



รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของการลดระดับการแสดงออกของยีน G6PD ต่อพยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของเซลล์มะเร็งปอด
(Effects of G6PD gene suppression on molecular pathogenesis of lung cancer cells)

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.พุลลาภ ชีพสุนทร

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน 2561

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(This research is funded by Chulalongkorn University)

บทคัดย่อภาษาไทย

ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของเซลล์มะเร็ง คือ การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการใช้พลังงานและเมตาบอลิซึม ซึ่งวิถีเพนโทสฟอสเฟตเป็นวิถีที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยมีเอนไซม์กลูโคส 6 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G6PD) เป็นกุญแจสำคัญในปฏิกิริยา จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า G6PD มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งตับ อีกทั้งจากการทดสอบระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับเซลล์ปกติโดยใช้โปรแกรม CU-DREAM (Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays) พบว่า G6PD มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งตับ และปอด โดยมะเร็งปอดสามารถพบได้เป็นอันดับ 2 ของผู้ป่วยมะเร็ง อีกทั้งอัตราการรอดชีวิตภายหลังการตรวจพบโรคมะเร็งปอดนั้นต่ำ ปัจจุบันพบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งปอดบางรายที่ไม่ตอบสนองต่อยาและวิธีการรักษาแบบอื่น งานวิจัยนี้จึงศึกษาระดับการแสดงออกและบทบาทของ G6PD ต่อมะเร็งปอดทั้งในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งปอดและเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชาวไทย 64 รายพบการย้อมติด G6PD ในส่วนของเซลล์มะเร็งทั้งหมดเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติข้างเคียง อีกทั้งพบการย้อมติด G6PD ใน non-small cell (NSCLC) ร้อยละ 81.8 (36/44 ราย) และ small cell ร้อยละ 10 (2/20) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า G6PD มีความสำคัญต่อมะเร็งปอดโดยเฉพาะชนิด NSCLC อีกทั้งผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดยใช้ DHEA และการลดระดับการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA สามารถยับยั้งระดับการเพิ่มจำนวนเซลล์, migration และ colony formation ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 ได้ โดยการยับยั้งเอนไซม์ G6PD ไปรบกวนการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ ที่ควบคุม DNA methylation และ apoptosis โดยไปเพิ่มขึ้นการแสดงออกของยีน DNMT3a และ Bax/Bcl-2 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลง ระดับ apoptosis เพิ่มขึ้น และ ระดับ methylation ของ genome ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลกระทบให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดถูกยับยั้ง ผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงบทบาทของเอนไซม์ G6PD ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ที่จะพัฒนายาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในการรักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Metabolic reprogramming is one important cancer hallmark characterized by the up-regulation of biosynthetic and bioenergetic pathways such as pentose phosphate pathway (PPP). Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a key enzyme in PPP, highly expressed in many cancerous tissues, for example, liver cancer. Analysis of gene expression datasets available for several types of cancers using CU-DREAM (Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays) revealed that G6PD was significantly up-regulated in liver and lung cancers ($p < 0.05$). Lung cancer is the second most common cause of cancer death. Survival rate of patients with lung cancer after diagnosis was low. Moreover, some patients were not responded to anticancer drugs and chemotherapy. Therefore, this research was proposed to investigate the roles of G6PD in lung cancer, both immunohistochemical study and *in vitro* studies.

Immunohistochemical study of lung cancer biopsy tissue samples from 64 Thai patients demonstrated that all lung cancer cells were strongly positive for G6PD as compared to surrounding normal cells. The majority of non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue samples (81.8%; 36/44 cases) were stained positive for G6PD. On the contrary, only 2 cases out of 20 (10.0%) of small cell lung cancer tissue samples were stained positive for G6PD. These findings suggested that G6PD may play a significant role in NSCLC. Results further showed that suppression of G6PD using G6PD inhibitor (DHEA) and siRNA decreased cell proliferation, cell migration and colony formation of NSCLC cell lines, including NCI-H292 and NCI-H1975. Suppression of G6PD also altered expression levels of genes involved in DNA methylation and apoptosis. For example, DNMT3a and Bax/Bcl-2 were increased after the suppression of G6PD. It was postulated that altered expression of these genes could lead to cell cycle arrest, apoptosis and genomic hypermethylation and therefore suppressing of NSCLC proliferation. The results of this study indicate that G6PD has important roles in NSCLC progression. Thus, suppression of G6PD may be potential therapeutic strategy for lung cancer.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
1. บทนำ	9
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
3. ขอบเขตของโครงการวิจัย	11
4. วิธีการดำเนินการวิจัย	12
5. ผลการทดลอง	21
6. อภิปราย/วิจารณ์	34
7. สรุปผลการวิจัย	42
8. บรรณานุกรม	43
9. ภาคผนวก (Appendix)	46

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 เซลล์มะเร็งปอดที่ใช้ในงานวิจัย	14
ตารางที่ 2 แสดงลำดับ RNA ของ siRNA ที่จำเพาะต่อ G6PD mRNA และ Scrambled (control).....	15
ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้สำหรับ Real-time PCR	20
ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์ (Primers) สำหรับ Real-time PCR	21
ตารางที่ 5 ระดับของโปรตีน G6PD กับ parameter เชงปริมาณ.....	23
ตารางที่ 6 ระดับของโปรตีน G6PD กับ parameter เชงคุณภาพ.....	23

สารบัญภาพ (List of Illustration)

	หน้า
รูปที่ 1 ผลการย้อมชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วย hematoxylin & eosin	22
รูปที่ 2 ผลของระดับไขมันตภาพเอนไซม์ของ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292	24
รูปที่ 3 ผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 และ NCI-H292.....	25
รูปที่ 4 ผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292	26
รูปที่ 5 ผลระดับการแสดงออกของยีน G6PD เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA.....	26
รูปที่ 6 ผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD.....	27
รูปที่ 7 ผลระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD.....	28
รูปที่ 8 อัตราการเข้ามาปิดช่องว่างของเซลล์เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD.....	30
รูปที่ 9 อัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD	31
รูปที่ 10 ระดับ lactate ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD.....	32
รูปที่ 11 ระดับการแสดงออกของยีน Bax/Bcl2 เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD.....	33
รูปที่ 12 ระดับการแสดงออกของยีน DNMT1 และ DNMT3a เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD.....	34
รูปที่ 13 G6PD กับการรักษาสมดุลของระดับ ROS ภายในเซลล์.....	39
รูปที่ 14 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการลดระดับการแสดงออกของ G6PD ต่อเซลล์มะเร็งปอด...	41
รูปที่ 15 แนวทางการคัดกรองและรักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปอด	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of abbreviations)

ALK	anaplastic lymphoma kinase
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ATP	adenosine triphosphate
BAX	BCL2 associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
DHEA	dehydroepiandrosterone
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
EGFR	epidermal growth factor receptor
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMR	energy metabolism reprogramming
FST	fluorescent spot test
G6PD	glucose 6-phosphate dehydrogenase
GEO	gene expression omnibus
HMS	hexose monophosphate shunt
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MCT	monocarboxylate transporters
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOX	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NSCLC	non small cell lung cancer cells
PCR	polymerase chain reaction
PPP	pentose phosphate pathway
ROS	reactive oxygen species
SAM	s-adenly methionine
SCLC	small-cell lung cancer
Sp1	stimulatory protein 1
SP3	stimulatory protein 3
TCA	tricarboxylic acid

บทนำ (Introduction)

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ ของประชากรทั่วโลก ในปี 2012 พบผู้เสียชีวิตจากมะเร็งมากกว่า 8.8 ล้านคน (World Cancer Report 2014) โดย 2 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งปอด (1.59 ล้านราย) และมะเร็งตับ (745,000 ราย) จากการสำรวจของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ⁽¹⁾ พบว่าตั้งแต่ปี 2006 ถึงปี 2015 เป็นต้นมา จำนวนผู้ป่วยมะเร็งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยในปี 2015 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งและมารับบริการที่สถาบันมะเร็ง 3,439 ราย โดยแบ่งออกเป็นเพศชาย 1,418 ราย (คิดเป็นร้อยละ 41.2) และเพศหญิง 2,021 ราย (คิดเป็นร้อยละ 58.8) จากข้อมูลทางสถิติที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่ามะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ การรักษามะเร็งปอดในปัจจุบันนี้มีหลายวิธี เช่น precision medicine, การผ่าตัด (surgery) รังสีบำบัด (radiation therapy) และเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นต้น⁽²⁾ การเลือกใช้วิธีการรักษาขึ้นอยู่กับการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR*, *EML4-ALK*, *BRAF*, ระยะของมะเร็ง (stage) ตำแหน่ง (location) และการตอบสนองต่อยา อีกทั้งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดและมีผลข้างเคียงที่ต่างกัน เช่น การไม่ตอบสนองต่อยา *EGFR*, *ALK inhibitors* วิธีการผ่าตัดและการฉายแสงนั้นเหมาะกับเซลล์มะเร็งที่ยังไม่แพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่น⁽³⁾ การฉายรังสีก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง (skin irritation) บริเวณที่รับรังสีโดยตรง ขณะที่รังสีบำบัดอาจทำให้เกิดภาวะปอดอักเสบ (radiation pneumonitis)⁽⁴⁾ ส่วนเคมีบำบัดนั้นเหมาะกับมะเร็งที่กระจายไปยังหลายตำแหน่ง เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง แต่มีผลข้างเคียงทำให้คลื่นไส้ (nausea) และอาเจียน (vomiting) เบื่ออาหาร (loss of appetite) ท้องร่วง (diarrhea) ผมร่วง (hair loss) เป็นต้น⁽⁵⁾ ซึ่งอาการจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณยาที่ใช้และผู้ป่วยแต่ละราย ดังนั้นการศึกษากลไกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เพื่อนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้ในการรักษาให้มีประสิทธิภาพต่อไป

ลักษณะที่สำคัญ (hallmark) ของเซลล์มะเร็งลักษณะหนึ่งคือ การเปลี่ยนแปลงวิถีเมตาบอลิซึม (metabolism) สำหรับการสร้างพลังงาน (energy metabolism reprogramming: EMR)^(6, 7) โดยพบว่าเซลล์มะเร็งหลายชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน มักอาศัยวิถีแอโรบิกไกลโคไลซิส (aerobic glycolysis) หรือที่เรียกว่า Warburg effect โดยมีวิถี glycolysis และเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway: PPP หรือ hexose monophosphate shunt; HMS) ร่วมในกระบวนการ⁽⁶⁻⁹⁾ ซึ่งวิธีดังกล่าวแม้จะให้พลังงานน้อยกว่ากระบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเรชัน (oxidative phosphorylation) แต่สามารถผลิต ATP เพื่อสนองต่อความต้องการของเซลล์ได้รวดเร็วกว่า

เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase: G6PD) อยู่ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ในกระบวนการรีดอกซ์ (redox) และการสังเคราะห์กรดไขมัน⁽⁷⁾ อีกทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตยังสร้างน้ำตาลไรโบส 5-ฟอสเฟต (ribose 5-phosphate) ที่สำคัญต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid)⁽⁸⁾ ซึ่งผลิตผล (product) ทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากวิถีเพนโตสฟอสเฟตล้วนแล้วแต่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง ทั้งการเจริญเติบโต (proliferation) และการอยู่รอด (survival) ของเซลล์มะเร็ง⁽⁹⁾

ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์เนื้อเยื่ออกและมะเร็งหลายชนิดทั้ง primary cells และ cell lines มีระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ที่สูงขึ้น เช่น มะเร็งผิวหนัง (melanoma)⁽¹⁰⁾ เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer tissue)⁽¹¹⁾ มะเร็งเต้านม (primary breast carcinoma)⁽¹²⁾ และเนื้องอกปอด (lung tumor)⁽¹³⁾ เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ข้อมูล cDNA microarray ใน GEO dataset ของ NCBI ด้วยโปรแกรม CU-DREAM ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดและตับ ที่พบว่า G6PD มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อีกทั้งยังพบว่าระดับเอนไซม์ G6PD ที่สูงขึ้นแปรผันตรงกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) และ poor prognosis ขณะเดียวกัน G6PD แปรผกผันกับอัตราการรอดชีวิต (survival rate)^(14, 15) ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ G6PD จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญต่อการวิจัยโรคมะเร็งในปัจจุบัน เช่น การศึกษาบทบาทของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD deficiency) ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human melanoma cell) และมะเร็งตับ (HepG2)⁽¹⁶⁾ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมา ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในผู้ป่วยมะเร็งยังไม่พบความสัมพันธ์ที่แน่ชัด⁽¹⁷⁻²⁰⁾ อีกทั้งมะเร็งแต่ละชนิดมีกลไกและการควบคุมภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมที่มีระดับการแสดงออกของ G6PD เป็นบวก (positive) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมที่มีผล G6PD เป็นลบ (negative) พบว่าอัตราการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) ไม่แตกต่างกัน⁽¹²⁾ แสดงให้เห็นว่า G6PD มีความสำคัญต่างกันในแต่ละชนิดของมะเร็ง โดยปัจจุบันยังไม่มีที่ยืนยันถึงความสัมพันธ์และบทบาทหน้าที่ของ G6PD ในมะเร็งปอด จึงเป็นที่มาของการศึกษาเพื่อยืนยันระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดเทียบกับเนื้อเยื่อปกติในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ขนาดใหญ่ (Non Small Cell Lung Cancer Cells: NSCLC) ร่วมกับการศึกษาพยาธิกำเนิดระดับโมเลกุลภายใต้การลดระดับการแสดงออกของ G6PD ด้วย siRNA และการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์โดยใช้ตัวยับยั้ง หรือ dehydroepiandrosterone (DHEA) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปอด โดยผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้นอกจากจะเป็นความรู้พื้นฐานที่ทำให้เข้าใจถึงบทบาทของเอนไซม์ G6PD ต่อการเจริญเติบโตของมะเร็งปอดแล้ว G6PD ยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญต่อการพัฒนากลยุทธ์ในการรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

