

ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์ของยีน XRCC1 กับการสัมผัสควันบุหรี่และความเสี่ยง
ในการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA ใน
เด็กไทย

ปกปิด

นางสาวปิยะนุช ศรีพยัพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 4 7 5 5 2 3 0

INTERACTION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS OF *XRCC1* GENE AND
CIGARETTE SMOKE EXPOSURE AS RISK FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC
LEUKEMIA IN THAI CHILDREN.

Miss Piyanuch Sripayup

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

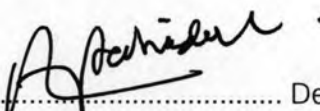
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502122

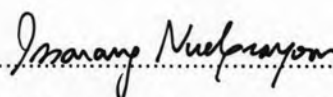
Thesis Title INTERACTION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS OF
XRCC1 GENE AND CIGARETTE SMOKE EXPOSURE AS RISK
FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN.
By Miss Piyanuch Sripayup
Field of study Medical Science
Thesis Advisor Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.

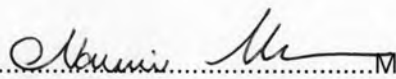
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of the Faculty of Medicine
(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Narin Hiransuthikul, M.D., Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Tewin Tencomnao, Ph.D.)

ปิยะนุช ศรีพิภพ : ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์ของยีน *XRCC1* กับการสัมผัสควันบุหรี่และความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA ในเด็กไทย. (INTERACTION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS OF *XRCC1* GENE AND CIGARETTE SMOKE EXPOSURE AS RISK FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN.) อ.ที่ปรึกษา: รศ.นพ.อิศรางค์ นุชประยูร, 77 หน้า.

มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดของมะเร็งที่พบในเด็กทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นผลมาจากความผิดปกติของโครโมโซมและการกลายพันธุ์ซึ่งกระบวนการที่สำคัญต่าง ๆ ในการสร้างหรือพัฒนาร่างกาย การเกิดมะเร็งนั้นไม่ได้เกิดจากพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวแต่ต้องมีปัจจัยอื่น ๆ จากสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย เพื่อที่จะสามารถอธิบายสาเหตุของการเกิดโรคได้ชัดเจนมากขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาทั้งด้านโพลีมอร์ฟิสมของยีน *XRCC1* ร่วมกับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมคือการสัมผัสควันบุหรี่ของมารดาระหว่างตั้งครรภ์ ในคนไข้เด็กที่เป็น ALL จำนวน 139 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 139 คน ที่ทำการจับคู่เพศและอายุ พบว่า ความผิดปกติของยีน *XRCC1* ที่ลำดับเบสที่ 194 และ 399 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงการเกิดโรค ALL อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ลำดับเบส 399 (Odds ratio (OR), A/G OR=3.17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% =1.42-7.06 และ A/A OR=2.94 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% =1.73-5.00) มีความสัมพันธ์ในการเพิ่มความเสี่ยงสูงกว่าที่ลำดับเบส 194 (T/C OR=2.00 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% =1.14-3.53) นอกจากนี้ยังพบว่า haplotype (ที่ลำดับเบส 194-280-399) แบบ D (C-G-A, OR=4.38 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% =2.64-7.33), E (T-G-A, OR=4.19 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%=1.55-2.44), F (C-A-G, OR=3.03 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%=1.69-5.48) และ H (T-G-G, OR=2.55 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%=1.42-4.60) ก็มีความสัมพันธ์กับการเกิด ALL ในทางกลับกันไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ของโพลีมอร์ฟิสมของลำดับเบส 280 กับการเพิ่มความเสี่ยงการเกิด ALL ส่วนปัจจัยทางด้านสัมผัสควันบุหรี่ของมารดาระหว่างตั้งครรภ์ จากการศึกษานี้พบว่ามารดาสูบบุหรี่น้อยมากจึงไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิดโรค ALL

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... *ปิยะนุช ศรีพิภพ*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *อิศรางค์ นุชประยูร*

487 47552 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA / DNA REPAIR /
XRCC1

PIYANUCH SRIPAYUP: INTERACTION BETWEEN GENERTIC
POLYMORPHISMS OF XRCC1 GENE AND CIGARETTE SMOKE EXPOSURE AS
RISK FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN. THESIS
ADVISOR: ASSOC. PROF. ISSARANG NUCHPRAYOON, M.D., Ph.D., 77 pp.

Polymorphisms of DNA repair genes can alter protein structure and may impair DNA repair capacity. Defects in repairing damaged DNA lead to genetic instability and carcinogenesis. This study was performed to evaluate the effect of the polymorphisms of DNA repair genes on risk of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). We studied polymorphisms of X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) codon 194 (Arg to Trp), 280 (Arg to His) and 399 (Arg to Gln) and interaction between cigarette smoke and leukemia in 139 children with ALL compared to age and sex matched control. The XRCC1 399 and 194 was associated with a significantly increased risk of ALL whereby codon 399 polymorphism (Odds ratio (OR), A/G OR=3.17, 95% confidence interval (95% CI) =1.42-7.06 and A/A OR=2.94, 95% CI =1.73-5.00) had an increased risk of ALL higher than codon 194 (T/C OR=2.00, 95% CI =1.14-3.53). The haplotype (codon 194-280-399) that were associated with an increased risk of childhood ALL were type D (C-G-A, OR=4.38, 95% CI=2.64-7.33), type E (T-G-A, OR=4.19, 95% CI=1.55-2.44), type F(C-A-G, OR=3.03, 95% CI=1.69-5.48) and type H (T-G-G, OR=2.55, 95% CI=1.42-4.60). In contrast, the distribution of the allele and genotype frequency of XRCC1 codon 280 was not associated with increased risk of ALL. For ALL cases and controls, no significant difference of active and passive exposure was observed between ALL cases and controls.

Field of study Medical Science

Academic year 2007

Student's signature.....*Piyamuch Sripayup*.....

Advisor's signature.....*Issarang Nuchprayoon*.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to all those who made the completion of this thesis possible. I want to thank the Committee of the Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis and conduct the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor, Associate Professor Dr. Issarang Nuchprayoon, for his support and invaluable advice. His excellence in the molecular genetics of leukemia improved my own knowledge and skills.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Narin Hiransuthikul and Associate Professor Samart Pakakasama, for their stimulating guidance in this study and I express my appreciation to my other committee members, Assistant Professor Tewin Tencomnao for their helpful suggestions and insightful comments during my study.

I feel profoundly indebted technicians and all members in hematology laboratory of department of pediatric, faculty of medicine, Chulalongkorn University for their suggestion and support.

I am really thankful to Miss Miss Patramon Aungbamnet, Miss.Chalisa Louichalem, and all members in the Snake Venum Unit, Filariasis Unit for their encouragement, sincerity and friendship. I wish to express my special thanks to Associate Professor Narin Hiransuthikul for his helpful on analysis data.

I am also thankful to Mrs. Nittaya Thong-oun and Mrs. Umaporn and all members in laboratory of department of pediatric, faculty of medicine, Chulalongkorn University for their assistance in collection specimens.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their love and understanding.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
- Background and Rational.....	1
- Research Questions.....	4
- Objective of the Study.....	4
- Hypothesis.....	4
- Key Words.....	5
- Conceptual Framework.....	5
- Expected Benefits and Applications.....	5
II LITERATURE REVIEW.....	6
- Leukemia.....	6
- World Health Organization (WHO) classification of leukemias.....	6
- Acute lymphoblastic leukemia (ALL).....	11
- Acute lymphoblastic leukemia in Childhood of Thailand.....	15
- Acute myeloid leukemia (AML).....	16
- DNA repair.....	18
- XRCC1 (X-ray repair cross complementing group 1).....	19
- Cigarette smoke.....	24
III MATERIALS AND METHODS.....	28
Materials.....	28
- Population Study.....	28

CHAPTER	Page
- Specimen Collection	29
- Genomic DNA Extraction.....	29
- Genotyping of <i>XRCC1</i>	29
- Data collection.....	30
- Statistical analysis.....	30
- Chemicals.....	30
- Work flow.....	31
Methods.....	32
- Immunophenotyping by Three-color flow cytometry.....	32
- Genotyping of <i>XRCC1</i>	32
- Data Collection.....	35
- Data analysis.....	35
IV RESULTS.....	37
- Characteristics of leukemia subtype.....	37
- Identification of <i>XRCC1</i> gene polymorphisms.....	38
- Characteristics of <i>XRCC1</i> gene polymorphisms.....	41
- Haplotype of <i>XRCC1</i> polymorphisms.....	44
- The cigarette smoke exposure in childhood ALL cases and control ..	46
V CONCLUSION AND DISCUSSION.....	47
REFERENCE.....	50
APPENDIXS.....	63
BIOGRAPHY.....	77

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Age-standardized incidence of childhood cancer (per million) Thailand and Comparison registries.....	2
2. The major biological subtypes of childhood leukemia and associated Chromosomal changes.....	9
3. Study characteristics and genotype prevalences from published studies on the relation of the x-ray repair cross-complementing group 1 (<i>XRCC1</i>) Arg194Trp and Arg280His polymorphisms to cancer risk.....	22
4. Study characteristics and genotype prevalences from published studies on the relation of the x-ray repair cross-complementing group 1 (<i>XRCC1</i>) Arg399Gln polymorphism to cancer risk.....	23
5. Primary Toxic and Carcinogenic components of Cigarette Smoke including vapour- phase and particulate phase components.....	24
6. Base sequences of primers for PCR polymorphisms assay.....	33
7. <i>XRCC1</i> polymorphisms, restriction enzymes and results for <i>XRCC1</i> Polymorphisms.....	24
8. Distribution of <i>XRCC1</i> allele frequencies in childhood ALL cases and Controls.....	42
9. Distribution of <i>XRCC1</i> gene frequencies in childhood ALL cases and Controls.....	43
10. Haplotype Frequencies of <i>XRCC1</i> polymorphisms in childhood ALL cases and controls.....	45
11. The cigarette smoke exposure in childhood ALL cases and controls.....	46

LIST OF FIGURES

Table	Page
1. Frequency of the major subtypes of hematopoietic malignancies in pediatric and adult patients.....	11
2. Bone marrow aspirate from a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia. The marrow is replaced with lymphoblasts of various sizes. No myeloid or erythroid precursors are seen. Megakaryocytes are absent.....	13
3. Bone marrow aspirate from a child with B-cell acute lymphoblastic leukemia. The lymphoblasts are large and have basophilic cytoplasm with prominent vacuoles.....	13
4. Immunophenotyping by flow cytometry : Acute lymphoblastic leukemia (ALL) : A; B-cell ALL, B; T-cell ALL.....	14
5. Bone marrow aspirate from a child with acute myeloid leukemia (AML) or acute non-lymphoblastic leukemia (ANLL).....	17
6. Bone marrow aspirate from a child with AML. The marrow is replaced with myeloblasts. No lymphoid are seen. Megakaryocytes are absent.....	17
7. Immunophenotyping by flow cytometry: Acute myelocytic leukemia (AML).	18
8. Base excision repair pathway (BER).....	19
9. Protein–protein interactions mediated by <i>XRCC1</i>	20
10. Common <i>XRCC1</i> polymorphisms.....	21
11. Pie charge representing prevalence of childhood acute lymphoblastic leukemia.....	37
12. RFLP analysis of <i>XRCC1</i> codon194 genotype analysis	38
13. RFLP Analysis of <i>XRCC1</i> codon 280 genotype analysis.....	39
14. RFLP Analysis of <i>XRCC1</i> codon 399 genotype analysis	40

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pairs
°C	degree Celsius
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
mM	millimolar
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rpm	revolution per minute
μl	microlite
U	unit