

การตรวจหา *MDR1* polymorphism ด้วยวิธี Real Time Polymerase Chain Reaction โดยใช้ TaqMan Probe ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม

ดนัย ทิวาเวช¹ ญาณิณี จรัสวิสูตรพร² Takafumi Ishida³

¹งานชีววิทยามะเร็ง กลุ่มงานวิจัย และ ²กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

³Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Japan

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเต้านม (breast cancer, BRC) เป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของประเทศไทยที่เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งในหญิงไทย การตรวจคัดกรองหาผู้มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็น BRC ระยะเริ่มแรกให้พบโดยเร็วโดยใช้ตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมและตามด้วยการตรวจพิเศษในห้องปฏิบัติการจนตรวจพบก้อนมะเร็งแต่เนิ่นๆแล้วทำการรักษาให้หายจึงเป็นแนวทางที่มีความสำคัญที่จะลดอัตราการตายที่เกิดจาก BRC ลงได้ Multidrug resistance 1 gene (*MDR1*) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม 7q21.12 ทำหน้าที่สร้าง P-glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็นปั๊มอยู่บนผิวเซลล์เพื่อขับสารก่อมะเร็งและยาออกจากเซลล์ มีรายงานว่าบน exon 26 ตำแหน่ง nucleotide 3435 ของ *MDR1* ในมนุษย์นั้นมี single nucleotide polymorphism (SNP) โดย cytosine base (C) ถูกแทนที่ด้วย thymine base (T) ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม [*MDR1* (C3435T) polymorphism] เป็น 3 ชนิด (genotypes) คือ CC genotype (wild type), CT genotype (heterozygous type) และ TT genotype (mutant type) และผู้ที่มี TT genotype มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดมากกว่าผู้ที่มี CC genotype การตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมเพื่อตรวจหาผู้มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็น BRC ระยะเริ่มแรกได้ แต่การตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) แบบเดิมนั้นค่อนข้างซับซ้อน และใช้เวลามากจึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้ทำการตรวจคัดกรองตัวอย่างครั้งละมากๆ ได้ ปัจจุบันวิธี Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ TaqMan Probe (TP) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน และใช้เวลาน้อยถูกพัฒนาขึ้นมาใช้ตรวจหา polymorphism ของยีนต่างๆ ได้หลายชนิด ดังนั้นการวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในหญิงไทย ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 90 ราย เพื่อตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP เปรียบเทียบกับวิธี PCR-RFLP พบว่าผลของการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP ให้ผลเหมือนกับ PCR-RFLP ร้อยละ 100 ($K=1.0$) นอกจากนี้พบว่าวิธี RT-PCR-TP ตรวจได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัดกว่าวิธี PCR-RFLP อีกด้วย การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP ที่พัฒนาขึ้นมาเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน เชื่อถือได้ และน่าจะนำไปใช้แทนวิธี PCR-RFLP ในการตรวจคัดกรองค้นหากลุ่มหญิงไทยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมต่อไปได้

คำสำคัญ : *MDR1* (C3435T) ความหลากหลายทางพันธุกรรม มะเร็งเต้านม Real Time PCR TaqMan Probe

* Corresponding author

ดร. ดนัย ทิวาเวช

กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ถนนพระราม 6 ราชเทวี กทม. 10400, E-mail: tdnai@hotmail.com

Real Time Polymerase Chain Reaction with TaqMan Probe Assay for Detection of *MDR1* (C3435T) Polymorphism in Breast Cancer Patients

Danai Tiwawech¹, Yaninee Jarratwisarutporn², Takafumi Ishida³

¹Research Division and ²Pathology Division, National Cancer Institute

³Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Abstract

Breast cancer (BRC) is a huge public health problem in Thailand since it is the first cause of cancer death in Thai women. Screening for BRC high risk group who will develop an early stage of this cancer using genetic risk factor follow by performing special laboratory check up and early treatment is an important way to decrease the mortality of BRC. Multidrug resistance 1 gene (*MDR1*) located on chromosome 7q21.12 encoded for P-glycoprotein (P-gp), an efflux-pump on cell membrane, to excrete carcinogen and drug from the cell. It has been reported that on exon 26 at nucleotide position 3435 of human *MDR1* there is a single nucleotide polymorphic (SNP) by the substitution of Thymine base (T) to cytosine base (C) which yielded 3 genotypes, CC genotype (wild type), CT genotype (heterozygous type) and TT genotype (mutant type). TT genotype carriers have been reported to be at higher risk than CC genotype carriers for several cancers. Thus, *MDR1* (C3435T) polymorphism can be used as a genetic risk factor for screening of high risk group of BRC. However, *MDR1* (C3435T) polymorphism detection by using the conventional polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay is complicated and time consuming which is not suitable for a mass screening. Recently, a Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using Taqman Probe (TP) assay has been established for a quicker method to improve these problems. Therefore, the purpose of present study is to establish the RT-PCR-TP assay for *MDR1* (C3435T) polymorphism detection in BRC patients and confirm the results of this assay with the PCR-RFLP assay. Ninety DNA samples, extracted from peripheral blood leukocyte of Thai patients with BRC, were examined for *MDR1* (C3435T) polymorphism by using RT-PCR-TP and PCR-RFLP assay, respectively. The results of *MDR1* (C3435T) polymorphism detection in all BRC cases by RT-PCR-TP assay were in complete concordance with PCR-RFLP assay ($\kappa = 1.0$). In addition, RT-PCR-TP assay was a simple, faster and cheaper method for *MDR1* (C3435T) polymorphism detection than PCR-RFLP assay. The results of present study suggest that detection of *MDR1* (C3435T) polymorphism by using RT-PCR-TP assay may be a convenient, faster, reliable and suitable method for screening of BRC high-risk group in Thai women.

Keywords: *MDR1* (C3435T), Polymorphism, Breast cancer, Real Time PCR, TaqMan Probe

*Corresponding author

Dr. Danai Tiwawech

Research Division, National Cancer Institute, Rama 6 Rd., Ratchathevi, Bangkok 10400

E-mail: tdnai@hotmail.com

บทนำ

โรคมะเร็งเต้านม (breast cancer, BRC) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของแทบทุกประเทศ เนื่องจากเป็นโรคที่พบบ่อยเป็นอันดับที่ 1 ในผู้หญิงทั่วโลก โดยมีอัตราการตรวจพบประมาณ 37.4 รายต่อสตรี 1 แสนคน และคาดว่าจะมีการตรวจพบผู้ป่วยใหม่ของมะเร็งเต้านมทั่วโลกมากกว่า 1 ล้านคนในทุกปี¹ ส่วนในประเทศไทย BRC พบมากเป็นอันดับที่ 1 (21,967 ราย หรือประมาณ 20.9 รายต่อผู้หญิง 1 แสนคน) ในผู้หญิงเช่นกัน² จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า BRC เป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 1 ของผู้หญิงทั่วประเทศ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการตายของมะเร็งดังกล่าวนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี³ จึงเชื่อว่า BRC น่าจะเป็นโรคที่สร้างความสูญเสียให้กับประเทศไทยอย่างมากทุกปี แต่หากตรวจพบ BRC ได้ในระยะเริ่มแรกในขณะที่มีขนาดเล็กลงกว่า 1 ซม. และยังไม่มีการกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองจะเป็นโรคที่มีผลของการรักษาที่ดี ผู้ป่วยจะมีการรอดชีวิตในช่วง 5 ปีประมาณร้อยละ 90 ในทางตรงกันข้ามหากตรวจพบเมื่อมีขนาดใหญ่กว่า 5 ซม. และมีการกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองแล้ว การมีชีวิตรอดในช่วง 5 ปีของผู้ป่วยจะลดลงเหลือร้อยละ 40⁴ ดังนั้นการตรวจหา BRC ระยะเริ่มแรกให้พบแต่เนิ่นๆ ในขณะที่ยังไม่มีอาการแล้วให้การรักษาในทันทีซึ่งจะทำให้การรักษาและการพยากรณ์โรคดีขึ้นจึงมีความจำเป็นรีบด่วนในการต่อสู้กับโรคร้ายนี้