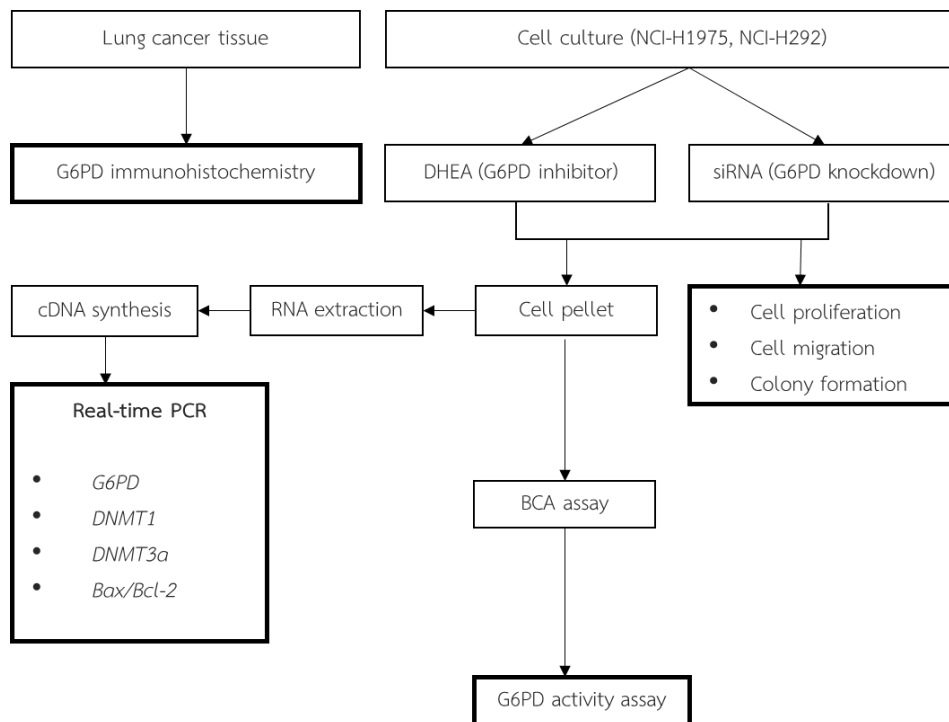
1. เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติด้วยวิธี Immunohistochemistry
2. เพื่อสร้างโมเดลของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และศึกษาผลของภาวะดังกล่าวต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งปอด
3. เพื่อศึกษาผลของ DHEA ต่อการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอดผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD
4. เพื่อสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท-เอกที่มีความรู้ ความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยีการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพให้ยั่งยืน

5. เพื่อผลิตผลงานวิชาการ ให้เป็นแหล่งความรู้และอ้างอิงในสาขาชีวเคมีทางการแพทย์ อนุชีวิวิทยาของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และพยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของเซลล์มะเร็ง ทั้งระดับชาติและนานาชาติ

ขอบเขตของโครงการวิจัย (Scope of project)

การศึกษาแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษา immunohistochemistry เพื่อตรวจระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ใน cancerous cell เทียบกับ non-cancerous cell ในเนื้อเยื่อปอดของผู้ป่วยมะเร็งปอดจำนวน 162 คน และการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อสร้างโมเดลของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด (NCI-H1975, NCI-H292) ที่ถูกทำให้มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยการ knock down ยีน *G6PD* เซลล์โมเดลที่ได้จะนำไปใช้อธิบายกระบวนการตอบสนองและกลไกพยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของเซลล์มะเร็งปอดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูก knock down ยีน *G6PD* ในด้านต่างๆ ได้แก่ การเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง และเมตาบอลิซึมของ lactate รวมถึงความไวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด จากการใช้ DHEA ไปยับยั้ง G6PD องค์กรความรู้ใหม่ที่ได้นอกจากจะทำให้เข้าใจถึงบทบาทของเอนไซม์ G6PD ต่อการเจริญเติบโตของมะเร็งปอดแล้ว ยังจะเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนากลยุทธ์ป้องกันและรักษามะเร็งปอดแบบชี้เป้า ซึ่งอาจจะนำไปสู่การขยายผลไปยังมะเร็งชนิดอื่นๆ ต่อไปอีกด้วย

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and methods)



1) Immunohistochemistry

งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB 561/59, COA No. 1034/2016)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเป็นชิ้นเนื้อที่เก็บจากผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่ปี 2552 - 2557 จำนวน 64 ราย แบ่งเป็น non-small cell จำนวน 44 ราย และ small cell 20 ราย เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของผู้ป่วยมะเร็งปอด ที่ถูกเก็บรักษาไว้ในพาราฟิน โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry

1.1. ขั้นตอนการกำจัดพาราฟิน

เนื้อเยื่อมะเร็งปอดในพาราฟินจะถูกกำจัดพาราฟิน (deparaffinize) และเติมน้ำกลับสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) โดยการจุ่มสไลด์ที่มีแผ่นพาราฟินของเนื้อเยื่อมะเร็งปอดที่ผ่านการตัดมาแล้วลงใน xylene เพื่อกำจัดพาราฟิน เป็นเวลา 5 นาที นำไปจุ่มใน ethanol 100%, 95%, 70% และ 50% ตามลำดับเพื่อคืนน้ำสู่เนื้อเยื่อ แล้วจึงล้างในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

1.2. ขั้นตอนการย้อม Hematoxylin และ Eosin

นำแผ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ผ่านการกำจัดพาราฟินมาทำการย้อมด้วย hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อล้างสีส่วนเกินออก แล้วจึงกำจัดน้ำส่วนเกินโดยจุ่ม

สไลด์ลงใน 95% ethanol จุ่มสไลด์ลงในสี eosin เป็นเวลา 5 นาที ล้างสไลด์ขึ้นลง 2 ครั้ง ด้วย 95% ethanol เพื่อล้างสีส่วนเกิน แล้วจึงล้างด้วย absolute ethanol เพื่อดึงน้ำส่วนเกินออก กำจัด ethanol และทำให้เนื้อเยื่อใสขึ้นโดยจุ่มสไลด์ขึ้นลง 10 ครั้งใน xylene จากนั้นเช็ดแผ่นสไลด์ให้แห้ง แล้วจึงทำการตรึงเนื้อเยื่อโดยหยด mounting medium บนชิ้นเนื้อแล้วจึงนำแผ่นกระจกมาปิดทับ ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปศึกษา

1.3. ขั้นตอนการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry

เนื่องจากเนื้อเยื่อมะเร็งปอดที่ถูกเตรียมในฟอร์มาลีน ทำให้เกิดการรวมตัวกันของกรดอะมิโน (aldehyde linkage หรือ methylene bridge) ทำให้แอนติบอดี (antibody) ไม่สามารถเข้าจับได้ดี จึงต้องมีการคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval) โดยใช้ความร้อน (heat-induced epitope retrieval)

ชิ้นเนื้อบนสไลด์ที่ผ่านการกำจัดพาราฟินออกแล้วจากขั้นตอนที่ 1.1 นำมาเติม สารละลาย Tris/EDTA pH 9.0 และ sodium citrate pH 6.0 บนสไลด์ แล้วให้ความร้อนโดย ไมโครเวฟ เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วย TBS plus 0.025% Triton X-100 แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% normal serum ร่วมกับ 1% BSA ใน TBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ชั้สารละลายส่วนเกินรอบๆ ชิ้นเนื้อบนสไลด์ จากนั้นย้อมสี hematoxylin เป็นเวลา 8 นาที แล้วจึงล้างน้ำเพื่อกำจัดสีส่วนเกินออก แล้วจึงย้อม G6PD primary antibody (HPA000247) (Sigma, USA) สัดส่วน 1 ส่วน ต่อ TBS 500 ส่วน ร่วมกับ 1% BSA แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน หลังจากนั้นล้างสไลด์ใน TBS 0.025% Triton 2 รอบ ครั้งละ 5 นาที บ่มกับ Secondary antibody ที่ละลายใน TBS ร่วมกับ 1% BSA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBS 5 นาที 3 รอบ รอกการเกิดสี Horseradish peroxidase (HRP) 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ซึ่งให้สีน้ำตาลบริเวณที่มีการแสดงออกของ G6PD และทำการบันทึกภาพ และวัดความเข้มของสีโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Inverted phase contrast (Nikon Eclipse TS100) (Nikon, Japan)

2) การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงในภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 (Corning, USA) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (HyClone™, USA) สำหรับ NCI-H1975 และ Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) ชนิด High Glucose (HyClone™, USA) สำหรับ NCI-H292 ร่วมกับ 10% fetal bovine serum (FBS) (ThermoFisher, USA) เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยง (BINDER, Germany) ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระดับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 95-99

ตารางที่ 1 เซลล์มะเร็งปอดที่ใช้ในงานวิจัย

Cell line	Characteristic	Gender	Gene mutations	Gene Sequence
NCI-H1975	adenocarcinoma; non-small cell lung cancer	Female	EGFR (epidermal growth factor receptor)	c.2573T>G, c.2369C>T
			PIK3CA (phosphatidylinositol- 4, 5-bisphosphate 3- kinase, catalytic subunit alpha)	c.353G>A
			CDKN2A (Cyclin- dependent kinase inhibitor 2A)	c.205G>T
			TP53 (tumor suppressor transcription factor)	c.818G>A
NCI-H292	mucoepidermoid carcinoma; non- small cell lung cancer	Female	CDKN2A	c.1_471del471

3) การ Knockdown ยีน *G6PD*

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-H292 (ตารางที่ 1) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24-well plates) (Costar®, USA) โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 1.9×10^5 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย FBS ร้อยละ 10 จนกระทั่งเซลล์โตเต็มพื้นที่ประมาณร้อยละ 70 ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ เตรียม Opti-MEM (HyClone™, USA) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ Lipofectamine® 3000 (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (หลอด A) ผสม Opti-MEM (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร กับ siRNA (ThermoFisher, USA) (ตารางที่ 2) ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ตามลำดับ (หลอด B)

ผสมสารจากหลอด A และหลอด B เข้าด้วยกันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำสารละลายดังกล่าวปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่แล้ว 450 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปทำการทดลองต่อไป

เพื่อวัดความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อลดการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA เซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-H292 จะถูกเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 0.5×10^4 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย FBS ร้อยละ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับภาชนะที่เลี้ยง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมด้วย siRNA ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย FBS ร้อยละ 10 ระดับการแบ่งตัวของเซลล์จะถูกวัดที่ 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเทคนิค MTT assay

ตารางที่ 2 แสดงลำดับ RNA ของ siRNA ที่จำเพาะต่อ G6PD mRNA และ Scrambled (control)

Gene	Sequence (5' → 3')
G6PD_siG6PD_571	Sense: GGCCGUCACCAAGAACAUU Antisense : UGUUCUUGGUGACGGCCUU
G6PD_Scrambled	Sense: GGCACUACCAGACACGAUU Antisense : UCGUGUCUGGUAGUGCCUU

4) การวัดระดับการทำงานของเอนไซม์

วิธีการที่ใช้ในการวัดระดับกัมมันตภาพเอนไซม์เป็นไปตามการศึกษาก่อนหน้า⁽²¹⁾ pellet ที่ถูกเก็บไว้ใน 1X PBS จะถูกนำไปทำให้แตกด้วยคลื่นเสียงโดยใช้ sonicator (The VIRTIS Co, Inc., USA) และนำไปวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวัดกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดูดสารละลายจากเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ master mix ปริมาตร 490 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย NADP (Sigma, USA) 0.38 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ (Bio Basic Canada Inc., Canada) 6.3 มิลลิโมลาร์, glucose 6-phosphate (Sigma, USA) 3.3 มิลลิโมลาร์, maleimide (Sigma, USA) 5 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl (pH7.5) buffer (Bio Basic Canada Inc., Canada) 50 มิลลิโมลาร์

แบ่งลงภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plates) (Costar®, USA) 150 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy Ht) (Biotek, USA) ค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเทียบกับ NADH standard curve (NADH มีค่า maximum wavelength ที่ 340 nm เช่นเดียวกับ NADPH ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา) ตามวิธีการของ Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA) โดยเจือจาง NADH ออกเป็นความเข้มข้นที่ 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 นาโนโมลต่อหลุม ตามลำดับ นำค่าที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร มาคำนวณ ดังสมการ

$$\text{G6PD Activity (nmol/min/mg of protein)} = \left(\frac{B}{(T_2 - T_1)} \right) \times \text{Sample dilution} / P$$

B = NADH ที่เกิดขึ้น ณ ช่วงเวลา T2-T1 (นาโนโมล)

T1 = เวลาที่เริ่มต้นการวัด

T2 = เวลาสุดท้ายของการวัด

P = ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)

5) วัดปริมาณ cell viability

เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DHEA (Merck Millipore, USA) ต่อความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell viability) เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCL-H1975 และ NCL-H292 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 0.5×10^4 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย FBS ร้อยละ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับภาชนะที่เลี้ยง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมด้วย DHEA ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 นาโนโมลาร์ และ 1, 10, 100, 200, 300, 400, 500 ไมโครโมลาร์ โดยทำละลาย DHEA ใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA) แล้วจึงเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย FBS ร้อยละ 10 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ระดับการเจริญเติบโตของเซลล์จะถูกวัดที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค MTT assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

6) การวัดความสามารถในการเคลื่อนตัวของเซลล์มะเร็ง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCL-H1975 และ NCL-H292 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 1.9×10^5 และเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์เรียงตัว 1 ชั้น (monolayer) จนเต็มภาชนะเลี้ยงเซลล์

ใช้ทิป (tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร ชูดเซลล์เป็นเส้นตรงผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม แล้วล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์ที่หลุดออกมาจากขั้นตอนการชูดเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม DHEA ถ่ายรูปการเคลื่อนตัวของเซลล์มะเร็งปอดที่มาปิดช่องว่างจากการชูด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted phase contrast (Nikon Eclipse TS100) (Nikon, Japan) ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า ตั้งแต่ช่วงเวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

คำนวณอัตราการปิดช่องว่าง (wound confluence) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ wound confluence} = \frac{(A - B) * 100\%}{A}$$

A = พื้นที่ของช่องว่างเริ่มต้น

B = พื้นที่ของช่องว่างที่ช่วงเวลา x

7) การวัดระดับแลคเตท (lactate)

pellet และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกเก็บจากการทดลองจะนำไปวิเคราะห์ระดับแลคเตทโดยใช้ Lactate Assay Kit II (Sigma, USA) ผสม supernatant ใน lactate assay buffer ที่ปริมาตร 4 เท่าของตัวอย่าง นำไปผ่าน Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters MWCO 10 kDa (Merck Millipore, USA) เพื่อกำจัดโปรตีนของ lactate dehydrogenase เตรียม lactate standards โดยเจือจาง 10 ไมโครลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ lactate standard ด้วย lactate assay ปริมาตร 990 ไมโครลิตร เติมน้ำ lactate standards ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8, 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ เติมน้ำ lactate assay buffer ในแต่ละหลุม ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ lactate standards ที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาโนโมลต่อหลุมตามลำดับ

7.1 ^{ขั้น}เตรียม master mix และ blank sample

เตรียม master mix ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย

- Lactate Assay buffer 46 ไมโครลิตร
- Lactate Enzyme Mix 2 ไมโครลิตร
- Lactate Substrate Mix 2 ไมโครลิตร

ใส่ตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเตรียม blank sample ซึ่งประกอบด้วย Lactate Assay Buffer 48 ไมโครลิตร, Lactate Substrate Mix 2 ไมโครลิตร และ ตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร

7.2 ^{ขั้น}ขั้นตอนการคำนวณระดับแลคเตท

วัดระดับการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader โดยสีที่เกิดขึ้นจะคงอยู่ประมาณ 4 ชั่วโมง เนื่องจาก NADH และ NADPH จากเซลล์สามารถบวกรวมผลการวัดได้ จึงต้องทำการหักลบ (subtracted) กับ blank คำนวณความเข้มข้นของแลคเตทที่วัดได้โดยใช้สมการดังนี้

$$S_a/S_v = C$$

S_a = ปริมาณกรดแลคเตทที่วัดได้จากตัวอย่าง (unknown sample) (nmole)

เทียบจากกราฟมาตรฐาน (standard curve)

S_v = ปริมาตรตัวอย่างที่ใส่ลงในแต่ละ well (ไมโครลิตร)

C = ความเข้มข้นของกรดแลคเตทในตัวอย่าง

8) การวัดความสามารถการสร้างโคโลนี (colony forming assay)

เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างโคโลนี (colony formation) ของเซลล์มะเร็งปอด เซลล์ NCI-H292 และ NCI-H1975 ถูกเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well plates) (Costar®, USA) ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 200 เซลล์ต่อหลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม FBS ร้อยละ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย DHEA หรือ siRNA กับ FBS ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน

เพื่อทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ ล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อหลุม เติมสีย้อมซึ่งประกอบด้วย 6.0% glutaraldehyde และ 0.5% crystal violet ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเลี้ยงภาชนะให้สีย้อมสัมผัสกับโคโลนีอย่างทั่วถึง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ดูดสีย้อมทั้งหมดออก ทำการล้างสีย้อมส่วนเกินโดยจุ่มภาชนะที่ย้อมลงในอ่างที่มีน้ำประปา และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนกระดาษสีขาว

9) การวัดระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน G6PD

9.1 การเก็บรักษาเพลเลต (pellet) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

เพื่อเก็บรักษาเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ เซลล์จะถูกแยกออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการทริปซินไนเซชัน (trypsinization) โดยใช้ทริปซิน (trypsin) ร้อยละ 0.25 (HyClone™, USA) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (centrifuge H-11n) (Kokusan Corp, Japan) pellet จะถูกผสมกับ 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) (Bio Basic Canada Inc., Canada) ซึ่งประกอบด้วย KCl 2.7 มิลลิโมลาร์, NaCl 137 มิลลิโมลาร์ และ Phosphate Buffer 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้ในการทดลอง

9.2 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ทำให้ pellet แยกด้วยคลื่นเสียงด้วยเครื่อง sonicator แล้วจึงนำส่วน supernatant ที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้ Bicinchoninic acid (BCA) assay kits (ThermoFisher, USA)

เตรียม BCA Working Reagent (WR) โดยผสม สาร A ปริมาตร 50 ส่วน เข้ากับสาร B ปริมาตร 1 ส่วน ผสมสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทำให้ pellet แยก ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เข้ากับ WR ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader

9.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

นำเซลล์มะเร็งเรียงปอดที่ได้จากการทดลองมาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol® Reagent (ThermoFisher, USA) ล้างเซลล์ที่อยู่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ T25 หรือ T75 ด้วย 1X PBS เติม TRIzol® Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับภาชนะเลี้ยงเซลล์ T25 หรือ 2 มิลลิลิตร สำหรับภาชนะเลี้ยงเซลล์ T75 แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และเคาะภาชนะเลี้ยงเซลล์เบาๆ ทุกๆ 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะ สามารถเพิ่มเวลาได้หากเซลล์ยังไม่ออกจากภาชนะ

ดูด TRIzol® Reagent ที่มีเซลล์อยู่จากภาชนะเลี้ยงเซลล์มายังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม chloroform (Merck Millipore, USA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อ TRIzol® Reagent 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่า (Vortex labnet vx 100) (MO BIO Laboratories, Inc., USA) เป็นเวลา 15 วินาที จน TRIzol® Reagent และ chloroform ผสมเข้ากันดีจนเห็นเป็นสีนมชมพู (milky pink) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที หากยังเห็น pellet ของเซลล์อยู่ ควรเพิ่มเวลาการบ่มอีกประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงเขย่าอีกครั้งเพื่อให้เซลล์แตกตัวอย่างสมบูรณ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (RPM) หรือ 12,000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนแยกออกเป็นสาร 3 ชั้น ย้ายสารละลายใสส่วนบนสุด (aqueous phase) ซึ่งประกอบด้วย RNA ไปยังหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropanol (Merck Millipore, USA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 RPM หรือ 12,000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำ Isopropanol ที่แล้วเติม 75% ethanol (Merck Millipore, USA) เย็น (-20 องศาเซลเซียส) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำ 75% ethanol ที่แล้ววางหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ pellet แห้ง

เติมน้ำ RNase free water (HyClone™, USA) ปริมาตรประมาณ 20 ไมโครลิตร เพื่อละลาย pellet และวัดปริมาณ RNA โดยใช้เครื่อง Nanodrop (ThermoFisher, USA) และเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะถูกนำออกมาใช้ทำการทดลองในขั้นต่อไป

9.4 การสังเคราะห์ cDNA

RNA ที่สกัดได้จากขั้นตอนการสกัด RNA จะถูกเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, USA) โดยผสม master mix ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยประกอบด้วย Oligo (dT)₁₈ Primers ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5X Reaction Buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLock Rnase Inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร RevertAid M-MuLVRT

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม RNA temple และปรับปริมาตรสุทธิให้ได้ 20 ไมโครลิตร ด้วย RNase free water โดยปริมาณ RNA สุทธิควรอยู่ที่ 0.1 นาโนกรัม ถึง 5 ไมโครกรัม แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 70 องศาเซลเซียส 5 นาทีตามลำดับ โดยใช้เครื่อง Applied Biosystems ProFlex PCR (ThermoFisher, USA) เก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาใช้ทำการทดลอง

9.5 การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์ apoptosis และการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค Real-time PCR

cDNA ที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction ด้วยเครื่อง Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR (ThermoFisher, USA) โดยผสม cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) เข้ากับ 2X maxima SYBR Green (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ forward primers และ reverse primers (IDT, USA) ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร แล้วเติม RNase free water ให้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ในหลอด real-time PCR ขนาด 0.1 ไมโครลิตร (Corning, USA) โดยลำดับขั้นอุณหภูมิที่ใช้ตามตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้สำหรับ Real-time PCR

Stage	Temperature (°C)	Time (min)
Pre-denaturation	95	15
Denaturation	95	15 sec
Annealing	ตารางที่ 4	30 sec
Extension	72	30 sec
Melt curve	95	15 sec
	64	1
	95	15

} 40 รอบ

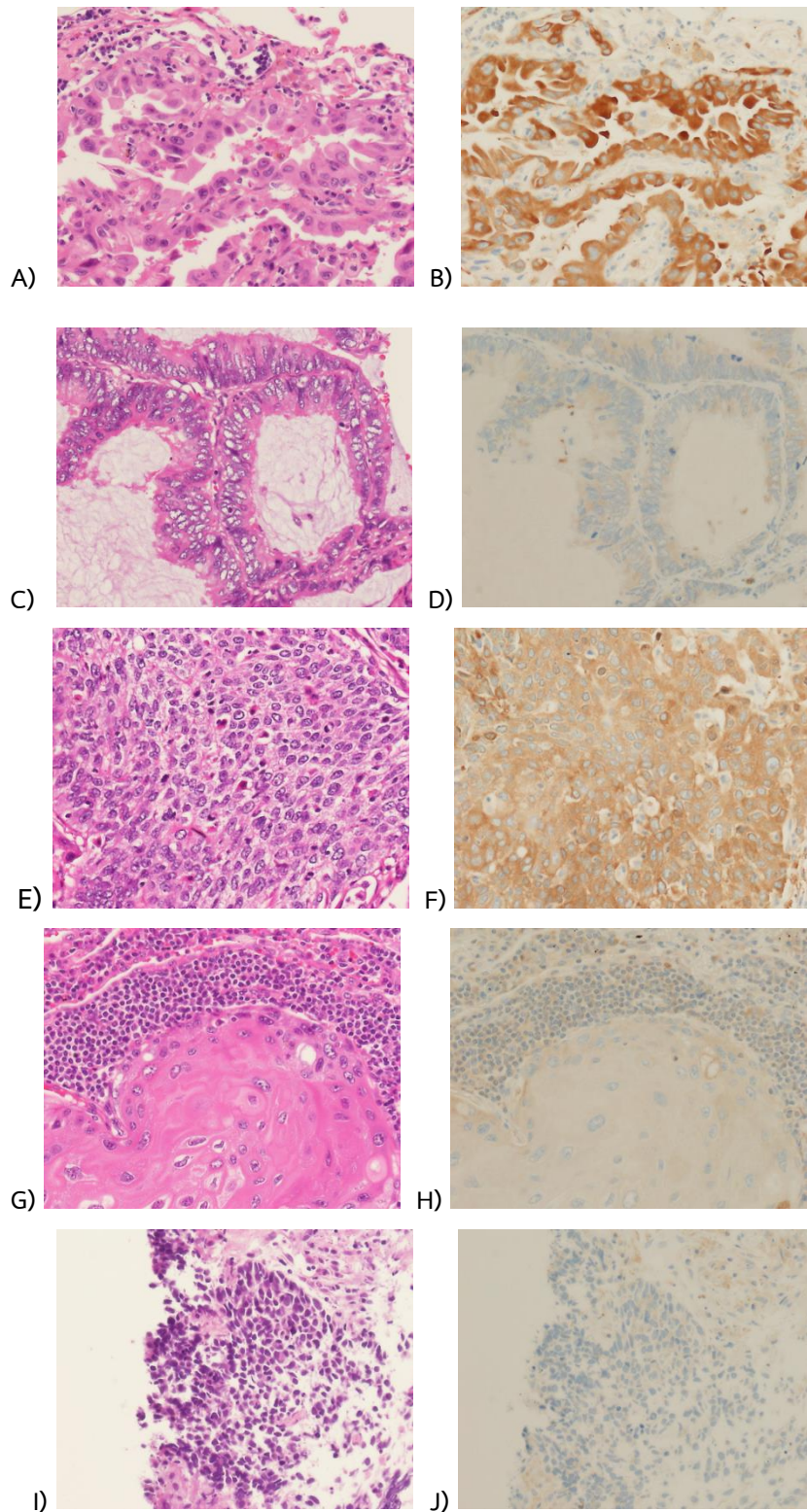
ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์ (Primers) สำหรับ Real-time PCR

Gene	Sequence 5' → 3'	Annealing temp.	PCR Product size (bp)
β-Actin	Forward primer: ACT CTT CCA GCC TTC CTT C	57	171
	Reverse primer: ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC		
G6PD	Forward primer: GTC AAG GTG TTG AAA TGC ATC	57	187
	Reverse primer: CAT CCC ACC TCT CAT TCT CC		
BAX	Forward primer: AAC ATG GAG CTG CAG AGG AT	57	200
	Reverse primer: CAG CCC ATG ATG GTT CTG AT		
Bcl-2	Forward primer: GGT GGG GTC ATG TGT GTG	57	89
	Reverse primer: CGG TTC AGG TAC TCA GTC ATC		
DNMT1	Forward primer: AGG TGA AAA GGC CCT CAT CG	57	290
	Reverse primer: CGG CCT CGT CAT AAC TCT CC		
DNMT3a	Forward primer: TGA TGG AAT CGC TAC AGG GC	57	382
	Reverse primer: CCT CTT GTC ACT AAC GCC CA		

ผลการทดลอง (Results)

1) การย้อมโปรตีน G6PD ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยวิธี immunohistochemistry และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด 64 ราย แบ่งเป็น non small cell จำนวน 44 ราย และ small cell 20 ราย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5, 6 เมื่อศึกษาระดับโปรตีน G6PD ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด พบการย้อมติดสี G6PD (positive stain) เฉพาะในเซลล์มะเร็งเท่านั้น แต่ไม่พบในเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดี G6PD มีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์มะเร็งปอด อีกทั้งพบการย้อมติดสี G6PD ในชิ้นเนื้อชนิด non small cell จำนวน 36 ราย คิดเป็นร้อยละ 81.8 ของตัวอย่างชิ้นเนื้อชนิด non small cell ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชนิด small cell ที่พบเพียง 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 10 ของตัวอย่างชิ้นเนื้อชนิด small cell ($p < 0.001$) (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าระดับโปรตีน G6PD มีความสัมพันธ์กับชนิดของมะเร็งปอดชนิด non small cell



รูปที่ 1 ผลการย้อมชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วย hematoxylin & eosin (คอลัมน์ซ้าย) และ immunohistochemistry ต่อ G6PD (คอลัมน์ขวา) (A, B) adenocarcinoma ที่ย้อมติด G6PD (G6PD positive) (C, D) adenocarcinoma ที่ย้อมไม่ติด G6PD (G6PD negative) (E, F) squamous cell carcinoma ที่ย้อมติด G6PD (G, H) squamous cell carcinoma ที่ย้อมไม่ติด G6PD และ (I, J) small cell ที่ย้อมไม่ติด G6PD

ตารางที่ 5 ระดับของโปรตีน G6PD กับ parameter เชิงปริมาณ

Parameters	Number	G6PD (n)		P-value [#]
		Negative (mean ± SD)	Positive (mean ± SD)	
Age (years)	64	26 (68.69 ± 10.93)	38 (70.05 ± 13.50)	
Non small cell	44	8 (69.13 ± 11.85)	36 (70.31 ± 13.65)	0.822
Small cell	20	18 (68.50 ± 10.85)	2 (65.50 ± 13.435)	0.719
P-value [#]		0.896	0.631	
Size of tumor (cm)	62 [*]	24 (5.83 ± 2.91)	38 (3.90 ± 2.18)	
Non small cell	44	8 (4.39 ± 1.61)	36 (3.91 ± 2.23)	0.607
Small cell	18	16 (6.58 ± 3.17)	2 (3.75 ± 1.77)	0.241
P-value [#]		0.074	0.924	

[#] Independent t-test, * ข้อมูลของคนไข้บางรายไม่ครบถ้วน

ตารางที่ 6 ระดับของโปรตีน G6PD กับ parameter เชิงคุณภาพ

Characteristics	Number	G6PD (n)		P value
		Negative (%)	Positive (%)	
Sex				0.013*
Non small cell				0.259**
Male	24	6 (25.0)	18 (75.0)	
Female	20	2 (10.0)	18 (90.0)	
Small cell				0.368**
Male	16	15 (93.8)	1 (6.3)	
Female	4	3 (75.0)	1 (25.0)	
Lung cancer types				< 0.001*
Non small cell	44	8 (18.2)	36 (81.8)	0.434**
Adenocarcinoma	28	4 (14.3)	24 (85.7)	
Squamous cell	16	4 (25.0)	12 (75.0)	
Small cell	20	18 (90.0)	2 (10.0)	
Stages				0.021*
Non small cell	42 [#]	8 (19.0)	34 (81.0)	0.482**
I – II	27	6 (22.2)	21 (77.8)	
III – IV	15	2 (13.3)	13 (86.7)	
Small cell	20	18 (90.0)	2 (10.0)	0.732**
I – II	1	1 (100.0)	0 (0.0)	
III – IV	19	17 (89.5)	2 (10.5)	

