

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล



ผลของ H₂O₂ ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ H₂O₂ และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ แต่ไม่กระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงสัมผัส H₂O₂ ตั้งแต่ความเข้มข้น 0-150 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 20) ในเซลล์ทั้งสามชนิดได้แก่ HK-2 (A) UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) พบว่า ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 μ M ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ ในขณะที่ H₂O₂ ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 μ M ขึ้นไป ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับ H₂O₂ โดยใน HK-2 cell ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 51.33 (P = 0.0084), 3.00% และ 1.00 % (P < 0.0001) ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 μ M ตามลำดับ เช่นเดียวกับ UM-UC-3 ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 84.33% (P = 0.0214), 56.67% (P = 0.0004) และ 30.33% (P < 0.0001) ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 μ M ตามลำดับ และยังคงพบลักษณะเดียวกันใน TCCSUP cell ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 64.33% (P = 0.0109), 26.33% (P = 0.0001) และ 10.00% (P=0.0003) ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 μ M ตามลำดับ

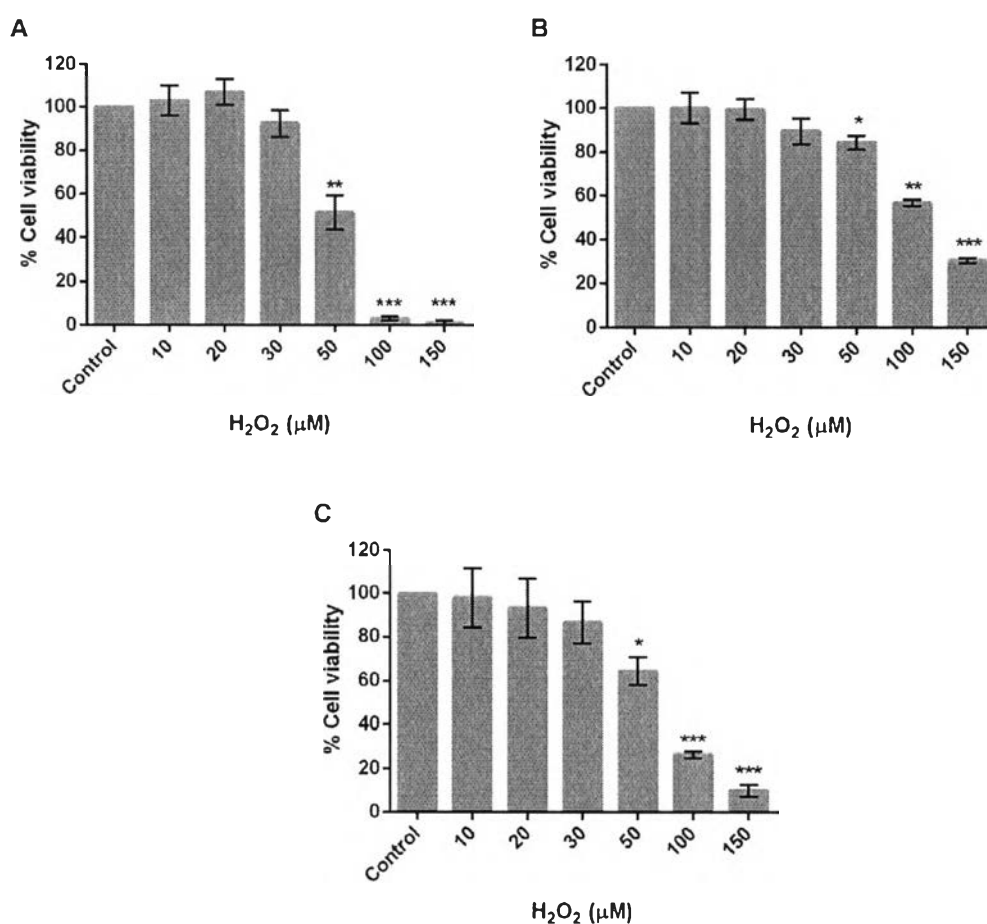
เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงสัมผัส H₂O₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 21) พบว่า ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับ H₂O₂ ในขณะที่ H₂O₂ ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 μ M ขึ้นไป ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับ H₂O₂ โดยใน HK-2 cell ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 95.67 (P = 0.0221), 65.33 (P = 0.0014), 19.00 (P = 0.0001), 4.0 (P < 0.0001) และ 3 (P < 0.0001) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 100 และ 150 μ M ตามลำดับ เช่นเดียวกับ UM-UC-3 ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 84.43 (P = 0.0157), 35.19 (P = 0.0010), 1.29 และ 0.67 (P < 0.0001) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 100 และ 150 μ M ตามลำดับ และยังคงพบลักษณะเดียวกันใน TCCSUP cell ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 68.34 (P = 0.0061), 24.93 (P = 0.0004) 1.8 และ 1.3 (P < 0.0001) ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 μ M ตามลำดับ

เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงสัมผัส H₂O₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 22) พบว่า ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับ H₂O₂ ในขณะที่ H₂O₂ ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 μ M ขึ้นไป ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทาง

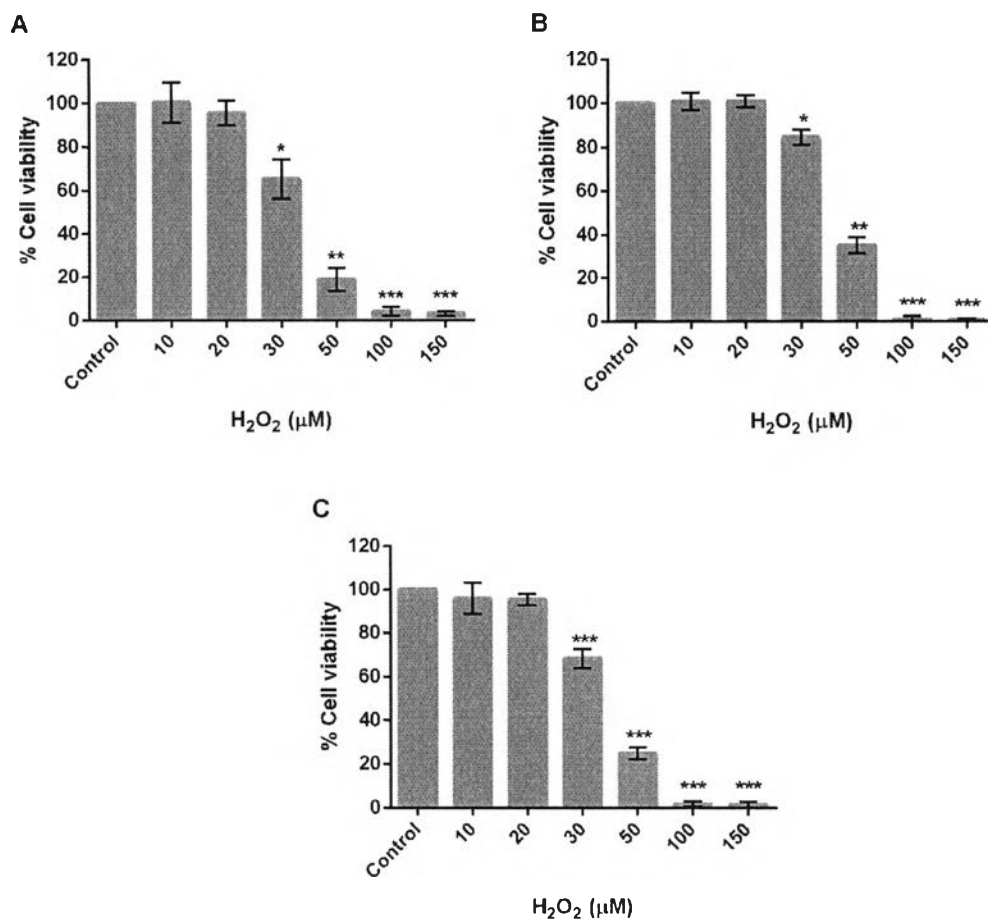


2071921265

สถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับ H_2O_2 โดยใน HK-2 cell ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 48.00 ($P < 0.0001$), 17 ($P < 0.0001$), 5.5 ($P < 0.0001$) และ 4 ($P < 0.0001$) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 100 และ 150 μM ตามลำดับ เช่นเดียวกับ UM-UC-3 ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 63 ($P = 0.0117$), 25.33 ($P = 0.0050$), 0.33 ($P < 0.0001$) และ 0.33 ($P < 0.0001$) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 100 และ 150 μM ตามลำดับ และยังคงพบลักษณะเดียวกันใน TCCSUP cell ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 53.67 ($P = 0.0034$), 25.33 ($P = 0.0043$) 0.33 ($P < 0.0001$) และ 0.33 ($P < 0.0001$) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 100 และ 150 μM ตามลำดับ