การดื้อยาเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัด แม้ว่าเคมีบำบัดจะเป็นวิธีที่นิยมใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมแต่อัตราความสำเร็จจากการรักษาดังกล่าวมักถูกจำกัดด้วยผลจากการดื้อยา⁵ กลไกที่ทราบกันดีซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยคือการเพิ่มความสามารถของเซลล์มะเร็งในการขับยาออกจากเซลล์โดยใช้ ATP-dependent transporters⁶ จากการศึกษาพบว่า พี-ไกลโคโปรตีน (P-gp) เป็น ATP-dependent transporters ชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นจากการถอดรหัสบน multi-drug resistant 1 gene (*MDR1*) และมีคุณสมบัติเป็น transmembrane glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 kDa⁷ นักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการศึกษาและยืนยันว่า P-gp มีบทบาทในการทำให้เกิดการดื้อยาใน cell lines ต่างๆ และในมะเร็งอีกหลายชนิด^{8,9}

MDR1 เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม 7q21.12 ซึ่งประกอบไปด้วย 28 exon และมีความยาว 1.2 กิโลเบส (Kb) โดยมีบริเวณที่สามารถถอดรหัสได้ (coding region) น้อยกว่าร้อยละ 5 ของทั้งหมด¹⁰ มีรายงานว่า *MDR1* ของมนุษย์สามารถตรวจพบ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ได้มากกว่า 50 ตำแหน่ง¹¹ และหนึ่งในจำนวนดังกล่าวนี้คือ C3435T SNP บน exon 26 ซึ่งเป็น silent mutation ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับปริมาณการแสดงออกของ *MDR1* และมีผลต่อการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง¹²

ในสภาวะปกติ *MDR1* จะสร้าง P-gp ไปทำหน้าที่เป็นปั๊มอยู่ที่ cell membrane เพื่อขับสารก่อมะเร็งและสารพิษอื่นๆออกจากเซลล์ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง และสารที่ถูกปั๊มที่เกิดจาก P-gp ขับออกจากเซลล์นั้นได้แก่ PhIP¹³, PAHs¹⁴, HCAs^{13,15,16}, ยารักษาโรคต่างๆ^{17,18}, ยาฆ่าวัชพืช และ ยาฆ่าแมลง¹⁹ รวมทั้ง steroids และ cytokines^{20,21} มีรายงานว่า C3435T SNP บน exon 26 ของ *MDR1* เกิดขึ้นได้เนื่องจาก Cytosine base (C) ที่ตำแหน่ง 3435 ถูกแทนที่ด้วย Thymine base (T) [*MDR1* (C3435T) polymorphism] ทำให้ *MDR1* เกิดความหลากหลาย (polymorphism) ได้ 3 แบบ (genotype) คือ CC genotype (Wild type), CT genotype (heterozygous type) และ TT genotype (mutant type) โดยทั่วไปเซลล์ที่มี TT genotype จะทำหน้าที่ขับสารก่อมะเร็งและสารพิษออกจากเซลล์ได้น้อยกว่า CC genotype ดังนั้นผู้ที่มี TT genotype จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งมากกว่าผู้ที่มี CC genotype ปัจจุบัน Cizmarikova M และคณะ และ Turgut S และคณะ รายงานว่า *MDR1* (C3435T) polymorphism มีความสัมพันธ์กับการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม โดยพบว่าผู้หญิงชาวสโลวัก และชาวตุรกี ที่มี *MDR1* แบบ TT genotype มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมมากกว่าผู้ที่มี *MDR1* แบบ CC genotype เท่ากับ 2.12 และ 1.5 เท่าตามลำดับ^{22,23} จากข้อมูลดังกล่าวทำให้คาดได้ว่าน่าจะมีนักวิจัยในประเทศไทยประสงค์ที่จะทำการศึกษา

ความสัมพันธ์ระหว่าง *MDR1* (C3435T) polymorphism กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในคนไทยในอนาคต แต่การตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) แบบเดิมนั้นมีความซับซ้อน และใช้เวลานานจึงไม่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมครั้งละมากๆ ได้ ปัจจุบันวิธี Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ TaqMan[®] Probe (TP) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน และใช้เวลาน้อยถูกพัฒนาขึ้นมาใช้ตรวจหา polymorphism ของยีนต่างๆ ได้หลายชนิด ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นด้วยการใช้วิธี RT-PCR-TP และเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีนี้กับวิธี PCR-RFLP โดยใช้ DNA จากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในหญิงไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือด (EDTA blood 3 ml) ที่เหลือจากการเจาะเลือดส่งห้องตรวจเลือดตามปกติของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มารับการตรวจสุขภาพประจำปี หรืออยู่ระหว่างการรักษาในสถานมะเร็งแห่งชาติจำนวน 90 ราย จากนั้นปั่นแยกเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 20 นาที และเก็บเม็ดเลือดขาวที่ได้ทั้งหมดไว้ที่ -20°C จนกว่าจะ

นำไปใช้ ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทุกรายได้รับการตรวจทางพยาธิวิทยา และมีผลการวินิจฉัยเป็น BRC ชนิด invasive ductal carcinoma และทุกคนได้ลงชื่อให้ความยินยอมในแบบฟอร์มยินยอมให้ทำการศึกษา

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *MDR1* (C3435T) gene polymorphism กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติเรียบร้อยแล้ว

การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว

ทำการสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย BRC ทั้งหมด โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QuickGene DNA whole blood kit S และใช้เครื่องสกัด DNA รุ่น QuickGene-810 (FUJIFILM Corporation, Japan) ในการสกัด DNA มีการปฏิบัติตามคำแนะนำที่แนบมากับชุดน้ำยาทุกขั้นตอนเป็นอย่างดี สำหรับ DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 40 ng/μl จากนั้นนำ DNA ทั้งหมดไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำไปศึกษา

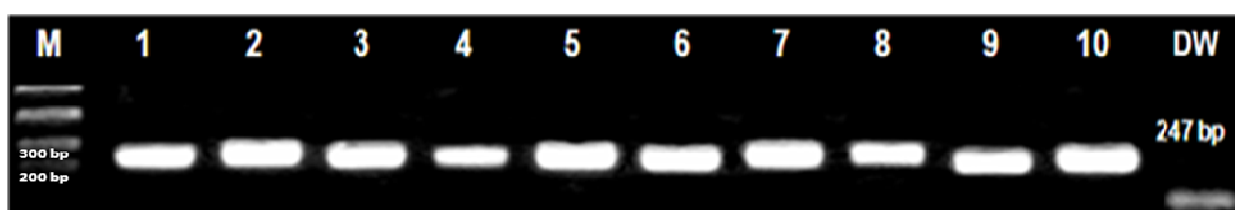
การตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP:

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *MDR1* (C3435T) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ใช้ primer 5'-GCTGGTCCTGAAGTTGATCTGTGAAC-3' (forward)

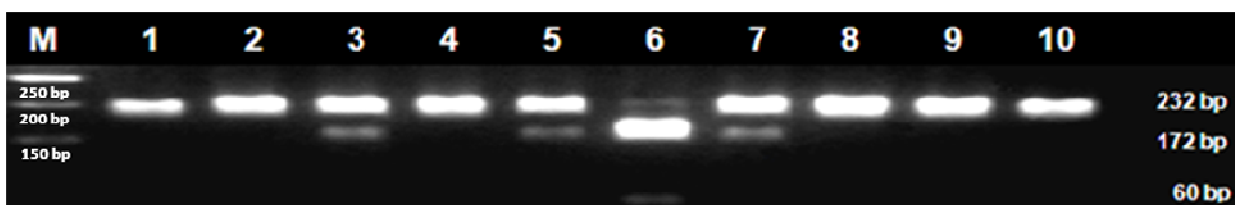
และ 5'-ACATTAGGCAGTGACTCGATGAAGGCA-3' (reverse) เพื่อเพิ่มจำนวนของ *MDR1* exon 26 โดยนำ PCR reaction mixture 50 μl [น้ำกลั่น 2 ครั้ง (DW) 32.8 μl + PCR buffer 5 μl + MgCl₂ 4 μl + dNTP 5 μl + 20 pmole ของแต่ละ primer 1 μl + Taq DNA polymerase 0.2 Unit + DNA template 1 μl] ที่ใส่ใน PCR tube ไป incubate ที่ 95°C นาน 2 นาที จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง Thermocycler (Biometra TPersonal, Germany) ตามโปรแกรมดังนี้ 94°C นาน 30 วินาที, 61°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72°C นาน 4 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด DNA ด้วยการทำให้ electrophoresis ใน agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และย้อม DNA ด้วยสี GelStar[®] (Cambrex Bio Science, Rockland, USA) จะได้ PCR product ที่มีขนาด 247 base pair (bp) ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้น้ำ DW เป็น negative control (รูปที่ 1) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำการย่อยด้วยวิธี RFLP โดยใช้เอนไซม์ 2 U, *MboI* restriction enzyme (Fermentas, Germany) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และอุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที ตามลำดับ นำ PCR-RFLP product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของ DNA อีกครั้งหนึ่งด้วยการทำให้ electrophoresis ใน agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.0 และย้อม DNA ด้วยสี GelStar[®] หาก PCR-RFLP product ใหม่ที่ได้เป็น CC genotype จะตรวจพบ

