รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยการศึกษารหัสพันธุกรรมในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก โดยวิธีถอดรหัสและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหน้าที่

Genetic characterization of patients with hyperalphalipoproteinemia using resequencing approach and functional analysis

ทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๓-๒๕๕๔

โดย

วีรพันธุ์ โชวิฑูรกิจ
วาณี เปล่งพานิชย์
ปาล์ม ชาติยิ่งเจริญ
Wilfried LeGoff

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๓-๒๕๕๔

บทคัดย่อภาษาไทย

วัตถุประสงค์: ปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับภาวะเอชดีแอลในเลือดสูงยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด คณะผู้วิจัยทำการถอดรหัสพันธุกรรมยีน 3 ยีน คือ *CETP*, *LIPC* และ *LIPG* ซึ่งสร้างโปรตีน คอเลสเตอริล เอสเทอร์ ทรานสเฟอร์ โปรตีน, เฮบพาติค ไลเปส และ เอนโดทีเลียล ไลเปส ตามลำดับ ในคนไทยที่มีระดับเอชดีแอลในเลือดสูงมากเทียบกับประชากรกลุ่มควบคุม

วิธีดำเนินการวิจัย คณะผู้วิจัยทำการถอดรหัสยีน*CETP*, *LIPC* และ *LIPG* ในส่วนของ exon และ exon-intron junctions เพื่อค้นหาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในคนไทย 64 คนที่มีระดับเอชดีแอล $\geq$2.59 มิลลิโมล/ลิตร (100 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) และเปรียบเทียบกับผลในประชากรกลุ่มควบคุม 113 คน

ผลการวิจัย ใน coding region ของยีน *CETP* พบมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน 2 ตำแหน่ง คือ deletion mutation ใน exon 9 (c.785-788 delTCCC หรือ p.Leu262ProfsX31) และ duplication mutation ใน exon 13 (c.1226-1230 dupAGACT หรือ p.Val411ArgfsX6) และพบการเปลี่ยนแปลงที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนอีก 4 ตำแหน่งในส่วนของ*CETP* promoter ได้แก่ 18-bp deletion mutation (g.4989-5006delGGGCGGACATACATATAC) 1 ตำแหน่งและ point mutations 3 ตำแหน่ง (g.4982G>T, g.4961C>T และ g.4659C>T) ในยีน *LIPC* พบมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนแบบ missense mutations 2 ตำแหน่ง คือ p.Gly141Ser และ p.Val173Met การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าวไม่พบในกลุ่มควบคุมเลย การทดลองทำ site-directed mutagenesis และศึกษาการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ในระดับเซลล์ พบว่าการเปลี่ยนแปลง 18-bp deletion mutation ที่ *CETP* promoter มีผลทำให้ transcriptional activity ลดลง นอกจากนี้พบการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยในยีน *CETP* คือ p.Asp459Gly หรือ D459G ที่พบบ่อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มคนไข้ที่มีระดับเอชดีแอลสูงเทียบกับกลุ่มควบคุม (23% และ 4% ตามลำดับ, P<0.0001) สำหรับในยีน *LIPG* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใหม่

สรุป คณะผู้วิจัยพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในยีน *CETP* และ *LIPC* ในกลุ่มคนที่มีระดับเอชดีแอลสูง การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในยีน *CETP* และ *LIPC* ทั้งแบบที่พบใหม่และที่มีการรายงานมาก่อน พบได้ประมาณ 1 ใน 3 ของคนที่มีระดับเอชดีแอลสูงดังกล่าว

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Objective Genetic factors associated with high HDL-cholesterol levels or hyperalphalipoproteinemia are incompletely understood. We resequenced 3 candidate genes, *CETP*, *LIPC* and *LIPG*, which encode cholesteryl ester transfer protein, hepatic lipase, and endothelial lipase, respectively, in Thai subjects with very high levels of HDL-cholesterol compared with healthy controls.

Materials and Methods Sequence variants of the *CETP*, *LIPC* and *LIPG* genes were identified by sequencing the exon and exon-intron junctions in 64 subjects with HDL-cholesterol levels $\geq$2.59 mmol/L (100 mg/dL) and compared with 113 normolipidemic subjects.

Results In the *CETP* gene, we found 2 novel mutations in the coding sequence, a deletion mutation in exon 9 (c.785-788 delTCCC or p.Leu262ProfsX31) and a duplication mutation in exon 13 (c.1226-1230 dupAGACT or p.Val411ArgfsX6). Four other novel mutations in the *CETP* promoter, one deletion mutation (g.4989-5006delGGGCGGACATACATATAC) and 3 point mutations (g.4982G>T, g.4961C>T, g.4659C>T) were also identified. In the *LIPC* gene, 2 novel missense mutations (p.Gly141Ser and p.Val173Met) were found. None of these mutations were found in the control group. Site-directed mutagenesis and functional studies *in vitro* confirmed that the 18-bp deletion mutation in the *CETP* promoter was associated with a reduction in transcriptional activity. One common variant in the *CETP* gene (p.Asp459Gly or D459G) was also found more commonly in the hyperalphalipoproteinemia group compared to the control group (23% *vs* 4%, respectively, $P<0.0001$). No rare or novel variants in the *LIPG* gene were identified.

Conclusion Several variants were found in the *CETP* and *LIPC* genes in subjects with high HDL-cholesterol levels. Rare and common variants in the *CETP* and *LIPC* genes contribute to approximately one-third of the Thai subjects with hyperalphalipoproteinemia.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	9
วิธีดำเนินการวิจัย	16
ผลการวิจัย	18
อภิปรายผล	24
สรุป	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	31
ประวัติผู้วิจัย	32

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา 18

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่พบน้อย (rare sequence variants) ในยีน *CETP*, *LIPC* และ *LIPG* 19

ตารางที่ 3. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อย (common sequence variants) ในยีน *CETP*, *LIPC* และ *LIPG* 20

ตารางที่ 4. Carrier frequencies ของ sequence variants ในยีน *CETP* และ *LIPC* 21

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 เมตะบอลิสมของ HDLและบทบาทของ CETP และ HL 11

รูปที่ 2 สมมติฐานของยีนที่เกี่ยวข้องกับระดับของ HDL 14

รูปที่ 3 ลำดับการเรียงตัวของ nucleotide ในส่วนของ CETP promoter และ novel deletion mutation ที่พบ 22

รูปที่ 4 Luciferase activity ใน cell lysate 23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Apo	apolipoprotein
CE	cholesteryl ester
CETP	cholesteryl ester transfer protein
FC	free cholesterol
HALP	hyperalphalipoproteinemia
HDL	high-density lipoprotein
HL	hepatic lipase
LCAT	lecithin:cholesterol acyltransferase
LDL	low-density lipoprotein
LDL-R	low-density lipoprotein receptor
LRP	LDL receptor-related protein
OR	odds ratio
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RFLP	PCR-restriction fragment length polymorphism
SD	standard deviation
SNP	single nucleotide polymorphism
SR-BI	scavenger receptor class B type I
TG	triglyceride
VLDL	very low-density lipoprotein

บทนำ

โรคหลอดเลือดหัวใจและโรคหลอดเลือดสมองตีบเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตและภาวะทุพพลภาพในอันดับต้นๆของประชากรทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ในปัจจุบัน พบมีแนวโน้มโรคเหล่านี้มากขึ้นเรื่อยๆ (1) ระดับไขมันในเลือดที่ผิดปกติ ไม่ว่าจะมีระดับ low-density lipoprotein (LDL) cholesterol สูง หรือมีระดับ high-density lipoprotein (HDL) cholesterol ต่ำล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคดังกล่าว ยารักษาภาวะไขมันในเลือดผิดปกติในปัจจุบัน ได้ผลดีในการลดระดับ LDL แต่ยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพดีและมีอาการข้างเคียงต่ำในการเพิ่มระดับ HDL (2)

HDL เป็นอนุภาคของโปรตีนและไขมัน (lipoprotein) ในเลือดซึ่งมีหน้าที่ป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) แม้ว่าระดับของ HDL ในเลือดจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งทางพันธุกรรมและทางสิ่งแวดล้อม การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่กำหนดระดับ HDL อย่างเป็นระบบยังมีอยู่น้อย

ระดับ HDL ในเลือด ถือเป็น complex quantitative trait ซึ่งไม่ได้ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ Mendelian แต่เป็นผลจากความแตกต่างของ DNA ในหลายๆตำแหน่ง (3) ในปัจจุบัน การถอดรหัสพันธุกรรมที่เรียกว่า resequencing approach ซึ่งทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนหลายๆยีนที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ศึกษากำลังได้รับความนิยมมากขึ้น (4,5) ซึ่งสามารถใช้ค้นหา missense DNA variants ที่พบได้ไม่บ่อยในประชากรกลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษา เนื่องจากการที่มี missense DNA variants หลายๆตำแหน่งเป็นตัวกำหนด quantitative trait ดังกล่าว จึงมีการใช้วิธีนี้ในการศึกษา trait ของโรคหรือลักษณะที่พบบ่อย เช่น การศึกษาในคนที่มีระดับ HDL ต่ำ พบว่าเกิดจากมี missense mutations ของยีน *LCAT*, *APOA1* และ *ABCA1* (3) การศึกษาในคนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง พบว่าเกิดจากมี missense mutations ของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* (5)

ระดับ HDL ในเลือดสูง จัดเป็น complex quantitative trait อันหนึ่ง การศึกษาทางพันธุกรรมของระดับ HDL สูงที่ผ่านมา มักศึกษาจำเพาะเจาะยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น (6) และยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบมาก่อนว่าเกิดจาก missense DNA variants ใน candidate gene ต่างๆหรือไม่ การศึกษานี้ต้องการค้นหาความผิดปกติทางพันธุกรรมในคนที่มีระดับ HDL สูง (hyperalphalipoproteinemia หรือ HALP) และยืนยันความผิดปกติที่พบดังกล่าวโดยการศึกษาหน้าที่ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการทำ expression studies

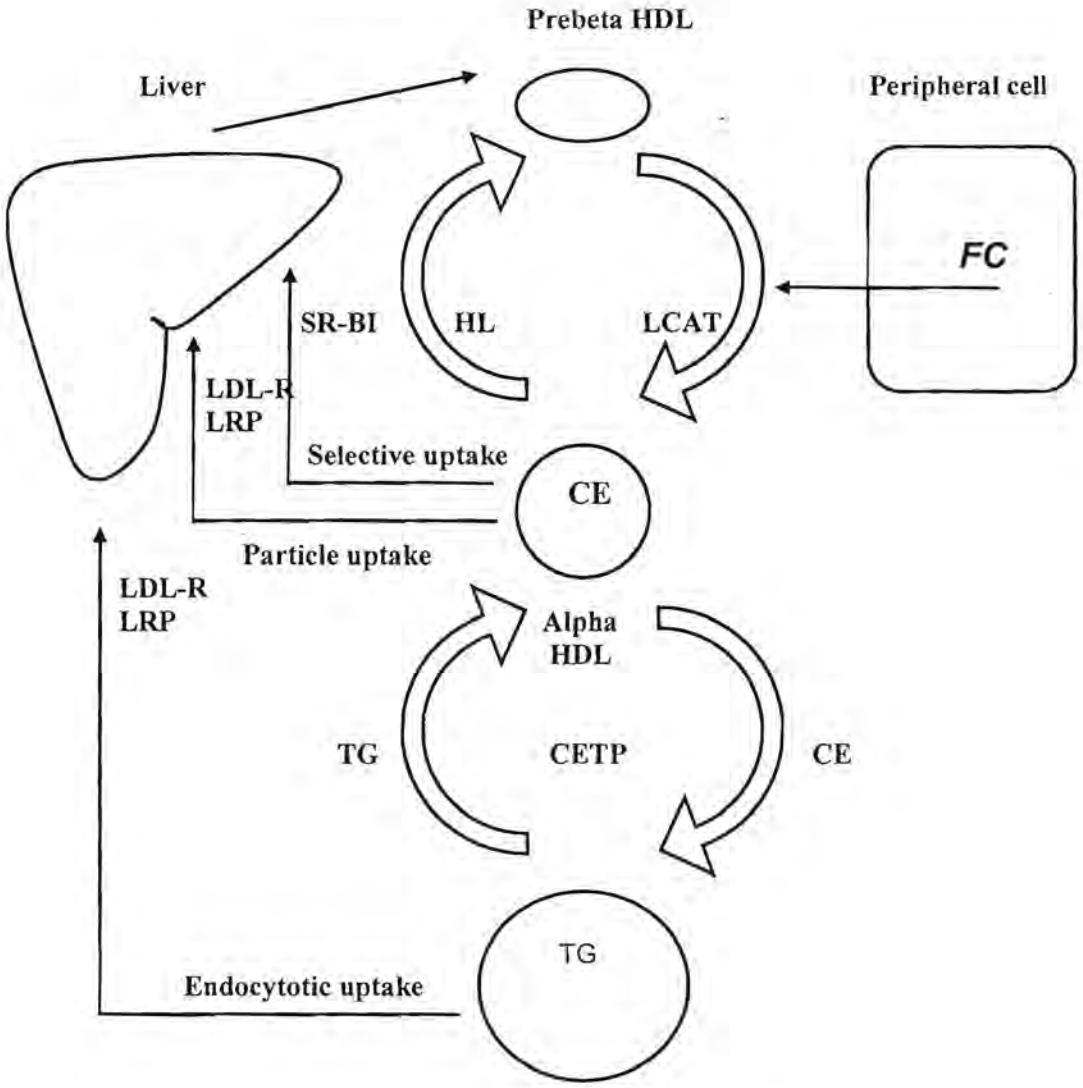
ทบทวนวรรณกรรม

High-density lipoprotein หรือ HDL เป็นอนุภาคโปรตีนและไขมัน (lipoprotein) ในเลือดซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการลำเลียงคอเลสเตอรอล (cholesterol) ส่วนเกินออกจากอวัยวะต่างๆรวมทั้งผนังหลอดเลือด เพื่อนำไปขับทิ้งออกจากร่างกายทางน้ำดีที่ตับ (7) ข้อมูลทางระบาดวิทยาแสดงให้เห็นว่าระดับของ HDL ในเลือดมี

ความสัมพันธ์ผกผันกับการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) กล่าวคือ คนที่มีระดับของ HDL สูงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งที่ลดลง ในขณะที่คนที่มีระดับ HDL ต่ำพบว่าเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งเพิ่มขึ้น (7)

ระดับของ HDL ในเลือดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยที่มีปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นตัวหลักและอาจมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย การศึกษาในประชากรแฝดที่ได้รับการเลี้ยงดูแยกจากกัน พบว่าระดับของ HDL ในเลือดส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดยปัจจัยทางพันธุกรรม (8) ในคนที่มีระดับ HDL ในเลือดต่ำพบว่ามักมีประวัติครอบครัวของระดับ HDL ในเลือดต่ำ และในคนที่มีระดับ HDL ในเลือดสูง ก็พบว่ามีประวัติครอบครัวของระดับ HDL ในเลือดสูงเช่นกัน

