



รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ต่อการเสื่อมของเซลล์ไตในโรคเบาหวาน  
(Effect of G6PD deficiency on renal cell degeneration in diabetes mellitus)

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร  
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร  
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน 2561

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
(This research is funded by Chulalongkorn University)

## บทคัดย่อภาษาไทย

เอนไซม์ glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย มีหน้าที่สร้าง nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) จากวิถี pentose phosphate pathway (PPP) เพื่อช่วยป้องกันภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ด้วยการรักษาระดับ reduced glutathione (GSH) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับเอนไซม์ G6PD ส่งผลกระทบต่อเซลล์จากภาวะ oxidative stress เช่น ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis และ nephropathy นอกจากนี้ยังพบภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานเมื่อเทียบกับคนปกติ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาผลของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ต่อความเสื่อมของเซลล์ไตในภาวะที่มีระดับน้ำตาลนอกเซลล์สูง และประสิทธิภาพของมะนาวผงต่อการป้องกันความเสื่อมของเซลล์ไตในภาวะดังกล่าว

จากการ pre-treatment มะนาวผงในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ร่วมกับภาวะเบาหวาน พบว่าเซลล์กลุ่มดังกล่าวอ่อนไหวต่อภาวะเบาหวานน้อยกว่าเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับการ pretreatment ดังจะเห็นได้จากผลการทดสอบระดับเซลล์รอดชีวิตที่เพิ่มขึ้น ระดับการแสดงออกของยีน *Bcl2* เพิ่มขึ้น และ *Bax* ลดลง อีกทั้งระดับเซลล์ตายจาก apoptosis ที่ผ่านการย้อม PI มีระดับลดลง โดยที่ไม่ผ่าน NF- $\kappa$ B ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามะนาวผงมีส่วนช่วยลดการตายของเซลล์ไตที่พร่องเอนไซม์ G6PD ในสภาวะเบาหวาน ผ่านการเพิ่มระดับ anti-apoptotic หรือ *Bcl2* และลดระดับ pro-apoptotic หรือ *Bax* นอกจากนี้ยังพบว่ามะนาวผงสามารถลดระดับ ROS ในเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ร่วมกับภาวะเบาหวาน ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับการ pre-treatment แสดงว่ามะนาวผงน่าจะมีสรรพคุณช่วยลดระดับอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญของภาวะเบาหวานที่กระตุ้นให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ไต นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการ pre-treatment จากมะนาวผง จะพยายามอาศัยระบบการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม antioxidant เช่น GSH-Px และ CAT ในเซลล์ช่วยลดระดับ ROS ลง ด้วยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับมะนาวผง จากผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการพร่องเอนไซม์ G6PD ของเซลล์ไตส่งผลให้เกิดความเสื่อมของไตอันเนื่องจากความเป็นพิษของน้ำตาล โดยทำให้เซลล์ไวต่อภาวะ oxidative stress แต่สามารถป้องกันได้ด้วยมะนาวผงที่นอกจากจะมีฤทธิ์ในการป้องกันนิ่วไตจากรายการอื่นก่อนหน้าแล้วยังช่วยลดภาวะเสื่อมของเซลล์ไตจากความเป็นพิษของน้ำตาลได้อีกด้วย

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is an enzyme found in every cells in the body. It produces nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) from the pentose phosphate pathway (PPP) to prevent cellular oxidative stress by maintaining reduced glutathione (GSH) levels. Therefore, any G6PD deficient cell types including kidney cells are subjected to cellular damage caused by elevated intracellular ROS levels. G6PD deficiency can induce renal apoptosis and nephropathy and has been reported in patients with diabetes mellitus. This study aimed to investigate effects of G6PD deficiency on the deterioration of kidney cells challenged with high concentration of glucose. In addition, the protective effects of lime powder were tested in this model.

Pre-treatment with lime powder increased the survival of G6PD deficiency HEK293 cells that were challenged with high concentration of glucose, as compared to the non-pre-treatment group. These protective effects of lime powder coincided with a decreased expression of pro-apoptosis gene Bax, an increased expression of anti-apoptosis gene Bcl2, and an increase in the ability of cells to exclude propidium iodide (PI) fluorescent dye and were independent of NF- $\kappa$ B activation. In addition, pre-treatment with lime powder effectively reduced intracellular ROS levels in these cells. Cells in the non-pretreatment group showed an increased expression of antioxidant genes such as GSH-Px and CAT indicating a mechanism to compensate for the effects of G6PD deficiency in the presence of high concentration of glucose. These results indicated that G6PD deficiency increased the susceptibility of kidney cells to an increased oxidative stress level induced by exposure to high concentration of glucose and such effects could be prevented by lime powder.

## สารบัญตาราง (List of Tables)

|   | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 ลำดับ sequences ของ shG6PD   | 11   |
| ตารางที่ 2 Specific primer สำหรับการวัดการแสดงออกของยีน โดยวิธี real time PCR | 13   |

## สารบัญภาพ (List of Illustration)

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1 ระดับ cell viability ในเซลล์ HEK293 ปกติหลังเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L  | 14   |
| รูปที่ 2 ระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HEK293 ปกติหลังเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L  | 15   |
| รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน <i>G6PD</i> หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ปกติด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L  | 15   |
| รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน <i>GSH-Px</i> หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ปกติด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L  | 16   |
| รูปที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีน <i>CAT</i> (Catalase) หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ปกติด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L  | 16   |
| รูปที่ 6 การแสดงออกของ GFP ของเซลล์ HEK293 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> ด้วย shRNA (shG6PD-A, shG6PD-C)                            | 17   |
| รูปที่ 7 ระดับ <i>G6PD</i> activity ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> โดย shRNA  | 17   |
| รูปที่ 8 ระดับการแสดงออกของ ยีน <i>G6PD</i> ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> โดย shRNA  | 18   |
| รูปที่ 9 ระดับการแสดงออกของโปรตีน <i>G6PD</i> ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i>  | 18   |
| รูปที่ 10 ระดับ cell viability ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง            | 19   |
| รูปที่ 11 ระดับ cell viability หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยมะนาวฝง ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50, 100, 200, 500, และ 1000 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง                              | 20   |
| รูปที่ 12 ระดับ cell viability ของเซลล์ HEK293 (shG6PD-A) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยมะนาวฝง ร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงที่ 12.5 mmol/L และ 25 mmol/L                 | 21   |
| รูปที่ 13 ระดับ cell viability ของเซลล์ HEK293 (shG6PD-C) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยมะนาวฝง ร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงที่ 12.5 mmol/L และ 25 mmol/L                 | 22   |
| รูปที่ 14 ระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HEK293 (shG6PD-A) หลังเพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวฝง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L  | 23   |
| รูปที่ 15 ระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HEK293 (shG6PD-C) หลังเพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวฝง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L  | 24   |
| รูปที่ 16 ระดับของการแสดงออกของยีน <i>GSH-PX</i> และ <i>Catalase</i> เซลล์ HEK293 (shG6PD-A) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวฝง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มี | 25   |

สารบัญภาพ (List of Illustration) (ต่อ)

|   | หน้า |
|---|------|
| ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L  |      |
| รูปที่ 17 ระดับของการแสดงออกของยีน <i>GSH-PX</i> และ <i>Catalase</i> เซลล์ไต HEK293 (shG6PD-C) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L | 26   |
| รูปที่ 18 ระดับของการแสดงออกของยีน <i>Bax</i> และ <i>Bcl-2</i> ของเซลล์ไต HEK293 (shG6PD-A) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L    | 27   |
| รูปที่ 19 ระดับของการแสดงออกของยีน <i>Bax</i> และ <i>Bcl-2</i> ของเซลล์ไต HEK293 (shG6PD-C) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L    | 28   |
| รูปที่ 20 การศึกษาการอักเสบภายในเซลล์โดย วิธี immunofluorescence ต่อ NF- $\kappa$ B เซลล์ HEK293 (shG6PD-A)   | 29   |
| รูปที่ 21 การศึกษาการอักเสบภายในเซลล์โดย วิธี immunofluorescence ต่อ NF- $\kappa$ B เซลล์ HEK293 (shG6PD-C)   | 30   |
| รูปที่ 22 อัตราการตายของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการติดสีระหว่าง propidium iodide กับ Hoechst 33342 ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> ด้วย shRNA (shG6PD-A)                                   | 31   |
| รูปที่ 23 การศึกษาการตายของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยการย้อม propidium iodide ในเซลล์ไต HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> ด้วย shRNA (shG6PD-A)                                   | 32   |
| รูปที่ 24 อัตราการตายของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการติดสีระหว่าง propidium iodide กับ Hoechst 33342 ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> ด้วย shRNA (shG6PD-C)                                   | 33   |
| รูปที่ 25 การศึกษาการตายของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยการย้อม propidium iodide ในเซลล์ไต HEK293 หลังจาก knockdown ยีน <i>G6PD</i> ด้วย shRNA (shG6PD-C)                                   | 34   |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of abbreviations)

|               |  |
|---------------|--|
| G6PD          | Glucose 6-phosphate dehydrogenase                            |
| NADPH         | Nicotinamide adenine dinucleotide                            |
| PPP           | Pentose phosphate pathway                                    |
| GSH           | Reduced glutathione  |
| DN            | Diabetic nephropathy   |
| PKA           | Protein kinase A   |
| cAMP          | Cyclic adenosine monophosphate                               |
| FSGS          | Focal segmental glomerulosclerosis                           |
| HEK293        | Human embryonic kidney 293                                   |
| ROS           | Reactive oxygen species                                      |
| DMEM          | DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium                        |
| FBS           | Fetal bovine serum   |
| MTT           | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| nm            | Nanometers   |
| DMSO          | Dimethyl sulfoxide   |
| shG6PD        | Short hairpin G6PD   |
| GFP           | Green fluorescence protein                                   |
| BCA           | Bicinchoinic acid  |
| DCFH-DA       | Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate                       |
| DMSO          | Dimethyl sulfoxide   |
| RCF           | Relative centrifugal field                                   |
| RNA           | Ribonucleic acid   |
| cDNA          | Complementary deoxyribonucleic acid                          |
| RT-PCR        | Reverse transcription polymerase chain reaction              |
| mRNA          | Messenger ribonucleic acid                                   |
| GSH-Px        | Glutathione peroxidase                                       |
| CAT           | Catalase   |
| SDS-PAGE      | Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis    |
| w/v           | Weight/volume  |
| TBST          | Tris Buffered Saline with Tween 20                           |
| One-Way ANOVA | One-way analysis of variance                                 |
| mmol/L        | Millimole per liter  |
| µg/mL         | Microgram per milliliter                                     |

## บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันประชากร 400 ล้านคนทั่วโลกได้รับผลกระทบจากภาวะพร่องเอนไซม์ glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD deficiency) ที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานลดลง จนเป็นเหตุให้เซลล์ไวต่อภาวะ oxidative stress เนื่องด้วยเอนไซม์ G6PD มีหน้าที่สร้าง nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) จากวิถี pentose phosphate pathway (PPP) เพื่อช่วยป้องกันภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ด้วยการรักษาระดับ reduced glutathione (GSH) <sup>(1)</sup> โดยปกติผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G6PD มักไม่แสดงอาการ แต่เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น เช่น การติดเชื้อ หรือการได้รับยาบางชนิด จะส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการโลหิตจางจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (acute haemolytic anemia) ดีซ่าน (jaundice) และ hyperbilirubinemia อย่างไรก็ตามเนื่องจากเอนไซม์ G6PD เป็น housekeeping enzyme ที่พบได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย ดังนั้นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับเอนไซม์ G6PD ย่อมส่งผลกระทบต่อเซลล์อื่นๆ ในระยะยาวจาก oxidative stress ได้เช่นกัน จากการศึกษาของ Xu และคณะใน 2010 พบว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ไตของหนูมีระดับ oxidative stress เพิ่มขึ้นจนเกิด apoptosis อีกทั้งยังเพิ่มระดับ 8-isoprostane และ albumin ในปัสสาวะ โดยทั้งสองเป็น marker ของ oxidative stress ที่พบได้ในภาวะ endothelial dysfunction และการอักเสบของ renal tubule <sup>(2)</sup> งานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เป็นปัจจัยหนึ่งของความผิดปกติของไต (nephropathy)

Diabetic nephropathy (DN) หรือโรคไตจากเบาหวานเป็นผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยเบาหวาน (diabetes mellitus) โดยมีน้ำตาลเป็นสาเหตุสำคัญ จากการศึกษาวิจัยของ Xu และ Zhang ในปี 2005 และ 2000 พบว่าระดับน้ำตาลที่สูงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress อีกทั้งลดระดับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidant เช่น G6PD โดยอาศัยการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน protein kinase A (PKA) <sup>(3)</sup> และ cAMP <sup>(4)</sup> อีกทั้งยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD และภาวะเบาหวาน โดยพบภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานเมื่อเทียบกับคนปกติ <sup>(5-8)</sup> ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD, DN และเบาหวาน มีความสัมพันธ์ต่อกันโดยอาจมี oxidative stress เป็นปัจจัยที่สำคัญ

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมาศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมาก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress เช่น มะนาวผง (Lime powder regiment) ที่ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ คิดค้นเพื่อช่วยรักษาและป้องกันโรคนี้ไว้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการเยียวยาภาวะเบาหวานร่วมการพร่องเอนไซม์ G6PD สารสกัดมะนาวผงเป็นผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากมะนาว จากการศึกษา Pajaree Chariyavilaskul และคณะ พบว่าสารสกัดมะนาวผงมีความสามารถในการลดระดับของ reactive oxygen species (ROS) ได้ และ ลดการเกิด oxidative stress ของเซลล์บุท่อไต HK-2 cells ในสภาวะ calcium oxalate monohydrate treatment ด้วยเหตุนี้ สารสกัดมะนาวผง จึงน่าจะมีศักยภาพเพียงพอต่อการป้องกันและฟื้นฟูความเสื่อมของเซลล์ไตจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากการพร่องเอนไซม์ G6PD ร่วมกับภาวะเบาหวาน จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยนี้เพื่ออธิบายกลไกการเสื่อมของเซลล์ไต human embryonic kidney 293 (HEK293) จากการพร่องเอนไซม์ G6PD ร่วมกับภาวะเบาหวาน และ



ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด มะนาวผง ต่อการป้องกันและฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์ไต ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการเข้าใจกลไกการเสื่อมของเซลล์ไตที่เกิดจาก oxidative stress ด้วยการเหนี่ยวนำจากการพร่องเอนไซม์ G6PD ร่วมกับภาวะเบาหวาน ซึ่งอาจนำไปสู่การป้องกันและรักษาภาวะ DN อีกทั้งเป็นการต่อยอดและเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทยอีกทางหนึ่งด้วย

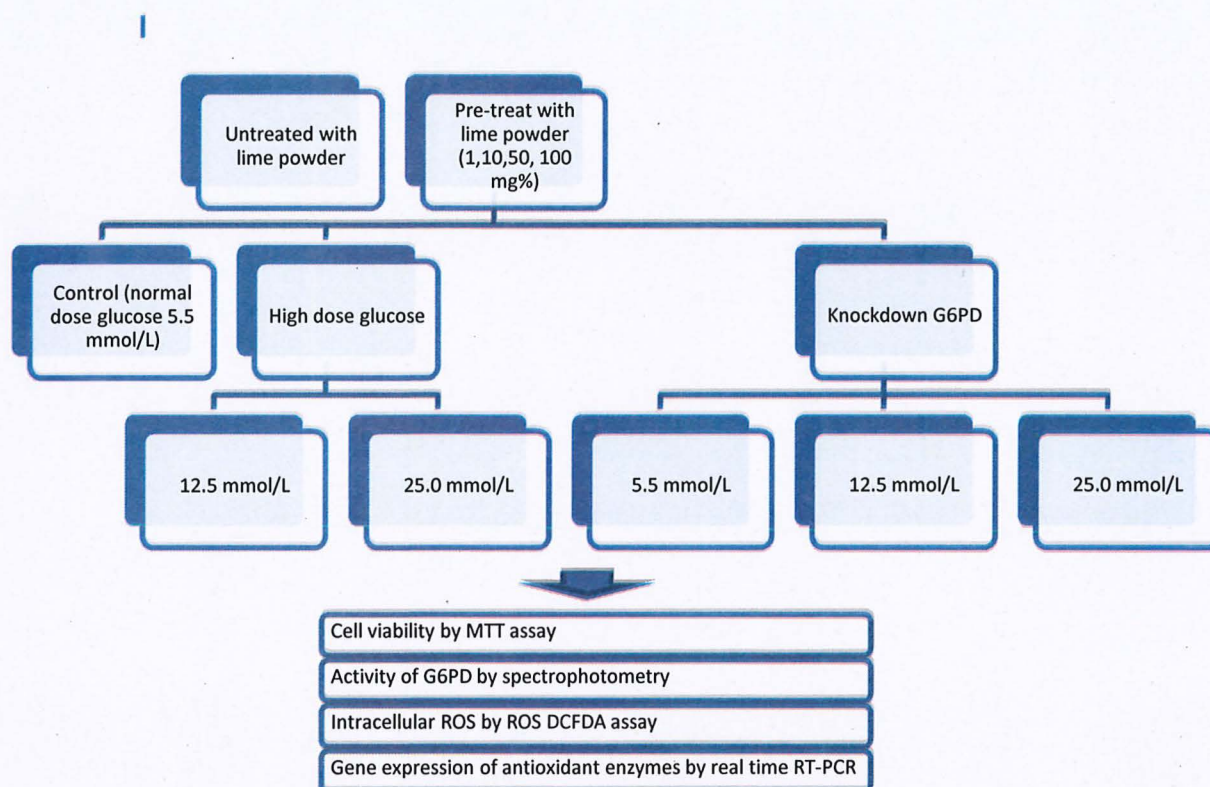
#### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อสร้างโมเดลของเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD และศึกษาผลของภาวะดังกล่าวต่อการเสื่อมและการอยู่รอดของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูง
2. เพื่อศึกษากระบวนการตอบสนองและกลไกการเสื่อมของเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูง ทั้งในระดับยีนและโปรตีน
3. เพื่อทดสอบผลของมะนาวผงต่อการฟื้นฟูเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD จากความเสียหายที่เกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูง เพื่อต่อยอดวัตถุประสงค์งานวิจัยข้อที่ 1 และข้อที่ 2 และเป็นการส่งเสริมงานวิจัยพื้นฐานในการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อต้านการตายของเซลล์ได้
4. เพื่อสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท-เอกที่มีความรู้ ความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะ เป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ และเทคโนโลยีการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพให้ยั่งยืน

#### ขอบเขตของโครงการวิจัย (Scope of project)

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ภาวะเบาหวาน และความเสียหายของเซลล์ไต โดยทำการศึกษาใน model เซลล์ไต HEK293 ที่ทำให้พร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธี knock down ยีน *G6PD* และเพาะเลี้ยงในสภาวะเบาหวาน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยวัดระดับ cell viability ตรวจสอบปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม antioxidant และ apoptosis อีกทั้งวัดระดับการตายของเซลล์จาก apoptosis ตลอดจนทำการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์ HEK293 จากภาวะดังกล่าวด้วยมะนาวผง

## วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and methods)



### 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ใน DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) ในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ที่ร้อยละ 5 และความชื้นร้อยละ 95-99

### 2. วัดปริมาณ cell viability และความเป็นพิษของน้ำตาลความเข้มข้นสูงและมะนาวผง

เพื่อทดสอบความเป็นพิษของน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงในเซลล์ HEK293 โดยพิจารณาจากระดับของ cell viability โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นของเซลล์  $2 \times 10^4$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L วัดจำนวนเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เครื่อง microplate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (nanometres)

เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของมะนาวผง ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาจากระดับของ cell viability โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นของเซลล์  $2 \times 10^4$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับมะนาวผง ที่มีความเข้มข้น 1, 10, 50, และ 100 µg/mL โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย วัดจำนวนเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เครื่อง microplate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (nanometres)

จากนั้นเซลล์ HEK293 จะถูกทำการทดสอบความเป็นพิษของมะนาวผง ร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง โดยหลังจากได้ระดับความเข้มข้นของมะนาวผง ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HEK293 จึงได้เพาะเลี้ยงกับ

เซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงร่วมกับ D-glucose (Sigma, USA) ที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และดูระดับของความเป็นพิษของเซลล์โดยเทคนิค MTT assay

### 3. Knockdown ยีน *G6PD*

Knockdown ยีน *G6PD* ในเซลล์ไต HEK293 โดยใช้ shRNA ต่อยีน *G6PD* (Origene, USA) ที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *G6PD* ในระดับ translation โดยระดับการทำงานของเอนไซม์ *G6PD* เทียบได้กับภาวะพร่องเอนไซม์ *G6PD* Class II เพื่อใช้เป็นโมเดลในการศึกษาต่อ โดยมี 2 constructs ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับ sequences ของ sh*G6PD*

| Construction      | Sequences                          |
|-------------------|------------------------------------|
| sh <i>G6PD</i> -A | 5'ATGAGCCAGATAGGCTGGAACCGCATCAT3'  |
| sh <i>G6PD</i> -C | 5'CTGACCTACGGCAACAGATAACAAGAACGT3' |

*G6PD* shRNA ถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยใช้ Lentivirus (Origene, USA) ในการสร้างอนุภาคไวรัส อนุภาคไวรัสที่ผลิตถูกนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ HEK293 โดยมีขั้นตอนการ transfection ดังนี้

- วันที่ 1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ใน 12 well plate ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่ 37 องศาเซลเซียส
- วันที่ 2 ทำการเตรียมหลอดที่ 1 ที่ประกอบด้วย 0.5 µg ของ pLeti-shRNA constructor, 0.5 µg pLenti-ORF expression, และ 0.6 µg packaging plasmid ใน Optimem (Life technologies, UK) 50 µl
- เตรียมหลอดที่ 2 ผสม Megatran trasfecton reagent (Origene, USA) 4.4 µl กับ optimum ปริมาตร 50 µl
- จากนั้นผสมหลอดที่ 1 และ หลอดที่ 2 ให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที แล้วนำไปใส่ในเซลล์ HEK293 ที่เพาะเลี้ยงไว้ เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง
- วันที่ 3 จึงเปลี่ยนเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ
- วันที่ 4 เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการคัดเลือกเซลล์ที่ถูก knockdown ยีน *G6PD* โดยประกอบไปด้วย 10% FBS และ 2 µg/mL puromycin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการตรวจสอบการเรืองแสงของ GFP หลังจากการ transfection และ ตรวจสอบระดับของ *G6PD* activity, *G6PD* mRNA expression และ การแสดงออกของโปรตีน *G6PD* ก่อนทำการทดลองอื่นๆ ต่อไป

### 4. วัดระดับ *G6PD* activity ภายในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD*

เก็บ pellets ในสารละลาย 1X PBS จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยคลื่นเสียงด้วย sonicator จากนั้นจะวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี bicinchoinic acid (BCA) assay kits (Thermo Fisher Scientific Inc.,USA)

วัดระดับ *G6PD* activity โดยนำสารละลายจากเซลล์ปริมาตร 10 µl ผสมกับสารละลาย master mix ปริมาตร 490 µl ซึ่งประกอบด้วย NADP (Sigma, USA) 0.38 mM, MgCl<sub>2</sub> (Bio Basic Canada Inc,

Canada) 6.3 mM, glucose 6-phosphate (Sigma, USA) 3.3 mM, melaimide (Sigma, USA) 5 mM, และ Tris-HCl (pH7.5) buffer (Bio Basic Canada Inc, Canada) 50 mM และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเครื่อง microplate reader จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับ NADPH standard curve เพื่อคำนวณหาระดับของ G6PD activity

#### 5. วัดระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

เพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ใน 96 well plate ชนิด black plate (corning, USA) ให้มีความหนาแน่น  $2 \times 10^4$  cells/well จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นระดับของอนุมูลอิสระภายในเซลล์จะถูกวัดโดยวิธี Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay (Cell Biolab, USA) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับน้ำตาล เซลล์ถูกบ่มโดยการเติม DMSO ปริมาตร 8.6  $\mu$ l เพื่อละลาย DCFH-DA ให้ได้ความเข้มข้น 10 mM แล้วจึงผสมกับ 1X PBS ในปริมาตร 100  $\mu$ l/well และบ่มทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นระดับของอนุมูลอิสระภายในเซลล์จะถูกวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่การดูดกลืนและปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 495 และ 525 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง microplate reader

#### 6. วัดระดับการแสดงออกของยีน

หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* และ เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง เซลล์ที่ได้จากการทดลองจะถูกนำมาสกัด RNA โดยอาศัยปฏิกิริยาของ Trizol reagent โดยเติม Trizol (GeneMark Bio, Taiwan) ลงไปในเซลล์ pellets ที่ได้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม chloroform (Sigma, USA) ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จนเห็นการแยกชั้นของสารละลาย จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 RCF เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนสุดมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol (Merck Millipore, USA) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 RCF เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเห็น pellet ขนาดเล็กที่ก้นหลอด แล้วเท isopropanol ทิ้ง แล้วเติม 75% ethanol (Merck, Germany) ปริมาตร 500  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 RCF เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะเท ethanol ทิ้ง และ วาง pellet ทิ้งไว้จนแห้ง จึงเติม RNase free water เพื่อละลายและนำไปวัดปริมาณของ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนจะนำไปสังเคราะห์ cDNA โดยผ่านกระบวนการ RT-PCR ในการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยชุด revertAid First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA) เพื่อที่จะนำไปวัดการแสดงออกของยีนที่สนใจ

หลังจากที่สังเคราะห์ cDNA แล้ว ต่อไป cDNA จะถูกนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยวิธี real time polymerase chain reaction (Real time PCR) ด้วยเครื่อง real time thermocycler (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยในการทดลองครั้งนี้จะวัดการแสดงออกของยีน

*G6PD*, *glutathione peroxidase*, *catalase* และมี  $\beta$ -*actin* เป็น internal control โดย sequence ของ primer ทั้งหมดจะถูกแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Specific primer สำหรับการวัดการแสดงออกของยีน โดยวิธี real time PCR

| Gene                   | Sequences 5'-3'   | Annealing temperature | PCR product size (bp) |
|------------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| <i>G6PD</i>            | Forward primer : GTCAAGGTGTTGAAATGCATC<br>Reverse primer : CATCCCACCTCTCATTCTCC | 57°C                  | 187                   |
| <i>GSH-Px</i>          | Forward primer : CGATCGGTGTATGCCTTCTCG<br>Reverse primer : GAGGGACGCCACATTCTCG  | 57°C                  | 105                   |
| <i>Catalase</i>        | Forward primer : TGGAGCTGGTAACCCAGTAG<br>Reverse primer : CCTTTGCCTTGGAGTATTTGG | 55°C                  | 209                   |
| $\beta$ - <i>actin</i> | Forward primer : ACTCTTCCAGCCTTCCTTC<br>Reverse primer : ATCTCCTTCTGCATCCTGTC   | 57°C                  | 171                   |
| <i>Bax</i>             | Forward primer : AACATGGAGCTGCAGAGGAT<br>Reverse primer : CAGCCCATGATGGTTCTGAT  | 57°C                  | 200                   |
| <i>Bcl-2</i>           | Forward primer : CGTGGGGTCATGTGTGTG<br>Reverse primer : CGGTTCAAGTACTCAGTCATC   | 57°C                  | 89                    |

## 7. วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน

เซลล์ pellet ที่ผ่านการ knockdown ยีน *G6PD* จะถูกเก็บ เพื่อนำมาวัดการแสดงออกของโปรตีน *G6PD* เซลล์จะถูกทำให้แตกใน Ripa buffer (sigma, USA) ร่วมกับการใช้เครื่อง sonicator (VIRITIS company, USA) จากนั้นจะถูกนำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ bicinchoinic acid (BCA) assay kits (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) หลังจากนั้นโปรตีนที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมจะถูกนำมาวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน *G6PD* ต่อไป

โดยมีขั้นตอนดังนี้ โปรตีนจะถูกแยกใน 10% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 volts เป็นเวลา 75 นาที หลังจากนั้นจะถูก transfer ไปยัง nitrocellulose membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 90 นาที เมื่อ transfer เสร็จเรียบร้อย แผ่น membrane จะถูก block ใน blocking solution (5% w/v non-fat milk ใน TBST buffer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ทำการล้าง membrane 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดย TBST buffer จากนั้นนำแผ่น membrane ไปบ่มกับ anti-*G6PD* (sigma, USA) ที่ dilution 1:3000 ใน TBST buffer เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น ล้าง membrane 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ด้วย TBST buffer และบ่มกับ secondary antibody ที่ dilution 1:5000 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ ล้าง antibody ส่วนเกินออกด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนที่จะวัดระดับการ

แสดงออกของโปรตีน G6PD ด้วย chemiluminescence system และ  $\beta$ -actin จะถูกใช้เป็น internal control สำหรับการ normalization ต่อไป

## 8. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

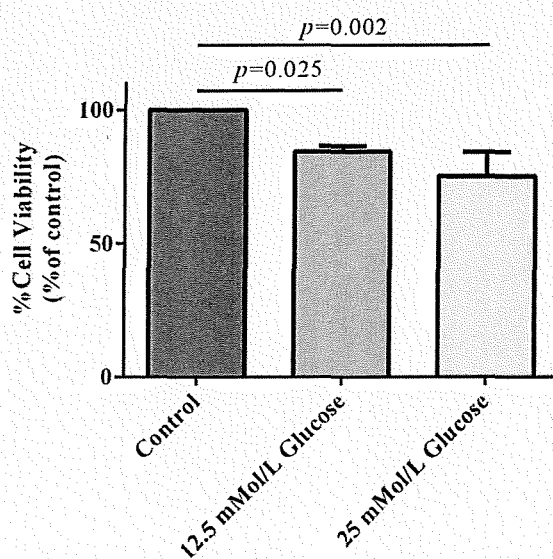
งานวิจัยในครั้งนี้จะนำเสนอข้อมูลเชิงพรรณนา แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ในรูปกราฟและตาราง การทดลองแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มควบคุม (control) และ กลุ่มตัวอย่าง ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงปกติ ใช้ unpair *t*-test เพื่อเปรียบเทียบ 2 กลุ่มประชากร หรือ One-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบมากกว่า 2 กลุ่มประชากรขึ้นไป แต่หากมีการแจกแจงไม่ปกติจะใช้สถิติ Mann-Whitney U test โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ  $p < 0.05$

### ผลการทดลอง (Results)

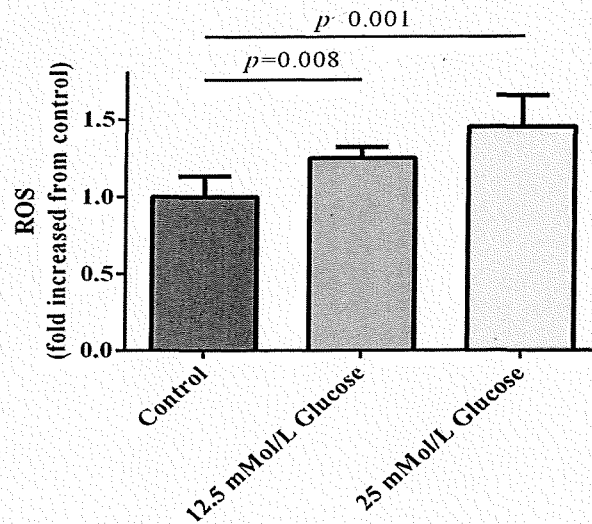
#### 1. การทดสอบความเป็นพิษและระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

หลังจากเลี้ยงเซลล์ HEK293 ปกติ ด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 12.5 mmol/L และ 25 mmol/L สามารถทำให้ระดับ cell viability ลดลงเหลือ  $84.37 \pm 2.11\%$  และ  $75.10 \pm 9.22\%$  ซึ่งมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่  $p=0.025$  และ  $p=0.002$  ตามลำดับ (รูปที่ 1)

อีกทั้งยังพบว่าหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L ระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหรือประมาณ  $1.25 \pm 0.06$  ( $p=0.008$ ) และ  $1.45 \pm 0.20$  ( $p < 0.001$ ) เท่าของเซลล์ในกลุ่มควบคุมตามลำดับ (รูปที่ 2)



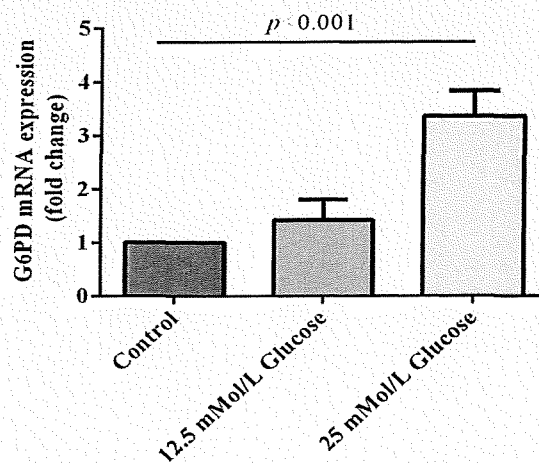
รูปที่ 1 ระดับ cell viability ในเซลล์ HEK293 ปกติหลังเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L



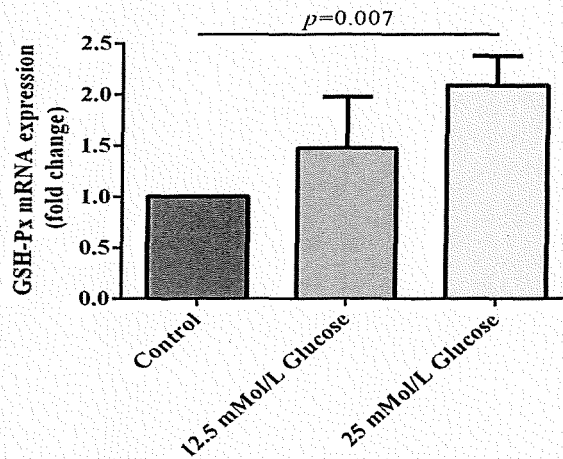
รูปที่ 2 ระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไต HEK293 ปกติหลังเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

2. การทดสอบการแสดงออกของยีนกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ในเซลล์ไต HEK293 ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

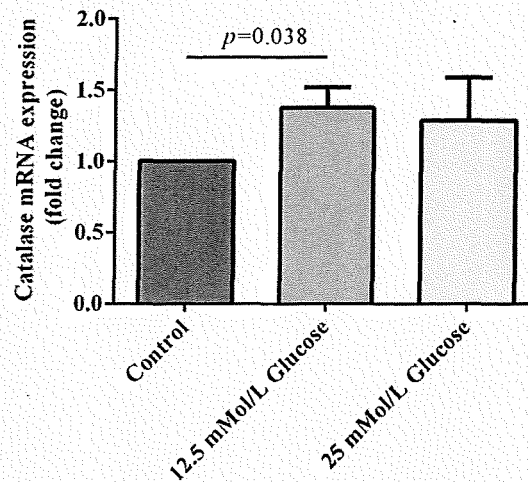
ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ปกติ ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L พบการแสดงออกของยีน *G6PD* เพิ่มขึ้น  $1.42 \pm 0.38$  ( $p=0.196$ ) และ  $3.36 \pm 0.48$  ( $p<0.001$ ) เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) เช่นเดียวกับยีน *GSH-Px* ก็พบว่าการแสดงออกเพิ่มขึ้น  $1.47 \pm 0.50$  ( $p=0.130$ ) และ  $2.08 \pm 0.29$  ( $p=0.007$ ) เท่าของกลุ่มควบคุม เมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ (รูปที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *CAT* (catalase) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่  $1.38 \pm 0.14$  ( $p=0.038$ ) เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 mmol/L และ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น  $1.28 \pm 0.31$  ( $p=0.113$ ) เท่าในเซลล์ไต HEK293 ที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาล 25 mmol/L (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *G6PD* หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ปกติด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L



รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ปกติด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L

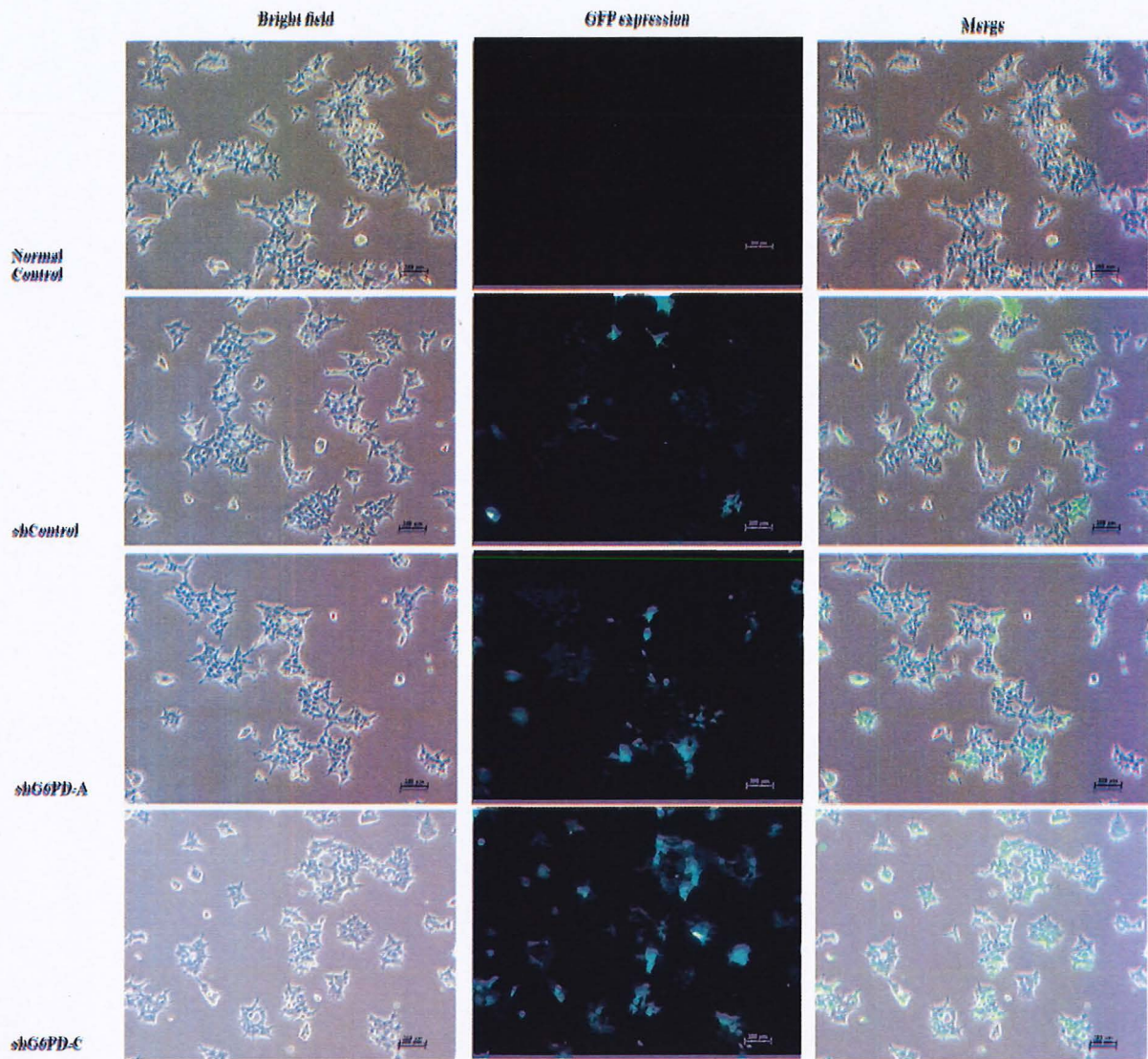


รูปที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีน *CAT* (Catalase) หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ปกติด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L

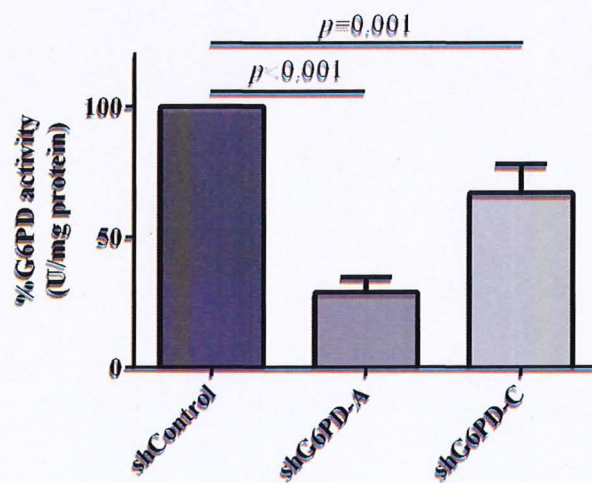
### 3. การสร้างเซลล์ HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยการ knockdown ยีน *G6PD*

เมื่อทำการ knockdown ยีน *G6PD* ในเซลล์ไต HEK293 ได้สำเร็จ จะพบการเรืองแสงของ GFP ภายใต้อัลตร้าไวโอเล็ต (รูปที่ 6) และพบว่าเซลล์ HEK293 ที่ knockdown ด้วย shG6PD-A และ shG6PD-C ระดับ G6PD activity ของเซลล์ลดลงมาที่  $28.78 \pm 5.86\%$  และ  $78.84 \pm 11.08\%$  โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.001$  และ  $p = 0.001$  ตามลำดับเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (shControl) ซึ่งการลดลงนี้เทียบได้กับ G6PD class II และ G6PD class IV ตามลำดับ (รูปที่ 7)



