

ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ตับอ่อนที่ถูกเลี้ยงไว้ในระดับน้ำตาลสูง

นางสาวพิชญ์นิชชา มหาวงษ์* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พญ.สุวตณี กุปติวุฒิ**

Miss Pitchnischa Mahawong; Major Thesis advisor: Dr. Suwattanee Kooptiwut Associate Professor

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีภาวะดื้อต่ออินซูลินและเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินทำงานลดลง ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ มีการศึกษาพบว่าภาวะอนุมูลอิสระเกิน (oxidative stress) เป็นเส้นทางที่สำคัญต่อการตายของเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินแบบ apoptosis เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนเพศหญิงชนิดสเตอรอยด์ โดยการทดลองก่อนหน้านี้ของเราพบว่า เอสโตรเจนเพิ่มการหลั่งอินซูลินในกลุ่มเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงไว้ในระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานานได้ และเอสโตรเจนสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Bcl2* ที่ยับยั้งการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านม จึงเป็นไปได้ว่า เอสโตรเจนน่าจะลดการตายของเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินแบบ apoptosis ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานาน เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเอสโตรเจน เซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินจะถูกเลี้ยงไว้ในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลปกติหรือระดับน้ำตาลสูง ร่วมกับการใส่และไม่ใส่เอสโตรเจน การศึกษานี้พบว่าเอสโตรเจนลดการตายของเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูง และเอสโตรเจนสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์อยู่รอดอีกด้วย สรุปได้ว่าเอสโตรเจนมีฤทธิ์ด้านการตายเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานานได้

Abstract

Type 2 diabetes is characterized by insulin resistance and β -cell dysfunction resulting in hyperglycemia. Previous studies, oxidative stress is the main partway leading to high glucose-induced β -cell apoptosis. Estrogen is a female steroid hormone. In our previous study, estrogen increased insulin secretion in mouse pancreatic islets in prolonged hyperglycemia. In addition, estrogen increased anti-apoptotic gene, *Bcl2*, in human breast cancer cell. It is possible that estrogen may decrease β -cell apoptosis in chronic high glucose condition. To examine anti-apoptotic effect of 17β -estradiol, INS-1 cells were incubated in normal or high glucose with and without estrogen. Estrogen decreased DNA fragmentation INS-1 prolonged cultured in high glucose. Moreover, estrogen increased β -cell viability in high glucose condition. It suggested that estrogen exerted anti-apoptotic effect in pancreatic β -cells prolonged cultured in high glucose condition.

Keywords: 17β -estradiol, High glucose, Pancreatic β -cells, Apoptosis

* วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาการแพทย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล e-mail address

pomma79@gmail.com** รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล e-mail address siskw@mahidol.ac.th** รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล e-mail address siskw@mahidol.ac.th

บทนำ

เบาหวานเป็นโรคที่มีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นต่อประชากรทั่วโลก (Roglic, 2009) และประชากรไทย (Aekplakom et al., 2003) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการใช้ชีวิตประจำวันขาดการออกกำลังกายและการรับประทานอาหารอย่างไม่จำกัดทำให้คนเป็นโรคอ้วนลงพุงซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคเบาหวาน โรคเบาหวานแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ เบาหวานประเภทที่ 1 และ เบาหวานประเภทที่ 2 โดยเบาหวานประเภทที่ 1 พบประมาณ 10 % ของโรคเบาหวานทั้งหมด เกิดจากภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลิน (β -cell) ทำให้ไม่สามารถสร้างอินซูลินได้ ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยโรคเบาหวานประมาณ 90 % เป็นเบาหวานประเภทที่ 2 สาเหตุของโรคเบาหวานประเภทที่ 2 คือภาวะดื้อต่ออินซูลิน และการเสียการทำงานของเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลิน (Muio & Newgard, 2008; Rhodes, 2005) ทำให้เซลล์ตับอ่อนสร้างอินซูลินได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง (Maedler, 2008) การวินิจฉัยโรคเบาหวาน เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารมีค่าสูงมากกว่า 126 มก/ดล การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน (hyperglycemia) ในผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนและทำให้โรครุนแรงขึ้น

การตายของเซลล์แบบ apoptosis คือ การตายของเซลล์แบบที่มีโปรแกรมกำหนดไว้แล้ว ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์ทำให้เซลล์มีลักษณะการตายที่เฉพาะ เช่น การโป่งออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (blebbing) , การหดตัวของเซลล์, นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน, โครมาตินหนาตัวขึ้น, และดีเอ็นเอแตกเป็นท่อน (DNA fragmentation) เป็นต้น ซึ่งการตายของเซลล์แบบ apoptosis นี้ มีความจำเป็นต่อกระบวนการเจริญพัฒนาของสิ่งมีชีวิต ภาวะชราภาพ และการหยุดการเจริญเติบโตในเซลล์ที่เสียหายเกินกว่าจะซ่อมแซมได้ แต่ถ้าการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis นี้เสียไป จะนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคหลายชนิดได้ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์เป็นตัวกลางสำคัญที่ทำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis

กลไกของภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้การทำงานของเซลล์ตับอ่อนลดลง จนเกิดการตายของเซลล์ตับอ่อนนั้นมียาหลายกลไก โดยระดับน้ำตาลที่สูงจะเข้าเซลล์ทำให้กระบวนการต่างๆภายในเซลล์ตับอ่อนเพิ่มขึ้น เช่น glucose auto-oxidation (Robertson, 2004), glyceraldehyde autoxidation (Robertson, 2004), polyol pathway (Robertson, 2004) and hexosamine biosynthesis pathway (Robertson, 2004) ซึ่งผลของกระบวนการต่างๆเหล่านี้ทำให้มีการสร้างสารที่เป็นอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์ตับอ่อนสร้างอินซูลินลดลง รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับอ่อนได้ (Maiese, Morhan, & Chong, 2007; Robertson, 2006)

หญิงวัยหมดประจำเดือนมีอัตราการเป็นโรคเบาหวานประเภทที่ 2 สูงกว่าหญิงในวัยเจริญพันธุ์ (Roglic et al., 2005; Wild, Roglic, Green, Sicree, & King, 2004) การได้รับเอสโตรเจนทดแทนทำให้การสลายอาหารประเภทน้ำตาลและไขมันดีขึ้น (Andersson et al., 1997) นอกจากนี้ภาวะดื้ออินซูลินในหญิงวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ลดลงเมื่อได้รับเอสโตรเจนทดแทน (Brussaard, Gevers Leuven, Frolich, Kluft, & Krans, 1997) ในหนูทดลองที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ทำให้ขาดเอนไซม์ aromatase หรือ ขาดตัวรับของเอสโตรเจนชนิดแอลฟา ซึ่งได้รับสาร streptozotocin (STZ) ที่ทำลายเซลล์ตับอ่อนแทนหนูทำให้หนูเป็นโรคเบาหวาน เมื่อหนูที่เป็นเบาหวานเหล่านี้ได้รับเอสโตรเจนระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเหล่านี้ลดลง (Le May et al., 2006) จากการศึกษาของเราที่ผ่านมาพบว่าการเลี้ยงกลุ่มเซลล์ตับอ่อนในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงนาน 10 วัน ทำให้เกิดภาวะการกระตุ้นหลังอินซูลินด้วยน้ำตาลกลูโคสลดลง แต่การเติมเอสโตรเจนในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงทำให้กลุ่มเซลล์ตับอ่อนเพิ่มการหลังอินซูลินเมื่อกระตุ้นด้วยน้ำตาลกลูโคสได้ (Kooptiwut et al., 2005)

อย่างไรก็ตาม ผลในการป้องกันการตายของเซลล์ของเอสโตรเจนในเซลล์ตับอ่อนที่ถูกทำให้เกิดการตายโดยภาวะระดับน้ำตาลสูงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอสโตรเจนน่าจะมีผลในการลดการตายของเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงไว้ในภาวะระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานานได้ การศึกษานี้ทำเพื่อพิสูจน์ผลของเอสโตรเจนต่อการเกิดการตายของเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูง

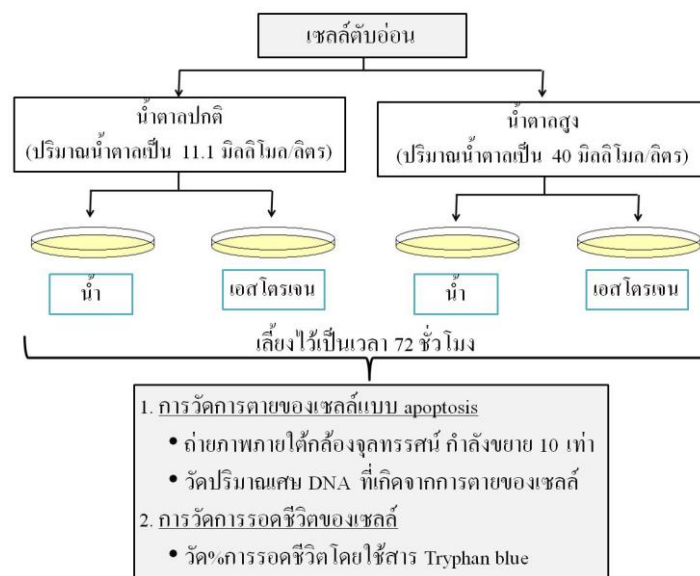
วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ตับอ่อนที่หลังอินซูลินที่เลี้ยงไว้ในระดับน้ำตาลสูง
2. เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการรอดชีวิตของเซลล์ตับอ่อนที่หลังอินซูลินที่เลี้ยงไว้ในระดับน้ำตาลสูง

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย

ในการวิจัยนี้ ประกอบด้วย การวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ การวัดการรอดชีวิตของเซลล์



ภาพที่ 1 ระเบียบวิธีวิจัยการวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ การวัดการรอดชีวิตของเซลล์

2. วิธีวิจัย

2.1) กลุ่มตัวอย่าง

เซลล์ตับอ่อนที่หลังอินซูลินชนิด INS-1

การเลี้ยงเซลล์ตับอ่อน

เซลล์ตับอ่อนชนิด INS-1 เลี้ยงด้วย RPMI 1640 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % มีค่าความเป็นกรดค่าเท่ากับ 7.4 น้ำเลี้ยงจะเปลี่ยนทุก 2 วัน ซึ่งเซลล์ตับอ่อนเลี้ยงใน 2 ภาวะ คือ ภาวะที่มีระดับน้ำตาลปกติ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 11.1 มิลลิโมล/ลิตร และภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 40 มิลลิโมล/ลิตร ร่วมกับ

การให้น้ำหรือเอสโตรเจนที่ละลายในน้ำ ที่มีความเข้มข้นเป็น 10^{-8} โมล/ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเซลล์ไปทดลองหาปริมาณเศษของ DNA ซึ่งแสดงถึงการตายของเซลล์ และ หาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอด

2.1) เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย และวิธีการทดลอง

การทดลองหาปริมาณเศษของ DNA ที่เกิดจากการตายของเซลล์

เซลล์ต้นอ่อนชนิด INS-1 จะถูกแยกออกมาจากงานเลี้ยงแล้วนำไปย่อยเซลล์ด้วยสารย่อย ซึ่งประกอบด้วย เกลือ NaCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมล/ลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมล/ลิตร EDTA ความเข้มข้น 250 มิลลิโมล/ลิตร SDS 10 % และเอนไซม์ proteinase จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตลอดทั้งคืน เมื่อครบเวลานำมาปั่นและเก็บส่วนที่เป็นน้ำใส่ในหลอดใหม่ ใส่ Tris-HCl ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล/ลิตร และใส่เอนไซม์ RNase ปริมาณ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เติม 100 % เอทานอลที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ตลอดทั้งคืน จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 70 % ทิ้งให้แห้ง แล้วจึงเติมสารละลาย TE DNA ที่ได้นำนาวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง ND-1000 Spectrophotometer จากนั้น จะทำการแยก DNA ตามขนาด โดยวิธี electrophoresis ซึ่งใช้ปริมาณ DNA 1 ไมโครกรัม แยกในเจล agarose ความเข้มข้น 1.5 % แล้วนำมาย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นทำการถ่ายภาพ ภายใต้แสง ultraviolet

การทดลองหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอด

เซลล์ต้นอ่อนชนิด INS-1 จะถูกแยกจากงานเลี้ยง โดยใช้ trypsin จากนั้นจะนำเซลล์มาย้อมด้วย trypan blue ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer เซลล์ที่มีชีวิตไม่ติดสี ส่วนเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน เนื่องจากเซลล์ตาย trypan blue สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ ค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์รอดโดยเทียบกับเซลล์ทั้งหมดตามสูตรดังต่อไปนี้:

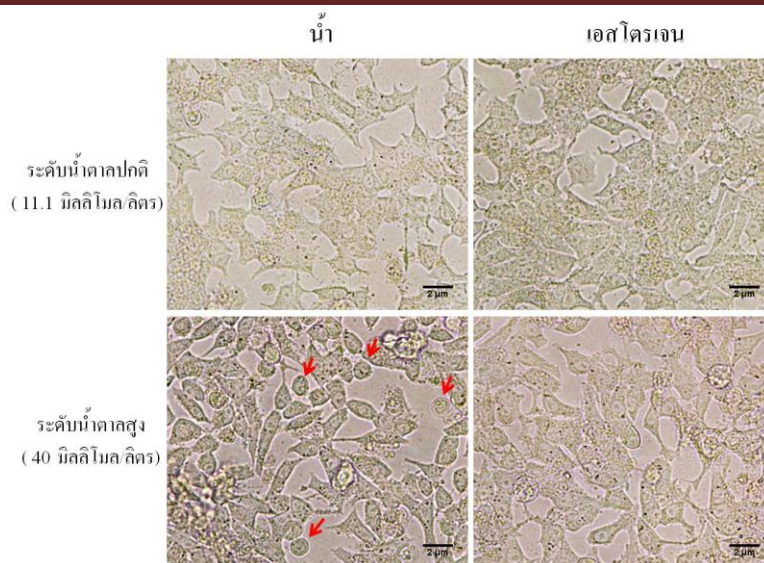
$$\% \text{ ปริมาณเซลล์รอดชีวิต} = (\text{ปริมาณเซลล์ที่ไม่ติดสี} / \text{ปริมาณเซลล์ทั้งหมด}) \times 100 \%$$

3. การวิเคราะห์ข้อมูลวิจัย

ทุกข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานค่าเฉลี่ย ข้อมูลจะถูกวิเคราะห์โดยใช้สถิติ ANOVA ตามด้วย Tukey's post hoc test ที่ถือว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จะต้องมีความ $p < 0.05$ วิเคราะห์ข้อมูลวิจัย

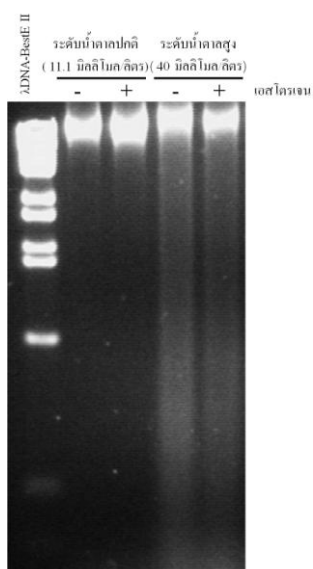
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ต้นอ่อนที่หลังอินซูลินที่เลี้ยงไว้ในระดับน้ำตาลสูงเซลล์ต้นอ่อนที่หลังอินซูลินจะเลี้ยงไว้ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลปกติซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 11.1 มิลลิโมล/ลิตร หรือ ภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเป็น 40 มิลลิโมล/ลิตร ร่วมกับการให้น้ำหรือเอสโตรเจนที่ละลายในน้ำ ที่มีความเข้มข้นเป็น 10^{-8} โมล/ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า ลักษณะของเซลล์ต้นอ่อนที่เลี้ยงในภาวะระดับน้ำตาลสูง มีลักษณะการตายของเซลล์ และเมื่อให้เอสโตรเจนแก่เซลล์ต้นอ่อนที่เลี้ยงในภาวะระดับน้ำตาลสูงนี้พบว่าลักษณะของเซลล์ต้นอ่อนเหมือนปกติที่เลี้ยงในน้ำตาลระดับปกติ ดังแสดงในภาพที่ 2



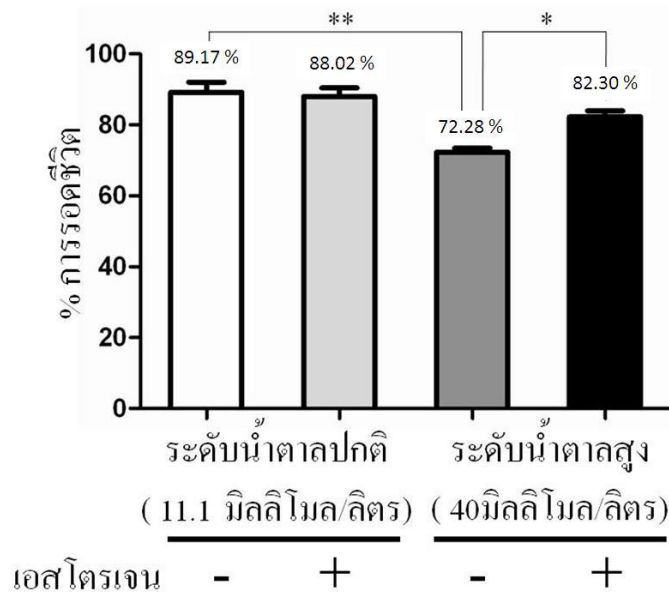
ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยระดับน้ำตาลปกติ หรือระดับน้ำตาลสูง ร่วมกับให้น้ำหรือเอสโตรเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า

ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองหาเศษของ DNA ที่เกิดจากการตายของเซลล์ โดยพบว่าในภาวะที่เลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูง จะมีเศษของ DNA เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับในภาวะระดับน้ำตาลปกติ และเมื่อให้เอสโตรเจนร่วม พบว่าเอสโตรเจนไปมีผลลดเศษของ DNA ได้ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลของการแตกของ DNA ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยระดับน้ำตาลปกติ หรือระดับน้ำตาลสูง ร่วมกับให้น้ำหรือเอสโตรเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. การศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการรอดชีวิตของเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงอินซูลินที่เลี้ยงไว้ในระดับน้ำตาลสูงผลจากการหา %การรอดชีวิตของเซลล์ตับอ่อน แสดงให้เห็นว่า มี %การรอดชีวิตของเซลล์ตับอ่อนลดลง ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลที่มีระดับน้ำตาลสูง มีค่าเท่ากับ 72.1 % ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงน้ำตาลที่มีระดับน้ำตาลปกติ มีค่าเท่ากับ 89.1 % ซึ่งเมื่อคำนวณค่าทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่า $p = 0.003$ ที่น่าสนใจคือ เมื่อให้เอสโตรเจนแก่เซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยภาวะระดับน้ำตาลสูง พบว่าเซลล์ตับอ่อนมี %การรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น คิดเป็น 82.30 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า $p = 0.045$ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 %การรอดชีวิตของเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยระดับน้ำตาลปกติ หรือระดับน้ำตาลสูง ร่วมกับให้น้ำหรือเอสโตรเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

อภิปรายผลการทดลอง

เมื่อมีภาวะระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานาน ส่งผลให้เกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 โดยระดับน้ำตาลสูงนี้ทำให้การทำงานของเซลล์ตับอ่อนผิดปกติและเซลล์ตับอ่อนตายได้ การศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า ระดับน้ำตาลที่สูงเพิ่มการตายของเซลล์ตับอ่อน (Hou et al., 2008; Zraika et al., 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของเราที่แสดงให้เห็นว่า เซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลานาน จะมีการตายของเซลล์ เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่อยู่ในน้ำตาลที่มีระดับน้ำตาลปกติ โดยดูจากผลของเศษ DNA ในภาพที่ 3 และพบว่าเซลล์ตับอ่อนมีลักษณะของเซลล์เปลี่ยนไปจากภาวะปกติ คือ เซลล์แยกตัวออกจากเซลล์ข้างเคียง และเซลล์หดตัวเล็กลง ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า ดังภาพที่ 2

จากผลการทดลอง พบว่าปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงในเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลที่มีระดับน้ำตาลสูงแต่เอสโตรเจนสามารถเพิ่มปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำตาลที่มีระดับน้ำตาลสูงด้วย ดังภาพที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า ในหนูทดลองที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ทำให้ขาดเอนไซม์ aromatase ซึ่งจะขาดเอสโตรเจน เมื่อได้รับสาร streptozotocin (STZ) ที่ทำลายเซลล์ตับอ่อนแก่หนูทำให้หนูเป็นโรคเบาหวาน เมื่อหนูที่

เป็นเบาหวานเหล่านี้ได้รับเอสโตรเจน พบว่าเอสโตรเจนป้องกันการทำลายเซลล์ตับอ่อน เซลล์ตับอ่อนมีลักษณะปกติ และมีปริมาณอินซูลินเท่ากับปกติ (Le May et al., 2006)

กลไกหลักที่น้ำตาลสูงทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินนั้นคือการสร้างสารอนุมูลอิสระมากเกินไปกว่าที่เซลล์จะทำลายอนุมูลอิสระนั้นได้ อนุมูลอิสระที่มีมากจะไปทำลายโครงสร้างและขัดขวางกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ เช่น การสร้างและขนส่งโปรตีนที่ใช้ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ปกติและตายในที่สุด เซลล์ตับอ่อนที่สร้างอินซูลินมีเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase and glutathione peroxidase (GPx) อยู่ไม่น้อยทำให้เซลล์เหล่านี้เสี่ยงต่อการตายจากสารอนุมูลอิสระมากกว่าเซลล์อื่นๆ เอสโตรเจนสามารถลดน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่เกิดจากการให้สาร STZ ได้ โดยสาร STZ ทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น มีผลให้เซลล์ตับอ่อนส่วนใหญ่ถูกทำลายไม่สามารถสร้างอินซูลินได้เพียงพอ ทำให้หนูเป็นเบาหวาน การให้เอสโตรเจนทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเหล่านี้ดีขึ้น (Le May et al., 2006) ดังนั้นเอสโตรเจนน่าจะทำให้เซลล์ที่ตายจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระลดลง ซึ่งในรายงานนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าการตายของเซลล์ตับอ่อนลดลงจริงตามสมมติฐาน ซึ่งการลดการตายของเซลล์น่าจะเกิดจากการที่เอสโตรเจนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ว่าเอสโตรเจนเพิ่มการสร้างเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase and glutathione peroxidase (GPx) ในเซลล์ตับของหนูที่เป็นเบาหวาน (Hamden et al., 2008) และยังมีรายงานอีกว่า เอสโตรเจนสามารถป้องกันระดับน้ำตาลสูงที่ทำลายเซลล์เยื่อ (endothelium) โดยไปลดอนุมูลอิสระ (Chakrabarti & Davidge, 2009) นอกจากนี้เอสโตรเจนสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Bcl 2* ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) ได้ โดยยีนชนิดนี้ทำให้ลดการตายแบบ apoptosis และทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น (Wang & Phang, 1995) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าตัวรับของเอสโตรเจนที่เซลล์ตับอ่อนมีทั้งชนิดที่อยู่ภายในเซลล์และอยู่ที่ผิวเซลล์ (Roperio, Soria, & Nadal, 2002) ดังนั้นเอสโตรเจนอาจทำให้เกิดการตายของเซลล์น้อยลงจากกลไกอื่นๆ โดยกลไกเหล่านี้น่าจะเกิดจากเอสโตรเจนออกฤทธิ์ที่ผ่านตัวรับที่ผิวเซลล์

รายงานฉบับนี้แสดงถึงฤทธิ์ของเอสโตรเจนในการป้องกันการตายของเซลล์ ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยระดับน้ำตาลสูง ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่า ในเซลล์ตับอ่อนที่เลี้ยงด้วยระดับน้ำตาลสูงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อให้เอสโตรเจนความเข้มข้น 10^{-8} โมล/ลิตร จะสามารถลดปริมาณการแตกของ DNA และทำให้ลักษณะของเซลล์เป็นปกติได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เอสโตรเจนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์รอดชีวิตในภาวะระดับน้ำตาลสูงได้อีก

