

นิพนธ์ต้นฉบับ

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

ปัญญา ญนนอก¹ ภัทร จันทาพูน² วราภรณ์ ยงทอง² ศรัญญา หอมแก่นจันทร์² และ รัชพันธ์ วงศ์เสนา²

¹ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ ประเทศไทยมีความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในอัตราสูง ผลจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อ เป็นสาเหตุให้เกิดตับอักเสบนิดเดียวพลันและเรื้อรัง ซึ่งมีความเสี่ยงสูงที่จะพัฒนาเป็นโรคตับแข็งและมะเร็งตับ Interleukin-6 (IL-6) เป็นหนึ่งใน inflammatory cytokines ที่สำคัญโดยจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีภายในเซลล์ตับ มีรายงานว่าเกิดการเกิด Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) ในส่วนโปรโมเตอร์ของยีน IL-6 ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) ทำให้เกิดความแตกต่างของระดับการสร้าง IL-6 ส่งผลต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แตกต่างกันซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและป้องกันกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง **วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน IL-6 ณ ตำแหน่ง -174 กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี **วัสดุและวิธีการ** ทำการวิเคราะห์ SNPs ของยีน IL-6 ณ ตำแหน่ง -174 ในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 259 ราย จำแนกเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 78 ราย กลุ่มตัวอย่างที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว 85 ราย และกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 96 ราย ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและทำการตรวจวิเคราะห์ SNPs โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) **ผลการวิจัย** พบว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ GG, GC และ CC ในกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร้อยละ 97.44, 2.56 และ 0 ตามลำดับ ในกลุ่มตัวอย่างที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้วร้อยละ 97.65, 2.35 และ 0 ตามลำดับ และในกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังร้อยละ 98.96, 1.04 และ 0 ตามลำดับ การกระจายความถี่ของจีโนไทป์ใน 3 กลุ่มตัวอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.724$) **สรุป** ไม่พบความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน IL-6 ณ ตำแหน่ง -174 กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีจำนวนน้อยเกินไป รวมถึงอาจมีปัจจัยจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์อื่นร่วมด้วย ดังนั้นควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์อื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นประโยชน์มากขึ้น

Keywords : ● Single nucleotide polymorphism ● Cytokine ● Hepatitis B virus ● Interleukin-6

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2559;26:115-22.

บทนำ

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus, HBV) เป็น non-cytopathic virus โดยเชื้อไวรัสเองไม่ทำให้เซลล์ตับตาย แต่เป็นผลจากการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อ เป็นสาเหตุทำให้เกิดตับอักเสบนิดเดียวพลันและเรื้อรัง¹ โดยมีผู้ติดเชื้อเรื้อรังทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคน เมื่อมีการติดเชื้อนี้จะมีความเสี่ยงสูงที่จะพัฒนาเป็นโรคตับแข็งและมะเร็ง

ตับ² Interleukin-6 (IL-6) เป็นหนึ่งในไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammatory cytokines) ที่สำคัญโดยทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบเฉียบพลัน^{3,4} IL-6 สร้างได้จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ fibroblast, stromal cell, macrophage, T lymphocyte และ mast cell เป็นต้นหน้าที่หลักของไซโตไคน์นี้คือชักนำเซลล์ตับให้มีการสร้าง acute phase protein ซึ่งมีบทบาทในการสร้างเม็ดเลือดหลายชนิด⁵ และช่วยกระตุ้นเซลล์ B lymphocyte ให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี⁶ นอกจากนี้ IL-6 ยังมีส่วนในการส่งเสริมการสร้าง cytotoxic T lymphocyte (CTL) ซึ่งเซลล์ CTL เป็นเซลล์เอฟเฟกเตอร์ (effector cell) หลักในการกำจัดเชื้อไวรัสและการ

ได้รับต้นฉบับ 15 กุมภาพันธ์ 2559 รับลงตีพิมพ์ 10 พฤษภาคม 2559

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ผศ.ดร. รัชพันธ์ วงศ์เสนา ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

E-mail: wachananw@nu.ac.th

เกิดพยาธิสภาพของตับ สามารถออกฤทธิ์โดยการหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ interferon-gamma (IFN- γ) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ซึ่งไปยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งอยู่ภายในเซลล์โดยใช้กลไกหลัก 2 กลไก คือการยับยั้งขั้นตอน nucleocapsid formation ในระยะต่างๆ และทำให้จีโนมของเชื้อไวรัสไม่คงตัว (destabilization of viral DNA)⁶ โดยแอนติเจนที่เป็นเป้าหมายหลักในการทำลายของเซลล์ CTL คือ ชิ้นส่วนของ HBcAg ที่ถูกนำเสนอร่วมกับ MHC class I บนผิวของเซลล์ตับที่ติดเชื้อ เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ตับจะมีการสร้างโปรตีนของเชื้อ โดยอาศัยกลไกการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ของมนุษย์ โปรตีน HBcAg ที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าสู่กระบวนการ antigen processing และ antigen presentation โดยมีการย่อย HBcAg ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งมีบางชิ้นส่วนเท่านั้นที่จะสามารถจับได้กับ MHC class I จึงถูกนำเสนอบนผิวเซลล์ และเป็นเป้าหมายในการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อเซลล์ CTL ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนของเชื้อไวรัสโดยอาศัย T cell receptor จับแบบจำเพาะกับ MHC-peptide complex แล้วเกิดการทำลายเชื้อ^{7,8} ดังนั้น IL-6 จึงมีบทบาทในการต่อต้านไวรัสตับอักเสบบีและการกระตุ้นให้เกิดภาวะการอักเสบของตับนำไปสู่ภาวะตับแข็งและมะเร็งตับ⁹ ซึ่งความหลากหลายของยีน *IL-6* ที่ตำแหน่ง -174 (G/C) มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนไปของเบส Guanine (G) ไปเป็นเบส Cytosine (C) ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนน้อย มีปริมาณการสร้าง *IL-6* ต่ำ ซึ่งบุคคลที่มีจีโนไทป์แบบ GG จะมีการสร้าง *IL-6* ในปริมาณที่สูง จีโนไทป์แบบ GC จะมีการสร้าง *IL-6* ในปริมาณปานกลาง และ จีโนไทป์แบบ CC จะมีการสร้าง *IL-6* ในปริมาณที่ต่ำ¹⁰ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความหลากหลายของยีน *IL-6* มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ¹¹ และยังมีรายงานพบความหลากหลายของยีน *IL-6* ตำแหน่ง -174 (G/C) จีโนไทป์ GG (wild-type) ว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในกลุ่มชาวคอเคเซียน¹² นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายของยีน *IL-6* มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งคนไทยมีความแตกต่างจากคนคอเคเซียน ซึ่งคนไทยพบความถี่ของจีโนไทป์ GG, GC และ CC ร้อยละ 97.0, 3.0 และ 0 ตามลำดับ¹³ อาจส่งผลต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่แตกต่างกัน การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดที่เก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA รายละ 5 mL ซึ่งเหลือจากงานตรวจคัดกรองโลหิตตามปกติของผู้บริจาคโลหิตที่เป็นคนไทย ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 259 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (healthy blood donor) หมายถึงผู้ที่ให้ผลตรวจ HBsAg และ Anti-HBc เป็นลบ จำนวน 78 รายโดยสุ่มจากผู้บริจาคโลหิตที่ผ่านเกณฑ์การบริจาคโลหิตตามมาตรฐาน กลุ่มตัวอย่างที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแล้วหาย (recovery) หมายถึงผู้ที่มีผลตรวจ HBsAg เป็นลบแต่ผล anti-HBs และ anti-HBc เป็นบวกจำนวน 85 ราย และกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) ซึ่งหมายถึงผู้ที่ตรวจพบ HBsAg ระยะเวลาเกินกว่า 6 เดือนโดยการตรวจสอบจากประวัติการบริจาคโลหิตย้อนหลัง จำนวน 96 รายและโครงการนี้ได้ผ่านการรับรองการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ เลขที่โครงการ 52 01 04 0028 เมื่อวันที่ 24 กันยายน 2552

2. การตรวจสอบหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *IL-6*

สกัด Genomic DNA จากตัวอย่างเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งด้วยวิธี Guanidine Thiocyanate แล้วตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน *IL-6* ที่ตำแหน่ง -174 (G/C) โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ SNP ดังนี้ forward; อัลลิล G: 5'-CCC TAG TTG TGT CTT GCG-3' และอัลลิล C : 5'-CCT AGT TGT GTC TTG CC-3' กับ reverse; 5'-GAG CTT CTC TTT CGT TCC-3' และยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพภายในแต่ละหลอดปฏิกิริยา (human growth hormone; HGH) มี primer คือ forward; 5'-TCAC-GGATTCTGTGTGTGTTTC-3' กับ reverse; 5'-GCCTT-CCCAACCATTCCTTA-3' เตรียม PCR reaction ปริมาตรรวม 13 μ L ประกอบด้วย PCR buffer, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP 0.2 mM, specific primers 0.25 μ M, control primers 0.19 μ M, Taq polymerase 0.25 unit, DNA 100 ng และ DW 8.71 μ L นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ initial denaturing 95°C นาน 5 นาทีต่อด้วยการทำ PCR 35 รอบประกอบด้วยขั้นตอนที่ 1 ที่ 95°C นาน 30 วินาที 65°C นาน 1 นาที 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 5 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 ที่ 95°C นาน 30 วินาที 62°C นาน 1 นาที 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 20 รอบ ขั้นตอนที่ 3 ที่ 95°C นาน 30 วินาที 55°C นาน 1 นาที 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 10 รอบตามด้วย final extension 72°C นาน 10 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel หลังจากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide นำแผ่น gel ที่ย้อมแล้ว อ่านผลและบันทึกภาพด้วยเครื่อง UVTEC Platinum D55 Gel Documentation

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาความถี่ของอัลลีลและจีโนไทป์ของยีน *IL-6* ในส่วน promoter ณ ตำแหน่ง -174 ในกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยสถิติ Chi square กำหนดให้ p-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ โดยโปรแกรม SPSS version 11.5 และวิเคราะห์หาค่า Odds ratio และ 95% confidence interval ด้วยโปรแกรม Epi info version 7

ผลการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 259 ราย เป็นเพศชาย 132 ราย และเพศหญิง 127 ราย มีช่วงอายุ 19 ถึง 60 ปี อายุเฉลี่ย 36.97 ปี เป็นกลุ่ม healthy จำนวน 78 ราย (ชาย 25 คน หญิง 53 คน อายุเฉลี่ย 36.00 ปี) กลุ่ม recovery จำนวน 85 ราย (ชาย 52 คน หญิง 33 คน อายุเฉลี่ย 40.61 ปี) และกลุ่ม chronic จำนวน 96 ราย (ชาย 55 คน หญิง 41 คน อายุเฉลี่ย 34.30 ปี) พบว่าการกระจายของอายุและเพศในกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ) แสดงดัง Table 1

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีน *IL-6* ในตำแหน่ง -174 โดยวิธี PCR-SSP แสดงตัวอย่างดัง Figure 1 พบความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) ในกลุ่มตัวอย่าง (1) ผู้ที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (2) ผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว และ (3) ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ดังนี้จีโนไทป์ GG ร้อยละ 97.44, 97.65 และ 98.96 ตามลำดับ จีโนไทป์ GC ร้อยละ 2.56,

Table 1 Characteristics of age and gender in 3 study groups

	Healthy (n = 78)	Recovery (n = 85)	Chronic (n = 96)	p-value
Age (yr)				
Min	19	21	19	0.001
Max	60	57	58	
Mean	36.00	40.61	34.30	
Gender				
Male	25	52	55	< 0.001
Female	53	33	41	

Healthy = without HBV infection; Recovery = recovery from HBV infection; Chronic = chronic HBV infection

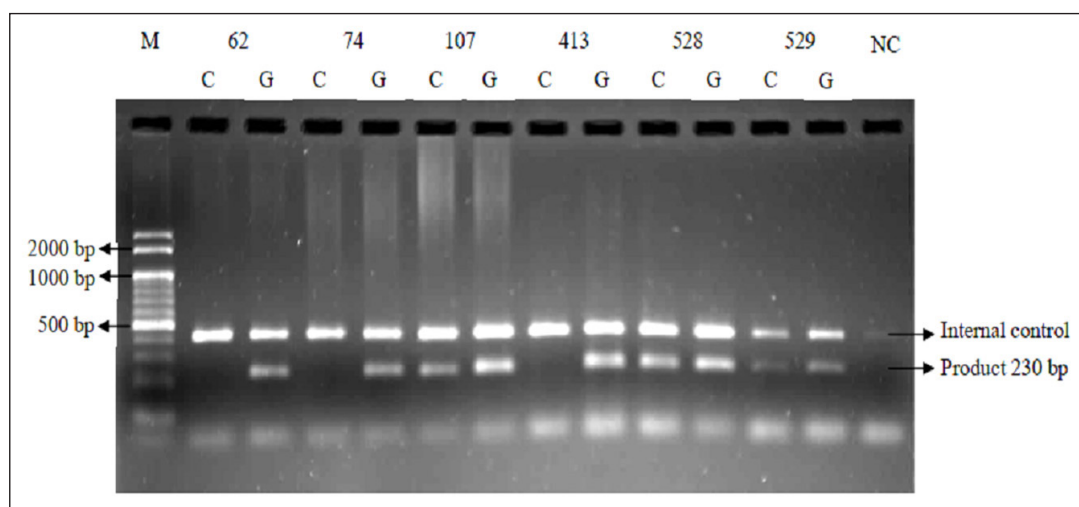


Figure 1 The detection of SNPs of *IL-6* gene at position -174 (G/C); Lane M is marker, Lane NC is negative control, Sample 62, 74 and 413 are homozygous -174 G/G, Sample 107, 528 and 529 are heterozygous -174 G/C

2.35 และ 1.04 ตามลำดับ แต่ไม่พบจีโนไทป์ CC และอัลลีล G ร้อยละ 98.7, 98.8 และ 99.5 ตามลำดับ อัลลีล C ร้อยละ 1.3, 21.2 และ 0.5 ตามลำดับ แสดงดัง Table 2 เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าการกระจายความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.724$ และ $p = 0.726$ ตามลำดับ)

จากการทดสอบทางสถิติหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยเปรียบเทียบระหว่าง (1) กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี กับกลุ่มผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้วพบผลการวิเคราะห์ของอัลลีล G เทียบกับอัลลีล C และจีโนไทป์ GG เทียบกับจีโนไทป์ GC มีค่า Odds ratio (OR)(95%CI) ดังนี้ 1.09 (0.08, 15.21), 1.09 (0.08, 15.40) ตามลำดับ (2) กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อ

ไวรัสตับอักเสบบี กับกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังพบผลการวิเคราะห์ของอัลลีล G เทียบกับอัลลีล C และจีโนไทป์ GG เทียบกับจีโนไทป์ GC มีค่า OR (95%CI) ดังนี้ 2.48 (0.13, 147.09), 2.50 (0.13, 149.02) ตามลำดับ และ (3) กลุ่มผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้วกับกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังพบผลการวิเคราะห์ของอัลลีล G เทียบกับอัลลีล C และจีโนไทป์ GG เทียบกับจีโนไทป์ GC มีค่า OR (95%CI) ดังนี้ 2.27 (0.12, 134.84), 2.29 (0.12, 136.45) ตามลำดับ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าอัลลีล G และจีโนไทป์ GG อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างอื่น แต่ก็ยังไม่พบความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แสดงดัง Table 3

Table 2 Genotype and allele frequencies of *IL-6* -174 gene polymorphism in 3 study groups

IL-6 -174	Healthy (n = 78)	Recovery (n = 85)	Chronic (n = 96)	p-value
Genotype frequencies				
GG	76 (97.44%)	83 (97.65%)	95 (98.96%)	0.724
GC	2 (2.56%)	2 (2.35%)	1 (1.04%)	
CC	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Allele frequencies				
G	154 (98.7%)	168 (98.8%)	191 (99.5%)	0.726
C	2 (1.3%)	2 (1.2%)	1 (0.5%)	

Table 3 Association between genotype and allele frequencies of the *IL-6* gene at position -174 with outcomes of hepatitis B virus infection

IL-6 -174 (G/C)		Recovery vs Healthy		Chronic vs Healthy	Chronic vs Recovery
Allele	C	p-value	0.93	0.44	0.49
		OR	0.92	0.40	0.44
		95%CI	0.07, 12.79	0.006, 7.83	0.007, 8.54
	G	p-value	0.93	0.44	0.49
		OR	1.09	2.48	2.27
		95%CI	0.08, 15.21	0.13, 147.09	0.12, 134.84
Genotype	GG/GC	p-value	0.93	0.44	0.49
		OR	1.09	2.50	2.29
		95%CI	0.08, 15.40	0.13, 149.02	0.12, 136.45
	GC/GG	p-value	0.93	0.44	0.49
		OR	0.92	0.40	0.44
		95%CI	0.06, 12.93	0.007, 7.86	0.007, 8.57

OR = Odds ratio; 95%CI = 95% confident interval: lower, upper;

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

วิจารณ์

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษานี้เป็นประชากรไทยทั้ง 3 กลุ่มซึ่งสามารถจัดปัจจัยในเรื่องความแตกต่างของเชื้อชาติได้แต่พบว่ามีความแตกต่างของการกระจายของอายุและเพศในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดจากการคัดเลือกตัวอย่างที่ใช้วิธีแบบสุ่ม (random) และพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเพศชายมากกว่าเพศหญิง¹⁴ อาจเนื่องจากส่วนใหญ่แล้วเพศชายมักมีพฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เช่น การมีคู่นอนหลายคน การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน การใช้เข็มสักตามตัวหรือสียที่ใช้สักตามตัวร่วมกัน และการใช้มีดโกนหรือที่ตัดเล็บร่วมกัน เป็นต้น¹⁵ ซึ่งผลของการศึกษาพบความหลากหลายของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) มีความถี่ของอัลลีล G สูงกว่าความถี่ของอัลลีล C ในทุกกลุ่มตัวอย่างและทั้ง 3 กลุ่มดังอย่างมีความถี่ของจีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกันโดยพบจีโนไทป์ GG ร้อยละ 97.44, 97.65 และ 98.96 ตามลำดับ จีโนไทป์ GC ร้อยละ 2.56, 2.35 และ 1.04 ตามลำดับ แต่ไม่พบจีโนไทป์ CC ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกลุ่มคนไทยโดย Sodsai และคณะ¹³ พบว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ในสัดส่วนร้อยละ GG 97, GC 3 และ CC 0 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรแอฟริกัน จีน และญี่ปุ่น จะพบความถี่ของจีโนไทป์สัดส่วนร้อยละ GG 100, GC 0 และ CC 0 แสดงว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างจากกลุ่มประชากรชาวคอเคเซียนที่พบความถี่ของจีโนไทป์สัดส่วนร้อยละ GG 23, GC 47 และ CC 30 และพบว่าคนไทย แอฟริกัน จีน และญี่ปุ่นมีความถี่ของจีโนไทป์ GG ในอัตราที่สูงและไม่พบจีโนไทป์ CC ซึ่งส่งผลต่อระดับการสร้าง *IL-6* ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ช่วยในการต่อต้านไวรัสและจุลชีพภายในเซลล์จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบความชุกของคนที่ติดเชื้อเรื้อรังในคนไทยและคนจีนสูงกว่าคนคอเคเซียนดังที่รายงานโดย Hoffmann SC และคณะ¹⁶ พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *IL-6* ระหว่างคนเอเชีย คนสเปน คนผิวดำและคนผิวขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

การวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่หายแล้วและมีภูมิคุ้มกัน กับกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง สอดคล้องกับการศึกษาของ Ben-Ari Z และคณะ¹⁷ ซึ่งศึกษาในกลุ่มชนชาติอิสราเอลและการศึกษาของ Ribeiro CS และคณะ¹⁸ ซึ่งศึกษาในกลุ่มชนชาติบราซิลพบว่าการกระจายของความหลากหลายของยีน *IL-6* ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังกับกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่หายแล้วและมีภูมิคุ้มกันแตกต่างจากรายงานของ

Zhao XM และคณะ¹⁹ ศึกษาในกลุ่มคนจีนพบว่าความหลากหลายของยีน *IL-6* ในหลายตำแหน่งมีอิทธิพลทำให้มีการแสดงออกของยีน *IL-6* ในระดับที่สูงและมีความสัมพันธ์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความแตกต่างของอัลลีล G เทียบกับอัลลีล C พบค่า OR (95%CI) ในกลุ่ม recovery เทียบกับกลุ่ม healthy กลุ่ม chronic เทียบกับกลุ่ม healthy และกลุ่ม chronic เทียบกับกลุ่ม recovery ตามลำดับดังนี้ 1.09 (0.08, 15.21), 2.48 (0.13, 146.09) และ 2.27 (0.12, 134.84) วิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ GG เทียบกับจีโนไทป์ GC พบค่า OR (95%CI) ตามลำดับดังนี้ 1.09 (0.08, 15.40), 2.50 (0.13, 149.02) และ 2.29 (0.12, 136.45) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบอัลลีล G และจีโนไทป์ GG ที่มีผลให้มีการสร้าง *IL-6* ในระดับที่สูงอาจมีโอกาสรiskต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างอื่นๆ อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Xia C และคณะ⁹ พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและมะเร็งตับพบระดับ *IL-6* สูงกว่าคนปกติและพบความสัมพันธ์ระหว่าง *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบบี อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์นี้ไม่แสดงในทุกกลุ่มประชากร โดยเฉพาะในกลุ่มพื้นที่ที่มีความชุกของไวรัสตับอักเสบบีสูงเป็นไปได้ว่ารูปแบบการติดเชื้อในพื้นที่ที่มีการระบาดสูง ผู้ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่จะพัฒนาเป็นพาหะซึ่งเกิดจากการติดเชื้อจากแม่สู่ลูกและการติดเชื้อในเด็ก²¹ โดยในเด็กจะมีภูมิคุ้มกันที่ยังไม่พัฒนาซึ่งจะทำให้มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อที่ต่ำกว่าในวัยผู้ใหญ่จึงทำให้ปัจจัยทางพันธุกรรมมีผลกระทบลดลง รวมถึงอาจมีปัจจัยจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *IL-6* ไคโตไคน์อื่นๆ ที่ควบคุมการสร้าง *IL-6* เช่น การเกิดความหลากหลายของยีน *TNF-α* โดย *TNF-α* จะชักนำให้มีการสร้าง *IL-1* และ *IL-6* ซึ่งเมื่อเกิดความหลากหลายของยีน *TNF-α* อาจจะมีผลทำให้มีการสร้าง *IL-6* ลดลงด้วย²² นอกจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่อาจทำให้แต่ละการศึกษาให้ผลลัพธ์ที่ต่างกันได้ ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างอยู่ในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบีสูง เช่น ประเทศไทยซึ่งมีความชุกประมาณร้อยละ 5-10 ของประชากร² ความแตกต่างของไวรัส ความแตกต่างของบุคคลและสภาพแวดล้อม^{23,24} หรือจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยอาจมีจำนวนน้อยเกินไป ดังนั้นเพื่อลดความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างควรเลือกกลุ่ม

ตัวอย่างที่มีการควบคุมตัวแปรต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการศึกษาในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่ให้ความแตกต่างกัน เช่น อายุ เพศ เชื้อชาติ และอายุขณะติดเชื้อ จำนวนตัวอย่างเป็นต้น และควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตไคน์ตำแหน่งอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นประโยชน์มากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและป้องกันกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังได้

สรุป

จากการศึกษาความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *IL-6* ในส่วนของ promoter ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) ในคนไทยแบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างผู้ที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี กลุ่มตัวอย่างผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกันแล้ว และกลุ่มตัวอย่างผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง พบว่ามีความถี่ของจีโนไทป์ GG, GC และ CC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างมีความถี่ของอัลลีล G สูงกว่าอัลลีล C และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *IL-6* ณ ตำแหน่ง -174 (G/C) กับกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและกลุ่มตัวอย่างที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีภูมิคุ้มกัน ($p > 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษาอยู่ในประเทศที่มีอุบัติการณ์การของพาหะไวรัสตับอักเสบบีสูง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหารของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้โอกาสผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้และให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากผู้บริจาคโลหิต ทั้งนี้การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ (โครงการเลขที่ R2554B099)

เอกสารอ้างอิง

- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215-29.
- Tangkijvanich P, Mahachai V, Komolmit P, Fongsarun J, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. *World J Gastroenterol* 2005;11:2238-43.
- Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006;8(Suppl 2):S2.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000;19:2548-56.
- Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2010;2:1394-410.
- Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36.
- Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999;19:157-69.
- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 1995;17:261-81.
- Xia C, Liu Y, Chen Z, Zheng M. Involvement of Interleukin 6 in Hepatitis B Viral Infection. *Cell Physiol Biochem* 2015;37:677-86.
- 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.
- Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006;80:1197-213.
- Cussigh A, Falletti E, Fabris C, Bitetto D, Cmet S, Fontanini E, et al. Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C. *Immunogenetics* 2011;63:33-41.
- Sodsai P, Nakkuntod J, Kupatawintu P, et al. Distribution of cytokine gene polymorphisms in Thai population. *Tissue Antigens* 2011;77:593-7.
- 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.
- 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.
- Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Kozio DE, Harlan DM, et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant* 2002;2:560-7.
- Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003;98:144-50.
- 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.
- Zhao XM, Gao YF, Zhou Q, Pan FM, Li X. Relationship between interleukin-6 polymorphism and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19:6888-93.
- Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19:2449-55.

21. Kwon SY, Lee CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Korean J Hepatol* 2011;17:87-95.
22. Ertuğra M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J BiolSci* 2012;8:1254-66.
23. 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.
24. Du T, Guo XH, Zhu XL, Li JH, Lu LP, Gao JR, Gou CY, Li Z, Liu Y, Li H. Association of TNF- α promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *J Viral Hepat* 2006;13:618-24.

Interleukin-6 Gene Polymorphism at Position -174 (G/C) and the Outcome of Hepatitis B Virus Infection

Panya Thunnok¹, Pattara Jantapoon², Waraporn Yongthong², Saranya Homkeanjan²
and Wachanan Wongsena²

¹Blood Testing Section, National Blood Centre, Thai Red cross Society; ²Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

Abstract:

Background: Thailand has a high prevalence of Hepatitis B virus (HBV) infection. Immune response to HBV results infected liver cell destruction as acute and chronic hepatitis. It might be a risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Interleukin-6 (IL-6) is an important inflammatory cytokine that suppressed HBV replication in liver cells. Previous study demonstrated that the single nucleotide polymorphisms (SNPs) at position -174 (G/C) in the IL-6 promoter affected the different level of IL-6 production that lead to the difference of outcome of HBV infection. This information can be used as a surveillance and groups protection at risk of chronic hepatitis B virus infection. **Objective:** To determine the association of IL-6 gene polymorphism at position -174 (G/C) with the outcome of HBV infection. **Methods:** Two hundred and fifty nine cases of blood donor were analyzed SNPs for position -174 of IL-6 gene, composing of 78 cases without a HBV infection, 85 cases with a recovery from HBV infection, and 96 cases with a chronic HBV infection. DNA was extracted from EDTA blood and analyzed for SNPs using Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP). **Results:** The detective rates of GG, GC and CC genotype were 97.44%, 2.56% and 0% in healthy controls; 97.65%, 2.35% and 0% in recovery HBV infection subjects; 98.96%, 1.04% and 0% in chronic HBV infections. The distribution of genotype was not significantly different among 3 groups ($p = 0.724$). **Conclusions:** The results showed that the SNPs at position -174 (G/C) in the IL-6 promoter was not associated with the outcome of hepatitis B virus infection. It might be the limitation of sample size. Also, the different of cytokine gene polymorphism could be affected. Therefore, a deeply study of cytokine polymorphism would help to get more understanding.

Keywords : ● Single nucleotide polymorphism ● Cytokine ● Hepatitis B virus ● Interleukin-6

J Hematol Transfus Med 2016;26:115-22.