บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลทั่วไปและระดับสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ มีตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 204 ราย อายุเฉลี่ย 43.5 ± 9.3 เป็นเพศชาย 71 ราย คิดเป็นร้อยละ 34.8 และเพศหญิง 133 ราย คิดเป็นร้อยละ 65.2 จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบอายุเฉลี่ยระหว่างเพศชาย (44.6 ± 10.6) และเพศหญิง (42.9 ± 9.3) ของกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยกลุ่มตัวอย่างประชากรที่ศึกษามีค่าเฉลี่ยของ body mass index (BMI) 23.9 ± 3.8 Kg/m^2 และมีค่าเฉลี่ยของสารชีวเคมีในเลือดหลังจากอดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมงดังนี้ glucose 95.3 ± 24.2 mg/dL, total cholesterol (TC) 207.5 ± 38.3 mg/dL, triglyceride (TG) 119.6 ± 67.7 mg/dL, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) 58.6 ± 14.3 mg/dL, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) 124.9 ± 34.5 mg/dL, aspartate aminotransferase (AST) 21.0 ± 8.1 U/L, alanine aminotransferase (ALT) 20.3 ± 11.2 U/L และ alkaline phosphatase (ALP) 68.8 ± 20.7 U/L นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าความดันโลหิต (blood pressure) ซึ่งเป็นปัจจัยของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด พบว่ากลุ่มตัวอย่างประชากรที่ศึกษามีภาวะความดันโลหิตสูงโดยมีค่า systolic blood pressure (SBP) มากกว่าหรือเท่ากับ 140 mmHg และ/หรือ diastolic blood pressure (DBP) มากกว่าหรือเท่ากับ 90 mmHg จำนวน 92 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.1 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลทั่วไปและระดับสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มประชากรที่ศึกษา (n=204)

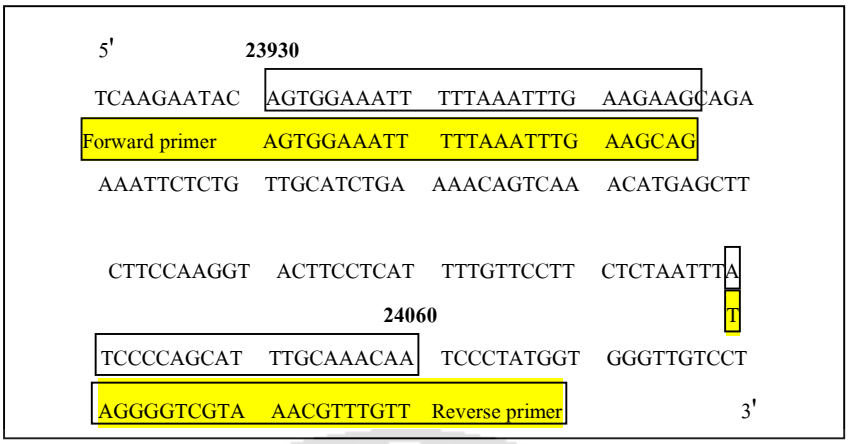
Characteristic	Mean ± SD
Age (year)	43.5 ± 9.3
Male (n [%])	71 (34.8%)
BMI (Kg/m^2)	23.8 ± 3.8
Hypertension (n [%])	92 (45.1%)
Glucose (mg/dL)	95.3 ± 24.2
Total cholesterol (mg/dL)	207.5 ± 38.3
Triglycerides (mg/dL)	119.6 ± 67.7
HDL-C (mg/dL)	58.6 ± 14.3
LDL-C (mg/dL)	124.9 ± 34.5
AST (U/L)	21.0 ± 8.1
ALT (U/L)	20.3 ± 11.2
ALP (U/L)	68.8 ± 20.7

4.2 การอ่านผล *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G) และ 311 (C311S)

ในกระบวนการทำ PCR เป็นขั้นตอนเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่สนใจในแต่ละ polymorphisms หลังจากย่อย PCR product ด้วย restriction endonuclease Fnu4HI (*PON2*-A148G) และ restriction endonuclease DdeI (*PON2*-C311S) ทำการตรวจสอบ genotype จากขนาดของ DNA fragments ที่ตัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

