และดูผ่าน UV transilluminator และถ่ายรูป

3.5 การตรวจหาจีโนมของ HPV โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ทำการตรวจหาจีโนมของเชื้อไวรัส HPV โดยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GP5+/6+ ที่สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของจีโนม L1 ของไวรัส HPV โดยมีส่วนประกอบของน้ำยาในปริมาตร 50 μ l ดังนี้คือ 2.5 mmole $MgCl_2$, 0.2 mmole dNTP, 1XPCR buffer, 50 pmole forward primer และ 50 pmole reverse primer, 1.25 U Taq DNA polymerase, PCR grade water และดีเอ็นเอ 5 μ l จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยจำนวน 40 รอบดังนี้ 94°C เป็นเวลา 1 นาที 42°C เป็นเวลา 1 นาทีและ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำ PCR products ปริมาณ 5 μ l จะถูกนำมาตรวจโดย 1.5 % agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย EtBr และดูผ่าน UV transilluminator และถ่ายรูป โดยจะให้ขนาดของ PCR products ขนาด 150 bp

3.6 การตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัส HPV โดยวิธี reverse line blot hybridization (RLBH)

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาจีโนมของ HPV ถูกนำมาทดสอบหาชนิดของเชื้อไวรัส HPV โดยนำ PCR products มาใช้ในการทำ PCR เพื่อใส่ biotin เข้าตรงปลาย 5' ของ PCR products โดยใช้ไพรเมอร์ GP5+/6+biotin หลังจากนั้น biotin labeled PCR products จะถูกนำมาใช้ในการหาชนิดของไวรัส HPV ต่อไปดังนี้

ทำการเตรียมแผ่น nylon Biodyne C membrane โดยแช่ membrane ในสารละลาย 16% (w/v) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC)(16% EDAC) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างแผ่นในลอนด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นในลอน มาวางบนเครื่อง miniblotted MN45 แล้วทำการเติม amino labeled oligonucleotide probe ปริมาณ 300 pmole ลงในแต่ละช่องของเครื่อง miniblotted MN45 ทำจนครบจำนวน 37 probes ทั้งไว้ 10 นาทีแล้วดูด probe ออก ช่องปลายของเครื่องนำดินสอมาทำเป็นสัญลักษณ์ นำแผ่นในลอนมาแช่ใน 100 mM NaOH เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นในลอนมาแช่ใน 2X SSPE/0.1%SDS ที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากขั้นตอนนี้นำแผ่นในลอนไปวางบนเครื่อง miniblotted MN45 โดยวางในแนวตั้งฉาก 90° กับตอนที่ใส่ probe เพื่อรอ hybridization กับ denatured biotin labeled PCR products

การเตรียม denatured biotin labeled PCR products ทำดังนี้โดยดูด biotin labeled PCR products มา 20 μ l แล้วเติมลงใน 2X SSPE/0.1% SDS ปริมาณ 130 μ l แล้วนำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดใส่เครื่อง miniblotted MN45 ในแต่ละช่องให้ครบตามจำนวนตัวอย่างแล้วนำไปไว้ที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นในลอนออกจากเครื่อง miniblotted MN45 ทำการล้างใน 2X SSPE/0.5% SDS ที่อุณหภูมิ 52°C เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง แล้วนำแผ่นในลอนมาใส่ใน 2X SSPE/0.5% SDS ที่เติม streptavidin-HRP conjugate ที่เจือจาง 1:6000 แล้วนำไปไว้ที่ 42°C เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างใน 1XPBS/0.3% tween20 ที่อุณหภูมิ 45°C เป็น

เวลา 10 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ chemiluminescence substrate (LumiGLO; KPL Inc.) เป็นเวลา 1 นาทีและนำไปประกบแผ่นฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 20 นาที หลังจากล้างฟิล์มแล้วนำแผ่นฟิล์มมาแปลผลดังนี้ ผลบวกจะให้จุดสีเหลี่ยมสีดำเกิดขึ้น

3.7 การตรวจหา integration site (viral cellular flanking sequence) โดยวิธี amplification of papillomavirus oncogene transcripts (APOT) assay

จะทำ PCR สองรอบ (nested PCR) และใช้ primers ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีส่วนประกอบของน้ำยารอบแรกที่ใช้ในการตรวจ HPV16 ในปริมาตร 50 μ l ดังนี้คือ 1.5 mmole $MgCl_2$, 0.2 mmole dNTP, 1XPCR buffer, 12.5 pmole forward primer (P1) และ 12.5 pmole reverse primer (P3), 1.25 U Taq DNA polymerase, PCR grade water และ cDNA 4 μ l จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยจำนวน 30 รอบดังนี้ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที 59°C เป็นเวลา 30 วินาทีและ 72°C เป็นเวลา 4 นาที และ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

สำหรับ PCR รอบที่สองที่ใช้ในการตรวจ HPV16 มีส่วนประกอบของน้ำยาในปริมาตร 50 μ l ดังนี้คือ 1.5 mmole $MgCl_2$, 0.2 mmole dNTP, 1XPCR buffer, 12.5 pmole forward primer (P2) และ 12.5 pmole reverse primer (dT17-P3), 1.25 U Taq DNA polymerase, PCR grade water และ cDNA 4 μ l จาก PCR รอบแรก จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยจำนวน 30 รอบดังนี้ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที 67°C เป็นเวลา 30 วินาทีและ 72°C เป็นเวลา 4 นาที และ 72°C เป็นเวลา 7 นาที นำ PCR product ที่ ปริมาณ 50 μ l จะถูกนำมาตรวจโดย 1.2 % agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย EtBr และดูผ่าน UV transilluminator และถ่ายรูป สำหรับ HPV18, 31, 33, 45 และ 58 ใช้ส่วนประกอบของน้ำยาเช่นเดียวกับ HPV16 แต่อุณหภูมิที่ primer ใช้ในการจับกับ DNA ที่จำเพาะจะแตกต่างกันดังตารางที่ 1

โดย PCR products ที่มีขนาด 300 bp ขึ้นไปและมีปริมาณมากในแผ่นวุ้นจะถูกตัดออกและนำมาสกัดให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) โดยทำการเติม buffer QG 300 μ l และปั่นที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที พร้อมเขย่า 1000 rpm จากนั้นทำการเติม isopropanol 100 μ l ผสมกันโดยคว่ำหลอดกลับขึ้นมา 10 รอบ ดูดมาใส่ใน QIAquick column ที่วางบน 2 ml collection tube แล้วปั่น 1 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm ทั้ง flowthrough แล้วเติม buffer QG 500 μ l แล้วปั่น 1 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm เพื่อล้าง column ทั้ง flowthrough แล้วเติม buffer PE 750 μ l แล้วปั่น 1 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm ทั้ง flowthrough แล้วปั่นอีกรอบที่ 1 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm เพื่อให้ buffer PE ออกให้หมด นำ column ไปวางบนหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml อันใหม่ แล้วเติมน้ำ 30 μ l ทั้งไว้ 10 นาทีแล้วปั่น 1 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm เพื่อล้างเอา DNA ออกมาแล้วนำ DNA ไปเก็บที่ -20°C หรือ -70°C

นำ DNA ที่ได้มาทำ PCR เพื่อ sequencing โดยมีส่วนประกอบของน้ำยารอบแรกในปริมาตร 15 μ l ดังนี้คือ sequenziemix 6 μ l, 5 pmole of P2 และ DNA 8 μ l ทำปฏิกิริยาจำนวน 25 รอบดังนี้ 96°C เป็นเวลา 10 วินาที 55°C เป็นเวลา 5 วินาทีและ 60°C เป็นเวลา 4 นาที และสุดท้าย 72°C เป็นเวลา 6 นาที

ทำการตกตะกอน PCR product ดังนี้ เติมน้ำ HPLC 85 µl ใส่ใน PCR product แล้วดูดมาใส่ 1.5 ml microtube ที่มี sodium acetate 10 µl และ absolute ethanol 250 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 15 นาที ที่ 13,000 rpm ที่ส่วน supernatant แล้วเติม 75% ethanol ครึ่งหลอดไปมาแล้วนำไปปั่น 5 นาที ที่ 13,000 rpm ที่ส่วน supernatant แล้วคว่ำหลอดไว้ 15 นาทีแล้วนำไปปั่นในเครื่อง DNA Speed Vac เป็นเวลา 6 นาที เติม HIDI 12 µl ที่หัวที่อุณหภูมิห้อง 3 นาทีแล้วดูดไปใส่ 96-well microplate แล้วนำไปใส่เครื่อง ABI Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems)

ตรวจลำดับเบสใน DNA โดยลำดับเบสที่ได้จะนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BLAST analysis

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้ในการศึกษาโดยวิธี APOT

HPV genotype	Primer sequences			
	P1	Tm (°C)	P2	Tm (°C)
HPV16	CGG ACA GAG CCC ATT ACA AT	59	CCT TTT GTT GCA AGT GTG ACT CTACG	67
HPV18	TAG AAA GCT CAG CAG ACG ACC	61	ACG ACC TTC GAG CAT TCC AGCAG	70
HPV31	GCAGAACCGGACACATCC	56	GTTGTCAAGTGAAGTCTACACTTCG	58
HPV33	TGAGGATGAAGGCTTGGACC	56	CACCACAGTTCGTTTATGTGTCAA	58
HPV45	CCCACGAGCCGAACCACAG	56	GAGAGCTCGGCAGAGGACCTTAG	58
HPV58	ACTTGTGGCACCACGGTTCGTTTGTG	60	TTCGTTTGTGTATCAACAGTACAAC	60
P3	GAC TCG AGT CGA CAT CG			
Frohman	GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTTTTTTTTTTTTT			

3.8 การพัฒนาการตรวจหา HPV58 physical status โดยวิธี Southern blot hybridization assay

ในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนามีวิธีการตรวจหา HPV58 physical status จึงมีการใช้เทคนิค Southern blot hybridization มาใช้ในการทดสอบ physical status โดยนำ PCR product ที่ ปริมาณ 50 µl จะถูกนำมาตรวจโดย 1.2% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย EtBr และดูผ่าน UV transilluminator และถ่ายรูปและนำเจลมาทำการถ่ายโอน DNA ลงบน nylon membrane โดยมีวิธีการทำ ดังนี้ ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเจลมาแช่ใน 0.25 M HCl เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นแช่ใน denaturation solution เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องสองครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นแช่ใน neutralization solution เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องสองครั้ง หลังจาก DNA ถูกทำให้เสียสภาพ (denature) แล้วก็ทำการย้าย DNA ลงสู่แผ่นไนลอน (nylon membrane) โดยใช้ 20X SSC เป็นเวลาข้ามคืน และทำการล้างแผ่นไนลอนด้วย 2XSSC เป็นเวลา 10 นาทีและนำแผ่นเมมเบรนไปอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต DNA จะติดแน่นบนแผ่นเมมเบรน สามารถนำไปใช้ทำไฮบริดเซชันต่อได้ โดยใช้โพรบที่มีความจำเพาะต่อจีโนม HPV58 E7 และต่อจีโนม HPV58 E4 ทำการ hybridize เป็นเวลา

ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 55°C และทำการล้างใน washing solution ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 8 นาที 4 ครั้ง แล้วนำแผ่นไนลอนไปทำปฏิกิริยากับ blocking solution เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำแผ่นไนลอนมาทำปฏิกิริยากับ streptavidin-HRP conjugate ที่เจือจาง 1:300 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างใน washing buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที 4 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ chemiluminescence substrate (LumiGLO; KPL Inc.) เป็นเวลา 5 นาทีและนำไปประกบแผ่นฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 10 วินาที หลังจากล้างฟิล์มแล้วนำแผ่นฟิล์มมาแปลผล

3.9 การหาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA methylation บริเวณ HPV16 E2BS กับการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในเซลล์ปากมดลูก

3.9.1 การตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a}

1. เตรียมชิ้นเนื้อโดยตัด formalin-fixed paraffin-embedded tissue ให้ได้ขนาดความหนา 4 µm โดยเครื่อง Microtome (Leica) แล้ววาง section ที่มีชิ้นเนื้อในอ่างน้ำอุณหภูมิประมาณ 37 °C แล้ววางชิ้นเนื้อบนสไลด์ Superfrost Plus slides (Menzel Gläser, Germany) รอให้ section แห้งสนิท นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน
2. ขั้นตอน deparaffinization ทำโดยล้าง paraffin ที่เคลือบ section ด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 100% alcohol 5 นาที ตามด้วย 96 % alcohol และสุดท้าย 70% alcohol แล้วแช่ในน้ำกลั่น
3. ย้อมโปรตีน p16^{ink4a} ใช้น้ำยา CINtec® Histology Kit (mtm Laboratories AG, Heidelberg, Germany)

นำสไลด์มาแช่ใน Epitope Retrieval Solution ที่เจือจาง แล้ววางใน water bath ที่อุณหภูมิ 99°C เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำสไลด์มาทำปฏิกิริยากับ Peroxidase-Blocking Reagent เป็นเวลา 5 นาที ล้างสไลด์ด้วย washing buffer และเติม p16^{ink4a}-specific monoclonal antibody เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย washing buffer แล้วเติม Visualization Reagent เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย washing buffer แล้วเติม Substrate-Chromogen Solution (DAB) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำประปาแล้วย้อมสไลด์ด้วย hematoxylin แล้วปิดทับด้วย coverslip โดยอ่านผลดังนี้ negative, sporadic, focal, และ diffuse staining pattern

3.9.2 การสกัด DNA จากตัวอย่างที่ผ่านการ microdissection เพื่อใช้ในการตรวจ methylation ของ HPV16 E2BS โดยน้ำยา QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN)

ใช้เข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเขี่ยชิ้นเนื้อตรงบริเวณที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน p16^{ink4a} แล้วใส่ลงใน 180 µl Buffer ATL แล้วเติม proteinase K 20 µl แล้ววางใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชม. หรือจนกว่าชิ้นเนื้อจะย่อยสลายหมด แล้วนำตัวอย่างไป incubate ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 ชม หลังจากนั้นเติม Buffer AL ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเติม Buffer AL ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารน้ำทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp MinElute column ที่วางบน 2 ml collection tube แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAamp MinElute columnวางบน 2 ml collection tube อัน

ใหม่ แล้วเติม Buffer AW1 ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAamp MinElute column วางบน 2 ml collection tube อันใหม่ แล้วเติม Buffer AW2 ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAamp MinElute column วางบน 2 ml collection tube อันใหม่ ไม่ต้องเติมสารอะไร แล้วนำไปปั่นแห้งที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อขจัด ethanol นำ QIAamp MinElute column วางบน 1.5 ml collection tube อันใหม่แล้วเติม sterile DNase/RNase free water ปริมาตร 30 µl วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ DNA ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้

3.9.3 การตรวจ DNA methylation โดยวิธี Bisulfite modification, PCR, TA cloning และ bisulfite genomic sequencing of multiple clones

คัดเลือก HPV16 ที่มี physical status แบบ episomal และ integration จำนวน 22 ตัวอย่าง พร้อมด้วย DNA ที่สกัดจากเซลล์ SiHa และ CaSki โดย SiHa มีเชื้อ HPV16 แบบ integration จำนวน 1-2 copies/cell และ CaSki มีเชื้อ HPV16 แบบ integration จำนวน 500 copies/cell ทำการเปลี่ยนแปลงสภาพของ DNA โดย Methylamp™ DNA modification Kit (Epigentek, Brooklyn, NY, USA) โดยมีหลักการดังนี้เมื่อเติม sodium bisulfite ในกรณี unmethylated cytosine จะเปลี่ยนเป็น uracil ในขณะที่ methylated cytosine จะไม่เปลี่ยนแปลงยังคงสภาพเป็น cytosine ขั้นตอนดังนี้ ใช้ปริมาณ DNA สูงสุด 500 ng หรือ 24 µl จาก DNA ที่สกัดจากสไลด์ FFPE แล้วเติม R1 (DNA denature) 1 µl แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม DNA modification solution (เป็นส่วนผสมของ R3 (DNA modification solution) R2 (DNA modification powder) และ R1 (DNA denature solution)) 125 µl และ incubate ที่ 65°C เป็นเวลา 90 นาที เพื่อเปลี่ยน unmethylated cytosine ให้เป็น uracil หลังจากนั้นเติม modified DNA capture solution ปริมาตร 300 µl ผสมและดูดไปใส่ใน column ที่วางบน collection tube และปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารน้ำจาก collection tube ออกไปและเติม modified DNA cleaning solution ปริมาตร 200 µl และปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารน้ำจาก collection tube ออกไป เติมน้ำผสมระหว่าง 90% Ethanol/ DNA denature solution ปริมาตร 50 µl และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาทีและปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เติมน้ำ 90% ethanol ปริมาตร 200 µl และปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเติมน้ำ 90% ethanol ปริมาตร 200 µl และปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 35 วินาที นำ column วางบน 1.5 ml collection tube อันใหม่แล้วเติม sterile DNase/RNase free water ปริมาตร 30 µl วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ modified DNA ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้

