Thesis Title	Genotyping and E6/E7 mRNA Expression of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer Cells
Author	Mr. Chatsri Kuansuwan
M.S.	Medical Technology

Examining Committee

Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai	CHAIRMAN
Assoc. Prof. Dr. Jatupol Srisomboon	MEMBER
Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi	MEMBER
Asst. Prof. Dr. Suchart Punjaisee	MEMBER

ABSTRACT

Cervical carcinoma is the most common cancer of women in developing countries. One of the agents that plays a major role in cancer genesis is human papillomavirus (HPV) infection. The expression of the early genes, E6 and E7 of the HPV, was necessary for transformation or immortalization activity. The study of the E6 and E7 gene expression may have some prognostic value in cancer development. In this study, 214 cervical specimens were collected from women who attended the outpatient gynecological clinic of Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. By using the polymerase chain reaction (PCR) based restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, the HPV L1 sequence was amplified and genotyped by using restriction endonuclease digestion; *Rsa* I, *Dde* I, *Hae* III, and *Hinf* I. Sixteen of 104 (15.38%) preinvasive and 35 of 48 (72.92%) invasive cervical cancer samples contained HPV sequences. Eight HPV genotypes were identified among 47

positive samples. The HPV16 genotype was found most frequently (41.18%) and followed by HPV-18 (13.73%), -35 (13.73%), -52 (9.8%), -6 (7.84%), -11 (1.96%), -51 (1.96%) and -59 (1.96%). HPV-16 was found to have a high prevalence in squamous cell carcinoma (SCC). The detection of HPV-16 and HPV-18 E6 and E7 gene expressions was performed by using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using fluorescent-labeled primer. The fragment sizes and intensity of the amplified products were analyzed in a relative proportion by using an automatic genetic analyzer (ABI 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer USA). Eighteen out of 21 HPV-16 containing samples were found to be a transcriptionally active early gene. At least 2 subsets of E6/E7 transcripts were detected, E6*I and E6*II. In most samples, the E6*I, which putatively encoded the E7 protein, was synthesized at a relatively higher amount than the E6*II that encoded the E6 protein. However, the relative proportion of E6*I and E6*II transcripts varied independently with tumor stages. Among HPV-18 containing samples, 4 out of 7 were actively expressed and only an E6*I spliced subset was detected. The different expression pattern of the E6/E7 genes observed from these two high-risk HPV types might be partly due to the differences in splicing signals. Although the relationship between the relative proportion of each E6/E7 gene transcript and tumor stage was not observed, this study confirmed that the E6 and E7 genes were transcriptionally active in those tumor stages. The application of the HPV E6/E7 gene expression assay in the prognosis of tumor development is too early at present and it should wait until a prospective long-term follow-up study with a larger proportion of cervical samples obtained.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การจำแนกทัยป์ และการแสดงออกของ E6/E7 mRNA ของเชื้อ Human Papillomaviruses ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ชื่อผู้เขียน นายชัชศรี เขื่อนสุวรรณ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.ปราณี ลี้ชนะชัย	ประธานกรรมการ
รศ.นพ. จตุพล ศรีสมบูรณ์	กรรมการ
ผศ.ดร.วาสนา ศิริรังษี	กรรมการ
ผศ.ดร. สุชาติ ปันจัยสีห์	กรรมการ

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มสตรีของประเทศกำลังพัฒนา ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็งนี้คือการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) โดยที่การแสดงออกของยีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV เป็นสิ่งจำเป็นที่ทำให้เกิดการกลายรูป และการมีชีวิตยืนยาวของเซลล์ได้ การศึกษาถึงการแสดงออกของยีนจึงน่าจะเป็นสิ่งที่ช่วยในการพยากรณ์การพัฒนาของมะเร็งได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในสิ่งส่งตรวจจากสตรีที่มารับการตรวจรักษา ที่แผนกตรวจผู้ป่วยนอก คลินิกสูตินรีเวช โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 214 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มปริมาณพันธุกรรมของเชื้อในส่วนยีน L1 และจำแนกทัยป์ ด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยอาศัยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Rsa* I, *Dde* I, *Hae* III, and *Hinf* I สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ ในเซลล์มะเร็งระยะไม่ลุกลามจำนวน 16 จาก 104 ตัวอย่าง (15.38%) และจากเซลล์มะเร็งระยะลุกลามจำนวน 35 จาก 48 ตัวอย่าง (72.92%) ในจำนวนนี้มี 47 รายที่สามารถจำแนกทัยป์ได้ โดยตรวจพบทั้งสิ้น 8 ยีโนทัยป์ ทัยป์ที่พบมากที่สุดคือ HPV-16 (41.18) รองลงไปคือ HPV-18 (13.73%), -35 (13.73%), -52

(9.8%), -6 (7.84%), -11 (1.96%), -51 (1.96%) และ –59 (1.96%) นอกจากนี้ยังพบความชุกของเชื้อ HPV-16 ได้สูงสุดในมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma (SCC) ในการตรวจการแสดงออกของยีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV-16 และ HPV-18 โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ร่วมกับการใช้ primer ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ขนาดและความเข้มของชิ้นส่วนของผลิตผลจากปฏิกริยาจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์พันธุกรรมอัตโนมัติ (ABI 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer) รายงานผลออกมาเป็นปริมาณสัมพัทธ์ ซึ่งพบว่าจากจำนวนสิ่งส่งตรวจ 21 ตัวอย่าง มี 18 ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีนอย่างสม่ำเสมอโดยสามารถตรวจพบ E6/E7 mRNA ได้ 2 ชนิด คือ E6*I ที่ทำหน้าที่สร้าง โปรตีน E7 และ E6*II ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน E6 และพบว่าระดับของ E6*I จะสูงกว่า E6*II ในเกือบทุกราย ขณะที่อัตราส่วนระหว่าง E6*I /E6*II กับเซลล์มะเร็งในระยะต่าง ๆ นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV-18 ตรวจพบการสร้าง E6/E7 mRNA ได้เพียง 4 ใน 7 ราย และตรวจพบเฉพาะ E6*I เท่านั้น ความแตกต่างในการแสดงออกของยีน E6 และ E7 จากเชื้อ HPV กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงที่พบนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของ splicing signal ของเชื้อทั้งสองชนิด ถึงแม้ว่าปริมาณสัมพัทธ์ระหว่าง E6*I และ E6*II จะไม่มีความสัมพันธ์กับระยะมะเร็ง แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้ได้ยืนยันให้เห็นว่ายีน E6 และ E7 มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในเซลล์มะเร็งเหล่านั้น การนำวิธีการตรวจหาการแสดงออกของยีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV มาประยุกต์ใช้ในการทำนายการพัฒนาของระยะมะเร็งนั้นยังเป็นการเร็วเกินไปในขณะนี้ และควรรอให้มีการศึกษาในลักษณะของการศึกษาติดตามระยะยาวในกลุ่มตัวอย่างที่มากพอและต่อเนื่องก่อน