ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส
และปัจจัยของไวรัสตับอักเสบบีในการเกิดมะเร็งตับ

นางสาวชุรีพร   ทองใบ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์   จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ASSOCIATIONS BETWEEN P53 MUTATION (R249S) AND HEPATITIS B VIRAL FACTORS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA.

Miss Chureeporn Thongbai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2012
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์ 249 เอส และปัจจัยของไวรัสตับอักเสบบีในการเกิดมะเร็งตับ
โดย	นางสาวชุรีพร ทองใบ
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(แพทย์หญิงบุปผา พรธิสาร)

ชุรีพร ทองใบ: ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์ 249 เอส และปัจจัยของไวรัสตับอักเสบบีในการเกิดมะเร็งตับ (ASSOCIATIONS BETWEEN P53 MUTATION (R249S) AND HEPATITIS B VIRAL FACTORS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ. นพ.ยง ภู่วรวรรณ, 65 หน้า.

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งตับ งานวิจัยนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของไวรัสตับอักเสบบีและการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์ 249 เอส ซึ่งใช้บ่งชี้การได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ที่สามารถเหนี่ยวนำการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยทำการศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับจำนวน 65 ราย และผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับจำนวน 89 ราย วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249 เอสในซีรั่ม โดยใช้วิธีการตรวจคู่เบสโดยตรง (direct sequencing) และวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะและแยกตามความหลากหลายของความยาวสายพันธุกรรม (RFLP) ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับ มีการกลายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบบีในส่วน basal core promoter (BCP) แบบ T1753A/G/C และ A1762T/G1764A มากกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์ 249 เอสในซีรั่มของผู้ป่วยมะเร็งตับ คิดเป็นร้อยละ 6.2 และกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ คิดเป็นร้อยละ 3.4 เมื่อเปรียบเทียบความชุกของการกลายพันธุ์ชนิด อาร์249เอส ระหว่างสองกลุ่มพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี multiple logistic regression analysis พบการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A เป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์ที่สุดต่อการเกิดมะเร็งตับ ดังนั้นสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีแบบ A1762T/G1764A มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับ แต่การกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรไทยที่ทำการศึกษา

ภาควิชา: ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต...

สาขาวิชา: ชีวเคมีทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก...................................

ปีการศึกษา: 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม....................................

5374682930: MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEY WORDS: Hepatitis B / Aflatoxin / *R249S* / Hepatocellular carcinoma / TUMOR SUPPRESSOR GENE

CHUREEPORN THONGBAI : ASSOCIATIONS BETWEEN P53 MUTATION (R249S) AND HEPATITIS B VIRAL FACTORS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA. ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D.,CO-ADVISOR:PROF.YONG POOVORAWAN, M.D., 65 pp.

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection and dietary exposure to aflatoxin B1 (AFB1) are major risk factors for hepatocellular carcinoma (HCC). The aim of this study was to evaluate the role of HBV genetic variations and *R249S* mutation of the *p53* gene, a marker of AFB1-induced HCC, in Thai patients chronically infected with HBV. Sixty-five patients with HCC and 89 patients without HCC were included. Viral mutations and *R249S* mutation were characterized by direct sequencing and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in serum samples, respectively. The prevalence of T1753C/A/G and A1762T/G1764A mutations in the basal core promotor (BCP) region were significantly higher in the HCC group compared to the non-HCC group. *R249S* mutation was detected in 6.2% and 3.4% of the HCC and non-HCC groups, respectively, which was not significantly different. By multiple logistic regression analysis, the present of A1762T/G1764A mutations were independently associated with the risk of HCC. Overall, the data suggested that A1762T/G1764A mutations were associated with the development of HCC. In contrast, *R249S* mutation was not associated with the risk of HCC in Thai patients.

Department : ....Biochemistry.....................	Student's Signature ……………………….......…..
Field of Study : …...Medical Biochemistry……....	Advisor's Signature…………………...................
Academic Year : ……….......2012………........…	Co-advisor's Signature…………………………...

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ที่ให้โอกาสในการเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท พร้อมทั้งคอยให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยหาวิธีการแก้ไขปัญหาอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยช่วยเหลือในด้านการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม อีกทั้งให้คำปรึกษาแนะนำ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร และอาจารย์แพทย์หญิงบุปผา พรธิสาร ที่กรุณารับเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ และได้สละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ทั้งได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนทำให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนสามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาชีวเคมี ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน และพี่ๆ น้องๆในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิกที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในด้านต่างๆจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำ ในการดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนสำเร็จการศึกษา ตลอดจนขอขอบใจเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณครอบครัว ที่ให้โอกาสทางการศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่ทรงคุณค่า พร้อมทั้งให้ความรักและคอยเป็นกำลังใจให้แก่ผู้เขียนเสมอมา อันเป็นแนวทางนำไปสู่ความสำเร็จของผู้เขียน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย…………………………………………………………………..	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ..………..	ฉ
สารบัญ...	ช
สารบัญตาราง………………………………………………………………………..	ฌ
สารบัญรูป…...……………………………………………………………………….	ญ
สารบัญแผนภาพ………………………………………………………………………..	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..	ฐ
บทที่ 1 บทนำ..	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..	3
ขอบเขตของการวิจัย………………………………………………………………..	3
ข้อตกลงเบื้องต้น…………………………………………………………………………	3
ข้อจำกัดของการวิจัย……………………………………………………………..	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย………………………………………………………….	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…………………………………………………………....	5
วิธีดำเนินการวิจัย…………………………………………………………………...	6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย…………………………………………………	6
กรอบแนวความคิด…………………………………………………………………	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……………………………………………..	8
โรคมะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma)……………………………………	8
ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งตับ………………………………………………	8
ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งตับตับ……………………………………………	8
การศึกษาความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับ……..	9
การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Precore………………………………………………..	10
การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Basic core promoter……………………………………..	11
การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *X* gene………………………………………………...	12

หน้า

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *Pre-S*………………………………………………….. 13
ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 และโอกาสเสี่ยงต่อเกิดมะเร็งตับ 15
ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังและโอกาสเสี่ยงต่อเกิดมะเร็งตับ……………………………………... 16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย……………………………………………………………… 18
รูปแบบการวิจัยและประชากรศึกษา……………………………………………... 18
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย……………………………………………………... 20
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย…………………………………………………………... 21
การเก็บตัวอย่าง…………………………………………………………………….. 23
การสกัดดีเอ็นเอ……………………………………………………………………. 23
การวิเคราะห์ HBV DNA และ การวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV genotyping)………………………………………………………………. 24
การวิเคราะห์ปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในซีรั่มตัวอย่าง (HBV viral load)………….. 25
การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV mutations)…………….... 26
การตรวจหาการกลายพันธุ์ยีนพี 53ชนิดอาร์249เอส โดยวิธี Restriction fragment length polymorphism…………………………………………………………. 27
การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล……………………………………………………... 28
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA analysis)………………………………….. 29
การเก็บรวบรวมข้อมูล……………………………………………………………. 30
การวิเคราะห์ข้อมูล………………………………………………………………. 30
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล…………………………………………………………. 31
ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัส(genotype)กับการเกิดมะเร็งตับ………………... 39
ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์หรือการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ในส่วน *Pre-S1/Pre-S2/S*…………………………………………………………….... 40
ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วน *EnhII/BCP/Precore*……………………….. 45
ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วน *p53 (R349S)* mutation……………........... 47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ…………………………….... 51
รายการอ้างอิง………………………………………………………………………….. 55
ภาคผนวก………………………………………………………………………………. 61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……………………………………………………………... 65

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่		หน้า
1	สรุปการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบต่างๆที่พบบ่อยและมีความสัมพันธ์ทางคลินิก………………………………………………………..	14
2	แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อทำการวัดปริมาณ HBV DNA ในซีรั่ม……………………………………………………….	25
3	เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม…………..	32
4	แสดงผลการตรวจสอบซีรั่มตัวอย่างด้วยวิธี PCR…………………………...	33
5	แสดงผลการจำแนก genotype ของกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับ……………………………………………………………….	39
6	แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/Sในตัวอย่างที่ทำการศึกษา……………………………………………………………………...	41
7	แสดงผลการตรวจสอบซีรั่มตัวอย่างด้วยวิธี PCR…………………………...	46
8	เปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วน EnhII/BCP/Pre-core ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ……………..	47
9	แสดงผลวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนพี53 ชนิด อาร์249เอส ในเลือดกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม…………………………………………………	49

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี…………………………..	10
2	แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S…………………………………………………...............	32
3	ตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST………	34
4	ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST…………………...	35
5	ตัวอย่างผลการตรวจสอบ genotype โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank)……………….	36
6.	แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษา………...	38
7	ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST…………………...	40
8	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S1 ของตัวอย่าง LM 244_S จาก Chromatogram……………………………………………………………….	42
9	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 ของตัวอย่าง LM259_S จาก Chromatogram……………………………………………………………….	43
10	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ S ของตัวอย่าง HB38_S จาก Chromatogram……………………………………………………………….	43
11	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S1 ของตัวอย่าง LM159_S จาก Chromatogram………………………………………………………......	44
12	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 ของตัวอย่าง LM186_S จาก Chromatogram……………………………………………………………….	44
13	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ S ของตัวอย่าง HB99_S จาก Chromatogram……………………………………………………………….	45
14	แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ EnhII/BCP/Pre-core………………………………………………	46

รูปที่		หน้า
15	แสดงผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส ด้วยวิธี RFLP……………....	48
16	ตัวอย่างผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส จากตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ได้ผลเป็น wild type คือโคดอน 249 เป็น AGG…………………………………………	48
17	ตัวอย่างผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส จากตัวอย่างที่ทำ RFLP ได้ว่ามีการกลายพันธุ์ (ตัวอย่างหมายเลข 2) ได้ผลเป็น mutant คือมีโคดอน 249 เป็น AGT คือมีการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส……………………………………………….	49

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ หน้า

1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย.. 7

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
µl	Microliter
ml	Mililiter
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
PCR	Polymerase Chain Reaction
P53	*P53* Tomor suppressor gene
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFB1	Aflatoxin B1
ALT	Alanine aminotransferase
NCBI	The National Center for Biotechnology Informaion
P-value (*P)*	Probability Value
95%Cl	95% Confidence interval

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งตับหรือมะเร็งของเซลล์ตับชนิด Hepatocellular carcinoma เป็นโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับที่ 5 ของโลก และจัดอยู่ในอันดับที่ 4 ของโรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลก ซึ่งคาดว่าในแต่ละปีอาจพบจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งตับรายใหม่มากกว่า 500,000 คนต่อปี โดยคิดเป็นร้อยละ 4 ของจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ทั้งหมด โดยผู้ป่วยมะเร็งตับมากกว่าร้อยละ 80 อยู่ในประเทศกำลังพัฒนา พบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (South-east Asia) และภูมิภาคที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา แอฟริกา (sub-Sahara Africa) [1] รวมทั้งในประเทศไทย โรคมะเร็งตับมีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับหนึ่งในเพศชาย พบประมาณ 33:100,000 คนต่อปี และอันดับที่ 3 ในเพศหญิง พบประมาณ 13:100,000 คนต่อปี [2][3] มะเร็งตับเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากมีการดำเนินโรคที่รวดเร็ว ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตภายในระยะเวลาหนึ่งปีภายหลังจากการวินิจฉัยของแพทย์ ผู้ป่วยมะเร็งตับมากกว่าร้อยละ 60 มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคมะเร็งตับพบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis B virus infection) และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis C virus infection) และการได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 (aflatoxin B1) ซึ่งปนเปื้อนในอาหาร หรือเกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น การดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ(Alcoholism) และโรคเบาหวาน (diabetes) [3],[4],[5]),[6] โดยมีงานวิจัยที่สนับสนุนการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประเทศไทย เช่น การศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุม (case-control study) ในประชากรไทยที่ศูนย์วิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทย์ศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับสูงกว่าผู้ที่ไม่มีเชื้อไวรัสประมาณ 20 เท่า และผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรังมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับสูงกว่าผู้ที่ไม่มีเชื้อไวรัสประมาณ 8 เท่า [7] และการศึกษาของ Kuang SY et al.[8] พบว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคมะเร็งตับในกลุ่มประชากรภาคเหนือของไทย นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (viral factors) เช่น การกลายพันธุ์ของไวรัสในบริเวณ *pre-S* gene, Basal core promoter, enhancer II และ X region มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าในภูมิภาคที่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังสูงมักพบการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินอยู่ในอาหารปริมาณมากและพบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับสูงด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา เช่น ประเทศไต้หวัน ,ประเทศแกมเบีย,ประเทศกินี และบางมณฑลของประเทศจีน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสตับอักเสบบีและสารอะฟลาทอกซิน ทั้งสองปัจจัยช่วยเพิ่มโอกาสเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับอย่างมาก [9],[10],[11] สารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) มักพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร สารอะฟลาทอกซินชนิดบี1(aflatoxin B1) เป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา Aspergillus flavus. เมื่อเข้าสู่ร่างกายสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 จะเปลี่ยนเป็น 8,9-epoxide ซึ่งเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบจำเพาะต่อยีนพี 53 (p53 mutation) ในตำแหน่ง codon ที่ 249 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เบสตำแหน่งที่ 3 โดยเบสกวานีน (guanine;G) ถูกแทนที่ด้วยเบสไทมีน (thymine; T) ซึ่งอยู่ใน axon ที่ 7 ของยีน เป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีน (arginine,R) เป็นเซอรีน (serine,S) ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์ 249 เอส เป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนาที่มีระดับการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินสูงในอาหาร [12] ส่วนประเทศที่พัฒนาแล้ว พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารน้อยกว่า จึงพบอัตราการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์ 249 เอส น้อยกว่าประเทศกำลังพัฒนา[13]แม้ว่าประเทศไทยพบการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินอยู่ในระดับปานกลาง แต่เชื่อว่าผลที่เกิดจากการได้รับสารอะฟลาทอกซินจะพบได้เช่นเดียวกันกับประเทศที่มีการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินสูง ประกอบกับประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจำนวนมาก ซึ่งทั้งสองเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญส่งเสริมการเกิดมะเร็งตับ ฉะนั้นสารอะฟลาทอกซินจึงอาจมีบทบาทต่อการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศไทยร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ในอดีตมีหลายการศึกษาที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของทั้งสองปัจจัยนี้ ซึ่งผลของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส นั้นยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน แต่ผู้เชี่ยวชาญหลายท่านเชื่อว่าไวรัสตับอักเสบบีอาจทำให้การกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249 เอส เกิดได้ง่ายขึ้น แต่ข้อมูลยังไม่เพียงพอ มีการศึกษาที่รวบรวมข้อมูลการศึกษาที่ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส จำนวน 48 การศึกษา (meta-analysis) พบว่ายังไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะสรุปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอส ซึ่งการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวทำได้ยากเพราะผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในการศึกษาเหล่านั้นมีน้อยมาก อีกทั้งไม่มีการระบุผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับ

อักเสบบีแฝง (occult HBV infection) และไม่มีรายละเอียดข้อมูลความเสี่ยงอื่นๆของการเกิดมะเร็งตับมากเพียงพอ [14]

ในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอส ในเลือดและการเกิดโรคมะเร็งตับในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทย รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆของไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค RFLP (Restriction Fragement Length Polymorphism) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ ซึ่งผู้วิจัยเชื่อว่างานวิจัยนี้ช่วยทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการได้รับสารอะฟลาทอกซินกับการเกิดมะเร็งตับ สามารถใช้เป็นแนวทางป้องกันการเกิดโรคมะเร็งตับและลดจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งตับในประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249 เอสในเลือดของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังกับการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทย โดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส และปัจจัยต่างๆของไวรัสตับอักเสบบี เช่น ปริมาณไวรัส, สายพันธุ์, การกลายพันธุ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทย โดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ

ขอบเขตของการวิจัย

1. กลุ่มที่ทำการศึกษา (case) คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. กลุ่มควบคุม (control) คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและไม่เป็นมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 2 กลุ่ม ได้แก่
   1.1 กลุ่มที่ทำการศึกษา (case) คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
   1.2 กลุ่มควบคุม (control) คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและไม่เป็นมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับใช้การวินิจฉัยทางรังสีวิทยาและ/หรือใช้การวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยาโดยการตรวจชิ้นเนื้อจากเนื้องอกที่ตับ (liver biopsy) ตามหลักเกณฑ์สมาคมโรคตับของอเมริกา (American Association for the Study of Liver Diseases ; AASLD) [50]
3. การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอสในเลือด อนุมานว่าเกิดจากชิ้นเนื้อของมะเร็งตับเกิดการแตกของเซลล์ทำให้มี circulating free DNA ออกมาในกระแสเลือดและทำให้สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยได้ ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิด อาร์249เอส อนุมานว่าเกิดจากการได้รับสารอะฟลาทอกซิน
4. การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ใช้การตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ในตับ คือ AST และ ALT เพื่อประเมินการทำงานของตับ และการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี คือ HBsAg, HBeAg และยืนยันการวินิจฉัยโดยการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส (HBV DNA) ในเลือด

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. การศึกษานี้ไม่ได้วัดปริมาณโปรตีน (aflatoxin–albumin adduct) หรือปริมาณสารเมตาบอไลท์ของอะฟลาทอกซินในปัสสาวะ ซึ่งเป็นการบอกการได้รับสารอะฟลาทอกซินในช่วงหลายเดือนก่อนการตรวจ แต่การตรวจดังกล่าวไม่สามารถบอกการได้รับสารอะฟลาทอกซินในระยะยาวได้ ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส เป็นผลสุดท้ายของสารอะฟลาทอกซิน โดยการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอส มีความจำเพาะต่อการบ่งชี้การได้รับสารอะฟลาทอกซิน

2. การศึกษานี้ไม่ได้เก็บข้อมูลเกี่ยวกับที่อยู่อาศัย,อาชีพและการดำเนินชีวิตของผู้เข้าร่วมวิจัยซึ่งอาจมีผลต่อการได้รับสารอะฟลาทอกซินในแต่ละบุคคล
3. การพบกลายพันธุ์ดังกล่าวในทั้ง 2 กลุ่มก็บอกได้เพียง association แต่ไม่สามารถสรุป causative effect ของการเกิดโรคมะเร็งตับ

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Hepatocellular carcinoma หมายถึง มะเร็งตับปฐมภูมิ ซึ่งเป็นมะเร็งของเซลล์ตับชนิด Hepatocellular carcinoma

2. การกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส หมายถึง การกลายพันธุ์แบบจำเพาะต่อยีนพี53 (p53 tumor suppressor gene) ในตำแหน่ง codon ที่ 249 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เบสตำแหน่งที่ 3 โดยเบสกวานีน (guanine;G) ถูกแทนที่ด้วยเบสไทมีน (thymine; T) ซึ่งอยู่ใน axon ที่ 7 ของยีน เป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีน (arginine,R) เป็นเซอรีน (serine,S)

3. ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หมายถึง ผู้ที่ตรวจพบแอนติเจนชนิดผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg)

4. Genotype หมายถึง การแบ่งกลุ่มของไวรัสตับอักเสบบี โดยวิธีการตรวจสอบจากรหัสพันธุกรรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอสกับโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับ ซึ่งสามารถนำความรู้ ความเข้าใจความสัมพันธ์นี้ไปประยุกต์ใช้ในการประมาณถึงผลเสียของการได้รับสารอะฟลาทอกซินกับโอกาสเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับกับการกลายพันธุ์ชนิด อาร์249เอส ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยพิจารณารวมถึงปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวกับเชื้อไวรัส อาจนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งตับ นอกจากนี้หากการกลายพันธุ์ชนิด อาร์249เอส ในเลือดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับ ในอนาคตอาจนำการกลายพันธุ์ชนิด อาร์249เอส ในเลือดมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) มะเร็งตับในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งตับได้

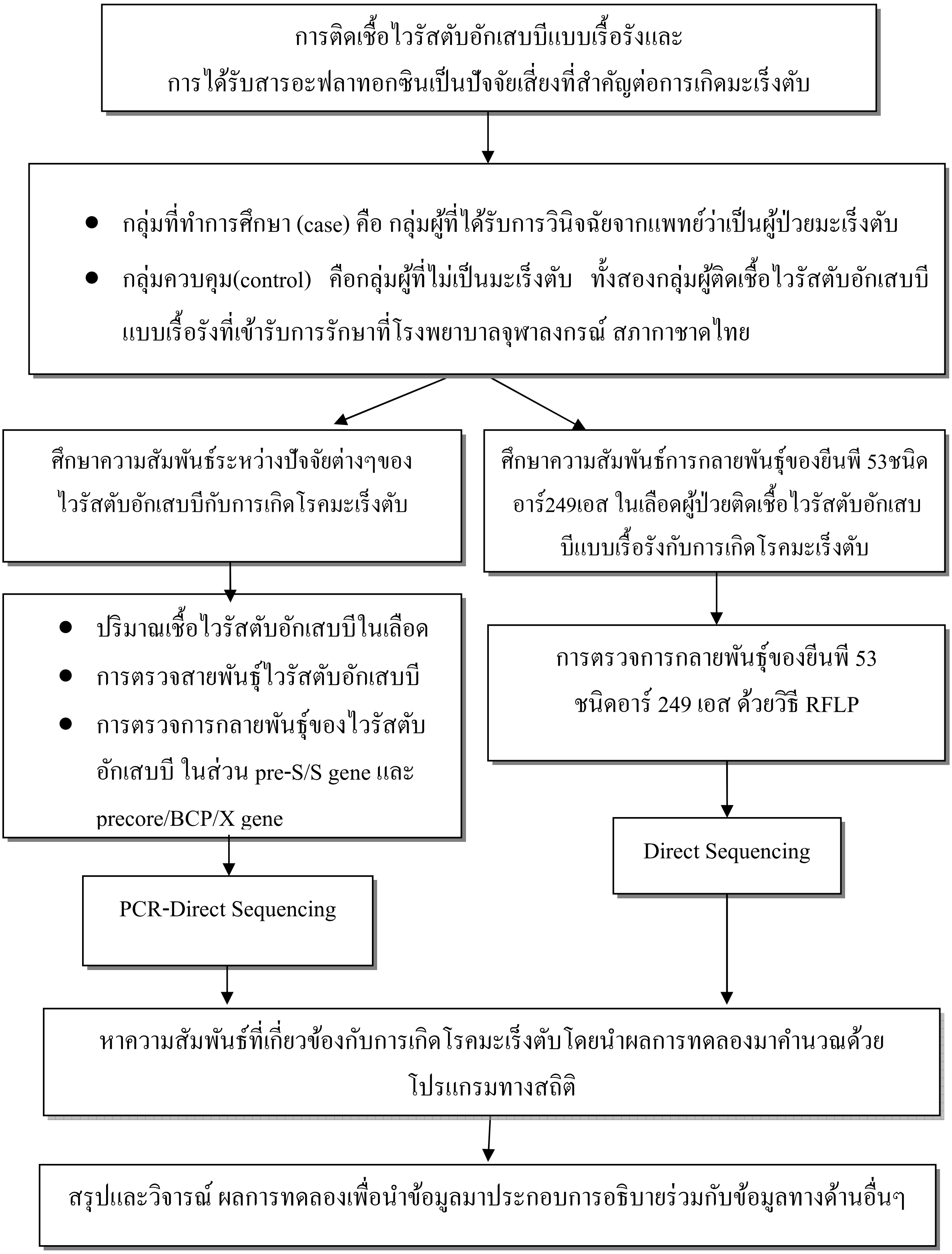
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 15 มิลลิลิตร ด้วยการเจาะเลือดโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ใส่ในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Clot blood)
2. การปั่นเลือดและแยกเก็บซีรั่ม แล้วทำการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbentm Assay) เพื่อหาแอนติเจนต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วม
3. การสกัด DNA จากซีรั่มในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม โดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction
4. การวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV genotyping)
5. การวิเคราะห์ปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในซีรั่มตัวอย่าง (HBV viral load)
6. การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV mutations)
7. การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส ด้วยเทคนิค RFLP
8. การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ผล

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาชีวเคมีทางการแพทย์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ดำเนินการวิจัย รวบรวมข้อมูล สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย
4. นำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ต่อสาธารณะชนและยื่นเสนอวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตรวท.ม.(สาขาชีวเคมีทางการแพทย์) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวความคิดวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคมะเร็งเซลล์ตับ เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญและเป็นสาเหตุของการป่วยและการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก เป็นมะเร็งชนิดที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงมากในหลายๆประเทศ โรคมะเร็งเซลล์ตับจัดอยู่ในอันดับที่ 5 ของโรคมะเร็งที่พบบ่อยในผู้ชายและเป็นอันดับที่ 8 ของโรคมะเร็งที่พบบ่อยในผู้หญิง โดยพบผู้ป่วยมะเร็งตับรายใหม่ประมาณ 560,000 คนต่อปี ผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 80 อยู่ในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และภูมิภาคที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา ประเทศแอฟริกา [1] ในประเทศไทยโรคมะเร็งตับมีอุบัติการณ์เกิดโรคสูงเป็นอันดับหนึ่งในผู้ชาย พบประมาณ 33:100,000 คนต่อปี และอันดับที่ 3 ในผู้หญิง พบประมาณ 13:100,000 คนต่อปี [2],[3] กระบวนการการเกิดโรคมะเร็งตับนั้นมีหลายขั้นตอน เช่นเดียวกับโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมมากมาย สุดท้ายนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับและพัฒนาเป็นมะเร็งของเซลล์ตับในที่สุด [15] เนื่องจากมะเร็งตับมีการดำเนินโรคที่รวดเร็ว ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักตรวจพบว่าเป็นมะเร็งตับในระยะท้าย ทำให้ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตภายในระยะเวลาหนึ่งปีภายหลังการวินิจฉัยของแพทย์

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

ผู้ป่วยโรคตับ (liver disease) ส่วนใหญ่จะเกิดตับแข็ง (cirrhosis) ซึ่งเกิดจากตับอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis) จนเกิดภาวะตับแข็ง ภายในระยะเวลาประมาณ 15-40 ปี และผู้ป่วยโรคมะเร็งตับประมาณร้อยละ 70-90 พัฒนามาจากผู้ที่เป็นตับแข็ง แต่มีเพียงร้อยละ 10 ของผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่เกิดตับแข็งมาก่อน กลไกการเกิดมะเร็งตับอาจใช้เวลามากกว่า 10 ปี เกิดการสะสมสารพันธุกรรมต่างๆที่เปลี่ยนแปลงจนนำไปสู่การเกิดมะเร็งตับ ดังนั้นเมื่อตับเกิดความเสียหายแบบเรื้อรัง เกิดการทำลายเซลล์ตับอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน มีการทำลาย DNA และเกิดการอักเสบของตับ ส่งผลให้เกิด dysplastic และการเกิด nodule ขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของ neoplastic [16]

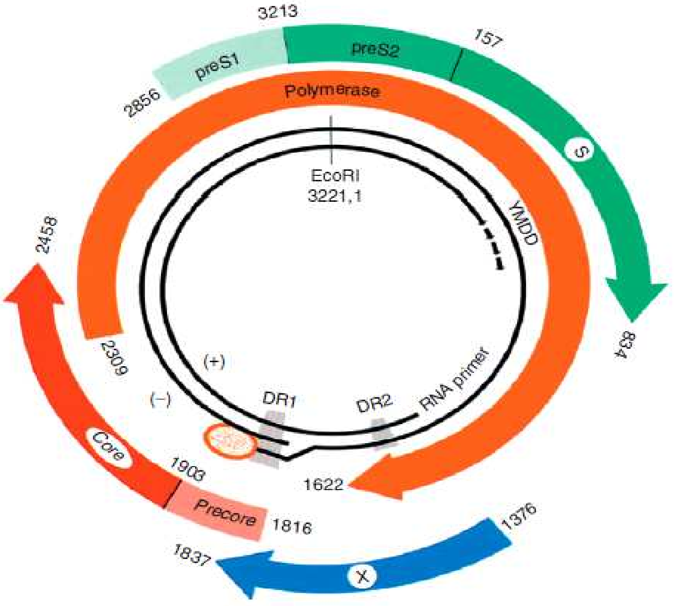
ปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคมะเร็งตับเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง และการได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ซึ่ง

ปนเปื้อนในอาหาร [3],[4] หรือสาเหตุอื่นๆ เช่น ผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำและโรคเบาหวาน [5],[6] ,ผู้ที่มีภาวะ hereditary hemochromatosis [17] เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและโอกาสเสี่ยงต่อเกิดมะเร็งตับ

ไวรัสตับอักเสบบี จำแนกอยู่ในตระกูล (family) *Hepadnaviridae* เป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุการอักเสบของตับ เป็นเชื้อไวรัสที่มีโปรตีน enveloped protein ห่อหุ้มอยู่ภายนอกและมีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ ขนาดจีโนมประมาณ 3200 คู่เบส เชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถจำแนกเป็น 8 จีโนไทป์ เรียงตามลำดับตัวอักษร A ถึง H ปัจจุบันค้นพบเพิ่มอีกสองจีโนไทป์ คือ จีโนไทป์ I และ จีโนไทป์ J [18] สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี ทั้ง 8 จีโนไทป์ พบอยู่ในภูมิภาคต่างๆของโลกและพบในเชื้อชาติที่แตกต่างกันด้วย เช่น จีโนไทป์ C และ B พบมากในเอเชีย ขณะที่ จีโนไทป์ A และ D พบในยุโรป,อเมริกาและแอฟริกากลาง หลักเกณฑ์ในการจำแนกจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีอาศัยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 8 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี [19],[20] จีโนมประกอบด้วย open reading frame (ORF) ซึ่งซ้อนทับกันอยู่ (overlapping ORF) 4 open reading frame ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนต่างๆ ดังนี้ *pre-S/S* gene เป็นบริเวณที่มีบทบาทในการสร้าง envelope proteins, *pre-C/C* gene ยีนบริเวณนี้ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้าง Hepatitis B e antigen (HBeAg) และ core protein หรือ Hepatitis B core antigen (HBcAg), *P* gene ยีนบริเวณนี้ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้างเอนไซม์ DNA polymerase และ reverse transcriptase, *X* gene ยีนบริเวณนี้ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ transcriptional trans-activator เรียกว่า x โปรตีน (HBx) ซึ่งมีความสำคัญในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ และยังมีบทบาทในกระบวนการ transcription ของเชื้อไวรัส นอกจากนี้เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคมะเร็งตับภายหลังจากที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [21]



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี [22]

เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีมีลักษณะเป็น asymmetric อาศัยขั้นตอน reverse transcription ได้เป็น RNA ซึ่งทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสร้าง DNA ต่อไป ด้วยเหตุนี้ทำให้ไวรัสตับอักเสบบีมีแนวโน้มการกลายพันธุ์มากกว่า DNA ไวรัสชนิดอื่นๆ โดยพบอัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1x 10^{-5} ถึง 3x10^{-5} /ตำแหน่ง/ปี ลักษณะของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอาจถูกคัดเลือกในคงอยู่แทนไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่มีการกลายพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการอยู่รอดของเชื้อไวรัส และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและการกลายพันธุ์ของไวรัส มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับ [6],[23]

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Precore (Precore mutations)

การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด คือ การเปลี่ยนแปลงเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1896 ของโคดอนที่ 28 โดยเบสกวานีน (Guanine,G) เปลี่ยนเป็นอะดินีน (Adenine, A) (G1896A) การกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในส่วนของ precore gene ทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีน precore ได้ ซึ่งเป็นโปรตีนเริ่มต้น (precursor) ของ HBeAg แต่เนื่องจากส่วนของ precore ไม่จำเป็นต่อขบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการกลายพันธุ์แบบ G1896A เกิดขึ้นในส่วน upstream ของบริเวณ core ดังนั้นจึงไม่ส่งผลต่อขบวนการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสและ HBcAg โดยการกลายพันธุ์แบบนี้มักพบในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ที่ไม่พบ HBeAg หรืออาจพบได้บ้างในผู้ป่วยภาวะตับวาย

อย่างเฉียบพลัน (fulminant hepatitis)[24] ความชุกของการกลายพันธุ์แบบ G1896A แตกต่างกันตามภูมิภาคของโลก การศึกษาที่ศูนย์วิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบอัตราความชุกของการกลายพันธุ์แบบ G1896A ในประชากรไทยประมาณร้อยละ 25-35 [25] การกลายพันธุ์แบบอื่นๆในบริเวณ precore ของไวรัสตับอักเสบบีที่ทำให้ไม่มีการสร้าง HBeAg ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงเบสกวานีน (Guanine,G) เป็นอะดินีน (Adenine, A) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1898(G1898A) และ 1989 (G1989A) หรือการเปลี่ยนแปลงเบสไซโตซีน (Cytosine,C) เป็นเบสไทมีน (Thymine,T) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1856 ของโคดอนที่ 15 (C1856T) และการเปลี่ยนจากเบสอะดินีน (Adenine, A) เป็นไซโตซีน (Cytosine,C) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1814 (A1814C) ซึ่งเป็น start codon [26]

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Basic core promoter (BCP mutations)

การกลายพันธุ์ในบริเวณ core promoter นี้ส่งผลต่อการควบคุมและการแสดงออกของ HBeAg และ core protein การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยมักเกิดการกลายพันธุ์แบบที่เรียกว่า double mutation คือ A1762T/G1764A ซึ่งทำให้การแสดงออกของ HBeAg ลดลงร่วมกับกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสด้วย [27] โดยที่การกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A คือ การเปลี่ยนแปลงเบส 2 ตำแหน่งพร้อมกัน ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 และ 1764 โดยมีการเปลี่ยนแปลงจากเบสอะดินีน (Adenine, A) เป็นไทมีน (Thymine,T) ร่วมกับการเปลี่ยนจากเบสกวานีน (Guanine,G) เป็นอะดินีน (Adenine, A) ตามลำดับ ข้อมูลส่วนใหญ่บ่งชี้ว่าการกลายพันธุ์แบบนี้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของตับอักเสบแบบเรื้อรังโดยเฉพาะการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ การกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่นๆที่พบได้บ่อย ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงเบสจากเบสไทมีน (Thymine,T) เป็นไซโตซีน (Cytosine,C) หรือกวานีน (Guanine,G) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1753 (T1753C/G) ซึ่งมักพบร่วมกับ A1762T และ G1764A การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใกล้กันในส่วนของ EnhII คือ การเปลี่ยนแปลงจากเบสไซโตซีน(Cytosine,C) เป็นไทมีน (Thymine,T) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1653 (C1653T) จากการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมในประชากรไทยเปรียบเทียบความชุกการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีแบบต่างๆด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (direct sequencing) ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ในส่วน EnhII/BCP/precore ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1287-2038 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นมะเร็งตับ จำนวนกลุ่มละ 60 คน การศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A, T1753C/G และ G1899A พบได้บ่อยในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการกลายพันธุ์แบบ C1653T พบได้บ่อยกว่า

ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เละเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่อไปพบว่า การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีแบบ A1762T/G1764A และ G1899A มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรที่ศึกษา [28]

การกลายพันธุ์ของยีน *X* (*X* gene mutations)

โปรตีน X สร้างจาก *X* gene โดยที่โปรตีน X ทำหน้าที่เป็น transcriptional activator และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีและเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ นอกจากนี้มีหลายการศึกษาที่ศึกษาบทบาทของโปรตีน X ในคน ซึ่งพบการกลายพันธุ์ของ *X* gene เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ [29],[30] เนื่องจาก *X* gene มีส่วนซ้อนทับกับ core promoter ดังนั้นเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีนในส่วน core promoter จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของโปรตีน X ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 130-132 ดังต่อไปนี้ กรดอะมิโนไลซีน (lysine,K) เปลี่ยนเป็นเมไธโอนีน (methionine, M), กรดอะมิโนวาลีน (valine,V) เปลี่ยนเป็นไอโซลิวซีน (isoleucine, I) และกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) เปลี่ยนเป็นไทโรซีน (thyrosine) ส่งผลให้ลดการทำหน้าที่ของโปรตีน x ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโต [31] เช่น การกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP double mutations แบบ A1762T/G1764A ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน X จากไลซีน (lysine,K) เป็นเมไธโอนีน (methionine, M) ที่ตำแหน่ง 130 (K130M) และเปลี่ยนจากเวลีน (valine,V) เป็นไอโซลิวซีน (isoleucine, I) ที่ตำแหน่ง 131 (V131I), การกลายพันธุ์แบบอื่นๆในส่วน core promoter เช่น T1753C/G และ C1653T ทำให้เกิดการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน X เป็น I127N/S/T และ H94Y ตามลำดับ [32]

จากการศึกษาในประเทศไทยพบการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน X ในบางตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP (Basic core promoter) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย โดยการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมในประชากรไทยเพื่อเปรียบเทียบความชุกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ *X* gene ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ จำนวนกลุ่มละ 60 คน วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR และ การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าการกลายพันธุ์แบบ K130M, V131I และ I127T/N พบบ่อยในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน H94Y พบบ่อยในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับเช่นกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ [28]

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Pre-S (Pre-S mutations)

Pre-S gene ของไวรัสตับอักเสบบี ประกอบด้วย pre-S1 และ pre-S2 ซึ่งเป็นส่วนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunogenicity) ในบริเวณนี้มักเกิดการกลายพันธุ์แบบ deletion ซึ่งความชุกของการกลายพันธุ์นั้นแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค โดยจำนวนประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง Pre-S คิดเป็นร้อยละ 10.5 ของจำนวนผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั้งหมด [33] และพบว่าการกลายพันธุ์ในส่วน *pre-S* gene ช่วยสนับสนุนกระบวนการเกิดมะเร็งตับ ผ่านกลไกต่างๆ ซึ่งในอดีตเคยมีรายงานว่าการกลายพันธุ์ของ pre-S1 และ pre-S2 ทำให้เกิดการสร้างและสะสมโปรตีนชนิด large hepatitis B surface (LHBs) ในเอ็นโดพลาสมิคเรติคูลั่ม (Endoplasmic reticulum, ER) ทำให้เกิดความเครียดต่อเอ็นโดพลาสมิคเรติคูลั่ม ซึ่งอาจส่งผลทำให้ DNA เกิดความเสียหายและเกิดภาวะขาดความเสถียรของจีโนม (genomic instability) อาจนำไปสู่กระบวนการเกิดมะเร็งตับได้ในที่สุด [34] การกลายพันธุ์ที่บริเวณ pre-S เหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งวัฏจักรเซลล์ คือ cyclin-dependent kinase inhibitor ส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ได้ [35] นอกจากนี้การกลายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบบีในส่วน pre-S พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ที่เป็นยีนต้านมะเร็ง [34] โดยมีหลายการศึกษารายงานว่าการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วน pre-S โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกลายพันธุ์แบบ deletion มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ [36] ,[37] เช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศไทย เป็นการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S ด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างเลือดจำนวน 147 ตัวอย่างที่รวบรวมจากกลุ่มประชากรทั่วไปใน 4 ภาคของประเทศเมื่อปีพ.ศ. 2547 ประกอบด้วยจังหวัดเชียงราย, ชลบุรี,นครศรีธรรมราชและอุดรธานี พบว่ามีการกลายพันธุ์แบบ pre-S2 deletion จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 41 รองลงมา คือการกลายพันธุ์แบบ pre-S2 start codon mutation คิดเป็นร้อยละ 2.9 , การกลายพันธุ์แบบ pre-S2 deletion และ pre-S2 start codon mutation ร่วมกัน คิดเป็นร้อยละ 2 และการกลายพันธุ์แบบ pre-S1 deletion คิดเป็นร้อยละ 0.7 [38] ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของประเทศญี่ปุ่นและประเทศเกาหลีที่พบว่าการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S2 deletion และ pre-S2 start codon mutation เป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด [33],[36]

มีหลายการศึกษาที่รายงานการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S โดยเฉพาะ pre-S1 deletion หรือ pre-S2 deletion สามารถพบได้บ่อยประมาณร้อยละ 60 ตรวจพบได้ทั้งในเลือดและเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับและการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S มีส่วนสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ [39] เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบีเป็นเชื้อไวรัสชนิด DNA ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ระดับยีนค่อนข้างสูง ทั้งที่เกิดเองตามธรรมชาติหรือเป็นผลจากการได้รับวัคซีนหรือยาต้านไวรัส แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบต่างๆที่พบบ่อยและมีความสัมพันธ์ทางคลินิก [40]

จีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบี ที่เกิดการกลายพันธุ์	**ชนิดของการกลายพันธุ์**	**ความสัมพันธ์ทางคลินิก**
Pre- core	G1896A	การกลายพันธุ์ทำให้การสร้าง HBeAg ผิดปกติ ตรวจไม่พบ HBeAg
Basal core promoter (BCP) and enhancer II region	C1653T A1753T A1762T/G1764A	การดำเนินโรคที่รวดเร็ว การดำเนินโรคที่รวดเร็ว การกลายพันธุ์ทำให้ตรวจไม่พบ HBeAg การดำเนินโรคตับอักเสบที่รุนแรง และการเกิดมะเร็งตับ
X	K130M/V131I	การเกิดมะเร็งตับ
Pre-S	Deletions	การเกิดมะเร็งตับ
S	“a” determinant	การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับวัคซีน
Polymerase	In domains B,C and D	การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านไวรัส

การกลายพันธุ์ระดับยีนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่พบบ่อยและมีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ การกลายพันธุ์ในบริเวณของ precore และ basic core promoter (BCP) mutation โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิดมะเร็งตับมีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ในบริเวณ pre-S และ EnhII /BCP /Precore ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณ preS และ EnhII/BCP/Precore มากกว่าจีโนไทป์ B โดยรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบคือA2962G , pre-S2 start codon mutation, T105C, T1753V, และA1762T/G1764A แต่พบการกลายพันธุ์แบบ A2962G และ T105C เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ [41] เมื่อไม่นานนี้มีการศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสในบริเวณ *Enhancer II/core promoter/precore* and *X* gene ของไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับใน

ประเทศไทย พบว่าการกลายพันธุ์ในบริเวณ basal core promoter แบบ A1762T/G1764A เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ [28] ผลจากการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศจีน,ไต้หวันและเกาหลี ซึ่งสามารถพบการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A ประมาณ 3-4 เท่าในผู้ป่วยมะเร็งตับ นอกจากนี้การกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ C มากกว่า จีโนไทป์ B และพบการกลายพันธุ์แบบ G1899A เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประเทศไทยเช่นกัน

ดังนั้นความแตกต่างของสายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในรูปแบบของการแทนที่นิวคลีโอไทด์เบสที่แตกต่างกัน มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดโรคมะเร็งตับ (hepatocarcinogenesis)

ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 และโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ

สารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus flavus.* เมื่อเข้าสู่ร่างกายสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ถูกออกซิไดส์โดยไซโตโครม P450 (CYP450) ที่ตับ โดยเปลี่ยนอยู่ในรูป AFB1-exo-8,9 epoxide ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลท์ของอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 ที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic) การศึกษาระบาดวิทยาพบประเทศจีนและประเทศแอฟริกาใต้ เป็นภูมิภาคที่มีความชุกของมะเร็งตับสูงและอาหารมีการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 สูงที่สุด ซึ่งเมตาบอไลท์ของสารอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบจำเพาะต่อยีนพี 53 ในตำแหน่งเบสที่ 3 ของ codon ที่ 249 เปลี่ยนแปลงเบสกวานีน (guanine;G) เป็นไทมีน (thymine; T) ซึ่งอยู่ในแอกซอนที่ 7 ของยีนเป็นผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีน (arginine,R) เป็นเซอรีน (serine,S) ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส เป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ที่พบได้บ่อยที่สุด [42] จากการศึกษาและเก็บข้อมูลของ IARC [43] พบการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส เกิดขึ้นมากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ในผู้ป่วยมะเร็งตับจากภูมิภาคที่ได้รับสารอะฟลาทอกซินในระดับสูง เช่น มณฑล Qidong ในประเทศจีนและหลายๆพื้นที่ในประเทศแอฟริกา ส่วนประเทศไต้หวันและฮ่องกงที่มีการได้รับสารอะฟลาทอกซินในระดับปานกลางพบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวลดลงคิดเป็นร้อยละ 30-40 และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับจากภูมิภาคที่พบว่ามีการได้รับสารอะฟลาทอกซินในระดับต่ำ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศญี่ปุ่น พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอส น้อยกว่าร้อยละ 6 อย่างไรก็ตามมีรายงานการได้รับสารอะฟลาทอกซินปริมาณมากๆแบบฉับพลันนั้นเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้เนื่องจากพิษของอะฟลาทอกซินมีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ตับ ส่วนการได้รับสารอะฟลาทอกซินปริมาณต่ำ แต่ได้รับเป็นระยะเวลานานนั้นพบว่าไม่เป็น

สาเหตุของการเสียชีวิต แต่ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอย่างมาก โดยการได้รับสารอะฟลาทอกซินปริมาณมากแบบฉับพลัน นั่นคือ การได้รับสารอะฟลาทอกซินปริมาณ 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งพบได้ไม่บ่อย [44] ในทางตรงข้าม ร้อยละ 90 ของกลุ่มที่พบว่ามีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งตับนั้นได้รับปริมาณสารอะฟลาทอกซินเพียง 0.01-0.3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม/วันและได้รับเป็นระยะเวลานาน [45],[44]

จากข้อมูลของการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภูมิภาคที่มีอุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งตับสูงและมีการระบาดของไวรัสตับอักเสบบี มักจะสัมพันธ์กับการได้รับสารอะฟลาทอกซิน เช่นเดียวกับประเทศไทยที่พบผู้ป่วยมะเร็งตับและผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำนวนมาก ถึงแม้ว่าประเทศไทยมีปริมาณการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินอยู่ในระดับปานกลาง แต่เชื่อว่าสารอะฟลาทอกซินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ได้เช่นเดียวกับภูมิภาคที่มีการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินสูง

ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าในกลุ่มประชากรที่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังสูงจะพบความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับสารอะฟลาทอกซินในปริมาณสูงและความชุกของโรคมะเร็งตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา เช่น ไต้หวัน,แกมเบีย,กินี และบางมณฑลของประเทศจีน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและสารอะฟลาทอกซิน ทั้งสองปัจจัยช่วยเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอย่างมาก [9],[10],[11] ส่งผลให้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของทั้งสองปัจจัยมากขึ้น โดยที่การตรวจพบการกลายพันธุ์แบบ R249S ใช้เป็นตัวบ่งชี้การได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 โดยศึกษาถึงผลกระทบระหว่างสารพิษจากเชื้อราและไวรัสตับอักเสบบี ผลจากการศึกษาดังกล่าวพบว่ายังไม่มีความชัดเจน จากการศึกษาในประเทศไต้หวัน พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดอาร์ 249 เอสจะเป็นผู้ที่ตรวจพบ HBsAg นั่นคือเป็นผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วย โดยมีค่าอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ประมาณ (Odds ratio) ต่อการเกิดมะเร็งตับ เท่ากับ 10 [9] ผลการศึกษาคล้ายกับการศึกษาในมณฑล Qidong ประเทศจีน โดยการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส ตรวจพบในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [10] ประเทศที่มีอัตราการเกิดมะเร็งตับสูงและมีการระบาดของไวรัสตับอักเสบบีมักจะสัมพันธ์กับการได้รับสารอะฟลาทอกซิน ทำให้ประชากรที่ได้รับปัจจัยเสี่ยงทั้งสองร่วมกันมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับเพิ่มสูงขึ้นเป็นเท่าตัว [46] การได้รับสารอะฟลาทอกซินในพื้นที่ Sub-saharan Africa และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งทั้งสองภูมิภาคมีการปนเปื้อนสารอะฟลาทอก

ซินมากและสัมพันธ์กับการเพิ่มโอกาสเกิดมะเร็งตับ โดยเฉพาะผู้ที่ได้รับสารอะฟลาทอกซินและติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมด้วย [47]

อย่างไรก็ตามแม้จะพบว่ามีการศึกษาในลักษณะที่คล้ายกันในอดีต [11],[48],[49] ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองสามารถเพิ่มโอกาสเสี่ยงการเกิดมะเร็งตับนั้นยังไม่ชัดเจนและพบข้อมูลค่อนข้างน้อยที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและสารอะฟลาทอกซินในการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส เนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อยเพราะผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในการศึกษาเหล่านั้นมีน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ที่แท้จริงได้ รวมทั้งการศึกษาของการกลายพันธุ์ชนิดอาร์ 249 เอส ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มี HBsAg และผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่พบ HBsAg จะแปลผลได้ยากเพราะการเกิดมะเร็งตับเกิดจากหลายปัจจัยและปัจจัยต่างๆก็มีปฏิสัมพันธ์กัน กล่าวคือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอาจทำให้การกลายพันธุ์ชนิดอาร์ 249 เอส เกิดง่ายขึ้น หรือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอยู่แล้วมีโอกาสเกิดมะเร็งตับสูง ขณะที่ผู้ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่มีกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์ 249 เอส ก็สรุปผลไม่ได้เนื่องจากยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่นๆที่ร่วมส่งเสริมการเกิดมะเร็งตับ ซึ่งไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ทั้งหมด นอกจากนี้พบข้อจำกัดในเรื่องปริมาณการได้รับสารอะฟลาทอกซินในประชากรที่ทำการศึกษา ,การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ในผู้ป่วยแต่ละคน หรือ วิธีที่ใช้วิเคราะห์อาจไม่มีความไวและความจำเพาะเพียงพอ รวมทั้งการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ในเลือดยังขึ้นอยู่กับการแตกหรือสลายตัวของเซลล์ตับผู้ป่วยด้วย

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249 เอส ในเลือดและการเกิดโรคมะเร็งตับในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทย รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆของไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศไทย โดยงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค RFLP เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249 เอส ในเลือดซึ่งความรู้ความเข้าใจจากการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางป้องกันการเกิดมะเร็งตับและลดจำนวนผู้ป่วยที่ต้องเสียชีวิตจากโรคมะเร็งตับได้ โดยการลดปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับ นั่นคือ การจำกัดปริมาณการได้รับสารอะฟลาทอกซินและลดจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอสในเลือด อาจนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) การได้รับสารอะฟลาทอกซินหรือเพื่อใช้ในการพยากรณ์การเกิดมะเร็งตับในระยะแรกได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาแบบ case-control study โดยการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Ethics Committee of the hospital and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) หมายเลข IRB 408/54

ประชากรศึกษา

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

1.1 กลุ่มที่ทำการศึกษา คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยและมีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป

<u>เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา</u> (Inclusion criteria)

1) ผู้ป่วยเชื้อชาติไทย ที่มีอายุมากกว่า 18 ปี
2) ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งตรวจพบ HBsAg และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบี (HBV DNA) ซึ่งใช้กระบวนการคัดเลือกตัวอย่างแบบสุ่ม โดยทำการสุ่มตัวอย่างมาจากซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรัง (Chronic liver disease) และ <u>*กรณีกลุ่มที่ทำการศึกษา*</u> ต้องเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางรังสีวิทยาและ/หรือใช้การวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อตับว่าเป็นมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) ที่เข้ารับการรักษาและเฝ้าติดตามการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
3) ไม่เป็นผู้ที่มีโรคที่เป็นอันตรายจากการเจาะเลือด เช่น Hemophilia
4) ผู้ที่เซ็นต์ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

<u>เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก</u> (Exclusion criteria)

1) ผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

2) ผู้ที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีหรือผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
3) ผู้ที่มีประวัติการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณมากหรือผู้ที่มีประวัติการติดแอลกอฮอล์หรือได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสในช่วงเวลาที่มีการเก็บตัวอย่าง
4) ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับหรือตรวจพบว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วม
5) ผู้ที่ไม่สามารถเซ็นต์ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัยหรือไม่ยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

1.2 กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่เป็นมะเร็งตับ รวมทั้งผู้ป่วยโรคตับเรื้อรังและไม่เป็นมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีเชื้อชาติไทยอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป

2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size) คำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{โดย} \quad N = \frac{[Z_\alpha\sqrt{2p\,(1-p)} + Z\,\beta\sqrt{p_1\,(1-p_1) + p_2\,(1-p2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

N หมายถึง ประชากรที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

P_1 หมายถึง อัตราที่คาดว่าประชากรกลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยที่ผู้วิจัยสนใจ ซึ่งนำมาจากการศึกษาในอดีต เนื่องจากไม่ได้มีการทำ pilot test ดังนั้น $P_0 = 0.03$
โดยค่า P_0 ที่นำมาคำนวณ เป็นค่าที่อ้างอิงจากการศึกษาของ Kirk GD, et al.2005. [11]

P_2 หมายถึง อัตราที่คาดว่าประชากรกลุ่ม case จะมีปัจจัยที่ผู้วิจัยสนใจ
โดย P_2 มีค่าเท่ากับ P_1x OR / $[1+P_1(OR-1)]$

OR (Odds ratio) หมายถึง ค่าอัตราเสี่ยงสัมพัทธ์ประมาณ ได้มาจากการศึกษาในอดีตที่ศึกษาในรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน โดยกำหนดให้ค่า Odds ratio = 10
โดยค่า Odds ratio ที่นำมาใช้คำนวณหาจำนวนกลุ่มประชากรศึกษามาจากการศึกษาของ Kirk GD,et al.2005 [11]

P มีค่าเท่ากับ $(P_2 + P_1)/2$

Z_α ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test โดย $Z_{\alpha/2} = 1.96$ เมื่อกำหนด $\alpha = 0.05$

Z_β ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 โดย Z_β มีค่า 1.28 ที่ระดับของความคลาดเคลื่อนร้อยละ 10

แทนค่าในสมการข้างต้น

$$\text{ดังนั้น} \quad N = \frac{[1.96\sqrt{2*0.1*0.9} + 1.28\sqrt{(0.03*0.97) + (0.24*0.76)}]^2}{(0.03 - 0.24)^2}$$

$$N = 53.49$$

ดังนั้นจะต้องมีจำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ทำการศึกษา (case) และกลุ่มควบคุม (control) โดยมีตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม อย่างน้อยกลุ่มละ 54 ราย เพื่อความแน่นอนและถูกต้องของข้อมูล และป้องกันการสูญหายของตัวอย่าง จึงต้องทำการเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่สามารถเก็บได้ โดยที่จับคู่ (match) ข้อมูลเพศ,อายุ โดยพยายามจับคู่ให้ทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกันมากที่สุด

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย
   - Pipette tip: 10 µl, 200 µl และ 1,000 µl (Elkay, Ireland)
   - Microcentrifuge tube: 0.2 ml และ 1.5 ml (Axygen, USA)
   - Microwave oven (Sanyo, Japan)
   - Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
   - Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
   - Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
   - Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, USA)
   - Pipette rack (Eppendorf, Germany)
   - Parafilm (American Nation Can, USA)
   - Pasteur pipette (Hycon Plastics Inc., USA)
   - Plastic wrap
   - Stirring-magnetic bar
   - Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
   - Combs (Bio-RAD, Hercules, California)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
- Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20(2-20 µl) (Socorex,Switzerlang), P200 (20-200 µl) (Eppendorf, Germany),P1000 (100-1000 µl) (Eppendorf, Germany)
- Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)
- Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- Cuvett: 5 µl, 10 µl (MiralBio, Japan)
- Freezer -20˚C (Sanyo, Japan)
- Freezer -70˚C (Forma Scientific, USA)
- Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- Incubator (Memmert, Germany)
- Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- PCR Cabinet (Augusta)
- PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)
- Power supply model 250 (Giboco BRL,USA)
- Rotor- Gene PG-3000™(CR CORBETT Research, Sydney, Australia)
- Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
- Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)
- UV transilluminator (Fotodyne, USA)
- Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

3. สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Phosphate buffered saline (PBS) (Bio Basic Inc.)
- Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

4. สารเคมีสำหรับสกัด DNA (DNA extraction)

- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)
- Absolute ethanol (Merck, Germany)

- Chloroform (Sigma, MO, USA)
- Glycogen (USB, Cat no. 16445)
- Isoamyl alcohol (BDH, UK)
- Phenol (amresco, ohio, USA)
- *Proteinase K* (Sigma, Singapore)
- Tris-HCl (USB, Hong Kong)

5. สารเคมีสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR
    - 5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)
    - Distill water (DW)
    - DNA template
    - Specific primers: forward primers และ reverse primer
6. สารเคมีสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอสโดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ
    - *Hea*III (New England BioLabs inc, Ipswich, MA)
    - 10X Buffer (New England BioLabs inc, Ipswich, MA
    - Distill water (DW)
    - DNA template
7. สารเคมีสำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis
    - GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas,Cat no. SM0321)
    - Agarose, Low EEO, Molecular Biology grade (Reserch Organics,Cat no. 1170A)
    - 1X Tris borate buffer (1XTBE)
    - Boric acid (Fisher scientific, UK)
    - Tris base (Promega, USA)
    - EDTA (Amersham life science, UK)
    - Ethidium Bromide (SIGMA, USA)
8. สารเคมีสำหรับทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์
    - Agarose GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany)
9. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatic

- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9)
- Chromas Lite (version 2.01)
- SeqMan (DNA STAR, Madison, WI)
- EditSeq (DNA STAR, Madison, WI)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 4.0.2)
- HBV Genotyping Tool (NCBI)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

การเก็บตัวอย่างจากผู้ยินยอมเข้าร่วมการวิจัยตั้งแต่มกราคม พ.ศ.2553 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2555 โดยเก็บตัวอย่างเลือดจาก peripheral venous blood ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ตัวอย่างเลือดในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Clot blood) จากนั้นทำการปั่นแยกเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อแยกเก็บซีรั่มนำไปใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เพื่อทำการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA เพื่อหาแอนติเจนต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วม และเพื่อใช้สกัด DNA ทำการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ทำการสกัด DNA จากซีรั่ม ในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เป็นมะเร็งตับ โดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction และตรวจทางอณูไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี และทดสอบการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส โดยวิธี RFLP เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์

การสกัดสารพันธุกรรมไวรัสตับอักเสบบีมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ใช้ตัวอย่างซีรั่มของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังปริมาณ 100 µl เติม lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0,0.5%SDS) ลงไปประมาณ 400 µl และเติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาณ 10 µl จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 50°C ประมาณ 1-2 ชั่วโมง

2. เติม phenol ปริมาณ 250 μl. และ chloroform : isoamyl alcohol (49:1) ปริมาณ 250 μl. แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที
3. จากนั้นเตรียม micro tube อีกอัน โดยเติม glycogen ปริมาณ 4 μl และ absolute ethanol ปริมาณ 800 μl และ 2M NaOAc ปริมาณ 40 μl แล้วดูดน้ำส่วนใส (supernate) ที่ได้จากข้อ (2) ใส่ลงใน micro tube อันใหม่ แล้วผสมกันโดยใช้ vortex
4. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 30 นาที หรือ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เก็บไว้ข้ามคืน
5. เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำมาปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที ทำการดูดส่วนใสทิ้ง ในขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังไม่ดูดส่วนที่เป็นตะกอน (pallet) ทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลือล้างด้วย 70% ethanol ปริมาณ 1 ml แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที
6. ดูดส่วนใส (supernate) ทิ้งออกให้หมด ให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนสีขาว (pallet) ที่ก้น micro tube แล้วนำไปอบให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที
7. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) 30 μl ทำการเก็บส่วนของสารละลาย DNA ที่สกัดได้ (HBV DNA) โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของ DNA เอาไว้

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน pre-S1/pre-s2/S และ การวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV genotyping)

1. นำ DNA ของไวรัสตับอักเสบบีที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCRใช้ไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ประกอบด้วย PF+ (PreS1F+:5'- GGGTCACCATATTCTT GGGAAC-3') เป็น forward primer และ R5-5'TCGGGTTTCTGGGTGTTAAG 3' เป็น reverse primer ซึ่งไพรเมอร์ครอบคลุม บริเวณ pre-S1/pre-S2/*S* ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
2. เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของไวรัสตับอักเสบบี ดังนี้ สารละลาย DNA 2 μl, เติม primer แต่ละชนิดปริมาณ 0.5 μl, ใส่ 10 μl ของ 2.5x MasterMix® (Eppendorf, Germany)แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ(sterile distilled water) ให้มีปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 25 ul จากนั้นนำ micro tube ที่ใส่สารละลายทั้งหมดเรียบร้อยแล้วนำไปใส่เครื่อง PCR thermocycler (Eppendorf AG,

Hamburg, Germany) โดยปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอน ภายใต้ สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

3. เริ่มต้นปฏิกิริยา denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C ระยะเวลา 3 นาที แล้วตามด้วยปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C ระยะเวลา 30 วินาที ขั้น Annealing ใช้อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 30 วินาที และขั้น Extension ใช้อุณหภูมิ 72°C ระยะเวลา 1 นาที โดยจะเกิดปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ และในปฏิกิริยาสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที
4. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis โดยขนาดของผลผลิต คือ 1,414 bp. จากนั้น ทำการแยกผลิตผลของ PCR ออกจาก agarose gel โดยใช้ Agarose Gel Extract Mini Kit®
5. ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct Sequencing นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแก้ไขโดยใช้โปรแกรม SEQMAN (LASERGENE program package, DNASTAR) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม CLUSTAL_W (version 1.83) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์และการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ และแยกจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้ Genotyping tool และวิธี Phylogenetic analysis

4. การวิเคราะห์ปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในซีรั่มตัวอย่าง (HBV viral load)

1. เตรียม HBV DNA standard โดยใช้พลาสมิด pGem®-T Easy Vector ที่ใส่ชิ้นส่วนผลผลิต PCR (ใช้ PF+ เป็น forward primer และ R3 เป็น reverse primer) ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว หลังจากนั้นเตรียมพลาสมิดให้มีความเข้มข้น ระหว่าง 10^2 ถึง 10^{10} copies/ µl นำมาหาความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ของไวรัส ตับอักเสบบีด้วยวิธี real-time PCR
2. เตรียมส่วนผสมของสารในการทำปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ DNA ไวรัสตับอักเสบบี ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อทำการวัดปริมาณ HBV DNA ในซีรั่ม

ส่วนผสม (Master mix)	**ปริมาตร (ไมโครลิตร : µl)**
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (distilled water)	5.5 µl
5 PRIME MasterMix®	5.0 µl
Magnesium (Mg2+)	0.5 µl
Forward primer; 25 µM PF+	0.5 µl
Reverse primer ; 25 µM PR2	0.5 µl
10x SYBR Green	0.2 µl
Master mix	**ปริมาตรรวม 12.2 µl**

3. นำส่วนผสมต่างๆที่เตรียมเป็น master mix ปริมาตร 12.2 µl ใส่ DNA template ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ 1µl แล้วทำการเพิ่มจำนวนและวัดปริมาณ DNA ของไวรัสตับอักเสบบีด้วยเครื่อง Roter Gene®

5. การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV mutations)

1. นำ HBV DNA ที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCRใช้ไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ประกอบด้วย X101 :5'-TCTGTGCCTTCTCATCTG -3'เป็น forward primer และCO2 : 5'-GTGAGGTGAACAATG TTCCG -3' เป็น reverse primer ซึ่งไพรเมอร์ครอบคลุมบริเวณ *EnhII/BCP/PC* gene ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ขนาดของผลผลิต คือ 530 bp. ทำการเพิ่มจำนวนปริมาณ DNA โดยใช้ส่วนผสมต่างๆในการทำปฏิกิริยา, อุณหภูมิและเวลาตามที่กล่าวมาแล้ว
2. ตรวจสอบผลผลิตที่ได้ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis กรณีที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน HBV DNA ที่ต้องการได้ ใช้เทคนิค Reverse Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์อีกคู่ คือX101 :5'-TCTGTGCCTTCTCATCTG-3' เป็น forward primer และ PC1 :5'-CTTTCTTCAGTCTTCCG-3'เป็น reverse primer ขนาดของผลผลิต คือ 423 bpตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการแยกผลิตผลของ PCR ออกจาก agarose gel โดยใช้ Agarose Gel Extract Mini Kit®
3. ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct Sequencing นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแก้ไขโดยใช้โปรแกรม SWQMAN (LASERGENE program

package, DNASTAR) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม CLUSTAL_W (version 1.83) แล้ววิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในบริเวณ EnhII/BCP/PC โดยอาศัยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

6. การตรวจหาการกลายพันธุ์ยีนพี 53ชนิดอาร์249เอส โดยวิธีการตัดด้วยเอนไซด์ที่มีความจำเพาะและแยกตามความหลากหลายของความยาวสายพันธุกรรม

1. นำ DNA ไปเพิ่มจำนวนส่วนของเอกซอน 7 โดยการทำ PCR 2 ครั้ง(Nested PCR) โดยผสมสารละลาย DNA 2 µl เข้ากับสารละลาย PerfectTaq Plus Master Mix Kit (5-Prime, Hamburg, Germany) 10 µl.และไพรเมอร์ปริมาตร 0.5 µl. ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ตัว คือ (1.25 mM outer forward primer (TP53-OS: 5’-CTTGCCACAGGTCTCCCCAA -3’) และ1.25 mM outer reverse ward primer (TP53-OAS:5’-AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA-3’) และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 25 µl.
2. ดำเนินการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของเอกซอน 7 โดยเริ่มกระบวนการ PCR โดยใช้อุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 94^{o}C นาน 3 นาที, ตามด้วย 94^{o}C นาน 18 วินาที ,50^{o}C นาน 21 วินาที, และ ที่อุณหภูมิ 72^{o}C นาน 1.30 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 40 รอบ, สุดท้ายทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72^{o}C นาน 10 นาที.
3. นำผลิตภัณฑ์จาก PCR ที่ได้ ซึ่งเป็นเอกซอน 7 ที่มีความยาวประมาณ 237 คู่เบส มาเพิ่มจำนวนอีกครั้งโดยทำ PCR ใช้ไพรเมอร์อีกคู่ซึ่งจับกับส่วนปลายของ PCR product ของครั้งแรก (คือใช้สารละลาย เช่นเดียวกับข้อ 1. แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็น 1.25 mM inner forward primer (TP53-OS: 5’-AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT-3’) และ1.25 mM inner reverse ward primer (TP53-OAS: 5’-TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC-3’) โดยใช้ PCR product ที่ได้จากข้อ 1.ปริมาณ 0.5 µl.
4. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCRครั้งที่ 2 มาแยกบน 2% Agarose gel electrophoresis และผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) นำมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และดูด้วยกล้องยูวี (UV transluminator) โดยผลผลิตที่ได้จะเป็นแถบ 2 แถบที่มีความยาว 237 และ 177 คู่เบส (เพราะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด)
5. นำมาตรวจการกลายพันธุ์โดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะโดยใช้เอนไซม์ restriction endonuclease ชื่อ *HaeIII* ซึ่งจะตัดสายดีเอนเอในตำแหน่งที่มีคู่เบสเป็น CCGG เท่านั้น ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งโคดอนที่ 249 พอดี แต่ยังมีตำแหน่ง

CCGG อีกตำแหน่งที่ส่วนต้นของผลิตภัณฑ์ PCR ของการศึกษานี้ที่เป็น CCGG ซึ่งจะโดนตัดเช่นกัน ทำปฏิกริยาโดยผสมเอนไซม์ *HeaIII* (New England BioLabs inc, Ipswich, MA) 1 ยูนิตกับ 10X Buffer 4 (New England BioLabs inc, Ipswich, MA) 2 µl. และผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ปริมาตร 15 µl. แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร

6. ทิ้งสารละลายดังกล่าวไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
7. จากนั้นตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ โดยนำมาแยกบน 3% Agarose gel electrophoresis และผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และดูด้วยกล้องยูวี (UV transluminator)
8. การแปลผล เนื่องจาก *HaeIII* จะตัดสายดีเอนเอได้ที่ตำแหน่งที่ 12, 24, และ 116 ซึ่งตำแหน่ง 116 ตรงกับโคดอน 249 โดยในตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์จะพบว่าแถบเรืองแสงจะปรากฏที่ความยาว 12, 61 และ 92 คู่เบส ขณะที่ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์จะพบว่าแถบเรืองแสงจะปรากฏที่ความยาว 12 และ153 คู่เบส

7. การตรวจสอบผลการทำ PCR โดยวิธี Agarose gel electrophoresis และการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย Agarose Gel Extract mini kit

หลังจากนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เมื่อพบแถบของ PCR product ที่ต้องการแล้วจึงทำการตัด gel บริเวณนั้นออก เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Agarose Gel Extract mini kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เติม buffer PS ลงไปจากนั้นนำไปอุ่นที่ 50 °C จนกระทั่ง gel ละลายเป็นเนื้อเดียวกันจนหมด
2. ระหว่างรอเวลาให้เตรียม CB2 column ที่จัดไว้ให้จากนั้นเติม buffer BL 500 µl แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้งขั้นตอนนี้ทำเพื่อชะล้าง filter ให้พร้อมสำหรับขั้นตอนต่อไป
3. ดูด gel ที่ละลายแล้วลงใน CB2 column จากนั้นจึงนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง
4. เติม buffer PW 600 µl นำไป centrifuge เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง
5. ทำซ้ำขั้นตอนข้างตนอีกครั้งแต่ใช้ buffer PW แค่ 500 µl จากนั้นเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง

6. ทำการ centrifuge เพิ่มอีก 2 นาที จากนั้นย้าย CB2 column ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml ใหม่
7. เติม buffer PEB ปริมาณ 50 μl แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไป centrifuge 1 นาที จะได้ PRC product ที่บริสุทธิ์ตามต้องการ

นำ PCR product ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ปริมาณ 5μl มาตรวจอีกครั้งด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบดูว่ามี DNA ที่ต้องการหรือไม่ จากนั้นจึงส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First base laboratories SDN BHD ประเทศมาเลเซีย

อ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite (version 2.0.1) เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ว่ามีความสัมพันธ์กับกราฟ chromatogram หรือไม่ แล้วทำการวิเคราะห์ต่อไป

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA analysis)

โดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้

- Chromas Lite (version 2.0.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับดูลำดับนิวคลีโอไทด์และกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9) ใช้สำหรับการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิจัยนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- SeqMan เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการประกอบสาย forward และ reverse ของลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าด้วยกัน
- EditSeq เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการ export นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบแล้วจาก SeqMan
- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.0.1) จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อยืนยันในขั้นต้นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วน pre-S1/Pre-S2/S มาต่อให้เป็น consensus sequence โดยใช้โปรแกรม SeqMan
- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ pre-S1/Pre-S2/Sที่ต่อเรียบร้อย นำมาวิเคราะห์จีโนไทป์โดยใช้โปรแกรม HBV Genotyping Tool และ phylogenetic analysis

- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้จากการศึกษานี้ ทั้งในส่วนของ pre-S1/Pre-S2/S และ EnhII/BCP/Pre-core มาทำการจัดเรียงด้วยโปรแกรม BioEdit (version 7.0.9) เพื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์
- ทำการเปรียบเทียบเพื่อตรวจหาตำแหน่งที่เกิดการแทนที่ (substitution), การหายไป (deletion) และการเพิ่มเข้ามา (insertion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ pre-S1/Pre-S2/S และ EnhII/BCP/Pre-core ด้วยโปรแกรม BioEdit (version 7.0.9)

10. การเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองผู้วิจัยได้ทำการเก็บข้อมูลโดยการจดลงสมุดบันทึกและลงข้อมูลต่างๆในคอมพิวเตอร์โดยได้จัดทำตารางการเก็บข้อมูลแยกรายละเอียดของแต่ละบุคคลโดยบันทึกรูปแบบของสารพันธุกรรมที่ได้ลงใน case record form และบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

11. การวิเคราะห์ข้อมูล

การสังเกต, การวัด และ วิธีวิเคราะห์ข้อมูล (Observation, Measurement and Method of data analysis)

- ความชุกของการกลายพันธุ์แสดงผลเป็นจำนวนและร้อยละ
- ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยส่วนที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพแสดงเป็นจำนวนและร้อยละ และข้อมูลเชิงปริมาณแสดงเป็นค่าเฉลี่ย,ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ค่ามัธยฐาน
- การเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับนั้น เปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติไคสแควร์ (chi-square) เพราะเป็นการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงคุณภาพ โดยค่าความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$
- หาความเสี่ยงในการทำให้เกิดโรคโดยใช้ค่าสถิติ Odds Ratio
- ข้อมูลที่ได้จากแบบเก็บข้อมูลจะถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลจะถูกป้อนลงและวิเคราะห์ในโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17.0

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

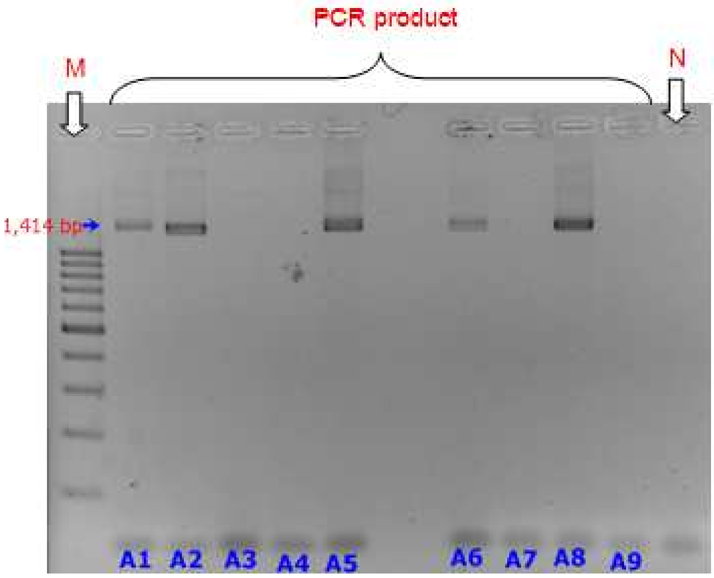
จากการเก็บตัวอย่างซีรั่มกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยและมีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปและ ตัวอย่างซีรั่มกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่เป็นมะเร็งตับ รวมทั้งผู้ป่วยโรคตับเรื้อรังและไม่เป็นมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ซึ่งใช้กระบวนการคัดเลือกตัวอย่างแบบสุ่ม โดยทำการสุ่มตัวอย่างมาจากซีรั่มของกลุ่มผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรัง โดยตัวอย่างทั้งสองกลุ่มเป็นผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งตรวจพบ HBsAg ด้วยวิธี ELISA และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบี จากการคัดเลือกตัวอย่างพบจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 154 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างซีรั่มกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) จำนวน 65 คน และตัวอย่างซีรั่มกลุ่มควบคุม จำนวน 89 คน

ลักษณะของผู้ป่วยมะเร็งตับที่นำมาศึกษาเป็นผู้ชายร้อยละ 81.5 และเป็นผู้หญิงร้อยละ 18.5 อายุเฉลี่ย 58.1±12.0 ปี ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ เป็นผู้ชายร้อยละ 74.2 และเป็นผู้หญิงร้อยละ 25.8 โดยกลุ่มควบคุมมีอายุเฉลี่ย 41.3±8.8 ปี เมื่อเปรียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบจำนวนผู้ชายและผู้หญิงที่เข้าร่วมการศึกษาไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งสองกลุ่มมีอายุเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องด้วยผู้ป่วยมะเร็งตับส่วนใหญ่มักมีอายุมากกว่าผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ อาจเป็นสาเหตุทำให้การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยของทั้งสองกลุ่มมีอายุโดยเฉลี่ยแตกต่างกัน นอกจากนี้ข้อมูลของไวรัสตับอักเสบบี เช่น ปริมาณเชื้อไวรัสตับอักเสบบี,สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

ลักษณะทางคลินิก	**กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับ (n=65)**	**กลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับ (n= 89)**	***p-value***
Age (years)	58.1±12.0	41.3±8.8	<0.001
Male Female	53 (81.5) 12 (18.5)	66 (74.2) 23 (25.8)	0.376
HBV genotype B C Unknown	 8 (12.3) 48 (73.8) 9 (13.9)	 17 (19.1) 42 (47.2) 30 (33.7)	0.003
HBV DNA level (log IU/mL)	5.4±1.0	5.3±1.0	0.505

ผลการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S จากการทำ PCR โดยใช้ primer คือ PreS1F+ และ R5 จะได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 1,414 bp ตามรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S ด้วย primer :PreS1F+ และ R5 ได้ผลผลิตขนาด 1.414 bp (แถว M: DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่A1-A9 : PCR product, แถว N : Negative control)

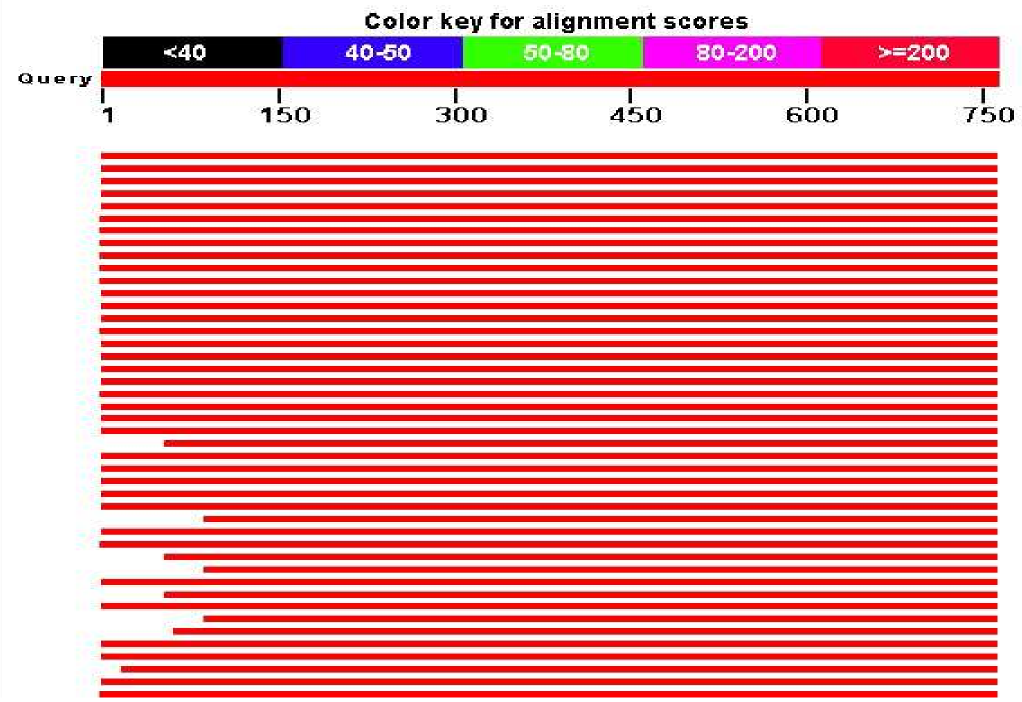
จากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR จากซีรั่มตัวอย่างทั้งหมด 154 ราย ทั้งสองกลุ่มให้ผลบวกต่อ PCR จำนวน 111 ราย คิดเป็นร้อยละ 72.1 ของทั้งหมด แบ่งออกเป็นกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับ PCR ให้ผลบวกจำนวน 55 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.6 และกลุ่มควบคุมที่ PCR ให้ผลบวกจำนวน 56 ราย คิดเป็นร้อยละ 62.9

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบซีรั่มตัวอย่างด้วยวิธี PCR

	กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับ (n=65)	**กลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับ (n=89)**	**รวม (n=154)**
จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ PCR	55	56	111
คิดเป็นร้อยละ (%)	84.6	62.9	72.1

ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Pre-S1

ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Pre-S1 โดยได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย primer Pre-S_1F+ เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีทุกตัวอย่าง



Sequences producing significant alignments:

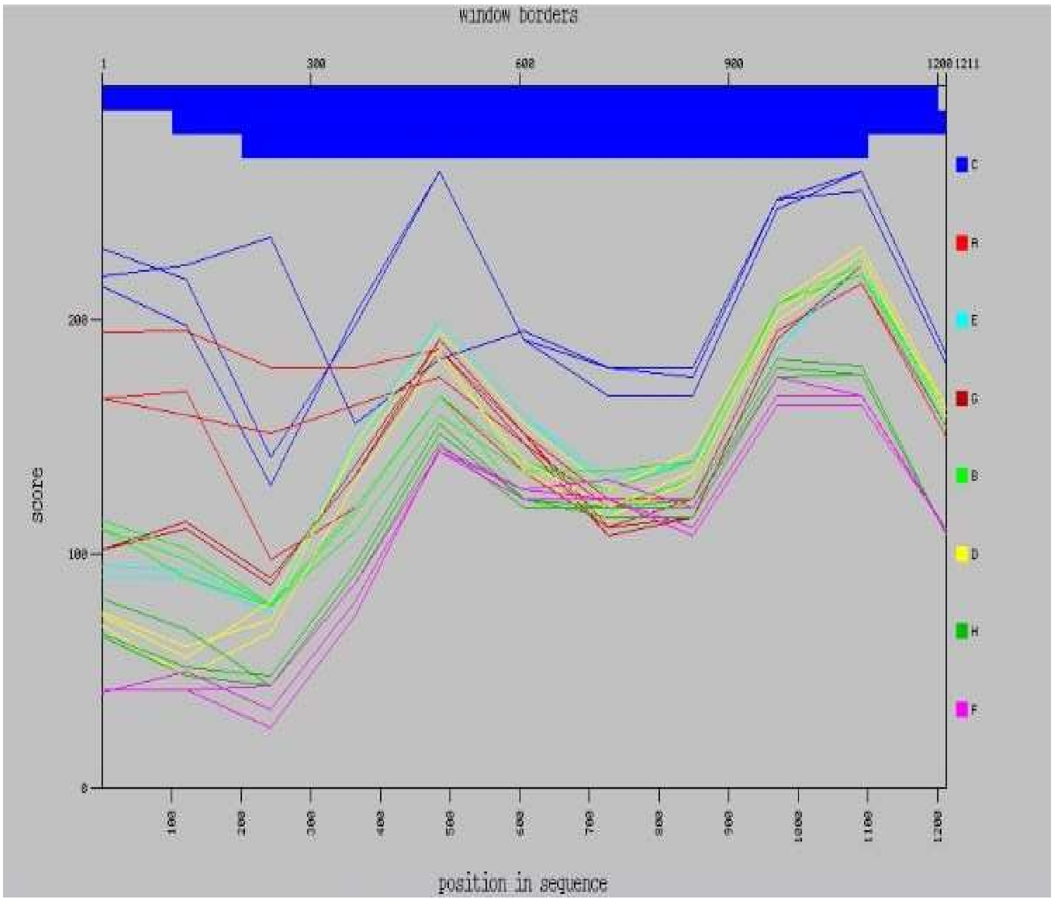
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Hepatitis B virus isolate migrant 3305 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete	1314	1314	99%	0.0	98%	GQ855331.1
Hepatitis B virus S gene for large surface protein, isolate QW037	1297	1297	99%	0.0	97%	FM211403.1
Hepatitis B virus isolate migrant 3599 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, partial cd	1275	1275	99%	0.0	97%	GQ855400.1
Hepatitis B virus isolate migrant 1654 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete	1267	1267	99%	0.0	96%	GQ855507.1
Hepatitis B virus isolate CRM-097 S protein gene, partial cds	1264	1264	99%	0.0	97%	DQ361525.1
Hepatitis B virus isolate S50_27A polymerase gene, complete cds	1249	1249	100%	0.0	96%	JQ707773.1
Hepatitis B virus isolate S50_13A polymerase gene, complete cds	1249	1249	100%	0.0	96%	JQ707769.1
Hepatitis B virus isolate S50_10A-6 polymerase gene, complete cds	1249	1249	100%	0.0	96%	JQ707768.1
Hepatitis B virus isolate S50_C4 polymerase gene, complete cds	1243	1243	100%	0.0	96%	JQ707774.1
Hepatitis B virus isolate S50_26A polymerase gene, complete cds	1243	1243	100%	0.0	96%	JQ707772.1
Hepatitis B virus isolate S50_14B polymerase gene, complete cds	1243	1243	100%	0.0	96%	JQ707770.1
Hepatitis B virus isolate migrant 1208 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete	1234	1234	99%	0.0	96%	GQ855371.1
Hepatitis B virus isolate 8096 large S protein (S) gene, partial cds	1230	1230	99%	0.0	96%	JN107880.1
Hepatitis B virus isolate migrant 548 truncated large S protein (S), truncated middle S protein (S), and truncated small S	1230	1230	99%	0.0	96%	GQ855443.1

รูปที่ 3 ตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ surface antigen gene

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม Genotyping tool พบว่าสามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากตัวอย่างได้เป็นจีโนไทป์ C และ B



รูปที่ 5 ตัวอย่างผลการตรวจสอบจีโนไทป์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม Genotyping tool จากรูปพบว่าตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรมมีความเหมือนกับจีโนไทป์ C มากที่สุด จึงจำแนกได้ว่าเป็นจีโนไทป์ C

Phylogenetic analysis

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา วิเคราะห์จีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี Phylogenetic analysis โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจีโนไทป์ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารสารพันธุกรรม ดังนี้

Genotype A : AF090842, JX144293, JX144293

Genotype B : GQ924675, GQ855365, AB033554

Genotype C : GQ924663, JX125373, JX125370

Genotype D : JX090649, JX090645, AB263405

Genotype E : EF662028, AB091255, AB091256

Genotype F : AF223965, X68798, AB036910

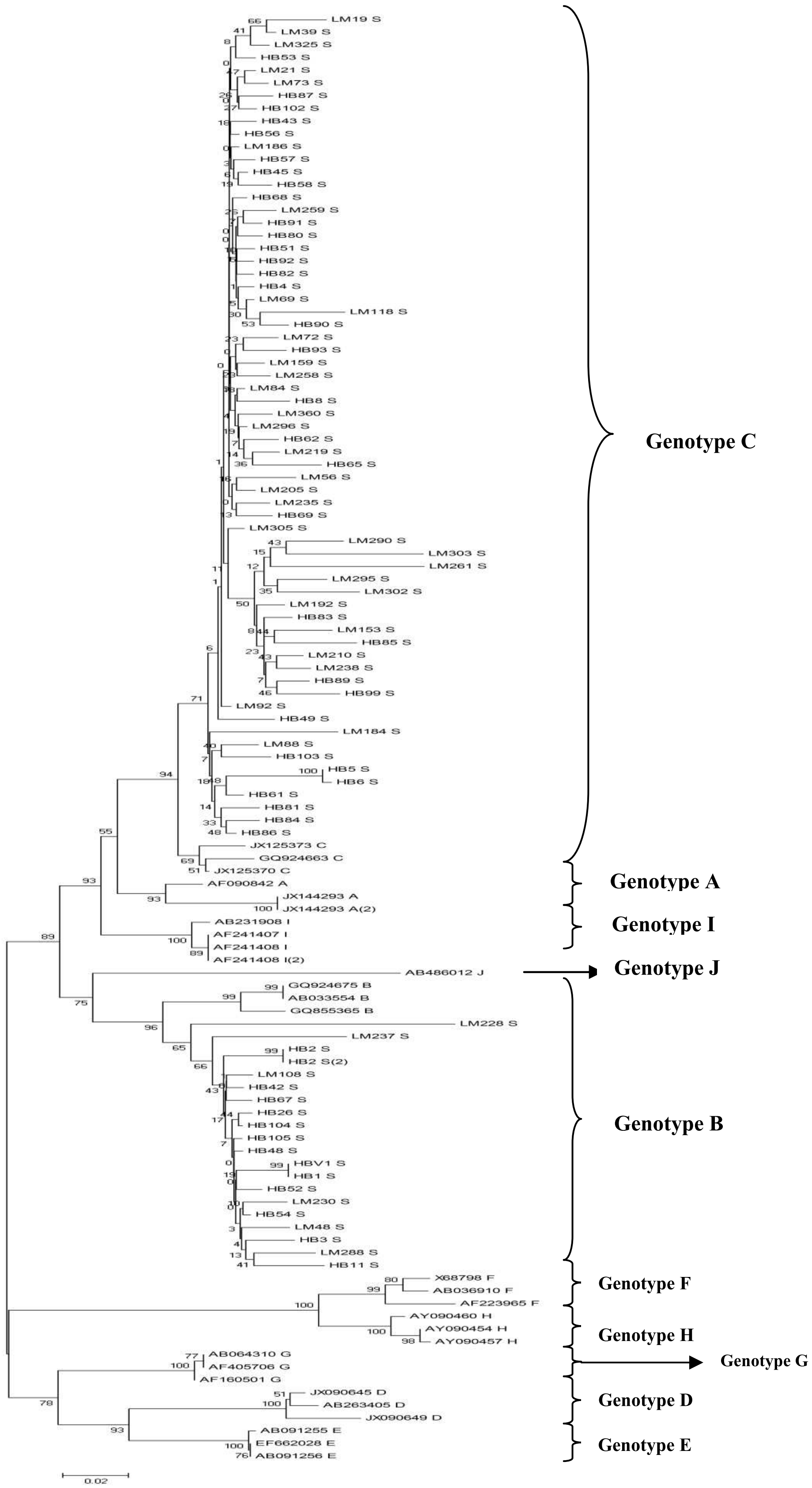
Genotype G : AB064310, AF160501, AF405706

Genotype H : AY090454, AY090457, AY090460

Genotype I : AB231908, AF241407, AF241408

Genotype J : AB486012

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ทราบจีโนไทป์แล้วมาทำการจัดเรียง ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 เพื่อสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining method แบบ Boostrap



รูปที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษา

ผลการจำแนกจีโนไทป์ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม Genotyping tool และ Phylogenetic analysis ซึ่งศึกษาในกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับจำนวนทั้งหมด 154 ราย ผลการศึกษาสรุปได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการจำแนกจีโนไทป์ของกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับจำนวน 154 ราย

	กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับ (n=65)	**กลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับ (n=89)**	***P-value***
Genotype (%)			0.003
B	8 (12.3)	17 (19.1)	
C	48 (73.8)	42 (47.2)	
Unknown	9 (13.9)	30 (33.7)	

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับมีเชื้อไวรัสตับอักเสบจีโนไทป์บี C จำนวน 48 ราย (ร้อยละ 73.8) และจีโนไทป์ B จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 12.3) และ ผู้ที่ไม่ทราบจีโนไทป์ (unknown) จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 13.9) ส่วนกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เป็นมะเร็งตับ ตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ C จำนวน 42 ราย (ร้อยละ47.2) , จีโนไทป์ B จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 19.1) และผู้ที่ไม่ทราบจีโนไทป์จำนวน 30 ราย (ร้อยละ 33.7) เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองกลุ่มพบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C มากกว่าจีโนไทป์ B แต่จากผลการทดลองกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับมีจำนวนผู้ที่ไม่ทราบจีโนไทป์จำนวนมากถึง 30 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.7 ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C มากกว่าจีโนไทป์ B โดยทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.003)

ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *S* gene

ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *S* gene โดยได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย primer R5 เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มี

อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม BLAST ซึ่งพบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีทุกตัวอย่าง

```
Download  GenBank  Graphics
Hepatitis B virus isolate 08/H1467 polymerase (P), large S protein (S), and middle S protein (S) genes, partial cds;
Sequence ID: gb|JQ514540.1|  Length: 1032  Number of Matches: 1

Range 1: 408 to 855  GenBank  Graphics                Next Match  Previous Match
Score          Expect  Identities     Gaps        Strand
784 bits(424)  0.0     441/449(98%)   2/449(0%)   Plus/Minus

Query  1    TTTTCAATC-ATAGGTCTATTTATAGGGAAGTTTCCGAAAACATTGTTTCAATTTTTGTA  59
            ||| ||||| ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  855  TTTCCAATCAATAGGTCTATTTATA-GGAAGTTTCCGAAAACATTGTTTCAATTTTTGTA  797

Query  60   CAATATGTTCCTGTGGCAAGGTACCCCAACTTCCAATTACATATCCCATGAAGTTAAGGG  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  796  CAATATGTTCCTGTGGCAAGGTACCCCAACTTCCAATTACATATCCCATGAAGTTAAGGG  737

Query  120  AGTAGCCCCAACGTTTGGTTTTATTAGGGTTTAAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAAAT  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  736  AGTAGCCCCAACGTTTGGTTTTATTAGGGTTTAAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAAAT  677

Query  180  TGGTAATAGCGGTAAAAAGGGATTCAAGATGTTGTACAGACTTGGCCCCCAATACCACAT  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  676  TGGTAATAGCGGTAAAAAGGGATTCAAGATGTTGTACAGACTTGGCCCCCAATACCACAT  617

Query  240  CATCCATATAACTGAAAGCCAAACAGTGGGGGAAAGCCCTACGAACCACTGAACAAATGG  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  616  CATCCATATAACTGAAAGCCAAACAGTGGGGGAAAGCCCTACGAACCACTGAACAAATGG  557

Query  300  CACTAGTAAACTGAGCCAGGAGAAACGGACTGAGGCCCACTCCCATAGGAATCTTGCGAA  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  556  CACTAGTAAACTGAGCCAGGAGAAACGGACTGAGGCCCACTCCCATAGGAATCTTGCGAA  497

Query  360  AGCCCAAGATGATGGGATGGGAATACAAGTGCAATTTCCGTCCAAAGGATCTGCACAGCA  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| | || ||||||
Sbjct  496  AGCCCAAGATGATGGGATGGGAATACAAGTGCAATTTCCGTCCGAAGGTTTTGTACAGCA  437

Query  420  ACAAGAGGGAAACATAGTGGTTCCTTGAG  448
            ||||||||||||||||| |||||||||||
Sbjct  436  ACAAGAGGGAAACATAGAGGTTCCTTGAG  408
```

รูปที่ 7 ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ surface antigen gene โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S region

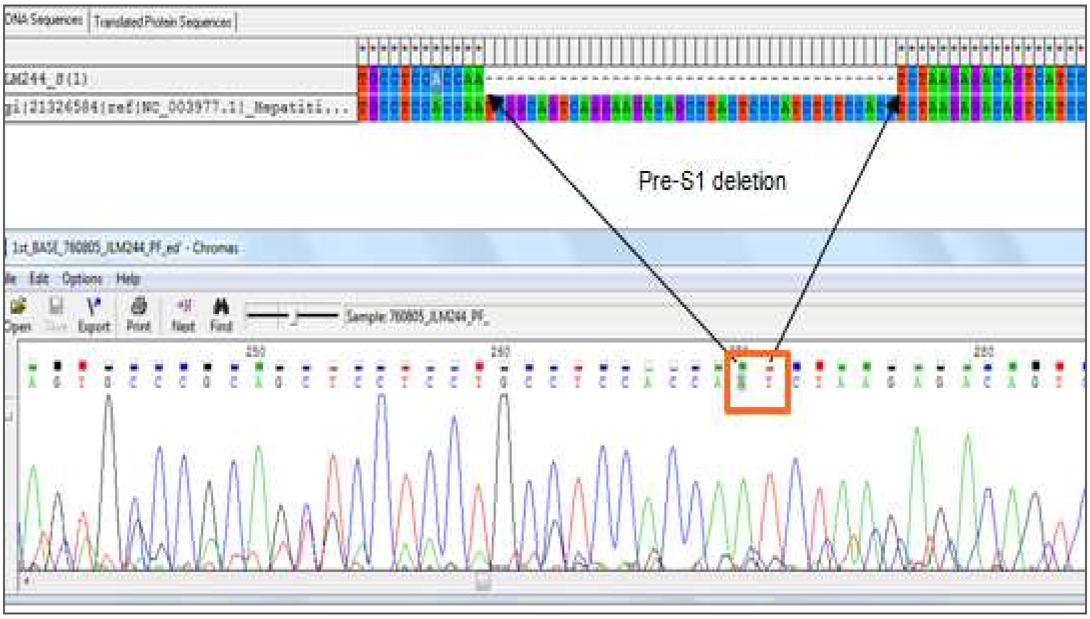
ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.83 มาจัดเรียงแบบ Multiple Alignment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S ในตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด 154 ราย

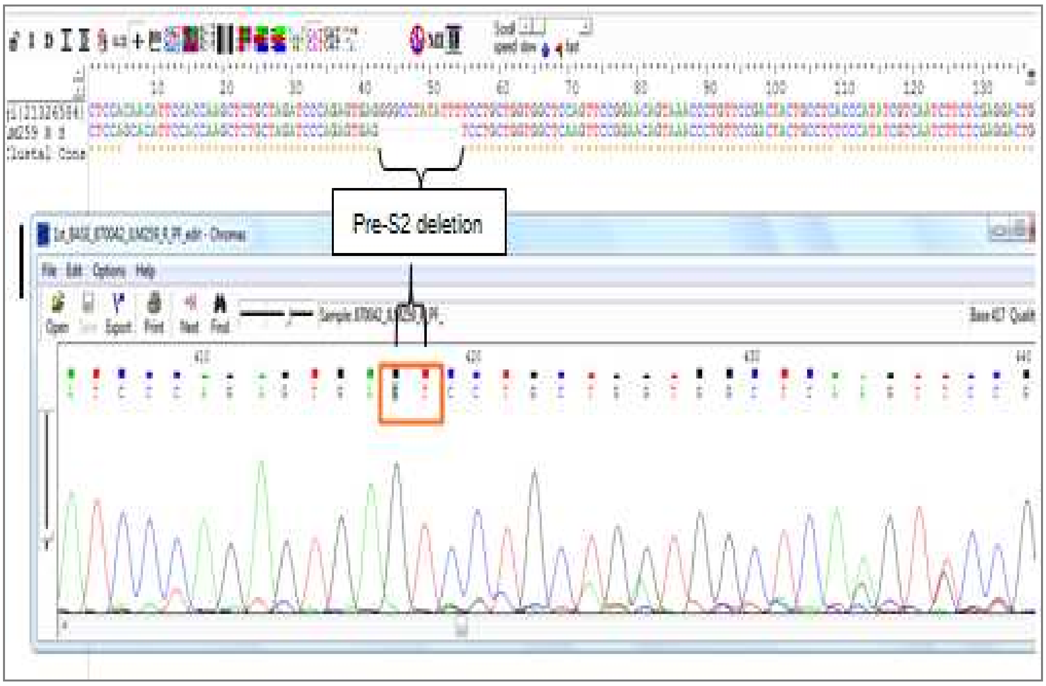
Pre-S1/Pre-S2/S mutation/deletion	กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับ (n= 65)	กลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับ (n= 89)	*p-value*
Pre-S1 start codon mutation	10(18.2)	11(19.6)	1
Pre-S1 deletion	5(9.1)	0(0)	0.07
Pre-S2 start codon mutation	6(10.9)	5(8.9)	0.895
Pre-S2 deletion	6(10.9)	9(16.1)	0.435
S start codon mutation	5(9.1)	7(12.5)	0.676
S deletion	13(23.6)	25(44.6)	0.019

จากตารางที่ 6 การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของ *S* gene ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ Pre-S1,Pre-S2 และ S โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้อ้างอิง คือ Hepatitis B virus, complete genome, accession :NC_003977 ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม พบว่ากลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับพบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S1 จำนวน 10 ราย (ร้อยละ18.2), พบการเกิด deletion ที่ Pre-S1 จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 9.1) , พบการกลายพันธุ์ในรูปแบบการเกิดการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 จำนวน 6 (ร้อยละ 10.9) พบการเกิด deletion ที่ Pre-S2 จำนวน 6 ราย (ร้อยละ10.9), พบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ S จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 9.1), พบการ deletion ที่ S จำนวน 13 ราย (ร้อยละ 23.6) และกลุ่มควบคุมพบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S1 จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 50.00) แต่ไม่พบการเกิด deletion ที่ Pre-S1, พบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 จำนวน 5 (ร้อยละ 8.9) พบการเกิดdeletion ที่ Pre-S2 จำนวน 9 ราย (ร้อยละ16.1), พบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ S จำนวน 7 ราย (ร้อยละ 12.5), พบการ deletion ที่ S จำนวน 25 ราย (ร้อยละ 44.6)

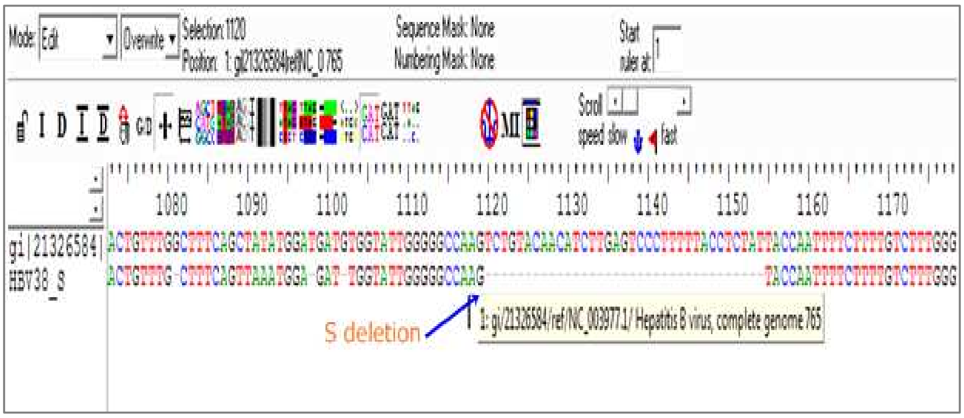
เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นของทั้งสองกลุ่มพบว่าผู้ที่เป็นมะเร็งตับมักมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ลักษณะการเกิด deletion ที่ Pre-S1, การกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งไม่เป็นมะเร็งตับและพบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ S โดยกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับมีการเกิด deletion ที่ S มากกว่ากลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองถึงแม้จะพบว่าเกิด deletion ที่ Pre-S1 ในกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



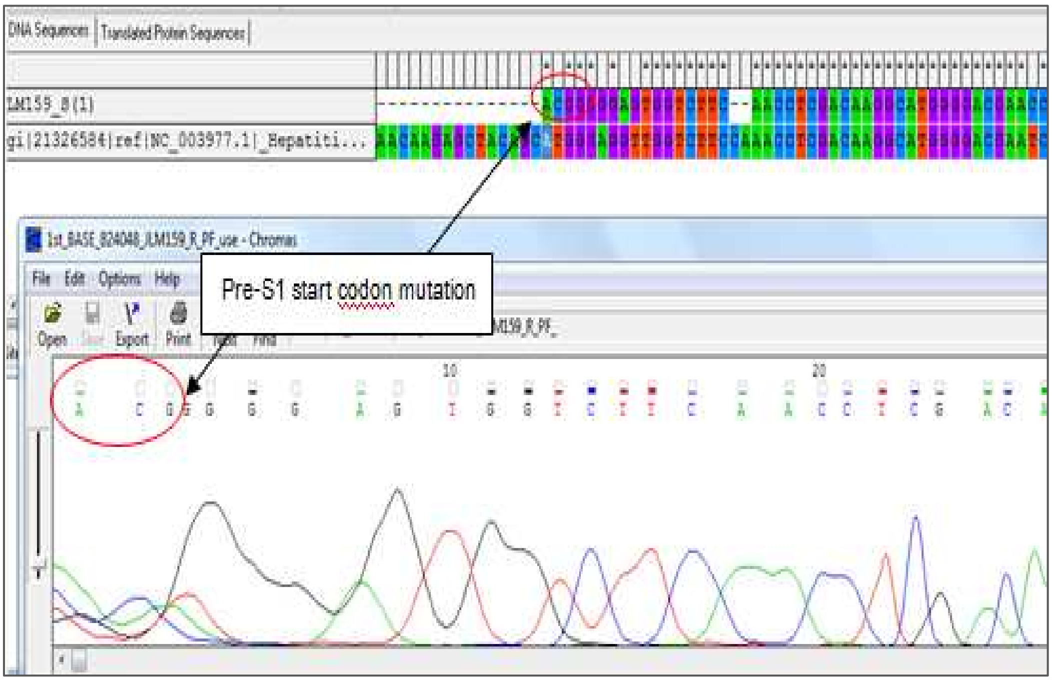
รูปที่ 8 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S1 ของตัวอย่าง LM244_S จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S* gene ที่ปกติ จะพบการเกิด deletion นั่นคือมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ขาดหายไปจำนวน 38 bp ซึ่งข้อมูลจาก Chromatogram พบว่ามีการ deletion หายไปที่ Pre-S1



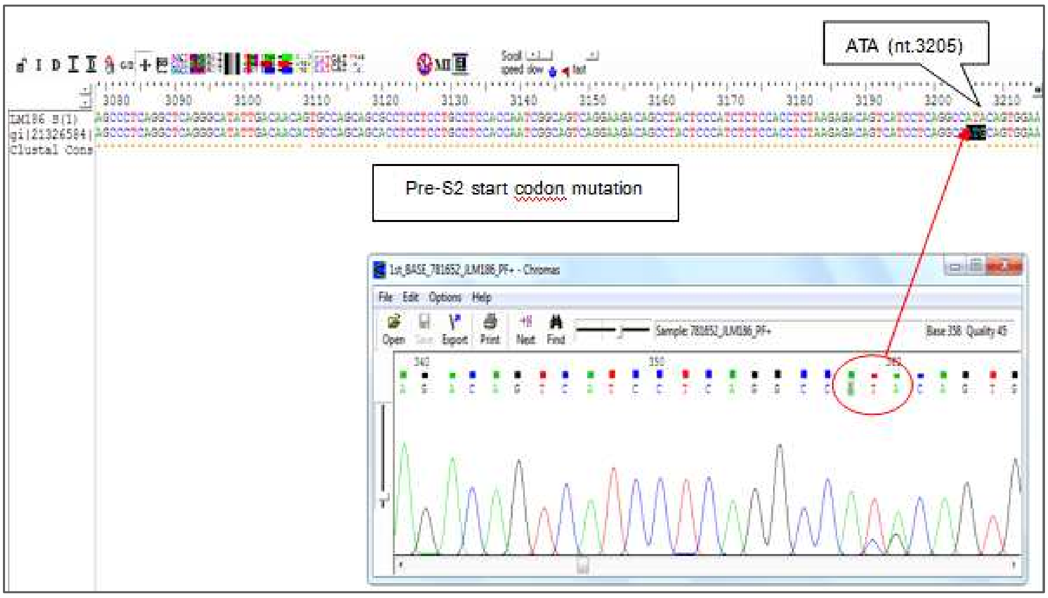
รูปที่ 9 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 ของตัวอย่าง LM259_S จากรูปจะเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ S gene ที่ปกติ จะพบการเกิด deletion จำนวน 12 bp ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion หายไปที่ Pre-S2



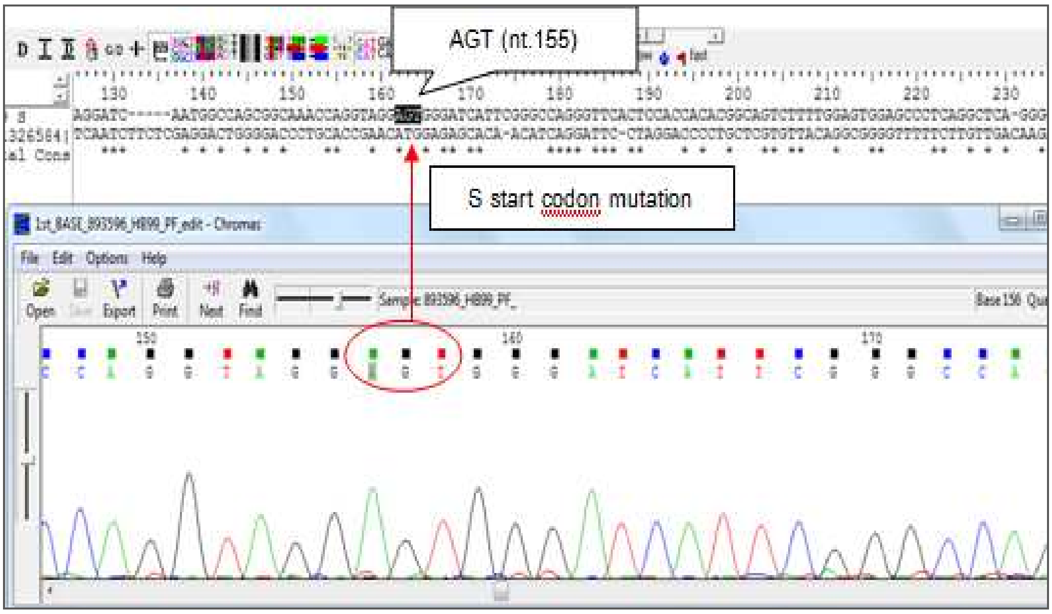
รูปที่ 10 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ S ของตัวอย่าง HB38_S จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S* gene ที่ปกติ เมื่อพิจารณาข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion หายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 35 bp



รูปที่ 11 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S1 ของตัวอย่าง LM159_S จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S* gene ที่ปกติ จะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nt. 2848 ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nt. 2848



รูปที่ 12 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 ของตัวอย่าง LM186_S จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S* gene ที่ปกติ จะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nt.3205 ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nt.3205

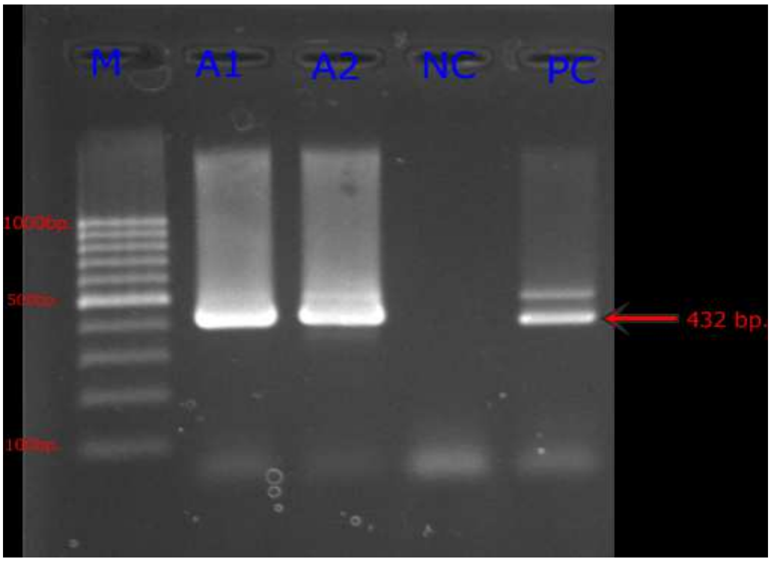


รูปที่ 13 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ S ของตัวอย่าง HB99_S จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S* gene ที่ปกติ จะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nt.155 ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nt.155

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของ EnhII/BCP/Precore region

จากตัวอย่างซีรั่มกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยมะเร็งตับจำนวน 65 ราย และตัวอย่างซีรั่มกลุ่มควบคุมจำนวน 89 ราย แต่ละตัวอย่างทำการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ EnhII/BCP/Pre-core (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1287-2038)

จากการทำ nested- PCR จาก HBV DNA ในส่วนของ EnhII/BCP/Pre-core ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ คือ คู่ที่ 1 X101,CO2 และคู่ที่ 2 X101,PC1 จะได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 432 bp ตามรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ EnhII/BCP/Pre-core จะได้ผลผลิตขนาด 432 bp (แถว M: DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่ A1, A2 : PCR product, แถว NC : Negative control, PC: Positive control)

จากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR จากซีรั่มตัวอย่างทั้งหมด 154 ราย ได้ผลบวกต่อ PCR ทั้งหมด 120 ราย คิดเป็นร้อยละ 77.9 ของทั้งหมด โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับที่ PCR ให้ผลบวกจำนวน 44 ราย คิดเป็นร้อยละ 67.7 และกลุ่มควบคุม PCR ให้ผลบวกจำนวน 76 ราย คิดเป็นร้อยละ 85.4

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบซีรั่มตัวอย่างด้วยวิธี PCR

	กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับ (n=65)	**กลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ (n=89)**	**รวม (n=154)**
จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ PCR	44	76	120
คิดเป็นร้อยละ (%)	67.7	85.4	77.9

จากการเปรียบเทียบความชุกของการกลายพันธุ์ในส่วน EnhII/BCP/Pre-core โดยพบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆดังนี้ C1653T, T1753A/G/C, A1762T/G1764A, Pre-core start codon mutation, G1896A และ G1899A พบว่าการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A และ T1753A/C/G พบได้บ่อยกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ และ G1899A พบได้บ่อยกว่าในกลุ่มมะเร็ง

ตับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอัตราความชุกของ C1653T และ Pre-core start codon mutation ไม่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วน EnhII/BCP/Pre-core ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ

EnhII/BCP/PC mutations/deletion	**กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับ (n=65)**	**กลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับ (n= 89)**	***p-value***
C1653T	9 (20.5)	11 (14.5)	0.575
T1753A/G/C	26 (59.1)	27 (35.5)	0.008
A1762T/G1764A	39 (88.6)	52 (68.4)	0.003
Pre-core start codon mutation	3 (6.8)	6 (7.9)	1
G1896A	15 (34.1)	50 (65.8)	0.003
G1899A	12 (27.3)	12 (15.8)	0.12

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส ในเลือด

จากการตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด อาร์249เอสในเลือด ด้วยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ พบการกลายพันธุ์ของยีนพี53 ชนิด อาร์249เอสในเลือดของกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับจำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.2 และ ในกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับพบการกลายพันธุ์จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.4 โดยตัวอย่างที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ ส่งตรวจยืนยันโดยวิธี direct sequencing

แต่การกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอสในเลือดไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรศึกษา

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยไวรัสตับอักเสบบีกับการเกิดมะเร็งตับและการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์ 249เอสในเลือด จำนวนผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งหมด 154 คน โดยลักษณะของผู้ป่วยมะเร็งตับที่นำมาศึกษาเป็นผู้ชายจำนวน 53 ราย คิดเป็นร้อยละ 81.5 และผู้หญิงจำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 18.5 และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เป็นมะเร็งตับ เป็นผู้ชายจำนวน 66 ราย คิดเป็นร้อยละ 74.2 ,เป็นผู้หญิงจำนวน 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 25.8 เมื่อเปรียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับมีอายุเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) เนื่องด้วยผู้ป่วยมะเร็งตับส่วนใหญ่มีอายุมากกว่าผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ ทำให้อายุเฉลี่ยของผู้เข้าร่วมศึกษาทั้งสองกลุ่มแตกต่างกัน ในขณะที่เพศและปริมาณ HBV DNA ในเลือดของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน

ทำการศึกษาความชุกของสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและความชุกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีแบบต่างๆระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับแล้วทำการเปรียบเทียบความชุกปัจจัยต่างๆของไวรัสตับอักเสบบีระหว่างสองกลุ่ม โดยปัจจัยต่างๆของไวรัสตับอักเสบบีวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ EnhII/BCP/Pre-core และส่วน Pre-S1/Pre-S2/S ตามลำดับ

จากผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับส่วนใหญ่ติดเชื้อไวรัสจีโนไทป์ C และ จีโนไทป์ B โดยกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C มากกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับ แต่เนื่องจากกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับพบผู้ที่ไม่ทราบจีโนไทป์จำนวน 30 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 ซึ่งอาจติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ B หรือจีโนไทป์ C ก็ได้ ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C มากกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการศึกษาจากประเทศไต้หวัน จีน และ ญี่ปุ่นพบว่าผู้ติดเชื้อไวรัส จีโนไทป์ C มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับสูงกว่าผู้ติดเชื้อไวรัสจีโนไทป์ B เช่นการศึกษาแบบไปข้างหน้าจากประเทศไต้หวัน ทำการศึกษาผู้ป่วยจำนวน 4,841 ราย ติดตามผลประมาณ 14 ปี พบว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ค่า odds ratio เท่ากับ 5.11 (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 3.20 ถึง 8.18) [52] อย่างไรก็ตาม

ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบบีและการเป็นมะเร็งตับยังไม่ชัดเจน เนื่องจากผลการศึกษาต่างๆที่ผ่านมามีความขัดแย้งกัน นอกจากนี้ผลการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับพบการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A และ T1753A/G/C มากกว่ากลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p=0.003*), (*p=0.008*) ตามลำดับ และพบว่ากลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับมีอายุเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มผู้ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ (*p=0.001*) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) ผู้วิจัยทำการเก็บข้อมูลเพียงครั้งเดียวในช่วงเวลาหนึ่งแล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้กลุ่มผู้เป็นมะเร็งตับมีอายุเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับพบการกลายพันธุ์ในส่วน EnhII/BCP/PC แบบต่างๆใกล้เคียงกับผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ อาจเกิดจากประชากรที่ศึกษาในกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับนั้น เป็นผู้ป่วยโรคตับเรื้อรังที่มีการดำเนินโรคตับอยู่ในระยะท้ายก่อนการเกิดมะเร็งตับ ทำให้ตรวจพบการกลายพันธุ์ในส่วนของ EnhII/BCP/PC ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาบ่งชี้ว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดได้บ่อยที่สุดในส่วนของ basal core promoter (BCP) และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของตับอักเสบแบบเรื้อรัง โดยเฉพาะการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ นอกจากนี้การกลายพันธุ์แบบ T1753A/G/C มักพบร่วมกับการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A มีรายงานว่า T1753A/G/C มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับเช่นเดียวกัน [53] แม้ว่ากลไกการเกิดมะเร็งตับจากการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A ยังไม่ชัดเจน แต่มีหลายสมมุติฐานที่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับได้แก่ 1) การกลายพันธุ์แบบนี้อาจทำให้เชื้อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเนื่องจากมีสัดส่วนของ pgRNA ต่อ precore mRNA เพิ่มมากขึ้น [54] 2) การกลายพันธุ์แบบนี้อาจทำให้การตอบสนองของ T lymphocyte ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง [55] 3) การกลายพันธุ์แบบนี้ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน X ทำให้มีการยับยั้งการทำงานของยีนพี 53 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง และเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคมะเร็งตับ [5]

การกลายพันธุ์ในบริเวณ Pre-S เป็นการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรัง จากการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมในผู้ป่วยมะเร็งตับ 64 คนและผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังที่ไม่มีอาการ 202 คน พบว่า Pre-S deletion เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดมะเร็งตับ มีค่า odds ratio เท่ากับ 3.72 (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.44 ถึง 9.65) [56] การขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์หรือ deletion ของ pre-S มีผลกระทบต่อการสร้าง middle และ Small surface protein ทำให้มีการสะสม Large surface protein ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลั่ม (ER) เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้นภายในเซลล์ตับ แล้วเกิดการทำลายเซลล์ตับอย่างต่อเนื่อง นำไปสู่การเป็นมะเร็งตับในที่สุด [39] ซึ่งจากผลการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S1/Pre-S2/S

พบว่ามีการกลายพันธุ์แบบ Pre-S1 deletion ในกลุ่มผู้ที่เป็นมะเร็งตับมากกว่าในกลุ่มผู้ที่ไม่เป็นมะเร็งตับ คิดเป็นร้อยละ 9.1 เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p= 0.07)*

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าในกลุ่มประชากรที่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังสูงจะพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการได้รับสารอะฟลาทอกซินสูงและความชุกของโรคมะเร็งตับ โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา เช่น ไต้หวัน,แกมเบีย,กินี และบางมณฑลของประเทศจีน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและสารอะฟลาทอกซิน ทั้งสองปัจจัยช่วยเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอย่างมาก [9],[10],[11] ส่งผลให้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของทั้งสองปัจจัยมากขึ้น โดยที่การตรวจพบการกลายพันธุ์แบบ อาร์249เอส ใช้เป็นตัวบ่งชี้การได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 โดยศึกษาถึงผลกระทบระหว่างสารพิษจากเชื้อราและไวรัสตับอักเสบบี ผลจากการศึกษาดังกล่าวพบว่ายังไม่มีความชัดเจน เช่น การศึกษาในตอนเหนือของประเทศไทย พบการพันธุ์แบบ A1762T/G1764A และการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอสในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งตับ คิดเป็นร้อยละ 40 และร้อยละ 25 ตามลำดับ [8] การศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมในประเทศไทย ซึ่งรายงานเกี่ยวกับการเกิดมะเร็งตับมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและการได้รับสารอะฟลาทอกซิน ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส โดยพบความสัมพันธ์ดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยและไม่มีภาวะตับแข็ง [57][58]. อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยผู้วิจัยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี 1ในการเกิดมะเร็งตับ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ชนิดอาร์249เอส ในกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับและไม่เป็นมะเร็งตับ พบการกลายพันธุ์ระหว่างสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p=0.669*) นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบอายุเฉลี่ยระหว่างผู้ที่เป็นมะเร็งตับที่พบการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A ร่วมกับการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส กับกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับพบว่ามีอายุเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อาจกล่าวได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรไทยที่ทำการศึกษา ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสมมุติฐานต่อไปนี้

1) การศึกษานี้ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิด อาร์249เอสในซีรั่ม ซึ่งยีน *p53* สามารถพบหรือสกัดได้จากเม็ดเลือดขาว ซึ่งในซีรั่มมีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยมาก ทำให้มียีน p53 ที่ต้องการศึกษามีปริมาณน้อย ส่งผลต่อโอกาสที่จะตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส มีน้อยด้วย เนื่องจากยีนพี 53 พบได้ในเม็ดเลือดขาว ดังนั้นอาจตรวจการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ใน Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งเป็น เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง เช่น โมโนไซต์

สามารถแยกได้จาก buffy coat ของเลือดตัวอย่าง โดยที่การตรวจการกลายพันธุ์ยีนพี 53 ชนิดอาร์ 249เอสใน PBMCs นั้นเชื่อว่าจะทำให้ตรวจพบการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น

2) ในขั้นตอน PCR การเพิ่มจำนวนยีนพี 53 บริเวณ exon ที่ 7 ด้วยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนที่ต้องการจำนวน 35 รอบ จะได้ ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ 2^{35} ชุด ซึ่ง DNA ที่ได้จากกระบวนการ PCR อาจมีปริมาณน้อย ส่งผลให้เมื่อวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ด้วยวิธี RFLP จึงตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ดังนั้นถ้าเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR มากขึ้น จะทำให้ได้ปริมาณชิ้นส่วนของยีนพี 53 บริเวณ exon ที่7 เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งทำให้โอกาสการตรวจพบการกลายพันธุ์ยีนพี 53ชนิดอาร์ 249เอส ด้วยวิธี RFLP เพิ่มขึ้น

3) การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์ 249 เอสในซีรั่ม อาจต้องพิจารณาข้อมูลการได้รับสารอะฟลาทอกซินในผู้เข้าร่วมวิจัยด้วย เนื่องจากโอกาสการได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ในแต่ละคนอาจแตกต่างกันตามสิ่งแวดล้อมของที่พักอาศัย, ลักษณะการดำเนินชีวิต, อาชีพและภูมิประเทศที่แตกต่างกัน ซึ่งงานวิจัยนี้ไม่ได้เก็บข้อมูลดังกล่าว

ดังนั้นจากการศึกษาสรุปได้ว่าปัจจัยต่างๆของไวรัสตับอักเสบบีมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ โดยที่การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพยากรณ์การเกิดโรคมะเร็งตับได้ ในทางตรงข้ามงานวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอส กับการเกิดโรคมะเร็งตับ ดังนั้นผู้วิจัยเสนอให้มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนผู้เข้าร่วมวิจัยให้มีจำนวนที่มากขึ้นรวมทั้งเก็บข้อมูลการได้รับสารอะฟลาทอกซินในประชากรที่เข้าร่วมวิจัย และตรวจหากลายพันธุ์ของยีนพี 53 ชนิดอาร์249เอสใน PBMCs เพื่อสามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสตับอักเสบบีและการได้รับสารอะฟลาทอกซินกับการเกิดมะเร็งตับได้ในอนาคต

รายการอ้างอิง

[1] Bosch, F.X., Ribes, J., Diaz, M., and Cleries, R. Primary liver cancer worldwide incidence and trends. Gastroenterology 127(2004):S5-S16.

[2] Srivatanakul, P., Sriplung, H., and Deerasamee, S. Epidermiology of liver cancer: an overview. Asian Pac J Cancer Prev 5(2004):118-25.

[3] Yuen, M.F., Hou, J.L., and Chutaputti, A.; Asia Pacific Working Party on Prevention of Hepatocellular Carcinoma. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region. J Gastroenterol Hepatol. 24(2009):346-53.

[4] Yu, M.C., Yuan, J.M., Govindarajan, S., and Ross, R.K. Epidermiology of hepatocellular carcinoma. Can J Gastroenterol 14(2000):703-9.

[5] Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W., and Harris, C.C.TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. Oncogene 26(2007):2166-76.

[6] Lok, A.S. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 127(2004):S303-9.

[7] Tangkijvanich, P., Theamboonlers, A., Sriponthong, M., Kullavanijaya, P., and Poovorawan, Y. SEN virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma:a case-control study. Am J Gastroenterol 98(2003):2500-4.

[8] Kuang, S.Y., Lekawanvijit, S., Maneekarn, N., et al. Hepatitis B 1762T/1764A mutations, hepatitis C infection,and codon 249 p53 mutations in hepatocellular carcinomas from Thailand. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(2005):380-4.

[9] Lunn, R.M., Zhang, Y.J., Wang, L.Y., et al. p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan . Cancer Res 57(1997):3471-7.

[10] Ming, L., Thorgeirsson, S.S., Gail, M.H., et al. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong China. Hepatology 36(2002):1214-20.

[11] Kirk, G.D., Lesi, O.A., Mendy, M., et al. 249ser TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B virus infection and risk of hepatocellular carcinoma. Oncogene 38(2005):5858-67.

[12] Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., and Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis :incidence and risk factors. Gastroenterology. 127(2004):S35-50.

[13] Park, N.H., Chung, Y.H., Youn, K.H., et al. Close correlation of p53 mutation to microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. J Clin Gastroenterol33(2001) :397-401.

[14] Wild, C.P. and Montesano, R. A model of interaction : Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer etiology prevention. Cancer Lett 286(2009):22-8.

[15] Levrero, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. Oncogene 25(2006): 3834-47.

[16] Terada, T., Ueda, K., and Nakanuma, Y. Histopathological and morphometric analysis of atypical adenomatous hyperplasia of human cirrhotic livers. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 422(1993):381-8.

[17] Fracanzani, A.L., Conte, D., Fraquelli, M., et al. Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. Hepatology 33(2001):647-51.

[18] Schaefer, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol. 13(2007):14-21.

[19] Norder, H., Courouce, A.M., and Magnius, L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. Virology 198(1994):489-503.

[20] Stuyver, L., De, G.S., Van, G.C., et al. A new genotype of hepatitis B virus:complete genome and phylogenetic relatedness.J Gen Virol 81(2000):67-74.

[21] Lee, W.M. Hepatitis B virus infection . N Engl J Med 337(1997):1733-45.

[22] Kao, J.H., Chen, P.J. and Chen, D.S. Recent Advances in the Research of Hepatitis B virus-related Hepatocellular carcinoma: Epidermiologic and Molecular Biological Aspects. Adv Cancer Res. 108(2010):21-72.

[23] Yang, H.I., Yeh, S.H., Chen, P.J., et al. Associations Between Hepatitis B Virus Genotype and Mutants and the Risk of Hepatocellular Carcinoma. J Natl Cancer Inst100(2008) :1134-43.

[24] Ehata, T., Omata, M., Chuang, W.L. et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. J Clin Invest91(1993): 1206-13.

[25] Tangkijvanich, P., Theamboonlers, A., Jantaradsamee, P., et al. Core promoter and precore mutants of hepatitis B virus : prevalence and clinical relevance in Chronic hepatitis patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health 31(2000):627-35.

[26] Yeun, M.F. Revisiting the natural history of chronic hepatitis B:impact of new concepts on clinical management. J Gastroenterol Hepatol 22(2007):973-6.

[27] Hunt, C.M., McGill, J.M., Allen, M.I., and Condreay, L.D. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. Hepatology 31(2000):1037-44.

[28] Tangkijvanich, P., Sa-nguanman, P., Mahachai, V.,Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. A case –control study on sequence variants in the enhanceII/core promoter/pre core and x genes of Hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatol Int 31(2010):577-84.

[29] Maroyama, R., Kato, N., Yoshida, H., et al. Nucleotide change of codon 38 in the X gene of hepatitis B virus genotype C is associated with an increased of hepatocellular carcinoma . J Hepatol 45(2006):805-12.

[30] Yeh, C.T., Shen, C.H., Tai, D.I., et al. Identification and characterization of a previous hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. Oncogene 19(2000):5213-20.

[31] Guo, X., Jin, Y., Quan, G.S., and Tu, H. Sequential accumulation of the mutations in core promoter of hepatitis B virus is associated with the development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China. J Hepatol 49(2008):718-25.

[32] Liu, C.J., and Kao, J.H. Core promoter mutations of hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma:story beyond A1762T/G1764A mutations. J Gastroenterol Hepatol 23(2008):347-50.

[33] Huy, T.T., Ushijima, H., Win, K.M., et al. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. J Clin Microbiol 41(2003):5449-55. .

[34] Hsieh, Y.H., Su, I.J., Wang, H.C., et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induced oxidative stress and DNA damage. Carcinogenesis 25(2004): 2023-32.

[35] Hsieh, Y.H., Su, I.J., Wang, H.C., et al. Hepatitis B virus preS2 mutant surface antigen induces degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through c-Jun activation domain-binding protein 1.Mol Cancer Res 5(2007):1063-72.

[36] Choi, M.S., Kim, D.Y., Lee, D.H., et al. Clinical significance of pre-S mutations in patients with genotype C hepatitis B virus infection. J Viral Hepat 14(2007):161-8.

[37] Gao, Z.Y., Li, T., Wang, J., et al. Mutations in pre-S genes of genotype C hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 42(2007):761-8.

[38] Suwannakarn, K., Tangkijvanich, P., Thawornsuk, N., et al. Molecular epidermiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes. Hepatol Res 38(2008):244-51.

[39] Wang, H.C., Huang, W., Lai, M.D., and Su, I.J. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. Cancer Sci 97(2006):683-8.

[40] Pujol, F.H., Navas, M.C., Hainaut, P., and Chemin, I. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Lett 286(2009):80-8.

[41] Liu, S., Xie, J., Yin, J., et al. A Matched Case–Control Study of Hepatitis B Virus Mutations in the PreS and Core Promoter Regions Associated Independently With Hepatocellular Carcinoma. J Med Virol 83(2011):45-53.

[42] Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., and Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis:Incidence and risk factors. Gastroenterology 127(2004):S35-50.

[43] Petitjean, A. , Mathe, E., Kato, S., et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype:lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat 28(2007):622-9.

[44] Wild, C.P., and Gong, Y.Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. Carcinogenesis 31(2010):71-82.

[45] Liu, Y., and Wu, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. Environ Health Perspect 118(2010):818-24.

[46] Wild, C.P., Jiang, Y.Z., Allen, S.J., Jansen, L.A., Hall, A.J., and Montesano, R. Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world. Carcinogenesis 17(1990):2271-4.

[47] IARC (International Agency for Research on Cancer). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol.56. Lyons: IARC Press, 1993.

[48] IARC (International Agency for Research on Cancer).Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene.IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 82. Lyons: IARC Press, 2002.

[49] Jackson, P.E., Kuang, S.Y., Wang, J.B., et al. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. Carcinogenesis 24(2003):1657-63.

[50] Szymanska, K., Lesi, O.A., Kirk, G.D., et al. Ser-249TP53 mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in the Gambia, West Africa. Int J Cancer 110(2004):374-9.

[51] Bruix, J., and Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology 42(2005) :1208-36.

[52] Yu, M.W., Yeh, S.H., Chen, P.J., et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. J Natl Cancer Inst 97(2005) :265-72.

[53] Liu, C.J., and Kao, J.H. Genetic variability of hepatitis and response to antiviral therapy. Antivir Ther 13(2008):613-24.

[54] Hunt, C.N., McGrill, J.M., Allen, M.I., and Condreny, L.D. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. Hepatology 31(2000):1037-44.

[55] Malamassari, S.L., Deng, Q., Fontaine, H., et al. Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations an T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. Hepatology 45(2007):1199-209.

[56] Lin, C.L., Liu, C.H., Chen, W., et al. Association of pre-S deletion mutant of hepatitis B virus with risk of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 22(2007):1098-103.

[57] Villar, S., Ortiz-Cuaran, S., Abedi-Ardekani, B., et al. Aflatoxin-induced TP53 R249S mutation in hepatocellular carcinoma in Thailand: association with tumors developing in the absence of liver cirrhosis. PLoS One 7(2012):e37707.

[58] Ortiz-Cuaran, S., Villar, S., Gouas, D., et al. Association between HBX status, aflatoxin-induced R249S TP53 mutation and risk of hepatocellular carcinoma in a case-control study from Thailand. Cancer Lett 331(2013):46-51.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 5xTris borate buffer (5x TBE)

Tris–base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	กรัม
1 x TBE	200	มิลลิลิตร

ละลายด้วยการอุ่นในเตาไมโครเวฟแล้วผสมให้เข้ากันจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลาย lysis buffer

5.0 M NaCl	15	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	48	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. สารละลาย 20 mg/ml Proteinase K

Proteinase K	2	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

7. สารละลาย Red Cell Lysis Buffer (RCLB)

1M TRIS-HCl (pH 7.6)	10	มิลลิลิตร
5M NaCl	2	มิลลิลิตร
1M $MgCl_2$	5	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวชุรีพร ทองใบ

(ภาษาอังกฤษ) Miss Chureeporn Thongbai

เกิดวันที่ 28 มกราคม 2525

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

สถานภาพ โสด

ที่อยู่ปัจจุบัน 48/47 เอ.ซี.อพาร์ทเม้นท์ (203) งามวงศ์วาน ซอย8 ถ.งามวงศ์วาน ต.บางเขน อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000 โทรศัพท์ 0-2580-7377

การศึกษา **ระดับปริญญาตรี** สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2544 – 2548

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2553

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

Hepatitis B Virus Genetic Variations and *TP53 R249S* mutation in Patients with Hepatocellular Carcinoma in Thailand.

ผลงานได้รับการตอบรับว่าจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Asian Pacific Journal of Cancer Prevention . vol.14 issue 5.