

การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 และ RUNX3 โดยเคอร์คิวมิน
และสูตรมะนาวผง ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

นายวิกรม วงศ์ไพบูลย์วัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

Modulation of LINE-1 and *RUNX3* methylation by curcumin and lime powder
in bladder cancer cell line

Mister Wikrom Wongpaiboonwattana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

วิกรม วงศ์ไพบุลย์วัฒน์ : การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 และ RUNX3 โดยเคอร์คิวมิน และสูตรมะนาวผง ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ. (Modulation of LINE-1 and RUNX3 methylation by curcumin and lime powder in bladder cancer cell line) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชาญชัย บุญหล้า, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์, อ.ดร.นพ.ฐิติณัฐ ดิษยบุตร, 71 หน้า.

ภาวะเครียดออกซิเดชัน ภาวะอักเสบ และการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ เป็นปรากฏการณ์ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การศึกษาก่อนหน้าได้แสดงให้เห็นว่าทั้งภาวะเครียดออกซิเดชันและภาวะอักเสบแปรผกผันกับการเติมหมู่เมทิลที่ Long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1) ซึ่งเป็นทรานสโพซอนที่กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม นอกจากนี้ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะยังพบการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้นที่โปรโมเตอร์ของยีน *Runt-related transcription factor 3 (RUNX3)* ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 และ RUNX3 โดยวิธี Combined bisulfite restriction analysis และ Methylation-specific PCR ตามลำดับ ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชันและสภาวะอักเสบ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 10 และ 50 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นความเครียดออกซิเดชัน ทำให้ระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้น ขณะที่ระดับการเติมเมทิลที่ LINE-1 ลดลง และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ tocopheryl acetate ความเข้มข้น 50 และ 300 μM ควบคู่กันไป ระดับ protein carbonyl กลับลดลง และระดับการเติมเมทิลที่ LINE-1 กลับเพิ่มขึ้น แต่ระดับการเติมเมทิลที่ LINE-1 ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผง ส่วนการเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของยีน RUNX3 นั้นเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 และลดลงเมื่อได้รับ tocopheryl acetate ควบคู่กัน สำหรับการกระตุ้นภาวะอักเสบ เซลล์ได้รับการกระตุ้นโดย TNF- α ความเข้มข้น 1-20 ng/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าภาวะดังกล่าวไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ สรุป ผลการศึกษานี้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า ภาวะเครียดออกซิเดชันกระตุ้นการเกิดมะเร็งโดยการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ และผลการวิจัยนี้ยังชี้ให้เห็นว่ากลไกระหว่างการเติมหมู่เมทิลในยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีนนั้นน่าจะมีความแตกต่างกัน

ภาควิชาชีวเคมี..... ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา2555..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5374688730 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : BLADDER CANCER/ DNA METHYLATION/ LINE1/ RUNX3/ OXIDATIVE STRESS

WIKROM WONGPAIBOONWATTANA : MODULATION OF LINE-1 AND *RUNX3* METHYLATION BY CURCUMIN AND LIME POWDER IN BLADDER CANCER CELL LINE. ADVISOR : ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA, Ph.D., CO-ADVISOR : PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, THASINAS DISSAYABUTR, Ph.D., 71 pp.

Increases in oxidative stress and inflammation and alterations of DNA methylation are frequently detected in bladder cancer patients. Previously, increased oxidative stress and inflammation was found to associate with hypomethylation of a transposable element, long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1). Hypermethylation of promoter of a tumor suppressor gene, *runt-related transcription factor 3 (RUNX3)*, is well recognized in bladder cancer patients. In this study, changes of DNA methylation in LINE-1 and *RUNX3* promoter in UM-UC-3 cell line under oxidative stress and inflammation conditions were investigated. Combined bisulfite restriction analysis and methylation-specific PCR were used to measure LINE-1 and *RUNX3* promoter methylation, respectively. UM-UC-3 cells were challenged with 10 and 50 μM H_2O_2 for 72 h for induction of oxidative stress. Protein carbonyl content increased in H_2O_2 -treated cells and decreased in H_2O_2 -treated cells pretreated with tocopheryl acetate (50 and 300 μM). LINE-1 hypomethylation was observed in H_2O_2 -treated cells, but it was prevented by pretreatment with tocopheryl acetate. However, LINE-1 methylation did not increased after pretreatment with lime powder regimen. Methylation of *RUNX3* promoter increased in cells exposed to H_2O_2 and decreased in tocopheryl acetate/ H_2O_2 -treated cells. For inflammatory stimulation, cells were treated with 1-20 ng/ml TNF- α for 72 h. No change in LINE-1 methylation was observed. Conclusion, our findings demonstrated that oxidative stress induced hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of *RUNX3* promoter in bladder cancer cell line. These evidences support the hypothesis that oxidative stress promotes tumorigenesis of urothelial cells through modulation of DNA methylation. Our data also imply that mechanistic pathways of DNA methylation between gene and non-gene regions might be different.

Department Biochemistry..... Student's Signature

Field of Study Medical Biochemistry..... Advisor's Signature

Academic Year 2012..... Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงมีสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยตัวข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียว ต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ และ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ สุสิดนัส ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ที่ให้คำแนะนำอย่างดี ตั้งแต่การออกแบบการทดลอง การวางแผนงาน การทดลอง ตลอดจนการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนพัฒนาและส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่สนับสนุนและให้โอกาสข้าพเจ้าได้ศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแห่งนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒน์ ที่อนุเคราะห์เป็นประธานกรรมการ รวมถึง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ทัศนพงศ์ธรรม ที่อนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณสำหรับคำแนะนำและเครื่องมือสำหรับการศึกษาเมทิลเลชั่นจากศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และนักวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการวิจัยของอาจารย์ มา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกคนในห้องปฏิบัติการวิจัยชีวเคมีและโรคทางเมตาบอลิซึม ที่ช่วยถ่ายทอดความรู้ และสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ อบรมสั่งสอน รวมถึงอำนวยความสะดวกต่างๆ จนข้าพเจ้าประสบความสำเร็จมาได้ถึง ณ จุดนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	5
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	5
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
วิธีดำเนินการวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	23
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	26
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	34
ผลของ Hydrogen peroxide ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3.....	34
ผลของ TNF- α ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3.....	35
ผลของมะนาวผงต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3.....	36

ผลของไขมันชั้นต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3.....	37
ระดับ protein carbonyl ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	38
การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	39
ผลของสูตรมะนาวต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ภายใต้ สภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	44
การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ภายใต้สภาวะอักเสบ.....	45
การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 promoter ภายใต้สภาวะเครียด ออกซิเดชัน.....	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	48
สรุปผลการวิจัย.....	48
อภิปรายผลการวิจัย.....	49
ข้อเสนอแนะ.....	53
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	66
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระในมะนาวผง.....	15
2	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	23
3	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	24

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพแสดงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด noninvasive และชนิด invasive.....	11
2	ปัจจัยส่งเสริมและป้องกันการเกิด ROS ในเซลล์ และ transcription factor ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย ROS.....	12
3	กลไกการเกิดอนุมูลอิสระในไขมันและการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิตามินอี.....	14
4	การกระตุ้น NF-κB ผ่าน Canonical pathway และ Non-canonical pathway	17
5	โครงสร้างของ Curcuminoid หลัก 3 ชนิด.....	19
6	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วย sodium bisulfite และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ TaqI และ TspI ของ LINE-1 ที่มีการเติมหมู่เมทิลแบบต่างๆ.....	30
7	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ LINE-1 ที่ได้จากการตัดด้วย restriction enzyme.....	30
8	ความเป็นพิษของ H ₂ O ₂ ความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์ UM-UC-3	34
9	ความเป็นพิษของ TNF-α ความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์ UM-UC-3.....	35
10	ความเป็นพิษของมะนาวผงความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์ UM-UC-3.....	36
11	ความเป็นพิษของ curcumin ความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์ UM-UC-3.....	37
12	ระดับ protein carbonyl เมื่อเซลล์ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ tocopheryl acetate.....	38
13	ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ tocopheryl acetate.....	39
14	ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 แบบ hypermethylated form และแบบ hypomethylated form ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ tocopheryl acetate.....	41
15	ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 แบบ partialmethylated form ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ tocopheryl acetate.....	42
16	การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลรูปแบบต่างๆของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ tocopheryl acetate.....	43
17	ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ มะนาวผง.....	44

ภาพที่		หน้า
18	ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ TNF- α หรือ curcumin.....	45
19	การเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H ₂ O ₂ หรือ tocopheryl acetate.....	47

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine
APS	Ammonium persulfate
^m C	Methylated cytosine
^u C	Unmethylated cytosine
COBRA	Combined bisulfite restriction analysis
DNMT	DNA methyltransferase
EMEM	Eagle's minimum essential medium
GSH	Glutathione
LINE-1	Long interspersed nuclear element 1
LPR	Lime powder regimen
NF-κB	Nuclear factor kappa B
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
ROS	Reactive oxygen species
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SAH	S-adenosylhomocysteine
SAM	S-adenosylmethionine
SD	Standard deviation
SE	Standard error
TA	Tocopheryl acetate
TCC	Transitional cell carcinoma
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TSG	Tumor suppressor gene

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Bladder cancer) เป็นมะเร็งชนิดที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะในผู้ป่วยเพศชายซึ่งพบมากเป็นอันดับ 4 ของมะเร็งทั้งหมด มีอัตราการตายเท่ากับ 4 และ 1.1 คนต่อประชากรทุก 100,000 คนในเพศชายและหญิงตามลำดับ (1) สำหรับประเทศไทยอุบัติการณ์ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเท่ากับ 4.2 และ 1.3 คนต่อประชากรทุก 100,000 คนในเพศชายและหญิงตามลำดับ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีหลายชนิดจำแนกตามชนิดของเซลล์ที่เป็นมะเร็ง ซึ่งชนิดที่พบมากที่สุดคือมะเร็งของเซลล์เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ (Transitional cell carcinoma, TCC) พบได้มากถึงร้อยละ 90 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด และสามารถแบ่งตามระดับความรุนแรงได้ 2 แบบ คือ superficial type และ muscle invasive type ซึ่งส่วนใหญ่ที่พบเป็นชนิด superficial type และปัญหาที่สำคัญของ superficial TCC คือมีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำสูง ปัจจุบันมีผู้ป่วยจำนวนมากที่ต้องเข้ารับการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะซ้ำ (Recurrent TCC) ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและสภาพจิตใจของผู้ป่วย ดังนั้น การยับยั้งการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซ้ำจึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาและฟื้นฟูคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยให้ดีขึ้น

ปัจจัยส่งเสริมการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งเป็นปัจจัยภายนอก เช่น การสูบบุหรี่ การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารหนู (Arsenic) การสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง เช่น aromatic amine, aniline และ polycyclic aromatic carbon (2) และปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม เพศ อายุ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งเสริมให้กลไกการทำงานของเซลล์เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะบกพร่อง เช่น ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระลดลง เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) การซ่อมแซมดีเอ็นเอลดลงและการกลายพันธุ์ของยีนสะสมมากขึ้น มีการแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง (oncogenes) เพิ่มขึ้น ขณะที่การแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes, TSG) ลดลง ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่มีการตายแบบ apoptosis ลดลง จนกระทั่งเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

การแสดงออกของยีนนอกจากจะถูกควบคุมโดย gene promoter และโปรตีน transcription factors แล้ว การเปลี่ยนแปลงในระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetic modification) ก็สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน ซึ่ง epigenetic regulation เป็นกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในดีเอ็นเอ แต่เป็นการ

เปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบอื่นที่อยู่รอบๆ ดีเอ็นเอ เช่น การเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ (DNA methylation) และการเติมหมู่เมทิลและอะเซทิลของโปรตีนฮิสโตน (Histone modification) กระบวนการ DNA methylation เป็นการเติมหมู่เมทิลให้กับนิวคลีโอไทด์ชนิด cytidine (C) พบการเติมหมู่เมทิลมากที่ตำแหน่ง CpG dinucleotides รายงานการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่าที่ตำแหน่ง promoter ของ TSG จะมีการเติมหมู่เมทิลมากขึ้น เรียกว่า promoter hypermethylation ทำให้ transcription factors และ RNA polymerase ไม่สามารถจับกับ promoter ได้ จึงส่งผลให้การแสดงออกของ TSG ลดลง (3) Kim และคณะ รายงานว่า *runt-related transcription factor 3 (RUNX3)* เป็น TSG สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (4) และพบว่าในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter มากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวแทนในการทำนายการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ อย่างไรก็ตามในเซลล์มะเร็งทุกชนิดรวมทั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จะมีระดับ DNA methylation โดยรวมของทั้งจีโนม (Global DNA methylation) ต่ำกว่าเซลล์ปกติ เรียกว่าเกิดภาวะ global hypomethylation (5) ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่นิยมศึกษาเพื่อใช้เป็นตัวแทนของระดับ Global DNA methylation คือ Long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1) เนื่องจาก LINE-1 มีกระจายอยู่ทั่วไปทั้งจีโนม พบประมาณร้อยละ 16.9 ในจีโนมมนุษย์ (6) รายงานวิจัยของ Jurgens และคณะ พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ global hypomethylation สูงกว่าปกติ (7) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Gasche และคณะ พบว่าการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลใน LINE-1 สัมพันธ์กับภาวะการอักเสบ โดยการอักเสบที่มากขึ้นจะส่งผลให้เกิด LINE-1 hypomethylation มากขึ้นด้วย (8)

การอักเสบเป็นกลไกหนึ่งที่ทราบกันดีว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ซึ่งการอักเสบจะส่งเสริมการเกิดมะเร็งทั้งในระยะก่อตัว (Initiation) ระยะส่งเสริม (Promotion) และระยะก้าวหน้า (Progression) โดยการไปกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น ยีนต่อต้านการตายแบบ apoptosis (เช่น IAP, Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP และ survivin) ยีนกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (เช่น COX-2 และ cyclin D1) และยีนสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็ง (เช่น VEGF และ MMP9) เป็นต้น (9) การศึกษาของ Chuang และคณะพบว่าในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ NF- κ B จะอยู่ในรูปที่ถูกกระตุ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการกระตุ้นการอักเสบภายในเซลล์มะเร็ง (10) และ Michaud และคณะได้รวบรวมหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าการอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ การศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการกระตุ้นให้มีการ

ติดเชื้ในระบบทางเดินปัสสาวะและการให้ inflammatory cytokine สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะขึ้นได้ รวมทั้งมีการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่มีประวัติการติดเชื้ในทางเดินปัสสาวะมาก่อน (11)

การอักเสบมีความสัมพันธ์กันกับภาวะ oxidative stress หลายการศึกษาพบว่าปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในภาวะ oxidative stress สูงขึ้นในภาวะที่มีการอักเสบ (12) และหลายงานวิจัยเสนอว่าภาวะ oxidative stress และการอักเสบน่าจะส่งผลต่อการเกิด DNA methylation (13, 14) แม้ว่ากลไกการเปลี่ยนแปลงของระดับ DNA methylation โดยภาวะ oxidative stress และการอักเสบจะยังไม่ทราบชัดเจน อย่างไรก็ตามกลไกหนึ่งที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง ROS กับ Global hypomethylation คือ ROS ที่สูงขึ้นในภาวะ oxidative stress สามารถทำปฏิกิริยากับเบส guanine (G) ในดีเอ็นเอ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ให้กลายเป็น 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) หรือ O⁶-methylguanine ได้ ส่งผลให้เอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ไม่สามารถเติมหมู่เมทิลในตำแหน่งที่ดีเอ็นเอถูกทำลายนั้นได้ (15) อีกกลไกหนึ่งคือ oxidative stress และ nitrosative stress จะไปกระตุ้นการสร้าง glutathione จาก homocysteine ซึ่งถูกสร้างมาจาก S-adenosylmethionine (SAM) ทำให้ในเซลล์มีปริมาณปริมาณของ SAM ลดลง ซึ่ง SAM เป็นตัวให้หมู่เมทิล (methyl donor) ในปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ DNMT จึงส่งผลให้มีการเติมหมู่เมทิลได้น้อยลง (16) ส่วนการเกิด promoter hypermethylation นั้นยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน แต่พบว่าที่ยีน *RUNX3* จะมีการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับ nitric oxide ที่เกิดขึ้นภายหลังมีการอักเสบจากการติดเชื้ (17)

จากที่กล่าวมาข้างต้นภาวะ oxidative stress เป็นสาเหตุที่สำคัญต่อการเกิดการกลายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรม (genetic mutation and epigenetic change) และเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิดมะเร็งทุกชนิด รวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยการศึกษาพบว่าระดับ oxidative product ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ oxidative stress สูงกว่าคนปกติ (18-21) ดังนั้นการให้สารต้านอนุมูลอิสระจึงน่าจะส่งผลดีต่อการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ วิตามินอีเป็นวิตามินที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน มีการศึกษาพบว่าวิตามินอีมีส่วนยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (22) และยังมีผลของการรับประทานวิตามินอีเป็นอาหารเสริมพบว่าการได้รับวิตามินอีเสริมหรือในผู้ที่รับประทานวิตามินอีเป็นประจำอยู่แล้ว สามารถลดอัตรา

เสี่ยงและลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ (23-26) อย่างไรก็ตามยังมีอีกหลายการศึกษาที่พบว่าการรับประทานวิตามินอีเสริมหรือการรับประทานอาหารที่มีวิตามินอีสูงนั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับการลดความเสี่ยงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (27-29) ดังนั้นการใช้วิตามินอีในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจึงยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ แต่รายงานล่าสุดของ Lotan และคณะ (30) พบว่า อัตราการเกิดมะเร็งนั้นไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ให้วิตามินอีหรือกลุ่มที่ให้วิตามินอีควบคู่กับ selenium กับกลุ่มที่ให้ยาหลอก สารต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งคือสูตรมะนาวผง (Lime powder regimen, LPR) ซึ่งคิดค้นโดยศาสตราจารย์ปิยะวัฒน์ ไตสุโขวงศ์และคณะ และจากการศึกษาของ ไตสุโขวงศ์และคณะ พบว่าสูตรมะนาวผงมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระสูง และมีความสามารถในการลดภาวะเครียดออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคนี้ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญ (31) ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า วิตามินอีและสูตรมะนาวผงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถลด oxidative stress ได้ จึงน่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ DNA methylation ใน LINE-1 และ RUNX3 promoter ของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้เช่นกัน

Curcumin เป็นสารประกอบสีเหลือง จัดอยู่ในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoid) เป็นองค์ประกอบหลักในขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) และพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ซึ่งขมิ้นชันถูกนำมาใช้ประกอบอาหารในเอเชีย รวมถึงประเทศไทยด้วย มีงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า Curcumin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (32, 33) นอกจากนี้ Curcumin ยังมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยพบว่า Curcumin สามารถยับยั้งการกระตุ้นของ NF- κ B ได้ (34) ซึ่ง NF- κ B ที่ถูกกระตุ้นจะนำไปสู่การสร้าง ROS และ RNS แล้วนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้น Curcumin จึงน่าจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลทั้งในบริเวณ promoter ของ TSG และใน LINE-1 นำไปสู่การยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์มะเร็ง

จากคุณสมบัติของ วิตามินอี สูตรมะนาวผง และ Curcumin ในขมิ้นชัน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการให้สารทั้งสามชนิดนี้ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 promoter และ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดไม่ลุกลาม (UM-UC-3 cell) โดยใช้ H₂O₂ และ TNF- α เป็นตัวกระตุ้นภาวะ oxidative stress และ inflammation ตามลำดับ ผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงบทบาทของ oxidative stress และ inflammation ที่มีผลต่อการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 promoter และ LINE-1 รวมทั้งทราบถึงคุณสมบัติของวิตามินอี สูตรมะนาวผง และ Curcumin ในการยับยั้งมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของภาวะ oxidative stress และภาวะอักเสบโดยการกระตุ้นด้วย H_2O_2 และ TNF- α ตามลำดับ ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอที่ LINE-1 และ RUNX3 promoter ในเซลล์ UM-UC-3
2. เพื่อศึกษาผลของภาวะอักเสบ โดยการกระตุ้นด้วย TNF- α ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอที่ LINE-1 ในเซลล์ UM-UC-3
3. เพื่อศึกษาผลของ วิตามินอี curcumin และสูตรมะนาวต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอที่ LINE-1 ในเซลล์ UM-UC-3 ที่อยู่ภายใต้ภาวะ oxidative stress และภาวะอักเสบ
4. เพื่อศึกษาผลของ วิตามินอี ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอที่ RUNX3 promoter ในเซลล์ UM-UC-3 ที่อยู่ภายใต้ภาวะ oxidative stress

