

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีนเอ็นทีซีพีกับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อ
ไวรัสตับอักเสบบี



นางสาวนงนภัทร์ ตูยपालะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Association of NTCP polymorphisms with clinical outcome of hepatitis B infection

Miss Nongnaput Tuyapala



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบน ยีนเอ็นทีซีพีกับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับ อักเสบบี
โดย	นางสาวนงนภัสร์ ตูยปลาชะ
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. นพัต จันทรวินุต)

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

นางณภัทร์ ตูยปาละ : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีนเอ็นทีซีพีกับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Association of NTCP polymorphisms with clinical outcome of hepatitis B infection) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สัญชัย พงษ์กร, 71 หน้า.

Sodium taurocholate cotransporting polypeptide หรือ NTCP ถูกค้นพบเมื่อเร็วๆ นี้ว่าเป็นตัวรับที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ตับ ทำให้ไวรัสตับอักเสบบีสามารถผ่านเข้าไปสู่เซลล์ตับได้ มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่นพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) ของยีน *NTCP* มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนนี้กับการดำเนินโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรชาวไทย กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาประกอบด้วยกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน จำนวน 242 คน, กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง จำนวน 230 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 635 คน ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับร่วมด้วย จำนวน 319 คน การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวทำโดยวิธี Allelic discrimination ด้วย TaqMan probe real-time PCR จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ความถี่ของจีโนไทป์ GG, GA และ AA ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีเป็น 74.2%, 22.1% และ 3.7% ตามลำดับ, กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองเป็น 84.0%, 15.1% และ 0.9% ตามลำดับ และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเป็น 85.0%, 13.4% และ 1.6% ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ non-GG (GA และ AA) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง [odds ratio (OR) 0.54; 95 % CI (0.35-0.86), $P=0.001$] และในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (0.51; 0.35-0.73, $P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ส่วนของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 ไม่พบความแตกต่างของจีโนไทป์ CC, CT และ TT ในแต่ละกลุ่มของตัวอย่างที่ศึกษา นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เป็นมะเร็งตับกับไม่ได้เป็นมะเร็งตับ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าจีโนไทป์ GA หรือ AA ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรชาวไทย อย่างไรก็ตาม ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและการพัฒนาจากระยะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังไปเป็นมะเร็งตับ

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5874037630 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HEPATITIS B VIRUS (HBV) / CHRONIC HBV INFECTION (CHB) / SPONTANEOUS HBV CLEARANCE / HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) / SODIUM-DEPENDENT TAUROCHOLATE CO-TRANSPORTING POLYPEPTIDE (NTCP)

NONGNAPUT TUYAPALA: Association of NTCP polymorphisms with clinical outcome of hepatitis B infection. ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D., 71 pp.

Background: The sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) has been recently identified as the cellular receptor of hepatitis B virus (HBV). In addition, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *NTCP* gene are shown to be associated with developing chronic HBV infection in Chinese Han populations. However, it is unclear whether these SNPs are related to the clinical outcome of HBV infection in Thai populations. Methods: We recruited 242 healthy controls without previous HBV exposure, 230 individuals with spontaneous HBV clearance and 635 patients with chronic hepatitis B (CHB). Among the CHB group, 319 patients were diagnosed with hepatocellular carcinoma (HCC). SNPs (rs2296651 and rs4646287) of the *NTCP* were detected by allelic discrimination using real-time with *TaqMan* probe. Results: The frequencies of GG, GA and AA genotypes of rs2296651 in healthy controls were 74.2%, 22.1% and 3.7%, respectively. The corresponding genotypes in the HBV clearance group were 84.0% 15.1% and 0.9%, while their frequencies in the CHB group were 85.0%, 13.4% and 1.6%, respectively. Compared with healthy controls, the distribution of non-GG (GA and AA) genotypes were significantly lower in the HBV clearance group [odds ratio (OR) 0.54; 95 % CI (0.35-0.86), $P=0.001$] and the CHB groups (0.51; 0.35-0.73, $P<0.001$). However, there was no difference in their frequencies between the HBV clearance and CHB groups. Regarding rs4646287, there was no difference in the distribution of CC, CT and TT genotypes among the study groups. The role of these SNPs in relation to HCC development was further analyzed in the CHB groups. There was no difference in the distribution of SNPs rs2296651 and rs4646287 between patients with or without HCC. Conclusions: In this report, GA or AA genotypes of rs2296651 were associated with decreased risk of HBV infection. However, SNPs rs2296651 and rs4646287 were not contributed to spontaneous HBV clearance, developing CHB and HCC occurrence.

Department: Biochemistry

Field of Study: Medical Biochemistry

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ไม่อาจสำเร็จลุล่วงไปได้ หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักคือ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโทมาบัดนี้ คอยให้ความรู้และคำแนะนำอย่างเอาใจใส่ ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขปัญหาของวิทยานิพนธ์ นอกจากนี้อาจารย์ยังมอบทุนค่าเล่าเรียนและค่าครองชีพมาตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จการศึกษา ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงค่ะ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ทุกครั้งเมื่อประสบปัญหาในด้านเทคนิคการทำวิจัย อาจารย์ได้แนะนำวิธีแก้ปัญหาและทางออกที่ดีให้เสมอ อีกทั้งยังให้โอกาสทำวิจัยในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์เพียบพร้อมและทันสมัยสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรษาเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย และอาจารย์ ดร. นพิต จันทรวิสูตร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย ที่สละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ อีกทั้งยังให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้มอบความรู้ต่างๆ รวมถึงเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมีทุกท่านด้วย

ขอขอบคุณเจ้าของเลือดตัวอย่างทุกท่านที่อุทิศตนเพื่องานวิจัยนี้และขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 และหน่วยปฏิบัติการวิจัย Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนอกจากนี้ขอขอบคุณ น.ส.ณัฐชยาน์ ช่วยเพ็ญ เป็นอย่างมากที่ให้การช่วยเหลือทุกอย่างมาโดยตลอด จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาต่อระดับปริญญาโทมาบัดนี้ รวมทั้งสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจอันสำคัญตลอดมา คุณค่าและคุณประโยชน์ของงานวิจัยเล่มนี้ขอมอบให้แก่ทุกท่านที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จครั้งนี้ ขอขอบคุณค่ะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (Background and rationale).....	1
คำถามงานวิจัย (Research questions).....	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives).....	3
สมมติฐาน (Hypothesis).....	3
กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	4
ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation).....	4
นิยามเชิงปฏิบัติการ (Operation definition).....	5
คำสำคัญ (Key words).....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Benefits of study).....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคมะเร็งตับ (Liver cancer).....	6
การแบ่งระยะโรคของผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC.....	7
การวินิจฉัยมะเร็งตับ.....	8

การตรวจการทำงานของตับ.....	9
สารบ่งชี้มะเร็งตับ.....	9
การรักษาผู้ที่เป็นโรคมะเร็งตับ	10
ไวรัสตับอักเสบบี.....	10
<i>Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)</i>	13
เป้าหมายในการรักษา.....	15
ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>NTCP</i> กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับ อักเสบบี	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	18
รูปแบบการวิจัย (Research design)	18
ประชากรศึกษา (Population study).....	18
ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)	20
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	21
วิธีการดำเนินวิจัย	23
การเฝ้าระวังความเข้มข้นของพลาสมา.....	30
การรวบรวมข้อมูล (Data Collection).....	31
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	33
การทำ Positive control ของยีน <i>NTCP</i> (rs2296651,rs4646287).....	33
ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมาที่ใช้เป็น Positive control ในหน่วย Copies/ μ l	37
ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษาในงานวิจัย	37
การกระจายตัวของจีโนไทป์ใน Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)	40
Linkage Disequilibrium	41

ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษากับค่าทางคลินิก	41
ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	43
ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ	48
ความสัมพันธ์ระหว่าง HBeAg status และ HBV genotype กับความหลากหลายทาง พันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287	51
ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	52
ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับการเกิดมะเร็งตับ	52
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	59
ยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651.....	59
ยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs4646287	61
รายการอ้างอิง	64
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	71

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดง Child-Pugh scoring criteria.....	8
ตารางที่ 2	สารที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay ของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287.....	24
ตารางที่ 3	สภาวะที่ใช้ทำ real-time PCR.....	25
ตารางที่ 4	สารที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector.....	27
ตารางที่ 5	สารที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay ของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287.....	29
ตารางที่ 6	สภาวะที่ใช้ทำ Real-time PCR.....	29
ตารางที่ 7	ความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับ Positive control	37
ตารางที่ 8	ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากร.....	39
ตารางที่ 9	การกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละ SNPs ที่ศึกษา	40
ตารางที่ 10	ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีบนยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 กับค่าทางคลินิก	42
ตารางที่ 11	ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีบนยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs4646287 กับค่าทางคลินิก	42
ตารางที่ 12	การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม	46
ตารางที่ 13	การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs4646287 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม	47
ตารางที่ 14	การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็ง	49

ตารางที่ 15 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs4646287 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็ง	50
ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับค่าทางคลินิก.....	57
ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม.....	58
ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับ.....	58
ตารางที่ 19 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	60
ตารางที่ 20 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs2296651 กับการเกิดมะเร็งตับ.....	61
ตารางที่ 21 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs4646287 กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	62
ตารางที่ 22 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง rs4646287 กับการเกิดมะเร็งตับ.....	62

สารบัญรูป

รูปที่ 1	กระบวนการเกิดมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma)	7
รูปที่ 2	จีโนมของไวรัสตับอักเสบบี	11
รูปที่ 3	โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี	11
รูปที่ 4	วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี (41).....	12
รูปที่ 5	NTCP ทำหน้าที่เป็น Bile acid transporter.....	13
รูปที่ 6	NTCP ทำหน้าที่เป็น HBV receptor	14
รูปที่ 7	ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 157-165 ของ NTCP มีความจำเพาะต่อ PreS1 (47)	15
รูปที่ 8	ยาที่สามารถยับยั้งและป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	16
รูปที่ 9	แผนที่ประเทศจีน	17
รูปที่ 10	กระบวนการ Mutagenesis ด้วยวิธี PCR.....	26
รูปที่ 11	ตัวอย่างผลการทดลองจากกราฟ Allelic Discrimination Plot.....	30
รูปที่ 12	ผลการทำ Real-time PCR ของยีน <i>NTCP</i> ที่ตำแหน่ง rs2296651	33
รูปที่ 13	ผลการทำ Real-time PCR ของยีน <i>NTCP</i> ที่ตำแหน่ง rs4646287	34
รูปที่ 14	ผลการทำ Colony PCR ของยีน <i>NTCP</i> ที่ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287.....	35
รูปที่ 15	ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง SNP rs2296651.....	36
รูปที่ 16	ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน <i>NTCP</i> ตำแหน่ง SNP rs4646287.....	36
รูปที่ 17	แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map).....	41

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดงานวิจัย.....	4
---	---



คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
AFP	Alpha-fetoprotein
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
NTCP	Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide
SNPs	Single nucleotide polymorphisms

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (Background and rationale)

มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นโรคมะเร็งที่พบว่าเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับที่ 3 ของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลก นอกจากนี้ผู้ป่วยมะเร็งตับร้อยละ 80 พบในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (South-east Asia) เช่น ประเทศไทยและภูมิภาคที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮาราในทวีปแอฟริกา (Sub-Sahara Africa) มะเร็งชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นได้จากสาเหตุต่าง ๆ เช่น ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการดื่มแอลกอฮอล์ (1) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (Chronic hepatitis B virus) ถือว่าเป็นปัญหาทางสุขภาพที่สำคัญและมีการระบาดไปทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบเอเชียแปซิฟิกและแอฟริกาตอนใต้ (2, 3) นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma or HCC), ตับแข็ง (Liver cirrhosis) และตับวาย (Liver failure) (4, 5) มีข้อมูลรายงานว่าประชากรทั่วโลกประมาณ 350-400 ล้านคนมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและมีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 9.1 ต่อปี (6, 7) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังถือเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดมะเร็งตับในประเทศไทย โดยพบว่าคนไทยเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบีมากกว่า 6 ล้านคน (8, 9) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งตับ ส่งผลทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ จึงได้มีการศึกษากลไกการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส พบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถเข้าสู่เซลล์ตับได้ โดยการจับกับตัวรับจำเพาะที่ผิวของเซลล์ตับ (Specific receptor) ที่ค้นพบและทราบคุณสมบัติเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมาคือ Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (*NTCP*) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการขนส่งน้ำดีเข้าสู่ตับ (Bile acid transporter) อีกด้วย (10)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single nucleotide polymorphisms หรือ SNPs) บนยีน *NTCP* กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไม่มากนัก โดยในปี 2014 Su Z. และคณะ พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 จีโนไทป์ AA มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรจีนฮั่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่มียา (Non-HCC) (11) ต่อมาในปี 2015 จากการศึกษาของ Peng L. และคณะ พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 จีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนฮั่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มี

สุขภาพดี (12) รวมถึงการศึกษาของ Hu HH. และคณะ ในปี 2016 ที่ทำการศึกษาในประชากรชาว ไต้หวันพบว่า จีโนไทป์ AA มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับ (13) ในปีเดียวกันนั้น Yang J. และคณะ พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 อัลลีล T มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนชาวฮั่นอย่าง มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี รวมทั้งตำแหน่ง rs2296651 อัลลีล A มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนชาวฮั่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี (14)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Su Z. และคณะในปี 2016 ซึ่งทำการศึกษาในประชากรจีน ชาวธิเบต (อยู่บริเวณเมือง Xizang) และชาวอุยกูร์ (อยู่บริเวณเมือง Xinjiang) พบว่าความ หลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ ตำแหน่ง rs4646287 ไม่มี ความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (15) แสดงให้เห็นว่าแม้จะเป็นประชากรในประเทศ เดียวกัน แต่ผลการศึกษาอาจแตกต่างกันได้

นอกจากนี้พบว่าเชื้อชาติ (Ethnicity) ก็มีความเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างความ หลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับอีกด้วย อย่างไรก็ตามไม่พบในประชากรชาวยุโรป อเมริกัน รวมถึงสเปน ถือได้ว่าเป็น major variation ของ ชาวเอเชีย (16) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบน ยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287 ในผู้ป่วยชาวไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เป็นหรือไม่ได้เป็นมะเร็งตับ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาในประชากรชาวไทยมาก่อน ซึ่ง ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็น biomarker เพื่อทำนายการดำเนินโรครจากการติดเชื้อไวรัส ตับอักเสบบีของกลุ่มประชากรไทย รวมถึงอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาเพื่อนำมาใช้ในการรักษา โรคได้ในอนาคต

คำถามงานวิจัย (Research questions)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังและการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยหรือไม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

