

ไวยุทธศาสตร์ก. เสนอชนิดปีใน เซลล์ต้นของผู้ป่วยมะเร็งระดับ



นางสาวสุรีย์พร ลิ้มปัสสุภฤกษ์

006115

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท สาขาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2523

HEPATITIS B VIRUS IN LIVER CELLS FROM PATIENTS WITH LIVER CANCER



Miss Sureeyaporn Limsupalork

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1980

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับของผู้ป่วยมะเร็งตับ
โดย นางสาวสุรีย์พร ลิ้มปศุภฤกษ์
ภาควิชา จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุงสุวรรณ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

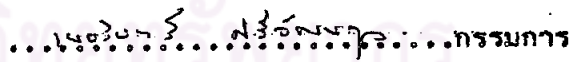
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประสิทธิ์ บุญนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ

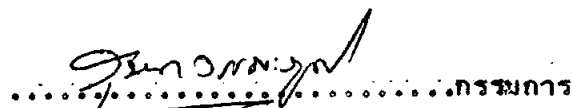
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิวาท ทุติยะโพธิ์)



.....กรรมการ



.....กรรมการ



.....กรรมการ

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับของผู้ป่วยมะเร็งตับ
 ชื่อนิสิต สุรียพร ลิมปัสกุลฤกษ์
 อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุงสุวรรณ
 ภาควิชา จุลชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2523



บทคัดย่อ

ไวรัสตับอักเสบบี มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับอักเสบบีชนิดต่าง ๆ โรคตับแข็ง โรคมะเร็งตับ และโรคอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับตับ (extrahepatic diseases) นอกจากนี้ไวรัสตับอักเสบบียังตรวจพบได้ในคนปกติจำนวนมาก โดยไม่ทำให้เกิดโรค Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ตรวจพบได้ในอัตราสูงในน้ำเหลือง และเซลล์ตับของผู้ป่วยมะเร็งตับ แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในเซลล์ตับจาก biopsied ของผู้ป่วยมะเร็งตับทุกราย และ HBsAg นี้ตรวจพบได้ในบางกลุ่มของเซลล์ และบางส่วนของตับที่ทำ autopsied เท่านั้น การศึกษานี้มุ่งที่จะค้นคว้าว่าเซลล์ชนิดใดในตับที่เป็นมะเร็ง และในอวัยวะอื่น ๆ (ม้าม ตับอ่อน ไต ต่อม้ำน้ำเหลือง) จะมี antigens ของไวรัสตับอักเสบบี และตรวจหา HBsAg, anti-HBs, Hepatitis B e antigen (HBeAg) และ anti-HBe ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยเหล่านี้ด้วย

เก็บชิ้นเนื้อและเลือดจากหัวใจของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งตับ 5 ราย (ผู้ป่วยมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ 3 ราย มะเร็งท่อน้ำดี 1 ราย มะเร็งตับชนิดทุติยภูมิ 1 ราย) และในผู้ป่วยโรคอื่น ๆ 13 ราย (ผู้ป่วยโรคตับแข็ง 2 ราย พยาธิใบไม้ในตับ 1 ราย โรคหัวใจ 2 ราย โรคกระเพาะ 1 ราย ความดันโลหิตสูง 1 ราย และผู้ป่วยทางด้านนิติเวช 6 ราย) มาศึกษา ปรากฏว่า anti-HBs ตรวจพบ 1 ราย ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคหัวใจเท่านั้น และ HBsAg ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธี counter immuno-electrophoresis แต่ตรวจพบ HBsAg 2 ราย (ผู้ป่วยมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ 1 ราย

และพยาธิใบไม้ในตับ 1 ราย) โดยวิธี reverse passive haemagglutination
HBeAg และ anti-HBe ไม่สามารถตรวจพบในน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่มี HBsAg ในน้ำเหลือง
โดยวิธี immunodiffusion

ทำการตรวจหา HBsAg, HBeAg และ Hepatitis B core antigen (HBcAg)
ในเซลล์ตับ 5 ตำแหน่ง และเซลล์จากอวัยวะอื่น ๆ พร้อมทั้งศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ
ส่วนเดียวกัน โดยตัดชิ้นเนื้อส่วนที่ต้องการศึกษาเป็นชิ้นเล็ก ป้ายบนสไลด์ ย้อมด้วยวิธี
indirect immunofluorescence โดยใช้ antisera 2 กลุ่ม คือ sera จากคนที่มี
antibodies ต่อไวรัสตับอักเสบบี (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc + anti-
HBe) - และ antisera ที่ได้จากการ immunized กระต่าย (anti-HBc, anti-HBL)
ปรากฏว่า HBsAg และ HBcAg สามารถตรวจพบเฉพาะในเซลล์ตับ โดยการใช้ human
antisera เท่านั้น โดยตรวจพบ HBsAg และ HBcAg ในผู้ป่วยมะเร็งตับทั้ง 5 ราย
และในกลุ่ม control 5 ราย (ผู้ป่วยโรคตับแข็ง 2 ราย พยาธิใบไม้ในตับ 1 ราย
โรคกระเพาะ 1 ราย และผู้ป่วยทางด้านนิติเวช 1 ราย) HBsAg และ HBcAg ส่วน
ใหญ่จะปรากฏอยู่ในกลุ่มเซลล์ตับปกติในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ และมีปริมาณน้อยในกลุ่มเซลล์ตับ
ที่มีกลุ่มเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์ที่มีลักษณะผิดปกติแบบ dysplasia จำนวนมาก ในทางตรง
กันข้าม แม้ว่าจะตรวจพบเซลล์ตับปกติจำนวนมากที่มี HBsAg ในผู้ป่วยบางรายในกลุ่ม
control แต่ตรวจพบเซลล์ที่มี HBcAg น้อยมาก Fluorescent positive
cells ที่ตรวจพบในตับมีลักษณะต่างกัน คือ ส่วนใหญ่มี fluorescent positive reac-
tion ใน cytoplasm บ้างก็มี fluorescent positive reaction ทั้งเซลล์ ซึ่งอาจ
แสดงว่าในบางกลุ่มของเซลล์ตับมีการเจริญของไวรัสตับอักเสบบีระดับขั้นต่างกัน นอกจากนี้
นี้ยังตรวจพบ HBsAg ในเม็กลีอดขาวด้วย แสดงว่าเม็กลีอดขาวอาจมีการติดเชื่อไวรัส
ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไวรัสตับอักเสบบีคงอยู่ในร่างกายผู้ติดเชื่อได้เป็นระยะเว
นาน

จากการศึกษานี้พบว่า HBsAg และ HBcAg ตรวจพบได้ในเซลล์ตับของผู้ป่วย
โรคมะเร็งตับ และโรคตับอื่น ๆ ทุกรายที่ทำการศึกษา รวมทั้งผู้ป่วย 2 ใน 10 รายของกลุ่ม
ผู้ป่วยอื่น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่ตรวจพบ antigens ของไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับปกติ

ดังนั้นการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า HBsAg และ HBeAg ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับเซลล์มะเร็งตับโดยตรง การมี antigens เหล่านี้อาจเป็นผลเนื่องจากการถูกกระตุ้นของไวรัสที่แฝงอยู่ในเซลล์ตับ (activation of latent virus infection) ภายหลังจากมีพยาธิสภาพในตับเกิดขึ้น ไวรัสตับอักเสบบีอาจไม่ได้เป็นสาเหตุในการทำให้เกิดมะเร็งตับ แต่อาจเป็นเพียงตัวร่วมกับสารที่ทำให้เกิดมะเร็ง (co-carcinogen) ในการทำให้เกิดมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิขึ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Hepatitis B Virus in Liver Cells from Patients
 with Liver Cancer

Name Sureeyaporn Limsupalork

Thesis Advisor Petcharin Srivatanakul, Ph.D.

Co-Advisor Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Department Microbiology

Academic Year 1980

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) has been shown to be associated with various types of hepatitis, cirrhosis, hepatoma and extrahepatic diseases. HBV has also been found in many healthy persons. There was high occurrence of Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in sera and hepatocytes from patients with hepatoma. It has been demonstrated that HBV antigens could not be found in all cases of the biopsied hepatoma liver. Only some population of the liver cells in certain areas of the autopsied hepatoma liver were positive for HBsAg. The present study was designed to investigate various types of cells in the hepatoma liver and cells in other organs (spleen, pancreas, kidney, lymph node) that are positive for HBV antigens. The presence of HBsAg, anti-HBs, Hepatitis B e antigen (HBeAg) and anti-HBe in the sera of the same patients was also studied.

Autopsied tissues and heart blood were obtained from 5 patients with liver cancer (three cases of primary liver cancer, one case of cholangiocarcinoma and one case of secondary liver

cancer) and 13 patients with other diseases (two cases of cirrhosis, one case of opisthorchiasis, two cases of heart disease, one case of peptic ulcer, one case of hypertension, and six of forensic cases). By using counter immunoelectrophoresis, anti-HBs was only found in a patient with heart disease, but the presence of HBsAg can not be demonstrated in all of the plasma. HBsAg was found in two cases (one case of primary liver cancer and one case of opisthorchiasis) by using reverse passive haemagglutination technique. HBeAg and anti-HBe could not be demonstrated in the plasma of HBsAg positive cases by using immunodiffusion technique.

HBsAg, Hepatitis B core antigen (HBcAg), HBeAg were detected in five areas of the autopsied liver tissues, and other tissues from various autopsied organs. The histopathology of the tissues in the same area was also studied. Imprints of the livers and various organs from all cases were stained by indirect immunofluorescent technique using both human antisera (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc + anti-HBe) and rabbit antisera (anti-HBc, anti-HBL). HBsAg could be demonstrated only in the liver cells, by using human antisera, in all five cases of liver cancer patients and only five cases of the other group (two cases of cirrhosis, one case of opisthorchiasis, one case of peptic ulcer and one of forensic case). The results were shown that most of HBsAg and HBcAg were present in the normal hepatocytes in the liver cancer patients. A few of the positive cells were demonstrated in the imprints which had numerous malignant or dysplastic cells. In contrast, many HBsAg positive cells were also demonstrated in the liver of some cases of the

other group, but a few HBcAg positive cells were demonstrated. It was found that different patterns of positive immunofluorescence were demonstrated in the liver cells, i.e., mostly in the cytoplasm, whole cell; suggesting that different stages of viral replication occurred in the liver cells. HBsAg could also be demonstrated in mononuclear leukocytes in the imprints of liver. The leukocytes may also be a target cell for HBV infection. This may be a possible mechanism for persistence of HBV in the infected host.

The present study demonstrated that HBsAg and HBcAg were found in the liver cells from all patients with liver cancer and other liver diseases, including two out of ten cases of the other diseases group. Most of HBV antigens were found in normal hepatocytes of all positive cases. The results indicated that HBsAg and HBcAg are not directly associated with the cancer cells. The presence of these antigens may be a result of the activation of latent HBV infection in the liver cells by pathological changes in the liver. HBV may not be a causative agent, but may only act as a co-carcinogen in the development of primary hepatocellular carcinoma.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร. เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล หัวหน้างานชีววิทยา ฝ่ายวิจัย และคณบดีว่า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุดงสุวรรณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องจนกระทั่งงานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดินรัตน์ สถิตนิมานการ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา รพ. ศิริราช, รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประยูร สุคนธมาน หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา รพ. จุฬาลงกรณ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สุภรณ์ พงสะบุตร ภาควิชาพยาธิวิทยา รพ. จุฬาลงกรณ์, แพทย์หญิงพูนศิริ สันะวัฒน์ หัวหน้าฝ่ายพยาธิวิทยา รพ. ขอนแก่น, นายแพทย์ชวลิต ไพโรจน์กุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และแพทย์หญิงสุภาพร ไชรินทะ หัวหน้าฝ่ายพยาธิวิทยา รพ. เสิดลิน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทางด้านการเก็บ specimen และขอขอบคุณอาจารย์ศิริรัตน์ เร่ง-พิพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พร้อมทั้งคุณโรสริน จันทโรจวงศ์ ภาควิชาพยาธิวิทยา รพ. จุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในการเก็บ specimen

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประสาร จิมากร ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และดูผลทางด้าน histopathology ซึ่งช่วยให้งานวิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ Professor Kusuyu Nishioka, the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, โตเกียว, ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจหา titer ของ anti-HBs และ anti-HBc

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
กิตติกรรมประกาศ.....	ญ
รายการตารางประกอบ.....	ฉ
รายการรูปประกอบ.....	ฐ
อธิบายคำย่อ.....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ความรู้พื้นฐาน.....	3
3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ.....	11
4 ผลการทดลอง.....	19
5 วิจารณ์และสรุป.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	53
ประวัติ.....	56



