

กลไกการก่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยอนุมูลอิสระจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

พวงรัตน์ ยงวนิชย์¹

สมชาย ปิ่นละออ²

¹ภาควิชาชีวเคมี

²ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Mechanism of *Opisthorchis viverrini* Associated Cholangiocarcinogenesis Mediated by Free Radicals

Puangrat Yongvanit¹, Somchai Pinlaor²

¹Departments of Biochemistry, ²Parasitology, Faculty of Medicine; Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University

กระบวนการก่อมะเร็ง

กระบวนการก่อมะเร็ง เป็นกระบวนการที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ในระดับจีน ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต การแบ่งตัว และการตาย (apoptosis) ของเซลล์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนหรือที่เรียกว่า multistage carcinogenesis กระบวนการก่อมะเร็งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นก่อตัว (initiation) ขั้นส่งเสริม (promotion) และขั้นก้าวหน้า (progression) การเปลี่ยนแปลงในแต่ละขั้นตอนใช้เวลาแตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงในขั้นก่อตัวเกิดขึ้นภายในระยะเวลาสั้นๆ และเกิดขึ้นรวดเร็วในเวลาเซลล์สัมผัสกับสารเคมี หรือเชื้อโรค โดยทั่วไปร่างกายจะมีกลไกในการซ่อมแซมเพื่อให้เป็นปกติได้เหมือนเดิมหากไม่ได้รับสารเคมีหรือติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน ส่วนการเปลี่ยนแปลงในขั้นส่งเสริมเป็นการสะสมความผิดปกติในขั้นตอนแรก ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติแบ่งเซลล์เกิดเป็นเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ ส่วนขั้นก้าวหน้านั้นเป็นขั้นตอนที่เนื้อเยื่อที่ผิดปกติแพร่กระจายไปจากอวัยวะหนึ่งไปอีกอวัยวะหนึ่ง หรือจากเนื้อเยื่อที่ผิดปกติเพียงเล็กน้อยหรืออยู่ในขอบเขตจำกัดแพร่กระจายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่วนมากจะใช้เวลานานมากเป็นหลาย ๆ ปี¹

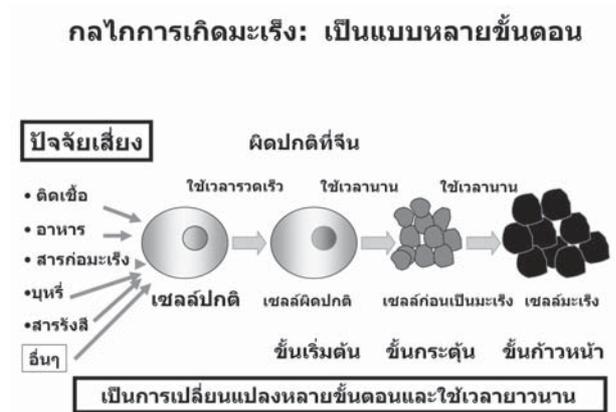
การเปลี่ยนแปลงในระดับจีนโดยเฉพาะการผ่าเหล่า (mutation) เป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการก่อมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายได้ โดยกลุ่มจีนที่เป็นเป้าหมายและเกี่ยวข้องในกระบวนการก่อมะเร็งได้แก่ proto-oncogenes, tumor suppressor genes และ apoptosis genes สำหรับสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจีนเกิดจากการที่เราได้

รับปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น สารก่อมะเร็งจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งอาจจะเป็นสารเคมี รังสี หรือเชื้อโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเชื้อไวรัส แบคทีเรีย หรือตัวพยาธิ เป็นต้น² ดังรูปที่ 1