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลในเซลล์เพาะเลี้ยงเท่านั้น โดยเลือกใช้เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด Urothelial carcinoma และใช้ H_2O_2 และ TNF- α เป็นตัวกระตุ้นภาวะ oxidative stress และ inflammation ตามลำดับ

ข้อตกลงเบื้องต้น

เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ

ข้อจำกัดในงานวิจัย

การศึกษาค้นคว้านี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* experiment) โดยใช้เซลล์ UM-UC-3 ชนิดเดียว ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด Urothelial carcinoma ในมนุษย์ ผลการทดลองอาจไม่สามารถอธิบายผลที่จะเกิดขึ้นจริงในมนุษย์ (*in vivo*) ได้ทั้งหมด

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Bladder cancer หรือโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือการที่เนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะ แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากผิดปกติจนเกิดเป็นเนื้องอกขึ้น มักเกิดที่เยื่อบุผิวชั้นนอกและอาจลุกลามไปยังเนื้อเยื่อชั้นในหรืออวัยวะอื่นๆได้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด
2. Superficial bladder cancer เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดที่ไม่ลุกลามไปยังชั้นกล้ามเนื้อ มี 3 ระยะ ได้แก่ CIS (carcinoma *in situ*), Ta (non-invasive papillary tumor) และ T1 (limited to lamina propria invasion)
3. UM-UC-3 cell line คือเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดหนึ่ง ที่คัดแยกมาจากเซลล์เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะส่วนที่เป็นมะเร็ง จากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชาย
4. Epigenetics คือการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับเหนือพันธุกรรม กล่าวคือเป็นการควบคุมโดยไม่มี การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในดีเอ็นเอ ในการศึกษาจะเน้นการควบคุมโดยการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ (DNA methylation) เป็นหลัก
5. DNA methylation คือการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอโดยการเติมหมู่เมทิลไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบส cytosine ที่อยู่ติดกับ guanine (CpG dinucleotide) เนื่องจากบริเวณ promoter และส่วนต้นของ exon ตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นบริเวณที่พบ CpG หนาแน่นกว่าตำแหน่งอื่นในจีโนม (CpG islands) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของระดับ DNA methylation มักเกิดขึ้นที่บริเวณนี้
6. Promoter hypermethylation คือสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีนใดยีนหนึ่งเพิ่มขึ้นจากระดับปกติ
7. Global hypomethylation คือสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอโดยภาพรวมทั้งจีโนมที่ลดลงจากระดับปกติ
8. Hypermethylated form คือสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 โดยมีการเติมที่ cytosine ทั้ง 2 ตำแหน่งใน LINE-1 ที่ศึกษาในการทดลองนี้
9. Hypomethylated form คือสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 โดยไม่มีการเติมที่ cytosine ทั้ง 2 ตำแหน่งใน LINE-1 ที่ศึกษาในการทดลองนี้

10. Partial methylated form คือสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 โดยมีการเติมที่ cytosine ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งจาก 2 ตำแหน่งใน LINE-1 ที่ศึกษาในการทดลองนี้
11. Oxidative stress หรือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน คือ ภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ มีระดับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนแปลงไป
12. Inflammation หรือ สภาวะอักเสบ คือสภาวะที่ร่างกายปรับตัวเพื่อรักษาการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เช่น การเกิดบาดแผล หรือ การติดเชื้อ โดยสภาวะนี้เซลล์จะมีการหลั่ง cytokine ต่างๆ ออกมา ซึ่งมีผลควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ด้วย
13. Lime powder regimen คือสูตรมะนาวผงที่คิดค้นโดย ศ.ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ และคณะ เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคทางระบบทางเดินปัสสาวะ ผลิตจากมะนาวโดยเทคนิค freeze-dry พบว่ามีคุณสมบัติเป็นแหล่งของซีเทรตและสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของภาวะ oxidative stress และภาวะอักเสบ ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
2. ทราบผลของภาวะ oxidative stress ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอของ *RUNX3* promoter ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
3. ทราบผลของ วิตามินอี curcumin และสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน
4. ทราบผลของ วิตามินอี ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอของ *RUNX3* promoter ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน
5. ทราบผลของ H_2O_2 , $TNF-\alpha$, curcumin และสูตรมะนาวผงต่อการตายของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
6. องค์ความรู้พื้นฐานใหม่เกี่ยวกับการกระตุ้นการเกิด LINE-1 hypomethylation และ *RUNX3* promoter hypermethylation ด้วย ROS และ inflammatory cytokine

วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 ถูกเลี้ยงให้อยู่ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน และสภาวะอักเสบ ด้วยตัวกระตุ้น H_2O_2 และ $TNF-\alpha$ ตามลำดับ แล้ววัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ ภายใต้ตัวกระตุ้นความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใช้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาวัดสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 และ *RUNX3* promoter ด้วยวิธี Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) และ Methylation-specific PCR (MSP) ตามลำดับ จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีความเครียดออกซิเดชัน หรือสภาวะอักเสบ ควบคู่กับการยับยั้งด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (tocopheryl acetate และ LPR) และสารต้านการอักเสบ (curcumin) แล้วนำมาวัดปริมาณการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 และ *RUNX3* promoter

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Bladder cancer)

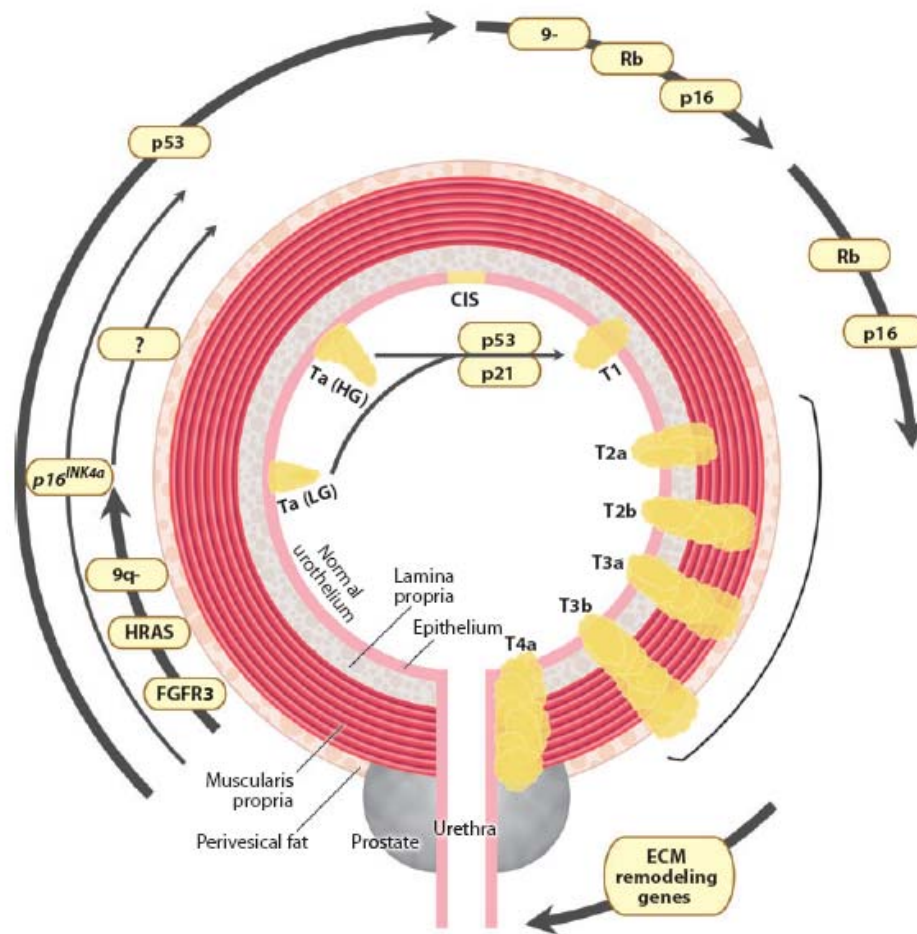
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ โดยพบผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในชาย 10.1 คนจาก 100,000 คน และในหญิง 2.5 คนจาก 100,000 คน และมีอัตราการเสียชีวิตในชาย 4 คนจาก 100,000 คน และในหญิง 1.1 คนจาก 100,000 คน (1) โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบได้ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 3-4 เท่า โดยพบมากเป็นอันดับที่ 4 ของมะเร็งทั้งหมดในเพศชาย อายุเฉลี่ยของผู้ที่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะอยู่ที่ 65 ปี ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ การสูบบุหรี่ การได้รับสารหนู (arsenic) ในน้ำดื่ม และการสัมผัสสารก่อมะเร็ง ได้แก่ aniline, aromatic amine และ polycyclic aromatic carbon ซึ่งผู้ที่ทำงานในโรงงานสี โรงพิมพ์ โรงงานแปรรูปเหล็กและอะลูมิเนียม รวมถึงโรงงานผลิตยาง จะได้รับสารเหล่านี้ในปริมาณมากกว่าคนทั่วไป (2)

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีหลายชนิด แบ่งตามชนิดของเซลล์ที่เป็นมะเร็ง ได้แก่ urothelial carcinoma หรือ transitional cell carcinoma (90%), squamous cell carcinoma, adenocarcinoma และมะเร็งของเซลล์อื่นๆ (~10%) เมื่อแบ่งตามความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะไม่ลุกลาม (non-invasive หรือ superficial type) และระยะลุกลาม (muscle invasive type) ซึ่งระยะไม่ลุกลามจะมีการเจริญของเซลล์มะเร็งอยู่บริเวณชั้น epithelium เท่านั้น ส่วนระยะลุกลามจะมีการเจริญของเซลล์มะเร็งเข้าไปในชั้น lamina propria และชั้น muscularis propria ซึ่งระยะการลุกลามมี 3 ระยะ ได้แก่ CIS (carcinoma *in situ*), Ta (non-invasive papillary tumor) และ T1 (limited to lamina propria invasion) (ภาพที่ 1) ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะไม่ลุกลาม และพบว่ามีอัตราการเกิดซ้ำของมะเร็งภายหลังการผ่าตัดสูง ซึ่งเป็นปัญหาหลักที่สำคัญในการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะ อาการของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะนั้นมีเพียงการปัสสาวะเป็นเลือด ซึ่งบางครั้งอาจแสดงอาการเล็กน้อยจนคนไข้ไม่สังเกตเห็น การตรวจวินิจฉัยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีหลายวิธี ได้แก่ 1. การตรวจโดยการถ่ายภาพ (Imaging) ซึ่งมีทั้งการถ่ายแบบ Intravenous urography (IVU) การใช้ Computed tomography (CT) urography และการทำ Transabdominal ultrasound (TU) 2. การตรวจเซลล์ในปัสสาวะ (Urinary cytology) โดยจะตรวจเซลล์ที่หลุดลอกออกแล้วถูก

ชะออกมาพร้อมกับปัสสาวะว่าเป็นเซลล์มะเร็งหรือไม่ 3. การตรวจตัวบ่งชี้มะเร็งในปัสสาวะ (Urine molecular test) โดยตรวจจากดีเอ็นเอและแอนติเจนที่จำเพาะในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น การขาดหายไปของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 9p21 การแสดงแอนติเจน mucin glycoprotein และ carcinoembryonic antigen เป็นต้น (35) 4. การส่องกล้องภายใน (Cystoscopy) ซึ่งจะใช้กล้องขนาดเล็กสอดผ่านท่อปัสสาวะเข้าไปทางท่อทางเดินปัสสาวะ เพื่อตรวจหาตำแหน่งของมะเร็ง 5. การตรวจชิ้นเนื้อ (Transurethral resection) คือเมื่อทำ Cystoscopy แล้ว แพทย์จะตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่เป็นมะเร็งนำมาตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อยืนยันการเป็นเซลล์มะเร็งต่อไป

กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะระดับโมเลกุล

มีการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดต่างๆในระดับโมเลกุล (ภาพที่ 1) การขาดหายของโครโมโซมคู่ที่ 9 เป็นระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เมื่อเริ่มมีการขาดหายของโครโมโซมแล้วเซลล์อาจมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น ประกอบกับการกระตุ้น Receptor tyrosine kinase-Ras pathway มีการกลายพันธุ์ของยีน Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (*HRAS*) และยีน Fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) เซลล์จะเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด low grade Ta พบว่ามะเร็งชนิดนี้จะมีการกลายพันธุ์ของ *FGFR3* ประมาณร้อยละ 70 ในขณะที่มะเร็งชนิด invasive จะมีการกลายพันธุ์แค่ร้อยละ 10-20 (36-38) เนื่องจาก *p16^{INK4a/ARF}* ซึ่งเป็น TSG อยู่บนตำแหน่ง 9p21 การขาดหายของโครโมโซมคู่ที่ 9 มักเกิดร่วมกับ *p16^{INK4a/ARF}* deletion แล้วเซลล์จึงพัฒนาต่อไปเป็น high grade Ta (39) ส่วนในบางกรณีหากมีการขาดหายของโครโมโซมคู่ที่ 9 เซลล์อาจไม่เพิ่มจำนวนแต่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์แทน หากมีการลดการแสดงออกของ *p53* ควบคุมด้วย จะทำให้เซลล์พัฒนาไปเป็น CIS จากนั้นหากยีน Retinoblastoma (*Rb*) ลดการแสดงออกด้วยก็จะทำให้ CIS พัฒนาไปเป็น invasive tumor โดยเริ่มจาก T1 และอาจมีการพัฒนาต่อไปเรื่อยๆโดยมีการกลายพันธุ์ของยีนหลายกลุ่มอย่างต่อเนื่อง อาทิ ยีนควบคุมวงจรของเซลล์ การตาย การเจริญเติบโตของเซลล์ การสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็ง การบุกรุกแพร่กระจาย รวมไปถึงยีนที่ควบคุมการสื่อสารสัญญาณในเซลล์ (2)

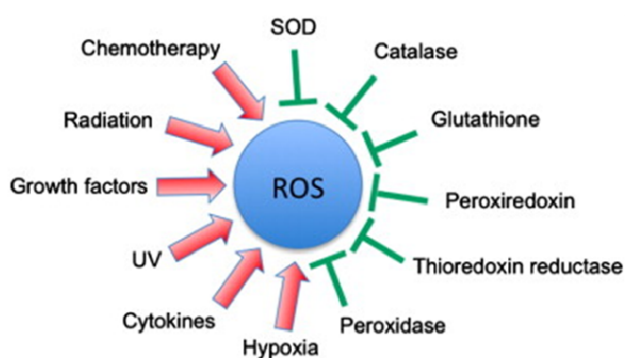


ภาพที่ 1 ภาพแสดงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด non-invasive หรือ superficial (Ta, T1, CIS) และชนิด muscle invasive (T2a, T2b, T3a, T3b, T4a) Ta เป็นชนิดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ไม่บุกรุกไปยังชั้น lamina propria โดยแบ่งเป็น Low grade (LG) และ High grade (HG) ตามลักษณะของชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ CIS เป็นกลุ่มของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอซึ่งยังไม่มีลักษณะเป็นเนื้องอกขึ้นมาแต่มีแนวโน้มจะพัฒนาเป็นมะเร็งชนิด invasive ได้ T1 คือระยะที่มะเร็งลุกลามไปยังชั้น lamina propria T2 คือระยะที่มะเร็งลุกลามไปยังชั้น muscularis propria แบ่งเป็น T2a และ T2b ตามความก้าวหน้าของการลุกลาม T3 คือระยะที่มะเร็งลุกลามไปถึงชั้น perivesical fat แบ่งเป็น T3a และ T3b ตามความก้าวหน้าเช่นกัน ส่วน T4 คือระยะที่มะเร็งลุกลามไปยังต่อมลูกหมาก (2)

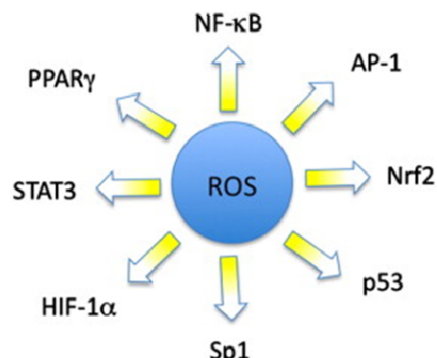
ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress)

Oxidative stress คือภาวะที่เซลล์ไม่สามารถรักษาสมดุลระหว่าง reactive oxygen species (ROS) กับ antioxidants ไว้ได้ เนื่องจากโดยปกติเซลล์ที่ใช้ออกซิเจนในการสร้างพลังงาน จะมี ROS เช่น superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical (OH^\cdot) เกิดขึ้นตลอดเวลา (ภาพที่ 2a) โดยส่วนใหญ่เกิดที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด electron transport chain ดังนั้นในสภาวะปกติ เซลล์จะมีการสร้าง antioxidants เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione ขึ้นมากำจัด ROS เหล่านี้ แต่เมื่อใดก็ตามที่เซลล์ไม่สามารถรักษาสมดุลนี้ได้ ROS ที่มากเกินไปจะไปทำลายองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ ทั้งโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนส่งสัญญาณหรือ transcription factors อีกหลายชนิด (ภาพที่ 2b) ทำให้การทำงานของเซลล์เปลี่ยนไป และในที่สุดส่งผลให้เซลล์กลายเป็นมะเร็งได้ (40)

(a)



(b)



ภาพที่ 2 บ่งชี้กระตุ้น (ลูกศร) และยับยั้ง (\perp) การสร้าง ROS ในเซลล์ (a) และ transcription factors ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย ROS (b) (40)

ในการวัดระดับ oxidative stress นั้นสามารถวัดได้จากปริมาณ oxidative product ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมี oxidative stress เกิดขึ้นในเซลล์ โดยอาจวัดจากปริมาณ protein carbonyl ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (41) หรือปริมาณ 8-OHdG ซึ่งเป็นผลผลิตจากกรดนิวคลีอิก (42) หรืออาจวัดจาก malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในไขมัน (43)

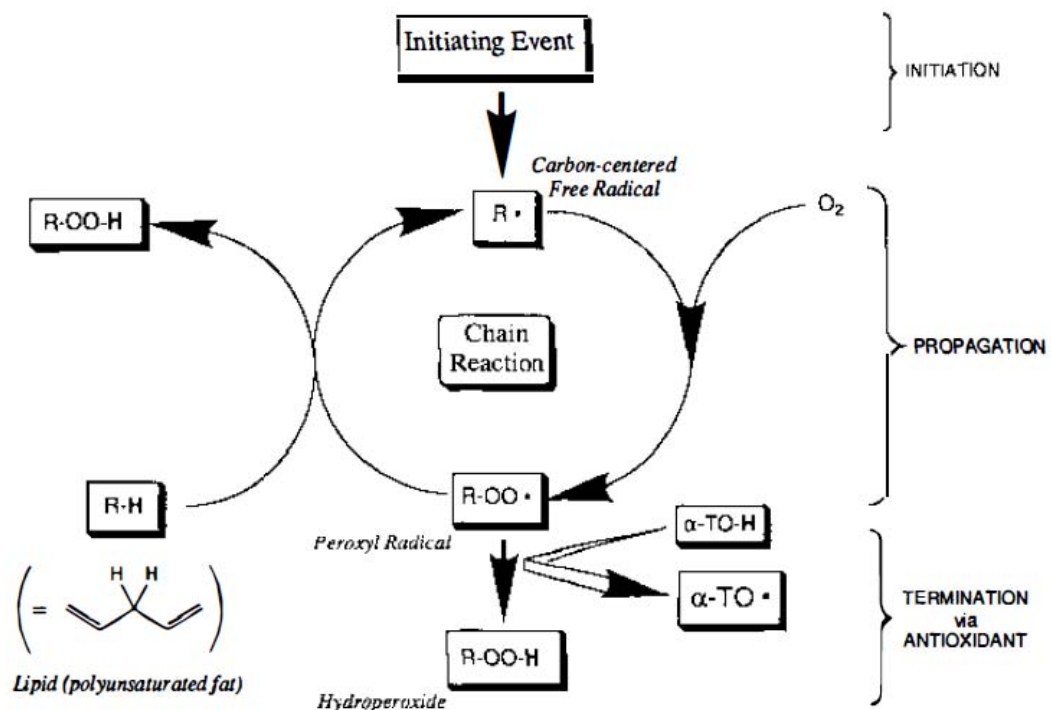
มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง oxidative stress และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดย Honglertsakul และคณะ พบว่าระดับ 8-OHdG และ MDA ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของ oxidative damage ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (18)

นอกจากนี้ Akcay และคณะยังพบว่า 8-OHdG ในเม็ดเลือดขาวมีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วยเช่นกัน (19) แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ oxidative stress สูงกว่าคนปกติ ดังนั้นการยับยั้ง oxidative stress ด้วย antioxidants น่าจะเป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ เช่นงานวิจัยของ Liang และคณะ พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ α -tocopherol ในพลาสมาต่ำกว่าคนปกติ (44) และงานวิจัยของ Bai และคณะ ที่ให้สารสกัดสมุนไพรรesveratrol ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าเซลล์เกิด apoptosis ได้มากขึ้นและเกิด cell cycle arrest และยังสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ด้วย (45)

วิตามินอี

วิตามินอีเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย หน้าที่หลักของวิตามินอีในร่างกายคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่เกิดที่ไขมัน การเกิดอนุมูลอิสระในไขมันนั้นจะเริ่มจากการเกิดอิเล็กตรอนอิสระที่อะตอมของคาร์บอน (carbon-centered radical) จากนั้นคาร์บอนอะตอมนี้จะเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็น peroxy radical จากนั้นจะทำปฏิกิริยากับไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) เกิดเป็น hydroperoxide และได้อนุมูลอิสระเกิดใหม่อีก 1 โมเลกุล ซึ่งจะกลับไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ใหม่ วนเป็นวัฏจักรต่อไป ซึ่งวิตามินอีนั้นมีคุณสมบัติเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีจากการรับอิเล็กตรอนอิสระเข้ามาในโครงสร้าง แล้วใช้คุณสมบัติ resonance เป็นตัวลดความว่องไวของอิเล็กตรอนอิสระ ก่อนที่จะกำจัดอิเล็กตรอนอิสระนี้ต่อไปด้วยตัวรับอิเล็กตรอนและอนุมูลอิสระต่างๆ ในเซลล์ (ภาพที่ 3)

วิตามินอีที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูป α -tocopherol ซึ่งเป็นรูปที่พบได้มากที่สุดและมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด แต่ในทางการค้า นั้น α -tocopherol เป็นวิตามินอีในรูปที่ไม่เสถียร สามารถสลายตัวได้ง่าย จึงไม่สะดวกในการเก็บรักษาและนำมาใช้จริง จึงมีการสังเคราะห์วิตามินอีในรูป tocopheryl acetate ซึ่งมีคุณสมบัติเสถียรกว่า และสามารถถูกเมตาบอลิซึมเป็น α -tocopherol ได้ ในที่สุด มีการศึกษาดูความสามารถในการดูดซึม (bioavailability) ของ tocopheryl acetate ในหนูและคน พบว่า tocopheryl acetate มีคุณสมบัติในการดูดซึมและสามารถตรวจพบอยู่ในรูป α -tocopherol ได้ (46, 47) อีกทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงก็พบว่า tocopheryl acetate สามารถถูกดูดซึมและเปลี่ยนเป็น α -tocopherol ได้เช่นกัน (48)



ภาพที่ 3 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระในไขมันและการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิตามินอี (49)

สูตรมะนาวผง (Lime powder regimen)

สูตรมะนาวผง คือสูตรยาสมุนไพรจากมะนาวที่คิดค้นโดยศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์และอาจารย์สุชาดา ไชยสวัสดิ์ โดยแปรรูปน้ำมะนาวและทำให้อยู่ในรูปของผงมะนาวโดยวิธีการอบแห้งแบบ แช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด (freeze-dried method) มะนาวมีปริมาณวิตามินซีสูง รวมทั้งยังมีสารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และวิตามินอี (ตารางที่ 1) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นกลไกป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดมะเร็งได้ มีการศึกษาสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในผลมะนาวและพืชในวงศ์เดียวกันพบว่ามีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี (50-52) รวมถึงสูตรมะนาวผงสูตรนี้ก็มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและลดความเครียดออกซิเดชันได้ดีเช่นกัน (31) สูตรมะนาวผงจึงเป็นสูตรยาที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระในมะนาวผง (5 กรัมต่อซอง)

องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อซอง)
Citrate	4092 (63 mEq)
Potassium	819 (21 mEq)
Sodium	6.58 (0.29 mEq)
Calcium	78.90
Phosphate	4.10
Oxalate	0.26
Magnesium	3.78
Vitamin C	27.30
Polyphenols	9.20
Flavonoids	8.80
Beta-carotene	0.022
Vitamin E	0.012
Cryptoxanthin	0.007
Lycopene	0.002

กระบวนการอักเสบ (Inflammation)

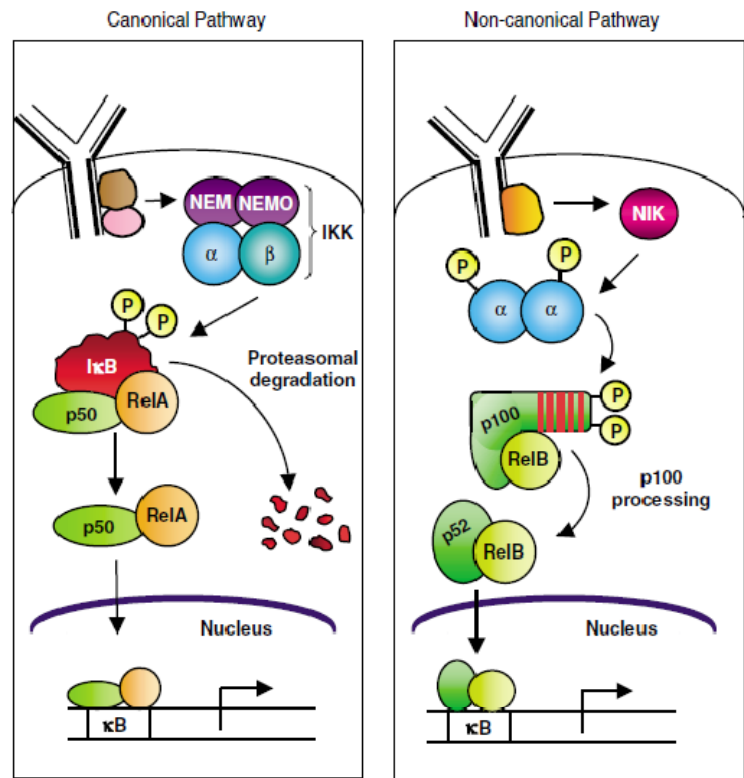
การอักเสบเป็นกระบวนการรักษาการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเกิดจากบาดแผล หรือ การติดเชื้อ ซึ่งเมื่อมีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นแล้ว จะทำให้บริเวณนั้นเกิดสภาวะอักเสบขึ้น (inflammatory microenvironment) การอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันแล้วว่าภาวะอักเสบเรื้อรัง มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วย (11, 53)

ในกระบวนการอักเสบนั้นจะมีการกระตุ้น transcription factor ที่สำคัญตัวหนึ่งคือ NF- κ B ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนหลายกลุ่ม เช่น ยีนต่อต้านการตายแบบ apoptosis ได้แก่ *IAP*, *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *cFLIP* และ *survivin* ยีนกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ได้แก่ *COX-2* และ *cyclinD1* ยีนสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ *VEGF* และ *MMP9* ยีนในการเพิ่ม stress ให้แก่เซลล์ เช่น Inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง cytokine และ

chemokine เช่น *TNF*, *IL-1* และ *IL-6* เป็นต้น (9) ซึ่งวิถีการกระตุ้น NF- κ B มี 2 วิธี คือ canonical และ non-canonical หรือ alternative pathways การกระตุ้น NF- κ B จะเกิดผ่าน canonical pathway เป็นหลัก (ภาพที่ 4) โดยเซลล์จะได้รับการกระตุ้นผ่าน receptors เช่น Toll-like receptor (TLR), Tumor necrosis factor receptor (TNFR) และ Interleukin-1 receptor (IL-1R) ซึ่งเมื่อ receptors เหล่านี้ถูกกระตุ้นแล้วจะกระตุ้น I κ B-kinase (IKK) complex ที่ประกอบไปด้วย NEMO 2 โมเลกุล IKK α และ IKK β อย่างละ 1 โมเลกุลให้ทำงาน จากนั้น IKK complex จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Inhibitor of NF- κ B (I κ B) ที่จับอยู่กับโปรตีน p50 (หรือ NF- κ B1) และ RelA ทำให้ I κ B ถูกเติมหมู่ Ubiquitin แล้วย่อยสลายผ่าน proteasome แล้วปล่อย p50 และ RelA ในรูปที่ถูกกระตุ้นแล้วออกมา จากนั้น p50 และ RelA จะเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสทำหน้าที่เป็น transcription factor ต่อไป ส่วนการกระตุ้น NF- κ B อีกวิธีหนึ่งซึ่งเกิดขึ้นน้อยกว่า คือ non-canonical pathway หรือ alternative pathway ซึ่ง receptors ที่ใช้กระตุ้นนั้นจะเป็นคนละกลุ่มกับ canonical pathway เมื่อ receptors เหล่านี้ เช่น CD40 surface receptor หรือ lymphotoxin β receptor เป็นต้น ถูกกระตุ้นแล้วจะไปกระตุ้น NF- κ B-inducing kinase (NIK) ให้ทำงานโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ IKK complex ซึ่งเป็น complex ของ IKK α 2 โมเลกุล จากนั้น IKK ก็จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน p100 ที่จับกับ RelB ทำให้โปรตีน p100 ถูกตัดออกบางส่วนเหลือเป็นโปรตีน p52 (หรือ NF- κ B2) จากนั้น complex ของโปรตีน p52 ที่จับอยู่กับ RelB จะอยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสแล้วจับกับดีเอ็นเอเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ต่อไป การกระตุ้น NF- κ B ผ่าน canonical pathway จะควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั่วไป เช่น *IL-6*, *IL-8*, *iNOS*, *Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* เป็นต้น ส่วน non-canonical pathway จะควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับ secondary lymphoid organ ต่างๆ เช่น secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1), B-cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) (54)

การอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งทั้งในระยะก่อตัว (initiation) ระยะส่งเสริม (promotion) และระยะก้าวหน้า (progression) ในระยะก่อตัวนั้นการอักเสบจะกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสร้าง ROS และ reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation แล้วสารเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับเบสใน DNA ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น แล้วสะสมการกลายพันธุ์มากขึ้นจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ในระยะส่งเสริมและระยะก้าวหน้า การอักเสบจะกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง cytokines ซึ่งจะกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมี

การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในขณะที่ลดการตายของเซลล์เหล่านี้ จนทำให้เซลล์มะเร็งมีจำนวนเพิ่มขึ้นได้ รวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งให้พัฒนาและบุกรุกแพร่กระจายต่อไปในที่สุด



ภาพที่ 4 การกระตุ้น NF-κB ผ่าน Canonical pathway และ Non-canonical pathway (55)

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าภาวะติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดการพัฒนาของเซลล์ในกระเพาะปัสสาวะไปเป็นเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น รวมถึงการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ก็พบว่าผู้ป่วยจำนวนมากมีประวัติการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (11) และยังพบว่า polymorphism ของยีน IL-6 มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดย polymorphism ที่ทำให้ยีน IL-6 มีการแสดงออกมากกว่าปกติมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของมะเร็ง (56) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าการยับยั้ง NF-κB activation ในเซลล์มะเร็ง น่าจะเป็นแนวทางที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งได้ (57) หนึ่งในสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้ง NF-κB activation ได้ คือ สารสกัดจากขมิ้นชัน หรือสารกลุ่ม curcuminoids

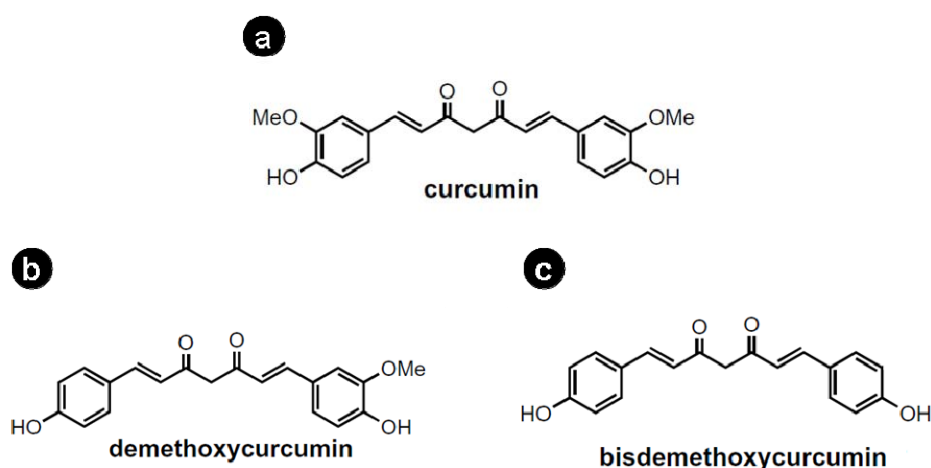
TNF- α เป็น cytokine หนึ่งที่มีบทบาทในการกระตุ้น NF- κ B pathway โดยการสร้าง TNF- α ของเซลล์นั้น เซลล์จะสร้างเป็น transmembrane protein มีขนาด 26 kDa เรียกว่า pro-TNF- α จากนั้น pro-TNF- α จะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม metalloproteinase กลายเป็น soluble protein มีขนาด 17 kDa เรียกว่า mature TNF- α (58) โดย TNF- α ที่หลั่งออกมาจะจับกันเป็น homotrimer ก่อนที่จะเข้าจับกับ TNF receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์แล้วกระตุ้นให้ receptor ทำงาน (59) โดย TNF receptor จะไปกระตุ้น pathway ต่างๆในเซลล์ เช่น NF- κ B pathway หรือ MAPK pathway เป็นต้น

กระบวนการอักเสบยังมีความเชื่อมโยงกับ Oxidative stress โดย ROS มีคุณสมบัติในการกระตุ้น NF- κ B ให้พร้อมทำงาน รวมถึงมีบทบาทในการกระตุ้น NF- κ B ผ่าน cytokines อื่นๆ เช่น IL-1 β หรือ TNF- α ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง (60) จากนั้น NF- κ B จะไปกระตุ้นยีนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งให้แสดงออกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว รวมถึงกระตุ้นการสร้าง ROS และ RNS ให้เพิ่มขึ้นด้วย (61) การอักเสบนั้นสามารถกระตุ้น oxidative stress ได้หลายช่องทาง พบว่า TNF- α สามารถกระตุ้นการสร้าง ROS ใน neutrophil ได้ ในขณะที่ IL-1 β , TNF- α และ interferon- γ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS ได้ (12)

Curcumin

Curcumin เป็นสารประกอบที่พบได้ในพืชกลุ่มขมิ้นชัน (*Curcuma* spp.) ซึ่งจัดอยู่ในสารกลุ่ม Curcuminoid โดยในขมิ้นชันจะมี Curcuminoid ประกอบอยู่ 3 ชนิดหลัก คือ Curcumin (Diferuloylmethane), Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin (ภาพที่ 5) ในขมิ้นชันจะมี Curcumin ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 0.15 ของน้ำหนักแห้ง คิดเป็นประมาณร้อยละ 50 ของ Curcuminoid ทั้งหมด (62, 63) ส่วนในผลิตภัณฑ์ขมิ้นชันผงจะมี Curcumin ประกอบอยู่ร้อยละ 0.05-3.14 ของน้ำหนักแห้ง (63) Curcumin สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้เป็น Curcumin ที่สกัดจากขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn. โดยวิธีสกัดด้วยเอทานอล มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองส้ม ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย องค์ประกอบมี Curcuminoid ทั้ง 3 ชนิด โดยมี Curcumin ประมาณร้อยละ 77 Demethoxycurcumin ประมาณร้อยละ 17 และ Bisdemethoxycurcumin ประมาณร้อยละ 3 (64) Curcumin เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อยมาก สามารถละลายได้ดีใน Dimethylsulfoxide (DMSO), Acetone, Ethanol และน้ำมัน มีสีเหลืองและมีช่วงการดูดกลืนแสงประมาณ 420 nm แต่จะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (65) ผลิตภัณฑ์ขมิ้นที่มีจำหน่ายทั่วไปนั้นมี 2 รูปแบบ หนึ่งคือสารสกัด

หายาบจากขมิ้นชัน โดยจะใช้ขมิ้นชันมาบดแล้วอบให้แห้ง บรรจุแคปซูลหรือบรรจุถุง ขมิ้นชันรูปแบบนี้จะมีปริมาณ Curcumin และ Curcuminoid ชนิดต่างๆ เป็นสัดส่วนไม่มาก แต่จะยังคงประกอบไปด้วยสารฟีนอลิกและน้ำมันหอมระเหยที่มีอยู่ในขมิ้นชันโดยธรรมชาติ อีกรูปแบบหนึ่งคือสารสกัด Curcumin จากขมิ้นชัน จะนำขมิ้นชันมาสกัดเอาเฉพาะ Curcumin โดยใช้เอทานอล ขมิ้นชันรูปแบบนี้จะมี Curcumin ประมาณ 70-80% และมี Curcuminoid ชนิดอื่นปริมาณเล็กน้อย ซึ่งทั้งสองรูปแบบนี้มีขายทั่วไปในท้องตลาดและสามารถนำมาใช้ในผู้ป่วยได้โดยไม่เป็นอันตราย มีการศึกษานำ Curcumin มาใช้ต่อต้านมะเร็งเป็นจำนวนมาก พบว่ากลไกออกฤทธิ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งของ Curcumin คือ การขัดขวางกระบวนการอักเสบ (anti-inflammatory action) โดยพบว่า Curcumin มีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของ COX-2 (66, 67) แล้วส่งผลให้ลดการผลิต inflammatory cytokines เช่น IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (68) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวนี้จะเป็นผลจากความสามารถในการยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B โดยพบในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (69, 70) มะเร็งเต้านม (71) มะเร็งปอด (66) มะเร็งตับ (10) และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (72, 73) เป็นต้น นอกจากนี้จากการศึกษาด้วย molecular docking ยังพบว่า Curcumin มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ DNMT1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เติมหมู่เมทิลใน DNA (74) นอกจากนี้กลไกทั้งสองนี้แล้ว Curcumin และ metabolite ของ Curcumin (Tetrahydrocurcumin) ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (75, 76) ซึ่งอนุมูลอิสระมีบทบาทหน้าที่ต่อสารชีวโมเลกุลหลายชนิด และมีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็ง ดังนั้น Curcumin จึงเป็นสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมและน่าสนใจที่จะนำมาใช้ป้องกันการเกิดมะเร็ง



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ Curcuminoid หลัก 3 ชนิด ได้แก่ Curcumin (a), Demethoxycurcumin (b) และ Bisdemethoxycurcumin (c)

DNA methylation

DNA methylation คือ กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ คือ DNA methyltransferase (DNMT) โดยใช้ S-adenosylmethionine (SAM) เป็นตัวให้หมู่เมทิลกับนิวคลีโอไทด์ชนิด cytidine ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ซึ่งในจีโนมของมนุษย์ จะมีบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ cytidine ต่ออยู่กับ guanosine อย่างต่อเนื่องหลายซ้ำ เรียกว่า CpG island ซึ่งเป็นตำแหน่งของการเติมหมู่เมทิล และเมื่อมีการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณนี้แล้ว จะทำให้กีดกันการแสดงออกของยีนบริเวณนั้น เนื่องจากการเติมหมู่เมทิลจะทำให้โครมาตินบริเวณนั้นหดตัวกันแน่น เกิดเป็น heterochromatin ทำให้ไม่สามารถเกิด transcription ได้

เอนไซม์ DNMT ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ มี 3 ไอโซไซม์ คือ DNMT1, DNMT3A และ DNMT3B โดยแต่ละไอโซไซม์จะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้แก่ cytidine เช่นเดียวกัน แต่จะมีบทบาทในสถานการณ์ที่แตกต่างกันไป DNMT1 มีบทบาทในการรักษาการเติมหมู่เมทิลให้คงเดิม (maintenance DNMT) เมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัวดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จะยังไม่มีการเติมหมู่เมทิล จึงต้องอาศัย DNMT1 เป็นตัวเติมหมู่เมทิลให้แก่ดีเอ็นเอสายใหม่นี้ โดยอาศัยหมู่เมทิลของดีเอ็นเอสายคู่สมเป็นตัวนำเอนไซม์เข้ามาเติม รวมถึงเมื่อมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอเกิดขึ้น ดีเอ็นเอสายใหม่ก็ต้องอาศัย DNMT1 ในการเติมหมู่เมทิลด้วยเช่นกัน ส่วน DNMT3A และ 3B มีบทบาทในการเติมหมู่เมทิลใหม่ให้แก่จีโนม แบบ *de novo* methylation โดยไม่ต้องอาศัยหมู่เมทิลที่มีอยู่เดิมเหมือน DNMT1 จึงเป็นไอโซไซม์ที่น่าจะถูกเหนี่ยวนำด้วยสิ่งแวดล้อมได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังมี DNMT ที่ไม่มีบทบาทในการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอหรือจีโนม คือ DNMT2 และ DNMT3L โดย DNMT2 มีบทบาทในการเติมหมู่เมทิลให้แก่ transfer RNA เพื่อป้องกันการสลายตัวจาก stress ต่างๆ ส่วน DNMT3L มีบทบาทเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ histone deacetylase

ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่าที่ promoters ของ TSG จะมีการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้มีการแสดงออกลดลง เช่นยีน *RARβ*, *RASSF1a*, *DAPK*, *CDH1*, *p16* และ *SFN* เป็นต้น ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเป็นมะเร็ง (3, 77, 78) นอกจากนี้ยีนที่สำคัญอีกยีนหนึ่งคือ *RUNX3* พบว่าสามารถนำมาใช้ทำนายการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ รวมถึงทำนายการบุกรุกแพร่กระจายของมะเร็งได้ (4, 79) นอกจากการเติมหมู่เมทิลที่ promoter ของยีนแล้ว ยังมีการศึกษาการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม (Global methylation) ซึ่งพบว่าในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะมีการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมลดลง (Global hypomethylation) โดยพบว่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ (80, 81)

ซึ่งการวิเคราะห์ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมนั้น นิยมวิเคราะห์จากระดับ methylation ของ LINE-1 ซึ่งเป็น transposon ที่พบกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมของมนุษย์ จึงสามารถใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ทั้งจีโนมได้ โดย LINE-1 จะมีส่วน promoter ซึ่งมี CpG island เป็นองค์ประกอบอยู่ภายใน ใช้เป็นตำแหน่งในการตรวจหาการเกิด methylation (82) ซึ่งพบว่าการเกิด global methylation นี้มีความสัมพันธ์กับการอักเสบ โดย Gasche และคณะ (8) ได้กระตุ้นเซลล์มะเร็งช่องปากด้วย IL-6 ซึ่งเป็น cytokine ที่กระตุ้นการอักเสบแบบเรื้อรัง พบว่ามีการลดลงของการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 หลังถูกกระตุ้นด้วย IL-6

Runt-related transcription factor 3 (*RUNX3*)

RUNX3 เป็นยีนที่สังเคราะห์โปรตีนในกลุ่ม runt-related transcription factors (RUNX) ซึ่งมี Runt domain ที่ปลาย N ร่วมกัน ประกอบด้วย 3 ยีน คือ *RUNX1/AML1*, *RUNX2* และ *RUNX3* โดย *RUNX3* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 1p36 ในมนุษย์ โดย *RUNX3* มีคุณสมบัติเป็น tumor suppressor gene ที่ยังไม่รู้จักไกในการควบคุมมะเร็งที่แท้จริง แต่การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าในหนูที่ถูกขัดขวางการทำงานของ *RUNX3* เกิด hyperplasia ขึ้น โดยมีการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์และลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ลง (4) ในการควบคุมการเติมหมู่เมทิลในบริเวณ promoter ของยีน *RUNX3* นั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การเป็นซ้ำ และระยะของโรคด้วย (79) อีกทั้งยังพบว่ามีสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบอีกด้วย โดยเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* และมีการเลี้ยงร่วมกับ macrophage จะมีการเติมหมู่เมทิลที่ promoter ของ *RUNX3* เพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย inhibitor ของ iNOS (17) ดังนั้นในเซลล์มะเร็งจึงมีแนวโน้มที่จะพบ *RUNX3* hypermethylation เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ

Long interspersed nuclear element 1 (LINE-1)

LINE-1 เป็น Retrotransposon ที่พบได้มากถึง 5 แสนซ้ำในจีโนมของมนุษย์ (83) LINE-1 ที่พบในจีโนมมนุษย์นั้นอาจมีขนาดแตกต่างกันไปขึ้นกับกระบวนการจำลองตัวและการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น LINE-1 ทั้งหมดนั้นมีความยาวประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 5' untranslated region ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของตัวเอง Open reading frame (ORF) สำหรับ RNA-binding protein ประมาณ 1 kb มี ORF สำหรับ endonuclease และ reverse transcriptase ยาวประมาณ 4 kb และส่วนของ 3' untranslated region และ poly A อีกเล็กน้อย เนื่องจากคุณสมบัติที่ LINE-1 กระจายตัวอยู่มากในจีโนมมนุษย์จึงนำมาใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์

global DNA methylation (84) ซึ่งการวิเคราะห์จากการเติมหมู่เมทิลโดยใช้ LINE-1 เป็นตัวแทน เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยกว่าการวิเคราะห์ทุกนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์ การเติมหมู่เมทิลจาก LINE-1 นั้น จะใช้ปฏิกิริยาเคมีของ bisulfite ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเฉพาะ กับ cytosine ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลแล้ว ได้ จากนั้นจะใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แล้ววิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีต่างๆต่อไป แต่สำหรับการวิเคราะห์ทุกนิวคลีโอไทด์นั้นจะใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย chromatography หรือวิเคราะห์ด้วยการใช้ DNA methyltransferase ควบคู่กับ SAM ที่ติดสาร กัมมันตรังสี เพื่อดูปริมาณสารกัมมันตรังสีที่จะเพิ่มเข้าไปภายหลังในดีเอ็นเอที่ยังไม่ถูกเติมหมู่ เมทิลมาก่อน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลามาก มีหลายขั้นตอน และใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก

นอกจาก LINE-1 แล้ว ยังมีการใช้ Alu repeats ซึ่งเป็นทรานสโพซอนที่กระจายอยู่ทั่วไป ในจีโนมมนุษย์มาวัด global methylation โดยใช้หลักการเช่นเดียวกับ LINE-1 ในการประเมินการ เติมหมู่เมทิล ซึ่งทั้ง LINE-1 และ Alu ก็สามารถใช้เป็นตัวแทนในการประเมิน global methylation ได้เป็นอย่างดี (84)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมี

ตารางที่ 2 และตารางที่ 3 แสดงเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยนี้

ตารางที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
6, 24 and 96-well culture plate	Nunclon, Roskilde, Denmark
Autoclave	Hirayama, Saitama, Japan
Autopipette 10, 20, 100, 200, 1000 μ l	Bio-Rad, California, USA
Balance	Sartorius, Gottingen, Germany
Cell culture flask 25 cm ²	Corning, New York, USA
Cell culture flask 75 cm ²	Corning, New York, USA
Centrifuge tube 15, 50 ml	Axygen, California, USA
CO ₂ incubator	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Cryotube	SPL lifescience, Gyeonggi-do, South Korea
Distilled water maker	Labconco, Missouri, USA
Freezer (-20°C)	Sanyo Electric, Osaka, Japan
Freezer (-80°C)	Sanyo Electric, Osaka, Japan
Horizontal electrophoresis system	BIO-RAD, California, USA
Hot air oven	Memmert, Schwabach, Germany
Laminar air flow	Esco Technologies, Pennsylvania, USA
Liquid nitrogen container	Taylor-Wharton, Husum, Germany
Low speed centrifuge	KOKUSAN, Japan
Microcentrifuge	Spectrafuge, LABNET, USA
Microcentrifuge tube	Axygen, California, USA
Microwave oven	Sharp, Osaka, Japan

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
Nanodrop	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
PCR machine	Bio-Rad, California, USA
pH meter	Mettler Toledo, Ohio, USA
Refrigerated high speed centrifuge	Hettich, Tuttlingen, Germany
Spectrophotometer	Thermoscientific, Massachusetts, USA
Sterile pipette 15 ml	Corning, New York, USA
STORM scanner	GE Lifescience, Pennsylvania, USA
Thin wall tube	Axygen, California, USA
Vortex mixer	VORTEX-2 GENIE, USA
Water baths	GFL, Burgwedel, Germany

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
10X BSA	New England Biolabs, Massachusetts, USA
25 bp DNA step ladder	Promega, Wisconsin, USA
40% acrylamide/Bis solution 19:1	Bio-Rad, California, USA
Ammonium acetate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Boric acid	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Coomassie brilliant blue dye solution	Bio-Rad, California, USA
Dimethylsulfoxide	Carlo Erba, Val De Reuil, France
Dinitrophenylhydrazine (DNPH)	Riedel-de Haen, Hannover, Germany
dNTP mix	QIAGEN, Hilden, Germany
Eagle's minimum essential medium (EMEM)	Gibco, California, USA
Ethanol	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Ethyl acetate	BDH, Dorset, England
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fetal bovine serum	Gibco, California, USA

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Glycogen	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Guanidine hydrochloride	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
High pure PCR template preparation kit	Roche, Indianapolis, USA
Hydrochloric acid	BDH, Dorset, England
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Vidhyasom, Bangkok, Thailand
Hydroquinone	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Isopropanol	Merck Millipore, Massachusetts, USA
MTT	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NEB buffer	New England Biolabs, Massachusetts, USA
Penicillin Streptomycin	Gibco, California, USA
Phosphate buffer saline solution	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Restriction enzyme <i>TasI</i> และ <i>TaqI</i>	Fermentas, Maryland, USA
Sodium hydroxide	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Sodium metabisulfite	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SyBr GreenI	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
<i>TaqI</i>	Invitrogen, California, USA
<i>Taq</i> DNA polymerase	QIAGEN, Hilden, Germany
<i>TasI</i>	Invitrogen, California, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TNF- α	Gibco, California, USA
Tocopheryl acetate	Mega Lifescience, Bangkok, Thailand
Trichloroacetic acid	BDH, Dorset, England
Tris base	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Trypsin with EDTA	Gibco, California, USA
Wizard DNA clean-up system	Promega, Wiscosin, USA

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เซลล์เพาะเลี้ยง UM-UC-3

UM-UC-3 cell line เป็นเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะของมนุษย์ชนิด Urothelial carcinoma แยกจากผู้ป่วยเพศชาย พัฒนาโดย Grossman ในปี 1986 (85) ซึ่งจาก American Type Culture Collection (ATCC) เพาะเลี้ยงด้วย Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin/ streptomycin ใน flask สำหรับเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ความชื้น 95% กระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress และ Inflammation โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย H₂O₂ และ TNF- α ตามลำดับ การทดสอบผลของวิตามินอี ขมิ้นชัน และสูตรมะนาวผงต่อระดับเมทิลเลชันในเซลล์ ทดลองแบบ dose-dependent ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการศึกษาทั้งหมด 3 ซ้ำ การทดลองใช้เวลา 72 ชั่วโมง โดยจะมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาค่าของ antioxidant ทั้ง Tocopheryl acetate และสูตรมะนาวผงในการยับยั้งผลของ H₂O₂ จะให้เซลล์ได้รับ Tocopheryl acetate หรือสูตรมะนาวผงก่อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงค่อยให้ H₂O₂ แก่เซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การวิเคราะห์การมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธี MTT assay

หลักการเป็นการวัด metabolic activity ที่เกิดขึ้นในเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการสร้าง NADH จากหลาย metabolic pathways และ NADH จะทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ reductase ในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ reductase นี้จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองให้เป็น formazan salt ซึ่งเป็นสารสีม่วง ดังนั้น ปริมาณ formazan salt ที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่มีอยู่ วิธีทำโดยย่อ คือ เพาะเลี้ยงเซลล์ UM-UC-3 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีเซลล์เริ่มต้นที่ 40,000 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง หรือจนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่มีสารที่ต้องการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่มี MTT 0.5 μ g/ml (ภาคผนวก) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นละลาย formazan salt ด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) หลุมละ 100 μ l จากนั้นเขย่าจานเพาะเลี้ยง 10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร

การคำนวณหา % cell viability เมื่อเทียบกับ control

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(\text{OD}_{\text{test}} \times 100)}{\text{OD}_{\text{control}}}$$

OD_{trest} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่ตัวอย่างขมิ้นชันหรือมะนาวผง

$\text{OD}_{\text{control}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ใส่เฉพาะตัวทำละลาย

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง

การสกัดดีเอ็นเอใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) ตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่แนบมา มีวิธีโดยสังเขปคือ นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้ว นำมาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติม binding buffer และ proteinase K ที่มากับชุดสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายและเซลล์ที่บ่มแล้วย้ายใส่ชุด filter ที่มากับชุดสกัด นำไปปั่นเหวี่ยง 10000 xg เพื่อให้สารละลายไหลผ่าน filter ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอจะถูก filter กรองดักไว้ จากนั้นเติมสารละลาย inhibitor removal buffer และ wash buffer ที่ให้มากับชุดสกัด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10000 xg เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนในดีเอ็นเอออกไป ในขั้นตอนสุดท้ายชะดีเอ็นเอออกจาก filter ด้วยการเติม elution buffer ปริมาตร 100 μl เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง 10000 xg จะได้ดีเอ็นเอจากเซลล์ที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยากับ bisulfite และทำ PCR ต่อไปได้

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ด้วยวิธี Combined Bisulfite Restriction Analysis LINE-1 (COBRA LINE-1)

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 นั้น จะใช้ Sodium bisulfite ในการแบ่งแยก ระหว่าง Cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิล (Methylated C) กับ Cytosine ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล (Unmethylated C) โดย Sodium bisulfite จะเปลี่ยน unmethylated C ให้เป็น Uracil (U) ในขณะที่ methylated C จะยังคงเดิม ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป จะสามารถใช้ออกการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 6) วิธี COBRA LINE-1 ที่ใช้ในการศึกษานี้ (5) มีขั้นตอนโดยสังเขปคือ สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอ 200 ng ปริมาตร 50 μl มาทำปฏิกิริยากับ Sodium bisulfite โดยเติม ด้วย 2 M NaOH 5.5 μl แล้วทำปฏิกิริยาโดยเติม 10 mM Hydroquinone 30 μl และ 3 M Sodium bisulfite 520 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป

Wizard DNA-Clean up system (Promega, Wisconsin, USA) โดยนำดีเอ็นเอที่ทำปฏิกิริยาแล้ว ไปผสมกับ resin ในชุดสำเร็จ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ชุด filter ที่ต่อกับ suction แล้ว แล้วเปิด suction ให้ดูดสารละลายทั้งหมดผ่านลง filter จากนั้นล้าง filter โดยเติม 70% ethanol 2 ml แล้วดูดสารละลายผ่าน filter ทำทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วจึงแยก filter ออกมา ประกอบเข้ากับ microcentrifuge tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg เพื่อให้สารละลายออกจาก filter ให้หมดก่อน จากนั้นจึงละลายดีเอ็นเอออกจาก filter โดยเติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 95°C ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg จะได้สารละลายที่มีดีเอ็นเอ แล้วตกตะกอน ดีเอ็นเอโดยเติม 20 mg/ml glycogen 1 μ l, 10 M ammonium acetate 17 μ l, isopropanol 220 μ l บ่มที่อุณหภูมิ -20°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วปั่นให้ตกตะกอนที่ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณในส่วน promoter ของ LINE-1 ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) (Forward primer: 5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTT TTT-3' Reverse primer: 5'-RTAAAACCCCTCCRAACCAAATATAAA-3') โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย $MgCl_2$ 2.5 mM ไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 μ M dNTP ชนิดละ 0.2 mM Hotstart Taq DNA polymerase 1 U และ 1X buffer โดยใช้ Initial denaturation ที่ 95°C 15 นาที และขั้นตอนเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วย Denaturation 95°C, Annealing 50°C, Extension 72°C ขั้นตอนละ 1 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วทำ Final extension 72°C 7 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ซึ่งมีขนาด 160 bp ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *TaqI* และ *TasI* อย่างละ 2 units ที่ 60°C นาน 16 ชั่วโมง (ภาคผนวก) โดย *TaqI* ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง 5'-T'CGA-3' ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 2 bp overhang ส่วน *TasI* ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง 5'-AATT-3' ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4 bp overhang แล้วดูผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย nondenaturing acrylamide gel electrophoresis (8%) ผลการแยกด้วย gel electrophoresis แสดงในภาพที่ 7

ในการคำนวณ %methylation จะคำนวณโดยใช้ %band intensity ของแถบดีเอ็นเอที่ได้ จากผล COBRA LINE-1 ขนาด 160, 98, 80 และ 62 bp มาคำนวณ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ตรวจสอบการเติมหมู่เมทิล 2 ตำแหน่ง เพราะฉะนั้นการเติมหมู่เมทิลจะเกิดได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ คือ เติมหมู่เมทิลทั้ง 2 ตำแหน่ง ($^{13}C_1^{13}C_2$; hypermethylated form) ไม่เติมหมู่เมทิลทั้ง 2 ตำแหน่ง ($^{12}C_1^{12}C_2$; hypomethylated form) เติมหมู่เมทิลเฉพาะตำแหน่งที่ 1 ($^{13}C_1^{12}C_2$) และเติมหมู่เมทิล เฉพาะตำแหน่งที่ 2 ($^{12}C_1^{13}C_2$) ซึ่งเรียกรวมกันว่า partial methylated form การเติมหมู่เมทิลแบบ $^{13}C_1^{13}C_2$ เมื่อผ่านการทำปฏิกิริยาแล้ว สายดีเอ็นเอจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* ได้ ทำให้ได้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอขนาด 80 bp จำนวน 2 ชิ้น การเติมหมู่เมทิลแบบ $^{12}C_1^{12}C_2$ เมื่อผ่านกระบวนการแล้วจะได้

ดีเอ็นเอขนาด 62 และ 98 bp การเติมหมู่เมทิลแบบ ${}^mC_1{}^uC_2$ จะได้ดีเอ็นเอขนาด 160 bp และการเติมหมู่เมทิลแบบ ${}^uC_1{}^mC_2$ จะได้ดีเอ็นเอ จำนวน 3 ชิ้น ขนาด 62, 18 และ 80 bp ดังภาพที่ 6

เมื่อนำมาคำนวณ %methylation ค่า band intensity ของแต่ละ band จะถูกคิดเป็นร้อยละเทียบกับ band อื่นๆ อีก 3 band จากนั้นจะหารด้วยจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ band นั้นก่อน (หาค่า intensity per bp เป็นการ normalization เพื่อเปรียบเทียบ intensity ของดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่เท่ากัน) จากนั้นจึงคำนวณโดยนำ %band intensity ของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่ต้องการมาคำนวณ หารด้วย intensity ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นทั้งหมด ในการ normalize ด้วยจำนวนเบสในสายนิวคลีโอไทด์นั้น จะคำนึงถึงลักษณะปลายสายดีเอ็นเอด้วย โดยปลายด้านที่เกิด overhang จะไม่ถูกนำมาคำนวณด้วย เนื่องจากบริเวณที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้น โมเลกุลของ SyBR green จะไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปจับได้ ดังนั้นแล้วในการคำนวณจะมีสูตรดังนี้

$$\%160 \text{ bp} / 160 = A$$

$$\%98 \text{ bp} / 94 = B$$

$$\%80 \text{ bp} / 77 = C$$

$$\%62 \text{ bp} / 62 = D$$

ส่วน %band intensity ของ 18 bp จะหาจาก D-B กำหนดเป็นค่า E

การหา %methylation ซึ่งเป็นการคิด mC ทั้งหมดโดยไม่แยกรูปแบบ จะคิดจาก

$$C+A$$

แล้วหารด้วย ${}^mC + {}^uC$ ซึ่งคิดได้จาก

$$(C+A)+(A+B+D)$$

เพราะฉะนั้น %methylation จะคิดได้จาก

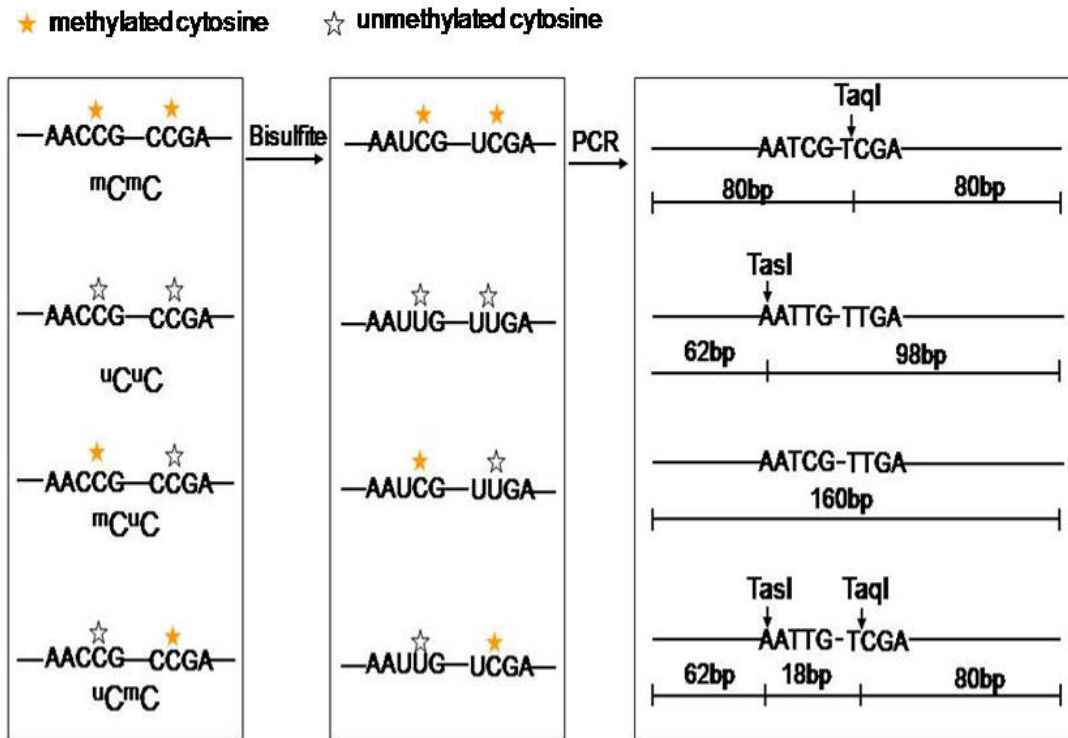
$$\% \text{methylation} = 100(C+A)/(C+2A+B+D)$$

