

การควบคุมเนื้อพันธุกรรมของยีน *Nrf2* โดยอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวต่อการลุกลามของมะเร็งตับ



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EPIGENETIC REGULATION OF *Nrf2* GENE BY REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PROGRESSION

Mr. Chakriwong Ma-on



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University



จักรีวงศ์ มาอ้น : การควบคุมเหนือพันธุกรรมของยีน *Nrf2* โดยอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวต่อการลุกลามของมะเร็งตับ (EPIGENETIC REGULATION OF *Nrf2* GENE BY REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PROGRESSION) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชาญชัย บุญหล้า, 89 หน้า.

อนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวถูกสร้างมากขึ้นในมะเร็งมะเร็งทุกชนิดรวมทั้งมะเร็งตับ ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในสภาวะแวดล้อมมะเร็ง (tumor microenvironment) ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*) และ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อมะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งตับและในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง (HepG2 cells) ศึกษาความสัมพันธ์ทางคลินิกของการแสดงออก *Nrf2* และ 8-OHdG ในผู้ป่วยมะเร็งตับ ทดสอบว่าอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวสามารถกระตุ้นการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับได้หรือไม่ และศึกษาว่ากลไกการเพิ่มการแสดงออกของ *Nrf2* ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงหลังจากกระตุ้นด้วยอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวอาศัยกลไกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) หรือไม่ ผลการย้อมชิ้นเนื้อทางอิมมูโนวิทยาพบว่า การแสดงออกของ *Nrf2* และ 8-OHdG เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อข้างเคียงที่ไม่เป็นมะเร็งตับ การแสดงออกของ 8-OHdG ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำลงของผู้ป่วยมะเร็งตับ ในการศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งตับโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวกระตุ้นการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่าในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มขึ้นแต่ระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมลดลง และผลการย้อมเซลล์ทางอิมมูโนวิทยาพบว่า การแสดงออกของ *Nrf2* และ 8-OHdG เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เช่นกัน แต่ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการแสดงออกของ *Nrf2* และ 8-OHdG ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระวิตามินอี (Tocopheryl acetate) และตัวให้หมู่เมทิล S-adenosylmethionine (SAM) ผลการวัดการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับพบว่ามีระดับสูงมากขึ้นในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่วิตามินอีและ SAM สามารถลดการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับได้ ผลการศึกษา Bisulfite sequencing พบว่าไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่ CpG dinucleotides ของ *Nrf2* promoter ในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งให้ผลคล้ายกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากการศึกษาที่สรุปได้ว่า *Nrf2* และ 8-OHdG มีการแสดงออกมากขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ แสดงว่ามีการเพิ่มขึ้นของระบบการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและมีการทำลายดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้นด้วย การทำลายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นนี้สัมพันธ์กับการมีชีวิตรอดที่ลดลงในผู้ป่วยมะเร็งตับ การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า อนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *Nrf2* และ 8-OHdG ได้ และเพิ่มศักยภาพการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับ อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระวิตามินอีและ SAM ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้ชี้แนะว่า *Nrf2* น่าจะมีบทบาทในการเพิ่มการลุกลามของมะเร็งตับภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระน่าจะช่วยชะลอการลุกลามของมะเร็งตับภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก .....

# # 5774012830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: HCC / NRF2 / 8-OHDG / ROS / EPIGENETICS / CANCER PROGRESSION

CHAKRIWONG MA-ON: EPIGENETIC REGULATION OF *Nrf2* GENE BY REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PROGRESSION. ADVISOR: ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA, Ph.D., 89 pp.

Reactive oxygen species (ROS) are excessively generated in all solid tumors including hepatocellular carcinoma (HCC) creating an oxidative stress microenvironment. In this study, hepatic expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) were investigated in HCC patients. Clinical relevance of these two oxidative stress markers were evaluated. Whether tumor aggressiveness of HCC cells was enhanced by ROS, and if ROS epigenetically up-regulated Nrf2 in HCC cells were investigated. Immunohistochemical staining for Nrf2 and 8-OHdG were performed in hepatic sections obtained from HCC patients. Expression of Nrf2 and 8-OHdG were remarkably increased in HCC tissues compared with the noncancerous hepatic tissues. Elevated expression of 8-OHdG was associated with poor survival in HCC patients.  $H_2O_2$ , an ROS representative, provoked oxidative stress in HepG2 cells, indicated by increased protein carbonyl content and decreased total antioxidant capacity. Nrf2 expression and 8-OHdG formation were markedly increased in the  $H_2O_2$ -treated cells compared with the untreated control. Co-treatment with antioxidants, tocopheryl acetate (TA) and S-adenosylmethionine (SAM), effectively attenuated the Nrf2 and 8-OHdG expression in  $H_2O_2$ -treated cells. HepG2 cells treated with  $H_2O_2$  had significantly higher migration and invasion capabilities than untreated control cells. These tumor aggressive activities were significantly inhibited by TA and SAM co-treatments. Bisulfite sequencing revealed that CpG dinucleotides in *Nrf2* promoter were unmethylated in  $H_2O_2$ -treated cells similar to untreated control. In conclusion, robust histological evidence of increased antioxidative response and oxidative DNA damage in human HCC tissues was demonstrated. Elevated oxidative DNA lesion 8-OHdG was associated with a shorter survival in HCC patients. Experimentally, ROS enhanced NRF2 expression, 8-OHdG formation, and tumor progression in HCC cells. These enhancements were inhibited by antioxidant TA and SAM. The present findings suggest that Nrf2, at least in part, involves in the oxidative stress-induced HCC progression. Antioxidants might be beneficial to decelerate the HCC progression induced by ROS.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature .....

Academic Year: 2016

Advisor's Signature .....

### กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้หากปราศจากความเมตตาจากผู้มีพระคุณ ในนามผู้ประพันธ์และศึกษางานวิจัยขอใช้พื้นที่นี้กล่าวขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาผู้ให้คำแนะนำและออกแบบการทดลองในหัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทันสมัยและน่าสนใจนี้ ตลอดจนช่วยรังสรรค์วิธีการแก้ปัญหาทุกอุปสรรคให้เกิดความเป็นไปได้ให้สำเร็จลุล่วงตามเป้าประสงค์อย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธ์ เสรีมาศพันธุ์, ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวินัย และรองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงชนิดรา ธวัชิตต์ ประธานและกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิช่วยขัดเกลาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีคุณภาพและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์นายแพทย์อนพัช สรรพาวัตร พยาธิแพทย์ผู้ให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ผลทางพยาธิวิทยา

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงณัฐธิดา หิรัญกาญจน์ และคุณจิราพร อิศะอัมพร ผู้เอื้อเพื่อเซลล์ HepG2 และ HCC paraffin embedded tissues ใช้ศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์สัญญา สุขพนชนันท์ ผู้นำที่มีวิสัยทัศน์กว้างไกลเมตตาอุปถัมภ์และส่งเสริมให้ถึงความสำคัญของการศึกษาเมตตาเป็นที่ปรึกษาในการขอรับทุนพระราชทานพัฒนาศิริราช

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงตัมทิพย์ แสงรุจิ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา ผู้สนับสนุนปัจจัยที่มีผลต่อความสุขในการทำงานให้กับบุคลากรภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์และคุณวนิดา บัวสอน ผู้เอื้อเพื่อเครื่องมือในการเตรียมสไลด์อีกทั้งรอยยิ้มและความเมตตาแรกเข้าเมื่อก้าวเดินเข้าสู่รั้วงามจรีแห่งนี้

ขอขอบคุณคุณชนิษฐา ศรีสุข และคุณปรีชา เรืองเวชรชัย ผู้เชี่ยวชาญทางด้านอิมมูโนฮิสโตเคมี เอื้อเพื่อให้คำปรึกษาแนะนำและถ่ายทอดเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยความเอื้อเฟื้อและเมตตาอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร ผู้เมตตาเอื้ออาทรเป็นที่ปรึกษาตลอดหนึ่งภาคการศึกษา

ขอขอบคุณคุณจอมขวัญ อรรถโกชนัน, คุณธนกร วัชรमानนท์, คุณวริศรา พรมสุข และคุณธัญรัตน์ พรหมวิจิตร หัวหน้าและเพื่อนร่วมงานผู้เสียสละช่วยปฏิบัติหน้าที่แทนตลอดระยะเวลาการลาศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณอำภา ช่างน้ำและคุณจันรรจจา สุขมี ผู้ชำนาญงานฮิสโตเคมีและงานสไลด์พยาธิเอื้อเพื่อเทคนิคทางด้านฮิสโตเคมีและเทคนิคทางสไลด์พยาธิกายวิภาคต่อการศึกษางานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิก CB Lab. 806 ในความดูแลของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า ประกอบด้วยคุณสุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์, คุณพัชราวลัย วงศ์ศิริ, คุณสุจิตรา โพธิ์เย็น, และคุณพิมพ์กัญญา หม้อกรอง ผู้เอื้อเพื่อบรรยากาศอันอบอุ่นเป็นกันเองแบบพี่น้องช่วยเหลือแบ่งปันรอยยิ้มในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เสมอมาโดยตลอด

ขอขอบคุณสมาชิก Nano Lab. ทุกท่านในความดูแลของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์อมรพันธ์ เสรีมาศพันธุ์ ผู้เอื้อเพื่อช่วยเหลือแบ่งปันทุก ๆ โอกาสเสมอมา

ขอขอบคุณคุณดวงนภา อินทรสงเคราะห์, คุณพรชัย อนันตสมบุญ, คุณอภิวัฒน์ ภูทองไชย รวมทั้งเพื่อนนิสิตวิทยาศาสตร์การแพทย์ รุ่น 57 ทั้งหลายซึ่งไม่สามารถกล่าวได้หมด ผู้ซึ่งเป็นกัลยาณมิตรอันเกื้อกูลกันเสมอมา

ขอขอบคุณคุณอภิณญา บุตรลี เจ้าหน้าที่ธุรการหลักสูตรผู้ใจดีให้ความสะดวกด้านเอกสารและการประสานงานที่เยี่ยมยอด

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสามล้อของพ่อ ข้าวเหนียวไข่เจียวของแม่ ผู้มอบลมหายใจเลี้ยงดูส่งเสียลูกคนนี้ได้มาไกลถึงเกียรติภูมิแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	10
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale).....	10
คำถามงานวิจัย (Research question).....	13
วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives).....	13
สมมติฐานการวิจัย (Research hypothesis).....	14
กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	14
คำสำคัญ (Key words).....	15
รูปแบบการวิจัย (Research design).....	16
ปัญหาด้านจริยธรรม (Ethical consideration).....	16
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of study).....	17
อุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem).....	17
มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma (HCC)).....	18
กระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetic) ในมะเร็งตับ.....	20
ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (Oxidative stress) และการก่อมะเร็ง.....	23
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....	25
วิตามิน อี หรือโทโคเฟอร์อล อะซิเตท (Tocopherol acetate ; TA).....	25
วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid).....	26
Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2).....	26

บทบาทของ Nrf2 ในโรคมะเร็ง (Roles of Nrf2 in cancers).....	31
การแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็ง .....	36
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology).....	37
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ .....	40
1. ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture study).....	40
การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) .....	40
ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยวิธี MTT reduction test .....	40
การกระตุ้นเซลล์ด้วย H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated condition).....	41
การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง (Protein extraction) .....	41
การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง (DNA extraction).....	42
การศึกษา Oxidative stress marker ในเซลล์เพาะเลี้ยง .....	42
การศึกษากการเกิด Methylation ของ <i>Nrf2</i> promoter.....	45
2. ศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC (Human study) .....	47
การประเมินผลการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunohistochemical staining.....	49
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) .....	49
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	50
1. ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture study).....	50
ผลของ Hydrogen peroxide ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2.....	50
ผลการศึกษา Oxidative stress marker ในเซลล์เพาะเลี้ยง .....	51
ผลการศึกษาการเกิด methylation ของ <i>Nrf2</i> promoter.....	58
ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Migration) ด้วยวิธี Wound healing assay .....	60
การศึกษารุกรานของเซลล์ (Invasion) ด้วยวิธี Transwell invasion assay .....	62
2. ผลการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC (Human study).....	63



ผลศึกษาการแสดงออกของ Nrf2 และ Oxidative stress markers (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อ มะเร็งตับด้วยวิธี Immunohistochemistry ( IHC).....	63
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Nrf2 และ 8-OHdG ต่ออัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วย มะเร็งตับ .....	65
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ .....	68
สรุปผลการวิจัย.....	68
สรุปผลการวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model).....	68
สรุปผลการวิจัยในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ (Human model).....	71
อภิปรายผล.....	72
ข้อเสนอแนะ .....	74
ภาคผนวก.....	75
การเตรียมสารเคมี .....	75
ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin staining.....	78
ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin staining.....	79
ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin staining.....	80
ผลการย้อม IHC ด้วย Nrf2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ .....	82
ผลการย้อม IHC ด้วย 8 - OHdG ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ.....	86
เอกสารรับรองโครงการวิจัย .....	88
เอกสารรับรองโครงการวิจัย.....	89
รายการอ้างอิง .....	ณณณ
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	ณณณ

# บทที่ 1

## บทนำ

### ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale)

มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นโรคที่มีความสำคัญที่พบได้บ่อยในประชากรทั่วโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) รายงานว่าพบมากเป็นอันดับ 5 คิดเป็นร้อยละ 5.6 ของมะเร็งทั้งหมด โดยพบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง 2-4 เท่า ในปี พ.ศ.2543 พบอุบัติการณ์ของผู้ป่วย มะเร็งตับใหม่ทั่วโลกประมาณ 564,000 คนต่อปี <sup>[1]</sup> ผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณ 271,500 คนอยู่ในทวีปเอเชีย (จากประเทศจีน 221,000 คน และญี่ปุ่น 33,000 คน) สำหรับในสหรัฐอเมริกาและประเทศในทวีปยุโรป พบประมาณ 11,500 คนและ 50,000 คนต่อปี ตามลำดับ และมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งตับทั่วโลกสูงถึง 549,000 คนต่อปี จากรายงานของกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยปี พ.ศ.2551 พบว่าโรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและเจ็บป่วยเรื้อรังจากสาเหตุการตายก่อนวัยอันควรเป็นอันดับ 1 และเป็นมะเร็งที่พบบ่อยอันดับ 1 ในผู้ชายและอันดับ 5 ในผู้หญิง <sup>[2]</sup>

มะเร็งเป็นความผิดปกติของเซลล์ โดยเกิดจากการที่เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ กล่าวคือ เซลล์มะเร็งจะแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาและเป็นเซลล์ที่สามารถหลบเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์ นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังมีความสามารถในการรุกรานเซลล์ข้างเคียง (invasion) และไปแพร่กระจายยังอวัยวะอื่นที่ไกลจากจุดกำเนิดมะเร็ง (metastasis) เซลล์มะเร็งที่หลุดไปยังอวัยวะอื่นสามารถเจริญเติบโตได้โดยการสร้างหลอดเลือดมาหล่อเลี้ยง และพร้อมที่จะรุกรานไปยังอวัยวะอื่นจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็งตับแบ่งเป็นปัจจัยภายนอก เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ การติดเชื้อจากไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบบี สารพิษอะฟลาทอกซิน และปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม เพศ อายุ <sup>[3]</sup> ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งเสริมให้กลไกการทำงานของเซลล์ตับบกพร่อง เช่น ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระลดลง เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) การซ่อมแซมดีเอ็นเอลดลงและการกลายพันธุ์ของยีนสะสมมากขึ้น มีการแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง (oncogenes) เพิ่มขึ้น ขณะที่ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes, TSG) แสดงออกลดลง ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่มีการตายแบบ apoptosis ลดลง จนกระทั่งเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การแสดงออกของยีนนอกจากจะถูกควบคุมโดย gene promoter และโปรตีน transcription factor แล้ว การเปลี่ยนแปลงในระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) ก็สามารถควบคุมการแสดงออกของ

ยีนได้เช่นกัน ซึ่ง epigenetic regulation เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับการถอดรหัส (transcription control) เช่น กระบวนการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ (DNA methylation) กระบวนการเติมหมู่อะซีทิลของโปรตีนฮิสโตน (Histone acetylation) และกระบวนการตัดหมู่อะซีทิล (Histone deacetylation) กระบวนการ DNA methylation เป็นการเติมหมู่เมทิลให้กับนิวคลีโอไทด์ชนิด cytidine (C) ที่ตำแหน่ง CpG dinucleotides รายงานการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ พบว่าที่ตำแหน่ง *Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)* promoter จะมีการเติมหมู่เมทิลน้อยลง (promoter hypomethylation) ทำให้ transcription factors และ RNA polymerase สามารถจับกับ promoter ได้ดี จึงส่งผลให้การแสดงออกของ *Nrf2* เพิ่มขึ้น<sup>[4]</sup> Zhang และคณะ รายงานว่า *Nrf2* เป็นยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ และพบว่าในเซลล์มะเร็งตับมีการเติมหมู่เมทิลที่ *Nrf2* promoter น้อยกว่าปกติซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งตับได้<sup>[5]</sup>

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นภาวะที่ไม่สมดุลระหว่างสารออกซิแดนต์ (oxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) โดยทั่วไปสารออกซิเดนต์ เช่น อนุมูลอิสระ (free radicals) สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในร่างกาย (endogenous production) ในภาวะปกติ จากกระบวนการสลายสารอาหารในวิถีเมแทบอลิซึม และจากการได้รับการกระตุ้นจากภายนอก (exogenous sources) เช่น ยา รังสี และสารเคมีต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสร้างสารออกซิเดนต์ (oxidants) และหรือสารอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ สารออกซิเดนต์มีหลายชนิด ที่สำคัญคือ สารอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ superoxide anion ( $O_2^-$ ) hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ซึ่ง ROS สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลและเซลล์ได้ ทำให้ชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ไม่เสถียร ส่งผลให้สารชีวโมเลกุลเสียหายที่ ทั้งยังสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่กับโมเลกุลอื่นหรือเซลล์ข้างเคียงได้ ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) หาก ROS เกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเออาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ นอกจากนี้ ROS ยังสามารถส่งผลต่อการเกิด epigenetic change ได้ โดยเฉพาะ DNA methylation และหลายงานวิจัยรายงานว่า ROS มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิด<sup>[6]</sup> แต่อย่างไรก็ตาม ร่างกายมีกลไกที่สำคัญในการกำจัด ROS เพื่อยับยั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS scavengers) หลายชนิด ทั้งที่ร่างกายสร้างได้เอง เช่น glutathione และสารที่ได้รับจากอาหาร เช่น vitamin C และ vitamin E เป็นต้น<sup>[7],[8],[9]</sup>

ผลของอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว (ROS) ต่อการแพร่กระจายของมะเร็ง เช่น ROS กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน integrin ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ การส่งสัญญาณภายในเซลล์ และเพิ่มการซึมผ่านได้ของหลอดเลือด ซึ่งส่งผลให้เกิดการดำเนินโรคของมะเร็งเร็วขึ้น ลุกลามเร็วขึ้น และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นในที่สุด ROS มี

ความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็ง และเซลล์มะเร็งยังสร้าง ROS ปริมาณมากกว่าเซลล์ปกติ จากการศึกษาของ Sheridan และคณะ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำลายดีเอ็นเอจาก ROS โดยประเมินจากการแสดงออกของ 8-oxo-7,8 dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) กับอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 143 รายพบว่า การแสดงออกของ 8-oxo-dG ที่มากจะสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็งและอัตราการรอดชีวิตสั้นกว่า<sup>[10]</sup> นอกจากนี้ Zhang และคณะ ยังมีการศึกษาพบว่า *Nrf2* มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับ (HCC) อีกด้วย<sup>[11]</sup>

*Nrf2* เป็น transcription factor ที่ทำให้เซลล์เพิ่มการแสดงออกของ antioxidant genes เพื่อป้องกันตนเองและรักษาสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ โดยโปรตีน Nrf2 ในไซโตพลาสซึมจะถูกควบคุมการทำงานโดย Keap1 ซึ่ง Keap1 ทำหน้าที่จับ *Nrf2* เพื่อไม่ให้ทำงานและคงอยู่ในไซโตพลาสซึม ดังนั้นเซลล์ในสภาวะปกติที่ไม่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือไม่มี ROS มากกระตุ้น การทำงานของ *Nrf2* จะถูกยับยั้งไว้ด้วย Keap1 เมื่อมีสาร oxidants เช่น ROS จะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Keap1 ทำให้การจับระหว่าง *Nrf2* และ Keap1 เสียไป มีผลทำให้ *Nrf2* หลุดจาก Keap1 แล้วเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียส เพื่อเข้าจับดีเอ็นเอส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนเป้าหมาย เรียกว่า antioxidant response element (ARE) ส่งผลให้เกิดการสร้าง antioxidant genes ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารพิษ เช่น NADPH quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) และ glutathione S-transferases (*GSTs*) รวมทั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ เช่น heme oxygenase -1 (*HMOX1*) และ peroxiredoxins และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ glutathione (GSH) และที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ metabolism เช่น glutamate – cysteine ligase (*GCL*) ดังนั้น ในสภาวะที่มี ROS สูง เซลล์จะมีการกระตุ้นการทำงานของ *Nrf2*-ARE pathway มากขึ้น เพื่อสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นในการป้องกันเซลล์จาก ROS ซึ่งภาวะที่มี ROS สูงนี้พบในเซลล์มะเร็งด้วยเช่นกัน ซึ่งเชื่อว่าเซลล์มะเร็งใช้กลไกนี้ในการหลบเลี่ยงการตายของเซลล์ (ROS-induced cell death) เมื่อไม่นานมานี้ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Nrf2* กับโรคมะเร็งตับ (HCC) พบว่า มีการแสดงออกของ *Nrf2* เพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ<sup>[5]</sup> และผู้ป่วยมะเร็งตับมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ<sup>[6],[5]</sup> อย่างไรก็ตาม ไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับการแสดงออกของ *Nrf2* และยังไม่ทราบกลไกการควบคุมการแสดงออกของ *Nrf2* โดย ROS ในเซลล์มะเร็ง HCC โดยเฉพาะกลไกทาง epigenetics ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้นในผู้ป่วย HCC นี้ ทำให้มีการแสดงออกของ *Nrf2* มากขึ้น โดย ROS จะไปกระตุ้นให้เกิด promoter hypomethylation ของ *Nrf2* ส่งผลให้เซลล์มะเร็ง HCC มีการแสดงออก *Nrf2* มากขึ้นเพื่อกระตุ้นให้เซลล์สร้างกลไกการหลบเลี่ยงการตายและเพิ่มศักยภาพในการลุกลามไปยังอวัยวะอื่น

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันต่อการเติมหมู่เมทิลบน *Nrf2* promoter การแสดงออกของ *Nrf2* และการกลูตามของเซลล์มะเร็งตับ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนย่อย I. ส่วนที่หนึ่งศึกษาในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง (HepG2 cells) เพื่อดูผลของ ROS ต่อระดับเมทิลเลชันบน *Nrf2* promoter นอกจากนี้ยังศึกษาผลของ ROS ต่อการเคลื่อนที่ (migration) และการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็งตับที่เพิ่มขึ้นในสภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นผลมาจากการแสดงออกการเติมหมู่เมทิลบน *Nrf2* promoter หรือไม่ II. ส่วนที่สองศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ เพื่อดูระดับการแสดงออกของ *Nrf2* และ oxidative stress markers (8-OHdG) แล้ววิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ *Nrf2* และ 8-OHdG กับการมีชีวิตอยู่รอดในผู้ป่วยมะเร็งตับ

การศึกษานี้จะเป็นการศึกษาแรกในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับและผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การเข้าใจกลไกของ ROS ในการเปลี่ยนแปลงการเกิด DNA methylation ในเซลล์มากขึ้น ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งในอนาคตได้

#### คำถามงานวิจัย (Research question)

1. ภาวะเครียดจากออกซิเดชันควบคุมการแสดงออกของ *Nrf2* ผ่านทางการเติมหมู่เมทิลบน *Nrf2* promoter หรือไม่
2. ภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มศักยภาพในการการกลูตามของเซลล์มะเร็งตับได้หรือไม่
3. *Nrf2* มีบทบาทในการเพิ่มศักยภาพการกลูตามของเซลล์มะเร็งตับภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือไม่

#### วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objectives)

1. เพื่อศึกษาระดับเมทิลเลชันของ *Nrf2* promoter ในเซลล์มะเร็งตับที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว ( $H_2O_2$ -treated HepG2 cells)
2. เพื่อศึกษาศักยภาพในการกลูตามของเซลล์มะเร็งตับภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (ใน  $H_2O_2$ -treated HepG2 cells)
3. เพื่อวัดระดับของ oxidative stress markers (8-OHdG) และ *Nrf2* ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ เปรียบเทียบกับส่วนที่ไม่เป็นมะเร็งข้างเคียง (adjacent non-cancerous areas)
4. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในชิ้นเนื้อมะเร็งตับกับการแสดงออกของ *Nrf2* และระยะการกลูตามของผู้ป่วยมะเร็งตับ

### สมมติฐานการวิจัย (Research hypothesis)

1. ภาวะเครียดจากออกซิเดชันน่าจะเหนี่ยวนำให้เกิด hypomethylation บน *Nrf2* promoter ทำให้เพิ่มการแสดงออกของ *Nrf2*
2. ภาวะเครียดจากออกซิเดชันน่าจะสามารถเพิ่มศักยภาพในการลุกลามของเซลล์มะเร็งระดับได้
3. ระดับการแสดงออกของ 8-OHdG และ *Nrf2* ในชิ้นเนื้อมะเร็งระดับน่าจะสูงกว่าชิ้นเนื้อดีในส่วนที่ไม่เป็นมะเร็งข้างเคียง (adjacent non-cancerous areas)
4. ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (8-OHdG) และการแสดงออกของ *Nrf2* น่าจะสัมพันธ์กับการมีชีวิตอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งระดับ

### กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework)

จากการทบทวนวรรณกรรม ภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้นในมะเร็งหลายชนิด และมีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการ carcinogenesis และ cancer progression โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ *Nrf2* ซึ่งหลายงานวิจัยรายงานว่า *Nrf2* มีการแสดงออกสูงขึ้นในเซลล์มะเร็ง และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและการเพิ่มศักยภาพในการลุกลามของเซลล์มะเร็ง แต่ยังไม่มีการศึกษามากนักเกี่ยวกับกลไกการควบคุมเหนือพันธุกรรมของ *Nrf2* ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน งานวิจัยที่ผ่านมาของคณะวิจัยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งระดับมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้จึงต้องการยืนยันการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชันในชิ้นเนื้อมะเร็งระดับ และศึกษาความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ *Nrf2* รวมถึงความสัมพันธ์กับระยะการดำเนินโรค ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน จากนั้นทดสอบสมมติฐานว่า ROS กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ *Nrf2* มากขึ้นโดยผ่านกลไก promoter hypomethylation หรือไม่ และการเพิ่มการแสดงออกของ *Nrf2* จะส่งผลให้ aggressiveness ของเซลล์มะเร็งระดับสูงขึ้นหรือไม่



## คำสำคัญ (Key words)

1. มะเร็งตับ (liver cancer) เป็นโรคที่เกิดจากเซลล์ของตับกลายเป็นมะเร็งมีการแบ่งตัวของเซลล์และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ซึ่งเป็นเนื้องอกที่เจริญเติบโตโดยไร้การควบคุม โดยที่เนื้องอกแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ที่เป็นเนื้อร้ายหรือมะเร็ง และที่เป็นเนื้องอกธรรมดาที่ไม่ได้เป็นเนื้อร้าย และยังสามารถแบ่งมะเร็งตับตามระยะลุกลามของโรคได้แก่

1.1 มะเร็งตับปฐมภูมิ (primary liver cancer) เป็นมะเร็งตับที่เกิดขึ้นในตัวเอง แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดี (cholangio - carcinoma)

1.2 มะเร็งตับทุติยภูมิ คือ มะเร็งที่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น เช่น ปอด ตับ ลำไส้

2. Epigenetics หรือการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม ที่สามารถถ่ายทอดสู่เซลล์รุ่นต่อไปได้ โดยเป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับลำดับเบส (sequence) ของยีน แต่เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นรอบๆ ดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่น การดัดแปลงโครมาติน (chromatin modification) และ DNA methylation

3. DNA methylation หรือปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอ เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอ โดยการเติมหมู่เมทิลไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน (cytosine) ที่ติดอยู่กับกัวนีน (CpG dinucleotide) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในบริเวณที่พบ CpG ก่อนข้างหนาแน่น (CpG islands) โดยส่วนใหญ่พบในบริเวณ promoter และส่วนต้นของ exon ตำแหน่งที่ 1

4. CpG dinucleotide คือ ตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส C อยู่ต่อกับเบส G โดย p หมายถึง phosphodiester bond ที่เชื่อมระหว่าง C และ G เป็นตำแหน่งที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา DNA methylation โดยเป็นบริเวณที่เอนไซม์ DNMT สามารถย้ายหมู่เมทิลมาเติมบริเวณเบส C เกิดเป็น 5-methylcytosine (5-mC)

5. Bisulfite conversion คือการนำดีเอ็นเอทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite ซึ่งปฏิกิริยานี้จะทำให้ unmethylation cytosine เปลี่ยนเป็นเบส uracil ในขณะที่ 5-methylcytosine จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง วิธีการนี้มีประโยชน์ในการศึกษารูปแบบการเกิด DNA methylation

6. Oxidative stress หรือภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (cell injury) และถูกทำลาย (cell damage) ตามมา

7. Tumor progression คือการศึกษาการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งต้องมีความสามารถพิเศษเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 ประการ ดังนี้

7.1 Migration คือการเคลื่อนที่ของเซลล์ เซลล์มะเร็งจะมีศักยภาพในการเคลื่อนที่สูงขึ้น การวัดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์นิยมใช้วิธี wound healing หรือ scratch assay

7.2 Invasion เป็นการรุกรานของเซลล์ ซึ่งนอกจากจะเคลื่อนที่ได้แล้ว เซลล์ต้องสามารถหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อย extracellular matrix ได้ด้วย วิธีที่ใช้ศึกษา invasion ในเซลล์เพาะเลี้ยง คือ Transwell invasion assay

8. HepG2 cell line คือ hepatocellular carcinoma cell line ที่ได้มาจาก cancer human liver

9. *Nrf2* คือ ยีนที่ทำให้เซลล์เพิ่มการแสดงออกจากการป้องกันตนเองเพื่อรักษาสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์จากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress)

### รูปแบบการวิจัย (Research design)

การศึกษาใน cell culture model เป็นงานวิจัยแบบ experimental analytical study ส่วนการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับเปรียบเทียบกับระหว่างส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissues) กับส่วนที่ไม่เป็นมะเร็ง (noncancerous tissues) เป็น Observational analytical study สำหรับ

### ปัญหาด้านจริยธรรม (Ethical consideration)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในชิ้นเนื้อของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการคุณธรรมจริยธรรมวิจัยในคนก่อนการศึกษา โดยวิเคราะห์ตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน 3 ข้อ ได้แก่ หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) คือการไม่เปิดเผยข้อมูลผู้ป่วยโดยไม่ใช้ชื่อผู้ป่วยในการลงทะเบียนส่งตรวจแต่จะใช้รหัสหมายเลขแทน หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) คือการรักษาความลับของผู้ป่วย โดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย และหลักความยุติธรรม (Justice) คือ มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา



## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of study)

1. ผลที่ได้จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง
  - 1.1 ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับการลุกลามในเซลล์มะเร็งตับ
  - 1.2 ทราบถึงระดับเมทิลเลชันของยีน *Nrf2* ในเซลล์มะเร็งตับภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)
  - 1.3 ทราบถึงการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน
2. ผลที่ได้จากการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ
  - 2.1 ทราบถึงระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (8-OHdG) และการแสดงออกของ *Nrf2* ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ
  - 2.2 ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (8-OHdG) และการแสดงออกของ *Nrf2* กับการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยมะเร็งตับ

## อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem)

1. ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ อาจพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ เช่น แบคทีเรีย หรือ เชื้อรา ได้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จึงต้องมีการทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูง (autoclave) ก่อน นอกจากนี้อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์จะต้องผ่านการกรองพร้อมทั้งมีการใส่ antibiotic, ก่อนการใช้ตู้เลี้ยงเซลล์จะต้องมีการเปิด UV ก่อน อย่างน้อย 15 นาที และการเลี้ยงเซลล์จะต้องเลี้ยงด้วยวิธี aseptic technique
2. ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ การดูดส่วนใสด้านบนหลังจากปั่นตกต้องระมัดระวังไม่ให้ติดส่วนขาวขุ่นมาด้วย เนื่องจากจะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์ สามารถแก้ไขได้โดยการเติม Phenol: Chloroform ซ้ำและปั่นตกอีกครั้ง
3. ในแต่ละการทดลองต้องกำหนดกลุ่มควบคุม (control group) ให้เหมาะสมและสามารถเป็นตัวควบคุมที่ดีให้การทดลองนั้นๆ ได้

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

#### มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma (HCC))

มะเร็งตับ (liver cancer) เป็นโรคที่เกิดจากเซลล์ของตับกลายเป็นมะเร็งที่มีการแบ่งตัวของเซลล์ และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ซึ่งเป็นเนื้องอกที่เจริญเติบโตโดยไร้การควบคุม มะเร็งตับพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย เนื่องจากตับเป็นอวัยวะภายในที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีกำลังสำรองมาก ผู้ป่วยมะเร็งตับในระยะแรกจึงมักไม่แสดงอาการ เพราะตับยังคงทำงานได้เกือบปกติ จะมีอาการที่ชัดเจนเมื่อก่อนมะเร็งมีขนาดที่ใหญ่มาก ดังนั้น ผู้ป่วยมะเร็งตับจึงมักมีอัตราการอยู่รอดต่ำ ซึ่งการวินิจฉัยมักตรวจพบเมื่อมะเร็งอยู่ในระยะที่ลุกลามและมีขนาดใหญ่มาแล้ว มะเร็งตับสามารถจำแนกตามระยะลุกลามของโรคได้คือ มะเร็งตับปฐมภูมิ (primary liver cancer) ซึ่งเป็นมะเร็งตับที่เกิดขึ้นในตับเอง แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือมะเร็งของเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้คำว่า มะเร็งตับ และชนิดที่สองคือมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) สำหรับมะเร็งตับทุติยภูมิ คือ มะเร็งที่แพร่กระจายมาจากอวัยวะอื่น เช่น ปอด ตับ ลำไส้ ซึ่งในประเทศไทยร้อยละ 95 เป็นมะเร็งตับ HCC ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญที่พบได้บ่อยในประชากรทั่วโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) รายงานว่าพบมากเป็นอันดับ 5 คิดเป็นร้อยละ 5.6 ของมะเร็งทั้งหมด โดยพบในผู้ชายมากกว่าหญิง 2-4 เท่า ในปี พ.ศ. 2543 พบอุบัติการณ์ของผู้ป่วย มะเร็งตับใหม่ทั่วโลกประมาณ 564,000 คนต่อปี<sup>[1]</sup> ผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณ 271,500 คนอยู่ในทวีปเอเชีย (จากประเทศจีน 221,000 คนและญี่ปุ่น 33,000 คน) สำหรับในสหรัฐอเมริกาและประเทศในทวีปยุโรป พบประมาณ 11,500 คนและ 50,000 คนต่อปีตามลำดับ และมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งตับทั่วโลกสูงถึง 549,000 คนต่อปี จากรายงานของกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยปี พ.ศ. 2551 พบว่าโรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและเจ็บป่วยเรื้อรังจากสาเหตุการตายเป็นอันดับ 1 และเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 1 ในผู้ชายและอันดับ 5 ในผู้หญิง<sup>[12]</sup>

ปัจจัยเสี่ยงและสาเหตุของมะเร็งตับ ประมาณร้อยละ 80-90 ของมะเร็งตับทั้งหมดพบในผู้ที่มีตับแข็ง (cirrhosis) อยู่แล้ว ซึ่งสาเหตุของตับแข็งที่สำคัญและพบบ่อย ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง การดื่มแอลกอฮอล์ และภาวะไขมันสะสมในตับ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) ปัจจัยเสี่ยงและสาเหตุของมะเร็งตับมีความแตกต่างกันตามภูมิภาคของโลก เช่น ในประเทศทางทวีปยุโรปและอเมริกาพบว่ามะเร็งตับส่วนใหญ่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มะเร็งตับที่พบในประเทศญี่ปุ่นมักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ส่วนมะเร็งตับที่พบในประเทศจีนและประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง<sup>[13]</sup> การเกิด

มะเร็งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน (multi-step process) และใช้เวลายาวนานกว่าสิบปีโดยมีปัจจัยร่วมหลายสาเหตุ (multi-factorial process) ทั้งทางชีวภาพ พันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้จะทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง การเกิดพังผืด และพัฒนาต่อไปเป็นมะเร็งเซลล์ตับ โดยทั่วไปการอักเสบแบบเรื้อรังจะทำให้มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดมากขึ้นจากการทำงานของ hepatic stellate cells (HSC) ที่ถูกกระตุ้นจากไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) หรืออนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น เมื่อมีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดอย่างต่อเนื่องจะนำไปสู่การเกิดตับแข็งในที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 20-40 ปี ตั้งแต่เริ่มต้นของตับอักเสบแบบเรื้อรัง<sup>[14]</sup> ในระหว่างที่เซลล์ตับมีการทำลายและมีการสร้างเซลล์ตับขึ้นมาใหม่อาจมีความผิดปกติทางพันธุกรรมของเซลล์เกิดขึ้นได้บ่อยในขณะที่ยังอยู่ในวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) เนื่องจากมีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้น (accelerated rate of cell division) ร่วมกับมีระยะเวลาของการซ่อมแซมความผิดปกติทางพันธุกรรมลดลง การได้รับสารก่อมะเร็งต่างๆ เช่น สารอะฟลาทอกซินหรือไนโตรซามีนมีส่วนทำให้เซลล์ตับมีอัตราการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มของสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการอักเสบของตับมีส่วนกระตุ้นการเหนี่ยวนำสัญญาณเซลล์ (signaling pathways) ต่างๆที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การพัฒนาเซลล์ (cell differentiation) และโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) รวมทั้งสามารถทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ได้โดยตรง ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์ของเซลล์ในที่สุด เซลล์ตับที่มีการกลายพันธุ์นี้ สามารถหลีกเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์และสามารถแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการสะสมของเซลล์ที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งในเวลาต่อมา<sup>[14], [15], [16], [17], [18]</sup>

นอกจากผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 80-90 มักจะมีตับแข็งร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับอาจไม่มีตับแข็งเลยโดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ส่วนมะเร็งตับที่เกิดจากตับปกติโดยไม่มีอาการอักเสบหรือมีเนื้อเยื่อพังผืดเลยมีโอกาสนั้นไปได้น้อยมาก ผู้ป่วยที่เป็นตับอักเสบบีแบบเรื้อรังหรือตับแข็งจากการติดเชื้อไวรัสอาจตรวจพบ liver cell dysplasia ซึ่งแบ่งตามการตรวจทางพยาธิวิทยาเป็น large และ small cell dysplasia ซึ่งข้อมูลในปัจจุบันเชื่อว่า small cell dysplasia เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดมะเร็งตับ ในผู้ป่วยที่เป็นตับแข็งจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือไวรัสตับอักเสบบี<sup>[16]</sup> นอกจากนี้ผู้ป่วยที่เป็นตับแข็งมักตรวจพบ dysplastic nodules ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งตับ (precancerous lesion) โดยสามารถวินิจฉัยได้จากการตรวจทางรังสีวิทยา เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT scan) หรือวินิจฉัยจากการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อตับที่ได้จากการผ่าตัดเปลี่ยนตับ (liver transplantation) การศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective studies) พบว่าผู้ป่วยตับแข็งที่เกิดจากสาเหตุต่างกันมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับไม่เท่ากัน เช่น ตับแข็งจากการติดเชื้อ

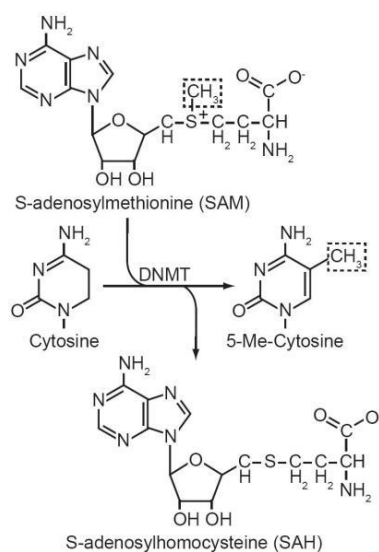
ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นและชาวตะวันตกมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับสูงสุด โดยมีอุบัติการณ์สะสมของการเป็นมะเร็งตับในเวลา 5 ปี (5-year cumulative incidence) ร้อยละ 30 และ 17 ตามลำดับ ส่วนผู้ป่วยตับแข็งจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศทางตะวันตกและประเทศในภูมิภาคที่มีความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูง เช่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีอุบัติการณ์สะสมของการเป็นมะเร็งตับในเวลา 5 ปี ร้อยละ 10 และ 15 ตามลำดับ<sup>[17]</sup>

การเกิดมะเร็งตับเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของยีนหลายขั้นตอน เช่น มีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (chromosomal aberrations) มีการกลายพันธุ์ของยีนมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรม (epigenetic alterations) เกิดขึ้นได้บ่อย รวมทั้งพบการเหนี่ยวนำสัญญาณเซลล์ต่างๆ ที่ผิดปกติ (disrupted signaling pathways) ด้วย

### กระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetic) ในมะเร็งตับ

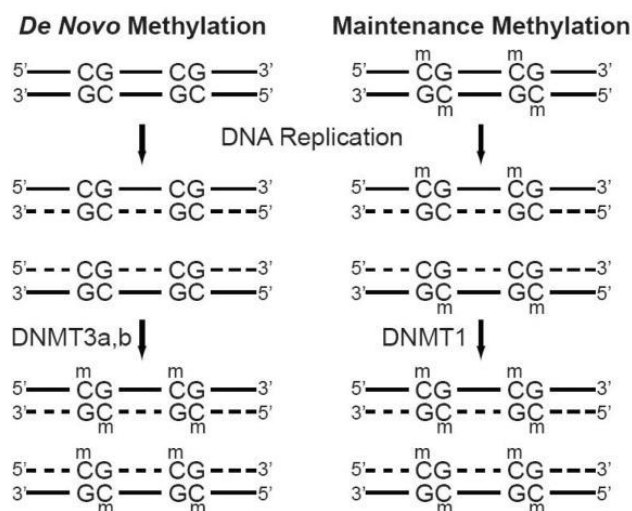
กระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetic) เป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ไม่ขึ้นกับลำดับเบสบนดีเอ็นเอ แต่เกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ เช่น การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) การปรับแต่งโปรตีนฮิสโตน (histone modification) การจัดตำแหน่งนิวคลีโอโซม (nucleosome positioning) และการแสดงออกของ non-coding RNAs ซึ่งสามารถเกิดขึ้นใหม่และสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ กลไกเหนือยีนหรือเหนือพันธุกรรมเหล่านี้จะส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการถ่ายทอดรหัส (transcriptional control) โดยสามารถมีความแตกต่างกันได้ในแต่ละเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ และอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามระยะเวลาหรืออายุของเซลล์ การศึกษาความผิดปกติของกระบวนการเหนือพันธุกรรมที่นิยมศึกษากันมากที่สุดคือ DNA methylation โดยจากรายงานที่ผ่านพบว่า ความผิดปกติของ DNA methylation มีความสัมพันธ์กับโรคหลายชนิด เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคทางระบบประสาท รวมถึงโรคมะเร็งชนิดต่าง<sup>[19], [20], [21]</sup>

กลไกการเติมหมู่เมทิล อาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMTs) โดยเอนไซม์ DNMT จะเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เมทิลจาก s-adenosylmethionine (SAM) ที่ทำหน้าที่เป็นผู้ให้หมู่เมทิล (methyl donor) ไปที่ตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine (5mC) และ SAM เปลี่ยนเป็น s-adenosylhomocysteine (SAH) ดังภาพที่ 1<sup>[22],[23]</sup>



ภาพที่ 1 แสดงกลไกของกระบวนการ DNA methylation โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เมทิล จาก s-adenosylmethionine (SAM) ไปตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine (5mC) และ SAM เปลี่ยนเป็น S-adenosylhomocysteine (SAH)

เอนไซม์ DNMTs ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian) มี 3 ชนิด ได้แก่ 1) DNMT1 2) DNMT3a 3) DNMT3b โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทตามความสามารถในการจับกับซัสเตรตซึ่งก็คือ CpG dinucleotide ที่แตกต่างกัน<sup>[23],[24]</sup> ประเภทแรกได้แก่ เอนไซม์ DNMT1 เร่งปฏิกิริยาของกระบวนการ maintenance DNA methylation<sup>[25]</sup> เพราะสามารถจับได้ดีกับ hemimethylated CpG<sup>[26]</sup> ประเภทที่สอง ได้แก่ เอนไซม์ DNMT3a และ DNMT3b เร่งปฏิกิริยาของกระบวนการ de novo DNA methylation เพราะจับได้ดีกับ unmethylated CpG<sup>[27]</sup> ดังภาพที่ 2<sup>[22]</sup>



ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการ maintenance และ de novo DNA methylation ของ genomic DNA โดยกระบวนการ maintenance DNA methylation เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ DNMT1 และมี hemimethylated CpG เป็นซับสเตรต กระบวนการ de novo DNA methylation เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ DNMT3a และ DNMT3b มี unmethylated CpG เป็นซับสเตรต

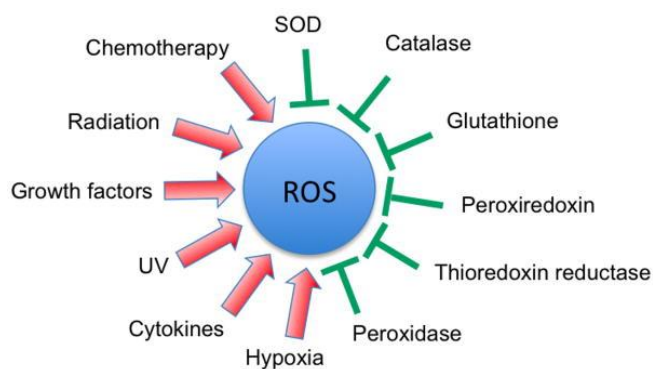
การเพิ่มขึ้นของหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง CpG dinucleotides ในบริเวณ promoter ของยีนต้านมะเร็งเป็นผลทำให้ยีนดังกล่าวทำงานไม่ได้ตามปกติและทำให้ mRNA ที่เป็นผลผลิตจากยีนนั้นมีจำนวนน้อยลง การเพิ่มขึ้นของหมู่เมทิลของยีนต้านมะเร็งชนิดต่างๆในมะเร็งตับที่พบบ่อยได้แก่ p16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)) E-cadherin suppressor of cytokine signaling (SOSC-1) RAS-association domain family (RASSF 1A) soluble frizzled related protein-1 (SFRP1) และ phosphate and tensin homolog (PTEN) [17],[23] ข้อสังเกตจากการศึกษาหลายงานพบว่าการเพิ่มขึ้นหรือพบใน dysplastic nodules และมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเป็นมะเร็งตับแล้ว ดังนั้นการตรวจพบการเพิ่มขึ้นของหมู่เมทิลของยีนต้านมะเร็งในผู้ป่วยที่ยังไม่เป็นมะเร็งตับอาจเป็นตัวบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับในอนาคต [28]

การเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ย้อนกลับได้ (reversible) การเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในมะเร็งตับ ได้แก่ การเพิ่มของหมู่เมทิลในยีนต้านมะเร็ง (promoter hypermethylation) ซึ่งจะยับยั้งการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง และการลดลงของหมู่เมทิลโดยรวมของจีโนม (global hypomethylation or genome-wide hypomethylation) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการเกิดมะเร็ง เนื่องจากทำให้โครโมโซมขาดความเสถียรและกระตุ้นการทำงานของยีนก่อมะเร็ง (proto-oncogene activation) (26),[29]

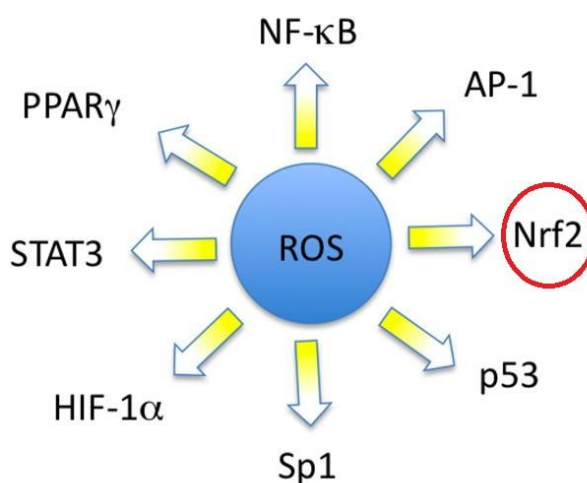
การควบคุมเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) ข้างต้น เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับถอดรหัส (transcriptional control) กระบวนการ DNA methylation จึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาของมะเร็ง เนื่องจาก DNA methylation มีผลโดยตรงต่อการเกิด transcription ของยีน กระบวนการ DNA methylation เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอที่ไม่ทำให้ลำดับเบสมีการเปลี่ยนแปลง และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยการเติมหมู่เมทิล (methyl or  $\text{CH}_3$ ) ไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในเบสไซโตซีน (cytosine (C)) ที่ติดอยู่กับกวานีน (guanine (G)) หรือ CpG (CpG dinucleotide) ซึ่งถ้าตำแหน่ง promoter ของยีนมี methylation สูง จะยับยั้งการเข้าจับของ RNA polymerase ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน (gene repression) นั้น ในเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่จะพบ promoter hypermethylation ของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) <sup>[30],[31],[32],[33]</sup> และ promoter hypomethylation ของยีนมะเร็ง (oncogene) <sup>[34],[35],[36],[37]</sup>

### ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) และการก่อมะเร็ง

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ ภาวะที่เซลล์ไม่สามารถรักษาสมดุลระหว่าง reactive oxygen species (ROS) กับ antioxidant ไว้ได้ ในสภาวะปกติกระบวนการสร้างพลังงานจากสารอาหารที่บริโภคจำเป็นต้องใช้ออกซิเจน ทำให้มีการสร้างสารออกซิเดนต์ (oxidants) ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน หรือ ROS ได้แก่ superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ) และ hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) เกิดขึ้นตลอดเวลาถึงภาพที่ 3 โดยส่วนใหญ่เกิดที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด electron transport chain ดังนั้น ในสภาวะปกติเซลล์จะมีการสร้าง antioxidants เช่น superoxide dismutase catalase และ glutathione ขึ้นมากำจัด ROS เหล่านี้ แต่เมื่อใดก็ตามที่เซลล์ไม่สามารถรักษาสมดุลได้ ROS ที่มากเกินไปจะไปทำลายองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ทั้งโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก จนเกิด oxidative damage อีกทั้ง ROS ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนส่งสัญญาณหรือ transcription factors อีกหลายชนิด ดังภาพที่ 4 <sup>[38]</sup> ซึ่งจะทำให้การทำงานของเซลล์เปลี่ยนไป และในที่สุดส่งผลให้เซลล์กลายเป็นมะเร็งได้ ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษา Nrf2 transcription factor



ภาพที่ 3 ปัจจัยกระตุ้นและยับยั้งการสร้าง ROS ในเซลล์



ภาพที่ 4 Transcription factors ที่ถูกกระตุ้นด้วย ROS

ในการวัดระดับ oxidative stress นั้นสามารถวัดได้จากปริมาณ oxidative product ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมี oxidative stress เกิดขึ้นในเซลล์ โดยอาจวัดจากปริมาณ protein carbonyl ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน<sup>[39]</sup> หรือปริมาณ 8-OHdG ซึ่งเป็นผลผลิตจากกรดนิวคลีอิก<sup>[40]</sup> หรืออาจวัดจาก malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxynonenal (4-HNE) ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในไขมัน<sup>[41]</sup>

อย่างที่กล่าวไว้แล้วเบื้องต้นว่า oxidative stress เป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ มักเกิดจากการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระหรือมีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียด สารอนุมูลอิสระมีแหล่งกำเนิดจากทั้งภายในเซลล์ (endogenous source) เช่น mitochondria และ peroxisome และผลิตจากเซลล์ในกระบวนการอักเสบ และจากภายนอกร่างกาย เช่น การได้รับสารเคมีจากสิ่งแวดล้อม (environmental agent) ยา รวมถึงสารเคมีในอุตสาหกรรมโดยภาวะเครียด จะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลในด้าน



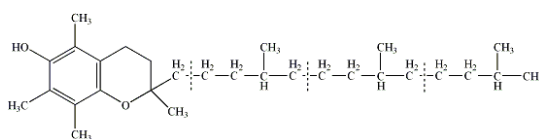
โครงสร้างและการทำหน้าที่ผิดปกติไป ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมตามมา เช่น genetic mutation และ chromosome instability เป็นต้น ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (malignant transformation) [7],[9],[42] สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่หลายชนิดและในการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

### สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

#### วิตามิน อี หรือโทโคเฟอรอล อะซีเตท (Tocopherol acetate ; TA)

วิตามิน อี หรือ โทโคเฟอรอล อะซีเตท (tocopherol acetate) เป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระ (potent antioxidant) ละลายได้ดีในไขมัน เช่นเดียวกับวิตามินเอ วิตามินดี และวิตามินเค วิตามินอี มีหลายชนิด ได้แก่ แอลฟา เบตา แกมมา และซิกมา โทโคเฟอรอล โดยชนิดที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด คือ แอลฟาโทโคเฟอรอล (alpha-tocopherol) เนื่องจากผนังของเซลล์ต่างๆ ในร่างกายมีไขมันที่ไม่อิ่มตัวเป็นโครงสร้างหลัก โครงสร้างที่ว่านี้จะถูกทำลายได้ง่ายด้วยกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) และส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ชนิดต่างๆ ตามมา ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างภายในเซลล์ที่สัมผัสกับสารอนุมูลอิสระ ซึ่งมีผลในการป้องกันการทำลายเซลล์ หรือลดความเสี่ยงของอวัยวะต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีผลช่วยปกป้องการเสื่อมสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ (stabilize) ที่บุอยู่ตามอวัยวะต่างๆ เช่น ผิวหนัง ตา ตับ เต้านม หลอดเลือด และเม็ดเลือดแดง ทำให้อวัยวะดังกล่าวทำงานอย่างมีประสิทธิภาพและมีความคงทนมากขึ้นด้วย

โครงสร้างโมเลกุลของวิตามินอีประกอบด้วยส่วนที่มีหัวของวงแหวนโครแมน (chroman ring) ซึ่งเป็นส่วนหัวที่เป็นส่วนที่ออกฤทธิ์เป็น antioxidant และส่วนหางของ tocopherol เป็นหมู่ที่แทนที่ด้านข้างด้วยส่วนที่ไม่มีหัวจากหมู่ phytyl group ในขณะที่ส่วนหางของ tocotrienol เป็น polyisoprenoid group ส่วนหางนี้ ทำหน้าที่ฝังตัว และยึดเหนี่ยวกับสารไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ และแกนของ lipoprotein แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันที่จำนวน และตำแหน่งของหมู่เมทิล (methyl group, -CH<sub>3</sub>) ในวงแหวนโครแมนล ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5, 7 และ 8



ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของวิตามินอี

กลไกการทำงาน วิตามินอีที่มีอยู่ในเซลล์จะทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จากกระบวนการในเซลล์ ทำให้ลดพิษของอนุมูลอิสระที่อาจเกิดอันตรายกับเซลล์ในร่างกาย และ เปลี่ยนรูปของอนุมูลอิสระทำให้ร่างกายสามารถกำจัดออกในระบบต่างๆได้ดี ขึ้น

### วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)

กรดแอสคอร์บิก ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันภายในเซลล์ เพราะ คุณสมบัติเป็นแอนท็อกซิแดนต์ (antioxidant) ป้องกันสารอื่นไม่ให้ถูกออกซิไดส์ เช่น วิตามินเอ วิตามินอี กรดเตรตระไฮโดรโฟลิก<sup>[43]</sup> และยังเป็นสารที่มีพลังรีดิวสูงและมีฤทธิ์เป็น antioxidant ที่มี ผลต่อ redox potential ของร่างกาย อนุพันธ์ของวิตามินซีสามารถให้อิเล็กตรอนได้ 1 หรือ 2 อิเล็กตรอน<sup>[44]</sup> จึงทำให้วิตามินซี มีบทบาทต่อ Free-radical scavenger โดยเมื่อกรดแอสคอร์บิกถูก ออกซิไดส์ไปเป็น dehydroascorbate และเป็น ascorbate free radical ที่เรียกว่า monodehydroascorbic acid สารตัวนี้แม้เป็น free radical แต่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์เพราะจะ ไปทำหน้าที่เป็น antioxidant ให้แก่ร่างกายเพื่อไปทำลาย free radical ที่เกิดจากออกซิเจนที่จะมา เป็นอันตรายต่อผนังเซลล์<sup>[45]</sup> ในบรรดาอนุมูลอิสระหรืออนุมูลออกซิเจนที่เกิดขึ้นในร่างกายจะเป็น ตัวกลางให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นในพลาสมาเซลล์ membrane ตลอดจนเนื้อเยื่อของ สิ่งมีชีวิต ซึ่งจะเป็นการเชื่อมโยงให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ขึ้นในร่างกายหรือการเกิดมะเร็ง รวมทั้ง ความชรา (aging) ของมนุษย์ที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ อย่างไรก็ตาม กรดแอสคอร์บิกจะไปทำลาย หรือกำจัดพวกอนุมูลอิสระต่างๆ ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$  และ  $HO_2^{\cdot}$ ) ดังกล่าวมาแล้ว ให้เบาบางลงหรือหมดไป ได้<sup>[46], [47]</sup>

### Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)

Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) เป็นยีนที่ทำให้เซลล์เพิ่มการแสดงออกจากการป้องกันตนเองเพื่อรักษาสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ โดย Nrf2 ถูกควบคุมสมดุลการทำงานโดย Keap1 ซึ่ง Keap1 ทำหน้าที่จับ Nrf2 เพื่อไม่ให้ทำงานและคงอยู่ในไซโตพลาสซึม ดังนั้นเซลล์ใน สภาวะปกติจึงคงสมดุลการทำงานของ Nrf2 ได้ เมื่อเซลล์ได้รับตัวกระตุ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ของโปรตีน ส่งผลทำลายการจับระหว่าง Nrf2 และ Keap1 มีผลทำให้ Nrf2 ในรูปอิสระแล้วจะเคลื่อน ตัวเข้าสู่นิวเคลียส และเข้าจับดีเอ็นเอส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน (ARE) เมื่อมีอนุมูล อิสระจะส่งผลให้เซลล์เกิด ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งเป็นความไม่สมดุล ระหว่างการผลิตและการกำจัดของออกซิเจน (reactive oxygen species (ROS)) มีบทบาทสำคัญใน การเกิดโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็ง

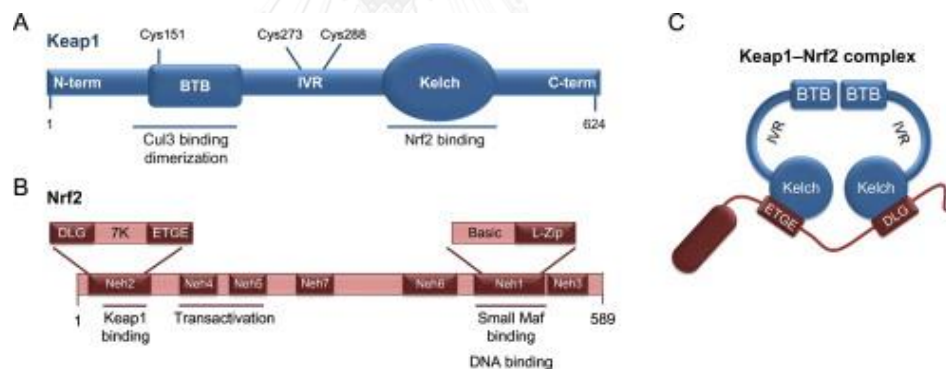
Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) – nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) pathway คือ กระบวนการของการส่งสัญญาณที่สำคัญภายในเซลล์เพื่อป้องกันและควบคุมการรอดจากภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันของเซลล์<sup>[48],[49]</sup> โดยมีกระบวนการทำงานอย่างละเอียดดังนี้

