



การพัฒนา Panel การกลายพันธุ์ของยีน TP53 ร่วมกับการตรวจหา สายพันธุ์ HPV ความเสี่ยงสูง เพื่อการวินิจฉัยและวางแผนการรักษามะเร็งปากมดลูก

ข้อมูลโดย วิกนัยดา วรปิตรังสี

โครงการนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนา “Multiplex SNPs panel testing” ที่ใช้เทคนิค MassARRAY ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อ HPV ความเสี่ยงสูง (สายพันธุ์ 16,18,52) และการกลายพันธุ์ของยีน TP53 ได้พร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียว โดยชุดตรวจนี้มีความแม่นยำสูงเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน (Real-time PCR) แต่ให้ข้อมูลเชิงลึกที่มากกว่า จึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการประเมินความเสี่ยงของผู้ป่วย และสนับสนุนการวางแผนการรักษาแบบจำเพาะบุคคล (Personalized Medicine) สำหรับมะเร็งปากมดลูกในอนาคต

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อ high risk Human Papillomavirus (hrHPV) อย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันนั้น ยุทธศาสตร์การป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งปากมดลูกได้เปลี่ยนผ่านจากการตรวจทางเซลล์วิทยา มาสู่การใช้การตรวจหาดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อ hrHPV ซึ่งเป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้น (Primary screening) เนื่องจากมีความไวสูงกว่า อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญคือการติดเชื้อ HPV ส่วนใหญ่มักเป็นภาวะชั่วคราวและสามารถหายไปได้เองโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีเพียงส่วนน้อยของการติดเชื้อแบบต่อเนื่องเท่านั้นที่จะดำเนินไปสู่รอยโรคก่อนมะเร็ง (Precancerous lesion) และมะเร็งในที่สุด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarkers) เพิ่มเติม เพื่อใช้ในการแบ่งชั้นความเสี่ยงและระบุกลุ่มสตรีที่ติดเชื้อ HPV ที่มีความเสี่ยงสูงสุดในการเกิดโรคได้อย่างแม่นยำ

กลไกระดับโมเลกุลของมะเร็งปากมดลูกคือการทำงานของ Onco-protein E6 และ E7 ที่สร้างโดยเชื้อ hrHPV โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน E6 ที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เซลล์โฮสต์กลายเป็นเซลล์มะเร็งผ่านการจับและสลายของโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนกดการเกิดเนื้องอก (Tumor suppressor protein) ที่ควบคุมโดยยีน TP53 โดยโปรตีนนี้มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการสำคัญของเซลล์ เช่น การหยุดวัฏจักรเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ และการชักนำให้เซลล์ตายอย่างเป็นระบบ (Apoptosis) เมื่อเซลล์เกิดความเสียหายทางพันธุกรรมจะส่งผลให้เซลล์สูญเสียกลไกการควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของเซลล์มะเร็ง

นอกจากนี้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือ Polymorphism ในตำแหน่งเฉพาะ เช่น Arg72Pro ยังมีผลต่อความไวของโปรตีน p53 ต่อการถูกทำลายโดยโปรตีน E6 อีกด้วย ด้วยเหตุนี้ การวิเคราะห์แบบบูรณาการ ซึ่งประเมินทั้งสถานะการติดเชื้อ HPV และความสมบูรณ์ของยีน TP53 จึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูงในการเพิ่มความแม่นยำของการพยากรณ์โรค และเป็นรากฐานสำคัญในการพัฒนาการุ้การรักษาแบบมุ่งเป้า (Targeted therapy) และการแพทย์แบบจำเพาะบุคคล (Personalized medicine) สำหรับผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในอนาคต

จุดเด่นของการตรวจ hrHPV, TP53 panel ด้วยเทคนิค MassARRAY

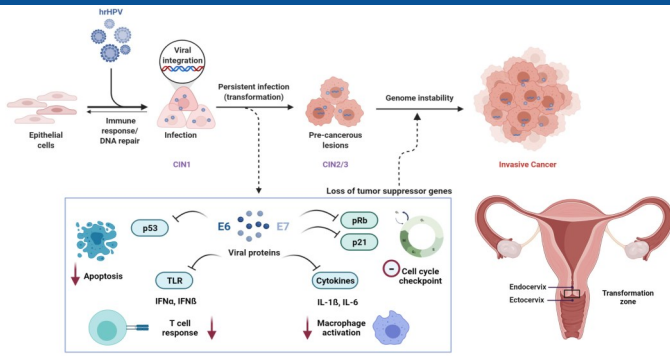
1. ยืนยันตำแหน่ง hrHPV (HPV 16, 18, 52) ด้วย **2 SNP ต่อสายพันธุ์** เพื่อเพิ่มความแม่นยำ
2. สามารถตรวจ hrHPV (HPV 16, 18, 52), p53 hotspot : R175H, R248W, R273H และ Arg72Pro **ได้พร้อมกันในครั้งเดียว**

