



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกระดับโมเลกุลของการกระตุ้นให้เกิดการลดลงของการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอไลน์วันโดยภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (The molecular mechanisms of oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation in bladder cancer cells)

โดย ชัญชัย บุญหล้า

มีนาคม 2560

สัญญาเลขที่ RSA5680019

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกระดับโมเลกุลของการกระตุ้นให้เกิดการลดลงของการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอไลน์วันโดยภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (The molecular mechanisms of oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation in bladder cancer cells)

ชาญชัย บุญหล้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code :

(รหัสโครงการ)

Project Title :

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address :

Project Period :

(ระยะเวลาโครงการ)

เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย วัตถุประสงค์ วิธีทดลอง ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง
และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

บทนำ วิธีการทดลอง ผลการทดลอง บทวิจารณ์ หนังสืออ้างอิง

Keywords : จำนวน 3-5 คำ

(คำหลัก)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) พร้อมแจ้งสถานะของการตีพิมพ์ เช่น submitted, accepted, in press, published
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ด้วยเงินทุนพัฒนานักวิจัย RSA5680019 และกราบขอภัยที่บางครั้งส่งรายงานล่าช้ากว่าที่กำหนด

ขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ร่วมงานวิจัยด้วยกันมาจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบคุณทีมแพทย์พยาบาล เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลบุรีรัมย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องช่วยให้งานวิจัยสำเร็จได้ ขอขอบคุณนิสิตทุกคนที่ทุ่มเททำงานวิจัยจนสำเร็จลงได้ และที่สำคัญขอบคุณผู้ป่วยทุกท่านที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ

ขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนให้คณาจารย์ทำงานวิจัยได้เต็มที่

ขอบคุณผู้ร่วมวิจัยในต่างประเทศ Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz, Department of Urology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany และขอบคุณ Alexander von Humboldt Foundation สำหรับการสนับสนุนให้ไปทำวิจัยบางส่วนที่ต่างประเทศ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5680019
ชื่อโครงการ : กลไกระดับโมเลกุลของการกระตุ้นให้เกิดการลดลงของการเติมหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอไลนวันโดยภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
ชื่อนักวิจัย : ชานชัย บุญหล้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address : chanchai.b@chula.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

งานวิจัยนี้ศึกษากลไกของ oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation การแสดงออกของ 5-methylcytosine (5mC), hOGG1, LINE-1 ORF1 protein (ORF1p) และ oxidative stress marker (4-HNE) ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และศึกษาการแสดงออกของ ORF1p ภายใต้ภาวะ oxidative stress ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ผลการศึกษาพบว่า reactive oxygen species (ROS) กระตุ้น oxidative stress และทำให้การสร้าง methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) ในเซลล์ลดลง ส่งผลให้เกิด DNA hypomethylation ที่ LINE-1 elements ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระ (tocopheryl acetate และ N-acetylcysteine) และสารตัวกลางใน one-carbon metabolism (methionine, SAM และ folic acid) สามารถยับยั้งการเกิด ROS-induced LINE-1 hypomethylation ได้ ระดับการแสดงออกของ 5mC ลดลง ขณะที่ ORF1p และ 4-HNE เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ไม่ใช่มะเร็ง การแสดงออกของ ORF1p ใน muscle-invasive และ high-grade tumors สูงกว่าใน non-muscle-invasive และ low-grade tumors อย่างมีนัยสำคัญ ในเซลล์ VM-CUB-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ROS มีการแสดงออกของ ORF1p เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ ROS ไม่สามารถกระตุ้นให้มีสร้างใหม่ของ ORF1p ได้ใน UM-UC-3 เซลล์ TCCSUP และ UM-UC-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ROS เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย ROS ผลการทดลอง ChIP-qPCR พบ enrichment ของ full-length LINE-1 elements ที่ active chromatin mark H3K18ac ในเซลล์ VM-CUB-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ROS ขณะที่ในเซลล์ UM-UC-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ROS จะพบ enrichment ของ full-length LINE-1 elements ที่ heterochromatin H3K9me3 และ H3K27me3 งานวิจัยนี้สรุปว่า ROS ทำให้เกิด LINE-1 hypomethylation โดยลดการสร้าง SAM ในเซลล์ และ ROS ทำให้เซลล์มะเร็งมี progression มากขึ้น การแสดงออกของ ORF1p สูงขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและสัมพันธ์กับ tumor progression ผลการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะบ่งชี้ว่า ROS กระตุ้นให้มีการแสดงออกมากขึ้นโดยเพิ่มการเกิด open chromatin mark H3K18ac ที่ full-length LINE-1 elements อย่างไรก็ตาม ROS ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด de novo expression ของ ORF1p ได้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้แนะนำว่าการใช้สารที่สามารถลดระดับ oxidative stress ได้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และช่วยยับยั้ง tumor progression ได้

คำหลัก : ไลนวัน, ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน, มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ, ภาวะเหนือพันธุกรรม, การดำเนินโรคมะเร็ง

Abstract

Project Code : RSA5680019
Project Title : The molecular mechanisms of oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation in bladder cancer cells
Investigator : Chanchai Boonla Chulalongkorn University
E-mail Address : chanchai.b@chula.ac.th
Project Period : 3 years

In this study, we investigated mechanism of oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation, expressions of 5-methylcytosine, hOGG1, LINE-1 ORF1 protein (ORF1p) and oxidative stress marker (4-HNE) in bladder cancer tissues, and mechanism of reactive oxygen species (ROS) on induction of ORF1p expression in bladder cancer cells. Our data showed that ROS provoked oxidative stress, caused depletion of cellular methyl donor S-adenosylmethionine (SAM), and that subsequently led to hypomethylation of LINE-1 elements. Supplements with either antioxidants (tocopheryl acetate and N-acetylcysteine) or metabolites in one-carbon metabolism pathway (methionine, SAM and folic acid) significantly inhibited the ROS-induced LINE-1 hypomethylation. Expression level of 5mC was significantly decreased, while ORF1p and 4-HNE were increased, in bladder cancer tissues compared with the noncancerous counterparts. ORF1p expression in muscle-invasive and high-grade tumors were significantly higher than that of non-invasive and low-grade tumor, respectively. In VM-CUB-1 cells treated with ROS, expression of ORF1p was significantly increased compared with the untreated controls. However, ROS was not able to induce de novo expression of ORF1p in ORF1p-silencing UM-UC-3 cells. TCCSUP and UM-UC-3 cells exposed to ROS migrated faster than the unexposed cells. Based on ChIP-qPCR, full-length LINE-1 elements were enriched by active chromatin mark H3K18ac in ROS-treated VM-CUB-1 cells. In contrast, enrichment of LINE-1 elements in ROS-treated UM-UC-3 cells was found at heterochromatin H3K9me3 and H3K27me3. In conclusion, we demonstrated that LINE-1 hypomethylation induced by ROS was mediated through SAM depletion. ROS also promoted progression of bladder cancer cells. Expression of ORF1p was elevated in bladder cancer tissues and its increment was associated with increased tumor progression. Experimentally, we showed that ROS induced ORF1p expression through formation of open chromatin mark H3K18ac. However, ROS was not capable of inducing de novo expression of ORF1p in ORF1p-silencing cells. Approaches to attenuate oxidative stress might be useful for preventing LINE-1 hypomethylation and reactivation in bladder cancer and hence decelerating tumor progression.

Keywords : LINE-1, oxidative stress, bladder cancer, epigenetic, tumor progression

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการตายอันดับหนึ่งทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย รายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของไทย พบผู้ป่วยรายใหม่ในปี 2010 สูงถึง 25,476 ราย [1] ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญมาก มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder cancer หรือ urothelial cancer หรือ transitional cell carcinoma) ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ที่ 4.2 คนต่อประชากร 100,000 คน สำหรับผู้ชาย และ 1.3 คนต่อประชากร 100,000 คน สำหรับผู้หญิง [2] เพื่อที่จะลดอุบัติการณ์ของโรคนี้จำเป็นต้องทราบกลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและการดำเนินของโรคในผู้ป่วยไทย

กลไกการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ทราบว่าเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ (genetic mutation) และการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรม (epigenetic alteration) นอกจากนี้ปัจจัยที่พบว่าส่งเสริมการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ การอักเสบ และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) [3-5] หลายงานวิจัยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ [5-8] โดย reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นในภาวะ oxidative stress จะมีผลต่อทั้ง genetic mutations และ epigenetic alterations [9] สำหรับ epigenetic alterations ที่พบบ่อยในมะเร็ง คือ ความผิดปกติของ DNA methylation ได้แก่ global hypomethylation และ regional (site-specific CpG island promoter) hypermethylation [10, 11] ซึ่ง global DNA hypomethylation มักจะพบในดีเอ็นเอที่เป็น repetitive และ retrotransposon elements [12] การเกิด DNA hypomethylation นี้จะส่งผลให้จีโนมไม่เสถียร (genomic instability) ต่อไป [13, 14] retrotransposon ที่มีมากที่สุดไนจีโนมและมีการศึกษามากที่สุด คือ long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) และพบว่า LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [15-17]

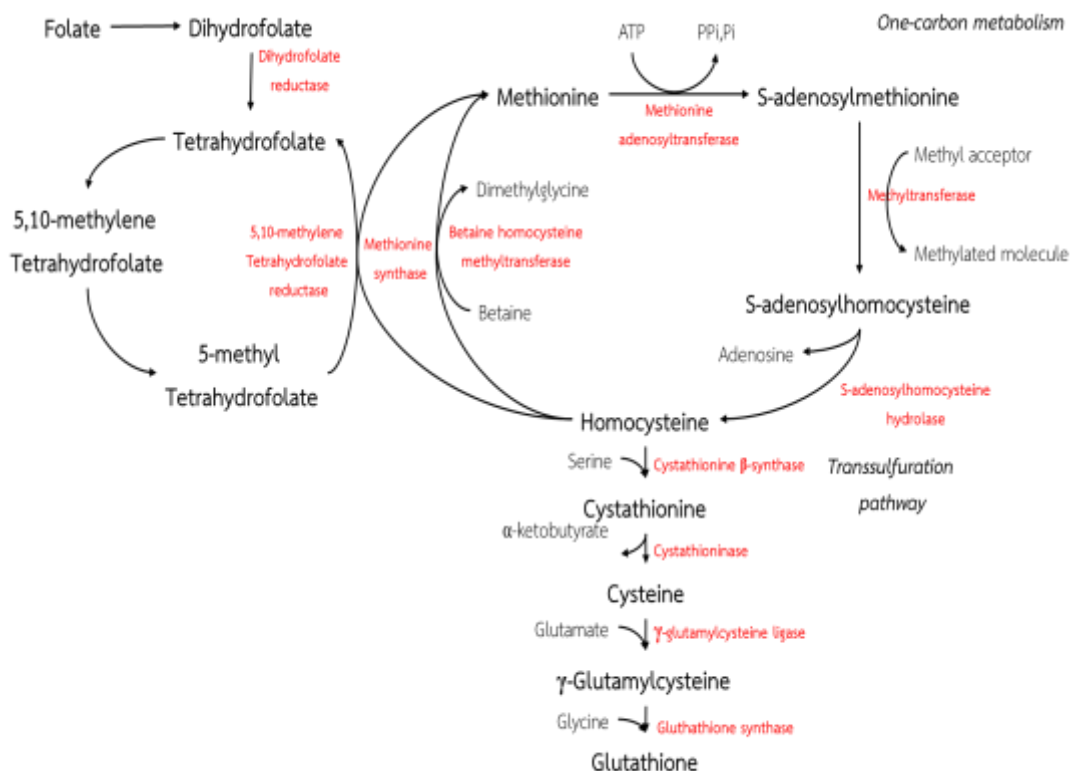
Long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1 หรือ L1s) เป็น retrotransposon ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มีประมาณร้อยละ 17 ของจีโนมทั้งหมด [18, 19] LINE-1 จัดอยู่ในกลุ่ม non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposon มีขนาด (full-length) ประมาณ 6 kb ซึ่ง LINE-1 เป็น mobile DNA ชนิดเดียวในจีโนมของมนุษย์ที่ยังทำงาน (functionally active) อยู่ และการทำงานของ LINE-1 จะส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม (genomic instability) ดังนั้น ในภาวะปกติ LINE-1 จะถูกกดการทำงานหรือกดการแสดงออก (repression/silence) ไว้ ซึ่งกระบวนการที่สำคัญในการกดการแสดงออกของ LINE-1 คือ การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) [16] หลายงานวิจัยพบว่า LINE-1 hypomethylation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ แล้วส่งผลให้จีโนมไม่เสถียร [20, 21] และที่สำคัญ LINE-1 hypomethylation มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด [15] และยังเชื่อว่าน่าจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ (markers) ของการเกิดมะเร็งหรือการดำเนินโรคของมะเร็งได้ [22] อย่างไรก็ตาม สาเหตุและกลไกของการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์มะเร็งยังไม่ทราบทั้งหมด แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับ DNA methylation ด้วย สำหรับปฏิกิริยาการเกิด DNA methylation จะอาศัยการทำงาน

ของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) และใช้ S-adenosylmethionine (SAM) เป็นตัวให้หมู่เมทิล (methyl donor) ดังนั้น ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า กลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์มะเร็งน่าจะเกี่ยวข้องกับการลดลงของ SAM ในเซลล์

SAM เป็นสารตัวกลาง (metabolite) ที่สำคัญของเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เมทิล (methyl donor) ในปฏิกิริยา methylation ของชีวโมเลกุลในเซลล์ ทั้งโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก เซลล์สังเคราะห์ SAM ขึ้นจาก one-carbon metabolism pathway (รูปที่ 1) โดยใช้กรดอะมิโน methionine และ adenosine triphosphate (ATP) เป็นสารตั้งต้น และเอนไซม์ methionine adenosyltransferase (MAT) ในการย้ายหมู่ adenosyl จาก ATP ไปให้ methionine เกิดเป็น SAM ซึ่งเป็น sulfonium ion ที่สำคัญที่พร้อมให้หมู่เมทิลแก่สารชีวโมเลกุลอื่น โดยต้องอาศัยเอนไซม์ methyltransferase เมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้ว SAM จะถูกเปลี่ยนเป็น S-adenosylhomocysteine (SAH) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น homocysteine (Hcy) โดยเอนไซม์ SAH hydrolase จากนั้น Hcy จะถูกเปลี่ยนกลับเป็น methionine สำหรับใช้สังเคราะห์ SAM ต่อไป อย่างไรก็ตาม นอกจาก one-carbon metabolism pathway แล้ว เซลล์ยังมีการนำ Hcy ไปใช้ใน transsulfuration pathway (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นวิถีในการสังเคราะห์ cysteine เพื่อนำไปสร้าง glutathione ในเซลล์ สำหรับใช้ในการกำจัดสารออกซิไดซ์อิสระ โดยจะใช้ Hcy เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ cystathionine อาศัยเอนไซม์ cystathionine- β -synthase และ cystathionine ที่เกิดขึ้น จะถูกเปลี่ยนไปเป็น cysteine และ glutathione ต่อไป ดังนั้น จากวิถีเมแทบอลิซึมทั้ง 2 วิถีนี้ คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า เมื่อเซลล์มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง เซลล์จะต้องสังเคราะห์ glutathione เพิ่มมากขึ้น มีการใช้ Hcy มากขึ้น ทำให้สังเคราะห์ SAM ในเซลล์ได้น้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้การเกิด DNA methylation ลดลง [23, 24]

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นภาวะไม่สมดุลระหว่างสารออกซิแดนท์ (oxidants) และ antioxidants โดยทั่วไปสารออกซิแดนท์และอนุมูลอิสระ สามารถเกิดขึ้นได้ในร่างกาย (endogenous production) ทั้งในภาวะปกติจากกระบวนการสลายสารอาหารในวิถีเมแทบอลิซึม หรือจากการได้รับการกระตุ้นจากภายนอก (exogenous sources) เช่น ยา รังสี และ สารเคมีต่างๆ ทำให้เกิดสารออกซิแดนท์และ/หรือสารอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ สารออกซิแดนท์มีหลายชนิด ที่สำคัญคือ สารที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($OH^\cdot$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่ง ROS สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลและเซลล์ได้ ทำให้สารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น โปรตีน ไขมัน ไม่เสถียรและเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่กับโมเลกุลอื่นหรือเซลล์ข้างเคียงได้ ส่งผลให้สารชีวโมเลกุลสูญเสียหน้าที่ และส่งผลให้เกิดอาการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) รวมไปถึงสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ ยิ่งไปกว่านั้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันสามารถส่งผลต่อการเกิด epigenetic change โดยเฉพาะ DNA methylation ได้ และเกี่ยวข้องกับการเกิดและการลุกลามของมะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม ปกติร่างกายจะมีกลไกที่สำคัญในการกำจัด ROS เพื่อยับยั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidants, ROS scavengers) หลายชนิด ทั้งที่ร่างกายสร้างเองได้ ที่สำคัญ

คือ glutathione ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักภายในเซลล์ และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากอาหาร เช่น vitamin C และ vitamin E เป็นต้น [25-27]



รูปที่ 1 แสดงวิถี one-carbon metabolism และ transsulfuration โดย one-carbon metabolism สังเคราะห์ SAM รวมถึง Hcy ถึงเป็นจุดเชื่อมต่อกับ transsulfuration pathway ที่ใช้ Hcy เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ cysteine เพื่อนำไปสร้าง glutathione ในเซลล์ (ดัดแปลงจาก Lu S.C., 2000) [28]

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเกิดเมทิลเลชันของ LINE-1 ในคนปกติที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของ Patchsung และคณะ ในปี 2012 [17] พบว่าการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน มีความสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ LINE-1 methylation ทั้งในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติ แสดงให้เห็นว่า LINE-1 hypomethylation ไม่น่าจะสัมพันธ์กับมะเร็งโดยตรงแต่สัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และจากการศึกษา Wongpaiboonwattana และคณะ ในปี 2013 [29] พบว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (UM-UC-3 cells) สามารถกระตุ้นการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ด้วย ROS (H_2O_2 as ROS representative) และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (tocopheryl acetate) สามารถป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกที่แน่ชัดที่อธิบายสาเหตุการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะที่มี oxidative stress หนึ่งในกลไกที่น่าจะเป็นไปได้เกี่ยวกับผลของอนุมูลอิสระต่อการเกิด DNA methylation คือ เมื่อเซลล์เกิดภาวะ

oxidative stress จะทำให้เซลล์จำเป็นต้องสร้าง glutathione เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดย glutathione ถูกสร้างมาจาก Hcy ผ่านทาง transsulfuration pathway และเมื่อเซลล์ต้องการสร้าง glutathione มากขึ้น จะทำให้ปริมาณของ Hcy ลดลง จึงถูกเปลี่ยนไปเป็น methionine เพื่อนำไปสังเคราะห์ SAM ได้น้อยลง ส่งผลให้ปริมาณของ SAM ในเซลล์ลดลง จึงทำให้เกิด DNA methylation ลดลงด้วย นำไปสู่การเกิด genome-wide DNA hypomethylation ซึ่งจากรายงานของ Niedzwiecki และคณะ ในปี 2013 [24] พบว่า ในผู้ใหญ่ที่มีระดับ glutathione ในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น สัมพันธ์กับการลดลงของ SAM และการเกิด global hypomethylation ดังนั้น คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่ากลไกที่ ROS กระตุ้นให้เกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ น่าจะมาจากการรบกวน one-carbon metabolism pathway และ transsulfuration pathway ทำให้การสังเคราะห์ SAM ในเซลล์ลดลงและไม่เพียงพอต่อการเกิด DNA methylation

อีกกลไกหนึ่งที่จะทำให้เกิด LINE-1 hypomethylation ภายใต้ภาวะ oxidative stress คือ การเกิด oxidized DNA lesions จากการโจมตีของ ROS ซึ่ง oxidative DNA lesion ที่ศึกษากันมาก คือ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) หรือ 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) หากเกิด lesion นี้ที่ตำแหน่ง CpG dinucleotides จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNMT ในการเติมหมู่เมทิลที่ C residue ที่ติดกับ oxidized G (8-OHdG or 8-oxo-dG) [30] จึงทำให้ระดับ DNA methylation ลดลง อย่างไรก็ตาม เซลล์มีกระบวนการซ่อมแซม oxidized DNA ที่เกิดขึ้นจาก ROS ด้วยกลไก base excision repair (BER) ซึ่ง ขั้นตอนแรกในการจดจำและตัด 8-OHdG ออกไปจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 8-oxo-dG DNA glycosylase (hOGG1 for human)

คณะผู้วิจัยคาดว่าเมื่อเกิด LINE-1 hypomethylation มากขึ้น น่าจะสามารถทำให้เกิด reactivation ของ full-length LINE-1 elements ได้ แล้วส่งผลให้เกิด LINE-1 mobilization และ genomic instability ต่อไป ซึ่ง full-length LINE-1 elements จะสร้างโปรตีนได้ 2 ชนิด ที่จำเป็นต่อการเกิด LINE-1 retrotransposition คือ LINE-1 ORF1 protein (ORF1p) และ ORF2p มีรายงานวิจัยที่พบว่ามี การแสดงออกของ full-length LINE-1 สูงขึ้นในมะเร็ง โดยเฉพาะ ORF1p และแนะนำว่า LINE-1 proteins น่าจะใช้เป็น marker ของมะเร็งได้ [31] อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ทำให้ LINE-1 proteins แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งภายใต้ภาวะ oxidative stress

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ภายใต้ภาวะเครียด จากออกซิเดชันในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยศึกษาทั้งในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากผู้ป่วย เพื่อดูการแสดงออกของ 5-methylcytosine (5mC), hOGG1, ORF1p และ 4-hydroxynonenal (4-HNE ใช้เป็น oxidative stress marker) และศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะว่า ROS ทำให้เซลล์มีการสร้าง SAM ลดลงแล้วส่งผลให้เกิด LINE-1 hypomethylation หรือไม่ ROS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ORF1p ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้หรือไม่ หากได้ผ่านกลไก chromatin remodeling หรือไม่ ตำแหน่ง LINE-1 elements มี heterochromatin ลดลงและมี active chromatin เพิ่มขึ้นหรือไม่ ผล

การศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การเข้าใจสาเหตุและกลไกในการเปลี่ยนแปลงการเกิด DNA methylation และ histone modification ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ในอนาคต

วิธีการทดลอง

การศึกษานี้เป็น observational analytical study ใน human study ที่ใช้ bladder cancer tissues และเป็น experimental analytical study ใน cell culture study

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ normal human kidney cells (HK-2) และ bladder cancer cell lines อีก 3 ชนิด คือ TCCSUP, UM-UC-3 และ VM-CUB-1 เลี้ยงเซลล์ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% pen-strep under 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ใช้ H₂O₂ เป็นตัวแทนของ ROS สำหรับกระตุ้นให้เกิด oxidative stress ในเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ คือ Tocopheryl acetate (TA, 300 µM) และ S-adenosylmethionine (SAM, 100 µM) ขนาด (dose) ของ H₂O₂ ที่ใช้ จะเป็นขนาดที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ (non-toxic dose) แต่ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด oxidative stress ได้ ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (cell viability test) และวัดระดับการสร้าง ROS ในเซลล์ด้วยวิธี Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay [32]

ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากผู้ป่วยจำนวน 36 ราย ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ เก็บโดยศัลยแพทย์ระบบปัสสาวะที่ร่วมโครงการวิจัย นายแพทย์เชาว์วัศ พิมพิรัตน์ และนายแพทย์อุดมศักดิ์ วิจิตรเศรษฐกุล เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อใน 10% buffered formalin จากนั้นตัดชิ้นเนื้อให้ได้ 3 µM tissue sections เพื่อทำการย้อม hematoxylin & eosin (H&E) และย้อม immunohistochemistry งานวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจริยธรรมการวิจัยจาก คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ของโรงพยาบาลบุรีรัมย์

ย้อมชิ้นเนื้อ immunohistochemical (IHC) staining

นำ tissue section มาทำ deparaffinization และ rehydration ตามด้วย antigen retrieval ใน citrate buffer, pH 6.0 ทำลาย endogenous peroxidase ในละลาย 0.3% H₂O₂ (30 min) แล้ว block non-specific binding ด้วย normal horse serum (20 min) incubate กับ primary antibodies (5mC, hOGG1, ORF1p และ 4-HNE Ab) ที่ 4°C ข้ามคืน ล้างด้วย TBST buffer แล้ว incubate กับ biotinylated universal antibody (anti-mouse และ anti-rabbit) (1 h) ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST buffer แล้ว incubate กับ ABC reagent (Vectastain Elite ABC Universal Kit) ทำให้เกิดสีด้วย DAB reagent (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate Kit) ผลบวกจะเกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาล (brown precipitate) ในเซลล์ H&E staining ย้อมด้วยวิธีมาตรฐาน

การอ่านผลระดับการแสดงออกของ 5mC, hOGG1, ORF1p และ 4-HNE พิจารณาจากการติดสี 2 ส่วน ทั้งจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก และความเข้มของสีที่พบ จำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ 0-5% = 0, 6-25% = 1, 26-50% = 2, 51-75% = 3 and 75-100% = 4 และความเข้มของสีก็แบ่งออกเป็น 4 ระดับ เช่นกัน คือ negative = 0, + = 1, ++ = 2, +++ = 3 and ++++ = 4 ค่าคะแนนที่บอกระดับการแสดงออกในชิ้นเนื้อ (IHC score) คำนวณจากผลคูณของทั้งสองส่วนนี้ ดังนั้น คะแนนต่ำสุดจะเป็น 0 และคะแนน IHC score สูงสุดจะ เท่ากับ 16

ชนิดของมะเร็งแบ่งตามความรุนแรงแบ่งออกเป็น papillary/superficial and muscle-invasive types ส่วน histological grading แบ่งออกเป็น into papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP), low-grade tumor และ high-grade tumor ซึ่งอ่านผลและจัดกลุ่มโดยพยาธิแพทย์ที่ร่วมโครงการวิจัย นายแพทย์อนันต์ สรรพาวช ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot

สกัดโปรตีนจากเซลล์ด้วย RIPA buffer จากนั้นวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี bicinchoninic acid assay วัดระดับ protein oxidation (หนึ่งใน oxidative stress markers) ด้วยวิธี protein carbonyl determination นำโปรตีนที่ได้ไปแยกตามขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

เตรียม 10% SDS-polyacrylamide gel นำตัวอย่างโปรตีน load ลงในแต่ละ well (15 µg/well) run electrophoresis ที่ 180 V, 1.5 h ในกระบอกน้ำแข็ง ถ่ายโปรตีนจาก gel ลงบน PVDF membrane โดยใช้ wet tank blotting ที่ 180 mA, 1 h ในกระบอกน้ำแข็ง จากนั้นล้าง membrane ที่ blotted แล้ว ด้วย TBST buffer แล้ว block non-specific binding ด้วย 5% skimmed milk for 1 h ที่อุณหภูมิห้อง incubate กับ ORF1p antibody ที่ 4°C ข้ามคืน ล้างแล้วตามด้วย HRP-conjugated anti mouse antibody เป็นเวลา 1 h ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย TBST buffer แล้ว incubate กับ ECL reagent (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate) ถ่ายรูปและวัด band intensity ด้วย digital ECL scanner (LICOR) ใช้ α -tubulin เป็น loading control ระดับการแสดงออกของ ORF1p รายงานเป็นค่า ratio ของ ORF1p ต่อ α -tubulin (ORF1p-to- α -tubulin ratio)

วัดระดับ SAM, SAH, glutathione และ homocysteine (Hcy)

สารตัวอย่าง cell lysate นำมาวัดระดับ SAM และ SAH ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) [33, 34] คอลัมน์ที่ใช้คือ C18 HPLC column (vertical chromatography) mobile phase ประกอบด้วย solvent A (methanol) และ solvent B (4.5 mM octanesulfonic acid, with 50 mM phosphate buffer solution, pH 3.5) ใช้สัดส่วน A:B เป็น 30:70 Flow rate 1 mL/min และตรวจสอบด้วยการดูดกลืนแสง UV 254 nm

Glutathione ใน cell lysate วัดโดยใช้ Glutathione Assay Kit (US Biological, Salem, MA, USA) สำหรับสารมาตรฐานเป็น known GSH concentration standards (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 and 2.0 $\mu\text{g}/\text{well}$)

สำหรับ Hcy ส่งสารตัวอย่าง cell lysate ไปที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ วัดระดับ Hcy ในสารตัวอย่างโดยใช้เครื่อง automated fluorescence polarization immunoassay (Abbott Diagnostics, IL, USA)

ตรวจวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์เร้ง (wound healing assay หรือ scratch assay)

เลี้ยงเซลล์ (TCCSUP, UM-UC-3 cells) ใน 6-well plates เมื่อเซลล์เต็มพอประมาณ (confluent) ทำรอยขีด (scratch) โดยใช้ p200 pipette tip จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ใส่ conditioned media ทั้ง 3 conditions แยกกัน (untreated control, H_2O_2 and H_2O_2 + TA) ถ่ายรูปที่เวลาเริ่มต้น (0 h) และสิ้นสุด (72 h) เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อปิดรอยแผลที่ขีดไว้ ในแต่ละ condition

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำเสนอข้อมูลเป็น mean $\pm$ standard deviation (SD) หรือ median (interquartile range, IQR) ตามความเหมาะสมและการกระจายตัวของข้อมูล ใช้ t-test หรือ Mann-Whitney test สำหรับทดสอบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ใช้ anova test หรือ Kruskal-Wallis test ตามด้วย Sidak multiple comparison test สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของ 3 กลุ่มขึ้นไป Pearson correlation test หรือ Spearman rank correlation test สำหรับหาความสัมพันธ์ของ 2 continuous variables ใช้ logistic regression สำหรับคำนวณ odds ratio (OR) ใช้ Stata version 12 and GraphPad Prism 5 สำหรับการสร้างกราฟและการคำนวณทางสถิติ กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

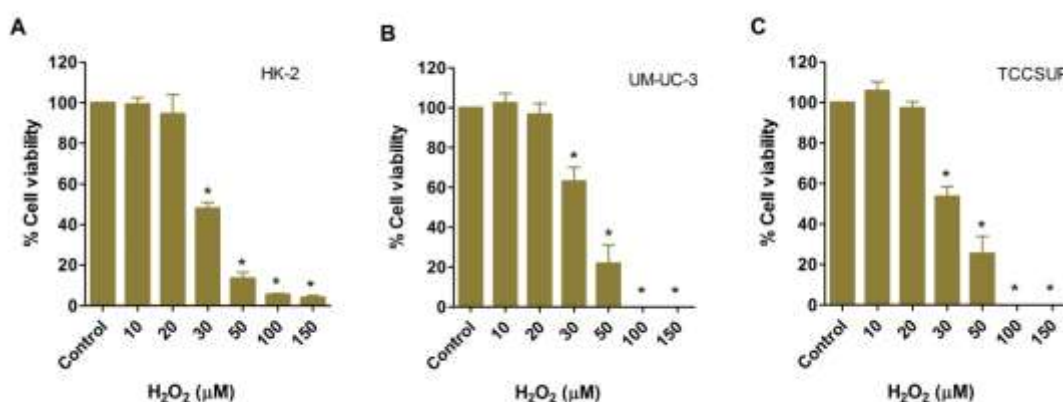
ผลการทดลอง

งานวิจัยในช่วงแรก มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 2 ชนิด ได้แก่ UM-

UC-3 และ TCCSUP cell lines และเซลล์เยื่อบุท่อไตปกติ (HK-2 cell line) กระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วย H_2O_2 และตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation, SAM, SAH และ glutathione นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการเสริม (supplement) ด้วย TA, NAC, SAM, methionine และ folate ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย H_2O_2 มีผลการศึกษาเป็นดังนี้

ผลของ H_2O_2 ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ แต่ไม่กระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงสัมผัส H_2O_2 ตั้งแต่ความเข้มข้น 0-150 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้น 10 และ 20 μM ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ H_2O_2 ในขณะที่ H_2O_2 ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 μM ขึ้นไป ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม โดยใน HK-2 cell ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 48.00 ($P < 0.0001$), 17 ($P < 0.0001$), 5.5 ($P < 0.0001$) และ 4.0 ($P < 0.0001$) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 100 และ 150 μM ตามลำดับ เช่นเดียวกับ UM-UC-3 ที่ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 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 และใน TCCSUP cells ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 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 (รูปที่ 2) ดังนั้น ในการทดสอบอื่น ๆ ต่อไปที่ต้องใช้ H_2O_2 ในการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน จะใช้ H_2O_2 ความเข้มข้นที่ 20 μM เพื่อตัดปัจจัยด้านการตายของเซลล์เข้ามารบกวนผลการทดลอง



รูปที่ 2 ความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อ HK-2 cell (A) UM-UC-3 cell (B) และ TCCSUP cell (C) เมื่อเซลล์สัมผัส H_2O_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30

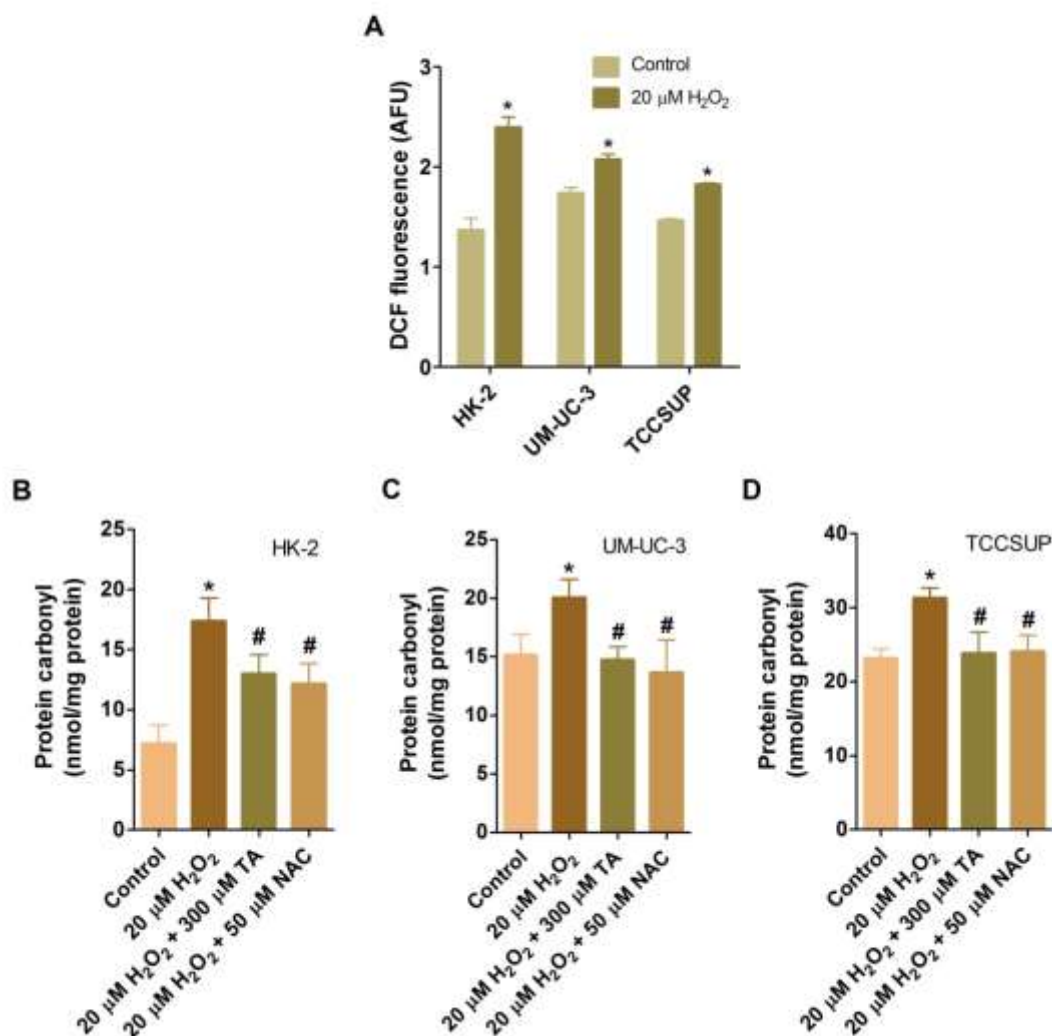
μM แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * $P < 0.05$ vs. control