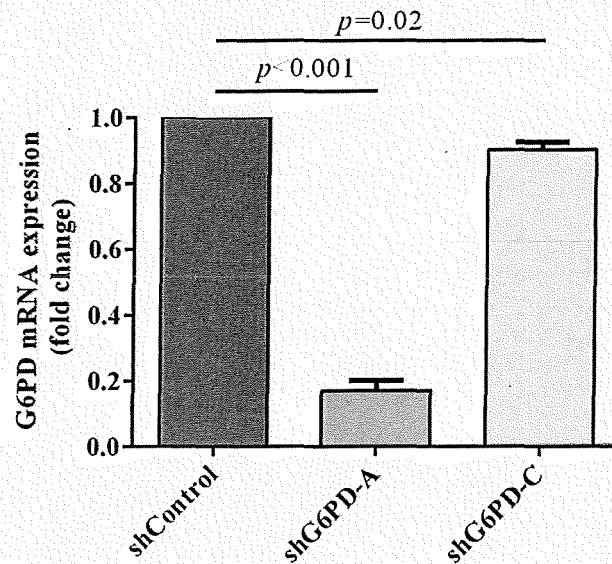


รูปที่ 6 การแสดงออกของ GFP ของเซลล์ HEK293 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* ด้วย shRNA (shG6PD-A, shG6PD-C)



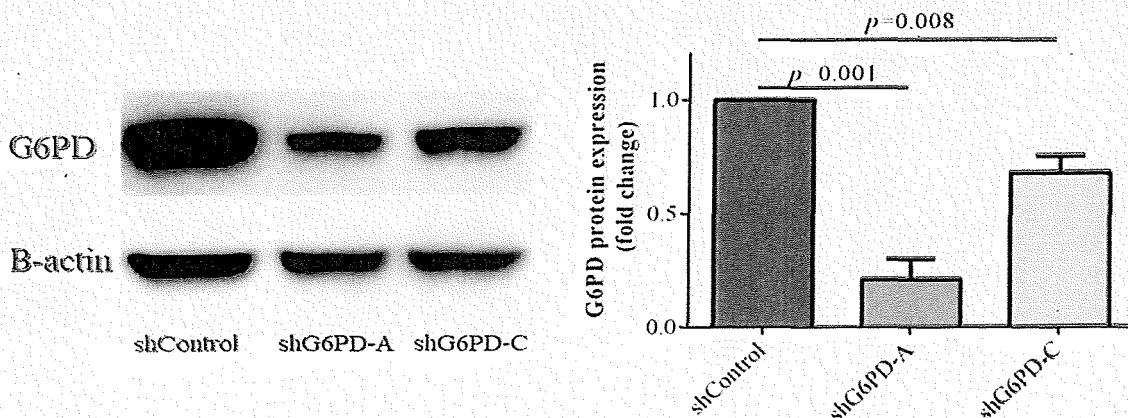
รูปที่ 7 ระดับ G6PD activity ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* โดย shRNA

หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* โดย shRNA ในเซลล์ไต HEK293 ได้ยืนยันการแสดงของยีน *G6PD* โดยวิธี Real time PCR พบว่า เซลล์ไต HEK293 ที่ถูก knockdown ยีน *G6PD* มีการแสดงออกของยีน *G6PD* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่  $0.17 \pm 0.029$  ( $p < 0.001$ ) เท่าในเซลล์ shG6PD-A และ  $0.90 \pm 0.022$  ( $p = 0.002$ ) เท่าในเซลล์ shG6PD-C เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (shControl) (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ระดับการแสดงออกของ ยีน *G6PD* ในเซลล์ไต HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* โดย shRNA

หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* โดย shRNA ในเซลล์ไต HEK293 จึงได้ยืนยันการแสดงของโปรตีน *G6PD* โดยวิธี western blot พบว่า เซลล์ไต HEK293 ที่ถูก knockdown ยีน *G6PD* มีการแสดงออกของโปรตีน *G6PD* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่  $0.21 \pm 0.086$  ( $p < 0.001$ ) เท่าในเซลล์ shG6PD-A และ  $0.68 \pm 0.074$  ( $p = 0.008$ ) เท่า ในเซลล์ shG6PD-C เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (shControl) (รูปที่ 9)



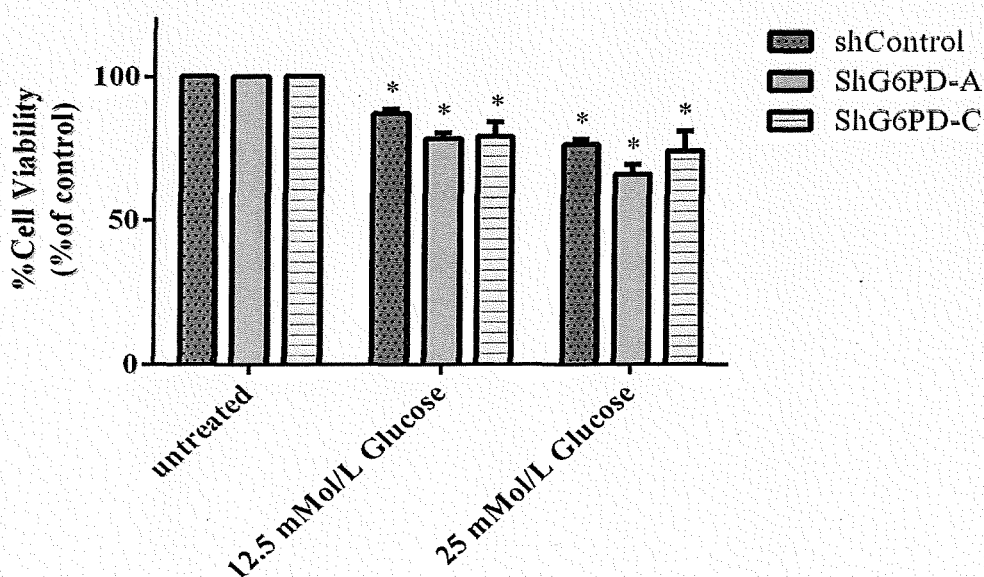
รูปที่ 9 ระดับการแสดงออกของโปรตีน *G6PD* ในเซลล์ไต HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD*

#### 4. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำตาลความเข้มข้นสูงต่อเซลล์ไต HEK293 ที่ถูก knockdown ยีน *G6PD*

หลังจากยืนยันการแสดงออกของยีน โปรตีน และ *G6PD* activity ในเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* เป็นที่เรียบร้อยแล้ว เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยพบว่าในเซลล์ไต HEK293 ในกลุ่ม shControl มีระดับ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง โดยมีระดับของ cell viability เหลือ  $87.02 \pm 3.01\%$  ( $p=0.001$ ) และ  $76.28 \pm 3.19\%$  ( $p<0.001$ ) ตามลำดับ และยังพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ไต HEK293 ในกลุ่ม shControl ระหว่างน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ที่  $p=0.002$  (รูปที่ 10) โดยพบว่ายิ่งระดับน้ำตาลเพิ่มขึ้น เซลล์จะตายมากขึ้น

เซลล์ในกลุ่ม sh*G6PD*-A พบว่า cell viability มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L glucose โดยมีระดับของ cell viability เหลือ  $78.37 \pm 3.27\%$  ( $p<0.001$ ) และ  $65.95 \pm 5.78\%$  ( $p<0.001$ ) ตามลำดับ และ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ที่  $p=0.007$  (รูปที่ 10)

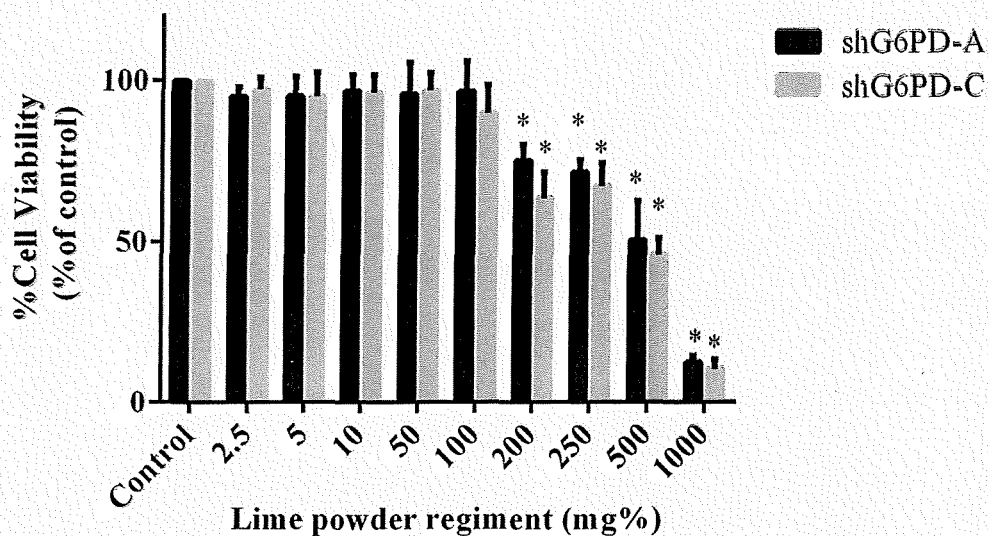
ส่วนเซลล์ในกลุ่ม sh*G6PD*-C พบว่า cell viability มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L glucose โดยมีระดับของ cell viability เหลือ  $79.04 \pm 8.78\%$  ( $p=0.24$ ) และ  $73.91 \pm 11.94\%$  ( $p=0.01$ ) ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ( $p=0.491$ ) (รูปที่ 10) แต่อย่างไรก็ตามระดับ cell viability ของเซลล์ในกลุ่ม sh*G6PD*-C ยังมากกว่าเซลล์ในกลุ่ม sh*G6PD*-A ในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาล



รูปที่ 10 ระดับ cell viability ในเซลล์ไต HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L)

## 5. การทดสอบความเป็นพิษของมะนาวผง

จากผลการทดลองความเป็นพิษของมะนาวผง ต่อเซลล์ไต HEK293 ในกลุ่มที่ knockdown ยีน *G6PD* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับของ cell viability ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50 และ 100 mg% ในทั้งสองเซลล์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงกับมะนาวผง แต่ที่ความเข้มข้น 200, 250, 500, และ 1000 mg% พบว่าระดับของ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ  $75.28 \pm 4.94\%$  ( $p < 0.001$ ),  $71.61 \pm 3.87\%$  ( $p < 0.001$ ),  $50.36 \pm 12.29\%$  ( $p < 0.001$ ) และ  $12.38 \pm 2.03\%$  ( $p < 0.001$ ) ตามลำดับ ในเซลล์ shG6PD-A และ  $63.54 \pm 7.80\%$  ( $p < 0.001$ ),  $67.22 \pm 7.10\%$  ( $p < 0.001$ ),  $45.95 \pm 5.13\%$  ( $p < 0.001$ ), และ  $10.21 \pm 3.03\%$  ( $p < 0.001$ ) ในเซลล์ shG6PD-C (รูปที่ 11) จากผลการทดลองในครั้งนี้ มะนาวผง ที่ 50mg% จึงถูกเลือกเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

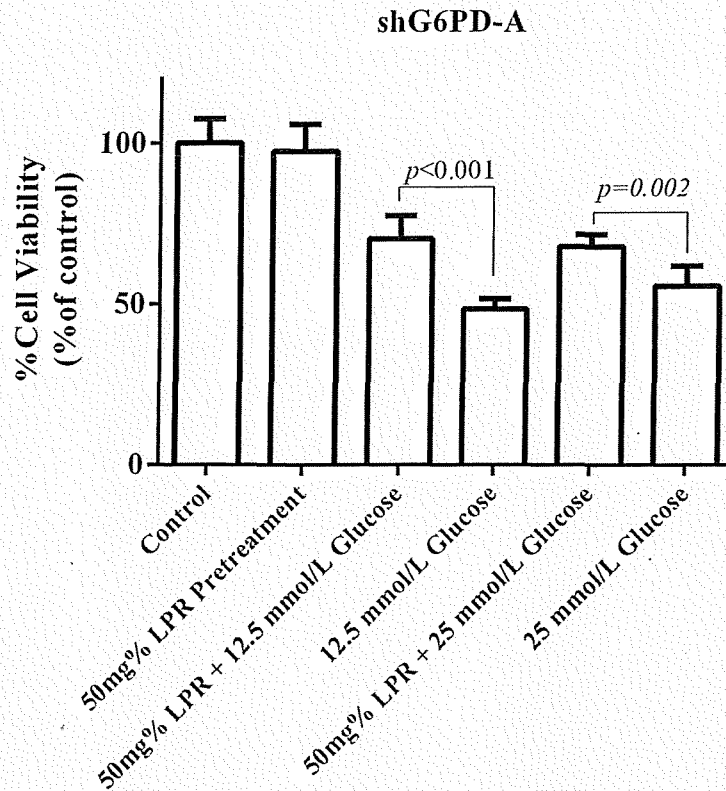


รูปที่ 11 ระดับ cell viability หลังเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยมะนาวผง ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50, 100, 200, 500, และ 1000 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับมะนาวผง)

## 6. ประสิทธิภาพของมะนาวผง ต่อการเสื่อมของเซลล์ไต HEK293 ในภาวะเบาหวานและพร่องเอนไซม์ *G6PD*

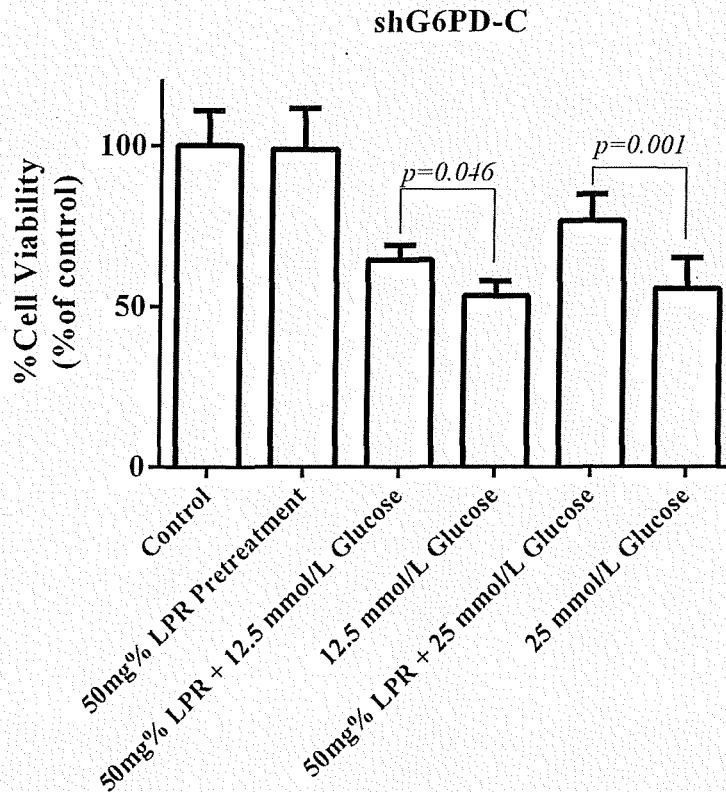
ผู้วิจัยเลือกความเข้มข้นของมะนาวผง ที่ 50 mg% มาใช้ในการป้องกัน (pre-treatment) กับเซลล์ไต HEK293 cell ในกลุ่มที่ knockdown ยีน *G6PD* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 5.5, 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยพบว่ากลุ่มที่ pre-treatment ด้วยมะนาวผงก่อนเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลระดับปกติที่ความเข้มข้น 5.5 mmol/L ระดับ cell viability ของเซลล์กลุ่ม shG6PD-A และ กลุ่ม shG6PD-C ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม  $97.53 \pm 8.31\%$  ( $p = 0.525$ ) และ  $98.77 \pm 12.68\%$  ( $p = 0.826$ ) ตามลำดับ

