โครงการ : ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์ กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับบี

โดย ดร.วัชนันท์ วงศ์เสนา และคณะ

30 เมษายน 2556

สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2554B099

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับบี

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ดร.วัชนันท์ วงศ์เสนา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นายปัญญา ถุนนอก ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 19 ก.ค. 2556
เลขทะเบียน 1632976
เลขเรียกหนังสือ ว QC
648
.H44
ว3975
2556

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
Executive summary	5
บทนำ	6
วัตถุประสงค์	8
วัสดุ และวิธีการ	9
ผลการวิจัย	14
วิจารณ์และสรุป	23
เอกสารอ้างอิง	25
Output ที่ได้จากโครงการ	27
ภาคผนวก	28

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีพบได้ทั่วโลก ผลลัพธ์จากการติดเชื้อในบางคนภูมิคุ้มกันสามารถกำจัดเชื้อและสร้างแอนติบอดีได้ แต่ในบางคนไม่สามารถกำจัดเชื้อได้นำไปสู่การติดเชื้อแบบเรื้อรังซึ่งมีความเสี่ยงที่จะพัฒนาเป็นโรคตับแข็งและมะเร็งตับ ความแตกต่างของภูมิค้มกันในแต่ละบุคคลน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีผลลัพธ์จากการติดเชื้อที่ต่างกัน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNP) ของยีนไซโตไคน์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยศึกษาจำนวน 5 ยีนรวม 9 ตำแหน่งที่มีรายงานมาก่อนว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีน โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจากสภากาชาดไทยจำนวนทั้งสิ้น 359 รายแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง กลุ่มที่หายจากติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกัน และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยวิธี polymerase chain reaction sequence specific primer (PCR-SSP) พบว่า SNP ของยีน *IL-10* ณ ตำแหน่ง -1082 G/T พบว่าอัลลีล G (Odds ratio = 4.30, 95% confidence interval = 1.44-13.67, p = 0.003) และจีโนทัยป์ GG+GA (Odds ratio = 4.61, 95% confidence interval = 1.51-15.03, p = 0.002) มีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการติดเชื้อ และที่ตำแหน่ง -819 C/T พบว่าอัลลีล C (Odds ratio = 3.13, 95% confidence interval = 1.57-8.55, p = 0.011) และจีโนทัยป์ CC+CT (Odds ratio = 4.43, 95% confidence interval = 1.74-11.11, p <0.001) มีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มที่หายจากการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่ง -592 C/A พบว่าอัลลีล C (Odds ratio = 1.50, 95% confidence interval = 1.00-2.26, p = 0.040) และจีโนทัยป์ CC (Odds ratio = 2.89, 95% confidence interval = 1.21-6.73, p = 0.006) มีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เมื่อเทียบกับกลุ่มคนไม่ติดเชื้อและคนที่หายจากการติดเชื้อตามลำดับ ซึ่ง SNP ทั้ง 3 ตำแหน่งข้างต้นล้วนเป็นอัลลีลที่มีการแสดงออกของ IL-10 ระดับสูง ดังนั้นความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจาก IL-10 มีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันทำให้เซลล์ติดเชื้อไม่ถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเชื้อจึงเจริญต่อไปได้และเกิดการติดเชื้อเรื้อรังในที่สุด เมื่อวิเคราะห์แบบแฮพโพลทัยป์ก็พบว่า GCC และ ACC มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HBV แบบเรื้อรังเมื่อทียบกับคนปกติไม่ติดเชื้อและคนที่หายจากการติดเชื้อตามลำดับ ซึ่งทั้งสองแฮพโพลทัยป์นี้เป็นชนิดที่มีการแสดงออกสูง นอกจากนี้ยังพบว่า ACA มีความสัมพันธ์แบบลดความเสี่ยงการติดเชื้อแบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับแฮพโพลทัยป์ ATA ซึ่งเป็นแฮพโพลทัยป์ที่มีการแสดงออกของ IL-10 ระดับต่ำสุด ขณะที่ ACA มีการแสดงออกระดับปานกลาง จึงอาจเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่พอเหมาะเนื่องจาก IL-10 ทำหน้าที่รักษาสมดุลของ Th1 & Th2 response ส่วนการวิเคราะห์ SNP ของยีน TNF-α, IFN-γ, IL-6 และ TGF-β พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HBV ทั้งการวิเคราะห์แบบความถี่อัลลีล จีโนทัยป์ และแฮพโพลทัยป์ ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงสรุปว่า IL-10 มีบทบาทสำคัญต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is worldwide. The outcomes of infection compose of viral clearance and produce protective antibody, and some people with chronic infection who risk for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The different of immunity may be one of the risk factor. This research aimed to detect the polymorphism (SNP) of cytokine genes involved in immune response. Five genes with 9 SNPs were detected by polymerase chain reaction sequence specific primer (PCR-SSP). A total 359 blood donors obtained from The Thai Red Cross Society were divided to 3 groups; chronic HBV infection, recovery from HBV infection and healthy control who never infected with HBV. The genetic associations were found in SNPs of *IL-10* at position -1082 G/T allele G (Odds ratio = 4.30, 95% confidence interval = 1.44-13.67, p = 0.003) and genotype GG+GA (Odds ratio = 4.61, 95% confidence interval = 1.51-15.03, p = 0.002) as the risk factor for chronic infection comparing with healthy control. In addition, at -819 C/T, allele C (Odds ratio = 3.13, 95% confidence interval = 1.57-8.55, p = 0.011) and genotype CC+CT (Odds ratio = 4.43, 95% confidence interval = 1.74-11.11, p <0.001) were also correlated with increased risk for chronic infection when compared with recovery group. Furthermore, at -592 C/A, allele C (Odds ratio = 1.50, 95% confidence interval = 1.00-2.26, p = 0.040) and genotype CC (Odds ratio = 2.89, 95% confidence interval = 1.21-6.73, p = 0.006) were associated as the risk for chronic infection comparing with healthy control and recovery group, respectively. All 3 alleles of *IL-10* SNP found as the risk for chronic HBV, were previously reported as high producer. Thus the risk association may be the result of immune suppression activity of IL-10. For haplotype analysis, GCC and ACC, the high producer, also correlated with increased risk for chronic infection comparing with healthy control and recovery group, respectively. Furthermore, ACA, the moderate producer was associated as protective from chronic infection. This result was supported by the activity of IL-10 that regulate immune response by balance Th1 and Th2 cytokines. This study was not found the association between SNPs of TNF-α, IFN-γ, IL-6 and TGF-β, and the outcome of HBV infection. In conclusion, *IL-10* may play an importance role in the HBV outcome.

Executive summary

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 ในครั้งนี้ ซึ่งผลการวิจัยทำให้ทราบว่าความหลากหลายของยีนอินเตอร์ลิวกิน-10 เป็นปัจจัยเสี่ยงหนึ่งที่ทำให้การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นแบบเรื้อรัง เนื่องจากเป็น SNP ที่ทำให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์เพิ่มขึ้นซึ่งนำไปสู่การยับยั้ง Th1 cytokine และการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทำให้ไม่สามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้ เกิดการติดเชื้อเรื้อรังตามมา นอกจากนี้ยังพบแฮพโพลทัยป์ที่มีการแสดงออกของไซโตไคน์ระดับปานกลาง มีความสัมพันธ์แบบป้องกันการเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรังอีกด้วย ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้เข้าใจถึงกลไกที่ทำให้ผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความแตกต่างกัน

โครงการนี้ได้มีส่วนในการพัฒนาทักษะทางการวิจัยแก่นิสิต โดยแบ่งเป็นงานวิจัยของนิสิตระดับปริญญาตรีในรายวิชาโครงงานเทคนิคการแพทย์จำนวน 4 โครงงาน นิสิตทำโครงงานละ 3 คน รวม 12 คน และเป็นวิทยานิพนธ์นิสิตระดับปริญญาโท 1 คน นอกจากนี้วิธีการตรวจ SNP ด้วยวิธี PCR-SSP ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการศึกษาอื่นๆต่อไป เช่น การศึกษากลไกการเกิดมะเร็ง และโรคภูมิคุ้มกันต่อตนเอง เป็นต้น

สำหรับปัญหาและอุปสรรคที่ทำให้การดำเนินงานครั้งนี้เกิดความล่าช้า เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาความหลากหลายของยีนในส่วนโปรโมเตอร์และอินทรอนซึ่งตำแหน่งดังกล่าว มีลักษณะคล้ายคลึงกับบริเวณอื่นๆจึงทำให้จัดตั้งวิธีการตรวจได้ช้า ขณะนี้อยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ต่อไป

บทนำ

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus; HBV) เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วโลก และพบว่าเป็นสาเหตุการตายประมาณหนึ่งล้านคนต่อปี องค์การอนามัยโลกได้ประมาณจำนวนผู้ติดเชื้อตับอักเสบเรื้อรังทั่วโลกสูงถึง 350 ล้านคน (1) และกลุ่มคนเหล่านี้มีความเสี่ยงที่จะพัฒนาไปเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง โรคตับแข็งและมะเร็งตับต่อไป โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับเป็นผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูงถึง 80% (2) อย่างไรก็ตามผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 90-95% สามารถกำจัดเชื้อและหายได้ เหลืออีก 5-10% ที่ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ ทำให้เป็นพาหะหรือการติดเชื้อเรื้อรัง (3) ส่วนการติดเชื้อในเด็กนั้นแตกต่างไปคือพบการติดเชื้อเรื้อรังสูงถึง 90% ปัจจัยที่อาจทำให้ผู้ติดเชื้อแต่ละคนมีผลลัพธ์ที่ต่างกัน ได้แก่ ความแตกต่างของไวรัส (4) ความแตกต่างของพันธุกรรมของโฮสต์ (4-8) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (9-10) เป็นต้น

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายในการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้น อาศัยไซโตไคน์เป็นสื่อกลางในการกระตุ้นและยับยั้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ไซโตไคน์กลุ่ม Th1 ได้แก่ interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (IFN-gamma) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของ activated cytotoxic T lymphocyte ในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ ส่วนไซโตไคน์กลุ่ม Th2 ได้แก่ IL-4 และ IL-10 นั้น มีบทบาทในการกระตุ้น B lymphocyte ซึ่งทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี นอกจากนี้ยังมีไซโตไคน์กลุ่ม T regulatory ได้แก่ IL-10 และ Tumor growth factor-beta (TGF-beta) ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการกระตุ้น Th1 cell จากการทบทวนวรรณกรรม ไซโตไคน์กลุ่ม Th1 มีความสัมพันธ์กับการต้านทานต่อการติดเชื้อ (11) ส่วนไซโตไคน์กลุ่ม Th2 มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (12)

ความหลากหลายของยีน (single nucleotide polymorphism; SNP) ไซโตไคน์ทั้งในส่วนโปรโมเตอร์และเนื้อยีน พบว่ามีการรบกวนการแสดงออกของยีนหรือระดับของไซโตไคน์นั้น เช่น ยีน TNF-alpha ณ ตำแหน่ง -308 ถ้าเป็น A/A หรือ A/G จะสร้าง TNF- alpha ในระดับสูง แต่ถ้าเป็น G/G จะสร้าง TNF- alpha ในระดับต่ำ (13); ยีน IL-6 ณ ตำแหน่ง -174 ถ้าเป็น G/G หรือ G/C จะสร้าง IL-6 ในระดับสูง แต่ถ้าเป็น C/C จะสร้าง IL-6 ในระดับต่ำ (14); ยีน IFN-gamma ณ ตำแหน่ง +874 ถ้าเป็น T/T จะสร้าง IFN- gamma ในระดับสูง แต่ถ้าเป็น T/A จะสร้าง IFN- gamma ในระดับปานกลาง แต่ถ้าเป็น A/A จะสร้าง IFN- gamma ในระดับที่ต่ำ (15); ยีน IL-10 มี SNP 3 ตำแหน่งคือ -1082 (G/A), -819 (C/T) และ -592 (A/C) หากมี haplotype เป็น GCC, ACC, และ ATA จะสร้าง IL-10 ในระดับสูง, กลาง และต่ำ ตามลำดับ (16-17); ส่วนยีน TGF-beta มี SNP 2 ตำแหน่งคือ codon 10 (+869, T/C) และ codon 25 (+915, C/G) มี haplotype 9 แบบ และสร้าง TGF- beta ในระดับที่ต่างกันได้สามระดับ (18)

จากการทบทวนวรรณกรรม พบรายงานความความหลากหลายของยีนไซโตไคน์มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ (19) โดยเฉพาะอย่างยิ่งคนเอเชียมีความแตกต่างจากคนผิวขาวหลายยีน ได้แก่ IFN-gamma, IL-6, IL-10, และ TGF- beta ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความความหลากหลายของยีนไซโตไคน์ กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในคนเชื้อชาติไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความชุกของพาหะสูง

(>8% ของประชากร) ส่วนอเมริกาและยุโรปจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความชุกของพาหะต่ำ (<2% ของประชากร) (20-21) ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนเหล่านี้ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะนำไปพัฒนาแนวทางป้องกันและรักษาโรคนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของโฮสต์ ในส่วนโปรโมเตอร์และยีนไซโตไคน์ ประกอบด้วย IFN-gamma, IL-6, IL-10, TNF-alpha, และ TGF-beta ในประชากรไทย และความสัมพันธ์ต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

วัสดุ และวิธีการ

ระเบียบวิธีวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็น Case-control study

กลุ่มประชากรที่ศึกษา

กลุ่มตัวอย่างจำนวน 359 คนแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ

1) คนที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีการสร้าง Anti-HBs (HBV recovery) แล้วจำนวน 132 คน

2) คนที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและยังคงตรวจพบ HBs antigen นานเกิน 6 เดือน (HBV chronic carrier) จำนวน 101 คน

3) กลุ่มควบคุม (Control group) ได้จากคนที่มีสุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งหมายถึงผู้ที่มีผลตรวจ HBs antigen, Anti-HBs และ Anti-HBc เป็นลบจำนวน 126 คน

โดยทั้งสามกลุ่มเป็นคนเชื้อชาติไทย ที่มาบริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และผ่านการคัดกรองประวัติการเจ็บป่วยจากแบบสอบถามสำหรับคุณสมบัติของผู้บริจาคโลหิตแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มที่เหลือจากการตรวจ HBs antigen จากงานประจำ มาตรวจหา anti-HBs และ anti-HBc โดยวิธี ELISA (Biorad) แล้วแยกเป็น 3 กลุ่มตัวอย่างข้างต้น

การสกัด DNA

นำตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง Acid citrate dextrose รายละ 5 ml นำมาสกัด DNA โดยวิธี Guanidine thiocyanate ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำ Citrated Blood 5 ml ไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 g นาน 10 นาที แยกพลาสมาออก แล้วเติม Cell lysis buffer 5 ml แล้ว mix โดยใช้ vortex แล้วนำไปปั่นอีกครั้งแล้วทิ้ง Supernatant ทำซ้ำ 3 ครั้งหรือจนกระทั่งไม่เห็นสีแดงของเม็ดเลือดแดงที่ pellet

2. เติม Protienase K 1.5 µl แล้ว mix โดยใช้ Brief vortex แล้ว Incubate 55 °C นาน 3-6 ชั่วโมงจากนั้นนำหลอดตัวอย่างออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Protein precipitation solution 100 µl ลงใน Cell lysate แล้ว mix โดยใช้ vortex 10-20 วินาที ปั่นที่ความเร็วสูง 13,000 rpm นาน 5 นาที ดูด supernatant ใส่ Microcentrifuge tube 1.5 ml หลอดใหม่

4. ทำการตกตะกอน DNA โดยเติม Isopropanol 300 µl แล้ว Mix แบบ Invert เบาๆ 50 ครั้ง ปั่น 13,000 rpm นาน 5 นาที เท Supernatant ทิ้ง

5. ทำการล้าง DNA โดยเติม 70% Ethanol แล้ว Invert tube หลายๆครั้ง ปั่น 13,000 rpm นาน 5 นาที แล้วเทส่วน Supernatant ทิ้ง ทำให้แห้งด้วยอากาศโดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ข้ามคืน

6. ละลาย DNA โดยเติม 1X TE 100 µl แล้ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นเก็บ DNA ที่ -20 °C

การตรวจหาความหลากหลายของยีน *IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, TGF-beta*

1. ทำการออกแบบ primer โดยใช้ลำดับนิวคลิโอไทด์อ้างอิง ดังตาราง 1

ตาราง 1 ลำดับนิวคลิโอไทด์อ้างอิงของยีน *IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, TGF-beta*

ยีน	Accession number
IL-10	NG_012088
TNF-alpha	NT_007592.15
IFN-gamma	NG_015840.1
IL-6	NG_011640.1
TGF-beta	NG_013364

2. ทำการตรวจ SNP ของยีน *IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, TGF-beta* รวม 9 ตำแหน่งโดยวิธี Polymerase chain reaction sequence specific primer (PCR-SSP) ในกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ primer ดังตารางที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์จากยีนที่เป็น internal control ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 Primer สำหรับการทำ PCR เพื่อตรวจ SNPs ทั้ง 9 ตำแหน่ง

Gene	Polymorphism	Primer name	Primer sequence (5'...3')	Product
IL-10	-1082 A/G	IL1003	F: CTAAGGCTTCTTTGGGAA	579 bp
		IL1004	F: CTAAGGCTTCTTTGGGAG	
		IL1002	R : GGTGGGCTAAATATCCTC	
	-819 T/C	IL1013	F: AACTGGCTCCCCTTACCT	382 bp
		IL1005	R : AAACTGAGGCACAGAGATA	
		IL1006	R : AAACTGAGGCACAGAGATG	
	-592A/C	IL1014	F: ATCCAAGACAACACTACTAA	541 bp
		IL1007	R : AGACTGGCTTCCTACAGT	
		IL1008	R : AGACTGGCTTCCTACAGG	
TNF-alpha	-308 G/A	TNF08	F: AGGTTTTGAGGGGCATGG	182 bp
		TNF03	F: AGGTTTTGAGGGGCATGA	
		TNF04	R : CTCGGTTTCTTCTCCATCG	
	-238 G/A	TNF01	F: TCAAGCCTGCCACCAAGC	327 bp
		TNF06	R : TCCCCATCCTCCCTGCTCC	
		TNF07	R : TCCCCATCCTCCCTGCTCT	

Gene	Polymorphism	Primer name	Primer sequence (5'...3')	Product
IFN-gamma	+874 A/T	IFN03	F: TTATNCTTACAACACAAAATC A AATCA	267 bp
		IFN04	F : TTATNCTTACAACACAAAATC A AATCT	
		IFN05	R : TCAACAAAGCTGATACTCCA	
IL-6	-174 C/G	IL601	R: GAG CTT CTC TTT CGT TCC	230 bp
		IL602	F: CCT AGT TGT GTC TTG CC	
		IL603	F : CCC TAG TTG TGT CTT GCG	
TGF-beta	-509 T/C	TGF08 T	F: TCCTGACCCTTCCATCCT	207 bp
		TGF09 C	F : TCCTGACCCTTCCATCCC	
		TGF05	R : GTCACCAGAGA AAGAGGAC	
	+869 T/C	TGF01	F: TCCGTGGGATACTGAGACAC	233 bp
		TGF02	R : ACAGCAGCGGTAGCAGCA	
		TGF03	R : ACAGCAGCGGTAGCAGCG	

ตารางที่ 3 Internal control primer สำหรับการตรวจ SNPs ของยีนต่างๆ

Gene	Internal control for SNPs of	Primer name; Primer sequence (5'...3')	Product
Human actin	*IL-10, TNF-alpha*	Actin 1: CTA ACA CTG GCT CGT GTG ACA AG	751 bp
		Actin 2: CAT GCC TGA GAG GGA AAT GAG	
Human growth hormone	*IFN-gamma, IL-6, TGF-beta*	HGH 3: GCCTTCCCAACCATTCCCTTA	429 bp
		HGH 4: TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	

ปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวม 13 µl ส่วนผสมแสดงดังตารางที่ 4 โดยแต่ละตำแหน่งของ SNP จะทำปฏิกิริยา 2 หลอดซึ่งตรวจหาอัลลีลที่ต่างกัน โดยส่วนผสมจะต่างกันที่ไพรเมอร์จำเพาะกับอัลลีลเท่านั้น

ตารางที่ 4 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับการตรวจหา SNP

Component	Volume (13 µl)	Final concentration
10xPCR buffer	1.30 µl	1X
50 mM MgCl2	0.52 µl	2.0 mM
10 mM dNTP	0.26 µl	0.2 mM
10 µM Forward SNP Primer	0.50 µl	0.38 µM
10 µM Reverse SNP Primer	0.50 µl	0.38 µM
10 µM Forward internal control Primer	0.13 µl	0.1 µM
10 µM Reverse internal control Primer	0.13 µl	0.1 µM
5U/µl *Taq* polymerase	0.05 µl	0.5 U
100 ng/µl DNA	1.00 µl	100 ng
DW	Add to 13 µl	

ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermocycler (TECHNE UK. รุ่น TC412, UK) ใช้ PCR profile ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดง PCR profile สำหรับทำ PCR สำหรับการตรวจหา SNP

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial Denaturing	95	5 นาที	1
Denaturing	95	30 วินาที	35
Annealing	65 สำหรับรอบที่ 1-5 62 สำหรับรอบที่ 6-25 55 สำหรับรอบที่ 26-35	30 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final Extension	72	10 นาที	1
Holding	25	∞	-

ตรวจสอบ PCR product โดยทำ gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น Agarose 2% ใน 0.5X TBE buffer ใช้เครื่อง Gel electrophoresis (COSMOB10 รุ่น IMR-001, USA) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 135 โวลท์ เวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย 0.5 µg/ml Ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นเจลที่ย้อมเสร็จแล้วไปดู PCR product ภายใต้แสง UV

3. ยืนยันผลอัลลีลละอย่างน้อย 2 รายโดยการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ โดยการทำ PCR ให้คร่อมตำแหน่งที่เกิด SNP โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นจึงทำการ purify PCR product โดยใช้ Gel/PCR DNA fragment extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan) และส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์

ตารางที่ 6 Primer สำหรับการทำ PCR เพื่อตรวจลำดับนิวคลิโอไทด์

Gene, position	Primer name	Primer Sequences (5'...3')	Product
IL-10	IL1001	F : GAAGTCCTGATGTCACTG	724 bp
	IL1002	R : GGTGGGCTAAATATCCTC	
TNF-alpha	TNF01	F : TCAAGCCTGCCACCAAGC	582 bp
	TNF02	R : GTCCTCTGCTGTCCTTGC	
IFN-gamma	IFN02	F : ATGATTCTGGCTAAGGAATG	525 bp
	IFN06	R : ACTCCAAAGGTCCCAAAAACTA	
IL-6	IL605	F : G TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG CGG AG	344 bp
	IL601	R : GAG CTT CTC TTT CGT TCC	
TGF-beta -509	TGF04	F : CAGACTCTAGAGACTGTCAG	418 bp
	TGF05	R : GTCACCAGAGA AAGAGGAC	
TGF-beta +869	TGF06	F : CCTCCCCACCACACCAG	268 bp
	TGF07	R : CGGCACCTCCCCCTGGCTCG	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. วิเคราะห์ผลโดยการหา allele frequency, phenotype frequency และ haplotype frequency โดย direct counting หาความสัมพันธ์โดย Odds ratio และเปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 กลุ่มโดย Chi square test จากโปรแกรม Epi Info version 6

2. วิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg equilibrium โดย Chi square test จากโปรแกรม OEGE – Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies

ผลการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างประชากรที่นำมาศึกษานี้มีลักษณะข้อมูลแสดงดังตารางที่ 7 จากการวิเคราะห์การกระจายของเพศระหว่างกลุ่มพบว่ามีความความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (<0.001) ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุระหว่างกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.179)

ตารางที่ 7 คุณลักษณะกลุ่มตัวอย่างประชากรที่ศึกษา

Characteristics	Chronic HBV infection (%) N = 101	Recovery from HBV infection (%) N =132	Healthy control (%) N= 126
Sex			
Female	39 (38.6)	62 (46.8)	88 (69.8)
Male	62 (61.4)	70 (53.2)	38 (30.2)
Age (y)			
Mean ± SD	34.2 ± 8.6	40.2 ± 9.8	36.1 ± 9.2
Range	19-58	21-59	19-60

ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของ SNP ทั้ง 9 ตำแหน่งของผู้ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 8-12 ส่วนผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการติดเชื้อและผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแสดงดังตารางที่ 13 การวิเคราะห์ตามความถี่แฮพโลทัยป์ของ IL-10 และความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แสดงดังตารางที่ 14 และ 15 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 แสดงการกระจายความถี่ของ Allele และ genotype ของยีน *IL-10*

Cytokine SNP	Chronic HBV infection n (%)	Recovery from HBV infection n (%)	Healthy control n (%)	Total n (%)	HWE χ^{2}*
IL-10 -1082 Genotypes					
AA	84 (84.0)	116 (87.9)	121 (96.0)	321 (89.7)	0
GA	16 (16.0)	15 (11.4)	5 (4.0)	36 (10.0)	
GG	0	1 (2.5)	0	1 (0.3)	
Alleles					
A	184 (92.0)	247 (93.6)	247 (98.0)	678 (94.7)	
G	16 (8.0)	17 (6.4)	5 (2.0)	38 (5.3)	
IL-10 -819 Genotypes					
TT	42 (42.0)	42 (37.5)	51 (41.5)	135 (40.3)	8.28
TC	33 (33.0)	62 (55.4)	40 (32.5)	135 (40.3)	
CC	25 (25.0)	8 (7.1)	32 (26.0)	65 (19.4)	
Alleles					
T	117 (58.5)	146 (65.2)	142 (57.7)	504 (60.4)	
C	83 (41.5)	78 (34.8)	104 (42.3)	265 (39.6)	
IL-10 -592 Genotypes					
AA	46 (45.5)	49 (43.4)	70 (55.1)	165 (48.4)	13.59
CA	31 (30.7)	53 (46.9)	38 (29.9)	122 (35.8)	
CC	24 (23.8)	11 (9.7)	19 (15.0)	54 (15.8)	
Alleles					
A	123 (60.9)	151 (66.8)	178 (70.1)	452 (66.3)	
C	79 (39.1)	75 (33.2)	76 (29.9)	230 (33.7)	

*χ^{2} >3.84 มีค่า p value <0.05, *χ^{2} >6.63 มีค่า p value <0.01, *χ^{2} >7.88 มีค่า p value <0.005, *χ^{2} >10.83 มีค่า p value <0.001

ตารางที่ 9 แสดงการกระจายความถี่ของ Allele และ genotype ของยีน *TNF-alpha*

Cytokine SNP	Chronic HBV infection n (%)	Recovery from HBV infection n (%)	Healthy control n (%)	Total n (%)	HWE χ^{2}*
TNF-α -308 Genotypes					
GG	81 (81.99)	73 (72.3)	71 (85.5)	225 (78.9)	0.7
GA	20 (18.02)	26 (25.7)	12 (14.5)	58 (20.4)	
AA	0	2 (2.0)	0	2 (0.7)	
Alleles					
G	182 (90.1)	172 (85.1)	154 (92.8)	508 (89.1)	
A	20 (9.9)	30 (14.9)	12 (7.2)	62 (10.9)	
TNF-α -238 Genotypes					
GG	95 (93.1)	86 (88.7)	76 (91.6)	257 (91.1)	0.61
GA	7 (6.9)	11 (11.3)	7 (8.4)	25 (8.9)	
AA	0	0	0	0	
Alleles					
G	197 (96.6)	183 (94.3)	159 (95.8)	539 (95.6)	
A	7 (3.4)	11 (5.7)	7 (4.2)	25 (4.4)	

*χ^{2} >3.84 มีค่า p value <0.05, *χ^{2} >6.63 มีค่า p value <0.01, *χ^{2} >7.88 มีค่า p value <0.005, *χ^{2} >10.83 มีค่า p value <0.001

ตารางที่ 10 แสดงการกระจายความถี่ของ Allele และ genotype ของยีน *IFN-gamma*

Cytokine SNP	Chronic HBV infection n (%)	Recovery from HBV infection n (%)	Healthy control n (%)	Total n (%)	HWE χ^{2}*
IFN-γ +874 Genotypes					
AA	60 (59.4)	67 (55.4)	48 (57.8)	175 (57.4)	3.32
AT	34 (33.7)	47 (38.8)	23 (27.7)	104 (34.1)	
TT	7 (6.9)	7 (5.8)	12 (14.5)	26 (8.5)	
Alleles					
A	154 (76.2)	181 (74.8)	119 (71.7)	454 (74.4)	
T	48 (23.8)	61 (25.2)	47 (28.3)	156 (25.6)	

*χ^{2} >3.84 มีค่า p value <0.05, *χ^{2} >6.63 มีค่า p value <0.01, *χ^{2} >7.88 มีค่า p value <0.005, *χ^{2} >10.83 มีค่า p value <0.001

ตารางที่ 11 แสดงการกระจายความถี่ของ Allele และ genotype ของยีน *IL-6*

Cytokine SNP	Chronic HBV infection n (%)	Recovery from HBV infection n (%)	Healthy control n (%)	Total n (%)	HWE χ^{2}*
IL-6 -174 Genotypes					
GG	98 (99.0)	82 (99.8)	96 (97.0)	276 (98.2)	0.02
GC	1 (1.0)	1 (1.2)	3 (3.0)	5 (1.8)	
CC	0	0	0	0	
Alleles					
G	197 (99.5)	165 (99.4)	195 (98.5)	557 (99.1)	
C	1 (0.5)	1 (0.6)	3 (1.5)	5 (0.9)	

*χ^{2} >3.84 มีค่า p value <0.05, *χ^{2} >6.63 มีค่า p value <0.01, *χ^{2} >7.88 มีค่า p value <0.005, *χ^{2} >10.83 มีค่า p value <0.001

ตารางที่ 12 แสดงการกระจายความถี่ของ Allele และ genotype ของยีน *TGF-beta*

Cytokine SNP	Chronic HBV infection n (%)	Recovery from HBV infection n (%)	Healthy control n (%)	Total n (%)	HWE χ^{2}*
TGF-β -509 Genotypes					
TT	30 (34.1)	29 (26.4)	29 (29.9)	88 (29.8)	2.86
TC	45 (51.1)	60 (54.5)	54 (55.7)	159 (53.9)	
CC	13 (14.8)	21 (19.1)	14 (14.4)	48 (16.3)	
Alleles					
T	105 (59.7)	118 (53.6)	112 (57.7)	335 (56.8)	
C	71 (40.3)	102 (46.4)	82 (42.3)	255 (43.2)	
TGF-β +869 Genotypes					
TT	28 (31.8)	25 (32.5)	32 (35.2)	85 (33.2)	8.84
TC	50 (56.8)	44 (57.1)	50 (54.9)	144 (56.3)	
CC	10 (11.4)	8 (10.4)	9 (9.9)	27 (10.5)	
Alleles					
T	106 (60.2)	94 (61.0)	114 (62.6)	314 (61.3)	
C	70 (39.8)	60 (39.0)	68 (37.4)	198 (38.7)	

*χ^{2} >3.84 มีค่า p value <0.05, *χ^{2} >6.63 มีค่า p value <0.01, *χ^{2} >7.88 มีค่า p value <0.005, *χ^{2} >10.83 มีค่า p value <0.001

ตาราง 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง SNP แต่ละตำแหน่งกับการติดเชื้อผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HBV

Cytokine SNP	Chronic vs. recovery from HBV infection		Chronic HBV infection vs. healthy control	
	Odds ratio (95% CI)	P value	Odds ratio (95% CI)	P value
IL-10 -1082 Genotypes				
GG+GA/AA	1.47 (0.65-3.35)	0.315	4.61 (1.51-15.03)	0.002*
Alleles				
G/A	1.26 (0.59-2.71)	0.517	4.30 (1.44-13.67)	0.003*
IL-10 -819 Genotypes				
CC+CT/TT	4.43 (1.74-11.11)	<0.001*	0.98 (0.55-1.73)	0.936
Alleles				
C/T	3.13 (1.57-8.55)	0.011*	0.97 (0.65-1.44)	0.869
IL-10 -592 Genotypes				
CC/CA+AA	2.89 (1.21-6.73)	0.006*	1.77 (0.86-3.65)	0.091
Alleles				
C/A	1.29 (0.85-1.96)	0.202	1.50 (1.00-2.26)	0.040*
TNF-α -308 Genotypes				
GG/GA+AA	1.55 (0.77-3.15)	0.186	0.68 (0.29-1.60)	0.341
Alleles				
G/A	1.59 (0.84-3.03)	0.131	0.71 (0.31-1.58)	0.365
TNF-α -238 Genotypes				
GG/GA+AA	1.74 (0.59-5.23)	0.271	1.25 (0.37-4.18)	0.688
Alleles				
G/A	1.69 (0.59-4.95)	0.283	1.24 (0.38-4.02)	0.693
IFN-γ +874 Genotypes				
AA/AT+TT	1.18 (0.67-2.09)	0.545	1.07 (0.38-4.02)	0.829
Alleles				
A/T	1.08 (0.68-1.71)	0.725	1.27 (0.77-2.08)	0.321

ตาราง 13 (ต่อ)

Cytokine SNP	Chronic vs. recovery from HBV infection		Chronic HBV infection vs. healthy control	
	Odds ratio (95% CI)	P value	Odds ratio (95% CI)	P value
IL-6 -174 Genotypes				
GG/GC+CC	1.20 (0.0-44.48)	1.000	3.06 (0.26-77.78)	0.621
Alleles				
G/C	1.19 (0.0-43.99)	1.000	3.03 (0.28-76.25)	0.623
TGF-β -509 Genotypes				
TT/TC+CC	1.44 (0.75-2.79)	0.237	1.21 (0.62-2.36)	0.541
Alleles				
T/C	1.28 (0.84-1.95)	0.230	1.08 (0.70-1.67)	0.707
TGF-β +869 Genotypes				
TT/TC+CC	0.97 (0.48-1.97)	0.929	0.86 (0.44-4.68)	0.635
Alleles				
T/C	0.97 (0.61-1.54)	0.880	0.90 (0.58-1.41)	0.639

*p<0.05

ตาราง 14 การกระจายความถี่แฮพโพลทัยป์ IL-10 และ TNF-α

Haplotype	Chronic HBV infection n (%)	Recovery from HBV infection n (%)	Healthy control n (%)	Total n (%)
IL-10 (-1082, -819, -592)				
ATA	109 (54.5)	149 (62.6)	135 (55.3)	393 (57.6)
ACC	61 (30.5)	48 (20.2)	62 (25.4)	171 (25.1)
GCC	14 (7.0)	17 (7.1)	5 (2.1)	36 (5.3)
ACA	8 (4.0)	15 (6.3)	36 (14.75)	59 (8.7)
ATC	6 (3.0)	9 (3.8)	6 (2.5)	21 (3.1)
GCA	2 (1.0)	0	0	2 (0.3)
TNF−α (-308, -238)				
GG	178 (87.3)	177 (81.2)	147 (88.6)	502 (85.4)
AG	19 (9.3)	29 (13.3)	11 (6.6)	59 (10.0)
GA	5 (2.1)	8 (3.7)	7 (4.2)	20 (3.4)
AA	2 (1.0)	4 (1.8)	1 (0.6)	7 (1.2)

ตาราง 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่แฮพโพลทัยป์ IL-10 กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HBV

Haplotype	Chronic vs. recovery from HBV infection		Chronic HBV infection vs. healthy control	
	Odds ratio (95% CI)	P value	Odds ratio (95% CI)	P value
IL-10 (-1082, -819, -592)				
ATA	Reference		Reference	
ACC	1.57 (0.97-2.54)	0.0498*	1.22 (0.77-1.93)	0.372
GCC	1.02 (0.45-2.29)	0.959	3.47 (1.12-11.41)	0.015*
ACA	0.66 (0.25-1.73)	0.361	0.28 (0.11-0.65)	<0.001*
ATC	0.83 (0.25-2.63)	0.724	1.24 (0.34-4.48)	0.717
ACC+GCC	1.43 (0.92-2.22)	0.093	1.39 (0.90-2.15)	0.122
TNF−α (-308, -238)				
GG	Reference		Reference	
AG+GA+AA	0.63 (0.36-1.11)	0.089	1.13 (0.58-2.22)	0.704

*p<0.05

วิจารณ์และสรุป

กลุ่มตัวอย่างประชากรที่ศึกษาครั้งนี้ทั้ง 3 กลุ่มมีอายุเฉลี่ยไม่แตกต่างกันแต่มีเพศที่แตกต่างกัน โดยพบว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อทั้งติดเชื้อแบบเรื้อรังและหายจากการติดเชื้อแล้วมีสัดส่วนเพศชายมากกว่าเพศหญิง ขณะที่ผู้ไม่ติดเชื้อ HBV มีสัดส่วนผู้หญิงมากกว่าเพศชายทั้งนี้อาจเนื่องจากพฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อแตกต่างกัน เช่น พฤติกรรมทางเพศสัมพันธ์ เป็นต้น

การตรวจ SNP ทั้ง 5 ยีน รวม 9 ตำแหน่งโดยวิธี PCR-SSP ที่พัฒนาขึ้นในสำหรับการศึกษานี้มีความน่าเชื่อถือ นั่นคือให้ขนาด PCR product ที่ถูกต้อง ชัดเจน และมีความจำเพาะ เมื่อตรวจยืนยันด้วยการส่งตรวจลำดับนิวคลิโอไทด์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานก็พบว่าให้ผลที่ตรงกัน

กลุ่มประชากรที่ศึกษาครั้งนี้มีการกระจายความถี่ของอัลลีลไม่ได้เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium ทุกตำแหน่งอาจเนื่องจากเป็นการคัดเลือกตาม HBV marker ที่กำหนดไว้ไม่ได้เลือกแบบสุ่มทั้งหมด

ผลของความถี่อัลลีล จีโนไทป์และแฮพโพลทัยป์ของกลุ่มตัวอย่างรวมมีความสอดคล้องและใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประชากรไทย (22) ซึ่งแตกต่างจากประชากร Caucasian, African, Chinese และ Japanese จึงเป็นที่น่าสนใจว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความไวหรืออุบัติการณ์การเกิดโรคบางชนิดมีความแตกต่างกัน รวมถึงผลลัพธ์ของการติดเชื้อที่แตกต่างกัน

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HBV พบว่า SNP ของยีน *IL-10* ณ ตำแหน่ง -1082 G/T พบว่าอัลลีล G และจีโนทัยป์ GG+GA มีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการติดเชื้อ HBV ในขณะที่ตำแหน่ง -819 C/T พบว่าอัลลีล C และจีโนทัยป์ CC+CT มีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มที่หายจากการติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่ง -592 C/A พบว่าอัลลีล C และจีโนทัยป์ CC มีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มคนไม่ติดเชื้อและคนที่หายจากการติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกันตามลำดับ ซึ่ง SNP ทั้ง 3 ตำแหน่งข้างต้นล้วนเป็นลัลลีลที่มีการแสดงออกของ IL-10 ระดับสูง (14-16) ดังนั้น SNP ที่เกิดขึ้นนี้อาจเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการติดเชื้อ HBV เรื้อรัง เนื่องจาก IL-10 มีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน ทำให้เซลล์ติดเชื้อไม่ถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เชื้อเจริญต่อไปได้ และเกิดการติดเชื้อเรื้อรังในที่สุด เมื่อวิเคราะห์แบบแฮพโพลทัยป์ พบว่าความถี่ใกล้เคียงกับการศึกษาในคนไทยก่อนหน้านี้ (22) ซึ่งแตกต่างจากประชากร Caucasian, African, Mexican และ Chinese และพบว่า ACA ซึ่งเป็นแฮพโพลทัยป์ซึ่งไม่มีรายงานในประชากรอื่น ยกเว้นในคนไทยเท่านั้น มีข้อดีคือมีความสัมพันธ์แบบลดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เมื่อเทียบกับแฮพโพลทัยป์ ATA ซึ่งเป็นแฮพโพลทัยป์ที่มีการแสดงออกของ IL-10 ระดับต่ำสุด ขณะที่ ACA มีการแสดงออกระดับปานกลาง จึงอาจเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่พอเหมาะเนื่องจาก IL-10 ทำหน้าที่รักษาสมดุลของ Th1 & Th2 response นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าแฮพโพลทัยป์ GCC และ ACC มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HBV แบบเรื้อรังเมื่อเทียบกับคนปกติไม่ติดเชื้อและคนที่ติดเชื้อแต่หายจากการติดเชื้อตามลำดับ ซึ่งทั้งสองแฮพโพลทัยป์นี้เป็นชนิดที่มีการแสดงออกสูงดังนั้นจึงมีผลต่อการกดภูมิคุ้มกันได้

การวิเคราะห์ SNP ของยีน *TNF-α, IFN-γ, IL-6* และ *TGF-β* พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HBV ทั้งการวิเคราะห์แบบความถี่อัลลีล จีโนทัยป์ และแฮพโพลทัยป์ ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงสรุปว่า IL-10 มีบทบาทสำคัญต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

16329576

สำนักหอสมุด

เอกสารอ้างอิง

1. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol. 2005;5(3):215-29.
2. Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B Virus. In: Knipe DM et al., eds. Fields Virology, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2971-3036.
3. Höhler T, Kruger A, Schneider PM, Schopf RE, Knop J, Rittner C, Meyer zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. J Invest Dermatol. 1997;109(4):562-5.
4. Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol. 2003;9(4):641-4.
5. Abel L, Dessein AJ. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases. Curr Opin Immunol. 1997;9(4):509-16.
6. McNicholl J. Host genes and infectious diseases. Emerg Infect Dis. 1998;4(3):423-6.
7. McNicholl JM, Cuenco KT. Host genes and infectious diseases. HIV, other pathogens, and a public health perspective. Am J Prev Med. 1999;16(2):141-54.
8. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature. 1994;371(6497):508-10.
9. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol. 1995;3:29-60.
10. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. Annu Rev Immunol. 2001;19:65-91.
11. Penna A, Del Prete G, Cavalli A, Bertoletti A, D'Elios MM, Sorrentino R, D'Amato M, Boni C, Pilli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. Hepatology. 1997;25(4):1022-7.
12. Bertoletti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. Gastroenterology. 1997;112(1):193-9.

19 ก.ค. 2556
? BC
614
.H44
2556

13. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(7):3195-9.

14. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998;102(7):1369-76.

15. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. Eur J Immunogenet. 1999;26(1):1-3.

16. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997;24(1):1-8,

17. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. : Tissue Antigens. 1999;54(4):386-90.

18. He B, Xu C, Yang B, Landtblom AM, Fredrikson S, Hillert J. Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1998;86(1):13-9.

19. Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. Am J Transplant. 2002;2(6):560-7.

20. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. Clin Microbiol Rev. 1999;12(2):351-66.

21. Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M. Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. Bull World Health Organ. 1999;77(10):801-7.

22. Sodsai P, Nakkuntod J, Kupatawintu P, Hirankarn N. Distribution of cytokine gene polymorphisms in Thai population. Tissue Antigens. 2011 Jun;77(6):593-7.

Output ที่ได้จากโครงการ

โครงการนี้ได้จัดแบ่งให้นิสิตระดับปริญญาตรีได้ทำในรายวิชาโครงงานเทคนิคการแพทย์ จำนวนทั้งสิ้น 4 โครงงาน และวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตปริญญาโทอีก 1 เรื่อง รายละเอียดดังนี้

โครงงาน/วิทยานิพนธ์	นิสิตผู้ทำวิจัย	ปีที่สำเร็จการศึกษา
1. ความหลากหลายของยีน Interleukin-10 ในคนไทยที่มีสุขภาพดี	1. นายมาณพ แสนสุข 2. นายวทัญญู อุปปิง 3. นายภัคพล วงค์ไชยา	2554
2. ความหลากหลายของยีน Tumor necrosis factor-α ในคนไทยสุขภาพดี	1. น.ส.ฐิติมา สัมพันธ์อภัย 2. น.ส.สุธาสินี พินิจกรรณ์ 3. น.ส.พุริยา สุวรรณพฤกษ์	2554
3. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรม ของยีน IFN-γ ณ ตำแหน่ง +874 (T/A) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	1. นายนพดล ช้างน้อย 2. น.ส.ประภาศรี วิญญารักษ์ 3. น.ส.อัจฉราวี แก้วเพ็ญพันธุ์	2555
4. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน อินเตอร์ลิวกิน-6 ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	1. นายภัทร จันทาพูน 2. น.ส.วราภรณ์ ยงทอง 3. น.ส.ศรัญญา หอมแก่นจันทร์	2556
5. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน อินเตอร์ลิวกิน-10 อินเตอร์เฟอรอน-แกมมา และทูเมอร์เรโครซิสแฟคแตอร์-อัลฟ่ากับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	1. นายปัญญา ถุนนอก	คาดว่า 2556

โครงงานลำดับที่ 1 ถึง 4 ได้ส่งรูปเล่มโครงงานฉบับสมบูรณ์แล้วและได้นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานแสดงโปสเตอร์ของนิสิตคณะสหเวชศาสตร์ซึ่งจัดเป็นประจำทุกปี ส่วนลำดับที่ 5 อยู่ระหว่างการตรวจรูปเล่มวิทยานิพนธ์และการเขียนต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่

ได้วิธีการตรวจ SNP สำหรับไซโตไคน์ด้วยวิธี PCR-SSP ซึ่งสามารถนำไปศึกษาในโรคอื่นได้ต่อไป

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1.	Cell lysis buffer		
	100 mM NaCl	0.5844	กรัม
	100 mM Tris-Cl pH 8.0	1.211	กรัม
	25 mM EDTA pH 8.0	0.9306	กรัม
	0.5% SDS	0.50	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร
2.	Protein precipitation solution		
	4 M Guanidine Thiocycnate	23.63	กรัม
	0.1 M Tris-Cl (pH 7.5)	0.61	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50	มิลลิลิตร
3.	Proteinase K (20 mg/ml)		
	Proteinase K	4	มิลลิกรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200	ไมโครลิตร
4.	70% Ethanol		
	Absolute Ethanol	35	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร
5.	1X TE, pH 8.0		
	Tris-Cl	0.061	กรัม
	EDTA	0.018	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50	มิลลิลิตร
6.	6X Gel loading buffer		
	Bromphenol blue (BPB)	0.025	กรัม
	Glycerol	5	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร
7.	5X TBE buffer (pH 8.0)		
	Tris-Cl	54	กรัม
	Boric acid	27.5	กรัม
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร
8.	2% Agarose gel		
	Agarose gel	2	กรัม
	0.5X TBE buffer	100	มิลลิลิตร

ความหลากหลายของยีน Interleukin-10 ในคนไทยที่มีสุขภาพดี

Interleukin-10 Polymorphism in Healthy Thais

มาณพ แสนสุข
วทัญญู อุปปิง
ภัคพล วงค์ไชยา

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีการศึกษา 2553

ความหลากหลายของยีน Tumor necrosis factor-α ในคนไทยสุขภาพดี

Polymorphism of *Tumor necrosis factor-α* in healthy Thais

ฐิติมา สัมพันธ์อภัย
สุธาสินี พินิจกรรณ์
พุริยา สุวรรณพฤกษ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีการศึกษา 2553

ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน IFN-γ ณ ตำแหน่ง +874 (T/A) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

Association of IFN-γ gene polymorphism at position +874 (T/A) with the outcome of hepatitis B virus infection

นายนพดล ช้างน้อย

นางสาวประภาศรี วิญญารักษ์

นางสาวอัจฉราวี แก้วเพ็ญพันธุ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2554

ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนอินเตอร์ลิวกิน-6 ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

Association of *Interleukin-6* gene polymorphism at position -174 (G/C) with the outcome of hepatitis B virus infection

ภัทร จันทาพูน

วราภรณ์ ยงทอง

ศรัญญา หอมแก่นจันทร์

โครงงานวิชาชีพนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2555