บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาการตรวจหาการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด คือ SiHa และ C33A โดยการเพิ่มจำนวน DNA ของเซลล์ทั้งสองด้วยวิธี PCR และใช้ไพรเมอร์ *L1* บริเวณ MY09/MY11 พบว่าเซลล์ SiHa มีการติดเชื้อ HPV ในขณะที่ C33A ไม่มีการติดเชื้อ HPV ซึ่งเป็นการยืนยันข้อมูลที่ทราบมาก่อนแล้วว่า เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa มีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 (Yee *et al.*, 1985) ในขณะที่ C33A ไม่พบการติดเชื้อ HPV แต่มีกลายพันธุ์ของ *p53* ที่ codon 273 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงมากของ *p53* อีกทั้งยังมีการกลายของ *RB* ที่บริเวณ splice junction ทำให้เกิด in-frame deletion ของ exon 20 ส่งผลให้เกิดมะเร็งปากมดลูก (Scheffner *et al.*, 1991)

ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ใน SiHa และ C33A โดยการใช้เทคนิค sodium bisulfite treatment และ MSP ซึ่งใช้ duplex primer ได้แก่ methylated และ unmethylated *CCNA1* primer พบว่า SiHa มีการเกิด methylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 100% ในขณะที่ C33A มีการเกิด methylation 44.97% ผลการศึกษาในส่วนนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV ซึ่งพบการเกิดเมทิเลชันสูงมากกว่า 93% (Kitkumthorn *et al.*, 2006) รวมถึงในมะเร็งชนิดต่างๆ ที่พบการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เช่น มะเร็งหลังโพรงจมูกพบ 48% (Yanatatsaneejit *et al.*, 2008) มะเร็งศีรษะและคอพบ 34.7% (Basel *et al.*, 2011) และมะเร็งช่องปากพบ 72% (Shaw *et al.*, 2006) เป็นต้น การเกิดเมทิเลชันของ *CCNA1* นี้เองสามารถใช้ประโยชน์ในการเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ (marker) ของการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ ดังที่ Yang และคณะ (2009) พบว่า การเกิดเมทิเลชันของยีน *CCNA1* สอดคล้องกับมะเร็งปากมดลูกในระยะ high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II เป็นต้นไป เป็นต้น อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ C33A จะไม่มีการติดเชื้อ HPV แต่ยังมีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* อยู่ ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดมะเร็งเป็น multistep process จึงอาจมีกลไกอื่นๆ นอกเหนือจากการติดเชื้อ HPV เข้ามาเกี่ยวข้องในการชักนำให้เกิดเมทิเลชัน เช่น การเกิดการกลายของ DNMT1 อาจทำให้เกิด site-specific hypermethylation (Klein *et al.*, 2011) หรือ การดัดแปลงโปรตีนฮีสโตนส่งผลให้เกิดการชักนำการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ขึ้น อีกทั้ง C33A นั้นมีการกลายของ *p53* ซึ่งนี่อาจเป็นสาเหตุของการชักนำให้เกิดรูปแบบที่ผิดปกติของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ขึ้นก็เป็นได้ (Tatemichi *et al.*, 2008)

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* จากการทำ RT-PCR และ duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *CCNA1* และ *GAPDH* พบว่าใน SiHa และ C33A มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* 26.85% และ 70.31% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า SiHa มีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ถึง 100% มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* ได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับ C33A ที่มี

2788028802

การเกิดเมทิเลชันของ *CCNA1* เพียงเล็กน้อยและมีการแสดงออกของยีน *CCNA1* มากกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดเมทิเลชันของยีน *CCNA1* ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของยีน *CCNA1* เองด้วย ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองโดยใช้ human methylome data ที่พบว่าการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีนมักจะยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นด้วยเช่นกัน (Du *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม Mueller และคณะ (2000) ได้ศึกษา tissue-specific expression ของยีน *CCNA1* โดยการทำ microinjection ของยีน *CCNA1* ในหนู พบว่า การยับยั้งการทำงานของโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* พบได้ในทุกอวัยวะโดยที่ไม่จำเป็นต้องมีการเกิด CpG methylation ของโพรโมเตอร์ ซึ่งเป็นผลมาจาก tissue-specific expression เช่น ใน testis นั้นมีการแสดงออกของยีน *CCNA1* สูงมาก แม้ว่าจะมี CpG methylation สูงมากเช่นเดียวกัน ดังนี้ จะเห็นได้ว่า การเกิดเมทิเลชันซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมการแสดงออกของยีนอาจไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ทั้งหมด เนื่องจากมี tissue-specific expression เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย นอกจากนี้ มีการศึกษาในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก HeLa ซึ่งมีการติดเชื้อ HPV ชนิด 18 พบว่าการลดลงของเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ส่งผลต่อการกลับมาแสดงออกของยีน *CCNA1* เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างการทดลองอื่นๆ ที่ใช้ 5'-aza-2'-deoxycytidine แล้วทำให้ silenced gene กลับมามีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Cameron *et al.*, 1999) จึงเป็นไปได้ว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ใน HeLa นั้น อาจเป็นผลมาจากการเกิด histone deacetylation ดังนั้น การเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ 100% ใน SiHa และเกือบ 50% ใน C33A แต่กลับมีการแสดงออกของยีน *CCNA1* จากการทดลองครั้งนี้นั้น จึงอาจเป็นผลมาจาก tissue-specific expression และการดัดแปลงโปรตีนฮีสโตน ที่เข้ามามีบทบาทและทำให้เกิดรูปแบบที่จำเพาะของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* ใน SiHa และ C33A

อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* สามารถยืนยันได้จากการให้ยา 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 uM แก่ SiHa และ C33A เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งพบว่า ใน SiHa มีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* แม้ว่าเมื่อวัด % ความเข้มของแบนด์แล้วจะได้ 100% ในทุกๆ ความเข้มข้นของ 5'-azacytidine ที่ใช้ก็ตาม แต่อาจอนุมานได้ว่าการเกิดเมทิเลชันนั้นลดลงเนื่องจาก methylated band บางลงเรื่อยๆ เมื่อใช้ 5'-azacytidine ความเข้มข้นสูงขึ้น ในขณะ C33A มีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อได้รับ 5'-azacytidine ความเข้มข้นสูงขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของยีน *CCNA1* นั้นพบว่า ทั้ง SiHa และ C33A มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ผลการทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่าการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของยีน *CCNA1* จริง ทั้งนี้ ใน SiHa แม้จะได้รับยาที่ความเข้มข้นสูงถึง 7 uM แต่ก็ยังไม่มี unmethylated band เกิดขึ้น อาจเป็นเพราะว่า SiHa นั้นมีการติดเชื้อ HPV ซึ่งโดยปกติแล้วยีน *E7* ของ HPV สามารถจับกับ DNMT1 ได้ (Burgers *et al.*, 2007) ยีน *E7* ของ HPV นี่เอง อาจเป็นตัวชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ได้มากแม้ว่าจะมีการให้ยา 5'-azacytidine แล้วก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ C33A ที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV ทำให้ผลการให้ยา 5'-azacytidine ใน SiHa นั้นเห็นการลดลงของการเกิดเมทิเลชันได้ไม่ชัดเจนเท่าใน C33A ทว่า ผลการให้ยา 5'-azacytidine แก่

2788028802

เซลล์มะเร็งที่ได้ศึกษาในครั้งนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยจำนวนมาก เช่น การศึกษาของ Yang และ Zheng (2014) ซึ่งพบว่าการให้ 5'-azacytidine แก่เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A ส่งผลให้เกิดความสัมพันธ์ในเชิงลบระหว่างการเกิด hypermethylation และการแสดงออกของยีนและโปรตีน KLF4 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูก เป็นต้น ปัจจุบัน US Food and Drug Administration (FDA) ได้รับรองการใช้ 5'-azacytidine ในการรักษาโรค myelodysplasic syndrome (MDS) ซึ่งโรคนี้สามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ในอนาคต (Kaminskas *et al.*, 2005) รวมถึง การพัฒนาและศึกษาจำนวนโดสของ 5'-azacytidine เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งอื่นๆ เนื่องจากการใช้ 5'-azacytidine ในโดสที่สูงเกินไปจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Christman, 2002)

สำหรับการศึกษากลไกการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 นั้น สามารถตรวจสอบได้จากการทำ siRNA ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์ SiHa และการชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์ C33A ผลการศึกษาจากการทำ siRNA ใน SiHa โดยใช้ *E7* siRNA ปริมาณ 30 pmol และใช้ lipofect transfection reagent 1 ul ในปริมาตรสุดท้าย 100 ul เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณของ siRNA และระยะทรานสเฟ็กที่เหมาะสมที่สุด พบว่า ยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือเพียง 0.60 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ในขณะที่การแสดงออกของยีน *CCNA1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 6.24 เท่าใน SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA เมื่อเปรียบเทียบกับ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA อีกทั้งยังพบว่าใน SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA มีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน เหลือเพียง 50.79% เมื่อเปรียบเทียบกับ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ซึ่งมีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 59.97% และสำหรับผลของการชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 จาก recombinant plasmid ในเซลล์ C33A พบว่า ใน C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid มีการแสดงออกของยีน *E7* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 91,660 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ C33A ที่ได้รับ empty vector ในขณะที่การแสดงออกของยีน *CCNA1* นั้นพบว่า C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือเพียง 0.27 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ C33A ที่ได้รับ empty vector สำหรับการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*นั้น ใน C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid มีการเกิดเมทิเลชันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 49.08% เมื่อเปรียบเทียบกับ C33A ที่ได้รับ empty vector ที่มีการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 37.20% ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการลดการแสดงออกของยีน *CCNA1* ซึ่งจากการทำ *E7* siRNA ใน SiHa และการชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ใน C33A ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน ทั้งนี้ มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาผลของยีน *E7* ของ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่า การทำ siRNA ของยีน *E7* ของ HPV ส่งผลให้การเจริญของเซลล์มะเร็งลดลง รวมถึงเซลล์มีรูปแบบการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้น และการเกิด cell proliferation ลดลง (Chang *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2008; Jonson *et al.*, 2008) นอกจากนี้ Hasan และคณะ (2013) ยังพบว่าจากการทำ siRNA ของยีน *E7* ของ HPV ส่งผลให้เกิด histone4

