

พยาธิกำเนิดระดับโมเลกุลของการลดระดับการแสดงออกของ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอด



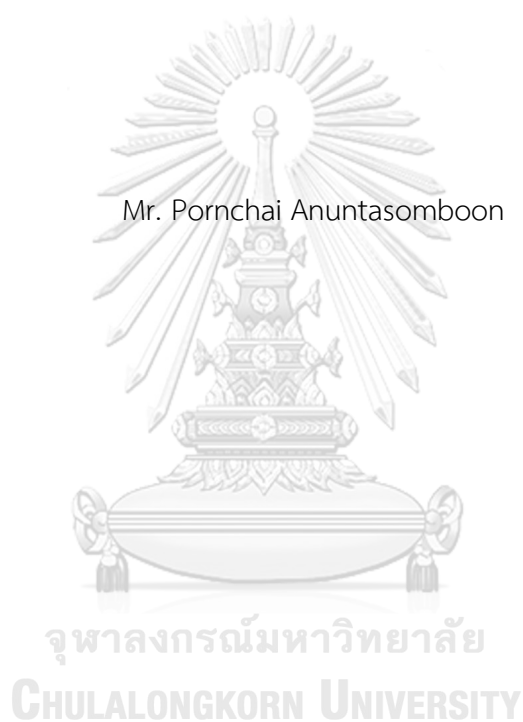
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Molecular pathogenesis by suppressing G6PD in lung cancer cells

Mr. Pornchai Anuntasomboon



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 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	พยาธิกำเนิดระดับโมเลกุลของการลดระดับการแสดงออก ของ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอด
โดย	นายพรชัย อนันตสมบุรณ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรากร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. พันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำจร)

พรชัย อนันตสมบุญ : พยาธิกำเนิดระดับโมเลกุลของการลดระดับการแสดงออกของ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอด (Molecular pathogenesis by suppressing G6PD in lung cancer cells) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, 81 หน้า.

ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของเซลล์มะเร็ง คือ การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการใช้พลังงานและเมตาบอลิซึม ซึ่งวิถีเพนโตสฟอสเฟตเป็นวิถีที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยมีเอนไซม์กลูโคส 6 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G6PD) เป็นกุญแจสำคัญในปฏิกิริยา จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *G6PD* มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่นเซลล์มะเร็งตับ อีกทั้งจากการทดสอบระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับเซลล์ปกติโดยใช้โปรแกรม CU-DREAM (Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays) พบว่า *G6PD* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งตับ และมะเร็งปอด โดยมะเร็งปอดสามารถพบได้เป็นอันดับ 2 ของผู้ป่วยมะเร็ง อีกทั้งอัตราการรอดชีวิตภายหลังการตรวจพบโรคมะเร็งปอดนั้นต่ำ ปัจจุบันพบว่ายังมีผู้ป่วยมะเร็งปอดบางรายที่ไม่ตอบสนองต่อยาและวิธีการรักษาแบบอื่น งานวิจัยนี้จึงศึกษาระดับการแสดงออกและบทบาทของ *G6PD* ต่อมะเร็งปอดทั้งในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งปอดและเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้ทำการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชาวไทย 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 โดยไปเพิ่มชิ้นการแสดงออกของยีน *DNMT3a* และ *Bax/Bcl-2* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลง ระดับ apoptosis เพิ่มขึ้น และ ระดับ methylation ของ genome ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลกระทบให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดถูกยับยั้ง ผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงบทบาทของเอนไซม์ *G6PD* ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ที่จะพัฒนายาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *G6PD* ในการรักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774054130 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: NON SMALL CELL LUNG CANCER / G6PD SUPPRESSION / IMMUNOHISTOCHEMISTRY / CELL PROLIFERATION / METASTASIS

PORNCHAI ANUNTASOMBOON: Molecular pathogenesis by suppressing G6PD in lung cancer cells. ADVISOR: ASST. PROF. CHALISA LOUICHAROEN CHEEPSUNTHORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 81 pp.

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 for G6PD in lung cancer, both *in vivo* 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.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลิสสา หลุยเจริญ ซีพสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ซีพสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความกรุณาในการให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆในการศึกษาวิจัยตลอดมา รวมทั้งช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ประธานคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์ นครินทร์ กิตกำธร ที่ได้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นพ.สมบูรณ์ ศิลาวัดน์ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา และ อาจารย์ นายแพทย์ คมกฤต เรืองฤทธิ์ชาญกุล อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาและย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งปอดในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสิริรักษ์ มู่เก็ม คุณมาฆมาศ จันดา คุณศุภมาศ จารุจรณ คุณวัชรพงษ์ จักรนำอ่าง คุณวงศธร อภิชาติเสรีกุล คุณวรนิษฐา ไชยนา คุณรัตนากร สันตะวาฬิม คุณอัญชลี ต้นสมบูรณ์ คุณวลัยพร ผลิรัตน์ คุณสถาพร บุตรน้ำเพ็ชร พี่และน้องในห้องปฏิบัติการ 828 ตึกแพทย์พัฒนา ผู้ซึ่งคอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และคอยห่วงใยเสมอมา

ขอขอบคุณ พี่สมาชิกของห้องปฏิบัติการ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ผู้ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย อุปกรณ์และสารเคมี และให้กำลังใจ ตลอดจนสามารถแก้ปัญหาต่างๆในงานวิจัยได้เสมอมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดาและมารดา พี่สาวและแม่อีก 1 ตัว ผู้คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนตลอดมาจนสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้อย่างเสร็จสิ้นด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.4 สมมติฐาน.....	3
1.5 คำสำคัญ.....	4
1.6 รูปแบบการวิจัย.....	4
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
1.8 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	5
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	5
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็ง: การเปลี่ยนแปลงวิถีเมตาบอลิซึมสำหรับการสร้างพลังงาน (The Hallmarks of Cancer : Energy metabolism reprogramming (EMR)).....	6
2.2 มะเร็งปอด (lung cancer).....	8
2.3 เอนไซม์ กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glucose 6-phosphate dehydrogenase; G6PD).....	10

2.4	ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD Deficiency)	11
2.5	การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD	12
2.6	ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ G6PD และมะเร็ง	12
2.6.1	การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ G6PD และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง	12
2.6.2	การศึกษาเอนไซม์ G6PD ในผู้ป่วยมะเร็ง	13
2.6.3	การศึกษาเอนไซม์ G6PD ของเซลล์มะเร็งในระบบ <i>in vitro</i>	14
2.7	ดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเทอโรน (Dehydroepiandrosterone; DHEA).....	14
2.8	ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress).....	15
2.9	ภาวะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis).....	16
2.9.1	Extrinsic pathway	16
2.9.2	Intrinsic pathway	17
2.10	การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและมะเร็ง (DNA methylation and cancer).....	18
2.10.1	DNA methylation และกลไกการควบคุม	18
2.10.2	ความสัมพันธ์ของ DNA methylation กับเซลล์มะเร็ง	19
2.11	Lactate กับเซลล์มะเร็ง.....	21
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1	การออกแบบงานวิจัย.....	23
3.2	การย้อมโปรตีน G6PD ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยวิธี immunohistochemistry... 23	
3.2.1	ขั้นตอนการกำจัดพาราฟิน.....	24
3.2.2	ขั้นตอนการย้อม Hematoxylin และ Eosin	24
3.2.3	ขั้นตอนการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry.....	25
3.3	การเพาะเลี้ยงเซลล์	26
3.4	การเก็บรักษาเพลเลต (pellet) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง.....	27

3.5 การวัดระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD.....	27
3.6 การทดสอบความเป็นพิษและความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอด ของ DHEA	28
3.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA	28
3.8 การทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อลดการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA.....	29
3.9 การทดสอบความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอด	30
3.10 การวัดระดับแลคเตท (lactate).....	30
3.10.1 ชั้นเตรียม master mix และ blank sample.....	31
3.10.2 ขั้นตอนการคำนวณระดับแลคเตท.....	31
3.11 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....	32
3.12 การวัดความสามารถการสร้างโคโลนี (colony forming assay).....	32
3.13 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA).....	32
3.14 การสังเคราะห์ cDNA	33
3.15 การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์ apoptosis และการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค Real-time PCR	34
3.16 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง	37
4.1 การย้อมโปรตีน G6PD ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยวิธี immunohistochemistry และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย.....	37
4.2 ระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง.....	40
4.3 ผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD	41
4.3.1 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย DHEA และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์.....	41
4.3.2 การยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA.....	42

4.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ siRNA ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>G6PD</i>	43
4.3.4 การยับยั้งการทำงานของโปรตีน <i>G6PD</i> โดย DHEA และ siRNA.....	44
4.4 การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดโดย DHEA และ siRNA.....	45
4.5 ความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน <i>G6PD</i> โดย DHEA และเมื่อลดการแสดงออกของ <i>G6PD</i> โดยใช้ siRNA.....	46
4.6 ความสามารถในการสร้างโคโลนี (colony formation)	48
4.7 การวัดระดับ lactate.....	50
4.8 ระดับการแสดงออกของยีน.....	51
4.8.1 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis	51
4.8.2 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ DNA methylation	52
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	55
รายการอ้างอิง	65
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก	77
ภาคผนวก ข	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	81

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงระดับความรุนแรงและความชุก ในแต่ละระดับกัมมันตภาพของเอนไซม์ G6PD ตามเกณฑ์ของ World Health Organization	11
ตารางที่ 2 เซลล์มะเร็งปอดที่ใช้ในงานวิจัย	26
ตารางที่ 3 แสดงลำดับ RNA ของ siRNA ที่จำเพาะต่อ G6PD mRNA และ Scramble (control) .	30
ตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้สำหรับ Real-time PCR	34
ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ (Primers) สำหรับ Real-time PCR	35
ตารางที่ 6 ระดับของโปรตีน G6PD กับ parameter เชิงปริมาณ.....	39
ตารางที่ 7 ระดับของโปรตีน G6PD กับ parameter เชิงคุณภาพ.....	40



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนภาพแสดงลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็งที่มีการเปลี่ยนวิถีที่ใช้ในการสร้างพลังงานภายในเซลล์จาก oxidative phosphorylation เป็นวิถี aerobic glycolysis	7
รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการนำกลูโคสเข้าสู่เพื่อสร้างพลังงานของเซลล์ในขณะปกติและเมื่อเซลล์ต้องการแบ่งตัว.....	7
รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการจำแนกชนิดของเซลล์มะเร็งปอดและความชุก	8
รูปที่ 4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในวิถี PPP โดยการเปลี่ยน NADP ⁺ ให้เป็น NADPH (G6PD; glucose 6-phosphate dehydrogenase, ATP; adenosine triphosphate, ADP; adenosine diphosphate, NADP ⁺ ; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH; reduced NADP, GSSG; oxidized glutathione, GSH; reduced glutathione)	10
รูปที่ 5 โครงสร้างของ DHEA.....	14
รูปที่ 6 Extrinsic pathway และ intrinsic pathway ของการเกิด apoptosi	18
รูปที่ 7 กลุ่มของเอนไซม์ DNMTs และการทำงาน	20
รูปที่ 8 Lactate synthesis	22
รูปที่ 9 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.....	39
รูปที่ 10 แสดงผลของระดับไขมันตภาพเอนไซม์ของ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292 ในสภาวะปกติ (A) และระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292 ในสภาวะปกติ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย ** $p < 0.01$	41

รูปที่ 11 แสดงผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เมื่อเลี้ยงใน DMSO ร้อยละ 0.4 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการเพิ่มจำนวนของเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย $**p < 0.01$ 42

รูปที่ 12 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย $*p < 0.05$ และ $**p < 0.001$ 43

รูปที่ 13 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 $**p < 0.001$ 44

รูปที่ 14 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 $**p < 0.001$ 45

รูปที่ 15 แสดงผลระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย $**p < 0.001$ 46

รูปที่ 16 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 $**p < 0.001$ 48

รูปที่ 17 แสดงผลอัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงอัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์ Mean \pm SD โดย $**p < 0.001$ 49

รูปที่ 18 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 $**p < 0.001$ 51

รูปที่ 19 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 ** $p < 0.001$	52
รูปที่ 20 แสดงผลระดับการแสดงออกของยีน DNMT1 และ DNMT3a เมื่อการทำงานของเอนไซม์ 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 ** $p < 0.001$	54
รูปที่ 21 G6PD กับการรักษาสมดุลของระดับ ROS ภายในเซลล์	60
รูปที่ 22 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการลดระดับการแสดงออกของ G6PD ต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอด.....	63
รูปที่ 23 แนวทางการคัดกรองและรักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปอด	63

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

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) การเลือกใช้วิธีรักษาขึ้นอยู่กับการกลายพันธุ์ของยีน *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) โดยพบว่า เซลล์มะเร็งหลายชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน มักอาศัยวิถีแอโรบิกไกลโคไลซิส (aerobic glycolysis) หรือที่เรียกว่า Warburg effect โดยมีวิถี glycolysis และเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway: PPP หรือ hexose monophosphate shunt; HMS) ร่วมใน

กระบวนการ (6-9) ซึ่งวิธีดังกล่าวแม้จะให้พลังงานน้อยกว่ากระบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเรชัน (oxidative phosphorylation) แต่สามารถผลิต ATP เพื่อสนองต่อความต้องการของเซลล์ได้รวดเร็วกว่า

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

ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์เนื้องอกและมะเร็งหลายชนิดทั้ง 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) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในผู้ป่วยมะเร็งยังไม่พบความสัมพันธ์ที่แน่ชัด (17-20) อีกทั้งมะเร็งแต่ละชนิดมีกลไกและการควบคุมภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาในผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมที่มีระดับการแสดงออกของ G6PD เป็นบวก (positive) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมที่มีผล G6PD เป็นลบ (negative) พบว่าอัตราการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) ไม่แตกต่างกัน (12) แสดงให้เห็นว่า G6PD มีความสำคัญต่างกันในแต่ละชนิดของมะเร็ง โดยปัจจุบันยังไม่มีการยืนยันถึงความสัมพันธ์และบทบาทหน้าที่ของ G6PD ในมะเร็งปอด จึงเป็นที่มาของการศึกษาเพื่อยืนยันระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดเทียบกับเนื้อเยื่อปกติในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ขนาดใหญ่ (Non Small Cell Lung Cancer Cells: NSCLC) ร่วมกับการศึกษาพยากรณ์ระดับโมเลกุลภายใต้การลดระดับการ

แสดงออกของ G6PD ด้วย siRNA และการยับยั้งกัมมันตภาพเอนไซม์โดยใช้ตัวยับยั้ง หรือ dehydroepiandrosterone (DHEA) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปอด โดยผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนั้นนอกจากจะเป็นความรู้พื้นฐานที่ทำให้เข้าใจถึงบทบาทของเอนไซม์ G6PD ต่อการเจริญเติบโตของมะเร็งปอดแล้ว G6PD ยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญต่อการพัฒนากลยุทธ์ในการรักษา มะเร็งปอดชนิด NSCLC อีกด้วย

1.2 คำถามของการวิจัย

- 1.2.1 ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดมีความแตกต่างกับเนื้อเยื่อปกติในผู้ป่วย NSCLC หรือไม่อย่างไร
- 1.2.2 ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ทั้งระดับการแสดงออกของยีน หรือการทำงานของเอนไซม์ สามารถยับยั้งการแบ่งตัวและ metastasis อีกทั้งเพิ่มการตายแบบ apoptosis ของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปอดได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.3.1 เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วย NSCLC ด้วยวิธี Immunohistochemistry
- 1.3.2 เพื่อศึกษาพยาธิกำเนิดระดับโมเลกุล เช่น การแบ่งตัว, metastasis และการตายแบบ apoptosis ภายใต้สภาวะที่ลดการแสดงออก หรือลดกัมมันตภาพของเอนไซม์ G6PD ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปอด

1.4 สมมติฐาน

- 1.4.1 การแสดงออกของเอนไซม์ G6PD ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดมีระดับที่สูงกว่าเนื้อเยื่อปกติที่ได้จากผู้ป่วย NSCLC รายเดียวกัน
- 1.4.2 การลดการแสดงออก หรือลดกัมมันตภาพของเอนไซม์ G6PD ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปอด ช่วยยับยั้งการแบ่งตัว และ metastasis อีกทั้งเพิ่มการตายของเซลล์แบบ apoptosis มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ G6PD เป็นปกติ

1.5 คำสำคัญ

มะเร็งปอด (Non small cell lung cancer)

การลดระดับการแสดงออกของ G6PD (G6PD suppression)

อิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation)

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Metastasis)

1.6 รูปแบบการวิจัย

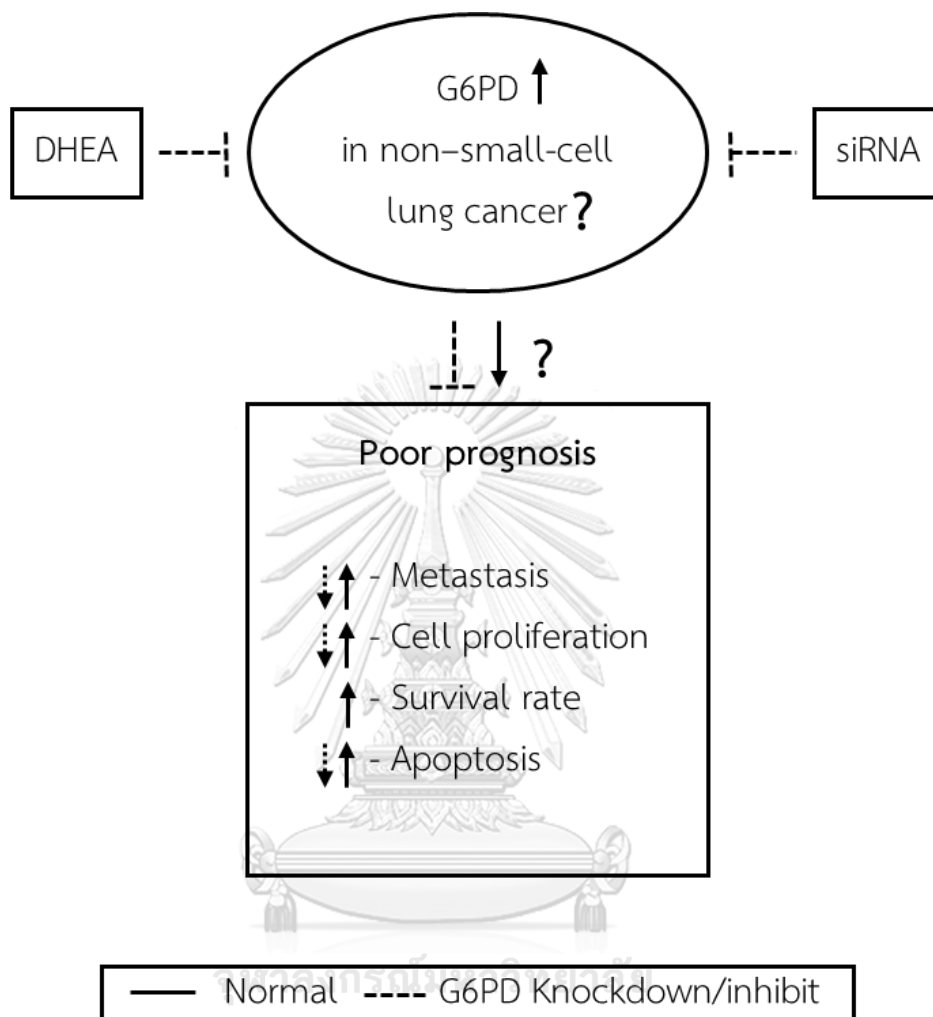
วิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) และวิจัยเชิงการทดลอง (Experimental design)

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ไม่มี



1.8 กรอบแนวคิดการวิจัย



1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

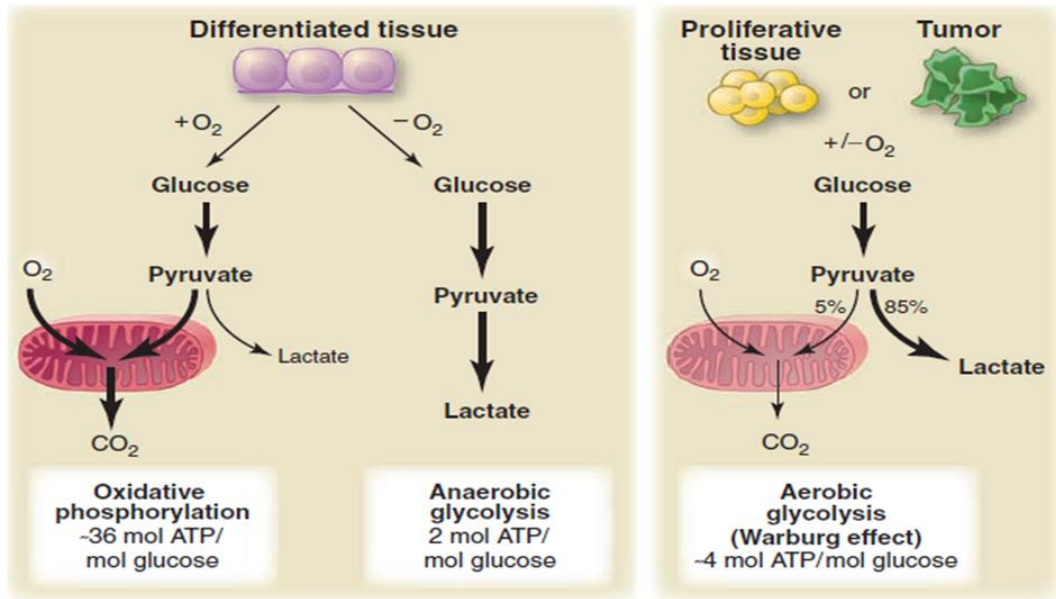
- 1.9.1 ทำให้ทราบถึงความแตกต่างของระดับโปรตีน G6PD ในเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งปอดของผู้ป่วยมะเร็งปอด (NSCLC) ชนิดต่างๆ
- 1.9.2 ทราบถึงความสำคัญของเอนไซม์ G6PD ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การตายของเซลล์ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด (NSCLC)
- 1.9.3 G6PD อาจเป็น targeted therapy ของมะเร็งปอดในกรณี que ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

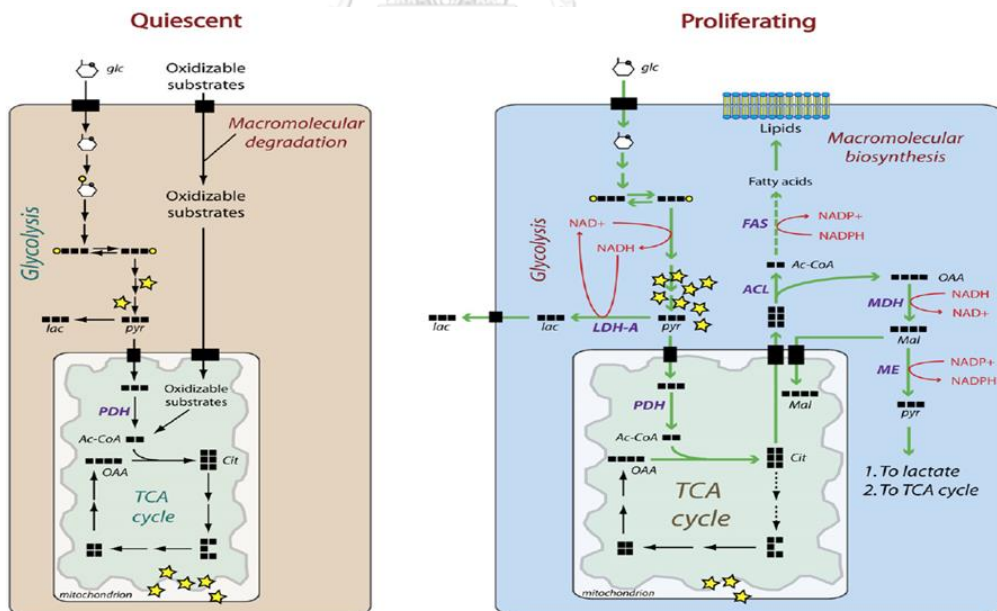
2.1 ลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็ง: การเปลี่ยนแปลงวิถีเมตาบอลิซึมสำหรับการสร้างพลังงาน (The Hallmarks of Cancer : Energy metabolism reprogramming (EMR))

ในสภาวะที่มีออกซิเจน เซลล์ปกติส่วนใหญ่อาศัยวิถี glycolysis และ tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ในการสร้างพลังงาน เพื่อให้ได้ ATP จำนวนทั้งสิ้น 36 โมเลกุลต่อน้ำตาล 1 โมเลกุล แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เซลล์จะอาศัยวิถี anaerobic glycolysis เพื่อผลิตแลคเตท (lactate) ให้พลังงาน ATP จำนวน 2 โมเลกุลต่อน้ำตาล 1 โมเลกุล (7, 9) (รูปที่ 1)

ในปี 1920 Otto Warburg ได้พบว่าเนื้องอก (tumor) ในช่องท้องที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว มีอัตราการใช้กลูโคสสูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ โดยร้อยละ 90 ของกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น lactate จึงเป็นที่มาของปรากฏการณ์ “Warburg effect” (21) ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะของเซลล์มะเร็ง ต่อมาเมื่อมีการศึกษาพบว่า แม้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ยังคงอาศัยการสร้างพลังงานแบบ aerobic glycolysis (6, 9) จากการเปลี่ยนกลูโคสเป็น lactate และให้ ATP เพียง 4 โมเลกุลต่อน้ำตาล 1 โมเลกุล โดย Warburg ได้ให้สมมติฐานว่าอาจเกิดจากความผิดปกติที่ไม่โตคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์มะเร็ง (22) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า mitochondria ในเซลล์มะเร็งยังคงสามารถทำงานได้เป็นปกติ (23-25) จึงมีการตั้งสมมติฐานต่อไปว่า เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์ได้มากกว่าเซลล์ปกติ เพื่อให้ตอบสนองต่อการใช้พลังงานในกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการอื่นๆ ภายในเซลล์มะเร็งได้อย่างรวดเร็วและเพียงพอ (รูปที่ 2) (26) เซลล์จึงอาศัยกระบวนการสร้างพลังงานอย่างง่ายไม่ซับซ้อน ด้วยวิถี aerobic glycolysis อีกทั้งเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการสะสมอนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ oxidative phosphorylation ในไมโทคอนเดรีย อีกทั้งยังพบว่า lactate ที่เพิ่มขึ้นจะถูกขับออกนอกเซลล์มะเร็ง ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียงได้อีกทางหนึ่ง (7)



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็งที่มีการเปลี่ยนวิถีที่ใช้ในการสร้างพลังงานภายในเซลล์จาก oxidative phosphorylation เป็นวิถี aerobic glycolysis (7)

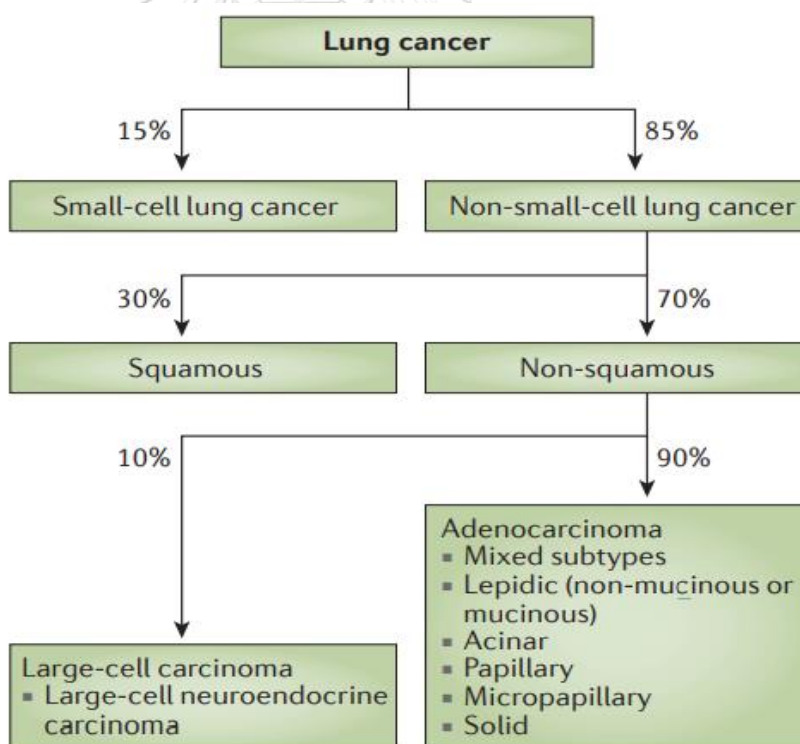


รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการนำกลูโคสเข้าสู่เพื่อสร้างพลังงานของเซลล์ในขณะปกติและเมื่อเซลล์ต้องการแบ่งตัว (2)

2.2 มะเร็งปอด (lung cancer)

มะเร็งปอดเป็นหนึ่งในโรคมะเร็งที่สามารถพบได้บ่อยและนำไปสู่การเสียชีวิต ซึ่งผู้ป่วยมะเร็งปอดมักจะมีการแสดงอาการและได้รับการตรวจพบเมื่ออยู่ในระยะท้ายๆ แล้ว (advanced stage) มะเร็งปอดมีหลายชนิด ได้แก่

- ชนิดเซลล์ขนาดใหญ่ (Non-Small Cell Lung cancer Small Cell: NSCLC) เป็นเซลล์มะเร็งปอดที่สามารถพบได้ร้อยละ 85 ของผู้ป่วยมะเร็งปอด แบ่งเป็น
 - squamous พบได้ร้อยละ 30
 - non-squamous ร้อยละ 70 ซึ่งสามารถแบ่งได้ 2 แบบคือ
 - Adenocarcinoma พบได้ร้อยละ 90
 - Large-cell carcinoma พบได้ร้อยละ 10
- ชนิดเซลล์ขนาดเล็ก (Small-cell lung cancer; SCLC) ซึ่งสามารถพบได้ร้อยละ 15 ของผู้ป่วยมะเร็งปอด (รูปที่ 3) (27, 28)
-



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการจำแนกชนิดของเซลล์มะเร็งปอดและความชุก (29)

การรักษามะเร็งปอดในปัจจุบันนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น การผ่าตัด (surgery) รังสีบำบัด (radiation therapy) และเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นต้น (2) การเลือกใช้วิธีใดสำหรับการรักษานั้นขึ้นอยู่กับระยะ (stage) และตำแหน่ง (location) ของมะเร็ง วิธีการผ่าตัดและการฉายแสงนั้นเหมาะกับเซลล์มะเร็งที่อยู่เฉพาะจุดและยังไม่ได้แพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่น ระยะเวลาการฟื้นตัวหลังการผ่าตัดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณเนื้อปอดที่ถูกตัดออกไป (3) การฉายรังสี เป็นการใช้รังสีเอกซ์ (X-ray) หรือ รังสีแกรมม่า (gamma ray) เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็ง ด้วยการทำลายสาย DNA (DNA damage) หรือก่อให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตาย (apoptosis) ผลข้างเคียงของการฉายรังสีก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง (skin irritation) บริเวณที่ได้รับรังสีโดยตรง ผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปอดที่ได้รับรังสีบำบัดอาจมีภาวะ radiation pneumonitis ภายหลังการทำรังสีบำบัด โดยมีอาการไอ (cough) หายใจหอบ (dyspnoea) มีไข้ต่ำๆ (low grade fever) รู้สึกไม่สบายบริเวณช่วงอก (chest discomfort) เจ็บหน้าอกเวลาหายใจเข้าหรือไอ (pleuritic chest pain) เป็นต้น (4) การรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นการรักษาที่เหมาะสมกับมะเร็งที่กระจายไปยังหลายตำแหน่ง โดยยาจะไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยเคมีบำบัดในปัจจุบันมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติ โดยผู้ป่วยอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ท้องร่วง ผม่ว เป็นต้น (5)

การรักษาโรคมะเร็งปอดนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งระยะของโรค (stage) ชนิดของเซลล์ทางพยาธิวิทยา (histological cell type) และลักษณะระดับโมเลกุล (molecular profile) โดยจากผลการศึกษาเนื้อเยื่อมะเร็งปอดจากผู้ป่วยที่สูบบุหรี่หรือพบการกลายพันธุ์ (mutations) ของยีน epidermal growth factor receptor (*EGFR*) หลายตำแหน่ง เช่น exon 18 ตำแหน่ง G719C, G719S, exon 19 พบ deletion ตำแหน่ง E746-A750, exon 21 ตำแหน่ง L858R, G719A อีกทั้งพบการกลายพันธุ์ใน anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) ได้ร้อยละ 10-60 ใน adenocarcinomas การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนเหล่านี้เป็นมีความสำคัญต่อการเลือกใช้ยาที่เหมาะสมกับผู้ป่วย (first-line chemotherapy) (30) เช่น Gefitinib ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ยังยั้ง *EGFR* kinase (*EGFR* kinase inhibitor) จากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นถึงการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* สามารถคาดการณ์ความไว (sensitivity) ต่อยา Gefitinib ของผู้ป่วย NSCLC (31)

2.3 เอนไซม์ กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glucose 6-phosphate dehydrogenase; G6PD)

G6PD เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway ; PPP หรือ hexose monophosphate shunt; HMS) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง pentose phosphate สำหรับใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และการสร้าง NADPH สำหรับเป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ในการสังเคราะห์กรดไขมัน (32) และเป็น coenzyme ของเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) ในการรักษาระดับกลูตาไธโอนรีดิวซ์ (GSH) (33, 34) (รูปที่ 4) NADPH ช่วยรักษาระดับปฏิกิริยา redox ในเซลล์ไม่ให้อนุมูลอิสระ (free radical) ภายในเซลล์มีมากเกินไปซึ่งต่อเซลล์ ด้วยเหตุนี้ G6PD จึงเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการควบคุมระดับ NADPH/NADP⁺ (35) การทำงานที่ผิดปกติไปของเอนไซม์ G6PD หรือภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD deficiency) ส่งผลให้เกิดอาการแสดงทางโลหิตวิทยา (hematology) เช่น ภาวะโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia) ภายหลังการติดเชื้อหรือได้รับสารเคมีบางชนิด (36)

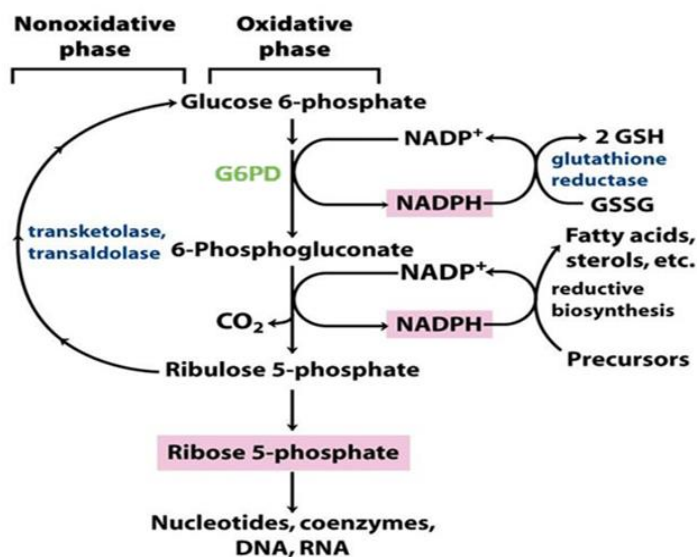


Figure 14-20
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

รูปที่ 4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในวิถี PPP โดยการเปลี่ยน NADP⁺ ให้เป็น NADPH (G6PD; glucose 6-phosphate dehydrogenase, ATP; adenosine triphosphate, ADP; adenosine diphosphate, NADP⁺; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH; reduced NADP, GSSG; oxidized glutathione, GSH; reduced glutathione) (37)

2.4 ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD Deficiency)

ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD พบได้มากกว่า 400 ล้านคนทั่วโลก (32, 38) โดยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* บนแขนข้างยาวของโครโมโซม X (Xq28) จึงถ่ายทอดแบบ x-linked recessive ยีน *G6PD* มีขนาดประมาณ 21 กิโลเบส (Kilobase; Kb) ประกอบด้วย 13 เอกซอน (exons) และ 12 อินทรอน (introns) และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 515 ตัว ได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 59 กิโลดาลตัน (Kilodalton; KDa) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนยีน *G6PD* มีมากกว่า 440 ชนิด (39) โดยมากเป็นชนิดที่เบสเปลี่ยนเพียงตำแหน่งเดียว (substitution) ส่งผลให้กรดอะมิโนและคุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์เปลี่ยน ซึ่งกระทบโดยตรงต่ออาการทางคลินิกที่จะแตกต่างกันไปตามชนิดของการกลายพันธุ์ (36, 38) อาการทางคลินิกที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G6PD ได้แก่ ตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด (neonatal jaundice) และภาวะเม็ดเลือดแดงแตกอย่างเฉียบพลันเมื่อได้รับการกระตุ้นจากยาบางชนิดหรือการติดเชื้อ ในปี 1967 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization ; WHO) ได้แบ่งระดับค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ G6PD (G6PD activity) ออกเป็น 5 กลุ่มตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระดับความรุนแรงและความชุก ในแต่ละระดับกัมมันตภาพของเอนไซม์ G6PD ตามเกณฑ์ของ World Health Organization (40)

กลุ่ม (Class)	ระดับ (Level of deficiency)	การทำงานของเอนไซม์ (Enzyme activity)	ความชุก (Prevalence)
I	รุนแรง (severe)	น้อยกว่าร้อยละ 10 และพบสภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเรื้อรัง (Chronic nonspherocytic hemolytic)	พบได้น้อย
II	รุนแรง (severe)	น้อยกว่าร้อยละ 10 และพบการแตกของเม็ดเลือดแดงเมื่อได้รับการกระตุ้น (intermittent hemolysis)	พบได้ในประชากรเอเชียและบริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean) (36)
III	ปานกลาง (moderate)	ร้อยละ 10 – 60 และเม็ดเลือดแดงแตกเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น	ร้อยละ 10 ของประชากรผู้ชายผิวดำในสหรัฐอเมริกา (36)
IV	น้อย – ไม่แสดงอาการ (mild to none)	ร้อยละ 100– 150	พบยาก
V	ไม่แสดงอาการ (none)	มากกว่าร้อยละ 150	พบยาก

2.5 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD

การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สามารถทำได้หลายวิธีทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ เช่น การวัดเชิงปริมาณด้วยวิธี G6PD activity assay เป็นการวัดกัมมันตภาพเอนไซม์ซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) อ้างอิงจาก WHO โดยวัดอัตราการผลิต NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และการวัดเชิงคุณภาพด้วยวิธี fluorescent spot test (FST) ทั้งนี้การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ชนิดที่เป็น heterozygote นั้นทำได้ยาก เนื่องจากระดับเอนไซม์มีความผันผวนสูงตามระดับ lyonization จึงจำเป็นต้องใช้วิธีตรวจวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ G6PD และมะเร็ง

2.6.1 การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ G6PD และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

การทำงานของเอนไซม์ G6PD ถูกควบคุมด้วยโปรตีน p53 โดยยับยั้งการรวมตัวเป็นไดเมอร์ (dimer) ของเอนไซม์ G6PD ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (inactive) p53 เป็นยีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่ยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ที่ผิดปกติไปเป็นเซลล์เนื้องอก (tumor suppressor gene) โดยมีหน้าที่ที่หลากหลาย เช่น ควบคุมการแบ่งเซลล์ (cell cycle) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (anti-proliferation) และเหนี่ยวนำเซลล์ที่ผิดปกติให้เข้าสู่ภาวะหยุดการแบ่งตัว (cell arrest) (41, 42) จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์ (human colon cancer; HCT116) พบว่าเซลล์ที่ขาด p53 ($p53^{-/-}$) มีความต้องการในการใช้กลูโคสมากขึ้น (glucose consumption) และเพิ่มการสร้าง lactate แต่เมื่อยับยั้งเอนไซม์ G6PD โดยใช้ siRNA และ DHEA กลับทำให้ระดับการใช้กลูโคสลดลง แต่เพิ่มระดับการผลิต lactate ได้ อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวให้ผลเพียงเล็กน้อยในกลุ่ม $p53^{+/+}$ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภาวะพร่องเอนไซม์ p53 (p53 deficiency) สามารถเพิ่มระดับการนำเข้าของกลูโคสได้โดยผ่านทางวิถี PPP (43)

ในปัจจุบันกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน *G6PD* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีน *G6PD* ในปี 1998 พบว่าเมื่อกลายบริเวณ -102 ถึง -57 และ -48 ถึง -31 base แล้วยีนมีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า promoter บริเวณดังกล่าวมีความสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *G6PD* (44) อีกทั้งพบตำแหน่งที่ Sp1 (stimulatory protein 1) และ Sp3 (stimulatory protein 3) ซึ่งเป็น transcription factor ของ DNMTs (45) และ p53 (46) สามารถเข้าจับได้หลายบริเวณของ promoter ยีน *G6PD* เช่นกัน (47)

2.6.2 การศึกษาเอนไซม์ G6PD ในผู้ป่วยมะเร็ง

จากการศึกษา *in vivo* ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 164 ราย พบว่าระดับการแสดงออกของ G6PD ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ร่วมกับอาการ (11) ดังนี้

- size of tumor ($p=0.039$)
- lymph node metastasis ($p=0.044$)
- invasion ($p=0.003$)
- TNM stage (T : size of the original, N : nearby (regional) lymph nodes, and M : distant metastasis) ($p=0.030$)
- survival rate ($p=0.010$)

อีกทั้งพบงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าระดับโปรตีน G6PD อาจสามารถใช้ในการทำนายโรค (prognosis) เบื้องต้นของมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น (primary breast carcinoma) ได้ (12)

จากผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ G6PD จากฐานข้อมูล Gene Expression Omnibus (GEO) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ CU-Dream พบว่ายีน *G6PD* แสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma; GSE1420) และเซลล์มะเร็งปอด (squamous cell lung carcinoma; GSE12472)

การศึกษาในผู้ป่วยเพศชายที่เป็นมะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma) ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จำนวน 108 คนเทียบกับคนปกติ 75 คน พบว่าระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ที่ลดลงมีความสัมพันธ์ต่อ tumor stage และการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง แต่ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดซ้ำของมะเร็ง (tumor recurrence) แสดงให้เห็นว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูกมีความเกี่ยวข้องกับ poor prognosis (20)

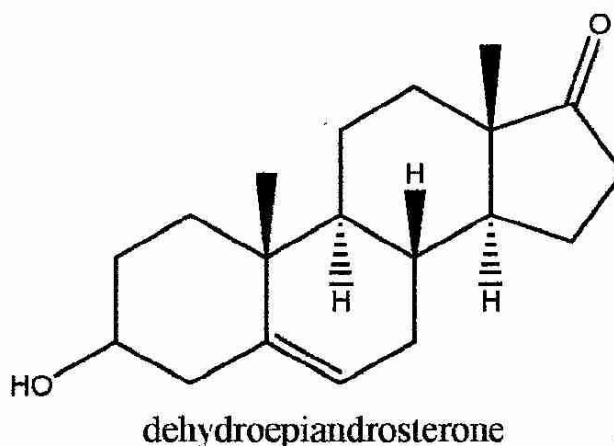
จากการศึกษาในกลุ่มประชากรผู้ป่วยชาย 186 คนที่เป็นมะเร็งเทียบกับผู้ป่วยชายโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคทางโลหิตวิทยาจำนวน 186 คน ที่เข้ารับการรักษาในช่วงเวลาและโรงพยาบาลเดียวกัน พบว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ไม่สามารถลดความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลงได้ อย่างไรก็ตามได้มีการแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD กับความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (18) ทั้งนี้ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หรือไม่นั้นยังคงไม่สามารถสรุปได้ (17)

2.6.3 การศึกษาเอนไซม์ G6PD ของเซลล์มะเร็งในระบบ *in vitro*

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายีน *G6PD* มีความสัมพันธ์ต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human melanoma cells) ที่ถูก knockdown *G6PD* โดยใช้ shRNA ทำให้เซลล์แบ่งตัวลดลงร้อยละ 25 และเพิ่มอัตรา apoptosis เป็นร้อยละ 40 (10) เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ถูก knockdown *G6PD* สามารถเพิ่มระดับการเกิด apoptosis เมื่อถูกกระตุ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) โดยผ่านทาง MAPK (mitogen-activated protein kinase) (16) ในขณะที่เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) ที่ถูกยับยั้ง *G6PD* โดยใช้ DHEA สามารถลดระดับ metastasis และการแบ่งเซลล์ได้ (15)

2.7 ดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเทอโรน (Dehydroepiandrosterone; DHEA)

DHEA เป็นฮอร์โมนชนิดสเตอรอยด์ (steroid) (รูปที่ 5) ถูกสร้างจากต่อมหมวกไต (adrenal gland) (48) DHEA ถูกนำไปใช้สังเคราะห์แอนโดรเจน (androgen) และเอสโตรเจน (estrogen) มีการศึกษาที่พบว่า DHEA สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) (49) และเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (14) โดยยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด (50) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า DHEA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *G6PD* แบบ non-competitive inhibition (14) ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 5 โครงสร้างของ DHEA

(ภาพจาก: http://www.benbest.com/nutrceut/DHEA_S.jpg)

2.8 ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดขึ้นจากความไม่สมดุลระหว่างระดับอนุมูลอิสระ (oxidants) หรือรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species; ROS) กับสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidants) ความไม่สมดุลของ ROS ที่เกิดขึ้นสร้างความเสียหายให้กับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ที่อาจนำไปสู่การเกิดมะเร็ง ทั้งเหนี่ยวนำให้เกิด mutation ของ DNA (51) และผ่านการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (52, 53) ROS ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจาก mitochondria ที่ได้จากการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (54) ทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion; O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) และไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; $OH\cdot$) (55) นอกจากนี้ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน mitochondria ยังสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างรีแอกทีฟไนโตรเจนสปีชีส์ (reactive nitrogen species; RNS) (54)

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าระดับภาวะ oxidative stress เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ DNA นำไปสู่ความไม่เสถียรของจีโนม (genome instability) ซึ่งทำให้เซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (56) นอกจากนี้ยังพบว่า ROS มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง โดยเพิ่มระดับของเอนไซม์กลุ่ม นิโคตินาไมด์ อดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ออกซิเดส (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase) หรือ Nox เช่น Nox4 และ Nox5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการผลิต ROS สามารถส่งเสริมการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของมะเร็งตัวอ่อนและมะเร็งปอด ผ่านการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B (57) อีกทั้ง ROS ยังกระตุ้นการทำงานของ Akt/PKB (58) ซึ่งยับยั้งการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ผ่านการยับยั้งโปรตีน caspase-9 Bcl-2 homology3 และ Bad (59)

ภาวะ oxidative stress ยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของ NF- κ B ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell transformation) การเพิ่มจำนวน (cell proliferation) และการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) (60) ภาวะ oxidative stress อย่างอ่อนๆ (mild oxidative stress) สามารถกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ได้เล็กน้อย ซึ่งมีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ human Burkitt lymphoma Daudi cell line ในทางตรงกันข้ามการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (61) แต่อย่างไรก็ตามภาวะ extensive oxidative stress กลับยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ทั้งนี้กลไกการทำงานของ NF- κ B โดยผ่าน ROS ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (62)

ระดับ ROS อาจมีความสำคัญต่อเซลล์มะเร็งในการแพร่กระจายตัว (metastasis) จากการทดลองกระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะเครียดในระดับที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย (sub-lethal oxidative stress) ในเซลล์เนื้องอกหนู (murine mammary tumor cell) สามารถลดการเกาะติดกับลามินิน (laminin) และไฟโบรเนกติน (fibronectin) แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการหลุดออกจากตำแหน่งเดิมและแพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่นของเซลล์มะเร็ง (63)

2.9 ภาวะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis)

รูปแบบการตายของเซลล์แบบ apoptosis เป็นหนึ่งในกระบวนการตายของเซลล์ซึ่งเป็นการตายแบบที่ต้องอาศัยพลังงานและมีกลไกที่จำเพาะ apoptosis สามารถเกิดขึ้นได้ในเซลล์ปกติ ทั้งช่วง development และการแก่ชราของเซลล์ (aging) เพื่อรักษาสมดุลประชากรของเซลล์ในเนื้อเยื่อให้เหมาะสม อย่างไรก็ตามการกระตุ้นทางกายภาพหรือทางระดับโมเลกุลที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ก็สามารถกระตุ้น apoptosis ได้เช่นเดียวกัน apoptosis สามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะเห็นการหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage) การรวมตัวกันแน่นของ cytoplasm จนเป็นตะปุ่มตะป่ำ (membrane blebbing) และการรวมตัวของโครมาติน (chromatin condensation)

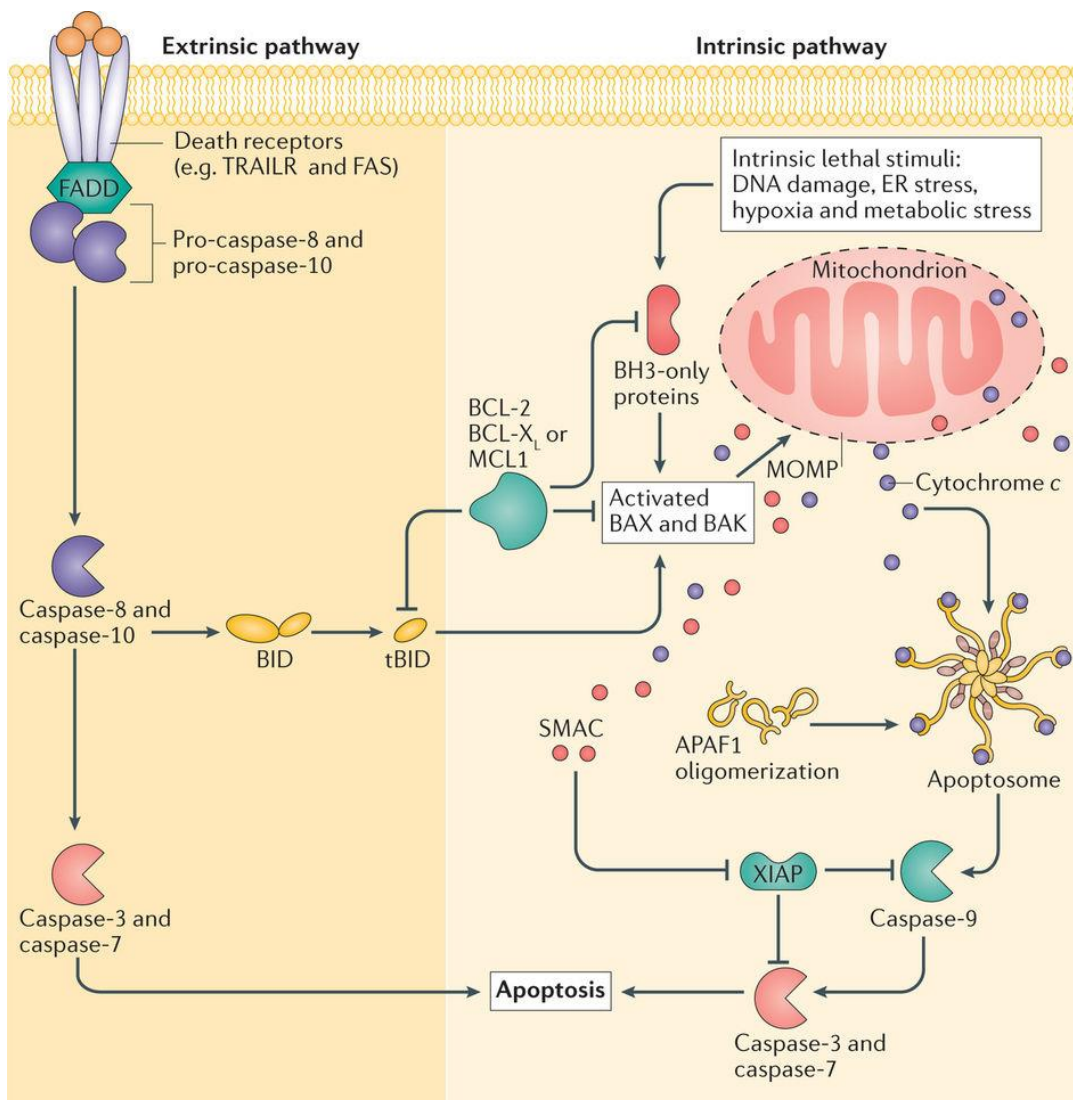
2.9.1 Extrinsic pathway (รูปที่ 6)

การส่งสัญญาณจากภายนอก (extrinsic pathway) ให้เกิด apoptosis เป็นการกระตุ้นที่มีตัวส่งสัญญาณและตัวรับมาเกี่ยวข้อง (receptor) เช่น tumor necrosis factor (TNF) (64) หรือ Fas ligand (FasL)/ Fas receptor (FasR) เป็นต้น การกระตุ้น FasR ผ่าน FasL ทำให้เกิด death-inducing signaling complex (DISC) ซึ่งประกอบด้วย Fas-associated protein with death domain (FADD) caspase 8 และ caspase 10 และมีผลกระตุ้นการทำงานของ caspase 8 และ caspase 3 ตามลำดับ การกระตุ้น caspase 8 และ 10 ทำให้โปรตีน BID (BH3 interacting-domain death agonist) ถูกตัด (cleavage) กลายเป็น tBID ซึ่งจะไปควบคุมให้เกิด pro-apoptosis (65) โดยผ่านการทำงานของโปรตีน BAX (BCL2 associated X) ให้เคลื่อนที่จาก cytosol ไปยัง mitochondria มีผลทำให้ไซโทโครมซี (cytochrome c) รั่วออกจาก mitochondria เข้าสู่ cytosol เรียกสภาวะนี้ว่า การสูญเสียความสามารถในการเลือกผ่านเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นนอก (mitochondrial outer membrane permeabilization; MOMP) (66) ในทางกลับกันโปรตีน Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) เป็นโปรตีนที่ยับยั้ง apoptosis โดยสามารถยับยั้งการทำงานของ tBid และ BAX นอกจากนี้ Bcl-2 ยังมีบทบาทสำคัญในการรักษาความต่างศักย์ของเยื่อหุ้ม mitochondria

(mitochondrial membrane potential) เพื่อยับยั้งการรั่วของ cytochrome C ออกมาภายนอก (67)

2.9.2 Intrinsic pathway (รูปที่ 6)

การส่งสัญญาณจากภายใน (Intrinsic pathway) ให้เกิด apoptosis เป็นการกระตุ้นที่ไม่จำเป็นต้องผ่านตัวรับ โดยการกระตุ้นสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การขาดฮอร์โมน (hormones) หรือไซโตไคน์ (cytokines) ที่ส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ รวมไปถึงการได้รับสารพิษ รังสี อนุมูลอิสระที่มากเกินไป ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) ภาวะเครียดที่เอ็นโดพลาสมิครีติคูลัม (ER stress) เป็นต้น ผลกระทบจากข้างต้นส่งผลให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นใน (inner mitochondrial membrane) เสื่อมสภาพและทำให้ cytochrome c รั่วออกมาสู่ cytosol (68) และรวมตัวกับ Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) และ pro-caspase-9 กลายเป็นอะพอพอโตโซม (apoptosome) (69, 70) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ caspase 9 และ 3 ตามลำดับ



Nature Reviews | Cancer

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 6 Extrinsic pathway และ intrinsic pathway ของการเกิด apoptosis (71)

2.10 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและมะเร็ง (DNA methylation and cancer)

2.10.1 DNA methylation และกลไกการควบคุม

DNA methylation คือการเติมหมู่เมทิล (methyl group) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (cytosine) ของ DNA โดยการเคลื่อนย้ายหมู่ methyl นี้สามารถเกิดขึ้นได้ผ่านเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMTs) ซึ่งสามารถย้ายหมู่ methyl จาก

เอส-อดีนิว เมทไทโอนีน (S-adenly methionine; SAM) ไปยังเบสไซโตซีน โดย DNMTs สามารถแบ่งการทำงานออกได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มเอนไซม์ DNMT1 ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl ให้แก่ DNA สายใหม่ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ DNA replication เพื่อคงรูปแบบ methylation ของ DNA สายใหม่ให้เหมือนสายต้นแบบ (DNA template) (รูปที่ 7b)

2. กลุ่มเอนไซม์ DNMT3a และ DNMT3b ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl ในตำแหน่งใหม่ (*de novo*) (รูปที่ 7a) ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดถึงการเข้าจับของ DNMT3a และ DNMT3b ที่บริเวณ target sequence (72) อย่างไรก็ตามมีทฤษฎีที่คาดว่าอาจเกิดจากการควบคุมผ่าน transcription factor ที่เคลื่อนที่ไปยัง target sequence แล้วเหนี่ยวนำหรือป้องกัน DNMT3a/b ให้เข้ามาเติมหมู่ methyl ที่ target sequence หรือ transcription factor อาจสามารถเข้าจับกับ DNMTa/b ได้โดยตรง (73)

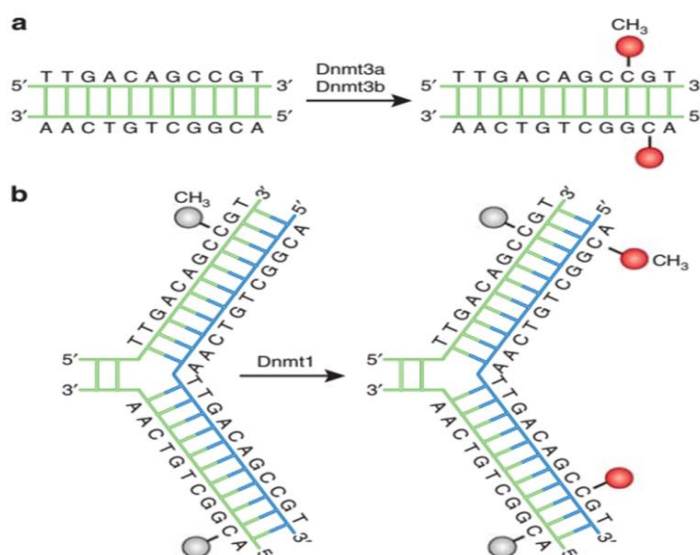
การเกิด methylation ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่เบส cytosine ที่ติดอยู่กับเบสกวานีน (guanine) ที่เรียกว่าตำแหน่ง CpG แต่อาจพบการเติมหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง non-CpG Methylation ได้เช่นกัน ทั้งนี้ methylation ที่เกิดขึ้นบริเวณ non-CpG Methylation จะหายไปเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มที่ (mature tissues) (74, 75) การเกิด DNA methylation มีความสำคัญต่อทั้ง tissue-specific gene expression และ X chromosome inactivation

2.10.2 ความสัมพันธ์ของ DNA methylation กับเซลล์มะเร็ง

DNMT1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม DNA methyl transferase ที่พบมากที่สุดเซลล์ (76) โดยมีหน้าที่หลักในการรักษาระดับ DNA methylation ภายในเซลล์ จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการ knock out ยีน *DNMT1* ในเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์ (human colorectal carcinoma) ทำให้ระดับ DNA methylation ลดลงเพียงร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับระดับปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการรักษาระดับ DNA methylation อาจพบได้ใน DNMT กลุ่มอื่นเช่นกัน (77) ในขณะที่การ knock out ยีน *Dnmt3a* ซึ่งเป็น DNMT ที่ควบคุมการเกิด methylation ที่ตำแหน่งใหม่ (*de novo*) ในหนู (mice) พบว่าหนูมีชีวิตรอดเพียง 4 สัปดาห์ (78)

จากการศึกษาระดับเมทิลเลชันของทั้งเซลล์ (global methylation) ในเซลล์มะเร็งพบว่า มีระดับลดลงในส่วน repetitive elements ซึ่งอาจนำไปสู่ความไม่เสถียรของจีโนม (genomic instability) ในการศึกษา promoter ของยีน *Rb* ซึ่งเป็น tumor suppressor gene ใน primary retinoblastoma tumor ของมนุษย์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ methylation

(hypermethylation) ซึ่งนำไปสู่การลดระดับการแสดงออกของยีน Rb เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ส่งผลให้เซลล์เข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน (acute myeloid leukaemia; AML) ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *DNMT3a* ใน hematopoietic stem cell ของผู้ป่วย โดยไม่พบการกลายพันธุ์ในยีนอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค AML (79-81) แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของ *DNMT3a* อาจมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดได้ (82) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนกลุ่ม DNMTs สามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น ในมะเร็งกระเพาะอาหาร (83) และมะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) พบการเพิ่มขึ้นทั้งระดับ mRNA และโปรตีนของ DNMT1 และ DNMT3a โดยผลจาก Chip assay แสดงให้เห็นถึงการเข้าจับกันระหว่างโปรตีน DNMT1 กับโปรตีน GLI (Glioma-Associated Oncogene Family Zinc Finger) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GLI อาจมีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของ DNMT1 (84) การเพิ่มขึ้นของโปรตีน DNMT1 อย่างมีนัยสำคัญยังสามารถพบได้ในเซลล์ human hepatocellular carcinomas โดยสามารถย้อมติดโปรตีน DNMT1 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งตับได้ถึงร้อยละ 43 แต่ไม่พบการย้อมติดสี (negative staining) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับปกติ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน DNMT1 กับการเจริญของเนื้องอก (poor tumor differentiation) ($p = 0.0006$) รวมไปถึงอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย โดยอัตราการรอดชีวิตลดลงในผู้ป่วยมีมะเร็งปอดที่มีระดับการแสดงออกของ DNMT1 สูง (85)



รูปที่ 7 กลุ่มของเอนไซม์ DNMTs และการทำงาน (72)

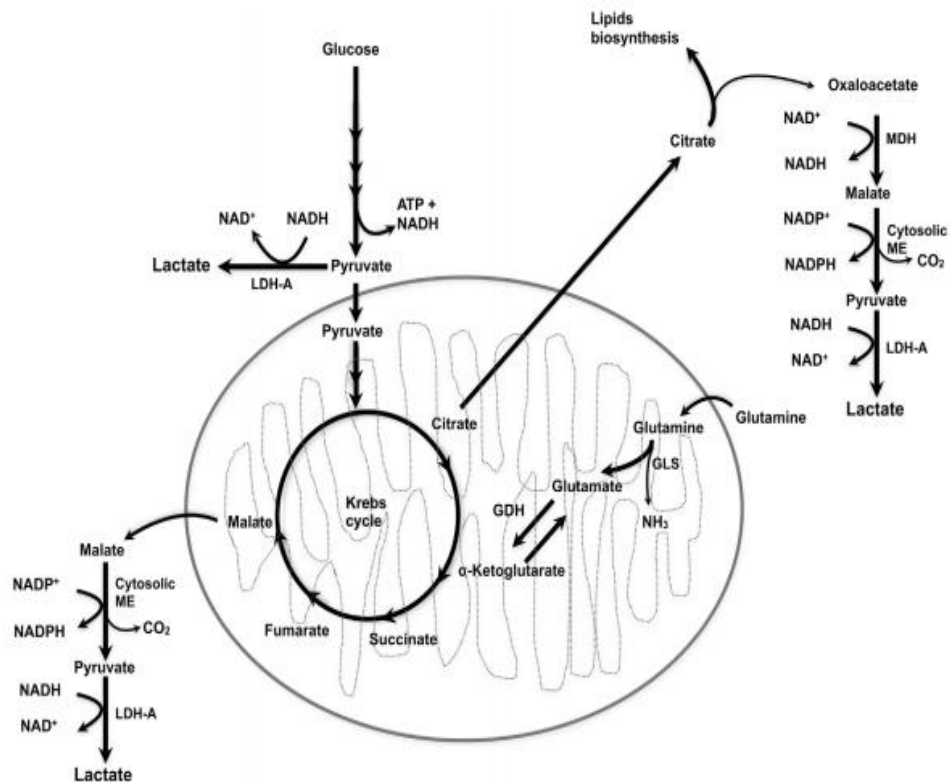
2.11 Lactate กับเซลล์มะเร็ง

วิถีการสร้าง lactate สามารถพบเกือบทุกเซลล์ของร่างกาย และ lactate จะถูกกำจัดออกได้ทางตับและไต (86) ในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ (normoxic) ของเซลล์ปกติ วิถี glycolysis จะเปลี่ยน pyruvate เป็น อะซีติลโคเอ (acetyl-CoA) โดยอาศัยเอนไซม์ ไพรูเวท ดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase; PDH) แล้วจึงเข้าสู่วัฏจักร TCA ต่อไป แต่ในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนต่ำ (hypoxic) pyruvate จะถูกเปลี่ยนเป็น lactate โดยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) แต่สำหรับเซลล์มะเร็ง แม้อยู่ในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ เซลล์เลือกที่จะเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น lactate มากกว่าที่จะเข้าสู่วัฏจักร TCA (87) (รูปที่ 8) กล่าวคือใช้พลังงานจาก aerobic glycolysis หรือ Warburg effect (21) การเปลี่ยนรูปแบบการสร้างและใช้พลังงานของเซลล์มะเร็ง (metabolic reprogramming) ทำให้เซลล์มะเร็งมีการสร้าง lactate ที่สูงกว่าเซลล์ปกติถึง 40 เท่า (88) นอกจากวิถี aerobic glycolysis ที่สามารถสร้าง lactate แล้ว กลูตามีน (glutamine) ก็สามารถนำมาใช้สร้าง lactate ได้โดยผ่านทางกลูตามิโนไลซิส (glutaminolysis) โดย glutamine ถูกเปลี่ยนเป็น glutamate แล้วจึงถูกเปลี่ยนเป็น แอลฟาคีโตกลูตาเลท (α -ketoglutarate) โดยอาศัยเอนไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase) ใน mitochondria แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นมาเลท (malate) และออกซิไดซ์เป็น pyruvate ตามลำดับ (89, 90) ผลที่เกิดขึ้นจากการสร้างและหลั่ง lactate ออกสู่ภายนอกเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ก่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (acidic microenvironment) (pH 6.0-6.5) (91)

lactate มีส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณให้เกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) รวมไปถึงกีดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) (92-94) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เป็นกรด สามารถยับยั้ง proliferation ของ T-cell และการสร้าง cytokine ของ human cytotoxic T lymphocytes ลงถึงร้อยละ 95 แต่เซลล์สามารถกลับมาทำงานได้ตามปกติเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี lactate (lactic acid-free medium) (92) นอกจากนี้สภาวะ acidic microenvironment ที่เกิดขึ้นรอบๆ เซลล์มะเร็งยังสามารถกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวด (pain) และ metastasis ของมะเร็งในผู้ป่วยโรคมะเร็งบางชนิดอีกด้วย (95)

การขนส่ง lactate เข้าออกเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้ผ่านทางโมโนคาร์บ็อกซิเลส ทรานสปอร์ตเตอร์ (monocarboxylate transporters; MCTs) ซึ่งพบอยู่ที่บริเวณพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์ (96) การยับยั้งการทำงานของ MCT4 ทำให้เกิดการสะสมของ lactate ภายในเซลล์ (lactate accumulation) และนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็ง (97) จากการทดลองด้วยการลดการแสดงออก (knockdown) ของ MCT4 ทำให้เห็นว่า MCT4 มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณอื่น (migration) และการบุกรุก (invasion) ของเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) (98)

และเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ (human lung cancer) (99) อีกทั้งพบว่าการลดระดับการแสดงออกของ MCT1 และ MCT4 โดยใช้ siRNA ในเซลล์ basal-like breast cancer ในสภาวะ normoxic และภาวะ hypoxic สามารถลดความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง (aggressive) (91) ด้วยเหตุนี้ระดับ lactate จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ (biomarker) ในการติดตามระดับของ Warburg effect ในเซลล์มะเร็งได้

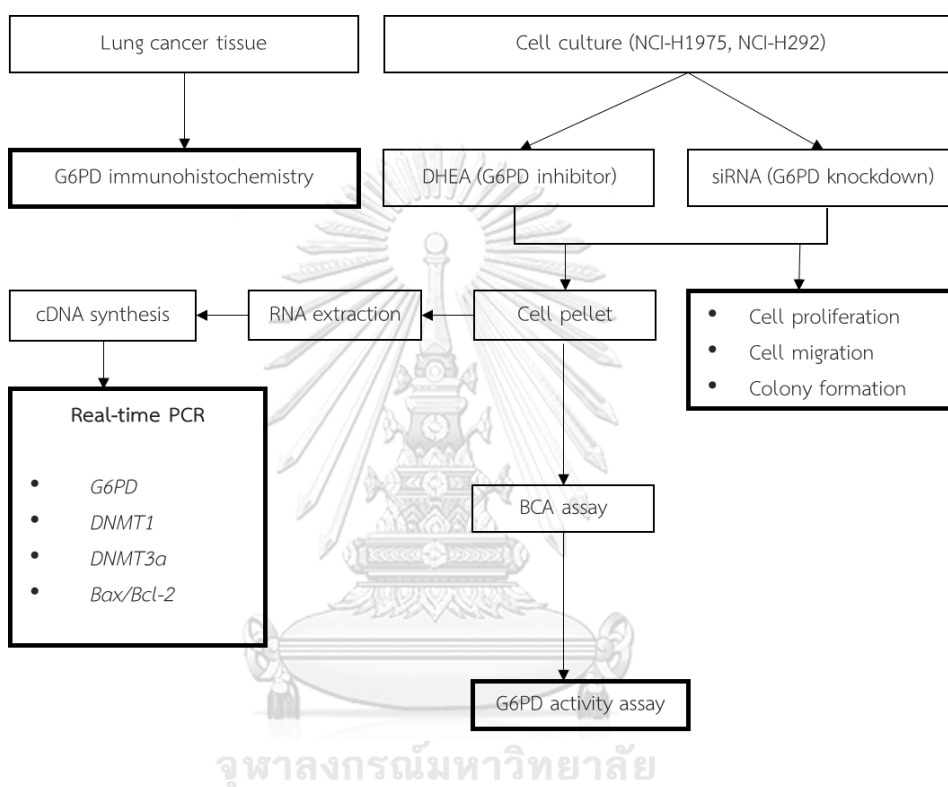


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 8 Lactate synthesis (97)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การออกแบบงานวิจัย



3.2 การย้อมโปรตีน G6PD ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยวิธี 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

3.2.1 ขั้นตอนการกำจัดพาราฟิน

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

3.2.2 ขั้นตอนการย้อม Hematoxylin และ Eosin

1. นำแผ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ผ่านการกำจัดพาราฟินมาทำการย้อมด้วย hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
2. จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อล้างสีส่วนเกินออก แล้วจึงกำจัดน้ำส่วนเกินโดยจุ่มสไลด์ลงใน 95 % ethanol จุ่มสไลด์ลงในสี eosin เป็นเวลา 5 นาที
3. ล้างสไลด์ขึ้นลง 2 ครั้ง ด้วย 95 % ethanol เพื่อล้างสีส่วนเกิน
4. ล้างด้วย absolute ethanol เพื่อดึงน้ำส่วนเกินออก
5. กำจัด ethanol และทำให้เนื้อเยื่อใสขึ้นโดยจุ่มสไลด์ขึ้นลง 10 ครั้งใน xylene
6. เช็ดแผ่นสไลด์ให้แห้ง แล้วจึงทำการตรึงเนื้อเยื่อโดยหยด mounting medium บนชิ้นเนื้อแล้วจึงนำแผ่นกระจกมาปิดทับ
7. ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปนำไปศึกษา

3.2.3 ขั้นตอนการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry

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

1. ซึ้นเนื้อบนสไลด์ที่ผ่านการกำจัดพาราฟินออกแล้วจากข้อ 3.2.1
2. เติมสารละลาย Tris/EDTA pH 9.0 และ sodium citrate pH 6.0 บนสไลด์
3. แล้วให้ความร้อนโดยไมโครเวฟเป็นเวลา 3 นาทีแล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 10 นาที
4. ล้างสไลด์ด้วย TBS plus 0.025% Triton X-100
5. แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% normal serum ร่วมกับ 1% BSA ใน TBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
6. ซับสารละลายส่วนเกินรอบๆ ซึ้นเนื้อบนสไลด์
7. ย้อมสี hematoxylin เป็นเวลา 8 นาที แล้วจึงล้างน้ำเพื่อกำจัดสีส่วนเกินออก
8. ย้อม G6PD primary antibody (HPA000247) (Sigma, USA) สัดส่วน 1 ส่วน ต่อ TBS 500 ส่วน ร่วมกับ 1% BSA
9. บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน
10. หลังจากนั้นล้างสไลด์ใน TBS 0.025% Triton 2 รอบครั้งละ 5 นาที
11. บ่มกับ Secondary antibody ที่ละลายใน TBS ร่วมกับ 1% BSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
12. ล้างด้วย TBS 5 นาที 3 รอบ รอการเกิดสี Horseradish peroxidase (HRP) 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ซึ่งให้สีน้ำตาลบริเวณที่มีการแสดงออกของ G6PD และทำการบันทึกภาพและวัดความเข้มของสีโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Inverted phase contrast (Nikon Eclipse TS100) (Nikon, Japan)

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด 2 ชนิดดังนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เซลล์มะเร็งปอดที่ใช้ในงานวิจัย (ATCC, USA)

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
NCI-H292	mucoepidermoid carcinoma; non- small cell lung cancer	Female	TP53 (tumor suppressor transcription factor)	c.818G>A
			CDKN2A	c.1_471del471

โดยเพาะเลี้ยงในภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 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) เลี้ยงเซลล์ใน

ตู้เพาะเลี้ยง (BINDER, Germany) ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระดับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95-99

3.4 การเก็บรักษาเพลเลต (pellet) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

เพื่อเก็บรักษาเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการใช้ทดลอง 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

3.5 การวัดระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCL-H1975 และ NCL-H292 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^6 และเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะถูกนำไปทดสอบ

วิธีการที่ใช้ในการวัดระดับกัมมันตภาพเอนไซม์เป็นไปตามการศึกษาก่อนหน้านี้ (100) 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, MgCl₂ (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)

3.6 การทดสอบความเป็นพิษและความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดของ DHEA

เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DHEA (Merck Millipore, USA) ต่อความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell viability) เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-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

3.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA

เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DHEA ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดยพิจารณาจากระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD และ cell viability จากข้อที่ 3.4 โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-H292 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 หลุม (12-well plates) (Costar®, USA) ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 3.8×10^5 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม FBS ร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุม เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งมีความหนาแน่น

ประมาณร้อยละ 70 แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมด้วย DHEA ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 นาโนโมลาร์ และ 1, 10, 100, 200, 300, 400, 500 ไมโครโมลาร์ โดยทำละลาย DHEA ใน DMSO แล้วจึงเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย FBS ร้อยละ 10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อหลุม ระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ของเซลล์จะถูกวัดที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค spectrophotometry โดยใช้ Microplate reader (BioTEK Instruments, Inc., USA) แล้วจึงทำการเก็บ pellet มาวัดระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD โดยทันที เพื่อหาช่วงเวลาในระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ถูกยับยั้งอย่างคงที่

3.8 การทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อลดการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCL-H1975 และ NCL-H292 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 3) ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ตามลำดับ (หลอด B)

ผสมสารจากหลอด A และ หลอด B เข้าด้วยกันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำละลายดังกล่าวปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่แล้ว 450 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปทำการทดลองต่อไป

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

ตารางที่ 3 แสดงลำดับ RNA ของ siRNA ที่จำเพาะต่อ G6PD mRNA และ Scramble (control)

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

3.9 การทดสอบความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอด

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-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

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

A = พื้นที่ของช่องว่างเริ่มต้น

B = พื้นที่ของช่องว่างที่ช่วงเวลา x

3.10 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 โดย

เจือจาง 10 ไมโครลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ lactate standard ด้วย lactate assay ปริมาตร 990 ไมโครลิตร เติม lactate standards ลงในภาชนะเลี้ยวเซลล์ขนาด 96 หลุม ปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8, 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ เติม lactate assay buffer ในแต่ละหลุม ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ lactate standards ที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาโนโมลต่อหลุมตามลำดับ

3.10.1 ขั้นตอนเตรียม master mix และ blank sample

เตรียม master mix ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย

- a. Lactate Assay buffer 46 ไมโครลิตร
- b. Lactate Enzyme Mix 2 ไมโครลิตร
- c. Lactate Substrate Mix 2 ไมโครลิตร

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

3.10.2 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

3.11 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ทำให้ pellet แยกด้วยคลื่นเสียงด้วยเครื่อง sonicator แล้วจึงนำส่วน supernatant ที่ได้มา วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้ 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

3.12 การวัดความสามารถการสร้างโคโลนี (colony forming assay) (101, 102)

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 จากนั้น เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย 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 แล้วเอียงภาชนะให้สีย้อมสัมผัสกับโคโลนีอย่างทั่วถึง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ดูดสีย้อมทั้งหมดออก ทำการล้างสีย้อมส่วนเกินโดยจุ่มภาชนะที่ย้อมลงในอ่างที่มีน้ำประปา และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เกิดขึ้นบนกระดาษสีขาว

3.13 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

นำเซลล์มะเร็งปอดที่ได้จากการทดลองมาสกัด 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 x 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 x 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

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

3.14 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 template 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

3.15 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) โดยลำดับขั้นตอนหมุมที่ใช้ตามตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้สำหรับ Real-time PCR

Stage	Temperature (°C)	Time (min)	
Pre-denaturation	95	15	
Denaturation	95	15 sec	} 40 รอบ
Annealing	ตารางที่ 5	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Melt curve	95	15 sec	
	64	1	
	95	15	

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ (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		



3.16 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22.0 (IBM, USA) และ Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA)

เก็บข้อมูลขึ้นเนื้อมะเร็งปอดของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในช่วง พ.ศ. 2552 - 2557 จำนวน 64 ราย โดยรวบรวมจากเวชระเบียน ซึ่งข้อมูล ประกอบด้วย เพศ อายุ วันที่ได้รับการวินิจฉัย ขนาดของเนื้องอก ระยะของเนื้องอก เป็นต้น

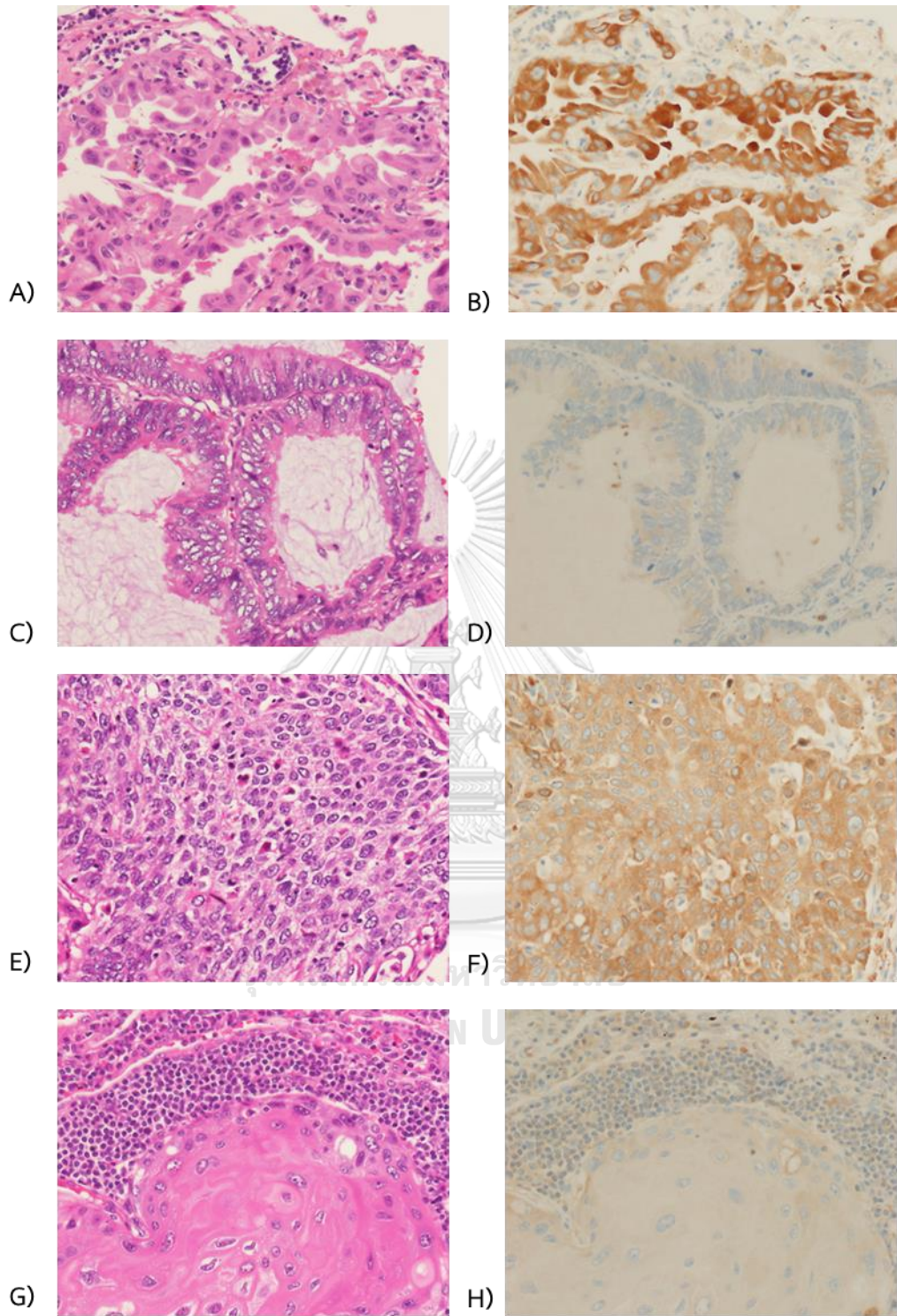
ข้อมูลเชิงคุณภาพของการย้อมติด G6PD (ผลบวก, ผลลบ) เพศ และระยะของมะเร็ง นำเสนอข้อมูลในรูปแบบตาราง โดยนำเสนอด้วยจำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ) และนำเสนอความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยสถิติ Chi-Square ที่ความเชื่อมั่น p -value น้อยกว่า 0.05

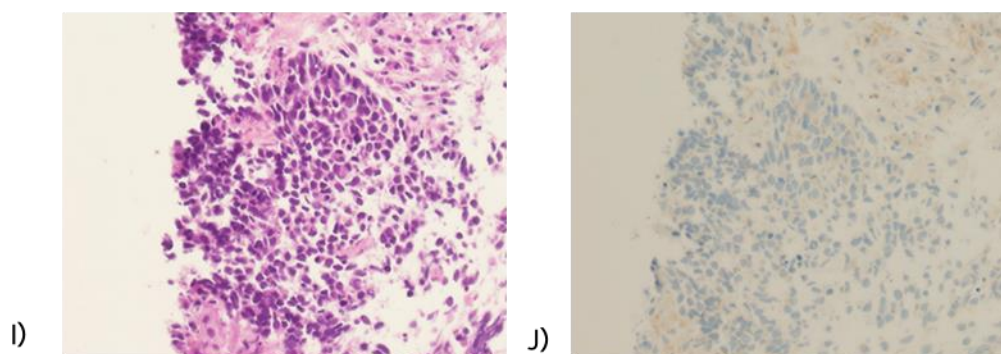
ข้อมูลด้าน อายุ และขนาดของมะเร็ง นำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย (Mean) \pm ค่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD standard deviation) การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Independent t-test โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติประเมินที่ความเชื่อมั่น p -value น้อยกว่า 0.05 ข้อมูลของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การ migration colony formation และการแสดงออกของยีน นำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) นำเสนอความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Tukey โดยค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติประเมินที่ความเชื่อมั่น p -value น้อยกว่า 0.05

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การย้อมโปรตีน G6PD ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยวิธี immunohistochemistry และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด 64 ราย แบ่งเป็น non small cell จำนวน 44 ราย และ small cell 20 ราย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6, 7 เมื่อศึกษาระดับโปรตีน G6PD ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้งหมด พบการย้อมติดสี G6PD (positive stain) เฉพาะในเซลล์มะเร็งเท่านั้น แต่ไม่พบในเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง (รูปที่ 9) 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 9) แสดงให้เห็นว่าระดับโปรตีน G6PD มีความสัมพันธ์กับชนิดของมะเร็งปอดชนิด non small cell





รูปที่ 9 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 6 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 7 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

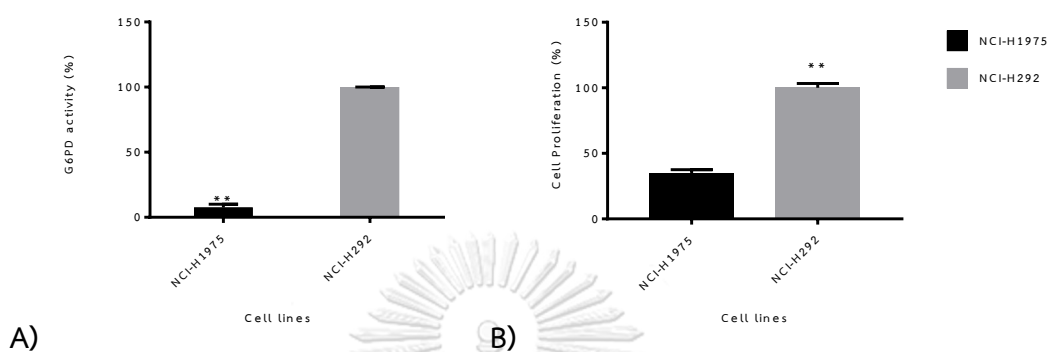
** Chi-square test ระหว่าง negative และ positive ภายในกลุ่มชนิดของเซลล์มะเร็งปอด

ข้อมูลของคนไข้บางรายไม่ครบถ้วน

4.2 ระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยง

หลังจากที่พบระดับเอนไซม์ G6PD ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็งปอดจากการย้อมขึ้นเนื้อด้วยวิธี immunohistochemistry แล้ว ผู้วิจัยจึงทำการประเมินระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่า NCL-H292 มีระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD มากกว่า NCL-H1975 ร้อยละ 92.5 (รูปที่ 10A) อีกทั้งพบว่าเซลล์ NCL-292 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่า NCL-1975 ร้อยละ 65.2 (รูปที่ 10B) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า

G6PD น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบสมมติฐานในการทดลองต่อไป



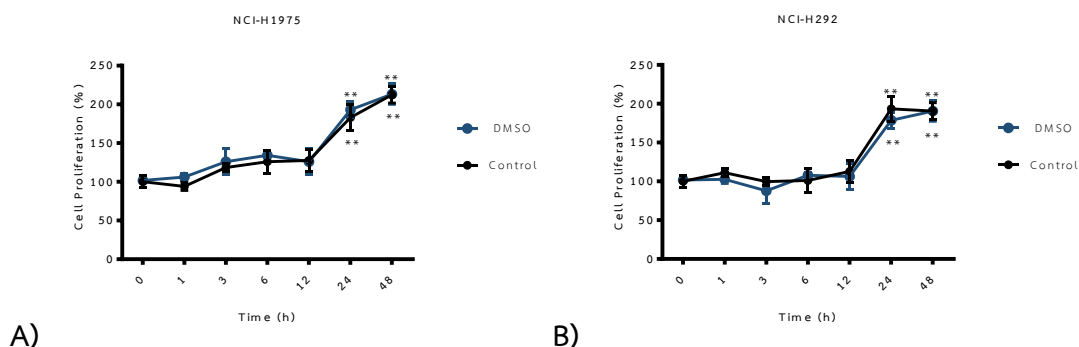
รูปที่ 10 แสดงผลของระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ของ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292 ในสภาวะปกติ (A) และระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 เปรียบเทียบกับ NCI-H292 ในสภาวะปกติ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (mean) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย $**p < 0.01$

4.3 ผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD

4.3.1 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย DHEA และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์

เพื่อทดสอบระดับความเข้มข้นของ DMSO (ตัวทำละลายของ DHEA) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาจากอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค MTT assay ผลการทดลองพบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ของ DMSO ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 เป็นตัวทำละลาย DHEA ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 11)

อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด NCI-H1975 และ NCI-H292 ที่ช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 11) จึงเลือก 2 ช่วงเวลาดังกล่าวมาศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในการทดลองต่อไป



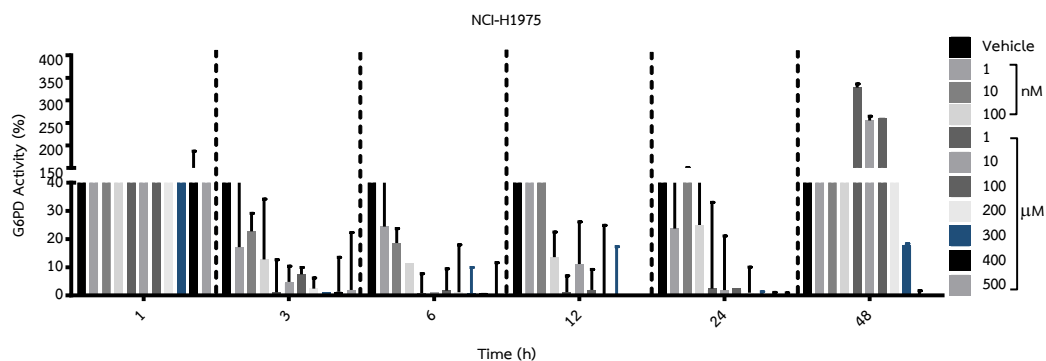
รูปที่ 11 แสดงผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เมื่อเลี้ยงใน DMSO ร้อยละ 0.4 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการเพิ่มจำนวนของเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย $**p < 0.01$

4.3.2 การยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA

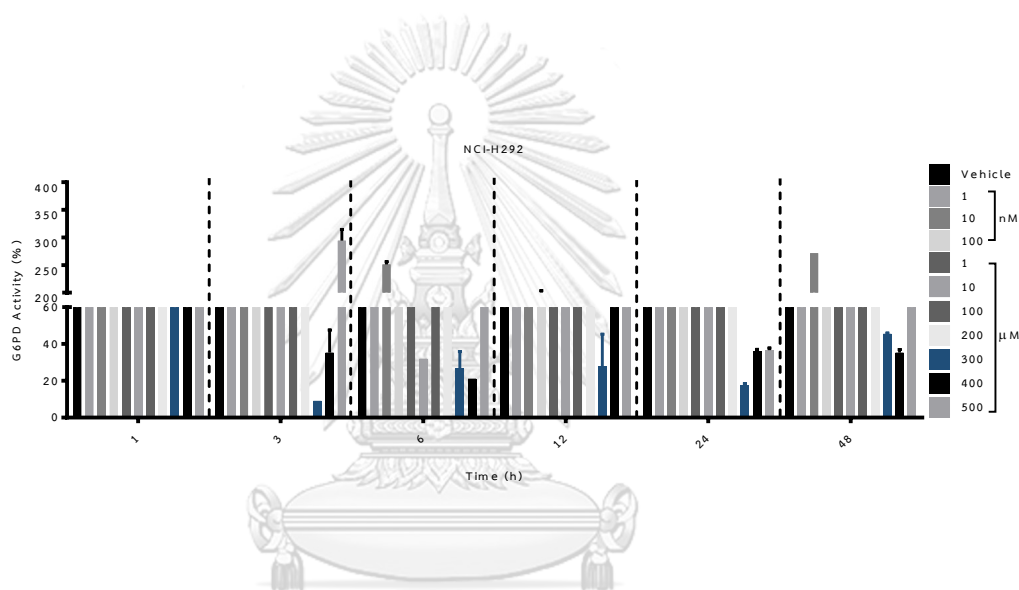
เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DHEA ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดยพิจารณาจากระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD และความเสถียรของการยับยั้ง DHEA ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 นาโนโมลาร์ และ 1, 10, 100, 200, 300, 400, 500 ไมโครโมลาร์ โดยระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ของเซลล์จะถูกวัดที่เวลา 0, 1, 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 12) ในขณะที่พบการตกตะกอนของ DHEA ที่ความเข้มข้น 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ จากสภาวะอิมพัลจึงไม่นำความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการทดลองต่อไป

A)



B)



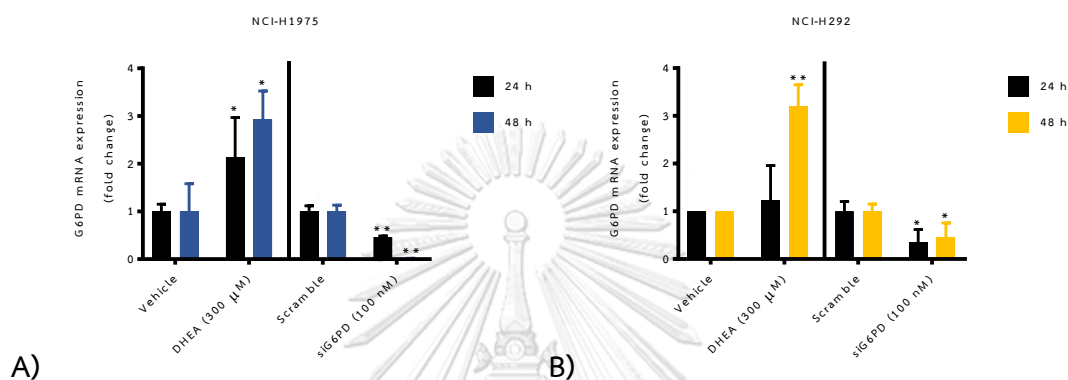
รูปที่ 12 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

4.3.3 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 13) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อการยับยั้ง

การทำงานของเอนไซม์ 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 13)



รูปที่ 13 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 ** $p < 0.001$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

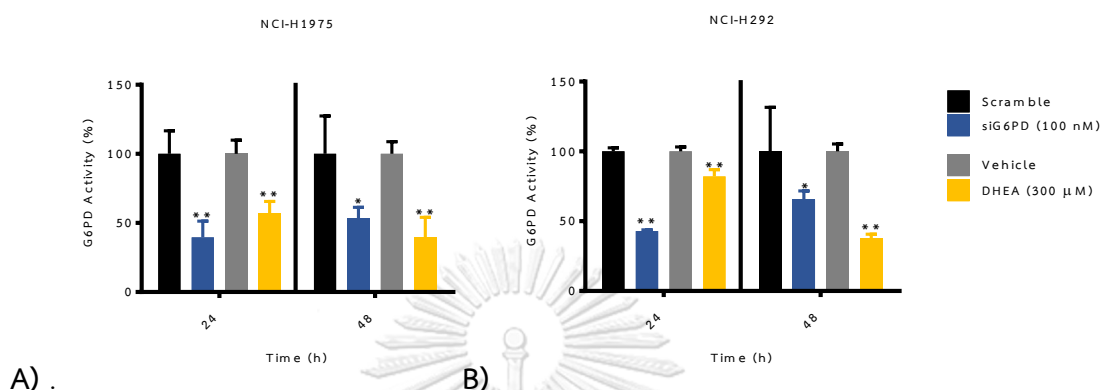
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3.4 การยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดยใช้ DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ และการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน G6PD โดยใช้ siRNA โดยระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ของเซลล์จะถูกวัดที่เวลา 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 14)

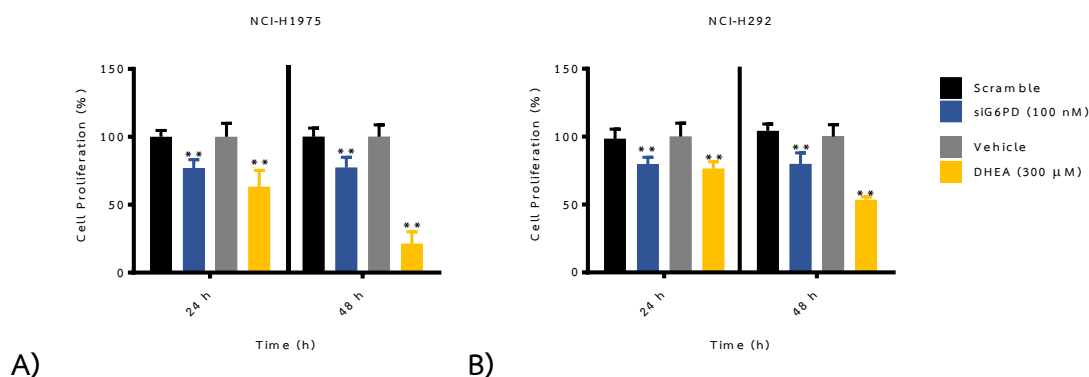


รูปที่ 14 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

4.4 การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดโดย DHEA และ siRNA

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

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ของ DHEA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน ของ NCI-H1975 และ NCI-H292 ลงเหลือร้อยละ 63.1 และ 76.5 ที่เวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ 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 ชั่วโมงตามลำดับ และลดลงเหลือร้อยละ 77.3 และ 79.9 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 แสดงผลระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และ siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดง Mean \pm SD โดย ** $p < 0.001$

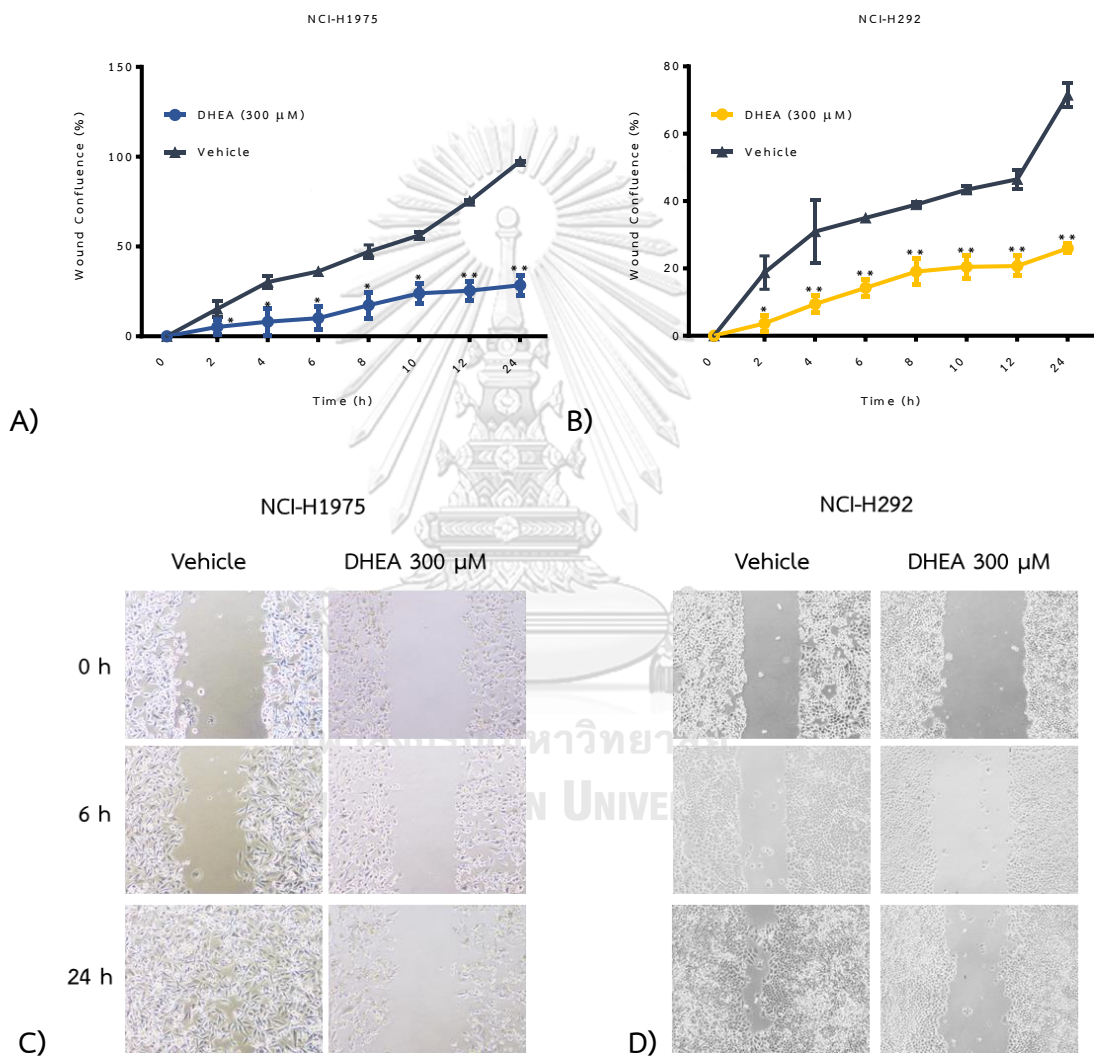
4.5 ความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA และเมื่อลดการแสดงออกของ G6PD โดยใช้ siRNA

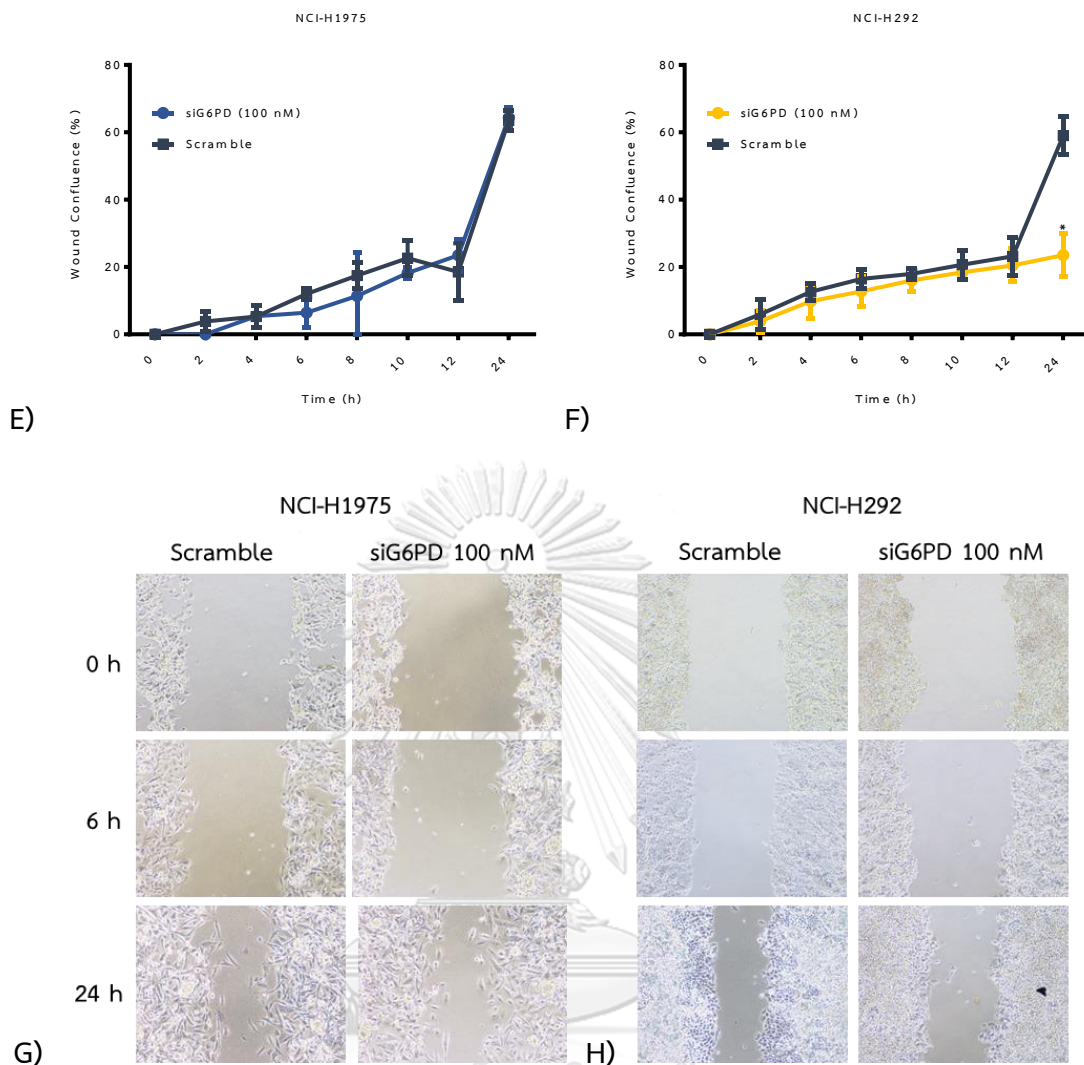
ภายหลังจากทราบว่าผลการลดการทำงานของเอนไซม์ G6PD มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์แล้ว ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาคูณสมบัติ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยง เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ หรือเมื่อถูกลดระดับการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์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

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA มีอัตราการเคลื่อนที่เข้ามาปิดช่องว่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง NCI-H1975 และ NCI-H292 ในกลุ่มที่ถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA มีอัตราการเคลื่อนที่เข้ามาปิดช่องว่างร้อยละ 28.4, 25.9 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle) ที่ 24 ชั่วโมง ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เข้ามาปิดช่องว่างร้อยละ 97.4 และ 71.4 ตามลำดับ (**รูปที่ 16A-D**)

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

เคลื่อนที่มาปิดช่องว่างของกลุ่มที่ใส่ siRNA อยู่ที่ร้อยละ 23.54 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (scramble) ที่สามารถเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างได้ร้อยละ 59.0 ที่ช่วงเวลาเดียวกัน ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่มาปิดช่องว่างของเซลล์ NCI-H1975 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 16E-H)





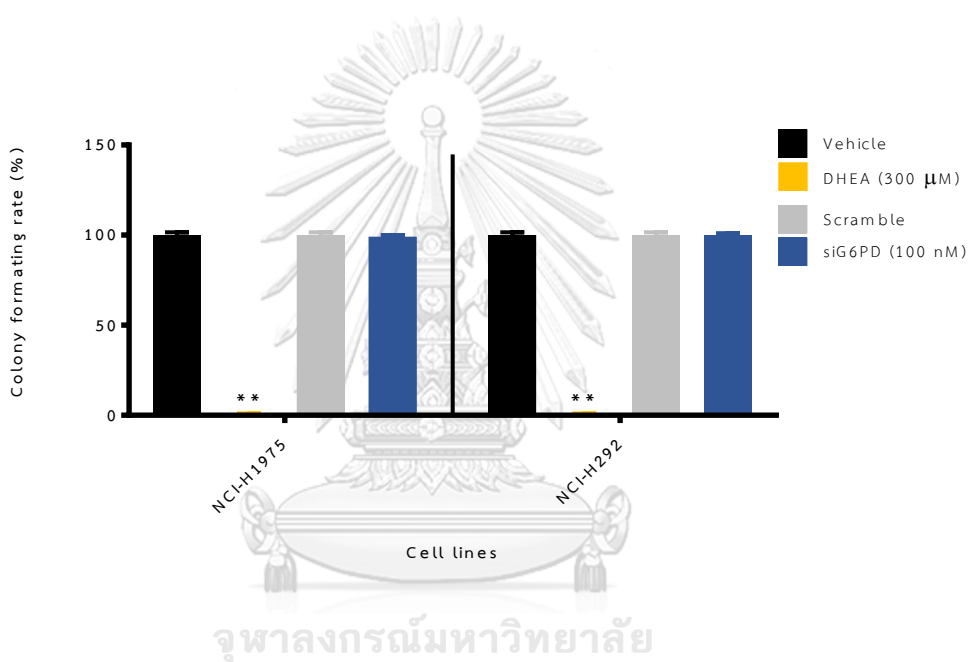
รูปที่ 16 แสดงผลอัตราการเข้ามาปิดช่องว่างของเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA (A-D) หรือยับยั้งการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA (E-H) ใน NCI-H1975 (A, C, E, G) และ NCI-H292 (B, D, F, H) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ข้อมูลแสดงอัตราการเข้ามาปิดช่องว่างของเซลล์ Mean \pm SD โดย $**p < 0.001$

4.6 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 17)

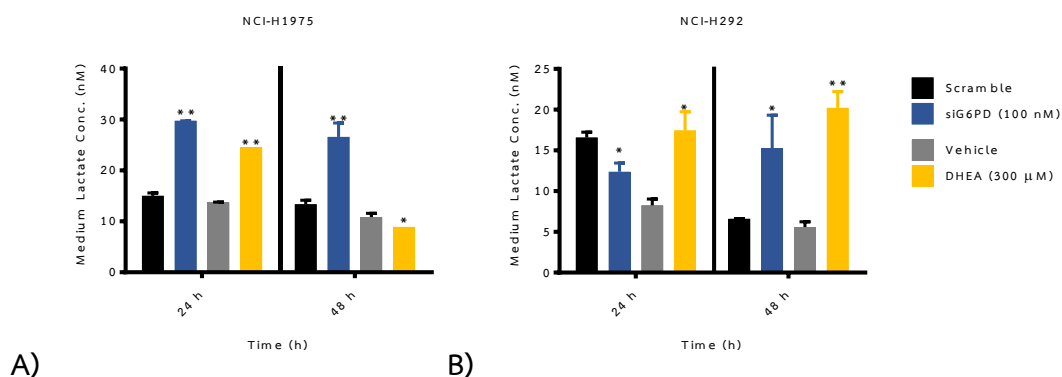


รูปที่ 17 แสดงผลอัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ G6PD โดย siRNA ใน NCI-H1975 และ NCI-H292 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงอัตราการสร้างโคโลนีของเซลล์ Mean \pm SD โดย $**p < 0.001$

4.7 การวัดระดับ 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 ด้วยเอนไซม์เอนไซม์ lactate dehydrogenase โดยปกติกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นได้มากในเซลล์มะเร็ง เป็นผลมาจาก 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 18)



รูปที่ 18 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 ** $p < 0.001$

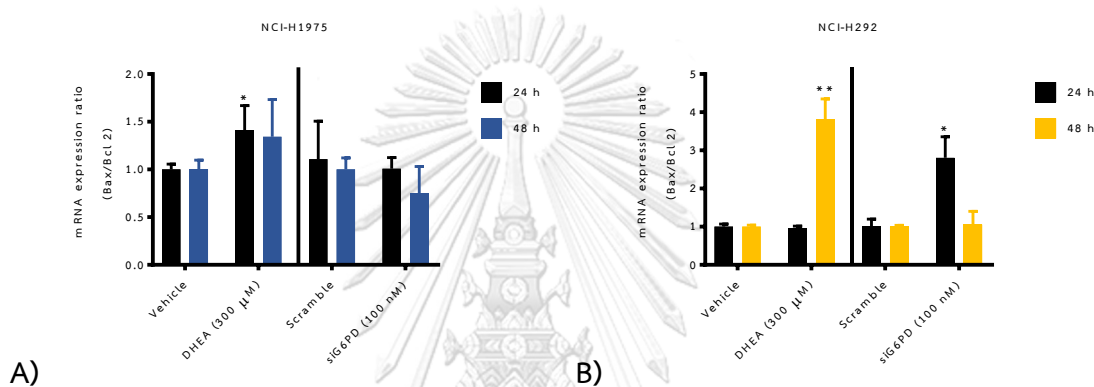
4.8 ระดับการแสดงออกของยีน

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

4.8.1 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis

Bax และ Bcl2 เป็นโปรตีนที่ควบคุมการเกิด apoptosis โดย Bax เป็นยีนที่กระตุ้นการเกิด apoptosis และ Bcl2 เป็นยีนที่ยับยั้งการเกิด apoptosis ดังนั้นการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จึงอาจทำนาย apoptosis ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อเอนไซม์ 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 19)



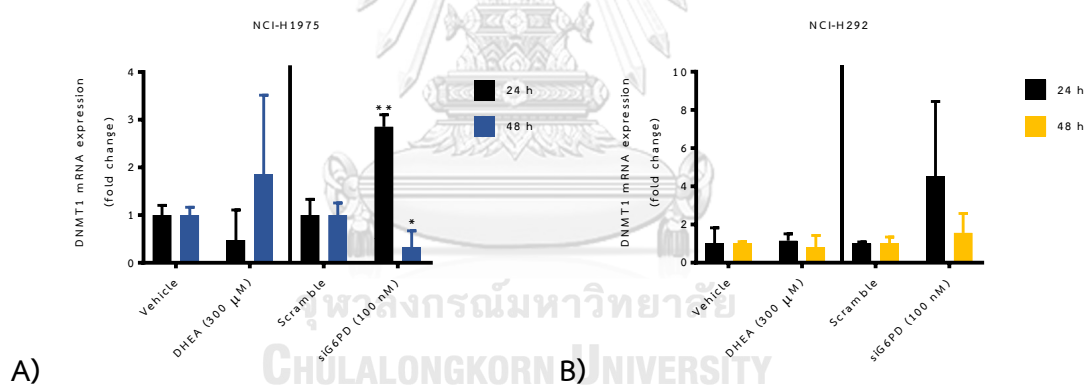
รูปที่ 19 แสดงผลระดับการแสดงออกของยีน Bax/Bcl2 เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *G6PD* โดย DHEA หรือลดการแสดงออกของ *G6PD* โดย siRNA ใน NCI-H1975 (A) และ NCI-H292 (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle, Scramble) ข้อมูลแสดงระดับการแสดงออกของยีน (fold change) \pm SD โดย * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$

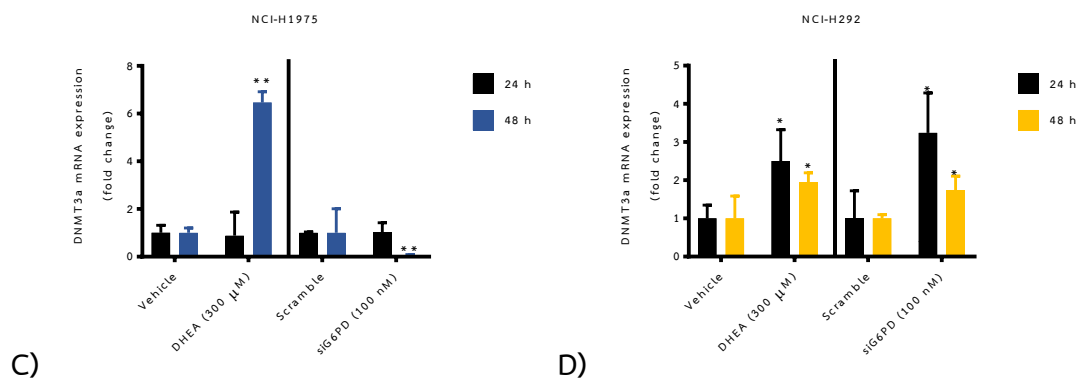
4.8.2 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ DNA methylation

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 23)

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 20)





รูปที่ 20 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



บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

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 ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 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 นอกจากการค้นพบนี้จะเป็นประโยชน์ในการวิจัยพื้นฐานแล้ว 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 CUDREAM 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 ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมัน และ nucleotide ตามลำดับ อีกทั้ง NADPH ช่วยลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงช่วยลด oxidative stress ที่เป็นพิษต่อเซลล์อีกประการหนึ่ง จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอดโดยเฉพาะ 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 เกิดการอิมมูตัมและตกตะกอน ทำให้ได้ผลการทดสอบที่อาจไม่สะท้อนคุณสมบัติของ DHEA อย่างแท้จริง นอกจากนี้พบว่า DHEA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ กลับเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ G6PD ในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะยีน *G6PD* มีการ

แสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการใส่ DHEA ดังจะเห็นได้จากผลการทดสอบการ แสดงออกของยีน *G6PD* ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าเป็นสถานะที่เซลล์พยายามตอบสนองต่อ DHEA หรือ ตัวยับยั้งแบบ non-competitive inhibitor ด้วยการเร่งสร้างเอนไซม์ *G6PD* ใหม่เพื่อทดแทนส่วนที่ ถูกยับยั้งไป ดังนั้นหากเซลล์มีการแสดงออกของ *G6PD* มากพอเมื่อเทียบกับระดับ DHEA แล้วเซลล์ก็ อาจจะสามารถปรับสภาพภายในเซลล์ให้เหมือนเดิมได้ แต่หากใช้ DHEA ให้มากเกินไป เกินกว่าที่ เซลล์จะสร้างเอนไซม์ *G6PD* ได้พอเพียงก็สามารถลดระดับการทำงานของเอนไซม์ *G6PD* ได้ ดังผล การทดสอบของ 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 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ก่อนหน้านี้ที่พบว่า 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 ของเซลล์มะเร็งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยัง อวัยวะอื่นในร่างกาย และนำไปสู่การรักษาที่ยากยิ่งขึ้น เพราะจำเป็นต้องใช้การรักษาด้วยเคมีบำบัด เข้าร่วมกับการรักษา รวมไปถึงโอกาสในการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง ดังนั้นการลดความสามารถใน การ migration ของเซลล์มะเร็งจึงเป็นอีกหนึ่งเป้าหมายในการควบคุมการแพร่กระจายและการ ลุกกลามของเซลล์มะเร็ง จากผลการทดสอบโดยใช้ DHEA พบว่าสามารถลดระดับการ migration ของ เซลล์มะเร็งปอดได้ทั้ง NCI-H1975 และ NCI-H292 ทั้งนี้การยับยั้ง cell migration ของมะเร็งปอด โดยใช้ DHEA อาจไม่ได้มีสาเหตุมาจากการที่ DHEA ไปยับยั้งการทำงานของ *G6PD* แล้วส่งผลต่อ cell migration แต่อาจเป็นผลโดยตรงของ DHEA เองที่ไปยับยั้ง cell migration ได้โดยไม่ต้องอาศัย *G6PD* เป็นสื่อกลาง ดังผลการทดสอบก่อนหน้านี้ที่พบว่า DHEA สามารถยับยั้งการ migration ของ เซลล์มะเร็งเต้านม (15, 104) มะเร็งปากมดลูก (103) และ vascular smooth muscle cells ได้ โดย DHEA ไปยับยั้งการยึดเกาะกับ fibronectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ migration ของ เซลล์ (105) การศึกษาวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปบทบาทของ *G6PD* ต่อการ migration ของเซลล์มะเร็ง ปอดได้ 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 ซึ่งเป็นการยับยั้งที่ขั้นตอนก่อนที่ mRNA จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD และระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้ง NCI-H1975 และ NCI-H292 และทั้งสองช่วงเวลาเมื่อ 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) (49) และเซลล์มะเร็งเต้านมได้ (14) แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่า siRNA ต่อ mRNA G6PD ไม่สามารถลด migration ของเซลล์ NCI-H1975 ได้ ในขณะเดียวกันผู้วิจัยไม่สามารถทดสอบ 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

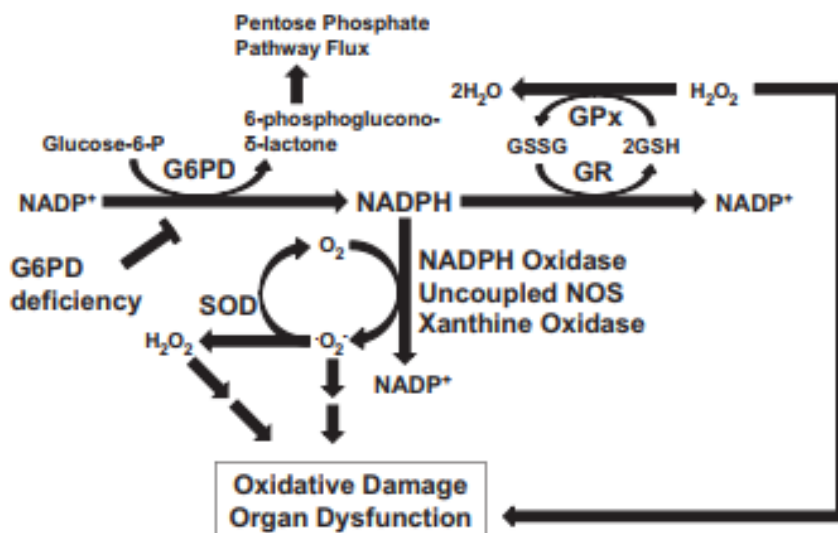
จากการศึกษาก่อนหน้าในเซลล์มะเร็งตับ (human hepatocellular carcinoma; HepG2) พบว่าการลดการแสดงออกของยีน *G6PD* โดยใช้ shRNA ทำให้ระดับความเครียดของเซลล์ (oxidative stress) เพิ่มสูงขึ้นนำไปสู่การยับยั้งการทำงานของ mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signalling) สำหรับการควบคุมการเพิ่มจำนวนและพัฒนาการของเซลล์ (106) นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้ง MKP-1 ไปมีผลต่อ cell viability ของเซลล์ไลน์มะเร็งผิวหนัง (human melanoma cell line; A375) (10) ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้ประกอบกับงานวิจัยที่กล่าวมา ชี้ให้เห็นว่า อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ลดลงนั้นอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากระดับ ROS ภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากสาเหตุระดับเอนไซม์ G6PD ที่ลดลง (7) ทำให้ NADPH และระบบ anti-oxidant ภายในเซลล์เสียหาย ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการส่งสัญญาณเพื่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในที่สุด (รูปที่ 21)

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 จากการศึกษาระดับ global DNA methylation ในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิดพบว่า เซลล์มะเร็งมักมีระดับ DNA methylation ลดต่ำลง (hypomethylation) และมักพบการกลายพันธุ์ของยีน DNMT3a ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ DNMT3a ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการเติมหมู่เมทิลให้แก่ DNA ในตำแหน่งใหม่ (*de novo* methyltransferase) การสูญเสียการทำงานของ DNMT3a นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้องอก (tumorigenesis) (107) จากการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ G6PD ด้วย DHEA และ siRNA ใน NCI-H292 และ NCI-H1975 พบการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของ DNMT3a ซึ่งอาจนำไปสู่การเพิ่ม

ระดับ global DNA methylation ของเซลล์มะเร็งโปด หรือ hypermethylation ในขณะที่ DNMT1 นั้นมีหน้าที่ในการควบคุมการรักษาระดับ DNA methylation ภายในเซลล์เมื่อเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ จากการทดลองในครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่พบระดับการแสดงออกของ DNMT1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น NCI-H1975 ที่ใช้ siRNA แสดงให้เห็นว่าโดยรวมแล้วระดับการแสดงออกของ DNMT1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ G6PD มะเร็งโปด

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 อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้วัดระดับ ROS ที่แท้จริงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายหลังการใส่ DHEA หรือ siRNA ผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องจึงใช้เป็นส่วนหนึ่งในการคาดการณ์ถึงการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดขึ้น

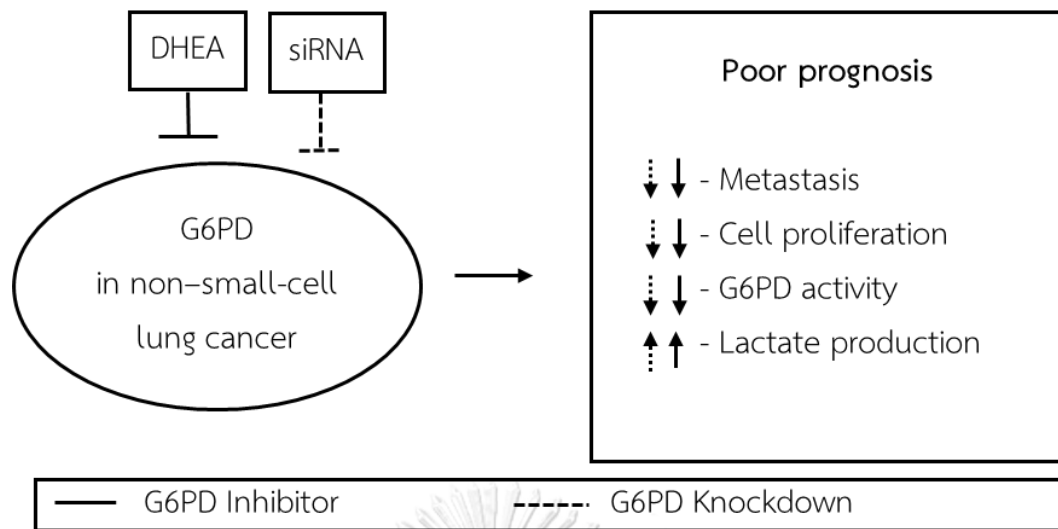


รูปที่ 21 G6PD กับการรักษาสมดุลของระดับ ROS ภายในเซลล์ (108)

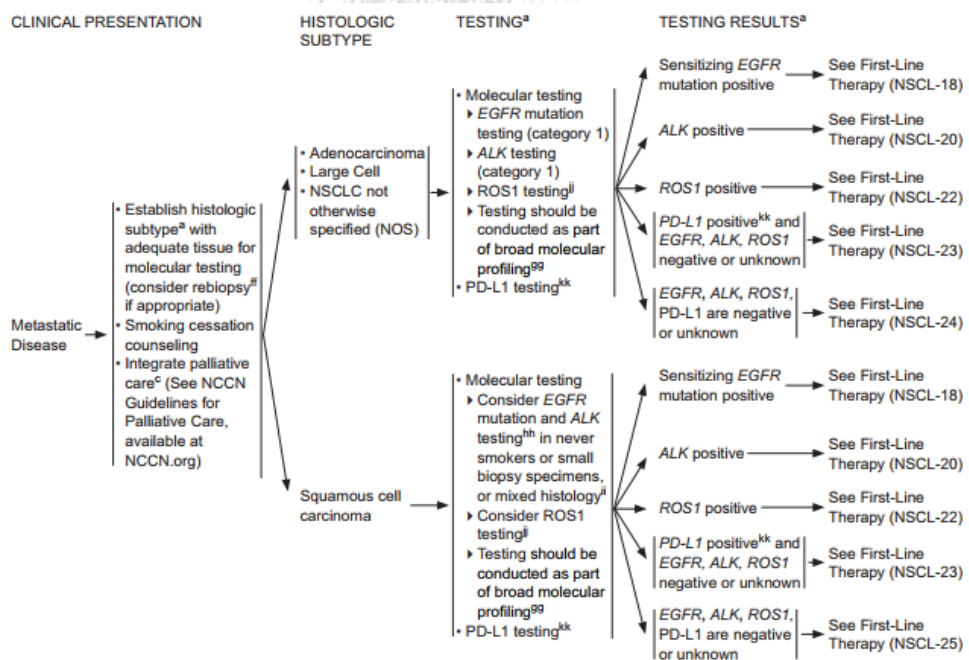
การยับยั้งเอนไซม์ G6PD ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการสร้าง lactate เนื่องจาก glucose 6-phosphate ที่เกิดขึ้นไม่สามารถเข้าสู่วิถี PPP ได้ จึงถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate และ lactate มากขึ้นตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอดมีความพยายามที่จะปรับวิถี metabolism ให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ โดยปกติในเซลล์มะเร็ง lactate มีส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณให้เกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) รวมไปถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression)(92-94) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสถานะที่เป็นกรด สามารถยับยั้ง proliferation ของ T-cell และการสร้าง cytokine ของ human cytotoxic T lymphocytes ลงถึงร้อยละ 95 (92) นอกจากนี้สถานะ acidic microenvironment ที่เกิดขึ้นรอบๆ เซลล์มะเร็งยังสามารถกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวด (pain) และ metastasis ของมะเร็งในผู้ป่วยโรคมะเร็งบางชนิดอีกด้วย (95) การศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดดูลูกจากผู้ป่วยจำนวน 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 ต่ำมีอัตราการรอดชีวิตโดยรวมและอัตราการรอดชีวิตที่ปลอดจากโรคนสูงกว่ากลุ่มที่มีระดับ lactate สูง ($p=0.015$ และ 0.014 ตามลำดับ) (109) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า lactate มีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน 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 ซึ่งสอดคล้องไปกับการ

ทดลอง *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 22) ดังนั้น G6PD จึงอาจเป็น targeted therapy ของการรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC ได้ โดยในปี 2017 Clinical Practice Guidelines in Oncology ได้อธิบายแนวทางการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอด (110) (รูปที่ 23) 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 (111) 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* ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาเพื่อนำมารักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ไม่ตอบสนองต่อยาที่มีอยู่ในปัจจุบันได้ หรือ G6PD อาจมีบทบาทในการใช้เป็น biomarker สำหรับการแยกมะเร็งปอดชนิด non small cell และ small cell อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ G6PD กับชนิดของมะเร็งปอดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังอาจนำไปสู่การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ G6PD ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของ G6PD ในเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งชนิดอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 22 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการลดระดับการแสดงออกของ G6PD ต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งปอด



รูปที่ 23 แนวทางการคัดกรองและรักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปอด (110)

สรุปผลการวิจัย

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



รายการอ้างอิง

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, Dessi 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. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*. 1925;9(1):148-63.
22. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.

23. Weinhouse S. The Warburg hypothesis fifty years later. *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie*. 1976;87(2):115-26.
24. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cell*. 2006;9(6):425-34.
25. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *Federation of European Biochemical Societies*. 2007;274(6):1393-418.
26. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.
27. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *Journal of clinical oncology*. 2006;24(28):4539-44.
28. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology*. 2013;31(8):992-1001.
29. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15009.
30. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(11):2556-68.
31. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-500.
32. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The lancet*. 2008;371(9606):64-74.
33. Ho H-y, Cheng M-l, Lu F-j, Chou Y-h, Stern A, Liang C-m, et al. Enhanced oxidative stress and accelerated cellular senescence in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29(2):156-69.

34. Ho H-y, Cheng M-l, Chiu DT-y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase—from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report*. 2007;12(3):109-18.
35. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. *Advances in Parasitology*. 2013;81:133-201.
36. Beutler E. G6PD deficiency. *BLOOD-NEW YORK*-. 1994;84:3613-.
37. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan; 2008.
38. Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood reviews*. 1996;10(1):45-52.
39. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood cells, molecules, and diseases*. 2002;28(2):93-103.
40. Organization BotWH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. *Bull World Health Organ*. 1989;67(6):601-11.
41. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
42. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413-31.
43. Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature Cell Biology*. 2011;13(3):310-6.
44. Franzè A, Ferrante MI, Fusco F, Santoro A, Sanzari E, Martini G, et al. Molecular anatomy of the human glucose 6-phosphate dehydrogenase core promoter. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 1998;437(3):313-8.
45. Kishikawa S, Murata T, Kimura H, Shiota K, Yokoyama KK. Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins. *Federation of European Biochemical Societies*. 2002;269(12):2961-70.

46. Lin R-K, Wu C-Y, Chang J-W, Juan L-J, Hsu H-S, Chen C-Y, et al. Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer research*. 2010;70(14):5807-17.
47. Philippe M, Larondelle Y, Lemaigre F, Mariamé B, Delhez H, Mason P, et al. Promoter Function of the Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Depends on Two GC Boxes that are Cell Specifically Controlled. *Federation of European Biochemical Societies*. 1994;226(2):377-84.
48. ORENTREICH N, BRIND JL, RIZER RL, VOGELMAN JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1984;59(3):551-5.
49. 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.
50. Regelson W, Kalimi M. Dehydroepiandrosterone (DHEA)–the Multifunctional Steroid. *Annals of the New York Academy of sciences*. 1994;719(1):564-75.
51. Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*. 2010;59(4):459.
52. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(4):290-302.
53. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer letters*. 2009;282(2):125-36.
54. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009;20(7):332-40.
55. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978;201(4359):875-80.
56. Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Current opinion in drug discovery & development*. 2009;12(2):240-5.
57. Kamata T. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer science*. 2009;100(8):1382-8.

58. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(4):777-90.
59. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
60. Baldwin Jr AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*. 1996;14(1):649-81.
61. Rath PC, Aggarwal BB. Antiproliferative effects of IFN- α correlate with the downregulation of nuclear factor- κ B in human Burkitt lymphoma Daudi cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2001;21(7):523-8.
62. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(11):1493-505.
63. Kundu N, Zhang S, Fulton AM. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 1995;13(1):16-22.
64. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
65. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development*. 2000;14(16):2060-71.
66. Schinzel A, Kaufmann T, Schuler M, Martinalbo J, Grubb D, Borner C. Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *The Journal of cell biology*. 2004;164(7):1021-32.
67. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999;399(6735):483-7.
68. Saelens X, Festjens N, Walle LV, Van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861.
69. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. 1999;1(1):5-15.

70. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*. 2004;23(10):2134-45.
71. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*. 2016.
72. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
73. Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Viré E, De Smet C, et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO journal*. 2005;24(2):336-46.
74. Ramsahoye BH, Binizskiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(10):5237-42.
75. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *nature*. 2009;462(7271):315-22.
76. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic acids research*. 1999;27(11):2291-8.
77. Rhee I, Jair K-W, Yen R-WC, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, et al. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*. 2000;404(6781):1003-7.
78. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He W-W, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 1999;236(1):87-95.
79. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi Y, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 2010;29(25):3723-31.

80. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(25):2424-33.
81. Yan X-J, Xu J, Gu Z-H, Pan C-M, Lu G, Shen Y, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nature genetics*. 2011;43(4):309-15.
82. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(3):152-65.
83. Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, et al. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *The American journal of pathology*. 2004;164(2):689-99.
84. He S, Wang F, Yang L, Guo C, Wan R, Ke A, et al. Expression of DNMT1 and DNMT3a are regulated by GLI1 in human pancreatic cancer. *PloS one*. 2011;6(11):e27684.
85. Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *International journal of cancer*. 2003;105(4):527-32.
86. Consoli A, Nurjhan N, Reilly J, Bier D, Gerich J. Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and lactate metabolism in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1990;259(5):E677-E84.
87. Phipers B. Lactate physiology in health and. *Continuing education in Anaesthesia, critical care & pain*. 2006;6(3):129.
88. Holm E, Hagmüller E, Staedt U, Schlickeiser G, Günther H-J, Leweling H, et al. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer research*. 1995;55(6):1373-8.
89. Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RG, McDonald JG, DeBerardinis RJ. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer research*. 2009;69(20):7986-93.

90. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3678.
91. Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Gonçalves V, Moreira AH, Queirós S, Vilaça JL, et al. Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth. *Oncotarget*. 2015;6(22):19177.
92. 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.
93. Mandler 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.
94. Husain Z, Seth P, Sukhatme V. Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: linking metabolism to cancer immunology. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):e26383.
95. Nagee 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.
96. Cheeti S, Warriar BK, Lee CH. The role of monocarboxylate transporters in uptake of lactic acid in HeLa cells. *International journal of pharmaceuticals*. 2006;325(1):48-54.
97. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MMB, Prado-Garcia H, Sánchez-García FJ. Lactate contribution to the tumor microenvironment: mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Frontiers in immunology*. 2016;7.
98. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer research*. 2007;67(9):4182-9.
99. Izumi H, Takahashi M, Uramoto H, Nakayama Y, Oyama T, Wang KY, et al. Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer science*. 2011;102(5):1007-13.

100. 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.
101. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006;1(5):2315.
102. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, MK KR, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The soft agar colony formation assay. *Journal of visualized experiments*. 2014(92):e51998-e.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.

109. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, SundfØr K, Rofstad EK, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer research*. 2000;60(4):916-21.
110. 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.
111. 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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

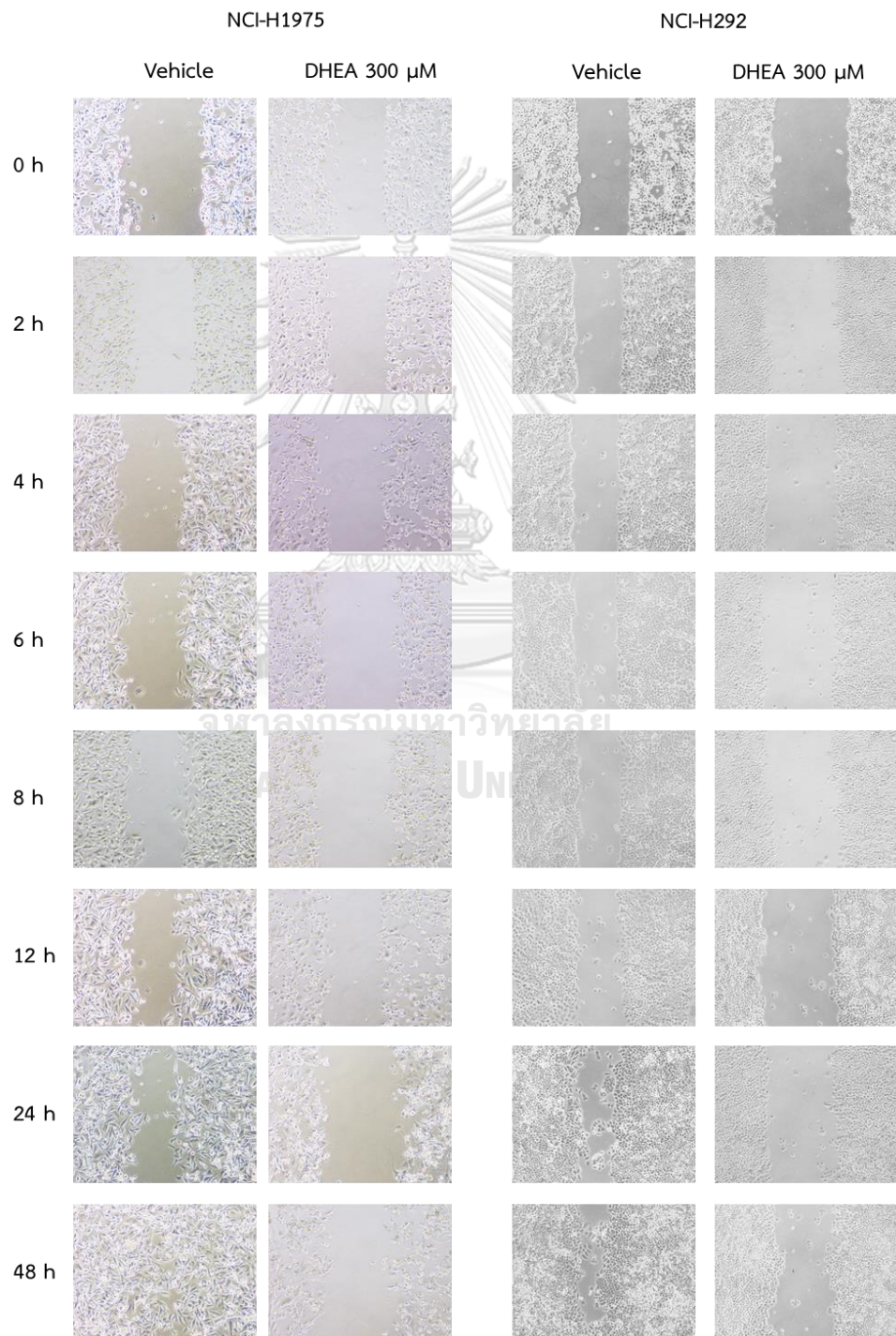
ALK	anaplastic lymphoma kinase
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ATP	adenosine triphosphate
BAX	BCL2 associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
DHEA	dehydroepiandrosterone
DISC	death-inducing signaling 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

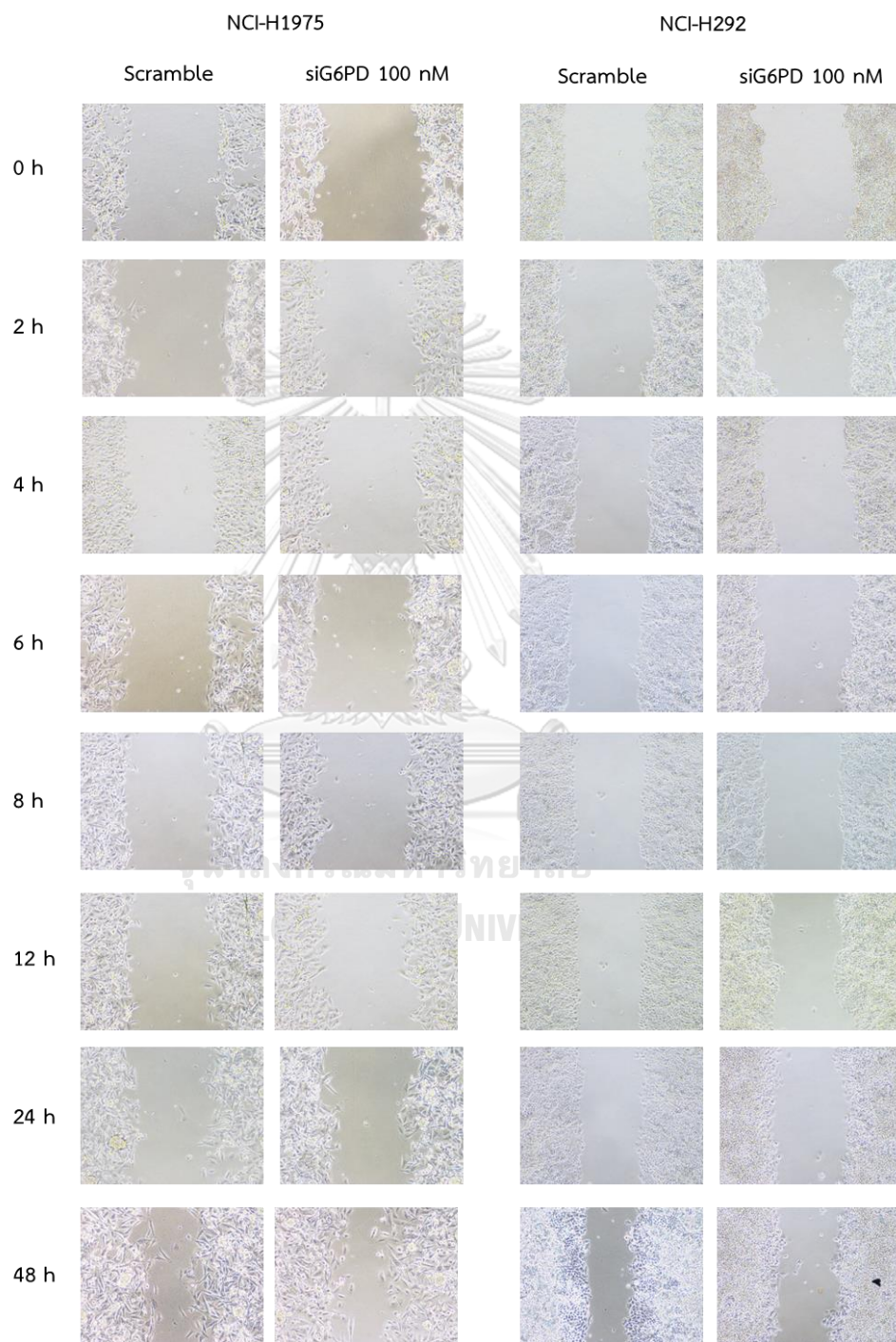


ภาคผนวก ข

1. ความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน G6PD โดย DHEA ใน NSCLC



2. ความสามารถในการ migration ของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อลดระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* โดย siRNA ใน NSCLC



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1. ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ นายพรชัย อนันตสมบุรณ์

เพศ ชาย

วัน/เดือน/ปี 18 เมษายน 2534

เบอร์โทรศัพท์ 092-814-3946

E-mail Pronchai.an@gmail.com

2. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 – ปัจจุบัน วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์

คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2552 – 2556 วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา (พันธุศาสตร์)

ภาควิชาพันธุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

3. ผลงานและทุนวิจัย

พ.ศ. 2557 รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 2 ในการนำเสนอผลงานประเภทโปสเตอร์
สาขา Human and Medical Research จากงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 20

รางวัลนิสิตผู้นำชื่อเสียงแก่คณะแพทย์จุฬาฯ