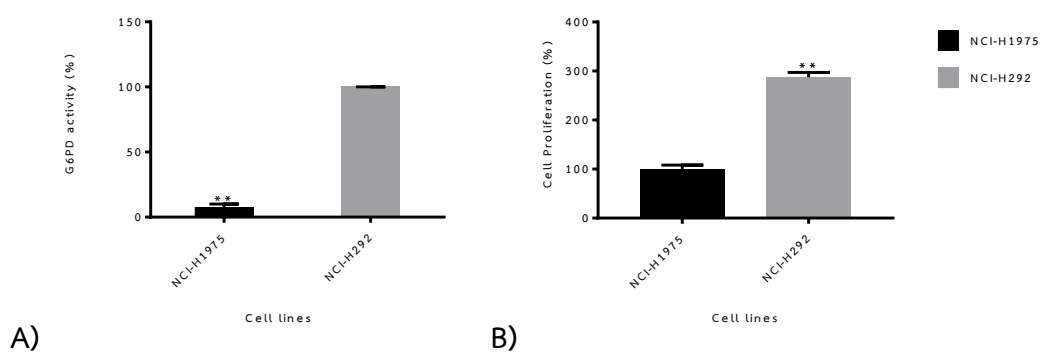
* Chi-square test ระหว่าง negative และ positive โดยไม่แยกชนิดของเซลล์มะเร็งปอด

** Chi-square test ระหว่าง negative และ positive ภายในกลุ่มชนิดของเซลล์มะเร็งปอด

[#] ข้อมูลของคนไข้บางรายไม่ครบถ้วน

2) ระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง

หลังจากที่พบระดับเอนไซม์ G6PD ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็งปอดจากการย้อมขึ้นเนื้อด้วยวิธี immunohistochemistry แล้ว ผู้วิจัยจึงทำการประเมินระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่า NCL-H292 มีระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD มากกว่า NCL-H1975 ร้อยละ 92.5 (รูปที่ 2A) อีกทั้งพบว่าเซลล์ NCL-292 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่า NCL-1975 ร้อยละ 187.64 (รูปที่ 2B) จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า G6PD น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบสมมติฐานในการทดลองต่อไป



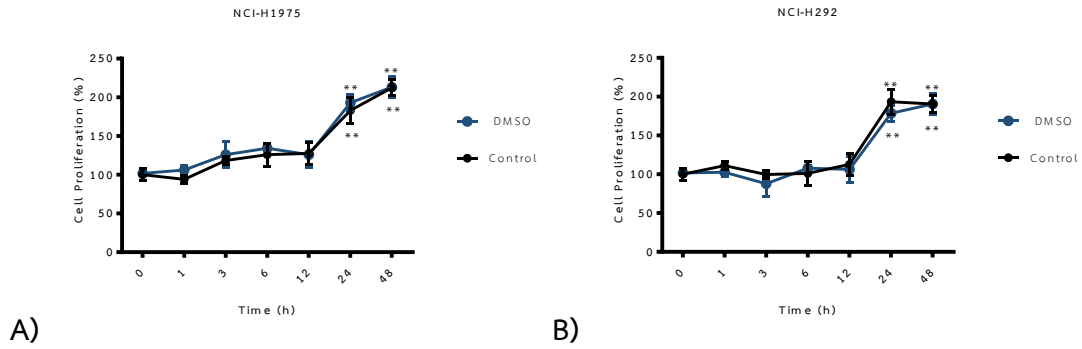
รูปที่ 2 แสดงผลของระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ของ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292 ในสภาวะปกติ (A) และระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292 ในสภาวะปกติ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (mean) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย $**p < 0.01$

3) ผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD

3.1 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย DHEA และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์

เพื่อทดสอบระดับความเข้มข้นของ DMSO (ตัวทำละลายของ DHEA) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาจากอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT assay ผลการทดลองพบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ของ DMSO ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 เป็นตัวทำละลาย DHEA ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 3)

อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-H292 ที่ช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 3) จึงเลือก 2 ช่วงเวลาดังกล่าวมาศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในการทดลองต่อไป

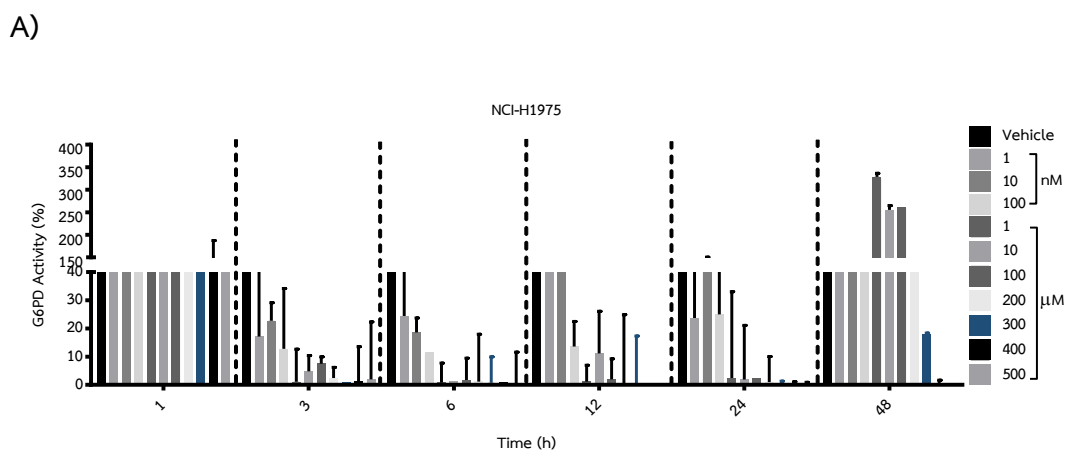


รูปที่ 3 แสดงผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เมื่อเลี้ยงใน DMSO ร้อยละ 0.4 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการเพิ่มจำนวนของเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย $**p < 0.01$

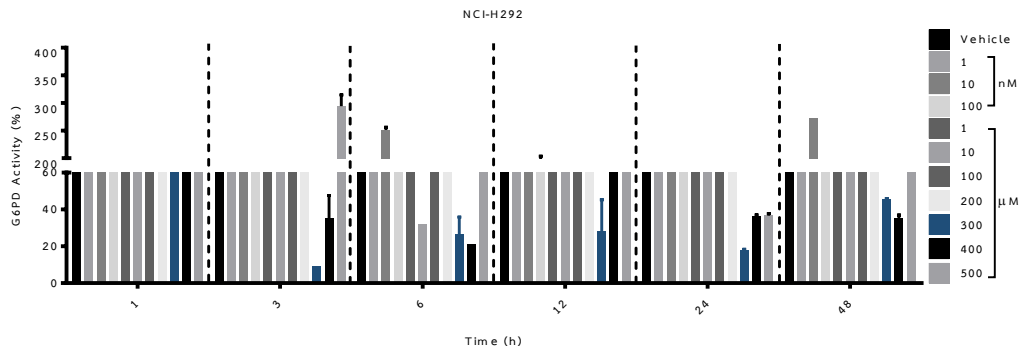
3.2 การยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA

เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DHEA ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดยพิจารณาจากระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD และความเสถียรของการยับยั้ง DHEA ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 นาโนโมลาร์ และ 1, 10, 100, 200, 300, 400, 500 ไมโครโมลาร์ โดยระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ของเซลล์จะถูกวัดที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค spectrophotometry โดยใช้ Microplate reader

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ของ DHEA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือร้อยละ 56.8 และ 76.4 ที่เวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ และลดลงเหลือร้อยละ 39.7 และ 53.5 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4) ในขณะที่พบการตกตะกอนของ DHEA ที่ความเข้มข้น 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ จากสภาวะอิมิตัว จึงไม่นำความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการทดลองต่อไป



B)

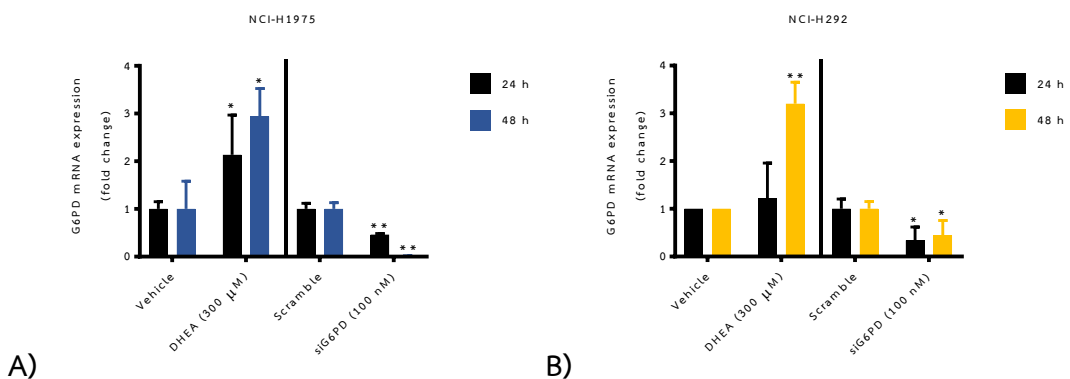


รูปที่ 4 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ siRNA ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน G6PD

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *G6PD* โดยใช้ siRNA โดยระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* ของเซลล์จะถูกวัดที่เวลา 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค RT-qPCR

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า siRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *G6PD* ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือ 0.46 และ 0.33 เท่า และลดลงเหลือ 0.01 และ 0.44 เท่า ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 5) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA โดยพบว่าเซลล์พยายามรักษาสมดุลของระดับเอนไซม์ G6PD ด้วยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *G6PD* โดยพบระดับของ mRNA *G6PD* ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 เพิ่มขึ้น 2.13 และ 1.22 เท่า ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้น 2.93 และ 3.20 เท่า ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 5)

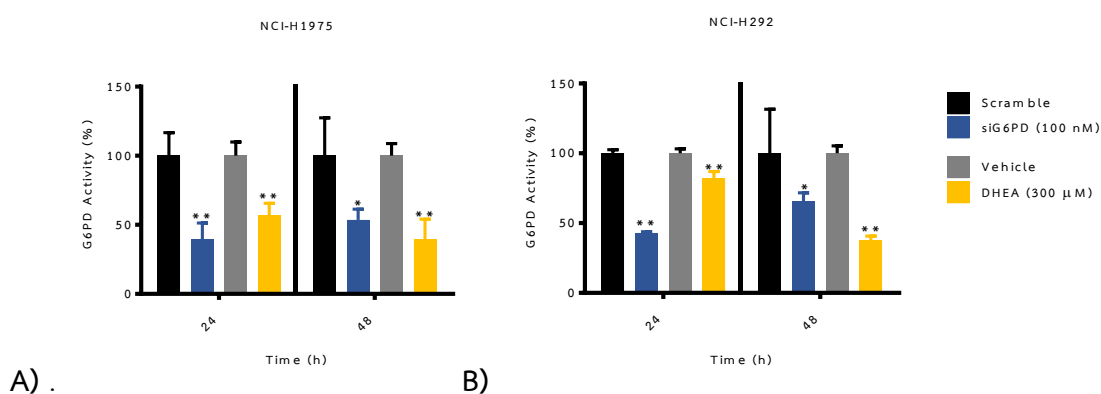


รูปที่ 5 แสดงผลระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ *G6PD* โดย siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงระดับการแสดงออกของยีน (fold change) Mean \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

3.4 การยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดยใช้ DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ และการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน G6PD โดยใช้ siRNA โดยระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ของเซลล์จะถูกรวัดที่เวลา 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค spectrophotometry โดยใช้ Microplate reader

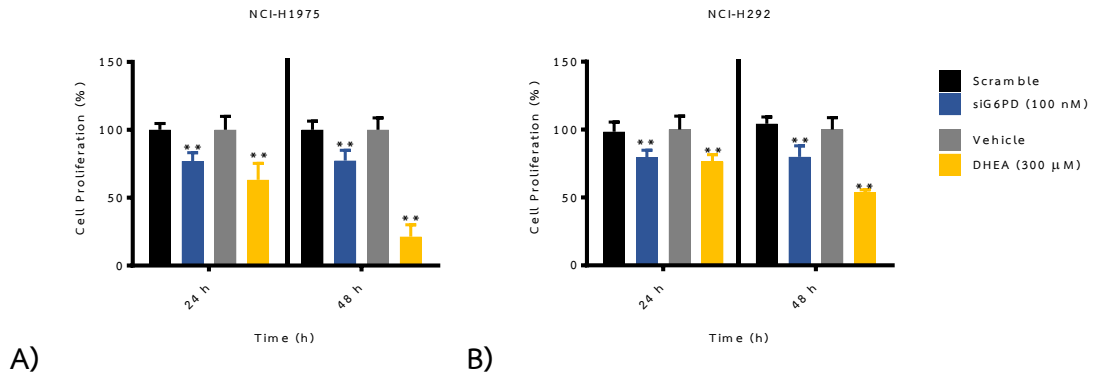
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ของ DHEA สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือร้อยละ 56.8 และ 82.0 ที่เวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ และลดลงเหลือร้อยละ 39.7 และ 37.7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่การลดระดับการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือร้อยละ 39.5 และ 42.9 ที่เวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ และลดลงเหลือร้อยละ 53.5 และ 65.4 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

4) การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดโดย DHEA และ siRNA

ภายหลังจากที่ผู้วิจัยได้ระดับความเข้มข้นของ DHEA, siRNA และช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สามารถลดการทำงานของเอนไซม์ G6PD ได้แล้ว จึงทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อถูกยับยั้ง ด้วย DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ หรือ siRNA โดยวัดระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เวลา 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เครื่อง Microplate reader



รูปที่ 7 แสดงผลระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย $**p < 0.001$

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ของ DHEA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือร้อยละ 63.1 และ 76.5 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และลดลงเหลือ 21.4 และ 53.5 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ siRNA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือร้อยละ 76.9 และ 79.8 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และลดลงเหลือร้อยละ 77.3 และ 79.9 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 7)

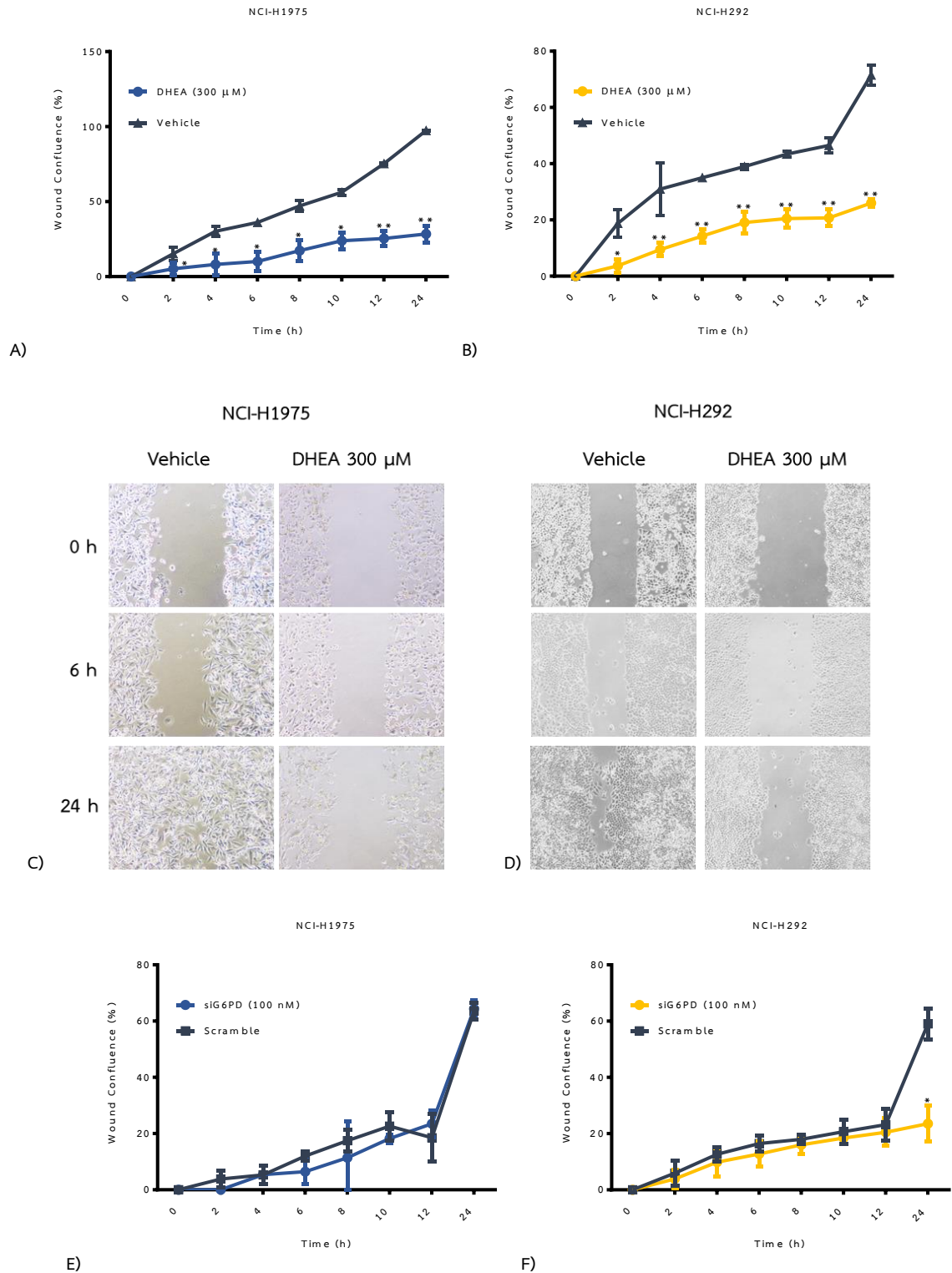
5) ความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และเมื่อลดการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA

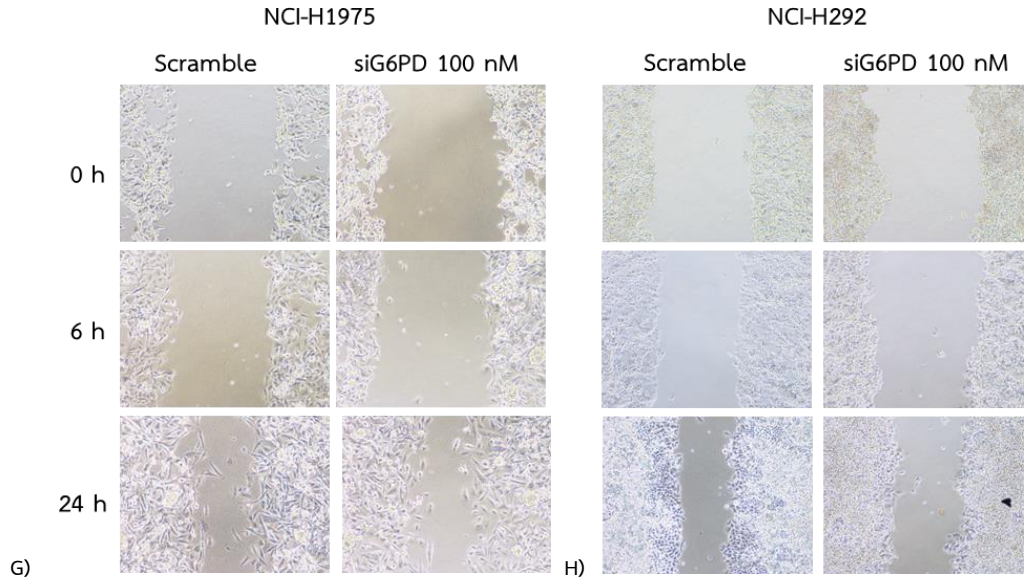
ภายหลังจากทราบว่าการทำงานของเอนไซม์ G6PD มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์แล้ว ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาค้นสมบัติ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง เมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ หรือเมื่อถูกลดระดับการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ ตั้งแต่ช่วงเวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยการวัดอัตราการเข้ามาปิดช่องว่าง (wound confluence) ซึ่งเปรียบเทียบกับช่วงเวลาเริ่มต้น

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA มีอัตราการเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง NCI-H1975 และ NCI-H292 ในกลุ่มที่ถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA มีอัตราการเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างร้อยละ 28.4, 25.9 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle) ที่ 24 ชั่วโมง ที่มีอัตราการเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างร้อยละ 97.4 และ 71.4 ตามลำดับ (รูปที่ 8A-D)

ผลการทดลองพบว่าเซลล์ NCI-H292 ที่ถูกลดระดับการแสดงออกของ G6PD mRNA โดย siRNA มีอัตราการเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมง อัตราการ

เซลล์ที่มาปิดช่องว่างของกลุ่มที่ใส่ siRNA อยู่ที่ร้อยละ 23.54 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (scramble) ที่สามารถเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างได้ร้อยละ 59.0 ในช่วงเวลาเดียวกัน ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างของเซลล์ NCI-H1975 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8E-H)



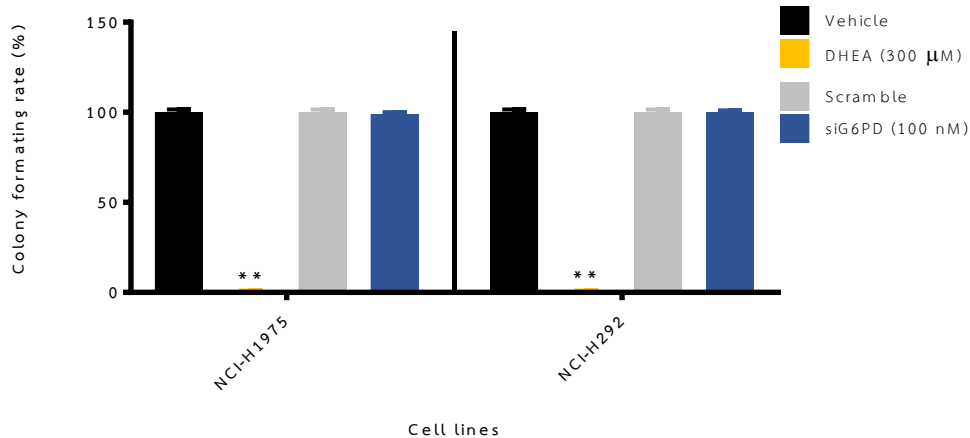


รูปที่ 8 แสดงผลอัตราการเข้ามาปิดช่องว่างของเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA (A-D) หรือยับยั้งการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA (E-H) ใน NCI-H1975 (A, C, E, G) และ NCI-H292 (B, D, F, H) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ข้อมูลแสดงอัตราการเข้ามาปิดช่องว่างของเซลล์ Mean \pm SD โดย $**p < 0.001$

6) ความสามารถในการสร้างโคโลนี (colony formation)

ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่สำคัญอีกหนึ่งอย่างคือ colony formation ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ NCI-H292 และ NCI-H1975 ต่อ colony formation เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของ G6PD โดย DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 200 เซลล์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏภายหลังจากการย้อมด้วย 6.0% glutaraldehyde และ 0.5% crystal violet และทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์สามารถลดการสร้างโคโลนีลงได้มากกว่าร้อยละ 99 ทั้งใน NCI-H1975 และ NCI-H292 ในขณะที่การลดการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมทั้งใน NCI-H1975 และ NCI-H292 (**รูปที่ 9**)

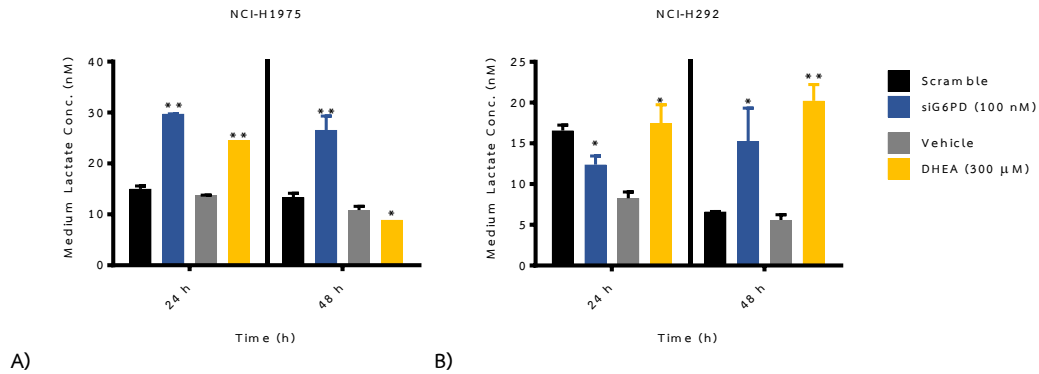


รูปที่ 9 แสดงผลอัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงอัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์ Mean ± SD โดย ** $p < 0.001$

7) ระดับของ lactate

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า DHEA และ siRNA G6PD มีผลต่อ cancer progression ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อว่า การลดการทำงานของเอนไซม์ G6PD มีผลต่อ Warburg effect ของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงหรือไม่ จึงทำการวัดระดับ lactate ใน media เซลล์หลั่งออกมาจากเซลล์ ซึ่ง lactate เป็นผลผลิตที่ได้มาจากการเปลี่ยนจาก pyruvate เป็น lactate ด้วยอาศัยเอนไซม์ lactate dehydrogenase โดยปกติกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นได้มากในเซลล์มะเร็งเป็นผลมาจาก Warburg effect เพื่อผลิต ATP ให้แก่เซลล์ ดังนั้นการวัดระดับ lactate ที่เกิดขึ้นสามารถทำนายระดับ Warburg effect ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์มะเร็งได้

เพื่อวัดระดับ lactate ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ หรือลดการแสดงออกของ G6PD ด้วย siRNA เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า NCI-H1975 ที่ถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA มีระดับ lactate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (24.4 นาโนโมลาร์) มากกว่ากลุ่มควบคุม (13.6 นาโนโมลาร์) ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง แต่ลดลง (8.9 นาโนโมลาร์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (10.8 นาโนโมลาร์) ที่ช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่ NCI-H292 มีการเพิ่มขึ้นของ lactate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง (17.4 นาโนโมลาร์) และ 48 ชั่วโมง (20.2 นาโนโมลาร์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle) ในช่วงเวลาเดียวกัน (8.25 นาโนโมลาร์ที่ 24 ชั่วโมง และ 5.6 นาโนโมลาร์ ที่ 48 ชั่วโมง) (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงผลระดับ lactate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงระดับ lactate (nM) mean \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

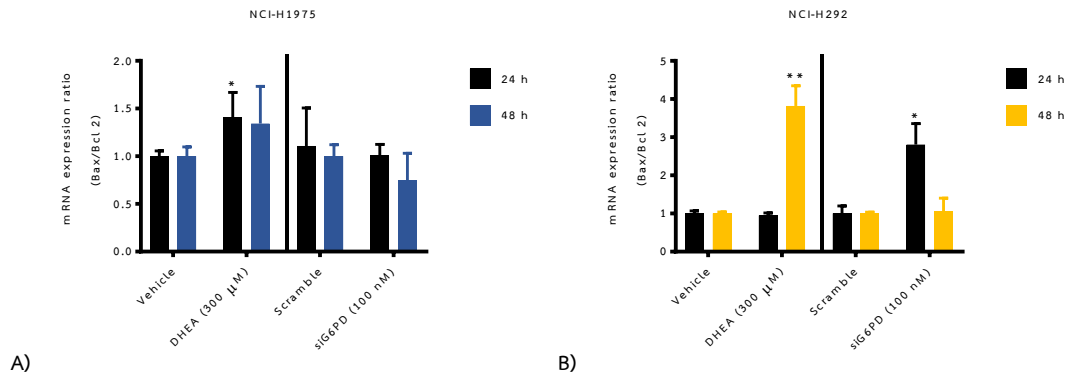
8) ระดับการแสดงออกของยีน

จากการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA และ siRNA G6PD พบว่าการยับยั้งเอนไซม์ G6PD สามารถควบคุม cancer progression ทั้งการลดจำนวนของเซลล์มะเร็ง การลด colony formation, การลด migration ของเซลล์ อีกทั้งกระทบต่อ Warburg effect ของเซลล์มะเร็ง ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อในระดับโมเลกุล เพื่อทำการศึกษว่าการยับยั้งเอนไซม์ G6PD มีผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์อย่างไรบ้าง เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ การตายของเซลล์ และเอนไซม์ที่ควบคุม DNA methylation เป็นต้น โดยทำการวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

6.1 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis

Bax และ Bcl2 เป็นโปรตีนที่ควบคุมการเกิด apoptosis โดย Bax เป็นยีนที่กระตุ้นการเกิด apoptosis และ Bcl2 เป็นยีนที่ยับยั้งการเกิด apoptosis ดังนั้นการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จึงอาจทำนาย apoptosis ของเซลล์มะเร็งรอดเมื่อเอนไซม์ G6PD ถูกยับยั้ง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ G6PD ด้วย siRNA G6PD ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 ตามลำดับ สัดส่วนการแสดงออกของ mRNA Bax และ Bcl 2 เท่ากับ 1.0 และ 2.8 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 0.7, 1.0 เท่า ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 พบว่าสัดส่วนการแสดงออกของ mRNA Bax และ Bcl 2 เท่ากับ 1.4 และ 0.9 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้น 1.3 และ 3.8 เท่า ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 11)



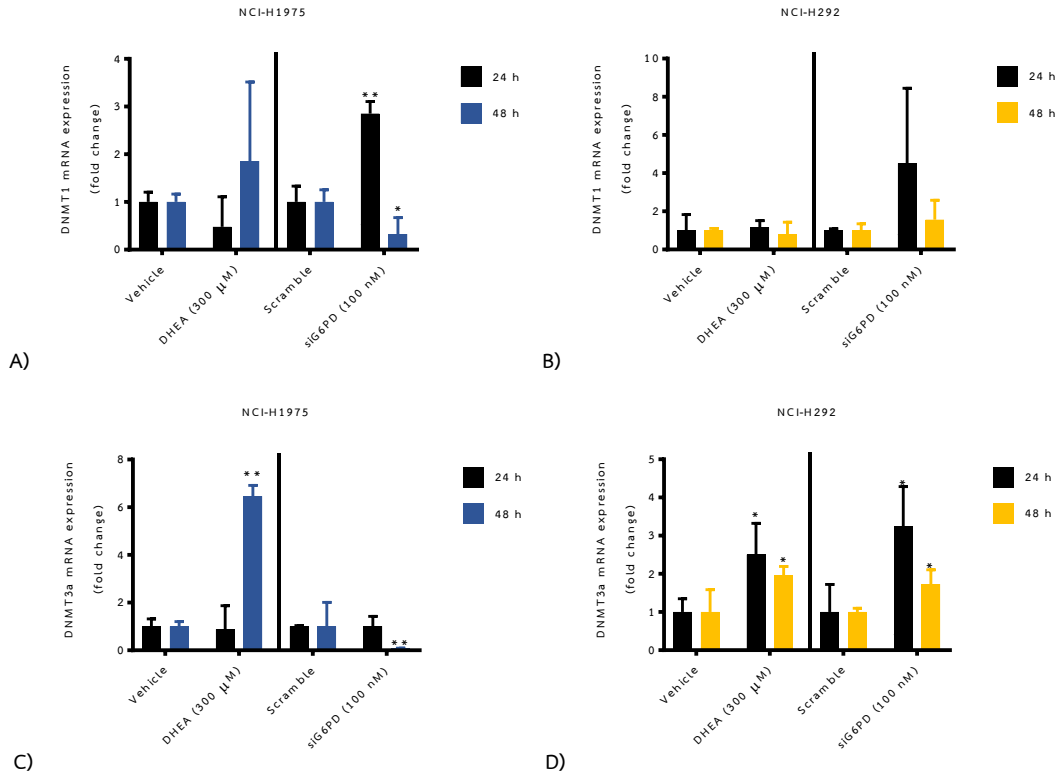
รูปที่ 11 แสดงผลระดับการแสดงออกของยีน Bax/Bcl2 เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงระดับการแสดงออกของยีน (fold change) \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

6.2 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ DNA methylation

โปรตีน DNMT1 และ DNMT3a เป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ควบคุม DNA methylation โดย DNMT1 เป็นเอนไซม์ที่รักษาระดับ DNA methylation ของ DNA สายใหม่ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ DNA replication ในขณะที่ DNMT3a เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการเกิด DNA methylation ในตำแหน่งใหม่ (*de novo*) บนสาย DNA ดังนั้นการแสดงออกของยีนเหล่านี้จึงอาจใช้ทำนายการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อเอนไซม์ G6PD ถูกยับยั้ง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อลดการแสดงออกของ G6PD ด้วย siRNA G6PD ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 ระดับ mRNA DNMT1 เพิ่มขึ้นเป็น 2.8 และ 4.5 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเป็น 0.3, 1.5 เท่า ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 พบว่าระดับ mRNA DNMT1 ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.5 และ 1.1 เท่า ในขณะที่ 48 ชั่วโมง มีแสดงออกเป็น 1.8 และ 0.8 เท่า ตามลำดับ (**รูปที่ 12**)

เมื่อลดการแสดงออกของ G6PD ด้วย siRNA G6PD ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 พบระดับ mRNA DNMT3a เท่ากับ 1.0 และ 3.2 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 0.1, 1.7 เท่า ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 พบว่าการแสดงออกของ mRNA DNMT3a ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกเป็น 0.9 และ 2.5 เท่า ในขณะที่ 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกเป็น 1.0 และ 1.9 เท่า ตามลำดับ (**รูปที่ 12**)



รูปที่ 12 แสดงผลระดับการแสดงออกของยีน DNMT1 และ DNMT3a เมื่อการทำงานเอนไซม์ G6PD โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ใน NCI-H1975 (A, C) และ NCI-H292 (B, D) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงระดับการแสดงออกของยีน (fold change) \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

ปัจจุบันพบว่า G6PD มีความสัมพันธ์และสำคัญต่อมะเร็งหลายชนิด แต่ก็ยังไม่มีที่ยืนยันถึงความสัมพันธ์และบทบาทหน้าที่ของ G6PD ในมะเร็งปอด จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อแสดงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอด โดยผลจากการศึกษาพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด 64 ราย พบการย้อมติดสีของ G6PD (positive staining) ได้เฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์มะเร็งเท่านั้น ส่วนเซลล์ข้างเคียงจากชิ้นเนื้อเดียวกันที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งนั้นไม่พบการย้อมติดสีของ G6PD แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเอนไซม์ G6PD มีความสัมพันธ์กับมะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงถึงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในเซลล์มะเร็งปอดของผู้ป่วย โดยที่ระดับการแสดงออกมีความสำคัญต่อชนิดของเซลล์มะเร็งปอดร่วมด้วย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งปอด พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในวัยสูงอายุ ทั้งกลุ่มที่ย้อมติดและไม่ติด G6PD และกลุ่ม non small cell และ small cell ซึ่งจากข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ⁽¹⁾ พบว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดมักพบอยู่ในกลุ่มอายุประมาณ 60 ถึง 65 ปี เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าผู้สูงอายุมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปอดมากกว่ากลุ่มที่อายุน้อยกว่า อีกทั้งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างที่เลือกมานั้นมีความใกล้เคียงประชากรผู้ป่วยมะเร็งปอดในภาพรวม นอกจากนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ขนาดของมะเร็ง ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มที่ย้อมติดและไม่ติด G6PD และกลุ่ม non small cell และ small cell แต่ผู้วิจัยพบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด non small cell จำนวน 44 ราย สามารถย้อมติด G6PD ถึงร้อยละ 81.8 ขณะที่ชนิด small cell จำนวน 20 ราย พบเพียงร้อยละ 10.0 แสดงให้เห็นว่าระดับของเอนไซม์ G6PD มีความสัมพันธ์กับมะเร็งปอดชนิด non small cell อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งเป็นการค้นพบใหม่ที่พบว่าระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD มีความสัมพันธ์กับ subtype ของเซลล์มะเร็ง สะท้อนให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งมีความต้องการเอนไซม์ G6PD ไม่เท่ากันแม้ว่าจะเป็นเซลล์มะเร็งปอดเหมือนกันก็ตาม นอกจากนี้การค้นพบนี้จะเป็นประโยชน์ในการวิจัยพื้นฐานแล้ว ยังอาจเป็นประโยชน์ในการประยุกต์นำการย้อม G6PD ไปใช้เป็น biomarker ร่วมกับ biomarker อื่นๆ ในการวิเคราะห์ชนิดของ non small cell lung cancer cells (NSCLC) ได้อีกด้วย

จากการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดต่างๆ โดยอาศัยข้อมูล cDNA microarray ใน GEO dataset ของ NCBI ด้วยการใช้โปรแกรม CU-DREAM ผู้วิจัยพบว่าเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งตับมีระดับของเอนไซม์ G6PD เพิ่มขึ้นกว่าเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง (melanoma)⁽¹⁰⁾ เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer tissue)⁽¹¹⁾ มะเร็งเต้านม (primary breast carcinoma)⁽¹²⁾ และเนื้องอกปอด (lung tumor)⁽¹³⁾ ที่พบว่าระดับของเอนไซม์ G6PD จะเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเอนไซม์ G6PD น่าจะมีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด เพื่อทดสอบบทบาทของเอนไซม์ G6PD ต่อ cancer progression ในเซลล์มะเร็งปอด ผู้วิจัยจึงใช้เซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ได้แก่ NCI-H1975 และ NCI-H292 เป็นตัวแทนในการทดสอบต่อไป

ในการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 พบว่า NCI-H292 มีระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD และอัตราการเพิ่มจำนวนมากกว่า NCI-H1975 ถึงร้อยละ 92.5 และ 65.2 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า G6PD มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ด้วยสาเหตุประการหนึ่งเป็นเพราะเอนไซม์ G6PD มีส่วนช่วยในการสร้างสารตัวกลางที่สำคัญสำหรับการแบ่งตัวของเซลล์ เช่น NADPH และ ribose 5-phosphate ที่ใช้ในการสร้างกรดไขมัน และ nucleotide ตามลำดับ อีกทั้ง NADPH ช่วยลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงทำให้ลด oxidative stress ที่เป็นพิษต่อเซลล์อีกประการหนึ่ง จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอด โดยเฉพาะ NSCLC ชนิด NCI-H292 มีความต้องการเอนไซม์ G6PD อย่างมาก ดังนั้นหากเซลล์มะเร็งปอดตกอยู่ในภาวะที่ขาดเอนไซม์ G6PD ย่อมมีผลต่อการเจริญเติบโต ผู้วิจัยจึงได้ทำการยับยั้งเอนไซม์ G6PD ทั้งระดับการทำงานของเอนไซม์ผ่านการใช้ G6PD inhibitor หรือ DHEA และระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* ผ่านทาง siRNA ต่อ mRNA ของ G6PD และติดตาม cancer progression ในเซลล์ทั้งสองชนิด

จากผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA พบว่า DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์สามารถลดระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ของทั้งสองเซลล์มะเร็งได้ทั้งช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อีกทั้งให้ผลดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นสูงๆ เช่น 400-500 ไมโครโมลาร์ DHEA เกิดการอิมิตัวและตกตะกอน ทำให้ได้ผลการทดสอบที่อาจไม่สะท้อนคุณสมบัติของ DHEA อย่างแท้จริง นอกจากนี้พบว่า DHEA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ กลับเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะยีน G6PD มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการใส่ DHEA ดังจะเห็นได้จากผลการทดสอบการแสดงออกของยีน G6PD ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าเป็นสถานะที่เซลล์พยายามตอบสนองต่อ DHEA หรือตัวยับยั้งแบบ non-competitive inhibitor ด้วยการเร่งสร้างเอนไซม์ G6PD ใหม่เพื่อทดแทนส่วนที่ถูกยับยั้งไป ดังนั้นหากเซลล์มีการแสดงออกของ G6PD มากพอเมื่อเทียบกับระดับ DHEA แล้วเซลล์ก็อาจจะสามารถปรับสภาพภายในเซลล์ให้เหมือนเดิมได้ แต่หากใช้ DHEA ให้มากเกินไป เกินกว่าที่เซลล์จะสร้างเอนไซม์ G6PD ได้พอเพียงก็สามารถลดระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ได้ ดังผลการทดสอบของ DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์

เมื่อได้ความเข้มข้นของ DHEA ที่เหมาะสมแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของ DHEA ต่อการยับยั้ง cancer progression ของเซลล์ทั้งสองชนิดผ่านการติดตามการเพิ่มจำนวนของเซลล์ migration และ colony formation โดยพบว่า DHEA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ migration และ colony formation ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า DHEA สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (human cervical cancer cell lines; HeLa, SiHa) (103) และเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast cancer cell lines; MDA-MB-231, MCF-7, Hs578T)^(14, 15)

การ migration ของเซลล์มะเร็งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นในร่างกาย และนำไปสู่การรักษาที่ยากยิ่งขึ้น เพราะจำเป็นต้องใช้การรักษาด้วยเคมีบำบัดเข้ารวมกับการรักษา รวมไปถึงโอกาสในการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง ดังนั้นการลดความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งจึงเป็นอีกหนึ่งเป้าหมายในการควบคุมการแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็ง จากผลการทดสอบโดยใช้ DHEA พบว่าสามารถลดระดับการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดได้ทั้ง NCI-H1975 และ NCI-H292 ทั้งนี้การยับยั้ง cell migration ของมะเร็งปอดโดยใช้ DHEA อาจไม่ได้มีสาเหตุมาจากการที่ DHEA ไปยับยั้งการทำงานของ G6PD แล้วส่งผลต่อ cell migration แต่อาจเป็นผลโดยตรงของ DHEA เองที่ไปยับยั้ง cell migration ได้โดยไม่ต้องอาศัย G6PD เป็นสื่อกลาง ดังผลการทดสอบก่อนหน้านี้ที่พบว่า DHEA สามารถยับยั้งการ migration ของเซลล์มะเร็งเต้านม^(15, 22) มะเร็งปากมดลูก⁽²³⁾ และ vascular smooth muscle cells ได้ โดย DHEA ไปยับยั้งการยึดเกาะกับ fibronectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของเซลล์⁽²⁴⁾ การศึกษาวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปบทบาทของ G6PD ต่อการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม แต่อย่างไรก็ตาม ทำให้ทราบว่า DHEA สามารถยับยั้ง cell migration ของมะเร็งปอดได้

การวัดความสามารถด้าน colony formation นั้นเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาเพื่อวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เริ่มต้นจากเซลล์ 1 เซลล์และพัฒนาไปเป็น colony จากผลการทดสอบด้วย DHEA ที่สามารถลดการสร้าง colony ของเซลล์มะเร็งปอดลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ($p < 0.01$) แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด

ขณะที่การลดระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* ผ่านทาง siRNA ซึ่งเป็นการยับยั้งที่ขึ้นตอนก่อนที่ mRNA จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD และระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้ง NCI-H1975 และ NCI-H292 และทั้งสองช่วงเวลา เมื่อ siRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *G6PD* ได้ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบ cancer progression ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 โดยพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *G6PD* ผ่าน siRNA สามารถลดการเพิ่มจำนวนของ NCI-H292 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า siRNA, shRNA ต่อ mRNA *G6PD* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)⁽²⁵⁾ และเซลล์มะเร็งเต้านมได้⁽¹⁴⁾ แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่า siRNA ต่อ mRNA *G6PD* ไม่สามารถลด migration ของเซลล์ NCI-H1975 ได้ ในขณะที่ผู้วิจัยไม่สามารถทดสอบ colony formation กับ siRNA ได้ เนื่องจากวิธี colony formation นั้นต้องใช้เวลาในการทดสอบ 7 วัน แต่ siRNA เป็นระบบการยับยั้งการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient translation inhibition) หรือก่อนที่เซลล์จะแบ่งตัวรอบต่อไป ดังนั้นเมื่อต้องเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน siRNA ที่ใส่เข้าไปในเซลล์ไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนตามเซลล์ที่แบ่งได้ จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ตามต้องการได้ หรืออาจจะต้องใส่ siRNA เพิ่มอยู่ตลอดระยะเวลาของการศึกษา colony formation เพื่อยืนยันผลของ siRNA อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พยายามใช้ shRNA เพื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *G6PD* อย่างถาวร (permanent translation inhibition) ในเซลล์มะเร็งปอดทั้งสองชนิด เพื่อทดสอบบทบาทของ *G6PD* ต่อการอยู่รอดของมะเร็งปอดแล้ว พบว่าเซลล์มะเร็งปอดมีอัตราการรอดชีวิตต่ำมาก จนไม่สามารถนำมาทำการศึกษาใดๆ ต่อได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *G6PD* บทบาทสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด

หากเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *G6PD* และ cancer progression โดยใช้ DHEA และ siRNA แล้วพบว่า DHEA จะให้ผลดีในระยะยาว ขณะที่ siRNA จะให้ผลดีในระยะสั้นๆ และไม่เสถียรเท่ากับ DHEA อีกทั้ง siRNA ไม่สามารถลด cell migration ของ NCI-H1975 ได้ รวมทั้งไม่ให้ผลต่อการศึกษา colony formation เนื่องด้วย siRNA ไม่เสถียรเท่ากับ DHEA

จากการศึกษาก่อนหน้าในเซลล์มะเร็งตับ (human hepatocellular carcinoma; HepG2) พบว่าการลดการแสดงออกของยีน *G6PD* โดยใช้ shRNA ทำให้ระดับความเครียดของเซลล์ (oxidative stress) เพิ่มขึ้นนำไปสู่การยับยั้งการทำงานของ mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) ซึ่ง

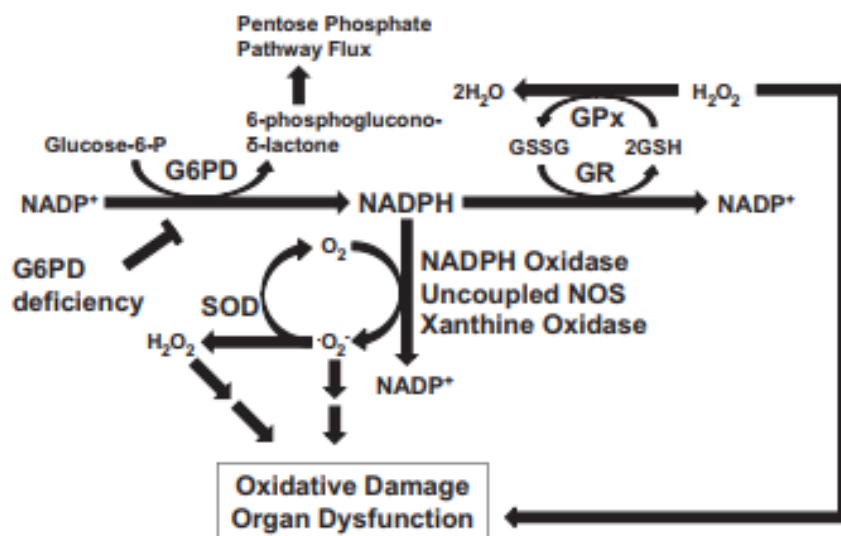
เป็นโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signalling) สำหรับการควบคุมการเพิ่มจำนวนและพัฒนาการของเซลล์⁽²⁶⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้ง MKP-1 ไปมีผลต่อ cell viability ของเซลล์ไลน์มะเร็งผิวหนัง (human melanoma cell line; A375)⁽¹⁰⁾ ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้ประกอบด้วยงานวิจัยที่กล่าวมา ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ลดลงนั้นอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากระดับ ROS ภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จากสาเหตุระดับเอนไซม์ G6PD ที่ลดลง⁽⁷⁾ ทำให้ NADPH และระบบ anti-oxidant ภายในเซลล์เสียสมดุล ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการส่งสัญญาณเพื่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในที่สุด (รูปที่ 13)

จากที่กล่าวมาข้างต้น ภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นได้สร้างความเสียหายต่อ macromolecule ต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น วัฏจักรของเซลล์ DNA methylation และการตายของเซลล์ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องเช่น Bax, Bcl 2, DNMT1 และ DNMT3a

การเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation ที่ก่อให้เกิด genomic instability ก็มีสาเหตุมาจาก ROS ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ จากการศึกษาในระดับ global DNA methylation ในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิดพบว่าเซลล์มะเร็งมักมีระดับ DNA methylation ลดต่ำลง (hypomethylation) และมักพบการกลายพันธุ์ของยีน *DNMT3a* ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ DNMT3a ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการเติมหมู่เมทิลให้แก่ DNA ในตำแหน่งใหม่ (de novo methyltransferase) การสูญเสียการทำงานของ DNMT3a นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้องอก (tumorigenesis)⁽²⁷⁾ จากการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA และ siRNA ใน NCI-H292 และ NCI-H1975 พบการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของ DNMT3a ซึ่งอาจนำไปสู่การเพิ่มระดับ global DNA methylation ของเซลล์มะเร็งปอด หรือ hypermethylation ในขณะที่ DNMT1 นั้นมีหน้าที่ในการควบคุมการรักษาระดับ DNA methylation ภายในเซลล์เมื่อเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ จากการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่พบระดับการแสดงออกของ DNMT1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น NCI-H1975 ที่ใช้ siRNA แสดงให้เห็นว่าโดยรวมแล้วระดับการแสดงออกของ DNMT1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ G6PD มะเร็งปอด

จากที่กล่าวไปข้างต้น หากเซลล์มีความเสียหายอย่างรุนแรง เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้วัดระดับการแสดงออกของยีน *Bax/Bcl-2* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis โดยพบว่าอัตราส่วนของการแสดงออกของ *Bax* ต่อ *Bcl-2* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อมีการยับยั้งเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA และ siRNA ใน NCI-H292 และ NCI-H1975 แสดงให้เห็นถึงโอกาสที่เซลล์จะเกิด apoptosis ขึ้น ทั้งนี้เซลล์ NCI-H1975 สามารถตอบสนองต่อการใช้ DHEA ได้ดีกว่า NCI-292 ที่จะตอบสนองต่อ siRNA ได้มากกว่า อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้วัดระดับ ROS ที่แท้จริงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

ภายหลังการใส่ DHEA หรือ siRNA ผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องจึงใช้เป็นส่วนหนึ่งในการคาดการณ์ถึง การส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดขึ้น



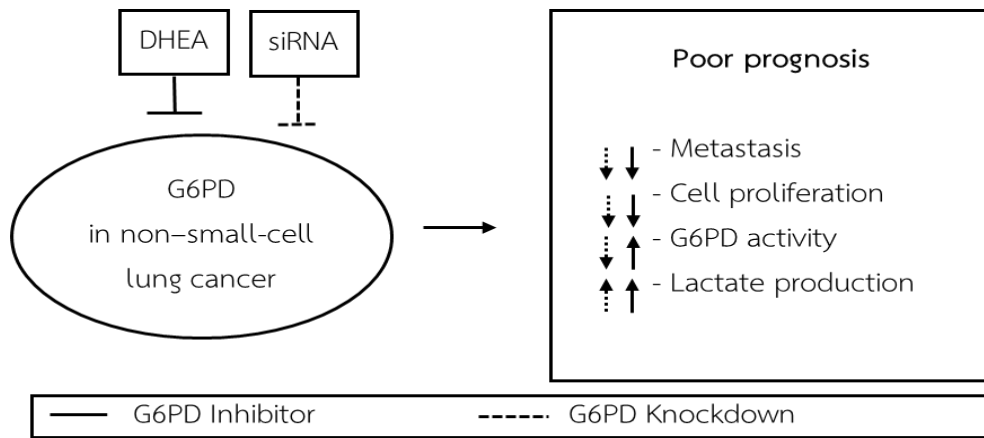
รูปที่ 13 G6PD กับการรักษาสมดุลของระดับ ROS ภายในเซลล์⁽²⁸⁾

การยับยั้งเอนไซม์ G6PD ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการสร้าง lactate เนื่องจาก glucose 6-phosphate ที่เกิดขึ้นไม่สามารถเข้าสู่วิถี PPP ได้ จึงถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate และ lactate มากขึ้นตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอดมีความพยายามที่จะปรับวิถี metabolism ให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ โดยปกติในเซลล์มะเร็ง lactate มีส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณให้เกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) รวมไปถึง กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression)⁽²⁹⁻³²⁾ จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสถานะที่เป็นกรด สามารถยับยั้ง proliferation ของ T-cell และการสร้าง cytokine ของ human cytotoxic T lymphocytes ลงถึงร้อยละ 95⁽²⁹⁾ นอกจากนี้สภาวะ acidic microenvironment ที่เกิดขึ้นรอบๆ เซลล์มะเร็งยังสามารถกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวด (pain) และ metastasis ของมะเร็งในผู้ป่วยโรคมะเร็งบางชนิดอีกด้วย⁽³²⁾ การศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งปอกมดลูกจากผู้ป่วยจำนวน 34 คน พบว่าระดับ lactate มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastatic spread) โดยผู้ป่วยที่มีการแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็งมีระดับ lactate ที่สูงกว่า ($10.0 \pm 2.9 \mu\text{mol/g}$; $n=20$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการแพร่กระจายตัวของมะเร็ง ($6.3 \pm 2.8 \mu\text{mol/g}$; $n=14$) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ lactate กับอัตราการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) และอัตราการรอดชีวิตที่ปลอดจากโรค (disease free survival) ของผู้ป่วยมะเร็ง พบว่ากลุ่มที่มีระดับ lactate ต่ำมีอัตราการรอดชีวิตโดยรวมและอัตราการรอดชีวิตที่ปลอดจากโรครสูงกว่ากลุ่มที่มีระดับ

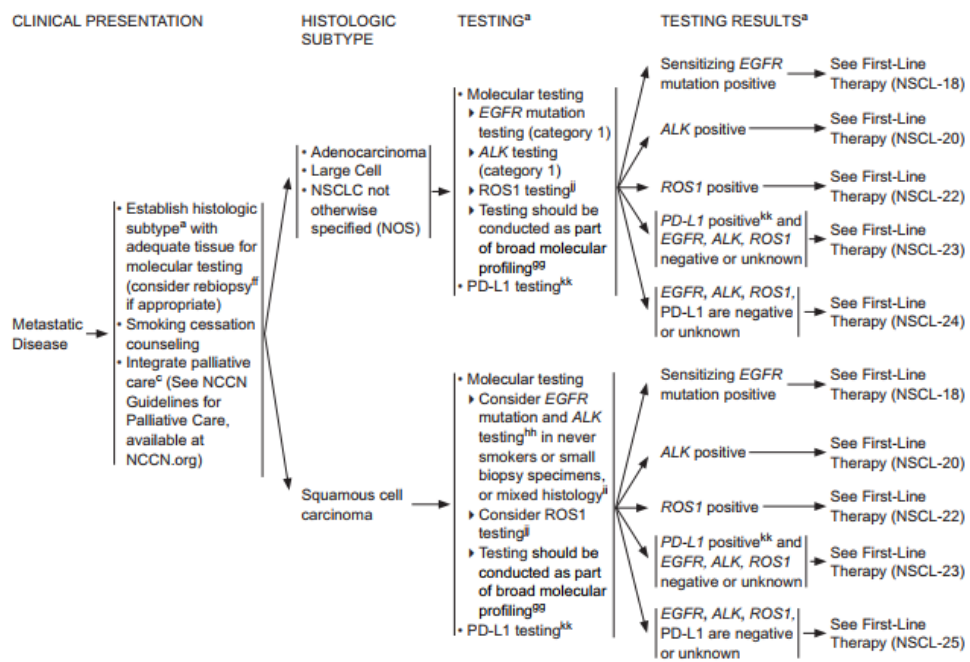
lactate สูง ($p=0.015$ และ 0.014 ตามลำดับ) (109) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า lactate มีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและหลบหนีระบบภูมิคุ้มกัน แต่ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของ lactate ที่มากเกินไปแม้จะทำให้เซลล์มะเร็งตาย แต่อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติได้เช่นกัน

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD และการลดการแสดงออกของ G6PD mRNA นั้นอาจให้ผลที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้ เนื่องจาก NCI-H1975 มีระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD เพียงร้อยละ 7.5 เมื่อเปรียบเทียบกับ NCI-H292 ซึ่งมากกว่าถึงร้อยละ 92.5 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 นั้นอาจไม่ได้ขึ้นอยู่กับ G6PD (G6PD independent) เพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า เมื่อยับยั้งเอนไซม์ G6PD การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 ก็ถูกยับยั้งไปด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็น G6PD ยังคงมีบทบาทที่สำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC โดยพบการแสดงออกของ G6PD เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิด NSCLC ของผู้ป่วย ซึ่งยืนยันผลการศึกษาว่า G6PD อาจมีความสำคัญกับการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ซึ่งสอดคล้องไปกับการทดลอง *in vitro* ซึ่งศึกษาใน NCI-H1975 และ NCI-H292 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิด NSCLC โดยทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดยใช้ DHEA และลดระดับการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน การ migration และ colony formation ได้ (รูปที่ 14) ดังนั้น G6PD จึงอาจเป็น targeted therapy ของการรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC ได้ โดยในปี 2017 Clinical Practice Guidelines in Oncology ได้อธิบายแนวทางการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอด⁽³³⁾ (รูปที่ 15) ว่าการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์มะเร็งนั้นมีความสำคัญต่อการเลือกใช้ยารักษาผู้ป่วย เช่น deletion ของยีน Epidermal growth factor receptor (EGFR) ที่ exon 19 และ exon 21 โดยพบได้ร้อยละ 45 และร้อยละ 40 ของผู้ป่วย NSCLC ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ตามลำดับ โดยการกลายพันธุ์ของ *EGFR* ส่งผลต่อการทำงานของ tyrosine kinase ที่มากผิดปกติ ซึ่งผู้ป่วยจะตอบสนองต่อยาในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของ tyrosine kinase (tyrosine kinase inhibitor; TKIs) ได้ดี เช่น gefitinib และ afatinib เป็นต้น⁽³⁴⁾ ส่วนการ fusion ของยีน echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) และ anaplastic lymphoma kinase (ALK) พบได้ร้อยละ 2 – 7 ของผู้ป่วย NSCLC โดยตรวจได้ด้วยเทคนิค *in situ* hybridization (FISH) ซึ่งผู้ป่วยในกลุ่มนี้จะตอบสนองไม่ดีต่อยากลุ่ม EGFR TKIs แต่มีลักษณะทางคลินิก (clinical characteristics) คล้ายกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเพื่อนำมารักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ไม่ตอบสนองต่อยาที่มีอยู่ในปัจจุบันได้ หรือ G6PD อาจมีบทบาทในการใช้เป็น biomarker สำหรับการแยกมะเร็งปอดชนิด non-small cell และ small cell อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ G6PD กับชนิดของมะเร็งปอดที่พบในการศึกษานี้ยัง

อาจนำไปสู่การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ G6PD ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งชนิดอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 14 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการลดระดับการแสดงออกของ G6PD ต่อเซลล์มะเร็งปอด



รูปที่ 15 แนวทางการคัดกรองและรักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปอด⁽³³⁾

สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

เซลล์มะเร็งปอดมีระดับการแสดงของโปรตีน G6PD สูงเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยเฉพาะชนิด NSCLC อีกทั้งเอนไซม์ G6PD มีบทบาทอย่างมากต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC โดยเฉพาะการเจริญเติบโต ซึ่ง G6PD น่าจะเป็นโมเลกุลเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC หรือที่ไม่ตอบสนองต่อยาในปัจจุบัน โดยอาจจะใช้ DHEA หรือ compound สังเคราะห์ที่สามารถยับยั้ง G6PD ได้โดยตรง โดยไม่มีผลกระทบต่อชีววิทยาของเซลล์อื่นๆ

ทั้งนี้งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการที่ควรแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น เช่น การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนควบคู่กับระดับ mRNA การทดสอบระดับ ROS การวัดระดับ DNA global methylation และการพิสูจน์หน้าที่ของเอนไซม์ G6PD ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. <http://www.nci.go.th/>.
2. Ettinger DS, Bepler G, Bueno R, Chang A, Chang JY, Chirieac LR, et al. Non-small cell lung cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology™. JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2006;4(6):548-82.
3. Sabel MS, Diehl KM, Chang AE. Principles of surgical therapy in oncology. *Oncology*. 2006:58-72.
4. Perez C, Brady L. Principles and Practice of Radiation Oncology. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 1999;21(6):560.
5. Coates A, Abraham S, Kaye SB, Sowerbutts T, Frewin C, Fox R, et al. On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 1983;19(2):203-8.
6. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008;7(1):11-20.
7. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
8. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences*. 2014;39(8):347-54.
9. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(11):891-9.
10. Li D, Zhu Y, Tang Q, Lu H, Li H, Yang Y, et al. A new G6PD knockdown tumor-cell line with reduced proliferation and increased susceptibility to oxidative stress. *Cancer Biother Radiopharm*. 2009;24(1):81-90.
11. Wang J, Yuan W, Chen Z, Wu S, Chen J, Ge J, et al. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumour Biology*. 2012;33(1):95-101.
12. Pu H, Zhang Q, Zhao C, Shi L, Wang Y, Wang J, et al. Overexpression of G6PD is associated with high risks of recurrent metastasis and poor progression-free survival in primary breast carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*. 2015;13:323.
13. Dessi S, Batetta B, Cherchi R, Onnis R, Pisano M, Pani P. Hexose monophosphate shunt enzymes in lung tumors from normal and glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient subjects. *Oncology*. 1988;45(4):287-91.

14. Di Monaco M, Pizzini A, Gatto V, Leonardi L, Gallo M, Brignardello E, et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition in the antiproliferative effects of dehydroepiandrosterone on human breast cancer cells. *British journal of cancer*. 1997;75(4):589.
15. Lopez-Marure R, Contreras PG, Dillon JS. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2011;660(2-3):268-74.
16. Lin C-J, Ho H-Y, Cheng M-L, Cheng T-H, Yu J-S, Chiu DT-Y. Impaired dephosphorylation renders G6PD-knockdown HepG2 cells more susceptible to H₂O₂-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49(3):361-73.
17. Cocco P. Does G6PD deficiency protect against cancer? A critical review. *Journal of epidemiology and community health*. 1987;41(2):89-93.
18. Cocco P, Dessí S, Avataneo G, Picchiri G, Heinemann E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and cancer in a Sardinian male population: a case-control study. *Carcinogenesis*. 1989;10(5):813-6.
19. Cocco P, Manca P, Dessi S. Preliminary results of a geographic correlation study on G6PD deficiency and cancer. *Toxicologic pathology*. 1987;15(1):106-8.
20. Cheng AJ, Chiu DTY, See LC, Liao CT, Chen IH, Chang JTC. Poor Prognosis in Nasopharyngeal Cancer Patients with Low Glucose-6-phosphate-dehydrogenase Activity. *Japanese journal of cancer research*. 2001;92(5):576-81.
21. García-Nogales P, Almeida A, Fernández E, Medina JM, Bolanos JP. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 1999;72(4):1750-8.
22. López-Marure R, Zapata-Gómez E, Rocha-Zavaleta L, Aguilar MC, Espinosa Castilla M, Meléndez Zajgla J, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits events related with the metastatic process in breast tumor cell lines. *Cancer biology & therapy*. 2016;17(9):915-24.
23. ORTEGA-CALDERÓN YN, Lopez-Marure R. Dehydroepiandrosterone inhibits proliferation and suppresses migration of human cervical cancer cell lines. *Anticancer research*. 2014;34(8):4039-44.
24. Furutama D, Fukui R, Amakawa M, Ohsawa N. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by dehydroepiandrosterone sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1998;1406(1):107-14.

25. YAMASHITA R, SAITO T, SATOH S, AOKI K, KABURAGI Y, SEKIHARA H. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. *Endocrine journal*. 2005;52(6):727-33.
26. Korhonen R, Moilanen E. Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 as an Inflammatory Factor and Drug Target. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2014;114(1):24-36.
27. Raddatz G, Gao Q, Bender S, Jaenisch R, Lyko F. Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. *PLoS genetics*. 2012;8(12):e1003146.
28. Hecker PA, Leopold JA, Gupte SA, Recchia FA, Stanley WC. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013;304(4):H491-H500.
29. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9.
30. Mendler AN, Hu B, Prinz PU, Kreutz M, Gottfried E, Noessner E. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *International journal of cancer*. 2012;131(3):633-40.
31. Husain Z, Seth P, Sukhatme V. Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: linking metabolism to cancer immunology. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):e26383.
32. Nagae M, Hiraga T, Yoneda T. Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2007;25(2):99-104.
33. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2017;15(4):504-35.
34. Langer CJ. Epidermal growth factor receptor inhibition in mutation-positive non-small-cell lung cancer: is afatinib better or simply newer? : *American Society of Clinical Oncology*; 2013.

ภาคผนวก (Appendix)

ประวัตินักวิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสา หลุยเจริญ ซีพสุนทร

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานตีพิมพ์:

1. Anantasomboon P, Chanda M, Jugnam-Ang W, Witoonpanich P, Cheepsunthorn P, Nuchprayoon I, Fucharoen S, **Cheepsunthorn CL**. Evaluating the performance of automated UV enzymatic assay for screening of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Int J Lab Hematol*. 2018 Nov 1. doi: 10.1111/ijlh.12943.
2. Para S, Mungkalasut P, Chanda M, Nuchprayoon I, Krudsood S, **Cheepsunthorn CL**. An Observational Study of the Effect of Hemoglobinopathy, Alpha Thalassemia and Hemoglobin E on *P. Vivax* Parasitemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10(1):e2018015.
3. Kanchanavithayakul A, Prasittisa K, Kiat-Amornrak P, Chanda M, Kittiwatanasarn P, Nuchprayoon I, **Cheepsunthorn CL**. Prevalence of glucose 6-phosphate Dehydrogenase deficiency and genetic mutations among Karen and Lao populations in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2017;48(6): 1308-17.
4. Soontarawirat I, Imwong M, Woodrow CJ, **Cheepsunthorn CL**, Day NPJ, Paul R, Singhasivanon P. Exploring the association between glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and color blindness in Southeast Asia. *Asian Biomed (Res Rev News)*. 2017; 11(4): 365–70.
5. van Bruggen R, Gualtieri C, Iliescu A, **Louicharoen Cheepsunthorn C**, Mungkalasut P, Trape JF, Modiano D, Sodiomon Sirima B, Singhasivanon P, Lathrop M, Sakuntabhai A, Bureau JF, Gros P. Modulation of Malaria Phenotypes by Pyruvate Kinase (PKLR) Variants in a Thai Population. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144555.
6. **Cheepsunthorn CL**, Nilsri N. Prevalence of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and molecular genetics of G6PD in Thai population of Phayao province. *J Hematol Transfus Med*. 2015;25:131-7.
7. Pornprasert S, Panya A, **Cheepsunthorn CL**, Srithep S, Kingkeow D. HAART has no major impact on hematological and plasma bilirubin changes in HIV-infected patients with congenital G-6-PD deficiency. *Curr HIV Res*. 2013;11:193-7.
8. **Cheepsunthorn CL**, Nuchprayoon I. Molecular characterization of G6PD mutations in the Phuan tribe in Thailand. *Asian Biomed*. 2013;7:567-70.

9. Lawaly YR, Sakuntabhai A, Marrama L, Konate L, Phimpraphi W, Sokhna C, Tall A, Sarr FD, Peerapittayamongkol C, **Louicharoen C**, Schneider BS, Levescot A, Talman A, Casademont I, Menard D, Trape JF, Rogier C, Kaewkunwal J, Sura T, Nuchprayoon I, Ariey F, Baril L, Singhasivanon P, Mercereau-Puijalon O, Paul R. Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites. *PLoS One*. 2010;29: e11358.
10. **Louicharoen C**, Patin E, Paul R, Nuchprayoon I, Witoonpanich B, Peerapittayamongkol C, Casademont I, Sura T, Laird NM, Singhasivanon P, Quintana-Murci L, Sakuntabhai A. Positively Selected G6PD-Mahidol Mutation Reduces Plasmodium vivax Density in Southeast Asians. *Science*. 2009;326:1546-9.
11. Phimpraphi W, Paul R, Witoonpanich B, Turbpaiboon C, Peerapittayamongkol C, **Louicharoen C**, Casademont I, Tungpradabkul S, Krudsood S, Kaewkunwal J, Sura T, Looareesuwan S, Singhasivanon P, Sakuntabhai A. Heritability of P. falciparum and P. vivax malaria in a Karen population in Thailand. *Plos One*. 2008;3:e3887.
12. Nuchprayoon I, **Louicharoen C**, Charoenvej W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Mon and Burmese of Southern Myanmar. *J Hum Genet*. 2008;53:48-54.
13. **Louicharoen C**, Nuchprayoon I. G6PD Viangchan (871G>A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population. *J Hum Genet*. 2005;50:448-52.
14. Kittiwatanasarn P, **Louicharoen C**, Sukkapan P, Nuchprayoon I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Northeastern Thailand: prevalence and relationship to neonatal jaundice. *Chula Med J*. 2003;47:471-9.

ผู้ร่วมวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานตีพิมพ์:

1. Anantasomboon P, Chanda M, Jugnam-Ang W, Witoonpanich P, **Cheepsunthorn P**, Nuchprayoon I, Fucharoen S, Cheepsunthorn CL. Evaluating the performance of automated UV enzymatic assay for screening of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Int J Lab Hematol*. 2018 Nov 1. doi: 10.1111/ijlh.12943.
2. Mairuae N, **Cheepsunthorn P**. Valproic acid attenuates nitric oxide and interleukin-1 β production in lipopolysaccharide-stimulated iron-rich microglia. *Biomed Rep*. 2018 Apr;8(4):359-364.
3. Mairuae N, Connor JR, Lee SY, **Cheepsunthorn P**, Tongjaroenbuangam W. The effects of okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) on the cellular events associated with Alzheimer's disease in a stably expressed HFE neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurosci Lett*. 2015: 603; 6-11.
4. Benjarongrat H, Srikiatkachorn A, **Cheepsunthorn P**. LPS induces myelin P0 expression and NF-kB-mediated IL-6 p. 36th Congress on Pharmacology of Thailand/Thai Journal of Ph. 2014: 36; 48-53.
5. Boondam Y, **Cheepsunthorn P**. Patterns of microglial innate immune responses elicited by amyloid β 1-42 and lipopolysaccharide: the similarities of the differences. *Asian Biomed* 2014; 8(3): 353-59.
6. Thongtan T, Wikan N, Wintachai P, Rattanarungsan C, Srisomsap C, **Cheepsunthorn P**, Smith DR. Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *J Med Virol* 2012; 84(4): 615-23.
7. Mairuae N, Connor JR, **Cheepsunthorn P**. Increased cellular iron levels affect matrix metalloproteinase expression and phagocytosis in activated microglia. *Neurosci Lett*. 2011: 500(1); 36-40.
8. Angsuwittaya N, Srisomsap C, **Cheepsunthorn P**. Proteome analysis of microglial secretion induced by AB. *Thai Journal of Pharmacology*. 2011: 33(1); 73-76.
9. Mairuae N, Hall li EC, **Cheepsunthorn P**, Lee SY, Connor JR. The H63D HFE gene variant promotes activation of the intrinsic apoptotic pathway via mitochondria dysfunction following β -amyloid peptide exposure. *J Neurosci Res*. 2010; 88(14): 3079-89.

10. Thongtan T, **Cheepsunthorn P**, Chaiworakul V, Rattanasungsan C, Wikan N, Smith DR. Highly permissive infection of microglial cells by Japanese encephalitis virus: a possible role as a viral reservoir. *Microbes Infect.* 2010; 12(1): 37-45.
11. Kaomongkolgit R, **Cheepsunthorn P**, Pavasant P, Sanchavanakit N. Iron increases MMP-9 expression through activation of AP-1 via ERK/Akt pathway in human head and neck squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2008; 44(6): 587-94.
12. Sangsanoh P, Waleetorncheepsawat S, Suwanton O, Wutticharoenmongkol P, Weeranantanapan O, Chuenjitbuntaworn B, **Cheepsunthorn P**, Pavasant P, Supaphol P. In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds. *Biomacromolecules* 2007; 8(5): 1587-94.
13. Suwanton O, Waleetorncheepsawat S, Sanchavanakit N, Pavasant P, **Cheepsunthorn P**, Bunaprasert T, Supaphol P. In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *Int J Biol Macromol.* 2007; 40(3): 217-238.
14. **Cheepsunthorn P**, Mairae N, Nasee K. Estrogen enhances the inhibitory effect of iron on microglial nitric oxide production. *J Med Assoc Thai.* 2006; 89(6): 840-5.
15. Connor JR, Xuesheng Z and **Cheepsunthorn P**. Iron and Glial Toxicity. *The Role of Glia in Neurotoxicity* (2nd), Ascher M and Costa 2005: 367-77.
16. **Cheepsunthorn P**, Radov L, Menzies S, Reid J, Connor JR. Characterization of a novel brain-derived microglial cell line isolated from neonatal rat brain. *Glia* 2001; 35(1): 53-62.
17. **Cheepsunthorn P**, Palmer C, Menzies S, Roberts RL, Connor JR. Hypoxic/ischemic insult alters ferritin expression and myelination in neonatal rat brains. *J Comp Neurol.* 2001; 431(4): 382-96.
18. **Cheepsunthorn P**, Palmer C, Connor JR. Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *J Comp Neurol.* 1998; 400(1): 73-86.