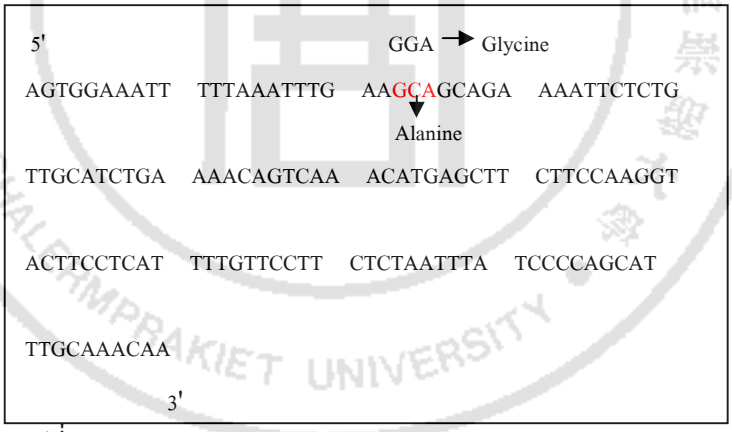
***PON2*-A148G polymorphisms**

ในกระบวนการ PCR *PON2*-A148G primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 23930 ถึงตำแหน่ง 24060[(GenBank: AY210982.1)] ทำให้ได้ PCR product ขนาด 130 bp ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงการจับของ primer บนสายของ DNA ตำแหน่ง 23930 ถึงตำแหน่ง 24060[(GenBank: AY210982.1)]

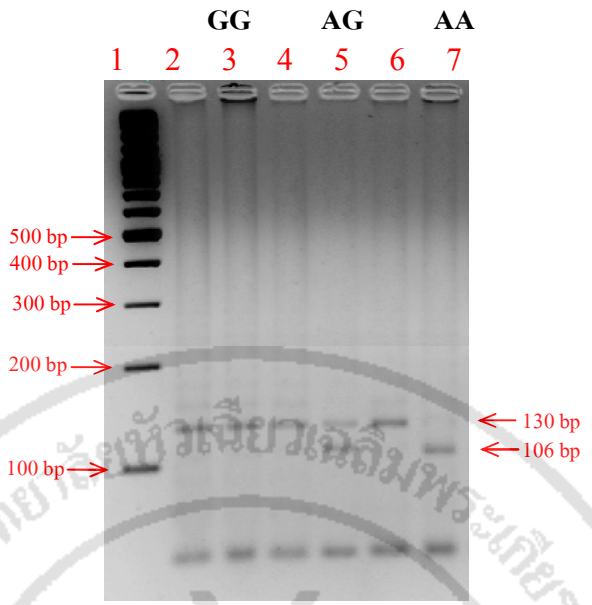
เอนไซม์ Fnu4HI จะตัดชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง GC*NGC ซึ่งตรงกับตำแหน่ง codon ที่ 148 ของ *PON2* ซึ่งกำกับการสร้าง alanine (A) ถูกเอนไซม์ตัดได้เป็นชิ้นส่วน DNA ขนาด 106 bp และ 24 bp ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงการเปลี่ยนของลำดับเบส glycine และ alanine ของ *PON2*-A148G

ตัวอย่างที่มี genotype เป็น AA นั้น PCR product ทั้งหมดสามารถถูกตัดโดยเอนไซม์ Fnu4HI จึงพบชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 24 bp และ 106 bp แต่เนื่องจากชิ้นส่วนที่มีขนาด 24 bp นั้นเล็กมากจึงไม่สามารถมองเห็นได้บน 2.5% agarose gel ส่วนตัวอย่างที่มี genotype เป็น GG ไม่มีบริเวณที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ Fnu4HI จึงปรากฏแถบของชิ้นส่วน DNA ขนาด 130 bp เพียงแถบเดียว ในขณะที่ตัวอย่างที่มี genotype เป็น AG จะมี DNA บางส่วนที่ถูกตัดและบางส่วนไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ Fnu4HI จึงปรากฏเป็นชิ้นส่วน DNA 3 ขนาด คือ 24 bp, 106 bp และ 130 bp

แต่ชิ้นส่วน DNA ขนาด 24 bp มีขนาดเล็กมาก จึงทำให้ปรากฏชิ้นส่วน DNA ที่มองเห็นบน agarose gel ได้เพียง 2 ขนาด คือ 106 bp และ 130 bp ดังภาพที่ 4

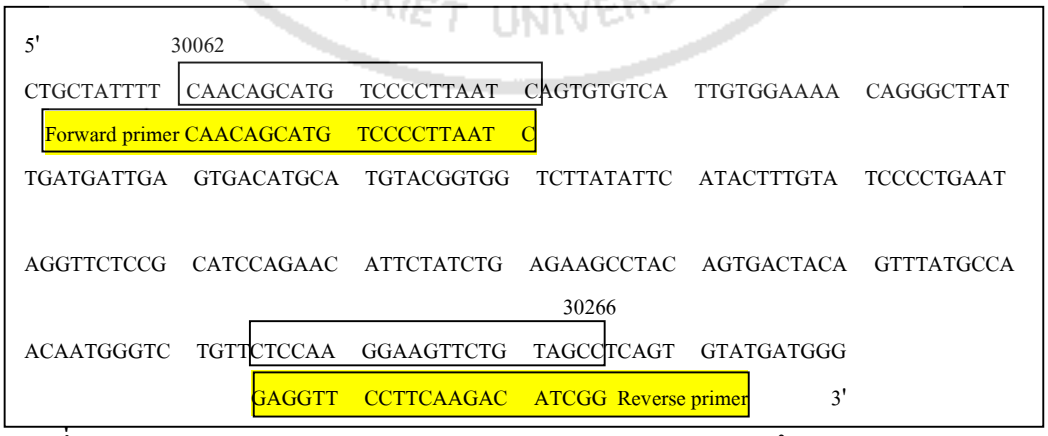


ภาพที่ 4 แสดงลักษณะชิ้นส่วน DNA ของ genotype แบบต่างๆ ของ *PON2*-A148G

แถวที่ 1 จากทางซ้ายมือ คือ 100 bp marker แถวที่ 3 คือ GG genotype แถวที่ 5 คือ AG genotype และแถวที่ 7 คือ AA genotype ส่วนแถวที่ 2, 4 และ 6 คือ PCR product ที่ไม่ได้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ Fnu4HI (undigested)

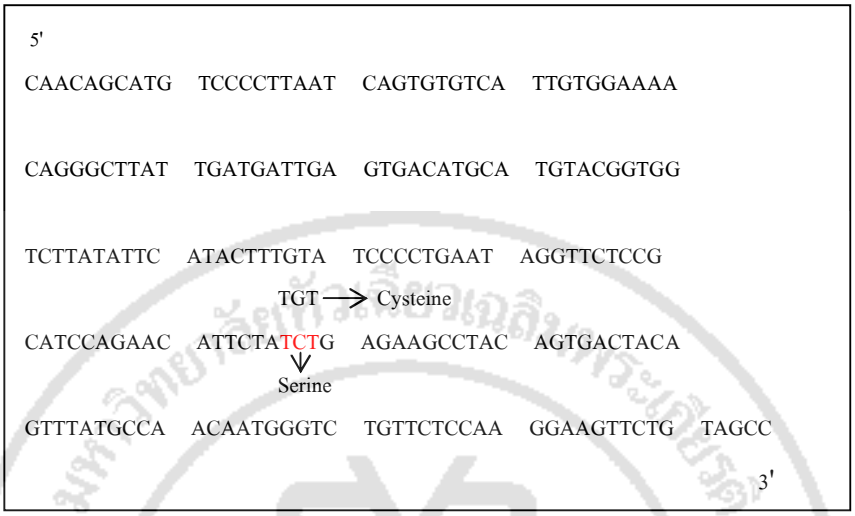
***PON2*-C311S polymorphisms**

ในกระบวนการ PCR *PON2*-C311S primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 30062 ถึงตำแหน่ง 30266[(GenBank: AY210982.1)] ทำให้ได้ PCR product ขนาด 205 bp ดังภาพที่ 5



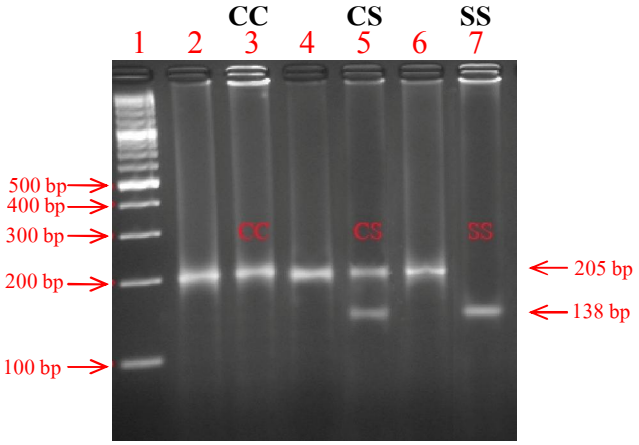
ภาพที่ 5 แสดงการจับของ primer บนสายของ DNA ตำแหน่ง 30062 ถึงตำแหน่ง 30266[(GenBank: AY210982.1)]

เอนไซม์ DdeI จะตัดชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง C*TNAG ซึ่งตรงกับตำแหน่ง codon ที่ 311 ของ *PON2* ซึ่งกำกับการสร้าง serine (S) ถูกเอนไซม์ตัดได้เป็นชิ้นส่วน DNA ขนาด 67 bp และ 138 bp ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงการเปลี่ยนของลำดับเบส cysteine และ serine ของ *PON2*-C311S

ตัวอย่างที่มี genotype เป็น SS นั้น PCR product ทั้งหมดสามารถถูกตัดโดยเอนไซม์ DdeI จึงพบชิ้นส่วน DNA 2 ขนาดคือ 67 bp และ 138 bp แต่เนื่องจากชิ้นส่วนที่มีขนาด 67 bp นั้นเล็กมาก จึงไม่สามารถมองเห็นได้บน 2.5% agarose gel ส่วนตัวอย่างที่มี genotype เป็น CC ไม่มีบริเวณที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ DdeI จึงปรากฏแถบของชิ้นส่วน DNA ขนาด 205 bp เพียงแถบเดียว ในขณะที่ตัวอย่างที่มี genotype เป็น CS จะมี DNA บางส่วนที่ถูกตัดและบางส่วนไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ DdeI จึงปรากฏเป็นชิ้นส่วน DNA 3 ขนาด คือ 67 bp, 138 bp และ 205 bp แต่ชิ้นส่วน DNA ขนาด 67 bp มีขนาดเล็กมาก จึงทำให้ปรากฏชิ้นส่วน DNA ที่มองเห็นบน agarose gel ได้เพียง 2 ขนาด คือ 138 bp และ 205 bp ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะชิ้นส่วน DNA ของ genotype แบบต่างๆ ของ *PON2*-C311S

แถวที่ 1 จากทางซ้ายมือ คือ 100 bp marker แถวที่ 3 คือ CC genotype แถวที่ 5 คือ CS genotype และแถวที่ 7 คือ SS genotype ส่วนแถวที่ 2, 4 และ 6 คือ PCR product ที่ไม่ได้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ DdeI (undigested)

4.3 การกระจายตัวของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G) และ 311 (C311S)

จากการศึกษาการกระจายตัว *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G) และที่ตำแหน่ง (C311S) โดยสมการ Hardy-Wienberg (Hardy-Weinberg equilibrium) พบว่าค่าความถี่ที่ observed ได้ของ genotype ทั้งสองตำแหน่งไม่แตกต่างจากค่าความถี่ที่ expected โดยค่า $p > 0.05$ ดังตารางที่ 8

ผลการศึกษาการกระจายตัวของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G) ในตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 204 ราย พบว่ามี genotype เป็น AA 91 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 44.61 genotype เป็น AG 97 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 47.55 และ genotype เป็น GG 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.84 ดังตารางที่ 9 และพบว่า allele A มีการกระจายตัวมากกว่า allele G โดยมีค่า allele frequency 0.68 และ 0.32 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของ genotype frequencies และ allele frequencies ระหว่างเพศชายและเพศหญิงของกลุ่มประชากรที่ศึกษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการศึกษาการกระจายตัวของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 311 (C311S) ในตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษาจำนวน 204 ราย พบว่ามี genotype เป็น CC 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.88 genotype เป็น CS 76 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.26 และ genotype เป็น SS 116 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 56.86 ดังตารางที่ 10 และพบว่า allele S มีการกระจายตัวมากกว่า allele C โดยมีค่า allele frequency 0.75 และ 0.25 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของ genotype frequencies และ allele frequencies ระหว่างเพศชายและเพศหญิงของกลุ่มประชากรที่ศึกษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 8 แสดงค่าความถี่ genotype ของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G) และ 311 (C311S) เทียบกับค่าจาก Hardy-Weinberg equilibrium

	Genotype frequencies			
Parameters	Observed	Expected	Chi-square value	*p*-value
***PON2*-A148G**				
AA	91	95.4	2.024	0.154*
AG	97	88.2		
GG	16	20.4		
***PON2*-C311S**				
CC	12	12.3	0.009	0.923*
CS	76	75.5		
SS	116	116.3		

* ค่า $p > 0.05$ ถือว่าค่า observed ไม่แตกต่างจากค่า expected อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 9 แสดงการกระจายตัวของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G)

	Male (n=71)	Female (n=133)	Total (n=204)
Genotype frequencies			
PON2-A148G	AA : 38.03	AA : 48.12	AA : 44.61
	AG : 50.70	AG : 45.86	AG : 47.55
	GG : 11.27	GG : 6.02	GG : 7.84
Allele frequencies	A : 0.63	A : 0.71	A : 0.68
	G : 0.37	G : 0.29	G : 0.32

ตารางที่ 10 แสดงการกระจายตัวของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 311 (C311S)

	Male (n=71)	Female (n=133)	Total (n=204)
Genotype frequencies			
PON2-C311S	CC : 2.82	CC : 7.52	CC : 5.88
	CS : 46.48	CS : 32.33	CS : 37.26
	SS : 50.70	SS : 60.15	SS : 56.86
Allele frequencies	C : 0.26	C : 0.24	C : 0.25
	S : 0.74	S : 0.76	S : 0.75

4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S (Gene linkage and linkage disequilibrium)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง A148G กับ C311S โดยมีค่า p เท่ากับ 0.000

4.5 การเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือดของยีน *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S

จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือด ได้แก่ glucose, total cholesterol, triglyceride, HDL-C และ LDL-C ของกลุ่มประชากรที่ศึกษาในแต่ละ genotype ของยีน *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S ดังตารางที่ 11 และ 12 ตามลำดับ พบว่า genotype แบบ CS มีระดับความเข้มข้นของ total cholesterol และ LDL-C สูงกว่า genotype แบบ CC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ genotype SS มีระดับความเข้มข้นของ total cholesterol และ LDL-C สูงกว่า CC genotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ แต่ระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีในเลือดระหว่าง genotype ของ ยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง A148G ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีต่อ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 148 (A148G)

***PON2*-A148G**	**AA**	**AG**	**GG**
Glucose (mg/dL)	97.5 ± 31.9	93.4 ± 15.6	94.8 ± 14.3
Total cholesterol (mg/dL)	210.6 ± 38.4	206.8 ± 38.7	194.0 ± 34.5
Triglyceride (mg/dL)	115.3 ± 68.0	123.9 ± 70.0	118.4 ± 52.9
HDL-C (mg/dL)	60.5 ± 13.9	57.0 ± 15.1	57.4 ± 10.3
LDL-C (mg/dL)	127.0 ± 33.5	125.0 ± 36.2	113.0 ± 29.2

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารชีวเคมีต่อ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง 311 (C311S)

***PON2*-C311S**	**CC**	**CS**	**SS**
Glucose (mg/dL)	88.8 ± 5.4	94.0 ± 16.2	96.9 ± 29.2
Total cholesterol (mg/dL)	180.6 ± 22.6	209.3 ± 41.7 [a*]	209.1 ± 36.5 [b**]
Triglyceride (mg/dL)	103.5 ± 45.3	123.9 ± 62.4	118.5 ± 73.0
HDL-C (mg/dL)	57.1 ± 14.2	58.5 ± 15.5	58.8 ± 13.6
LDL-C (mg/dL)	102.8 ± 23.6	126.0 ± 39.0 [a*]	126.6 ± 31.7 [b**]

a* Genotype แบบ CC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ genotype แบบ CS ที่ $p < 0.05$

b** Genotype แบบ CC genotype แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ genotype แบบ SS ที่ $p < 0.01$