นำ modified DNA มาทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers 2 คู่ โดยคู่แรกจำเพาะต่อ E2BS1 และคู่ที่สองจำเพาะต่อ E2BS2, 3 และ 4 รวมทั้ง SP-1 หลังจากทำการเพิ่มจำนวนแล้วนำ amplified products ที่ได้มาทำ electrophoresis ที่ 1.5% agarose gel และตัวอย่างที่ให้ผลลบ ได้ทำการเพิ่มจำนวนอีกครั้งโดยใช้ primers เดิม

สกัด PCR product จากเจลเพื่อนำมาใช้ในการโคลนเข้า TA vector โดยใช้น้ำยา QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) หลังจากตัดเจลน้ำหนักประมาณ 200 mg ที่มี PCR products แล้วเติม Buffer QG 600 µl แล้วนำไป incubate ที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะถูกละลายหมด หลังจากนั้นเติม isopropanol 200 µl ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดสารน้ำมาใส่ QIAquick spin column ที่วางอยู่บน collection tube แล้วปั่น 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารน้ำออกจาก collection tube ทิ้งไปแล้วเติม Buffer QG 500 µl แล้วปั่น 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารน้ำทิ้งไปแล้วเติม Buffer PE 750 µl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วปั่น 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารน้ำทิ้งแล้วปั่นแห้ง 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ column วางบน 1.5 ml collection tube อันใหม่แล้วเติม sterile DNase/RNase free water ปริมาตร 30 µl วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ purified PCR product ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อใช้ในการโคลนนิ่งในวันถัดไป

3.9.4 การโคลน purified PCR product เข้าไปใน TA vector

เตรียม TOPO cloning reaction โดยใช้ TOPO Cloning kit (Invitrogen) มีส่วนผสมดังนี้ เติม purified PCR product 2 µl, salt solution 0.5 µl และ TOPO vector 0.5 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ดูด TOPO cloning reaction mix 2 µl ใส่ใน OneShot Chemically Competent *E. coli* (TOP10) แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปสู่ขั้นตอน heat-shock โดยวางหลอดทดลองไว้ที่ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งโดยทันที แล้วเติม S.O.C medium ปริมาตร 250 µl แล้วนำไปไว้ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C และ shake 200 rpm เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นดูดสารน้ำมา 100 µl แล้ว spread ลงบน LB plate ที่มี ampicillin และ X-gal แล้วนำไปอบที่ 37 °C ข้ามคืน

วันถัดมาทำการ pick colony มาตัวอย่างละ 8 colonies ใส่ในหลอดทดลองที่มี sterile water 20 µl แล้วนำไป incubate ที่ 99 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาทำ colony PCR โดยใช้ M13 primers ซึ่งเป็น primers ที่จำเพาะต่อ TOPO vector แล้วนำ amplified products ที่ได้มาทำ PCR for sequencing โดยใช้ primer เส้นเดียวในการทดลองนี้ใช้ M13 reverse primer กับ Big-Dye terminator DNA-sequencing Kit (Perkin-Elmer, Boston, USA) หลังจากนั้น purify amplified product แล้วนำไปทำ sequencing โดยใช้เครื่อง ABI Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์การเกิด methylation โดยใช้โปรแกรม QUMA (Quantification tool for methylation analysis) ซึ่งเป็นโปรแกรมฟรีทางอินเทอร์เน็ต การคำนวณร้อยละของการเกิด methylation ที่ตำแหน่งต่างๆโดยใช้ตัวหารคือ 8 ซึ่งเป็นจำนวนโคลนที่นำมาตรวจในแต่ละตัวอย่าง

3.10 การตรวจลำดับเบสบริเวณ E2BS ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปโดยวิธี TA cloning และ genomic sequencing of multiple clones

คัดเลือก HPV16 ที่มี physical status แบบ episomal และ integration จำนวน 22 ตัวอย่าง นำ DNA มาทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers 2 คู่ โดยคู่แรก

จำเพาะต่อ E2BS1 และคู่ที่สองจำเพาะต่อ E2BS2, 3 และ 4 รวมทั้ง SP-1 หลังจากทำการเพิ่มจำนวนแล้วนำ amplified products ที่ได้มาทำ electrophoresis ที่ 1.5% agarose gel

สกัด PCR product จากเจลเพื่อนำมาใช้ในการโคลนเข้า TA vector โดยใช้น้ำยา QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ดังที่กล่าวในข้อ

การโคลน purified PCR product เข้าไปใน TA vector

เตรียม TOPO cloning reaction โดยใช้ TOPO Cloning kit (Invitrogen) มีส่วนผสมดังนี้ เติมน purified PCR product 2 µl, salt solution 0.5 µl และ TOPO vector 0.5 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ตูต TOPO cloning reaction mix 2 µl ใส่ใน OneShot Chemically Competent *E. coli* (TOP10) แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปสู่ขั้นตอน heat-shock โดยวางหลอดทดลองไว้ที่ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งโดยทันที แล้วเติม S.O.C medium ปริมาตร 250 µl แล้วนำไปไว้ที่ตู้บอุณหภูมิตั้งที่ 37°C และ shake 200 rpm เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นดูดสารน้ำมา 100 µl แล้ว spread ลงบน LB plate ที่มี ampicillin และ X-gal แล้วนำไปอบที่ 37 °C ข้ามคืน

วันถัดมาทำการ pick colony มาตัวอย่างละ 5 colonies ใส่ในหลอดทดลองที่มี sterile water 20 µl แล้วนำไป incubate ที่ 99 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาทำ colony PCR โดยใช้ M13 primers ซึ่งเป็น primers ที่จำเพาะต่อ TOPO vector แล้วนำ amplified products ที่ได้มาทำ PCR for sequencing โดยใช้ primer เส้นเดียวในการทดลองนี้ใช้ M13 reverse primer กับ Big-Dye terminator DNA-sequencing Kit (Perkin-Elmer, Boston, USA) หลังจากนั้น purify amplified product แล้วนำไป ทำ sequencing โดยใช้เครื่อง ABI Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). นำลำดับที่ได้อันไหนที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BLAST analysis ซึ่งเป็นโปรแกรมฟรีทาง อินเทอร์เน็ต การให้ผลบอกต่อการเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อ 3 ใน 5 โคลนให้ผลลำดับเบส เปลี่ยนแปลงเหมือนกัน

3.11 การตรวจปริมาณของเชื้อ HPV16 ที่มีลักษณะแบบ integration โดยวิธี quantitative PCR (qPCR)

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16 ที่มีลักษณะการติดเชื้อแบบ integration จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยใช้น้ำยา Fast SYBR Green master mix (Applied Biosystems) ใช้ primers ที่จำเพาะต่อจีโนม HPV16 E6 ดังนี้ forward 5' TTG CTT TTC GGG ATT TAT GC 3' และ reverse 5' CAG GAC ACA CAG TGG CTT TTG A 3' และจีโนม human beta globin (HBB) 5' GGC AGA CTT CTC CTC AGG AGT C 3' และ 5'CTT AGA CCT CAC CCT GTG GAG C 3' โดยมีส่วนผสมของน้ำยาดังนี้ DNase/Rnase free water 4.7 µl, Fast SYBR Green 10 µl, 5 µM primers mix 0.3 µl และ DNA 5 µl นำส่วนผสมมาทำปฏิกิริยา ในเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) โดย 1 ตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ทำการคำนวณปริมาณของไวรัสต่อเซลล์โดยวิธีเปรียบเทียบ Ct value ที่

ได้จากจีน HPV16 E6 และ HBB ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ SiHa และ Caski ให้นำมาใช้เป็น positive controls และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control

3.12 การเตรียม C33A-HPV16LCR-Luciferase cell line

นำพลาสมิด pGLuc containing HPV16 LCR, luciferase and geneticin resistance genes (ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. Svetlana Vinokurova, รูปที่ 7) มาทำ transfection ใน C33A cell line เพื่อสร้าง stable cell lines (เซลล์ที่มีการแทรกจีโนมของไวรัสเข้าสู่จีโนมของโฮสต์)

เพาะเลี้ยงเซลล์ C33A โดยใส่เซลล์ 6×10^5 cells/well ลงใน 24-well tissue culture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FCS-DMEM ที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น Transfect เซลล์ C33A โดยการเติมพลาสมิด pGLuc containing HPV16 LCR ปริมาณ 0.5 μg และ 1 μg และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ C33A ที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 48-72 ชม. ทำ trypsinization เพื่อนำเซลล์ออกจาก 24-well tissue culture plate เพาะเลี้ยงเซลล์ transfected C33A cells ใน 10 cm Petri dish โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 10%FCS-DMEM with penicilin/streptomycin ปริมาณ 10 ml และเติมสาร G418 (Geneticin) ปริมาณ 1 mg/1 ml เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 48-72 ชม. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมเติมสาร G418 ทุก 2-3 วัน และทำการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ ทำ trypsinization เพื่อเก็บ stable cells ไว้ใช้ในการทำ limiting dilution เพื่อหาเซลล์เดี่ยว ๆ ที่มี integration site จุดเดียวกัน ทำ limiting dilution เพื่อให้ได้ single clone โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well tissue culture plate โดยขั้นตอนแรกเลี้ยงเซลล์ 30,000 เซลล์ ในหลุม A1 แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM 200 μl และเพาะเลี้ยงเซลล์ C33A ต่อไปที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นทำการ trypsinization เซลล์ในหลุมที่ 1 ให้มีปริมาณของสารเท่ากับ 100 μl และทำการเติม DMEM 100 μl ในหลุมที่ A2 ถึง A10 หลังจากนั้นดูด DMEM จาก A2 100 μl แล้วเติมลงในหลุม A1 ผสมแล้วดูดสารน้ำมาทั้งหมด 200 μl และปล่อยทิ้งลงในหลุม A2 แล้วทำการดูดสารน้ำจากหลุม A2 มา 100 μl แล้วทำการเจือจางไปเรื่อยๆจนถึงหลุม A10 และในหลุม A10 จะมีปริมาณสารน้ำ 200 μl แล้วดูดเซลล์จากหลุม A10 มา 200 μl และเติมลงใน 10 ml DMEM ผสมให้เข้ากัน แล้วดูด cell suspension 100 μl ใส่ในแต่ละหลุมทั้ง 96 หลุม และเติม DMEM 100 μl ลงในหลุม A1 หลังจากนั้นวาง 96-well tissue culture plate ในแนวเอียง 45° เป็นเวลา 15 นาที และนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C , 5% CO_2 และสังเกตดูเซลล์ที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม ว่ามีเซลล์เดี่ยวๆ มีการเติบโตขึ้น หลังจากนั้นแยกเซลล์โดย trypsinization แต่ละโคลนที่ได้ แล้วเพาะเลี้ยงใน tissue culture flask เมื่อได้ปริมาณเซลล์มากพอทำการเก็บในตู้แช่แข็ง -80°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.13 การตรวจสอบการแสดงออกของ luciferase ใน stable C33A-HPV16 LCR-Luciferase cell line ที่ได้แต่ละโคลน

เพาะเลี้ยง stable C33A-HPV16 LCR-Luciferase cells ปริมาณ 50,000 cells/well ใน 48-well tissue culture plate โดยเพาะเลี้ยงโคลนละ 3 หลุม (triplicate) เป็นเวลา 48-72 ชม. แล้วตรวจวัดการแสดงออกของ luciferase โดยเตรียม substrate *Gaussia* Luciferase Assay Kit (New England Biolabs) โดยผสม Gluc Substrate 50 μl กับ Gluc Assay Buffer 5 ml เก็บไว้ในที่มืด ดูดอาหารเลี้ยง

เซลล์จากข้อ 1 มา 50 μ l ใส่ลงใน 96-well plate หลังจากนั้นเติมส่วนผสม substrate 50 μ l ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปตรวจวัดระดับของ luciferase ทันทีโดยเครื่อง luminometer (Tecan GENios™) ภายในเวลา 5 นาที จากนั้นจึงคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของ luciferase สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป เมื่อได้โคลนที่ต้องการแล้วนำมาทำการตรวจการเกิด methylation เพื่อศึกษาผลของ DNA methylation บน HPV LCR ต่อ HPV16 LCR promoter activity

3.14 ทดลองหาความเข้มข้นของสาร dexamethasone และ progesterone ที่เหมาะสมในการทดสอบกับ stable cell lines และ transient cell lines

3.14.1 การทดสอบกับ stable cell lines

เพาะเลี้ยง stable C33A-HPV16 LCR-Luciferase cells โดยเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของ luciferase มากที่สุดปริมาณ 50,000 cells/well ใน 48-well tissue culture plate โดยเพาะเลี้ยงโคลนละ 3 หลุม (triplicate) ที่ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. เติมสาร dexamethasone ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.05, 1, 1.5, 2, 2.5 μ M และ progesterone ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 2, 20, 100, 200 ng แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดการแสดงออกของ luciferase ด้วย *Gaussia* Luciferase Assay Kit โดยผสม Gluc Substrate 50 μ l กับ Gluc Assay Buffer 5 ml เก็บไว้ในที่มืด โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดลองมา 50 μ l ใส่ลงใน 96-well plate หลังจากนั้นเติมส่วนผสม substrate 50 μ l ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปตรวจวัดระดับของ luciferase ทันทีโดยเครื่อง luminometer (Tecan GENios™) ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

3.14.2 การทดสอบกับ transient cell lines

เพาะเลี้ยง C33A cells ปริมาณ 50,000 cells/well ใน 48-well tissue culture plate ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. Transfect เซลล์ C33A โดยการเติมพลาสมิด pGLuc containing HPV16 LCR ปริมาณ 0.5 μ g และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ C33A ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. เติมสาร dexamethasone ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.05, 1, 1.5, 2, 2.5 μ M และ progesterone ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 2, 20, 100, 200 ng แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดการแสดงออกของ luciferase ด้วย *Gaussia* Luciferase Assay Kit โดยผสม Gluc Substrate 50 μ l กับ Gluc Assay Buffer 5 ml เก็บไว้ในที่มืด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากข้อ 3 มา 50 μ l ใส่ลงใน 96-well plate หลังจากนั้นเติมส่วนผสม substrate 50 μ l ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปตรวจวัดระดับของ luciferase ทันทีโดยเครื่อง luminometer ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

3.15 การทดสอบผลของฮอร์โมน dexamethasone, progesterone และ trichostatin A (TSA) ต่อ promoter activity ของ stable cell lines

เพาะเลี้ยง stable C33A-HPV16 LCR-Luciferase cells ปริมาณ 50,000 cells/well ใน 48-well tissue culture plate โดยเพาะเลี้ยงโคลนละ 3 หลุม (triplicate) ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. เติมสาร dexamethasone และ progesterone ที่ความเข้มข้นที่ได้ทดลองในข้อ 1.3 ลงในหลุมที่กำหนดไว้แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อไปที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. เติมสาร TSA ลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้แล้วทำ

การเพาะเลี้ยงต่อไปที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดการแสดงออกของ luciferase โดยใช้ *Gaussia* Luciferase Assay Kit แล้วนำไปตรวจวัดระดับของ luciferase ทันทีโดยเครื่อง luminometer

3.16 การทดสอบผลของฮอร์โมน dexamethasone, progesterone และ trichostatin A (TSA) ต่อ promoter activity ของ transient cell lines

เพาะเลี้ยง C33A cells ปริมาณ 50,000 cells/well ใน 48-well tissue culture plate ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. Transfect เซลล์ C33A ด้วย pGLuc containing HPV16 LCR ปริมาณ 0.5 µg และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ C33A ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. เติมสาร dexamethasone และ progesterone ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1.3 ลงในหลุมที่กำหนดไว้แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อไปที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. เติมสาร TSA ลงในแต่หลุมที่กำหนดไว้แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อไปที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดการแสดงออกของ luciferase ด้วย *Gaussia* Luciferase Assay Kit แล้วนำไปตรวจวัดระดับของ luciferase ทันทีโดยเครื่อง luminometer

3.17 การทดสอบผลของโปรตีน E2 ต่อ HPV16 promoter ที่ไม่มี methylation บน LCR แบบ transient transfection

เพาะเลี้ยง C33A cells ปริมาณ 50,000 cells/well ใน 48-well tissue culture plate ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. Transfect เซลล์ C33A ด้วยพลาสมิด pGLuc containing HPV16 LCR ปริมาณ 0.5 µg ร่วมกับ plasmid containing E2 gene ที่ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ng/well และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ C33A ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดการแสดงออกของ luciferase

