

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน STAT3 และ STAT4
กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง



นายนาวิน จันทรา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

ASSOCIATIONS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN STAT3 AND STAT4
FOR RISK OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN THAI PATIENTS
WITH CHRONIC HEPATITIS B

Mr. Nawin Chanthra



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของ
ยีน STAT3 และ STAT4 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง
ตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

โดย

นายนาวิน จันทรา

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตรีประเสริฐสุข)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต.เทียนประเสริฐ)

นาวิณ จันทรา : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน STAT3 และ STAT4 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง. (ASSOCIATIONS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN STAT3 AND STAT4 FOR RISK OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.สัญญาชัย พยุงภร, 85 หน้า.

โปรตีน Signal transducers and activator of transcriptions (STATs) เป็นสมาชิกของตระกูล transcription factor ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในวิถีการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ (cytokines) มีหลักฐานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนยีน STATs เช่น rs2293152 และ rs1053004 บนยีน STAT3 และ rs7574865 บนยีน STAT4 มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis B, CHB) งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะอธิบายความสัมพันธ์ของ SNPs เหล่านี้กับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งการศึกษาแบ่งผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ (CHB-related HCC) จำนวน 192 ราย กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับ (CHB without HCC) จำนวน 200 ราย และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls) จำนวน 190 ราย สำหรับการหาจีโนไทป์ของ SNPs rs2293152 และ rs7574865 ทำโดยวิธี polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism ส่วน SNP rs1053004 ทำด้วยวิธี allelic discrimination assays โดยอาศัย TaqMan real-time PCR ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า การกระจายตัวของจีโนไทป์ของ SNPs rs2293152 และ rs1053004 บนยีน STAT3 และ rs7574865 บนยีน STAT4 อยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg ($P > 0.05$) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งตับ ($P > 0.05$) ในขณะที่ SNP ตำแหน่ง rs1053004 จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC (odds ratio=1.85, 95% confidence interval=1.00-3.43, $P=0.049$) นอกจากนี้จีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง rs7574865 บนยีน STAT4 (GG เทียบกับ TT+GT) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม healthy controls (odds ratio=1.71, 95% confidence interval=1.13-2.59, $P=0.011$) ดังนั้นการค้นพบเหล่านี้จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงว่ายีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004 และยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับและอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) สำหรับการทำนายการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยได้

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5574202530 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HEPATITIS B VIRUS (HBV) / HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) / SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3 (STAT3) / SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 4 (STAT4) / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS)

NAWIN CHANTHRA: ASSOCIATIONS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN STAT3 AND STAT4 FOR RISK OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B. ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D., 85 pp.

Signal transducers and activator of transcription (STAT) proteins, a family of transcription factors that play pivotal roles in cytokine signaling pathways. Several evidences indicated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in STATs gene such as rs2293152 and rs1053004 at STAT3 and rs7574865 at STAT4 have been associated with chronic hepatitis B (CHB) induced hepatocellular carcinoma (HCC). This study aims to describe the association between these SNPs and HCC in Thai patients with CHB. Study subjects were enrolled and divided into 3 groups including CHB-related HCC (n=192), CHB without HCC (n=200) and healthy controls (n=190). The rs2293152 and rs7574865 SNPs were genotyped using polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism whereas the rs1053004 SNP was genotyped using allelic discrimination assays based on TaqMan real-time PCR. Data analysis revealed that the distribution of rs2293152 and rs1053004 at STAT3 and rs7574865 at STAT4 genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). rs2293152 SNP on STAT3 gene was not significantly associated with the risk of HCC ($P > 0.05$) whereas the CC genotype of rs1053004 SNP was significantly associated with an increased risk of HCC compared with the CHB without HCC (odds ratio=1.85, 95% confidence interval=1.00-3.43, $P=0.049$). In addition, the genotype of rs7574865 SNP at STAT4 (GG versus TT+GT) was significantly associated with a reduced risk of HCC when compared with the healthy controls (odds ratio=1.71, 95% confidence interval=1.13-2.59, $P=0.011$). Therefore, these findings provided important evidence that the rs1053004 SNP at STAT3 and rs7574865 SNP at STAT4 were significantly associated with HCC risk and might be used as a novel genetic marker for HCC in Thai population.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากปราศจากบุคคลผู้หนึ่งซึ่งมีพระคุณเป็นอย่างสูงต่อการศึกษาในระดับปริญญาโทของข้าพเจ้า บุคคลผู้นั้นคือ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นับตั้งแต่ข้าพเจ้าเข้ารับการศึกษาในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์คอยให้ความรู้และคำแนะนำสั่งสอนอย่างเอาใจใส่ รวมทั้งเป็นต้นแบบที่ดีในทุก ๆ ด้านมาโดยตลอด นอกจากนี้อาจารย์ยังมอบทุนค่าเล่าเรียนและค่าครองชีพแก่ข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จการศึกษา จึงประจักษ์ชัดแล้วว่าอาจารย์คือบุคคลที่ให้โอกาสทางการศึกษาและเป็นต้นแบบทางความคิดของข้าพเจ้าอย่างแท้จริง ทำให้ข้าพเจ้ามีวันนี้ วันที่มีการศึกษาและอนาคตที่ดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงครับ

การบรรลุสู่จุดหมายของงานวิจัย นอกจากต้นแบบทางความคิดแล้วยังจำเป็นต้องอาศัยต้นแบบทางกายหรือการกระทำด้วย ต้นแบบที่กล่าวถึงนี้คือแบบอย่างที่ถูกต้องในการปฏิบัติการทดลอง ซึ่งต้องได้รับการถ่ายทอดจากผู้เชี่ยวชาญ บุคคลผู้ที่เป็นต้นแบบทางกายของข้าพเจ้าคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตย์ชัย พงษ์กร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ทุกครั้งที่มีความปัญหาในด้านเทคนิคการทำวิจัย อาจารย์จะแนะนำวิธีแก้ปัญหาและทางออกที่ดีให้กับข้าพเจ้าเสมอ ทำให้ข้าพเจ้าไม่ย่อท้อต่ออุปสรรค และก้าวข้ามปัญหาที่เกิดขึ้นมาสู่ความสำเร็จได้เป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงครับ

วิทยานิพนธ์จะบริบูรณ์พร้อมไม่ได้หากปราศจากคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย และรองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตริประเสริฐสุข กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย ซึ่งคอยชี้แจงเคลือบข้อสงสัยและพิจารณาเนื้อหาให้ถูกต้อง ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านครับ

ขอขอบคุณเจ้าของเลือดตัวอย่างทุกท่านที่อุทิศตนเพื่องานวิจัยอันทรงคุณค่า และเป็นแรงผลักดันให้เกิดการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์ของประเทศ ขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บเลือดตัวอย่างมาใช้ในงานวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย และขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 และหน่วยปฏิบัติการวิจัย Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย นอกจากนี้ ขอขอบคุณคุณเกษมณี ไพโรจน์ตถาวร ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูล น.ส.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ และน.ส.อภิชญา คล้ายพั้งสินธุ์ ที่ช่วยเก็บรวบรวมเลือดตัวอย่าง ขอขอบคุณครับ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาต่อระดับปริญญาโทบัณฑิต พร้อมทั้งให้ความรักความอบอุ่น และเป็นกำลังใจที่ดีของข้าพเจ้าตลอดมา ข้าพเจ้าขอขอบความสำเร็จและความภาคภูมิใจนี้ให้กับทุกท่านที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จของข้าพเจ้า ขอขอบคุณครับ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	5
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	5
คำสำคัญ.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).....	8
บทบาทของโปรตีน STAT3 ในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปกติไปสู่เซลล์มะเร็ง.....	9
บทบาทของโปรตีน STAT3 ต่อการอักเสบ.....	9
บทบาทของโปรตีน STAT3 ในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis.....	11
บทบาทของโปรตีน STAT3 ในวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle).....	11
บทบาทของโปรตีน STAT3 ในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis).....	11
บทบาทของโปรตีน STAT3 ในการรุกรานเซลล์ (Cellular invasion).....	12
HBV กับการทำงานของโปรตีน STAT3.....	12

Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4).....	12
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)	16
TaqMan probe real-time PCR	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
รูปแบบการวิจัย.....	18
ประชากรที่ศึกษา	18
1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)	18
2. การคำนวณขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Sample size)	20
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	21
1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	21
3. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)	22
4. สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR	22
5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)	23
6. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector	23
7. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation	23
8. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)	23
9. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP rs2293152 บนยีน STAT3 และ SNP rs7574865 บนยีน STAT4 ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	23
10. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP rs1053004 บนยีน STAT3 ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR.....	24
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis.....	24
12. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatics.....	24
13. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	24
วิธีดำเนินการวิจัย	25
1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) จากเซลล์ HepG2, A549 และ HeLa	25
2. การทำ positive control สำหรับ SNP rs2293152 บนยีน STAT3 และ SNP rs7574865 บนยีน STAT4	26

3.	การทำ positive control สำหรับ SNP rs1053004 บนยีน <i>STAT3</i>	33
4.	การเก็บตัวอย่างเลือด	38
5.	การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMCs ของกลุ่มประชากรเป้าหมาย.....	38
6.	การหาจีโนไทป์ของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมายด้วยวิธี PCR-RFLP	40
7.	การหาจีโนไทป์ของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs1053004 ในกลุ่มประชากรเป้าหมายด้วยวิธี <i>TaqMan</i> probe real-time PCR	42
8.	การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	43
9.	การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis).....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....		44
1.	การทำ positive control สำหรับ SNP rs2293152 บนยีน <i>STAT3</i>	44
2.	การทำ positive control สำหรับ SNP rs7574865 บนยีน <i>STAT4</i>	47
3.	การทำ positive control สำหรับ SNP rs1053004 บนยีน <i>STAT3</i>	50
4.	การหาจีโนไทป์ของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และยีน <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย	53
5.	ตัวอย่างตารางบันทึกผลการสกัดดีเอ็นเอและจีโนไทป์ของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และยีน <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย	56
6.	ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ใช้ในงานวิจัย	58
7.	Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE).....	60
8.	ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และ <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ	61
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง		67
รายการอ้างอิง		74
ภาคผนวก.....		81
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี.....		82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์		85

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ ยีน <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865.....	26
ตารางที่ 2	สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR.....	26
ตารางที่ 3	สภาวะที่ใช้ทำ PCR.....	27
ตารางที่ 4	สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector.....	28
ตารางที่ 5	ขนาดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR-RFLP สำหรับยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 ภายหลังจาก การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	32
ตารางที่ 6	สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR พลาสมิดสำหรับยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865	33
ตารางที่ 7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs1053004	33
ตารางที่ 8	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR.....	34
ตารางที่ 9	สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา real-time PCR	37
ตารางที่ 10	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ TaqMan probe real-time PCR.....	37
ตารางที่ 11	สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR.....	40
ตารางที่ 12	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR.....	40
ตารางที่ 13	สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา real-time PCR	42
ตารางที่ 14	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ TaqMan probe real-time PCR.....	42
ตารางที่ 15	ตัวอย่างผลการสกัดดีเอ็นเอและจีโนมไทป์ของยีน <i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และยีน <i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย.....	56
ตารางที่ 16	ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ใช้ในงานวิจัยนี้	58
ตารางที่ 17	การเปรียบเทียบความถี่จีโนมไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ บนยีน <i>STAT3</i> และ <i>STAT4</i> ในกลุ่มประชากรที่ศึกษากับค่าคาดหวังโดยใช้สมมูลของ Hardy-Weinberg.....	60

ตารางที่ 18 ความถี่จีโนไทป์และแอลลีลของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152
 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC 64

ตารางที่ 19 ความถี่จีโนไทป์และแอลลีลของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004
 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC 65

ตารางที่ 20 ความถี่จีโนไทป์และแอลลีลของยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865
 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC 66



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1	จีโนมของ HBV.....	6
รูปที่ 2	ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC.....	7
รูปที่ 3	ความสัมพันธ์ของโปรตีน STAT3 กับการอักเสบและการเกิดมะเร็ง.....	9
รูปที่ 4	ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง STAT3 และ NF- κ B.....	10
รูปที่ 5	เซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่มีส่วนร่วมในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HBV ..	13
รูปที่ 6	โปรตีน STATs ต่าง ๆ ภายใน myeloid cells ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทาน และส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง ..	14
รูปที่ 7	ขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR.....	16
รูปที่ 8	ขั้นตอน Real-time PCR โดยอาศัย TaqMan probes.....	17
รูปที่ 9	ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	32
รูปที่ 10	ผลการทำ PCR ยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 จากเซลล์ HepG2 และ A549 ..	44
รูปที่ 11	ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 ..	45
รูปที่ 12	PCR-RFLP ของยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 ..	46
รูปที่ 13	ผลการทำ PCR ยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 จากเซลล์ HepG2 และ HeLa ..	47
รูปที่ 14	ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 ..	48
รูปที่ 15	PCR-RFLP ของยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 ..	49
รูปที่ 16	ผลการทำ PCR ยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004 จากเซลล์ HepG2 และ A549 ..	50
รูปที่ 17	ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004 ..	51
รูปที่ 18	Allelic discrimination plot ของ positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ของยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004 ..	52
รูปที่ 19	ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152.....	53
รูปที่ 20	ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865.....	54
รูปที่ 21	ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004.....	55

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย..... 4



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
μl	Microliter
95%CI	95% Confidence interval
bp	Base pair
CHB	Chronic hepatitis B
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase chain reaction
<i>P</i> -value	Probability value
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Round per minute
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
TBE	Tris Borate Buffer
T_m	Melting temperature

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งของเซลล์ตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นโรคมะเร็งตับปฐมภูมิ (primary liver cancer) ที่พบได้อย่างแพร่หลาย และจัดเป็นโรคมะเร็งที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งเสียชีวิตมากเป็นอันดับที่ 4 [1] ซึ่งคาดว่าในแต่ละปีอาจพบผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC รายใหม่ประมาณ 250,000 ราย และพบว่ามีผู้เสียชีวิตจากการเป็นมะเร็งชนิดนี้ในแต่ละปีประมาณ 500,000 ถึง 600,000 ราย [2] ผู้ป่วยมะเร็งตับร้อยละ 80 อยู่ในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งพบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (South-east Asia) และภูมิภาคที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา ทวีปแอฟริกา (Sub-Sahara Africa) [3] มะเร็งตับมีการดำเนินของโรคที่รุนแรงและรักษายาก เพราะผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ในระยะท้ายของโรค ดังนั้นจึงมีผู้เสียชีวิตจากการเป็นมะเร็งชนิดนี้จำนวนมากในแต่ละปี [4] ประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับในเพศชายสูงเป็นอันดับที่หนึ่งและในเพศหญิงเป็นอันดับที่สาม [5, 6] มะเร็งตับมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น ตับแข็ง (cirrhosis) ตับอักเสบ (hepatitis) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis B, CHB) หรือติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis C, CHC) การได้รับสารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) การดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ [7-9] จากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเป็นปัจจัยที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus, HBV) มีโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิดมะเร็งตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง X protien ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของ signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในวิถี Janus kinase (JAK)/STAT [10, 11] นอกจากนี้โปรตีน STAT3 สามารถจับกับ HBV enhancer 1 ได้ และกระตุ้นการแสดงออกของยีนใน HBV [12, 13]

จากการศึกษาก่อนหน้าของ Xie J. และคณะ (2013) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs2293152 จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ ส่วนในเพศหญิงพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs1053004 จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ [14]

นอกจากโปรตีน STAT3 แล้วยังมีโปรตีน STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) ที่เป็นสมาชิกของตระกูล STATs transcription factor ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเป็นตัวส่งสัญญาณจาก interleukin-12 (IL-12) และ type I interferon (IFN- α หรือ IFN- β) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิต type II interferon (IFN- γ) [15-17] IFN- γ เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันร่างกายจากการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และการยับยั้งการเกิดมะเร็ง การสูญเสียความสามารถในการกระตุ้นการผลิต IFN- γ อาจจะทำให้ลดความสามารถในการต้านทานไวรัสและมะเร็งลง [18-20] ในขณะที่มีการแสดงออกของ IFN- γ มากเกินไป อาจทำให้เกิด autoimmune disease ได้ [21] จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ความสมดุลในการแสดงออกของยีน *STAT4* มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด autoimmune disease และมะเร็งผ่านทาง การตอบสนองของการอักเสบ จากการศึกษาของ Jiang D.K. และคณะ (2013) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ โดยอัลลีล (Allele) G มีความสัมพันธ์กับระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *STAT4* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในเนื้อเยื่อที่เป็นและไม่เป็นมะเร็งตับ แต่เนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งตับจะมีระดับของการแสดงออกของยีน *STAT4* ที่ต่ำกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ [22] นอกจากนี้ การศึกษาของ Clark A. และคณะ (2013) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 ในประชากรเวียดนามให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Jiang D.K. และคณะ (2013) โดยพบว่าอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับ ส่วนอัลลีล G เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยเวียดนามที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ [23]

จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs1053004 โดยการใช้เทคนิค TaqMan probe real - time PCR ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic markers) เพื่อทำนายการเกิดมะเร็งตับสำหรับผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทยได้

คำถามของการวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* และ *STAT4* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ที่มีสุขภาพดีมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC หรือไม่

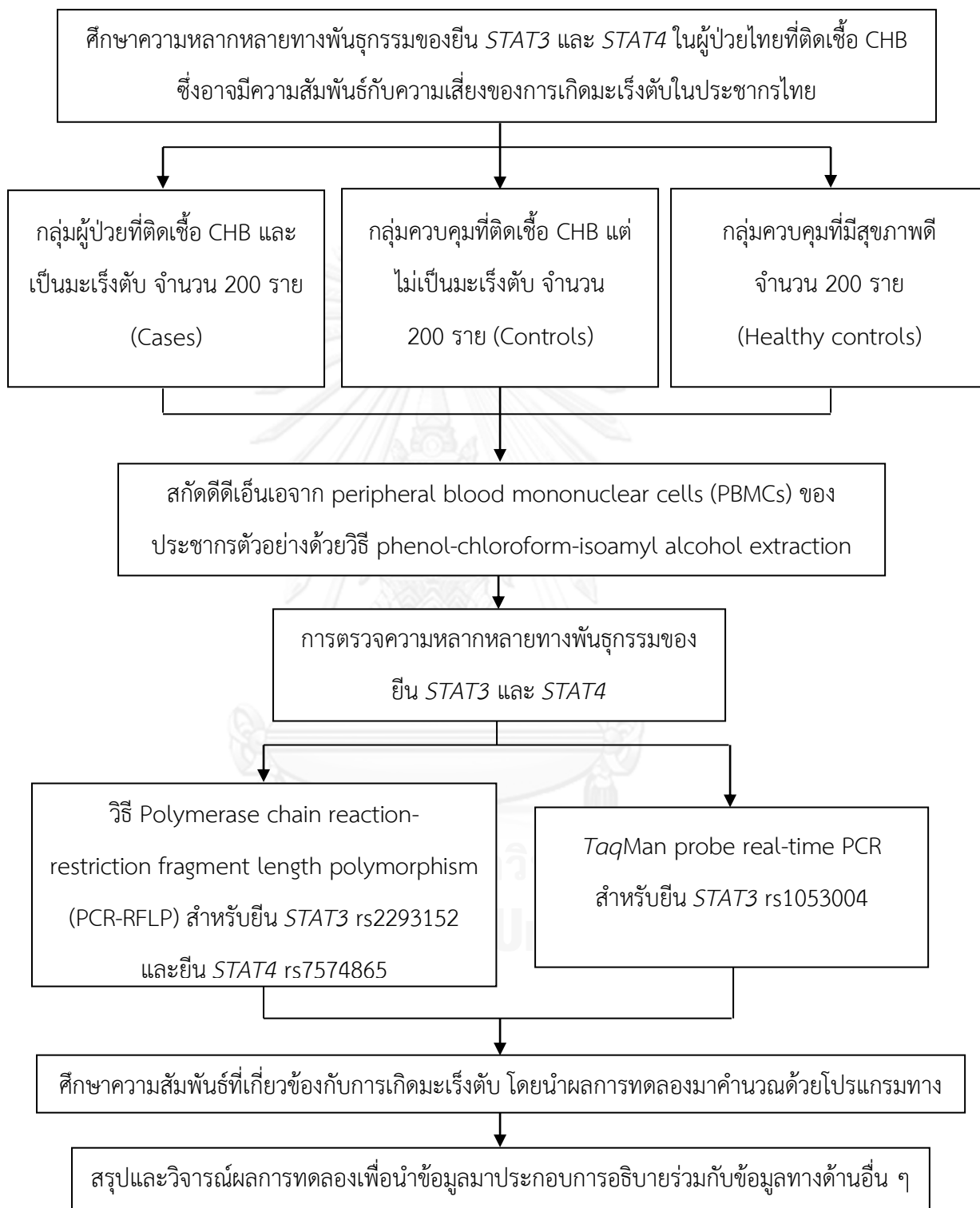
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* และ *STAT4* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ที่มีสุขภาพดีกับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC

สมมติฐานของการวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* และ *STAT4* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและผู้ที่มีสุขภาพดีมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ส่วนใหญ่เป็นเพศชายและมีอายุมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จึงยากต่อการที่จะทำให้อายุและเพศของประชากรในแต่ละกลุ่มมีความใกล้เคียงกัน
2. ตัวอย่างเลือดบางตัวอย่างที่เก็บไว้นาน เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจะทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยและคุณภาพไม่ดี จึงไม่สามารถหาจีโนไทป์ (Genotype) ของ Single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนยีน *STAT3* และ *STAT4* ได้

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. Hepatocellular carcinoma หมายถึง มะเร็งตับปฐมภูมิ ซึ่งเป็นมะเร็งของเซลล์ตับชนิด Hepatocellular carcinoma
2. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง หมายถึง บุคคลผู้ที่ตรวจพบแอนติเจนชนิดผิวของเชื้อ HBV (HBsAg) ในกระแสโลหิตนานกว่า 6 เดือน หากไม่มี HBsAg แต่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัส HBV (HBV DNA) ก็จัดเป็นผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง
3. กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (Healthy controls) คือ กลุ่มประชากรที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไม่เป็นมะเร็งตับ

คำสำคัญ

Hepatitis B virus (HBV)

Hepatocellular Carcinoma (HCC)

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

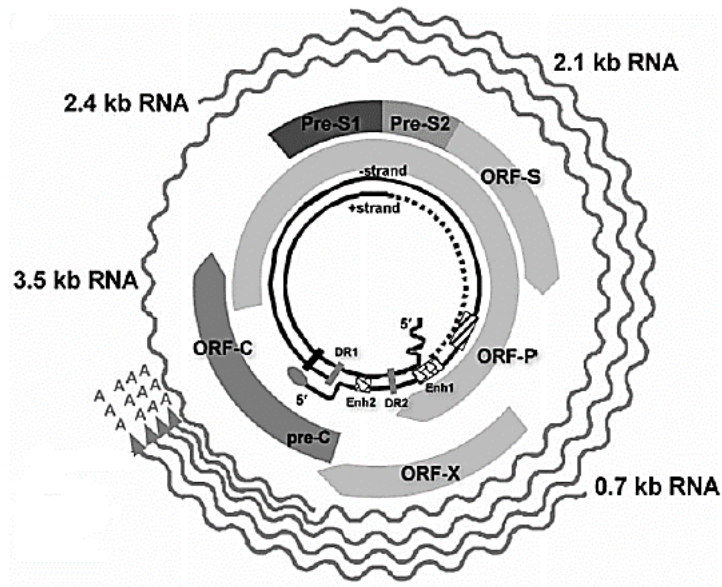
ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* และยีน *STAT4* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังกับการเกิดมะเร็งตับ และอาจนำไปใช้เป็น genetic markers เพื่อทำนายการเกิดมะเร็งตับสำหรับผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ในประเทศไทย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งตับ (Liver cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบได้มากเป็นอันดับที่ 5 ในเพศชาย และเป็นอันดับที่ 7 ในเพศหญิงประมาณร้อยละ 70 ถึง 85 ของโรคมะเร็งตับเป็นมะเร็งชนิด HCC [24] โดยเพศชายมีอัตราการเกิดมะเร็งตับมากกว่าเพศหญิงสามเท่า [25] จากข้อมูลความชุกของการเป็นมะเร็งตับชนิด HCC พบว่า ทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงสูงที่สุดในการเป็นมะเร็งชนิดนี้ โดยมีสาเหตุหลักคือ การติดเชื้อ HBV [26]

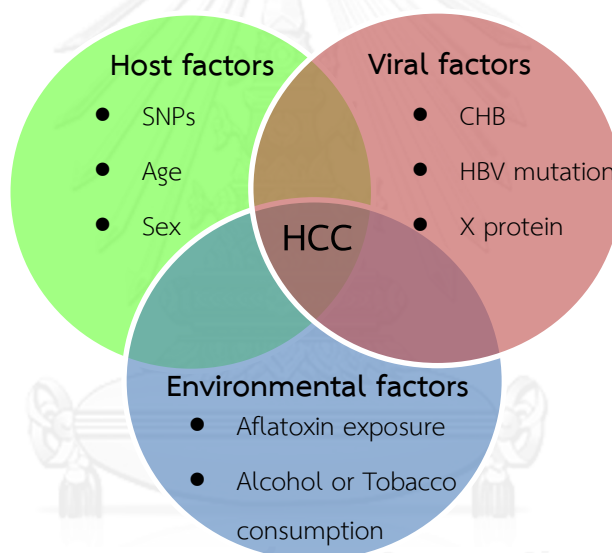
HBV เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอแบบสายคู่วงกลมที่ไม่สมบูรณ์ (Partially double-stranded DNA) (รูปที่ 1) อนุภาคของไวรัสที่สมบูรณ์มีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดประมาณ 40 ถึง 42 นาโนเมตร ประกอบด้วย envelope ห่อหุ้ม nucleocapsid ที่มี core protein และ HBV DNA ซึ่ง HBV DNA ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ 2 สายคือ สายลบ (L หรือ minus strand) มีความยาวตลอดสายประมาณ 3,200 นิวคลีโอไทด์ และสายบวก (S หรือ plus strand) มีขนาดไม่แน่นอนโดยมีความยาวประมาณร้อยละ 20 ถึง 80 ของสายลบ [27, 28]



รูปที่ 1 จีโนมของ HBV [28]

HBV DNA ประกอบด้วย 4 open reading frames (ORFs) หลักซึ่งทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัส ดังนี้ S-ORF ทำหน้าที่สร้าง surface protein หรือ hepatitis B surface antigen (HBsAg) C-ORF ทำหน้าที่สร้าง core protein หรือ hepatitis B core antigen (HBcAg) P-ORF ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ DNA polymerase และ X-ORF ทำหน้าที่สร้าง X protein หรือ hepatitis B x antigen (HBxAg) [27, 28] ดังแสดงในรูปที่ 1

HCC เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยร่วมกัน (รูปที่ 2) ได้แก่ ปัจจัยภายในร่างกาย (Host factors) เช่น Single nucleotide polymorphisms (SNPs) อายุ และเพศ ปัจจัยของไวรัส (Viral factors) อาทิ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง การกลายพันธุ์ของ HBV (HBV mutation) และ X protein และปัจจัยสิ่งแวดล้อม (Environmental factors) ได้แก่ การได้รับสารอะฟลาทอกซิน การดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ เป็นต้น [1, 6, 14, 22, 29]



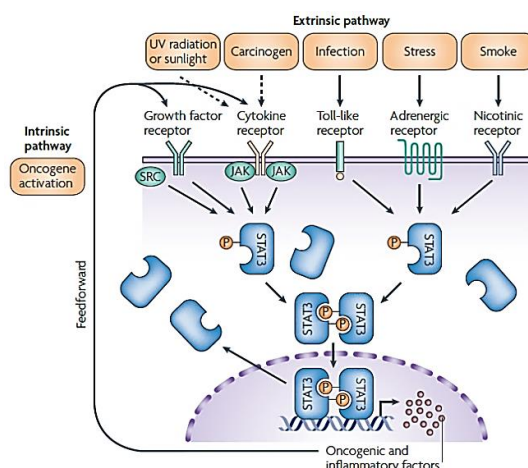
รูปที่ 2 ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC

ข้อมูลจากการศึกษาต่าง ๆ พบว่ากลไกการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC โดยการติดเชื้อ HBV อาจเกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอของไวรัสเข้ากับจีโนมของเซลล์ตับ ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ตับให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งได้ง่ายขึ้น เช่น X protein ของ HBV ที่มีการขาดหายไปของปลายคาร์บอกซีสามารถกระตุ้นการทำงานของมะเร็ง ในขณะที่ X protein ที่ปกติมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง [30] หรืออาจเกิดจาก X protein ของ HBV ไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน STAT3 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญในวิถี Janus kinase (JAK)/STAT [10, 11] โดยจะทำให้เกิดการอักเสบและนำไปสู่การเป็นมะเร็งตับ [1]

โปรตีน STATs ได้รับการค้นพบในปี ค.ศ. 1993 โดย James Darnell และคณะ [31] เมื่อโปรตีน STATs ได้รับการกระตุ้นจาก receptors บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จะทำหน้าที่เป็น secondary messengers เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ [31] โปรตีน STATs มีหน้าที่สำคัญในการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ (differentiation) [32] ตระกูลของโปรตีน STATs มีสมาชิกทั้งหมด 7 ตัว ประกอบด้วย STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b และ STAT6 ในกลุ่ม STATs โปรตีน STAT3 ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เนื่องจาก STAT3 เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ pro-inflammatory cytokines และ growth factors โดยมีส่วนร่วมกับการกลไกการทำลายและซ่อมแซมตัว [33-35]

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

ยีน *STAT3* อยู่บนโครโมโซมที่ 17q21 ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีน STAT3 ที่มีขนาดประมาณ 92 กิโลดาลตันประกอบด้วย 770 กรดอะมิโน [36] โปรตีน STAT3 เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดยเชื่อมโยงกับ Intrinsic และ Extrinsic pathways (รูปที่ 3) [17] Intrinsic pathway เป็นการกระตุ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการแสดงออกของ growth factor receptor และ cytokine receptor เป็นจำนวนมาก ซึ่ง receptors เหล่านี้เกี่ยวข้องกับ Janus kinase (JAK) family tyrosine kinase และ non-receptor tyrosine kinase ส่วน Extrinsic pathway เป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) สารก่อมะเร็ง การติดเชื้อ ความเครียด และการสูบบุหรี่ โดยทั้งสองกลไกนี้กระตุ้นการทำงานของ tyrosine kinase ซึ่งทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน STAT3 ทำให้โปรตีน STAT3 ได้รับการกระตุ้น จากนั้นจึงรวมกันเป็น homodimer แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งและ inflammatory factor นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการ up-regulation ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (proliferation) การดำรงชีพ (survival) การเจริญลุกลามแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่น (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง โปรตีน STAT3 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของไซโตไคน์ เคโมไคน์ (chemokines) และ mediators อื่น ๆ เช่น interleukin-6 (IL-6) และ cyclooxygenase 2 (COX-2) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบและในขณะเดียวกัน receptors ของสารเหล่านี้ก็เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของโปรตีน STAT3 เช่นกัน [17]



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของโปรตีน STAT3 กับการอักเสบและการเกิดมะเร็ง [17]

บทบาทของโปรตีน STAT3 ในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปกติไปสู่เซลล์มะเร็ง

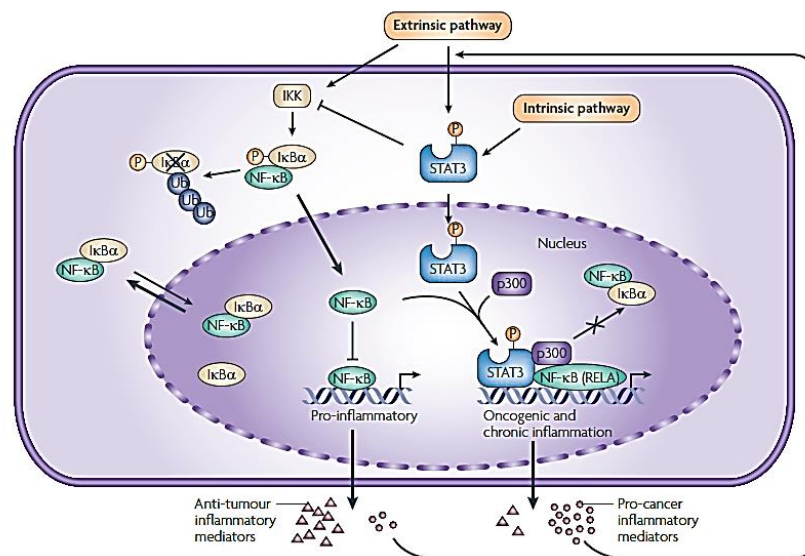
โปรตีน STAT3 เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์อย่างหลากหลาย เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ การดำรงชีพ และการแพร่กระจายของเซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดการเริ่มต้นและพัฒนาไปสู่มะเร็งตับ [37] จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน STAT3 ด้วยวิธี proteome microarray analysis พบว่าโปรตีน STAT3 มีการแสดงออกปริมาณมากในมะเร็งตับปฐมภูมิ (primary hepatocellular carcinoma) [38] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่า STAT3 antisense oligonucleotide สามารถลดปริมาณโปรตีน STAT3 ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งใน HCC cell line ที่ปลูกถ่ายเข้าสู่หนูทดลองได้เป็นอย่างดี [39]

บทบาทของโปรตีน STAT3 ต่อการอักเสบ

โปรตีน STAT3 ทำงานร่วมกับ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ในการตอบสนองต่อการอักเสบ ซึ่งสนับสนุนให้เกิดการพัฒนาและเจริญของมะเร็ง NF- κ B ไม่เพียงเกี่ยวข้องกับ pro-carcinogenic inflammation เท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับ anti-tumour immune response ด้วยตระกูลของ NF- κ B ประกอบด้วย REL และ RELA โดย REL ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของไซโตไคน์และเคโมไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานเชื้อก่อโรคและมะเร็ง ในขณะที่ RELA มีหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและมีผลต่อ pro-oncogene โปรตีน STAT3 สามารถเพิ่มการกระตุ้น NF- κ B ในมะเร็ง และในการกระตุ้น STAT3 ก็ต้องอาศัย NF- κ B (RELA) เช่นเดียวกัน เนื่องจากยีนเป้าหมายของ RELA คือไซโตไคน์และ growth factors ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน STAT3 ได้เช่น IL-6 เป็นต้น [17]

ในสภาวะปกติตัวยับยั้งของ NF- κ B (I κ B α) จะยับยั้ง NF- κ B ให้อยู่ภายในไซโทพลาสซึมโดยที่ไม่มีการทำงาน เมื่อเชื้อก่อโรคหรือ proinflammatory cytokines กระตุ้น I κ B kinase (IKKs) จะทำให้ I κ B α ได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตและถูกย่อยสลายด้วยกระบวนการ ubiquitylation (Ub) จากนั้น NF- κ B จะเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็น transcription factor โดย NF- κ B ที่เป็น REL จะ up-regulate ยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ T helper 1 (T_H1) ซึ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมเชื้อก่อโรคและต้านมะเร็ง ส่วนไซโตไคน์และ growth factors ที่ควบคุมโดย NF- κ B ที่เป็น RELA จะทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีน STAT3 (รูปที่ 4) โปรตีน STAT3 ที่ได้รับการกระตุ้นแล้วสามารถยับยั้ง IKK ได้ ทำให้ลดปริมาณของ NF- κ B ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น T_H1 [17]

NF- κ B-I κ B α complexes สามารถผ่านเข้าออกนิวเคลียสได้โดยไม่ต้องได้รับการกระตุ้น ซึ่งอัตราการส่งออกจะมากกว่าการนำเข้านิวเคลียส แต่ p300 จะทำให้ RELA ไม่สามารถออกจากนิวเคลียสได้ด้วยกระบวนการ acetylation ของ RELA เมื่อกิจกรรมของ STAT3 มีมากขึ้นในมะเร็ง RELA จะรวมกับ STAT3-p300 ทำให้มีการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งและ inflammatory mediators ที่ควบคุมการกระตุ้นของโปรตีน STAT3 อีกครั้งหนึ่ง (รูปที่ 4) [17]



รูปที่ 4 ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง STAT3 และ NF- κ B [17]

บทบาทของโปรตีน STAT3 ในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis

โปรตีน STAT3 มีส่วนร่วมในการเกิดมะเร็งระดับ ผ่านการ up-regulation ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis เช่น *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *survivin*, *Mcl-1* และ *XIAP* ดังปรากฏในการศึกษาที่พบว่า การกระตุ้นโปรตีน STAT3 สามารถสนับสนุนให้เซลล์มะเร็งดำรงอยู่ได้ผ่านการ up-regulation ของยีน *Bcl-xL* [1] เป็นต้น นอกจากนี้จากการศึกษาที่พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน XIAP ใน HCC cell line ปริมาณมากอีกด้วย [1]

บทบาทของโปรตีน STAT3 ในวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle)

โปรตีน STAT3 ทำหน้าที่ในการควบคุมการถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ใน ระยะ G1-S phase ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของมะเร็ง [40] จากการศึกษาที่พบว่า ความไม่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ เช่น cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4), cyclin E, cyclin A, p16 และ p27 ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นและการพัฒนาของมะเร็งระดับ [1] โปรตีน STAT3 มีหน้าที่เป็น negative regulator ในการถอดรหัสของยีน *cyclin D1* ระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์ (fetal liver) ในขณะที่เป็น positive regulator ในการแสดงออกของยีน *cyclin D1* ในมะเร็งของเซลล์ตับ (hepatoma cells) และระยะเริ่มต้นในการงอกใหม่ของตับ จากการค้นพบนี้แสดงให้เห็นแล้วว่ายีน *cyclin D1* คือยีนเป้าหมายของโปรตีน STAT3 [1]

บทบาทของโปรตีน STAT3 ในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis)

กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นหนึ่งในเครื่องหมายที่แสดงถึงการพัฒนารุ้มะเร็ง เพราะการสร้างหลอดเลือดใหม่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่บริเวณเริ่มต้น และบริเวณที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจายออกไป ในขณะที่เนื้อเยื่อเจริญเป็นอวัยวะ ทุกเซลล์ในเนื้อเยื่อจำเป็นต้องอาศัยอยู่ใกล้กับหลอดเลือดเพื่อรับสารอาหารและออกซิเจน เช่นเดียวกัน มะเร็งส่วนมากไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยปราศจากออกซิเจนและสารอาหาร ในเซลล์มะเร็งจะเพิ่มการผลิต vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งจะกระตุ้นเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cell) ให้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดย VEGF จะจับกับ tyrosine kinase receptor ของเซลล์บุผิวหลอดเลือด ทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีน STAT3 ซึ่งสามารถควบคุมการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ เช่น basic FGF (bFGF) ที่เหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุผิวหลอดเลือดเพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ นอกจากนี้โปรตีน STAT3 ยัง

ควบคุมการถอดรหัสของยีน *VEGF* ทางอ้อมอีกด้วย โดยการควบคุมการแสดงออกของยีน *hypoxia-inducible factor (HIF)-1* ซึ่งเป็น transcription factor ของยีน *VEGF* [1]

บทบาทของโปรตีน STAT3 ในการรุกรานเซลล์ (Cellular invasion)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีน STAT3 มีผลต่อการแพร่กระจายของมะเร็งระดับผ่านกลไกของโมเลกุลต่าง ๆ เช่น โปรตีน STAT3 จะควบคุมการแสดงออกของ matrix metalloproteinases (MMP-2 และ MMP-1) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรุกรานและการแพร่กระจายของมะเร็ง อย่างไรก็ตาม STAT3 สามารถเพิ่มการแสดงออกของ tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ขัดขวาง metalloproteinase และลดการรุกรานในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้อีกด้วย [1] จึงเป็นที่ประจักษ์แล้วว่า การส่งสัญญาณของโปรตีน STAT3 มีบทบาทที่สำคัญต่อการรุกรานและแพร่กระจายของมะเร็งเป็นอย่างมาก

HBV กับการทำงานของโปรตีน STAT3

การติดเชื้อ HBV เป็นปัจจัยที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะ HBV มีโปรตีนบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง X protein ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของโปรตีน STAT3 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญใน Janus kinase (JAK)/STAT signaling pathway [10, 11] โดยจะทำให้เกิดการอักเสบและเป็นมะเร็งตับในที่สุด [1] นอกจากนี้โปรตีน STAT3 ยังสามารถจับกับ HBV enhancer 1 ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งจะกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ของ HBV ได้เป็นอย่างดี [12, 13]

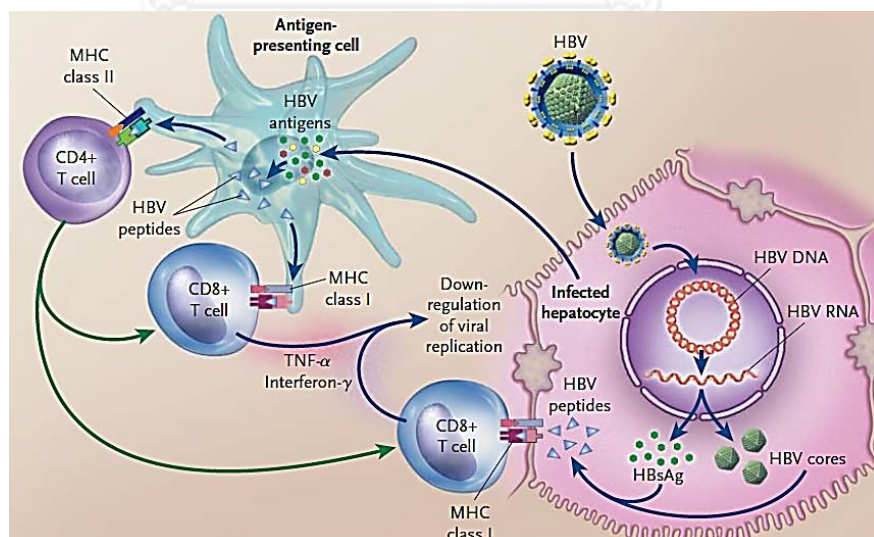
Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)

นอกจากโปรตีน STAT3 แล้วยังมีโปรตีน STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) ที่เป็นสมาชิกของตระกูล STATs transcription factor ยีน *STAT4* อยู่บนโครโมโซมที่ 2 [22] ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยได้รับสัญญาณจาก interleukin-12 (IL-12) และ type I interferon (Interferon- α , IFN- α หรือ Interferon- β , IFN- β) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิต type II interferon (Interferon- γ , IFN- γ) [15-17] IFN- γ เป็นไซโตไคน์ที่มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันร่างกายจากการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม [20] การสูญเสียความสามารถในการกระตุ้นการผลิต IFN- γ ผ่านทาง STAT4 อาจจะทำให้ลดความสามารถในการต้านทานไวรัสและมะเร็งลงได้ [18, 19] แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการแสดงออกของ IFN- γ

ในปริมาณมากอาจทำให้เกิด autoimmune disease ได้เช่นกัน [21] นอกจากนี้ IFN- γ ยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HBV อีกด้วย

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HBV ประกอบด้วยระบบต่าง ๆ ดังนี้ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immunity) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันนี้คือ Dendritic cells (DCs) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immunity) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันนี้คือ CD4+ T lymphocytes และ CD8+ T lymphocytes การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (Cellular immune response) เริ่มต้นขึ้นเมื่อ DC นำแอนติเจนของเชื้อ HBV เข้าสู่เซลล์เพื่อนำเสนอให้กับ CD8+ T cells ผ่านทางโมเลกุลของ Major Histocompatibility Complex (MHC) class I (รูปที่ 5) CD8+ T cells สามารถรับรู้แอนติเจนนี้ได้ และกำจัด HBV โดยอาศัยกลไก 2 อย่างร่วมกันคือ [27, 41-44]

1. การทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Cytolytic mechanism) โดย CD8+ T cells ได้รับการกระตุ้นจาก core protein ของไวรัสและสามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อโดยตรงด้วยการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ Apoptosis
2. การกำจัดเชื้อไวรัสโดยไม่มีการทำลายเซลล์ (Non-cytolytic mechanism) เนื่องจาก CD8+ T cells สามารถหลั่ง IFN- γ และ Tumor necrosis factor- α (TNF- α) ซึ่งสามารถทำลายเชื้อไวรัสด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัส

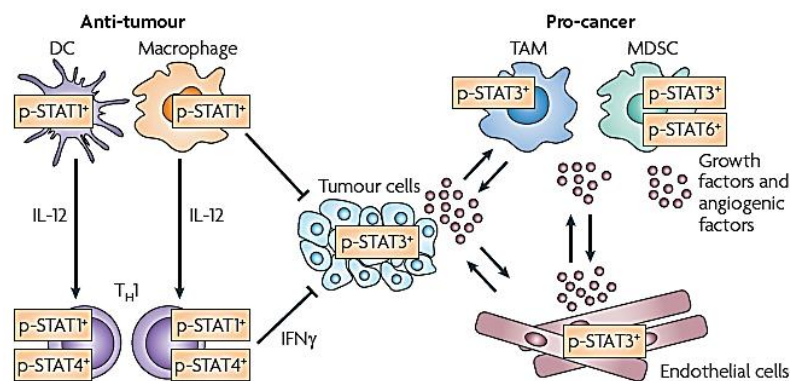


รูปที่ 5 เซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่มีส่วนร่วมในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HBV [27]

มีการทดลองจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า ระบบภูมิคุ้มกันสามารถควบคุมการเกิดมะเร็งได้ โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีหน้าที่ควบคุมการเจริญของมะเร็งคือ innate immune cells ได้แก่ macrophages และ DCs ซึ่งสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ เมื่อโปรตีน STAT1 ภายในเซลล์เหล่านั้นได้รับการกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (p-STAT1) DCs และ macrophages จะสามารถกระตุ้นโปรตีน STAT4 (p-STAT4) ภายใน T_H1 ทำให้ T_H1 มีการผลิต IL-12 และ IFN- γ ซึ่งส่งผลให้เซลล์มะเร็งตาย แสดงให้เห็นแล้วว่าการกระตุ้นโปรตีน STAT1 และ STAT4 ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันมีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 6) [17]

นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าการกระตุ้น STAT3 (p-STAT3) ภายใน tumour-associated macrophage (TAM) หรือเมื่อมีการกระตุ้น STAT3 (p-STAT3) และ STAT6 (p-STAT6) ภายใน myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) จะทำให้ TAM และ MDSCs หลั่ง growth factor และ angiogenic factor ซึ่งส่งผลให้เกิดการสร้างเซลล์บุผิวหลอดเลือดใหม่ไปหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และส่งเสริมให้เกิดมะเร็งในที่สุด (รูปที่ 6) [17]

อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน STAT4 เป็นจำนวนมาก แต่ก็ยังไม่ทราบหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้อย่างแน่ชัด



รูปที่ 6 โปรตีน STATs ต่าง ๆ ภายใน myeloid cells ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทาน และส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง [17]

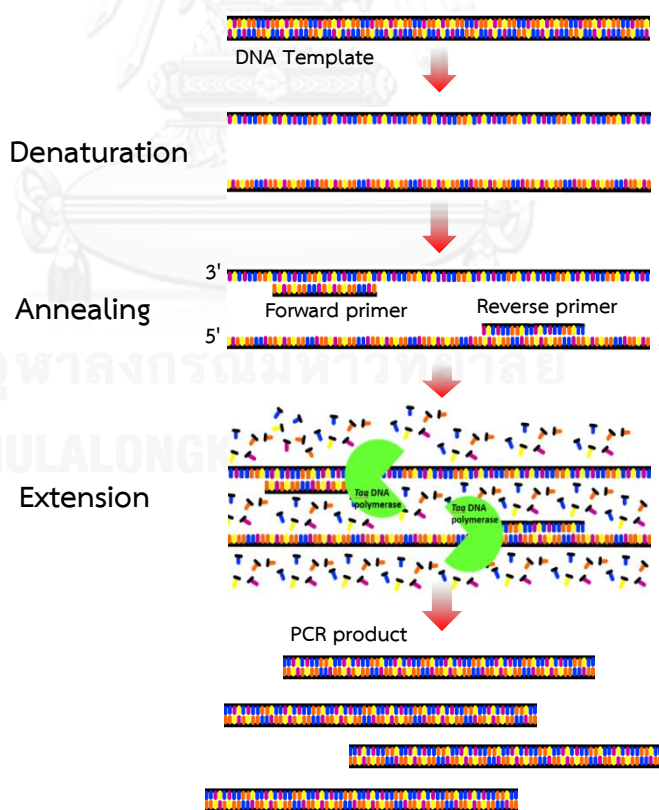
จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งและตอบสนองต่อการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งไต มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งตับ [14, 45, 46] โดยการศึกษาของ Xie J. และคณะ (2013) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs2293152 จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ ส่วนในเพศหญิงพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs1053004 จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ [14] จากการศึกษาของ Jiang D.K. และคณะ (2013) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ โดยอัลลีล (Allele) G มีความสัมพันธ์กับระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *STAT4* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในเนื้อเยื่อที่เป็นและไม่เป็นมะเร็งตับ แต่เนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งตับจะมีระดับการแสดงออกของยีน *STAT4* ที่ต่ำกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ [22] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Clark A. และคณะ (2013) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 ในประชากรเวียดนามให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Jiang D.K. และคณะ (2013) โดยพบว่าอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับ ส่วนอัลลีล G เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยเวียดนามที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ [23]

จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs1053004 โดยใช้เทคนิค TaqMan probe real - time PCR ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็น genetic markers เพื่อทำนายการเกิดมะเร็งตับสำหรับผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทยได้

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

PCR หรือ *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (รูปที่ 7) โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญดังนี้ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA Template) เอนไซม์ *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polymerase ไพร์เมอร์ (Forward และ Reverse Primers) Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด บัฟเฟอร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งในแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

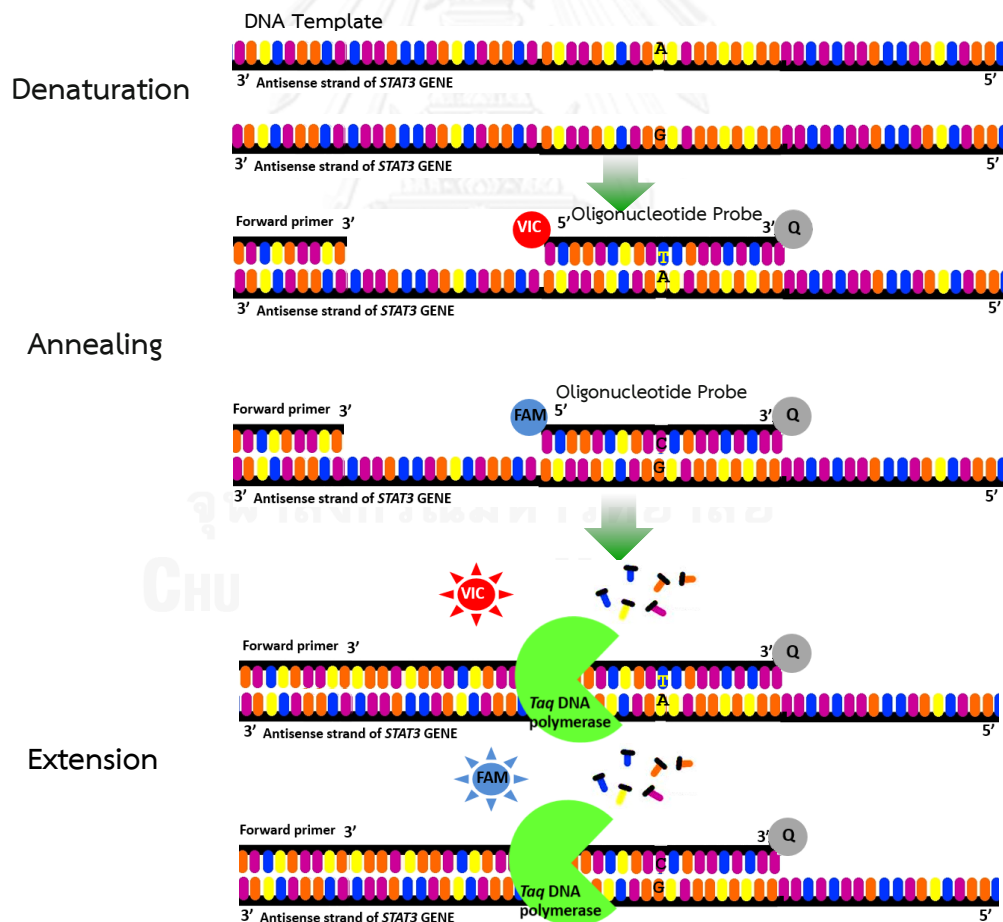
1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอแม่แบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C
2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ไพร์เมอร์จับกับ DNA Template ตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม โดยการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C
3. ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากไพร์เมอร์โดยมีทิศทางจากปลาย 5' ไปยัง 3' อุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 70-75 °C



รูปที่ 7 ขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR

TaqMan probe real-time PCR

TaqMan probe เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว (single oligonucleotide) ที่บริเวณปลาย 5' ของ probe จะติดฉลากด้วย reporter dye เช่น VIC และ FAM ส่วนปลายอีกด้านของ Probe จะติดฉลากด้วย quencher dye ซึ่งมีความสามารถในการดูดซับพลังงานแสงของ reporter dye เมื่อเข้าสู่กระบวนการของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ในขั้น Extension 5'endonucleolytic activity ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase จะสามารถย่อยสาย single oligonucleotide probe ทำให้ reporter dye หลุดออกเป็นอิสระจาก quencher dye จึงทำให้สามารถคายพลังงานแสงเมื่อได้รับการกระตุ้น (รูปที่ 8) สำหรับการตรวจหา Single nucleotide polymorphisms (SNPs) โดยใช้ TaqMan probe ทำได้โดยอาศัย oligonucleotide probes จำนวน 2 สาย ที่ติดฉลากด้วย reporter dye ที่แตกต่างกัน probe จะมีความจำเพาะต่อเบสที่แตกต่างกัน ณ ตำแหน่งของ SNPs ที่สนใจ



รูปที่ 8 ขั้นตอน Real-time PCR โดยอาศัย TaqMan probes

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ case-control study ซึ่งได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) โครงการวิจัยหมายเลข (IRB No.) 360/56

ประชากรที่ศึกษา

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

- 1.1. กลุ่มที่ทำการศึกษา (Cases) คือ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งตับชนิด HCC (CHB related HCC patients) ที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- 1.2. กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (CHB ที่ไม่เป็น HCC) คือ กลุ่มที่ติดเชื้อ HBV มานานกว่า 6 เดือน และไม่เป็นผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- 1.3. กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (Healthy controls) คือ กลุ่มประชากรที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไม่เป็นมะเร็งตับ จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HBV คือ ผู้ที่ตรวจพบ HBsAg และตรวจพบ HBV DNA และกรณี CHB related HCC patients ต้องเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางรังสีวิทยา หรือ ใช้การวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อตับว่าเป็นมะเร็งตับ ตามหลักเกณฑ์สมาคมโรคตับของอเมริกา (American Association for the Study of Liver Disease, AASLD) [47] ที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. สำหรับกลุ่ม Healthy controls ต้องเป็นผู้ที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อ HBV โดยตรวจ HBxAg และไม่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นเช่น ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C virus) โดยตรวจ anti-HCV
3. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวិจัย

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อ HBV ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบซี หรือเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)
2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย
3. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย

นำข้อมูลของกลุ่มประชากรเป้าหมายทั้งหมดจับคู่กันระหว่างกลุ่มควบคุม (CHB ที่ไม่เป็น HCC และกลุ่ม Healthy controls) และกลุ่ม CHB related HCC patients ให้อายุและเพศของประชากรในแต่ละกลุ่มมีความใกล้เคียงกันมากที่สุด

2. การคำนวณขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ case-control study โดยกลุ่มประชากรเป้าหมายทั้ง 3 กลุ่มเป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นจึงคำนวณหาจำนวนประชากรเป้าหมายในแต่ละกลุ่มโดยใช้สูตรดังนี้

$$N = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

N หมายถึง ประชากรที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

P_2 หมายถึง โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับเท่ากับ 0.3 [14]

OR หมายถึง odds ratio เท่ากับ 2.04 [14]

P_1 หมายถึง อัตราที่คาดว่าประชากรกลุ่ม case จะมีปัจจัยที่ผู้วิจัยสนใจ

$$\text{โดย } P_1 \text{ มีค่าเท่ากับ } \frac{P_2 \times OR}{1 + P_2(OR - 1)} = 0.4665$$

P มีค่าเท่ากับ $\frac{(P_2 + P_1)}{2} = 0.3833$

Z_{α} ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test โดย

$$Z_{\alpha/2} = 1.96 \text{ เมื่อกำหนด } \alpha = 0.05$$

Z_{β} ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 โดย $Z_{\beta} = 1.28$

แทนค่าในสมการข้างต้น

$$\text{จะได้ว่า } N = \frac{[1.96\sqrt{(2 \times 0.3833)(1 - 0.3833)} + 1.28\sqrt{0.4665(1 - 0.4665) + 0.3(1 - 0.3)}]^2}{(0.4665 - 0.3)^2} = \frac{177}{\text{group}}$$

ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในแต่ละกลุ่ม ต้องมีจำนวนอย่างน้อย 177 ราย เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูล เนื่องจากมีเป้าหมายที่จะตีพิมพ์ผลงานวิจัยนี้ลงในวารสารระดับนานาชาติ จึงต้องเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่สามารถเก็บได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. กลุ่ม CHB related HCC patients ที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 200 ราย
2. กลุ่มควบคุม CHB ที่ไม่เป็น HCC ซึ่งเข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 200 ราย
3. กลุ่ม Healthy controls จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 200 ราย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1. Cylinder ขนาด 250 ml และ 1,000 ml (K-EXAX, USA)
- 1.2. Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
- 1.3. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (GenFollower, China)
- 1.4. Microwave oven (Sharp, Japan)
- 1.5. Parafilm (Plastic Packaging, USA)
- 1.6. PCR tube (Neptune, Mexico)
- 1.7. Pipette rack (Biohit Oyj, Finland)
- 1.8. Pipette tip ขนาด 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Neptune, Mexico)
- 1.9. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml (GenFollower, China)
- 1.10. Polypropylene conical tube ขนาด 50 ml (SPL lifesciences, Korea)
- 1.11. Reagent bottle ขนาด 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Schott Duran, Germany)
- 1.12. Real-time PCR tube (Kisker Biotech, Netherlands)
- 1.13. Stirring-magnetic bar

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1. Autoclave (Hirayama, Thailand)
- 2.2. Automatic adjustable micropipette ขนาด P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (2-20 μ l), P200 (20-200 μ l) และ P1000 (100-1000 μ l) (Biohit Oyj, Finland)
- 2.3. Balance (Precisa, UK)
- 2.4. Centrifuge Universal 320r (Hettich Centrifuge, UK)
- 2.5. Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, USA)
- 2.6. Freezer -20 $^{\circ}$ C (Sanyo, Japan)
- 2.7. Freezer -70 $^{\circ}$ C (Thermo Scientific, USA)
- 2.8. Freezer -80 $^{\circ}$ C (Panasonic, Japan)
- 2.9. Gel Doc 1000 (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- 2.10. Heater block (Bioer Technology)

- 2.11. Mini Centrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.12. Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
- 2.13. PCR cabinet
- 2.14. PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)
- 2.15. Power supply model 250 (Major Science, USA)
- 2.16. Refrigerator 4 °C (Panasonic, Japan)
- 2.17. StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA)
- 2.18. UV transilluminator (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- 2.19. Vacuum (Schott Duran, Germany)
- 2.20. Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

3. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

- 3.1. Absolute ethanol (Merck, Germany; Cat No. 1009832500)
- 3.2. Chloroform (RCI Labscan, Thailand; Cat No. EP1027E)
- 3.3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Singapore; Cat No. E9884)
- 3.4. Glycogen (USB, Hongkong; Cat No. G8170-41B1)
- 3.5. Isoamyl alcohol (Carlo Erba Reagenti, Italy)
- 3.6. Nuclease-free water
- 3.7. Phenol (AMRESCO, USA; Cat No. 0945400ML)
- 3.8. Proteinase K (Life Technologies, USA; Cat No. 25530-015)
- 3.9. Sodium acetate (NaOAc) (Merck, Germany; Cat No. 567418)
- 3.10. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AMRESCO, USA; Cat No. 0227)
- 3.11. Tris-HCl (Sigma, Singapore; Cat No. T5941)

4. สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR

- 4.1. DNA template
- 4.2. dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)
- 4.3. Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
- 4.4. *Taq* DNA polymerase, Recombination (Invitrogen, USA; Cat No. 11615-010)

5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)
 - 5.1. RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YDF300)
6. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector
 - 6.1. RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. RC013)
7. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation
 - 7.1. Agar (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. RC013)
 - 7.2. Ampicillin (General Drugs House, Thailand)
 - 7.3. Distill water (DW)
 - 7.4. Glucose (Ajax Finechem, NZ; Cat No. 783)
 - 7.5. Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMRESCO, USA; Cat No. 0487)
 - 7.6. Potassium chloride (KCl)
 - 7.7. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
 - 7.8. Tryptone (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. 223000)
 - 7.9. X-gal (AMRESCO, USA; Cat No. 0428)
 - 7.10. Yeast extract (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. 210934)
8. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)
 - 8.1. RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YPD300)
9. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP rs2293152 บนยีน *STAT3* และ SNP rs7574865 บนยีน *STAT4* ด้วยวิธี PCR-RFLP
 - 9.1. 10X buffer Tango (Thermo Scientific, USA)
 - 9.2. Nuclease-free water
 - 9.3. PCR reaction mixture
 - 9.4. เอนไซม์ *HpaI* สำหรับยีน *STAT4* (Thermo Scientific, USA; Cat No. ER1031)
 - 9.5. เอนไซม์ *HpaII* สำหรับยีน *STAT3* (Thermo Scientific, USA; Cat No. ER0511)

10. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP rs1053004 บนยีน STAT3 ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR

10.1. Distill wayer (DW)

10.2. DNA template

10.3. dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)

10.4. Taq DNA polymerase, Recombination (Invitrogen, USA; Cat No. 11615-010)

10.5. TaqMan SNP Genotyping Assays [ID: C_1795285_1] (Applied Biosystems, CA)

11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

11.1. 100 bp DNA ladder H3 RTU (Ready-to-Use) (GeneDireX, Taiwan; Cat No. DM003-R500)

11.2. Agarose (Invitrogen, USA; Cat No. 75510-019)

11.3. Boric acid (Fisher Scientific, UK)

11.4. Ethidium bromide (AMRESCO, USA; Cat No. 0.492)

11.5. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Singapore, Cat No. E9884)

11.6. Tris base (Promega, USA)

12. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatics

12.1. BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9)

12.2. Oligos. Microsoft Visual Studio (version 6.0 SP5, 2001)

13. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

13.1. GraphPad Software

(<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>)

13.2. Hardy-Weinberg Equilibrium (<http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>)

13.3. MedCalc Statistical Software Version 12.7.7

(http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) จากเซลล์ HepG2, A549 และ HeLa

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction มีขั้นตอนดังนี้

- 1.1. นำเซลล์ HepG2, A549 และ HeLa ความเข้มข้น 800 cells/ μ l ปริมาตร 100 μ l มาเติมด้วย lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 400 μ l จากนั้นเติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 μ l แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 1.2. เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 250 μ l และ chloroform: isoamyl alcohol (49:1) ปริมาตร 250 μ l จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 1.3. เตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่โดยเติม glycogen ปริมาตร 4 μ l absolute ethanol ปริมาตร 800 μ l และ 2 M Sodium acetate ปริมาตร 40 μ l จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนที่ได้จากขั้นตอนที่ 1.2. ใส่ลงใน microcentrifuge tube นี้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
- 1.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 1.5. จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง นำส่วนตะกอนที่เหลือมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
- 1.6. ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวกัน microcentrifuge tube จากนั้นนำไปอบให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum เป็นเวลาประมาณ 15 นาที
- 1.7. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอด Nuclease (Nuclease-free water) ปริมาตร 30 μ l จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ณ อุณหภูมิ -20 °C
- 1.8. วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer และบันทึกผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

2. การทำ positive control สำหรับ SNP rs2293152 บนยีน STAT3 และ SNP rs7574865 บนยีน STAT4

2.1. การเพิ่มจำนวนชิ้นยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 ด้วยวิธี PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอของเซลล์ HepG2 และ A549 ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 และนำสารละลาย DNA ของเซลล์ HepG2 และ HeLa ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา และสภาวะที่ใช้ทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ ยีน STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865 [48, 49]

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Tm (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
STAT3_rs2293152_F	Forward	TCCCCTGTGATTCAGATCCC	62	233
STAT3_rs2293152_R	Reverse	CATCCCACATCTCTGCTCC	62	
STAT4_rs7574865_F	Forward	AAAGAAGTGGGATAAAAAGAAGTTTG	68	147
STAT4_rs7574865_R	Reverse	CCACTGAAATAAGATAACCACTGT	66	

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาณ (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distill water (DW)	18.88	-
10X PCR buffer minus Mg	2.50	1X
10 mM dNTPs mixture	0.50	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	0.75	1.5 mM
10 μM Forward primer	0.63	0.25 μM
10 μM Reverse primer	0.63	0.25 μM
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.13	0.65 Units
DNA template from DNA extraction	1	-
Total volume	25	-

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	5 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	62	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel และย้อมเจลด้วย Ethidium bromide สำหรับยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 จะตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 233 bp ส่วนยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 จะตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 147 bp จากนั้นนำชิ้นเจลของทั้งสอง SNPs นี้ไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลในขั้นตอนต่อไป

2.2. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

Gel extraction โดยใช้ชุดสกัด RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้

- 2.2.1. นำชิ้นเจลที่ตัดได้จากขั้นตอนที่ 2.1. ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 2.2.2. จากนั้นเติมสารละลาย DF buffer ปริมาตร 500 μ l และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
- 2.2.3. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 °C ประมาณ 15 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมดโดยระหว่างบ่มนั้นควรกลับ microcentrifuge tube ทุก 2-3 นาที
- 2.2.4. นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน DF column ที่ใส่อยู่ใน collection tube
- 2.2.5. หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 2.2.6. ทิ้งของเหลวใน collection tube และใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
- 2.2.7. เติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน DF column
- 2.2.8. หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

- 2.2.9. ทิ้งของเหลวใน collection tube และใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
- 2.2.10. ทำซ้ำข้อ 2.2.7.-2.2.9. อีกครั้ง
- 2.2.11. หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 2.2.12. นำ DF column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่
- 2.2.13. เติม Elution buffer ปริมาตร 30 μ l ลงใน DF column
- 2.2.14. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 2.2.15. หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 2.2.16. เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

2.3. การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector (Ligation)

ในงานวิจัยนี้ใช้ RBC TA cloning vector kit ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector โดยแสดงสารเคมีที่ใช้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร (μ l)
Ligation buffer A	1
Ligation buffer B	1
RBC TA cloning vector	2
Insert (ดีเอ็นเอที่ได้จาก gel extraction ในขั้นตอนที่ 2.2.)	5
T4 DNA ligase	1
Total volume	10

จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 30 นาที และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C

ข้ามคืน

2.4. การเตรียม Competent cells

- 2.4.1. นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl) ปริมาตร 50 ml โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 2.4.2. นำเชื้อ *E. coli* ในข้อ 2.4.1. มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 200 ml และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 2.4.3. วัดความขุ่นของ *E. coli* ที่ความยาวคลื่น 600 nm หากมีค่าความขุ่นประมาณ 0.4 ถึง 0.6 จึงนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไปได้
- 2.4.4. บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เลี้ยง *E. coli* ใส่ลงใน conical tube ขนาด 50 ml และแช่ในน้ำแข็งประมาณ 30 นาที
- 2.4.5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที
- 2.4.6. เติสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ *E. coli* ด้วย 0.1 M CaCl₂ ปริมาตร 10 ml และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- 2.4.7. นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที
- 2.4.8. เติสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ *E. coli* ด้วย 0.1 M CaCl₂ ที่มี 15% (w/v) กลีเซอรอล ปริมาตร 1 ml
- 2.4.9. แช่ในน้ำแข็งประมาณ 2-3 ชั่วโมง และแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 100 µl
- 2.4.10. เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

2.5. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ความร้อน (Transformation by heat shock)

- 2.5.1. เติสารละลาย Ligation ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3. ปริมาตร 10 µl ลงในสารละลาย Competent cells ปริมาตร 50 µl จากนั้นแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- 2.5.2. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
- 2.5.3. เติ SOC medium ที่มี 2 M Mg²⁺ และ 2 M Glucose ปริมาตร 950 µl หลังจากนั้นนำมาเขย่าด้วยเครื่อง Environmental Shaker-Incubator ES-20 ที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยความเร็ว 200 rpm ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที
- 2.5.4. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

- 2.5.5. ทեսสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาณประมาณ 50 μ l
- 2.5.6. จากนั้น Spread ลงบน LB agar plate ที่มี Ampicillin, IPTG และ X-gal เคลือบอยู่ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 2.5.7. เลือกลโคไลเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีสีขาวมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2 μ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง

2.6. การสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)

Plasmid extraction โดยใช้ชุดสกัด RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้

- 2.6.1. นำ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 2 ml จากขั้นตอนที่ 2.5.7. มาถ่ายลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 2.6.2. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งสารละลายส่วนใสออก
- 2.6.3. เติม PD1 buffer ปริมาตร 200 μ l และนำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
- 2.6.4. เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 μ l และกลับหลอด microcentrifuge tube ประมาณ 10 ครั้ง
- 2.6.5. เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 μ l และกลับหลอด microcentrifuge tube ประมาณ 10 ครั้ง
- 2.6.6. จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 2.6.7. เตรียม PD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml จากนั้นถ่ายส่วนใสลงใน PD column
- 2.6.8. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 2.6.9. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใน Collection tube อีกครั้ง
- 2.6.10. เติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน PD column
- 2.6.11. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 2.6.12. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใน Collection tube อีกครั้ง

- 2.6.13. เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน PD column
- 2.6.14. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 2.6.15. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใน Collection tube อีกครั้ง
- 2.6.16. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 2.6.17. จากนั้นใส่ PD column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 2.6.18. เติม Elution buffer ปริมาตร 30 μ l และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 2.6.19. เก็บพลาสมิดที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.7. การตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR และ sequencing

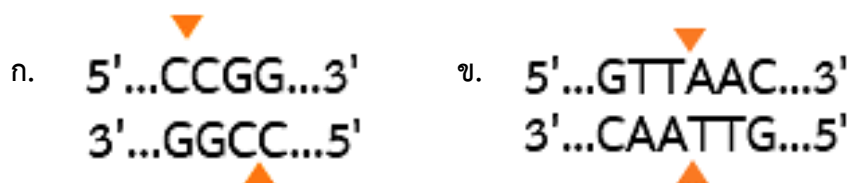
การตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการทำ PCR ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 (ขั้นที่ 2.1.) โดยใช้พลาสมิดเจือจาง 100 เท่า เป็น DNA template จากนั้นนำพลาสมิดส่ง sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SNPs ต่าง ๆ และพิจารณาแอลลีลของ SNPs จากโครมาโทแกรม (chromatogram) ของแต่ละ พลาสมิด

2.8. การทำ PCR-RFLP ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 โดยใช้พลาสมิดเป็น DNA template

- 2.8.1. เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 2 โดยใช้พลาสมิดเจือจาง 100 เท่า เป็น DNA template
- 2.8.2. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ปริมาตร 10 μ l มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel และย้อมเจลด้วย Ethidium bromide หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 233 bp สำหรับยีน *STAT3* และแถบดีเอ็นเอขนาด 147 bp สำหรับยีน *STAT4* จึงดำเนินการขั้นต่อไป
- 2.8.3. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่เหลือมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 5 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ในรูปที่ 9 และสารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ขนาดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR-RFLP สำหรับยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ยีน	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	แอลลีล	ขนาดผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (bp)
<i>STAT3</i> rs2293152	<i>Hpa</i> II	G (Major allele)	212 และ 21
		C (Minor allele)	132, 80 และ 21
<i>STAT4</i> rs7574865	<i>Hpa</i> I	G (Major allele)	147
		T (Minor allele)	122 และ 25



รูปที่ 9 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ก. *Hpa*II ข. *Hpa*I

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR พลาสมิดสำหรับยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR reaction mixture	10	-
Nuclease-free water	7.5	-
10X buffer B	2	1X
<i>STAT3</i> ตำแหน่ง SNP rs2293152 เอนไซม์ <i>HpaII</i> (10U/μl)	0.5	5 Units
<i>STAT4</i> ตำแหน่ง SNP rs7574865 เอนไซม์ <i>HpaI</i> (10U/μl)		
Total volume	20	-

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ 3% agarose gel และย้อมเจลด้วย Ethidium bromide

3. การทำ positive control สำหรับ SNP rs1053004 บนยีน *STAT3*

3.1. การเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ด้วยวิธี PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอของเซลล์ HepG2 และ A549 ที่สกัดได้มาเป็น DNA template สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *STAT3* rs1053004 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา และสภาวะที่ใช้ทำ PCR แสดงในตารางที่ 7, 2 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 [14]

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Tm (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
STAT3_rs1053004_F	Forward	ACAGGTGAGGCAGAACAGC	60	111
STAT3_rs1053004_R	Reverse	AGAGGCAGCCCATCCAG	56	

ตารางที่ 8 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	} 40 รอบ
Annealing	56	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel และย้อมเจลด้วย Ethidium bromide ตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 111 bp จากนั้นนำชิ้นเจลที่ตัดได้ไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลตามขั้นตอนที่ 2.2. ต่อไป

3.2. การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector (Ligation)

การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 เข้าสู่ TA cloning vector ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2.3.

3.3. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ความร้อน (Transformation by heat shock)

3.3.1. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ความร้อนทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2.5. จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีสีขาวมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2 µl ผสมอยู่ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง

3.3.2. จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตามขั้นตอนที่ 2.6.

3.4. การตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR และ sequencing

การตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการทำ PCR ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ตามขั้นตอนที่ 3.1. เพื่อตรวจสอบว่าพลาสมิดมีชิ้นยีน *STAT3* อยู่หรือไม่ จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาตรวจหาแอลลีลของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 (Major allele: T และ Minor allele: C) ทั้งสองแอลลีลที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี sequencing

3.5. การทำ TaqMan probe real-time PCR พลาสมิด

การทำ TaqMan probe real-time PCR จำเป็นต้องมี Positive control สำหรับจีโนไทป์ต่าง ๆ ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ดังนี้ จีโนไทป์ TT, TC และ CC สำหรับ homologous genotype (TT และ CC) สามารถใช้พลาสมิดที่มี SNP ตำแหน่งนี้เป็นแอลลีล T และ C ตามลำดับ แต่สำหรับจีโนไทป์ TC ต้องเตรียมจากพลาสมิดที่มี SNP ตำแหน่งนี้เป็นแอลลีล T และ C ผสมกัน โดย พลาสมิดที่นำมาผสมกันต้องมีความเข้มข้นที่เท่ากัน เพื่อให้คล้ายคลึงกับสภาพที่พบในธรรมชาติมากที่สุด

การเตรียม Positive control จีโนไทป์ TC สำหรับยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 มีขั้นตอนดังนี้

3.5.1. การคำนวณสำหรับการเจือจางพลาสมิด

3.5.1.1. เลือกพลาสมิดที่มีแอลลีลของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 เป็น T และ C มาอย่างละ 1 หลอด

3.5.1.2. วัดความเข้มข้นพลาสมิดด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer

3.5.1.3. จากนั้นคำนวณจำนวน Copies ของพลาสมิดโดยใช้สูตรดังนี้

$$\frac{m}{M.W.} = \frac{N}{6.02 \times 10^{23}}$$

m คือ มวล (g)

N คือ จำนวน Copies ของพลาสมิด (copies/ μ l)

M.W. คือ น้ำหนักโมเลกุลของ recombinant vector ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$= [\text{ความยาวของ TA cloning vector (2,723 bp) + Insert (111 bp)}] \times \text{น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของคู่นิวคลีโอไทด์ (660)}$$

3.5.1.4. เจือจางความเข้มข้นพลาสมิดให้มีความเข้มข้นเป็น 10^{10} copies/ μ l ปริมาตร 10 μ l โดยใช้สูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ยังไม่ได้เจือจาง

V_1 คือ ปริมาตรของพลาสมิดที่ยังไม่ได้เจือจาง

C_2 คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดภายหลังจากการเจือจาง

V_2 คือ ปริมาตรของพลาสมิดภายหลังจากการเจือจาง

3.5.1.5. เจือจางความเข้มข้นพลาสมิดจากความเข้มข้น 10^{10} copies/ μ l ให้มีความเข้มข้นเป็น 10^6 copies/ μ l ปริมาตร 100 μ l ด้วยเทคนิค Serial dilution ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.5.1.5.1. เจือพลาสมิดเข้มข้น 10^{10} copies/ μ l ให้เป็น 10^8 copies/ μ l (เจือจาง 100 เท่า) โดยนำพลาสมิดเข้มข้น 10^{10} copies/ μ l ปริมาตร 1 μ l มาผสมกับน้ำปลอด DNase ปริมาตร 99 μ l

3.5.1.5.2. เจือพลาสมิดเข้มข้น 10^8 copies/ μ l ให้เป็น 10^6 copies/ μ l (เจือจาง 100 เท่า) โดยนำพลาสมิดเข้มข้น 10^8 copies/ μ l ปริมาตร 1 μ l มาผสมกับน้ำปลอด DNase ปริมาตร 99 μ l

จากนั้นนำพลาสมิดที่มีแอลลีลของ SNP ตำแหน่งนี้เป็นแอลลีล T และ C ความเข้มข้น 10^6 copies/ μ l มาผสมกันอย่างละ 33 μ l สำหรับ จีโนไทป์ TC

3.5.1.6. สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา และสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 9 และ 10 ตามลำดับ

ตารางที่ 9 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา real-time PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distill water (DW)	7.21	-
10X PCR buffer minus Mg	1	1X
10 mM dNTPs mixture	0.2	0.2 mM
50 mM MgCl_2	0.3	1.5 mM
40X <i>TaqMan</i> SNP Genotyping Assays	0.25	1X
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ μl)	0.04	0.2 Units
Plasmid (10^6 copies/ μl)	1	10^6 copies
Total volume	10	-

ตารางที่ 10 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ *TaqMan* probe real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	หมายเหตุ
Hold	95	10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	92	10 วินาที	
Annealing/Extension	60	1 นาที	

จากนั้นพิจารณาผลการทดลองจากกราฟ Allelic Discrimination Plot

หมายเหตุ แอลลีล T ตรวจวัดได้จากสัญญาณ VIC fluorescence ส่วนแอลลีล C ตรวจวัดได้จากสัญญาณ FAM fluorescence

4. การเก็บตัวอย่างเลือด

- 4.1. เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดปริมาตร 5 ml บรรจุลงในหลอดที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA (หลอดฝาสีม่วง)
- 4.2. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกพลาสมา
- 4.3. ดูดพลาสมาใส่ใน microcentrifuge tube และเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C
- 4.4. ใส่ Lymphocyte separation medium (Wisent Inc., Quebec, Canada) ที่แช่เย็น ณ อุณหภูมิ 4 °C ลงในหลอดประมาณ 1 ml จากนั้นดูดส่วน Buffy coat ใส่ลงบน Lymphocyte separation medium
- 4.5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยก PBMCs
- 4.6. เติมสารละลาย Red cell lysis buffer (RCLB) ประมาณ 3 ใน 4 ของหลอดทดลองอันใหม่
- 4.7. ดูดสารละลายส่วน PBMCs ลงในสารละลาย RCLB ข้อ 4.6 จากนั้นดูดสารละลายผสมขึ้นลงเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก
- 4.8. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 4.9. เทสารละลายส่วนใสทิ้งและตีดหลอดเพื่อให้ PBMCs หลุดออกจากข้างหลอด
- 4.10. เติม PBS ประมาณ 1-1.5 ml ลงในหลอด
- 4.11. ผสมให้เข้ากันและเก็บ PBMCs ที่ได้ ณ อุณหภูมิ -70 °C

5. การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMCs ของกลุ่มประชากรเป้าหมาย

การสกัดดีเอ็นเอจาก PBMCs ของกลุ่มประชากรเป้าหมายโดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction มีขั้นตอนดังนี้

- 5.1. นำ PBMCs ปริมาตร 100 µl มาเติมด้วย lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 400 µl เติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 µl แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5.2. เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 250 µl และ chloroform: isoamyl alcohol (49:1) ปริมาตร 250 µl จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 5.3. เตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่โดยเติม glycogen ปริมาตร 4 µl absolute ethanol ปริมาตร 800 µl และ 2 M Sodium acetate ปริมาตร 40 µl

จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนที่ได้จากขั้นที่ 5.2. ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

- 5.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 30 นาที
- 5.5. จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลื้อมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
- 5.6. ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวก้นหลอด microcentrifuge tube จากนั้นนำไปอบให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum เป็นเวลาประมาณ 15 นาที
- 5.7. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอด Nuclease (Nuclease-free water) ปริมาตร 30 μl จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C
- 5.8. วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer และบันทึกผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

6. การหาจีโนไทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมายด้วยวิธี PCR-RFLP

6.1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 11 ส่วนสภาวะที่ใช้ทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาณ (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distill water (DW)	18.88	-
10X PCR buffer minus Mg	2.50	1X
10 mM dNTPs mixture	0.50	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	0.75	1.5 mM
10 μM Forward primer*	0.63	0.25 μM
10 μM Reverse primer*	0.63	0.25 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/μl)	0.13	0.65 Units
DNA template from PBMCs (50-500 ng/μl)	1	-
Total volume	25	-

หมายเหตุ * ไพรเมอร์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 12 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	5 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	59	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

- 6.2. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide หากผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ของยีน *STAT3* rs2293152 และ *STAT4* rs7574865 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 233 และ 147 bp ตามลำดับ จึงดำเนินการขั้นต่อไป
- 6.3. การทำ PCR-RFLP ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865
- 6.3.1. ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152: นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่เหลือมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII* โดยขนาดผลิตภัณฑ์ภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงในตารางที่ 5 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ในรูปที่ 9 (ก.) และสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาในตารางที่ 6
- 6.3.2. ยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865: นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่เหลือมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaI* โดยขนาดผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงในตารางที่ 5 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ในรูปที่ 9 (ข.) และสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาในตารางที่ 6

7. การหาจีโนไทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ในกลุ่มประชากรเป้าหมายด้วยวิธี *TaqMan* probe real-time PCR

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา และใช้สภาวะของปฏิกิริยาตามตารางที่ 13 และ 14 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา real-time PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distill water (DW)	7.21	-
10X PCR buffer minus Mg	1	1X
10 mM dNTPs mixture	0.2	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	0.3	1.5 mM
40X <i>TaqMan</i> SNP Genotyping Assays	0.25	1X
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/µl)	0.04	0.2 Units
DNA template from PBMCs (50-500 ng/µl)	1	-
Total volume	10	-

ตารางที่ 14 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ *TaqMan* probe real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Hold	95	10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	92	10 วินาที	
Annealing/Extension	60	1 นาที	

จากนั้นพิจารณาผลการทดลองจากกราฟ Allelic Discrimination Plot

หมายเหตุ แอลลีล T ตรวจวัดได้จากสัญญาณ VIC fluorescence ส่วนแอลลีล C ตรวจวัดได้จากสัญญาณ FAM fluorescence

8. การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยการจดลงสมุดบันทึกผลการทดลองและบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

- 9.1. ใช้โปรแกรม GraphPad Software ในการคำนวณ Student's t test เพื่อพิจารณาความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกระหว่าง case และ control
- 9.2. เปรียบเทียบการกระจายตัวจีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ บนยีน *STAT3* และ *STAT4* ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา (Observed amount) กับค่าคาดหวัง (Expected amount) โดยใช้ Hardy-Weinberg Equilibrium จากเว็บไซต์ <http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>
- 9.3. ใช้โปรแกรม MedCalc Statistical Software Version 12.7.7 คำนวณความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* และ *STAT4* กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ (Odds ratio, OR) โดยใช้สถิติ chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P\text{-value} < 0.05$)

บทที่ 4

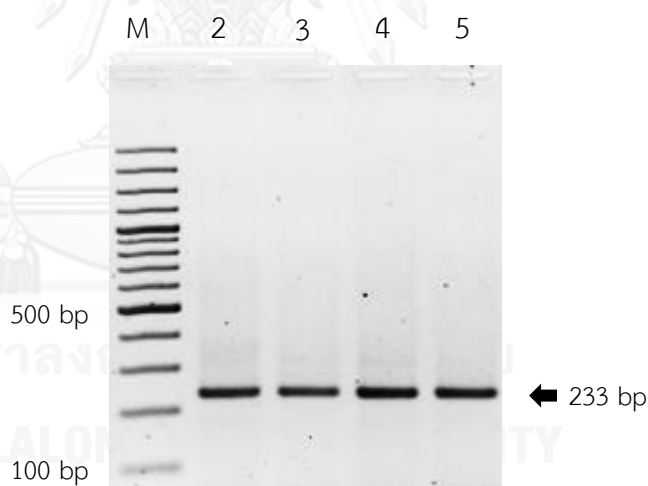
ผลการทดลอง

1. การทำ positive control สำหรับ SNP rs2293152 บนยีน *STAT3*

1.1. ผลการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HepG2 และ A549 เป็น DNA template

ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 233 bp ดังแสดงในรูปที่ 10 จากนั้นตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล และทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนนี้ด้วยวิธี transformation ต่อไป

ในงานวิจัยนี้นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 ที่ได้จากการ transformation ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing จากนั้นพิจารณาแอลลีลของ SNP ตำแหน่งนี้จาก chromatogram ของแต่ละพลาสมิด



รูปที่ 10 ผลการทำ PCR ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 จากเซลล์ HepG2 และ A549

หมายเหตุ

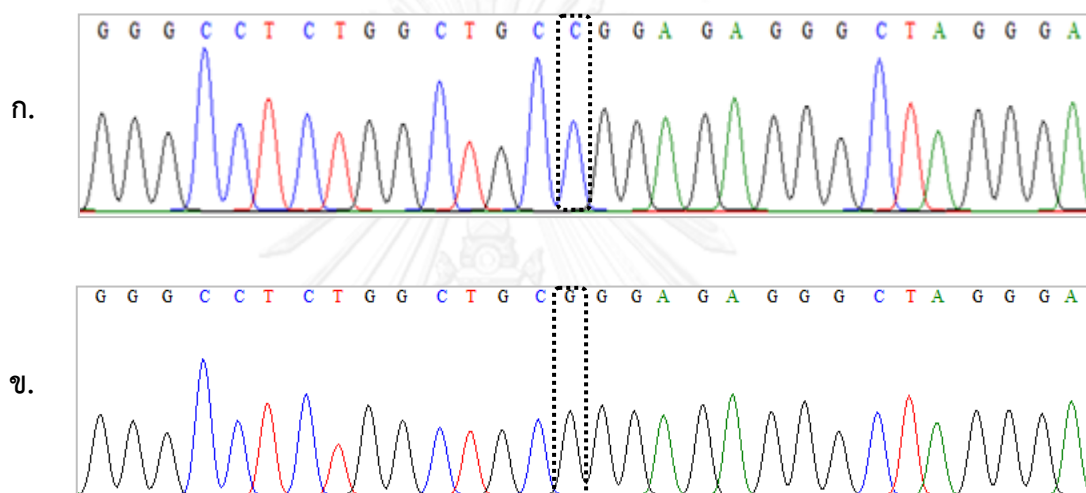
แถว M คือ 100 bp DNA Ladder

แถวที่ 2 และ 3 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HepG2 เป็น DNA template

แถวที่ 4 และ 5 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ A549 เป็น DNA template

1.2. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 ด้วยวิธี sequencing

ยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs2293152 มี Major และ Minor allele คือ G และ C ตามลำดับ จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดพบว่า พลาสมิดที่มีซันยีนนี้จากเซลล์ HepG2 เป็น แอลลีล C ส่วนเซลล์ A549 เป็นแอลลีล G ดังแสดงในรูปที่ 11 ทำให้การหาจีโนไทป์สำหรับ SNP ตำแหน่งนี้มี positive control ของทั้งสองแอลลีลครบตามต้องการ



รูปที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152

ก. แอลลีล C และ ข. แอลลีล G

1.3. การทำ PCR-RFLP ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152

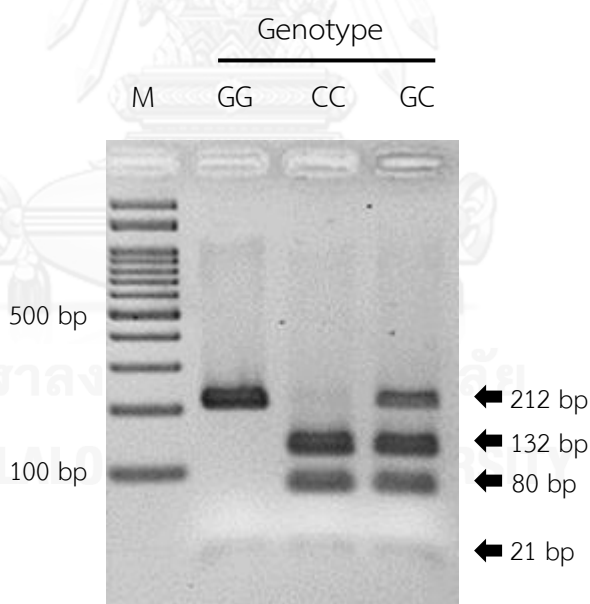
จีโนไทป์ของยีน *STAT3* rs2293152 มี 3 แบบ คือ GG, CC และ GC ดังนั้นการตรวจหาจีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่งนี้จากกลุ่มประชากรเป้าหมายด้วยวิธี PCR-RFLP จึงสามารถปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเมื่อนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 3% agarose gel ในการทดลองนี้จึงใช้พลาสมิดที่มีแอลลิลที่แตกต่างกันเป็น DNA template ในการทำ PCR-RFLP เพื่อให้ผลจีโนไทป์ที่แตกต่างกันทั้งสามแบบนี้

พลาสมิดจากเซลล์ A549 สำหรับจีโนไทป์ GG

พลาสมิดจากเซลล์ HepG2 สำหรับจีโนไทป์ CC

และพลาสมิดจากเซลล์ A549 ผสมกับ HepG2 สำหรับจีโนไทป์ GC

หากตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นจีโนไทป์ GG ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 212 และ 21 bp แต่ถ้าเป็นจีโนไทป์ CC ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 132, 80 และ 21 bp ส่วนจีโนไทป์ GC ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 212, 132, 80 และ 21 bp บน 3% agarose gel ดังปรากฏในรูปที่ 12



รูปที่ 12 PCR-RFLP ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152

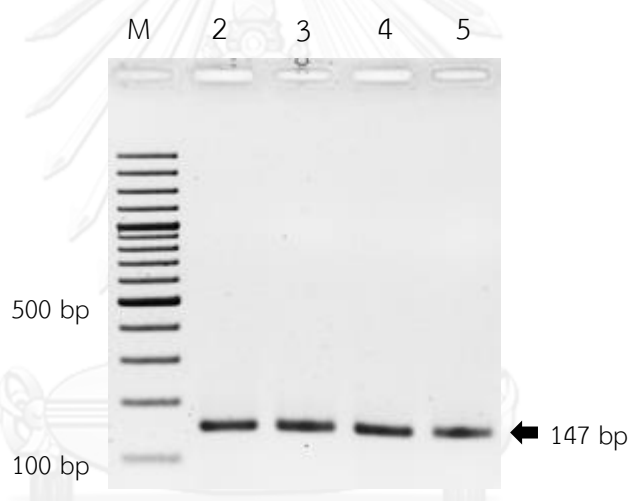
หมายเหตุ

แถว M คือ 100 bp DNA Ladder

2. การทำ positive control สำหรับ SNP rs7574865 บนยีน *STAT4*

2.1. ผลการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HepG2 และ HeLa เป็น DNA template

ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 147 bp ดังแสดงในรูปที่ 13 จากนั้นตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนนี้ด้วยวิธี transformation ต่อไปในงานวิจัยนี้ นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ที่ได้จากการ transformation ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing จากนั้นพิจารณาแอลลีลของ SNP ตำแหน่งนี้จาก chromatogram ของแต่ละพลาสมิด



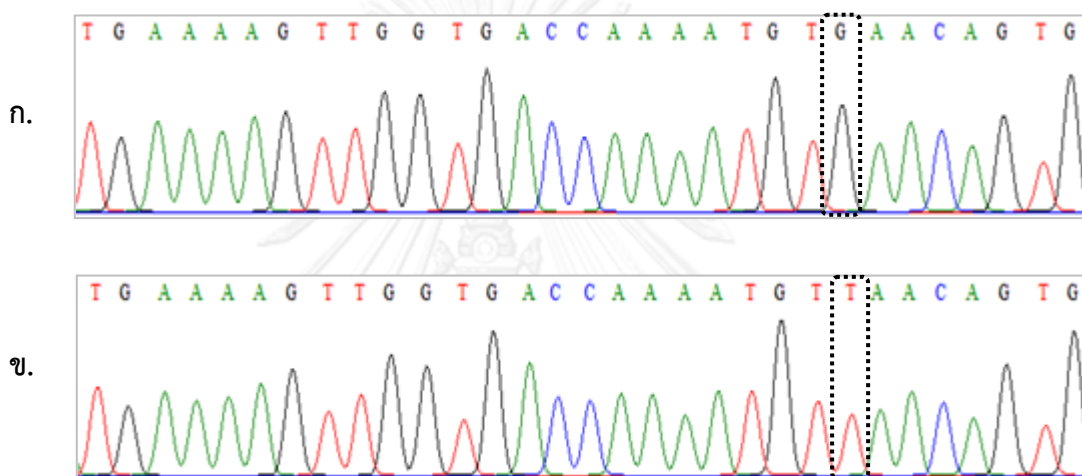
รูปที่ 13 ผลการทำ PCR ยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 จากเซลล์ HepG2 และ HeLa

หมายเหตุ

- แถวม M คือ 100 bp DNA Ladder
- แถวกที่ 2 และ 3 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HepG2 เป็น DNA template
- แถวกที่ 4 และ 5 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HeLa เป็น DNA template

2.2. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ด้วยวิธี sequencing

ยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 มี Major และ Minor allele คือ G และ T ตามลำดับ จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดพบว่า พลาสมิดที่มีซึ้นยีนนี้จากเซลล์ HepG2 เป็น แอลลีล G ส่วนเซลล์ HeLa เป็นแอลลีล T ดังแสดงในรูปที่ 14 ทำให้การหาจีโนไทป์สำหรับ SNP ตำแหน่งนี้มี Positive control ของทั้งสองแอลลีลครบตามต้องการ



รูปที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

ก. แอลลีล G และ ข. แอลลีล T

2.3. การทำ PCR-RFLP ของยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

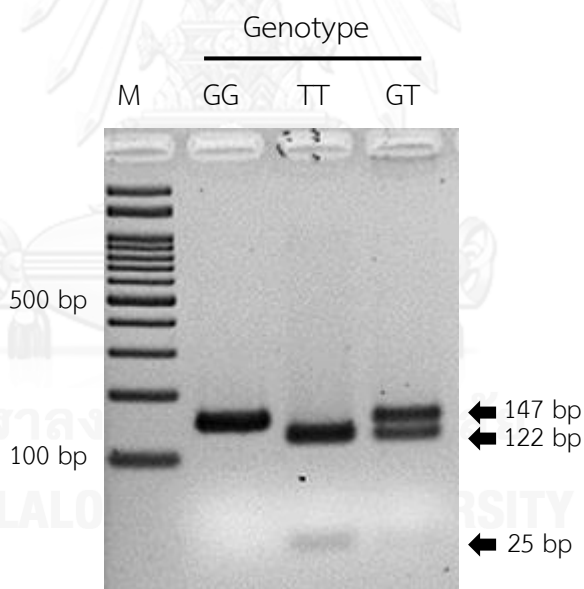
จีโนไทป์ของยีน *STAT4* rs7574865 มี 3 แบบ คือ GG, TT และ GT ดังนั้นการตรวจหาจีโนไทป์ของ SNPs ตำแหน่งนี้จากกลุ่มประชากรเป้าหมายด้วยวิธี PCR-RFLP จึงสามารถปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเมื่อนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 3% agarose gel ในการทดลองนี้จึงใช้พลาสมิดที่มีแอลลิลที่แตกต่างกันเป็น DNA template ในการทำ PCR-RFLP เพื่อให้ผลจีโนไทป์ที่แตกต่างกันทั้งสามแบบนี้

พลาสมิดจากเซลล์ HepG2 สำหรับจีโนไทป์ GG

พลาสมิดจากเซลล์ HeLa สำหรับจีโนไทป์ TT

และพลาสมิดจากเซลล์ HepG2 ผสมกับ HeLa สำหรับจีโนไทป์ GT

หากตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นจีโนไทป์ GG ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 147 bp เพียงแถบเดียวแต่ถ้าเป็นจีโนไทป์ TT จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 122 และ 25 bp ส่วนจีโนไทป์ GT ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 147, 122 และ 25 bp บน 3% agarose gel ดังปรากฏในรูปที่ 15



รูปที่ 15 PCR-RFLP ของยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

หมายเหตุ

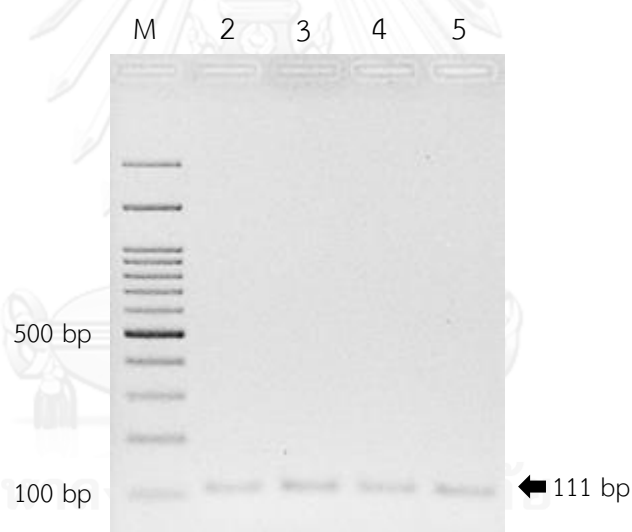
แถว M คือ 100 bp DNA Ladder

3. การทำ positive control สำหรับ SNP rs1053004 บนยีน *STAT3*

3.1. ผลการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HepG2 และ A549 เป็น DNA template

ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 111 bp ดังแสดงในรูปที่ 16 จากนั้นตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล และทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนนี้ด้วยวิธี transformation ต่อไป

ในงานวิจัยนี้นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ที่ได้จากการ transformation ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing จากนั้นพิจารณาแอลลีลของ SNP ตำแหน่งนี้จาก chromatogram ของแต่ละพลาสมิด



รูปที่ 16 ผลการทำ PCR ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 จากเซลล์ HepG2 และ A549

หมายเหตุ

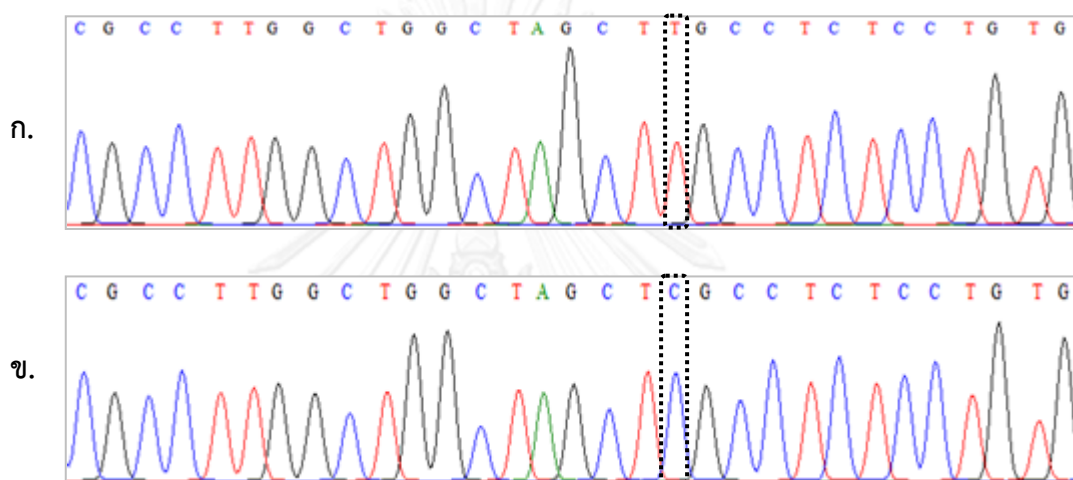
แถว M คือ 100 bp DNA Ladder

แถวที่ 2 และ 3 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ HepG2 เป็น DNA template

แถวที่ 4 และ 5 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ A549 เป็น DNA template

3.2. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ด้วยวิธี sequencing

ยีน *STAT3* ตำแหน่ง rs1053004 มี Major และ Minor allele คือ T และ C ตามลำดับ จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดพบว่า พลาสมิดที่มีซึ้นยีนนี้จากเซลล์ HepG2 เป็น แอลลีล T ส่วนเซลล์ A549 เป็น แอลลีล C ดังแสดงในรูปที่ 17 ทำให้การหาจีโนไทป์สำหรับ SNP ตำแหน่งนี้มี positive control ของทั้งสองแอลลีลครบตามต้องการ



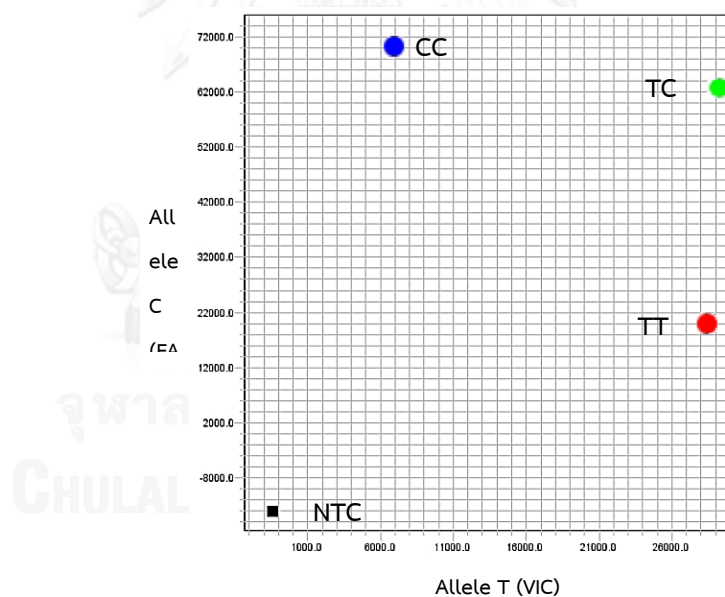
รูปที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004

ก. แอลลีล T และ ข. แอลลีล C

3.3. การทำ TaqMan probe real-time PCR ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004

จีโนไทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 มี 3 แบบ คือ CC, TT และ TC การหาจีโนไทป์ของยีนนี้ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR อาศัยการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent signal) ที่เกิดขึ้นจากแต่ละรอบของการทำ PCR โดยฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าวคือ FAM fluorescence สำหรับแอลลีล C และ VIC fluorescence สำหรับแอลลีล T สำหรับการหาจีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่งนี้ในกลุ่มประชากรเป้าหมายจำเป็นต้องอาศัย Positive control ของจีโนไทป์แต่ละแบบดังแสดงในรูปที่ 18

จากกราฟ Allelic Discrimination Plot รูปที่ 18 พบว่า จีโนไทป์ TT เครื่อง StepOnePlus Real-Time PCR System ตรวจวัดสัญญาณ VIC fluorescence ได้สูง แต่สัญญาณ FAM fluorescence ต่ำ ในขณะที่จีโนไทป์ CC ตรวจวัดสัญญาณ VIC fluorescence ได้ต่ำ แต่สัญญาณ FAM fluorescence สูง ส่วนจีโนไทป์ TC ตรวจวัดสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ทั้งสองได้ปริมาณใกล้เคียงกัน



รูปที่ 18 Allelic discrimination plot ของ positive control

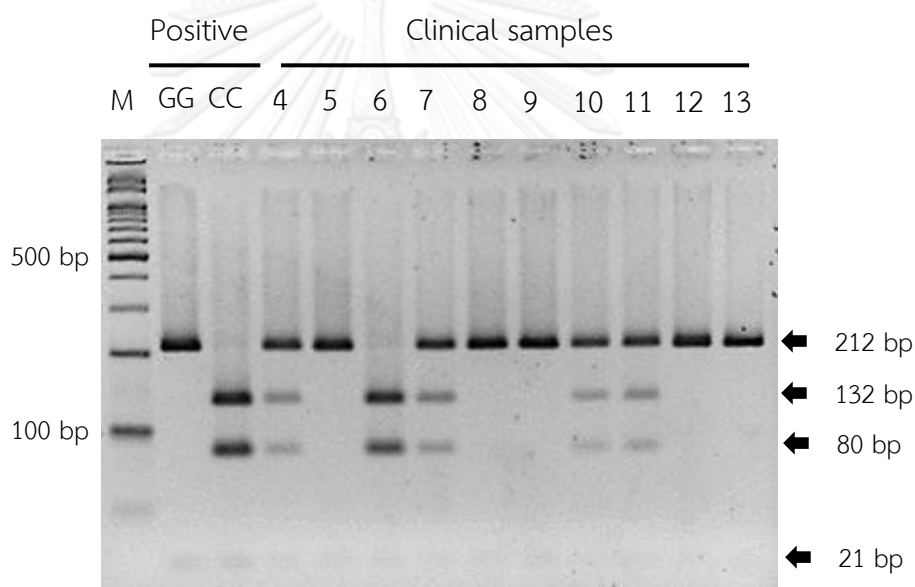
สำหรับการหาจีโนไทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004

หมายเหตุ NTC คือ no template control

4. การหาจีโนไทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

STAT3 ตำแหน่ง SNP rs2293152

ถ้าตัวอย่างที่นำมาศึกษามี SNP ตำแหน่งนี้เป็นจีโนไทป์ GG ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 212 และ 21 bp แต่ถ้าเป็นจีโนไทป์ CC จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 132, 80 และ 21 bp ส่วนจีโนไทป์ CG ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 212, 132, 80 และ 21 bp บน 3% agarose gel ดังปรากฏในรูปที่ 19



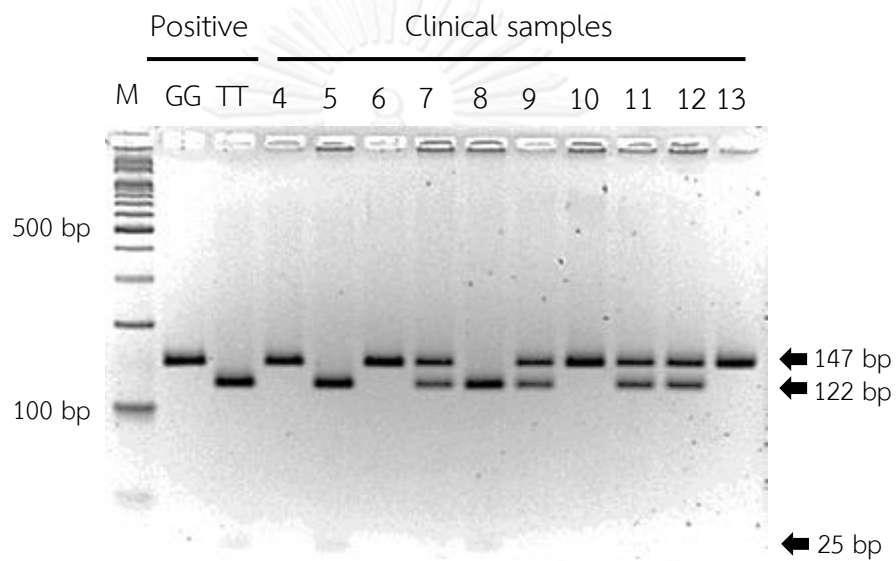
รูปที่ 19 ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152

หมายเหตุ

- แฉว M คือ 100 bp DNA Ladder
 แฉวที่ 2 และ 3 คือ Positive control สำหรับจีโนไทป์ GG และ CC ตามลำดับ
 แฉวที่ 4 ถึง 13 คือ ผลการทำ PCR-RFLP จากกลุ่มประชากรเป้าหมาย

STAT4 ตำแหน่ง SNP rs7574865

ถ้าตัวอย่างที่นำมาศึกษามี SNP ตำแหน่งนี้เป็นจีโนไทป์ GG ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 147 bp เพียง แถบเดียวแต่ถ้าเป็นจีโนไทป์ TT ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 122 และ 25 bp ส่วน จีโนไทป์ GT ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 147, 122 และ 25 bp บน 3% agarose gel ดังปรากฏใน รูปที่ 20



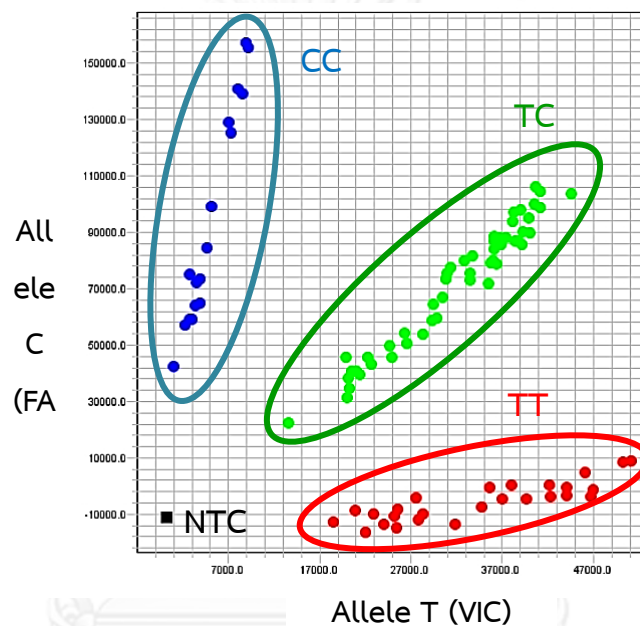
รูปที่ 20 ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

หมายเหตุ

- แถว M คือ 100 bp DNA Ladder
 แถวที่ 2 และ 3 คือ Positive control สำหรับจีโนไทป์ GG และ TT ตามลำดับ
 แถวที่ 4 ถึง 13 คือ ผลการทำ PCR-RFLP จากกลุ่มประชากรเป้าหมาย

STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004

จากกราฟ Allelic Discrimination Plot รูปที่ 21 พบว่า ถ้าตัวอย่างที่นำมาศึกษามี SNP ตำแหน่งนี้เป็นจีโนไทป์ TT เครื่อง real-time (StepOnePlus Real-Time PCR System) ตรวจวัดสัญญาณ VIC fluorescence ได้สูง แต่สัญญาณ FAM fluorescence ต่ำ ในขณะที่จีโนไทป์ CC ตรวจวัดสัญญาณ VIC fluorescence ได้ต่ำ แต่สัญญาณ FAM fluorescence สูง ส่วนจีโนไทป์ TC ตรวจวัดสัญญาณของฟลูออเรสเซนต์ทั้งสองได้ปริมาณใกล้เคียงกัน



รูปที่ 21 ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน STAT3 ตำแหน่ง SNP rs1053004

หมายเหตุ NTC คือ no template control

5. ตัวอย่างตารางบันทึกผลการสกัดดีเอ็นเอและจีโนมโทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

ตารางที่ 15 ตัวอย่างผลการสกัดดีเอ็นเอและจีโนมโทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

No.	OD _{260/280}	DNA Concentration (ng/μl)	Genotype		
			STAT3 rs2293152	STAT3 rs1053004	STAT4 rs7574865
1	1.67	97.1	GC	TC	GG
2	1.74	69.7	GG	TC	TT
3	1.56	121.3	CC	TC	GG
4	1.79	246.7	GC	TT	GT
5	1.41	86	GG	CC	TT
6	1.63	58.2	GG	TC	GT
7	1.72	356	GC	TT	GG
8	1.67	82.3	GC	TC	GT
9	1.58	145.4	GG	TC	GT
10	1.63	116.9	GG	CC	GG

จากข้อมูลที่บันทึกลงในตารางที่ 15 สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้ดังนี้ หมายเลขตัวอย่างที่นำมาศึกษา สามารถนำมาใช้เพื่อหาข้อมูลอายุ เพศ และข้อมูลอื่น ๆ ของประชากรเป้าหมาย

ค่า OD_{260/280} เป็นค่าที่แสดงถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยอาศัยเทคนิค spectrophotometer เนื่องจากดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD₂₆₀) การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอทำได้โดยเปรียบเทียบค่า OD₂₆₀ และ OD₂₈₀ สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วนของ OD₂₆₀/OD₂₈₀ อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แต่ถ้ามีค่าต่ำกว่า 1.8 เล็กน้อย แสดงว่ามีการปนเปื้อนโปรตีนและฟีนอล จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดในการทดลองนี้มีการปนเปื้อนโปรตีนและฟีนอล เนื่องจาก OD₂₆₀/OD₂₈₀ มีค่าต่ำกว่า 1.8

ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอแสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่สกัด ซึ่งมีความสำคัญในการใช้เป็นข้อมูลสำหรับการใส่ DNA template ลงในปฏิกิริยา PCR โดยในการทดลองนี้ใช้ DNA template ปริมาณ 50 ถึง 500 ng ในการทำ PCR แต่ละปฏิกิริยา หากสารละลายดีเอ็นเอมีปริมาณมากกว่า 500 ng จะทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วงที่กำหนด แต่ถ้าสารละลายดีเอ็นเอมีปริมาณน้อยกว่า 50 ng ก็เพิ่มปริมาตรของ DNA template ที่ใช้ทำ PCR ให้มากขึ้น โดยให้มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 50 ถึง 500 ng ในการทำ PCR แต่ละปฏิกิริยา

ผลจีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ นำไปใช้หาความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ โดยนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6. ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ใช้ในงานวิจัย

ผลการหาจีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ จากกลุ่มประชากรเป้าหมายทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ (HCC) จำนวน 200 ราย และกลุ่มควบคุม จำนวน 400 ราย ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับ (CHB ที่ไม่เป็น HCC) จำนวน 200 ราย และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (Healthy controls) จำนวน 200 ราย พบว่ามีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถหาจีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ ได้ เนื่องจากตัวอย่างเลือดบางตัวอย่างอาจเก็บไว้เป็นระยะเวลาสั้น เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจึงทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย และคุณภาพไม่ดี งานวิจัยนี้จึงคัดตัวอย่างเหล่านั้นออก ทำให้ได้จำนวนประชากรในแต่ละกลุ่มที่ใช้ในการคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* และ *STAT4* กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับดังนี้ กลุ่ม HCC จำนวน 192 ราย กลุ่มควบคุมจำนวน 390 ราย ประกอบด้วยกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC จำนวน 200 ราย และกลุ่ม Healthy controls จำนวน 190 ราย และรวบรวมข้อมูลทางคลินิกของประชากรในแต่ละกลุ่มลงในตารางที่ 16 ดังนี้

ตารางที่ 16 ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ใช้ในงานวิจัยนี้

	HCC (n=192)	CHB without HCC (n=200)	Healthy controls (n=190)	<i>P</i> values
Age (years)	57.64 ± 9.80	45.84 ± 14.04	47.83 ± 5.31	<0.001 ^{*,†,‡}
Gender				
Male (%)	164 (85.42)	140 (70.00)	112 (58.95)	<0.001 ^{*,†,‡}
Female (%)	28 (14.58)	60 (30.00)	78 (41.05)	
AST (IU/L)	87.04 ± 76.01	35.75 ± 35.15	ND	<0.001 [*]
ALT (IU/L)	59.32 ± 55.57	45.31 ± 62.58	ND	0.023 [*]

HCC, Hepatocellular Carcinoma; CHB, Chronic Hepatitis B; ALT, Alanine Transaminase;

AST, Aspartate Aminotransferase; ND, No Data.

* เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HCC และกลุ่มควบคุม CHB ที่ไม่เป็น HCC

† เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HCC และกลุ่มควบคุม healthy controls

‡ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HCC และกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มรวมกัน

หมายเหตุ คำนวณค่า *P* values สำหรับ Student's t test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Software

จากลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายแต่ละกลุ่มซึ่งปรากฏในตารางที่ 16 จะเห็นได้ว่า ประชากรที่ใช้ในงานวิจัยนี้กลุ่ม HCC มีอายุเฉลี่ยมากกว่าประชากรกลุ่มควบคุม CHB ที่ไม่เป็น HCC และกลุ่ม Healthy controls ประมาณ 12 และ 10 ปี ตามลำดับ สัดส่วนของเพศชายพบมากที่สุดในกลุ่มประชากร HCC ซึ่งมีจำนวน 164 ราย คิดเป็น 85.42% ของประชากรกลุ่ม HCC และพบน้อยที่สุดในกลุ่ม Healthy controls ซึ่งมีจำนวน 112 ราย คิดเป็น 58.95% ของประชากรในกลุ่มนี้ ในขณะที่สัดส่วนของเพศหญิงพบมากที่สุดในประชากรกลุ่ม Healthy controls มีจำนวน 78 ราย คิดเป็น 41.05% ของประชากรกลุ่ม Healthy controls และพบน้อยที่สุดในกลุ่ม HCC ซึ่งมีจำนวน 28 ราย คิดเป็น 14.58% ของประชากรในกลุ่มนี้ และพบว่ามีความแตกต่างของสัดส่วนเพศระหว่างกลุ่ม HCC และ กลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.001) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเอนไซม์ในตับ AST และ ALT ของประชากรกลุ่ม HCC มีค่าสูงกว่ากลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.001 และ 0.023 ตามลำดับ)

จากค่าเอนไซม์ในตับ AST และ ALT พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับมีค่าเอนไซม์ ALT สูงกว่า AST ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับชนิด HCC มีค่าเอนไซม์ AST สูงกว่า ALT แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ความแตกต่างของระดับเอนไซม์ทั้งสองนี้ในการติดตามการพัฒนามาสู่การเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังได้

7. Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

สมมติของ Hardy-Weinberg คือ ความสมดุลของความถี่จีโนไทป์และความถี่แอลลีล ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากประชากรรุ่นหนึ่งไปสู่ประชากรอีกรุ่นหนึ่งได้ เมื่อประชากรนั้นมีขนาดใหญ่ มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการกลายพันธุ์ ไม่มีการอพยพของประชากร และไม่มีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงทดสอบความเบี่ยงเบนความถี่จีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ จากสมมติของ Hardy-Weinberg เพื่อแสดงให้เห็นว่า กลุ่มประชากรที่ศึกษามีความถี่จีโนไทป์ที่สมดุลไม่เอนเอียงไปในจีโนไทป์ใดจีโนไทป์หนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ บนยีน *STAT3* และ *STAT4* ในกลุ่มประชากรที่ศึกษากับค่าคาดหวังโดยใช้สมมติของ Hardy-Weinberg

Gene	Genotype	Observed amount	Expected amount	Chi-square (P value) [†]
<i>STAT3</i> rs2293152	GG	169	167.79	0.841
	GC	287	289.41	
	CC	126	124.79	
<i>STAT3</i> rs1053004	TT	179	189.96	0.064
	TC	307	285.08	
	CC	96	106.96	
<i>STAT4</i> rs7574865	GG	232	237.13	0.357
	GT	279	268.73	
	TT	71	76.13	

หมายเหตุ คำนวณสมดุล Hardy-Weinberg โดยใช้เว็บไซต์ <http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>

[†]Pearson's goodness-of-fit chi-square

จากตารางที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ของยีน *STAT3* rs2293152 และ rs1053004 รวมทั้งยีน *STAT4* rs7574865 จากกลุ่มประชากรที่ศึกษากับค่าคาดหวังที่คำนวณตามกฎของ Hardy-Weinberg พบว่า SNPs ทั้งสามตำแหน่งอยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรที่นำมาศึกษาเป็นกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ดี และมีความน่าเชื่อถือของข้อมูล

8. ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 และ rs1053004 และ *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ

8.1. ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152

จากผลการหาจีโนไทป์พบว่าความถี่จีโนไทป์ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 ในกลุ่มประชากร HCC เป็นดังนี้ จีโนไทป์ GG, GC และ CC คือ 56 (29.17%), 97 (50.52%) และ 39 (20.31%) ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มประชากร CHB ที่ไม่เป็น HCC คือ 60 (30.00%), 95 (47.50%) และ 45 (22.50%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Healthy controls มีความถี่จีโนไทป์เป็น 53 (27.89%), 95 (50.00%) และ 42 (22.11%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18 ส่วนความถี่แอลลีล G และ C ของ SNPs ตำแหน่งนี้ในประชากรกลุ่ม HCC คือ 209 (54.43%) และ 175 (45.57%) ตามลำดับ และประชากรกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC คือ 215 (53.75%) และ 185 (46.25%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Healthy controls มีความถี่ของแอลลีลต่าง ๆ เป็น 201 (52.89%) และ 179 (47.11%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18

การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและกลุ่ม Healthy controls พบว่า ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (P value > 0.05)

8.2. ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004

จากตารางที่ 19 พบว่าความถี่จีโนไทป์ TT, TC และ CC ของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 ในกลุ่มประชากร HCC เป็นดังนี้ 45 (23.44%), 108 (56.25%) และ 39 (20.31%) ตามลำดับ และในกลุ่มประชากร CHB ที่ไม่เป็น HCC คือ 62 (31.00%), 109 (54.50%) และ 29 (14.50%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Healthy controls มีความถี่จีโนไทป์เป็น 72 (37.89%), 90 (47.37%) และ 28 (14.74%) ตามลำดับ ส่วนความถี่แอลลีล T และ C ของ SNPs ตำแหน่งนี้ในประชากรกลุ่ม HCC คือ 198 (51.56%) และ 186 (48.44%) ตามลำดับ และประชากรกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC คือ 233 (58.25%) และ 167 (41.75%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Healthy controls มีความถี่ของแอลลีลต่าง ๆ เป็น 234 (61.58%) และ 146 (38.42%) ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ พบว่าจีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม CHB ที่ไม่เป็น HCC (OR=1.85, 95% CI=1.00-3.43, $P=0.049$) และมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Healthy controls (OR=2.23, 95% CI=1.21-4.11, $P=0.010$) และในขณะเดียวกันจีโนไทป์ CC ยังมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ (All controls; CHB ที่ไม่เป็น HCC และ Healthy controls) อีกด้วย (OR=2.04, 95% CI=1.20-3.46, $P=0.008$) นอกจากนี้พบว่าความถี่ของแอลลีล C ของ SNPs นี้ มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Healthy controls และ All controls อย่างมีนัยสำคัญ (OR=1.51, 95% CI=1.13-2.01, $P=0.005$ และ OR=1.40, 95% CI=1.10-1.79, $P=0.007$ ตามลำดับ) และยังพบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันนี้ใน Dominant model เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Healthy controls และตัวแปรควบคุมทั้งหมด (OR=1.99, 95% CI=1.28-3.11, $P=0.002$ และ OR=1.71, 95% CI=1.15-2.54, $P=0.008$ ตามลำดับ) แต่ไม่พบใน Recessive model

8.3. ยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

จากตารางที่ 20 พบว่าความถี่จีโนไทป์ TT, GT และ GG ของยีน *STAT4* rs7574865 ในกลุ่มประชากร HCC เป็นดังนี้ 19 (9.90%), 86 (44.79%) และ 87 (45.31%) ตามลำดับ และในกลุ่มประชากร CHB ที่ไม่เป็น HCC คือ 24 (12.00%), 93 (46.50%) และ 83 (41.50%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Healthy controls มีความถี่จีโนไทป์เป็น 28 (14.74%), 100 (52.63%) และ 62 (32.63%) ตามลำดับ ส่วนความถี่แอลลีล T และ G ของ SNPs ตำแหน่งนี้ในประชากรกลุ่ม HCC คือ 124 (32.29%) และ 260 (67.71%) ตามลำดับ และประชากรกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC คือ 141 (35.75%) และ 259 (64.75%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Healthy controls มีความถี่ของแอลลีลต่าง ๆ เป็น 156 (41.05%) และ 224 (58.95%) ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *STAT4* rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับพบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Healthy controls (OR=2.07, 95% CI=1.06-4.03, $P=0.033$) และพบว่าความถี่ของแอลลีล G ของ SNPs นี้ มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Healthy controls อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR=1.46, 95% CI=1.09-1.96, $P=0.012$) นอกจากนี้ Recessive model ของ SNPs นี้ ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับเช่นกัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Healthy controls (OR=1.71, 95% CI=1.13-2.59, $P=0.011$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม CHB ที่ไม่เป็น HCC และตัวแปรควบคุมทั้งหมดรวมทั้ง Dominant model

ตารางที่ 18 ความถี่ของจีโนไทป์และแอลลีลของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC

<i>STAT3</i> rs2293152	HCC (n=192)	CHB without HCC (n=200)	Healthy controls (n=190)	HCC vs. CHB		HCC vs. Healthy controls		HCC vs. All controls [†]	
				OR (95% CI)	<i>P</i> values	OR (95% CI)	<i>P</i> values	OR (95% CI)	<i>P</i> values
Genotype*									
GG	56 (29.17%)	60 (30.00%)	53 (27.89%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
GC	97 (50.52%)	95 (47.50%)	95 (50.00%)	1.09 (0.69-1.74)	0.703	0.97 (0.60-1.55)	0.887	1.03 (0.69-1.54)	0.885
CC	39 (20.31%)	45 (22.50%)	42 (22.11%)	0.93 (0.53-1.63)	0.796	0.88 (0.49-1.56)	0.660	0.90 (0.55-1.48)	0.691
Allele									
Major (G)	209 (54.43%)	215 (53.75%)	201 (52.89%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Minor (C)	175 (45.57%)	185 (46.25%)	179 (47.11%)	0.97 (0.73-1.29)	0.849	0.94 (0.71-1.25)	0.671	0.96 (0.75-1.22)	0.725
Dominant									
GG	56 (29.17%)	60 (30.00%)	53 (27.89%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
CG+CC	136 (70.83%)	140 (70.00%)	137 (72.11%)	1.04 (0.67-1.61)	0.857	0.94 (0.60-1.47)	0.783	0.99 (0.68-1.45)	0.962
Recessive									
GG+CG	153 (79.69%)	155 (77.50%)	148 (77.89%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
CC	39 (20.31%)	45 (22.50%)	42 (22.11%)	0.88 (0.54-1.42)	0.598	0.90 (0.55-1.47)	0.668	0.89 (0.58-1.36)	0.583

HCC, hepatocellular carcinoma; CHB, chronic hepatitis B; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

* rs2293152 alleles are reported in reverse orientation to genome.

[†] Between CHB patients and Healthy controls.

ตารางที่ 19 ความถี่ของ SNP rs1053004 และแอลลีลของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC

<i>STAT3</i> rs1053004	HCC (n=192)	CHB without HCC (n=200)	Healthy controls (n=190)	HCC vs. CHB		HCC vs. Healthy controls		HCC vs. All controls [†]	
				OR (95% CI)	<i>P</i> values	OR (95% CI)	<i>P</i> values	OR (95% CI)	<i>P</i> values
Genotype*									
TT	45 (23.44%)	62 (31.00%)	72 (37.89%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
TC	108 (56.25%)	109 (54.50%)	90 (47.37%)	1.37 (0.86-2.18)	0.192	1.92 (1.21-3.06)	0.006	1.62 (1.07-2.44)	0.022
CC	39 (20.31%)	29 (14.50%)	28 (14.74%)	1.85 (1.00-3.43)	0.049	2.23 (1.21-4.11)	0.010	2.04 (1.20-3.46)	0.008
Allele									
Major (T)	198 (51.56%)	233 (58.25%)	234 (61.58%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Minor (C)	186 (48.44%)	167 (41.75%)	146 (38.42%)	1.31 (0.99-1.74)	0.060	1.51 (1.13-2.01)	0.005	1.40 (1.10-1.79)	0.007
Dominant									
TT	45 (23.44%)	62 (31.00%)	72 (37.89%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
TC+CC	147 (76.56%)	138 (69.00%)	118 (62.11%)	1.47 (0.94-2.30)	0.094	1.99 (1.28-3.11)	0.002	1.71 (1.15-2.54)	0.008
Recessive									
TT+TC	153 (79.69%)	171 (85.50%)	162 (85.26%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
CC	39 (20.31%)	29 (14.50%)	28 (14.74%)	1.50 (0.89-2.55)	0.130	1.47 (0.87-2.51)	0.153	1.49 (0.95-2.34)	0.083

HCC, hepatocellular carcinoma; CHB, chronic hepatitis B; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

* rs1053004 alleles are reported in reverse orientation to genome.

[†] Between CHB patients and Healthy controls.

ตารางที่ 20 ความถี่ของจีโนไทป์และแอลลีลของยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC

<i>STAT4</i> rs7574865	HCC (n=192)	CHB without HCC (n=200)	Healthy controls (n=190)	HCC vs. CHB		HCC vs. Healthy controls		HCC vs. All controls [†]	
				OR (95% CI)	<i>P</i> values	OR (95% CI)	<i>P</i> values	OR (95% CI)	<i>P</i> values
<i>Genotype*</i>									
TT	19 (9.90%)	24 (12.00%)	28 (14.74%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
GT	86 (44.79%)	93 (46.50%)	100 (52.63%)	1.17 (0.60-2.28)	0.649	1.27 (0.66-2.43)	0.475	1.22 (0.68-2.19)	0.505
GG	87 (45.31%)	83 (41.50%)	62 (32.63%)	1.32 (0.68-2.59)	0.414	2.07 (1.06-4.03)	0.033	1.64 (0.91-2.96)	0.099
<i>Allele</i>									
Minor (T)	124 (32.29%)	141 (35.75%)	156 (41.05%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Major (G)	260 (67.71%)	259 (64.75%)	224 (58.95%)	1.14 (0.85-1.54)	0.382	1.46 (1.09-1.96)	0.012	1.29 (1.00-1.67)	0.054
<i>Dominant</i>									
TT	19 (9.90%)	24 (12.00%)	28 (14.74%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
GT+GG	173 (90.10%)	176 (88.00%)	162 (85.26%)	1.24 (0.66-2.35)	0.506	1.57 (0.85-2.93)	0.152	1.40 (0.80-2.44)	0.235
<i>Recessive</i>									
TT+GT	105 (54.69%)	117 (58.50%)	128 (67.37%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-
GG	87 (45.31%)	83 (41.50%)	62 (32.63%)	1.17 (0.78-1.74)	0.447	1.71 (1.13-2.59)	0.011	1.40 (0.99-1.99)	0.060

HCC, hepatocellular carcinoma; CHB, chronic hepatitis B; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

* rs7574865 alleles are reported in forward orientation to genome.

[†] Between CHB patients and Healthy controls.

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152

ยีน *STAT3* อยู่บนโครโมโซมที่ 17q21 ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีน *STAT3* ที่มีการทำงานเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เมื่อโปรตีน *STAT3* ได้รับการกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต โปรตีนนี้จะรวมกันเป็น homodimer แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง และ inflammatory factor [17] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเติมฟอสเฟตให้กับโปรตีน *STAT3* จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของมะเร็งอย่างควบคุมไม่ได้ [50] ในปัจจุบันนี้มีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ของยีน *STAT3* กับการการพัฒาไปสู่การเป็นมะเร็งและการตอบสนองต่อการรักษามะเร็งหลายชนิด หนึ่งในโรคมะเร็งเหล่านั้นคือมะเร็งตับชนิด HCC [14, 45, 46] การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน *STAT3* มีความสำคัญในการสร้างเซลล์ตับที่ตายไปและพัฒนาไปสู่การเกิดพังผืดที่ตับและเกิดตับแข็ง ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของการพัฒนามาสู่การเป็นมะเร็งตับ [1] แม้โปรตีน *STAT3* มีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งตับ แต่ปัจจุบันก็ยังมีการศึกษาที่เชื่อมโยงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* กับการเกิดมะเร็งตับจำนวนน้อย งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNPs rs2293152 และ rs1053004 กับการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

งานวิจัยนี้พบว่า SNP rs2293152 มีความถี่ของแอลลีล G ในประชากรทั้ง 3 กลุ่ม คือ HCC, CHB ที่ไม่เป็น HCC และ Healthy controls (54.43, 53.75 และ 52.89% ตามลำดับ) สูงกว่าแอลลีล C ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Xie J. และคณะ (2013) [14] ที่ศึกษาในกลุ่มประชากรจีน โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่ม HCC จำนวน 1,021 ราย CHB ที่ไม่เป็น HCC จำนวน 990 ราย และ Healthy controls จำนวน 1,012 ราย การศึกษาของ Xie J. และคณะ (2013) พบว่าประชากรในแต่ละกลุ่มมีความถี่ของแอลลีล G (49.36, 47.41 และ 46.09% ตามลำดับ) น้อยกว่าแอลลีล C แสดงให้เห็นว่าในประชากรไทย SNP rs2293152 มีแอลลีล G เป็น major allele แต่ในขณะเดียวกันแอลลีลนี้เป็น minor allele ในประชากรจีน ความแตกต่างในการกระจายตัวแอลลีลสำหรับ SNP ตำแหน่งนี้เป็นอีกหนึ่งหลักฐานสำคัญที่ชี้ให้เห็นว่า เชื้อชาติมีผลต่อการกระจายตัวของแอลลีลแตกต่างกัน

SNP rs2293152 เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่อยู่ตรงบริเวณอินตรอนที่ 11 ของยีน *STAT3* และเป็น synonymous polymorphism ซึ่งไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนโดยตรง อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเป็นจำนวนมากที่บ่งชี้ว่า SNPs ตรงบริเวณอินตรอนและ synonymous polymorphism สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนนั้นได้ เช่น การศึกษาของ Griseri P. และคณะ (2011) แสดงให้เห็นว่า synonymous polymorphism ภายในยีน *Tristetraprolin (TTP)* มีความสัมพันธ์กับการแพร่หลายของมะเร็งปอดและการตอบสนองต่อการรักษาเมะเร็งเต้านม [51] ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1)* มีการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลง codon AAC เป็น AAT ทำให้ลดการแสดงออกของยีน *ERCC1* และการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ [52] นอกจากนี้ในงานวิจัยก่อนหน้าของ Sato K. และคณะ (2009) รายงานว่า จีโนไทป์ CC ของ SNP rs2293152 มีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรค Crohn's disease ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีน *STAT3* ได้ โดยกระตุ้นกลไกการอักเสบ [48] แม้ว่า SNP rs2293152 เป็น synonymous polymorphism แต่ SNP ตำแหน่งนี้ก็อาจส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน *STAT3* และอาจมีผลกระทบในการพัฒนาไปสู่มะเร็งตับชนิด HCC ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน *STAT3* และการพัฒนาไปสู่ HCC ได้อย่างไร ซึ่งยังต้องศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไปในอนาคต

แม้ว่ามีหลักฐานจากงานวิจัยต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นที่แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งตับชนิด HCC [14] ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Xie J. และคณะ (2013) พบว่า จีโนไทป์ GG ของ SNP rs2293152 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับ โดยพบความสัมพันธ์ดังกล่าวในประชากรผู้หญิง (Adjusted odds ratio=2.04, 95% CI=1.15-3.61, $P=0.015$) แต่สำหรับงานวิจัยนี้ไม่พบว่า SNP rs2293152 บนยีน *STAT3* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ ในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ไม่ว่าจะเป็น Allelic, Dominant และ Recessive models (P value>0.05) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะงานวิจัยนี้ใช้กลุ่มประชากรตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษา ก่อนหน้า และเพศและอายุระหว่างกลุ่ม case และ control ไม่เท่ากัน

ยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004

SNP rs1053004 เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่อยู่บริเวณ 3' untranslated region (3'-UTR) ของยีน *STAT3* ซึ่งเป็นบริเวณควบคุมการแสดงออกของโปรตีน *STAT3* โดยอาจเป็นบริเวณที่จับของ microRNAs ที่จำเพาะ ทำให้ลดกิจกรรมของโปรตีน *STAT3* ลง ผ่านกระบวนการ mRNA degradation [53] จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประชากรจีนของ Xie J. และคณะ (2013) พบว่า SNP rs1053004 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเพศหญิง [14] อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่งนี้กับการเกิดมะเร็งตับในปริมาณน้อย งานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานแรกๆที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของ SNP rs1053004 กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่มประชากรกลุ่ม HCC, CHB ที่ไม่เป็น HCC และ Healthy controls มีความถี่ของแอลลีล T (51.56%, 58.25% และ 61.58% ตามลำดับ) สูงกว่าแอลลีล C แสดงให้เห็นว่า SNP rs1053004 ในประชากรไทยมี major allele เป็น T และ minor allele เป็น C ซึ่งสอดคล้องกับ การศึกษาของ Xie J. และคณะ (2013) ที่ศึกษาในประชากรจีน พบว่าในกลุ่มประชากร HCC, CHB ที่ไม่เป็น HCC และ Healthy controls มีความถี่ของแอลลีล T (63.43%, 63.20% และ 65.63% ตามลำดับ) สูงกว่าแอลลีล C เช่นเดียวกัน [14] งานวิจัยนี้จึงเป็นอีกหนึ่งหลักฐานสำคัญซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของแอลลีลสำหรับ SNP ตำแหน่งนี้ในประชากรไทยกับประชากรจีนไม่มีความแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง SNP rs1053004 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังพบว่า จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับชนิด HCC เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ (CHB ที่ไม่เป็น HCC และ Healthy controls) (OR=2.04, 95% CI=1.20-3.46, $P=0.008$) และยังพบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันนี้เมื่อเทียบกับกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC ด้วย (OR=1.85, 95% CI=1.00-3.43, $P=0.049$) การค้นพบดังกล่าวข้างต้นแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Xie J. และคณะ (2013) พบว่า จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับในเพศหญิง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ (CHB ที่ไม่เป็น HCC และ Healthy controls) (Adjusted odds ratio= 0.49, 95% CI=0.25-0.97, $P=0.040$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันนี้เมื่อเทียบกับกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC [14] ความแตกต่างระหว่างการศึกษาี้ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด อาจเกิดขึ้นจากความแตกต่างของเพศในกลุ่มประชากรที่ศึกษา เนื่องจากประชากรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่เป็น

เพศชายในขณะที่การศึกษาของ Xie J. และคณะ (2013) พบความสัมพันธ์ของ SNP rs1053004 กับการเกิดมะเร็งตับในเพศหญิง อาจเป็นเพราะความแตกต่างของเพศมีผลต่อการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเพศ การเพิ่มการสัมผัสกับปัจจัยเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมในการเกิดมะเร็ง เช่น การสูบบุหรี่และการดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น มีการศึกษาที่พิสูจน์แล้วว่า การดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่อย่างหนักส่งผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับในเพศชาย [54-56] สำหรับประชากรไทยเพศชายมีอัตราการสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์มากกว่าเพศหญิง อย่างไรก็ตาม มีบางงานวิจัยที่มีการเชื่อมโยงการส่งสัญญาณของโปรตีน STAT3 กับฮอร์โมนเพศ เช่น การส่งสัญญาณของ interleukin-6/STAT3 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ receptor ของฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) ได้ ซึ่งมีส่วนร่วมในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก [57] จึงเป็นไปได้ว่า SNPs rs1053004 อาจส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน STAT3 และมีความสัมพันธ์กับการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเพศ โดยอาจมีบทบาททั้งทางตรงและทางอ้อมในการทำให้เกิดมะเร็งตับแตกต่างกันระหว่างเพศชายกับเพศหญิง อย่างไรก็ตามปฏิสัมพันธ์ของ SNP rs1053004 และฮอร์โมนเพศกับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC ยังคงต้องได้รับการพิสูจน์จากการศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไปในอนาคต

นอกจาก SNP rs1053004 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับแล้ว ยังมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าว่า SNP ตำแหน่งนี้มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของโรคภาวะแท้งซ้ำโดยไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic recurrent miscarriage) อีกด้วย [58] แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบว่ามีรายงานใดที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง SNP rs1053004 กับการแสดงออกและการทำงานของโปรตีน STAT3 ได้ จึงต้องมีการพิสูจน์ความสัมพันธ์ของ SNP rs1053004 กับกลไกการเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีน STAT3 ซึ่งนำมาสู่การเป็นมะเร็งตับต่อไป

ยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865

SNPs rs7574865 อยู่บริเวณอินตรอนที่ 3 ของยีน *STAT4* ซึ่งยีนนี้แปลรหัสเป็นโปรตีน *STAT4* มีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเป็นตัวส่งสัญญาณจาก interleukin-12 (IL-12) และ type I interferon (IFN- α หรือ IFN- β) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิต type II interferon (IFN- γ) [15-17] IFN- γ เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันร่างกายจากการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม การตายของเซลล์ที่แบบ apoptosis และยับยั้งการเกิดมะเร็ง การสูญเสียความสามารถในการกระตุ้นการผลิต IFN- γ อาจจะทำให้ลดความสามารถในการต้านทานไวรัสและมะเร็งลง [18-20] ในขณะที่มีการแสดงออกของ IFN- γ มากเกินไป อาจทำให้เกิด autoimmune disease ได้ [21] แม้ว่าจะมีการศึกษาก่อนหน้าจำนวนมากที่พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* มีความสัมพันธ์กับการเกิด autoimmune disease เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) และโรคตับแข็งจากทางเดินน้ำดีชนิดปฐมภูมิ (primary biliary cirrhosis) [59-61] แต่ก็ยังมีโรคอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ทราบว่ายีนนี้อาจจะมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาและการเกิดโรคได้เช่นกัน จนกระทั่งมีรายงานจากศึกษาด้วยวิธี genome-wide association study (GWAS) ของ Jiang D.K. และคณะ (2013) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *STAT4* rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรจีนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยกลุ่มประชากรที่ศึกษาประกอบด้วยชาวจีนจากมณฑลต่าง ๆ ดังนี้ Qidong, Suzhou, Shanghai, Nanjing, Beijing, Henan และ Guangxi จากการศึกษาพบว่ายีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม CHB ที่ไม่เป็น HCC (OR=1.21, 95% CI=1.14-1.28, $P_{\text{met}}=2.48 \times 10^{-10}$) [22] งานวิจัยดังกล่าว จึงเป็นการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* กับการเกิดมะเร็งตับเป็นครั้งแรก และยังต้องการการยืนยันจากการศึกษาในกลุ่มประชากรอื่นอีกเป็นจำนวนมาก

ต่อมาได้มีรายงานการศึกษาในประชากรเวียดนามของ Clark A. และคณะ (2013) ซึ่งทำการศึกษาในลักษณะเดียวกับการค้นพบดังกล่าวข้างต้น โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 3 กลุ่ม คือ CHB ที่ไม่เป็น HCC จำนวน 206 ราย กลุ่มที่เป็นตับแข็ง (Liver cirrhosis) จำนวน 222 ราย และกลุ่ม HCC จำนวน 239 ราย โดยพบว่าอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับ (OR=0.84, 95% CI=0.70-0.99, $P=0.048$) ส่วนอัลลีล G เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเป็น

มะเร็งตับในผู้ป่วยเวียดนามที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [23] ซึ่งการค้นพบของ Clark A. และคณะ (2013) สอดคล้องกับการศึกษาของ Jiang D.K. และคณะ (2013) ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้

จากหลักฐานที่สำคัญยิ่งดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *STAT4* ตำแหน่ง rs7574865 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จากการศึกษาพบว่าในกลุ่มประชากร Healthy controls มีความถี่แอลลีล G น้อยกว่ากลุ่มประชากร HCC (OR=1.46, 95% CI=1.09-1.96, P=0.012) แสดงให้เห็นว่า แอลลีล G มีความสัมพันธ์ในการเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับชนิด HCC ในขณะที่แอลลีล T ลดปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับชนิดนี้ในผู้ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Jiang D.K. และคณะ (2013) ที่รายงานว่าพบความถี่ของแอลลีล G ซึ่งเป็นแอลลีลที่ส่งผลให้เกิดมะเร็งตับ (risk allele) ในกลุ่ม HCC มากกว่ากลุ่ม Healthy controls [22]

นอกจากความถี่ของแอลลีลแล้ว งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าความถี่ของจีโนไทป์ในประชากรแต่ละกลุ่มมีการกระจายตัวไม่เท่ากัน โดยพบว่ากลุ่ม Healthy controls มีจีโนไทป์ GG น้อยกว่ากลุ่ม HCC (OR=2.07, 95% CI=1.06-4.03, P=0.033) และยังพบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันนี้ใน Recessive genetic model (GG เทียบกับ TT+GT) อีกด้วย (OR= 1.71, 95% CI=1.13-2.59, P=0.011) ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า ความแตกต่างของจีโนไทป์ของ SNP rs7574865 มีผลต่อการแสดงออกของยีน *STAT4* โดยจะมีการแสดงออกของยีน *STAT4* ในเนื้อเยื่อมะเร็งน้อยกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็ง [22] ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า ในประชากรไทยความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT4* โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอลลีล G ของ SNP rs7574865 มีผลทำให้ผู้ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC ผ่านทางการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *STAT4* อย่างไรก็ตาม SNP rs7574865 อยู่ตรงบริเวณ non-coding region ของยีน *STAT4* SNP จึงบ่งชี้ว่า SNP นี้อาจมีผลต่ออัตราการแสดงออกของยีน *STAT4* ในระดับการถอดรหัสของยีน หรือส่งผลต่อ RNA splicing [62] ซึ่งยังไม่ทราบความสัมพันธ์ของ SNP rs7574865 กับกลไกการแสดงออกของยีน *STAT4* อย่างแน่ชัด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่พบว่า SNP rs7574865 บนยีน *STAT4* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen K. และคณะ (2013) [26] ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่งนี้กับการเกิดมะเร็งตับในประชากรจีนชาวยุ่่น แม้จะมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่ายีน *STAT4* มีส่วนร่วมในการพัฒนาเป็นมะเร็ง

ดับชนิด HCC ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง [22, 23] งานวิจัยนี้จึงเป็นอีกหนึ่งหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า ความแตกต่างของเชื้อชาติ และขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่างมีผลต่อความแตกต่างทางพันธุกรรมเช่นกัน

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs2293152 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งตับ ในขณะที่ SNP ตำแหน่ง rs1053004 จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม CHB ที่ไม่เป็น HCC นอกจากนี้จีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง rs7574865 บนยีน *STAT4* (GG เทียบกับ TT+GT) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับเมื่อเทียบกับกลุ่ม healthy controls ดังนั้นการค้นพบเหล่านี้จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงว่ายีน *STAT3* ตำแหน่ง SNP rs1053004 และยีน *STAT4* ตำแหน่ง SNP rs7574865 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับ และอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมสำหรับการทำนายการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในด้านของจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษามีขนาดเล็ก และอายุและเพศระหว่างกลุ่ม case และ control ไม่เท่ากัน เนื่องจากประชากรกลุ่ม HCC ส่วนใหญ่เป็นเพศชายและมีอายุมาก ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปในอนาคตจึงต้องมีการเพิ่มขนาดประชากรที่ศึกษาให้มากขึ้น และจับคู่อายุและเพศระหว่างกลุ่ม case และ control ให้เท่ากัน เพื่อความสมบูรณ์และความน่าเชื่อถือของข้อมูล

รายการอ้างอิง

- [1] Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, Li F, Nachiyappan A, Dai X, Swamy SN, Ahn KS, Kumar AP, Tan BK, Hui KM, Sethi G. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2013;1835:46-60.
- [2] Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2013;13:123-135.
- [3] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5-S16.
- [4] Pawarode A, Tangkijvanich P, Voravud N. Outcomes of primary hepatocellular carcinoma treatment: an 8-year experience with 368 patients in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:860-864.
- [5] Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004;5:118-125.
- [6] Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A, Asia Pacific Working Party on Prevention of Hepatocellular C. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:346-353.
- [7] Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 2005;11:7391-7400.
- [8] Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:537-544.
- [9] Herzer K, Sprinzl MF, Galle PR. Hepatitis viruses: live and let die. *Liver Int* 2007;27:293-301.
- [10] Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515.

- [11] Wang C, Yang W, Yan HX, Luo T, Zhang J, Tang L, Wu FQ, Zhang HL, Yu LX, Zheng LY, Li YQ, Dong W, He YQ, Liu Q, Zou SS, Lin Y, Hu L, Li Z, Wu MC, Wang HY. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice. *Hepatology* 2012;55:108-120.
- [12] Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729.
- [13] Wang SH, Yeh SH, Lin WH, Wang HY, Chen DS, Chen PJ. Identification of androgen response elements in the enhancer I of hepatitis B virus: a mechanism for sex disparity in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;50:1392-1402.
- [14] Xie J, Zhang Y, Zhang Q, Han Y, Yin J, Pu R, Shen Q, Lu W, Du Y, Zhao J, Han X, Zhang H, Cao G. Interaction of signal transducer and activator of transcription 3 polymorphisms with hepatitis B virus mutations in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:2369-2377.
- [15] Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996;382:171-174.
- [16] Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Biron CA. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 2002;297:2063-2066.
- [17] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:798-809.
- [18] Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* 2010;50:1-14.
- [19] Horras CJ, Lamb CL, Mitchell KA. Regulation of hepatocyte fate by interferon-gamma. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:35-43.

- [20] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6:836-848.
- [21] Schwarting A, Tesch G, Kinoshita K, Maron R, Weiner HL, Kelley VR. IL-12 drives IFN-gamma-dependent autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Immunol* 1999;163:6884-6891.
- [22] Jiang DK, Sun J, Cao G, Liu Y, Lin D, Gao YZ, Ren WH, Long XD, Zhang H, Ma XP, Wang Z, Jiang W, Chen TY, Gao Y, Sun LD, Long JR, Huang HX, Wang D, Yu H, Zhang P, Tang LS, Peng B, Cai H, Liu TT, Zhou P, Liu F, Lin X, Tao S, Wan B, Sai-Yin HX, Qin LX, Yin J, Liu L, Wu C, Pei Y, Zhou YF, Zhai Y, Lu PX, Tan A, Zuo XB, Fan J, Chang J, Gu X, Wang NJ, Li Y, Liu YK, Zhai K, Zhang H, Hu Z, Liu J, Yi Q, Xiang Y, Shi R, Ding Q, Zheng W, Shu XO, Mo Z, Shugart YY, Zhang XJ, Zhou G, Shen H, Zheng SL, Xu J, Yu L. Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2013;45:72-75.
- [23] Clark A, Gerlach F, Tong H, Hoan NX, Song le H, Toan NL, Bock CT, Kremsner PG, Velavan TP. A trivial role of STAT4 variant in chronic hepatitis B induced hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol* 2013;18:257-261.
- [24] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- [25] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
- [26] Chen K, Shi W, Xin Z, Wang H, Zhu X, Wu X, Li Z, Li H, Liu Y. Replication of genome wide association studies on hepatocellular carcinoma susceptibility Loci in a chinese population. *PLoS One* 2013;8:e77315.
- [27] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
- [28] Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009;49:S13-S21.

- [29] Chen CJ, Chen DS. Interaction of hepatitis B virus, chemical carcinogen, and genetic susceptibility: multistage hepatocarcinogenesis with multifactorial etiology. *Hepatology* 2002;36:1046-1049.
- [30] Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009;286:52-59.
- [31] Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE, Jr. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 1993;261:1744-1746.
- [32] Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421.
- [33] Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest* 2003;112:978-980.
- [34] Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* 2003;38:1331-1347.
- [35] Mangnall D, Bird NC, Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver Int* 2003;23:124-138.
- [36] Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 2009;1171:59-76.
- [37] Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 2008;18:254-267.
- [38] Tannapfel A, Anhalt K, Hausermann P, Sommerer F, Benicke M, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol* 2003;201:238-249.

- [39] Li WC, Ye SL, Sun RX, Liu YK, Tang ZY, Kim Y, Karras JG, Zhang H. Inhibition of growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by antisense oligonucleotide targeting signal transducer and activator of transcription 3. *Clin Cancer Res* 2006;12:7140-148.
- [40] Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-2488.
- [41] Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
- [42] Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:16-23.
- [43] Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:258-266.
- [44] Baumert TF, Thimme R, von Weizsacker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:82-90.
- [45] Eto M, Kamba T, Miyake H, Fujisawa M, Kamai T, Uemura H, Tsukamoto T, Azuma H, Matsubara A, Nishimura K, Nakamura T, Ogawa O, Naito S, Japan Immunotherapy S-SGfKC. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon-alpha therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2013;63:745-752.
- [46] Wang K, Zhou B, Zhang J, Xin Y, Lai T, Wang Y, Hou Q, Song Y, Chen Y, Quan Y, Xi M, Zhang L. Association of signal transducer and activator of transcription 3 gene polymorphisms with cervical cancer in Chinese women. *DNA Cell Biol* 2011;30:931-936.
- [47] Bruix J, Sherman M. Diagnosis of Small HCC. *Gastroenterology* 2005;129:1364.

- [48] Sato K, Shiota M, Fukuda S, Iwamoto E, Machida H, Inamine T, Kondo S, Yanagihara K, Isomoto H, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J Clin Immunol* 2009;29:815-825.
- [49] Hu K, Yang P, Jiang Z, Hou S, Du L, Li F. STAT4 polymorphism in a Chinese Han population with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome and Behcet's disease. *Hum Immunol* 2010;71:723-726.
- [50] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303.
- [51] Griseri P, Bourcier C, Hieblot C, Essafi-Benkhadir K, Chamorey E, Touriol C, Pages G. A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients. *Hum Mol Genet* 2011;20:4556-4568.
- [52] Viguier J, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin JC, Ducreux M, Sarasin A, Praz F. ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:6212-6217.
- [53] Foshay KM, Gallicano GI. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol* 2009;326:431-443.
- [54] Derom EY, Pauwels RA, Van der Straeten ME. The effect of inhaled salmeterol on methacholine responsiveness in subjects with asthma up to 12 hours. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:811-815.
- [55] Yu MW, Yang YC, Yang SY, Cheng SW, Liaw YF, Lin SM, Chen CJ. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1644-1651.

- [56] Li Z, Tuteja G, Schug J, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell* 2012;148:72-83.
- [57] Chen T, Wang LH, Farrar WL. Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:2132-2135.
- [58] Finan RR, Mustafa FE, Al-Zaman I, Madan S, Issa AA, Almawi WY. STAT3 polymorphisms linked with idiopathic recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:22-27.
- [59] Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WW, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007;357:977-986.
- [60] Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Lu Y, Gu X, Walker EJ, Jing K, Juran BD, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Coltescu C, Atkinson EJ, Heathcote EJ, Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med* 2009;360:2544-2555.
- [61] Mells GF, Floyd JA, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin SY, Heneghan MA, Neuberger JM, Donaldson PT, Day DB, Ducker SJ, Muriithi AW, Wheeler EF, Hammond CJ, Dawwas MF, Consortium UP, Wellcome Trust Case Control C, Jones DE, Peltonen L, Alexander GJ, Sandford RN, Anderson CA. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2011;43:329-332.
- [62] Korman BD, Kastner DL, Gregersen PK, Remmers EF. STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8:398-403.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 5X Tris borate buffer (5X TBE buffer) ปริมาตร 1,000 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Tris-base	54 g
Boric acid	27.5 g
0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	20 ml

จากนั้นเติม Distill water ให้ได้ปริมาตร 1,000 ml แล้วผสมให้เข้ากัน เมื่อต้องการใช้งานให้เตรียมเป็น 1X Tris borate buffer (1X TBE buffer) โดยตวง 5X TBE buffer ปริมาตร 100 ml จากนั้นเติม Distill water ลงไป 400 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

2. การเตรียม 2% (w/v) agarose gel ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agarose	2 g
1X TBE buffer	100 ml

3. การเตรียม 3% (w/v) agarose gel ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agarose	3 g
1X TBE buffer	100 ml

4. การเตรียม 10% Ethidium bromide

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร
Ethidium bromide	30 μ l
Distill water	300 μ l

5. สารละลาย lysis buffer ปริมาตร 50 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Tris-HCl	0.1050 g
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	0.1245 g
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.3350 g

จากนั้นเติม Distill water ให้ได้ปริมาตร 50 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

6. การเตรียมสารละลาย Red Cell Lysis Buffer (RCLB) ปริมาตร 1,000 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
1M Tris-HCl pH 7.6	10 ml
5M NaCl	2 ml
1M MgCl ₂	5 ml

จากนั้นเติม Distill water ให้ได้ปริมาตร 983 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

7. LB agar ปริมาตร 250 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agar	3.75 g
Yeast extract	1.25 g
Tryptone	2.5 g
NaCl	1.25 g

เติม Distill water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 250 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติม ampicilin 100 mg/ml ปริมาตร 250 μ l แล้วจึงเทใส่ plate ปริมาตร 35 ml/plate

8. LB broth ปริมาตร 250 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Yeast extract	1.25 g
Tryptone	2.5 g
NaCl	1.25 g

เติม Distill water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 250 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave

9. SOC medium ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Yeast extract	0.5 g
Tryptone	2.0 g
1M NaCl	1.0 ml
1M KCl	0.25 ml

เติม Distill water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave รอให้อุณหภูมิลดลง จากนั้นเติม 2M Glucose และ 2M Mg²⁺ อย่างละ 1 ml

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายนาวิน จันทรา
(ภาษาอังกฤษ) Mr.Nawin Chanthra

เกิดวันที่ 11 กันยายน 2532

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

สถานภาพ โสด

ที่อยู่ปัจจุบัน 127/1 ม.2 ต.สระกะเทียม อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม 73000

การศึกษา ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เมื่อปี พ.ศ. 2551-2554

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)
หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย
เมื่อปี พ.ศ.2555

ผลงานทางวิชาการ

การประชุมวิชาการ

หัวข้อเรื่อง Associations of single nucleotide polymorphism rs1053004 in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) for risk of hepatocellular carcinoma in Thai patients with chronic hepatitis B

ชื่อผู้นิพนธ์ Nawin Chanthra, Sunchai Payungporn, Natthaya Chuaypen and Pisit Tangkijvanich

ตีพิมพ์ในหนังสือ Proceedings ของงานประชุมวิชาการ The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014 “Bridging ASEAN Biochemical Research Communities” ณ โรงแรมรามารการ์เด้นส์ กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 2-3 เมษายน พ.ศ. 2557 หน้า 138



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY