บทที่ 1
บทนำ

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2071921265

ที่มาและความสำคัญ

Long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1 หรือ L1s) เป็น retrotransposon ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มีประมาณร้อยละ 17 ของจีโนมทั้งหมด (1, 2) LINE-1 จัดอยู่ในกลุ่ม non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposon มีขนาด (full-length) ประมาณ 6 kb ซึ่ง LINE-1 เป็น mobile DNA ชนิดเดียวในจีโนมของมนุษย์ที่ยังทำงานอยู่ (functionally active) และการทำงานของ LINE-1 จะส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม ดังนั้นในภาวะปกติ LINE-1 จะถูกกดการทำงานไว้ ซึ่งกระบวนการที่สำคัญในการยับยั้งการทำงานของ LINE-1 คือ การเติมหมู่เมทิล-บนดีเอ็นเอ (DNA methylation) (3) หลายงานวิจัยพบว่า LINE-1 hypomethylation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ แล้วส่งผลให้จีโนมไม่เสถียร (4, 5) ที่สำคัญ LINE-1 hypomethylation มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด (6) และเชื่อว่าน่าจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ (markers) ของการเกิดมะเร็งหรือการดำเนินโรคของมะเร็งได้ (7) อย่างไรก็ตามสาเหตุและกลไกของการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์มะเร็งยังไม่ทราบแน่ชัด กระบวนการ DNA methylation อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) มีตัวให้หมู่เมทิล (methyl donor) คือ S-adenosylmethionine (SAM) ดังนั้นการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์มะเร็งอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของการสังเคราะห์ SAM ในเซลล์ (8)

SAM เป็นสารตัวกลาง (metabolite) ที่สำคัญของเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เมทิล (methyl donor) ในปฏิกิริยา methylation ของชีวโมเลกุล ทั้งโปรตีน ไขมัน รวมไปถึงกรดนิวคลิอิก โดยเซลล์สังเคราะห์ SAM ใน one-carbon metabolism pathway ใช้กรดอะมิโน methionine และ adenosine triphosphate (ATP) เป็นสารตั้งต้น และเอนไซม์ methionine adenosyltransferase (MAT) ในการย้ายหมู่ adenosyl จาก ATP ไปให้ methionine เกิดเป็น SAM ซึ่งเป็น sulfonium ion สำคัญที่พร้อมให้หมู่เมทิลแก่สารชีวโมเลกุลอื่น โดยอาศัยเอนไซม์ methyltransferase ซึ่งภายหลังปฏิกิริยา SAM ที่เสียหมู่เมทิลจะถูกเปลี่ยนเป็น S-adenosylhomocysteine (SAH) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น homocysteine (Hcy) โดยเอนไซม์ SAH hydrolase ก่อนที่ Hcy จะถูกเปลี่ยนกลับเป็น methionine โดยเอนไซม์ methionine synthase ซึ่งจะทำให้มี methionine สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ SAM ต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม นอกจาก one-carbon metabolism pathway แล้ว เซลล์ยังมีการนำ Hcy ที่ได้จาก one carbon metabolism ไปใช้ใน transsulfuration pathway ซึ่งเป็นวิถีในการสังเคราะห์ glutathione ในเซลล์ เพื่อใช้ในการกำจัดสารออกอนุมูลอิสระ โดยจะใช้ Hcy เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ cystathionine อาศัยการทำงานของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase และ cystathionine ที่เกิดขึ้น จะถูกเปลี่ยนไป

เป็น cysteine และ glutathione ต่อไป ดังนั้น จากวิถีเมแทบอลิซึมนี้ หากเซลล์มีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสูง เซลล์จะมีการสังเคราะห์ glutathione เพิ่มมากขึ้น และจะทำให้การสังเคราะห์ SAM ในเซลล์ลดลง แล้วน่าจะส่งผลให้การเกิด DNA methylation ลดลงได้ (9, 10)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) เป็นภาวะไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระ (oxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) โดยทั่วไปสารออกซิแดนท์และอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้ในร่างกาย (endogenous production) ทั้งในภาวะปกติจากกระบวนการสลายสารอาหารในวิถีเมแทบอลิซึม หรือจากการได้รับการกระตุ้นจากภายนอก (exogenous sources) เช่น ยา รังสี และ สารเคมีต่างๆ ทำให้เกิดสารออกซิแดนท์ (oxidants) และ/หรือสารอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ สารออกซิแดนท์มีหลายชนิด ที่สำคัญคือ สารที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ superoxide anion (O_2^-), hydroxylradical (OH^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่ง ROS สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลและเซลล์ได้ ทำให้ชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมัน ไม่เสถียรและเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่กับโมเลกุลอื่นหรือเซลล์ข้างเคียงได้ ส่งผลให้สารชีวโมกุลสูญเสียหน้าที่และส่งผลให้เกิดอาการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) รวมไปถึงสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ ยิ่งไปกว่านั้นภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสามารถส่งผลต่อการเกิด epigenetic change โดยเฉพาะ DNA methylation ได้ และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตาม ร่างกายมีกลไกที่สำคัญในการกำจัด ROS เพื่อยับยั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS scavengers) หลายชนิด ทั้งที่ร่างกายสร้างเองได้ ที่สำคัญคือ glutathione ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักภายในเซลล์ และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากอาหาร เช่น vitamin C และ vitamin E เป็นต้น (11-13)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการเกิดเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในคนปกติที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของมธุรดาและคณะในปี 2012 (14) พบว่าการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น มีความสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ LINE-1 methylation ทั้งในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติ แสดงให้เห็นว่า LINE-1 hypomethylation ไม่น่าจะสัมพันธ์กับมะเร็งโดยตรงแต่สัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น และจากการศึกษาวิกรมและคณะในปี 2013 (15) พบว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (UM-UC-3 cell) สามารถกระตุ้นการให้เกิด LINE-1 hypomethylation ได้ด้วย ROS (H_2O_2) และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (tocopheryl acetate) สามารถป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกที่แน่ชัดที่อธิบายสาเหตุการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะที่มี oxidative stress หนึ่งในกลไกที่น่าจะเป็นไปได้เกี่ยวกับผลของอนุมูลอิสระต่อการเกิด DNA methylation คือ เมื่อเซลล์เกิดภาวะ oxidative stress จะทำให้เซลล์จำเป็นต้องสร้าง glutathione เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดย glutathione ถูกสร้างมาจาก homocysteine ผ่านทาง transsulfuration pathway และเมื่อเซลล์ต้องการสร้าง glutathione มากขึ้น จะทำให้ปริมาณ

2071921265

ของ homocysteine ลดลง จึงถูกเปลี่ยนไปเป็น methionine เพื่อนำไปสังเคราะห์ SAM ได้น้อยลง ส่งผลให้ปริมาณของ SAM ในเซลล์ลดลง เมื่อปริมาณ SAM ลดลง จึงทำให้เกิด DNA methylation ลดลงด้วย นำไปสู่การเกิด genome-wide DNA hypomethylation จากรายงานของ Niedzwiecki และคณะ ในปี 2013 (10) พบว่า ในผู้ใหญ่ที่มีระดับ glutathione ในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น สัมพันธ์กับการลดลงของ SAM และการเกิด global hypomethylation ดังนั้น คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า กลไกที่ ROS กระตุ้นให้เกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ น่าจะมาจากการรบกวน one-carbon metabolism pathway และ transsulfuration pathway ทำให้การสังเคราะห์ SAM ในเซลล์ลดลง และไม่เพียงพอต่อการเกิด DNA methylation

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 2 ชนิด ได้แก่ UM-UC-3 และ TCCSUP cell lines และเซลล์เยื่อบุท่อไตปกติ (HK-2 cell line) กระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นด้วย H_2O_2 และตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation, SAM, SAH และ glutathione นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการ supplement ด้วย tocopheryl acetate, N-acetylcysteine (NAC), SAM, methionine และ folate ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย H_2O_2 การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะและเซลล์บุผิวท่อไต และผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การเข้าใจสาเหตุและกลไกในการเปลี่ยนแปลงการเกิด DNA methylation ในเซลล์มากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งในอนาคตได้

2071921265

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวัดระดับการเกิด LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAM, SAH, homocysteine และ glutathione ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2
3. เพื่อศึกษาผลของ tocopheryl acetate, NAC, SAM, methionine และ folate ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2

ขอบเขตและรูปแบบการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์และทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro* analytical experimental study) โดยการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (UM-UC-3 และ TCCSUP) และเซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อบุท่อไต (HK-2) ให้อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นด้วย H_2O_2 วัดตัวบ่งชี้การเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ได้แก่ การสร้าง ROS ภายในเซลล์และระดับโปรตีนคาร์บอนิล วัดระดับการเกิด LINE-1 methylation และตรวจวัดสารตัวกลางที่สำคัญใน one-carbon metabolism pathway และ transsulfuration pathway รวมถึงวัดระดับ glutathione ในเซลล์ เพื่อวิเคราะห์กลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ที่อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น
2. ทราบผลของการให้ tocopheryl acetate, NAC, SAM, methionine และ folate ต่อการป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ที่อยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น

2071921265

คำสำคัญ

Bladder cancer, DNA methylation, epigenetics, glutathione, LINE-1, oxidative stress, S-adenosylmethionine,

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือที่ใช้ทดสอบนั้นๆ
2. ทุกการทดสอบมีการควบคุมมาตรฐานการทดสอบด้วยสารมาตรฐาน (standard) และสารควบคุมคุณภาพ (control)

หอสมุดกลาง สำนักงาน...
จุฬาลงกรณ์...

ข้อจำกัดในงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง ผลการศึกษาที่ได้ อาจจะไม่สามารถนำไปอธิบายสิ่งที่เกิดขึ้นจริงทั้งหมดในร่างกายหรือในเซลล์มะเร็งในร่างกายผู้ป่วยมะเร็งได้ทั้งหมด แต่จะใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนในการอธิบายกลไกการเกิดมะเร็งและการตอบสนองของเซลล์ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลได้

เนื่องจากไม่สามารถหา normal urothelial cell line เพื่อเปรียบเทียบกับ urothelial cancer cell lines (UM-UC-3 และ TCCSUP) ได้ การศึกษานี้จึงทำใน HK-2 cell ซึ่งเป็นเซลล์บุผิวปกติของ human renal proximal tubules แทน

คำนิยามเชิงปฏิบัติการ

1. Oxidative stress คือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ซึ่งเป็นภาวะเสียสมดุลระหว่างสารอนุมูลและสารต้านอนุมูล สารออกซิไดซ์มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระหรือมีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ เกิดขึ้น
2. Epigenetics คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอและโปรตีนฮีสโตนที่ส่งผลต่อควบคุมการแสดงออกของยีน โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนดีเอ็นเอ (DNA sequence)
3. DNA methylation คือ การเติมหมู่ methyl (CH_3-) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ cytosine base ที่อยู่ต่อกับ guanine base โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methylatransferase (DNMT)
4. CpG dinucleotide คือ ตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส C อยู่ต่อกับเบส G โดย p หมายถึง phosphodiester bond ที่เชื่อมระหว่าง C และ G เป็นตำแหน่งที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา DNA methylation โดยเป็นบริเวณที่เอนไซม์ DNMT สามารถย้ายหมู่เมทิลมาเติมบริเวณเบส C เกิดเป็น 5-methylcytosine (5-mC)
5. Bisulfite conversion คือ การนำดีเอ็นเอทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite ซึ่งปฏิกิริยานี้จะทำให้ unmethylated cytosine เปลี่ยนเป็นเบส uracil ในขณะที่ 5-methycytosine จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง วิธีการนี้มีประโยชน์ในการศึกษารูปแบบการเกิด DNA methylation
6. HK-2 cell line คือ Proximal tubular cell (PTC) line ที่ได้จาก normal human kidney
7. UM-UC-3 cell line คือ Transitional cell carcinoma cell line (invasive type) ของ urinary bladder

2071921265

8. TCCSUP cell line คือ Grade IV transitional cell carcinoma cell line (invasive type) ของ urinary bladder

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

งานวิจัยนี้ได้รับการยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการประชุมครั้งที่ COE No. 016/2014 (ภาคผนวก ข)

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวมรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์
2. จัดทำนิพนธ์ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในรูปแบบ proceeding ชื่อเรื่อง "Hypomethylation of LINE-1 in bladder cancer cell lines under oxidative stress condition" ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ชื่อการประชุม "The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference" ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร วันที่ 2-3 เมษายน 2557 (ภาคผนวก ค)
3. จัดทำนิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

2071921265