



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง บทบาทของกลู่มยีน Class II cytokine receptor ในการเกิดโรคและการดำเนินโรคของ  
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประชากรไทย

The Role of Class II cytokine receptor Family in Disease Susceptibility and  
Progression of Chronic Hepatitis B Virus Infection in Thai Population

นามผู้วิจัย นางสาวสิรินัดดา ร่มพร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อิงอร กิมกง, วท.ด. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

สืบสินธุ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

บทบาทของกลุ่มยีน Class II cytokine receptor ในการเกิดโรค  
และการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประชากรไทย

The Role of Class II cytokine receptor Family in Disease Susceptibility  
and Progression of Chronic Hepatitis B Virus Infection in Thai Population

โดย

นางสาวสิรินัดดา ร่วมพร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สิรินัดดา ร่วมพร 2557: บทบาทของกลุ่มยีน Class II cytokine receptor ในการเกิดโรคและการ  
ดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศไทย

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อิงอร กิมกง, วท.ค. 72 หน้า

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของการเกิดโรคตับอักเสบบีและโรคตับ  
อักเสบบีเรื้อรัง ประชากรทั่วโลกมากกว่า 2,000 ล้านคน มีประวัติการติดเชื้อ หรือติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ  
ประมาณ 90% ของผู้ที่ติดเชื้อหายขาดจากโรค ส่วนอีกประมาณ 10% ไม่สามารถกำจัดไวรัสได้และพัฒนาไป  
เป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังซึ่งส่วนมากจะพบในภูมิภาคเอเชียและแอฟริกา สำหรับประเทศไทยก็เป็น  
ประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกที่ยังคงมีการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบบี สาเหตุของการเกิดโรคม  
จากหลายปัจจัย ได้แก่ เชื้อไวรัส สภาพแวดล้อม และพันธุกรรมของผู้ป่วย จากการศึกษาในครอบครัวชาวจีน  
ได้หวั่นและการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในชุมชนที่มีความแตกต่างกันของ  
เชื้อชาติ สนับสนุนว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ดังนั้น  
ผู้วิจัยจึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *IFNAR2* และ *IL10RB* ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี  
เรื้อรัง 227 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่พัฒนาเป็นมะเร็งตับ 100 คน และผู้ป่วยที่ไม่ได้พัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ  
127 คน สำหรับกลุ่มควบคุมประกอบด้วย ผู้ที่มีสุขภาพดี 150 คน และกลุ่มที่มีการติดเชื้อชั่วคราวและสามารถ  
กำจัดเชื้อได้ 170 คน ในการศึกษาครั้งนี้วิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส-เอนไซม์ตัด  
จำเพาะ ผลการศึกษาพบว่า อัลลีล C ของตำแหน่ง *IFNAR2* - *F8S* มีการเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง  
เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR (95% CI) = 3.31 (2.11-5.21),  
 $P = 6.214 \times 10^{-9}$  และ  $P_c = 1.864 \times 10^{-8}$ ] ซึ่งผลอัลลีลนี้มีลักษณะการถ่ายทอดแบบยีนเด่น จากการศึกษาเปรียบเทียบ  
จีโนไทป์ CC และ CT กับ TT ได้ค่า odd ratio = 4.02 ( $P = 4.631 \times 10^{-9}$  และ  $P_c = 1.389 \times 10^{-8}$ ) นอกจากนี้ จีโน  
ไทป์ AA ของยีน *IL10RB* - *K47E* พบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง เมื่อเทียบกับ  
ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อชั่วคราวและสามารถกำจัดเชื้อได้  $P = 0.006$  ,  $P_c = 0.018$  และ OR = 0.45 สำหรับการ  
วิเคราะห์แฮพโทไทป์พบว่าแฮพโทไทป์ CA และ CG มีความสัมพันธ์กับโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังเมื่อเทียบ  
กับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ( $P = 0.014$ , OR = 6.84 และ  $P = 0.002$ , OR = 3.75 ตามลำดับ) การศึกษาครั้งนี้  
แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายที่ตำแหน่ง *IFNAR2* - *F8S* อาจจะเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี  
เรื้อรัง และจีโนไทป์ AA ของตำแหน่ง *IL10RB* - *K47E* อาจมีส่วนป้องกันการดำเนินของโรค อย่างไรก็ตาม ควร  
ศึกษาโดยใช้ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อยืนยันผลการศึกษานี้

Sirinadda Romporn 2014: The Role of Class II cytokine receptor Family in Disease Susceptibility and Progression of Chronic Hepatitis B Virus Infection in Thai Population. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Ingorn Kimkong, Ph.D. 72 pages.

The hepatitis B virus infection is a major cause of acute liver disease and chronic hepatitis. More than 2000 million people around the world who have a history of infection or hepatitis B virus infection, approximately 90% of those infected with the disease cured. The other 10% cannot eliminate the virus and have developed a chronic hepatitis B. The majority of the population is in Asia and Africa. For Thailand is one country in Asia - Pacific is still an epidemic of hepatitis B. The causes of disease from several factors, including viral, environmental and genetic factors. Studies in family education China, Taiwan and the epidemiology of chronic hepatitis B in the community who are of different races have been suggested that genetic factor is important in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus. Therefore, we investigated the effects of two functional polymorphisms, type I interferon receptor 2 gene (IFNAR2)-F8S and interleukin-10 receptor subunit beta gene (IL10RB)-K47E, on chronic hepatitis B virus (HBV) infection. We included 227 Thai patients with chronic HBV infection [100 with hepatocellular carcinoma (HCC) and 127 non-HCC], 170 individuals with self-limited HBV infection and 150 healthy controls. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to analyze these two single nucleotide polymorphisms (SNPs). In this study, the C allele of IFNAR2-F8S was found to be significantly increased in chronic HBV patients when compared with healthy controls [odds ratio, OR (95% confidence interval, CI) = 3.31 (2.11-5.21),  $P = 6.214 \times 10^{-9}$  and corrected P-value,  $P_c = 1.864 \times 10^{-8}$ ]. The effect of this allele was similar to that of an autosomal dominant gene in the presence of CC and CT genotype, when compared to TT with an OR of 4.02 ( $P = 4.631 \times 10^{-9}$  and  $P_c = 1.389 \times 10^{-8}$ ). Furthermore, AA genotype of IL10RB-K47E was found to be significantly decreased in chronic HBV patients compared with individuals with self-limited HBV infection ( $P = 0.006$ ,  $P_c = 0.018$  and OR = 0.45). For haplotype analysis, we found CA and CG haplotypes were associated with susceptibility to chronic HBV ( $P = 0.014$ , OR = 6.84 and  $P = 0.002$ , OR = 3.75, respectively) when compared with healthy individuals. This study suggests that IFNAR2-F8S polymorphisms might be involved in the susceptibility to chronic HBV infection. Moreover, AA genotype of IL10RB-K47E may provide a protective effect in this disease. However, an association study using a larger sample size should be performed to confirm these findings.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อิงอร กิมกง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ศ.พญ.ดร.ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์ รศ.ชัยวัฒน์ กิตติภูลและ ผศ.ดร.ทพ. นกรินทร์ กิตติคำธร ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจข้าพเจ้ามาตลอดในทุกเรื่อง

สิรินัดดา ร่วมพร  
พฤศจิกายน 2557

## สารบัญ

## หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	26
ผลการวิจัยและวิจารณ์	35
ผลการวิจัย	35
วิจารณ์	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	48
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	49
ภาคผนวก	53
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	72

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กลุ่มของยีน <i>CRF2</i> บนโครโมโซมที่ 21q22 ซึ่งประกอบด้วยยีน <i>IFNAR1</i> , <i>IFNAR2</i> , <i>IFNGR2</i> และ <i>IL-10RB</i>	25
2	ข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง	36
3	ผลการวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium ในผู้ป่วยกลุ่มควบคุมสำหรับยีน <i>IFNAR2</i>	40
4	ผลการวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium ในผู้ป่วยกลุ่มควบคุมสำหรับยีน <i>IL10RB</i>	40
5	การกระจายของความถี่โนไทป์และอัลลีลของ SNP <i>IFNAR2-F8S</i> (rs2229207, T/C) และ <i>IL10RB-K47E</i> (rs2834167, A/G)	43
6	การวิเคราะห์แฮพโทไทป์ของยีน <i>IFNAR2-F8S</i> (rs2229207) และ <i>IL10RB-K47E</i> (rs2834167)	45

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อนุภาคของไวรัสตับอักเสบบีจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	5
2	ลักษณะยีนโนมของไวรัสตับอักเสบบี	6
3	โปรตีนทั้งสามชนิดที่สร้างจากS ORF	8
4	แสดง marker ของผู้ป่วยติดเชื้อเฉียบพลัน (Acute infection)	14
5	แสดง marker ของผู้ป่วยติดเชื้อเรื้อรัง (Chronic infection)	15
6	แสดงการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบบี ในประชากรทั่วโลก	16
7	โครงสร้างโปรตีนของcytokine receptor familyclass II(CRF2)	22
8	cytokine receptor familyclass II(CRF2) receptors กับ cytokineligands	23
9	ผลการวิเคราะห์จีโนมไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สำหรับยีน <i>IFNAR2</i>	37
10	ผลการวิเคราะห์จีโนมไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สำหรับยีน <i>IL10RB</i>	38
11	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Direct sequencing	39
ภาพผนวกที่		
1	แสดงลักษณะของ SNP ที่เกิดขึ้นบนสาย DNA	54
2	วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	55
3	ชุดสกัด HiYield™ Gel PCR DNA Fragments Extraction Kit	60
4	ขั้นตอนการสกัด PCR product โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ Gel PCR DNA Fragments Extraction Kit	60

**บทบาทของกลุ่มยีน Class II cytokine receptor ในการเกิดโรค  
และการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประชากรไทย**

**The Role of Class II cytokine receptor Family in Disease Susceptibility and  
Progression of Chronic Hepatitis B Virus Infection in Thai Population**

**คำนำ**

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของการเกิดโรคตับอักเสเฉียบพลัน (acute hepatitis) และโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) ประชากรทั่วโลกมากกว่า 2,000 ล้านคนมีการติดเชื้อหรือมีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ประมาณ 90% ของผู้ที่ติดเชื้อหายขาดจากโรค ส่วนอีกประมาณ 10% ไม่สามารถกำจัดไวรัสได้และมีการพัฒนาไปเป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังซึ่งส่วนมากจะเป็นประชากรในภูมิภาคเอเชียและแอฟริกา (Lok and McMahon, 2001) สำหรับประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ที่ยังคงมีการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบบี (Mohamed *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยประมาณ 1 ล้านคนต่อปี (Zhang *et al.*, 2008) สาเหตุของการเกิดโรคมามากมายปัจจัยซึ่งได้แก่ เชื้อไวรัส, สภาพแวดล้อม และพันธุกรรมของผู้ป่วย จากการศึกษาในครอบครัวชาวจีนได้หวั่นและการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในชุมชนที่มีความแตกต่างกันของเชื้อชาติสนับสนุนว่าปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (Lin *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2004) มีหลายการศึกษาเพื่อค้นหาฮีนที่เกี่ยวกับโรคนี้ โดยพบความสัมพันธ์ของยีน human leukocyte antigen (HLA) กับการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและ/หรือความสามารถในการกำจัดไวรัส HBV (Thursz *et al.*, 1995; Thio *et al.*, 1999; Ahnet *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้เชื่อว่ายีน non-HLA น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมมากกว่ายีนในกลุ่ม HLA การศึกษา whole genome scan โดยใช้ microsatellite markers ของ Frodsham และคณะ ได้ยืนยันความสำคัญของบริเวณโครโมโซมที่ 21 ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Bayer, Blumberg and Werner, 1968; Runndle, Atkin and Sudell, 1975) โดยพบว่าบริเวณโครโมโซม 21q22 เป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในผู้ป่วยชาวแอมเบีย (LOD > 3.16) (Frodsham *et al.*, 2006) โดยบริเวณนี้เป็นบริเวณของกลุ่มยีน class II cytokine receptor ซึ่งประกอบไปด้วยยีน type I interferon receptor (*IFNAR1* และ *IFNAR2*), interferon- $\gamma$  receptor

(*IFNGR2*) และ interleukin-10 receptor (*IL-10RB* หรือ *IL-10R2*) การศึกษาต่อมาได้ใช้ DNA marker ที่ละเอียดมากกว่า microsatellites นั่นคือการศึกษา single nucleotide polymorphism (SNP) ในยีนเหล่านี้ ผลที่ได้จากการศึกษาต่างๆยังให้ผลที่แตกต่างกัน และนอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้กับการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

งานวิจัยนี้เลือกศึกษาเพื่อที่จะยืนยันบทบาทของยีน *IFNAR2* และ *IL-10RB* ในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังซึ่งทั้งสองยีนนี้มีรายงานว่าสัมพันธ์กับ viral clearance ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั้งชาวแอฟริกัน (Frodsham *et al.*, 2006) โดยทำการวิเคราะห์ functional SNP rs2229207 ของยีน *IFNAR2* ซึ่ง SNP นี้อยู่ในบริเวณ signal peptide ซึ่งมีความสำคัญในการขนส่งโปรตีนไปยังเมมเบรน โดยจะเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก F (ฟีนิลอะลานีน) เป็น S (ซีรีน) และ SNP rs2834167 ของยีน *IL-10RB* ซึ่งอยู่ในบริเวณ first extracellular fibronectin type III (FNIII) domain repeat ซึ่งมีความสำคัญต่อระดับ mRNA, receptor surface expression และ signaling โดยจะเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก K (ไทโรซีน) เป็น E (กรดกลูตามิก) ซึ่ง SNP ทั้งสองตำแหน่งนี้จะทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราว และสามารถกำจัดเชื้อได้

ผลที่ได้จากการวิจัยจะทำให้ทราบถึงความสำคัญของยีน *IFNAR2* และ *IL10RB* เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญอันจะนำมาสู่ความเข้าใจมากยิ่งขึ้นต่อกลไกการเกิดโรคและการดำเนินโรค ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษา การพยากรณ์ และการป้องกันโรคในอนาคต

## วัตถุประสงค์

เพื่อค้นหา functional SNP ในกลุ่มยีน class II cytokine receptor ที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประชากรไทย



## การตรวจเอกสาร

### ไวรัสตับอักเสบบี

ในปีค.ศ. 1963 Blumberg ได้ค้นพบแอนติเจนในซีรัมของชาว aborigine ในออสเตรเลียเรียก Australia antigen และยังพบแอนติเจนชนิดนี้ในซีรัมของผู้ป่วยตับอักเสบบีด้วย (White *et al.*, 1994) ในเวลาต่อมาพบว่าแอนติเจนดังกล่าวนี้อยู่บน envelope ของไวรัสตับอักเสบบีจึงตั้งชื่อใหม่ว่า hepatitis B surface antigen (HBsAg) ไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็นสมาชิกที่จัดเป็น prototype ของ family *Hepadnaviridae* ในตระกูล *Hepadnaviridae* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบบีในสัตว์ต่างๆ แบ่งได้เป็น 2 genus คือ *Orthohepadnavirus* ประกอบด้วย Human hepatitis B virus, Woodchuck hepatitis virus และ Ground squirrel hepatitis virus ส่วนอีก genus หนึ่งคือ *Avihepadnavirus* ประกอบด้วย Heron hepatitis virus และ Duck hepatitis virus (ปราโมชย์, 2527)

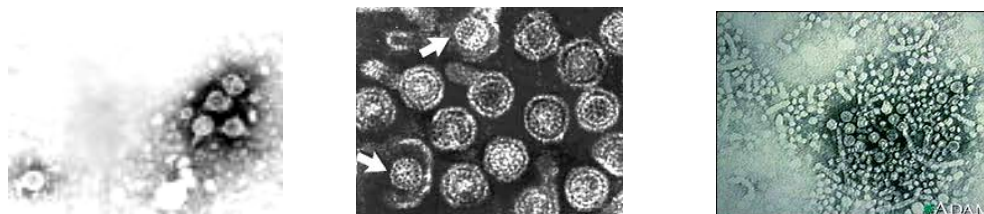
#### 1. อนุภาคของไวรัสตับอักเสบบี

ซีรัมของผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีเมื่อนำมาทำการสกัดแยกไวรัสและสังเกตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถตรวจพบอนุภาคที่มีลักษณะ 3 รูปแบบ คือ (ปราโมชย์, 2527)

1.1 อนุภาคที่สมบูรณ์และก่อให้เกิดการติดเชื้อได้มีชื่อเฉพาะเรียกว่า Dane particle มีขนาด 42 - 47 นาโนเมตร พบได้ในประมาณ 10<sup>4</sup> - 10<sup>9</sup> อนุภาคในเลือด 1 มิลลิลิตร

1.2 อนุภาคทรงกลมขนาด 20 นาโนเมตร พบในซีรัมเป็นจำนวนมากกว่า Dane particle ตั้งแต่หมื่นถึงล้านเท่า คือ ประมาณ 1,013 อนุภาคในเลือด 1 มิลลิลิตร

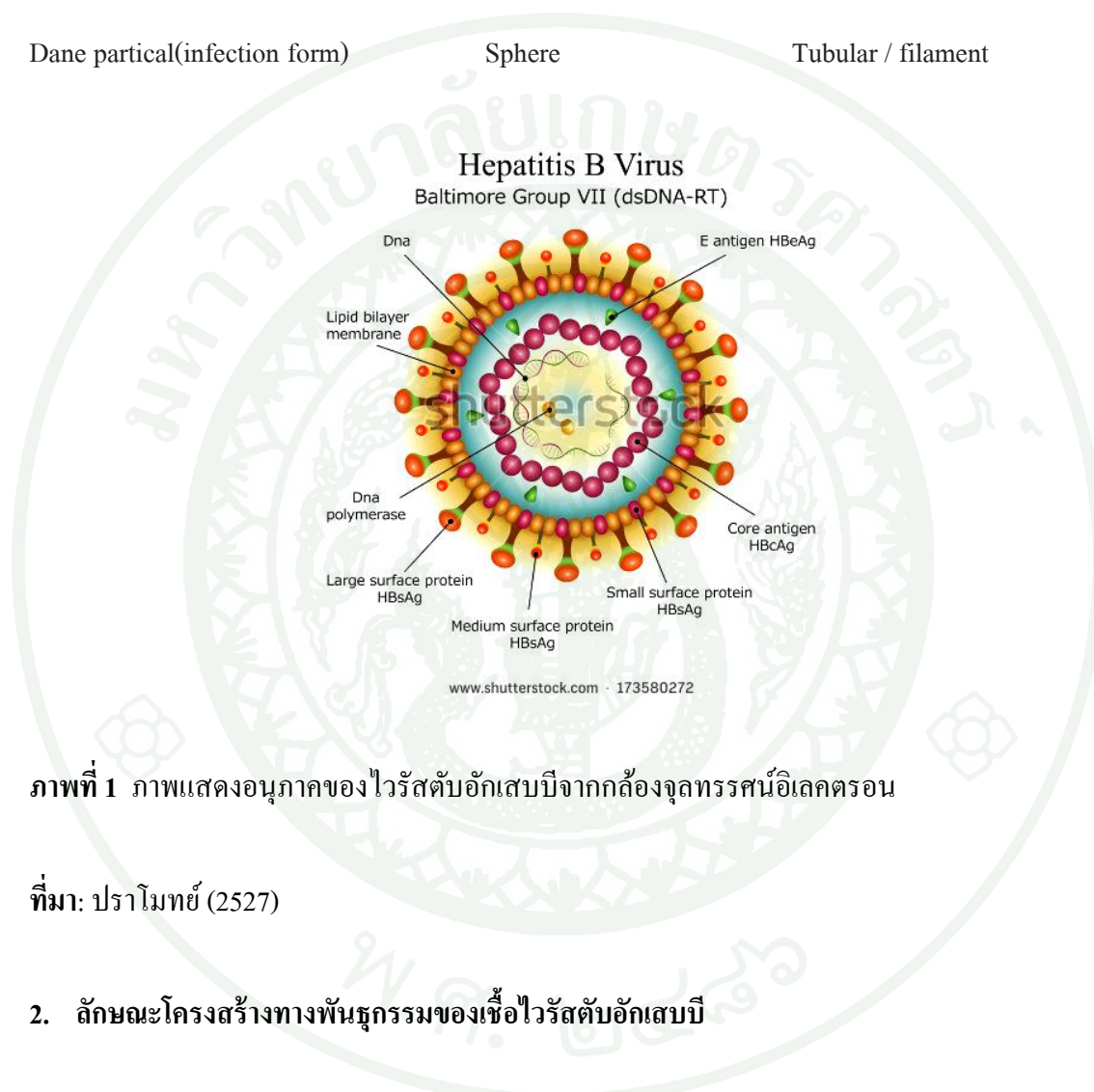
1.3 อนุภาครูปปร่างเป็นท่อนยาว (filamentous) ความกว้าง 20 นาโนเมตร แต่ความยาวมีขนาดไม่แน่นอนตั้งแต่ 50 - 500 นาโนเมตร อนุภาคชนิดนี้พบได้ในปริมาณไม่มากโดยปกติแล้ว มักจะมีอนุภาคทรงกลมและรูปท่อนยาวเป็นอนุภาคที่ไม่สมบูรณ์และไม่ก่อการติดเชื้อเหล่านี้มากกว่า Dane particle



Dane partical(infection form)

Sphere

Tubular / filament

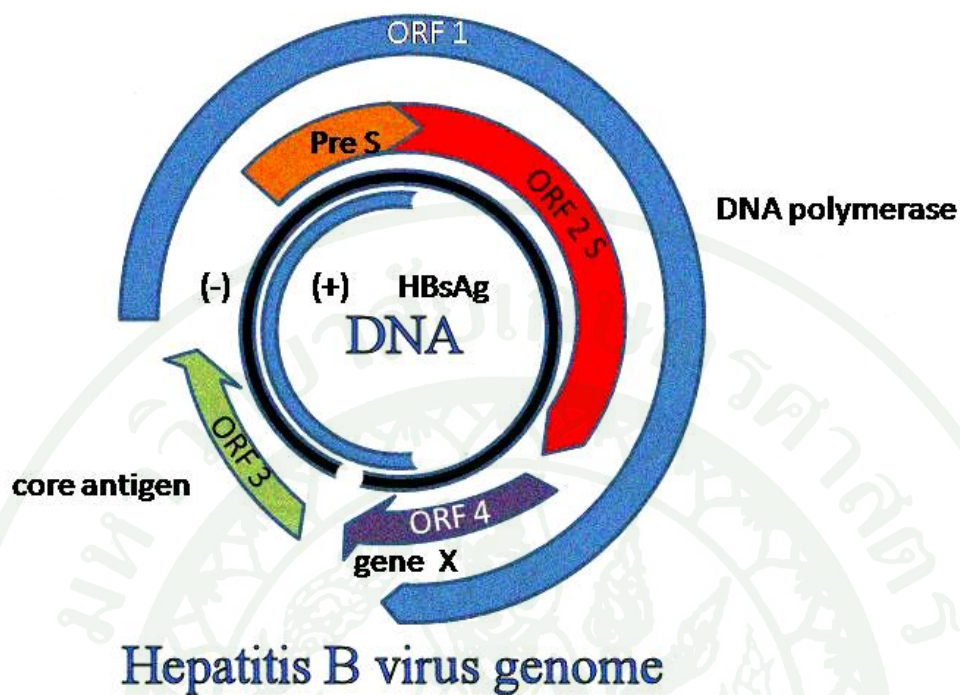


ภาพที่ 1 ภาพแสดงอนุภาคของไวรัสตับอักเสบบีจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: ปราโมทย์ (2527)

## 2. ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายคู่มีขนาดของยีนโนมประมาณ 3,200 คู่เบส แต่สามารถจัดลำดับการเรียงตัวของยีนจนสามารถสร้างโปรตีนได้หลายชนิด ประกอบด้วย open reading frame ซ้อนทับกันอยู่ (overlapping ORF) คือ *S*, *C*, *P* และ *X* โดยที่ *S* ORF ใช้ในการสร้าง surface protein (HBsAg), *C* ORF ใช้ในการสร้าง nucleocapsid protein หรือ core protein (HBsAg และ HBeAg), *P* ORF ใช้ในการสร้างเอนไซม์ DNA polymerase/reversetranscriptase และ *X* ORF ใช้ในการสร้าง Hepatitis B X protein (HBX) อยู่บนสาย DNA สายผสมซึ่งจะแปลรหัสเป็น mRNA เพื่อสร้างโปรตีน (Anna Kramvis, 2005)



ภาพที่ 2 ภาพแสดงลักษณะจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี

ที่มา: มาลินี (2551)

### 3. ยีนและโปรตีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

โปรตีนในส่วน envelope ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ major หรือ small protein (S), middle protein (M) และ large protein (L) โดยที่ S protein จะอยู่ในส่วนของ S gene ที่มีกรดอะมิโน 226 ตัว ส่วน M และ L protein จะมีจำนวนกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นอีก 55 ตัว (*pre S2*) และ 108 ตัว (*pre S1*) ตามลำดับ ในจุดเริ่มต้น (start codon) ของส่วน S gene ซึ่งจะพบโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ในอนุภาคไวรัสชนิดสมบูรณ์ที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ (infectious viral particle) ที่เราเรียกว่า Dane particles (Anna Kramvis, 2005)

*S* ORF เป็นรหัสในการสร้าง HBsAg ได้ 3 ชนิด คือ major protein เป็นส่วนที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบันเนื่องจากภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อโปรตีนชนิดนี้เป็น protective immunity ส่วนของ major protein นี้มี 2 รูปแบบคือ non glycosylated form มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน (P24) และ glycosylated form มีน้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน (GP27) (Anna Kramvis, 2005)

Middle protein สร้างจากชิ้นส่วน *pre S2* และ *S* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 281 ตัว เป็นส่วนประกอบของ envelope antigen ซึ่งมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 2 แบบ คือ 33 กิโลดาลตัน (GP33) และ 36 กิโลดาลตัน (GP36) ในส่วนของ *pre S2* มี receptor สำหรับจับกับ polymerized Human serum albumin เป็นทางที่ HBV เข้าเซลล์ตับได้อีกทางหนึ่ง (Anna Kramvis, 2005)

Large protein สร้างจากชิ้นส่วน *pre S1*, *pre S2* และ *S* gene ประกอบด้วยกรดอะมิโน 389 ตัว หรือ 400 ตัว Large protein จะมีการสร้างขึ้นมา 2 รูปแบบ คือ non glycosylated และ glycosylated ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39 และ 42 กิโลดาลตันตามลำดับ (P39 และ GP42) ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละ subtype คาดว่ามีบทบาทในการเกาะติดระหว่างเซลล์ไวรัสกับเซลล์ตัวหรือเซลล์เป้าหมายอื่นๆ (Anna Kramvis, 2005)

โดยปกติแล้วเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะสร้างโปรตีนทั้ง 3 ชนิดเพื่อเป็น surface protein โดยที่เชื้อไวรัสที่สมบูรณ์ (Dane particle หรือ complete virion) จะมีสัดส่วน major protein : middleprotein : large protein ประมาณ 4:1:1 ส่วนอนุภาคที่ไม่สมบูรณ์จะมีแต่ major protein อาจจะมี middle protein เล็กน้อย (Anna Kramvis, 2005)

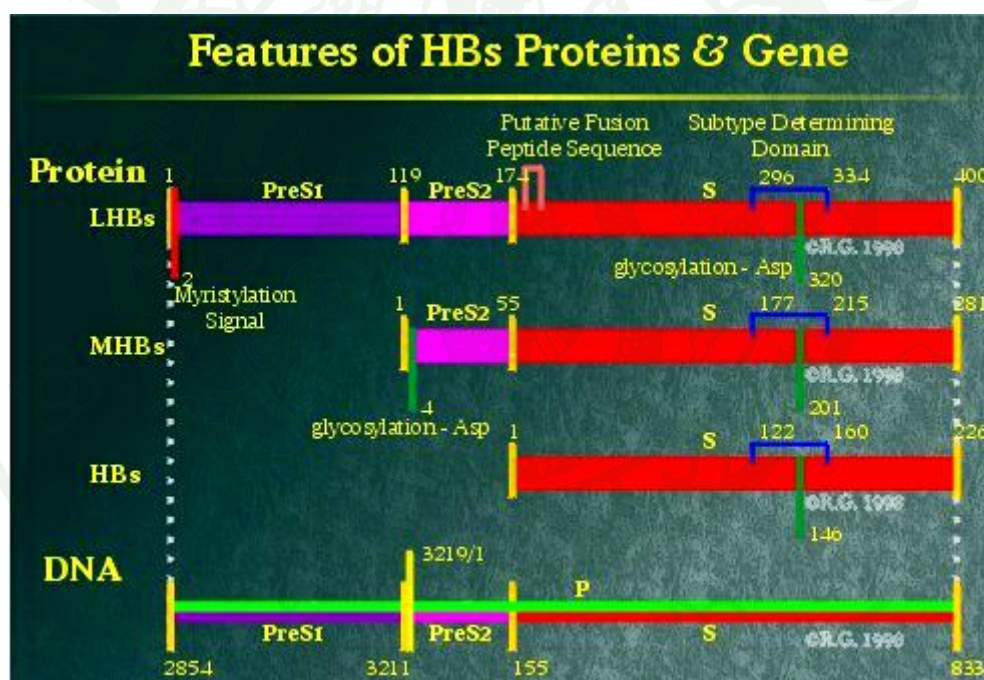
*C* ORF เป็นรหัสในการสร้าง Hepatitis B core antigen (HBcAg) ซึ่งจะทำให้เกิด nucleocapsid และ Hepatitis B e Ag (HBeAg) ซึ่งใช้บ่งบอกถึงการติดเชื้อระยะที่เชื้อไวรัสยังแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ (Anna Kramvis, 2005)

*P* ORF เป็นรหัสในการสร้างเอนไซม์ polymerase เพื่อใช้ในขบวนการ replication (Anna Kramvis, 2005)

*X* ORF เป็นรหัสในการสร้างโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของไวรัส ในขณะที่เข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย (transfected cell) (Anna Kramvis, 2005)

Polymerase gene หรือ *P* gene เป็น ORF ที่ใหญ่ที่สุด overlap กับ *S* gene ทั้งหมดและกับบางส่วนของ *C* และ *X* gene โปรตีนที่สร้างจากยีนนี้คือเอนไซม์ DNA polymerase และ endonuclease (RNase H) (Anna Kramvis, 2005)

*X* region เป็นยีนขนาดเล็กผลผลิตจากยีนนี้คือ HB (x) protein เป็นโปรตีนขนาด 17 กิโลดาลตัน มีบทบาทในการกระตุ้นที่เกี่ยวกับการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (HCC) (Anna Kramvis, 2005)



ภาพที่ 3 ภาพวาดแสดงโปรตีนทั้งสามชนิดที่สร้างจาก *S* ORF

ที่มา: ดวางรัตน์ (2546)

## 4. แอนติเจนที่พบในไวรัสตับอักเสบบี

### 4.1 Hepatitis B surface antigen (HBsAg)

แอนติเจนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่ code จาก pre S/S gene สามารถตรวจพบได้ 3 ชนิดคือ major HBsAg, middle HBsAg และ large HBsAg โปรตีนชนิดนี้ถูกควบคุมการสร้างโดย S gene ทางด้านปลาย 3' โปรตีนที่มีรหัสจากยีนส่วนนี้มี antigenic determinant ที่สำคัญและเป็น group-specific determinant มีอยู่ในเชื้อ HBV เกือบทุกสายพันธุ์ (subtype) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune protective determinant) ในการฉีดวัคซีนป้องกัน (vaccination) และการตรวจวินิจฉัยโรค (diagnosis) (ปราโมทย์, 2527)

นอกจากนี้ HBsAg ยังประกอบด้วย subtype determinant ที่ต่างกัน 2 ชนิดคือ d และ y determinant ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 122 ว่าเป็นชนิด Lysine (ลำดับเบส AAA หรือ AAG) หรือ Arginine (ลำดับเบส AGA หรือ AGG) ส่วน determinant ชนิด w หรือ r determinant ขึ้นกับชนิดของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 160 ว่าเป็นชนิด Lysine หรือ Arginine ดังนั้น จึงสามารถจัดกลุ่ม HBV ออกได้เป็น 4 subtype ใหญ่ๆ (antigenic subtype) คือ *adw*, *ayw*, *adr* และ *ayr* (ปราโมทย์, 2527)

### 4.2 Hepatitis B core antigen (HBcAg) และ Hepatitis B e antigen (HBeAg)

แอนติเจนทั้งสองชนิดนี้มีกรดอะมิโนร่วมกันและเป็นผลผลิตจาก c gene แอนติเจนชนิดนี้พบได้ในเซลล์ตับที่ติดเชื้อไม่พบแอนติเจนอิสระในเลือดเมื่อนำเอา core ของ HBV มาทำปฏิกิริยากับ detergent หรือย่อยด้วยเอนไซม์บางชนิด HBeAg ก็จะหลุดออกมาได้ นอกจากนี้ ยังพบ HBeAg อิสระในเลือดซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่า HBV กำลังเพิ่มจำนวนในเซลล์ตับ (ดวงรัตน์, 2546)

HBcAg มีความเป็น immunogen ที่ดีมาก คือ สามารถกระตุ้นการตอบสนองของทั้ง humoral และ cellular immunity ความรุนแรงของการอักเสบของเซลล์ตับเชื่อกันว่าเกิดขึ้นจากการที่ cytotoxic T cell ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตับซึ่งมี HBcAg อยู่บนผิวเซลล์ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่า HBeAg มีหน้าที่อย่างไรทราบแต่ว่าไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้ติดเชื้อ นอกจากนี้ สันนิษฐาน

ว่า HBeAg เป็นสาเหตุทำให้ทารกติดเชื้อเรื้อรังได้ถึง 70 - 90 เปอร์เซ็นต์ จากแม่ที่มี HBeAg ในซีรัม (ดวงรัตน์, 2546)

## 5. การแบ่งกลุ่ม (subtype) ของไวรัส

จัดกลุ่มย่อยๆ หรือ subtype ต่างๆ อาศัยความแตกต่างของยีนหรือโปรตีนในส่วน hepatitis B surface antigen (antigenic determinants บน HBsAg) หรือยีนส่วนอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็น *d* หรือ *y* และ *r* หรือ *w* โดยทุกสายพันธุ์จะมีแอนติเจนร่วมหรือส่วนที่เป็น group specific antigenic determinants ได้แก่ “a” determinant เหมือนกัน ดังนั้น จึงจัดตาม subtype หลักได้เป็น *adr*, *ayr*, *adw* และ *ayw* ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น *adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3* และ *ayw4* นอกจากนี้ ยังมี determinant *q* ที่พบได้ในเชื้อแทบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น เชื้อใน subtype *adr* บางสายพันธุ์เท่านั้น ดังนั้น subtype *adr* อาจจะแบ่งอีกได้เป็น *adrq-* และ *adrq+* (ปราโมทย์, 2527)

เชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ละ genotype หรือ subtype/serotype มักจะไม่แตกต่างกันในแง่กลไกการก่อโรคความรุนแรงของโรคการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาหรือลักษณะทางคลินิกอื่นๆ แต่จะมีความสำคัญด้านทางศึกษาทางระบาดวิทยาเนื่องจากมีการกระจายตัวของเชื้อแต่ละกลุ่มแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก (ปราโมทย์, 2527)

Genotype A พบมากในทวีปยุโรปตอนเหนือทวีปอเมริกาเหนือและทวีปแอฟริกาบริเวณ sub-sahara

Genotype B พบมากในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Genotype C พบมากในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย

Genotype D พบได้ทั่วโลกแต่พบมากในบริเวณรอบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้

Genotype E พบได้ในทวีปแอฟริกาบริเวณ sub-sahara

Genotype F พบมากในทวีปอเมริกาใต้

จากการศึกษา พบว่า subtype ที่พบมากในประเทศไทย คือ subtype *adr* พบประมาณร้อยละ 80 และ subtype *adw* พบประมาณร้อยละ 20 (ดวงรัตน์, 2546)

## 6. พยาธิกำเนิด

HBV เข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่มีรอยแหว่งหรือบาดแผลเป็นสำคัญ ส่วนการติดต่อจากมารดาสู่ทารกและการติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยเชื้อเข้าทางเยื่อเมือกอาจเกิดขึ้นได้ แต่ต้องการเชื้อเป็นจำนวนมากเชื้อไวรัสจะมียู่มากในเลือดและตับ ในน้ำลายและน้ำอสุจิจะมีเชื้อไวรัสในจำนวนน้อยกว่า

นอกจากเซลล์ตับแล้ว HBV ยังพบได้ในอวัยวะต่างๆ เช่น ต่อม้ำเหลือง ม้าม ไต ต่อมไทรอยด์ ต่อมอะดรีนัล และต่อมอื่นๆ เชื้อไวรัสมีระยะฟักตัวนาน 75 วัน (40 - 150 วัน) โดยเฉลี่ยผู้ติดเชื้อบางรายไม่แสดงอาการแต่บางรายแสดงอาการป่วยผู้ป่วยบางรายเป็นตับอักเสบและมีอาการดีขึ้น คือ อาการตัวเหลือง และอาจมีอาการตาเหลืองด้วย แต่บางรายเป็นตับอักเสบโดยไม่เหลือง (มาลินี, 2551)

## 7. ผลของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (ขง, 2552)

7.1 Acute hepatitis (ตับอักเสบเฉียบพลัน) พบได้ในผู้ป่วยร้อยละ 90 โดยผู้ป่วยจะติดเชื้อและแสดงอาการแบบเฉียบพลันแต่จะหายขาดจากการติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นตลอดชีวิต

7.2 Chronic hepatitis (ตับอักเสบเรื้อรัง) ผู้ติดเชื้อไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสให้หมดไปจากร่างกายได้เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสอยู่ตลอดเวลาพบในผู้ติดเชื้อร้อยละ 5 - 10 การติดเชื้อในคนอายุน้อยมักเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง

7.3 Fulminant hepatitis (ตับอักเสบูรุนแรง) พบได้ในผู้ติดเชื้อร้อยละ 0.5 เกิดขึ้นในผู้ใหญ่มากกว่าเด็ก

## 8. ความทนทานของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีค่อนข้างทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เมื่อเทียบกับไวรัสอื่น คือ ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ของไวรัสในซีรัมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส HBV อยู่ได้นานอย่างน้อย 6 เดือน หรือในสภาพแช่แข็งได้นานถึง 10 - 15 ปี ทนต่อสภาวะกรด พีเอช 2.4 ได้อย่างน้อย 6 ชั่วโมงและทนต่ออีเทอร์ (ปราโมทซ์, 2527)

โดยปกติแล้วสามารถทำลายเชื้อได้โดยวิธีต่อไปนี้

1. ความร้อน 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง
2. ต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีโดยเชื้อไวรัสส่วนใหญ่จะถูกทำลายตั้งแต่ 1-2 นาทีแรก
3. Autoclave นาน 15 นาที
4. สารเคมีต่างๆเช่น
  - 4.1 Alcohol 70%
  - 4.2 Sodium hypochlorite (0.5 g chlorine/l)
  - 4.3 Glutaraldehyde 2%
  - 4.4 Sparicin pH 7.9 (glutaraldehyde 0.12%, phenol 0.44%)
  - 4.5 wescodyne 1:213 (iodine 84 mg/l)

ได้มีการพัฒนาวิธีการทำลายเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเลือดเพื่อให้สามารถนำเลือดที่อาจจะปนเปื้อนเชื้อนี้ไปใช้งานได้หลายวิธี เช่น การทำลายเชื้อโดยใช้ beta-propiolactone แล้วนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น

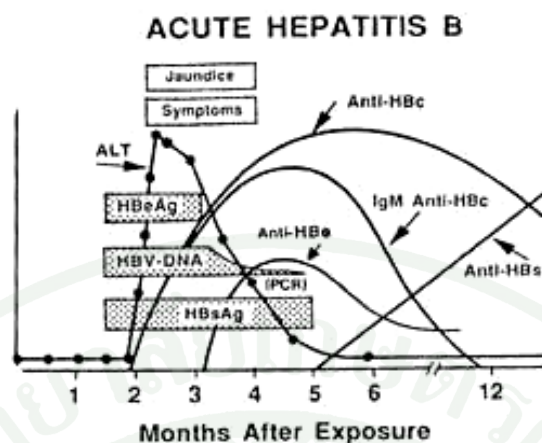
## 9. ลักษณะอาการทางคลินิก

ผู้ที่ได้รับเชื้อ HBV ไม่ว่าจะ subtype ใดๆ ส่วนใหญ่มักไม่ค่อยพบว่ามีอาการทางคลินิก (subclinical infection) โดยเฉพาะเมื่อได้รับเชื้อในวัยเด็กแบ่งได้ 2 ลักษณะ (ปิยะวัฒน์, 2550)

### 9.1 อาการเฉียบพลัน

1 ใน 3 ของผู้ติดเชื้อในผู้ใหญ่จะมีอาการเฉียบพลันเมื่อได้รับเชื้อจะมีระยะฟักตัวของโรคอยู่ราว 60 - 180 วัน โดย 50 เปอร์เซ็นต์จะไม่มีอาการ 30 เปอร์เซ็นต์จะปรากฏอาการบ้าง เช่น เบื่ออาหาร คลื่นไส้ วิงเวียน อาจมีอาเจียนร่วมด้วย และอีก 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่มีอาการป่วยและตัวเหลือง ตาเหลือง หรือเรียกว่าอาการดีซ่าน บางรายอาจมีอาการ serum sickness คือ มีไข้ต่ำ มีผื่นขึ้นคล้ายกับลมพิษข้ออักเสบและมีผื่นที่ผิวหนังได้บ่อยทางด้านชีวเคมี เมื่อตรวจเลือดจะพบความผิดปกติของเอนไซม์ในตับซึ่งจะพบตั้งแต่เริ่มป่วยและต่อมาจะค่อยๆ กลับคืนสู่ระดับปกติ (ปิยะวัฒน์, 2550)

ผู้ป่วยบางรายมีอาการตับอักเสบบรุนแรง คือ มีไข้สูง ตัวเหลือง ตาเหลืองอย่างรวดเร็ว ตามด้วยเนื้อสมองเสื่อม (encephalopathy) ขึ้นโคม่า และตายในที่สุด พบอัตราการตายสูงสุดในผู้ป่วยอายุมากกว่า 45 ปี บางรายก็จะเป็นพาหะเรื้อรัง ซึ่งสามารถตรวจพบ HBsAg ในเลือดได้ ทารกที่ได้รับเชื้อในระหว่างคลอดหรือแรกเกิดมีโอกาสสูงที่จะเป็นพาหะซึ่งไม่มีอาการอัตราการเป็นพาหะจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อติดเชื้อในขณะอายุมากขึ้น (ปิยะวัฒน์, 2550)

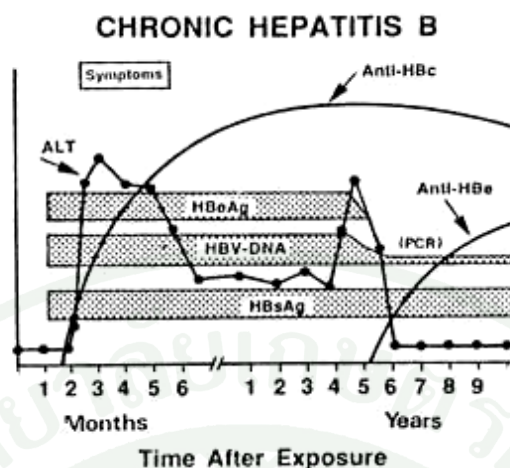


ภาพที่ 4 ภาพแสดง marker ของผู้ป่วยติดเชื้อเฉียบพลัน (Acute infection)

ที่มา: ดวงรัตน์ (2546)

## 9.2 อาการเรื้อรัง

พบในผู้ป่วยที่มี HBsAg ในซีรัมนาน 6 เดือนหรือมากกว่านั้น 90 เปอร์เซ็นต์จะพบในทารกแรกเกิด 20 เปอร์เซ็นต์ในเด็ก และ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์พบในผู้ใหญ่ จากตัวเลขดังกล่าวจะพบว่าการติดเชื้อเรื้อรังแบบพาหะนี้จะลดลงเมื่อช่วงอายุมากขึ้น ตับอักเสบเรื้อรังจะมีอาการดำเนินของโรคอย่างช้าๆ และจะแสดงอาการมากขึ้นเมื่ออายุ 40 ปีขึ้นไป (ปิยะวัฒน์, 2550)



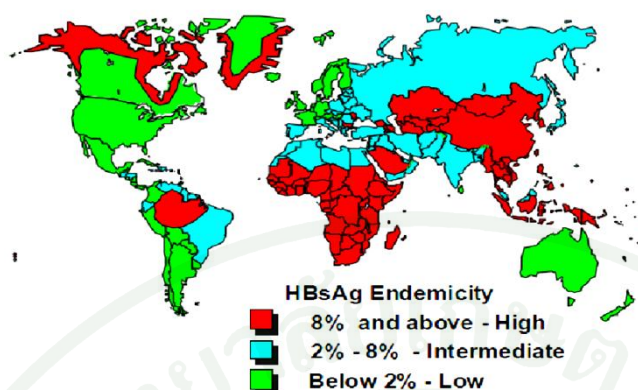
ภาพที่ 5 ภาพแสดง marker ของผู้ป่วยติดเชื้อเรื้อรัง (Chronic infection)

ที่มา: ดวงรัตน์ (2546)

#### 10. ระบาดวิทยาและความสำคัญของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุของการเกิดโรคตับหลายชนิด อาทิ โรคตับอักเสบนี้นเฉียบพลัน, โรคตับอักเสบเรื้อรัง, โรคตับแข็ง และโรคมะเร็งตับ ผลการตรวจของโรคตับทางคลินิกที่ได้เป็นผลสืบเนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่างทั้งที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส, สภาพแวดล้อม และพันธุกรรมของผู้ป่วย ซึ่งการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัจจัยหนึ่งที่พบได้บ่อยและยังเป็นปัญหาหลักทางสุขภาพที่มีความสำคัญทั่วโลกอีกด้วย (Zhang *et al.*, 2008) ประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชีย - แปซิฟิกที่ยังคงมีการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบบี (Mohamed *et al.*, 2004) และจากผลการตรวจทางเซรุ่มวิทยา พบว่า ประชากรหนึ่งในสามของโลก (2,000 ล้านคน) มีการติดเชื้อไวรัสหรือมีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนอกจากนี้ โรคไวรัสตับอักเสบบียังเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบเรื้อรังในประชากรมากกว่า 400 ล้านคน (6% ของประชากรโลก) ซึ่งส่วนมากจะเป็นประชากรในภูมิภาคเอเชียและแอฟริกา (Takkenberg *et al.*, 2009; Bertolotti and Gehring, 2006) โรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังนั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับแข็ง และโรคมะเร็งตับ ซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยประมาณ 1 ล้านคนต่อปี (Zhang *et al.*, 2008)

World distribution map



From: World Health Organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services, 2001, Geneva, WHO, WHO/V&B/01.31

ภาพที่ 6 ภาพแสดงการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบบี ในประชากรทั่วโลก

ที่มา: WHO

## 11. การวินิจฉัยโรคไวรัสตับอักเสบบีในห้องปฏิบัติการ

อาการตับอักเสบบแบบเฉียบพลันที่มีสาเหตุมาจาก HBV มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในไวรัสตับอักเสบบี, ซี และ อี คือ จะพบระดับเอนไซม์ transaminase (Aminotransferase) ในเลือดสูงขึ้นไปกว่าปกติ 5 - 100 เท่าระดับ ALT (Alanine aminotransferase) และ AST (Aspartate aminotransferase) เริ่มสูงขึ้นพร้อมกันในช่วงท้ายของระยะฟักตัวและสู่ระดับสูงเมื่อมีอาการเหลือง (jaundice) ซึ่งอาการเหลืองนี้ใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัสตับอักเสบบีออกจากไวรัสตับอักเสบบชนิดอื่นๆ ดังที่กล่าวมา และถ้าไม่มีอาการแทรกซ้อนระดับเอนไซม์จะกลับคืนปกติภายใน 2 เดือน (ปราโมทย์, 2527)

### 11.1 การตรวจปฏิบัติการน้ำเหลือง

วิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย HBV ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางและมีความไวมากที่สุด คือ radioimmunoassay (RIA) และ enzyme immunoassay (EIA) โดยมี 5 ชนิด (markers) ที่พบในซีรัมที่มีความสำคัญในการวินิจฉัยได้แก่ HBsAg, HBeAg, แอนติบอดีต่อ HBsAg (anti-HBsAg) แอนติบอดีต่ออีแอนติเจน (anti-HBe) และแอนติบอดีต่อ core แอนติเจน (anti-HBc)

HBsAg สามารถตรวจพบได้ในซีรัมหลังจากได้รับ HBV ได้ 1 - 2 สัปดาห์ หรือ 11 - 12 สัปดาห์หรือ อาจจะใช้วิธีตรึงคอมพลีเมนต์ (complement fixation) หลังจากได้รับเชื้อ 30 - 40 วันซึ่งมีความไวพอที่จะสามารถตรวจได้ ส่วน anti-HBsAg จะตรวจได้ใน 1 - 3 เดือนหลังจากที่ตรวจ HBsAg ไม่พบ (Rogelio *et al.*, 1994) HBeAg จะพบในเวลาใกล้เคียงกับ HBsAg แต่ในระยะสั้นกว่าส่วนในระยะพักฟื้นจะพบ anti-HBe ส่วน anti-HBcIgM จะพบตั้งแต่เริ่มมีอาการและอยู่ได้นานเป็นเวลาหลายเดือน (ปราโมทย์, 2527)

ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังจะตรวจพบ HBsAg, HBeAg และ HBV-DNA ได้ในซีรัมอย่างน้อย 6 เดือนโดย marker สำคัญ คือ HBsAg ในซีรัมที่อยู่ได้นานตลอดชีวิต และถ้าระยะนี้ตรวจพบ HBeAg จะเป็นช่วงที่ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนและมีความสามารถแพร่เชื้อได้ (ปราโมทย์, 2527)

## 11.2 การตรวจปริมาณ HBV-DNA

การตรวจ HBV-DNA ในช่วงที่เพิ่มจำนวนและสามารถแพร่เชื้อได้โดยการสกัด HBV-DNA จากซีรัมของผู้ป่วยนำมาเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) และนำ product ที่ได้จาก PCR มาตรวจยืนยันโดยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) (มาลินี, 2551)

นอกจากจะใช้วิธี PCR ในการตรวจหา HBV-DNA ได้แล้วยังนำมาใช้ในการตรวจหา subtype ของ HBV ในซีรัมผู้ป่วยที่เป็นพาหะได้ (มาลินี, 2551)

## 12. การควบคุมและป้องกัน

ปัจจุบันนี้ธนาคารเลือดได้มีการตรวจ HBsAg ในเลือดโดยใช้วิธี RIA และ EIA เพื่อจะได้ลดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบและการควบคุมการแพร่กระจายของโรคสามารถทำได้โดยให้ความรู้แก่ประชากรการใช้วิธีการที่เหมาะสมในการทำลายขยะจากโรงพยาบาล และการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อในทารกแรกเกิดที่คลอดจากแม่ที่เป็นพาหะควรจะให้วัคซีนป้องกัน HBV (HBvaccine) และ hepatitis B immune globulin (HBIG) (ปราโมทย์, 2527)

## 12.1 Passive immunization

ทำได้โดยฉีด HBIG ซึ่งได้จากผู้ที่หายจากโรคและมี anti-HBs ในปริมาณสูง ใช้สำหรับป้องกันการเกิดโรคหลังสัมผัสเชื้อ (post exposure prophylaxis) หรือให้แก่เด็กทารกที่คลอดจากแม่ที่ตรวจพบ HBsAg โดยควรได้รับ HBIG ขนาด 0.06 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเร็วที่สุดที่สามารถทำได้และควรให้วัคซีนกระตุ้น (active immunization) ควบคู่ไปพร้อมกันด้วยโดยควรให้วัคซีนภายใน 7 วันหลังคลอด (มาลินี, 2551)

## 12.2 Active immunization

เป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการให้วัคซีนในปัจจุบันวัคซีนที่ใช้มีทั้งชนิดที่เตรียมจากพลาสมาของผู้ที่เป็นตับอักเสบของผู้ที่เป็นพาหะ โดยนำ HBsAg มาทำให้บริสุทธิ์แล้วใช้สารเคมีหรือความร้อนทำลายไวรัสทุกชนิดที่อาจปนเปื้อนอยู่ก่อนนำมาวัคซีนชนิดนี้เรียกว่า plasma-derived vaccine ทำให้ต้องใช้ความระมัดระวังจากการปนเปื้อนของเชื้อโรคเอดส์ (HIV) รวมทั้งการควบคุมคุณภาพของการผลิตในแต่ละครั้งนั้นทำได้ยาก อีกชนิดหนึ่งเตรียมโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมโดยเลือกใช้ HBsAg ที่มีขนาดอนุภาค 22 นาโนเมตรนี้ สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้และวัคซีนที่ได้มีความปลอดภัยในการใช้ไม่เสี่ยงต่อการติดเชื้อจากเชื้อไวรัสเองด้วยโดยนำส่วนของ S gene มาใช้ในการผลิตวัคซีนขึ้นจากยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น Chinese hamster ovary (CHO) cells เรียกว่า recombinant vaccine ซึ่งจะมีส่วนของ PreS2+S สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า vaccine ที่มีส่วนของ S gene อย่างเดียวโดยที่วัคซีนทั้งสองชนิดนี้ได้ผลดีใกล้เคียงกันโดยต้องให้วัคซีน 3 ครั้งเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันตามต้องการจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาปรับปรุงวัคซีนให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นโดยการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine) เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจโดยในขณะนี้การทดลองยังอยู่ในช่วงการศึกษาผลทางคลินิกซึ่งจะสามารถทราบผลได้ในเร็ววันนี้ (มาลินี, 2551)

### 13. การรักษา

ในการรักษาอาการตับอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะทำการรักษาตามความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น (ยง, 2552)

#### 13.1 ตับอักเสบเฉียบพลัน

การรักษาเบื้องต้นในผู้ป่วยที่มีอาการตับอักเสบเฉียบพลันควรให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีประโยชน์หลีกเลี่ยงจากกิจกรรมที่ทำให้เกิดความเหนื่อยล้า ผู้ป่วยต้องการการพักผ่อนที่เพียงพอควรมีการรักษาระดับน้ำในร่างกายของผู้ป่วยให้อยู่ในสภาวะสมดุล และแนะนำให้ผู้ป่วยหลีกเลี่ยงจากการใช้ยาที่มีพิษต่อตับและเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ผสม อาจแนะนำให้ผู้ป่วยรับประทานวิตามินเคถ้าผู้ป่วยมีภาวะเลือดแข็งตัวช้า การรักษาตัวในโรงพยาบาลอาจจำเป็นในรายที่อาเจียนไม่หยุด มีความบกพร่องในการแข็งตัวของเลือด หรือเกิดตับอักเสबरุนแรง ส่วนผลของรายงานการใช้อินเตอร์เฟอรอนแอลฟา (Interferon-alpha) และอินเตอร์เฟอรอนเบต้า (Interferon-beta) เพื่อรักษาอาการตับอักเสบเฉียบพลันนั้นผลยังไม่แน่ชัดนัก ทั้งนี้เพราะไม่ใช่ทุกการศึกษาที่แสดงว่าอินเตอร์เฟอรอนเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย (ยง, 2552)

#### 13.2 ตับอักเสबरุนแรง

ไม่มีวิธีการที่จำเพาะในการรักษาอาการตับวายอย่างรุนแรง แต่จะเน้นการป้องกันและรักษาโรคแทรกซ้อนโดยจะรักษาเพื่อพองอาการร่วมกับการปลูกถ่ายตับการใช้ยาด้านไวรัสในการรักษาให้ผลไม่ชัดเจนนัก อย่างไรก็ตามการใช้ยา foscarnet อินเตอร์เฟอรอนและยา cyclosporine เป็นประโยชน์สำหรับผู้ป่วยส่วนการรักษาด้วยการปลูกถ่ายตับนั้นต้องป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซ้ำในตับที่ถูกปลูกถ่ายใหม่โดยการให้ HBIG ร่วมด้วย (ยง, 2552)

### 13.3 ตับอักเสบบีเรื้อรัง

การรักษาอาการตับอักเสบบีเรื้อรังมีความยุ่งยากและมีข้อจำกัดของผลการรักษาระยะยาวโดยทางเลือกในการรักษาตาม OMGE Practice Guideline มีอยู่ 3 ทางคือ

13.3.1 การใช้อินเตอร์เฟอรอนแอลฟา (IFN-alpha) อย่างเดียวโดยแนะนำให้ใช้ IFN-alpha 5 ล้านยูนิตต่อวัน หรือ 10 ล้านยูนิต 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ในเด็กแนะนำให้ใช้ 6 ล้านยูนิต 3 ครั้งต่อสัปดาห์โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 16 สัปดาห์ (การรักษาานานกว่า 37 สัปดาห์อาจจำเป็นในผู้ป่วยบางราย) (ยง, 2552)

13.3.2 การใช้ยา Lamivudine หรือยาในกลุ่มอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์อื่นโดยแนะนำให้รับประทาน Lamivudine ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อวัน (ยง, 2552)

13.3.3 การใช้ IFN-alpha ร่วมกับการใช้ยา Lamivudine พบว่าไม่ทำให้ผลการรักษาดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ IFN-alpha หรือยา Lamivudine เพียงอย่างเดียวในการศึกษาการใช้ร่วมกับยาในกลุ่มอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์อื่นพบว่าให้ผลการรักษาดีขึ้นและลดการดื้อยาได้ (ยง, 2552)

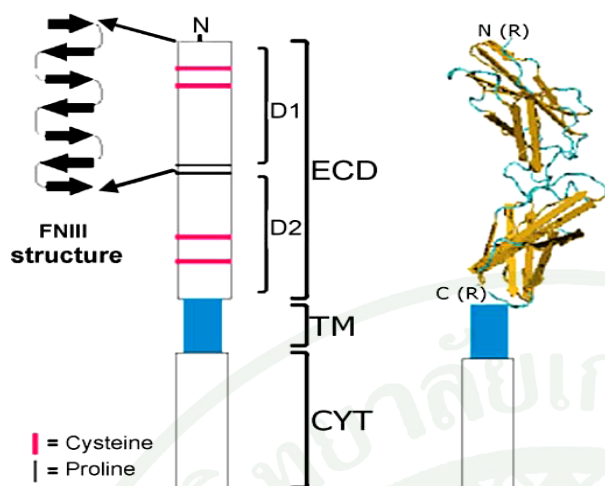
### 14. สาเหตุของการเกิดโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง

ในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายถึงกระบวนการที่นำไปสู่การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังได้ ปัจจัยต่างๆ ทั้งทางไวรัส (viral load, genotype และ genomic mutations) และทางส่วนของผู้ป่วยเอง (อายุ, เพศ และ พันธุกรรม) มีส่วนทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง จากการศึกษาในครอบครัวชาวจีนได้หวั่นสันนิษฐานว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง โดยพบว่า ระดับ HBsAg ในคู่ฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกันสูงกว่าคู่ฝาแฝดที่เกิดจากไข่คนละใบอย่างมีนัยสำคัญ (Lin *et al.*, 1989) นอกจากนี้ การศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในชุมชนที่มีความแตกต่างกันของเชื้อชาติพบว่าความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในชาวเอเชีย (2.1%) สูงมากกว่าชาวคอเคเซียน (0.02%) ถึง 100 เท่า (Kim *et al.*, 2004) มีหลายการศึกษาเพื่อค้นหาพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง โดยพบความสัมพันธ์ของยีน human leukocyte antigen (HLA) กับการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและ/หรือ ความสามารถในการ

การกำจัดไวรัสตับอักเสบบี (Thursz *et al.*, 1995; Thio *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้เชื่อว่ายีน non-HLA น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมกกว่ายีนในกลุ่ม HLA ซึ่ง ยีนในกลุ่ม non-HLA ยีนไซโตไคน์ต่างๆ (cytokine genes) เช่น tumor necrosis factor alpha (*TNF- $\alpha$* ), interferon  $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) และ Interleukin-1 beta (*IL-1 $\beta$* ) (Höhler *et al.*, 1998; Ben-Ari *et al.*, 2003; Migita *et al.*, 2007) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response-related genes) เช่น Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (*CTLA-4*), mannose-binding lectin (*MBL*) และ chemokine receptor 5(*CCR5*) (Thio *et al.*, 2004, 2007; Chong *et al.*, 2005) การศึกษา whole genome scan โดยใช้ microsatellite markers ของ Frodsham *et al.* ได้ยืนยันความสำคัญของบริเวณ โครโมโซมที่ 21 ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Bayer, Blumberg and Werner, 1968; Runndle, Atkin and Sudell, 1975) โดยพบว่าบริเวณ โครโมโซม 21q22 เป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในผู้ป่วยชาวแอฟริกัน (LOD > 3.16) (Frodsham *et al.*, 2006) บริเวณนี้เป็นบริเวณ ของกลุ่มยีน class II cytokine receptor ซึ่งประกอบด้วยยีน type I interferon receptor (*IFNAR1* และ *IFNAR2*), interferon- $\gamma$  receptor (*IFNGR2*) และ Interleukin-10 receptor (*IL-10RB* หรือ *IL-10R2*)

#### 15. Class II cytokine receptor (CRF2) family

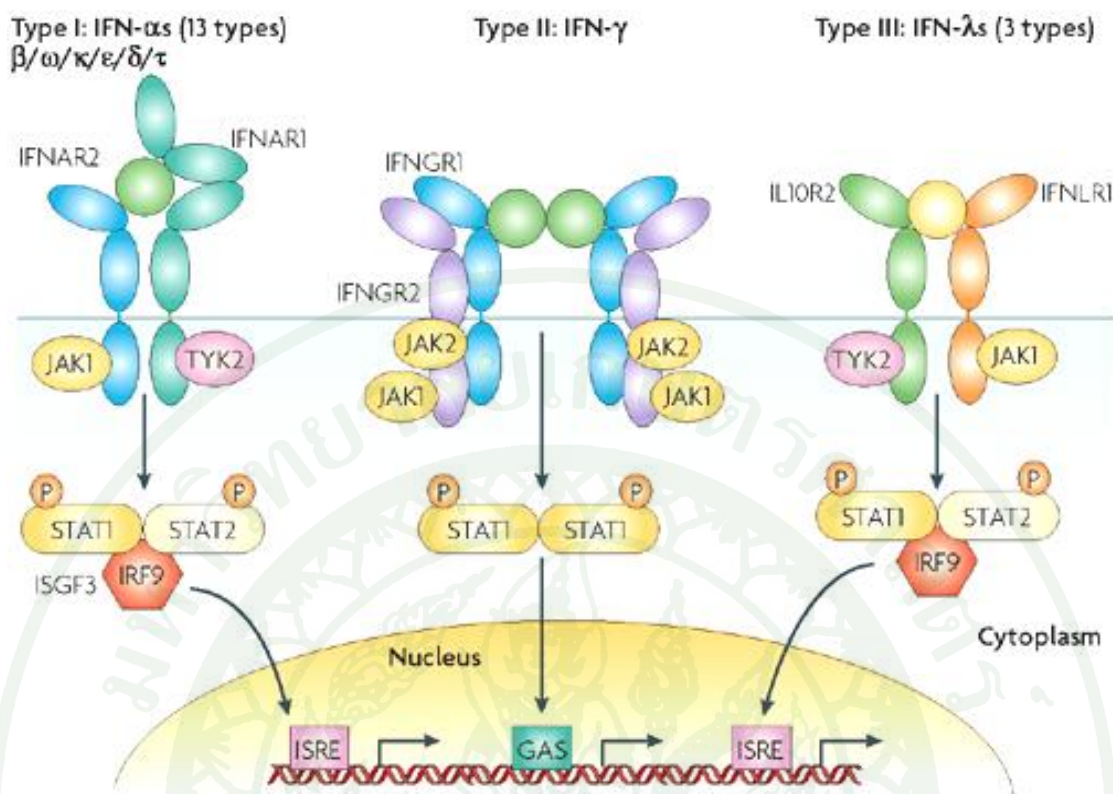
กลุ่มยีน CRF2 ประกอบด้วยยีนจำนวนทั้งหมด 12 ยีน แต่ละยีนอยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกัน โดยยีน type I interferon receptor (*IFNAR1* และ *IFNAR2*), interferon- $\gamma$  receptor (*IFNGR2*) และ Interleukin-10 receptor (*IL-10RB* หรือ *IL-10R2*) อยู่บนโครโมโซมที่ 21q22 ยีน interferon- $\gamma$  receptor (*IFNGR1*), Interleukin-20 receptor (*IL-20R1*) และ Interleukin-22-Binding Protein (*IL-22BP*) อยู่บนโครโมโซมที่ 6q24 ยีน Interleukin-22 receptor (*IL-22R1*) และ Interferon lambda receptor 1 (*IFNLR1* หรือ *IL-28R $\alpha$* ) อยู่บนโครโมโซมที่ 1p36 ยีน Interleukin-20 receptor (*IL-20R2*) อยู่บนโครโมโซมที่ 3q22.3 ยีน Tissue factor (*TF*) อยู่บนโครโมโซมที่ 1p22-p21 และยีน Interleukin-10 receptor (*IL-10R1*) อยู่บนโครโมโซมที่ 11q23 สำหรับโครงสร้างโปรตีนของ cytokine receptor family class II (CRF2) (ภาพที่ 7) ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ extracellular domain (ECD) ซึ่งประกอบด้วย fibronectin type III (FNIII) 2 domains (D1 และ D2), transmembrane segment (TM) และ cytoplasmic domain (CYT) โดยส่วน extracellular domain ของ receptor แต่ละชนิดจะจับกับ ligand อย่างจำเพาะ (Langer, Cutrone and Kotenko, 2004)



ภาพที่ 7 โครงสร้างโปรตีนของ cytokine receptor family class II (CRF2)

ที่มา: Langer *et al.*(2004)

งานวิจัยนี้สนใจศึกษากลุ่ม CRF2 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 21q22 ซึ่งได้แก่ *IFNAR1*, *IFNAR2*, *IFNGR2* และ *IL-10RB* โดย ligand ของ *IFNAR1* และ *IFNAR2* คือ type I interferons (IFNs) ซึ่งชนิดย่อยของ type I IFNs ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกนมน คือ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  และ  $\tau$  (Hardy *et al.*, 2004) สำหรับ type II IFN- $\gamma$  เป็น ligand ของ IFN- $\gamma$ receptor 1 (*IFNGR1*) ซึ่งต้องทำงานคู่กับ *IFNGR2* ส่วน beta subunit ของ Interleukin 10 receptor (*IL-10RB*) หรือ *IL-10R2* สามารถจับกับ ligand ได้หลายชนิด ได้แก่ type III IFN (IFN- $\lambda$ ), IL-10, IL-22, IL-26, IL-28 และ IL-29 การจับกันระหว่าง receptor เหล่านี้กับ cytokine เป็นการเริ่มต้นส่งสัญญาณผ่าน JAK-STAT signaling cascade เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ IFN-stimulated genes (ISGs) จำนวนมากซึ่ง ISGs ต่างนี้มีบทบาทที่สำคัญในการต้านไวรัส ภาพที่ 8 แสดง CRF2 receptors กับ cytokineligands (Borden *et al.*, 2007)



ภาพที่ 8 cytokine receptor family class II (CRF2) receptors กับ cytokine ligands

ที่มา: Borden, *et al.* (2007)

## 16. ยีน *IFNAR2* และ *IL-10RB* กับโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง

จากการศึกษา whole genome scan โดยใช้ microsatellite markers พบว่า บริเวณโครโมโซม 21q22 ที่มีกลุ่มของยีน CRF2 บรรจบอยู่เป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคตับอักเสบบีเรื้อรังในผู้ป่วยชาวแอฟริกัน (LOD > 3.16) (Frodsham *et al.*, 2006) การศึกษาต่อมาได้ใช้ DNA marker ที่ละเอียดมากกว่า microsatellites นั่นคือ การศึกษา single nucleotide polymorphism (SNP) ในบริเวณของกลุ่มยีน CRF2 ผลที่ได้จากการศึกษาต่างๆ ยังให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาของ Frodsham และคณะในยีน type I IFN receptor (*IFNAR1* และ *IFNAR2*), IFN- $\gamma$  receptor (*IFNGR2*) และ IL-10 receptor (*IL-10RB* หรือ *IL-10R2*) พบว่า เฉพาะ *IFNAR2-F8S* และ *IL-10RB-K47E* เท่านั้น ที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคตับอักเสบบีเรื้อรังในผู้ป่วยชาวแอฟริกัน (Frodsham *et al.*, 2006) การศึกษาต่อมาในชาวจีนเพื่อยืนยันความสำคัญของยีน *IFNAR2* และ *IL-10RB* พบว่า ยีนทั้งสองมี

ความสัมพันธ์โดยมีผลในการป้องกันไม่ให้เกิดโรค (protective effect) ในรูปแบบจีโนไทป์ KK ของยีน *IL-10RB* กับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดยึดเชื้อ (persistent HBV infection) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราวและสามารถกำจัดเชื้อได้ (self-limited HBV infection) ส่วนในยีน *IFNAR2* นั้น ไม่พบความสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบยึดเชื้อ (Gong *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม Gong *et al.* ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (chronic HBV infection) ออกเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบ HBeAg (HBeAg negative) และกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบ HBeAg (HBeAg positive) ผลการศึกษาพบความถี่ของรูปแบบจีโนไทป์ CC (SS) ของยีน *IFNAR2* สูงมากกว่าในกลุ่ม HBeAg negative เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HBeAg positive อย่างมีนัยสำคัญ และนอกจากนี้ยังพบว่า ความถี่ของรูปแบบจีโนไทป์ CC (SS) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดสูง (high viral loads) ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดต่ำ (low viral loads) (Gong *et al.*, 2009) อีกหนึ่งการศึกษาต่อมาซึ่งทำการศึกษาในชาวจีนเช่นกัน พบว่า มีความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล A และรูปแบบจีโนไทป์ AA ของยีน *IL-10RB* กับผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (chronic HBV infection) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการติดเชื้อและหายได้เอง (recovered subjects) ในขณะที่ยีน *IFNAR2* ในการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ใดๆ กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (chronic hepatitis B) (Chen *et al.*, 2010)

ตารางที่ 1 กลุ่มของยีน *CRF2* บนโครโมโซมที่ 21q22 ซึ่งประกอบด้วยยีน *IFNAR1*, *IFNAR2*, *IFNGR2* และ *IL-10RB*

Name	Product	Position	Size (bp)	SNPs	Features
IFNAR1	TypeI IFN receptor 1	Chr21: 34697214-34732129	34,916	302	9 exon, 8 intron
IFNAR2	TypeI IFN receptor 2	Chr21: 34602231-34636827	34,597	343	8 exon, 7 intron
IFNGR2	IFN gamma receptor 2	Chr21: 34775202-34809828	34,627	270	7 exon, 6 intron
IL-10RB	IL-10 receptor, beta	Chr21: 34638672-34669520	30,849	388	7 exon, 6 intron

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง PCR, อุปกรณ์ gel electrophoresis, เครื่องปั่นตกตะกอน DNA, ชุดถ่ายภาพเจลโฟรีซีสพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์หริ่น MiniBISPRO, เครื่อง Vortex
2. สารเคมี ได้แก่ 0.5 TAE, 4 % Agarose
3. อุปกรณ์พลาสติก ได้แก่ หลอดพลาสติก (Tip) สำหรับใช้กับเครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติขนาดต่างๆ (micropipette)
4. เครื่องมือขนาดเล็ก ได้แก่ เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติขนาดต่าง ๆ เครื่องผสมสาร
5. เครื่องมือขนาดใหญ่ ได้แก่ ตู้อบ 65 องศาเซลเซียส และ องศาเซลเซียส 37, หม้อนึ่งความดันไอ

### วิธีการ

#### 1. กลุ่มประชากรที่ศึกษา

1.1 ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 227 คน โดยจะทำการตรวจหาระดับของ HBsAg ในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งต้องมีค่าสูง เกิน 6 เดือนขึ้นไป และได้รับการยืนยันว่า ไม่ได้เป็นโรคตับจากสาเหตุอื่น เช่น แอลกอฮอล์ หรือ ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซี รวมถึงการตรวจหาระดับเอนไซม์ในตับ 2 ค่า คือ เอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ก่อน เมื่อตรวจคัดกรอง แยกเฉพาะผู้ป่วยไวรัสตับบีเรื้อรังได้แล้ว จึงแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ผู้ป่วยที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (non-hepatocellular carcinoma patients) จำนวน 127 คน และผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma patients) จำนวน 100 คน สำหรับการแยกผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ ออกจากผู้ป่วยที่ไม่มีการพัฒนาไป

เป็นโรคมะเร็งตับนั้น ใช้การตรวจวินิจฉัยทาง histopathology และ/หรือ ร่วมกับการตรวจชิ้นเนื้อ และมีค่า serum alpha fetoprotein มากกว่า 400 ng/ml.

1.2 กลุ่มควบคุมจำนวน 320 คน โดยแยกเป็น กลุ่มควบคุมที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราวและสามารถกำจัดเชื้อได้ (Self-limited HBV infection) จำนวน 170 คน และ กลุ่มควบคุมที่เป็นประชากรปกติสุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อ (healthy controls) จำนวน 150 คน ผู้ป่วยที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราวและสามารถกำจัดเชื้อได้ ผลการตรวจ HBsAg ให้เป็นลบ, Anti-HBc และ Anti-HBs เป็นบวก, ค่าการทำงานของตับปกติ และ ไม่มีประวัติการได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน ส่วนกลุ่มควบคุมที่เป็นประชากรปกติสุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อเป็นกลุ่มที่บริจาคเลือดให้สภากาชาดไทย ข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างแสดงในตารางที่ 2

## 2. การเก็บตัวอย่างเลือดและสกัด DNA

เก็บตัวอย่างเลือด 10 มิลลิลิตร ใน EDTA tube ปั่นแยก buffy coat และนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี salting out และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

## 3. วิธีการเลือก SNPs ในยีน *IFNAR2* และ *IL10RB*

งานวิจัยนี้เลือก SNPs ในบริเวณ coding region ที่เป็น non-synonymous SNPs ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนหรือทำงานของโปรตีน เช่น เปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกับโปรตีนอื่นๆ หรือหน้าที่ในการส่งต่อสัญญาณเข้าภายในเซลล์ โดย SNP *IFNAR2-F8S* (rs2229207, T/C) เป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ไปเป็นซีรีน (serine) ส่วน *IL10RB-K47E* (rs2834167, A/G) เปลี่ยนแปลงจากไลซีน (Lysine) ไปเป็น กรดกลูตามิก (Glutamic Acid)

#### 4. การวิเคราะห์จีโนมไทป์

ทำการวิเคราะห์โดยวิธี PCR – RFLP (Polymerase Chain Reaction– Restriction Fracment Length Polymorphism)

4.1 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

ยีน *IFNAR2*

IFN2\_F: 5'-CTATTCCTTACAGGTCTCTC-3' (forward primer) และ

IFN2\_R: 5'-GCAGCACTTACCCATGAG-3' (reverse primer)

ยีน *IL10RB*

ILRB\_F: 5'-TACAGTGGGAGTCACCTGCTTTTGTC-3' (forward primer) และ

ILRB\_R: 5'-TAGTCAGACTCCCTTCCTCCTGT-3' (reverse primer)

โดยมีส่วนผสมของพีซีอาร์ ดังนี้

4.1.1 สำหรับยีน *IFNAR2* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (non-hepatocellular carcinoma)

10x PCR buffer	1.00	ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.00	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.20	ไมโครลิตร
20 pmol forward primer	0.25	ไมโครลิตร
20 pmol reverse primer	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	5.25	ไมโครลิตร
Total volume	10.00	ไมโครลิตร

4.1.2 สำหรับยีน *IL10RB* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (non-hepatocellular carcinoma)

10x PCR buffer	1.00	ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.00	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.20	ไมโครลิตร
20 pmol forward primer	0.25	ไมโครลิตร
20 pmol reverse primer	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	5.25	ไมโครลิตร
Total volume	10.00	ไมโครลิตร

4.1.3 สำหรับยีน *IFNAR2* ในกลุ่มที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราว และสามารถกำจัดเชื้อได้ (Self-limited HBV infection)

10x PCR buffer	1.00	ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.00	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.20	ไมโครลิตร
20 pmol forward primer	0.25	ไมโครลิตร
20 pmol reverse primer	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	4.00	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	3.25	ไมโครลิตร
Total volume	10.00	ไมโครลิตร

4.1.4 สำหรับยีน *IL10RB* ในกลุ่มที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราว และสามารถกำจัดเชื้อได้ (Self-limited HBV infection)

10x PCR buffer	1.00	ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.00	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.20	ไมโครลิตร
20 pmol forward primer	0.25	ไมโครลิตร
20 pmol reverse primer	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	4.00	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	3.25	ไมโครลิตร
Total volume	10.00	ไมโครลิตร

4.1.5 สำหรับยีน *IFNAR2* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) และกลุ่มประชากรปกติสุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อ (healthy controls)

TopTaq Master Mix	5.00	ไมโครลิตร
20 pmol forward primer	0.25	ไมโครลิตร
20 pmol reverse primer	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	1.50	ไมโครลิตร
corol load	1.00	ไมโครลิตร
Total volume	10.00	ไมโครลิตร

4.1.6 สำหรับยีน *IL10RB* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) และกลุ่มประชากรปกติสุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อ (healthy controls)

TopTaq Master Mix	5.00	ไมโครลิตร
20 pmol forward primer	0.25	ไมโครลิตร
20 pmol reverse primer	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	1.50	ไมโครลิตร
corol load	1.00	ไมโครลิตร
Total volume	10.00	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของพีซีอาร์ ใส่ในเครื่อง PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มลดอุณหภูมิ ดังนี้

กรณีที่ใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน *IFNAR2*

1. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
2. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว; Denaturation)
3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที (ขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA template ที่ complementary กัน; Annealing)
4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที (ขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์; Elongation)
5. คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
6. ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ

### กรณีที่ใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน *IL10RB*

1. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
2. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว; Denaturation)
3. อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที (ขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA template ที่ complementary กัน; Annealing)
4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที (ขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์; Elongation)
5. คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
6. ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 209 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ สำหรับยีน *IFNAR2* และควรมีขนาดประมาณ 155 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ สำหรับยีน *IL10RB*

#### 4.2 นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีส่วนผสมดังนี้

##### 4.2.1 สำหรับยีน *IFNAR2*

Buffer no.4	1	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
<i>XmnI</i>	0.5	ไมโครลิตร
PCR product	7	ไมโครลิตร
Total volume	8.6	ไมโครลิตร

##### 4.2.2 สำหรับยีน *IL10RB*

Buffer no.4	1	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
<i>Taq<sup>α</sup>1</i>	0.5	ไมโครลิตร
PCR product	7	ไมโครลิตร
Total volume	8.6	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมที่ได้ไปป้อนที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ ยีน *IFNAR2* และ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *IL10RB* เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

## 5. การวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 วิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) โดยจะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Hardy-Weinberg equilibrium calculator (<http://www.oego.org/software/hwe-mr-calc.shtml>)

5.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *IFNAR2* และ *IL10RB* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง จะใช้ Chi-square test (EpiInfo version 6) ในการหาความแตกต่างทางสถิติระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุมสำหรับแต่ละ SNP ซึ่งจะคำนวณ *P* values และ odds ratios

5.3 การวิเคราะห์ haplotype จะคำนวณค่า Maximum likelihood haplotype frequencies โดยวิธี Expectation-Maximization (EM) approach ด้วยโปรแกรม PLINK v1.07 program (Purcell *et al.*, 2007)



## ผลการวิจัยและวิจารณ์

### ผลการวิจัย

#### 1. ผลข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยนี้กลุ่มประชากรที่ศึกษาประกอบด้วย ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (Chronic HBV infection) จำนวน 227 ราย โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (Chronic HBV infection without HCC) จำนวน 127 คน และผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (Chronic HBV infection with HCC) จำนวน 100 คน กลุ่มควบคุมจำนวน 320 คน โดยเป็นกลุ่มควบคุมที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราวและสามารถกำจัดเชื้อได้ (Self-limited HBV infection) จำนวน 170 คน และกลุ่มควบคุมที่เป็นประชากรปกติสุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อ (Healthy subjects) จำนวน 150 คน อายุเฉลี่ยของประชากรที่ศึกษาอยู่ในช่วงระหว่าง 24.27 - 53.96 ปี ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ตับ alanine aminotransferase (ALT) อยู่ในช่วงระหว่าง 61.86 - 160.59 U/I ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ตับ aspartate aminotransferase (AST) อยู่ในช่วงระหว่าง 87.6 - 110.34 U/I สำหรับระดับ HBV DNA อยู่ในช่วงระหว่าง 5.53 - 5.75 ( $\log_{10}$ )

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง

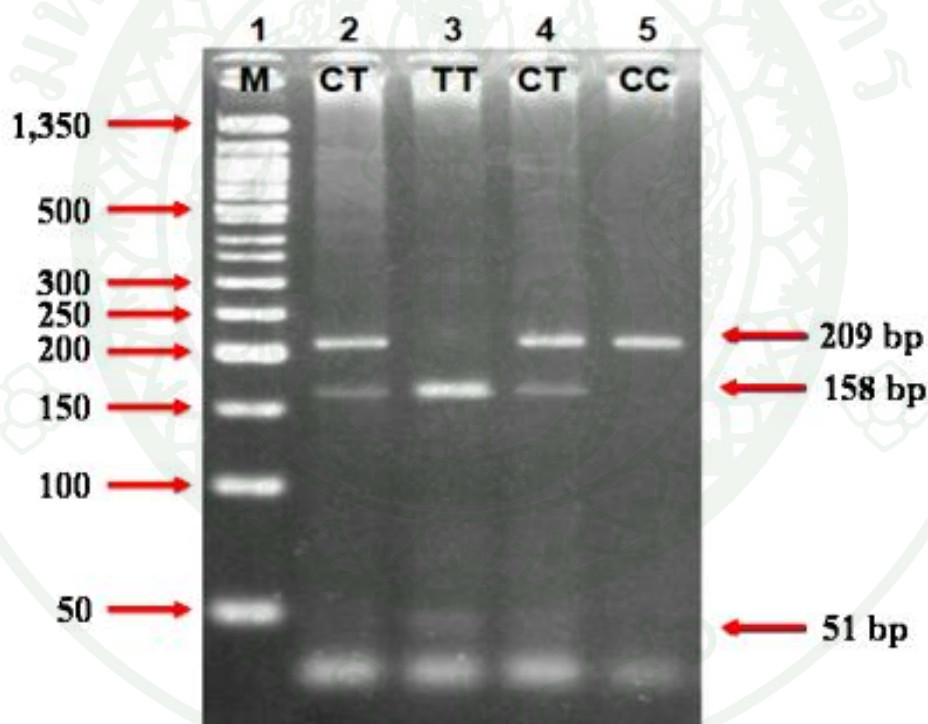
	Healthy subjects	Self-limited HBV infection	Chronic HBV infection	
			Without HCC	With HCC
Number of subjects	150	170	127	100
Gender (female//male)	86/64	89/81	50/77	15/85
Age (mean $\pm$ SD)	24.27 $\pm$ 7.19	48.41 $\pm$ 13.76	44.44 $\pm$ 14.63	53.96 $\pm$ 16.97
ALT (U/I) (mean $\pm$ SD)	NA	NA	160.59 $\pm$ 225.95	61.86 $\pm$ 50.26
AST (U/I) (mean $\pm$ SD)	NA	NA	110.34 $\pm$ 136.84	87.6 $\pm$ 90.88
HBV DNA ( $\log_{10}$ ) (mean $\pm$ SD)	NA	NA	5.53 $\pm$ 1.77	5.75 $\pm$ 2.19

หมายเหตุ	HBV = Hepatitis B virus
	HCC = Hepatocellular carcinoma
	ALT = Alanine aminotransferase
	AST = Aspartate aminotranferase
	NA = Not applicable

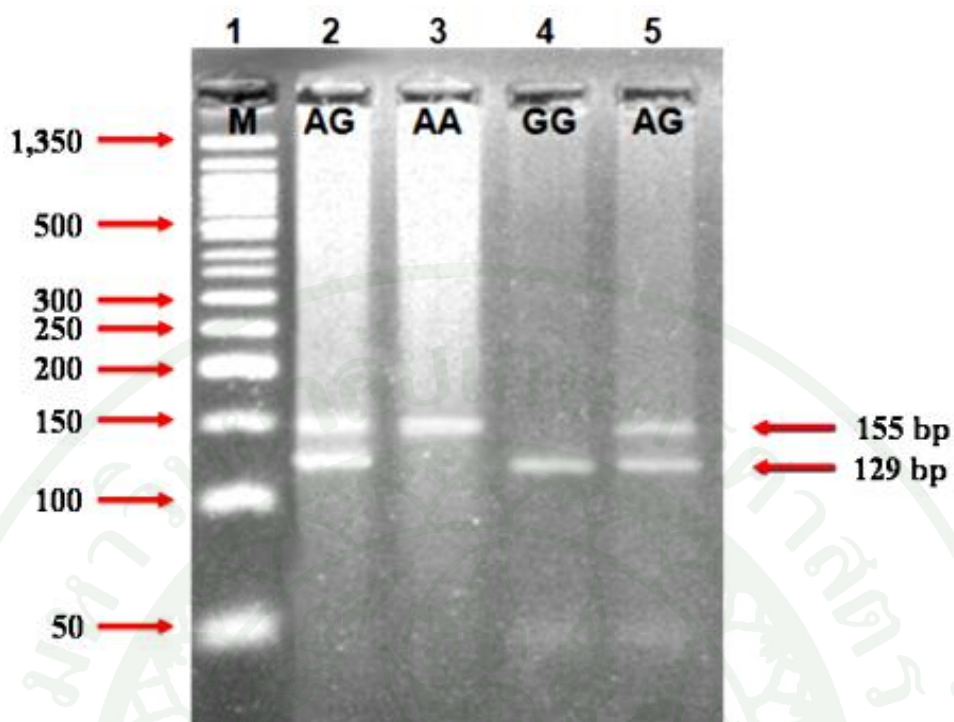
## 2. ผลการวิเคราะห์รูปแบบจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์รูปแบบความหลากหลายของยีน *IFNAR2* ในตำแหน่ง rs2229207 (T/C) โดยวิธี PCR-RFLP พบว่าก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XmnI* ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาด 209 คู่เบส และเมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XmnI* ซึ่งจะตัดตรงตำแหน่งเบสที่เป็น T ดังนั้น หากจีโนไทป์ของตัวอย่างเป็นเบส C จะไม่มีการตัดของเอนไซม์ ขนาดของคู่เบส จึงเป็น 209 คู่เบส เท่ากับขนาดก่อนตัดด้วยเอนไซม์ ดังแสดงใน lane ที่ 5 แต่ถ้า จีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างเป็นเบส T จะเกิดการตัดของเอนไซม์ ผลการตัด จะทำให้ได้ขนาด 158 และ 51 คู่เบส ดังแสดงใน lane ที่ 3 และ ถ้าหากจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง เป็นชนิด heterozygous CT จะเกิดทั้งการตัดเบส T และไม่ตัดเบส T ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ จะมีขนาด 209 158 และ 51 คู่เบส ดังแสดงในเลนที่ 2 และ 4 (แสดงดังภาพที่ 9)

จากการวิเคราะห์รูปแบบความหลากหลายของยีน *IL10RB* ในตำแหน่ง rs2834167 (A/G) โดยวิธี PCR-RFLP พบว่า ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq<sup>α</sup>1* ผลิตภัณฑ์ที่ได้ จะมีขนาด 155 คู่เบส และเมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq<sup>α</sup>1* ซึ่งจะตัดตรงตำแหน่งเบสที่เป็น G ดังนั้น หากจีโนไทป์ของตัวอย่างเป็นเบส A จะไม่มีการตัดของเอนไซม์ขนาดของคู่เบส จึงเป็น 155 คู่เบส เท่ากับขนาดก่อนตัดด้วยเอนไซม์ ดังแสดงใน lane ที่ 3 แต่ถ้า จีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างเป็นเบส G จะเกิดการตัดของเอนไซม์ ผลการตัดจะทำให้ได้ขนาด 129 และ 26 คู่เบส ดังแสดงใน lane ที่ 4 และ ถ้าหากจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง เป็นชนิด heterozygous AG จะเกิดทั้งการตัดเบส G และไม่ตัดเบส G ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ จะมีขนาด 155 129 และ 26 คู่เบส ดังแสดงในเลนที่ 2 และ 5 (แสดงดังภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สำหรับยีน *IFNAR2* ขนาดของผลิตภัณฑ์หลังตัดด้วย *XmnI* มีขนาด 209 คู่เบส ในกรณีที่ผู้ป่วยมีจีโนไทป์แบบ homozygous CC (ดังแสดงในเลนที่ 5), มีขนาด 209, 158 และ 51 คู่เบส ในกรณีที่ผู้ป่วยมีจีโนไทป์แบบ heterozygous CT (ดังแสดงในเลนที่ 2, 4) และ มีขนาด 158 และ 51 คู่เบส ในกรณีที่ผู้ป่วยมีจีโนไทป์แบบ homozygous TT (ดังแสดงในเลนที่ 3)



ภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์หัตถ์โนไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สำหรับยีน *IL10RB* ขนาดของผลิตภัณฑ์หลังตัดด้วย *Taq<sup>α</sup>1* มีขนาด 155 คู่เบส ในกรณีของผู้ป่วยมีหัตถ์โนไทป์ แบบ homozygous AA (ดังแสดงในเลนที่ 3), มีขนาด 155, 129 และ 26 คู่เบส ในกรณีของผู้ป่วยมีหัตถ์โนไทป์ แบบ heterozygous AG (ดังแสดงในเลนที่ 2 และ 5) และ มีขนาด 129 และ 26 คู่เบส ในกรณีของผู้ป่วยมีหัตถ์โนไทป์ แบบ homozygous GG (ดังแสดงในเลนที่ 4)

### 3. ผลการยืนยันรูปแบบหัตถ์โนไทป์ โดยวิธี Direct sequencing

ตัวอย่าง : ผู้ป่วยในกลุ่ม Recover ทำการทดลองด้วยวิธี PCR-RFLP วิเคราะห์ผล พบว่าหัตถ์โนไทป์ แบบ Homozygous แบบ CC เมื่อยืนยันผลด้วยทำการ direct sequencing จากรูปที่แสดง จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์เป็น Homozygous CC เช่นกัน



#### 4. ผลการวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium ในผู้ป่วยกลุ่มควบคุม สำหรับยีน *IFNAR2*

Genotype	Expected	Observed
Common homoygotes	199.12	196
Heterocygotes	109.75	116
Rare homocygotes	15.12	12
p allele frequency =	0.78	
q allele frequency =	0.22	
P-value =	0.55	

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium ในผู้ป่วยกลุ่มควบคุม สำหรับยีน *IL10RB*

Genotype	Expected	Observed
Common homoygotes	125.08	132
Heterocygotes	151.64	138
Rare homocygotes	46.08	53
p allele frequency =	0.62	
q allele frequency =	0.38	
P-value =	0.24	

จาก ตารางแสดงผลที่ 3 และ 4 พิจารณา *P-value* จะเห็นว่า มีค่า มากกว่า 0.05 แสดงถึงไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างค่าที่คาดหวัง และค่าที่ได้จากการทดลอง (อยู่ในสมดุล ฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก)

## 5. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *IFNAR2* และ *IL10RB* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรัง

ตารางที่ 5 แสดงการกระจายของความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของ SNP *IFNAR2-F8S* (rs2229207, T/C) และ *IL10RB-K47E* (rs2834167, A/G) ในแต่ละกลุ่มประชากรที่ศึกษา ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังทั้งหมด (total HBV) โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (HBV without HCC) และผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ (HBV with HCC) กลุ่มควบคุมที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราว และสามารถกำจัดเชื้อได้ (Self-limited HBV) และ กลุ่มควบคุมที่เป็นประชากรปกติ สุขภาพดีที่ไม่เคยติดเชื้อ (Healthy controls) เมื่อเปรียบเทียบความถี่อัลลีล SNP *IFNAR2-F8S* (rs2229207, T/C) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีทั้งหมด (ทั้งที่มีการพัฒนา และ ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ) กับกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีมีความถี่ของอัลลีล C สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพแข็งแรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR (95% CI)=3.31 (2.11–5.21),  $P=6.214 \times 10^{-9}$  และ  $P_c=1.864 \times 10^{-8}$ ] โดยลักษณะการถ่ายทอดของอัลลีล C เป็นแบบยีนเด่น (autosomal dominant) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของจีโนไทป์ CC และ CT กับ TT ในยีน *IFNAR2* ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีทั้งหมด (ทั้งที่มีการพัฒนา และ ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ) กับกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่า OR = 4.02 (95% CI=2.41–6.75,  $P=4.631 \times 10^{-9}$  และ  $P_c=1.389 \times 10^{-8}$ )

ในงานวิจัยนี้ยังแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังเป็นผู้ป่วยที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ และผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับ และเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล C และ T ในยีน *IFNAR2* ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับและกลุ่มที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ กับกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่า ความถี่ของอัลลีล C ของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ และกลุ่มที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพแข็งแรงอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองกลุ่ม {[OR (95% CI)=3.50 (2.09–5.87),  $P=2.630 \times 10^{-7}$  และ  $P_c=7.890 \times 10^{-7}$ ]; [OR (95% CI)=3.61 (1.93–5.20),  $P=9.169 \times 10^{-7}$  and  $P_c=2.751 \times 10^{-6}$ ]} ซึ่งผลการถ่ายทอดของอัลลีล C เป็นแบบยีนเด่น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของจีโนไทป์ CC และ CT กับ TT มีค่า OR = 4.19, 95% CI=2.29–7.70,  $P=6.734 \times 10^{-7}$  และ  $P_c=2.020 \times 10^{-6}$  สำหรับกลุ่มที่มีการพัฒนาไป

เป็นมะเร็งตับและ OR = 3.90, 95% CI=2.20–6.94,  $P = 3.814 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 1.144 \times 10^{-6}$  ในกลุ่มที่ไม่มี การพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ (แสดงดังตารางที่ 5)

ผลการศึกษาในตำแหน่ง *IL10RB-K47E* (rs2834167, A/G) เมื่อเปรียบเทียบความถี่ของ จีโนไทป์ AA กับ AG และ GG ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังทั้งหมด (ทั้งที่มีการพัฒนา และ ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ) กับกลุ่มตัวอย่างที่เคยได้รับเชื้อไวรัส ตับอักเสบบีและสามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ (self-limited HBV) พบว่า ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไวรัส ตับอักเสบบีเรื้อรัง มีความถี่ของจีโนไทป์ AA ต่ำกว่ากลุ่ม self-limited HBV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR (95% CI)= 0.45 (0.24–0.83),  $P = 0.006$  and  $P_c = 0.018$ ] และเมื่อแบ่งกลุ่มออกเป็นผู้ป่วยที่มีการ พัฒนา และ ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ พบว่า เฉพาะกลุ่มที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็น มะเร็งตับที่ให้ผลความถี่ของจีโนไทป์ AA ต่ำกว่ากลุ่ม self-limited HBV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [OR (95% CI)= 0.32 (0.13–0.72),  $P = 0.003$ ,  $P_c = 0.009$ ] (แสดงดังตารางที่ 5)

ผลการวิเคราะห์ haplotype ของ SNPs *IFNAR2-F8S* และ *IL10RB-K47E* (แสดงดังตารางที่ 6) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความถี่ haplotype CA และ CG กับกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยไวรัส ตับอักเสบบีเรื้อรังทั้งหมด ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ และ กลุ่มตัวอย่างที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ เทียบกับ กลุ่มตัวอย่างที่สุขภาพแข็งแรง พบว่า ในกลุ่มที่เป็น ไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังทุกกลุ่ม มีความถี่ haplotype CA และ CG สูงกว่า กลุ่มตัวอย่างที่สุขภาพ แข็งแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [total chronic HBV (OR = 6.84 และ  $P_c = 0.014$ ), with HCC (OR = 7.7 และ  $P_c = 0.016$ ), without HCC (OR = 5.99 และ  $P_c = 0.039$ ); total chronic HBV (OR = 3.75 และ  $P_c = 0.002$ ), with HCC (OR = 3.48 และ  $P_c = 0.002$ ), without HCC (OR = 3.72 และ  $P_c = 0.001$ ), ตามลำดับ] ในทางตรงกันข้าม พบว่า TG เป็น protective haplotype เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่สุขภาพแข็งแรง (OR = 0.59 และ  $P_c = 0.048$ )

ตารางที่ 5 การกระจายของความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของ SNP *IFNAR2-F8S* (rs2229207, T/C) และ *IL10RB-K47E* (rs2834167, A/G)

SNP	Genotype/ allele	Total HBV N=227 (%)	HBV with HCC N=100 (%)	HBV without HCC N=127 (%)	Self-limited HBV N=170 (%)	Healthy control N=150 (%)
<b><i>IFNAR2-F8S</i></b> <b>(rs2229207)</b>	CC	13 (5.73) <sup>a</sup>	7 (7) <sup>d</sup>	6 (4.72) <sup>f</sup>	10 (5.88)	2 (1.33)
	CT	96 (42.29) <sup>a</sup>	42 (42) <sup>d</sup>	54 (42.52) <sup>f</sup>	86 (50.59)	26 (17.33)
	TT	118 (51.98)	51 (51)	67 (52.76)	74 (43.53)	122 (81.33)
	C	122 (26.87) <sup>b</sup>	56 (28) <sup>e</sup>	66 (25.98) <sup>g</sup>	106 (31.18)	30 (10)
	T	332 (73.13)	144 (72)	188 (74.02)	234 (68.82)	270 (90)
<b><i>IL10RB-K47E</i></b> <b>(rs2834167)</b>	AA	22 (9.69) <sup>c</sup>	13 (13)	9 (7.09) <sup>h</sup>	33 (19.41)	19 (12.67)
	AG	115 (50.66)	51 (51)	64 (50.39)	67 (39.41)	69 (46)
	GG	90 (39.65)	36 (36)	54 (42.52)	70 (41.18)	62 (41.33)
	A	159 (35.02)	77 (39)	82 (32.28)	133 (39.12)	107 (35.67)
	G	295 (64.98)	123 (62)	172 (67.72)	207 (60.88)	193 (64.33)

หมายเหตุ SNP = single nucleotide polymorphism

HBV = Hepatitis B Virus

HCC = Hepatocellular carcinoma

ตารางที่ 5 (ต่อ)

<sup>a</sup> Autosomal dominant model CC+CT compared with TT genotype (total HBV vs. healthy control); OR (95%CI) = 4.02 (2.41-6.75),  $P = 4.631 \times 10^{-9}$ ,  $P_c = 1.389 \times 10^{-8}$ .

<sup>b</sup> C compared with T allele (total HBV vs. healthy control); OR (95%CI) = 3.31 (2.11-5.21),  $P = 6.214 \times 10^{-9}$ ,  $P_c = 1.864 \times 10^{-8}$ .

<sup>c</sup> AA compared with AG + GG genotype (total HBV vs. self-limited HBV); OR (95%CI) = 0.45 (0.24 -0.83),  $P = 0.006$ ,  $P_c = 0.018$ .

<sup>d</sup> Autosomal dominant model CC+CT compared with TT genotype (HBV with HCC vs. healthy control); OR (95%CI) = 4.19 (2.29-7.70),  $P = 6.734 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 2.020 \times 10^{-6}$ .

<sup>e</sup> C compared with T allele (HBV with HCC vs. healthy control); OR (95%CI) = 3.50 (2.09-5.87),  $P = 2.630 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 7.890 \times 10^{-7}$ .

<sup>f</sup> Autosomal dominant model CC+CT compared with TT genotype (HBV with HCC vs. healthy control); OR (95%CI) = 3.90 (2.20-6.94),  $P = 3.814 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 1.144 \times 10^{-6}$ .

<sup>g</sup> C compared with T allele (HBV without HCC vs. healthy control); OR (95%CI) = 3.61 (1.93-5.20),  $P = 9.169 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 2.751 \times 10^{-6}$ .

<sup>h</sup> AA compared with AG + GG genotype (HBV without HCC vs. self-limited HBV); OR (95%CI) = 0.32 (0.13 -0.723),  $P = 0.003$ ,  $P_c = 0.009$ .

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์แอสโทไทป์ของยีน *IFNAR2-F85* (rs2229207) และ *IL10RB-K47E* (rs2834167)

Haplotype	Haplotype frequency				HBV without HCC vs Healthy control		HBV with HCC vs Healthy control		Total HBV vs Healthy control	
	Healthy control	HBV without HCC	HBV with HCC	Total HBV	OR	$P_c$ value	OR	$P_c$ value	OR	$P_c$ value
CA	0.0248	0.0730	0.0841	0.0835	5.99	<b>0.039</b>	7.7	<b>0.016</b>	6.84	<b>0.014</b>
TA	0.3416	0.2498	0.2896	0.2902	0.63	0.116	0.80	0.887	0.69	0.732
CG	0.0779	0.1868	0.1852	0.1858	3.72	<b>0.001</b>	3.48	<b>0.002</b>	3.75	<b>0.002</b>
TG	0.5557	0.4904	0.4412	0.4406	0.72	0.414	0.59	<b>0.048</b>	0.66	0.059

หมายเหตุ HBV = Hepatitis B Virus  
HCC = Hepatocellular carcinoma  
OR = odds ratio  
 $P_c$  = corrected  $P$ -value

## วิจารณ์

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาเพื่อหาบทบาทของยีน *IFNAR2* และยีน *IL10RB* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม Class II cytokine receptor ในการเกิดโรคและการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประชากรไทย สนิปตำแหน่งที่สนใจศึกษา คือ *IFNAR2 -F8S* (rs2229207, T/C) ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากฟีนิลอะลานีนเป็นเซอรินและอยู่บริเวณ signal peptide ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการ Protein trafficking ของยีน *IFNAR2 -F8S* การพบอัลลีล C ที่ตำแหน่งนี้ มีผลให้การแสดงออกของโปรตีนที่ผิวหน้าเซลล์ต่ำลง รวมทั้งทำให้กระบวนการ signal transduction และ antiviral response (ซึ่งถูกเหนี่ยวนำจาก interferon alpha) ลดลงด้วย (Frodsham *et al.*, 2006)

จากผลการทดลอง ได้แสดงให้เห็นว่า ยีน *IFNAR2 -F8S* มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยอัลลีล C ในยีน *IFNAR2 -F8S* จะสูงขึ้นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพปกติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เคยติดเชื้อชั่วคราวและสามารถกำจัดเชื้อได้นั้น กลับไม่พบความสัมพันธ์ อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีการดำเนินโรคไปเป็นมะเร็งตับ และกลุ่มที่ติดเชื้อตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่มีการดำเนินโรคไปเป็นมะเร็งตับ พบว่ายีน *IFNAR2 -F8S* สัมพันธ์กับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ ดังนั้น สันนิษฐานได้ว่า อัลลีล C สัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เพราะไปส่งผลถึง กระบวนการ signal transduction และ antiviral response ตามที่กล่าวมาข้างต้น แต่ทั้งนี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาในประชากรกลุ่มใหญ่กว่านี้เพื่อยืนยันผลการศึกษาต่อไป

สนิปอีกตำแหน่งหนึ่งที่สนใจศึกษา คือ *IL10RB-K47E* (rs2834167, A/G) มีบทบาทในการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากไลซีนเป็นกรดกลูตามิก อยู่ในตำแหน่ง first extracellular FnIII domain repeat (Frodsham *et al.*, 2006) การศึกษาของ Frodsham *et al.* พบว่า อัลลีล A ของยีน *IL10RB-K47E* มีผลต่อการแสดงออกของ receptor ให้ลดต่ำลงทำให้กระบวนการ signal transduction ลดลงเช่นกัน จากผลการศึกษา ไม่พบความสัมพันธ์ของความถี่ของอัลลีลของสนิปตำแหน่งนี้กับกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพปกติ แต่เมื่อวิเคราะห์ความถี่ของจีโนไทป์กลับพบความสัมพันธ์ กล่าวคือ จีโนไทป์ AA ลดลงในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อและสามารถกำจัดเชื้อได้เอง และเมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม

คือ กลุ่มดัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ และกลุ่มที่ดัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ พบว่า มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจีโนไทป์ AA ในกลุ่มผู้ป่วยที่ดัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่มีการดำเนินโรคไปเป็นมะเร็งตับ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ระบุว่า จีโนไทป์ AA อาจจะเป็น protective genotype (Gong *et al.*, 2009) แต่ให้ผลการศึกษตรงข้ามกับการศึกษาในผู้ป่วยชาวจีน ที่ระบุว่าอัลลีล A อาจจะเป็นความเสี่ยงในการเป็นไวรัสตับอักเสบบี (Chen *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยเพิ่มจำนวนประชากรให้กลุ่มใหญ่ขึ้น และมีความหลากหลายของกลุ่มประชากรมากขึ้น เพื่อยืนยันผลการศึกษานี้อีกครั้ง

นอกจากนี้ ได้มีการวิเคราะห์ haplotype พบว่า haplotype ทั้งหมดที่มีอัลลีล C (CA และ CG) ในยีน *IFNAR2-F8S* (rs2229207) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการดัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ และไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ การวิเคราะห์ haplotype นี้ จึงเป็นสิ่งที่ยืนยันผลการทดลองก่อนหน้านี้ ที่ระบุว่าอัลลีล C มีความสำคัญต่อการเกิดโรคและการดำเนินโรคของไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง แต่ผลการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาในผู้ป่วยชาวจีน ที่ไม่พบความสัมพันธ์ใดๆ เลยในการวิเคราะห์ haplotype (Gong *et al.*, 2009) ดังนั้น การเพิ่มจำนวนประชากรให้มากขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษาเรื่องนี้ต่อไป

## สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *IFNAR2* และ *IL10R* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังในประเทศไทย พบความสัมพันธ์ระหว่าง ยีน *IFNAR2* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ พบว่าจีโนไทป์ homozygous AA ของ SNP *rs2834167* สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพียงชั่วคราว และสามารถกำจัดเชื้อได้ เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แสดงว่า *IL10RB* AA genotype อาจมีผลในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับบีแบบเรื้อรัง อาจจะเป็น protective genotype

ทั้งนี้ อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนประชากรตัวอย่าง และเพิ่มความหลากหลายของกลุ่มประชากรเพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ได้ในอนาคต

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ดวงรัตน์ จุลอักษร. 2546. การผลิตและศึกษาคุณสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ **Common Antigenic Determinant** ของไวรัสตับอักเสบบี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราโมทย์ ทองกระจาย. 2527. ไวรัสวิทยา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์. 2550. รู้ทันโรคตับ รู้ลึกเรื่องเปลี่ยนตับ. ศูนย์โรคตับและปลูกถ่ายตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, กรุงเทพฯ.
- มาลินี ศรีคำม้วน. 2551. รู้จริง รู้ชัด ไวรัสตับอักเสบบี บี ซี ดี และ อี. สำนักพิมพ์ไกลด์หมอ, กรุงเทพฯ.
- ยง ภู่วรรณ. 2552. จับเข้าคุยเรื่องไวรัสตับอักเสบบี กัยเงียบที่ป้องกันและรักษาได้. ศูนย์โรคตับ และปลูกถ่ายตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, กรุงเทพฯ.
- Ahn, S.H., K.H. Han, J.Y. Park, C.K. Lee, S.W. Kang, C.Y. Chon, Y.S. Kim, K. Park, D.K. Kim and Y.M. Moon. 2000. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. **Hepatology** 31(6): 1371-1373.
- Bayer, M.E., B.S. Blumberg and B. Werner. 1968. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. **Nature** 218(5146): 1057-1059.
- Ben-Ari, Z., E. Mor, O. Papo, B. Kfir, J. Sulkes, A.R. Tambur, R. Tur-Kaspa and T. Klein. 2003. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. **Am J Gastroenterol** 98(1): 144-150.

- Bertoletti, A. and A.J. Gehring. 2006. The immune response during hepatitis B virus infection. **J Gen Virol** 87(6): 1439-1449.
- Borden, E.C., G.C. Sen, G. Uze, R.H. Silverman, R.M. Ransohoff, G.R. Foster and G.R. Stark. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nat Rev Drug Discov** 6(12): 975-990.
- Chen, D.Q., Y. Zeng, J. Zhou, L. Yang, S. Jiang, J.D. Huang, L. Lu and B.J. Zheng. 2010. Association of candidate susceptible loci with chronic infection with hepatitis B virus in a Chinese population. **J Med Virol** 82(3): 371-378.
- Chong, W.P., Y.F. To, W.K. Ip, M.F. Yuen, T.P. Poon, W.H. Wong, C.L. Lai and Y.L. Lau. 2005. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology** 42(5): 1037-1045.
- Frodsham, A.J., L. Zhang, U. Dumpis, N.A. Taib, S. Best, A. Durham, B.J. Hennig, S. Hellier, S. Knapp, M. Wright, M. Chiaramonte, J.I. Bell, M. Graves, H.C. Whittle, H.C. Thomas, M.R. Thursz and A.V. Hill. 2006. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(24): 9148-9153.
- Gong, Q.M., X.F. Kong, Z.T. Yang, J. Xu, L. Wang, X.H. Li, G.D. Jin, J. Gao, D.H. Zhang, J.H. Jiang, Z.M. Lu and X.X. Zhang. 2009. Association study of IFNAR2 and IL10RB genes with the susceptibility and interferon response in HBV infection. **J Viral Hepat** 16(9): 674-680.
- Hardy, M.P., C.M. Owczarek, L.S. Jermin, M. Ejdebäck and P.J. Hertzog. 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. **Genomics** 84: 331-345.

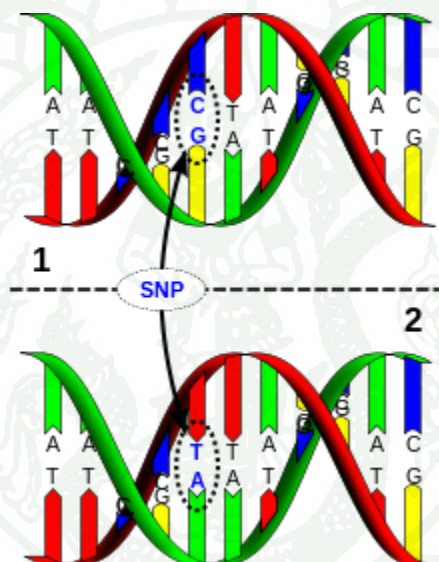
- Höhler, T., A. Kruger, G. Gerken, P.M. Schneider, Meyer ZumBüschenefelde K.H. and C. Rittner. 1998. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. **ClinExpImmunol** 111(3): 579-582.
- Kramvis, A., Michael K., Guido F. 2005. Hepatitis B virus genotypes. **Vaccine** 23: 2409–2423.
- Kim, W.R., J.T. Benson, T.M. Therneau, H.A. Torgerson, B.P. Yawn and L.J. Melton. 2004. Changing epidemiology of hepatitis B in a U.S. community. **Hepatology** 39(3): 811-816.
- Langer, J.A., E.C. Cutrone and S. Kotenko. 2004. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. **Cytokine Growth Factor Rev** 15(1): 33-48.
- Lin, T.M., C.J. Chen, M.M. Wu, C.S. Yang, J.S. Chen, C.C. Lin, T.Y. Kwang, S.T. Hsu, S.Y. Lin and L.C. Hsu. 1989. Hepatitis B virus markers in Chinese twins. **Anticancer Res** 9(3): 737-741.
- Lok, A.S. and B.J. McMahon. 2001. Chronic hepatitis B. **Hepatology** 34(6): 1225-1241.
- Migita, K., Y. Maeda, S. Abiru, M. Nakamura, A. Komori, S. Miyazoe, K. Nakao, H. Yatsuhashi, K. Eguchi and H. Ishibashi. 2007. Polymorphisms of interleukin-1 $\beta$  in Japanese patients with hepatitis B virus infection. **J Hepatol** 46(3): 381-386.
- Mohamed, R., P. Desmond, D.J. Suh, D. Amarpurkar, E. Gane, Y. Guangbi, J.L. Hou, W. Jafri, C.L. Lai, C.H. Lee, S.D. Lee, S.G. Lim, R. Guan, P.H. Phiet, T. Piratvisuth, J. Sollano and J.C. Wu. 2004. Practical difficulties in the management of hepatitis B in the Asia-Pacific region. **J GastroenterolHepatol** 19(9): 958-969.

- Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I. de Bakker, M.J. Daly and P.C. Sham. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am J Hum Genet** 81(3): 559-575.
- Rundle, A.T., J. Atkin and B. Sudell. 1975. Hepatitis associated antigen and the ABO locus in Down's syndrome. **Clin Genet** 8(1): 1-4.
- Takkenberg, R.B., C.J. Weegink, H.L. Zaaijer and H.W. Reesink. 2009. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. **Vox Sang** 98(4): 481-494.
- Thio, C.L., M. Carrington, D. Marti, S.J. O'Brien, D. Vlahov, K.E. Nelson, J. Astemborski and D.L. Thomas. 1999. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. **J Infect Dis** 179(4): 1004-1006.
- Thio, C.L., T.L. Mosbrugger, R.A. Kaslow, C.L. Karp, S.A. Strathdee, D. Vlahov, S.J. O'Brien, J. Astemborski and D.L. Thomas. 2004. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. **J Virol** 78(20): 11258-11262.
- Thursz, M.R., D. Kwiatkowski, C.E. Allsopp, B.M. Greenwood, H.C. Thomas and A.V. Hill. 1995. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. **N Engl J Med** 332(16): 1065-1069.
- White, O. D. and F. J. Fenner. 1994. **Hepadnaviridae and Deltavirus Medical Virology**. 4<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Zhang, Q., Y. Wang, L. Wei, D. Jiang, J.H. Wang, H.Y. Rao, L. Zhu, H. Chen, R. Fei and X. Cong. 2008. Role of ISGF3 in modulating the anti-hepatitis B virus activity of interferon-alpha in vitro. **J GastroenterolHepatol** 23(11): 1747-1761.



### ซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลิมอร์ฟิซึม (Single-nucleotide polymorphism)

ซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลิมอร์ฟิซึม (Single-nucleotide polymorphism) หรือสเนป (SNP) เป็นการแปรผันของลำดับดีเอ็นเอชนิดหนึ่งซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัวในจีโนมทำให้แตกต่างจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่นในสปีชีส์เดียวกันหรือต่างจากโครโมโซมอีกแห่งหนึ่งในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ตัวอย่างเช่น จีนส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันจากคนสองคนพบเป็น AAGCCTA และ AAGCTTA มีความแตกต่างที่นิวคลีโอไทด์ตัวหนึ่ง เช่นนี้กล่าวได้ว่า SNP นี้มี 2 อัลลีล โดย SNP ส่วนใหญ่มีเพียง 2 อัลลีลเท่านั้น



ภาพผนวกที่ 1 แสดงลักษณะของ SNP ที่เกิดขึ้นบนสาย DNA

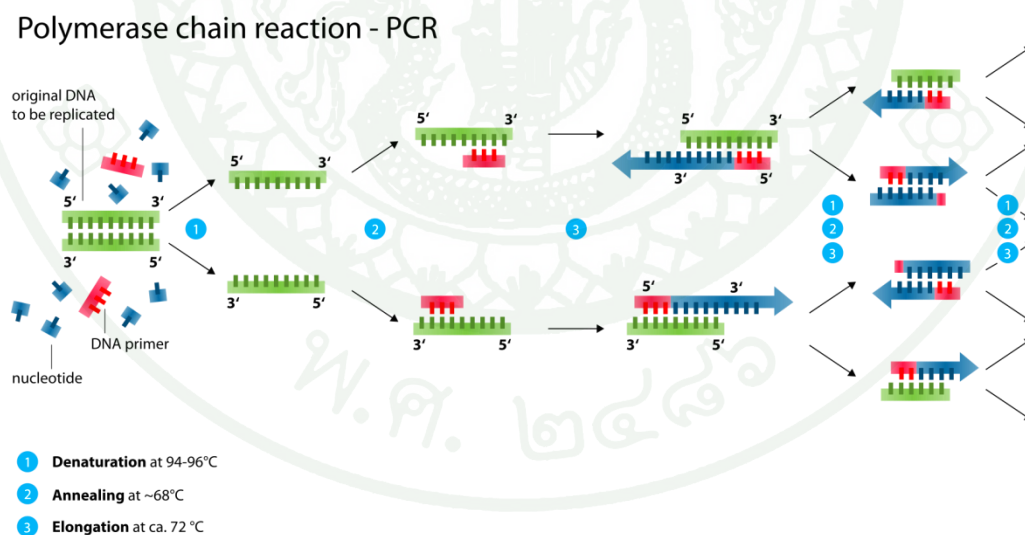
### เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR (Polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนของ DNA ส่วนที่ต้องการจาก DNA รวมทั้งหมดที่สกัดมาได้จุดเริ่มต้นของการทำ PCR คือส่วนผสมของ DNA ที่มีส่วนของ DNA ที่เราต้องการเพิ่มจำนวนอยู่มี oligonucleotide primer 1 คู่ที่มีลำดับเบส complementary กันกับลำดับเบสของปลาย 2 ข้างของ DNA ส่วนที่เราต้องการเพิ่มจำนวน (ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทราบลำดับเบสบางส่วนของ DNA ที่อยู่ใกล้หรือ DNA ส่วนที่เราต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อที่เราจะสามารถเพิ่มจำนวน DNA ส่วนนั้นๆได้)

## วิธีการทำ PCR ประกอบไปด้วย

1. denaturation ทำให้สาย double stranded DNA แยกตัวออกมาเป็น single stranded โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94°C
2. annealing หมายถึง การรวมตัวระหว่าง primer กับลำดับเบสที่ complementary กัน
3. polymerization หรือ extension หรือ elongation เป็นการต่อสาย primer ใช้เอนไซม์ DNA polymerase โดยในการนี้เราจะใช้ DNA polymerase ชนิดพิเศษที่เรียกว่า Taq (Tack) polymerase เป็น DNA polymerase ที่สกัดมาจากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้ (แบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาศัยอยู่บริเวณน้ำพุร้อน)

ทำซ้ำจากข้อ 1 ถึงข้อ 3 คือ heat denaturation, annealing of primers และ primer extension อีกหลายๆรอบโดยทั่วไปนิยมทำประมาณ 25 - 30 รอบ



ภาพผนวกที่ 2 วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ข้อเสียเปรียบประการหนึ่งของวิธี PCR คือ Taq polymerase ที่ใช้ไม่มีคุณสมบัติ proof reading ดังนั้นอาจมีความผิดพลาดในการนำเบสที่ถูกต้องมาต่อในสาย DNA นั้นได้ทำให้ได้เบสที่ผิดไปจาก DNA ต้นแบบอีกประการหนึ่ง PCR เป็นวิธีที่ไวต่อการปนเปื้อนของ DNA ถ้า DNA ตัวต้นถูกปนเปื้อนด้วย DNA อื่นซึ่ง primer สามารถจับได้ก็จะมีเพิ่มจำนวนส่วนของ DNA นั้นๆ พร้อมๆกับการเพิ่มจำนวน DNA ส่วนที่เราต้องการได้มีการประยุกต์นำเอาวิธีการและผลผลิตจาก PCR ไปใช้หลายด้านรวมทั้งการเพิ่มจำนวนของส่วนของ DNA เพื่อนำไปทำ DNA cloning หรือการเพิ่มจำนวนส่วนของ DNA ที่ต้องการจาก genomic DNA เพื่อใช้ไปทำ sequencing รวมถึงการใช้วิธี PCR ในการวินิจฉัยโรค

วิธี PCR นี้จำนวนของ DNA ส่วนที่ต้องการจะเพิ่มขึ้นแบบเรขาคณิตกล่าวคือถ้าเริ่มต้นจาก DNA 1 โมเลกุลรอบที่หนึ่งของ PCR จะได้ DNA 2 โมเลกุลรอบที่สองจะได้ 4 โมเลกุลรอบที่สามจะได้ 8 โมเลกุลอย่างนี้เรื่อยไปรอบที่สิบจะได้ 1,026 โมเลกุลรอบที่ยี่สิบจะได้ 1,048,576 โมเลกุล

วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย, รวดเร็วแต่ละรอบใช้เวลาไม่นาน แต่เราต้องรู้บางส่วนของลำดับเบสของ DNA ที่เราสนใจเพื่อเป็นประโยชน์ในการออกแบบและสังเคราะห์ primer PCR สามารถช่วยวินิจฉัยโรคได้เช่นใช้ PCR ในการตรวจค้นแบคทีเรียหรือไวรัสเช่น HIV (human immunodeficiency virus) ที่เป็นสาเหตุของโรค AIDS Human cytomegalovirus และ hepatitis B virus PCR ยังสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมโดยเฉพาะทำให้การตรวจสอบ single-copy sequence ใน DNA ของเซลล์เป็นไปได้ง่ายขึ้นมาก การประยุกต์ใช้ PCR ที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งคือ “ancient DNA analysis” คือการใช้ PCR เพิ่มจำนวน DNA ของซากของสิ่งมีชีวิตที่มีอายุเป็นร้อยหรือพันปีมาแล้วเช่น DNA จากมัมมี่จากซากแมลงเพื่อนำมาศึกษาค้นคว้าด้านวิวัฒนาการ เป็นต้น

## อิเล็กโทรโฟลซิส (Electrophoresis)

เป็นวิธีการแยกสารที่ผสมกันอยู่ในให้ออกจากกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้าหลักการของ electrophoresis คือเมื่อวางโมเลกุลที่มีประจุลงในสนามไฟฟ้าที่เกิดจากขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วที่อยู่ใต้สารละลายโมเลกุลของสารนั้นจะมีการเคลื่อนย้ายจากขั้วหนึ่ง ไปสู่ขั้วหนึ่ง โดยที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ ในขณะที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวกการเคลื่อนที่ในลักษณะนี้เราเรียกว่า electrophoresis ความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการคือแรงผลักดันซึ่งเกิดโดยสนามไฟฟ้ากระทำต่อโมเลกุลนั้นๆ ปัจจัยอีกประการหนึ่งคือแรงต้านทานการเคลื่อนที่ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่โมเลกุลนั้นเคลื่อนย้ายเข้าไปในตัวกลาง

เมื่อเริ่มเปิดสนามไฟฟ้าโมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ด้วยความเร่งจนกระทั่งถึงความเร็วที่สมดุลกับแรงต้านทานจากนั้นโมเลกุลจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่และเนื่องจากโมเลกุลของสารต่างๆ มีความแตกต่างกันทั้งขนาดรูปร่างและประจุไฟฟ้าทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกันจึงสามารถแยกออกจากกันได้การแยกสารโดยวิธี electrophoresis นี้จึงเป็นประโยชน์และเป็นที่ยอมรับอย่างมากในทางอณูชีววิทยานิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ในการแยกขนาดของ DNA และ โปรตีน

### Paper electrophoresis และ Gel electrophoresis

แม้ว่า electrophoresis จะสามารถกระทำได้ในสารละลายแต่จะเป็นการสะดวกกว่าเป็นอย่างมากถ้าทำให้โมเลกุลเหล่านี้เคลื่อนที่ในตัวกลางที่กำหนดให้แทนที่จะเคลื่อนที่ในสารละลายตัวกลางที่นิยมใช้มี 2 ประเภท คือ

1. paper electrophoresis ซึ่งนิยมใช้ในการแยกสารที่เป็นส่วนผสมของโมเลกุลที่มีประจุและมีขนาดเล็กโดยใช้กระดาษ (ส่วนมากเป็นกระดาษกรอง) นำมาทำให้เปียกด้วยสารละลายที่มีการควบคุม pH และนำมาวางไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วจากนั้นนำสารที่ต้องการจะแยกโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันไปหยดที่ตำแหน่งที่กำหนดบนกระดาษนั้นเมื่อเปิดสนามไฟฟ้าและปล่อยให้เคลื่อนที่เป็นเวลาพอเหมาะแล้วจึงนำเอากระดาษนั้นมาทำให้แห้งย้อมสีและเปรียบเทียบกับผลการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานที่เราทราบทำให้เราสามารถศึกษาโมเลกุลต่างๆ เหล่านั้นได้หรือถ้าใช้สารกัมมันตรังสีก็จะเอาไปประกบกับ film x-ray เป็นต้น

2. gel electrophoresis คือการใช้วุ้นเป็นตัวกลางซึ่งเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกวุ้นประกอบไปด้วยเนื้อวุ้นและสารละลายที่เหมาะสมและจะถูกหล่อเป็นแบบอยู่ระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นเนื้อวุ้นที่นิยมใช้มี 2 ชนิดคือ polyacrylamide ซึ่งเป็น cross-linked polymer ที่ละลายน้ำได้และ agarose ซึ่งเป็น polysaccharide ในเนื้อวุ้นที่หล่อเป็นแบบมีคุณสมบัติเป็นรูพรุนอยู่ภายในจากนั้นเนื้อวุ้นจะถูกนำไปตั้งไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วสารละลายที่เราต้องการศึกษาจะถูกหยดลงไปบนเนื้อวุ้นและเมื่อเราเปิดกระแสไฟฟ้าโมเลกุลในสารละลายนั้นก็จะมี การเคลื่อนที่ถ้าปัจจัยอื่นๆเหมือนกัน โมเลกุลใหญ่กว่าก็จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วช้ากว่า ยิ่งใช้เวลานานขึ้นก็จะเคลื่อนที่แยกกันได้ชัดเจนขึ้นเมื่อได้เวลาพอเหมาะก็จะปิดกระแสไฟฟ้าและนำวุ้นออกมาจากแผ่นกระจกแล้วนำไปย้อมสีหรือประกบกับ film x-ray ต่อไป

### อาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Frangment Length Polymorphism)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากการตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างเท่าที่ควร จึงมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน

เมื่อมี DNA polymorphism แล้ว บริเวณที่มีความหลากหลายนี้ อาจอยู่ในส่วนที่เป็นจุดตัดจำเพาะทำให้ restriction enzyme สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวขาดได้หรืออาจตัดไม่ได้ในจีโนมของต่างตัวบุคคลกัน จึงทำให้ขนาดของชิ้นส่วน RFLP (ที่บริเวณตำแหน่งเดียวกันของดีเอ็นเอในจีโนม) เป็นขนาดที่หลากหลายกัน

ถ้าพบ RFLP ในบริเวณโลคัสใดแล้วย่อมกล่าวได้ว่าต้องมีมิวแทนชันเกิดขึ้นที่บริเวณดังกล่าว เรียกแต่ละชิ้นส่วน RFLP ในตำแหน่งโลคัสเดียวกันว่า อัลลีล

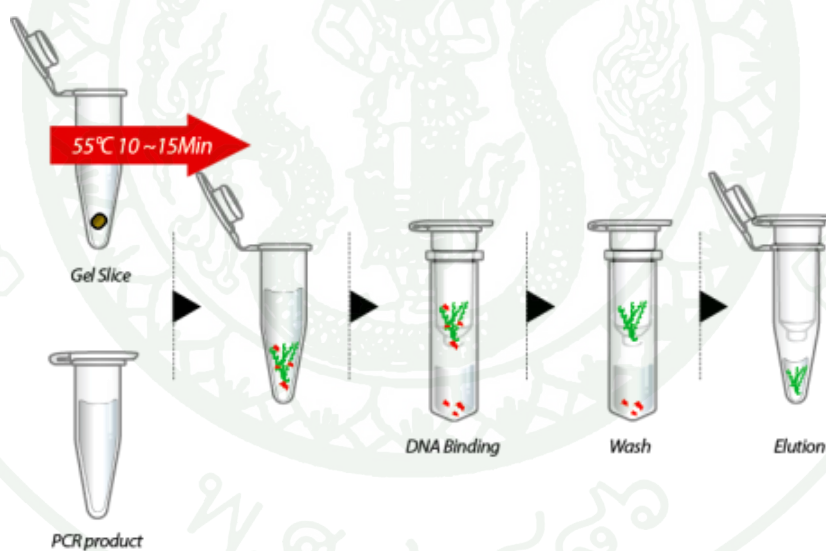
## DNA sequence

เทคนิคในการหา DNA sequence นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธีด้วยกันคือวิธีที่หนึ่ง พัฒนาขึ้นโดย Allan Maxam และ Walter Gilbert โดยใช้สารเคมีที่จะตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะโดยที่สำคัญ DNA ที่เราจะนำมาทำการหาลำดับเบสนั้นจะต้องเป็น DNA ชนิดเดียวกันและมีขนาดประมาณ 200-1000 bp วิธีนี้เรียกว่า Maxam-Gilbert sequencing ส่วนอีกวิธีหนึ่งนั้นเรียกว่า dideoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดย Fred Sanger โดยวิธีการใช้ enzyme มาต่อสาย DNA จาก primer ในปัจจุบันวิธี dideoxy เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด วิธีการหาลำดับเบสนั้นได้รับการพัฒนามาตลอด จนปัจจุบันนี้สามารถทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อนยุ่งยากนัก การหาลำดับเบสนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาสิ่งต่าง ๆ ทั้งในคน สัตว์ และพืช โดยในคน human genome project เป็นโครงการที่จะศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของคน ซึ่งได้เริ่มและดำเนินการติดต่อกันมาหลายปีแล้ว

สำหรับการส่งตรวจลำดับเบสโดยตรง (DNA sequencing) หลังจากเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเจลอิเล็กโตรโพลีซิสแล้ว ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด HiYield™ Gel PCR DNA Fragments Extraction Kit (ภาพที่ 3)



ภาพผนวกที่ 3 ชุดสกัด HiYield™ Gel PCR DNA Fragments Extraction Kit



ภาพผนวกที่ 4 ขั้นตอนการสกัด PCR product โดยใช้ชุด สกัด HiYield™ Gel PCR DNAFragments Extraction Kit

## การวิเคราะห์สแน็ปด้วยวิธีทางสถิติ

โปรแกรม PLINK v1.07 program ผลิตโดย Purcell S et al จาก the Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Boston (Purcell S et al., 2007). The software is available online at <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>. Input file format

ข้อมูล 2 ไฟล์ใช้กับโปรแกรม PLINK ประกอบด้วย PED file และ MAP file

### 1. PED file

PED file คือ white-space (space or tab) delimited file: คอลัมน์ที่ 1 - 6 มีหัวข้อดังนี้

Family ID

Individual ID

Paternal ID

Maternal ID

Sex (1=male; 2=female)

Phenotype (normal=1; SLE=2)

สำหรับคอลัมน์ที่ 7 ถัดมาคือจีโนไทป์ที่จะเป็นตัวอักษร (1,2,3,4 หรือ A,C,G,T และอื่นๆ)

ยกเว้นห้ามใส่เลขศูนย์

ตัวอย่างของ PED file (IFI2.ped) แสดงให้เห็นด้านล่าง

Marker	Chromosome	Genetic Distance	Base-pair Position	Marker Type
FN1	N1	0	0	2
FN2	N2	0	0	1
FN3	N3	0	0	2
FN4	N4	0	0	2
FN5	N5	0	0	2
FN6	N6	0	0	2
FN7	N7	0	0	2
FN8	N8	0	0	2
FN11	N11	0	0	2
FN14	N14	0	0	2
FN17	N17	0	0	2
FN18	N18	0	0	1
FN19	N19	0	0	2
FN20	N20	0	0	2
FN21	N21	0	0	1

## 2. MAP file

โดยค่าเริ่มต้นของแต่ละคอลัมน์ของ MAP file อธิบาย single marker ซึ่งมีข้อมูลจำนวน 4 แถวดังนี้

chromosome (1-22, X, Y or 0 if unplaced)

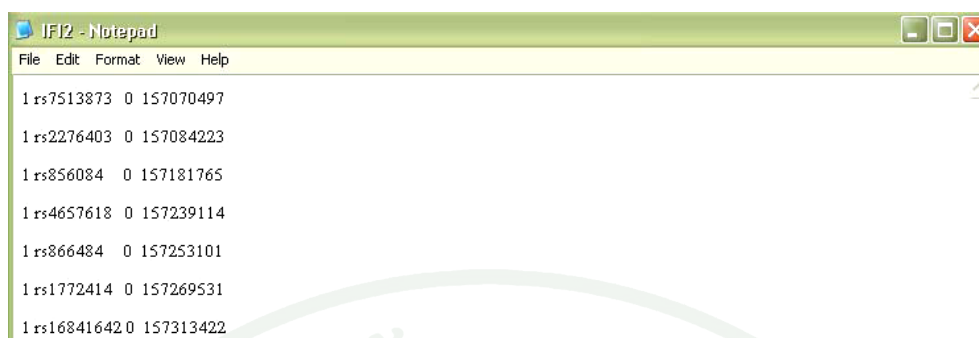
rs# or snp identifier

Genetic distance (morgans)

Base-pair position (bp units)

การวิเคราะห์ส่วนใหญ่ไม่จำเป็นต้องเป็นแผนที่ทางพันธุกรรมที่ถูกระบุไว้ในกรณีใดๆ specifying a genetic (cM) map เป็นสิ่งสำคัญที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ที่หาส่วนที่ใช้ร่วมกันระหว่างบุคคลสำหรับการทดสอบการเชื่อมโยงขึ้นพื้นฐานคอลัมน์ระยะทางพันธุกรรมที่สามารถตั้งค่าที่ 0

ตัวอย่างของ MAP file (IFI2.map) แสดงให้เห็นด้านล่าง



```

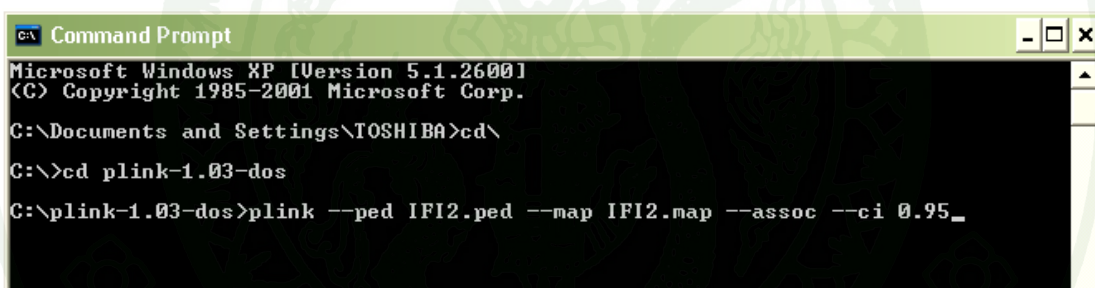
1 rs7513873 0 157070497
1 rs2276403 0 157084223
1 rs856084 0 157181765
1 rs4657618 0 157239114
1 rs866484 0 157253101
1 rs1772414 0 157269531
1 rs16841642 0 157313422

```

## การ Running ของโปรแกรม PLINK

### 1. Allelic association test

เพื่อดำเนินการมาตรฐานกรณี / การควบคุมการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามคำสั่งข้างล่างนี้



```

C:\>cd plink-1.03-dos
C:\plink-1.03-dos>plink --ped IFI2.ped --map IFI2.map --assoc --ci 0.95_

```

CHR	Chromosome
SNP	SNP ID
BP	Physical position (base-pair)
A1	Minor allele name (based on whole sample)
F_A	Frequency of this allele in cases
F_U	Frequency of this allele in controls
A2	Major allele name
	PExact p-value for this test
	OREstimated odds ratio (for A1)
L95	Lower bound of 95% confidence interval for odds ratio
U95	Upper bound of 95% confidence interval for odds ratio

ตัวอย่างของ output file แสดงให้เห็นด้านล่าง

CHR	SNP	BP	A1	F A	F U	A2	CHISQ	P	OR	L95	U95
1	rs7513873	157070497	A	0.1256	0.1156	G	0.1811	0.6704	1.099	0.7104	1.701
1	rs2276403	157084223	T	0.09231	0.08333	C	0.1912	0.6619	1.119	0.6766	1.849
1	rs856084	157181765	G	0.2974	0.3683	T	4.309	0.03792	0.7262	0.5366	0.9827
1	rs4657618	157239114	T	0.4128	0.4113	C	0.00184	0.9658	1.006	0.7541	1.343
1	rs866484	157253101	G	0.5	0.422	C	4.655	0.03096	1.369	1.029	1.823
1	rs1772414	157269531	G	0.5128	0.4274	A	5.573	0.01824	1.41	1.06	1.876
1	rs16841642	157313422	T	0.4333	0.414	G	0.2921	0.5889	1.083	0.812	1.443

ยังมีการดำเนินการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงตามคำสั่งข้างล่างนี้

```
C:\plink-1.03-dos>plink --ped IFI2.ped --map IFI2.map --assoc --mperm 100000
```

## 2. Model of inheritance analysis

การทดสอบ dominantmodels และ recessive models คือการศึกษาเพื่อ minor allele ( ซึ่ง minor allele สามารถพบใน output ของคำสั่ง -- assoc หรือ -- freq

สมมติถ้า D คือ minor allele และ d คือ major allele

Allelic: D versus d  
 Dominant: (DD, Dd) versus dd  
 Recessive: DD versus (Dd, dd)  
 Genotypic: DD versus Dd versus dd

จากกล่าวข้างต้น ทำการทดสอบตามคำสั่งข้างล่างนี้

```
C:\plink-1.03-dos>plink --ped IFI2.ped --map IFI2.map --model
```

## การเตรียมสารเคมี

### 1. Primer

เตรียม stock ให้เป็น 200 pmol/ $\mu$ l โดยการคำนวณ

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 100 \times 568 &= 200 \times V_2 \\ V_2 &= (568 \times 100)/200 \\ V_2 &= 284 \end{aligned}$$

เตรียม working ให้เป็น 20 pmol/ $\mu$ l ปริมาตร 100  $\mu$ l โดยการคำนวณ

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 200 \times V_1 &= 20 \times 100 \\ V_1 &= (20 \times 100)/200 \\ V_1 &= 10 \end{aligned}$$

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 90  $\mu$ l ใช้ primer 10  $\mu$ l

### 2. 5 M NaCl

NaCl	29.22	g
Distilled water	100	ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH ที่ 7.2 ผสมสารละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C เวลา 15 นาที

### 3. EDTA

EDTA	37.22	g
Distilled water	200	ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 200 ml ปรับ pH ที่ 8.0 ผสมสารละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C เวลา 15 นาที

### 4. 50x Tris-acetate buffer (TAE)

Tris base	424.0	g
Glacial acetic acid	57.1	g
0.5 M EDTA pH 8.0	100	ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 ml ปรับ pH ที่ 8.0 ผสมสารละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C เวลา 15 นาที

### 5. 10 mg/ml Ethidium bromide

Ethidium bromide	1.0	g
Distilled water	100	ml

ผสมสารละลายและเก็บไว้ที่มืด 4 °C

### 6. 1.5% Agarose gel

Agarose	0.3	g
1x TAE	20	ml

ละลายด้วยความร้อนในเตาอบไมโครเวฟและเครื่องผสมเป็นครั้งคราวจนไม่มีเม็ด agarose



## Association of *IFNAR2* and *IL10RB* genes in chronic hepatitis B virus infection

S. Romporn<sup>1</sup>, N. Hirankarn<sup>2</sup>, P. Tangkijvanich<sup>3</sup> & I. Kimkong<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

<sup>2</sup> Immunology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>4</sup> Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, National Research University-Kasetsart University, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, Thailand

### Key words

chronic hepatitis B; hepatocellular carcinoma; interleukin-10 receptor subunit beta; single nucleotide polymorphisms; type I interferon receptor 2

### Correspondence

Ingorn Kimkong, PhD  
Department of Microbiology  
Faculty of Science  
Kasetsart University  
Bangkok, 10900  
Thailand  
Tel: +66 2 5625555 ext. 4040  
Fax: +66 2 5792081  
e-mail: fsciok@ku.ac.th

Received 25 November 2012; revised 7 March 2013; accepted 19 April 2013

doi: 10.1111/tan.12133

### Abstract

In this study, we investigated the effects of two functional polymorphisms, type I interferon receptor 2 gene (*IFNAR2*)-F8S and interleukin-10 receptor subunit beta gene (*IL10RB*)-K47E, on chronic hepatitis B virus (HBV) infection. We included 227 Thai patients with chronic HBV infection [100 with hepatocellular carcinoma (HCC) and 127 non-HCC], 170 individuals with self-limited HBV infection and 150 healthy controls. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to analyze these two single nucleotide polymorphisms (SNPs). In this study, the C allele of *IFNAR2*-F8S was found to be significantly increased in chronic HBV patients when compared with healthy controls [odds ratio, OR (95% confidence interval, CI) = 3.31 (2.11–5.21),  $P = 6.214 \times 10^{-9}$  and corrected  $P$ -value,  $P_c = 1.864 \times 10^{-8}$ ]. The effect of this allele was similar to that of an autosomal dominant gene in the presence of CC and CT genotype, when compared to TT with an OR of 4.02 ( $P = 4.631 \times 10^{-9}$  and  $P_c = 1.389 \times 10^{-8}$ ). Furthermore, AA genotype of *IL10RB*-K47E was found to be significantly decreased in chronic HBV patients compared with individuals with self-limited HBV infection ( $P = 0.006$ ,  $P_c = 0.018$  and OR = 0.45). For haplotype analysis, we found CA and CG haplotypes were associated with susceptibility to chronic HBV ( $P = 0.014$ , OR = 6.84 and  $P = 0.002$ , OR = 3.75, respectively) when compared with healthy individuals. This study suggests that *IFNAR2*-F8S polymorphisms might be involved in the susceptibility to chronic HBV infection. Moreover, AA genotype of *IL10RB*-K47E may provide a protective effect in this disease. However, an association study using a larger sample size should be performed to confirm these findings.

### Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection is the most common cause of acute and chronic hepatitis. Although the number of HBV infection has been reduced by the use of an effective HBV vaccine, there remain 350 million individuals worldwide infected chronically and who become carriers of the virus. In addition, chronic HBV infection is associated with the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) leading to the death of approximately 1 million people each year (1). Thailand has been classified as a region of intermediate endemicity as well as Taiwan, India, Pakistan, Korea and Philippines (2). Chinese twin studies showed a higher concordance rate for hepatitis B e antigen (HBeAg) persistence in monozygotic twins as compared with dizygotic twins (3). Therefore, the difference of host genetics might

affect the different outcomes of patients with HBV infection. Several studies indicate an association between human leukocyte antigen gene (HLA) with this disease and/or the ability to eliminate HBV (4–6). However, recent studies showed that non-HLA genes are likely to be involved more than HLA genes. In a whole genome study of Frodsham et al., a cluster of class II cytokine receptor gene on chromosome 21q22 was identified as a major susceptibility locus (7). Further study of Frodsham et al. found *IFNAR2*-F8S and *IL10RB*-K47E that are nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were significantly associated with outcome of persistent HBV infection in Gambians (7). Moreover, several studies in Chinese populations reported that these two functional SNPs were associated with susceptibility to chronic HBV infection (8, 9). However, these studies have shown controversial results. In

the Chen study (9), IL10RB SNP, A allele was found to be at risk for chronic HBV infection, whereas Gong et al's study (8) showed the protective effect of this allele. For IFNAR2 SNP, the study of Gong et al. found that CC (SS) genotype was associated with HBeAg negative patients and the T (F) allele was associated with the risk to high viral loads. However, these results were not found in Chen et al's study. Therefore, we investigated the effects of these two polymorphisms on chronic HBV infection in a Thai population.

## Materials and methods

### Subjects

Two hundred and twenty-seven Thai patients with chronic HBV infection from Chulalongkorn Memorial Hospital were recruited in this study. The diagnosis of chronic hepatitis B was established by seropositivity for hepatitis B surface antigen (HBsAg) over a 6-month period and did not have any other types of liver diseases such as chronic hepatitis C or alcoholic liver disease. In addition, all patients had elevated serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels. Patients with chronic HBV infection were further divided into two groups: without ( $N = 127$ ; 50 women and 77 men; mean age  $\pm$  SD =  $44.44 \pm 14.63$  years) and with HCC ( $N = 100$ ; 15 women and 85 men; mean age  $\pm$  SD =  $53.96 \pm 16.97$  years) according to the absence or presence of concurrent HCC. Diagnosis of HCC was based on histopathology and/or a combination of mass lesion in the liver from hepatic imaging and serum alpha fetoprotein level  $>400$  ng/ml. Moreover, self-limited HBV group served as control for the population-based case-control study contained 170 subjects (89 women and 81 men; mean age  $\pm$  SD =  $48.41 \pm 13.76$  years), who tested HBsAg negative and both HBV core antibody (anti-HBc) and HBV surface antibody (anti-HBs) positive, with normal liver function tests, and no history of HBV vaccination. Moreover, 150 ethnically and geographically matched controls (86 women and 64 men; mean age  $\pm$  SD =  $24.27 \pm 7.19$  years) from healthy blood donor of the Thai Red Cross Society were recruited as healthy control group. The ethics committee of the faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand approved the study and the subjects gave their informed consent. Demographical characteristics and clinical profiles of subjects are shown in Table 1.

### DNA extraction and genotyping study

DNA was extracted from the buffy coat collected with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant, using the salting-out method (10). DNA was aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to analyze the polymorphisms

of IFNAR2 gene [F8S, rs2229207 (T/C)] and IL10RB gene [K47E, rs2834167 (A/G)]. The primer sequences for IFNAR2-F8S were newly designed in this study. The forward primer was 5'-CTATTCCTTACAGGTCTCTC-3' and the reverse primer was 5'-GCAGCACTTACCCATGAG-3'. PCR conditions were as follows: predenaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min, followed by 35-step cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 50 s and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s, with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min;  $10\ \mu\text{l}$  of PCR products were digested with *Xmn*I for 16 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The digestion products were separated on 4% agarose gel and visualized under ultraviolet light with ethidium bromide staining. For IL10RB-K47E, analysis of this SNP was previously described by Chen et al. (9). Ten percent of the samples were confirmed by direct sequencing of PCR products to verify the accuracy of genotyping.

### Statistical Analysis

Genotype frequencies were checked for consistency among normal controls with those expected from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Allele and genotype frequencies were compared between groups using the chi-squared ( $\chi^2$ ) test or Fisher's exact probability test, where appropriate. The PLINK v1.07 program was used to calculate HWE,  $P$ -values, odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs), as well as for haplotype analysis (11). A  $P$ -value of  $<0.05$  was considered statistically significant. In the case of multiple comparisons, corrected  $P$ -value ( $P_c$ ) for a number of comparisons (Bonferroni correction) was applied.

### Results

The distribution of genotype and allele frequencies of IFNAR2-F8S (rs2229207, T/C) and IL10RB-K47E (rs2834167, A/G) polymorphisms in chronic HBV patients (with HCC and without HCC), self-limited HBV patients and healthy controls is shown in Table 2. In this study, both SNPs were in HWE when comparing the observed and expected genotype frequencies of each SNP ( $P > 0.05$ ).

In our study, we found statistically significant differences in the allele frequency of IFNAR2-F8S between patients with chronic HBV and healthy controls. The C allele of this SNP was significantly associated with an increased risk in chronic HBV infection as compared with healthy individuals [OR (95% CI) = 3.31 (2.11–5.21),  $P = 6.214 \times 10^{-9}$  and  $P_c = 1.864 \times 10^{-8}$ ]. The effect of C allele was similar to autosomal dominant in which the presence of CC and CT genotype when compared with TT conferred the OR of 4.02 (95% CI = 2.41–6.75,  $P = 4.631 \times 10^{-9}$  and  $P_c = 1.389 \times 10^{-8}$ ). In addition, we classified the total chronic HBV group into those with HCC ( $N = 100$ ) and those without HCC ( $N = 127$ ). Our finding showed a significant difference of C allele of

**Table 1** Demographical characteristics and clinical profiles of subjects

	Healthy subjects	Self-limited HBV infection	Chronic HBV infection	
			Without HCC	With HCC
Number of subjects	150	170	127	100
Gender (female/male)	86/64	89/81	50/77	15/85
Age (mean $\pm$ SD)	24.27 $\pm$ 7.19	48.41 $\pm$ 13.76	44.44 $\pm$ 14.63	53.96 $\pm$ 16.97
ALT (U/l) (mean $\pm$ SD)	NA	NA	160.59 $\pm$ 225.95	61.86 $\pm$ 50.26
AST (U/l) (mean $\pm$ SD)	NA	NA	110.34 $\pm$ 136.84	87.6 $\pm$ 90.88
HBV DNA (log <sub>10</sub> ) (mean $\pm$ SD)	NA	NA	5.53 $\pm$ 1.77	5.75 $\pm$ 2.19

HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; NA, not applicable.

**Table 2** Genotype and allele frequencies of IFNAR2-F8S and IL10RB-K47E gene polymorphisms in chronic HBV patients (with HCC and without HCC), self-limited HBV patients and healthy controls

SNP	Genotype/allele	Total HBV N = 227 (%)	HBV with HCC N = 100 (%)	HBV without HCC N = 127 (%)	Self-limited HBV N = 170 (%)	Healthy control N = 150 (%)
IFNAR2-F8S (rs2229207,T/C)	CC	13 (5.73) <sup>a</sup>	7 (7) <sup>d</sup>	6 (4.72) <sup>f</sup>	10 (5.88)	2 (1.33)
	CT	96 (42.29) <sup>a</sup>	42 (42) <sup>d</sup>	54 (42.52) <sup>f</sup>	86 (50.59)	26 (17.33)
	TT	118 (51.98)	51 (51)	67 (52.76)	74 (43.53)	122 (81.33)
	C	122 (26.87) <sup>b</sup>	56 (28) <sup>e</sup>	66 (25.98) <sup>g</sup>	106 (31.18)	30 (10.00)
IL10RB-K47E (rs2834167,A/G)	T	332 (73.13)	144 (72)	188 (74.02)	234 (68.82)	270 (90.00)
	AA	22 (9.69) <sup>c</sup>	13 (13)	9 (7.09) <sup>h</sup>	33 (19.41)	19 (12.67)
	AG	115 (50.66)	51 (51)	64 (50.39)	67 (39.41)	69 (46.00)
	GG	90 (39.65)	36 (36)	54 (42.52)	70 (41.18)	62 (41.33)
	A	159 (35.02)	77 (39)	82 (32.28)	133 (39.12)	107 (35.67)
	G	295 (64.98)	123 (62)	172 (67.72)	207 (60.88)	193 (64.33)

HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; SNP, single nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>Autosomal dominant model CC + CT compared with TT genotype (total HBV vs healthy control); OR (95% CI) = 4.02 (2.41–6.75),  $P = 4.631 \times 10^{-9}$ ,  $P_c = 1.389 \times 10^{-8}$ .

<sup>b</sup>C compared with T allele (total HBV vs healthy control); OR (95% CI) = 3.31 (2.11–5.21),  $P = 6.214 \times 10^{-9}$ ,  $P_c = 1.864 \times 10^{-8}$ .

<sup>c</sup>AA compared with AG + GG genotype (total HBV vs self-limited HBV); OR (95% CI) = 0.45 (0.24–0.83),  $P = 0.006$ ,  $P_c = 0.018$ .

<sup>d</sup>Autosomal dominant model CC + CT compared with TT genotype (HBV with HCC vs healthy control); OR (95% CI) = 4.19 (2.29–7.70),  $P = 6.734 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 2.020 \times 10^{-6}$ .

<sup>e</sup>C compared with T allele (HBV with HCC vs healthy control); OR (95% CI) = 3.50 (2.09–5.87),  $P = 2.630 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 7.890 \times 10^{-7}$ .

<sup>f</sup>Autosomal dominant model CC + CT compared with TT genotype (HBV with HCC vs healthy control); OR (95% CI) = 3.90 (2.20–6.94),  $P = 3.814 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 1.144 \times 10^{-6}$ .

<sup>g</sup>C compared with T allele (HBV without HCC vs healthy control); OR (95% CI) = 3.61 (1.93–5.20),  $P = 9.169 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 2.751 \times 10^{-6}$ .

<sup>h</sup>AA compared with AG + GG genotype (HBV without HCC vs self-limited HBV); OR (95% CI) = 0.32 (0.13–0.723),  $P = 0.003$ ,  $P_c = 0.009$ .

IFNAR2-F8S (rs2229207) between chronic HBV patients with HCC vs healthy control [OR (95% CI) = 3.50 (2.09–5.87),  $P = 2.630 \times 10^{-7}$  and  $P_c = 7.890 \times 10^{-7}$ ] and the patients without HCC vs healthy controls [OR (95% CI) = 3.61 (1.93–5.20),  $P = 9.169 \times 10^{-7}$  and  $P_c = 2.751 \times 10^{-6}$ ]. The effect of C allele seems to be autosomal dominant with an OR of 4.19 (95% CI = 2.29–7.70,  $P = 6.734 \times 10^{-7}$  and  $P_c = 2.020 \times 10^{-6}$ ) for patients with HCC and the OR of 3.90 (95% CI = 2.20–6.94,  $P = 3.814 \times 10^{-7}$ ,  $P_c = 1.144 \times 10^{-6}$ ) in the patients without HCC.

For IL10RB-K47E, AA genotype was found to be significantly decreased in chronic HBV patients compared with those with self-limited HBV infection [OR (95% CI) = 0.45 (0.24–0.83),  $P = 0.006$  and  $P_c = 0.018$ ]. When we classified total chronic HBV patients into those with HCC and those without HCC, we found that only the chronic HBV patients

without HCC still showed a significant decrease in the frequency of AA genotype as compared with the self-limited HBV group [OR (95% CI) = 0.32 (0.13–0.72),  $P = 0.003$ ,  $P_c = 0.009$ ].

Furthermore, we performed haplotype analysis of these two SNPs of IFNAR2-F8S and IL10RB-K47E. The results of haplotype analysis are shown in Table 3. There were four haplotypes including CA, TA, CG and TG. To test the association of IFNAR2-IL10RB haplotype and disease development, we compared each tested haplotype with the other three haplotypes between patient groups and healthy controls. In this study, we found significant association between CA and CG haplotypes and risk to chronic HBV infection [total chronic HBV (OR = 6.84 and  $P_c = 0.014$ ), with HCC (OR = 7.7 and  $P_c = 0.016$ ), without HCC (OR = 5.99 and  $P_c = 0.039$ ); total chronic HBV (OR = 3.75 and  $P_c = 0.002$ ), with HCC

**Table 3** Haplotype analysis for IFNAR2-F8S (rs2229207) and IL10RB-K47E (rs2834167)

Haplotype	Haplotype frequency				HBV without HCC vs Healthy control		HBV with HCC vs Healthy control		Total HBV vs Healthy control	
	Healthy control	HBV without HCC	HBV with HCC	Total HBV	OR	$P_c$ value	OR	$P_c$ value	OR	$P_c$ value
CA	0.0248	0.0730	0.0841	0.0835	5.99	<b>0.039</b>	7.7	<b>0.016</b>	6.84	<b>0.014</b>
TA	0.3416	0.2498	0.2896	0.2902	0.63	0.116	0.80	0.887	0.69	0.732
CG	0.0779	0.1868	0.1852	0.1858	3.72	<b>0.001</b>	3.48	<b>0.002</b>	3.75	<b>0.002</b>
TG	0.5557	0.4904	0.4412	0.4406	0.72	0.414	0.59	<b>0.048</b>	0.66	0.059

HBV, hepatitis B Virus; HCC, hepatocellular carcinoma; OR, odds ratio;  $P_c$ , corrected  $P$ -value.

(OR = 3.48 and  $P_c = 0.002$ ), without HCC (OR = 3.72 and  $P_c = 0.001$ ), respectively]. In contrast, TG was observed to be a protective haplotype. The protective association of TG haplotype was found only in chronic HBV patients with HCC when compared with healthy controls (OR = 0.59 and  $P_c = 0.048$ ).

### Discussion

In this study, we investigated the association between of IFNAR2-F8S (rs2229207, T/C) and IL10RB-K47E (rs2834167, A/G) polymorphisms and the susceptibility to chronic HBV infection. Our results suggest that the IFNAR2-F8S polymorphism might be important in the susceptibility to chronic HBV infection. In this study, we found that the C allele (S allele) of IFNAR2-F8S was higher in the chronic hepatitis B group when compared with healthy controls, but not when compared with the self-limited HBV group. The association of this SNP seems to be a dominant effect by model of inheritance analysis. Our results were consistent with previous Chinese studies of Chen et al. (9) and Gong et al. (8) who found no differences in the allele frequency in chronic HBV infection patients when compared to patients with self-limited HBV. However, these studies did not compare chronic HBV patients with healthy individuals. Our study is the first to report comparisons with healthy controls, which indicates susceptibility to chronic HBV. It is interesting that the genotype frequency between healthy controls and self-limited HBV differ. Our finding suggests that this SNP might be influential in individuals susceptible to HBV infection and lead to chronic HBV infection. The negative association in patients with self-limited HBV suggests that this SNP might not be important for viral clearance. In addition, we divided chronic HBV patients into patients with HCC and patients without HCC groups. Our results showed that IFNAR2-S allele was associated with both groups when compared with healthy controls. This suggests that the IFNAR2 polymorphism affect susceptibility to the chronic HBV infection but not the progression of HCC. IFNAR2 gene is a member of class II cytokine receptor family located on chromosome 21 (12). The IFNAR2-F8S (rs2229207, T/C) is nonsynonymous SNP altering amino acid from phenylalanine to serine. This SNP is located on

signal peptide region, which is important in IFNAR2 protein trafficking to the membrane. The risk S allele found in this study associates with lower cell surface protein expression of IFNAR2 (7). Furthermore, the enhancement of signal transduction and antiviral response induced by interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) is lesser in cells expressing the S than the F allele (7). These observations suggest that S allele of IFNAR2 gene might be responsible for the risk of chronic HBV infection and the development of HCC by affecting the protein expression of IFNAR2 on the cell surface, leading to impaired signal transduction and antiviral response. However, the functionality of this polymorphism in our Thai patients should be further determined in more like studies.

For IL10RB-K47E (rs2834167, A/G), we did not find the association of allele frequency of this SNP between chronic HBV patients and healthy controls. However, when we analyzed genotype frequencies, the AA (KK) genotype was significantly decreased in chronic HBV patients when compared with patients with self-limited HBV infection. In addition, we observed that only the chronic HBV without HCC group showed a significant decrease in the frequency of KK genotype compared with patients with self-limited HBV infection when the total chronic HBV was classified into with and without HCC subgroups. Our results are consistent with a previous study suggesting that the KK might be a protective genotype in patients with persistent infection (8). However, these results differed from the study of Chen et al. (9) who found that the A allele may be a risk for chronic HBV infection. However, further study in other populations might confirm these finding. IL10RB-K47E is a nonsynonymous SNP changing amino acid from lysine to glutamic acid. This SNP is located on the first extracellular FnIII domain repeat region. There has been report that K allele of IL10RB gene affected lower receptor expression, resulting in the decrease of signal transduction (7). The reduced IL-10/IL-10R signal might cause the blockade of immunoregulatory role of IL-10 and lead to the resolution of chronic HBV infection. Further study is required to prove this hypothesis.

In haplotype analysis, we found that all haplotypes having risk C allele from IFNAR2 gene (CA and CG haplotypes) showed significant association with susceptibility to chronic HBV infection in both the patients with HCC and without HCC. This confirmed the importance of C allele in disease

susceptibility and the progression of HCC. However, these results are inconsistent with the study of Gong et al. (8) in which no significant associations were found by haplotype analysis. Increased sample sizes and further studies are needed to confirm this finding.

In conclusion, we found an association between IFNAR2-F8S polymorphisms and susceptibility to chronic HBV infection. Furthermore, a protective effect of AA genotype of IL10RB-K47E was observed in this study. Nevertheless, an association study using a larger sample size should be performed to further verify our findings.

#### Acknowledgments

This study was supported by the research grant from Thailand Research Fund (RMU5180051, MRG5480191 and BRG5580005), faculty of Science (PRF12/2553 and ScRF-E1/2554), the Graduate School, Kasetsart University, Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI), the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (HR1163A) and Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer, Chulalongkorn University.

#### Conflict of Interests

The authors have declared no conflicting interests.

#### References

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; **11**: 97–107.
2. Mohamed R, Desmond P, Suh DJ et al. Practical difficulties in the management of hepatitis B in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; **19**: 958–69.
3. Lin TM, Chen CJ, Wu MM et al. Hepatitis B virus markers in Chinese twins. *Anticancer Res* 1989; **9**: 737–41.
4. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1065–9.
5. Thio CL, Carrington M, Marti D et al. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999; **179**: 1004–6.
6. Ahn SH, Han KH, Park JY et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; **31**: 1371–3.
7. Frodsham AJ, Zhang L, Dumpis U et al. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 9148–53.
8. Gong QM, Kong XF, Yang ZT et al. Association study of IFNAR2 and IL10RB genes with the susceptibility and interferon response in HBV infection. *J Viral Hepat* 2009; **16**: 674–80.
9. Chen DQ, Zeng Y, Zhou J et al. Association of candidate susceptible loci with chronic infection with hepatitis B virus in a Chinese population. *J Med Virol* 2010; **82**: 371–8.
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
11. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 559–75.
12. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; **15**: 33–48.

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวสิรินัดดา ร่วมพร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 เมษายน พ.ศ. 2523
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลภูมิพล กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	<ol style="list-style-type: none"> <li>นำเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง Class II cytokine receptor gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in Hepatitis B virus infectious ในงาน International Singapore Symposium of Immunology ครั้งที่ 5 วันที่ 7-8 มิถุนายน 2555 ที่ประเทศสิงคโปร์</li> <li>ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการเรื่อง Association of IFNAR2 and IL10RB genes in chronic hepatitis B virus infection ลงในวารสาร Tissue Antigen, 2013 Jul;82(1):21-5. doi:10.1111/tan.12133.</li> <li>ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการเรื่อง การประเมินความคงตัวของวัคซีนบีซีจีชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศ ลงในวารสารวิชาการสาธารณสุข, 2557</li> </ol>
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนการตีพิมพ์ผลงานวิทยานิพนธ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์