



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ความหลากหลายของยีน Glutathione -S- transferase P1 ที่ exon 5 และ exon 6  
ในผู้ป่วยมะเร็งตับชาวไทย

GLUTATHIONE - S- TRANSFERASE P1 POLYMORPHISM ON EXON 5 AND  
EXON 6 IN THAI LIVER CANCER PATIENTS.

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนศ พงศ์ธีรรัตน์

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2561

ชื่อเรื่อง : ความหลากหลายของยีน Glutathione -S- transferase P1 ที่ exon 5 และ exon 6 ในผู้ป่วยมะเร็งตับ  
ชาวไทย

ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์ สถาบัน: มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : 2563

สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

จำนวนหน้างานวิจัย : 27 หน้า

คำสำคัญ : กลูตาไธโอน เอส ทรานสเฟอเรส พี 1, ความหลากหลายของยีน, มะเร็งตับ

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

### บทคัดย่อ

มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบมากอันดับห้าในประชากรโลกและเป็นอันดับสี่ของการตายจากโรคมะเร็ง มะเร็งตับจะพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงสองถึงสี่เท่า พบมากในประชากรในเอเชียและแอฟริกา สาเหตุที่เพศชายเกิดมากกว่าเพศหญิงเพราะปัจจัยจากพฤติกรรมในชีวิตประจำวัน และปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งเซลล์ตับ มีหลายปัจจัยเช่นการดื่มสุรา/เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ GSTP1 เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษ เช่นสารก่อมะเร็ง และความหลากหลายของยีน GSTP1 codon 105 ใน exon 5 และ codon 114 ใน exon 6 จะทำให้การทำงานของเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพน้อยลงซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ การวิจัยนี้จึงได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ความหลากหลายของยีน GSTP1 กับผู้ป่วยมะเร็งตับ และความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับ และหวังว่างานวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับผลของความหลากหลายของยีน GSTP1 ต่อผู้ป่วยมะเร็งตับชาวไทย

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความหลากหลายของยีน GSTP1 ของผู้ป่วยมะเร็งตับชาวไทยจำนวน 52 ราย และกลุ่มคนปกติ 62 ราย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 กับกลุ่มผู้ป่วย กลุ่มคนปกติ กับพยาธิสภาพของผู้ป่วย พบว่าความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 (C/T) เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับ (OR value = 4.40) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับเพศของผู้ป่วย ( $P = 0.015$ ) ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยแต่อย่างใด

ผลการวิจัยสรุปได้ว่าเฉพาะความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับของชาวไทยในผู้ป่วยเพศชายและมีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และไม่พบว่าความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ

Title Glutathione - S- transferase P1 Polymorphism on exon 5 and exon 6 in Thai Liver Cancer Patients.

Researcher : Asst.Prof.Dr.Tanett Pongtheerat      Institution : Rangsit University

Year of Publication : 2020      Publisher : Rangsit University

Sources : Research Institute Rangsit University      No. of Page : 33 pages

Keyword : glutathione S-transferase P1, Polymorphism, Liver Cancer

Copy Right : Rangsit University

### Abstract

Liver cancer is the fifth most common malignancy and the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide. Liver cancer cases are two to four times more common in males than in females, and the highest incidences are found in Asia and Sub-Saharan Africa. This gender disparity is the result of different behavioral risk factors, such as smoking and drinking alcohol. GSTP1 is an enzyme that is involved in the detoxification of carcinogenic electrophiles. GSTP1 codon 105 in exon 5 and codon 114 in exon 6 polymorphisms result in decreased enzyme detoxification activity, which is the cause of many cancers. This study aims to investigate the associations between GSTP1 polymorphism, liver cancer patients, and the risk factors for liver cancer. It is hoped that this research will provide useful knowledge on the effects of genetic GSTP1 polymorphism in Thai liver cancer patients.

DNA from forty-four Thai liver cancer patients and 52 healthy controls were analyzed for GSTP1 exon 5 and exon 6 polymorphisms by PCR-RFLP. The associations between GSTP1 polymorphism, the control group, and clinicopathological parameters were determined. The results show that GSTP1 exon 6 polymorphism genotypes (C/T) were correlated with an increased risk of hepatocellular carcinoma susceptibility (OR value = 4.40). Moreover, exon 6 polymorphism genotypes (C/T) were associated with the gender of patients ( $P = 0.015$ ), but no relationships were found between GSTP1 exon 5 polymorphism and the clinicopathological data of patients.

The results suggest that the GSTP1 exon 6 polymorphism genotype was associated with an increase in the risk of liver cancer in male patients and that it tended to be related to cancer differentiation. No association was found between GSTP1 exon 5 polymorphism and the risk of liver cancer.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้จะไม่อาจสำเร็จได้ถ้าไม่ได้รับความร่วมมือจากหมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในการให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่และเครื่องมือต่างๆ ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยมะเร็งตับ และกลุ่มคนปกติ และงานวิจัยนี้สำเร็จได้โดยได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับการตอบรับตีพิมพ์ผลงานวิจัยนี้ในวารสาร Oncology (2020) ในหัวข้อเรื่อง Glutathione - S-transferase P1 Polymorphism on exon 6 and Risk of Thai Male Hepatocellular Carcinoma ได้แทรกไว้ในภาคผนวกเพื่อความสมบูรณ์ของงานวิจัย

คณะผู้วิจัย



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1	
บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ทบทวนเอกสารวรรณกรรมทางวิชาการ	3
บทที่ 3	
ระเบียบวิธีวิจัย	6
การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ	6
การทำ PCR-RFLP สำหรับยีน GSTP1	6
การวิเคราะห์ข้อมูล	7

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4	ผลการวิจัย
	8
	การทำ PCR ของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6
	8
	การทำ PCR-RFLP ของยีน GSTP1
	10
	การวิเคราะห์ข้อมูล
	16
	การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 ในกลุ่มผู้ป่วยและ
	กลุ่มคนปกติ
	16
	การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 กับพยาธิสภาพ
	ของผู้ป่วยมะเร็งตับ
	17
บทที่ 5	สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ
	23
	สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ
	23
บรรณานุกรม	25
ประวัติผู้วิจัย	28

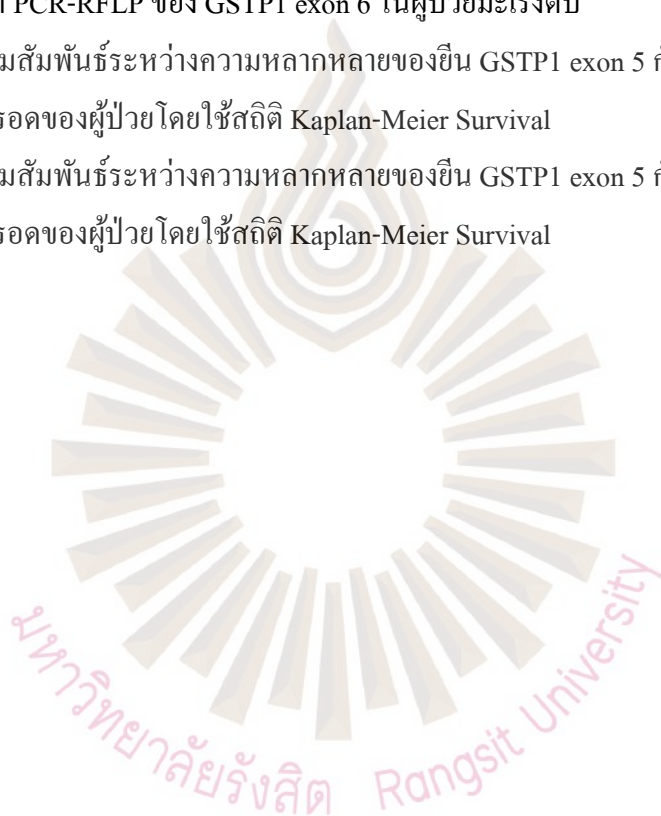
สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 5 ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งระดับ	12
2 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 5 ในตัวอย่างกลุ่มคนปกติ	13
3 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 6 ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งระดับ	14
4 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 6 ในตัวอย่างกลุ่มคนปกติ	15
5 แสดงค่าความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 ของผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ	16
6 แสดงข้อมูลประวัติผู้ป่วยมะเร็งระดับ	17
7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งระดับ	19
8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งระดับ	20



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงผลผลิต PCR ของ GSTP1 exon 5 ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับ	8
2 แสดงผลผลิต PCR ของ GSTP1 exon 6 ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับ	9
3 แสดงผลผลิต PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 5 ในผู้ป่วยมะเร็งตับ	10
4 แสดงผลผลิต PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 6 ในผู้ป่วยมะเร็งตับ	11
5 แสดงหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 กับ อัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival	21
6 แสดงหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 กับ อัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival	22





## บทที่ 1

## บทนำ

## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งตับ (liver cancer) เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับห้าของโรคมะเร็งที่พบในประชากรโลก ในปี 2018 คาดว่าจะมีผู้ป่วยมะเร็งตับรายใหม่ ประมาณ 840,000 ราย และมีผู้ป่วยมะเร็งตับเสียชีวิตประมาณ 695,900 ราย สำหรับประเทศไทย ในเพศชายมะเร็งตับพบสูงเป็นอันดับหนึ่งมีอัตราการเกิด 33.9/100,000 ของประชากร และพบบ่อยเป็นอันดับสามในเพศหญิง 12.9/100,000 ของประชากร การวินิจฉัยโรคและการพยากรณ์โรคมะเร็งตับในปัจจุบันยังคงไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยหลังการผ่าตัด (5 year survival) ต่ำ

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งตับมีหลายสาเหตุเช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และชนิดซี การป่วยเป็นโรคตับแข็ง การดื่มสุรา/เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การรับประทานอาหารที่มีเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ที่ผลิตสารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ที่ปนเปื้อนในอาหาร การได้รับสารพิษจากการทำงาน การสูบบุหรี่และปัจจัยทางพันธุกรรมก็พบเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับ ปัจจัยทางพันธุกรรมนี้มีกลุ่มยีนที่สำคัญที่ศึกษากันมากคือ Carcinogen metabolism genes ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่สร้างเอ็นไซม์ที่ทำให้สารพิษหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลง ยีนกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ Phase I enzyme ได้แก่ CYP1A1, CYP2D6 ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารแปลกปลอมต่างๆ Phase II enzyme ได้แก่ Glutathione S-transferase ซึ่งช่วยให้สารพิษละลายน้ำได้มากขึ้นและถูกขับออกจากร่างกายได้