โรคมะเร็งที่เกิดจากการติดเชื้อหรือมีการอักเสบแบบเรื้อรัง

โรคมะเร็งจากการติดเชื้อหรือมีการอักเสบแบบเรื้อรังมีประมาณร้อยละ 18 ของโรคมะเร็งที่เกิดในประชากรทั่วโลก ตัวอย่างของโรคมะเร็งกลุ่มนี้เช่น โรคมะเร็งกระเพาะอาหารที่เกิดจากแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* โรคมะเร็งตับที่เกิดจากไวรัสตับ Hepatitis B และ C virus รวมทั้งโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* เป็นต้น ในปัจจุบันมีหลักฐานที่ชัดเจนว่ากลไกการเกิดมะเร็งเหล่านี้เกิดมาจากกระบวนการอักเสบ³ ซึ่งกระบวนการอักเสบนี้เกิดจากการที่ภาวะด้านภูมิคุ้มกันของร่างกายที่พยายามสร้างสารกลุ่มอนุมูลอิสระจำนวนมากหรือเพื่อต่อต้านเชื้อโรค แต่อนุมูลอิสระเหล่านี้ยังสามารถทำอันตรายต่อดีเอ็นเอของเซลล์ร่างกายของเราเองได้ โดยเฉพาะถ้าการทำลายดีเอ็นเอในกลุ่มจีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ซึ่งเป็นขั้นตอนก่อตัวของกระบวนการเกิดก่อมะเร็ง นอกจากนี้กระบวนการอักเสบยังมีการหลั่งสารไซโตไคน์ออกมาจำนวนมาก ซึ่งเหนี่ยวนำเซลล์อักเสบและส่งเสริมการแสดงออกของจีนมากมาย ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติเปลี่ยนแปลงและมีโอกาสถูกทำลายได้มากขึ้นจากสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ ในที่นี้จะขอกกล่าวเฉพาะ “กลไก

การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ” ซึ่งจัดว่าเป็นตัวอย่างหนึ่งในกลุ่มมะเร็งที่เกิดมาจากการติดเชื้อ⁴



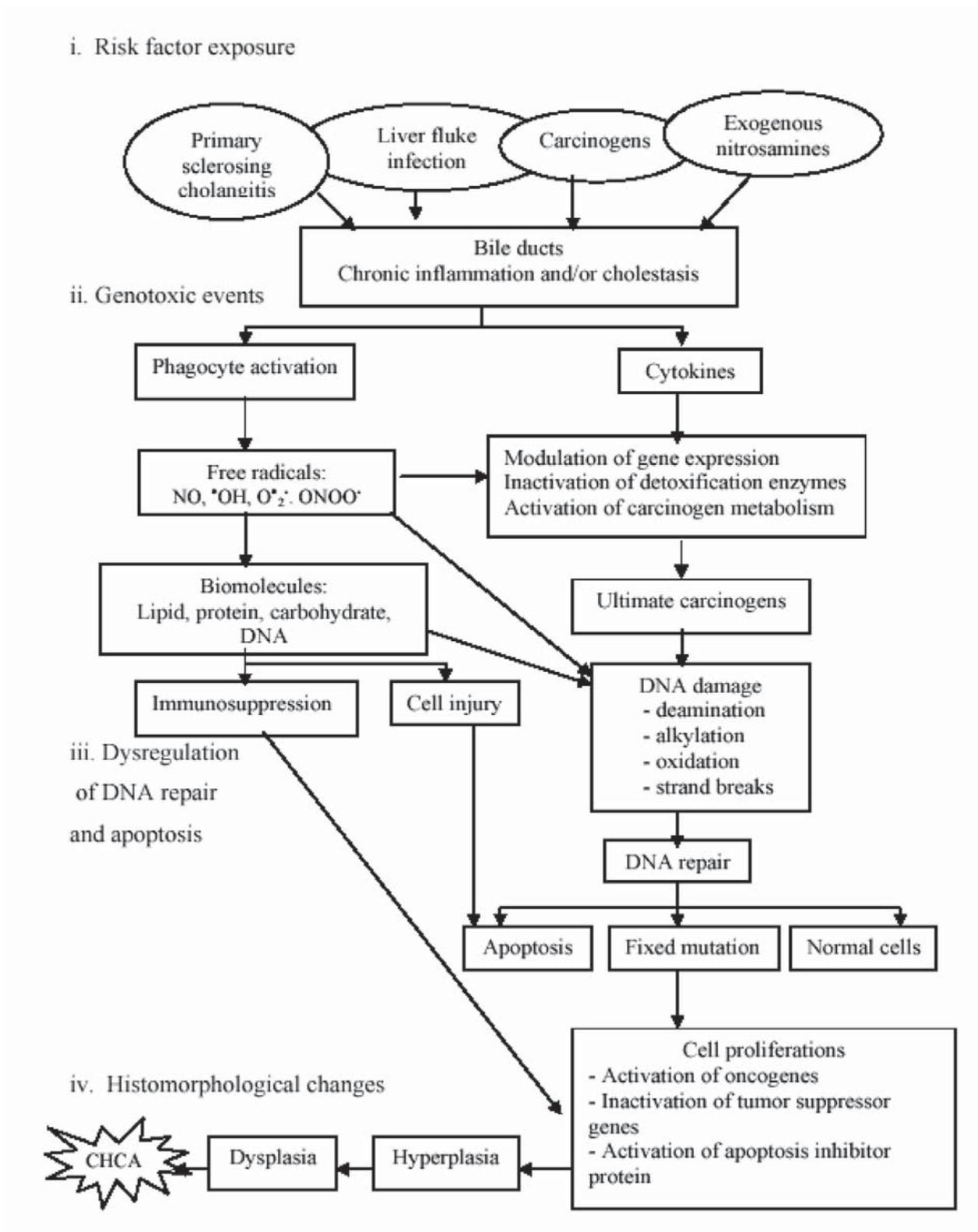
รูปที่ 1 กลไกการเกิดมะเร็ง เป็นแบบหลายขั้นตอน และใช้เวลานาน (ดัดแปลงจาก Loft & Poulsen, 1996 : Ohshima et al., 2003).

กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุล

ในปีคศ. 1994 Ohshima และ Bartsch⁵ ได้ตั้งสมมุติฐานของกลไกการเกิดมะเร็งที่เกิดจากการติดเชื้อหรือการอักเสบแบบเรื้อรัง ซึ่งต่อมาสมมุติฐานนี้ได้ถูกเพิ่มเติมให้สมบูรณ์ขึ้นโดย Holzinger et al.⁶ ในปี 1999 (รูปที่ 2) กล่าวโดยสรุปดังนี้คือ เมื่อมีการติดเชื้อเช่นพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (OV) แอนติเจนของ OV จะไปกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน และเกิดการเหนี่ยวนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (ได้แก่ macrophages, eosinophils และ neutrophils เป็นต้น) ให้เคลื่อนที่มาชุมนุมยังบริเวณที่มีการติดเชื้อ ในขณะที่เดียวกันเซลล์เหล่านี้ก็จะถูกกระตุ้นให้สร้างสารอนุมูลอิสระจำนวนมาก สารอนุมูลอิสระประกอบด้วย 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น และกลุ่ม reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งตัวที่สำคัญคือ nitric oxide (NO) และ peroxynitrite ($ONOO^-$) อนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่เพียงแต่จะทำลายพยาธิ OV แต่ยังสามารถเปลี่ยนแปลงทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ชนิดอันได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน และลิพิดของเซลล์ร่างกายด้วยเช่นกัน การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญที่นำไปสู่การก่อมะเร็งคือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียหายด้วยปฏิกิริยาต่างๆ เช่น deamination, alkylation, oxidation และ nitration⁷ หรือทำลายโครงสร้าง

ของดีเอ็นเอ (DNA strand break) เป็นต้น การทำลาย ดีเอ็นเอโดยสารอนุมูลอิสระนี้เกิดขึ้นได้ตลอดเวลาในทุกๆ ขั้นตอนของกระบวนการก่อมะเร็งไม่ว่าจะเป็น ขั้นก่อตัว ขั้นส่งเสริมหรือขั้นก้าวหน้า โดยปกติเมื่อเกิดการทำลายดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอจะมีระบบซ่อมแซม ด้วยเอ็นไซม์ (DNA repairing enzyme) แต่หากมีการสะสมของเบสที่ผิดปกติเพิ่มมากขึ้น จนเกินขีดความสามารถของการซ่อมแซม ก็จะส่งผลให้เกิดการผ่าเหล่าของจีนได้ในทุกกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็ง ดังมีรายงานความผิดปกติของกลุ่มจีนส่งเสริมการก่อมะเร็ง oncogene ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเช่น c-myc, K-ras และ c-erbB-2 เป็นต้น (ดูเพิ่มเติมบท “การแสดงออกและการทำงานของจีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งท่อน้ำดี”) รวมทั้งยังมีความผิดปกติของกลุ่ม tumor suppressor gene ที่สำคัญคือ p53 หากจีนนี้ผิดปกติไปจะทำให้เซลล์ไม่หยุดแบ่งตัวในขณะที่เซลล์ยังมีความผิดปกติ และในขณะเดียวกันยังทำให้การตายแบบ apoptosis ถูกยับยั้ง ซึ่งเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์ที่มีการผ่าเหล่าแบ่งตัวต่อไปอย่างไม่หยุดยั้งและหลุดรอดจากการ ตายแบบ apoptosis ไปได้อีกด้วย นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ lymphocyte เกิดภาวะการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติไม่ถูก ทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกัน เป็นเหตุให้เซลล์มะเร็งเติบโตได้ต่อไป

ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการยอมรับ (susceptibility) ต่อการเกิดมะเร็งคือการที่พยาธิใบไม้ซึ่งอาศัยอยู่ในท่อน้ำดี ท่อน้ำดี ตัวพยาธิจะเคลื่อนที่ในท่อน้ำดี ทำให้เกิดการระคายเคืองเสียดสีภายในท่อน้ำดีส่งผลทำให้เซลล์เยื่อผิวท่อน้ำดีบาดเจ็บ หรือเกิดการหลุดลอก ผ่นวกกับการที่เซลล์เกิดการบาดเจ็บจากอนุมูลอิสระ จึงทำให้มีการตายและเกิดการหลุดลอกของเซลล์ เยื่อผิวท่อน้ำดีตลอดเวลา เป็นเหตุให้เกิดการเหนี่ยวนำ การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว เพื่อสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนเป็นอย่างมาก (hyperplasia) นอกจากนี้สารคัดหลั่งบางชนิดจากพยาธิก็สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ เยื่อผิวท่อน้ำดีเร็วขึ้นด้วย ดังนั้นหากมีการแบ่งเซลล์ของเยื่อผิวท่อน้ำดีในขณะที่มีความผิดปกติของจีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง จะเป็นการส่งเสริมให้เข้าสู่ขั้นตอน promotion และ progression ของกระบวนการก่อมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้บริเวณที่ติดเชื้อยังมีการซ่อมแซม โดยการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrosis) เป็นอย่างมาก การเกิดเนื้อเยื่อพังผืดรอบท่อน้ำดี (periductal fibrosis) อาจส่งผลให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำดี (obstructive jaundice) ทำให้มีการคั่งของน้ำดี มีการติดเชื้อซ้ำจากแบคทีเรีย น้ำดีที่ผิดปกติอาจไปทำลายเยื่อผิวท่อน้ำดีและเป็นปัจจัยเสริมในขั้นตอน promotion ได้เช่นกัน

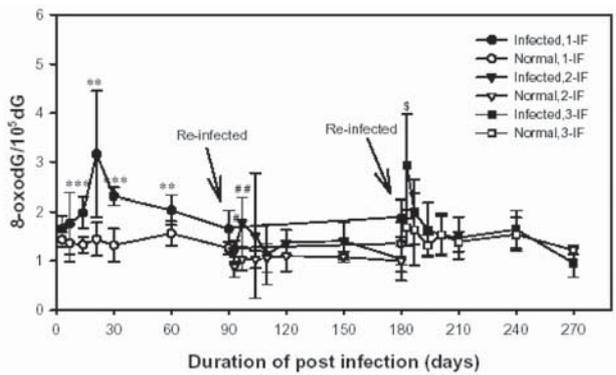


รูปที่ 2 สมมุติฐานของกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (ดัดแปลงจาก Ohshima & Bartsch, 1994 และ Holzinger, 1999)

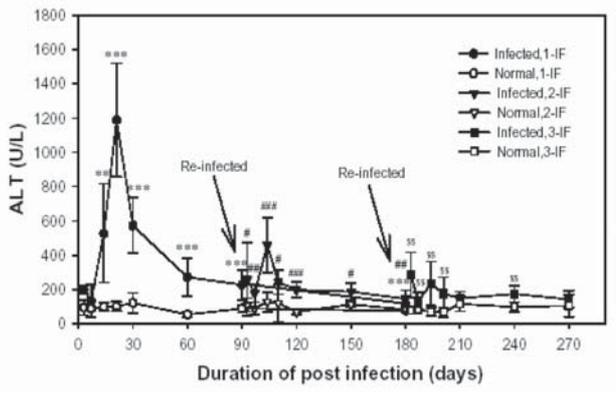
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรังและซ้ำซากก่อให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ : หลักฐานจากสัตว์ทดลอง

การศึกษาของคณะผู้วิจัยจากศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สามารถแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรังในหนูแฮมสเตอร์ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบแบบเรื้อรังในท่อน้ำดี และส่งผลให้มีการสร้างสารประกอบที่เป็นอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) และไนโตรเจน (reactive nitrogen species; RNS) จำนวนมาก ซึ่งสารเหล่านี้สามารถทำความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจีน และมีโอกาสเสี่ยงนำไปสู่การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปได้ โดยผลการศึกษานี้สามารถแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี หลังจากสัตว์ทดลองได้รับเชื้อพยาธิใบไม้ตับ โดยการตรวจพบระดับของเบสชนิดดีเอ็นเอที่ถูกเปลี่ยนแปลงไปเพิ่มสูงขึ้น คือ 8-oxodG และ 8-nitroguanine ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจนตามลำดับ^๑

การทดลองเรื้อรังต่อไปพบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิซ้ำเป็นครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่ามีจะเกิดการการทำลายดีเอ็นเอใหม่ทุกครั้ง และความรุนแรงของการทำลายเกิดได้รวดเร็วขึ้นตามจำนวนครั้งของการติดเชื้อซ้ำ กล่าวคือพบการทำลายดีเอ็นเอจนถึงจุดสูงสุดที่ 21 วัน, 7 วัน และ 3 วัน ของการติดเชื้อครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ^๑ (รูปที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าความรวดเร็วของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับรวมทั้งการตอบสนองของเซลล์อักเสบและการตายของเนื้อเยื่อ (ซึ่งดูจากเอนไซม์ตับ, alanine aminotransferase, (ALT) (รูปที่ 4) จะมีความรุนแรงสูงสุดในวันที่ 21 ของการติดเชื้อ



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของระดับเบส 8-OxodG ในตับของแฮมสเตอร์เมื่อให้พยาธิ OV จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC/ECD (** P < 0.01, * P < 0.001 เมื่อติดเชื้อ 1 ครั้ง; # P < 0.05, ## P < 0.01 เมื่อติดเชื้อ 2 ครั้ง; \$\$\$ P < 0.05 เมื่อติดเชื้อ 3 ครั้ง เทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเอนไซม์ ALT ในพลาสมาของแฮมสเตอร์เมื่อให้พยาธิ OV จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง (** P < 0.01, * P < 0.001 เมื่อติดเชื้อ 1 ครั้ง; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 เมื่อติดเชื้อ 2 ครั้ง; \$\$\$ P < 0.01 เมื่อติดเชื้อ 3 ครั้ง เทียบกับกลุ่มควบคุม)

ครั้งเดียว, วันที่ 7 ของการติดเชื้อสองครั้ง และวันที่ 3 ของการติดเชื้อสามครั้ง ในขณะที่ในระยะเรื้อรังของการติดเชื้อครั้งเดียวและการติดเชื้อซ้ำ จำนวนเซลล์อักเสบจะลดลงแต่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเพิ่มขึ้น การติดเชื้อ OV ซ้ำสามครั้ง สองครั้งและครั้งเดียว จะเห็นว่าจำนวนเซลล์อักเสบให้เคลื่อนที่มารวดเร็วขึ้นเป็นลำดับ และเซลล์อักเสบนี้จะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในตับและความหนาตัวของเนื้อเยื่อ¹⁰

โดยรวมอาจสรุปได้ว่า การศึกษาของคณะผู้วิจัยแสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทำให้เกิดในการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดีได้เป็นจำนวนมากในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อในสัตว์ทดลอง และเมื่อติดเชื้อนานถึง 90 วันก็ยังสามารถตรวจ พบความผิดปกติเหล่านี้ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสัตว์ทดลองนั้นมีการติดเชื้อซ้ำๆ ถึง 3 ครั้ง ดังนั้นการที่สัตว์ทดลอง ได้รับเชื้อพยาธิซ้ำจึงเป็นการเก็บสะสมการทำลาย ดีเอ็นเอซึ่งเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็งอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ นอกจากนี้การติดเชื้อพยาธิยังทำให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดีหลุดลอกและมีการแบ่งเซลล์จำนวนมาก ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้เซลล์ที่เกิดใหม่เหล่านี้เกิดการผ่าเหล่ามากยิ่งขึ้น

ดังนั้นการศึกษาในสัตว์ทดลองจึงเป็นหลักฐานที่สามารถแสดงให้เห็นว่าผู้ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำซากด้วยการรับประทานปลาดิบที่มีพยาธิตัวอ่อนเป็นประจำ น่าจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Loft S and Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med.* 1996;74:297-312.
2. Ohshima H, Tatemichi M, and Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2003;417:3-11.
3. Coussens LM and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-7.
4. Hussain SP, Hofseth LJ, and Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:276-85.
5. Ohshima H and Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994;305: 253-64.
6. Holzinger F, Z'Graggen K, and Buchler MW. Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenetic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol.* 1999;10 Suppl 4:122-6.
7. Kawanishi S, Hiraku Y, and Inoue S. DNA damage induced by Salmonella test-negative carcinogens through the formation of oxygen and nitrogen-derived reactive species (review). *Int J Mol Med.* 1999;3:169-74.
8. Pinlaor S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Semba R, Oikawa S, and et al. 8-Nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:567-71.
9. Pinlaor S, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, and et al. Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis.* 2004;25:1535-42.
10. Pinlaor S, Sripa B, Sithithaworn P, and Yongvanit P. Hepatobiliary changes, antibody response, and alteration of liver enzymes in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini*. *Exp Parasitol.* 2004;108:32-9.