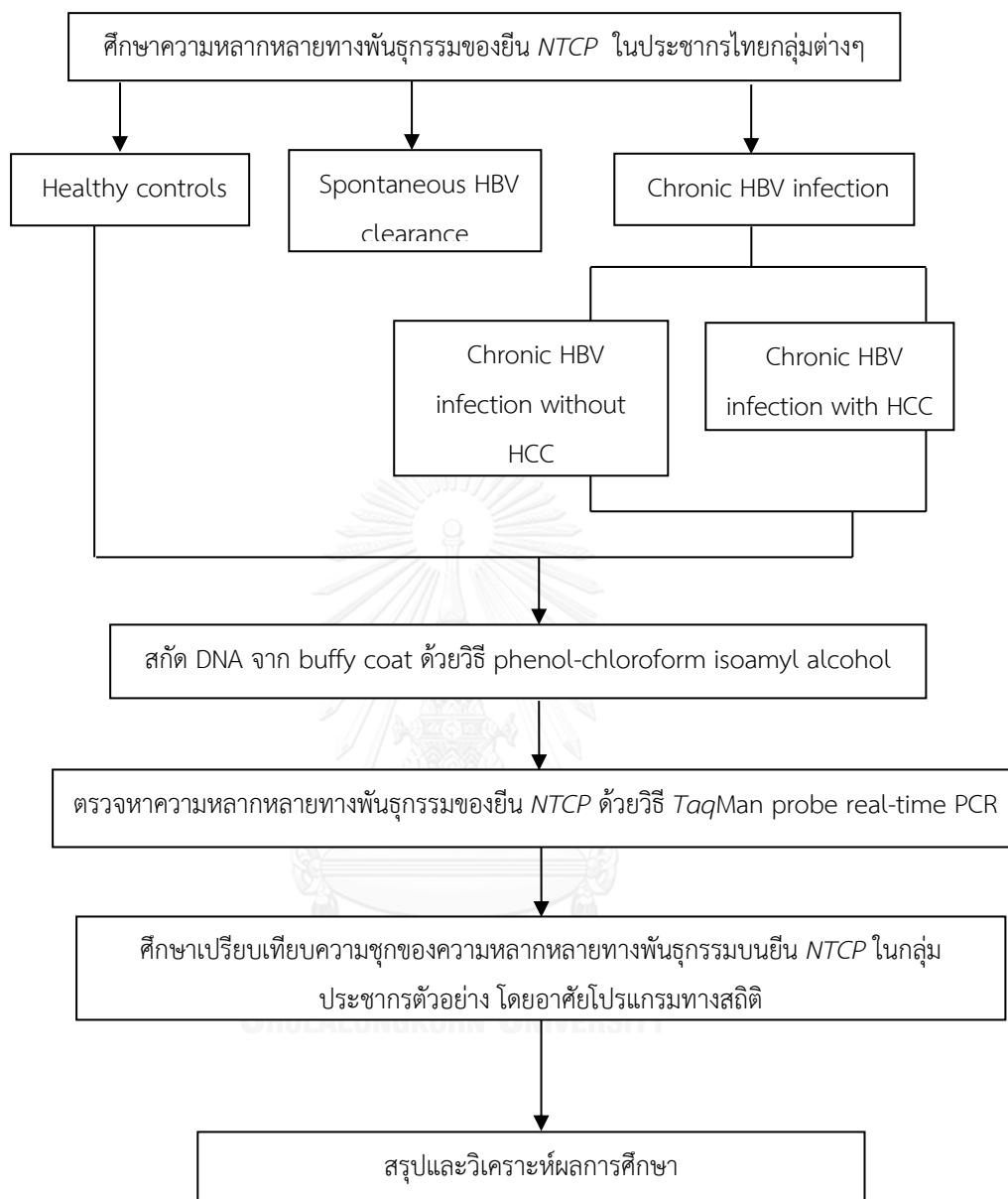
1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ซึ่งไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังซึ่งเป็นมะเร็งตับและไม่เป็นมะเร็งตับ

สมมติฐาน (Hypothesis)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย



กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดงานวิจัย

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (Spontaneous clearance) เป็นกลุ่มที่พบน้อยและมีจำนวนจำกัด

นิยามเชิงปฏิบัติการ (Operation definition)

1. Healthy controls คือ กลุ่มประชากรที่มีสุขภาพดีและไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี [ตรวจไม่พบ Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) และ anti-HBc antibody (anti-HBc)]
2. Spontaneous HBV clearance คือ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง [ตรวจไม่พบ HBsAg แต่ตรวจพบ anti-HBc และ anti-HBs antibody (anti-HBs)]
3. Chronic HBV infection คือ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เป็นผู้ที่ตรวจพบ HBsAg ในเลือดนานกว่า 6 เดือน
4. HBV-associated HCC คือ ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ

คำสำคัญ (Key words)

Hepatitis B virus (HBV)
 Chronic HBV infection
 Spontaneous HBV clearance
 Hepatocellular carcinoma (HCC)
 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)
 Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Benefits of study)

ทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย สามารถนำมาใช้เป็น genetic marker เพื่อทำนายความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและเกิดมะเร็งตับในประชากรชาวไทยได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งตับ (Liver cancer)

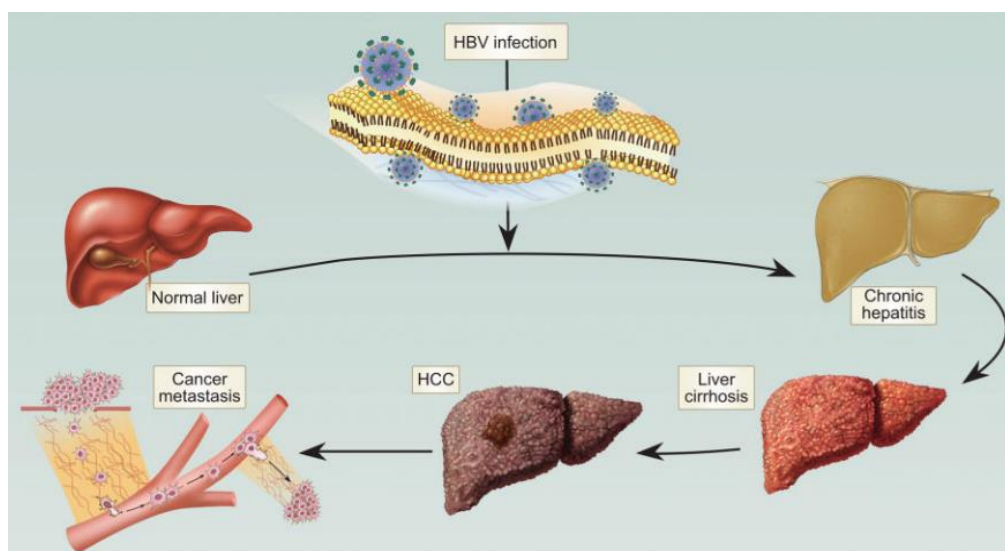
โรคมะเร็งตับ (Liver cancer) เป็นโรคมะเร็งที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตเป็นอันดับที่ 3 ของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลก ซึ่งพบได้มากเป็นอันดับที่ 5 ในเพศชาย และเป็นอันดับที่ 7 ในเพศหญิง ส่วนใหญ่เกิดจากการเป็นมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) (17) มะเร็งชนิดนี้พบได้บ่อยในประเทศที่อยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมไปถึงจีน ญี่ปุ่นและแอฟริกา ในประเทศไทยจะพบมะเร็งชนิดนี้ในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงประมาณ 4-5 เท่าและมักเกิดในช่วงอายุ 40-70 ปี เนื่องจากมะเร็งตับมีการดำเนินโรคที่รุนแรงและรักษาได้ยากหากผู้ป่วยเป็นมะเร็งระยะท้ายๆแล้ว ดังนั้นจึงมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมะเร็งชนิดนี้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี (18) สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับร้อยละ 80 ของผู้ที่เป็นมะเร็งตับทั้งหมดนั้นมักจะเป็นผู้ที่เป็นตับแข็งอยู่แล้ว ซึ่งมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือซีแบบเรื้อรัง การดื่มแอลกอฮอล์และภาวะไขมันสะสมในตับ อย่างไรก็ตามสาเหตุของการเกิดโรคนั้นจะแตกต่างกันไปตามภูมิภาคของโลก เช่น ในประเทศทางทวีปยุโรปและอเมริกาเกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ในขณะที่ญี่ปุ่นมักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง สำหรับในประเทศไทยรวมถึงประเทศต่างๆในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีสาเหตุหลักคือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (19) นอกจากนี้ยังพบว่าคนไทยจำนวนหลายล้านคนมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง แต่ส่วนใหญ่มักไม่ได้มีการแสดงอาการที่ผิดปกติออกมา

หลังจากติดเชื้อไวรัสตับอักเสบลแล้ว จะเกิดโรคตับอักเสบ (Hepatitis) ซึ่งทำให้เซลล์ตับถูกทำลายได้ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามระยะเวลาของการดำเนินโรค ได้แก่

1. ตับอักเสบบแบบเฉียบพลัน (Acute hepatitis) มีระยะเวลาการดำเนินโรคน้อยกว่า 6 เดือน
 2. ตับอักเสบบแบบเรื้อรัง (Chronic hepatitis) มีระยะเวลาการดำเนินโรคมมากกว่า 6 เดือน
- โดยการเกิดตับอักเสบบแบบเรื้อรังนั้นอาจนำไปสู่การเป็นมะเร็งตับได้ (20)

กระบวนการเกิดมะเร็งตับ ใช้เวลานานกว่าตับจะกลายเป็นมะเร็งได้ ซึ่งมีปัจจัยร่วมหลายสาเหตุ ได้แก่ ปัจจัยภายในร่างกาย (Host factors) เช่น Single nucleotide polymorphisms (SNPs) อายุ และเพศ ปัจจัยของไวรัส (Viral factors) เช่น การติดเชื้อ HBV และปัจจัยสิ่งแวดล้อม (Environmental factors) ได้แก่ การดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ เป็นต้น การเกิดมะเร็งตับเริ่มจากเมื่อเกิดตับอักเสบนานเกิน 6 เดือน ซึ่งนำไปสู่การเกิดตับอักเสบเรื้อรัง (Chronic hepatitis) ต่อมาจะทำให้ตับเกิดการสร้างพังผืดขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองต่อการอักเสบบแบบเรื้อรังของตับ

ถ้าสาเหตุของตับอักเสบยังไม่ได้รับการแก้ไขก็จะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพังผืดทั่วตับนำไปสู่ภาวะตับแข็ง (Cirrhosis) และเกิดมะเร็งตับในที่สุด (Hepatocellular carcinoma) ดังรูปที่ 1 (21)



รูปที่ 1 กระบวนการเกิดมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) จากตับปกติ เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทำให้ตับอักเสบนานเกิน 6 เดือนนำไปสู่การเกิดตับอักเสบแบบเรื้อรัง สามารถพัฒนาไปสู่การเกิดตับแข็งและเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด (22)

การแบ่งระยะโรคของผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC

ในต่างประเทศมีการใช้หลายระบบในการแบ่งระยะโรคมะเร็งตับ ได้แก่ Okuda staging, Child-Pugh สำหรับ Barcelona Clinic Liver Cancer หรือ BCLC เป็นระบบที่มีการยอมรับและใช้กันมากทั่วโลกทั้งนี้เพราะครอบคลุมผู้ป่วยโรคตับที่มีความรุนแรงของโรคตับในลักษณะต่างๆ (23)

1. Very early stage

มะเร็งตับมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร ไม่มีการแสดงของโรคและยังไม่เกิดการลุกลาม

2. Early stage

มะเร็งตับที่พบเนื้องอกก้อนเดียวขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 5 เซนติเมตร หรือพบเนื้องอกตับจำนวนไม่เกิน 3 ก้อน โดยเนื้องอกแต่ละก้อนมีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 3 เซนติเมตร ยังไม่มีการลุกลามหรือแพร่กระจายออกนอกตับ

3. Intermediate stage

มะเร็งตับที่พบจะมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตรหรือพบก้อนมากกว่า 3 ก้อน โดยก้อนใดก้อนหนึ่งขนาดใหญ่กว่า 3 เซนติเมตร และมะเร็งยังไม่มีการลุกลามหรือแพร่กระจายออกนอกตับ

4. Advanced stage

มีอาการของโรคระยะเรื้อรัง และมีภาวะมีการลุกลามหรือมีการกระจายออกนอกตับ

5. Terminal stage

ผู้ป่วยระยะสุดท้าย มีอาการของโรคระยะเรื้อรัง รวมถึงมีภาวะมีการลุกลามหรือแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ

การแบ่งระยะความรุนแรงของโรคตับแข็งด้วยหลักเกณฑ์ Child-Pugh ดังแสดงในตารางที่ 1
ตารางที่ 1 แสดง Child-Pugh scoring criteria

Indicator	Score		
	1 point	2 points	3 points
Hepatic encephalopathy (Grade)	None	Slight	Occasional drowsiness
Ascites	None	Mild	Numerous
Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	< 34	34-51	>51
Albumin (g/l)	> 35	28-35	<28
Prolonged prothrombin time (s)	<4	4-6	>6

หมายเหตุ Class A: 5-6 points; Class B: 7-9 points; and Class C: ≥ 10 points (24)

การวินิจฉัยมะเร็งตับ

เมื่อตรวจคัดกรองมะเร็งตับในกลุ่มเสี่ยงโดยการตรวจอัลตราซาวด์หรือตรวจวัดระดับ AFP แล้วพบความผิดปกติที่สงสัยว่าอาจเป็นมะเร็งตับ ควรมีการตรวจเพิ่มเติมโดยการตรวจทางรังสีวิทยา ซึ่งมีความสำคัญในการยืนยันการวินิจฉัยและบอกความรุนแรงของโรค (25)

1. การวินิจฉัยโรคระยะเรื้อรังสามารถใช้การตรวจภาพรังสีวิทยาซึ่งปลอดภัยหรืออาจใช้ผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อตับ

2. การวินิจฉัยโรคระยะเรื้อรังส่วนใหญ่ใช้การตรวจภาพรังสีวิทยา ด้วยวิธีที่มีการฉีดสารเพื่อดูภาพการเปลี่ยนแปลงของก้อนเนื้ออกภายในตับอย่างน้อย 1 วิธี ได้แก่ การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ การตรวจคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือการตรวจอัลตราซาวด์ ที่มีการฉีดสารเข้าหลอดเลือด โดยมีลักษณะเฉพาะทางภาพรังสีของมะเร็ง

3. การวินิจฉัยมะเร็งตับด้วยผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อตับ มีความจำเป็นเฉพาะกรณีที่พบก้อนเนื้ออกในตับที่การตรวจภาพรังสีวินิจฉัยให้ผลไม่แน่ชัดแม้ว่าจะมีการฉีดสารเพื่อดูการ

เปลี่ยนแปลงของก้อนเนื้อออก นอกจากนี้ยังใช้การตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) เพื่อช่วยวินิจฉัยโรคได้

4. ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ได้เป็นตับแข็ง สามารถวินิจฉัยมะเร็งได้เมื่อมีลักษณะเฉพาะ คือพบก้อนในตับที่มี arterial enhancement ร่วมกับ washout ใน venous หรือ delayed phase ร่วมกับระดับ AFP ในเลือดสูงกว่า 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

การตรวจการทำงานของตับ

เพื่อดูความผิดปกติของตับ ซึ่งค่าที่นิยมตรวจมีดังนี้ (26, 27)

1. Alanine aminotransferase (ALT) หรือ Serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT) ส่วนใหญ่สร้างจากเซลล์ตับ เมื่อมีความผิดปกติของตับ ตับอักเสบ ค่า ALT ในเลือดจะสูงขึ้น โดยค่าปกติจะไม่เกิน 40 IU/l

2. Aspartate aminotransferase (AST) หรือ Serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) สร้างได้จากหลายอวัยวะ เช่น ตับ กล้ามเนื้อ และไต เมื่อมีความผิดปกติของตับ ตับอักเสบ ค่า AST ในเลือดจะสูงขึ้น โดยค่าปกติจะไม่เกิน 40 IU/l ดังนั้นค่า ALT จึงมีความจำเพาะต่อตับมากกว่า AST

3. Alkaline phosphatase (ALP) เป็นเอนไซม์ที่บอกถึงการทำงานของท่อน้ำดี โดยหากมีการอุดตันของท่อน้ำดี ALP จะสูงขึ้น

4. Bilirubin เป็นสารสีเหลืองในน้ำดี เกิดจากการสลายของ Heme ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดง โดย Unconjugated bilirubin จะเข้าสู่เซลล์ตับ ซึ่งตับจะทำหน้าที่ Conjugated กับ Glucuronic acid เปลี่ยนเป็น Conjugated bilirubin สามารถละลายน้ำได้และขับออกทางน้ำดี หากเกิดความผิดปกติของตับ จะทำให้ไม่สามารถขับ Conjugated bilirubin ออกมาได้ จึงมี Conjugated bilirubin สูงมากในปัสสาวะ

5. Albumin เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างจากตับ พบมากในเลือด มีหน้าที่รักษา osmotic pressure ของเลือด และยังจับสารต่างๆที่ไม่สามารถละลายได้ในเลือด เช่น ฮอรโมน ไขมัน และวิตามิน ค่าปกติจะอยู่ที่ 35-55 g/dl แต่หากตับมีความผิดปกติพบว่าจะมีค่าลดลง

สารบ่งชี้มะเร็งตับ

Alpha-fetoprotein (AFP)

ถูกสร้างโดยเซลล์ตับที่มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวอย่างรวดเร็วตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อนในครรภ์ มารดาเมื่อ AFP ถูกสร้างจะถูกหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด จึงตรวจพบระดับของ AFP ได้สูงในทารก แต่

หลังจากคลอดแล้วพบว่ามียาระดับต่ำลง โดยในคนปกติจะมีค่า AFP ในระดับที่ต่ำในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับจะตรวจพบค่า AFP ในระดับที่สูง (28)

การรักษาผู้ที่เป็นโรคมะเร็งตับ

มีทั้งการรักษาด้วยการผ่าตัด (Surgery) และการรักษาด้วยวิธีที่ไม่ต้องผ่าตัด ได้แก่ การใช้รังสีรักษา (Radiation therapy), การใช้รังสีร่วมรักษา (Interventional radiology) , การรักษาด้วยเคมีบำบัด (Chemotherapy), การรักษาด้วยการปลูกถ่ายตับ (Liver transplantation), การใช้คลื่นวิทยุความถี่สูง (Radiofrequency ablation) และการฉีดแอลกอฮอล์เข้าไปที่ก้อนมะเร็ง (Percutaneous ethanol injection) เป็นต้น การรักษานั้นจะขึ้นอยู่กับเกณฑ์การแบ่งระดับความรุนแรงของโรค (29)

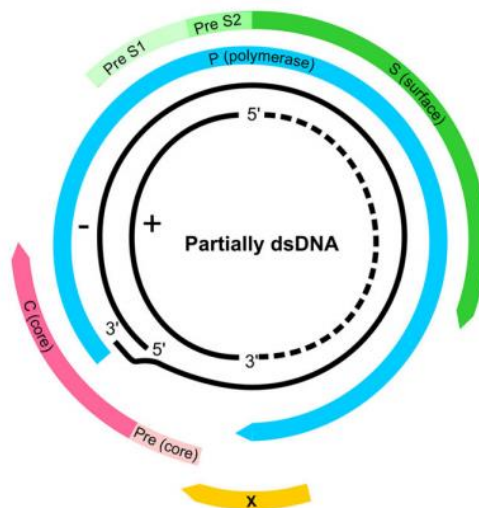
อย่างไรก็ตามการรักษาแต่ละแบบในปัจจุบันนั้น จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆหลายประการ เนื่องจากอัตราในการรอดชีวิตของการรักษาแต่ละแบบนั้นก็แตกต่างกัน สิ่งสำคัญที่สุด คือการตรวจวินิจฉัยโรค ซึ่งถ้าสามารถทำการตรวจวินิจฉัยได้แต่ระยะแรกๆ ก็จะทำให้สามารถทำการรักษาได้อย่างรวดเร็ว

ไวรัสตับอักเสบบี

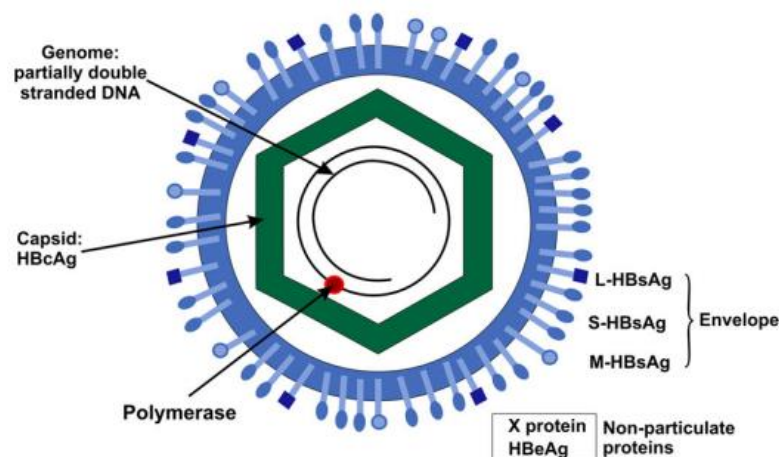
จากสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับนั้น คือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งจัดเป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอสายคู่แบบวงกลมที่ไม่สมบูรณ์ (Partially double stranded DNA) อยู่ในวงศ์ (Family) *Hepadnavirus* และสกุล (Genus) *Orthohepadnavirus* (30) พบว่าไวรัสตับอักเสบบีมี 10 จีโนไทป์ คือ A-J ซึ่งจีโนไทป์ A พบมากในแถบยุโรป, จีโนไทป์ D พบในแถบตะวันออกกลาง, จีโนไทป์ E พบในแถบแอฟริกา, จีโนไทป์ F และ H พบในแถบอเมริกากลางและใต้, จีโนไทป์ G พบในแถบประเทศสหรัฐอเมริกา เม็กซิโก ฝรั่งเศส เยอรมัน, จีโนไทป์ I พบในแถบประเทศลาว เวียดนาม จีน และจีโนไทป์ J พบในแถบประเทศญี่ปุ่น ในขณะที่จีโนไทป์ B และ C พบในแถบเอเชีย (31-36) มีรายงานว่าความแตกต่างของจีโนไทป์ของไวรัสส่งผลต่อการตอบสนองจากการรักษาที่ต่างกัน ในเอเชียพบว่าจีโนไทป์ C มีความเชื่อมโยงกับโรคตับที่รุนแรงมากกว่าจีโนไทป์ B และพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ C สามารถพัฒนาไปสู่โรคตับแข็งและมะเร็งตับได้มากกว่าจีโนไทป์ B (37) ในส่วนของเปลือกหุ้มเชื่อนั้นประกอบด้วยโปรตีน 3 ขนาด ได้แก่ Small S (S region), Middle M (S+preS2 region) และ Large L (S+preS2+preS1 region) (38, 39)

HBV DNA ประกอบด้วย 4 Open reading frames (ORFs) หลักซึ่งทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัส ได้แก่ 1) S-ORF ทำหน้าที่สร้าง Surface protein หรือ Hepatitis B surface antigen (HBsAg) 2) C-ORF ทำหน้าที่สร้าง Core protein หรือ

Hepatitis B core antigen (HBcAg) 3) P-ORF ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ DNA polymerase และ 4) X-ORF ทำหน้าที่สร้าง X protein หรือ Hepatitis B x antigen (HBxAg) (38, 39)

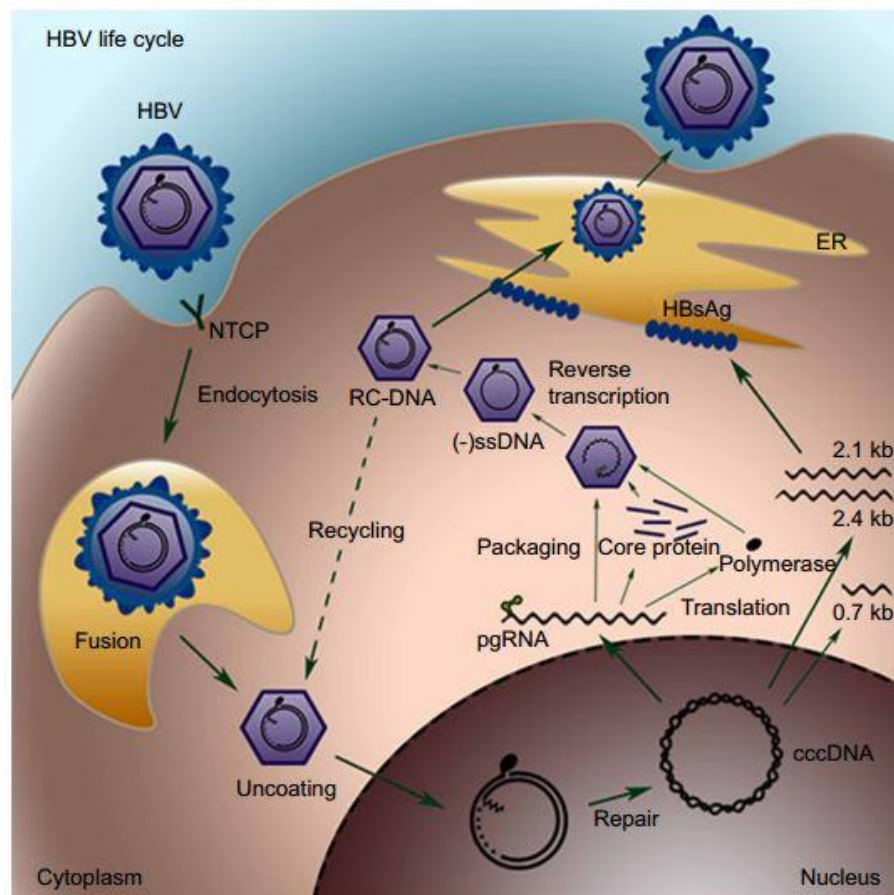


รูปที่ 2 จีโนมของไวรัสตับอักเสบบี เชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีขนาดประมาณ 3,200 bp ประกอบด้วย 4 ORF โดยส่วน Pre(core)/C(core) ถอดรหัสได้ HBeAg และ HBcAg; P(polymerase) ถอดรหัสได้ Polymerase (Reverse transcriptase); PreS1/PreS2/S ถอดรหัสได้ HBsAg และ X ถอดรหัสได้ โปรตีน Transcriptional trans-activator และมีลักษณะเป็น DNA สายคู่ที่ไม่สมบูรณ์ประกอบด้วย สายลบที่สมบูรณ์และสายบวกที่ไม่สมบูรณ์ (40)



รูปที่ 3 โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี เชื้อไวรัสตับอักเสบบีถูกห่อหุ้มด้วย Surface protein ทั้งหมด 3 ชนิด คือ Small protein, Medium protein และ Large protein(40)

ไวรัสตับอักเสบบีเข้าสู่เซลล์ตับโดยจะจับกับตัวรับที่จำเพาะเจาะจง (HBV receptor) ที่อยู่บนผิวของเซลล์ตับ โดยส่วนของไวรัสตับอักเสบบีที่จะไปจับนั้นเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนปลายของหม้ออะมิโนใน Large protein (PreS1 domain) หลังจากที่เชื้อไวรัสเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ตับแล้ว จะสร้างสายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เรียกว่า Covalently closely circular DNA (cccDNA) มีลักษณะเป็น Supercoiled DNA ซึ่งทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสร้าง mRNA ของไวรัสต่อไป จากนั้น cccDNA สายลบจะเกิดการถอดรหัสกลายเป็น mRNA ที่มีขนาดต่างๆ (Pregenomic และ Sub-genomic RNA, pgRNA และ sgRNA) โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II ของเซลล์ตับ ต่อมาจึงสร้างดีเอ็นเอสายบวกจากดีเอ็นเอสายลบ หลังจากนั้นจะถูกส่งไปยังเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic reticulum, ER) เพื่อไปรวมกับโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม ทำให้กลายเป็นไวรัสที่สมบูรณ์ แล้วจึงส่งออกนอกเซลล์ตับ แต่มีบางส่วนที่ไม่ได้ไปรวมกับโปรตีนเปลือกหุ้ม จะกลับเข้าสู่ นิวเคลียสของเซลล์ตับอีกครั้งเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง cccDNA ซึ่งทำให้ปริมาณของ cccDNA ในเซลล์ตบนั้นมีปริมาณคงที่ ดังรูปที่ 4 (41)



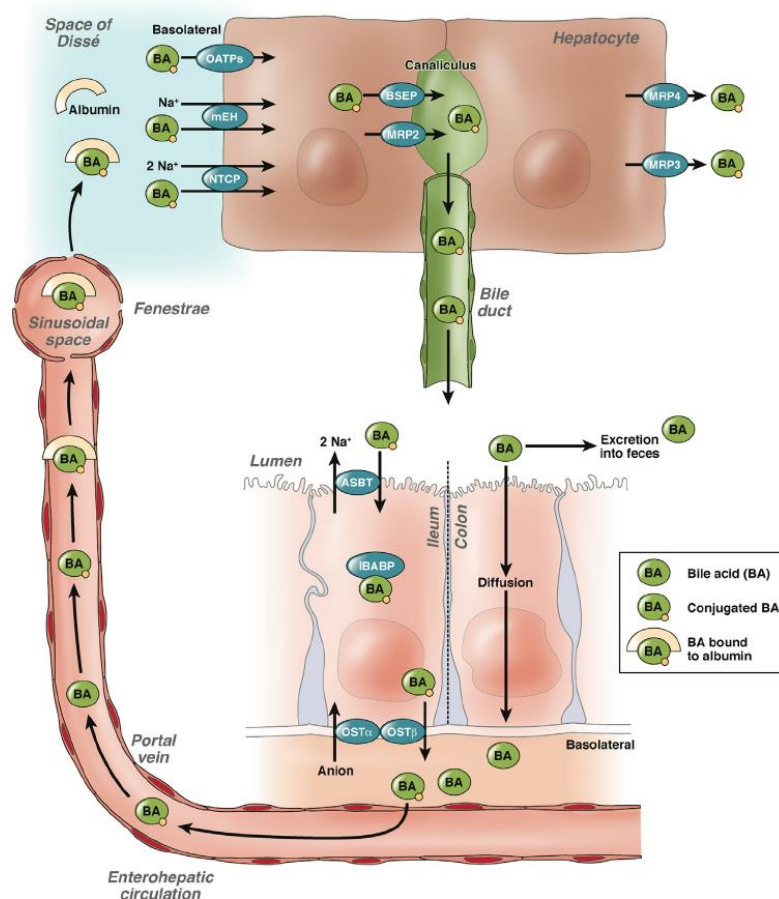
รูปที่ 4 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี (41)

เปลือกหุ้มเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถเข้าสู่เซลล์ตับได้ พบว่าส่วนของ PreS1 region ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งใน Large protein ของเปลือกหุ้มเชื้อไวรัสที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-47 จะจับกับ HBV receptor ได้อย่างจำเพาะ (10)

Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)

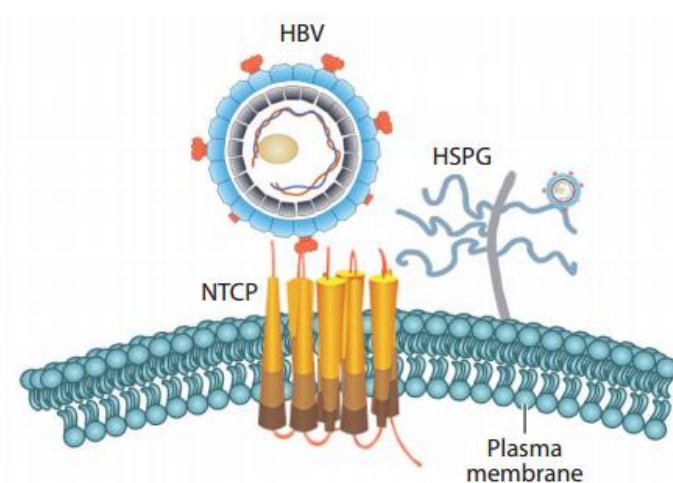
NTCP เป็น Transmembrane protein ที่มีการแสดงออกอยู่ในเซลล์ตับ ถูกถอดรหัสมาจากยีน *NTCP (SLC10A1)* ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของ Solute carrier family SLC10 ยีนนี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14

ก่อนที่จะสามารถระบุได้ว่า HBV receptor คือ NTCP นั้น พบว่ามีหน้าที่หลัก คือ ขนส่งน้ำดี (Bile acid transporter) เข้าสู่เซลล์ตับ ดังรูปที่ 5 (42, 43)



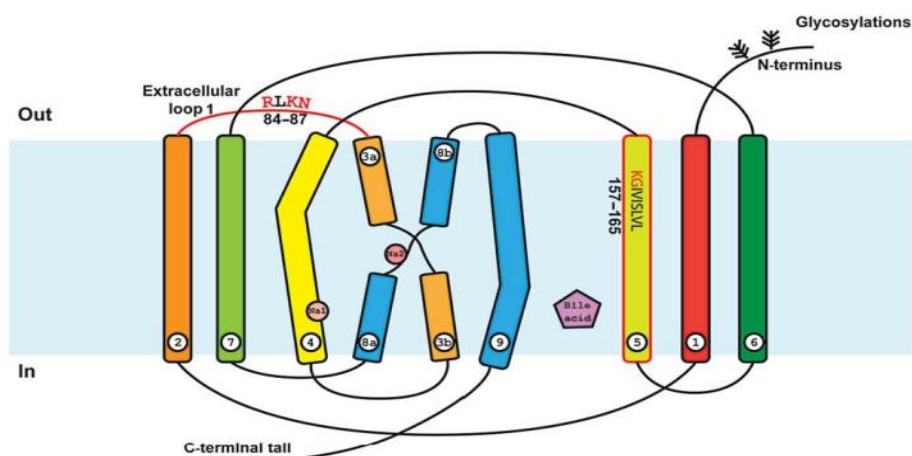
รูปที่ 5 NTCP ทำหน้าที่เป็น Bile acid transporter ขนส่งน้ำดีเข้าสู่เซลล์ตับ (44)

ในปี 2012 Yan และคณะ พบว่า HBV receptor ก็คือ Sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) ดังรูปที่ 5 จากการทำการทดลองใน *in vitro* ซึ่งได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของ NTCP พบว่าการแสดงออกของ NTCP ที่ลดลง ส่งผลให้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับลดลงด้วยเช่นกันและยังทำให้ทราบว่า Hepatoma cells เช่น HepG2 และ Huh7 มีการแสดงออกของ NTCP น้อยมาก เมื่อเทียบกับ Primary human hepatocytes (10)



รูปที่ 6 NTCP ทำหน้าที่เป็น HBV receptor อยู่ที่บริเวณผิวของเซลล์ตับ ซึ่งจะจับกับ PreS1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ Surface protein ที่หุ้มไวรัสตับอักเสบบี (45)

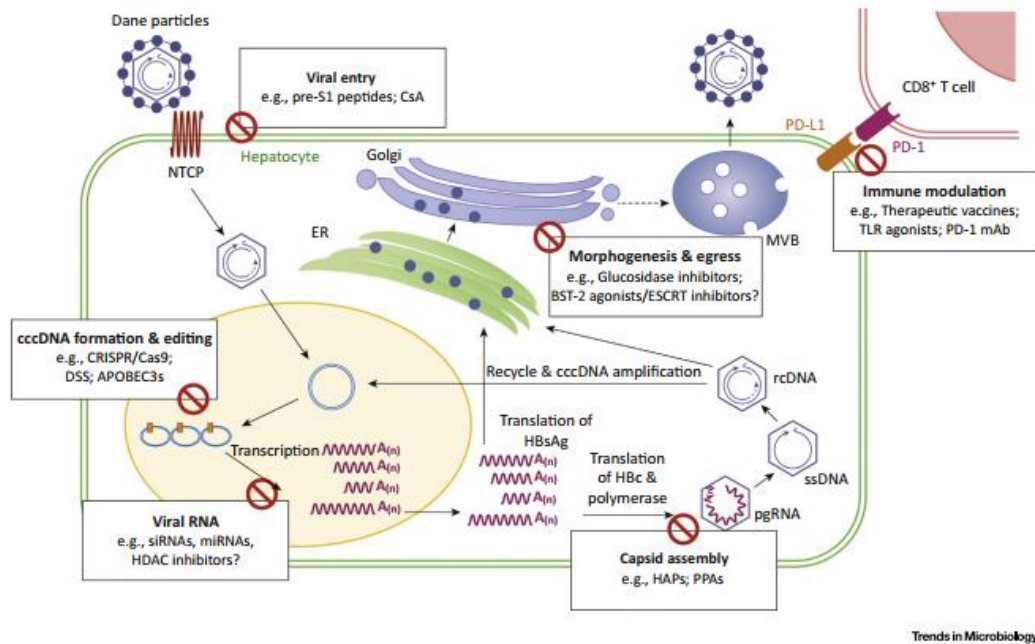
นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเพื่อหาบริเวณที่จำเพาะของ NTCP ต่อ HBV อีกด้วย โดยทำการศึกษาใน NTCP ของมนุษย์และของลิง เนื่องจากทราบว่า NTCP ของลิง ไม่ได้มีความจำเพาะกับ HBV จึงได้ทำการตัดต่อส่วนของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 157-165 ของมนุษย์เข้าไปใน NTCP ของลิง ปรากฏว่าทำให้ NTCP ของลิงที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมนั้น สามารถทำให้ HBV เข้าสู่เซลล์ได้ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 157-165 ของ NTCP มีความจำเพาะกับ HBV ดังรูปที่ 7 (10, 46)



รูปที่ 7 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 157-165 ของ NTCP มีความจำเพาะต่อ PreS1 (47)

เป้าหมายในการรักษา

มีงานวิจัยที่พบว่า Myrcludex-B ซึ่งเป็น Lipoprotein สามารถจับกับบริเวณ PreS1 ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของโปรตีน (Large surface protein) ที่หุ้มเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไว้ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 2-48 โดยพบว่าสามารถรบกวนการจับกันระหว่างเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและ NTCP ซึ่งเป็นตัวรับที่จำเพาะได้ จึงยับยั้งการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้จากการศึกษาใน *in vitro* และ *in vivo* (48) นอกจากนี้ยังมีตัวยับยั้งอื่นๆอีก ได้แก่ Cyclosporin A ซึ่งเป็นยากดภูมิคุ้มกัน ที่มีการรายงานเมื่อไม่นานมานี้ก็พบว่าสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสตับอักเสบบีเข้าสู่เซลล์ได้ โดยมีกลไกการทำงานคือไปจับที่ NTCP เป็นการแย่งจับไม่ให้เชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาจับได้ รวมไปถึงสารยับยั้ง NTCP ตัวอื่นๆที่มีการศึกษาแล้วพบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ แสดงให้เห็นว่า NTCP นั้นมีความสำคัญกับการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยขึ้นอยู่กับระดับการแสดงออกของ NTCP (49) ในปัจจุบันจึงสนใจยาที่มีความเกี่ยวข้องกับ NTCP มากกว่า เนื่องจากสามารถยับยั้งไม่ให้เชื้อไวรัสตับอักเสบบีเข้าสู่เซลล์ได้เป็นการป้องกันที่ต้นเหตุ



รูปที่ 8 ยาที่สามารถยับยั้งและป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งในปัจจุบันแบ่งออกได้เป็นหลายประเภท (50)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

จากงานวิจัยที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ในปี 2014 Su Z. และคณะ (11) ได้ทำการศึกษา SNPs ตำแหน่ง rs4646296, rs4646287 และ rs7154439 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 จีโนไทป์ AA มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งตับในกลุ่มประชากรจีนชาวยุ่อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้มะเร็งตับ (Non-HCC)

ในปี 2015 Peng L. และคณะ (12) ได้ทำการศึกษา SNPs ตำแหน่ง rs2296651 และ rs148467625 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 จีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนชาวยุ่อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

โดยในปี 2016 มิ่งานวิจัยของ Hu HH. และคณะ (13) ได้ทำการศึกษา SNP ตำแหน่ง rs2296651 พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 จีโนไทป์ AA มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรไต้หวันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Yang J. และคณะ (14) ได้ทำการทำการการศึกษา SNPs ที่ตำแหน่งที่ rs4646287, rs2296651, rs28437822, rs11624523 และ rs4646285 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 อัลลีล T มี

ความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนชาวฮั่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี รวมทั้งตำแหน่ง rs2296651 อัลลีล A มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนชาวฮั่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Su Z. และคณะในปี 2016 (15) ที่ทำการศึกษา SNPs ตำแหน่ง 7154439, rs4646287 และ rs2296651 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ทั้ง 3 ตำแหน่งไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในประชากรจีนชาวธิเบต (อยู่บริเวณ Xizang) และชาวอุยกูร์ (อยู่บริเวณ Xinjiang)



รูปที่ 9 แผนที่ประเทศจีน สามารถเข้าถึงได้ที่

https://aerospaceneblog.files.wordpress.com/2016/03/857px-china_administrative_claimed_included-svg.png?w=700

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 และตำแหน่ง rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยตำแหน่ง rs2296651 อยู่บน exon 2 เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส G เป็นเบส A หรือ C เป็น T ทำให้กรดอะมิโนเซอร์อินเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ส่วนตำแหน่ง rs4646287 อยู่บน intron 1 เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส C เป็นเบส T หรือ G เป็น A

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research design)

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาแบบ Case-control study

ประชากรศึกษา (Population study)

งานวิจัยนี้จะขอใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจาก โครงการวิจัยหมายเลข IRB 455/54 , 230/58 , 069/56 และ 409/59 ซึ่งทุกโครงการได้มีการลงลายมือชื่อยินยอมจากผู้ป่วยแล้วในกรณีที่ให้เก็บ ตัวอย่างเลือดที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

- กลุ่มประชากรที่ศึกษา (Case) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม
1. กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง คือ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนานกว่า 6 เดือน และไม่เป็นผู้ป่วยมะเร็งตับที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาด ไทย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งตรวจพบ HBsAg เป็น positive
2. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวี
 2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย
2. กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ คือ กลุ่มที่เป็นมะเร็งจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. เป็นผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และได้รับการวินิจฉัยทางรังสีวิทยา หรือใช้การวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อตับว่าเป็น

มะเร็งตับ ตามหลักเกณฑ์สมาคมโรคตับของอเมริกา (American Association for the Study of Liver Disease, AASLD) ที่เข้ารับการรักษาน ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับเสปปีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวี
2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

• กลุ่มควบคุม (controls) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy control) คือ กลุ่มประชากรสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย
2. กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (Spontaneous clearance) จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. กลุ่ม Spontaneous clearance คือ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง คือ ตรวจไม่พบ HBsAg แต่ตรวจพบ anti-HBs และ anti-HBc
2. กลุ่ม Healthy controls เป็นผู้ที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อ HBV โดยตรวจ HBsAg และไม่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis C virus) โดยตรวจ anti-HCV
3. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อ HBV ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)
2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

3. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ Case-control study โดยกลุ่มประชากรที่ศึกษาเป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นจึงคำนวณหาจำนวนประชากรเป้าหมายในแต่ละกลุ่มดังนี้

$$N = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{2P(1-P)} + Z_{\beta}\sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

N หมายถึง ประชากรที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

P_1 หมายถึง สัดส่วนของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีปัจจัยเสี่ยงที่ผู้วิจัยสนใจต่อผู้ป่วยทั้งหมด เท่ากับ 0.009 (11)

P_2 หมายถึง สัดส่วนของคนปกติที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อประชากรควบคุมทั้งหมด 0.067 (11)

P มีค่าเท่ากับ $\frac{(P_2+P_1)}{2} = 0.038$

Z_{α} หมายถึง ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test โดย $Z_{\alpha/2} = 1.96$ เมื่อกำหนด $\alpha = 0.05$

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

$$N = \frac{[1.96\sqrt{(2 \times 0.038)(1 - 0.038)} + 1.28\sqrt{0.009(1 - 0.009) + 0.067(1 - 0.067)}]^2}{(0.009 - 0.067)^2}$$

$$= \frac{226}{\text{group}}$$

ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในกลุ่มประชากรนี้ จึงแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมจำนวนอย่างน้อยกลุ่มละ 226 ราย ทั้งนี้เพื่อให้ข้อมูลงานวิจัยมีความน่าเชื่อถือและสามารถส่งข้อมูลตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. กลุ่มผู้ป่วย Chronic HBV infection จำนวน 635 ราย

- 1.1 Chronic HBV infection without HCC จำนวน 319 ราย
- 1.2 Chronic HBV infection with HCC จำนวน 316 ราย

2. กลุ่มควบคุม 472 รายแบ่งเป็น

- 2.1 Spontaneous HBV clearance จำนวน 232 ราย
- 2.2 Healthy controls จำนวน 240 ราย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Autoclave (Hirayama, Japan)
2. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
3. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
4. Electrophoresis chamber (BioRAD, USA)
5. Freeze -20 °C (Sanyo, Japan)
6. Gel Doc (BioRAD, USA)
7. Heater block (Lab line instrument, USA)
8. LightCycler 480 Real-Time PCR (Life Science, USA)
9. Magnetic stirrer (Thermolyne, USA)
10. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 µl (Axygen, USA)
11. Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
12. Parafilm (American nation, USA)
13. Polypropylene conical tube ขนาด 50 ml (SPL Lifesciences, Korea)
14. Vacuum (Eppendorf, Germany)
15. Vortex mixer (Scientific industry, USA)

2. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

1. Absolute ethanol (Merck, Germany)
2. Chloroform (RCI Labscan, Thailand)
3. Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA (Bio Basic Canada, Canada)
4. Glycogen (USB, Hong Kong)
5. Isoamyl alcohol (Carlo Erba Reagenti, Italy)
6. Nuclease-free water
7. Phenol (Amresco, USA)
8. Proteinase K (Life Technologies, USA)
9. Tris-HCl (Sigma, Singapore)
10. Sodium acetate (Merck, Germany)
11. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AMRESCO, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ด้วยวิธี *TaqMan* probe real-time PCR

1. 5X *TaqMan* Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Germany)
2. Distill water (DW)
3. *TaqMan* SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Germany)
 - rs2296651 (Assay ID: C__16184554_10)
 - rs4646287 (Assay ID: C__32354582_10)

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1. Agarose (Invitrogen, USA)
2. Boric acid (Bio Basic Canada, Canada)
3. 100 bp DNA ladder H3 RTU (Ready-to-Use) (GeneDireX, Taiwan)
4. EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hong Kong)
5. Tris base Biotechnology Grade (Bio Basic Canada, Canada)

5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

1. RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan)

6. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector

1. 10X Ligation buffer (Thermo Scientific, USA)
2. RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan)
3. T4 DNA ligase (Thermo Scientific, USA)

7. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation

1. Agar (Becton, Dickinson and Company (BD), USA)
2. Ampicillin (M&H Manufacturing, Thailand)
3. Distill water (DM)
4. Glucose (Ajax Finechem, New Zealand)
5. Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMRESCO, USA)
6. Potassium chloride (KCl) (VMR international, USA)
7. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)
8. Tryptone (Becton, Dickinson and Company (BD), USA)
9. X-gal (AMRESCO, USA)
10. Yeast extracts (Becton, Dickinson and Company (BD), USA)

8. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)
 1. RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan)
9. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatics
 1. BioEdit Sequence Alignment Editor
10. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
 1. SPSS software for Windows version 22.0 (SPSS, Chicago, IL)
 2. MedCalc statistical software Version 17.6

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

วิธีการดำเนินวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Allelic discrimination assay โดยใช้ TaqMan probe real-time PCR หาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287

13.1 การสกัด DNA

การสกัดสารพันธุกรรมจากเซลล์ Huh7 เพื่อทำ Positive control และ Buffy coat ที่ได้จากเลือดตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค Phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction มีขั้นตอน ดังนี้

1. นำสารที่ต้องการสกัด DNA (Cell line ใช้ปริมาณ 100 μ l) หรือ (Buffy coat ใช้ปริมาณ 200 μ l) เติม Lysis buffer ปริมาตร 400 μ l (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) จากนั้นเติม Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 μ l ผสมให้เข้ากันในหลอด Microcentrifuge tube 1.5 ml แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติมสารละลาย Phenol ปริมาตร 250 μ l (ดูสูตรละลายชั้นล่าง) และ Chloroform : Isoamyl alcohol (49:1) ปริมาตร 250 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

* ระหว่างนี้เตรียม Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เติม Glycogen ปริมาตร 4 μ l Absolute ethanol (ที่แช่เย็น) ปริมาตร 800 μ l และ 2 M NaOAc ปริมาตร 40 μ l ผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารละลายชั้นบนที่ได้หลังจากปั่นเหวี่ยงลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 30 นาที

5. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลือมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
6. ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวกัน Microcentrifuge tube เท่านั้น จากนั้นนำไประเหยให้แห้งด้วย Vacuum โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที
7. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile distilled water) ปริมาตร 30 μ l จากนั้นเก็บสารละลาย DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C
8. นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และบันทึกผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

13.2 การทำตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control)

13.2.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287

ด้วยวิธี Real-time PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอของเซลล์ Huh7 ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287 ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ทำ Real-time PCR ดังแสดงในตารางในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 สารที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287

สารที่ใช้	ปริมาตร (μ l)
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	2.5
5X <i>TaqMan</i> Genotyping Master Mix	5
20X SNP assay (primer+probe mixture)	0.5
DNA template	2
Total volume	10

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ทำ real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Pre-holding stage	60	30 วินาที	
Holding stage	95	10 นาที	
Denaturation	95	15 วินาที	40 รอบ
Annealing/Extension	60	1 นาที	40 รอบ

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel with Red Safe electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที และตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการเพื่อสกัดเจลต่อไป

13.2.2 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

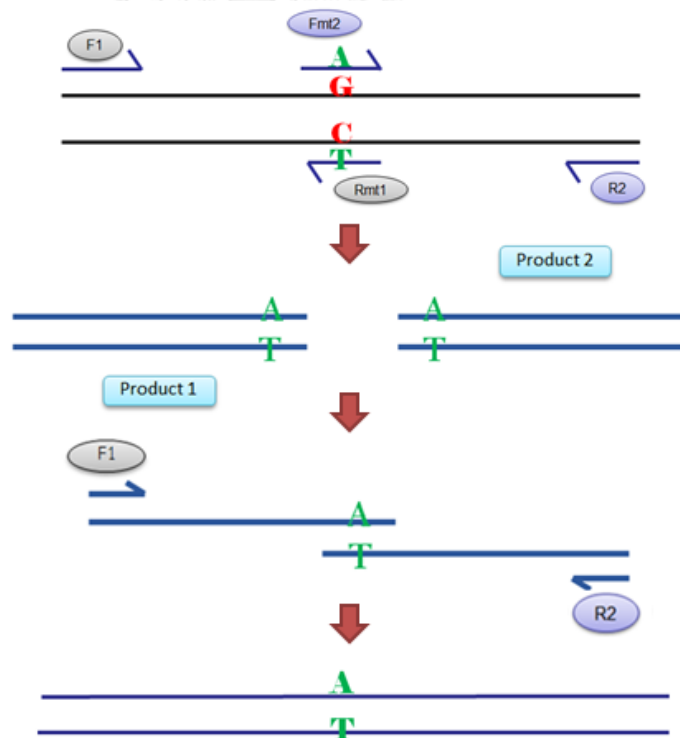
ใช้ชุดสกัดเจล RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

1. ตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. เติม DF buffer ปริมาตร 500 μ l (300 mg gel ต่อปริมาตร DF buffer 500 μ l) ลงใน Tube ที่มีเจลอยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex
3. บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมดโดยระหว่างบ่มนั้น ควรกลับ Microcentrifuge tube ทุกๆ 2-3 นาที
4. นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน DF column ที่ใส่อยู่ใน Collection tube
5. หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งของเหลวใน Collection tube จากนั้นใส่ DF column กลับไปใน Collection tube อีกครั้ง
6. เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน DF column
7. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube และใส่ DF column กลับไปใน Collection tube อีกครั้ง
8. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ DF column แห้งสนิท

9. นำ DF column ใส่ลงใน 1.5 ml Microcentrifuge tube อันใหม่
10. เติม Elution buffer ปริมาตร 30 μ l ลงใน DF column และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

13.2.3 Site-directed mutagenesis

การทำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะที่ เพื่อให้ได้ DNA สายใหม่ที่เบสมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมในตำแหน่งที่ต้องการ ซึ่งอาศัยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาช่วยด้วย ต้องใช้ Primer 2 คู่ โดยคู่ที่ 1 ประกอบด้วย Forward primer และ Reverse mutant primer (Mutagenic primer) ซึ่งเป็น Primer ที่มีการออกแบบเบสให้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และคู่ที่ 2 ประกอบด้วย Forward mutant primer (Mutagenic primer) และ Reverse primer นำไปเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยกระบวนการ PCR ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 กระบวนการ Mutagenesis ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer 2 คู่ นำไปเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยกระบวนการ PCR นำ Product ที่ได้จาก Primer คู่ที่ 1 และ 2 มาผสมกัน จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนชิ้น DNA โดยใช้ Forward primer จากคู่ที่ 1 และ Reverse primer จากคู่ที่ 2 ด้วยวิธี PCR จะได้เป็น DNA สายใหม่ ที่มีลำดับเบสเป็นไปตามที่ต้องการ

13.2.4 การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector (Ligation)

ใช้ชุด RBC TA cloning vector kit โดยใช้สารเคมีดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Ligation buffer	1	1X
TA cloning vector (RBC) (25 ng/ μl)	1	5 ng/ μL
T4 DNA ligase (5 units/ μl)	1	5 Units
Purified PCR Product	7	-
Total volume	10	

จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน

13.2.5 การเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation (Heat shock)

- ผสม Competent cells (*E. coli*) ปริมาตร 50 μl และสารละลาย Ligation ปริมาตร 5 μl ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
- บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 50 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาทีทันที
- เติม SOC medium ที่มี 2M MgCl_2 และ 2M Glucose ปริมาตร 950 μl (ผสม 2M Mg 10 μl และ 2M Glucose 10 μl ลงใน SOC medium 1 ml)
- หลังจากนั้นนำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
- นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาตร ประมาณ 50 μl
- ดูดตะกอนและสารละลายที่เหลือมา Spread ลงใน LB agar plate ที่มี Ampicillin

(ก่อนหน้า Spread ต้องผสมสารละลายของ 200 mg/mL IPTG 5 μl และ X-gal 15 μl ลงใน LB agar ก่อน)

- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

- นำโคลน *E. coli* ที่มีสีขาวมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2 μ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

13.2.6 การสกัดพลาสมิด (Plasmid Extraction)

ชุดสกัดพลาสมิดที่ใช้คือ RBC Real Genomics Hiyield™ Plasmid Mini Kit

- นำโคลน *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงมาถ่ายลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสออก
- เติม PD1 buffer ปริมาตร 200 μ l และนำมาเขย่าด้วยเครื่อง Vortex
- เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 μ l และกลับ Microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง
- เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 μ l และกลับ Microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง
- จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- เตรียม PD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml จากนั้นดูดส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยง ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง
- เติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง
- เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column ลงใน collection tube อีกครั้ง
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ PD column แห้ง
- จากนั้นใส่ PD column ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- เติม Elution buffer ปริมาตร 30 μ l และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเก็บพลาสมิดที่สกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

13.2.7 การตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยวิธี Sequencing

เพื่อตรวจสอบว่าพลาสมิดมีขึ้นยืน *NTCP* อยู่หรือไม่ โดยนำพลาสมิดที่ได้มาตรวจหาอัลลีลของยืน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs2296651 (Major allele = G, Minor allele = A) และตำแหน่ง rs4646287 (Major allele = C, Minor allele = T) ด้วยวิธี Sanger sequencing

13.3 การตรวจความหลากหลายของยืน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 ด้วยวิธี Allelic discrimination assay โดยใช้ TaqMan probe real-time PCR

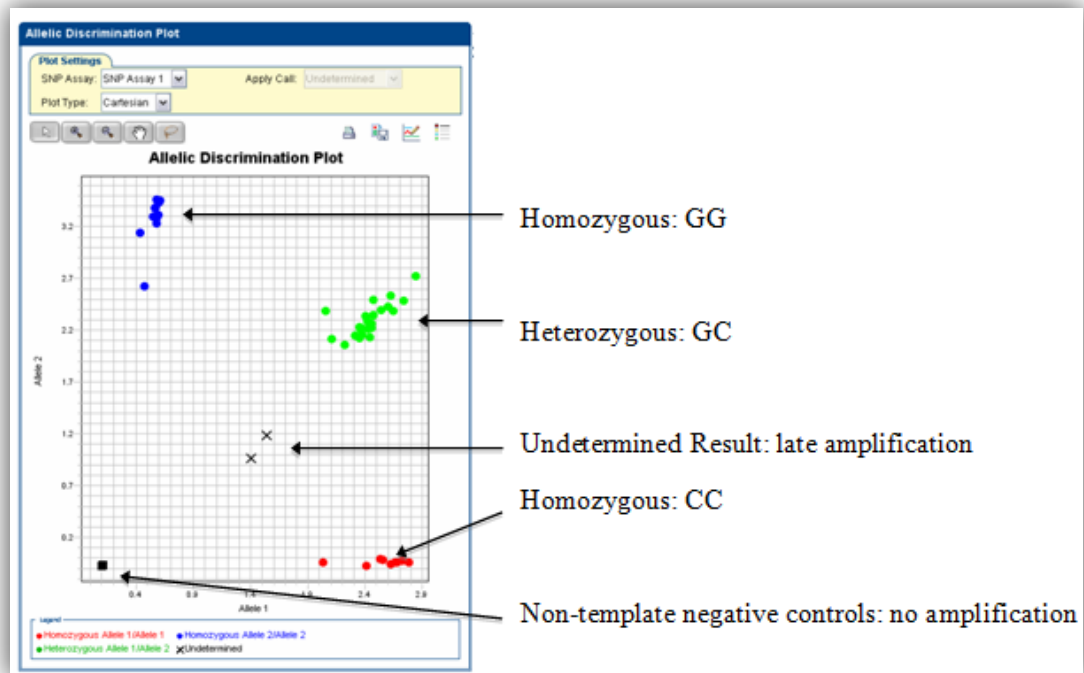
ตารางที่ 5 สารที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay ของยืน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ ตำแหน่ง rs4646287

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	2.5
5X TaqMan Genotyping Master Mix	5
20X SNP assay (primer+probe mixture)	0.5
DNA template	2
Total volume	10

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ทำ Real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Pre-holding stage	60	30 วินาที	
Holding stage	95	10 นาที	
Denaturation	95	15 วินาที	40 รอบ
Annealing/Extension	60	1 นาที	40 รอบ

จากนั้นพิจารณาผลการทดลองจากกราฟ Allelic Discrimination Plot



รูปที่ 11 ตัวอย่างผลการทดลองจากกราฟ Allelic Discrimination Plot (จุดสีน้ำเงินแทนอัลลีล 2, จุดสีเขียวแทนอัลลีล 1/2, จุดสีแดงแทนอัลลีล 1)

การเจือจางความเข้มข้นของพลาสมิด

เจือจางความเข้มข้นของ Positive control ให้ความเข้มข้นเป็น 10^6 ng/ μ l โดยพลาสมิดที่มี Allele ต่างกัน จะได้ความเข้มข้นของ N ในหน่วย copies/ μ l

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

เมื่อ m = มวล (g)

N = จำนวน copies ของพลาสมิด (copies/ μ l)

M.W. = ความยาวของ vector (2723 bp) + ผลิตภัณฑ์ของยีนที่ทำ PCR \times M.W.

เฉลี่ยของเบส (660)

จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ได้ให้เป็น 1×10^{10} copies/ μ l ปริมาตร 10 μ l

ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

โดย C_1 คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดก่อนเจือจาง

V_1 คือ ปริมาตรของพลาสมิดก่อนเจือจาง

C_2 คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดหลังเจือจาง

V_2 คือ ปริมาตรของพลาสมิดหลังเจือจาง

$$\text{จะได้ } V_1 (\mu\text{l}) = \frac{10^{10} \times 10}{N}$$

เติม D.W. ให้มีปริมาตรเป็น 10 μl แล้วเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 10^8 และ 10^6 ตามลำดับ

- หมายเหตุ การทำ Positive control ของ Genotype ที่เป็น Heterozygous นำพลาสมิดทั้ง 2 allele ที่ความเข้มข้น 10^6 copies/ μl มาอย่างละ 0.5 μl ต่อ 1 reaction ของ real-time PCR

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยการจดลงสมุดบันทึกผลการทดลอง และบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ใช้โปรแกรม SPSS ในการคำนวณ Unpaired t-test, ANOVA และ Chi-square เพื่อพิจารณา ความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกระหว่าง Case และ Control

2. เปรียบเทียบการกระจายตัวจีโนไทป์ของ SNPs ต่าง ๆ ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา (Observed amount) กับค่าคาดหวัง (Expected amount) โดยใช้ Hardy-Weinberg Equilibrium จากเว็บไซต์ <http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html> ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

เมื่อให้ p เป็นความถี่ของยีนเด่น (A) และ q เป็นความถี่ของยีนด้อย (a) ในประชากรแล้ว

- ความถี่ของยีน = $p + q = 1$

- ความถี่ของจีโนไทป์ = $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

- ความถี่ของอัลลีล A หรือ a = $\sqrt{\text{ความถี่ของจีโนไทป์ AA หรือ aa}}$

- Expected amount = $p^2 \times \text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด (Dominant)}$
 $= 2pq \times \text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด (Heterozygous)}$
 $= q^2 \times \text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด (Recessive)}$

3. ใช้โปรแกรม MedCalc Statistical Software คำนวณความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Odds ratio, OR) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P\text{-value} < 0.05$) ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$\text{Odds ratio (OR)} = \frac{ad}{bc}$$

Exposed/Disease	D+	D-
E+	a	b
E-	c	d
Total	a+c	b+d

การแปลความหมาย Odds Ratio

- OR > 1 กลุ่มเกิดเหตุการณ์มีอัตราส่วนการสัมผัสปัจจัยมากเป็นจำนวน n เท่าของกลุ่มไม่เกิดเหตุการณ์
- OR < 1 กลุ่มเกิดเหตุการณ์มีอัตราส่วนการสัมผัสปัจจัยน้อยกว่ากลุ่มไม่เกิดเหตุการณ์จำนวน n เท่า
- OR = 1 กลุ่มเกิดเหตุการณ์มีอัตราส่วนการสัมผัสปัจจัยเท่ากับกลุ่มไม่เกิดเหตุการณ์



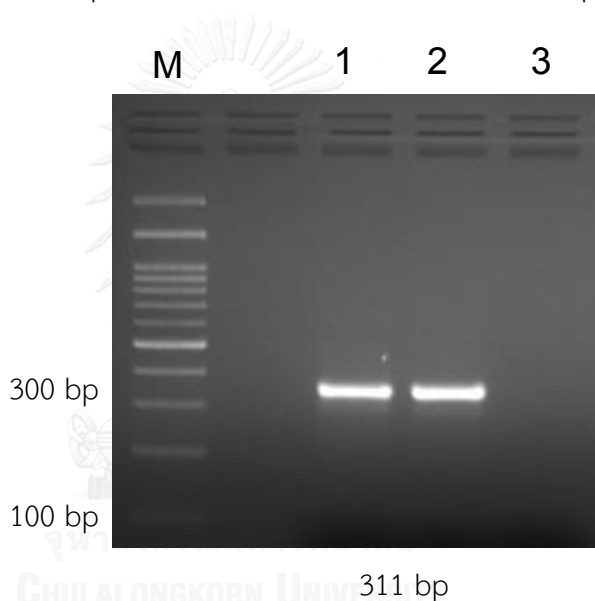
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทำ Positive control ของยีน *NTCP* (rs2296651,rs4646287)

1.1 ผลการทำ Real-time PCR

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ Real-time PCR ของยีน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs2296651 หลังจากตรวจสอบด้วย 2% gel Agarose gel โดยวิธี Electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 311 bp และที่ตำแหน่ง rs4646287 ขนาด 286 bp ดังรูปที่ 15 และ 16



รูปที่ 12 ผลการทำ Real-time PCR ของยีน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs2296651

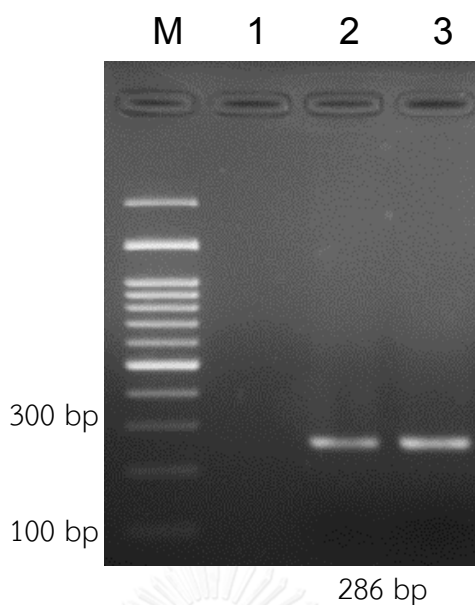
หมายเหตุ

แถว M คือ 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 คือ rs2296651 mutant (minor)

แถวที่ 2 คือ rs2296651 major

แถวที่ 3 คือ Negative control



รูปที่ 13 ผลการทำ Real-time PCR ของยีน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs4646287

หมายเหตุ

แฉก M คือ 100 bp DNA ladder

แฉกที่ 1 คือ Negative control

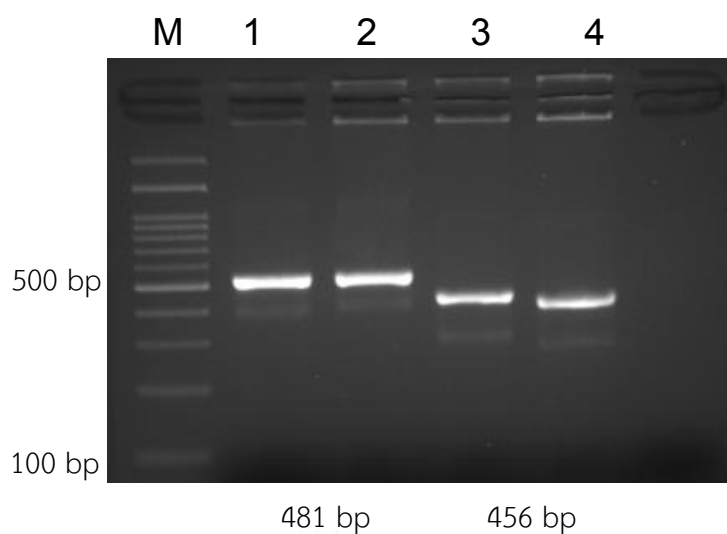
แฉกที่ 2 คือ rs4646287 mutant (minor)

แฉกที่ 3 คือ rs4646287 major

จากนั้นจึงทำการตัดแถบเจลในบริเวณดังกล่าว สกัด DNA ออกจากเจล เชื่อมผลิตภัณฑ์เข้าสู่ TA vector และ Transformation ใน *E.coli* จากนั้นทำ Colony PCR เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีนที่สนใจใน TA vector

1.2 ผลการทำ Colony PCR โดยใช้ Primer คือ M13F และ M13R

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ Colony PCR ของยีน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs2296651 หลังจากตรวจสอบด้วย 2% gel Agarose gel โดยวิธี Electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 481 bp และที่ตำแหน่ง rs4646287 ขนาด 456 bp ดังรูปที่ 17



รูปที่ 14 ผลการทำ Colony PCR ของยีน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287

หมายเหตุ

แฉว M คือ 100 bp DNA ladder

แฉวที่ 1 คือ rs2296651 mutant (minor)

แฉวที่ 2 คือ rs2296651 major

แฉวที่ 3 คือ rs4646287 mutant (minor)

แฉวที่ 4 คือ rs4646287 major

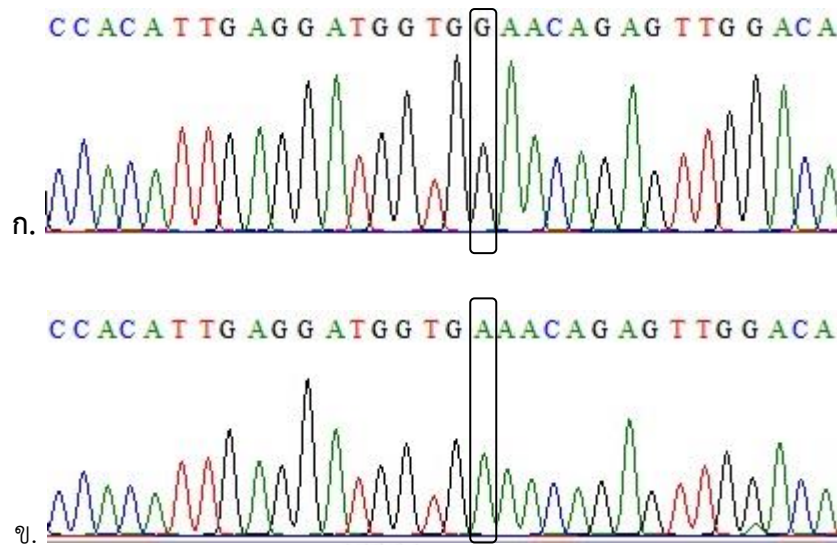
แฉวที่ 5 คือ Negative control

จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่คาดว่ามีส่วนของยีน *NTCP* ที่ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 ที่ได้จากการทำ Transformation ด้วยวิธี Heat shock และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sequencing ต่อไป พิจารณา Allele ของแต่ละ SNPs จาก Chromatogram

1.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651

ด้วยวิธี Sequencing

ยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 มี Major และ Minor allele คือ G และ A ตามลำดับ จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดพบว่า พลาสมิดที่มีชิ้นยีนนี้จากเซลล์ Huh7 เป็นอัลลิล G และจากการทำ Site-directed mutagenesis เป็นอัลลิล A ดังที่แสดงในรูปที่ 18 ทำให้การหาจีโนไทป์สำหรับ SNPs ตำแหน่งนี้มี Positive control ของทั้งสองอัลลิลครบตามที่ต้องการ

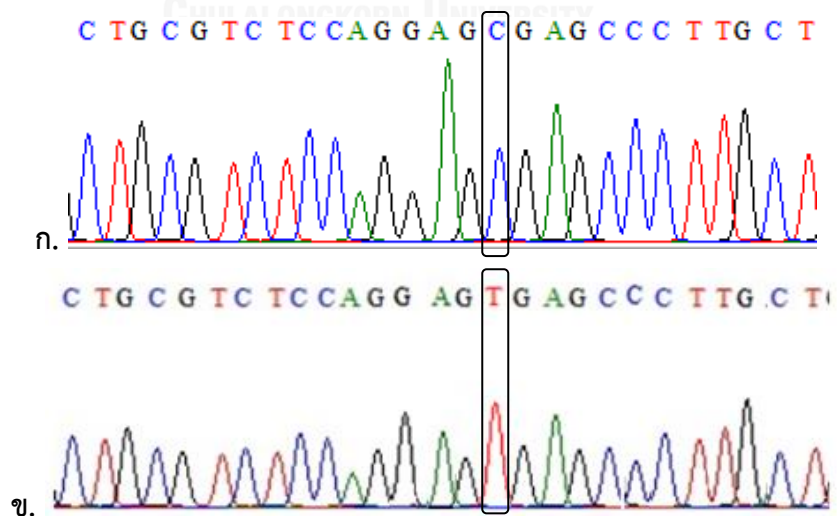


รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651
 ก.อัลลีล G (Major allele) ข.อัลลีล A (Minor allele)

1.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287

ด้วยวิธี Sequencing

ยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287 มี Major และ Minor allele คือ C และ T ตามลำดับ จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดพบว่า พลาสมิดที่มีขึ้นยีนนี้จากเซลล์ Huh7 เป็นอัลลีล C และจากการทำ Site-directed mutagenesis เป็นอัลลีล T ดังที่แสดงในรูปที่ 19 ทำให้การหาจีโนมไทป์สำหรับ SNPs ตำแหน่งนี้มี Positive control ของทั้งสองอัลลีลครบตามที่ต้องการ



รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดที่มียีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287
 ก.อัลลีล C (Major allele) ข.อัลลีล T (Minor allele)

ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิดที่ใช้เป็น Positive control ในหน่วย Copies/ μ l

เมื่อได้พลาสมิดที่ใช้เป็น Positive control เรียบร้อยแล้วต่อมาทำการเจือจางความเข้มข้นของพลาสมิดให้มีความเข้มข้นเป็น 10^6 ng/ μ l ซึ่งผลการหาความเข้มข้นของแต่ละพลาสมิด แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับ Positive control

SNPs	Allele	Concentration (ng/ μ l)	OD _{260/280}	Copies/ μ l
rs2296651	G	162.1	1.88	4.87×10^{10}
	A	151.8	1.79	4.56×10^{10}
rs4646287	C	131.75	1.60	3.99×10^{10}
	T	146.3	1.75	4.43×10^{10}

จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ได้ให้เป็น 1×10^{10} , 1×10^8 และ 1×10^6 Copies/ μ l ตามลำดับ

ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษาในงานวิจัย

ผลการทดลองเพื่อหาจีโนไทป์ของ SNPs บนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287 สามารถแบ่งกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษาได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 240 คน

กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง จำนวน 232 คน

กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 635 คน ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นมะเร็งตับ 319 คนและกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ 316 คน

จากข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับถูกนำมาวิเคราะห์ผล ดังตารางที่ 8 โดยพบว่าประชากรในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีอายุเฉลี่ย 53.1 ± 13 ปี กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี มีอายุเฉลี่ย 48.6 ± 6 ปีและกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองมีอายุเฉลี่ย

49.8±6 ปี ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับมีอายุเฉลี่ย 49.4±11 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับมีอายุเฉลี่ย 47.3±12 ปี

ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่าเพศชายมากกว่าเพศหญิง ซึ่งพบเพศชายมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 450 คน จาก 635 คน คิดเป็น 70.9% และพบน้อยที่สุดในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 128 คน จาก 240 คน คิดเป็น 53.3% ส่วนเพศหญิงนั้นพบมากที่สุดในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 112 คน จาก 240 คน คิดเป็น 46.7% และน้อยที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจำนวน 185 คน จาก 635 คน คิดเป็น 29.1% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับพบว่าเพศชายมากกว่าเพศหญิง นอกจากนี้พบว่ามีความแตกต่างของอายุเฉลี่ยและสัดส่วนของเพศระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี, กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$)

สำหรับค่าทางคลินิกอื่นๆ ได้แก่ ค่า Albumin, ALT, ALP, AST และ AFP ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับมีความแตกต่างกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน HBeAg ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับพบว่ามีค่า TB เฉลี่ยประมาณ 1.25, มีการแบ่งระยะมะเร็งตามเกณฑ์ของ Child-Pugh พบว่าส่วนใหญ่อยู่ใน Class A แต่เมื่อมีการแบ่งระยะมะเร็งตามเกณฑ์ของ BLCL พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในระยะ intermediate stage (stage B) สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับนั้นพบว่ามีค่า HBV DNA เฉลี่ยประมาณ 0.90 log IU/ml และส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วยจะติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C มากกว่า

ตารางที่ 8 ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากร

Baselines	Healthy controls (n= 240)	Spontaneous HBV clearance (n= 232)	Chronic HBV infection (n= 635)			P-value
			Total	Non-HCC	HCC	
Age (years)	48.6±6	49.8±6	53.1±13	47.3±12	49.4±11	0.001*, 0.001**
Sex (%)						
Male	128 (53.3%)	154 (66.4%)	450 (70.9%)	187 (58.6%)	263 (83.2%)	
Female	112 (46.7%)	78 (33.6%)	185 (29.1%)	132 (41.4%)	53 (16.8%)	0.001*, 0.001**
TB (mg/dL)	ND	ND	ND		1.25±0.9	
Albumin (mg/dL)	ND	ND	ND	3.9±0.9	3.58±0.7	0.052
ALT (IU/L)	ND	ND	ND	52.3±49.6	58.6±66.7	0.045**
ALP (mg/L)	ND	ND	ND	71.4±24.6	151.9±122.8	0.001**
AST (IU/L)	ND	ND	ND	38.3±31.3	86.3±99.8	0.001**
AFP (ng/mL)	ND	ND	ND	3.1±2.8	9979.7±34420.1	0.001**
Child-Pugh	ND	ND	ND	ND		
A					177 (75.6%)	
B-C					57 (24.4%)	
BCLC	ND	ND	ND	ND		
0-A					88 (31.4%)	
B					110 (39.3%)	
C-D					82 (29.3%)	
HBeAg	ND	ND	ND			0.054**
Negative					24 (19.2%)	
Positive					101 (80.8%)	
HBV DNA (log IU/ml)	ND	ND	ND	0.9±2.8	ND	
Genotype	ND	ND	ND		ND	
B					22 (27.8%)	
C					57 (72.2%)	

TB: Total Bilirubin, ALT: Alanine transaminase, ALP: Alkaline phosphatase, AST: Aspartate aminotransferase, AFP: Alpha-fetoprotein, BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer, HBV: Hepatitis B virus, ND = No data,

* เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Healthy controls, Spontaneous HBV clearance และ Chronic HBV infection,

**เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Non-HCC และ HCC

การกระจายตัวของจีโนไทป์ใน Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

สมดุล Hardy-Weinberg Equilibrium คือ ความสมดุลของความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากประชากรรุ่นหนึ่งไปสู่ประชากรอีกรุ่นได้ เมื่อประชากรนั้นมีขนาดใหญ่ มีการผสมแบบสุ่ม ไม่มีการกลายพันธุ์ ไม่มีการอพยพของประชากร และไม่มีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงทดสอบความเบี่ยงเบนความถี่จีโนไทป์ของ SNPs ต่างๆจากสมดุลของ Hardy-Weinberg Equilibrium เพื่อแสดงให้เห็นว่า กลุ่มประชากรที่ศึกษามีความถี่จีโนไทป์ที่สมดุลไม่เอนเอียงไปในจีโนไทป์ใดจีโนไทป์หนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละ SNPs ที่ศึกษา

SNPs	Groups	Genotype	ค่า Observed	ค่า Expected	P-value
rs2296651	Healthy controls	GG	178	174.25	0.12
		GA	53	60.5	
		AA	9	5.25	
	Spontaneous HBV clearance	GG	195	194.64	0.76
		GA	35	35.72	
		AA	2	1.64	
	Chronic HBV infection	GG	540	534.34	0.20
		GA	85	90.32	
		AA	10	10.34	
rs4646287	Healthy controls	CC	199	198.93	0.95
		CT	39	39.15	
		TT	2	1.93	
	Spontaneous HBV clearance	CC	200	201.10	0.26
		CT	32	29.79	
		TT	0	1.10	
	Chronic HBV infection	CC	513	507.18	0.15
		CT	109	120.65	
		TT	13	7.18	

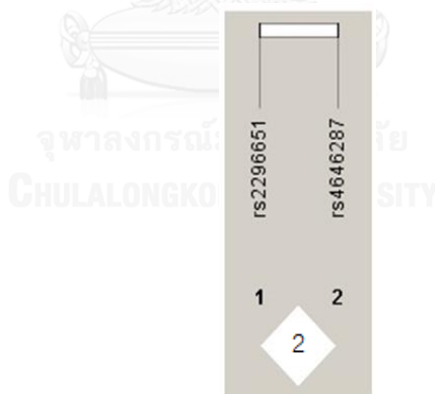
ค่า Observed = ค่าที่ได้จากการสังเกต, ค่า Expected = ค่าคาดหวัง ซึ่งได้จากการคำนวณ (สูตรคำนวณดังหน้าที่ 32)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า SNPs ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 ($P_{HWE} > 0.05$) เป็นไปตามสมมติฐานของ Hardy-Weinberg Equilibrium แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรที่เลือกมาศึกษาเป็นกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ดี และมีความน่าเชื่อถือของข้อมูล

Linkage Disequilibrium

แผนภาพ linkage disequilibrium map (LD map) เป็นแผนภาพที่แสดงความสัมพันธ์ของอัลลีลที่อยู่คนละตำแหน่งบนโครโมโซมเดียวกันว่ามีความเกี่ยวข้องหรือมีความสัมพันธ์กันอย่างไร และถูกถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นต่อไปด้วยกันหรือไม่ โดยพิจารณาจาก D' (Lewontin's coefficient) หากค่า $D' \leq 0.8$ แสดงว่า SNPs หลายตำแหน่งเหล่านั้นเป็นอิสระต่อกัน ไม่ได้ถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปด้วยกัน จะเรียกกลุ่มของ SNPs เหล่านี้ว่า Linkage equilibrium แต่หากค่า $D' > 0.8$ แสดงว่า SNPs หลายตำแหน่งเหล่านั้นถูกถ่ายทอดไปด้วยกันในกลุ่มประชากรพบบ่อยกว่าการที่พบโดยบังเอิญ จะเรียกกลุ่มของ SNPs เหล่านี้ว่า Linkage disequilibrium

จาก SNPs ทั้ง 2 ตำแหน่งคือ rs2296651 และ rs4646287 ที่นำมาศึกษา พบว่ามีค่า $D' = 0.02$ แสดงว่า SNPs ทั้ง 2 ตำแหน่งนี้เป็นอิสระต่อกันและไม่ได้มีอิทธิพลต่อกัน (Linkage equilibrium) จึงสามารถนำมาศึกษาได้ทั้ง 2 ตำแหน่ง



รูปที่ 17 แสดงแผนผังการถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map)

ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษากับค่าทางคลินิก

5.1 ยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651

เมื่อศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างผลของจีโนไทป์กับค่าทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับและเป็นมะเร็งตับ โดยแบ่งจีโนไทป์ออกเป็น 2 กลุ่มคือ จีโนไทป์ GG และจีโนไทป์ GA+AA พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่ได้

เป็นมะเร็งตับและเป็นมะเร็งตับ ผลของจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าทางคลินิก ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 กับค่าทางคลินิก

rs2296651						
Baselines	Non-HCC		P-value	HCC		P-value
	GG	GA+AA		GG	GA+AA	
Albumin (mg/dL)	3.9±0.9	0.4±1.2	0.92	3.6±0.7	3.5±0.7	0.43
ALT (IU/L)	50.0±47.8	60.6±58	0.93	57.6±59.2	65.1±103.3	0.5
ALP (mg/L)	70.5±23.4	79.0±34.3	0.13	149.3±118.9	169.1±145.7	0.34
AST (IU/L)	37.1±32.3	39.6±26.7	0.92	83.0±78.7	107.3±185.2	0.14
AFP (ng/mL)	3.2±2.9	2.7±1.9	0.11	9924.0±33935.2	10292.5±37495.7	0.95