GSTP1 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 มีความหลากหลายของยีนตรง Codon ที่ 105 บน exon 5 และ Codon ที่ 114 exon 6 ของยีนนี้ คือ บน exon 5 มีการเปลี่ยนจากเบส G เป็นเบส A ซึ่งเป็นตำแหน่ง active site ของเอ็นไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Isolucine เป็น Valine และ exon 6 เปลี่ยนจาก Alanine เป็น Valine ซึ่งมีผลทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ลดลง

ในการหาความหลากหลายของยีน GSTP1 มักใช้เทคนิค PCR-RFLP และหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีนกับมะเร็งชนิดต่างๆมีการศึกษากันมากขึ้น โดยเฉพาะประเทศตะวันตก แต่สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาอยู่บ้างแต่ยังไม่มากนัก ผู้วิจัยมุ่งศึกษาหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีนนี้กับมะเร็งตับของผู้ป่วยชาวไทยและกลุ่มคนปกติเพื่อเป็นพื้นฐานความรู้ให้ศึกษาความสำคัญของยีนเหล่านี้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความถี่ของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 ในผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มคนปกติ
2. หาความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งตับจากของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 ในผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มคนปกติ
3. หาความสัมพันธ์ระหว่างของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ เช่น อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการอยู่รอดและระดับความรุนแรงของโรคมะเร็งตับ

### สมมติฐานของการวิจัย

1. ความถี่ของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มคนปกติ
2. ความถี่ของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ
3. ความถี่ของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 มีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

### ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาทางระบาดวิทยาของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 ในผู้ป่วยมะเร็งตับชาวไทยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวนประมาณ 100 คน และหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ 6 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ ได้แก่ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, อัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย และระยะของโรคมะเร็ง

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประเมินบทบาทความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 ที่นำไปสู่ความเชื่อมโยงกับอัตราการอยู่รอดผู้ป่วยและพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ ซึ่งจะมีผลต่อการประเมินการรักษาและ การให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ต่อผู้ที่เป็นมะเร็งตับ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### บททวนเอกสารวรรณกรรมทางวิชาการ

มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับห้าของโรคมะเร็งที่พบในประชากรโลก (1) ในปี 2018 คาดว่าจะมีผู้ป่วยมะเร็งตับรายใหม่ ประมาณ 840,000 ราย (2) สำหรับประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของมะเร็งตับอยู่ในอันดับหนึ่งของโรคมะเร็งที่พบทั้งหมด (3) ในเพศชายมะเร็งตับพบสูงเป็นอันดับหนึ่งมีอัตราการเกิด 33.9/100,000 ของประชากร และพบบ่อยเป็นอันดับสามในเพศหญิง 12.9/100,000 ของประชากร อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคและการพยากรณ์โรคมะเร็งตับในปัจจุบันยังคงไม่ดีเท่าที่ควร คาดกันว่าอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยหลังการผ่าตัด (5 year survival) อยู่ที่ประมาณ 26-44 % อาจเนื่องมาจากผู้ป่วยจะทราบว่าเป็นมะเร็งก็ต่อเมื่อโรคมะเร็งเข้าสู่ระยะลุกลามไปแล้ว การตรวจหา DNA marker สำหรับผู้ป่วยมะเร็งตับจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการพยากรณ์โรคและการดำเนินไปของโรค (1)

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งตับเช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และชนิดซี การป่วยเป็นโรคตับแข็ง การดื่มสุรา/เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การรับประทานอาหารที่มีเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ที่ผลิตสารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ที่ปนเปื้อนในอาหาร เช่น ถั่วลิสงป่น พริกป่น ธัญพืชที่เปียกชื้น การได้รับสารพิษจากการทำงานเช่นสาร vinyl chloride monomer การสูบบุหรี่ก็พบเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับ(4, 5)

ยีน Glutathione S-transferase

กลุ่มยีนที่มีการศึกษากันมากกลุ่มหนึ่งคือ ยีนที่สร้างเอนไซม์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ biotransformation ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีในสิ่งมีชีวิตที่จะเปลี่ยนคุณสมบัติการละลายของสารที่มีพิษต่อร่างกายหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลงและมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้นจึงขับออกจากร่างกายได้ โดยปรกติเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Biotransformation จะแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ phase I enzyme ได้แก่ Cytochrome P450 enzyme และ phase II enzyme ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ glutathione S-transferase ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีหลายชนิด โดยธรรมชาติแล้วทำหน้าที่ในการทำลายสารที่ทำให้เกิดพิษ เช่น สารตัวกลางที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม, สารอนุมูลอิสระ, ยาต่างๆ หรือสารก่อมะเร็งชนิดต่างๆ โดยการเชื่อมต่อดังกล่าวกับสาร glutathione แล้วขับทิ้งจากร่างกาย ยีนที่ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์คือ glutathione S-transferase (GSTs) กลุ่มนี้ (6, 7)

กลุ่มของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase (glutathione S-transferase gene family) ในขณะที่พบว่ามียีนทั้งสิ้น 16 ยีนที่ควบคุมการสร้าง glutathione S-transferase ในส่วนไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อ และมี 6 ยีน ที่ควบคุมการสร้างในส่วนเมมเบรน (8) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะยีนควบคุมการสร้าง glutathione S-transferase ในส่วนไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อ ซึ่งในมนุษย์พบว่าแบ่งเป็น 8 คลาสใหญ่ๆ (9) ได้แก่

1. คลาส Alpha อยู่บน chromosome คู่ที่ 6 (6p) แบ่งเป็น A1-A4
2. คลาส Mu อยู่บน chromosome คู่ที่ 1 (1p) แบ่งเป็น M1-M5
3. คลาส Theta อยู่บน chromosome คู่ที่ 22 (22q) แบ่งเป็น T1 และ T2
4. คลาส Pi อยู่บน chromosome คู่ที่ 11(11q) แบ่งเป็น P1
5. คลาส Zeta อยู่บน chromosome คู่ที่ 14 (14q) แบ่งเป็น Z1
6. คลาส Sigma อยู่บน chromosome คู่ที่ 4 (4q)
7. คลาส Kappa ยังไม่ทราบตำแหน่งแน่ชัด แต่พบว่าอาจควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ K1
8. คลาส Chi หรือ Omega อยู่บน chromosome คู่ที่ 10 (10q) แบ่งเป็น O1 และ O2

ความหลากหลายของยีน (Genetic Polymorphism) ) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการกลายพันธุ์ของยีน (Gene mutation) แตกต่างกันตรงที่ Polymorphism สามารถพบได้อย่างต่ำ 1% ของคนปกติ ส่วนใหญ่ของ Polymorphism มักจะมีลักษณะเป็น single nucleotide polymorphism หรือที่เรียกว่า SNPs SNPs ที่เป็น homozygote จะมีลักษณะเป็น biallelic polymorphism marker คือมี polymorphism ในทั้งสองอัลลีลของโครโมโซม พบว่าความถี่ในการเกิด SNPs จะสูง โดยจะพบการเกิด SNPs ได้ในทุกๆ 300 bps ในปัจจุบันพบว่าเกิดการเกิด polymorphism ในยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึม อาจมีผลต่อการกำจัดการพิษได้ ดังเช่นที่พบในยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Glutathione S-transferase

glutathione S-transferase ชนิด P1(GSTP1) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11q13 มีความหลากหลายของยีนตรง Codon ที่ 105 บน exon 5 และ Codon ที่ 114 บน exon 6 ของยีนนี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนซึ่งมีผลทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง (10) พบว่าความหลากหลายของยีนตรง Codon ที่ 105 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ (11) และความหลากหลายตรง Codon ที่ 114 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปอด (12)

สำหรับการศึกษาผลกระทบของยีนนี้กับโรคมะเร็งต่างๆในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก เช่น มีการศึกษาผลของความหลากหลายของยีน GSTP1 กับมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็กพบว่ายีนนี้ยังไม่มีมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งชนิดนี้ (13) การหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของยีนกับมะเร็งชนิดต่างๆ

มีการศึกษากันมากขึ้น โดยเฉพาะประเทศตะวันตก แต่สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาอยู่บ้างแต่ยังไม่มากนัก ผู้วิจัยมุ่งศึกษาหาความสัมพันธ์ของความแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอของยีนทั้งสองชนิดกับมะเร็งตับของผู้ป่วยชาวไทยเพื่อเป็นพื้นฐานความรู้ให้ศึกษาความสำคัญของยีนเหล่านี้



### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย

การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ

ใช้บล็อกชิ้นเนื้อฝิ่งพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งตับของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างปี พ. ศ. 2555-2558 จำนวน 100 ราย

โดยคำนวณจากสูตรของ Taro Yamane

$$n = \frac{N}{1+N(e)^2}$$

n = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

N = จำนวนประชากรทั้งหมด (ผู้ป่วยมะเร็งตับตั้งแต่ปี 2555-2558)

e = ความคลาดเคลื่อน (0.1)

แทนค่า

$$n = \frac{1232}{1+1232(0.1)^2}$$

จำนวนกลุ่มตัวอย่าง = 93

โดยตัดบล็อกชิ้นเนื้อฝิ่งพาราฟินมีความหนา ขนาด 10 ไมครอน จำนวน 2 ชิ้น มาตรฐานดีเอ็นเอ พร้อมเก็บข้อมูลทางพยาธิสภาพของผู้ป่วยคือ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, ระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง และอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย การรักษาคด้วยยาเคมีโดยข้อมูลทั้งหมดของผู้ป่วยผู้วิจัยจะต้องปิดเป็นความลับและใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของกลุ่มคนปกติจำนวน 100 ราย (ประมาณ 200 นาโนกรัม/ 15 ไมโครลิตร) ซึ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลือจากโครงการ “ความหลากหลายของยีน VEGF และ EGF กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับ” ใบจริยธรรมเลขที่ 046/2554

การทำ PCR-RFLP สำหรับยีน **GSTP1**

ความผิดปกติจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จะใช้เทคนิค PCR และตัดผลิตภัณฑ์ของ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์

ดีเอ็นเอเริ่มต้น(Primer) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน GSTP1 exon 5 คือ 5'-GGC TCT ATG GGA AGG ACC AGC-3' และ (5'-AAG GGG TCA GCC CAA GCC A-3') มีผลิตภัณฑ์ของ PCR ขนาด 206 bp ทำ PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งมีขั้นตอนคือกำหนดอุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที, หลังจากนั้น

โปรแกรมเครื่องกำหนด 30 รอบการทำ PCR ดังนี้ 94 °C เวลา 5 วินาที, 60°C เวลา 5 วินาที, 72°C เวลา 15 วินาทีและสุดท้าย 72°C เวลา 7 นาทีเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ของ PCR แล้วนำไปแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จแล้วย้อมด้วยสีย้อม fluorodye เพื่อดูผลิตภัณฑ์ของ PCR ขนาด 205 bp ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของ PCR ไปตัดด้วยเอ็นไซม์ BsmA1 และนำไปแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าย้อมด้วยสีย้อม fluorodye เพื่อดูชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 3 แบบหลังการตัดด้วยเอ็นไซม์คือถ้าตัวอย่างมีนิวคลีโอไทด์ปกติจะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 205 bp ชิ้นเดียว แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีการเปลี่ยนจาก A เป็นเบส G แบบ heterozygous ก็จะสามารถถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์โดยจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้นขนาด 206 bp, 120 bp และ 86 bp แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีการเปลี่ยนจาก A เป็นเบส G แบบ homozygous จะมีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 120 bp และ 86 bp

ดีเอ็นเอเริ่มต้น(Primer) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน GSTP1 exon 6 (15) คือ 5' GCA GAG GAG AAT CTG GGA CTC T 3' และ 5'GGC TCA CAC CTG TGT CCA TCT G 3' มีผลิตภัณฑ์ของ PCR ขนาด 224 bp ทำ PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งมีขั้นตอนคือกำหนดอุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที, หลังจากนั้นโปรแกรมเครื่องกำหนด 30 รอบการทำ PCR ดังนี้ 94 °C เวลา 30 วินาที, 67°C เวลา 30 วินาที, 72°C เวลา 30 วินาทีและสุดท้าย 72°C เวลา 7 นาทีเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ของ PCR แล้วนำไปแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จแล้วย้อมด้วยสีย้อม fluorodye เพื่อดูผลิตภัณฑ์ของ PCR ขนาด 280 bp ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของ PCR ไปตัดด้วยเอ็นไซม์ AciI และนำไปแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าย้อมด้วยสีย้อม fluorodye เพื่อดูชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 3 แบบหลังการตัดด้วยเอ็นไซม์คือถ้าตัวอย่างมีนิวคลีโอไทด์ปกติจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 170 bp และ 110 bp แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีการเปลี่ยนเป็นแบบ mutant ก็จะไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์โดยจะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด ขนาด 280 bp ถ้าเป็น heterozygous ก็จะสามารถถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์โดยจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้นขนาด 280 , 170 bp และ 110 bp

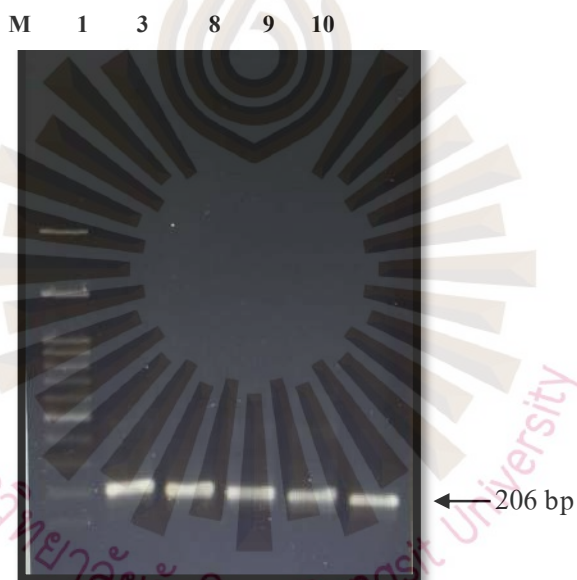
#### การวิเคราะห์ข้อมูล

เป็นการศึกษาทางระบาดวิทยาของความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 และ exon 6 ผู้ป่วยมะเร็งตับชาวไทยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ใช้ logistic regression analysis คำนวณค่า Odds ratio และ 95% confident interval ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มคนปกติ และหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีนกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ ได้แก่ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, โดยใช้สถิติ chi-square test และหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีนกับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยและระดับความรุนแรงของโรคมะเร็งผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier survival ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยมีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การทำ PCR ของยีน **GSTP1** exon 5 และ exon 6

การเพิ่มปริมาณของยีน **GSTP1** exon 5 โดยการทำให้ PCR จากดีเอ็นเอของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จแล้วย้อมด้วยสาร fluorodye จะได้ผลผลิตขนาด 206 bp ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลผลิต PCR ของ **GSTP1** exon 5 ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับหมายเลข 1, 3, 8, 9 และ 10 บน 2.0% agarose gel และย้อมด้วย fluorodye เลน M คือ 100 bp marker



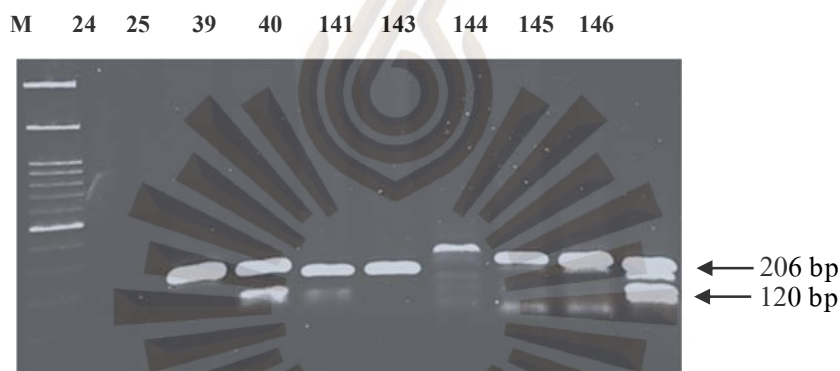
การเพิ่มปริมาณของยีน **GSTP1** exon 6 โดยการทำให้เซลล์ต้นกำเนิดของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับและ  
ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จแล้วเชื่อมด้วยสาร fluorodye จะได้ผลผลิตขนาด 280 bp ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลผลิต PCR ของ **GSTP1** exon 6 ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับหมายเลข 1, 3, 8, 9 และ 10 บน 2.0% agarose gel และเชื่อมด้วย fluorodye เลน M คือ 100 bp marker

#### 4.2 การทำ PCR-RFLP ของยีน GSTP1

ความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 โดยวิธี PCR-RFLP โดยหลังการทำ PCR จนได้ผลผลิตขนาด 206 bp แล้วจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ BsmA1 ผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับความหลากหลายของยีน GSTP1 ที่ตำแหน่งโคดอน 105 ดังรูปที่ 3 และสรุปผลการทดลองของทั้งตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับและตัวอย่างคนปกติ ได้ดังตารางที่ 1 และ 2

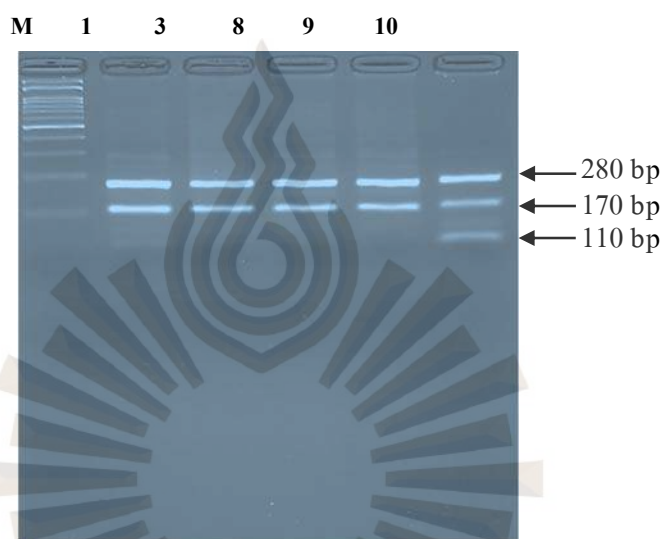


รูปที่ 3 แสดงผลผลิต PCR-RFLP ของ GSTP1 exon 5 ในผู้ป่วยมะเร็งตับ

หมายเหตุ M คือ 100 base pair marker

- 25 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 25 และมี polymorphism เป็น A/A
- 39 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 39 และมี polymorphism เป็น A/G
- 40 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 40 และมี polymorphism เป็น A/G
- 141 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 141 และมี polymorphism เป็น A/A
- 143 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 143 และมี polymorphism เป็น A/A
- 144 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 144 และมี polymorphism เป็น A/A
- 145 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 145 และมี polymorphism เป็น A/A
- 146 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 146 และมี polymorphism เป็น A/G

ความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 6 โดยวิธี PCR-RFLP โดยหลังการทำ PCR จนได้ผลผลิตขนาด 280 bp แล้วจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ **BsmA1**ผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับความหลากหลายของยีน **GSTP1** ที่ตำแหน่งโคดอน 114 ดังรูปที่ 4 และสรุปผลการทดลองของทั้งตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับและตัวอย่างคนปกติ ได้ได้ดังตารางที่ 3 และ 4



รูปที่ 4 แสดงผลผลิต PCR-RFLP ของ **GSTP1** exon 6 ในผู้ป่วยมะเร็งตับ

หมายเหตุ M คือ 100 base pair maker

1 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 1 และมี polymorphism เป็น C/T