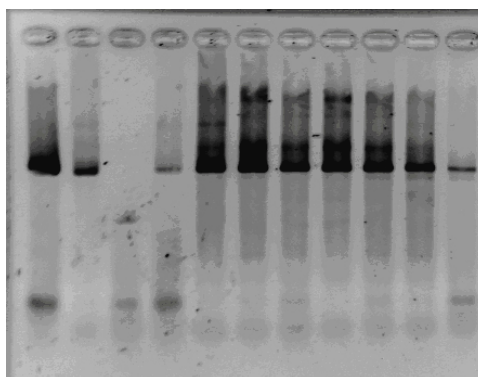
4. ผลการวิจัย (Result)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยทั้งหมด 344 ตัวอย่าง ผู้ป่วยที่ศึกษา มีอายุอยู่ในช่วง 17-75 ปี โดยอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยคือ 39.9 ปี สามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกออกเป็น 4 กลุ่มคือ

1. กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก (no CIN) จำนวน 65 ราย มีอายุอยู่ในช่วง 20-71 ปี และมีอายุเฉลี่ย 41 ปี
2. กลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกแบบ CIN I จำนวน 167 ราย มีอายุอยู่ในช่วง 17-66 ปี และมีอายุเฉลี่ย 39.3 ปี
3. กลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกแบบ CIN II-III จำนวน 75 ราย มีอายุอยู่ในช่วง 19-75 ปี และมีอายุเฉลี่ย 42.3 ปี
4. กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก (squamous cell carcinoma) จำนวน 37 ราย มีอายุอยู่ในช่วง 37-73 ปี และมีอายุเฉลี่ย 52.3 ปี

4.1 การทดสอบคุณภาพของ DNA

หลังจากที่ได้ทำการสกัด DNA แล้วนำตัวอย่างมาตรวจคุณภาพของ DNA โดย amplify จีน GAPDH โดยวิธี PCR แล้วตรวจดู PCR product ดังรูปที่ 1 โดยพบว่าตัวอย่างทั้งหมดให้ผลบวกต่อจีน GAPDH แสดงว่า DNA ที่นำมาใช้มีคุณภาพดี และนำตัวอย่าง DNA มาใช้ในการตรวจหา HPV DNA



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างภาพการตรวจคุณภาพ DNA จากตัวอย่างโดยตรวจหา DNA ของจีน GAPDH

4.2 HPV DNA detection and genotyping

ผลจากการตรวจหาการติดเชื้อ HPV โดยวิธี PCR ใช้ primers GP5+/6+ และ reverse line blot hybridization จากตัวอย่าง DNA ทั้งหมด 344 ราย พบว่าความชุกของการติดเชื้อ HPV คิดเป็นร้อยละ 43.6 (150/344) โดยแยกความชุกของการติดเชื้อตามระดับความผิดปกติของเซลล์ดังนี้ พบร้อยละ 27.7 (18/65), 35.3 (59/167), 57.3 (43/75), 81.1 (30/37) ในตัวอย่าง no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC ตามลำดับ

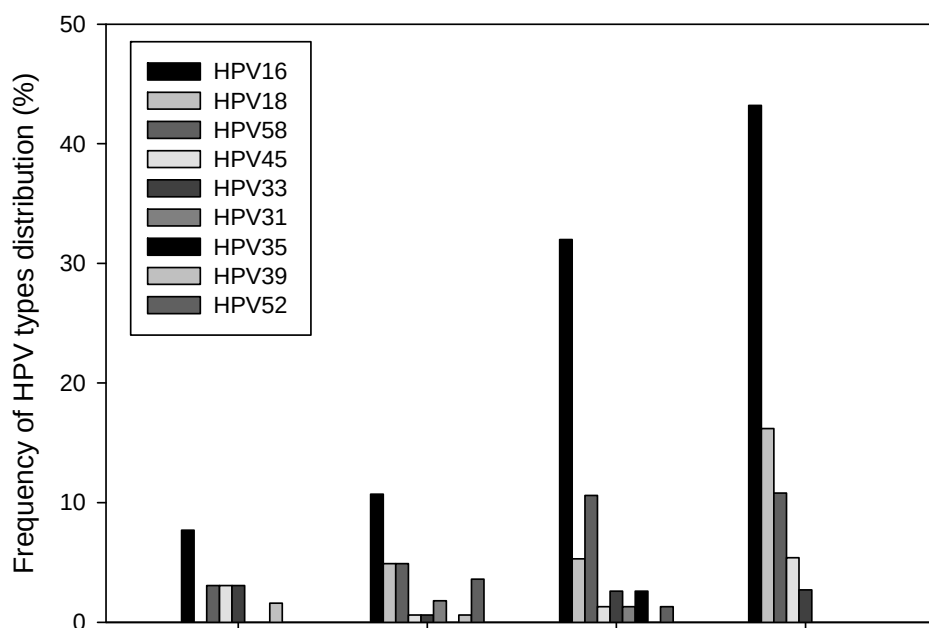
จากตัวอย่างทั้งหมดพบความชุกของการติดเชื้อ HPV16 มากที่สุดร้อยละ 42 (63/150) โดยแบ่งเป็น ติดเชื้อแบบชนิดเดียว (single infection) ร้อยละ 36.67 (55/150) และติดเชื้อร่วมกับชนิดอื่นร้อยละ 5.3 (8/150) และพบ HPV16 ทั้ง single infection และ multiple infections ร้อยละ 42 (63/150) ของผู้ติดเชื้อ HPV โดยพบในตัวอย่างกลุ่ม no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC ร้อยละ 27.7 (5/18), 30.5 (18/59), 55.8 (24/43), 53.3 (16/30) ตามลำดับ อันดับรองลงมาคือ HPV58 พบร้อยละ 13.3 (20/150) และ HPV18 พบร้อยละ 11.3 (17/150) และเชื้อ HPV ชนิดอื่นๆ เช่น HPV6, 11, 31, 33, 35, 39, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 59, 66, 67 และ 70 และไม่ทราบชนิดมี 17 ตัวอย่าง มีการติดเชื้อร่วมกันสองชนิดร้อยละ 11.3 (19/168) และติดเชื้อมากกว่า 2 ชนิดอยู่ร้อยละ 1.19 (2/168) ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจ HPV DNA และ genotype ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก 344 ราย ที่มีผลการตรวจทางเนื้อเยื่อเป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC

	No CIN (n = 65)	CIN I (n = 167)	CINII-III (n = 75)	SCC (n = 37)	Total (n = 344)
HPV negative	47 (72.3%)	108 (64.7%)	32 (42.7%)	7 (18.9%)	194 (56.4%)
HPV positive	18 (27.7%)	59 (35.3%)	43 (57.3%)	30 (81.1%)	150 (43.6%)
HPV16	5	14	21	15	55
HPV18	0	5	1	5	11
HPV58	2	6	3	3	14
HPV6	1	0	0	0	1
HPV11	0	1	1	1	3
HPV 31	0	3	0	0	3
HPV33	0	0	2	1	3
HPV35	0	0	2	0	2
HPV39	1	0	0	0	1
HPV43	0	1	1	0	2
HPV45	2	1	0	2	5
HPV52	0	4	0	0	4
HPV53	0	0	1	0	1
HPV59	0	2	0	0	2
HPV56	1	1	0	0	2
HPV66	0	1	1	0	2

ตารางที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจ HPV DNA และ genotype ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก 344 ราย ที่มีผลการตรวจทางเนื้อเยื่อเป็น no CIN, CIN I, CIN II-III และ SCC

	No CIN (n = 65)	CIN I (n = 167)	CINII-III (n = 75)	SCC (n = 37)	Total (n = 344)
HPV67	0	1	0	0	1
HPV70	1	1	1	0	3
HPV33,51	1	0	0	0	1
HPV11, 18	0	1	0	0	1
HPV16,52	0	1	0	0	1
HPV16, 56	0	1	0	0	1
HPV16,33	0	1	0	0	1
HPV31, 58	0	0	1	0	1
HPV43, 56	0	1	0	0	1
HPV11, 16	0	1	2	0	3
HPV16, 18	0	0	1	1	2
HPV56, 58	0	0	1	0	1
HPV11, 58	0	0	0	1	1
HPV11, 18, 58	0	1	1	0	2
HPV11, 39, 51, 52	0	1	0	0	1
HPV11, 18, 52, 58	0	0	1	0	1
Unidentified	4	10	2	1	17



รูปที่ 2 จำนวน HPV genotype และแบบแผนการติดเชื้อที่พบในตัวอย่างตรวจ

4.3 ผลการตรวจหา physical status ของ HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 และผลการศึกษา chromosomal site of HPV integration โดยวิธี APOT assay

4.3.1 การพัฒนาเทคนิคการตรวจ HPV58 physical status โดยวิธี Southern blot hybridization และ APOT assay โดยมีลำดับวิธีการทำดังนี้

ทำการออกแบบไพรเมอร์และโพรบในการตรวจหา HPV58 โดยมีลำดับเบสดังนี้

Oligo (dT)17-primer (dT) 17-p3 5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

p3 (5'-GACTCGAGTCGACATCG-3')

HPV58 E7-p1-58 specific 5'-ACTTGTGGCACCACGGTTCGTTTGTG-3'

HPV58 E7 p2-58 specific 5'-TTCGTTTGTGTATCAACAGTACAAC-3'

HPV58-E7-specific probe h1-58, 5'-TGCTTATGGGCACATGTACCATTG 3'

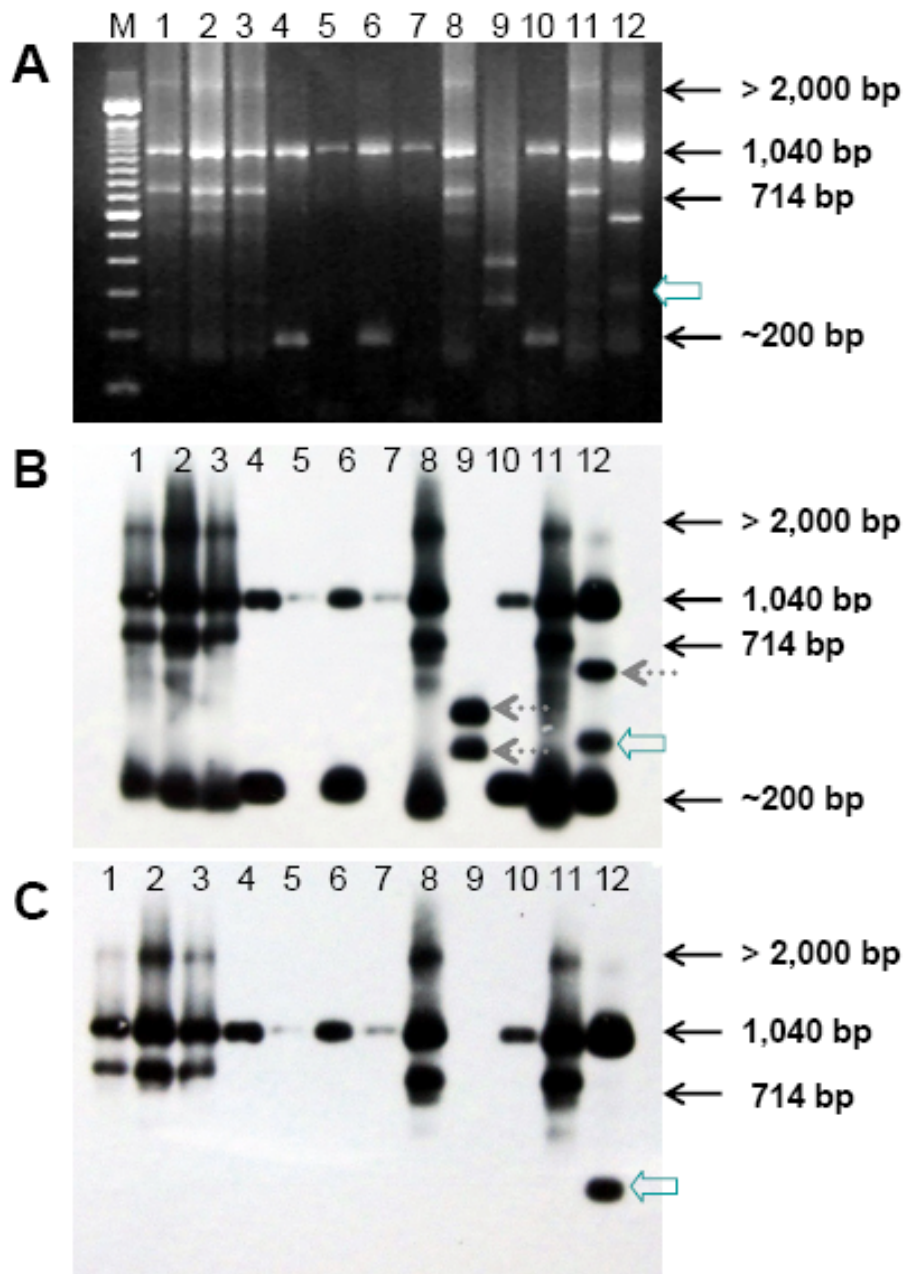
HPV58-E4-specific probe h2 58, 5'-AGTACACAGGGGACAAAGCGACGACG 3'

หลังจากทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี APOT ก็ได้นำ DNA มาทำการตรวจ physical status โดยวิธี Southern blot hybridization ดังรูปที่ 3 เป็นผลการทำ APOT ของ HPV58 และ Southern blot hybridization ในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV58 โดยทำการทดสอบในตัวอย่างจากประเทศไทยจำนวน 16 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากประเทศเยอรมันจำนวน 12 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยที่ 3A เป็นการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี APOT ของ HPV58 พบว่าในตัวอย่างที่ติดเชื้อที่พบเป็น episomal จะพบขนาดของ PCR ขนาด >2000 bp, 1,040 bp, 714 bp และ <200 bp และในตัวอย่างที่เป็น integration จะพบขนาด

ของ PCR ที่แตกต่างจากที่กล่าวข้างต้น **รูปที่ 3B และ 3C** เป็นผลการทำ Southern blot hybridization พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ E7 จะพบผลบวกกับ PCR product ทุกขนาดทั้ง episomal และ integration เนื่องจากว่าในกลุ่ม episomal และ integration จะมีจีน E6 และ E7 คงอยู่และเมื่อใช้ไพรเมอร์ E4 จะพบผลบวกเฉพาะในตัวอย่าง episomal แต่ไม่พบในตัวอย่าง integration เนื่องจากในตัวอย่าง integration ส่วนมากจะมีการขาดหายไปของจีน E2 และในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ HPV58 ที่มีการเกิด integration และพบจีน E2 คงอยู่จึงน่าจะมีการขาดไปของ HPV58 E2 ในการเกิด integration เช่นเดียวกับที่พบใน HPV16

หลังจากทำการตรวจลำดับ DNA เพื่อทำการตรวจดู splicing pattern พบว่า ในกลุ่ม episomal ที่พบขนาดของ PCR product >2,000 bp, 1,040 bp และ 714 bp จะพบ splicing donor site ที่ตำแหน่งเดียวกันคือ ตำแหน่งที่ 898 ตรงจีน E1 และพบ splicing acceptor site ที่ตำแหน่ง 3353 ตรงจีน E4 และในตัวอย่างที่มี HPV58 integration จะพบ splicing donor site ที่ตำแหน่งเดียวกันคือ ตำแหน่งที่ 898 ตรงจีน E1 และเกิด splicing กับ DNA ของคนซึ่งเป็น Transcript type A ดังแสดงในรูปที่ 4

จากการทำ sequencing เพื่อหาลำดับ DNA ของตัวอย่างที่เป็น episomal และ integration พบว่า ในตัวอย่างที่เป็น episomal ที่มีขนาดของ PCR product >2,000 bp, 1,040 bp และ 714 bp จะมี splicing donor site ที่ DNA ลำดับที่ 898 ตรงบริเวณจีน E1 และมี splicing acceptor ที่ DNA ลำดับที่ 3353 บริเวณจีน E2 และพบว่า poly A signal ของ PCR product ขนาด >2,000 bp และ 1,040 bp จะพบที่ตำแหน่งเดียวกันคือลำดับเบสที่ 4230 และสำหรับ PCR product ขนาด 714 bp จะ poly A signal ที่ลำดับเบสที่ 3904 และสำหรับ PCR product ขนาดประมาณ <200 bp พบว่าลำดับ DNA เป็นส่วนของ E7 และ E1



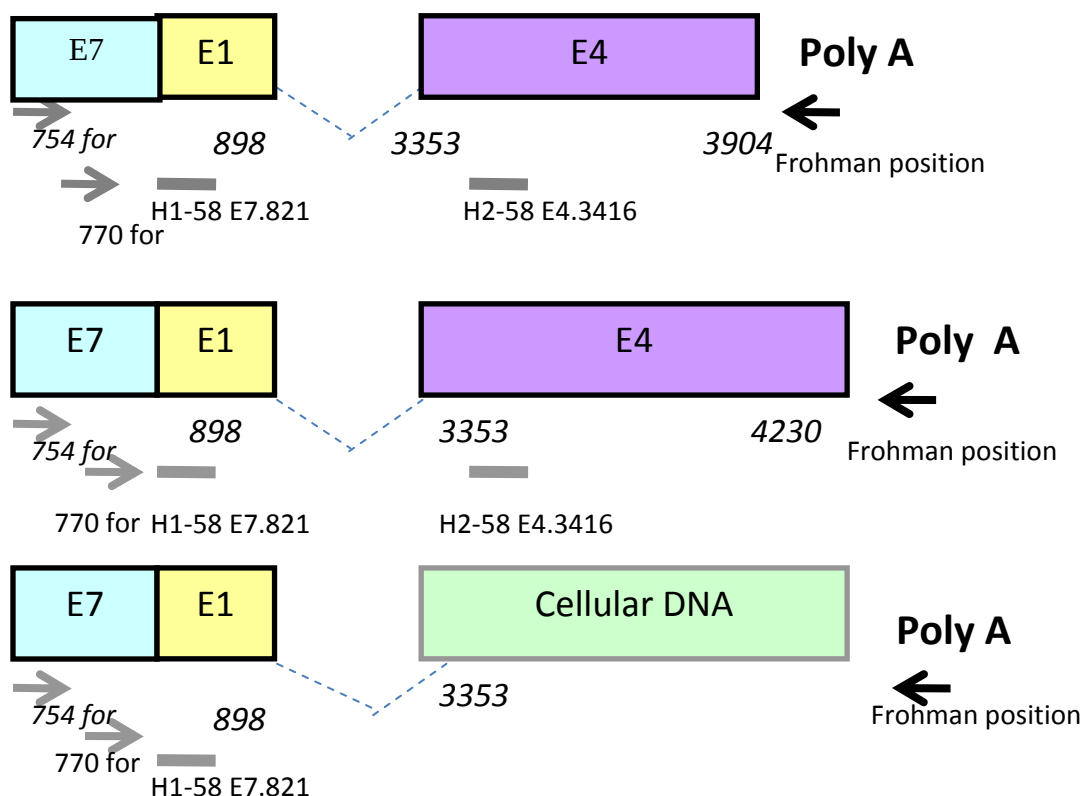
รูปที่ 3 ผลการทำ APOT ของ HPV58 และ Southern blot hybridization ในตัวอย่างที่มี HPV58 DNA

A: DNA Marker 100 bp, lanes 1-3, 8 และ 11 = ตัวอย่างที่เป็น episomal หลังจากเพิ่มจำนวนโดย APOT จะพบขนาดของ PCR >2,000 bp, 1,040 bp, 714 bp และ <200 bp และ lanes 4-7 = ตัวอย่างที่เป็น integration จะพบขนาดของ PCR ที่แตกต่างจากที่กล่าวข้างต้น

(lanes 1-3: no CIN; lanes 4-6: CIN I; lanes 7-9: CIN II-III; และ lanes 10-12: SCC)

B: ผลการทำ Southern blot hybridization พบว่า เมื่อใช้โพรบ E7 จะพบผลบวกกับ PCR product ทุกขนาดทั้ง episomal และ integration

C: เมื่อใช้โพรบ E4 จะพบผลบวกเฉพาะในตัวอย่าง episomal



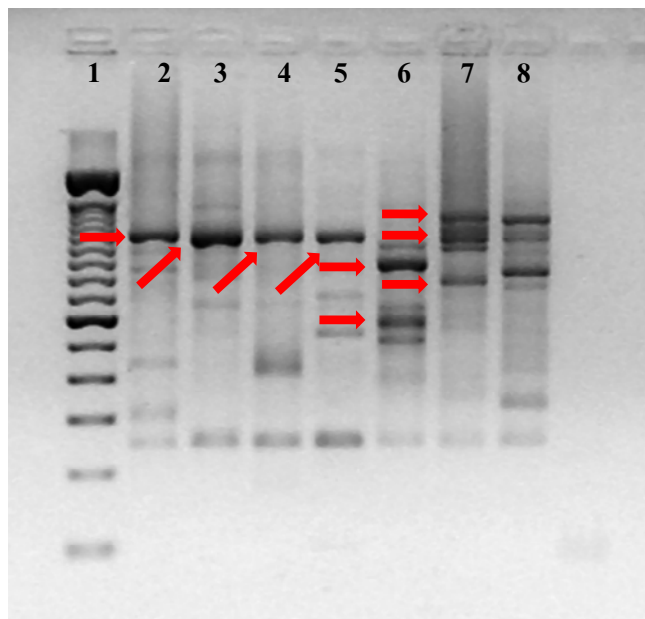
รูปที่ 4 รูปแบบการเกิด splicing ของ HPV58 ของตัวอย่างที่พบเป็น episomal และ integration

4.3.2 ผลการตรวจหา HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 physical status และ chromosomal site ที่ HPV มีการเกิด integration โดยวิธี APOT assay

รูปที่ 5 เป็นการแสดงผลการตรวจหา physical status ของ HPV16 ในตัวอย่างตรวจที่มีผลบวกหรือมีการติดเชื้อ HPV16 (Lane 2-6) โดยการตรวจการแสดงออกของ E6/E7 mRNA และมีแบบแผนของการแสดงออกต่างกัน physical status ต่างกันเช่น episomal form, integrated form และ mixed form ในตารางที่ 2 เป็นการตรวจหา physical status โดยวิธี APOT assay ในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 จากตัวอย่างทั้งหมด 99 ตัวอย่างที่มี RNA ที่มีคุณภาพสามารถใช้ในการตรวจสอบได้ โดยแยกเป็น HPV16 จำนวน 53 ตัวอย่าง HPV18 จำนวน 10 ตัวอย่าง HPV58 จำนวน 28 ตัวอย่าง HPV31 จำนวน 3 ตัวอย่าง HPV33 จำนวน 4 ตัวอย่างและ HPV45 จำนวน 1 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า HPV integration ของการติดเชื้อทุกชนิดที่ศึกษาพบในเฉพาะตัวอย่างที่มีความผิดปกติในระดับ CIN II-III และ SCC แต่ไม่พบในระดับ no CIN และ CIN I โดยพบว่า HPV16, 18, 58 และ 45 integration พบร้อยละ 40, 100,

25 และ 100 ในตัวอย่าง SCC ตามลำดับและพบ HPV16 และ 58 integration ร้อยละ 5 และ 16 ในตัวอย่าง CIN II-III ตามลำดับ

ผลจากการตรวจหา chromosomal site of integration จากตัวอย่างที่มี viral genome integration พบ HPV16 integration ที่โครโมโซมที่ 2, 4, 5, 8, 11, 16 และ 17 พบ HPV18 integration ที่โครโมโซม 1, 6, 8 และ 19 พบ HPV58 integration ที่โครโมโซม 4, 12 และ 18 และพบ HPV45 integration ที่โครโมโซม 6



รูปที่ 5 ผลการตรวจ HPV16 physical status โดยวิธี APOT

lane 1 = DNA marker 100 bp,

lanes 2-5 = episomal HPV16,

lanes 6-8 = integrate และ mixed form HPV16

ตารางที่ 3 ความชุกของ integrate derived transcripts และ chromosomal site of integration ที่ตรวจพบใน HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58 โดยวิธี APOT assay

Lesions HPV types	No CIN	CIN I	CIN II-III	SCC	Total
HPV16	0/2 (0%)	0/17(0%)	1/19(5%) Chr 16	6/15 (40%) Chr. 2,4,5,8,11,17	53
HPV18	0/0 (0%)	0/3 (0%)	0/1 (0%)	6/6 (100%) Chr 1,6,8,19	10
HPV58	0/4 (0%)	0/5 (0%)	2/15 (13.3%) Chr 18, 4	1/4 (25%) Chr 12	28*
HPV31	0/0 (0%)	0/2 (0%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)	3
HPV33	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/2 (0%)	0/0 (0%)	4
HPV45	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (100%) Chr 6	1
Total	7	28	38	26	99

*สำหรับ HPV58 จำนวน 16 ตัวอย่างจากประเทศไทยและอีก 12 ตัวอย่างจากประเทศเยอรมันนี

ผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ E6 และ E7 mRNA ของเชื้อ HR-HPV (HPV16, 18, 31, 33, 45 และ 58) ทำให้ทราบลักษณะ physical status ของเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมทั้งได้ทราบตำแหน่ง integration site ในโครโมโซมของโฮสต์ในตัวอย่างที่มี physical status แบบ integration

4.4 การตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในเซลล์ปากมดลูก

ในปัจจุบันโปรตีน p16^{ink4a} ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก จากตัวอย่าง FFPE cervical tissue จำนวน 94 ราย แบ่งความผิดปกติของเนื้อเยื่อดังนี้ no CIN 7 ราย, CIN I 31 ราย, CIN II-III 47 ราย และ SCC 9 ราย พบว่าในกลุ่ม no CIN ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในขณะที่พบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ใน CIN I และ CIN II-III ร้อยละ 16 และ 89 ตามลำดับ และพบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ใน SCC ถึงร้อยละ 100

จากผลการศึกษาข้างนี้จึงกล่าวได้ว่าการตรวจหาโปรตีน p16^{ink4a} สามารถช่วยในการวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกได้

ตารางที่ 4 ผลตรวจการแสดงออกของโปรตีน p16 ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่างๆ

p16 ^{ink4a}	No CIN	CIN I	CIN II-III	SCC	Total
positive	0	5 (16%)	42 (89%)	9 (100%)	56
negative	7 (100%)	26 (84%)	5 (11%)	0	38
Total	7	31	47	9	94

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} และ HPV physical status

ผลการทดลองแสดงว่าในตัวอย่างที่ p16^{ink4a} negative เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 100 ในกลุ่ม p16 positive CIN I เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 100 ในกลุ่ม p16^{ink4a} positive CIN II-III เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 95 และ integration ร้อยละ 5 และในกลุ่ม p16^{ink4a} positive SCC เชื้อ HPV มี physical status แบบ episomal ร้อยละ 50 และ integration ร้อยละ 50

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} และ HPV physical status

p16 ^{ink4a}	Physical status	No CIN	CIN I	CIN II-III	SCC	Total
Positive	Episomal	0	3 (100%)	19 (95%)	4 (50%)	26 (83.87%)
	Integrated/Mixed	0	0	1 (5%)	4 (50%)	5 (16.13%)
Negative	Episomal	1 (100%)	6 (100%)	2 (100%)	0	9 (100%)
	Integrated/Mixed	0	0	0	0	0
Total		1	9	22	8	40

4.6 การตรวจ DNA methylation ของ HPV16 E2 binding site (E2BS) 1, 2, 3 และ 4

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้ว พบมี episomal HPV ร้อยละ 100 ในกลุ่มตัวอย่าง no CIN และ CIN I ในขณะที่พบเพียงร้อยละ 7.9 ใน CIN II-III และร้อยละ 53.8 ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก จึงทำให้สนใจที่จะศึกษาปัจจัยที่ชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 มากขึ้นในกรณี episomal HPV ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E2 คณะผู้วิจัยจึงได้สนใจตรวจปัจจัยทาง epigenetic นั่นคือ DNA methylation

ได้ทำการตรวจ CpG methylation ตรงบริเวณ E2BS 1, 2, 3 และ 4 และส่วน SP-1 ของ HPV16 จากสมมติฐานที่พบ episomal HPV16 ในตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกและไม่พบ integration HPV16 ในตัวอย่าง normal และ CIN I และพบ integration จำนวนน้อยในตัวอย่าง CIN II-III จึงตั้งสมมติฐานว่าปัจจัยทาง epigenetic เช่น DNA methylation ตรงตำแหน่ง E2BS ป้องกันการจับของโปรตีน E2 ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ได้ โดยในสภาวะการติดเชื้อเมื่อโปรตีน E2 จับตรงบริเวณ distal E2BS (E2BS1) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ได้ และเมื่อโปรตีน E2 จับตรงบริเวณ proximal E2BS (E2BS 3 และ 4) สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ได้ และตรง E2BS 2 เป็นส่วนที่โปรตีน E2 จะจับกับโปรตีน E1 และมีการจำลองจีโนมของไวรัสเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัส

ในการทดลองนี้ได้ใช้ DNA ที่สกัดจาก CaSki (ซึ่งมี 500 copies of integrated HPV16/cell) และ SiHa (ซึ่งมี 1-2 copies of integrated HPV16/cell) เป็นตัวควบคุมที่มีและไม่มี DNA methylation ตามลำดับทำการตรวจ CpG island จำนวน 10 ตำแหน่ง ผลการทดลองพบไม่มีการเกิด DNA methylation จาก 8 clones ของตัวอย่าง SiHa และพบการเกิด DNA methylation ในตัวอย่าง CaSki ที่ตำแหน่งต่างๆ ตั้งแต่ร้อยละ 50-100 ตารางที่ 5 เป็นผลร้อยละของการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งต่างๆ โดยใช้ตัวหารคือ 8 ซึ่งเป็นจำนวนโคลนที่นำมาตรวจในแต่ละตัวอย่าง

จากการตรวจตัวอย่างที่มี integration จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีการเกิด DNA methylation ในตัวอย่าง 523 จำนวน 7 ตำแหน่ง ในตัวอย่าง L006 จำนวน 9 ตำแหน่ง และเกิด 4 ตำแหน่งในตัวอย่าง L029 ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ที่เหลือ ไม่พบการเกิด DNA methylation

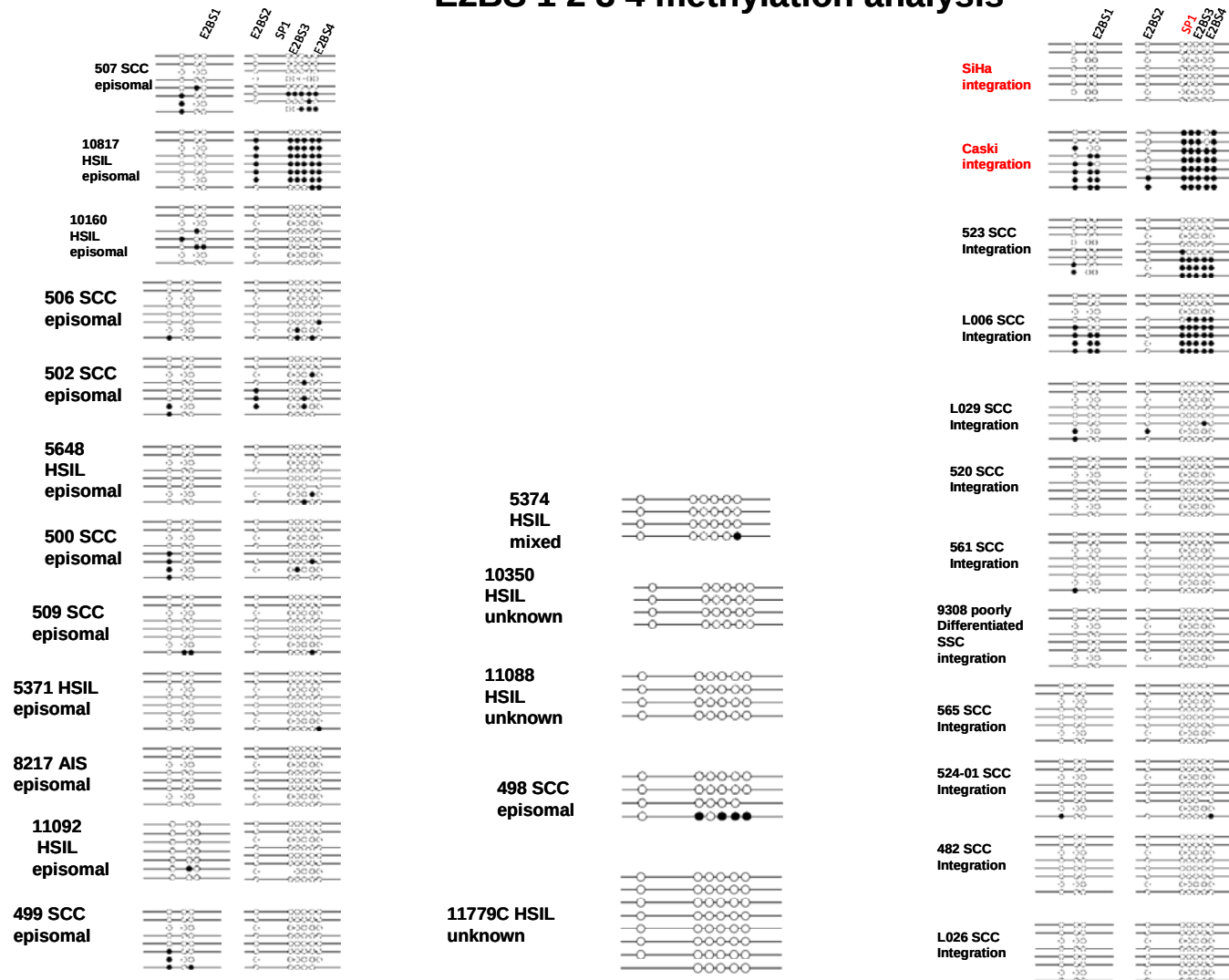
ได้ทำการตรวจ copy number ของ HPV16 ที่มี physical status แบบ integration form โดยวิธี quantitative real time PCR พบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีการเกิด methylation มี copy number เท่ากับ 1-2 copies number ต่อ 1 เซลล์และในตัวอย่างที่มีการเกิด methylation ในระดับที่สูงมี copy number ที่สูงในระดับ 4- 20 copies number ต่อ 1 เซลล์

พบการเกิด DNA methylation ตรงบริเวณ E2BS บน HPV16 LCR ที่มี physical status แบบ episomal แต่มีการเกิด methylation แบบไม่สม่ำเสมอ แต่สามารถพบ DNA methylation ได้ทั้ง 4 ตำแหน่งของ E2BS บน HPV16 LCR ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลตรวจ HPV16 methylation จาก DNA ที่สกัดจากบริเวณที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน p16^{ink4a} โดยคิดเป็นร้อยละ

		10 CpG									
				E2BS1		E2BS2	SP-1	E2BS3		E2BS4	
	Position	7426	7432	7453	7459	7860	31	37	43	52	58
Sample no.	Physical status	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)
SiHa	Integration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CaSki	Integration	63	50	63	50	25	100	100	100	75	100
523	Integration	25	25	0	0	0	50	38	38	38	38
L006	Integration	50	38	38	38	0	50	63	63	63	63
L029	Integration	25	13	0	0	13	0	0	0	13	0
520	Integration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
561	Integration	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9308	Integration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
565	Integration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
524-01	Integration	13	0	0	0	0	0	0	0	0	13
482	Integration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L026	Integration	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0
507	Episomal	38	13	13	0	0	13	13	25	38	25
10817	Episomal	0	0	0	0	75	75	75	75	88	88
10160	Episomal	13	0	25	13	0	0	0	0	0	0
506	Episomal	13	0	0	0	0	0	25	0	13	13
502	Episomal	25	0	0	0	38	0	0	28	13	0
5648	Episomal	0	0	0	0	0	0	0	13	13	0
500	Episomal	50	0	0	0	0	0	13	0	13	0
509	Episomal	0	0	13	13	0	0	0	0	13	0
5371	Episomal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
8217	Episomal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11092	Episomal	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0
499	Episomal	38	25	0	13	0	0	0	0	0	0

E2BS 1 2 3 4 methylation analysis



รูปที่ 6 ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งที่มีการเกิด DNA methylation บริเวณ E2 binding site ตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4

4.7 การเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปบน HPV16 LCR ตรงบริเวณ distal และ proximal E2BS

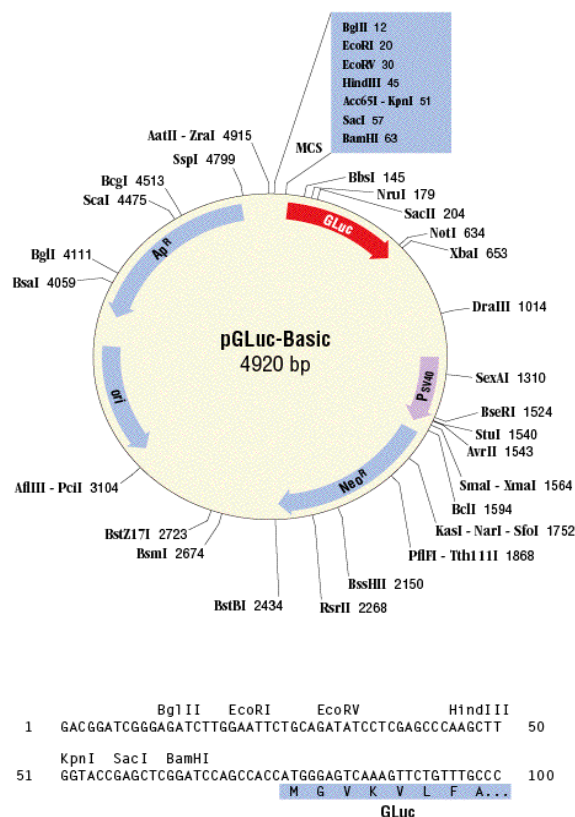
นอกเหนือจากปัจจัยทาง epigenetic คือการเกิด methylation ตรงบริเวณ E2BSs ที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ oncogenes ของไวรัสเพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มแรกที่มีการเปลี่ยนแปลงจาก productive infection เป็น transforming infection ปัจจัยทาง genetic คือ การเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปตรงบริเวณ E2BS อาจมีส่วนส่งเสริมให้มีการแสดงออกของ oncogenes มากขึ้นได้เนื่องจากไปยับยั้งการจับของโปรตีน E2 ตรงบริเวณลำดับเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไป ในการศึกษาได้ทำการตรวจใน 22 ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16 โดยแบ่งดังนี้ HPV16 integration (9 ตัวอย่าง) และ HPV16 episome (13 ตัวอย่าง) เราได้ทำวิธี TA cloning และตรวจลำดับเบสใน 5 โคลนแบคทีเรียโดยจะยอมรับผลเมื่อสามโคลนในห้าโคลนให้ผลที่ตรงกัน ผลที่ได้มีดังนี้พบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดเจ็ดตำแหน่งคือ 7391(T>G) (5%, 1/20), 7416 (A>T) (100%, 20/20), 7427 (G>A) (10%, 2/20), 7448 (T>C) (10%, 2/20), 7872 (C>G) (9%, 2/22), 24 (C>T, C>G) (13.6%, 3/22) และ 83 (A>G) (4.5%, 1/22). เมื่อแยกตาม physical status พบว่าในกลุ่ม integrated HPV16 มีการเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่ง 7448 (T>C) ซึ่งใกล้กับ E2BS1 (11.1%, 1/9) และ 7416 (A>T) (100%, 9/9) ส่วนในกรณี episomal HPV16 พบตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไปคือ 7391(T>G) ตรงบริเวณ GRE, 9% (1/11), 7416 (A>T) (100%, 11/11), 7427 (G>A) (18%, 2/11), 7448 (T>C) ซึ่งใกล้กับ E2BS1 (9%, 1/11), 7872 (C>G) (15.4%, 2/13), 24 (C>T, C>G) ซึ่งใกล้กับ SP-1 (23%, 3/13) และ 83 (A>G) (7.7%, 1/13) (ตารางที่ 6) เราสรุปว่าการเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปตรงบริเวณ E2BS เป็นเหตุการณ์ที่ไม่เจอในการทดลองนี้ ดังนั้นปัจจัยทาง epigenetic จึงมีความสำคัญต่อการชักนำให้การแสดงออกของ oncogenes ของไวรัสให้สูงขึ้น

ตารางที่ 6 ความถี่ของการเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปบน HPV16 LCR ตรงบริเวณ distal และ proximal E2BS ซึ่งเป็นผลจาก 3 ใน 5 โคลนที่ให้ผลตรงกัน

Nucleotide	Change	Binding site	Integration (n=9)	Episomal (n=13)	Total (n=22)
7391	T>G	GRE		1/13 (7.7%)	1/22 (4.5%)
7416	A>T		9/9 (100%)	13/13 (100%)	22/22 (100%)
7427	G>A	within CpG		2/13 (15.4%)	2/22 (9%)
7448	T>C	close to E2BS1	1/9 (11.1%)	1/13 (7.7%)	2/22 (9%)
7872	C>G			2/13 (15.4%)	2/22 (9%)
24	C>T, C>G	close to SP1		3/13 (23%)	3/22 (13.6%)
83	A>G			1/13 (7.7%)	1/22 (4.5%)

4.8 การสร้าง C33A-HPV16 LCR-Luciferase stable cell lines

ผลจากการทดสอบการแสดงออกของ luciferase ใน stable cell lines ที่ได้จำนวน 7 โคลน (G6, A10, G5, H2, H5, B3 และ A8) พบว่ามีการแสดงออกของ luciferase จำนวน 5 โคลนได้แก่ A8, B3, H2, H5 และ G5 ได้ทำการตรวจ methylation บริเวณ E2BS ใน stable cell lines พบว่า stable cell lines G6 และ A10 มีการเกิด methylation ในระดับสูง stable cell lines A8 และ H2 มีการเกิด methylation ในระดับปานกลาง และ stable cell lines B3, G5 และ H5 มีการเกิด methylation ในระดับต่ำหรือไม่มีเลย ซึ่งระดับการเกิด methylation จะสัมพันธ์กับการแสดงออกของ luciferase โดยเซลล์ G6 และ A10 พบว่ามีการแสดงออกของ luciferase ในระดับที่ต่ำมากหรือไม่มีการแสดงออกเลย เซลล์ B3, A8, H2 และ H5 มีการแสดงออกของ luciferase ในระดับปานกลางถึงระดับสูง



รูปที่ 7 โครงสร้างของ pGLuc-Basic โดยนำส่วน HPV16 LCR มาตัดต่อเข้าส่วน HindIII และ BamHI ตามด้วย luciferase และ neomycin resistance genes

4.9 ความเข้มข้นของสาร progesterone และ dexamethasone ที่เหมาะสมในการกระตุ้น viral promoter

จากการทดลองพบว่าการแสดงออกของviral promoter รูปแบบ episomal form และ integration form ถูกกระตุ้นโดย progesterone และ dexamethasone แบบ dose dependent manner และทำการคัดเลือกความเข้มข้นสารที่เหมาะสมดังนี้ progesterone ปริมาณ 20 ng และ dexamethasone ปริมาณ 1 μ M

4.10 การทดสอบผลของฮอร์โมน dexamethasone, progesterone และ TSA ต่อ promoter activity ของ stable cell lines

ในบริเวณ HPV LCR ประกอบด้วยส่วน enhancer region ซึ่งถูกควบคุมโดย glucocorticoid response elements (GREs) สาร dexamethasone และ progesterone เป็นสารในกลุ่ม glucocorticoid และกลุ่มสเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid) ตามลำดับ โดยจะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ HPV E6/E7 oncogenes ได้ สาร TSA เป็นสารในกลุ่ม histone deacetylase inhibitors (HDIs or HDACIs)

จากการทดสอบกับ stable cell lines ทั้ง 5 โคลน (G5, H2, H5, B3 และ A8) พบว่าเมื่อมีการเติมสาร TSA โคลน H5, H2 และ A8 มีการแสดงออกของ luciferase ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ stable cell lines ที่ไม่ได้ใส่สาร TSA โคลน B3 และ G5 มีการแสดงออกของ luciferase ในระดับเท่าเดิมหรือลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อมีการเติมสาร TSA สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าในกรณีโคลนที่มีการแสดงออกของ luciferase ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเกิด DNA methylation ตรงบริเวณ HPV16 LCR จึงทำให้โครโมโซมมีการปิดในบางส่วนเมื่อเติมสาร TSA ทำให้โครโมโซมเปิดออกจึงทำให้มีโปรตีนของโฮสต์ที่ทำหน้าที่เป็น transcription factors สามารถมาจับตรง LCR และกระตุ้นการแสดงออกของ luciferase ได้แต่ในกรณีที่มีการแสดงออกของ luciferase ไม่เปลี่ยนแปลงหรือลดลงเพียงเล็กน้อยสันนิษฐานได้ว่า HPV16 LCR มีการเกิด DNA methylation ในระดับที่ต่ำหรือไม่มีเลยทำให้โครโมโซมเปิดดังนั้น TSA จึงไม่มีผลต่อโครงสร้างของโครโมโซมหรือในอีกกรณีหนึ่งเนื่องจากมีโปรตีนที่ยับยั้ง viral promoter มาจับตรง LCR ซึ่งความแตกต่างอาจเกิดจากบริเวณของโฮสต์ที่ไวรัสมีการแทรกจีโนมเป็นตัวกำหนดการเข้ามาของโฮสต์โปรตีน หรือเกิดจาก cis acting host sequence

พบว่าการแสดงออกของ luciferase ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ทั้ง 5 โคลน เมื่อมีการเติมสาร TSA พร้อมด้วย progesterone หรือ dexamethazone หรือเฉพาะสาร progesterone หรือ dexamethazone อย่างเดียว แต่ระดับการแสดงออกมีความแตกต่างกันเช่นในกรณีโคลน G5 และ H2 มีการแสดงออกที่ต่ำกว่าโคลน H5, B3 และ A8 (รูปที่ 8)

จากการทดลองเราสามารถจำแนกได้ว่าโคลน B3 และ H5 มีการแสดงออกของ luciferase ในระดับที่สูง โคลน A8 มีการแสดงออกของ luciferase ในระดับปานกลาง ส่วนโคลน G5 และ H2 มีการแสดงออกของ luciferase ในระดับที่ต่ำ และการแสดงออกของ luciferase ที่ถูกกระตุ้นโดย HPV16 LCR ในโคลนต่างๆ ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากกรณีแรกมีการเกิด DNA methylation และโครงสร้างของโครโมโซมบริเวณ LCR ในระดับที่ต่างกันซึ่งสามารถป้องกันการจับของ host factors ได้และกรณีที่สองในแต่ละโคลนมีการแทรก

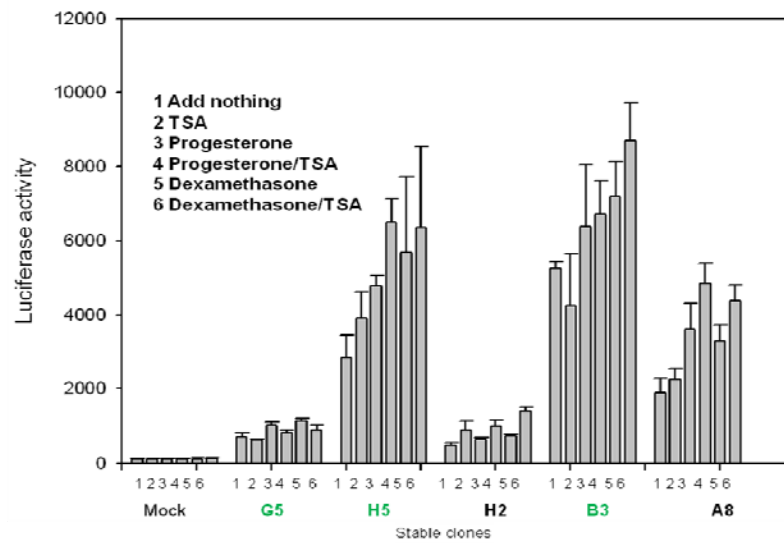
จีโนมของไวรัสในโครโมโซมของเซลล์ในตำแหน่งที่แตกต่างกันซึ่งเป็นผลมาจาก cis acting host sequence โดยเมื่อมีการเติมสาร TSA เซลล์ที่มีการแสดงออกของ luciferase ที่ลดลงอาจเนื่องมาจากการมีโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของจีน (negative regulatory protein) มาจับซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้ถูกชักนำให้มาที่บริเวณ โดยตำแหน่งของโครโมโซม ในกรณีเติมสาร progesterone หรือ dexamethazone อย่างเดียวแล้วมีการแสดงออกของ luciferase ที่เพิ่มขึ้นทั้ง 5 โคลนอาจเกิดจากตรงบริเวณ glucocorticoid responsive element เปิด (active)

4.11 การทดสอบผลของฮอร์โมน dexamethasone, progesterone และ TSA ต่อ promoter activity ของ transient cell lines