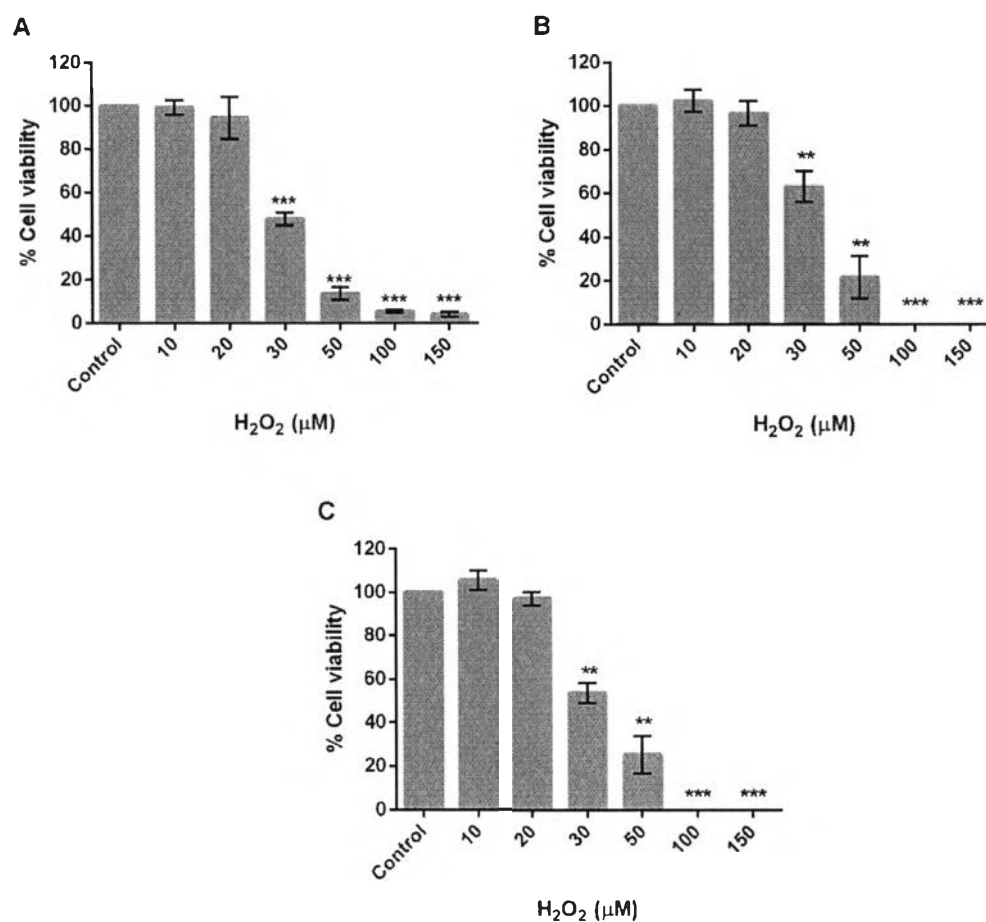
ภาพที่ 20 ความเป็นพิษของ H_2O_2 ความเข้มข้น 10-150 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) เมื่อเซลล์สัมผัส H_2O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 μM แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$



ภาพที่ 21 ความเป็นพิษของ H₂O₂ ความเข้มข้น 10-150 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) เมื่อเซลล์สัมผัส H₂O₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 μM แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)



2071921265

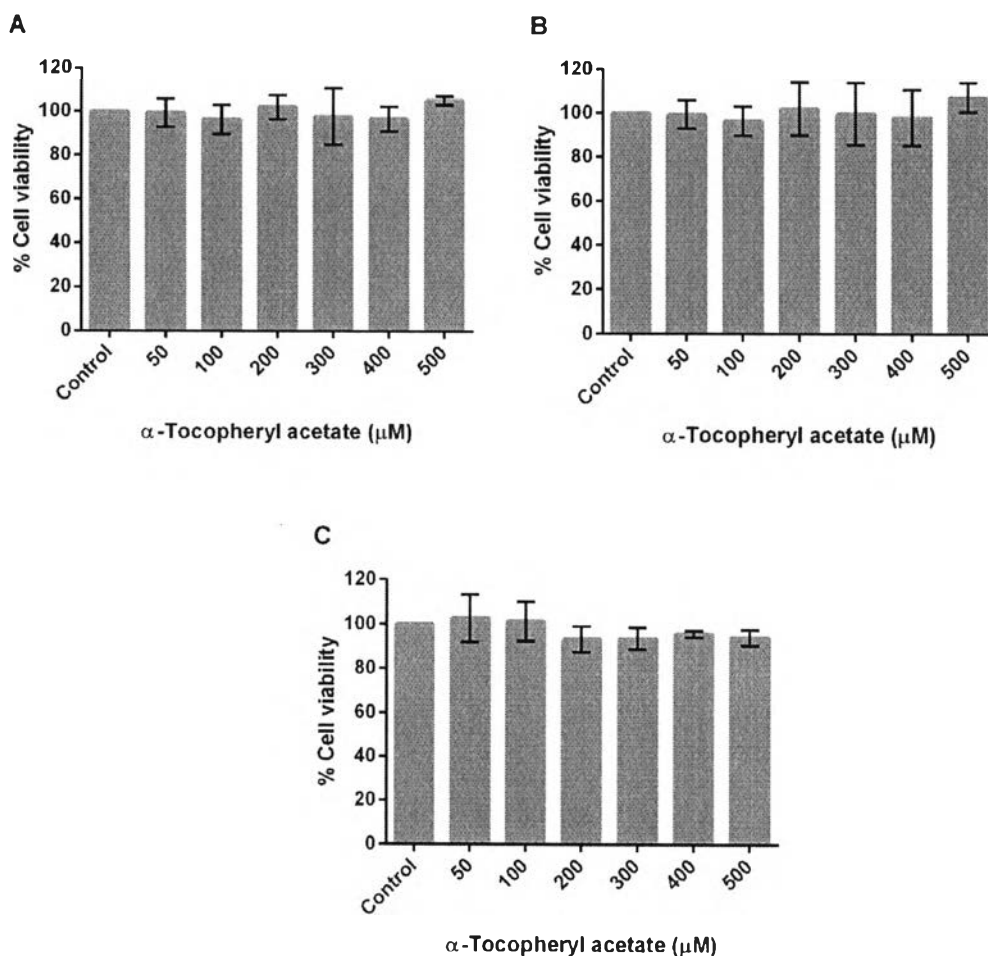


ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของ H₂O₂ ความเข้มข้น 10-150 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) เมื่อเซลล์สัมผัส H₂O₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 μM แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นได้ว่า H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 20 μM หรือน้อยกว่า ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ทุกชนิดที่ใช้ศึกษา เมื่อให้เซลล์สัมผัส H₂O₂ ตั้งแต่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังนั้น ในการทดสอบอื่นๆ ที่ต้องใช้ H₂O₂ ในการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น จะใช้ H₂O₂ ความเข้มข้นที่ 20 μM เพื่อตัดปัจจัยด้านความมีชีวิตของเซลล์เข้ามาบรรจบผลการทดลอง

ผลของ α -tocopheryl acetate ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

