

# การเปลี่ยนแปลงความยาวเทโลเมียร์ และจำนวนชุด ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จากเซลล์ชั้นเอ็นใน โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ: การศึกษานำร่อง

สินสุดา เดชสุภา*	วีรศักดิ์ สิงหนัดกิจ**
วรวรรณ ลิมทองกุล**	วิชาญ ยิงศักดิ์มงคล**
ธันว์ อธิพานิชพงศ์**	สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก***

**Dechsupa S, Singhatanadgige W, Limthongkul W, Yingsakmongkol W, Ittipanichpong T, Honsawek S. Alterations of relative telomere length and mitochondrial DNA copy number from ligamentum flavum-derived cells in lumbar spinal stenosis : Pilot study. Chula Med J 2017 Jul – Aug;61(4):497 - 509**

**Background** : Lumbar spinal stenosis is the common cause of low back pain in elderly people. It is characterized by hypertrophic ligamentum flavum (LF), a decrease of elastin-to-collagen ratio, and age-related fibrosis. Several studies have been reported that the telomere shortening, abnormality of mitochondrial DNA (mtDNA), and senescent cells were associated with age and degenerative diseases such as osteoporosis, osteoarthritis, and heart disease. However, the relative telomere length, mtDNA, and senescence mechanisms of human LF cells from lumbar spinal stenosis remain unclear.

**Objective** : To determine the relative telomere length, mitochondrial DNA copy number (mtDNAcn), and cell senescence between non-pathologic and pathologic LF cells from lumbar spinal stenosis patients with various ages.

\* นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\* ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\*\*ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Methods** : We serially cultivated non-pathologic and pathologic human LF cells from 4 patients with various ages (61, 66, 77, and 84 years). During each subcultivation, we investigated relative telomere length and mtDNAcn by real-time polymerase chain reaction (PCR) and examined cell senescence markers by senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining.
- Results** : With advancing culture passages, there was a steady decline in the relative telomere length and mtDNAcn of non-pathologic and pathologic human LF cells. The elderly patients (84 years) had lower relative telomere length and mtDNAcn than the younger patients. Particularly, the elderly patients (77 and 84 years) had higher percentage of the SA- $\beta$ -gal-positive human LF cells than the younger patients (61 and 66 years).
- Conclusions** : There was a steady decline in the relative telomere length and mtDNAcn of human LF cells with advancing passages, irrespective of patient age. Senescent human LF cells accumulated in the LF with increasing age and pathologic tissue. These findings may provide a better understanding of pathogenesis of lumbar spinal stenosis.
- Keywords** : Telomere length, mitochondrial DNA copy number, cell senescence, ligamentum flavum, lumbar spinal stenosis.

Correspondence to: Honsawek S. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. February 27, 2017.

สินสุตา เดชสุภา, วีรศักดิ์ สิงหนัดกิจ, วรวรรธน์ ลิ้มทองกุล, วิชาญ ยิ่งศักดิ์มงคล,  
ธันว์ อธิพานิชพงศ์, สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก. การเปลี่ยนแปลงความยาวเทโลเมียร์ และ  
จำนวนชุดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จากเซลล์ชั้นเอ็นในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ:  
การศึกษานำร่อง. *จุฬาลงกรณ์เวชสาร* 2560 ก.ค. - ส.ค.;61(4):497 - 509

**เหตุผลของการทำวิจัย :** โรคกระดูกสันหลังเสื่อมพบมากในประเทศไทยและพบบ่อยในผู้สูงอายุ โดยเฉพาะ โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis) ซึ่งเกิดจากการหนาตัวของชั้นเอ็นช่องไขสันหลัง อัตราส่วนของอีลาสติน และคอลลาเจนลดลง และรวมถึงพังผืดจากอายุ ที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษา ความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mitochondrial DNA (mtDNA) และ cell senescence ในโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบและยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกี่ยวข้องกับปัจจัยใด

**วัตถุประสงค์ :** เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mtDNA และทดสอบตัวชี้วัดการเกิดเซลล์ชรา (cell senescence) ในเซลล์ไฟโบบลาสต์ จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่มีการหนาตัว และเซลล์ไฟโบบลาสต์ จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่ไม่หนาตัว โดยเปรียบเทียบจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่ได้รับการผ่าตัดขยายช่องไขสันหลังที่มีอายุแตกต่างกัน

**วิธีการทำวิจัย :** ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจำนวน 4 ราย อายุระหว่าง 61- 84 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดลดการกดทับไขสันหลังตามปกติ โดยในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัวและระดับที่ไม่หนาตัว ทำการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mtDNA (mitochondrial DNA copy number; mtDNAcn) โดยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (PCR) และทดสอบตัวชี้วัดการเกิดเซลล์ชรา (cell senescence) โดยการย้อม senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal)

**ผลการศึกษา :** เซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัวและระดับที่ไม่หนาตัว มีความยาวเทโลเมียร์และจำนวนชุด mtDNA ลดลงในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่อายุต่างกัน (61 และ 84 ปี) พบว่าความยาวเทโลเมียร์และจำนวนชุด mtDNA ของผู้ป่วยที่อายุมาก มีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่าและจำนวนชุด mtDNA น้อยกว่าผู้ป่วยที่อายุน้อย นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษา cell senescence เซลล์จากผู้ป่วยที่อายุแตกต่างกันผ่านไปในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ พบว่าเซลล์ของผู้ป่วยที่มีอายุมาก (77 และ 84 ปี) มีร้อยละของการติดสี SA- $\beta$ -gal ตั้งแต่การเลี้ยงเซลล์ในรอบแรก ซึ่งมากกว่าเซลล์ของผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (61 และ 66 ปี) และแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์พบจำนวนรอยละการติดสี SA- $\beta$ -gal เพิ่มจำนวนมากขึ้นในแต่ละรอบ

- สรุป** : การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mtDNA ของเซลล์จากชิ้นเอ็นของไขสันหลังลดลงตามจำนวนรอบของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น รวมถึงลดลงตามอายุของผู้ป่วยและพยาธิสภาพของโรค ส่งผลให้เกิดการสะสมของ cell senescence มากขึ้น ซึ่งมีส่วนช่วยให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่มีต่อพยาธิกำเนิดของโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ
- คำสำคัญ** : ความยาวของเทโลเมียร์, จำนวนชุดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ, เซลล์ชรา, ชิ้นเอ็นของไขสันหลัง, โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ.

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ (lumbar spinal stenosis; LSS) เป็นโรคพบได้บ่อยในผู้สูงอายุ และเป็นสาเหตุของอาการปวดหลังระดับเอวและสะโพก (low back pain) ปวดและชาไปตามรากประสาทที่ถูกกดทับ โดยบางครั้งมีอาการปวดชาพร้อมด้วย บางรายทำให้ขาอ่อนแรงและกล้ามเนื้อสลายจะดูจางๆไม่ได้<sup>(1)</sup> กระดูกสันหลังเสื่อมเมื่ออายุมากขึ้น เป็นผลมาจากชั้นเอ็นข้อไขสันหลังหน้าตัว (ligamentum flavum; LF) ขึ้นเอ็นที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงและช่วยพยุงกระดูกสันหลัง<sup>(2)</sup> มีอัตราส่วนของอีลาสตินและคอลลาเจนลดลง ส่งผลให้ความยืดหยุ่นน้อยลง และมีการหนาตัวเพิ่มขึ้น (hypertrophy) ลดช่องว่างของโพรงไขสันหลัง ทำให้เกิดอาการปวดหลัง และเกิดโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ<sup>(3)</sup> ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสื่อมและปวดหลัง คือ การสะสมของสารอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้ DNA ของเซลล์บริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอวได้รับสารอนุมูลอิสระ เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และ DNA เกิดการเสียหาย ซึ่งสามารถนำมาอธิบายการเกิดโรคกระดูกสันหลังเสื่อม เช่น ในภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกมีการทำงานที่ผิดปกติ กระบวนการซ่อมแซม DNA บกพร่อง ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ผิดปกติ รวมถึงมีเซลล์ชราเพิ่มขึ้น ความยาวของเทโลเมียร์สั้นลง ซึ่งทำให้เร่งกระบวนการเกิดโรคกระดูกสันหลังเสื่อมมากขึ้น<sup>(4)</sup>

เซลล์ชรา (cell senescence) เป็นกระบวนการที่เซลล์ปกติตอบสนองต่อปัจจัยความเครียดหลากหลายชนิด<sup>(5)</sup> ทำให้เซลล์หยุดสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลาย กลไกสำคัญที่กระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการเซลล์ชรา เช่น การหดสั้นของเทโลเมียร์ ซึ่งพบได้จากการจำลอง DNA ที่ไม่สมบูรณ์บริเวณเทโลเมียร์ ส่งผลให้เทโลเมียร์ของเส้น DNA หดสั้นลงเรื่อยๆ ในแต่ละรอบของการแบ่งเซลล์ รวมถึงภาวะเครียดออกซิเดชัน ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (oncogenes) และรังสีไอออน (ionizing radiation) เป็นต้น<sup>(6)</sup> ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้ DNA ถูกทำลาย และเกิดการหดสั้นของเทโลเมียร์ (telomere erosion) ทำให้เซลล์ชราที่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น<sup>(7)</sup> เซลล์ชรา

ในเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte senescence) ส่วนใหญ่เกิดจากการสะสมของอนุมูลอิสระ หรือ reactive oxygen species (ROS) และการเกิดสาร advanced glycation end products ทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ DNA ในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง<sup>(8)</sup> ในปี พ.ศ. 2543 Martin JA และคณะ<sup>(9)</sup> ได้วิเคราะห์เซลล์ชราจากเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของผู้ป่วยข้อเสื่อม 27 ราย พบว่ามีการแสดงออกของ  $\beta$ -galactosidase เพิ่มขึ้นตามอายุอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่อยู่ในระยะชรา มีความสัมพันธ์กับอายุ ยิ่งอายุเพิ่มมากขึ้น จำนวนเซลล์ชราเกิดการสะสมและอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการฟื้นฟูซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ อาจส่งผลต่อการเป็นโรคข้อเสื่อมได้

เทโลเมียร์ (telomere) ประกอบด้วยกลุ่มนิวคลีโอไทด์โปรตีนอยู่บริเวณปลายของโครโมโซม เกี่ยวข้องในการแบ่งตัวของเซลล์ และปกป้องส่วนปลายของโครโมโซม เทโลเมียร์ประกอบด้วยลำดับเบส TTAGGG บนเส้นคู่ของ DNA ซ้ำกันอยู่ประมาณ 2 - 20 กิโลเบส (kb) และพบบน DNA เส้นเดี่ยวประมาณ 50 - 500 นิวคลีโอไทด์<sup>(10)</sup> เทโลเมียร์ทำหน้าที่ป้องกันลำดับของ DNA ที่ปลายโครโมโซม ไม่ให้หดสั้นหรือถูกทำลาย เรียกว่า end-replication problem จากการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งกระบวนการเกิด end-replication problem เริ่มจาก RNA primer จับบนเส้น DNA เพื่อทำการต่อเส้น DNA เส้นใหม่ เมื่อสิ้นสุดการต่อเส้น DNA ต่อมา RNA primer ตัวสุดท้ายถูกกำจัดด้วยเอนไซม์ 5'-3' exonuclease แต่เนื่องจาก DNA polymerase ไม่สามารถเติมเบสถัดไปได้ เพราะบนเส้น DNA ไม่มีหมู่ 3'-OH ทำให้เกิดการขาดหายไป เกิดเป็นช่องว่างบนเส้น DNA ทำให้โครโมโซมหดสั้นลง เกิดเซลล์ชรา (cell senescence) และเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) เร็วกว่าเซลล์อื่น ๆ<sup>(11)</sup>

ทั้งนี้สารพันธุกรรมไม่ได้พบอยู่เฉพาะนิวเคลียสเท่านั้น แต่ภายในไมโทคอนเดรียมีสารพันธุกรรมเป็นของตัวเองหลายชุด ที่เรียกว่า mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่ง mtDNA ของมนุษย์ที่ได้จากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมมีลักษณะเป็นวงกลมขนาด 16,569 คู่เบส<sup>(12)</sup> เมื่อเซลล์เข้าสู่เซลล์ชราหรือได้รับสารอนุมูลอิสระมากขึ้น การทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง ส่งผลให้ mtDNA เกิดการกลายพันธุ์ ทั้งนี้การทำงานของไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติสามารถตรวจวัดได้จากจำนวนชุดไมโทคอนเดรีย (mtDNA copy number; mtDNAcn) ซึ่งจำนวนชุดไมโทคอนเดรียไม่ได้แสดงถึงความสามารถในการสังเคราะห์พลังงานเท่านั้น แต่ยังแสดงถึงการที่เซลล์ตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน

จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเทโลเมียร์และ mtDNA ในเซลล์จาก LF ทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาความยาวเทโลเมียร์ mtDNA และ cell senescence ที่ได้จากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างความยาวเทโลเมียร์ mtDNAcn และ cell senescence ในเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังที่มีการหนาตัวและชิ้นเอ็นที่ไม่หนาตัว โดยเปรียบเทียบจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่มีอายุแตกต่างกัน

### วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive study) เพื่อศึกษาความแตกต่างของความยาวเทโลเมียร์ mtDNAcn และ cell senescence ของเซลล์ไฟโบบลาสชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง จากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่มีอายุแตกต่างกัน ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

กลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมการวิจัยตามความสมัครใจ โดยคำนึงถึงจริยธรรมการทำวิจัย และพิทักษ์สิทธิการวิจัยครั้งนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในคน

จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่จริยธรรม IRB 225/59

### กลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบจากการหนาตัวของ ligamentum flavum จำนวน 4 ราย เพศชาย 2 ราย (อายุ 61 และ 84 ปี) และเพศหญิง 2 ราย (อายุ 66 และ 77 ปี) ที่เข้ารับการรักษาช่องไขสันหลังตีบบริเวณเอวจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวที่ได้จากการผ่าตัดตามแผนการรักษาปกติของผู้ป่วยขนาด 0.2 × 0.2 ซม. และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทันที

### การสกัดและการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจากชิ้นเอ็นช่องไขสันหลัง

ชิ้นเอ็นช่องไขสันหลังได้มาจากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาผ่าตัด ถูกนำมาล้างด้วยน้ำเกลือและตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาด 0.5 × 0.5 มม. นำชิ้นเนื้อมาวางในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีระยะห่างเท่ากัน เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ alpha-minimum essential medium (α-MEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และ 200 IU/ml penicillin/streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเลี้ยงเซลล์จนมีจำนวนเซลล์มากพอ ทำการหยิบชิ้นเนื้อออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และนำเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ผสมกับ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 2 มิลลิลิตร จากนั้นดูดเซลล์ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ เลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์มากพอ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน เพื่อให้เซลล์ได้รับอาหารในการเจริญเติบโต

### การศึกษาความยาวเทโลเมียร์และจำนวนชุดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ ดีเอ็นเอของเซลล์ไฟโบบลาสจากชั้นเอ็นโนของไขสันหลังถูกสกัดโดยใช้ tissue DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ให้มีความเข้มข้น 1.56 ng/ $\mu$ l แล้วทำการวิเคราะห์ความยาวเทโลเมียร์และ mtDNAcn โดยใช้เทคนิค real-time polymerase chain reaction (PCR) โดยความยาวเทโลเมียร์วัดจากอัตราส่วนระหว่าง telomeric fragment/single-copy gene (T/S) และ mtDNAcn วัดจากอัตราส่วนระหว่าง mitochondrial ND1 gene/human-globulin gene (ND1/HGB)

ในปฏิกิริยา PCR แต่ละหลอดประกอบด้วย SYBR Green RBC ThermOne™ Real-Time PCR Premix (RBC Bioscience, Taiwan) ปริมาตร 5  $\mu$ l น้ำกลั่น 2.6  $\mu$ l DNA 2  $\mu$ l และ primer 0.2  $\mu$ l โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ primers ทั้ง telomere, single-copy gene, mitochondrial ND1 gene และ human globulin gene (HGB) เท่ากับ 10  $\mu$ M ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Telomere	(Forward) 5'-CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3' (Reverse) 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
Single copy gene	(Forward) 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3' (Reverse) 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'
Mitochondrial DNA (ND1)	(Forward) 5'-CCCTAAAACCCGCCACATCT-3' (Reverse) 5'-GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT-3'
Human globulin gene (HGB)	(Forward) 5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3' (Reverse) 5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'

การวัดความยาวเทโลเมียร์และ mtDNAcn ใช้เครื่อง SteoOnePlus Real Time System (Life Technologies, USA) สภาวะที่ใช้ทำ real-time PCR ของความยาวเทโลเมียร์ โดยมี single copy gene เป็นยีนควบคุมการแสดงออก คือ 1 รอบ 95°C 10 วินาที; 40 รอบ 95°C 15 วินาที และ 54°C 1 นาที ในขณะที่สภาวะที่ใช้ทำ real-time PCR ของ mtDNAcn โดยมี human globulin เป็นยีนควบคุมการแสดงออก คือ 1 รอบ 95°C 30 วินาที; 35 รอบ 94°C 30 วินาที, 58°C 30 วินาที, และ 72°C 50 วินาที เมื่อเสร็จกระบวนการได้ค่า Ct นำค่า Ct มาคำนวณโดยใช้สูตร  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sam} - \Delta Ct_{ref}$

### การย้อม Senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal)

การศึกษาร้อยละของการย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal เซลล์ไฟโบบลาสจากชั้นเอ็นโนของไขสันหลังทำการศึกษาในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (passage) เริ่มแรกนับเซลล์และใส่เซลล์ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (6-well plate) จำนวน 1  $\times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) และตรึงเซลล์

ด้วย 2% formaldehyde และ 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS และใส่สารละลาย SA-β-gal ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังครบเวลานำภาชนะเลี้ยงเซลล์ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำเงินจากจำนวนเซลล์ทั้ง 300 เซลล์ นับทั้งหมดสองครั้งหาค่าเฉลี่ย คิดจำนวนร้อยละของการติดสี SA-β-gal คำนวณโดยใช้สูตร ร้อยละการติดสี SA-β-gal = (จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี SA-β-gal/ จำนวนเซลล์ 300 เซลล์) ×100

**การเก็บรวบรวมข้อมูล**

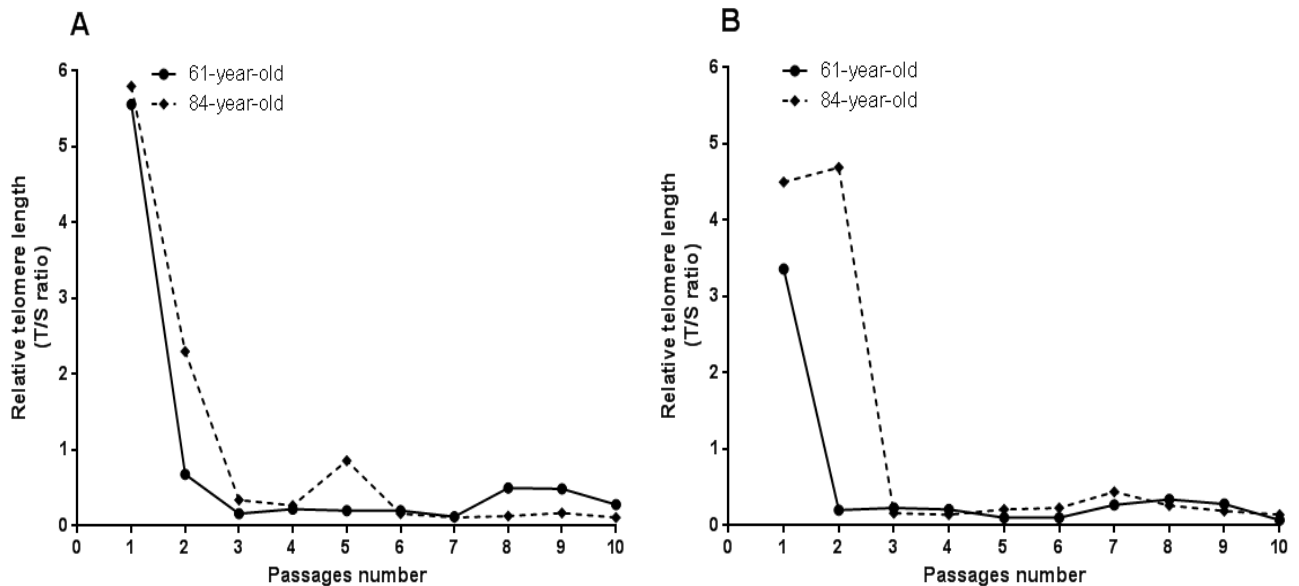
การทดสอบทางสถิติที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ศึกษา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ใช้ในการเปรียบเทียบอัตราส่วนของความยาวเทโลเมียร์ mtDNAcn และค่าร้อยละของการติดสี SA-β-gal ของเซลล์ไฟโบบลาสต์ขึ้นเอ็นของไซส์นหลังจากกลุ่มผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลัง

ส่วนเอวระดับขึ้นเอ็นที่หน้าตัวเปรียบเทียบกับระดับที่ไม่หน้าตัวและเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีอายุแตกต่างกัน

**ผลการวิจัย**

**การเปลี่ยนแปลงความยาวเทโลเมียร์**

ผลการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ของเซลล์ไฟโบบลาสต์จากขึ้นเอ็นของไซส์นหลังระดับที่หน้าตัวเปรียบเทียบกับขึ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว พบว่าเซลล์จากขึ้นเอ็นระดับที่หน้าตัวมีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่าเซลล์จากขึ้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว และเมื่อศึกษาในผู้ป่วย 2 ช่วงอายุแตกต่างกันคือ อายุ 61 และ 84 ปี พบว่าความยาวเทโลเมียร์ ในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์จากผู้ป่วยที่อายุ 61 ปี ของเซลล์ไฟโบบลาสต์ขึ้นเอ็นของไซส์นหลังที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวมีความยาวเทโลเมียร์ที่สูงกว่าผู้ป่วยอายุ 84 ปี แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไปในแต่ละรอบ แนวโน้มของความยาวเทโลเมียร์ลดลงตามจำนวนรอบ (passage) ในแต่ละช่วงของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. ความยาวเทโลเมียร์ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสต์จาก (A) ขึ้นเอ็นของไซส์นหลังระดับที่ไม่หน้าตัวและ (B) ขึ้นเอ็นของไซส์นหลังที่หน้าตัวเปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61 ปี และ 84 ปี



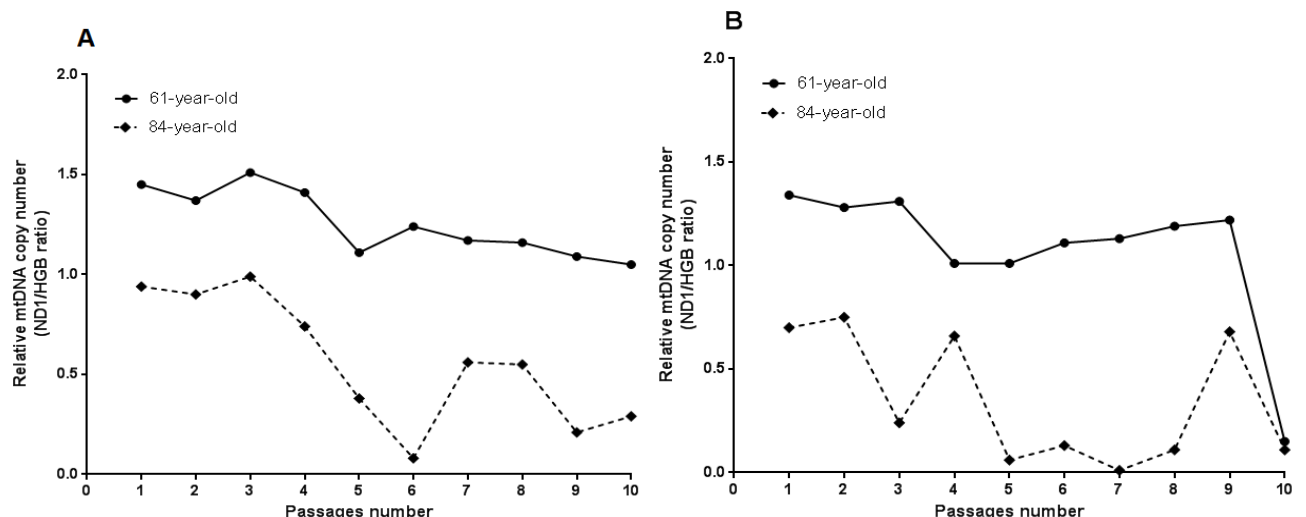
### การเปลี่ยนแปลงจำนวนชุด mtDNA

จากการศึกษาจำนวนชุด mtDNA ของเซลล์ไฟโบบลาสจากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หน้าตัวและระดับที่ไม่หน้าตัว พบว่าจำนวนชุด mtDNA เซลล์จากชั้นเอ็นระดับที่หน้าตัวมีจำนวนน้อยกว่าเซลล์จากชั้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัว และเมื่อเปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61 และ 84 ปี พบว่าจำนวนชุด mtDNA เซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 61 ปี มีจำนวนชุด mtDNA มากกว่าเซลล์จากชั้นเอ็นในผู้ป่วยอายุ 84 ปี ทั้งนี้แนวโน้มจำนวนชุด mtDNA ลดลงตามจำนวน passage ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 2)

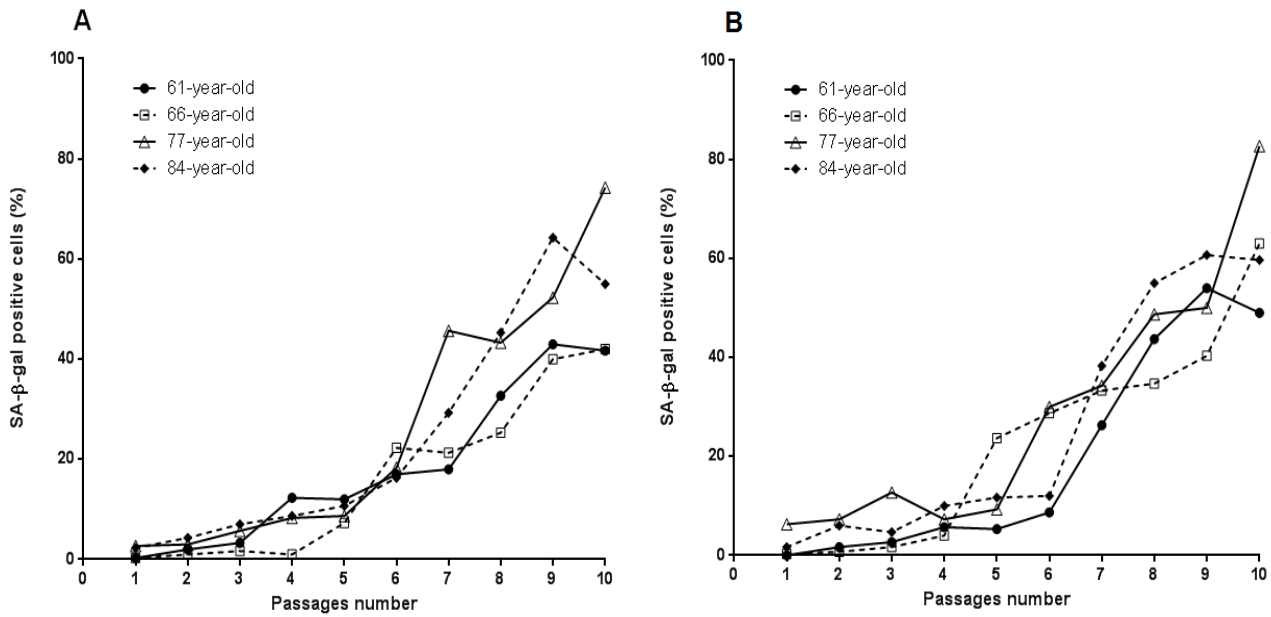
### การย้อม SA-β-gal

ในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์ ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA-β-gal เซลล์ไฟโบบลาสของชั้นเอ็นช่องไขสันหลังที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 61,

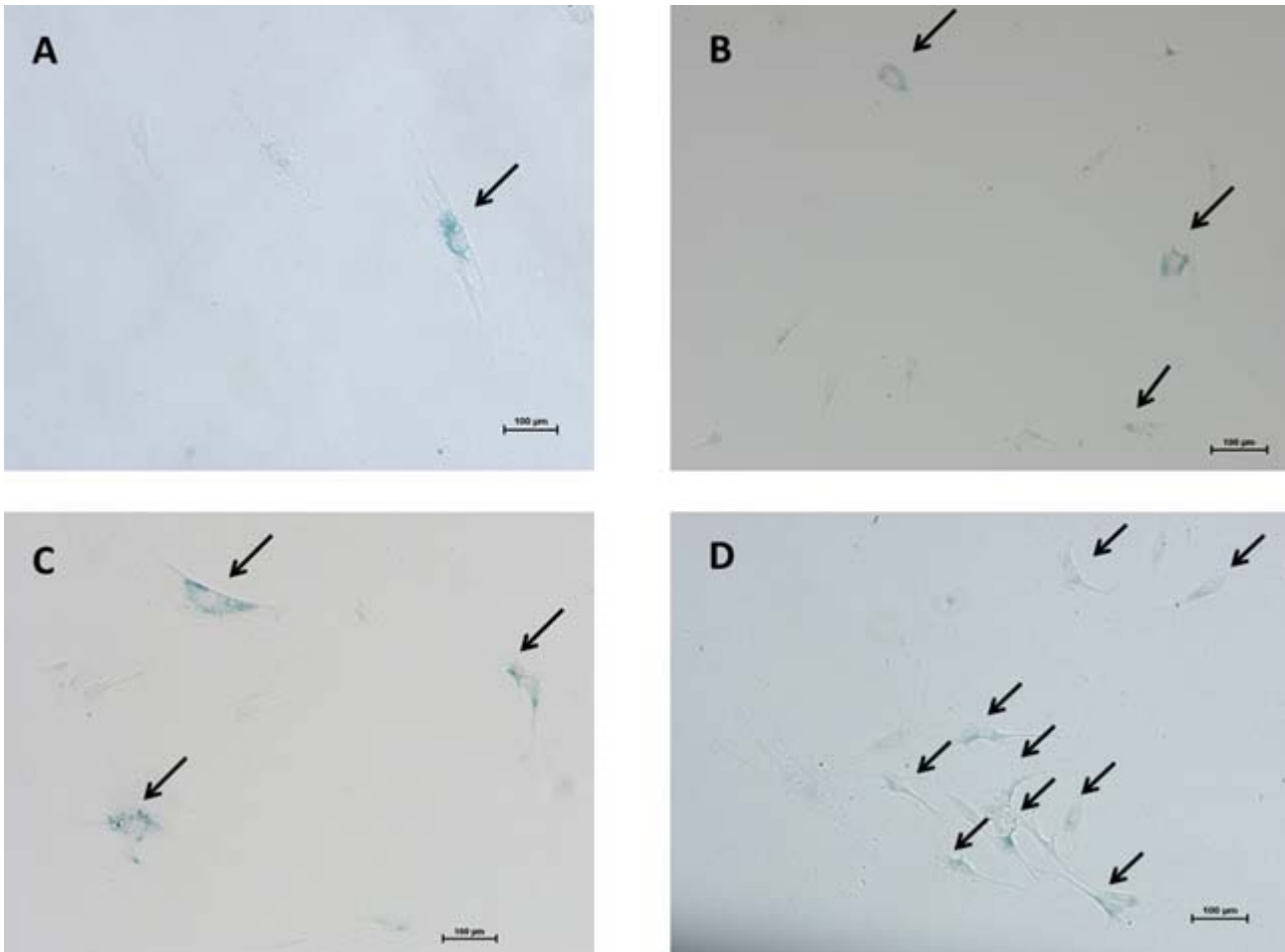
66, 77 และ 84 ปี โดยใน passage แรกของเซลล์ไฟโบบลาสจากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 61 และ 66 ปี มีค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีมีค่าเท่ากับ 0.3, 0, 0.3, และ 0.3 ตามลำดับ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น แต่ร้อยละการย้อมติดสีของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 50 ในเซลล์จากผู้ป่วยอายุ 61 และ 66 ปี (รูปที่ 3) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA-β-gal เซลล์ไฟโบบลาสของชั้นเอ็นช่องไขสันหลังที่หน้าตัวและไม่หน้าตัวของผู้ป่วยอายุ 77 และ 84 ปี พบว่าใน passage แรกมีค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีเท่ากับ 2.70, 6.30, 2.30, และ 1.70 ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละการย้อมติดสีของเซลล์มากกว่าร้อยละ 50 ใน passage 9 นอกจากนี้พบว่าร้อยละของเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หน้าตัวย้อมติดสี SA-β-gal มากกว่าเซลล์จากชั้นเอ็นระดับที่ไม่หน้าตัวในผู้ป่วยรายเดียวกัน



รูปที่ 2. จำนวนชุด mtDNA ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่ไม่หน้าตัวและ (B) ชั้นเอ็นช่องไขสันหลังที่หน้าตัวเปรียบเทียบในผู้ป่วยอายุ 61 ปี และ 84 ปี



รูปที่ 3. ค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี SA-β-gal ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ไฟโบบลาสจาก (A) ขึ้นเอ็นของไขสันหลังระดับที่ไม่หนาตัวและ (B) ขึ้นเอ็นของไขสันหลังระดับที่หนาจากผู้ป่วยที่มีช่วงอายุต่างกัน (61, 66, 77, และ 84 ปี)



รูปที่ 4. การย้อมติดสี SA-β-gal (ลูกศร) ของเซลล์ไฟโบบลาสจากขึ้นเอ็นของไขสันหลังระดับที่หนาตัวเปรียบเทียบใน (A) passage 1 และ (B) passage 10 จากผู้ป่วยอายุ 61 ปี กับ (C) passage 1 และ (D) passage 10 จากผู้ป่วยอายุ 84 ปี (กำลังขยาย ×10)

## วิจารณ์ผล

โรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบถือเป็นสาเหตุทั่วไปของอาการปวดหลังที่มาจากความเสื่อมหรือความชราของร่างกายที่พบมากในผู้สูงอายุ พยาธิสภาพของโรคเกิดจากไขสันหลังส่วนหลังถูกกดทับ หมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อม รวมถึงชั้นเอ็นช่องไขสันหลังหนาตัว<sup>(13)</sup> การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการหนาตัวของชั้นเอ็นช่องไขสันหลังเกี่ยวข้องกับการลดลงของอีลาสตินและคอลลาเจนซึ่งก่อให้เกิดพังผืดตามมา<sup>(14,15)</sup> การศึกษานี้ทำการเปรียบเทียบความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mtDNA และ cell senescence ในเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังในระดับที่หนาตัวและระดับที่ไม่หนาตัวจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัวและไม่หนาตัวผ่านไปแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ ความยาวเทโลเมียร์ลดลงตามจำนวนรอบในแต่ละช่วงของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หนาตัว มีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่าเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่ไม่หนาตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2550<sup>(16)</sup> พบว่าเซลล์จากหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อมมีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่าเซลล์จากหมอนรองกระดูกสันหลังไม่เสื่อม และความยาวเทโลเมียร์ลดลงในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น เซลล์ที่ได้จากชั้นเอ็นที่มีพยาธิสภาพหรือหนาตัวมีขนาดเทโลเมียร์สั้นกว่า อาจเป็นผลมาจากชั้นเนื้อเหล่านั้นมีจำนวนเซลล์มาก ทั้งยังมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นจากรอยโรคที่มีพยาธิสภาพ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากชั้นเอ็นที่หนาตัวส่งผลให้ความยาวของเทโลเมียร์ในชั้นเอ็นระดับที่หนาตัวมีความยาวของเทโลเมียร์สั้นกว่าชั้นเอ็นระดับที่ไม่หนาตัว

ในขณะที่จำนวนชุด mtDNA ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์จากชั้นเอ็นช่องไขสันหลังมีจำนวน mtDNA ลดลงเช่นเดียวกัน ผลที่ได้ตรงข้ามกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2555<sup>(17)</sup> พบว่าจำนวนชุด mtDNA ในเซลล์มะเร็งลดลง

อาหารที่มีจำนวนชุด mtDNA เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์มะเร็งแตกต่างจากเซลล์อื่น เพราะเซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และต้องอาศัยจำนวนไมโทคอนเดรียมากขึ้นในการผลิตพลังงานให้แก่เซลล์ในการหายใจระดับเซลล์ ในขณะที่เซลล์ปกตินั้นได้รับพลังงานที่มากพอจากการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนมากกว่าไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้เวลาเลี้ยงเซลล์ปกติผ่านไปแต่ละรอบ เซลล์มีระดับสารอนุมูลอิสระสะสมมากขึ้นภายในเซลล์ ก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าชั้นเอ็นจากช่องไขสันหลังระดับหนาตัว หรือชั้นเนื้อที่เกิดพยาธิสภาพ มีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ปกติ รวมทั้งได้รับภาวะเครียดออกซิเดชันมากขึ้น ทำให้ทุกครั้งที่การแบ่งเซลล์ส่งผลให้ความยาวเทโลเมียร์และจำนวนชุด mtDNA ลดลง

การหดสั้นของเทโลเมียร์และจำนวนชุด mtDNA ที่เปลี่ยนแปลงนั้น อาจเกี่ยวเนื่องกับปัจจัยระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับอายุ โดยกระตุ้นให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพและเกิดความเสื่อม ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิด cell senescence จากการศึกษาทำการเลี้ยงเซลล์และการย้อมติดสี SA- $\beta$ -gal เพื่อตรวจวัดการเกิด cell senescence ในแต่ละรอบของการเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีความแตกต่างระหว่างเซลล์ของผู้ป่วยอายุน้อยกับอายุมาก โดยในเซลล์ของผู้ป่วยที่อายุมากนั้นมีจำนวนเซลล์ติดสี SA- $\beta$ -gal เกิดขึ้นในรอบแรกของการเลี้ยงเซลล์และมีจำนวนเซลล์ติดสีมากกว่าเซลล์จากผู้ป่วยอายุน้อย ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2556<sup>(18)</sup> ที่เซลล์จากหมอนรองกระดูกสันหลังของผู้ป่วยโรคหมอนรองกระดูกสันหลังเสื่อมอายุมาก มีจำนวน cell senescence มากกว่าผู้ป่วยอายุน้อย เหตุผลสำหรับการเกิดเซลล์ชราในผู้ป่วยอายุมากนั้น อาจเป็นเพราะผู้ป่วยอายุมากนั้นมีการสะสมของเซลล์ชราจำนวนหนึ่ง ประกอบกับมีการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสต่ำ (telomerase activity) จึงส่งผลให้ความยาวของเทโลเมียร์สั้นลง และเกิดเซลล์ชราเพิ่มขึ้น

### ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องในกลุ่มผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบ ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นยังมีจำนวนน้อย ดังนั้นหากทำการศึกษาในอนาคต ควรเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อวิเคราะห์โดยตรงและเพิ่มจำนวนตัวอย่างจากผู้ป่วยให้มีอายุแตกต่างกัน เพื่อให้การวิเคราะห์มีความแม่นยำมากขึ้น ทำให้ข้อมูลมีความชัดเจนและน่าเชื่อถือมากขึ้น นอกจากนี้ การศึกษานี้วิเคราะห์เฉพาะความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mtDNA และ cell senescence แต่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เอนไซม์เทโลเมอเรส (telomerase) และภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส และภาวะเครียดออกซิเดชันในชั้นเอ็นช่องไขสันหลังที่ระดับหน้าตัดยังไม่ทราบแน่ชัด จึงต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

### สรุป

จากการศึกษาความยาวเทโลเมียร์ จำนวนชุด mtDNA และ cell senescence เซลล์ชั้นเอ็นช่องไขสันหลังจากผู้ป่วยโรคโพรงกระดูกสันหลังส่วนเอวตีบแคบที่ระดับหน้าตัดและไม่หน้าตัด พบว่าเซลล์ชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่หน้าตัด มีความยาวเทโลเมียร์สั้นกว่า จำนวนชุด mtDNA น้อยกว่า และพบ cell senescence ในจำนวนที่มากกว่าเซลล์ชั้นเอ็นช่องไขสันหลังระดับที่ไม่หน้าตัด ดังนั้นตำแหน่งของการเกิดพยาธิสภาพของโรคและอายุของผู้ป่วย ถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ความยาวเทโลเมียร์ และจำนวนชุด mtDNA เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการสะสมของ cell senescence มากขึ้น

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษาและทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผลงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจาก

โครงการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559 สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (NRU59-056-AS) ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องผ่าตัด ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บชิ้นเนื้อ รวมถึงผู้ป่วยทุกคนในงานวิจัย ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 718 ทุกคนสำหรับความช่วยเหลือและให้กำลังใจต่อการทำวิจัยนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Katz JN, Harris MB. Clinical practice. Lumbar spinal stenosis. *N Engl J Med* 2008;358: 818-25.
2. al-Orainy IA, Kolawole T. Ossification of the ligamentum flavum. *Eur J Radiol* 1998;29:76-82.
3. Mobbs RJ, Dvorak M. Ossification of the ligamentum flavum: diet and genetics. *J Clin Neurosci* 2007;14:703-5.
4. Kim KW, Ha KY, Lee JS, Na KH, Kim YY, Woo YK. Senescence of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *Asian Spine J* 2008;2:1-8.
5. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:961-76.
6. Mathon NF, Lloyd AC. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:203-13.
7. Adnot S, Amsellem V, Boyer L, Marcos E, Saker M, Houssaini A, et al. Telomere Dysfunction and Cell Senescence in Chronic Lung Diseases: Therapeutic Potential. *Pharmacol Ther* 2015;153:125-34.
8. Li J, Pei M. Cell senescence: a challenge in cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18:270-87.
9. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of

- osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 2: 106-10.
10. Diotti R, Loaya D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 2011; 2:119-35.
11. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44:235-46.
12. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:592-606.
13. Azimi P, Mohammadi HR, Benzel EC, Shahzadi S, Azhari S. Lumbar spinal canal stenosis classification criteria: A new tool. *Asian Spine J* 2015;9:399-406.
14. Park JB, Lee JK, Park SJ, Riew KD. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:2750-7.
15. Chen MH, Hu CK, Chen PR, Chen YS, Sun JS, Chen MH. Dose-dependent regulation of cell proliferation and collagen degradation by estradiol on ligamentum flavum. *BMC Musculoskelet Disord* 2014;15:238.
16. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R45.
17. Lin CS, Lee HT, Lee SY, Shen YA, Wang LS, Chen YJ, et al. High mitochondrial DNA copy number and bioenergetic function are associated with tumor invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Mol Sci* 2012;13:11228-46.
18. Jeong SW, Lee JS, Kim KW. In vitro lifespan and senescence mechanisms of human nucleus pulposus chondrocytes. *Spine J* 2014;14: 499-504.