ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการพยากรณ์โรคมะเร็งเซลล์ตับ

เพ็ญศรี แซ่หลี (ปร.ด.)[1] ระวิศักดิ์ จันทร์วาสน์ (พ.บ.)[2] และ ธเนศ พงศ์ธีรัตน์ (ปร.ด.)[3]

[1] กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
[2] กลุ่มงานศัลยกรรม สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
[3] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี ประเทศไทย

บทคัดย่อ

บทนำ ยีน epidermal growth factor (*EGF*) อยู่บนโครโมโซม 4q25-27 โปรตีนของยีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง การเจริญเติบโต การแทรกซึม และการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งเซลล์ตับ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการเกิดมะเร็งเซลล์ตับ รวมทั้งศึกษาผลต่อพยาธิสภาพทางคลินิก และอัตราการรอดชีพ

วิธีการศึกษา ตรวจหาความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดของคนปกติ จำนวน 254 ราย และตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ จำนวน 76 ราย ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

ผลการศึกษา ตรวจพบจีโนไทป์ (genotype) GG GA และ AA ร้อยละ 44.09 (112/254), 46.85 (119/254) และ 9.05 (23/254) ตามลำดับ ในกลุ่มคนปกติ และร้อยละ 39.47 (30/76), 57.89 (44/76) และ 2.63 (2/76) ตามลำดับ ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ นอกจากนี้ตรวจพบความถี่ของอัลลีล (allele) G และ A ร้อยละ 67.52 (343/508) และ 32.48 (165/508) ตามลำดับ ในกลุ่มคนปกติ และร้อยละ 68.42 (104/152) และ 31.58 (48/152) ตามลำดับ ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการเกิดมะเร็งเซลล์ตับ แต่พบว่าจีโนไทป์ GA+AA สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (tumor grade II, p = 0.01) และมีอัตราการรอดชีพ (overall survival) ยาวนานกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG (p = 0.01) โดยมีค่ามัธยฐานการรอดชีพ (median survival) 22 และ 7 เดือน ตามลำดับ

สรุป ความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย แต่พบว่าจีโนไทป์ชนิด GA+AA เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรค และมีการพยากรณ์โรคที่ดีในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ

คำสำคัญ มะเร็งเซลล์ตับ ความหลากหลายของดีเอ็นเอ จีโนไทป์ อัลลีน *EGF* PCR-RFLP การพยากรณ์โรค

ผู้นิพนธ์ที่รับผิดชอบ เพ็ญศรี แซ่หลี
กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
Email: pensrisaelee@gmail.com

วันที่รับบทความ : กรกฎาคม 2563 **วันที่ตอบรับบทความ : ธันวาคม 2563**

Association between *EGF +61G/A* polymorphisms and prognosis in hepatocellular carcinoma

Pensri Saelee (Ph.D.)[1], Rawisak Chanwat (M.D.)[2] and Tanett Pongtheerat (Ph.D.)[3]

[1] Division of Research, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand
[2] Division of Surgery, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand
[3] Unit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Patumthani, Thailand

Abstract

Introduction: Epidermal growth factor (*EGF*) gene is located on chromosome 4q25-27. Its functions have been associated with proliferation, differentiation, tumor growth, invasion and metastasis in several cancers including hepatocellular carcinoma (HCC).

Objective: To examine the association between *EGF +61G/A* polymorphisms and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma, clinicopathological parameters as well as the overall survival of patients with HCC.

Material and Methods: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed for determination of *EGF +61G/A* polymorphisms in 254 healthy control samples and 76 HCC patients.

Results: The frequencies of GG, GA and AA genotypes were 44.09 (112/254), 46.85 (119/254) and 9.05 (23/254) respectively, in the healthy control group, while the HCC patients group exhibited 39.47 (30/76), 57.89 (44/76) and 2.63 (2/76) respectively. Furthermore, the frequency of G and A alleles were 67.52 (343/508) and 32.48 (165/508) respectively, in the healthy control subjects and 68.42 (104/152) and 31.58 (48/152) respectively, in the HCC patients. There was no association between *EGF +61G/A* polymorphisms and carcinogenesis of HCC. While, we found that *EGF 61 +G/A* genotype of GA+AA was significantly correlated with tumor grade II (p = 0.01) and had a good prognosis in patient with HCC when comparing with GG genotype (p = 0.01, median survival 22 and 7 months, respectively).

Conclusions: There was no association between *EGF 61 +G/A* polymorphisms and hepatocarcinogenesis. However, this study was found the correlation between GA+AA genotype and low tumor grading and good prognosis in Thai HCC patients.

Keywords: HCC, DNA polymorphisms, genotype, allele, *EGF*, PCR-RFLP, prognosis

Corresponding author: Pensri Saelee
Division of Research, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand
Email: pensrisaelee@gmail.com

Received Date : July 2020 **Accepted Date : December 2020**

อ้างอิง

เพ็ญศรี แซ่หลี, ระวิศักดิ์ จันทร์วาสน์, ธเนศ พงศ์ธีรัตน์. ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการพยากรณ์โรคมะเร็งเซลล์ตับ. บูรพาเวชสาร. 2564; 8(1): 17-27.

Citation

Saelee P., Chanwat R., Pongtheerat T. Association between *EGF +61G/A* Polymorphisms and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. BMJ. 2021; 8(1): 17-27.

บทนำ

มะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้ชายไทยและอันดับสองในผู้หญิงไทย พบได้ประมาณ 33.9 และ 12.9 ต่อประชากร 100,000 ราย ตามลำดับ โรคมะเร็งชนิดนี้ประกอบด้วยมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีตับ (cholangiocarcinoma)[1] สาเหตุสำคัญของโรคมะเร็งเซลล์ตับเกิดจากหลายสาเหตุซึ่งมีผลเกื้อหนุนกันและจากขบวนการซับซ้อน ปัจจัยสาเหตุเหล่านี้ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสบี ไวรัสซี การได้รับสาร aflatoxin ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร สารก่อมะเร็งตับ แอลกอฮอล์ (เหล้า) ฮอร์โมน ภาวะตับแข็ง และภาวะภูมิคุ้มกันของบุคคลนั้น ๆ ส่วนมะเร็งท่อน้ำดีตับ คือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อทางเดินน้ำดีซึ่งรวมถึงท่อน้ำดีภายในและภายนอกตับ สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งชนิดนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับการรับประทานปลาน้ำจืดที่มีเกล็ดแบบดิบ ๆ ซึ่งจะทำให้ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในตับ (metacercaria of Opisthorchis viverrini) และจะเจริญเติบโตอยู่ในท่อทางเดินน้ำดี[2]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเกิดมะเร็งตับเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีนหลายชนิดรวมทั้งการเกิดความหลากหลาย (DNA polymorphisms) ของยีน epidermal growth factor (*EGF*) ซึ่งยีน *EGF* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 4q25-27[3] โปรตีนในกลุ่ม *EGFs* ประกอบด้วย transforming growth factor-alpha (*TGF-a*), heparin-binding EGF-like growth factor (*HB-EGF*), epiregulin (*EPR*), betacellulin (*BTC*) และ amphiregulin (*AR*) เมื่อโปรตีน *EGF* จับกับตัวรับ (receptor) บนบริเวณเซลล์เมมเบรนจะกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) ของโปรตีนตัวกลางเช่น *ras/raf/MAPK* หรือ phosphatidylinositol-3-kinase (*PI3K*) ทำให้เกิดกระบวนการที่ส่งเสริมการเกิดเซลล์มะเร็งเช่นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation)[4-6] นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (tumour growth) การแทรกซึม (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งเซลล์ตับ[3,7-10]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ความหลากหลาย หรือความผันแปร (polymorphisms) ของยีน *EGF +61G/A* ตำแหน่ง 61 บริเวณโปรโมเตอร์ด้านปลาย 5’ (5’ untranslated region) มีผลต่อการสร้างโปรตีนและการทำงานของยีนชนิดนี้[11] และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง (carcinogenesis) ความรุนแรงของโรค (severity) และการรอดชีพ (survival) ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง (melanoma)[12] มะเร็งสมองชนิด glioblastoma multiforme (GBM)[13] มะเร็งหลอดอาหาร (esophageal adenocarcinoma)[14] มะเร็งปลายลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer)[15] รวมทั้งมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma)[9,10,16,17] แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* ในมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการเกิดโรคและการพยากรณ์โรคในมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) ด้วยการตรวจหาจีโนไทป์ของยีน *EGF +61G/A* โดยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดของคนปกติจำนวน 254 ราย และจากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับจำนวน 76 ราย รวมทั้งวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *EGF +61G/A* กับข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ เช่น อายุขณะวินิจฉัย (age at diagnosis) เพศ (gender) ขนาดก้อนมะเร็ง (tumour size) histologic grade รวมทั้งอัตราการรอดชีพ (overall survival) ของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับจำนวน 76 ราย จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติและโรงพยาบาลศูนย์มะเร็งอุดรธานี โดยบันทึก อายุขณะวินิจฉัย เพศ ขนาดก้อนมะเร็ง histologic grade และระยะเวลาการรอดชีพ (overall survival) จากแฟ้มประวัติของผู้ป่วย สำหรับการแบ่งระยะโรค (staging) ใช้เกณฑ์ TNM (tumor size, number of lymph node, metastasis) เนื่องจากข้อมูลทางพยาธิที่รวบรวมได้ไม่ครบถ้วน (ขาดข้อมูล metastasis) จึงไม่สามารถประเมินระยะโรคได้ และใช้ตัวอย่างเลือดของคนปกติที่เข้ารับการตรวจสุขภาพทั่วไปที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ไม่มีประวัติเป็นโรคมะเร็ง จำนวน 254 ราย (ประมาณร้อยละ 50 ของกลุ่มคนปกติมีภูมิลำเนาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย) และงานวิจัยนี้ได้ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันมะเร็งแห่งชาติเลขที่ EC 247/2554