### กระบวนการของ Keap1-Nrf2 (The Keap1-Nrf2 pathway)

โดยปกติแล้วเซลล์ได้มีการเจริญและพัฒนากลไกที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันตัวเองซึ่งทำให้เซลล์มีความสามารถที่จะอยู่รอดภายใต้สภาวะความเครียด หนึ่งในระบบการส่งสัญญาณที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันตัวเองของเซลล์ คือ กระบวนการ Keap1-Nrf2 pathway ซึ่งจะถูกระตุ้นในการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากปัจจัยที่อยู่ภายในเซลล์เองหรือปัจจัยที่มาจากภายนอกเซลล์ ในสภาวะปกติ Nrf2 จะถูกจับอยู่กับ Keap1 ในไซโตพลาสซึม Keap1 จะทำหน้าที่เสมือนโปรตีนตัวเชื่อมในโมเลกุลของ cullin 3 (Cul3)-based E3 ligase complex ซึ่งโมเลกุลนี้จะทำหน้าที่เติมหมู่ ubiquitin ให้แก่ Nrf2 ส่งผลให้ Nrf2 ถูกทำลายที่ proteasome ในภาวะที่ไม่มีภาวะเครียด (unstressed condition)<sup>[48]</sup> ในสภาวะความเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน จะชักนำให้เกิดการสะสมของ Nrf2 ในนิวเคลียส ซึ่งในนิวเคลียส Nrf2 จะจับอยู่กับ antioxidant response element (ARE)<sup>[49]</sup> ซึ่งเป็นส่วนควบคุมยีนเป้าหมาย โดยที่ยีนเหล่านี้ประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารพิษ เช่น NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) และ glutathione S-transferases (GSTs) รวมทั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ เช่น heme oxygenase -1 (HMOX1) และ peroxiredoxins และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ glutathione (GSH) และที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ metabolism เช่น glutamate – cysteine ligase (GCL) นอกจากนี้ Nrf2 ยังควบคุมโปรตีนที่เป็นโปรตีนของ proteasome และโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวพา (chaperone protein) บ่งชี้ว่า Nrf2 มีบทบาทสำคัญในการฟื้นฟูและกำจัดโปรตีนที่เสียสภาพด้วย<sup>[50]</sup>

โปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งในกระบวนการนี้ คือ Keap1 ซึ่งประกอบไปด้วย 5 โดเมน ดังนี้ โดเมนที่หนึ่ง คือ N-terminal domain ซึ่งเป็นส่วนจับซ้อนและครอบคลุมบริเวณกว้าง โดเมนที่สองคือ Tramtrack และโดเมนที่สาม คือ Bric-a-Brac ซึ่งเป็นโดเมนที่เชื่อมกันอยู่รวมเรียกว่า BTB domain ซึ่งบริเวณ BTB จะเชื่อมอยู่กับโดเมนของ Kelch ด้วย intervening region (IVR) โดเมนที่สี่ คือ โดเมนที่เรียกว่า Kelch domain ซึ่งมีส่วนที่มีลำดับของกรดอะมิโนซ้ำกัน และโดเมนที่ห้า คือ C-terminal domain (ภาพที่ 6 A) Keap1 คือโมเลกุลที่จับกันสองโมเลกุล (dimer) ซึ่งเข้าคู่กันผ่านการจับ BTB domain และประกอบขึ้นเป็นโครงสร้างคล้ายกับ cherry bob (ภาพที่ 6 C) Keap1 จะติดอยู่กับหน่วยย่อยของไมโครฟิลลาเมน (microfilament) ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนเซลล์ (cytoskeletal actin) ผ่านการจับของ Kelch domain กับ Nrf2 โดยที่ Nrf2 ประกอบด้วยบริเวณที่

เป็น Neh 7 ตำแหน่ง ได้แก่ Neh1-Neh7 คล้ายกับโครงสร้างของการจับกันระหว่าง Nrf2 และ ECH (ภาพที่ 6 B) โดยที่ Neh1 ประกอบไปด้วยบริเวณที่เป็นลำดับของ CNC เป็นพื้นฐานเพื่อให้ DNA มาจับและโครงสร้างของ leucine zipper มีไว้เพื่อการเข้าคู่กับโปรตีนขนาดเล็กที่มีชื่อว่า Maf ส่วน Neh2 คือโดเมนที่ทำหน้าที่ควบคุมในเชิงลบต่อกระบวนการถอดรหัสของ Nrf2 ผ่านการจับกับโปรตีน Keap1 บริเวณที่เป็น Neh2 มีสองตำแหน่งที่มีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกันประกอบด้วย ETGE และ DLG ซึ่งสองตำแหน่งนี้จับกับ Keap1 มีผลทำให้เกิดเป็นโครงสร้างโมเลกุลประกอบของ Keap1-Nrf2 complex ในอัตราส่วนโครงสร้างทางเคมีหนึ่งต่อสองซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ใน Nrf2 สองบริเวณ (ภาพที่ 6 C) ตำแหน่งสองตำแหน่งนี้ที่ใช้จับกับ Keap1 มีประโยชน์สำหรับกระบวนการเติมหมู่ ubiquitin ของ Nrf2 เพราะบริเวณที่มีกรดอะมิโน lysine เป็นบริเวณที่วางตัวอยู่ระหว่างตำแหน่งที่ใช้จับกับ Keap1 นั่นก็คือ ETGE และ DLG (ภาพที่ 6 A) สำหรับ Neh3 Neh4 Neh5 และ Neh6 คือบริเวณที่เป็นไว้สำหรับการเกิดปฏิกิริยาแบบ trans บริเวณที่มีการศึกษามากที่สุดเมื่อไม่นานมานี้ คือ บริเวณ Neh 7 ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 209 ถึง 316 บริเวณนี้ที่ถูกประมาณการว่าจะจับกับ RXR ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยับยั้งสัญญาณที่เกิดขึ้นระหว่างการจับกันของ Nrf2 กับ ARE<sup>[51]</sup>



ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างโปรตีน Keap1 และ Nrf2

(A) Keap1 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 624 ตัวแบ่งเป็น 5 โดเมน (B) Nrf2 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 589 ตัว แบ่งเป็น 7 โดเมน คือ Neh1 – Neh7 โดเมน Neh2 จะประกอบไปด้วย motif ETGE และ DLG ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับ Keap1 และประกอบไปด้วยส่วน hydrophobic ซึ่งมี lysine อยู่ (7K) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยสลาย (degradation) ของ Nrf2 (C) Nrf2 จะจับกับ Keap1 ด้วย 2 โมเลกุลผ่านทาง ETGE และ DLG

โมเลกุลประกอบของ Keap1-Nrf2 pathway ที่พร้อมในการทำงานจะกระตุ้น ARE และเพิ่มกระบวนการทำงานของเอนไซม์ NQO1 จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า โมเลกุลที่ทำหน้าที่

กระตุ้น ARE (ARE inducers) มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน รูปแบบโดยทั่วไปของโมเลกุลจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีความหลากหลายซึ่งทำปฏิกิริยากับ sulfhydryls เช่น กรดอะมิโน cysteine thiols และนอกจากนั้นการค้นพบของโปรตีน Kelch 1 ที่มีกรดอะมิโน cysteine เป็นจำนวนมากสามารถกระตุ้น ARE ให้จับกับ Keap1 และทำให้ Keap 1 สามารถเป็นตัวตรวจตัวจับสัญญาณความเครียดในรูปของสารละลายประจุไฟฟ้าที่ละลายในน้ำซึ่งอยู่ภายในเซลล์ (electrophile stress)

### การควบคุมการทำงานของโปรตีน Nrf2 โดยโปรตีน Keap1 (Keap1-dependent regulation of Nrf2) <sup>[51]</sup>

ภายใต้สภาวะปกติ Keap1 จะทำหน้าที่เหมือนเป็นโปรตีนตัวพา ในโมเลกุลของ Cul3-based E3 ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ ubiquitin และทำให้เกิดการสลายตัวของ Nrf2 อย่างรวดเร็วตามมา (ภาพที่ 7 A) ครึ่งชีวิตของโปรตีน Nrf2 มีระยะเวลาที่สั้น เพียง 10-20 นาที ซึ่งป้องกันกระบวนการกระตุ้นที่เกิดจากการตอบสนองของสารต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามในระหว่างการเกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือสารละลายประจุไฟฟ้าที่ละลายในน้ำซึ่งอยู่ภายในเซลล์ (electrophile stress) ตำแหน่งที่เป็นกรดอะมิโน cysteine ที่อยู่ในโปรตีน Keap1 ถูกเปลี่ยนโครงสร้างชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนและการจับกันระหว่าง Keap1-Nrf2 เป็นผลทำให้ขัดขวางปฏิกิริยาการเติมหมู่ ubiquitin และการย่อยสลายของ Nrf2 (ภาพที่ 7 B) จากผลข้างต้นทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ Nrf2 ที่ถูกสังเคราะห์เข้าไปในนิวเคลียสและจับกับ ARE และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ในการวิเคราะห์ทางโปรตีน กรดอะมิโน cysteine 27 ตัว ในโปรตีน Keap1 ของมนุษย์ถูกพบว่าการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อสารละลายประจุไฟฟ้าที่ละลายในน้ำซึ่งอยู่ภายในเซลล์ (electrophile stress) ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามกรดอะมิโน cysteine ของโปรตีน Keap1 ได้แก่ ตำแหน่งของกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 151 273 และ 288 ถูกพบว่ามีผลสำคัญในแง่ของระบบการทำงานของระบบโปรตีน Keap1-Nrf2 ในขณะที่กรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 273 และ 288 มีความสำคัญกับโปรตีน Keap1 ในการไปยับยั้งโปรตีน Nrf2 ภายใต้สภาวะปกติ ส่วนหนึ่งของตัวกระตุ้นที่เป็น Nrf2 มีเป้าหมายต่อกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 151 อย่างไรก็ตามไขมันที่มาจกสารละลายประจุไฟฟ้าที่ละลายในไขมันในหมู่ของกรด nitro-oleic (OA-NO<sub>2</sub>) prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>) 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$  – prostaglandin J<sub>2</sub> (15d – PGJ<sub>2</sub>) และสารประกอบโลหะหนักของสารหนู สามารถกระตุ้นโปรตีน Nrf2 โดยไม่ขึ้นกับกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 151 ของโปรตีน Keap1

นอกจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโน cysteine ของโปรตีน Keap1 กลไกอื่นๆที่อาศัยโปรตีน Keap1 เพื่อกระตุ้น Nrf2 โดยที่โปรตีนซึ่งทำหน้าที่แย่ง Keap1 ในการจับกับ Nrf2 อย่างเช่น Sequestosome 1/62 (SQSTM1/p62) กระตุ้นกระบวนการของ Keap1-Nrf2 ผ่านการ

จับกันกับ Keap1 ตรงบริเวณที่อยู่ภายในด้านปลายที่มีหมู่ carboxy ซึ่งคล้ายกับบริเวณที่มีกรดอะมิโน ETGE ใน Nrf2 (ภาพที่ 7 C) กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟสของ p62 ตรงตำแหน่งที่เป็นกรดอะมิโน serine ตำแหน่งที่ 351 จะเพิ่มปฏิกิริยาการจับของโปรตีน p62 และ Keap1 ชักนำให้เกิดการสะสมของ Nrf2 ในนิวเคลียส และการแสดงออกของยีนซึ่งเกิดจาก Nrf2 transcription factor

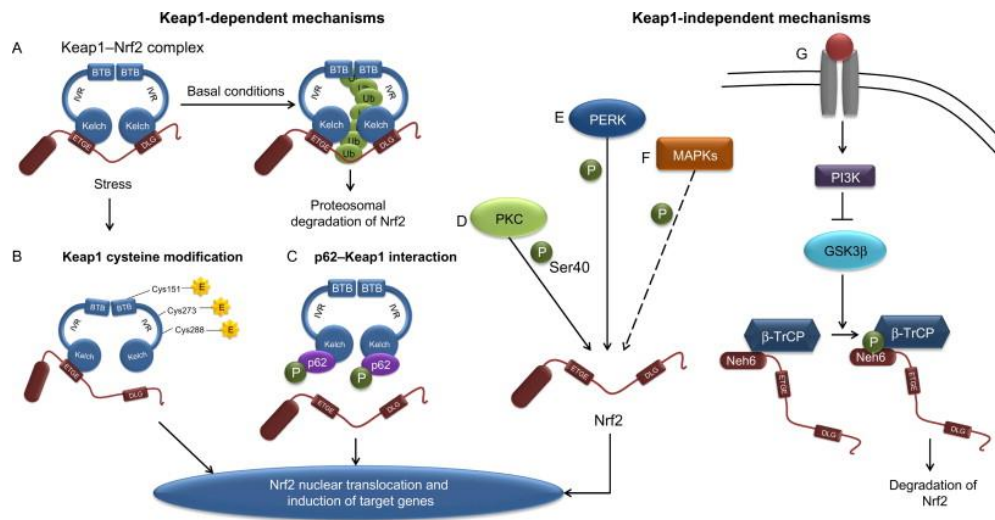
### การควบคุมของ Nrf2 ที่ไม่ต้องอาศัยโปรตีน Keap1 <sup>[51]</sup>

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโน cysteine ของโปรตีน Keap1 แสดงให้เห็นว่าเป็นกลไกหลักในการกระตุ้นกระบวนการการจับกันระหว่าง Keap1 และ Nrf2 อย่างไรก็ตามมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่ายังมีกลไกอื่นสำหรับการกระตุ้น Nrf2 นั่นก็คือกลไกการกระตุ้นที่ไม่ต้องอาศัยโปรตีน Keap1

ความหลากหลายของเอนไซม์ Kinases ได้ถูกบ่งชี้ว่าสามารถที่จะกระตุ้นกระบวนการจับกันระหว่าง Keap1 และ Nrf2 เช่น โปรตีน kinases C (PKC) สามารถเติมหมู่ฟอสเฟสได้โดยตรงให้กับ Nrf2 ตรงกรดอะมิโน serine ตำแหน่งที่ 40 ชักนำให้เกิดการเหนี่ยวนำของยีนเป้าหมายของ Nrf2 (ภาพที่ 7 D) นอกจากนี้เอนไซม์ kinase ซึ่งมีลักษณะคล้ายเอนไซม์ Kinase ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum ที่ถูกกระตุ้นด้วย RNA สายคู่ (double-strand RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK)) เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นด้วยความเครียดของ ER ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ Nrf2 ที่ตำแหน่งซึ่งไม่ทราบแน่ชัด เป็นผลให้เกิดการสะสมของ Nrf2 ในนิวเคลียส (ภาพที่ 7 E) นอกจากนี้เอนไซม์ MAP kinase (MAPKs) เช่น p38 MAPK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) และ extracellular signal-regulated kinase (ERK) เช่นเดียวกับ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ได้รับการบ่งชี้ว่าทำหน้าที่ในการกระตุ้น Nrf2 (ภาพที่ 6 F)

นอกจากการย่อยสลาย Nrf2 ผ่านการใช้ Keap1 ยังมีกระบวนการอื่นที่สามารถย่อย Nrf2 ได้อีก โดยที่ Nrf2 จะไปจับกับกับโปรตีนที่มีลำดับของ  $\beta$ -transducin เป็นส่วนซ้ำๆกัน ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein) โดยจับที่ตำแหน่ง Neh6 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีกรดอะมิโน serine ที่สามารถถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )) เป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยอาศัย cullin1 ((Cul1)-dependent ubiquitination) และการย่อยสลายของ Nrf2 สำหรับกระบวนการทำงานของ GSK-3 $\beta$  ถูกควบคุมโดยเอนไซม์ Kinase ที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ตัวยับยั้งของโปรตีน PI3K และ Akt (PI3K and Akt inhibitor) เพิ่มบทบาทการทำงานของ GSK-3 $\beta$  และทำให้เกิดการกีดกันการแสดงออกของ Nrf2 แสดงให้เห็นว่าในทางกลับกัน คือ กระบวนการทางการส่งสัญญาณของ PI3K ยับยั้งกระบวนการของ GSK-3 $\beta$  ส่งผลให้มี Nrf2 มากขึ้น (ภาพที่ 7 G) การเติมหมู่ฟอสเฟตที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ GSK-3 $\beta$  เกิดขึ้นหลังจากการกระตุ้นที่อาศัยโปรตีน keap1 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยสารละลายในรูปประจุ

ไฟฟ้าที่ละลายในน้ำ ที่เป็นผลมาจากการทำงานของยีนเป้าหมายของ *Nrf2* กลไกดังกล่าวจึงเหมือนเป็นกลไกของการทำลาย *Nrf2* ภายหลังจากได้รับการกระตุ้น



ภาพที่ 7 การกระตุ้นการทำงานของ Keap1 – Nrf2 pathway

(A) ในสภาวะปกติ Keap1 จำนวน 2 โมเลกุลจะจับกับ Nrf2 และมีการเติมหมู่ ubiquitin โดย Cul3 – based E3 ligase complex และส่งผลทำให้เกิดการสลายตัว(degradation) ของ Nrf2 ที่ proteasome (B) ในสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน cysteine ใน Keap1 จะถูก modified ไปยับยั้งการเติมหมู่ ubiquitin ของ Nrf2 (C) ในการกระตุ้นการทำงานของกระบวนการ p62-dependent ซึ่ง p62 จะจับการโดเมนของ Keap1 และเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของ *Nrf2* ในนิวเคลียส ในโมเดลนี้ *Nrf2* ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะเคลื่อนเข้าไปยังนิวเคลียสและจับกับ ARE และเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ *Nrf2* ได้แก่ NQO1 HMOX1 GCL และ GST สำหรับ Keap1-independent mechanisms จะประกอบไปด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตของ *Nrf2* โดย PKC (D) PEPK (E) และ MAP kinase (F) โดยที่ PI3K จะควบคุม *Nrf2* ผ่าน indirect mechanism โดยยับยั้งการทำงานของ GSK-3 β โดยที่ GSK-3 β จะ phosphorylate *Nrf2* และมีการจับกันระหว่าง Nch6 ของ *Nrf2* กับ β –TrCP ส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ ubiquitin ทำให้เกิดการสลายตัวของ *Nrf2* (G)

### บทบาทของ *Nrf2* ในโรคมะเร็ง (Roles of *Nrf2* in cancers)

#### 1. *Nrf2* ในบทบาทยีนมะเร็ง (Oncogenic role of *Nrf2*)<sup>[51]</sup>

โดยปกติแล้ว *Nrf2* ถูกจัดว่าเป็นยีนที่เข้าจับอย่างจำเพาะกับ DNA เพื่อกระตุ้นให้เกิดการ transcription (transcription factor) ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน *Nrf2* เช่น เซลล์ความแก่

ของเซลล์และโรคที่เกิดขึ้นจากภาวะความแก่ของเซลล์ เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ แต่อย่างไรก็ตาม ยีนเป้าหมายของ *Nrf2* หลายๆ ยีน เช่น NQO1 และ GST1 ถูกทำให้แสดงออกมากในโรคมะเร็ง ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งมีความต้านทานหรือดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา โดยปกติแล้วในเซลล์มะเร็งที่ได้รับยารักษาจะมีระดับของ GSH สูงและการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์หลายๆ ตัวที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องการทำงานของยาและช่องทางที่จะนำยาออกจากเซลล์ (drug efflux pump) ซึ่งทั้งเอนไซม์และปั๊มถูกควบคุมร่วมกันโดย *Nrf2* มีการศึกษาในผู้ป่วยและเซลล์มะเร็งปอด พบว่า *Nrf2* จะแสดงออกมากในนิวเคลียส ซึ่งเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ยีน แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Keap1<sup>[52]</sup> และมีกลไกอีกหลายอย่างที่ทำให้มีการเพิ่มการทำงานของ Keap1-Nrf2 pathway (ภาพที่ 8) และมีหลายการศึกษารายงานว่า การเพิ่มการทำงานของ Keap1-Nrf2 pathway ชักนำไปเกิดการดำเนินโรคในผู้ป่วยรุนแรงมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกตลอดเวลาของยีนที่ทำหน้าที่ป้องกันในเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งจึงใช้ประโยชน์จากการทำงานของ Keap1-Nrf2 pathway เพื่อทนต่อสภาวะเครียดและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

## 2. Nrf2 ในบทบาทการเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจติดตามทางชีวภาพ (biomarker) ของโรคมะเร็ง (Nrf2 as a prognostic marker of cancer)<sup>[51]</sup>

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มีระดับการทำงานของ *Nrf2* ที่สูงมาก มักจะมีภาวะการตอบสนองไม่ต่อการรักษาด้วยวิธีการทางเคมีและรังสีบำบัด รายงานในมะเร็ง full name (NSCLC) พบ *Nrf2* ในระดับที่สูงซึ่งมีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกไม่ดี ส่วนในมะเร็งสมองพบการเติมหมู่ methyl สูงขึ้นใน promoter ของยีน *Keap1* เป็นผลให้ระดับการแสดงออกของ *Keap1* mRNA ลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับการลุกลามของโรคที่สูงขึ้น<sup>[53]</sup> และผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน ระดับ mRNA ของ *Nrf2* ที่สูงในเม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์กับการมีชีวิตอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งที่ยาวนานขึ้น<sup>[54]</sup>

นอกจากการแสดงออกของ *Nrf2* single nucleotide polymorphism (SNP) ยังมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *NFE2L2* มีรายงานว่า SNPs หลายๆ ตำแหน่งใน promoter เช่น rs6721961C/A (- 617C/A) rs35652124A/G (- 653A/G) -686A/G -684G -650C/A และ rs6721961T/T และ rs2706110A/A สามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงปัจจัยเสี่ยงของการดำเนินโรคมะเร็งบางชนิดได้<sup>[55],[56],[57]</sup> ยกตัวอย่างเช่น ผู้ที่มี SNPs -686/ -684 A/G จะมีความความเสี่ยงน้อยต่อการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ส่วน SNP-617(rs6721961)สามารถเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในหลายๆ โรค และ SNP-617A มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของภาวะการบาดเจ็บของปอดชนิดเฉียบพลัน<sup>[58]</sup> SNPs -617A/A และ T/T ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด<sup>[55]</sup> ตามลำดับ



นอกจากนี้ ผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มี SNP -617A/A ร่วมกับยีน wt-MDM2 (mouse double minute 2 homolog, รู้จักกันในชื่อของ E3 ubiquitin ligase) พบว่ามีความสัมพันธ์กับการมีชีวิตอยู่รอดมากกว่า 1700 วัน หลังจากการได้รับการผ่าตัด [59] นอกจากนี้ยังพบว่า rs2706110AA คือยีนที่มีเกี่ยวข้องกับความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดต่ำในโรคมะเร็งเต้านม [57]

## กลไกการทำงานของ Nrf2 ที่มากขึ้นในโรคมะเร็ง (Mechanisms of Nrf2 overactivity in cancer)

### 1. การหลุดออกจากกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีนของ Keap1-Nrf2 (Disrupted protein-protein interaction of Keap1-Nrf2) [51]

การกลายพันธุ์ที่ทำให้สูญเสียหน้าที่การทำงานในยีน *Keap1* ถูกพบในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งชนิด adenocarcinoma (ภาพที่ 8) เช่น การเปลี่ยนของกรดอะมิโนจากไกลซีน (Glycine) เป็นซิสเทอีน (Cysteine) ใน Kelch domain ของ Keap1 จะลดประสิทธิภาพในการจับกับ Nrf2 มีผลทำให้เกิดการสะสมของ Nrf2 ในนิวเคลียสเพิ่มขึ้น [52] การกลายพันธุ์ใน *Keap1* ยังพบได้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งถุงน้ำดี มะเร็งตับ มะเร็งรังไข่ มะเร็งท่อไต และมะเร็งปอด การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะอยู่ใน Kelch domain ของ *Keap1* แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ในบริเวณอื่นก็พบได้เช่นกัน ที่สำคัญคือแม้การกลายพันธุ์ของ *Keap1* เกิดขึ้นบนแอลลีนเดียวก็มิผลทำให้กระบวนการทำงานของ Nrf2 เพิ่มขึ้นได้

การกลายพันธุ์ของ *Nrf2* พบได้ในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งบริเวณศีรษะและคอ [60], [61], [62] การกลายพันธุ์มักถูกพบในตำแหน่ง ETGE และ DLG motifs ของ Nrf2 ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของ Nrf2 จับกับ Keap1 ได้ลดลง และยังยับยั้งการสลายตัวของ NRF2 อีกด้วย

การกลายพันธุ์ของยีน *CUL3* ซึ่งสร้างโปรตีน scaffold สำหรับจับกับ Keap1 Rbx1 และ E2 ligase ในโมเลกุลของ ubiquitin ligase พบในเซลล์มะเร็งปอด (lung cancer) และเซลล์มะเร็งไต (renal carcinoma) [63] และยังพบอัตราการกลายพันธุ์ของ *NEF2L2-KEAP1-CUL3* ในมะเร็งบริเวณคอและหัว (head and neck carcinoma) มะเร็งปอด (lung adenocarcinoma) มะเร็งมดลูก (uterine corpus endometrial carcinoma) และมะเร็งท่อปัสสาวะ (bladder urothelial carcinoma) [64] ซึ่งจะมีผลทำให้กระบวนการทำงานของ NRF2 เพิ่มขึ้น ดังนั้น การศึกษาเหล่านี้ช่วยเน้นย้ำถึงบทบาทของ *Nrf2* ที่เป็นยีนเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็ง กลไกอื่นที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ การกลายพันธุ์ของยีน แล้วทำให้กระบวนการทำงานของ *Nrf2* เพิ่มขึ้น เช่น โปรตีน p62 ไปกระตุ้นการสลายตัวของ Keap1 ผ่านกระบวนการ autophagy (ภาพที่ 8) ทั้งนี้ p62 เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ถูกเติมหมู่ ubiquitin และเข้าสู่ autophagosome โปรตีน p62 จะมี STGE motif ซึ่งเหมือนกับ

ETCE motif ที่อยู่ใน Nrf2 ดังนั้น p62 สามารถแย่งจับ Nrf2 หรือแย่งจับ Keap1 ทำให้ Keap1 ไม่สามารถจับกับ Nrf2 ได้ จึงส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการย่อยสลายของ Keap1 โดยปกติแล้ว p62 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายของ Keap1 เกิดขึ้นในเซลล์ที่ไม่มี autophagy ซึ่งมีระดับการแสดงออกของ p62 ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังพบว่า p62 ยังสามารถถูกเติมหมู่ฟอสเฟส ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในการจับ Keap1 และเหนี่ยวนำให้ Keap1 ถูกทำลายในกระบวนการ autophagy<sup>[65]</sup>

นอกจาก p62 ยังมีโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ Keap1 หลายชนิดที่สามารถเพิ่มระดับการสะสมของ Nrf2 ในนิวเคลียสได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะแย่งจับที่ ETGE motif ของ Keap1 ส่งผลทำให้ Keap1 ไม่สามารถจับกับ Nrf2 ได้ ดังนั้น Nrf2 จึงไม่ถูกย่อยสลายและเคลื่อนเข้าสู่ในนิวเคลียส นอกจากนี้โปรตีน PALB2 DPP3 และ WTX ยังสามารถยับยั้งการเติมหมู่ ubiquitin ให้กับ Nrf2 ได้เช่นกัน<sup>[66], [67]</sup>

โปรตีน p21 เป็นเป้าหมายของโปรตีน p53 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ถูกเหนี่ยวนำในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยที่ p21 จะมี KRR motif ซึ่งสามารถจับได้กับตำแหน่ง ETGE และ DLG motif ใน Nrf2 ดังนั้น จะทำให้เกิดการแย่งจับกับ Keap1 ส่งผลให้ Keap1 ไม่สามารถจับกับ Nrf2 ได้

การศึกษาในมะเร็งเซลล์ไต (type 2 papillary renal cell carcinoma) พบว่ามีการทำงานของ Nrf2 เพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะมาจากกลไกที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างเอนไซม์ Fumarate hydratase (FH) ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน fumarate ไปเป็น malate ได้ จึงมี succinate คั่ง ทำให้เกิดการเติม succinate (succination) ที่โปรตีน Keap1 แล้วกุดการทำงานของ Keap1 จึงส่งผลให้ระดับการทำงานของ Nrf2 มากขึ้น (ภาพที่ 8) เป็นการส่งเสริมการดำเนินโรคของมะเร็งดังกล่าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

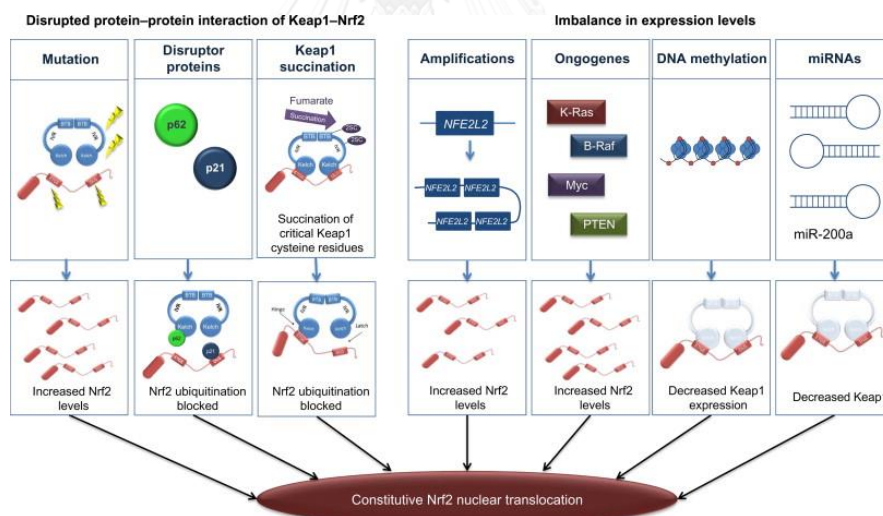
## 2. ระดับการแสดงออกไม่สมดุลของ Nrf2 (Imbalance in expression levels of Nrf2)<sup>[51]</sup>

ในเซลล์ปกติ การทำงานของ Nrf2 ถูกควบคุมในขั้นตอนหลังการถอดรหัสโดยไม่มีผลกระทบต่อระดับของ mRNA ของ Nrf2 แต่อย่างไรก็ตามในเซลล์มะเร็ง พบว่ามี การกระตุ้นการทำงานของ Nrf2 การเพิ่มมากขึ้นและส่งผลกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมที่มียีน Nrf2 ทำให้มีการแสดงออกของ Nrf2 เพิ่มขึ้น ทำให้ Nrf2 เคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสมากขึ้นด้วย (ภาพที่ 8)

ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้ DNA คือกลไกเหนือพันธุกรรมของการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งการเติมหมู่เมทิลเกิดขึ้นในตำแหน่ง CpG โดยปกติแล้วตำแหน่งที่เป็น CpG ของมนุษย์จะถูกเติมหมู่เมทิลประมาณ 60-80 % แต่ promoter ของยีนที่มีการแสดงออก จะไม่มีการเติมหมู่เมทิล การเติมหมู่เมทิลตรงบริเวณ promoter จะทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีน promoter ของ Keap1 พบมีการเติมหมู่เมทิลในมะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งสมอง มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งเต้านม ซึ่งลดระดับการแสดงออกของ Keap1 (ภาพที่ 8) ดังนั้น การเติมหมู่เมทิลจะทำให้

ประสิทธิภาพการจับของ transcription factor ลดลง ซึ่งส่งผลทำให้การถอดรหัส DNA ลดลง นอกจากนี้ในขั้นตอนหลังการถอดรหัส ยังพบว่า miRNA ที่สามารถลดระดับ mRNA และระดับโปรตีนของ Keap1 ได้ ส่งผลให้มีการสะสมของ *Nrf2* ในนิวเคลียสมากขึ้น เช่น ในมะเร็งเต้านม [68] (ภาพที่ 8 )

K-ras, B-Raf และ Myc เป็นยีนมะเร็ง (oncogene) ที่สามารถเพิ่มระดับ *Nrf2* และระดับยีนเป้าหมายของ *Nrf2* ได้ โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับ Keap1 แต่ผ่านกลไกของ MAP kinases JNK และ ERK (34) (ภาพที่ 8) นอกจากนี้การรบกวนของโปรตีน PTEN tumor suppresser และการกลายพันธุ์ของ EGFR (epithelial growth factor receptor) จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Nrf2* เพิ่มมากขึ้น และทำให้เซลล์เติบโตเพิ่มจำนวน NF- $\kappa$ B ก็สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน *Nrf2* เพิ่มมากขึ้นในลักษณะเดียวกันนี้ ซึ่งรายงานในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน [69] นอกจากนี้ในมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งมดลูก มะเร็งเต้านม และมะเร็งรังไข่ ยังพบการทำงานที่มากขึ้นของ *Nrf2* ได้เช่นกัน เชื่อว่า ฮอร์โมนเพศ (gonadotropin) และสารประเภทสเตออยรอน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัสของ *Nrf2*



ภาพที่ 8 กลไกการทำงานของ *Nrf2* ในโรคมะเร็ง (Mechanisms of *Nrf2* overactivity in cancer)

### ผลที่ตามมาของการทำงานเพิ่มขึ้นของ *Nrf2* (Consequences of *Nrf2* hyperactivity) [51]

โดยปกติแล้วในระหว่างการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งต้องการลักษณะพิเศษใหม่ซึ่งประกอบด้วย การส่งสัญญาณเพื่อเพิ่มจำนวน การหลบเลี่ยงสัญญาณที่หยุดยั้งการทำงานของเซลล์ และการตายของเซลล์ เหนี่ยวนำให้มีการเจริญเติบโตของหลอดเลือดเข้าไปยังเซลล์มะเร็ง

กระบวนการเผาผลาญสารอาหารเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็ง สำหรับการทำงานที่สูงขึ้นของ *Nrf2* มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสามารถชักนำให้เกิดการดำเนินของโรคมะเร็งหลายชนิด เนื่องจาก *Nrf2* ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์มีผลทำให้เอื้อประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งที่มีระดับการทำงานของ *Nrf2* ที่สูงจะไม่ค่อยตอบสนองต่อเคมีและรังสีบำบัด นอกจากนี้เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีนนี้มีความสามารถที่จะหลบหลีกโปรแกรมการตายของเซลล์และเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วเนื่องจากกลไกที่เซลล์มีกระบวนการ metabolic reprogramming นอกจากนี้การทำงานที่สูงของ *NRF2* ยังมีผลต่อการเจริญของหลอดเลือดเข้าไปยังเซลล์มะเร็งด้วย

### การแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็ง

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งของเซลล์มะเร็ง และเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนหลายชนิด เช่น integrins เอนไซม์ matrix metalloproteinase และโปรตีนในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง (angiogenesis) มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงผลของอนุมูลอิสระต่อการแพร่กระจายของมะเร็ง เช่น อนุมูลอิสระกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน integrin ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ การส่งสัญญาณภายในเซลล์ และเพิ่มการซึมผ่านได้ของหลอดเลือด ซึ่งส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของมะเร็งในที่สุด มีการศึกษาระดับของ 8OHdG, 4-HNE และสารที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่า ระดับสารดังกล่าวในระยะแพร่กระจายสูงกว่าในระยะเริ่มต้น<sup>[70]</sup> เช่นเดียวกันกับมะเร็งเต้านมพบว่าในระยะแพร่กระจายมีระดับของเอนไซม์ lysyl oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์สร้าง  $H_2O_2$  สูงกว่าระยะเริ่มต้น<sup>[71]</sup> นอกจากนี้พบว่ามีอนุมูลอิสระสามารถกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง (neoangiogenesis) โดยเพิ่มการสร้าง vascular endothelial growth factor (VEGF) มากขึ้นและยังพบว่า vascular endothelial growth factor ยังสามารถเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion ได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้น อนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งโดยอาศัยหลายๆ กลไกข้างต้นร่วมกัน และเซลล์มะเร็งก็สามารถสร้างอนุมูลอิสระปริมาณมากได้เช่นเดียวกัน ส่งผลให้มีการแสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วยได้หลายอย่างเช่น ระยะของโรคที่ลุกลามและแพร่กระจาย นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการสร้างและทำงานของไซโตไคน์ (cytokines) ต่างๆ โดยเฉพาะ tumor necrotic factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ทำให้เกิดภาวะ cancer cachexia นอกจากนี้ Sheridan และคณะ<sup>[10]</sup> ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระโดยประเมินจากการแสดงออกของผลิตภัณฑ์ของอนุมูลอิสระ 8-oxo-dG กับอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 143 รายพบว่า การแสดงออกของ 8-oxo-dG ที่มากขึ้นจะสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็งและอัตราการรอดชีวิตที่สั้นกว่า

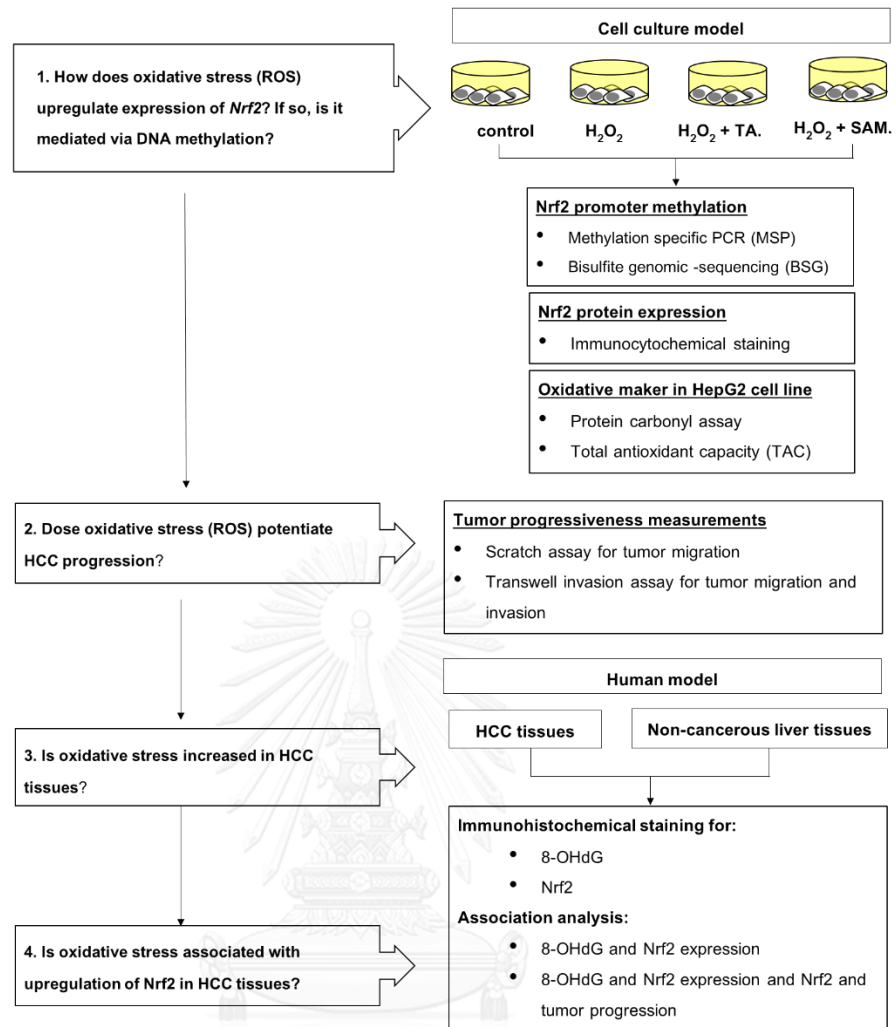
ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันต่อการเติมหมู่เมทิลบน *Nrf2* promoter การแสดงออกของ *Nrf2* และการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนย่อย I. ส่วนที่หนึ่งศึกษาในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง (HepG2 cells) เพื่อดูผลของ ROS ต่อระดับเมทิลเลชันบน *Nrf2* promoter นอกจากนี้ยังศึกษาผลของ ROS ต่อการเคลื่อนที่ (migration) และการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็งตับที่เพิ่มขึ้นในสภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นผลมาจากการแสดงออกการเติมหมู่เมทิลบน *Nrf2* promoter หรือไม่ II. ส่วนที่สองศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ เพื่อดูระดับการแสดงออกของ *Nrf2* และ oxidative stress markers (8-OHdG) แล้ววิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ *Nrf2* และ oxidative stress markers (8-OHdG) กับการมีชีวิตอยู่รอดในผู้ป่วยมะเร็งตับ



### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

Study flow diagram ลำดับการทำงานวิจัยนี้แสดงในแผนภูมิด้านล่าง



จาก Study flow diagram ลำดับการทำงานวิจัยที่แสดงในแผนภูมิด้านบนข้างต้น สามารถอธิบายวิธีโดยละเอียดดังนี้

1. ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell study) โดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงจากตับ Human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2 cells)

2. ศึกษาในชิ้นเนื้อ (Human study) โดยศึกษาจากบล็อกชิ้นเนื้อ (paraffin-embedded block) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งตับและผลพยาธิวิทยาเป็น HCC โดยคำนวณกลุ่มตัวอย่างจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Khor และคณะ<sup>[72]</sup> ดังนี้

$$n = \frac{Z^2 p (1-p)}{d^2}$$

เมื่อ  $n$  = ขนาดตัวอย่าง

$Z$  = ค่าคงที่ 1.96 ที่ความเชื่อมั่น 95%

$p$  = ความชุกการเกิด methylation ของการศึกษาครั้งก่อน มีค่าเท่ากับ 0.11

$d$  = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ที่ 10% = 0.1

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.11 (1 - 0.11)}{0.1^2} = 37.2$$

ดังนั้น จะต้องศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง จำนวนอย่างน้อย 38 ราย

## การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

### 1. ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture study)

#### การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ Human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2 cells) ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% antibiotic (Penicillin-streptomycin) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub>

ขั้นตอนการ trypsinization โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลือออกด้วย 10 mM Phosphate Buffer (PBS) เติม 0.25% Trypsin/EDTA (1ml/25cm<sup>2</sup> of surface area) เอียงภาชนะเพาะเลี้ยง เพื่อให้ trypsin กระจายเต็มพื้นที่ภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> และ 95% humidity นาน 3-5 นาทีหรือจนกว่าเซลล์จะหลุดออกจากภาชนะ (ไม่ควรเกิน 7 นาที) ตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverted microscope) เติม complete medium ปริมาตร 2 vol ของ Trypsin/EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 5 นาที แล้ว resuspend เซลล์ complete medium แล้วแบ่งลงภาชนะเลี้ยงตามจำนวนที่ต้องการ สำหรับการเก็บเซลล์แช่แข็งให้ resuspend เซลล์ด้วย FBS with 10% DMSO

#### ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยวิธี MTT reduction test

เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารอื่นๆ เช่น antioxidant ที่นำมาบ่มกับเซลล์เพาะเลี้ยง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ MTT assay เป็นการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ อาศัยการทำงานของ oxidoreductase enzymes ในการสลาย yellow-colored tetrazolium salt; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ให้กลายเป็น purple colored formazan crystal เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ที่จะมี enzyme activity สำหรับเปลี่ยนสีของ MTT ดังกล่าว ดังนั้น สีม่วงของ formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต<sup>[73]</sup> ขั้นตอนโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) โดยมีจำนวนเซลล์  $5 \times 10^3$  เซลล์ บ่มที่ตู้ภายใต้ภาวะที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> และ 95% humidity นาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 200  $\mu$ M) ใน serum free media ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วเติม serum free media ที่มีการทดสอบตามความเข้มข้นที่ต้องการ เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมงให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 0.5 mg/ml MTT บ่มที่ตู้ภายใต้ภาวะที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> และ 95% humidity นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบ



กำหนดเวลาให้ดูดสารละลาย MTT ทั้ง แล้วเติม DMSO เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm (OD) แล้วคำนวณ % Cell viability ดังนี้

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{Treatment}} \times 100}{\text{OD}_{\text{Control}}}$$

### การกระตุ้นเซลล์ด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated condition)

นำเซลล์ HepG2 มาเพาะเลี้ยงในภาชนะ (cell culture flask) ขนาด 25 cm<sup>2</sup> จำนวน 4 ใบ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub> ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกด้วย 10 mM Phosphate Buffer (PBS) จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่ปราศจากซีรัม ในภาชนะใบที่หนึ่งซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control) จำนวน 3 ml สำหรับภาชนะใบที่สองเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่ปราศจากซีรัมและมีส่วนผสมของ ROS โดยเติม 70 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> จำนวน 3 ml ส่วนภาชนะใบที่สามเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่ปราศจากซีรัมซึ่งมีส่วนผสมของ ROS และ antioxidant (Tocopherol acetate ; TA) โดยการเติม 70 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ 300 μM TA จำนวน 3 ml และภาชนะใบที่สี่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่ปราศจากซีรัมซึ่งมีส่วนผสมของ ROS และ SAM โดยการเติม 70 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ 100 μM SAM จำนวน 3 ml แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub> เวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ trypsinization แล้วสกัดนำไปดีเอ็นเอหรือเติม Radioimmunoprecipitation RIPA buffer แล้วชุดโปรตีน เพื่อจะนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

### การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง (Protein extraction)

การสกัดโปรตีนวิธีทางเคมี (chemical method) จากเซลล์ (whol cell protein) โดยใช้ Radioimmunoprecipitation RIPA buffer ประกอบด้วย ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate และ 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยวิธีการสกัดคือ ใส่ RIPA buffer 300 μl ลงในภาชนะเลี้ยงเชื้อ หลังจากการ treat เซลล์แล้ว เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C ชุดเซลล์โดยใช้ scrapper จากนั้นบีบใส่ใน microcentrifuged tube และปั่นเหวี่ยง 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C จะได้ส่วน supernatant สำหรับตรวจวัดระดับ total protein และ protein carbonyl หรือถ้ายังไม่ทดสอบในทันที ให้เก็บ supernatant ที่ -20 °C

### การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยง (DNA extraction)

หลังจาก trypsinization แล้วดูดเซลล์เพาะเลี้ยงใส่ในหลอดขนาด 2 ml แล้วนำไปปั่นตกด้วยความเร็ว 5,000 x g นาน 5 นาที จากนั้นปั่นล้างด้วย PBS ความเร็ว 5,000 x g นาน 5 นาที แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin® 8 Tissue Kit (Bethlehem, USA) ตามเอกสารประกอบชุดน้ำยาโดยการเติม binding buffer และ proteinase K ที่มากับชุดสกัด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายและเซลล์ที่ปั่นแล้วย้ายใส่ในชุด filter ที่มากับชุดสกัด นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 x g เพื่อให้สารละลายไหลผ่าน filter ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอจะถูก filter กรองตกไว้ จากนั้นเติมสารละลาย inhibitor removal buffer และ wash buffer ที่มากับชุดสกัด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนในดีเอ็นเอออกไป ในขั้นตอนสุดท้ายชะดีเอ็นเอออกจาก filter ด้วยการเติม elution buffer ปริมาตร 100 µl เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 x g จะได้ดีเอ็นเอจากเซลล์ที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยากับ bisulfite และทำ PCR ต่อไป

### การศึกษา Oxidative stress marker ในเซลล์เพาะเลี้ยง

#### การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Total antioxidant (TAC)

#### Measurement by ABTS (Radical scavenging capacity assay) assay

ABTS assay เป็นวิธีวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมโดยใช้สาร 2, 2'- azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล  $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$  ซึ่งสาร ABTS ทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต หรือ AAPH (2,2-azobis (2-aninopropane) dihydrochloride) ให้กลายเป็น  $ABTS^+$  ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีสีฟ้า-เขียวและมี  $\lambda_{max}$  ที่ 734 nm โดยปรับค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้น  $ABTS^+$  ให้เป็น 0.0650 เมื่อเติมสารทดสอบที่มีสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้  $ABTS^+$  ลดลงซึ่งทำให้สีจางลงผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity, VEAC) โดยมีวิธีการทำดังนี้ เตรียมหลอด 3 conditions คือ ในหลอด Blank ปิเปตน้ำกลั่น 20 µl จากนั้นเติม ABTS ลงไป 980 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนในหลอด standard ascorbic acid หรือ Vitamin C (Std. AA) ปิเปต Std. AA มา 20 µl จากนั้นเติม ABTS ลงไป 980 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และในหลอด sample โดยปิเปต sample มา 20 µl จากนั้นเติม ABTS ลงไป 980 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 nm. แล้วจึงนำไปคำนวณปริมาณ total antioxidant capacity (% AA, % antioxidant activity) ดังนี้<sup>[74]</sup>

$$\% \text{ antioxidant activity} = \frac{(\text{OD}_{\text{Blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}) \times 100}{\text{OD}_{\text{Blank}}}$$

$$\text{VCEAC (mM)} = \% \text{ AA} \div \text{Slope of vitamin C concentration standard curve}$$

$$\text{VCEAC (mg/L)} = \text{VCEAC (mM)} \times 176.12 \text{ (Molecular weight of vitamin C)}$$

### การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

ความเข้มข้นของโปรตีนสามารถวัดด้วยวิธี Bradford assay โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 และกรดอะมิโน เมื่อทำปฏิกิริยากัน Coomassie จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งจะวัดค่าดูดกลืนแสงสีน้ำเงินจากค่า absorbance ที่ 595 nm ซึ่งเป็นสัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานนี้ นำเอาโปรตีนที่สกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยง 5 ไมโครลิตรผสมกับ Coomassie Brilliant Blue 250 ไมโครลิตร แล้ว incubate 5 นาที แล้วนำไปวัดค่า absorbance ที่ 595 nm โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ที่ 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml เป็นค่า standard protein เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นโปรตีน [75]

### การวัดระดับโปรตีน Carbonyl ด้วยวิธี DNPH assay

นำโปรตีนที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 62.5  $\mu\text{l}$  (ใช้โปรตีนความเข้มข้น 0.1-10 mg/ml หากความเข้มข้นเกินกว่านี้ให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่น) ส่วนแรกนำไปเติม 2 N HCL 250  $\mu\text{l}$  เป็น blank sample อีกส่วนหนึ่งนำไปเติม 10 mM DNPH 250  $\mu\text{l}$  เช่นกัน เป็น test sample จากนั้นนำทั้งหมดไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง โดยนำมาเขย่าเป็นระยะๆ ทุก 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเติม 20% trichloroacetic acid ปริมาตร 300  $\mu\text{l}$  แล้วบ่มที่ 4°C อีก 10 นาที เมื่อบ่มแล้วจะมีตะกอนเกิดขึ้นให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วย ethanol : ethylacetate (1:1) ปริมาตร 625  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย guanidine hydrochloride ปริมาตร 300  $\mu\text{l}$  แล้วบ่มที่ 37 °C อีก 30 นาที เพื่อละลายตะกอน หากยังมีตะกอนเหลืออยู่ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายด้านบนไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน Carbonyl โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคูณด้วยค่าคงที่ 45.5 จะได้ปริมาณโปรตีน Carbonyl ในหน่วย nmol/ml จากนั้นนำปริมาณที่ได้นี้ไปเทียบเป็นปริมาณโปรตีน Carbonyl ต่อปริมาณทั้งหมด ดังนี้ [76]

$$\text{Protein carbonyl (nmol/mg)} = \frac{\text{A375} \times 45.45 \text{ (nmol/mL)}}{\text{Total protein concentration (mg/mL)}}$$

### การศึกษา Oxidative stress markers (8-OHdG) และการแสดงออกของ Nrf2 ใน เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunocytochemistry

Immunocytochemistry เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบการจับกันระหว่าง antigen และ antibody (Nrf2, 8-OHdG) ในเซลล์เพาะเลี้ยง ขั้นตอนคือเพาะเลี้ยงเซลล์ลงบน coverslip sterile glass ภายในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) บ่มที่ตู้ภายใต้ภาวะที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> และ 95% humidity นาน 24 ชั่วโมง จากนั้น treated cells ด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ antioxidant (เซลล์ที่ treated ด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> จำนวน 2 หลุม, เซลล์ที่ treated ด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> กับ TA อีก 2 หลุม, เซลล์ที่ treated ด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> กับ SAM อีก 2 หลุม และเซลล์ที่ไม่ treated ด้วยสารใดๆ เลย จำนวน 2 หลุม) บ่มที่ตู้ ภายใต้ภาวะที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> และ 95% humidity นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้ดูดสารละลายทดสอบทิ้ง แล้วเติม fixative ด้วย 4% paraformaldehyde นาน 10 นาที จากนั้น permeabilization เซลล์ใน 0.5% Triton X-100 นาน 10 นาที แล้วล้างด้วย PBS จากนั้น blocking non-specific ใน normal serum แล้ว incubated ใน primary antibodies (Nrf2 และ 8-OHdG) ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน จากนั้นล้างด้วย PBS นาน 5 นาที แล้วจึงหยด secondary antibody (HRP-conjugated) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS นาน 5 นาที จากนั้น หยด ABC reagent (VECTOR laboratories, Theera trading Co, USA) แล้ว incubate ใน อุณหภูมิห้องนาน 30 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS นาน 5 นาที จากนั้น detection substrate - chromogen ด้วย 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB ) incubate ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้างในน้ำประปาไหลผ่าน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ DAB จากนั้น counterstain ด้วย Hematoxylin ประมาณ 20 วินาที แล้วจึงล้างในน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที จากนั้นดึงน้ำออก จากเซลล์ (dehydration) ด้วย ethanol alcohol จากเปอร์เซ็นต์ต่ำไปสูง และทำให้ใส (clearing) ด้วย xylene แล้วจึง mounting ด้วย permanent mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์<sup>[4]</sup>

## การศึกษาการเกิด Methylation ของ *Nrf2* promoter

### การเตรียม Bisulfite conversion DNA

นำดีเอ็นเอปริมาณ 250 ng มาทำปฏิกิริยา bisulfite conversion ด้วยชุดน้ำยา EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (ZYMO RESEARCH, USA) ตามเอกสารประกอบชุดน้ำยาโดยมีวิธีการทำปฏิกิริยา bisulfite conversion ดังนี้ ผสม 50 ng/μl DNA ปริมาณ 20 μl กับ CT conversion reagent 130 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปต นำหลอดตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 98°C นาน 10 นาที 64 °C นาน 2.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (หลังจากนั้นสามารถเก็บที่ 4 °C ได้นาน 20 ชั่วโมง) เติม M-binding buffer 600 μl ใน Zumo-Spin IC column แล้วประกอบเข้ากับ collection tube นำตัวอย่าง DNA ย้ายลง Zumo-Spin IC column ซึ่งมี M-binding buffer 600 μl ผสมให้เข้ากัน ด้วยวิธี inverting ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที, เทสารละลายทิ้งแล้วเติม M-Wash buffer 100 μl ลง column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที เติม M-Desulphonation buffer 200 μl ลง column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที เติม M-Wash buffer 200 μl ลง column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นย้าย Zumo-Spin IC column ไปยังหลอดใหม่ขนาด 1.5 μl ที่เตรียมไว้แล้วเติม M-Elution buffer 15 μl ลง column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 วินาที เก็บ DNA ที่ -20 °C เพื่อทดสอบ MSP ต่อไป

### การวิเคราะห์การเกิด Methylation ของ *Nrf2* ด้วยวิธี Methylation specific PCR (MSP)

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่ *Nrf2* promoter อาศัยหลักการทำปฏิกิริยากับ Sodium bisulfite ในการแบ่งแยกระหว่าง Cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิล (Methylated C) ซึ่งใน MSP นี้ใช้ primer ที่จำเพาะต่อ *Nrf2* ที่ถูกเติมหมู่เมทิล (methylated *Nrf2* ) และ *Nrf2* ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล (unmethylated *Nrf2* ) แทนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีวิเคราะห์นั้นเริ่มจากสกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยากับ Sodium bisulfite จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่ปรับเปลี่ยนเล็กน้อยจากวิธีของ Kang และคณะ<sup>[4]</sup> ดังนี้ โพรเมอร์สำหรับ methylated *Nrf2* คือ 5'-AGG GAG GCG TAG TTT TTA TAT TAA C-3' และ 5'-AAC TAA AAT CCC AAC AAA CGA A -3' ส่วนโพรเมอร์สำหรับ unmethylated คือ *Nrf2* 5'-ACC AAC TAA AAT CCC AAC AAA CA -3' และ 5'-GGA GGT GTA GTT TTT ATA TTA ATG T -3' ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) อุณหภูมิสำหรับ PCR ใช้ Initial denaturation ที่ 95°C 15 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation 94°C 15 วินาที, Annealing 50°C (สำหรับ methylated *Nrf2*) หรือ 56°C (สำหรับ unmethylated *Nrf2* ) นาน 30 วินาที, Extension 72°C 30 วินาที

จำนวน 43 รอบ แล้วทำ Final extension 72°C 10 นาที แล้วดูผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis

### การแยกดีเอ็นเอตามขนาดด้วยวิธี Electrophoresis

ผสมสารละลาย 2.5% agarose แล้วเทใส่พิมพ์สำหรับทำเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำเจลไปประกอบขั้วไฟฟ้าในชุด horizontal electrophoresis system โดยใช้ 1X TAE buffer เป็น take buffer ใส่สารตัวอย่างที่จะทำการแยก โดยผสมสารตัวอย่าง 8 µl กับ loading dye 2 µl แล้วจึงหยดลงในช่องของเจล จากนั้นให้ไฟฟ้า ความต่างศักย์คงที่ 130 V เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบ 60 นาทีแล้ว นำเจลออกจากพิมพ์ แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide สำหรับย้อมเจล เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเอ บนแผ่นวุ้น (Gel Doc™ XR+ System, BIO-RAD Co., USA)

### การวัดระดับการเกิด Methylation ของ *Nrf2* โดยวิธี Bisulfite genomic sequencing (BSG)

วิธีการวิเคราะห์เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยากับ Sodium bisulfite จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่ปรับเปลี่ยนเล็กน้อยจากวิธีของ Tin Oo Khor และคณะ<sup>[72]</sup> ดังนี้ ไพรเมอร์สำหรับ BSG *Nrf2* Forward คือ 5'-ATTTGGAAGTAATAAGGAGAAAT 3' และไพรเมอร์สำหรับ BSG *Nrf2* Reverse คือ 5'-AAAAACCTCTTCCCACCAAAA 3' ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO, Osaka, Japan) อุณหภูมิสำหรับ PCR ใช้ Initial denaturation ที่ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation รอบที่ 1 94°C นาน 48 วินาที Annealing รอบที่ 1 45 °C นาน 45 วินาที Extension รอบที่ 1 72°C นาน 1 นาที จำนวน 15 รอบ แล้วตามด้วยขั้นตอน Denaturation รอบที่ 2 94 °C นาน 30 วินาที, Annealing รอบที่ 2 57 °C นาน 45 วินาที, Extension รอบที่ 2 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วทำ Final extension 72°C 10 นาที แล้วดูผลิตภัณฑ์โดยการส่งตรวจหาลำดับเบส

### การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Migration) ด้วยวิธี Wound healing assay

Wound healing หรือ scratch assay เป็นวิธีที่ใช้วัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) โดยวัดจากรอยแยกจาก monolayer ของเซลล์ วิธีการคือเลี้ยงเซลล์ HepG2 ในภาชนะชนิด 6 หลุมที่ต้องการ treatment จำนวน 4 conditions นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub> ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์จัดเรียงตัวเป็น monolayer จากนั้นนำ pipet ขนาด 200 ไมโครลิตร มาขูดเพื่อทำให้เกิดรอยในแต่ละหลุม โดยรอยแต่ละหลุมต้องมีลักษณะเดียวกัน หลังจาก

ชุดแล้ว ก็จะนำมาล้างเบาๆ ด้วย PBS และใส่อาหารเลี้ยงเชื้อกับใส่ treatment ที่แตกต่างกันในแต่ละหลุม ขนาดของรอยแยกเริ่มต้นจะถูกสังเกตและวัดโดยใช้กล้อง microscope หลังจากนั้นจะนำเซลล์ไป incubate ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายหลังการ incubate แล้วจะนำมาตรวจวัดการ migration ของเซลล์ในแต่ละ treatment<sup>[77]</sup>

### การศึกษาการรุกรานของเซลล์ (Invasion) ด้วยวิธี Transwell invasion assay

Transwell assay เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนไหวของเซลล์กันอย่างกว้างขวาง ยกตัวอย่างเช่นในการศึกษาการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยดูจากการวัดจำนวนเซลล์ที่แทรกผ่านเนื้อเยื่อ membrane ของ transwell compartment ใน cost Matrix gel โดยการเริ่มต้น transwell devices จะมี filter ที่มีรูขนาด 8 ไมโครเมตร เพื่อใช้แบ่งชั้นในหลุมของภาชนะชนิด 12 หลุม เป็น 2 ส่วนคือส่วนบนและส่วนล่าง จากนั้นใส่ DMEM ซึ่งประกอบไปด้วย 0.5% FBS ไปยังส่วนล่าง โดยที่ส่วนบนจะใส่ Cell suspension ใน serum-free medium กับ treatment ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะถูก fix ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นระยะเวลา 10 นาที เซลล์ที่อยู่ด้านบนของ filter เป็นเซลล์ที่ไม่มีการ migrate ลงมาด้านล่าง จะถูกเอาออกโดยใช้ cotton swap และในส่วนเซลล์ด้านล่างที่ถูก fix จะย้อมด้วย 1% crystal violet ใน 2% ethanol เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วนำไปดูภายใต้กล้อง microscope จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีการ invasion โดยการละลายสี crystal violet ที่ย้อมติดเซลล์ ด้วย acetic acid แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm (OD) <sup>[78]</sup>

## 2. ศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC (Human study)

### การศึกษาโครงสร้างเซลล์มะเร็งตับในชิ้นเนื้อด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin staining

เพื่อวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็นโรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) พยาธิแพทย์จำเป็นต้องอาศัยการวินิจฉัยจากโครงสร้างของเซลล์มะเร็งตับด้วยการย้อม hematoxylin & eosin (H&E staining) โดยมีกระบวนการเตรียมสไลด์ดังนี้ เลือกชิ้นเนื้อบริเวณที่สงสัยว่ามีพยาธิสภาพหรือรอยโรคใส่ลงใน classed block แล้วแช่ในน้ำยาตรึง (fixative) 10% formalin แล้วนำไปเข้าเครื่อง Tissue processing ซึ่งเครื่องนี้อาศัยหลักการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ด้วย alcohol และ acetone แล้วทำให้ใส (clearing) ด้วย xylene จากนั้นจะแทนที่น้ำด้วยพาราฟิน แล้วนำชิ้นเนื้อจาก classed block ไปฝัง (embedding) ในพาราฟินด้วยเครื่อง embedded machine ทิ้งให้เย็นในอุณหภูมิ -20 °C จะได้ชิ้นเนื้อที่ถูกฝังในพาราฟิน (paraffin embedded block) จากนั้นตัดให้บางด้วยเครื่องตัด microtome ขนาดความหนา 2-3 ไมครอน แล้วนำ section ลอยในอ่างน้ำอุ่น (40

°C) จากนั้นใช้สไลด์ (glass slide) ซ้อน section นำไปผึ่งให้แห้ง แล้วอบสไลด์ในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 20 นาที

ในขั้นตอนย้อม H&E นำสไลด์ไปดึงเอาพาราฟินออก (deparaffinization) ด้วย xylene แล้วดึงน้ำเข้าเซลล์ (rehydrate) ด้วย alcohol จากเปอร์เซ็นต์สูงไปต่ำ จากนั้นนำไปล้างในน้ำประปาไหลผ่าน (running) นาน 3 นาที แล้วย้อมในสี hematoxylin นาน 2 นาที ล้างในน้ำประปาไหลผ่าน (running) นาน 3 นาที แล้วย้อมในสี eosin นาน 30 วินาที จากนั้นนำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย alcohol จากเปอร์เซ็นต์ต่ำไปสูง ดึงน้ำออกจากเซลล์อีกครั้งด้วย acetone แล้วทำให้ใส (clearing) ด้วย xylene และนำไป mounting ด้วย permanent mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## ศึกษาการแสดงออกของ Nrf2 และ Oxidative stress markers (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อด้วยวิธี

### Immunohistochemistry

เตรียมสไลด์ชิ้นเนื้อก่อนย้อมโดย อบ Slide ด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 20 นาที จากนั้นเอาพาราฟินออกจากเซลล์ (deparaffinization) ด้วย xylene แล้วดึงน้ำเข้าเซลล์ (rehydration) ด้วย ethanol alcohol จากเปอร์เซ็นต์สูงไปต่ำ จากนั้น block endogenous peroxidase ด้วย 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> นาน 15 นาที ส่วนในขั้นตอนการคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval) เลือกใช้การคืนสภาพด้วยความร้อนจาก microwave โดยเริ่มจากเตรียม 1X citrate buffer, pH 6.0 แล้วนำ citrate buffer ไปอุ่นใน microwave โดยใช้ Hi-power ตั้งเวลาให้น้ำยาเดือด 5 นาที แล้วนำสไลด์ไปคืนสภาพตั้งเวลาต่อไปอีก 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลงในอุณหภูมิห้อง แล้วจึง blocking non-specific binding ด้วย normal serum reagent ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นหยด Primary antibody ซึ่งได้แก่ Nrf2 (Abcam, Prima scientific Co, USA) และ Oxidative stress marker ได้แก่ 8-OHdG (Millipore, Merck millipore Co, USA) แล้ว incubate ใน Humidity Chamber ที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBS นาน 5 นาที แล้วจึงหยด secondary antibody (HRP-conjugated) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS นาน 5 นาที จากนั้นหยด ABC reagent (VECTOR laboratories, Theera trading Co, USA) แล้ว incubate ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS นาน 5 นาที จากนั้น detection substrate - chromogen ด้วย 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB ) incubate ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้างในน้ำประปาไหลผ่าน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ DAB จากนั้น counterstain ด้วย Hematoxylin ประมาณ 20 วินาที แล้วจึงล้างในน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที จากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ด้วย ethanol alcohol จากเปอร์เซ็นต์ต่ำไป



สูง และทำให้ใส (clearing) ด้วย xylene แล้วจึง mounting ด้วย permanent mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [72]

### การประเมินผลการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunohistochemical staining

การประเมินผลการย้อมทั้งในส่วนของการย้อมในนิวเคลียสและในไซโตพลาสซึมจะวัดผลคะแนนจาก % positive ของ tumor cell คูณกับระดับความเข้มของการย้อมติดสี (%) โดยผลที่วัดได้นี้จะถูกยืนยันซ้ำอีกทีโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ<sup>[10]</sup>

<u>Positive tumor cell (%)</u>		<u>Intensity (%)</u>		
-Score 0 (0%)		-Weak(1)		
-Score 1 (1-10%)	X	-Moderate(2)	=	Score
-Score 2 (11-50%)		-Strong(3)		(0-12)
-Score 3 (>50%)				

### การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลทั้งหมดจะนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือ median (interquartile range) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองจะใช้ student's t-test หรือ Mann-Whitney test และในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยที่มีมากกว่า 2 กลุ่มจะใช้ ANOVA หรือ Kruskal-Wallis test ในการทดสอบ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) โดยใช้ Pearson correlation test หรือ Spearman's rank correlation test และระหว่างตัวแปรกลุ่ม (categorical variables) โดย chi-square test หรือ Fisher's exact test กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่  $p\text{-value} < 0.05$

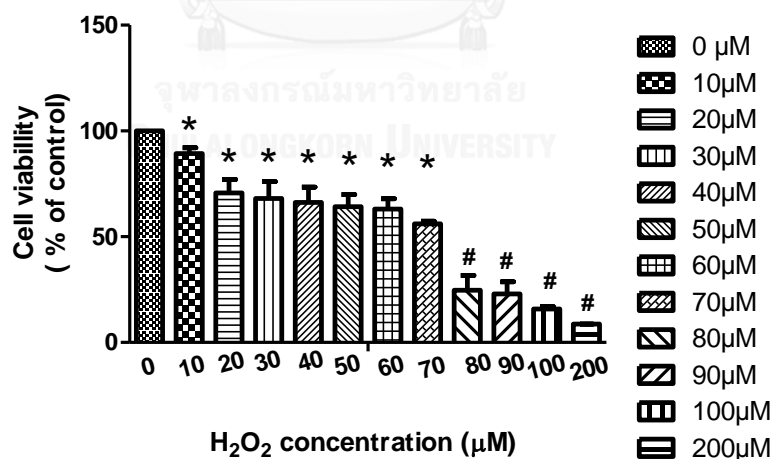
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture study)

##### ผลของ Hydrogen peroxide ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2

เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) อยู่ที่ 10-200  $\mu M$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT method พบว่า ในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  ตั้งแต่ 10-70  $\mu M$  จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มี  $H_2O_2$  (0  $\mu M$ ) ตามลำดับ แต่จำนวนเซลล์ก็ยังมีอยู่ในอัตราการรอดมากกว่าร้อยละ 50 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  เป็น 80-200  $\mu M$  กลับพบว่า เซลล์มีอัตราการลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 9) จากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 70  $\mu M$  มีผลต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ และเซลล์สามารถปรับตัวให้รอดจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ ดังนั้นในการทดลองนี้ใช้  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 70  $\mu M$  เป็นตัวแทนของเซลล์ที่แข็งแรง (survive) สามารถมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่มี stress มากสุดที่เซลล์จะปรับตัวได้เพื่อศึกษาผลของ ROS ต่อการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลต่อจากนี้



ภาพที่ 9 แสดงความเป็นพิษของ  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 10,20,30,40,50,60,70,80,90,100, และ 200  $\mu M$  ต่อเซลล์ HepG2 เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์มีการตายมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 80  $\mu M$  ขึ้นไป \* และ #  $P < 0.05$  vs. Control (0)

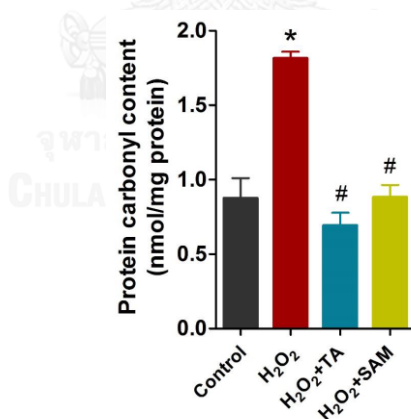
## ผลการศึกษา Oxidative stress marker ในเซลล์เพาะเลี้ยง

### ระดับโปรตีน Carbonyl ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

เมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันมาวัดระดับ oxidative stress โดยวัดจากระดับ protein carbonyl พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน Carbonyl เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยพบว่าใน HepG2 (ภาพที่ 10) มีระดับโปรตีน Carbonyl เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม  $0.085 \text{ nmol/mg protein}$  เป็น  $0.121 \text{ nmol/mg protein}$

เมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu\text{M TA}$ ) พบว่า ระดับ protein carbonyl ลดลงเป็น  $0.072 \text{ nmol/mg protein}$  และเมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ร่วมกับการใช้  $100 \mu\text{M SAM}$  พบว่า ระดับโปรตีน Carbonyl ลดลงเป็น  $0.084 \text{ nmol/mg protein}$

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน รวมถึงทำให้เกิดความเสียหายของโปรตีนภายในเซลล์ (oxidative protein damage) นอกจากนั้นยังพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระ(TA) และ SAM สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ได้



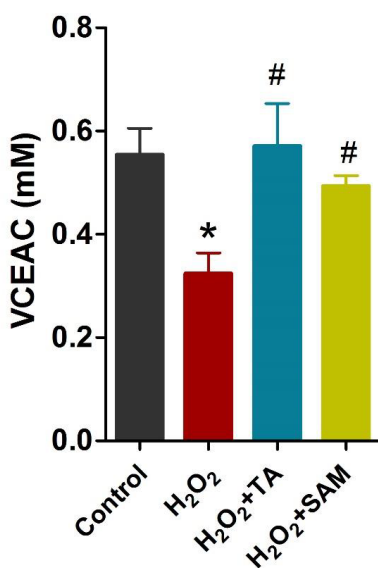
ภาพที่ 10 แสดงระดับโปรตีน Carbonyl ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน Carbonyl ในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น และเมื่อวิเคราะห์ผลของสารอนุมูลอิสระและ SAM ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนภายในเซลล์พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu\text{M TA}$ ) และ  $100 \mu\text{M SAM}$  ตามลำดับ สามารถลดระดับโปรตีน Carbonyl ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  เพียงอย่างเดียว \* $P < 0.05$  vs. control, # $P < 0.05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$

### ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Total antioxidant (TAC)

#### Measurement by ABTS (Radical scavenging capacity assay) assay

เมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันมาวัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระพบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้การลดลงของระดับสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยพบว่าใน HepG2 (ภาพที่ 11) มีระดับสารต้านอนุมูลอิสระ ลดลงจากกลุ่มควบคุม  $0.55 \text{ nmol/mg protein}$  เป็น  $0.33 \text{ nmol/mg protein}$

เมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu\text{M TA}$ ) พบว่าระดับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เป็น  $0.58 \text{ nmol/mg protein}$  และเมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ร่วมกับการใช้  $100 \mu\text{M SAM}$  พบว่าระดับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเป็น  $0.50 \text{ nmol/mg protein}$  จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ทำให้ระดับสารต้านอนุมูลอิสระลดลงบ่งชี้ให้เห็นว่ามีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (TA) และ SAM สามารถเพิ่มระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ได้



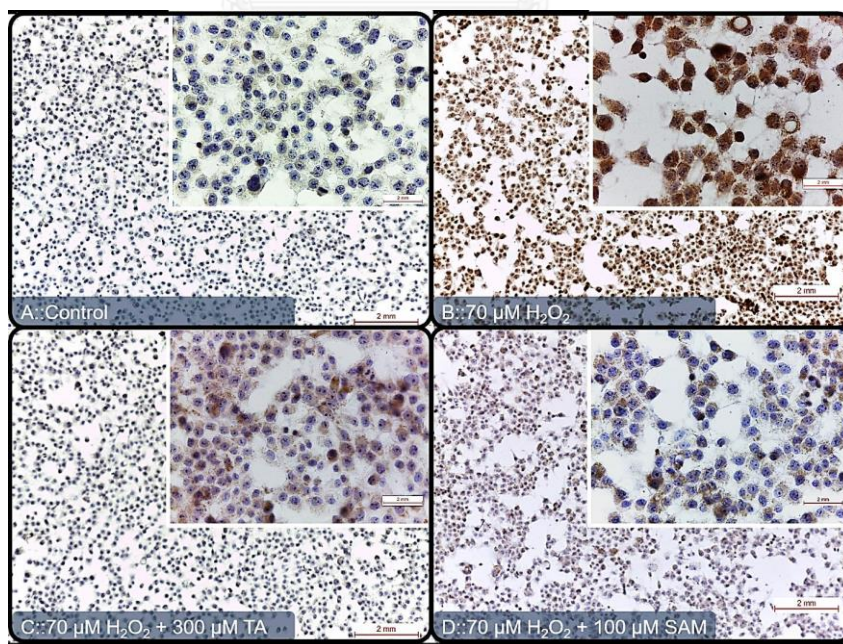
ภาพที่ 11 แสดงระดับสารต้านอนุมูลอิสระภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ส่งผลให้มีการลดลงของระดับสารต้านอนุมูลอิสระ ในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น และเมื่อวิเคราะห์ผลของสารอนุมูลอิสระ (TA) และ SAM ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu\text{M TA}$ ) และ  $100 \mu\text{M SAM}$  ตามลำดับ สามารถเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $70 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  เพียงอย่างเดียว \* $P < 0.05$  vs. Control, # $P < 0.05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$

### ผลการศึกษา Oxidative stress markers (8-OHdG) และการแสดงออกของยีน Nrf2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunocytochemistry

เมื่อนำเอาเซลล์มาเพาะเลี้ยงบน cover glasses ขนาด 22 x 22 mm ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันแล้วนำมาทดสอบหา Oxidative stress markers (8-OHdG) และการแสดงออกของ Nrf2 ด้วยวิธี Immunocytochemistry ได้ผลการศึกษาดังนี้

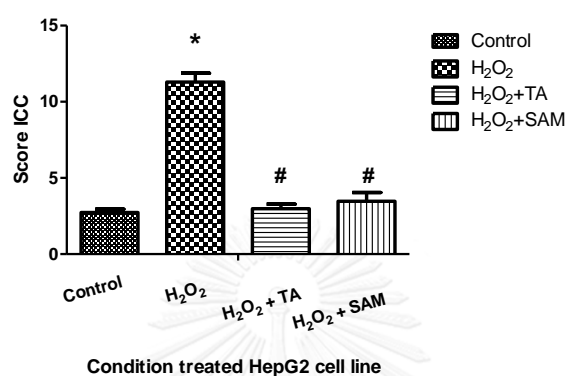
### ผลการศึกษา Oxidative stress markers (8-OHdG) ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunocytochemistry

หลังจากที่เพาะเลี้ยงเซลล์บน cover glasses ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน 4 กลุ่มการทดลองเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบหา Oxidative stress markers (8-OHdG) ด้วยวิธี Immunocytochemistry ดังภาพที่ 12 เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น  $70 \mu M$  พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ Oxidative stress markers (8-OHdG) เพิ่มมากขึ้น (ภาพ B) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  (ภาพ A) และเมื่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu M$  TA) และ  $100 \mu M$  SAM ดังภาพ C และภาพ D ตามลำดับ กลับพบว่าการติดสีของ antibody 8-OHdG มีความเข้มข้นน้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่กระตุ้น  $H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระและ SAM มีผลทำให้การแสดงออกของ Oxidative stress markers ลดลง (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงผลการทดลอง Immunocytochemistry โดยทดสอบหาการแสดงออกของ Oxidative stress marker (8-OHdG) ในเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  นาน 24

ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ 8-OHdG2 ที่เพิ่มขึ้น (ภาพ B) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น (ภาพ A) และกลุ่มที่กระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้ สารต้านอนุมูลอิสระ (300  $\mu$ M TA) และ 100  $\mu$ M SAM ดังภาพ C และภาพ D ตามลำดับ



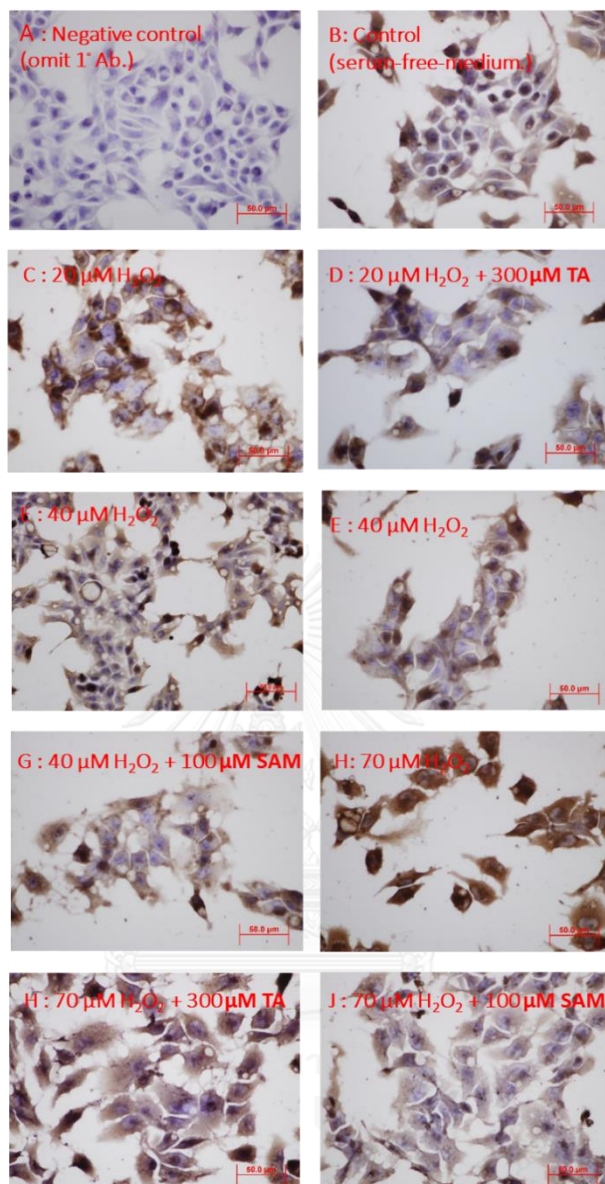
ภาพที่ 13 แสดงผลคะแนนความเข้มของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น  $H_2O_2$  โดยเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  พบว่าผลคะแนนความเข้มของการติดสีมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมและเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระและ SAM มีผลทำให้ค่าคะแนนความเข้มของการติดสีลดลง \*P < 0.05 vs. Control, #P < 0.05 vs.  $H_2O_2$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดสอบข้างต้นสรุปได้ว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออก Oxidative stress marker (8-OHdG) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นหรือกลุ่มที่ถูกกระตุ้นร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ

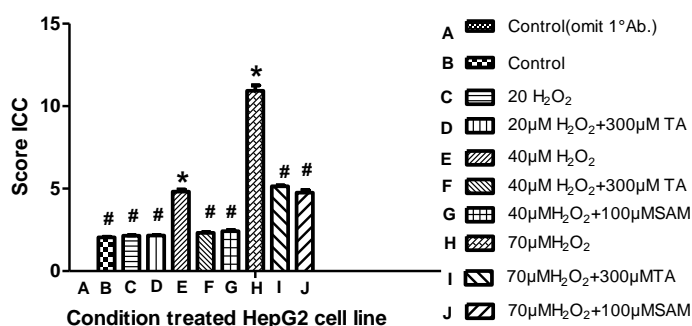
### ผลการศึกษาการแสดงออกของ Nrf2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunocytochemistry

เมื่อเลี้ยงเซลล์บน cover glasses ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบหาการแสดงออกของ Nrf2 ด้วยวิธี Immunocytochemistry เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 20  $\mu M$  (ภาพ C) พบว่ามีความเข้มจากการติดสีของ antibody Nrf2 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  (ภาพ B) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  เป็น 40  $\mu M$ , 70  $\mu M$  กลับพบว่ามีความเข้มของการติดสีมากขึ้น (ภาพ E และ ภาพ H) ตามลำดับ และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 20, 40, และ 70  $\mu M$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (300  $\mu M$  TA) พบว่าความเข้มของสีลดลง (ภาพ D, F และ I) ส่วนเซลล์ที่กระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 40 และ 70  $\mu M$  ควบคู่กับการใช้ 100  $\mu M$  SAM พบว่ามีความเข้มของสีลดลงเช่นกัน (ภาพ G และ J) จากการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วยความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  ที่สูงขึ้น จะส่งผลต่อการแสดงออกของ Nrf2 เพิ่มสูงขึ้นด้วย ในทางกลับกันเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (300  $\mu M$  TA) และ 100  $\mu M$  SAM จะส่งผลต่อการแสดงออกของ Nrf2 ลดลงด้วยเช่นกัน ( ดังภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงผลการทดสอบหาการแสดงออกของ Nrf2 ด้วยวิธี Immunocytochemistry ในเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยการกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, และ 70  $\mu M$  (ภาพ B, C, E, และ H) ตามลำดับ พบว่ามีการแสดงออกของยีน Nrf2 เพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (ภาพ A) และเมื่อกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 70  $\mu M$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (300  $\mu M$  TA) และ 100  $\mu M$  SAM พบว่าความเข้มของการติดสีลดลงตามลำดับ (ภาพ D, F, G, I และ J) ซึ่งให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีผลต่อการแสดงออกของ Nrf2





ภาพที่ 15 แสดงค่าความเข้มของการติดสีของผลการย้อม Nrf2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 พบว่า ค่าความเข้มของการติดสีที่ความเข้มข้น 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (H) สูง แสดงให้เห็นว่า ที่ 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  มีการแสดงออกของ NRF2 สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , ร่วมกับการใช้ TA หรือ SAM \*P < 0.05 vs. Control, #P < 0.05 vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$

จากผลการทดสอบเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  อยู่ในช่วงปรับสภาพให้อยู่ได้ในสภาวะที่มี stress ที่สูง โดยมีการแสดงออกของ Nrf2 ที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลของ 8-OHdG ที่สูงขึ้นด้วย ทั้งนี้ยังสอดคล้องกับผลของระดับโปรตีน carbonyl ที่สูงขึ้นด้วยเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับผลของ ABTS จะให้ผลลดลงตรงกันข้าม จากผลการทดสอบทั้งหมดข้างต้นสามารถเชื่อมโยงดังแผนภูมิ ต่อไปนี้

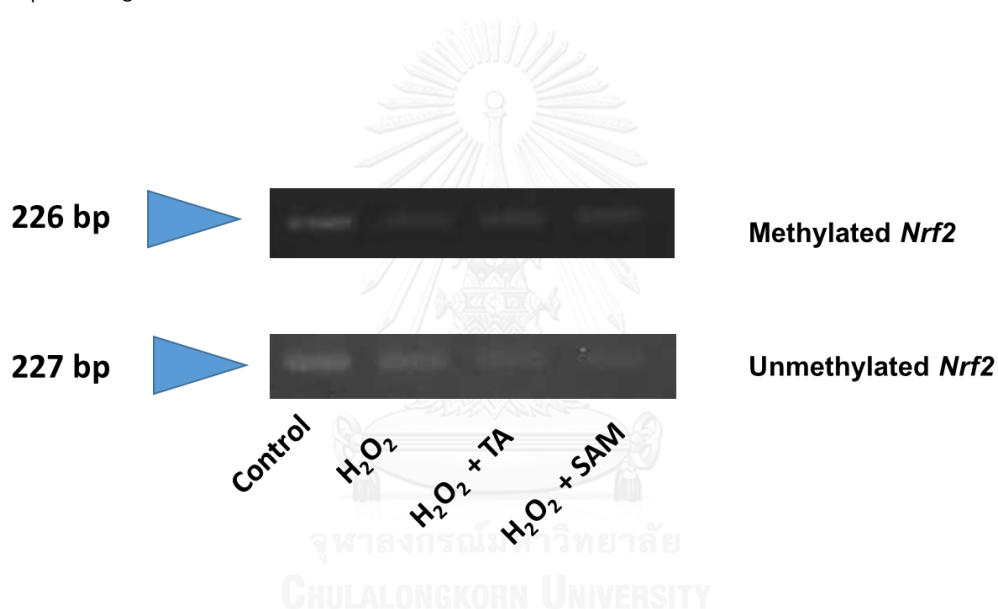


จากแผนภูมิข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ HepG2 ที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ซึ่งเป็นการจำลองให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันส่งผลให้ระดับโปรตีน carbonyl สูงขึ้น โดยที่ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (ABTS) ลดลง ทั้งนี้ระดับ oxidative stress marker (8-OHdG) ยังเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้การแสดงออกของ Nrf2 สูงขึ้นด้วย สรุปได้ว่า ในสภาวะของเซลล์มะเร็งตับที่ถูกควบคุมให้เกิดภาวะเครียด (70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ส่งผลให้เซลล์มีการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด (survive) ในสภาวะแวดล้อมที่เกิดภาวะเครียดที่สูงขึ้นดังกล่าวส่งผลให้เซลล์มีการปรับระดับ 8-OHdG และ Nrf2 ให้สูงขึ้นด้วย ดังนั้นจากการทดสอบนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าระดับที่สูงขึ้นของ 8-OHdG และ Nrf2 จึงมีความสัมพันธ์กับปริมาณของออกซิเดชัน (70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่สูงขึ้นนั่นเอง

## ผลการศึกษาการเกิด methylation ของ *Nrf2* promoter

### ผลการวิเคราะห์การเกิด methylation ของ *Nrf2* ด้วยวิธี Methylation specific PCR (MSP)

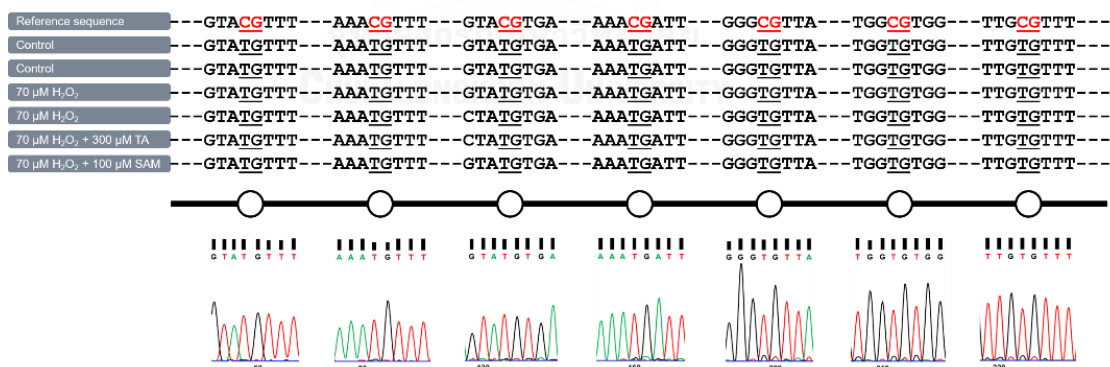
เมื่อนำดีเอ็นเอจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเครียดจากออกซิเดชันมาวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลด้วยวิธี MSP แล้ววิเคราะห์หาการเกิด PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ methylated *Nrf2* ต่อปริมาณ PCR product และที่ได้จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ unmethylated *Nrf2* พบว่า ผลการทดสอบนี้ให้ผลไม่แตกต่าง ซึ่งระดับการเกิด methylation จะส่งผลต่อระดับ *Nrf2* หรือไม่นั้นควรศึกษาวิเคราะห์หาระดับการเกิด methylation ของ *Nrf2* ด้วยวิธี Bisulfite genomic sequencing (BSG) ต่อไป



ภาพที่ 16 แสดงผลการศึกษาการเกิด methylation ของ *Nrf2* ด้วยวิธี Methylation specific PCR (MSP)

## ผลการวัดระดับการเกิด Methylation ของ *Nrf2* ด้วยวิธี Bisulfite genomic sequencing (BSG)

ผลการทดสอบให้ผลค่อนข้างน่าสนใจต่อการตอบคำถามงานวิจัยครั้งนี้ที่ว่า การแสดงออกของ *Nrf2* ผ่านการกระตุ้นจากอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไวในเซลล์มะเร็งระดับมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของภาวะการเกิดปฏิกิริยา methylation บน *Nrf2* promoter หรือไม่ โดยการศึกษาครั้งนี้มีการตั้งสมมติฐานไว้ว่า promoter ของยีน *Nrf2* ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  จะเกิดปฏิกิริยา Methylation น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น แต่อย่างไรก็ตาม จากผลลำดับเบสของ Bisulfite จาก 7 CpG dinucleotides บน *Nrf2* promoter พบว่า สภาวะของการเกิดปฏิกิริยา Methylation ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 70  $\mu M$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง บริเวณที่มีลำดับเบสใน 7CpG ทั้งหมดยังไม่มีการเกิดปฏิกิริยา Methylation ซึ่งไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (ภาพที่ 15) ทั้งนี้ในการทดสอบกระตุ้นเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (TA) และ SAM ก็พบว่าไม่ได้เปลี่ยนแปลงการเกิดภาวะ Methylation ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า การควบคุมเหนือพันธุกรรมของ *Nrf2* ที่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับลำดับเบสของยีน ผ่านการเกิดปฏิกิริยา Methylation บน *Nrf2* Promoter ซึ่งอาจจะไม่ได้มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน *Nrf2* ในเซลล์มะเร็งระดับ

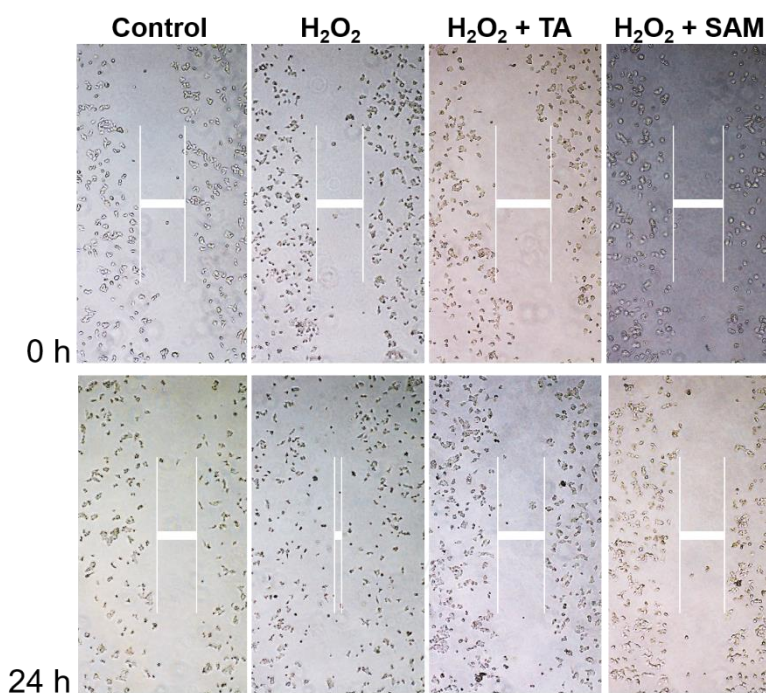


ภาพที่ 17 แสดงผลการวัดระดับการเกิด methylation ของ *Nrf2* ด้วยวิธี Bisulfite genomic sequencing (BSG) จาก 7 CpG บนตำแหน่ง *Nrf2* promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 (ข้างล่างเส้น) หลังจากทำ Bisulfite แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ถ้า unmethylation ลำดับเบส C จะถูกเปลี่ยนเป็น G ตามปกติ แต่ถ้า methylation ลำดับเบส C จะถูกเปลี่ยนไปเป็น T จากภาพเส้นแรกคือ reference sequence (NC\_000002.11:178095031-178129859, Homo sapiens

chromosome 2, reference GRCh37.p10 primary assembly, including 2.1 kb of its 50-upstream sequence <sup>[72]</sup>) ซึ่งใช้เปรียบเทียบกับลำดับที่ทำการทดสอบ โดยที่ในส่วนของเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (control) ลำดับเบสบนตำแหน่ง CpG ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล จากภาพจะเห็นได้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ( $H_2O_2$ ) ลำดับเบสบนตำแหน่ง CpG ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล (C ไม่ได้ถูกเปลี่ยนเป็น T) ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ(TA) หรือ SAM พบว่า ลำดับเบสบนตำแหน่ง CpG ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล (C ไม่ได้ถูกเปลี่ยนเป็น T) เช่นกัน

### ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Migration) ด้วยวิธี Wound healing assay

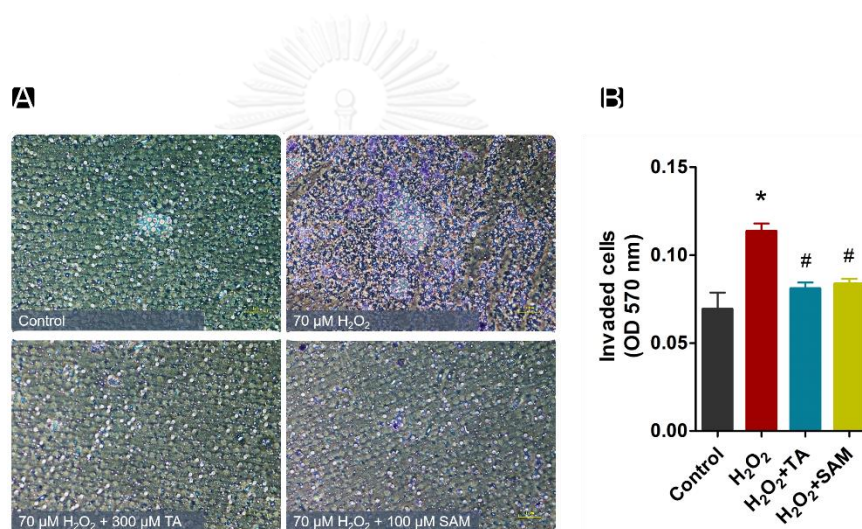
ความเกี่ยวข้องจากผลของอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวที่ไปกระตุ้นให้เกิดการลุกลามในมะเร็งตับได้นั้น จากการทดสอบด้วยวิธี wound healing (scratch assay) โดยการนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทำให้เกิดแผล (scratch assay) แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยเปรียบเทียบจากเวลาที่เริ่มทำแผล (ศูนย์ชั่วโมง) จนถึงเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ HepG2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  มีการลุกลามได้ไวอย่างเห็นได้ชัด สังเกตจากการซ่อมแซมบริเวณที่เกิดรอยแยกจากการขูดให้เกิดแผล เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (ภาพที่ 18) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ(TA) หรือ SAM ทำให้ความสามารถในการซ่อมแซมบาดแผลของเซลล์มะเร็งลดลง สังเกตเห็นได้จากความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเพื่อที่เข้าหากัน ตรงบริเวณที่ได้ทำการขูดเซลล์มะเร็งได้ช้าลง การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งไปยังบริเวณข้างเคียง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  (control)



ภาพที่ 18 แสดงผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Migration) ด้วยวิธี Wound healing assay เพื่อทดสอบดูการเคลื่อนที่ของเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เปรียบเทียบระหว่างศูนย์ชั่วโมงกับ 24 ชั่วโมง แถวที่หนึ่งจากด้านซ้ายมือแสดงเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (control) แถวที่สองแสดงเซลล์ที่ถูกทดสอบภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ส่วนแถวที่ 3 และ 4 แสดงเซลล์ที่ถูกทดสอบภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (TA) หรือ (SAM) ตามลำดับ จากภาพจะเห็นได้ว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ส่วนแถวที่ 2 (ล่าง) มีการเคลื่อนที่ของเซลล์มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์แถวที่ 1, 3 และ 4 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ถูกกระตุ้นภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน มีการลุกลามของเซลล์มะเร็งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

### การศึกษาการรุกรานของเซลล์ (Invasion) ด้วยวิธี Transwell invasion assay

ในการทดสอบถึงความเกี่ยวข้องของอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวต่อความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้ศึกษาด้วยเทคนิค Transwell invasion assay ทั้งนี้จำนวนของเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ผ่าน Matrix gel ในภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  มีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 19) การกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (TA) หรือ SAM สามารถยับยั้งความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวสามารถเพิ่มการรุกรานของเซลล์มะเร็งตับและสารต้านอนุมูลอิสระ(TA) และ SAM ยังช่วยยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งในสภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้



ภาพที่ 19 แสดงผลการศึกษาการรุกรานของเซลล์ (Invasion) ด้วยวิธี Transwell invasion assay เพื่อศึกษาการรุกรานของเซลล์ HepG2 ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน จากภาพ A คือ เซลล์ที่รุกรานผ่านชั้น Matrix gel ซึ่งถูกย้อมด้วยสี Crystal violet พบว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $70 \mu M H_2O_2$  มีการรุกรานมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นหรือเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $70 \mu M H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (TA) หรือ SAM ตามลำดับ ส่วน B คือแผนภูมิเปรียบเทียบการรุกรานของเซลล์มะเร็ง พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $70 \mu M H_2O_2$  แสดงค่าความเข้มในการติดของสี Crystal violet มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น หรือเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $70 \mu M H_2O_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (TA) หรือ SAM ตามลำดับ \*P < 0.05 vs. Control, #P < 0.05 vs.  $H_2O_2$

## 2. ผลการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC (Human study)

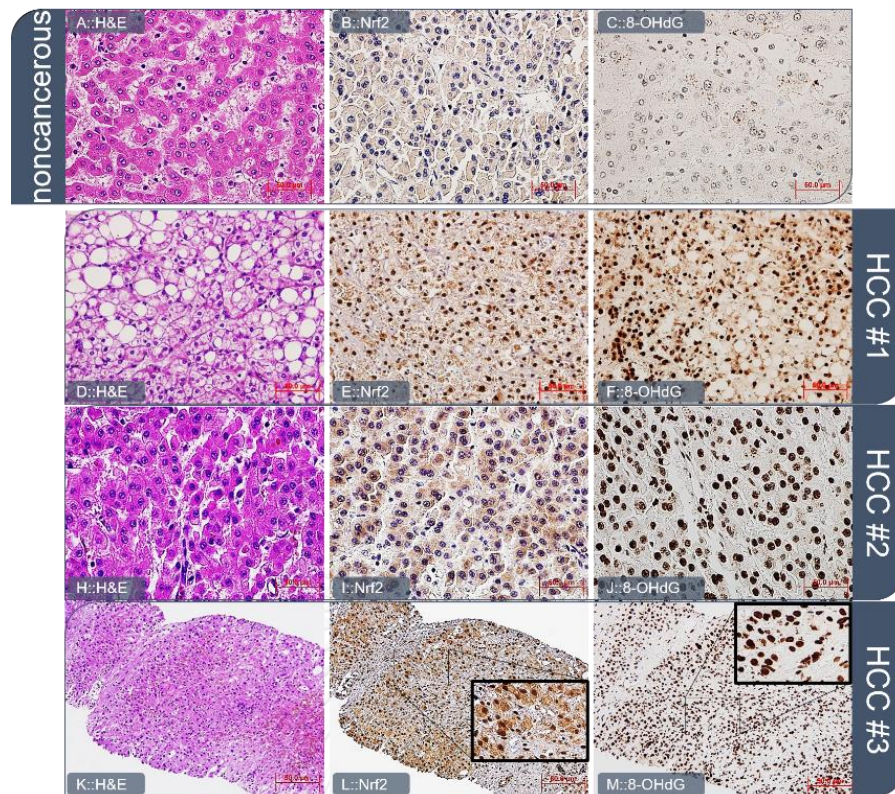
### ผลศึกษาการแสดงออกของ Nrf2 และ Oxidative stress markers (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC)

การศึกษา Nrf2 ที่ควบคุมการตอบสนองต่ออนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว พบว่ามีการแสดงออกในชิ้นเนื้อมะเร็งตับในทุกราย คิดเป็นร้อยละ 27 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (median : 78% , IQR : 17) การให้ลำดับคะแนนของผลการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธี IHC ได้แก่ 2, 3, 4, 6, 8, 9, และ 12 คิดเป็นร้อยละ 4, 21, 3, 13, 16, 4 และ 39 ตามลำดับ การแสดงออกของ NRF2 ถูกพบในไซโตพลาสซึมและในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งตับแต่พบอย่างโดดเด่นในนิวเคลียสในส่วนของชิ้นเนื้อตับบริเวณที่ไม่ได้เป็นมะเร็งจะไม่พบการแสดงออกหรือการแสดงออกของ Nrf2 ในระดับที่ต่ำ(ภาพที่ 20)

ผลการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค IHC แสดงให้เห็นว่า Nrf2 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ นอกจากนี้ Nrf2 ยังมีการแสดงออกในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งตับซึ่งเป็นข้อมูลที่ยืนยันว่ามีการกระตุ้นของ Transcription factor ที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ

8-OHdG พบการแสดงออกอย่างเด่นชัดในรอยโรคที่เกิดจากกระบวนการการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คิดเป็นร้อยละ 28 และ 99 (median : 81% , IQR : 15) ไปในทางเดียวกันกับการแสดงออกของ Nrf2 โดยการแสดงออกของ 8-OHdG พบว่ามีการแสดงออกที่เด่นชัดในนิวเคลียส (ภาพที่ 20) แต่ในทางตรงกันข้าม ในชิ้นเนื้อตับบริเวณตำแหน่งที่ไม่ได้เป็นมะเร็งไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ชิ้นเนื้อมะเร็งตับส่วนใหญ่ มีการแสดงออกของ 8-OHdG ในระดับที่สูง (ร้อยละ 54 กับผลการย้อม IHC ในลำดับคะแนนเท่ากับ 12) ซึ่งทั้งนี้ลำดับคะแนนของผลการทำ Immunohistochemistry ได้แก่ 8, 3, 6, 9, 4, และ 2 คิดเป็นร้อยละ 19, 13, 8, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ

ดังนั้นในการศึกษานี้พบว่า การแสดงออกของ Nrf2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ 8-OHdG ( $r=0.9945$ ,  $P < 0.001$ )



ภาพที่ 20 ผลศึกษาการแสดงออกของ Nrf2 และ Oxidative stress markers (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อด้วยวิธี Immunohistochemistry ( IHC) จากภาพจะเห็นการแสดงออกของ Nrf2 และ 8-OHdG ในตำแหน่งชิ้นเนื้อที่ไม่พบเซลล์มะเร็ง (A-C) และตำแหน่งที่พบมะเร็งเซลล์มะเร็งตับ (D-M) ซึ่งจากภาพ A,D,H และ K แสดงผลการย้อมชิ้นด้วยเทคนิค H&E จากภาพจะเห็นว่า ชิ้นเนื้อบริเวณตำแหน่งที่ไม่พบเซลล์มะเร็งจะไม่พบการแสดงออกของ Nrf2 ต่ำ (B) แต่จะเห็นการแสดงออกชัดเจนในบริเวณที่พบเซลล์มะเร็ง ( E, I และ L) ซึ่งการแสดงออกของ NRF2 จะพบทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมโดยในนิวเคลียสจะชัดเจนกว่า ส่วนการแสดงออกของ 8-OHdG ในบริเวณตำแหน่งที่ไม่พบเซลล์มะเร็งตับจะมีลักษณะเช่นเดียวใน Nrf2 โดยพบการแสดงของ 8-OHdG ต่ำ (C) และลักษณะการติดสีของ 8-OHdG ในบริเวณตำแหน่งที่เซลล์มะเร็ง มีลักษณะเหมือนกันโดยจะติดในนิวเคลียสมากกว่าในไซโตพลาสซึม (F,J และ M) เช่นกัน



### ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Nrf2 และ 8-OHdG ต่ออัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรัง

จากการรวบรวมข้อมูลทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง Nrf2 และ 8-OHdG ต่ออัตราการรอดชีวิตโดยมีรายละเอียดดังนี้

Characteristics	Frequency (%)
n	92
Age (mean $\pm$ SD, Years)	61.7 $\pm$ 11.2
Males : Females	79 (86%): 13 (14%)
Hepatitis B virus infection	53 (58%)
Hepatitis C virus infection	11 (12% )
Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)	3 (3%)
Tumor differentiation	91 (100%)
- Well differentiation	24 (26.4%)
- Moderate differentiation	49 (53.8%)
- Poor differentiation	18 (19.8%)
Cirrhosis (n=75)	28 (37%)
Metastasis (n=74)	69 (93.2%)
Total bilirubin (mean $\pm$ SD, mg/dL)	1.5 $\pm$ 1.7
Albumin (mean $\pm$ SD, mg/dL)	3.4 $\pm$ 0.7
SGOT/AST (mean $\pm$ SD, mg/dL)	356.7 $\pm$ 600.5
SGPT/ALT (mean $\pm$ SD, mg/dL)	267.6 $\pm$ 414.0
ALP (mean $\pm$ SD, mg/dL)	96.0 $\pm$ 81.3

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรัง

จากข้อมูลทางคลินิกเบื้องต้นสามารถนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่าง Nrf2 และ 8-OHdG ต่ออัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังด้วย Chi-square test โดยพบว่า การแสดงออกของ Nrf2 ไม่สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางคลินิก อีกทั้งความสัมพันธ์ของ 8-OHdG ไม่สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางคลินิก เช่นกัน ดังที่แสดงในตารางที่ 2

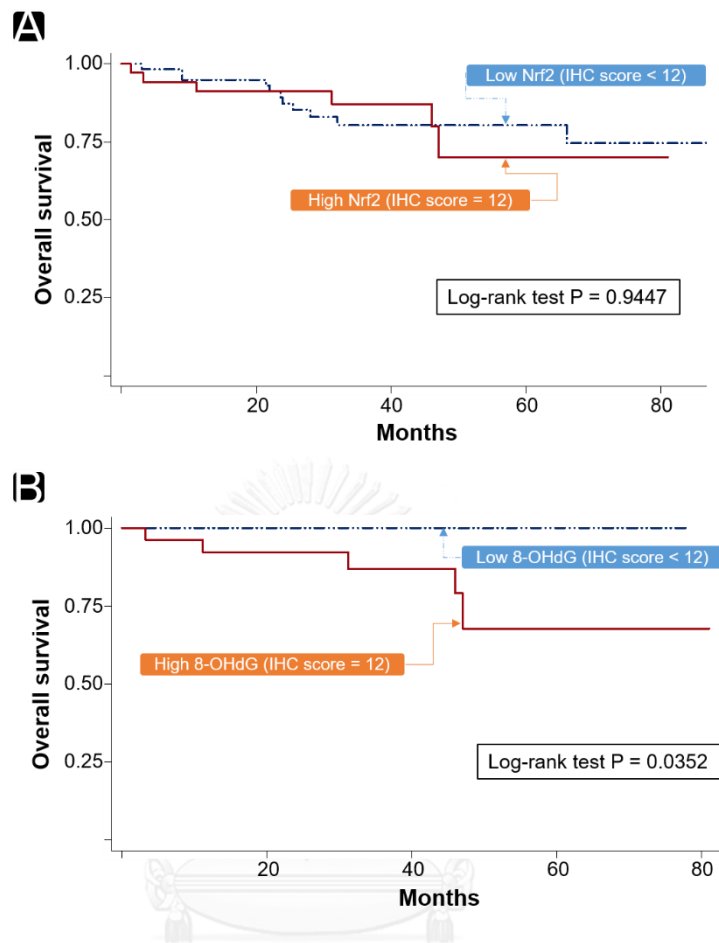
Characteristics	Chi-square test ( <i>p</i> -value)
<b>Nrf2</b>	
Tumor differentiation	0.227
Number of tumor mass	0.840
Cirrhosis	0.239
Metastasis	0.656
<b>8-OHdG</b>	
Tumor differentiation	0.152
Number of tumor mass	0.538
Cirrhosis	0.150
Metastasis	0.190

\*  $p \leq 0.01$

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่าง Nrf2 และ 8-OHdG ต่ออัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังด้วย Chi-square test

จากนั้นหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Nrf2 และ 8-OHdG กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยได้ต่อไปด้วยการวิเคราะห์ Kaplan-Meier curve โดยการแสดงออกของ Nrf2 และ 8-OHdG แบ่งเป็น การแสดงออกในระดับที่สูง ซึ่งมีเกณฑ์คือ มีคะแนนของผลการย้อมสีขึ้นเนื้อด้วยวิธี IHC เท่ากับ 12 และการแสดงออกในระดับที่ต่ำ คือ คะแนนของผลการย้อมสีขึ้นเนื้อด้วยวิธี IHC น้อยกว่า 12 ซึ่งทั้งนี้ การแสดงออกของ 8-OHdG ในระดับที่สูง มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงในผู้ป่วยโรคมะเร็งเรื้อรัง (ภาพที่ 21)

ผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของ 8-OHdG ในระดับที่สูง มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกที่ระดับต่ำ ( $P = 0.035$ ) (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แสดงผลการแสดงออกของ Nrf2 และ 8-OHdG ด้วยการวิเคราะห์ Kaplan-Meier curve ในผู้ป่วยมะเร็งตับ จากภาพ A การแสดงออกของ Nrf2 ที่ไม่สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย โดยที่ระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยกับการแสดงออกที่สูงขึ้นของ Nrf2 ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับการแสดงออกของ NRF2 ที่ต่ำกว่า (Log-rank test,  $P = 0.945$ ) ส่วนภาพ B คือผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ 8-OHdG ในผู้ป่วยมะเร็งตับ โดยการแสดงออกของ 8-OHdG ในระดับที่สูงมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ 8-OHdG ต่ำ อย่างมีนัยสำคัญ (Log-rank test,  $P = 0.035$ ) แสดงให้เห็นว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันในระดับสูงมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในระดับต่ำ

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ ซึ่งสามารถสรุปผลการวิจัยเพื่อตอบคำถามงานวิจัยได้ดังนี้

#### สรุปผลการวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model)

การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

**1. เพื่อศึกษาระดับเมทิลเลชันของ *Nrf2* promoter ในเซลล์มะเร็งตับที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวหรือภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ( $H_2O_2$ -treated HepG2 cells) สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้**

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (HepG2) ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดระดับโปรตีน Carbonyl เพื่อทดสอบว่าในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  อันเป็นตัวแทนของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย  $70 \mu M H_2O_2$  ส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของระดับ protein carbonyl เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยพบว่าใน HepG2 มีระดับโปรตีน Carbonyl เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม  $0.085 \text{ nmol/mg protein}$  เป็น  $0.121 \text{ nmol/mg protein}$  และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu M TA$ ) พบว่าระดับโปรตีน Carbonyl ลดลงเป็น  $0.072 \text{ nmol/mg protein}$  และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้  $100 \mu M SAM$  พบว่าระดับโปรตีน Carbonyl ลดลงเป็น  $0.084 \text{ nmol/mg protein}$  จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า  $70 \mu M H_2O_2$  สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน รวมถึงทำให้เกิดความเสียหายของโปรตีนภายในเซลล์ (oxidative protein damage) นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (TA) และ SAM สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ได้

จากนั้นทำการทดสอบหาระดับสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $70 \mu M H_2O_2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้มีการลดลงของระดับสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยพบว่าในเซลล์ HepG2 มีระดับสารต้านอนุมูลอิสระลดลงจากกลุ่มควบคุม  $0.55 \text{ nmol/mg protein}$  เป็น  $0.33 \text{ nmol/mg protein}$  เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ( $300 \mu M TA$ ) พบว่า ระดับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเป็น  $0.58 \text{ nmol/mg protein}$  และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้  $100 \mu M SAM$  พบว่าระดับ

protein carbonyl เพิ่มขึ้นเป็น 0.50 nmol/mg protein จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ทำให้ระดับสารต้านอนุมูลอิสระลดลงบ่งชี้ให้เห็นว่ามีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระ TA และ SAM สามารถเพิ่มระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ได้

การทดลองเพื่อยืนยันว่าในเซลล์เพาะเลี้ยงมีการแสดงของ Nrf2 สูงขึ้นในภาวะเครียดจากออกซิเดชันและทดสอบว่า Nrf2 ที่สูงขึ้นสามารถป้องกันการเกิด oxidative damage ได้หรือไม่ ได้ผลวิจัยพอสรุปได้ดังนี้

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์บน cover glasses ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน 4 กลุ่มการทดลองเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบหาการแสดงออกของ Nrf2 ด้วยวิธี Immunocytochemistry ในเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, และ 70  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ พบว่ามีการแสดงออกของ Nrf2 เพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ control และเมื่อกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 70  $\mu\text{M}$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ 300  $\mu\text{M}$  TA และ 100  $\mu\text{M}$  SAM พบว่าความเข้มของการติดสีลดลงตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีผลทำให้การแสดงออกของ Nrf2 สูงขึ้น

เมื่อทดสอบหา oxidative stress marker 8-OHdG ด้วยวิธี Immunocytochemistry เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 70  $\mu\text{M}$  พบว่า เซลล์มีการแสดงออกของ 8-OHdG เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  และเมื่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ TA และ SAM ตามลำดับ กลับพบว่าการติดสีของ 8-OHdG มีความเข้มน้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่กระตุ้น  $\text{H}_2\text{O}_2$  ควบคู่กับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ และ SAM มีผลทำให้การเกิด oxidative DNA lesion ลดลง

**“จากการทดสอบดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ในเซลล์เพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของ NRF2 สูงขึ้นจริงภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันแบบเฉียบพลัน (70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของ NRF2 นี้ไม่ส่งผลในการป้องกันการเกิด oxidative DNA damage ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่พบการตายของเซลล์เกิดขึ้นเมื่อสูงเซลล์ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้นสูงแบบเฉียบพลันดังกล่าว”**

จากนั้นหาคำตอบต่อไปว่า “ภาวะเครียดจากออกซิเดชันควบคุมการแสดงออกของยีน Nrf2 ผ่านทางการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอหรือไม่” โดยการทดสอบด้วยวิธี Bisulfite genomic sequencing (BSG) จาก 7 CpG บนตำแหน่ง Nrf2 promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 หลังจากทำ Bisulfite แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ถ้าเกิด unmethylation ลำดับเบส C จะถูกเปลี่ยนเป็น G ตามปกติ แต่ถ้า methylation ลำดับเบส C จะถูกเปลี่ยนไปเป็น T จากลำดับเบสของ Bisulfite จาก 7 CpG

dinucleotides บน *Nrf2* promoter พบว่าสถานะของการเกิดปฏิกิริยา Methylation ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 70  $\mu M$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง บริเวณที่มีลำดับเบสใน 7 CpGs ทั้งหมดยังไม่มีภาวะการเกิดปฏิกิริยา Methylation ซึ่งไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ทั้งนี้ในการทดสอบกระตุ้นเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ TA และ SAM ก็พบว่าไม่ได้เปลี่ยนแปลงการเกิดภาวะ Methylation ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า ไม่พบการควบคุมเหนือพันธุกรรมผ่านการเกิดปฏิกิริยา Methylation บน Promoter ในยีน *Nrf2* ในเซลล์มะเร็งระดับที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชันเฉียบพลัน แสดงว่าการแสดงออกของโปรตีน *Nrf2* ในเซลล์มะเร็งระดับในภาวะดังกล่าวไม่น่าจะถูกควบคุมโดย promoter methylation

จากข้อสรุปข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า “การควบคุมการแสดงออกของยีน *Nrf2* ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันแบบเฉียบพลัน ไม่ได้ผ่านทางกลไกการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ”

**2. เพื่อศึกษาศักยภาพในการลุกลามของเซลล์มะเร็งระดับภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (ใน  $H_2O_2$ -trated HepG2 cells) สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้**

จากข้อสงสัยจากคำถามงานวิจัยที่ว่า “ภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มศักยภาพในการการลุกลามของเซลล์มะเร็งระดับหรือไม่” จึงเป็นที่มาของการทดสอบเพื่อหาคำตอบ ดังนี้

ผลของอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวที่ไปกระตุ้นให้เกิดการลุกลามในมะเร็งระดับได้นั้น จากการทดสอบด้วยวิธี wound healing (scratch assay) โดยการนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทำให้เกิดแผลแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยเปรียบเทียบจากเวลาที่เริ่มทำแผล (ศูนย์ชั่วโมง) จนถึงเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ HepG2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  มีการลุกลามได้ไวอย่างเห็นได้ชัด สังเกตจากการซ่อมแซมบริเวณที่เกิดรอยแยกจากการขูดให้เกิดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ TA หรือ SAM ทำให้ความสามารถในการซ่อมแซมบาดแผลของเซลล์มะเร็งลดลง สังเกตเห็นได้จากความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเพื่อที่เข้าหากันตรงบริเวณที่ได้ทำการขูดเซลล์มะเร็งได้ช้าลง การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ชี้ให้เห็นว่า อนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งไปยังบริเวณข้างเคียงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  (control)

ในการทดสอบถึงความเกี่ยวข้องของอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวต่อความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้ศึกษาด้วยเทคนิค Transwell invasion assay ทั้งนี้จำนวนของเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ผ่าน Matrix gel ในภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  มีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ การกระตุ้นเซลล์ด้วย  $H_2O_2$  ร่วมกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ TA หรือ

SAM สามารถยับยั้งความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาในครั้งนี้ จึงบ่งชี้ว่าอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวสามารถเพิ่มการรุกรานของเซลล์มะเร็งตับและสารต้านอนุมูลอิสระ TA และ SAM ยังช่วยยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งในสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

จากข้อสรุปผลการวิจัยข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่า “ภาวะเครียดจากออกซิเดชันส่งผลในการเพิ่มศักยภาพในการการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการลุกลามดังกล่าวได้”

### สรุปผลการวิจัยในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ (Human model)

การศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Nrf2 และ oxidative stress marker (8-OHdG) ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ เปรียบเทียบกับส่วนที่ไม่เป็นมะเร็งข้างเคียง (adjacent non-cancerous areas) สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

Nrf2 ซึ่งควบคุมการตอบสนองต่ออนุมูลอิสระออกซิเจนที่ว่องไว พบว่ามีการแสดงออกในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ การแสดงออกของ NRF2 ถูกพบทั้งในไซโตพลาสซึมและในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งตับ แต่พบอย่างโดดเด่นในนิวเคลียส ในส่วนของชิ้นเนื้อตับบริเวณที่ไม่ได้เป็นมะเร็งนั้น พบการแสดงออกของ NRF2 ในระดับที่ต่ำ ซึ่งผลการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค Immunohistochemistry นั้นบ่งชี้อย่างชัดเจนว่า NRF2 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับ นอกจากนี้ Nrf2 ยังมีการแสดงออกในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งตับซึ่งเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่า มีการกระตุ้นของ Transcription factor ที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ

8-OHdG พบการแสดงออกอย่างเด่นชัดในพยาธิสภาพที่เกิดจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งไปในทางเดียวกันใน NRF2 โดยการแสดงออกของ 8-OHdG พบว่ามีการแสดงออกที่เด่นชัดในนิวเคลียสแต่ในทางตรงกันข้ามในชิ้นเนื้อตับบริเวณตำแหน่งที่ไม่ได้เป็นมะเร็งพบการแสดงออกในระดับต่ำ

ดังนั้นในการศึกษานี้ชิ้นเนื้อมะเร็งตับที่มีการแสดงออกของ NRF2 ในเซลล์มะเร็งตับมีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ 8-OHdG ( $r=0.9945$ ,  $P < 0.001$ ) ซึ่งการแสดงออกของ oxidative stress markers (8-OHdG) และโปรตีน NRF2 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับมีการแสดงออกมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนที่ไม่เป็นมะเร็งข้างเคียง (adjacent non-cancerous areas)

## 2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (8-OHdG) และการแสดงออกของ Nrf2 กับการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยมะเร็งตับ สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Nrf2 และ 8-OHdG กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งตับ วิเคราะห์ด้วย Kaplan-Meier curve พบว่าการแสดงออกของ Nrf2 ไม่สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งตับ โดยที่ระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยกับการแสดงออกที่สูงขึ้นของ Nrf2 ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับการแสดงออกของ NRF2 ที่ต่ำกว่า (Log-rank test,  $P = 0.945$ ) ส่วนผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ 8-OHdG ในผู้ป่วยมะเร็งตับ พบว่าแสดงออกของ 8-OHdG ในระดับที่สูงมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ 8-OHdG ต่ำ อย่างมีนัยสำคัญ (Log-rank test,  $P = 0.035$ ) ซึ่งให้เห็นว่า ภาวะเครียดจากออกซิเดชันในระดับสูงมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในระดับต่ำ

ดังนั้น ระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในชิ้นเนื้อมะเร็งตับมีความสัมพันธ์กับการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยมะเร็งตับ

## อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและความเสียหายของดีเอ็นเอจากภาวะออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยง (HepG2) และยังสามารถศึกษาภาวะแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Nrf2 และ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วย พบว่าการเพิ่มขึ้นต่อการแสดงออกของ 8-OHdG ในเซลล์ตับมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับและในเซลล์เพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวเป็นสาเหตุให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Nrf2 และ 8-OHdG เมื่อวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลบน Nrf2 promoter พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Nrf2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในการเติมหมู่เมทิลบน Nrf2 promoter แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการกลูตามของเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวซึ่งยืนยันสมมติฐานที่ว่าอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่มีภาวะความเครียดจากออกซิเดชันในมะเร็งและส่งเสริมการลุกลามของมะเร็งด้วย

ผลการวิจัยขึ้นเนื้อด้วยเทคนิค Immunohistochemistry มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในผู้ป่วยมะเร็งตับชาวจีนพบว่าการแสดงออกของ Nrf2 เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งตับ<sup>[5]</sup> ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการตอบสนองที่เพิ่มขึ้นต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันผ่านกลไกการกระตุ้นจาก



กระบวนการ Nrf2-Keap1-ARE ในผู้ป่วยมะเร็งระดับ และการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ NRF2 นั้นน่าจะเป็นกลไกที่ไปกระตุ้นให้เกิดภาวะการก่อมะเร็ง [79] การศึกษาในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นถึงระดับการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชันในดีเอ็นเอ มีการแสดงออกของ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อมะเร็งระดับสูงขึ้น ซึ่งสภาวะนี้บ่งชี้ถึงการดำเนินของความเครียดที่ดำเนินอยู่อย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งนั้นสร้างอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวออกมามาก และเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในสภาวะแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง มีหลายรายงานที่พบว่าเซลล์มะเร็งระดับมีการสร้าง 8-OHdG มากขึ้น [80],[81],[82] อีกทั้งมีความสัมพันธ์กับการลุกลามของมะเร็ง [83],[84] และอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง [85] การศึกษาในครั้งนี้ได้ยืนยันด้วยผลการทดลองว่า เซลล์เพาะเลี้ยง (HepG2) ที่ถูกกระตุ้นภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ส่งผลต่อความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระลดลงเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Transcription factor ของ *Nrf2* และมีการทำลายดีเอ็นเอให้เสียหาย ซึ่งบ่งชี้ว่าการเพิ่มขึ้นของ *Nrf2* ไม่สามารถป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งพยายามที่จะรักษาภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เพื่อกระตุ้นให้มีการสะสมของ *Nrf2* ในระดับที่สูง ซึ่งระดับของ NRF2 ที่สูงนี้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการลุกลามของมะเร็ง คล้ายกับภาวะการอักเสบในสภาวะแวดล้อมมะเร็ง (inflammatory tumor environment) [86] แต่มีคำถามต่อไปอีกว่า เซลล์มะเร็งระดับรอดจากภาวะความเครียดออกซิเดชันได้อย่างไร ยังคงเป็นปริศนาและต้องการการศึกษาทดลองต่อไป เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่า *Nrf2* สามารถทำให้เซลล์มีชีวิตรอดมากขึ้นและยังกระตุ้นการลุกลามในเซลล์มะเร็งด้วย [81],[87]

การศึกษาในครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่าการลุกลามของเซลล์มะเร็งระดับถูกกระตุ้นโดยอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว อีกทั้งอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวนี้ยังไปกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่และการรุกรานในเซลล์เพาะเลี้ยง (HepG2) โดยที่กลไกของเซลล์ที่อนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวไปกระตุ้นการลุกลามของเซลล์มะเร็งระดับยังไม่มีการศึกษาที่สามารถอธิบายในเรื่องนี้ได้ แต่เป็นที่ทราบกันดีว่า Epithelial mesenchymal transition (EMT) มีบทบาทสำคัญในการลุกลามของมะเร็งระดับ [88] การเหนี่ยวนำของ EMT ในเซลล์มะเร็งระดับเกิดขึ้นผ่านการกระตุ้นกระบวนการ PI3K/AKT [89] สารคัดหลังทำให้เกิดการอักเสบและภาวะการมีออกซิเจนต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด EMT ได้ และยังมีรายงานว่าอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวสามารถกระตุ้น EMT ได้ในเซลล์เยื่อบุผิวในหนู mouse [90] และเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตส่วนต้นของหนู [91] การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงได้คาดเดาว่า การที่อนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวไปกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งระดับเคลื่อนที่แพร่กระจายและลุกลามที่พบในการศึกษาครั้งนี้ อาจเกิดขึ้นผ่านการเหนี่ยวนำจากการกระตุ้นของ EMT ซึ่งจะต้องการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป

แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในสถานการณ์การเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลของ *Nrf2* Promoter ในเซลล์เพาะเลี้ยง (HepG2) ที่ถูกกระตุ้นด้วย  $H_2O_2$  ที่มีความ

เข้มข้นสูง (70  $\mu$ M) บ่งชี้ให้เห็นว่า การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ *Nrf2* ในภาวะการตอบสนองแบบฉับพลันต่ออนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวต่อการควบคุมเหนือพันธุกรรม (epigenetic) ไม่ได้ถูกควบคุมด้วยกลไกการเติมหมู่เมทิลของ *Nrf2* promoter กลไกอื่นๆ เช่น การควบคุมภาวะสมดุลในปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) น่าจะมีบทบาทในการตอบสนองอย่างฉับพลันต่อการทำงานของอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว [92]

ในการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกที่รายงานการแสดงออกของ *Nrf2* และ 8-OHdG ในชั้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งตับและพบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ 8-OHdG ในเซลล์ตับซึ่งมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง เราได้ทำการศึกษาทดลองและพบว่าอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวกระตุ้นการลุกลามของเซลล์มะเร็งและสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ TA และ SAM มีความสามารถในการลดการลุกลามที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว การค้นพบองค์ความรู้จากการศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ว่าการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในสภาวะแวดล้อมของเซลล์มะเร็งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการลุกลามของมะเร็ง ดังนั้นการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์มะเร็งอาจจะเป็นวิธีที่เป็นประโยชน์ในการรักษาเพื่อลดการลุกลามของมะเร็งได้

## ข้อเสนอแนะ

ข้อจำกัดของการศึกษาในครั้งนี้คือไม่ได้ศึกษาถึง KEAP1 (a negative regulator of *Nrf2*), active (phosphorylated) form ของ *Nrf2* และการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ *Nrf2* ยังไม่ได้ถูกศึกษาในการศึกษาครั้งนี้เช่นกัน อีกทั้งไม่ได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันการกระตุ้นของกระบวนการ *Nrf2*-keap1-ARE ด้วยการกุดการทำงานของยีนโดยใช้ siRNA เพื่อยืนยันหน้าที่การทำงานของ *Nrf2* ในการควบคุมการลุกลามของเซลล์มะเร็งก็ยังไม่ได้ศึกษาในครั้งนี้ อีกทั้งการศึกษานี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งตับเพียงชนิดเดียวอาจจะทำให้เกิดผลการทดลองที่ได้ไม่ครอบคลุมเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งตับชนิดอื่นๆ การศึกษาในครั้งต่อไปควรศึกษาให้ครอบคลุมในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายๆ ชนิด เพื่อยืนยันหน้าที่การทำงานของ *Nrf2* ในเซลล์มะเร็งตับต่อไป

## ภาคผนวก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียมสารเคมีในการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

1.1 Phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 2.7 mM potassium chloride (KCl), 2 mM potassium phosphate monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) และ 137 mM sodium chloride (NaCl) pH 7.4)

- ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MW=141.98) 1.4 g, KCl (MW=74.44) 0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MW=136.08) 0.24 g และ NaCl (MW=58.44) 8 g
- ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 600 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml

#### 1.2 5 mg/ml MTT stock solution

- ชั่ง MTT 50 mg ละลายใน 10 ml ของ 1XPBS
- แบ่งเก็บใส่หลอดละ 1 ml เก็บที่ 4°C นาน 1 เดือน

#### 1.3 0.5 mg/ml MTT working solution

- นำ 5 mg/ml MTT stock solution มา 1 ml
- ใส่ serum free medium 9 ml จากนั้นผสมให้เข้ากัน

#### 2. การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับโปรตีน Carbonyl

##### 2.1 Trichloroacetic acid (TCA) (20%w/v)

- ชั่ง TCA 20 g เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml

##### 2.2 Dinitrophenylhydrazine (DNPH) (10 mM DNPH ใน 2N hydrochloric acid (HCl))

- เติม HCl 98.5 ml ในน้ำกลั่น 500 ml
- ชั่ง DNPH (MW=198.14) 0.99 g ละลายใน HCl ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1

### 2.3 Ethanol:Ethyl acetate (1:1)

- เตรียม 95% ethanol 500 ml และ ethyl acetate 500 ml
- ผสมสารละลายในข้อ 2.1 ให้เข้ากัน

### 2.4 Guanidine hydrochloride (GdmCl) (6 M GdmCl และ 0.5 M potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 2.5)

- ชั่ง KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MW=136.08) 34.023 g และ GdmCl (MW=95.53) 286.6 g
- ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 2.5 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 ml

## 3. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Total antioxidant (TAC)

### 3.1 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphanic acid (5 mM ABTS)

- ชั่ง ABTS (MW = 584.7) 0.1372 g
- ละลายใน 1XPBS ปริมาตร 50 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

### 3.2 2,2-azobis (2-aninopropane) dihydrochloride (2.5 mM AAPH)

- ชั่ง AAPH (MW=271.2) 0.0542 g
- ละลายใน 1XPBS 100 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

## 4. การเตรียมสารเคมีในการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Immunohistochemistry

### 4.1 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- เตรียม 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 ml

### 4.2 10 mM Sodium citrate buffer stock solution

- ชั่ง sodium citrate dihydrate 29.41 g ละลายในน้ำกลั่น 600 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 6 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 ml
- เก็บที่ 4°C นาน 3 เดือน

#### 4.3 10 mM Sodium citrate buffer working solution

- เตรียม 10 mM Sodium citrate buffer stock solution 100 ml แล้วเติมน้ำกลั่น 900 ml
- เติม Tween-20 500  $\mu$ l แล้วผสมให้เข้ากัน

#### 4.4 Phosphate buffer saline (1XPBS)

- เตรียม 1XPBS 1000 ml แล้วเติม normal horse serum 1 ml, Triton X-100 100  $\mu$ l และ Tween-20 1 ml
- จากนั้นผสมสารเคมีข้างต้นให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว

#### 4.5 Tris-HCl buffer (20 mM Tris และ 500 mM sodium chloride (NaCl) pH

7.5)

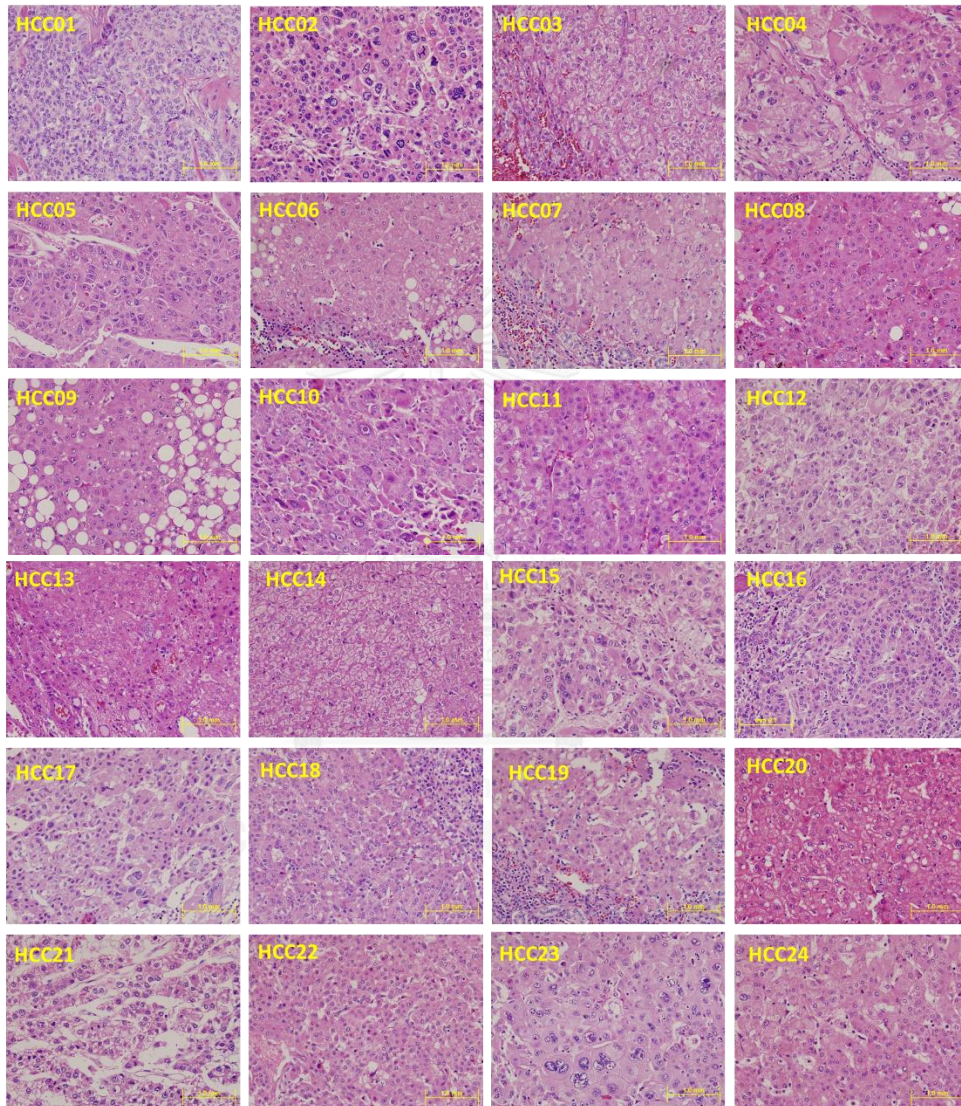
- ชั่ง Tris (MW=121.14) 2.42 g และ NaCl (MW=58.44) 29.24 g
- ละลายสารเคมีในน้ำกลั่น 600 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 7.5 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 ml

#### 4.6 1% 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)

- ชั่ง DAB 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml
- แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml จำนวน 1 ml แล้วเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

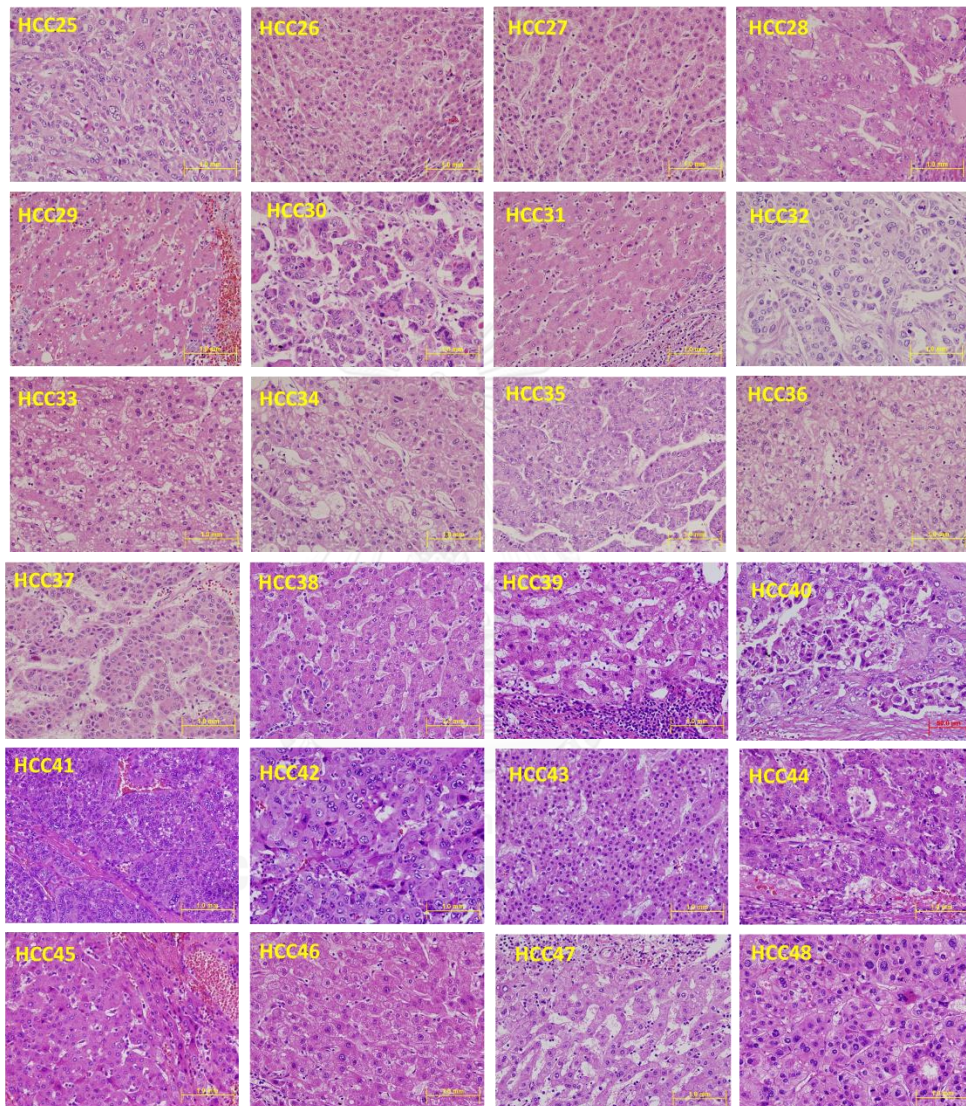
## ภาคผนวก(ต่อ)

ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin &amp; Eosin staining



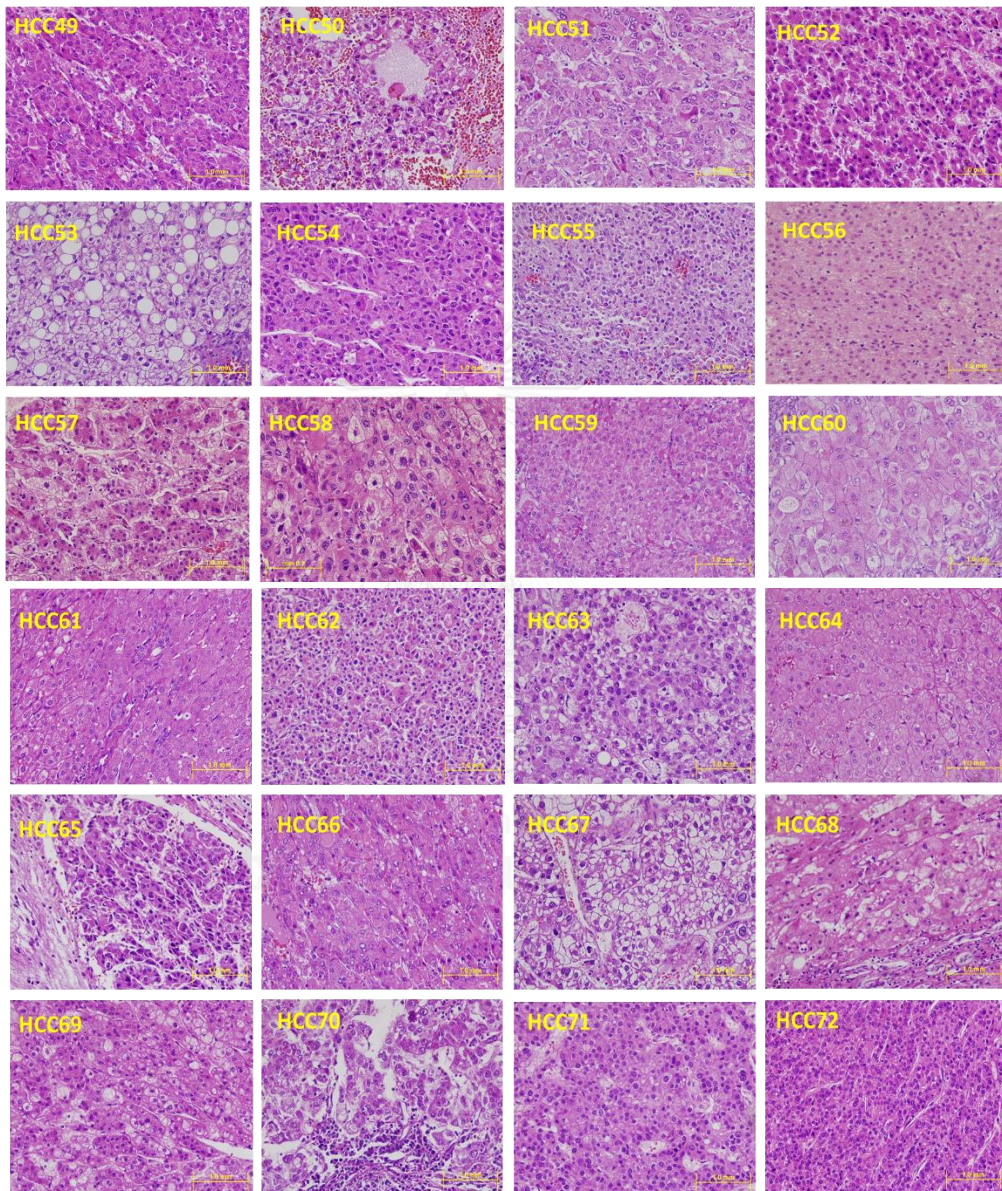
## ภาคผนวก(ต่อ)

ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin &amp; Eosin staining



## ภาคผนวก(ต่อ)

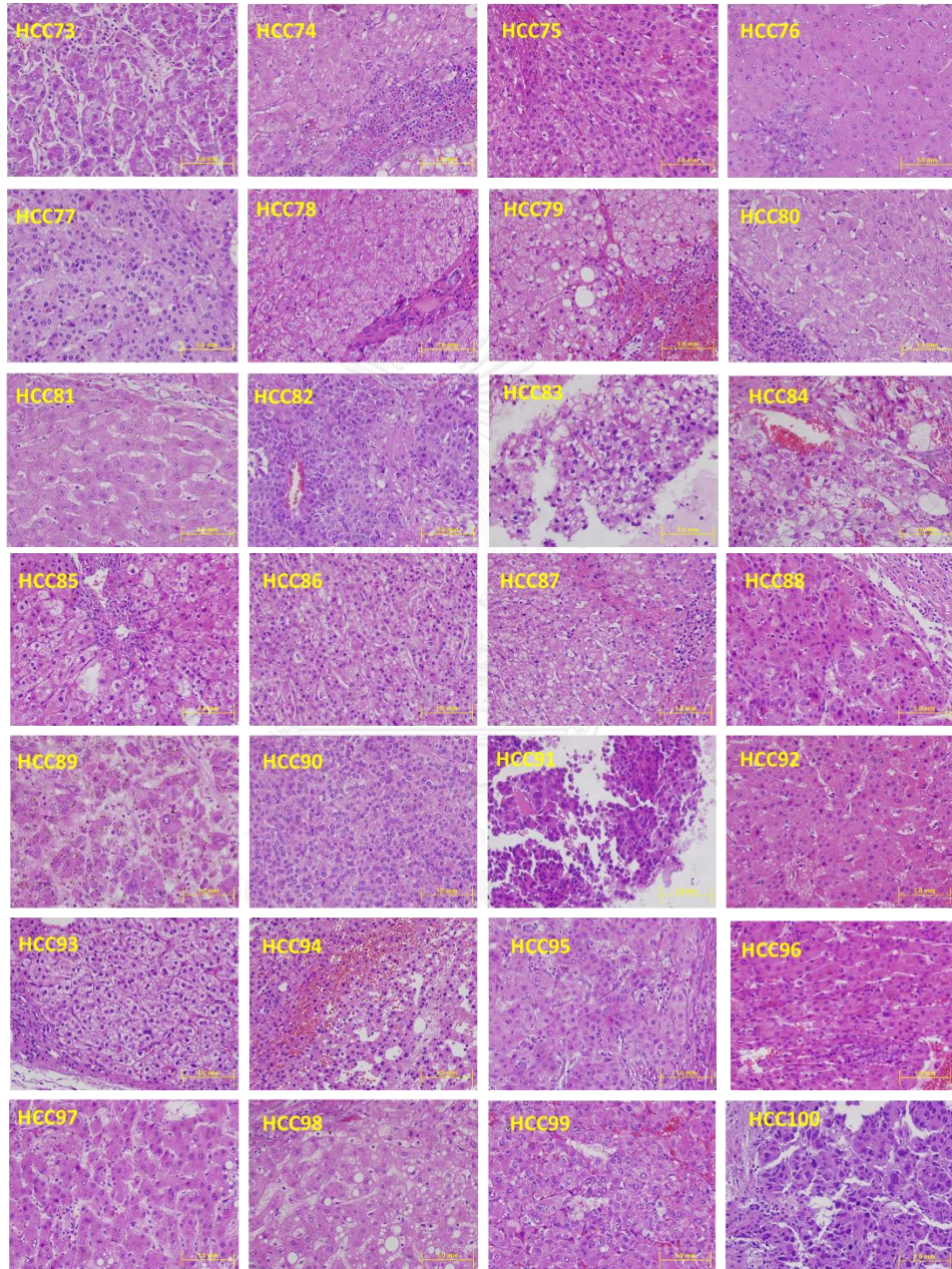
ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin &amp; Eosin staining



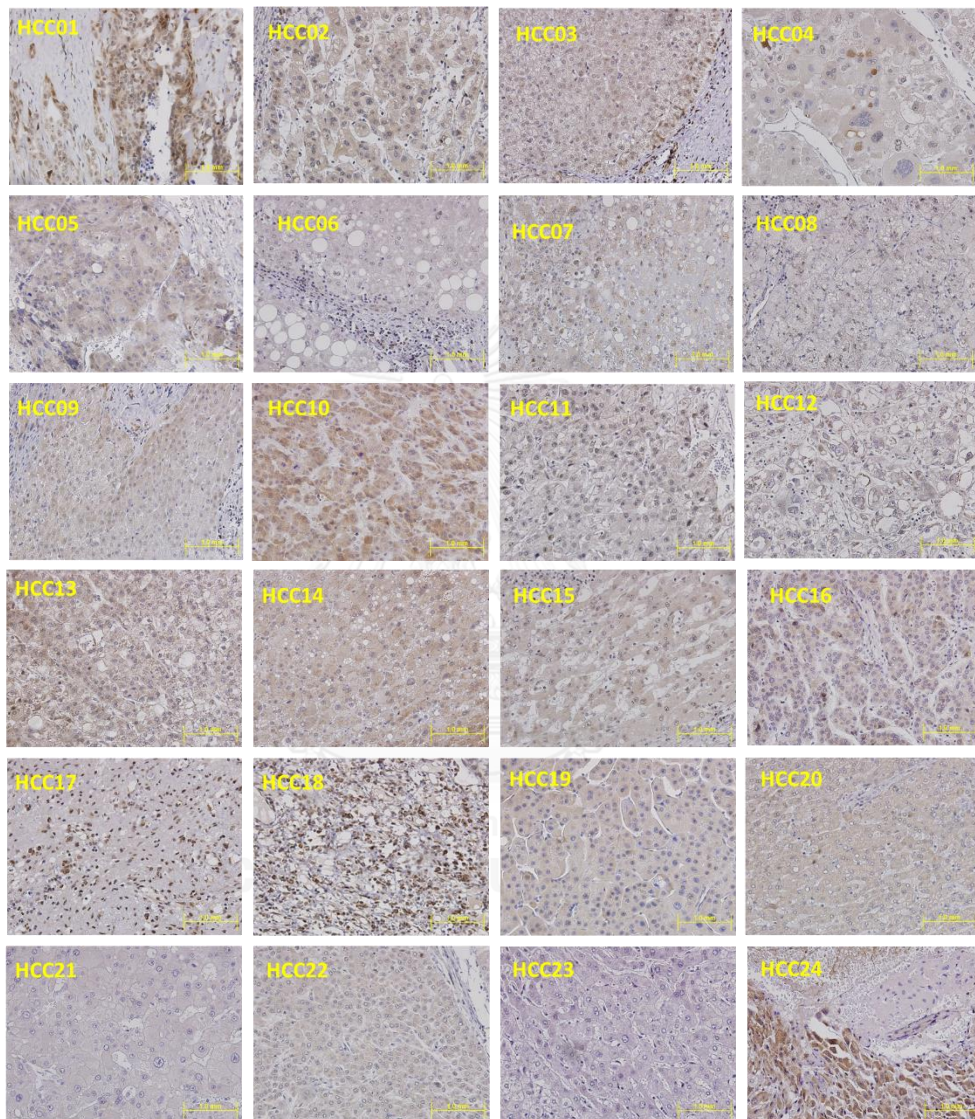


## ภาคผนวก(ต่อ)

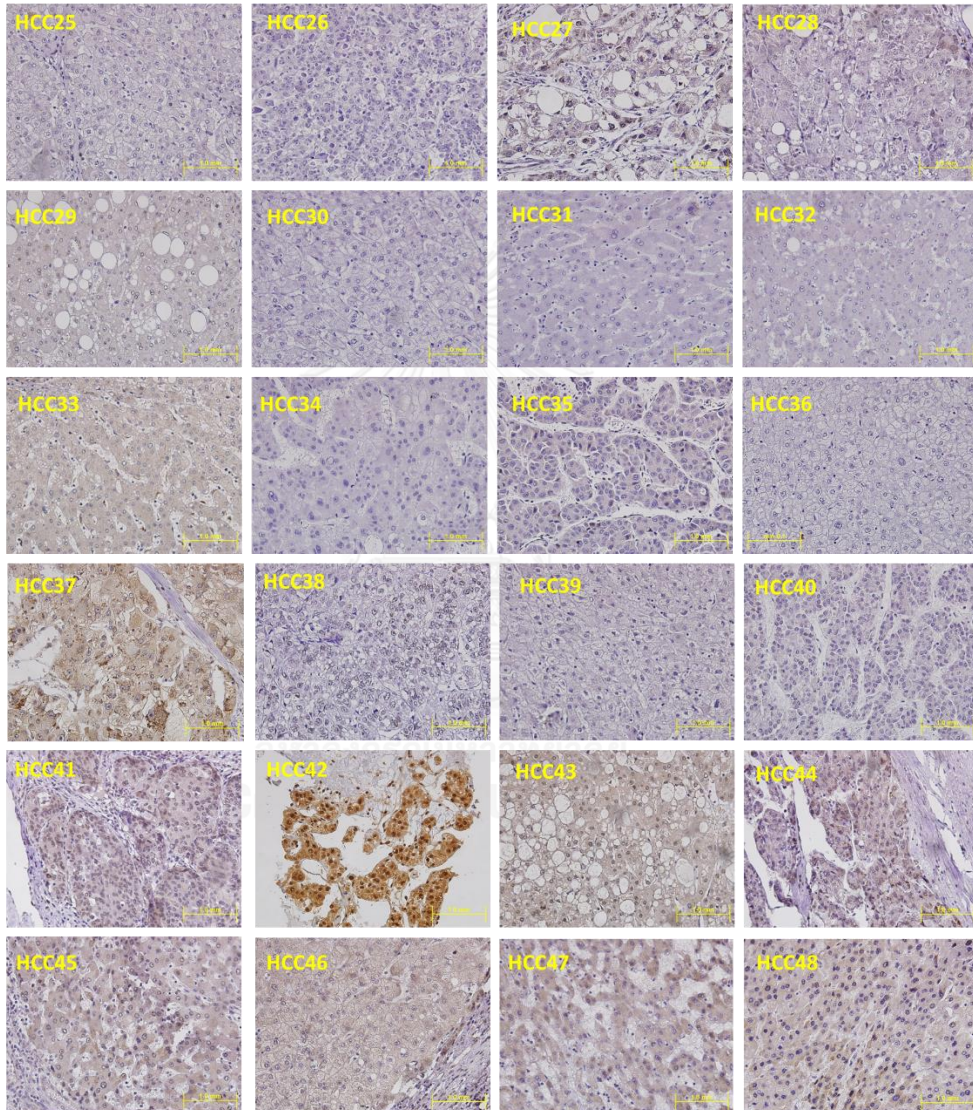
ผลการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งตับด้วยวิธี Hematoxylin &amp; Eosin staining



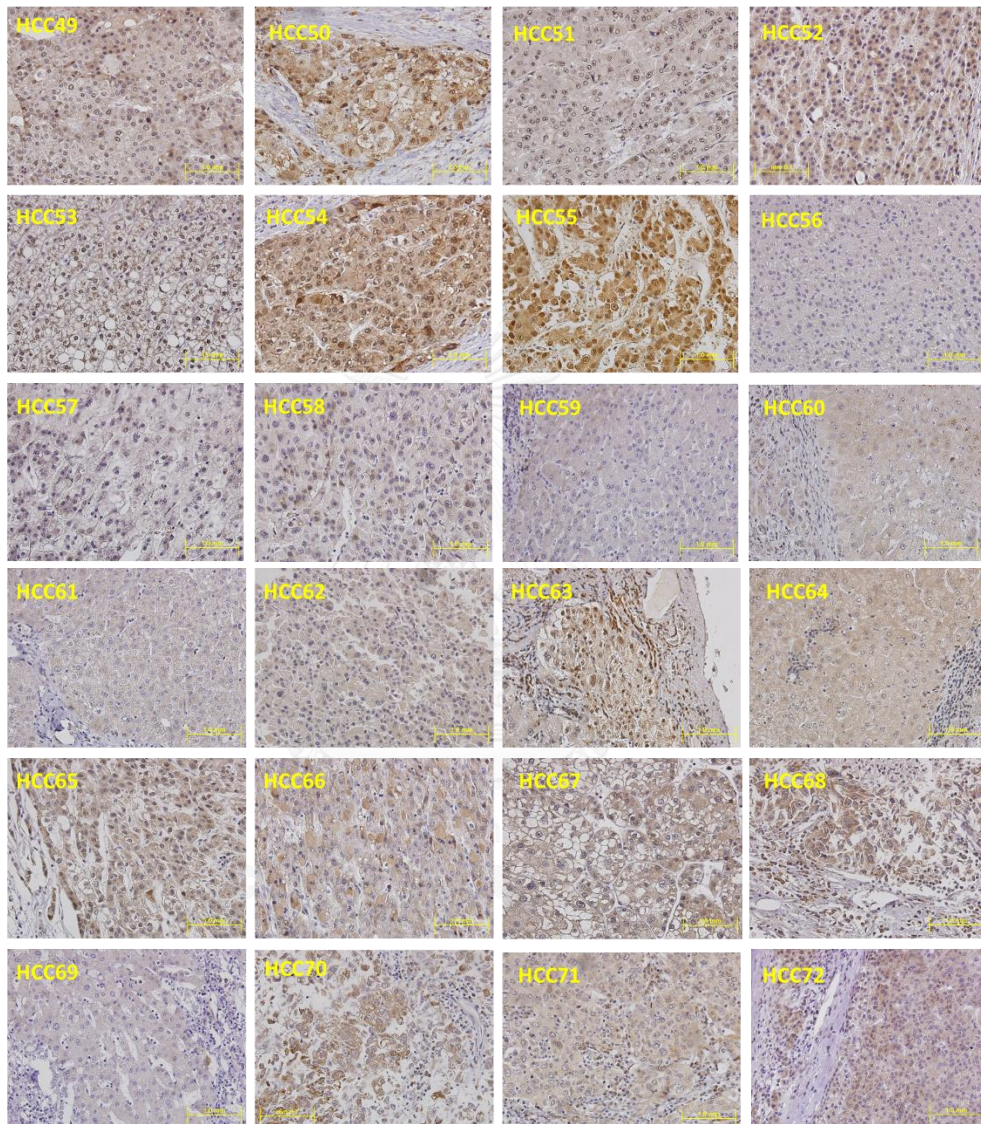
ภาคผนวก(ต่อ)  
ผลการย้อม IHC ด้วย Nrf2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ



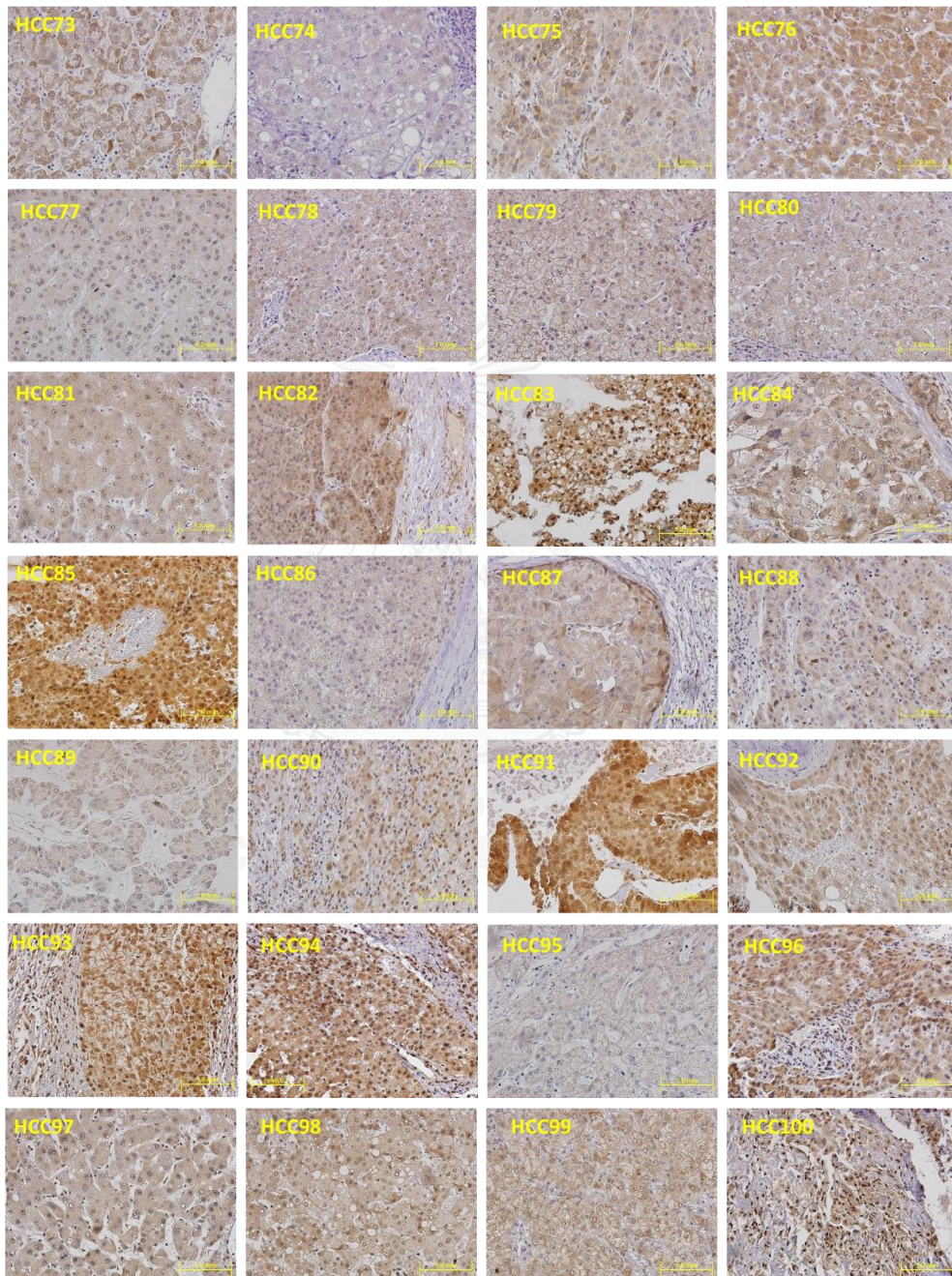
ภาคผนวก(ต่อ)  
ผลการย้อม IHC ด้วย Nrf2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ



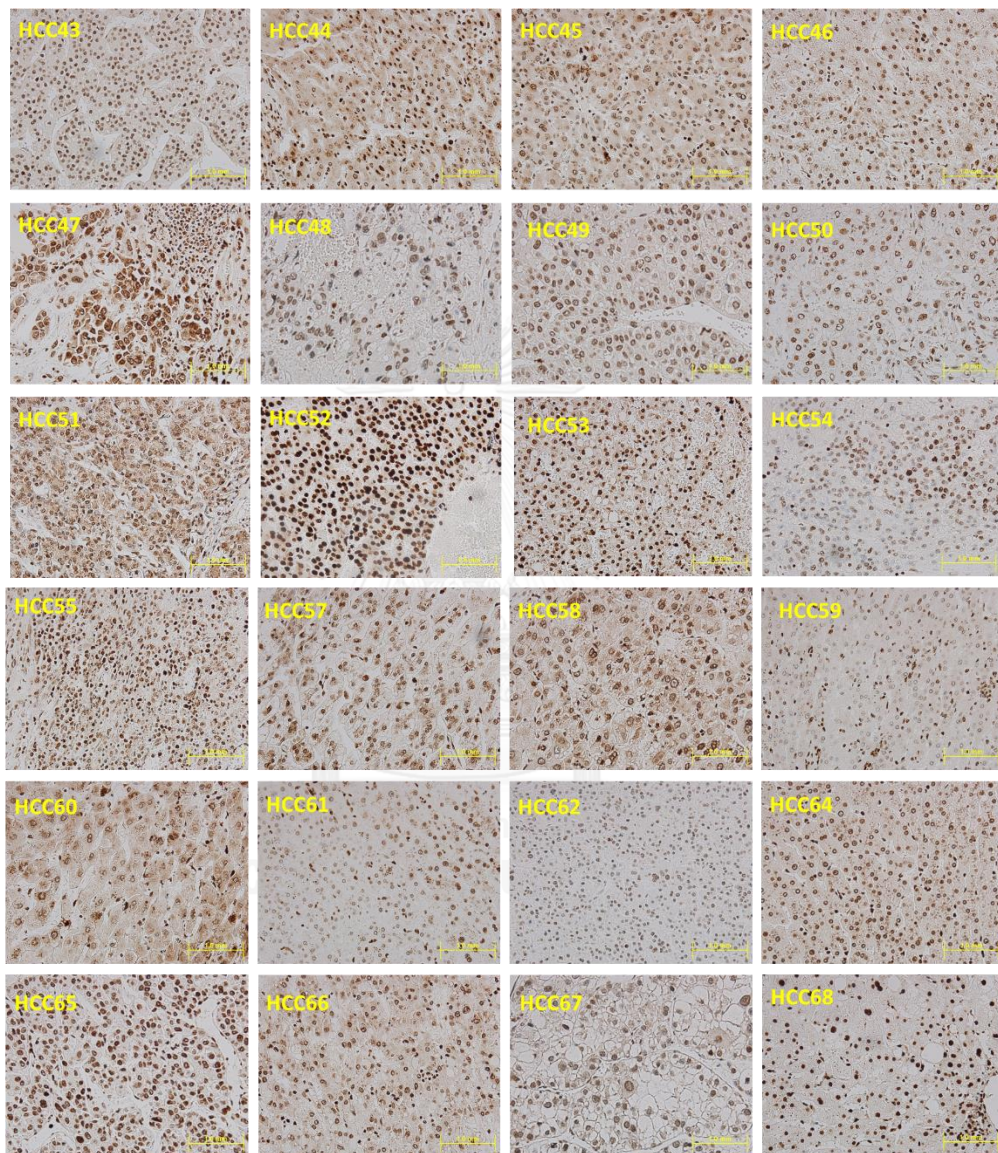
ภาคผนวก(ต่อ)  
ผลการย้อม IHC ด้วย Nrf2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ



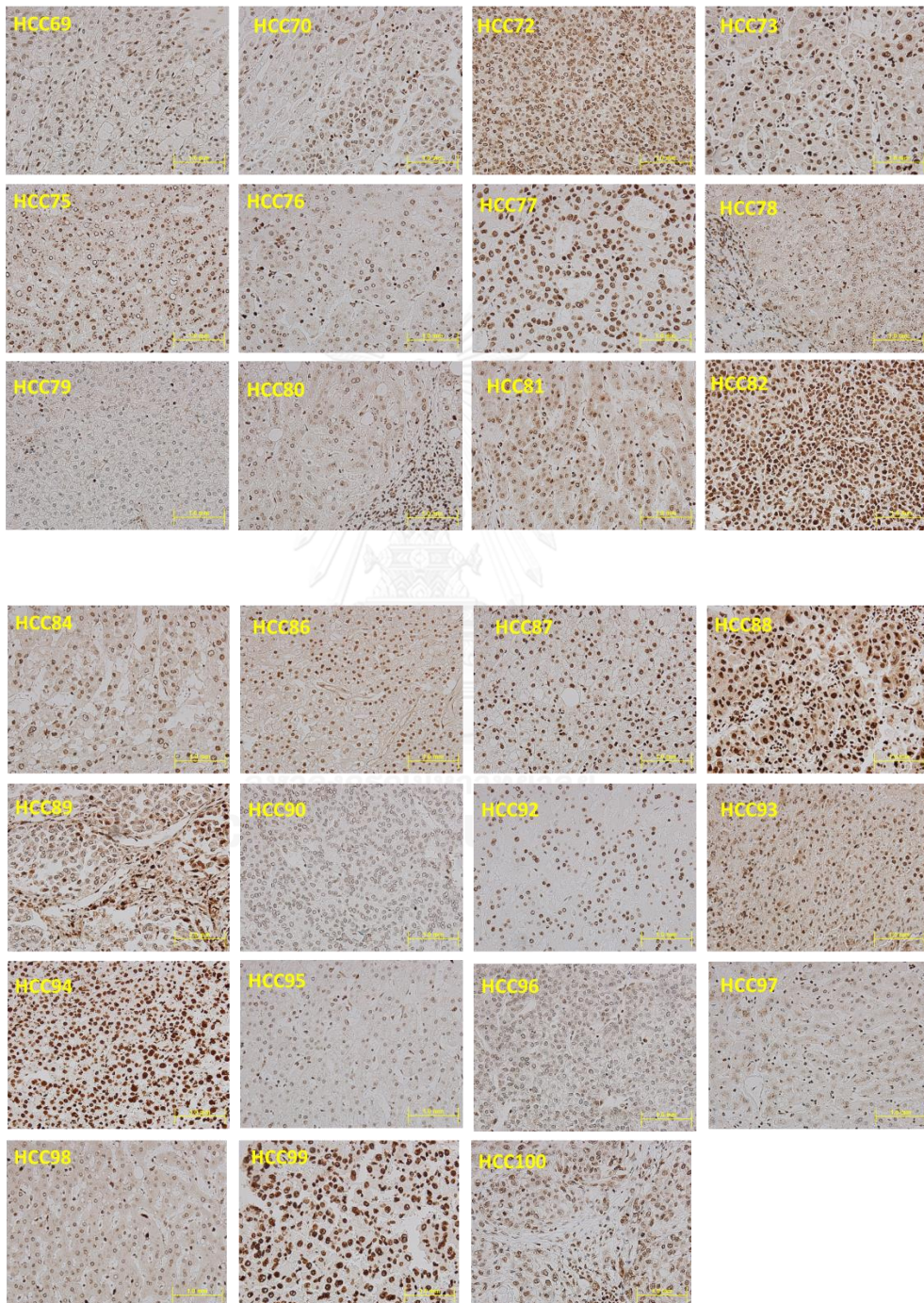
ภาคผนวก(ต่อ)  
ผลการย้อม IHC ด้วย Nrf2 ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ



ภาคผนวก(ต่อ)  
ผลการย้อม IHC ด้วย 8 - OHdG ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ



ภาคผนวก(ต่อ)  
ผลการย้อม IHC ด้วย 8-OHdG ในชิ้นเนื้อมะเร็งตับ







ภาคผนวก(ต่อ)  
เอกสารรับรองโครงการวิจัย





COA No. 348/2016

IRB No. 127/59

## INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama IV Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4493

---

**Certificate of Approval**

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

**Study Title** : EPIGENETIC REGULATION OF Nr2 GENE BY REACTIVE OXYGEN SPECIES  
IN HEPATOCELLUAR CARCINOMA PROGRESSION

**Study Code** : -

**Principal Investigator** : Mr.Chakriwong Ma-on

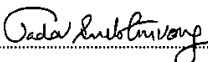
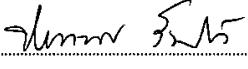
**Affiliation of PI** : Master of Science (M.SC. Medical Science),  
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

**Review Method** : Expedited

**Continuing Report** : At least once annually or submit the final report if finished.

**Document Reviewed** :

1. Research Proposal Version 1.0 Date 11 March 2016
2. Protocol Synopsis Version 2.0 Date 6 April 2016
3. Case Record Form (CRF) for Hepatocellular Carcinomas Version 3.0 Date 2 May 2559
4. Curriculum vitae Version 1.0 Date 11 March 2016
5. GCP Training

**Signature:**  **Signature:** 

(Emeritus Professor Tada Sueblinvong MD)

(Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)

Chairperson

Member and Secretary

The Institutional Review Board

The Institutional Review Board

**Date of Approval** : May 10, 2016

**Approval Expire Date** : May 09, 2017

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)



## รายการอ้างอิง

[1]



[1]

1. Bosch, F.X., et al., *Epidemiology of hepatocellular carcinoma*. Clin Liver Dis, 2005. **9**(2): p. 191-211, v.
2. Health, T.M.o.P., *Public Health Statistics*. 2006.
3. McKillop, I.H., et al., *Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. J Surg Res, 2006. **136**(1): p. 125-35.
4. Kang, K.A., et al., *Epigenetic modification of Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells: involvement of TET-dependent DNA demethylation*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1183.
5. Zhang, M., et al., *Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 531.
6. Pongpaiboj, P., et al., *Increased Oxidative Stress and RUNX3 Hypermethylation in Patients with Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Induction of RUNX3 Hypermethylation by Reactive Oxygen Species in HCC Cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(13): p. 5343-8.
7. Evans, M.D., M. Dizdaroglu, and M.S. Cooke, *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*. Mutat Res, 2004. **567**(1): p. 1-61.
8. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, and B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. Toxicol Pathol, 2010. **38**(1): p. 96-109.
9. Franco, R., et al., *Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis*. Cancer Lett, 2008. **266**(1): p. 6-11.
10. Sheridan, J., et al., *Nuclear oxidative damage correlates with poor survival in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2009. **100**(2): p. 381-8.
11. Zhang, L., et al., *The Relevance of Nrf2 Pathway and Autophagy in Pancreatic Cancer Cells upon Stimulation of Reactive Oxygen Species*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 3897250.
12. Araujo, A.R., et al., *Catalytic Mechanism of Retroviral Integrase for the Strand Transfer Reaction Explored by QM/MM Calculations*. J Chem Theory Comput, 2014. **10**(12): p. 5458-66.

13. Tangkijvanich, P., et al., *Association of hepatitis viruses with hepatocellular carcinoma in Thailand*. J Gastroenterol, 1999. **34**(2): p. 227-33.
14. Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1655-69.
15. Brechot, C., *Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S56-61.
16. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1312-27.
17. Wong, C.M. and I.O. Ng, *Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2008. **28**(2): p. 160-74.
18. Fattovich, G., et al., *Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S35-50.
19. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
20. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
21. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
22. Hitchler, M.J. and F.E. Domann, *An epigenetic perspective on the free radical theory of development*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(7): p. 1023-36.
23. Villanueva, A., et al., *Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(1): p. 55-76.
24. Bacolla, A., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33011-9.
25. Kautiainen, T.L. and P.A. Jones, *DNA methylation in mammalian nuclei*. Biochemistry, 1985. **24**(20): p. 5575-81.
26. Bolden, A.H., et al., *Primary DNA sequence determines sites of maintenance and de novo methylation by mammalian DNA methyltransferases*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(4): p. 1135-40.

27. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
28. Tischoff, I. and A. Tannapfe, *DNA methylation in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(11): p. 1741-8.
29. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
30. Ohtani-Fujita, N., et al., *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Oncogene, 1993. **8**(4): p. 1063-7.
31. Herman, J.G., et al., *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9700-4.
32. Yang, B., et al., *Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma*. Am J Pathol, 2003. **163**(3): p. 1101-7.
33. Kuroki, T., et al., *Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3724-8.
34. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **111**(1): p. 47-54.
35. Fang, J.Y., et al., *Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol, 1996. **11**(11): p. 1079-82.
36. Yuille, M.R., et al., *TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation*. Genes Chromosomes Cancer, 2001. **30**(4): p. 336-41.
37. Gupta, A., et al., *Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(3): p. 664-73.
38. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* Free Radic Biol Med, 2010. **49**(11): p. 1603-16.

39. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress*. Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 23-38.
40. Shigenaga, M.K. and B.N. Ames, *Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(3-4): p. 211-6.
41. Janero, D.R., *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(6): p. 515-40.
42. Weitzman, S.A., et al., *Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1261-4.
43. Bendich, A., E. Gabriel, and L.J. Machlin, *Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat*. J Nutr, 1986. **116**(4): p. 675-81.
44. Levine, M., *New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid*. N Engl J Med, 1986. **314**(14): p. 892-902.
45. Stadtman, E.R., *Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins*. Am J Clin Nutr, 1991. **54**(6 Suppl): p. 1125S-1128S.
46. Pryor, W.A., *Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **393**: p. 1-22.
47. Zeisel, S.H., K.A. DaCosta, and J.G. Fox, *Endogenous formation of dimethylamine*. Biochem J, 1985. **232**(2): p. 403-8.
48. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
49. Hybertson, B.M., et al., *Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation*. Mol Aspects Med, 2011. **32**(4-6): p. 234-46.
50. Digaleh, H., M. Kiaei, and F. Khodaghali, *Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: implication for proteasomal degradation and autophagy*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(24): p. 4681-94.
51. Leinonen, H.M., et al., *Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer*. Adv Cancer Res, 2014. **122**: p. 281-320.
52. Padmanabhan, B., et al., *Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer*. Mol Cell, 2006. **21**(5): p. 689-700.



53. Muscarella, L.A., et al., *Regulation of KEAP1 expression by promoter methylation in malignant gliomas and association with patient's outcome*. Epigenetics, 2011. **6**(3): p. 317-25.
54. Garcia-Manero, G., et al., *Phase II trial of vorinostat with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome*. J Clin Oncol, 2012. **30**(18): p. 2204-10.
55. Marzec, J.M., et al., *Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury*. FASEB J, 2007. **21**(9): p. 2237-46.
56. Yamamoto, T., et al., *Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 72-9.
57. Hartikainen, J.M., et al., *Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5537-46.
58. Arisawa, T., et al., *The relationship between Helicobacter pylori infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis*. Int J Mol Med, 2007. **19**(1): p. 143-8.
59. Okano, Y., et al., *SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73794.
60. Kim, Y.R., et al., *Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin*. J Pathol, 2010. **220**(4): p. 446-51.
61. Shibata, T., et al., *NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer*. Neoplasia, 2011. **13**(9): p. 864-73.
62. Shibata, T., et al., *Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13568-73.

63. Ooi, A., et al., *CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2013. **73**(7): p. 2044-51.
64. Kandoth, C., et al., *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. *Nature*, 2013. **502**(7471): p. 333-9.
65. Ichimura, Y., et al., *Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy*. *Mol Cell*, 2013. **51**(5): p. 618-31.
66. Camp, N.D., et al., *Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of NRF2 protein through competitive binding to KEAP1 protein*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(9): p. 6539-50.
67. Hast, B.E., et al., *Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination*. *Cancer Res*, 2013. **73**(7): p. 2199-210.
68. Eades, G., et al., *miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(47): p. 40725-33.
69. Rushworth, S.A., et al., *The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF-kappaB and underlies its chemo-resistance*. *Blood*, 2012. **120**(26): p. 5188-98.
70. Oberley, T.D., *Oxidative damage and cancer*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 403-8.
71. Payne, S.L., et al., *Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism*. *Cancer Res*, 2005. **65**(24): p. 11429-36.
72. Khor, T.O., et al., *Epigenetic DNA methylation of antioxidative stress regulator NRF2 in human prostate cancer*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014. **7**(12): p. 1186-97.
73. Sylvester, P.W., *Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability*. *Methods Mol Biol*, 2011. **716**: p. 157-68.
74. Floegel, A., et al., *Antioxidant intake from diet and supplements and elevated serum C-reactive protein and plasma homocysteine concentrations in US adults: a cross-sectional study*. *Public Health Nutr*, 2011. **14**(11): p. 2055-64.

75. Kruger, N.J., *The Bradford method for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 9-15.
76. Uzun, H., R. Kayali, and U. Cakatay, *The chance of gender dependency of oxidation of brain proteins in aged rats*. Arch Gerontol Geriatr, 2010. **50**(1): p. 16-9.
77. Chen, H. and J. Nalbantoglu, *Ring cell migration assay identifies distinct effects of extracellular matrix proteins on cancer cell migration*. BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 183.
78. Valster, A., et al., *Cell migration and invasion assays*. Methods, 2005. **37**(2): p. 208-15.
79. Ganan-Gomez, I., et al., *Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 750-64.
80. Ichiba, M., et al., *Expression of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2003. **23**(5): p. 338-45.
81. Jo, M., et al., *Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2011. **46**(6): p. 809-21.
82. Nishikawa, T., et al., *Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation*. Liver Int, 2009. **29**(6): p. 846-56.
83. Chuma, M., et al., *8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2008. **23**(9): p. 1431-1436.
84. Tanaka, H., et al., *Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C*. British Journal of Cancer, 2008. **98**(3): p. 580-586.
85. Li, S.M., et al., *8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine expression predicts hepatocellular carcinoma outcome*. Oncology Letters, 2012. **3**(2): p. 338-342.
86. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-867.

87. Liu, D., et al., *Activation of AKT pathway by Nrf2/PDGFA feedback loop contributes to HCC progression*. *Oncotarget*, 2016.
88. Jayachandran, A., B. Dhungel, and J.C. Steel, *Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2016. **9**.
89. Zhang, P.F., et al., *Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling*. *Cell Death & Disease*, 2016. **7**.
90. Radisky, D.C., et al., *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability*. *Nature*, 2005. **436**(7047): p. 123-127.
91. Rhyu, D.Y., et al., *Role of reactive oxygen species in TGF-beta 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005. **16**(3): p. 667-675.
92. Ma, Q., *Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 53, 2013, 2013. **53**: p. 401-+.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายจักรีวงศ์ มาอ้น

วัน เดือน ปีเกิด 11 เมษายน 2526

สถานที่เกิด จังหวัดมหาสารคาม

สถานที่ติดต่อ 2 อาคารอูลยเดชวิกรม ชั้น 2 โรงพยาบาลศิริราช ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

วุฒิการศึกษา ปริญญาสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต สาขาสาธารณสุขศาสตร์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ประวัติการทำงาน ตำแหน่งนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ งานการตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยเทคนิคพิเศษ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ทุนการศึกษา กองทุนพระราชทานพัฒนาศิริราช พระบรมราชูปถัมภ์ในพระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มหิตลาธิเบศรรามาธิบดี จักรีนฤพดินทร สยามมินทราธิราช บรมนาถบพิตร