2788028802

acetylation (AceH4) และ histone3 trimethyl lysine 4 (H3K4me3) เพิ่มขึ้น ซึ่งแต่เดิมนั้นการสูญเสียการทำงานของ AceH4 และ H3K4me3 ทำให้เกิด histone deacetylation ซึ่งส่งผลต่อบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *TLR9* การศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันหน้าที่ของยีน *E7* ของ HPV ที่มีผลต่อการดัดแปลงโปรตีนฮีสโตนซึ่งเป็นหนึ่งในกลไกทาง epigenetics อีกทั้ง Laurson และคณะ (2010) พบว่า ยีน *E7* ของ HPV สามารถเพิ่มการทำงานของ DNMT1 และส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของ *E-cadherin* แต่เมื่อศึกษาบริเวณโพรโมเตอร์ของ E-cadherin ในเซลล์ที่มี HPV กลับไม่มีความแตกต่างกันกับเซลล์ที่ไม่มีเชื้อ HPV เลยคือบริเวณโพรโมเตอร์ยังคงเป็น fully unmethylation จากผลการศึกษาที่ได้อาจเป็นไปได้ว่ากิจกรรมของ DNMT1 ที่เพิ่มขึ้นอันเป็นผลมาจากยีน *E7* ของ HPV นั้น อาจมีเป้าหมายต่อยีนอื่นๆ ซึ่งโปรตีนของยีนนั้นมามีผลต่อ *E-cadherin* promoter ก็เป็นได้จึงทำให้ *E-cadherin* มีการแสดงออกลดลง ดังนี้ จะเห็นได้ว่า *E7* ของ HPV มีบทบาทต่อการเกิดมะเร็งในหลายกลไก อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ได้ศึกษาผลยีน *E7* ของ HPV ต่อการเกิดดีเอ็นเอเมทิเลชันและการเกิดมะเร็ง ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นถึงอีกบทบาทหนึ่งของยีน *E7* ของ HPV ในแง่ของการทำให้เกิดดีเอ็นเอเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งส่งผลต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้

ในส่วนของการพิสูจน์ว่าโปรตีน E7 และ DNMT1 สามารถจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เพื่อชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ได้หรือไม่นั้นได้ทดสอบด้วยการทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP) ผลการทดลองที่ได้นั้น *CCNA1* ถูกเพิ่มจำนวนได้ใน input DNA ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้ไม่มีปัญหาในการทำ PCR และในตัวอย่างที่ใช้ H3K4me3 antibody พบว่า สามารถตรวจสอบ *CCNA1* band ได้ ทั้งในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid อีกทั้งเมื่อใช้ normal rabbit IgG พบว่าสามารถตรวจสอบ *CCNA1* band ได้เช่นกันซึ่ง band ที่เกิดขึ้นแสดงถึง background ของ H3K4me3 antibody ซึ่งเป็น rabbit polyclonal antibody แต่ *CCNA1* band ที่ได้เมื่อใช้ H3K4me3 antibody เข้มกว่าเมื่อใช้ normal rabbit IgG มาก แสดงว่า H3K4me3 antibody สามารถตกตะกอน protein-DNA complex ได้จริง นั่นหมายความว่าขั้นตอน immunoprecipitation ที่ทำนั้นสามารถใช้ได้กับ antibody อื่นๆ ในการตกตะกอน protein-DNA complex ได้ด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ E7 หรือ HIS antibody พบว่า สามารถตรวจสอบ *CCNA1* band ได้ในเฉพาะเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid เท่านั้น อีกทั้งใน normal mouse rabbit พบว่าไม่มี *CCNA1* band เกิดขึ้นเลย จึงยืนยันได้ว่าโปรตีน E7 สามารถจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้จริง ทว่า E7 antibody มีประสิทธิภาพต่ำกว่า HIS antibody มาก ดังนี้เมื่อใช้ antibody ในการตกตะกอน protein-DNA complex ในปริมาณเท่ากันคือ 10 ไมโครกรัม เมื่อใช้ HIS antibody จึงสามารถตรวจสอบ *CCNA1* band ได้ชัดเจนกว่าเมื่อใช้ E7 antibody สำหรับในตัวอย่างที่ใช้ DNMT1 antibody นั้น พบว่าสามารถตรวจสอบ *CCNA1* band ได้ทั้งในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า *CCNA1* band ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid เข้มกว่าในเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid เป็นไปได้ว่า โปรตีน E7 ของ HPV อาจชักนำให้ DNMT1 มีความสามารถในการจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้มากขึ้น สำหรับ *CCNA1* ที่สามารถ

2788028802

ตรวจสอบได้เช่นกันในเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid นั้น สอดคล้องกับผลการตรวจสอบระดับเมทิเลชันในเซลล์ C33A ซึ่งมีระดับเมทิเลชัน 44.97% ดังรูปที่ 19 ถึงแม้ว่า C33A ไม่มีการติดเชื้อ HPV แต่ DNMT1 ก็สามารถไปเกาะยังบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* แล้วก่อให้เกิดเมทิเลชันบริเวณนั้นได้ เนื่องจากปกติแล้ว DNMT1 นั้นมีอยู่ในเซลล์ทั่วไป ซึ่งจะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิเลชันให้แก่ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอเส้นเดิมที่ได้รับการเติมหมู่เมทิลแล้วนั้นเป็นต้นแบบ (maintenance methylation) ซึ่งกลไกนี้เกิดขึ้นในระยะ S ในวัฏจักรของเซลล์ (Detich *et al.*, 2001) ดังนี้ C33A ที่ได้รับ empty plasmid จึงตรวจสอบ *CCNA1* ได้ เมื่อใช้ DNMT1 ในการตกตะกอน protein-DNA complex

สรุปผลการวิจัย

เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A พบว่าเซลล์ SiHa มีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 ในขณะที่เซลล์ C33A นั้นไม่มีการติดเชื้อ HPV และเมื่อตรวจสอบระดับการเกิดเมทิเลชันของยีน *CCNA1* พบว่าในเซลล์ SiHa มีระดับเมทิเลชันของยีน *CCNA1* 100% ในขณะที่เซลล์ C33A มีระดับเมทิเลชันของยีน *CCNA1* แค่เพียงบางส่วนเท่านั้น อีกทั้งเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* พบว่า เซลล์ SiHa มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* น้อยกว่าเซลล์ C33A และเพื่อเป็นการยืนยันว่าการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *CCNA1* จึงให้ยา 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 ไมโครโมลาร์แก่เซลล์ SiHa และ C33A เป็นระยะเวลา 7 วัน ผลการศึกษาที่ได้พบว่าระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่การแสดงออกของยีน *CCNA1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงยืนยันได้ว่า การเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีความสัมพันธ์กันจริง อย่างไรก็ตามใน SiHa มีการติดเชื้อ HPV และยีน *E7* ของ HPV อาจมีบทบาทในการชักนำให้เกิดเมทิเลชันก็เป็นได้ ดังนี้จึงพบว่าการลดลงของระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ไม่ชัดเจนเท่าใน C33A

จากการทำ *E7* siRNA ใน SiHa พบว่า ยีน *E7* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่การแสดงออกของยีน *CCNA1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อตรวจสอบระดับเมทิเลชันบริเวณพบว่า บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มีระดับเมทิเลชันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาที่ได้นี้มีความสอดคล้องและมีแนวโน้มไปในทิศทางตรงข้ามกับการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์ C33A ดังนี้ จึงสรุปได้ว่า ยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการชักนำการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการลดการแสดงออกของยีน *CCNA1*

เพื่อศึกษากลไกของโปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 และ DNMT1 ในการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* จึงได้ทำ ChIP ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid หลังจากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* พบว่า โปรตีน E7 และ DNMT1 สามารถจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้ ดังนี้จึงเป็นการยืนยันว่าโปรตีน E7 และ DNMT1 นั้นสามารถจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้โดยตรง จากนั้นจึงชักนำให้เกิดเมทิเลชันและการลดระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในที่สุด

2788028802

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบการเกิดเมทิเลชันควรใช้วิธี pyrosequencing เนื่องจากเป็นการวัดระดับเมทิเลชันบริเวณที่สนใจในเชิงปริมาณ (quantitative method) ดังนั้น ผลที่ได้จะมีความชัดเจน แม่นยำมากกว่าการศึกษาด้วยวิธี duplex-MSP ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งเป็นวิธีวัดแบบกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative method)

2. หากมีระยะเวลาในการทำงานวิจัยมากกว่านี้อาจทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และโปรตีน DNMT1 ด้วยการทำ co-immunoprecipitation เพื่อยืนยันผลการศึกษาของ Burgers และคณะ (2007) จะให้งานวิจัยครั้งนี้สมบูรณ์มากขึ้น