3 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 3 และมี polymorphism เป็น C/T

8 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 8 และมี polymorphism เป็น C/T

9 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 9 และมี polymorphism เป็น C/T

10 คือ ผู้ป่วยมะเร็งตับ หมายเลข 10 และมี polymorphism เป็น C/T

ตาราง 1 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ *GSTP1* exon 5 ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับ (n= 52)

Sample	PCR-RFLP result	Sample	PCR-RFLP result
T1	A/A	T29	-
T2	A/A	T30	-
T3	A/A	T31	-
T4	A/A	T32	-
T5	G/A	T33	A/A
T6	G/A	T34	A/A
T7	A/A	T35	A/A
T8	A/A	T36	A/A
T9	A/A	T37	A/A
T10	A/A	T38	A/A
T11	A/A	T39	A/A
T12	A/A	T40	A/A
T13	A/A	T41	A/A
T14	A/A	T42	A/A
T15	A/A	T43	A/A
T16	A/A	T44	G/A
T17	A/A	T45	G/A
T18	A/A	T46	A/A
T19	-	T47	G/A
T20	-	T48	-
T21	-	T49	-
T22	-	T50	A/A
T23	-	T51	G/A
T24	-	T52	G/A
T25	-		
T26	-		
T27	-		
T28	-		

Remark: Wild type (A/A), Heterozygous (G/A), -= Not detected

ตาราง 2 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ *GSTP1* exon 5 ในตัวอย่างกลุ่มคนปกติ (n= 62)

Sample	PCR-RFLP result	Sample	PCR-RFLP result
C1	G/A	C33	G/A
C2	A/A	C34	G/A
C3	A/A	C35	A/A
C4	A/A	C36	A/A
C5	A/A	C37	A/A
C6	A/A	C38	G/A
C7	A/A	C39	A/A
C8	A/A	C40	A/A
C9	G/A	C41	G/A
C10	A/A	C42	G/A
C11	A/A	C43	A/A
C12	G/A	C44	A/A
C13	A/A	C45	A/A
C14	A/A	C46	A/A
C15	A/A	C47	G/A
C16	A/A	C48	A/A
C17	A/A	C49	G/A
C18	A/A	C50	A/A
C19	-	C51	A/A
C20	-	C52	G/A
C21	-	C53	G/A
C22	-	C54	A/A
C23	-	C55	A/A
C24	-	C56	G/A
C25	-	C57	G/A
C26	-	C58	A/A
C27	-	C59	A/A
C28	-	C60	A/A
C29	G/A	C61	A/A
C30	A/A	C62	A/A
C31	G/A		

C32	G/A		
-----	-----	--	--

ตาราง 3 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ *GSTP1* exon 6 ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งตับ (n= 52)

Sample	PCR-RFLP result	Sample	PCR-RFLP result
T1	C/T	T29	C/C
T2	-	T30	C/C
T3	-	T31	C/C
T4	-	T32	C/C
T5	-	T33	C/T
T6	-	T34	C/T
T7	C/T	T35	C/T
T8	C/T	T36	C/T
T9	C/T	T37	C/T
T10	C/T	T38	C/T
T11	C/T	T39	C/T
T12	C/C	T40	C/T
T13	C/T	T41	C/T
T14	C/T	T42	C/T
T15	C/T	T43	C/T
T16	C/T	T44	C/T
T17	C/T	T45	C/T
T18	C/T	T46	C/T
T19	C/T	T47	C/T
T20	C/T	T48	C/T
T21	C/T	T49	C/T
T22	C/C	T50	C/T
T23	C/C	T51	C/T
T24	C/C	T52	C/C
T25	C/C		
T26	C/C		
T27	C/C		
T28	C/C		

Remark: Wild type (C/C), Heterozygous (C/T), -= Not detected

ตาราง 4 ผลสรุปการทำ PCR-RFLP ของ *GSTP1* exon 6 ในตัวอย่างกลุ่มคนปกติ (n= 62)

Sample	PCR-RFLP result	Sample	PCR-RFLP result
C1	-	C33	CC
C2	-	C34	CC
C3	-	C35	CC
C4	-	C36	CC
C5	-	C37	CC
C6	-	C38	CC
C7	C/C	C39	CC
C8	-	C40	CC
C9	C/C	C41	CC
C10	-	C42	CC
C11	-	C43	CC
C12	-	C44	CC
C13	C/C	C45	CC
C14	C/C	C46	CC
C15	-	C47	CC
C16	-	C48	CC
C17	C/C	C49	CC
C18	-	C50	CC
C19	C/C	C51	CC
C20	C/C	C52	CC
C21	C/C	C53	CC
C22	C/C	C54	CC
C23	C/C	C55	CC
C24	C/C	C56	CC
C25	C/C	C57	CC
C26	C/C	C58	CC
C27	C/C	C59	CC
C28	C/C	C60	CC
C29	C/C	C61	CC
C30	C/C	C62	CC
C31	C/C		
C32	C/C		

## การวิเคราะห์ข้อมูล

การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ

โดยใช้สถิติ Chi-Square Test จากตารางที่ 5 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ (ค่า  $P > 0.05$ ) จากค่าความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 แต่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 6 กับกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ (ค่า  $P = 0.000$ ) เมื่อหาค่าความสัมพันธ์จากค่า Odds ratio ก็พบว่าความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 6 เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ (OR = 4.4) ค่าว

ตารางที่ 5 แสดงค่าความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 และ exon 6 ของผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ

<b>GSTP1 status</b>	<b>EXON5</b>		<b>EXON6</b>	
	<b>Control</b>	<b>HCC</b>	<b>Control</b>	<b>HCC</b>
<b>Wild type</b>	35 (67.3%)	29 (80.6%)	49 (100%)	10 (22.7%)
<b>Mutant</b>	17 (32.7%)	7 (19.4%)	0 (0.0%)	34 (77.3%)
<b>Total</b>	52	36	49	44
<b>Odds ratio, (95% CI)</b>	0.50 (0.18-1.36)		4.40 (2.55-7.59)	
<b>P-Value</b>	0.170		0.000*	



การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ

หาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอของยีนกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ ได้แก่ อายุ, ขนาดของก้อนมะเร็ง, โดยใช้สถิติ chi-square test และหาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอของยีนและอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยมีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลประวัติผู้ป่วยมะเร็งตับ

sample	Gender	Age	Histological	Tumor Size	Survival (weeks)
T1	M	68	PD	3.3	94.4
T2	M	55	MD	5	201.9
T3	M	58	MD	16.5	38.9
T4	M	55	PD	8.7	185.4
T5	M	71	MD	12.5	67.3
T6	F	34	MD	5.6	29.0
T7	M	47	MD	17	39.3
T8	M	74	MD	3	184.1
T9	M	61	WD	2.8	164.6
T10	M	31	MD	8.5	161.3
T11	F	44	MD	18	33.3
T12	F	37	WD	10.3	149.7
T13	M	64	MD	12.5	186.0
T14	M	57	MD	2	245.1
T15	F	50	MD	15.1	60.6
T16	F	50	MD	4.3	121.0
T17	M	57	MD	11	119.9
T18	M	37	MD	3	93.7
T19	M	53	WD	2.8	165.6
T20	M	43	PD	15.7	49.9
T21	M	58	MD	3.2	86.4
T22	F	53	unknown		87.4
T23	F	57	MD	3.4	84.7
T24	F	54	MD	1.3	79.0
T25					76.6
T26	M	51	MD	3.1	75.7
T27	M	51	WD	14	71.6

T28	F	69	WD	1.5	46.9
T29	M	57	MD	3.5	48.0
T30	M			3	Alive
T31	M	79	MD	3.5	Alive
T32	M	53	MD	3	Alive
T33	M	39	unknown	9	102.86
T34	F	54	unknown	6	18.86
T35	M	39	unknown	9	102.86
T36	M	57	MD	11	108.2014
T37	M	47	MD	4	
T38	M	43	MD	11	1.29
T39	F	39	MD	10	100.2014
T40	M	51	unknown	6	9.14
T41	M	63	unknown	6	>115.28
T42	M	57	unknown	15	14
T43	M	33	unknown	5	21.71
T44	M	55	unknown	6	23.14
T45	M	64	unknown	7.5	>85.71
T46	M	38	unknown	20	9.2014
T47	M	62	unknown	5	>84.71
T48	F	59	unknown	3	>85.42
T49	M	55	unknown	10	>42.14
T50	M	47	unknown	15	15.71
T51	M	75	unknown	7	58.43
T52	M	42	PD	7	>300.42

การหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 และ exon 6 กับพยาธิสภาพด้านต่างๆของผู้ป่วยมะเร็งตับโดยใช้สถิติ Chi-Square Test ในการวิเคราะห์ข้อมูลจากผู้ป่วยโดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 6 เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยทุกราย โดยค่า P-value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการหาความสัมพันธ์พบว่าความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพยาธิสภาพด้านต่างๆของผู้ป่วย (ค่า  $P > 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 7 ในขณะที่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 6 กับผู้ป่วยเพศชาย (ค่า  $P = 0.15$ ) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ

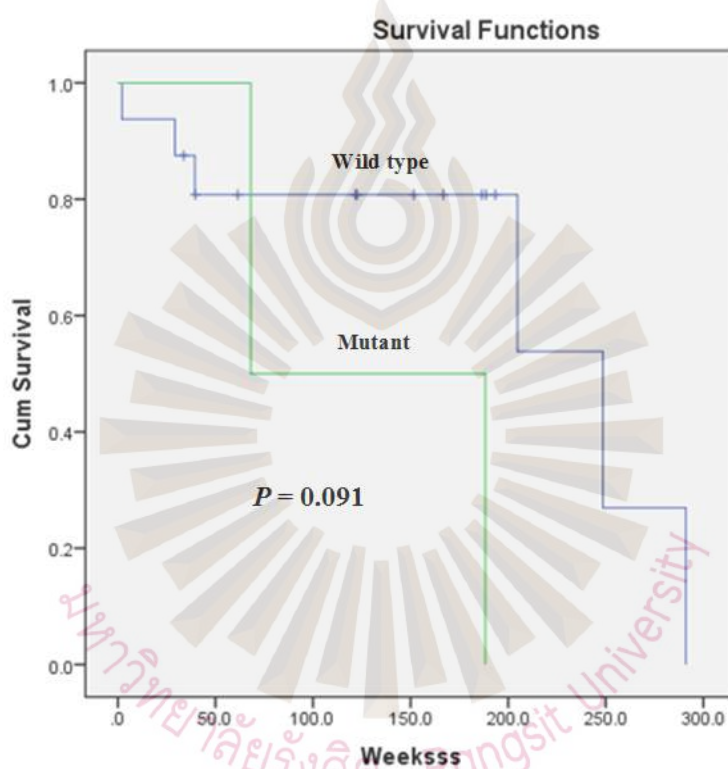
Parameter	<b>GSTP1 status</b>		<b>P-value</b>
	Wild type	Mutant	
	A/A n(%)	A/G n(%)	
<b>Stage</b>			0.356
<b>I+II</b>	18 (78)	2 (8)	
<b>III</b>	2 (8)	1 (4)	
<b>Tumor size</b>			0.566
<b>≤3</b>	4 (13)	0 (0)	
<b>&gt;3</b>	25 (69)	7 (18)	
<b>Differentiation</b>			0.485
<b>WD</b>	2 (9)	0 (0)	
<b>MD</b>	16 (68.5)	2 (9)	
<b>PD</b>	2 (9)	1 (4.5)	
<b>Sex</b>			1.000
<b>F</b>	6 (17)	1 (2)	
<b>M</b>	23 (64)	6 (17)	
<b>Age</b>			0.674
<b>≤50</b>	13 (36)	2 (6)	
<b>&gt;50</b>	16 (44)	5 (14)	

ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 6 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยมะเร็งตับ

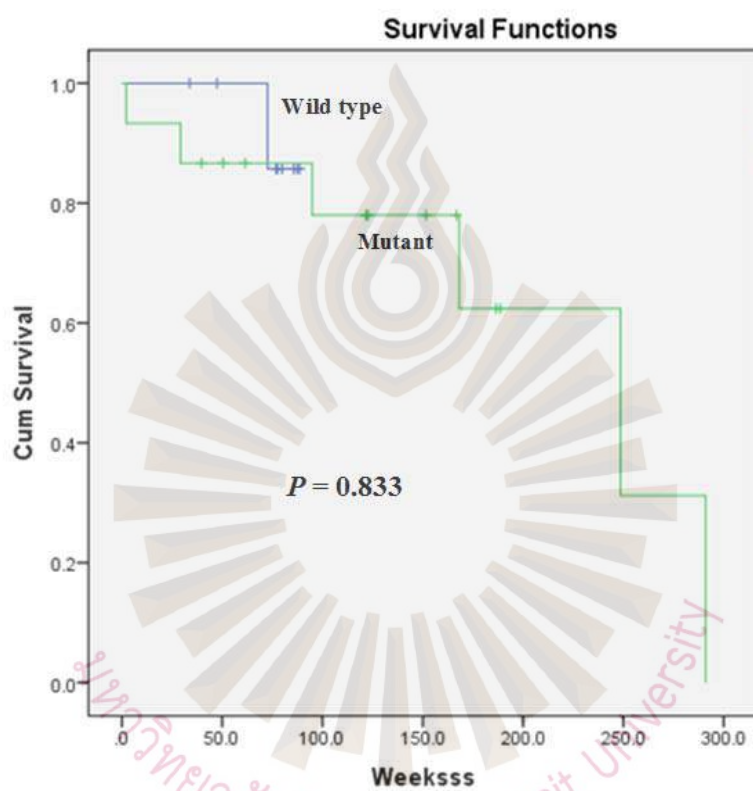
Parameter	<b>GSTP1 status</b>		<b>P-value</b> *significant
	Wild type C/C	Mutant C/T	
	n(%)	n(%)	
<b>Stage</b>			0.574
<b>I+II</b>	7 (25)	17 (61)	
<b>III</b>	2 (7)	2 (7)	
<b>Tumor size</b>			0.624
<b>≤3</b>	2 (5)	5 (12)	
<b>&gt;3</b>	7 (16)	29 (67)	
<b>Differentiation</b>			<b>0.070</b>
<b>WD</b>	3 (11)	1 (4)	
<b>MD</b>	4 (16)	16 (53)	
<b>PD</b>	2 (8)	2 (8)	
<b>Sex</b>			<b>0.015*</b>
<b>F</b>	6 (14)	6 (14)	
<b>M</b>	4 (9)	28 (63)	
<b>Age</b>			0.452
<b>≤50</b>	2 (5)	13 (30)	
<b>&gt;50</b>	8 (18)	21 (47)	

การหาความสัมพันธ์ระหว่างระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 และ exon 6 กับอัตราการรอดของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival โดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 6 พบว่ายีน **GSTP1** exon 5 มีค่า P-value 0.091 และ **GSTP1** exon 6 มีค่า P-value 0.833 จึงถือว่าไม่มีความสัมพันธ์ของยีน **GSTP1** กับอัตราการรอดของผู้ป่วยดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6

รูปที่ 5 แสดงหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 กับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival



รูปที่ 6 แสดงหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP1** exon 5 กับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ Kaplan-Meier Survival



## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

#### สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

เอนไซม์ Glutathione S-transferase (GSTs) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมทางด้าน Biotransformation มีบทบาทสำคัญในกระบวนการกำจัดสารพิษและปกป้องเซลล์จากอนุพันธ์ของสารก่อมะเร็ง หลังจากคอนจูเกตแล้วจะทำให้ได้สารที่มีพิษน้อยลงและละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงถูกขับออกจากร่างกายได้ง่าย และการเกิดความหลากหลายของยีน **GSTP1** มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ Glutathione S-transferase ทำให้เซลล์ถูกทำลายจากสารพิษต่างๆ ได้ (14)

ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความหลากหลายของยีน **GSTP** exon 5 มีผลทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งตับ(15, 16) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างความหลากหลายของยีน **GSTP** exon 5 กับ ผู้ป่วย ที่เป็น wild type genotype Ile105/Ile105 และ ผู้ป่วยแบบ heterozygous genotype Ile105/Val105 ( $P = 0.170$ ) โดยมีค่าความเสี่ยง  $OR = 0.05$  แต่กลับพบว่าความหลากหลายของยีน **GSTP** exon 6 แบบ wild type genotype (Ala114/Ala114) และผู้ป่วยแบบ heterozygous genotype Ala114/Val114 ( $P = 0.00$ ) มีผลทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งตับ ( $OR = 4.40$ ) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ความหลากหลายของยีน **GSTP** และพยาธิสภาพด้านต่างๆของผู้ป่วยมะเร็งตับผลการศึกษาพบว่า ยีน **GSTP** exon 6 แบบ heterozygous genotype Ala114/Val114 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเพศของผู้ป่วย ( $P = 0.015$ ) โดยเฉพาะเพศชายที่มีความถี่ในการพบความหลากหลายของยีน **GSTP** exon 6 แบบ heterozygous genotype สูงกว่าเพศหญิงมาก (เพศชาย 63%, เพศหญิง 14%)

โดยทั่วไปผู้ชายมักจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดเป็นตับแข็ง ไชมันพอกตับ และมะเร็งตับมากกว่าเพศหญิงเพราะว่าเพศหญิงจะมีฮอร์โมนเอสโตรเจนที่จะสามารถช่วยลดภาวะการอักเสบของตับได้ (17, 18) ทำให้พบอัตราการเกิดของโรคมะเร็งตับในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 2-4 เท่า ซึ่งสาเหตุมาจากการใช้ชีวิตประจำวันเช่น การดื่มเหล้า และสูบบุหรี่ ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวมีในเพศชายมากกว่าเพศหญิงมาก (19, 20) และทำให้เนื้อเยื่อตับและดีเอ็นเอถูกทำลายจากภาวะ oxidative stress และการอักเสบ เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า oxidative stress เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ เพราะขบวนการoxidation นี้เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสารพิษต่างๆและก่อให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเอนไซม์ Glutathione S-transferase (GSTs)

โดยเฉพาะ GSTP1 จะทำหน้าที่ช่วยกำจัด ROS ออกจากร่างกาย โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามี ความสัมพันธ์ระหว่าง GSTP1 และค่า oxidative stress โดยถ้ามีการแสดงออกของยีน GSTP1 ลดลงจะ ส่งเสริมให้เกิดค่า oxidative stress เพิ่มมากขึ้นและทำให้มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งมากขึ้นด้วย (21)

งานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 กับความเสี่ยงต่อการ เกิดมะเร็งชนิดต่างๆมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งมีเพียงบางงานวิจัยที่พบว่าความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปอด (22) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นรายงานแรกที่เสนอผลของความหลากหลาย ของยีน GSTP1 exon 6 มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับและความรุนแรงของโรค (cancer differentiation)

ผลงานวิจัยสรุปได้ว่า ความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการ เกิดมะเร็งตับและ มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยมะเร็งตับเพศชายและมีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับความรุนแรงของ โรค แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 5 กับพยาธิสภาพของผู้ป่วย มะเร็งตับและความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ

ในการศึกษาในอนาคตควรมีการทดสอบ GSTP1 enzyme activity โดยใช้ mammalian cell line เพื่อ บอกได้ว่าการเกิดความหลากหลายของยีน GSTP1 exon 6 มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และเป็นสาเหตุ ของการเกิดมะเร็งตับหรือไม่



## บรรณานุกรม

1. Song J, Wang LZ, Li X, Jiang TP, An TZ, Xu M, et al. (2014). Polymorphisms of vascular endothelial growth factor on prognosis in hepatocellular carcinoma patients receiving transcatheter arterial chemoembolization treatment. *Genet Mol Res*, 13(4): 8946-53.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127(12): 2893-2917.
3. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (2558). ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2556. บริษัท บีทีเอส เพรส จำกัด กรุงเทพมหานคร.
4. Srivatanakul P, Sriplung H & Deerasamee S. (2004). Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev*, 5(2): 118-25.
5. Gao J, Xie L, Yang WS, Zhang W, Gao S, Wang J, et al. (2012). Risk factors of hepatocellular carcinoma - current status and perspectives. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(3): 743-52.
6. Kang D. (2003). Genetic polymorphism and cancer susceptibility of breast cancer in Korean women. *J Biochem Mol Biol*, 36(1): 28-34.
7. Kim SU, Lee KM, Park SK, Yoo KY, Noh DY, Choe KJ, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 and breast cancer risk. *J Biochem Mol Biol*, 37 (5): 582-5.
8. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. (2001). Glutathione S-transferase family of enzyme. *Mutat Res*, 482 (1-2): 21-31.
9. Grubben MJ, Nagengast FM, Katan MB, Peters WH. (2001). The glutathione Biotransformation system and colorectal cancer risk in humans. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 234: 68-76.
10. Hivonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S and Vainio H. (1993). The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of lung. *Carcinogenesis*, 14(7): 1479-81.
11. Nørskov MS, Frikke-Schmidt R, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Loft S and Tybjærg-Hansen A. (2011). Copy number variation in glutathione-S-transferase T1 and M1 predicts incidence

- and 5-year survival from prostate and bladder cancer, and incidence of corpus uteri cancer in the general population. *Pharmacogenomics J*, 11(4): 292–9.
12. Loktionov A, Watson MA, Gunter M, Stebbings WSL, Speakman CTM, Bingham SA. (2001). Glutathione S-transferase gene polymorphism in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor. *Carcinogenesis*, 22 (7): 1053-60.
  13. Xu S, Wang Y, Roe B and Pearson WR. (1998). Characterization of the human class Mu Glutathione S-transferase gene cluster and GSTM1 deletion. *J Biol Chem*. 273 (6): 3517-27.
  14. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998 Feb; 19(2): 275-80.
  15. Chen YL, Tseng HS, Kuo WH, Yang SF, Chen DR, Tsai HT. Glutathione S-Transferase P1 ( GSTP1) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma. *BMC Med Genet*. DOI: 10.1186/1471-2350-11-46.
  16. Cheng-Gang L, Zhao Z, Hu M, Liu R. Predictive role of glutathione-S-transferase gene polymorphisms in risk and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2012 13(7): 3247-52.
  17. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*. 2007 Jul; 317(5834): 121-4.
  18. Liu WC, Liu QY. Molecular mechanisms of gender disparity in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014 May; 20(20): 6252-61.
  19. Wu EM, Wong LL, Hernandez BY, Ji JF, Jia W, Kwee SA, et al. Gender differences in hepatocellular cancer: disparities in nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis and liver transplantation. *Hepatoma Res*. DOI: 10.20517/2394-5079.2018.87.
  20. Makarova-Rusher OV, Altekruse SF, McNeel TS, Ulahannan S, Duffy AG, Graubard BI, et al. Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Cancer* 2016 Jun; 122(11): 1757-65.

21. Li T, Zhao XP, Wang LY, Gao S, Zhao J, Fan YC, et al. Glutathione S-Transferase P1 Correlated with Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Med Sci.* 2013; 10(6): 683-90.
22. Shahsavari G, Amiri A, Shamaei M, Adibhesami G, Emami Razavi A, et al. The Relation between Polymorphisms in Exon 5 and Exon 6 of GSTP1 Gene and the Risk of Lung Cancer in Iranian People. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 May; 20(5): 1503-1509.



# Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism on Exon 6 and Risk of Hepatocellular Carcinoma in Thai Male Patients

Thanet Sophonnithiprasert<sup>a</sup> Pensri Saelee<sup>b</sup> Tanett Pongtheerat<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Patumthani, Thailand;

<sup>b</sup>Research Division, National Cancer Institute of Thailand, Bangkok, Thailand

## Keywords

GSTP1 polymorphism · Thai male hepatocellular carcinoma patients · Hepatocellular carcinoma

## Abstract

**Introduction:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common malignancy and the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide. HCC cases are two to four times more common in males than in females, and the highest incidence is found in Asia and Sub-Saharan Africa. This gender disparity is the result of different behavioral risk factors, such as smoking and drinking alcohol. Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) is an enzyme that is involved in the detoxification of carcinogenic electrophiles. GSTP1 codon 105 in exon 5 and codon 114 in exon 6 polymorphisms result in decreased enzyme detoxification activity, which is the cause of many cancers. **Objectives:** This study aims to investigate the associations between GSTP1 polymorphism, HCC patients, and the risk factors for HCC. It is hoped that this research will provide useful knowledge on the effects of genetic GSTP1 polymorphism in Thai HCC patients. **Methods:** DNA from 44 Thai HCC patients and 52 healthy controls was analyzed for GSTP1 exon 5 and exon 6 polymorphisms by

PCR-RFLP. The associations between GSTP1 polymorphism, the control group, and clinicopathological parameters were determined. **Results:** The results show that GSTP1 exon 6 polymorphism genotypes (C/T) were correlated with an increased risk of HCC susceptibility (OR = 4.40). Moreover, exon 6 polymorphism genotypes (C/T) were associated with the gender of patients ( $p = 0.015$ ), but no relationships were found between GSTP1 exon 5 polymorphism and the clinicopathological data of patients. **Conclusions:** The results suggest that the GSTP1 exon 6 polymorphism genotype was associated with an increase in the risk of HCC in male patients and that it tended to be related to cancer differentiation. No association was found between GSTP1 exon 5 polymorphism and the risk of HCC.

© 2020 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common malignancy in the world and the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide [1]. The risk factors for HCC include chronic hepatitis virus infections, cirrhosis, alcohol, nonalcoholic fatty liver disease,

smoking, and consuming food contaminated with aflatoxin [2, 3]. HCC is two to four times more likely to be found in males than females, and the highest incidence is found in Asia and Sub-Saharan Africa [4, 5]. In Thailand, HCC is the leading cause of cancer in males, and the third leading cause of cancer in females [6]. This gender disparity is the result of differences in behavioral risk factors, such as smoking and drinking alcohol [7].

Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) is an enzyme located on chromosome 11q13 that is involved in the detoxification of carcinogenic electrophiles. Research showed that GSTP1 genetic polymorphism results in decreased enzyme detoxification activity, which is the cause of many cancers. Prior studies also found that the polymorphism at codon 105 in exon 5 results in a substitution of isoleucine for valine [8], and codon 114 in exon 6 causes the substitution of alanine for valine [9]. The GSTP1 polymorphism at codon 105 may be associated with susceptibility to breast cancer [10], and codon 114 may be associated with lung cancer [11]. In Thailand, recent research showed that GSTP1 polymorphism was related to cancer progression in breast cancer patients [12].

PCR-RFLP was used to analyze the genetic polymorphism of GSTP1 in Thai HCC patients and to investigate the association between GSTP1 polymorphism and the clinicopathological parameters of HCC patients. The risk factors were determined by applying binary logistic regression to compare the frequencies of GSTP1 polymorphism in the control group and the patients. The survival status was determined using the Kaplan-Meier survival curve. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ . It is hoped that this research will provide useful knowledge on the effects of genetic GSTP1 polymorphism in Thai HCC patients.

## Materials and Methods

### Sample Collection and DNA Isolation

Forty-four HCC DNA samples were extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues obtained from the National Cancer Institute of Thailand. The DNA was collected using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Germany) from the peripheral blood of 52 healthy control subjects who had no history of cancer.

### Analysis of the GSTP1 Polymorphism by PCR-RFLP

Gene polymorphisms in GSTP1 exon 5 and exon 6 (rs1695:313 A > G, and rs1138272:341C > T) were analyzed using PCR-RFLP. For GSTP1 exon 5, the 206-bp amplicon fragment was amplified using forward primer (5'-GGC TCT ATG GGA AGG ACC AGC-3') and reverse primer (5'-AAG GGG TCA GCC CAA GCC A-3') in a final volume of 25  $\mu$ L, consisting of 1.5 mm MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mm of

each dNTPs, 0.2  $\mu$ m of each primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (PL1202; Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia) in PCR buffer containing 500 mm KCl, 100 mm Tris-HCl (pH 9.1) and 0.1% Triton™ X-100, and DNA template 100 ng. The thermal cycling conditions were initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of amplification as follows: a denaturing step at 94°C for 5 s, a primer annealing step at 60°C for 5 s, then an extension step at 72°C for 15 s, and a final extension step was done at 72°C for 5 min. For GSTP1 exon 6, the 280-bp amplicon fragment was amplified using forward primer (5'-GCA GAG GAG AAT CTG GGA CTC T-3') and reverse primer (5'-GGC TCA CAC CTG TGT CCA TCT G-3') in a final volume of 25  $\mu$ L, consisting of 1.5 mm MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mm of each dNTPs, 0.2  $\mu$ m of each primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (PL1202; Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia) in PCR buffer containing 500 mm KCl, 100 mm Tris-HCl (pH 9.1) and 0.1% Triton™ X-100, and DNA template 100 ng. The thermal cycling conditions were initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of amplification as follows: a denaturing step at 95°C for 30 s, a primer annealing step at 67°C for 30 s, then an extension step at 72°C for 30 s, and a final extension step was done at 72°C for 5 min.

The amplicon polymorphism fragments of GSTP1 exon 5 and exon 6 were analyzed by digesting with *Bsm*AI (R0529; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and *Ac*II (R0551; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), respectively. For GSTP1 exon 5 polymorphism, homozygous A/A (wild type) individuals had a single fragment length of 206 bp, heterozygous A/G individuals had three fragments of 206, 120, and 86 bp and homozygous G/G individuals had two fragments of 120 and 86 bp. For GSTP1 exon 6 polymorphism, homozygous C/C (wild type) individuals had two fragments of 170 and 110 bp, heterozygous C/T individuals had three fragments of 280, 170, and 110 bp, and homozygous T/T individuals had a single fragment of 280 bp. All the PCR-RFLP reaction products were analyzed using 2% agarose gel electrophoresis.

