


ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน miR-149, miR-499 และ miR-101-1 ที่ส่งผลต่อการเกิด
มะเร็งตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง



นางสาวพรพิศรา ประเทศรีรัตน์

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.

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) ON MIR-149, MIR-499 AND MIR-101-1
GENE RELATED TO DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) IN THAI
PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B VIRUS



Miss Pornpitra Pratedrat

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

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน miR-149, miR-499 และ miR-101-1 ที่ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง

โดย

นางสาวพรพิศรา ประเทศรัตน์

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมบัติ ตรีประเสริฐสุข)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

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

พรพิตรรา ประเทศรัตน์ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน miR-149, miR-499 และ miR-101-1 ที่ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรัง. (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) ON MIR-149, MIR-499 AND MIR-101-1 GENE RELATED TO DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B VIRUS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงภร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, 66 หน้า.

ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอที่ไม่แปลรหัสขนาดเล็กประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนและเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนยีนของไมโครอาร์เอ็นเอ เช่น miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (chronic hepatitis B, CHB) งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ดังกล่าวและการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง โดยผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ (CHB-related HCC) จำนวน 166 ราย กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับ (CHB without HCC) จำนวน 159 ราย และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls) จำนวน 167 ราย สำหรับการหาจีโนไทป์ของ miR-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs7536540) ทำด้วยวิธี allelic discrimination assays โดยอาศัยเทคนิค TaqMan real-time PCR ในขณะที่การหาจีโนไทป์ของ miR-499 (rs3746444) ใช้เทคนิค PCR-RFLP ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าจีโนไทป์และอัลลีลของ miR-149 (rs2292832), miR-101-1 (rs7536540) และ miR-499 (rs3746444) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า SNPs ทั้ง 3 ตำแหน่งไม่เกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการเกิดมะเร็งตับ และไม่อาจใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) สำหรับมะเร็งตับในประชากรไทยได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดคืออายุและเพศของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความถูกต้องของข้อมูล ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ประชากรที่มีอายุและเพศสอดคล้องกันในแต่ละกลุ่ม เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ดังกล่าวและการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยต่อไป

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

5574203130 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HEPATITIS B VIRUS (HBV) / HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) /
MIRNAS / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS)

PORNPITRA PRATEDRAT: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) ON
MIR-149, MIR-499 AND MIR-101-1 GENE RELATED TO DEVELOPMENT OF
HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC
HEPATITIS B VIRUS. ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D.,
CO-ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., 66 pp.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs with approximately 22 nucleotides in length which play an important role in regulation of gene expression and related with several processes of the cells. At the present time, several reports indicated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) within miRNA genes such as miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) and miR-101-1 (rs7536540) were associated with the risk of hepatocellular carcinoma (HCC) development in patients with chronic hepatitis B (CHB). This study is the first report that describes the association between these SNPs and HCC in Thai patients with CHB. Subjects were categorized into 3 groups comprising CHB-related HCC (n=166), CHB without HCC (n=159) and healthy controls (n=167). Genotyping of miR-149 (rs2292832) and miR-101-1 (rs7536540) SNPs were performed by using allelic discrimination assays based on TaqMan real-time PCR whereas genotyping of miR-499 (rs3746444) was detected by PCR-RFLP. Data analysis revealed that genotypes and alleles of miR-149 (rs2292832), miR-101-1 (rs7536540) and miR-499 (rs3746444) were not statistically different between case and control groups ($P>0.05$). In conclusion, these 3 SNPs were not significantly associated with the risks of HCC and might not be able to use as genetic markers for HCC development in Thai population. However, the limitation of this study was unmatched of age and sex between case and control groups. Thus, further case-control study with age and sex matched among each group is necessary in order to control confounding factors and confirm the association of these SNPs with the risk of 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

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร ที่ให้โอกาส สนับสนุน ชี้แนะเทคนิคต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยและช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในโครงร่างวิทยานิพนธ์ วิทยานิพนธ์และร่างผลงานวิจัยที่จะตีพิมพ์ในวารสาร ความช่วยเหลืออื่นๆตลอดการวิจัยอบรมสั่งสอนวิชาความรู้ทั้งหมดตลอดช่วงระยะเวลาศึกษาทำการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ที่กรุณาแนะนำ ให้ความรู้ และอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดที่ใช้ในงานวิจัยทั้งหมด รวมไปถึงช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของทั้งวิทยานิพนธ์และร่างผลงานที่จะตีพิมพ์ในวารสารจนสำเร็จจุลวงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อบรมสั่งสอนและประสาทวิชาความรู้ จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยตลอดจนการให้ความช่วยเหลือกรณีต่างๆตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณเกษมณี ไพรอนันตถาวรสำหรับการช่วยเหลือในการทดลองและช่วยตรวจทานผลจีโนมไทป์ของเทคนิค PCR-RFLP คุณณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญสำหรับการช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในงานวิจัยตลอดมาคุณอภิษฎา คล้ายพั้งสินธุ์สำหรับการช่วยเหลือ ติดต่อและอำนวยความสะดวกในการเก็บ จัดเก็บตัวอย่างเลือด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมีและพี่ๆในหน่วยวิจัยโรคตับทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกช่วยเหลือมาโดยตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษางานวิจัย ขอขอบคุณทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนงบประมาณงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกนานาประการตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆที่คอยให้กำลังใจและให้คำปรึกษาตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ที่คอยสนับสนุนและและให้โอกาสทางการศึกษาและให้กำลังใจด้วยความรักอย่างหาที่สุ่มมิได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
คำถามของการวิจัย	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
สมมติฐานของการวิจัย	3
ขอบเขตของงานวิจัย	4
ข้อจำกัดในงานวิจัย	4
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย.....	5
คำย่อหรือคำสำคัญในการวิจัย	5
ขอบเขตงานวิจัย	6
ระเบียบวิธีวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคมะเร็งตับ	10
1. ภาวะตับแข็ง	10
2. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	11
3. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	11
4. การติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วยกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	11
5. โรคที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องของตับ	11

6. โรคตับคั่งไขมัน.....	12
7. การปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร	12
8. การดื่มเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมแอลกอฮอล์	12
9. พันธุกรรม.....	12
ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)	13
ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA)	13
กระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
รูปแบบงานวิจัย.....	19
ประชากรที่ใช้ศึกษา	19
เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้าเพื่อศึกษา	19
ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size).....	20
วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	21
วิธีดำเนินงานวิจัย	24
1. การเก็บสิ่งตัวอย่าง	24
2. สกัดดีเอ็นเอจาก PBMC โดยใช้เทคนิค Phenol-chloroform-isoamyl alcohol	24
3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR).....	25
4. Agarose gel electrophoresis.....	26
5. การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด HiYield™ Gel Extraction	26
6. การเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ TA vector (RBC) เพื่อเตรียม positive control	27
7. การนำพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ Competent cell (Transformation) มีขั้นตอนดังนี้.....	27
8. การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด HiYield™ Plasmid Mini kit.....	28
9. การคำนวณจำนวนชุดของพลาสมิดเพื่อเตรียม Positive control.....	29
10. การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	33
การวิเคราะห์ผลข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มกรณีศึกษาและกลุ่มควบคุม	33
ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบนิวคลีโอไทด์เดี่ยวที่อาจส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับ	34

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรม miR-149 (rs2292832).....	39
3. ความหลากหลายทางพันธุกรรม miR-101-1 (rs7536540).....	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	49
รายการอ้างอิง	57
ภาคผนวก.....	64
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	66



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ปฏิกริยา.....	25
ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR.....	25
ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miRNA-101-1 (rs7536540).....	26
ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation.....	27
ตารางที่ 5 แสดงผลอัลลีส SNPs ของmiR-499 (rs3746444) โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดเพื่อดูขนาดผลิตภัณฑ์.....	31
ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ RFLP สำหรับ miR-499 (rs3746444).....	31
ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ Real time PCR สำหรับ miR-149 (rs2292832).....	31
ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ Real time PCR สำหรับ miR-101-1 (rs7536540).....	32
ตารางที่ 9 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ Real time PCR สำหรับ miR-101-1 (rs7536540) และ miR-149 (rs2292832).....	32
ตารางที่ 10 แสดงอายุ เพศและเอนไซม์ในตับของประชากรไทยที่ใช้ในการศึกษา.....	34
ตารางที่ 11 แสดงความถี่ของอัลลีสและจีโนไทป์ของ miR-499 (rs374644).....	38
ตารางที่ 12 แสดงความถี่ของอัลลีสและจีโนไทป์ของ miR-149 (rs2292832).....	43
ตารางที่ 13 แสดงความถี่ของอัลลีสและจีโนไทป์ของ miR-101-1 (rs7536540).....	48
ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miR-499 (rs3746444) กับการเกิดมะเร็งตับของประเทศไทยและต่างประเทศ.....	53
ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miRNA-149 (rs2292832) กับการเกิดมะเร็งตับของประเทศไทยและต่างประเทศ.....	54
ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miR-101-1 (rs7536540) กับการเกิดมะเร็งตับของประเทศไทยและต่างประเทศ.....	55

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงอัตราของช่วงอายุผู้ป่วยมะเร็งระดับต่างเพศและพื้นที่ (7).....	10
รูปที่ 2 ภาพแสดงกระบวนการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอ (42).....	15
รูปที่ 3 แผนภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ	35
รูปที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit	35
รูปที่ 5 การตรวจสอบ SNPs miR-499 (rs3746444) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP	36
รูปที่ 6 การตรวจสอบ SNPs miR-499 (rs3746444) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา.....	36
รูปที่ 7 แผนภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ	39
รูปที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit	39
รูปที่ 9 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ	39
รูปที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit.....	40
รูปที่ 11 แสดงแผนภาพ Discrimination plot เพื่อแสดงผล SNPs genotyping miR-149 (rs2292832) โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR.....	41
รูปที่ 12 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ	44
รูปที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit.....	44
รูปที่ 14 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ	44
รูปที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit.....	45

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 1 ขอบเขตงานวิจัย 6



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
μl	Microliter
95%CI	95% Confidence interval
AOR	Adjusted odd ratio
bp	Base pair
CHB	Chronic hepatitis B virus infection
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
ml	Mililiter
miR	microRNA
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
OR	Odd ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPI	pyrophosphate
P-value (<i>P</i>)	Probability Value
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมาเร็งเป็นโรคมาเร็งชนิดหนึ่งที่มีความร้ายแรงต่อสุขภาพของประชากรทั่วโลก ไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคมาเร็งและเป็นปัญหาที่สำคัญต่อสาธารณสุขพบว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกระจายตามภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความชุกแถบทวีปแอฟริกา ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอขนาดเล็ก มีกลไกการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์พอลิเมอเรสและรีเวิร์สทรานสคริปเทส การกำจัดเชื้อไวรัสที่อยู่ในรูปแบบของดีเอ็นเอนั้นเป็นไปได้ยาก ผลคือผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังรวมถึงการรักษาด้วยการใช้ยาต้านไวรัสที่มีการใช้ในปัจจุบันเป็นไปได้ยาก

ปัจจุบันมีการศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลเพื่อจัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส 2 แบบ คือซีรัมวิทยา และจีโนไทป์โดยที่ซีรัมวิทยาเป็นการตรวจจากแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่อยู่บน surface protein หรือ HBsAg ซึ่งพบว่าไวรัสตับอักเสบบีทุก serotype มีส่วน a determinant ที่เหมือนกัน แต่มีส่วนแอนติเจนอื่น ๆ ที่ต่างกันไป ซึ่งแบ่งได้เป็นทั้งหมด 4 Serotypes ได้แก่ adr, adw, ayr และ ayw ความแตกต่างของ serotype นั้นขึ้นกับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของ HBsAg สำหรับการจำแนกจีโนไทป์เป็นการแบ่งสายพันธุ์โดยใช้ความแตกต่างในส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของเชื้อไวรัสโดยไวรัสต่างจีโนไทป์จะมีความแตกต่างอย่างน้อยร้อยละ 8 (1) ในปัจจุบันพบว่ามีอย่างน้อย 10 จีโนไทป์ได้แก่ A-J จากการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทยพบซีรัมวิทยาประเภท adr และ จีโนไทป์ซีเป็นจำนวนมาก

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาพบว่ามีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะลดลง อันเนื่องมาจากการได้รับวัคซีนป้องกันเชื้อไวรัสตับอักเสบบีตั้งแต่วัยเด็ก แต่ยังมีผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถติดต่อได้ทางโลหิต ซึ่งส่งผลให้เกิดความรุนแรงต่อพยาธิสภาพของตับ อันได้แก่ โรคตับอักเสบบีเรื้อรัง โรคตับแข็ง โรคมาเร็ง การดำเนินของโรคในผู้ป่วยแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันโดยมีปัจจัยต่าง ๆ ทั้งจากภายนอก ได้แก่ การได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี การดื่มแอลกอฮอล์ พิษจากการรับเชื้ออะฟลาทอกซิน B1 และปัจจัยภายใน คือ พันธุกรรมของแต่ละบุคคล ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสาเหตุทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งบนสายนิวคลีโอไทด์ (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) ว่ามีผลต่อกระบวนการกลไก ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคมาเร็ง การหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการอยู่รอดของผู้ป่วยโรคมาเร็งอย่างไร

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไมโครอาร์เอ็นเอ ไมโครอาร์เอ็นเอคืออาร์เอ็นเอโมเลกุลขนาดเล็ก ประมาณ 20-22 นิวคลีโอไทด์ มีหน้าที่หลักคือควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเข้าไปจับกับสาย mRNA ที่ตำแหน่งคู่สม ซึ่งทำให้กระบวนการแปลรหัสจาก mRNA นั้นถูกยับยั้ง ยีนไมโครอาร์เอ็นเอมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์มากมาย เช่น วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) สัญญาณภายในเซลล์ (signal pathway) พยาธิสภาพของโรค (pathogenesis) และกระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ดังนั้นการเกิด SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเออาจมีผลต่อการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอและส่งผลกระทบต่อกระบวนการภายในเซลล์

จากการศึกษาก่อนหน้าพบ ความสัมพันธ์ของ SNPs miR-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs7536540) กับการเกิดมะเร็งตับ ขณะที่ miR-499 (rs3746444) พบความสัมพันธ์ที่ไม่แน่ชัดเมื่อทำการศึกษาในกลุ่มที่แตกต่างกันในประเทศจีน เกาหลี ตุรกี แต่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในประชากรเกาหลี อีกทั้งมีรายงานว่า miR-149 เป็น Tumor suppressor ในมะเร็งทางเดินอาหารมียีนเป้าหมายคือ *ZBTB2* ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ (2) และวัฏจักรเซลล์และเป็น Tumor suppressor ในเซลล์มะเร็งสมองมียีนเป้าหมายคือ *AKT1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (3) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ miR-499 เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยจะยับยั้งยีน forkhead box O4 (FOXO4) and programmed cell death 4 (PDCD4) (4) และ miR-101-1 อาจยับยั้งการแสดงออกของ V-fos FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (FOS) ในมะเร็งตับ (5) ดังนั้นในการศึกษานี้มุ่งเน้นดูความสัมพันธ์ของ SNPs กับการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย ด้วยความสัมพันธ์ของ miRNA ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษา SNPs miR-149 (rs2292832) miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ซึ่งเป็นการศึกษาครั้งแรกในประชากรไทยในกลุ่มประชากรโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและกลุ่มประชากรที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่มีประวัติเกี่ยวกับโรคตับและโรคมะเร็งทุกชนิดเพื่อดูความสัมพันธ์ของ SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสามชนิดต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหรือการเกิดมะเร็งตับของประชากรไทยที่อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อติดตามการดำเนินของโรคมะเร็งตับซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์อย่างมากทางการแพทย์ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ และสามารถตรวจวัดได้ง่ายจากเซรั่มหรือพลาสมา

คำถามของการวิจัย

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือไม่อย่างไร
2. ความถี่ของรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี มีความแตกต่างกันหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความถี่ของรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ในกลุ่มประชากรไทยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เป็นมะเร็งตับ ไม่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี
2. เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

สมมติฐานของการวิจัย

1. ความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังแต่ไม่มีประวัติการตรวจพบมะเร็งตับมีความแตกต่างกันและในกลุ่มประชากรไทยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีมีความแตกต่างกัน
2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (SNPs) miR-149 (rs2292832) miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) มีความสัมพันธ์กับโอกาสการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ตรวจหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยวหรือการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งของ rs2292832 miR-149 rs3746444 miR-499 และ rs7536540 miR-101-1 จากกลุ่มประชากรดังนี้

1. กลุ่มกรณีศึกษาคือกลุ่มประชากรที่เป็นโรคมะเร็งตับและติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคมะเร็งตับ เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย
2. กลุ่มประชากรควบคุมแบ่งเป็น กลุ่มประชากรที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง ได้รับการวินิจฉัยและเข้ารับการรักษาจากแพทย์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และกลุ่มประชากรที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวีไม่มีประวัติโรคที่เกี่ยวข้องกับตับและโรคมะเร็ง

ข้อจำกัดในงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังร่วมด้วยมีข้อจำกัดของอายุและเพศส่งผลให้ความเป็นไปได้ยากที่กลุ่มตัวอย่างศึกษาและกลุ่มควบคุมจะมีช่วงอายุและเพศใกล้เคียงกัน
2. การศึกษาเพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งบน ไมโครอาร์เอ็นเอ miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง ผู้ที่มีสุขภาพดีไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวีไม่มีประวัติโรคที่เกี่ยวข้องกับตับและโรคมะเร็ง เป็นแนวทางการศึกษาเบื้องต้นเพื่อดูความสัมพันธ์เชิงความแตกต่างของ SNPs กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดโรคมะเร็งตับ อาจจะสามารถนำมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) เพื่อคัดกรองผู้ป่วยโรคมะเร็งตับเบื้องต้น แต่ไม่สามารถบอกผลการยับยั้งของยีนเป้าหมายหรืออธิบายกลไกการยับยั้งของไมโครอาร์เอ็นเอต่อยีนเป้าหมายได้

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย

Hepatocellular Carcinoma หมายถึง โรคมะเร็งตับมาจากเซลล์ต้นกำเนิด Hepatocyte ซึ่งเป็นเซลล์ส่วนใหญ่ของตับมี 2 ลักษณะ

1. มีลักษณะก้อนใหญ่ก้อนเดียว
2. มีลักษณะหลายก้อนกระจายไปตามเนื้อตับโดยมะเร็งส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะนี้

Chronic hepatitis B virus infection หมายถึง เป็นการอักเสบของตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยเชื้อไวรัสจะบุกเข้าสู่เซลล์ตับก่อให้เกิดการอักเสบส่งผลให้เกิดการทำลายตับ

คำย่อหรือคำสำคัญในการวิจัย

Chronic Hepatitis B Infection (CHB)

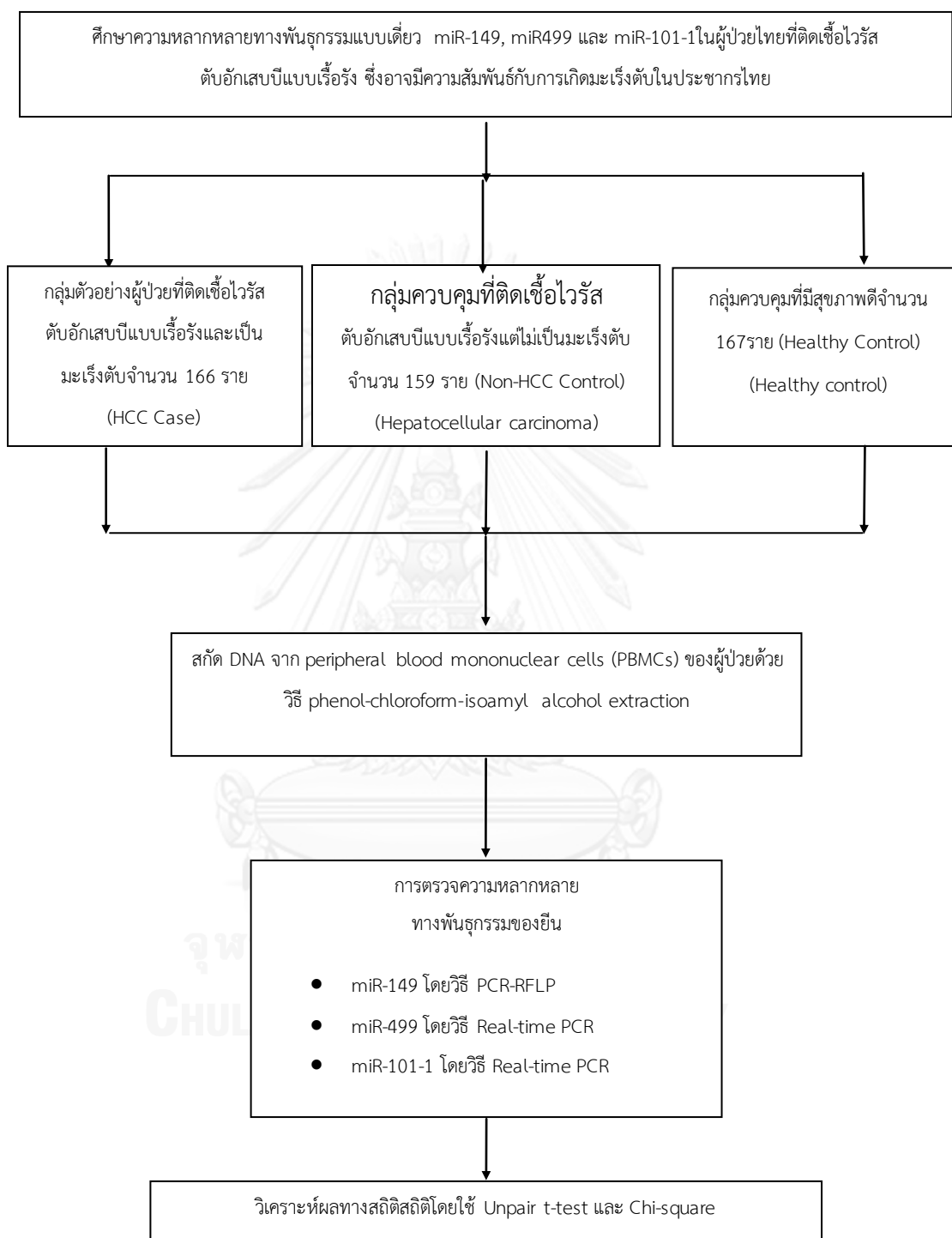
Hepatocellular Carcinoma (HCC)

Hepatitis B virus (HBV)

microRNAs (miRNAs)

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

ขอบเขตงานวิจัย



แผนภาพที่ 1 ขอบเขตงานวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยจะได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 361/56)

1. การคัดเลือกผู้ป่วยกรณีกลุ่มผู้ป่วยตัวอย่างที่เป็นโรคมะเร็งตับและมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรังร่วมด้วย ที่เข้ารับการรักษากรณีจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย
2. การคัดเลือกกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังที่เข้ารับการรักษากรณีจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย กลุ่มควบคุมที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่มีประวัติการเป็นโรคเกี่ยวกับตับและโรคมะเร็ง
3. เตรียมตัวควบคุมผลบวก (Positive control) สกัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ Hela A549 และ HepG2 จากนั้นโคลนเข้า TA cloning vector ส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์
4. สกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี Phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction
5. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ miRNA-499 โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)
6. ตรวจสอบ SNPs miRNA-499 (rs3746444) โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด (Restriction fragment length polymorphism; RFLP)
7. การตรวจสอบ SNPs miRNA-149 (rs2292832) และ miRNA-101-1 (rs7536540) โดยวิธี Real-time PCR
8. รวบรวมข้อมูลผลอัลลีล SNPs miRNA-499 (rs3746444), miRNA-149 (rs2292832) และ miRNA-101-1 (rs7536540) เพื่อนำมาหาค่าทางสถิติดูความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ/หรือการเกิดโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งหรือ SNPs miR-149 (rs2292832) miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง, ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง, ผู้ที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับโรคตับและโรคมะเร็งในประเทศไทย
2. เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งหรือ SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอ miR-149, miR-499, miR-101-1 ที่อาจเป็นแนวทางในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) เพื่อติดตามคัดกรองความรุนแรงของโรคมะเร็งตับในประเทศไทยต่อไปได้

บทที่ 2

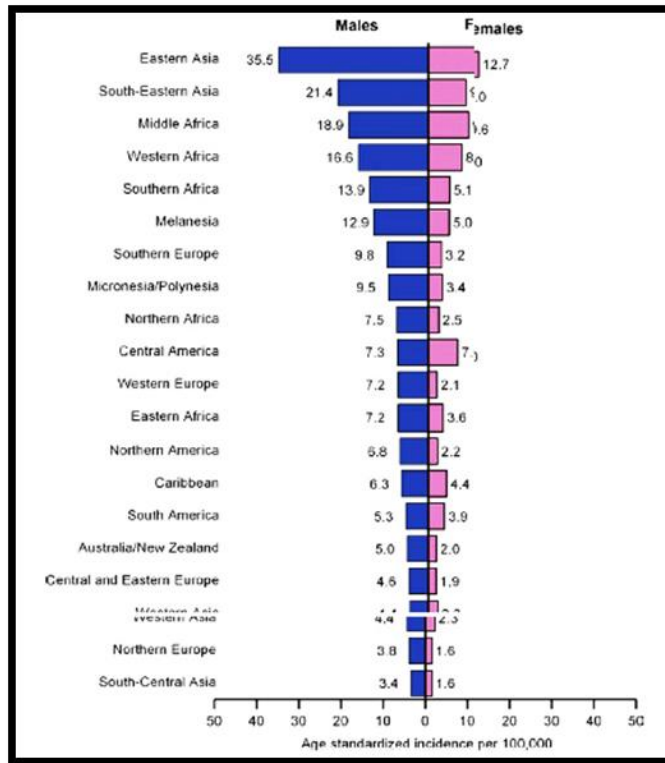
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบในเพศชายเป็นลำดับที่ห้าโดยเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นลำดับที่สอง พบในเพศหญิงเป็นลำดับที่เจ็ดโดยมีผู้เสียชีวิตเป็นลำดับที่หกของประชากรทั่วโลก การเพิ่มขึ้นของประชากรพบอัตราการเกิดมะเร็งตับในผู้ชายมากกว่าในผู้หญิงคิดเป็นสองเท่า พบประชากรที่เป็นมะเร็งตับมากบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกากลางและแอฟริกาตะวันออกขณะที่พบประชากรที่เป็นมะเร็งตับน้อยในแถบเอเชียใต้ เอเชียตะวันตก ทางตอนเหนือและตะวันออกของยุโรป Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นมะเร็งตับชนิดหนึ่งที่พบมากประมาณร้อยละ 70-85 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งตับที่เสียชีวิตทุกชนิดทั่วโลก (6)

อัตราของผู้ที่เป็น HCC สูงในแถบเอเชียและแอฟริกาโดยมากมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยมีประชากรบริเวณพื้นที่เอเชียและแอฟริกามากกว่าร้อยละ 8 ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและมีอัตราผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (Liver cancer) ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 60 เมื่อคำนวณจากกลุ่มประชากรในประเทศที่กำลังพัฒนา และประมาณร้อยละ 23 จากกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและได้รับพิษจากอะฟลาทอกซินจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ(8)ขณะที่บริเวณอเมริกา ประเทศทางตะวันตกมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีน้อย แต่มักมีสาเหตุอื่น อาทิ การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เกิดจากความผิดปกติของโรคที่เกี่ยวข้องกับไขมันสะสมตับ (fatty liver) สัมพันธ์กับโรคอ้วน (Obesity) ซึ่งจะเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งตับในประชากรประเทศอเมริกาและประเทศทางตะวันตก (9) อัตราผู้ป่วยโรคมะเร็งตับทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นในอดีตที่ผ่านมาจนกระทั่งทางปี ค.ศ. 1992 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ประกาศให้ฉีดวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีของเด็กแรกเกิด เพื่อลดจำนวนประชากรที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากการรับเชื้อจากมารดาโดยเริ่มให้วัคซีนเมื่อปีค.ศ.1995 (10, 11)

Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นชนิดของมะเร็งตับที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ตับพบได้มากที่สุด HCC มีความแตกต่างจากมะเร็งตับชนิดอื่นๆ มีไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ พบผู้ป่วยมะเร็งตับ (HCC) ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและมีภาวะของโรคตับแข็ง (Cirrhosis) ประมาณร้อยละ 70-90 ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ อาทิ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และโรคที่เกิดจาก Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (12, 13) นอกจากนี้พิษจากอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารภาวะของโรคเบาหวาน น้ำหนักเกิน และสภาวะ

ผิดปกติของร่างกายจากโรคทางพันธุกรรม อาทิ hemochromatosis metabolic disorders บางประเภท (12, 14, 15) ดังรายละเอียด



รูปที่ 1 แสดงอัตราของช่วงอายุผู้ป่วยมะเร็งตับต่างเพศและพื้นที่ (7)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคมะเร็งตับ

1. **ภาวะตับแข็ง** เป็นปัจจัยเสี่ยงเบื้องต้นของการพัฒนาไปเป็น HCC สาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสबी จากจำนวนผู้ป่วย HCC ทั่วโลกพบว่ามีประมาณร้อยละ 50 ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร้อยละ 25 ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสबी (16) ภาวะตับแข็งที่เกิดขึ้นจะเริ่มจากเซลล์ตับถูกทำลาย ความสามารถในการสร้างเซลล์ตับลดลง (17) เมื่อเซลล์ตับที่ตาย เซลล์ตับโดยรอบจะมีเนื้อเยื่อพังพืดตั้งรับเซลล์ตับส่วนที่ตายจนเกิดเป็น Cancerous nodules ที่มีลักษณะผิวตะปุ่มตะป่ำ มีเลือดอุดตัน ความดันในตับสูงส่งผลให้การทำงานของตับลดลง (18) เนื่องจากภาวะตับแข็งเกี่ยวเนื่องกับความรุนแรงของการอักเสบในตับที่สามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็ง สามารถใช้วินิจฉัยและประเมินการรักษาโรคได้ ปัจจุบัน การศึกษากลไกการทำงานของระดับเซลล์ที่ส่งผลกระตุ้นให้เกิดมะเร็งตับ พบว่า การสูญเสียการทำงานของเทโลเมียร์และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายในเซลล์พบว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (9) การสูญเสียการทำงานของเทโลเมียร์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิ ชนิดของเซลล์ ยีน p53 ซึ่งเป็นยีน tumor suppressor (19) เมื่อให้สารกระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนูทดลองจะส่งผลให้เพิ่มการแสดงออกของยีน p53 (20) ลักษณะที่

สำคัญของภาวะตับแข็งคือการสร้างเซลล์พังพืดจากเซลล์ stellate cells ส่งผลให้ปริมาณ cytokine growth factor และอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (21)

2. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อมีอยู่ 2 ลักษณะคือแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง การติดเชื้อแบบเรื้อรังจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับประมาณ 100 เท่า (22) พบผู้ป่วยมะเร็งตับ แถบแอฟริกา เอเชีย และทางตะวันตกของแปซิฟิกที่ติดเชื้อมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด (23) ไวรัสตับอักเสบบีจัดอยู่ใน family *Hepadnaviridae* genus *Orthohepadnavirus* มีจีโนมมีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ไม่สมบูรณ์ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีผลต่อวิถีการเกิดมะเร็งทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยไวรัสตับอักเสบบีจะทำลายเซลล์ตับทำให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบ ตามด้วยการสร้างเซลล์ขึ้นมาใหม่ เกิดพังพืดเป็นภาวะตับแข็ง การสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลายเกิดซ้ำไปมาและเกิดการกลายพันธุ์มากขึ้นของจีโนมเจ้าบ้าน อาทิ genetic alterations, chromosomal rearrangements กระตุ้นการทำงานของยีนก่อมะเร็ง (tumor gene) และการยับยั้งการทำงานของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor) (24) ไวรัสตับอักเสบบีสามารถแทรกเข้าไปในจีโนมเจ้าบ้านทำให้เกิด Secondary chromosomal rearrangement และทำให้ความเสถียรของจีโนมลดลง (22)

3. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบชนิดเรื้อรัง ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และเกิดภาวะตับแข็ง (24) ความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับจากผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะเพิ่มประมาณ 17 เท่า (25) พบผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแถบทางตอนเหนือ กลางของแอฟริกาสูงประมาณร้อยละ 31 จากประชากรทั่วโลก (23)

4. การติดเชื้อเอชไอวีร่วมตัวกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้ป่วยที่เป็นตับแข็งที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและติดเชื้อเอชไอวีร่วมกันจะเพิ่มความรุนแรงส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง (26) และเพิ่มความรุนแรงของการดำเนินของโรคมะเร็งตับ (27)

5. โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องของตับ เป็นสภาวะที่ไม่รู้ที่มาและสาเหตุที่แน่ชัด ลักษณะของโรคจะเพิ่มความรุนแรง หากเริ่มมีพังพืด จะเพิ่มความรุนแรงของการดำเนินโรคไปสู่ภาวะตับแข็งโดยการทำลายเซลล์ตับ มีรายงานพบผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องจะพบในผู้ป่วยมะเร็งตับน้อยกว่าร้อยละ 1 แต่พบว่าพบมากในผู้ป่วยที่เป็น Autoimmune hepatitis หรือโรคตับอักเสบบี ซึ่งเป็นผลพวงมาจากระบบภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์ของตับโดยตรงและในผู้ป่วยที่เป็นตับแข็ง (28-30) เป็นที่สนใจว่า ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องในตับอาจมีกลไกที่ป้องกันการเป็นมะเร็ง จากสมมุติฐานหนึ่งคือสารกดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยสามารถยับยั้งไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์ อาทิ interleukin 1 beta, TNF alpha ซึ่งมีบทบาทสำคัญของการเพิ่มจำนวนและการเจริญของเซลล์มะเร็ง หากลดจำนวนไซโตไคน์เหล่านี้จะมีผลให้ลดการเกิดมะเร็ง (30)

6. โรคตับคั่งไขมัน เป็นภาวะที่มีไขมันสะสมพบมากในประชากรแถบประเทศตะวันตก (31) ในผู้ป่วยที่ไม่ดื่มสุรา ลักษณะของภาวะไขมันพอกตับคือมีไขมันบางส่วนที่ทำให้เกิดการอักเสบในตับ เกิดเป็น hepatic steatosis เซลล์ตับถูกทำลาย (32) ระบาดวิทยาพบว่าโรคไขมันพอกตับเกี่ยวข้องกับโรค Metabolic syndrome หรือกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือด เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ความสัมพันธ์ของโรคภาวะพร่องไขมันในตับกับโรคความผิดปกติ (Metabolism syndrome) มีแนวโน้มเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคตับอักเสบเรื้อรัง โรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับ (33) ปัจจุบันมีการรายงานว่าโรคภาวะไขมันพอกตับเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญหลักของการเกิดมะเร็งตับ

7. การปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร การปนเปื้อนของเชื้อ Alplatoxin B1 (34) ซึ่งเป็นสารพิษเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรากลุ่ม *Aspergillusfungus* ในอาหาร เชื้ออะฟลาทอกซินเจริญได้ดีในสภาพอากาศอบอุ่นและชื้น (9) เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเปลี่ยนรูปแบบให้เป็น AFB1-exo-8,9-epoxide ซึ่งจะเข้าจับกับสายดีเอ็นเอและทำให้เกิดการกลายพันธุ์

8. การดื่มเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมแอลกอฮอล์ ในช่วง 50-70 กรัมต่อวัน เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะตับแข็ง (35)

9. พันธุกรรม เป็นปัจจัยภายในที่สำคัญ ปัจจุบันมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการเกิดโรคมามากขึ้นปัจจัยทางพันธุกรรมอาจเกิดขึ้นได้จากการกระตุ้นโดยสภาพแวดล้อมต่างๆ อาทิ สารเคมี รังสี การได้รับพิษ หรือการควบคุมจากกลไกภายในสิ่งมีชีวิต อาทิ การกลายพันธุ์ (mutation), ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว SNPs (genetic variation)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)

เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคลในมนุษย์โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง โดยความแตกต่างนี้จะต้องมีความถี่ที่พบในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 ความแตกต่างนี้ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อสาเหตุของโรค แต่อาจมีผลต่อการเกิดโรคหากมีความผิดปกติหลายๆตำแหน่งและจะส่งผลมากหากบริเวณที่มี SNPs เป็นบริเวณยีนเป้าหมายที่สำคัญของวิถีและกระบวนการต่างๆของร่างกายหรือเป็นบริเวณโครงสร้างไมโครอาร์เอ็นเอที่ส่งผลต่อการจับกันระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอและยีนเป้าหมาย การศึกษาที่ผ่านมาพบ SNPs บริเวณยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอและ SNPs บริเวณไมโครอาร์เอ็นเอ มีผลต่อการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอที่สมบูรณ์ (Mature miRNAs) SNPs จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาค้นคว้ามากขึ้นโดยมีสมมุติฐานที่ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนไปหนึ่งตำแหน่งมีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างมะเร็ง หรือการยับยั้งกระบวนการสร้าง เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาตัวบ่งชี้โรคมะเร็ง อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) การศึกษาทั่วโลกการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอและ SNPs ภายในเซลล์เป็นอีกแนวทางที่สำคัญอาจนำมาเป็นแนวทางการรักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต

โดย SNPs ที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้ในบริเวณ (36) ดังนี้

- SNPs บริเวณ coding region ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนและการทำงานเปลี่ยนไป
- SNPs บริเวณ regulatory region เป็นบริเวณควบคุม เช่น promoter, operator, enhancer ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน
- SNPs บริเวณ non-coding region เป็นส่วนของอาร์เอ็นเอ ที่ไม่ได้ใช้ในการแปลรหัสเป็นโปรตีนเช่น ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ไมโครอาร์เอ็นเอชนิดแรกที่ถูกค้นพบชื่อ lin-4 และ let-7 ในหนอนตัวกลมทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของ *Caenorhabditis elegans* เมื่อศึกษาพบว่าไมโครอาร์เอ็นเอมีลักษณะสายเดี่ยว (37, 38) ต่อมาพบว่าไมโครอาร์เอ็นเอพบได้ทั้งสิ่งมีชีวิตประเภท พืช สาหร่ายสีเขียว ไวรัส และสัตว์ต่างๆ (39) การศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอที่มากขึ้นอย่างต่อเนื่องในปัจจุบันพบว่าไมโครอาร์เอ็นเอมีบทบาทที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการภายในเซลล์ ควบคุมการทำงานของยีนที่มีผลต่อกระบวนการต่างๆ อาทิการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ การเจริญของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การตายของเซลล์ กระบวนการเมตาบอลิซึมและการพัฒนาการของเซลล์

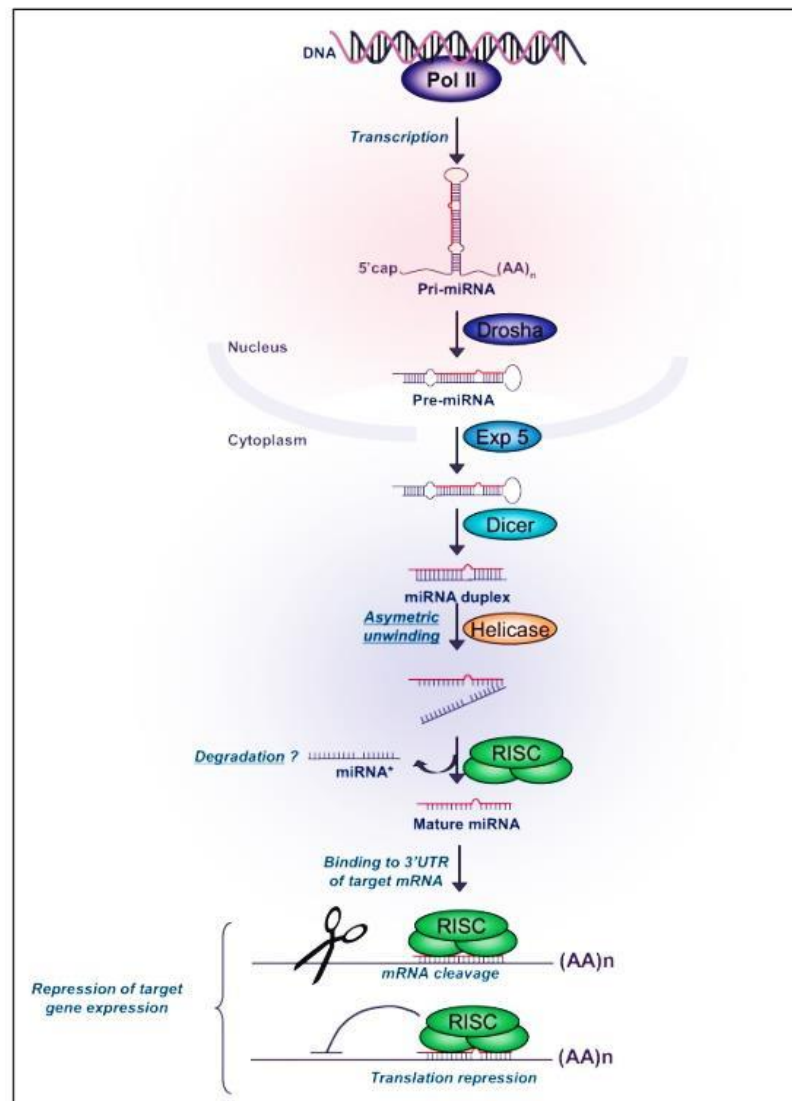
(40) โดยเข้าจับบริเวณ 3'UTR (Untranslated region) ของสายแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) เป้าหมายส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแปลรหัสหรือการสลายสาย mRNA

กระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

ไมโครอาร์เอ็นเอจะใช้ RNA polymerase II หรือ RNA polymerase III ในการถอดรหัส ได้เป็น primary-miRNA สายยาว จากนั้นเกิดกระบวนการภายในนิวเคลียสโดยอาศัย Drosha and DGCR8 (microprocessor complex) เพื่อให้อยู่ในรูป stem loop มีความยาวประมาณ 70 นิวคลีโอไทด์เรียกว่า precursor miRNAs (pre-miRNAs) และเคลื่อนตัวออกจากนิวเคลียสโดยอาศัยโปรตีน exportin 5 ที่บริเวณเมมเบรนของนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึม บริเวณไซโตพลาสซึมจะเกิดกระบวนการตัดโดย RNase III endonuclease (Dicer) ให้ได้ไมโครอาร์เอ็นเอที่สมบูรณ์ (mature miRNAs) ขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปยัง RNA induced silencing complex (RISC) ก่อนที่จะแยกเป็นสายเดี่ยว (รูปที่ 2) ไมโครอาร์เอ็นเอที่ได้สามารถเข้าคู่ (hybridization) เพื่อเข้าคู่กับสาย messenger RNA (mRNA) ผลของการเข้าคู่นี้ 2 ลักษณะ คือ

- Translational repression คือไมโครอาร์เอ็นเอจับได้บางส่วนกับสาย mRNA ส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของยีนบริเวณนั้นเนื่องจากไม่สามารถแปลรหัสให้ได้โปรตีนเพื่อทำหน้าที่ต่อไปได้ ลักษณะเช่นนี้ mRNA จะไม่ถูกทำลาย
- mRNA cleavage คือไมโครอาร์เอ็นเอจับได้สมบูรณ์กับสาย RNA ส่งผลให้ mRNA ถูกทำลาย (41)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอและ SNPs บนยีนเป้าหมายมีความสัมพันธ์กับมะเร็งหลายประเภท ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษา SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งตับ งานวิจัยปัจจุบันที่เผยแพร่ SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอบางชนิดเพื่อดูความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งตับมี หมายเลข SNPs rs3859501 บนไมโครอาร์เอ็นเอ miR-371-373 (43) rs2292832 miR-149c (44) มีความสัมพันธ์ลักษณะลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง rs7536540 miR-101-1rs12375841 miR-101-2 (45) rs4938723 miR-34b/c (45) rs999885 miR-106b-25 cluster (46) มีความสัมพันธ์ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ rs3746444 miR-499a (44, 47, 48) พบความสัมพันธ์ลักษณะที่ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งจากการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีรายงานมาแล้วนั้นพบเชื้อชาติส่งผลต่อ SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอ การศึกษาวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาทางการแพทย์เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อไปในอนาคตเพื่อใช้เป็นตัววัดชีวภาพประกอบการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าหากจะเลือก SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอมาเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในประเทศไทยเพื่อใช้ติดตามผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ



รูปที่ 2 ภาพแสดงกระบวนการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอ (42)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงเบสหนึ่งตำแหน่งหรือ SNPs ที่อาจมีความสัมพันธ์ในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง ประชากรไทยที่เป็นโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและประชากรที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี การเป็นมะเร็งและการเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540)

มีรายงานว่า miR-149 อาจเป็นยีน Tumor suppressor โดยอาจจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (Proliferation) และการหยุดชะงักของวัฏจักรเซลล์โดยเข้าจับกับยีนเป้าหมาย ZBTB2 (2) ในมะเร็งทางเดินอาหาร และ miRNA-149 อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเนื้องอกในสมอง (Glioma cell) (3) โดยเข้ายับยั้ง AKT ซึ่งเป็นสัญญาณภายในเซลล์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ การตายของเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนไมโครอาร์เอ็นเออาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องและส่งผลกระทบต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง

การศึกษา miRNA-149 (rs2292832) ในกลุ่มประชากรเกาหลีที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคมะเร็งตับจำนวน 159 ราย และกลุ่มประชากรที่คัดกรองว่าไม่มีปัญหาด้านสุขภาพเกี่ยวกับโรคมะเร็งและความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพจำนวน 201 ราย พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี จีโนไทป์ CC+TC และ TC มีแนวโน้มที่จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT (Wild type) โดยการใช้ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (44) และเมื่อวิเคราะห์โดยดูจีโนไทป์ของ miRNA-149 (rs2292832) อัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งตับใช้ Kaplan–Meier survival estimates แสดงจีโนไทป์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่เป็นแบบ CC หรือ CT จะมีโอกาสรอดชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ TT การศึกษาในกลุ่มประชากรเกาหลีสามารถสรุปผลได้ว่า miR-149 (rs2292832) มีแนวโน้มที่จะป้องกันหรือลดความเสี่ยงการเป็นมะเร็งตับ

มีรายงาน miR-499 มีผลในการยับยั้งการกระจายตัวและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งโดยเข้ายับยั้งการทำงานของยีนเป้าหมาย forkhead box O4 (FOXO4) and programmed cell death 4 (PDCD4) ในมะเร็งลำไส้ โดย FOXO4 เป็นแฟกเตอร์ในการลอรทัสและกำหนดการสร้างโปรตีนต่างๆจากยีน ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายของเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ โปรตีนที่หยุดวงจรการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นการเข้าคู่ของ miR-499 จึงเป็นผลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งหากเกิดความผิดปกติหรือการเกิด SNPs อาจส่งผลต่อการเข้าจับกับยีนเป้าหมาย (4)

การศึกษา miR-499 (rs3746444) ที่ผ่านมาในกลุ่มประชากรเกาหลีที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคมะเร็งตับจำนวน 159 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง และกลุ่มประชากรที่คัดกรองว่าไม่มีปัญหาด้านสุขภาพเกี่ยวกับโรคมะเร็งและมีความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพจำนวน 201 ราย พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี จีโนไทป์ CT+CC มีแนวโน้มลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT และเมื่อเปรียบเทียบของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับกับผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังพบว่า จีโนไทป์ CT+CC มีแนวโน้มลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ จีโนไทป์ TT จากการศึกษาในกลุ่มประชากรเกาหลี สามารถสรุปได้ว่า miRNA-149 (rs3746444) มีความสัมพันธ์กับการป้องกันการเป็นมะเร็งตับ (44)

miR-499 (rs3746444) ในกลุ่มประชากรจีนที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคมะเร็งตับ จำนวน 100 ราย ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 27 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรัง 100 ราย กลุ่มประชากรที่คัดกรองว่าไม่มีปัญหาด้านสุขภาพ 100 ราย โดยผู้ป่วยที่มีอัลลีล C มีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม น้อยกว่า 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล T และอัลลีล C มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับสูงกว่าอัลลีล T สามารถสรุปได้ว่า miRNA-149 (rs3746444) มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรจีน (48) ในขณะเดียวกันมีการศึกษาในกลุ่มประชากรจีนที่เป็นโรคมะเร็งตับ 185 รายและกลุ่มประชากรสุขภาพดี 203 ราย พบ SNPs จีโนไทป์ CC ลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT (49) และในกลุ่มประชากรทางตะวันตกของจีนไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของ SNPs miR-499 (rs3746444) ระหว่างผู้เป็นโรคมะเร็งตับ 186 ราย และผู้ที่มีสุขภาพดี 483 ราย (50) miR-499 (rs3746444) ในกลุ่มประชากรตุรกีไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มประชากรที่เป็นมะเร็งตับ 222 ราย และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี 222 ราย (47)

miR-101-1 (rs7536540) อยู่บนโครโมโซม 1p31.3 เป็นปัจจัยที่สำคัญของปฏิสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์กับไวรัส มีการศึกษาความสัมพันธ์ของ miR-101-1 กับการพัฒนาของเซลล์มะเร็งตับ พบว่า miR-101-1 จะแสดงออกน้อยลงในเซลล์มะเร็งตับ (Hepatoma cell line) และเนื้อมะเร็ง (Human HCC cell line) โดย miR-101-1 มีแนวโน้มที่อาจจะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งตับได้ (Hepatoma cell line) โดยการกระตุ้นจากยาเคมีบำบัด (Chemotherapeutic drug) (51) พบการแสดงออกของ miR-101-1 ลดลงมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำลงในผู้ป่วยมะเร็งตับ (52) นอกจากนี้มีรายงานว่า miR-101-1 จะควบคุมการแสดงออกของ V-fos FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (FOS) หรือ ยีนมะเร็งในมะเร็งตับ (5)

การแสดงออกของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ miR-101-1 ลดลงจากปกติประมาณ 2 เท่าในเนื้อมะเร็ง และพบว่าการระดับการแสดงออกของ miR-101-1 มีผลยับยั้งการรุกรานการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับในอาหารเลี้ยงเซลล์ (5) โดยรวมรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง miR-101-1 อาจเป็นสาเหตุการเกิดมะเร็งตับและการติดเชื้อไวรัส ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเปลี่ยนลำดับเบส 1 ตำแหน่งหรือการเกิด SNPs บน miR-101-1 กับการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับยังไม่เป็นที่แน่ชัด

การศึกษา SNPs miR-101-1 (rs7536540) ในประชากรเกาหลีเพื่อดูความสัมพันธ์กับการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคตับแข็งและมะเร็งตับ จำนวน 1439 ราย ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมคือผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยธรรมชาติ (Spontaneously recovered) 404 รายกลุ่มกรณีศึกษา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 313 ราย ผู้ที่เป็นโรคตับแข็ง 305 ราย และผู้ที่เป็นมะเร็งตับ 417 รายผลพบว่า miR-101-1 (rs7536540) อาจมีความสัมพันธ์การเกิดตับแข็งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังที่ไม่เป็นตับแข็งและกลุ่มผู้ที่เป็นตับแข็งและการเกิดมะเร็งตับโดยเปรียบเทียบการเกิดมะเร็งตับกับผู้ป่วยที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและเป็นตับแข็ง (45)

แม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างชนิด SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอกับการเกิดมะเร็งตับนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัดด้วยปัจจัยหลายประการ อาทิ ชนิดมะเร็ง เชื้อชาติ อายุ เพศ ปัจจัยภายนอกต่างๆ แต่ด้วยบทบาทหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอที่ควบคุมกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ของร่างกายนั้นเป็นจุดสำคัญที่ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเปลี่ยนตำแหน่งเบสหนึ่งตำแหน่ง หรือ SNPs อาจมีผลต่อการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอส่งผลให้กระบวนการทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งต่างๆ เปลี่ยนไป ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีจุดประสงค์หลักเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยว (SNPs) miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง อาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อใช้ในการทำนายโรคมะเร็งตับได้ในผู้ป่วยไทย

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

รูปแบบงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยแบบ Case-control study เพื่อวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงในกลุ่มประชากรเปรียบเทียบกับกันเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเหตุและผล ทดสอบสมมุติฐานหาความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค เปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเพื่อย้อนหาสาเหตุของการเกิดโรค โดยผ่านการพิจารณาและอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB No. 361/56

ประชากรที่ใช้ศึกษา

กลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มกรณีศึกษา คือ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (HCC) ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยวินิจฉัยโดยการตรวจพบ HBsAg และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) โดยการสุ่มเลือกนำตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังกรณีกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจะได้รับการยืนยันผลการวินิจฉัยทางรังสีวิทยาและ/หรือใช้การวินิจฉัยทางพยาธิสภาพจากชิ้นเนื้อจำนวน 166 ราย

กลุ่มควบคุม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (CHB) ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยจำนวน 159 รายวินิจฉัยโดยตรวจ HBsAg และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
- กลุ่มประชากรสุขภาพดี (Healthy) เป็นผู้ที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวีและไม่มีประวัติโรคตับ ซึ่งเข้าบริจาคเลือดที่สภากาชาดไทย จำนวน 167 ราย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้าเพื่อศึกษา

1. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งตรวจพบ HBsAg และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) โดยใช้การสุ่มเลือกนำตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและกรณีกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจะต้องได้รับการยืนยันผลการวินิจฉัยทางรังสีวิทยาและ/หรือใช้การวินิจฉัยทางพยาธิสภาพจากชิ้นเนื้อ (ผู้ป่วยที่คัดเลือกเข้ามีทั้งเพศหญิงและชายโดยอายุของผู้ป่วยจะอยู่ระหว่างช่วงอายุประมาณ 40-70 ปี)

2. กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพที่ดี ต้องเป็นผู้ที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไวรัสตับอักเสबीไวรัสเอชไอวี ไม่มีประวัติโรคตับและไม่เป็นมะเร็ง
3. ให้ความยินยอมในการเข้าร่วมงานวิจัย

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size)

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นลักษณะการศึกษาแบบ Case control study โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่มจำนวนโดยเป็นอิสระต่อกัน สูตรที่ใช้คำนวณหาจำนวนประชากรของกลุ่มตัวอย่าง (case) และกลุ่มควบคุม (control) ให้มีจำนวนเท่ากัน (53)

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

N หมายถึง ประชากรที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

P_2 หมายถึง โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งระดับเท่ากับ 0.3

OR หมายถึง odd ratio เท่ากับ 3.630 (48)

P_1 หมายถึง อัตราที่คาดว่าประชากรกลุ่ม case จะมีปัจจัยที่ผู้วิจัยสนใจ

โดย P_1 มีค่าเท่ากับ $\frac{P_2 \times OR}{1 + P_2(OR - 1)} = 0.60872$

P มีค่าเท่ากับ $\frac{(P_2 + P_1)}{2} = 0.45436$

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

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

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

แทนค่าในสมการข้างต้นจะได้ว่า

$$N = \frac{[1.96\sqrt{(2 \times 0.45436)(1 - 0.45436)} + 1.28\sqrt{0.60872(1 - 0.60872) + 0.3(1 - 0.3)}]^2}{(0.60872 - 0.3)^2} = 53 \text{ ราย}$$

หมายเหตุ ตัวอย่างเลือดกลุ่มประชากรเป้าหมายและกลุ่มควบคุมทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยต้องมีจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มอย่างน้อย 53 รายเพื่อความถูกต้องและมีความคลาดเคลื่อนทางค่าสถิติจึงได้วิเคราะห์ห้กลุ่มจากกลุ่มประชากรเป้าหมายทั้งสิ้นจำนวน 166 ราย กลุ่มประชากรควบคุมกลุ่มละ 326 ราย

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. วัสดุและอุปกรณ์ทั่วไปสำหรับงานวิจัย

- Heat box (Bioer Technology)
- Mini spin Centrifuge (Eppendorf)
- ตู้ป่ม 37°C (Biosan)
- MicroCentrifuge Tube ขนาด 0.1, 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)
- Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Neptune)
- Pipette ขนาด 3, 10, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Biohit)
- Parafin (American Nation Can, USA)
- Stirring-magnetic bar
- Polypopylene conical tube 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- Reagent bottle 100 ml 250 ml 500 ml และ 1000 ml (Duran)
- Autoclave
- Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
- Freezer -70°C (Forma, Scientific, USA)

2. สารเคมีสำหรับการเก็บเลือดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวและสกัดดีเอ็นเอ

- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Cat No. E9884)
- Lysis buffer (100 ml) (รายละเอียดดังแสดงในส่วนภาคผนวก)
- Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
- Phenol (AMRESCO, USA; Cat No. 0945400ML)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AMRESCO, USA; Cat No. 0227)
- Mercaptoethanol
- Proteinase K (Life Technologies, USA; Cat No. 25530-015)
- Chloroform (RCI Labscan, Thailand; Cat No. EP1027E)
- Isoamyl alcohol (Carlo Erba Reagenti, Italy)
- Sodium acetate (NaOAc) (Merck, Germany; Cat No. 567418)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AMRESCO, USA; Cat No. 0227)
- Absolute ethanol (Merck, Germany; Cat No. 1009832500)
- Tris-HCl (Sigma, Singapore; Cat No. T5941)

3. สารเคมีสำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

- RBC HiYield™ GeI/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YDF300)

4. สารเคมีสำหรับการทำ DNA cloning

- RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. RC013)
- Ampicillin (General Drugs House, Thailand)
- Glucose (Ajax Finechem, NZ; Cat No. 783)
- Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMRESCO, USA; Cat No. 0487)
- Agar (BD, USA; Cat No. RC013)
- Potassium chloride (KCl)
- Yeast extract (BD, USA; Cat No. 210934)
- Tryptone (BD), USA; Cat No. 223000)
- X-gal (AMRESCO, USA; Cat No. 0428)

6. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

- RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YPD300)

7. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับใช้ตรวจสอบไมโครอาร์เอ็นเอโดยวิธี PCR

- เครื่อง PCR Eppendorf master cycler® Gradient (Eppendorf)
- Autoclaved distilled water
- *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA; Cat No. 11615-010)
- 10X PCR Buffer, Minus Mg
- 50 mM Magnesium Chloride
- 10mM dNTPmixture (ThermoScientific,USA;Cat No. R0181)
- Primer (Integrated DNA Technologies, Singapore)

8. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- *Bcl*I (Thermo Sciencetific, Cat no. ER0721) 5 U/μL
- 10X Buffer Tango™ (Thermo Sciencetific)

9. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับ Agarose gel electrophoresis

- 100 bp DNA ladder H3 (GeneDireX, Taiwan; Cat No. DM003-R500)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Cat No. E9884)
- Agarose (Invitrogen, USA; Cat No. 75510-019)
- Tris base (Promega, USA)
- Boric acid (Fisher Scientific, UK)
- Ethidium bromide (AMRESCO, USA; Cat No. 0.492)

10. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับ Real time PCR

- TaqMan SNP Genotyping Assay Rs2292832 miR-149 (Gene Plus, Cat No.11533078_1)
- TaqMan SNP Genotyping Assay Rs7536540 miR-101-1 (GenePlus, Cat No.26137992_10)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)
- StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)
- ABI master mix (Applied Biosystems)
- SNP genotyping assay (Applied Biosystems)

โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

- Med Calc (http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)
- T-test (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest>)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.4.1)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บสิ่งตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ได้รับการยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้โดยเจาะโลหิตจากหลอดเลือดดำบริเวณรอยพับข้อศอก (Cubital fossa) ด้วยเข็มที่ปลอดเชื้อโดยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ (Aseptic technique) โดยพยาบาลผู้ชำนาญการ จากนั้นจัดเก็บโลหิตลงในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Clot blood) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นแยกซีรัมแล้วนำมาตรวจหา HBsAg, HBeAg และ Anti-HBc หลังจากนั้นเก็บรักษาซีรัมและพลาสมาที่ปั่นแยกโดยใช้ Lymphocyte separation media (Wisent Inc., Quebec, Canada) แยกออกมาเป็น peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) แล้วละลายในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)

2. สกัดดีเอ็นเอจาก PBMC โดยใช้เทคนิค Phenol-chloroform-isoamyl alcohol

2.1 ใช้ตัวอย่าง PBMC ปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอด microcentrifuge tube จากนั้นเติม lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 400 μ l หลังจากนั้นเติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 μ l แล้วบ่มปฏิกิริยาที่ 50°C

2.2 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 นาทีเพื่อให้เกิดการแยกชั้น

2.3 จากนั้นเตรียมหลอด microcentrifuge อันใหม่โดยการเติม glycogen ปริมาตร 4 μ l absolute ethanol ปริมาตร 800 μ l และ 2M Sodium acetate (NaOAc) ปริมาตร 40 μ l จากนั้นดูดสารละลายจากชั้นที่ 2 เฉพาะส่วนใส (supernatant) ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

2.4 นำไปบ่มที่ -70°C เป็นเวลา 30 นาที

2.5 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลือมาล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที

2.6 ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด microcentrifuge เท่านั้น จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยเครื่อง Vacuum ประมาณ 15 นาที

2.7 นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 30 μL จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ตารางที่ 1 แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ปฏิกริยา

ส่วนประกอบ	ปริมาณ ($\mu\text{L}/\text{reaction}$)	Final conc.
10X PCR Buffer minus Mg	2.5	1X
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.125	1.0-2.5 unit
10 mM dNTPs mixture	0.5	0.2 mM each
50 mM MgCl_2	0.75	1.5 mM each
Forward Primer (10 μM)	1.25	0.5 μM each
Reverse Primer (10 μM)	1.25	0.5 μM each
DNA template (50-500 ng/ μL)	1	
Distilled water	18.75	-
Total volume	25	

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	
Initial denaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 40รอบ
Annealing	59	30 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	7 วินาที	

ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miRNA-101-1 (rs7536540)

ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)	อ้างอิง
miR-149_	F	5'-CTG GCT CCG TGT CTT CAC TC-3'	263	(44)
miR-149_	R	5'-TGA GGC CCG AAA CAC CCG TA-3'		
miR-499_	F	5'-CAA AGT CTT CAC TTC CCT GCC A-3'	146	(44)
miR-499_	R	5'-GAT GTT TAA CTC CTC TCC ACG TGA TC-3'		
miR-101-1_	F	5'-CAG CAA GTG GTG AGG CTG AAA-3'	371	(45)
miR-101-1_	R	5'-AGC AGT TTT GAA TGT TTG GCA GA-3'		

4. Agarose gel electrophoresis

นำ PCR product มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel

- กรณีตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 2 % (w/v) ด้วยแรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 Volt เวลา 40 นาที และใช้ 100 bp DNA ladder ในการอ้างอิงขนาดของ DNA โดยนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV
- กรณีการทำ RFLP-PCR ใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 3 % (w/v) ด้วยแรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 Volt เวลา 40 นาที และใช้ 100 bp DNA ladder ในการอ้างอิงขนาดของ DNA โดยนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV

5. การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด HiYield™ Gel Extraction

- 5.1 ตัดเจลบริเวณที่มีขนาดของชิ้น DNA ที่ต้องการใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
- 5.2 เติม DF buffer ลงใน microcentrifuge tube และผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex
- 5.3 บ่มที่อุณหภูมิ 55°C ประมาณ 15 นาที โดยนำหลอดมาพลิกเป็นระยะๆจนกว่าเจลจะละลายหมด จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex
- 5.4 นำสารละลายที่ได้ใส่ใน DF column ซึ่งสวมเข้ากับ collecting tube
- 5.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 5.6 ทิ้งของเหลวใน collecting tube และใส่ DF column กลับไปใน collecting tube อีกครั้ง
- 5.7 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 5.8 นำ DF column ใส่ลงใน 15ml microcentrifuge tube อันใหม่
- 5.9 เติม Elution buffer 35 µl ใส่ลงใน DF column
- 5.10 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 5.11 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ที่ -20 °C

6. การเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ TA vector (RBC) เพื่อเตรียม positive control

ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation

สารที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (μl)
10X Ligation buffer	1
DNA Ligase	1
TA-vector (RBC)	2
Purified PCR product	6
Total volume	10

-บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน

7. การนำพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ Competent cell (Transformation) มีขั้นตอนดังนี้

7.1 นำ competent cell (*E.coli*) 50 μl ผสมกับสารละลาย ligation 5 μl

7.2 แช่เย็นบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

7.3 บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที (Heat shock) จากนั้นนำไปแช่บนน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที

7.4 เติมสารละลายที่ประกอบด้วย SOC medium (แสดงดังรายละเอียดในภาคผนวก) 950 μl 2M MgCl₂ 10 μl และ 2M Glucose 10 μl

7.5 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

7.6 ปั่นเหวี่ยง 4,000 rpm นาน 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

7.7 นำส่วนที่มีตะกอนไปเกลี่ยให้ทั่วบน LB agar ที่มี ยา ampicillin 2.5 μg X-gal 15 μl และ 200 mg/ml IPTG 5 μl

7.8 เกลี่ยให้ทั่วจน plate แห้งแล้วจึงนำไปบ่มที่ 37°C

7.9 ทำการเลือก white colony ที่คาดว่าไม่มีอิน miRNA

7.10 จากนั้นนำมาเพาะต่อใน LB broth ปริมาตร 1.5 ml ที่มียา ampicillin 1.5 mg และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการสกัด plasmid DNA จาก culture (ปริมาตร 1.5 ml) โดยใช้ชุด HiYield™ Plasmid kit

8. การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด HiYield™ Plasmid Mini kit

- 8.1 นำ culture ที่บ่มไว้เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
- 8.2 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใสออก
- 8.3 เติมสารละลาย PD1 Buffer 200 μ l และนำไป vortex
- 8.4 เติมสารละลาย PD2 Buffer 300 μ l จากนั้นพลิกหลอดไปมา
- 8.5 เติมสารละลาย PD3 Buffer 300 μ l จากนั้นพลิกหลอดไปมา
- 8.6 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 8.7 เตรียม PD column ลงใน 2 ml Collecting tube และถ่ายส่วนใสลงใน PD column
- 8.8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 8.9 ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collecting tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- 8.10 เติม W1 Buffer 400 μ l ลงใน PD column
- 8.11 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 8.12 ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- 8.13 เติม wash buffer 600 μ l PD column
- 8.14 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 8.15 ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- 8.16 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 8.17 นำ PD column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
- 8.18 เติม Elution Buffer 50 μ l
- 8.19 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

9. การคำนวณจำนวนชุดของพลาสมิดเพื่อเตรียม Positive control

ตัวอย่างการวัดจำนวนชุดของพลาสมิดที่มี miRNA-101-1

9.1 วัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดจากเครื่องนาโตรอป ได้เป็นความเข้มข้นหน่วย ng/ μ l ของพลาสมิดที่มีอัลลีลเป็น Homozygous แบบ CC และ GG

miRNA101-1 [GG] มีความเข้มข้น	275.9 ng/ μ l
miRNA101-1 [CC] มีความเข้มข้น	193.1 ng/ μ l

จากสูตร

$$\frac{\text{ความเข้มข้นของพลาสมิด} \times 10^{-9} (\text{nanogram}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{ค่าเฉลี่ยคู่มือรีเอเจนต์} \times (\text{ความยาวของTA vector} + \text{ความยาวลำดับที่คือ miRNA})}$$

จำนวนชุดของพลาสมิดจีโนไทป์ GG

$$N = \frac{275.9 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{660 \times (2723 + 371)}$$

$$= 8.13 \times 10^{10}$$

จำนวนชุดของพลาสมิดจีโนไทป์ CC

$$N = \frac{193.1 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{660 \times (2723 + 371)}$$

$$= 5.69 \times 10^{10}$$

9.2 การเจือจางพลาสมิด

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นของพลาสมิดตั้งต้น

C_2 = ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ต้องการโดยทำให้เป็นความเข้มข้น 10^6

V_1 = ปริมาตรของพลาสมิดตั้งต้น

V_2 = ปริมาตรพลาสมิดเจือจางที่ต้องการ 80 μ l

พลาสมิดจีโนไทป์ CC

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$8.13 \times 10^{10} \times V_1 = 10^6 \times 80$$

$$V_1 = 9.84 \mu\text{l}$$

เติมน้ำ DW เท่ากับ $80 - 9.84 = 70.62 \mu\text{l}$ โดยที่พลาสมิดมีความเข้มข้น 10^{10}

พลาสมิดจีโนไทป์ GG

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$5.69 \times 10^{10} \times V_1 = 10^{10} \times 80$$

$$V_1 = 15.05 \mu\text{l}$$

เติมน้ำ D.W 80 - 14.05 = 65.95 μl โดยที่พลาสมิดมีความเข้มข้น 10^{10}

ต้องการเจือจางพลาสมิดให้ได้ความเข้มข้น 10^6 เพื่อเตรียม Positive control

จึงต้องเติมน้ำ 99 μl ใส่พลาสมิด 1 μl ได้ความเข้มข้น 10^8

จึงต้องเติมน้ำ 99 μl ใส่พลาสมิด 1 μl ได้ความเข้มข้น 10^6

ดังนั้นจะได้พลาสมิดจีโนไทป์ CC ที่มีความเข้มข้น 10^6 ปริมาตร 100 μl

ดังนั้นจะได้พลาสมิดจีโนไทป์ GG ที่มีความเข้มข้น 10^6 ปริมาตร 100 μl

9.3 การเตรียม Heterozygous

โดยแบ่งพลาสมิดจีโนไทป์ allele 1 และจีโนไทป์ allele 2 มาอย่างละ 35 μl รวมจะมีปริมาตร 70 μl สำหรับ Heterozygous

หมายเหตุ เจือจางพลาสมิดเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกทั้ง 3 ยีน

10. การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรม

การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อยืนยัน Positive control

- นำพลาสมิดที่ได้จากการทำ Cloning ส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (1 Base) และวิเคราะห์ข้อมูลโครมาโตแกรมด้วยโปรแกรม Bioedit
- การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA-499 (rs2292832) จากกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมโดยใช้วิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) สารเคมีและเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 5-6
- การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครอาร์เอ็นเอ miR-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs7536540) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR สารที่ใช้แสดงดังตารางที่ 7-8

ตารางที่ 5 แสดงผลอัลลีล SNPs ของmiR-499 (rs3746444) โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด

ยีน	ขนาดยีน (bp)	เอนไซม์	แอลลีล	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
miRNA-499	146	<i>BclI</i>	A	120,26
			G	146

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ RFLP สำหรับ miR-499 (rs3746444)

สารที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (μl)
Distilled water	7
10X Buffer	2
PCR product	10
Restriction Enzyme (5 units/uL)	1
Total	20

นำ PCR product มารันใน agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 3% (w/v) และใช้ 100 bp DNA ladder ในการอ้างอิงขนาดของ DNA โดยนำไปย้อมด้วย Ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ Real time PCR สำหรับ miR-149 (rs2292832)

สารที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (μl)
ABI buffer 2X master mix	7.5
40X primers & probes mix	0.25
DNA template	1.0
Total	20

ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ Real time PCR สำหรับ miR-101-1 (rs7536540)

สารที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (μl)	Final conc.
10X PCR Buffer	2.0	1X
Taq DNA Polymerase (5units/ μl)	0.125	1.0-2.5 units
10 mM dNTPs mixture	0.4	0.2 mM each
50 mM MgCl ₂	0.6	1.5 mM each
SNPs miR-101-1 (rs7536540) 40X	0.5	1X
DNA template (50-500 ng/μl)	1	
Distilled water	15.375	
Total	20	

ตารางที่ 9 แสดงสถานะที่ใช้ในการทำ Real time PCR สำหรับ miR-101-1 (rs7536540) และ miR-149 (rs2292832)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Hold	95	10 นาที
Denaturation	92	15 วินาที
Annealing/ Extension	60	60 วินาที

} 40 รอบ

11. การวิเคราะห์ข้อมูลและค่าทางสถิติ

รวบรวมข้อมูลของอัลลีล SNPs และจีโนไทป์ miR-149 (rs2292832), miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) ของกลุ่มประชากรเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังในกลุ่มประชากรไทยโดยใช้โปรแกรม Med Calc โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติกส์ด้วยความเชื่อมั่นทางสถิติที่ร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มกรณีศึกษาและกลุ่มควบคุม

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงกลุ่มประชากร (Analytical control study) และได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) ผู้เข้าร่วมงานวิจัยทุกคนได้ให้ความยินยอมในการเข้าร่วมงานวิจัยโดยก่อนเก็บเลือดผู้ที่เข้าร่วมโครงการจะต้องลงลายมือชื่อลงในใบยินยอม (informed consent) ก่อนที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย ข้อมูลจะเป็นความลับที่ไม่เปิดเผยถึงตัวบุคคลเนื่องจากจะใช้ code ในการระบุแทนชื่อบุคคลผู้ป่วยได้รับรายละเอียด เอกสารชี้แจงข้อมูลพร้อมทั้งวัตถุประสงค์ในการวิจัยแล้วทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 10 ซึ่งประกอบด้วย

1. กลุ่ม HCC คือ ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ ทั้งหมด 166 ราย
2. กลุ่ม CHB คือผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับทั้งหมด 159 ราย
3. กลุ่ม Healthy เป็นผู้ที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่มีภาวะของโรคที่เกี่ยวกับตับและโรคมะเร็งทั้งหมด 167 ราย

กลุ่มที่ 1 กลุ่ม HCC คือ ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ ทั้งหมด 166 ราย เข้ารับการรักษาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย พบว่า เป็นผู้ชายจำนวน 144 ราย คิดเป็นจำนวนร้อยละ 86.75 หญิง 22 ราย คิดเป็นจำนวนร้อยละ 13.25 ค่าอายุเฉลี่ย 58.16 ปีและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 10.14 ปี ค่าเฉลี่ยเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT) 63.39 IU/L ค่าเฉลี่ยเอนไซม์ Aspartate transaminase (AST) 88.05 IU/L

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม CHB คือผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับ ทั้งหมด 159 ราย เข้ารับการรักษาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย พบว่า เป็นผู้ชายจำนวน 94 ราย คิดเป็นจำนวนร้อยละ 59.12 หญิง 65 ราย คิดเป็นจำนวนร้อยละ 40.88 ค่าอายุเฉลี่ย 43.67 ปีและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 14.30 ปี ค่าเฉลี่ยเอนไซม์ ALT 47.20 IU/L ค่าเฉลี่ยเอนไซม์ AST 36.65 IU/L

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม Healthy เป็นผู้ที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่เป็นโรคที่เกี่ยวกับตับและโรคมะเร็งทั้งหมด 167 ราย เข้าปรึกษาโลหิต ณ สภากาชาดไทย พบว่า เป็นผู้ชายจำนวน 95 ราย คิดเป็นจำนวนร้อยละ 55.23 หญิง 72 ราย คิดเป็นจำนวนร้อยละ 43.11 ค่าอายุเฉลี่ยอายุ 47.93 ปีและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 5.25 ปี

ตารางที่ 10 แสดงอายุเพศและเอนไซม์ในตับของประชากรไทยที่ใช้ในการศึกษา

Characteristic	HCC cases N = 166 (%)	CHB subjects N = 159 (%)	P value	Healthy subjects N = 167 (%)	P value
Age (years) mean	58.16 ±10.14	43.67 ± 14.30	<0.0001	47.93 ± 5.25	<0.0001
Male sex	144 (86.75)	94 (59.12)	<0.0001	95 (55.23)	<0.0001
AST (IU/L)	88.05 ± (76.80)	36.65 ± (38.20)	<0.0001		
ALT (IU/L)	63.39 ± (66.42)	47.20 ± (68.56)	0.0372		

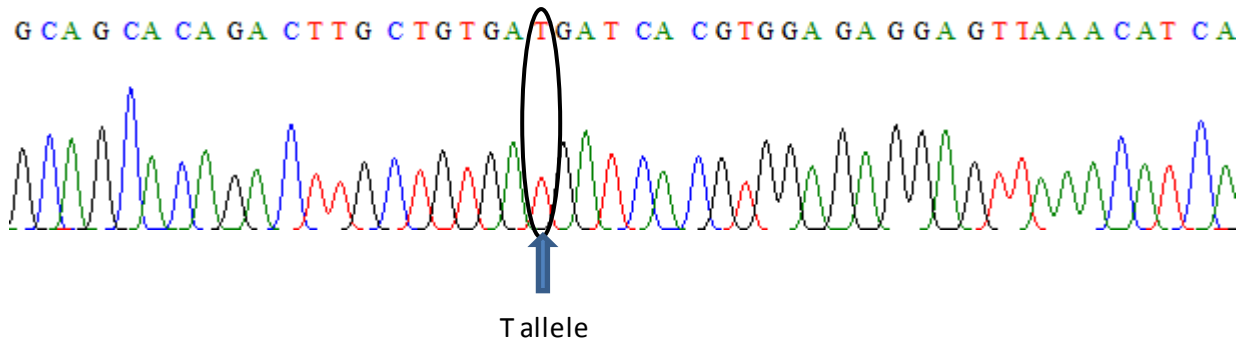
จากการใช้ *t*-test เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าอายุ เพศ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า *p* value น้อยกว่า 0.05) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง และ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า *p* value น้อยกว่า 0.05) ของค่าเอนไซม์ AST (IU/L) และ ALT (IU/L) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบนิวคลีโอไทด์เดี่ยวที่อาจส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับ

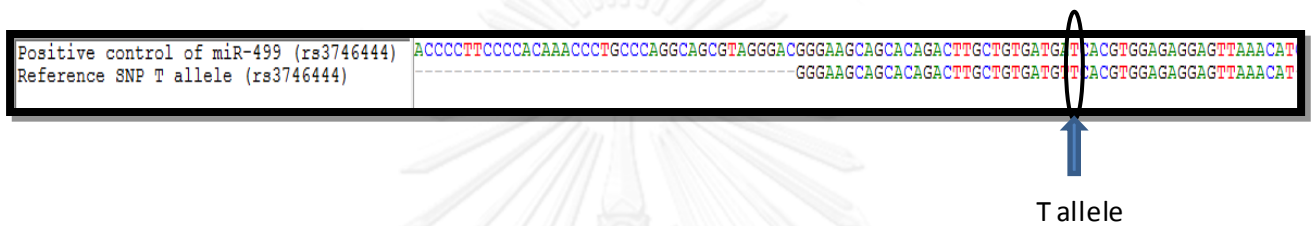
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบนิวคลีโอไทด์เดี่ยวที่อาจส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง การศึกษานี้มุ่งเน้นศึกษา miR-499 (rs3746444), miR-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs7536540) ดังนี้

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ miR-499 (rs3746444)

1.1 ดีเอ็นเอที่นำมาจากเซลล์ HepG2 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน miR-499 (48) ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 146 bp จากนั้นโคลนเข้าสู่ TA cloning vector จากนั้นคัดเลือกโคลนีเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing) ดังรูปที่ 3 จากนั้นนำผลมา Alignment เทียบกับ Reference SNPs miR-499 (rs3746444) ดังรูปที่ 4 จากรูปที่ 4 พบว่า Positive control มี Allele T เพื่อใช้เป็น Positive control ในการหา SNPs Genotyping ต่อไป

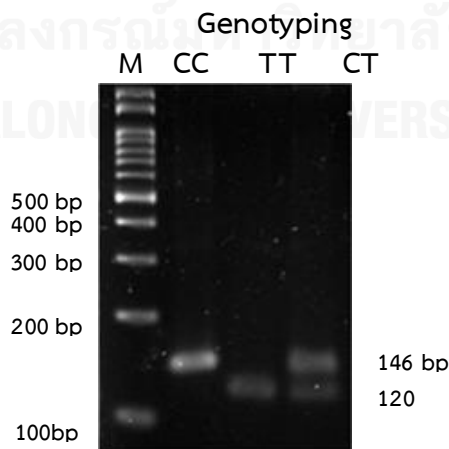


รูปที่ 3 แผนภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ

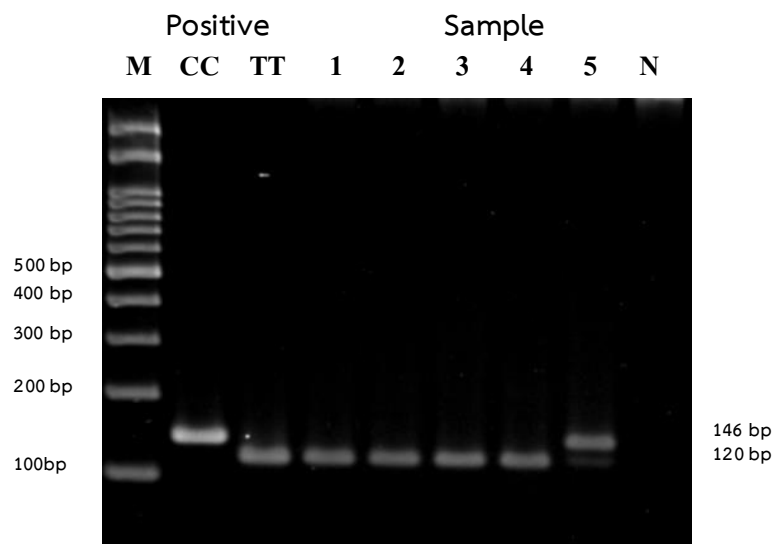


รูปที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit

1.2 การหา SNPs Genotyping ของยีน miR-499 (rs3746444) ใช้หลักการของเทคนิค PCR-RFLP พบว่า T allele สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *BclI* ผลิตพันธะที่ได้คือ 120 และ 26 bp ในขณะที่ C allele ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *BclI* ได้ผลิตพันธะขนาด 146 bp จากนั้นเมื่อนำไปแยกด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใน 3% agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide แล้วส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตดังรูปที่ 5 จากนั้นนำ positive control มาเพื่อหา genotyping ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา ได้แก่ HCC, CHB และ Healthy ดังรูปที่ 6



รูปที่ 5 การตรวจสอบ SNPs miR-499 (rs3746444) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ใน 3% Agarose gel; M คือ 100 bp DNA marker (หมายเหตุ จากภาพไม่เห็นผลิตภัณฑ์ขนาด 26 bp)



รูปที่ 6 การตรวจสอบ SNPs miR-499 (rs3746444) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา; M คือ 100 bp DNA marker, ตัวเลข 1-5 แสดงตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา, N คือ Negative control

1.3 การหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ SNPs miR-499 (rs3746444) ในการจำแนกกลุ่ม 3 กลุ่ม เปรียบเทียบโดยใช้ค่า odd ratios (OR) และ 95% confidence interval (CI) โดยใช้จีโนไทป์ TT เป็น reference แล้วแปลผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P value < 0.05 ผลการตรวจสอบ SNPs miR-499 (rs3746444) ได้ผลดังนี้ ตารางที่ 11

- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **HCC** พบว่ามีจีโนไทป์ TT จำนวน 121 ราย จีโนไทป์ CC จำนวน 14 รายและจีโนไทป์ TC จำนวน 31 รายพบอัลลีล T จำนวน 273 ราย อัลลีล C จำนวน 59 ราย
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยวในกลุ่ม **CHB** พบว่ามีจีโนไทป์ TT จำนวน 115 ราย จีโนไทป์ CC จำนวน 16 ราย จีโนไทป์ TC จำนวน 28 ราย พบอัลลีล T จำนวน 258 ราย อัลลีล C จำนวน 60 ราย
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่ม **Healthy** พบว่ามีจีโนไทป์ TT จำนวน 111 ราย จีโนไทป์ CC จำนวน 22 รายจีโนไทป์ TC จำนวน 34 ราย พบอัลลีล T จำนวน 256 ราย อัลลีล C จำนวน 78 ราย

- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ CHB** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.83$, 95% $CI=0.39-1.78$ และ $P = 0.635$
 - จีโนไทป์ CT เทียบกับ TT พบว่า $OR= 1.06$,95% $CI= 0.59-1.86$ และ $P = 0.861$
 - จีโนไทป์ CC+CT เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.97$, 95% $CI= 0.6-1.58$ และ $P = 0.909$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT+TC พบว่า $OR=0.82$, 95% $CI= 0.39-1.75$ และ $P = 0.612$
 - อัลลีล C เทียบกับ T พบว่า $OR=0.93$, 95% $CI = 0.62-1.38$ และ $P = 0.718$

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ Healthy** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับTT พบว่า $OR=0.58$, 95% $CI=0.28-1.20$ และ $P =0.142$
 - จีโนไทป์ CT เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.84$, 95% $CI= 0.48-1.45$ และ $P = 0.525$
 - จีโนไทป์ CC+CT เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.74$, 95% $CI =0.46-1.18$ และ $P = 0.203$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT+TC พบว่า $OR=0.61$, 95% $CI=0.3-1.23$ และ $P= 0.167$
 - อัลลีล C เทียบกับT พบว่า $OR= 0.71$, 95% $CI= 0.49-1.04$ และ $P = 0.076$

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ CHB + Healthy** ได้ผลดังนี้

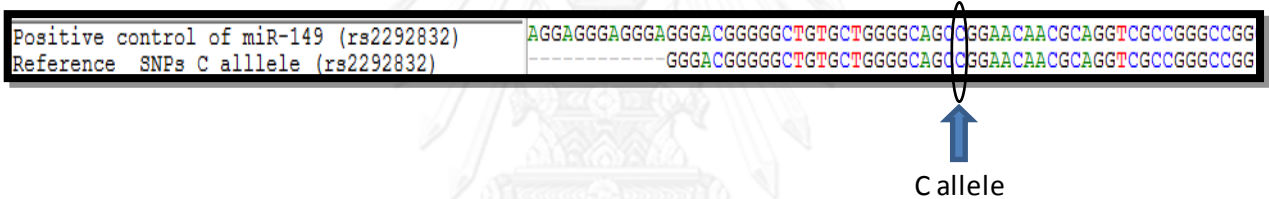
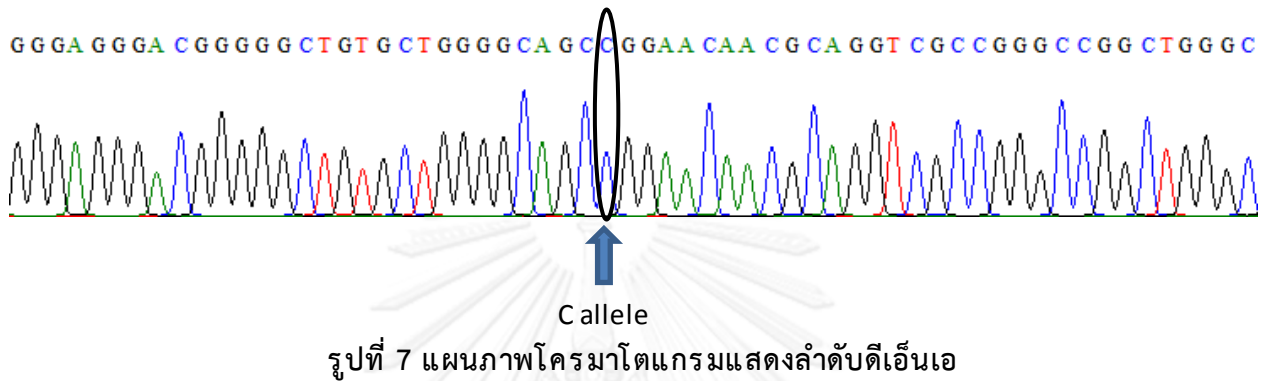
- จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.69$, 95% $CI=0.36-1.32$ และ $P = 0.261$
 - จีโนไทป์ CT เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.93$, 95% $CI=0.57-1.52$ และ $P = 0.782$
 - จีโนไทป์ CC+CT เทียบกับ TT พบว่า $OR=0.84$, 95% $CI=0.55-1.27$ และ $P= 0.412$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT+TC พบว่า $OR=0.7$, 95% $CI=0.37-1.33$ และ $P = 0.274$
 - อัลลีล C เทียบกับ T พบว่า $OR=0.81$, 95% $CI=0.57-1.13$ และ $P = 0.209$
- พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 11 แสดงความถี่ของอัลลีลและจีโนไทป์ของ miR-499 (rs3746444)

SNP rs3746444	HCC N =166 (%)	CHB N =159 (%)	Healthy N =167 (%)	CHB + Health (%)	HCC vs. CHB		HCC vs. Healthy		HCC vs. CHB + Healthy	
					OR (95% CI)	P values	OR (95% CI)	P values	OR (95% CI)	P values
Genotype										
TT	121 (72.89)	115 (72.33)	111 (66.47)	226 (69.33)	1.00		1.00		1.00	
CC	14 (8.43)	16 (10.06)	22 (13.17)	38 (11.66)	0.83 (0.39-1.78)	0.635	0.58 (0.28-1.2)	0.142	0.69 (0.36-1.32)	0.261
CT	31 (18.67)	28 (17.61)	34 (20.36)	62 (19.02)	1.06 (0.59-1.86)	0.861	0.84 (0.48-1.45)	0.525	0.93 (0.57-1.52)	0.782
Allele										
Major T	273	258	256	514	1.00		1.00		1.00	
Minor C	59	60	78	138	0.93 (0.62-1.38)	0.718	0.71 (0.49-1.04)	0.076	0.81 (0.57-1.13)	0.209
Dominant										
TT	121	115	111	226	1.00		1.00		1.00	
CC+CT	45	44	56	100	0.97 (0.6-1.58)	0.909	0.74 (0.46-1.18)	0.203	0.84 (0.55-1.27)	0.412
Recessive										
TT+TC	152	143	145	288	1.00		1.00		1.00	
CC	14	16	22	38	0.82 (0.39-1.75)	0.612	0.61 (0.3-1.23)	0.167	0.7 (0.37-1.33)	0.274

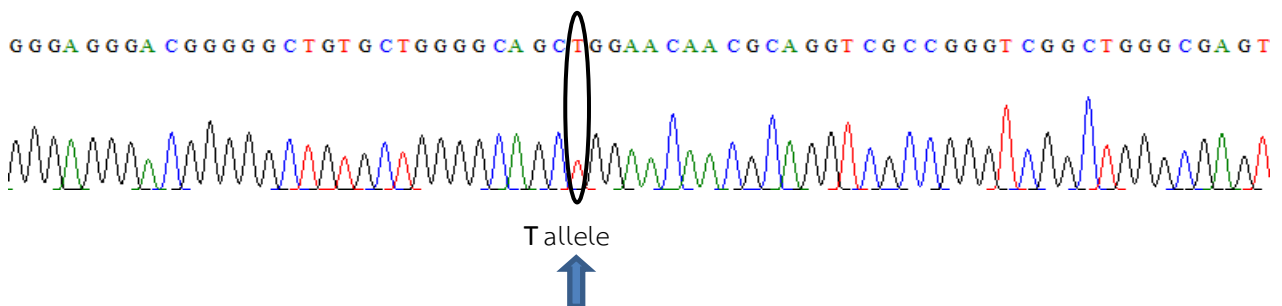
2. ความหลากหลายทางพันธุกรรม miR-149 (rs2292832)

2.1 ดีเอ็นเอที่ใช้นำมาจากเซลล์ HepG2 ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน miR-149(48) ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 263 pb จากนั้นโคลนเข้าสู่ TA vector cloning จากนั้นคัดเลือกโคลนเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing) ดังรูปที่ 7 จากนั้นนำผลมา alignment เทียบกับ reference SNPs miR-149 (rs2292832) ดังรูปที่ 8 จากรูปที่ 8 พบว่า positive control มี allele C เพื่อใช้เป็น positive control ในการหา SNPs Genotyping ต่อไป



รูปที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit

ดีเอ็นเอที่ใช้นำมาจากเซลล์ HeLa ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน miR-149 (48) ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 263 pb จากนั้นโคลนเข้าสู่ TA vector cloning จากนั้นคัดเลือกโคลนเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing) ดังรูปที่ 9 จากนั้นนำผลมา alignment เทียบกับ reference SNPs miR-149 (rs2292832) ดังรูปที่ 10 จากรูปที่ 10 พบว่า positive control มี allele T เพื่อใช้เป็น positive control ในการหา SNPs Genotyping ต่อไป



รูปที่ 9 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ

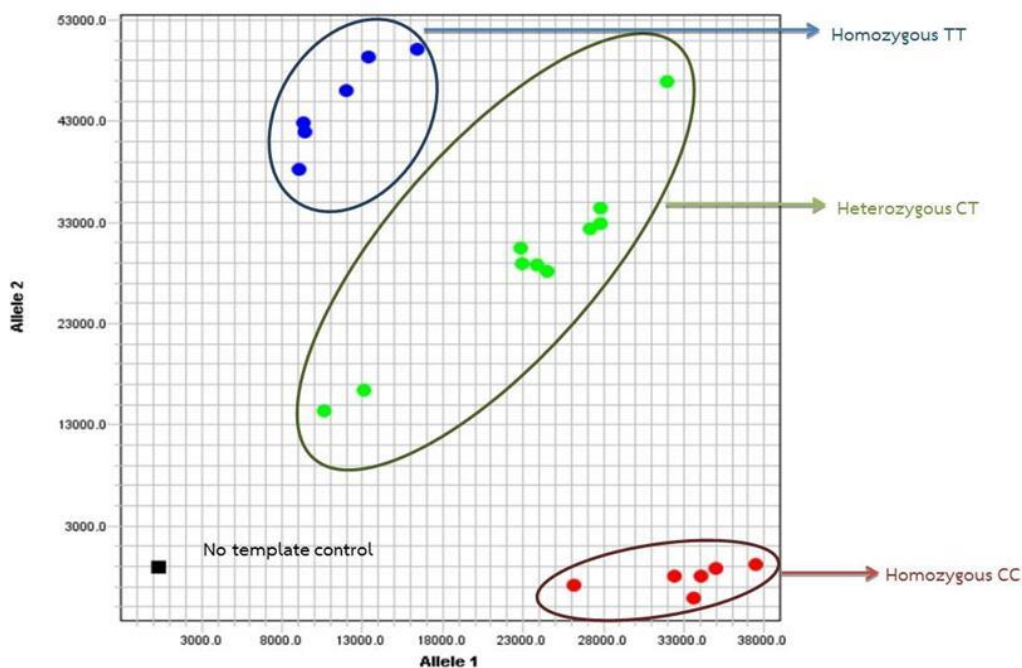
Positive control of miR-149 rs2292832	GAGGAGGGAGGGAGGGACGGGGGCTGTGCTGGGGCAGCTGGAAACAACGCAGGTCGCCGGGTCGG
Reference SNPs T allele rs2292832	-----GGGACGGGGGCTGTGCTGGGGCAGCTGGAAACAACGCAGGTCGCCGGGCCGG

↑
T allele

รูปที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit

2.2 การหา SNPs Genotyping ของยีน miR-149 (rs2292832) โดยใช้หลักการของเทคนิค real-time PCR โดยอาศัย *TaqMan* probes จำนวน 2 probes ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างกัน และจะมีความจำเพาะต่ออัลลีลแต่ละอัลลีล เช่น probe ที่จำเพาะต่ออัลลีล T จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง VIC ในขณะที่ probe ที่จำเพาะต่ออัลลีล C จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM ซึ่งสามารถแปลผลจาก discrimination plot (รูปที่ 11) เพื่อหา SNPs genotyping ได้ดังนี้

- ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ TT จะสามารถตรวจวัดการเรืองแสงของ FAM ได้ในปริมาณสูง และการเรืองแสงของ VIC ได้ในปริมาณต่ำ
- ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ CC จะสามารถตรวจวัดการเรืองแสงของ VIC ได้ในปริมาณสูง และการเรืองแสงของ FAM ได้ในปริมาณต่ำ
- ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ Heterozygous CT จะสามารถตรวจวัดการเรืองแสงของทั้ง FAM และ VIC ในปริมาณสูงใกล้เคียงกัน



รูปที่ 11 แสดงแผนภาพ Discrimination plot เพื่อแสดงผล SNPs genotyping miR-149 (rs2292832) โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR

2.3 การหาความสัมพันธ์ระหว่างของจีโนไทป์ของ SNPs miR-149 (rs2292832) ในการจำแนกกลุ่ม 3 กลุ่ม เปรียบเทียบใช้ค่า odd ratios (OR) และ 95% confidence interval (CI) โดยใช้จีโนไทป์ TT เป็น reference แล้วแปลผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p value < 0.05 ผลการตรวจสอบ SNPs miR-149 (rs2292832) ได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 12)

- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **HCC** ที่มีจีโนไทป์ TT จำนวน 101 ราย จีโนไทป์ CC จำนวน 19 ราย และจีโนไทป์ CT จำนวน 46 ราย พบอัลลีล T จำนวน 248 ราย อัลลีล C จำนวน 84 ราย
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **CHB** ผู้ที่มีจีโนไทป์ TT จำนวน 109 ราย จีโนไทป์ CC 17 ราย จีโนไทป์ CT 33 ราย พบอัลลีล T จำนวน 251 ราย อัลลีล C จำนวน 67 ราย
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **Healthy** ที่มีจีโนไทป์ TT จำนวน 105 ราย จีโนไทป์ CC 20 ราย จีโนไทป์ CT 42 ราย พบอัลลีล T จำนวน 252 ราย อัลลีล C จำนวน 82 ราย

- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ CHB** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT พบว่า OR=1.20, 95% CI= 0.59-2.45 และ $P = 0.603$
 - จีโนไทป์ CT เทียบกับ TT พบว่า OR=1.50, 95% CI= 0.89-2.53 และ $P = 0.126$
 - จีโนไทป์ CC+CT เทียบกับ TT พบว่า OR=1.40, 95% CI= 0.89-2.22 และ $P = 0.150$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT+TC พบว่า OR= 1.08, 95% CI= 0.54-2.16 และ $P = 0.83$
 - อัลลีล C เปรียบเทียบ T พบว่า OR=1.27, 95%CI=0.88-1.83 และ $P = 0.200$

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ Healthy** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT พบว่า OR=0.99, 95% CI=0.50-1.96 และ $P = 0.972$
 - จีโนไทป์ CT เทียบกับ TT พบว่า OR=1.14, 95% CI=0.69-1.88 และ $P = 0.610$
 - จีโนไทป์ CC+CT เทียบกับ TT พบว่า OR=1.09, 95% CI= 0.70-1.7 และ $P = 0.70$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT+TC พบว่า OR=0.95, 95% CI=0.49-1.85 และ $P = 0.88$
 - อัลลีล C เทียบกับ T พบว่า OR=1.04, 95% CI= 0.73-1.48 และ $P = 0.82$

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของกลุ่ม **HCC และ CHB + Healthy** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT พบว่า OR=1.09, 95% CI= 0.6-2.0 และ $P = 0.783$
 - จีโนไทป์ CT เทียบกับ TT พบว่า OR=1.3, 95% CI=0.84-2.01 และ $P = 0.240$
 - จีโนไทป์ CC+CT เทียบกับ TT พบว่า OR=1.23, 95% CI=0.84-1.81 และ $P = 0.290$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ TT+TC พบว่า OR=1.01, 95% CI= 0.56-1.82 และ $P = 0.970$
 - อัลลีล C เทียบกับ T พบว่า OR=1.14, 95% CI =0.84-1.55 และ $P = 0.390$

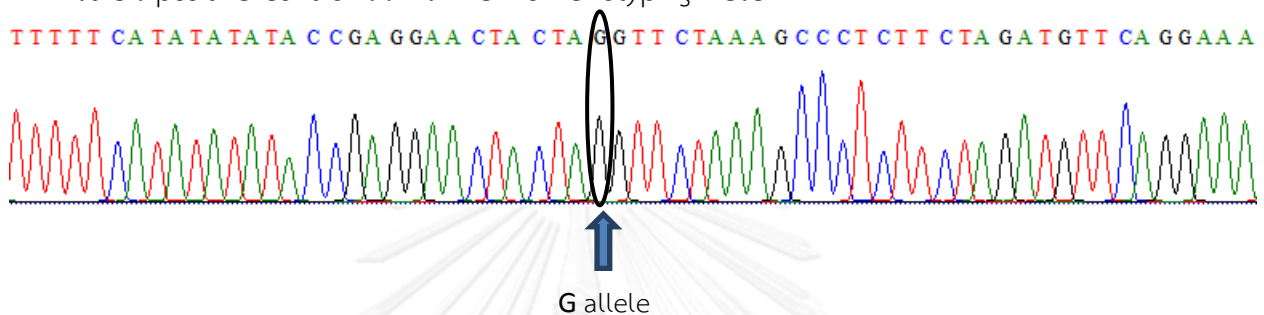
พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 12 แสดงความถี่ของอัลลีลและจีโนไทป์ของ miR-149 (rs2292832)

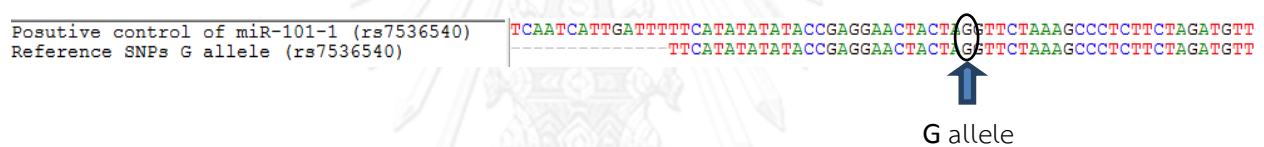
SNP rs2292832	HCC N =166 (%)	CHB N =159 (%)	Healthy N =167 (%)	CHB + Health (%)	HCC vs. CHB		HCC vs. Healthy		HCC vs. CHB + Healthy	
					OR (95% CI)	P values	OR (95% CI)	P values	OR (95% CI)	P values
Genotype										
TT	101 (60.84%)	109 (68.55%)	105 (62.87)	214 (65.64)	1.00		1.00		1.00	
CC	19 (11.45%)	17 (10.69%)	20 (11.98)	37 (11.35)	1.20 (0.59-2.45)	0.603	0.99 (0.50-1.96)	0.972	1.09 (0.6-2.0)	0.783
CT	46 (27.71)	33 (20.75%)	42 (25.15)	75 (23.01)	1.50 (0.89-2.53)	0.126	1.14 (0.69-1.88)	0.610	1.3 (0.84-2.01)	0.240
Allele										
Major T	248	251	252	503	1.00		1.00		1.00	
Minor C	84	67	82	149	1.27 (0.88-1.83)	0.2	1.04 (0.73-1.48)	0.82	1.14 (0.84-1.55)	0.39
Dominant										
TT	101	109	105	214	1.00		1.00		1.00	
CC+CT	65	50	62	112	1.40 (0.89-2.22)	0.15	1.09 (0.70-1.7)	0.70	1.23 (0.84-1.81)	0.29
Recessive										
TT+TC	147	142	147	289	1.00		1.00		1.00	
CC	19	17	20	37	1.08 (0.54-2.16)	0.83	0.95 (0.49-1.85)	0.88	1.01 (0.56-1.82)	0.97

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรม miR-101-1 (rs7536540)

3.1 ดีเอ็นเอที่ใช้นำมาจากเซลล์ A549 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน miR-101-1 (45) ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 371 pb จากนั้นโคลนเข้าสู่ TA vector cloning จากนั้นคัดเลือกโคลนนี้เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing) ดังรูปที่ 12 จากนั้นนำผลมา alignment เทียบกับ reference SNPs miR-101-1 (rs7536540) ดังรูปที่ 13 จากรูปที่ 13 พบว่า positive control มี Allele G เพื่อใช้เป็น positive control ในการหา SNPs Genotyping ต่อไป

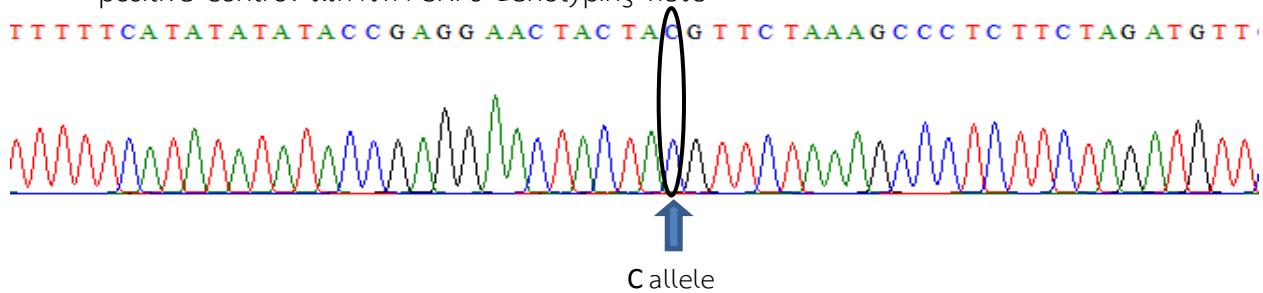


รูปที่ 12 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ



รูปที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit

ดีเอ็นเอที่ใช้นำมาจากเซลล์ A549 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน miR-101-1 (45) ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 371 pb จากนั้นโคลนเข้าสู่ TA vector cloning จากนั้นคัดเลือกโคลนนี้เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing) ดังรูป 14 จากนั้นนำผลมา alignment เทียบกับ reference SNPs miR-101-1 (rs7536540) ดังรูปที่ 15 จากรูปที่ 15 พบว่า positive control มี Allele C เพื่อใช้เป็น positive control ในการหา SNPs Genotyping ต่อไป



รูปที่ 14 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงลำดับดีเอ็นเอ

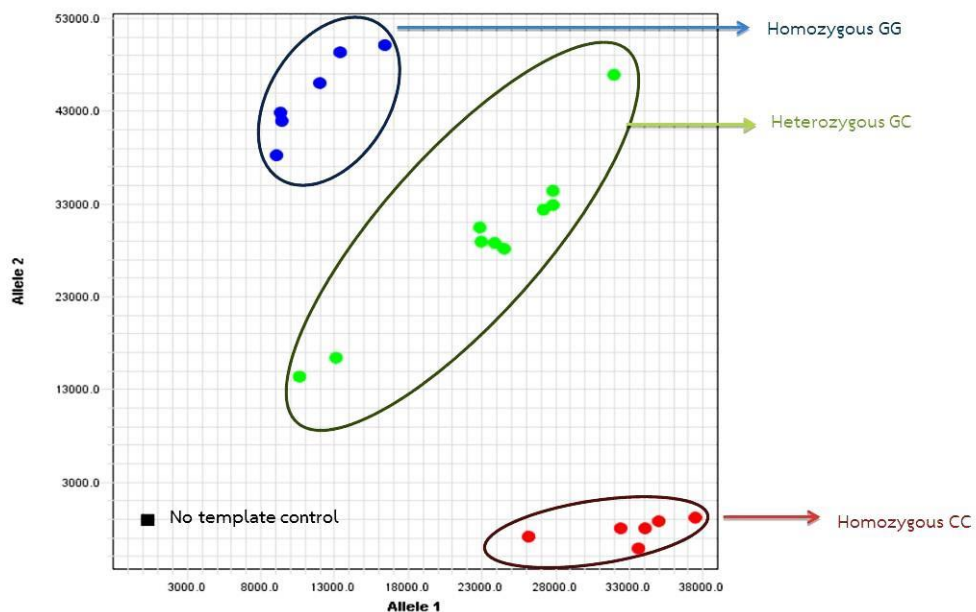
Positive control of miRNA-101-1 (rs7536540)
Reference SNPs C allele (rs7536540)

TTTTTCATATATATACCGAGGAACTACTACGTTCTAAAGCCCTCTCTAGATGTT
---TTCATATATATACCGAGGAACTACTACGTTCTAAAGCCCTCTCTAGATGTT

C allele

รูปที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference SNPs เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก positive control ด้วยโปรแกรม Bioedit

3.2 การหา SNPs Genotyping ของยีน miR-101-1 (rs7536540) โดยใช้หลักการของเทคนิค real-time PCR โดยอาศัย *TaqMan* probes จำนวน 2 probes ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างกัน และจะมีความจำเพาะต่ออัลลีลแต่ละอัลลีล เช่น probe ที่จำเพาะต่ออัลลีล G จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM ในขณะที่ probe ที่จำเพาะต่ออัลลีล C จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง VIC ซึ่งสามารถแปลผลจาก Discrimination plot (รูปที่ 16) เพื่อแสดงผล SNPs genotyping ได้ดังนี้



รูปที่ 16 แสดงแผนภาพ Discrimination plot เพื่อแสดงผล SNPs genotyping miR-101-1 (rs7536540) โดยใช้ *TaqMan* Probe Real-time PCR

3.3 การหาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ของ SNPs miR-101-1(rs7536540) ในการจำแนกกลุ่ม 3 กลุ่ม เปรียบเทียบใช้ค่า Odd ratios (OR) และ 95% confidence interval (CI) โดยใช้จีโนไทป์ GG เป็น Reference แล้วแปลผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P value < 0.05 ผลการตรวจสอบ SNPs miR-101-1 (rs7536540) ได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 13)

- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **HCC** ที่มีจีโนไทป์ GG จำนวน 53 ราย จีโนไทป์ CC จำนวน 24 รายและจีโนไทป์ CG จำนวน 89 รายพบอัลลีล G จำนวน 195 ราย อัลลีล C จำนวน 137 ราย
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **CHB** ผู้ที่มีจีโนไทป์ GG จำนวน 47 ราย จีโนไทป์ CC 30 รายจีโนไทป์ CG 82 ราย พบอัลลีล G จำนวน 176 ราย อัลลีล C จำนวน 142 ราย
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมเดี่ยวในกลุ่ม **Healthy** จีโนไทป์ GG จำนวน 67 ราย จีโนไทป์ CC 23 รายจีโนไทป์ CG 77 ราย พบอัลลีล G จำนวน 211 ราย อัลลีล C จำนวน 123 ราย
- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ CHB** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ GG พบว่า $OR=0.71$, $95\% CI =0.36-1.38$ และ $P = 0.312$
 - จีโนไทป์ GC เทียบกับ GG พบว่า $OR=0.96$, $95\% CI=0.59-1.58$ และ $P =0.880$
 - จีโนไทป์ CC+CG เทียบกับ GG พบว่า $OR=0.89$, $95\% CI=0.56-1.43$ และ $P =0.644$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ GG+CG พบว่า $OR=0.73$, $95\% CI = 0.40-1.31$ และ $P =0.287$
 - อัลลีล C เทียบกับ G $OR=0.87$, $95\% CI=0.64-1.19$ และ $P = 0.383$
 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม **HCC และ Healthy** ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ GG พบว่า $OR=1.32$, $95\% CI=0.67-2.59$ และ $P = 0.422$
 - โนไทป์ GC เทียบกับ GG พบว่า $OR=1.46$, $95\% CI=0.91-2.34$ และ $P = 0.115$
 - จีโนไทป์ CC+CG เทียบกับ GG พบว่า $OR= 1.43$, $95\% CI= 0.91-2.24$ และ $P = 0.120$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ GG+CG พบว่า $OR=1.06$, $95\% CI=0.57-1.96$ และ $P = 0.858$
 - อัลลีล C เทียบกับ G $OR=1.21$, $95\% CI=0.88-1.65$ และ $P =0.241$

- พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่ม HCC และ CHB + Healthy ได้ผลดังนี้
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ GG พบว่า $OR=0.97$, $95\% CI=0.54-1.74$ และ $P = 0.929$
 - โนไทป์ GC เทียบกับ GG พบว่า $OR=1.07$, $95\% CI=0.70-1.62$ และ $P = 0.750$
 - จีโนไทป์ CC+CG เทียบกับ GG พบว่า $OR=1.15$, $95\% CI = 0.77-1.71$ และ $P = 0.500$
 - จีโนไทป์ CC เทียบกับ GG+CG พบว่า $OR=0.87$, $95\% CI=0.52-1.47$ และ $P = 0.604$
 - อัลลีล C เทียบกับ G $OR=1.06$, $95\% CI=0.81-1.39$ และ $P = 0.662$

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 13 แสดงความถี่ของอัลลีลและจีโนไทป์ของ miR-101-1 (rs7536540)

SNP rs7536540	HCC N =166 (%)	CHB N =159 (%)	Healthy N =167 (%)	CHB Health (%)	HCC vs. CHB		HCC vs. Healthy		HCC vs. CHB + Healthy	
					OR (95% CI)	P values	OR (95% CI)	P values	OR (95% CI)	P values
Genotype										
GG	53 (31.93)	47 (29.56)	67 (40.12)	114 (34.97)	1.00		1.00		1.00	
CC	24 (14.46)	30 (18.87%)	23 (13.77)	53 (16.26)	0.71 (0.36-1.38)	0.312	1.32 (0.67-2.59)	0.422	0.97 (0.54-1.74)	0.929
CG	89 (53.61)	82 (51.57%)	77 (46.11)	179 (54.91)	0.96 (0.59-1.58)	0.880	1.46 (0.91-2.34)	0.115	1.07 (0.70-1.62)	0.750
Allele										
Major G	195	176	211	387	1.00		1.00		1.00	
Minor C	137	142	123	265	0.87 (0.64-1.19)	0.383	1.21 (0.88-1.65)	0.241	1.06 (0.81-1.39)	0.662
Dominant										
GG	53	47	67	114	1.00		1.00		1.00	
CC+CG	113	112	100	212	0.89 (0.56-1.43)	0.644	1.43 (0.91-2.24)	0.120	1.15 (0.77-1.71)	0.500
Recessive										
GG+CG	142	129	144	273	1.00		1.00		1.00	
CC	24	30	23	53	0.73 (0.40-1.31)	0.287	1.06 (0.57-1.96)	0.858	0.87 (0.52-1.47)	0.604

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษา SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอในปัจจุบันมีความสำคัญต่อการแพทย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากมีงานวิจัยที่กล่าวถึงความสัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการ ทั้งนี้อาจเพื่อเป็นแนวทางที่จะอธิบายการเกิดโรค ติดตามอาการ วินิจฉัยโรคร่วมกับการตรวจสารต่างๆในร่างกายงานวิจัยนี้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอ (miR-149, miR-499 และ miR-101-1) กับการเกิดมะเร็งตับจากการคำนวณขนาดกลุ่มประชากรที่จำเป็นต้องใช้ในงานวิจัยพบว่าต้องมีจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มอย่างน้อย 53 รายเพื่อให้เกิดความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือทางสถิติ ซึ่งในงานวิจัยนี้ศึกษาในกลุ่มประชากรไทยที่เป็นมะเร็งตับและติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (HCC) จำนวน 166 ราย (ผู้ชาย 144 ราย ผู้หญิง 22 ราย) กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (CHB) จำนวน 159 ราย (ผู้ชาย 94 ราย ผู้หญิง 65 ราย) และกลุ่มที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่มีภาวะการป่วยของโรคที่เกี่ยวข้องกับตับและโรคมะเร็ง (Healthy) จำนวน 167 ราย (ผู้ชาย 95 ราย ผู้หญิง 72 ราย) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้จำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่มมากกว่าที่คำนวณไว้ ประมาณ 3 เท่า ดังนั้นจึงมีความเพียงพอในด้านขนาดประชากร อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าสัดส่วนของเพศในผู้ป่วยแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม HCC จะมีผู้ป่วยเพศชายมากกว่าเพศหญิงคิดเป็นสัดส่วน (7:1) ทั้งนี้ความแตกต่างของเพศจะส่งผลกระทบต่อในแง่ของฮอร์โมน และพฤติกรรมกรรมการดำรงชีวิต เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ และภาวะโภชนาการ เป็นต้น ดังนั้นความแตกต่างในแง่สัดส่วนของเพศที่ต่างกันจึงเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อผลการศึกษา (confounding factor) ซึ่งอาจทำให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษามีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือลดลง

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาข้อมูลในแง่อายุของประชากรในแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่ม HCC มีค่าอายุเฉลี่ย 58 ปี กลุ่ม CHB มีค่าอายุเฉลี่ย 43 ปี ในขณะที่กลุ่ม Healthy มีค่าอายุเฉลี่ย 47 ปีซึ่งจะเห็นว่าอายุเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้ความแตกต่างของอายุจะส่งผลกระทบต่อในแง่ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและความผิดปกติต่างๆ ของร่างกายเมื่อมีอายุมากขึ้น เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันที่เสื่อมลง และการสะสมของการกลายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น เป็นต้น ดังนั้นความแตกต่างในแง่อายุจึงเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อผลการศึกษา (confounding factor) ซึ่งอาจทำให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษามีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือลดลงเช่นกัน

เมื่อพิจารณาค่าเอนไซม์ alanine transaminase (ALT) และเอนไซม์ aspartate transaminase (AST) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากตับและจะมีการหลั่งออกมาจากเมื่อเซลล์ตับถูกทำลายโดยค่าปกติ (normal range) ของเอนไซม์ AST ไม่เกิน 40 U/L และ ALT ไม่เกิน 56 U/L (54) จากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับและติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (HCC) มีค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (CHB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าระยะการดำเนินของโรคในผู้ป่วย HCC และ CHB ต่างกันจริงยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วน AST/ALT ในผู้ป่วยมะเร็งตับจะมีค่าสูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมากสามารถบอกสภาวะของการเกิดตับแข็ง อย่างไรก็ตามควรเพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับผู้ป่วย เช่น ประวัติการสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นโรคมะเร็งภายในครอบครัว ระดับ albumin และ ระดับ α -Fetoprotein เป็นต้น เพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูลทางคลินิก

การศึกษา SNPs สำหรับ miR-499 (rs3746444) โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เนื่องจากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ miR-499 สามารถเพิ่มจำนวนยีน และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดบริเวณตำแหน่ง SNPs miR-499 (rs3746444) สามารถอ่านผลของจีโนไทป์ได้อย่างชัดเจนเมื่อนำไปแยกด้วย 3% agarose ในขณะที่ SNPs miR-101-1 (rs7536540) ไม่สามารถใช้เทคนิค PCR-RFLP ได้เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับ SNPs miR-101-1 (rs7536540) เป็นเอนไซม์ที่หายากและเมื่อนำมาคำนวณค่าใช้จ่ายพบว่าการใช้เอนไซม์มีราคาแพงกว่าการใช้ TaqMan Probe Real-time PCR ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้เทคนิค Real-time PCR ในการหา SNPs miR-101-1 (rs7536540) ส่วน SNPs miRNA-149 (rs2292832) ไม่สามารถใช้เทคนิค PCR-RFLP ได้เนื่องจากการใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ให้ผล PCR product ที่ไม่จำเพาะ (non-specific bands) ทำให้ไม่สามารถอ่านผลจีโนไทป์ได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เทคนิค TaqMan Probe Real-time PCR ในการหา SNPs miRNA-149 (rs2292832) เช่นกัน

โดยสรุป การใช้เทคนิค PCR-RFLP มีความเหมาะสมในการหา SNPs เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อจำกัดคือจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ด้วยเทคนิค PCR และมีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดบริเวณ SNPs แล้วทำให้อ่านผลได้อย่างชัดเจน ส่วนการใช้เทคนิค TaqMan Probe Real-time PCR จะมีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น แต่มีความเหมาะสมในกรณีที่ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดบริเวณตำแหน่ง SNPs นอกจากนี้ข้อดีสำหรับเทคนิค TaqMan Probe Real-time PCR คือ สามารถทำได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค PCR-RFLP และไม่ก่อให้เกิด non-specific band เนื่องจากการตรวจสอบสัญญาณ fluorescence บน probe ในการอ่านและวิเคราะห์ผลอย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการหา SNPs มากมาย (57) เช่น

- MALDI-TOF mass spectrometry เป็นเทคนิคที่ใช้ความแตกต่างของมวลดีเอ็นเอ ข้อดีคือมีความไวสูง รวดเร็ว ใช้สารปริมาณน้อย ดีเอ็นเอที่ใช้ไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์มาก วิเคราะห์ได้จำนวนมากๆในเวลาเดียวกันแต่เครื่องมือมีราคาแพง
- Fluorescence resonance energy transfer เป็นการตรวจลำดับเบสที่สนใจของดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณของการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ ตัวอย่างเช่นการติดสารฟลูออเรสเซนต์บางชนิดที่ปลายสายของ probe ที่ทราบลำดับเบสที่แน่นอนในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยการนำมาใช้ร่วมกับแคโทดไอออนิกพอลิเมอร์เรืองแสงและอาศัยหลักการของ FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) และใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปี (Fluorescence spectroscopy) ตรวจวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์นั้น
- Chemiluminescence เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจวัด PPI ไพโรฟอสเฟตเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน PPI ที่ถูกปล่อยออกมาทำให้เกิดแสง เหมาะสมกับการตรวจวัดเชิงปริมาณ ตรวจวัดได้เร็ว แต่อาจมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ SNPs ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น

ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยวหรือ SNPs miR-499 (rs3746444) เกี่ยวข้องในหลายกระบวนการที่สำคัญของการเกิดมะเร็ง อาทิ การตายของเซลล์แบบมีแบบแผน (apoptosis) การเคลื่อนตัวของเซลล์ (migration) การแก่ของเซลล์ (cell senescence) และการอักเสบ (inflammation) (4, 55, 56) มีงานวิจัยที่กล่าวถึง miR-499 (rs3746444) แถบเอเชียใต้แก่ จีน เกาหลี ในประชากรผิวขาว ชาวตุรกี พบว่าผลของความสัมพันธ์ระหว่าง cmiR-499 (rs3746444) กับการเกิดมะเร็งตับไม่มีความชัดเจนเนื่องจากการศึกษาพบทั้งที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับและไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับดังรายละเอียดต่อไปนี้

ปี ค.ศ. 2012 รายงานการศึกษา SNPs miR-499 (rs3746444) ในประชากรเกาหลี กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 159 ราย และ กลุ่มประชากรที่คัดกรองว่าไม่มีปัญหาด้านสุขภาพเกี่ยวกับโรคมะเร็งและมีความผิดปกติเกี่ยวกับสุขภาพจำนวน 201 ราย พบว่าจีโนไทป์ TC+CC (AOR=0.603, 95% CI=0.370–0.984, $P=0.043$) มีแนวโน้มลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มผู้มีสุขภาพดี จีโนไทป์ TC+CC (AOR=0.561, 95% CI=0.331–0.950, $P=0.032$) มีแนวโน้มลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ จีโนไทป์ TT เมื่อ

เปรียบเทียบในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับกับผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังในประชากรเกาหลี miRNA-449 (rs3746444) มีความสัมพันธ์กับการป้องกันการเป็นมะเร็งตับ (44)

ปี ค.ศ. 2012 ประชากรจีนมีการรายงานผล SNPs miR-499 (rs3746444) กับความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งตับแตกต่างออกไปดังนี้ เมื่อคัดผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจำนวน 100 ราย ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 27 ราย กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 100 ราย กลุ่มประชากรที่คัดกรองว่าไม่มีปัญหาด้านสุขภาพ 100 ราย พบว่าอัลลีล C มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ (OR=3.630, 95% CI=1.545–8.532) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่มน้อยกว่า 0.001เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล T และอัลลีล C มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับสูงกว่าอัลลีล T (OR=3.133, 95% CI=1.248–7.861) (48) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในประชากรจีน ในปี ค.ศ. 2013 พบว่าเมื่อศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ 185 รายและกลุ่มประชากรสุขภาพดี 203 ราย พบ SNPs จีโนไทป์ CC มีแนวโน้มลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT (AOR=0.74, 95%CI=0.24-0.96) (49)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยศึกษาพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง miR-499 (rs3746444) และการเกิดโรคมะเร็งตับ เช่น ในปี ค.ศ. 2012 งานวิจัยในกลุ่มประชากรทางตะวันตกของจีนไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างผู้เป็นโรคมะเร็งตับ 186 ราย และผู้ที่มีสุขภาพดี 483 ราย (50) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2011 งานวิจัยในประชากรชาวตุรกีไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างผู้ป่วยมะเร็งตับ 222 ราย และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี 222 ราย (47)

ในงานวิจัยนี้เมื่อศึกษาในประชากรไทยในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 166 ราย ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 159 ราย ผู้ที่ไม่ติดเชื้อไม่เป็นมะเร็ง 167 ราย ของประชากรไทย เพื่อดูความสัมพันธ์ของ miR-499 (rs3746444) กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมะเร็งตับพบว่าจีโนไทป์ TT มากกว่าจีโนไทป์ CC ซึ่งสอดคล้องเป็นไปตามฐานข้อมูลของ SNPs database NCBI ที่รายงานว่า T เป็น major allele คือพบได้ในจีโนมและในกลุ่มประชากรมากกว่าอีกอัลลีลคือ C allele เป็น minor allele และเมื่อเปรียบเทียบจีโนไทป์และอัลลีลของ miR-499 (rs3746444) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งไปกว่านั้นการวิเคราะห์ข้อมูลรวมผลจากข้อมูลย่อยเพื่อประมวลผล (meta-analysis) (55, 57) ความสัมพันธ์ของ miR-499 (rs3746444) กับมะเร็งตับผลคือไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง miR-499 (rs3746444) กับการเกิดมะเร็งตับเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miR-499 (rs3746444) กับการเกิดมะเร็งตับของประเทศไทยและต่างประเทศสรุปดังตาราง

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miR-499 (rs3746444) กับการเกิดมะเร็งตับ
ของประเทศไทยและต่างประเทศ

MicroRNA (SNPs)	Country	Ethnicity	Number Case / control	Odd ratio	95% CI	P value	Association	Allele/ genotype
miR-499 (rs3746444)	Korean	Asian	159 / 201	0.603	(0.370–0.984)	0.043	Reduce risk	CC+CT
	China	Asian	100 / 100	3.630	(1.545–8.532)	< 0.001	Increase risk	C
	China	Asian	186 / 483			> 0.05	-	
	Turkey	Caucasian	222/ 222			> 0.05	-	
	China	Asian	186/ 203	0.74	(0.24-0.96)	< 0.05	Reduce risk	CC
	Thailand	Asian	166/ 167			> 0.05	-	

ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเดี่ยวหรือ SNPs miRNA-149 (rs2292832) ปี ค.ศ. 2012 ที่ผ่านมากในประชากรเกาหลีในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับจำนวน 159 ราย และกลุ่มประชากรที่คัดกรองว่าไม่มีปัญหาด้านสุขภาพเกี่ยวกับโรคมะเร็งและความผิดปกติเกี่ยวกับสุขภาพจำนวน 201 ราย พบจีโนไทป์ CC+TC (AOR=0.536, 95% CI=0.335–0.858, P=0.009) และ TC (AOR=0.542, 95% CI=0.332–0.886, P=0.015) มีแนวโน้มที่จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT โดยการใช้ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี จีโนไทป์ CC+TC (AOR=0.536, 95% CI=0.335–0.858, P=0.009) และ TC (AOR=0.542, 95% CI=0.332–0.886, P=0.015) มีแนวโน้มที่จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ TT (44)

เมื่อศึกษาในประชากรไทยในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 166 ราย ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 159 ราย ผู้ที่ไม่ติดเชื้อไม่เป็นมะเร็ง 167 รายของประชากรไทย เพื่อดูความสัมพันธ์ของ SNPs การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมะเร็งตับพบว่าประชากรที่ศึกษามีจีโนไทป์ TT มากกว่าจีโนไทป์ CC ซึ่งสอดคล้องเป็นไปตามฐานข้อมูลของ SNPs database NCBI และเมื่อเปรียบเทียบจีโนไทป์และอัลลีลของ miRNA-149 (rs2292832) เพื่อดูความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับผลคือไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบความสัมพันธ์ miRNA-149 (rs2292832) กับการเกิดมะเร็งตับของประเทศไทยและต่างประเทศสรุปดังตาราง

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miRNA-149 (rs2292832) กับการเกิดมะเร็ง
ตับของประเทศไทยและต่างประเทศ

MicroRNA (SNPs)	Country	Ethnicity	Number Case / control	Odd ratio	95% CI	P value	Association	Allele/genotype
miR-149 (rs2292832)	Korean	Asian	159 / 201	0.536	(0.335–0.858)	0.009	Reduce risk	CC+TC
				0.542	(0.332–0.886)	0.015	Reduce risk	TC
	Thailand	Asian	166 / 167			> 0.05	-	

miR-101-1 (rs7536540) มีรายงานการแสดงออกของระดับไมโครอาร์เอ็นเอ miR-101-1 ลดลงจากปกติประมาณ 2 เท่าในเนื้อมะเร็ง และพบว่าการระดับการแสดงออกของ miR-101-1 มีผลยับยั้งการรุกรานการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งระดับในอาหารเลี้ยงเซลล์ (5) โดยรวมรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง miR-101-1 อาจเป็นสาเหตุการเกิดมะเร็งตับและการติดเชื้อไวรัส ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบเปลี่ยนลำดับเบส 1 ตำแหน่งหรือการเกิด SNPs บน miR-101-1 กับการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับยังไม่เป็นที่แน่ชัด

การศึกษา miR-101-1 (rs7536540) ในประชากรเกาหลีเพื่อดูความสัมพันธ์กับการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคตับแข็งและมะเร็งตับ จำนวน 1,439 ราย ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมคือผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยธรรมชาติ (Spontaneously recovered) 404 ราย กลุ่มกรณีศึกษา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 313 ราย ผู้ที่เป็นโรคตับแข็ง 305 ราย และผู้ที่เป็นมะเร็งตับ 417 ราย ผลพบว่า miR-101-1 (rs7536540) อาจจะมีความสัมพันธ์การเกิดตับแข็ง ($P = 0.02$, OR = 0.63 in the dominant model) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังที่ไม่เป็นตับแข็งและกลุ่มผู้ที่เป็นตับแข็งและการเกิดมะเร็งตับ ($P = 0.02$, OR = 0.79 in the co-dominant model ; $P = 0.003$, OR = 0.63 in the dominant model) โดยเปรียบเทียบการเกิดมะเร็งตับกับผู้ป่วยที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและเป็นตับแข็ง (45)

เมื่อศึกษาในประชากรไทยในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 166 ราย ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง 159 ราย ผู้ที่ไม่ติดเชื้อไม่เป็นมะเร็ง 167 รายของประชากรไทย เพื่อดูความสัมพันธ์ของ miR-101-1 (rs7536540) กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมะเร็งตับพบว่า เมื่อเปรียบเทียบจีโนไทป์และอัลลีลของ SNPs miR-101-1 (rs7536540) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบความสัมพันธ์ miR-101-1 (rs7536540) กับการเกิดมะเร็งตับของประเทศไทยและต่างประเทศสรุปดังตาราง

ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ miR-101-1 (rs7536540) กับการเกิดมะเร็งตับ
ของประเทศไทยและต่างประเทศ

MicroRNA (SNPs)	year	Country	Ethnicity	Number Case control	Odd ratio	95% CI	p value	Association	Allele/genotype
miR-101-1 (rs7536540)	2012	Korean	Asian	404 / 1,035	0.79	(0.65-0.97)	0.02	Reduce risk	CG vs CC+GG
		Thailand	Asian	166 / 167	0.63	(0.46-0.85)	0.003	Reduce risk	GG vs CC+CG
							> 0.05	-	

แม้ว่าความสัมพันธ์ของ SNPs miRNA-149 (rs2292832) miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) เมื่อนำมาคำนวณหาค่า Chi-square จะไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจากค่าการคำนวณช่วงความเชื่อมั่นปกติร้อยละ 95 (95% confidence interval) โดยที่ความกว้างของช่วงจะบ่งชี้ความเที่ยงของการศึกษาโดยจะครอบคลุมค่าจริงของประชากร หากช่วงค่า 95% CI คร่อม 1 จะพบว่าค่า *p* value มากกว่า 0.05 คือเมื่อทำการศึกษา miRNA-149 (rs2292832) พบว่ามีแนวโน้มจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมะเร็งตับมากที่สุด โดยมีค่า 95% CI ไกล่เคียง 1 มากกว่า miR-499 (rs3746444) และ miR-101-1 (rs7536540) และควรดูค่า *P* value ประกอบการพิจารณา

หากในอนาคตจะเลือก SNPs บนไมโครอาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งระดับ ควรพิจารณาจากค่า 95% CI, ค่า Odd ratio พิจารณายินเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอเพื่อดูความเกี่ยวข้องกับกระบวนการภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องและนำไปสู่การเกิดมะเร็ง นอกจากนี้อาจเปลี่ยนกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาให้มีความแตกต่างจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาในประเทศอื่น ๆ เพื่อลดปัจจัยในด้านขนาดกลุ่มประชากร อาจทำได้โดยการเปลี่ยนมาทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่เป็นมะเร็งระดับชนิดเดียวโดยอาจแบ่งเป็นขั้นของการเป็นมะเร็งหรือเลือกกลุ่มประชากรที่มีเงื่อนไขที่ยังไม่ค่อยมีการศึกษาในกลุ่มประชากรอื่น เช่น การพิจารณาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและเป็นตับแข็งให้ชัดเจน และยังไปกว่านั้นหากศึกษา SNPs หลายตัวที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับอาจเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพร่วมกัน

โดยสรุปงานวิจัยนี้ทำการศึกษา SNPs genotyping ของ miR-499 (rs3746444), miRNA-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs7536540) เพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (CHB) และผู้ที่มีสุขภาพดีไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสเอชไอวี ไม่มีประวัติโรคมะเร็งและโรคที่เกี่ยวข้องตับ (Healthy) ซึ่งจัดได้ว่าเป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษายีน miR-499 (rs3746444), miRNA-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs7536540) ในประชากรไทย แต่จากผลการศึกษาพบว่า ทั้ง 3 SNPs ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในการศึกษาด้านอายุ และเพศที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม case และ control (P value < 0.05) จึงเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อผลการศึกษา (confounding factor) ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษา SNPs ของ miR-499 (rs3746444), miRNA-149 (rs2292832) และ miR-101-1 (rs753654) ที่อาจจะไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการติดตามการดำเนินของโรคมะเร็งตับได้ในประชากรไทย ดังนั้นข้อเสนอแนะในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs และการเกิดโรคมะเร็งตับ คือควรคัดเลือกประชากรทุกกลุ่มให้มีอายุ และเพศ สอดคล้องกัน รวมทั้งมีการซักประวัติการสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นโรคมะเร็งภายในครอบครัว และประวัติทางคลินิก เพื่อลดปัจจัยที่ส่งผลต่อผลการศึกษาซึ่งจะเพิ่มความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้จากการศึกษา

รายการอ้างอิง

1. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2002;17(6):643-50.
2. Wang Y, Zheng X, Zhang Z, Zhou J, Zhao G, Yang J, et al. MicroRNA-149 inhibits proliferation and cell cycle progression through the targeting of ZBTB2 in human gastric cancer. *PloS one*. 2012;7(10):e41693.
3. Pan SJ, Zhan SK, Pei BG, Sun QF, Bian LG, Sun BM. MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2012;25(4):871-81.
4. Liu X, Zhang Z, Sun L, Chai N, Tang S, Jin J, et al. MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis*. 2011;32(12):1798-805.
5. Li S, Fu H, Wang Y, Tie Y, Xing R, Zhu J, et al. MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(4):1194-202.
6. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of hepatology*. 2006;45(4):529-38.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
8. Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, et al. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology*. 2002;36(5):1214-20.
9. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2007;37 Suppl 2:S88-94.
10. Centers for Disease C, Prevention. Implementation of newborn hepatitis B vaccination--worldwide, 2006. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2008;57(46):1249-52.

11. Centers for Disease C, Prevention. Global progress toward universal childhood hepatitis B vaccination, 2003. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2003;52(36):868-70.
12. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
13. Poon D, Anderson BO, Chen LT, Tanaka K, Lau WY, Van Cutsem E, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *The lancet oncology*. 2009;10(11):1111-8.
14. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;963:13-20.
15. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2008;14(27):4300-8.
16. Gurtsevitch VE. Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis. *Biochemistry Biokhimia*. 2008;73(5):504-13.
17. Delhaye M, Louis H, Degraef C, Le Moine O, Deviere J, Gulbis B, et al. Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology*. 1996;23(5):1003-11.
18. Caillot F, Derambure C, Bioulac-Sage P, Francois A, Scotte M, Gorla O, et al. Transient and etiology-related transcription regulation in cirrhosis prior to hepatocellular carcinoma occurrence. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(3):300-9.
19. Farazi PA, Glickman J, Horner J, Depinho RA. Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression. *Cancer research*. 2006;66(9):4766-73.
20. van Gijssel HE, Maassen CB, Mulder GJ, Meerman JH. p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion. *Carcinogenesis*. 1997;18(5):1027-33.

21. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):209-18.
22. Szabo E, Paska C, Kaposi Novak P, Schaff Z, Kiss A. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathology oncology research : POR*. 2004;10(1):5-11.
23. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(12):3030-44.
24. But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2008;14(11):1652-6.
25. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *American journal of epidemiology*. 2002;155(4):323-31.
26. Pineda JA, Romero-Gomez M, Diaz-Garcia F, Giron-Gonzalez JA, Montero JL, Torre-Cisneros J, et al. HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(4):779-89.
27. Puoti M, Bruno R, Soriano V, Donato F, Gaeta GB, Quinzan GP, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *Aids*. 2004;18(17):2285-93.
28. Park SZ, Nagorney DM, Czaja AJ. Hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(10):1944-8.
29. Yeoman AD, Al-Chalabi T, Karani JB, Quaglia A, Devlin J, Mieli-Vergani G, et al. Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: Implications for follow-up and screening. *Hepatology*. 2008;48(3):863-70.
30. Teufel A, Weinmann A, Centner C, Piendl A, Lohse AW, Galle PR, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(5):578-82.

31. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005;42(1):44-52.
32. Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2008;24(3):320-7.
33. Bugianesi E, Vanni E, Marchesini G. NASH and the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in type 2 diabetes. *Current diabetes reports*. 2007;7(3):175-80.
34. Abdel-Wahab M, Mostafa M, Sabry M, el-Farrash M, Yousef T. Aflatoxins as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Egypt, Mansoura Gastroenterology Center study. *Hepato-gastroenterology*. 2008;55(86-87):1754-9.
35. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *American family physician*. 2006;74(5):756-62.
36. Ramirez-Bello J, Vargas-Alarcon G, Tovilla-Zarate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gaceta medica de Mexico*. 2013;149(2):220-8.
37. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
38. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
39. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*. 2008;36(Database issue):D154-8.
40. Lawrie CH. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *British journal of haematology*. 2007;137(6):503-12.
41. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):623-31.
42. Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. miRNAs and rheumatoid arthritis - promising novel biomarkers. *Swiss medical weekly*. 2011;141:w13175.

43. Kwak MS, Lee DH, Cho Y, Cho EJ, Lee JH, Yu SJ, et al. Association of polymorphism in pri-microRNAs-371-372-373 with the occurrence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infected patients. *PloS one*. 2012;7(7):e41983.
44. Kim WH, Min KT, Jeon YJ, Kwon CI, Ko KH, Park PW, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene*. 2012;504(1):92-7.
45. Bae JS, Kim JH, Pasaje CF, Cheong HS, Lee TH, Koh IS, et al. Association study of genetic variations in microRNAs with the risk of hepatitis B-related liver diseases. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2012;44(10):849-54.
46. Liu Y, Zhang Y, Wen J, Liu L, Zhai X, Liu J, et al. A genetic variant in the promoter region of miR-106b-25 cluster and risk of HBV infection and hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2012;7(2):e32230.
47. Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Akgollu E, Uskudar O. Genetic variation in the microRNA-499 gene and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population: lack of any association in a case-control study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2011;12(11):3107-12.
48. Xiang Y, Fan S, Cao J, Huang S, Zhang LP. Association of the microRNA-499 variants with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Molecular biology reports*. 2012;39(6):7019-23.
49. Zou HZ, Zhao YQ. Positive association between miR-499A>G and hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2013;14(3):1769-72.
50. Zhou J, Lv R, Song X, Li D, Hu X, Ying B, et al. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. *DNA and cell biology*. 2012;31(4):524-30.
51. Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer research*. 2009;69(3):1135-42.

52. Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(3):897-907.
53. Joseph L. Fleiss BL, Myunghee Cho Paik. *Statistical methods for rates and proportions*. 3 ed: John Wiley & Sons, Inc.; 2003.
54. Nyblom H, Bjornsson E, Simren M, Aldenborg F, Almer S, Olsson R. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(7):840-5.
55. Hu M, Zhao L, Hu S, Yang J. The association between two common polymorphisms in MicroRNAs and hepatocellular carcinoma risk in Asian population. *PloS one*. 2013;8(2):e57012.
56. Yang B, Chen J, Li Y, Zhang J, Li D, Huang Z, et al. Association of polymorphisms in pre-miRNA with inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Human immunology*. 2012;73(1):101-6.
57. Xu Y, Li L, Xiang X, Wang H, Cai W, Xie J, et al. Three common functional polymorphisms in microRNA encoding genes in the susceptibility to hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Gene*. 2013;527(2):584-93.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสาร

1 LB Agar

- Agar 3.75 กรัม
- Yeast Extract 1.25 กรัม
- Tryptone 2.5 กรัม
- NaCl 1.25 กรัม
- น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. LB Broth

- Yeast Extract 0.5 กรัม
- Tryptone 1.0 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. SOC Medium

- Yeast Extract 0.5 กรัม
- Tryptone 1.0 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีและใส่ 2 โมลาร์ของ Mg^{2+} , 2 โมลาร์ Glucose และ 1 โมลาร์ KCl

4. การเตรียม 5X TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)

- Tris 54 กรัม
- Boric Acid 27.5 กรัม
- EDTA 4.16 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

5. การเตรียม 2% (w/v) agarose gel

- Agarose gel 4 กรัม
- 1XTBE 200 มิลลิลิตร

ละลายด้วยความร้อนผสมให้เข้ากันจนกว่า agarose gel

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) : นางสาวพรพิตรา ประเทศรัตน์
 เกิด : 30 มกราคม 2533
 สถานที่เกิด : เชียงใหม่
 E-mail address: pornpitrapie@gmail.com
 ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2551-2554	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน	เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสนอผลงานรูปแบบ proceeding

- หัวข้อ “Single Nucleotide Polymorphisms (rs3756444) on microRNA-499 gene related to development of Hepatocellular carcinoma (HCC) in Thai patients
- ชื่อผู้นิพนธ์ Pornpitra Pratedrat, Jarika Makkoch, Kesmanee Praianantathavorn, Natthaya Chuaypen, Pisit Tangkijvanich, Sunchai Payungporn
- นำเสนองานวิจัยในงานประชุม The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014 “Bridging ASEAN Biochemical Research Communities” วันที่ 2-3 เมษายน 2557 ณ โรงแรม Rama Gardens Hotel & Resort กรุงเทพมหานคร