

การศึกษาระดับซีทีจีเอฟในเลือดและปัจจัยทางพันธุกรรมในผู้ป่วยเด็ก  
โรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย



นางสาวภัทริดา สงวนหมู่

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4297-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SERUM CTGF LEVEL AND POLYMORPHISMS IN THAI CHILDREN WITH BILIARY ATRESIA

Miss Pattaratida Sa-nguanmoo

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2005  
ISBN 974-17-4297-5



ภัทริดา สงวนหมู่ : การศึกษาระดับซีทีจีเอฟในเลือดและปัจจัยทางพันธุกรรมในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย (SERUM CTGF LEVEL AND POLYMORPHISMS IN THAI CHILDREN WITH BILIARY ATRESIA) อ. ที่ปรึกษา : ศ. นพ. ยง ภูววรรณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นพ. ดร.ไพศาล เวชพิพัฒน์, 82 หน้า. ISBN 974-17-4297-5.

Connective tissue growth factor (CTGF) เป็นโปรตีนที่พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับ การเกิดพังผืดโดยพบว่ามี การแสดงออกเพิ่มขึ้นในอวัยวะที่มีการสะสมของพังผืดรวมไปถึงตับด้วย ผู้ป่วย โรคท่อน้ำดีตีบตันภายหลังจากการทำผ่าตัดแบบ Kasai แล้วมีการพัฒนาของพังผืดในตับมีระดับที่ไม่ เท่ากัน single-nucleotide polymorphisms (SNPs) ในบริเวณ promoter ของยีน CTGF ตำแหน่งที่มี transcription factor มาจับได้แก่ -447G>C และ -132C>G อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตันและ การพัฒนาของระดับพังผืดในผู้ป่วยที่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษา polymorphism ใน ตำแหน่งดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 84 คนและกลุ่มควบคุม 142 คน เพื่อศึกษา ความถี่ของ polymorphism และ haplotype ในบริเวณ promoter ของยีน CTGF รวมไปถึงระดับของ ซีทีจีเอฟในเลือดยุบรวมกับระดับความรุนแรงการทำงานของตับในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมในประชากรไทย โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน promoter ของยีน CTGF แล้วนำไปวิเคราะห์ ด้วยวิธี Amplification- refractory mutation systems (ARMS) และ polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP) ทางสถิติทำการตรวจสอบระดับของ CTGF ในเลือดด้วยวิธี Enzyme link Immunosorbent assay (ELISA) ทำการตรวจสอบ Hardy-Weinberg equilibrium ด้วย โปรแกรม SNPAnalyzer วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS และ Epi Info version 6 ผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการตรวจสอบ polymorphisms ในตำแหน่ง -447G>C และ -132C>G พบ polymorphism ใน ประชากรไทยเพียงตำแหน่งเดียวคือ ตำแหน่ง -447G>C พบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญระหว่าง ความถี่ genotype allele และเพศระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุมหรือในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ด้วยกัน สำหรับระดับของ CTGF ในเลือดไม่สามารถตรวจได้เนื่องจากไม่สามารถหาค่าปริมาณโปรตีนที่ แท้จริงได้ทำให้ยากต่อการตรวจด้วยวิธี ELISA จำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมใน การตรวจระดับโปรตีนต่อไป โดยสรุปคือ SNP ใน promoter ของยีน CTGF ตำแหน่ง -447 ไม่มี ความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการทำงานของตับ

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....ภัทริดา สงวนหมู่.....  
 ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อ. ยง ภูว.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4674758030: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: BILIARY ATREISA / CTGF / POLYMORPHISMS/ ARMS / RFLP/ ELISA

PATTARATIDA SA-NGUANMOO : SERUM CTGF LEVEL AND POLYMORPHISMS IN THAI CHILDREN WITH BILIARY ATRESIA. THESIS ADVISOR : PROFESSOR YONG POOVORAWAN, M.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. PAISARN VEJCHAPIPAT, M.D. Ph.D., 82 pp. ISBN 974-17-4297-5.

Connective tissue growth factor (CTGF) is a highly profibrogenic molecule, which is overexpressed in many fibrotic organs, including those of the liver. Biliary atresia (BA) patients who receive Kasai operation have variable fibrosis levels in their livers. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CTGF* gene promoter (-447G>C and -132C>G) may be associated with BA and the variable fibrosis levels in the patients. This study was performed to determine the frequencies of polymorphisms and haplotype in the *CTGF* gene promoter in the Thai population and to investigate the susceptibility of this population to BA. The target fragments of the *CTGF* gene promoter were amplified and analyzed by Amplification- refractory mutation systems (ARMS) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism techniques in 84 BA patients and 142 healthy controls. The test for Hardy-Weinberg equilibrium was performed using HWE program of SNPAnalyzer and statistical analysis was carried out with the SPSS and Epi Info version 6 programs. Two SNPs were genotyped, both of them in the promoter region (-447G>C and -132C>G). There is only one SNP at the position -447 in the Thai population. No significant differences in genotype and allele frequency were observed between BA and controls or with BA subgroups. In this experiment, serum CTGF levels in patients cannot be distinguished from the control group because the system of ELISA technique was not optimized. In conclusion, our population *CTGF* polymorphism at -447G>C is not involved with BA and susceptibility of the host.

Field of study .....Medical Science.....Student's signature.....Pattaratida Sa-nguanmoo  
 Academic year .....2005.....Advisor's signature.....Yong Poovorawan  
 Co-advisor's signature.....Paisarn Vejchapipat

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่มีศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้เปิดโอกาสให้ผู้เขียนได้เข้ารับการศึกษาค้นคว้า ให้ความรู้ ให้ความเมตตา และให้กำลังใจผู้เขียนในขณะที่กำลังศึกษารวมไปถึงขณะทำวิทยานิพนธ์ ผู้เขียนขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.ไพศาล เวชชพิพัฒน์ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์กับผู้เขียน ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวรที่คอยให้ความช่วยเหลือผู้เขียนยามที่ผู้เขียนไปปรึกษาเรื่องการทำให้ ELISA

ผู้เขียนขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบรวมไปถึงพี่ๆน้องๆและเพื่อนที่อยู่ในห้องของอาจารย์ที่ให้กำลังใจให้คำปรึกษาที่มีค่า ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อิศรางค์ นุชประยูรเป็นอย่างสูงที่สละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.สุวรรณา นพพรพันธ์สำหรับ recombinant human CTGF เพื่อใช้ในการตรวจสอบ ELISA ขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆและน้องๆในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทย ในส่วนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ โดยเฉพาะในการพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่และสนับสนุนเงินทุนวิจัยในการศึกษาดังกล่าว

สุดท้ายผู้เขียนขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ที่ให้ความรัก ให้โอกาสในการศึกษา และคอยตักเตือนแนะนำสั่งสอนแต่สิ่งดีๆ รวมไปถึงน้องๆที่คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมาจนผู้เขียนมีวันนี้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
- คำถามของการวิจัย.....	2
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
- สมมติฐาน.....	3
- ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
- การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย.....	3
- กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
- ข้อจำกัดในการวิจัย.....	4
- คำสำคัญ.....	5
- รูปแบบการวิจัย.....	5
- ปัญหาทางจริยธรรม.....	5
- ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
- ระเบียบวิธีวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
- โรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	6
- ยีน CTGF และผลิตภัณฑ์.....	15
- บทบาทของไซโตไคน์ CTGF ในกระบวนการรักษาบาดแผลและการเกิดโรคที่ เกี่ยวข้องกับพังผืด.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
- ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	35

- เครื่องมือ.....	35
- อุปกรณ์.....	35
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	37
- วิธีการดำเนินการวิจัย.....	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	48
- ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ <i>CTGF</i> gene ระหว่างตำแหน่ง -559 ถึง 39.....	50
- ผลการตรวจยืนยันผลของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ <i>CTGF</i> gene.....	48
- ผลการวิเคราะห์ SNP ที่ตำแหน่ง -447G>C ด้วยวิธี ARMS.....	50
- ผลการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อยืนยันผล heterozygous GC และ homozygous GG ของ SNP ตำแหน่ง -447G>C.....	51
- ผลการวิเคราะห์ SNP ที่ตำแหน่ง -132C>G ด้วยวิธี RFLP.....	52
- ผลการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อยืนยันผล homozygous GG ของ SNP -132C>G.....	53
- ผลการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อยืนยันผล sequencing ที่ตำแหน่ง -132 ด้วย RFLP.....	54
- ผลการวัดระดับ CTGF ในเลือดด้วย sandwich ELISA.....	55
- ผลการคำนวณทางสถิติ.....	56
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	58
รายการอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	82



## สารบัญญัตราง

ณ

ตารางที่	หน้า
1	ปัจจัยที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดท่อน้ำดีตีบตันปัจจัยที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดท่อน้ำดีตีบตัน.....10
2	Proposed nomenclature สำหรับ CCN proteins.....15
3	สมาชิก 6 ตัวของ CCN gene family ในมนุษย์และในสัตว์สี่เท้าได้แก่ สัตว์ตระกูล Xenopus จนถึงสัตว์ตระกูล Rodent.....16
4	การแสดงออกอย่างมากของ CTGF ในโรคต่างๆที่มีรายงานไว้.....25
5	ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์.....41
6	reaction mixture สำหรับ PCR ตำแหน่งระหว่าง -559 ถึง 39.....41
7	รอบปฏิกิริยาสำหรับตำแหน่งระหว่าง -559 ถึง 39.....42
8	ส่วนประกอบของ PCR สำหรับตำแหน่งที่ -447G>C.....42
9	รอบปฏิกิริยาสำหรับตำแหน่ง -447G>C.....42
10	reaction mixture ของ RFLP สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง -132C/G.....43
11	sequencing mixture สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส.....45
12	CTGF genotypic และ allele distribution ณ ตำแหน่ง -447G>C ในผู้ป่วย BA และกลุ่มควบคุม.....56
13	CTGF genotypic และ allele distribution ณ ตำแหน่ง -447G>C ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันแบบ without jaundice และ persistent jaundice .....56

## สารบัญญภาพ

ญ

ภาพที่		หน้า
1	ปัจจัย 4 ประการที่คาดว่าเมื่อมีปฏิสัมพันธ์กันแล้วจะทำให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	9
2	ชื่อและการจัดเรียงโครงสร้างของสมาชิกทั้ง 6 ตัวของ CCN family.....	17
3	ภาพของ human CTGF gene promoter แสดงส่วน control element.....	18
4	ผลการศึกษาลำดับเบสของ human CCN2 (CTGF) promoter.....	20
5	โครงสร้างการจัดเรียงตัวของยีน CTGF.....	21
6	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CTGF แต่ละ species.....	22
7	กระบวนการการเกิดพังผืด.....	27
8	ตำแหน่งการจัดเรียงตัวของเซลล์ชนิดต่างๆภายในตับปกติ.....	28
9	subendothelial ระหว่าง stellate cell ถูกกระตุ้น.....	29
10	การกระตุ้น stellate cell เมื่อตับได้รับบาดเจ็บ.....	30
11	ความเกี่ยวข้องของ transforming growth factor- $\beta$ และ Smad ในการกระตุ้นการ แสดงออกของยีนคอลลาเจน.....	32
12	การผลิต CTGF และการแสดงบทบาทของ CTGF ในการสร้างพังผืดในตับ.....	33
13	ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณ -559 ถึง 39 ของ CTGF gene.....	48
14	ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast.....	49
15	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ขนาด 250 bp จากตัวอย่าง ที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ CTGF gene กับ Human DNA sequence จาก clone RP11-6918.....	49
16	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ขนาด 250 bp จากตัวอย่าง ที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ CTGF gene กับ Homo sapiens connective tissue growth factor gene, promoter และบางส่วนของารถอดรหัส.....	50
17	รูปแบบการตรวจสอบ SNPs บริเวณ -447G>C ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี ARMS..	51
18	ภาพ chromatogram ที่ได้รับจาก automated sequencing.....	52
19	ภาพแสดงผลจากการย่อยด้วยเอนไซม์ BstUI.....	53
20	ผลการตรวจด้วยวิธี direct sequencing บริเวณ -132.....	53
21	ผลการตรวจสอบด้วย RFLP โดยใช้ HpaII.....	54
22	ผลการวัดค่าความเข้มแสงในความเข้มข้นของโปรตีนระดับที่แตกต่างกัน.....	55
23	ระดับซีรัม CTGF ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี.....	61

## คำย่อ

## คำย่อ

BA  
BLAST  
bp  
C-terminal  
CMV  
CTGF  
CYR61  
DNA  
dNTP  
ECM  
EDTA  
ELISA  
EST  
FAK  
h  
HGF  
HSC  
HSPG  
HUVEC  
HWE  
IGFBP  
LRP  
MCP  
MMP  
mRNA  
NOV  
OR  
PCR  
PDGF  
r

## ความหมาย

biliary atresia  
basic local alignment search tool  
base pair  
carboxy-terminal  
cytomegalovirus  
connective tissue growth factor  
cysteine rich  
deoxynucleic acid  
deoxyribonucleotide triphosphate  
extracellular matrix  
ethylene diamine tetraacetic acid  
enzyme-linked immunosorbent assay  
expressed sequence tag  
focal adhesion kinase  
human  
Hepatocyte growth factor  
hepatic stellate cells  
heparan sulfate proteoglycan  
human umbilical endothelial cells  
Hardy-Weinberg equilibrium  
insulin growth factor binding protein  
low density lipoprotein receptor-related protein  
monocyte chemo-attractant protein  
matrix metalloproteinase  
messenger ribonucleic acid  
nephroblastoma overexpressed  
odd ratio  
polymerase chain reaction  
platelet derived growth factor  
recombinant

**คำย่อ****คำย่อ**

RNA

RT

SD

SNP

TGF- $\beta$ 

TIMP

TSP

VEGF

VWC

WISP

**ความหมาย**

ribonucleic acid

reverse transcription

standard deviation

single nucleotide polymorphism

transforming growth factor- $\beta$ 

tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

thrombospondin repeat

vascular endothelial growth factor

von Willebrand type IC repeat

Wnt-induced secreted protein



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia) หรือ BA (OMIM 210500) เป็นกลุ่มอาการคั่งของน้ำดีที่เกิดในทารกอันเนื่องมาจากการตีบตันในบางส่วนหรือทั้งหมดของท่อน้ำดี [1-3] และเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด ซึ่งการตีบตันของท่อน้ำดีทำให้เกิดการคั่งของน้ำดี (cholestasis) และการคั่งของน้ำดีที่เกิดขึ้นนี้ก่อให้เกิดพังผืดขึ้นในตับ [4] หากปล่อยทิ้งไว้หรือไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องจะพัฒนาต่อไปสู่ภาวะตับแข็ง ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตภายในขวบปีแรกและโดยมากจะเสียชีวิตทั้งหมดภายในอายุ 7 ปี [5] ผู้ป่วยแสดงอาการตัวเหลืองตาเหลือง (jaundice) อุจจาระมีสีซีด ปัสสาวะมีสีเข้ม เนื่องจากมีการสะสมของบิลิรูบิน (bilirubin) ในเลือด สำหรับอาการที่ปรากฏร่วมกัน ได้แก่ อาการตับโต น้ำหนักลด โดยแปรตามลักษณะของอาการตัวเหลืองตาเหลืองที่เพิ่มขึ้น ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในระยะแรกจะได้รับการผ่าตัดแบบคาสาย (Kasai portoenterostomy) หากการดำเนินโรคยังไม่ดีขึ้นจะได้รับการแนะนำให้เปลี่ยนตับ (liver transplants) ต่อไป ซึ่งอัตราการอยู่รอดภายหลังการผ่าตัดเปลี่ยนตับในปัจจุบันอยู่ที่ 90% [6]

ตัวเลขรายงานอุบัติการณ์การเกิดโรคในเด็กแรกเกิดมีชีพของประเทศต่างๆ ที่แสดงไว้เช่น ประเทศฝรั่งเศส (1:19,500) ประเทศอังกฤษรวมทั้งเครือจักรภพ (1:16,700) ประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศสวีเดน (1:14,000) [7-10] แสดงให้เห็นว่าโรคนี้เป็นโรคที่ค่อนข้างพบน้อยและแม้ว่าจะได้รับการศึกษาค้นคว้าอย่างจริงจังแล้วก็ตามขณะนี้ก็ยังไม่มีความเข้าใจที่ชัดเจนว่าอะไรคือสาเหตุของการเกิดโรคที่แน่นอน อีกทั้งยังไม่สามารถหา animal model ที่เหมาะสมต่อโรคได้ ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้ความเข้าใจถึงกระบวนการในการเกิดโรคเป็นไปอย่างล่าช้า มีสมมติฐานมากมายที่พยายามอธิบายถึงสาเหตุของการเกิดโรค โดยทั่วไปมี 2 สมมติฐาน สมมติฐานแรกคาดว่าเกิดจากผลของ ductal plate malformations ที่เกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาระดับ และสมมติฐานที่สองคาดว่าเกิดจากกระบวนการของการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกัน [11] โดยสมมติฐานสุดท้ายนี้อาศัยหลักฐานทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) และวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) มาสนับสนุน

และแม้ว่าผู้ป่วยทุกคนจะได้รับการผ่าตัดแบบคาสายแล้วก็ตามผู้ป่วยในแต่ละคนก็มีการพัฒนาของพังผืดในตับที่ระดับไม่เท่ากัน Connective tissue growth factor (CTGF) เป็นโปรตีนที่ได้รับการศึกษาและพบว่าอาจเป็นกุญแจสำคัญต่อการพัฒนาพังผืด (fibrosis) และกระบวนการซ่อมแซมของผิวหนัง (wound repair) [12] จากการศึกษาวิจัยพบอีกว่า CTGF

แสดงออกอย่างชัดเจน (over expressed) ในแผลเป็นที่มีลักษณะเป็นพังผืดในอวัยวะต่างๆรวมไปถึงตับด้วย [13]

มีผู้ศึกษาในบริเวณ promoter ของยีน *connective tissue growth factor* พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphisms) ทั้งในบริเวณที่มี transcription factor มาจับและไม่ใช่โดยคาดว่า polymorphisms ในบริเวณที่มี transcription factor มาจับอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดพังผืดได้ [14,15] อย่างไรก็ตามการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ทั้งหมดเป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีความแตกต่างกับประชากรในประเทศไทย ผลที่ได้ อาจมีความแตกต่างกัน อีกทั้งยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษา polymorphisms ในบริเวณ promoter ของยีน *connective tissue growth factor* ในกลุ่มของเด็กไทยที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันมาก่อน เป็นไปได้ว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกันระหว่าง polymorphisms ในส่วน promoter ของยีนกับการเกิดโรคและระดับพังผืดที่ต่างกันของผู้ป่วยแต่ละบุคคล วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือเพื่อที่จะหาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphisms ในบริเวณ promoter ของยีน *CTGF* กับการเกิดโรค ระดับของ *CTGF* ในเลือด และระดับของพังผืดในตับโดยใช้การทำงานของตับเป็นตัวบ่งบอกในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันภายหลังจากการได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ

### คำถามของการวิจัย

1. ความแตกต่างทางพันธุกรรม (SNPs) ในส่วน promoter ของยีน *CTGF* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือไม่
2. ความแตกต่างทางพันธุกรรม (SNPs) ในส่วน promoter ของยีน *CTGF* มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการทำงานของตับในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันภายหลังจากผ่าตัดคาไซหรือไม่
3. ระดับ *CTGF* ในเลือดมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการทำงานของตับในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันภายหลังจากผ่าตัดคาไซหรือไม่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *CTGF* กับการเกิดโรค ระดับ *CTGF* ในเลือด และระดับความรุนแรงของการทำงานของตับในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน

## สมมติฐาน

1. ความแตกต่างทางพันธุกรรม (SNPs) ในส่วน promoter ของยีน *CTGF* เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน
2. ความแตกต่างทางพันธุกรรม (SNPs) ในส่วน promoter ของยีน *CTGF* ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกับผู้ป่วยที่ไม่มีความรุนแรงของโรค
3. ระดับ *CTGF* ในเลือดของผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่ากลุ่มควบคุม

## ข้อตกลงเบื้องต้น

กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 2 กลุ่ม 1) กลุ่มที่ทำการศึกษา (Case) คือ กลุ่มเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้มาทำการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร 2) กลุ่มควบคุม (Control) เป็นกลุ่มเด็กสุขภาพดีที่ไม่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มสตรีมีครรภ์ที่มารับการฝากท้องที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ระดับพังผืดในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะใช้ค่า Total bilirubin (TB) เป็นตัวแบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่มคือ no jaundice ( $TB < 2.0$  mg/dl) และ persistent jaundice ( $TB \geq 2.0$  mg/dl)

เนื่องจากอุบัติการณ์โรคท่อน้ำดีตีบตันในเชื้อชาติต่างๆไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจึงไม่มีการแยกเชื้อชาติโดยผู้ป่วยทุกรายเกิดในประเทศไทย

## การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

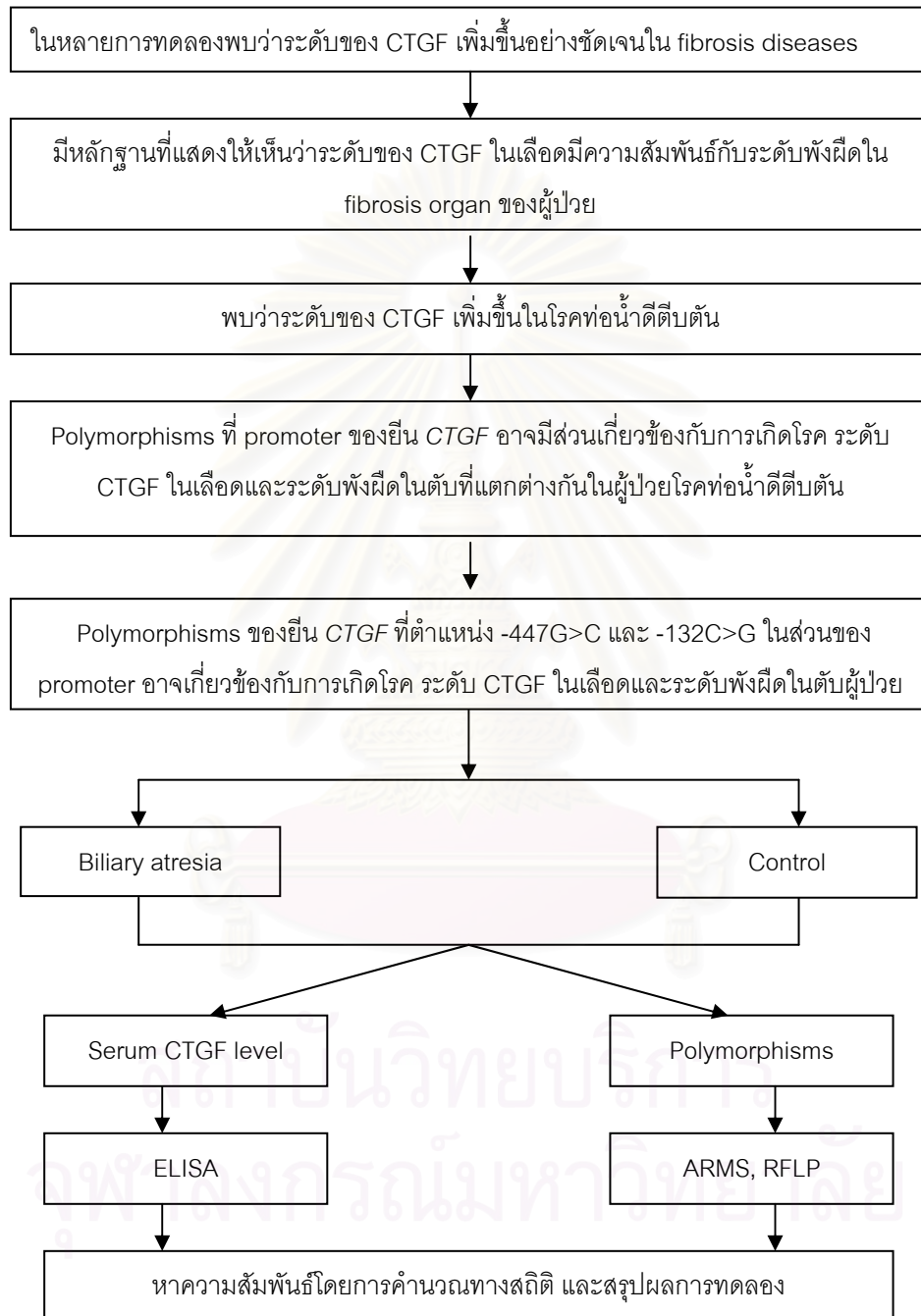
Polymorphisms ในบริเวณ promoter ของยีน *CTGF* ที่จะทำการศึกษามี 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง -447G>C จะทำการศึกษาโดยใช้ ARMS-PCR และในตำแหน่ง -132 C>G จะทำการศึกษาโดยใช้ RFLP

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ศึกษาทั้ง genotype และ haplotype ในส่วนของ genotype นั้น polymorphism สำหรับ -447G>C จะเขียนในรูปของ -447GG, -447GC, และ -447CC ในขณะที่ genotype ในตำแหน่ง -132C>G จะเขียนในรูปของ -132CC, -132CG และ -132GG ในกรณีของ genotype combination สำหรับ -447G>C และ -132C>G จะใช้เครื่องหมาย "/" ยกตัวอย่างเช่น -447GC/-132CG แสดงให้เห็นว่าบุคคลนั้นมี polymorphism เป็นแบบ -447GC ร่วมกับ -132CG ในขณะที่ -447GG/-132GG อธิบายได้ว่าบุคคลนั้นมี polymorphism เป็นแบบ -447GG ร่วมกับ -132GG

สำหรับ haplotype จะใช้เครื่องหมาย "-" ยกตัวอย่างเช่น G-C/C-G หมายความว่า 1 allele มี G และ C ที่ตำแหน่ง -447 และ -132 ในขณะที่อีก allele ประกอบด้วย C ที่ตำแหน่ง

nucleotide -447 และ G ที่ตำแหน่ง nucleotide -132 และหากกล่าวถึงเพียง 1 allele จะใช้ G-C แสดงว่า allele นั้นมี G ที่ nucleotide -447 และ C ที่ nucleotide -132

### กรอบแนวความคิดในการวิจัย



### ข้อจำกัดในการวิจัย

ไม่สามารถคำนวณจำนวนประชากรที่จะใช้ในการทดลองได้เนื่องจากไม่มีการศึกษาอื่นในกลุ่มประชากรไทยมาก่อน

ปัญหาด้านลิขสิทธิ์ของสารที่นำมาทำการพัฒนาชุด ELISA



## คำสำคัญ

CTGF, Biliary atresia, Polymorphisms, ARMS, RFLP, ELISA

## รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Case-control study

## ปัญหาทางจริยธรรม

โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และก่อนการทำการเจาะเลือดในผู้ป่วยท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมได้อธิบายจุดมุ่งหมายการศึกษาและขออนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร

## ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphisms ของยีน CTGF ในส่วนของ promoter กับการเกิดโรค ระดับ CTGF ในเลือดและการทำงานของตับที่เกี่ยวข้องกับระดับพังผืดในตับโดยใช้ liver function test เป็นตัวกำหนดระดับความรุนแรงของโรค การทราบการทำงานของ CTGF กับความรุนแรงจะสามารถใช้เป็นตัวบอกรายการพยากรณ์ของโรค รวมทั้งแนวทางการรักษา ป้องกันการเกิดพังผืดในอนาคต

## ระเบียบวิธีวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 กลุ่มผู้ป่วย (case) คือ กลุ่มเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร

1.2 กลุ่มควบคุม (control) คือกลุ่มเด็กสุขภาพดีที่มารับวัคซีนและกลุ่มสตรีที่มารับการฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร

### 2. ขั้นตอนในการศึกษา

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

2.2 การสกัด DNA และการเก็บ serum

2.3 การเพิ่มจำนวน DNA

2.4 การตรวจสอบ polymorphism โดยใช้ ARMS และ Restriction Fragment length polymorphism

2.5 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้ Agarose gel electrophoresis

2.6 Enzyme Link Immunosorbent Assay

2.7 การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia; BA)

##### ความเป็นมา

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia หรือ BA) (OMIM 210500) เป็นกลุ่มอาการคั่งของน้ำดีในวัยแรกเกิด สาเหตุการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด โรคนี้มีการตีบตันของท่อน้ำดีในส่วน of extrahepatic bile duct [16] รูปแบบของการเกิดท่อน้ำดีตีบตันแบ่งออกตามระยะการแสดงผลอาการได้เป็น 2 แบบ คือ [17]

(1) Non-syndromic BA หรือ postnatal form มีประมาณ 80% ของผู้ป่วย อาการเกิดขึ้นในระยะ 3 ถึง 6 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด โดยก่อนหน้านี้นี้เด็กมีลักษณะปกติและจะค่อยๆมีอุจจาระสีซีดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงเป็นนัยให้เห็นว่าอาจเกิดจากการที่เด็กได้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก

(2) Syndromic BA หรือ fetal/embryonic form มีประมาณ 20% ของผู้ป่วย อาการของโรคเกิดภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด คาดว่าเกิดเนื่องจากความผิดปกติที่เป็นมาแต่กำเนิดอันเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น polysplenia, cardiac หรือ intra abdominal defects (situs inversus, pre-duodenal portal vein, absence of retro-hepatic inferior vena cava, intestinal malrotation, annular pancreas)

##### พยาธิวิทยา

พยาธิวิทยาของ extrahepatic biliary system มีความหลากหลายอย่างมากในกลุ่มผู้ป่วยแต่สามารถจำแนกโดยใช้ตำแหน่งการตีบตันเป็นพื้นฐานในการแยกทำให้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ [7]

Type I: Common bile duct atresia ชนิดที่มีการตีบตันบริเวณ common duct ในขณะที่ proximal ducts ปกติ เป็นการตีบตันเฉพาะส่วนปลายของท่อน้ำดี

Type II: Common hepatic duct atresia ชนิดที่มีการตีบตันของ hepatic duct และพบ cystic structures ในบริเวณ porta hepatitis เป็นการตีบตันเฉพาะส่วนต้นของท่อน้ำดี

Type III: Common bile duct รวมทั้ง right และ left hepatic duct atresia (>90% ของผู้ป่วย) มีการตีบตันบริเวณ right และ left hepatic ducts ไปจนถึง porta hepatitis เป็นการตีบตันตลอด extrahepatic bile duct

## ลักษณะทางคลินิก

ลักษณะทางคลินิกของโรคท่อน้ำดีตีบตันผู้ป่วยจะมีอาการที่เรียกว่า jaundice กล่าวคือผู้ป่วยจะมีตัวเหลืองและบริเวณตาขาวมีสีเหลือง อาการตัวเหลืองตาเหลืองในเด็กเกิดใหม่ถือว่าเป็นเรื่องพบได้บ่อย และเด็กสามารถหายเหลืองได้ภายใน 2 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด อย่างไรก็ตาม ถ้าสาเหตุของอาการตัวเหลืองตาเหลืองมาจากการเกิดโรคตับอาการเหล่านี้จะไม่หายไป นอกจากนี้ยังมีอาการอื่นๆ ได้แก่ ปัสสาวะมีสีเข้มและอุจจาระมีสีซีด แต่อาการเหล่านี้ก็ไม่ได้เป็นอาการที่บ่งบอกแน่ชัดว่าผู้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน จำเป็นที่จะต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างละเอียดต่อไป

## ความถี่ (Frequency)

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบได้น้อยโดยจะพบในอัตราส่วนประมาณ 1 ต่อ 10,000 ถึง 20,000 ของเด็กแรกเกิดมีชีพ มีรายงานถึงอุบัติการณ์ในการเกิดโรค BA ไว้ในหลายแห่งด้วยกันเช่น 5/100,000 ในประเทศเนเธอร์แลนด์ [18] 5.1/100,000 ในประเทศฝรั่งเศส [19] 6.5 /100,000 ในรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา [20] 7/100,000 ในรัฐวิกตอเรีย ประเทศออสเตรเลีย [21] 7.4/100,000 ในประเทศญี่ปุ่น [22] และจากการศึกษา time- และ space - time distribution ของโรค BA พบว่าโรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกๆฤดูกาลแต่การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่จำกัด [20,21]

## เชื้อชาติ (Race)

โรคท่อน้ำดีตีบตันพบได้ทุกเชื้อชาติ

## เพศ (Sex)

พบได้ทั้งสองเพศบางรายงานพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย

## อายุ (Age)

เกิดเฉพาะในช่วงแรกเกิดเท่านั้น โดยแบบ fetal/ perinatal form จะเกิดภายใน 2 สัปดาห์แรก และแบบ postnatal form จะเกิดภายใน 2-8 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด

## การตาย (Mortality / Morbidity)

อัตราการมีชีวิตรอดในระยะยาวภายหลังจากการได้รับการผ่าตัดแบบคาโชอยู่ที่ 47-60% ภายใน 5 ปีและ 25-35% ภายใน 10 ปี สำหรับผู้ที่ได้รับการผ่าตัดแบบคาโชแล้วอาจมีอาการข้างเคียงได้แก่ cholangitis (50%) และ portal hypertension (>60%) มีเด็กจำนวนหนึ่งประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยทั้งหมดซึ่งภายหลังจากการได้รับการผ่าตัดแบบคาโชแล้วน้ำดียังไม่สามารถไหลผ่านไปได้ ตับของผู้ป่วยเด็กเหล่านี้อาจมีการพัฒนาไปเป็นตับแข็งภายในช่วงปีแรก

ของชีวิต ผู้ป่วยที่มีอาการตับแข็งยังมีความเสี่ยงที่จะพัฒนาต่อไปเป็นมะเร็งตับ (Hepatocellular Carcinoma) วิธีเดียวที่สามารถจะทำให้เด็กมีอายุยืนยาวต่อไปได้ก็คือการผ่าตัดเปลี่ยนตับ

### การวินิจฉัย (Diagnosis)

การวินิจฉัยประกอบด้วยการทำ HIDA scan (การฉีดสารรังสีแล้ว scan ตับ) เพื่อประมาณการไหลของน้ำดี การทำ abdominal x-ray เพื่อตรวจดูตับและม้าม การทำ liver biopsy เพื่อประมาณระดับการเกิดภาวะตับแข็ง หรืออาจใช้วิธีการอื่นทางห้องปฏิบัติการทดแทนเพื่อหาสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองตาเหลือง โดยทั่วไปจะใช้วิธีการที่เรียกว่า serum fractionated bilirubin assay โดยค่าที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ก็คือค่าที่มีค่ามากกว่า 2 mg/dl (34.2  $\mu$ mol/l) ของ total bilirubin เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ค่านี้ใช้เป็นบรรทัดฐานในการตรวจวินิจฉัย เป็นตัวช่วยให้มีการตรวจอย่างอื่นและเป็นตัวตัดสินในการเลือกวิธีการรักษา ค่านี้ได้กำหนดและแนะนำให้ใช้โดยศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทาง (centers of excellence) [23] อย่างไรก็ตามการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมดไม่สามารถที่จะบอกได้อย่างถูกต้องแน่นอน การตรวจวินิจฉัยที่ดีที่สุดคือการทำ intraoperation cholangiography

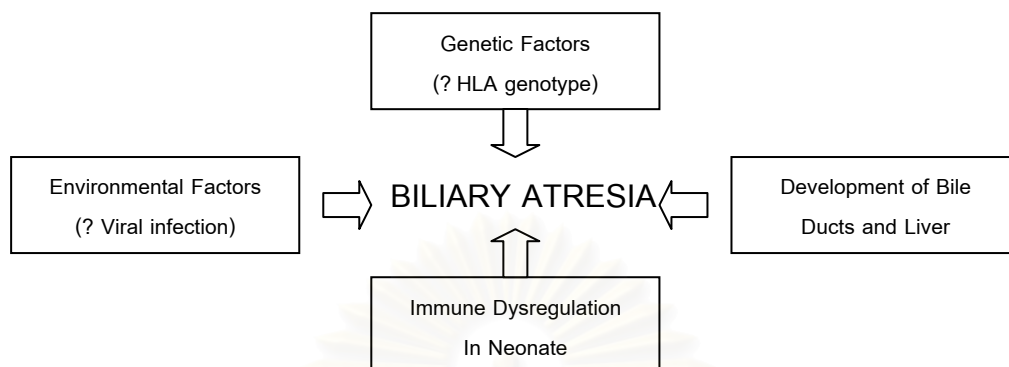
### การรักษา (Treatment)

ผู้ป่วยเด็กที่ไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดภาวะตับวาย (liver failure) ภายใน 1 หรือ 2 ปี การจัดการเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบันมี 2 ขั้นตอนด้วยกัน ในช่วงแรกเกิดผู้ป่วยจะได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อที่จะขจัดน้ำดีที่มีการสะสมอยู่ในตับให้ไหลออกไปทางลำไส้ (intestine) การผ่าตัดได้เกิดขึ้นในช่วงปลายปี ค.ศ.1959 นพ.Morio kasai ศัลยแพทย์ชาวญี่ปุ่นได้รายงานว่าเขาได้ทำการตรวจทาง microscopic ที่ท่อน้ำดีของเด็กทารกที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันทำให้พบว่ามี channel ที่บริเวณ porta hepatic เป็นจำนวนมาก การเปิด channels เหล่านี้โดยการใช้การผ่าตัดเอาส่วนของ extrahepatic biliary ที่เกิดการตีบตันออกก็จะส่งผลให้มีการระบายน้ำดีให้ซึมออกไปได้ การผ่าตัดนี้จะส่งผลดีต่อเด็กโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากได้รับการผ่าตัดภายใน 8 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด การผ่าตัดแบบคาไซนี้ปัจจุบันได้รับการยอมรับว่าเป็นการผ่าตัดที่ใช้เป็นมาตรฐานในการรักษาอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน 2) ขั้นตอนที่ 2 ทำการเปลี่ยนตับซึ่งใช้ในกรณีที่การรักษาการผ่าตัดแบบคาไซล้มเหลวเป็นการแก้ปัญหาการคั่งของน้ำดีที่เกิดร่วมกับการเกิดภาวะตับแข็ง

### สาเหตุการเกิดโรค (Etiology)

ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด จากการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เชื่อว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเกิดจากปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอกกรรมกัน รวมไปถึงปัจจัยก่อนคลอดและหลัง

คลอด โดยเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจงในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม คือระหว่างช่วงก่อนคลอดไปจนถึงเด็กอายุได้ 3 เดือนนับตั้งแต่แรกคลอด ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปัจจัย 4 ประการที่คาดว่าเมื่อมีปฏิสัมพันธ์กันแล้วจะทำให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน [24]

โรคท่อน้ำดีตีบตันไม่จัดว่าเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรม เนื่องจากการศึกษา identical twins แบบ discordant ในหลายการศึกษาพบว่าเพียง 1 ใน 2 คนเท่านั้นที่เป็นโรคนี้ (discordant) อีกทั้งการเกิดซ้ำของโรคนี้ในครอบครัวเดียวกันเป็นไปได้ยากมาก [25,26] สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาในแฝด 8 รายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยการผ่าตัดตรวจท่อน้ำดี พบว่าผู้ป่วยทุกรายที่เป็นแฝดจะเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันเพียงคนเดียว (discordant) โดยที่แฝดอีกคนปกติดี ในจำนวนนี้แฝด 1 คู่เป็นแบบ dizygotic twin แฝดอีก 6 คู่พบว่ามีหมู่เลือด ABO หมู่เดียวกัน และในจำนวนนี้ 2 คู่พบว่ามีหมู่เลือด minor ที่เหมือนกัน (Dec, MM และ Le a-b-) ทารกคู่สุดท้ายได้พิสูจน์โดยใช้ Short tandem repeat (STR) ในพ่อ แม่ และแฝด พบว่าแฝดทั้งสองรายนี้น่าจะเป็น monozygotic twin (โอกาส > 99.99%) ทำให้สนับสนุนว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่เกิดขึ้นหลังคลอดมากกว่าที่จะเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยตรง [27]

ทฤษฎีเกี่ยวกับสาเหตุการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยสรุปในปัจจุบันมี 6 ทฤษฎี ดังแสดงในตารางที่ 1

**Viral Infection** จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่ามีความเป็นไปได้ว่าสาเหตุการเกิดโรคน่าจะมาจากการติดเชื้อหรือการได้รับการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน infectious agent [9] ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาโดยการทดลองให้ virus infection เข้าไปในหนูที่เพิ่งเกิดใหม่พบว่าหนูสร้าง lesion ที่คล้ายคลึงกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [28] ในปี ค.ศ. 1974 Benjamin Landing นักพยาธิวิทยาโรคเด็ก ได้เสนอโรคท่อน้ำดีตีบตัน โรค idiopathic neonatal hepatitis และโรค choledochal cyst น่าจะเป็นกลุ่มอาการของโรคที่มีผลจากการได้รับการบาดเจ็บที่บริเวณ hepatobiliary tree ที่แตกต่างกัน และเป็นคนแรกที่บัญญัติคำว่า infantile

**ตารางที่ 1** ปัจจัยที่คาดว่าจะน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดท่อน้ำดีตีบตัน [24]

---

Infectious: reovirus, rotavirus, retrovirus, cytomegalovirus, human papilloma virus
Immune dysregulation
Autoimmune mechanism
Vascular lesion/ateriopathy
Defective morphogenesis
Inherited mutations
Laterality genes (presumed), associated with polysplenia and asplenia syndromes (e.g. <i>CFC1</i> )
Ductal plate malformation (e.g. <i>HNF6</i> )
<i>Jagged 1</i>
Somatic mutations
Modifier genes
Toxin exposure

---

obstructive cholangiopathies [29] แม้ว่า Landing จะเสนอว่าสาเหตุของโรคน่าจะเกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบบ แต่จากการศึกษาอีกลงไปแล้วพบว่าไวรัสตับอักเสบบทั้ง เอ บี และ ซี ไม่มีความสัมพันธ์กับโรคท่อน้ำดีตีบตัน ในปัจจุบันจึงมุ่งศึกษาไปที่ไวรัสอื่นอีก 5 ชนิด

ในหลายปีมานี้ cytomegalovirus (CMV) ได้ถูกคาดหมายว่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเพราะพบเด็กที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในอัตราส่วนที่มากเมื่อเทียบกับเด็กที่มีสุขภาพดี [30] รวมทั้งการศึกษาในประเทศไทยได้ผลเช่นเดียวกัน (ข้อมูลที่ไม่ได้ลงพิมพ์) ปัจจุบันการศึกษาของประเทศสวีเดนพบ CMV antibodies ในแม่ของผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน และพบ DNA ของ CMV ในตับของผู้ป่วยครึ่งหนึ่งของจำนวนผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคในประเทศแคนาดา แต่ก็ไม่สามารถจะแสดงให้เห็นได้ว่ามี CMV อยู่ใน bile duct ของเด็ก [31] บทบาทของ CMV ยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไป

ไวรัสอีกสองชนิดที่ได้รับความสนใจได้แก่ reovirus และ rotavirus สาเหตุที่ reovirus ได้รับความสนใจเนื่องจากการสังเกตและพบว่ามีการติดเชื้อของไวรัสชนิดนี้แล้วทำให้เกิดอาการของโรคบริเวณ intrahepatic และ extrahepatic bile duct รวมทั้งตับซึ่งคล้ายคลึงกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [32] lesions ที่เกิดขึ้นนี้จะยังคงติดอยู่ต่อไปภายหลังจากการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าจะตรวจไม่พบแอนติเจนของไวรัสแล้วก็ตาม มีคณะนักวิจัยคณะหนึ่งได้ทำการทดลองแล้วตรวจพบว่าพบแอนติเจนของ reovirus ที่บริเวณ bile duct remnants จากเด็กที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน [33,34] และพบในลูกลิง rhesus เช่นเดียวกัน [35] อย่างไรก็ตาม Steele และคณะ [36] ได้ทำการตรวจหา reovirus RNA ในเนื้อเยื่อตับที่ถูก fix ด้วยฟอร์มาลีนในผู้เด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จำนวน 14 คน และกลุ่มควบคุมอีก 16 คน โดยใช้ nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) แต่ตรวจไม่พบ ผลของการศึกษาที่แตกต่างกันนี้อาจจะเป็นผลมาจากวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อ วิธีการสกัด RNA และการใช้ PCR primers ที่ตรวจสอบ reovirus genes ที่แตกต่างกัน ถ้า reovirus มีความเกี่ยวข้องจริง ก็ต้องจัดวิธีการศึกษาให้มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด รวมทั้งต้องมีการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการของโรคที่เด่นชัดและกลุ่มควบคุมที่สุขภาพดีในปริมาณที่มากพอด้วย

Riepenhoff-Talty และคณะ นำ rotavirus group A ฉีดเข้าไปให้เกิดการติดเชื้อกับหนูเกิดใหม่พบว่าเกิดการตีบตันของ extrahepatic bile duct ที่มีลักษณะทางเนื้อเยื่อเหมือนกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [37] หลังจากการทดลองนี้แล้วกลุ่มศึกษานี้ได้นำเอาเนื้อเยื่อส่วน hepatobiliary tissues จากผู้ป่วยมาตรวจสอบ rotavirus group C โดยใช้วิธี RT-PCR พบว่า 10 จาก 18 รายในผู้ป่วยตรวจพบ RNA ของไวรัสชนิดนี้ ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ป่วยจำนวน 12 รายตรวจไม่พบเลย [38] ทางกลุ่มของ Bobo และคณะ [39] ได้ตรวจหา RNA ของ rotavirus group A B และ C จากเนื้อเยื่อผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 10 คน และ กลุ่มควบคุม 14 คน ด้วยวิธี nested RT-PCR/ enzyme immunoassay แต่ตรวจไม่พบ อย่างไรก็ตามครึ่งหนึ่งของกลุ่มผู้ป่วยมีอายุมากกว่า 12 เดือนแล้วในขณะที่นำเอาเนื้อเยื่อออกมา

ในประเทศอาเจนตินามีการศึกษา Human papilloma virus (HPV) ในเนื้อเยื่อตับผู้ป่วยจำนวน 18 คน โดยวิธี PCR ตรวจพบว่าผู้ป่วยมีไวรัสจำนวน 16 คน ในขณะที่กลุ่มควบคุมตรวจไม่พบ [40] แต่จากการตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกันนี้ของ Domiati-Saad และคณะในประเทศสหรัฐอเมริกาโดยใช้ผู้ป่วยจำนวน 19 คนกลับตรวจไม่พบไวรัสชนิดนี้ [41]

**Immune injury** Schreiber และ Kleinman [42] ได้เสนอแนวคิดว่าบริเวณ biliary epithelium หากมีการติดเชื้อไวรัสหรือได้รับสารพิษก็จะนำไปสู่การแสดงออกของแอนติเจนที่บริเวณ bile duct epithelia ขึ้น เหตุการณ์เหล่านี้เกิดขึ้นจากการ present ของ macrophage ต่อ T lymphocyte เป็นเหตุให้เกิด epithelial injury การมี innate และ acquired immunity ที่เกิดในเด็กทารกแรกเกิดนี้อาจอธิบายได้ว่าทำไมโรคนี้จึงเกิดภายใน 3 เดือนแรกของชีวิต ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง immune regulatory protein ที่ควบคุมเกี่ยวกับ susceptibility ของ immune หรือ autoimmune injury ในโรคท่อน้ำดีตีบตันมีหลายตัวด้วยกัน โดยทั่วไปในโรคที่เกี่ยวข้องกับ immune-mediated liver disease อย่างเช่น autoimmune hepatitis, primary sclerosing cholangitis และ primary biliary cirrhosis พบว่าเกี่ยวข้องกับ specific HLA antigens [43] Silviara และคณะ ได้เสนอว่าในประชากรชาวยุโรป HLA-B12 และ haplotypes A9-B5 และ A28-B35 มีความเกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน (49% ของผู้ป่วย biliary atresia และ 23% ในกลุ่มควบคุม) ในขณะที่ญี่ปุ่นมีความสัมพันธ์เป็นแบบ A33, B44 และ DR6 [44] แต่ในประเทศสเปนไม่พบ

ความสัมพันธ์ของ HLA กับผู้ป่วย BA ทั้งหมดจำนวน 48 คนเลย [45] แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การศึกษาจีโนมของ MHC I และ II ยังไม่สมบูรณ์ทั้งหมด มียีน HLA กว่า 100 ยีนใน human MHC genome เป็นไปได้ว่าอาจจะพบความสัมพันธ์ของ HLA ตัวอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับโรคก็เป็นได้

**Autoimmunity** โรคท่อน้ำดีตีบตันอาจเป็นผลมาจากกระบวนการ autoimmune-mediated process มีการทดลอง 2 การทดลองด้วยกันที่ทำการทดสอบ autoantibodies ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน Vasiliasukas และคณะ [46] รายงานว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 10 คน จาก 11 คน ตรวจพบ serum IgG และ IgM antinutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) เป็นบวก และมีระดับของ IgM-ANCA ในกลุ่มผู้ป่วยอยู่ในระดับสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเด็กและผู้ใหญ่ที่ป่วยด้วยโรคตับอื่นๆ Burch และคณะ [47] ศึกษา autoantibodies ในแม่ของเด็กที่ป่วยด้วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อทดสอบสมมติฐานที่การถ่ายทอด autoantibodies จากแม่ไปสู่ลูกอาจจะเกี่ยวข้องกับ liver และ bile duct injury จากการศึกษพบว่า titer ของ anti-Rho antibodies ในแม่ที่มีลูกป่วยด้วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีอยู่ในระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่ง Rho protein เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด actin organization, gene expression และ cell cycle progression โดยพบว่าการมี titer ของ anti-Rho antibodies อยู่ในระดับต่ำนี้พบมากในแม่ของทารกที่ป่วยด้วยโรคตับ อาจเป็นไปได้ว่า maternal factor ในเรื่องของ immune-mediated bile duct injury อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นยังไม่ได้รับการยืนยันอย่างชัดเจน

และเป็นที่น่าสนใจมากเมื่อปัจจัยเสี่ยงในเรื่องของ autoimmunity เกี่ยวข้องกับการมี polymorphism ของยีน ซึ่งสามารถใช้ทำนาย susceptibility ของบุคคลที่มีลักษณะของ autoimmune disorder ได้ จากรายงานของ Bernal และคณะ [48] และ Mitchell และคณะ [49] พบว่า polymorphism ของ TNF- $\alpha$  เกี่ยวข้องกับ susceptibility ของผู้ป่วยโรค primary sclerosing cholangitis นอกจากนี้ยังมี polymorphism ของ IL-1 gene family เกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคของผู้ป่วย primary biliary cirrhosis [50] จากการตรวจสอบ polymorphism บริเวณ promoter ของยีน TNF- $\alpha$  และ IL-1 อีก 2 ตัวได้แก่ *IL1B* และ *IL1RN* และ ในยีน IL-10 บริเวณ promoter 3 ตำแหน่ง โดยใช้ genomic DNA ของเด็กที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 101 คน ในประเทศอังกฤษเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยผู้ใหญ่จำนวน 96 คนที่มีการ match แบบ geographical และแบบ racial พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในตำแหน่งของ allele, genotype หรือ haplotype ในทุกยีนที่ทดลองเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม [51] ทำให้เห็นว่า candidate gene เหล่านี้ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดท่อน้ำดีตีบตัน แต่อาจจะมีส่วน immunoregulatory gene ตัวอื่นๆที่อาจจะเป็นตัวแสดงบทบาทของ biliary tract injury ต่อไปในอนาคต



**Vascular etiology** สมมติฐานนี้เกิดจากการทำการทดลองโดยการจำลองเหตุการณ์นี้โดยตรง จากความรู้ที่ว่า intrahepatic และ extrahepatic bile duct ได้รับเลือดจากกระบวนกร hepatic arterial circulation ดังนั้นหากมีการกระทบกับระบบนี้อาจมีการเกิด hepatic arterial ischemia ขึ้น Pickett และคณะ [52] ได้ทดสอบให้เห็นว่ามีการคั่งของน้ำดีภายหลังจากการเชื่อม hepatic vessels ของแกะในระยะ fetus นอกจากนี้ได้มีผู้ทำการสังเกตผู้ป่วยด้วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าผู้ป่วยมีความผิดปกติของแขนงของ hepatic artery ในส่วน extrahepatic biliary tree ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าความผิดปกติของหลอดเลือดทำให้เกิด lesion ขึ้นในผู้ป่วยอย่างไรก็ตามกระบวนกรการเกิด lesion ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

**Defective morphogenesis** มีอีกหลายกรณีที่สนับสนุนว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิด fetal form เกิดจากกระบวนกร morphogenesis ที่ผิดปกติของ biliary tree เพราะพบความผิดปกติของ visceral organ symmetry ในโรค polysplenia syndrome รวมกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน และการเกิด recessive insertional mutation บริเวณ proximal ของโครโมโซมที่ 4 ในหนู หรือการเกิดแบบ complete deletion ของยีน *INV* ในหนูทำให้เกิดความผิดปกติของ hepatobiliary system ดังนั้น Schon และคณะ [53] จึงได้ทำการ mapped ยีนในมนุษย์พบว่าไม่ปรากฏว่ามี mutation ในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 7 คนที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันแสดงให้เห็นว่ายีน *INV* อาจไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนี้

สำหรับยีนของมนุษย์ตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดแกนซ้ายขวาของมนุษย์ ได้แก่ *ZIC3*, *LEFTB* และ *ACVR2B* มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด situs defect ในเปอร์ด์เซนต์ที่น้อยมาก Bamford และคณะ [54] พบว่าในยีน *CFC1* ซึ่งถอดรหัสได้เป็น CRYPTIC protein ในผู้ป่วยที่มี laterality defects จำนวน 9 คนจากคนไข้ 144 คนมี heterozygous mutations และในจำนวนนั้นมีผู้ป่วย 1 รายที่มีอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตันร่วมกับ polysplenia syndrome Jacquemin และคณะ [55] ได้สังเกตพบว่าในพี่น้อง 2 คนที่เป็น laterality defect และมีคนหนึ่งเป็น BA ร่วมด้วยทั้งคู่มี heterozygous gene mutations ซึ่งได้รับมาจากแม่ที่มีสุขภาพดีเหมือนกัน ทำให้ดูเหมือนว่า *CFC1* ไม่น่าจะเกี่ยวข้องต่อการเกิด phenotype นี้โดยตรง แต่น่าจะเกิดจากการที่มี environment factor หรือ genetic factor ตัวอื่นมาช่วยส่งเสริมให้เกิดลักษณะของโรคนี้ขึ้น

นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วบทบาทของ *JAGGED1* ที่แสดงออกต่อ ductal plate epithelia และ *HNF6* ซึ่งเป็น nuclear transcription factor ที่แสดงออกในช่วงการพัฒนาระบบ extrahepatic bile duct และ gall bladder กำลังได้รับความสนใจ Kohsaka และคณะ [56] พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน 9 รายจากผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 102 รายมี missense mutations ของยีน *JAGGED1* ผู้ป่วยกลุ่มที่มี mutations นี้มีการดำเนินโรคที่แย่มาก สิ่งนี้แนะนำให้เห็นว่า

*JAGGED1* อาจเป็น modifying factor ในผู้ป่วย นอกจากนั้นการ knockout ยีน *Hnf6* ในหนูเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติของ hepatic artery และแขนงได้ [57]

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสาเหตุการเกิดโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด หากทำการสืบค้นยีนที่มีการแสดงออกจำเพาะในเนื้อเยื่อตับที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจากนั้นจึงทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ก็นำมาซึ่งความเข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคได้ดีกว่า ในการศึกษาของ Choe และคณะ [58] ได้นำตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่รอรับการผ่าตัดเปลี่ยนตับ และตับปกติของผู้ให้ตับมาสกัด RNA แล้วเปลี่ยนให้เป็น cDNA เพื่อนำมาทำเป็น radiolabeled cDNA prob ด้วยวิธีการ random primed DNA labeling method ใช้ในการคัดกรองการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วยการทำการ hybridize ด้วย expressed sequence tags (EST) dot blot panel ทำการยืนยันผลด้วย Northern blot hybridization กับยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมากกับเนื้อเยื่อตับปกติ ผลการทดลองพบว่าจาก 1,730 EST clones มี clones ที่มีการแสดงออกอย่างมากในโรค biliary cirrhosis จำนวน 26 cDNA clones และมี clones ที่มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญอีกจำนวน 2 clones ผลจากการยืนยันด้วย Northern blot hybridization พบว่า Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 และ IGFBP-2 มีความสัมพันธ์กับผลของ EST screening ซึ่งจากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่ายีนที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในโรคนี้ น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพังผืด หรือกระบวนการยับยั้งการสลายพังผืดนั่นเอง ในอีกการทดลองหนึ่งโดยใช้เทคนิค cDNA microarray ของ Chen และคณะ [59] เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนทาง messenger RNA จำนวน 18,000 ยีนโดยทำการเปรียบเทียบระหว่างตับปกติ, disease control และตับที่เป็น end-stage BA จากนั้นทำการศึกษาดังวิธี Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Northern blot analysis เพื่อเป็นการยืนยันการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีน ผลการวิเคราะห์ด้วย cluster และ principal component analysis เปิดเผยว่ากลุ่มที่เป็น BA ทั้งหมดแยกออกจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม diseased control อย่างชัดเจน อีกทั้งยังพบอีกว่ามียีนจำนวน 35 ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในกลุ่มที่เป็นโรคกับกลุ่มควบคุม ซึ่งยีนส่วนใหญ่เหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ cell signaling, transcription regulation, hepatic development, morphogenesis

**Toxin exposure** การเกิด outbreak ของโรคท่อน้ำดีตีบตันในแกะและฝูงสุศุสัตว์ในประเทศออสเตรเลียอาจเกี่ยวข้องกับเชื้อราหรือ toxin ตัวใดตัวหนึ่งที่สัตว์เหล่านี้ได้รับจากสิ่งแวดล้อมรอบๆ [60] อาจเป็นไปได้ว่าสารพิษหรือเชื้อต่างๆเหล่านี้จะไปทำให้ชั้นของ bile duct epithelial ที่อยู่ในชั้น submucosa ได้รับการบาดเจ็บแล้วส่งผลให้เกิดการทำลาย extrahepatic bile ducts ขึ้น

## 2. ยีน CTGF และผลิตภัณฑ์

### การค้นพบ

Human connective tissue growth factor (CTGF) ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Bradham และคณะ [61] ใน conditioned medium โดยถูกห่อหุ้มออกมาจาก human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ที่ culture ไว้ และพบว่ามีฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นการเกิด DNA synthesis และ chemotaxis ใน fibroblast มีการค้นพบว่าโมเลกุลนี้มีฤทธิ์ทาง immunoreactivity กับ platelet derived growth factor (PDGF) polyclonal antibodies ถึงแม้ว่า CTGF จะไม่มีลำดับกรดอะมิโนใดๆที่ homology ต่อ PDGF เลย และในช่วงเวลาใกล้เคียงกันก็มีการค้นพบ mouse CTGF ซึ่งแยกได้จาก serum-stimulated mouse NIH 3T3 fibroblasts และจาก transforming growth factor (TGF) -  $\beta$  - stimulated mouse AKK-2B cells โดยใช้ differential cloning techniques [62-64]

### CCN gene family

CTGF มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับโปรตีนสองกลุ่มคือ cysteine-rich (CYR61) และ nephroblastoma overexpressed (NOV) ดังนั้นชื่อย่อ "CCN" จึงมาจาก (CTGF/CYR1/NOV) ซึ่งถูกตั้งโดย Peter Bork ในปี 1993 [65] ภายหลังจากการค้นพบ CTGF ก็ได้รับการตั้งชื่อไปหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น CCN2, NOV2, insulin-like growth factor-binding protein 24 (HSC24) แต่ปัจจุบันได้มีมติเกี่ยวกับการตั้งชื่อโปรตีนของ CCN family ออกมาแล้วเพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน [66] ดังนั้นชื่อของ CTGF จึงกำลังจะถูกเปลี่ยนไปเป็น CCN2

สำหรับสมาชิกของ CCN gene family ในมนุษย์ประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมด 6 ตัว อันได้แก่ cystein-rich 61 (CRY61), connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), nephroblastoma overexpressed (NOV/CCN3), Wnt-induced secreted protein-1 (WISP-1/CCN4), -2 (WISP-2/CCN5), -3 (WISP-3/CCN6) [67] ในตารางที่ 2 แสดงชื่อมาตรฐานของสมาชิกในกลุ่ม CCN gene family และในตารางที่ 3 แสดงชื่อของสมาชิกของในสัตว์สปีชีส์ต่างๆ

ตารางที่ 2 Proposed nomenclature สำหรับ CCN proteins [68]

CCN nomenclature	Current names	Alternative designation
CCN1	CYR61/CCE10	IGFBP-rP4
CCN2	CTGF/FISP12	IGFBP-rP2, HSC24
CCN3	NOV	IGFBP-rP3
CCN4	WISP-1/ELM1	
CCN5	WISP-2/rCOP-1	
CCN6	WISP-3	

ตารางที่ 3 สมาชิก 6 ตัวของ CCN gene family ในมนุษย์และในสัตว์สปีชีส์ต่างๆ ได้แก่สัตว์ตระกูล Xenopus จนถึงสัตว์ตระกูล Rodent [68]

ชื่อยีนและตำแหน่ง	ชื่อเต็มในมนุษย์	ชื่อในสัตว์สปีชีส์ต่างๆ
cyr61 (1p22.3)	cystein-rich 61	CEF10(chicken embryo fibroblast) (Ck) βIG1 (TGFβ induced gene) cyr61 (Mu)
ctgf (6q23.1)	connective tissue growth factor	Ctgf (Ck) ctgf (Sw) ctgf (Xn) βIG2 (TGFβ induced gene) (Mu) Fisp 12 (fibroblast inducible secreted protein) (Mu)
nov (8q24.1)	nephroblastoma overexpressed	Nov (Ck) novM (Mu) nov (Sw) nov (Xn)
WISP-1 (8q24.1-24.3)	Wnt-induced secreted protein-1	Elm1 (expressed in low metastatic type 1 cells) (Mu) Wisp 1 (Mu)
WISP-2 (20q12-13)	Wnt-induced secreted protein-2	rCop-1 (expression lost after transformation) (Mu) HICP (heparin induced CCN-like protein)Wisp-2 (Mu)
WISP-3 (6q23.1)	Wnt-induced secreted protein-3	

CYR61/CCN1 ถูกจำแนกครั้งแรกว่าเป็น growth factor-inducible immediate-early gene โดยใช้วิธีการ differential hybridization screening จาก cDNA library ที่ได้จาก serum-stimulated mouse fibroblasts [69] ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา CYR61/CCN1 ก็ถูกพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องหลายอย่างไม่ว่าจะเป็น cell adhesion การชักนำให้เกิด cell migration ส่งเสริมให้เกิด mitogenesis และการสนับสนุนให้ cell survival [70, 71]

NOV/CCN3 ได้รับการจัดว่าเป็น over-expressed gene ใน chicken nephroblastomas ซึ่งถูก induced โดย myeloblastosis-associated virus [72] การ overexpression ของ full-length chicken NOV/CCN3 ยังแสดงให้เห็นว่ามันไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ chicken embryo fibroblasts (CEFs) อีกด้วย [73] ข้อมูลในปัจจุบันยังระบุว่า NOV/CCN3 สนับสนุนการเกิด endothelial cell adhesion ผ่าน integrins  $\alpha_5\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  และ Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) รวมทั้งชักนำให้เกิด cell migration โดยการใช้อินทิกริน  $\alpha_5\beta_3$  และ  $\alpha_5\beta_1$  [73]

WISP-1/CCN4 ถูกค้นพบโดยนักวิจัยที่ทำการศึกษา low metastatic K-1735 melanoma cells [74] เป็นยีนที่ถูก upregulate โดย Wnt-1 ใน mammary epithelial cells [75] มีคุณสมบัติแบบ growth-suppressive properties ยกตัวอย่างคือ เมื่อฉีด WISP-1/CCN4 เข้าไปในเซลล์จะทำให้เซลล์ที่ถูกฉีดเข้าไปเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์ควบคุมและเมื่อฉีด WISP-1/CCN4

เข้าไปใน tumorigenic และ metastatic K-1735 cells ผลที่ออกมาคือลดการเกิด lung metastatic colonies และชักนำไปสู่การลดการเจริญเติบโตของก้อนเนื้ออก [76]

WISP-2/CCN5 พบว่าเป็นยีนที่ down-regulated ใน rat embryo fibroblasts และเป็น inactivated p53 tumor suppresser gene [77] มีการแสดงออกของ WISP-2/CCN5 ในระดับสูงใน heparin-arrested cells และลดต่ำลงใน proliferating cells [78] โพรตีนตัวนี้ขาดส่วนของ C-terminal domain ซึ่งเป็นส่วนที่พบในโปรตีนตัวอื่นของ CCN gene family [79]

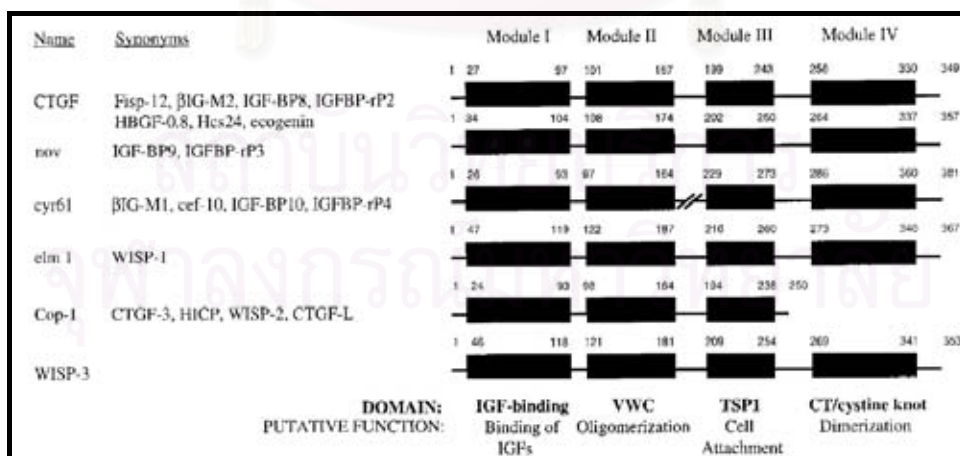
WISP-3/CCN6 ถูกพบด้วย expressed sequence tag (EST) database ร่วมกับ WISP-1/CCN4 โพรตีนตัวนี้ประกอบด้วยส่วน conserve ของ cysteine residues เพียง 34 จาก 38 ตัวที่สมาชิกของ CCN protein family มีเนื่องจากมีการขาดหายของ cysteine residues 4 ตัวใน module ที่ 2 [79] WISP-3/CCN6 ยังไม่ค่อยมีการศึกษามากนักแต่มีการค้นพบว่า over-expressed ใน human colon tumors [75]

**CCN family modular structure**

สมาชิกของ CCN family เป็นโปรตีนขนาดประมาณ 30-40 กิโลดอลตันซึ่งประกอบด้วย cysteine-rich เป็นส่วนใหญ่ถึง 10% โดยมวล [79] โพรตีนกลุ่มนี้มี 4 modules ด้วยกัน [68]

Module 1 มีชื่อว่า insulin-like growth factor (IGF)-binding domain ซึ่งมีส่วนที่ conserve ที่มีการจัดเรียงเป็นแบบ Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-X-X-Cys โดย X คือ กรดอะมิโนใด ๆ การจัดเรียงแบบนี้จะอยู่ใน amino-terminal portion ของ IGF binding protein [80]

Module 2 มีชื่อว่า von Willebrand type C domain เกี่ยวข้องกับ Oligomerization และ protein complex formation [81]



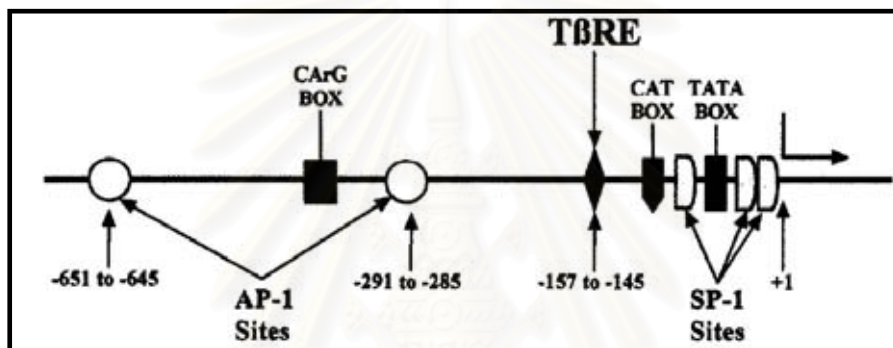
ภาพที่ 2 ชื่อและการจัดเรียงโครงสร้างของสมาชิกทั้ง 6 ตัวของ CCN family [13]

Module 3 มีชื่อว่า thrombospondin-1 domain เกี่ยวข้องกับการจับของ soluble และ matrix macromolecules [82]

Module 4 มีชื่อว่า C-terminal domain ประกอบด้วยส่วนของ cystine knot ที่มีความ homologous กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา midline glia และ commissural axon pathways ในแมลงหวี่ [83] นอกจากนี้ส่วนของ C-terminal domain ยังเกี่ยวข้องกับการจับของ cell surface receptor binding [84] และแสดงคุณสมบัติทางด้านการ mitogenic activity ต่อ fibroblasts [85]

### การศึกษา ยีน CTGF และโปรตีน

ยีน *hCTGF* อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ตำแหน่ง 6q23.1 [85] มีขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วย 5 exons และ 4 introns [86]



ภาพที่ 3 ภาพของ human CTGF gene promoter แสดงส่วน control element [83]

*CTGF* promoter : ประกอบด้วยส่วนของ regulatory elements มากมาย เช่น AP-1, CaG, TATA, M-CAT, SP1 [85] TGF $\beta$  response element (T $\beta$ RE/BCE-1) ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Grotendorst และคณะในปี 1996 [86] เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องและมีความสำคัญอย่างมากต่อการแสดงออกขั้นพื้นฐานของยีน [12] ต่อมาได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น BCE-1 ขณะนี้ได้มีความพยายามศึกษาเกี่ยวกับ factor(s) ที่จะมาจับกับส่วนนี้อยู่ นอกจากนี้ยังมีส่วนของ SMAD binding element ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำของ TGF $\beta$  ต่อการแสดงออกของยีน *CTGF* ใน fibroblast ของปอดและผิวหนัง จากการศึกษาโดยใช้ Electromobility shift assay แสดงให้เห็นว่ามีการจับของ SMAD3 กับ SMAD4 ต่อ SMAD binding element นี้ และพบอีกว่าการจับของ SMADs สามารถถูกยับยั้งด้วย ski และ snoN ซึ่งเป็นตัวควบคุม SMAD activity [87] ใน dermal fibroblast พบว่า Sp1 binding site มีความจำเป็นต่อ *CTGF* promoter activity เช่นกัน แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการชักนำการแสดงออกของ TGF $\beta$  ต่อการแสดงออกของ *CTGF* แต่ใน mesangial cells พบว่า Sp1 ไม่เกี่ยวข้องกับการควบคุม *CTGF* promoter activity [88] Wilms tumor suppressor WT1 พบว่าเป็นตัวกวดการแสดงออกของ *CTGF* [89] ยังมีรายงานเกี่ยวกับ transcription factor binding sites อีกได้แก่ การศึกษาของ Blom และคณะ [15] โดยใช้โปรแกรม TRANSFAC พบว่าในบริเวณ

CTGF promoter (ภาพที่ 4) ของผู้ป่วย 5 คนและกลุ่มควบคุม 6 คนจากผู้ป่วย ischaemic heart disease จำนวน 32 คนและกลุ่มควบคุมจำนวน 45 คน มี polymorphic site อยู่บริเวณตำแหน่ง -447G>C ซึ่งใกล้เคียงกับ MZF1 recognition site และพบผู้ป่วยจำนวน 1 คนมีที่ตำแหน่ง -132C>G ซึ่งใกล้เคียงกับ PBX-1 recognition site สำหรับ PBX-1 ยังไม่มีหลักฐานการศึกษา แต่สำหรับ MZF1 แสดงบทบาทในการเพิ่มอัตราการเจริญของ NIH3T3 cells เมื่อฉีดเข้าไปในหนูยังส่งผลให้มีการพัฒนาเป็น fibrosarcoma สำหรับการทดลองใน In vitro เซลล์ที่ฉีด MZF1 จะเกิด lost contraction inhibition อาจเป็นไปได้ว่า MZF1 อาจมีผลทาง biological effect ต่อการควบคุมยีน CTGF ดังเช่น ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ CTGF ทำให้ NIH3T3 cells ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด proliferation หรือทำให้ CTGF กระตุ้น fibroblast proliferation เกิดการ form ของ granule tissue ดังนั้น MZF1 site น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของ CTGF ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในการศึกษา

3' Untranslated region: Kondo และคณะ [90] ศึกษาบริเวณ 3'UTR region ของ mouse CTGF (Fisp-12) เปรียบเทียบกับมนุษย์โดยใช้ส่วนที่เชื่อมต่อกับ coding region จำนวน 91 base pair พบว่ามีความเหมือนกันประมาณ 82.4% เมื่อทำการโคลน 91 base pair นี้เข้าไปในระบบของ luciferase reporter construction พบว่ามีการยับยั้งการแสดงออกของ luciferase ที่สังเกตได้เป็น 65.4 และ 46.1% เมื่อทำการโคลนแบบ sense และ antisense ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยนี้ทำให้เห็นว่า orientation ก็สามารรถที่จะทำนายความเสถียรของโครงสร้างสองมิติของ 91 base pair fragment ได้ และจากการศึกษาของ Kubota และคณะ [91] ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธี RNA gel electromobility analysis พบว่าส่วนนี้แสดงบทบาทเป็น RNA-structure dependent post-transcriptional regulatory element การศึกษาในครั้งนี้จึงทำให้สามารถนำเอาผลของการศึกษาไปประยุกต์ใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษา in vitro culture condition

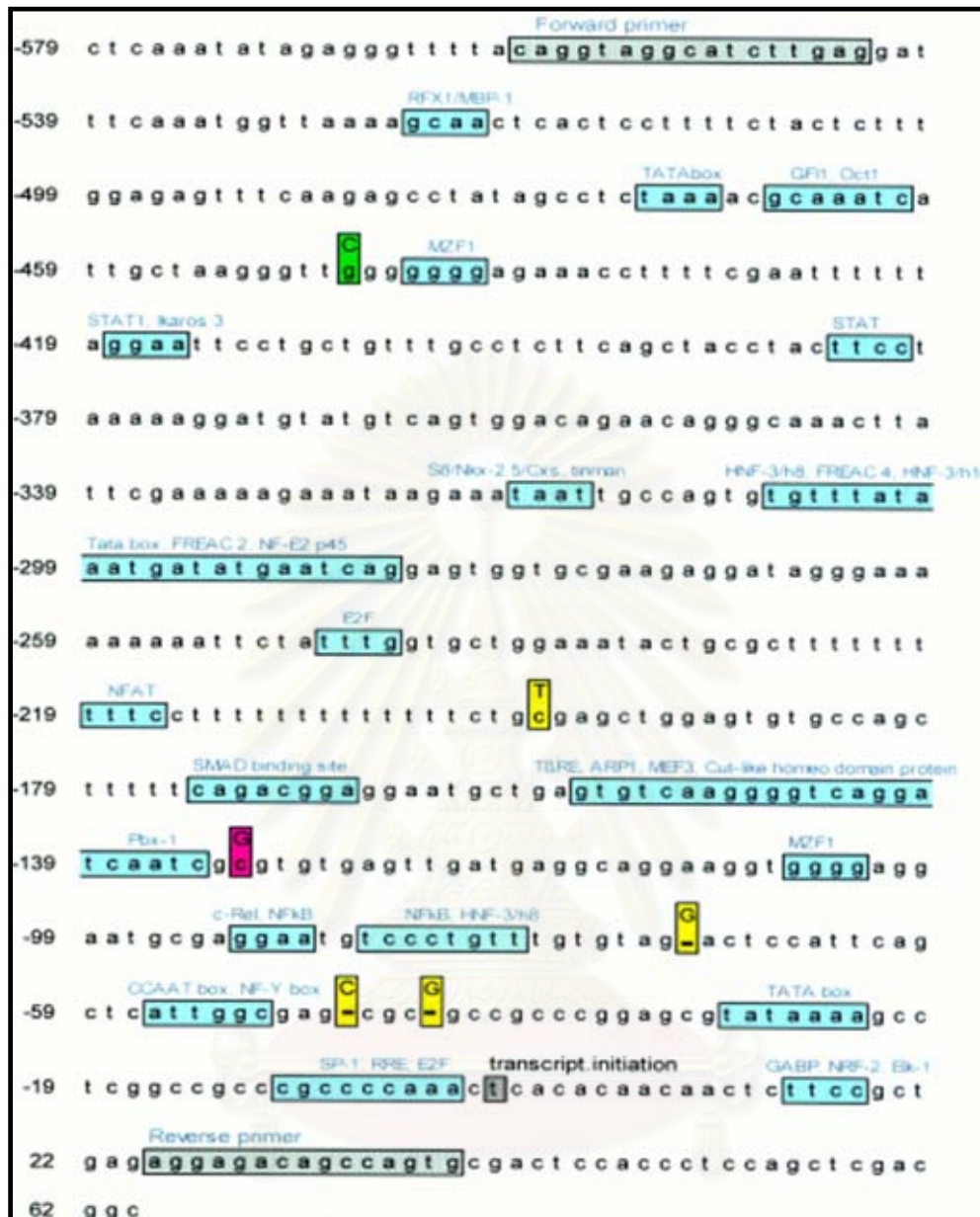
exon ที่ 1: ประกอบด้วย 37 กรดอะมิโนซึ่งถอดรหัสได้เป็น leader peptide sequence มีบทบาทในการนำเอา CTGF ออกจาก endoplasmatic reticulum ไปสู่ Golgi [92]

exon ที่ 2: ถอดรหัสให้ insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) หรือโดเมนที่ 1 [79]

exon ที่ 3: ถอดรหัสให้โดเมนที่ 2 หรือ Von Willebrand factor type C

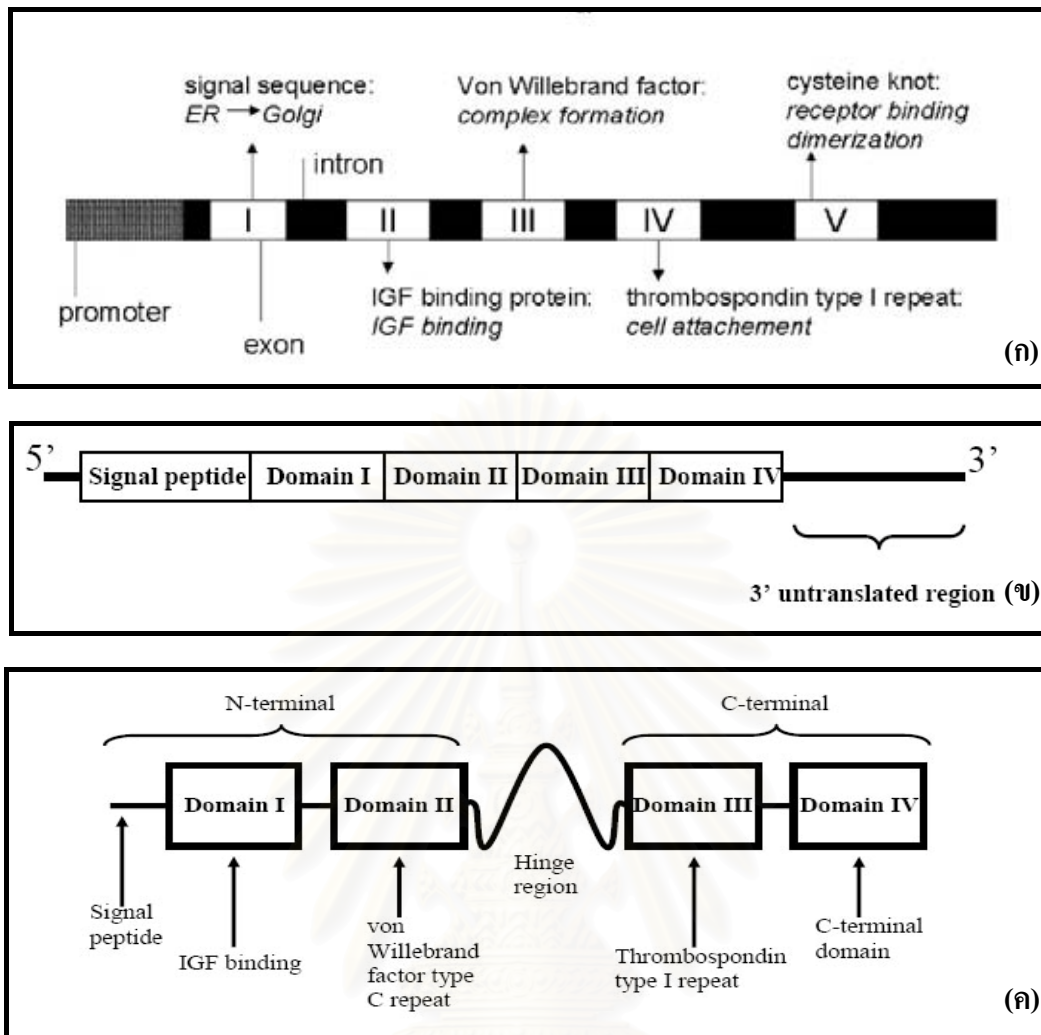
exon ที่ 4: ถอดรหัสให้โดเมนที่ 3 คือ thrombospondin type I domain (TSP1)

exon ที่ 5: ถอดรหัสให้ส่วน C-terminal domain ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 4 ผลการศึกษาลำดับเบสของ human *CCN2* (*CTGF*) promoter จากตำแหน่ง -579 ถึง +64 ในผู้ป่วยโรค ischaemic heart disease แสดง forward และ reverse primers, ส่วนที่คาดว่าจะเป็น transcription factor binding site โดยวิเคราะห์จากโปรแกรม TRANSFAC, polymorphism ที่ตำแหน่ง -447G>C, -132C>G, insertion ที่ตำแหน่ง -43(G), -47(C), -71(G), -198C>G และตำแหน่งของการเริ่ม transcriptional initiation site [15]





ภาพที่ 5 โครงสร้างการจัดเรียงตัวของยีน CTGF ตัวเอนระบุน้ำที่ของแต่ละส่วน (ก) mRNA ของ hCTGF (ข) และโปรตีน (ค) [12]

จากการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ CTGF ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 5 species และสัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบกอีก 2 species (ภาพที่ 6) พบว่าประกอบด้วย 343-349 residues และมีการคาดการณ์ว่า 22-27 residues แรกมีหน้าที่เป็น signal peptides ในภาพแสดง homology ของโปรตีนในแต่ละ species สังเกตได้ว่าความหลากหลายจะพบอยู่ในส่วนของ signal peptide region

1	M	T	A	A	S	M	G	P	V	R	V	A	F	V	V	L	L	A	L	C	S	R	P	A	T	V	G	Q	N	C	-	S	G	P	C	R	C	P	D	E	P	CTGF human	
1	M	L	A	S	V	A	G	P	I	S	L	A	L	V	-	L	L	A	L	C	T	R	P	A	T	G	Q	D	C	-	S	A	Q	C	Q	C	A	A	E	A	CTGF mouse		
1	M	L	A	S	V	A	G	P	I	S	L	A	L	V	-	L	L	A	L	C	T	R	P	A	T	G	Q	D	C	-	S	A	Q	C	Q	C	A	A	E	A	CTGF rat		
1	M	S	A	T	G	L	S	P	V	R	C	A	F	V	L	L	L	A	L	C	S	R	P	A	S	S	S	Q	D	C	-	S	G	O	C	Q	C	A	A	G	K	CTGF pig	
1	M	S	A	T	G	L	S	P	V	R	C	A	F	V	L	L	L	A	L	C	S	R	P	A	S	S	S	Q	D	C	-	S	A	P	C	Q	C	P	A	G	P	CTGF cow	
1	M	-	S	A	G	-	-	-	K	V	T	A	V	L	L	F	A	L	F	C	W	V	S	D	A	Q	D	C	-	N	G	E	C	C	C	P	N	K	V	CTGF Xenopus			
1	M	-	S	A	G	M	G	A	L	R	L	P	L	L	L	A	V	L	L	F	C	W	V	S	D	A	Q	D	C	-	S	G	E	C	R	C	N	K	P	CTGF newt			
40	A	P	R	C	P	A	G	V	S	L	V	L	D	G	C	G	C	C	R	V	C	A	K	Q	L	G	E	L	C	T	E	R	D	P	C	D	P	H	K	G	CTGF human		
39	A	P	H	C	P	A	G	V	S	L	V	L	D	G	C	G	C	C	R	V	C	A	K	Q	L	G	E	L	C	T	E	R	D	P	C	D	P	H	K	G	CTGF mouse		
38	A	P	R	C	P	A	G	V	S	L	V	L	D	G	C	G	C	C	R	V	C	A	K	Q	L	G	E	L	C	T	E	R	D	P	C	D	P	H	K	G	CTGF rat		
40	R	R	A	C	P	A	G	V	S	L	V	L	D	G	C	G	C	C	-	V	C	A	K	Q	L	S	E	L	C	T	E	R	D	P	C	D	P	H	K	G	CTGF pig		
41	A	P	R	C	P	A	G	V	S	L	V	L	D	G	C	G	C	C	-	V	C	A	K	Q	L	S	E	L	C	T	E	R	D	P	C	D	P	H	K	G	CTGF cow		
35	-	P	V	C	D	P	G	V	R	M	V	Q	D	G	C	G	C	C	-	K	V	C	A	K	Q	L	G	E	L	C	T	E	R	D	V	C	D	P	H	K	G	CTGF Xenopus	
39	-	P	E	C	P	A	G	T	S	L	V	M	D	G	C	G	C	K	V	C	A	K	Q	L	G	E	L	C	T	E	R	D	V	C	D	P	H	R	G	CTGF newt			
80	L	F	C	D	F	G	S	P	A	N	R	K	I	G	V	C	T	A	K	D	G	A	P	C	V	F	G	G	T	V	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF human		
79	L	F	C	D	F	G	S	P	A	N	R	K	I	G	V	C	T	A	K	D	G	A	P	C	V	F	F	G	G	S	V	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF mouse	
78	L	F	C	D	F	G	S	P	A	N	R	K	I	G	V	C	T	A	K	D	G	A	P	C	V	F	F	G	G	S	V	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF rat	
80	L	F	C	D	F	G	S	P	A	N	R	K	I	G	V	C	T	A	K	D	G	A	P	C	V	F	F	G	G	T	V	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF pig	
80	L	F	C	D	F	G	S	P	T	N	R	K	I	G	V	C	T	A	R	E	G	A	P	C	V	I	F	F	G	G	T	V	Y	Q	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF cow
74	L	F	C	D	F	G	S	R	V	N	R	K	I	G	V	C	T	A	R	E	G	A	P	C	V	I	F	F	G	G	T	V	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF Xenopus
78	L	F	C	D	F	G	S	R	V	N	R	K	I	G	V	C	T	A	K	D	G	A	P	C	V	F	F	G	G	M	V	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	CTGF newt	
120	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	S	M	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	F	R	R	V	K	L	P	G	K	CTGF human		
119	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	S	M	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	F	R	R	V	K	L	P	G	K	CTGF mouse		
118	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	S	M	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	F	R	R	V	K	L	P	G	K	CTGF rat		
120	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	S	M	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	F	R	R	V	K	L	P	G	K	CTGF pig		
120	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	S	M	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	F	R	R	V	K	L	P	G	K	CTGF cow		
114	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	S	M	D	I	R	L	P	S	P	E	C	P	F	F	R	R	V	K	L	P	G	K	CTGF Xenopus		
118	C	K	Y	Q	C	T	C	L	D	G	A	V	G	C	V	P	L	C	G	V	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	F	R	R	V	K	Q	L	G	R	CTGF newt		
160	C	C	E	E	W	V	C	D	E	P	K	D	R	T	V	V	G	P	A	L	A	A	Y	R	L	E	D	T	F	G	P	D	P	T	M	I	R	A	N	C	CTGF human		
159	C	C	E	E	W	V	C	D	E	P	K	D	R	T	A	V	G	P	A	L	A	A	Y	R	L	E	D	T	F	G	P	D	P	T	M	M	R	A	N	C	CTGF mouse		
158	C	C	E	E	W	V	C	D	E	P	K	D	R	T	V	V	G	P	A	L	A	A	Y	R	L	E	D	T	F	G	P	D	P	T	M	M	R	A	N	C	CTGF rat		
160	C	C	E	E	W	V	C	D	E	P	K	D	H	T	V	V	G	P	A	L	A	A	Y	R	L	E	D	T	F	G	P	D	P	T	M	M	R	A	N	C	CTGF pig		
160	C	C	E	E	W	V	S	R	D	E	K	E	R	T	V	V	G	P	A	L	A	A	Y	R	L	E	D	T	F	G	P	D	P	T	M	I	R	A	N	C	CTGF cow		
154	C	C	E	E	W	V	C	D	Q	P	Q	E	E	R	T	L	V	G	P	A	L	P	A	E	R	M	E	E	T	Y	G	P	D	P	S	L	I	R	A	N	C	CTGF Xenopus	
158	C	C	E	E	W	V	C	D	Q	P	K	E	Q	T	R	V	V	G	P	A	L	A	V	Y	R	D	E	E	T	Y	G	P	D	S	S	L	M	R	A	N	C	CTGF newt	
200	L	V	Q	T	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	A	S	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF human		
199	L	V	Q	T	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	T	F	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF mouse		
198	L	V	Q	T	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	A	F	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF rat		
200	L	V	Q	T	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	A	F	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF pig		
200	Q	V	Q	T	T	E	W	S	A	Y	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	A	F	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF cow		
194	L	V	Q	T	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	E	H	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF Xenopus		
198	L	V	Q	T	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G	I	S	T	R	V	T	N	D	N	E	M	C	R	L	E	K	Q	S	R	L	C	M	V	CTGF newt		
240	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	S	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	M	K	T	Y	CTGF human		
239	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	A	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	V	K	T	Y	CTGF mouse		
238	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	A	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	V	K	T	Y	CTGF rat		
240	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	S	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	V	K	T	Y	CTGF pig		
240	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	S	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	M	K	T	Y	CTGF cow		
234	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	S	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	V	K	T	Y	CTGF Xenopus		
238	R	P	C	E	A	D	L	E	E	N	I	K	K	G	K	K	C	I	R	T	P	K	I	S	K	P	V	K	F	E	L	S	G	C	T	S	V	K	T	Y	CTGF newt		
280	R	A	K	F	C	G	V	C	T	D	G	R	C	C	T	P	H	R	T	T	L	P	V	E	F	K	C	P	D	G	E	V	M	K	K	N	M	M	F	CTGF human			
279	R	A	K	F	C	G	V	C	T	D	G	R	C	C	T	P	H	R	T	T	L	P	V	E	F	K	C	P	D	G	E	I	M	K	K	N	M	M	F	CTGF mouse			
278	R	A	K	F	C	G	V	C	T	D	G	R	C	C	T	P	H	R	T	T	L	P	V	E	F	K	C	P	D	G	E	I	M	K	K	N	M	M	F	CTGF rat			
280	R	A	K	F	C	G	V	C	T	D	G	R	C	C	T	P	H	R	T	T	L	P	V	E	F	K	C	P	D	G	E	V	M	K	K	S	M	M	F	CTGF pig			
280	R	A	K	F	E	G	V	C	T	D	G	R	C	C	T	P	H	R	T	T	L	P	V	E	F	K	C	P	D	G	E	V	M	K	K	S	M	M	F</				

### 3. บทบาทของไซโตไคน์ CTGF ในกระบวนการรักษาบาดแผลและการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับพังผืด

#### ไซโตไคน์ (cytokines)

ไซโตไคน์ (cytokines) คือ สารน้ำต่างๆที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ของร่างกายมีบทบาทในภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และแบบจำเพาะ (specific immunity) ไซโตไคน์ส่วนใหญ่มีธรรมชาติเป็นโปรตีน เซลล์สำคัญที่หลั่งไซโตไคน์คือเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ มาโครฟาจ โมโนซัยท์ และลิมโฟซัยท์ นอกจากนี้ไซโตไคน์ยังหลั่งจากเซลล์อื่น อาทิเช่น endothelial cell, fibroblast ฯลฯ [93] ในที่นี้ CTGF ถูกผลิตได้จากเซลล์หลายชนิดด้วยกันภายในตับ ได้แก่ fibroblast, mononuclear cell, myofibroblast, hepatocyte, bile duct epithelial cell และ endothelial cell [94] กระบวนการรักษาบาดแผล (wound healing) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน การซ่อมแซม (repair) จะเริ่มตั้งแต่การได้รับการอักเสบอย่างเฉียบพลันของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ 2 กระบวนการด้วยกัน คือ กระบวนการเกิดใหม่ (regeneration) ของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายโดย parenchymal cell ของเนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบ และอีกกระบวนการหนึ่งคือ กระบวนการการแทนที่โดย connective tissue ในกระบวนการสร้างพังผืด ทั้งสองกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นระหว่างการซ่อมแซม ไซโตไคน์และ soluble growth factors ต่างๆ จะมีหน้าที่ควบคุมการเกิด migration, proliferation และ differentiation ของเซลล์พร้อมๆกับการควบคุมการสังเคราะห์และการสลายของส่วนประกอบของ extracellular matrix (ECM)

จากการศึกษาถึงกระบวนการการเกิดพังผืดพบว่ามีความสลับซับซ้อนมากเกินกว่าที่ไซโตไคน์ตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียวจะเป็นตัวก่อให้เกิดกระบวนการรักษาบาดแผลและกระบวนการการเกิดพังผืดได้ [95] สิ่งสำคัญที่สุดคือการเลือกไซโตไคน์ที่เหมาะสมเพื่อที่จะพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์แบบ anti-cytokine/cytokine therapy ต่อไป สำหรับเกณฑ์ในการเลือกว่าไซโตไคน์ตัวใดเหมาะที่จะนำมาศึกษา ในปัจจุบันยึดเกณฑ์ดังนี้ [96] ประการแรก candidate cytokine(s) ต้องเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิด fibroblast proliferation และการสังเคราะห์คอลลาเจน ประการที่สอง ไซโตไคน์เหล่านี้ควรถูกผลิตในบริเวณที่เกิดการสร้างพังผืด ประการที่สาม ควรจะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของไซโตไคน์เหล่านี้ในผู้ป่วยที่มีพังผืดและ/หรือในสัตว์ทดลองที่เกิดพังผืด ประการที่สี่ การเพิ่มมากขึ้นของไซโตไคน์ หรือการ deficiency/knockout ยีนของไซโตไคน์ตัวนี้เป็นผลต่อการเกิดพังผืดในสัตว์ทดลองที่เกิดโรค ประการที่ห้า anti-cytokine agents ควรจะเป็น non-toxic, non-immunogenic, เสถียร และบรรเทาการเกิดพังผืดในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งจากทั้งหมดนี้ CTGF เป็นไซโตไคน์ที่ครอบคลุมกฎเกณฑ์เกือบจะทุกประการที่กล่าวมา ดังนั้นจึงเป็นไซโตไคน์ที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาต่อไป

## CTGF กับกฎเกณฑ์ความเหมาะสมทั้ง 5 ประการ

จากที่กล่าวมาข้างต้นถึงหลักเกณฑ์ในการเลือกไซโตไคน์ที่นำมาใช้ในการศึกษาพบว่า CTGF มีความครอบคลุมกฎเกณฑ์ทั้ง 5 ประการดังนี้

ประการที่ 1 ไซโตไคน์จะต้องเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด fibroblast proliferation และการสังเคราะห์คอลลาเจน

ในปัจจุบันพบว่า CTGF มีบทบาทต่างๆมากมายทั้งทางด้านกระบวนการทางสรีรวิทยา การพัฒนาของเอ็มบริโอ รวมไปถึงกระบวนการ differentiation [71] นอกจากนี้สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือ CTGF ยังแสดงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืด และกระบวนการหายของบาดแผลรวมถึงการสร้าง extracellular matrix [79] อีกทั้งยังควบคุม proliferation, migration, adhesion และการผลิต ECM molecule ใน cultured fibroblasts อีกด้วย [71] ในทางกลับกันมีรายงานว่า CTGF มีบทบาททำให้เกิด apoptosis [96] ความขัดแย้งที่เกิดขึ้นนี้ยังไม่มีข้อสรุปแน่ชัดแต่น่าจะเกิดจากการที่ใช้ model systems และขั้นตอนในการศึกษาที่แตกต่างกันรวมถึงสถานะในการศึกษาแม้กระทั่งสารเคมีที่ใช้ก็หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน CTGF และแอนติบอดี และเนื่องจากโครงสร้างที่ซับซ้อนของ CTGF เอง ทำให้การศึกษาเป็นไปอย่างล่าช้า

ประการที่สอง ไซโตไคน์เหล่านี้ควรจะถูกลดที่บริเวณที่เกิดการสร้างพังผืด

การศึกษาปัจจุบันพบว่า CTGF มีความสามารถในการส่งเสริมการสร้างพังผืดโดยถูกชักนำด้วย TGF- $\beta$  และมีเป้าหมายอยู่ที่ fibroblast [64] ในกรณีของการเกิดพังผืดในตับตรวจพบ CTGF ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิดในตับได้แก่ fibroblast, mononuclear cell, myfibroblast, hepatocyte, bile duct epithelial cell และ endothelial cell [94] ดังได้กล่าวไปแล้ว

ประการที่สาม ควรจะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของไซโตไคน์เหล่านี้ในผู้ป่วยที่มีพังผืดและ/หรือในสัตว์ทดลองที่เกิดพังผืด

พบว่า CTGF มีการแสดงออกอย่างชัดเจน (over-expression) ในผู้ป่วยโดยมีการแสดงร่วมกับ TGF- $\beta$  ใน fibrotic skin disorder หลายโรครวมทั้งโรคท่อน้ำดีตีบตันและพบการแสดงออกของ CTGF mRNA และ/หรือโปรตีนใน fibrotic lesions ในเนื้อเยื่อภายในอวัยวะต่างๆ ซึ่งรวมไปถึงตับด้วยดังแสดงในตารางที่ 4

ประการที่สี่ การเพิ่มมากขึ้นของไซโตไคน์ หรือการ deficiency/knockout ยีนของไซโตไคน์ตัวนี้เป็นผลต่อการเกิดพังผืดในสัตว์ทดลองที่เกิดโรค

จากหลายการทดลองระบุว่าภายหลังจากฉีด CTGF เข้าทาง subcutaneous ในสัตว์ทดลองพบว่าการพัฒนาของ fibrotic lesions แต่ยังไม่มีความแน่นอนว่า CTGF มีบทบาทโดยตรงต่อการเกิดพังผืดภายในอวัยวะของสิ่งมีชีวิต [94]

**ตารางที่ 4** การแสดงออกอย่างมากมายของ CTGF ในโรคต่างๆที่มีรายงานไว้ [97]

Disease	Reference
Gastro-intestinal diseases	
Chronic pancreatitis	di Mola et al., 1999
Liver fibrosis, hepatitis C	Paradis et al., 1999
Chron's disease, ulcerative colitis	Dammeier et al., 1998
Dermatological diseases	
Scleroderma, eosinophilic fasciitis,	Igarashi et al., 1996
Dupuytren's contracture	
Pulmonary diseases	
Idiopathic pulmonary fibrosis,	Allen et al., 1999;
sarcoidosis, asthma	Burgess et al., 2003
Cardiovascular diseases	
Cerebral infarction	Schwab et al., 2000
Ischaemic heart disease	Chen et al., 2000
Atherosclerosis	Oemar et al., 1997
Renal diseases	
IgA nephropathy, crescentic glomerulonephritis,	Ito et al., 1998;
focal glomerulosclerosis, lupus nephritis,	Wahab et al., 2001
membranoproliferative glomerulonephritis	Riser et al., 2003
and diabetic nephropathy	
Malignancies	
Desmoplastic malignant melanoma	Kubo et al., 1998
Mammary carcinoma	Frazier and Grotendorst, 1997
Pancreatic cancer	Wenger et al., 1999
Cartilaginous tumors	Shakunaga et al., 2000
Glioblastoma	Pan et al., 2002

ประการที่ห้า anti-cytokine agents ควรจะเป็น non-toxic, non-immunogenic, เสถียร และ บรรเทาการเกิดพังผืดในสัตว์ทดลองได้

จากการศึกษาของบริษัท FibroGen ประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการออกแบบการยับยั้งการ แสดงออกของ CTGF ในกระบวนการพัฒนาพังผืดพบว่าพังผืดสามารถรักษาได้ด้วยแอนติบอดีต่อ CTGF ในสัตว์ทดลองที่เป็น systemic sclerosis และป่วยเป็นโรคพังผืดในไตและปอด จาก การศึกษาอื่นๆยังพบว่า CTGF เป็น downstream ที่ตอบสนองต่อ transforming growth factor-beta (TGF-beta) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ CTGF ต่อการรักษาโรคพังผืดเรื้อรัง TGF-beta เป็นโปรตีนควบคุมที่มีบทบาทต่างๆมากมายรวมไปถึงบทบาทที่ตอบสนองต่อการอักเสบและการ

เกิดบาดแผล อีกทั้งเป็นตัวควบคุม CTGF จากบทบาทของ CTGF ต่อกระบวนการการเกิดแผลเป็นนี้เอง CTGF จึงเหมาะสมอย่างมากที่จะเป็น specific target สำหรับกระบวนการการรักษาแบบ anti-fibrotic therapies ซึ่งพบว่าสามารถให้ผลที่ดีอย่างชัดเจนทางคลินิกโดยที่ไม่มีผลกระทบบ้างเคียงในวงกว้าง [98]

### **พังผืด (fibrosis)**

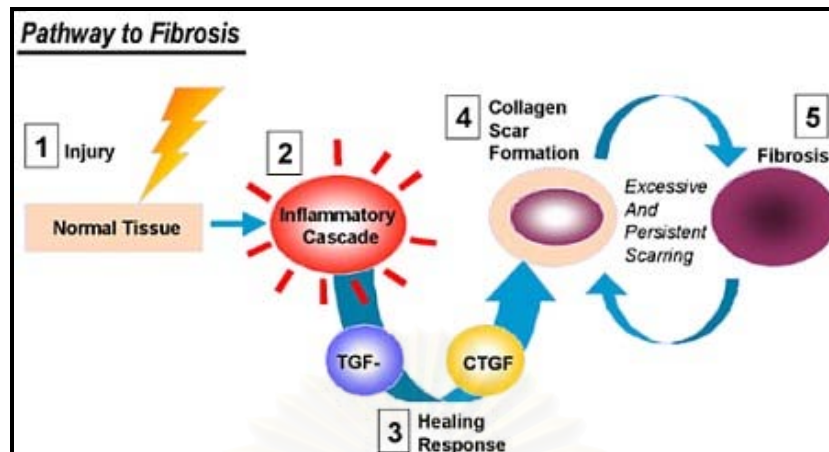
พังผืดหรือ fibrosis เป็นคำกล่าวสำหรับใช้เรียกการสะสมและการก่อตัวขึ้นของ scar tissue ที่มีมากจนเกินไป เกิดเนื่องมาจากการขาดความสมดุลระหว่างสองกระบวนการในการรักษาสมดุลนั่นก็คือ กระบวนการสร้างและกระบวนการสลายของพังผืด ส่งผลต่อการขาดประสิทธิภาพหรือการสูญเสียไปของอวัยวะที่มีการสะสมของพังผืดที่มากจนเกินไป พังผืดเกิดมาจากโรคเรื้อรังของปอด ไต ตา หัวใจ ตับและผิวหนังในปัจจุบันยังไม่มีการรักษา

### **CTGF กับการเกิดพังผืด**

เป็นที่รู้กันดีว่า CTGF มีบทบาทในระดับ downstream ของกระบวนการกระตุ้นการเกิดพังผืดแบบเรื้อรังของ transforming growth factor-beta (TGF-beta) (ภาพที่ 7) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-beta แล้ว CTGF ก็จะถูกชักนำก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เซลล์ fibroblast ไปเป็น myofibroblast ซึ่งมีการสะสมชั้นของคอลลาเจน พังผืดเกิดจากกระบวนการสร้าง scar tissue มีความเร็วในการสร้างมากกว่าการสลายทำให้น้ำเยื่อปกติดูถูกแทนที่ด้วย scar tissue ส่งผลให้อวัยวะที่ถูกแทนที่นี้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ดีเพียงพออาจนำไปสู่ภาวะอวัยวะล้มเหลวทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระดับของ CTGF มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงในโรคหลายชนิด ได้แก่ diabetic nephropathy, glomerulosclerosis และ IgA nephropathy (สาเหตุของภาวะไตวาย) diabetic retinopathy และ advanced macular degeneration (พังผืดของตา ทำให้ตาบอด) ตับแข็ง (cirrhosis) และโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) ทำให้เกิดพังผืดในตับและตับวาย

### **กระบวนการการเกิดพังผืดในตับและการพัฒนาไปสู่ภาวะตับแข็ง [99]**

ระดับของการเกิดพังผืดเป็นตัวกำหนดที่สำคัญต่อผลที่เกิดขึ้นกับความผิดปกติของตับและทางเดินท่อน้ำดีในเด็ก พังผืดเป็นผลมาจากการสร้างและสะสมของ extracellular matrix ที่มากเกินไป hepatic stellate cells มีส่วนสำคัญเพราะเซลล์เหล่านี้มีหน้าที่สร้าง extracellular matrix collagen เป็น extracellular matrix มีส่วนสำคัญโดยจะรวมตัวกันเป็น scaffold ประกอบด้วย fibril-forming inter-stitial collagens type-I และ III รวมทั้ง sheet-forming basement membrane collagen type IV ในภาวะตับแข็งองค์ประกอบเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า กระบวนการการเกิดพังผืดในตับเกี่ยวข้องกับ hepatic stellate cells (HSCs) ดังนี้



ภาพที่ 7 กระบวนการการเกิดพังผืด (1) การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อปกติ (2) เกิดการกระตุ้นแบบ cascade ของการอักเสบส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ TGF (3) การตอบสนองต่อการรักษาโดย TGF ไปกระตุ้น CTGF ซึ่งเป็น downstream (4) เกิดการสร้างคอลลาเจน (5) ภาวะการสร้างเป็นไปอย่างขาดสมดุลทำให้เกิดการสะสมเพิ่มมากขึ้นของพังผืด [98]

#### องค์ประกอบของ Matrix ในเซลล์ตับปกติและเซลล์ตับที่เป็นพังผืด

ในเซลล์ตับปกติจะประกอบด้วยเซลล์สำคัญ (ภาพที่ 8) คือ

1. epithelial component (hepatocytes) มีหน้าที่คอยควบคุมการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นเนื่องจากการติดเชื้อ สารพิษ เมตาบอลิซึม และภูมิคุ้มกันต่อตับโดย hepatocytes สร้างและหลั่งอนุมูลอิสระ lipid peroxide products, proteases, cytokine และ growth factors ทำให้เซลล์ข้างเคียงสร้าง collagen

2. endothelial lining แบ่งเป็น

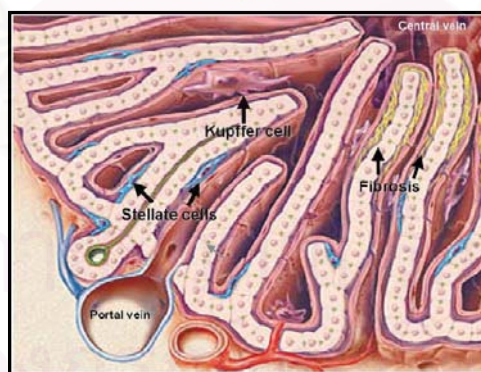
- bile duct epithelial cells ทำหน้าที่สร้างน้ำดี cytokine, chemokine และ growth factor
- sinusoidal endothelia มีรูเล็กรูเล็กเพื่อให้สารต่างๆไหลเวียนไปสู่ hepatocytes เซลล์เหล่านี้สร้างและหลั่ง hepatocyte growth factor, Insulin-like growth factors-2, transforming growth factor  $\alpha$ , endothelin และองค์ประกอบต่างๆของ matrix เมื่อมีการอักเสบเซลล์เหล่านี้จะแสดง intracellular adhesion molecule 1 ซึ่งส่งผลต่อการยึดเกาะของ neutrophils และเพิ่มการตอบสนองต่อการอักเสบก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ ถ้า sinusoidal endothelia ถูกทำลายจะทำให้การไหลเวียนของเลือดบกพร่องและนำไปสู่ ischemic injury ต่อไป

3. tissue macrophages (Kupffer cells) ทำหน้าที่เป็น macrophages ของตับทำให้เกิดขบวนการ phagocytosis นอกจากนี้ยังผลิต tumor necrosis factor, interferon alfa-1 และ

beta-1, interleukin (IL)-1, IL-6, prostaglandin 2 และ proinflammatory products อื่นๆ สารเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น T cells cytotoxicity เพิ่มการตอบสนองของภาวะอักเสบและกระตุ้น fibrogenesis

4. perivascular stellate cell (ปัจจุบันมีหลายชื่อ ได้แก่ Ito cell, lipocyte, perisinusoidal cell หรือ fat-storing cell) มีหน้าที่เก็บสะสมวิตามิน A และเป็นแหล่งผลิต extracellular matrix collagen type I และ III ดังนั้นเซลล์นี้จึงมีส่วนสำคัญต่อการเกิดพังผืดที่ตับนำไปสู่การเกิดตับแข็ง นอกจากนี้ stellate cells ยังสังเคราะห์ และหลั่ง transforming growth factor  $\alpha$ , endothelin, nitric oxide, insulin like growth factor และ matrix metalloproteinase และ inhibitor เนื่องจากเซลล์เหล่านี้ยึดติดตัวได้จึงสามารถควบคุมการไหลเวียนของเลือดภายใน sinusoid

ภายใน sinusoidal ในส่วนของ subendothelial space of Disse จะมี hepatocytes ประกอบด้วย low-density หรือ basement membrane-like matrix ซึ่ง subendothelial matrix เหล่านี้ประกอบด้วย ECM molecule ที่เกิดการสานกันคล้ายๆร่างแหเพื่อทำหน้าที่ขึงเซลล์เอาไว้ แต่ก็อนุญาตให้มีการไหลผ่านเข้าออกของสารละลายหรือ growth factors ได้ (ภาพที่ 9 ก) กระจกที่ตับได้รับอันตรายส่วนประกอบของ ECM ก็จะกลายเป็นแบบ scar-like หน้าที่ของเซลล์ตับก็จะเสื่อมลงซึ่งสิ่งเหล่านี้เองที่อธิบายได้ว่าทำไมการพัฒนาของพังผืดจึงทำให้เกิดการแสดงออกอย่างชัดเจนต่อการลดลงของ serum albumin การสูญเสียความสามารถในการกำจัดสารพิษและการสูญเสียการผลิต clotting factor (ภาพที่ 9 ข)

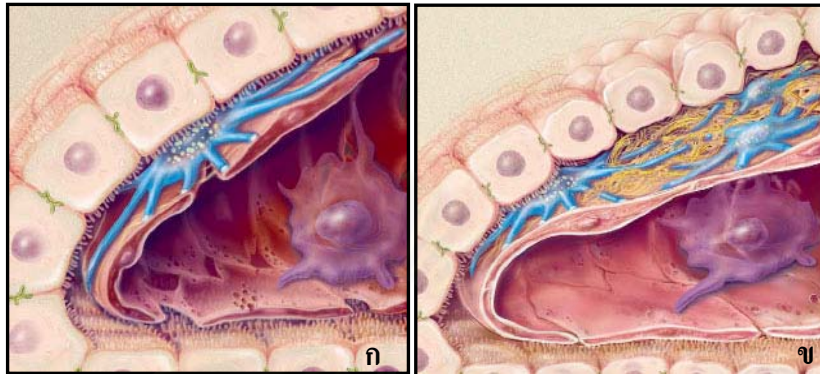


ภาพที่ 8 ตำแหน่งการจัดเรียงตัวของเซลล์ชนิดต่างๆภายในตับปกติ ในส่วนที่มีชื่อว่า space of Disse มี hepatic stellate cells แทรกอยู่ โดยปกติ Kupffer cell จะจับอยู่ที่ผนัง endothelial ในช่องว่างระหว่าง sinusoidal space การกระตุ้น hepatic stellate cells ส่งผลให้เกิดการสะสมของ extracellular matrix (fibrosis) [99]

การกระตุ้น hepatic stellate cells สู่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากระยะพักที่มีการเก็บสะสมของวิตามิน A (quiescent cells vitamin A-storing cells) ให้มีการแบ่งตัวสร้างเส้นใยมาก



ขึ้น จนเข้าสู่สภาพที่เรียกว่า myofibroblasts (ภาพที่ 10) ในช่วงระยะแรกของกระบวนการจะเรียกว่า Initiation หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า preinflammatory stage ระยะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับการตอบสนองจากไซโตไคน์

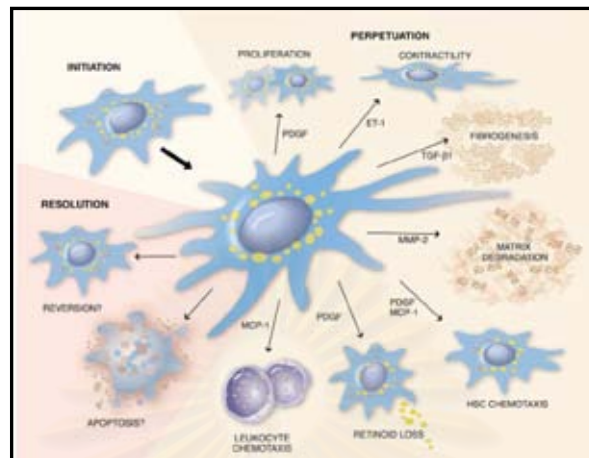


**ภาพที่ 9** subendothelial ระหว่าง stellate cell ถูกกระตุ้น (ก) การจัดเรียงตัวปกติของ sinusoidal ที่ประกอบด้วย stellate cell มีวิตามิน A อยู่รอบนิวเคลียสล้อมรอบด้วย low density matrix (ข) ระหว่างการบาดเจ็บของตับ stellate cell มีการเพิ่มจำนวน และมีการสะสมของ fibrillar matrix ในขั้นนี้ hepatocytes จะมีการสูญเสีย microvilli และมีการปิดของช่องว่างของ endothelial (endothelial fenestrae) [99]

#### บทบาทของกระบวนการการอักเสบในการกระตุ้น hepatic stellate cell และการเกิดพังผืด

ในช่วงต้นของการเปลี่ยนแปลง ภายใน stellate cells จะได้รับการกระตุ้นแบบ paracrine จากเซลล์ข้างเคียงอันได้แก่ sinusoidal endothelium, Kupffer cells, platelets และ leukocytes สำหรับ endothelial cells จะมีส่วนร่วมทั้งกระตุ้น-สร้าง cellular fibronectin และการเปลี่ยน TGF $\beta$  จากสภาวะนิ่ง (latent) ให้อยู่ในสภาวะตื่นตัว (active) ในระยะนี้สามารถใช้ Kupffer cell เป็น marker ในการบ่งบอกถึงการกระตุ้น stellate cells ได้เพราะจะมีการแทรกซึมเข้ามาของ kupffer cell โดย kupffer cell จะไปกระตุ้นการสังเคราะห์ matrix การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการ release ของวิตามิน A ออกจาก stellate cell ผ่านทางไซโตไคน์ ยกตัวอย่างเช่น TGF $\beta$  จาก Kupffer cell จะกระตุ้นการสังเคราะห์ extracellular matrix ของ stellate cell นอกจากนั้นเมื่อมีการเพิ่มเข้ามาของ leukocyte ในระหว่างการทำหน้าที่ตับได้รับบาดเจ็บ leukocyte ก็จะมาพร้อมกับ Kupffer cell ในการทำหน้าที่สร้างองค์ประกอบต่างๆเพื่อที่จะมาช่วยควบคุม stellate cell เป็นที่น่าสังเกตว่า leukocyte มีส่วนอย่างมากในการเกิดพังผืด การเกิดพังผืดจากการอักเสบเป็นผลมาจากไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจาก lymphocyte และ neutrophil ซึ่งกระตุ้น hepatic stellate cell ทั้งแบบ paracrine และ autocrine ไซโตไคน์เหล่านี้ได้แก่ TGF $\beta$  , vascular endothelial growth factor (VEGF) platelet-derived growth factor (PDGF) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้น

โดยตรงต่อ fibrogenic cytokine อย่าง connective tissue growth factor (CTGF) ใน cultured stellate cells ด้วย



ภาพที่ 10 การกระตุ้น stellate cell เมื่อตับได้รับบาดเจ็บ การกระตุ้นที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บของตับมี 2 ขั้นตอนคือ ระยะแรก (initiation) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ของ host และสิ่งเร้า stellate cell ก็เข้าสู่ระยะ perpetuation อันประกอบด้วยลำดับขั้นต่างๆมากมายดังแสดงในภาพ สุดท้ายแล้วผลก็คือมีการเพิ่มการสะสมของเส้นใย fibril หรือ scar matrix ขั้นต่อมาคือขั้น resolution เป็นขั้นที่ fibrosis stellate cell จำนวนหนึ่งถูกกำจัดโดยกระบวนการ apoptosis และกระบวนการ reversion เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ชนิด quiescent ให้มากขึ้น [99]

#### กระบวนการ perpetuation ของ stellate cell activation

กระบวนการ perpetuation ประกอบด้วยขั้นต่างๆดังนี้ proliferation, fibrogenesis, contractility, การ release ของ proinflammatory cytokines, chemotaxis, การสูญเสีย retinoid และการสลาย matrix

Proliferation: การเพิ่มขึ้นของจำนวน hepatic stellate cell ระหว่างที่ตับถูกทำลายทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ cytokine receptors ส่งผลให้ไซโตไคน์สามารถที่จะมีการแสดงออกได้ดีขึ้นและมีการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนการแบ่งตัวของ hepatic stellate cell และเพิ่มกระบวนการการสร้างพังผืดตามมา [100] PDGF จัดว่าเป็น proliferative cytokine ที่ได้รับความสนใจมากที่สุดในช่วงนี้

Fibrogenesis: การสร้าง matrix โดย hepatic stellate cell ที่ถูกกระตุ้นสามารถสังเกตได้จากการทำงานของ TGF $\beta$  [101] Stellate cells เป็นแหล่งที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างพังผืดในตับโดยการควบคุมของ TGF $\beta$  [102] TGF $\beta$  receptors ใน quiescent HSCs และ activated HSCs ที่อยู่ในแบบ myofibroblast-like มีอยู่ 2 ชนิดด้วยกัน คือ T $\beta$ RI และ RII [103]

Contractility: stellate cells สามารถผลิต nitric oxide (NO) ซึ่งออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ Endothelin-1 (ET-1) และผลรวมของ contractility activity ของ stellate cells ในสิ่งมีชีวิตก็จะขึ้นกับปัจจัยทั้งสองนี้ หากเกิดความไม่สมดุลกันทำให้ endothelin มีบทบาทมากกว่าก็จะให้เกิดการพัฒนาของโรคตับขึ้น [104]

Cytokine release: กระบวนการ stellate cell activation ถูกควบคุมด้วยการควบคุมของไซโตไคน์แบบ autocrine ในสิ่งมีชีวิต ไซโตไคน์เหล่านี้ได้แก่ TGF $\beta$ 1, PDGF, FGF, HGF, platelet activating factor และ ET-1 [105] ในขณะนี้ยังค้นพบไซโตไคน์ตัวใหม่ๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

Loss of vitamin A (retinoids): ในกระบวนการกระตุ้น stellate cells จะเกิดมีการสูญเสีย retinoid หรือวิตามิน A ออกไปสู่ extracellular space [106] แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเหตุใดจึงเป็นเช่นนี้ อย่างไรก็ตามการสูญเสีย retinoid อาจเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการกระตุ้น stellate cells หากมีการยับยั้งการสูญเสีย retinoid อาจส่งผลต่อลำดับขั้นการเกิดกระบวนการกระตุ้นได้

Chemotaxis: โดยปกติแล้วเมื่อมีการเกิด proliferation ขึ้น stellate cells ก็จะมาสะสมกันในบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บด้วยกระบวนการ chemotaxis ตัวสารที่ใช้กระตุ้นการเคลื่อนที่นี้มีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ PDGF, IGF-1, ET และ monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) ตัวที่เป็น chemoattractants ใน HSCs ที่สำคัญคือ PDGF, IGF-1 (99) MCP-1 ถูกผลิตด้วย HSCs ทำให้เกิดการเข้ามาสะสมของ monocyte, lymphocytes และยังออกฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์เหล่านี้ด้วย (107)

Matrix degradation: กระบวนการย่อยสลาย ECM แบ่งอย่างกว้างๆได้เป็น 2 ชนิดด้วยกันภายในตับ คือ กระบวนการย่อยสลาย matrix แบบที่เป็น low density matrix ในตับปกติหรือที่เรียกว่า pathologic matrix degradation และอีกกระบวนการหนึ่งคือการย่อย scar ที่สะสมอยู่ซึ่งจะช่วยทำให้ตับที่ได้รับการบาดเจ็บเปลี่ยนกลับไปเป็นปกติ เรียกกระบวนการย่อยนี้ว่า restorative matrix degradation กระบวนการย่อยจะถูกควบคุมด้วย matrix-metalloproteinase family หรือที่รู้จักกันในชื่อของ matrixins ซึ่งจะใช้ควบคุมทั้งแบบ pathologic และแบบ restorative matrix degradation โดย matrix-metalloproteinase เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลาย collagens และ non-collagen [108] เอนไซม์เหล่านี้แบ่งได้เป็น 5 ประเภท คือ interstitial collagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2,-9), stromelysins (MMP-3, -7, -10,-11), membrane type (MMP-14, -15, -16,-17,-24,-25) และ metalloelastase (MMP-12) การสูญเสียกระบวนการทำลายการสะสมของ scar matrix จึงเป็นสาเหตุทำให้มีการพัฒนาจนกลายเป็นตับแข็ง

### กระบวนการ resolution ของพังผืดในตับและทิศทางของ activated stellate cells

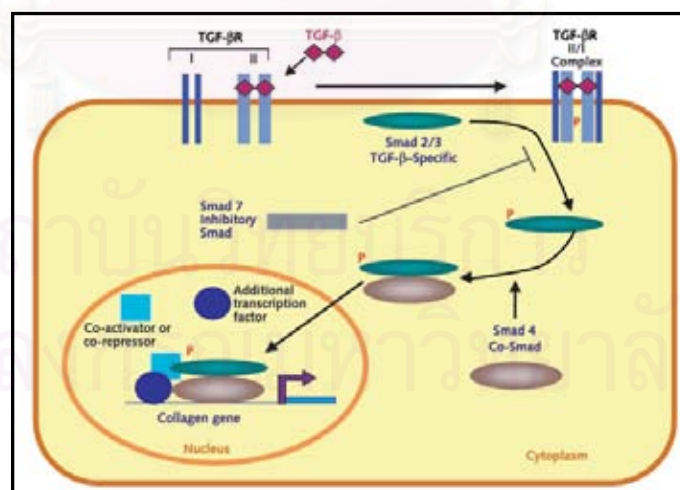
จากการค้นพบในมนุษย์และจากการทดลองในตับที่ได้รับบาดเจ็บพบว่าปริมาณของ activated stellate cells ที่ถูกเก็บไว้ในเนื้อเยื่อลดลง อาจเป็นไปได้ว่ามีกระบวนการอย่างน้อย 2 กระบวนการที่พอจะสังเกตได้นั้นคือ กระบวนการ reversion ของ stellate cells ที่ถูกกระตุ้น และ กระบวนการในการกำจัด activated stellate cells โดยวิธี apoptosis [109]

กระบวนการ Reversion: ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า activated stellate cells สามารถกลับไปเป็น ระยะ quiescent ในสิ่งมีชีวิตได้อย่างไร

กระบวนการ Apoptosis: การเกิด apoptosis ของ HSCs อาจเป็นกระบวนการในการลด activated stellate cells ในพังผืดของตับได้ โดย apoptosis จะลดการเกิด activated HSCs ในตับปกติ ดังนั้นเมื่อตับเกิดได้รับบาดเจ็บขึ้น apoptosis จึงถูกยับยั้งด้วย soluble factor และ matrix components ที่ถูกสร้างจาก activated HSCs จึงทำให้เกิดพังผืดขึ้น [110]

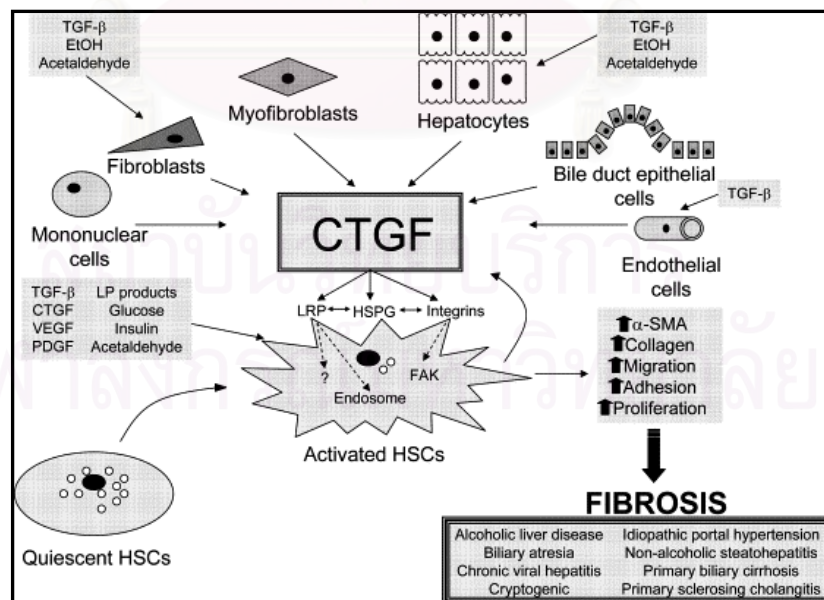
### **CTGF กักการเกิดพังผืดในตับ**

จากการศึกษาในระยะต้นด้วยการใช้ fibroblast พบว่า CTGF เป็น TGF- $\beta$ 1-induced immediated early gene [63] การแสดงออกของ CTGF ตามการกระตุ้นของ TGF- $\beta$  เป็นไปอย่างรวดเร็วเพียงเสี้ยววินาที โดยการตอบสนองนี้จะเกี่ยวข้องกับ TGF- $\beta$  response element ภายใน CTGF promoter [86] อย่างไรก็ตามในการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ นอกจากจะพบว่าการแสดงออกพื้นฐานของ CTGF จำเป็นจะต้องใช้ TGF- $\beta$  response element แต่ก็พบว่ายังต้องอาศัย Smad-binding sequence และ ส่วนอื่นที่อยู่บริเวณ promoter นี้ด้วย [111]



**ภาพที่ 11** ความเกี่ยวข้องของ transforming growth factor- $\beta$  และ Smad ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนคอลลาเจน [112]

จากภาพที่ 11 TGF- $\beta$  จะถูกหลั่งออกมาจาก activated lymphocytes หรือ monocytes ในรูป inactive form และจะต้องอยู่ในรูปที่จับซ้อนจับเป็น complex ก่อนจึงจะทำงานได้ เมื่อเป็น active TGF- $\beta$  แล้วจึงจะมาจับกับเซลล์เป้าหมาย หลังจากนั้นก็จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ TGF- $\beta$ II receptor บนผิวเซลล์เป้าหมาย จากนั้นจึงเกิดกระบวนการ phosphorylation ของ TGF- $\beta$ I และ TGF- $\beta$ II รวมตัวกันทำให้กลายเป็น active receptor complex ต่อมาจึงส่งสัญญาณเข้าไปภายใน นิวเคลียสโดยรวมกับ Smad family protein โดย Smad 2 หรือ Smad 3 จะไปจับกับ TGF- $\beta$  receptor complex เกิด phosphorylation แล้วจับเป็น complex กับ Smad 4 ซึ่งเป็นโปรตีน ภายใน cytoplasm ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด translocation ของ Smad complex เพื่อเข้าไปใน นิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบว่า Smad 7 เป็นตัวยับยั้ง Smad ที่จะไปจับกับ TGF- $\beta$  receptor complex และป้องกันการเกิดการ phosphorylation ของ Smad 2 และ Smad 3 ส่งผลให้เกิดการ ลดลงของการแสดงออกของยีนคอลลาเจนที่ต้องการการกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$  จากภาพเมื่อ complex เคลื่อนไปยังนิวเคลียสแล้วจะไปกระตุ้นยีนคอลลาเจนซึ่งในที่นี้ได้แก่ ยีน CTGF นั่นเอง โดยไปจับบริเวณ promoter แล้วรวมตัวกับ co-activator และ additional transcription factor เกิดการแสดงออกของยีนขึ้น [112] เมื่อเกิดการแสดงออกของ CTGF ซึ่งผลิตจากเซลล์ต่างๆ ภายในตับที่เกิดจากการกระตุ้นของ TGF- $\beta$  แล้ว CTGF ก็จะไปกระตุ้น quiescent HSCs เพื่อให้ กลายเป็น activated HSCs ต่อไป



ภาพที่ 12 การผลิต CTGF และการแสดงบทบาทของ CTGF ในการสร้างพังผืดในตับ [94]

จากภาพที่ 12 การผลิต CTGF ถูกผลิตจากเซลล์หลายชนิดภายในตับ โดยเซลล์เป้าหมายแบบ autocrine และ paracrine ของ CTGF ก็คือ HSCs โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CTGF มีความจำเป็นต่อการใช้กระตุ้น HSCs ซึ่ง CTGF จะจับได้กับทั้ง low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) ซึ่งเป็น signaling และ adhesion receptor และ integrins บนผิวของ HSC เกี่ยวข้องกับ Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) กระบวนการที่จับกับ LRP นั้น CTGF อาจจะถูกกำจัดให้หมดไปได้โดยการย่อยสลายจาก endosome และในกรณีเดียวกันการจับกับ Integrin ก็ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นในส่วน of intracellular cascade เพื่อเพิ่มการเกิด proliferation, adhesion, motility และการสังเคราะห์คอลลาเจน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (Specimens)

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ peripheral blood leukocyte และซีรัม จากผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน, เด็กที่มีสุขภาพดี และสตรีที่มารับการฝากครรภ์ที่โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์

#### เครื่องมือ (Materials)

- Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)
- Barrier Tip: 200  $\mu$ l (BioScience, USA)
- Beaker: 5 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, England)
- Combs (Bio-RAD, USA)
- Cylinder: 25 ml (Pyrex, England)
- Flat-bottom ELISA plate (Costar, USA)
- Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BioScience, USA)
- Parafilm (Penchiney plastic packaging, USA)
- Petri dish
- Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- Pipette Tips: 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l (BioScience, USA)
- Polypropylene conical tube: 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
- Reagent bottle: 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, Germany)
- Sterile pasture pipette (Samco Scientific Corporation, USA)
- Stirring magnetic bar (V&P scientific, USA)
- Thermometer (Precision, Germany)

#### อุปกรณ์ (Equipments)

- ABIPRISM™ 310 Genetic (Perkin-Elmer, USA)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

Automatic adjustable micropipette: P2.5 (0.1-2.5  $\mu$ l), P10 (0.5-10  $\mu$ l),  
P200 (20-200  $\mu$ l) (Eppendorf, Germany), P20 (2-20  $\mu$ l) (Socorex,  
Switzerland), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France)

Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

Chemical safety carbinet (Toxicap, France)

Class II microbiological safety carbinet (Envair, England)

Cuvett: 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l (MiralBio, Japan)

Deep Freezer -20°C (Sanyo, Japan)

Deep Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)

ELISA microplate reader (Bio-RAD model 3550, USA)

ELISA microplate washer (TECAN, Austria)

Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)

Incubator (Mettler, Germany)

Incubator with orbital shaker (Stuart Scientific, UK)

Microcentrifuge 0.2 ml (Butterfly, Taiwan)

Microcentrifuge 1.5 ml (Denver, USA)

Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)

Multi-block heater (Lab-Line Instrument, USA)

Multi-channel pipette: P (Socorex, Switzerland)

PCR HEPA+ carbinet (LIO LAB, Thailand)

PCR safety carbinet (LIO LAB, Thailand)

pH meter (Eutech Cybernatics, Singapore)

Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)

Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)

Spectrophotometer (MiralBio, Japan)

Speed-Vac (Thomas Scientific, USA)

Stirring hot plate (Bamstead/Thermolene, USA)

Thermal cycler (Eppendorf, MasterCycler gradient, Germany)

Thermal paper (Bio-RAD, USA)



Thermostat shaking-water bath (Heto, Denmark)

UV transilluminator (Fotodyne, USA)

Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

Water purification equipment (Yamato Scientific, Japan)

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagent)

#### 1. สารเคมีทั่วไป (General reagent)

Agarose molecular grade (Promega, USA)

Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

Sucrose (USB, Hong Kong)

Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)

Bromphenal blue (Pharmacia, Hong kong)

Boric acid (USB, Hong kong)

Tris (USB, Hong Kong)

Hydrochloric acid (Sigma, Singapore)

100 base pair DNA ladder (Biolabs, USA)

#### 2. สารเคมีสำหรับสกัด DNA (DNA extraction)

Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

Chloroform (Sigma, Singapore)

Disodium ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA (USB, Hong Kong)

Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)

Magnesium chloride (Sigma, Singapore)

Phenol (Sigma, Singapore)

Proteinase K (Sigma, Singapore)

Sodium acetate (USB, Hong Kong)

Sodium chloride (USB, Hong Kong)

Sodium dodecyl sulfate (Sigma, Singapore)

Sodium hydroxide (USB, Hong Kong)

Tris-HCl (USB, Hong Kong)

Triton X-100 (Sigma, Singapore)

3. สารเคมีสำหรับ Polymerase Chain Reaction (PCR)
  - Eppendorf MasterMix (2.5X) (Eppendorf, Germany): Taq DNA polymerase (62.5 U/ml) 125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 8.3, 3.75 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.25% Igepal<sup>®</sup>- CA630, 500 μM of each dNTP and stabilizer.
  - Genomic DNA sample
  - Oligonucleotide primers (Proligo, Singapore)
4. สารเคมีสำหรับ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
  - Anti-human CTGF C-terminal peptide antibody (R&D, USA)
  - Alkaline phosphatase -conjugated streptavidin (Zymed, USA)
  - Biotinylated anti-human CTGF C-terminal peptide antibody (R&D, USA)
  - Bovine serum albumin (Sigma, Singapore)
  - p-nitrophenyl phosphate (Zymed, USA)
  - Phosphate buffered saline: PBS tablets (Bio Basic, Canada)
  - Recombinant human CTGF (MBL, USA)
  - Trizma base (Sigma, Singapore)
5. สารเคมีสำหรับโคลนนิ่ง (Cloning)
  - Ampicillin (Pharmacia, Hong kong)
  - isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside: IPTG (Bio Basic, Germany)
  - Magnesium sulfate (Sigma, Singapore)
  - pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)
  - Tryptone (Gibco BRL, USA)
  - Yeast extract (Gibco BRL, USA)
  - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside:X-gal (Bio Basic, Germany)
6. สารเคมีสำหรับการทำ Sequencing
  - ABI PRISM<sup>™</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA)
  - Gel Extraction Kit (Eppendorf, Germany)

## 7. เอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับ Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

*Bst*U1 and 10X NE buffer 2 (Biolabs, USA)

*Hpa*II and 10X NE buffer 1 (Biolabs, USA)

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. ประชากรศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ปกครองของผู้ป่วยเด็กทั้งหมดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันรวมไปถึงเด็กที่มีสุขภาพดีจะได้รับคำแนะนำถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ และลงลายมือชื่อยินยอมให้ทำการศึกษาเป็นลายลักษณ์อักษรแล้ว

ผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้งหมดจำนวน 84 คน แบ่งเป็นผู้ป่วยหญิง 44 คน และผู้ป่วยชายจำนวน 40 คน (อายุเฉลี่ย  $\pm$  SD = 6.12  $\pm$  4.79) ซึ่งเป็นผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับการผ่าตัดแบบคาไซแล้วและมาติดตามรับการรักษาเป็นประจำที่หน่วยโรคระบบทางเดินอาหารที่แผนกผู้ป่วยนอก ตึก ภปร. ชั้น 9 ทุกวันพุธ เวลา 09.00-12.00 น. สำหรับกลุ่มควบคุมจำนวน 142 คน แบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 95 คนและเพศชายจำนวน 47 คน (อายุเฉลี่ย  $\pm$  SD = 17.39  $\pm$  9.21) ซึ่งเป็นเด็กที่มาตรวจรับวัคซีนในคลินิกเด็กที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เด็กในกลุ่มควบคุมมีลักษณะปกติและไม่ได้กำลังป่วยเป็นโรคจำนวน 110 คน แบ่งเป็นเพศชาย 47 คนและเพศหญิง 63 คน (อายุเฉลี่ย  $\pm$  SD = 13.30  $\pm$  3.01) และจากกลุ่มสตรีที่เข้ามารับการฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 32 คน (อายุเฉลี่ย  $\pm$  SD = 34.69  $\pm$  5.84) เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันด้วยกันจะใช้ระดับของ total bilirubin (TB) เป็นตัวจำแนกจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองตาเหลือง (without jaundice) คือมีค่า(TB < 2.0 mg/dl, n= 47) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองตาเหลือง (with jaundice) TB  $\geq$  2.0 mg / dl, n= 37) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตัดผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนตับ (Liver transplantation) โดยไม่ได้ทำการผ่าตัดแบบคาไซ หรือเป็นผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดแบบคาไซแล้วไม่ประสบผลสำเร็จเป็น end stage biliary atresia คือการทำงานของตับล้มเหลว รอการทำการผ่าตัดเปลี่ยนตับ รวมไปถึงผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคอื่นๆ (ยกเว้นโรคที่เป็นภาวะแทรกซ้อนจากการผ่าตัดแบบคาไซ) แสดงอาการไข้หรือมีการอักเสบของท่อน้ำดีหรือมีความผิดปกติเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดเมื่อทำการเจาะเลือด

#### 2. การเก็บตัวอย่างซีรัม

ซีรัมถูกเก็บจาก peripheral venous whole blood ปริมาตร 3 ml ซึ่งถูกดูดจาก sterile syringe แล้วเก็บไว้ใน clotted blood tube ปล่อยให้เลือดแข็งตัวจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง

เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตซีรัมส่วนบนนำไปใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งนำไปใช้ตรวจสอบ

### 3. การสกัดดีเอ็นเอ [112]

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดปริมาตร 3 ml ที่ถูกเก็บไว้ใน EDTA vacutainer tubes นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตพลาสมาส่วนบนเก็บไว้เพื่อนำไปทำการทดลองอย่างอื่นต่อไป จากนั้นนำ buffy coat และ ส่วนของเม็ดเลือดแดงที่เหลือทั้งหมดไปใส่ใน polypropylene tube เติม lysis buffer 1\* ปริมาตร 10 ml เขย่าส่วนผสมอย่างแรงให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตส่วนข้างบนทั้งหมดทิ้งเติม lysis buffer 1 ปริมาตร 3 ml ลงไปแล้วเขย่าส่วนผสมอย่างแรงให้เข้ากันอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาทีที่ 3,000 rpm ปิเปตส่วนบนทิ้งเติม lysis buffer 2\* 900  $\mu\text{l}$  proteinase K (20 mg/ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) \* 10  $\mu\text{l}$  และ 10% SDS\* ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  เขย่าอย่างแรงประมาณ 30 วินาทีแล้วบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)\* ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  นำไปเขย่าอย่างแรงอีก 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องอีก 5 นาทีที่ 6,000 rpm ค่อยๆย้ายส่วนใสข้างบนแบ่งใส่ microcentrifuge tube ใหม่ขนาด 1.5 ml จำนวน 2 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง หลอดละประมาณ 500  $\mu\text{l}$  เติม 100% ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 800 มิลลิลิตร 3 M ammonium acetate\* 50  $\mu\text{l}$  และ 20  $\mu\text{g/ml}$  glycogen \* 4  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการตกตะกอน dsDNA โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตส่วนน้ำใสทิ้งจนหมดแล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml แล้วหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาทีที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ปิเปต ethanol ทิ้งไป นำตะกอน dsDNA ที่ได้ทำให้เป็นผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) ใน แห่งด้วยเครื่อง speed vacuum เพื่อให้ ethanol ระเหยออกไปจนหมดเป็นเวลา 10 นาที (หรือจนกว่าจะแห้ง) ละลาย dsDNA ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  1 ชั่วโมง หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันดีด้วยการปิเปตขึ้นลง แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 260 nm จากนั้นเก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

---

\* ดูรายละเอียดในภาคผนวก

#### 4. ข้อมูลของ SNPs

SNPs 2 ตำแหน่งบริเวณ *CTGF* promoter อันได้แก่ตำแหน่ง -447G>C และ -132 C>G ได้อ้างอิงจากการศึกษาที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ของ Blom และคณะ [15]

#### 5. การออกแบบไพรเมอร์

Forward primer และ Reverse primer ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *CTGF-F* และ *CTGF-R* ตามลำดับใช้อ้างอิงจาก Blom และคณะ [15] และทำการออกแบบเพิ่มเติมจากลำดับเบสที่ตีพิมพ์ในการศึกษาเดียวกัน [15] ได้แก่ *CTGF/G* และ *CTGF/C* (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์

PCR amplification	Forward	Reverse	Product (bp)
<i>CTGF</i> ตำแหน่ง-559ถึง39	<i>CTGF-F</i> : 5'CAGGTAGGCATCTTGAG3'	<i>CTGF-R</i> : 5'CACTGGCTGTCTCCT3'	598
<i>CTGF</i> (-447G>C)	<i>CTGF/G</i> : 5'GCAAATCATTGCTAAAGGGTTG3' or <i>CTGF/C</i> : 5'GCAAATCATTGCTAAAGGGTTC3'		506

#### 6. การตรวจสอบลำดับเบส

ก่อนที่ polymorphisms ที่ตำแหน่ง -447G>C และ -132C>G ที่อยู่บริเวณ promoter ของยีน *CTGF* จะถูกวิเคราะห์ ในขั้นแรกจะเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมในบริเวณตำแหน่งที่ -559 จนถึงตำแหน่ง 39 (primary PCR product) โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) โดย reaction mixture และรอบปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 reaction mixture สำหรับ PCR ตำแหน่งระหว่าง -559 ถึง 39

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (25 µl)
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	10 µl
25 µM <i>CTGF-F</i> primer	0.5 µM	0.5 µl
25 µM <i>CTGF-R</i> primer	0.5 µM	0.5 µl
50 ng/µl Genomic DNA	100 ng	2 µl
Distilled water	-	12 µl

ตารางที่ 7 รอบปฏิกิริยาสำหรับตำแหน่งระหว่าง -559 ถึง 39

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	94°C	3 min
40 cycle of Denaturation	94°C	30 sec
Annealing	59°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
Final extension	72°C	7 min

### 6.1 CTGF -447G>C

ตำแหน่งนี้ตรวจสอบด้วย Amplification- refractory mutation systems (ARMS) ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้แบ่งเป็น 2 ชุดด้วยกัน ชุดแรกประกอบด้วย CTGF/G และ CTGF-R และอีกชุดหนึ่งคือ CTGF/C และ CTGF-R ซึ่งทำการเพิ่มจำนวนแยกกันเป็น 2 หลอดในแต่ละตัวอย่าง สำหรับการเพิ่มจำนวนในการทดลองนี้ใช้ปฏิกิริยาและส่วนประกอบตามตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของ PCR สำหรับตำแหน่งที่ -447G>C

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	10 µl
25 µM CTGF/G or C primer	0.5 µM	0.5 µl
25 µM CTGF-R primer	0.5 µM	0.5 µl
primary PCR product (dilution 1:1000)	-	2 µl
Distilled water	-	12 µl
ปริมาตรรวม		25 µl

ตารางที่ 9 รอบปฏิกิริยาสำหรับตำแหน่ง -447G>C

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	94°C	3 min
40 cycle of Denaturation	94°C	30 sec
Annealing	63°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
Final extension	72°C	7 min

## 6.2 CTGF -132 C>G

ศึกษาตำแหน่ง -132C>G ด้วยการตัด primary PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะย่อยด้วย 1 U *Bst*UI เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60°C ใน 10X NE buffer 2 และตัดด้วย 1U *Hpa*II เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ใน 10X NE buffer 1 ส่วนประกอบในการทำต่อ 1 ปฏิกริยาปริมาตรรวม 10 µl แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 reaction mixture ของ RFLP สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง -132C>G

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา
PCR product	5 µl
10X NE Buffer 2,1	1 µl
<i>Bst</i> UI, <i>Hpa</i> II	0.1 µl
Sterile Distilled water	3.9 µl

## 7. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย Electrophoresis

ผลิตภัณฑ์จากทั้งการตรวจสอบด้วย ARMs และ RFLP ปริมาตร 10 µl ถูกตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยนำมาผสมกับ loading buffer\* ปริมาตร 4 µl แล้วนำไปแยกขนาดด้วย 2% (w/v) gel\* ใน 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer\* และใช้กระแสไฟความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide (10 µg/ml) นำเจลไปตรวจหาแถบของ DNA ภายใต้แสง UV แล้วบันทึกภาพ

## 8. การหาขนาดของ DNA

คำนวณขนาดของ DNA จากการเปรียบเทียบระยะทางที่ DNA เคลื่อนที่ไปกับความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ DNA มาตรฐานเคลื่อนที่กับขนาดของ DNA มาตรฐาน (100 base pair DNA ladder (Biolabs, USA))

## 9. การทำโคลนนิ่ง และการเตรียมพลาสมิดเพื่อการทำ positive control

ทำการเตรียม primary PCR product ที่ได้ให้มีความเข้มข้นโดยใช้วิธีของ Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) นำ PCR product solution ที่ได้มาแยกโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% (w/v) gel ใน 1X TBE และใช้กระแสไฟความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide (10 µg/ml) เป็น

\* ดูรายละเอียดในภาคผนวก

เวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำเจลไปตรวจหาแถบของ DNA ภายใต้แสง UV ตัดชิ้นส่วนของเจลที่มี DNA ที่ต้องการจากเจลแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) นำ primary PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM-T\* ตามวิธีของ pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)

นำพลาสมิดสายผสมถ่ายเข้าสู่ Competent cell (*Escherichia coli* JM109) โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Cohen Chang และ Hsu (1972) [อ้างถึงใน 113] โดยนำ Competent cell ที่เก็บไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  มาปล่อยให้ละลายในน้ำแข็ง ใส่ ligation mixture 10  $\mu\text{l}$  ผสมกับ competent cell ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำมาบ่มใน water bath ที่  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 50 วินาที เมื่อครบกำหนดนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติม SOC\* ปริมาตร 950  $\mu\text{l}$  เพื่อฟื้นฟูสภาพเซลล์ นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมงด้วยการแกว่งที่ความเร็ว 200 rpm เมื่อครบเวลานำหลอดออกจากตู้บ่มนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 5 วินาที แล้วดูด SOC ที่ประมาณ 750  $\mu\text{l}$  เพื่อให้เหลือเซลล์ประมาณ 100  $\mu\text{l}$  ผสมเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยดูดขึ้นลงด้วยปิเปตเบาๆ จากนั้นนำไปเกลี่ยบนผิวน้ำอาหาร LB Agar\* ซึ่งใน 1 plate ปริมาตรประมาณ 25  $\mu\text{l}$  มี Ampicillin\* (2.5 $\mu\text{g}$ ) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal)\* (0.6  $\mu\text{g}$ ) และ 0.5 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)\* (0.6  $\mu\text{g}$ ) นำ plate ไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง

เมื่อทำการเลือก blue-white colony โดยเลือก white colony มาเขียนบน LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มี Ampicillin (0.5 mg) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง ทำการสกัดแบบ Miniprep โดยใช้แต่ละ culture ปริมาตร 3 มิลลิลิตรด้วย FastPlasmid Mini 100 preparation kit (Eppendorf, Germany) ตามที่แนะนำจากผู้ผลิต

---

\* ดูรายละเอียดในภาคผนวก



## 10. การวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequence Analysis)

ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ถูกทำให้บริสุทธิ์จาก 2% agarose gel โดยใช้ Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) หรือสกัดพลาสมิดสายผสมจาก culture โดยใช้ FastPlasmid Mini 100 preparation kit (Eppendorf, Germany) ทำการหาลำดับเบสด้วย dideoxy chain termination ร่วมกับวิธี PCR และใช้สารเรืองแสงเป็นตัวติดฉลากโดยมีการติดฉลากสีในสาย DNA ขณะมีการสร้างสาย DNA โดยติดที่ปลาย 3' ของ dideoxynucleotide triphosphate (dye terminator) DNA template สำหรับปฏิบัติการทำ sequencing จะใช้ AmpliTaq™ DNA Polymerase FS dye terminator cycle sequencing chemistry จากชุด ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA) ซึ่งประกอบด้วย ddNTPs 4 แบบที่ถูกติดฉลากด้วย fluorescence ที่แตกต่างกัน (BigDye™ Terminators) การเตรียม sequencing reactions ปริมาตร 20 µl สำหรับ PCR products หรือพลาสมิดสายผสมแต่ละปฏิบัติการเตรียมในหลอดขนาด 0.2 ml ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 sequencing mixture สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
Big Dye	4
Buffer	2
Primer (at 25 mM)	0.67
Template	8
Sterile distilled water	5.33

ผสมส่วนผสมข้างต้นให้เข้ากันดี จากนั้นนำหลอดส่วนผสมมาเข้าเครื่อง Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA) โดยใช้ทั้งหมด 25 รอบปฏิบัติการดังนี้ โดยในแต่ละรอบปฏิบัติการประกอบด้วย 96°C 10 วินาที 50°C 10 วินาที 60°C 4 นาที เมื่อครบเวลานำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี isopropanol precipitation โดยนำหลอดมาปั่นตกประมาณ 10 วินาทีย้ายผลิตภัณฑ์ภายในหลอดโดยการปิเปตใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 ml เติม 20 µg/ml glycogen ปริมาตร 4 µl, 75% isopropanol ปริมาตร 80 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ควบคู่กับล้างบนทิ้งทั้งหมดโดยใช้ pipet tip แยกแต่ละตัวอย่าง ระวังระวังอย่าให้โดนตะกอน DNA จากนั้นเติม 75% isopropanol ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex ประมาณ 10 วินาที หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาทีที่ 13,000 rpm เมื่อครบเวลากำจัดน้ำส่วนบนออกแล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง speed-vacuum เป็น

เวลา 5-10 นาที (หรือจนกว่าจะแห้ง) ละลายตะกอนของแต่ละตัวอย่างด้วย TSR 25  $\mu$ l นำตัวอย่างไปบ่มที่ 95°C เป็นเวลา 2 นาทีจากนั้นย้ายหลอดไปไว้ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที ในขั้นสุดท้ายย้ายส่วนผสมใส่ลงในหลอดสำหรับทำการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยตัวอย่างที่เตรียมไว้จะถูกนำไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยเครื่อง Perkin Elmer 310 Sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)

### 11. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลที่ได้มาทำการตรวจสอบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตชนิดใดบ้าง โดยใช้โปรแกรม Blast เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ที่มีอยู่ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI)

### 12. CTGF sandwich ELISA

วัดปริมาณของ CTGF ในซีรัมด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ biotinylated และ non-biotinylated affinity purified goat polyclonal antibodies ต่อ human CTGF โดยนำ 6  $\mu$ g/ml Anti-human CTGF C-terminal peptide antibody \*(R&D, USA) ซึ่งละลายใน 10 mM sodium carbonate\*, pH 9.6 ปริมาตร 100  $\mu$ l ใส่ลงใน flat-bottom ELISA plate (Costar 96-well) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง antibody ที่ไม่ได้จับกับผิว plate จะถูกชะออกไปด้วย PBS ที่ประกอบด้วย 0.1% (vol/vol) Triton X-100 (บัฟเฟอร์ A) 300  $\mu$ l ล้างจำนวน 4 ครั้ง เคา่น้ำออกให้หมด จากนั้นเติม 300  $\mu$ l ของบัฟเฟอร์ A ซึ่งประกอบด้วย 1% BSA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 300  $\mu$ l จำนวน 4 ครั้ง เคา่น้ำออกให้หมด เติม rhCTGF\* หรือ ซีรัมปริมาตร 100  $\mu$ l แล้วนำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 300  $\mu$ l จำนวน 4 ครั้ง กำจัดน้ำออกให้หมดแล้วเติม 0.8  $\mu$ g/ml Biotinylated anti-human CTGF C-terminal peptide antibody \*(R&D, USA) ปริมาตร 100  $\mu$ l นำไปบ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบเวลานำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ A ตามขั้นตอนที่ผ่านมา ภายหลังจากการล้างเติม 1.5  $\mu$ g/ml alkaline phosphatase - conjugated streptavidin\* 100  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยบัฟเฟอร์ A แล้วเติม 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate\* ปริมาตร 100  $\mu$ l บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30

---

\* ทุกรายละเอียดในภาคผนวก

นาที่ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.75 M NaOH แล้ววัดค่า Absorbance ที่ 405 nm ด้วย microplate reader

### 13. การวิเคราะห์ทางสถิติ

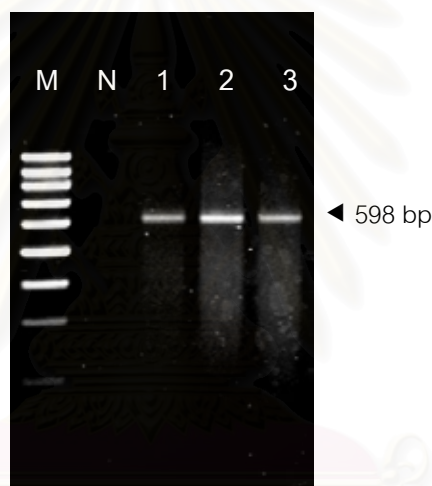
ในวิทยานิพนธ์นี้มีผลการทดลองที่ต้องวิเคราะห์คือผลจากการตรวจสอบ genotype และผลของระดับซีรัม CTGF ในกลุ่มผู้ป่วย โดย SNP genotypes จะถูกแบ่งออกเป็น สามกลุ่ม โดยถือว่า common homozygous genotype ที่พบมากที่สุดเป็นตัวอ้างอิง คำนวณ haplotype ด้วยการใช้ common haplotype ที่พบมากที่สุดเป็นตัวอ้างอิง สำหรับ SNP แต่ละตำแหน่งจะนำไปคำนวณว่าอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg equilibrium หรือไม่ด้วย Markov chain random-walk algorithm [114] และคำนวณ linkage disequilibrium coefficient ( $D'$ ) ตามวิธีของ Lewontin [115] ซึ่งการคำนวณที่กล่าวมาข้างต้นใช้โปรแกรม SNPAnalyzer ([http://www.istech.info/istech/board/login\\_form.jsp](http://www.istech.info/istech/board/login_form.jsp)) จากนั้นเปรียบเทียบความถี่ allele และ genotype ด้วย chi-square test (<http://www.unc.edu/~preacher/chisq/chisq.htm>) หาค่า Odds ratio และ 95% confidence interval (CI) ด้วยโปรแกรม Epi info version 6 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs และโรค เปรียบเทียบระดับของ CTGF ในเลือดกับ genotypes ด้วย analysis of variance (ANOVA) ใช้ Kruskal-Wallis test ด้วยโปรแกรม SPSS โดยกำหนดให้ค่า  $P < 0.05$  ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ *CTGF* gene ระหว่างตำแหน่ง -559 ถึง 39

สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ *CTGF* gene ได้ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ -559 ถึง 39 (CTGF-F และ CTGF-R) พบแถบของสารพันธุกรรมขนาด 598 bp โดยตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมได้จะนำไปตรวจสอบ Single nucleotide polymorphisms ในบริเวณดังกล่าวต่อไปด้วยวิธี Amplification- refractory mutation systems (ARMS) และ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) สำหรับผลของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในการทดลองครั้งนี้แสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณ -559 ถึง 39 ของ *CTGF* gene ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี phenal-chloroform extraction โดยใช้ 2% agarose gel โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง N คือ ชุดควบคุมที่ใช้แทน DNA ช่อง 1-3 คือ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง

#### 2. ผลการตรวจยืนยันผลของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ *CTGF* gene

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 250 bp จากการทำ direct sequencing มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blast จากฐานข้อมูลใน GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ภาพที่ 14) พบว่ามีความเหมือนกับ Human DNA sequence from clone RP11-69I8 on chromosome 6 Contains the *CTGF* gene for connective tissue growth factor, the 3' end of a novel gene and a CpG island, complete sequence มากที่สุด (97% Identity; 243/250 bp) และเหมือนกับ Homo sapiens connective tissue growth factor gene,

promoter and partial cds (96% Identity; 242/250 bp) ในอันดับรองลงมา ดังแสดงในภาพที่ 15 และ 16



ภาพที่ 14 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วย PCR ขนาด ประมาณ 600 bp ซึ่งลำดับเบสที่ได้รับจากการทำ sequencing มีจำนวน 250 bp

```
> gi|11128486|emb|AL354866.10 D Human DNA sequence from clone RP11-69I8
on chromosome 6 Contains the CTGF gene for connective tissue growth factor,
the 3' end of a novel gene and a CpG island, complete sequence Length=61349

Score = 391 bits (197), Expect = 3e-105
Identities = 243/250 (97%), Gaps = 1/250 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 14      TCCTTTTC-ACTCTTTGGAGAGTTTCAAGAGCCTATAGCCTCTAAAAACGCAAATCATTGC 72
            |||
Sbjct 33812    TCCTTTTCTACTCTTTGGAGAGTTTCAAGAGCCTATAGCCTCTAAAAACGCAAATCATTGC 33753

Query 73      TAAGGGTTnnnnnnnAGAAACCTTTTCGAATTTTTTAGGAATTCCTGCTGTTTGCCTCTT 132
            |||
Sbjct 33752    TAAGGGTTGGGGGGGAGAAACCTTTTCGAATTTTTTAGGAATTCCTGCTGTTTGCCTCTT 33693


Query 133     CAGCTACCTACTTCTCTAAAAAGGATGTATGTCAGTGGACAGAACAGGGCAAACCTTATTCG 192
            |||
Sbjct 33692    CAGCTACCTACTTCTCTAAAAAGGATGTATGTCAGTGGACAGAACAGGGCAAACCTTATTCG 33633

Query 193     AAAAAAGAAATAAGAAATAATGCCAGGGTGTATTATAAAAGAGATGAATCGGGAGGGGTGC 252
            |||
Sbjct 33632    AAAAAAGAAATAAGAAATAATGCCAGTGTATTATAAATGATATGAATCAGGAGTGGTGC 33573

Query 253     GAAGTGGATA 262
            |||
Sbjct 33572    GAAGAGGATA 33563
```

ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ขนาด 250 bp จากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ CTGF gene กับ Human DNA sequence จาก clone RP11-69I8

```

>  gi|14334034|gb|AF316368.1|AF316368  Homo sapiens connective tissue
growth factor gene, promoter and partial cds Length=1026

Score = 391 bits (197), Expect = 3e-105
Identities = 242/250 (96%), Gaps = 1/250 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 14 TCCTTTTC-ACTCTTTGGAGAGTTTCAAGAGCCTATAGCCTCTAAAACGCAAATCATTGC 72
      |||
Sbjct 254 TCCTTTCTACTCTTTGGAGAGTTTCAAGAGCCTATAGCCTCTAAAACGCAAATCATTGC 313

Query 73 TAAGGGTTnnnnnnnAGAAACCTTTTCGAATTTTTTAGGAATTCCTGCTGTTTGCCTCTT 132
      |||
Sbjct 314 TAAGGGTTCGGGGGAGAAACCTTTTCGAATTTTTTAGGAATTCCTGCTGTTTGCCTCTT 373

Query 133 CAGCTACCTACTTCTCTAAAAGGATGTATGTTCAGTGGACAGAACAGGGCAAACCTATTTCG 192
      |||
Sbjct 374 CAGCTACCTACTTCTCTAAAAGGATGTATGTTCAGTGGACAGAACAGGGCAAACCTATTTCG 433

Query 193 AAAAAGAAATAAGAAATAATTGCCAGGGTGTTTATAAAAAGAGATGAATCGGGAGGGGTGC 252
      |||
Sbjct 434 AAAAAGAAATAAGAAATAATTGCCAGTGTGTTTATAAATGATATGAATCAGGAGTGGTGC 493

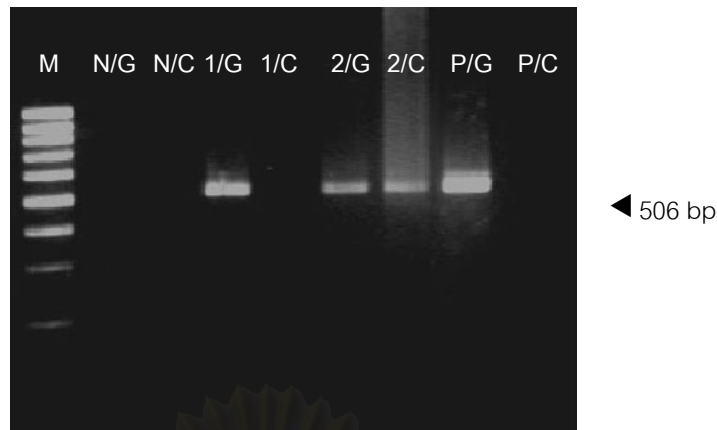
Query 253 GAAGTGGATA 262
      |||
Sbjct 494 GAAGAGGATA 503

```

ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ขนาด 250 bp จากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ *CTGF* gene กับ Homo sapiens connective tissue growth factor gene, promoter และบางส่วนของการถอดรหัส

### 3. ผลการวิเคราะห์ SNP ที่ตำแหน่ง -447G>C ด้วยวิธี ARMS

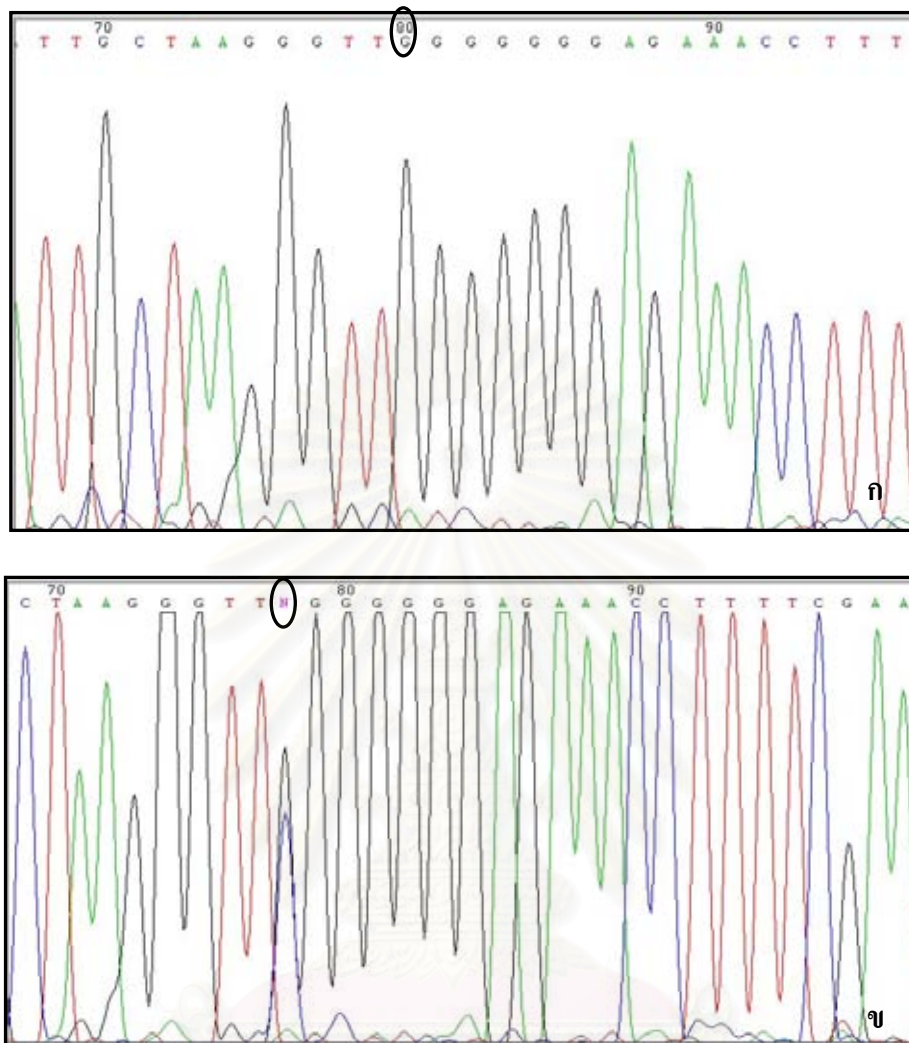
เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ *CTGF* gene ไปตรวจสอบ SNP ในตำแหน่ง -447G>C ด้วยวิธี ARMS ซึ่งสามารถตรวจ SNPs ได้ 3 รูปแบบด้วยกันคือ -447GG, -447GC และ -447CC ผลจากการตรวจสอบในกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 84 คนและกลุ่มควบคุมจำนวน 142 คน พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมีรูปแบบของ SNPs ที่เป็นแบบ -447GG จำนวน 70 คน แบ่งเป็นชาย 31 คน และหญิง 39 คน แบบ -447GC จำนวน 14 คน แบ่งเป็นชาย 9 คน หญิง 5 คน กลุ่มควบคุมมีรูปแบบ -447GG จำนวน 131 คน แบ่งเป็นชาย 45 คน หญิง 86 คน แบบ -447GC จำนวน 11 คน แบ่งเป็นชาย 2 คน หญิง 9 คน สำหรับรูปแบบ -447CC ตรวจไม่พบทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ภาพการตรวจสอบ SNP ในตำแหน่ง -447G>C ด้วยวิธี ARMS แสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 รูปแบบการตรวจสอบ SNPs บริเวณ -447G>C ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี ARMS โดยใช้ 2% agarose gel ช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง N/G คือชุดควบคุมสำหรับชุดที่ใช้ไพรเมอร์ CTGF/G ร่วมกับไพรเมอร์ CTGF-R ช่อง N/C คือชุดควบคุมสำหรับชุดที่ใช้ไพรเมอร์ CTGF/C ร่วมกับไพรเมอร์ CTGF-R และใช้น้ำแทน PCR product ช่อง 1/G และ 1/C คือ ตัวอย่างที่ 1 พบแถบของ DNA ในชุด 1/G เพียงชุดเดียว จัดเป็น homozygous GG ช่อง 2/G และ 2/C คือ ตัวอย่างที่ 2 พบแถบของ DNA ทั้งสองชุด จัดเป็น heterozygous GC ช่อง P/G คือ positive control สำหรับ homozygous GG ที่ได้จากพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ allele G เชื่อมอยู่ ใช้ไพรเมอร์ CTGF/G ร่วมกับไพรเมอร์ CTGF-R ช่อง P/C คือ positive control สำหรับ homozygous GG ที่ได้จากพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ allele G เชื่อมอยู่ ใช้ไพรเมอร์ CTGF/C ร่วมกับไพรเมอร์ CTGF-R

#### 4. ผลจากการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อยืนยันผล heterozygous GC และ homozygous GG ของ SNP ตำแหน่ง -447G>C

ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการตรวจด้วยวิธี ARMs ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็น heterozygous ทั้งหมดในกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 14 คน และกลุ่มควบคุมจำนวน 8 คนจาก 11 คน และ homozygous บางส่วนโดยตรวจสอบในกลุ่มผู้ป่วย 5 คนและกลุ่มควบคุม 10 คนโดยใช้วิธี direct sequencing จาก PCR product ระหว่างตำแหน่ง -559 ถึง 39 ของ CTGF gene ขนาดประมาณ 600 bp โดยใช้ไพรเมอร์ CTGF-R [15] จากผลการตรวจสอบพบว่าให้ผลตรงกับผลของ ARMs ทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ ผลการตรวจด้วยวิธี direct sequencing แสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ภาพ chromatogram ที่ได้รับจาก automated sequencing แสดง homozygous GG จากตัวอย่างที่ให้ผลเป็น homozygous GG ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี ARMs (ก) และ heterozygous GC จากตัวอย่างที่ให้ผลเป็น heterozygous GC ณ ตำแหน่ง -447G>C (ข)

##### 5. ผลการวิเคราะห์ SNP ที่ตำแหน่ง -132C>G ด้วยวิธี RFLP

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ *CTGF* gene ไปตรวจสอบ SNP ในตำแหน่ง -132C>G ด้วยวิธี RFLP ซึ่งสามารถตรวจได้ 3 รูปแบบคือ -132CC, -132CG และ -132GG ในกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 84 คนและกลุ่มควบคุมจำนวน 142 คน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย 2% agarose gel ซึ่งในกรณีของ homozygous CC ผลิตภัณฑ์ของ PCR product ขนาด 598 bp จะถูกย่อยออกเป็น 3 ส่วน ประกอบไปด้วยขนาด 427, 88 และ 83 bp กรณีของ heterozygous CG จะถูกย่อยออกเป็น 4 ขนาดด้วยกันคือ 515, 427, 88 และ 83 bp กรณีของ homozygous GG จะถูก



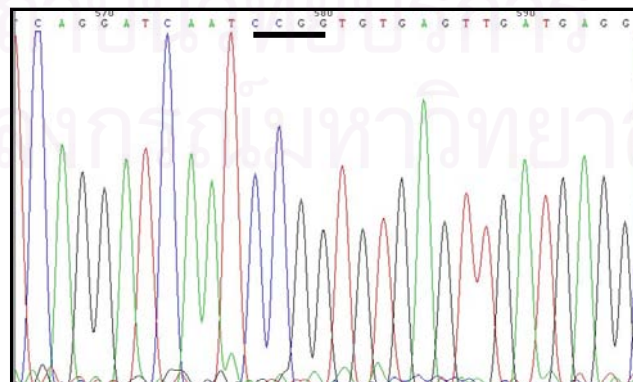
ย่อยออกเป็น 3 ขนาดคือ 515, 88 และ 83 bp ผลจากการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI พบว่าทั้งในกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 84 คนและกลุ่มควบคุมจำนวน 142 คน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ประกอบด้วยแถบขนาด 515, 88 และ 83 bp ซึ่งแปลผลได้ว่าเป็น homozygous GG (ภาพที่ 19)



**ภาพที่ 19** ภาพแสดงผลจากการย่อยด้วยเอนไซม์ *Bst*UI ใน 2% agarose gel โดย M คือ 100 bp DNA marker 1-5 คือตัวอย่างที่นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ *Bst*UI พบแถบของสารพันธุกรรมถูกย่อยเหลือขนาดประมาณ 515, 88 และ 83 bp โดยแถบของสารพันธุกรรมที่ถูกย่อยขนาด 88 และ 83 bp ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ซึ่งตรวจพบรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์แบบนี้ในทุกตัวอย่าง

#### 6. ผลการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อยืนยันผล homozygous GG ของ SNP -132C>G

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ CTGF gene ด้วยไพรเมอร์ CTGF-F และ CTGF-R ขนาดประมาณ 600 bp ไปตรวจสอบ SNP ในตำแหน่ง -132C>G ด้วยวิธี direct sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ CTGF-R เพื่อยืนยันผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI ซึ่งให้ผลเป็น homozygous GG ทั้งหมดในตัวอย่างที่ทดลอง ผลจากการตรวจสอบตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่างด้วยวิธี direct sequencing ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 20

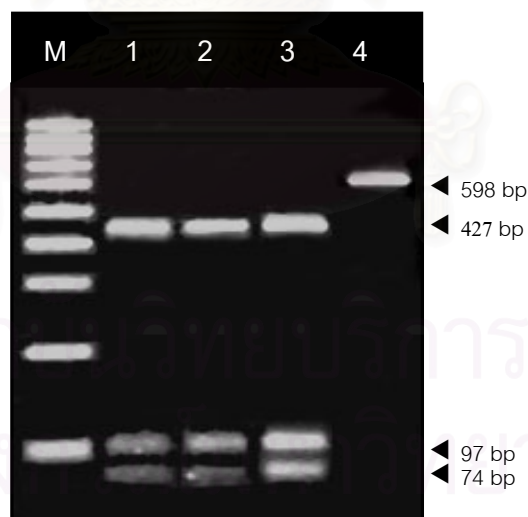


**ภาพที่ 20** ผลการตรวจด้วยวิธี direct sequencing บริเวณ -132 ทำให้ทราบว่าไม่มีลำดับเบสที่ไม่ใช่ restriction site ของเอนไซม์ *Bst*UI ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถตัดที่ตำแหน่งนี้ได้

จากผลการตรวจยืนยันด้วยวิธี direct sequencing ทำให้ทราบว่าเป็นเพราะลำดับเบสบริเวณ -132 ของ *CTGF* gene มีการเรียงลำดับเป็นแบบที่เอนไซม์ *Bst*UI ไม่สามารถตัดได้ (ซึ่งเอนไซม์นี้มี restriction site คือ CG/CG แต่จากผลการตรวจลำดับเบสทั้งหมด 20 ตัวอย่างโดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วย 10 คน และกลุ่มควบคุม 10 คน ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 24 คือบริเวณนั้นมีการเรียงลำดับเบสเป็นแบบ CCGG จึงทำให้เห็นเป็นรูปแบบเดียวกับ homozygous GG คือมีแถบของสารพันธุกรรมที่บริเวณประมาณ 515 bp ซึ่งหมายความว่าเอนไซม์ไม่สามารถตัดในตำแหน่งนี้ได้นั่นเอง

### 7. ผลการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อยืนยันผล sequencing ที่ตำแหน่ง -132 ด้วย RFLP

เนื่องจากผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI ไม่สามารถตัดที่ตำแหน่ง -132 ได้เพราะมีลำดับเบสที่ไม่ตรงกับ restriction site ของเอนไซม์ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลจากการทำ sequencing ว่าลำดับเบสในตัวอย่างที่ทำการศึกษานั้นทั้งหมดมีการเรียงลำดับเป็นแบบ CCGG ทุกตัวอย่างจริง จึงได้ทำการยืนยันผลของ sequencing ด้วยการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ -559 ถึง 39 ของ *CTGF* gene ทุกตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hpa*II ซึ่งมี restriction site เป็นแบบ CC/GG หากมีลำดับเบสเรียงแบบ CC/GG ชิ้นส่วนขนาด 598 bp จะถูกย่อยออกเป็น 3 ส่วนคือ 427, 97 และ 74 bp ผลการตรวจสอบด้วย RFLP โดยใช้ *Hpa*II แสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ผลการตรวจสอบด้วย RFLP โดยใช้ *Hpa*II ใน 2% agarose gel โดย M คือ 100 bp DNA marker 1-3 คือตัวอย่างที่นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa*II 4 คือชุดควบคุมที่มีตัวอย่างและใช้น้ำแทนเอนไซม์

จากภาพที่ 21 เอนไซม์ *Hpa*II สามารถย่อยทุกตัวอย่างและให้แถบของ DNA เป็น 3 ส่วนคือ 427, 97 และ 74 bp แสดงว่าทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษามีลำดับเบสเรียงแบบ CCGG ไม่เหมือนกับการเรียงแบบ CGCG ดังที่มีรายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้ [15]

## 8. ผลการวัดระดับ CTGF ในเลือดด้วย sandwich ELISA

ตรวจสอบระดับของ CTGF ในเลือดด้วย sandwich ELISA เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ CTGF ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยกับ genotype แบบต่างๆ ที่เกิดจาก polymorphisms ในบริเวณ CTGF promoter รวมทั้งเปรียบเทียบระดับของ CTGF ในเลือดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ทำการพัฒนาชุด sandwich ELISA โดยใช้ capturing antibody คือ Anti-human CTGF C-terminal peptide antibody และ detecting antibody คือ Biotinylated anti-human CTGF C-terminal peptide antibody ตรวจวัดด้วยระบบ Alkaline phosphatase (AP) และ para-nitro phenylphosphate (PNPP) และใช้ recombinant human CTGF เป็น standard เพื่อใช้ในการวัดหาระดับของ CTGF ที่ต้องการตรวจสอบในตัวอย่างซีรัม ผลการทดลองคือไม่สามารถตรวจวัดระดับของ CTGF ได้เนื่องจากตรวจไม่พบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ recombinant human CTGF และค่าที่ได้จากการทดลองของระดับ CTGF ในกลุ่มควบคุมปกติไม่ตรงตามค่าเป็นจริงที่ได้จากการทดลองอื่น [121] สำหรับผลการทดลองและตารางการเติมสาร แสดงในภาพที่ 22

	1	2	ช่อง	1° antibody	antigen	2° antibody
A	0.040	0.464	1A	X	X	X
B	0.144	0.350	1B	X	Healthy serum	✓
C	0.419	0.431	1C	✓	X	✓
D	0.543		1D	✓	rhCTGF 200 ng/ml	✓
E	0.600		1E	✓	rhCTGF 100 ng/ml	✓
F	0.564		1F	✓	rhCTGF 50 ng/ml	✓
G	0.343		1G	✓	rhCTGF 10 ng/ml	✓
H	0.536		1H	✓	rhCTGF 1 ng/ml	✓
			2A	✓	rhCTGF 0.1 ng/ml	✓
			2B	✓	rhCTGF 1 µg/ml	✓
			2C	✓	Healthy serum	✓

ภาพที่ 22 ผลการวัดค่าความเข้มแสงในความเข้มข้นของโปรตีนระดับที่แตกต่างกัน

## 9. ผลการคำนวณทางสถิติ

### 9.1 การศึกษา polymorphism ของยีน CTGF

เมื่อตรวจสอบ SNPs ของยีน CTGF ที่ตำแหน่ง -447G>C และ -132C>G โดยใช้วิธี ARMs และ RFLP ตามลำดับในการศึกษานี้พบว่าพบเพียงตำแหน่ง -447G>C เท่านั้นที่พบ polymorphisms โดยที่ตำแหน่ง -447 ในกลุ่มควบคุมจำนวน 142 คน (อายุเฉลี่ย  $\pm$  SD = 17.39  $\pm$  9.21) พบว่ามีแบบของ genotype GG, GC และ CC จำนวน 131, 11 และ 0 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 84 คน (อายุเฉลี่ย  $\pm$  SD = 6.12  $\pm$  4.79) พบว่ามีแบบของ genotype เป็น GG จำนวน 70 คน GC จำนวน 14 คน และไม่พบแบบ CC เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 CTGF genotypic และ allele distribution ณ ตำแหน่ง -447G>C ในผู้ป่วย BA และกลุ่มควบคุม

	BA, n (%) n=84	Controls, n(%) n=142	Odds ratio (95%CI)	P
Age (yr)	6.12 $\pm$ 4.79	17.39 $\pm$ 9.21		<0.0005
Male: female	40: 44	47: 95		0.03
Genotype				
GG	70 (83.33)	131 (92.25)	Ref	
GC	14 (16.67)	11 (7.75)	2.38 (0.96-5.98)	0.04
CC	0 (0)	0 (0)		
Alleles				
G	154 (91.67)	273 (96.13)	Ref	0.05
C	14 (8.33)	11 (3.87)	2.26 (0.94-5.47)	

Ref. = Reference category

### 9.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง -447G>C polymorphism และ สภาวะ jaundice

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของ CTGF gene promoter ที่ตำแหน่ง -447 ในกลุ่มผู้ป่วยโดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มคือ No jaundice (TB < 2.0 mg/dl) และ persistent jaundice (TB  $\geq$  2.0 mg/dl) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 CTGF genotypic และ allele distribution ณ ตำแหน่ง -447G>C ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันแบบ without jaundice และ persistent jaundice

	No Jaundice, n(%) n=47	Jaundice, n(%) n=37	Odds ratio (95%CI)	P
Age (yr)	6.70 $\pm$ 4.35	5.38 $\pm$ 5.26		0.210
Male: Female	24: 23	16:21		0.476
Genotype				
GG	40 (85.11)	30 (81.08)	Ref	
GC	7 (14.89)	7 (18.92)	1.33 (0.37-4.84)	0.623
CC	0 (0)	0 (0)		

Ref. = Reference category

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ที่ตำแหน่ง -447G>C กับระดับ CTGF ในเลือดของผู้ป่วย without jaundice และ persistent jaundice, การศึกษา polymorphism ที่ตำแหน่ง -132C>G ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม, การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ที่ตำแหน่ง -132C>G กับระดับ CTGF ในเลือดของผู้ป่วย without jaundice และ persistent jaundice, การศึกษาความแตกต่างระหว่างระดับ CTGF ในเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยไม่สามารถทำได้เนื่องจาก ตรวจไม่พบ polymorphism ที่ตำแหน่ง -132 ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา และไม่สามารถตรวจวัดระดับของ CTGF ในเลือดได้อย่างถูกต้องแน่นอน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### สรุปผลการทดลอง

ยีน *CTGF* เป็นยีนที่ถูกค้นพบใหม่ว่ามีบทบาทในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อและเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิดพังผืด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกอย่างมากในหลายโรคที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดเช่นโรค liver fibrosis [97] ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของ *CTGF* อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดก็เป็นได้ และโรคท่อน้ำดีตีบตันก็เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืด Polymorphism ในส่วน promoter ของยีนอาจส่งผลกระทบต่อการเกิด transcription และต่อเนื่องไปถึงการแสดงออกของยีน ในกรณีนี้ความแตกต่างของ genotypes ที่มีอยู่ในแต่ละบุคคลอาจเป็นตัวบ่งบอกถึงความแตกต่างทาง susceptibility, severity และผลทางคลินิกของโรคได้ [116] จากการศึกษาของ Blom และคณะ [15] ซึ่งได้ศึกษา polymorphic sites ในส่วน promoter ของยีน *CTGF* ในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 45 คนกับกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค Ischemic heart disease (IHD) จำนวน 32 คน พบว่าในกลุ่มควบคุม 6 คน และกลุ่มผู้ป่วย IHD จำนวน 5 คน ที่ตำแหน่ง -447 ของยีน *CTGF* พบ polymorphism แบบ G>C ซึ่งตำแหน่งนี้ใกล้เคียงกับตำแหน่ง binding site ของ MZF1 โดย MZF1 นี้มีความสำคัญต่อการเกิด granulopoiesis ในมนุษย์ และพบว่าเมื่อ transfect เข้าไปในเซลล์ NIH3T3 ส่งผลให้เซลล์มี growth rate เพิ่มมากขึ้น ยิ่งกว่านี้ยังพบว่าเมื่อ transfect เซลล์ด้วย MZF1 เข้าไปใน athymic mice ทำให้เซลล์มีการพัฒนาไปเป็น fibrosarcomas ด้วย [117] ใน In vitro เมื่อทำการ transfect MZF1 เข้าไปในเซลล์ NIH3T3 พบว่าเซลล์สูญเสีย contact inhibition และพบอีกว่าการเกิด proliferation ของเซลล์ NIH3T3 fibroblast ในจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อให้ร่วมกับ *CTGF* และเมื่อทำการศึกษาต่อไปในสัตว์ทดลองพบว่าการให้ MZF1 ร่วมกับ *CTGF* จะกระตุ้นให้เกิด fibroblast proliferation และ granulation tissue formation [118] จากหลักฐานต่างๆที่กล่าวมา เป็นไปได้ว่าบทบาทของ MZF1 น่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *CTGF*

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วย IHD 1 คนพบ C>G substitution ที่ตำแหน่ง -132 โดยที่ตำแหน่งนี้มีความใกล้เคียงกับ Pbx-1 homeo domain box ซึ่งคาบเกี่ยวด้านการควบคุมการแสดงออกของยีนระหว่าง Pbx และ Hox ในการควบคุมรูปแบบการกำหนด anterior-posterior และการพัฒนาของเอมบริโอ [15] และ *CTGF* ก็เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเอมบริโอด้วย ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงบทบาทของ -132C>G substitution ในการแสดงออกด้านใดๆเลย อาจเป็นไปได้ว่าตำแหน่งนี้อาจส่งผลต่อ susceptibility, severity และผลทางคลินิกของโรคได้ susceptibility, severity และผลทางคลินิกของโรคได้เช่นกัน

เมื่อทำการทดลองในตำแหน่ง -447 และ -132 ของยีน *CTGF* ในกลุ่มประชากรคนไทยพบว่าที่ตำแหน่ง -447 ในกลุ่มผู้ป่วยมี Genotype แบบ heterozygous GC สูงกว่าในกลุ่มควบคุม ( $p$ -value = 0.04) โดยมี genotype frequency แบบ homozygous GG ในกลุ่มควบคุมคือ 92.25 % และในกลุ่มผู้ป่วยคือ 83.33 % แบบ heterozygous GC ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 7.75 % และกลุ่มผู้ป่วยเท่ากับ 16.67 % ซึ่งในการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้ในโรค IHD [15] ก็มีค่าของ genotype frequency ใกล้เคียงกัน คือ ในแบบ homozygous GG ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 86.6% ในกลุ่มผู้ป่วยคือ 84.4% แต่สำหรับแบบ heterozygous GC ในกลุ่มที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้มีความแตกต่างกันกับกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน คือ มีค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 13.3 % และกลุ่มผู้ป่วยมีค่าเท่ากับ 15.6 % ซึ่งในการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง genotype แบบ heterozygous GC ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย เป็นที่น่าสังเกตว่าทั้งในการทดลองที่มีรายงานมาก่อนหน้าและในการทดลองนี้ตรวจไม่พบบุคคลที่มี genotype CC เลยทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

เมื่อนำข้อมูลจากการศึกษามาคำนวณค่า Odds ratio เพื่อคำนวณหาว่าบุคคลหนึ่งหากมี genotype แบบ GC จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นเท่าใด พบว่าได้ค่าเป็น 2.38 และมีค่า 95%CI อยู่ระหว่าง 0.96-5.98 เนื่องจากค่า 95%CI มีค่า 1 ตกอยู่ในช่วงดังกล่าวด้วย แสดงว่าอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคในกลุ่มผู้มี genotype GC เท่ากับอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคในกลุ่มที่ไม่มี genotype GC

เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ตำแหน่ง -447 เปรียบเทียบกับระดับความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคตามค่า Total bilirubin พบว่า polymorphism แบบ GC ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคหรือระดับพังผืดในตับของผู้ป่วย ( $p$ -value = 0.623)

ในการศึกษา polymorphism ในตำแหน่ง -132 ของยีน *CTGF* พบว่าเมื่อทำการทดลองแล้วในกลุ่มประชากรของคนไทยทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าที่ตำแหน่งนี้มีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสที่แตกต่างไปจากกลุ่มประชากรที่มีรายงานไว้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรเนเธอร์แลนด์ [15] ดังนั้นตำแหน่งนี้จึงไม่เป็น polymorphism ในกลุ่มประชากรไทย ภายหลังจากการรายงานการศึกษาในกลุ่มประชากรคอเคซอยด์หลังจากนั้น 1 ปีได้มีรายงานของลำดับเบสในส่วน *CTGF* promoter gene ตั้งแต่ตำแหน่ง -499 ถึง +100 ซึ่งทำการศึกษาในประชากรชาวญี่ปุ่นและมีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับประชากรไทยพบว่าที่ตำแหน่ง -132 ในประชากรชาวญี่ปุ่นมีการเรียงลำดับเบสที่เหมือนกับประชากรชาวไทย [119]

ในการศึกษาระดับ CTGF ในเลือดด้วยวิธี ELISA นั้นไม่สามารถวัดระดับปริมาณโปรตีนในเลือดได้เนื่องจากระบบไม่มีความไวพอในการแยกแยะระดับปริมาณโปรตีน

### วิจารณ์ผลการทดลอง

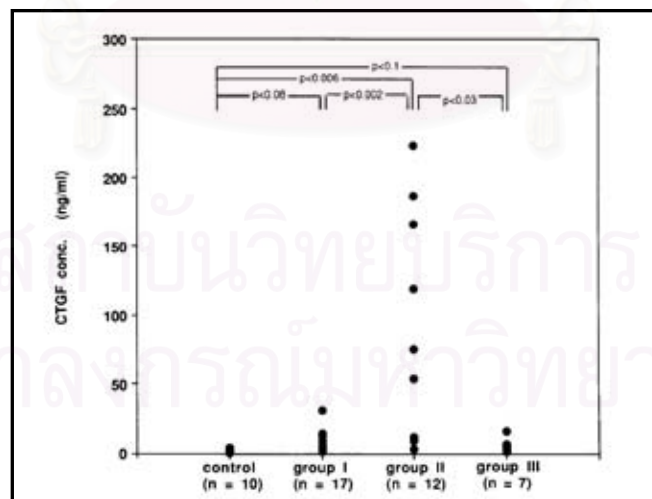
การศึกษาความถี่ของ genotype และ allele ในตำแหน่ง polymorphic site ของ CTGF promoter gene ในตำแหน่ง -447G>C พบว่าการเกิด polymorphism ที่ตำแหน่งนี้ไม่เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรคหรืออัตราการเกิดพังผืดในตับของผู้ป่วยแต่ละคน ซึ่งมีความเป็นไปได้เนื่องจากเมื่อตรวจสอบลำดับการเรียงตัวของเบสที่เป็น recognition site ของ MZF-1 ในมนุษย์แล้วพบว่า recognition site เป็น NGNGGGGA [120] จะสังเกตเห็นว่าตำแหน่งแรกของ recognition site คือตัว N ซึ่งหมายถึงเบสใดๆก็ได้ และตำแหน่งนี้ตรงกับตำแหน่ง polymorphic site ของ -447G>C พอดี ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าไม่อาจมีการเปลี่ยนเบสเป็นแบบใด เช่นมีการเปลี่ยนเบสแบบ G ไปเป็นแบบ C ดังที่ตำแหน่ง -447 ก็ไม่น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ transcription ของยีน และจากการคำนวณค่า odds ratio เพื่อคำนวณหาว่าบุคคลหนึ่งหากมี genotype แบบ GC จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นเท่าใดนั้นได้ค่าเป็น 2.38 และมีค่า 95%CI อยู่ระหว่าง 0.96-5.98 ซึ่งตามทฤษฎีแล้วจะถือว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากค่า 95%CI มีค่าล่างอยู่ที่ 0.96 และค่าบนอยู่ที่ 5.98 สังเกตได้ว่าค่ามีแนวโน้มที่จะมีความเสี่ยงมากกว่าจึงอาจถือได้ว่าบุคคลที่มี genotype แบบ GC มีแนวโน้มที่จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันมากกว่าบุคคลที่ไม่มี genotype แบบ GC

จากการศึกษาความถี่ของ genotype และ allele ที่ตำแหน่ง -132C>G ไม่พบว่ามี polymorphism ที่ตำแหน่งนี้ในกลุ่มประชากรชาวไทยที่ทำการศึกษาซึ่งลำดับการเรียงตัวของเบสเรียงแบบเดียวกับกลุ่มประชากรชาวญี่ปุ่น แต่เรียงต่างกับกลุ่มประชากรชาวเนเธอร์แลนด์ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งนี้อาจไม่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเนื่องจากอุบัติการณ์ในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความใกล้เคียงกันทั่วโลก [18-22] และความแตกต่างกันนี้ยังแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งนี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างกับระดับของพังผืดในตับที่แตกต่างกันในผู้ป่วย ทั้งนี้เนื่องจากผู้ป่วยทุกคนมีการเรียงลำดับเบสที่ตำแหน่งนี้เป็นรูปแบบเดียวกัน

ในการศึกษาระดับ CTGF ในเลือดได้ทำการวัดระดับโปรตีนโดยวิธี sandwich ELISA แต่เนื่องจากไม่มีชุดตรวจวัดระดับโปรตีน CTGF สำเร็จรูปจำหน่ายจึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจเอง และจำเป็นต้องใช้ capturing, detecting antibody และ recombinant human CTGF จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการวัดระดับโปรตีนตัวนี้ในต่างประเทศใช้ antibody ทั้งสองตัว และ recombinant human CTGF ที่ใช้เป็น standard จากบริษัท FibroGen ซึ่งเป็นบริษัทค้นคว้าพัฒนายา โดยได้ติดต่อขอ recombinant human CTGF และ antibody ทั้งสองตัวจากบริษัทแต่ไม่ได้รับการตอบรับใดๆ จึงจำเป็นต้องสั่งซื้อ antibody จากบริษัท R&D และ recombinant



human CTGF จากบริษัท MBL แต่เนื่องจากบริษัท FibroGen ได้จดลิขสิทธิ์เกี่ยวกับ antibody ทั้งสองตัวไว้ทำให้บริษัทอื่นๆไม่สามารถผลิต antibody ที่จำเพาะกับส่วนที่ทางบริษัท FibroGen จดลิขสิทธิ์ไว้ก่อนได้ ดังนั้น antibody ทั้งสองตัวที่ได้สั่งซื้อจากบริษัท R&D จึงจำเพาะกับโปรตีนคนละส่วนกับของทางบริษัท FibroGen และตัว capturing antibody ที่สั่งซื้อได้ระบุไว้ในข้อบ่งใช้ว่าสำหรับการตรวจสอบแบบ direct ELISA ส่วน detecting antibody ได้ระบุไว้สำหรับ western blot ซึ่งไม่ได้ระบุโดยตรงว่าใช้ได้กับ sandwich ELISA อย่างไรก็ตามทางบริษัท R&D ได้ทดลองใช้ antibody 2 ตัวนี้ในการทำ sandwich ELISA ซึ่งสามารถตรวจสอบ recombinant human CTGF ได้ แต่ไม่ได้ทดลองกับตัวอย่างซีรัมจริงและไม่ได้มีการทดลองเพิ่มเติมไปกว่านี้ จึงได้นำ antibody ทั้งสองตัวมาพัฒนาชุด sandwich ELISA แต่ก็มีขีดจำกัดคือผลที่ได้รับไม่สามารถตรวจวัดระดับของ CTGF อันเป็นค่าที่ถูกต้องได้เนื่องจาก recombinant human CTGF ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบระดับของ CTGF นั้นให้ค่าจากการวัดความเข้มแสง (OD) ซึ่งวัดที่ความยาวคลื่น 405 nm ไม่ต่างกันระหว่างค่าปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน ในการทดลองที่ผ่านมาได้ทดสอบปริมาณโปรตีนไปแล้ว 8 ความเข้มข้นด้วยกันคือ 0, 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 ng/ml และ 1 µg/ml พบว่าปริมาณโปรตีนที่ต่างกันทั้งหมดให้ค่าจากการวัดความเข้มแสงไม่ต่างกัน นอกจากนี้เมื่อนำไปทดสอบด้วยซีรัมของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นบุคคลปกติจำนวน 4 รายและมีอายุใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย ค่าที่ได้ควรจะมีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนอยู่ที่น้อยกว่า 0.5 ng/ml [121] แต่ค่าที่วัดได้ให้ค่าวัดความเข้มแสงเท่ากับ recombinant human CTGF ความเข้มข้นโปรตีนที่ 200 ng/ml ผลการทดลองที่ได้จึงให้ค่าของกลุ่มควบคุมผิดหลักความเป็นจริงดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ระดับซีรัม CTGF ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี [121]

จากภาพที่ 22 รายงานผลการตรวจสอบระดับของ CTGF ในซีรัมโดยใช้ sandwich ELISA ในกลุ่มประชากรชาวญี่ปุ่น เห็นได้ว่ากลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่น้อยกว่า 0.5 ng/ml กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันแบ่งด้วยค่า liver function test ออกเป็น 3 กลุ่มซึ่งค่าที่มากที่สุดของกลุ่ม

ผู้ป่วยอยู่ที่ 220.90 ng/ml จากหลักฐานดังกล่าวจึงเป็นไปได้ที่ค่าของระดับโปรตีนในกลุ่มควบคุมจะมีค่าเท่ากับผู้ป่วยที่มีค่าของโปรตีนมากที่สุด นอกจากนี้ยังประสบปัญหา background สูงแต่ไม่สามารถปรับลดได้เนื่องจากค่า OD ที่วัดได้อยู่ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามก็ได้ทำการแก้ปัญหาดังกล่าวดังนี้

#### สัญญาณต่ำ

- ปรับระยะเวลา incubate ให้มากขึ้น ผลที่ได้คือ สัญญาณยังคงต่ำแต่ให้ background สูงขึ้น
- ตรวจสอบ activity ของ substrate และ conjugate แล้วว่าสามารถใช้ตรวจสอบได้
- อาจมีสารประกอบบางอย่างในตัวอย่างที่ทดลองรบกวน antibody ที่ coat ไว้ที่ ELISA plate จึงทำการ dilute ซีรัมแต่ให้ผลไม่ค่อยแตกต่างกับไม่ dilute มากนักอีกทั้งในส่วนของ recombinant human CTGF ซึ่งค่อนข้างบริสุทธิ์ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน
- ตรวจสอบแล้วว่าปริมาณของสารที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดได้ใช้ตามช่วงที่บริษัทได้แนะนำไว้

#### Background สูง

- ได้เพิ่มปริมาตรของ blocking solution เวลาในการ incubate และเปลี่ยนชนิดของ blocking solution เป็นหลายชนิดแล้วแต่ให้ผลคงเดิม
- ได้ปรับความเข้มข้นของ conjugated second antibody โดยทำการลดความเข้มข้นของลงแล้วแต่ก็ยังคงให้ background สูงเช่นเดิม

