

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบตา กับ ผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ปัญญา ภูนอก¹ และ วัชรินทร์ วงศ์เสนา²

¹ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

บทนำ ไวรัสตับอักเสบบีทำให้เกิดอาการตับอักเสบชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังพบได้ทั่วโลก การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายในการกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้นต้องอาศัยไซโตไคน์เป็นสื่อกลางในการกระตุ้นและยับยั้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบตา (TGF- β) เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายและยับยั้งการอักเสบ มีการรายงานถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β มีผลต่อระดับการสร้าง TGF- β ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ต่างกัน **วัตถุประสงค์** เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี **วัสดุและวิธีการ** วิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β ในตำแหน่ง -509 (T/C) และ +869 (T/C) ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) ในเลือดผู้บริจาคโลหิตจำนวน 304 ราย แบ่งเป็น (1) ผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จำนวน 99 ราย (2) ผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว จำนวน 110 ราย และ (3) ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังจำนวน 95 ราย **ผลการศึกษา** พบตำแหน่ง -509 (T/C) มีการกระจายความถี่ genotype TT, TC และ CC ในกลุ่ม (1) ร้อยละ 29.9, 55.7 และ 14.4 ตามลำดับ กลุ่ม (2) ร้อยละ 26.4, 54.5 และ 19.1 ตามลำดับ และกลุ่ม (3) ร้อยละ 34.1, 51.1 และ 14.8 ตามลำดับ ในตำแหน่ง +869 (T/C) มีการกระจายความถี่ genotype TT, TC และ CC ในกลุ่ม (1) ร้อยละ 35.2, 54.9 และ 9.9 ตามลำดับ กลุ่ม (2) ร้อยละ 32.5, 57.1 และ 10.4 ตามลำดับ และกลุ่ม (3) ร้อยละ 31.8, 56.8 และ 11.4 ตามลำดับ และพบการกระจายความถี่ของ haplotype ทั้งสามกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และ haplotype CC พบความถี่สูงในกลุ่ม (2) และ (3) เมื่อเทียบกับกลุ่ม (1) **สรุป** ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β (-509/+869) มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดย haplotype CC เป็นชนิดที่ลดการสังเคราะห์ไซโตไคน์นี้พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

คำสำคัญ : ● Polymorphism ● Cytokine ● Transforming growth factor- β ● Hepatitis B virus

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2561;28:137-44.

ได้รับต้นฉบับ 29 มีนาคม 2561 รับลงตีพิมพ์ 11 พฤษภาคม 2561

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ผศ.ดร.วัชรินทร์ วงศ์เสนา ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

E-mail: wachananw@nu.ac.th

Original Article

Transforming Growth Factor-beta Gene Polymorphism with the Outcomes of Hepatitis B Virus Infections

Panya Thunnok¹ and Wachanan Wongsena²¹National Blood Centre, Thai Red Cross Society; ²Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University**Abstract:**

Background: Hepatitis B virus (HBV) causes acute and chronic hepatitis worldwide. Immune response in limiting HBV infection requires cytokines-mediated stimulation and inhibition of immune cells. Transforming growth factor- β (TGF- β) plays a role in regulating the immune response and inhibits inflammation. Previous study reported that TGF- β gene polymorphisms affected the different level of TGF- β production that lead to the different outcomes of HBV infection. **Objective:** To investigate the association of TGF- β gene polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infections. **Materials and Methods:** TGF- β gene polymorphisms at -509 (T/C) and +869 (T/C) were determined by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) in 304 donating blood samples. Subjects consisted of 3 groups as I) Naïve HBV group who do not get HBV infection (n = 99), II) HBV recovery group who recovered from HBV infections with immunity (n = 110 cases), and III) Chronic HBV group who has HBV persistence infection (n = 95). **Results:** The detective rate of TT, TC and CC genotype at -509 (T/C) in group (I) were 29.9%, 55.7% and 14.4 %, respectively; in group (II) 26.4%, 54.5% and 19.1%, respectively; and group (III) 34.1%, 51.1% and 14.8%, respectively. Rate of TT, TC and CC genotype at +869 (T/C) in group (I) were 35.2%, 54.9% and 9.9 %, respectively; group (II) 32.5%, 57.1% and 10.4%, respectively; and group (III) 31.8%, 56.8% and 11.4% respectively. The frequency distributions of haplotypes in three groups were significantly different (p < 0.001). The frequencies of CC haplotype in group (II) and (III) were higher than group (I). **Conclusion:** Polymorphisms of TGF- β (-509/+869) were associated with HBV infections. The CC haplotype, decreased this cytokine production, was associated with increased risk of HBV infections.

Keywords : ● Polymorphism ● Cytokine ● Transforming growth factor- β ● Hepatitis B virus

J Hematol Transfus Med. 2018;28:137-44.

บทนำ

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus; HBV) เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการอักเสบทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง ปัจจุบันพบผู้ติดเชื้อเรื้อรังหรือพาหะของไวรัสตับอักเสบบีทั่วโลกประมาณ 350-400 ล้านคน^{1,2} ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบีสูง โดยพบพาหะเรื้อรังประมาณร้อยละ 6-10 ของประชากรทั้งหมด³ ซึ่งกลุ่มคนเหล่านี้มีความเสี่ยงที่จะพัฒนาไปเป็นโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง โรคตับแข็ง และมะเร็งตับ^{4,5} อย่างไรก็ตามผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 90-95 สามารถกำจัดเชื้อและหายได้ ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 5-10 ที่ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ทำให้เป็นพาหะหรือมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง⁶ มีรายงานการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แตกต่างกันมีผลต่อการดำเนินของโรคให้หายจากการติดเชื้อ หรือเกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง⁷ ซึ่งการทำลายไวรัสและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเกี่ยวข้องกับทั้ง humoral immunity และ cellular immunity^{8,9} โดยอาศัยไซโตไคน์เป็นสื่อกลางในการกระตุ้นและยับยั้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

Transforming growth factor- β (TGF- β) เป็นไซโตไคน์ที่ผลิตจากเซลล์หลากหลายชนิด เช่น T lymphocytes, B lymphocytes และ macrophages มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์ T lymphocytes และควบคุมกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ ทั้ง cell proliferation, differentiation, apoptosis และ angiogenesis จึงเป็นไซโตไคน์ที่สำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน^{10,11} จะถูกกระตุ้นและปล่อยออกมาเมื่อมีภาวะตับอักเสบเกิดขึ้น จึงมีหน้าที่ในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเป็นผลให้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ตับของผู้ติดเชื้อได้¹² ดังนั้นระดับการสร้าง TGF- β ที่ต่างกันส่งผลให้กลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความแตกต่างกันและมีผลต่อการดำเนินของโรคให้หายจากการติดเชื้อหรือเกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง¹³

มีการศึกษาพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (single nucleotide polymorphism; SNP) TGF- β ตำแหน่ง upstream region (-509, T/C) และ codon 10 (+869, T/C) พบว่ามีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในระดับที่แตกต่างกัน โดยพบว่า genotype TT จะสร้าง TGF- β ในระดับสูง TC จะสร้างในระดับปานกลาง แต่ถ้าเป็น CC จะสร้างในระดับที่ต่ำ¹⁴ และ haplotype TT จะมีการสร้าง TGF- β ในระดับสูง ส่วน haplotype CC จะสร้างในระดับที่ต่ำ¹⁵ นอกจากนี้ยังพบรายงานความหลากหลายของยีน TGF- β มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ¹⁶

โดยเฉพาะอย่างยิ่งคนเอเชียมีความแตกต่างจากคนผิวขาว อาจส่งผลต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แตกต่างกัน การศึกษาจึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน TGF- β กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในคนไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความชุกของพาหะสูง (6-10% ของประชากร) ส่วนสหรัฐอเมริกาและยุโรปจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความชุกของพาหะต่ำ (< 2% ของประชากร)¹⁷ ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนเหล่านี้ ซึ่งถือเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปพัฒนาแนวทางป้องกันและรักษาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดที่มีสารกันแข็งชนิด EDTA จากคนไทยที่มาบริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 304 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย (1) กลุ่ม Naïve HBV ซึ่งไม่เคยติดเชื้อมาก่อน (HBsAg, Anti-HBs และ Anti-HBc เป็นลบ) จำนวน 99 ราย; (2) กลุ่ม HBV recovery group ซึ่งเคยติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกันแล้ว (HBsAg เป็นลบ แต่ผล anti-HBs และ anti-HBc เป็นบวก) จำนวน 110 ราย; และ (3) กลุ่ม Chronic HBV group ซึ่งติดเชื้อเรื้อรัง (พบ HBsAg นานกว่า 6 เดือนโดยตรวจสอบจากประวัติการบริจาคโลหิตย้อนหลัง) จำนวน 95 ราย โครงการนี้ได้ผ่านการรับรองการทำวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมมนุษยมหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่โครงการ 52 01 04 0028 เมื่อวันที่ 24 กันยายน 2552

2. วิธีการตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β

สกัด Genomic DNA จากตัวอย่างเลือดด้วย Guanidine Thiocyanate แล้วตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน TGF- β ที่ตำแหน่ง -509 (T/C) และ +869 (T/C) โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) โดยในตำแหน่ง -509 (T/C) ใช้ primer ที่จำเพาะดังนี้ forward; allele T: 5'- TCC TGA CCC TTC CAT CCT -3' และ allele C: 5'- TCC TGA CCC TTC CAT CCC -3' กับ reverse; 5'- GTC ACC AGA GAA AGA GGA C -3' ส่วนตำแหน่ง +869 (T/C) ใช้ primer ที่จำเพาะดังนี้ forward; 5'- TCC GTG GGA TAC TGA GAC AC -3' กับ reverse allele T: 5'- ACA GCA GCG GTA GCA GCA -3' และ allele C: 5'- ACA GCA GCG GTA GCA GCG -3' โดยมีเอ็นไซม์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพภายในแต่ละหลอดปฏิกิริยา (human growth hormone;

HGH) ด้วย primer คือ forward; 5'- TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C -3' กับ reverse; 5'- GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA -3'¹⁸ ในการทดสอบ ใช้ตัวอย่าง DNA สกัดปริมาณ 1 μ L (100 ng) ผสมกับ PCR reaction ปริมาตรรวม 13 μ L ประกอบด้วย PCR buffer, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP 100 pM, specific primers 40 pM, control primers 10 pM และ Taq polymerase 2 unit นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ initial denaturing 95 °C 5 นาทีเพื่อด้วยการทำ PCR 35 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอนที่ 1 ที่ 95 °C 30 วินาที, 65 °C 1 นาที, 72 °C 45 วินาที จำนวน 5 รอบ ขั้นตอนที่ 2 ที่ 95 °C 30 วินาที, 62 °C 1 นาที, 72 °C 45 วินาที จำนวน 20 รอบ ขั้นตอนที่ 3 ที่ 95 °C 30 วินาที, 55 °C 1 นาที, 72 °C 45 วินาที จำนวน 10 รอบตามด้วย final extension 72 °C 10 นาที¹⁹ จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel หลังจากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide นำแผ่น gel ที่ย้อมแล้ว อ่านผลและบันทึกภาพด้วยเครื่อง UVTEC Platinum D55 Gel Documentation นอกจากนี้ได้ยืนยันผล SNP โดยการลุ่มตัวอย่างส่งตรวจลำดับเบส (sequencing) ที่สำนักงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีจำนวน 10 ราย

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาร้อยละความถี่ของ allele, genotype และ haplotype ของยีน *TGF- β* ในตำแหน่ง -509 (T/C) และ +869 (T/C) และทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน *TGF- β* กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดย Chi-square test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 และวิเคราะห์หาค่า Odds ratio และ 95% confidence interval ด้วยโปรแกรม Epi info version 7

ผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 304 รายเป็นเพศชาย 148 ราย และเพศหญิง 156 ราย มีช่วงอายุ 19 ถึง 60 ปี อายุเฉลี่ย 36.5 ± 9.5 ปี แยกเป็นกลุ่ม Naïve HBV จำนวน 99 ราย (ชาย 30 คน หญิง 69 คน อายุเฉลี่ย 35.7 ± 9.2 ปี) กลุ่ม HBV recovery จำนวน 110 ราย (ชาย 63 คน หญิง 47 คน อายุเฉลี่ย 39.9 ± 10.3 ปี) และ กลุ่ม Chronic HBV จำนวน 95 ราย (ชาย 55 คน หญิง 40 คน อายุเฉลี่ย 34.4 ± 3.37 ปี) พบว่าการกระจายตัวของอายุและเพศในทั้งสามกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และยังพบว่าในกลุ่ม Chronic HBV และ HBV recovery มีความถี่ของเพศชายสูงกว่ากลุ่ม Naïve HBV ($p < 0.001$) แสดงดัง Table 1

การทดสอบ HWE พบว่าการกระจายความถี่ genotype ของยีน *TGF- β* ในตำแหน่ง -509 (T/C) ค่าที่ได้เทียบกับความถี่ของค่าที่คาดหวังมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p = 0.09$) แต่พบในตำแหน่ง +869 (T/C) ค่าที่ได้เทียบกับความถี่ของค่าที่คาดหวังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.002$)

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีน *TGF- β* โดยวิธี PCR-SSP พบว่ามี genotype ตรงกับการตรวจด้วยวิธี DNA sequencing ทำให้มั่นใจว่าผลการตรวจด้วยวิธี PCR-SSP มีความถูกต้องและการศึกษาความถี่ของ genotype และ allele ในกลุ่มตัวอย่าง (1) ผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (2) ผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว และ (3) ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ในตำแหน่ง -509 (T/C) พบว่าการกระจายความถี่ของ genotype และ allele ในตัวอย่างทั้งสามกลุ่มนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.730$ และ 0.460 ตามลำดับ) โดยพบความถี่ของ genotype TC ร้อยละ 55.7, 54.5 และ 51.1 ตามลำดับ และ allele T ร้อยละ 57.7, 53.6 และ 59.7 ตามลำดับ ซึ่งเป็น genotype และ allele ที่พบสูงในทั้ง 3

Table 1 Characteristics of age and gender in the study groups

Characteristics	Naïve HBV (%) (n = 99)	HBV recovery (%) (n = 110)	Chronic HBV (%) (n = 95)	p - value
Gender				
Female	69 (69.7)	47 (42.7)	40 (42.1)	< 0.001
Male	30 (30.3)	63 (57.3)	55 (57.9)	
Age (yr)				
Mean $\pm$ SD	35.7 ± 9.2	39.9 ± 10.3	34.4 ± 8.3	< 0.001
Range	19-60	21-59	19-58	

Naïve HBV = without HBV infection; HBV recovery = recovery from HBV infection; Chronic HBV = chronic HBV infection

กลุ่มและในตำแหน่ง +869 (T/C) พบการกระจายความถี่ของ genotype และ allele ในตัวอย่างทั้งสามกลุ่มนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.989$ และ 0.893 ตามลำดับ) โดยพบความถี่ของ genotype TC ร้อยละ 54.9, 57.1 และ 56.8 ตามลำดับ และ allele T ร้อยละ 62.6, 61.0 และ 60.2 ตามลำดับ ซึ่งเป็น genotype และ allele ที่พบสูงในทั้ง 3 กลุ่ม ส่วนการกระจายความถี่ของ haplotype ในตำแหน่ง $TGF-\beta$ (-509/+869) ในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยพบ haplotype TT ร้อยละ 45.0, 39.0 และ 26.5 ตามลำดับ พบ haplotype CC ร้อยละ 16.1, 30.5 และ 27.2 ตามลำดับ แสดงดัง Table 2

ผลการทดสอบทางสถิติหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน $TGF-\beta$ กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในตำแหน่ง -509 (T/C) และ +869 (T/C) โดยเปรียบเทียบระหว่าง (1) กลุ่มผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้วกับกลุ่มผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (2) ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกับกลุ่มผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (3) กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกับกลุ่มผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับ

อักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว และ (4) กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและกลุ่มผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้วกับกลุ่มผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบความสัมพันธ์ของ haplotype CC ในเชิงเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเทียบกับ haplotype TT (HBV recovery vs. Naïve HBV; Odds ratio = 2.19; 95%CI: 1.19-4.03; $p = 0.006$, Chronic HBV vs. Naïve HBV; Odds ratio = 2.86; 95%CI: 1.51-5.34; $p = 0.0004$ และ HBV recovery + Chronic HBV vs. Naïve HBV; Odds ratio = 2.47; 95%CI: 1.44-4.24; $p = 0.0004$) และเมื่อเทียบกับ haplotype TT+TC+CT (HBV recovery vs. Naïve HBV; Odds ratio = 2.29; 95%CI: 1.31-4.00; $p = 0.001$, Chronic HBV vs. Naïve HBV; Odds ratio = 1.94; 95%CI: 1.11-3.40; $p = 0.012$ และ HBV recovery + Chronic HBV vs. Naïve HBV; Odds ratio = 2.11; 95%CI: 1.29-3.45; $p = 0.001$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของ genotype และ allele กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แสดงดัง Table 3

Table 2 Genotype, allele and haplotype frequencies of $TGF-\beta$ gene polymorphisms

$TGF-\beta$ SNP	Naïve HBV n (%)	HBV recovery n (%)	Chronic HBV n (%)	Total n (%)	p - value
-509	n = 97	n = 110	n = 88	n = 295	
Genotypes					
TT	29 (29.9)	29 (26.4)	30 (34.1)	88 (29.8)	0.730
TC	54 (55.7)	60 (54.5)	45 (51.1)	159 (53.9)	
CC	14 (14.4)	21 (19.1)	13 (14.8)	48 (16.3)	
Alleles					
T	112 (57.7)	118 (53.6)	105 (59.7)	335 (56.8)	0.460
C	82 (42.3)	102 (46.4)	71 (40.3)	255 (43.2)	
+869	n = 91	n = 77	n = 88	n = 256	
Genotypes					
TT	32 (35.2)	25 (32.5)	28 (31.8)	85 (33.2)	0.989
TC	50 (54.9)	44 (57.1)	50 (56.8)	144 (56.3)	
CC	9 (9.9)	8 (10.4)	10 (11.4)	27 (10.5)	
Alleles					
T	114 (62.6)	94 (61.0)	106 (60.2)	314 (61.3)	0.893
C	68 (37.4)	60 (39.0)	70 (39.8)	198 (38.7)	
Haplotype (-509/+869)	n = 90*2	n = 77*2	n = 81*2	N = 248*2	
T/T	81 (45.0)	60 (39.0)	43 (26.5)	184 (37.1)	<0.001
T/C	46 (25.6)	21 (13.6)	56 (34.6)	123 (24.8)	
C/T	24 (13.3)	26 (16.9)	19 (11.7)	69 (13.9)	
C/C	29 (16.1)	47 (30.5)	44 (27.2)	120 (24.2)	

Table 3 Association between genotype, allele and haplotype frequencies of *TGF-β* gene with outcomes of hepatitis B virus infection

<i>TGF-β</i> SNP	HBV recovery vs. Naïve HBV		Chronic HBV vs. Naïve HBV		Chronic HBV vs. HBV recovery	
	Odds ratio (95%CI)	p value	Odds ratio (95%CI)	p value	Odds ratio (95%CI)	p value
-509						
Genotypes						
TT/TC+CC	0.84 (0.44-1.61)	0.572	1.21 (0.62-2.36)	0.541	1.44 (0.75-2.79)	0.237
Alleles						
T/C	0.85 (0.56-1.27)	0.402	1.08 (0.70-1.67)	0.707	1.28 (0.84-1.95)	0.230
+869						
Genotypes						
TT/TC+CC	0.89 (0.44-1.77)	0.713	0.86 (0.44-1.68)	0.635	0.97 (0.48-1.97)	0.929
Alleles						
T/C	0.93 (0.59-1.49)	0.763	0.90 (0.58-1.41)	0.639	0.97 (0.61-1.54)	0.880
(-509/+869)						
Haplotype						
CC/TT	2.19 (1.19-4.03)	0.006	2.86 (1.51-5.43)	0.0004	1.31 (0.71-2.40)	0.356
CC/TT+TC+CT	2.29 (1.31-4.00)	0.001	1.94 (1.11-3.40)	0.012	0.85 (0.51-1.42)	0.509

95%CI = 95% confident interval; If 95% CI lower < 1 and upper > 1 = not significant different

วิจารณ์

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษานี้เป็นคนไทยทั้งสามกลุ่ม การกระจายตัวของเพศและอายุแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ($p < 0.001$) ซึ่งอาจเกิดจากการคัดเลือกตัวอย่างที่ใช้วิธีแบบสุ่ม และมีรายงานพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเพศชายมากกว่าเพศหญิง³ อาจเนื่องจากส่วนใหญ่แล้วเพศชายมักมีพฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เช่น การมีคู่นอนหลายคน การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน การใช้เข็มสักหรือส้อมที่ใช้สักตามตัวร่วมกัน และการใช้มีดโกนหรือที่ตัดเล็บร่วมกัน เป็นต้น²⁰

ผลการตรวจยืนยัน allele ของยีน *TGF-β* วิธี PCR-SSP ที่ใช้ในการศึกษานี้ให้ผลตรงกับผลตรวจ DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน จึงสามารถนำมาตรวจในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้ พบว่าการกระจายความถี่ genotype ของยีน *TGF-β* ในตำแหน่ง -509 (T/C) เป็นไปตามหลัก Hardy-Weinberg equilibrium แต่ในตำแหน่ง +869 (T/C) พบการกระจายความถี่ wild-type ต่ำกว่าค่าที่คาดหวังอาจเกิดจากการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างไม่เป็นไปอย่างอิสระโดยคัดเลือกจากผลการตรวจ HBV marker และปัจจุบันนี้ประชากรไทยมีการอพยพย้ายถิ่นมากขึ้นส่งผลต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมมีความแปรผันมากขึ้น²¹ ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายของยีน *TGF-β* ในตำแหน่ง -509 (T/C)

พบความถี่ allele T สูงกว่าความถี่ของ allele C ในทั้งสามกลุ่มตัวอย่างและมีความถี่ของ genotype ที่ใกล้เคียงกันโดยพบ genotype TT ร้อยละ 29.9, 26.4 และ 34.1 ตามลำดับ genotype TC ร้อยละ 53.9, 54.5 และ 51.1 ตามลำดับ และ genotype CC ร้อยละ 14.4, 19.1 และ 14.8 ตามลำดับ และในตำแหน่ง +869 (T/C) พบความถี่ allele T สูงกว่าความถี่ของ allele C ในทั้งสามกลุ่มตัวอย่างและมีความถี่ของ genotype ที่ใกล้เคียงกันโดยพบ genotype TT ร้อยละ 35.2, 32.5 และ 31.8 ตามลำดับ genotype TC ร้อยละ 54.9, 57.1 และ 56.8 ตามลำดับ และ genotype CC ร้อยละ 9.9, 10.4 และ 11.4 ตามลำดับ ซึ่งความถี่นี้สอดคล้องกับการศึกษาในกลุ่มคนไทยโดย Sodsai P และคณะ²¹ พบว่ามีความถี่ของ genotype ยีน *TGF-β* (+869) ในคนไทย สัดส่วนร้อยละ TT 36, TC 49 และ CC 15 เมื่อเทียบกับกลุ่มคนจีนและชาวคอเคเซียนพบว่ามีความถี่ของ genotype ที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันมีนัยสำคัญกับคนแอฟริกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Visentainer JE และคณะ²² ทำการศึกษาในกลุ่มคนบราซิลพบความถี่ของ genotype ใกล้เคียงกับการศึกษานี้ ส่วนการกระจายความถี่ของ haplotype ในสามกลุ่มตัวอย่างพบ TT ร้อยละ 45.0, 39.0 และ 26.5 ตามลำดับ CC ร้อยละ 16.1, 30.5 และ 27.2 ตามลำดับ ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Eskandari E

และคณะ²³ ทำการศึกษาในชาวอิหร่านพบ haplotype TT ร้อยละ 43 และ CC ร้อยละ 32 จากความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้ที่ส่งผลต่อระดับการสร้าง TGF- β ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสตับอักเสบบี²⁴ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้พบความชุกของคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในแต่ละกลุ่มประชากรแตกต่างกัน

จากการศึกษานี้พบของ haplotype CC ของยีน TGF- β (-509/+869) มีความสัมพันธ์ในเชิงเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอาจเป็นไปได้ว่า haplotype CC ที่ส่งผลให้มีการสร้าง TGF- β ในระดับที่ต่ำมีผลต่อภูมิคุ้มกันในการต้านการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ลดลงทำให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของ genotype และ allele กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสอดคล้องกับการศึกษาของ Ribeiro CS และคณะ²⁵ ซึ่งศึกษาในกลุ่มชนชาติบราซิลพบว่าการกระจายของความหลากหลายของยีน TGF- β (+869 T/C) ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังกับกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่หายแล้ว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sodsai และคณะ²⁶ ที่ศึกษาในกลุ่มเชื้อชาติไทยก็ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β (+869 T/C) กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและในปี ค.ศ. 2014 Hosseini Razavi A และคณะ¹⁵ ศึกษาในประเทศอิหร่านระหว่างกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่พบความสัมพันธ์ของยีน TGF- β (-509 T/C) กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง แตกต่างจากรายงานของ Migita K และคณะ²⁷ ทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและเป็นมะเร็งตับ พบความสัมพันธ์ของยีน TGF- β กับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.028$) จากผลการศึกษาที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ศึกษาอาจมีความแตกต่างกัน อาจมีปัจจัยจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์อื่นร่วมด้วยเช่น IL-10, TNF- α , IFN- γ และอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกาย และนอกจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่อาจทำให้ผู้ติดเชื้อแต่ละคนมีผลลัพธ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างอยู่ในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบีสูงทำให้มีโอกาสเกิดการติดเชื้อจากแม่สู่ลูกได้สูงซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อแบบเรื้อรัง ความแตกต่างของไวรัส ความแตกต่างของบุคคลและสภาพแวดล้อม²⁸ ดังนั้นควรเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีการควบคุมตัวแปรต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการศึกษาในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่ให้เกิดความแตกต่างกัน เช่น อายุ เพศ เชื้อชาติ อายุขณะติดเชื้อ และจำนวนตัวอย่าง

เป็นต้น และควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์ในยีนตำแหน่งอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันร่วมด้วยเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นประโยชน์มากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและรักษากลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

สรุป

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TGF- β (-509/+869) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต (1) ผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (2) ผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว และ (3) ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง พบการกระจายความถี่ของ haplotype ในกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และพบ haplotype CC มีความสัมพันธ์ในเชิงเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่พบการกระจายความถี่ของ genotype และ allele ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แตกต่างกันอีกนอกเหนือจากปัจจัยทางพันธุกรรม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สำหรับความอนุเคราะห์เลือดจากผู้บริจาคโลหิต ทั้งนี้การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ (โครงการเลขที่ R2554B099)

เอกสารอ้างอิง

- Olayinka AT, Oyemakinde A, Balogun MS, Ajudua A, Nguku P, Aderinola M, et al. Seroprevalence of hepatitis B infection in Nigeria: a national survey. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95:902-7.
- Macedo LC, Isolani AP, Visentainer JE, Moliterno RA. Association of cytokine genetic polymorphisms with the humoral immune response to recombinant vaccine against HBV in infants. *J Med Virol.* 2010;82:929-33.
- Chiarakul S, Eunumjitkul K, Vuttiopas S, Vorapimol AR, Kaewkungwal J, Poovorawan Y. Seroprevalence and risk factors of hepatitis B virus infection among health care workers at the Institute of Neurology. *J Med Assoc Thai.* 2007;90:1536-45.
- Van Hees S, Michielsens P, Vanwolleghem T. Circulating predictive and diagnostic biomarkers for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2016;22:8271-82.
- Niederau C. Chronic hepatitis B in 2014: great therapeutic progress, large diagnostic deficit. *World J Gastroenterol.* 2014;20:11595-617.

6. Akhtar F, Rehman S. A public health analysis on gaps in disease monitoring and opportunities for improved care for the management of hepatitis B and C. *Cureus*. 2018;10:e2077. doi: 10.7759/cureus.2077.
7. Tan A, Koh S, Bertoletti A. Immune Response in Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5:a021428. doi: 10.1101/cshperspect.a021428.
8. Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:1163-9.
9. Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, Ghany M, Hoofnagle JH, Sette A, et al. Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol*. 2004;173:5863-71.
10. Schaeue D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res*. 2012;178:505-23.
11. Li S, Gu X, Yi S. The regulatory effects of transforming growth factor-beta on nerve regeneration. *Cell Transplant*. 2017;26:381-94.
12. Moudi B, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Impact of host gene polymorphisms on susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Infect Genet Evol*. 2016;44:94-105.
13. Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3:386-406.
14. Ma J, Liu YC, Fang Y, Cao Y, Liu ZL. TGF-beta1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. *Genet Mol Res*. 2015;14:4461-8.
15. Hosseini Razavi A, Azimzadeh P, Mohebbi SR, Hosseini SM, Romani S, Khanyaghma M, et al. Lack of association between transforming growth factor beta 1 -509C/T and +915G/C polymorphisms and chronic hepatitis B in Iranian patients. *Hepat Mon*. 2014;14:e13100. doi: 10.5812/hepatmon.13100.
16. Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant*. 2002;2:560-7.
17. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HL, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int*. 2016;10:1-98. doi: 10.1007/s12072-015-9675-4. Epub 2015 Nov 13.
18. Kupatawintu P, Nathalang O, R OC, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. *Immunohematology*. 2005;21:5-9.
19. Thunnok P, Jantapoon P, Yongthong W, Homkeanjan S, Wongsena W. Interleukin-6 gene polymorphism at position -174 (G/C) and the outcome of hepatitis B virus infection. *J Hematol Med*. 2016;26:115-22.
20. Saravanan S, Velu V, Nandakumar S, Madhavan V, Shanmugasundaram U, Murugavel KG, et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection among patients with chronic liver disease. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009;42:122-8.
21. Sodsai P, Nakkuntod J, Kupatawintu P, Hirankarn N. Distribution of cytokine gene polymorphisms in Thai population. *Tissue Antigens*. 2011;77:593-7.
22. Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFβ1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet*. 2008;35:287-93.
23. Eskandari E, Metanat M, Pahlevani E, Nakhzari-Khodakheir T. Association between TGFβ1 polymorphisms and chronic hepatitis B infection in an Iranian population. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50:301-8.
24. Hong MH, Chou YC, Wu YC, Tsai KN, Hu CP, Jeng KS, et al. Transforming growth factor-beta1 suppresses hepatitis B virus replication by the reduction of hepatocyte nuclear factor-4alpha expression. *PLoS One*. 2012;7:e30360. doi: 10.1371/journal.pone.0030360. Epub 2012 Jan 20.
25. Ribeiro CS, Visentainer JE, Moliterno RA. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:435-40.
26. Sodsai P, Surakiatchanukul T, Kupatawintu P, Tangkitvanich P, Hirankarn N. Association of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms with the risk of chronic hepatitis B. *Asian Pac J Allergy Immuno*. 2013;31:277-85.
27. Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2005;42:505-10.
28. Zeng Z, Guan L, An P, Sun S, O'Brien SJ, Winkler CA. A population-based study to investigate host genetic factors associated with hepatitis B infection and pathogenesis in the Chinese population. *BMC Infect Dis*. 2008;8:1. doi: 10.1186/1471-2334-8-1.