ผลของ H_2O_2 ต่อการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์

เพื่อยืนยันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 จึงวัดปริมาณการสร้าง ROS ภายในเซลล์ ด้วยเทคนิค DCFH-DA พบว่า ระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้รับ H_2O_2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับเซลล์ควบคุม ($P < 0.001$) (รูปที่ 3A)

ผลการวัดระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพื่อบ่งชี้ระดับ protein oxidation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า ในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ระดับโปรตีนคาร์บอนิลจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และระดับโปรตีนคาร์บอนิลจะลดลงเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ($300 \mu\text{M}$ TA หรือ $50 \mu\text{M}$ NAC) ร่วมด้วย ทั้งใน HK-2 cells (รูปที่ 3B), UM-UC-3 cells (รูปที่ 3C) และ TCCSUP cells (รูปที่ 3D)

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า $20 \mu\text{M}$ H_2O_2 สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ทั้ง 3 ชนิดได้ และ สารต้านอนุมูลอิสระทั้ง TA และ NAC สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ได้

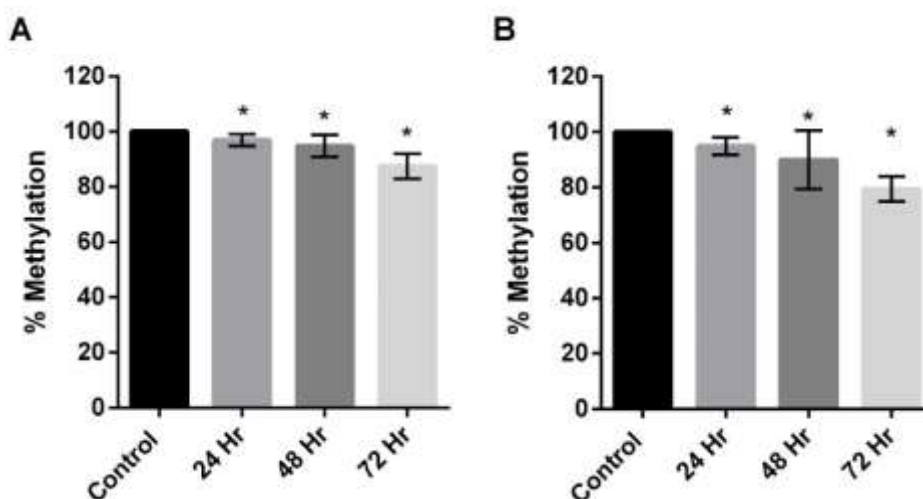


รูปที่ 3 ระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ พบว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H_2O_2 มีระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (A) ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H_2O_2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับเซลล์ควบคุม HK-2 (B), UM-UC-3 (C) และ TCCSUP (D) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H_2O_2

ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ด้วยเทคนิค COBRA PCR ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 และ TCCSUP โดยกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H_2O_2 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าระดับร้อยละ LINE-1 methylation ของเซลล์ UM-UC-3 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากร้อย

ละ 100 ในกลุ่มควบคุม เป็นร้อยละ 96.80 ($P = 0.0289$), 94.98 ($P = 0.0444$) และ 93.06 ($P = 0.0003$) ตามลำดับ (รูปที่ 4) และใน TCCSUP cell พบการลดลงของระดับ LINE-1 methylation อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกัน จากร้อยละ 100 ในกลุ่มควบคุม เป็นร้อยละ 94.85 ($P = 0.0046$), 89.96 ($P = 0.0462$) และ 79.49 ($P < 0.001$) จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับ H_2O_2 ส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ลดลงมากขึ้นตามระยะเวลาที่สัมผัส (time-dependent manner) และจากผลการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ ระยะเวลากระตุ้นเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ต่อไป เพื่อให้เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนมากที่สุด

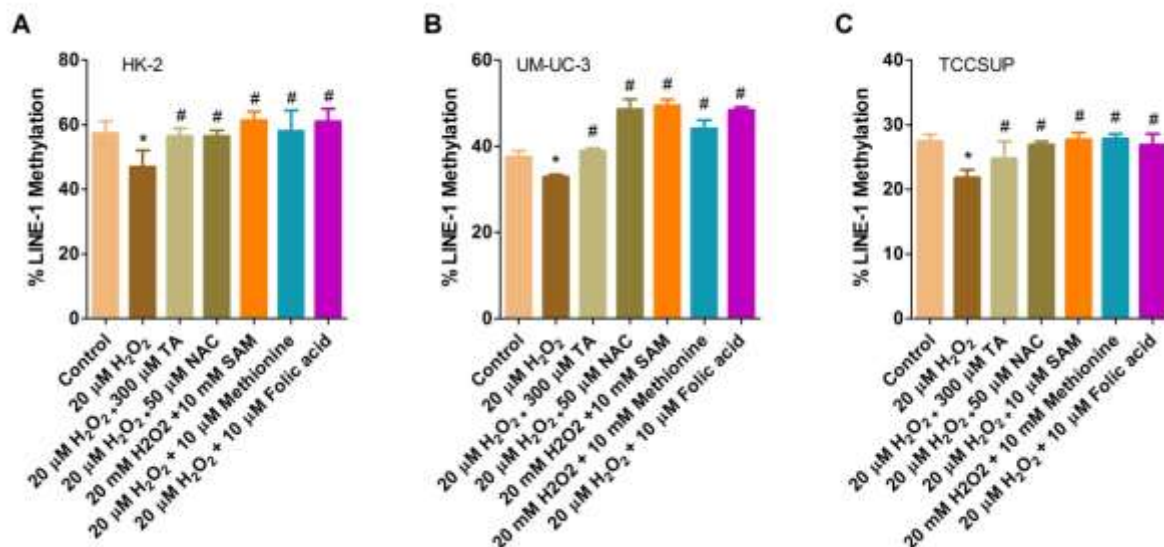


รูปที่ 4 แสดงร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของ UM-UC-3 (A) และ TCCSUP (B) ที่ได้รับการกระตุ้นให้อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วย $20 \mu M H_2O_2$ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * $P < 0.05$ vs. control

ผลของ H_2O_2 และสารต้านอนุมูลอิสระและสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation

ผลการศึกษาผลของการเสริมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์เยื่อบุท่อไต HK-2 (รูปที่ 5A) ด้วย H_2O_2 ส่งผลให้ระดับ LINE-1 methylation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม และในเซลล์ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ TA และ NAC ระดับ LINE-1 methylation จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันเมื่อเสริมด้วย methionine, SAM และ folic acid สามารถเพิ่มระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 cells (รูปที่ 5B) และ TCCSUP cells (รูปที่ 5C) ได้ผล

เช่นเดียวกับที่พบใน HK-2 cells แสดงให้เห็นว่าทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism สามารถป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation ใน H_2O_2 -treated cells ได้

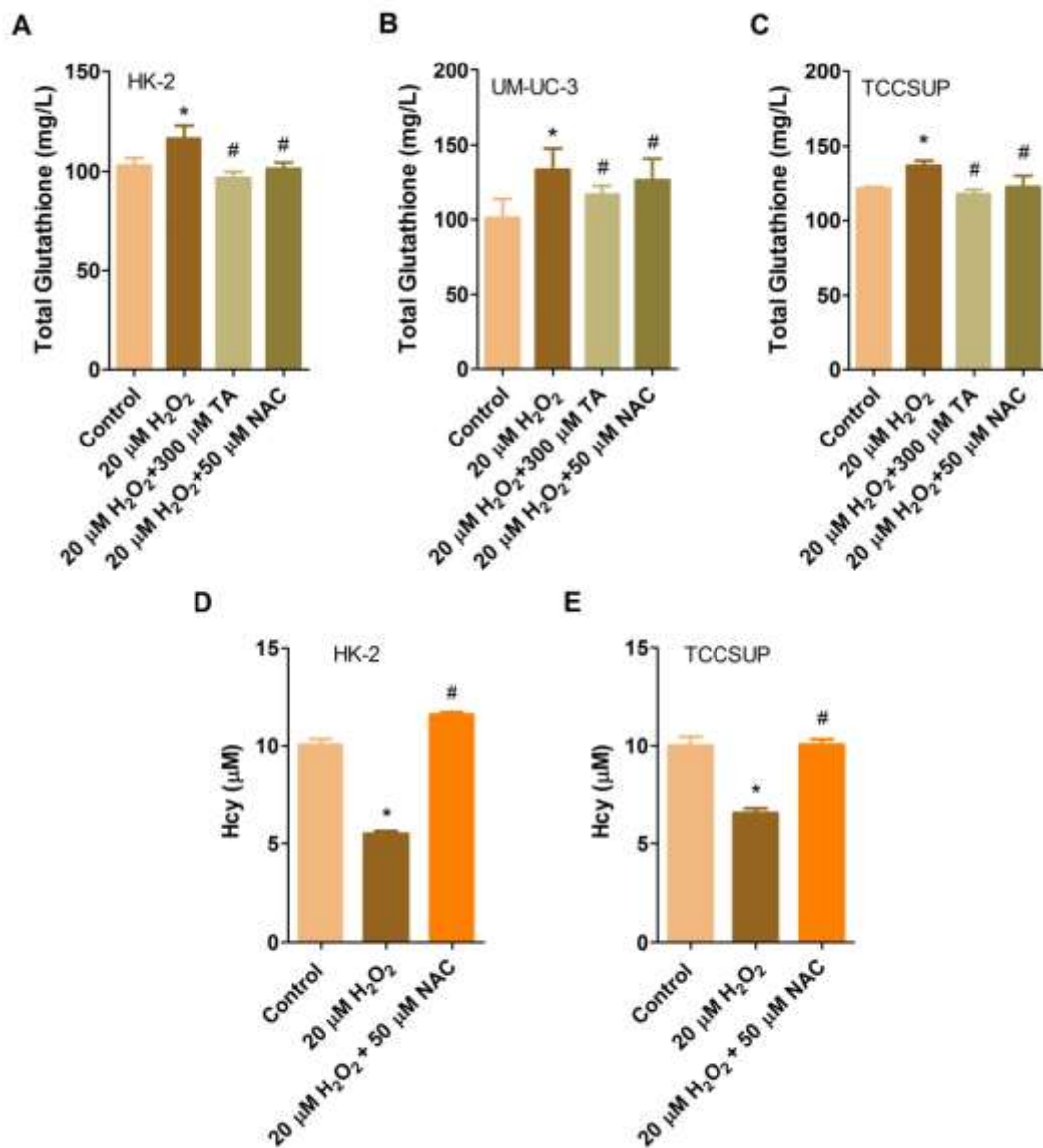


รูปที่ 5 แสดงระดับ LINE-1 methylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและผลของการเสริมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ใน HK-2 cell (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2

ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione และ Hcy ในเซลล์

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione ภายในเซลล์ พบว่า ใน HK-2 cells (รูปที่ 6A) ที่ได้รับ H_2O_2 ปริมาณ total glutathione เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ ขณะที่ในเซลล์ที่ได้รับ NAC หรือ TA ร่วมด้วย จะไม่พบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่ามีระดับ total glutathione ต่ำกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 และ TCCSUP cells (รูปที่ 6B และ 6C) ให้ผลเช่นเดียวกับใน HK-2 cells

ผลการวัดระดับ Hcy ในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของการเสริมด้วย NAC ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Hcy พบว่า ระดับ Hcy (% control) ใน HK-2 cells (รูปที่ 6D) และ TCCSUP cells (รูปที่ 6E) ที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับ NAC ระดับ Hcy เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2

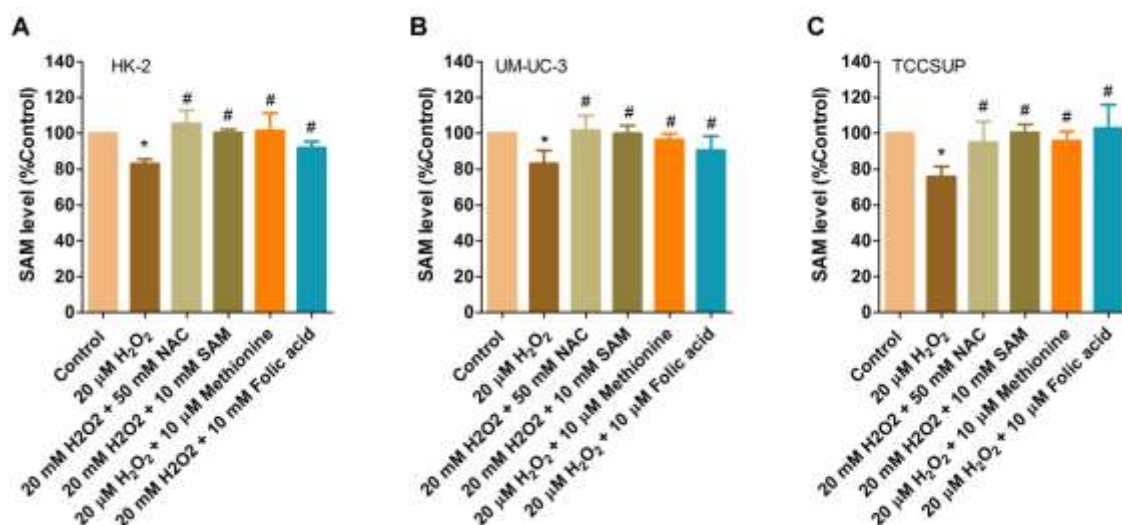


รูปที่ 6 ผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ (TA และ NAC) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione ใน HK-2 (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) cells และผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Hcy ในเซลล์ HK-2 (D) และ TCCSUP (E) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2

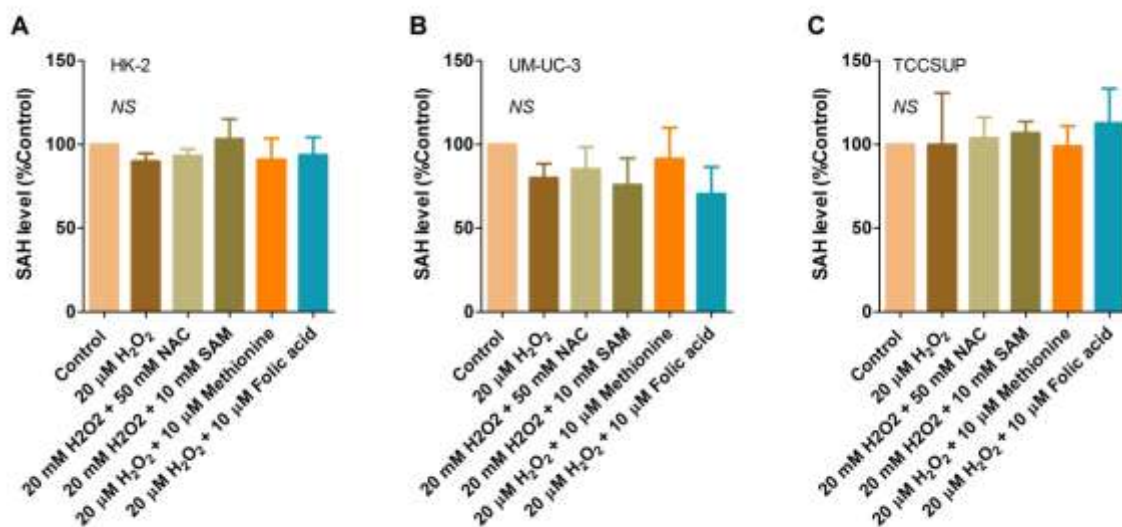
ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAM และ SAH ในเซลล์

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ SAM ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของการเสริมด้วยสารตัวกลางใน one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ SAM ภายในเซลล์ พบว่า ระดับ SAM ในทั้ง 3 เซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับเซลล์ควบคุม (รูปที่ 7)

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณของ SAH (รูปที่ 8) ในภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผลของการเสริมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารตัวกลางใน one-carbon metabolism ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับของ SAH ในเซลล์ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามพบแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของ SAH คล้ายคลึงกับ SAM



รูปที่ 7 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ และสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAM ในเซลล์ HK-2 (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), * แสดงนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม, # แสดงนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย 20 μ M H_2O_2

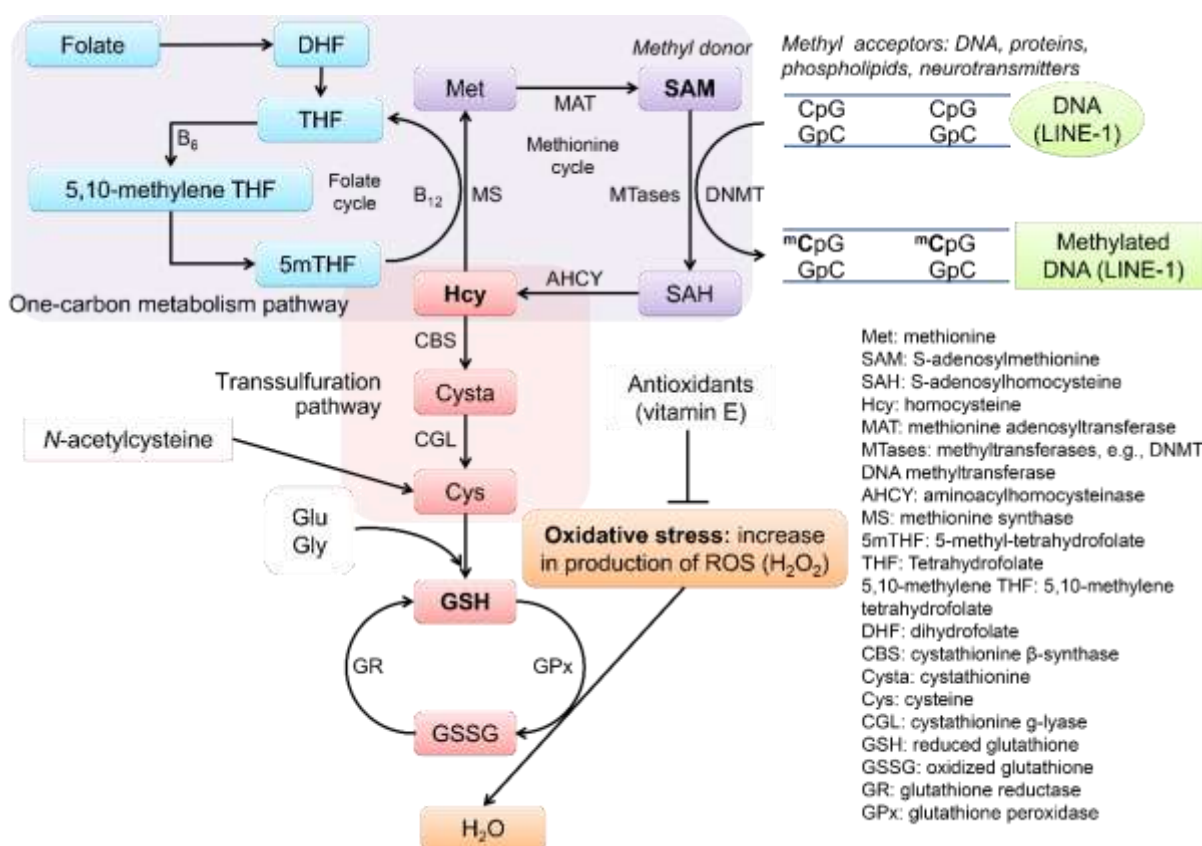


รูปที่ 8 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ และสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAH ในเซลล์ HK-2 (A), UM-UC-3 (B) และ TCCSUP (C) แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย (mean), error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

สรุปผลการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μ M H_2O_2 (72 ชั่วโมง) ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้น (ระดับ ROS และปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์สูงขึ้น) ผลการวัดระดับ LINE-1 methylation พบว่า H_2O_2 ทำให้ระดับเมทิลเลชันที่ LINE-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (LINE-1 hypomethylation) ใน UM-UC-3, TCCSUP และ HK-2 cells แต่ LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งได้ด้วย α -tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), methionine, SAM และ folic acid เมื่อวัดระดับ SAM ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่ามีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของ total glutathione ในเซลล์ ซึ่งการลดลงของ SAM ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ถูกยับยั้งได้ด้วย NAC, methionine, SAM และ folic acid และการเพิ่มขึ้นของ total glutathione สามารถกู้กลับคืนสู่ระดับปกติได้ด้วย TA และ NAC ผลการวัดระดับ homocysteine (Hcy) ในเซลล์ HK-2 และ TCCSUP ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าระดับของ Hcy ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่สามารถกู้กลับคืนได้ด้วย NAC ดังนั้น ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 มีการลดลงของระดับ SAM และ Hcy ในขณะที่มีการเพิ่มระดับ total glutathione โดยความผิดปกติดังกล่าวสามารถทำให้กลับคืนสู่ภาวะปกติได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (TA และ NAC) และการให้สารตัวกลางใน one-carbon metabolism (methionine, SAM และ folic acid)

ดังนั้น การศึกษานี้สรุปได้ว่า กลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เกิดจากการเพิ่มการสังเคราะห์ glutathione ผ่านวิถี transsulfuration ซึ่งมีการนำ Hcy มาเปลี่ยนเป็น cysteine สำหรับนำไปสังเคราะห์ glutathione ส่งผลให้เกิดการพร่อง Hcy จึงไม่มี Hcy เพียงพอที่จะนำไป

สร้าง methionine และ SAM ตามลำดับ ส่งผลให้เกิดการพร่อง SAM ในเซลล์ และเนื่องจาก SAM เป็น methyl donor ที่สำคัญในเซลล์ เมื่อปริมาณ SAM ลดลง จึงนำไปสู่การเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ (รูปที่ 9) ผลการวิจัยนี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน และผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นว่า สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น TA และ NAC รวมถึงสารในวิถี one-carbon metabolism ได้แก่ methionine, SAM และ folic acid สามารถยับยั้งการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการรักษาและป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ในอนาคต ผลงานวิจัยที่ได้นี้ได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสาร Cell Biochemistry & Function (DOI: 10.1002/cbf.3124, PMID: 26178977) full-text paper แสดงในภาคผนวก



รูปที่ 9 สรุปกลไกการเกิด ROS-induced LINE-1 hypomethylation ที่ได้จากงานวิจัยนี้

งานวิจัยส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาเพิ่มในเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 cells ด้วย เพื่อพิสูจน์ว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์มะเร็งอื่นด้วยหรือไม่ การศึกษาในเซลล์หลายชนิดจะทำให้ให้ผลการศึกษามีความน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งผลการศึกษาจะทำให้ทราบ

ว่าการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่กระตุ้นจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้นจำเพาะกับเซลล์มะเร็งชนิดใดชนิดหนึ่งหรือไม่ หรือเป็นกลไกทั่วไปที่ไม่จำเพาะและพบได้ในเซลล์ทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

ผลการศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันและ RUNX3 promoter hypermethylation ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (HBV-associated HCC)

เพื่อศึกษาว่าผู้ป่วย HBV-associated HCC จะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงและมีความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เหมือนกับผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะหรือไม่ งานวิจัยส่วนนี้จึงวัดระดับ oxidative stress biomarkers และ promoter methylation ของยีนต้านมะเร็ง RUNX3 ในผู้ป่วยมะเร็งตับเทียบกับกลุ่มควบคุมคนปกติ (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วย HBV-associated HCC มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลในพลาสมาสูงกว่า ขณะที่ระดับสารต้านอนุมูลอิสระรวมต่ำกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10) แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งตับมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ

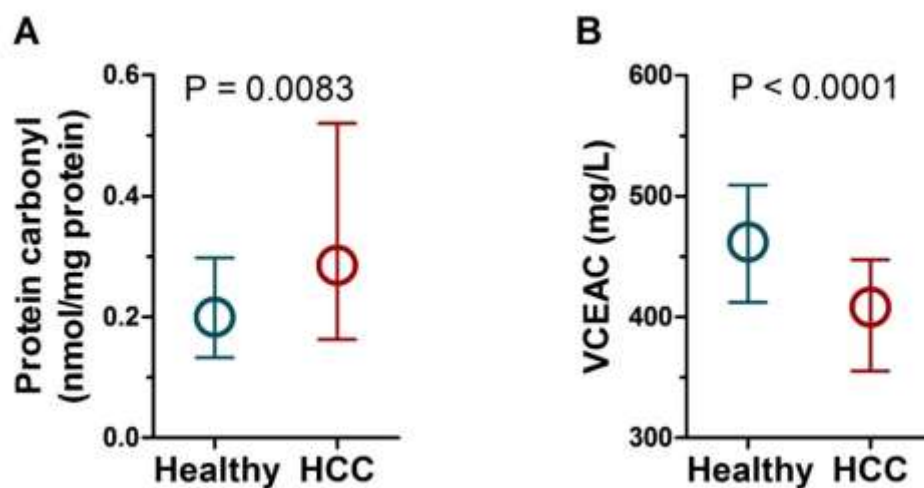
เมื่อวัดระดับ RUNX3 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่า ระดับ RUNX3 methylation ในกลุ่มผู้ป่วย HBV-associated HCC สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 11) แสดงว่า ผู้ป่วยมะเร็งตับเกิด RUNX3 promoter hypermethylation

จากนั้นพิสูจน์ว่า RUNX3 promoter hypermethylation ที่พบเป็นผลมาจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือไม่ โดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า HepG2 cells ที่ได้รับ H₂O₂ มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้นและมีระดับ RUNX3 methylation สูงกว่าเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับ H₂O₂ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 12) ดังนั้น การศึกษานี้พิสูจน์ให้เห็นว่า ROS เป็นตัวกระตุ้นให้เกิด RUNX3 promoter hypermethylation ในเซลล์มะเร็งตับ (HCC cells)

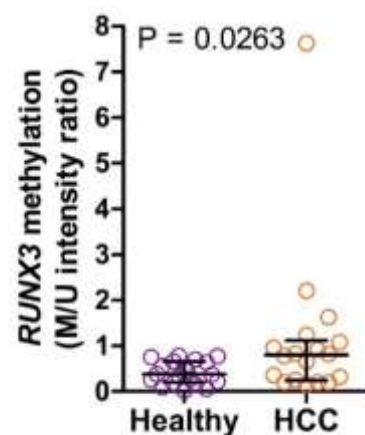
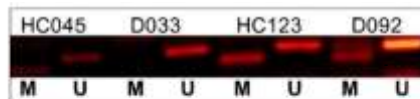
สรุป ผลการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยมะเร็งตับพบว่า กลุ่มผู้ป่วยมีระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ และ promoter hypermethylation ของยีน RUNX3 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ และการศึกษาใน HepG2 cells พบว่า ด้วย 20 μ M H₂O₂ สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์ และทำให้เกิด promoter hypermethylation ของยีน RUNX3 ผลงานวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว ในวารสาร Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (PMID: 26225676) full-text paper แสดงในภาคผนวก ดังนั้นผลการศึกษาชี้ว่า การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่กระตุ้นจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้นไม่ได้จำเพาะกับเซลล์มะเร็งชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่เป็นกลไกทั่วไปของการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ที่พบได้ในเซลล์ทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 1 จำนวนและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วย HBV-associated HCC และกลุ่มควบคุมคนปกติ

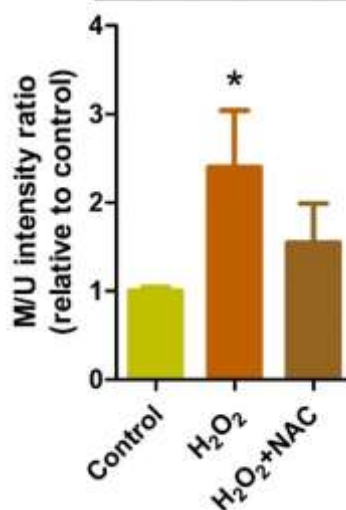
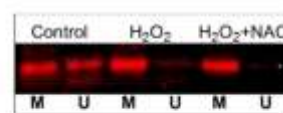
Characteristics	Healthy	HBV-associated HCC	P value
Total number of subjects	80	60	
Age (years)	50.59 ± 5.54	52.33 ± 7.91	0.127
Males: Females (% male)	50:30 (62.50)	52:8 (86.67)	0.001
Cirrhosis (%)		52 (100)	
- Yes		41 (78.85)	
- No		11 (21.15)	
BCLC staging (%)		52 (100)	
- 0 (very early stage)		2 (3.85)	
- A (early stage)		7 (13.46)	
- B (intermediate stage)		19 (36.54)	
- C (advanced stage)		24 (46.15)	



รูปที่ 10 ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในพลาสมา (A) และสารต้านอนุมูลอิสระรวม (B) ในกลุ่มผู้ป่วย HBV-associated HCC และกลุ่มควบคุมคนปกติ



รูปที่ 11 ระดับ *RUNX3* methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ในกลุ่มผู้ป่วย HBV-associated HCC เทียบกับ กลุ่มควบคุมคนปกติ ภาพด้านบนแสดงผลของ methylation specific PCR M: methylation band, U: unmethylation band, HC: รหัสผู้ป่วยมะเร็งระดับ D: รหัสคนปกติ



รูปที่ 12 *RUNX3* promoter hypermethylation ในเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง ในเซลล์ HepG2 cells ที่ได้รับ H₂O₂ มีระดับ *RUNX3* methylation สูงกว่าเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับ H₂O₂ อย่างมีนัยสำคัญ และระดับ *RUNX3* methylation ลดลงเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ NAC ร่วมด้วย ภาพด้านบนแสดงผลของ methylation specific PCR M: methylation band, U: unmethylation band *: P < 0.05 vs. control.

