



รายงานการวิจัย

เรื่อง

บทบาทของตัวบ่งชี้ทางระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสและการเกิดมะเร็ง
ตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

Role of immunological markers associated with treatment response and
hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B virus

หัวหน้าโครงการ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีงบประมาณ 2560

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (This research is funded by Chulalongkorn University) และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (the Center of Excellence in Hepatitis and Liver Cancer, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University)

บทคัดย่อ

B-cell activating factor (BAFF) เป็น cytokine ที่สำคัญในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B cell ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไวรัสตับอักเสบบี แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของ BAFF ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบียังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการตรวจวัดระดับ BAFF ในพลาสมาและหาความสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน BAFF rs9514828 และ rs12583006 และการทำนายและพยากรณ์ความรุนแรงของโรค โดยตรวจวัดระดับของ BAFF ในพลาสมาของผู้ที่มีสุขภาพดี กลุ่มควบคุม 100 คน กลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 290 คน และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 200 คน ผลการศึกษาพบว่าระดับของ BAFF ในพลาสมาในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$). ระดับของ BAFF ในพลาสมายังมีความสัมพันธ์กับระดับ alpha-fetoprotein (AFP), ระยะของโรค (Child-Pugh classification), ขนาดของก้อนมะเร็ง (tumor size) และระยะของโรค (BCLC stage). เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงทั้งหมดด้วย Multivariate analyses พบว่าระดับของ BAFF ($\geq 1,100$ pg/ml) สามารถใช้ทำนายระยะเวลาการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งตับได้ (OR=2.28, 95%CI: 1.07–4.87; $P=0.034$). นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน BAFF ตำแหน่ง rs9514828 พบความถี่ของจีโนไทป์ CT+TT ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูงกว่ากลุ่มควบคุม (58.0% vs. 46.0%, $P=0.029$). ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงสรุปว่า ระดับ BAFF ในพลาสมาสูงมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและระยะเวลาการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งตับ เพราะฉะนั้นการทำงานของ B-cell อาจจะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการดำเนินโรคและพัฒนาเป็นมะเร็งตับ

Abstract

Abstract B-cell activating factor (BAFF), an important cytokine for B lymphocyte activation, has been shown to be increased in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. This study aimed at evaluating clinical correlation and prognostic role of plasma BAFF and related polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). Plasma BAFF levels were measured in samples of 100 healthy controls and 490 patients with chronic HBV infection (200 with HCC and 290 without HCC). The rs9514828 and rs12583006 polymorphisms were determined by allelic discrimination. The HCC group had significantly higher BAFF levels compared with the non HCC group and healthy controls ($P < 0.001$). In HCC, elevated BAFF levels positively correlated with alpha-fetoprotein levels, Child-Pugh classification, tumor size and BCLC stage. Multivariate analyses showed that elevated BAFF ($\geq 1,100$ pg/ml) was an independent prognostic factor of overall survival in patients with HCC (OR=2.28, 95%CI: 1.07–4.87; $P=0.034$). Regarding BAFF polymorphisms, the frequency of rs9514828 CT+TT genotypes was higher distributed in patients with chronic HBV infection compared with healthy controls (58.0% vs. 46.0%, $P=0.029$). In summary, elevated BAFF levels at presentation correlated with disease severity and overall survival in patients with HCC, suggesting that B-cell immunity may play an essential role in promoting tumor development and progression.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

สารบัญตาราง (List of Contents)	i
สารบัญภาพ (List of Illustration)	ii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	iii
ที่มาและความสำคัญ (Introduction)	1
วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	2-8
อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)	9-10
สรุปและเสนอแนะการวิจัยขั้นต่อไป	11
บรรณานุกรม	12-15
ประวัตินักวิจัยและคณะ	16-44

สารบัญตาราง (Table of Contents)

ตารางที่1	คุณสมบัติของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษา	4
ตารางที่2	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BAFF ในพลาสมากับคุณสมบัติของอาสาสมัคร	6
ตารางที่3	ความชุกของความหลากหลายทางพันธุกรรม	7
ตารางที่4	ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งตับ	8

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปภาพที่1 ระดับของ BAFF ในพลาสมา	5
รูปภาพที่2 อัตราการรอดชีวิตทั้งหมดของผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกี่ยวข้องกับระดับของ BAFF และความหลากหลายทางพันธุกรรม	7

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

BAFF, B cell-activating factor; HCC, hepatocellular carcinoma;

HBV, hepatitis B virus;

TNFSF13B, tumor necrosis factor superfamily;

AST, aspartate aminotransferase;

ALT, alanine aminotransferase;

AFP, alpha fetoprotein;

TB, total bilirubin;

SNPs, single nucleotide polymorphisms

ที่มาและความสำคัญ (Introduction)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดตับอักเสบบี การเกิดพังผืดในตับ ภาวะตับแข็ง และมะเร็งตับ [1] งานศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้มีรายงานว่าพยาธิสภาพของการเกิดไวรัสตับอักเสบบีมีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย [2] เมื่อเกิดภาวะติดเชื้อไวรัสแบบเฉียบพลัน ภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยเฉพาะ B และ T-cell จะถูกกระตุ้นเพื่อต่อสู้กับไวรัส ในทางกลับกันหากเมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ภูมิคุ้มกันของร่างกายมักจะทำงานผิดปกติไป [2] ในปัจจุบันพบว่า T-cell มีความสำคัญในการเกิดการทำลายของเซลล์ตับและการดำเนินโรค [3] อย่างไรก็ตามการศึกษาการทำงานของ ทั้ง T-cell และ B-cell ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังยังคงมีการศึกษาไม่มาก

B cells มีหน้าที่สำคัญในการผลิตภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดี ควบคุมการหลั่งสารอักเสบ และกระตุ้นการทำงานของ T-cell [4,5] ซึ่งโดยทั่วไปการทำงานของเม็ดเลือดขาว (B lymphocytes) จำเป็นต้องอาศัย B cell-activating factor (BAFF) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ tumor necrosis factor superfamily (TNFSF13B) และ IFN stimulated gene และสามารถพบได้จากการหลั่งของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils, และ monocytes เซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) dendritic cells และ T cells ที่ถูกกระตุ้น [6] การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระดับของ BAFF ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคที่แย่งลง [7-9] นอกจากนี้ยังพบว่ามีสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งบางชนิด [10] นอกจากนี้ยังพบสูงในคนไข้ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังโดยเฉพาะในกลุ่มที่มี cryoglobulinemia อีกด้วย [11,12] และในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอีกด้วย [13] ข้อมูลนี้จึงอาจสรุปได้ว่าระดับของ BAFF อาจส่งผลให้เกิดการดำเนินโรคตับ และพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังได้ในอนาคต อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ของ BAFF กับผลทางคลินิกและการพัฒนาเป็นมะเร็งตับยังไม่มีการศึกษาได้มากเท่าที่ควร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือ single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนยีน *BAFF* ประกอบด้วยตำแหน่ง rs9514828 และ rs12583006 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับของ BAFF และโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและโรคเลือด [14-16] แต่ยังไม่พบการศึกษาน้อยในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี [17] และยังไม่ทราบว่า SNPs ตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและการเกิดมะเร็งตับหรือไม่ เพราะฉะนั้น การศึกษานี้จึงศึกษาหาความสัมพันธ์ของระดับของ BAFF ในพลาสมา กับ SNPs และผลทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ได้รับการติดเชื้อจากไวรัสตับอักเสบบี

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับของ BAFF และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน BAFF จากผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากผลการตรวจค่า HBsAg ในเลือดและยืนยันผลของมะเร็งจากการอ่านผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อตับ

โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่พบและไม่พบมะเร็งตับและคัดผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิดอื่นออก

2. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจเชิงคุณภาพของ HBsAg, HBeAg จากซีรัม ด้วย enzyme-linked immunosorbent assays ระดับ HBV DNA ด้วย Abbott Real Time HBV assay และตรวจระดับ BAFF จากพลาสมาโดยใช้เทคนิค ELISA

3. การศึกษาจีโนมไทป์ของ BAFF

สกัดดีเอ็นเอจาก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธี phenol-chloroform ตรวจเชิงคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) และตรวจจีโนมไทป์ rs9514828 ด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ PCR master mix (Thermo scientific) ไพรเมอร์ : 5'-GGCACAGTCAACATGGGAGT-3'(forward)

5'-GCTAAGTGTTTTAGCATTGAATTG-3' (reverse)

จากการศึกษา [15] จะใช้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

- initial denaturation at 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
 - 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 - 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 - 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 - final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที
- } 40 รอบ

ตัดยอยผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ BsrBI และติดตามผลด้วย 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ส่วน BAFF จีโนมไทป์ rs12583006 จะใช้ TaqMan genotyping assay (C_11705495_10, Applied Biosystem) โดยใช้ TaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems) 20X primers และ probes mixture (TaqMan SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems) ด้วย ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)

จะใช้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

- initial denaturation at 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
 - denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
 - annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 - extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- } 40 รอบ

4. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

ใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 ในการวิเคราะห์ผลการวิจัยโดยนำเสนอข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของตัวแปรด้วย χ^2 หรือ Student's t-test ค่า $p < 0.05$ จะถูกพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา (Results)

1.1 Clinical characteristics

ตารางที่ 1 แสดงผลทางคลินิกพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด โดยผู้ป่วยมะเร็งระดับมีอายุมากกว่า เป็นเพศชายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มผู้ป่วยสุขภาพดี ($P<0.001$) และมีระดับของค่าเฉลี่ยของ AST, TB, Albumin, platelet counts, และ AFP นอกจากนี้ยังมี FIB-4 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิดพังผืดในตับ และมีภาวะเกิดตับแข็งสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่เป็นมะเร็งระดับ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับ ALT ระดับของ HBV DNA และ HBeAg-positive