### Statistical Analysis

The GSTP1 genotype frequencies of the control group and patients were compared using the  $\chi^2$  test. The association between the control genotype and the disease was evaluated using binary logistic regression. The relationship between the clinicopathological parameters of the patients and the GSTP1 polymorphism was determined using the  $\chi^2$  test. Survival status was determined using the Kaplan-Meier survival method and the log-rank test. A  $p$  value lower than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### The Relationship between the GSTP1 Polymorphism Frequencies of the Control Group and the Patients

The GSTP1 genetic polymorphism was analyzed using the PCR-RFLP technique. The overall mutant exon 5 (A/G) and exon 6 (C/T) frequencies of the control samples were 32.7 and 0.00%, respectively, and those of the patients were 19.4 and 77.3%, respectively. After analysis

**Table 1.** *GSTP1* polymorphism status in hepatocellular carcinoma (HCC) patients and the control group

<i>GSTP1</i> status	Exon 5		Exon 6	
	control	HCC	control	HCC
Wild type	35 (67.3%)	29 (80.6%)	49 (100%)	10 (22.7%)
Mutant	17 (32.7%)	7 (19.4%)	0 (0.0%)	34 (77.3%)
Total	52	36	49	44
Odds ratio (95% CI)	0.50 (0.18–1.36)		<b>4.40 (2.55–7.59)</b>	
<i>p</i> value	0.170		<b>0.000*</b>	

\* Significant.

**Table 2.** *GSTP1* Exon 5 polymorphism status and clinicopathological parameters of hepatocellular carcinoma patients

Parameter	<i>GSTP1</i> status		<i>p</i> value
	wild-type A/A, n (%)	mutant A/G, n (%)	
Stage			0.356
I + II	18 (78)	2 (8)	
III	2 (8)	1 (4)	
Tumor size			0.566
≤3 cm	4 (13)	0 (0)	
>3 cm	25 (69)	7 (18)	
Differentiation			0.485
WD	2 (9)	0 (0)	
MD	16 (68.5)	2 (9)	
PD	2 (9)	1 (4.5)	
Sex			1.000
Female	6 (17)	1 (2)	
Male	23 (64)	6 (17)	
Age			0.674
≤50 years	13 (36)	2 (6)	
>50 years	16 (44)	5 (14)	

WD, well differentiated; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated.

**Table 3.** *GSTP1* Exon 6 polymorphism status and clinicopathological parameters of hepatocellular carcinoma patients

Parameter	<i>GSTP1</i> status		<i>p</i> value*
	wild-type C/C, n (%)	mutant C/T, n (%)	
Stage			0.574
I + II	7 (25)	17 (61)	
III	2 (7)	2 (7)	
Tumor size			0.624
≤3 cm	2 (5)	5 (12)	
>3 cm	7 (16)	29 (67)	
Differentiation			<b>0.070</b>
WD	3 (11)	1 (4)	
MD	4 (16)	16 (53)	
PD	2 (8)	2 (8)	
Sex			<b>0.015*</b>
Female	6 (14)	6 (14)	
Male	4 (9)	28 (63)	
Age			0.452
≤50 years	2 (5)	13 (30)	
>50 years	8 (18)	21 (47)	

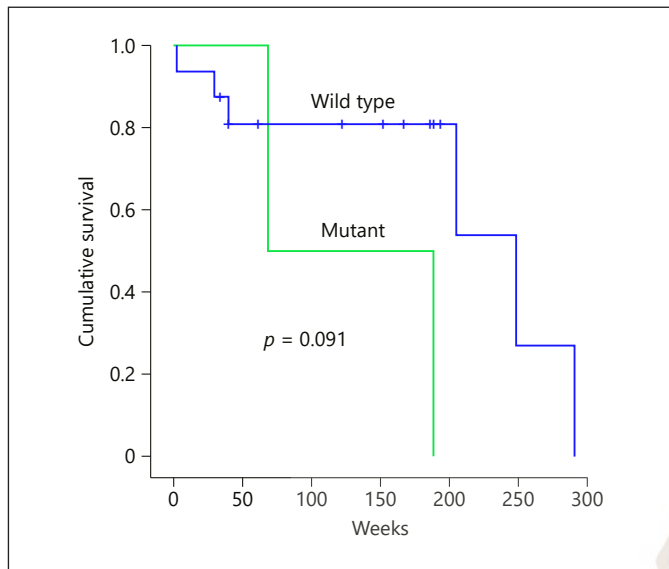
WD, well differentiated; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated. \* Significant.

using the  $\chi^2$  test, there were no differences between the control group and the patients in *GSTP1* exon 5 ( $p \geq 0.05$ ), but the data showed a statistical difference in *GSTP1* exon 6 ( $p = 0.00$ ).

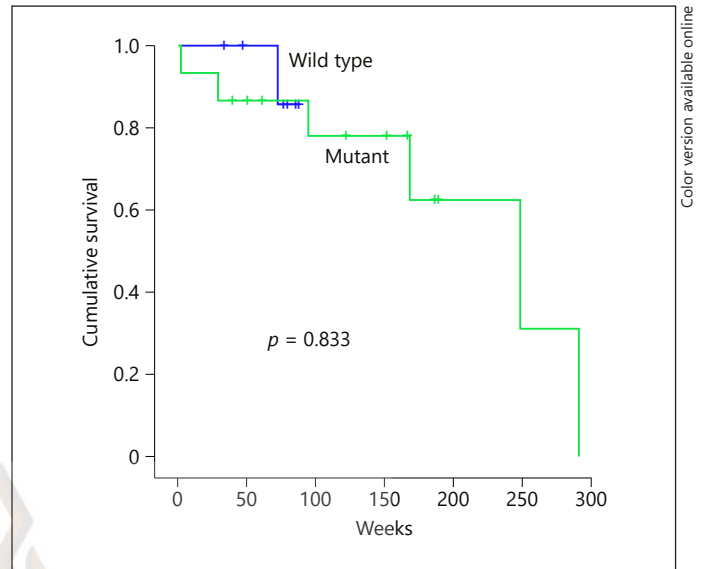
Only *GSTP1* exon 6 polymorphism (C/T) was shown to be associated with a high risk of hepatocellular carcinogenesis (OR = 4.40). While the *GSTP1* exon 5 polymorphism (A/G) was not related to the risk factors for HCC (OR = 0.50), the data are summarized in Table 1.

#### Statistical Analysis of *GSTP1* Frequencies and the Clinicopathological Parameters of the Patients

The relationship between the clinicopathological parameters of the HCC patients and *GSTP1* polymorphisms was observed, as shown in Tables 2 and 3. The *GSTP1* exon 5 genotype showed no significant difference in stage, size of tumor, differentiation, gender, and the patients' age at diagnosis ( $p > 0.05$ ). Recently, the *GSTP1* exon 6 genotype was found to be correlated with male patients ( $p = 0.015$ ), and it tended to be associated with cancer differentiation ( $p = 0.070$ ).



**Fig. 1.** Kaplan-Meier survival curve for the patients with hepatocellular carcinoma according to GSTP1 exon 5 polymorphisms.



**Fig. 2.** Kaplan-Meier survival curve for the patients with hepatocellular carcinoma according to GSTP1 exon 6 polymorphisms.

#### Survival of Patients with GSTP1 Polymorphisms

The survival analysis showed that there was no association between GSTP1 polymorphism and patient survival (Fig. 1 and 2,  $p = 0.091$  and  $0.833$ , respectively).

#### Discussion/Conclusion

The GSTP1 gene was involved in the detoxification of carcinogenic electrophiles and genetic polymorphism led to a loss of enzyme catalytic activity, resulting in an increase in harm to the cell or DNA from various toxic agents [13]. Previous studies have indicated that GSTP1 exon 5 polymorphism increased the risk of hepatocellular carcinogenesis [14, 15]. Conversely, the results of our study found no significant difference between the control group and Thai HCC patients with wild-type Ile105/Ile105 and heterozygous genotype Ile105/Val105 ( $p = 0.170$ ) and the risk of HCC (OR = 0.50). However, we found a relationship between the wild-type Ala114/Ala114 and heterozygous genotype Ala114/Val114 ( $p = 0.00$ ) that increased the risk for HCC (OR = 4.40). We analyzed the relationship between GSTP1 polymorphism and the clinicopathological parameters; the results showed that the GSTP1 exon 6 mutant genotype was associated with the gender of patients ( $p = 0.015$ ). The frequency of mutant genotype in male patients was higher than in female patients (male 63%, female 14%).

Males are more likely to develop chronic hepatitis, cirrhosis, and HCC from the hepatitis virus than females because the effect of the estrogen hormone decreases hepatic inflammation and viral production [16, 17]. However, HCC was found in males two to four times more often than in females due to behavioral risk factors such as smoking and alcohol consumption. Smoking and alcohol use are more common in males than in females [7, 18] damaging the liver tissue and DNA structure by oxidative stress and inflammation. It is already known that oxidative stress is correlated with the pathogenesis of HCC. Oxidative stress is an oxidation process that occurs after the body has been exposed to harmful factors, which produces excess reactive oxygen species. Glutathione S-transferases, especially in GSTP1, are involved in the reactive oxygen species detoxification pathway [19]. Previous research noted the correlation between GSTP1 and oxidative stress in HCC. The results showed that a decrease in the GSTP1 expression might elevate oxidative stress and promote hepatocellular carcinogenesis [20].

Research into the relationship between GSTP1 exon 6 polymorphism and overall cancer risk has been limited. Previous studies only identified an association with lung cancer susceptibility [21]. This research is the first to provide data on the effects of GSTP1 polymorphism risks for HCC in Thailand. We found that GSTP1 exon 6 polymorphism was related to an increased risk of hepatocellular carcinogenesis, and it tended to be related to cancer differentiation.

In conclusion, we found that GSTP1 exon 6 polymorphism was associated with an increased risk for HCC in male patients, and it tended to be related to cancer differentiation. However, no association was found between GSTP1 exon 5 polymorphism and the risk for HCC.

### Acknowledgement

The study was supported by the Faculty of Science, Rangsit University and National Cancer Institute, Thailand.

### Statement of Ethics

The study was approved by the Rangsit University Ethics Committee (No. RSUERB2019-050) and the Ethics Committee of the National Cancer Institute, Thailand (No. EC COA 017/2019). As this was a retrospective study, informed consent was not required.

### References

- 1 Song J, Wang LZ, Li X, Jiang TP, An TZ, Xu M, et al. Polymorphisms of vascular endothelial growth factor on prognosis in hepatocellular carcinoma patients receiving transcatheter arterial chemoembolization treatment. *Genet Mol Res*. 2014 Oct;13(4):8946–53.
- 2 Wu KT, Wang CC, Lu LG, Zhang WD, Zhang FJ, Shi F, et al. Hepatocellular carcinoma: clinical study of long-term survival and choice of treatment modalities. *World J Gastroenterol*. 2013 Jun;19(23):3649–57.
- 3 Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis. *Gastroenterology*. 2017 Mar;152(4):745–61.
- 4 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
- 5 Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S5–S16.
- 6 National Cancer Institute: Hospital based cancer registry annual report 2013. Bangkok: BTS Press Co., Ltd; 2015.
- 7 Wu EM, Wong LL, Hernandez BY, Ji JF, Jia W, Kwee SA, et al. Gender differences in hepatocellular cancer: disparities in nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis and liver transplantation. *Hepatology Res*. 2018;4:pii: 66.
- 8 Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Sep;98(20):11592–7.
- 9 Kim SU, Lee KM, Park SK, Yoo KY, Noh DY, Choe KJ, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 and breast cancer risk. *J Biochem Mol Biol*. 2004 Sep;37(5):582–5.
- 10 Balmukhanov TS, Khanseitova AK, Nigmatova VG, Ashirbekov EE, Talaeva SZ, Aitkhozina NA. Polymorphisms at GSTM1, GSTP1, GSTT1 detoxification genes loci and risk of breast cancer in Kazakhstan population. *Adv Breast Cancer Res*. 2013;2:114–8.
- 11 Ye Z, Song H. Glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2005 May;41(7):980–9.
- 12 Pongtheerat T, Tretrisool M, Purisa W. Glutathione S-transferase polymorphisms in breast cancers of Thai patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009 Jan-Mar;10(1):127–32.
- 13 Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998 Feb;19(2):275–80.
- 14 Chen YL, Tseng HS, Kuo WH, Yang SF, Chen DR, Tsai HT. Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma. *BMC Med Genet*. 2010 Mar 24;11:46.
- 15 Li CG, Zhao Z, Hu M, Liu R. Predictive role of glutathione-S-transferase gene polymorphisms in risk and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(7):3247–52.
- 16 Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*. 2007 Jul;317(5834):121–4.
- 17 Liu WC, Liu QY. Molecular mechanisms of gender disparity in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014 May;20(20):6252–61.
- 18 Makarova-Rusher OV, Altekruze SF, McNeel TS, Ulahannan S, Duffy AG, Graubard BI, et al. Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Cancer*. 2016 Jun;122(11): 1757–65.
- 19 Funke S, Risch A, Nieters A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler CM, et al. Genetic polymorphisms in genes related to oxidative stress (GSTP1, GSTM1, GSTT1, CAT, MnSOD, MPO, eNOS) and survival of rectal cancer patients after radiotherapy. *J Cancer Epidemiol*. 2009;2009:302047.
- 20 Li T, Zhao XP, Wang LY, Gao S, Zhao J, Fan YC, et al. Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int J Med Sci*. 2013;10(6):683–90.
- 21 Shahsavari G, Amiri A, Shamaei M, Adibhesami G, Emami Razavi A, et al. The relation between polymorphisms in exon 5 and exon 6 of GSTP1 gene and the risk of lung cancer in Iranian people. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 May;20(5):1503–9.

### Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Funding Sources

This publication has emanated from research conducted with the financial support of Rangsit University Research Fund, under Grant Number 16/2562.

### Author Contributions

T.S. carried out the molecular studies and participated in the draft of the manuscript. P.S. performed the sample preparation and statistical analysis. T.P. conceived the project, analyzed the field data and wrote on the draft of the manuscript. All the authors contributed to the manuscript conceptualization and editing and approved the final manuscript.



## ประวัติผู้วิจัย



คำนำหน้า	ดร.
ตำแหน่งทางวิชาการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ชื่อผู้วิจัย	ชเนศ
นามสกุลผู้วิจัย	พงศธีรัตน์
ชื่อภาษาอังกฤษ	Tanett
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Pongtheerat
วัน/เดือน/ปี/ เกิด	13 ตุลาคม 2515
ที่อยู่	77/31 ม.เมอริทแกรนด์ ซ.เทิดราชัน 1 ถ.เทิดราชัน สีกัน ดอนเมือง
จังหวัด	กรุงเทพมหานคร
รหัสไปรษณีย์	10210
โทรศัพท์	0846454570
แฟกซ์	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	09 9972222 ต่อ 4877
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	-
อีเมล	tanett.p@rsu.ac.th
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขา	ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี
ปีที่จบ	2538
สถาบัน	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประเทศ	ไทย

ปริญญาโท -  
 สาขา -  
 ปีที่จบ -  
 สถาบัน -  
 ประเทศ -

ปริญญาเอก                     ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต  
 สาขา                                อายุรศาสตร์เขตร้อน  
 ปีที่จบ                               2549  
 สถาบัน                             มหาวิทยาลัยมหิดล  
 ประเทศ                             ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, วิชัย ปุริสา, นารีรัตน์ เพชรพิรุณ, ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์ ความสัมพันธ์ระหว่างความ  
 หลากหลายของยีน GSTO2 กับการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง. วารสาร  
 โรคมะเร็ง 2551; ปีที่ 28 ฉบับที่ 4 หน้า 190-195.

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, วิชัย ปุริสา, ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์ การใช้ความหลากหลายของยีน GSTO2 ช่วยพยากรณ์  
 โรคในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง. วารสาร โรคมะเร็ง 2553; ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 หน้า 18-23.

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, เพ็ญศรี แซ่หลี่, วิชัย ปุริสา, ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์. ความหลากหลายของยีน Glutathione  
 S-Transferase Omega 1 กับการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง. วารสาร  
 โรคมะเร็ง, 2555; ปีที่ 32 ฉบับที่ 4, หน้า 151-157.

เพ็ญศรี แซ่หลี่, สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, อาคม ชัยวีระวัฒน์, อารยะ อุดลย์พันธ์, วิมล สุขตั้งมั่น, ชเนศ พงศ์ธี  
 รัตน์. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน APC กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม. วารสารโรคมะเร็ง, 2556; ปีที่ 33 ฉบับที่ 4, หน้า 146-155.

ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์, ภาณุการ์ ฤทธิไธ, พิมพ์กัญญา หม้อกรอง, เพ็ญศรี แซ่หลี่. ความหลากหลายของยีน  
 Glutathione-S-transferase P1 ที่ตำแหน่ง Ile105Val และ Ala114Val ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม. วารสาร  
 โรคมะเร็ง, 2557; ปีที่ 34 ฉบับที่ 1, หน้า 26-33.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์) (ต่อ)

- Pongtheerat T, Kha R, Kueachat K, Dokdoug P, Purisa W, Chariyalertsak S. Polymorphism of Glutathione S-Transferase Omega 2 (GSTO2) Gene in DNA Extracted from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Breast Cancer Tissues. Bull. Health, Sci. & Tech. 2009; 1-2: 27-32.
- Pakdeethai S, Fongchaiya V, Pongtheerat T, Iampenkhae K, Sampatanukul P. Relation Between Promoter Methylation and Protein expression of Glutathione S-Transferase Gene Class P1 (GSTP1) in Breast Cancer. Asian Archives of Pathology 2012; 8: 45-53.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- Pongtheerat T, Tretrisool M, Purisa W. Glutathione S-transferase (GSTs) Polymorphism in breast cancer of Thai patients. Asian Pac J Cancer Prev 2009; 10: 127-32.
- Pongtheerat T, Pakdeethai S, Purisa W, Chariyalertsak S, Petmitr S. Promoter Methylation and Genetic Polymorphism of Glutathione S-Transferase P1 Gene (GSTP1) in Thai Breast-cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev 2011; 12: 2731-4.
- Pongtheerat T, Chaksangchaichot P, Saelee P. Prognosis in Thai colorectal-cancer patients with GSTM1 and GSTT1 copy number variation. European Journal of Oncology. 2013 18(4): 189-195.
- Pongstaporn W, Pakakasama S, Chaksangchaichote P, Pongtheerat T, Hongeng S, Permitr S. MDR1 C3435T and C1236T Polymorphisms: Association with High-risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Asian Pac J Cancer Prev, 2015 16 (7), 2839-2843.
- Sophonmithprasert T, Saelee P, Pongtheerat T. GSTM1 and GSTT1 copy number variants and the risk to Thai females of hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Oncol 2019; 10(2): 324-329.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่)

- ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์, อาภาภรณ์ อานามวงศ์, มานพ แก้วกล้า การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสมุนไพรรองแดงโดยเทคนิค RAPD. RSU Research Conference 2010, มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี หน้า 51-56.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่) (ต่อ)

ภาณุการ์ ฤทธิไธ พิมพ์กัญญา หม้อกรอง ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Glutathione-S-transferase ชนิด P1 บริเวณ codon 114 exon 6 (Ala114Val) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทย. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 2, 21 มีนาคม 2557, 206-210

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่)

-

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล(โปรดระบุรางวัลที่ได้รับ)

-

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์, ลักษณะของยีน Glutathione-S-transferase กับการเกิดโรคมะเร็ง, วารสารโรคมะเร็ง 2551; ปีที่ 28 ฉบับที่ 4: 197-203.

ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์, การศึกษาทางชีวโมเลกุลของโรคมะเร็งเต้านมในสตรีไทย. วารสารโรคมะเร็ง 2552, ปีที่ 29 ฉบับที่ 2, 80-85.

ชเนศ พงศ์ธีรรัตน์, DNA Methylation กับการเกิดโรคมะเร็ง. วารสารโรคมะเร็ง 2556, ปีที่ 33 ฉบับที่ 3, 120-125.

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ      ชีวโมเลกุลของโรคมะเร็ง