

เอสโตรเจนลดการแสดงออกของตัวรับ Angiotensin II ชนิดที่ 1 ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำตาลระดับสูง Reduction AT1R Expression by Estrogen in INS-1 Pancreatic β -cell After Prolong Culturing in High Glucose

นางสาวกิริติ วันชัย* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พญ. สุวตณี กุปติวุฒิ**

Ms. Keerati Wanchai; Major Thesis advisor: Dr. Suwattanee Kooptiwut Associate Professor

บทคัดย่อ

เมื่อหญิงวัยหมดประจำเดือนได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ลดลง ในเซลล์ตับอ่อนที่อยู่ในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูง มีการแสดงออกของตัวรับ angiotensin II ชนิดที่ 1 (AT1R) ในเซลล์ตับอ่อนเพิ่มขึ้น เชื่อว่าการเพิ่มของ AT1R จะนำไปสู่ความผิดปกติของการหลั่งอินซูลินของเซลล์ตับอ่อน เอสโตรเจนมีผลต่อการแสดงออกของ AT1R ในเนื้อเยื่อต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของ AT1R ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำตาลระดับสูง โดยทำการวิจัยเชิงทดลอง โดยการเลี้ยงเซลล์ตับอ่อนในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลปกติ (11.1 mM) และน้ำตาลสูง (40 mM) ร่วมกับการมีและไม่มีเอสโตรเจนความเข้มข้น 10^{-8} M เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการสกัด RNA และตรวจสอบการแสดงออกของ AT1R ด้วยวิธี RT-PCR ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงมีการแสดงออกของ AT1R เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลปกติ ($P=0.015$) โดยเอสโตรเจนสามารถลดการแสดงออกของ AT1R ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงได้ ($P=0.029$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการแสดงออกของ AT1R ในเซลล์ตับอ่อนที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูง

Abstract

The risk of type 2 diabetes increases after menopause but estrogen replacement therapy can decrease the developing of this disease. Hyperglycemia induced expression of local pancreatic islet angiotensin II type 1 receptor (AT1R), which led to the impairment of insulin secretion. Estrogen also has a role in AT1R expression in various tissues. This study aimed to investigate the effect of estrogen on AT1R expression in pancreatic β -cells after prolonged culturing in high glucose medium. INS-1, rat pancreatic β -cells, was cultured in normal and high glucose medium (11.1mM and 40 mM, respectively) with or without 10^{-8} M 17β -estradiol. After 48 h, total RNA was extracted and reverse transcribed to cDNA. After that, AT1R gene expression was examined by real time PCR. AT1R gene expression is significantly increased in cells cultured in high glucose medium compared to those cultured in normal glucose medium ($P=0.015$). Whereas, estrogen significantly decreased high glucose-stimulated AT1R gene expression ($P=0.029$). This study demonstrated that prolonged culture of INS-1 cells in high glucose can up-regulate AT1R gene expression, while 17β -estradiol can restore the expression.

Keywords: Estrogen, Angiotensin II type 1 receptor, INS-1, High glucose

* มหาวิทยาลัยสุรนารี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุรนารี e-mail address w_keerati@hotmail.com

** รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล e-mail address siskw@mahidol.ac.th

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบมากขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของการดำเนินชีวิตในยุคปัจจุบันมีการออกกำลังกายน้อยลง ทำให้คนเป็นโรคอ้วนมากขึ้น และโรคอ้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงทำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ดังนั้นอัตราการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จึงเพิ่มขึ้นทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อน โดยระดับน้ำตาลในเลือดสูงก่อให้เกิดภาวะน้ำตาลเป็นพิษ (glucotoxicity) มีผลให้ความสามารถของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินเมื่อถูกกระตุ้นด้วยกลูโคสของเซลล์ตับอ่อนลดลง (Eizirik et al., 1992, Marshak et al., 1999) นอกจากนี้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานมีผลให้เกิดการตายของเซลล์ตับอ่อน ทำให้ปริมาณเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินลดลง (Federici et al., 2001) กลไกที่ทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์ตับอ่อนนั้นยังไม่ชัดเจน แต่เชื่อกันว่าจะเป็นผลจากการเกิดสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species หรือ ROS) เพิ่มขึ้นปริมาณมากในเซลล์ตับอ่อน (Robertson, 2004 ; Wu et al., 2004) ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดย ROS เพิ่มขึ้นได้จากกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการ glycation ของโปรตีน (Tajiri et al., 1997), การเกิด glucose-auto oxidation (Wolff & Dean, 1987), กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและ ROS ที่เกิดจากการกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase (Kaneto et al., 2009) เป็นต้น

Renin-angiotensin system (RAS) มีบทบาทสำคัญในระบบไหลเวียนและฮอร์โมนที่ควบคุมความดันเลือด อิเล็กโทรไลต์และสมดุลของของเหลวในร่างกาย (Peach, 1977) ระบบ RAS ประกอบด้วย angiotensinogen ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น angiotensin I โดยเอนไซม์ renin จากนั้น angiotensin I จะถูกเอนไซม์ angiotensin converting enzyme (ACE) เปลี่ยนให้เป็น angiotensin II ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆผ่านทาง angiotensin II receptor ชนิดที่ 1 (AT1R) เช่น การหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction), การกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน aldosterone จากต่อมหมวกไต, การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation), การสร้างสารอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์แบบ apoptosis เป็นต้น ต่อมาเมื่อมีการศึกษาพบว่านอกจาก angiotensin II จะสร้างเพื่อควบคุมการทำงานของระบบไหลเวียนทั่วร่างกายแล้ว (systemic RAS) ในระบบอื่นๆ ของร่างกายพบว่า สามารถสร้าง angiotensin II ที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่ด้วย (local RAS) เช่น ในตับอ่อน มีการสร้าง angiotensin II เพื่อควบคุมการทำงานของต่อมมีท่อ (acinar RAS) และควบคุมการทำงานของต่อมไร้ท่อ (islet RAS) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของระดับน้ำตาลในเลือดโดยควบคุมการหลั่งอินซูลินจากการกระตุ้นของกลูโคส (glucose-induced insulin secretion) (Leung, 2007) การรายงานในผู้ป่วยเบาหวานว่าการให้ยาที่ขัดขวางการออกฤทธิ์ของ angiotensin II receptor ทำให้ระดับน้ำตาลในผู้ป่วยโรคเบาหวานดีขึ้น (Scheen, 2004) ต่อมาเมื่อมีการศึกษาต่างๆ ตามมามากมายเกี่ยวกับการสร้าง Angiotensin II ในตับอ่อน โดยเฉพาะในเซลล์ตับอ่อนของมนุษย์มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง angiotensinogen, angiotensin II และ AT1R (Lam & Leung, 2002) ในเซลล์ตับอ่อนของหนูมีรายงานพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง angiotensin II เช่นกัน ได้แก่ angiotensinogen, ACE, และ AT1R (Lam et al., 2004) นอกจากนี้มีการรายงานว่าในหนูที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยอาหารที่มีไขมันสูง (obesity-induced type2 DM mice) พบการแสดงออกของ AT1R เพิ่มขึ้นและ angiotensin II ที่สร้างจากเซลล์ตับอ่อน มีผลไปยับยั้งการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนโดยลดการสร้างอินซูลินผ่านทาง AT1R (Chu et al., 2006)

เอสโตรเจนสร้างจากเซลล์ granulosa (เซลล์ G) ของรังไข่ มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาการระบบสืบพันธุ์เพศ นอกจากในระบบสืบพันธุ์แล้ว เอสโตรเจนยังมีบทบาทควบคุมดุลยน้ำตาลในร่างกายอีกด้วย มีรายงานพบว่า ในหญิงวัยหมดประจำเดือน มีอัตราการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับเอสโตรเจน ทดแทนสามารถลดอัตราการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 นี้ได้ (Louet et al., 2004) นอกจากนี้ เอสโตรเจน มีผลโดยตรงต่อกลุ่มเซลล์ของตับอ่อนที่ทำงาน

ลดลงจากการอยู่ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานาน ให้หลังอินซูลินดีขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยกลูโคส (Kooptiwut et al., 2007) รวมทั้งเอสโตรเจนน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของ AT1R ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและหลอดเลือด มีการรายงานในหนูที่ทำให้ขาดเอสโตรเจน โดยการตัดรังไข่ (ovariectomized rat) พบว่าการแสดงออกของ AT1R เพิ่มขึ้น (Nickenig & Harrison, 2002) ผลของรายงานนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ เอสโตรเจน ต่อการแสดงออกของ AT1R อย่างไรก็ดี ตาม ยังไม่มีการรายงานถึงผลของเอสโตรเจนต่อการควบคุม AT1R ในเซลล์ของตับอ่อน

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของ angiotensin II type 1 receptor (AT1R) ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีน้ำตาลระดับสูง

วิธีการดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองที่ต้องการศึกษาตัวแปร คือ ฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่มีผลต่อการแสดงออกของ AT1R ในเซลล์ตับอ่อน โดยตัวแปรที่ต้องทำการควบคุมได้แก่ ระดับน้ำตาลในน้ำเลี้ยงและความเข้มข้นของเอสโตรเจน

เครื่องมือการวิจัยและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยหลักๆ มีดังนี้ สำหรับอุปกรณ์อื่นๆที่เกี่ยวข้องจะได้กล่าวในวิธีการดำเนินการวิจัยต่อไป
เซลล์ตับอ่อน Rat insulinoma cell (INS-1)

ฮอร์โมนเอสโตรเจน

Real Time Polymerase Chain Reaction (real time PCR) machine

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการเลี้ยงเซลล์

เซลล์ตับอ่อนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ คือ INS-1 โดยเลี้ยงในน้ำเลี้ยง RPMI-1640 ที่ประกอบไปด้วย 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin ในตู้บ่มเพาะที่มีอุณหภูมิ 37°C, ความชื้น 95% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% น้ำเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกๆ 2 วัน การทดลองทำใน INS-1 ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีน้ำตาลความเข้มข้นปกติ คือ 11.1 mM และน้ำเลี้ยงที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง คือ 40 mM โดยมีหรือไม่มีเอสโตรเจน ความเข้มข้น 10^{-8} M เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการสกัด RNA

การสกัด RNA และการตรวจสอบคุณภาพของ RNA

หลังจาก 2 วัน เซลล์ถูกนำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNA (High pure RNA isolation kit บริษัท Roche, Germany) หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง spectrophotometry จากนั้น RNA 200-300 µg/µl นำไปแยกด้วย 1.5% agarose gel containing 1M urea เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้

การสังเคราะห์ cDNA

RNA ปริมาณ 1-2 µg ที่ตรวจสอบแล้วว่ามีคุณภาพดีจะถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ด้วย M-MLV reverse transcriptase เอนไซม์ ร่วมกับ Primer ชนิด Random Hexamer 50 ng/µl (SuperScrip III บริษัท Invitrogen, USA)

การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของจีนด้วย real time PCR

cDNA ที่ได้นำมาวิเคราะห์การแสดงออกของ AT1R mRNA ด้วยวิธี real time PCR โดยใช้ SYBR green เป็นสารเรืองแสงเพื่อตรวจวัดปริมาณผลผลิตของ PCR โดยใช้ cDNA ร่วมกับ primer ของ AT1R จีน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ภาวะดังนี้ เริ่มจากการแยกสาย cDNA ที่ 95°C นาน 10 นาที ตามด้วย 45 รอบของการสร้างสาย DNA ใหม่โดยใช้อุณหภูมิที่ 95°C 15 วินาที ตามด้วยการลดอุณหภูมิมาที่ 60°C 30 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิกลับมาที่ 72°C 30 วินาที ข้อมูลที่ได้แสดงด้วยค่า threshold cycle (C_T) ซึ่งจะถูกคำนวณด้วย Stratagene's Mx3005P QPCR system ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta C_T}$ โดยมี β -actin เป็นจีนที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ AT1R ระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับเอสโตรเจนและไม่ได้รับเอสโตรเจน ดังนั้นค่าที่แสดงจึงเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลง (fold change) ที่เป็นเท่าของ AT1R จีน

ตารางที่ 1 Primer ของ AT1R และ β -actin จีน

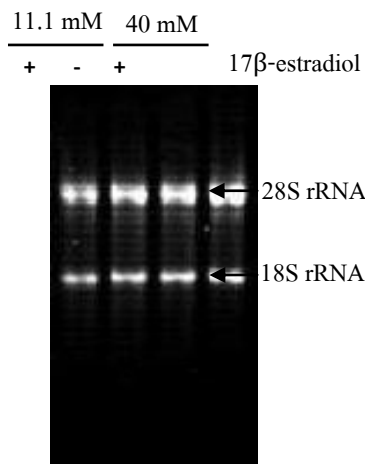
ชื่อ Primer	นิวคลีโอไทด์ (5'→3')
INS-1 AT1R_F	CAGTGTGCGCGTTTCATTATG
INS-1 AT1R_R	TGGTAAGGCCCGACCCCTAT
β -actin_F	ATGAAGTGTGACGTTGACATCGTC
β -actin_R	CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG

การวิเคราะห์ทางสถิติ

กลุ่มการทดลองมีทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลปกติ ไม่ได้รับเอสโตรเจน, กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลปกติที่ได้รับเอสโตรเจน, กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลระดับสูง ไม่ได้รับเอสโตรเจน และกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลระดับสูงที่ได้รับเอสโตรเจน ทำการทดลองทั้งหมด 4 ครั้ง ($n=4$) ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่า ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ด้วย one way ANOVA ตามด้วย Tukey's post hoc test และยอมรับค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P\text{-value} \leq 0.05$

ผลการวิจัย

RNA ที่สกัดได้จาก INS-1 เซลล์ มีคุณภาพดี แสดงได้จากผล gel electrophoresis ปรากฏแถบ 28S rRNA และ 18S rRNA ชัดเจนและไม่ปรากฏแถบของ DNA แสดงถึงไม่มีการปนเปื้อนของ genomic DNA ดังแสดงในภาพที่ 1 เนื่องจาก rRNA เป็น RNA ที่พบมากที่สุดประมาณ 85% จาก RNA ทั้งหมดในเซลล์ ในขณะที่ mRNA มีปริมาณน้อยมากซึ่งไม่มากพอที่จะตรวจวัดได้ ดังนั้น จึงใช้ rRNA เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของ RNA ทั้งหมด โดย RNA ที่มีคุณภาพดีจะมีอัตราส่วนระหว่าง 28S:18S rRNA เท่ากับ 2:1



ภาพที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้จาก INS-1 เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลปกติ (11.1 mM) และน้ำตาลสูง (40 mM) ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับเอสโตรเจน ด้วยวิธี 1.5% agarose gel containing 1M urea electrophoresis พบ 28S rRNA และ 18S rRNA ในสัดส่วน 2:1 ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพของ RNA

การแสดงออกของ AT1R ใน INS-1 เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง (40 mM) พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ INS-1 เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีน้ำตาลความเข้มข้นปกติ (11.1 mM) (P -value=0.015, $n=4$) ในขณะเดียวกัน เมื่อให้เอสโตรเจนความเข้มข้น 10^{-8} M การแสดงออกของ AT1R ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ INS-1 เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงที่ไม่ได้รับเอสโตรเจน (P -value=0.029, $n=4$) ดังแสดง ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าที่เปลี่ยนแปลงเป็นเท่าของการแสดงออกของ AT1R

ภาวะที่เลี้ยงเซลล์	ค่าที่เปลี่ยนแปลงเป็นเท่า	ค่า P
11.1 mM glucose+DW	1	-
11.1 mM glucose+E ₂ 10 ⁻⁸ M	1.59 ± 0.63	-
40 mM glucose+DW	3.82 ± 0.70	0.015
40 mM glucose+ E ₂ 10 ⁻⁸ M	1.29 ± 0.56	0.029

สรุปผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของตัวรับ AT1R พบว่าในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ เซลล์ตับอ่อนจะมีการเพิ่มการแสดงออกของ AT1R ในขณะที่เซลล์ตับอ่อนที่ได้รับเอสโตรเจนในภาวะเดียวกันมีการแสดงออกของ AT1R ลดลง แสดงให้เห็นถึงผลของเอสโตรเจนในการลดการแสดงออกของ AT1R ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูง

ในการศึกษาครั้งนี้ ระดับน้ำตาลที่ใช้บ่งบอกระดับน้ำตาลปกติและระดับน้ำตาลสูง คือ 11.1 mM และ 40 mM ตามลำดับ ซึ่งได้อ้างอิงจากการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้ (Kooptiwut et al., 2007) ว่าระดับน้ำตาล 40 mM มีผลต่อหลังอินซูลินของเซลล์ตับอ่อนที่แยกได้จากหนู คือ ทำให้การหลั่งอินซูลินของเซลล์ตับอ่อนลดลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยกลูโคสเมื่อเทียบกับเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำตาล 11.1 mM อาจกล่าวได้ว่า ระดับน้ำตาลที่ 40 mM บ่งบอภาวะระดับน้ำตาลเป็นพิษที่ส่งผลเสียต่อการทำงานของเซลล์ตับอ่อน ซึ่งเชื่อมโยงกับการเพิ่มขึ้นของ ATIR ที่ได้จากการศึกษาของ Leung KK & Leung PS, 2008 ที่มีการรายงานว่ามีผลทำให้การหลั่งอินซูลินของเซลล์ตับอ่อนลดลงเช่นกัน โดยการเพิ่มขึ้นของ ATIR นี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของภาวะอนุมูลอิสระเกินภายในเซลล์ ซึ่งทำให้มีผลต่อการทำงานของตับอ่อนผิดปกติไป เชื่อว่าการทำงานที่ลดลงของตับอ่อนนี้เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของระบบ RAS ภายในตับอ่อนในภาวะที่มีน้ำตาลสูง ซึ่งจะไปกระตุ้นภาวะอนุมูลอิสระเกิน อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการตรวจสอบภาวะอนุมูลอิสระเกินที่เกิดขึ้นในระดับน้ำตาล 40 mM ซึ่งจะช่วยยืนยันถึงกลไกที่ ATIR ทำให้การทำงานของเซลล์ตับอ่อนผิดปกติไป นอกจากนี้ ในเซลล์ตับอ่อนของหนูทดลองที่มีภาวะเบาหวาน พบการแสดงออกของระบบ RAS เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อการทำงานของและการทำลายเซลล์ตับอ่อนและเชื่อว่าเกิดจากการกระตุ้นภาวะอนุมูลอิสระเกินเช่นกัน (Hasegawa, 2009) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา เป็นการยืนยันถึงการเพิ่มขึ้นของระบบ RAS ในตับอ่อน ที่ถูกกระตุ้นในภาวะที่มีน้ำตาลสูง นอกจากนี้ ผลการศึกษายังพบว่า เอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการลดการแสดงออกของ ATIR จากการศึกษาที่ผ่านมา เอสโตรเจนลดการแสดงออกของ ATIR ในต่อม pituitary โดยการยับยั้งขบวนการถอดรหัสสาย DNA (transcription) ในหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับเอสโตรเจนทดแทน (Wu et al, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่เอสโตรเจนลดการแสดงออกของ ATIR mRNA กล่าวได้ว่าเอสโตรเจนไปยับยั้งขบวนการถอดรหัสสาย DNA ในขณะเดียวกันในต่อมหมวกไตในการศึกษาเดียวกันนี้ เอสโตรเจนไปยับยั้งขบวนการ translation โดยไปควบคุมการทำงานของ 5' leader sequence (5'LS) binding protein ของ ATIR mRNA ทำให้ไปยับยั้ง ribosomal scanning ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญในการ translation เพื่อแสดงออกเป็นโปรตีน สอดคล้องกับการศึกษาของ Krishnamurthi et al, 1999 ส่งผลให้การแสดงออกของ ATIR โปรตีนลดลง อย่างไรก็ตาม ผลของเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของ ATIR โปรตีนในเซลล์ตับอ่อนในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงยังต้องทำการยืนยันในการศึกษาครั้งต่อไป เช่นเดียวกับกลไกที่ชัดเจนของเอสโตรเจนในการยับยั้งขบวนการถอดรหัสสาย DNA ของ ATIR

ตัวรับ ATIR มีบทบาทสำคัญในระบบ renin angiotensin (RAS) ที่ควบคุมสมดุลของระบบไหลเวียนและฮอร์โมนในร่างกาย ขณะเดียวกันระบบ RAS ในแต่ละเนื้อเยื่อหรือ Local RAS เช่นในตับอ่อน พบมีความสำคัญในภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้นๆ เกิดพยาธิสภาพ ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูง ตับอ่อนจะมีการแสดงออกของ ATIR เพิ่มขึ้น มีผลกระตุ้นภาวะอนุมูลอิสระเกิน ซึ่งส่งผลเสียต่อการทำงานของตับอ่อน ในขณะการศึกษาพบว่า เอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ ATIR ในเซลล์ตับอ่อน โดยไปลดการแสดงออกของ ATIR โดยการยับยั้งขบวนการ ATIR transcription ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูง

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

จากการวิจัยครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีผลยับยั้งการแสดงออกของ ATIR ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำตาลระดับสูง ผลการวิจัยนี้จึงน่าจะมีความสำคัญในการศึกษาถึงกระบวนการในการป้องกันหรือชะลอผลเสียที่เกิดขึ้นในภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้าวิจัยถึงกลไกของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการป้องกันและรักษาโรคเบาหวานต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยนี้ ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันกลไกของ ATIR ที่มีผลทำให้การทำงานของเซลล์ตับอ่อนลดลงในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูง เช่น การวัดสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นหรือวัดการหลั่งอินซูลินที่ลดลง ซึ่งจะช่วยบ่งบอกถึงประโยชน์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในการป้องกันโรคเบาหวาน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนพัฒนางานวิจัยประเภทที่ 3 และทุนบัณฑิตศึกษาคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

บรรณานุกรม

- Chu, K.Y., Lau, T., Carlsson, P.O., Leung, P.S. (2006). Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*,55(2),367-74.
- Eizirik, D.L., Korbitt, G.S., Hellerstrom, C. (1992). Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *J Clin Invest*,90(4),1263-8.
- Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., et al. (2001). High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes*, 50(6),1290-301.
- Hasegawa, G., Fukui, M., Hosoda, H., Asano, M., Harusato, I., Tanaka, M., et al. (2009). Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *European Journal of Pharmacology*, 605,164-169.
- Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T., (2009). Role of reactive species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Imflammation*, 2010.
- Kooptiwut, S., Semprasert , N., Chearskul, S. (2007). Estrogen increases glucose-induced insulin secretion from mouse pancreatic islets cultured in a prolonged high glucose condition. *J Med Assoc Thai*, 90(5),956-61.
- Krishnamurthi, K., Verbalis, J.G., Zheng, W., Wu, Z., Clerch, L.B., Sandberg, K. (1999). Estrogen regulates angiotensin AT1 receptor expression via cytosolic protein that bind to the 5' leader sequence of the receptor mRNA. *Endocrinology*,140,5435-5438.
- Lam, K.Y. & Leung, P.S. (2002). Regulation and expression of a renin-angiotensin system in human pancreas and pancreatic endocrine tumours. *Eur J Endocrinol*, 146(4),567-72.
- Lau, T., Carlsson, P.O., Leung, P.S. (2004). Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, 47(2),240-8.
- Leung, K.K. & Leung, P.S. (2008) Effects of hyperglycemia on angiotensin II receptor type 1 expression and insulin secretion in an INS-1E pancreatic beta-cell line. *JOP*, 9(3),290-9.
- Leung, P.S. (2007). The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol*,1;580,31-7.
- Louet, J.F., LeMay, C., Mauvais-Jarvis, F. (2004). Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep*,6(3),180-5
- Marshak, S., Leibowitz, G., Bertuzzi, F., Socci, C., Kaiser, N., Gross, D.J., et al. (1999). Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes*,48(6),1230-6.
- Nickenig, G. & Harrison, D.G. (2002). The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation*, 29;105(4),530-6.
- Peach, M.J.(1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*,57(2),313- 70.

-
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*,8;279(41),42351-4.
- Scheen, A.J. (2004). Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus Part 2. *Diabetes Metab*, 30,498-505.
- Tajiri, Y., Moller, C., Grill, V. (1997). Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. *Endocrinology*,138(1),273-80
- Wolff, S.P. & Dean, R.T. (1987). Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*,1;245(1),243-50.
- Wu, L., Nicholson, W., Knobel, S.M., Steffner, R.J., May, J.M., Piston, D.W., et al. (2004). Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *J Biol Chem*,26;279(13),12126-34.
- Wu, Z., Maric, C., Roesch, D.M., Zheng, W., Verbalis, J.G., Sandberg, K. (2003). Estrogen regulates adrenal angiotensin AT1 receptors by modulating AT1 receptor translation. *Endocrinology*,144(7),3251-61.