- ใช้ detergent ที่แรงขึ้นก็ยังส่งผลให้เกิด high background อยู่

ซึ่งจากการปรับเปลี่ยนตามขั้นตอนต่างๆแล้วก็ยังให้ผลคงเดิมอยู่นั่นคือสัญญาณต่ำ background สูง และไม่สามารถตั้งค่า standard ได้ เมื่อได้ทำการทดลองเพิ่มสัญญาณก็จะทำให้ background สูงขึ้นตามไปด้วย เมื่อ background สูงแล้วทำการเพิ่มความแรงของ detergent ทำให้ background ลดลงแต่ก็ทำให้สัญญาณหายไป อีกทั้งปริมาณของโปรตีนในซีรัมของกลุ่มควบคุมปกติให้ค่าที่สูงเกินความเป็นจริงได้ลอง dilute ซีรัมลงครึ่งหนึ่งให้ผลไม่ต่างกับไม่ dilute ด้วยเหตุนี้จึงไม่ยังสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบได้

และเนื่องจากปัจจุบันนี้ยังไม่มีชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (Kit) จำหน่าย ซึ่งบางการทดลองได้มีการ induce antibody ในหนูขึ้นมาใช้ แต่สำหรับการทดลองนี้ได้ซื้อ antibody ซึ่งมีความจำเพาะกับส่วนที่แตกต่างกันของโปรตีน CTGF ใช้ standard ที่ผลิตเพื่อจำหน่ายและได้มาจากคนละแหล่งกับ antibody ซึ่งตามหลักแล้วไม่น่าจะมีความแตกต่างกันในการให้ผลของการตรวจสอบปริมาณโปรตีน การพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับโปรตีน CTGF เพื่อจำหน่ายนี้อาจเป็นไปได้ยากเนื่องจากติดปัญหาลิขสิทธิ์ของบริษัท FibroGen ที่มุ่งพัฒนายามากกว่าที่จะผลิตเพื่อ

การคำอีกทั้งหากจะผลิต antibody ที่จำเพาะกับส่วนเดียวกับของทางบริษัท FibroGen ซึ่งให้ผลการทดลองที่ดีก็ทำไม่ได้เนื่องจากติดปัญหาลิขสิทธิ์เช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในส่วนที่ได้ทำการทดลองไปแล้วซึ่งพบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคดังนั้นก็อาจจะไม่ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนเปลี่ยนแปลงจนส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของพังผืดที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลได้ ดังนั้นการทำการวัดระดับ CTGF ด้วย ELISA ก็อาจไม่จำเป็นที่จะต้องทำการทดลอง

โดยสรุปคือพบ polymorphism ที่ตำแหน่ง -447 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีรูปแบบของ Genotype GC สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $p$ -value = 0.04) โดยบุคคลที่มี Genotype GC ในตำแหน่งของ -447CTGF promoter gene มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่แตกต่างไปจากบุคคลที่ไม่มี genotype แบบนี้ และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งนี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของการทำงานของตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

1. Hollander, M., and Schaffner, F. Electron microscopic studies in biliary atresia. L Bile ductular proliferation. Am J Dis Child 116 (1968): 49-56.
2. Hollander, M., and Schaffner, F. Electron microscopic studies in biliary atresia. IL Hepatocellular alteration. Am J Dis Child 116 (1968): 57-65.
3. Sterling, J. A. Biliary tract morphology and prognosis of biliary atresia. An J Gastroenterol 45 (1966): 261-266.
4. Gautier, M., and Eliot, N. Extrahepatic biliary atresia: morphological study of 98 biliary remnants. Arch Path Lab Med 105 (1981): 397-402.
5. Karrer, F. M.; Lilly, J. R.; Stewart, B. A.; and Hall, R. J. Biliary atresia registry, 1976 to 1989. J Pediatr Surg 25 (1990): 1076-1080.
6. Rudolph, J. A., and Balistreri, W. F. Optimal treatment of biliary atresia-“Halfway” there! Hepatology 30 (1999): 808-810.
7. Chardot, C., et al. Prognosis of biliary atresia in the era of liver transplantation: French national study from 1986 to 1996. Hepatology 30 (1999): 606-611.
8. McKiernan, P. J.; Baker, A. J.; and Kelly, D. A. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. Lancet 355 (2000): 25-29.
9. Yoon, P. W.; Bresee, J.S.; Olney, R. S.; James, L. M.; and Khoury, M.J. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. Pediatrics 99 (1997): 376-382.
10. Fischler, B.; Haglund, B; and Hjern, A. A Population-based study on the incidence and possible pre- and perinatal etiologic risk factors of biliary atresia. J Pediatr 141 (2002): 217-222.
11. Desmet, V. J. Ludwig symposium on biliary disorder- - part I. Pathogenesis of ductal plate abnormalities. Mayo Clin Proc 73 (1998): 80-89.
12. Blom, I. E.; Goldschmeding, R; and Leask, A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? Matrix Biol 21 (2002): 473-482.
13. Moussad, E. A., and Brigstock, D. R. Connective tissue growth factor: What's in a name? Mol Gen Met 71 (2000): 276-292.

14. Ortlepp, J. R., et al. The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. Euro Heart J 25 (2004): 514-522.
15. Blom, I. E.; van Dijk, A. J.; de Weger, R. A.; Tilanus, M. G. J.; and Goldschmeding, R. Identification of human *ccn2* (connective tissue growth factor) promoter polymorphisms. J Clin Pathol: Mol Pathol 54 (2001): 192-196.
16. Balistreri, W. F., et al. Biliary atresia: summary of a symposium. Hepatology 23 (1996): 1682-1697.
17. Howard, E. R. Biliary atresia. In M. D. Stringer; K. T. Oldham; P. D. E. Mouriquand; E. R. Howard (eds.), Pediatric surgery and urology: long term outcomes, pp.402-416. London: WB Saunders, 1998.
18. Houwen, R. H.; Kerremans, I; van Steensel- Moll, H. A.; van Romunde, L. K.; Bijleveld, C. M; and Schweizer, P. Time- space distribution of extrahepatic biliary atresia in The Netherlands and west Germany . Z kinderchir 43 (1988): 68-71.
19. Chardot, C; Carton, M; Spire-Bendelac, N; Le Pommelet, C; Gollmard, J. L; and Auvert, B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-96, J hepatol 31 (1999):1006-1013.
20. Strickland, A. D., and Shannon, K. Studies in the aetiology of extrahepatic biliary Atresia: time-space Clustering. Pediatrics 100 (1982): 749-753.
21. Danks, D. M; Campbell, P. E.; Jack, I.; Rogers, J; and Smith, A. I. Studies of the actiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. Arch Dis child 52 (1977): 360-367.
22. Chiba, T.; Ohi, R.; Kamiyama, T.; Nio, M.; and Ibrahim, M. Japanese biliary atresia registry. In R Ohi (ed.), Biliary atresia, pp. 79-86. Tokyo: ICOM associates, 1991.
23. Sydney, M. C. Extra-hepatic biliary atresia: diagnostic methods. J Pediatr 79 (2003):107-114.
24. Sokol, R. J.; Mack C.; Narkewicz M. R.; and Karrer F. M. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. J Pediatr Gastro Nutr 37 (2003): 4-21.

25. Schweizer, P., and Kerremans, J. Discordant findings extrahepatic bile duct atresia in 6 sets of twins. Z Kinderchir 43 (1988): 72-75.
26. Hyams, J. S.; Glaser, J. H.; Leichtner, A. M.; and Morecki, R. Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins. J pediatr 107 (1985): 420-422.
27. Poovorawan, P; Chongsrisawat, V; Tanunyuthawongse, C; Norapaksunthorn, T; Mutirangura, A; and Chandrakamol, B. Extrahepatic biliary atresia in twins: Zygosity determination by short tandem repeat loci. J Med Assoc Thai 79 (1996): 119-124.
28. Sokol, R. J., and Mack, C. Etiopathogenesis of biliary atresia. Semin Liver Dis 21 (2001): 517-524.
29. Landing, B. H. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst- - the concept of infantile obstructive cholangiopathy. Prog pediatr Surg 6 (1974):113-139.
30. Tarr, P. I.; Hass, J. E.; and Christie, D. L. Biliary atresia, cytomegalovirus, and age at referral. Pediatrics 97 (1996): 828-831.
31. Jevon, G. P., and Dimmick, J. E. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. Pediatr Dev Pathol 2 (1999): 11-14.
32. Bangaru, B.; Morecki, R.; Glaser, J. H.; Garther, L. M.; and Horwitz, M. S. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus – indeed cholangitis in weanling mice. Lab invest 43 (1980): 456-462.
33. Morecki, R.; Glaser, J. H.; Cho, S.; Balistreri, W. F.; and Horwitz, M. S. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. New Engl J Med 307 (1982): 482-484.
34. Morecki, R., et al. Detection of reovirus type 3 in the liver of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. Hepatology 4 (1984): 1137-1142.
35. Rosenberg, D. P.; Morecki, R.; Lollini, L. O.; Glaser, J; and Cornelius, C. E. Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (*macaca mulata*). Hepatology 3 (1983): 577-580.
36. Steele, M. I., et al. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. Hepatology 21 (1995): 697-702.

37. Riepenhoff-Talty, M., et al. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. Pediatr Res 33 (1993): 394-399.
38. Riepenhoff-Talty, M., et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. J Infect Dis 174 (1996): 8-15.
39. Bobo, L., et al. Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction/ enzyme immunoassay of hepatobiliary samples from children with biliary atresia. Pediatr Res 41 (1997): 229-234.
40. Drut, R., et al. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 27 (1998): 530-535.
41. Domiati-Sadd, R.; Dawson, D. B.; Margraf, L. R.; Finegold, M. J., Weinberg, A. G.; and Roger, B. B. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. Pediatr Dev Pathol 3 (2000): 367-373.
42. Schreiber, R. A., and Kleinman, R. E. Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a division? J pediatr Gastroenterol Nutr 16 (1993): 111-113.
43. Donaldson, P. T., and Manns, M. P. Immunogenetics of liver disease. In J. P. Benhamou, et al. (eds.), Oxford textbook of clinical hepatology, pp.173-188. New York: Oxford university Press, 1999.
44. Kobayashi, et al. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. J Pediatr Surg 32 (1997): 590-593.
45. Jurado, A., et al. Is extrahepatic biliary atresia an HLA-associated disease? J Pediatr Gastroenterol Nutr 25 (1997): 557-558.
46. Vasiliauskas, E., et al. Biliary atresia – an autoimmune disorder? Hepatology 22 (1995): 87.
47. Burch, J., et al. The role of maternal antibodies in cholestatic liver disease in infant: a new isolated finding in neonatal lupus? J Pediatr Gastroenterol Nutr 31 (2000): 108.
48. Bernal, W., et al. Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis. J Hepatol 30 (1999): 237-241.

49. Mitchell, S. A., et al. Association of tumor necrosis factor alpha-308 but not the interleukin 10-627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. Gut 49 (2001): 288-294.
50. Donaldson, P., et al. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. Gut 48 (2001): 397-402.
51. Donaldson, P. T., et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. Liver 22 (2002): 213-219.
52. Pickett, L. K., and Briggs, H. C. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. J Pediatr Surg 4 (1969): 95-101.
53. Schon, P., et al. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right laterality development and biliary atresia. Human Genet 110 (2002): 157-165.
54. Bamford, R. N., et al. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. Nat Genet 26 (2000): 365-369.
55. Jacquemin, E., et al. CFC1 gene mutation and biliary atresia with polysplenia syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr 34 (2002): 326-327.
56. Kohsaka, T., et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. Hepatology 36 (2002): 904-912.
57. Clotman, F., et al. The oncut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. Development 129 (2002): 1819-1828.
58. Choe, B.H., et al. The pattern of differentially expressed genes in biliary atresia. J Korean Med Sci 18 (2003): 392-396.
59. Chen L., et al. Altered expression of genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia. Hepatology 38 (2003): 567-576.
60. Harper, P.; Plant, J. W.; and Unger, D. B. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. Aust Vet J 67 (1990): 18-22.



61. Bradham, D. M.; Igarashi, A.; Potter, R. L.; and Grotendorst, G. R. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol 114 (1991): 1285-1294.
62. Ryseck, R.P.; Macdonald-Bravo, H.; Mattei, M. G.; and Brovo, R. Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor- inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. Cell Growth Differ 2 (1991): 225-233.
63. Brunner, A.; Chinn, J.; Neubauer, M.; and Purchio, A. F. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. DNA Cell Biol 10 (1991): 293-300.
64. Almendral, J. M.; Sommer, D.; Macdonald-Bravo, H.; Burckhardt, J.; Perera, J.; and Bravo, R. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. Mol Cell Biol 8 (1988): 2140-2148.
65. Bork, P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. FEBS Lett 327 (1993): 125-130.
66. Brigstock, D. R., et al. Proposal for a unified CCN nomenclature. Mol Pathol 56 (2003): 127-128.
67. Brigstock, D. R. The CCN family: a new stimulus package. J Endo 178 (2003): 169-175.
68. Perbal, B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structure and functional issues. J Clin Pathol: Mol Pathol 54 (2001): 57-79.
69. Lau, L. F., and Nathans, D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. Embo J 4 (1985): 3145-3151.
70. Leu, S. J.; Lam, S. C.; and Lau, L. F. Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins alphavbeta3 and alpha6beta1 in human umbilical vein endothelial cells. J Biol Chem 277 (2002): 46248-46255.
71. Kireeva, M. L.; Mo, F. E.; Yang, G. P.; and Lau, L.F. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. Mol Cell Biol 16 (1996): 1326-1334.

72. Joliot, V., et al. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. Mol Cell Biol 12 (1992): 10-21.
73. Lin, C. G., et al. CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. J Biol Chem 278 (2003): 24200-24208.
74. Hashimoto, Y.; Shindo-Okada, N.; Tani, M.; Takeuchi, K.; Toma, H.; and Yokota, J. Identification of genes differentially expressed in association with metastatic potential of K-1735 murine melanoma by messenger RNA differential display. Cancer Res 56 (1996): 5266-5271.
75. Pennica, D., et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998): 14717-14722.
76. Hashimoto, Y., et al. Expression of the Elm1 gene, a novel gene of the CCN (connective tissue growth factor, Cry61/Cef10, and neuroblastoma overexpressed gene) family, suppresses In vivo tumor growth and metastasis of K-1735 murine melanoma cells. J Exp Med 187 (1998): 289-296.
77. Zhang, R., et al. Identification of rCOP-1, a new member of the CCN protein family, as a negative regulator for cell transformation. Mol Cell Biol 18 (1998): 6131-6141.
78. Delmolino, L. M.; Stearns, N. A.; and Castellot, J. J. COP-1, a member of the CCN family, is a heparin –induced growth arrest specific gene in vascular smooth muscle cells. J Cell Physiol 188 (2001): 45-55.
79. Brigstock, D. R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. Endocr Rev 20 (1999): 189-206.
80. Albiston, A. L., and Herington, A. C. Cloning and characterization of the growth hormone –dependent insulin-like growth factor binding protein. Biochem Biophys Res Commun 166 (1990): 892-897.
81. Mancuso, D. J., et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. J Biol Chem 264 (1989) 264: 19514-19527.

82. Holt, G.D.; Pangburn, M. K.; and Ginsburg, V. Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO4) beta 1-1 cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. J Biol chem 265 (1990): 2852-2855.
83. Rothberg, J. M.; Jacobs, J. R.; Goodman, C. S.; and Artavanis-Tsakonas, S. An extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. Genes Dev 4 (1990): 2169-2187.
84. Segarini, P. R.; Nesbitt, J. E.; LI, D.; Hays, L. G.; Yates, J. R.; Carmichael, D. F. The low density lipoprotein receptor-regulate protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. J Biol Chem 276 (2001): 40659-40667.
85. Martinerie, C., et al. Physical mapping of human loci homologous to chicken nov protooncogene. Oncogene 7 (1992): 2529-2534.
86. Grotendorst, G.R.; Okochi, H.; and Hayashi, N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. Cell Growth Differ 7 (1996): 469-480.
87. Holmes, A.; Abraham, D. J.; Sa, S.; Shiwen, X.; Black, C. M.; and Leask, A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. J Biol Chem 276 (2001): 10594-10601.
88. Chen, Y.; Segarini, P.; Raoufi, F.; Bradham, D.; and Lepask, A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase and PKC. Kidney Int 62 (2002):1149-1159.
89. Standhope-Baker, P., and Williams, B. R. Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. J Biol Chem 275 (2000): 38139-38150.
90. Kondo, S., et al. Chatacterization of a mouse CTGF 3'UTR segment that mediates repressive regulation of gene expression. Biochem Biophys Res Commum 278 (2000): 119-124.

91. Kubota, S., et al. Identification of and RNA element that confers post-transcriptional repression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific 24 (CTGF/HCS24) gene: similarities to retroviral RNA-protein interactions. Oncogene 19 (2000): 4773-4786.
92. Chen, Y; Segarini, P; Raoufi, F; Bradham, D; and Leask, A. Connective tissue growth factor is secreted through the Golgi and is degraded in the endosome. Exp Cell Res 271 (2001): 109-117.
93. วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์. ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์. ใน สุทธิพันธ์ สารสมบัติ (บรรณาธิการ), ภูมิคุ้มกันวิทยา, หน้า 111-132, กรุงเทพมหานคร: พีพีเอส ซายน์เทคโนโลยี, 2543.
94. Rachfal, A. W., and Brigstock, D. R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. Hepatol Res 26 (2003): 1-9.
95. Gharaee-Kermani, M., and Phan, S. H. Role of cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. Curr Pharm Des 7 (2001): 1083-1103.
96. Hishikawa, K.; Oemar, B. S.; Tanner, F. C.; Nakaki, T.; Fujii, T.; and Luscher, T. F. Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Circulation 100 (1999): 2108-2112.
97. Finckenberg, P. Regulation of connective tissue. Dissertation Department of Pharmacology, Institute of Biomedicine, University of Helsinki, 2003.
98. Wang, Q. Amelioration of diabetic nephropathy (DN) induced by renal ischemia-reperfusion (IR) in rats with diabetes mellitus (DM) by treatment with FG-3019, a monoclonal antibody against connective tissue growth factor (CTGF). ASN renal week [online]. (n.d.) Available from: <http://www.fibrogen.com> [2004, October 31]
99. Friedman, S. L. Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatol 38 (2003): 38-53.
100. Friedman, S. L. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. Semin Liver Dis 10 (1990): 20-29.
101. Olaso, E., and Friedman, S. L. Molecular mechanism of hepatic fibrogenesis. J Hepatol 29 (1998): 836-847.
102. Bissell, D. M.; Wang, S. S.; Jarnagin, W. R.; and Roll, F. J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. J Clin Invest 96 (1995): 447-455.

103. Dooley, S.; Delvoux, B.; Lahme, B.; Mangasser-Stephan, K.; and Gressner, A. M. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 283 (2001): 554-562.
104. Racine-Samson, L.; Rockey, D. C.; and Bissell, D.M. The role of alpha 1 beta 1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. J Biol Chem 272 (1997): 30911-30917.
105. Pinzani, M.; Milani, S.; Grappone, C.; Weber, F. J.; Gentilini, P.; and Abboud, H. E. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. Hepatology 19 (1994): 701-707.
106. Friedman, S. L. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med 328 (1993): 1828-1835.
107. Baggiolini, M.; Dewald, B.; and Moser, B. Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 15 (1997): 675-705.
108. Benyon, D., and Arthur, M. J. P. Extracellular matrix degradation and the role of stellate cells. Semin Liver Dis 21 (2001): 373-384.
109. Friedman, S. L., and Arthur MJ. Reversing hepatic fibrosis. Sci Med 8 (2002): 194-205.
110. Iredale, J. P. Stellate cell behavior during resolution of liver injury. Semin Liver Dis 21 (2001): 427-436.
111. Leask, A.; Sa, S.; Holmes, A.; Shiwan, X.; Black, C. M.; and Abraham, D. J. The control of ccn2 (ctgf) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. Mol Pathol 54 (2001): 180-183.
112. Jimenez, S. A., and Derk, C. T. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. Ann Intern Med 140 (2004): 37-50.
113. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; and Maniatis, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Second edition. Woodbury: Cold Spring Harborn Laboratory Press, 1989.

114. Guo, S. W., and Thompson, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48 (1992): 361-372.
115. Lewontin, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. Genetics 49 (1964): 49-67.
116. Bidwell, J., et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. Genes and Immunity 1 (1999): 3-19.
117. Hromas, R., et al. Aberrant expression of the myeloid zinc finger gene, MZF-1, in oncogenic. Cancer Res 55 (1995): 3610-3614.
118. Frazier, K., et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. J Invest Dermatol 107 (1996): 404-411.
119. Suzuki, Y.; Yamashita, R.; Nakai, K.; and Sugano S. DBTSS: database of human transcription start sites and full-length cDNAs. Nucleic Acids Res 30 (2002): 328-331.
120. Morris, J. F.; Hromas, R.; and Rauscher, F. J. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. Mol Cell Biol 14 (1994): 1786-1795.
121. Tamatani, T., et al. Establish of the enzyme-linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. Biochem Biophys Res Commun 251 (1998): 748-752.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บัฟเฟอร์ และ สารละลาย

### 1. Lysis Buffer I

Sucrose	109.54	g
1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	10	ml
1.0 M MgCl <sub>2</sub>	5	ml
Triton X-100 (pure)	10	ml
Distilled water เป็น	1000	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บในตู้เย็นที่ 4°C

### 2. Lysis Buffer II

5.0 M NaCl	15	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	48	ml
Distilled water เป็น	1000	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 3. 20 mg/ml Proteinase K

Proteinase K	2	ml
Distilled water เป็น	1	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็นที่ -20°C

### 4. 10% SDS solution

Sodium dodecyl sulfate	10	g
Distilled water เป็น	100	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 5. 25:24:1 (v/v) Phenol/chloroform/isoamyl alcohol

Phenol	25	volume
Chloroform	24	volume
Isoamyl alcohol	1	volume

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บใส่ในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วในตู้เย็นที่ 4°C



6. 7.5 M Ammonium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )

Ammonium acetate	57.81	g
Distilled water	80	ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave

7. 20  $\mu\text{g/ml}$  glycogen

Glycogen	4	g
Distilled water	1	ml

## 8. 1.0 M Tris-HCl

Tris base	12.11	g
-----------	-------	---

เติม Distilled water และปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl

Distilled water เป็น	100	ml
----------------------	-----	----

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 9. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Disodium ethylenediamine tetraacetate.2H <sub>2</sub> O	186.6	g
---	-------	---

เติม Distilled water และปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH

Distilled water เป็น	1000	ml
----------------------	------	----

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. 1.0 M  $\text{MgCl}_2$  solution

Magnesium chloride.6H <sub>2</sub> O	20.33	g
--------------------------------------	-------	---

Distilled water เป็น	100	ml
----------------------	-----	----

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 11. 5 M NaCl solution

Sodium chloride	29.25	g
-----------------	-------	---

Distilled water เป็น	100	ml
----------------------	-----	----

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 12. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

Tris-base	100	g
Boric acid	55	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 13. 6X loading dye

Bromphenol blue	0.25	g
Xylene cyanol	0.25	g
Glycerol	50	ml
1M Tris (pH 8.0)	1	ml
Distilled water เป็น	100	ml

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

## 14. 2% Agarose gel (w/v)

Agarose	2	g
1X TBE เป็น	100	ml

ละลายด้วยการอุ่นในเตาไมโครเวฟจากนั้นผสมให้เข้ากันจนเจลละลายจนหมด

## 15. SOB Medium

Tryptone	20	g
yeast extract	5	g
NaCl	0.5	g
250 mM KCl	10	ml
Distilled water เป็น	1	L

นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave

## 16. SOC medium

SOB ที่มี 2 M  $MgCl_2$  และ 1.0 M glucolin

## 17. LB agar

NaCl	10	g
Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Agar	15	g
Distilled water เป็น	1	L

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 5 N NaOH แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave

## 18. LB broth

NaCl	10	g
Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Distilled water เป็น	1	L

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 5 N NaOH นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave

## 19. Ampicillin stock solution (100 mg/ml)

Ampicillin sodium salt	5	g
Deionized water	50	ml

(ใช้ Filter-sterilize เก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$ )

## 20. IPTG stock solution (100 mM)

Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside	238.3	g
Deionized water	10	ml

(ใช้ Filter-sterilize เก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$ )

21. 200  $\mu\text{g/ml}$  Anti-human CTGF C-terminal peptide antibody

ละลาย 100  $\mu\text{g}$  ของ Anti-human CTGF C-terminal peptide antibody ด้วย sterile PBS ปริมาตร 0.5 ml แล้วเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

22. 200  $\mu\text{g/ml}$  Recombinant human CTGF

ละลาย 20  $\mu\text{g}$  ของ Recombinant human CTGF ด้วย Deionized water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  แล้วเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

## 23. 50 µg/ml Biotinylated anti-human CTGF C-terminal peptide antibody

ละลาย 50 µg ของ Biotinylated anti-human CTGF C-terminal peptide antibody ด้วย sterile Tris-buffered saline pH 7.3 (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl) ที่ประกอบด้วย 0.1% BSA ปริมาตร 1 ml

## 24. 1.5 µg/ml alkaline phosphatase -conjugated streptavidin

ละลาย alkaline phosphatase -conjugated streptavidin ปริมาตร 1.5 µl ใน 50 mM Tris-buffered saline, pH 7.5 โดยเติมให้ครบ 1 ml

## 25. 10 mM Sodium carbonate, pH 9.6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.159	g
NaHCO <sub>3</sub>	0.293	g
Distilled water เป็น	100	ml

## 26. 50 mM Tris-buffered saline, pH 7.5

Tris HCl	6.35	g
Tris Base	1.18	g
NaCl	8.77	g
Distilled water	800	ml

ปรับ pH ให้เป็น 7.5 แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 1 L

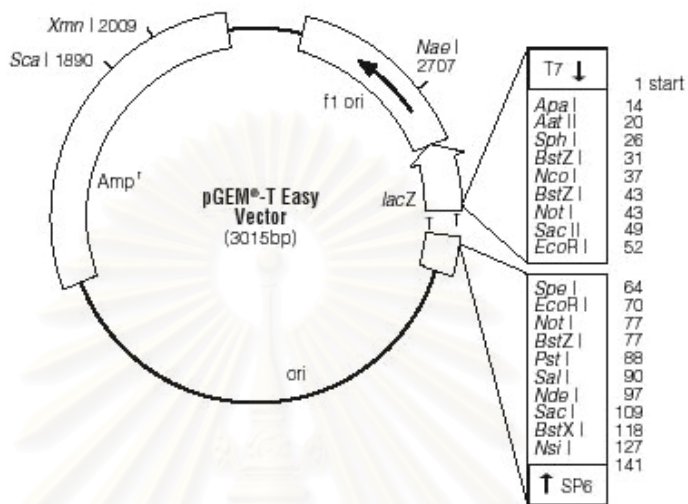
## 27. 100 mg/ml p-nitrophenyl phosphate stock solution (Zymed, USA)

ละลาย PNPP 100 mg ด้วย deionized water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ml จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

## 28. 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate (Zymed, USA)

เตรียม 0.1 M 2-amino-2-methyl 1,3-propanediol, pH 10.3 โดยนำ substrate buffer ปริมาตร 1 ml ผสมกับ Distilled water 9 ml จากนั้นนำ 100 mg/ml p-nitrophenyl phosphate stock solution ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 µl ผสมกับ 0.1 M 2-amino-2-methyl 1,3-propanediol, pH 10.3 ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันเก็บที่ 4°C

29. พลาสมิด pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA))



pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Sequence reference points:**

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวภัทรธิดา สงวนหมู่ เกิดเมื่อวันอาทิตย์ ที่ 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2524 ที่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายโดยเป็นนักเรียนโครงการ ลงทะเบียนเรียนตามเวลาและความสามารถ (ลบส.) จากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ ใน ระดับปริญญาตรี ได้รับคัดเลือกเข้าศึกษาต่อในโครงการรับนิสิตด้วยวิธีพิเศษ (วพ.1) ในปี การศึกษา 2542 จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สาขาพันธุศาสตร์ สำเร็จ การศึกษาในปีการศึกษา 2545 และสำเร็จการศึกษาจากคณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัย รามคำแหง สาขาภาษาไทย ในปีการศึกษา 2547 ระดับปริญญาโทได้เข้าศึกษาในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจบการศึกษาในปีการศึกษา 2548



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย