จีโนไทป์และฟีโนไทป์ของกลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรสในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ

นางสาวชลรดา วิรัตรมณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENOTYPE AND PHENOTYPE OF *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* IN THAI SUBJECTS WITH LIVER CANCER

Miss Chonlada Viratroumanee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology
Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

500377

หัวข้อวิทยานิพนธ์	จีโนไทป์และฟีโนไทป์ของกลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ
โดย	นางสาว ชลรดา วิรัตรมณี
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	นายแพทย์ ชนินทร์ ลิ่มวงศ์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(นายแพทย์ ชนินทร์ ลิ่มวงศ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์จันทนี อิทธิพานิชพงศ์)

ชลรดา วิรัตรมณี: จีโนไทป์และฟีโนไทป์ของกลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรสในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ. (GENOTYPE AND PHENOTYPE OF *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* IN THAI SUBJECTS WITH LIVER CANCER) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: นพ. ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ 79 หน้า.

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma; HCC หรือ cholangiocarcinoma) 140 คน เปรียบเทียบกับคนปกติ 280 คน ทำการหาจีโนไทป์ของยีนจากตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมวิจัย พบว่ายีน *GSTP1* (Ile/Val) ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับมีความแตกต่างกับคนปกติ (OR= 0.5745; 95% CI: 0.3648-0.9046; *p*-value = 0.016) โดยมีผลลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ และมีการกระจายตัวตามสมการของ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) เมื่อนำยีน *GSTP1* (Ile/Val) มาศึกษาร่วมกับยีน *GSTT1* (+/+) ยังพบว่ามีความแตกต่างกับคนปกติ (OR= 0.4125; 95% CI: 0.1836-0.9269; *p*-value = 0.029) และยังมีผลในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ เมื่อทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ร่วมกันทั้ง 3 ยีนพบว่ามียีน 4 กลุ่มที่มีความแตกต่างกับคนปกติและลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ คือ *GSTM1* (+/+), *GSTT1* (+/+) และ *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.3745; 95% CI: 0.1742-0.8052; *p*-value = 0.011); *GSTM1* (-/-), *GSTT1* (+/+) และ *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.1830; 95% CI: 0.0707-0.4736; *p*-value = 0.0002); *GSTM1* (+/+), *GSTT1* (-/-) และ *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.1220; 95% CI: 0.0151-0.9862; *p*-value = 0.022); *GSTM1* (-/-), *GSTT1* (-/-) และ *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.3835; 95% CI: 0.1573-0.9347; *p*-value = 0.032) การศึกษาฟีโนไทป์ในกลุ่มมะเร็งตับ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีจำนวนน้อยเกินไป ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTP1* นั้นมีผลลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรไทยที่ทำการศึกษา

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....ชลรดา วิรัตรมณี.....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....พรเพ็ญ เปรมโยธิน.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4976564133: MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* / POLYMORPHISMS / LIVER CANCER / THAI POPULATION / GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION

CHONLADA VIRATROUMANEE: GENOTYPE AND PHENOTYPE OF *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* IN THAI SUBJECTS WITH LIVER CANCER. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. PORNPEN PRAMYOTHIN, Ph.D. THESIS COADVISOR: CHANIN LIMWONGSE, M.D., 79 pp.

Polymorphisms of *GSTs* genes (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) in 140 Thai subjects suffering from liver cancer (hepatocellular carcinoma; HCC or cholangiocarcinoma) were compared with 280 healthy volunteers in this case-control study. The genotype was determined from blood samples. Statistical analysis associated with *GSTP1* gene distribution of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) showed the decrease in risk of liver cancer in patients with *GSTP1* (Ile/Val) (OR= 0.5745; 95% CI: 0.3648-0.9046; *p*-value = 0.016). Likewise, *GSTP1* heterozygous mutant (Ile/Val) in combination with *GSTT1* wild type (+/+) in patients decreased susceptibility of liver cancer (OR= 0.4125; 95% CI: 0.1836-0.9269; *p*-value = 0.029). Interestingly, the combination of 3 genes that showed the decrease in risk of liver cancer in patients were 4 groups of *GSTM1* (+/+), *GSTT1* (+/+) and *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.3745; 95% CI: 0.1742-0.8052; *p*-value = 0.011); *GSTM1* (-/-), *GSTT1* (+/+) and *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.1830; 95% CI: 0.0707-0.4736; *p*-value = 0.0002); *GSTM1* (+/-), *GSTT1* (-/-) and *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR= 0.1220; 95% CI: 0.0151-0.9862; *p*-value = 0.022); *GSTM1* (-/-), *GSTT1* (-/-) and *GSTP1* (Ile/Val or Val/Val) (OR = 0.3835; 95% CI: 0.1573-0.9347; *p*-value = 0.032). Phenotype was not correlated with genotype due to the small numbers of patients. In conclusion *GSTP1* polymorphisms may affect the decreased risk of liver cancer in Thai patients studied.

Department Pharmacology	Student's signature Chonlada Viratroumanee
Field of study Pharmacology	Principal advisor's signature Pornpen Pramyothin
Academic year 2007	Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์นายแพทย์ ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอด

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ พันตำรวจโทหญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำในด้านการศึกษา และในงานวิจัย รวมทั้งเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และรวมทั้งขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์ และรองศาสตราจารย์ จันทนี อิทธิพานิชพงศ์ สละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลศิริราช ที่อนุญาตให้เข้าทำการวิจัยในหน่วยอณูพันธุศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ขอขอบพระคุณ ดร. วรรณา ทองนพคุณ คุณไกรฤกษ์ ทวีเชื้อ คุณธีระพงศ์ โพธิ์เอี่ยม รวมทั้งนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ และบุคคลากรทุกท่านในหน่วยอณูพันธุศาสตร์ และอณูชีววิทยาโมเลกุล ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณเภสัชกรหญิง เพยียรัตน์ สุวรรณศรี และเภสัชกร อนันต์ชัย อัศวเมฆิน ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำ รวมทั้งให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณอำนาจ ภักดีโต และคุณวิลาต จันทร์ฉาย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย

และท้ายที่สุด ผู้วิจัยใคร่กราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ได้สนับสนุนในด้านการศึกษาและให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ภาควิชาเภสัชวิทยา รวมทั้งบุคคลอื่น ๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึง ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฎ

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3. ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4. ข้อจำกัดของการวิจัย 3

1.5. วิธีดำเนินการวิจัย 4

1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. เภสัชพันธุศาสตร์ 6

2.2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างปัจเจกบุคคล 6

2.3. พันธุกรรมกับความแตกต่างของปัจจัยทางเภสัชศาสตร์

2.3.1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่กำหนด
ปัจจัยทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ 7

2.3.2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่กำหนด
ปัจจัยทางด้านเภสัชพลศาสตร์ 8

2.4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนในวิถีเมตาบอลิสมของยา

2.4.1. การเปลี่ยนแปลงยาในวิถีเมตาบอลิสมที่ 1 9

2.4.2. การเปลี่ยนแปลงยาในวิถีเมตาบอลิสมที่ 2 10

2.5. กลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส 12

2.6. กลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ชนิด M1 14

หน้า

2.7. กลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ชนิด P1 16
2.8. กลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ชนิด T1 17
2.9. มะเร็งตับ 18
3. วิธีดำเนินการวิจัย
3.1. ประชากร
3.1.1. เกณฑ์การคัดเลือกประชากร 26
3.1.2. เกณฑ์การคัดออกประชากร 27
3.2. จำนวนกลุ่มตัวอย่าง 27
3.3. วัสดุและอุปกรณ์การวิจัย
3.3.1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 28
3.3.2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 29
3.4. วิธีดำเนินงานวิจัย
3.4.1. การหาชนิดและความถี่ของความหลากหลายของยีน *GSTs* 30
3.4.1.1. การแยกเม็ดเลือดขาวเพื่อเตรียมสกัด DNA 31
3.4.1.2. การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี phenol / chloroform 32
3.4.1.3. การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวโดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือ (salting-out) 33
3.4.1.4. ขั้นตอนการหาชนิดและความถี่ของความหลากหลายของยีน *GSTs* 34
3.4.1.5. Condition ในการทำ PCR ของยีน *GSTM1* 36
3.4.1.6. Condition ในการทำ PCR ของยีน *GSTP1* 37
3.4.1.7. Condition ในการทำ PCR ของยีน *GSTT1* 38
3.4.1.8. Condition ในการทำ real time-PCR 39
3.4.1.9. Condition ในการทำ DHPLC 40
3.4.2. การหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs
3.4.2.1. ขั้นตอนการสกัด cytosol จากชิ้นเนื้อตับตามวิธีของ Chirst Von Bahr *et al* 43
3.4.2.2. การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ GSTs กับสารตั้งต้น CDNB 44

หน้า

3.4.2.3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al* 46
3.4.3. การจัด haplo-group ของยีน *GSTs* 46
3.5. การวิเคราะห์ข้อมูล 47
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล
4.1. การวิเคราะห์ผลของจีโนไทป์ในยีน *GSTs*
4.1.1. การศึกษาจีโนไทป์ในยีน *GSTM1* 48
4.1.2. การศึกษาจีโนไทป์ในยีน *GSTP1* 49
4.1.3. การศึกษาจีโนไทป์ในยีน *GSTT1* 50
4.1.4. การวิเคราะห์ผลของ real time-PCR ในยีน *GSTM1* 51
4.1.5. การวิเคราะห์ผลของ DHPLC ในยีน *GSTM1* 52
4.2. การวิเคราะห์ผลของฟีโนไทป์ในยีน *GSTs* ในผู้เข้าร่วมวิจัย ที่เป็นมะเร็งตับ 53
4.3. การจัด haplo-group ของยีน *GSTs* ชนิด M1 และ P1 58
4.4. การวิเคราะห์เชิงพรรณนา 59
4.5. การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนด้วยโปรแกรม MDR 63
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 64
รายการอ้างอิง 68
ภาคผนวก 74
ประวัติผู้วิจัย 79

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของมนุษย์ในยีน *GSTs* 11
2. แสดงสารประกอบจำพวก polycyclic aromatic hydrocarbon 13
3. แสดงลักษณะการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 14
4. แสดงอุบัติการณ์ในการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรโลก 19
5. แสดงการศึกษาจีโนไทป์ของยีน GSTs ต่อการเกิด HCC ในประชากรกลุ่ม African, Caucasian และ Asian 23
6. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ที่ทำการวิจัย 31
7. แสดงลำดับเบส และขนาดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา 35
8. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* และเอนไซม์ตัดจำเพาะ 35
9. แสดงสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ (specific substrate) กับเอนไซม์ GSTs 41
10. แสดง Conditions ที่ใช้ในการประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยเครื่อง Spectrophotometer 45
11. แสดงการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 46
12. แสดงจีโนไทป์ของยีน *GSTs* ชนิด *M1* และ *P1* ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma 53
13. แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาของตัวแปรประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs 54
14. แสดงการจัด haplo-group ยีน *GSTs* ชนิด *M1* และ *P1* 58
15. แสดงความถี่และการกระจายตัวในยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma กับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย 59
16. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ยีน ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma และ cholangiocarcinoma กับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย 61
17. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ยีน ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma และ cholangiocarcinoma กับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย 62
18. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนด้วยโปรแกรม MDR 63

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ความสัมพันธ์ของผลการรักษา และการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา 8
2. แสดงการเกิดปฏิกิริยา glutathione conjugation 12
3. แสดงการเกิดการขาดหายไปของยีน GSTM1 15
4. แสดงการเกิด SNPs ของยีน *GSTP1* 16
5. แสดงการเกิดการขาดหายไปของยีน *GSTT1* 17
6. แสดงอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งของประชากรโลกในปี 1997 18
7. แสดงปฏิกิริยาระหว่าง glutathione conjugation กับสารตั้งต้น (CDNB) 42
8. แสดง gel electrophoresis ของยีน *GSTM1* 48
9. แสดง gel electrophoresis ของยีน *GSTP1* 49
10. แสดง gel electrophoresis ของยีน *GSTT1* 50
11. แสดงผลของ real time-PCR ในยีน *GSTM1* 51
12. แสดง DHPLC ของยีน *GSTM1* 52
13. แสดงฮิสโตรแกรมของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs 54
14. แสดงแผนภาพลำต้นและใบ (Stem-and-Leaf Plot) ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ 55
15. แสดง BoxPlot ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs 55
16. แสดง Normal Probability Plot ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs 56
17. แสดง Detrended Normal Plot ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs 57

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	percent
µl	=	microlitre
/	=	per
Ala	=	alanine
Asn	=	asparagine
ASR	=	age-standardized rate
BSA	=	bovine serum albumin
CDNB	=	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CYP	=	cytochrome P450
DHPLC	=	denaturing high performance liquid chromatography
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EPH	=	epoxide hydrolase
GS-DNB	=	1-(s-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzene
GSH	=	reduce glutathione
GSTs	=	glutathione s-transferases
HCC	=	hepatocellular carcinoma
HWE	=	Hardy-Weinberg equilibrium
Ile	=	Isoleucine
Lys	=	lysine
M	=	molar
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
MDR	=	mulifactor dimensionality reduction
NAT	=	N-acetyltransferase
PAH	=	polycyclic aromatic hydrocarbon

PBS	=	phosphate buffer solution
PCR	=	polymerase chain reaction
RBC	=	red blood cell
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RPM	=	revolution per minute
SDS	=	sodium decadocyl sulfate
SH-group	=	sulhydryl group
SNPs	=	single nucleotide polymorphisms
SULT	=	sulfotransferase
TEAA	=	triethyl ammonium acetate
TPMT	=	thiopurine methyltransferase
UGT	=	UDP glucuronosyltransferase
Val	=	valine
VNTRS	=	variable number of tandem repeats
WBC	=	white blood cell