ส่วนการหา %methylation คิดแยกแต่ละรูปแบบจะหาได้จาก

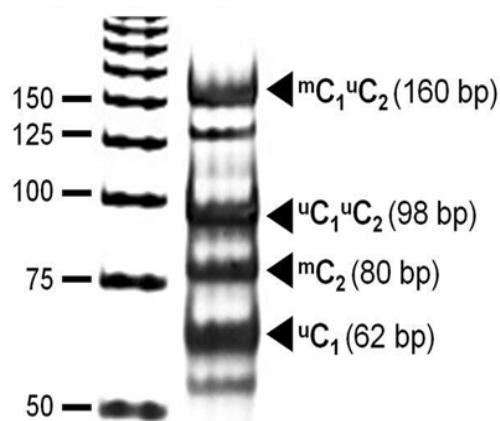
$${}^mC_1{}^mC_2 = 100[(C-E)/2]/[(C-E)/2]+A+B+E]$$

$${}^uC_1{}^uC_2 = 100B/[(C-E)/2]+A+B+E]$$

$$\text{partial methylation } ({}^mC_1{}^uC_2 + {}^uC_1{}^mC_2) = 100(A+E)/[(C-E)/2]+A+B+E]$$



ภาพที่ 6 ผลิตรหัสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วย sodium bisulfite และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* และ *TasI* ของ LINE-1 ที่มีการเติมหมู่เมทิลทั้ง 4 รูปแบบ (86)



ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างผลิตรหัสของ LINE-1 ที่ได้จากการตัดด้วย restriction enzyme เมื่อนำมาแยกด้วย 8% nondenaturing polyacrylamide gel ได้ผลิตรหัสหลัก 4 band คือ 160, 98, 80 และ 62 bp

จากนั้นในการเปรียบเทียบ %methylation ระหว่างเซลล์ในแต่สภาวะต่างๆ จะนำค่า %methylation ที่คำนวณจากสูตรมาคิดเป็นร้อยละเทียบกับ %methylation ของเซลล์ที่ไม่ได้ให้ตัวกระตุ้นใดๆ (control) จะได้เป็นค่า %methylation ที่เทียบกับ control หรือในกรณีที่มีการให้ทั้งตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งทั้งสองอย่าง %methylation ของสภาวะที่ให้ทั้งตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ %methylation ของสภาวะที่ให้ตัวกระตุ้นเพียงอย่างเดียว เพื่อเป็นการดูผลของตัวยับยั้งเท่านั้น

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* ด้วยวิธี Methylation-specific PCR

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter นั้น อาศัยวิธี MSP โดยใช้การทำปฏิกิริยากับ Sodium bisulfite เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ LINE-1 methylation แต่ในขั้นตอน PCR ใช้ primer ที่จำเพาะต่อ *RUNX3* ที่ถูกเติมหมู่เมทิล (methylated *RUNX3*) และ *RUNX3* ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล (unmethylated *RUNX3*) แทนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีวิเคราะห์นั้นเริ่มจากสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยากับ Sodium bisulfite เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ที่ LINE-1 จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่ปรับเปลี่ยนเล็กน้อยจากวิธีของ Homma และคณะ (87) ดังนี้ โพรเมอร์สำหรับ methylated *RUNX3* คือ 5'-ATA ATA GCG GTC GTT AGG GCG TCG-3' และ 5'-GCT TCT ACT TTC CCG CTT CTC GCG-3' ส่วนโพรเมอร์สำหรับ unmethylated *RUNX3* คือ 5'-ATA ATA GTG GTT GTT AGG GTG TTG-3' และ 5'-ACT TCT ACT TTC CCA CTT CTC ACA-3' ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย MgCl₂ 2.1 mM โพรเมอร์ชนิดละ 0.2 μM dNTP ชนิดละ 0.2 mM, Q-solution 4 μl, Hotstart Taq DNA polymerase 1 U และบัฟเฟอร์ 1X อุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยา PCR ใช้ Initial denaturation ที่ 95°C 15 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation 94°C 30 วินาที, Annealing 59°C (สำหรับ methylated *RUNX3*) หรือ 48°C (สำหรับ unmethylated *RUNX3*) นาน 60 วินาที, Extension 72°C 60 วินาที จำนวน 35 รอบ แล้วทำ Final extension 72°C 10 นาที แล้วดูผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย Gel electrophoresis โดยใช้ 8% nondenaturing polyacrylamide gel เช่นกัน

การแยกดีเอ็นเอตามขนาดด้วยวิธี Electrophoresis

ผสมสารละลาย 8% nondenaturing polyacrylamide (ภาคผนวก) แล้วเทใส่พิมพ์สำหรับทำเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำเจลไปประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าในชุด vertical electrophoresis system โดยใช้ 1X TBE buffer (ภาคผนวก)

เป็น tank buffer ใส่สารตัวอย่างที่จะทำการแยกโดยผสมสารตัวอย่าง 10 μ l กับ loading dye 2 μ l แล้วจึงหยอดลงในช่องของเจล จากนั้นให้ไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ที่ 130 V เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบ 60 นาทีแล้ว นำเจลออกจากพิมพ์ แล้วย้อมในสารละลาย SyBR green สำหรับย้อมเจล (ภาคผนวก) เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง STORM scanner

การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง

หลังจากเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่างๆใน 6-well plate ครบกำหนดเวลาแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS ที่เย็น ปริมาตร 1 ml 2 ครั้ง จากนั้นเติม RIPA buffer (ภาคผนวก) ที่แช่เย็นไว้ (4°C) 250 μ l ต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เมื่อครบ 5 นาทีแล้วใช้ scraper ขูดเซลล์ออกจากหลุม แล้วดูสารละลายทั้งหมดเก็บไว้ จะได้โปรตีนสกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl ต่อไป

การวัดระดับ protein carbonyl ด้วยวิธี DNPH assay

นำโปรตีนที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 62.5 μ l (ใช้โปรตีนความเข้มข้น 0.1-10 mg/ml หากความเข้มข้นเกินกว่านี้ให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่น) ส่วนแรกนำไปเติม 2 N HCl 250 μ l เป็น blank sample อีกส่วนหนึ่งนำไปเติม 10 mM DNPH (ภาคผนวก) 250 μ l เช่นกัน เป็น test sample จากนั้นนำทั้งหมดไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง โดยนำมาเขย่าเป็นระยะทุก 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเติม 20% trichloroacetic acid ปริมาตร 300 μ l แล้วบ่มที่ 4°C อีก 10 นาที เมื่อบ่มแล้วจะมีตะกอนเกิดขึ้น ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วย ethanol : ethylacetate (1:1) (ภาคผนวก) ปริมาตร 625 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 xg นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย guanidine hydrochloride (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่ 37°C อีก 30 นาทีเพื่อละลายตะกอน หากยังมีตะกอนเหลืออยู่ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายด้านบนไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ protein carbonyl โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคูณด้วยค่าคงที่ 45.45 จะได้ปริมาณ protein carbonyl ในหน่วย nmol/ml จากนั้นนำปริมาณที่ได้นี้ไปเทียบเป็นปริมาณ protein carbonyl ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด (88)

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี dye binding method

นำ Coomassie brilliant blue dye reagent (Bio-Rad, California, USA) 1 ส่วน มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอีก 4 ส่วน แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 1 ครั้ง จากนั้นใช้ dye reagent ที่กรองแล้ว 1.25 ml ผสมกับโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ 25 μ l โดยเจือจางโปรตีนจากเซลล์ 1 ต่อ 5 ก่อนนำมาทดลอง เมื่อผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ standard BSA ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.8 mg/ml

การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistical analysis)

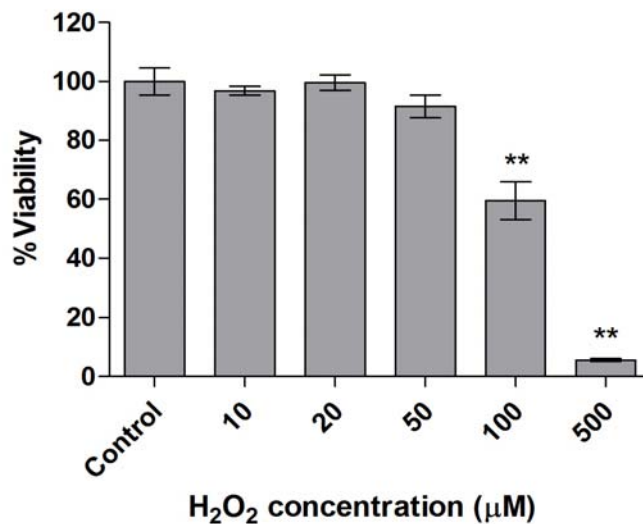
แสดงข้อมูลโดยใช้ค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) หรือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error, SE) และนำเสนอในรูปแบบของกราฟ (GraphPad Prism 5.0, California, USA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้ Two sample T-test และทดสอบความแตกต่างของสองกลุ่มขึ้นไปที่เป็นอิสระต่อกันโดย Kruskal-Wallis test โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ SPSS version 10 (IBM, New York, USA) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลของ Hydrogen peroxide ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3

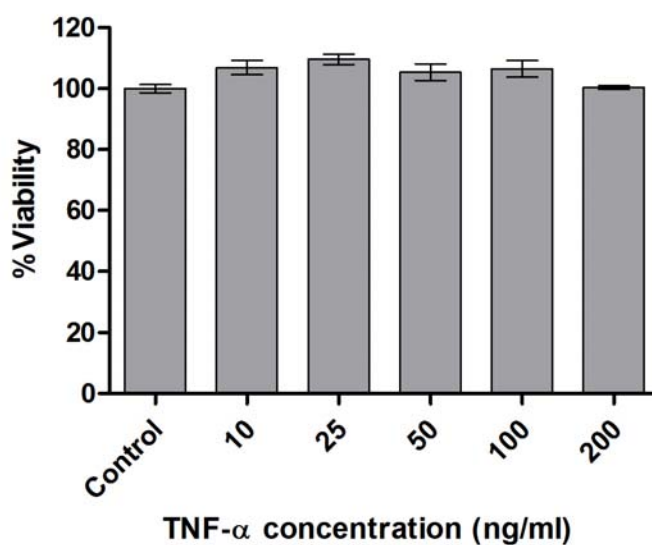
เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี Hydrogen peroxide (H_2O_2) อยู่ 10-500 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT method พบว่า ในสภาวะที่มี H_2O_2 10, 20 และ 50 μM จำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มี H_2O_2 แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี 100 μM H_2O_2 พบว่าเซลล์มีอัตราการมีชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 59.5 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$) (ภาพที่ 8) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 500 μM ทำให้เซลล์มีอัตราการมีชีวิตลดลงเหลือเพียงร้อยละ 5.6 และคำนวณค่า half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ของ H_2O_2 ได้เท่ากับ 109.2 μM (3.7 mg/ml) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 50 μM หรือน้อยกว่า ปกป้องภัยต่อเซลล์ UM-UC-3 หรือไม่ส่งผลให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญ ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ฉะนั้นแล้วในการทดลองนี้ใช้ H_2O_2 ความเข้มข้นไม่เกิน 50 μM สำหรับศึกษาผลของ ROS ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลต่อจากนี้ เพื่อไม่ให้มีปัจจัยด้านการตายของเซลล์มากกระทบต่อผลการทดลอง



ภาพที่ 8 ความเป็นพิษของ H_2O_2 ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 500 μM ต่อเซลล์ UM-UC-3 เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ที่ความเข้มข้น 100 μM ขึ้นไป (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D. และ ** แสดงนัยสำคัญที่ $p < 0.01$)

ผลของ TNF- α ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3

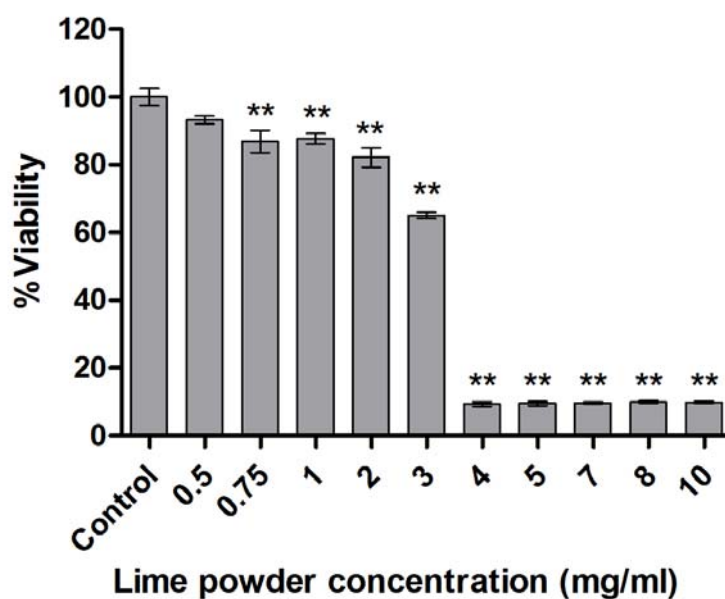
เมื่อเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ภายใต้สภาวะอักเสบโดยเลี้ยงในอาหารที่มี TNF- α ความเข้มข้น 1-200 ng/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT method พบว่า TNF- α ไม่มีผลเพิ่มหรือลดการมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 9) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ TNF- α ที่ความเข้มข้น 1-20 ng/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีการศึกษามาก่อนหน้าแล้วว่ามีผลกระตุ้น NF- κ B ได้ (89, 90)



ภาพที่ 9 ความเป็นพิษของ TNF- α ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 200 ng/ml ต่อเซลล์ UM-UC-3 เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า TNF- α ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แม้ให้ความเข้มข้นสูงถึง 200 ng/ml ($p > 0.05$) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D.)

ผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3

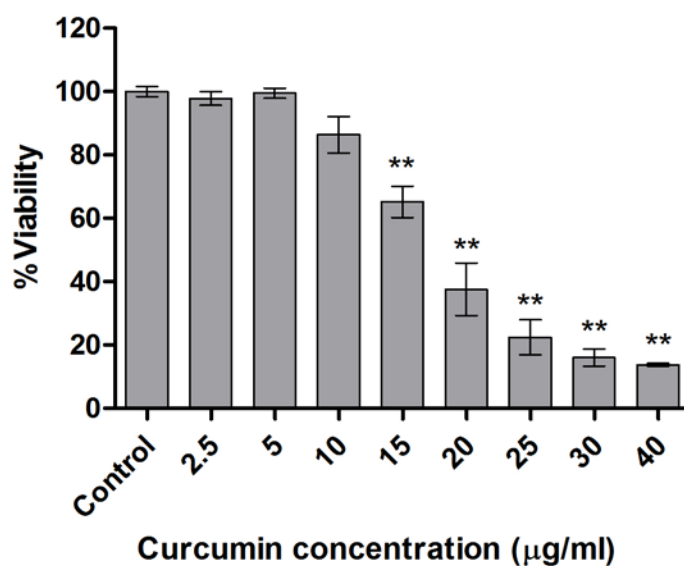
เมื่อศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิตของเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 0.5-10 mg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตด้วยวิธี MTT assay ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.75 mg/ml สูตรมะนาวผงทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (%viability น้อยกว่าร้อยละ 90, $p = 0.021$) (ภาพที่ 10) และส่งผลให้เซลล์ตายลงอย่างมากตั้งแต่ความเข้มข้น 4 mg/ml ขึ้นไป (%viability น้อยกว่าร้อยละ 20, $p < 0.001$) คำนวณค่า IC_{50} ของสูตรมะนาวผงได้เท่ากับ 3.06 mg/ml ซึ่งการที่สูตรมะนาวผงเป็นพิษต่อเซลล์ น่าจะเป็นผลจาก pH ที่เปลี่ยนแปลงไปมาก โดยค่า pH ในอาหารสูตรนี้จะมีค่าประมาณ 5 ในขณะที่ pH ปกติของอาหารเลี้ยงเซลล์จะอยู่ที่ 7 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้สูตรมะนาวผงความเข้มข้น 0.5 mg/ml



ภาพที่ 10 ความเป็นพิษของสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 0.5 ถึง 10 mg/ml ต่อเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 0.75 mg/ml เริ่มทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.021$) และเซลล์ตายลงอย่างมากที่ความเข้มข้น 4 mg/ml ขึ้นไป ($p < 0.001$) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D. และ ** แสดงนัยสำคัญที่ $p < 0.01$)

ผลของ curcumin ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3

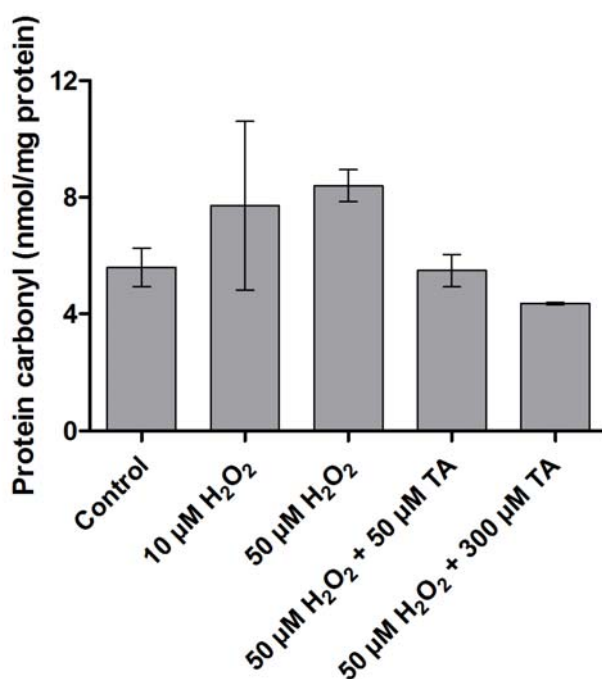
เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี curcumin ความเข้มข้น 2.5-40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตของเซลล์พบว่า เซลล์เริ่มตายมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ curcumin ความเข้มข้น 15 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) คำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 18.4 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ข้มันชั้นความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อไม่ให้เกิดการตายของเซลล์รบกวนต่อผลการทดลอง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ความเป็นพิษของ curcumin ความเข้มข้น 2.5 ถึง 40 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า curcumin ที่ความเข้มข้น 15 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป มีผลทำให้เซลล์ตายลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D. และ ** แสดงนัยสำคัญที่ $p < 0.01$)

ระดับ protein carbonyl ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน

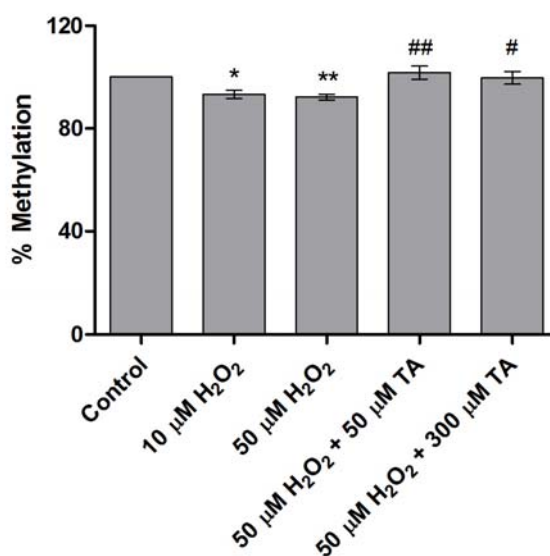
เมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชันมาวัดระดับ oxidative stress โดยวัดจากระดับ protein carbonyl พบว่าในสภาวะที่มี 10 และ 50 μM H_2O_2 เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์มีระดับ protein carbonyl เพิ่มมากขึ้นจาก 5.59 เป็น 7.71 และ 8.40 nmol/mg protein ($p = 0.596$ และ 0.085 ตามลำดับ) และเมื่อให้ tocopheryl acetate 50 และ 300 μM พบว่าระดับ protein carbonyl ลดลงเป็น 5.48 และ 4.35 nmol/mg protein ($p = 0.065$ และ 0.085) ตามลำดับ แสดงว่าการกระตุ้นด้วย H_2O_2 ทำให้เกิด oxidative stress สูงขึ้นได้ (ภาพที่ 12) ที่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติอาจเนื่องมาจากจำนวนครั้งที่ทำซ้ำที่น้อยเกินไป (การทดลองนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง)



ภาพที่ 12 ระดับ protein carbonyl เมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 หรือ tocopheryl acetate (TA) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ 10 และ 50 μM H_2O_2 ($p = 0.596$ และ 0.085 ตามลำดับ) และลดลงเมื่อได้รับ 50 และ 300 μM tocopheryl acetate ควบคู่กันโดยเทียบกับชุดที่ได้รับเฉพาะ 50 μM H_2O_2 ($p = 0.065$ และ 0.085 ตามลำดับ)

การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน

เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยเลี้ยงในอาหารที่มี H_2O_2 10 และ 50 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเซลล์มาสกัดดีเอ็นเอ แล้ววัดสถานะการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ด้วยวิธี COBRA พบว่า ในชุดทดลองที่มี H_2O_2 10 และ 50 μM นั้น เซลล์มีการเติมหมู่เมทิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคิดเป็นร้อยละ 93.35 และ 92.23 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการเติมหมู่เมทิลในชุดการทดลองที่ไม่มี H_2O_2 (ร้อยละ 100) ($p = 0.025$ และ 0.005 ตามลำดับ) (ภาพที่ 13) และเมื่อมีการให้ tocopheryl acetate ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้น 50 และ 300 μM ควบคู่ไปกับ H_2O_2 50 μM พบว่าเซลล์มีการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 101.76 และ 99.78 ตามลำดับ โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีเฉพาะ H_2O_2 50 μM เพียงอย่างเดียวซึ่งมีการเติมหมู่เมทิลร้อยละ 92.23 ($p = 0.003$ และ 0.029 ตามลำดับ)

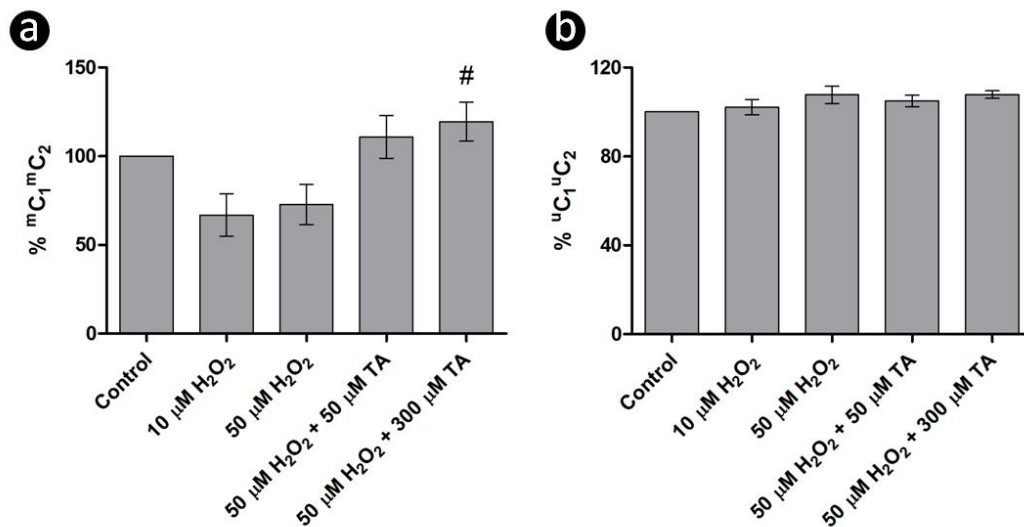


ภาพที่ 13 ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H_2O_2 หรือ tocopheryl acetate เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการเติมหมู่เมทิลลดลงในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 10 และ 50 μM เมื่อเทียบกับ control ($p = 0.025$ และ 0.005 ตามลำดับ) และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับ Tocopheryl acetate (TA) ความเข้มข้น 50 μM และ 300 μM แบบควบคู่กับ H_2O_2 ($p = 0.003$ และ 0.029 ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 เพียงอย่างเดียว (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D., * แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับ control * คือ $p < 0.05$, ** คือ $p < 0.01$, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 # คือ $p < 0.05$ และ ## คือ $p < 0.01$)

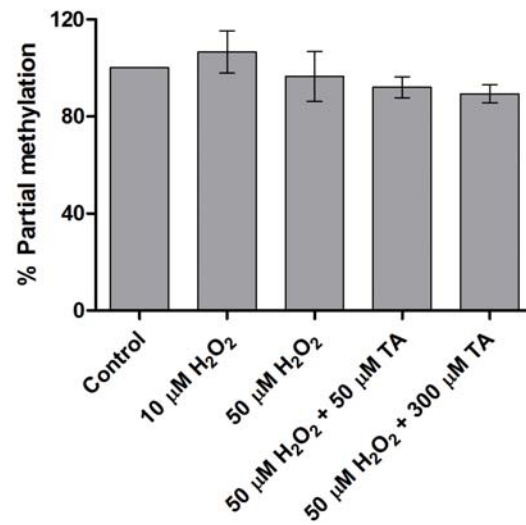
ผลศึกษาการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 จำแนกตามรูปแบบการเกิด methylation ได้แก่ hypomethylated form (${}^u\text{C}_1{}^u\text{C}_2$), partial methylated form (${}^u\text{C}_1{}^m\text{C}_2$ และ ${}^m\text{C}_1{}^u\text{C}_2$) และ hypermethylated form (${}^m\text{C}_1{}^m\text{C}_2$) เมื่อพิจารณา ระดับ hypermethylated form ลดลงมากจากร้อยละ 100 เป็นร้อยละ 66.83 และ 72.65 ($p = 0.015$ และ 0.207) ในเซลล์ที่ให้ 10 และ 50 μM H_2O_2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้ให้ H_2O_2 (ภาพที่ 14a) และมีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อให้ 50 และ 300 μM tocopheryl acetate เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ 50 μM H_2O_2 เพียงอย่างเดียว จาก 72.65 เพิ่มขึ้นเป็น 110.86 และ 119.44 ($p = 0.067$ และ 0.027) ตามลำดับ ในขณะที่ระดับ hypomethylated form เพิ่มขึ้นไม่มากนัก จากร้อยละ 100 ในเซลล์ควบคุมเป็นร้อยละ 102.14 และ 107.73 ($p = 0.541$ และ 0.150) ในเซลล์ที่ได้รับ 10 และ 50 μM H_2O_2 ตามลำดับ (ภาพที่ 14b) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 เพียงอย่างเดียว กับเซลล์ที่ได้รับ tocopheryl acetate คู่กัน พบว่าระดับ hypomethylated form เปลี่ยนแปลงจากร้อยละ 107.73 เป็นร้อยละ 104.97 และ 107.86 ($p = 0.563$ และ 0.983) ในเซลล์ที่ได้รับ 50 และ 300 μM tocopheryl acetate ตามลำดับ (ภาพที่ 14b)

ระดับ partial methylation form (ภาพที่ 15) มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับ 10 และ 50 μM H_2O_2 จากร้อยละ 100 เป็นร้อยละ 106.58 และ 96.54 ($p = 0.473$ และ 0.748) ตามลำดับ และเมื่อได้รับ 50 และ 300 μM tocopheryl acetate ความคู่กันจะเปลี่ยนแปลงจากร้อยละ 96.54 เป็นร้อยละ 92.02 และ 89.31 ($p = 0.773$ และ 0.645) ตามลำดับ

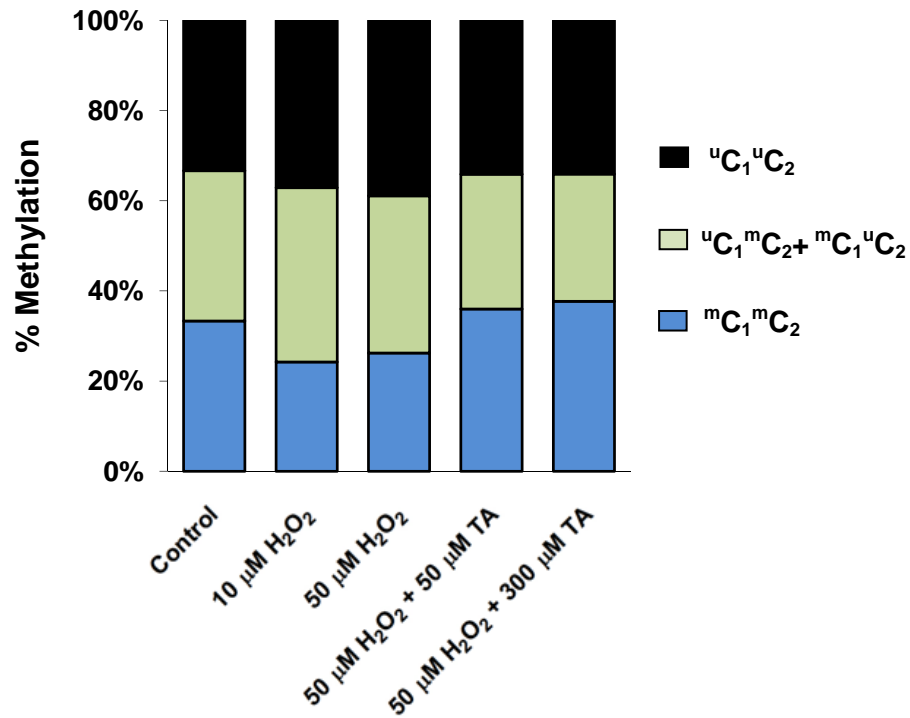
เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงเป็นขั้นตอนของการเติมหมู่เมทิลแต่ละรูปแบบ (ภาพที่ 16) จะพบว่าเมื่อให้ 10 μM H_2O_2 ระดับ hypermethylated form จะลดลงอย่างมาก แล้วไปเพิ่มในรูปแบบ partial methylated form เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 50 μM ระดับ partial methylated form จะลดลง และส่งผลให้ระดับ hypomethylated form เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ %methylation ลดลง และเมื่อมีการให้ tocopheryl acetate ความเข้มข้น 50 และ 300 μM ระดับ hypomethylated และ partial methylated form ลดลง ทำให้ระดับ hypermethylated form เพิ่มขึ้นและส่งผลให้ %methylation เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 14 (a) ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 แบบ hypermethylated form ($^m\text{C}_1^m\text{C}_2$) ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H_2O_2 หรือ tocopheryl acetate เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลดลงเมื่อเซลล์ได้รับ 10 และ 50 μM H_2O_2 ($p = 0.015$ และ 0.207 ตามลำดับ) และเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ tocopheryl acetate (TA) ควบคู่กัน ($p = 0.067, 0.027$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 อย่างเดียว (b) การเติมหมู่เมทิลแบบ hypomethylated form ($^u\text{C}_1^u\text{C}_2$) เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ 10 และ 50 μM H_2O_2 ($p = 0.541$ และ 0.150 ตามลำดับ) และลดลงเมื่อได้รับ tocopheryl acetate (TA) ควบคู่กัน ($p = 0.563, 0.983$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 อย่างเดียว (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D., * แสดงนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ control, # แสดงนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2)



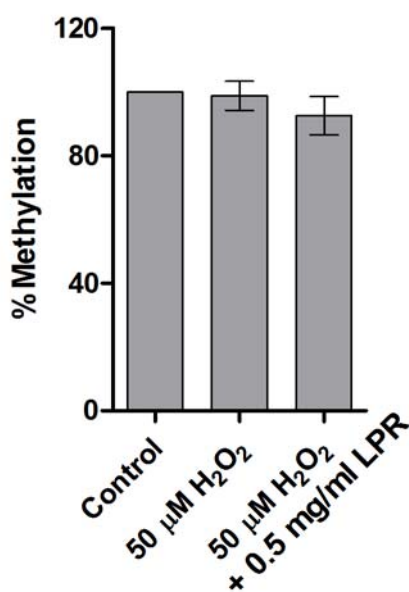
ภาพที่ 15 ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 แบบ partial methylated form ($^m\text{C}_1^u\text{C}_2$ และ $^u\text{C}_1^m\text{C}_2$) ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H_2O_2 หรือ tocopheryl acetate (TA) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ 10 μM H_2O_2 ($p = 0.473$) แต่ลดลงเมื่อได้รับ 50 μM H_2O_2 ($p = 0.748$) รวมถึงลดลงเมื่อให้ tocopheryl acetate ควบคู่กัน โดยเทียบกับชุดที่ได้รับเฉพาะ 50 μM H_2O_2 ($p = 0.773$ และ 0.645)



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลรูปแบบต่างๆที่ LINE-1 เมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 หรือ tocopheryl acetate (TA) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ระดับ hypermethylated form ($^{\text{m}}\text{C}_1^{\text{m}}\text{C}_2$) ลดลง ระดับของ partial methylated form ($^{100}\text{C}_1^{\text{m}}\text{C}_2 + ^{\text{m}}\text{C}_1^{100}\text{C}_2$) และ hypomethylated form ($^{100}\text{C}_1^{100}\text{C}_2$) เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ H_2O_2 และเมื่อได้รับ Tocopheryl acetate ควบคู่กัน ระดับ hypermethylated form เพิ่มขึ้น และระดับ partial methylated form และ hypomethylated form ลดลง

ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน

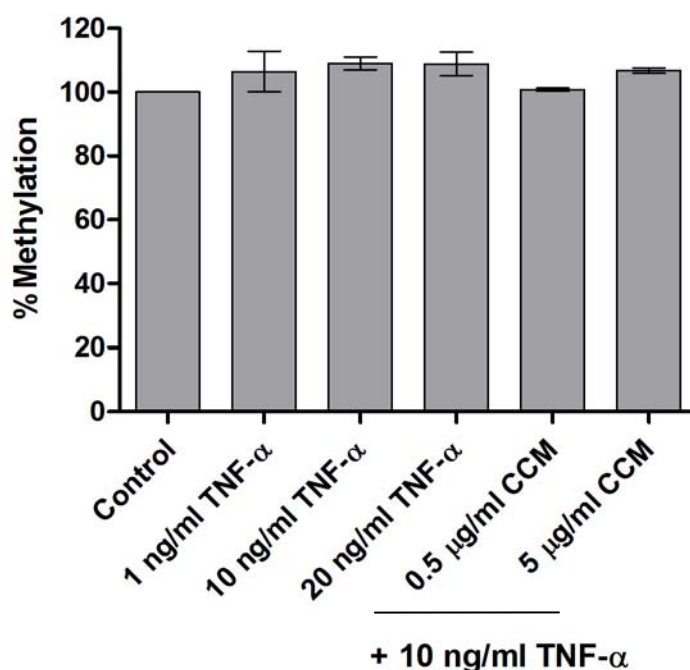
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่เกิดจาก H_2O_2 พบว่า ในเซลล์ที่ได้รับ $50 \mu M H_2O_2$ ร่วมกับสูตรมะนาวผง 0.5 mg/ml มีการเติมหมู่เมทิลลดลงจากร้อยละ 98.84 (เซลล์ที่ได้รับ $50 \mu M H_2O_2$ อย่างเดียว) เป็นร้อยละ 92.55 ($p = 0.421$) (ภาพที่ 17) ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์ได้รับความเครียดเพิ่มเติมจากการเปลี่ยนแปลงค่า pH เนื่องจากสูตรมะนาวผงมี pH เป็นกรดมาก หากนำมาละลายน้ำจะมี pH ประมาณ 3.7 ซึ่งถึงแม้จะเลือกความเข้มข้นในระดับที่ต่ำมากมาใช้ศึกษารวมถึงได้ปรับ pH ให้เท่ากับการทดลองอื่นๆ แล้ว แต่พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง มะนาวผงก็ยังส่งผลให้อาหารเลี้ยงเซลล์มี pH เป็นกรดมากขึ้นกว่าสภาวะอื่นๆ ผลการศึกษานี้จึงสรุปว่าสูตรมะนาวผงส่งผลให้ส่งผลให้ระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ลดลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป



ภาพที่ 17 ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ $50 \mu M H_2O_2$ หรือสูตรมะนาวผง (LPR) 0.5 mg/ml ระดับการเติมหมู่เมทิลลดลงเมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 และลดลงเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ H_2O_2 คู่กับสูตรมะนาวผง (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D.)

การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ภายใต้สภาวะอักเสบ

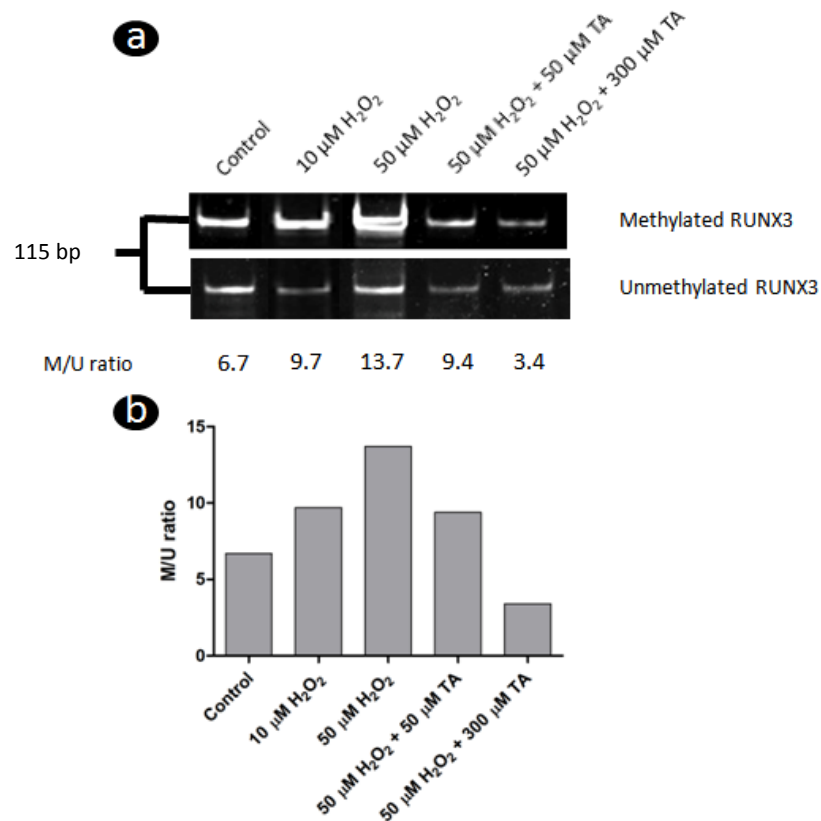
เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะอักเสบโดยการให้ TNF- α ความเข้มข้น 1, 10 และ 20 ng/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเซลล์มาสกัดดีเอ็นเอ แล้ววัดการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ด้วยวิธี COBRA พบว่าลักษณะการเติมหมู่เมทิลมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากร้อยละ 100 เป็นร้อยละ 106.43, 108.98 และ 108.87 ($p = 0.117, 0.102$ และ 0.252) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 18) และในเซลล์ที่ได้รับ curcumin ร่วมกับ TNF- α ความเข้มข้น 10 ng/ml ก็พบว่ามีการลดลงเล็กน้อย จากร้อยละ 108.98 (เซลล์ได้รับ 10 ng/ml TNF- α อย่างเดียว) เป็นร้อยละ 100.76 และ 106.72 สำหรับ curcumin ความเข้มข้น 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p = 0.061$ และ 0.54 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า TNF- α ในช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทดสอบ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ซึ่งทำให้ไม่สามารถศึกษาผลของ curcumin ต่อได้



ภาพที่ 18 ร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ TNF- α หรือ curcumin (CCM) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง LINE-1 มีการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเซลล์ได้รับ 1, 10 และ 20 ng/ml TNF- α แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control ($p > 0.05$) และมีการเติมหมู่เมทิลลดลงเล็กน้อยเมื่อได้รับ 0.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ curcumin ควบคู่กับ 10 ng/ml TNF- α แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 10 ng/ml TNF- α ($p > 0.05$) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย, error bar แสดงค่า S.D.)

การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน

เมื่อนำดีเอ็นเอจากเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะเครียดออกซิเดชัน มาวัดการเติมหมู่เมทิลด้วยวิธี MSP แล้วหาอัตราส่วนของปริมาณ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ methylated *RUNX3* ต่อ ปริมาณ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ unmethylated *RUNX3* (methylated-to-unmethylated (M/U) ratio) พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 μM มี M/U ratio เพิ่มขึ้นเป็น 9.7 และ 13.7 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ให้ H_2O_2 (M/U ratio เท่ากับ 6.7) (ภาพที่ 19) และเมื่อเซลล์ได้รับ tocopheryl acetate ที่ความเข้มข้น 50 และ 300 μM ควบคู่กับ H_2O_2 50 μM พบว่า M/U ratio ลดลง (9.4 และ 3.4 ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 19 การเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* ของเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H_2O_2 หรือ tocopheryl acetate ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ 10 และ 50 μM H_2O_2 เมื่อเปรียบเทียบกับ control และมีการเติมหมู่เมทิลลดลงเมื่อได้รับ 50 และ 300 μM tocopheryl acetate ควบคู่กับ 50 μM H_2O_2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 μM H_2O_2 เพียงอย่างเดียว (a) ผลลัพธ์จากการเพิ่มดีเอ็นเอของ *RUNX3* ที่เติมหมู่เมทิล (Methylated *RUNX3*) และไม่เติมหมู่เมทิล (Unmethylated *RUNX3*) ตัวเลขใต้ภาพแสดงถึงอัตราส่วนปริมาณ *RUNX3* promoter ที่เติมหมู่เมทิลต่อที่ไม่เติมหมู่เมทิล (methylated-to-unmethylated (M/U) ratio) (b) กราฟแสดง M/U ratio ของการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3*

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 และ RUNX3 promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่สภาวะเครียดออกซิเดชันและสภาวะอักเสบ และศึกษาผลของวิตามินอี สุตระมะนาวผง และ curcumin จากขมิ้นชัน ในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิล

ผลการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ UM-UC-3 พบว่า ที่ความเข้มข้นที่ 50 μM หรือน้อยกว่า H_2O_2 ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์และค่า IC_{50} ของ H_2O_2 เท่ากับ 3.7 mg/ml ส่วน TNF- α ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 200 ng/ml ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ UM-UC-3 อย่างมีนัยสำคัญ สุตระมะนาวผงความเข้มข้น 0.5 mg/ml หรือน้อยกว่าไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.06 mg/ml สำหรับ curcumin ความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อยู่ระหว่าง 2.5 ถึง 10 $\mu g/ml$ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.4 $\mu g/ml$

เมื่อเลี้ยงเซลล์ UM-UC-3 ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยได้รับ H_2O_2 พบว่าร้อยละการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ tocopheryl acetate พบว่าร้อยละการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 กลับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 อย่างเดียว และเมื่อพิจารณาแต่ละรูปแบบของ LINE-1 methylation พบว่า hypermethylated form ลดลงเมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 และกลับเพิ่มสูงขึ้นได้เมื่อได้รับ tocopheryl acetate ในทางตรงข้าม hypomethylated form เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 และลดลงเมื่อได้รับ tocopheryl acetate สำหรับ partial methylated form สามารถแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงจาก hypermethylated form ไปยัง partial methylated form แล้วเปลี่ยนเป็น hypomethylated form ได้ อีกทั้งผลการวัดปริมาณ protein carbonyl พบว่า protein carbonyl มีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อให้ H_2O_2 และลดลงเมื่อให้ tocopheryl acetate ควบคู่กัน แสดงว่าเกิด oxidative stress จริง ใน H_2O_2 -treated cells ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดออกซิเดชันส่งผลให้เกิดการลดลงของการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 (oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation)

เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชันร่วมกับสูตรมะนาวผง พบว่าร้อยละการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ลดลงเมื่อเทียบกับการให้ H_2O_2 อย่างเดียว ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะ pH ที่เป็นกรดมากของสูตรมะนาวผง ที่ทำให้เซลล์เกิดความเครียดซึ่งส่งผลต่อการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1

การทดลองเลี้ยงเซลล์ในสภาวะอักเสบพบว่า $TNF-\alpha$ ความเข้มข้นระหว่าง $1-20 \mu M$ ไม่สามารถกระตุ้นให้การเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 เปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถศึกษาผลของไขมันชั้นต่อไปได้

ในการศึกษาการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter พบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย H_2O_2 การเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter เพิ่มขึ้น และเมื่อเซลล์ได้รับ tocopheryl acetate ควบคู่กับ H_2O_2 การเติมหมู่เมทิลลดลงของ *RUNX3* promoter เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ดังนั้น การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดออกซิเดชันนอกจากจะมีผลทำให้เกิด LINE-1 hypomethylation แล้ว ยังมีผลเพิ่มการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter ด้วย (oxidative stress-induced promoter hypermethylation)

การศึกษานี้สรุปได้ว่า สภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการเติมหมู่เมทิลในเซลล์ โดยใน LINE-1 ซึ่งเป็นตัวแทนของ non-gene elements หรือ transposons มีการเติมหมู่เมทิลลดลง แต่ใน *RUNX3* ซึ่งเป็นตัวแทนของ TSG มีการเติมหมู่เมทิลที่ promoter เพิ่มขึ้น หลักฐานการวิจัยนี้จึงเป็นกลไกหนึ่งที่สนับสนุนว่าความเครียดจากออกซิเดชันส่งเสริมการก่อมะเร็ง ผ่านทาง epigenetic pathway โดยเพิ่มระดับ global hypomethylation และ TSG promoter hypermethylation

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ UM-UC-3 พบว่า H_2O_2 เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ $100 \mu M$ ขึ้นไป เป็นที่ทราบดีว่า oxidative stress เป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดความเครียดและตายได้จากการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ ส่งผลให้รบกวนการแบ่งตัวของเซลล์ หรือกระตุ้นการเกิด apoptosis (91) เมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 ในปริมาณมากกว่า $100 \mu M$ ขึ้นไป จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้และตายลง ซึ่งมีการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดพบว่าที่ความเข้มข้นสูงกว่า $100 \mu M$ นั้น H_2O_2 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ necrosis ได้ด้วย (92, 93) จากผลความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษานี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้น $50 \mu M$ ในการกระตุ้นสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สำหรับการทดลองการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่

เมทิล มีการศึกษาว่าปริมาณ H_2O_2 ในปัสสาวะ พบว่า ในคนปกติจะมี H_2O_2 อยู่ในช่วง 1-25 μM แต่อาจมีบางรายที่มี H_2O_2 สูงถึง 100 μM (94, 95) ซึ่งความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เลือกใช้ในการกระตุ้นสภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้น เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่พบในร่างกาย จึงน่าจะให้ผลใกล้เคียงกับเหตุการณ์จริงในร่างกายด้วย

เมื่อทดลองให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้มากขึ้นในผู้ป่วยมะเร็ง เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้ววัดการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 พบว่าระดับการเติมหมู่เมทิลลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่วัดระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับคนปกติ ที่พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะมีระดับการเติมหมู่เมทิลที่ต่ำกว่าคนปกติ รวมถึงในมะเร็งชนิดอื่นก็พบว่าระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของผู้ป่วยมะเร็งจะต่ำกว่าคนปกติ (5, 86) ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าการเติมหมู่เมทิลที่ลดลงจะทำให้ LINE-1 ซึ่งเป็น transposon นั้นแสดงออกได้มากขึ้น ส่งผลให้เกิด genomic instability และชักนำให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็งได้ (83) จากผลการทดลองเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ tocopheryl acetate แล้วทำให้ระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 กลับเพิ่มขึ้น เป็นการยืนยันว่าระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ที่ลดลงเป็นผลมาจากสารก่อความเครียดออกซิเดชัน (H_2O_2)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลรูปแบบต่างๆ จะพบว่า ในการให้ 10 μM H_2O_2 ซึ่งเป็นภาวะกระตุ้นระดับต่ำ จะมีการเปลี่ยนรูปแบบจาก hypermethylated form เป็น partial methylated form เป็นส่วนมาก มีบางส่วนที่เปลี่ยนไปเป็น hypomethylated form และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 μM จึงมีการเปลี่ยนเป็น hypomethylated form มากขึ้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 นั้นจึงน่าจะมีรูปแบบแบบค่อยเป็นค่อยไป คือเปลี่ยนจาก hypermethylated เป็น partial methylated แล้วจึงเปลี่ยนเป็น hypomethylated form ในที่สุด และเมื่อมีการให้ tocopheryl acetate ทำให้ hypomethylated form เปลี่ยนกลับมาเป็น hypermethylated form รวมถึง partial methylated form ก็มีการเปลี่ยนมาเป็น hypermethylated form ด้วย สาเหตุที่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงจาก hypomethylated form เป็น partial methylated form อาจเป็นเพราะประสิทธิภาพที่สูงของ tocopheryl acetate ในการยับยั้งผลของ H_2O_2 หากลดความเข้มข้นของ tocopheryl acetate ลง อาจสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงนั้นได้

และเมื่อพิจารณาระดับ protein carbonyl ก็พบว่ามียกระดับสอดคล้องกับการให้ H_2O_2 และ tocopheryl acetate โดย protein carbonyl เป็นผลผลิตที่เกิดจาก oxidative stress ดังนั้นระดับของ protein carbonyl จึงแสดงถึงระดับ oxidative stress ซึ่งเพิ่มขึ้นเป็นลำดับเมื่อให้ H_2O_2 ใน

ระดับที่สูงขึ้น และลดลงเป็นลำดับเมื่อให้ tocopheryl acetate ควบคู่กันในระดับที่สูงขึ้น โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการให้ H_2O_2 แก่เซลล์เพาะเลี้ยง fibroblast ทำให้ระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้น (96) รวมถึงการให้วิตามินอีในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิด oxidative stress สามารถลดระดับ protein carbonyl ลงได้เมื่อเทียบกับหนูที่ถูกกระตุ้น oxidative stress อย่างเดียว (97, 98)

สูตรมะนาวประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณมาก แต่ผลการทดลองพบว่า ทำให้ระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ลดลง สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการที่มะนาวมีความเป็นกรดสูง อาจส่งผลให้เซลล์เกิดความเครียดและไปกระตุ้นความเครียดออกซิเดชันได้ อีกเหตุผลหนึ่งอาจเกิดจาก ascorbate และ polyphenol ซึ่งมีอยู่มากในสูตรมะนาว เมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ อาจจะถูกออกซิไดซ์และได้ผลิตภัณฑ์เป็น H_2O_2 (99) ทำให้มีผลกระตุ้นให้การเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ลดลง นอกจากนี้ limonene ซึ่งเป็นสารประกอบหนึ่งในมะนาวยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ หรือมะเร็งตับ เป็นต้น (100, 101) ซึ่งอาจส่งผลอื่นที่นอกเหนือจากการเป็น antioxidant ทำให้ระดับการเติมหมู่เมทิลไม่เพิ่มขึ้นดังสมมติฐาน

มีการเสนอกลไกหลายกลไกของความเครียดจากออกซิเดชันที่มีผลทำให้การเติมหมู่เมทิลลดลง กลไกหนึ่งคือ เซลล์จะต่อต้านหรือลดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเซลล์โดยการสร้าง glutathione ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย ซึ่งการสร้าง glutathione จะใช้ homocysteine ในการสร้าง เมื่อเซลล์มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้น จึงสร้าง glutathione เพิ่มขึ้น ทำให้ระดับ homocysteine ลดลง จากนั้นเมื่อ homocysteine ลดลงเซลล์จะสร้าง homocysteine เพิ่มขึ้นจาก S-adenosylmethionine (SAM) ซึ่งเป็น methyl donor (102) เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดจากออกซิเดชันจะทำให้ระดับ SAM ลดลง ทำให้ไม่มี methyl donor เพียงพอสำหรับให้ DNMT ใช้ในการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ (16) นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่นที่ถูกนำเสนอ คือ ในภาวะเครียดจากออกซิเดชัน อัตราส่วนระหว่าง NAD^+ ต่อ $NADH$ จะมีค่าสูงขึ้น ทำให้เอนไซม์ Sirtuin-3 (SIRT3) ถูกกระตุ้น ซึ่ง SIRT3 เป็นเอนไซม์ NAD^+ -dependent deacetylase ในไมโทคอนเดรีย จะตัดหมู่อะเซทิลของ isocitrate dehydrogenase (IDH2) แล้ว IDH2 ถูกกระตุ้นให้เป็น activated IDH2 ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน isocitrate เป็น α -ketoglutarate เพิ่มขึ้น (103) และ α -ketoglutarate ที่เพิ่มขึ้น จะทำหน้าที่เป็น co-factor มีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ten eleven translocation (TET) โดย TET จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน 5-methylcytosine (5mC) เป็น 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) ซึ่งโดยทั่วไป 5hmC จะถูก deamination ได้ง่าย และเมื่อถูก deamination แล้วเซลล์จะตรวจสอบได้ว่า cytosine นี้มีความ

ผิดปกติ ต้องเข้าสู่กระบวนการซ่อมแซม โดย $^{5\text{hm}}\text{C}$ จะถูกเอนไซม์ glycosylase เข้ามาตัดออก แล้วเติม cytosine ตัวใหม่ผ่านกลไก nucleotide excision repair ซึ่ง cytosine ตัวใหม่ที่เติมเข้ามานี้ จะเป็น unmethylated cytosine ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิด hypomethylation ขึ้น (104) และกลไกสุดท้าย เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน เบส guanine จะถูกออกซิไดซ์เป็น 8-hydroxyguanine หรือ 8-oxoguanine ซึ่งเบส guanine ที่อยู่ติดกับ cytosine (CpG dinucleotides) เป็นตำแหน่งเป้าหมายที่เอนไซม์ DNMT ใช้ในการจับและเข้าทำปฏิกิริยา ดังนั้นเมื่อเบส guanine ที่อยู่ข้าง cytosine ถูกออกซิไดซ์ จึงทำให้ DNMT ไม่สามารถจดจำตำแหน่งนั้นได้และไม่สามารถเข้ามาเติมหมู่เมทิลให้แก่ cytosine ได้ และเกิด hypomethylation ขึ้นในที่สุด

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลโดยการกระตุ้นสภาวะอักเสบนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลเมื่อให้ 1-20 ng/ml TNF- α สาเหตุอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ TNF- α น้อยเกินไป หรือ TNF- α ไม่มีผลต่อการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 หรือกลไกที่มีผลต่อการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 มิได้เกิดจากการกระตุ้นผ่าน NF- κB ซึ่งโดยปกติแล้วจะถูกกระตุ้นด้วย TNF- α การศึกษาของ Gasche (8) พบว่าการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบด้วย Interleukin-6 ซึ่งเป็นการกระตุ้นผ่าน STAT pathway ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการเกิดการอักเสบ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้การกระตุ้นด้วย TNF- α ซึ่งเป็นการกระตุ้นผ่าน NF- κB pathway ดังนั้นสาเหตุที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลอาจเป็นเพราะการเติมหมู่เมทิลถูกควบคุมผ่าน STAT pathway ไม่ใช่ NF- κB pathway ทั้ง STAT และ NF- κB pathway นั้นสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ DNMT ได้ทั้งคู่ (105, 106) แต่มีการพบเพิ่มเติมว่า STAT3 นั้นสามารถเข้าจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *DNMT1* ได้ และสามารถรวมตัวกับ DNMT1 เป็น complex ที่จะจับกับ CpG site ได้ (107) STAT pathway จึงอาจเป็น pathway หลักในการควบคุมการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอ

การเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* promoter มีผลตรงข้ามกับ LINE-1 คือมีการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน และมีการเติมหมู่เมทิลลดลงเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระควบคู่กันไป มีการศึกษาการเติมหมู่เมทิลที่ *RUNX3* ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่า การเติมหมู่เมทิลใน *RUNX3* promoter ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและการพัฒนาของมะเร็งที่เพิ่มขึ้น (4) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ของ Kang และคณะ (108) ก็พบว่าการกระตุ้นความเครียดออกซิเดชันทำให้ *RUNX3* promoter มีการเติมหมู่เมทิลมากขึ้น และเมื่อให้สารต้านอนุมูลอิสระควบคู่กันไประดับ *RUNX3* promoter methylation ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นเอนไซม์ DNMT และ HDAC

จากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้แนะว่าในตำแหน่ง promoter ของยีนนั้น จะต้องมีความควบคุมพิเศษที่ทำให้การเติมหมู่เมทิลแตกต่างกับดีเอ็นเอส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ยีน เช่น LINE-1 กลไกที่มีการเสนอคือ ในสภาวะเครียดออกซิเดชันที่สัดส่วน NAD^+ ต่อ $NADH$ สูงนั้น จะไปกระตุ้นให้โปรตีนหลายชนิดรวมตัวกันที่ CpG island ของ *RUNX3* เรียกว่า polycomb complex ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงโปรตีน histone ให้ chromatin บริเวณนั้นเกิดเป็น heterochromatin (109) นอกจากนี้ polycomb complex ยังส่งผลให้ DNMT มี activity ที่สูงขึ้น และถูกโปรตีนใน polycomb complex เหนี่ยวนำให้เติมหมู่เมทิลในตำแหน่ง promoter นั้นๆ มากขึ้น (110)

การศึกษานี้มีข้อจำกัดที่ต้องกล่าวถึง คือ การศึกษานี้ยังขาดการยืนยันปริมาณ mRNA ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเกิด LINE-1 hypomethylation และ *RUNX3* hypermethylation รวมถึงการแสดงออกของ DNMT และ HDAC ซึ่งมีบทบาทควบคุมการเติมหมู่เมทิลที่สำคัญ นอกจากนี้การทดลองนี้ได้ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเดียว ซึ่งไม่สามารถยืนยันได้ว่าปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะทุกสายพันธุ์หรือไม่

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ไม่ได้วัดการกระตุ้น NF- κ B ที่เกิดขึ้นหลังการให้ TNF- α จึงไม่อาจยืนยันได้ว่าสาเหตุที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลหลังให้ TNF- α เกิดเนื่องจาก NF- κ B ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ หรือแท้จริงแล้ว NF- κ B อาจไม่ได้ถูกกระตุ้นเลย

นอกจากนั้นแล้วควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะอื่น เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดออกซิเดชันต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย หรืออาจทำการทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันปรากฏการณ์ในสิ่งมีชีวิตจริงด้วย

กลไกการควบคุมการเติมหมู่เมทิลโดยความเครียดออกซิเดชันที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ เป็นเพียงกลไกที่เสนอไว้โดยใช้ข้อมูลการทดลองก่อนหน้านี้บางส่วนมาสนับสนุนเท่านั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเพื่อยืนยันการเกิดขึ้นเหล่านั้นด้วย ซึ่งหากเราทราบกลไกที่เกิดขึ้นอย่างละเอียดแล้ว ข้อมูลเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของผู้ป่วยหรือเป็นแนวทางการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ และอาจนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาต่อไป

รายการอ้างอิง

- (1) Babjuk, M., *et al.* (2011) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. Eur Urol 59: 997-1008.
- (2) Mitra, A.P. and Cote, R.J. (2009) Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. Annu Rev Pathol 4: 251-285.
- (3) Negraes, P.D., *et al.* (2008) DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. BMC Cancer 8: 238.
- (4) Kim, E.J., Kim, Y.J., Jeong, P., Ha, Y.S., Bae, S.C. and Kim, W.J. (2008) Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. J Urol 180: 1141-1145.
- (5) Chalitchagorn, K., *et al.* (2004) Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. Oncogene 23: 8841-8846.
- (6) Cordaux, R. and Batzer, M.A. (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. Nat Rev Genet 10: 691-703.
- (7) Jurgens, B., Schmitz-Drager, B.J. and Schulz, W.A. (1996) Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. Cancer Res 56: 5698-5703.
- (8) Gasche, J.A., Hoffmann, J., Boland, C.R. and Goel, A. (2011) Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. Int J Cancer 129: 1053-1063.
- (9) Karin, M. and Greten, F.R. (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol 5: 749-759.
- (10) Chuang, S.E., *et al.* (2002) Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. Biochem Pharmacol 63: 1709-1716.

- (11) Michaud, D.S. (2007) Chronic inflammation and bladder cancer. Urol Oncol 25: 260-268.
- (12) Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F. and Loguercio, C. (2007) Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int J Cancer 121: 2381-2386.
- (13) Wachsmann, J.T. (1997) DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. Mutat Res 375: 1-8.
- (14) Stenvinkel, P., *et al.* (2007) Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? J Intern Med 261: 488-499.
- (15) Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A.G. and Panayiotidis, M.I. (2008) Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer Lett 266: 6-11.
- (16) Hitchler, M.J. and Domann, F.E. (2007) An epigenetic perspective on the free radical theory of development. Free Radic Biol Med 43: 1023-1036.
- (17) Katayama, Y., Takahashi, M. and Kuwayama, H. (2009) Helicobacter pylori causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. Biochem Biophys Res Commun 388: 496-500.
- (18) Honglertsakul, C., Opanuraks, J., Kittikowit, W., Boonla, C., Wunsuwan, R. and Tosukhowong, P. (2007) Increased urinary excretions of oxidative stress biomarkers and sialic acid associated with severity of bladder tumors. Thai J Surg 28: 133-137.
- (19) Akcay, T., Saygili, I., Andican, G. and Yalcin, V. (2003) Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. Urol Int 71: 271-274.
- (20) Opanuraks, J., *et al.* (2010) Elevated urinary total sialic acid and increased oxidative stress in patients with bladder cancer. Asian Biomed 4: 703.

- (21) Soini, Y., Haapasaari, K.M., Vaarala, M.H., Turpeenniemi-Hujanen, T., Karja, V. and Karihtala, P. (2011) 8-hydroxydeguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma. Int J Clin Exp Pathol 4: 267-275.
- (22) Kanai, K., *et al.* (2010) Vitamin E succinate induced apoptosis and enhanced chemosensitivity to paclitaxel in human bladder cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Sci 101: 216-223.
- (23) Jacobs, E.J., *et al.* (2002) Vitamin C and vitamin E supplement use and bladder cancer mortality in a large cohort of US men and women. Am J Epidemiol 156: 1002-1010.
- (24) Lamm, D.L., Riggs, D.R., Shriver, J.S., vanGilder, P.F., Rach, J.F. and DeHaven, J.I. (1994) Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. J Urol 151: 21-26.
- (25) Brinkman, M.T., Karagas, M.R., Zens, M.S., Schned, A., Reulen, R.C. and Zeegers, M.P. (2010) Minerals and vitamins and the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire Study. Cancer Causes Control 21: 609-619.
- (26) Michaud, D.S., Spiegelman, D., Clinton, S.K., Rimm, E.B., Willett, W.C. and Giovannucci, E. (2000) Prospective study of dietary supplements, macronutrients, micronutrients, and risk of bladder cancer in US men. Am J Epidemiol 152: 1145-1153.
- (27) Zeegers, M.P., Goldbohm, R.A. and van den Brandt, P.A. (2001) Are retinol, vitamin C, vitamin E, folate and carotenoids intake associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. Br J Cancer 85: 977-983.
- (28) Comstock, G.W., Helzlsouer, K.J. and Bush, T.L. (1991) Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington County, Maryland. Am J Clin Nutr 53: 260S-264S.

- (29) Michaud, D.S., Pietinen, P., Taylor, P.R., Virtanen, M., Virtamo, J. and Albanes, D. (2002) Intakes of fruits and vegetables, carotenoids and vitamins A, E, C in relation to the risk of bladder cancer in the ATBC cohort study. Br J Cancer 87: 960-965.
- (30) Lotan, Y., *et al.* (2012) Evaluation of vitamin E and selenium supplementation for the prevention of bladder cancer in SWOG coordinated SELECT. J Urol 187: 2005-2010.
- (31) Tosukhowong, P., *et al.* (2008) Citraturic, alkalizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. Urol Res 36: 149-155.
- (32) Chadalapaka, G., *et al.* (2008) Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. Cancer Res 68: 5345-5354.
- (33) Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B. and Aggarwal, B.B. (2008) Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. Cancer Lett 267: 133-164.
- (34) Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B. and Diederich, M. (2008) Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. Biochem Pharmacol 76: 1340-1351.
- (35) Mowatt, G., *et al.* (2010) Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. Health Technol Assess 14: 1-331, iii-iv.
- (36) Rieger-Christ, K.M., *et al.* (2003) Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. Cancer 98: 737-744.
- (37) van Rhijn, B.W., *et al.* (2004) FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. Cancer Res 64: 1911-1914.

- (38) Bakkar, A.A., *et al.* (2003) FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. Cancer Res 63: 8108-8112.
- (39) Kitamura, H. and Tsukamoto, T. (2006) Early bladder cancer: concept, diagnosis, and management. Int J Clin Oncol 11: 28-37.
- (40) Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. and Aggarwal, B.B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med 49: 1603-1616.
- (41) Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 329: 23-38.
- (42) Shigenaga, M.K. and Ames, B.N. (1991) Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. Free Radic Biol Med 10: 211-216.
- (43) Janero, D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med 9: 515-540.
- (44) Liang, D., *et al.* (2008) Plasma vitamins E and A and risk of bladder cancer: a case-control analysis. Cancer Causes Control 19: 981-992.
- (45) Bai, Y., *et al.* (2010) Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. Cancer Sci 101: 488-493.
- (46) Burton, G.W., *et al.* (1988) Comparison of free alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate as sources of vitamin E in rats and humans. Lipids 23: 834-840.
- (47) Horwitt, M.K., Elliott, W.H., Kanjanangulpan, P. and Fitch, C.D. (1984) Serum concentrations of alpha-tocopherol after ingestion of various vitamin E preparations. Am J Clin Nutr 40: 240-245.

- (48) Brisson, L., Castan, S., Fontbonne, H., Nicoletti, C., Puigserver, A. and Ajandouz el, H. (2008) Alpha-tocopheryl acetate is absorbed and hydrolyzed by Caco-2 cells comparative studies with alpha-tocopherol. Chem Phys Lipids 154: 33-37.
- (49) Burton, G.W. and Traber, M.G. (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Annu Rev Nutr 10: 357-382.
- (50) Minato, K., *et al.* (2003) Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. Life Sci 72: 1609-1616.
- (51) Ubando-Rivera, J., Navarro-Ocaña, A. and Valdivia-López, M.A. (2005) Mexican lime peel: Comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity. Food Chem 89: 57-61.
- (52) Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J.C.M., Sousa, M.J., Carvalho, A.M. and Ferreira, I.C.F.R. (2010) Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food Chem Toxicol 48: 99-106.
- (53) Grivennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. Cell 140: 883-899.
- (54) Bonizzi, G. and Karin, M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol 25: 280-288.
- (55) Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. Oncogene 25: 6680-6684.
- (56) Leibovici, D., *et al.* (2005) Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. J Clin Oncol 23: 5746-5756.
- (57) Tharakan, S.T., Inamoto, T., Sung, B., Aggarwal, B.B. and Kamat, A.M. (2010) Curcumin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers. Biochem Pharmacol 79: 218-228.

- (58) Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. and Lu, S.D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 53: 45-53.
- (59) Tang, P., Hung, M.C. and Klostergaard, J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. Biochemistry 35: 8216-8225.
- (60) Gloire, G., Legrand-Poels, S. and Piette, J. (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. Biochem Pharmacol 72: 1493-1505.
- (61) Xie, Q.W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C. (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem 269: 4705-4708.
- (62) Akamine, H., *et al.* (2007) Effects of application of N, P and K alone or in combination on growth, yield and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.). Plant Prod Sci 10: 151-154.
- (63) Tayyem, R.F., Heath, D.D., Al-Delaimy, W.K. and Rock, C.L. (2006) Curcumin content of turmeric and curry powders. Nutr Cancer 55: 126-131.
- (64) Sandur, S.K., *et al.* (2007) Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. Carcinogenesis 28: 1765-1773.
- (65) Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H. (2007). Curcumin: The Indian Solid Gold. In Aggarwal, B.B., Surh, Y.J., Shishodia, S., (eds.), The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, pp. 1-75: Springer US.
- (66) Lee, J., *et al.* (2005) Curcumin inhibits interferon-alpha induced NF-kappaB and COX-2 in human A549 non-small cell lung cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 334: 313-318.

- (67) Huang, M.T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D. and Conney, A.H. (1991) Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. Cancer Res 51: 813-819.
- (68) Cho, J.W., Lee, K.S. and Kim, C.W. (2007) Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. Int J Mol Med 19: 469-474.
- (69) Shishodia, S., Amin, H.M., Lai, R. and Aggarwal, B.B. (2005) Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. Biochem Pharmacol 70: 700-713.
- (70) Han, S.S., Chung, S.T., Robertson, D.A., Ranjan, D. and Bondada, S. (1999) Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF-kappa B, and p53. Clin Immunol 93: 152-161.
- (71) Bachmeier, B., *et al.* (2007) The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. Cell Physiol Biochem 19: 137-152.
- (72) Kamat, A.M., Sethi, G. and Aggarwal, B.B. (2007) Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in IFN-alpha-sensitive and IFN-alpha-resistant human bladder cancer cells. Mol Cancer Ther 6: 1022-1030.
- (73) Kamat, A.M., Tharakan, S.T., Sung, B. and Aggarwal, B.B. (2009) Curcumin potentiates the antitumor effects of Bacillus Calmette-Guerin against bladder cancer through the downregulation of NF-kappaB and upregulation of TRAIL receptors. Cancer Res 69: 8958-8966.
- (74) Liu, Z., *et al.* (2009) Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. Bioorg Med Chem Lett 19: 706-709.

- (75) Ak, T. and Gulcin, I. (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chem Biol Interact 174: 27-37.
- (76) Somparn, P., Phisalaphong, C., Nakornchai, S., Unchern, S. and Morales, N.P. (2007) Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. Biol Pharm Bull 30: 74-78.
- (77) Chan, M.W., *et al.* (2002) Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. Clin Cancer Res 8: 464-470.
- (78) Yates, D.R., *et al.* (2007) Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. Clin Cancer Res 13: 2046-2053.
- (79) Kim, W.J., *et al.* (2005) RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. Cancer Res 65: 9347-9354.
- (80) Moore, L.E., *et al.* (2008) Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. Lancet Oncol 9: 359-366.
- (81) Wilhelm, C.S., *et al.* (2010) Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. Clin Cancer Res 16: 1682-1689.
- (82) Florl, A.R., Lower, R., Schmitz-Drager, B.J. and Schulz, W.A. (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. Br J Cancer 80: 1312-1321.
- (83) Kazazian, H.H., Jr. and Goodier, J.L. (2002) LINE drive. retrotransposition and genome instability. Cell 110: 277-280.
- (84) Yang, A.S., Estecio, M.R., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E.H. and Issa, J.P. (2004) A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Res 32: e38.
- (85) Grossman, H.B., Wedemeyer, G., Ren, L., Wilson, G.N. and Cox, B. (1986) Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. J Urol 136: 953-959.

- (86) Patchsung, M., Boonla, C., Amnattrakul, P., Dissayabutra, T., Mutirangura, A. and Tosukhowong, P. (2012) Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. PLoS ONE 7: e37009.
- (87) Homma, N., *et al.* (2006) Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. Cancer Sci 97: 51-56.
- (88) Uzun, H., Kayali, R. and Cakatay, U. (2010) The chance of gender dependency of oxidation of brain proteins in aged rats. Arch Gerontol Geriatr 50: 16-19.
- (89) Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M. and Garner, W.L. (2001) TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. J Cell Sci 114: 131-139.
- (90) Perrot-Applanat, M., *et al.* (2011) Similar NF-kappaB gene signatures in TNF-alpha treated human endothelial cells and breast tumor biopsies. PLoS ONE 6: e21589.
- (91) Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis 12: 913-922.
- (92) Hampton, M.B. and Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett 414: 552-556.
- (93) Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T. and Ouchi, Y. (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: Protective roles of glutathione. Jpn J Pharmacol 79: 33-40.
- (94) Long, L.H., Evans, P.J. and Halliwell, B. (1999) Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. Biochem Biophys Res Commun 262: 605-609.
- (95) Halliwell, B., Long, L.H., Yee, T.P., Lim, S. and Kelly, R. (2004) Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. Curr Med Chem 11: 1085-1092.

- (96) Sitte, N., Merker, K. and Grune, T. (1998) Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts. FEBS Lett 440: 399-402.
- (97) Yatin, S.M., Aksenov, M. and Butterfield, D.A. (1999) The antioxidant vitamin E modulates amyloid beta-peptide-induced creatine kinase activity inhibition and increased protein oxidation: implications for the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. Neurochem Res 24: 427-435.
- (98) Reznick, A.Z., Witt, E., Matsumoto, M. and Packer, L. (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. Biochem Biophys Res Commun 189: 801-806.
- (99) Halliwell, B. (2003) Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? FEBS Lett 540: 3-6.
- (100) Crowell, P.L. (1999) Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J Nutr 129: 775S-778S.
- (101) Jia, S.S., *et al.* (2013) Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. Oncol Rep 29: 349-354.
- (102) Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J.W. and Roberts, R.J. (1993) Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. Cell 74: 299-307.
- (103) Chia, N., Wang, L., Lu, X., Senut, M.C., Brenner, C. and Ruden, D.M. (2011) Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. Epigenetics 6: 853-856.
- (104) Cedar, H. and Bergman, Y. (2012) Programming of DNA methylation patterns. Annu Rev Biochem 81: 97-117.
- (105) Zhang, Q., Wang, H.Y., Woetmann, A., Raghunath, P.N., Odum, N. and Wasik, M.A. (2006) STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. Blood 108: 1058-1064.

- (106) Imagawa, K., *et al.* (2011) The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes-- implications for osteoarthritis. Biochem Biophys Res Commun 405: 362-367.
- (107) Zhang, Q., Wang, H.Y., Marzec, M., Raghunath, P.N., Nagasawa, T. and Wasik, M.A. (2005) STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 6948-6953.
- (108) Kang, K.A., Zhang, R., Kim, G.Y., Bae, S.C. and Hyun, J.W. (2012) Epigenetic changes induced by oxidative stress in colorectal cancer cells: methylation of tumor suppressor RUNX3. Tumour Biol 33: 403-412.
- (109) O'Hagan, H.M., *et al.* (2011) Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. Cancer Cell 20: 606-619.
- (110) Vire, E., *et al.* (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature 439: 871-874.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. **Phosphate buffer saline (1X PBS)** (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))
 - ละลายผง PBS 1 ซองลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
 - นำสารละลาย PBS ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. **MTT solution**
 - ชั่ง MTT 25 g ละลายใน 1X PBS ปริมาตร 5 ml จะได้ 1 M MTT เก็บเป็น stock solution ที่ -20°C
 - เมื่อจะทำการทดลอง นำ MTT stock solution 1 ml ผสมใน serum-free EMEM ปริมาตร 9 ml จะได้ 0.1 M MTT working solution

3. **Sodium hydroxide (NaOH) (10 M)**
 - ชั่ง NaOH 1 เม็ด แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (ml) = $(5/2) \times$ น้ำหนักของ NaOH (g)

4. **Sodium hydroxide (NaOH) (2 M และ 3 M)**
 - เตรียม 2 M NaOH โดยนำ 10 M NaOH มา 100 μl แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 400 μl
 - เตรียม 3 M NaOH โดยนำ 10 M NaOH มา 150 μl แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 350 μl

5. **Sodium metabisulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (3 M, pH 5.0)**
 - ชั่ง $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (MW=190.11) 1.88 g เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 ml (สำหรับใช้ได้ 10 reaction) ผสมให้เข้ากัน
 - ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยใช้ 10 M NaOH ที่เตรียมไว้ในข้อ 2

6. Hydroquinone (C₆H₆O₂)

- เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 ml ห่อด้วยวัสดุป้องกันแสงจากภายนอก
- ชั่ง hydroquinone (MW=110.10) ปริมาณเล็กน้อย (ประมาณ 0.8 mg) ลงในหลอดที่เตรียมไว้
- แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (ml) = $(50/55) \times$ น้ำหนักของ hydroquinone ที่ชั่งได้(mg)

7. Tris Boric EDTA buffer (TBE buffer) (10X, pH 8.3)

- ละลาย Tris base (MW=121.14) 108 g และ boric acid (MW=61.83) 55 g ในสารละลาย 0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
- นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- เจือจางเป็นสารละลายเข้มข้น 1X เพื่อใช้เป็น tank buffer

8. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.5 M, pH 8.3)

- ละลาย EDTA (MW=292.24) 16.81 g ในน้ำกลั่น 80 ml ค่อยๆเติมสารละลาย NaOH เข้มข้นให้ได้ pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml
- นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9. Ammonium acetate (CH₃COONH₄) (10 M)

- ชั่ง CH₃COONH₄ (MW=77.08) 7.71 g แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจนได้ปริมาตร 10 ml

10. Glycogen (20 mg/ml)

- ละลาย glycogen 10 mg (type XI from oysters) ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากัน

11. Isopropanol (80% v/v)

- นำ isopropanol มาปริมาตร 80 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 100 ml

12. Nondenaturing polyacrylamide gel (8% w/v)

ผสมสารเคมีเหล่านี้ตามปริมาณที่ระบุ โดยเติม ammoniumpersulfate และ TEMED เป็นสองอย่างสุดท้าย แล้วรีบเทสารละลายใส่ในพิมพ์ เนื่องจากหลังเติมแล้วจะทำให้สารละลายเริ่มแข็งตัวเป็นเจล ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวสมบูรณ์เป็นอย่างน้อย 45 นาที

สารเคมี	ปริมาณ(สำหรับเจลขนาดเล็ก 1 แผ่น)
40% Acrylamide:Bisacrylamide 19:1	1 ml
10X Tris Boric EDTA buffer (วิธีเตรียมตามข้อ 5)	0.5 ml
น้ำกลั่น	3.5 ml
10% (w/v) Ammoniumpersulfate	50 μ l
TEMED	5 μ l

13. สารละลาย SyBR green สำหรับย้อมเจล

- ละลาย SyBR green 1.5 μ l ลงใน 1X TBE buffer 30 ml โดยปรับเปลี่ยนปริมาณสารละลายตามความเหมาะสมของภาชนะและปริมาณเจลที่ย้อม ควรให้สารละลายท่วมเจลในขณะที่ย้อม

14. ปฏิกริยาตัดด้วย restriction enzyme

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ TaqI และ TasI ตามปฏิกริยาต่อไปนี แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

สารเคมี	ปริมาณ (μ l)
NEB buffer	1.0
10X BSA	0.1
TaqI	0.2
TasI	0.2
H ₂ O	0.5
PCR product	8.0

15. Dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH ใน 2 N HCl)

- เติม HCl เข้มข้น ปริมาตร 98.5 ml ลงในน้ำกลั่น 500 ml แล้วชั่ง DNPH 0.99 g ละลายในสารละลาย HCl ที่เตรียมไว้

16. Ethanol : Ethylacetate (1:1)

- ผสม 95% ethanol 500 ml กับ ethyl acetate 500 ml ให้เข้ากัน

17. Guanidine hydrochloride (6 M)

- ชั่ง KH_2PO_4 34.023 g และ guanidine hydrochloride 286.6 g ละลายในน้ำกลั่น 300 ml แล้วนำไปปรับ pH ให้เป็น 2.5 จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นอีก 500 ml

18. RIPA buffer

- ตวง Tris 0.6 g, NaCl 0.87 g, Sodium dodecyl sulphate 0.1 g และ Triton-X 100 ปริมาตร 1 ml
- เติมน้ำกลั่น 90 ml แล้วปรับ pH เป็น 7.4
- ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เก็บไว้ที่ 4°C
- ก่อนนำมาใช้ให้แบ่งตามปริมาตรที่ต้องการใช้จริง นำมาเติม stock phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM

หมายเหตุ Stock PMSF สามารถเตรียมได้โดยละลาย PMSF ลงใน Propan-2-ol แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 10-20 mM เพื่อความสะดวกในการตวงเมื่อนำมาใช้

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นายวิกรม วงศ์ไพบูลย์วัฒน์
วัน เดือน ปีเกิด	4 กุมภาพันธ์ 2531
สถานที่เกิด	พิษณุโลก
สถานที่ติดต่อ	242 ถนนบรมไตรโลกนารถ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1 เหรียญทอง) สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนการศึกษา	ทุนพัฒนาและส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) โดย สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ