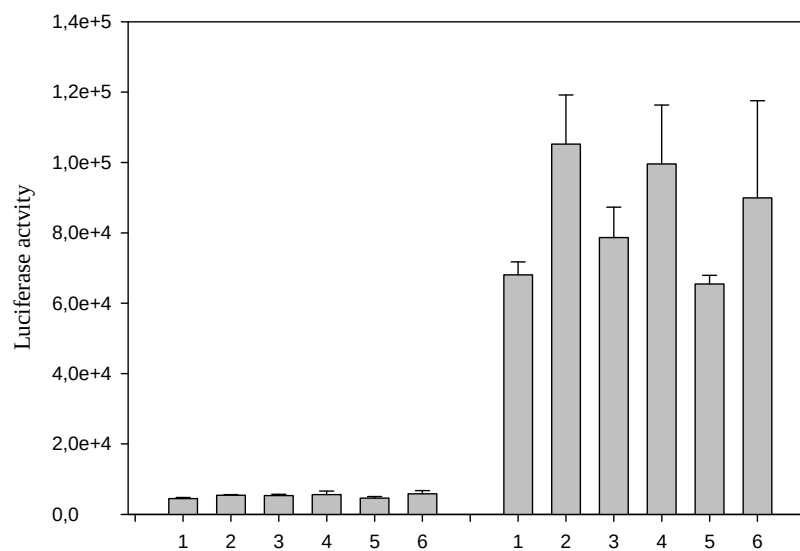
ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมสาร TSA อย่างเดียวและทั้ง TSA พร้อมทั้ง dexamethasone หรือ progesterone พบว่ามีพบมีการแสดงออกของ luciferase สูงขึ้นกว่า transient cell line ที่ไม่ได้เติมสารอะไรเลยและที่น่าสนใจคือเมื่อเติมสาร dexamethasone และ progesterone พบมีการแสดงออกของ luciferase ในระดับเท่ากับหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ transient cell line ที่ไม่ได้เติมสารอะไรเลย (รูปที่ 9) จากการทดลองจะพบว่าปริมาณของ luciferase ที่แสดงออกมาจาก episomal plasmid จะอยู่ในระดับสูงกว่า plasmid ที่มีการแทรกจีโนมสู่โฮสต์โครโมโซม

4.12 การทดสอบผลของโปรตีน E2 ต่อ HPV16 promoter ของ transient transfection

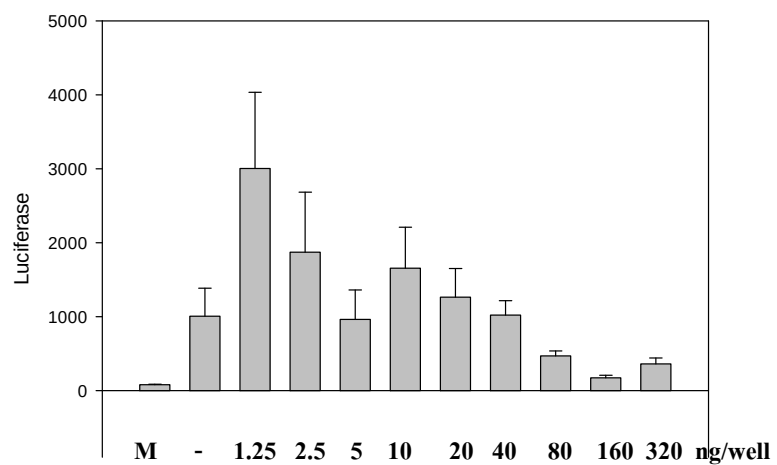
วัตถุประสงค์ของการคัดเลือกโปรตีน E2 มาใช้ในการทดสอบเพราะเมื่อไวรัสเมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์ปากมดลูก การแสดงออกของ viral oncogenes ของไวรัสจะถูกควบคุมให้อยู่ในระดับต่ำๆโดยโปรตีน E2 ที่ถูกสร้างโดยไวรัสเองโดยตรงบริเวณ HPV16 LCR จะมี E2 binding site 4 ตำแหน่งโดยแยกเป็น distal E2BS (E2BS1) และ proximal E2BS (E2BS2, 3 และ 4) ที่อยู่ติดกับ viral promoter โดย E2BS2 จะมีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเมื่อโปรตีน E2 มาจับตรง proximal E2BS (E2BS3 และ 4) จะยับยั้ง viral promoter และลดการแสดงออกของ viral oncogenes (โปรตีน E6 และ E7) ในทางตรงกันข้ามเมื่อโปรตีน E2 มาจับตรง distal E2BS (E2BS 1) จะกระตุ้น viral promoter ได้ ผลของโปรตีน E2 ต่อ HPV16 promoter ของ transient transfection ที่ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ng/well ผลการทดลองดังรูปที่ 10 จะพบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีน E2 ที่ 1.25 ng จะสามารถกระตุ้น HPV16 promoter และมีการแสดงออกของ luciferase ได้สูงและเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้นมีผลให้การแสดงออกของ luciferase จะลดลงและจะลดต่ำกว่าในหลุมพลาสมิด pGLuc containing HPV16 LCR ที่ไม่ได้เติมโปรตีน E2 ที่ความเข้มข้น 80 ng ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าโปรตีน E2 มีความสามารถในการกระตุ้น HPV16 promoter ในความเข้มข้นต่ำและสามารถยับยั้ง HPV16 promoter ได้ในความเข้มข้นมีสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาซึ่งเป็นกลไกของไวรัสเมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์ปากมดลูกไวรัสจะมีการควบคุมการแสดงออกของ viral oncogenes ให้อยู่ในระดับต่ำๆโดยโปรตีน E2 ซึ่งกลไกการควบคุมโดยโปรตีน E2 นี้จะถูกยับยั้งไปเมื่อมีการแทรกจีโนมของไวรัสเข้าสู่จีโนมของโฮสต์หรืออาจเกิดจาก epigenetic modification เช่น CpG methylation ตรงบริเวณ E2BS



รูปที่ 8 ผลของ dexamethasone, progesterone และ trichostatin A (TSA) ต่อ HPV16 promoter activity จากการทดลองแบบ stable transfection



รูปที่ 9 ผลของ dexamethasone, progesterone และ trichostatin A (TSA) ต่อ HPV16 promoter activity จากการทดลองแบบ transient transfection



รูปที่ 10 ผลของโปรตีน E2 ต่อ HPV16 promoter activity ในการทดลองแบบ transient transfection

5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

1. ความชุกของ HPV16, 18 และ 58 ในกลุ่มผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลการศึกษาการติดเชื้อ HPV ในผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบการติดเชื้อ HPV ประมาณ 19 ชนิด โดยมีแบบแผนการติดเชื้อเป็นทั้ง single infection และ multiple infection ตรวจความชุกของการติดเชื้อ HPV พบว่ามีการติดเชื้อ HPV16 มากที่สุดโดยมีอัตราเพิ่มขึ้นตามความรุนแรงโดยเฉพาะในกลุ่ม CIN II-III และ SCC ที่พบได้มากกว่าร้อยละ 50 ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่ผ่านมาโดยพบร้อยละ 43-75 ตามด้วย HPV18 [77, 82, 87-90] และในการทดลองครั้งนี้มีการใช้เทคนิคการสกัด DNA จากชิ้นเนื้อที่จำแนกเอาทั้ง DNA และ RNA โดยใช้ commercial kit เพื่อนำเอาเฉพาะ DNA มาตรวจหา HPV DNA โดย PCR และใช้ไพรเมอร์ GP5+/6+ ชนิดเดียวในการตรวจหาเชื้อ HPV ดังนั้นในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบการติดเชื้อ HPV ร้อยละ 81.1 จึงอาจได้ค่าที่ต่ำกว่าการทดลองที่ผ่านมาเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามี ความชุกของการติดเชื้อ HPV ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบได้ร้อยละ 86.7 ถึง 100 จากการตรวจในเซลล์ขูดปากมดลูก(exfoliated cells) และจาก formalin-fixed paraffin-embedded tissue [77, 88, 91, 92] นอกจากนี้ ชนิดของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาอาจจะมีผลการตรวจแตกต่างกันได้

ความชุกของการติดเชื้อและการกระจายของ high risk (HR) HPV genotypes ที่พบได้ในการศึกษานี้ พบว่า 5 ชนิด ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ HPV16, 18, 58, 45 และ 33 ซึ่งเป็นแบบแผนการกระจายที่พบได้ สอดคล้องในการศึกษาอื่นๆในส่วนอื่นๆของประเทศไทย [77, 82, 87-90, 93] และในแถบเอเชีย [70, 79, 94-96] ลักษณะดังกล่าวนี้จะมีความสำคัญในการพัฒนาวัคซีนที่จะนำมาใช้ในแถบเอเชียต่อไป

อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในกลุ่มการศึกษานี้คือ 52.3 ปีและในกลุ่ม no epithelial lesion, CIN I และ CIN II-III คือ 41, 39.3 และ 42.3 ปี ตามลำดับ ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าการพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกใช้เวลามากกว่า 10 ปี อายุเฉลี่ยของกลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อ HPV16 คือ 52.3 ปี HPV18 คือ 53 ปี และ HPV58 คือ 55.7 ปี การศึกษาที่ผ่านมาได้ศึกษาค่า odd ratio (OR) สำหรับการติดเชื้อ HPV ต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูกคือ 12.3-434 สำหรับ HPV16 3.2-248 สำหรับ HPV18 และ 66-114 สำหรับ HPV58 [3, 77, 87]

2. การเกิดจีโนมของเชื้อ HPV แทรกเข้าสู่โครโมโซมของคนเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ผิดปกติแล้ว

จากการทดลองที่พบว่าการติดเชื้อ HPV ชนิดต่างๆ ในมะเร็งปากมดลูกจะมีช่วงอายุเฉลี่ยที่แตกต่างกัน และมีค่า OR ที่แตกต่างกันเราจึงตั้งสมมติฐานว่าความสามารถของเชื้อ HPV แต่ละชนิดในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถของโปรตีน E6 และ E7 ทางผู้วิจัยจึงได้ตรวจภาวะการแทรกจีโนมของไวรัสเข้าสู่โครโมโซมของคน (integration form) ซึ่งสามารถแสดงถึงความสามารถของโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อแต่ละชนิดในการก่อให้เกิดโครโมโซมเกิดความไม่เสถียร (chromosome instability)

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจ HPV integration มีดังนี้คือ real time PCR[21], southern blot hybridization[15], in situ hybridization[97], E1/E2 PCR[13, 18], restriction enzyme cleavage, self-ligation, and inverse polymerase chain reaction reverse ligation (rli-PCR)[39], detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR)[40], restriction site PCR, amplification of viral oncogene transcripts (APOT)[20] และ random PCR [38, 41]

การศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธี APOT ในการตรวจ HPV physical status เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าวิธี APOT นี้ให้ค่าการตรวจพบ HPV integration ที่ใกล้เคียงกัน [20, 98, 99]เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆที่มีอัตราความถี่ในการตรวจพบที่หลากหลายในกลุ่มประชากรที่มีความผิดปกติของปากมดลูกในระดับเดียวกันเช่นวิธี real time PCR carcinoma [21, 44, 100-117]

การศึกษาที่ผ่านมาได้พัฒนาวิธี APOT เพื่อตรวจ HPV16, 18, 31, 33 และ 45 [98] ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาการตรวจเชื้อ HPV58 เพิ่มเติมเนื่องจากเจอ HPV58 เป็นลำดับที่สามในการศึกษาและพบในความชุกที่สูงในภูมิภาคเอเชีย ในการพัฒนาวิธีการตรวจ physical status ของ HPV58 พบว่าในกลุ่ม episomal จะมีขนาดของ PCR product >2,000 bp, 1,040 bp และ 714 bp ขณะที่กลุ่ม integrate จะมีแบบแผนเปลี่ยนไปและตรวจยืนยันผลได้โดยวิธี Southern blot hybridization และยังพบว่าในกลุ่ม integration จะไม่พบการแสดงออกของ E2ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจ physical status ของ HPV58 ในตัวอย่าง

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ HPV18 และ 45 มีการเกิด integration ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่ความชุกร้อยละ 100 และพบเพียงร้อยละ 40 และ 25 สำหรับ HPV16 และ 58 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองโดย Vinokurova S และคณะ ในปี 2008 [98] สำหรับการ HPV58 integration มีการตรวจในเอเชียจากสามกลุ่มวิจัยโดยวิธี real time PCR และ conventional PCR ซึ่งพบ HPV58 integration ร้อยละ 12 ถึง 93.3 [112, 118, 119] ซึ่งเมื่อมีการใช้เทคนิคที่เชื่อถือได้คือ APOT ในการศึกษาพบ HPV58 integration เพียงร้อยละ 25 ความแตกต่างของความชุกของการเกิด integration ที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงแบบแผนในการก่อโรคของเชื้อ HPV แต่ละชนิดที่แตกต่างกันในกลุ่ม high risk HPV

การตรวจหา HR HPV integration พบว่ามีการเกิด integration เฉพาะในกลุ่ม CIN II-III และมะเร็งปากมดลูกแต่ไม่พบในกลุ่ม CIN I และ no CIN ซึ่งบ่งชี้ว่าการเกิด HPV integration เข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์เป็นกลไกที่เกิดขึ้นหลังจากที่โครโมโซมมีความผิดปกติ ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อ HPV ในกลุ่ม high risk ที่เข้าสู่เซลล์และอยู่ใน episomal form โดยอาจจะติดเชื้ออยู่ในรูปแบบ persistent infection และมีการแสดงออกของ E6/E7 mRNA มากขึ้นซึ่งกลไกที่ชักนำให้ episomal HPV genome มีการแสดงออกของ E6/E7 mRNA เพิ่มขึ้นอาจมีได้จากหลายสาเหตุ เกี่ยวกับ viral factors เช่น เนื่องจากการเกิด methylation ตรง E2 binding site บนบริเวณ HPV LCR เกิดจากการมี nucleic acid variation บน HPV LCR เช่น E2BS [120] และตำแหน่ง YY binding site [121] มีผลให้ไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของ oncogenes ได้ และอาจเนื่องจากการมี amino acid variation ใน E2 gene [122]

ผลการศึกษานี้จะแตกต่างจากการศึกษาที่พบในแถบเอเชีย ซึ่งมีรายงานการเกิด integration พบได้ร้อยละ 2-10 ในกลุ่ม LSIL/CINI [105, 113] จึงเป็นการตั้ง hypothesis ของการศึกษานี้เพื่อตรวจหาการเกิด

integration ที่อาจจะพบได้ในระยะเริ่มแรก อย่างไรก็ตามภาวะที่ตรวจพบ integration ใน LSIL/CINI มักมีรายงานจากการศึกษาโดยใช้วิธีการตรวจด้วย real time PCR ขณะที่การตรวจโดยใช้ APOT ยังไม่พบมีรายงานการเกิด integration ใน LSIL/CINI ซึ่งการตรวจหา physical status ในปัจจุบันยังเชื่อว่า APOT เป็น gold standard อย่างไรก็ตาม อัตราการเกิด integration ของ HPV ชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน [98]

ความชุกของ integrate derived transcripts และ chromosomal site of integration ในตัวอย่างที่มี integration การศึกษานี้พบเกิดขึ้นได้ในหลากหลายโครโมโซม สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา [42, 123] เนื่องจากการพบ integration นี้เกิดขึ้นในระยะที่เซลล์ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งแล้วจากการกระตุ้นโดยโปรตีน E6 และ E7 ของไวรัสทำให้เกิดความไม่เสถียรของโครโมโซม (chromosomal instability)

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} กับภาวะการเกิด integration เพื่อยืนยันผลที่ว่า HPV integration เป็นเหตุการณ์ที่เกิดในเซลล์ที่ผิดปกติแล้วโดยโปรตีน p16^{ink4a} จะมีการแสดงออกในเซลล์ที่มีความผิดปกติไปแล้วจากผลการทดลองพบว่าในกลุ่ม CIN I ที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} พบเชื้อ HPV ในรูปแบบ episomal ร้อยละ 100 และพบ HPV integration ร้อยละ 5 และ 50 ในกลุ่ม CINII-III และมะเร็งปากมดลูกที่การแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาได้ใช้เทคนิค in situ hybridization (ISH) เปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} พบว่าในกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในระดับที่สูงแบบ diffuse form จะพบผลของ ISH เป็นจุด (dot หรือ punctate) ในนิวเคลียสซึ่งได้สรุปว่าการเกิดแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} สัมพันธ์กับการเกิด HPV integration [124-126] แต่อย่างไรก็ตามถ้าหากจำนวนไวรัสในเซลล์มีน้อยก็อาจให้ผลเป็นจุดได้โดยวิธี in situ hybridization

การศึกษาของ Duensing และคณะ[22] พบว่าโปรตีน E6 และ E7 ที่แสดงออกมาจาก episomal HPV สามารถกระตุ้นให้โครโมโซมเกิดความไม่เสถียรได้และ Hopman และคณะ[23] รายงานว่า episomal HPV ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ทำให้เกิดโครโมโซมผิดปกติแบบ tetrasomies และ single tetrasomy ดังนั้นเราสามารถสรุปได้ว่ามีกลไกทางเลือกอื่นๆ นอกเหนือจากการแทรกจีโนมของไวรัสเข้าสู่โครโมโซมของคนที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน E2 ของไวรัสและชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ได้

3. ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบริเวณ E2BS แต่พบการเกิด DNA methylation บริเวณ E2BS ของ episomal HPV16 ในตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกและเซลล์ที่ผิดปกติแล้ว

การศึกษานี้และการศึกษาที่ผ่านมาไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบน E2BS ของเชื้อ HPV16 แต่การศึกษาที่ผ่านมาพบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่สูงตรงตำแหน่ง 7450(T>A) ที่ใกล้กับ distal E2BS1 แต่ยังไม่มีการศึกษาทางชีวภาพในเซลล์เพาะเลี้ยง [120, 127, 128] สำหรับการตรวจ DNA methylation ได้กำหนดว่าหากมีการพบ methylation ใน 1 โคลนให้ถือว่าตัวอย่างนั้นให้ผลบวก methylation ผลการตรวจของตัวอย่าง integration พบลักษณะการเกิด methylation ตรง E2BS ได้ 2 แบบคือแบบแรกไม่พบว่ามี DNA methylation ซึ่งพบในกลุ่มที่มีจำนวนไวรัส 1-2 copies ต่อ 1 เซลล์และแบบที่สองมี DNA methylation ในระดับที่สูงซึ่งพบในกลุ่มที่มีไวรัสจีโนมในระดับ 4-20 จีโนมต่อเซลล์ ซึ่ง

สอดคล้องกับลักษณะการเกิด DNA methylation ใน SiHa (มี integrated HPV16 1-2 copies ต่อ 1 เซลล์) และ Caski (มี integrated HPV16 600 copies ต่อ 1 เซลล์) [53, 57, 58] การศึกษาพบว่าในเซลล์ CaSki มีการแสดงออกของจีน E6 และ E7 มาจากเพียง 1 copy [129, 130] เช่นเดียวกับที่พบใน SiHa cell และได้มีการศึกษาอัตราส่วนระหว่าง E6/E7 transcript ต่อปริมาณของไวรัส พบว่ามีค่า 0.11 จากการตรวจในเซลล์ CaSki cell และ 12.23 จากการตรวจในเซลล์ SiHa [131] ผลที่ได้บ่งชี้ว่าการเกิด methylation ในกลุ่ม integration form จะควบคุมการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ไม่ให้แสดงออกมากเกินไปเพื่อให้เซลล์สามารถอยู่ต่อไปได้โดยไม่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันและในตัวอย่าง episomal 12 ตัวอย่าง พบการเกิด DNA methylation ในตัวอย่าง 12 ตัวอย่างที่ตำแหน่งต่างๆ 10 ตำแหน่งคือ 7426, 7432, 7453, 7459, 7860, 31, 37, 43, 52 และ 58 คิดเป็นร้อยละดังนี้ 50, 16.7, 33.3, 25, 16.7, 16.7, 33.3, 25, 58.3 และ 33.3 โดยพบว่าที่ตำแหน่ง E2BS3 และ 4 มีการเกิด DNA methylation ในระดับที่สูง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูในแต่ละตัวอย่างจะพบการเกิด DNA methylation ที่หลากหลายแตกต่างกันไปในแต่ละตำแหน่งและไม่ได้พบเป็นร้อยละร้อยซึ่งบ่งชี้ว่าการเกิด DNA methylation ในตำแหน่ง E2BS 3 และ 4 ใน episomal HPV เพียงร้อยละ 10 จากจำนวนไวรัสทั้งหมดในเซลล์ อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ถึงแม้จะมีการแสดงออกของโปรตีน E2 แต่ E2 ไม่สามารถจับตรง E2BS 3 และ 4 ได้ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ E6 และ E7 oncogenes [56, 132, 133] และมีการศึกษาที่พบว่า CpG methylation ไม่สามารถยับยั้งการจับของโปรตีน SP1 ได้ [134] ทำให้โปรตีน SP-1สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ได้

Kalantari และคณะ และ Ding และคณะพบว่าการเกิด DNA methylation บน HPV16 LCR ที่สูงในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ปกติ (progressive hypermethylation) โดยใช้เทคนิค bisulfite genomic sequencing [57, 135] การศึกษาของ Bhattacharjee และ Sengupta พบการเกิด methylation ตรง E2BS ที่ใกล้กับ p97 promoter โดยใช้เทคนิค methylation sensitive HpaII/MspI restriction digestion ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปกติ [136] อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบการเกิด methylation น้อยในกลุ่มมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ปกติ (progressive hypomethylation) [58, 137] ซึ่งความแตกต่างอาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษามีการปนเปื้อนของทั้งเซลล์ปกติและผิดปกติ หรือการมี physical status ของเชื้อ HPV16 ที่แตกต่างกันซึ่งในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า physical status ของเชื้อ HPV16 มีผลต่อระดับการเกิด methylation บน HPV16 LCR

4. โครโมโซมและการเกิด DNA methylation ตรง HPV16 LCR ควบคุม promoter activity ของไวรัสได้

การศึกษาที่ผ่านมา [42, 123] และการศึกษาในปัจจุบันนี้ พบว่าเชื้อไวรัสมีการแทรกจีโนมเข้าสู่โครโมโซมในเซลล์ที่ตำแหน่งแตกต่างกัน และมีการแสดงออกของจีน E6 และ E7 จากตำแหน่งโครโมโซมต่างๆ ที่เพียงพอในการทำให้เซลล์คงสภาพความผิดปกติได้ บน HPV LCR สามารถถูกกระตุ้นได้โดยโปรตีนหลากหลายชนิดเช่น โปรตีน E2 ของไวรัส และจากโปรตีนในเซลล์เช่น AP-1, cEBP, glucocorticoid receptor (GRE), progesterone receptor (PRE), NF1, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2, Sp1 and

YY1 [51, 52] บน HPV LCR มี E2BSs จำนวน 4 ตำแหน่งและสามารถแบ่งได้เป็น proximal และ distal E2BSs โดยเมื่อโปรตีน E2 จับตรง distal E2BS สามารถกระตุ้น promoter ได้และถ้าโปรตีน E2 จับตรง proximal E2BS สามารถยับยั้ง promoter ได้ โดยไปยับยั้งการจับของโปรตีนของโฮสต์เช่น SP-1 [51, 138] และยังพบว่าฮอร์โมน dexamethasone และ progesterone สามารถกระตุ้น HPV promoter ได้จากการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง [69, 139] สำหรับโปรตีน CDP, YY1 และ histone deacetylases (HDACs) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ E6 และ E7 ได้ [140-142]

มีการศึกษาที่กล่าวไว้ว่าบริเวณที่ไวรัสมีการแทรกจีโนมเข้าสู่โครโมโซมของคนมีผลต่อการแสดงออกของจีน E6 และ E7 [26] และยังพบว่าโครงสร้างของโครโมโซมมีผลต่อการแสดงออกของจีน E6 และ E7 เช่นกัน [140] แต่เมื่อเติมโปรตีน AP-1 และ SP-1 ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซมและกระตุ้น promoter ได้ แต่โปรตีน E2 ไม่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซมได้

การศึกษานี้ได้ตั้งสมมติฐานว่าการเกิด DNA methylation และโครงสร้างของโครโมโซมมีผลต่อ promoter ของจีน E6 และ E7 จากการศึกษาพบว่าเมื่อเติมสาร TSA พร้อมด้วย dexamethasone หรือ progesterone สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ luciferase ได้มากกว่าเซลล์ที่เติมเพียง TSA หรือเซลล์ที่ไม่ได้เติมอะไรเลยทั้งในเซลล์ที่มีเชื้อ HPV16 แบบ episomal และ integration (รูปที่ 8 และ 9) การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Schmidt และคณะ ที่พบว่า TSA สามารถกระตุ้น promoter ของไวรัสได้ [143] ยังมีการพบว่าสาร progesterone ยับยั้งหรือลด promoter activity ของเชื้อ HPV16 ที่มีลักษณะแบบ episomal แต่สาร dexamethasone ไม่มีผลต่อ promoter activity และในกรณี HPV16 ที่มีลักษณะแบบ integration พบว่าสาร dexamethasone ปลอดภัย promoter activity แต่ progesterone สามารถกระตุ้น promoter activity เพียงเล็กน้อย ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่าโครงสร้างของโครมาตินภายใน HPV LCR อาจจะมีผลต่อการควบคุมหรือกระตุ้น promoter activity

การทดลองนี้ได้แสดงผลของโปรตีน E2 ต่อ promoter ของ HPV16 ที่มีลักษณะแบบ episomal และไม่มี methylation ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ (1.25-10 ng) สามารถกระตุ้นของ episomal HPV16 ได้ แต่ในความเข้มข้นของโปรตีน E2 ที่สูง (>40 ng) สามารถยับยั้ง promoter activity ได้ (รูปที่ 10) การศึกษานี้ยืนยันว่าโปรตีน E2 ของเชื้อไวรัสสามารถทำหน้าที่กระตุ้นหรือยับยั้ง promoter ของเชื้อ HPV16 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา [144]

การศึกษาของ Bechtold V และคณะแสดงให้เห็นว่าโปรตีน E2 สามารถยับยั้ง promoter activity ของ HPV16 ที่มีลักษณะแบบ integration [145] แต่โปรตีน E2 ไม่มีผลต่อ HPV16 promoter ที่มีลักษณะแบบ episomal ในเซลล์ W12 นอกจากนี้ Bechtold V และคณะ ยังได้สร้างเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV16 ที่มีลักษณะแบบ integration ทั้งหมด 7 โคลนและได้ทดสอบกับโปรตีน E2 และพบว่า 3 ใน 7 โคลนมีการแสดงออกของ luciferase ที่เพิ่มสูงขึ้น แต่อีก 4 โคลนพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือมีการแสดงออกของ luciferase เพียงเล็กน้อย จากการศึกษาสามารถกล่าวได้ว่า การแทรกจีโนมเข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์ไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวในการทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 เพิ่มมากขึ้น แต่ยังพบว่าการเกิด DNA methylation และโครงสร้างของโครโมโซมเป็นปัจจัยสำคัญต่อ promoter activity ของ HPV16

6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

ความชุกของ HR-HPV ที่พบได้บ่อย 5 อันดับแรกในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ HPV16, 18, 58, 45 และ 33 โดยที่ HPV16 จะพบได้บ่อยที่สุด (มากกว่าร้อยละ 50) มีสัดส่วนเพิ่มตามระดับความรุนแรงของ และการศึกษาไม่พบการ integration ใน no CIN และ CIN I แต่จะพบการ integration ใน CIN II และ SCC ที่ตำแหน่งไม่จำเพาะ

ผู้วิจัยได้ใช้การแสดงออกของโปรตีน p16^{ink4a} ในเนื้อเยื่อปากมดลูกปกติ และเนื้อเยื่อปากมดลูกที่มีความผิดปกติในระดับต่าง ๆ มาเป็นตัวบ่งชี้ว่า ในกรณีที่ไวรัสมีการแทรกจีโนมเข้าสู่โครโมโซมของคน เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่มีความผิดปกติแบบรุนแรง ซึ่งสรุปได้ว่าการตรวจหาโปรตีน p16^{ink4a} ในเซลล์ปากมดลูกสามารถช่วยวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกได้ และไวรัสมีการแทรกจีโนมเข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์เกิดขึ้นหลังจากโครโมโซมมีความไม่เสถียร (chromosomal instability) ทำให้ DNA มีการแตกหัก (double strand break) ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของ HPV protein คือ E6 และ E7 ออกมามากจาก HPV ที่มีลักษณะแบบ episomal ในช่วงแรกของการติดเชื้อ ซึ่งไปรบกวนการทำงานของโปรตีนของโฮสต์ เช่น p53 และ pRb ทำให้เซลล์มีความผิดปกติไปและการแสดงออกของโปรตีน p16 ที่มากขึ้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์ได้

ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic) และปัจจัยเหนือพันธุกรรม (epigenetic) เพื่อให้เข้าใจและทราบถึงปัจจัยอะไรที่ส่งผลต่อการแสดงออกของ viral oncogenes E6 และ E7 มากขึ้น การศึกษานี้พบว่าไม่มีการเกิดลำดับเบสที่เปลี่ยนไปตรงบริเวณ E2BS แต่พบว่ามีเกิด DNA methylation ในตำแหน่ง E2BS โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง E2BS3 และ E2BS 4 ซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะพบการเกิด DNA methylation ที่หลากหลายแตกต่างกันไปในแต่ละตำแหน่ง จากการศึกษาสรุปได้ว่า การเกิด DNA methylation ในตำแหน่ง E2BS3 และ E2BS4 อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการแสดงออกของ โปรตีน E6 และ E7 โดยไปยับยั้งการจับของโปรตีน E2 และสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติเซลล์ปากมดลูกได้

จากการศึกษาที่พบว่าเกิด DNA methylation ประกอบกับโครงสร้างของโครโมโซมที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 เราสามารถหาวิธีมาควบคุมการแสดงออก โดยไปยับยั้งกลไกการเกิด methylation และให้โครโมโซมเปิด เพื่อที่ตัวยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนก่อมะเร็งของไวรัสจะมาจับตรง HPV16 LCR และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 ได้ เช่นการใช้โปรตีน E2 มายับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7

บรรณานุกรม (Bibliography)

- [1] Evans MF, Cooper K. Human papillomavirus integration: detection by in situ hybridization and potential clinical application. *J Pathol.* 2004 Jan;202(1):1-4.
- [2] Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology.* 1994;37(3-4):143-9.
- [3] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine.* 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- [4] Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, 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.* 1999 Feb 26;274(9):5810-22.
- [5] Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):2160-7.
- [6] De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA, Wilbanks GD. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol.* 1993 Jun;49(3):303-10.
- [7] Wei Zhao FN, Wen Yong Chen, Tim M. Townes, Louise T. Chow, and Thomas R. Broker. Trichostatin A Up-Regulates Human Papillomavirus Type 11 Upstream Regulatory Region-E6 Promoter Activity in Undifferentiated Primary Human Keratinocytes. *J Virol.* 1999 june;73(6): 5026-33,.
- [8] Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Pr  tet JL, et al. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer.* 2007.
- [9] Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol.* 2007.
- [10] Ho CM, Cheng WF, Chu TY, Chen CA, Chuang MH, Chang SF, et al. Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Br J Cancer.* 2006 Nov 20;95(10):1384-9.
- [11] Peitsaro P, Johansson B, S. 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* 2002;40(3):886-91.
- [12] Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol.* 2007;20(2):256-66.
- [13] Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol.* 2003 Jul;56(7):532-6.
- [14] Kulmala SM, Syrj  nen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol.* 2006;59(5):513-7.
- [15] Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 1991 Feb;65(2):606-12.
- [16] Shirasawa H, Tomita Y, Kubota K, Kasai T, Sekiya S, Takamizawa H, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol.* 1986;67(20):2011-5.
- [17] Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic oncology.* 2004 Mar;92(3):873-80.
- [18] Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, et al. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol.* 2001 May;21(2):129-34.
- [19] Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, et al. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol.* 1997 Apr;65(1):121-9.
- [20] Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer research.* 1999 Dec 15;59(24):6132-6.
- [21] Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, et al. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *Journal of clinical microbiology.* 2002 Mar;40(3):863-7.
- [22] Duensing S, Duensing A, Flores ER, Do A, Lambert PF, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *Journal of virology.* 2001 Aug;75(16):7712-6.
- [23] Hopman AH, Smedts F, Dign  f W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol.* 2004 Jan;202(1):23-33.

- [24] Pett M, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA, et al. Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes Cancer Res. 2004;64:1359-68.
- [25] Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17(2):146-53.
- [26] von Knebel Doeberitz M, Bauknecht T, Bartsch D, zur Hausen H. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991 Feb 15;88(4):1411-5.
- [27] Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3059-63.
- [28] Jeon S, Lambert P F. Integration of Human Papillomavirus Type 16 DNA into the Human Genome Leads to Increased Stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for Cervical Carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:1654-8.
- [29] Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene.* 2003 Oct 16;22(46):7233-42.
- [30] Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene.* 2003 Feb 27;22(8):1225-37.
- [31] Wang L, Darling J, Zhang JS, Qian CP, Hartmann L, Conover C, et al. Frequent homozygous deletions in the FRA3B region in tumor cell lines still leave the FHIT exons intact. *Oncogene.* 1998 Feb 5;16(5):635-42.
- [32] Sheu BC, Chiou SH, Chang WC, Chow SN, Lin HH, Chen RJ, et al. Integration of high-risk human papillomavirus DNA correlates with HLA genotype aberration and reduced HLA class I molecule expression in human cervical carcinoma. *Clin Immunol.* 2005 Jun;115(3):295-301.
- [33] Wang YW, Chang HS, Lin CH, Yu WC. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(2):402-12.
- [34] Jeong Seo E, Jung Kim H, Jae Lee C, Tae Kang H, Seong Hwang E. The role of HPV oncoproteins and cellular factors in maintenance of hTERT expression in cervical carcinoma cells. *Gynecologic oncology.* 2004 Jul;94(1):40-7.
- [35] Dürst M, Croce C M, Gissmann L, Schwarz E, K H. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(41070-1074).
- [36] Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *Journal of virology.* 1991 Aug;65(8):4534-8.
- [37] Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, X S-G. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene.* 2006;25:5985-93.
- [38] Shera KA, Shera CA, McDougall JK. Small tumor virus genomes are integrated near nuclear matrix attachment regions in transformed cells. *Journal of virology.* 2001 Dec;75(24):12339-46.
- [39] Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 2001 Mar;10(1):46-54.
- [40] Luft F, Klaes R, Nees M, Durst M, Heilmann V, Melsheimer P, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *International journal of cancer.* 2001 Apr 1;92(1):9-17.
- [41] Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Apr 1;158(1):27-34.
- [42] Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene.* 2002 Jan 17;21(3):419-26.
- [43] Choo KB, Chen CM, Han CP, Cheng WT, Au LC. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. *Journal of medical virology.* 1996 May;49(1):15-22.
- [44] De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol.* 2007 Jan;38(1):7-13.
- [45] Manavi M, Hudelist G, Fink-Retter A, Gschwantler-Kaulich D, Pischinger K, Czerwenka K. Human papillomavirus DNA integration and messenger RNA transcription in cervical low- and high-risk squamous intraepithelial lesions in Austrian women. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Jun 22.
- [46] Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol.* 2007 Aug;212(4):356-67.
- [47] Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.

- [48] Anna-Barbara M. Human papilloma virus, papanicolaou smears, and the college female. *Pediatr Clin N Am*. 2005;52(1):163-77.
- [49] Schlecht N, Platt R, Negassa A, Duarte-Franco E, Rohan T, Ferenczy A, et al. Modeling the Time Dependence of the Association between Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Precursor Lesions. *Am J Epidemiol* 2003 158:878-86.
- [50] Yutaka U, Takayuki E, Takashi M, Keiichiro O, Tatsuo Y, Hiroyuki K, 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* 2003;83(10):1517-27.
- [51] Lewis H, Webster K, Sanchez-Perez AM, Gaston K. Cellular transcription factors regulate human papillomavirus type 16 gene expression by binding to a subset of the DNA sequences recognized by the viral E2 protein. *The Journal of general virology*. 1999 Aug;80 (Pt 8):2087-96.
- [52] Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *Journal of virology*. 1991 Nov;65(11):5933-43.
- [53] Rajeevan MS, Swan DC, Duncan K, Lee DR, Limor JR, Unger ER. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods*. 2006 Dec;138(1-2):170-6.
- [54] Rost F, Arab A, Klevenz B, zur Hausen H. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *The Journal of general virology*. 1993 May;74 (Pt 5):791-801.
- [55] Bhattacharjeea B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*. 2006;354 (2):280-5.
- [56] Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol*. 2003 Dec;77(23):12450-9.
- [57] Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *Journal of virology*. 2004 Dec;78(23):12762-72.
- [58] Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of virology*. 2003 Jun;77(11):6227-34.
- [59] Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H, Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology*. 2007 Apr 25;361(1):185-93.
- [60] de la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Contreras-Paredes A, Cantu D, Mohar A, Lizano M, 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*. 2007;4:18.
- [61] zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):690-8.
- [62] Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rost F. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene*. 1999 May 27;18(21):3187-98.
- [63] Hill CS, Treisman R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *Embo J*. 1995 Oct 16;14(20):5037-47.
- [64] Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol*. 1998 Oct;10(5):383-90.
- [65] Koromilas AE, Li S, Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 Jun-Sep;12(2-3):157-70.
- [66] Chen SL, Tsao YP, Yang CM, Lin YK, Huang CH, Kuo SW. Differential induction and regulation of c-jun, junB, junD and c-fos by human papillomavirus type 11 E5a oncoprotein. *The Journal of general virology*. 1995 Nov;76 (Pt 11):2653-9.
- [67] Chen SL, Lin YK, Li L, Tsao YP, Lo HY, Wang WB, et al. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol*. 1996;70(12):8558-63.
- [68] Crook T, Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L. Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformation of primary mouse cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Dec;85(23):8820-4.
- [69] Chen YH, Huang LH, Chen TM. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jul 25;224(3):651-9.

- [70] Chen CA, Liu CY, Chou HH, Chou CY, Ho CM, Twu NF, et al. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: A Taiwan Cooperative Oncologic Group Study. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Sep-Oct;16(5):1801-8.
- [71] de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453-9.
- [72] Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 May;14(5):1157-64.
- [73] Gonzalez-Losa Mdel R, Rosado-Lopez I, Valdez-Gonzalez N, Puerto-Solis M. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J Clin Virol*. 2004 Mar;29(3):202-5.
- [74] Clifford G, Smith J, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus type in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;88:63-73.
- [75] Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2095-100.
- [76] Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Sep 3;95(17):1336-43.
- [77] Sriamporn S, Snijders PJ, Pientong C, Pisani P, Ekalaksananan T, Meijer CJ, et al. Human papillomavirus and cervical cancer from a prospective study in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Jan-Feb;16(1):266-9.
- [78] Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. The Natural History of Type-specific Human Papillomavirus Infections in Female University Students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:485-90.
- [79] Inoue M, Sakaguchi J, Sasagawa T, Tango M. The evaluation of human papillomavirus DNA testing in primary screening for cervical lesions in a large Japanese population. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun;16(3):1007-13.
- [80] Pham TH, Nguyen TH, Herrero R, Vaccarella S, Smith JS, Nguyen Thuy TT, et al. Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer* 2003;104(2):213-20.
- [81] Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. *J Korean Med Sci*. 1999;14(6):593-9.
- [82] Thomas DB, Qin Q, Kuypers J, Kiviat N, Ashley RL, Koetsawang A, et al. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. II. Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *Am J Epidemiol*. 2001 Apr 15;153(8):732-9.
- [83] Chichareon S, Herrero R, Munoz N, Bosch F, Jacobs M, Deacon J, et al. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:50-7.
- [84] Bhattarakosol P, Poonnaniti A, Niruthisard S. Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai. *J Med Assoc*. 1996;79((Suppl. 1)):S56-64.
- [85] Sukvirach S, Pitakpraisan P, Kosiyatrakul T, Hankittipongpaisarn P. Detection of human papillomavirus DNA in normal and cervical carcinoma tissue of Thai females. *Thai Cancer J*. 1994;20:85-91.
- [86] Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingoes B, Thinkhamrop J, Yuenyao P, et al. Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. 2007;8(1):279-82.
- [87] Chichareon S, Herrero R, Munoz N, Bosch FX, Jacobs MV, Deacon J, et al. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jan 7;90(1):50-7.
- [88] Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingoes B, Kleeboon P, Charoensri N. Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand. *Int J Infect Dis*. 2009 Mar;13(2):212-9.
- [89] Siriaunkgul S, Suwiwat S, Settakorn J, Khunamornpong S, Tungsinmunkong K, Boonthum A, et al. HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand: adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. *Gynecologic oncology*. 2008 Mar;108(3):555-60.
- [90] Sukasem C, Pairon W, Saekang N, Pombubpha H, Srichunrasami C, Pongtippan A, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus genotype in women with high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer: Will a quadrivalent vaccine be necessary in Thailand? *Journal of medical virology*. 2011 Jan;83(1):119-26.

- [91] Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyingyoes B, Pengsa P, Kleeckaow P, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecologic oncology*. 2006 Oct;103(1):62-6.
- [92] Chansaenroj J, Lurchachaiwong W, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Niruthisard S, Trivijitsilp P, et al. Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(1):117-22.
- [93] Suthipintawong C, Siriaunkgul S, Tungsinmunkong K, Pientong C, Ekalaksananan T, Karalak A, et al. Human papilloma virus prevalence, genotype distribution, and pattern of infection in Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(4):853-6.
- [94] Chan PK, Li WH, Chan MY, Ma WL, Cheung JL, Cheng AF. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *Journal of medical virology*. 1999 Oct;59(2):232-8.
- [95] Lin H, Ma YY, Moh JS, Ou YC, Shen SY, ChangChien CC. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecologic oncology*. 2006 Apr;101(1):40-5.
- [96] Bhatla N, Lal N, Bao YP, Ng T, Qiao YL. A meta-analysis of human papillomavirus type-distribution in women from South Asia: implications for vaccination. *Vaccine*. 2008 Jun 2;26(23):2811-7.
- [97] Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee JO. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol*. 1991 Dec;44(12):990-6.
- [98] Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research*. 2008 Jan 1;68(1):307-13.
- [99] Nambaru L, Meenakumari B, Swaminathan R, Rajkumar T. Prognostic significance of HPV physical status and integration sites in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009 Jul-Sep;10(3):355-60.
- [100] Canadas MP, Videla S, Darwich L, Tarrats A, Pinol M, Garcia-Cuyas F, et al. Human papillomavirus HPV-16, 18, 52 and 58 integration in cervical cells of HIV-1-infected women. *J Clin Virol*. 2010 Jul;48(3):198-201.
- [101] Wanram S, Limpaboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Guiney DG, Lulitanond V, et al. The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Jul;201(1):79 e1-7.
- [102] Canadas MP, Darwich L, Sirera G, Cirigliano V, Bofill M, Clotet B, et al. New molecular method for the detection of human papillomavirus type 16 integration. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Oct 15.
- [103] Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, Hens N, et al. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Nov;18(11):2992-9.
- [104] Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Nov;46(11):3678-85.
- [105] Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):627-31.
- [106] Rousseau MN, Costes V, Konate I, Nagot N, Foulongne V, Ouedraogo A, et al. Viral load and genomic integration of HPV 16 in cervical samples from HIV-1-infected and uninfected women in Burkina Faso. *Journal of medical virology*. 2007 Jun;79(6):766-70.
- [107] Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol*. 2007 Feb;20(2):256-66.
- [108] Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecologic oncology*. 2007 Sep;106(3):549-57.
- [109] Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Pretet JL, et al. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *International journal of cancer*. 2007 Nov 15;121(10):2198-204.
- [110] Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, et al. Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer*. 2007 Jul 2;97(1):85-91.
- [111] Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllenstein UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006 May;59(5):513-7.
- [112] Ho CM, Chien TY, Huang SH, Lee BH, Chang SF. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2006 Jul;102(1):54-60.
- [113] Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis*. 2006 Dec 15;194(12):1706-12.
- [114] Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of clinical microbiology*. 2006 May;44(5):1755-62.

- [115] Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*. 2005 Jun 20;92(12):2195-200.
- [116] Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, Ozaki K, Yoshizaki T, Kanao H, 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*. 2003 Oct;83(10):1517-27.
- [117] Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Mar;40(3):886-91.
- [118] Wu EQ, Zha X, Yu XH, Zhang GN, Wu YG, Fan Y, et al. Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer. *The Journal of general virology*. 2009 May;90(Pt 5):1229-37.
- [119] Chan PK, Cheung JL, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu SS, et al. Profile of viral load, integration, and E2 gene disruption of HPV58 in normal cervix and cervical neoplasia. *J Infect Dis*. 2007 Sep 15;196(6):868-75.
- [120] Bhattacharjee B, Sengupta S. HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR: some significant associations with cervical cancer in Indian women. *Gynecologic oncology*. 2006 Feb;100(2):372-8.
- [121] Kim YB, Song YS, Jeon YT, Park JS, Um SJ, Kim JW, et al. Sequence variation and the transcriptional activity of the upstream regulatory region in human papillomavirus 16 E7 variants in cervical cancer of Korean women. *Oncology reports*. 2005 Aug;14(2):459-64.
- [122] Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *International journal of cancer*. 1999 Nov 12;83(4):449-55.
- [123] Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer research*. 2004 Jun 1;64(11):3878-84.
- [124] Samama B, Lipsker D, Boehm N. p16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. *Hum Pathol*. 2006 May;37(5):513-9.
- [125] Samama B, Schaeffer C, Boehm N. P16 expression in relation to human papillomavirus in liquid-based cervical smears. *Gynecologic oncology*. 2008 May;109(2):285-90.
- [126] Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. 2005 May;29(5):674-9.
- [127] Bhattacharjee B, Mandal NR, Roy S, Sengupta S. Characterization of sequence variations within HPV16 isolates among Indian women: prediction of causal role of rare non-synonymous variations within intact isolates in cervical cancer pathogenesis. *Virology*. 2008 Jul 20;377(1):143-50.
- [128] Mazumder Indra D, Singh RK, Mitra S, Dutta S, Chakraborty C, Basu PS, et al. Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression. *Gynecologic oncology*. 2011 Dec;123(3):597-604.
- [129] Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD, et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *Journal of virology*. 2004 Oct;78(20):11172-86.
- [130] Van Tine BA, Knops J, Broker TR, Chow LT, Moen PT, Jr. In situ analysis of the transcriptional activity of integrated viral DNA using tyramide-FISH. *Dev Biol (Basel)*. 2001;106:381-5.
- [131] Rajeevan MS, Swan DC, Nisenbaum R, Lee DR, Vernon SD, Ruffin MT, et al. Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV-16-positive women. *International journal of cancer*. 2005 May 20;115(1):114-20.
- [132] Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *Journal of virology*. 1996 Oct;70(10):7233-5.
- [133] Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Grana O, Ballestar E, Ropero S, et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome research*. 2009 Mar;19(3):438-51.
- [134] Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Apr;85(7):2066-70.
- [135] Ding DC, Chiang MH, Lai HC, Hsiung CA, Hsieh CY, Chu TY. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 Dec;147(2):215-20.
- [136] Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*. 2006 Oct 25;354(2):280-5.
- [137] Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Chen M, Badiga S, Edberg JC, et al. A higher degree of methylation of the HPV 16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*. 2011 Mar 1;117(5):957-63.

- [138] Doeberitz MK, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Archives of medical research*. 2009 Aug;40(6):435-42.
- [139] Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *Journal of virology*. 1989 Aug;63(8):3261-9.
- [140] Stunkel W, Bernard HU. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *Journal of virology*. 1999 Mar;73(3):1918-30.
- [141] O'Connor MJ, Stunkel W, Koh CH, Zimmermann H, Bernard HU. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *Journal of virology*. 2000 Jan;74(1):401-10.
- [142] Ai W, Toussaint E, Roman A. CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *Journal of virology*. 1999 May;73(5):4220-9.
- [143] Schmidt MT, Olejnik AK, Gozdzicka-Jozefiak A. The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome. *Acta biochimica Polonica*. 2005;52(4):823-32.
- [144] Fujii T, Brandsma JL, Peng X, Srimatkandada S, Li L, Canaan A, et al. High and low levels of cottontail rabbit papillomavirus E2 protein generate opposite effects on gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jan 12;276(2):867-74.
- [145] Bechtold V, Beard P, Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *Journal of virology*. 2003 Feb;77(3):2021-8.

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. การตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1.1 submit manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร “Oncogene”

Arkorn Chaiwongkot, Svetlana Vinokurova, Chamsai Pientong, Tipaya Ekalaksananan, Bunkerd Kongyingyoes, Pilaiwan Kleebskaow, Bandit Chumworathayee, Natcha Patarapadungkit, Miriam Reuschenbach, Magnus von Knebel Doeberitz. **Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in pre-invasive and invasive cervical lesions.**

1.2 submit manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร “Journal Virology Methods”

Arkorn Chaiwongkot, Chamsai Pientong, Tipaya Ekalaksananan, Svetlana Vinokurova, Bunkerd Kongyingyoes, Bandit Chumworathayee, Natcha Patarapadungkit, Sumalee Siriaunkgul, Magnus von Knebel Doeberitz. **Detection of human papillomavirus (HPV) 58 physical status by amplification of papillomavirus oncogene transcripts (APOT) assay.**

2. นำเสนอผลงานรูปแบบ oral presentation ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

2.1 Chaiwongkot A, Vinokourova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebskaow P, Chumworathayee B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M. **Methylation pattern of E2BS in episomal and integrated HPV16 genomes.**

Oral presentation in the 27th International Papillomavirus Conference and Workshops.

on September 17-22, 2011 in Berlin, Germany

2.2 Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebskaow P, Chumworathayee B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M. **The role of chromosomal integration to induce the transforming type of HPV gene expression.**

Oral presentation in Eurogin 2011

on May 8-11, 2011 at Lisbon, Portugal

3. นำเสนอผลงานรูปแบบ poster presentation ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

- 3.1 Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkao P, Chumworathayee B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. **The role of chromosomal integration to induce the transforming type of HPV gene expression in cervical preneoplastic lesions.**

Poster presentation in the 26th International Papillomavirus Conference and Workshops.

On July 3-8, 2010 at Palais des Congress de Montreal, Montréal, Canada.

- 3.2 Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkao P, Chumworathayee B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, Vinokourova S, von Knebel Doeberitz M. **High risk HPV physical status and P16^{INK4A} expression in cervical intraepithelial lesion from Thai women.**

Oral presentation in Eurogin 2010

on February 17-20, 2010 at Grimaldi Forum, Monte-Carlo, Monaco.