- **ความไวและความจำเพาะสูง**
ตรวจจับและจำแนกสารพันธุกรรมได้แม่นยำ
- **ประหยัดค่าใช้จ่าย**
มีต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ต่ำเมื่อเทียบกับวิธีอื่น
- **ตรวจวิเคราะห์ได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน**
สามารถตรวจได้หลายตำแหน่งในปฏิกิริยาเดียว
- **วิเคราะห์ได้รวดเร็ว**
ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจและแปลผล
- **ใช้งานง่าย**
ขั้นตอนไม่ซับซ้อน เหมาะทั้งงานวิจัยและงานทางคลินิก
- **ออกแบบชุดตรวจเองได้**
สามารถยื่นจดสิทธิบัตรและต่อยอดสู่การให้บริการ

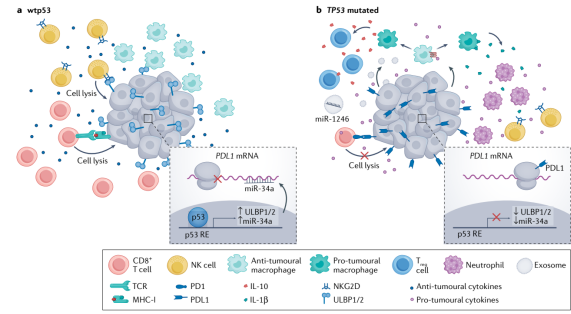
Parameter	กลุ่มทดสอบ (n=100)	กลุ่มอาสาสมัคร (n=86)
Sensitivity	97.1%	88.4%
Specificity	100%	100%
PPV	100%	100%
NPV	93.8%	90.6%
Accuracy	98%	94.2%

ตาราง 1 ตารางแสดงผลตรวจ hrHPV, TP53 panel ด้วยเทคนิค MassARRAY เมื่อเทียบกับผล Real-time PCR (gold standard)

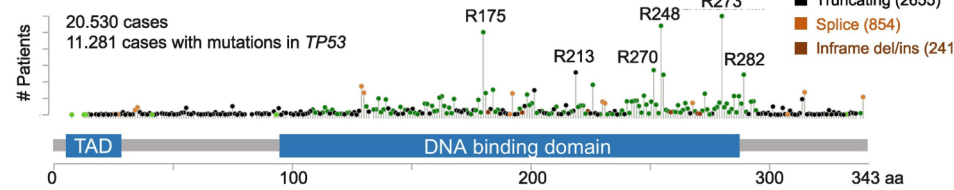
ความสัมพันธ์ของกลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูก hrHPV และโปรตีน



ภาพ 1 กลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูก: เซลล์เยื่อในบริเวณ Transformation zone ของปากมดลูกเกิดความผิดปกติจากการติดเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง (hrHPV) อย่างต่อเนื่อง Moe, S. et al., (2023)



ภาพ 2 wt p53 ทำหน้าที่เป็น "ผู้ยับยั้งมะเร็ง" โดยควบคุมเพื่อหยุดการเติบโตของเซลล์มะเร็ง ในทางกลับกัน mutp53 ทำหน้าที่เป็น "ผู้ส่งเสริมมะเร็ง" โดยใช้กลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยีน และ non-transcriptional เพื่อช่วยให้มะเร็งเติบโต Hassin, O., & Oren, M. (2023)

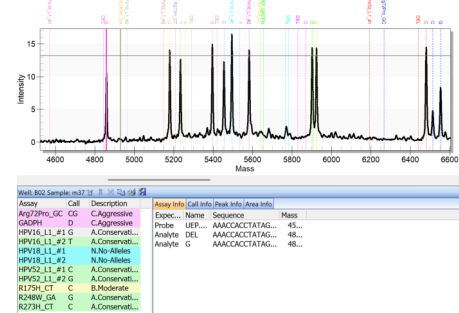


ภาพ 3 การกระจายตัวของการกลายพันธุ์ในโปรตีน p53 ตลอดทั้งสายโปรตีน จากการศึกษากลุ่มผู้ป่วย 20,530 รายที่เป็นมะเร็งชนิดต่างๆ พร้อมตำแหน่งกรดอะมิโน (residues) ที่พบการกลายพันธุ์บ่อยที่สุด Butera, A., and Amelio, I. (2025).