การเก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่างบล๊อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน และตัวอย่างเลือด

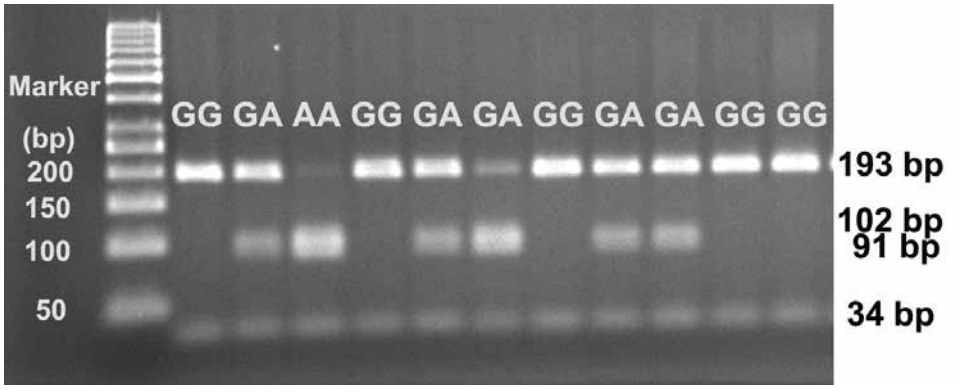
ผู้วิจัยได้นำบล็อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟินมาตัด section ขนาด 10 ไมครอน จำนวน 4 แผ่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการเก็บตัวอย่างเลือดใช้ตัวอย่างเลือดจำนวน 3 ซีซี นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปิเปต ส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาวและนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างชิ้นเนื้อและตัวอย่างเลือดมาแยกสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป high pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics, Germany) ตามคู่มือของชุดน้ำยาสำเร็จรูป

การตรวจหาความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* ด้วยวิธี PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *EGF* ด้วยไพร์เมอร์ (primer); F-*EGF*: 5’- TGT CAC TAA AGG AAA GGA GGT-3’ และ R-*EGF*: 5’- TTC ACA GAG TTT AAC AGC CC -3’ [18] โดยใช้เทคนิค PCR ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 ng PCR buffer (ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ KCl 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 9.0) 200 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละชนิดของ dNTP (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) 1 ยูนิตของ Taq DNA polymerase (Promega, Madison, USA) และ 20 พิโคโมล ของ forward และ reverse ไพร์เมอร์ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง S100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) ตั้งจำนวนรอบไว้ที่ 42 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอนที่สอง annealing ลดอุณหภูมิลงมาที่ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอนสุดท้าย extension โดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อครบ 42 รอบแล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 1.4% เอกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) นำแผ่นเจลไปถ่ายรูปด้วยเครื่องดูเจล (gel documentation) ภายใต้แสง Ultraviolet (UV) โดยผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *EGF* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ 242 bp การศึกษา polymorphism อาศัยตำแหน่งที่ตัดจำเพาะของยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงมองเห็นได้ด้วยการส่องแสง UV โดยไม่ต้องทำการหาลำดับเบสจึงไม่จำเป็นต้อง elute ผลผลิตพีซีอาร์ออกมาจากเจล

การตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดจีโนไทป์ของยีน *EGF* บริเวณตำแหน่ง +61G/A ด้วยเอนไซน์ตัดจำเพาะ (restriction fragment length polymorphisms)

โดยปิเปต 13 ไมโครลิตร PCR product มาตัดด้วยเอนไซน์ ตัดจำเพาะ AluI (New England Biolabs) โดยเตรียมส่วนผสม (master mix) 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย sterile distilled water 8.5 ไมโครลิตร ผลผลิตพีซีอาร์13 ไมโครลิตร 10X buffer (NEB) 2.5 ไมโครลิตร และ 10 ยูนิต ของ AluI นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ 25 ไมโครลิตร ของปฏิกิริยาเอนไซน์ ตัดจำเพาะ มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 3% เอกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ที่ 100 โวลล์ นาน 40 นาที นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายอีทีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) นาน 1 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น 1 ชั่วโมง นำแผ่นเอกาโรสเจล (agarose gel) ไปส่องดูด้วยเครื่องดูเจล พร้อมถ่ายรูปวิเคราะห์ผล โดยจำแนกจีโนไทป์ ของยีนออกเป็น GG (homozygous wild type) มีแถบดีเอ็นเอสามแถบ ขนาด 193 bp, 34 bp และ 15 bp GA (heterozygous genotype) มีห้าแถบ ขนาด 193 bp, 102 bp, 91 bp, 34 bp และ 15 bp และ AA (homozygous variant) มีแถบดีเอ็นเอสี่แถบ ขนาด 102 bp, 91 bp, 34 bp และ 15 bp การศึกษานี้จำแนกจีโนไทป์ โดยใช้เอกาโรสเจล เนื่องจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งต่างๆ สามารถแยกแถบดีเอ็นเอ ของแต่ละจีโนไทป์ ได้ชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้ จึงทำให้ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 15 bp จากรูปที่ 1 เช่น GG จะเห็นแถบดีเอ็นเอสองแถบ ส่วน GA จะเห็นแถบดีเอ็นเอสี่แถบ ส่วน AA จะเห็นแถบดีเอ็นเอสามแถบ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอ ของปฏิกิริยาเอ็นไซน์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) AluI ของยีน *EGF +61G/A* ในตัวอย่างมะเร็งเซลล์ตับ; GG (homozygous wild type) GA (heterozygous genotype) และ AA (homozygous variant)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยใช้ logistic regression model วัดระดับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการเกิดมะเร็งเซลล์ตับ โดยวิเคราะห์แบบ unadjusted และ adjusted analysis (ตัวแปร อายุ, เพศ เป็นปัจจัยควบคุม) เพื่อหาค่า Odds ratio และค่า 95% confident interval และใช้ chi-square test วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับข้อมูลพื้นฐานและผลทางพยาธิคลินิก เช่น อายุขณะวินิจฉัย เพศ ขนาดก้อนมะเร็ง และ histologic grade รวมทั้งใช้ Kaplan–Meier method วิเคราะห์อัตราการรอดชีพของผู้ป่วย (overall survival) โดยใช้ *p-value* < 0.05 เป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