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-A ภายหลังจาก pre-treatment ด้วยมะนาวผง และ เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับของ cell viability ลดลง ตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยลดลงเหลือ  $70.37 \pm 7.19\%$  และ  $67.79 \pm 3.76\%$  ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) แต่อย่างไรก็ตามระดับ cell viability ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวยังมากกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment โดยเซลล์ลดลงเหลือ  $48.45 \pm 3.24\%$  ( $p < 0.001$ ) และ  $55.76 \pm 6.07\%$  ( $p = 0.002$ ) ตามลำดับ (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ระดับ cell viability ของเซลล์ไต HEK293 (shG6PD-A) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยมะนาวผง ร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงที่ 12.5 mmol/L และ 25 mmol/L

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-C ภายหลังจาก pretreatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ พบว่าระดับของ cell viability ลดลง โดยลดลงเหลือ  $64.56 \pm 4.49\%$  และ  $76.65 \pm 8.16\%$  ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) แต่อย่างไรก็ตามระดับ cell viability ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวยังมากกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5, 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment โดยเซลล์ลดลงเหลือ  $53.37 \pm 4.43\%$  ( $p = 0.046$ ) และ  $55.76 \pm 6.07\%$  ( $p = 0.001$ ) ตามลำดับ (รูปที่ 13)

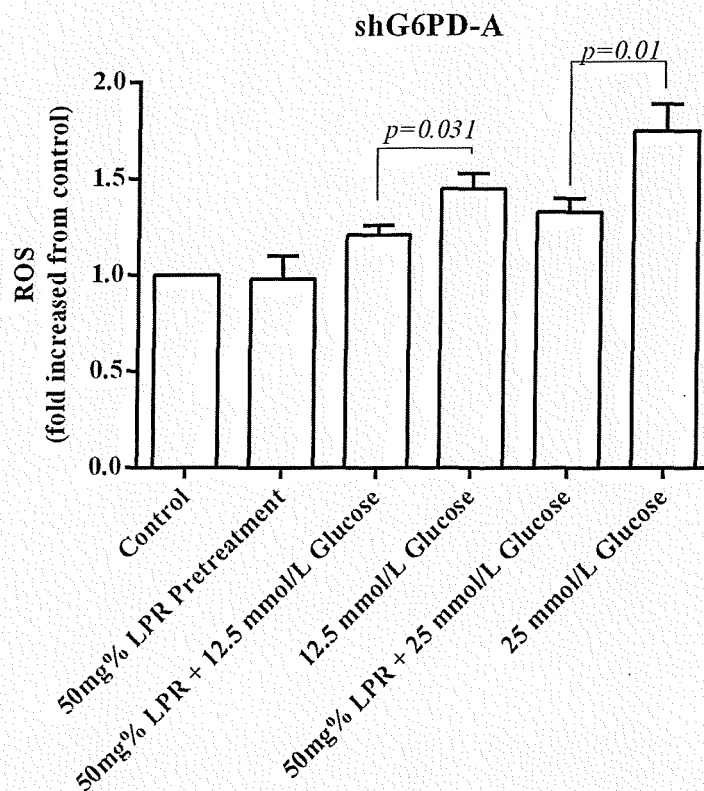


รูปที่ 13 ระดับ cell viability ของเซลล์ไต HEK293 (shG6PD-C) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยมะนาวผง ร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงที่ 12.5 mmol/L และ 25 mmol/L

7. การทดสอบระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงกับมะนาวผงและในน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

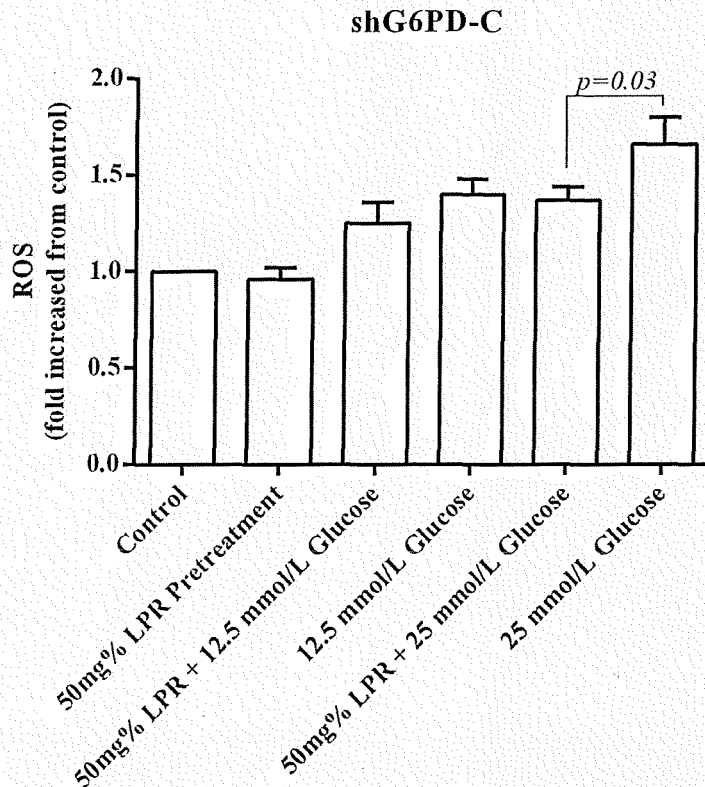
หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ด้วยการ pretreatment มะนาวผงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงได้ศึกษาาระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยวิธี DCFHDA assay โดยพบว่ากลุ่มที่ pretreatment ด้วยมะนาวผังก่อนเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลระดับปกติที่มีความเข้มข้น 5.5 mmol/L ระดับ ROS ของเซลล์กลุ่ม shG6PD-A และ กลุ่ม shG6PD-C ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม  $0.988 \pm 0.12$  และ  $0.96 \pm 0.06$  ตามลำดับ

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-A ภายหลังจาก pretreatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับของ ROS เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มเป็น  $1.21 \pm 0.05$  และ  $1.33 \pm 0.07$  เท่า ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) แต่อย่างไรก็ตามระดับ ROS ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวยังน้อยกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment โดยระดับ ROS เพิ่มขึ้นเป็น  $1.40 \pm 0.08$  ( $p = 0.031$ ) และ  $1.66 \pm 0.17$  เท่า ( $p = 0.010$ ) ตามลำดับ (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HEK293 (shG6PD-A) หลังเพาะเลี้ยงด้วยการ pre-treatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

ขณะที่เซลล์ HEK293 กลุ่ม shG6PD-C ภายหลังการ pre-treatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับของ ROS เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มเป็น  $1.25 \pm 0.11$  และ  $1.37 \pm 0.09$  เท่า ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) แต่อย่างไรก็ตามระดับ ROS ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวยังน้อยกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment โดยระดับ ROS เพิ่มขึ้นเป็น  $1.40 \pm 0.08$  และ  $1.66 \pm 0.17$  เท่า ( $p = 0.010$ ) ตามลำดับ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 ระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไต HEK293 (shG6PD-C) หลังเพาะเลี้ยงด้วยการ pretreatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

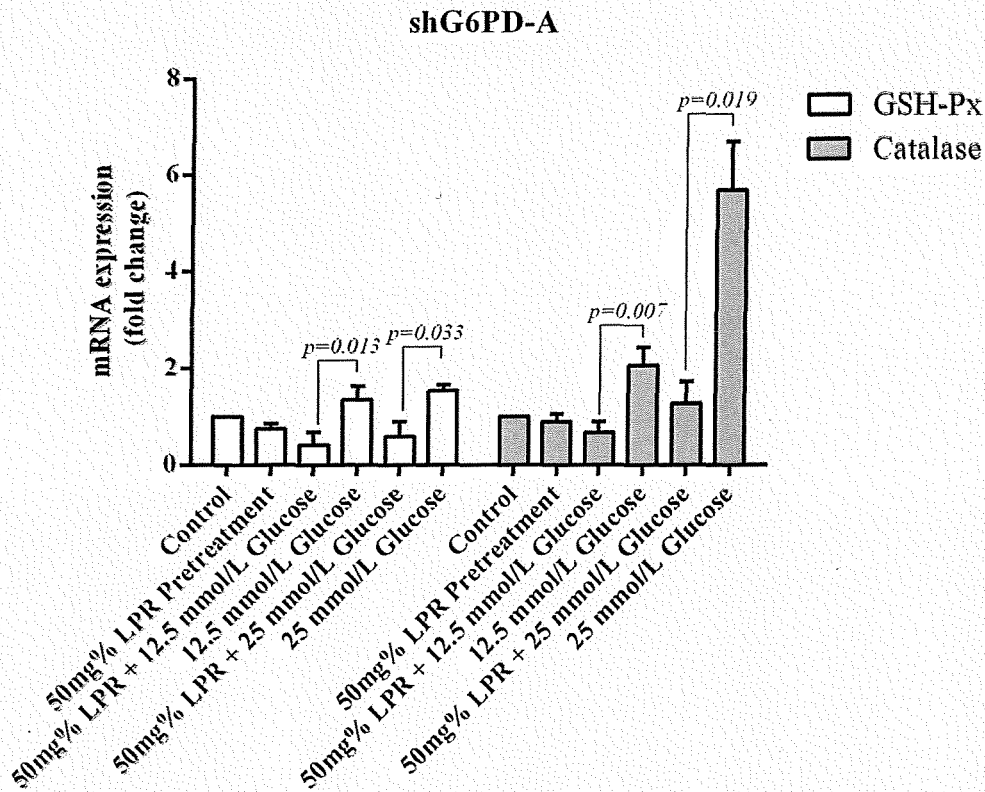
8. การทดสอบการแสดงออกของยีนกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ในเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ภายหลังจาก pre-treatment ด้วยมะนาวผง และ เพาะเลี้ยงในน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ด้วยการ pre-treatment มะนาวผง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย *Glutathione peroxidase (GSH-Px)* และ *Catalase* โดยวิธี real-time PCR

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-A ภายหลังจาก pretreatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงเหลือ  $0.42 \pm 0.26$  และ  $0.59 \pm 0.30$  เท่า ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pre-treatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* เพิ่มขึ้นเป็น  $1.35 \pm 0.28$  ( $p=0.013$ ) และ  $1.53 \pm 0.13$  ( $p=0.033$ ) เท่าตามลำดับ ขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Catalase* ลดลง ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 12.5 mmol/L เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงเหลือ  $0.67 \pm 0.22$  แต่กลับเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นน้ำตาล 25 mmol/L เพิ่มขึ้นเป็น  $1.27 \pm 0.45$



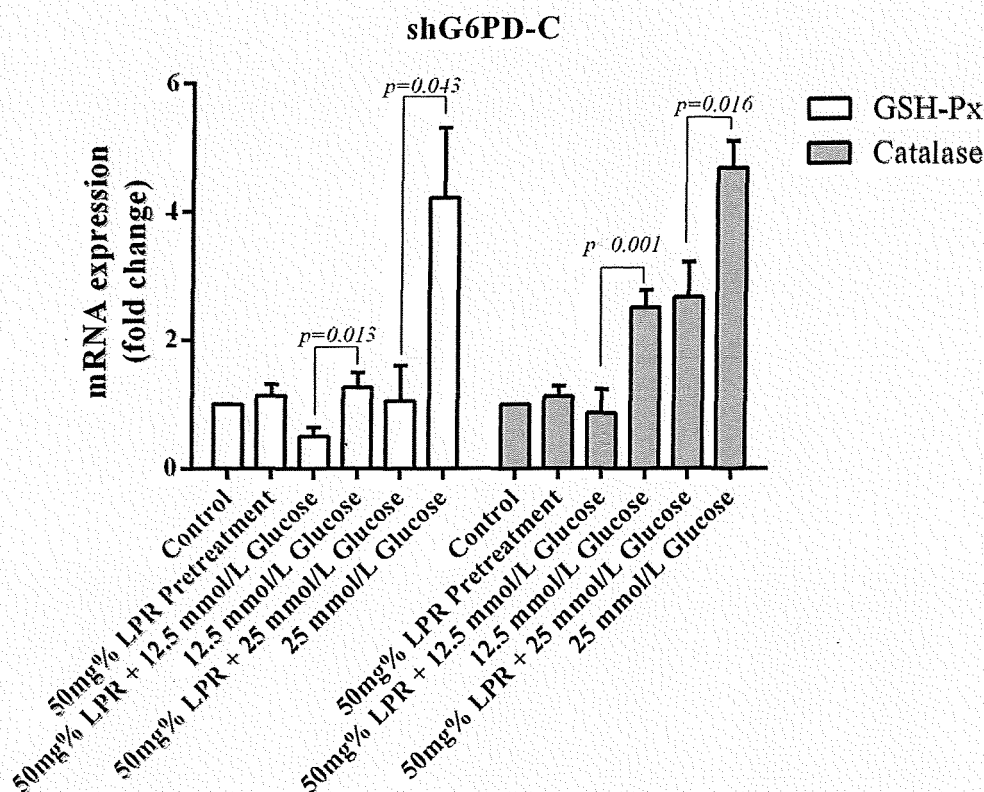
เท่า แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *Catalase* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอีกในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *Catalase* เพิ่มขึ้นเป็น  $2.05 \pm 0.37$  ( $p=0.007$ ) และ  $5.68 \pm 1.01$  ( $p=0.019$ ) เท่าตามลำดับ (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 ระดับของการแสดงออกของยีน *GSH-PX* และ *Catalase* เซลล์ไต HEK293 (shG6PD-A) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pre-treatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-A ภายหลังจาก pre-treatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงเหลือ  $0.50 \pm 0.15$  และ  $1.06 \pm 0.55$  เท่า ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pre-treatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *GSH-Px* เพิ่มขึ้นเป็น  $1.27 \pm 0.22$  ( $p=0.013$ ) และ  $4.22 \pm 1.09$  ( $p=0.043$ ) เท่าตามลำดับ ขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Catalase* ลดลง ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 12.5 mmol/L เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงเหลือ  $0.86 \pm 0.37$  แต่กลับเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นน้ำตาล 25 mmol/L เพิ่มขึ้นเป็น  $2.66 \pm 0.55$  เท่า แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *Catalase* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอีกในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ

กลุ่มที่ pretreatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *Catalase* เพิ่มขึ้นเป็น  $2.51 \pm 0.27$  ( $p=0.001$ ) และ  $4.78 \pm 0.42$  ( $p=0.016$ ) เท่าตามลำดับ (รูปที่ 17)



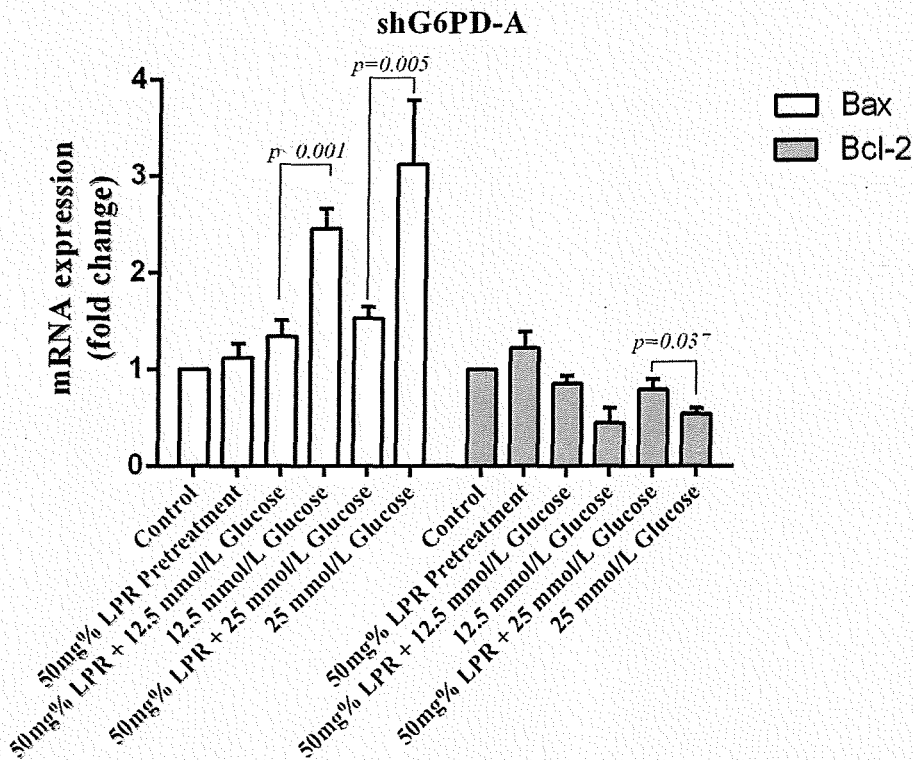
รูปที่ 17 ระดับของการแสดงออกของยีน *GSH-PX* และ *Catalase* เซลล์ไต HEK293 (shG6PD-C) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pre-treatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

9. การทดสอบการแสดงออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ภายหลังการ pre-treatment ด้วยมะนาวผง และ เพาะเลี้ยงในน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ด้วยการ pre-treatment มะนาวผง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มตายแบบ apoptosis ประกอบด้วย *Bax* (apoptotic gene) และ *Bcl-2* (anti-apoptotic gene) โดยวิธี real-time PCR

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-A ภายหลังการ pre-treatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับการแสดงออกของยีน *Bax* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเพิ่มเป็น  $1.34 \pm 0.17$  และ  $1.53 \pm 0.12$  เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Bax* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอย่างมากในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pre-treatment โดยระดับ การ

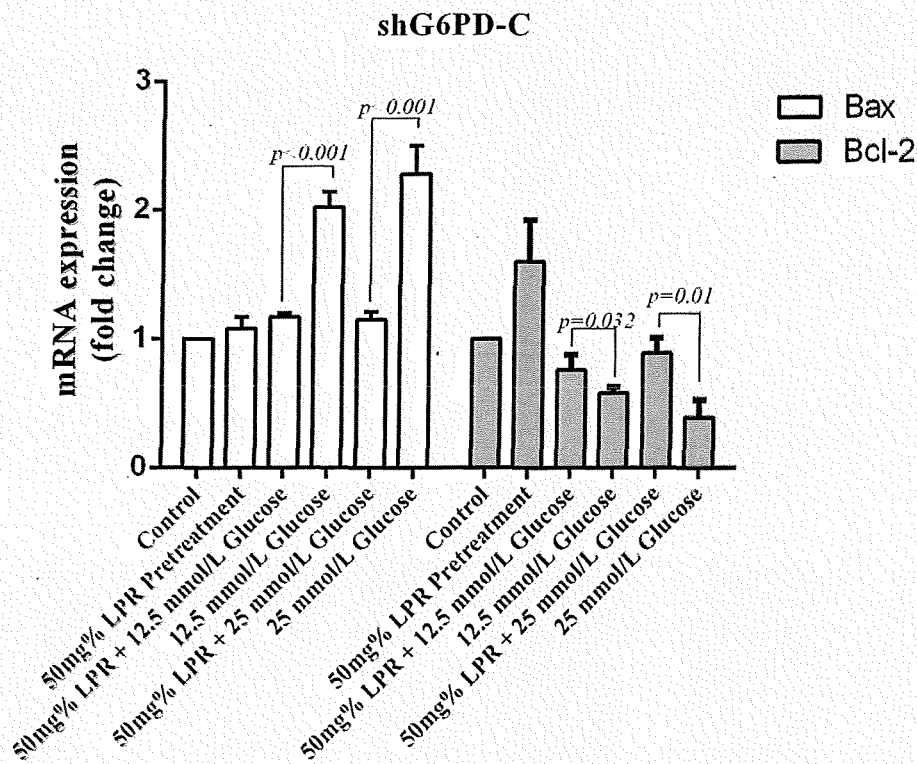
แสดงออกของยีน *Bax* เพิ่มขึ้นเป็น  $2.45 \pm 0.21$  ( $p < 0.001$ ) และ  $3.12 \pm 0.67$  ( $p = 0.005$ ) เท่าตามลำดับ ขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ลดลง ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 12.5 และ 25 mmol/L เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงเหลือ  $0.85 \pm 0.08$  และ  $0.79 \pm 0.11$  เท่า แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับลดลงไปอีกในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pre-treatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ลดลงเป็น  $0.45 \pm 0.15$  และ  $0.54 \pm 0.06$  ( $p = 0.037$ ) เท่าตามลำดับ (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ระดับของการแสดงออกของยีน *Bax* และ *Bcl-2* ของเซลล์ไต HEK293 (shG6PD-A) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pre-treatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-C ภายหลังจาก pre-treatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ ระดับการแสดงออกของยีน *Bax* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเพิ่มเป็น  $1.17 \pm 0.09$  และ  $1.15 \pm 0.06$  เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Bax* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอย่างมากในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pre-treatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *Bax* เพิ่มขึ้นเป็น  $2.02 \pm 0.12$  ( $p < 0.001$ ) และ  $2.28 \pm 0.22$  ( $p < 0.001$ ) เท่าตามลำดับ ขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ลดลง ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 12.5 และ 25 mmol/L เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงเหลือ  $0.76 \pm 0.12$  และ  $0.89 \pm 0.12$  เท่า แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับลดลงไปอีกในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25

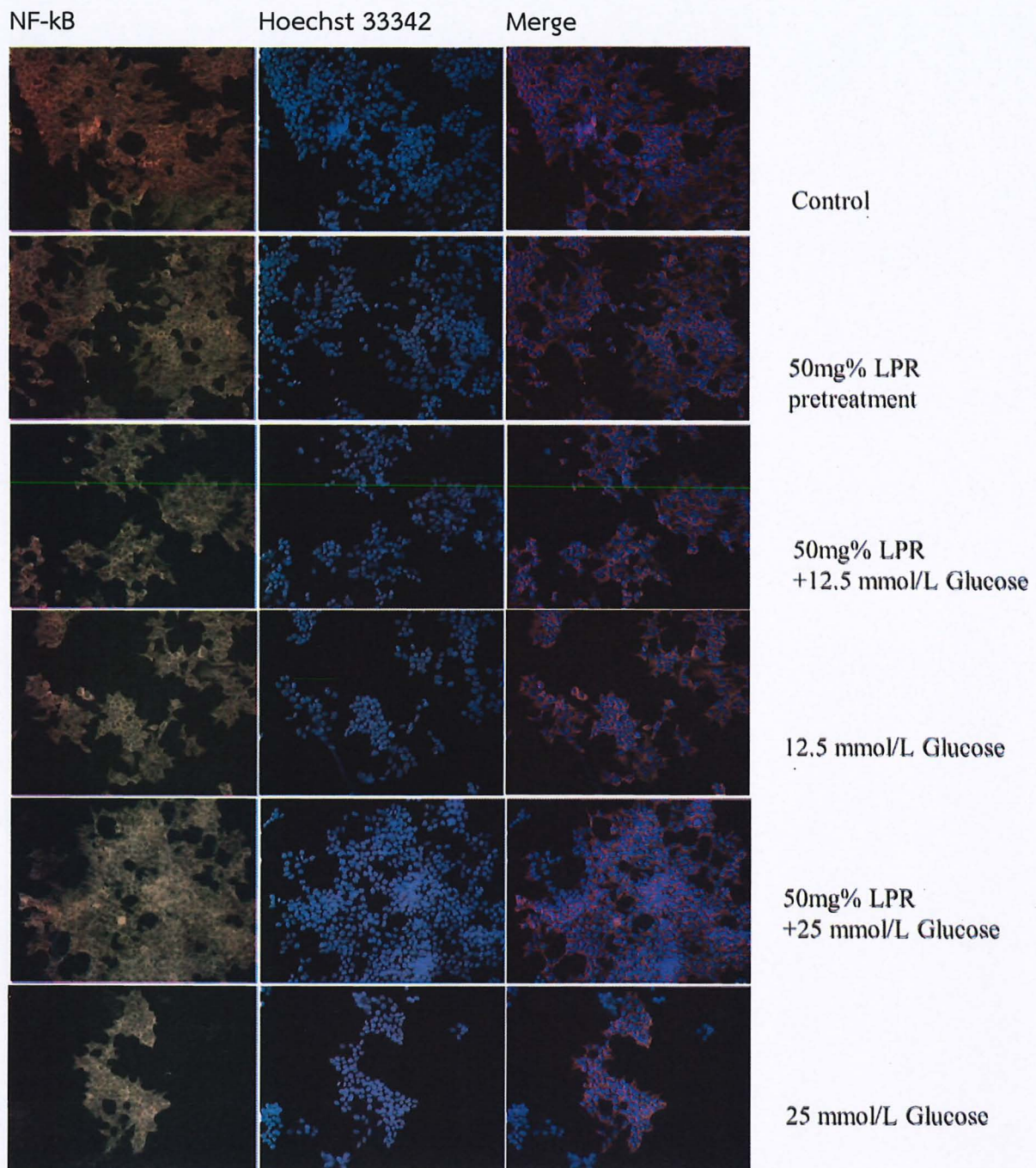
mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pre-treatment โดยระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ลดลงเป็น  $0.58 \pm 0.05$  ( $p=0.032$ ) และ  $0.39 \pm 0.06$  ( $p=0.01$ ) เท่าตามลำดับ (รูปที่ 19)



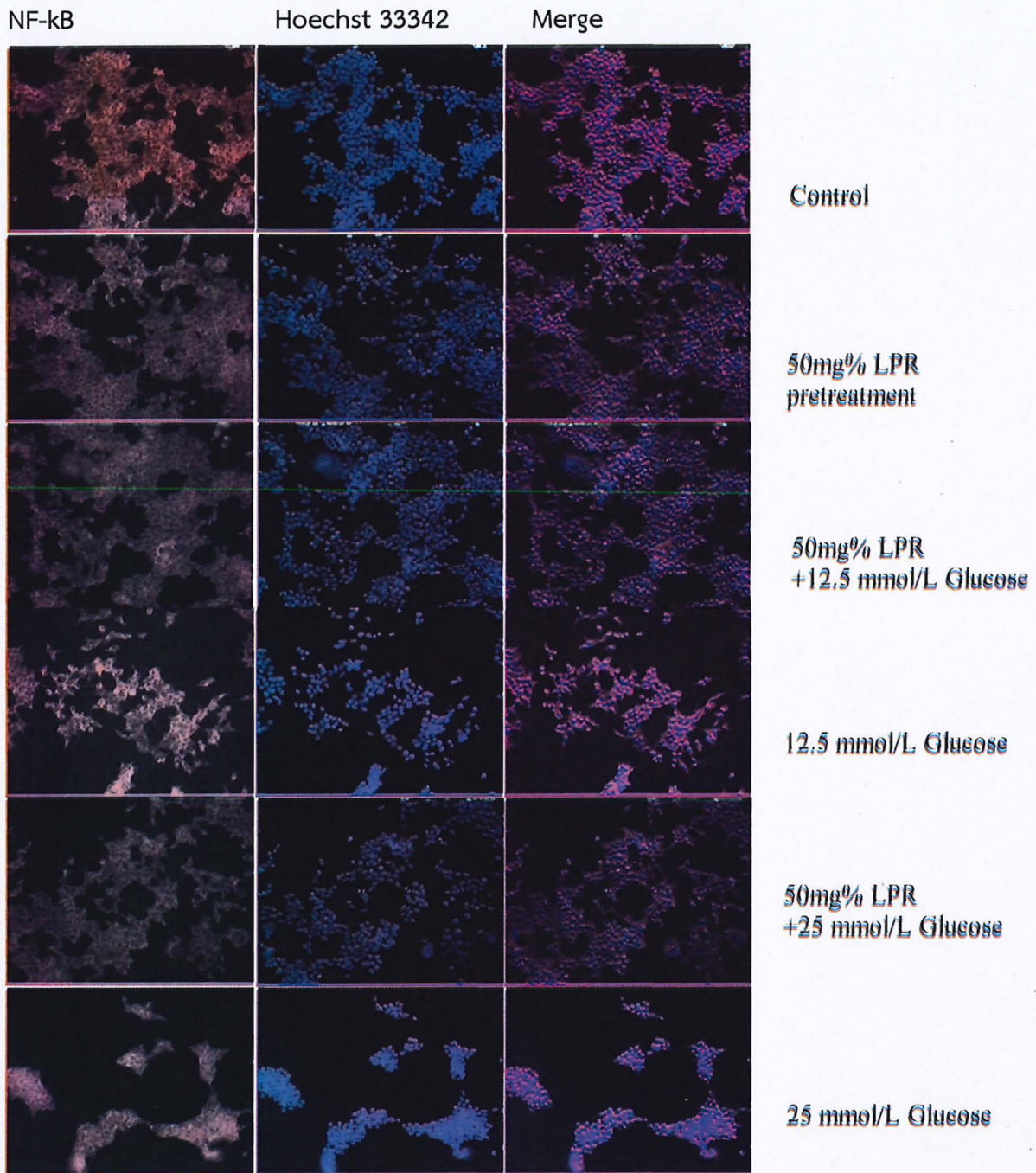
รูปที่ 19 ระดับของการแสดงออกของยีน *Bax* และ *Bcl-2* ของเซลล์ HEK293 (shG6PD-C) ที่เพาะเลี้ยงด้วยการ pre-treatment ของมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L

