ความหลากหลายและองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในกลุ่มประชากรไทย

Gut microbiome diversity and composition in hepatocellular carcinoma in Thai population

จักรกฤษณ์ ขำเจิม[1,2*], พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์[1], ธนารัตน์ ชลิดาพงศ์[3] และณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ[1]
Jakkrit Khamjerm[1,2*], Pisit Tangkijvanich[1], Thanarat Chalidabhongse[3] and Natthaya Chuaypen[1]
[1]ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]สหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]ภาควิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[1]Center of Excellence in Hepatitis and Liver Cancer, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
[2]Biomedical Engineering Program, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University
[3]Department of Computer Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University
Corresponding author: Email: 6470111021@student.chula.ac.th
(Received: September 10, 2023; Revised: October 20, 2023; Accepted: November 10, 2023)

บทคัดย่อ

ความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้มีความสัมพันธ์อย่างมากกับโรคมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิหรือมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma; HCC) โดยตับกับลำไส้นั้นมีความเชื่อมโยงผ่านทางระบบไหลเวียนตับและลำไส้ (enterohepatic circulation) อย่างไรก็ตาม ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของความหลากหลายและองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้กับการดำเนินโรคมะเร็งตับยังคงมีจำกัด ในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบและเปรียบเทียบลักษณะของจุลินทรีย์ในลำไส้กับการเกิดโรคมะเร็งตับที่เกิดจากสาเหตุของโรคที่แตกต่างกัน โดยผู้วิจัยคัดเลือกผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสบีหรือซีจำนวน 17 ราย กลุ่มมะเร็งตับที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสจำนวน 13 ราย และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 10 ราย และทำการตรวจสอบโปรไฟล์จุลินทรีย์ในลำไส้จากตัวอย่างอุจจาระโดยใช้การวิเคราะห์การจัดลำดับของนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) ด้วยเทคนิค next generation sequencing (NGS) และวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ ผลการศึกษาพบว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี และพบปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bacteroides*, *Ruminoccoccus gnavus group* และ *Erysipelatoclostridium* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มมะเร็งตับที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส จากนั้นได้นำข้อมูลดังกล่าวไปทำนายการทำงานของแบคทีเรีย โดยใช้โปรแกรม PICRUSt2 ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น การสังเคราะห์ไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีบทบาทในการส่งเสริมการพัฒนาของโรคมะเร็งตับ โดยสรุป ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การลดลงของความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้และการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในลำไส้ชนิดดังกล่าวอาจมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาการเกิดโรคมะเร็งตับ และอาจพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับได้ ดังนั้นการปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์และเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ อาจมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC ที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ในลำไส้, มะเร็งตับชนิด HCC ที่มีสาเหตุมาจากไวรัส, มะเร็งตับชนิด HCC ที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส, ยีน 16S rRNA และ ความหลากหลายของจุลินทรีย์

Abstract

Gut microbiota imbalance or gut dysbiosis emerges as a robust connection to hepatocellular carcinoma (HCC) through the gut-liver axis via enterohepatic circulation. However, current knowledge about gut microbiota in different HCC etiologies remains constrained. This study aimed to investigate the gut microbiota composition in patients with HCC at different etiologies. In this study, 17 patients with viral-related HCC, 13 HCC patients with non-viral-related HCC. and 10 healthy controls were recruited for comparative analysis. To examine gut microbiota profile, fecal samples were collected and 16S rRNA were sequenced using NGS. Then, data were analyzed by bioinformatic tools. Notably, a reduction of microbial diversity was observed in the HCC cohort relative to the healthy control group. Interestingly, there were 3 distinctive gut microbiomes including *Bacteroides*, *Ruminococcus gnavus group* and *Erysipelatoclostridium,* which showed significantly higher in the non-viral related HCC group when compared with viral-related HCC group. Based on PICRUSt2 analysis, these microbes were linked to the immune response such as lipopolysaccharide biosynthesis, thus contributing significantly to the progression of HCC. These results suggested that decreasing of gut microbiota diversity and increasing of those 3 bacteria could play an important role in HCC development. These bacteria could be used as diagnostic biomarkers in patients with HCC. In the future, interventions targeting the modulation of intestinal microbiota could enhance the intestinal equilibrium and might prevent the disease particularly in patients with HCC.

Keywords: Gut microbiome, Viral related HCC, Non-viral related HCC, 16S rRNA gene and Diversity

1. บทนำ

ในปัจจุบัน มะเร็งตับถือเป็นปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญอย่างหนึ่งของโลก และคาดว่าจะมีผู้ป่วยมากกว่า 1 ล้านราย ภายในปี 2568 (WHO, 2018) โดยมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นมะเร็งตับที่พบบ่อยที่สุดและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงมากถึง ร้อยละ 90 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบทวีปเอเชีย การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซีเป็นปัจจัยหลักในการพัฒนาการเกิดมะเร็งตับ (Viral-related HCC) อย่างไรก็ตาม ยังมีผู้ป่วยมะเร็งตับประมาณร้อยละ 5–20 ที่ได้รับการทดสอบเป็นลบสำหรับตัวบ่งชี้การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและไวรัสตับอักเสบบี โดยเรียกผู้ป่วยกลุ่มนี้ว่าผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี (Non-viral-related HCC) โรคเกี่ยวกับตับทีมีส่วนทำให้เกิดมะเร็งตับชนิดดังกล่าวมีได้หลากหลายชนิด เช่น โรคตับคั่งไขมันที่มีภาวะตับอักเสบร่วมด้วย (Nonalcoholic Steatohepatitis : NASH) และโรคตับคั่งไขมันหรือไขมันสะสมที่ตับ (Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) (Sciancalepore et al., 2018 ; Yang et al., 2019) ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคค่อนข้างซับซ้อน การใช้ถ่ายภาพรังสี เช่น อัลตราซาวด์ และการถ่ายภาพด้วยคลื่นสนามแม่เหล็ก (Magnetic Resonance Imaging : MRI) ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการคัดกรองโรค นอกจากนี้ การตรวจแบบมาตรฐานสูงสุด (Gold standard) สำหรับการวินิจฉัยโรคคือ การตัดชิ้นเนื้อตับเพื่อมาตับการตรวจหารอยโรค (Liver biopsy) (Bruix and Sherman 2005) อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวก็ยังมีความเสี่ยงมากมาย เช่น ความเจ็บปวดจากการผ่าตัด และข้อผิดพลาดในการสุ่มตัวอย่าง แม้ว่าตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโปรตีนในซีรั่ม เช่น อัลฟาฟีโตโปรตีน (Alpha-feto protein : AFP) จะถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในฐานะตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกราน (Non-invasive biomarker) อย่างไรก็ตาม ตัวชี้วัดทางชีวภาพเหล่านี้มีความไวและความจำเพาะต่ำในการวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มต้น (Johnson 2001)

ในปัจจุบันมีการศึกษาด้านจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut microbiota) กับการเกิดโรคต่างๆมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคตับ เนื่องจากตับและลำไส้สามารถสื่อสารกันได้ (Bidirectional communication) และมีความสัมพันธ์กันที่เรียกว่า "Gut-Liver axis" ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ในลำไส้และตับเกิดขึ้นผ่านทางหลอดเลือดดำพอร์ทัล (portal vein) ซึ่งนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากลำไส้ไปยังตับ และการเวียนกลับของน้ำดีและแอนติบอดีจากตับไปยังลำไส้ หรือเรียกว่า enterohepatic circulation (Tripathi et al., 2018) มีรายงานก่อนหน้านี้มีการศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยมะเร็งตับ พบว่าองค์ประกอบของจุลินทรีย์ของผู้ป่วยมีลักษณะจำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี และจุลินทรีย์ในลำไส้อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ไม่รุกรานสำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับชนิด HCC ได้ (Ren et al., 2019)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ในผู้ป่วยโรค HCC ที่มีสาเหตุของการเกิดโรคที่แตกต่างกัน การศึกษาครั้งนี้อาจนำไปสู่ความสามารถในการระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับชนิด HCC ท้ายที่สุดแล้ว เมื่อบรรลุวัตถุประสงค์เหล่านี้ได้สำเร็จ ผู้วิจัยเชื่อว่าการศึกษานี้มีศักยภาพสำคัญโดยการลดอัตราการเสียชีวิตที่เกี่ยวข้องกับโรค และปรับปรุงคุณภาพชีวิตโดยรวมของผู้ป่วยให้ดียิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์โปรไฟล์และความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีสาเหตุของการเกิดโรคที่แตกต่างกัน ระหว่างผู้ป่วยมะเร็งตับที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ (viral-related HCC) และผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อไวรัส (non-viral-related HCC)

3. แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์ในลำไส้เป็นระบบนิเวศที่ซับซ้อน โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญในสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งประกอบไปด้วยแนวคิด ทฤษฎี และขอบเขตการวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับดังนี้

1. ความสัมพันธ์ระหว่างลำไส้และตับ (Gut-Liver axis) เป็นคำที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์แบบสองทิศทางระหว่างระบบทางเดินอาหาร (ลำไส้) และตับ ซึ่งแสดงถึงการสื่อสารและปฏิสัมพันธ์อย่างต่อเนื่องระหว่างอวัยวะทั้งสองนี้ และมีบทบาทสำคัญในการดำเนินโรคต่างๆ

2. ความไม่สมดุลในองค์ประกอบและการทำงานของจุลินทรีย์ในลำไส้ เช่น การเสียสมดุ ลระหว่างจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และจุลินทรีย์ก่อโรค (Dysbiosis) มีความเกี่ยวข้องกับสภาวะสุขภาพต่างๆ เช่น โรคลำไส้อักเสบ โรคอ้วน และโรคแพ้ภูมิต้านตนเอง

3. การศึกษาสารพันธุกรรมจากชุมชนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Metagenomics) เช่น การศึกษาหาสารพันธุกรรมทั้งหมดจากตัวอย่างที่ได้รับมา เช่น ตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม หรือตัวอย่างจากทางคลินิก ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะได้ข้อมูลครอบคลุมทั้งหมดในระดับดีเอนเอ (DNA) อาร์เอนเอ (RNA) และช่วยทำนายหาการทำงานในระดับโปรตีน (protein) ได้อีกด้วย4. การแพทย์เฉพาะบุคคล (Personalized medicine) สำหรับเรื่องจุลินทรีย์ในลำไส้แสดงถึงขอบเขตด้านการดูแลสุขภาพที่มีศักยภาพในการปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ เพื่อนำไปสู่การป้องกัน การวินิจฉัย และการรักษาโรครายบุคคล ผู้วิจัยตั้งเป้าที่จะสร้างแนวทางให้เหมาะสม และเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์อันซับซ้อนระหว่างจุลินทรีย์และชีววิทยาของมนุษย์

แนวคิดและขอบเขตการวิจัยเหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงความเข้าใจที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับความสำคัญของจุลินทรีย์ในลำไส้ต่อสุขภาพและโรคของมนุษย์ และยังคงขับเคลื่อนการวิจัยเชิงนวัตกรรมในด้านจุลชีววิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา โภชนาการ และการแพทย์ต่อไป

4. วิธีดำเนินการ

4.1 ข้อมูลผู้เข้าร่วมงานวิจัย

4.1.1 กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

เกณฑ์การคัดเข้าสำหรับกลุ่มควบคุม

เพศชายหรือเพศหญิงสัญญาติไทยที่มีอายุ 18 ปีเป็นต้นไป มีดัชนีมวลกาย (Body mass index : BMI) อยู่ในช่วงปกติ ผลการตรวจแอนติเจนสำหรับไวรัสตับอักเสบบีและผลการตรวจแอนติบอดี้สำหรับไวรัสตับอักเสบซีเป็นลบ นอกจากนี้ต้องไม่มีประวัติการเป็นโรคตับและโรคทางเมทาบอลิซึมอื่นๆมาก่อน

เกณฑ์การคัดออกสำหรับกลุ่มควบคุม

อาสามสมัครที่มีประวัติเป็นโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอ้วน โรคทางเมทาบอลิซึม โรคกระเพาะอาหารอักเสบ โรคไขมันพอกตับ และโรคตับแข็ง นอกจากนี้อาสามสมัครที่มีการรับประทานโพรไบโอติกหรือยาปฏิชีวนะในภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์จะไม่นำมาเข้าร่วมในการศึกษาครั้งนี้

4.1.2 กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

ผู้ป่วยมะเร็งตับทั้งหมดได้รับการวินิจฉัยโดยใช้แนวทางสากลที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยมีแบบฟอร์มขอความยินยอมจากผู้ป่วยในก่อนการเก็บตัวอย่าง และได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมสถาบัน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกณฑ์การคัดเข้าสำหรับกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

ผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC ที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธีดังนี้ เช่น การตรวจชิ้นเนื้อตับ การตรวจด้วยภาพถ่ายทางรังสีวิทยา ประกอบด้วย อัลตร้าซาวด์ ซีทีสแกน หรือ การถ่ายภาพด้วยคลื่นแม่เหล็ก

เกณฑ์การคัดออกสำหรับกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ

ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับชนิดอื่น เช่น มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ เป็นต้น ผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีประวัติเคยได้รับการรักษา และผู้ป่วยที่มีข้อมูลทางคลินิกขาดหายไป จะไม่ถูกนำเข้ามาร่วมการศึกษา นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีการรับประทานโพรไบโอติกหรือยาปฏิชีวนะในภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์จะไม่นำมาเข้าร่วมในการศึกษาครั้งนี้

4.2 การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

ผู้เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการเก็บอุจจาระที่เหมาะสมตามขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard Operating Procedures : SOPs) (Dore et al., 2015) โดยหลอดเก็บอุจจาระ (DNA/RNA Shield™ – Zymo Research Corporation) ประกอบด้วยน้ำยา เพื่อรักษาคุณภาพสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์และยับยั้งเชื้อก่อโรคในตัวอย่าง และตัวอย่างที่ได้รับจากผู้เข้าร่วมการศึกษาจะถูกเก็บอยู่ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยจะทำการเก็บข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้เข้าร่วมทั้งหมดก่อนที่จะได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ได้แก่ เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย ผลตรวจทางชีวเคมีของตับ การทดสอบทางซีรัมวิทยา การทำงานของตับ ไต การประเมินความรุนแรงของโรค (Child-Pugh score) และการจัดจำแนกระยะของโรคมะเร็งตับโดยใช้เกณฑ์ของ Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)

4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอุจจาระ

ตัวอย่างอุจจาระถูกแบ่งมา 1 มิลลิลิตรสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการสกัดโดยใช้ ZymoBIOMICS™ DNA Mimiprep kit (Zymo Research Corporation) ซึ่งในชุดสกัดประกอบไปด้วยเม็ดบีทเพื่อทำให้ตัวอย่างรวมเป็นเนื้อเดียวกันและทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แตก จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DeNovix™

UV-Vis spectrophotometer ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำมาเพิ่มจำนวนบริเวณยีนที่มีความหลากหลายสูง (V3-V4) โดยอ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าเป็นบริเวณที่มีการศึกษามากที่สุดและครอบคลุมได้ในระดับจีนัส โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยเริ่มต้นด้วยการกระตุ้นครั้งแรกที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที โดยทำขั้นตอนดังกล่าวทั้งหมด 40 รอบ และทำ extension ขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR จะถูกนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ก่อนส่งไปยังตัวแทนบริษัทเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์โดยบริเวณยีน V3-V4 ที่มีความหลากหลายสูงของยีน 16S rRNA (341F/785R) ถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ดัง**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA

ไพรเมอร์	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์**	**ขนาด**	**อ้างอิง**
บริเวณ V3-V4	5’-CCTACGGGNGGCWGCAG-3’ 5’-CCTGCCTTTGCAATRTCIACRAANGC-3’	444 คู่เบส	(Klindworth et al., 2013)

4.4 การเตรียมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลดิบที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากแพลตฟอร์ม Illumina® MiSeq™ ของแต่ละตัวอย่างถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ไปป์ไลน์ nfcore/ampliseq (Straub et al., 2020) นอกจากนี้ข้อมูลที่จะได้จากการวิเคราะห์ จะถูกนำมาแสดงผล เช่น การแสดงผลองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่าง การวิเคราะห์ความหลายภายในกลุ่มการศึกษาเดียวกัน (Alpha diversity) การวิเคราะห์ความหลากหลายที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มการศึกษา (Beta diversity) ยิ่งไปกว่านั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงฟังก์ชันของจุลินทรีย์ที่พบโดยใช้ไปป์ไลน์ PICRUSt2 ซึ่งเป็นไปป์ไลน์สำหรับทำนายศักยภาพการทำงานของประชากรจุลินทรีย์โดยฐานข้อมูลยีนและจีโนมของเกียวโต (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes : KEGG) (Douglas et al., 2020)

4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติดำเนินการโดยใช้ SPSS เวอร์ชั่น 28.0 และ GraphPad Prism เวอร์ชั่น 8.0 การทดสอบ Chi’ square ถูกใช้สำหรับข้อมูลประเภท category data และการทดสอบ Mann-Whitney U ถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลประเภท continuous data ระหว่างทั้งสองกลุ่มการศึกษา การวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์จะดำเนินการทดสอบโดยใช้การเปรียบเทียบแบบคู่ของกลุ่มตัวอย่าง ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบมากกว่าสองกลุ่มการศึกษาจะใช้การทดสอบ ANOVA โดยใช้ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ หรือ $p < 0.05$

5. ผลการศึกษา

5.1 ข้อมูลผู้เข้าร่วมการศึกษา

ผู้ป่วย 30 รายที่เป็นมะเร็งตับชนิด HCC และอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 10 รายได้เข้าร่วมในการศึกษานี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มการศึกษา พบว่าลักษณะทางคลินิกของกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี (n=10) เปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC (n=30) และมะเร็งตับชนิด HCC ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส (n=17) เปรียบเทียบกับ มะเร็งตับชนิด HCC ที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส (n=13) โดยทั่วไปจะตรงกัน ได้แก่ ค่าดัชนีมวลกาย ค่าเกล็ดเลือด

ค่าโปรตีนต่างๆ (Alb AST ALP และ AFP) ขนาดของก้อนเนื้อ และระยะของ BCLC ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 2

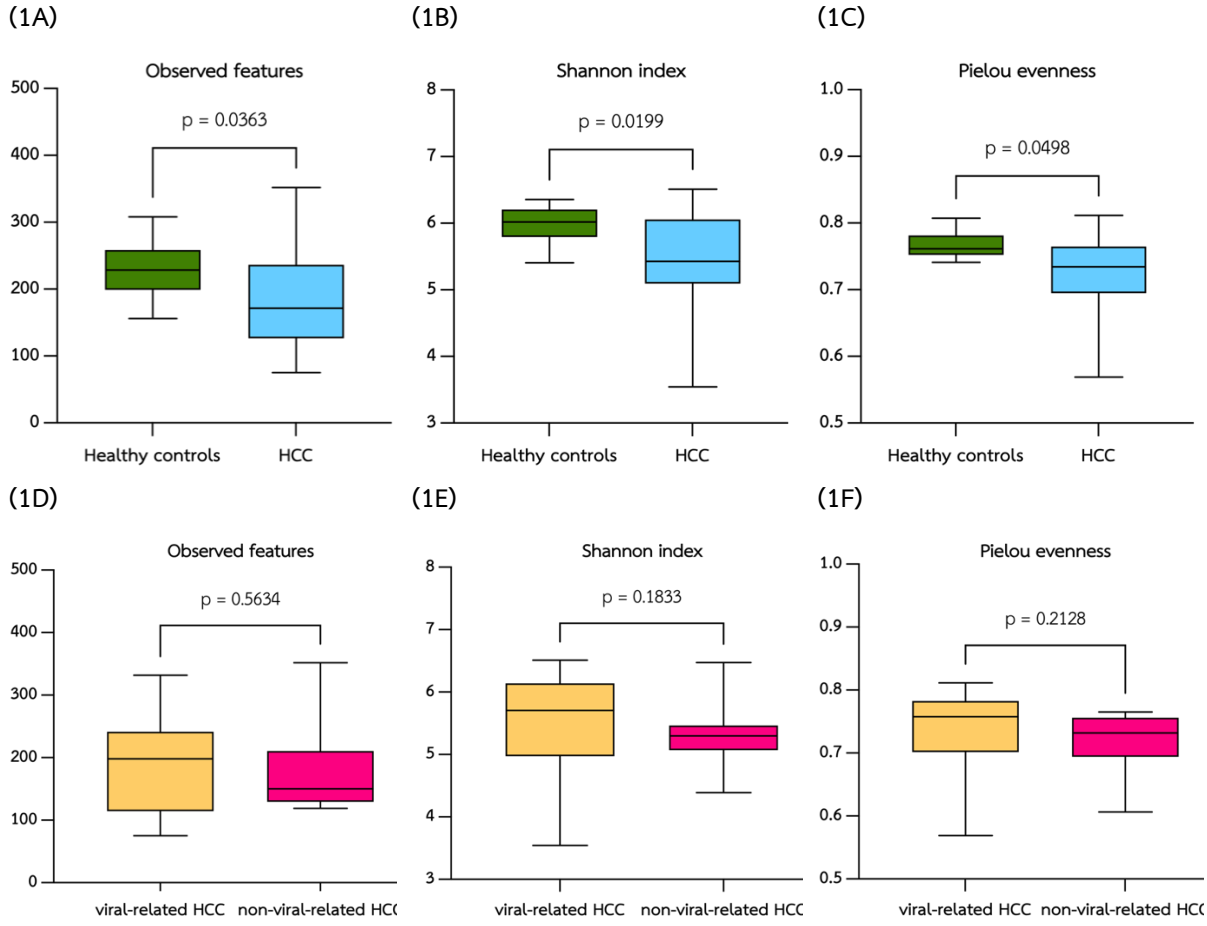
ตารางที่ 2 สรุปผลลักษณะทางคลินิกของผู้เข้าร่วมการศึกษา

Clinical parameters	Healthy controls (n=10)	HCC (n=30)	*P-value*	HCC (n=30)		
				viral-related HCC (n=17)	non-viral-related HCC (n=13)	*P-value*
Age	34.3±10.3	65.3±10.1	<0.001*	61.1±9.2	70.8±8.6	0.007*
Gender			<0.001*			<0.001*
• Male	5(50%)	28(93.3%)		17(100%)	11(84.6%)	
• Female	5(50%)	2(6.7%)		0(0%)	2(15.4%)	
BMI	22.0±3.6	25.5±5.0	0.053	25.2±4.9	25.8±5.2	0.750
Platelet				128.8±59.1	174.0±89.4	0.108
Albumin				3.6±0.6	3.7±0.6	0.541
AST				66.1±57.1	46.5±28.9	0.267
ALT				51.3±31.1	28.2±11.6	0.017*
ALP				98.3±37.1	136.7±96.4	0.142
AFP				4476.6±17980.2	416.6±911.3	0.950
Total mass						0.045*
• 1				9(52.9%)	7(53.9%)	
• 2				4(23.5%)	1(7.7%)	
• >3				4(23.5%)	5(38.4%)	
Maximum size				4.8±4.2	6.2±6.3	0.450
Cirrhosis				15(88.2%)	12(92.3%)	
BCLC stage						0.122
• 0-A				8(47.1%)	6(46.2%)	
• B				7(41.2%)	4(30.8%)	
• C				2(11.7%)	3(23.0%)	

Data showed mean±SD; proportion(n%); **P-value*<0.05; BMI=Body mass index; AST=Aspartate transaminase; ALT=Alanine aminotransferase; ALP =Alkaline phosphatase; AFP=Alpha fetoprotein; BCLC stage=Barcelona clinic liver cancer stage

5.2 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มการศึกษา

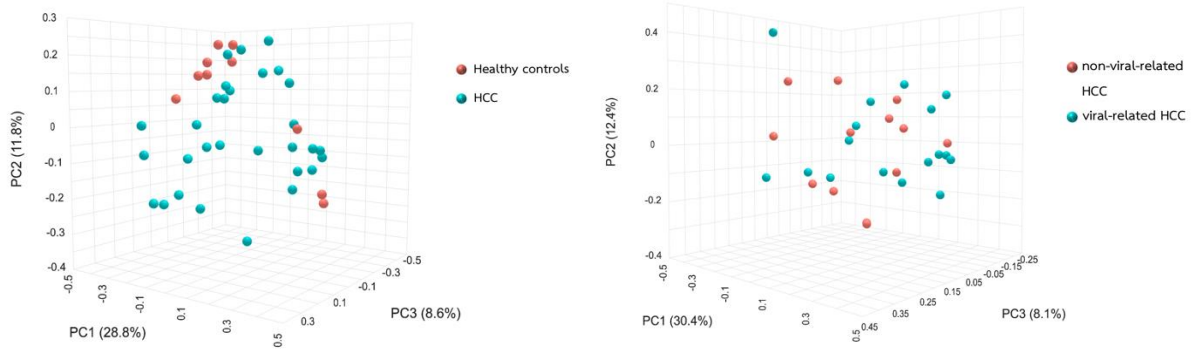
โดยอ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์ลำไส้มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคเกี่ยวกับตับหลายชนิด ตั้งแต่โรคตับอักเสบเรื้อรังไปจนถึงโรคตับแข็ง และมะเร็งตับชนิด HCC (Schnabl & Brenner 2014) ในการศึกษานี้แสดงถึงความหลากหลายในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบว่าความหลากหลายในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ มีความหลากหลายลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดัง**ภาพที่ 1A-1C** อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC และกลุ่มมะเร็งตับ non-viral-related HCC พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด non-viral-related HCC มีแนวโน้มของความหลากหลายของจุลินทรีย์ต่ำกว่ากลุ่ม viral-related HCC ดัง**ภาพที่ 1D-1F**



ภาพที่ 1 ความหลายภายในกลุ่มการศึกษาเดียวกัน (Alpha diversity) **(A)** Observed features **(B)** Shannon index **(C)** Pielou evenness ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มมะเร็งตับ **(D)** Observed features **(E)** Shannon index **(F)** Pielou evenness ระหว่างกลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC และกลุ่มมะเร็งตับชนิด non-viral-related HCC

นอกจากนี้ จาก**ภาพที่ 2A** และ **2B** พบว่าผลการศึกษาความหลากหลายที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มการศึกษา (Beta diversity) ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและกลุ่มมะเร็งตับ กลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC และกลุ่มมะเร็งตับชนิด non-viral-related HCC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(2A) (2B)

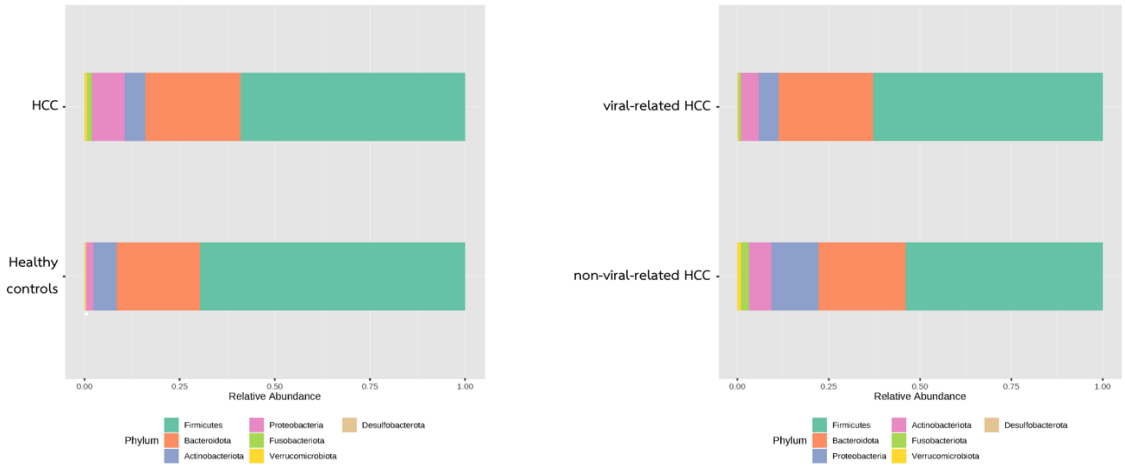


ภาพที่ 2 การศึกษาความหลากหลายที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มการศึกษา (Beta diversity) **(A)** กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกลุ่มมะเร็งตับ (p = 0.104) **(B)** กลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC และกลุ่มมะเร็งตับชนิด non-viral-related HCC (p = 0.147)

5.3 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ในกลุ่มการศึกษา

จากการผลการศึกษาปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนใหญ่พบไฟลัม (phylum) Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria และ Actinobacteroita ในแต่ละกลุ่มการศึกษา โดยเฉลี่ยสูงถึงร้อยละ 80 ดัง**ภาพที่ 3A** และ **3B**

(3A) (3B)



ภาพที่ 3 การศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ **(A)** กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกลุ่มมะเร็งตับ **(B)** กลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC และกลุ่มมะเร็งตับชนิด non viral-related HCC

นอกจากนี้ เมื่อศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ระดับจีนัส (genus) ผลการศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์ 5 ชนิด ได้แก่ Blautia, Ruminococcus gnavus group, Veillonella, Lachnospiraceae NK4A136 group และ Erysipelotrichaceae UCG-003 มีปริมาณสูงสุดจากทั้งหมด 50 genus ที่มีปริมาณและมีการีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มมะเร็งตับ ดังตารางที่ 2 นอกจากนี้ในกลุ่มดังกล่าวมีจุลินทรีย์ในลำไส้ 3 ชนิดที่ลดลงในกลุ่มมะเร็งตับ ได้แก่ Blautia, Lachnospiraceae NK4A136 group และ Erysipelotrichaceae UCG-003 โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้กล่าวว่า Blautia เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ของมนุษย์ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติที่เป็นไปได้ของโพรไบโอติกหลายอย่าง นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการบรรเทาการอักเสบ โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดอีกด้วย (Liu et al., 2021)

ตารางที่ 2 ผลทดสอบปริมาณ์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและกลุ่มมะเร็งตับที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Bacterial in genus level	Healthy controls		HCC		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	
Blautia	0.118	0.110	0.071	0.060	0.029
Ruminococcus gnavus group	0.001	0.000	0.007	0.030	0.045
Veillonella	0.000	0.000	0.001	0.010	0.019
Lachnospiraceae NK4A136 group	0.005	0.010	0.001	0.010	0.022
Erysipelotrichaceae UCG-003	0.002	0.010	0.000	0.000	0.018

สำหรับกลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC เปรียบเทียบกับกลุ่ม non-viral related HCC พบ 7 ชนิดของจุลินทรีย์ในระดับ genus ได้แก่ *Bacteroides*, *Coprococcus*, *Erysipelatoclostridium*, *Lachnospiraceae CAG 56*, *Lachnospiraceae ND3007 group*, *Ruminococcus gnavus group* และ *Subdoligranulum* จากทั้งหมด 50 genus ที่มีประมาณและการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นกัน ดัง**ตารางที่ 3** สิ่งที่น่าสนใจคือจุลินทรีย์ในลำไส้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bacteroides*, *Ruminococcus gnavus group* และ *Erysipelatoclostridium* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มมะเร็งตับชนิด non-viral-related HCC ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการศึกษาการทำนายการทำงานของจุลินทรีย์ที่พบโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PICRUSt2 พบว่ากลุ่มมะเร็งตับมี สัดส่วนเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) และเมแทบอลิซึมต่างๆของร่างกาย เป็นต้น

ตารางที่ 3 ผลทดสอบความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ระหว่างกลุ่มมะเร็งตับชนิด viral-related HCC และ non-viral-related HCC

Bacterial in genus level	Viral-related HCC		Non-viral-related HCC		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	
Bacteroides	0.052	0.088	0.119	0.115	0.031
Coprococcus	0.101	0.023	0.000	0.006	0.033
Erysipelatoclostridium	0.000	0.001	0.002	0.009	0.024
Lachnospiraceae CAG 56	0.002	0.008	0.000	0.000	0.005
Lachnospiraceae ND3007 group	0.003	0.007	0.000	0.002	0.024
Ruminococcus gnavus group	0.002	0.015	0.118	0.041	0.043
Subdoligranulum	0.009	0.015	0.000	0.003	0.006

6. การอภิปรายผล

จากการศึกษาพบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ลดลงในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่ลดลงในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC มีระดับของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก (probiotic) และยับยั้งกระบวนการอักเสบลดลง (Liu et al., 2021) เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของจุลินทรีย์ใน

ลำไส้ของกลุ่มการศึกษาย่อยในผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC โดยเปรียบเทียบผู้ป่วย viral-related HCC กับ non-viral related HCC พบว่า กลุ่มผู้ป่วย non-viral-related HCC มีการเพิ่มขึ้นของ Bacteroides และ Ruminococcus ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับชนิด HCC ที่มีสาเหตุมากจากโรคตับคั่งไขมันหรือไขมันสะสมที่ตับ (NAFLD-HCC) มีจุลินทรีย์ดังกล่าวเพิ่มขึ้น รวมถึงมีความเชื่อมโยงกับการเกิดการอักเสบของตับ (Ponziani et al., 2019) และเมื่อทำการศึกษาการทำงานของจุลินทรีย์ที่พบโดย PICRUSt2 พบว่าแบคทีเรียที่พบนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเมมเบรนของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การก่อให้เกิดการอักเสบ และเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ไขมัน (adipocyte) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาในโมเดลของสัตว์ทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในลำไส้และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ LPS/TLR4 มีบทบาทในการส่งเสริมการพัฒนาของโรคมะเร็งตับชนิด HCC (Zhang et al., 2012)

7. สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ในระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มมะเร็งตับชนิด HCC ยิ่งไปกว่านั้น ข้อมูลของเราแสดงให้เห็นถึงการเปรียบเทียบโดยตรงระหว่างกลุ่มมะเร็งตับชนิด viral และ non-viral-related HCC โดยจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มมะเร็งตับชนิด HCC ที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากไวรัสได้มีการรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบภายในร่างกาย ดังนั้นการปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์ในลำไส้อาจช่วยปรับปรุงสภาวะสมดุลของลำไส้และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ เช่น การปรับปรุงพฤติกรรมการทานอาหารในชีวิตประจำวัน เช่น การรับประทานอาหารที่มีกากใยสูง เช่น ผัก ผลไม้ เป็นต้น การรักษาแบบทางเลือกโดยใช้โพรไบโอติกหรือพรีไบโอติก เพื่อลดความรุนแรงของการดำเนินโรคและลดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC ที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส

8. ทุนสนับสนุน

ผลงานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม โดยหน่วยบริหารและจัดการทุนด้านการพัฒนากำลังคน และทุนด้านการพัฒนาสถาบันอุดมศึกษา การวิจัยและการสร้างนวัตกรรม สัญญาเลขที่ B36G660004

9. จริยธรรมในมนุษย์

งานวิจัยนี้ได้ทำการยื่นขอจริยธรรมกับคณะกรรมการจริยธรรมคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะกรรมการจริยธรรมได้อนุมัติเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยมีหนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัยหมายเลข IRB. No. 0371/66

10. เอกสารอ้างอิง

World Health Organization. (2018). Available source: http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf. **Liver**.

Sciancalepore, D., Zingaro, M. T., Luglio, C. V., Sabbà, C., and Napoli, N. (2018). Hepatocellular Carcinoma: Known and Emerging Risk Factors. **Journal of Cancer Therapy**, 9(05); 417.

Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, 16(10); 589-604.

Bruix, J., and Sherman, M. (2005). AASLD practice guideline. Management of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, 42(5); 1208-1236.

Johnson, P. J. (2001). The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. **Clinics in liver disease**, 5(1); 145-159.

Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B., and Knight, R. (2018). The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, 15(7); 397-411.

Ren, Z., Li, A., Jiang, J., Zhou, L., Yu, Z., Lu, H., Xie, H., Chen, X., Shao, L., Zhang, R. and Xu, S. (2019). Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma. **Gut**, 68(6); 1014-1023.

Dore, J., Ehrlich, S.D., Levenez, F., Pelletier, E., Alberti, A., Bertrand, L., Bork, P., Costea, P.I., Sunagawa, S. and Guarner, F. (2015). IHMS Sop 02 V1**:** standard operating procedure for fecal samples self**-**collection. **Int Hum Microbiome Stand**, 2(12).

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, 41(1); e1-e1.

Straub, D., Blackwell, N., Langarica-Fuentes, A., Peltzer, A., Nahnsen, S., & Kleindienst, S. (2020)**.** Interpretations of environmental microbial community studies are biased by the selected 16S rRNA (gene) amplicon sequencing pipeline. **Frontiers in Microbiology**, 11**,** 550420**.**

Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C. and Langille, M.G. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. **Nature biotechnology**, 38(6), 685-688.

Schnabl, B., and Brenner, D. A. (2014). Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. **Gastroenterology**, 146(6), 1513-1524.

Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H. and Chen, W. (2021). Blautia—a new functional genus with potential probiotic properties?. **Gut microbes**, 13(1), 1875796.

Ponziani, F.R., Bhoori, S., Castelli, C., Putignani, L., Rivoltini, L., Del Chierico, F., Sanguinetti, M., Morelli, D., Paroni Sterbini, F., Petito, V. and Reddel, S. (2019). Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 69(1); 107-120.

Zhang, H.L., Yu, L.X., Yang, W., Tang, L., Lin, Y., Wu, H., Zhai, B., Tan, Y.X., Shan, L., Liu, Q. and Chen, H.Y. (2012). Profound impact of gut homeostasis on chemically-induced pro-tumorigenic inflammation and hepatocarcinogenesis in rats. **Journal of hepatology**, 57(4), 803-812.