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

เอสโตรเจนมีฤทธิ์ในการฟื้นฟูเซลล์ตับอ่อนจากการทำให้เซลล์ตายด้วยระดับน้ำตาลสูง จึงเป็นไปได้ว่าเอสโตรเจนน่าจะมียุทธศาสตร์สำคัญในการป้องกันการตายของเซลล์ตับอ่อนในผู้ป่วยเบาหวาน แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการช่วยฟื้นฟูนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด จึงน่าจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่ได้รับการวิจัย

1. เพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานที่ทำให้ทราบถึงผลของเอสโตรเจน ที่มีผลช่วยลดการตายของเซลล์ และเพิ่มการรอดชีวิต ในเซลล์ตับอ่อนที่หลังอินซูลิน
2. เพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการพัฒนาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนพัฒนางานวิจัยประเภทที่2 และทุนบัณฑิตศึกษาคณะ
แพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

บรรณานุกรม

- Aekplakorn, W., Stolk, R. P., Neal, B., Suriyawongpaisal, P., Chongsuvivatwong, V., Cheepudomwit, S., et al. (2003). The prevalence and management of diabetes in Thai adults: the international collaborative study of cardiovascular disease in Asia. *Diabetes Care*, 26(10), 2758-2763.
- Andersson, B., Mattsson, L. A., Hahn, L., Marin, P., Lapidus, L., Holm, G., et al. (1997). Estrogen replacement therapy decreases hyperandrogenicity and improves glucose homeostasis and plasma lipids in postmenopausal women with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(2), 638-643.
- Brussaard, H. E., Gevers Leuven, J. A., Frolich, M., Kluff, C., & Krans, H. M. (1997). Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia*, 40(7), 843-849.
- Chakrabarti, S., & Davidge, S. T. (2009). High glucose-induced oxidative stress alters estrogen effects on ERalpha and ERbeta in human endothelial cells: Reversal by AMPK activator. *J Steroid Biochem Mol Biol*.**
- Hamden, K., Carreau, S., Boujbiha, M. A., Lajmi, S., Aloulou, D., Kchaou, D., et al. (2008). Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 beta-estradiol. *Steroids*, 73(5), 495-501.
- Hou, Z. Q., Li, H. L., Gao, L., Pan, L., Zhao, J. J., & Li, G. W. (2008). Involvement of chronic stresses in rat islet and INS-1 cell glucotoxicity induced by intermittent high glucose. *Mol Cell Endocrinol*, 291(1-2), 71-78.
- Kooptiwut, S., Kebede, M., Zraika, S., Visinoni, S., Aston-Mourney, K., Favaloro, J., et al. (2005). High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction. *J Mol Endocrinol*, 35(1), 39-48.
- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C. S., Simpson, E. R., Korach, K. S., et al. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9232-9237.
- Maedler, K. (2008). Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab*, 10(5), 408-420.
- Maiese, K., Morhan, S. D., & Chong, Z. Z. (2007). Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res*, 4(1), 63-71.
- Muoio, D. M., & Newgard, C. B. (2008). Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), 193-205.
- Rhodes, C. J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*, 307(5708), 380-384.
- Robertson, R. P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*, 279(41), 42351-42354.
- Robertson, R. P. (2006). Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol*, 6(6), 615-619.

- Roglic, G. (2009). Diabetes in women: the global perspective. *Int J Gynaecol Obstet*, 104 Suppl 1, S11-13.
- Roglic, G., Unwin, N., Bennett, P. H., Mathers, C., Tuomilehto, J., Nag, S., et al. (2005). The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*, 28(9), 2130-2135.
- Ropero, A. B., Soria, B., & Nadal, A. (2002). A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol Endocrinol*, 16(3), 497-505.
- Wang, T. T., & Phang, J. M. (1995). Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res*, 55(12), 2487-2489.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5), 1047-1053.
- Zraika, S., Hull, R. L., Udayasankar, J., Aston-Mourney, K., Subramanian, S. L., Kisilevsky, R., et al. (2009). Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis. *Diabetologia*, 52(4), 626-635.