#### 10. ประสิทธิภาพของมะนาวผงต่อการแสดงออกของ NF-kB ในเซลล์ HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ในภาวะเบาหวาน

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* ด้วยการ pretreatment มะนาวผงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงได้ศึกษาการแสดงออกของกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยผ่านการแสดงออกของ NF-kB โดยวิธี immunofluorescence จะเห็นได้ว่าจาก รูปที่ 20 และ 21 พบว่า เมื่อย้อม NF-kB หลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับมะนาวผง และ น้ำตาลความเข้มข้นสูง การติดสีของ NF-kB จะติดที่บริเวณ cytoplasm ของเซลล์ในทุกๆ กลุ่ม ซึ่งไม่เห็นความแตกต่างในทุกกลุ่มเซลล์



รูปที่ 20 การศึกษาการอักเสบภายในเซลล์โดย วิธี immunofluorescence ต่อ NF-kB เซลล์ HEK293 (shG6PD-A)

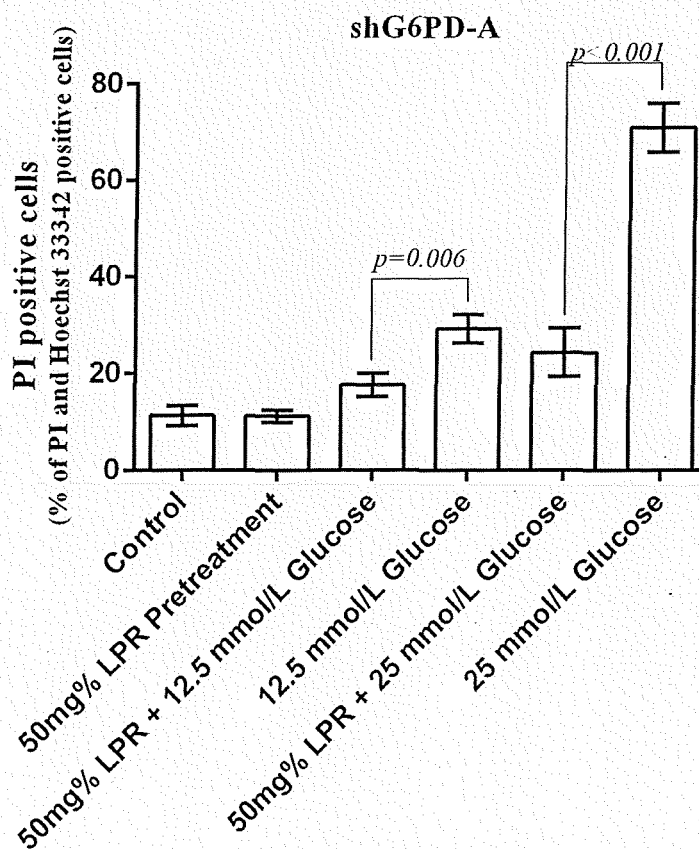


รูปที่ 21 การศึกษาการอักเสบภายในเซลล์โดย วิธี immunofluorescence ต่อ NF-kB เซลล์ HEK293 (shG6PD-C)

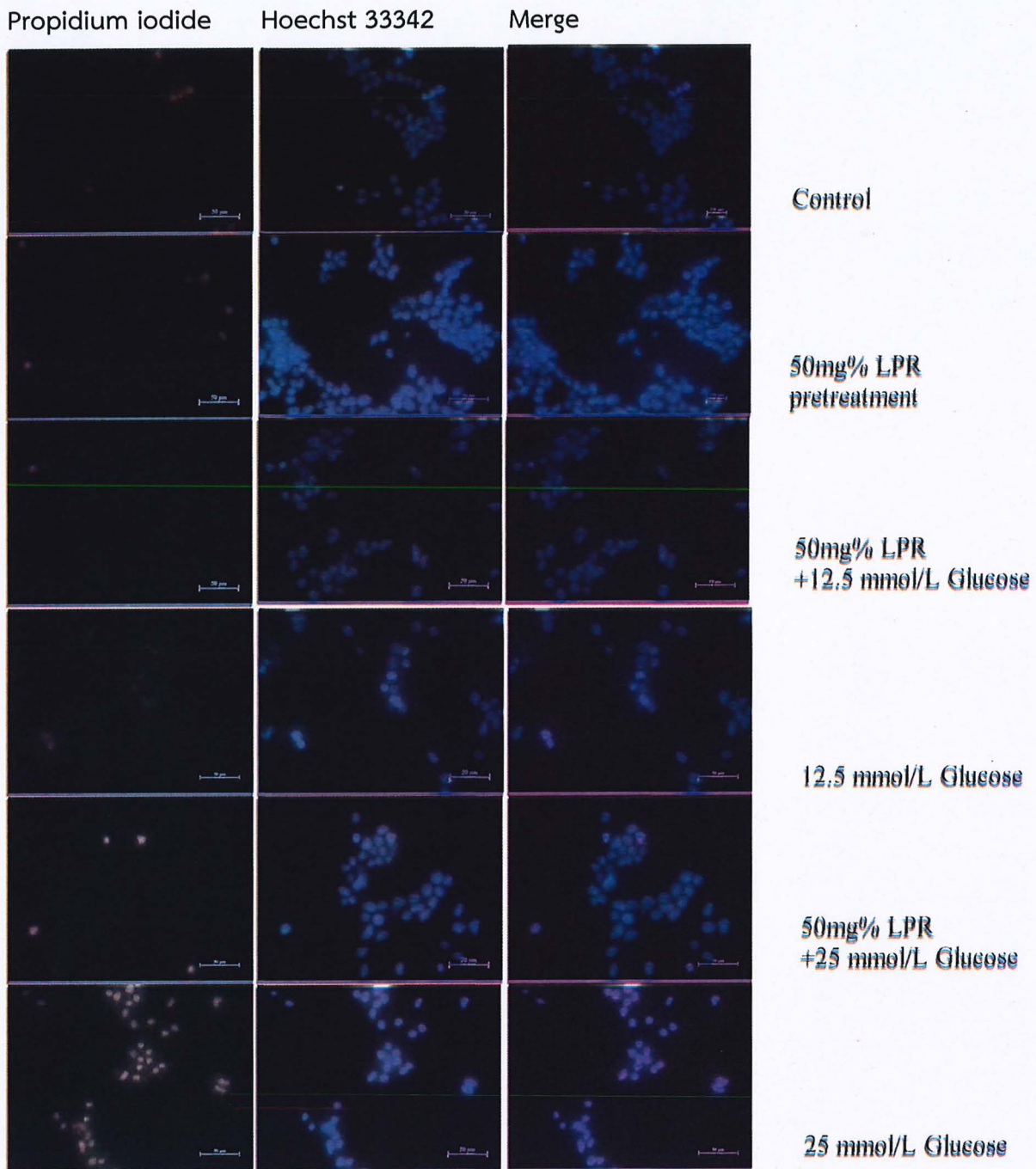
### 11. ประสิทธิภาพของมะนาวผงที่มีต่อการตายของเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ในสภาวะเบาหวาน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ G6PD กับมะนาวผงที่มีความเข้มข้นที่ 50 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่างๆ เช่น 5.5, 12.5 และ 25 mmol/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นได้ศึกษาการตายของเซลล์ด้วยการย้อม Propidium iodide โดยพบว่ากลุ่มที่ pre-treatment ด้วยมะนาวผงก่อนเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลระดับปกติที่มีความเข้มข้น 5.5 mmol/L ระดับการตายของเซลล์กลุ่ม shG6PD-A และ กลุ่ม shG6PD-C ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 11.21±1.27% (กลุ่มควบคุม 11.36±2.03%) และ 7.73±1.23% (กลุ่มควบคุม 6.86±1.36%) ตามลำดับ

ขณะที่เซลล์ไต HEK293 กลุ่ม shG6PD-A ภายหลังการ pre-treatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ พบระดับของการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นและเพิ่มตามระดับความเข้มข้นน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเพิ่มเป็น 17.65±2.45% และ 24.40±5.06% ตามลำดับ และระดับการตายของเซลล์ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอย่างมากในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment โดยเพิ่มขึ้นเป็น 29.3±2.93% ( $p=0.006$ ) และ 70.97±5.04% ( $p<0.001$ ) เท่าตามลำดับ (รูปที่ 22 และ 23)



รูปที่ 22 อัตราการตายของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการติดสีระหว่าง propidium iodide กับ Hoechst 33342 ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน G6PD ด้วย shRNA (shG6PD-A)

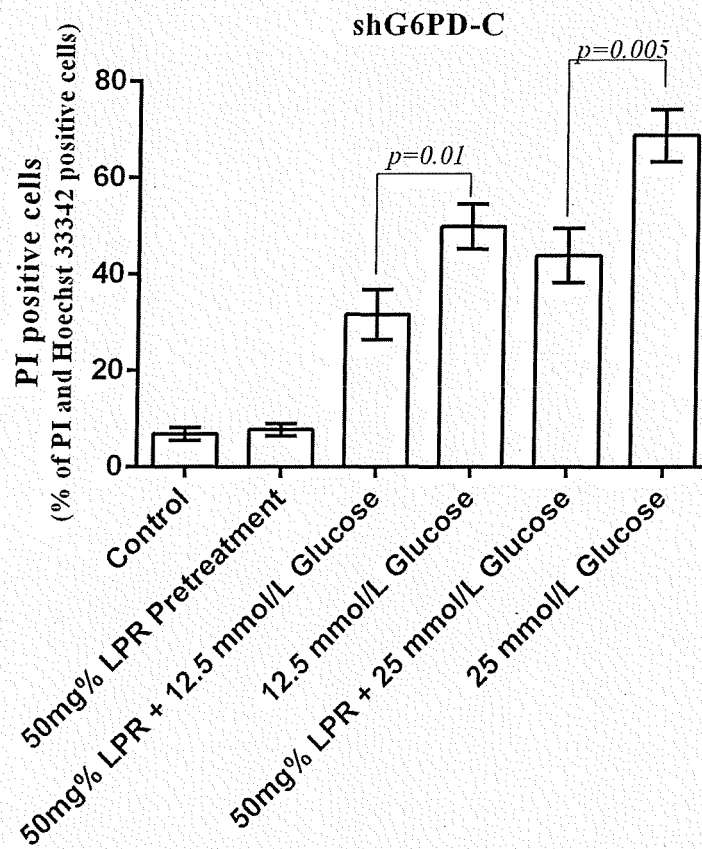


รูปที่ 23 การศึกษาการตายของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยการย้อม propidium iodide ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* ด้วย shRNA (shG6PD-A)