DNA ขนาด 172 bp และ 60 bp (PCR-RFLP product จะถูกเอ็นไซม์ *MboI* ตัดไป 15 bp และตัดที่ DNA ตรงตำแหน่ง nucleotide 3435 ที่ไม่เกิด SNP) ส่วนที่เป็น TT genotype จะตรวจพบ DNA ขนาด 232 bp (PCR-RFLP product ถูกเอ็นไซม์ *MboI* ตัดไป 15 bp แต่ในตำแหน่ง nucleotide 3435 ที่เกิด SNP จะไม่ถูกตัด) สำหรับที่เป็น CT genotype นั้น จะตรวจพบ DNA

ขนาด 232, 172 และ 60 bp (PCR-RFLP จะถูก enzyme ตัดไป 15 bp และตัดที่ DNA เส้นใดเส้นหนึ่งตรงตำแหน่ง nucleotide 3435 ที่ไม่เกิด SNP) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 (เนื่องจาก DNA ขนาด 15 bp ที่ถูกเอ็นไซม์ *MboI* ตัดออกไปนั้นข้อมติดสีจางมากจึงไม่สามารถแสดงไว้ในรูปที่ 2 ได้)



รูปที่ 1. แสดง PCR product ของ *MDRI* (C3435T) หลังจากผ่านการทำ PCR และ electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ซึ่งสามารถตรวจพบ DNA มีขนาด 247 bp ในทุกตัวอย่าง (ช่องหมายเลข 1-10), DW = น้ำกลั่น 2 ครั้ง, M = DNA size marker (100 bp)



รูปที่ 2. แสดงแถบ PCR product ของ *MDRI* (C3435T) หลังจากผ่านการถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *MboI* และการทำ electrophoresis บน agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.0 พบว่าในตัวอย่างที่นำมาศึกษา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 3 ชนิด คือ CC genotype (ช่องหมายเลข 6 มีแถบ DNA ขนาด 172 bp และ 60 bp), TT genotype (ช่องหมายเลข 1, 2, 4, 8, 9 และ 10 มีแถบ DNA ขนาด 232 bp) และ CT genotype (ช่องหมายเลข 3, 5 และ 7 มีแถบ DNA ขนาด 232, 172 และ 60 bp), M = DNA size marker (50 bp)

การตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP:

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *MDR1* (C3435T) โดยใช้เทคนิค RT-PCR-TP ใช้สำเนาสำเร็จรูป TaqMan[®] Genotyping Master Mix (ประกอบด้วย primers ของ *MDR1* : rs 104562 และ TaqMan[®] Probe) และ Genotyping Assay 20X รวมทั้งใช้เครื่อง RT-PCR รุ่น Step One Plus (Applied Biosystems, USA) โดยนำ RT-PCR reaction mixture 20 µl (DW 7 µl + TaqMan[®] Genotyping Master Mix 10 µl + Genotyping Assay 20X 1 µl + DNA template 2 µl) ที่อยู่ใน PCR tube ใส่ในเครื่อง real time PCR รุ่น Step One Plus แล้ว incubate ที่ 60°ซ นาน 30 วินาที และ 95°ซ นาน 10 นาที จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA และทำให้เกิดการเรืองแสงของ TaqMan[®] Probe เมื่อถูก exonuclease ของ Taq polymerase ตัดที่ปลายด้าน 5'-end ออกไป ตามโปรแกรมดังนี้ 95°ซ นาน 15 วินาที และ 60°ซ 60 วินาที เป็นจำนวน 40 รอบ และตามด้วย 60°ซ นาน 30 วินาที จากนั้นผลที่เกิดจากปฏิกิริยาการเรืองแสงของแต่ละตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมของเครื่อง Step One Plus ว่าตัวอย่างนั้นๆ เป็น genotype ชนิดใดของ *MDR1* (C3435T) polymorphism ซึ่งแสดงออกมาเป็นรูปเส้นโค้ง (curve) ของ C และ T allele ใน Amplification Plot หาก RT-PCR-TP product ที่ได้เป็น CC genotype จะตรวจพบ curve ของ C แต่ไม่พบ curve ของ T ส่วนที่เป็น TT genotype จะตรวจพบ curve ของ T แต่ไม่พบ curve ของ C สำหรับที่เป็น CT genotype นั้น จะตรวจพบทั้ง curve ของ C และ curve ของ T ในการทำ PCR ทุกครั้งใช้ DW เป็น negative control [รูปที่ 3 (A)]

การวิเคราะห์ข้อมูล

การคำนวณค่าของ Kappa (K) และ 95% confidence interval (95% CI) เพื่อวิเคราะห์ระดับการยอมรับในความเหมือนกันของผลที่ได้จากการตรวจด้วย 2 วิธี (วิธี RT-PCR-TP กับ PCR-RFLP) ใช้โปรแกรม The QuickCals online calculators for scientists (<http://graphpad.com>)²⁴ ในการคำนวณ โดยมีข้อกำหนดของระดับการยอมรับดังนี้ เมื่อค่าของ $K = 0-0.4$ แสดงว่าเห็นด้วยน้อยมากถึงค่อนข้างเห็นด้วย เมื่อค่าของ $K = 0.4-0.8$ แสดงว่าเห็นด้วยปานกลางถึงเห็นด้วย และเมื่อค่าของ $K = 0.8-1.0$ คือเห็นด้วยอย่างมาก

ผลการวิจัย

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 90 รายที่เข้าร่วมในการศึกษาครั้งนี้มีอายุระหว่าง 30-80 ปี และอยู่ในระหว่างก่อนได้รับการรักษา ผลของการศึกษาเกี่ยวกับความถี่ของ *MDR1* genotypes และค่าของ K ในการตรวจด้วยวิธี RT-PCR-TP และ PCR-RFLP ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับความถี่ของ *MDR1* genotypes ปรากฏว่าผลของการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP โดยใช้ตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 90 ราย พบว่าความถี่ของผู้ที่มี genotype ชนิด CC, CT และ TT เท่ากับ 13, 47 และ 30 คน ตามลำดับ (ร้อยละ 14.4, 52.2 และ 33.45 ตามลำดับ) ส่วนผลของการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่าความถี่ของผู้ที่มี genotype ชนิด CC,

CT และ TT เท่ากับ 13, 47 และ 30 คน ตามลำดับ (ร้อยละ 14.4, 52.2 และ 33.45 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจของ 2 วิธี โดยการคำนวณทางสถิติพบว่าได้ค่าของ $K = 1$ และค่าของ 95% confidence interval = 1.0-1.0 ซึ่งแสดงว่ามีความสอดคล้องอย่างมากกับการยอมรับในความเหมือนกันของผลที่ได้จากการตรวจด้วย 2 วิธีนี้

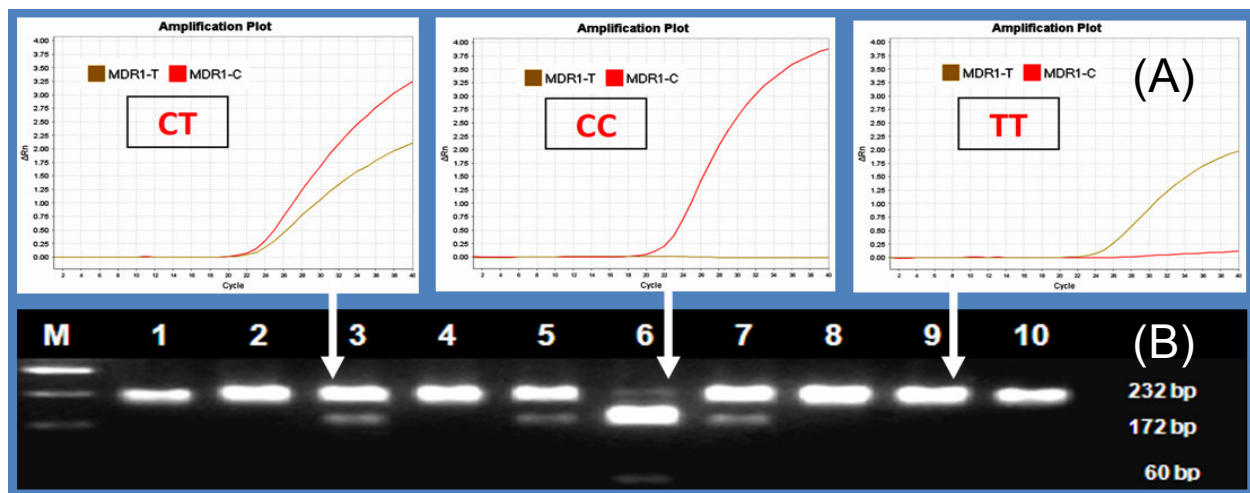
ตารางที่ 1 ความถี่ของ *MDR1* genotypes ในผู้ป่วย BRC โดยการตรวจด้วยวิธี RT-PCR-TP และ PCR-RFLP

วิธีตรวจ	จำนวน (ราย)	<i>MDR1</i> genotypes ^a			K (95%CI)
		CC	CT	TT	
RT-PCR-TP	90	13	47	30	1.0 (1.0-1.0)
PCR-RFLP	90	13	47	30	

^a, *MDR1* genotypes ตรวจด้วยวิธี RT-PCR-TP และ PCR-RFLP จากตัวอย่างของผู้ป่วยรายเดียวกัน

CC = CC genotype, TT= TT genotype, CT = CT genotype, K = kappa, CI= confidence interval

ในการศึกษานี้ตรวจพบผู้ที่มี *MDR1* (C3435T) polymorphism เป็น CC genotype จำนวน 13 ราย (ร้อยละ 14.4) ซึ่งมีการตรวจพบ curve ของ C แต่ตรวจไม่พบ curve ของ T ด้วยวิธี RT-PCR-TP สอดคล้องกับการตรวจพบ DNA-band 2 แถบของ CC genotype (172 และ 60 bp) ด้วยวิธี PCR-RFLP ทุกราย ในทำนองเดียวกันตรวจพบผู้ที่มี *MDR1* (C3435T) polymorphism เป็น CT genotype จำนวน 47 ราย (ร้อยละ 52.2) ซึ่งมีการตรวจพบทั้ง curve ของ C และ curve ของ T ด้วยวิธี RT-PCR-TP สอดคล้องกับการตรวจพบ DNA-band 3 แถบของ CT genotype (232, 172 และ 60 bp) ด้วยวิธี PCR-RFLP และตรวจพบผู้ที่มี *MDR1* (C3435T) polymorphism เป็น TT genotype จำนวน 30 ราย (ร้อยละ 33.4) ซึ่งมีการตรวจพบ curve ของ T แต่ตรวจไม่พบ curve ของ C ด้วยวิธี RT-PCR-TP สอดคล้องกับการตรวจพบ DNA-band 1 แถบของ TT genotype (232 bp) ด้วยวิธี PCR-RFLP [รูปที่ 3 (A) และ (B)]



รูปที่ 3. การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *MDR1* (C3435T) ด้วยวิธี RT-PCR-TP (A) เปรียบเทียบกับวิธี PCR-RFLP (B) ในผู้ป่วย BRC แสดงให้เห็นผลที่ได้จากการตรวจทั้ง 2 วิธีตรงกันโดยมีค่า K (95%CI) = 1.0 (1.0-1.0)

นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากการสกัด DNA เวลานั้นประมาณ 6 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าวิธี รียบร้อยแล้วจะใช้เวลาในการตรวจหา *MDR1* RT-PCR-TP มีจำนวนของขั้นตอนในการทำงาน และมี (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP ค่าใช้จ่ายของสารเคมีและวัสดุวิจัยในการตรวจน้อยกว่า ประมาณ 2 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี PCR-RFLP ต้องใช้ วิธี PCR-RFLP อีกด้วย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างวิธี RT-PCR-TP กับ PCR-RFLP ในการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism

วิธีตรวจ	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	ขั้นตอนการทำงาน (จำนวน)	ค่าเครื่องมือ (แสนบาท)	ค่าสารเคมี และวัสดุวิจัย (บาท/ราย)
RT-PCR-TP	2	1	6	500
PCR-RFLP	6	6	4	600

อภิปรายผล

BRC เป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของ ประเทศไทย เนื่องจากเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งในหญิงไทย ปัจจัยที่เป็นสาเหตุในการทำให้เกิด BRC

ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าความหลากหลายทาง พันธุกรรม (polymorphism) น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มี ส่วนร่วมในการทำให้เกิด BRC ด้วย มีรายงานว่า *MDR1* (C3435T) polymorphism สามารถเพิ่มความ

เสี่ยงต่อการเกิด BRC ได้ ในปี พ.ศ. 2553 Cizmarikova M และคณะรายงานว่า *MDR1* (C3435T) polymorphism มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในผู้หญิงชาวสโลวัก โดยพบว่าผู้ที่มี TT genotype มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมมากกว่าผู้ที่มี CC genotype เท่ากับ 2.12 เท่า ($OR=2.12$, $95\%CI=1.12-4.03$)²² ด้วยเหตุนี้การตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ในแต่ละบุคคลจึงมีความสำคัญและน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็กลุ่มเสี่ยงของ BRC ในประชากรไทย ก่อนหน้านี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP ขึ้นในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ แต่วิธีดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทำงานวิจัยทางระบาดวิทยาและงานบริการทางคลินิกที่มีการตรวจคัดกรองตัวอย่างเป็นจำนวนมากได้ เนื่องจากมีวิธีการทำที่ซับซ้อน และใช้เวลานาน (6 ชั่วโมง) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ที่ให้ได้ผลดีมากขึ้น ด้วยวิธี RT-PCR-TP ซึ่งจะช่วยลดความซับซ้อน เวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการทำลงจึงเป็นเรื่องที่มีประโยชน์เพื่อนำไปใช้ในการทำงานวิจัยต่อยอด หรืองานบริการทางคลินิกที่จะมีเพิ่มมากขึ้นในอนาคตต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้มีการพัฒนาการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ในผู้ป่วย BRC ด้วยวิธี RT-PCR-TP ขึ้นใหม่โดยเปรียบเทียบกับวิธี PCR-

RFLP และแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าทั้งสองวิธีดังกล่าวให้ผลการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ได้เหมือนกันอย่างสมบูรณ์ ($K=1.0$) แต่วิธี RT-PCR-TP มีการทำงานที่ไม่ซับซ้อน และใช้เวลาลดลงเหลือประมาณ 2 ชั่วโมง วิธี RT-PCR-TP นี้พัฒนามาจากวิธีของ Turgut S และคณะ²³ โดยใช้ primers ที่ให้ PCR product ของ *MDR1* (C3435T) polymorphism เหมือนกัน แต่มีการปรับเปลี่ยนน้ำยา PCR reaction mixture เป็น RT-PCR reaction mixture และใช้โปรแกรมการทำ RT-PCR ให้เหมาะสม วิธี RT-PCR-TP ใหม่นี้ทำให้ลดขั้นตอน ความซับซ้อน เวลา และแรงงานในการตรวจลงได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR-RFLP เนื่องจากมีเพียงขั้นตอนการทำ RT-PCR-TP เพื่อตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism แต่ไม่มีขั้นตอนการทำ gel electrophoresis การถ่ายภาพของ DNA ใน agarose gel จึงทำให้การทำงานสะดวก และรวดเร็วขึ้น อีกทั้งวิธี RT-PCR-TP มีการใช้ reaction mixture reagent และวัสดุวิจัยในการทำน้อยลงช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อ น้ำยา และวัสดุวิจัยดังกล่าวได้

ปัจจุบันการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP กำลังเริ่มมีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้แทนที่วิธี PCR-RFLP เพราะว่าวิธี RT-PCR-TP เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน และใช้เวลาน้อยกว่า นอกจากนี้การลงทุนในการทำวิธี RT-PCR-TP มี

ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ในการทำ real-time PCR มีราคาลดลงอย่างมาก และน้ำยาที่ใช้ในการทำวิธี real-time PCR ยังมีราคาใกล้เคียงกับวิธี PCR-RFLP อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเพื่อตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ด้วยวิธี RT-PCR-TP จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม ของความเสี่ยงต่อการเกิด BRC ในหน่วยงานต่างๆ ของกระทรวงสาธารณสุขที่อยู่ในส่วนกลาง และส่วนภูมิภาคได้ในอนาคต

จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism ในผู้ป่วย BRC ด้วยวิธี RT-PCR-TP ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีความน่าเชื่อถือ ไม่ซับซ้อน สะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าวิธี PCR-RFLP ดังนั้นวิธี RT-PCR-TP น่าจะเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจหา *MDR1* (C3435T) polymorphism สำหรับการตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็กลุ่มเสี่ยงของ BRC ในประเทศไทยได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานวิจัย กลุ่มงานพยาธิวิทยา กลุ่มงานศัลยกรรม กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ และกลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Garcia M, Jemal A, Ward EM, *et al.* Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.
2. Khuhaprema T, Srivatanakul P, Attasara P, *et al.* Cancer in Thailand, Vol. V, 2001-2003, Bangkok, Thailand, 2010.
3. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2550 กองสถิติสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข
4. Greene FL, Page DL, Fleming ID, *et al.* Cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.
5. Atalay C, Deliloglu GI, Irkkan C, *et al.* Multidrug resistance in locally advanced breast cancer. *Tumour Biol* 2006; 27: 309-18.
6. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
7. van der Deen M, de Vries EG, Timens W, *et al.* ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res* 2005; 6: 59-74.
8. Linn SC, Giaccone G, van Diest PJ, *et al.* Prognostic relevance of P-glycoprotein

- expression in breast cancer. *Ann Oncol* 1995; 6: 679-85.
9. Decleves X, Fajac A, Lehmann-Che J, *et al.* Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Cancer* 2002; 98: 173-80.
10. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 391-414.
11. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, *et al.* A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-8.
12. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-8.
13. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 216-37.
14. Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1754-63.
15. Enokizono J, Kusuhara H, Ose A, *et al.* Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 995-1002.
16. van Herwaarden AE, Wagenaar E, Karnekamp B, *et al.* Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* 2006; 27: 123-30.
17. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, *et al.* Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* 2006; 86: 1179-236.
18. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-98.
19. bu-Qare AW, Elmasry E, bou-Donia MB. A role for P-glycoprotein in environmental toxicology. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2003; 6: 279-88.

-
20. Mizutani T, Masuda M, Nakai E, *et al.* Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr Drug Metab* 2008; 9: 167-74.
21. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 1-6.
22. Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L, *et al.* *MDR1* (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J* 2010; 10: 62-9.
23. Turgut S, Yaren A, Kursunluoglu R, *et al.* *MDR1* C3435T polymorphism in patients with breast cancer. *Arch Med Res* 2007; 38: 539-44.
24. QuickCalcs online calculators for scientists. Available at <http://graphpad.com/quickcalcs/kappa.cfm>. Accessed November 15, 2008.
25. Jeffy BD, Schultz EU, Selmin O, *et al.* Inhibition of BRCA-1 expression by benzo [a]pyrene and its diol epoxide. *Mol Carcinog* 1999; 26: 100-18.
26. Goth-Goldstein R, Stampfer MR, Erdmann CA, *et al.* Interindividual variation in CYP1A1 expression in breast tissue and the role of genetic polymorphism. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2119-22.
27. Spurdle AB, Fahey P, Chen X, *et al.* Pooled analysis indicates that the *GSTT1* deletion, *GSTM1* deletion, and *GSTP1* Ile105Val polymorphisms do not modify breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122: 281-5.
28. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analysis of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.
29. Brody JG and Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1007-19.
30. Morabia A. Smoking (active and passive) and breast cancer: epidemiologic evidence up to June 2001. *Environ Mol Mutagen* 2002; 39: 89-95.
31. Office on Smoking and Health (US). The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the Surgeon General. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (US), 2006.
32. Zhu HH, Gao YT, Blair A, *et al.* Secondhand smoke and breast cancer risk: a community-based prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 2006; 163 (Suppl) (11): S98.

-
33. Morabia A. Active and passive smoking in breast cancer. *Epidemiology* 2002; 13: 744-5.
34. Persson I, Weiderpass E, Bergkvist L, *et al.* Risks of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *Cancer Causes Control* 1999; 10: 253-60.
35. Lu PH, Wei MX, Yang J, *et al.* Association between two polymorphisms of ABCB1 and breast cancer risk in the current studies: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125: 537-43.

Relationship Between Blood Pressure and Changes of Serum Gamma-Glutamyltransferase with Alcohol Consumption

Wantika Kruanamkam^{1*}, Sirikorn Phokham², Tadsanee Punjanon¹, Patamaporn Sukplang¹, Jintana Sirivarasai³

¹ Faculty of Science, Rangsit University

² Biomedical Sciences Program, Faculty of Science, Rangsit University

³ Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University

Abstract

Serum gamma-glutamyltransferase (GGT) activity is a biological marker of alcohol consumption and its important role related to antioxidant molecule, glutathione which influence on elevation of blood pressure and the development of hypertension. The aim of this study was to investigate the relationship between alcohol consumption and the influence of serum GGT on the risk for hypertension in Thai men. A cross-sectional study was conducted with 260 men, 30 to 60 years of age. The health assessments at study entry included medical history, physical examination, blood pressure measurement, biochemical measurements and a questionnaire on health-related behaviors. The results showed that blood pressure (both systolic; SBP and diastolic blood pressure; DBP), serum levels of GGT, AST and ALT among current drinkers were statistically higher than non-drinkers and ex-drinkers. Further analysis with 4 quartiles of GGT levels after adjusted for age and BMI, marked dose-response relationships among SBP (Q1; 125.3 mmHg, Q2; 129.6 mmHg, Q3: 135.1 mmHg, and Q4; 137.3 mmHg, respectively), DBP (Q1; 77.12 mmHg, Q2; 81.20 mmHg, Q3: 84.07 mmHg, and Q4; 85.51 mmHg, respectively) and serum ALT (Q1; 18.25 U/L, Q2; 22.34 U/L, Q3: 32.95 U/L, and Q4; 52.49 u/L, respectively) with serum GGT levels were found. Moreover, the positive correlations between quantity of alcohol intake and targeted parameters were found as seen by increased serum GGT levels with SBP in moderate drinkers ($p=0.028$) and with SBP, triglyceride and ALT levels in high drinkers ($p=0.019, 0.033$, and 0.047 , respectively). The highest incident of hypertension was found in drinkers followed by ex-drinkers and non-drinkers (abnormal SBP; drinkers 37.79%, ex-drinker 13.39% and non-drinkers 5.51% and abnormal DBP; drinkers 28.35%, ex-drinkers 9.45% and non-drinkers 5.51%, respectively). Among subjects with $GGT < 50$ U/L, the risk of hypertension was lower than those with $GGT \geq 50$ U/L. This study showed that increased GGT levels could be a predictor for hypertension in drinkers and the relationship between alcohol consumption and BP was more prominent among those with $GGT \geq 50$ U/L.

Keywords: Alcohol consumption, Blood pressure, Serum gamma-glutamyltransferase, Hypertension

*Corresponding author

Wantika Kruanamkam, Ph.D

Faculty of Science, Rangsit University, Muang, Pathumtani, 12000, Thailand,

E-mail : wantikarsu@yahoo.com

ความสัมพันธ์ระหว่างความดันโลหิต และการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ serum gamma-glutamyltransferase กับการดื่มแอลกอฮอล์

วันทิกา เครือน้ำคำ¹, ศิริกร โพธิ์คำ², ทศนีย์ ปัญจนาท¹, ปดมาพร สุกปลั่ง¹, จินตนา ศิริวราศัย³

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

² หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

³ หน่วยเภสัชวิทยาคลินิกและพิษวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ระดับการทำงานของเอนไซม์ serum gamma-glutamyltransferase (GGT) เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพตัวหนึ่งสำหรับการประเมินเรื่องการดื่มแอลกอฮอล์ และบทบาทที่สำคัญของเอนไซม์นี้จะเกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระกลูตาไธโอน ซึ่งสารนี้จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับความดันโลหิตและการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดื่มแอลกอฮอล์ และอิทธิพลของระดับการทำงานของเอนไซม์ GGT ต่อความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง การศึกษาครั้งนี้เป็นแบบภาคตัดขวางที่กลุ่มศึกษาเป็นเพศชาย จำนวน 260 คน อายุระหว่าง 30-60 ปี การประเมินทางด้านสุขภาพเมื่อเริ่มโครงการประกอบด้วยการซักประวัติด้านสุขภาพ การตรวจร่างกาย การวัดความดันโลหิต การตรวจทางห้องปฏิบัติการ และแบบสอบถามเกี่ยวกับพฤติกรรมความเสี่ยงต่อสุขภาพ ผลการศึกษาพบว่าระดับความดันโลหิต ระดับของเอนไซม์ GGT, AST, ALT ในกลุ่มดื่มแอลกอฮอล์มีระดับสูงกว่ากลุ่มเคยดื่มและกลุ่มไม่ดื่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ทางสถิติเพิ่มเติมโดยการแบ่งระดับของ เอนไซม์ GGT เป็น 4 กลุ่ม (4 quartiles) หลังจากควบคุมตัวแปรเรื่อง BMI และอายุ แล้วพบว่ามีความสัมพันธ์แบบ dose-response relationship ระหว่างระดับ SBP (Q1; 125.3 mmHg, Q2; 129.6 mmHg, Q3; 135.1 mmHg, and Q4; 137.3 mmHg, ตามลำดับ), DBP (Q1; 77.12 mmHg, Q2; 81.20 mmHg, Q3; 84.07 mmHg, and Q4; 85.51 mmHg, ตามลำดับ) และ serum ALT (Q1; 18.25 U/L, Q2; 22.34 U/L, Q3; 32.95 U/L, and Q4; 52.49 u/L, ตามลำดับ) กับระดับของเอนไซม์ GGT นอกจากนี้พบความสัมพันธ์ทางบวกระหว่างปริมาณการดื่มแอลกอฮอล์กับตัวแปรที่ต้องการศึกษา โดยในกลุ่มดื่มปานกลางพบการเพิ่มขึ้นของระดับ GGT กับระดับ SBP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.028$) และในกลุ่มดื่มมากพบการเพิ่มขึ้นของระดับ GGT กับระดับ SBP, triglyceride และ ALT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019, 0.033$ และ 0.047 ตามลำดับ) ส่วนภาวะความดันโลหิตสูงที่มีระดับของ SBP ผิดปกติพบสูงสุดในกลุ่มดื่มแอลกอฮอล์ (37.79%) รองลงมาได้แก่ กลุ่มเคยดื่ม (13.39%) และกลุ่มไม่ดื่ม (5.51%) เช่นเดียวกับระดับของ DBP ผิดปกติพบสูงสุดในกลุ่มดื่มแอลกอฮอล์ (28.35%) รองลงมาได้แก่ กลุ่มเคยดื่ม (9.45%) และกลุ่มไม่ดื่ม (5.51%) เมื่อพิจารณาระดับของเอนไซม์ GGT พบว่ากลุ่มที่มีระดับน้อยกว่า 50 U/L มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง น้อยกว่ากลุ่มที่มีระดับของเอนไซม์ GGT มากกว่าหรือเท่ากับ 50 U/L ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ GGT สามารถนำมาใช้ในการทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงในกลุ่มคนที่ดื่มแอลกอฮอล์ได้ และความสัมพันธ์นี้จะเห็นได้ชัดเจนในกลุ่มที่มีระดับของระดับของเอนไซม์ GGT มากกว่าหรือเท่ากับ 50 U/L ซึ่งเป็นค่าที่เกินค่าอ้างอิงมาตรฐาน

คำสำคัญ: การดื่มแอลกอฮอล์ ความดันโลหิต Serum gamma-glutamyltransferase ความดันโลหิตสูง

***Corresponding author**

ดร. วันทิกา เครือน้ำคำ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000, E-mail : wantikarsu@yahoo.com

Introduction

An important potent factor for the development of hypertension is excessive alcohol consumption. Previous studies reported the relationship between alcohol consumption and blood pressure. Systolic and diastolic blood pressure in the moderate and heavy drinkers (consuming 24 - 46 and > 47 g alcohol per day, respectively) were both 3-5 mmHg higher than those in the non-drinkers¹. Gamma-glutamyltransferase (GGT) is an enzyme synthesized in epithelial cells of the intra-hepatic duct and a well-known biological marker of alcohol abuse and / or liver damage². The significant association between serum GGT level within its normal range and the presence of diabetes, hypertension, obesity, dyslipidaemia and metabolic syndrome was found³. Moreover, Lee, et al.⁴ reported a clear dose-response relationship with alcohol consumption for healthy male workers with $\text{GGT} \geq 30$ U/L and the adjusted changes in blood pressure. Among those with $\text{GGT} \geq 30$ U/L, the adjusted relative risks for hypertension in light, moderate and heavy drinkers were 1.4 (95% CI: 0.5-4.5), 5.2 (95% CI: 1.5-18.0), and 5.3 (95%CI: 1.0-27.6), compared with non-drinkers⁴.

Serum GGT level might be a modest risk factor for hypertension among drinkers. However, the mechanism underlying these observations is not fully understood. Some possible mechanisms have been mentioned as elevation of GGT level related to hepatic cell-membrane damage (resulting in increased blood pressure) via oxidative stress pathway, rather than enzyme-induction. An experimental study indicated that GGT cleavage of glutathione (GSH) and the subsequent recapture of cysteine and cystine allow cells to maintain low levels of cellular ROS and

thereby avoid apoptosis induced by oxidative stress⁵.

Thailand was ranked at number 40 in the world statistic on *per capita* alcohol consumption in 2001 by the World Health Organization (WHO) Statistical Information System⁶. Current report by Assanangkornchai et al. described patterns of alcohol consumption in the Thai population (11,348 households and 26,633 respondents from 29 Provinces) by using a structured interview questionnaire, including information on pattern of alcohol consumption, Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT). Based on the AUDIT score, 6.7% of the Thai population could be classified as hazardous drinkers, 0.9% as harmful drinkers and 0.6% as probable alcohol dependents. The median drinking intensity was 50.8 g in men and 25.4 g in women⁷. Along with these data, adverse health burden with increased alcohol intake in Thai population may need to be taken into consideration. The aim of this cross-sectional study was to investigate the relationship between alcohol consumption and the effect of serum GGT on the risk for hypertension in Thai men.

Materials and Methods

Study population and measurements

Study participants were employees at official and private universities resided in Bangkok. Subjects included 260 Thai men, 30 to 60 years of age. Men, who reported consuming alcohol beverage average one time per week or more for 3 years, were regarded as drinkers. Ex-drinkers were defined as abstainers for the past 1 year and over. Subjects were classified as light, moderate, or high drinkers who averaged < 14.9 g/d, 15.0 to 29.9

g/d, or ≥ 30 g/d of ethanol. The exclusion criteria were individual with acute or chronic kidney, liver and cardiovascular disease with drug treatment, suffering various type of cancer, history of alcohol abuse and malignancy, undergoing medical treatment of hepatitis. This study was approved by the Institutional Review Board at Rangsit University. All subject were signed inform consent before participating in this study.

Questionnaires were used to assess information on demographic, medical, and lifestyle factors including medical and family history, cigarette smoking, and alcohol consumption. Blood pressure was measured, after a 5-min rest, on the right arm in the sitting position with a standard mercury sphygmomanometer. Body mass index (BMI) was calculated as the weight in kilograms divided by the height in meter squared. Participants were asked to fast at least 12 h and blood was collected from the antecubital vein and measured within 3 hours of blood collection. Serum levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), GGT, and glucose were determined using an automatic analyzer (Roche Cobas 6000).

Statistical analysis

Overall analyses were carried out on SPSS version 13 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were expressed as mean and S.E. Associations between serum GGT and other parameter were analyzed by quartiles (Q1, 8-20 U/L; Q2, 21.01-38.00 U/L; Q3, 38.01-67.00 U/L, and Q4, > 67.01 U/L). Pearson's

correlation was used for analysis of association between serum GGT, BP, and other biochemical values in different types of drinkers. Moreover, serum GGT levels were divided into two categories; normal was defined as value below 50 U/L, and abnormal with value ≥ 50 U/L. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for comparison of three groups related to alcohol consumption and 4 quartiles of GGT levels. The *P*-values used are two-sided, and values < 0.05 were regarded as statistically significant.

Results

The clinical characteristics of the study population according to alcohol consumption are presented in Table 1. The mean age of non-drinkers ($n=83$), ex-drinkers ($n=47$) and current drinkers ($n=130$) were 43.40, 45.34 and 39.75 years, respectively. Drinkers in this present study were significantly younger than the other 2 groups ($p < 0.05$). Moreover, SBP, DBP, serum levels of GGT, AST and ALT among current drinkers were statistically higher than non-drinkers and ex-drinkers. For lipid profile, HDL-cholesterol and triglyceride levels in drinkers were significantly higher than ex-drinkers levels (55.43 mg/dL for drinkers vs 49.91 mg/dL for ex-drinkers, $p < 0.05$) and non-drinkers levels (148.2 mg/dL for drinkers vs 130.1 mg/dL for non-drinkers, $p < 0.05$), respectively, in contrast to LDL-cholesterol levels (129.6 mg/dL for drinkers vs 138.9 mg/dL for ex-drinkers, $p < 0.05$).

Table 1. Clinical characteristics of the study population (Mean and S.E. ; N=260)

	Non-drinkers	Ex-drinkers	Drinkers
N	83	47	130
Age, years	43.40 (0.96)	45.34 (1.14)	39.75 (0.59) ^{a,b}
Body mass index, kg/m ²	23.26 (0.37)	22.55 (0.49)	22.95 (0.28)
Systolic blood pressure, mmHg	129.1 (1.72)	126.6 (1.92)	135.6 (1.34) ^{a,b}
Diastolic blood pressure, mmHg	80.07 (1.14)	79.70 (1.38)	84.13 (0.95) ^{a,b}
Exercise (%), times/week			
- < 2 times/week	25.0	32.1	22.2
- ≥ 2 times/week	75.0	67.9	77.8
Alcohol, mL/week	-	133.3 (51.66)	385.6 (30.58) ^b
Smoking, cigarettes/day	10.10 (1.36)	15.00 (1.82)	12.73 (1.15)
Total cholesterol, mg/dL	219.8 (4.59)	212.2 (5.43)	209.36 (3.20)
LDL cholesterol, mg/dL	143.7 (2.98)	138.9 (5.03)	129.6 (3.0) ^a
HDL cholesterol, mg/dL	51.22 (1.36)	49.91 (1.56)	55.43 (1.34) ^b
Triglyceride, mg/dL	130.1 (7.49)	139.7 (15.33)	148.2 (9.3) ^a
Gamma glutamyl transferase (GGT), U/L	39.89 (3.07)	38.70 (5.65)	82.58 (7.79) ^{a,b}
Aspartate aminotransferase (AST), U/L	26.43 (0.98)	26.51 (1.15)	33.26 (1.72) ^{a,b}
Alanine aminotransferase (ALT), U/L	27.90 (1.94)	26.65 (2.85)	35.74 (2.57) ^{a,b}
Glucose, mg/dL	93.62 (3.35)	90.00 (1.92)	93.01 (2.08)

^{a,b} Compared with non-drinkers, and ex-drinkers, respectively : p< 0.05

The associations between changes in blood pressure, biochemical parameters and 4 categories of serum GGT levels, classified by quartile, are shown in Table 2. After adjusted for age and BMI, there were slightly dose-response relationships among SBP (Q1; 125.3 mmHg, Q2; 129.6 mmHg, Q3: 135.1 mmHg, and Q4; 137.3 mmHg, respectively), DBP (Q1; 77.12 mmHg, Q2; 81.20 mmHg, Q3: 84.07 mmHg, and Q4; 85.51 mmHg, respectively) and serum ALT (Q1; 18.25 U/L, Q2; 22.34 U/L, Q3: 32.95 U/L, and Q4; 52.49 u/L, respectively) with serum GGT levels. Other biochemical variables except total, LDL, HDL cholesterol levels revealed some significant differences with increasing serum GGT.

Table 2. Quartiles of serum GGT and biochemical parameters in men being adjusted for age and body mass index

	Serum GGT (U/L)			
	Quartile 1 (8.00-21.00)	Quartile 2 (21.01-38.00)	Quartile 3 (38.01-67.00)	Quartile 4 (>67.01)
N	62	67	66	65
Systolic blood pressure, mmHg	125.3 (1.93)	129.6 (1.71)	135.1 (1.91) ^{a,b}	137.3 (1.82) ^{a,b}
Diastolic blood pressure, mmHg	77.12 (1.24)	81.20 (1.18) ^a	84.07 (1.29) ^a	85.51 (1.36) ^{a,b}
Total cholesterol, mg/dL	209.3 (6.89)	212.5 (3.69)	214.3 (7.23)	217.9 (4.96)
LDL cholesterol, mg/dL	127.7 (4.12)	137.2 (3.49)	136.0 (6.14)	132.5 (4.79)
HDL cholesterol, mg/dL	54.83 (1.58)	53.32 (1.39)	51.86 (1.48)	52.44 (2.30)
Triglyceride, mg/dL	95.29 (5.190)	116.2 (6.91)	134.9 (9.17) ^a	215.8 (16.48) ^{a,b,c}
Aspartate aminotransferase (AST), U/L	25.30 (1.01)	23.64 (0.72)	28.69 (1.25) ^b	41.80 (2.94) ^{a,b,c}
Alanine aminotransferase (ALT), U/L	18.25 (1.02)	22.34 (1.13)	32.95 (2.08) ^{a,b}	52.49 (4.52) ^{a,b,c}
Glucose, mg/dL	89.96 (5.24)	93.64 (3.43)	90.18 (1.50)	100.86 (4.43)

^{a,b,c} significant different from quartile 1, 2, and 3, respectively; p<0.05

From above data, serum GGT level was purposed as a good representative parameter of alcohol intake. Further analysis related to quantity of alcohol consumption classified as light, moderate, and high drinkers was performed by Pearson's correlation for relationship between serum GGT levels, blood pressure, lipid profile, liver enzymes and

glucoses (Table 3). In moderate drinkers, the positive correlation between serum GGT and SBP ($p=0.028$) was found whereas in high drinkers, SBP, triglyceride and ALT levels were statistically increased with serum GGT levels ($p=0.019$, 0.033 , and 0.047 , respectively).

Table 3. Pearson's Correlation (p value) between serum GGT levels in different types of drinkers and other targeted parameters.

	Serum GGT (U/L)		
	Light drinkers (n= 34)	Moderate drinkers (n=46)	High drinkers (n=50)
SBP (mmHg)	NS	0.028	0.019
DBP (mmHg)	NS	NS	NS
Total cholesterol, mg/dL	NS	NS	NS
LDL cholesterol, mg/dL	NS	NS	NS
HDL cholesterol, mg/dL	NS	NS	NS
Triglyceride, mg/dL	NS	NS	0.033
Aspartate aminotransferase (AST), U/L	NS	NS	NS
Alanine aminotransferase (ALT), U/L	NS	NS	0.047
Glucose, mg/dL	NS	NS	NS

NS = non-significance

Hypertension was defined as a SBP $\geq$ 140 mmHg and/ or a DBP $\geq$ 90 mmHg. An elevated serum GGT concentration is a risk factor for hypertension. The risk of developing both abnormal SBP and DBP values among 3 groups of alcohol consumption increased with

abnormal GGT value $\geq$ 50U/L (Table 4). The highest incident of hypertension was found in drinkers followed by ex-drinkers and non-drinkers (abnormal SBP; drinkers 37.79%, ex-drinker 13.39% and non-drinkers 5.51% and abnormal DBP; drinkers 28.35%, ex-drinker

9.45% and non-drinkers 5.51%, respectively). Further analysis stratified by serum GGT level, current drinkers with abnormal GGT value ≥ 50 U/L showed the

highest incident of hypertension among three alcohol groups (22.05% for abnormal SBP and 16.19% for abnormal DBP).

Table 4. Incidence of hypertension by level of serum GGT among 260 men

Alcohol consumption	All subjects		GGT level			
	SBP ≥ 140 mmHg (%)	DBP ≥ 90 mmHg (%)	< 50 U/L		≥ 50 U/L	
			SBP ≥ 140 mmHg (%)	DBP ≥ 90 mmHg (%)	SBP ≥ 140 mmHg (%)	DBP ≥ 90 mmHg (%)
Non-drinkers	5.51	5.51	3.57	3.57	1.94	1.94
Ex-drinkers	13.39	9.45	7.94	6.56	5.45	2.89
Drinkers	37.79	28.35	15.74	12.16	22.05	16.19

Discussion

The finding of this cross-sectional, population-based study indicated that alcohol consumption was associated with significantly higher hepatic enzyme levels. Serum activities of GGT, AST and ALT showed strong evidences with alcohol consumption. These enzyme levels were significantly higher in current drinkers than ex-drinkers and non-drinkers. The most significant increase was found for GGT, followed by AST and ALT (Table 1) with similar to previous report by Stranges, et al.⁸. There was substantial evidence supporting that GGT seemed to be the sensitive hepatic biomarkers most strongly related to alcohol intake⁹, whereas some studies reported that other factors such as obesity and body fat distribution, rather than alcohol consumption seemed to be stronger determinants of ALT and AST^{10,11}. However, elevation in serum hepatic enzymes among drinkers may result from an increased liver cell membrane permeability and cell necrosis. These hepatic enzymes are

traditional biomarkers routinely used in assessing the extent hepatic inflammation or injuries and the adverse health effect of alcohol on liver function. Further analysis as quartiles of serum GGT levels, our results demonstrated the closed link of serum GGT, AST and ALT activities, similar to study by Alatalo et al.¹². The authors showed that the amount of self-reported ethanol intake correlated significantly with serum GGT, AST, ALT and ferritin. Among these biomarkers, GGT was found to correlate strongly with AST ($r=0.42$), ALT ($r=0.53$); AST and ALT ($r=0.62$)¹².

Light and moderate alcohol consumption was usually associated with a reduced risk for atherosclerosis and coronary artery disease (CAD), whereas heavy drinkers were at an increased risk. The major mechanism appeared to be the well known ability of alcohol to raise HDL-C concentration. Relationship between the consumption of alcoholic beverage and lipid profile was mentioned in previous studies^{13,14}. The levels of HDL-C, LDL-C and TG

among participant in this study were also influenced by alcohol intake. Serum HDL-C and TG significantly increased, on the other hand serum LDL-C significantly decreased in drinkers compared to ex-drinkers and non-drinkers (Table 1). The increase in plasma HDL-C with moderate alcohol intake resulted from increased transport rate of the major apolipoproteins apo A-I and -II¹⁵. In addition, a daily dose of 30 g alcohol resulted in increases 3.99 mg/dL HDL-C level, and 8.82 mg/dL apo A-I¹⁶. Our results showed a relationship between alcohol and increased TG level, with similar to other studies^{13,14}. In contrast, an Italian study showed no significant association between alcohol and TG concentration¹⁷. The possible explanations may be differences in dietary and alcohol patterns and in ethnicity related to genetic factor in lipid metabolism. For LDL-C, its slope significantly decreased as alcohol intake increased ($p = 0.002$) which the authors suggested that the mechanism of how alcohol intake decreased the risk for increased LDL-C remained to be elucidated¹⁸. One plausible explanation was that alcohol might decrease the conversion of the very-low-density lipoprotein (VLDL) to LDL apo B or accelerate the clearance of LDL apo B¹⁸. In addition, elevated GGT has been linked to triglyceride accumulation¹⁹.

A close association between the volume of alcohol consumed and blood pressure level, concurrent with increased serum GGT with hypertension were observed by many researchers^{1,3,4}. In clinical practice, serum GGT has been used as a marker for assessment of excessive alcohol consumption, liver disease and cardiovascular risk factors (such as diabetes and hypertension). If the hypothesis that serum GGT reflected the individual susceptibility to the pressor effect of alcohol

was correct, the alcohol-increased SBP and DBP relation should be different in the individuals with different serum GGT levels. From this present study, there was a trend toward an increase in the relative risk of the hypertension according to alcohol consumption, as seen in Table 1 and 2. The incidence of hypertension was higher in subjects with serum GGT level of 50 U/L or over, compare with the subjects with serum GGT below 50 U/L (Table 3). These findings agreed with a report by Yamada et al. that found a significantly higher blood pressure and a higher prevalence of hypertension in the subjects with elevated serum GGT levels in comparison with those with normal serum GGT levels¹. This association may be a mechanism underlying an important role of GGT enzyme in antioxidant systems with response to oxidative stress, marking increase transport of glutathione to cell⁴. The result from this study suggested that serum GGT level could be proposed as a clinical parameter to predict alcohol drinkers with high risk for the development of hypertension.

The present study was a cross-sectional study to investigate the association between alcohol consumption and the alteration of serum GGT influencing on risk of hypertension. However, our study has some limitations similar to other previous reports related to alcohol drinking. These issue included heavy and/or adverse health-drinkers with less likely to participate in this study, underreport alcohol consumption, uncontrolled confounding factors related to liver function test and/ or cardiovascular disease, and lack of genetic study with identify susceptibility to adverse health effects. Further investigations with a large sample size with cover a broad range of potential confounding factors as well

as genetic polymorphisms of enzymes related to alcohol metabolism are warranted.

References

1. Yamada Y, Ishizaki M, Kido T, et al. Alcohol, high blood pressure, and serum δ -glutamyl transpeptidase level. *Hypertension* 1991;18:819-26.
2. Nemesanzky E, Lott JA. γ -glutamyl transpeptidase and its isoenzyme : progress and problem. *Clin Chem*. 1985;31:797-803.
3. Kim DJ, Noh JH, Lee BW, et al. Serum γ -glutamyltransferase with its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005;22:1134-40.
4. Lee DH, Ha MH, Kim JR, et al. Gamma-glutamyltransferase, alcohol, and blood pressure: a four year follow-up study. *Ann Epidemiol* 2002;12:90-6.
5. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects Ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem* 2001 ;276:3798-804.
6. World Health Organization. WHO global status report on alcohol 2004 Available at: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf. 2004. Accessed April 10, 2012.
7. Assanangkornchai S, Sam-Angsri N, Rerngpongpan S, Lertnakorn A. Patterns of alcohol consumption in the Thai population: results of the National Household Survey of 2007. *Alcohol Alcohol* 2010;45:278-85.
8. Stranges S, Freudenheim JL, Muti P, et al. Differential effects of alcohol drinking pattern on liver enzymes in men and women. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:949-56.
9. Sillanaukee P, Ponnio M, Allen JP, et al. Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population. *Am J Epidemiol* 2000;152:747-51.
10. Lee DH, Ha MH, Christiani DC. Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity-a 4-year follow-up study. *Int J Epidemiol* 2001;30:766-70.
11. Stranges S, Dorm JM, Muti P, et al. Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels : a population-based study. *Hepatology* 2004;39:754-63.
12. Alatalo P, Koivisto H, Puukka K, et al. Biomarkers of liver status in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol Alcohol* 2009;44:199-203.
13. Park H, Kim K. Relationship between alcohol consumption and serum lipid levels in elderly Korean men. *Arch Gerontol Geriatr* 2011 Sep 16. [Epub ahead of print]
14. Park H, Kim K. Association of alcohol consumption with lipid profile in hypertensive men. *Alcohol Alcohol* 2012; Feb 26. [Epub ahead of print]
15. De Oliveira E Silva ER, Foster D, McGee Harper M, et al. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 2000 ;102:2347-52.
16. Rim EB, William P, Fosher K, et al. Moderate alcohol intake and lower coronary heart disease: meta-analysis of

-
- effect on lipid and homeostatic factors. *Br Med J* 1999;319:1523-8.
17. Buja A, Scafato E, Sergi G, et al. Alcohol consumption and metabolic syndrome in the elderly: results from the Italian longitudinal study on aging. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:297-307.
18. Nakanishi N, Yoshida H, Nakamura K, et al. Influence of alcohol intake on risk for increases low-density lipoprotein cholesterol in middle-aged Japanese men. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1046-50.
19. Turgut O, Tandogan L, Gurlek A. Association of [gamma]-glutamyltransferase with cardiovascular risk: A prognostic outlook. *Arch Med Res* 2009;40:318-20.