

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

บทบาทของปัจจัยด้านพันธุกรรมของยีน glutathione S-transferase ต่อความเสี่ยงการเกิด  
โรคตับและระบบท่อน้ำดีในผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในชุมชนที่มีอุบัติการณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีสูง  
ในจังหวัดขอนแก่น

Roles of host genetic polymorphism of glutathione S-transferase genes as risk factor for  
hepatobiliary disease in opisthorchiasis in area with high incidence of cholangiocarcinoma  
in Khon Kaen Province

รศ.ดร.ไพฑูรย์ สิทธิถาวร

ศ.พญ.เอมอร ไม้เรียง

รศ.ดร.ธิดารัตน์ บุญมาศ

รศ.ดร.นิษนา นามวาท

รศ.พญ.จิราพร สิทธิถาวร

รศ.ดร.เทวราช หล้าหา

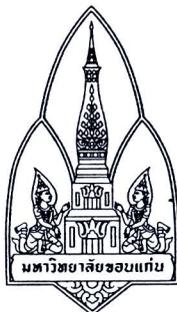


ศูนย์วิจัย

แพทย์ไปบัณฑิตและบัณฑิตแพทย์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปีงบประมาณ 2553



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

บทบาทของปัจจัยด้านพันธุกรรมของยีน glutathione S-transferase ต่อความเสี่ยงการเกิดโรคตับและระบบท่อน้ำดีในผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในชุมชนที่มีอุบัติการณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงในจังหวัดขอนแก่น

Roles of host genetic polymorphism of glutathione S-transferase genes as risk factor for hepatobiliary disease in opisthorchiasis in area with high incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen Province

รศ.ดร.ไพบูรณ์ สิทธิถาวร  
 ศ.พญ.เอมอร ไม้เรียง  
 รศ.ดร.ธิดารัตน์ บุญมาศ  
 รศ.ดร.นิษนา นามวาท  
 รศ.พญ.จิราพร สิทธิถาวร  
 รศ.ดร.เทวราช หล้าหา



ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปีงบประมาณ 2553

## กิตติกรรมประกาศ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และผลการตรวจอัลตราซาวด์เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยของ รศ. ดร. บรรจบ ศรีภา ซึ่งผู้วิจัยต้องขอขอบเป็นอย่างย้ง ขอขอบคุณ รศ ดร บัณฑิต ถิ่นคำรบ ที่ให้คำปรึกษาด้าน การวางแผนการทดลอง ผู้วิจัยขอขอบคุณอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีพศ 2553

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

เป็นที่ทราบดีว่าพยาธิใบไม้ตับเป็นสาเหตุของโรกระบบท่อน้ำดีและมะเร็งท่อน้ำดี แม้ว่าจะมีการรักษาควบคุมพยาธิอย่างต่อเนื่องแต่อุบัติการณ์การของการติดเชื้อซ้ำยังเกิดขึ้นตลอดเวลา เนื่องจากประชาชนยังมีพฤติกรรมในการบริโภคปลาดิบๆสุกๆอยู่เป็นประจำ และจากการใช้ยารักษาพยาธิอย่างแพร่หลายทำให้ปัจจัยเสี่ยงของโรกระบบท่อน้ำดีและมะเร็งท่อน้ำดีมีความซับซ้อนมากขึ้น การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาพยาธิสภาพก่อนการเกิดมะเร็งคือโรกระบบท่อน้ำดี และมุ่งแสวงหาปัจจัยเสี่ยงด้านพันธุกรรมซึ่งมีหลักฐานว่าสามารถเป็นได้ทั้งปัจจัยเสี่ยงหลักและมีปฏิสัมพันธ์กับปัจจัยอื่นๆ ยีน GST เป็นกลุ่มยีนที่น่าสนใจเนื่องจากมีบทบาทต่อการอักเสบในร่างกายโดยมีหน้าที่กำจัดสารก่อมะเร็งออกจากร่างกาย ซึ่งถ้าหากยีนนี้มีความผิดปกติ ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ glutathione S-transferase ได้น่าจะทำให้การอักเสบของเนื้อเยื่อรุนแรงส่งผลให้ตับและท่อน้ำดีมีพยาธิสภาพมากขึ้น นำไปสู่ความเสียหายของดีเอ็นเอ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด ยีน GST เป็นกลุ่มยีนที่มีองค์ประกอบหลายชนิดคือ Alpha(GSTA), Mu(GSTM), Pi(GSTP), Omega (GSTO), Theta (GSTT), และ Zeata (GSTZ) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลบ่งชี้อย่างชัดเจนว่าแต่ยีนละชนิดย่อยเหล่านี้มีบทบาทอย่างไรต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดีและมะเร็งท่อน้ำดี ในเบื้องต้นผลการศึกษาระบาดวิทยาและในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เริ่มชี้ให้เห็นว่ายีน GSTM1 และ GSTT1 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีและมีปฏิสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างเป็นระบบของยีนในกลุ่ม GST ทั้งหมดว่ามีอิทธิพลต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดีอย่างไรยังไม่มีข้อมูลมาก่อน ในขณะที่การศึกษาโดยทั่วไปจะใช้การเป็นมะเร็งเป็นตัวแปรตาม ดังนั้นผลงานวิจัยครั้งนี้จึงสร้างโอกาสให้สามารถนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ป้องกันมะเร็งระยะเริ่มต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เปรียบเทียบความหลากหลายของยีน GSTM1 และ GSTT1 ในกลุ่มตัวอย่างและ ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรกระบบท่อน้ำดี
2. หาความสัมพันธ์ระหว่างยีนและยีน (gene-gene interaction) คือยีน GSTM1 และ GSTT1 ต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดี
3. หาความสัมพันธ์ระหว่างยีนและสิ่งแวดล้อม (gene-environment interaction) ต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดี คือระหว่าง GSTM1 หรือ GSTT1 ต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยการตรวจอุจจาระและแอนติบอดีในเลือด

## วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ออกแบบเป็น case control study design โดยมีตัวอย่างประชากรจากจังหวัดขอนแก่น จำนวน 240 คน เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อวัดแอนติบอดี และเม็ดเลือดขาว นำไปสกัด genomic DNA เพื่อทำ genotyping ของยีน GSTM1 และ GSTT1

## ผลการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 240 คน มีอายุในช่วงระหว่าง 27-69 ปี ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 41-50 ปี ประกอบด้วยผู้ที่มีระบบท่อน้ำดีปกติ 124 ราย และผู้ที่มีความผิดปกติของระบบท่อน้ำดี (Advance periductal fibrosis, APF) 116 ราย กลุ่มตัวอย่างร้อยละ 35.2 สูบบุหรี่ในปัจจุบัน ประมาณร้อยละ 12.5 เคยสูบบุหรี่มาก่อน และไม่สูบบุหรี่ในปัจจุบันประมาณร้อยละ 52.3 ร้อยละ 26.6 มีการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกๆสัปดาห์ ประมาณร้อยละ 23.4 ไม่ดื่มแอลกอฮอล์และดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นครั้งคราวร้อยละ 42.2 สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GST พบว่าสำหรับยีน GSTM1 มีความถี่ของ wild type ร้อยละ 89.6 และ Null type ร้อยละ 10.4 ส่วนยีน GSTT1 ประกอบด้วย wild type ร้อยละ 65.9 และ Null type ร้อยละ 34.1

การติดเชื้อมีผลทำให้ความเสี่ยงเพิ่มขึ้น (Odd ration, OR = 3.03) สำหรับการสูบบุหรี่เป็นประจำในปัจจุบันทำให้ความเสี่ยงต่อโรกระบบท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า (OR = 2.28) ในขณะที่การเคยสูบบุหรี่ในอดีตไม่มีผลต่อความเสี่ยงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์แสดงทำให้ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในระบบท่อน้ำดีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

สำหรับปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและสิ่งแวดล้อม (gene-environment interaction) ต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดี คือระหว่าง GSTM1 หรือ GSTT1 และแอนติบอดีในเลือด พบว่าไม่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรค ในขณะที่เดียวกันการติดเชื้อมีผลทำให้ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในระบบท่อน้ำดีเพิ่มขึ้น (OR=3.76) ในทำนองเดียวกันสำหรับยีน GSTT1 กลุ่มที่ติดเชื้อมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมามากกว่ากลุ่มไม่ติดเชื้อ (OR=4.11) เช่นกัน

นอกจากนี้พบว่าในกลุ่มที่การสูบบุหรี่เป็นประจำในปัจจุบันที่มียีน GSTM1 และ GSTT1 แบบ wild มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในระบบท่อน้ำดีมากกว่ากลุ่มคนปกติที่ไม่สูบบุหรี่ (OR= 3.29 และ 5.81) ในขณะที่ผู้สูบบุหรี่เป็นประจำและมียีน GST null มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น (OR=2.42)

สำหรับการดื่มสุรานั้นพบผู้เคยดื่ม ดื่มประจำ หรือดื่มเป็นครั้งคราวมีปฏิสัมพันธ์กับยีน GSTM1 Wild โดยทำให้ความเสี่ยงต่อการเกิด APF เพิ่มขึ้น (OR 1.66-1.97) และในกลุ่ม GSTT1 wild และดื่มสุราเป็นประจำหรือเคยดื่มทำให้ความเสี่ยงเพิ่มขึ้น (OR=1.96-2.31) ซึ่งแสดงว่าการสูบบุหรี่และดื่มสุรามีบทบาทสำคัญในคนส่วนใหญ่ที่มียีน GSTT1 และ GSTM1

## ข้อเสนอด้านการวิจัย

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า การเกิดความคิดปกติของท่อน้ำดีที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับนั้น มีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้องยกตัวอย่างเช่น การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน พันธุกรรมของแต่ละบุคคล การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแบบซ้ำซาก รวมทั้ง life style ด้านการสูบบุหรี่ และการดื่มสุรา เป็นต้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ นั้น ส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพในท่อน้ำดีที่แตกต่างกันของแต่ละบุคคล อย่างไรก็ตาม ขบวนการเกิดการอักเสบ หรือในที่นี้ที่ตรวจสอบได้คือ APF นั้นนอกเหนือจากยีน GSTT1 และ GSTM1 มียีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องอีกจำนวนมาก ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อเนื่องต่อไปเพื่อตอบคำถามว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนชนิดใดที่มีอิทธิพลต่อการเกิดการอักเสบของท่อน้ำดีและมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

โรกระบบท่อน้ำดี (hepatobiliary disease) ที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) การตรวจหาว่ามีโรกระบบท่อน้ำดีหรือไม่สามารถทำได้โดยการตรวจอัลตราซาวด์เพื่อค้นหาการเกิดโรคที่เกิดจากผังผืดรอบๆท่อน้ำดีในตับ (advance periductal fibrosis, APF) ในปัจจุบันแนวทางการศึกษาหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคในอดีตเป็นการศึกษาที่มุ่งเป้าเฉพาะปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดีเป็นหลัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาความสำคัญของปัจจัยด้านพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดีโดยใช้ APF เป็นตัวแปรตาม ได้วางแผนการศึกษาเป็นแบบ case – control study กลุ่มตัวอย่างประชากรประกอบด้วยอาสาสมัครเข้าร่วมการศึกษาจำนวน 240 คน จากแหล่งระบาดในจังหวัดขอนแก่นประกอบ กลุ่มตัวอย่างที่มีผลตรวจอัลตราซาวด์เป็นบวก (APF+ve) มีจำนวน 124 คนเป็น cases และอัลตราซาวด์ปกติ (APF-ve) จำนวน 116 คนเป็น control ผลการวิเคราะห์ genotyping ของยีน glutathione S-transferase M1 และ T1 พบความถี่ของ GSTM1 wild = 89.6% GSTM1 null = 10.4% ส่วนความถี่ของยีน GSTT1 wild = 65.9% GSTT1 null = 34% ในการวิเคราะห์สมการถดถอยโดยใช้ตัวแปรอิสระเชิงเดียวพบว่า ความหลากหลายและปฏิสัมพันธ์ของยีน GSTM1 และ GSTT1 ไม่สัมพันธ์กับโรกระบบท่อน้ำดี (APF) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจากการตรวจอุจจาระเป็นความเสี่ยงต่อโรกระบบท่อน้ำดีโดยตรง (OR= 3.03) ส่วนการมีแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรค การสูบบุหรี่และการดื่มแอลกอฮอล์ทำให้ความเสี่ยงเพิ่มขึ้น (OR= 1.75-2.28) ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อความเสี่ยงของโรค พบว่าความหลากหลายของยีนและการมีแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับไม่มีผลต่อความเสี่ยงของการเกิดโรค ส่วนการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในคนที่มียีน GST wild type ทำให้มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น โดยในกลุ่มที่มี GSTM1 มีค่า OR=3.76 และ GSTT1 มีค่า OR=5.8 สำหรับปฏิสัมพันธ์ของการสูบบุหรี่ในกลุ่มที่มี GSTM1 wild type จะทำให้มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น (OR=3.29) ส่วนการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ในกลุ่มที่มียีน GSTT1 wild มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น (OR=5.8) และกลุ่มที่เป็น GSTT1 null type ทำให้มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นเช่นกัน (OR=2.42)

แม้ว่าการศึกษาค้นคว้าได้วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการกำจัดอนุมูลอิสระเพียง 2 ยีน แต่ผลการวิจัยแสดงให้เห็นค่อนข้างชัดเจนว่าปัจจัยด้านพันธุกรรมไม่มีผลโดยตรงต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดี แต่ยีนมีปฏิสัมพันธ์กับปัจจัยด้านอื่นๆ เช่นการติดเชื้อพยาธิ การสูบบุหรี่และการดื่มสุราทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดีสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ทราบอิทธิพลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อการเกิดโรกระบบท่อน้ำดี รวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดีให้สมบูรณ์มากขึ้น จึงจำเป็นต้องศึกษายีนชนิดอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบและการทำลายดีเอ็นเอให้มากขึ้นต่อไป

Opisthorchis – associated hepatobiliary diseases (HBD) is a pre malignancy condition which eventually leads to development of cholangiocarcinoma (CCA). Advanced periductal fibrosis (APF) is one of the abnormalities found in HBA and can be evaluated by abdominal ultrasonography. While most epidemiological studies to date documented risk factors associated mainly with CCA, this study focuses on genetics and environmental factors that associate with risk of APF. The sample population was recruited from an endemic area of opisthorchiasis in Khon Kaen province. In a case –control study design, the sample subjects were 240 individuals (124 of APF-positives for cases and 116 of APF-negative for controls) and 121 (51.7%) were males and 119 (49.6%) were females. Analyses of glutathione –S transferase M1 and T1 gene (GSTM1 and GSTT1) polymorphisms revealed that GSTM1 wild and null types were 89.6% and 10.4%, respectively. For GSTT1, the wild and null genotypes were 65.9% and 34%, respectively. Based on the univariate logistic regression analyses, GSTM1 and GSTT1 as well as their interactions were not associated with risk of APF. Current infection as detected by the presence of eggs in faeces, but not positive serology, associated with an increased risk of APF (OR=3.03). Regular smoking and alcoholic drink were also associated with risk of APF (OR= 1.75-2.28). No significant interaction of opisthorchiasis serology and GST gene polymorphism on risk of APF was observed. By contrast, presence of opisthorchiasis (egg-positive) and GST genotyping increased risk levels of APF i.e. OR =3.76 for GSTM1 wild genotype and OR=4.11 for GSTT1 wild genotype. Regular smoking in GSTM1 wild genotype increased risk of APF (OR=3.29). Regular and ex-regular alcoholic drink related to elevated risk of APF in GSTT1 wild genotype (OR=5.8) and that in GSTT1 null genotype (OR=2.42).

The results from genotyping of only a limited number of GST genotypes (GSTM1 and GSTT1) in this study suggested that genetic factor alone is not related to occurrence of HBD but exerted significant modifying effects in severity of inflammatory reactions which originated from the liver fluke infection as well as those from life style factors such as smoking and alcoholic drink. Further examination of gene polymorphism that involved in the inflammation and oxidative damage in opisthorchiasis is still needed to shed light on the roles of genetic factors on development of APF hence HBA and eventually CCA.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการทดลอง	12
วิเคราะห์และสรุปผล	19
บรรณานุกรม	22

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆ	4
ตารางที่ 2 ปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย	6
ตารางที่ 3 แสดงคุณลักษณะของกลุ่มตัวอย่างและการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ โรคระบบท่อน้ำดี และความถี่ของยีน GST	14
ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของ arbitrary unit serum IgG แยกตามผลตรวจอัลตราซาวด์ และการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	15
ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงเดี่ยว (univariate analysis) ของค่าความเสี่ยง (Odd ratio, OR) ต่อโรคระบบท่อน้ำดี (advance periductal fibrosis, APF) ของปัจจัยต่างๆ ด้านยีนส์ การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ระดับแอนติบอดี และการสูบบุหรี่ แสดงการกระจาย ตัวของผู้ที่มีความผิดปกติของระบบท่อน้ำดี	15
ตารางที่ 6 แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับด้วยการตรวจทาง น้ำเหลืองวิทยาและการตรวจอุจจาระ ต่อการเกิดโรคระบบท่อน้ำดี (advance periductal fibrosis, APF)	16
ตารางที่ 7 แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและการสูบบุหรี่ ต่อความเสี่ยงในการเกิด โรคระบบท่อน้ำดี (advance periductal fibrosis, APF)	17
ตารางที่ 8 แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ต่อความเสี่ยง ในการเกิดโรคระบบท่อน้ำดี (advance periductal fibrosis, APF)	18

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงขนาดของ PCR product คือ 480, 312 และ 250 bp สำหรับ GSTT1, CYP1A1 และ GSTM1	10
รูปที่ 2 ตารางแสดงระดับแอนติบอดี ของ standard reference serum ในแต่ละการเจือจาง และกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัม	11

### **List of Abbreviations**

°C = degree Celsius

AU= arbitrary unit

CCA =Cholangiocarcinoma

CI= confidence interval

ELISA= enzyme link immune sorbent assay

EPG= egg per gram

GST= glutathione S-transferase

Ig= immune globulin

OV=*Opisthorchis viverrini*

OR= Odd ratio

PCR= polymerase chain reaction