



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ยีน *transcription factor 7 like 2 (TCF7L2)*

ในผู้ป่วยไทยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

(Analysis of *transcription factor 7 like 2 (TCF7L2)* variants in
Thai patients with type 2 diabetes)

โดย

ดร.วทีพย์ ตั้งจิตติโกคิน และคณะ

เสร็จสิ้นโครงการมีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการวิเคราะห์ยีน *transcription factor 7 like 2*
(*TCF7L2*) ในผู้ป่วยไทยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

ดร.วทีพย์ ตั้งจิตติโกคิน

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การวิเคราะห์ยีน transcription factor 7 like 2 (*TCF7L2*) ในผู้ป่วยไทย โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Analysis of transcription factor 7 like 2 (*TCF7L2*) variants in Thai patients with type 2 diabetes) ได้รับทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (Project code: TRG5280002) ประจำปี 2552 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลที่ได้ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ ผศ. พญ. มยุรี หอมสนิท ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือด รวมทั้งศ. พญ. นภาพร บานชื่น รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยมหิดล และอดีตหัวหน้าภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่ดียิ่ง จนกระทั่งคณะผู้วิจัยสามารถทำการวิจัยได้สมบูรณ์

ดร.วทิพย์ ตั้งจิตติโกคิน

และคณะผู้ร่วมวิจัย

Abstract

Project Code: TRG5280002

Project Title: Analysis of *transcription factor 7 like 2 (TCF7L2)* variants in Thai patients with type 2 diabetes

Investigator: Watip Tangjittipokin, Ph.D

Department of Immunology, Siriraj hospital, Mahidol university

E-mail: siwtb@mahidol.ac.th

Project Period: 2 year

Type 2 diabetes (T2D) is the most frequent form of diabetes accounting for 90% of all diabetes cases. It is a genetically heterogeneous disease resulting from defects or variations of single or multiple genetic loci. T2D has become a health problem world-wide and its underlying molecular mechanisms remains poorly understood. The recent success of the genome-wide association studies (GWAS) by genotyping for a high density SNPs across the genome and the methods of complex genetic analyses have identified several novel genes. GWAS have showed that *TCF7L2* has been the most important locus predisposing to T2D. Genetic polymorphism of the *TCF7L2* is one of the few validated variants with large effects on the risk of type 2 diabetes in the populations of European ancestry. *Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)* is a key element of the Wnt signaling pathway. We aim to investigate whether the variants in *TCF7L2* are associated with T2D in Thai population. Five SNPs, (rs7896340, rs7901695, rs7903146, rs12255372 and rs11196205) were genotyped in T2D patients (n=202) and ethnically matched control subjects (n=205) by high resolution melting (HRM) analysis. The associations of SNPs, haplotypes with T2D and clinical characteristics of the patients were analyzed. SNPs rs7896340 and rs11196205 of the *TCF7L2* were associated with T2D in Thai population (p=0.023, dominant inheritance). The odds ratios (ORs) was 1.89 for the minor allele (95% CI 1.08-3.3) compared with the major allele. The haplotypes composed of GG minor allele of these two SNPs were also significantly associated with type 2 diabetes with ORs 1.89 [95% CI 1.12-3.19, p=0.018 (global p-value=0.013)]. Moreover, patients who carried minor allele of these two SNPs had earlier age onset of diabetes (AA=50.32±10.78 year, AG+GG=45.51±10.52 year, p=0.012). These data suggested that the *TCF7L2* polymorphisms are associated with type 2 diabetes and earlier age onset of the disease in the Thai population.

Keywords : Type 2 diabetes, *TCF7L2*, Thai

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5280002

ชื่อโครงการ: การวิเคราะห์ยีน *transcription factor 7 like 2 (TCF7L2)* ในผู้ป่วยไทยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

ชื่อหลักวิจัย: ดร. วทิพย์ ตั้งจิตติโกนิน

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail: siwtb@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิตและทุพพลภาพจากโรคแทรกซ้อน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคที่พบได้บ่อยประมาณ 90% ของโรคเบาหวานทั้งหมด โดยมีสาเหตุมาจากความผิดปกติทางพันธุกรรมยีนเดี่ยวหรือหลายยีน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 กลายเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก แต่ยังไม่ทราบกลไกในการก่อโรคที่แน่ชัด จากการศึกษา Genome wide association เพื่อหายีนก่อโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ผ่านมาพบว่า ยีน *TCF7L2* เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากที่สุดในประชากรกลุ่ม Caucasian โดยพบว่าความแปรผันมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้มีการศึกษายีนนี้ในอีกหลายกลุ่มประชากร ซึ่งผลที่ได้ตรงกันคือยีน *TCF7L2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อย่างไรก็ตามการศึกษายีน *TCF7L2* ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ชาวเอเชีย ซึ่งรวมถึงญี่ปุ่น, จีนและเกาหลีพบได้น้อยกว่าที่พบในประชากร Caucasian ส่วนในประชากรไทยยังไม่มีรายงาน

ยีน *TCF7L2* ซึ่งเป็นยีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับ beta-catenin ซึ่งมีสัญญาณมาจาก Wnt receptor โดยการจับนี้ส่งผลถึงการแสดงออกของยีนหลายยีนซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่เบต้าเซลล์และก่อให้เกิดโรคเบาหวานได้ในที่สุด

สำหรับโครงการวิจัยนี้จัดทำเพื่อหาว่าความหลากหลายที่พบในยีน *TCF7L2* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทยหรือไม่ โดยการหาความถี่ของความแปรผัน 5 ตำแหน่ง (rs7896340, rs7901695, rs7903146, rs12255372 และ rs11196205) เปรียบเทียบกันในกลุ่มประชากรปกติจำนวน 205 คนกับกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวน 202 คน โดยพบว่ามีสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลาย rs7896340 และ rs11196205 กับการเกิดโรคเบาหวานในประชากรไทย ด้วย p-value 0.023 ยิ่งไปกว่านั้นยังมีความสัมพันธ์กับอายุในการเกิดโรคอีกด้วย โดยพบว่าการที่มี major allele AA จะพบที่ช่วงอายุ 50.32 ± 10.78 ปี ในขณะที่มี minor allele AG+GG จะเกิดโรคในช่วงอายุที่น้อยกว่าคือ 45.51 ± 10.52 ปี ($p=0.012$)

คำหลัก : โรคเบาหวานชนิดที่ 2, ยีน *TCF7L2*, ไทย

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิตและทุพพลภาพจากโรคแทรกซ้อน จากการสำรวจประชากรไทยปีล่าสุด เมื่อพ.ศ. 2546-2547 พบอัตราความชุกของโรคเบาหวานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 14 ปีที่ผ่านมา คือระหว่างปี พ.ศ. 2534-2547 เพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 2.3 ในปีพ.ศ. 2534 เป็นร้อยละ 4.4 ในปีพ.ศ. 2539 และร้อยละ 6.9 ในปีพ.ศ. 2547 ซึ่งมีผลกระทบต่อภาระทางเศรษฐกิจในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานเป็นอย่างมาก

โรคเบาหวานแบ่งออกเป็นหลายชนิดตามเกณฑ์ของสมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association: ADA) โดยจำแนกออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 [Type 1 Diabetes mellitus (T1D)], โรคเบาหวานชนิดที่ 2 [Type 2 Diabetes mellitus (T2D)], โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ (Gestational Diabetes Mellitus) และโรคเบาหวานที่มีสาเหตุจำเพาะอื่นๆ (Other specific types of diabetes mellitus)

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบได้บ่อยที่สุดและเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีพยาธิกำเนิดหลากหลาย สาเหตุอาจเกิดได้จากความผิดปกติของยีนเดี่ยวหรือหลายยีนก็ได้ นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมและการดำเนินชีวิตยังมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคโดยเฉพาะในประชากรกลุ่มเสี่ยง (2). โรคเบาหวานชนิดนี้ได้กลายเป็นปัญหาสำคัญระดับโลก รวมทั้งประเทศไทย การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นแนวทางสำคัญที่จะนำไปสู่สาเหตุของโรค

ผู้ป่วยที่ควบคุมโรคเบาหวานไม่ได้จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนอันเกี่ยวเนื่องกับหลอดเลือดแดงซึ่งสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพและโรคได้กับหลายอวัยวะ การควบคุมน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้ใกล้เคียงปกติอย่างสม่ำเสมอสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆ ได้ ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่เกิดจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลายทำให้เกิดภาวะขาดอินซูลินโดยสมบูรณ์ (absolute insulin deficiency) ดังเช่นกรณีของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 จึงมีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการฉีดอินซูลินเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้ใกล้เคียงปกติ แต่กรณีของผู้ป่วยที่เบต้าเซลล์ของตับอ่อนไม่ได้ถูกทำลาย เช่น ในกรณีของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อาจสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้ใกล้เคียงปกติได้โดยไม่ต้องฉีดอินซูลิน

ผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวานทั้งโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และโดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นโรคเบาหวานที่พบได้บ่อยกว่าแบบอื่นๆ นอกจากนี้พบว่าโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยมีสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยที่มีบทบาทในการทำให้เกิดอาการแสดงของโรคในผู้ที่มีพันธุกรรมเสี่ยงต่อการเกิดโรค

ปัจจุบันการศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานเป็นการศึกษาความแปรผันของยีนที่เกี่ยวข้องในกลไกการเกิดโรค โดยการศึกษาจีโนมในแนวทางเพื่อค้นหาบริเวณของจีโนม (หรือบริเวณของโครโมโซม) ที่สัมพันธ์กับโรค (genome wide association) เป็นที่ยอมรับมากขึ้นเนื่องจากการเป็นการศึกษาที่ครอบคลุมบริเวณของโครโมโซมทั้งหมด ซึ่งสามารถตอบคำถามวิจัยได้ว่าบริเวณใดในโครโมโซมสัมพันธ์ไปกับการเกิดโรค อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวต้องใช้ปัจจัยการลงทุนค่อนข้างสูงทั้งด้านงบประมาณและการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนั้นแนวทางที่คณะผู้วิจัยเลือกใช้ในการศึกษานี้จึงเป็นการคัดเลือกความแปรผันของยีนที่มีความสัมพันธ์ต่อโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้จากการทำ genome wide association ของทั้งประชากรตะวันตกและประชากรเอเชียมาศึกษาในประชากรไทยโดยใช้กลุ่มตัวอย่างแบบสุ่มประมาณ 200 คน วิธีการนี้มีข้อดีคืองบประมาณและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้จะน้อยกว่าการทำ genome wide association โดยตรง และการศึกษาความแปรผันของยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ทำให้เห็นแนวโน้มของยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในประชากรไทยเปรียบเทียบกับประชากรอื่นจากความแตกต่างของ genetic background ที่แตกต่างกันของประชากรตะวันตกและประชากรเอเชียต่อความเสี่ยงต่อการเกิดโรค ดังนั้นผลลัพธ์จากการศึกษาในผู้ป่วยชาวไทยนี้จึงอาจแตกต่างจากที่พบในประชากรตะวันตก

ปัจจุบันพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ ยีน *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARG2; Pro12Ala; rs1801282)*, ยีน *insulin-like growth factor two binding protein 2 (IGF2BP2; rs4402960)*, ยีน *cyclin dependent kinase 5 (CDK5; rs7754840)*, ยีนที่เกี่ยวข้อง *zinc transporter* และ *solute carrier family 30 (SLC30A8; rs13266634)*, ยีน *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A; rs10811661)*, ยีน *hematopoietically expressed homeobox (HHEX; rs1111875)*, ยีน *transcription factor-7-like 2 (TCF7L2; rs10885409)*, ยีน *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11 (KCNJ11; rs5219)*, และยีน *fat mass obesity-associated (FTO; rs9939609)*.

จากการศึกษา Genome wide association เพื่อหายีนก่อโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ผ่านมาพบว่า ยีน *TCF7L2* เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากที่สุดในประชากรกลุ่ม Caucasian โดยพบว่าความแปรผัน DG10S478 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หลังจากการค้นพบในครั้งนี้ ได้มีการศึกษายีนนี้ในอีกหลายกลุ่มประชากร เช่น Finnish, UK, Dutch, Mexican Americans, Indian ซึ่งผลที่ได้ตรงกันคือยีน *TCF7L2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อย่างไรก็ตามการศึกษายีน *TCF7L2* ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ชาวเอเชีย ซึ่งรวมถึงญี่ปุ่น, จีนและเกาหลี พบว่าความถี่ของ risk allele ของ rs790146 น้อยกว่าที่พบในประชากร Caucasian อย่างไรก็ตามความหลากหลายที่พบในยีน *TCF7L2* ที่พบในประชากรเอเชียก็ยังพบว่าสัมพันธ์ไปกับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แต่ในสัดส่วนที่น้อยกว่าในประชากร Caucasian (Odd ratio (CI)=1.40 (1.25-156), $p<0.001$) ส่วนในประชากรไทยยังไม่มีรายงาน แต่จากข้อมูลที่กำลังมาอาจเป็นไปได้ว่ายีน *TCF7L2* อาจมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในชาวไทยแตกต่างออกไปเนื่องจากความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมอาจพบได้ในแต่ละเชื้อชาติ

โดยพบว่ายีน *TCF7L2* เป็นยีนที่พบว่าสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในหลายกลุ่มประชากร

นอกจากนี้ในอนาคตคณะผู้วิจัยยังวางแผนที่จะศึกษายีนก่อโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในผู้ป่วยชาวไทยโดยวิธี genome wide association โดยตรงซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปสู่การค้นพบยีนก่อโรคใหม่เพิ่มเติมเนื่องจากโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคพหุปัจจัย (multifactorial disease) ที่เกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บตัวอย่าง DNA ที่ดีและเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้มากขึ้น พร้อมทั้งการจัดเก็บและบริหารจัดการข้อมูลอย่างเป็นระบบเพื่อผลการทดลองตลอดจนการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุด

ทั้งนี้ความรู้ที่จะได้จากการศึกษานี้อาจก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่และอาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เพื่อการคิดหาวิธีป้องกันและรักษาโรคเบาหวานให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นได้ในอนาคต

สำหรับโครงการวิจัยนี้จัดทำเพื่อหาว่าความแปรผันที่พบในยีน *TCF7L2* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทยหรือไม่ โดยวิธีการ genotype ความหลากหลายที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในประชากรอื่น พร้อมทั้งหาความหลากหลายในประชากรไทยด้วยวิธี direct sequencing

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ

1.1 การคัดเลือกผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes: T2D)

ผู้ป่วย T2D คือผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานตามเกณฑ์ของสมาคมเบาหวานประเทศสหรัฐอเมริกา (The American Diabetes Association, ADA) กล่าวคือ

- 1) มีอาการของโรคเบาหวานร่วมกับระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาจากหลอดเลือดดำเวลาใดก็ตามมีค่า เท่ากับหรือมากกว่า 200 มก./ดล. (อาการของโรคเบาหวานได้แก่ ตื่นน้ำมาก, ปัสสาวะมาก และน้ำหนักตัวลดโดยไม่ทราบสาเหตุ)
- 2) ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาจากหลอดเลือดดำขณะอดอาหาร (fasting plasma glucose หรือ FPG) เท่ากับหรือมากกว่า 126 มก./ดล. (การอดอาหาร หมายถึง การงดรับประทานอาหาร หรือเครื่องดื่มที่ให้พลังงานเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชม.)
- 3) ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาจากหลอดเลือดดำที่เวลา 8 ชั่วโมง ในการตรวจ 75 gram oral glucose tolerance test (75 g OGTT) เท่ากับหรือมากกว่า 200 มก./ดล.)

ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการอธิบายอย่างละเอียดถึงความสำคัญ และความจำเป็น ตลอดจนประโยชน์ที่จะได้รับจากการเข้าร่วมโครงการวิจัย นอกจากนี้ยังสามารถซักถามข้อสงสัยที่มีได้อย่างเต็มที่จากผู้ทำการศึกษาวินิจฉัยจนกว่าจะมีความเข้าใจอย่างถ่องแท้ เมื่อตัดสินใจเข้าร่วมโครงการวิจัยผู้เข้าร่วมโครงการจะได้รับการปฏิบัติดังนี้

- 1) ผู้เข้าร่วมโครงการเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (inform consent)
- 2) ผู้ทำการศึกษาวินิจฉัยจะซักประวัติและตรวจร่างกายผู้เข้าร่วมโครงการโดยละเอียด รวมทั้งพงศาวลี (pedigree) ของผู้เข้าร่วมโครงการ
- 3) ผู้ทำการศึกษาวินิจฉัยจะขอตรวจเลือดจากหลอดเลือดดำส่วนปลายของผู้เข้าร่วมโครงการ (venous blood sampling from peripheral vein) ปริมาณ 15-20 มิลลิลิตร, ภายหลังจากอดอาหาร (รับประทานได้แต่น้ำเปล่า) มาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการตลอดจนสกัดสารพันธุกรรมจากเม็ดเลือดขาว
- 4) ข้อมูลจากข้อ 2 และ 3 จะถูกบันทึกใน Diabetes Mellitus Patient Record Form และ Diabetes Mellitus Patient Database

1.2 การคัดเลือกกลุ่มอาสาสมัครปกติเข้าร่วมโครงการ

กลุ่มอาสาสมัครปกติคือผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงกล่าวคือ

- 1) ไม่มีญาติระดับที่หนึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน
- 2) ไม่มีภาวะติดเชื้ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ก่อนทำการเจาะเลือด
- 3) ไม่ได้อยู่ในระยะสุดท้ายของโรคตับและไต
- 4) ไม่มีลักษณะของโรคออโตอิมมูน

- 5) ไม่มีภาวะความดันโลหิตสูง
- 6) ไม่มีประวัติโรคเมรั
- 7) ไม่ได้รับยาที่กระตุ้นหรือกดภูมิคุ้มกัน
- 8) ไม่ได้รับยาที่มีผลต่อระดับกลูโคสหรือกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน
- 9) มีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาจากหลอดเลือดดำขณะอดอาหารน้อยกว่า 100 mg/dl.

กลุ่มอาสาสมัครปกติที่เข้าร่วมโครงการจะได้รับการปฏิบัติตัวเช่นเดียวกับผู้ป่วย T2D โดยข้อมูลทั้งหมดจะถูกบันทึกไว้ใน Control Record Form

2. การเตรียมตัวอย่างตรวจและ DNA

ผู้เข้าร่วมโครงการจะถูกเจาะเลือดประมาณ 10-15 ml จากเส้นเลือดดำเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการในการหาระดับ plasma glucose, HbA_{1c}, serum total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, creatinine จาก serum

อีกส่วนของเลือดจากผู้ป่วยนำไปสกัด DNA โดย EDTA blood จะถูกผสมกับ RBC lysis buffer ในอัตราส่วน 3:1 จากนั้นนำมาปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที (ขั้นตอนการเติม RBC lysis buffer นี้จะทำซ้ำ 2 ครั้ง) RBCs ที่สลายแล้วจะถูกแยกทิ้งไป ส่วน WBCs จะถูกล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) แล้วนำไปปั่นเก็บใน screw-cap tube ขนาด 15 ml และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C

WBCs ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C จะถูกนำมาสกัดสาร DNA ที่อุณหภูมิห้อง โดยการสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐาน phenol chloroform extraction โดยการเติมสารละลาย Tris-EDTA (TE) 20:5 ประมาณ 4 ml ใน screw cap tube ดังกล่าวข้างต้น เขย่า tube จนกระทั่ง WBCs ละลายในสารละลาย TE จนหมด หลังจากนั้นเติมสารละลาย proteinase K (Promega, Madison, USA) ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาณ 200 µl ร่วมกับสารละลาย 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาณ 200 µl ลงในสารละลาย TE ดังกล่าว เขย่า tube เบา ๆ หลาย ๆ ครั้งแล้วนำไปไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C ชั่วข้ามคืน (Overnight) หลังจากนั้นจะเติมสารละลาย phenol และ chloroform-isoamyl alcohol (24:1) อย่างละ 2 ml ลงใน screw-cap tube เขย่า tube เบา ๆ นานประมาณ 3-5 นาที หรือจนเห็นสารละลายใน tube มีลักษณะเป็น homogeneous milk-like หลังจากนั้นนำ screw-cap tube ไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นสารละลายใน tube จะแยกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นบนหรือ aqueous phase จะเป็นชั้นที่มีสาร DNA อยู่ ส่วนชั้นล่างหรือ organic phase จะถูกดูดทิ้งไปโดย pasteur pipette จากนั้นเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาณ 4 ml ใน aqueous phase แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีอีกครั้งและใช้ pasteur pipette ดูด organic phase ทิ้งไปเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) และปั่นซ้ำอีกครั้ง DNA จะถูกแยกจาก aqueous phase ด้วยการตกตะกอนโดยเติมสารละลาย 4 M NaCl 1/10 ส่วน (ประมาณ 500 µl) และ absolute ethanol เย็น 2 ส่วน (ประมาณ 10 ml) เขย่าเบา ๆ และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ซึ่งจะทำให้เห็นตะกอนของ DNA (DNA pellet) ที่ก้นของ screw-cap tube ตะกอนดังกล่าว

จะถูกทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาละลายใหม่โดยการเติมน้ำกลั่น (distilled water) ประมาณ 500 µl หลังจากนั้นนำสารละลาย DNA ดังกล่าว 10 µl มาเติมน้ำกลั่น 990 µl (เจือจางในอัตราส่วน 1:100) แล้วนำไปวัด optical density (OD) โดยใช้แสงที่มีความยาวคลื่น 260 (OD 260) และ 280 (OD 280) นาโนเมตร (nm) ความบริสุทธิ์ของ DNA จะประเมินจากอัตราส่วนของ OD 260/OD 280 โดยถ้าค่าที่ได้ตั้งแต่ 1.8 ขึ้นไปแสดงถึง DNA มีความบริสุทธิ์สูง ส่วนความเข้มข้น (concentration) ของสารละลาย DNA คำนวณหาได้จากสูตร $OD\ 260 \times 50 \times \text{ความเจือจาง (dilution)}$ ของสารละลาย DNA

3. SNP genotyping

ทำการตรวจหา Common SNPs จำนวน 5 ตำแหน่ง โดยการวิเคราะห์ PCR product โดยดู melting curve หลักการคือ DNA สายคู่แต่ละคู่จะมีค่า T_m ที่ต่างกัน โดยความแตกต่างจะแปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของ DNA สายคู่ นั้นๆ แล้ววัดค่าการเปล่งแสงโดยเครื่อง LightCycler® 480 system (Roche Diagnostics Corporation) เปรียบเทียบ T_m ที่แตกต่างกันของ wild type และ SNP จากนั้น confirm ผลการ genotype ด้วยวิธี direct sequencing

4. Bi-directional sequencing

ส่วนของยีนในส่วนของ exons และ exon-intron junctions จะถูกนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทป์ด้วยวิธี direct sequencing โดยใช้ ABI Prism Big DYE™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Inc., California, USA) กล่าวคือ PCR products ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว 30-90 ng, terminator ready reaction mix 8 µl, primer 3.2 pmol และเติมน้ำกลั่นชนิด deionized จนได้ปริมาตรสุดท้าย 20 µl จากนั้นทำการขยายด้วยวิธี PCR โดยใช้ GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, California, USA) ในส่วนของ dye terminators ที่เกินจะถูกกำจัดออกโดยเติม 3M sodium acetate (NaOAc), pH 4.6 2 ml และ 100% ethanol 50 µl เพื่อตกตะกอน ทำการล้าง pellet ที่ได้ด้วย 70% ethanol 250 ml และทิ้งให้แห้งนานประมาณ 10-15 นาที นำตะกอนที่แห้งมาละลายอีกครั้งด้วย template suppression reagent (TSR) 25 µl แล้วนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และทำให้เย็นลงทันทีโดยใช้น้ำแข็งแล้ว load สู่ ABI 370 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc., California, USA) สัญญาณ fluorescent ที่ได้จากการทำ sequencing นี้จะถูกตรวจวัดโดยใช้ ABI collection software ส่วนการอ่านและวิเคราะห์ลำดับของเบสของ nucleotide (nucleotide sequence) จะใช้โปรแกรม Chromas 1.44

5. Data analysis

ค่าความถี่ของ genotype ของแต่ละ SNP จะถูกวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium โดยใช้ chi-square goodness-of-fit test และวิเคราะห์ Pair-wised linkage disequilibrium (LD) โดยใช้โปรแกรม Haploview version 3.2 นอกจากนี้ allele และ genotype จะถูกวิเคราะห์หาความแตกต่างในระหว่างกลุ่มประชากรผู้ป่วยและกลุ่มอาสาสมัครปกติด้วย logistic regression รวมถึงการวิเคราะห์หาความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยและกลุ่มอาสาสมัครปกติที่เข้าร่วมโครงการด้วย t-test รวมทั้งโดยค่าความถี่ Genotype และ allele ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มอาสาสมัครปกติจะถูกทำการวิเคราะห์โดยใช้ Chi-square test ที่ P-value ที่มีค่าน้อยกว่า 0.05 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS หรือ SAS การศึกษา Haplotypes association ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มอาสาสมัครปกติจะถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม HAPLO.SCORE ใน R software ซึ่งสามารถ download ได้ที่ URL (<http://www.biostat.wustl.edu/genetics/geneticssoft/manuals/haploscore/haplo.score.html>).

ผลการทดลอง

1. การรวบรวมอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ

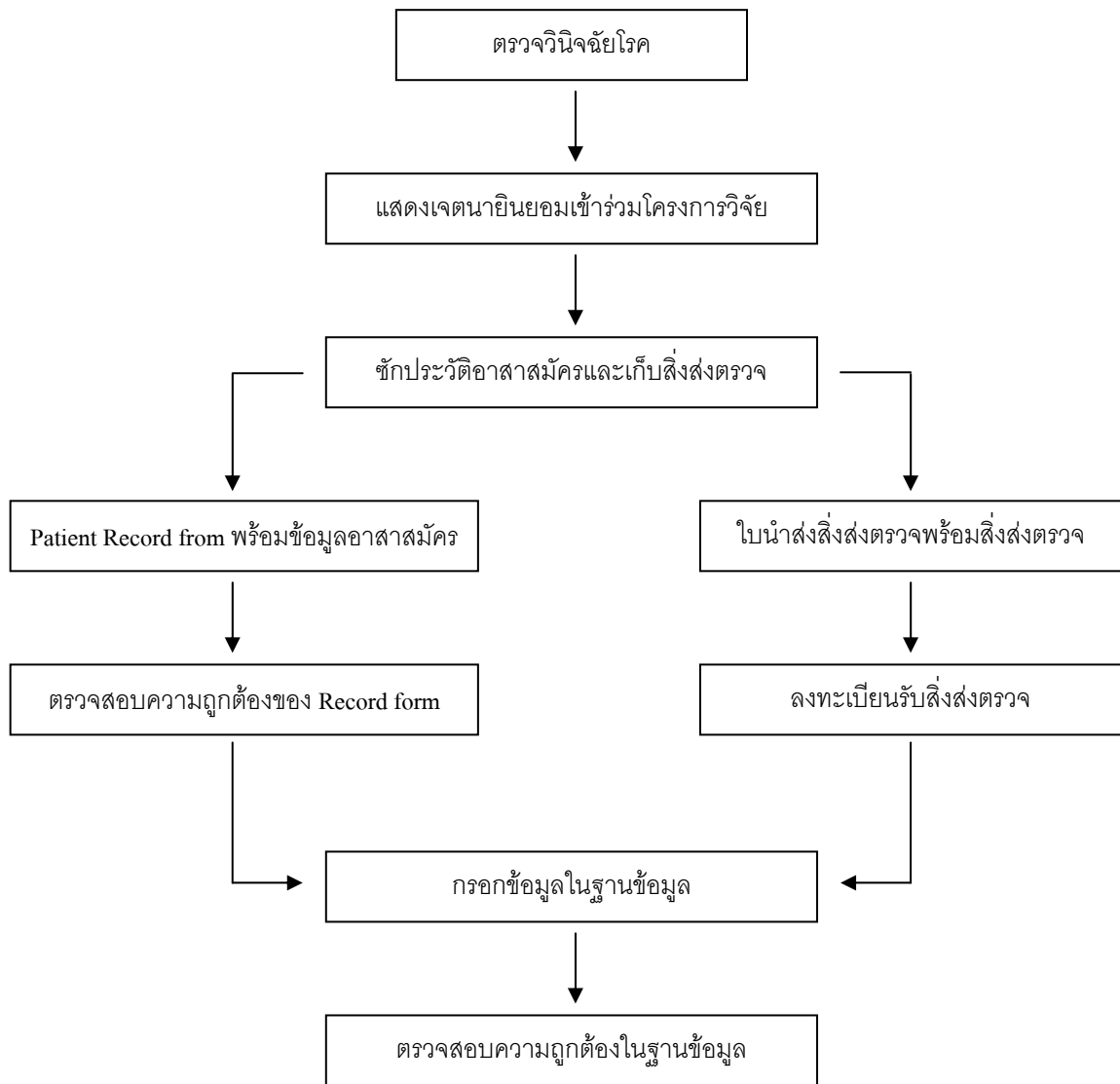
คณะผู้วิจัยได้รวบรวมอาสาสมัครผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ทั้งหมด 320 คนและกลุ่มอาสาสมัครปกติจำนวน 370 คน โดยอาสาสมัครทั้งหมดจะถูกซักประวัติและเก็บข้อมูลดังนี้ อายุ (years), BMI (kg/m²), น้ำหนัก (kg), ส่วนสูง (cm), รอบเอว (cm), รอบสะโพก (cm), Waist/Hip ratio, Systolic BP (mmHg), Diastolic BP (mmHg), FPG (mmol/l), Total cholesterol (mmol/l), Triglyceride (mmol/l), LDL-cholesterol (mmol/l), HDL-cholesterol (mmol/l)

2. การจัดทำฐานข้อมูลของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และกลุ่มอาสาสมัครปกติในประเทศไทยอย่างเป็นระบบ

2.1 การจัดเก็บข้อมูลในฐานข้อมูลของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

ระบบการจัดเก็บข้อมูลอาสาสมัครและการจัดเก็บสิ่งส่งตรวจ มีขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 กล่าวคือ เมื่อแพทย์วินิจฉัยว่าอาสาสมัครว่าเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แพทย์จะเป็นผู้ชักชวนให้อาสาสมัครดังกล่าวเข้าร่วมโครงการโดยอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย รวมถึงรายละเอียดต่างๆ ตามที่ระบุไว้ในเอกสารแนะนำสำหรับอาสาสมัครหรือผู้ป่วย (Participant information sheet) จากนั้นทีมงานที่ทำหน้าที่ซักประวัติและเก็บสิ่งส่งตรวจจะอธิบายขั้นตอนการเก็บสิ่งส่งตรวจ รวมทั้งข้อมูลที่อาสาสมัครต้องการทราบเกี่ยวกับงานวิจัยโดยละเอียดอีกครั้งหนึ่ง หลังจากอาสาสมัครเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการในหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยทางการแพทย์ (Inform consent) แล้ว ทีมงานจะซักประวัติอาสาสมัครรวมทั้งกรอกข้อมูลลงใน Diabetes Mellitus Patient Record form ซึ่งข้อมูลใน Record form ดังกล่าวจะถูกตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งโดยแพทย์ผู้วินิจฉัย ก่อนจะทำการกรอกข้อมูลลงในฐานข้อมูล Diabetes Mellitus Patient Database ดังแสดงตัวอย่างของฐานข้อมูล (database) นี้ในรูปที่ 3-5 ซึ่งในแต่ละหน้าของฐานข้อมูลจะต้องกรอกข้อมูลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ข้อมูลในฐานข้อมูลผู้ป่วยและข้อมูลใน Patient record form จะถูกตรวจสอบให้ตรงกันอีกครั้งโดยแพทย์ในทีม

EDTA blood และ clotted blood ที่เก็บจากอาสาสมัครจะถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการพร้อมใบนำส่งสิ่งส่งตรวจ ซึ่งเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการจะตรวจสอบความถูกต้องของชื่อและนามสกุลระหว่างสิ่งส่งตรวจกับใบนำส่งสิ่งส่งตรวจ แล้วจึงลงทะเบียนรับสิ่งส่งตรวจเหล่านั้นในสมุดบันทึกรายชื่ออาสาสมัคร จากนั้นสิ่งส่งตรวจจะถูกปั่นแยกส่วนพลาสมาและซีรัม แล้วทำการจัดเก็บตัวอย่างพลาสมาและซีรัมโดยระบุตำแหน่งการเก็บลงในสมุดลงทะเบียนพลาสมาและซีรัม ส่วน whole cells ที่เหลือจะถูกสกัด DNA ต่อไป

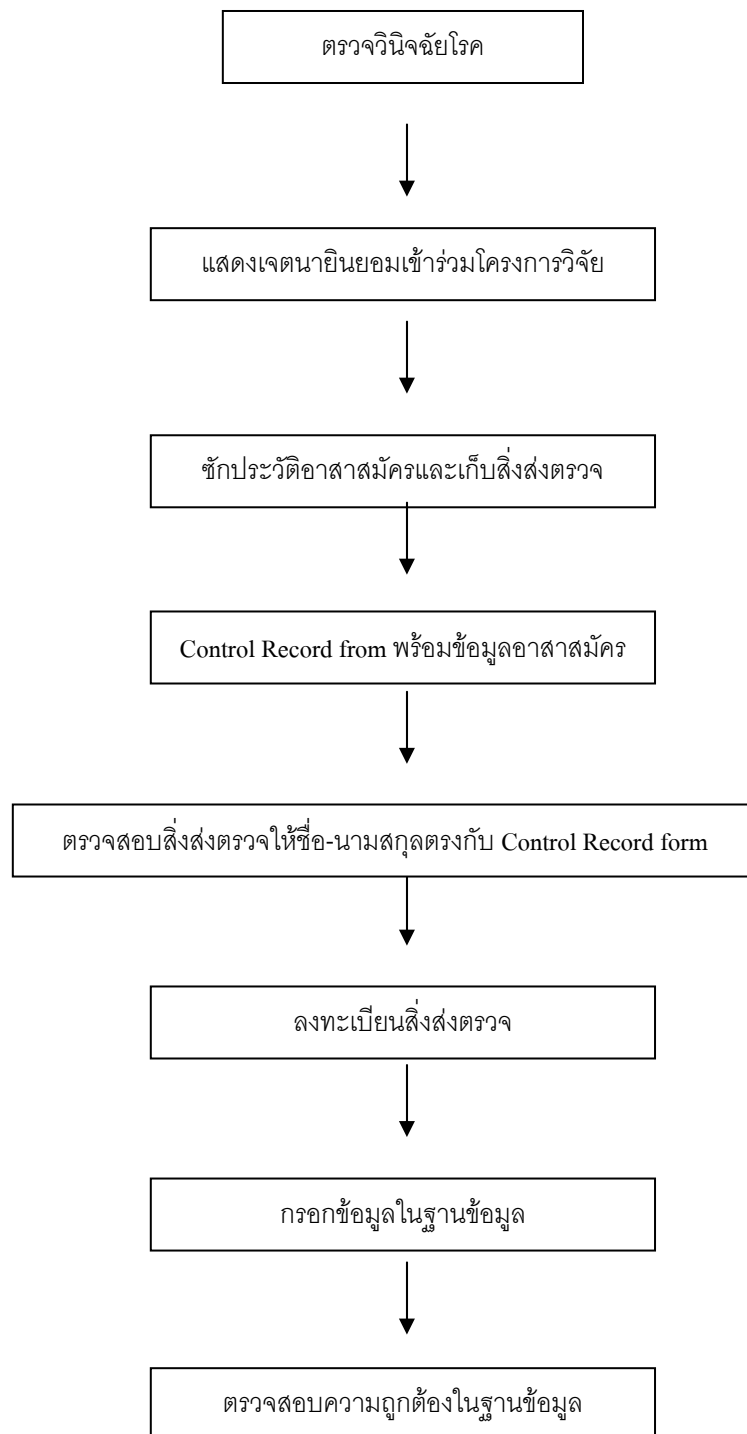


รูปที่ 1 แสดงระบบการจัดทำฐานข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

2.2 การจัดเก็บข้อมูลในฐานข้อมูลของกลุ่มอาสาสมัครปกติ

ระบบการจัดเก็บข้อมูลกลุ่มอาสาสมัครปกติ และการจัดเก็บสิ่งส่งตรวจ มีขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 ซึ่งแตกต่างจากการขั้นตอนการเก็บข้อมูลในฐานข้อมูลของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เล็กน้อย กล่าวคือ เมื่อแพทย์วินิจฉัยว่าอาสาสมัครไม่ใช่ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และมีคุณสมบัติจัดอยู่ในกลุ่มอาสาสมัครปกติ คณะผู้วิจัยจะเป็นผู้ชักชวนให้อาสาสมัครดังกล่าวเข้าร่วมโครงการโดยอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย รวมถึงรายละเอียดต่างๆ ตามที่ระบุไว้ในเอกสารแนะนำสำหรับอาสาสมัครหรือผู้ป่วย (Participant information sheet) จากนั้นทีมงานที่ทำหน้าที่ชักประวัติและเก็บสิ่งส่งตรวจจะอธิบายขั้นตอนการเก็บสิ่งส่งตรวจ รวมทั้งข้อมูลที่อาสาสมัครต้องการทราบเกี่ยวกับงานวิจัยโดยละเอียดอีกครั้งหนึ่ง หลังจากอาสาสมัครเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการในหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยทางการแพทย์ (Inform consent) แล้ว ทีมงานจะชักประวัติอาสาสมัครรวมทั้งกรอกข้อมูลลงใน Control Record form ซึ่งข้อมูลใน Record form ดังกล่าวจะถูกตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งโดยแพทย์ผู้วินิจฉัย ก่อนจะทำการกรอกข้อมูลลงในฐานข้อมูล Diabetes Mellitus Control Database ซึ่งจะคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Diabetes Mellitus Patient Database แต่จะแตกต่างกันในส่วนของ Medical history ตรงที่ชนิดของ Diagnosis กล่าวคือ ถ้าเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเลือกให้เป็น T1D หรือ T2D ตามชนิดของโรคที่ถูกวินิจฉัย ถ้าหากเป็นกลุ่มอาสาสมัครปกติจะเลือกให้เป็น CC1 หรือ CC2 ซึ่งจะแบ่งตามลักษณะการเก็บ เป็นต้น ทั้งนี้ข้อมูลในฐานข้อมูลกลุ่มอาสาสมัครปกติและข้อมูลใน Control record form จะถูกตรวจสอบให้ตรงกันอีกครั้งโดยแพทย์ในทีม

หลอด EDTA blood ซึ่งระบุชื่อและนามสกุล พร้อมทั้งวันที่ในการเก็บตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครจะถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการ โดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการจะตรวจสอบความถูกต้องของชื่อและนามสกุลที่แสดงไว้บนหลอดกับ Control record form ก่อนที่จะลงทะเบียนรับสิ่งส่งตรวจเหล่านั้นในสมุดบันทึกรายชื่ออาสาสมัคร จากนั้นสิ่งส่งตรวจจะถูกปั่นแยกส่วนพลาสมาและซีรัม แล้วทำการจัดเก็บตัวอย่างพลาสมาและซีรัมโดยระบุตำแหน่งการเก็บลงในสมุดลงทะเบียนพลาสมาและซีรัม ส่วน whole cells ที่เหลือจะถูกสกัด DNA (ตามขั้นตอนในหัวข้อ วิธีการทดลอง ข้อ 2) เช่นเดียวกับตัวอย่างเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ต่อไป



รูปที่ 2 แสดงระบบการจัดทำฐานข้อมูลกลุ่มอาสาสมัครปกติ

A. ข้อมูลทั่วไป

ระบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัครโครงการเบาหวาน - [ข้อมูลอาสาสมัคร]

เมนู Specimen ค้นหา Barcode รายงาน บันทึกการทำงาน

Subject Medical History Therapy Complication Blood Chemistry Pubertal status Specimen Gene

ข้อมูลทั่วไป DEMOGRAPHY1 DEMOGRAPHY2 DEMOGRAPHY3

รหัสอาสาสมัคร :

รหัสครอบครัว :

บัตรประชาชน :

Ward :

Hospital :

HN :

AN :

คำนำหน้าชื่อ :

ชื่อสกุล :

Proband :

ลบรูปภาพ

Date of Record :

mm/dd/yyyy

กรณกรรณกรรณกร

รหัสอาสาสมัคร :

ตรวจสอบ เพิ่มข้อมูล แก้ไขข้อมูล ยกเลิก บันทึก

B. DERMOGRAPHY 1

ระบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัครโครงการเบาหวาน - [ข้อมูลอาสาสมัคร]

เมนู Specimen ค้นหา Barcode รายงาน บันทึกการทำงาน

Subject Medical History Therapy Complication Blood Chemistry Pubertal status Specimen Gene

ข้อมูลทั่วไป DEMOGRAPHY1 DEMOGRAPHY2 DEMOGRAPHY3

Sex :

Status :

Race :

Others (please Specify) :

Age : Years Months Day

Birth Date :

mm/dd/yyyy

Birth Place (Please Specify) :

Birth weight :

Birth Place :

กรณกรรณกรรณกร

รหัสอาสาสมัคร :

ตรวจสอบ เพิ่มข้อมูล แก้ไขข้อมูล ยกเลิก บันทึก

รูปที่ 3 ตัวอย่างฐานข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด MODY ในส่วนของข้อมูลอาสาสมัคร (Subject) โดย A. ข้อมูลทั่วไป, B. DEMOGRAPHY 1, C. DEMOGRAPHY 2, และ D. DEMOGRAPHY 3

C. DEMOGRAPHY 2

ระบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัครโครงการเบาหวาน - [ข้อมูลอาสาสมัคร]

เบ็ก Specimen พิมพ์ Barcode รายงาน จนการทำงาน

Subject Medical History Therapy Complication Blood Chemistry Pubertal status Specimen Gene

ข้อมูลทั่วไป DEMOGRAPHY1 DEMOGRAPHY2 DEMOGRAPHY3

Height : cm Waist : cm BP : Systolic

Weight : kg Hip : cm Diastolic

BMI : (kg/m2) Waist/Hip ratio : mmHg

Residence

Address : Amphur :

Province : Post code :

Tel.(office) : Mobile :

Tel.(home) : Fax :

E-mail :

Residence (within 5 years) :

กรณกรนอกข้อมูล

รหัสอาสาสมัคร :

ตรวจสอบ เพิ่มข้อมูล แก้ไขข้อมูล ยกเลิก บันทึก

D. DEMOGRAPHY 3

ระบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัครโครงการเบาหวาน - [ข้อมูลอาสาสมัคร]

เบ็ก Specimen พิมพ์ Barcode รายงาน จนการทำงาน

Subject Medical History Therapy Complication Blood Chemistry Pubertal status Specimen Gene

ข้อมูลทั่วไป DEMOGRAPHY1 DEMOGRAPHY2 DEMOGRAPHY3

ลำดับญาติ :

สาเหตุการเสียชีวิต :

ประวัติการเจ็บป่วย :

การอยู่บ้านเดียวกับ Proband :

จำนวนบุตร :

ชื่อ-สกุล บิดา :

ชื่อ-สกุล มารดา :

กรณกรนอกข้อมูล

รหัสอาสาสมัคร :

ตรวจสอบ เพิ่มข้อมูล แก้ไขข้อมูล ยกเลิก บันทึก

รูปที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างฐานข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด MODY ในส่วนของข้อมูลอาสาสมัคร โดย A. ข้อมูลทั่วไป, B. DEMOGRAPHY 1, C. DEMOGRAPHY 2, และ D. DEMOGRAPHY 3

ระบบบันทึกข้อมูลทางคลินิก - [Medical History]

เมนู Specimen พิมพ์ Barcode รายงาน บันทึกการทำงาน

Subject Medical History Therapy Complication Blood Chemistry Pubertal status Specimen Gene

รหัสสาขาสังเคราะห์

Diagnosis

Type :

At Diagnosis : age Date :

At Onset : age Date :

Presenting symptoms :
(Please Specify)

History of ketoacidosis

Ketonuria

Positive Anti-GAD antibody u

Positive Anti-IA2 antibody u

ล้างรายการ บันทึก ปรับปรุง

รูปที่ 4 ตัวอย่างฐานข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด MODY ในส่วนของ Medical History

ระบบบันทึกข้อมูลทางคลินิก - [Blood Chemistry]

เมนู Specimen พิมพ์ Barcode รายงาน บันทึกการทำงาน

Subject Medical History Therapy Complication Blood Chemistry Pubertal status Specimen Gene

ข้อมูลสาขาสังเคราะห์

รหัสสาขาสังเคราะห์

Blood Chemistry

Test	Result	Date of Result
FPG	(mg/dl)	
Random PG	(mg/dl)	
HbA1c	(mg/dl)	
Insulin	(mU/ml)	
C-peptide	(ng/dl)	
Cr	(mg/dl)	
TC	(mg/dl)	
TG	(mg/dl)	
LDL-C	(mg/dl)	
HDL-C	(mg/dl)	

แก้ไข
ล้างรายการ
บันทึก

รูปที่ 5 ตัวอย่างฐานข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด MODY ในส่วนของ Blood Chemistry

3. การศึกษาความสัมพันธ์แบบ multi-locus analysis ของ SNP ของยีน *TCF7L2* ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับอาสาสมัครปกติ

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาความแปรผันในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ทั้งหมด 320 คนและกลุ่มอาสาสมัครปกติจำนวน 370 คน และเนื่องจากความครบถ้วนและความถูกต้องของข้อมูลทั้งในด้านคลินิกและ DNA ทำให้สามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์ได้จากกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวน 205 คนและกลุ่มอาสาสมัครปกติจำนวน 202 คนดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าประชากรของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันในเรื่องของระดับน้ำตาล ไขมันและความอ้วน

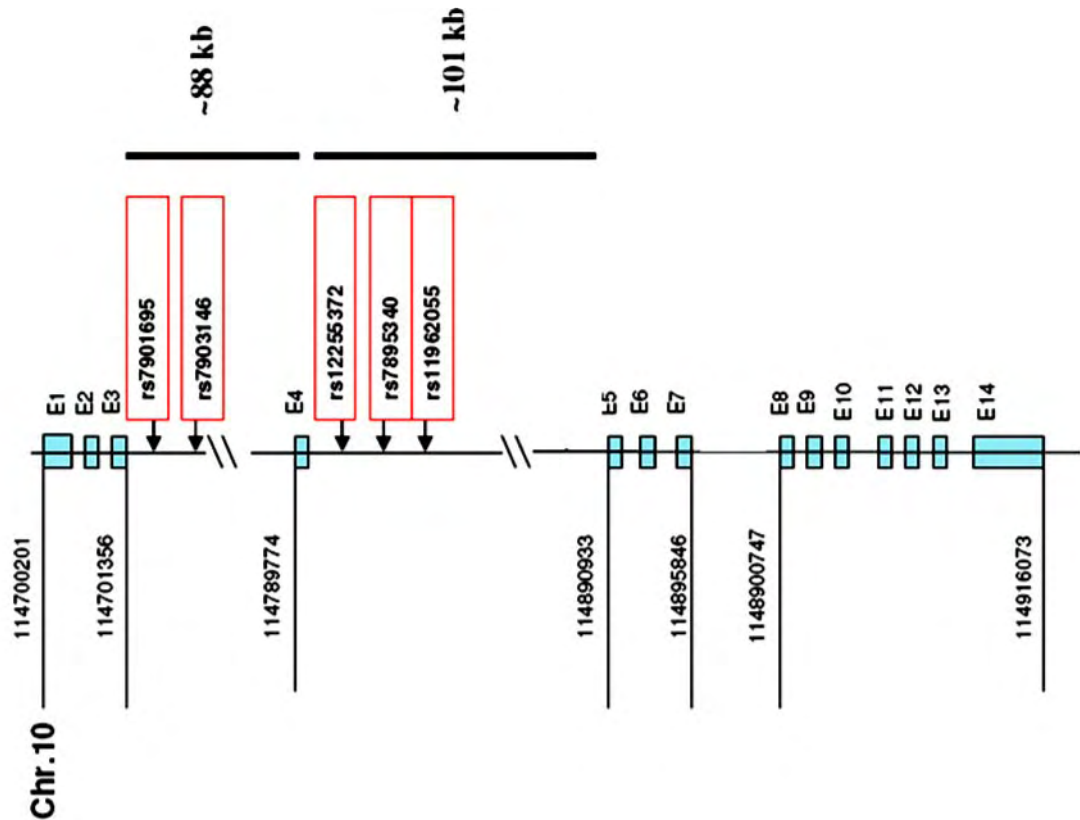
ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับอาสาสมัครปกติ

	Control	Case	p value
N	202	205	
Men (%)	28.29	28.71	0.9254
Age (years)	53.34 ± 9.06	53.75 ± 11.00	0.6776
BMI (kg/m ²)	23.85 ± 3.20	28.02 ± 5.53	2.49x10 ⁻¹⁸
Weight (kg)	59.08 ± 9.83	69.76 ± 15.33	1.69x10 ⁻¹⁵
Waist (cm)	82.24 ± 9.29	88.27 ± 12.14	3.77x10 ⁻⁸
Hip (cm)	95.53 ± 7.01	99.21 ± 10.99	7.21x10 ⁻⁵
Waist/Hip ratio	0.86 ± 0.06	0.89 ± 0.08	1.14x10 ⁻⁵
Systolic BP (mmHg)	116.00 ± 14.86	133.09 ± 17.91	9.19x10 ⁻²³
Diastolic BP (mmHg)	71.27 ± 9.90	81.43 ± 10.40	1.7x10 ⁻²¹
FPG (mmol/l)	87.88 ± 6.38	206.75 ± 98.93	5.42x10 ⁻⁴¹
Total cholesterol (mmol/l)	205.74 ± 36.27	228.08 ± 49.08	3.03x10 ⁻⁷
Triglyceride (mmol/l)	110.15 ± 59.69	205.13 ± 17.57	8.14x10 ⁻⁹
LDL (mmol/l)	124.83 ± 33.26	144.15 ± 43.73	8.37x10 ⁻⁷
HDL (mmol/l)	62.02 ± 17.31	50.28 ± 14.44	6.7x10 ⁻¹³

4. การตรวจหา SNP ของยีน *TCF7L2* ด้วยวิธี HRM และ RFLP และยืนยันผลด้วยวิธี

Direct Sequencing

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจหา Common SNPs จำนวน 5 ตำแหน่งคือ rs7901695, rs7903146, rs12256372, rs7895340, และ rs11962055 โดยทั้งหมดอยู่ในส่วน intron ของยีน *TCF7L2* ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของ SNP ทั้ง 5 ตำแหน่งในกรอบสี่เหลี่ยมบนยีน *TCF7L2*

4.1 การ genotype SNP rs7901695, rs7895340 และ rs1196205 ด้วยวิธี High resolution melting analysis (HRM)

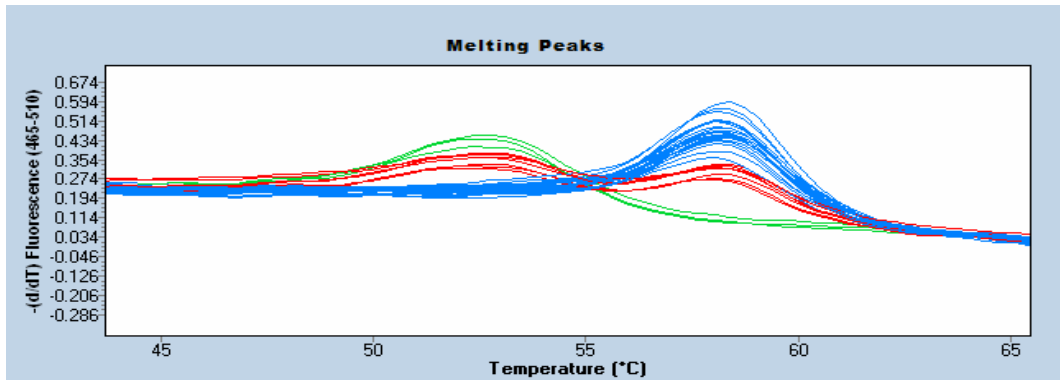
ทำการตรวจหา Common SNPs ทั้ง 3 ตำแหน่ง ด้วยวิธี High resolution melting analysis (HRM) โดยการทำให้ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งใช้ปริมาณ DNA template 75 ng, 25 mM MgCl₂ 1.2 µl, 50 µM L-primer 0.1 µl, 50 µM R-primer 0.1 µl, 10 µM Simple Probe 0.2 µl, Genotyping master 1 µl และใส่ sterile deionized water ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 µl หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ PCR product โดยดู melting curve ของ DNA สายคู่แต่ละคู่ที่มีค่า T_m ที่ต่างกัน โดยใช้ probe ที่จำเพาะกับชนิดของ SNP นั้นๆ แล้ววัดค่าการเปล่งแสงโดยเครื่อง LightCycler® 480 system (Roche Diagnostics Corporation) เปรียบเทียบ T_m ที่แตกต่างกันของ wild type และ SNP

ตัวอย่างโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 7 โดย rs7901695 และ rs7895340 ใช้อุณหภูมิช่วง amplification 53°C ส่วน rs1196205 ใช้อุณหภูมิช่วง amplification 55°C และผลการทดลองการตรวจหา Common SNPs ทั้ง 3 ตำแหน่งดังแสดงในรูป 8

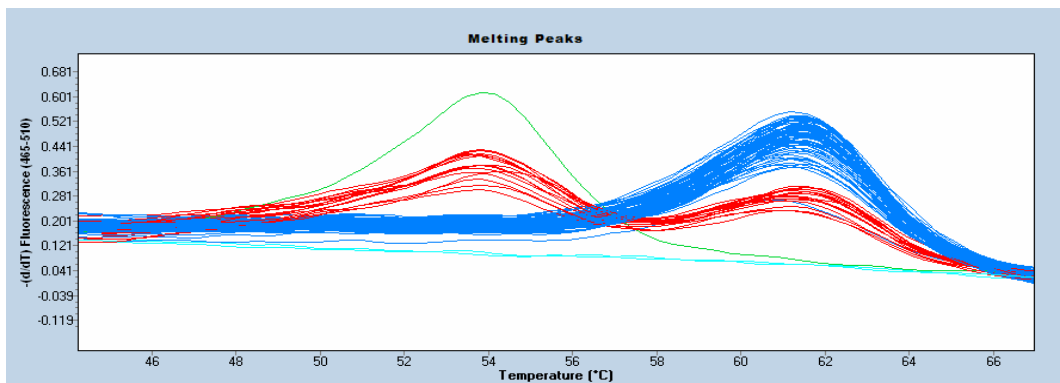
Programs							
Program Name	pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name	amplification						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
53	Single	00:00:10	2.20		48	0.5	1
72	None	00:00:10	4.40		0	0	0
Program Name	melting curve						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:01:00	4.40		0	0	0
52	None	00:01:00	2.20		0	0	0
40	None	00:01:00	2.20		0	0	0
85	Continuous		0.06	10	0	0	0
Program Name	cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

รูปที่ 7 แสดงโปรแกรมที่ใช้ในการตรวจหา Common SNPs ทั้ง 3 ตำแหน่ง ด้วยวิธี High resolution melting analysis (HRM) โดยเครื่อง LightCycler® 480 system (Roche Diagnostics Corporation)

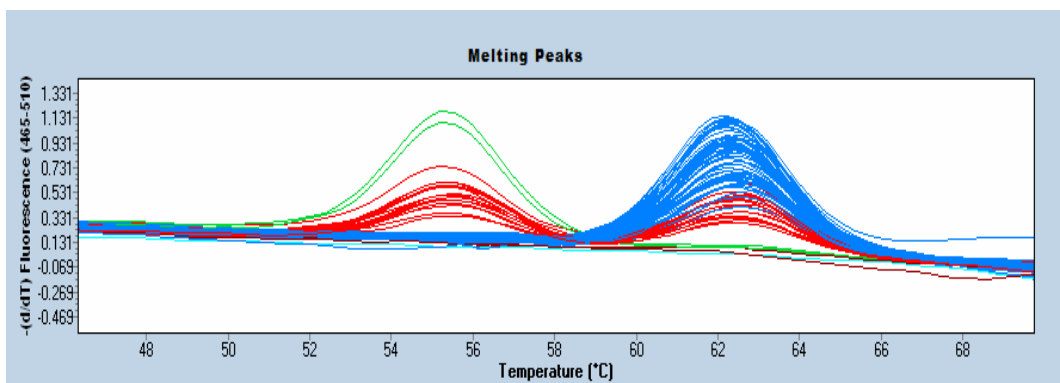
A. rs7901695



B. rs7895340



C. rs1196205

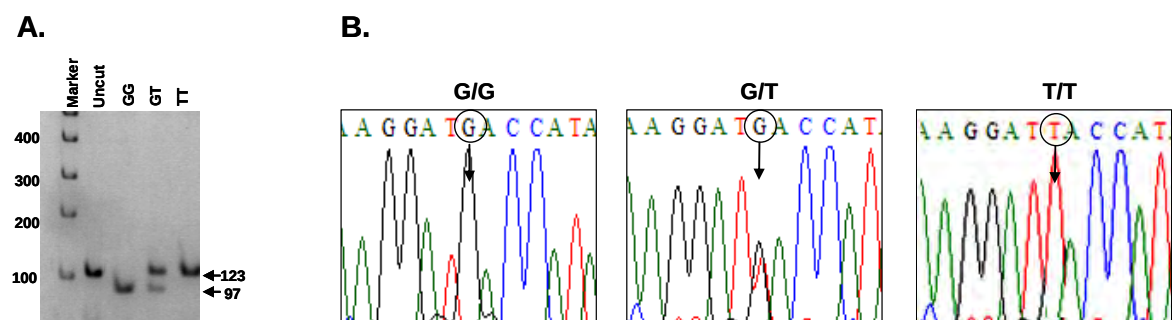


รูปที่ 8 แสดง melting peaks ซึ่ง plot ระหว่างสัญญาณแสง fluorescence และอุณหภูมิในการ genotype SNP rs7901695 (A.), rs7895340 (B.) และ rs1196205 (C.) บนยีน *TCF7L2* โดยใช้เทคนิค HRM ในการแยก genotype ระหว่าง wild type, heterozygote และ mutant

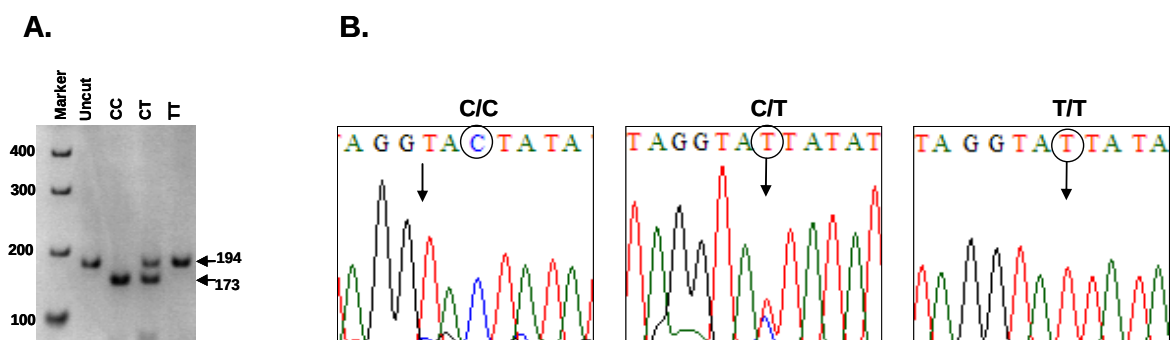
4.2 การ genotype SNP rs12255372 และ rs7903146 ด้วยวิธี Mismatch-Restriction fragment length polymorphism (Mismatch-RFLP) ใช้เอนไซม์ BseGI (FokI) และ RsaI ตามลำดับ โดย primer ที่ใช้และสภาวะที่เหมาะสมแสดงในตารางที่ 2 ส่วนผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9-10

ตารางที่ 2 แสดง primer และเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำ Mismatch-RFLP เพื่อ genotype rs12255372 ในยีน *TCF7L2*

Variation	Primer	Product size (bp)	PCR condition	Method	Size of restriction fragment (bp)	
			T. annealing (°C)		Major Allele	Minor Allele
rs12255372	CCAGGAATATCCAGGCAAGGAT	123	55	<i>FokI</i> Mismatch RFLP	26+97	123
	GGCATTCAAATGGAGGCTGA					
rs7903146	AGAGCTAAGCACTTTTATAGGT	194	50	<i>RsaI</i> Mismatch RFLP	21+173	194
	GATGAAATGTAGCAGTGAAGT					



รูปที่ 9 การ genotype rs12255372 ในยีน *TCF7L2* ด้วยวิธี Mismatch-RFLP (A.) และยืนยันผลด้วย Direct sequencing (B.)



รูปที่ 10 การ genotype rs7903146 ในยีน *TCF7L2* ด้วยวิธี Mismatch-RFLP (A.) และยืนยันผลด้วย Direct sequencing (B.)

5. การทดสอบด้วย Hardy-Weinberg Equilibrium test

คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ Common SNPs ทั้ง 5 ตำแหน่งว่าเป็นไปตาม Hardy-Weinberg Equilibrium หรือไม่ พบว่า SNP ทั้ง 5 ตำแหน่ง คือ rs7901695, rs7903146, rs12256372, rs7895340, และ rs11962055 เข้าตามกฎด้วย $p > 0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผล genotype distribution และ Hardy-Weinberg Equilibrium test

TCF7L2	Genotype Frequency			Chisquare test for HWE	
	Major	Hetero	Minor	χ^2 value	P value
rs7896340 (A>G)	AA	AG	GG		
Control	182 (181.70)	22 (22.60)	1 (0.70)	0.1422	0.7061
Case	163 (162.18)	36 (37.63)	3 (2.18)	0.3806	0.5373
Total	345 (343.68)	58 (60.65)	4 (2.68)	0.7762	0.3783
rs7901695 (C>T)	CC	CT	TT		
Control	181 (181.70)	24 (22.60)	0 (0.70)	0.7925	0.3733
Case	173 (171.27)	26 (29.47)	3 (1.27)	2.7940	0.0946
Total	354 (352.93)	50 (52.15)	3 (1.93)	0.6902	0.4061
rs7903146 (C>T)	CC	CT	TT		
Control	183 (183.54)	21 (19.92)	0 (0.54)	0.6007	0.4383
Case	172 (170.13)	24 (27.74)	3 (1.13)	3.6151	0.0573
Total	355 (353.61)	45 (47.77)	3 (1.61)	1.3578	0.2439
rs12255372 (G>T)	GG	GT	TT		
Control	191 (191.21)	13 (12.59)	0 (0.21)	0.2210	0.6383
Case	179 (177.66)	19 (21.68)	2 (0.66)	3.0512	0.0807
Total	370 (368.80)	32 (34.40)	2 (0.80)	1.9604	0.1615
rs11196205 (C>G)	CC	CG	GG		
Control	182 (181.70)	22 (22.60)	1 (0.70)	0.1422	0.7061
Case	163 (162.18)	36 (37.63)	3 (2.18)	0.3806	0.5373
Total	345 (343.68)	58 (60.65)	4 (2.68)	0.7762	0.3783

6. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน TCF7L2 และการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2

คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง Common SNPs จำนวน 5 ตำแหน่งกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เปรียบเทียบในกลุ่มอาสาสมัครปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษา Genotypic distribution ในแต่ละ SNP ของยีน TCF7L2

	Control (n)	Case (n)	OR (95%CI)	P value*
rs7896340				
AA	182	163	1	0.008
AG	22	36	1.89 (1.03-3.23)	
GG	1	3	3.35 (0.35-32.52)	
AG+GG	23	39	2.34 (1.22-4.47)	
rs7901695				
CC	180	173	1	0.54
CT	24	26	1.13 (0.62-2.04)	
TT	1	3	3.12 (0.32-30.30)	
CT+TT	25	29	1.23 (0.62-2.45)	
rs7903146				
CC	183	172	1	0.106
CT	21	25	1.26 (0.68-2.33)	
TT	1	4	4.23 (0.47-38.19)	
CT+TT	22	29	1.59 (0.78-3.22)	
rs12255372				
GG	191	179	1	0.088
GT	13	20	1.64 (0.79-3.40)	
TT	1	3	3.20 (0.33-31.06)	
GT+TT	14	23	1.96 (0.86-4.44)	
rs11196205				
CC	182	163	1	0.012
CG	22	36	1.83 (1.03-3.23)	
GG	1	3	3.35 (0.35-32.52)	
CG+GG	23	39	2.23 (1.18-4.26)	

7. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน TCF7L2 และลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง Common SNPs จำนวน 5 ตำแหน่ง กับลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า rs7895340 และ rs11962055 มีความสัมพันธ์กับอายุในการเกิดโรค ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 Mean trait values stratified by TCF7L2 rs7896340 genotype

	Control				Case			
	AA	AG	GG	p value	AA	AG	GG	p value
N	182	22	1		163	36	3	
Age	53.21	54.45	51.00	0.6491	54.77	49.19	50.33	0.0153
Age at diagnosis	-	-	-	-	50.32	44.72	45.00	0.0127
BMI (kg/m²)	23.76	24.79	19.65	0.4278	28.20	26.77	32.95	0.6560
Weight	58.83	61.75	46.00	0.4904	69.83	68.42	81.67	0.8100
Waist	81.92	85.55	69.00	0.3032	88.28	87.75	94.00	0.8363
Hip	95.28	98.09	85.00	0.2979	99.29	98.00	109.67	0.7816
Waist/Hip ratio	0.86	0.87	0.81	0.6218	0.89	0.89	0.85	0.8716
Systolic BP (mmHg)	116.07	116.36	96.00	0.6559	134.33	127.50	133.33	0.0748
Diastolic BP (mmHg)	71.32	71.27	62.00	0.6981	81.58	80.56	83.33	0.7612
FPG (mmol/l)	88.05	86.36	89.00	0.3131	208.13	204.86	154.00	0.5366
Total cholesterol (mmol/l)	206.26	201.05	214.00	0.6209	229.19	224.39	212.00	0.4572
Triglyceride (mmol/l)	112.23	93.55	98.00	0.1759	209.18	193.42	125.33	0.5103
LDL (mmol/l)	125.20	121.55	130.00	0.7009	144.16	144.28	142.00	0.9762
HDL (mmol/l)	61.75	63.73	73.00	0.4765	49.89	52.47	45.00	0.6033

* ANOVA was used to compare geometric mean levels of continuous characteristics across genotypes

คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs จำนวน 5 ตำแหน่งกับการไปด้วยกันแบบเป็น haplotype ดังแสดงในตารางที่ 6-8 พบว่า rs11962055 และ rs7895340 มักจะมีการถ่ายทอดไปด้วยกันด้วย $r^2=0.97$ และ rs7903146 กับ rs7901695 มักจะมีการถ่ายทอดไปด้วยกันด้วย $r^2=0.88$

	rs7895340	rs7901695	rs11196205	rs7903146	rs12255372
rs7895340	-	0.50993881	0.96766569	0.49547521	0.46526041
rs7901695	-	-	0.50993881	0.88266025	0.59397849
rs11196205	-	-	-	0.49547521	0.46526041
rs7903146	-	-	-	-	0.64915249
rs12255372	-	-	-	-	-

Haplotype frequencies estimation (n=407)									
	rs7895340	rs7901695	rs11196205	rs7903146	rs12255372	Total	group.0	group.1	Cumulative frequency
1	A	C	C	C	G	0.9038	0.9216	0.8859	0.9038
2	G	T	G	T	T	0.0402	0.0268	0.0538	0.944
3	G	C	G	C	G	0.0262	0.0199	0.0324	0.9702
4	G	T	G	T	G	0.011	0.007	0.0152	0.9812
5	A	T	C	T	G	0.0098	0.0145	0.0051	0.9911
6	A	T	C	C	G	0.0028	0.0029	0.0025	0.9939
7	G	T	G	C	T	0.0013	NA	0.0026	0.9951
8	A	C	C	T	T	0.0012	NA	0.0025	0.9964
9	A	T	G	T	T	0.0012	0.0024	NA	0.9976
10	G	T	C	T	T	0.0012	0.0024	NA	0.9988
11	G	T	G	C	G	0.0012	0.0024	NA	1

Haplotype association with response (n=407, crude analysis)								
	rs7895340	rs7901695	rs11196205	rs7903146	rs12255372	Freq	OR (95% CI)	P-value
1	A	C	C	C	G	0.9038	1.00	---
2	G	T	G	T	T	0.0402	1.96 (0.95 - 4.03)	0.07
3	G	C	G	C	G	0.0261	1.67 (0.68 - 4.15)	0.27
4	G	T	G	T	G	0.011	2.33 (0.55 - 9.91)	0.25
rare	*	*	*	*	*	0.0188	0.59 (0.21 - 1.66)	0.32

Global haplotype association p-value: 0.11

Table 8 Haplotype frequencies in T2D case subjects and control subjects

rs7895340/rs11196205 haplotype	Control (n=205)	Case (n=202)	OR (95% CI)	P-value
AC	0.939	0.896	1	-
GG	0.0561	0.104	1.89 (1.12 - 3.19)	0.018
AG	0.0024	0	0	1
GC	0.0024	0	0	1

9. การหาความผิดปกติของยีน *TCF7L2* ด้วยวิธี **direct sequencing**

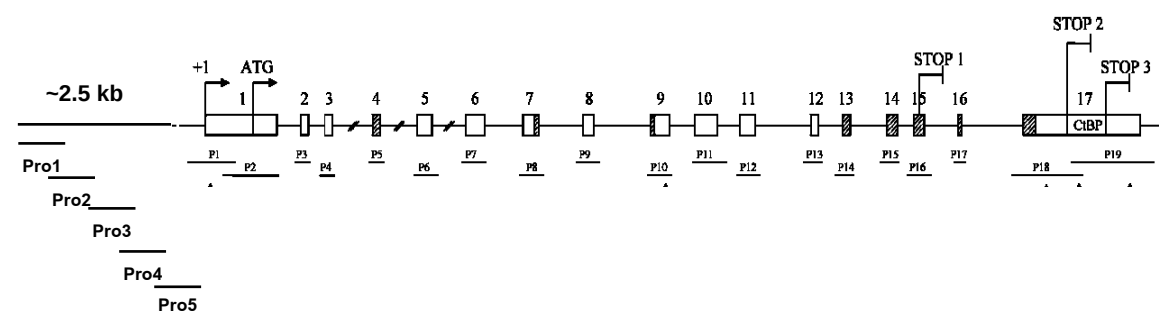
เนื่องจาก SNP ทั้ง 5 ตำแหน่งเป็น SNP ที่อยู่ใน intron คณะผู้วิจัยได้พยายามที่จะหา functional SNP ที่อยู่ในบริเวณ coding region, promoter และบริเวณ 5' และ 3' UTR โดย sample ที่ใช้จำนวน 8 sample ใช้ criteria ในการเลือกคือ มี BMI และรอบเอวที่น้อย หรือผอม เป็นโรคเบาหวานเมื่ออายุน้อยและรักษาด้วย insulin ตามลักษณะหน้าที่ของยีน *TCF7L2* มีลักษณะทางคลินิกดังแสดงในตารางที่ 9

วิธีการ direct sequencing จะใช้ primer ที่มีตำแหน่งดังแสดงในรูปที่ 12 และข้อมูลของ primer ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR แต่ละ fragment แสดงในตารางที่ 11

ผลการทำ direct sequencing ดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งความถี่ของ variation ที่พบดังตารางที่ 12 และตำแหน่งของ variation บนยีน *TCF7L2* ดังแสดงในรูปที่ 14

ตารางที่ 9 ลักษณะ sample ที่ใช้ในการ sequence หาความผิดปกติในยีน *TCF7L2*

id	diag	sex	age	bmi	waist	height	weight	hip	sys	dias	fpg	tc	tg	ldl	hdl
P083	1	1	44	22.20633069	78	163	59	91	100	60	244	217	292	132	37
P159	1	1	41	26.0261749	86	164	70	95	150	100	145	220	40	155	58
P204	1	1	39	24.6097337	88	165	67	91	120	80	177	242	300	156	27
P242	1	2	42	21.50446956	72	154	51	91	140	80	158	253	103	173	59
P250	1	2	39	23.37257618	74	152	54	85	140	80	162	163	161	92	39
P261	1	1	42	22.48132907	72	162	59	84	120	80	148	140	44	86	45
P292	1	2	29	17.62538055	67	158	44	84	110	70	184	170	126	100	45
P316	1	2	38	22.76943835	70	154	54	92	120	80	107	228	167	110	47



รูปที่ 11 แสดง organization ของยีน *TCF7L2* และ PCR product ที่ได้

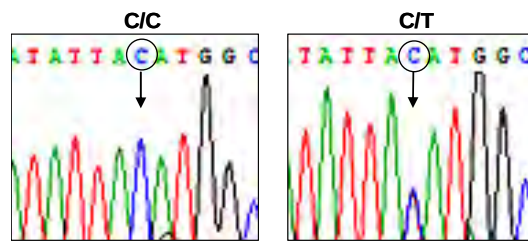
ตารางที่ 10 แสดง Oligonucleotide sequences ของ primer ที่ใช้เตรียม PCR เพื่อทำ direct sequencing

Oligonucleotide	Sequence (5'>3')	Chromosome region (10q25.3)	Product (bp)
TCF7L2-Pro1-F	ATGGGAACAAAGCCCTTAGT	114,697,578_114,698,197	620
TCF7L2-Pro1-R	GCATAGGATACAAAGCACAGG		
TCF7L2-Pro2-F	TCTGTCTCCACTCTCCCTCT	114,698,088_114,698,600	513
TCF7L2-Pro2-R	TCCAGGATGTACTGTTGTCC		
TCF7L2-Pro3-F	CTGAAACCCCAAACTCTCTAA	114,698,473_114,699,127	655
TCF7L2-Pro3-R	GTTGGAGGTAGTAGGAAATGAG		
TCF7L2-Pro4-F	CACTGTAGCCCAACTGATCCC	114,698,995_114,699,676	682
TCF7L2-Pro4-R	GTGGCGACCAAGTCAGGAATC		
TCF7L2-Pro5-F	CTGCTGAATTAACCACCAAGCAC	114,699,476_114,700,154	679
TCF7L2-Pro5-R	GGAAGCCGAAGATACAGGAGG		
TCF7L2-1A-F	TCGCCCTGTCAATAATCTCC	114,699,989_114,700,493	504
TCF7L2-1A-R	ACCAGCAGCAATTTTGAAG		
TC-F7L2-1BF	CTCCCCAGGAGAAAAAGACC	114,700,343_114,700,748	406
TCF7L2-1B-R	CCAAGCCCAGGAAACAGATA		
TCF7L2-2-F	TCTTTTCTCCCCCTTCTCC	114,700,883_114,701,266	384
TCF7L2-2-R	CCCTTAAAGAGCCCTCCATC		
TCF7L2-3-F	AGACAAATCCCGGAAAGTT	114,700,995_114,701,559	565
TCF7L2-3-R	GCAAACAAATCCAGTCCACA		
TCF7L2-4-F	CCAAGGCTGCAGTTCAATCT	114,714,193_114,714,606	414
TCF7L2-4-R	CTCTCCTTTGCTCCCCCTTCT		
TCF7L2-5-F	TGAGCTCTGAGGAAGACCCTA	114,789,597_114,790,009	413
TCF7L2-5-R	CCCAACAATATTTCCAAGAAAA		
TCF7L2-6-F	GTATGGGATGGGCAGAGTTG	114,890,792_114,891,214	423
TCF7L2-6-R	ACACCCAGAAAAGCAACAGG		
TCF7L2-7-F	CTTCCTCCTTCCCTGTTCC	114,893,585_114,893,988	404
TCF7L2-7-R	GGCTGTGGATTGCGCTGTAT		
TCF7L2-8-F	CCCACCCTTGTTCAAGTCT	114,895,716_114,896,018	303
TCF7L2-8-R	TTTCAGGGCAATTTTTCAGG		
TCF7L2-9-F	CATATGCCTTGGGTTGCTTT	114,900,618_114,901,052	435
TCF7L2-9-R	TTCTGCCACTGTGCACTCTC		
TCF7L2-10-F	GCTTGGGGTTATGAGACAA	114,901,377_114,901,779	403
TCF7L2-10-R	GAAGGCCATTCAAGGATTCA		
TCF7L2-11-F	CCTTGGCGTAATGTGTGATG	114,902,003_114,902,344	342
TCF7L2-11-R	AGCGATCCAGGAAGATGCTA		
TCF7L2-12-F	TGGAGGTTGGACAAATACCG	114,907,625_114,907,924	300
TCF7L2-12-R	TGTCCTGGCCTTGAATTTCT		
TCF7L2-13-F	GATGCATGCCTTTACAGTGG	114,908,236_114,908,602	367
TCF7L2-13-R	ACGAAACCGTGTGATGGTC		
TCF7L2-14-F	CCTTTCTCCACGTTCTCCT	114,909,618_114,909,824	207
TCF7L2-14-R	AAAGCAACAGGCCAGAGAAG		
TCF7L2-15-F	ATGTCCTTGGTGAGGGAAGA	114,910,232_114,910,645	414
TCF7L2-15-R	AGAGCAGGGGGAAAAGAGAG		
TCF7L2-16-F	TGGTGGAGGGATACCGACTA	114,911,235_114,911,453	219
TCF7L2-16-R	TCTAAACACGGAGCACATGG		
TCF7L2-17A-F	GTTTGCCAGAGCAGGCTTAG	114,915,098_114,915,668	571
TCF7L2-17A-R	GGAGCTGTGGGAATGTAAGG		
TCF7L2-17B-F	CTCCTCATCAATTGCACAGC	114,915,617_114,916,153	537
TCF7L2-17B-R	AAAATGATTGGTTCGCAAGC		

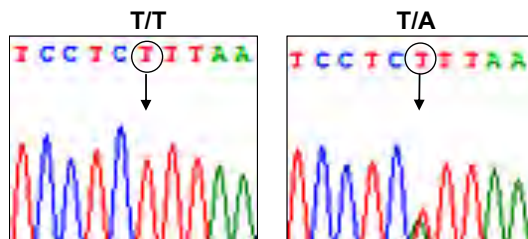
ตารางที่ 11 แสดงสถานะที่เหมาะสมที่ใช้เตรียม PCR ในการทำ direct sequencing ในยีน

TCF7L2

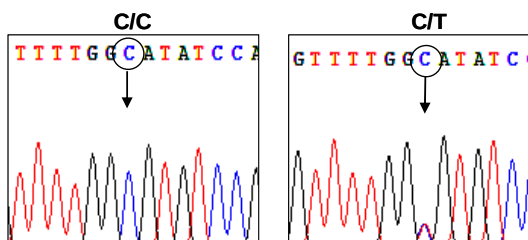
Primer name	Product (bp)	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Post-extension	Cycle
TCF7L2-Pro1-F	620	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	63°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-Pro1-R							
TCF7L2-Pro2-F	513	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-Pro2-R							
TCF7L2-Pro3-F	655	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	63°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-Pro3-R							
TCF7L2-Pro4-F	682	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	63°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-Pro4-R							
TCF7L2-Pro5-F	679	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	63°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-Pro5-R							
TCF7L2-1A-F	504	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	52°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-1A-R							
TCF7L2-1B-F	406	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	52°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-1B-R							
TCF7L2-2-F	384	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-2-R							
TCF7L2-3-F	565	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-3-R							
TCF7L2-4-F	414	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	52°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-4-R							
TCF7L2-5-F	413	95°C, 7 min	95°C, 40 sec	55°C, 45 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-5-R							
TCF7L2-6-F	423	95°C, 7 min	95°C, 40 sec	55°C, 45 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-6-R							
TCF7L2-7-F	404	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-7-R							
TCF7L2-8-F	303	95°C, 7 min	95°C, 40 sec	55°C, 45 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-8-R							
TCF7L2-9-F	435	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	52°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-9-R							
TCF7L2-10-F	403	95°C, 7 min	95°C, 30 sec	52°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-10-R							
TCF7L2-11-F	342	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-11-R							
TCF7L2-12-F	300	95°C, 7 min	95°C, 40 sec	55°C, 45 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-12-R							
TCF7L2-13-F	367	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-13-R							
TCF7L2-14-F	207	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-14-R							
TCF7L2-15-F	414	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-15-R							
TCF7L2-16-F	219	95°C, 7 min	95°C, 40 sec	58°C, 45 sec	72°C, 30 sec	72°C, 5 min	35
TCF7L2-16-R							
TCF7L2-17A-F	571	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30
TCF7L2-17A-R							
TCF7L2-17B-F	537	95°C, 7 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 5 min	30



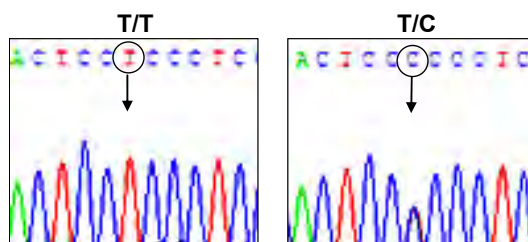
rs3814570 C>T



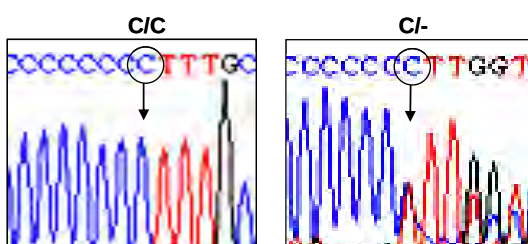
rs10885394 T>A



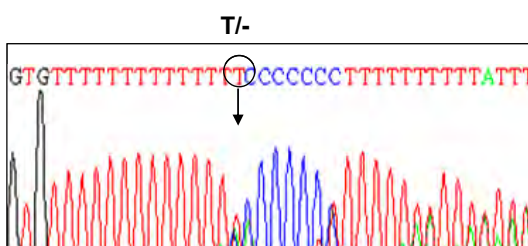
rs10885395 C>T



-394T>C

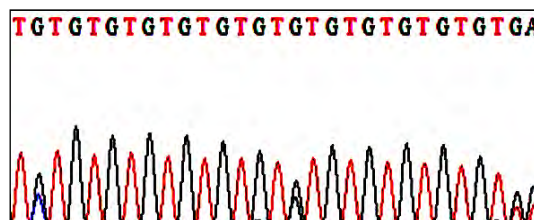
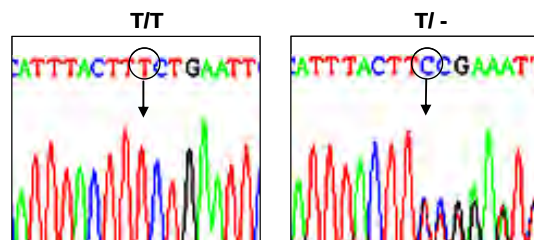
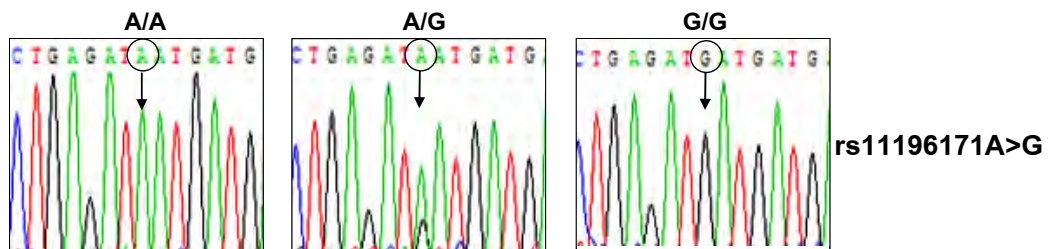
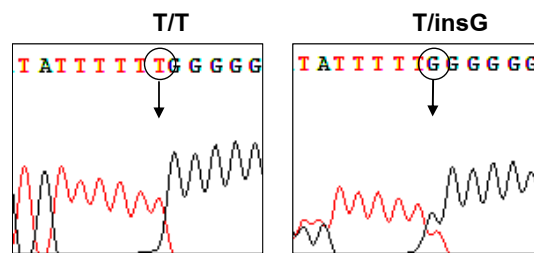


-40delT



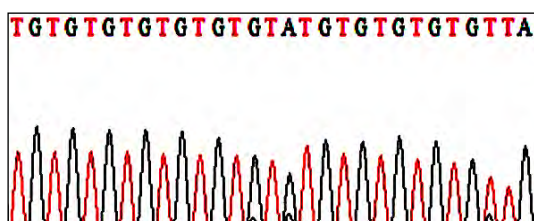
12delT

รูปที่ 12 แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทป์โดยวิธี direct sequencing ของยีน *TCF7L2*

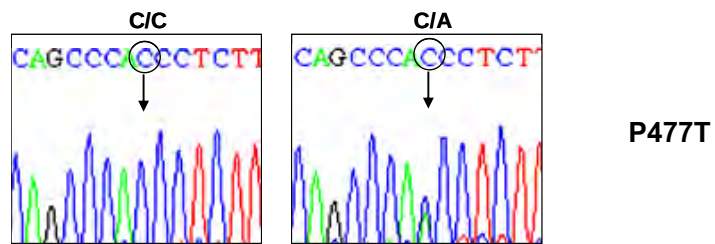


CTGTGTGTGTGT

GTGTGTGTGTGT



รูปที่ 12 (ต่อ) แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทป์โดยวิธี direct sequencing ของยีน *TCF7L2*

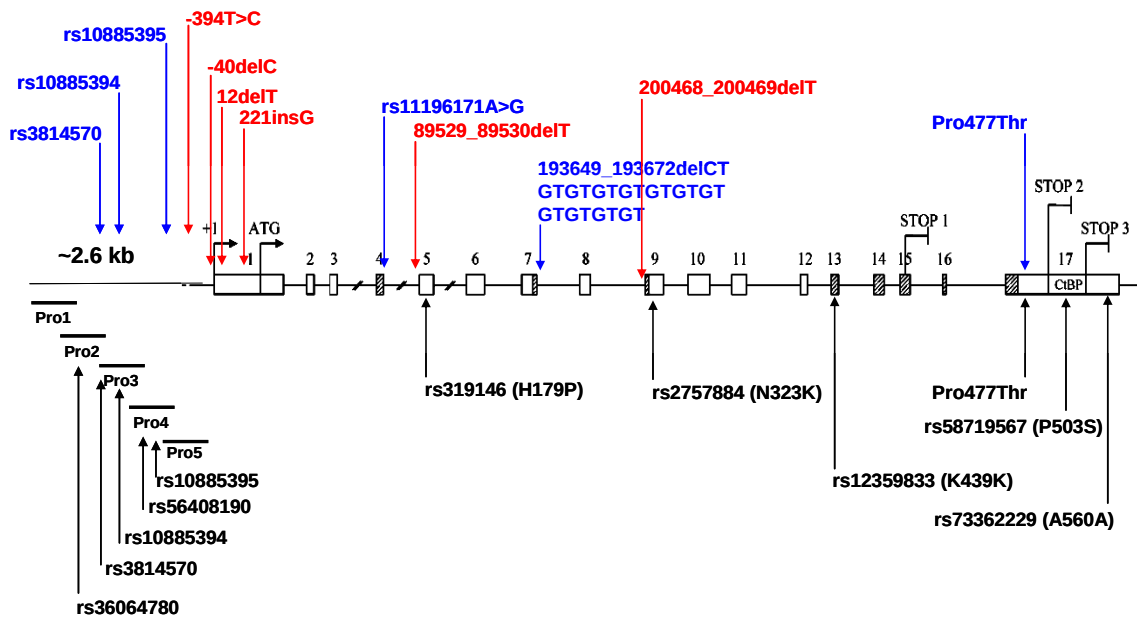


รูปที่ 12 (ต่อ) แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทป์โดยวิธี direct sequencing ของยีน *TCF7L2*

ตารางที่ 12 แสดงผลความแปรผันที่ตรวจพบโดยวิธี direct sequencing ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน
ชนิดที่ 2 จำนวน 7 คนและอาสาสมัครปกติ 1 คน

Location	Variation	Genotype			Total
		Major	Hetero	Minor	
Promoter	rs3814570 C>T	CC	CT	TT	
	Control	1	0	0	1
	Case	6	2	0	8
	Total	7	2	0	9
Promoter	rs10885394 T>A	TT	TA	AA	
	Control	1	0	0	1
	Case	6	2	0	8
	Total	7	2	0	9
Promoter	rs10885395 C>T	CC	CT	TT	
	Control	1	0	0	1
	Case	6	2	0	8
	Total	7	2	0	9
Promoter	-394T>C	TT	TC	CC	
	Control	1	0	0	1
	Case	7	1	0	8
	Total	8	1	0	9
5' UTR	-40delC	NN	NM	MM	
	Control	1	0	0	1
	Case	6	2	0	8
	Total	7	2	0	9
5' UTR	12delT	NN	NM	MM	
	Control	0	1	0	1
	Case	0	8	0	8
	Total	0	9	0	9
5' UTR	221insG	NN	NM	MM	
	Control	1	0	0	1
	Case	7	1	0	8
	Total	8	1	0	9
Intron	rs11196171A>G	AA	AG	GG	
	Control	0	1	0	1
	Case	2	4	2	8
	Total	2	5	2	9
Intron	89529_89530delT	NN	NM	MM	
	Control	1	0	0	1
	Case	7	1	0	8
	Total	8	1	0	9
Intron	193649_193672delCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	NN	NM	MM	
	Control	0	1	0	1
	Case	0	8	0	8
	Total	0	9	0	9
Intron	200468_200469delT	NN	NM	MM	
	Control	0	1	0	1
	Case	0	8	0	8
	Total	0	9	0	9
Exon	P477T C>A	CC	CA	AA	
	Control	0	1	0	1
	Case	6	2	0	8
	Total	6	3	0	9

Thai study variation



Reported variation

รูปที่ 13 แสดงความหลากหลายของยีน *TCF7L2* ที่พบในประชากรไทย (ส่วนบนของรูป) เทียบกับความหลากหลายที่มีรายงานในประชากรอื่น (ส่วนล่างของรูป)

10. การศึกษาความแปรผันที่ค้นพบจาก direct sequencing เปรียบเทียบในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด MODY กับอาสาสมัครปกติ

คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกความแปรผันที่ได้จาก direct sequencing ที่น่าสนใจมาศึกษาต่อ โดย genotype เพิ่มจำนวนในกลุ่มผู้ป่วยและอาสาสมัครปกติอย่างละ 200 คน ด้วยวิธี High resolution melting analysis (HRM) ได้แก่ rs10885394, rs10885395, -394T>C, 221insG และ P477T ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมและ Primer ที่ใช้เตรียม PCR ดังแสดงในตารางที่ 13 ตัวอย่างโปรแกรมที่ใช้ในการทำ HRM ดังแสดงในรูปที่ 14-15 ส่วน rs3814570 ทำการ genotype ด้วยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ด้วยเอนไซม์ *NlaIII* ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 16

การ genotype ด้วยวิธี HRM ในขั้นแรกจะสามารถแยก genotype ได้เป็น 2 กลุ่ม กล่าวคือ กลุ่ม Homozygote (Major allele รวมกับ Minor allele) และ Heterozygote ดังแสดงในรูป xx จากนั้นต้องทำการ spike ในอัตราส่วน 1:1 ด้วย sample ที่มี genotype เป็น homozygote (Major หรือ Minor allele ก็ได้) ใน sample ที่ให้ผลเป็น Homozygote ในรอบแรก ซึ่งจะสามารถแยก Homozygote ที่เป็น Major allele ออกจาก Minor allele ได้ ดังแสดงในรูปที่ 15 ผลการศึกษาความแปรผันทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 14

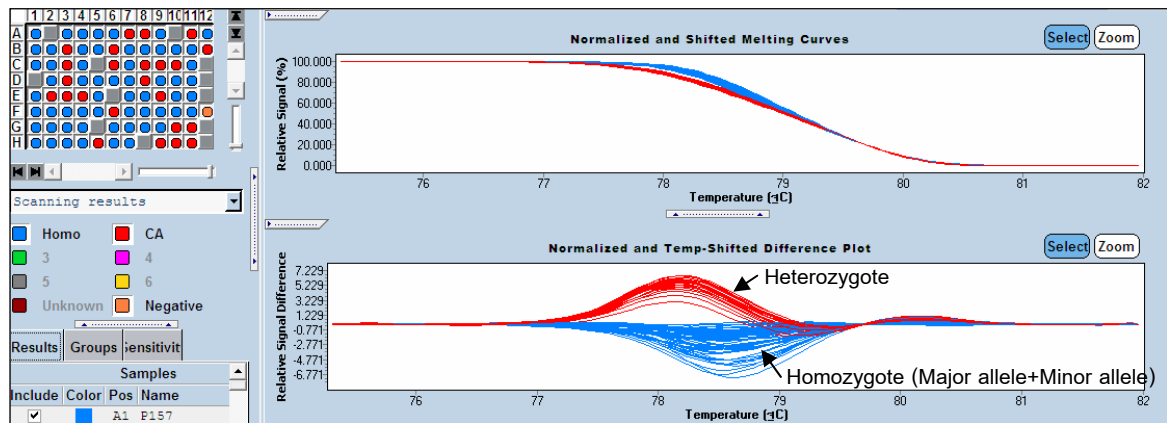
ตารางที่ 13 แสดง Oligonucleotide sequences ของ primer ที่ใช้ในการศึกษาความแปรผันโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM

Oligonucleotide	Sequence (5'>3')	Chromosome region (10q25.3)	Ta (°C)	Product (bp)
TCF7L2- rs3814570-F	CTGAAACCCCAAACTCTCTAA	114,708,483-114,708,610	62	128
TCF7L2- rs3814570-R	TCCAGGATGTACTGTTGTCC			
TCF7L2 rs10885394-F	CTATCACCCAGGAACATTGTG	114,708,744-114,708,840	62	97
TCF7L2 rs10885394-R	TAGAGGAGGAGCAGACTGATTT			
TCF7L2 rs10885395-F	GTTTCTGACATTTAGCATTTG	114,709,222-114,709,384	56	163
TCF7L2 rs10885395-R	GTTCTGTGTCATCTACAATG			
TCF7L2-394-F	GCACCCTCGCCCAGAATC	114,709,753-114,709,866	67	114
TCF7L2-394-R	GGAAAGAAGGAGGAAGAGAGGG			
TCF7L2-221insG-F	CTCCCAGGAGAAAAAGACC	114,710,352-114,710,502	62	151
TCF7L2-221insG-R	ACCAGCAGCAATTTTGAAG			
TCF7L2- P477T -F	TCGCTACATACAAGGTGAAGG	114,925,332-114,925,464	62	133
TCF7L2- P477T -R	GGTCTGCTCAGTCTGTGACTT			

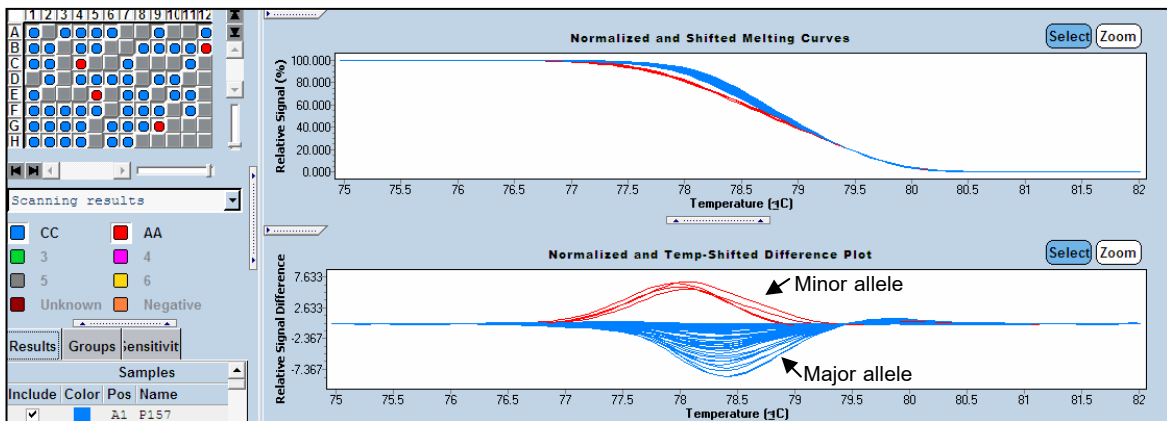
Programs							
Program Name	Program						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:07:00	4.40		0	0	0
Program Name	Program						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4.40		0	0	0
67	None	00:00:30	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:30	4.40		0	0	0
Program Name	Program						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4.40		0	0	0
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0
60	None	00:00:01	4.40		0	0	0
99	Continuous		0.02	25	0	0	0
Program Name	Program						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

รูปที่ 14 ตัวอย่างโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ด้วยวิธี High resolution melting analysis (HRM) โดยอุณหภูมิในช่วง Quantification ที่วงไว้จะแตกต่างกันในแต่ละความแปรผันที่ทำการวิเคราะห์

A. 1st HRM analysis

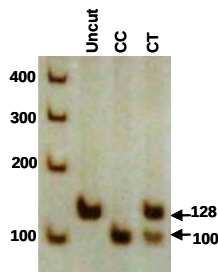


B. Spike in

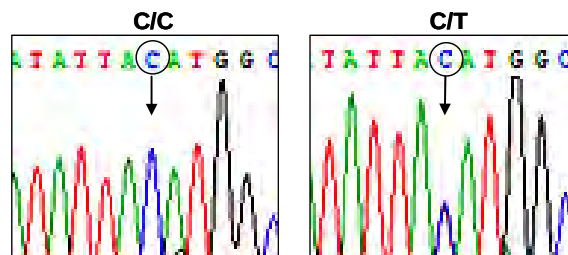


รูปที่ 15 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี High resolution melting analysis (HRM) โดยการวิเคราะห์ด้วย HRM ในรอบแรก (A.)

A.



B.



รูปที่ 16 การ genotype rs3814570 ในยีน *TCF7L2* ด้วยวิธี RFLP (A.) และยืนยันผลด้วย Direct sequencing (B.)

ตารางที่ 14 แสดงผลการศึกษาความแปรผันที่คัดเลือกเพื่อ genotype เพิ่ม เปรียบเทียบระหว่าง
กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด MODY และอาสาสมัครปกติ

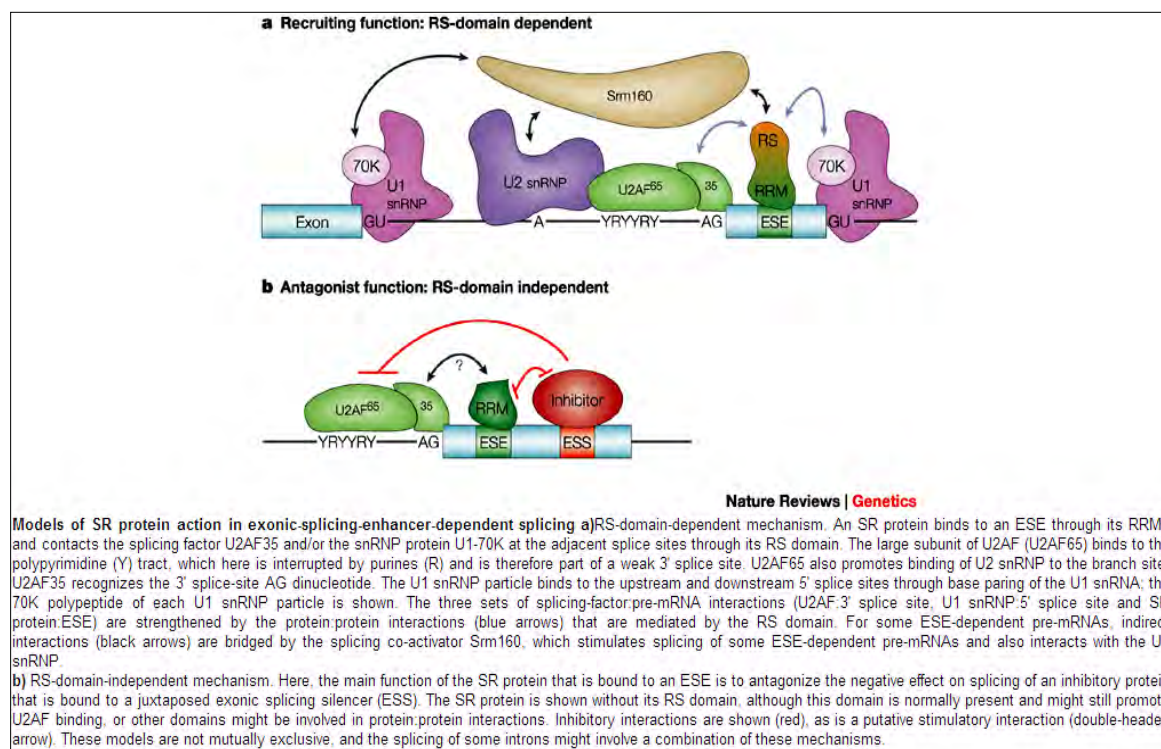
Variant	Genotype	Control	Case
P477T	CC	119	126
	CA	76	68
	AA	10	8
rs38914570	CC	164	158
	CT	40	43
	TT	1	1
rs10885394	TT	169	164
	TA	35	37
	AA	1	1
rs10885395	CC	168	162
	CT	36	38
	TT	1	1
Pro5	TT	200	194
	TC	4	7
	CC	0	0
rs11196218	GG	102	99
	GA	83	86
	AA	19	16
rs290487	TT	59	46
	CT	111	106
	CC	34	49

11. การศึกษาความแปรผันที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

การศึกษาความแปรผันที่เกิดขึ้นบน Promoter ของยีน *TCF7L2* ที่อาจมีผลต่อการจับของโปรตีนที่เป็น Transcription factor โดยการใช้โปรแกรมจากเว็บไซต์ <http://mapper.chip.org/> เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งของความแปรผันกับการจับของโปรตีน ซึ่งผลการศึกษาสรุปในตารางที่ 15

การศึกษาผลของความแปรผันที่เกิดขึ้นกับการจับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Splicing (Exonic Splicing Enhancer หรือ ESE) ใช้โปรแกรมจากเว็บไซต์ <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home> โปรตีนที่เกี่ยวข้องกันกระบวนการ Splicing ดังแสดงในรูปที่ xx ซึ่งผลการศึกษาในความแปรผันที่พบว่าทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในการจับของโปรตีนแสดงในตารางที่ xx

การศึกษาผลของความแปรผันที่เกิดขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของการเกิดกระบวนการ Splicing โดยการใช้โปรแกรม Alternative Splice Site Predictor (ASSP) จากเว็บไซต์ <http://www.es.embnnet.org/~mwang/assp.html> โดยพบว่าความแปรผันบางตำแหน่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการ Splicing ได้โดยดูจาก score ที่เปลี่ยนแปลง ผลของการศึกษาสรุปเฉพาะความแปรผันที่มีผลดังแสดงในตารางที่ xx



รูปที่ 17 แสดงโมเดลของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Splicing

ตารางที่ 15 แสดงผลการศึกษาความแปรผันต่อการจับของโปรตีนที่กระตุ้นกระบวนการ Splicing (EXE) และตำแหน่ง Splicing ที่เกิดเปลี่ยนแปลง (ASSP) จากการวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

Variation	Major allele	Minor allele
pro2		FOXJ2 (2.5) cdx-2 (3.1)
pro3		Oct-1 (4.3)
pro4	Thing1-E47 (1.5)	c-REL (1.5) C/EBP (2.4)
pro5	Sp3 (2.8)	MTF-1 (4.7) MZF_5-13 (2.3) RREB-1 (1.5) sp1 (0.6)

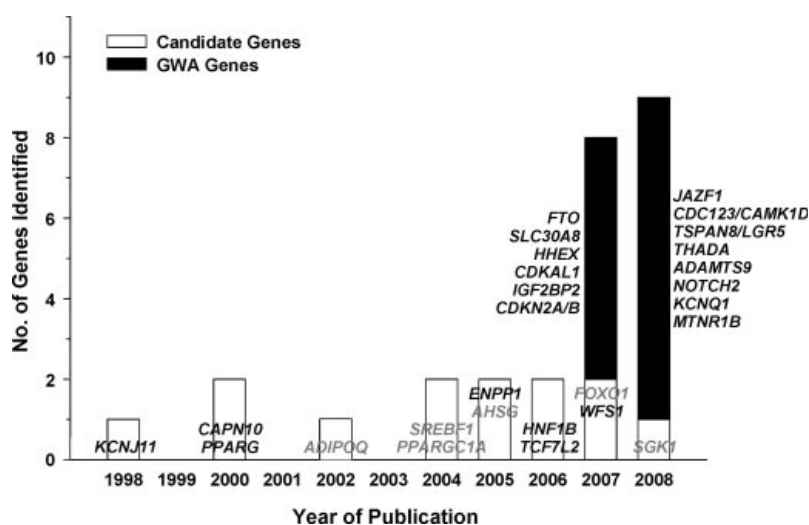
ตารางที่ 16 แสดงผลการศึกษาความแปรผันต่อการจับของโปรตีนที่กระตุ้นกระบวนการ Splicing (EXE) และตำแหน่ง Splicing ที่เกิดเปลี่ยนแปลง (ASSP) จากการวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

Variation	ESE		ASSP	
	Major	Minor	Major	Minor
rs11196171A>G	—	SF2/ASF Score : 2.24	—	—
P477T	SF2/ASF Score : 2.03	—	Constitutive acceptor Score : 7.736	Constitutive acceptor Score : 5.794

บทวิจารณ์

โรคเบาหวานชนิดที่สอง เป็นภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง อาจเนื่องมาจากภาวะดื้ออินซูลิน ทำให้เบต้าเซลล์ทำหน้าที่ลดน้อยลง โดยสาเหตุหนึ่งคือปัจจัยทางพันธุกรรม

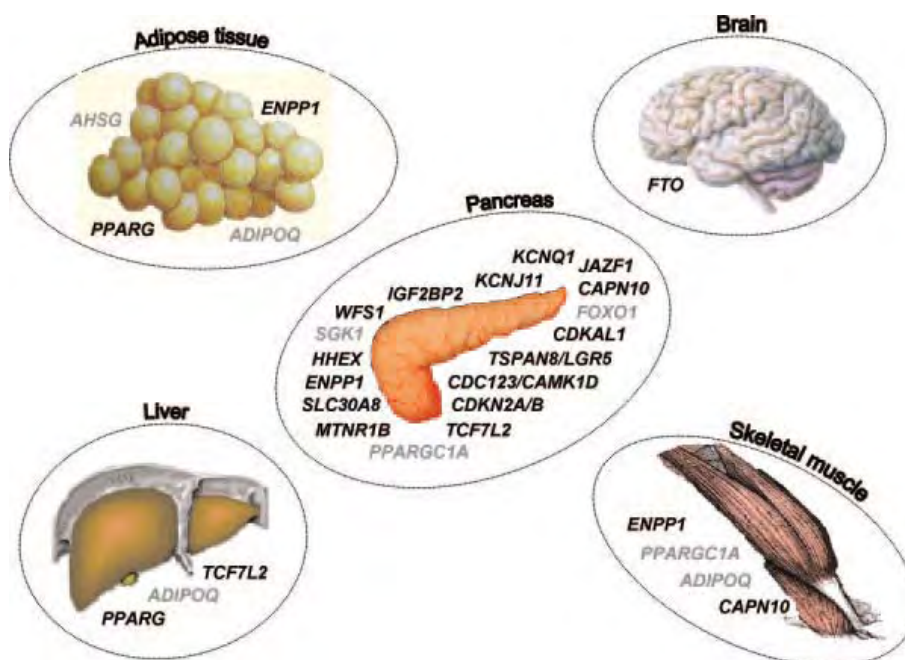
การศึกษาพหุยีนกำเนิดของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยใช้เทคนิค genome wide association (GWA) เพื่อหาพหุยีนที่เป็นพหุยีนกำเนิดของโรคเบาหวาน พบว่าความหลากหลายในยีน *TCF7L2* โดยเฉพาะ rs7903146 เป็นความหลากหลายที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากที่สุดในกลุ่มประชากร Caucasian และเมื่อมีการ replicate ในหลายกลุ่มประชากรก็ได้ผลเช่นเดียวกัน โดยยีน *TCF7L2* ได้มีการเริ่มทำเมื่อปี 2006 ตามรูปที่ 18



รูปที่ 18 กราฟแสดงเวลาที่ค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยแบ่งสีขาวแสดงยีนที่ได้จาก candidate gene approaches ส่วนแท่งสีดำแสดงยีนที่ได้จาก GWA studies

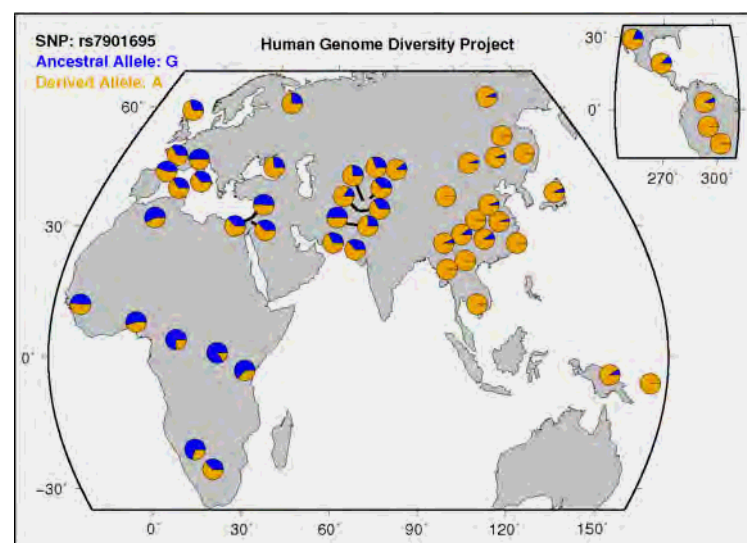
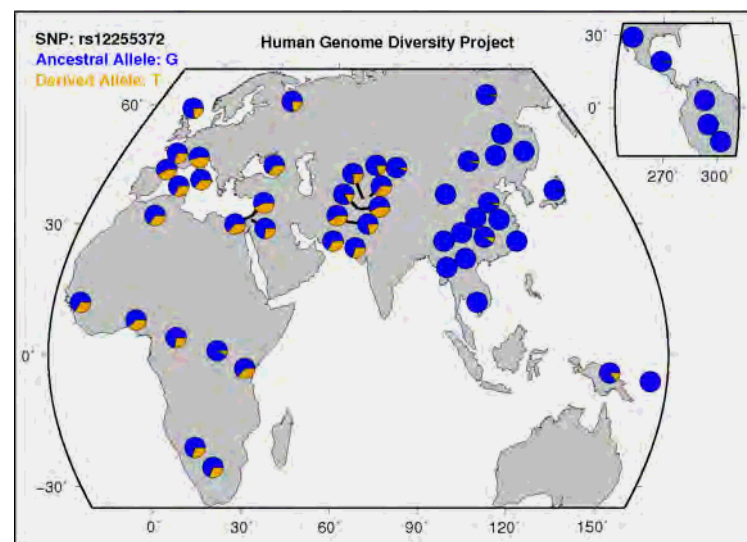
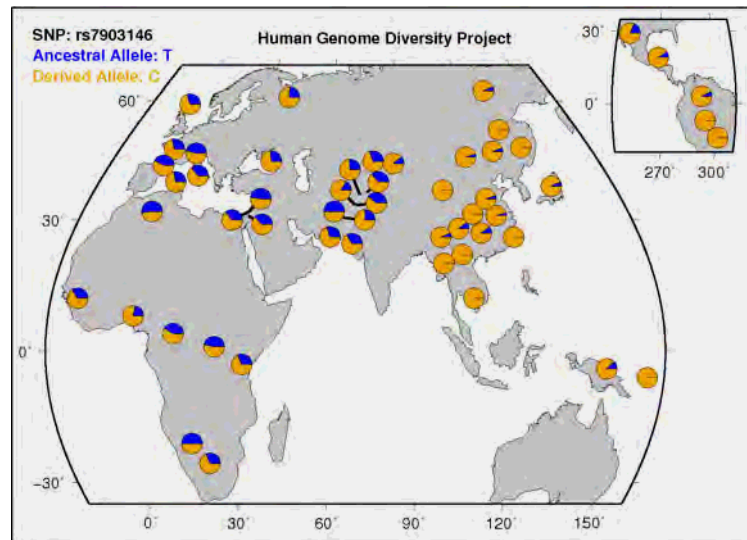
คณะผู้วิจัยจึงได้รวบรวมอาสาสมัครผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และกลุ่มควบคุมคนไทย เพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *TCF7L2* กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทย จากผลการทดลองพบความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันของยีน *TCF7L2* กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทย กล่าวคือ จากการวิเคราะห์ genotype frequency ของยีน *TCF7L2* ใน rs7896340 ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วย $P = 0.008$ และ rs11196205 ด้วย $P = 0.012$ โดยมีค่าความเสี่ยงในการเกิดโรคประมาณ 3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ

TCF7L2 เป็นยีนที่สังเคราะห์โปรตีน transcription factor ที่มีความสามารถในการจับกับ beta catenin ซึ่งมีสัญญาณมาจาก Wnt receptor (28) โดยการจับนี้ส่งผลถึงการแสดงออกของยีนหลายยีน ยีนส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวาน เช่น ยีนอินซูลิน ยีนกลูคาγον เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 อวัยวะสำคัญและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่สอง เช่น สมอ ตับอ่อน ตับ กล้ามเนื้อ ไขมัน

จากการศึกษา Genome wide association เพื่อหาพหุคูณโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ผ่านมาพบว่า ยีน *TCF7L2* เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากที่สุดในประชากรกลุ่ม Caucasian (29) โดยพบว่าความแปรผัน DG10S478 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (30) หลังจากการค้นพบในครั้งนี้ ได้มีการศึกษายีนนี้ในอีกหลายกลุ่มประชากร เช่น Finnish (31), UK (32), Dutch (33), Mexican Americans (34), Indian (35) ซึ่งผลที่ได้ตรงกันคือยีน *TCF7L2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อย่างไรก็ตามการศึกษายีน *TCF7L2* ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ชาวเอเชีย ซึ่งรวมถึงญี่ปุ่น (36) จีน (37, 38) และเกาหลี (39, 40) พบว่าความถี่ของ risk allele ของ rs790146 น้อยกว่าที่พบในประชากร Caucasian กล่าวคือใน Japanese พบความถี่ประมาณ 0.03-0.04, ใน Chinese พบความถี่ประมาณ 0.01-0.03, ใน Korean พบความถี่ประมาณ 0.01-0.03 จากความถี่ที่พบน้อยนี้เองทำให้ power calculation น้อยลงไปด้วย อย่างไรก็ตามความหลากหลายที่พบในยีน *TCF7L2* ที่พบในประชากรเอเชียก็ยังพบว่าสัมพันธ์ไปกับโรคเบาหวานชนิดที่สอง แต่ในสัดส่วนที่น้อยกว่าในประชากร Caucasian (Odd ratio (CI)=1.40 (1.25-156), $p < 0.001$) ส่วนในประเทศไทยยังไม่มีรายงาน แต่จากข้อมูลที่กำลังมาอาจเป็นไปได้ว่ายีน *TCF7L2* อาจมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในชาวไทยแตกต่างออกไปเนื่องจากความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมอาจพบได้ในแต่ละเชื้อชาติ เนื่องจากผลการทดลองในประเทศไทยพบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน แต่ความถี่ที่พบน้อยกว่าในประชากร Caucasian มากจะเห็นได้จากรูปที่ 20 :ซึ่งทำให้สัดส่วนความแตกต่างระหว่าง allele ในกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มควบคุมแตกต่างกันน้อย

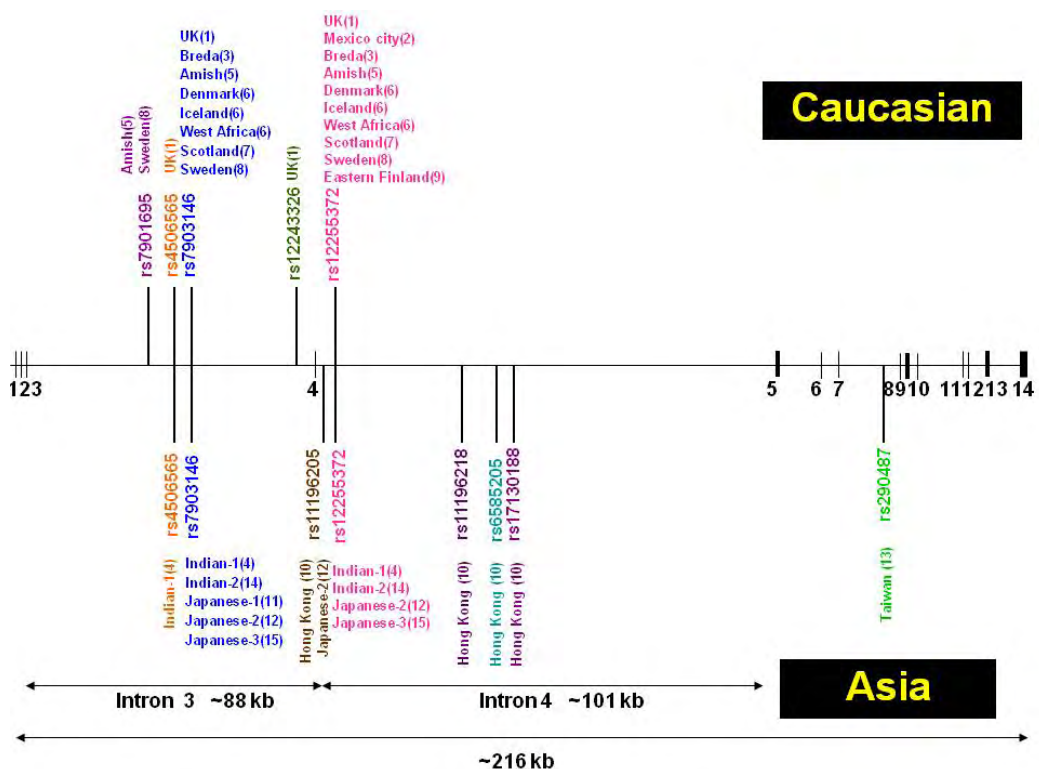


รูปที่ 20 แสดงสัดส่วนของ major และ minor allele ของความหลากหลายที่พบในประชากร

สำหรับการศึกษาผลของความแปรผันของยีน *TCF7L2* กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าเกี่ยวข้องกับการทำให้หน้าที่ของเบต้าเซลล์ผิดปกติไปโดยกลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *TCF7L2* มีผลต่อการแสดงออกของยีนอินซูลินรวมไปถึงการหลั่งอินซูลินที่ผิดปกติและระดับของอินซูลินในกระแสเลือดด้วย (41, 42)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีผล genotype ใน rs7896340 ที่แตกต่างกัน พบว่าผู้ป่วยที่มี variation GG หรือ minor allele จะมีอายุเฉลี่ย (50.33 ปี) ในการเกิดโรคน้อยกว่ากลุ่มที่มี variation AA หรือ major allele (54.77 ปี) ($P = 0.0153$) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใดๆ

การศึกษายีน *TCF7L2* โดยวิธี direct sequencing ครั้งนี้ยังพบ variation 12 ตำแหน่ง โดย 6 ตำแหน่งเป็น variation ที่พบใหม่ในประชากรไทย แต่เนื่องจากการศึกษานี้ยังมีตัวอย่างน้อย จึงยังไม่สามารถแปลผลได้ว่ามีผลในการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทยหรือไม่



รูปที่ 21 แสดงความหลากหลายในยีน *TCF7L2* ที่พบในประชากรไทยเปรียบเทียบกับประชากรในเอเชีย

จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่สองในประชากรไทยต่อไป

หนังสืออ้างอิง

References

1. Adeghate E, Schattner P, Dunn E. An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:1-29.
2. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med.* 1997;14 Suppl 5:S1-85.
3. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26 Suppl 1:S5-20.
4. Zeggini E. A new era for Type 2 diabetes genetics. *Diabet Med.* 2007;24(11):1181-6.
5. Moore AF, Florez JC. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and implications for antidiabetic therapy. *Annu Rev Med.* 2008;59:95-111.
6. Feingold J. Genetics of diabetes mellitus. *Diabete Metab.* 1976;1:123-9.
7. Keen H. The genetics of diabetes: from nightmare to headache. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987;294(6577):917-9.
8. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2000;26(1):76-80.
9. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(2):568-72.
10. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006;38(3):320-3.
11. Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S, Almgren P, et al. Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007;56(3):685-93.
12. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A, et al. Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007;39(8):951-3.
13. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007;39(8):977-83.
14. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:228-37.

15. O'Rahilly S, Barroso I, Wareham NJ. Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science*. 2005;307(5708):370-3.
16. Frayling TM. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet*. 2007;8(9):657-62.
17. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007;316(5829):1341-5.
18. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-5.
19. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
20. Jin T, Liu L. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 and Type II Diabetes Mellitus. *Mol Endocrinol*. 2008.
21. Cauchi S, Froguel P. TCF7L2 genetic defect and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2008;8(2):149-55.
22. Smith U. TCF7L2 and type 2 diabetes--we WNT to know. *Diabetologia*. 2007;50(1):5-7.
23. Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ, Hamlington J, Arya R, Abboud HE, et al. Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and its upstream region are associated with type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. *Diabetes*. 2007;56(2):389-93.
24. Douglas KR, Brinkmeier ML, Kennell JA, Eswara P, Harrison TA, Patrianakos AI, et al. Identification of members of the Wnt signaling pathway in the embryonic pituitary gland. *Mamm Genome*. 2001;12(11):843-51.
25. Hayashi T, Iwamoto Y, Kaku K, Hirose H, Maeda S. Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia*. 2007;50(5):980-4.
26. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*. 2007;50(4):747-51.
27. Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, et al. Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(10):2903-8.
28. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, et al. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia*. 2007;50(1):63-7.
29. Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD, et al. Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish:

replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(9):2654-9.

30. Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, et al. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med*. 2006;84(12 Suppl):1-10.
31. Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N, et al. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes*. 2006;55(9):2649-53.
32. van Vliet-Ostaptchouk JV, Shiri-Sverdlov R, Zhernakova A, Strengman E, van Haeften TW, Hofker MH, et al. Association of variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) with susceptibility to type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Diabetologia*. 2007;50(1):59-62.
33. Chang YC, Chang TJ, Jiang YD, Kuo SS, Lee KC, Chiu KC, et al. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. *Diabetes*. 2007;56(10):2631-7.
34. Ng MC, Tam CH, Lam VK, So WY, Ma RC, Chan JC. Replication and identification of novel variants at TCF7L2 associated with type 2 diabetes in Hong Kong Chinese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(9):3733-7.
35. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2155-63.
36. Weedon MN. The importance of TCF7L2. *Diabet Med*. 2007;24(10):1062-6.
37. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, et al. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med*. 2006;355(3):241-50.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

Tangjittipokin W, Chongjarean N, Plengvidhya N, Banchuin N, Yenchitsomanus P. Analysis of variant in *TCF7L2* gene with type 2 diabetes in Thai population, Diabetic Medicine (submitted)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เป็นวิทยากรในโครงการบรรยายและฝึกอบรมภาคปฏิบัติ molecular and cellular biology workshop 2009 หัวข้อเรื่อง Genetic qualitative and quantitative analysis วันที่ 26-29 พฤษภาคม 2552 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
- เป็นวิทยากรในการประชุมวิชาการ Human genomics and molecular biology 2009 หัวข้อเรื่อง Genetic and genomic analysis in diabetes ในวันจันทร์ที่ 14 ธันวาคม 2552 ณ โรงแรม เอส ดี อเวนิว
- เสนอผลงานการวิจัยแบบปากเปล่าในการประชุมนานาชาติ The 11th Symposium on Molecular Diabetology in Asia (The Study Group of Molecular Diabetology in Asia) เรื่อง Association Study of Genetic Polymorphisms of Transcription Factor 7-Like 2 (*TCF7L2*) Gene and Type 2 Diabetes in the Thai Population เมื่อวันที่ 19 ธันวาคม 2552 ณ เมือง Kaohsiung ประเทศไต้หวัน

Analysis of *TCF7L2* variants in Thais with type 2 diabetes

Watip Tangjittipokin¹, Naline Chongjarean¹, Nattachet Plengvidhya², Napatawn Banchuin¹, Pa-thai Yenchitsomanus³

¹Department of Immunology,

²Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine,

³Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700
THAILAND

Correspondence to:

Pa-thai Yenchitsomanus

Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand,
Tel: 66-2-4196666, Fax: 66-2-4181636

Email address: grpye@mahidol.ac.th

a running title not exceeding 75 characters including spaces

ABSTRACT

Aim Transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) is a key element of the Wnt signaling pathway. Genome-wide association studies have showed that *TCF7L2* has been the most important locus predisposing to type 2 diabetes. Genetic polymorphism of the *TCF7L2* is one of the few validated variants with large effects on the risk of type 2 diabetes in the populations of European ancestry. We aim to investigate whether the variants in *TCF7L2* are associated with type 2 diabetes in Thai population.

Methods Five single nucleotide polymorphisms (rs7896340, rs7901695, rs7903146, rs12255372 and rs11196205) were genotyped in type 2 diabetes patients (n=202) and ethnically matched control subjects (n=205) by high resolution melting analysis. The associations of SNPs and their haplotypes with type 2 diabetes and clinical characteristics of the patient were analyzed.

Results SNPs rs7896340 and rs11196205 of the *TCF7L2* were associated with type 2 diabetes in Thai population with p-value 0.009 and 0.013, respectively in dominant inheritance model. The odds ratios (ORs) was 2.34 (95% CI 1.22-4.47) for rs7896340 and 2.33 (95% CI 1.18-4.26) for rs11196205 for the minor allele compared with the major allele. The haplotypes composed of GG minor allele of these two SNPs were also significantly associated with type 2 diabetes with ORs 1.89 (95% CI 1.12-3.19, p=0.018 (global p-value=0.013)). Moreover, patients who carried minor allele of these two SNPs had earlier age onset of diabetes (AA=50.32±10.78 year, AG+GG=45.51±10.52 year, p=0.012).

Conclusions These data suggested that the *TCF7L2* polymorphisms are associated with type 2 diabetes and earlier age onset of the disease in Thai population.

(A structured summary (no more than 250 words))

Keywords: Type 2 diabetes, *TCF7L2*, Thai population

Introduction

Type 2 diabetes is a complex disorder (1) since both genetic and environmental factors contribute to its development and implicated in the etiology. Recent progress in diabetic research has shown that genes involved in pancreatic beta-cell function are candidate genes for type 2 diabetes. The identification of genes that predispose to type 2 diabetes could provide a better understanding in pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention of this increasingly prevalent and costly condition.

Genome-wide linkage analysis had shown that region on chromosome 10q contained type 2 diabetes susceptibility genes, which were later ascribed to intronic variations in the transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene. It was associated with a twofold increase in risk for type 2 diabetes in an Icelandic population (2). This finding has been replicated in cohorts of European (3, 4), Asian (5-7) and African (8, 9) descent. The precise mechanism by which *TCF7L2* predisposes to type 2 diabetes is not clear. It has been suggested that *TCF7L2* encodes a transcription factor that is expressed in fetal pancreas and involved in a Wnt signaling pathway through a regulation of glucagon-like peptide (*GLP-1*) which has a primary role in glucose homeostasis (10). Since there is no previous genetic study describing the impact of *TCF7L2* gene variants on type 2 diabetes risk among Thais, we therefore investigated the potential association of 5 variants at rs7896340, rs7901695, rs7903146, rs12255372 and rs11196205 of *TCF7L2* with type 2 diabetes. To our knowledge, this gene has not been previously tested in the Thai population.

Patients and Methods

Subject

The studied population included 407 Thai subjects. All diabetic patients ($n=205$) were recruited from the diabetic clinic, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. The patients age were greater than 40 years old and all of them were unrelated. Diabetes was defined according to the ADA criteria. Normoglycemic subjects ($n=202$) were recruited among those who were undergone annual health checkup at the same hospital. The inclusion criteria were: a fasting plasma glucose < 5.6 mmol/l. Informed consent was obtained from all subjects before participation; the study protocol was approved by local ethic committees.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocyte by a standard phenol/chloroform method. Five variants of *TCF7L2* were genotyped by melting curve analysis with simple probe in a single run on a LightCycler 480 machine (Roche Diagnostics, Germany). All details of primers, reaction conditions and software utilized are available from the authors.

Data analysis

Genotype distributions were tested at each polymorphic locus for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium before marker-trait association analysis. For analysis of genotype-phenotype association, logistic regression analysis including age, sex, and BMI, as covariates were employed. Tests for the associations of each SNP and haplotype with type 2 diabetes were estimated by using the Haploview software (11) and Haplo.score in R software (<http://www.biostat.wustl.edu/genetics/geneticssoft/manuals/haploscore/haplo.score.html>). This method provides a global test of association and haplotype-specific tests. SPSS software v17.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for general statistical analysis.

Results

Phenotypic characteristics of subjects

We studied *TCF7L2* variations in a total of 407 unrelated subjects including 202 type 2 diabetic case and 205 control subjects. The clinical characteristics of the subjects were described in Table 1.

Association with Type 2 diabetes

The allele and genotype frequencies of five variants were compared between the two study groups. The salient clinical characteristics of study populations are described in Table 1. Genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium at each polymorphic locus. Two SNPs (rs7896340 and rs11196205) were significantly associated with type 2 diabetes ($P=0.0088$ and 0.0121 , respectively, adjusted for age, sex, BMI) (Table 2). For both SNPs, the association was consistent with a dominant model of inheritance, with minor allele carriers having about twice the odds of type 2 diabetes than major allele homozygotes.

The minor G allele (rs7896340) of the *TCF7L2* was significantly increase type 2 diabetes risk with odd ratio 2.34, (95% CI 1.22-4.47, $P=0.009$). The correlation of *TCF7L2* genotypes with other covariates (sex, age, age at diagnosis, BMI, weight, waist, hip waist/hip ratio, systolic-diastolic blood pressure, FPG, total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol) were evaluated whether the G allele contributes to risk of type 2 diabetes through an effect on these covariates. Among type 2 diabetes patients, the G allele was associated with earlier age onset of disease (AA=50.32±10.78 year, AG+GG=45.51±10.52 year, $p=0.0127$) (Table 3). The similar trend was observed for rs11196205 (data not shown). However, in the normoglycemic subjects, *TCF7L2* genotypes did not show any association with clinical characteristics.

The two SNPs (rs7896340 and rs11196205) defined four haplotypes, the frequencies of which are shown in Table 4. The haplotype consisted of two minor alleles (haplotype GG) was more frequent in diabetic subjects ($P=0.018$). Conversely, the three haplotypes carrying at least one of the minor alleles at rs7896340 or rs11196205 (i.e., haplotypes AC, AG, or GC) were all more frequent in control subjects than case subjects. Also haplotype GG was associated with age onset of disease with p -value 0.002.

Discussion

Type 2 diabetes is inheritable metabolic disorder of polygenetic nature (12). Although theoretical analyses emphasized the power of genetic association study in common multifactorial diseases, the finding for genes which increase the risk of type 2 diabetes has not been very successful. The genes implicated in type 2 diabetes confer only modest effects on the disease risk and in many cases have yielded inconsistent results in replication efforts. Only few associations, notably the Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator activated receptor (*PPARG*) gene (13), the Glu23Lys polymorphism in the *KCNJ11* gene (14), and the genetic variants of calpain-10 genes (15), have been convincingly replicated. Recently, researchers searching the cause of a previously identified linkage signal on chromosome 10q found a strong association of a common microsatellite (DG10S478) of *TCF7L2* gene with type 2 diabetes in Icelandic sample, and the result was replicated in the samples from the U.S. and Denmark (2). DG10S478 is located within well-defined linkage disequilibrium (LD) block of 92.1 kb that encompassed exon 4 and parts of two large flanking introns. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs12255372, rs7903146, rs7901695, rs11196205, and rs7895340) within the LD block also showed similarly robust associations with type 2 diabetes (2). Further studies in other European populations, African Americans, Mexican Americans, and Asian Indians confirmed the strong associations with an estimated population attributable risk of 17–28% (3, 5, 9, 16-20). Several genome-wide association studies independently confirmed the strong associations of SNP rs7903146 in the *TCF7L2* locus with type 2 diabetes (21). These data convincingly demonstrated that the genetic variants within *TCF7L2* gene, especially rs7903146 T, are major genetic risk factors for type 2 diabetes in populations of European ancestry. However, unlike in populations of European origin, the frequency of the rs7903146 T-allele is relatively low (~2%) in Chinese and Japanese population (6, 22), raising the question of whether these variants are major contributors of type 2 diabetes in the Asian population. Furthermore, the association study of the genetic polymorphism of *TCF7L2* with type 2 diabetes in the Thai population has been lacking. Therefore, we conducted an association study in unrelated subjects in Thai population.

In this study, rs7895340 and rs11196205 variant of *TCF7L2* showed a significant association with type 2 diabetes in Thai population subjects, comparable with that of rs7903146 T in the populations of European origin. Moreover, our results demonstrate that different variations of the *TCF7L2* gene confer the risk of type 2 diabetes in different populations. These findings provided novel evidence supporting a role of the *TCF7L2* locus in the pathogenesis of type 2 diabetes in Thai population. The underlying mechanisms by which a genetic variation within the intron of the *TCF7L2* gene confers susceptibility of type 2 diabetes remain to be elucidated.

It is noteworthy that the association between variant in *TCF7L2* and type 2 diabetes has been consistently observed in different ethnic groups (2, 10), suggesting a high impact of this gene on the pathogenesis of type 2 diabetes. Therefore, it is reasonable to postulate that *TCF7L2* may also have a role in genetic susceptibility to type 2 diabetes among Thai population. Especially, we found significant association of rs7895340 and rs11196205 with age onset of diabetes. Patients who carried minor allele of these two SNPs had earlier age onset of diabetes. Variants in *TCF7L2* have also been

related to the age of onset of type 2 diabetes in Mexican Americans and Caucasians (23, 24). Such data, however, have so far not been reported in Asian.

However, rs7903146 variant had weak or no association with type 2 diabetes in Thai population. We did not detect any association of rs7903146 with type 2 diabetes in Thai population because of their low allele frequencies were observed. Thus, a sample size at least larger than our study would be needed to detect the effect of these genetic variants.

Conclusion

Our results confirm the association of genetic polymorphisms of the *TCF7L2* gene with type 2 diabetes and are genetic contributors of the risk of type 2 diabetes in Thai population. Follow-up work will be necessary to understand any possible effect of this gene on early age of onset.

Acknowledgments

This research project was supported by grants from the Thailand Research Fund (TRF) Grant for New Researcher (TRG5280002) to WT. PY is a Senior Research Scholar of Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE). NB and NP are the financial supports from Mahidol University. We thank all of the patients for their participation in this study.

Competing interests

Nothing to declare.

References

1. Freeman H, Cox RD. Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet*2006;15(2):202-9.
2. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*2006;38(3):320-3.
3. van Vliet-Ostaptchouk JV, Shiri-Sverdlov R, Zhernakova A, Strengman E, van Haeften TW, Hofker MH, et al. Association of variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) with susceptibility to type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Diabetologia*2007;50(1):59-62.
4. Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JB, Manson JE, van Dam RM, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes*2006;55(9):2645-8.
5. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, et al. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia*2007;50(1):63-7.
6. Hayashi T, Iwamoto Y, Kaku K, Hirose H, Maeda S. Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia*2007;50(5):980-4.
7. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*2007;50(4):747-51.
8. Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdottir S, et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet*2007;39(2):218-25.
9. Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, et al. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med*2006;84(12):1005-14.
10. Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, et al. Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes*2006;55(10):2903-8.
11. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*2005;21(2):263-5.
12. Ridderstrale M, Groop L. Genetic dissection of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*2009;297(1-2):10-7.
13. Buzzetti R, Petrone A, Ribaudo MC, Alemanno I, Zavarella S, Mein CA, et al. The common PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet*2004;12(12):1050-4.
14. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*2003;52(2):568-72.

15. Weedon MN, Schwarz PE, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, et al. Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *Am J Hum Genet*2003;73(5):1208-12.
16. Weedon MN, McCarthy MI, Hitman G, Walker M, Groves CJ, Zeggini E, et al. Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphisms improves disease prediction. *PLoS Med*2006;3(10):e374.
17. Munoz J, Lok KH, Gower BA, Fernandez JR, Hunter GR, Lara-Castro C, et al. Polymorphism in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with reduced insulin secretion in nondiabetic women. *Diabetes*2006;55(12):3630-4.
18. Mayans S, Lackovic K, Lindgren P, Ruikka K, Agren A, Eliasson M, et al. TCF7L2 polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern Sweden. *Eur J Hum Genet*2007;15(3):342-6.
19. Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Dina C, Born C, Marre M, et al. TCF7L2 variation predicts hyperglycemia incidence in a French general population: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes*2006;55(11):3189-92.
20. Marzi C, Huth C, Kolz M, Grallert H, Meisinger C, Wichmann HE, et al. Variants of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) are strongly associated with type 2 diabetes but not with the metabolic syndrome in the MONICA/KORA surveys. *Horm Metab Res*2007;39(1):46-52.
21. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*2007;316(5829):1341-5.
22. Chang YC, Chang TJ, Jiang YD, Kuo SS, Lee KC, Chiu KC, et al. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. *Diabetes*2007;56(10):2631-7.
23. Silbernagel G, Renner W, Grammer TB, Hugl SR, Bertram J, Kleber ME, et al. Association of TCF7L2 SNPs with Age of Onset of Type 2 Diabetes and Proinsulin/Insulin Ratio but not with Glucagon Like Peptide 1. *Diabetes Metab Res Rev*.
24. Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ, Hamlington J, Arya R, Abboud HE, et al. Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and its upstream region are associated with type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. *Diabetes*2007;56(2):389-93.

Table 1 Clinical and biochemical characteristics of type 2 diabetic case subjects and normoglycemic control subjects

	Control			Case			p value
N	202			205			
Men (%)	28.29			28.71			0.9254
Age (years)	53.34	±	9.06	53.75	±	11.00	0.6776
BMI (kg/m ²)	23.85	±	3.20	28.02	±	5.53	2.49x10 ⁻¹⁸
Weight (kg)	59.08	±	9.83	69.76	±	15.33	1.69x10 ⁻¹⁵
Waist (cm)	82.24	±	9.29	88.27	±	12.14	3.77x10 ⁻⁸
Hip (cm)	95.53	±	7.01	99.21	±	10.99	7.21x10 ⁻⁵
Waist/Hip ratio	0.86	±	0.06	0.89	±	0.08	1.14x10 ⁻⁵
Systolic BP (mmHg)	116.00	±	14.86	133.09	±	17.91	9.19x10 ⁻²³
Diastolic BP (mmHg)	71.27	±	9.90	81.43	±	10.40	1.7x10 ⁻²¹
FPG (mmol/l)	87.88	±	6.38	206.75	±	98.93	5.42x10 ⁻⁴¹
Total cholesterol (mmol/l)	205.74	±	36.27	228.08	±	49.08	3.03x10 ⁻⁷
Triglyceride (mmol/l)	110.15	±	59.69	205.13	±	17.57	8.14x10 ⁻⁹
LDL (mmol/l)	124.83	±	33.26	144.15	±	43.73	8.37x10 ⁻⁷
HDL (mmol/l)	62.02	±	17.31	50.28	±	14.44	6.7x10 ⁻¹³

Data are means ± SD.

Table 2 Genotypic and allelic distribution of five variants by glycemic status

	Control (n)	Case (n)	OR (95%CI)	P value*
rs7896340				
AA	182	163	1	0.008
AG	22	36	1.89 (1.03-3.23)	
GG	1	3	3.35 (0.35-32.52)	
AG+GG	23	39	2.34 (1.22-4.47)	0.009
rs7901695				
CC	180	173	1	0.54
CT	24	26	1.13 (0.62-2.04)	
TT	1	3	3.12 (0.32-30.30)	
CT+TT	25	29	1.23 (0.62-2.45)	0.54
rs7903146				
CC	183	172	1	0.106
CT	21	25	1.26 (0.68-2.33)	
TT	1	4	4.23 (0.47-38.19)	
CT+TT	22	29	1.59 (0.78-3.22)	0.198
rs12255372				
GG	191	179	1	0.088
GT	13	20	1.64 (0.79-3.40)	
TT	1	3	3.20 (0.33-31.06)	
GT+TT	14	23	1.96 (0.86-4.44)	0.109
rs11196205				
CC	182	163	1	0.012
CG	22	36	1.83 (1.03-3.23)	
GG	1	3	3.35 (0.35-32.52)	
CG+GG	23	39	2.23 (1.18-4.26)	0.013

*Adjusted for age, sex, and BMI

Table 3 Mean trait values stratified by *TCF7L2* rs7896340 genotype

	Control				Case			
	AA	AG	GG	p value	AA	AG	GG	P value
N	182	22	1		163	36	3	
Age	53.21	54.45	51.00	0.6491	54.77	49.19	50.33	0.0153
Age at diagnosis	-	-	-	-	50.32	44.72	45.00	0.0127
BMI (kg/m2)	23.76	24.79	19.65	0.4278	28.20	26.77	32.95	0.6560
Weight	58.83	61.75	46.00	0.4904	69.83	68.42	81.67	0.8100
Waist	81.92	85.55	69.00	0.3032	88.28	87.75	94.00	0.8363
Hip	95.28	98.09	85.00	0.2979	99.29	98.00	109.67	0.7816
Waist/Hip ratio	0.86	0.87	0.81	0.6218	0.89	0.89	0.85	0.8716
Systolic BP (mmHg)	116.07	116.36	96.00	0.6559	134.33	127.50	133.33	0.0748
Diastolic BP (mmHg)	71.32	71.27	62.00	0.6981	81.58	80.56	83.33	0.7612
FPG (mmol/l)	88.05	86.36	89.00	0.3131	208.13	204.86	154.00	0.5366
Total cholesterol (mmol/l)	206.26	201.05	214.00	0.6209	229.19	224.39	212.00	0.4572
Triglyceride (mmol/l)	112.23	93.55	98.00	0.1759	209.18	193.42	125.33	0.5103
LDL (mmol/l)	125.20	121.55	130.00	0.7009	144.16	144.28	142.00	0.9762
HDL (mmol/l)	61.75	63.73	73.00	0.4765	49.89	52.47	45.00	0.6033

* ANOVA was used to compare geometric mean levels of continuous characteristics across genotypes

Table 4 Haplotype frequencies in T2D case subjects and control subjects

rs7895340/rs11196205 haplotype	Control (n=205)	Case (n=202)	OR (95% CI)	P-value
AC	0.939	0.896	1	-
GG	0.0561	0.104	1.89 (1.12 - 3.19)	0.018
AG	0.0024	0	0	1
GC	0.0024	0	0	1