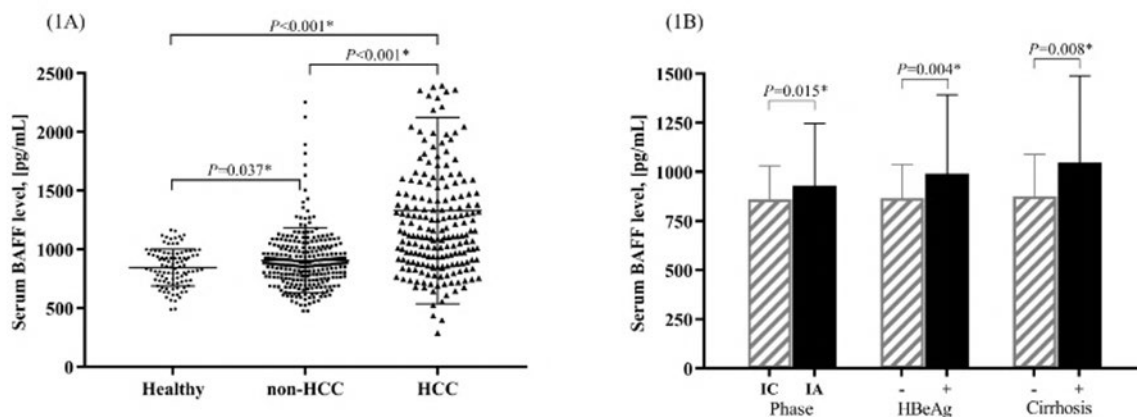
ตารางที่ 1 คุณสมบัติของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษา

Baseline Characteristics	Healthy controls (n=100)	Patients without HCC (n=290)	Patients with HCC (n=200)	P
Age (years)	49.3±5.2	42.9±11.8	58.1±11.9	<0.001*
Gender (Male)	65 (65.0)	174 (60.0)	168(84.0)	<0.001*
Aspartate aminotransferase (IU/L)		39.6±35.9	95.6±102.2	<0.001*
Alanine aminotransferase (IU/L)		58.9±70.3	59.5±54.3	0.915
Serum albumin (g/dL)		4.4±0.4	3.6±0.6	<0.001*
Total bilirubin (mg/dL)		0.7±0.3	1.2±0.7	<0.001*
Platelet count (10 ⁹ /L)		228.6±54.4	200.0±126.9	0.004*
HBeAg positivity		95 (33.0)	58 (29.0)	0.468
Log ₁₀ HBV DNA (IU/mL)		4.8±2.2	4.5±1.5	0.112
Alpha fetoprotein (ng/mL)		5.3±14.5	17203.5±60745.5	0.001*
FIB-4 index		1.26±0.83	4.87±4.14	<0.001
Presence of cirrhosis		52 (17.9)	168 (84.0)	<0.001*
BCLC stage (0-A/B/C-D)		-	61(30.5)/76(38.0)/3(31.5)	-

Data expressed as mean ± SD or n (%) as appropriate; *, P-value<0.05

1.2 Comparison of plasma BAFF levels between studied groups

ระดับของ BAFF ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งระดับอยู่ในช่วง 288.8 ถึง 79.8 pg/ml และมีค่าเฉลี่ยที่ 1,330.7±793.2 pg/ml. ระดับค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มผู้ป่วยสุขภาพดี (906.5±275.6 pg/ml และ 845.7±158.1 pg/ml) ตามลำดับ ส่วนระดับของ BAFF ในพลาสมาของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P=0.037$) (รูปภาพที่ 1A)



รูปภาพที่ 1 ระดับของ BAFF ในพลาสมา 1A) แต่ละกลุ่มของผู้ป่วยและอาสาสมัครสุขภาพดี 1B) กลุ่มย่อยของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่เป็นมะเร็งตับ

1.3 Plasma BAFF levels in subgroups of patients without HCC

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งตับ ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่อยู่ใน immune active (IA) มีค่าเฉลี่ยของ BAFF สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี inactive carrier (IC) (930.5 ± 315.3 pg/ml vs. 860.9 ± 169.4 pg/ml, $P=0.015$) เมื่อเปรียบเทียบ HBeAg status พบว่าผู้ป่วยที่มี HBeAg-positive มีระดับของ BAFF สูงกว่าผู้ป่วยที่มี HBeAg-negative (991.0 ± 401.4 pg/ml vs. 865.4 ± 172.9 pg/ml, $P=0.004$) นอกจากนี้ยังพบว่า ผู้ป่วยที่เป็นตับแข็งพบว่ามีระดับของ BAFF สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีตับแข็งร่วมด้วย (1047.6 ± 440.0 pg/ml vs. 875.7 ± 213.6 pg/ml, $P=0.008$) (รูปภาพที่ 1B)

ระดับของ BAFF ในพลาสมามีความสัมพันธ์กับระดับของ AST ($r=0.371$, $P<0.001$), ALT ($r=0.435$, $P<0.001$), HBV DNA ($r=0.140$, $P=0.021$), AFP ($r=0.481$, $P<0.001$) และ FIB-4 index ($r=0.362$, $P<0.001$) ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับของ BAFF และผลทางคลินิกอื่นๆ (อายุ, เพศ, อัลบูมิน, platelet counts และ อัลบูมิน)

1.4 Plasma BAFF levels and clinical features in patients with HCC

เมื่อประเมินความสัมพันธ์ของระดับของ BAFF ในพลาสมากับผลทางคลินิก โดยแบ่งผู้ป่วยมะเร็งตับออกเป็น 2 กลุ่มจากค่ากลางของ BAFF ($1,100$ pg/ml) โดยมีกลุ่มที่มีระดับของ BAFF ต่ำ 99 ราย และระดับของ BAFF สูง 101 ราย ความสัมพันธ์ของค่าของ BAFF กับผลทางคลินิกแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระดับของ BAFF ที่สูงสัมพันธ์กับระดับของ AFP, FIB-4 index ความรุนแรง และระยะของมะเร็งตับ อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ เพศ platelet count และระดับของ HBV DNA

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BAFF ในพลาสมา กับคุณสมบัติของอาสาสมัคร

Variables	Low BAFF (<1100 pg/ml)	High BAFF (≥1100 pg/ml)	P
	(n=99)	(n=101)	
Age (years)	58.2±11.9	58.0±11.9	0.900
Gender			0.177
Male (n=168)	87 (87.9)	81 (80.2)	
Female (n=32)	12 (12.1)	20 (19.8)	
Aspartate aminotransferase (IU/L)	72.4±71.8	118.4±121.1	0.001*
Alanine aminotransferase (IU/L)	59.3±17.5	59.8±51.2	0.954
Serum albumin (g/dL)	3.8±0.6	3.4±0.5	<0.001*
Total bilirubin (mg/dL)	1.0±0.6	1.3±0.8	0.008*
Platelet count (10 ⁹ /L)	188.8±121.7	210.9±131.5	0.221
Log ₁₀ HBV DNA (IU/mL)	4.5±1.5	4.4±1.5	0.879
Alpha fetoprotein (ng/mL)	5210.3±16801.2	28735.4±8208.0	0.015*
FIB-4 index	4.26±3.92	5.46±4.28	0.041*
Child-Pugh class			
A (n=158)	89 (87.3)	69 (70.4)	0.027*
B or C (n=42)	13 (12.7)	29 (29.6)	
BCLC tumor stage			
0-A (n=61)	40 (40.4)	21 (20.8)	<0.001*
B (n=76)	41(41.4)	35 (34.7)	
C-D (n=63)	18 (18.2)	45 (44.6)	

Data expressed as mean ± SD or n (%) as appropriate; *, P-value<0.05

1.5 Distribution of BAFF polymorphisms

ความถี่ของ SNPs ของยีน BAFF ตำแหน่ง rs9514828 และ rs12583006 ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา แสดงในตารางที่ 3 ไม่พบความแตกต่างของความถี่ของ SNPs ตำแหน่ง rs9514828 ใดๆก็ตามผู้ป่วยที่เป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังทั้งผู้ที่เป็นและไม่เป็นมะเร็งตับ พบว่ามีความถี่ของ CT และ CT+TT จีโนไทป์สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยสุขภาพดี ส่วน SNPs ตำแหน่ง rs12583006 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง 2 SNPs นี้กับระดับของ BAFF ในพลาสมาของกลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา

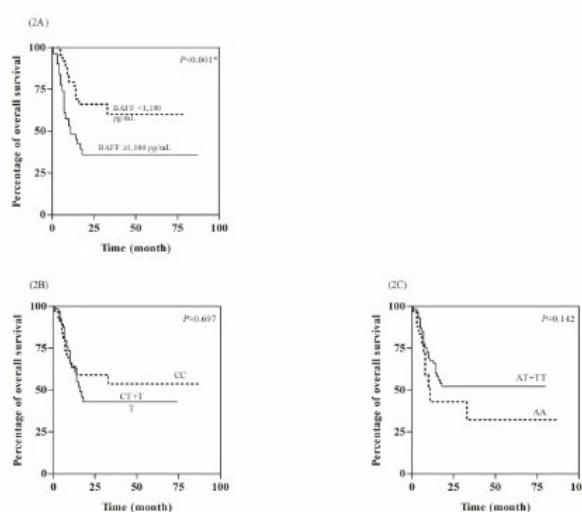
ตารางที่ 3 ความชุกของความหลากหลายทางพันธุกรรม

Polymorphisms	Healthy controls	Patients without HCC	Patients with HCC	Patients with and without HCC	HCC vs. Healthy controls		HCC vs. Non-HCC		Non-HCC and HCC vs. Healthy controls	
	(n=100)	(n=290)	(n=200)	(n=490)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
rs9514828										
CC	54 (54.0)	116 (40.0)	90 (45.0)	206 (42.0)	1.00		1.00		1.00	
CT	36 (36.0)	142 (49.0)	90 (45.0)	232 (47.4)	1.50 (0.90-2.51)	0.121	0.82 (0.56-1.20)	0.299	1.69 (1.06-2.68)	0.026*
TT	10 (10.0)	32 (11.0)	20(10.0)	52 (10.6)	1.20 (0.52-2.75)	0.667	0.81 (0.43-1.50)	0.496	1.36 (0.65-2.86)	0.412
CT + TT	46 (46.0)	174 (60.0)	110 (55.0)	284 (58.0)	1.43 (0.89-2.32)	0.142	0.81 (0.57-1.17)	0.271	1.62 (1.05-2.49)	0.029*
rs12583006										
AA	19 (19.0)	55 (19.0)	36 (18.0)	91 (18.6)	1.00		1.00		1.00	
AT	42 (42.0)	147 (50.7)	87 (43.5)	234 (47.8)	1.09 (0.56-2.13)	0.793	0.90 (0.55-1.49)	0.691	1.16 (0.64-2.11)	0.618
TT	39 (39.0)	88 (30.3)	77 (38.5)	165 (33.6)	1.04 (0.53-2.05)	0.905	1.34 (0.80-2.25)	0.274	0.88 (0.48-1.62)	0.688
AT + TT	81 (81.0)	235 (81.0)	164 (82.0)	399 (81.4)	1.07 (0.58-1.98)	0.833	1.07 (0.67-1.70)	0.787	1.03 (0.59-1.78)	0.920

Data expressed as n (%); OR=Odds ratio; CI=confidence intervals; *, P-value<0.05

1.6 Factors associated with overall survival of patients with HCC

เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยหลายปัจจัยในการทำนายอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับของ BAFF ในพลาสมาต่ำ <1,100 pg/ml มีอัตราการอยู่รอดยาว 47.5 เดือน ในขณะที่กลุ่มที่มีระดับของ BAFF ในพลาสมาสูง $\geq 1,100$ pg/ml มีอัตราการอยู่รอดเพียง 21.4 เดือน ($P < 0.001$ by log rank test) (รูปภาพ 2A) สำหรับ SNPs ตำแหน่ง rs9514828 ไม่พบความสัมพันธ์กับระยะเวลาการอยู่รอดระหว่างผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ CC หรือ CC+TT (รูปภาพที่ 2B) เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AT+TT ของ SNPs ตำแหน่ง rs12583006 (รูปภาพ 2C).



รูปภาพที่ 2 อัตราการรอดชีวิตทั้งหมดของผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกี่ยวข้องกับระดับของ BAFF และความหลากหลายทางพันธุกรรม A)ระดับของ BAFF ในพลาสมา B)จีโนไทป์ rs9514828 C)จีโนไทป์ rs12583006

การวิเคราะห์ปัจจัยทาง เพศ, อายุ, AST, ALT, platelet count, HBV DNA, FIB-4 index, Child-Pugh classification, ขนาดของก้อน และ BCLC stage ด้วย multivariate analysis พบว่าระยะของมะเร็งตับ, ระดับ AFP สูง, และ ระดับ BAFF สูง เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ทำนายระยะเวลาการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งตับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งตับ

Factors	Category	Overall survival			
		Univariate analysis		Multivariate analysis	
		OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
Age (years)	< 60 vs. ≥ 60	1.98 (1.14-3.45)	0.016*	0.69 (0.30-1.60)	0.387
Gender	Male vs. Female	1.35 (0.70-2.61)	0.374		
Aspartate aminotransferase (IU/L)	< 60 vs. ≥ 60	3.14 (1.76-5.63)	<0.001*	0.92 (0.39-2.19)	0.853
Alanine aminotransferase (IU/L)	< 60 vs. ≥ 60	2.74 (1.62-4.65)	<0.001*	1.34 (0.63-2.82)	0.445
Platelet count (10 ⁹ /L)	≥ 150 vs. < 150	2.94 (1.55-5.57)	0.001*	1.94 (0.75-5.02)	0.174
Log ₁₀ HBV DNA (IU/mL)	< 4.0 vs. ≥ 4.0	0.78 (0.39-1.56)	0.475		
Child-Pugh classification	A vs. B and C	1.42 (0.67-3.02)	0.361		
Alpha fetoprotein (ng/mL)	< 100 vs. ≥ 100	5.91 (2.99-11.68)	<0.001*	3.64 (1.53-8.64)	0.003*
FIB-4 index	<3.40 vs. ≥ 3.40	0.87 (0.52-1.51)	0.656		
Tumor size (cm.)	<5.0 vs. ≥ 5.0	10.55 (4.69-23.75)	<0.001*	2.10 (0.62-7.10)	0.231
BCLC stage	0, A vs. B vs. C, D	4.42 (2.91-6.70)	<0.001*	3.00 (1.53-5.87)	0.001*
Plasma BAFF level (pg/ml)	< 1100 vs. ≥ 1100	3.10 (1.75-5.49)	<0.001*	2.28 (1.07-4.87)	0.034*
rs9514828	CC vs. CT + TT	1.32 (0.52-3.32)	0.557		
rs12583006	AA vs. AT + TT	0.98 (0.57-1.67)	0.931		

Data express as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI); *, P-value<0.05

อภิปรายผล (Discussion)

มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่มีความชุกและพบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ [1] โดยทั่วไปการทำนายโรคมะเร็งตับนั้นทำได้ยาก เนื่องจากคนไข้มักมาพบแพทย์ในระยะท้ายแล้วเนื่องจากมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีปัจจัยหลายอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งภูมิคุ้มกันอ่อนแอส่งผลให้ตับถูกทำลาย [2] รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific immune system) ต่อชนิดของเชื้อโรค หรือ Adaptive immune โดยเฉพาะอย่างยิ่ง T-cells มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบของตับ รวมไปถึงถึงการเกิดมะเร็งตับ [21] ในทางกลับกันข้อมูลการศึกษาการทำงานของ B-cell ในการทำนายการดำเนินโรคมะเร็งตับยังมีการศึกษาไม่เพียงพอ

การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยพบว่าระดับของ BAFF สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [13] เมื่อพิจารณาในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี พบว่าระดับของ BAFF เพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วย inactive carriers (IC), immune active (IA) และตับแข็งตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าระดับของ BAFF สัมพันธ์กับระดับของ ALT ที่เป็นตัวบ่งชี้การทำลายของเซลล์ตับ ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าระดับของ BAFF ในพลาสมาเพิ่มขึ้นเมื่อมีการอักเสบแบบเฉียบพลัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการกระตุ้น type I interferons [4] โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วย immune active โดยพบว่าระดับของ BAFF ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มี HBeAg-positive สูงกว่าผู้ป่วย HBeAg-negative ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงที่พบว่า HBeAg สามารถกระตุ้นการทำงานของ BAFF ผ่านการทำงานของ monocyte [22] นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ BAFF มีความสัมพันธ์กับการเกิดพังผืดตับ (FIB-4 index) และมีระดับของ BAFF ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็งสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะตับแข็ง ผลการศึกษานี้สนับสนุนการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าระดับของ BAFF มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตับแข็งและพบมากขึ้นตามสาเหตุของการเกิดโรคตับ [21,23]

ผลการศึกษาพบว่าระดับของ BAFF ที่เพิ่มสูงขึ้นในพลาสมามีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งและความรุนแรงของโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ระดับของ BAFF ในพลาสมาสูงมักจะพบในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีก้อนขนาดใหญ่ และอยู่ในระยะรุนแรง นอกเหนือจากนี้การวิเคราะห์ปัจจัยหลายปัจจัยร่วมกัน (multivariate analysis) พบว่า BAFF สามารถใช้ทำนายอัตราการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งตับได้ ผู้ป่วยที่มีระดับตั้งต้นของ BAFF มากกว่า 1,100 pg/ml มีความเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคมะเร็งตับสูงกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ BAFF ต่ำ ข้อมูลนี้ให้ผลยืนยันว่าอาจใช้ระดับของ BAFF ในการทำนายความรุนแรงของโรคมะเร็งตับได้ และอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ติดตามการเจริญของก้อนมะเร็งและใช้ทำนายความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เช่นเดียวกับกับการศึกษานี้ที่พบว่าระดับของ BAFF มีความสัมพันธ์กับก้อนมะเร็งและความรุนแรงของโรคในผู้ป่วย hematological และ non-hematological malignancies [9, 24-27] นอกจากนี้ระดับ

ของ BAFF ยังมีความสัมพันธ์กับโรค multiple myeloma [26] และยังพบสูงในผู้ป่วยมะเร็งระดับอ่อน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแล้ว [26] ผลการศึกษานี้พบว่าบทบาทของ BAFF มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคมะเร็งตับและมะเร็งหลายชนิด

BAFF เป็นปัจจัยสำคัญของการเจริญของ B cells ซึ่งอาจจะมีผลกับการดำเนินโรคและการพัฒนาเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการทดลองในหนูที่ไม่มี B cell ถูกกระตุ้นให้มีพังผืดในตับได้จากการกระตุ้น CCl_4 ซึ่งเป็น profibrogenic ที่กระตุ้นการทำงานของ B cell [28] การศึกษาเรื่องนี้ พบว่า B cells ภายในตับส่งผลให้เกิดพังผืดได้ โดยการกระตุ้น hepatic stellate cell และการสร้างสารอักเสบ (inflammatory cytokines) [29] นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เกิดมะเร็งตับ [30] ในหนูทดลองที่ไม่มี B cells แต่มี T cells พบว่าสามารถป้องกันการพัฒนาเป็นมะเร็งตับได้ นอกจากนี้ผลการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งตับพบว่า B cells ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญของก้อนมะเร็ง และผู้ป่วยมีระยะเวลาอยู่รอดลดลง [30] เช่นเดียวกับ B cells ที่เพิ่มขึ้นใน PBMCs ในผู้ป่วยมะเร็งตับระยะรุนแรงมากกว่าผู้ป่วยมะเร็งตับระยะเริ่มต้น [25] เพราะฉะนั้นนอกจาก B cells จะควบคุมการเกิดพังผืดตับยังมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับอีกด้วย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน BAFF อาจส่งผลต่อการแสดงออกของ BAFF และมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคภูมิคุ้มกัน โรคมะเร็งเลือด หรือโรคติดเชื้อเรื้อรัง [14-16] การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า T allele ของ SNPs ตำแหน่ง rs9514828 พบมาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับ cryoglobulinemia (MC) และมีความสัมพันธ์กับระดับของ BAFF ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่มี MC [31, 32] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความถี่ของ CT+TT genotype บน SNPs ตำแหน่ง rs9514828 พบมากในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีและผู้ที่เป็นมะเร็งตับร่วมด้วยสูงกว่ากลุ่มควบคุมผู้ที่มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังไม่พบความสัมพันธ์กับระดับของ BAFF และผลทางคลินิกอื่นๆ ผลการศึกษานี้อาจสรุปได้ว่า CT+TT genotype ที่พบอาจมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นมะเร็งตับในประชากรชาวไทย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในคนจีนชาวฮั่น [17] ส่วน SNPs ตำแหน่ง rs12583006 ผลการศึกษานี้พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของ BAFF ในพลาสมาเช่นกัน และที่สำคัญไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอีกด้วย

สรุปและเสนอแนะการวิจัยขั้นต่อไป

การศึกษานี้อาจมีข้อจำกัด เนื่องจากเป็นการศึกษาแบบย้อนหลังและมีขนาดของประชากรที่ศึกษาน้อย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพียง 2 ตำแหน่งบนยีนนี้เป็นการศึกษาเฉพาะในประเทศไทยซึ่งไม่สามารถใช้กับประชากรเชื้อชาติอื่น การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของ BAFF ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และสามารถประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ โดยพบว่าระดับของ BAFF ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งและความรุนแรงของโรค นอกจากนี้ยังอาจใช้ระดับของ BAFF เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ในการวินิจฉัย และทำนายการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งตับได้ และอาจสรุปได้ว่าระบบภูมิคุ้มกันและการทำงานของ B cell มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคและพัฒนาเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังได้ อย่างไรก็ตามคงต้องมีการศึกษาหรือพิสูจน์การทำงานของ B-cell ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งตับต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

- [1] C. Trepo, H. L. Chan, A. Lok. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 384 (2014) 2053- 2063.
- [2] A. Bertoletti, C. Ferrari. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*. 61 (2012) 1754-1764.
- [3] A. Bertoletti, C. Ferrari. Adaptive immunity in HBV infection. *J Hepatol*. 64 (2016) S71- 83.
- [4] L. Lu. Frontiers in B-cell immunology. *Cell Mol Immunol*. 10 (2013) 95-96.
- [5] F. Mackay, J. L. Browning. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2 (2002) 465-475
- [6] G. A. Lied, A. Berstad. Functional and clinical aspects of the B-cell-activating factor (BAFF): a narrative review. *Scand J Immunol*. 73 (2011) 1-7.
- [7] G. S. Cheema, V. Roschke, D. M. Hilbert, W. Stohl. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 44 (2001) 1313-1319
- [8] D. C. Salazar-Camarena, P. C. Ortiz-Lazareno, A. Cruz, E. Oregon-Romero, J. R. Machado-Contreras, J. F. Munoz-Valle, M. Orozco-Lopez, M. Marin-Rosales, C. A. Palafox-Sanchez. Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 25 (2016) 582-592.
- [9] A. J. Novak, D. M. Grote, M. Stenson, S. C. Ziesmer, T. E. Witzig, T. M. Habermann, B. Harder, K. M. Ristow, R. J. Bram, D. F. Jelinek, J. A. Gross, S. M. Ansell. Expression of BLYS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood*. 104 (2004) 2247-2253.
- [10] J. Sakai, M. Akkoyunlu. The Role of BAFF System Molecules in Host Response to Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 30 (2017) 991-1014.
- [11] G. Lake-Bakaar, I. Jacobson, A. Talal. B cell activating factor (BAFF) in the natural history of chronic hepatitis C virus liver disease and mixed cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*. 170 (2012) 231-237.
- [12] D. Sene, N. Limal, P. Ghillani-Dalbin, D. Saadoun, J. C. Piette, P. Cacoub. Hepatitis C virus-associated B-cell proliferation--the role of serum B lymphocyte stimulator (BLYS/BAFF).

Rheumatology (Oxford). 46 (2007) 65-69.

[13] C. Yang, N. Li, Y. Wang, P. Zhang, Q. Zhu, F. Li, Q. Han, Y. Lv, L. Yu, P. Wei, Z. Liu. Serum levels of B-cell activating factor in chronic hepatitis B virus infection: association with clinical diseases. *J Interferon Cytokine Res.* 34 (2014) 787-794.

[14] M. Jasek, A. Bojarska-Junak, M. Wagner, M. Sobczynski, D. Wolowiec, J. Rolinski, L. Karabon, P. Kusnierczyk. Association of variants in BAFF (rs9514828 and rs1041569) and BAFF-R (rs61756766) genes with the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol.* 37 (2016) 13617-13626.

[15] A. J. Novak, S. L. Slager, Z. S. Fredericksen, A. H. Wang, M. M. Manske, S. Ziesmer, M. Liebow, W. R. Macon, S. R. Dillon, T. E. Witzig, J. R. Cerhan, S. M. Ansell. Genetic variation in B-cell-activating factor is associated with an increased risk of developing Bcell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 69 (2009) 4217-4224.

[16] A. Nezos, A. Papageorgiou, G. Fragoulis, D. Ioakeimidis, M. Koutsilieris, A. G. Tzioufas, H. M. Moutsopoulos, M. Voulgarelis, C. P. Mavragani. B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 51 (2014) 89-98.

[17] Q. Han, C. Yang, N. Li, F. Li, J. Sang, Y. Lv, W. Zhao, C. Li, Z. Liu. Association of genetic variation in B-cell activating factor with chronic hepatitis B virus infection. *Immunol Lett.* 188 (2017) 53-58.

[18] J. Bruix, M. Sherman, D. American Association for the Study of Liver. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology.* 53 (2011) 1020-1022.

[19] A. Forner, J. M. Llovet, J. Bruix. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 379 (2012) 1245- 1255.

[20] N. A. Terrault, N. H. Bzowej, K. M. Chang, J. P. Hwang, M. M. Jonas, M. H. Murad, D. American Association for the Study of Liver. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology.* 63 (2016) 261-283.

[21] H. Doi, E. Hayashi, J. Arai, M. Tojo, K. Morikawa, J. Eguchi, T. Ito, T. Kanto, D. E. Kaplan, H. Yoshida. Enhanced B-cell differentiation driven by advanced cirrhosis resulting in hyperglobulinemia. *J Gastroenterol Hepatol.* (2018).

[22] B. Lu, B. Zhang, L. Wang, C. Ma, X. Liu, Y. Zhao, Y. Jiao. Hepatitis B Virus e Antigen

Regulates Monocyte Function and Promotes B Lymphocyte Activation. *Viral Immunol.* 30 (2017) 35-44.

[23] T. Miyake, M. Abe, Y. Tokumoto, M. Hirooka, S. Furukawa, T. Kumagi, M. Hamada, K. Kawasaki, F. Tada, T. Ueda, Y. Hiasa, B. Matsuura, M. Onji. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int.* 7 (2013) 539-547.

[24] S. J. Kim, S. J. Lee, I. Y. Choi, Y. Park, C. W. Choi, I. S. Kim, W. Yu, H. S. Hwang, B. S. Kim. Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP chemotherapy. *Eur J Haematol.* 81 (2008) 177-184.

[25] J. C. Lin, Y. L. Shih, P. J. Chien, C. L. Liu, J. J. Lee, T. P. Liu, W. C. Ko, C. M. Shih. Increased percentage of B cells in patients with more advanced hepatocellular carcinoma. *Hum Immunol.* 71 (2010) 58-62.

[26] M. Fragioudaki, A. Boula, G. Tsirakis, F. Psarakis, M. Spanoudakis, I. S. Papadakis, C. A. Pappa, M. G. Alexandrakis. B cell-activating factor: its clinical significance in multiple myeloma patients. *Ann Hematol.* 91 (2012) 1413-1418.

[27] J. Bienertova-Vasku, A. Lungova, P. Bienert, F. Zlamal, J. Tomandl, M. Tomandlova, Z. Splichal, J. Sterba. Circulating levels of B-cell activating factor in paediatric patients with malignancy with or without cancer-related cachexia. *Klin Onkol.* 25 Suppl 2 (2012) 2S58-63.

[28] T. I. Novobrantseva, G. R. Majeau, A. Amatucci, S. Kogan, I. Brenner, S. Casola, M. J. Shlomchik, V. Koteliansky, P. S. Hochman, A. Ibraghimov. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest.* 115 (2005) 3072-3082.

[29] M. Thapa, R. Chinnadurai, V. M. Velazquez, D. Tedesco, E. Elrod, J. H. Han, P. Sharma, C. Ibegbu, A. Gewirtz, F. Anania, B. Pulendran, M. S. Suthar, A. Grakoui. Liver fibrosis occurs through dysregulation of MyD88-dependent innate B-cell activity. *Hepatology.* 61 (2015) 2067-2079.

[30] F. Faggioli, E. Palagano, L. Di Tommaso, M. Donadon, V. Marrella, C. Recordati, S. Mantero, A. Villa, P. Vezzoni, B. Cassani. B lymphocytes limit senescence-driven fibrosis resolution and favor hepatocarcinogenesis in mouse liver injury. *Hepatology.* (2017).

[31] L. Gragnani, A. Piluso, C. Giannini, P. Caini, E. Fognani, M. Monti, A. Petrarca, J. Ranieri, G. Razzolini, V. Froio, G. Laffi, A. L. Zignego. Genetic determinants in hepatitis C virus-associated

mixed cryoglobulinemia: role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fc γ receptors. *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1446-1451.

[32] M. W. Ayad, A. A. Elbanna, D. A. Elneily, A. S. Sakr. Association of BAFF -871C/T Promoter Polymorphism with Hepatitis C-Related Mixed Cryoglobulinemia in a Cohort of Egyptian Patients. *Mol Diagn Ther.* 19 (2015) 99-106

ประวัตินักวิจัยและคณะ