งานวิจัยส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและ cell culture เพื่อการแสดงออกของ 5mC, OGG1, ORF1p และ 4-HNE ใน bladder cancer tissues และดูผลของ oxidative stress ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ ORF1p และการเปลี่ยนแปลงของ chromatin marks ที่สัมพันธ์กับการ reactivation ของ LINE-1 elements และผลของ ROS ต่อ cancer progression ใน bladder cancer cell lines

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและผลการย้อม *H&E staining*

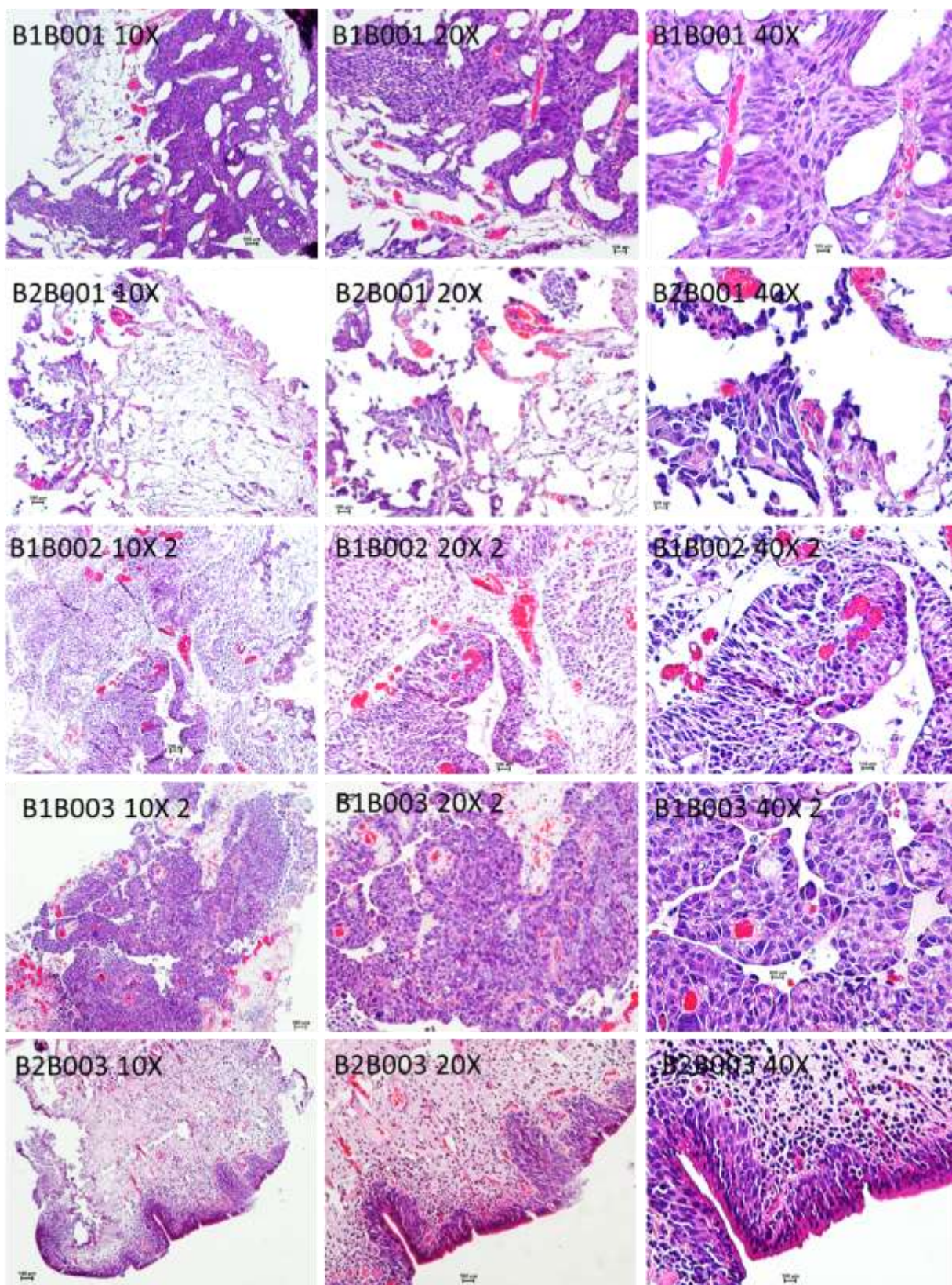
ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เก็บทั้งส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous tissue) และส่วนข้างเคียงที่ไม่เป็นมะเร็งสำหรับเป็นชิ้นเนื้อควบคุม (noncancerous adjacent tissue control) รายละเอียดของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ใช้ในการศึกษาและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปัสสาวะ จำนวน 36 ราย แสดงในตารางที่ 2

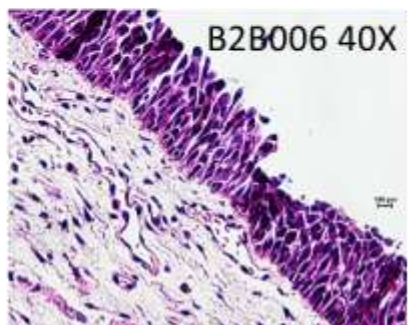
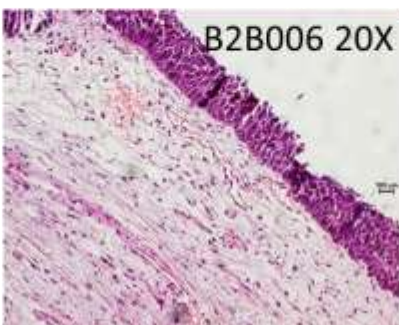
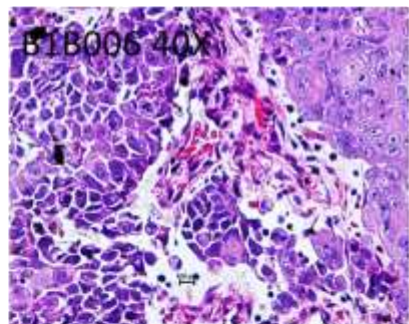
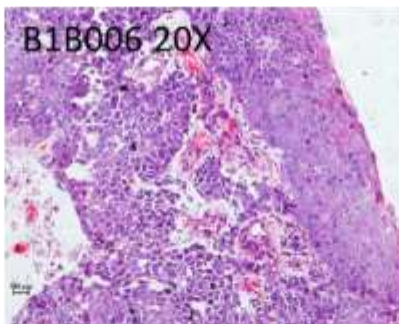
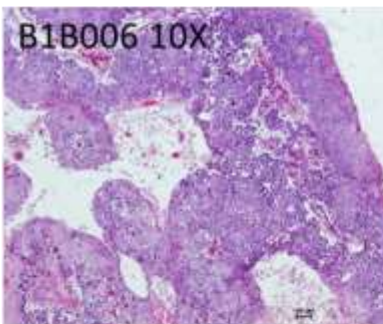
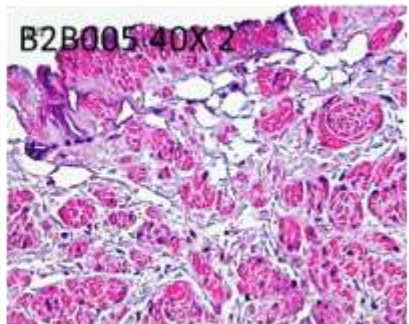
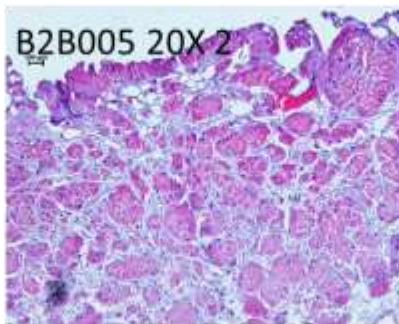
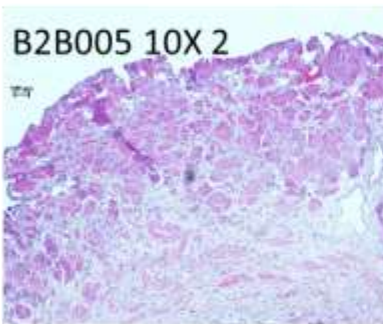
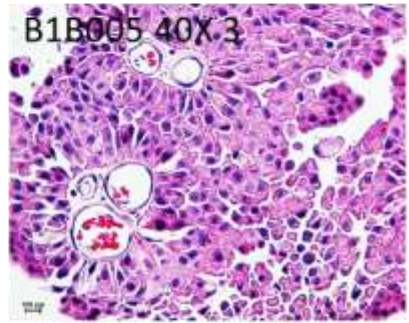
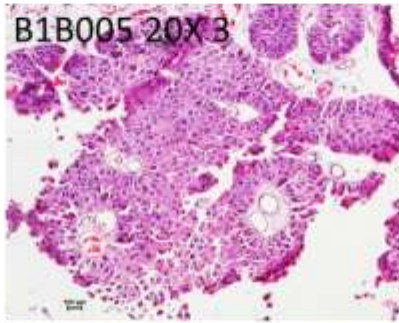
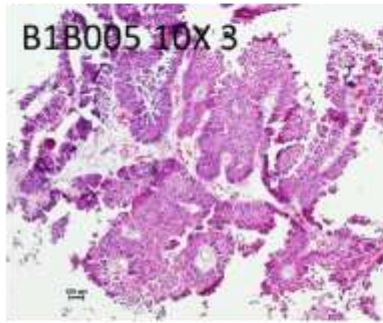
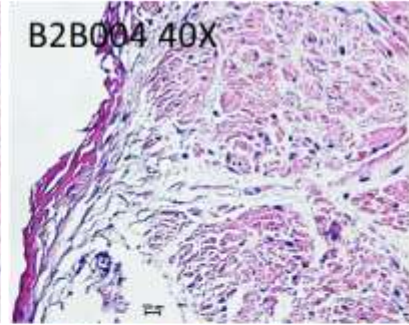
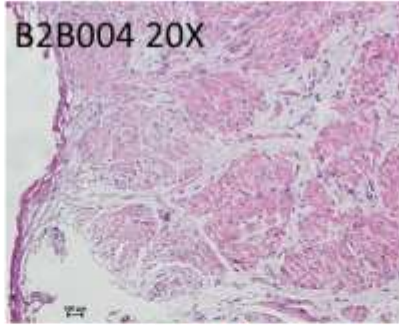
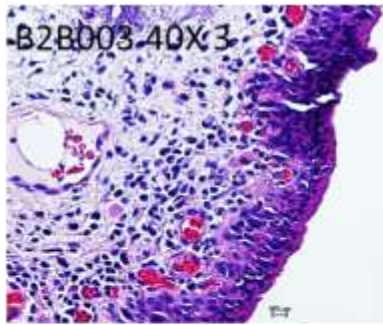
รูปที่ 13 แสดงตัวอย่างของ *H&E staining* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ 15 ตัวอย่าง ได้แก่ B001, 002, 003, 004, 005, 006, 008, 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015 และ 016 รหัส B1 และ B2 ข้างหน้า หมายถึง cancerous และ noncancerous tissues ตามลำดับ

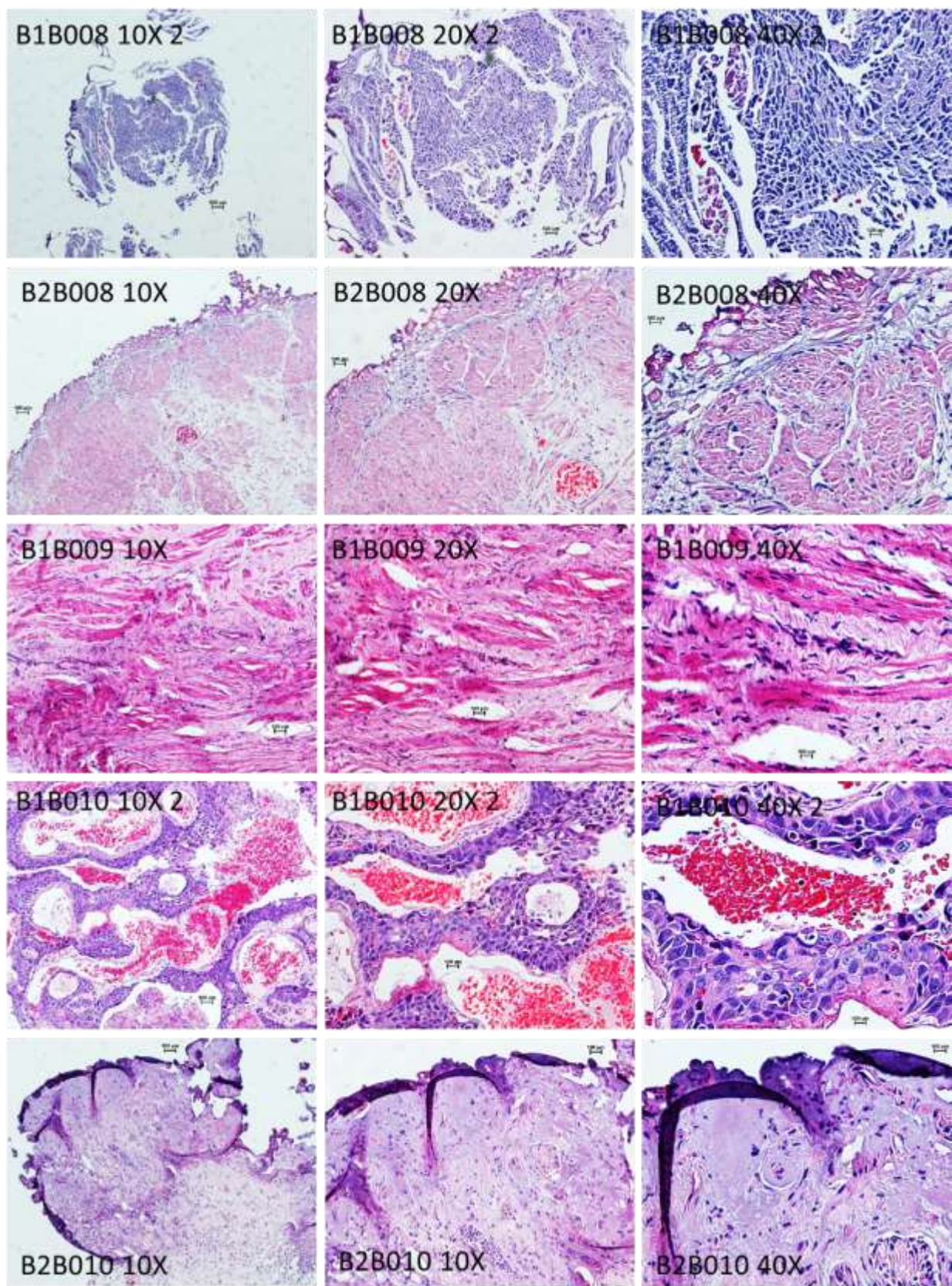
ตารางที่ 2 ข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ใช้ในการศึกษา

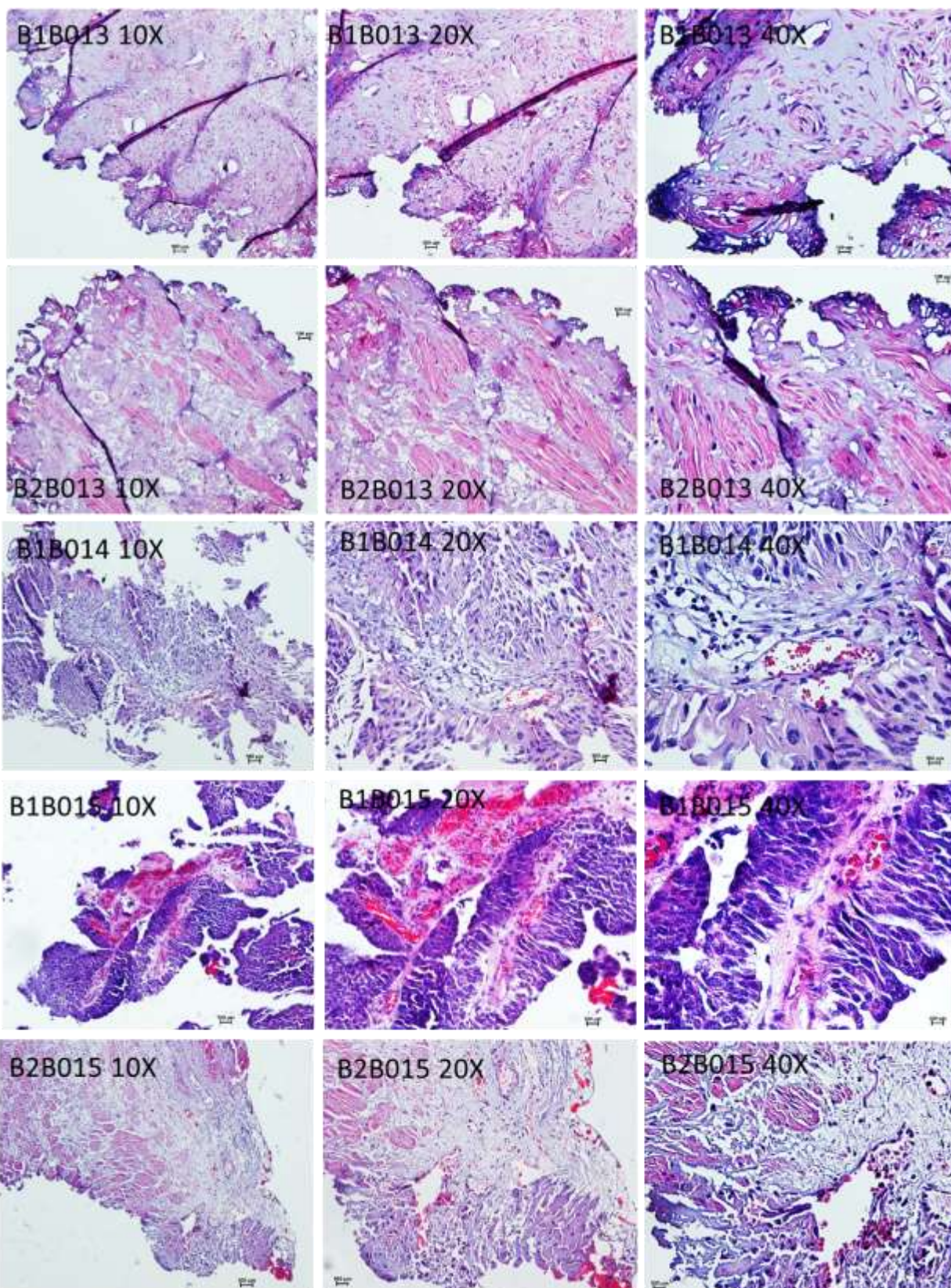
Characteristics	Frequency (%)
n	36
Age (years, mean $\pm$ SD)	71.5 $\pm$ 13.3
Gender M:F (%)	31 (86.1) : 5 (13.9)
Recurrence tumor (%)	
• No	25 (69.4)
• Yes	11 (30.6)
Surgical approach (n = 35)	
• TUR-BT	31 (88.6)
• Radical cystectomy	4 (11.4)
Tumor type (n = 32)	
• Papillary/superficial	19 (59.4)
• Muscle-invasive	13 (40.6)
Tumor grading (n = 33)	
• PUNLMP	2 (6.1)
• Low-grade	13 (39.4)
• High-grade	18 (54.5)

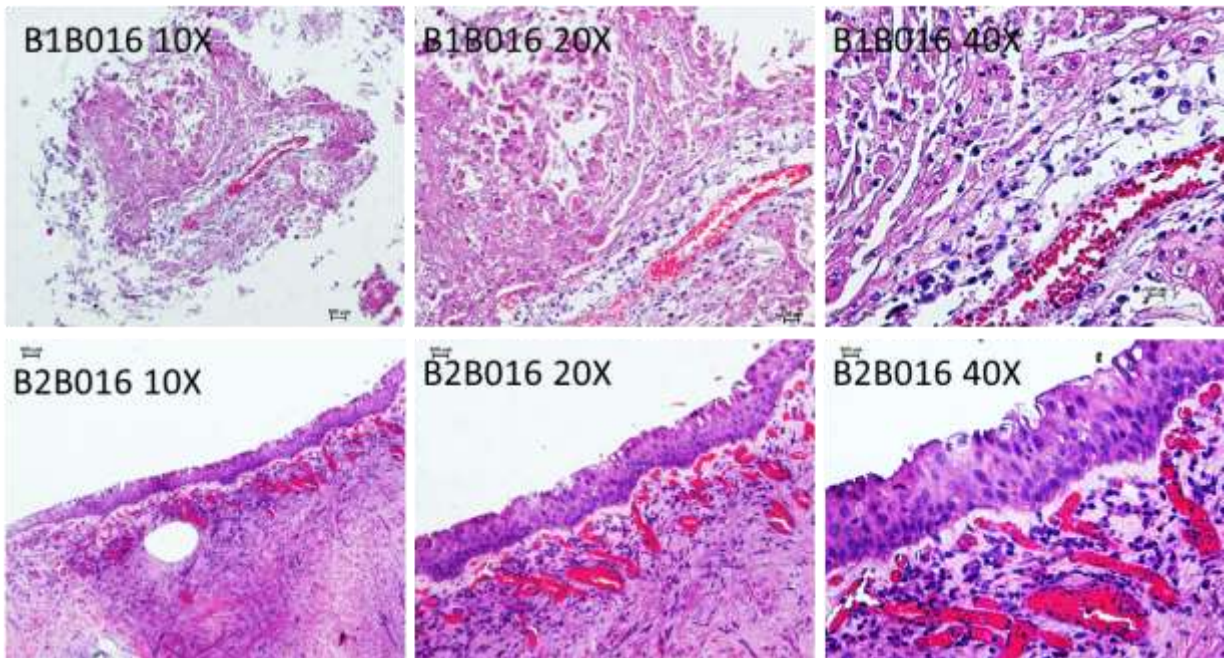
TUR-BT: transurethral resection of bladder tumor, PUNLUMP: papillary urothelial neoplasm of low malignant potential









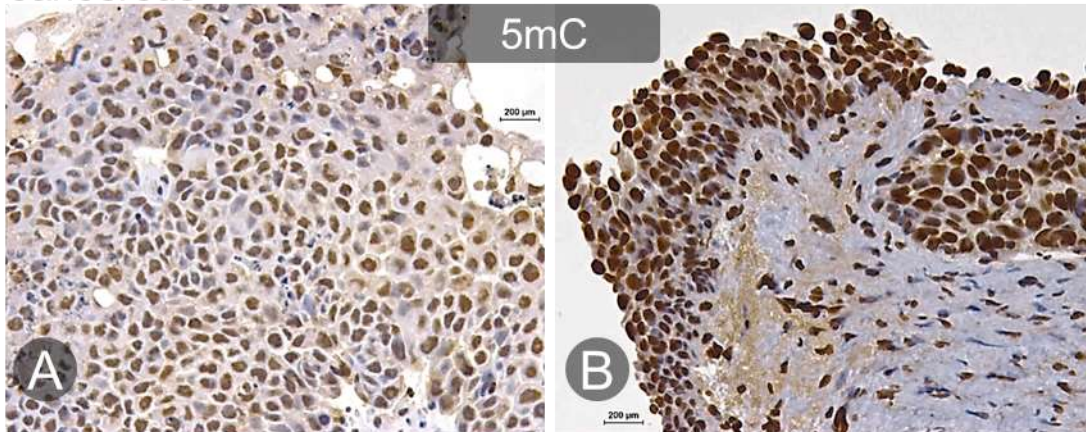


รูปที่ 13 ตัวอย่างผลการย้อม H&E ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 15 ราย B1: cancerous bladder tissues, B2: noncancerous bladder areas, 10x: กำลังขยาย 100 เท่า 20x: กำลังขยาย 200 เท่า 40x: กำลังขยาย 400 เท่า

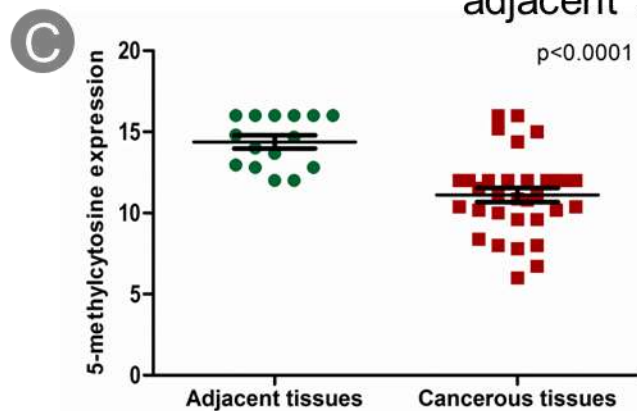
การแสดงออกของ 5mC ลดลงใน bladder cancer tissues

ผลการย้อม IHC ใน bladder cancer tissues พบว่า การแสดงออกของ 5mC ใน noncancerous bladder tissues ต่ำกว่าใน cancerous bladder tissues อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14A-C) แต่การแสดงออกของ hOGG1 ไม่พบว่ามีแตกต่างมากนักระหว่าง cancerous กับ noncancerous bladder tissues (รูปที่ 14D-E) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า bladder cancer tissues มีภาวะ global DNA hypomethylation ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่พบ LINE-1 hypomethylation ใน bladder tissues และ peripheral blood DNA ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [17]

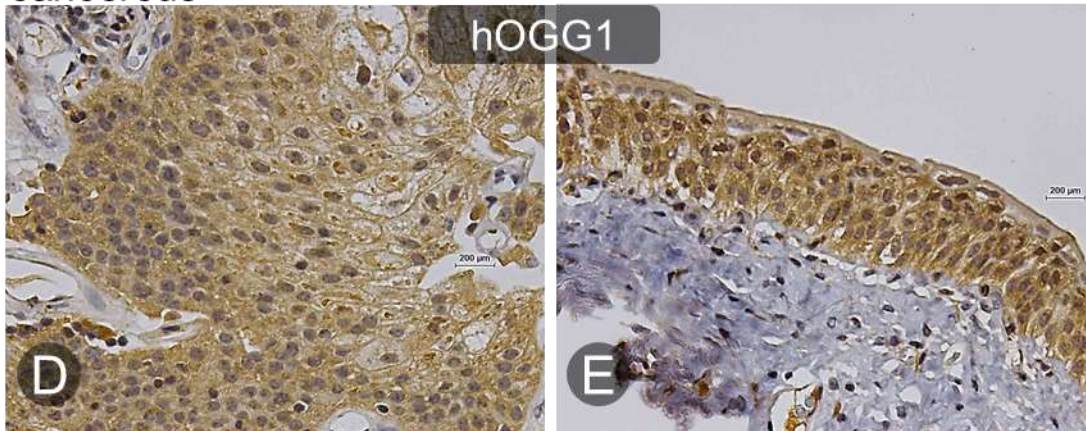
cancerous



adjacent noncancerous



cancerous

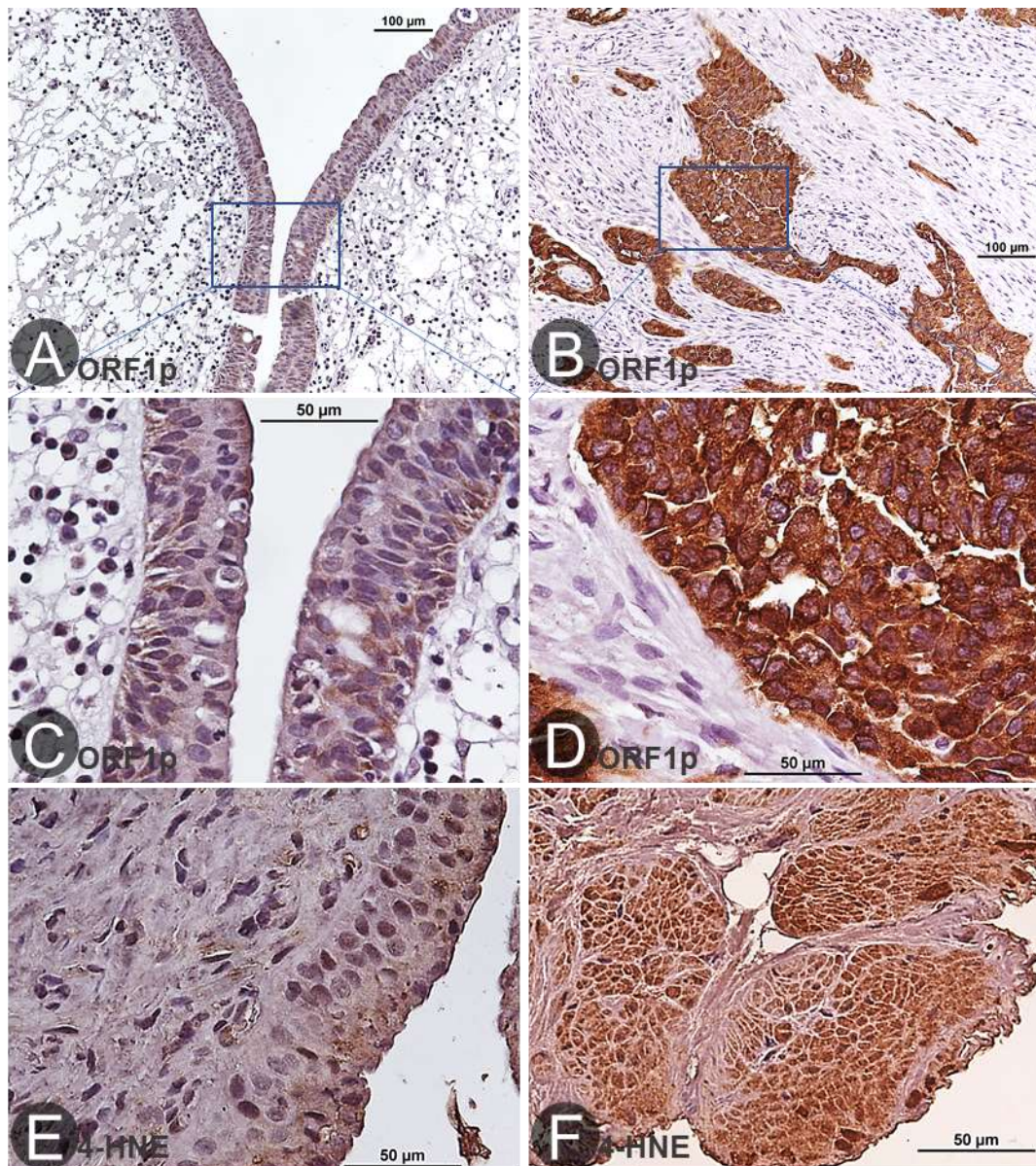


adjacent noncancerous

รูปที่ 15 ตัวอย่างผล IHC staining ของ 5mC (A-C) และ hOGG1 (D-E) เปรียบเทียบระหว่าง cancerous bladder tissues และ adjacent noncancerous bladder tissues ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของ hOGG1 แต่ระดับของ 5mC ใน cancerous tissues ต่ำกว่าใน noncancerous tissues อย่างมีนัยสำคัญ

การแสดงออกของ ORF1p และ 4-HNE สูงขึ้นใน bladder cancer tissues

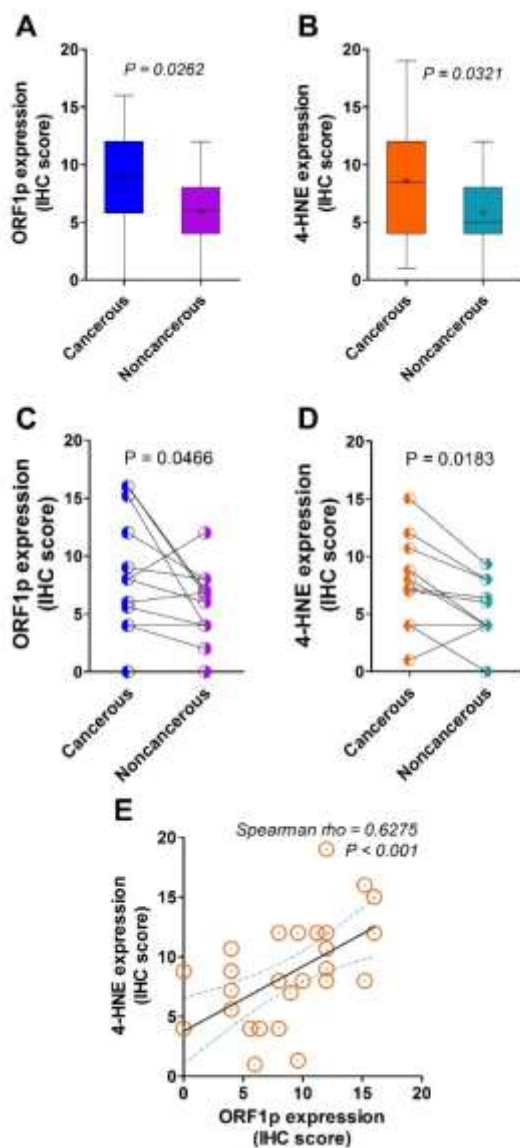
ผลการย้อม IHC พบว่า ORF1p ติดสีใน bladder cancer tissues มากกว่าใน adjacent noncancerous bladder tissues (รูปที่ 16A-D) เช่นเดียวกับ 4-HNE พบการติดสีใน bladder cancer tissues มากกว่าใน adjacent noncancerous bladder tissues (รูปที่ 16E-F) บ่งชี้ว่า bladder cancer tissues มีภาวะ oxidative stress สูงขึ้นมากกว่า noncancerous tissues



รูปที่ 16 ภาพ micrographs แสดงผลการย้อม IHC ของ ORF1p และ 4-HNE ใน bladder cancer tissues ORF1p ให้ผลลบหรือมีการแสดงน้อยใน noncancerous bladder tissues (A และ C) ตรงข้ามกับ bladder cancer tissues พบการแสดงออกของ ORF1p สูงขึ้นมาก (B และ D) ผลการย้อม 4-HNE ได้ผลคล้ายคลึง

กัน คือ มีการแสดงออกน้อยใน noncancerous bladder tissues (E) แต่สูงขึ้นใน bladder cancer tissues (F) Magnifications: x100 (A และ B), x400 (C-F)

เมื่อวัดระดับการแสดงออกโดยใช้ IHC score พบว่า ระดับการแสดงออกของ ORF1p และ 4-HNE ใน bladder cancer tissues สูงกว่าใน noncancerous bladder tissues อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 17A-B) เมื่อเปรียบเทียบในรายเดียวกันที่มีทั้ง bladder cancer tissues และ noncancerous bladder tissues (paired tissue samples) ให้ผลยืนยันว่า ระดับการแสดงออกของ ORF1p และ 4-HNE ใน bladder cancer areas สูงกว่าใน noncancerous bladder counterparts อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 17C-D) และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ ORF1p และ 4-HNE ใน bladder cancer tissues พบว่ามีความสัมพันธ์กันเชิงบวก (Spearman's rho 0.6275, $P < 0.001$) (รูปที่ 17E)



รูปที่ 17 ระดับการแสดงออกของ ORF1p และ 4-HNE เปรียบเทียบระหว่าง cancerous และ noncancerous bladder tissues ระดับการแสดงออกของทั้ง ORF1p (A) และ 4-HNE (B) ใน bladder cancer tissues สูงกว่าใน noncancerous bladder tissues อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับใน paired cancerous and noncancerous tissue samples พบระดับการแสดงออกของ ORF1p (C) และ 4-HNE (D) ใน cancerous areas สูงกว่า adjacent noncancerous regions อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับการแสดงออกของ ORF1p กับ 4-HNE ใน bladder cancer tissues (E)

การแสดงออกที่สูงขึ้นของ ORF1p สัมพันธ์กับ tumor progression

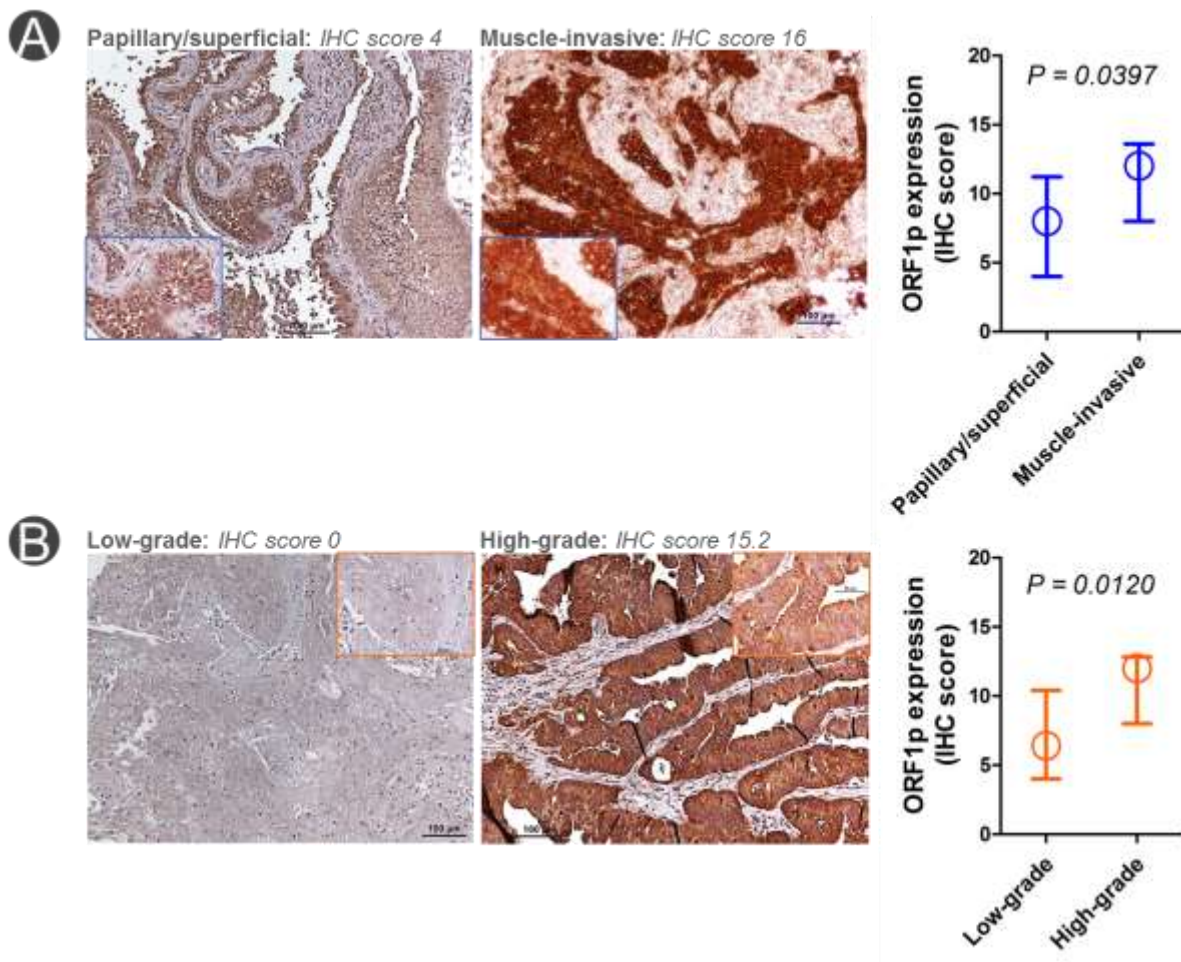
ระดับการแสดงออกของ ORF1p ใน papillary/superficial tumor ต่ำกว่าใน muscle-invasive tumor อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 18A) นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของ ORF1p ใน low-grade tumor ต่ำกว่าใน high-grade tumor อย่างมีนัยสำคัญด้วย (รูปที่ 18B) ผลการศึกษานี้จึงบ่งชี้ว่าการแสดงออกของ ORF1p สัมพันธ์กับ tumor progression