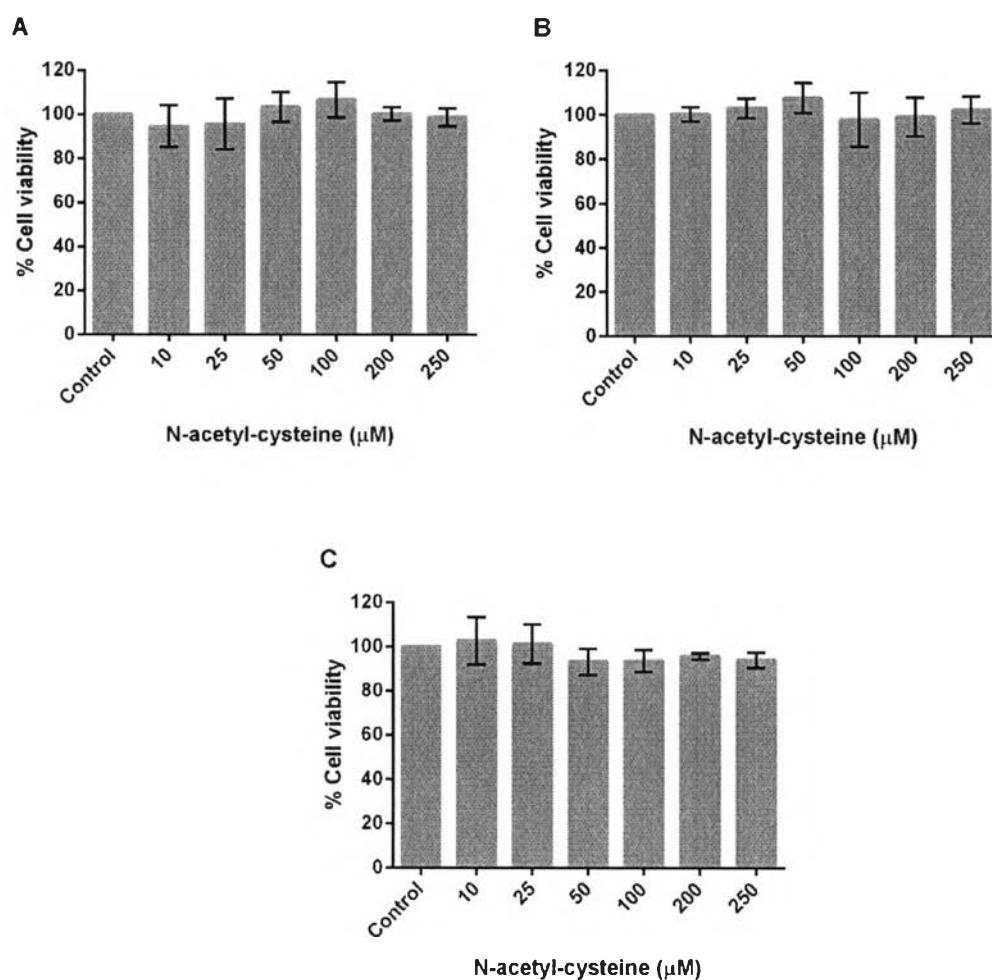
เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่สัมผัสกับ α -tocopheryl acetate ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-500 μ M เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษของ α -tocopheryl acetate (ภาพที่ 23) ในเซลล์ทั้งสามชนิดได้แก่ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP พบว่า α -tocopheryl acetate ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-500 μ M ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ α -tocopheryl acetate เข้มข้น 300 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยก่อนหน้า (15) และเห็นผลการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน



ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของ α -tocopheryl acetate ความเข้มข้น 50-500 μ M ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลของ N-acetylcysteine ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่สัมผัสกับ NAC ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษของ NAC (ภาพที่ 24) ในเซลล์ทั้งสามชนิดได้แก่ HK-2, UM-UC-3, และ TCCSUP พบว่า NAC ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ NAC เข้มข้น 50 μM



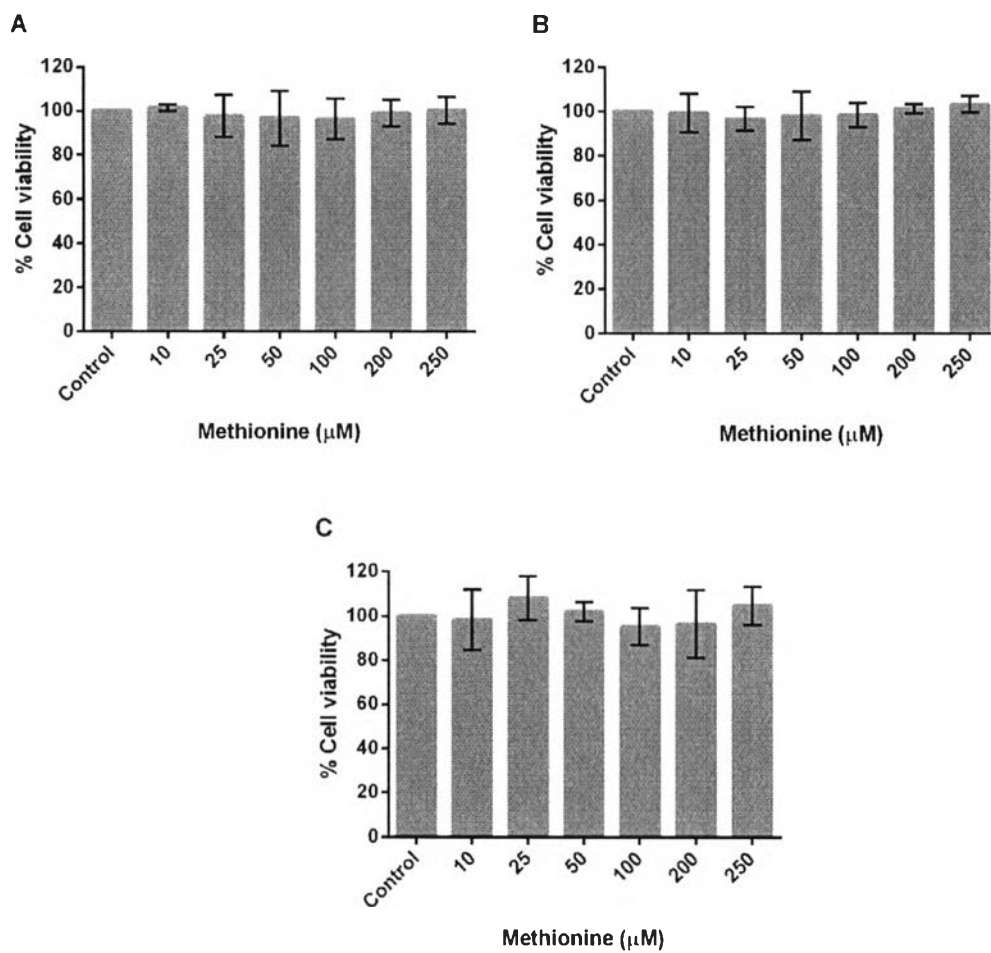
ภาพที่ 24 ความเป็นพิษของ NAC ที่ความเข้มข้น 10-250 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)



2071921265

ผลของ Methionine ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่สัมผัสกับ Methionine ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษของ Met (ภาพที่ 25) ในเซลล์ทั้งสามชนิดได้แก่ HK-2, UM-UC-3, และ TCCSUP พบว่า Methionine ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในการทดลองต่อไปเลือกใช้ Met ที่ความเข้มข้น 10 μM



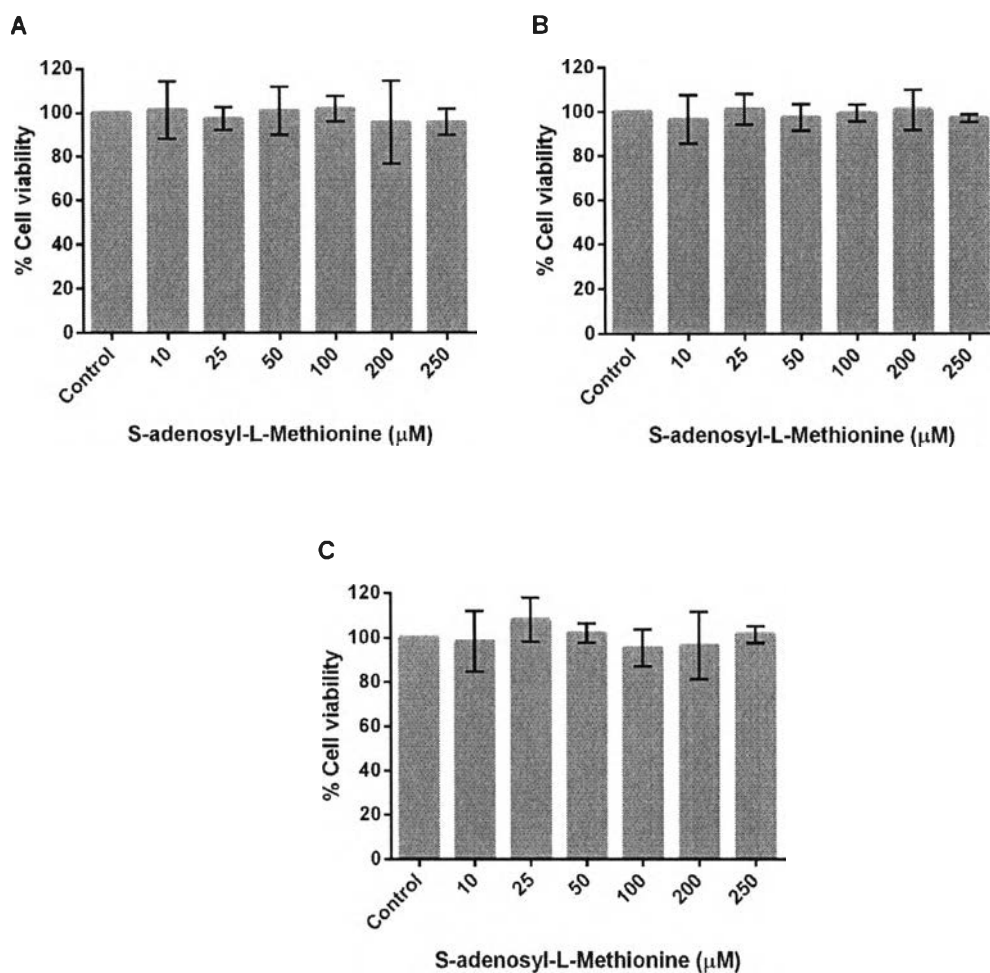
ภาพที่ 25 ความเป็นพิษของ Met ความเข้มข้น 10-250 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)



2071921265

ผลของ S-adenosylmethionine ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

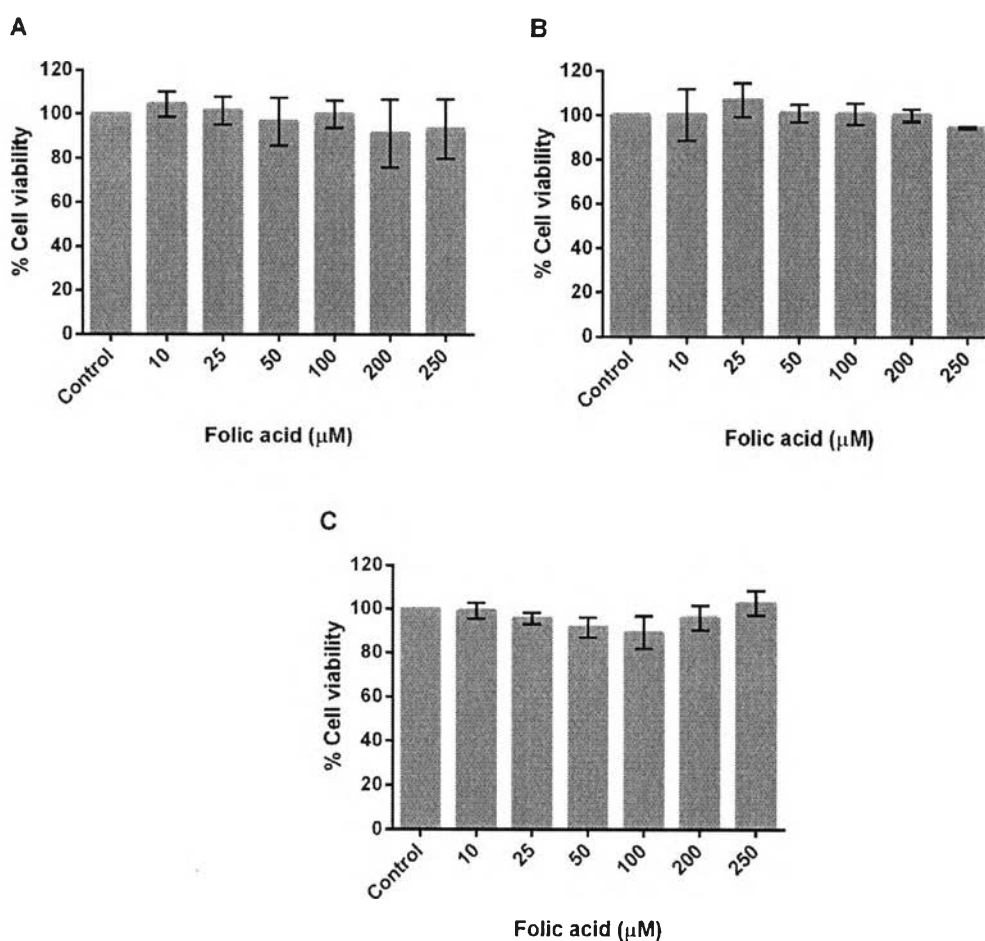
เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่สัมผัสกับ SAM ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษ SAM (ภาพที่ 26) ในเซลล์ทั้งสามชนิดได้แก่ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP พบว่า SAM ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังนั้นในการทดลองต่อไปเลือกใช้ SAM ที่ความเข้มข้น 10 μM



ภาพที่ 26 ความเป็นพิษของ SAM ความเข้มข้น 10-250 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลของ Folic acid ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

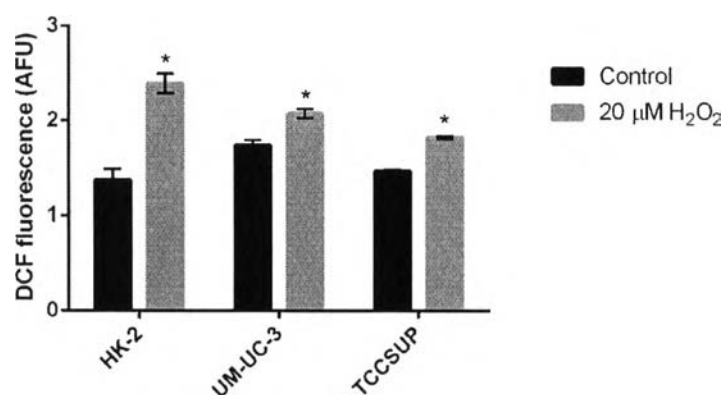
เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่สัมผัสกับ Folic acid ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษ Folic acid (ภาพที่ 27) ในเซลล์ทั้งสามชนิดได้แก่ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP พบว่า Folic acid ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-250 μM ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในการทดลองต่อไปเลือกใช้ความเข้มข้นของ Folic acid ที่ 10 μM



ภาพที่ 27 ความเป็นพิษของ Folic acid ความเข้มข้น 10-250 μM ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลของ H₂O₂ ต่อการเกิด ROS ภายในเซลล์

เพื่อยืนยันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เมื่อกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย H₂O₂ จึงทำวิเคราะห์การสร้าง ROS ภายในเซลล์ ด้วยเทคนิค DCFH-DA พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 20 μ M H₂O₂ พบว่าระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ($P < 0.001$) โดยพบว่า HK-2 cell มีค่า AFU เพิ่มขึ้น จาก 1.370 เป็น 2.392 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ ส่วน UM-UC-3 cell พบว่า มีค่า AFU เพิ่มขึ้น จาก 1.738 เป็น 2.074 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ และ TCCSUP cell มีค่า AFU เพิ่มขึ้น จาก 1.466 เป็น 1.824 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂



ภาพที่ 28 ระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ พบว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ มีระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * $P < 0.001$)

ผลของ H_2O_2 ต่อระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนคาร์บอนิล