หลักการการทำงานของ MassARRAY

MassARRAY เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยอาศัยหลักการของ Multiplex PCR ร่วมกับ MALDI-TOF Mass Spectrometry เพื่อระบุการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมได้อย่างแม่นยำ

หลักการการทำงานของเทคโนโลยีนี้ คือการวัด "น้ำหนักมวลโมเลกุล" ของชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยเบสพื้นฐาน 4 ชนิด ได้แก่ Adenine (A), Cytosine (C), Guanine (G) และ Thymine (T) แต่ละเบสจะมีน้ำหนักเฉพาะตัวแตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อตำแหน่งของเบสเปลี่ยนไป เช่น การกลายพันธุ์ (SNP หรือ Variant site) น้ำหนักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอก็จะเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยเครื่อง MassARRAY



ภาพ A สเปกตรัมฟิค แสดงให้เห็นถึงการจัดเรียงตำแหน่งฟิคของดีเอ็นเอและ Mass ทั้งหมดในการวิเคราะห์ ผ่านการทำ Multiplex PCR



ภาพ 4 ความแตกต่างของมวลของสารพันธุกรรมสามารถตรวจจับได้โดยเทคโนโลยี MassARRAY

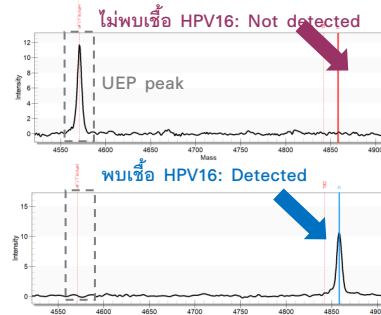
ตัวอย่างผลการทดสอบการตรวจ

hrHPV (HP 16,18,52), TP53 panel

เทคโนโลยี MassARRAY มาพร้อมซอฟต์แวร์ที่ใช้งานง่าย แสดงผลในรูปแบบกราฟและ Spectrum Plot โดยระบบจะแปลงข้อมูลจาก Mass Spectrometry Spectra ของผลิตภัณฑ์ PCR เป็นค่ามวลโมเลกุล เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุ การกลายพันธุ์ หรือ SNP ผลลัพธ์จะแสดงเป็น กราฟฟิค (Peak Spectrum) ช่วยให้การวิเคราะห์และแปลผลทำได้ง่ายและแม่นยำและเข้าใจง่าย

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	SAMPLE_WELL	Arg72Pro_GADPH	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1	HPV16_L1
2	M34	H03	CG	D								
3	M45	H04	G	D								
4	M49	H06	CG	D	G	T						
5	M67	H05	CG	D								
6	M73	H07	C	D								

สามารถอ่านและแปลผลได้อย่างสะดวก HPV16_L1_#1



ภาพ C และ D สเปกตรัมฟิคจากโปรแกรมแสดงการอ่านผลของตำแหน่งการวิเคราะห์เชื้อสายพันธุ์ HPV 16 โดย y-axis: ความเข้มของสัญญาณ (peak intensity), x-axis: ค่ามวล (Da)

ภาพ C ในกรณีไม่พบเชื้อ HPV จะตรวจพบสัญญาณฟิคของไพรเมอร์ที่ไม่ได้ขยายต่อ (UEP: Unextended Extension Primer)

ภาพ D ในกรณี พบเชื้อ HPV ไพรเมอร์ UEP จะถูกใช้ในการขยายต่อให้เกิดสัญญาณฟิค ซึ่งสามารถ ระบุตำแหน่ง SNP ที่ตรวจพบได้

ประสิทธิภาพการตรวจของ hrHPV, TP53 panel ด้วย
เทคนิค MassARRAY เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน RT-PCR

Parameter	กลุ่มทดสอบ (n=100)	กลุ่มอาสาสมัคร (n=86)
Sensitivity (95% CI)	97.1 (90.1–99.7)	88.4 (74.9–96.1)
Specificity (95% CI)	100 (88.4–100)	100 (91.8–100)
PPV (95% CI)	100 (94.7–100)	100 (90.7–100)
NPV (95% CI)	93.8 (79.2–99.2)	89.6 (77.3–96.5)
Accuracy (%)	98	94.2

Relative Sensitivity (Volunteer/Test)	0.91 (0.81–1.02)
P-value (Sensitivity)	0.103
P-value (Specificity)	1.000

PPV: Positive predictive value, TP / (TP + FP)
NPV: Negative predictive value, TN / (TN + FN)
95% CI (Confidence Interval)
P-value > 0.05, Fisher's exact test.

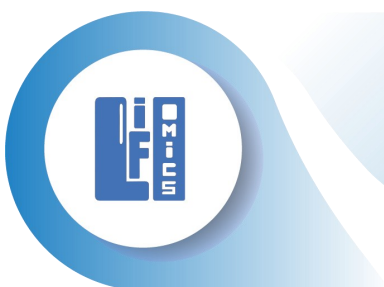
- ค่า Sensitivity และ Specificity ระหว่าง 2 เทคนิคไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- ค่า PPV อยู่ที่ 100% ในทุกกลุ่ม แสดงถึงความแม่นยำในการตรวจตัวอย่างที่ให้ผลบวก
- ค่า Accuracy > 94% เทคนิค MassARRAY มีความน่าเชื่อถือและ มีศักยภาพเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน

ตารางเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน RT-PCR และ
เทคนิค MassARRAY ในการตรวจ hrHPV

เทคนิค	Real-Time PCR (Gold standard)	MassARRAY® System
หลักการ	ตรวจจับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเรียลไทม์โดยใช้ไพรเมอร์เรืองแสง	ตรวจจับความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์มวลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry
เป้าหมาย	ตรวจจับ hrHPV สายพันธุ์ละ 1 ตำแหน่งเป้าหมาย 14 hrHPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), Internal Control (IC)	ตรวจจับ hrHPV สายพันธุ์ละ 2 ตำแหน่งเป้าหมาย (ความแม่นยำสูงกว่า) 3 hrHPV types (HPV 16, 18, 52) p53 hotspot : R175H, R248W, R273H, Arg72Pro, GADPH (Human IC)
Panel การตรวจที่กำหนดเอง	ไม่สามารถเลือกตำแหน่งเป้าหมายเองได้	สามารถเลือกตำแหน่งเป้าหมายเองได้ (Customizable)
ปริมาณ DNA ที่ใช้	4 µl	2 µl
ระยะเวลาผล (TAT)	4-6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง
ต้นทุน	ปานกลางถึงสูง, ต้นทุนต่อตัวอย่างสูงกว่าเมื่อตรวจหลายเป้าหมายพร้อมกัน	ต้นทุนเครื่องจักรเริ่มต้นสูง แต่ต้นทุนต่อตัวอย่างต่ำ (คุ้มค่าเมื่อตรวจในปริมาณมาก)
วิธีรายงานผล	เชิงปริมาณ (Quantitative)	เชิงปริมาณ (Quantitative)
ข้อดี	ใช้เวลาวิเคราะห์สั้น, เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้กันแพร่หลายและเป็นที่เข้าใจในห้องปฏิบัติการทั่วไป	ให้ข้อมูลทางคลินิกเชิงลึกที่มากกว่า (วิเคราะห์ SNPs), ปรับแต่ง panel ได้ (Customizable), ความไวสูงและประสิทธิภาพดี, ตรวจได้ในปริมาณมาก (high-throughput), วิเคราะห์ข้อมูลง่าย
ข้อเสีย	ไม่สามารถตรวจจับไวรัสและการกลายพันธุ์ได้พร้อมกัน และใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าเป็นสองเท่าต่อการทดสอบ	ขั้นตอนการเตรียมหลายขั้นตอน ต้องใช้อุปกรณ์/เครื่องมือพิเศษ (MassARRAY)

อ้างอิง

- Moe, S. E., Erland, F. A., Fromreide, S., Lybak, S., Brydoy, M., Dongre, H. N., ... & Aarstad, H. J. (2023). The TP53 codon 72 arginine polymorphism is found with increased TP53 somatic mutations in HPV (–) and in an increased percentage among HPV (+) Norwegian HNSCC patients. *Biomedicines*, 11(7), 1838. DOI: 10.3390/biomedicines11071838
- Hassin, O., and Oren, M. (2023). Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(2), 127-144. DOI: 10.1038/s41573-022-00571-8
- Butera, A., & Amelio, I. (2025). Deciphering the significance of p53 mutant proteins. *Trends in Cell Biology*, 35(3), 258-268. DOI: 10.1016/j.tcb.2024.06.003
- Basu, P., Chandna, P., Bamezai, R. N. K., Siddiqi, M., Saranath, D., Lear, A., & Ratnam, S. (2011). MassARRAY spectrometry is more sensitive than PreTect HPV-Proofer and consensus PCR for type-specific detection of high-risk oncogenic human papillomavirus genotypes in cervical cancer. *Journal of clinical microbiology*, 49(10), 3537-3544. DOI: 10.1128/JCM.00354-11
- Kodal, J. B., Vedel-Krogh, S., Kobylecki, C. J., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2017). TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Scientific Reports*, 7(1), 336. DOI: 10.1038/s41598-017-00427-x



บริษัท ไลโฟมิกส์ จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แขวงสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533

Agena
BIOSCIENCE



lifomicsth



@lifomics



www.lifomics.com