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1 จำนวน fluorescent positive cells ในตับของผู้ป่วยที่ เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งตับ โดยใช้ antibodies ต่อไวรัสตับ อักเสบนิตย.....	23
2 ลักษณะเซลล์ตับจากการย้อมสี H & E ในผู้ป่วยมะเร็งตับ.....	24
3 จำนวน fluorescent positive cells ในตับของผู้ป่วยกลุ่ม control โดยใช้ antibodies ต่อไวรัสตับอักเสบนิตย.....	25
4 เปรียบเทียบการตรวจพบ antigens ของไวรัสตับอักเสบนิตย ในเซลล์ตับ และใน plasma ของผู้ป่วยมะเร็งตับ และโรคอื่น ๆ....	26

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะ CIEP plate ที่ใช้ในการตรวจหา HBsAg และ anti-HBs..	17
2	ลักษณะ ID plate ที่ใช้ในการตรวจ identity ของ antiserum..	17
3	ลักษณะ ID plate ที่ใช้ในการตรวจหา HBeAg และ anti-HBe....	18
4	ลักษณะ microtiter plate ที่ใช้ในการตรวจหา HBsAg โดยวิธี RPHA.....	18
5	ลักษณะเซลล์มะเร็งระดับ เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ.....	27
6	ลักษณะเซลล์มะเร็งระดับ เปรียบเทียบกับกลุ่ม necrosis ของเซลล์ มะเร็ง.....	27
7	ลักษณะ regenerated nodule ซึ่งล้อมรอบด้วย fibrous tissue.....	28
8	ลักษณะ fluorescent positive cells ของเม็ดเลือดขาว โดยใช้ human anti-HBs.....	28
9	ลักษณะเซลล์มะเร็งของท่อน้ำดี.....	29
10	ลักษณะเซลล์ dysplasia จากผู้ป่วยมะเร็งตับชนิดทุติยภูมิ.....	29
11	ลักษณะ fluorescent positive cells ในตับของผู้ป่วยมะเร็งตับ ชนิดปฐมภูมิ โดยใช้ human anti-HBs.....	30
12	ลักษณะ fluorescent positive cells ในตับของผู้ป่วยมะเร็งตับ ชนิดปฐมภูมิ โดยใช้ human anti-HBc.....	30

อธิบายคำย่อ

anti-HBC	Antibody to Hepatitis B virus associated circulating antigen
anti-HBc	Antibody to Hepatitis B core antigen
anti-HBe	Antibody to Hepatitis B e antigen
anti-HBL	Antibody to Hepatitis B virus associated antigens in liver cells
anti-HBs	Antibody to Hepatitis B surface antigen
CIEP	Counter immunoelectrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetra acetate
g	gram
xg	relative centrifuge force-gravities
HBCAg	Hepatitis B virus associated circulating antigen
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HBeAg	Hepatitis B e antigen
HBLAg	Hepatitis B virus associated antigens in liver Cells
HBSS	Hanks balanced salt solution
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBV	Hepatitis B virus
H & E	Haematoxylin & eosin
ID	Immunodiffusion
IF	Indirect immunofluorescence

อธิบายคำย่อ

anti-HBC	Antibody to Hepatitis B virus associated circulating antigen
anti-HBc	Antibody to Hepatitis B core antigen
anti-HBe	Antibody to Hepatitis B e antigen
anti-HBL	Antibody to Hepatitis B virus associated antigens in liver cells
anti-HBs	Antibody to Hepatitis B surface antigen
CIEP	Counter immunoelectrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetra acetate
g	gram
xg	relative centrifuge force-gravities
HBCAg	Hepatitis B virus associated circulating antigen
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HBeAg	Hepatitis B e antigen
HBLAg	Hepatitis B virus associated antigens in liver cells
HBSS	Hanks balanced salt solution
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBV	Hepatitis B virus
H & E	Haematoxylin & eosin
ID	Immunodiffusion
IF	Indirect immunofluorescence

ml	Millilitre
PHA	Passive haemagglutination
PBS	Phosphate buffer saline
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic acid
RPHA	Reverse passive haemagglutination
ชม	ชั่วโมง
° ซ	องศาเซลเซียส
ตร ชม	ตารางเซนติเมตร
มม	มิลลิเมตร
มล	มิลลิลิตร
ลบ ชม	ลูกบาศก์เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย