

# ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน NTCP กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

นางณภัทร์ ตูยปาละ\*

สัจชัย พยุงภร\*\* พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์\*\*

**Tuyapala N, Payungporn S, Tangkijvanich P. Association between NTCP gene polymorphisms with disease progression of hepatitis B infection. Chula Med J 2018 Nov – Dec; 62(6): 935 - 45**

**Background** : *Sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) has been recently identified as the cellular receptor of hepatitis B virus (HBV). In addition, nucleotide polymorphisms (SNPs) in the NTCP gene are shown to be associated with developing chronic HBV infection in the Han Chinese population. However, it is unclear whether SNPs are related to the clinical outcome of HBV infection in the Thai population.*

**Objective** : *The aim of this study was to investigate the association of NTCP polymorphism with chronic HBV infection (CHB) and HCC progression.*

**Methods** : *We recruited 242 healthy controls without previous HBV exposure, 230 individuals with spontaneous HBV clearance and 635 patients with chronic hepatitis B (CHB). Among the CHB group, 319 patients were diagnosed with hepatocellular carcinoma (HCC). SNPs (rs2296651) of NTCP were detected by allelic discrimination assay using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probe. Statistical analysis was performed using unpaired t-test, analysis of variance (ANOVA) and Chi-square test.*

\* นิสิตปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Results** : *The frequencies of GG, GA and AA genotypes of rs2296651 in healthy controls were 74.2%, 22.1% and 3.7%, respectively. The corresponding genotypes in the HBV clearance group were 84.1% 15.1% and 0.8%, while their frequencies in the CHB group were 85.0%, 13.4% and 1.6%, respectively. Compared with healthy controls, the distribution of non-GG (GA and AA) genotypes were significantly lower in the HBV clearance group [odds ratio (OR) 0.54; 95 % CI (0.35 - 0.86), P = 0.001] and the CHB groups (0.51; 0.35 - 0.73, P < 0.001). However, there was no difference in their frequencies between the HBV clearance and CHB groups. The role of SNPs in relation to HCC development was further analyzed in the CHB groups. There was no difference in the distribution of SNP between patients with or without HCC.*
- Conclusion** : *In this report, GA or AA genotypes of rs2296651 were more prevalence in non-HBV infected population. However, SNP rs2296651 did not contribute to spontaneous HBV clearance, developing CHB and HCC occurrence.*
- Keywords** : *Hepatitis B virus (HBV), chronic HBV infection (CHB), spontaneous HBV clearance, hepatocellular carcinoma (HCC), single nucleotide polymorphisms (SNPs), sodium dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP).*

Correspondence to : Tangkijvanich P. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received: August 25, 2017

Revised: October 10, 2017

Accepted: December 20, 2017

นางณภัทร์ ตูยपालะ, สัณชัย พยุงภร, พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์. ความสัมพันธ์ระหว่างความ  
หลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.  
จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2561 พ.ย. – ธ.ค.;62(6): 935 – 45

- เหตุผลของการทำวิจัย** : *Sodium taurocholate co-transporting polypeptide* หรือ *NTCP* เป็นตัวรับที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ตับ ทำให้ไวรัสตับอักเสบบีสามารถผ่านเข้าไปสู่เซลล์ตับได้ มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่นพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (*single nucleotide polymorphisms, SNPs*) ของยีน *NTCP* มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนนี้กับการดำเนินโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มประชากรชาวไทย
- วัตถุประสงค์** : เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับ
- วิธีการทำวิจัย** : กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาประกอบด้วยกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน จำนวน 242 ราย, กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง จำนวน 230 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 635 ราย ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับร่วมด้วย จำนวน 319 ราย การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวทำโดยวิธี *Allelic discrimination* ด้วย *TaqMan probe real-time polymerase chain reaction* สถิติที่ใช้ ได้แก่ *unpaired t-test, analysis of variance (ANOVA)* และ *Chi-square test*
- ผลการศึกษา** : ความถี่ของจีโนไทป์ GG, GA และ AA ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีเป็นร้อยละ 74.2, ร้อยละ 22.1 และร้อยละ 3.7 ตามลำดับ, กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองเป็นร้อยละ 84.1, ร้อยละ 15.1 และร้อยละ 0.8 ตามลำดับ และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเป็นร้อยละ 85.0, ร้อยละ 13.4 และร้อยละ 1.6 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ non-GG (GA และ AA) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง [*odds ratio (OR)*]

0.54; 95 % CI (0.35 - 0.86),  $P = 0.001$ ] และในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (0.51; 0.35 - 0.73,  $P < 0.001$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน NTCP ตำแหน่ง rs2296651 กับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เป็นมะเร็งตับกับไม่ได้เป็นมะเร็งตับ

**สรุป :** จีโนไทป์ GA หรือ AA ของยีน NTCP ตำแหน่ง rs2296651 มีความชุกสูงในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตามความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน NTCP ตำแหน่ง rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง และการพัฒนาจากระยะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังไปเป็นมะเร็งตับ

**คำสำคัญ :** ไวรัสตับอักเสบบี, ไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง, มะเร็งตับ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ยีน NTCP.

มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับที่ 2 ของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลก ซึ่งร้อยละ 80 พบในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย และภูมิภาคที่อยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮาราในทวีปแอฟริกา มะเร็งชนิดนี้เกิดขึ้นได้จากสาเหตุต่าง ๆ เช่น ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และการดื่มแอลกอฮอล์<sup>(1,2)</sup> มีข้อมูลรายงานว่าประชากรทั่วโลกประมาณ 350 - 400 ล้านรายมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและประมาณ 700,000 รายนั้นเสียชีวิต<sup>(3)</sup> จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งตับส่งผลทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ จึงได้มีการศึกษากลไกการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส พบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากที่ผิวของเซลล์นั้นมีตัวรับที่จำเพาะเจาะจง (specific receptor) ซึ่งเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมาสามารถระบุได้ว่าตัวรับดังกล่าวนี้คือ sodium dependent taurocholate co-transporting polypeptide (*NTCP*) มีหน้าที่ คือ ขนส่งน้ำดีเข้าสู่ตับ (bile acid transporter)<sup>(4 - 7)</sup> ในปัจจุบันยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม (single nucleotide polymorphisms หรือ SNPs) บนยีน *NTCP* กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไม่มากนัก โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรจีนฮั่นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี<sup>(8 - 10)</sup> รวมถึงการศึกษาในประชากรชาวไต้หวัน พบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเป็นมะเร็งตับเช่นกัน<sup>(11)</sup> อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่นและชาวอุยกูร์ พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี<sup>(12)</sup> แสดงให้เห็นว่าแม้จะเป็นประชากรในประเทศเดียวกันแต่ผลการศึกษาก็อาจต่างกันได้ นอกจากนี้พบว่าเชื้อชาติ (ethnicity) ก็มี

ความเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเป็นมะเร็งอีกด้วย เนื่องจากไม่พบ minor allele ในประชากรชาวยุโรป, อเมริกัน รวมถึงสเปน จึงถือได้ว่าเป็น major variation ของชาวเอเชีย<sup>(13)</sup> ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดมะเร็งตับ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาในประชากรชาวไทยมาก่อน

## วิธีการศึกษา

### กลุ่มประชากรที่ศึกษา

เก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มควบคุม 472 ราย แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy control) จำนวน 240 ราย และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง (spontaneous HBV clearance) จำนวน 232 ราย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดจากศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic HBV infection) มีจำนวน 635 ราย แบ่งเป็นที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งเป็นมะเร็งตับจำนวน 316 รายและไม่เป็นมะเร็งตับจำนวน 319 ราย ที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ได้มีการลงลายมือชื่อยินยอมจากผู้ป่วยแล้วในกรณีที่ให้เก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต นอกจากนี้ผู้ป่วยแต่ละรายต้องไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีรวมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวี และได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย ซึ่งการศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 046/60 โดยทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

## การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน NTCP

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน NTCP ที่ตำแหน่ง rs2296651 โดยใช้เทคนิค real time polymerase chain reaction (real-time PCR) ร่วมกับ TaqMan probes (Applied Biosystems, USA) โดยมีสารที่ใช้ประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2.5  $\mu$ l, TaqMan Genotyping Master Mix 5  $\mu$ l, Taqman probe with primer 0.5  $\mu$ l และ DNA template 2  $\mu$ l ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ทำดังนี้ 1) pre-holding stage ที่ 60°C 30 วินาที 2) holding stage ที่ 95°C 10 นาที 3) denaturation ที่ 95°C 15 วินาที 4) annealing/extension ที่ 60°C 1 นาที 40 รอบ ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปโดยเครื่อง StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) ซึ่ง products ของยีน NTCP ตำแหน่ง rs2296651 ที่มีจีโนไทป์แบบ AA (mutant type) มีความจำเพาะกับ Taqman probe ที่ติดฉลากด้วย VIC และ จีโนไทป์แบบ GG (wild type) มีความจำเพาะกับ Taqman probe ที่ติดฉลากด้วย FAM

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 22 ใช้สถิติเชิงอนุมาน ได้แก่ unpaired *t* test และ analysis of variance (ANOVA) เพื่อพิจารณาความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มผู้ป่วย และใช้สถิติ Chi-square test ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมถึงใช้โปรแกรม MedCalc Statistical Software เพื่อคำนวณค่า odds ratio (OR) และค่า 95% confidence interval (CI) กำหนดให้ข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ  $P < 0.05$

## ผลการศึกษา

จากข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP rs2296651 กับการดำเนินโรคจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีถูกนำ

มาวิเคราะห์ผลดังตารางที่ 1 โดยพบว่าประชากรในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีอายุเฉลี่ย  $53.1 \pm 13$  ปี กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี มีอายุเฉลี่ย  $48.6 \pm 6$  ปี และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองมีอายุเฉลี่ย  $49.8 \pm 6$  ปี ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และเป็นมะเร็งตับมีอายุเฉลี่ย  $49.4 \pm 11$  ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ มีอายุเฉลี่ย  $47.3 \pm 12$  ปี ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่าเพศชายมากกว่าเพศหญิง ซึ่งพบเพศชายมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังคิดเป็นร้อยละ 70.9 และพบน้อยที่สุดในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีคิดเป็นร้อยละ 53.3 ส่วนเพศหญิงนั้นพบมากที่สุดในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี คิดเป็นร้อยละ 46.7 และน้อยที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง คิดเป็นร้อยละ 29.1 ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และเป็นมะเร็งตับ พบว่าเป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง

นอกจากนี้พบว่ามีความแตกต่างของอายุเฉลี่ย และสัดส่วนของเพศระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.0001$ ) สำหรับค่าอื่น ๆ ได้แก่ ค่า alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) และ alphafetoprotein (AFP) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ มีความแตกต่างกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับ ( $P = 0.042, 0.045, < 0.001, < 0.001, < 0.001$  ตามลำดับ) ส่วน HBeAg ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ( $P > 0.05$ ) นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับพบว่ามีค่า total bilirubin เฉลี่ยประมาณ 1.25 มีการแบ่งระยะความรุนแรงของโรคตับแข็งตามเกณฑ์ของ Child-Pugh พบว่าส่วนใหญ่อยู่ใน class A แต่เมื่อมีการแบ่งระยะมะเร็งตามเกณฑ์ของ Barcelona Clinic (BCLC) พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในระยะ intermediate stage (stage B)

ตารางที่ 1. ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากร

Baselines	Healthy controls (n = 240)	Spontaneous HBV clearance (n = 232)	Total	Chronic HBV infection Non-HCC (n = 319)	HCC (n = 316)	P - value
Age (years)	48.6 ± 6	49.8 ± 6	53.1 ± 13	47.3 ± 12	49.4 ± 11	0.001*, 0.001**
Sex (%)						0.001*, 0.001**
Male	128 (53.3%)	154 (66.4%)	450 (70.9%)	187 (58.6%)	263 (83.2%)	
Female	112 (46.7%)	78 (33.6%)	185 (29.1%)	132 (41.4%)	53 (16.8%)	
TB (mg/dL)	ND	ND	ND	3.9 ± 0.9	1.25 ± 0.9	0.052**
Albumin (mg/dL)	ND	ND	ND	52.3 ± 49.6	58.6 ± 66.7	0.045**
ALT (IU/L)	ND	ND	ND	71.4 ± 24.6	151.9 ± 122.8	0.001**
ALP (mg/L)	ND	ND	ND	38.3 ± 31.3	86.3 ± 99.8	0.001**
AST (IU/L)	ND	ND	ND	3.1 ± 2.8	9979.7 ± 34420.1	0.001**
AFP (ng/mL)	ND	ND	ND	ND	177 (75.6%)	
Child-Pugh	ND	ND	ND	ND	57 (24.4%)	
A					88 (31.4%)	
B - C					110 (39.3%)	
BCLC	ND	ND	ND	ND	82 (29.3%)	0.054**
0 - A					24 (19.2%)	
B					101 (80.8%)	
C - D						
HBeAg	ND	ND	ND	180 (57.7%)		
Negative				132 (42.3%)		
Positive						

(TB: Total bilirubin, ALT: Alanine transaminase, ALP: Alkaline phosphatase, AST: Aspartate aminotransferase, AFP: Alpha-fetoprotein, BCLC: Barcelona Clinic Liver

Cancer, HBV: Hepatitis B virus, ND = No data, P - value &lt; 0.05)

\* เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มรวมกัน

\*\* เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เป็นมะเร็งและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง

ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าจีโนไทป์ GA และ AA มีความสัมพันธ์ในลักษณะลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.036, 0.043$  ตามลำดับ) รวมทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ( $P = 0.011, 0.032$  ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ A allele พบว่ามีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.001$ ) รวมทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ( $P < 0.001$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

จากการพิจารณาค่า OR เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง ( $OR = 0.58, 95\% CI = 0.38 - 0.87$ ) และระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ( $OR = 0.6, 95\% CI = 0.43 - 0.83$ ) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น protective allele ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ( $OR = 1.04, 95\% CI = 0.71 - 1.53$ ) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น risk allele แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกัน ( $P > 0.05$ )

ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และเป็นมะเร็งตับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ ไม่พบความสัมพันธ์กัน ( $P > 0.05$ )

จากการพิจารณาค่า OR เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และเป็นมะเร็งตับ ( $OR = 0.92, 95\% CI = 0.62 - 1.35$ ) พบว่ามีแนวโน้มว่าจะเป็น risk allele แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกัน

## อภิปรายผล

ผลงานวิจัยพบว่า SNP ของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ในประชากรกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีความถี่ของอัลลีล G (ร้อยละ 85.2, ร้อยละ 91.6 และ ร้อยละ 91.7 ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าอัลลีล A แสดงให้เห็นว่า SNP rs2296651 ในประชากรไทยมี major allele เป็น G และ minor allele เป็น A ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yang J. และคณะ<sup>(10)</sup> ที่ศึกษาในประชากรจีนชาวจีน และยังคงสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Li N. และคณะ<sup>(14)</sup> ซึ่งศึกษาในประชากรจีนชาวจีนเช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความถี่ของอัลลีลสำหรับ SNP ตำแหน่งนี้ในประชากรไทยกับประชากรจีนไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Peng L. และคณะ<sup>(9)</sup> พบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ของ SNP rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีที่ศึกษาในประชากรจีนชาวจีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้

ในขณะที่การศึกษาของ Su Z. และคณะ<sup>(12)</sup> ที่ทำการศึกษาในประชากรชาวธิเบตและอุยกูร์พบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ของ SNP rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ จึงถือได้ว่าเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อชาติเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *NTCP* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี



**ตารางที่ 2.** ความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษา  
เทียบกับกลุ่มควบคุม

<i>NTCP</i>	Healthy controls (n = 240)	Spontaneous HBV clearance (n = 232)	Chronic HBV infection (n = 635)	Controls vs. Clearance	Controls vs. CHB	Clearance vs. CHB
				OR (95%CI)	OR (95%CI)	OR (95%CI)
				P - value	P - value	P - value
Allelic model						
Major (G)	409 (85.2%)	425 (91.6%)	1165 (91.7%)	1	1	1
Minor (A)	71 (14.8%)	39 (8.4%)	105 (8.3%)	0.58 (0.38 - 0.87)	0.6 (0.43 - 0.83)	1.04 (0.71 - 1.53)
Genotype						
GG	178 (74.2%)	195 (84.1%)	540 (85.0%)	1	1	1
GA	53 (22.1%)	35 (15.1%)	85 (13.4%)	0.6 (0.38 - 0.97)	0.5 (0.36 - 0.78)	0.88 (0.57 - 1.34)
AA	9 (3.7%)	2 (0.8%)	10 (1.6%)	0.2 (0.04 - 0.95)	0.37 (0.15 - 0.92)	1.81 (0.39 - 8.31)
Dominant model						
GG	178 (74.2%)	195 (84.1%)	540 (85.1%)	1	1	1
GA+AA	62 (25.8%)	37 (15.9%)	95 (14.9%)	0.54 (0.35 - 0.86)	0.51 (0.35 - 0.73)	0.92 (0.61 - 1.4)
Recessive model						
GG+GA	231 (96.3%)	230 (99.1%)	619 (97.5%)	1	1	1
AA	9 (3.7%)	2 (0.9%)	10 (1.5%)	0.5 (0.09 - 2.83)	1.52 (0.5 - 4.6)	2.97 (0.68 - 13.01)

HCC: Hepatocellular carcinoma, CHB: Chronic hepatitis B, CI: Confidence interval, OR: Odds ratio.

ตารางที่ 3. ความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับ

<i>NTCP</i>	Non HCC (n = 319)	HCC (n = 316)	Non HCC vs. HCC OR (95%CI)	<i>P</i> - value
Allelic model				
Major (G)	580 (90.9%)	579 (91.6%)	1	
Minor (A)	58 (9.1%)	53 (8.4%)	0.92 (0.62 - 1.35)	0.66
Genotype				
GG	266 (83.4%)	274 (86.7%)	1	
GA	48 (15.0%)	31 (9.8%)	0.63 (0.39 - 1.02)	0.06
AA	5 (1.6%)	11 (3.5%)	2.14 (0.73 - 6.23)	0.16
Dominant model				
GG	266 (83.4%)	274 (86.7%)	1	
GA + AA	53 (16.6%)	42 (13.3%)	0.77 (0.5 - 1.2)	0.24
Recessive model				
GG + GA	314 (98.4%)	305 (96.5%)	1	
AA	5 (1.6%)	11 (3.5%)	2.26 (0.78 - 6.6)	0.13

HCC : Hepatocellular carcinoma, CI : Confidence interval, OR : Odds ratio.

นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Li N. และคณะ<sup>(14)</sup> ในปี พ.ศ. 2557 ได้รายงานการวิจัยไว้ว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ ซึ่งศึกษาในประชากรจีนชาวฮั่นมีความสอดคล้องกับการศึกษาในประชากรไทย รวมถึงในการศึกษาของ Su Z. และคณะ<sup>(12)</sup> ที่ทำการศึกษาในประชากรชาวธิเบตและอุยกูร์ แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Hu H-H. และคณะ<sup>(11)</sup> ที่มีการรายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรชาวไต้หวัน ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ

## สรุป

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรชาวไทย รวมทั้งจีโนไทป์ GA หรือ AA ที่พบในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี อย่างไรก็ตามความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NTCP* ตำแหน่ง rs2296651 ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง และการพัฒนาจากระยะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังไปเป็นมะเร็งตับ

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านและขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวมถึงสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724, หน่วยปฏิบัติการวิจัย Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer และ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ เป็นอย่างมากที่ให้การช่วยเหลือในการศึกษานี้

## เอกสารอ้างอิง

1. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S5-16.
2. El Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118-27.
3. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167-85.
4. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholatecotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012;1:e00049.
5. Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (*SLC10A2*) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 2002;277:30559-66.
6. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004;126:322-42.
7. Li W. The hepatitis B virus receptor. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2015;31:125-47.
8. Su Z, Li Y, Liao Y, Cai B, Chen J, Zhang J, et al. Association of the gene polymorphisms in sodium taurocholatecotransporting polypeptide with the outcomes of hepatitis B infection in Chinese Han population. *Infect Genet Evol* 2014;27:77-82.
9. Peng L, Zhao Q, Li Q, Li M, Li C, Xu T, et al. The p.Ser267Phe variant in *SLC10A1* is associated with resistance to chronic hepatitis B. *Hepatology* 2015;61:1251-60.
10. Yang J, Yang Y, Xia M, Wang L, Zhou W, Yang Y, et al. A genetic variant of the *NTCP* gene is associated with HBV infection status in a Chinese population. *BMC cancer* 2016;16:211.
11. Hu HH, Liu J, Lin YL, Luo WS, Chu YJ, Chang CL, et al. The rs2296651 (S267F) variant on *NTCP* (*SLC10A1*) is inversely associated with chronic hepatitis B and progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *Gut* 2016;65:1514-21.
12. Su Z, Li Y, Liao Y, Cai B, Chen J, Zhang J, et al. Polymorphisms in sodium taurocholatecotransporting polypeptide are not associated with hepatitis B virus clearance in Chinese Tibetans and Uygurs. *Infect Genet Evol* 2016;41:128-34.
13. Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB. Ethnicity-dependent polymorphism in Na<sup>+</sup>-taurocholatecotransporting polypeptide (*SLC10A1*) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem* 2004;279:7213-22.
14. Li N, Zhang P, Yang C, Zhu Q, Li Z, Li F, et al. Association of genetic variation of sodium taurocholatecotransporting polypeptide with chronic hepatitis B virus infection. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014;18:425-9.