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ 4-HNE กับ tumor types และ grading พบว่า ระดับการแสดงออกของ 4-HNE ใน papillary/superficial tumor และ muscle-invasive tumor ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 19A) และระหว่าง low-grade tumor กับ high-grade tumor ก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (รูปที่ 19B)

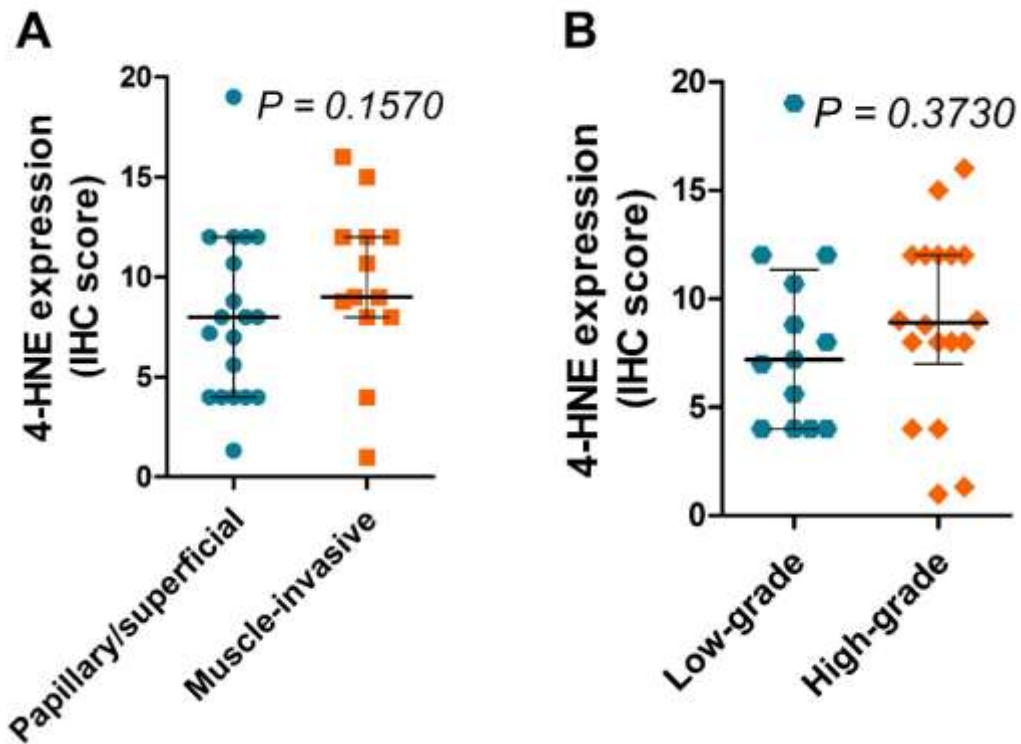
นอกจากนี้ พบ bladder tissues ที่เป็น benign หรือ PUNLMP จำนวน 2 ราย ระดับการแสดงออกของ ORF1p ใน 2 รายนี้ค่อนข้างต่ำ มีค่า IHC score ต่ำ เมื่อเทียบกับ bladder cancer tissues (รูปที่ 20) ผลการศึกษานี้จึงชี้ว่า ORF1p จะมีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเซลล์มีความเป็นมะเร็งมากขึ้น และสูงขึ้นอีกเมื่อมี progression มากขึ้น

ROS กระตุ้นการสร้าง ORF1p สูงขึ้นในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

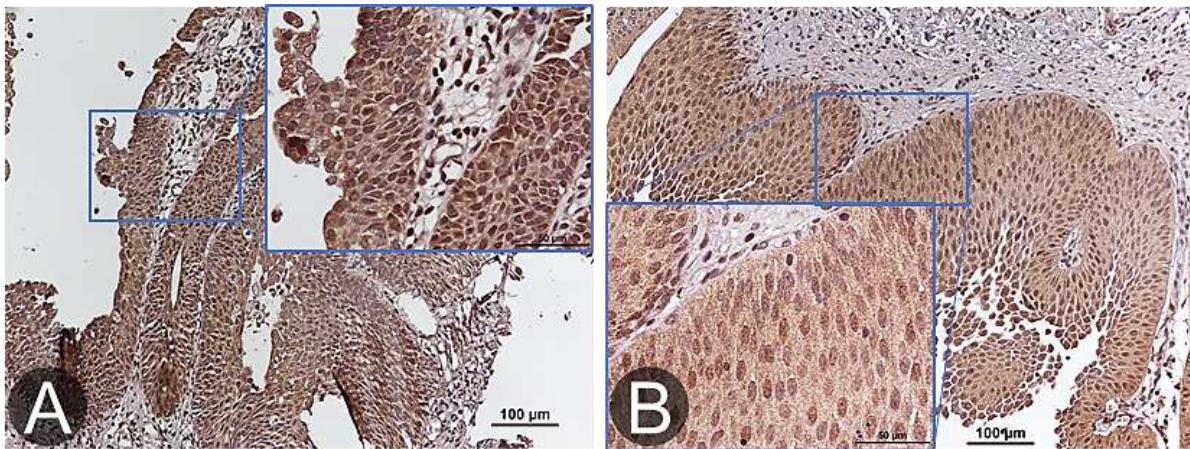
ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน ORF1p ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยวิธี western blot พบว่า ที่ baseline เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะแต่ละชนิดมีระดับการแสดงออกของ ORF1p แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกสูงสุด คือ BFTC905 รองลงมา คือ VM-CUB-1 เซลล์ที่มีการแสดงออกของ ORF1p ในระดับต่ำ ได้แก่ TCCSUP, RT4, SD และ TR112 แต่ไม่พบการแสดงออกของ ORF1p ในเซลล์ UM-UC-3 (รูปที่ 21) เมื่อกระตุ้นเซลล์ให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 พบแนวโน้มการแสดงออกของ ORF1p สูงขึ้นในเซลล์ BFTC905, VM-CUB-1 และ TCCSUP



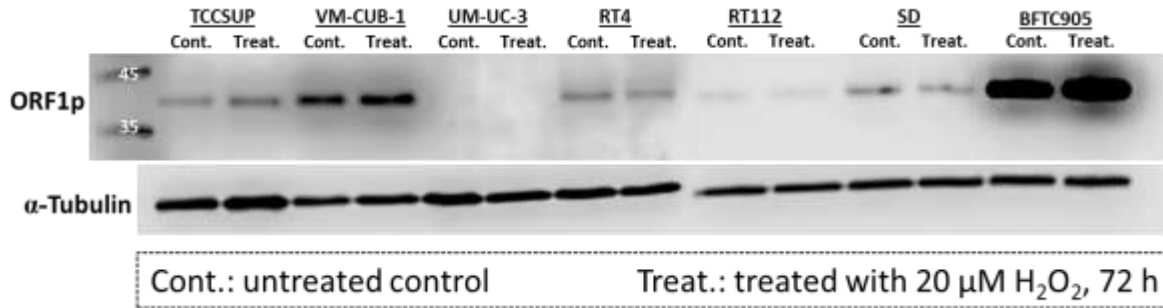
รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ORF1p และ bladder tumor progression ระดับการ
แสดงออกของ ORF1p ใน muscle-invasive bladder tumors สูงกว่าใน papillary/superficial types อย่างมี
นัยสำคัญ (A) และระดับ ORF1p ใน high-grade tumors สูงกว่าใน low-grade tumors อย่างมีนัยสำคัญ
เช่นกัน (B)



รูปที่ 19 ระดับการแสดงออกของ 4-HNE ระหว่าง superficial และ muscle-invasive tumors ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (A) เช่นเดียวกับระหว่าง low-grade และ high-grade bladder tumor ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการแสดงออกของ 4-HNE (B)

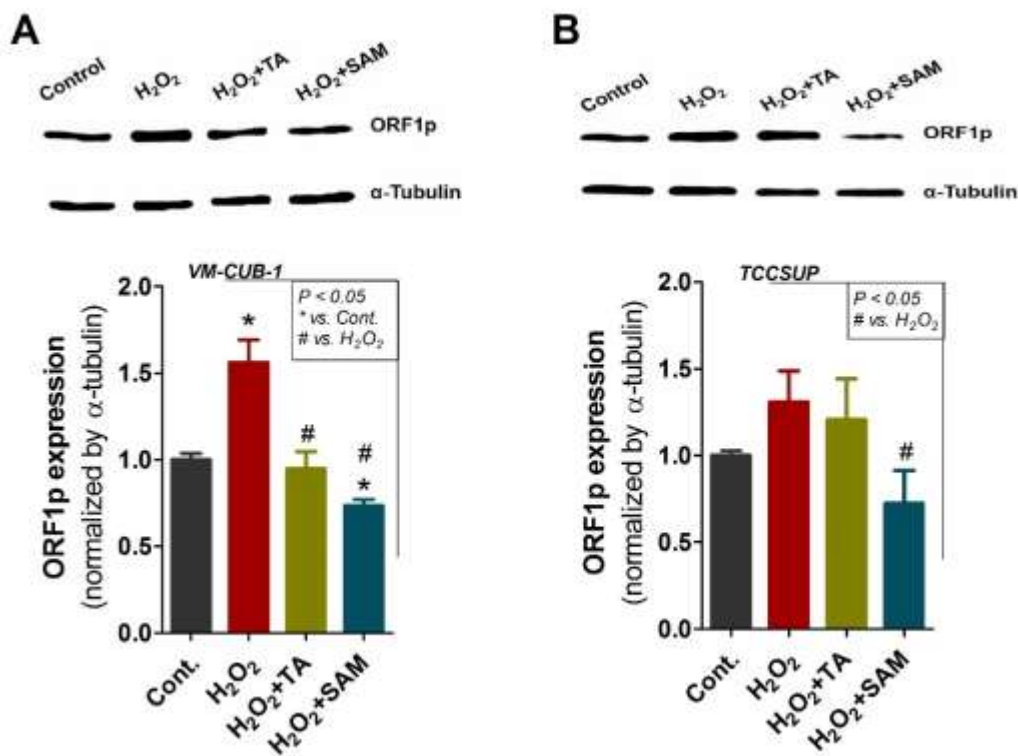


รูปที่ 20 การแสดงออกของ ORF1p ใน benign bladder tissues (PUNLMP stage) 2 ราย อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ cancerous bladder tissues A: IHC score 4, B: IHC score 5.6



รูปที่ 21 Baseline level ของการแสดงออกของ ORF1p ใน bladder cancer cell lines ไม่พบการแสดงออก ORF1p ใน UM-UC-3

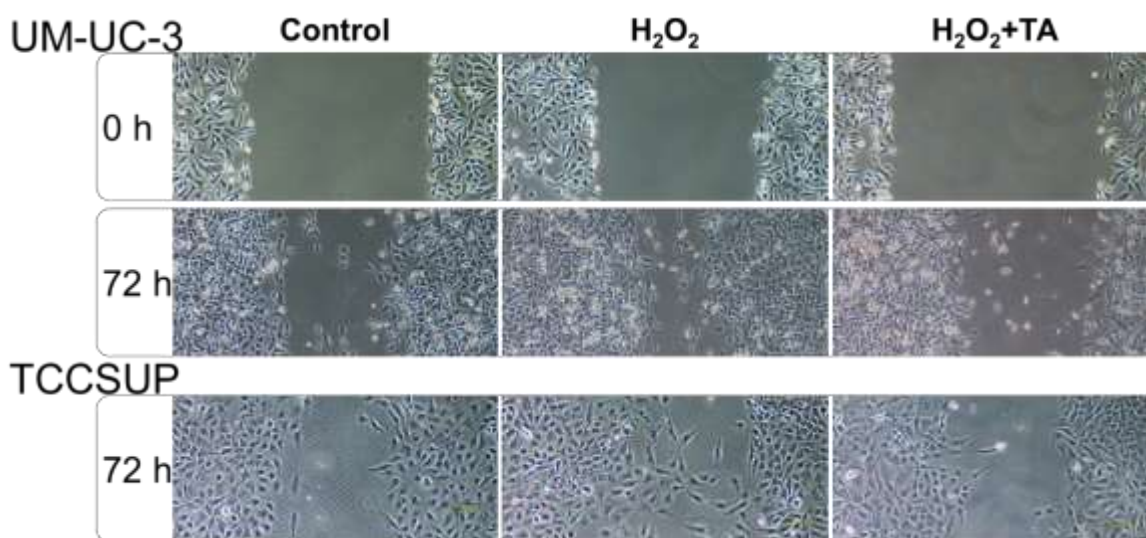
เมื่อวัดปริมาณการแสดงออกของ ORF1p เปรียบเทียบระหว่าง เซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 และ H_2O_2 ร่วมกับ antioxidants (TA และ SAM) ผลการทดลองพบว่า เซลล์ VM-CUB-1 ที่ได้รับ H_2O_2 มีระดับ ORF1p สูงกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อได้รับ TA หรือ SAM ร่วมด้วย ระดับการแสดงออกของ ORF1p ก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ VM-CUB-1 ที่ได้รับ H_2O_2 (รูปที่ 22A) พบแนวโน้มนี้ในเซลล์ TCCSUP เช่นกัน (รูปที่ 22B) แสดงว่า ROS กระตุ้นให้สร้าง ORF1p สูงขึ้นได้ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ



รูปที่ 22 ผลของ ROS ในการเพิ่มการแสดงออกของ ORF1p ใน bladder cancer cell lines ในเซลล์ VM-CUB-1 (A) พบว่า H_2O_2 (30 μM for 72 h) สามารถเพิ่มการสร้าง ORF1p ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ untreated control และการเพิ่มขึ้นนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย TA และ SAM สำหรับในเซลล์ TCCSUP (B) พบว่าระดับ ORF1p เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อกระตุ้นด้วย H_2O_2 แต่เมื่อเซลล์ได้รับ SAM ร่วมด้วย จะสามารถลดระดับ ORF1p ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ H_2O_2 -treated cells

ROS เพิ่ม cell migration activity ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ผลการทดลอง scratch assay ในเซลล์ UM-UC-3 และ TCCSUP พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเซลล์ควบคุม และ antioxidant TA สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ได้ (รูปที่ 23) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า oxidative stress สนับสนุนการเกิด tumor progression



รูปที่ 23 ผล scratch assay แสดง ROS-induced cell migration ใน bladder cancer cell lines ทั้งเซลล์ UM-UC-3 และ TCCSUP ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าใน untreated control cells และเมื่อเซลล์ได้รับ TA ร่วมด้วย จะสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ H_2O_2 -treated cells ได้

Full-length LINE-1 enrichment ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย H_2O_2

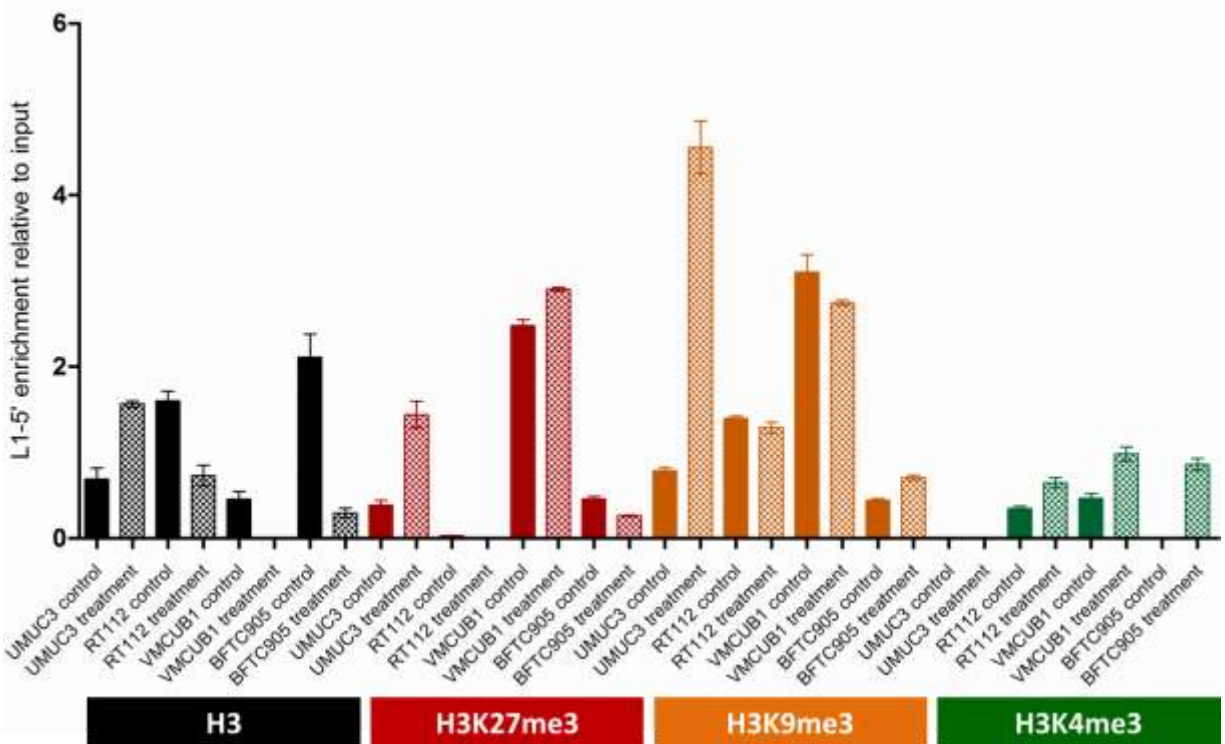
ผลการทดลอง ChIP-quantitative PCR (ChIP-qPCR) พบว่า full-length LINE-1 (ตรวจสอบโดยใช้ L1-5' primers) ถูก enriched ใน chromatin marks ที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ในเซลล์ UM-UC-3 ที่ได้รับ H_2O_2 และไม่มีการแสดงออกของ ORF1p พบ full-length LINE-1 สูงใน heterochromatin mark H3K27me3 และ H3K9me3 (รูปที่ 24) สำหรับ enrichment ของ full-length LINE-1 ที่ heterochromatin mark H3K27me3 และ H3K9me3 ไม่แตกต่างกันมากนักในเซลล์ VM-CUB-1 และ BFTC905 ที่ได้รับ

H₂O₂ และเซลล์ควบคุม (untreated control) ในเซลล์ VM-CUB-1 และ BFTC905 ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน ORF1p เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ H₂O₂ พบว่า มี full-length LINE-1 enrichment ที่ active chromatin H3K4me3 (รูปที่ 24) และ H3K18ac (รูปที่ 25) แต่ enrichment ที่ H3K18ac สูงกว่าที่ H3K4me3

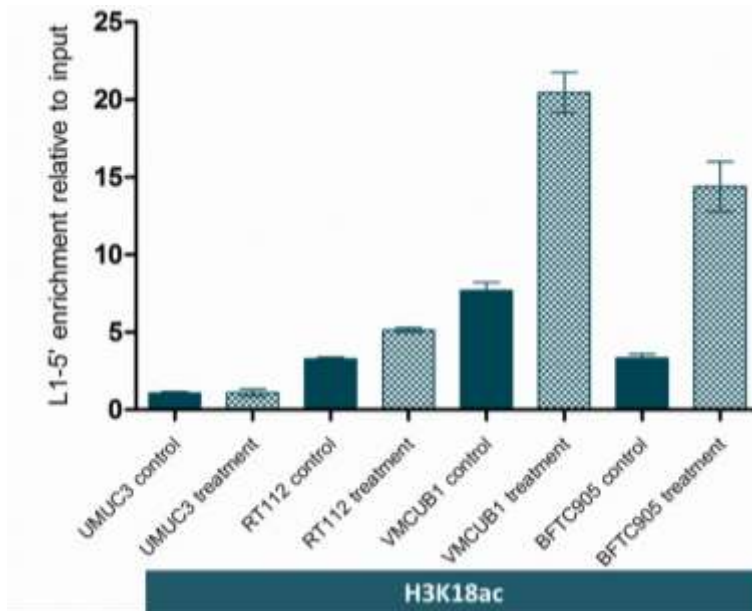
ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า silenced ORF1p ในเซลล์ UM-UC-3 น่าจะเป็นผลมาจากการเกิด heterochromatin H3K27me3 และ H3K9me3 และ heterochromatin นี้ยังเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ H₂O₂

ตรงกันข้ามกับเซลล์ VM-CUB-1 และ BFTC905 การเพิ่มขึ้นของ ORF1p เมื่อเซลล์ได้รับ H₂O₂ น่าจะมาจากการเกิด euchromatin หรือ open chromatin H3K18ac ที่ full-length LINE-1 elements

เหตุผลว่าทำไมเซลล์ UM-UC-3 ตอบสนองต่อ H₂O₂ แตกต่างกับ VM-CUB-1 และ BFTC905 ยังไม่ทราบ



รูปที่ 24 ผลการทดลอง ChIP-qPCR ของ full-length LINE-1 (L1-5' primers) โดย Immunoprecipitation ด้วย antibodies ต่อ H3, H3K27me3, H3K9me3 และ H3K4me3 ในเซลล์ UM-UC-3, RT112, VM-CUB-1 และ BFTC905 เปรียบเทียบระหว่าง H₂O₂ treatment และ untreated control



รูปที่ 25 ผลการทดลอง ChIP-qPCR ของ full-length LINE-1 (L1-5' primers) โดย Immunoprecipitation ด้วย H3K18ac antibody ในเซลล์ UM-UC-3, RT112, VM-CUB-1 และ BFTC905 เปรียบเทียบระหว่าง H₂O₂ treatment และ untreated control

บทวิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษากลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation และการแสดงออกของ LINE-1 ORF1 protein (ORF1p) ภายใต้ภาวะ oxidative stress ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ผลการศึกษาพบว่า ROS ทำให้การสร้าง methyl donor SAM ในเซลล์ลดลง ส่งผลให้เกิด DNA methylation ที่ LINE-1 elements ลดลง การเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation ยังพบได้ใน normal human kidney (HK-2) cells และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วย แสดงว่ากลไกที่ ROS ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation pattern น่าจะเป็นกลไกทั่วไปที่พบได้ในทุกเซลล์ ROS ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของ ORF1p ได้ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ VM-CUB-1 แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้มี de novo synthesis ของ ORF1p ได้ในเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ ORF1p เช่นในเซลล์ UM-UC-3 นอกจากนี้ผลการย้อมขึ้นเนื้อพบการแสดงออกของ 5mC ลดลง ขณะที่ ORF1p สูงขึ้นใน bladder cancer tissues เมื่อเทียบกับ adjacent noncancerous bladder tissues และการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ORF1p นี้สัมพันธ์กับ tumor progression และผลการทดสอบในเซลล์ TCCSUP และ UM-UC-3 พบว่า ROS สามารถกระตุ้นการเลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ด้วย แสดงว่าภาวะ oxidative stress ส่งเสริมให้เกิด tumor progression มากขึ้น กลไกที่ ROS ทำให้มีการแสดงออกของ ORF1p เพิ่มขึ้นในเซลล์ VM-CUB-1 น่าจะมาจากการที่ ROS ทำ

ให้เกิด active chromatin H3K18ac มากขึ้นที่ full-length LINE-1 elements ในทางตรงกันข้ามการที่ไม่พบการแสดงออกของ ORF1p ในเซลล์ UM-UC-3 เนื่องจากเกิด heterochromatin (H3K9me3 และ H3K27me3) ที่ full-length LINE-1 elements และปริมาณการเกิด H3K9me3 และ H3K27me3 heterochromatin marks นี้สูงขึ้นอีกเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะ oxidative stress

การเกิด LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [35-37] มีรายงานว่า LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับ advanced stages ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และสัมพันธ์กับ shorter survival ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [38] ผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้นับสาเหตุของการเกิด LINE-1 hypomethylation ภายใต้ภาวะ oxidative stress คือ ROS ทำให้ SAM ในเซลล์ต่ำลง แล้วส่งผลให้เกิด LINE-1 hypomethylation โดยที่สารต้านอนุมูลอิสระ (TA และ NAC) และสารตัวกลางใน one-carbon metabolism (methionine, SAM และ folic acid) สามารถยับยั้งการเกิด ROS-induced LINE-1 hypomethylation ได้ ดังนั้น สารเหล่านี้อาจจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและยับยั้งการดำเนินของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้

การเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation pattern ด้วย oxidative stress หรือ ROS ได้รับการยอมรับมากขึ้น [39, 40] นอกจาก LINE-1 hypomethylation แล้ว ROS ยังสามารถกระตุ้นให้เกิด promoter hypermethylation ของ tumor suppressor gene ได้ด้วย ดังรายงานของ Lim และคณะ [41] ที่แสดงให้เห็นว่า ROS ทำให้เกิด promoter hypermethylation ของ E-cadherin ได้ ในการศึกษาพบว่า oxidative stress และ RUNX3 promoter methylation สูงขึ้นในผู้ป่วย hepatocellular carcinoma และผลในเซลล์ HepG2 พบว่า ROS กระตุ้นให้เกิด promoter hypermethylation ในยีน RUNX3 ได้ แสดงให้เห็นว่า ROS เป็นสาเหตุของทั้ง DNA hypomethylation ใน retrotransposons และ promoter hypermethylation ใน tumor suppressor genes และกลไกนี้เป็นกลไกทั่วไป (fundamental mechanism) ที่เกิดได้ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง ดังนั้น การใช้ antioxidants น่าจะมีประโยชน์ในการป้องกัน oxidative stress-induced DNA methylation changes ได้

การศึกษานี้พบการเพิ่มขึ้นของ ORF1p ใน bladder cancer tissues และการแสดงออกของ ORF1p สัมพันธ์กับ tumor progression (สูงขึ้นใน invasive tumors และ high-grade tumors) มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานการแสดงออกของ full-length LINE-1 transcript สูงขึ้นใน bladder tumor tissues [42] ต่อมาจากรายงานการแสดงออกของ ORF1p สูงขึ้นใน bladder tumor tissues โดยพบ ผลบวก immunoreactivity ของ ORF1p ประมาณ 61% ของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ทดสอบ [43] แต่ในการศึกษานี้ พบผลลบของ ORF1p ใน bladder cancer tissues เพียง 8.3% (3/36) ผลการศึกษานี้เป็นการยืนยันว่ามีการแสดงออกของ ORF1p สูงขึ้นใน bladder tumors และการแสดงขึ้นนี้สัมพันธ์กับ tumor progression โดยส่วนใหญ่ของ LINE-1 elements ใน human genome จะเป็น 5'-truncated มีจำนวนน้อยมากที่เป็น full-length LINE-1 ที่สามารถสร้าง ORF1p และ ORF2p ได้ [44-46] นอกจากนี้ reactivation ของ LINE-1 ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ด้วย [47] สิ่งที่ยังไม่รู้คือ LINE-1 elements ใดที่ถูก reactivated ใน bladder cancer

ซึ่งถ้าหากรู้ตำแหน่งของ LINE-1 elements นี้ อาจทำให้สามารถใช้โปรตีนจาก LINE-1 ที่จำเพาะนี้ สำหรับเป็น specific marker ของ bladder cancer ได้ ดังที่เสนอไว้ใน review ของ Ardeljan และคณะ [31]

ผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้นำไปสู่การเข้าใจสาเหตุและกลไกในการเปลี่ยนแปลงการเกิด DNA methylation ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากขึ้น และคณะผู้วิจัยคาดว่าจะประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ในอนาคต

หนังสืออ้างอิง

1. Cancer Registry 2010. National Cancer Institute of Thailand. 2010;http://www.nci.go.th/cancer_record/cancer_rec1.html.
2. Sriplung H. Cancer In Thailand Vol.IV: URINARY BLADDER. National Cancer Institute of Thailand. 2000;p61. (http://www.nci.go.th/cancer_record/cancer_rec1.html).
3. Kawai K, Yamamoto M, Kameyama S, Kawamata H, Rademaker A, Oyasu R. Enhancement of rat urinary bladder tumorigenesis by lipopolysaccharide-induced inflammation. Cancer Res. 1993;53(21):5172-5.
4. Michaud DS. Chronic inflammation and bladder cancer. Urol Oncol. 2007;25(3):260-8.
5. Opanuraks J, Boonla C, Saelim C, Kittikowit W, Sumpatanukul P, Honglertsakul C, et al. Elevated urinary total sialic acid and increased oxidative stress in patients with bladder cancer. Asian Biomed. 2010;4(5):703-10.
6. Akcay T, Saygili I, Andican G, Yalcin V. Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. Urol Int. 2003;71(3):271-4.
7. Salim EI, Morimura K, Menesi A, El-Lity M, Fukushima S, Wanibuchi H. Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. Int J Cancer. 2008;123(3):601-8.
8. Soini Y, Haapasaari KM, Vaarala MH, Turpeenniemi-Hujanen T, Karja V, Karihtala P. 8-hydroxydeguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2011;4(3):267-75.
9. Wachsman JT. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. Mutat Res. 1997;375(1):1-8.
10. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358(11):1148-59.

11. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med.* 2011;17(3):330-9.
12. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):138-62.
13. Aporntheastan C, Phokaew C, Piriyaongsa J, Ngamphiw C, Ittiwut C, Tongsimas S, et al. Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2. *PLoS One.* 2011;6(3):e17934.
14. Hatziapostolou M, Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(10):1681-702.
15. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene.* 2004;23(54):8841-6.
16. Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenet.* 2011;doi:10.1007/s13148-011-0032-8.
17. Patchsung M, Boonla C, Amnattrakul P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Tosukhowong P. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One.* 2012;7(5):e37009.
18. Beck CR, Collier P, Macfarlane C, Malig M, Kidd JM, Eichler EE, et al. LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell.* 2010;141(7):1159-70.
19. Rodic N, Burns KH. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS genetics.* 2013;9(3):e1003402.
20. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* 2003;300(5618):455.
21. Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, et al. Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS genetics.* 2010;6(4):e1000917.
22. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):3927-37.
23. McBean GJ. The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino acids.* 2012;42(1):199-205.

24. Niedzwiecki MM, Hall MN, Liu X, Oka J, Harper KN, Slavkovich V, et al. Blood glutathione redox status and global methylation of peripheral blood mononuclear cell DNA in Bangladeshi adults. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2013;8(7):730-8.
25. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004;567(1):1-61.
26. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2008;266(1):6-11.
27. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010;38(1):96-109.
28. Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(4):391-5.
29. Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3773-8.
30. Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, Kozlowski K. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1261-4.
31. Ardeljan D, Taylor MS, Ting DT, Burns KH. The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clin Chem*. 2017.
32. Kittikowit W, Waiwijit U, Boonla C, Ruangvejvorachai P, Pimratana C, Predanon C, et al. Increased oxidative DNA damage seen in renal biopsies adjacent stones in patients with nephrolithiasis. *Urolithiasis*. 2014;42(5):387-94.
33. Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 2001;762(1):59-65.
34. Wise CK, Cooney CA, Ali SF, Poirier LA. Measuring S-adenosylmethionine in whole blood, red blood cells and cultured cells using a fast preparation method and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 1997;696(1):145-52.
35. Besaratinia A, Cockburn M, Tommasi S. Alterations of DNA methylome in human bladder cancer. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2013;8(10):1013-22.

36. Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008;13(4):298-307.
37. Hoffmann MJ, Schulz WA. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol*. 2005;83(3):296-321.
38. Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(8):993-1001.
39. Nishida N, Kudo M. Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis*. 2013;31(5-6):447-53.
40. Wu Q, Ni X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr Drug Targets*. 2015;16(1):13-9.
41. Lim SO, Gu JM, Kim MS, Kim HS, Park YN, Park CK, et al. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology*. 2008;135(6):2128-40, 40 e1-8.
42. Kreimer U, Schulz WA, Koch A, Niegisch G, Goering W. HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol*. 2013;3(255).
43. Rodic N, Sharma R, Sharma R, Zampella J, Dai L, Taylor MS, et al. Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. *Am J Pathol*. 2014;184(5):1280-6.
44. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5280-5.
45. Boissinot S, Chevret P, Furano AV. L1 (LINE-1) retrotransposon evolution and amplification in recent human history. *Mol Biol Evol*. 2000;17(6):915-28.
46. Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV, Kimberland ML, Naas TP, DeBerardinis RJ, et al. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet*. 1997;16(1):37-43.
47. Philippe C, Vargas-Landin DB, Doucet AJ, van Essen D, Vera-Otarola J, Kuciak M, et al. Activation of individual L1 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci. *Elife*. 2016;5

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1. Kloypan C, Srisa-Art M, Mutirangura A, Boonla C. LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. *Cell Biochem Funct.* 2015;33:375-85. (Published)
- 1.2. Pongpaiboon P, Whongsiri P, Suwannasin S, Khlaiphuengsin A, Tangkijvanich P, Boonla C. Increased Oxidative Stress and RUNX3 Hypermethylation in Patients with Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Induction of RUNX3 Hypermethylation by Reactive Oxygen Species in HCC Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2015;16(13):5343-8. (Published)
- 1.3. Patcharawalai Whongsiri, Chaowat Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Depicha Jindatip, Anapat Sanpavat, Wolfgang A. Schulz, Michèle J. Hoffmann, Wolfgang Goering, Siriporn Chuchawankul, Chanchai Boonla. LINE-1 ORF1 protein is upregulated by reactive oxygen species and associated with urinary bladder cancer progression. 2017 (Submitted)
- 1.4. Reactivation of LINE-1 elements induced by reactive oxygen species in bladder cancer is regulated through H3K18ac active chromatin mark. 2017 (Manuscript in preparation)

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- 2.1. Patcharawalai Whongsiri, Chiraphat Kloyphan, Wikrom Wongpaiboonwattana, Maturada Patchsung, Monpichar Srisa-Art, Thasinas Dissayabutra, Julin Opanuraks, Chaowat Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Depicha Jindatip, Piyaratana Tosukhowong, Apiwat Mutirangura, **Chanchai Boonla**. Oxidative stress epigenetically upregulates LINE-1 retrotransposon elements and induces tumor progression in bladder cancer. The 3rd CU-NIPS Symposium “Neuroscience meets cancer biology for a better life” January 6-7, 2017. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (Invited speaker)
- 2.2. **Chanchai Boonla**, Maturada Patchsung, Wikrom Wongpaiboonwattana, Chiraphat Kloyphan, Patcharawalai Whongsiri, Monpichar Srisa-Art, Thasinas Dissayabutra, Julin Opanuraks, Chaowat Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Depicha Jindatip, Piyaratana Tosukhowong, Apiwat Mutirangura. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 elements and promotes tumor progression in bladder cancer cells. The Research Group Meeting on Contamination with antibiotics and antibiotic resistant bacteria in Thai aquatic

systems. Ehime University Joint Usage/Research Center LaMer, CMES. 25 – 28 Sep., 2016. Matsuyama, Japan (Invited speaker)

- 2.3. **Chanchai Boonla**, Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura. Oxidative stress induces global DNA hypomethylation in bladder cancer. The 2nd Golden Bridge International Urology Conference. 30 Oct. – 1 Nov. 2015. Kunming, China. (Invited speaker)
- 2.4. **Chanchai Boonla**, Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura. Oxidative stress induces LINE-1 hypomethylation through depletion of S-adenosylmethionine. The 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) congress. 4 – 9 Jul., 2015, Berlin, Germany. (Poster presentation)
- 2.5. **Chanchai Boonla**. Hypomethylation of LINE-1 induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. Joint Conference in Medical Sciences 2015. JCMS2015: Health Equity through Innovation and Collaboration. 4-6 June, 2015. Centara Grand and Bangkok Convention Center, Bangkok Thailand. (Oral presentation, research session)
- 2.6. **Chanchai Boonla**, Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura. Hypomethylation of LINE-1 induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for Cancer Research 7-8 May, 2015. Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. (Invited speaker)

ภาคผนวก
(reprint และ manuscript สำหรับการเผยแพร่)

LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine

Chiraphat Kloypan¹, Monpicha Srisa-art², Apiwat Mutirangura³ and Chanchai Boonla^{1*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Whether long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) hypomethylation induced by reactive oxygen species (ROS) was mediated through the depletion of S-adenosylmethionine (SAM) was investigated. Bladder cancer (UM-UC-3 and TCCSUP) and human kidney (HK-2) cell lines were exposed to 20 μ M H₂O₂ for 72 h to induce oxidative stress. Level of LINE-1 methylation, SAM and homocysteine (Hcy) was measured in the H₂O₂-exposed cells. Effects of α -tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), methionine, SAM and folic acid on oxidative stress and LINE-1 methylation in the H₂O₂-treated cells were explored. Viabilities of cells treated with H₂O₂ were not significantly changed. Intracellular ROS production and protein carbonyl content were significantly increased, but LINE-1 methylation was significantly decreased in the H₂O₂-treated cells. LINE-1 methylation was restored by TA, NAC, methionine, SAM and folic acid. SAM level in H₂O₂-treated cells was significantly decreased, while total glutathione was significantly increased. SAM level in H₂O₂-treated cells was restored by NAC, methionine, SAM and folic acid; while, total glutathione level was normalized by TA and NAC. Hcy was significantly decreased in the H₂O₂-treated cells and subsequently restored by NAC. In conclusion, in bladder cancer and normal kidney cells exposed to H₂O₂, SAM and Hcy were decreased, but total glutathione was increased. Treatments with antioxidants (TA and NAC) and one-carbon metabolites (SAM, methionine and folic acid) restored these changes. This pioneer finding suggests that exposure of cells to ROS activates glutathione synthesis via the transsulfuration pathway leading to deficiency of Hcy, which consequently causes SAM depletion and eventual hypomethylation of LINE-1. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS—DNA methylation; epigenetics; oxidative stress; LINE-1; SAM; bladder cancer

INTRODUCTION

Epigenetic dysregulation, especially alteration of DNA methylation, is one of the hallmarks of carcinogenesis.^{1,2} Genome-wide hypomethylation (also known as global hypomethylation) is commonly found in cancer genome, and it consequently causes genomic instability, aberrant transcription and mobilization of retrotransposons.³ Furthermore, global hypomethylation is associated with poor prognosis in cancer patients.⁴ Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is a repetitive retrotransposon comprising about 18% of human genome (approx. 500 000 copies), which is widely used as a surrogate marker for genome-wide hypomethylation.^{5,6} Hypomethylation of LINE-1 is demonstrated in many cancers⁷ and has been suggested to have a role in driving tumorigenesis.⁶ However, factors and mechanistic pathways that induce LINE-1 hypomethylation in cancer cells are largely unknown.

Like other carcinomas, epigenetic alterations, including genome-wide hypomethylation, are found in bladder cancer.⁸ Recently, we demonstrated hypomethylation of LINE-1 in

peripheral blood and urinary exfoliated cells obtained from patients with bladder cancer.⁹ These patients also had increased levels of oxidative stress.^{9,10} Interestingly, a significant correlation between increased oxidative stress and decreased LINE-1 methylation was observed, not only in bladder cancer patients but also in healthy subjects.⁹ This suggests that oxidative stress (not cancer *per se*) is fundamentally associated with LINE-1 hypomethylation. We subsequently showed that reactive oxygen species (ROS) are capable of inducing LINE-1 hypomethylation in bladder cancer cell line.¹¹ However, the mechanism of how ROS induces hypomethylation of LINE-1 is not known.

At least three biochemical mechanisms of DNA hypomethylation induced by oxidative stress have been proposed.^{12–14} Firstly, ROS directly attacks DNA resulting in formation of oxidative DNA lesions (e.g. 8-hydroxydeoxyguanosine), and these lesions around CpG dinucleotides strongly inhibit the activity of DNA methyltransferase enzymes to methylate the cytosine residue.^{15,16} Secondly, the ten–eleven translocation (TET) hydroxylase enzyme, which is activated under the oxidative stress condition,¹² catalyses 5-methylcytosine (5mC) to generate 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). This 5hmC is further fixed and replaced by an unmethylated cytosine through base excision repair. Thirdly, because

*Correspondence to: Chanchai Boonla, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama IV Rd., Bangkok 10330, Thailand. E-mail: chanchai.b@chula.ac.th

S-adenosylmethionine (SAM) is a universal methyl donor in cells, a reduction in SAM availability can impair cellular methylation reaction. The metabolic regulation of SAM synthesis involves one-carbon metabolism and transsulfuration pathways (Figure 1). Folate mediates the remethylation of homocysteine (Hcy) to produce methionine, and the methionine is converted to SAM. Oxidative stress activates glutathione (GSH) synthesis through the transsulfuration pathway to convert Hcy to cysteine (Cys), a precursor of GSH.¹⁷ This consequently leads to depletion of SAM and impairment of methylation reaction. Whether these mechanisms are responsible for ROS-induced LINE-1 hypomethylation in bladder cancer cells has not been elucidated.

In the present study, we investigated whether LINE-1 hypomethylation induced by ROS was mediated via the depletion of SAM. Urothelial malignant (UM-UC-3 and TCCSUP) and normal human kidney (HK-2) cells were treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) to provoke oxidative stress. LINE-1 methylation and cellular levels of SAM, GSH and Hcy were determined in the H_2O_2 -treated cells. Co-treatments with tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), SAM, methionine and folic acid were performed to see if these agents were capable of preventing hypomethylation of LINE-1 in the H_2O_2 -treated cells.

METHODS

Cell culture conditions

UM-UC-3, TCCSUP and HK-2 cell lines were purchased from ATCC (ATCC, Manassas, VA, USA). UM-UC-3 and

TCCSUP cells were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM) (Gibco, CA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco), 1% Pen-Strep under 37 °C, 5% CO_2 and 95% humidity. HK-2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with the same added supplements. TA (Mega LifeSciences, Bangkok, Thailand) and NAC (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were used as antioxidants to diminish oxidative stress in the H_2O_2 -treated cells. Methionine (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), SAM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and folic acid (Merck Millipore), functioning as intermediates in one-carbon metabolism, were also supplemented in the H_2O_2 -treated cells to observe their effect on LINE-1 methylation.

MTT assay

UM-UC-3, TCCSUP and HK-2 cells were seeded in a 96-well plate (2×10^5 cells/well) and cultured for 24 h. Confluent cells were treated with varied concentrations of H_2O_2 (10, 20, 30, 50, 100 and 150 μM) in serum-free media for 72 h. After washing, the cells were combined with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/ml) and incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO_2 and 95% humidity. MTT solution was then discarded, and dimethyl sulfoxide (100 μl /well) was added to solubilize the purple formazan crystals. Absorption at 570 nm was measured. Untreated cells were used as controls and expressed as 100% viability.

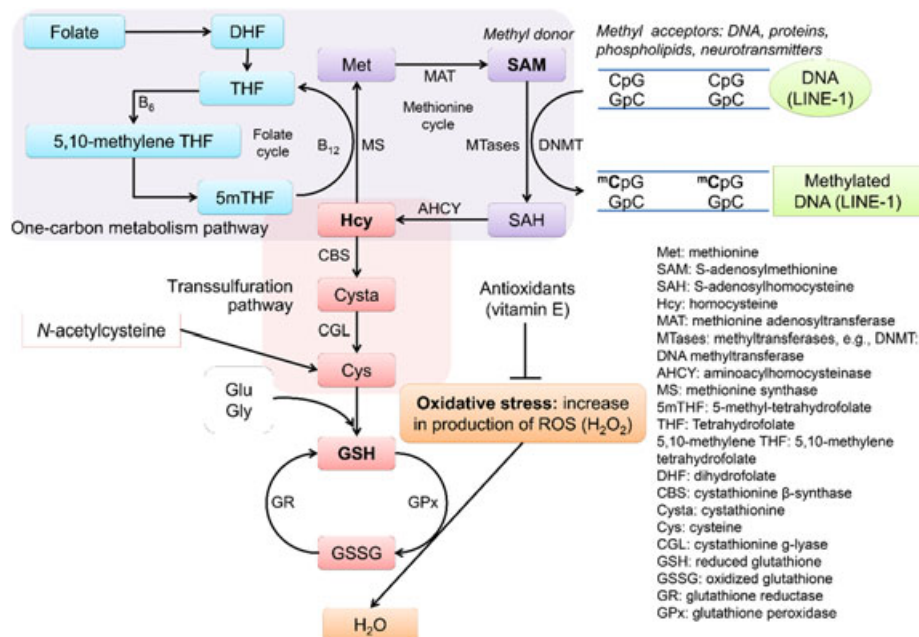


Figure 1. Synthesis of SAM in one-carbon metabolism pathway and production of Cys via transsulfuration pathway. SAM is a universal methyl donor that transfers methyl group to various types of cellular biomolecules (methyl acceptors), including DNA (such as long interspersed nuclear element-1). Methionine is a precursor of SAM. Hcy is converted to methionine using 5mTHF and B₁₂ as co-factors. Oxidative stress, a condition of overwhelming generation of ROS, activates the synthesis of GSH, which essentially requires Cys as a precursor. Cys is generated from cystathionine via the transsulfuration pathway. Cystathionine is converted from Hcy. NAC is a supplemental antioxidant that is directly converted to Cys, which is further used to synthesize GSH

Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate assay

Intracellular ROS generation was determined using dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) method, as described in our earlier study.¹⁸ Confluent cells in a 96-well plate were combined with serum-free medium containing 0.5 mM DCFH-DA (100 μ l) and incubated at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity for 30 min. After washing, 20 μ M H₂O₂ in serum-free medium (100 μ l) was added. Fluorescent intensity was recorded at 0 min (T₀) and 60 min (T₆₀), with excitation and emission wavelengths set at 480 and 535 nm, respectively. Arbitrary fluorescence unit of dichloro-dihydro-fluorescein (DCF), indicating the level of ROS generation, was calculated from the fluorescent intensity at T₆₀ divided by the fluorescent intensity at T₀.

Protein carbonyl determination

Protein carbonyl content, an indicator of protein oxidation or oxidative protein damage, was measured in cell lysate. Cells from each condition were lysed using freeze-thaw method. Briefly, cells were re-suspended in phosphate buffered saline (PBS) (1 ml), frozen at -80 °C for 4 h and then immediately flushed with running tap water until the cells were fully disrupted. The lysate was further sonicated at 2% amplitude for 1 min and centrifuged at 4500 xg for 10 min. Supernatant was collected. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The procedure for protein carbonyl measurement was fully described in our previous report.⁹ Experiments were performed at least three times.

DNA extraction and bisulfite treatment

DNA was extracted using genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan) according to the manufacturer's protocol. DNA concentration was measured using spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Wilmington, DE, USA). DNA (250 ng) was then subjected to bisulfite conversion using EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). In the last step, 20 μ l of M-Elution buffer was added to a column. After spinning, the bisulfite-treated DNA was collected and maintained at -20 °C until analysis.

Combined bisulfite restriction analysis PCR for LINE-1

Long interspersed nuclear element-1 methylation was determined using combined bisulfite restriction analysis (COBRA) polymerase chain reaction (PCR) assay, as described in our earlier studies.^{7,9,11} A part of 5'-UTR of LINE-1 was amplified from the bisulfite-treated DNA template. The PCR reaction contained 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 U of Hotstart Taq DNA polymerase and 0.2 μ M of each primer (F: 5'-CCG-TAA-GGG-GTT-AGG-GAG-TTT-TT-3' and R: 5'-RTA-AAA-CCC-TCC-RAA-CCA-AAT-ATA-AA-3'). PCR condition was set at 95 °C for 10 min, 35 cycles of 95 °C denaturation, 55 °C annealing, 72 °C extension (1 min each) and final extension at 72 °C for 10 min. LINE-1 amplicons (160 bp) containing two CpG dinucleotides were

cut by 1 U of TaqI (TTCGA) and TasI (LAATT), separated using 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, stained with SYBR Green and visualized by STORM scanner to quantify the band intensity (GE Healthcare Bio-sciences, Pittsburgh, PA, USA). Each experiment was performed at least six times. Schematic detail of the COBRA LINE-1 assay and the representative gel image are shown in Figure 2.

Two CpG dinucleotides in LINE-1 promoter (5'-AAC₁G-----CC₂GA--3') were detected. Four methylation patterns/states were classified, namely: ^mC₁^mC₂, ^uC₁^uC₂, ^mC₁^uC₂ and ^uC₁^mC₂. Intensity of bands, including 160 (^mC₁^mC₂), 98 (^uC₁^uC₂), 80 (^mC₁^mC₂ and ^uC₁^mC₂) and 62 bp (^uC₁^uC₂ and ^mC₁^mC₂), were quantified as described in the previous study.¹⁹ The intensity of each band was divided by its paired length, as follows: 160 bp/160 (a), 98 bp/94 (b), 80 bp/79 (c) and 62 bp/62 (d). The methylation level of LINE-1 was calculated as the percentage of the methylated (^mC) band intensity, divided by the sum of the ^mC and unmethylated (^uC) band intensities, as follows: 100 × (c + a)/(c + a + a + b + d). Percentage of ^mC₁^uC₂ (%^mC₁^uC₂) = 100 × (a)/((c - d + b)/2 + a + d), % ^uC₁^uC₂ = 100 × (d - b)/((c - d + b)/2 + a + d), % ^uC₁^mC₂ = 100 × b/((c - d + b)/2 + a + d) and % ^mC₁^mC₂ = 100 × ((c - d + b)/2)/((c - d + b)/2 + a + d). Pooled DNA from the untreated UM-UC-3 cells was used as a calibrator to normalize methylation variation between gels.

SAM and SAH determinations by high-performance liquid chromatography

S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine (SAH) concentrations in cell lysates were determined using high-performance liquid chromatography.^{20,21} Cell lysate samples (by freeze-thaw method) were combined with 0.8 M perchloric acid containing 3.2 mM sodium disulfite and incubated for 15 min on ice to precipitate proteins. The mixture was then centrifuged at 9000 xg at 4 °C for 10 min. Supernatant was collected, adjusted to pH 7.0 with 4 N KOH, filtered (0.22 μ m) and maintained at -20 °C until analysis.

Samples were loaded into a C18 HPLC column (vertical chromatography). The isocratic mobile phase consisted of solvent A (methanol) and solvent B (4.5 mM octanesulfonic acid, with 50 mM phosphate buffer solution pH 3.5) (A:B, 30:70) being used for separation. The flow rate was 1.0 ml/min. Ultraviolet absorption at 254 nm was monitored. Standard SAM and SAH with known concentrations dissolved in 0.4 M perchloric acid (standard curve R²: 0.9994 for SAM; 0.9999 for SAH) were used to calculate concentrations of SAM and SAH in cell lysate samples, based on the area under peaks. Because of variations in SAM and SAH concentrations between runs, changes in SAM and SAH levels in different conditions were expressed as percentage, as compared with the untreated control (100%).

Total GSH determination

Quantification of total GSH (reduced and oxidized forms) in cell lysate samples was carried out using Glutathione Assay Kit (US Biological, Salem, MA, USA). The test was

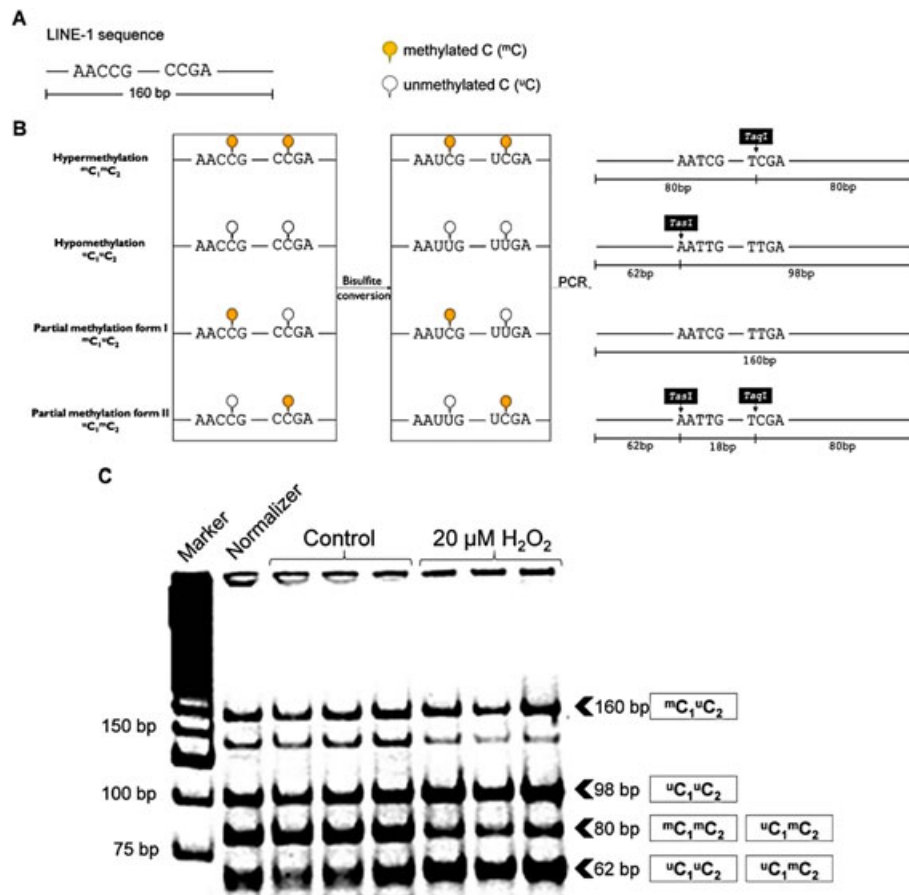


Figure 2. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) PCR for measurement of LINE-1 methylation. A: the detection 5'-UTR of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) sequence contains two CpG dinucleotides (5'-AAC₁G-----CC₂GA-3'). B: COBRA LINE-1 separated the detection LINE-1 region into four methylation patterns, namely: ^mC₁^mC₂, ^uC₁^uC₂, ^mC₁^uC₂ and ^uC₁^mC₂. The solid circles represent methylated C, and the hollow circles represent unmethylated C. After bisulfite treatment, the unmethylated C is converted to U, but the methylated C remains unchanged, resulting in retention or loss of CpG-containing recognition sites. PCR products (160 bp) are further digested with TaqI (TICGA) and TasI (IAATT) restriction enzymes. TaqI positive digestion yields two fragments of 80 bp. TasI positive digestion yields 62 and 98 bp fragments. C: representative gel image of COBRA PCR LINE-1 assay, from left to right: 25 bp marker, DNA control used for normalization between run, three DNA samples from untreated controls and three DNA samples from 20 μM H₂O₂-treated cells

performed according to the manufacturing's recommended procedure. Known GSH concentration standards (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 and 2.0 μg/well) were used to create a standard curve ($R^2=0.9786$) for calculating the GSH concentrations in cell lysate samples.

Hcy determination

Cell lysate samples were sent to the central laboratory, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand, for measurement of Hcy concentration using automated fluorescence polarization immunoassay (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). The laboratory routinely provides measurement of Hcy concentration in clinical specimens.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test, was used for testing the differences among groups.

GraphPad Prism 5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was employed for graphs and statistical analyses. P -value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Toxicity and oxidative stress induced by H₂O₂

For purposes of simulating ROS, H₂O₂ was used to induce oxidative stress in HK-2, UM-UC-3 and TCCSUP cells. To ensure that the H₂O₂ dose used in the experiments did not deliver a cytotoxic effect, MTT assay was performed in cells treated with various concentrations of H₂O₂ (10–150 μM). Cells treated with 10 and 20 μM H₂O₂ for 72 h did not significantly alter their viability. In contrast, H₂O₂ concentrations of 30 μM and higher caused a significant decrease in cell survival (Supplementary Figure 1). Therefore, an H₂O₂ concentration of 20 μM was selected for all subsequent experiments.

Intracellular ROS generation in all three cell types was significantly increased after exposure to 20 μ M H₂O₂ for 1 h (Figure 3A). Similarly, protein carbonyl content was significantly increased in cells treated with 20 μ M H₂O₂ for 72 h (Figure 3B–D). When co-treated with TA and NAC, levels of protein carbonyl in all three cell types were significantly decreased, as compared with H₂O₂-treated conditions. These findings indicate that H₂O₂ successfully induces cellular oxidative stress and that antioxidants are capable of preventing oxidative damage.

Reduced methylation of LINE-1 in cells exposed to H₂O₂

Long interspersed nuclear element-1 methylation levels in all three cell types exposed to 20 μ M H₂O₂ for 72 h were significantly decreased, as compared with untreated controls (Figure 4). After being treated with TA and NAC, levels of LINE-1 methylation were significantly increased. Similarly, co-treatment with SAM, methionine and folic acid precipitated significant increases in LINE-1 methylation, as compared with H₂O₂-treated cells (Figure 4). In control

condition, basal level of LINE-1 methylation in HK-2 cells was greater than UM-UC-3 and TCCSUP cells, respectively. We concluded that H₂O₂ effectively reduced LINE-1 methylation in normal kidney and bladder cancer cells. TA, NAC, SAM, methionine and folic acid were able to reestablish the methylation level of LINE-1.

Methylation level of each methylation species in cells treated with H₂O₂ is shown in Figure 5. %^mC₁^mC₂ was significantly decreased in HK-2 cells treated with H₂O₂ (Figure 5A), but it was significantly increased in UM-UC-3 cells treated with H₂O₂. Co-treatment with TA, NAC, SAM and folic acid caused a significant increase in %^mC₁^mC₂, as compared with the H₂O₂-treated condition, both in HK-2 and UM-UC-3 cells. %^uC₁^uC₂ in HK-2 and UM-UC-3 cells treated with H₂O₂ was significantly decreased, but it was significantly increased in TCCSUP cells treated with H₂O₂. Co-treatment with TA and SAM significantly decreased %^uC₁^uC₂ in all cell types, as compared with their respective H₂O₂-treated condition. Significant reduction of %^mC₁^uC₂ in H₂O₂-treated condition was found in HK-2 and UM-UC-3 cells, but significant

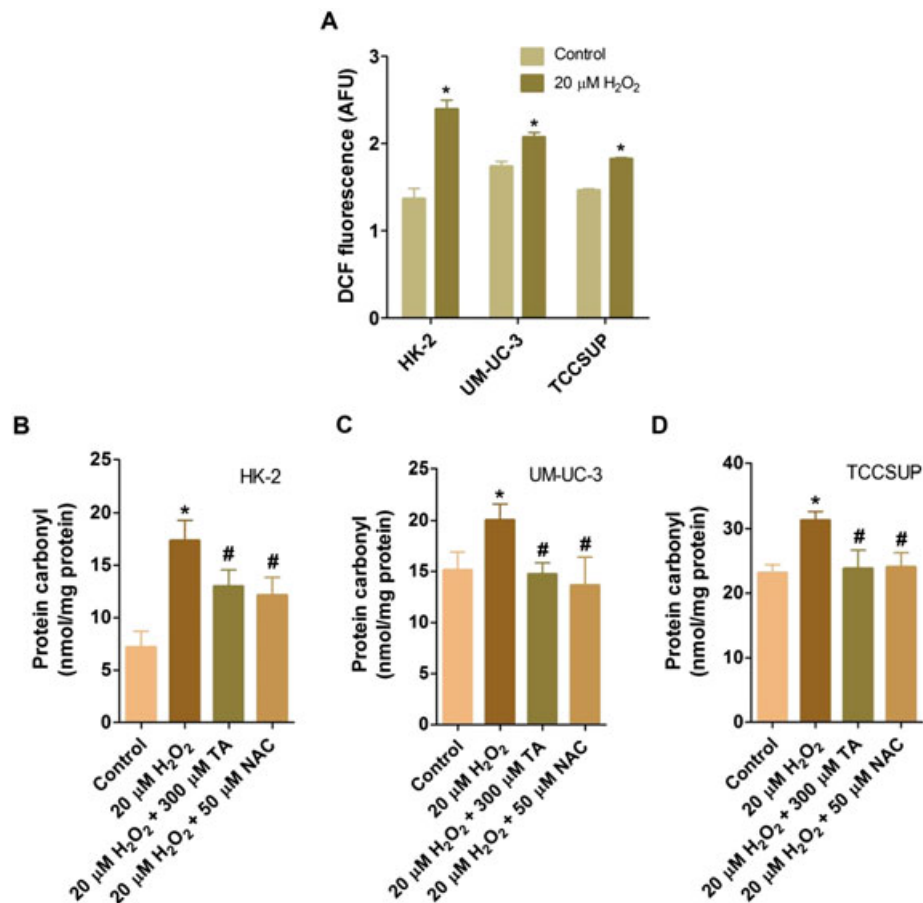


Figure 3. Reactive oxygen species (ROS) generation and protein oxidation in HK-2, UM-UC-3 and TCCSUP cells exposed to 20 μ M H₂O₂ for 72 h. ROS generation was significantly increased in all cells treated with H₂O₂, as compared with their respective untreated controls. Protein carbonyl content in HK-2 (A), UM-UC-3 (B), TCCSUP (C) and cells treated with H₂O₂ (D) were significantly greater than those of their untreated controls. Co-treatment with tocopheryl acetate (TA) and N-acetylcysteine (NAC) significantly reduced protein carbonyl content in cells treated with H₂O₂. Bars indicate means, and error bars indicate standard deviation. * denotes $P < 0.05$ vs control; # denotes $P < 0.05$ vs H₂O₂-treated condition

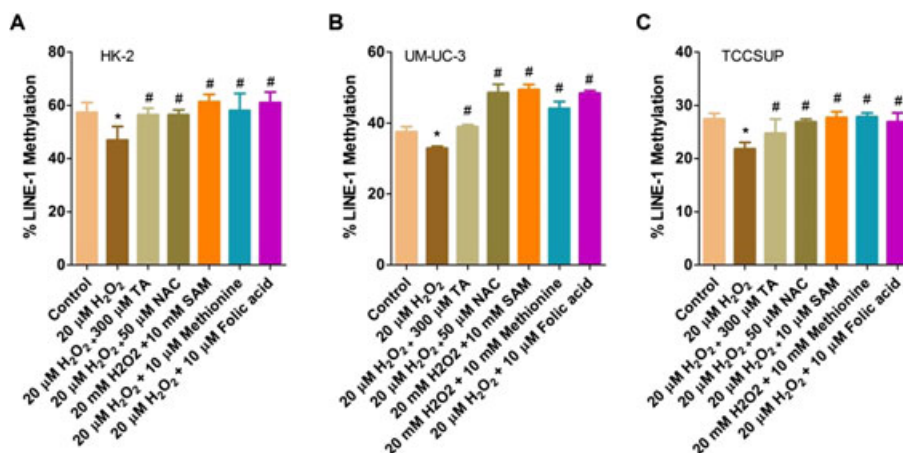


Figure 4. Level of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) methylation (%) in HK-2, UM-UC-3 and TCCSUP cells exposed to 20 μ M H_2O_2 for 72 h and the effect of tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), S-adenosylmethionine (SAM), methionine and folic acid on LINE-1 methylation in H_2O_2 -treated cells. LINE-1 methylation levels were significantly decreased in HK-2 (A), UM-UC-3 (B) and TCCSUP (C) cells treated with H_2O_2 , as compared with their respective untreated controls. Co-treatments with TA, NAC, SAM, methionine and folic acid significantly increased LINE-1 methylation levels in H_2O_2 -treated cells. Bars indicate means, and error bars indicate standard deviation. * denotes $P < 0.05$ vs control; # denotes $P < 0.05$ vs H_2O_2 -treated condition

reduction of $\%^{13}C_1C_2$ in H_2O_2 -treated condition was found in TCCSUP and UM-UC-3 bladder cancer cells. Supplement with antioxidants and metabolites in one-carbon metabolism pathway were able to restore the change (Figure 5).

Decreased SAM level in cells exposed to H_2O_2

Levels of SAM in cells treated with H_2O_2 for 72 h were significantly lower than levels of SAM in untreated controls (Figure 6). NAC supplied cysteine significantly increased the SAM level in cells exposed to H_2O_2 . In addition, SAM, methionine and folic acid supplements significantly increased SAM levels in cells treated with H_2O_2 . Changes in SAH levels in cells treated with H_2O_2 were not observed (Supplementary Figure 2). We concluded that SAM was depleted in cells undergoing oxidative stress, but that SAM levels could be replenished with SAM, NAC, methionine and folic acid supplements.

Increased total GSH and decreased Hcy in cells exposed to H_2O_2

Total GSH concentrations in all three cell types treated with H_2O_2 for 72 h were significantly increased, as compared with untreated cells (Figure 7A–C). Co-treatment with TA and NAC caused a significant decrease in total GSH concentrations, as compared with the H_2O_2 -treated cells. In contrast, Hcy concentrations in HK-2 and TCCSUP cells treated with H_2O_2 were significantly lower than those in the untreated controls (Figure 7D–E). Supplementation with NAC significantly increased Hcy levels in cells treated with H_2O_2 . This finding suggests that synthesis of GSH via the transsulfuration pathway in cells experiencing oxidative stress is increased (as an antioxidative response to fight ROS), leading to a decrease in Hcy levels.

DISCUSSION

Hypomethylation of LINE-1 is associated with an increased risk for bladder cancer development.^{9,22} We recently found that LINE-1 hypomethylation is associated with increased oxidative stress in both bladder cancer patients and healthy controls.⁹ Moreover, we demonstrated that ROS was an inducing factor for LINE-1 hypomethylation in the bladder cancer cell line.¹¹ In this study, we experimentally proved that ROS-induced LINE-1 hypomethylation was mediated through an inadequacy of SAM. We found that total GSH was elevated, Hcy and SAM were depleted, and LINE-1 was hypomethylated in bladder cancer and normal kidney cells challenged with H_2O_2 . These findings indicate that oxidative stress causes hypomethylation of LINE-1, both in cancer and normal conditions. Although not proven, we hypothesize that LINE-1 hypomethylation in normal cells may promote carcinogenic transformation; whereas, LINE-1 hypomethylation in cancer cells may potentiate the aggressiveness of tumour. Further study is required to establish the validity of these hypotheses. Interestingly, supplementations with TA, NAC, SAM, methionine and folic acid were successful in restoring the methylation level of LINE-1 in H_2O_2 -treated cells. These findings may stimulate the development of new treatments or approaches that effectively prevent tumorigenesis and decelerate cancer progression.

The methylation of cytosine in DNA to form 5mC essentially requires SAM.²³ SAM is synthesized from methionine in the one-carbon metabolism pathway, while methionine is converted from Hcy, using 5-methyl-tetrahydrofolate as a co-factor (Figure 1). Supplementations with SAM, methionine and folate have been shown to raise cellular SAM level and increase genomic DNA methylation.^{24,25} The one-carbon metabolism pathway is linked to oxidative stress via the transsulfuration pathway; whereas, Hcy is converted to Cys to be used in the synthesis of GSH, a major cellular

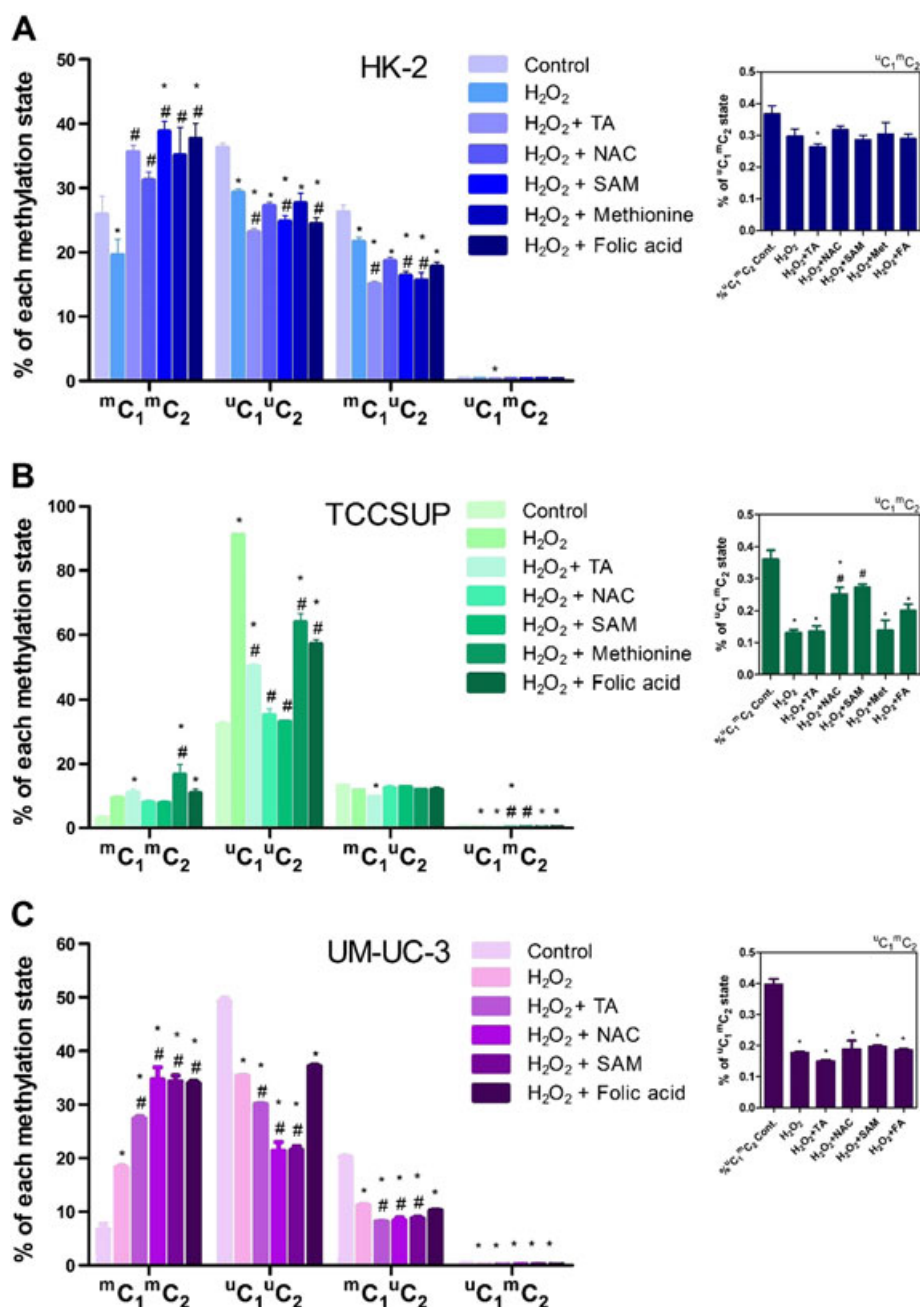


Figure 5. Percentage of each methylation state of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) in HK-2 (A), TCCSUP (B) and UM-UC-3 (C) cells exposed to 20 μ M H₂O₂ for 72 h and the effect of tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), S-adenosylmethionine (SAM), methionine and folic acid on % of each methylation state in H₂O₂-treated cells. Bars indicate means, and error bars indicate standard deviation. * denotes $P < 0.05$ vs control; # denotes $P < 0.05$ vs H₂O₂-treated condition

antioxidant.²⁶ Oxidative stress stimulates the activity of cystathionine β -synthase in the transsulfuration pathway to produce cystathionine from Hcy.¹⁷ About 50% of Cys in GSH is derived from Hcy, emphasizing the significance of the transsulfuration pathway in the synthesis of GSH.^{27,28} Furthermore, it is believed that the transsulfuration pathway is crucial in preventing cancer development by protecting normal cells from oxidative damage.²⁹ An increase in

GSH synthesis via the transsulfuration pathway to combat ROS leads to a decrease in Hcy, which is used for synthesizing SAM (Figure 1).

Causal association of oxidative stress with genome-wide hypomethylation has been documented, and oxidative stress-induced depletion of SAM leading to global DNA hypomethylation has been proposed.¹⁴ Mice with *superoxide dismutase 1* knockdown (*Sod1*^{+/-}) have increased oxidative

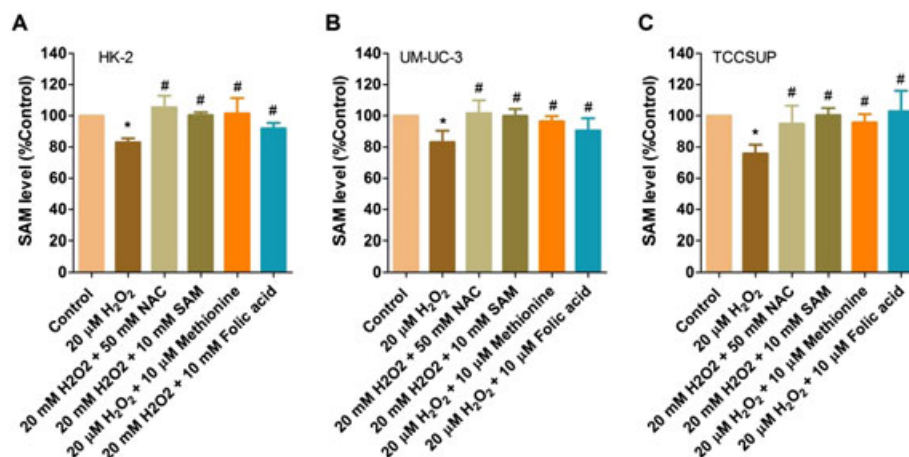


Figure 6. Level of S-adenosylmethionine (SAM) in HK-2, UM-UC-3 and TCCSUP cells exposed to 20 μ M H₂O₂ for 72 h and the effect of N-acetylcysteine (NAC), S-adenosylmethionine (SAM), methionine and folic acid on SAM level in H₂O₂-treated cells. SAM levels were significantly decreased in HK-2 (A), UM-UC-3 (B) and TCCSUP (C) cells treated with H₂O₂, as compared with their respective untreated controls. Co-treatments with NAC, SAM, methionine and folic acid significantly increased SAM levels in H₂O₂-treated cells. Bars indicate means, and error bars indicate standard deviation. * denotes $P < 0.05$ vs control; # denotes $P < 0.05$ vs H₂O₂-treated condition

stress and global DNA hypomethylation in prostatic tissues.³⁰ Intracellular SAM is depleted in lung epithelial-like cells (A549) exposed to H₂O₂ (1000 μ M, 1 h); whereas, total GSH concentration is increased after exposure to a lower concentration of H₂O₂ (100 μ M, 1 h).³¹ Exposure of leukemic cell line (K562) to cadmium causes increased generation of ROS and global hypomethylation; however, when co-treated with methionine, these alterations are restored.³² In melanoma cells (melan-a) with anchorage blockage, ROS production and total GSH level are increased; whereas, Hcy concentration is decreased.³³ A hepatoma cell line (HepG2) exposed to H₂O₂ (50–250 μ M, 24 h) showed a decrease in extracellular release of Hcy, suggesting an increase in intracellular usage of Hcy.³⁴ In mice lacking *apolipoprotein E* (*APOE*^{−/−}) (which have constitutively increased oxidative stress), plasma Hcy level was not elevated after feeding with folate-deficient diet, suggesting that Hcy transfers to the transsulfuration pathway for synthesizing GSH.³⁵ Although the findings mentioned earlier support the hypothesis that oxidative stress induces depletion of SAM leading to global DNA hypomethylation, the experiments are separately performed in different laboratories. Therefore, there is limitation for drawing a definite conclusion.

We provide, herein, first comprehensive results showing an increase in total GSH, but a decrease in Hcy following H₂O₂ exposure. Co-exposure with NAC normalized these changes. This finding indicates that the transsulfuration pathway is overly active in cells undergoing oxidative stress. Reduced amount of Hcy produces low amount of methionine, leading to inadequate production of SAM, resulting in hypomethylation of DNA. Therefore, transsulfuration and one-carbon metabolism pathways are a bridge of mechanistic linkage between oxidative stress and genome-wide hypomethylation. Based on our review of the literature, we have demonstrated for the first time

the mechanism of ROS-induced LINE-1 hypomethylation in bladder cancer and normal kidney cells. More specifically, we have shown that ROS-activated GSH synthesis results in Hcy depletion, thus causing a reduction in SAM synthesis, and finally resulting in hypomethylation of LINE-1.

Although we demonstrated that SAM depletion was responsible for ROS-induced LINE-1 hypomethylation, there might be other mechanism acting in concert to regulate the ROS-induced global hypomethylation. TET methylcytosine dioxygenase converts 5mC to 5hmC using α -ketoglutarate as co-substrate and Fe(II) as co-factor.³⁶ It is hypothesized that oxidative stress decreases nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) levels and consequently causes increase in NAD⁺ level in mitochondria leading to activation of NAD⁺-dependent Sirtuin 3, a protein deacetylase enzyme. Sirtuin 3 deacetylates mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and activates it. IDH2 converts isocitrate to α -ketoglutarate resulting in increased activity of the TET enzyme, hence increasing the conversion of 5mC to 5hmC.¹² Recently, Niu *et al.* demonstrated that TET activity and 5hmC level were reduced in human bronchial epithelial cells treated with H₂O₂ (150 μ M, 72 h, 50% cell survival).³⁷ They reasoned that perhaps ROS oxidized Fe(II) to Fe(III), hence reducing the activity of TET enzyme. Takumi *et al.* showed in mice that methyl-deficient diet induced hepatic expression of TET2, TET3 and proteins involved in DNA demethylation pathway.³⁸ Although methyl-deficient diet is known to induce oxidative stress, it is totally unknown how methyl-deficient diet upregulates the TET enzymes. Additionally, Kang *et al.* showed that ROS generated by 5-fluorouracil (5-FU) upregulated TET1 expression in colorectal cancer cells.³⁹ Global decrease in 5mC and increase in 5hmC levels were observed in the 5-FU-treated colorectal cancer cells. The authors concluded that 5-FU

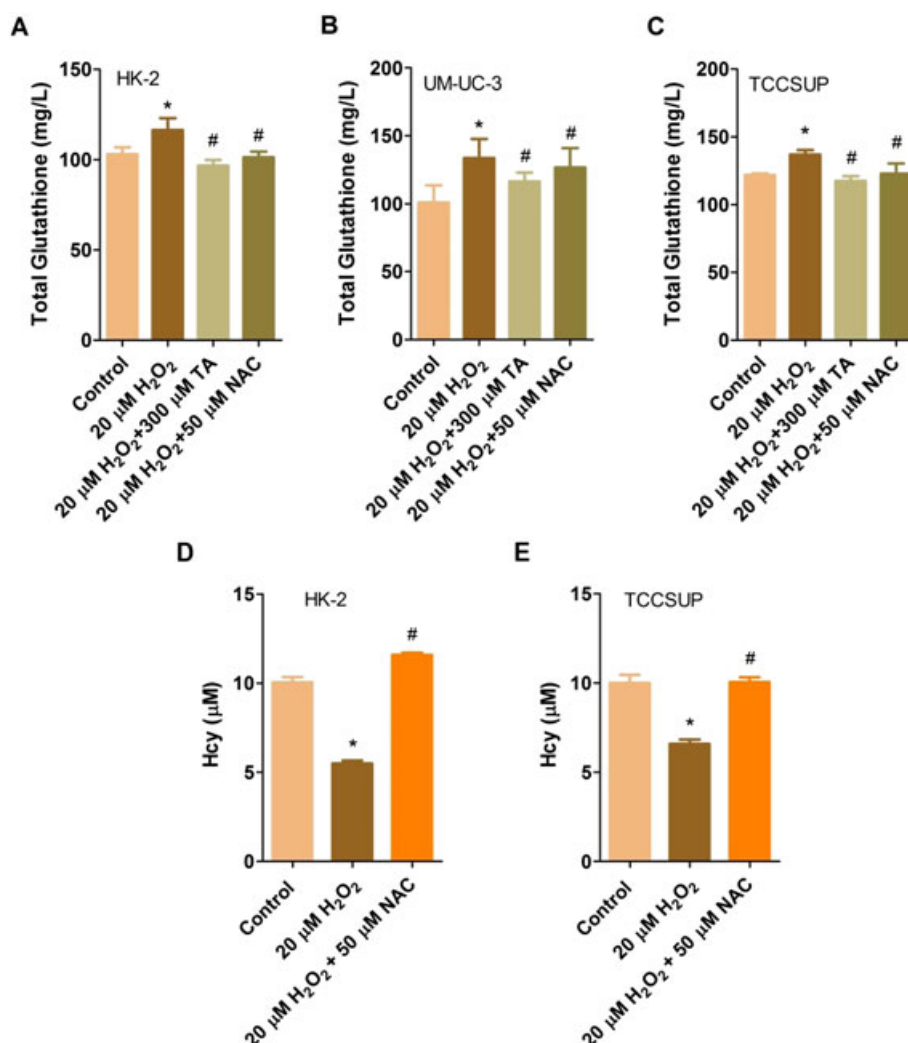


Figure 7. Total glutathione (GSH) and homocysteine (Hcy) concentrations in HK-2, UM-UC-3 and TCCSUP cells exposed to 20 μ M H₂O₂ for 72 h and the effect of antioxidants on total GSH and Hcy concentrations in H₂O₂-treated cells. Total GSH concentrations were significantly increased in HK-2 (A), UM-UC-3 (B) and TCCSUP (C) cells treated with H₂O₂, as compared with their respective untreated controls. Co-treatments with tocopheryl acetate (TA) and N-acetylcysteine (NAC) significantly decreased total GSH levels in the H₂O₂-treated cells. Hcy concentrations in H₂O₂-treated HK-2 (D) and TCCSUP (E) cells were significantly lower than those in the untreated controls. Supplements of NAC significantly raised Hcy concentrations in the H₂O₂-treated cells. Bars indicate means, and error bars indicate standard deviation. * denotes $P < 0.05$ vs control; # denotes $P < 0.05$ vs H₂O₂-treated condition

induced ROS generation that consequently caused increased expression of TET1, and thus leading to global reduction of 5mC. To the authors' knowledge, TET expression following H₂O₂ exposure has not been reported so far. Whether ROS directly induces TET expression and activates the TET-mediated DNA demethylation remain to be elucidated.

Bladder cancer and normal kidney cells were used in this study. We chose bladder cancer cell lines because of the results from our previous studies that showed that ROS was a cause of global hypomethylation in bladder cancer.^{9,11} Our primary aim was to explore whether the mechanism of ROS-induced LINE-1 hypomethylation is mediated via SAM depletion in bladder cancer cells. Although normal urothelial cells were the most appropriate normal counterpart of bladder cancer cells to test the effect of ROS on induction of LINE-1 hypomethylation in non-malignant

condition, the cells were not commercially available. We, therefore, opted to use normal kidney cells instead under the reason that at least normal urothelial and kidney cells located in the same urinary system and continually expose to urinary milieu. We observed ROS-induced global hypomethylation in both bladder cancer and normal kidney cells. Therefore, it is interesting to ask if this phenomenon is a general or fundamental process that occurs in other cell types as well. Recently, global hypomethylation accompanied with ageing phenotype was shown in dermal fibroblast and prostate cancer (DU145) cells treated with H₂O₂ (200 μ M, 2 h).⁴⁰ These might suggest that ROS-induced global DNA hypomethylation would be a general cellular process that responds to ROS rather than a process that is specific to cell types or cell states. However, this speculation needs further experimental proof.

H₂O₂ is widely used as representative of ROS in cell culture experiments. In addition to oxidative stress stimulation, H₂O₂ has various physiological functions in cells (known as redox biology), for instances, aiding in killing pathogen in phagocytic cells and acting as cellular signalling messenger.⁴¹ Physiologic level of intracellular H₂O₂ ranges between 0.001 and 0.7 μ M.⁴¹ Plasma level of H₂O₂ in healthy individuals can be found up to 35 μ M,⁴² while average urinary level of H₂O₂ in healthy subjects is reported at 16.94 $\pm$ 25.73 μ M.⁴³ Significant increases in concentrations of plasma (24.53 $\pm$ 4.68 vs 20.78 $\pm$ 1.05 μ M) and urinary (59.84 $\pm$ 4.85 vs 29.00 $\pm$ 2.10 μ M) H₂O₂ are observed in cancer patients compared with healthy controls.^{44,45} In the present study, we used concentration of H₂O₂ at 20 μ M that lied within the physiological range. Therefore, our present *in vitro* finding could translate to the physiological circumstance. However, the effect of H₂O₂ (at the same dose) on LINE-1 hypomethylation *in vivo* might have a lesser degree than that seen in an *in vitro* situation, because several antioxidants are usually presented in an *in vivo* system, but they are deficient in cell culture media.⁴⁶

Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation is involved in bladder cancer genesis.^{8,47,48} Neuhausen *et al.* report in patients with urothelial carcinoma that LINE-1 hypomethylation is associated with a higher stage of tumour and a shorter survival.⁴⁹ Additionally, LINE-1 hypomethylation is shown to associate with aggressiveness in colon cancer⁵⁰ and gastrointestinal stromal tumours.⁵¹ In this study, we found that antioxidants (TA and NAC), as well as one-carbon metabolites (methionine, SAM and folic acid), were capable of preventing hypomethylation of LINE-1, both in bladder cancer and normal kidney cells experiencing oxidative stress. Therefore, these agents may be beneficial in preventing the development and retarding the progression of bladder cancer. To verify this, extensive further study is required.

Limitations of the present study should be mentioned. This was an *in vitro* study that was designed to elucidate the biochemical mechanism(s) of ROS-induced LINE-1 hypomethylation. Oxidative stress, SAM depletion and LINE-1 hypomethylation in bladder cancer tissues were not investigated. As a result of normal urothelial cells not being available, human kidney cells were used as a non-malignant representative. Additionally, doses of antioxidant and one-carbon metabolite supplements in the H₂O₂-treated cells were not varied to see if the reestablishment of LINE-1 methylation caused by these supplements is dose-dependent. In addition to SAM depletion, TET-mediated DNA demethylation might be responsible for the ROS-induced LINE-1 hypomethylation. We did not explore this mechanism in the present study.

It also should be noted that the effect of ROS on induction of LINE-1 hypomethylation was found to be moderate. The reason for the moderate change may be due to the use of non-lethal low dose of H₂O₂ (20 μ M). This dose, however, is enough to stimulate oxidative stress in the exposed cells. The advantage is that confounding effect of cell death on oxidative stress-induced LINE-1 hypomethylation can be eliminated. The other reason for the moderate effect of

ROS on LINE-1 hypomethylation might be due to sensitivity of COBRA PCR assay. COBRA PCR has lower sensitivity than the other quantitative PCR-based methods.

In conclusion, this is the first study demonstrating that SAM depletion induced by H₂O₂ mediates the hypomethylation of LINE-1 in urothelial cancer and normal kidney cells. Our findings suggest that H₂O₂ triggers an influx of Hcy into the transsulfuration pathway, resulting in insufficient production of SAM via one-carbon metabolism. Antioxidant and one-carbon metabolite supplements efficiently reestablish cellular levels of SAM and the methylation level of LINE-1. Treatments or regimens to attenuate oxidative stress may be beneficial in preventing tumour development in normal conditions and in decelerating tumour progression in malignant conditions.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a TRF Research Career Development Grant from the Thailand Research Fund and by Chulalongkorn University (RSA5680019 to C.B.). C.K. was awarded a thesis research fund under the 90th Anniversary of Chulalongkorn University, Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund [42(2/2557)] from Chulalongkorn University.

REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 27–36.
- Jiang Y, Liu S, Chen X, Cao Y, Tao Y. Genome-wide distribution of DNA methylation and DNA demethylation and related chromatin regulators in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1835; **2013**: 155–163.
- Li J, Huang Q, Zeng F, *et al.* The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; **9**: e106290.
- Carreira PE, Richardson SR, Faulkner GJ. L1 retrotransposons, cancer stem cells and oncogenesis. *FEBS J* 2014; **281**: 63–73.
- Rodic N, Burns KH. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003402.
- Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, *et al.* Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004; **23**: 8841–8846.
- Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; **13**: 298–307.
- Patchesung M, Boonla C, Amnatrakul P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Tosukhowong P. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One* 2012; **7**: e37009.
- Opanuraks J, Boonla C, Saelim C, *et al.* Elevated urinary total sialic acid and increased oxidative stress in patients with bladder cancer. *Asian Biomed* 2010; **4**: 703–710.
- Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. Oxidative stress induces hypomethylation

- of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**: 3773–3778.
12. Chia N, Wang L, Lu X, Senut MC, Brenner C, Ruden DM. Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics* 2011; **6**: 853–856.
 13. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; **266**: 6–11.
 14. Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**: 1023–1036.
 15. Turk PW, Laayoun A, Smith SS, Weitzman SA. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 1253–1255.
 16. Wachsman JT. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; **375**: 1–8.
 17. McBean GJ. The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino Acids* 2012; **42**: 199–205.
 18. Kittikowit W, Waiwijit U, Boonla C, et al. Increased oxidative DNA damage seen in renal biopsies adjacent stones in patients with nephrolithiasis. *Urolithiasis* 2014; **42**: 387–394.
 19. Wangsri S, Subbalekha K, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Patterns and possible roles of LINE-1 methylation changes in smoke-exposed epithelia. *PLoS One* 2012; **7**: e45292.
 20. Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; **762**: 59–65.
 21. Wise CK, Cooney CA, Ali SF, Poirier LA. Measuring S-adenosylmethionine in whole blood, red blood cells and cultured cells using a fast preparation method and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; **696**: 145–152.
 22. Kreimer U, Schulz WA, Koch A, Niegisch G, Goering W. HERV-K and LINE-1 DNA methylation and reexpression in urothelial carcinoma. *Front Oncol* 2013; **3**: 255.
 23. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996; **10**: 471–480.
 24. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem* 2012; **23**: 853–859.
 25. Batra V, Verma P. Dietary L-methionine supplementation mitigates gamma-radiation induced global DNA hypomethylation: enhanced metabolic flux towards S-adenosyl-L-methionine (SAM) biosynthesis increases genomic methylation potential. *Food Chem Toxicol* 2014; **69**: 46–54.
 26. Bottiglieri T. S-Adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr* 2002; **76**: 1151S–1157S.
 27. Vitvitsky V, Mosharov E, Tritt M, Ataulkhanov F, Banerjee R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* 2003; **8**: 57–63.
 28. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000; **39**: 13005–13011.
 29. Rosado JO, Salvador M, Bonatto D. Importance of the trans-sulfuration pathway in cancer prevention and promotion. *Mol Cell Biochem* 2007; **301**: 1–12.
 30. Bhusari SS, Dobosy JR, Fu V, Almassi N, Oberley T, Jarrard DF. Superoxide dismutase 1 knockdown induces oxidative stress and DNA methylation loss in the prostate. *Epigenetics* 2010; **5**: 402–409.
 31. Panayiotidis MI, Stabler SP, Allen RH, Pappa A, White CW. Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutat Res* 2009; **674**: 23–30.
 32. Huang D, Zhang Y, Qi Y, Chen C, Ji W. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicol Lett* 2008; **179**: 43–47.
 33. Campos AC, Molognoni F, Melo FH, et al. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 2007; **9**: 1111–1121.
 34. Hultberg M, Hultberg B. Oxidative stress decreases extracellular homocysteine concentration in human hepatoma (HepG2) cell cultures. *Chem Biol Interact* 2007; **165**: 54–58.
 35. Rogers EJ, Chen S, Chan A. Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. *N Engl J Med* 2007; **357**: 421–422.
 36. Minor EA, Court BL, Young JJ, Wang G. Ascorbate induces ten–eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem* 2013; **288**: 13669–13674.
 37. Niu Y, DesMarais TL, Tong Z, Yao Y, Costa M. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic Biol Med* 2015; **82**: 22–28.
 38. Takumi S, Okamura K, Yanagisawa H, Sano T, Kobayashi Y, Nohara K. The effect of a methyl-deficient diet on the global DNA methylation and the DNA methylation regulatory pathways. *J Appl Toxicol* 2015; doi:10.1002/jat.3117.
 39. Kang KA, Piao MJ, Kim KC, et al. Epigenetic modification of Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells: involvement of TET-dependent DNA demethylation. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1183.
 40. Oh JH, Gertych A, Tajbakhsh J. Nuclear DNA methylation and chromatin condensation phenotypes are distinct between normally proliferating/aging, rapidly growing/immortal, and senescent cells. *Oncotarget* 2013; **4**: 474–493.
 41. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006; **8**: 243–270.
 42. Varma SD, Devamanoharan PS. Hydrogen peroxide in human blood. *Free Radic Res Commun* 1991; **14**: 125–131.
 43. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000; **486**: 10–13.
 44. Chandramathi S, Suresh KG, Anita ZB, Kuppusamy UR. Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. *Malays J Med Sci* 2009; **16**: 15–20.
 45. Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta* 2003; **334**: 205–209.
 46. Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and *in vivo*? *IUBMB Life* 2000; **50**: 251–257.
 47. Besaratinia A, Cockburn M, Tommasi S. Alterations of DNA methylome in human bladder cancer. *Epigenetics* 2013; **8**: 1013–1022.
 48. Hoffmann MJ, Schulz WA. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 2005; **83**: 296–321.
 49. Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2006; **5**: 993–1001.
 50. Sunami E, de Maat M, Vu A, Turner RR, Hoon DS. LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PLoS One* 2011; **6**: e18884.
 51. Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, et al. A novel correlation between LINE-1 hypomethylation and the malignancy of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 5114–5123.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

RESEARCH ARTICLE

Increased Oxidative Stress and *RUNX3* Hypermethylation in Patients with Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Induction of *RUNX3* Hypermethylation by Reactive Oxygen Species in HCC Cells

Poonsin Pongpairoj, Patcharawalai Whongsiri, Surasit Suwannasin, Apichaya Khlaiphuengsin, Pisit Tangkijvanich, Chanchai Boonla*

Abstract

Promoter hypermethylation of the runt-related transcription factor 3 (*RUNX3*) gene is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC). Oxidative stress plays a vital role in both carcinogenesis and progression of HCC. However, whether oxidative stress and *RUNX3* hypermethylation in HCC have a cause-and-effect relationship is not known. In this study, plasma protein carbonyl and total antioxidant capacity (TAC) in patients with hepatitis B virus (HBV)-associated HCC (n=60) and age-matched healthy subjects (n=80) was determined. *RUNX3* methylation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of subjects was measured by methylation-specific PCR. Effect of reactive oxygen species (ROS) on induction of *RUNX3* hypermethylation in HCC cells was investigated. Plasma protein carbonyl content was significantly higher, whereas plasma TAC was significantly lower, in HCC patients than healthy controls. Based on logistic regression, increased plasma protein carbonyl and decreased plasma TAC were independently associated with increased risk for HCC. PBMC *RUNX3* methylation in the patient group was significantly greater than in the healthy group. *RUNX3* methylation in hydrogen peroxide (H₂O₂)-treated HepG2 cells was significantly higher than in untreated control cells. In conclusion, increase in oxidative stress in Thai patients with HBV-associated HCC was demonstrated. This oxidative increment was independently associated with an increased risk for HCC development. *RUNX3* in PBMC was found to be hypermethylated in the HCC patients. *In vitro*, *RUNX3* hypermethylation was experimentally induced by H₂O₂. Our findings suggest that oxidative stress is a cause of *RUNX3* promoter hypermethylation in HCC cells.

Keywords: HCC, HBV, oxidative stress, ROS, *RUNX3* hypermethylation, DNA methylation

Asian Pac J Cancer Prev, 16 (13), 5343-5348

Introduction

Liver cancer is a leading cancer in Thailand comprising of two main forms. One is cholangiocarcinoma, and the other is hepatocellular carcinoma (HCC). HCC in Thailand is principally associated with chronic hepatitis B virus (HBV) infection (Tangkijvanich et al., 1999), however molecular mechanism of HBV-associated HCC development in Thai patients is not fully understood. Beside chronic inflammatory activation, oxidative stress is considerably increased in HBV-associated HCC patients (Tsai et al., 2009, Nair et al., 2010, Zhao et al., 2011), and has been believed to play an important role in the development of viral-induced HCC (Marra et al., 2011, Higgs et al., 2014). In addition, oxidative stress is found to increase during the replication of HBV in cell culture model (Severi et al., 2006).

Oxidative stress, a condition with overwhelming generation of reactive oxygen species (ROS) and/or inadequacy of antioxidants, exerts a tumorigenic role to promote both genetic mutation and epigenetic alteration (Franco et al., 2008, Ziech et al., 2011). An epigenetic hallmark that is found in all carcinomas including HCC is an alteration of DNA methylation (Herceg and Paliwal, 2011). There are two types of DNA methylation alterations in cancers viz. genome-wide or global hypomethylation and promoter hypermethylation of tumor suppressor genes (TSG). Silencing of TSG via DNA methylation is well recognized in the carcinogenesis of HCC (Sceusi et al., 2011). Runt-related transcription factor 3 (*RUNX3*) is one of TSG that vitally involves in the HCC carcinogenesis and progression. Promoter hypermethylation of *RUNX3* is associated with increased risk for HCC (Yang et al., 2014, Zhang et al., 2015). *RUNX3* expression is decreased

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand *For correspondence: chanchai.b@chula.ac.th

in HCC tissues as well as HCC cell lines (Li and Jiang, 2011). Loss of *RUNX3* expression is associated with the progression of tumor, as it is able to induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the low-EMT HCC cells (Tanaka et al., 2012). Up to now, cause and regulation of *RUNX3* hypermethylation in HCC is not known.

Oxidative stress-induced aberrations of DNA methylation in HCC has been hypothesized and demonstrated (Nishida and Kudo, 2013). ROS-induced hypermethylation of E-cadherin promoter is demonstrated in HCC cell lines (Lim et al., 2008). We previously demonstrated an induction of *RUNX3* hypermethylation by ROS in bladder cancer cells (Wongpaiboonwattana et al., 2013). Hitherto, causative relationship between ROS and *RUNX3* hypermethylation in HCC, especially HBV-associated HCC, has not been investigated.

In the present study, oxidative stress and *RUNX3* hypermethylation in HBV-associated HCC patients were investigated. Experimentally, whether ROS was able to induce *RUNX3* hypermethylation in HCC cells was investigated.

Materials and Methods

Patients and specimen collection

A total of 140 subjects divided into HCC (n=60) and healthy (n=80) groups were recruited for the study. Means age between these two groups (52.33±7.91 vs. 50.59±5.54 years old) were not significantly different (Table 1). There were 52 (86.67%) men and 8 (13.33%) women in the HCC groups. The healthy control group was consisted of 50 (62.5%) men and 30 (37.5%) women (P=0.001 vs. HCC group). All HCC patients were serologically proof (including DNA test) to have chronic HBV infection, considered as HBV-associated HCC. HBsAg was positive, but anti-hepatitis C virus was negative in all cases. Of 60 patients, 52 had data of cirrhosis and staging. Most of patients (78.85%) had cirrhotic liver. According to Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system, patients in stage 0, A, B and C were accounted for 2 (3.85%), 7 (13.46%), 19 (36.54%) and 24 (46.15%), respectively (Table 1).

Blood samples were preoperatively collected, representing as pre-treatment samples. Plasma was separated, and DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Healthy subjects were blood donors at Thai Red Cross, Bangkok, Thailand. Blood samples leftover from the routine blood test were used for plasma and DNA isolations. Informed consents were received from all participants prior to collection of specimen. Research protocol was approved by the Ethics Committee, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Protein carbonyl determination

Protein carbonyl content, an indicator of oxidative protein damage (protein oxidation), was measured in plasma samples and cell lysate. The procedure for protein carbonyl measurement in plasma was fully described in our previous report (Patchsung et al., 2012). For cell lysate, cells were lysed with RIPA buffer, and the

lysate was centrifuged at 4,500 xg for 10 min to collect supernatant. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Protein carbonyl in cell lysate was measured in a similar way to the procedure performed in plasma samples. Experiments were performed at least in triplicate.

Total antioxidant capacity (TAC) measurement

TAC was measured using 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) method (Floegel et al., 2011). For quality control, absorbance of ABTS radical solution at 734 nm between lots was adjusted to 0.650±0.020. Plasma or cell lysate samples were diluted (1:5) in distilled water. Samples or water (blank) (20 µL) were added to ABTS solution (980 µL). The mixture was mixed well and incubated at 37°C for 10 min. Absorption (A) at 734 nm was measured. Percentage of antioxidant activity (%AA) of sample was calculated from: $\%AA = ((A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}) \times 100$. Vitamin C standard with known concentrations (0, 0.25, 0.5 and 1 mM) were used for creating a standard curve (%AA vs. vitamin C concentration) ($R^2=0.9253$). TAC of each sample was derived from standard curve and expressed as vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) (mg/L). Each sample was measured in duplicate.

Cell culture condition

HepG2 cells gifted from Dr. Sunchai Payungporn were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, CA, USA), 1% Pen-Strep under 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. H₂O₂ (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany) was used to stimulate cellular oxidative stress. N-acetylcysteine (NAC) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) at 50 µM was used as antioxidant to attenuate oxidative stress in the H₂O₂-treated cells.

Cell viability assay

HepG2 cells were plated in a 96-well plate (2x10⁵ cells/well). Confluent cells were treated with varied concentrations of H₂O₂ (0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, and 200 µM) in serum-free medium for 72 h. After washing, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/mL) was added and incubated for 4 h at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. MTT solution was discarded and dimethyl sulfoxide (100 µL/well) was added to solubilize the purple formazan crystals. Absorption at 570 nm was measured. Untreated cells were used as controls and expressed as 100% viability.

DNA extraction and bisulfite treatment

PBMC was isolated from blood samples. DNA was extracted using genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan) according to the manufacturer's procedure. DNA concentration was measured using spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Wilmington, DE, USA). Bisulfite conversion of DNA (250 ng) was performed using EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The bisulfite-treated DNA was collected and kept at -20°C for further analysis.

Measurement of RUNX3 methylation by methylation-specific PCR (MSP)

RUNX3 methylation was measured by MSP method (Homma et al., 2006, Zhang et al., 2009). Methylated primers were F: 5'-ATA ATA GCG GTC GTT AGG GCG TCG-3' and R: 5'-GCT TCT ACT TTC CCG CTT CTC GCG-3' (115 bp). Unmethylated primers were F: 5'-ATA ATA GTC GTT GTT AGG GTG TTC-3' and R: 5'-ACT TCT ACT TTC CCA CTT CTC ACA-3' (124 bp). The PCR reaction contained MgCl₂ (6.7 mM for methylated primers, 5.0 mM for unmethylated primers), 1.0 mM dNTP, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1 μM primers and 1 U of i-Taq™ plus DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Korea). Initial denaturation was carried out at 95°C for 15 min using PCR thermal cycler (Eppendorf Mastercycler® Pro S, Germany). PCR of 35 cycles was performed as followed: denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 57°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. Final extension was performed at 72°C for 10 min. PCR products were separated in 3% agarose gel (100 volts, 70 min), stained with ethidium bromide and visualized using Molecular Imager Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories). Band intensity was measured by Image Lab™ software (Bio-Rad Laboratories). Level of RUNX3 methylation was expressed as methylation-to-unmethylation (M/U) band intensity ratio.

Statistical analysis

Data are presented as mean±standard deviation (SD) or median (interquartile range, IQR) as appropriate. Two-sample t-test or Mann-Whitney test was used to test the difference between two independent groups. One-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test or Kruskal-Wallis followed by Dunns test was used for testing the differences among three or more groups. Logistic regression was performed to obtain odds ratio (OR) adjusted for age and sex. Stata version 10 (College Station, TX) and GraphPad Prism 5 softwares (GraphPad, La Jolla, CA) was employed for graphs and statistical analyses. P value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Increased oxidative stress in HBV-associated HCC patients

Protein carbonyl and TAC were used as biomarkers for oxidative stress. Plasma protein carbonyl content in HBV-associated patients was significantly elevated, as compared to the age-matched healthy controls (Figure 1). In contrast, plasma TAC in HCC patients was significantly decreased, as compared to the healthy controls.

Because control group had more females than HCC group, we performed logistic regression to control confounding factors and quantify the strength of association of oxidative stress biomarkers with HCC. The β-coefficient of plasma protein carbonyl and TAC controlled for age and sex were 1.64 (95%CI: 0.55 - 2.73, P=0.003) and -0.02 (95%CI: -0.02 - -0.01, P<0.001), and their adjusted OR were 5.15 (95%CI: 1.73 - 15.39) and 0.98 (95%CI: 0.98 - 0.99), respectively (Table 2). These

mean that every one-unit (nmol/mg protein) increase in plasma protein carbonyl the risk for HCC (odds of being HCC) is increased 5.15 times and every one-unit (VCEAC, mg/L) increase in plasma TAC level the risk for HCC is reduced about 2% ((1 - 0.98) x 100). These findings indicated that plasma protein carbonyl and TAC were independent predictors of the development of HBV-associated HCC.

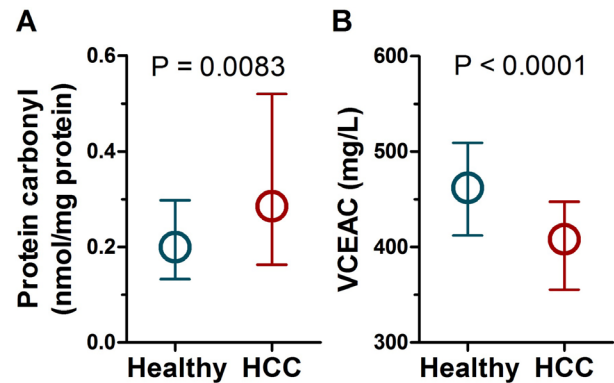


Figure 1. Plasma Protein Carbonyl Content and TAC in Healthy (n=80) and HBV-Associated HCC Subjects (n=60). Plasma levels of protein carbonyl and TAC (expressed as VCEAC) in HBV-associated patients were significantly higher than healthy controls. Data presented as median (IQR)

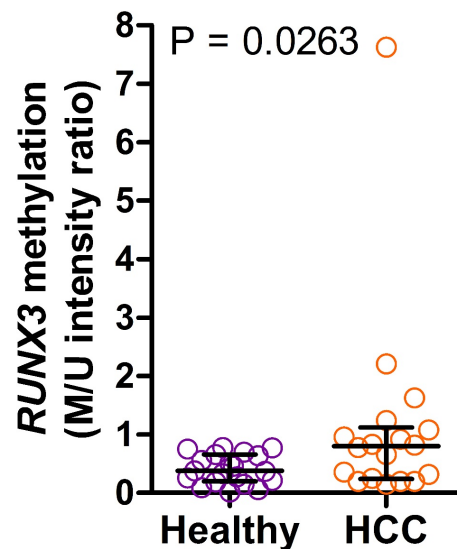
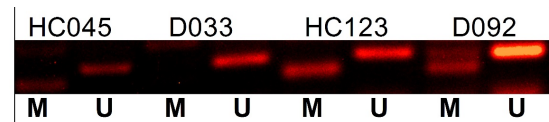


Figure 2. RUNX3 Methylation Levels in PBMC Compared between Healthy (n=20) and HCC (n=18). Above panel: Representative gel of RUNX3 methylation detection by MSP in two healthy subjects (D033 and D092) and two HCC patients (HC045 and HC123). As indicated by M/U intensity ratio, RUNX3 methylation in PBMC of HCC patients was significantly higher than healthy individuals. Bars indicate medians and IQR. M: methylation (115 bp), U: unmethylation (124 bp)

Table 1. Characteristics of the Studied Subjects

Characteristics	Healthy	HBV-associated HCC	P value
Total number of subjects	80	60	
Age (years)	50.59±5.54	52.33±7.91	0.127
Males: Females (% male)	50:30 (62.50)	52:8 (86.67)	0.001
Cirrhosis (%)		52 (100)	
Yes		41 (78.85)	
No		11 (21.15)	
BCLC staging (%)		52 (100)	
0 (very early stage)		2 (3.85)	
A (early stage)		7 (13.46)	
B (intermediate stage)		19 (36.54)	
C (advanced stage)		24 (46.15)	

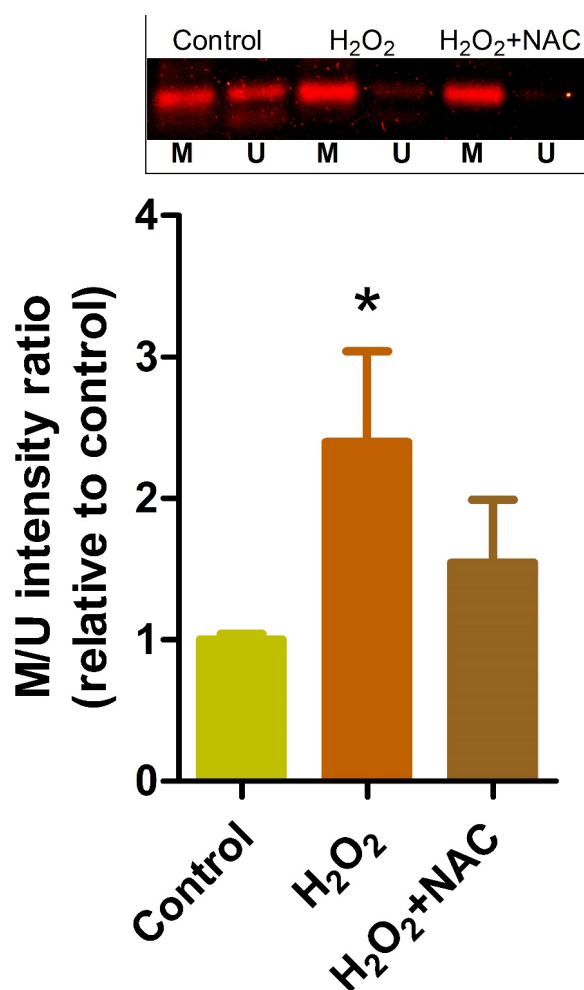


Figure 4. *RUNX3* Methylation Levels in HepG2 Cells Exposed to 20 μ M H_2O_2 (Non-Lethal dose). Above panel: Representative gel of *RUNX3* methylation detection by MSP in untreated control cells, cells treated with 20 μ M H_2O_2 and cells treated with 20 μ M H_2O_2 plus 50 μ M NAC. The M/U intensity ratio in cells treated with H_2O_2 was significantly greater than that in untreated control. *RUNX3* methylation in cells treated with H_2O_2 and NAC was lower than in cells treated with H_2O_2 , although it was not statistically significant yet. Bars indicate standard errors. M: methylation, U: unmethylation. * P <0.05 vs. untreated control

Increased *RUNX3* methylation in HBV-associated HCC patients

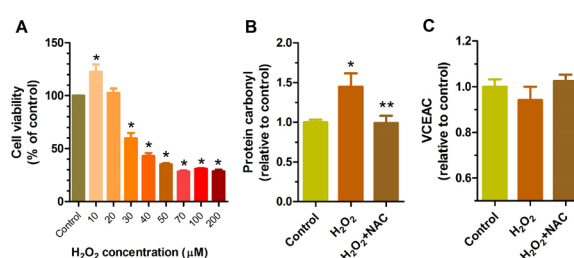


Figure 3. Cell Viability and Oxidative Stress in HepG2

Cells Treated with H_2O_2 for 72 h. A: % cell viability was compared among cells treated with different concentrations of H_2O_2 . Cell survival significantly increased in cells treated with 10 μ M H_2O_2 , but significantly decreased in cells treated with 30 μ M and higher concentrations of H_2O_2 , as compared to the untreated control. No significant change of cell viability in cells treated with 20 μ M H_2O_2 relative to control. B: Protein carbonyl content in cell lysate compared among untreated control, cells treated with 20 μ M H_2O_2 , and cells treated with 20 μ M H_2O_2 and 50 μ M NAC. Protein carbonyl content was significantly increased in cells treated with 20 μ M H_2O_2 compared with the untreated cells. Co-treatment with NAC significantly decreased protein carbonyl formation in the H_2O_2 -treated cells. C: TAC in the H_2O_2 -treated cells trended to be decreased relative to the control, and co-treatment with NAC caused restoration of antioxidant capacity, although statistically significant difference was not revealed. * P <0.05 vs. untreated control. ** P <0.05 vs. H_2O_2 -treated cells. Bars: means, error bars: standard errors

Of 140 subjects, 38 had PBMC DNA available for determination of *RUNX3* methylation. Based on M/U intensity ratio presented herein, patients with HCC (n=18) had significantly increased *RUNX3* methylation, as compared to the healthy individuals (n=20) (Figure 2). Mean age (52.39 vs. 52.55 years) and sex distribution (85.00% vs. 94.44% females) between the HCC and control groups were not significantly different. Representative gel for *RUNX3* methylation detection by MSP is shown in Figure 2.

Induction of *RUNX3* hypermethylation by H_2O_2 in HepG2 cell line

Causal relationship between oxidative stress and *RUNX3* hypermethylation was investigated in cell culture model. H_2O_2 was used as representative of ROS to stimulate oxidative stress in HepG2 cells (Figure 3). MTT assay showed that treatment with 10 μ M H_2O_2 for 72 h significantly increased cell survival, but treatments

Table 2. Logistic Regression Measuring Association Strength of Plasma Protein Carbonyl and Total Antioxidant Capacity with HCC Adjusted for Age and Gender

Variables	Adj. OR* (coeff.)	SE	P value	95%CI
Plasma protein carbonyl (nmol/mg protein)	5.15 (1.64)	2.877	0.003	3.68-14.20
Total antioxidant capacity, VCEAC (mg/L)	0.98 (-0.02)	0.004	< 0.001	0.98-0.99

*Adj. OR: adjusted odds ratio, coeff.: β coefficient, SE: standard error, CI: confidence interval, VCEAC: vitamin C equivalent antioxidant capacity.

with 30 μ M and more concentrations of H_2O_2 gradually caused significant decrease in cell viability (Figure 3A). HepG2 cells treated with 20 μ M H_2O_2 for 72 h did not alter cell viability. Therefore, we opted to use the non-lethal concentration of H_2O_2 at 20 μ M for investigating the effect of ROS on *RUNX3* methylation in HCC cells.

Cells treated with 20 μ M H_2O_2 caused significantly increased in cellular protein carbonyl content, as compared to the untreated control cells (Figure 3B). Co-treatment with NAC caused a significant decrease in protein carbonyl content, as compared to the H_2O_2 -treated cells. Although significant differences were not revealed yet, cellular TAC trended to be decreased in the H_2O_2 -treated cells and trended to be restored in the cells co-treated with H_2O_2 and NAC (Figure 3C). These indicated an increase in oxidative stress in HepG2 cells challenged with 20 μ M H_2O_2 .

RUNX3 M/U ratio in H_2O_2 -treated HepG2 cells was significantly higher than the untreated controls (Figure 4). The M/U ratio trended to be decreased in cells co-treated with H_2O_2 and NAC, although significant difference was not observed yet. Representative gel image compared among these three cultured conditions is shown in Figure 4.

Discussion

Chronic hepatitis infection either with HBV or HCV is a primary etiologic cause of HCC. Mechanistic insight into hepatocarcinogenesis reveals that oxidative stress promotes both genetic mutation and epigenetic alteration (Nishida and Kudo, 2013). Several lines of evidences demonstrate an increase in oxidative stress in HBV-associated HCC (Tsai et al., 2009, Nair et al., 2010, Zhao et al., 2011). *RUNX3* hypermethylation is also frequently detected in the HCC tissues (Yang et al., 2014, Zhang et al., 2015), suggesting a vital role in the HCC genesis. To date, the mechanism of how *RUNX3* is hypermethylated in the HCC is not known. In this study, we demonstrated an increased oxidative stress and hypermethylation of *RUNX3* promoter in patients with HBV-associated HCC. We additionally showed that increased extent of oxidative stress was independently associated with an increased risk for HCC development. Importantly, we experimentally demonstrated that H_2O_2 was capable of inducing *RUNX3* hypermethylation in HepG2 cells, indicated that ROS was an inducer of *RUNX3* hypermethylation.

Oxidative stress-induced DNA methylation alteration in cancers gains more and more recognition (Nishida and Kudo, 2013, Wu and Ni, 2015). ROS-induced promoter hypermethylation of TSG in HCC is well demonstrated for E-cadherin (Lim et al., 2008). The

authors conclude that Snail expression induced by H_2O_2 leads to recruiting histone deacetylase 1 (HDAC1) and DNA methyltransferase 1 (DNMT1), which subsequently causes hypermethylation of E-cadherin promoter. Similar mechanism that H_2O_2 induces HDAC1 and DNMT1 expressions leading to hypermethylation of tumor suppressor caudal type homeobox-1 is also demonstrated in the colorectal cancer cells (Zhang et al., 2013). Additionally, increased expression and activity of HDAC1 and DNMT1 at the *RUNX3* promoter resulting in *RUNX3* hypermethylation is shown in the colon cancer cell lines challenged with H_2O_2 (Kang et al., 2012). Whether the ROS-induced *RUNX3* hypermethylation in HCC cells is mediated via this mechanism remains to be elucidated.

The other mechanism for ROS-induced DNA hypermethylation is that H_2O_2 induces the formation of a large silencing complex comprising of DNMT1, histone deacetylase SIRT1 and polycomb repressive complex 4 (O'Hagan et al., 2011). Such a large silencing complex relocates from non-GC-rich to GC-rich regions including promoter CpG islands, which in turn causes hypermethylation of the CpG-rich promoters. In this study, we clearly showed in HCC cells that H_2O_2 is an inducer of *RUNX3* hypermethylation, however the mechanism is unknown. Further study is awaiting to conduct to uncover the molecular mechanism of *RUNX3* hypermethylation induced by ROS in HCC. Since *RUNX3* hypermethylation is associated with HCC progression, and loss of *RUNX3* is shown to induce EMT in the low-metastatic HCC cells (Tanaka et al., 2012), treatment with antioxidants might reestablish the unmethylated state of *RUNX3*, which in turn leads to re-expression of *RUNX3* and deceleration of the tumor progression.

Limitations of the current study should be mentioned. We did not have data of oxidative stress and *RUNX3* hypermethylation in HCC tissues to evaluate if they corresponded well with the measurements in blood samples. Samples size for detecting PBMC *RUNX3* methylation was rather small. The transcript expression of *RUNX3* did not measured. One cell line was investigated to demonstrate an induction of *RUNX3* hypermethylation by ROS. The dose-dependent fashion of ROS-induced hypermethylation did not explored.

In conclusion, to the authors' knowledge this is the first study demonstrating an increase in oxidative stress coincided with hypermethylation of *RUNX3* in patients with HBV-associated HCC. Increased degree of oxidative stress is an independent predictor for HCC development. It is also shown for the first time that ROS is able to induce the *RUNX3* hypermethylation in HCC cells indicating a cause-and-effect relationship between oxidative stress and hypermethylation of *RUNX3* promoter. Antioxidant

regimen might be beneficial to restore the unmethylated state of *RUNX3*, in order to re-express this tumor suppressor protein in the HBV-related liver cancer.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, National Research University Project, Office of Higher Education Commission (WCU011-HR57 to P.T.) and Thailand Research Fund (RSA5680019 to C.B.). We thank to Dr. Sunchai Payungporn for gifting HepG2 cells.

References

- Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal*, **24**, 1043-8.
- Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI (2008) Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett*, **266**, 6-11.
- Herceg Z, Paliwal A (2011) Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res*, **727**, 55-61.
- Higgs MR, Chouteau P, Lerat H (2014) 'Liver let die': oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. *J Gen Virol*, **95**, 991-1004.
- Homma N, Tamura G, Honda T, et al (2006). Spreading of methylation within *RUNX3* CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci*, **97**, 51-6.
- Kang KA, Zhang R, Kim GY, Bae SC, Hyun JW (2012) Epigenetic changes induced by oxidative stress in colorectal cancer cells: methylation of tumor suppressor *RUNX3*. *Tumour Biol*, **33**, 403-12.
- Li J, Jiang X (2011). Loss of runt-related transcription factor 3 expression associated with human hepatocellular carcinoma progression and prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, **12**, 2285-90.
- Lim SO, Gu JM, Kim MS, et al (2008) Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterol*, **135**, 2128-40.
- Marra M, Sordelli IM, Lombardi A, et al (2011) Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J Transl Med*, **9**, 171.
- Nair J, Srivatanakul P, Haas C, et al (2010) High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. *Mutat Res*, **683**, 23-8.
- Nishida N, Kudo M (2013). Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis*, **31**, 447-53.
- O'Hagan HM, Wang W, Sen S, et al (2011). Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell*, **20**, 606-19.
- Patchsung M, Boonla C, Amnattrakul P, et al (2012). Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One*, **7**, 37009.
- Sceusi EL, Loose DS, Wray CJ (2011) Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, **13**, 369-76.
- Severi T, Ying C, Vermeesch JR, et al (2006) Hepatitis B virus replication causes oxidative stress in HepAD38 liver cells. *Mol Cell Biochem*, **290**, 79-85.
- Tanaka S, Shiraha H, Nakanishi Y, et al (2012) Runt-related transcription factor 3 reverses epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, **131**, 2537-46.
- Tangkijvanich P, Hirsch P, Theamboonlers A, Nuchprayoon I, Poovorawan Y (1999) Association of hepatitis viruses with hepatocellular carcinoma in Thailand. *J Gastroenterol*, **34**, 227-33.
- Tsai SM, Lin SK, Lee KT, et al (2009) Evaluation of redox statuses in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Clin Biochem*, **46**, 394-400.
- Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C (2013) Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the *RUNX3* promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**, 3773-8.
- Wu Q, Ni X (2015) ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr Drug Targets*, **16**, 13-9.
- Yang Y, Ye Z, Zou Z, et al (2014) Clinicopathological significance of *RUNX3* gene hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, **35**, 10333-40.
- Zhang R, Kang KA, Kim KC, et al (2013) Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. *Gene*, **524**, 214-9.
- Zhang S, Wei L, Zhang A, Zhang L, Yu H (2009) *RUNX3* gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. *OMICS*, **13**, 307-11.
- Zhang X, He H, Zhang X, Guo W, Wang Y (2015) *RUNX3* Promoter Methylation Is Associated with Hepatocellular Carcinoma Risk: A Meta-Analysis. *Cancer Invest*, **33**, 121-5.
- Zhao J, Zhao Y, Wang H, et al (2011) Association between metabolic abnormalities and HBV related hepatocellular carcinoma in Chinese: a cross-sectional study. *Nutr J*, **10**, 49.
- Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI (2011) Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res*, **711**, 167-73.

Title page

Manuscript type: Original article

Title: LINE-1 ORF1 protein is upregulated by reactive oxygen species and associated with urinary bladder cancer progression

Authors:

Patcharawalai Whongsiri¹, Chaowat Pimratana², Udomsak Wijitsettakul², Depicha Jindatip³, Anapat Sanpavat⁴, Wolfgang A. Schulz⁵, Michèle J. Hoffmann⁵, Wolfgang Goering⁶, Siriporn Chuchawankul⁷, Chanchai Boonla^{1,*}

Departments of ¹Biochemistry, ³Anatomy and ⁴Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

²Division of Urology, Buriram Hospital, Buriram Province, 31000 Thailand

Department of ⁵Urology and ⁶Pathology, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany

⁷Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

Running title: ORF1p expression associated with bladder cancer progression

Corresponding author

Chanchai Boonla, PhD, Assistant Professor

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330 Thailand

Tel./Fax. +66-2-2564482

Email: chanchai.b@chula.ac.th

Abstract

Reactivation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) and increase in oxidative stress potentially drive tumorigenesis and progression. We investigated expression and clinical relevance of LINE-1-encoded protein (ORF1p) and oxidative stress marker 4-hydroxynonenal (4-HNE) in human bladder cancer tissues, and asked if reactive oxygen species (ROS) were capable of inducing ORF1p expression in bladder cancer cell lines. ORF1p and 4-HNE expressions in bladder cancer tissues were significantly higher than that in adjacent noncancerous bladder tissues. Expression of ORF1p and 4-HNE were positively correlated. ORF1p was expressed significantly higher in muscle-invasive type than papillary/superficial type. Likewise, high-grade tumor had significantly greater level of ORF1p expression than low-grade tumor. H₂O₂ significantly provoked oxidative stress and upregulated ORF1p expression in VM-CUB-1 bladder cancer cell line. In TCCSUP cells, exposure to H₂O₂ induced ORF1p expression, but it was not statistically significant compared with the untreated control. Co-treatment with antioxidants (tocopheryl acetate and S-adenosylmethionine) significantly inhibited the ROS-induced ORF1p expression in VM-CUB-1 and TCCSUP cells. TCCSUP and UM-UC-3 cells treated with H₂O₂ had a greater migration activity than the untreated cells, and their migration capability was inhibited by tocopheryl acetate. In conclusion, a robust histological evidence of increased ORF1p and 4-HNE expression in bladder cancer tissues was demonstrated. Elevated LINE-1 expression was associated with bladder tumor progression. ROS experimentally induced LINE-1 reactivation in VM-CUB-1 bladder cancer cells and increased tumor aggressiveness in TCCSUP and UM-UC-3 cells. Attenuation of ROS generation and suppression of LINE-1 protein expression might be clinically useful to decelerate bladder cancer progression.

Keywords: LINE-1; bladder cancer tissues; immunohistochemistry; ORF1p; 4-HNE; oxidative stress; cancer progression

Introduction

Retrotransposon reactivation is well recognized to contribute to tumor development and progression. Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is a predominant non-LTR retrotransposon in human genome comprising approx. 17% of DNA and having over 500,000 copies [1]. However, majority of LINE-1 elements (>99.8%) are 5'-truncated or rearranged with mean length of 0.9 kb, and they lack retrotransposition activity [2]. Full-length or autonomous LINE-1 elements (6 kb in length) encoded for ORF1p and ORF2p proteins have relatively small number, but they are responsible for LINE-1 mobilization. Increased LINE-1 activity and LINE-1 retrotransposition strongly link to cancers and have critical roles in tumorigenesis [3,4]. A bulk of retrotransposition in human genome is suggested to be executed by the highly active retrotransposition-competent LINE-1 or hot LINE-1 elements that contain intact ORF1p and ORF2p, estimating to exist around 80 – 100 copies in the genome [2,5].

ORF1p (40 kDa) forms homotrimer, functions to bind RNA in ribonucleoprotein particle and has chaperone activity. ORF2p (150 kDa) has dual activities of endonuclease and reverse transcriptase. In vitro evidence demonstrates that cells express ORF2p at a very much lower level than ORF1p [6]. Aberrant expression of ORF1p is suggested to be a hallmark of epithelial cancers and could be a new biomarker of neoplasia [7,8]. Mechanistic insight into how ORF1p is upregulated in tumors and what is the key inducing factor of ORF1p expression are largely unknown. Epigenetic regulation via DNA methylation is the most widely studied mechanism of LINE-1 dysregulation in cancers, and it is well known that LINE-1 promoter hypomethylation is associated with development of many cancers, including urothelial cancer [9].

Urothelial carcinoma is a common urologic cancer with the highest rate of recurrence among malignancies. Hypomethylation of LINE-1 in bladder tumor tissues was firstly reported by Jurgens et al. in 1996 [10], and later confirmed by Florl et al. [11] and Chalitchagorn et al. [12]. Full-length LINE-1 transcript was detected in bladder cancer cell lines, and it was suggested that the LINE-1 transcript expression was related to LINE-1 hypomethylation [11]. However, the cause of LINE-1 hypomethylation in bladder cancer is not fully known. We previously reported an association of increased oxidative stress with LINE-1 hypomethylation in bladder cancer patients [13], and demonstrated in bladder cancer cells that oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) was a cause of LINE-1 hypomethylation

[14,15]. We hypothesize that hypomethylation of LINE-1 induced by ROS in bladder cancer would lead to genomic instability and cancer progression through the mobilization of LINE-1 elements. To date, expression and role of LINE-1-encoded proteins in bladder cancer have been rarely explored.

We, in this study, investigated expression and clinical relevance of ORF1p in bladder cancer tissues using immunohistochemical staining. Expression of oxidative stress marker 4-hydroxynonenal (4-HNE) was also explored. Whether ROS were capable of inducing ORF1p expression and influencing cell migration in bladder cancer cell lines were investigated.

Materials and Methods

Patients and paraffin-embedded tissues

Bladder tissue specimens (n = 36) were collected during the operation from histologically-proved bladder cancer patients (by C.P. and U.W.), and fixed in 10% formalin buffer. The demographic and basic clinical data of the patients are shown in Table 1. Tissue specimens were processed and sectioned into 3 μ M. ORF1p and 4-HNE were immunostained in the paraffin-embedded bladder tumor sections. Research protocol was reviewed and approved by the institutional Ethics Committee, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Immunohistochemical (IHC) staining

After deparaffinization and rehydration, heat-induced antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer (pH 6.0). The sections were submerged in 0.3 % H₂O₂ in methanol for 30 min to inactivate endogenous peroxidase. Non-specific binding was blocked with normal horse serum for 20 min at room temperature. Sections were then incubated with 1:20,000 mouse ORF1p antibody (gifted from Prof. Kathleen H. Burns) or 1:2,000 rabbit 4-HNE antibody (ab46545, abcam) at 4°C, overnight. After washing, sections were incubated with biotinylated universal antibody for 1 h, followed by ABC reagent for 30 min (Vectastain Elite ABC Universal Kit). Sections were developed with diaminobenzidine (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit) to visualize the brown precipitates of immunoreactive complexes,

counterstained with Hematoxylin, dehydrated, cleared and finally mounted. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed according to the standard procedure.

Relative levels of ORF1p and 4-HNE expression were evaluated based on percentage of positive HCC cells (0-5% = 0, 6-25% = 1, 26-50% = 2, 51-75% = 3 and 75-100% = 4) and intensity of staining (negative = 0, + = 1, ++ = 2, +++ = 3 and ++++ = 4), averaged from 5 different microscopic fields (A.S. and P.W.). IHC score was calculated from: score of % positive cells (0-4) x score of intensity (0-4). The minimum score was 0 while the maximum score was 16. H&E evaluation (by A.S.) was carried out to classify tumor type into papillary/superficial and muscle-invasive types, and tumor grading into papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP), low-grade and high-grade tumors.

Cell culture condition

VM-CUB-1, TCCSUP and UM-UC-3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% pen-strep under 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. H₂O₂ (Sigma) was ROS representative used to stimulate oxidative stress in the cells (for 72 h). H₂O₂ used in the experiments was sub-lethal dose, 30 µM for VM-CUB-1 and 10-20 µM for TCCSUP and UM-UC-3 cells. Effect of H₂O₂ on cell viability was tested using MTT assay (data not shown) to ensure that it did not alter cell survival. Tocopheryl acetate (TA, at 300 µM) and S-adenosylmethionine (SAM, at 100 µM) [16] were used as antioxidants for attenuating oxidative stress in the H₂O₂-treated cells [17].

Western blot and immunodetection

Cells were lysed with RIPA buffer (incubated on ice for 30 min with interval mixing every 10 min), and the lysate was centrifuged at 12,000 xg (4°C) for 5 min. Supernatant was collected. Protein concentration was determined using bicinchoninic acid assay. Total protein of 15 µg was loaded into the SDS-PAGE gel.

Proteins were separated in 10% SDS-PAGE on ice, 180 V for 1.5 h. The electrophoresed proteins were transferred to PVDF membrane using wet tank on ice, 180 mA for 1 h. After washing, membranes were blocked with 5% skimmed milk for 1 h, room temperature. The blots were then

incubated with ORF1 antibody (1:10,000) overnight at 4 °C. After washing, blots were incubated with HRP-conjugated anti mouse antibody (1:5,000) at room temperature for 1 h. Specific immunocomplexes were detected by developing in ECL reagent (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate). Images of ECL signals were acquired and the band intensities were quantified by digital ECL scanner (LI-COR). For loading control, rabbit anti α -tubulin antibody (1:20,000) was re-probed after stripping. Relative expression of ORF1p was normalized by α -tubulin expression.

Wound healing (scratch) assay

TCCSUP and UM-UC-3 cells (5×10^6 cells per well) were seeded in 6-well plates and incubated for 24 h at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. After creating a scratch (straight line) with p200 pipette tip and washing twice with PBS, cells were treated separately in serum-free DMEM for 72 h as following: untreated control, H₂O₂ and H₂O₂ + TA. Images of the scratch were acquired at the beginning (0 h) and the end (72 h) of treatments to compare the rate of gap closing, a reflective of cell migration capability.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (interquartile range, IQR) as appropriate. Two-sample t-test or Mann-Whitney test was used to test the difference between two independent groups. Spearman rank correlation test was used for correlation analysis. Odds ratios (OR) were calculated from logistic regression. Stata version 12 and GraphPad Prism 5 were employed for graphs and statistical analyses. P value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

A total of 36 patients histologically diagnosed with bladder cancer were included in this study consisting of 31 (86.1%) men and 5 (13.9%) women (Table 1). Mean age of the patients was 71.5 ± 13.3 years old. About one-third of the patients (11/36, 30.6%) presented with recurrent tumors. Transurethral resection of the bladder tumor (88.6%) was the main surgical procedure for tumor removal. Thirty-two and 33 cases had available data of tumor type and histological grading, respectively. For further analysis, we

classified types of bladder tumor into papillary/superficial type (19/32, 59.4%) and muscle-invasive type (13/33, 40.6%). According to histological grading, papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP), low-grade tumor and high-grade tumor were categorized and accounted for 2 (6.1%), 13 (39.4%) and 18 (54.5%), respectively (Table 1).

ORF1p and 4-HNE were overexpressed in bladder tumor tissues

Expression of ORF1p was remarkably increased in bladder cancer tissues compared with adjacent noncancerous bladder tissues (Fig. 1, A-D). It was principally positive in cytoplasm of the cancerous cells. Based on IHC score, expression of ORF1p in bladder cancer tissues (n = 33) was significantly higher than that in noncancerous bladder tissues (n = 15) ($P = 0.026$, Fig. 2A). The result clearly indicated that LINE-1 was reactivated in bladder cancer tissues.

4-HNE expression was increased in the bladder cancer tissues compared with the noncancerous counterparts (Fig. 1, E and F). Similar to ORF1p, 4-HNE was mainly positive in cytoplasm of cancer cells. IHC score of 4-HNE expression in bladder cancer tissues (n = 34) was significantly greater than that in noncancerous tissues (n = 14) ($P = 0.0321$, Fig. 2B). This finding indicated that bladder cancer tissues had increased oxidative stress.

We additionally analyzed the expression of ORF1p and 4-HNE in paired bladder tissue samples that contained both cancerous and noncancerous areas. Expression of ORF1p in cancerous region was significantly higher than in noncancerous counterpart (n = 12) ($P = 0.0466$, Fig. 2C). Likewise, 4HNE expression was increased in cancerous region compared with the noncancerous area (n = 11) ($P = 0.0183$, Fig. 2D). We asked further if ORF1p and 4-HNE expression levels in bladder cancer tissues (n = 33) were correlated. A significant positive correlation between these two antigens was found (Spearman's $\rho = 0.6275$, $P < 0.001$) (Fig. 2E). We concluded that increased LINE-1 reactivation was associated with increased oxidative stress in bladder cancer tissues.

Increased ORF1p expression associated with bladder tumor progression

Expression of ORF1p in muscle-invasive tumor (n = 13) was significantly greater than in papillary and superficial type (n = 19) ($P = 0.0397$) (Fig. 3A). Similarly, level of ORF1p expression in high-grade

bladder tumor (n = 18) was statistically higher than that in low-grade tumor (n =13) (Fig. 3B). To quantify the strength of association between ORF1 expression and tumor progressive phenotypes, we categorized ORF1p expression into high (IHC score ≥ 12) and low (IHC score < 12) expression. Logistic regression adjusted for patients' age was performed. Bladder tumor tissues with muscle-invasive type had about 6 times higher chance than those with papillary/superficial type to have high ORF1p expression (Adjusted OR = 6.15, 95% CI: 1.25 – 30.36, P = 0.026). Similarly, the high-grade bladder tumor had approx. 7 times greater risk for high ORF1p expression than those with low-grade tumor (Adjusted OR = 6.73, 95% CI: 1.05 – 42.94, P = 0.044). This finding suggested that high expression of ORF1p in bladder tumor tissues was associated with bladder tumor progressive phenotypes.

Two sections were histologically classified as PUNLMP, a pre-malignant condition. Expression of ORF1p in these PUNLMP bladder tissues was relatively low (Supplementary Fig. 1). Expression levels of 4-HNE between muscle-invasive and papillary/superficial types were not significantly different (Supplementary Fig. 2). Also, 4-HNE expressions between low-grade and high-grade tumors were not significantly different.

ORF1p induced by ROS in bladder cancer cell line

As a positive correlation between 4-HNE and ORF1p expression in bladder cancer tissues was observed, we further tested whether ROS was able to induce expression of ORF1p in bladder cancer cell lines. In control condition (without H₂O₂), basal level of ORF1p expression in VM-CUB-1 cells was higher than TCCSUP cells, while expression of ORF1p in UM-UC-3 cells was not detectable (supplementary Fig. 3). After 72 h H₂O₂ treatment, expression of ORF1p in VM-CUB-1 cells was significantly increased compared with the untreated control (Fig. 4A). Co-treatment with antioxidants (TA and SAM) caused significant decrease in ORF1p expression in VM-CUB-1 cells compared with the H₂O₂-treated condition. In TCCSUP cells, a pattern of ORF1p expression in each treatment was similar to that found in VM-CUB-1 cells. but the expression of ORF1p in H₂O₂ treated condition was not statistically raised relative to the untreated control (Fig. 4B). Significant decrease in ORF1p expression in H₂O₂-treated TCCSUP cells was only observed in the co-treatment with SAM. Based on our current finding, we concluded that ROS significantly enhanced expression of ORF1p only in bladder cancer cells that already had high expression

of ORF1p (like in VM-CUB-1 cells). As seen in UM-UC-3 cells, ROS could not activate the de novo expression of ORF1p in cells that ORF1p had been silenced.

ROS induced bladder cancer cell migration

We further asked if ROS promoted motility of bladder cancer cells, TCCSUP and UM-UC-3 cells. Scratch assay revealed that bladder cancer cells treated with H₂O₂ had higher capability to fill the wounded gap (Fig. 5). Co-treatment with antioxidant TA retarded the migration of H₂O₂-treated bladder cancer cells. This data suggested that oxidative stress provoked by ROS enhanced tumor progression.

Discussion

Proteins encoded by full-length LINE-1 elements, ORF1p and ORF2p, are known to have tumorigenic function [18], and ROS is overwhelmingly generated in tumors causing oxidative microenvironment that further promotes tumor progression [19]. In this study, we found increased expression of ORF1p in human bladder cancer tissues compared with the adjacent noncancerous bladder tissues. This ORF1p expression was linearly correlated with 4-HNE expression in bladder cancer tissues. Importantly, elevated ORF1p expression was associated with muscle-invasive and high-grade tumors. Cause-and-effect relationship between oxidative stress and ORF1p expression in bladder cancer cell lines was explored. ROS significantly caused rise of ORF1p expression in VM-CUB-1 cell line, a muscle-invasive origin. Additionally, we showed that ROS was capable of inducing cell migration in TCCSUP and UM-UC-3 cells.

Although LINE-1 hypomethylation is well recognized in bladder cancer, the expression of full-length LINE-1, that is exclusively responsible for retrotransposition and genetic instability, is rarely reported. An increased transcript expression of full-length LINE-1 in bladder tumor tissues compared with the benign tissues was demonstrated [20]. ORF1p expression in bladder carcinoma tissues was firstly reported by Rodic et al. [8]. They found immunoreactivity of ORF1p in about 61% of tissue samples. In the present study, ORF1p was strongly expressed in bladder cancer tissues, and only 3 out of 36 (8.3%) sections were negative for ORF1p. More importantly, elevated ORF1p expression was associated with

the tumor progression. Our findings corroborated the reactivation of intact LINE-1 elements in bladder cancer, and its rise could be clinically useful as a reflective of tumor progression. Almost all of LINE-1 copies have no intact ORFs recognizing as molecular fossil. Only small number of intact LINE-1, called human-specific LINE-1 subfamily or L1HS-Ta, are highly active and accounted for retrotransposition and genome plasticity [2,21,22]. Furthermore, activation of LINE-1 in somatic cells is demonstrated to be cell-type dependent [23]. The question is that which active LINE-1 locus/loci are permissive for reactivation in bladder cancer. Figuring this out would pave the way towards using LINE-1 proteins as specific biomarker for bladder tumor.

We previously reported increased oxidative stress and hypomethylation of LINE-1 in bladder cancer patients, and experimentally showed that ROS caused hypomethylation of LINE-1 [13-15]. We sorted out in this study whether this ROS-induced LINE-1 hypomethylation led to upregulation of LINE-1-encoded protein in bladder cancer cells. Unfortunately, we found a significant upregulation of ORF1p by ROS (approx. 1.6 folds) only in VM-CUB-1 cells. In TCCSUP, ORF1p trended to be upregulated by ROS (approx. 1.3 folds), but not statistically significant relative to control. As mentioned above, the highly active LINE-1 loci in VM-CUB-1 and TCCSUP cells might be different, and that might cause different degree of response to ROS.

It might also be possible that capability of ROS to induce ORF1p expression depends on the degree of DNA hypomethylation. Study by Kreimer et al. showed that VM-CUB-1 cells had about 2 times lower level of LINE-1 methylation (measured by pyrosequencing) than UM-UC-3 cells, and the expression of full-length LINE-1 transcript in VM-CUB-1 cells was almost 10 times higher than UM-UC-3 cells. We reported that TCCSUP cell had significantly lower level of LINE-1 methylation (measured by COBRA PCR) than UM-UC-3 cells (approx. 1.4 times, 27.45 ± 1.02 vs. 36.85 ± 0.49 , $P < 0.001$) [14]. Thus, it is reasonable to conceive that LINE-1 methylation level in VM-CUB-1 is lower than TCCSUP and UM-UC-3 cells, respectively. Basal expression of ORF1p was high in VM-CUB-1, low in TCCSUP, but none in UM-UC-3 cells (Supplementary Fig. 3). We hypothesize that reactivation of LINE-1 protein expression mediated through DNA hypomethylation is initiated when level of LINE-1 methylation is low enough or reach the reactivating threshold. Once reactivated, ROS, that is highly generated in tumor cells, further enhances the ORF1p expression and subsequently promotes the tumor progression. We preliminary

showed in this study that migration activity of TCCSUP and UM-UC-3 cells was induced by ROS. Although it was only one type of experiment, this preliminary finding supports the hypothesis that ROS promotes tumor development and progression [24,25]. We recently demonstrated that ROS also induced migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells [17]. Perhaps, the ROS-induced tumor progression involves oncogenic function of LINE-1 proteins. Further experiments are needed to warrant this speculation.

Limitations of the present study should be mentioned. Sample size for IHC study was relatively small. However, significant difference between cancerous and noncancerous areas and clinical association of ORF1p were observed, suggesting a promising clinical potential of this protein. Active chromatin marks that associated with the full-length LINE-1 elements were not explored. LINE-1 methylation levels among the tested cell lines were not re-measured in this study. Exposure of cells to non-toxic dose of H₂O₂ was carried out for 3 days. However, other study reported that oxidative stress-induced epigenetic change required a long-term exposure (6 months) of cells to H₂O₂ [26]. This might be an additional explanation why we did not see a significant change in LINE-1 reactivation by ROS in TCCSUP and UM-UC-1 cells. Scratch assay did not carried out in VM-CUB-1 cells.

In conclusion, we demonstrated a robust evidence of reactivated ORF1p and increased oxidative stress in human bladder cancer tissues. ORF1p and 4-HNE expressions were positively correlated. Increased ORF1p was associated with muscle-invasive type as well as high-grade tumor. ROS was capable of enhancing ORF1p expression at least in VM-CUB-1 bladder cancer cell line. We additionally showed that ROS promoted bladder cancer cell migration. To our knowledge, this study is the second study showing increased ORF1p expression in human bladder cancer tissues, but it is the first for demonstrating an association of elevated ORF1p expression with bladder tumor progression. Approaches to diminish oxidative stress might be helpful for preventing LINE-1 reactivation and decelerating progression of bladder tumor.

Acknowledgement

The study was supported by Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (RSA5680019 to C.B.). P.W. awarded The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Scholarship and

the DPST scholarship. Partially supported by the Ratchapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (RA57/118 to C.B.).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: None.

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J. et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921. doi:10.1038/35057062
2. Brouha, B., Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Moran, J. V. et al (2003) Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5280-5285. doi:10.1073/pnas.0831042100
3. Doucet-O'Hare, T. T., Rodic, N., Sharma, R., Darbari, I., Abril, G., Choi, J. A. et al (2015) LINE-1 expression and retrotransposition in Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E4894-4900. doi:10.1073/pnas.1502474112
4. Rodic, N., and Burns, K. H. (2013) Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS Genet* 9:e1003402. doi:10.1371/journal.pgen.1003402
5. Beck, C. R., Collier, P., Macfarlane, C., Malig, M., Kidd, J. M., Eichler, E. E. et al (2010) LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* 141:1159-1170. doi:10.1016/j.cell.2010.05.021
6. Taylor, M. S., LaCava, J., Mita, P., Molloy, K. R., Huang, C. R., Li, D. et al (2013) Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell* 155:1034-1048. doi:10.1016/j.cell.2013.10.021

7. Ardeljan, D., Taylor, M. S., Ting, D. T., and Burns, K. H. (2017) The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clin Chem* doi:10.1373/clinchem.2016.257444
8. Rodic, N., Sharma, R., Sharma, R., Zampella, J., Dai, L., Taylor, M. S. et al (2014) Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. *Am J Pathol* 184:1280-1286. doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.007
9. Kitkumthorn, N., and Mutirangura, A. (2011) Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenetics* 2:315-330. doi:10.1007/s13148-011-0032-8
10. Jurgens, B., Schmitz-Drager, B. J., and Schulz, W. A. (1996) Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res* 56:5698-5703.
11. Florl, A. R., Lower, R., Schmitz-Drager, B. J., and Schulz, W. A. (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 80:1312-1321. doi:10.1038/sj.bjc.6690524
12. Chalitchagorn, K., Shuangshoti, S., Hourpai, N., Kongruttanachok, N., Tangkijvanich, P., Thong-ngam, D. et al (2004) Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 23:8841-8846. doi:10.1038/sj.onc.1208137
13. Patchsung, M., Boonla, C., Amnattrakul, P., Dissayabutra, T., Mutirangura, A., and Tosukhowong, P. (2012) Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One* 7:e37009. doi:10.1371/journal.pone.0037009
14. Kloypan, C., Srisa-art, M., Mutirangura, A., and Boonla, C. (2015) LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. *Cell Biochem Funct* 33:375-385. doi:10.1002/cbf.3124
15. Wongpaiboonwattana, W., Tosukhowong, P., Dissayabutra, T., Mutirangura, A., and Boonla, C. (2013) Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:3773-3778.

16. Evans, P. J., Whiteman, M., Tredger, J. M., and Halliwell, B. (1997) Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic Biol Med* 23:1002-1008.
17. Ma-On, C., Sanpavat, A., Whongsiri, P., Suwannasin, S., Hirankarn, N., Tangkijvanich, P. et al (2017) Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. *Med Oncol* 34:57. doi:10.1007/s12032-017-0914-5
18. Xiao-Jie, L., Hui-Ying, X., Qi, X., Jiang, X., and Shi-Jie, M. (2016) LINE-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. *Genet Med* 18:431-439. doi:10.1038/gim.2015.119
19. Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2012) Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol* 2012:762825. doi:10.1155/2012/762825
20. Kreimer, U., Schulz, W. A., Koch, A., Niegisch, G., and Goering, W. (2013) HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol* 3:255. doi:10.3389/fonc.2013.00255
21. Boissinot, S., Chevret, P., and Furano, A. V. (2000) L1 (LINE-1) retrotransposon evolution and amplification in recent human history. *Mol Biol Evol* 17:915-928.
22. Sassaman, D. M., Dombroski, B. A., Moran, J. V., Kimberland, M. L., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J. et al (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16:37-43. doi:10.1038/ng0597-37
23. Philippe, C., Vargas-Landin, D. B., Doucet, A. J., van Essen, D., Vera-Otarola, J., Kuciak, M. et al (2016) Activation of individual L1 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci. *Elife* 5doi:10.7554/eLife.13926
24. Liou, G. Y., and Storz, P. (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44:479-496. doi:10.3109/10715761003667554
25. Panieri, E., and Santoro, M. M. (2016) ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis* 7:e2253. doi:10.1038/cddis.2016.105
26. Mahalingaiah, P. K., Ponnusamy, L., and Singh, K. P. (2016) Oxidative stress-induced epigenetic changes associated with malignant transformation of human kidney epithelial cells. *Oncotarget* doi:10.18632/oncotarget.12091

Table 1 Characteristics of the studied bladder cancer patients

Characteristics	Frequency (%)
n	36
Age (years, mean $\pm$ SD)	71.5 $\pm$ 13.3
Gender M:F (%)	31 (86.1) : 5 (13.9)
Recurrence tumor (%)	
• No	25 (69.4)
• Yes	11 (30.6)
Surgical approach (n = 35)	
• TUR-BT	31 (88.6)
• Radical cystectomy	4 (11.4)
Tumor type (n = 32)	
• Papillary/superficial	19 (59.4)
• Muscle-invasive	13 (40.6)
Tumor grading (n = 33)	
• PUNLMP	2 (6.1)
• Low-grade	13 (39.4)
• High-grade	18 (54.5)

TUR-BT: transurethral resection of bladder tumor, PUNLUMP: papillary urothelial neoplasm of low malignant potential

Legends to figures

Fig. 1 Representative micrographs of ORF1p and 4-HNE expressions in bladder cancer tissues. ORF1p was negative or expressed at very low level in noncancerous bladder tissues (A and C). In contrast, expression of ORF1p in bladder cancer tissues was remarkably increased (B and D). Similar to ORF1p, 4-HNE expression was elevated in bladder cancer tissues (F), but it was obviously low in noncancerous bladder tissues (E). Magnifications: x100 (A and B), x400 (C-F).

Fig. 2 Levels of ORF1p and 4-HNE expression compared between cancerous and noncancerous bladder tissues, and correlation of ORF1p and 4-HNE expression in bladder cancer tissues. Both ORF1p (A) and 4-HNE (B) expression levels in bladder cancer tissues were significantly higher than that in noncancerous bladder tissues. In paired cancerous and noncancerous tissue samples, significantly greater levels of ORF1p (C) and 4-HNE (D) expression in cancerous areas than the adjacent noncancerous regions were also observed. ORF1p expression was positively correlated with 4-HNE expression in bladder cancer tissues (E).

Fig. 3 Association of ORF1p expression with bladder tumor progression. ORF1p expression in muscle-invasive bladder tumors was significantly higher than that in papillary/superficial types (A). Likewise, expression of ORF1p in high-grade tumors was significantly higher than low-grade tumors (B).

Fig. 4

Induction of ORF1p expression by ROS in bladder cancer cell lines. In VM-CUB-1 cells (A), exposure to H₂O₂ (30 μ M for 72 h) caused significant increase in ORF1p expression compared with untreated control, and this increment was effectively normalized by co-treatment with

antioxidants, TA and SAM. In TCCSUP cells (B), ORF1p expression was slightly increased after H₂O₂ exposure without reaching statistical significance. Co-treatment with SAM significantly caused reduction of ORF1p expression in H₂O₂-treated cells.

Fig. 5 Scratch assay showing ROS-induced cell migration in bladder cancer cell lines. Both UM-UC-3 and TCCSUP cells treated with H₂O₂ for 72 h migrated faster to fill the wounded gaps than the untreated control cells. Co-treatment with TA reduced the migration capability of the H₂O₂-treated cells, both in UM-UC-3 and TCCSUP cell lines.

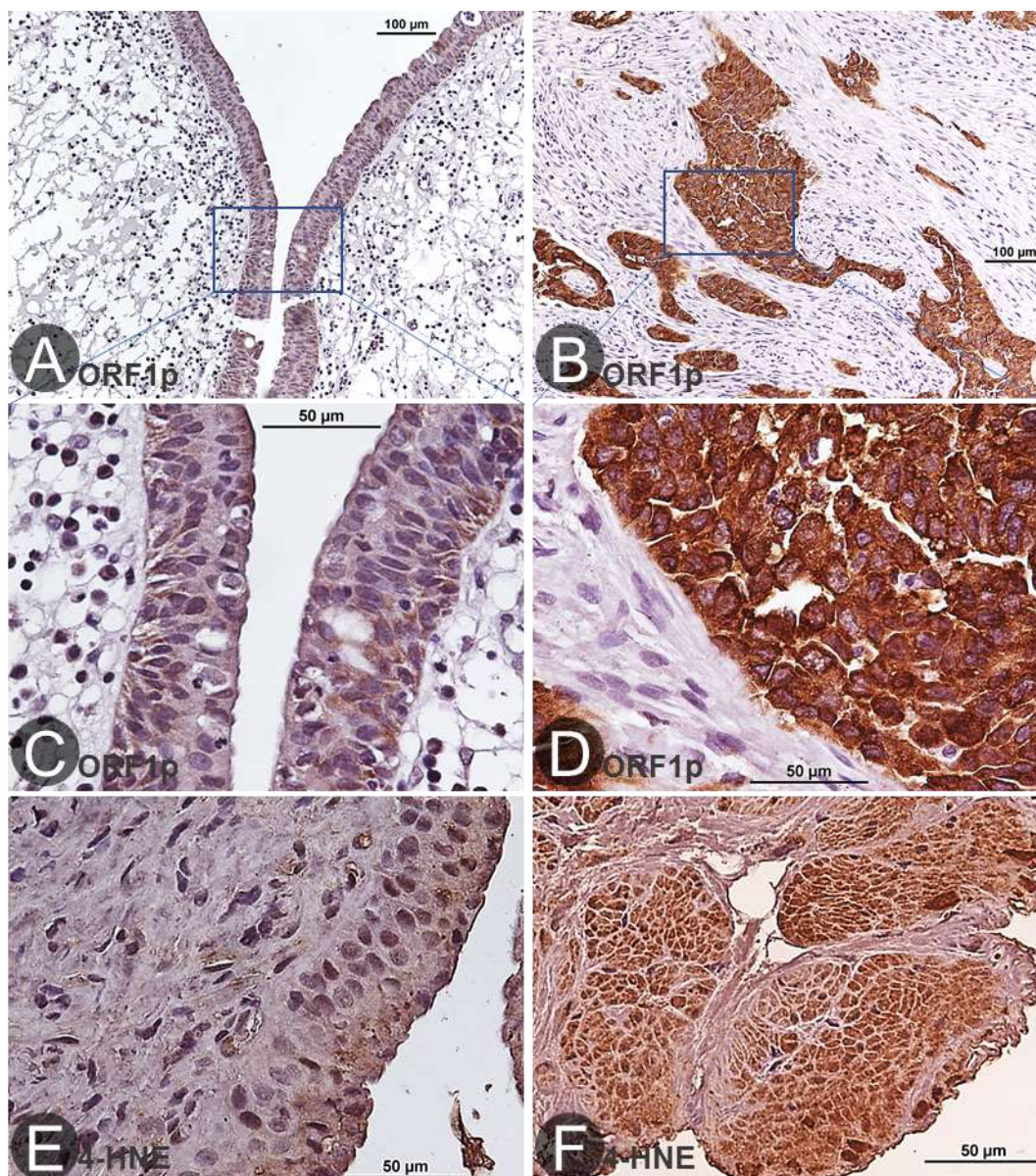


Fig. 1

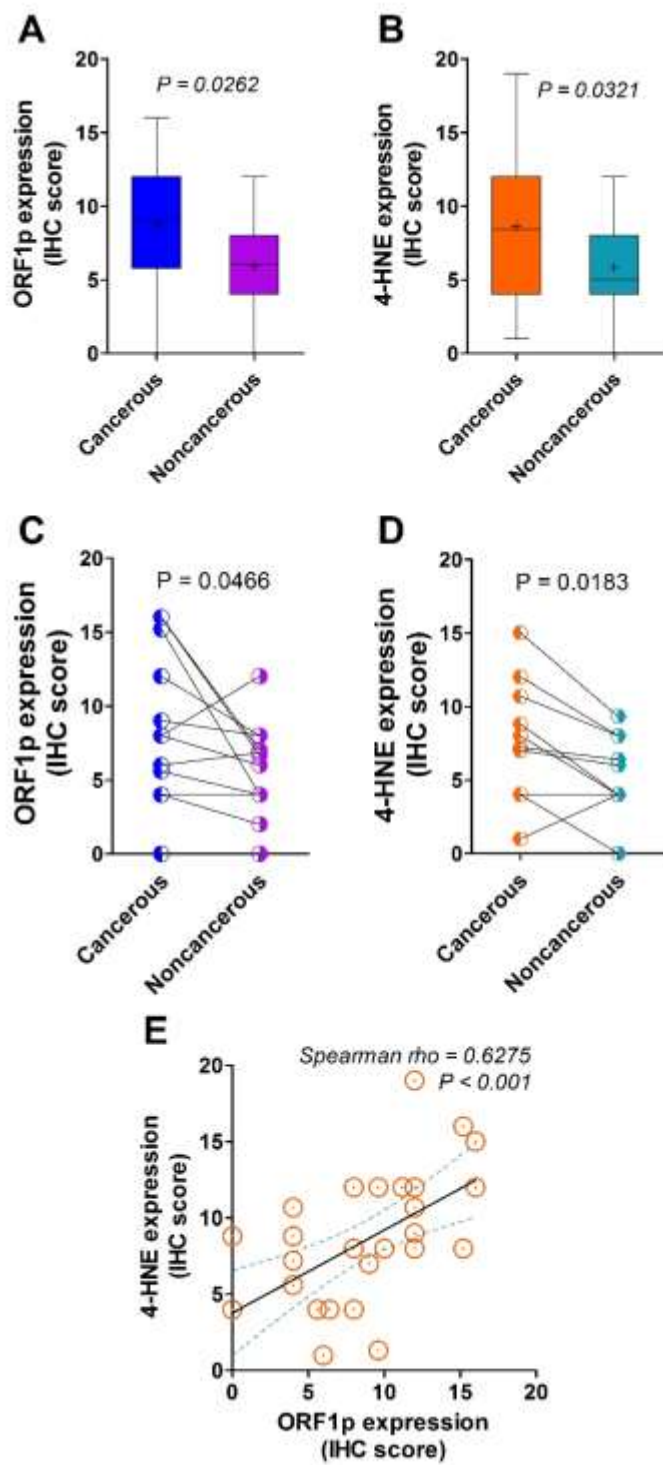


Fig. 2

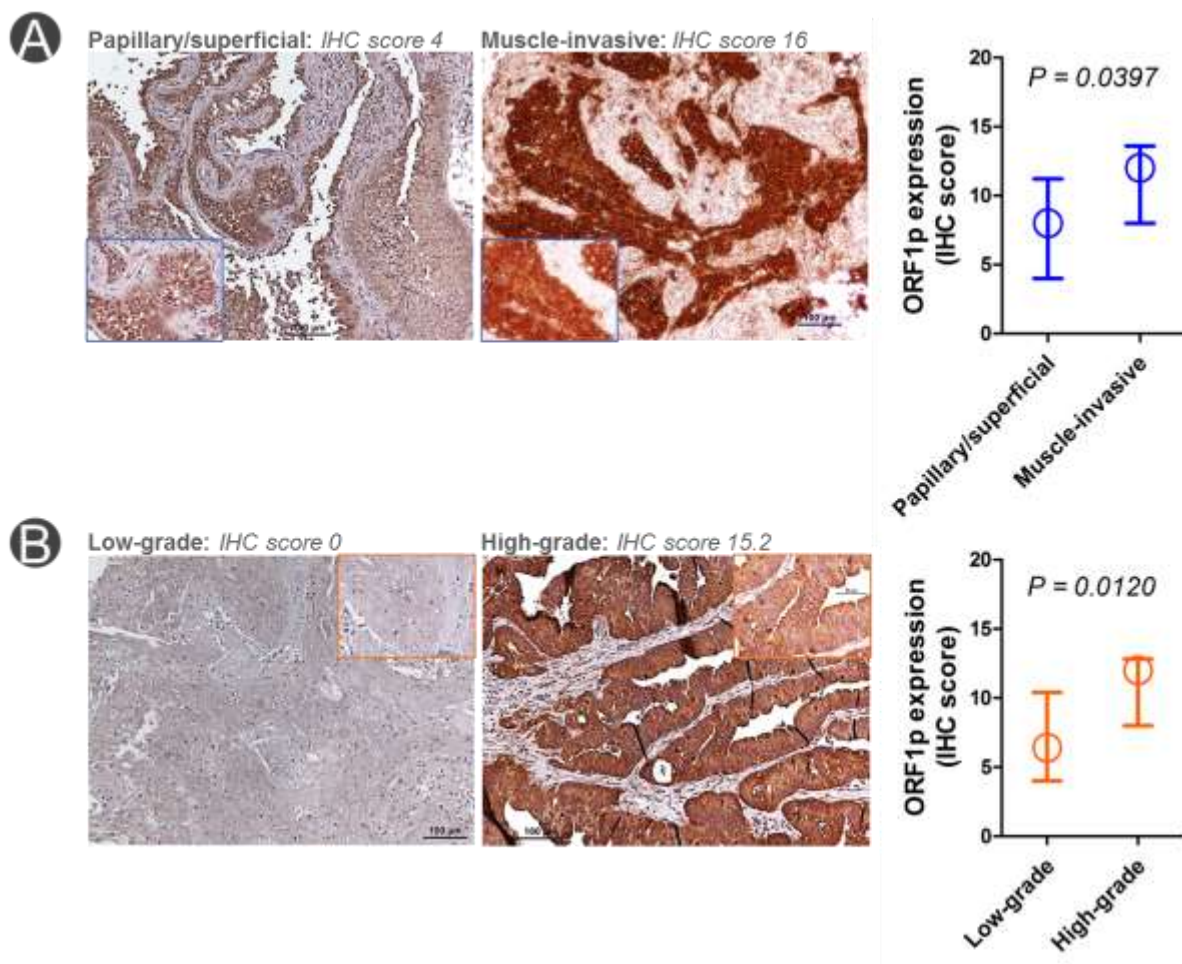


Fig. 3

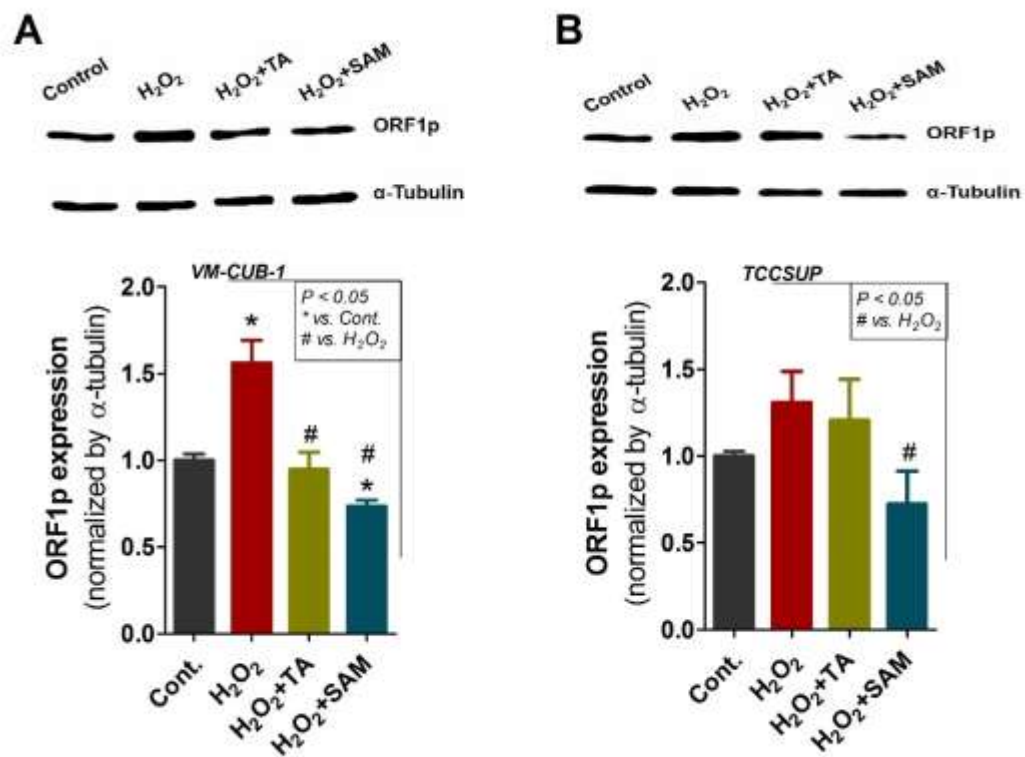


Fig. 4

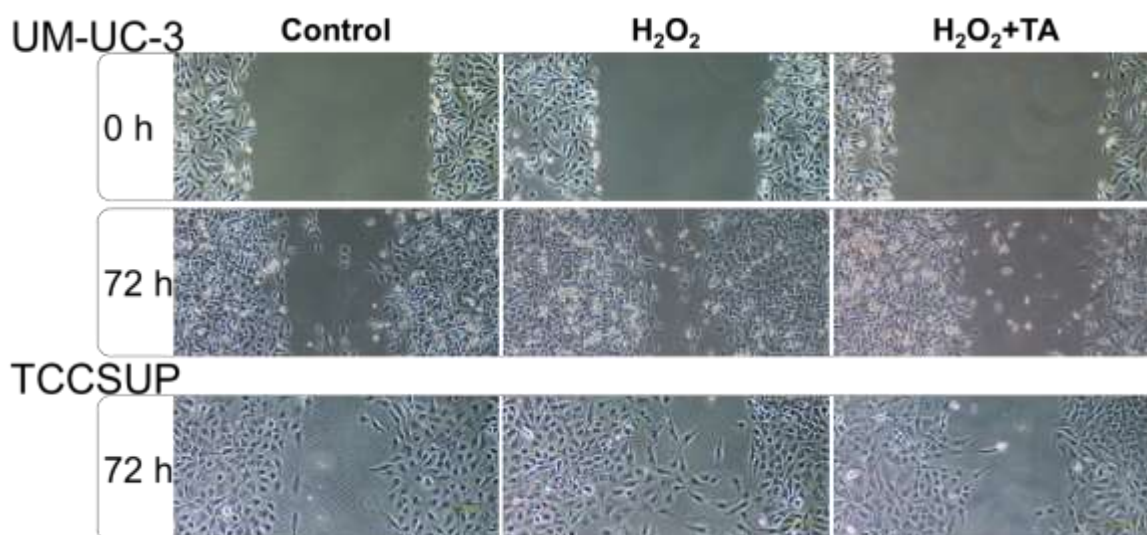
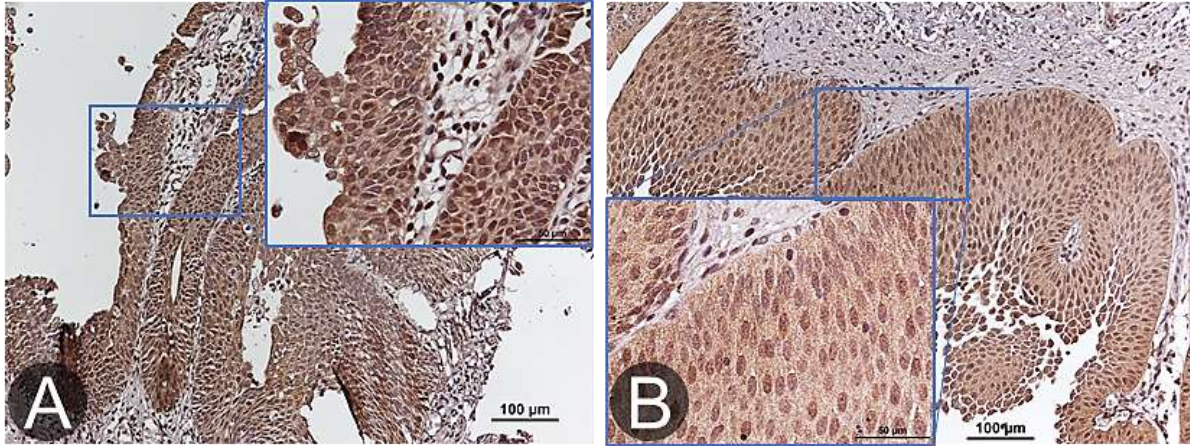
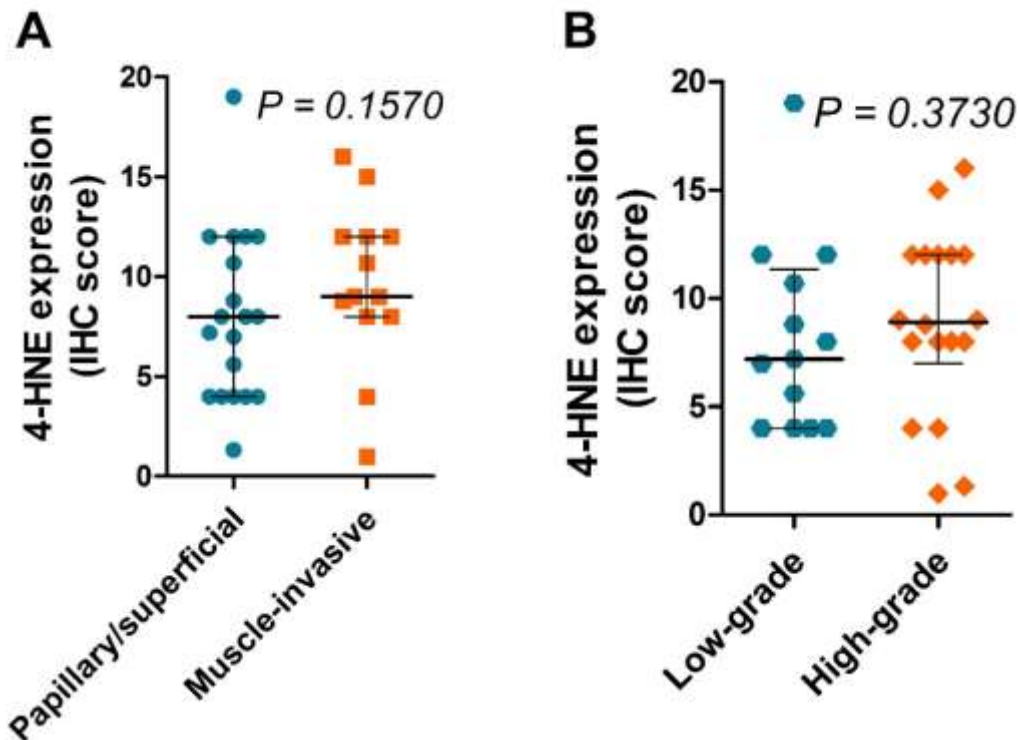


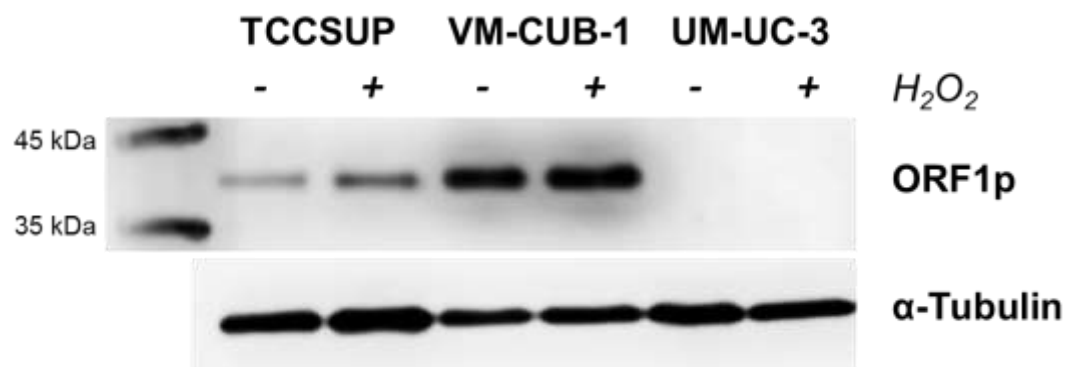
Fig. 5



Supplementary Fig. 1 Low expression of ORF1p in bladder tissues with PUNLMP grade. A: IHC score 4. B: IHC score 5.6.



Supplementary Fig. 2 4-HNE expression regarding tumor type and grade. Expression levels of 4-HNE between superficial and muscle-invasive tumors were not statistically different. Similarly, 4-HNE expression between low-grade and high-grade bladder tumor were not significantly different.



Supplementary Fig. 3 Expression of LINE-1 protein ORF1p among different bladder cancer cell lines based on Western blot immunodetection. Basal level of ORF1p expression (in control condition without H₂O₂ treatment) in VM-CUB-1 cells was higher than that in TCCSUP cells. In contrast, expression of ORF1p in UM-UC-3 cell line was undetectable. After induction of oxidative stress by H₂O₂ treatment, expression of ORF1p was increased in VM-CUB-1 and TCCSUP cell lines.