เมตะบอลิสมของ HDL ในร่างกาย มีความซับซ้อน และอาศัยการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนหลายชนิด (รูปที่ 1) ความผิดปกติของโปรตีนหลายๆตัวในกระบวนการต่างๆของเมตะบอลิสมของ HDL ทำให้ระดับของ HDL ในเลือดเปลี่ยนแปลงไปได้ เมตะบอลิสมของ HDL เริ่มจากการหลั่ง apolipoprotein A-I (apo A-I) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักของ HDL จากตับและลำไส้เล็ก Apo A-I สามารถรวมตัวกับฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ได้เป็น HDL ขนาดเล็กที่เรียกว่า prebeta HDL ซึ่ง prebeta HDL นี้สามารถรับคอเลสเตอรอลออกจากเซลล์ในอวัยวะต่างๆของร่างกายรวมทั้งเซลล์ macrophages ในผนังหลอดเลือดที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งด้วย เมื่อคอเลสเตอรอลถูกลำเลียงออกจากเซลล์มายัง prebeta HDL คอเลสเตอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็นคอเลสเตอริล เอสเทอร์ (cholesteryl ester) โดยเอนไซม์ lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) ที่อยู่บน HDL เมื่อคอเลสเตอรอลออกจากเซลล์มายัง prebeta HDL มากขึ้น HDL มีขนาดใหญ่ขึ้นๆ จนกลายเป็น HDL ขนาดใหญ่ที่เรียกว่า alpha HDL คอเลสเตอรอลที่ออกจากเซลล์และมาอยู่ที่ HDL นี้จะถูกส่งไปที่ตับเพื่อขับออกจากร่างกายทางน้ำดีได้หลายวิธี เช่น คอเลสเตอรอลอาจถูกส่งไปที่ตับโดย HDL จับกับ receptor ต่างๆที่ตับโดยตรง ได้แก่ LDL receptor, LDL receptor-related protein (LRP), และ scavenger receptor class B type I (SR-BI) หลังจากที่ HDL จับกับ receptor เหล่านี้ คอเลสเตอรอลจะถูกลำเลียงเข้าเซลล์ตับด้วยวิธีต่างๆกัน นอกจากนี้ คอเลสเตอรอลใน HDL ยังสามารถถูกส่งต่อไปที่ตับเพื่อกำจัดออก ผ่านทาง triglyceride-containing lipoproteins เช่น VLDL (very low-density lipoprotein) กับ LDL (low-density lipoprotein) โดยอาศัยเอนไซม์ cholesteryl ester transfer protein (CETP) เมื่อคอเลสเตอรอลถูกส่งต่อไปยัง VLDL และ LDL แล้ว HDL จะได้รับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) จาก VLDL และ LDL มาแทน ซึ่งไตรกลีเซอไรด์เหล่านี้จะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์ hepatic lipase (HL) ทำให้ HDL มีขนาดเล็กลงและเปลี่ยนจาก alpha HDL กลับไปเป็น prebeta HDL ตามเดิม (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 เมตะบอลิสมของ HDLและบทบาทของ CETP และ HL ตับสร้าง apo A-I ที่รวมตัวกับ phospholipid ได้เป็น prebeta HDL เมื่อ free cholesterol (FC) ออกจากเซลล์มาจะถูกเปลี่ยนเป็น cholesterol ester (CE) ด้วยเอนไซม์ LCAT เมื่อ CE มีมากขึ้น prebeta HDL จะกลายเป็น alpha HDL CE ถูกลำเลียงสู่ตับโดยตรงโดยผ่านทาง LDL-R, LRP หรือ SR-BI นอกจากนี้ CE อาจถูกแลกเปลี่ยนกับ triglyceride (TG) ใน triglyceride-containing lipoproteins โดยอาศัยเอนไซม์ CETP

ในสัตว์ทดลองบางชนิด เช่นหนู mouse และ หนู rat พบว่าไม่มีเอนไซม์ CETP (9) ดังนั้น การลำเลียงคอเลสเตอรอลส่วนเกินจากเซลล์กลับไปที่ตับในสัตว์เหล่านี้ จึงต้องอาศัย receptor ต่างๆที่ตับในการจับกับ HDL โดยตรง คือ LDL receptor, LRP และ SR-BI แต่ในสัตว์ที่มีเอนไซม์ CETP ซึ่งรวมทั้งคนด้วย การลำเลียง

คอเลสเตอรอลส่วนเกินจากเซลล์กลับไปที่ตับจะอาศัยเอนไซม์ CETP เป็นหลัก บทบาทของ LRP และ SR-BI ในคนนั้น จึงไม่ค่อยมีความสำคัญนัก

เอนไซม์ CETP เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเมตะบอลิสมของ HDL ของคน การขาดเอนไซม์นี้ส่งผลให้การลำเลียงคอเลสเตอรอลของ HDL ผิดปกติไป ทำให้ HDL คั่งในเลือดและระดับ HDL ในเลือดสูงขึ้น (10) การขาดเอนไซม์ CETP นี้เป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุดของการมีระดับ HDL ในเลือดสูง (11) อย่างไรก็ตาม การขาดเอนไซม์ CETP พบได้บ่อยเฉพาะในแถบเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนชาติญี่ปุ่น แต่พบได้น้อยมากในคนผิวขาวหรือผิวดำ (12)

การขาดเอนไซม์ CETP พบได้บ่อยในคนญี่ปุ่น ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *CETP* gene ที่ intron 14 ตรงตำแหน่ง splice site (Ivs14+1G>A หรือ c.1321+1 G>A) และที่ exon 15 ซึ่งเป็น missense mutation (p.Asn459Gly หรือ D442G) อย่างไรก็ตาม ในคนญี่ปุ่นที่มีระดับ HDL สูง พบว่า 36% มีการทำงานของเอนไซม์ CETP ปกติ (13) ซึ่งแสดงว่าการมีระดับ HDL สูงน่าจะเกิดจากสาเหตุอื่นร่วมด้วย

นอกเหนือจากการขาด CETP แล้ว ระดับของ HDL ที่สูงขึ้น อาจเกิดจากสาเหตุทางพันธุกรรมอื่นๆ มีรายงานประปรายว่าการขาดเอนไซม์ hepatic lipase ทำให้ระดับ HDL ในเลือดสูงได้ (14-17) hepatic lipase เป็นเอนไซม์ที่สลายไตรกลีเซอไรด์และ phospholipid ใน HDL และเป็นตัวกำหนดระดับ HDL ที่สำคัญอันหนึ่ง ในครอบครัวที่พบมีการขาดเอนไซม์ hepatic lipase พบมีการเพิ่มขึ้นของระดับ HDL (14-17) นอกจากนี้ ในสัตว์ทดลอง ยังพบว่าเอนไซม์ endothelial lipase มีความสำคัญในการควบคุมระดับ HDL โดยหนูทดลองที่ขาดเอนไซม์ endothelial lipase มีระดับ HDL สูงกว่าปกติ (18,19) การศึกษาในคนผิวขาวที่มีระดับ HDL สูง พบมีกลายพันธุ์ของ LIPG gene ที่สร้าง endothelial lipase (20)

สำหรับในประเทศไทย ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนว่าการที่มีระดับ HDL สูงในเลือด เกิดจากสาเหตุใด กลุ่มผู้วิจัยเป็นกลุ่มแรกที่ได้ศึกษาถึงสาเหตุของระดับ HDL ในเลือดสูงในคนไทย โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ CETP และ hepatic lipase ในกลุ่มคนไข้ที่มีระดับ HDL สูงที่ไม่พบมีสาเหตุอื่นที่อธิบายได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีระดับ HDL ปกติที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกัน (ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีที่ใช้วัดการทำงานของเอนไซม์ endothelial lipase ในเลือดได้) ผลการวิจัยพบว่า ในกลุ่มคนไข้ที่มีระดับ HDL สูง มีการทำงานลดลงของทั้งเอนไซม์ CETP และ hepatic lipase เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีระดับ HDL ปกติอย่างมีนัยสำคัญ (21) ซึ่งสาเหตุของการทำงานของเอนไซม์นี้ลดลง น่าจะเกิดจากความผิดปกติในรหัสพันธุกรรมของยีน *CETP* และ/หรือ *LIPC* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CETP และ hepatic lipase ตามลำดับนั่นเอง

ยีน *CETP* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ประกอบด้วย 16 exons ที่สร้างกรดอะมิโนทั้งสิ้น 476 กรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่พบในยีนนี้ ปัจจุบัน พบอย่างน้อย 10 ตำแหน่งในคนญี่ปุ่น (22) ในคนจีน

และไต้หวัน พบมีการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับในคนญี่ปุ่น (23-26) ในคนผิวขาวพบได้แต่น้อยมาก (12, 27-29) และในคนไทย ยังไม่มีการศึกษามาก่อน

ยีน *LIPC* ที่สร้าง hepatic lipase อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 15 ประกอบด้วย 9 exons มีรายงานการกลายพันธุ์ประปรายในหลายเชื้อชาติกว่า 10 mutations โดยเกือบทั้งหมดพบเป็น missense mutation (30-33)

ยีน *LIPG* ที่สร้าง endothelial lipase อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 ประกอบด้วย 10 exons การศึกษาทางพันธุกรรม มีเพียงการศึกษาเดียวที่ทำในคนที่มีระดับ HDL-C สูงผิวขาวและผิวดำ (34) นอกนั้นเป็นการศึกษา polymorphism ในคนปกติหรือคนที่มีโรคหัวใจ (35-37)

มีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *CETP* ที่พบได้บ่อยในคนญี่ปุ่นคือ D442G โดยมีการ express ในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่า D442G เป็นสาเหตุให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงจริง (38)

การศึกษารหัสพันธุกรรมในส่วนของ exon, exon-intron junction และ promoter ของยีน *CETP, LIPC* และ *LIPG* แบบ resequencing approach และทำการยืนยันการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบด้วย expression studies จึงเป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาการทำงานของ CETP และ hepatic lipase ในคนไทย (21)

ผู้วิจัยคาดว่าองค์ความรู้ใหม่ที่จะได้จากการศึกษานี้คือทราบถึงยีนที่มีผลต่อระดับ HDL สูง ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบครบถ้วนมาก่อน รวมทั้งให้ข้อมูลในด้านของ single nucleotide polymorphism ที่เป็นระบบในคนไทย การศึกษานี้จะทำการยืนยัน pathogenicity ของความผิดปกติที่พบในระดับเซลล์ด้วย องค์ความรู้ใหม่จากการศึกษานี้จะบอกถึงปัจจัยที่มีผลต่อระดับ HDL สูงและสามารถใช้เป็นเป้าหมายในการศึกษาต่อยอดเพื่อค้นหาวิธีปรับเปลี่ยนระดับ HDL ด้วยยาหรือสารที่มีผลต่อโปรตีนเป้าหมายใหม่เหล่านั้น โดยมีจุดหมายเพื่อเพิ่มระดับ HDL และลดการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งในที่สุด

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการควบคุมระดับ HDL ในคนที่มีระดับ HDL สูง

2. เพื่อยืนยันผลของการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่เกิดขึ้นโดยการศึกษาหน้าที่ด้วย in vitro expression studies

ขอบเขตของโครงการวิจัย

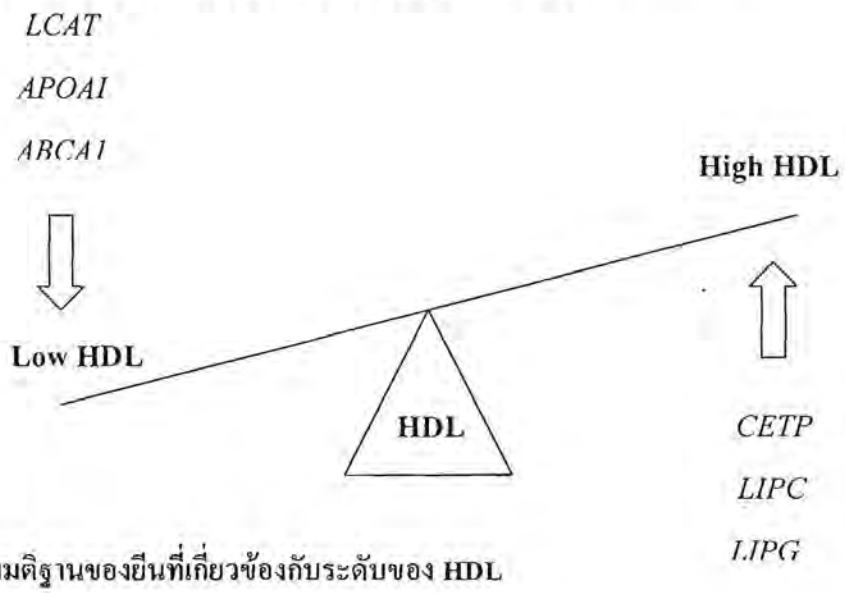
ในโครงการวิจัยนี้ ทำการถอดรหัสทางพันธุกรรมของของยีน *CETP, LIPC* และ *LIPG* ที่สร้างโปรตีน CETP, hepatic lipase และ endothelial lipase ตามลำดับ ในคนที่มีระดับ HDL สูงจำนวน 64 ราย เปรียบเทียบกับ

คนที่มีระดับ HDL ปกติ 113 ราย โดยทำการถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของ exon, exon-intron junction และ promoter ของยีนที่กล่าวมา เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน หรือมีการกลายพันธุ์ที่คาดว่าจะทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป จึงจะทำการยืนยันโดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่ในระดับเซลล์โดยวิธี in vitro expression studies ต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ระดับ HDL ในเลือด ถือเป็น complex quantitative trait หนึ่ง ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของ DNA ในหลายๆตำแหน่ง (3) ในปัจจุบัน พบว่าการที่มี missense DNA variants หลายๆตำแหน่งเป็นตัวกำหนด quantitative trait ต่างๆ จึงมีการศึกษาโดยอาศัยการถอดรหัสพันธุกรรมที่เรียกว่า resequencing approach ซึ่งทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนหลายๆยีนที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ศึกษา เพื่อค้นหา missense DNA variants ในประชากรกลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษาดังกล่าว (4,5) มีการใช้วิธีนี้ในการศึกษา trait ของโรคหรือลักษณะที่พบบ่อย เช่นการศึกษาในคนที่มีระดับ HDL ต่ำ พบว่าเกิดจากมี missense mutations ของยีน *LCAT*, *APOA1* และ *ABCA1* (3) การศึกษาในคนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง พบว่าเกิดจากมี missense mutations ของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* (5) อย่างไรก็ตาม การศึกษาทางพันธุกรรมของระดับ HDL สูงที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบโดยใช้วิธี resequencing มาก่อนว่าเกิดจาก missense DNA variants ใน candidate gene ต่างๆหรือไม่

สมมติฐานของโครงการวิจัยนี้ คือระดับ HDL ที่สูงขึ้นในเลือด เกิดจาก missense mutations ของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระดับ HDL คือ ยีน *CETP*, *LIPC* และ *LIPG*



รูปที่ 2 สมมติฐานของยีนที่เกี่ยวข้องกับระดับของ HDL

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลของการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ในการทราบถึงการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีบทบาทควบคุมระดับ HDL ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบครบถ้วนมาก่อน รวมทั้งให้ข้อมูลในด้านของ single nucleotide polymorphism ที่เป็นระบบในคนไทย องค์ความรู้ใหม่จากการศึกษานี้จะบอกถึงปัจจัยที่มีผลต่อระดับ HDL สูงและสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการวิจัยต่อยอดในอนาคตเพื่อค้นหาวิธีปรับเปลี่ยนระดับ HDL ด้วยยาหรือสารที่มีผลต่อโปรตีนเป้าหมายใหม่เหล่านั้น โดยมีจุดหมายเพื่อเพิ่มระดับ HDL และลดการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งในที่สุด

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนและวิธีการเก็บข้อมูลและตัวอย่างจากผู้ถูกวิจัย

ในการศึกษานี้ ใช้ตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุนรัชดาภิเษกสมโภช ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมเรียบร้อยแล้ว และผู้เข้าร่วมวิจัยได้ลงนามยินยอมให้มีการตรวจรหัสสารพันธุกรรมได้

จำนวน หรือขนาดตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ผู้มีระดับ HDL-cholesterol สูง (hyperalphalipoproteinemia หรือ HALP) 64 รายจากคลินิกผู้ป่วยนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยต้องมีระดับ HDL-cholesterol $\geq$2.59 มิลลิโมล/ลิตร (100 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) อย่างน้อย 2 ครั้งโดยไม่มีสาเหตุที่อธิบายได้ และไม่ได้ใช้ยาที่มีผลต่อระดับ HDL-cholesterol ส่วนกลุ่มควบคุม 113 รายมีระดับ HDL-cholesterol ปกติ

ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

เม็ดเลือดขาวของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งกลุ่มที่มีระดับ HDL สูงกว่าหรือเท่ากับ 100 มก./ดล. และกลุ่มควบคุม ที่ได้ทำการเก็บไว้แล้วถูกนำมาสกัด DNA ด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม DNA ของผู้มีระดับ HDL สูง และของกลุ่มควบคุม จะถูกทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ในส่วนของ exon, exon-intron junction และ promoter ของยีน *CETP* (16 exons), *LIPC* (10 exons) และ *LIPG* (9 exons) ที่สร้างโปรตีน CETP, hepatic lipase และ endothelial lipase ตามลำดับ จากนั้น จะมีการตรวจสอบขนาด DNA ว่าถูกต้องตามที่ต้องการด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วจึงส่ง DNA ที่เพิ่มจำนวนแล้วไปตรวจสอบรหัสพันธุกรรมโดยวิธี direct sequencing ด้วย automated DNA analyzer

ในการตรวจสอบรหัสพันธุกรรมของยีน *CETP, LIPC* และ *LIPG* เมื่อพบการกลายพันธุ์ที่ผิดปกติ จะทำการเปรียบเทียบกับ database ที่มีอยู่ และศึกษาเพิ่มเติมในผู้ที่มีระดับ HDL สูง และกลุ่มควบคุมทั้งหมด โดยใช้วิธี PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) หากพบการกลายพันธุ์ใหม่ (new mutation) จะทำการยืนยันเปรียบเทียบกับโครโมโซมของคนปกติจำนวนอย่างน้อย 200 โครโมโซม

เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ได้มีการคาดการณ์ว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทำให้การทำงานของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ โดยใช้โปรแกรม PANTHER, PolyPhen-2 และ SNP3D

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่ในระดับเซลล์ (expression studies) จะใช้วิธีมาตรฐานในการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) โดยมีการเตรียม full length DNA และ mutant DNA ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตามที่พบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี site-directed mutagenesis และยืนยันด้วยการทำ sequencing เพื่อ clone เข้าไปใน expression vector จากนั้น จะทำการ transfect เข้าในเซลล์ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่ในระดับเซลล์จะทำโดยการวัดการทำงานของโปรตีนในเซลล์และใน media ที่เพาะเลี้ยงเซลล์เปรียบเทียบกันระหว่าง DNA ปกติและ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ ในกรณีที่พบการกลายพันธุ์ในส่วนของ promoter ใช้ vector ที่มี reporter gene และวัดการทำงานด้วย reporter assay

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) แสดงผลโดยใช้ mean ± SD ส่วนข้อมูลที่ไม่มีการกระจายตัวแบบปกติ แสดงผลโดยใช้ median (interquartile range) การทดสอบการกระจายตัวว่าเป็นแบบปกติหรือไม่ ใช้การทดสอบด้วย One-Sample Kolmogorov-Smirnov Testการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ Chi square หรือ Student t test การวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS

ผลการวิจัย

ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษาทั้ง 2 กลุ่มแสดงในตารางที่ 1 พบว่ากลุ่มที่มีระดับ HDL-cholesterol สูง (HALP) มีระดับ total cholesterol สูงกว่าและระดับ triglyceride ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 1. ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา

	HALP (n=64)	**Controls** (n=113)	***P* value**
อายุ (ปี)	53.6 ± 14.2	50.7 ± 16.5	0.22
สัดส่วนเพศหญิง	91%	81%	0.08
Total cholesterol (mg/dL)	245.7 ± 42.1	200.0 ± 42.2	<0.001
Triglyceride (mg/dL)	66.8 ± 31.7	99.1 ± 53.3	<0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	114.9 ± 13.4	62.8 ± 12.8	<0.001
LDL-cholesterol (mg/dL)	116.6 ± 39.1	117.9 ± 37.4	0.83

แสดงข้อมูลเป็น mean ± SD หรือ %. HALP: hyperalphalipoproteinemia

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่พบน้อยในยีนที่ศึกษา ในยีน CETP พบการเปลี่ยนแปลง 2 ตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงแรกเป็น novel 4-bp deletion ใน exon 9 หรือ c.785-788delTCCC ซึ่งเคยรายงานโดยคณะผู้วิจัยมาก่อน (21) การเปลี่ยนแปลงนี้ คาดว่าทำให้เกิด frameshift mutation เกิดเป็น premature stop codon หลังจากนั้น 31 กรดอะมิโน ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่ 2 เป็น novel 5-bp duplication ใน exon 13 หรือ c.1226-1230dupAGACT ซึ่งคาดว่าทำให้เกิด frameshift mutation เกิดเป็น premature stop codon หลังจากนั้น 6 กรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทั้ง 2 นี้คาดว่าทำให้เกิดโปรตีนที่สั้นลงและขาดส่วน C-terminus ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับไขมัน

ตารางที่ 2. การเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่พบน้อย (rare sequence variants) ในยีน *CETP*, *LIPC* และ *LIPG*

Location	Variant name		Known or novel	Predicted effect at the protein level			No. of carrier	
	DNA level	Protein level (common name)		PANTHER (subPSEC score)	PolyPhen -2	SNP3D (SVM score)	HALP (n=64)	Controls (n=113)
Gene: *CETP*								
Exon 9	c.785-788 delTCCC	p.Leu262ProfsX31	novel	Frameshift with early truncation			1	0
Exon 13	c.1226-1230 dupAGACT	p.Val411ArgfsX6	novel	Frameshift with early truncation			1	0
Promoter	g.4989-5006 delGGGCGGAC ATACATATAC	(-25_-42del GGGCGGACA TACATATAC)	novel	-	-	-	1	0
	g.4982G>T	(-49G>T)	novel	-	-	-	1	0
	g.4961C>T	(-70C>T)	novel	-	-	-	2	0
	g.4659C>T	(-372C>T)	novel	-	-	-	1	0
Gene: *LIPC*								
Exon 3	c.421A>G	p.Gly141Ser	novel	deleterious (-4.43)	probably damaging	deleterious (-1.58)	1	0
Exon 4	c.517G>A	p.Val173Met	Novel	deleterious (-6.43)	possibly damaging	deleterious (-0.53)	1	0

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในส่วนของ *CETP* promoter เคยมีรายงานว่าสัมพันธ์กับภาวะ HDL สูง (39) ในการศึกษานี้ พบการเปลี่ยนแปลงใน *CETP* promoter 4 ตำแหน่ง โดยเป็น novel 18 bp deletion mutation 1 ตำแหน่ง ส่วนการเปลี่ยนแปลงอีก 3 ตำแหน่ง เป็น heterozygous novel point mutations ได้แก่ g.4982G>T (-49G>T), g.4961C>T (-70C>T), และ g.4659C>T (-372C>T) ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน

ในยีน *LIPC* พบการเปลี่ยนแปลงที่พบน้อย (rare variants) 2 ตำแหน่งคือ p.Gly141Ser และ p.Val173Met จากการใช้โปรแกรม 3 โปรแกรม (PANTHER, PolyPhen-2 และ SNP3D) ทำนายว่าทั้ง p.Gly141Ser และ p.Val173Met ทำให้โปรตีนทำงานได้ลดลงดังตารางที่ 2 สำหรับในยีน *LIPG* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่พบน้อยหรือพบใหม่

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อย (common variants) พบ 3 ตำแหน่งในยีน *CETP* คือ p.Val422Ile (I405V), p.Asp459Gly (D442G) และ g.4402C>A (-629C>A) ดังแสดงในตารางที่ 3 ในการศึกษานี้ พบว่าพบ p.Asp459Gly ได้บ่อยกว่าในกลุ่มที่มี HDL สูงอย่างมีนัยสำคัญ (Odds ratio = 8.3, 95% CI 2.6 to 26.4, ตารางที่ 4).

ตารางที่ 3. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อย (common sequence variants) ในยีน *CETP*, *LIPC* และ *LIPG*

Location	Variant name			Allele frequencies		*P* value
	DNA level	Protein level (common name)	SNP Identifier	HALP (n=64)	Controls (n=113)	
Gene: *CETP*						
Exon 14	c.1264G>A	p.Val422Ile (I405V)	rs5882	0.430	0.447	0.824
Exon 15	c.1376A>G	p.Asp459Gly (D442G)	rs2303790	0.133	0.018	<0.0001
Promoter	g.4402C>A	(-629C>A)	rs1800775	0.492	0.385	0.057
Gene: *LIPC*						
Exon 3	c.283G>A	p.Val95Met (V73M)	rs6078	0.352	0.296	0.287
Exon 5	c.644A>G	p.Asn215Ser (N193S)	rs6083	0.297	0.580	<0.0001
Exon 7	c.1068C>A	p.Phe356Leu (L334F)	rs3829462	0.039	0.053	0.616
Gene: *LIPG*						
Exon 3	c.332C>T	p.Thr111Ile	rs2000813	0.344	0.263	0.115

ในยีน *LIPC* พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อย 3 ตำแหน่ง คือ p.Val95Met (V73M), p.Asn215Ser (N193S), และ p.Phe356Leu (L334F) และยีน *LIPG* พบ 1 ตำแหน่งคือ p.Thr111Ile ความถี่ที่พบในประชากรที่ศึกษาทั้ง / กลุ่มไม่แตกต่างกัน ยกเว้น p.Asn215Ser ที่พบได้น้อยกว่าในกลุ่ม HDL สูง (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณาความถี่ของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบน้อยในยีน *CETP* หรือ *LIPC* พบว่าในกลุ่มที่มี HDL สูง พบได้ 5/64 (7.8%) เทียบกับ 0/113 (0%) ในกลุ่มควบคุม (OR = ∞, *P*=0.0056, ตารางที่ 4) ในขณะที่ความถี่ของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในยีน*CETP*, *LIPC* และ *LIPG* ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ยกเว้น p.Asp459Gly (ตารางที่ 3 และ 4) Odds ratio ของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบน้อยในยีน *CETP* หรือ *LIPC* หรือ *CETP* p.Asp459Gly เท่ากับ 11.5 โดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ 95% อยู่ในช่วง 3.7 ถึง 35.7 (*P*<0.0001)

ตารางที่ 4. Carrier frequencies ของ sequence variants ในยีน *CETP* และ *LIPC*

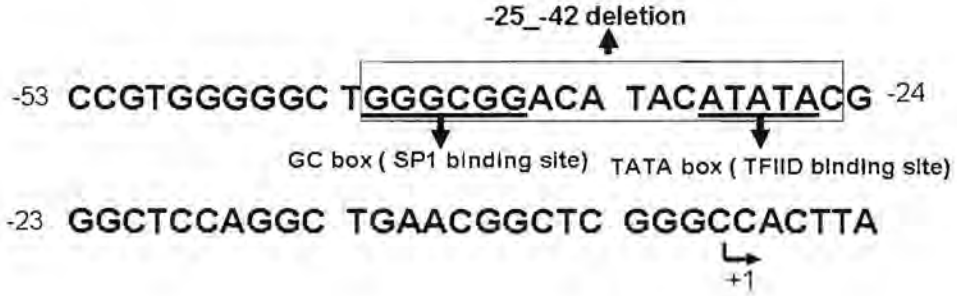
	HALP (n=64)	**Controls (n=113)**	***P* value**
Rare variants			
-≥1 *CETP* variants*	3 (4.7%)	0	0.046
-≥1 *LIPC* variants	2 (3.1%)	0	0.129
-≥1 *CETP* or *LIPC* variants	5 (7.8%)	0	0.0056
Common variants			
-≥1 *CETP* p.Asp459Gly	15 (23.4%)	4 (3.5%)	<0.0001
-≥1 any *CETP* variants	56 (87.5%)	94 (83.2%)	0.518
-≥1 any *LIPC* variants	51 (79.7%)	99 (87.6%)	0.193
Rare and common variants			
-≥1 rare variants or *CETP* p.Asp459Gly	19 (29.7%)	4 (3.6%)	<0.0001

* Individuals with novel point mutations in the *CETP* promoter were treated as controls

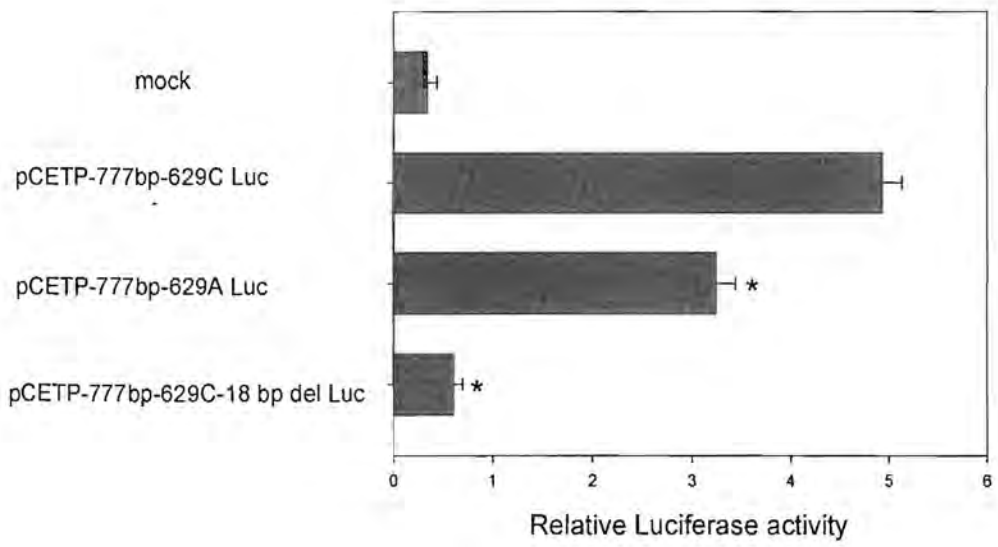
Novel deletion mutation ใน *CETP* promoter และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในหน้าที่ระดับเซลล์

คนไข้ 1 ราย พบว่ามี heterozygous 18 bp deletion mutation ในส่วนของ *CETP* promoter ที่ตำแหน่ง -25 ถึง -42 นับจาก transcription start site, -25_-42del GGGCGGACATACATATAC (รูปที่ 3, GenBank accession number HM191724) ซึ่งไม่พบในกลุ่มควบคุมทั้ง 113 ราย เนื่องจากตำแหน่ง -26 ถึง -43 ของ *CETP* promoter เป็นบริเวณที่มีการจับ (binding sites) สำหรับ Sp1 transcription factor และ TATA box (รูปที่ 3) ซึ่งมีรายงานว่า Sp1 ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน *CETP* ที่ตำแหน่ง -37 ดังนั้น novel deletion mutation ที่พบในผู้ป่วยรายนี้ น่าจะส่งผลให้การแสดงออกของยีน *CETP* ลดลง จึงได้ทำการทดลอง transfection experiments เพื่อประเมิน transcriptional activity ในเซลล์ HepG2

ผู้วิจัยได้ทำการ clone 777-bp DNA fragment ในส่วนของ *CETP* promoter ลงใน luciferase reporter vector และ transfect เข้าในเซลล์ HepG2 สำหรับ18 bp deletion mutant ที่ได้จากการทำ site-directed mutagenesis พบว่า luciferase activity ใน cell lysates ลดลงเหลือเพียง 12% เมื่อเทียบกับ wild-type sequences (0.60 ± 0.1 *vs.* 4.93 ± 0.2, $P < 0.001$, รูปที่ 4) ผลการทดลองนี้บ่งว่า novel 18 bp deletion mutation ที่พบใน *CETP* promoter มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ transcriptional activity



รูปที่ 3 ลำดับการเรียงตัวของ nucleotide ในส่วนของ *CETP* promoter และ novel deletion mutation ที่พบ



รูปที่ 4 Luciferase activity ใน cell lysate

อภิปรายผล

ภาวะ HDL สูงหรือ HALP เกิดได้จากสาเหตุต่างๆทั้งทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ในการศึกษานี้ได้ทำการถอดรหัสยีน 3 ยีนที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับภาวะ HDL สูง ผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบน้อย (rare variants) ในยีน *CETP* และ *LIPC* พบได้บ่อยในกลุ่มที่มี HDL สูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (7.8% *vs.* 0%) และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย (common variants) ของยีน *CETP* คือ p.Asp459Gly พบได้บ่อยในกลุ่ม HDL สูงเช่นเดียวกัน (23.4% vs. 3.5%) โดยรวมพบว่า 29.7% ของคนไข้ที่มี HDL สูงมี $\geq$1 copy ของ rare variants ในยีน *CETP* หรือ *LIPC* หรือ $\geq$1 copy ของ common *CETP* p.Asp459Gly variant

การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับบทบาททางพันธุกรรมของระดับไขมันในเลือดผิดปกติ ได้ใช้วิธีการถอดรหัส (resequencing approach) ซึ่งการศึกษาของ Cohen และคณะ แสดงว่า rare nonsynonymous variants ของยีน *ABCA1*, *APOA1* และ *LCAT* พบได้ 16% ในคนที่มีระดับ HDL ต่ำ (3) โดยที่ส่วนใหญ่ของ rare variants เหล่านี้ มีผลให้การทำงานของโปรตีนลดลง (functionally deleterious) การศึกษาในคนไข้ที่มีระดับไทรกลีเซอไรด์สูงมาก พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *LPL* และ *APOC2* พบได้ 10% (5) และเมื่อรวมกับ *APOA5* p.S19W common variant พบว่า 41.8% ของคนไข้ที่มีระดับไทรกลีเซอไรด์สูงมากมี $\geq$1 copy ของ rare variants ในยีน *LPL* หรือ *APOC2* หรือ $\geq$1 copy ของ common *APOA5* variant แต่พบเพียง 8.9% ในกลุ่มควบคุม (5) การศึกษาดังกล่าวแสดงถึงบทบาทของทั้ง rare และ common variants ในการกำหนดระดับของไขมันในกระแสเลือดในประชากรที่ศึกษา

ในการศึกษานี้ ได้เลือกยีน *CETP*, *LIPC*, และ *LIPG* เนื่องจากมีรายงานว่ามีบทบาทต่อระดับ HDL ในเลือด (6,11,14,20) การศึกษาเดิมของคณะผู้วิจัยได้แสดงว่าการทำงานของ CETP และ hepatic lipase ในเลือดต่ำลงในคนไข้ที่มี HDL สูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (21) การศึกษานี้บ่งว่ายีน *CETP* และ *LIPC* มีความสัมพันธ์กับระดับ HDL สูงในคนไทย แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของยีน *LIPG* กับระดับ HDL ในคนไทย ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในคนผิวขาว (12,20)

สำหรับ p.Asp459Gly variant นั้นพบได้บ่อยว่ามีความสัมพันธ์กับระดับ HDL สูงในคนเอเชีย การศึกษาในระดับเซลล์บ่งว่า p.Asp459Gly CETP mutant ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ได้น้อยกว่าและทำหน้าที่ได้ด้อยกว่า wild-type protein (38) ในการศึกษานี้ ได้พบ rare variants ใหม่ 2 ตำแหน่งที่ exon 9 และ exon 13 ของยีน CETP ซึ่งพยากรณ์ว่าทั้งคู่ทำให้เกิดโปรตีนที่สั้นลงที่ขาด C terminus นอกจากนี้ ยังพบ novel deletion mutation ที่ผลการศึกษาระดับเซลล์ยืนยันว่าทำให้ transcriptional activity ลดลงด้วย

สำหรับยีน *LIPC* พบมี novel missense mutation 2 ตำแหน่งคือ p.Gly141Ser และ p.Val173Met ซึ่งพยากรณ์ด้วย software ทั้ง 3 แบบพบว่าน่าจะมีผลทำให้การทำงานของโปรตีนเสียไป Our *in vitro* functional study also demonstrated that p.Gly141Ser was associated with low hepatic lipase activity.

ในการศึกษานี้ พบว่า p.Asn215Ser ของยีน *LIPC* พบได้น้อยกว่าในคนไข้ที่มี HDL สูง อย่างไรก็ตาม การศึกษาขนาดใหญ่ในคนผิวขาวพบว่า p.Asn215Ser รวมทั้ง p.Val95Met และ p.Phe356Leu ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ HDL ชัดเจน (40)

สรุป

การศึกษานี้บ่งว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *CETP* และ *LIPC* พบได้ถึง 1 ใน 3 ของคนไทยที่มีระดับ HDL สูง ซึ่งสนับสนุนแนวคิดที่ว่า rare alleles หลายๆตำแหน่งที่มีผลมาก (large effect sizes) มีส่วนเกี่ยวข้องกับระดับไขมันในเลือดที่ผิดปกติ นอกจากนี้ยังบ่งว่าบทบาททางพันธุกรรมของ HDL นั้นซับซ้อนและยังมียีนอีกจำนวนมากที่เกี่ยวของกับระดับ HDL แต่ยังไม่ได้รับการค้นพบ

บรรณานุกรม

1. Khoo KL, Tan H, Liew YM, Deslypere JP, Janus E. Lipids and coronary heart disease in Asia. Atherosclerosis. 2003;169:1-10.

2. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. Nat. Rev. Drug Discov. 2005;4:193-205.

3. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. Science. 2004;305:869-72.

4. Kryukov GV, Pennacchio LA, Sunyaev SR. Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. Am J Hum Genet. 2007;80:727-39.

5. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, Yusuf S, Pollex RL, Hegele RA. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:2450-5.

6. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K,Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. Atherosclerosis. 2000;152:271-285.

7. Barter PJ, Rye KA. Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. Curr. Opin. Lipidol. 2006;17:399-403.

8. Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. N. Engl. J. Med. 1993;328:1150-1156.

9. de Grooth GJ, Klerkx AH, Stroes ES, Stalenhoef AF, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. J Lipid Res. 2004;45:1967-74.

10. Barter PJ, Brewer HB, Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003;23:160-167.

11. Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, Ishigami M, Sakai N, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:1053-9.

12. van der Steeg WA, Hovingh GK, Klerkx AH, Hutten BA, Nootenboom IC, Levels JH, van Tol A, linga-Thie GM, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. Cholesteryl ester transfer protein and hyperalphalipoproteinemia in Caucasians. J. Lipid Res. 2007;48:674-682.

13. Maruyama T, Sakai N, Ishigami M, Hirano K, Arai T, Okada S, Okuda E, Ohya A, Nakajima N, Kadowaki K, Fushimi E, Yamashita S, Matsuzawa Y. Prevalence and phenotypic spectrum of cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Japanese hyperalphalipoproteinemia. Atherosclerosis. 2003;166:177-185.

14. Hegele RA, Little JA, Vezina C, Maguire GF, Tu L, Wolever TS, Jenkins DJ, Connelly PW. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. Arterioscler. Thromb. 1993;13:720-728.

15. Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M, et al. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995;15:1849-1856.

16. Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucler I. Hyperalphalipoproteinemia: characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein2 levels and decreased hepatic lipase activity. Metabolism. 1998;47:965-973.

17. Tilly-Kiesi M, Schaefer EJ, Knudsen P, Welty FK, Dolnikowski GG, Taskinen MR, Lichtenstein AH. Lipoprotein metabolism in subjects with hepatic lipase deficiency. Metabolism. 2004;53:520-525.

18. Jin W, Millar JS, Broedl U, Glick JM, Rader DJ. Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. J Clin Invest. 2003;111:357-62.

19. Ma K, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:2748-53.

20. Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, et al. Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans. J Clin Invest 2009;119:1042-50.

21. Plengpanich W, Siriwong S, Khovidhunkit W. Two novel mutations and functional analyses of the CETP and LIPC genes underlying severe hyperalphalipoproteinemia. Metabolism 2009;58:1178-84.

22. Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Takano M, Maruyama T, Ishihara M, Sagehashi Y, Kujiraoka T, Tanaka K, Hattori H, Sakai N, Nakajima N, Egashira T, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. J. Atheroscler. Thromb. 2004;11:110-121.

23. Wu JH, Lee YT, Hsu HC, Hsieh LL. Influence of CETP gene variation on plasma lipid levels and coronary heart disease: a survey in Taiwan. Atherosclerosis. 2001;159:451-458.

24. Jap TS, Wu YC, Tso YC, Chiu CY. A novel mutation in the intron 1 splice donor site of the cholesterol ester transfer protein (CETP) gene as a cause of hyperalphalipoproteinemia. Metabolism. 2002;51:394-397.

25. Hsu LA, Ko YL, Hsu KH, Ko YH, Lee YS. Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. Hum. Genet. 2002;110:57-63.

26. Bu X, Warden CH, Xia YR, De Meester C, Puppione DL, Teruya S, Lokensgard B, Daneshmand S, Brown J, Gray RJ. Linkage analysis of the genetic determinants of high density lipoprotein concentrations and composition: evidence for involvement of the apolipoprotein A-II and cholesteryl ester transfer protein loci. Hum. Genet. 1994;93: 639-648.

27. Teh EM, Dolphin PJ, Breckenridge WC, Tan MH. Human plasma CETP deficiency: identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. J Lipid Res. 1998;39:442-56.

28. Miettinen HE, Gylling H, Tenhunen J, Virtamo J, Jauhiainen M, Huttunen JK, Kantola I, Miettinen TA, Kontula K. Molecular genetic study of Finns with hypoalphalipoproteinemia and hyperalphalipoproteinemia: a novel Gly230 Arg mutation (LCAT[Fin]) of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) accounts for 5% of cases with very low serum HDL cholesterol levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:591-8.

29. Rhyne J, Ryan MJ, White C, Chimonas T, Miller M. The two novel CETP mutations Gln87X and Gln165X in a compound heterozygous state are associated with marked hyperalphalipoproteinemia and absence of significant coronary artery disease. J Mol Med. 2006;84:647-50.

30. Hegele RA, Tu L, Connelly PW. Human hepatic lipase mutations and polymorphisms. Hum. Mutat. 1992;1:320-324.

31. Knudsen P, Antikainen M, Ehnholm S, Uusi-Oukari M, Tenkanen H, Lahdenpera S, Kahri J, Tilly-Kiesi M, Bensadoun A, Taskinen MR, Ehnholm C. A compound heterozygote for hepatic lipase gene mutations Leu334-->Phe and Thr383-->Met: correlation between hepatic lipase activity and phenotypic expression. J. Lipid Res. 1996;37:825-834.

32. Knudsen P, Antikainen M, Uusi-Oukari M, Ehnholm S, Lahdenpera S, Bensadoun A, Funke H, Wiebusch H, Assmann G, Taskinen MR, Ehnholm C. Heterozygous hepatic lipase deficiency, due to two missense mutations R186H and L334F, in the HL gene. Atherosclerosis. 1997;128:165-174.

33. Takagi A, Ikeda Y, Mori A, Ashida Y, Yamamoto A. Racial differences in polymorphic allele heterozygosities of the human hepatic triglyceride lipase gene. Mol Cell Probes. 1997;11:163-6.

34. deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. Circulation. 2002;106:1321-6.

35. Mank-Seymour AR, Durham KL, Thompson JF, Seymour AB, Milos PM. Association between single-nucleotide polymorphisms in the endothelial lipase
(LIPG) gene and high-density lipoprotein cholesterol levels. Biochim Biophys Acta. 2004;1636:40-6.

36. Hutter CM, Austin MA, Farin FM, Viernes HM, Edwards KL, Leonetti DL, McNeely MJ, Fujimoto WY. Association of endothelial lipase gene (LIPG) haplotypes with high-density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoprotein AI plasma levels in Japanese Americans. Atherosclerosis. 2006;185:78-86.

37. Shimizu M, Kanazawa K, Hirata K, Ishida T, Hiraoka E, Matsuda Y, Iwai C, Miyamoto Y, Hashimoto M, Kajiya T, Akita H, Yokoyama M. Endothelial lipase gene polymorphism is associated with acute myocardial infarction, independently of high-density lipoprotein-cholesterol levels. Circ J. 2007;71:842-6.

38. Takahashi K, Jiang XC, Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Bujo H, Yamazaki H, Kusunoki J, Miura T, Kussie P, et al. A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. J Clin Invest. 1993;92:2060-2064.

39. Nagano M, Yamashita S, Hirano K, et al. Point mutation (-69 G-->A) in the promoter region of cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:985-90.

40. Johannsen TH, Kamstrup PR, Andersen RV, et al. Hepatic lipase, genetically elevated high-density lipoprotein, and risk of ischemic cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:1264-73.

ภาคผนวก

ผลงานนี้ได้นำเสนอแบบ oral ในงานประชุม 1st BIT Life Sciences 1st World Congress of Endobolism 2011 เมื่อวันที่ 25-27 มกราคม 2554 ที่เมืองเซี่ยเหมิน สาธารณรัฐประชาชนจีน

ผลงานตีพิมพ์

1. Plengpanich W, Siriwong S, Khovidhunkit W. Two novel mutations and functional analyses of the CETP and LIPC genes underlying severe hyperalphalipoproteinemia. *Metabolism* 2009;58:1178-84.

2. Plengpanich W, Le Goff W, Poolsuk S, Julia Z, Guerin M, Khovidhunkit W. CETP deficiency due to a novel mutation in the CETP gene promoter and its effect on cholesterol efflux and selective uptake into hepatocytes. Atherosclerosis 2011;216:370-3.

3. Resequencing *CETP*, *LIPC* and *LIPG* genes in Thai subjects with hyperalphalipoproteinemia. Manucript submitted.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย): นายวีรพันธุ์ โชวิฑูรกิจ **ตำแหน่งทางวิชาการ:** รองศาสตราจารย์

(ภาษาอังกฤษ): Weerapan Khovidhunkit

ภาควิชา: อายุรศาสตร์ **คณะ/สถาบัน:** แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 0-2256-4101 **โทรสาร:** 0-2652-5347 **E-mail:** wkhovid@gmail.com

2. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย): ดร. วาณี เปล่งพานิชย์

(ภาษาอังกฤษ): Wanee Plengpanich

ภาควิชา: อายุรศาสตร์ **คณะ/สถาบัน:** แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 0-2256-4101 **โทรสาร :** 0-2652-5347 **E-mail:** wplengpanit@gmail.com

3. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย): นาย ปาล์ม ชาติยิ่งเจริญ

(ภาษาอังกฤษ): Palm Chartyingcharoen

ภาควิชา: อายุรศาสตร์ **คณะ/สถาบัน:** แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 0-2256-4101 **โทรสาร:**0-2652-5347 **E-mail:** magnams@hotnail.com

4. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาอังกฤษ): Dr. Wilfried LeGoff

สถาบัน: Hopital de la Pitie, INSERM

E-mail: legoff@chups.jussieu.fr