5.2 ยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287

เมื่อศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างผลของจีโนไทป์กับค่าทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับและเป็นมะเร็งตับ โดยแบ่งจีโนไทป์ออกเป็น 2 กลุ่มคือ จีโนไทป์ GG และจีโนไทป์ GA+AA พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับและเป็นมะเร็งตับ ผลของจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าทางคลินิก ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 กับค่าทางคลินิก

rs4646287						
Baselines	Non-HCC		P-value	HCC		P-value
	GG	GA+AA		GG	GA+AA	
Albumin (mg/dL)	3.7±1.1	4.7±0.4	0.23	3.6±0.7	3.6±0.6	0.68
ALT (IU/L)	111.5±819.8	40.7±27.7	0.63	57.9±67.6	61.5±63.2	0.7
ALP (mg/L)	74.5±26.8	68.0±15.9	0.39	147.5±121.6	168.7±126.9	0.22
AST (IU/L)	33.6±31.1	31.3±17.9	0.7	87.7±107.2	81.1±64.5	0.64
AFP (ng/mL)	3.3±3.1	2.5±1.8	0.22	9271.4±28908.4	12477.4±49440.2	0.54

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

2.1 ยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651

การจำแนกจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 สามารถแบ่งได้เป็น 3 จีโนไทป์ คือ GG, GA และ AA โดยในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่า กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีจำนวน 240 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 178 (74.2%), 53 (22.1%) และ 9 (3.7%) ตามลำดับและกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองมีจำนวน 232 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 195 (84.1%), 35 (15.1%) และ 2 (0.8%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีจำนวน 635 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 540 (85.0%), 85 (13.4%) และ 10 (1.6%) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล G (Major) และอัลลีล A (Minor) พบว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีจำนวน 240 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 409 (85.2%) และ 71 (14.7%) ตามลำดับ และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองมีจำนวน 232 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 425 (91.6%) และ 39 (8.4%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีจำนวน 635 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 1165 (91.7%) และ 105 (8.3%) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า จีโนไทป์ GA และ AA มีความสัมพันธ์ในลักษณะลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.036$, 0.043 ตามลำดับ) รวมทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ($P = 0.011$, 0.032 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและใน Dominant model จีโนไทป์ GA+AA มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) รวมทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ($P < 0.002$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ในขณะที่ Recessive model จีโนไทป์ AA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนั้น A allele พบว่ามีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) รวมทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ดังแสดงในตารางที่ 12

จากการพิจารณาค่า OR เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (OR = 0.58, 95% CI = 0.38 – 0.87) และระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (OR = 0.6, 95% CI = 0.43 – 0.83) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น Protective allele ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (OR = 1.04, 95% CI = 0.71 – 1.53) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น Risk allele แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 ยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287

การจำแนกจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 สามารถแบ่งได้เป็น 3 จีโนไทป์ คือ CC, CT และ TT โดยในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่า กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีจำนวน 240 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 199 (82.9%), 39 (16.3%) และ 2 (0.8%) ตามลำดับ และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองจำนวน 232 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 200 (85.5%), 32 (14.5%) และ 0 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีจำนวน 635 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 513 (80.9%), 109 (17.0%) และ 13 (2.1%) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล C (Major) และอัลลีล T (Minor) พบว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีจำนวน 240 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 437 (91.1%) และ 43 (8.9%) ตามลำดับ และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองมีจำนวน 232 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 432 (92.3%) และ 36 (7.7%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีจำนวน 635 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 1134 (89.4%) และ 134 (10.6%) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ไม่พบความสัมพันธ์กัน ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 13

จากการพิจารณาค่า OR เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (OR = 0.85, 95% CI = 0.53 – 1.34) ระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (OR = 1.2, 95% CI = 0.84 – 1.72) และระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ปีแบบเรื้อรัง (OR = 1.42, 95% CI = 0.97 – 2.08) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น Risk allele แต่
อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ตารางที่ 12 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม

<i>NTCP</i>	Healthy controls (n= 240)	Spontaneous HBV clearance (n= 232)	Chronic HBV infection (n= 635)	Controls vs Clearance		Controls vs CHB		Clearance vs CHB	
				OR(95%CI)	P-value	OR(95%CI)	P-value	OR(95%CI)	P-value
Allelic model									
Major (G)	409 (85.2%)	425 (91.6%)	1165 (91.7%)	1		1		1	
Minor (A)	71 (14.8%)	39 (8.4%)	105 (8.3%)	0.58 (0.38-0.87)	0.001	0.6 (0.43-0.83)	0.002	1.04 (0.71-1.53)	0.83
Genotype									
GG	178 (74.2%)	195 (84.1%)	540 (85.0%)	1		1		1	
GA	53 (22.1%)	35 (15.1%)	85 (13.4%)	0.6 (0.38- 0.97)	0.036	0.5 (0.36-0.78)	0.011	0.88 (0.57- 1.34)	0.55
AA	9 (3.7%)	2 (0.8%)	10 (1.6%)	0.2 (0.04- 0.95)	0.043	0.37 (0.15-0.92)	0.032	1.81 (0.39- 8.31)	0.44
Dominant model									
GG	178 (74.2%)	195 (84.1%)	540 (85.1%)	1		1		1	
GA+AA	62 (25.8%)	37 (15.9%)	95 (14.9%)	0.54 (0.35-0.86)	0.001	0.51 (0.35-0.73)	< 0.001	0.92 (0.61-1.4)	0.72
Recessive model									
GG+GA	231 (96.3%)	230 (99.1%)	619 (97.5%)	1		1		1	
AA	9 (3.7%)	2 (0.9%)	10 (1.5%)	0.51(0.09-2.83)	0.44	1.52 (0.5-4.6)	0.45	2.97 (0.68-13.01)	0.15

ND = No data

ตารางที่ 13 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 และความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษา
เทียบกับกลุ่มควบคุม

<i>NTCP</i>	Healthy controls (n= 240)	Spontaneous HBV clearance (n= 232)	Chronic HBV infection (n= 635)	Controls vs Clearance		Controls vs CHB		Clearance vs CHB	
				OR(95%CI)	P-value	OR(95%CI)	P-value	OR(95%CI)	P-value
Allelic model									
Major (C)	437 (91.1%)	432 (92.3%)	1134 (89.4%)	1		1		1	
Minor (T)	43 (8.9%)	36 (7.7%)	134 (10.6%)	0.85 (0.53-1.34)	0.48	1.2 (0.84-1.72)	0.32	1.42 (0.97-2.08)	0.07
Genotype									
CC	199 (82.9%)	200 (85.5%)	513 (80.9%)	1		1		1	
CT	39 (16.3%)	32 (14.5%)	109 (17.0%)	0.82 (0.49- 1.36)	0.43	1.08 (0.73- 1.62)	0.69	1.33 (0.87- 2.03)	0.19
TT	2 (0.8%)	0	13 (2.1%)	ND	ND	2.52 (0.56- 11.3)	0.23	ND	ND
Dominant model									
CC	199 (82.9%)	200 (85.5%)	513 (80.9%)	1		1		1	
CT+TT	41 (17.1%)	32 (14.5%)	121 (19.1%)	0.83 (0.5-1.35)	0.45	1.14 (0.78-1.69)	0.5	1.39 (0.92-2.1)	0.12
Recessive model									
CC+CT	238 (99.2%)	232 (100%)	621 (97.9%)	ND	ND	1	0.23	ND	ND
TT	2 (0.8%)	0	13 (2.1%)			2.49 (0.56-11.12)			

ND = No data

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ

2.3 ยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651

การจำแนกจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 สามารถแบ่งได้เป็น 3 จีโนไทป์ คือ GG, GA และ AA โดยในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง แต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับมีจำนวน 319 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 266 (83.4%), 48 (15.1%) และ 5 (1.5%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับมีจำนวน 316 คนมีความถี่จีโนไทป์เป็น 274 (86.7%), 31 (9.8%) และ 11 (3.5%) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล G (Major) และอัลลีล A (Minor) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับมีจำนวน 319 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 580 (90.9%) และ 58 (9.1%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับมีจำนวน 316 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 579 (91.6%) และ 53 (8.4%) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ ไม่พบความสัมพันธ์กัน ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 14

จากการพิจารณาค่า OR เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ ($OR = 0.92$, 95% CI = 0.62 – 1.35) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น Risk allele แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 14 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็ง

<i>NTCP</i>	Non HCC (n=319)	HCC (n=316)	Non HCC vs HCC	
			OR (95%CI)	P-value
Allelic model				
Major (G)	580 (90.9%)	579 (91.6%)	1	
Minor (A)	58 (9.1%)	53 (8.4%)	0.92 (0.62-1.35)	0.66
Genotype				
GG	266 (83.4%)	274 (86.7%)	1	
GA	48 (15.1%)	31(9.8%)	0.63 (0.39-1.02)	0.06
AA	5 (1.5%)	11 (3.5%)	2.14 (0.73-6.23)	0.16
Dominant model				
GG	266 (83.4%)	274 (86.7%)	1	
GA+AA	53 (16.6%)	42 (13.3%)	0.77 (0.5-1.2)	0.24
Recessive model				
GG+GA	314 (98.4%)	305 (96.5%)	1	
AA	5 (1.6%)	11 (3.5%)	2.26 (0.78-6.6)	0.13

2.4 ยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287

การจำแนกจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 สามารถแบ่งได้เป็น 3 จีโนไทป์ คือ CC, CT และ TT โดยในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตบมีจำนวน 319 คน มีความถี่จีโนไทป์เป็น 263 (82.5%), 46 (14.4%)และ 10 (3.1%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตบมีจำนวน 316 คนมีความถี่จีโนไทป์เป็น 250 (79.1%), 63 (19.9%) และ 3 (1.0%) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล C (Major) และอัลลีล T (Minor) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตบมีจำนวน 319 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 572 (89.7%) และ

66 (10.3%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับมีจำนวน 316 คน มีความถี่อัลลีลเป็น 563 (89.1%) และ 69 (10.9%) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs24646287 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ ไม่พบความสัมพันธ์กัน ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 15

จากการพิจารณาค่า OR เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ ($OR = 1.06$, $95\% CI = 0.74 - 1.52$) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น Risk allele แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 15 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็ง

<i>NTCP</i>	Non HCC (n=319)	HCC (n=316)	Non HCC vs HCC	
			OR (95%CI)	P-value
Allelic model				
Major (C)	572 (89.7%)	563 (89.1%)	1	
Minor (T)	66 (10.3%)	69 (10.9%)	1.06 (0.74-1.52)	0.74
Genotype				
CC	263 (82.5%)	250 (79.1%)	1	
CT	46 (14.4%)	63 (19.9%)	1.44 (0.95-2.19)	0.09
TT	10 (3.1%)	3 (1.0%)	0.32 (0.09-1.16)	0.08
Dominant model				
CC	263 (82.5%)	250 (79.1%)	1	
CT+TT	56 (17.5%)	66 (20.9%)	1.24 (0.83-1.84)	0.29
Recessive model				
CC+CT	309 (96.9%)	313 (99.1%)	1	
TT	10 (3.1%)	3 (0.9%)	0.3 (0.08-1.09)	0.07

ความสัมพันธ์ระหว่าง HBeAg status และ HBV genotype กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287

จากข้อมูลดังตารางที่ 16 สามารถแบ่ง HBeAg status ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ HBeAg-positive และ HBeAg-negative โดยพบว่ายีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 จีโนไทป์ GG มีผู้ป่วยจำนวน 192 คน (82.4%) ที่เป็น Positive และอีก 174 คน (85.3%) ที่เป็น Negative ในขณะที่จีโนไทป์ GA+AA มีผู้ป่วยจำนวน 41 คน (17.6%) ที่เป็น Positive และอีก 30 คน (14.7%) ที่เป็น Negative สำหรับยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287 จีโนไทป์ CC มีผู้ป่วยจำนวน 194 คน (83.3%) ที่เป็น Positive และอีก 167 คน (81.9%) ที่เป็น Negative ในขณะที่จีโนไทป์ CT+TT มีผู้ป่วยจำนวน 39 คน (16.7%) ที่เป็น Positive และอีก 37 คน (18.1%) ที่เป็น Negative ส่วน HBV genotype สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ genotype B และ C พบว่าพบว่ายีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 จีโนไทป์ GG มีผู้ป่วยจำนวน 22 คน (100%) ที่เป็น genotype B และอีก 46 คน (80.7%) ที่เป็น genotype C ในขณะที่จีโนไทป์ GA+AA มีผู้ป่วยจำนวน 11 คน (19.3%) ที่เป็น genotype C สำหรับยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs4646287 จีโนไทป์ CC มีผู้ป่วยจำนวน 18 คน (81.8%) ที่เป็น genotype B และอีก 47 คน (82.5%) ที่เป็น genotype C ในขณะที่จีโนไทป์ CT+TT มีผู้ป่วยจำนวน 4 คน (18.2%) ที่เป็น genotype B และอีก 10 คน (17.5%) ที่เป็น genotype C

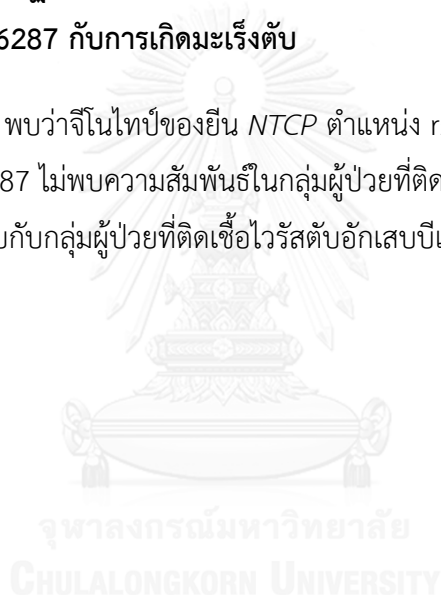
เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง HBeAg status และ HBV genotype ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง SNP rs2296651 และ rs4646287 ไม่พบความสัมพันธ์กัน ($P > 0.05$)

ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

จากตารางที่ 17 พบว่าจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 ไม่พบความสัมพันธ์ความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ($P > 0.05$) รวมทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ($P > 0.05$) และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง ($P > 0.05$)

ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับการเกิดมะเร็งตับ

จากตารางที่ 18 พบว่าจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และจีโนไทป์ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 ไม่พบความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและเป็นมะเร็งตับ ($P > 0.05$)



ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน NTCP ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับค่าทางคลินิก

SNP ID	Genotype	HBeAg				HBV genotype			
		Positive	Negative	OR (95%CI)	P-value	B	C	OR (95%CI)	P-value
rs2296651	GG	192 (82.4%)	174 (85.3%)	1		22 (100%)	46 (80.7%)	1	
	GA+AA	41 (17.6%)	30 (14.7%)	0.81 (0.48-1.35)	0.41	0 (0%)	11 (19.3%)	11.13 (0.63-197.44)	0.1
rs4646287	CC	194 (83.3%)	167 (81.9%)	1		18 (81.8%)	47 (82.5%)	1	
	CT+TT	39 (16.7%)	37 (18.1%)	1.1 (0.67-1.8)	0.7	4 (18.2%)	10 (17.5%)	0.96 (0.27-3.45)	0.95



ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม

Combined genotype	Healthy controls	Spontaneous HBV clearance	Chronic HBV infection	Controls vs Clearance		Controls vs CHB		Clearance vs CHB	
				OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value
rs2296651	rs4646287								
GG	CC	168	437	1		1		1	
GG	CT+TT	27	101	0.79 (0.45-1.39)	0.42	1.14 (0.73-1.78)	0.57	1.44 (0.91-2.28)	0.12
GA+AA	CC	30	76	0.56 (0.34-0.94)	0.053	0.55 (0.36-0.82)	0.064	0.98 (0.62-1.54)	0.91
GA+AA	CT+TT	5	19	0.4 (0.14-1.18)	0.1	0.59 (0.27-1.26)	0.17	0.64 (0.31-1.43)	0.29

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และ rs4646287 กับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับ

Combined genotype	Non HCC		HCC		Non HCC vs HCC	
	rs2296651	rs4646287	Non HCC	HCC	OR (95%CI)	P-value
GG	CC		219	218	1	
GG	CT+TT		47	56	1.2 (0.78-1.84)	0.41
GA+AA	CC		44	32	0.73 (0.45-1.2)	0.21
GA+AA	CT+TT		9	10	1.12 (0.45-2.8)	0.81

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651

ผลจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า SNP ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ในประชากรกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มีความถี่ของอัลลีล G คือ 85.2%, 91.6% และ 91.7% ตามลำดับ ในขณะที่อัลลีล A (14.8%, 8.4% และ 8.3% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า SNP rs2296651 ในประชากรไทยมี major allele เป็น G และ minor allele เป็น A ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yang J. และคณะ ในปี 2016 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่น พบว่าในประชากรกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีความถี่ของอัลลีล G (97.3% และ 97.6% ตามลำดับ) อัลลีล A (2.7% และ 2.4% ตามลำดับ) (14) และยังสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Li N. และคณะในปี 2014 ซึ่งศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่นเช่นเดียวกัน พบว่าประชากรในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีความถี่ของอัลลีล G (94.1%, 97.4% และ 97.8% ตามลำดับ) อัลลีล A (5.9%, 2.6% และ 2.2% ตามลำดับ) เช่นเดียวกัน (51) งานวิจัยนี้จึงเป็นอีกหนึ่งหลักฐานสำคัญซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของอัลลีลสำหรับ SNP ตำแหน่งนี้ในประชากรไทยกับประชากรจีนไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Peng L. และคณะ ในปี 2015 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่น พบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ของ SNP rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี [(Odds ratio = 0.36, 95% CI = 0.29-0.44, $P < 0.001$), (Odds ratio = 0.16, 95% CI = 0.06-0.40, $P < 0.001$) ตามลำดับ] (12) ในขณะที่ผลจากการทดลองนี้พบว่า จีโนไทป์ GA และ AA ในกลุ่มคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเทียบกับกลุ่มคนสุขภาพดี ที่ $OR = 0.5$, 95% CI = 0.36-0.78, $P = 0.011$ และ $OR = 0.37$, 95% CI = 0.15-0.92, $P = 0.032$ เช่นกัน

ในขณะที่ปี 2016 จากการศึกษาของ Z Su. และคณะ ที่ทำการศึกษาในประชากรชาวธิเบตและอุยกูร์พบว่า จีโนไทป์ GA และ AA ของ SNP rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (15) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่า จีโนไทป์ GA และ AA ของ SNP rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง

(OR = 0.88, 95% CI = 0.57- 1.34, $P = 0.55$) และ (OR = 1.81, 95% CI = 0.39- 8.31, $P = 0.44$) ดังนั้นการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในชาวไทยนี้จึงมีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังสรุปได้ตามตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

rs2296651	Genotype	Population	Subjects	OR (95% CI)	P-value
Li N., 2014 (51)	GA	Chinese Han	Control and CHB	2.913 (1.097-7.738)	0.026
Peng L., 2015 (12)	GA	Chinese Han	Control and CHB	0.36 (0.29-0.44)	<0.001
	AA		Control and CHB	0.16 (0.06-0.40)	<0.001
Su Z., 2016 (15)	GA	Tibetans	Clearance and CHB	0.33 (0.03-3.15)	0.370
	GA	Uygur	Clearance and CHB	2.39 (0.22-26.55)	0.595
Hu H-H., 2016 (13)	AA	Taiwan	Control and CHB	0.13 (0.05-0.34)	<0.001
Yang J., 2016 (14)	GA	Chinese Han	Control and CHB	1.61 (1.09-2.37)	0.017
In this study	GA	Thai	Control and	0.6 (0.38-0.97)	0.036
	AA		Clearance	0.2 (0.04-0.95)	0.043
	GA		Control and CHB	0.5 (0.36-0.78)	0.011
	AA			0.37 (0.15-0.92)	0.032
	GA		Clearance and CHB	0.88 (0.57-1.34)	0.55
	AA			1.81 (0.39-8.31)	0.44

เมื่อพิจารณาการเกิดมะเร็งตับ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง พบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ของ SNP rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ (OR = 0.63, 95% CI = 0.39-1.02, $P = 0.06$) และ (OR = 2.14, 95% CI = 0.73-6.23, $P = 0.16$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Li N. และคณะในปี 2014 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวจีน ได้รายงานการวิจัยไว้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (51) ดังสรุปในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 กับการเกิดมะเร็งตับ

rs2296651	Genotype	Population	Subjects	OR (95% CI)	P-value
Li N., 2014 (51)	GA	Chinese Han	Non-HCC and HCC	0.9 (0.34-2.39)	0.742
Hu H-H., 2016 (13)	GA+AA	Chinese Han	Non-HCC and HCC	0.54 (0.41-0.71)	<0.001
In this study	GA AA	Thai	Non-HCC and HCC	0.63 (0.39-1.02) 2.14 (0.73-6.23)	0.06 0.16

ยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287

ผลจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า SNP ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 ในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี, กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มีความถี่ของอัลลีล C (91.1%, 92.3% และ 89.4% ตามลำดับ) อัลลีล T (8.9%, 7.7% และ 10.6% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า SNP rs4646287 ในประชากรไทยมี major allele เป็น C และ minor allele เป็น T ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Su Z. และคณะ ในปี 2014 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวจีน พบว่าในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีความถี่ของอัลลีล C (90.3% และ 90.5% ตามลำดับ) อัลลีล T (9.7% และ 9.5% ตามลำดับ) (11) รวมถึงงานวิจัยของ Yang J. และคณะ ในปี 2016 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวจีน พบว่าประชากรในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีความถี่ของอัลลีล C (89.1% และ 89.9% ตามลำดับ) อัลลีล T (10.9% และ 10.1% ตามลำดับ) (14) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของอัลลีลสำหรับ SNP ตำแหน่งนี้ ในประชากรไทยกับประชากรจีนไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้จากผลการทดลองนี้พบว่า จีโนไทป์ CT ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนสุขภาพดี (OR = 1.08, 95% CI = 0.73-1.62, P = 0.69) และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (OR = 1.33, 95% CI = 0.87-2.03, P = 0.19) มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Z Su. และคณะ ในปี 2014 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวจีนพบว่าจีโนไทป์ CT และ TT ของ SNP rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (11) รวมถึงงานวิจัยของ Z Su. และคณะ ในปี 2016 ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวธิเบตและอุยกูร์พบว่า จีโนไทป์ CT และ TT ของ SNP rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเช่นเดียวกัน (15) ดังสรุปได้ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

rs4646287	Genotype	Population	Subjects	OR (95% CI)	P-value
Su Z., 2014 (11)	CT	Chinese Han	Control and CHB	0.96 (0.67–1.38)	0.834
	TT			1.56 (0.39–6.25)	0.530
Su Z., 2016 (15)	CT	Tibetans	Clearance and CHB	1.15 (0.81–1.64)	0.463
	TT			6.12 (0.73–51.08)	0.068
	CT	Uygur	Clearance and CHB	1.54 (0.76–3.11)	0.230
In this study	CT	Thai	Control and Clearance	0.82 (0.49–1.36)	0.43
	CT		Control and CHB	1.08 (0.73–1.62)	0.69
	TT			2.52 (0.56–11.3)	0.23
	CT		Clearance and CHB	1.33 (0.87–2.03)	0.19

เมื่อพิจารณาการเกิดมะเร็งตับ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง พบว่าจีโนไทป์ CT และ TT ของ SNP rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ (OR = 1.44, 95% CI = 0.95–2.19, $P = 0.09$) และ (OR = 0.32, 95% CI = 0.09–1.16, $P = 0.08$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 กับการเกิดมะเร็งตับ

rs4646287	Genotype	Population	Subjects	OR (95% CI)	P-value
Su Z., 2014 (11)	CT	Chinese Han	Non-HCC and HCC	0.93 (0.55–1.59)	0.801
	TT			15.74 (1.59–155.54)	0.018
In this study	CT	Thai	Non-HCC and HCC	1.44 (0.95–2.19)	0.09
	TT			0.32 (0.09–1.16)	0.08

จากตารางที่ 10 และ 11 ทำให้ทราบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าทางคลินิกต่างๆ เนื่องจากไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับตารางที่ 16 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และตำแหน่ง rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับ HBeAg status และ HBV genotype เนื่องจากไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P > 0.05$) แสดงว่า HBV genotype ไม่ได้ส่งผลต่อความสามารถของไวรัสตับอักเสบบีในการเข้าสู่เซลล์ตับ นอกจากนี้ในตารางที่ 17 และ 18 พบว่าการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ ไม่ได้เพิ่มระดับความรุนแรงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs4646287 ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และไม่มีความสัมพันธ์ในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง ในขณะที่ยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 มีความสัมพันธ์ในลักษณะลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งแสดงให้เห็นว่า SNPs นี้อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สำคัญในการทำนายถึงความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรชาวไทยได้ แต่อย่างไรก็ตาม SNPs นี้ ยังต้องมีการศึกษาหน้าที่และการทำงานของยีนที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับต่อไปในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *World J Gastroenterol.* 2004;127:S5-S16.
2. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol.* 2004;38:S158-68.
3. Toita R, Kawano T, Kang JH, Murata M. Applications of human hepatitis B virus preS domain in bio- and nanotechnology. *World J Gastroenterol.* 2015;21:7400-11.
4. McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med.* 2001;135:759-68.
5. Sjogren M. Immunization and the decline of viral hepatitis as a cause of acute liver failure. *World J Hepatol.* 2003;38:554-6.
6. Galun D, Basaric D, Zuvela M, Bulajic P, Bogdanovic A, Bidzic N, et al. Hepatocellular carcinoma: From clinical practice to evidence-based treatment protocols. *World J Hepatol.* 2015;7:2274-91.
7. European Association For The Study Of The L. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2012;57:167-85.
8. Nault JC. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28:937-47.
9. Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, et al. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1532-8.
10. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife.* 2012;1:e00049.
11. Su Z, Li Y, Liao Y, Cai B, Chen J, Zhang J, et al. Association of the gene polymorphisms in sodium taurocholate cotransporting polypeptide with the

outcomes of hepatitis B infection in Chinese Han population. *Infect Genet Evol.* 2014;27:77-82.

12. Peng L, Zhao Q, Li Q, Li M, Li C, Xu T, et al. The p.Ser267Phe variant in SLC10A1 is associated with resistance to chronic hepatitis B. *World J Hepatol.* 2015;61:1251-60.

13. Hu HH, Liu J, Lin YL, Luo WS, Chu YJ, Chang CL, et al. The rs2296651 (S267F) variant on NTCP (SLC10A1) is inversely associated with chronic hepatitis B and progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *Gut.* 2016;65:1514-21.

14. Yang J, Yang Y, Xia M, Wang L, Zhou W, Yang Y, et al. A genetic variant of the NTCP gene is associated with HBV infection status in a Chinese population. *BMC Cancer.* 2016;16:211.

15. Su Z, Li Y, Liao Y, Cai B, Chen J, Zhang J, et al. Polymorphisms in sodium taurocholate cotransporting polypeptide are not associated with hepatitis B virus clearance in Chinese Tibetans and Uygurs. *Infect Genet Evol.* 2016;41:128-34.

16. Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB. Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem.* 2004;279:7213-22.

17. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142:1264-73 e1.

18. Tangkijvanich P, Hirsch P, Theamboonlers A, Nuchprayoon I, Poovorawan Y. Association of hepatitis viruses with hepatocellular carcinoma in Thailand. *J Gastroenterol.* 1999;34:227-33.

19. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011;365(12):1118-27.

20. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *World J Hepatol.* 2009;49:S13-21.

21. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol.* 2009;27:1485-91.

22. Yang P, Markowitz GJ, Wang XF. The hepatitis B virus-associated tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma. *Natl Sci Rev.* 2014;1:396-412.

23. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362:1907-17.
24. Zhang HC, Hu RF, Zhu T, Tong L, Zhang QQ. Primary biliary cirrhosis degree assessment by acoustic radiation force impulse imaging and hepatic fibrosis indicators. *World J Gastroenterol*. 2016;22:5276-84.
25. Bodzin AS, Busuttil RW. Hepatocellular carcinoma: Advances in diagnosis, management, and long term outcome. *World J Hepatol*. 2015;7:1157-67.
26. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005;172:367-79.
27. Green RM, Flamm S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *World J Gastroenterol*. 2002;123:1367-84.
28. Bird TG, Dimitropoulou P, Turner RM, Jenks SJ, Cusack P, Hey S, et al. Alpha-Fetoprotein Detection of Hepatocellular Carcinoma Leads to a Standardized Analysis of Dynamic AFP to Improve Screening Based Detection. *PLoS One*. 2016;11:e0156801.
29. Murata S, Mine T, Sugihara F, Yasui D, Yamaguchi H, Ueda T, et al. Interventional treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20:13453-65.
30. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*. 1979;281:646-50.
31. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009;83:10538-47.
32. Phung TB, Alestig E, Nguyen TL, Hannoun C, Lindh M. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam--genotypes B4 and C1 predominate. *J Med Virol*. 2010;82:1327-33.
33. Kramvis A, Restorp K, Norder H, Botha JF, Magnus LO, Kew MC. Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. *J Med Virol*. 2005;77:47-52.

34. Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edorh AP, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO, et al. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis.* 2004;190:400-8.
35. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol.* 1993;74:1341-8.
36. Rahman MA, Hakim F, Ahmed M, Ahsan CR, Nessa J, Yasmin M. Prevalence of genotypes and subtypes of hepatitis B viruses in Bangladeshi population. *Springerplus.* 2016;5:278.
37. Chitapanarux T, Phornphutkul K. Risk Factors for the Development of Hepatocellular Carcinoma in Thailand. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3:182-8.
38. Baumert TF, Meredith L, Ni Y, Felmlee DJ, McKeating JA, Urban S. Entry of hepatitis B and C viruses - recent progress and future impact. *Curr Opin Virol.* 2014;4:58-65.
39. Liu J, Yang HI, Lee MH, Lu SN, Jen CL, Batrla-Utermann R, et al. Spontaneous seroclearance of hepatitis B seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2014;63:1648-57.
40. Kramvis A. The clinical implications of hepatitis B virus genotypes and HBeAg in pediatrics. *Rev Med Virol.* 2016;26:285-303.
41. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol.* 2009;90:127-35.
42. Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem.* 2002;277:30559-66.
43. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *World J Gastroenterol.* 2004;126:322-42.
44. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 2014;147:48-64.
45. Li W. The hepatitis B virus receptor. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:125-47.

46. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 2014;146:1070-83.
47. Yan H, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide acts as a receptor for hepatitis B and D virus. *Dig Dis.* 2015;33:388-96.
48. Petersen J, Dandri M, Mier W, Lutgehetmann M, Volz T, von Weizsacker F, et al. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol.* 2008;26:335-41.
49. Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol.* 2014;60:723-31.
50. Shih C, Chou SF, Yang CC, Huang JY, Chojijilsuren G, Jhou RS. Control and Eradication Strategies of Hepatitis B Virus. *Trends Microbiol.* 2016;24:739-49.
51. Li N, Zhang P, Yang C, Zhu Q, Li Z, Li F, et al. Association of genetic variation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide with chronic hepatitis B virus infection. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18:425-9.



การเตรียมสารเคมี

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

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

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

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

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agarose	2 g
1X TBE buffer	100 ml

3. สารละลาย Lysis buffer ปริมาตร 50 ml

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

จากนั้นเติม Distill water ให้ได้ปริมาตร 50 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

4. LB agar ปริมาตร 250 ml

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

เติม Distill water ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 250 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ Autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงแล้วจึงเติม Ampicilin 100 mg/ml ปริมาตร 250 μ l แล้วจึงเทใส่ Plate ปริมาตร 35 ml/plate

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวนงนภัทร์ ตูยपालะ
(ภาษาอังกฤษ) Miss Nongnaput Tuyapala

วัน เดือน ปีเกิด 5 กรกฎาคม 2536

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2558 ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2558

ผลงานทางวิชาการ นำเสนอในรูปแบบ Poster เรื่อง "Association of NTCP Polymorphisms with Clinical outcome of Hepatitis B Infection in a Thai Cohort" ในงานประชุม The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference in 2017 Nagasaki, Japan วันที่ 10-12 เมษายน 2560