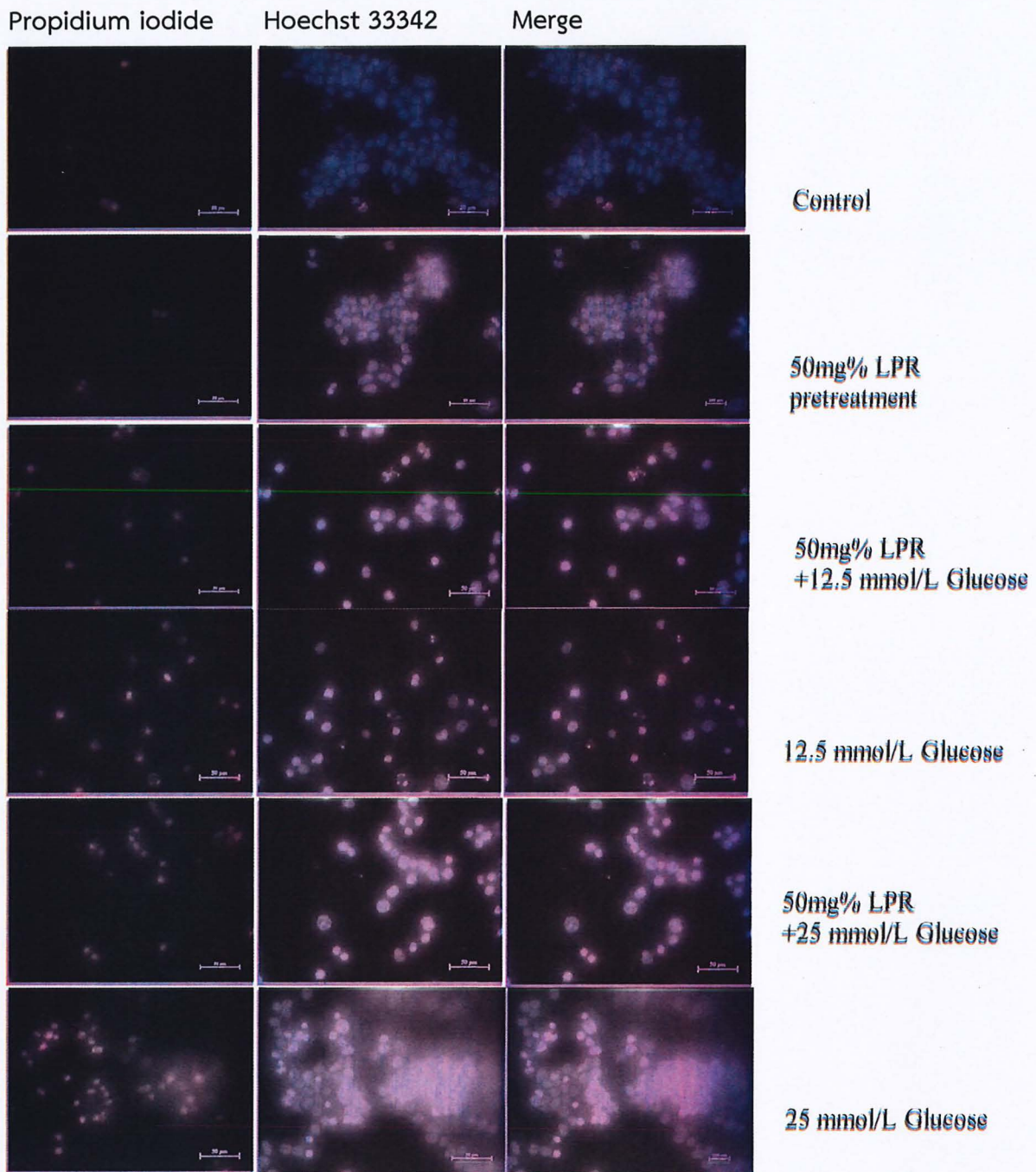
ขณะที่เซลล์ HEK293 กลุ่ม shG6PD-C ภายหลังการ pre-treatment ด้วยมะนาวผง และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L ตามลำดับ พบระดับของการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นและเพิ่มตามระดับความเข้มข้นน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเพิ่มเป็น  $31.70 \pm 5.18\%$  และ  $43.92 \pm 5.64\%$  ตามลำดับ และระดับการตายของเซลล์ของทั้งสองกลุ่มดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอย่างมากในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ



กลุ่มที่ pre-treatment โดยเพิ่มขึ้นเป็น  $49.93 \pm 4.65\%$  ( $p=0.01$ ) และ  $68.81 \pm 5.43\%$  ( $p=0.005$ ) เท่าตามลำดับ (รูปที่ 24 และ 25)



รูปที่ 24 อัตราการตายของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการติดสีระหว่าง propidium iodide กับ Hoechst 33342 ในเซลล์ HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* ด้วย shRNA (shG6PD-C)



รูปที่ 25 การศึกษาการตายของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยการย้อม propidium iodide ในเซลล์ไต HEK293 หลังจาก knockdown ยีน *G6PD* ด้วย shRNA (shG6PD-C)

## อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

ภาวะโรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยในโรคเบาหวาน ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลกระทบของน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงต่อเซลล์ไต ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาในเซลล์ไต HEK293 โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ร่วมกับภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง 12.5 และ 25 mmol/L พบว่าน้ำตาลความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ระดับของ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม และการลดลงของ cell viability แปรผกผันกับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังพบว่าระดับของอนุมูลอิสระในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง และการเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้เซลล์ไต HEK293 จึงมีการตอบสนองต่อภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงโดยมีภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นปัจจัยสำคัญ

โดยปกติแล้วเซลล์จะอาศัยกระบวนการ antioxidation ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายตัวเช่น G6PD, glutathione peroxidase (GSH-Px) และ catalase (CAT) ในการป้องกันและลดระดับภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในเซลล์ลง แต่เมื่อเอนไซม์เกิดภาวะพร่องจากกรรมพันธุ์ย่อมทำให้เซลล์ไวหรือไม่ทนต่อภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจากภาวะน้ำตาลที่สูงได้ ดังจะเห็นได้จากการทดลองที่พบว่าเอนไซม์ G6PD, GSH-Px และ CAT มีการแสดงออกมากขึ้น เพื่อพยายามควบคุมภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากการกระตุ้นภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยน้ำตาลความเข้มข้นสูงให้ลดลง จากผลการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ G6PD น่าจะมีความสำคัญต่อการควบคุมภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคไตจากเบาหวาน อย่างไรก็ตามผลการทดสอบดังกล่าวขัดแย้งกับงานวิจัยของ Xu และ Zhang ในปี 2005 และ 2000 ที่พบว่าระดับน้ำตาลที่สูงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress และลดระดับการทำงานของเอนไซม์ G6PD โดยอาศัยการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน protein kinase A (PKA)<sup>(3)</sup> และ cAMP<sup>(4)</sup> ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นผลในระยะยาวของการสูญเสียสมดุลในการควบคุมการทำงานของเซลล์ให้เป็นปกติเพื่อตอบสนองต่อภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจากภาวะเบาหวาน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจะดำเนินการติดตาม pathway ที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ G6PD อันเนื่องมาจากภาวะไตจากเบาหวานต่อไป

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าการพร่องของเอนไซม์ G6PD มีความเกี่ยวข้องกับโรคไตเบาหวาน โดยส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบ อีกทั้งการทดลองในหนูที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD พบว่า หนูมีภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะ (Albuminuria) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งภาวะดังกล่าวก่อให้เกิดโรคไตจากเบาหวาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้จำลองโมเดลของการ knockdown ยีน *G6PD* โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 ที่ knockdown ยีน *G6PD* และเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง พบว่าเซลล์ไต HEK293 ที่ถูก knockdown ยีน *G6PD* มีระดับของ cell viability ลดลงมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ knockdown ยีน *G6PD* ซึ่งปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตแปรผกผันกับระดับน้ำตาลและระดับการพร่องของเอนไซม์ G6PD ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าระดับอนุมูลอิสระในเซลล์ที่ knockdown ยีน *G6PD* มีปริมาณมากและแปรผันตามกับระดับน้ำตาลและการพร่องเอนไซม์ G6PD ที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าเซลล์จะพยายามปรับระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant enzymes แล้วก็ตาม นอกจากนี้ยัง

พบว่าเซลล์ที่ถูก knockdown ยีน *G6PD* มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกของ ยีน *Bax* หรือกลุ่ม apoptotic gene เพิ่มขึ้นและ *Bcl-2* หรือกลุ่ม anti-apoptotic gene ลดลง จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่ายีน *G6PD* มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ไตในสภาวะเบาหวาน การทดลองนี้สนับสนุนการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าการพร่องของเอนไซม์ *G6PD* เพิ่มความเสี่ยงต่อโรคไตจากเบาหวานมากขึ้น อันเนื่องมาจากกลไกในการป้องกันภาวะ oxidative stress ลดลง

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้นำมะนาวผง ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันภาวะ oxidative stress จากการวิจัยพบว่า ความเข้มข้นของมะนาวผงที่ 50 mg% เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไต HEK293 ที่พร่องเอนไซม์ *G6PD* และเมื่อเลี้ยงเซลล์แบบป้องกัน (pretreatment) โดยใช้มะนาวผง 50 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 12.5 และ 25 mmol/L พบว่า มะนาวผงมีคุณสมบัติในการป้องกันการตายของเซลล์ไตจากเบาหวานอันเนื่องมาจากภาวะ oxidative stress โดยสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และป้องกันการตายของเซลล์ไตที่พร่องเอนไซม์ *G6PD* ในภาวะเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญ จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า มะนาวผงมีคุณสมบัติในการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ไตที่พร่องเอนไซม์ *G6PD* อันเนื่องมาจากภาวะเบาหวาน

### สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

ภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงสามารถชักนำภาวะ oxidative stress ให้เกิดขึ้นในเซลล์ไต HEK293 เพิ่มมากขึ้น ในสภาวะปกติเซลล์พยายามหาทางป้องกันภาวะดังกล่าวด้วยการใช้ antioxidant enzymes เช่น *G6PD* ดังจะเห็นได้จากการแสดงออกของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ *G6PD* ย่อมส่งผลต่อการเสียสมดุลในการป้องกันภาวะ oxidative stress เป็นเหตุให้เซลล์ไตเสื่อมและตายมากขึ้น ดังนั้นการใช้สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบก็น่าจะสามารถลดความเสื่อมและการตายอันเนื่องจากภาวะเบาหวานของเซลล์ไตที่พร่องเอนไซม์ *G6PD* ได้เช่นกัน

### บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet. 2008;371:64-74
2. Xu Y, Zang Z, Hu J, Stillman IE, Leopold JA, Handy DE, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria. FASEB. 2010;24:610-6.
3. Xu Y, Osborne BW, Stanton RC. Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. Am J Physiol Renal Physiol. 2005;289:F1040-7.
4. Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase cAMP in aortic endothelial cells. J Biol Chem. 2000;275:40042-7.

5. Niazi GA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and diabetes mellitus. *Int J Hematol.* 1991;54:295-8.
6. Santana MS, Monteiro WM, Costa MRF, Sampaio VS, Brito MAM, Lacerda MVG, et al. High frequency of diabetes and impaired fasting glucose in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91:74-6.
7. Saeed TK, Hamamy HA, Alwan AA. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1985;1:110-2.
8. SAHA N. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with diabetes mellitus in ethnic groups of Singapore. *J Med Genet.* 1979;16:431-4.
9. Yang SM, Chan YL, Hua KF, Chang JM, Chen HL, Tsai YJ, et al. Osthole improves an accelerated focal segment glomerulosclerosis model in the early stage by activating the Nrf2 antioxidant pathway and subsequently inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated COX-2 expression and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2014;73:260-9.

## ภาคผนวก (Appendix)

### ประวัตินักผู้วิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ซีพสุนทร

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ผลงานตีพิมพ์:

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

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

ผู้ร่วมวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานตีพิมพ์:

1. Cheepsunthorn P, Palmer C, Connor JR. Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *J Comp Neurol.* 1998; 400(1): 73-86.
2. Cheepsunthorn P, Radov L, Menzies S, Reid J, Connor JR. Characterization of a novel brain-derived microglial cell line isolated from neonatal rat brain. *Glia* 2001; 35(1): 53-62.
3. Cheepsunthorn P, Palmer C, Menzies S, Roberts RL, Connor JR. Hypoxic/ischemic insult alters ferritin expression and myelination in neonatal rat brains. *J Comp Neurol.* 2001; 431(4): 382-96.
4. Connor JR, Xuesheng Z and Cheepsunthorn P. Iron and Glial Toxicity. *The Role of Glia in Neurotoxicity (2nd)*, Ascher M and Costa 2005: 367-77.
5. Cheepsunthorn P, Mairuae N, Nasee K. Estrogen enhances the inhibitory effect of iron on microglial nitric oxide production. *J Med Assoc Thai.* 2006; 89(6): 840-5.
6. Sangsanoh P, Waleetorncheepsawat S, Suwantong O, Wutticharoenmongkol P, Weeranantanapan O, Chuenjitbuntaworn B, Cheepsunthorn P, Pavasant P, Supaphol P. In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds. *Biomacromolecules* 2007; 8(5): 1587-94.
7. Suwantong O, Waleetorncheepsawat S, Sanchavanakit N, Pavasant P, Cheepsunthorn P, Bunaprasert T, Supaphol P. In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *Int J Biol Macromol.* 2007; 40(3): 217-238.
8. Kaomongkolgit R, Cheepsunthorn P, Pavasant P, Sanchavanakit N. Iron increases MMP-9 expression through activation of AP-1 via ERK/Akt pathway in human head and neck squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2008; 44(6): 587-94.
9. Mairuae N, Hall li EC, Cheepsunthorn P, Lee SY, Connor JR. The H63D HFE gene variant promotes activation of the intrinsic apoptotic pathway via mitochondria dysfunction following  $\beta$ -amyloid peptide exposure. *J Neurosci Res.* 2010; 88(14): 3079-89.
10. Thongtan T, Cheepsunthorn P, Chaiworakul V, Rattanarungsan C, Wikan N, Smith DR. Highly permissive infection of microglial cells by Japanese encephalitis virus: a possible role as a viral reservoir. *Microbes Infect.* 2010; 12(1): 37-45.



11. Mairuae N, Connor JR, **Cheepsunthorn P**. Increased cellular iron levels affect matrix metalloproteinase expression and phagocytosis in activated microglia. *Neurosci Lett*. 2011; 500(1); 36-40.
12. Angsuwittaya N, Srisomsap C, **Cheepsunthorn P**. Proteome analysis of microglial secretion induced by AB. *Thai Journal of Pharmacology*. 2011; 33(1); 73-76.
13. Thongtan T, Wikan N, Wintachai P, Rattanasungsan C, Srisomsap C, **Cheepsunthorn P**, Smith DR. Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *J Med Virol* 2012; 84(4): 615-23.
14. Benjarongrat H, Srikiatkachorn A, **Cheepsunthorn P**. LPS induces myelin P0 expression and NF- $\kappa$ B-mediated IL-6 p. 36<sup>th</sup> Congress on Pharmacology of Thailand/Thai Journal of Ph. 2014; 36; 48-53.
15. Boondam Y, **Cheepsunthorn P**. Patterns of microglial innate immune responses elicited by amyloid  $\beta$ 1-42 and lipopolysaccharide: the similarities of the differences. *Asian Biomed* 2014; 8(3): 353-59.
16. Mairuae N, Connor JR, Lee SY, **Cheepsunthorn P**, Tongjaroenbuangam W. The effects of okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) on the cellular events associated with Alzheimer's disease in a stably expressed HFE neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurosci Lett*. 2015; 603; 6-11.
17. Mairuae N, **Cheepsunthorn P**. Valproic acid attenuates nitric oxide and interleukin-1 $\beta$  production in lipopolysaccharide-stimulated iron-rich microglia. *Biomed Rep*. 2018 Apr;8(4):359-364.