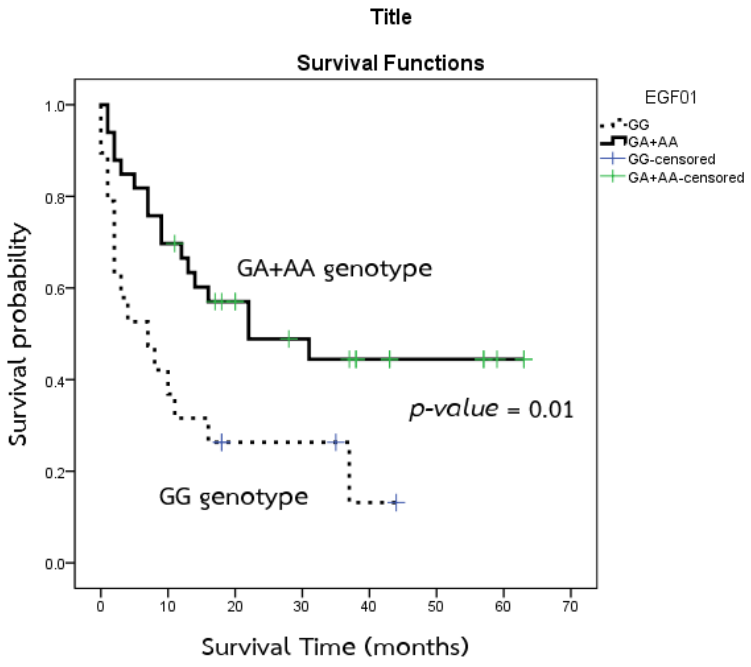
ผลการศึกษาตรวจพบจีโนไทป์ GG GA และ AA ร้อยละ 44.09 (112/254), 46.85 (119/254) และ 9.05 (23/254) ตามลำดับ ในกลุ่มคนปกติ และร้อยละ 39.47 (30/76), 57.89 (44/76) และ 2.63 (2/76) ตามลำดับ ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ นอกจากนี้ตรวจพบความถี่อัลลีล G และ A ร้อยละ 67.52 (343/508) และ 32.48 (165/508) ตามลำดับ ในกลุ่มคนปกติและร้อยละ 68.42 (104/152) และ 31.58 (48/152) ตามลำดับ ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ การศึกษานี้พบว่าความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย (ตารางที่ 1) แต่พบว่ายีน *EGF +61G/A* ที่มีจีโนไทป์ชนิด GA+AA สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (low tumor grade II, p = 0.01) (ตารางที่ 2) จากตารางที่ 2 จำนวนผู้ป่วยที่นำมาคำนวณ ขนาดของก้อนมะเร็ง และ histological grade ไม่เท่ากันเนื่องจากเป็นการค้นจากระเบียนผู้ป่วย ซึ่งบางครั้งข้อมูลไม่ครบทุกคน จึงทำให้จำนวนผู้ป่วยที่นำมาทำสถิติเกี่ยวกับขนาดก้อนมะเร็ง และ histological grade จึงน้อยกว่าจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับที่มีจีโนไทป์ชนิด GA+AA มีอัตราการรอดชีพยาวนานกว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับที่มีจีโนไทป์ชนิด GG (p=0.01) โดยมีค่ามัธยฐานการรอดชีพ 22 และ 7 เดือนตามลำดับ (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีนของยีน *EGF +61G/A* ระหว่างกลุ่มคนปกติ (254 ราย) และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ (76 ราย)

Polymorphisms / Genotype	จำนวน (ราย)	กลุ่มคนปกติ จำนวน (ร้อยละ)	กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ จำนวน (ร้อยละ)	Unadjusted analysis Odds ratio, 95%CI	*p-value*	Adjusted analysis Odds ratio, 95%CI	*p-value*
EGF61 genotypes	330	254	76				
GG	142	112(44.09)	30(39.47)	Reference		Reference	
GA	163	119(46.85)	44(57.89)	1.38,(0.81-2.35)	0.23	1.29,(0.75-2.24)	0.35
AA	25	23(9.05)	2(2.63)	0.33,(0.07-1.46)	0.14	0.33,(0.07-1.49)	0.15
EGF61 allele	660	508	152				
G	213	343(67.52)	104(68.42)	Reference			
A	447	165(32.48)	48(31.58)	0.96, (0.65-1.42)	0.84		

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ของจีโนไทป์ของยีน *EGF +61G/A* กับข้อมูลพื้นฐานและลักษณะทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ

ลักษณะทางพยาธิคลินิก	จำนวน (ราย)	EGF polymorphisms GG; จำนวน (ร้อยละ)	GA+AA; จำนวน (ร้อยละ)	Odds ratio, 95%CI	*p-value*
อายุ (ปี, n = 76)				1.69, 0.64-4.47	0.33
≤50	25	12(48.0)	13(52.0)		
>50	51	18(3503)	33(64.7)		
เพศ (n = 76)				1.27, 0.47-3.43	0.80
หญิง	23	10(43.5)	13(56.5)		
ชาย	53	20(37.7)	33(62.3)		
ขนาดก้อนมะเร็ง (cm, n =51)				1.19, 0.29-4.79	1.00
≤3	11	4(36.4)	7(63.6)		
>3	40	13(32.5)	27(67.5)		
Histologic grade (n = 40)				-	0.01
I	11	6(54.5)	5(45.5)		
II	24	4(16.7)	20(83.3)		
III	5	4(80.0)	1(20.0)		



รูปที่ 2 อัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับแบ่งตามจีโนไทป์ของยีน *EGF +61G/A* ชนิด homozygous wild type (GG) และ heterozygous genotype (GA) รวมกับ homozygous variant (AA)

วิจารณ์

โปรตีนของยีน *EGF* เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญเติบโต การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง การแทรกซึม และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการเพิ่มการแสดงออก (overexpression) หรือการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นของยีน *EGF* จึงมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งเซลล์ตับ ได้มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนบริเวณนี้มีผลต่อการสร้างโปรตีนของยีน *EGF* เช่นได้มีการศึกษาเพาะเลี้ยง mononuclear cell ในหลอดทดลอง (in vitro) พบว่า เซลล์ที่มีจีโนไทป์ GG และ GA มีการสร้างโปรตีน EGF เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีจีโนไทป์ AA[12] แต่ยังไงก็ตาม กลไกทางด้านโมเลกุลของความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับการเกิดมะเร็งเซลล์ตับยังไม่มีการศึกษาชัดเจน[16,17] ได้มีสมมติฐานที่อธิบายถึงกลไกที่ส่งผลต่อการสร้างโปรตีน EGF อาจเกิดจาก 1) ความผันแปรของยีน *EGF* บริเวณตำแหน่ง 61 มีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีนชนิดนี้ 2) เกิดจากบริเวณตำแหน่ง 61 ของยีน *EGF* เชื่อมต่อกับความผันแปรบริเวณอื่นของยีนชนิดนี้[12] และ 3) *HNF1* (hepatocyte nuclear factor 1) ซึ่งเป็นยีนปัจจัยการถอดรหัส (transcription factor) จะจับกับเบส G ไม่ใช่ A ตรงบริเวณตำแหน่ง 61 ของยีนชนิดนี้ กลไกเหล่านี้จึงมีผลต่อการสร้างโปรตีนและระดับความเข้มข้นของโปรตีน EGF[19] ดังนั้นความหลากหลายของ *EGF +61G/A* จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับ

การศึกษาก่อนนี้พบว่าความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งเซลล์ตับ เช่น Bhowmick และคณะ[13] ได้ศึกษาในมะเร็งสมองชนิด glioblastoma multiforme (GBM) พบว่าจีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับระดับโปรตีน EGF ที่เพิ่มขึ้นและมีอัตราการรอดชีพสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA และยังมีรายงานการศึกษาในมะเร็งผิวหนัง[12] มะเร็งปลายลำไส้ใหญ่[15] มะเร็งหลอดอาหาร[14] ซึ่งพบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเมื่อเทียบกับจีโนไทป์ AA นอกจากนั้น ยังมีการศึกษาในมะเร็งเซลล์ตับและพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี (Chronic hepatitis B virus HCC) มีความถี่ของจีโนไทป์ชนิด GG และอัลลีน G สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็ง (cirrhosis) และระดับโปรตีนในกลุ่มของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด GG สูงกว่ากลุ่ม GA และ AA[20] จากรายงานการศึกษาแบบ meta-analysis พบว่าอัลลีน G เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับโดยเฉพาะในกลุ่มประชากรแถบเอเชีย[9] รวมทั้งการศึกษาของ Baghdadi และคณะ[10] พบว่าจีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับและทำให้มีระดับโปรตีน EGF เพิ่มสูงในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับ

การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับโรคมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย อาจเนื่องมาจากขนาดตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย และใช้ตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับจากสองโรงพยาบาลที่อยู่ในภูมิภาคต่างกัน ในขณะเดียวกันใช้กลุ่มตัวอย่างของคนปกติ ที่เก็บจากโรงพยาบาลเดียว ปัจจัยเหล่านี้อาจทำให้มีผลต่อความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* กับความสัมพันธ์การเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย แต่ยังไงก็ตามการศึกษานี้พบว่าจีโนไทป์ชนิด GA+AA เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับที่มีระดับความรุนแรงของโรคต่ำ (low tumor grade II) และสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด GG ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Okamoto และคณะ[21] ที่รายงานการศึกษาว่าจีโนไทป์ชนิด AA ในผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนัง มีระยะเวลารอดชีวิตนานกว่าจีโนไทป์ชนิด GG และจากการศึกษาของ Jain และคณะ[22] พบว่าผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารที่มีจีโนไทป์ชนิด GG มีอัตราการรอดชีพที่ดี และยังพบว่าจีโนไทปชนิด GA และ AA ลดความเสี่ยงของมะเร็งหลอดอาหาร รวมทั้ง

ในมะเร็งกระเพาะอาหาร[18,23-24] รวมทั้งการศึกษาของ Abu Dayyeh และคณะ[17] พบว่า จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีการดำเนินของโรคเร็วขึ้น (progression) ในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ

สรุป

ความหลากหลายของยีน *EGF +61G/A* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับของคนไทย แต่พบว่าจีโนไทป์ชนิด GA+AA เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรค และมีการพยากรณ์โรคที่ดีในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนการทำวิจัย จากเงินงบประมาณ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2558

เอกสารอ้างอิง

1. Imsamran W, Pattatang A, Supaattagorn P, Chiawiriyabunya I, Namthaisong K, Wongsena M, et al. Cancer in Thailand, Vol. IX, 9, 2018.
2. อาคม ชัยวีระวัฒนะ, อาคม เชียรศิลป์, เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน และธีรวุฒิ คูหะเปรมะ. แนวทางการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
3. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 1995; 19: 183-232.
4. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Salomon DS. The role of EGF-related peptides in tumor growth. Front Biosci. 2001; 6: D685–707.
5. Groenen LC, Nice EC, Burgess AW. Structure-function relationships for the EGF/TGF-alpha family of mitogens. Growth Factors. 1994; 11: 235-57.
6. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Exp Cell Res. 2003; 284: 31-53.
7. Stoscheck CM, King LE Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. Cancer Res. 1986; 46: 1030-7.
8. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. Cytokine. 2000; 12: 547–54.
9. Jiang G, Yu K, Shao L, Yu X, Hu C, Qian P, et al. Association between epidermal growth factor gene +61A/G polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis based on 16 studies. BMC Cancer. 2015; 15: 314.
10. Baghdadi I, Ella KA, Shaaraway AE, Elshayeb E, El-Rebey HS, Hoseeny ME, et al. Genetic Polymorphism of Epidermal Growth Factor Gene as a Predictor of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Cirrhotic Patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2020; 21: 2047-53.
11. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. Cell Signal. 2006; 18(12): 2089-97.
12. Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhoury H, Fryer AA, Strange RC, et al. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. Lancet. 2002; 359: 397-401.

13. Bhowmick DA, Zhuang Z, Wait SD, Weil RJ. Functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. Cancer Res. 2004; 64: 1220-3.
14. Lanuti M, Liu G, Goodwin JM, Zhai R, Fuchs BC, Asomaning K, et al. A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome. Clin Cancer Res. 2008; 14: 3216-22.
15. Zhu X, Shen Y, Xie Q. The association between EGF A61G polymorphism and risk of colorectal cancer in a Chinese population: a case-control study. Biosci Rep. 2019; 39: SR20190495
16. Tanabe KK, Lemoine A, Finkelstein DM, Kawasaki H, Fujii T, Chung RT, et al. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. JAMA. 2008; 299: 53-60.
17. Abu Dayyeh BK, Yang M, Fuchs BC, Karl DL, Yamada S, Sninsky JJ, et al. HALT-C Trial Group. A functional polymorphism in the epidermal growth factor gene is associated with risk for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2011; 141: 141-9.
18. Cui L, Pan XM, Ma CF, Guan JS, Yu HB, Chen GX, et al. Association between epidermal growth factor polymorphism and esophageal squamous cell carcinoma susceptibility. Dig Dis Sci. 2010; 55: 40-5.
19. Ktistaki E, Talianidis I, Modulation of Hepatic Gene Expression by Hepatocyte Nuclear Factor 1. Science. 1997; 277, 109-12
20. Li Y, Xie Q, Lu F, Zhao J, Mao P, Li Z, et al. Association between epidermal growth factor 61A/G polymorphism and hepatocellular carcinoma susceptibility in Chinese patients. Liver Int. 2010; 30: 112-8.
21. Okamoto I, Roka F, Krögler J, Endler G, Kaufmann S, Tockner S, et al. The EGF A61G polymorphism is associated with disease-free period and survival in malignant melanoma. J Invest Dermatol. 2006; 126: 2242-6.
22. Jain M, Kumar S, Upadhyay R, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC, et al. Influence of apoptosis (BCL2, FAS), cell cycle (CCND1) and growth factor (EGF, EGFR) genetic polymorphisms on survival outcome: an exploratory study in squamous cell esophageal cancer. Cancer Biol Ther. 2007; 6: 1553-8.
23. Jin G, Miao R, Deng Y, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, et al. Variant genotypes and haplotypes of the epidermal growth factor gene promoter are associated with a decreased risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. Cancer Sci. 2007; 98: 864-8.
24. Hamai Y, Matsumura S, Matsusaki K, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the 5’ untranslated region of the EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. Pathobiology. 2005; 72: 133-8.