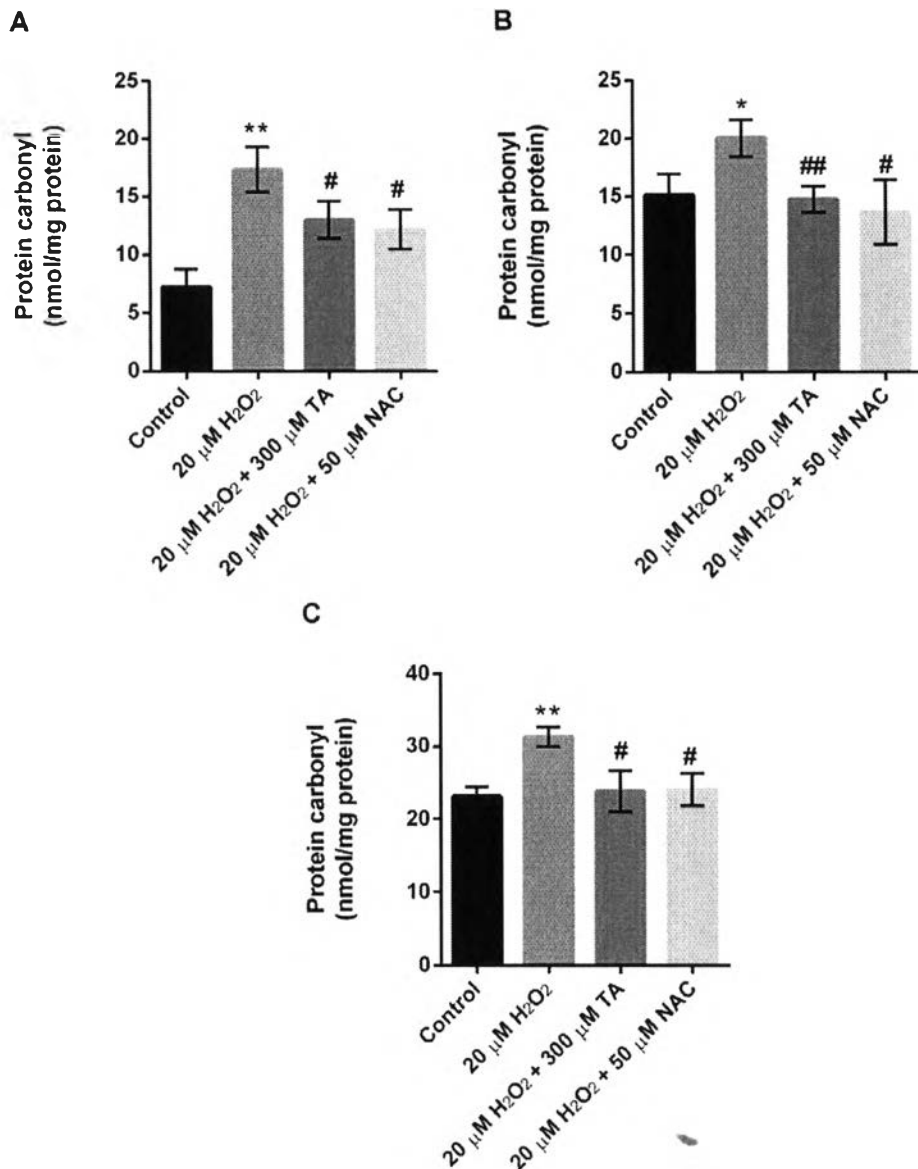
การวิเคราะห์ระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพื่อวัดระดับ protein oxidation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ด้วยวิธี Spectrophotometric NDPH assay พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ ด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนคาร์บอนิลอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยพบว่าใน HK-2 cell (ภาพที่ 29A) มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม $7.2 \text{ nmol/mg protein}$ เป็น $17.33 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0026$) และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 ร่วมกับการให้สารต้านอนุมูลอิสระ ($300 \mu M TA$ หรือ $50 \mu M NAC$) พบว่าระดับโปรตีนคาร์บอนิลลดลงเป็น $12.97 \text{ nmol/mg of protein}$ ($P = 0.0421$) และ $12.13 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0265$) ตามลำดับ โดยการลดลงของระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เพียงอย่างเดียว

UM-UC-3 cell (ภาพที่ 29B) มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม $15.13 \text{ nmol/mg protein}$ เป็น $20.03 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0240$) และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 ร่วมกับการให้สารต้านอนุมูลอิสระ ($300 \mu M TA$ หรือ $50 \mu M NAC$) พบว่าระดับโปรตีนคาร์บอนิลลดลงเป็น $14.73 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0117$) และ $13.63 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0371$) ตามลำดับ โดยการลดลงของระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เพียงอย่างเดียว

TCCSUP cell (ภาพที่ 29C) มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม $23.10 \text{ nmol/mg protein}$ เป็น $31.30 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0016$) และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 ร่วมกับการให้สารต้านอนุมูลอิสระ ($300 \mu M TA$ หรือ $50 \mu M NAC$) พบว่าระดับโปรตีนคาร์บอนิลลดลงเป็น $23.80 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0280$) และ $24.03 \text{ nmol/mg protein}$ ($P = 0.0132$) ตามลำดับ โดยการลดลงของระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เพียงอย่างเดียว

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า $20 \mu M H_2O_2$ สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน รวมถึงทำให้เกิดความเสียหายของโปรตีนภายในเซลล์ (oxidative protein damage) นอกจากนี้ยังพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์เมื่อกระตุ้นด้วย H_2O_2 ได้





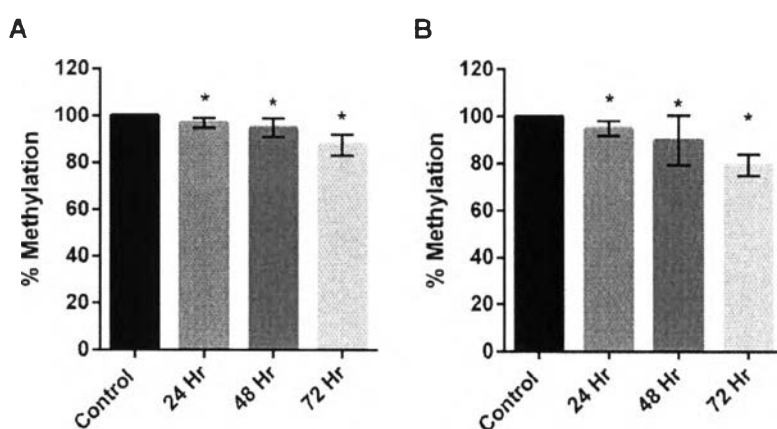
ภาพที่ 29 แสดงระดับโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ HK-2 (A), UM-UC-3 (B) และ (C) TCCSUP พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H₂O₂ ส่งผลให้มีการเพิ่มของระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวิเคราะห์ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนภายในเซลล์พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H₂O₂ ควบคู่กับการให้สารต้านอนุมูลอิสระ ทั้ง 300 μ M TA และ 50 μ M NAC สามารถลดระดับโปรตีนคาร์บอนิลได้อย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ เพียงอย่างเดียว แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ * คือ P < 0.05, ** คือ P < 0.01, # คือ P < 0.05, ## คือ P < 0.01



2071921265

ผลของ H₂O₂ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ตามระยะเวลา

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ด้วยเทคนิค COBRA-PCR ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 และ TCCSUP โดยกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H₂O₂ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าระดับร้อยละ LINE-1 methylation ของเซลล์ UM-UC-3 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จาก 100 เป็น 96.80 (P = 0.0289), 94.98 (P = 0.0444) และ 93.06 (P = 0.0003) ตามลำดับ เช่นเดียวกันใน TCCSUP cell พบการลดลงของระดับ LINE-1 methylation อย่างมีนัยสำคัญ เป็น 94.85 (P = 0.0046), 89.96 (P = 0.0462) 79.49 (P < 0.001) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับ H₂O₂ ส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ลดลงเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่สัมผัส (time-dependent manner) และจากผลการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ระยะเวลากระตุ้นเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ต่อไป เพื่อให้เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนมากที่สุด



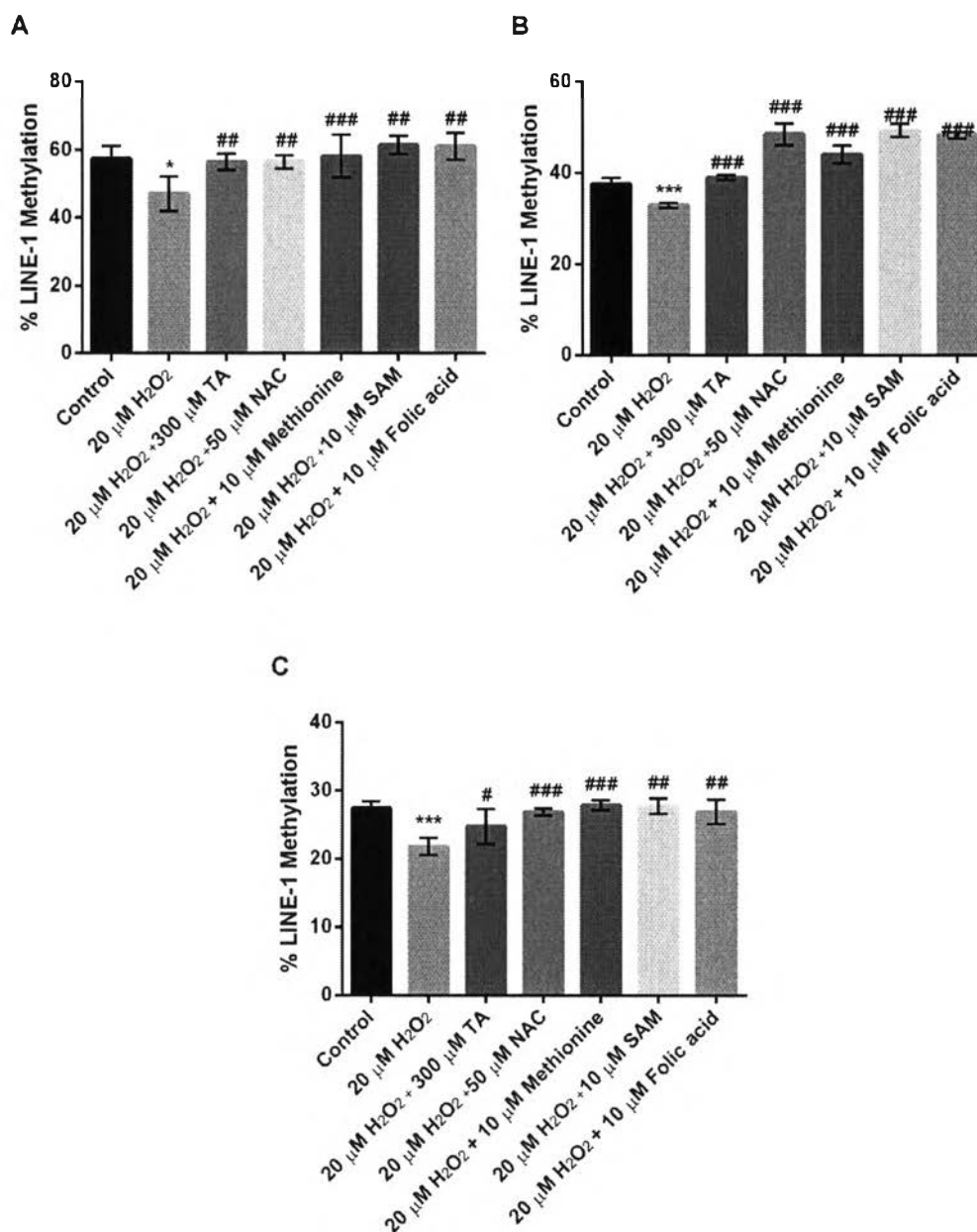
ภาพที่ 30 แสดงร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของ UM-UC-3 (A) และ TCCSUP (B) ที่ได้รับการกระตุ้นให้อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วย 20 μ M H₂O₂ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), *P < 0.05

ผลของ H₂O₂ และสารต้านอนุมูลอิสระต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation

หลังจากทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation ด้วย H₂O₂ จากผลการทดลองข้างต้น จึงนำไปสู่การศึกษาผลของ H₂O₂ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation และผลของสารต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงการขาดเซซสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์เยื่อบุท่อไต HK-2 (ภาพที่ 31A) ด้วย 20 μ M H₂O₂ ส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ลดลงเป็น 46.97% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น 57.35% ($P = 0.0028$) และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ 300 μ M TA และ 50 μ M NAC พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ LINE-1 methylation ได้อย่างมีนัยสำคัญ เป็น 56.43% ($P = 0.0042$) และ 56.40% ($P = 0.0035$) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการขาดเซซสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ได้แก่ 10 μ M methionine, 10 μ M SAM และ 10 μ M folic acid สามารถเพิ่มระดับ LINE-1 methylation เป็น 58.11% ($P = 0.002$), 61.38% ($P = 0.0037$) และ 61.01% ($P = 0.0028$) ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกด้วย 20 μ M H₂O₂ เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ของ UM-UC-3 cell (ภาพที่ 31B) พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H₂O₂ ส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ลดลงเป็น 32.87% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น 37.57% ($P < 0.0001$) และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ 300 μ M TA และ 50 μ M NAC พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ LINE-1 methylation ได้อย่างมีนัยสำคัญ เป็น 38.96 ($P < 0.0001$) และ 48.57% ($P < 0.0001$) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการขาดเซซสารตัวกลางด้วย 10 μ M methionine, 10 μ M SAM และ 10 μ M folic acid สามารถเพิ่มระดับ LINE-1 methylation เป็น 44.14% ($P < 0.0001$), 49.44% ($P < 0.0001$) และ 48.40% ($P < 0.0001$) ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกด้วย 20 μ M H₂O₂ เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ของ TCCSUP cell (ภาพที่ 31C) พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H₂O₂ ส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ลดลงเป็น 21.81% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น 27.45% ($P < 0.0001$) และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ 300 μ M TA และ 50 μ M NAC พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ LINE-1 methylation ได้อย่างมีนัยสำคัญ เป็น 24.77% ($P = 0.0257$) และ 26.90% ($P < 0.0001$) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการขาดเซซสารตัวกลางด้วย 10 μ M methionine, 10 μ M SAM และ 10 μ M folic acid สามารถเพิ่มระดับ LINE-1 methylation เป็น 27.86% ($P = 0.0002$), 27.70% ($P < 0.0001$) และ 26.90% ($P = 0.0012$) ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกด้วย 20 μ M H₂O₂ เพียงอย่างเดียว



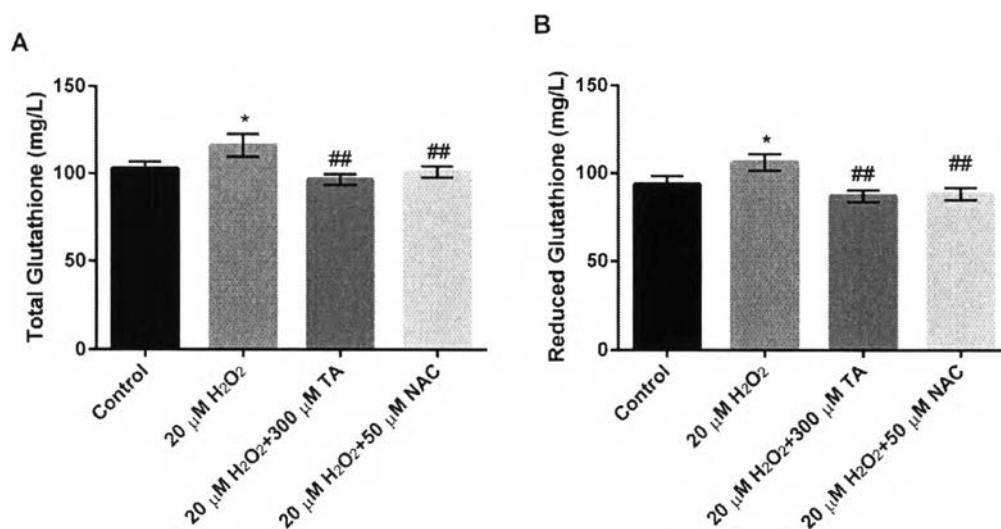
ภาพที่ 31 แสดงระดับ LINE-1 methylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและผลของสารต้านอนุมูลอิสระและการชดเชยสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ใน HK-2 cell (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, #P < 0.05, ##P < 0.01, ### P < 0.001



2071921265

ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูตาไทโอนภายในเซลล์

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione ภายในเซลล์ ด้วยเทคนิค fluorometric assay พบว่า ใน HK-2 cell (ภาพที่ 32A) ปริมาณ total glutathione เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยเพิ่มจาก 102.9 mg/L เป็น $116. \text{ mg/L}$ ($P = 0.0388$) ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ $50 \mu M$ NAC $300 \mu M$ TA ไม่พบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่ามียกระดับต่ำกว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ซึ่งเห็นผลให้ลักษณะเดียวกันในส่วนของ reduced glutathione (ภาพที่ 32B)

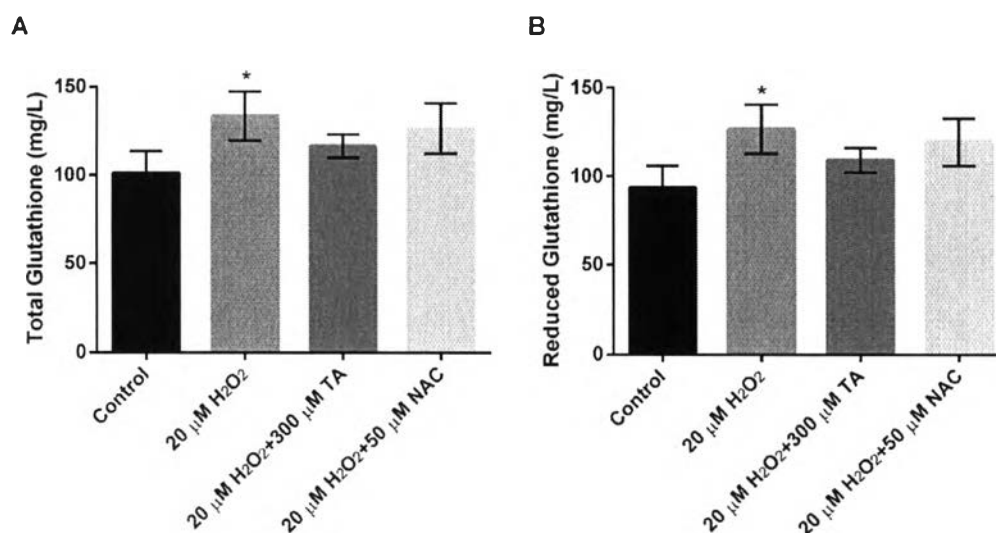


ภาพที่ 32 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ (TA และ NAC) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione (A) และ reduced glutathione (B) ใน HK-2 cell แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$



2071921255

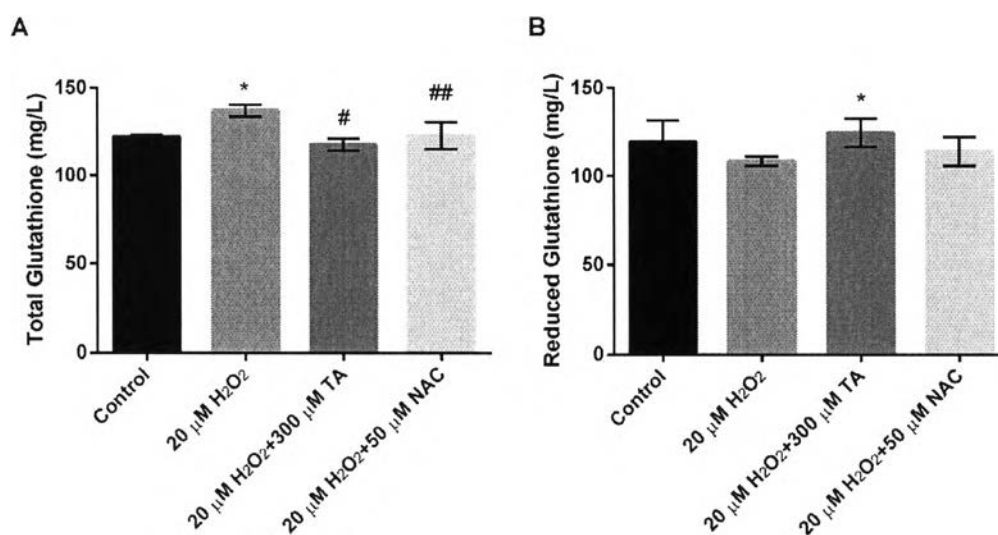
ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione ใน UM-UC-3 cell (ภาพที่ 33) ปริมาณ total glutathione ในเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย 20 μM H_2O_2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยเพิ่มจาก 101.1 mg/L เป็น 133.7 mg/L ($P = 0.0396$) ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ 50 μM NAC 300 μM TA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมรวมถึงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ซึ่งเห็นผลให้ลักษณะเดียวกันในส่วนของ reduced glutathione



ภาพที่ 33 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ (TA และ NAC) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione (A) และ reduced glutathione (B) ใน UM-UC-3 cell แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μM H_2O_2 * $P < 0.05$



ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione ใน TCCSUP cell (ภาพที่ 34) ปริมาณ total glutathione ในเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย 20 μM H_2O_2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยเพิ่มจาก 121.1 mg/L เป็น 136.9 mg/L ($P = 0.0018$) ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ 50 μM NAC และ 300 μM TA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่าระดับต่ำกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สำหรับระดับ reduced glutathione พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μM H_2O_2 ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเมื่อให้ 300 μM TA สามารถเพิ่มระดับของ reduced glutathione ได้อย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ reduced glutathione ของเซลล์ที่ได้รับ NAC เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้น



ภาพที่ 34 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ (TA และ NAC) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione (A) และ reduced glutathione (B) ใน TCCSUP cell แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μM H_2O_2 * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

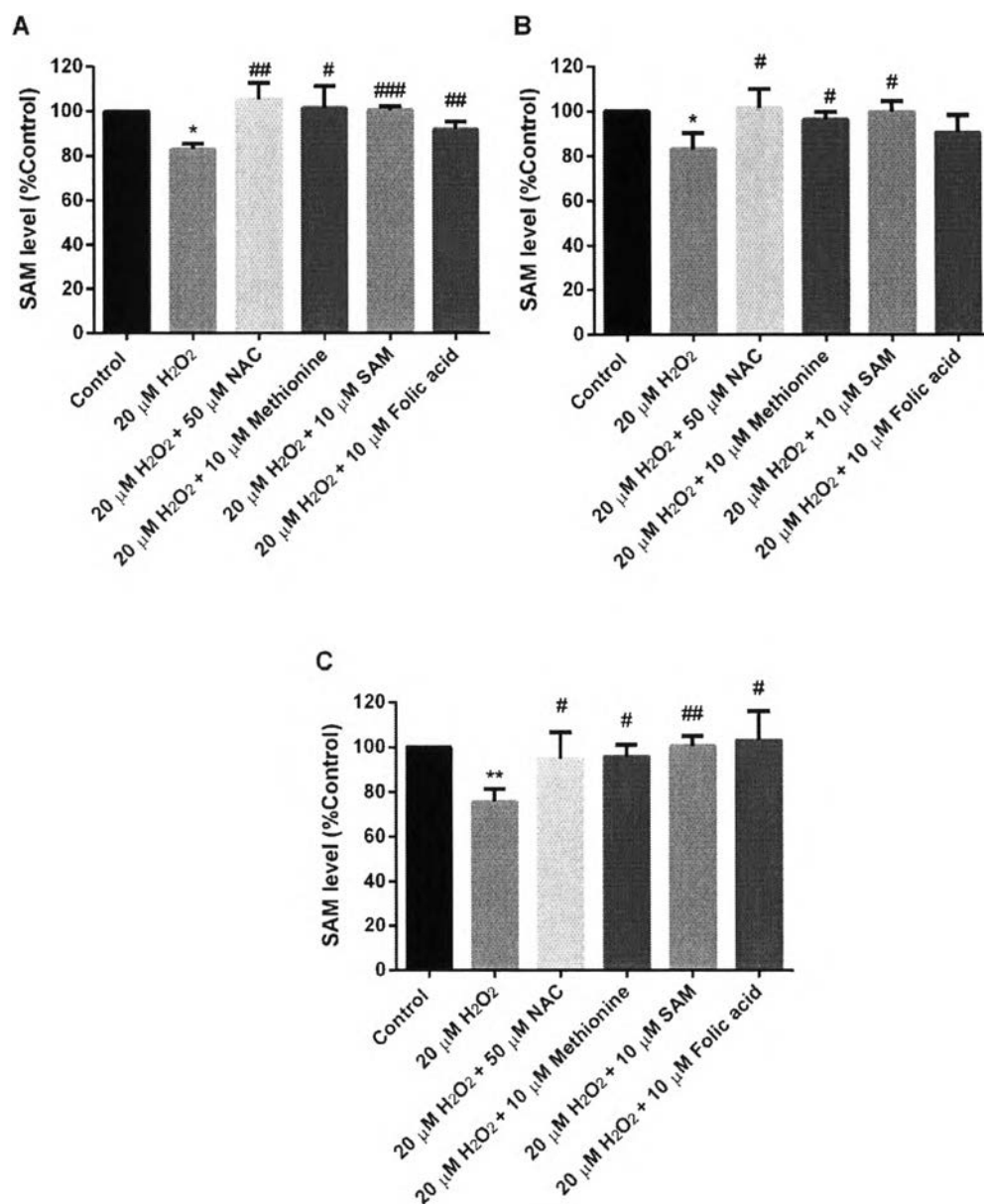
ผลของ H₂O₂ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ SAM และ SAH

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับ SAM ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของการชดเชยสารตัวกลางใน one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ SAM ภายในเซลล์ ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ใน HK-2 cell (ภาพที่ 35A) ระดับ SAM ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยลดจาก 100% เป็น 83.05% ($P = 0.0009$) ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับ 50 μ M NAC, 10 μ M methionine, 10 μ M SAM และ 10 μ M folic acid พบว่าระดับ SAM เพิ่มขึ้นจาก 83.05% เป็น 105.4% ($P = 0.0061$), 101.4% ($P = 0.0295$), 100.4% ($P < 0.0001$) และ 91.78% ($P = 0.0091$) ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ เพียงอย่างเดียว

สำหรับ UM-UC-3 cell (ภาพที่ 35B) ระดับ SAM ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยลดจาก 100% เป็น 83.11% ($P = 0.0187$) และเมื่อเซลล์ได้รับ 50 μ M NAC, 10 μ M methionine และ 10 μ M SAM 10 μ M พบว่าร้อยละของระดับ SAM เพิ่มขึ้นจาก 83.11% เป็น 101.6% ($P = 0.0160$), 96.36% ($P = 0.0273$) และ 99.86% ($P = 0.0111$) ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ 10 μ M folic acid ไม่สามารถเพิ่มระดับ SAM ภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ

TCCSUP cell (ภาพที่ 35C) พบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย 20 μ M H₂O₂ ระดับ SAM ภายในเซลล์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โดยลดจาก 100% เป็น 75.71% ($P = 0.0034$) และเมื่อชดเชยเซลล์ด้วย 50 μ M NAC, 10 μ M methionine, 10 μ M SAM และ 10 μ M folic acid สามารถเพิ่มระดับ SAM ในเซลล์จาก 75.71% เป็น 94.87% ($P = 0.0379$), 95.67% ($P = 0.0023$), 100.5% ($P = 0.0006$) และ 102.9% ($P = 0.0181$) ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ได้อย่างมีนัยสำคัญ

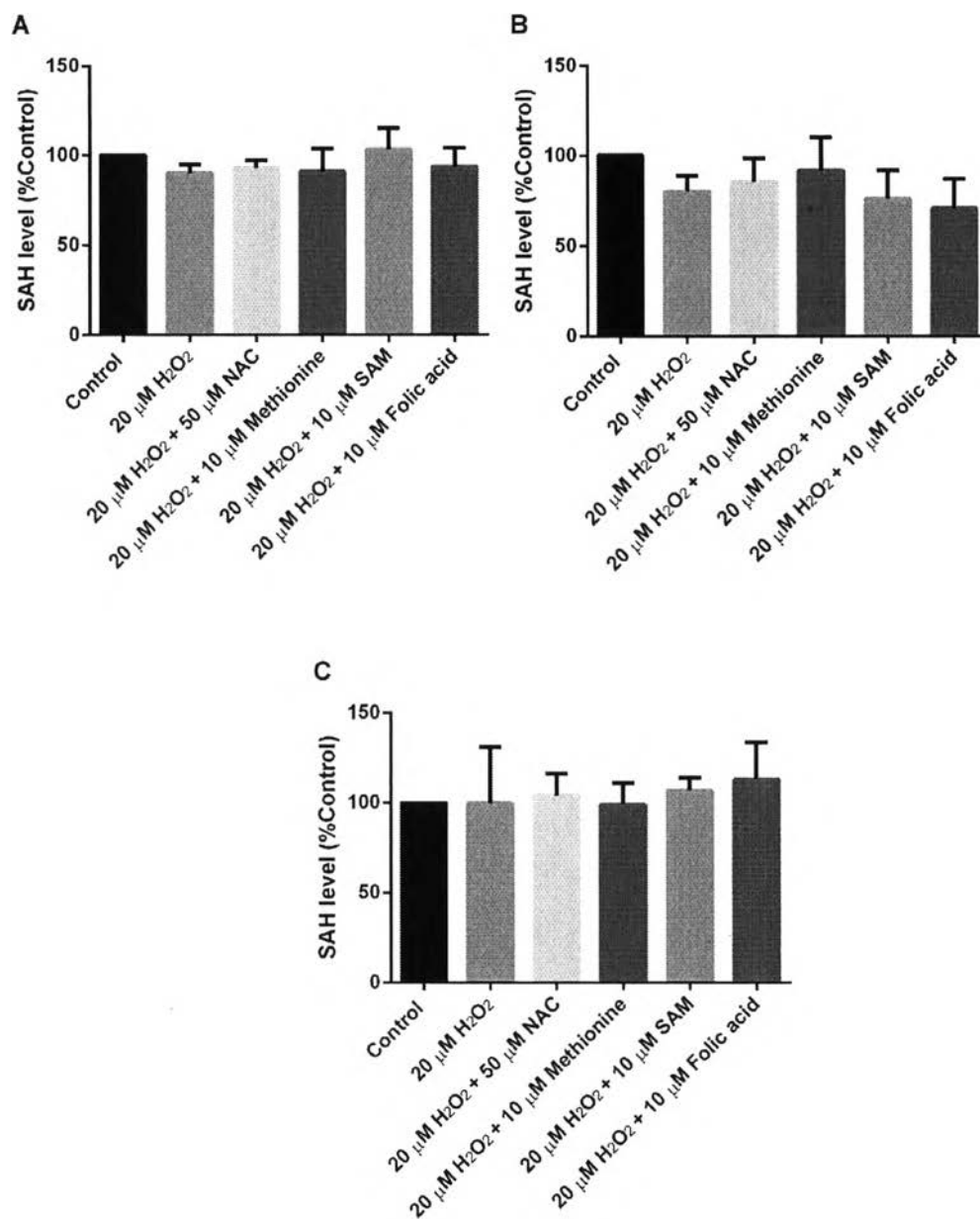
แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ปริมาณของ SAH (ภาพที่ 36) ในภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของสารต้านอนุมูลอิสระและการชดเชยสารตัวกลางใน one-carbon metabolism ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับของ SAH ในเซลล์ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของ SAH พบว่าคล้ายคลึงกับ SAM



ภาพที่ 35 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ และสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAM ใน HK-2 cell (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μM H₂O₂ *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001



2071921265

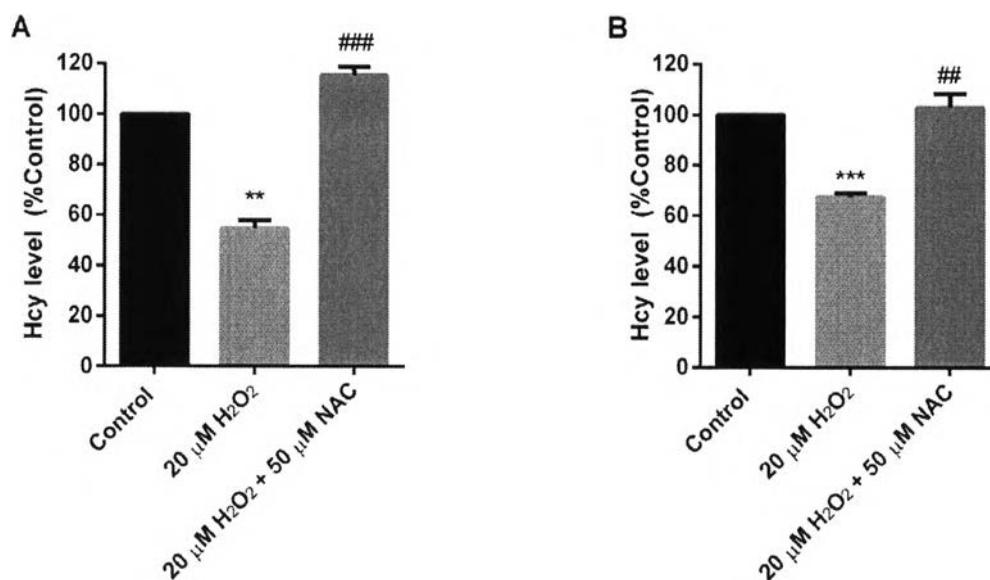


ภาพที่ 36 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ และสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAH ใน HK-2 cell (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Hcy

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับ Hcy ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของการชดเชยด้วย NAC ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Hcy ภายในเซลล์ ด้วยเทคนิค Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) พบว่า ใน HK-2 cell (ภาพที่ 37A) ระดับร้อยละ Hcy ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยลดจาก 100.00 เป็น 54.74 ($P = 0.0016$) ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับ $50 \mu M NAC$ พบว่าระดับร้อยละ Hcy เพิ่มขึ้น เป็น 115.4 ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เพียงอย่างเดียว ($P < 0.0001$)

เช่นเดียวกับใน TCCSUP cell (ภาพที่ 37B) ระดับร้อยละ Hcy ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น โดยลดจาก 100.00 เป็น 67.31 ($P = 0.0008$) ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับ $50 \mu M NAC$ พบว่าระดับ Hcy เพิ่มขึ้นเป็น 103.0 ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เพียงอย่างเดียว ($P = 0.0048$)



ภาพที่ 37 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Hcy ใน HK-2 cell (A) และ TCCSUP (B) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $20 \mu M H_2O_2$ ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$