ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47277

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างหน้าที่ของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* และ *NQO1* กับการสัมผัสสารบางชนิดกำเนิดมะเร็งและความเสี่ยงในการเกิดโรค acute lymphoblastic leukemia ในเด็กไทย

นางสาวภัทรนุช อึ้งบำเหน็จ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47277
b00254236

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์ของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* และ *NQO1* กับการสัมผัสสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและความเสี่ยงในการเกิดโรค acute lymphoblastic leukemia ในเด็กไทย

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

นางสาวภัทรมน อึ่งบำเหน็จ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4 8 7 4 7 6 8 4 3 0

INTERACTION BETWEEN *GSTM1, GSTT1, CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN

Miss Pattramon Aungbamnet

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	INTERACTION BETWEEN *GSTM1, GSTT1, CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN
By	Miss Pattramon Aungbamnet
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Associate Professor Issarang Nuchprayoon

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Medicine

(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Narin Hiransuthikul, M.D., Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

ภัทรมน อึ่งบำเหน็จ : ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์ของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* และ *NQO1* กับการสัมผัสสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและความเสี่ยงในการเกิดโรค acute lymphoblastic leukemia ในเด็กไทย (INTERACTION BETWEEN *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN) อ. ที่ปรึกษา : รศ.นพ.อิศรางค์ นุชประยูร, 66 หน้า

E 47277

มะเร็งเม็ดเลือดขาว acute lymphoblastic leukemia (ALL) เป็นโรคที่พบมากที่สุดของมะเร็งที่พบในเด็ก สาเหตุของการเกิด ALL มีหลายปัจจัยซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวกับกระบวนการทำลายสารก่อมะเร็ง คือเอนไซม์พวก xenobiotic-metabolizing เช่น cytochrome P-450 (*CYP*), glutathione-S-transferase (*GST*) และ NAD(P)H: quinone oxidoreductase (*NQO1*) ร่วมกับการกระตุ้นจากสารก่อมะเร็งต่างๆที่อยู่ในสภาพแวดล้อม เช่น สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสารฆ่าแมลงอาจเพิ่มความเสี่ยงที่จะเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ในเด็กไทย ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิสมของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1*, *NQO1* และการสัมผัสสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชจำพวกสารฆ่าแมลงภายในบ้านของมารดากับความเสี่ยงในการเกิด ALL ในเด็กไทย โดยการสัมภาษณ์มารดาเปรียบเทียบระหว่างคนไข้เด็กที่เป็น ALL จำนวน 139 รายกับเด็กที่ไม่เป็นโรคมะเร็งจำนวน 139 ราย โดยศึกษาแบบ matched case-control ผลการศึกษาพบว่าโพลีมอร์ฟิสมของยีนชนิด *GSTM1* null ร่วมกับ *CYP1A1*2A* เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรค ALL (OR=2.48, 95% CI 1.24-4.97) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิสมชนิดอื่นกับมะเร็ง ALL ส่วนในการศึกษาการสัมผัสสารฆ่าแมลงภายในบ้านกับความเสี่ยงในการเกิดโรค ALL พบว่าการใช้สารฆ่าแมลงภายในบ้านของมารดามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค ALL (OR=2.29, 95% CI 1.54-3.47) จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าโพลีมอร์ฟิสมของยีนชนิด *GSTM1* ร่วมกับ *CYP1A1*2A* และการสัมผัสสารฆ่าแมลงภายในบ้านของมารดาอาจมีความสัมพันธ์ในการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค ALL ในเด็กไทย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ภัทรมน อึ่งบำเหน็จ

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

487 47684 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA / XENOBIOTIC-METABOLIZING ENZYMES (XME) / PESTICIDES

PATTRAMON AUNGBAMNET : INTERACTION BETWEEN *GSTM1, GSTT1, CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ISSARANG NUCHPRAYOON, M.D., Ph.D., 66 pp.

E 47277

Acute lymphoblastic leukemia is the most common cancer in childhood. Many factors including xenobiotic-metabolizing enzymes genetic polymorphisms (e.g., cytochrome P-450 (*CYP*), glutathione-S-transferase (*GST*), or NAD(P)H: quinone oxidoreductase (*NQO1),* and the environment factors (e.g., pesticides, herbicides, or insecticides) are associated with increased risk of childhood ALL. In this study, we determined the relationship between the polymorphisms in genes encoding -metabolizing enzymes *GSTM1*, *GSTT1, CYP1A1* and *NQO1,* and pesticides exposure and the risk for ALL in 139 children with ALL and 139 age-sex-matched children. We found that combination of *GSTM1* null and *CYP1A1**2A were both found to be significantly associated with increased risk of ALL (OR=2.48, 95% CI 1.24-4.97), but not *GSTT1, CYP1A1**2B or *NQO1*, history of pesticides exposure was also significantly associated with increased risk of ALL (OR=2.29, 95% CI 1.54-3.47). These results suggest that the combined effect of polymorphisms in *GSTM1* and *CYP1A1**2A gene and pesticides exposure factor might contribute to increased risk of ALL in Thai children.

Field of study: Medical Science Student's signature: Pattramon Aungbamnet

Academic year: 2007 Advisor's signature: Issarang Nuchprayoon

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to all those who made the completion of this thesis possible. I want to thank the Committee of the Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis and conduct the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor, Associate Professor Dr. Issarang Nuchprayoon, for his support and invaluable advice. His excellence in the molecular genetics of leukemia improved my own knowledge and skills.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Narin Hiransuthikul and Associate Professor Samart Pakakasama, for their stimulating guidance in this study and I express my appreciation to my other committee members and Associate Professor Wilai Anomasiri for their helpful suggestions and insightful comments during my study.

I feel profoundly indebted to Associate Professor Panya Seksarn and Dr. Darintr Sosothikul and techniciants and all members in hematology laboratory of department of pediatric, faculty of medicine, Chulalongkorn University for their suggestion and support.

I am really thankful to Miss Piyanut Sripayab, Miss Chalisa Louicharoen and all members in the Snake Venum Unit, Filariasis Unit for their encouragement, sincerity and friendship. I wish to express my special thanks to Associate Professor Narin Hiransuthikul for his helpful on analysis data.

I am also thankful to Mrs. Nittaya Thong-oun and Mrs. Umaporn and all members in laboratory of department of pediatric, faculty of medicine, Chulalongkorn University for their assistance in collection specimens.

This thesis was partially supported by Ministry of University Affairs Funds.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents, my sisters and Miss Ganntapa Premkamol for their love, support and understanding.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii, viii, ix

LIST OF TABLE.....x

LIST OF FIGURES.....xi

LIST OF ABBREVIATIONS.....xii, viii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

1. Background and Rationale.....1
2. Research Questions.....4
3. Objective of the Study.....4
4. Hypothesis.....5
5. Key Words.....5
6. Conceptual Framework.....5
7. Expected Benefits and Applications.....5

II LITERATURE REVIEW.....6

Acute lymphoblastic leukemia.....6

Leukemia in Thailand.....7

Classification of Acute leukemia.....12

Xenobiotic enzymes (Detoxification enzymes).....14

Cytochrome P-450 (*CYP*).....15

NAD (P) H quinine oxidoreductase: *NQO1*.....17

Glutathione-S-Transferase *(GSTs)*.....18

Pesticides.....22

Page

CHAPTER

III MATERIALS AND METHODS.....24

1. Materials.....24

Population Study.....24

Collecting Specimen.....24

DNA Extraction.....24

Identification of Xenobiotic-metabolizing enzymes gene polymophisms.....25

Chemicals.....26

Work Outline.....27

2. Methods.....28

Extraction of Genomic DNA from Blood Sample.....28

Identification of *CYP1A1* (m1) Polymorphisms.....28

Identification of *CYP1A1* (m2) Polymorphisms.....28

Identification of *NQO1* Polymorphisms.....29

Identification of *GSTM1* Deletion.....29

Identification of *GSTT1* Deletion.....30

Data Collection.....30

Data analysis.....31

IV RESULTS.....32

Identification of *CYP1A1* Polymorphisms.....35

Identification of *NQO1* Polymorphisms.....37

Identification of *GSTM1* Polymorphisms.....39

Identification of *GSTT1* Polymorphisms.....41

Characteristics of the Pesticides Exposure.....42

Page

CHAPTER

V CONCLUSION AND DISCUSSION.....45

REFERENCES.....49

APPENDIX A.....57

APPENDIX B.....61

APPENDIX C.....63

BIOGRAPHY.....66

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Incidences of Cancers in Childhood, Both Sexes, Thailand 2003	9
2	Acute Lymphoblastic Leukemia Subtype (WHO)	12
3	Oligonucleotides and their descriptions	25
4	Restriction enzymes and buffer	26
5	Characteristics of the genetic variants	34
6	Genotype frequencies of *CYP1A1* (m1), *CYP1A1* (m2), and *NQO1* polymorphisms in cases-controls	34
7	Allele frequencies of *CYP1A1* (m1), *CYP1A1* (m2), *NQO1* polymorphisms in cases and controls	36
8	Distribution of *CYP1A1* genotypes in ALL patients and controls	37
9	Frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in cases-controls	39
10	Combined effects of *GSTM1* and *CYP1A1*2A* allele in cases and controls	42
11	Demographic data of pesticide exposure for the childhood ALL cases and controls	43
12	Type of pesticides exposure distribution for the childhood ALL cases and controls	43
13	Timing of pesticides exposure distribution for the childhood ALL cases and controls	44

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Molecular subclassification of childhood leukemia	2
2	Bone marrow aspirated from a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia	6
3	Bone marrow aspirate from a child with B-cell acute lymphoblastic leukemia	7
4	Age-adjusted incidence rates for childhood cancer by ICCC group	8
5	Age-adjusted incidence rates for childhood cancer by age & ICCC group	11
6	Immunophenotyping by flow cytometry	13
7	Xenobiotic-metabolizing enzymes pathway or detoxification pathway	15
8	Genetic polymorphisms of *CYP1A1* gene	16
9	Genetic polymorphisms of *NQO1* gene	18
10	Structure of the *GSTM1* Homologous recombination	20
11	Structure of the *GSTT1* Homologous recombination	21
12	Pie charge representing prevalence of childhood acute lymphoblastic leukemia	32
13	PCR-RFLP of *CYP1A1* T3801C (m1) and A2455G (m2)	35
14	PCR-RFLP of *NQO1* C609T	38
15	PCR amplification of *GSTM1* gene in ALL samples	40
16	PCR amplification of *GSTT1* gene in ALL samples	41

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pairs
°C	degree Celsius
cm	centimeter
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
F	forward primer
g	gram (s)
hr(s)	hour (s)
kb	kilobase
M	molar
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
N	normal
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
pmol	picomole
PCR	polymerase chain reaction
RNase	ribonuclease
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rpm	revolution per minute

sec	second
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	ultraviolet
WHO	World Health Organization
µg	microgram
µl	microlitre
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume