กลไกการตอบสนองภาวะดื้อต่อ Apoptosis ในมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อกระตุ้นด้วย TNF-alpha

Mechanisms Override the Apoptosis Signal in Cholangiocarcinoma after TNF-alpha Treatment

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ
ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2554

กลไกการตอบสนองภาวะดื้อต่อ Apoptosis ในมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อกระตุ้นด้วย TNF-alpha

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ ปีการศึกษา 2554

ชื่อเรื่อง กลไกการตอบสนองภาวะดื้อต่อ Apoptosisในมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อกระตุ้นด้วย TNF-alpha
ผู้วิจัย ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ, ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, มหาวิทยลัยมหิดล
ปีที่พิมพ์ 2558
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย 38 หน้า
คำสำคัญ มะเร็งท่อน้ำดี, apoptosis, TNF-alpha
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นที่บริเวณท่อทางเดินน้ำดี มีความสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อพยาธิที่ตับ ทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งหลั่งจากแมคโครเฟจและเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิดที่มีภาวะอักเสบเรื้อรัง ทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตายหรืออยู่รอดได้ ขึ้นอยู่กับการกระตุ้นมายังตัวรับสัญญานที่จำเพาะคือ TNFRI และ TNFRII ทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาสามารถควบคุมการอยู่รอดหรือการตายของมะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างไรยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการทดสอบครั้งนี้พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทั้งสองชนิดคือ TNFRI และ TNFRII การกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนี้ด้วยทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาพบการลดลงของการอยู่รอดของเซลล์หรือการเกิดอะพอพโทซิสอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT และ DAPI ตามลำดับ การกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาพบว่าระดับของ pMAPK1/2 และ pAkt เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาเพิ่มขึ้น และเมื่อไปยับยั้ง MEK1/2 และ Akt activity นี้ โดยใช้ U0126 และ LY294002 พบว่าสามารถหักล้างการดื้อต่อการเกิดอะพอพโทซิสหลังจากกระตุ้นด้วยทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาได้ ข้อมูลนี้สนับสนุนว่า MAPK และ Akt signaling pathway ทำให้เกิดการต้านทานต่อการเกิดอะพอพโทซิสของทูเมอร์เนคครอซิสแฟคเตอร์แอลฟาโดยไปเพิ่มกลไกการอยู่รอดของเซลล์ และเมื่อยับยั้งสัญญาณจาก MAPK และ Akt signaling จะไปลดสัญญาณด้านการอยู่รอดให้ต่ำกว่าระดับของกระบวนการตาย จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

คำสำคัญ : ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์, MAPK, Akt

Research Title	Mechanisms override the apoptosis signal in Cholangiocarcinoma after TNF-alpha treatment
Researchers	Panthip Rattanasinganchan, Rutaiwan Tohtong
Institution	Huachiew Chalermprakiet University, Mahidol University
Year of Publication	2015
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	38 pages
Keywords	cholangiocarcinoma, MAPK, Akt, TNF-alpha
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer of the bile duct associated with chronic inflammation due to liver fluke infection. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha is a pro-inflammatory cytokine released by macrophages as well as many cancer types with chronic inflammation. TNF-alpha can trigger death and survival, depending on the extent of activation of its cognate receptors, TNFRI and TNFRII. How TNF-alpha regulates survival and death in CCA is not completely understood. Here, we showed that KKU-100, a cholangiocarcinoma cell line, expressed both TNFRI and TNFRII. Treatment with TNF-alpha did not significantly reduce cell survival nor induce apoptotic death as shown by MTT assay and DAPI staining, respectively. Increasing concentrations of TNF-alpha was accompanied by an enhancement of pMAPK1/2 and pAkt level, while inhibition of MEK1/2 and Akt activity by U0126 and LY294002 abrogates resistance to TNF-alpha. These data suggest that MAPK and Akt signaling pathway mediates resistance to TNF-alpha in CCA by enhancing the survival signals, and that suppression of the MAPK and Akt signaling reduced the survival signal to a level below that of the death pathway, causing eventual cell death.

Keywords: TNF-alpha, MAPK, Akt

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง ที่ให้คำปรึกษาในการทำวิจัย และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนในด้านเครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ รศ.ดร.บรรจบ ศรีภา ที่อนุเคราะห์เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของคนไทยชนิด KKU-100 ในการวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวที่สนับสนุนทุนวิจัยทำให้การศึกษางานวิจัยด้านมะเร็งในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ฆ
สารบัญรูปภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 การอภิปรายผล	30
บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ	32
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก	
ประวัติย่อผู้วิจัย	37

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเป็นมะเร็ง	3
2. มะเร็งท่อน้ำดี ตามลักษณะทางกายภาพ	4
3. อัตราการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีและการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในจังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่ปี 1990-2001	5
4. วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*	6
5. การส่งสัญญาณของ TNF- α ผ่าน TNFR1	8
6. MAPKs และการส่งสัญญาณของ MAPK signaling pathway	9
7. กลไกการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์	10
8. พื้นที่ในการนับเซลล์ของ hematocytometer counting chamber	14
9. การเข้าจับของ SDS กับ โปรตีน ซึ่งทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นตรงและมีประจุลบ	16
10. ลำดับการวางแผ่น Polyacrylamide gel กับ Nitrocellulose membrane	18
11. การเปลี่ยนแปลงของ MTT ไปเป็น formazan เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	20
12. U0126 (MEK1/2 Inhibitor); Molecular Formula: $C_{18}H_{16}N_6S_2$	21
13. LY294002 (PI3 Kinase Inhibitor); Molecular Formula: $C_{19}H_{17}NO_3$	21
14. ภาพแสดงลักษณะการเกิด phosphorylation form ของ MAPK เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100	24
15. ภาพแสดงลักษณะการเกิด phosphorylation form ของ Akt เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 A) Phosphor-Akt B) Total Akt	25
16. ภาพแสดงผลการเพิ่มขึ้นของ phosphorylation form ของ MAPK และ Akt signaling เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และการลดลงของ A) Phosphor-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) เมื่อยับยั้งด้วย U0126 และ B) Phospho-Akt เมื่อยับยั้งด้วย LY294002	26
17. ผลการเกิด proliferation ในภาวะที่มี TNF-α ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100	27
18. การเกิด cytotoxicity ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ในภาวะที่มี TNF-α และ inhibitor ต่อ MAPK และ Akt	28
19. การเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100	29

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford 16

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 1 บทนำ

(Introduction)

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่นำไปสู่การวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดีคือมะเร็งของเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินน้ำดี (bile duct epithelial) ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดที่แน่ชัด แต่มีปัจจัยเสี่ยงมาจาก การอักเสบเรื้อรังจากภาวะหรือโรคต่าง ๆ และการติดเชื้อปรสิต เช่น การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchis viverrini* (OV)) ซึ่งระบาดมากในประเทศไทยและประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Sripa. 2008 : 350-351) มะเร็งท่อน้ำดีมีลักษณะการดำเนินของโรคที่ค่อนข้างช้า ผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์ในระยะสุดท้ายหรือระยะที่มีมะเร็งแพร่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่น จึงทำให้การตรวจพบมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรกนั้นยังทำได้ยากและมีข้อจำกัดในการรักษา การรักษาแบบดังเดิมโดยการฉายรังสีหรือให้ยาเคมีบำบัด พบว่าไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการยืดอายุผู้ป่วยให้ยืนยาว วิธีในการรักษาที่พบว่าสามารถช่วยให้ผู้ป่วยมีอายุได้ยืนยาว คือการผ่าตัด แต่คนไข้ประมาณ 70-90% จะมีพยาธิสภาพที่ทำให้ไม่สามารถผ่าตัดได้ และในผู้ที่สามารถผ่าตัดได้พบว่ามีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำอีกสูง และมีอัตราการรอดชีวิตได้ถึง 5 ปี อยู่ที่ 0-40% (Gores. 2003 : 1537, Anderson. 2004 : 51)

ในปี ค.ศ. 2002 มะเร็งตับซึ่งรวมทั้งมะเร็งที่เซลล์ตับและมะเร็งที่ท่อทางเดินน้ำดี เป็นมะเร็งที่พบในอันดับที่หกของโลก โดยมีผู้ที่เป็นมะเร็งชนิดนี้เพิ่มขึ้นถึง 626,241 คนต่อปี (เป็นเพศชาย 442,149 คน เพศหญิง 184,092 คน อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง ประมาณ 2.5 เท่า (Sripa. 2008 : 349) ในประเทศไทย มะเร็งท่อน้ำดีพบมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Sripa. 2008 : 350) จึงทำให้โรคมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีสาเหตุมาจากพฤติกรรมชอบกินปลาน้ำจืดดิบ ๆ เช่น ลาบก้อยปลา ปลาร้า ปลาจ่อม ส้มฟัก ทำให้เกิดการสะสมของพยาธิใบไม้ตับ (Sripa. 2008 : 354) การรักษามะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่ไม่สามารถผ่าตัดได้นั้น ส่วนใหญ่จะเป็นการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่จะสกัดมาจากพืช มีเพียงบางส่วนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา ยาเคมีบำบัดที่ปัจจุบันใช้ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่นิยมและยังมีการตอบสนองที่ดี ได้แก่ gemcitabine, cisplatin (CDDP) และ 5-fluorouracil (5-FU) (Lin. 2003 : 154-156, Giuliani. 2006 : vii73, Bhargava. 2003 : 1-2) อย่างไรก็ตามพบว่ามีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยามีอยู่หลายปัจจัย เช่น การเปลี่ยนแปลงการเมแทบอลิสมของยา การเปลี่ยนแปลงของเมมเบรนโปรตีน (เช่น solute carriers, channel and ATP-binding cassette (ABC) transporters) การเพิ่มของกระบวนการทำลายยา การเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ต้านต่อการเกิดอะพอพโทซิส ของเซลล์มะเร็ง (Raguz. 2008 : 387-389)

มะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรังที่เกิดขึ้นภายในท่อน้ำดี ในภาวะที่ร่างกายมีการอักเสบเซลล์จะทำการปล่อยไซโตไคน์ซึ่งมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันออกมาหลายชนิด และ ไซโตไคน์ที่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดี คือ TNF-α ซึ่งไซโตไคน์ชนิดนี้มีบทบาทต่อเซลล์ที่ต่างกันสองด้าน ทั้งการทำลายเซลล์มะเร็งและการส่งเสริมเซลล์มะเร็ง การทำงานของ TNF-α นั้นจะทำได้โดยผ่านรีเซฟเตอร์สองชนิด คือ TNFR1 และ TNFR2 โดยการกระตุ้นการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell survival) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation), การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่ต่างๆ (differentiation) โดยผ่านวิถีการทำงานของ MAPK (Mitogen-activated protein kinases) และ PI3K pathway ผ่าน TNFR1 และ TNFR2 ส่วนการกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis ทำได้โดยผ่านวิถีการทำงานของ caspase pathway ซึ่งพบ death domain (DD) ใน TNFR1 ซึ่งไม่พบใน TNFR2 (Tanimura. 2005 : 206, 211-212, Baud. 1999 : 1297-1298, Natoli. 1997 : 200, 202, Devin. 2000 : 426-427) การทำลายเซลล์มะเร็งโดยวิธีอะพอพโทซิสเป็นการทำลายโดยตรงที่จะไม่ทำให้เซลล์ข้างเคียงเกิดอันตรายไปด้วย จึงเป็นจุดหมายในการทำลายเซลล์มะเร็งและมีการวิจัยเกิดขึ้นมากมายเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นให้เกิดกลไกนี้ แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่ผ่านมา (ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. 2558 : 34-36) พบว่า TNF-α ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสได้ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และ KKU-M213 ซึ่งเซลล์มะเร็งดังกล่าวมีการแสดงออกของ TNFR1 และ TNFR2 ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการศึกษาเกี่ยวกับกลไกที่ เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อการเกิดอะพอพโทซิสในมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 (Sripa B., 2005) เป็นโมเดลในการทดลอง โดยมุ่งไปที่การศึกษาการแสดงออกของกลไกการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาในการกระตุ้น survival pathway ได้แก่ MAPK และ Akt pathway โดย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100
2. เพื่อศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100
3. เพื่อศึกษาการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 หากยับยั้ง MAPK และ Akt pathway ด้วย U1026 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (PI3K/Akt inhibitor) ไปพร้อม ๆ กับการกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของคนไทยชนิด KKU-100

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทำวิจัย

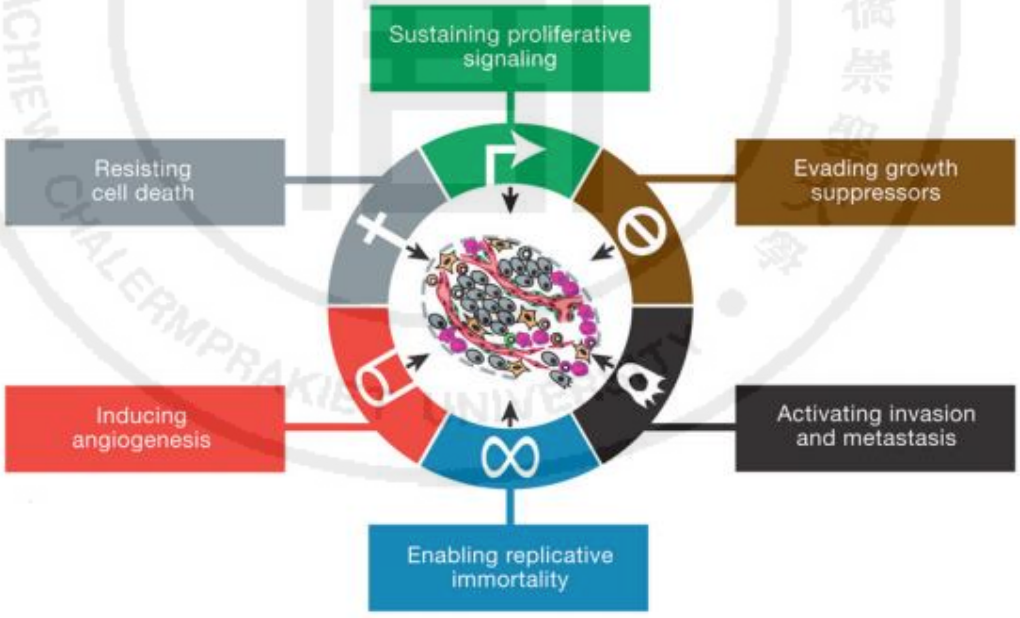
ทราบถึงกลไกที่เกี่ยวข้องในการต้านต่อการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของคนไทยชนิด KKU-100

บทที่ 2 ทฤษฎีและทบทวนเอกสาร

(Literature review)

2.1 มะเร็ง

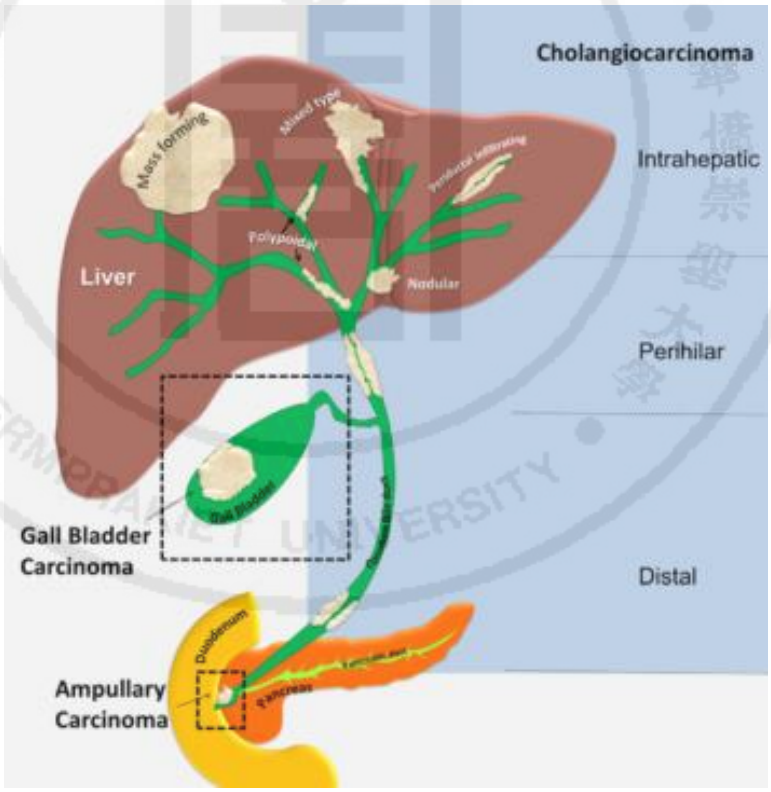
มะเร็งคือกลุ่มของโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตให้สมดุลย์ หรือเหมาะสมกับการดำรงอยู่ของร่างกายได้ เซลล์ที่กลายไปเป็นมะเร็งจะมีอัตราการเติบโตมากกว่าอัตราการตาย และมีการแบ่งตัวไปเรื่อย ๆ โดยไม่สิ้นสุด ก่อให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของร่างกายจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ สาเหตุของมะเร็งโดยทั่วไป สามารถสรุปออกมาเป็นปัจจัยหลักได้ 6 ประการ ได้แก่ การส่งสัญญาณในการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่อง การสามารถหลบหลีกจากสิ่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโต ความสามารถในการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องในการเจริญเติบโต การดื้อต่อการตาย ความสามารถในการสร้างเส้นเลือดเข้าไปเลี้ยงก้อนมะเร็ง ความสามารถในการกระตุ้นการเคลื่อนที่และการบุกรุก (Hanahan. 2011 : 647-657) (ภาพที่ 1)



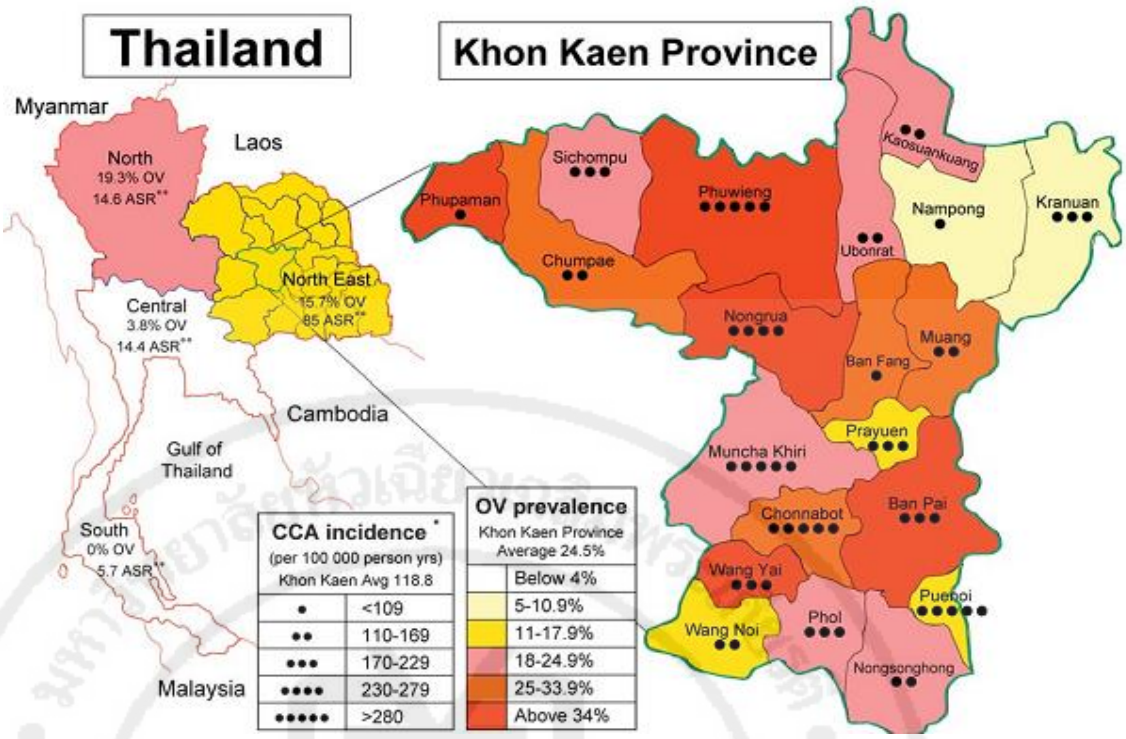
ภาพที่ 1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเป็นมะเร็ง (Hanahan. 2011 : 647)

2.2 โรคมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma)

มะเร็งท่อน้ำดี คือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อทางเดินน้ำดี ทั้งท่อน้ำดีภายในและภายนอกตับ แต่ไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดี และส่วนของ papilla of Vater จากการแบ่งประเภทของมะเร็งท่อน้ำดีตามลักษณะทางกายภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma หรือ peripheral type cholangiocarcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic type cholangiocarcinoma) (ภาพที่ 2) โรคมะเร็งท่อน้ำดีเกิดในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และที่สำคัญคือพบในประเทศไทยมากที่สุดในโลก ในปี ค.ศ.1998-2000 พบว่าจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการในการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย เช่น ขอนแก่น อุดรธานี นครพนม เป็นต้น (Sripa. 2008 : 350) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณที่พบว่ามีอัตราการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูงนั้น มีความสัมพันธ์กับอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverini*) (ภาพที่ 3) (Sripa. 2007 : 1149)



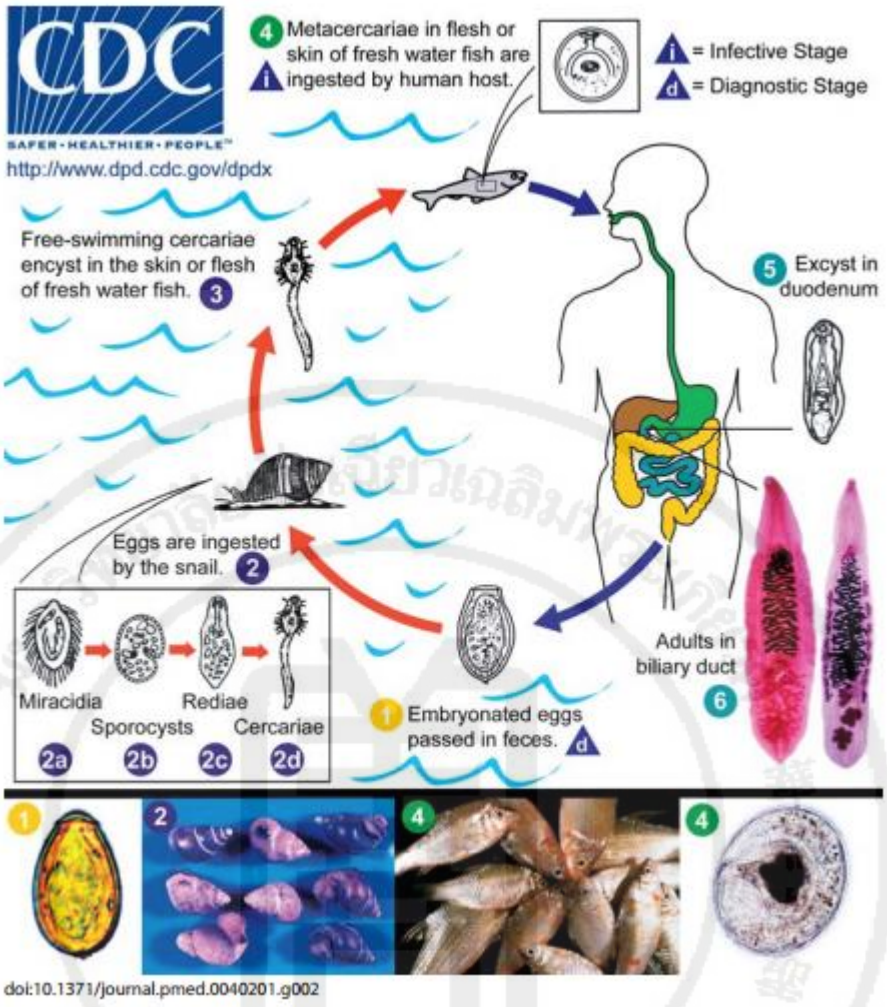
ภาพที่ 2 มะเร็งท่อน้ำดี ตามลักษณะทางกายภาพ (Hennedige. 2014 : 2)



ภาพที่ 3 อัตราการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีและการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ในจังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่ปี 1990-2001 (Sripa. 2007 : 1151)

2.3 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามีปัจจัยเสี่ยงจากการป่วยอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรงมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ โรคตับเรื้อรัง (chronic liver disease) ไม่ว่าจะจากการเป็นโรคตับอักเสบจากไวรัส (เช่น HBV, HCV) โรคตับจากแอลกอฮอล์ หรือ ตับแข็งจากสาเหตุอื่นๆ ต่างเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ยังมีโรคติดเชื้อปรสิตบางชนิดก็เป็นปัจจัยเสี่ยงด้วย เช่น การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* (พบในประเทศไทย ลาว และมาเลเซีย) หรือ *Clonorchis sinensis* (พบในญี่ปุ่น เกาหลี และเวียดนาม) ซึ่งติดต่อสู่คนจากการกินปลาน้ำจืดมีเกล็ดที่มีพยาธิเหล่านี้ (ภาพที่ 4) แบบปรุง สุก ๆ ดิบ ๆ จำพวก ก้อย ลาบ น้ำตก เป็นต้น ซึ่งการติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (Sripa. 2008 : 349-352)

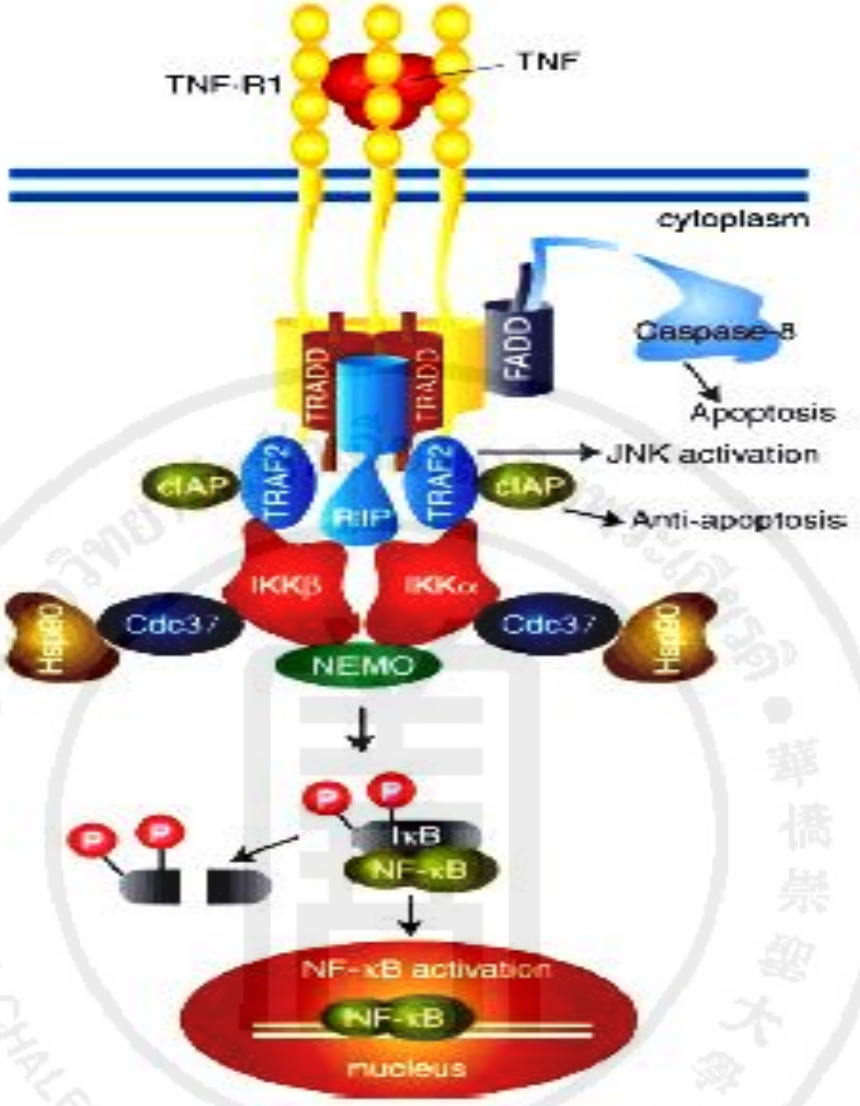


ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

เมื่อตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* วางไข่และไข่ถูกขับปนออกมากับอุจจาระของคนซึ่งเป็น definitive host *(1)* เมื่อหอยทากได้กินไข่ของพยาธิ *Opisthorchis viverrini* เข้าไปไข่ก็จะฟักออกมาเป็นตัวอ่อนเติบโตอยู่ในตัวหอยทาก โดยมีระยะต่าง ๆ คือ miracidia (2a), sporocysts (2b), rediae (2c) และ cercariea (2c) *(2)* เมื่อ cercariae ออกมาจากหอยทากจะแทรกเข้าไปอยู่ตามกล้ามเนื้อหรือใต้เกล็ดในปลาน้ำจืด (second intermedia host) และฝังอยู่ในรูปของ metacercariae *(3)* เมื่อ definitive host ซึ่งได้แก่ แมว สุนัข หรือคน มากินปลาที่มี metacercaria นี้เข้าไป metacercaria นี้ก็จะออกมาจากซิสและไปอยู่ที่ duodemum และตรงไปที่ท่อทางเดินน้ำดีซึ่งเป็นที่จะเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยและออกไข่หลังนั้นอีก 3-4 สัปดาห์ *(4)* (Sripa. 2007 : 1149)

2.4 Tumor necrosis factor-α (TNF-α)

TNF-α เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 233 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 kDa ผลิตจากเซลล์หลากหลายชนิด เช่น แมคโครเฟจ (macrophage) โมโนไซต์ (monocyte) ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เคราติโนไซต์ (keratinocyte) และ ไฟโบรบลาส (fibroblast) แต่ส่วนใหญ่จะผลิตจาก แมคโครเฟจ และโมโนไซต์ TNF-α ตอบสนองต่อกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน การแบ่งตัวของเซลล์ การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส การรักษาสมดุลของเซลล์ มีความสัมพันธ์กับภาวะการอักเสบของร่างกาย (Gupta. 2002 : 185, Ghezzi. 2004 : 1, Baud. 2001 : 372) TNF-α ทำงานโดยผ่านรีเซฟเตอร์จำเพาะ 2 ชนิด คือ TNFR1 (55-kD receptor) และ TNFR2 (75-kD receptor) (Bazzoni. 1996 : 1717-1719, Vandenabeele. 1995 : 392-393, Natoli. 1997 : 200) ซึ่งรีเซฟเตอร์ทั้งสองเป็นสมาชิกของ TNFR super family โดย TNFR1 จะมี cysteine rich extracellular subdomains และมี intracellular region ที่เรียกว่า death domain อยู่ประมาณ 80 อะมิโนแอซิด ซึ่งไม่พบใน TNFR2 (Gupta. 2002 : 185) TNF-α ส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์และการตายของเซลล์ โดยผ่านรีเซฟเตอร์ TNFR1 และ ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการบุกรุกของเซลล์ผ่าน TNFR2 (Misseri. 2005 : F406) เมื่อ TNF-α กระตุ้นจับกับ TNFR1 และกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิส จะทำงานโดยผ่านตัวกลาง ได้แก่ Fas-associated death domain (FADD) และกระตุ้น pro-caspase-8 จะส่งผลให้เกิดอะพอพโทซิส โดยเกี่ยวโยงกับ mitochondria และ caspases โมเลกุลอื่น ๆ จนสุดท้ายเกิดการทำงานของ endonuclease ส่งผลให้เกิด DNA fragmentation ในทางตรงข้ามหาก TNFR1 กระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ จะกระตุ้นผ่านทาง TRAF-2 complex และ receptor-interacting protein (RIP) ผ่านทาง NF-kB และ MAPK pathway (Baud. 2001 : 373-374, Chen. 2002 : 1634-1635) (ภาพที่ 5) ส่วนการกระตุ้น TNF-α ผ่านทาง TNFR2 มักพบการกระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ โดยส่งสัญญาณไปกระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์จะผ่าน PI3K-Akt pathway หรือ ระหว่าง PI3K/phosphoinositide-dependent kinase (PDK) 1/Akt และ Raf/MEK/MAPK pathway (Natoli. 1997 : 202) (Sato. 2004 : 33759)



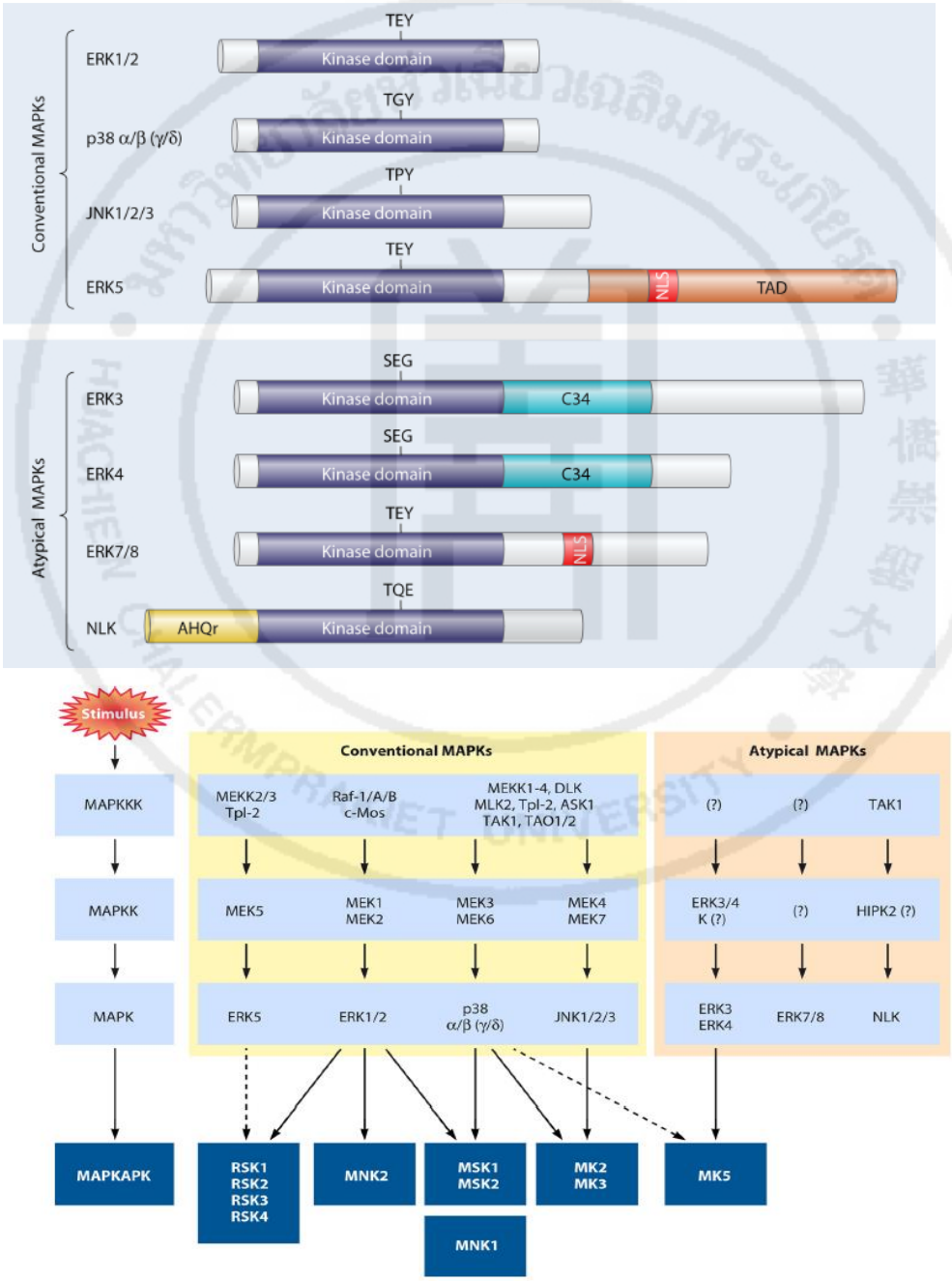
ภาพที่ 5 การส่งสัญญาณของ TNF- α ผ่าน TNFR1 (Chen G. 2002 : 1634)

2.5 Mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Mitogen-activated protein kinases เป็นกลุ่มของโปรตีน serine/threonine kinase โปรตีนในกลุ่มนี้เมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก จะทำงานโดยผ่านเอนไซม์ kinase เป็นลำดับดังนี้ ผ่าน Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) ตามด้วย Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK หรือ ERK kinase) และ Mitogen-activated protein kinase (MAPK หรือ ERK) การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้มีหน้าที่ต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ (differentiation) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) เป็นต้น การทำงานของ MAPK นี้จะส่งสัญญาณกระตุ้นผ่านโมเลกุลต่าง ๆ ของโปรตีนส่งผลต่อร่างกายหลายอย่าง

เช่น การแสดงออกของยีน ไมโอซิส เมทาบอลิสม การเคลื่อนที่ การมีชีวิตอยู่ การอะพอพโทซิส และการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เฉพาะ เป็นต้น

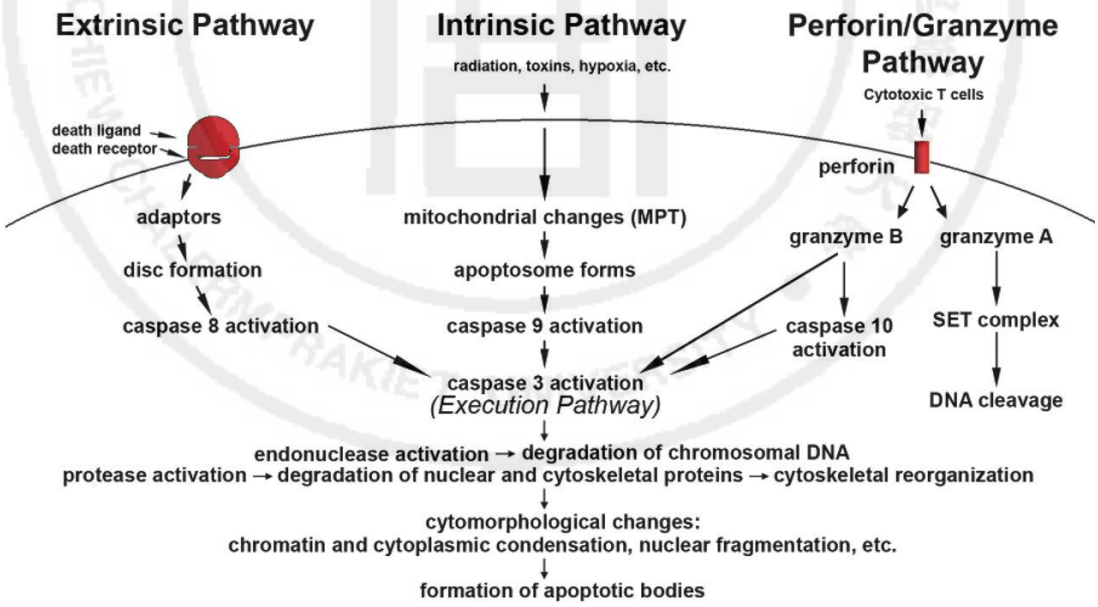
MAPK แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1. Conventional MAPKs ซึ่งประกอบไปด้วย extracellular signal-regulated kinases ½ (ERK1/2) c-Jun amino (N)-terminal kinase 1/2/3 (JNK1/2/3) p38 isoforms (α, β, γ and δ) และ 2. Atypical MAPKs ประกอบด้วย ERK3/4 ERK7/8 และ NLK การทำงานของ MAPKs จะประกอบไปด้วยกลุ่มของ kinases ดังนี้ MAPK MAPK kinase (MAPKK) และ MAPK kinase (MAPKKKs) (ภาพที่ 6) (Cargnello. 2001 : 52-53)



ภาพที่ 6 MAPKs และการส่งสัญญาณของ MAPK signaling pathway (Cargnello. 2001 : 52-53)

2.6 อะพอพโทซิส (apoptosis)

ขบวนการของโปรแกรมเซลล์เดท หรือ อะพอพโทซิส คือ ลักษณะโดยทั่วไปที่การตายของเซลล์โดยที่มีการควบคุมโดยยีนอย่างมีแบบแผนที่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีลักษณะจำเพาะ ที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิต หน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน ระบบฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเสื่อมของกล้ามเนื้อ การพัฒนาของตัวอ่อน และการกระตุ้นการตายของเซลล์จากสารเคมีในร่างกาย ลักษณะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสจะมีลักษณะจำเพาะคือ เซลล์จะเกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์หดเล็กลง ลักษณะนิวเคลียสเกิดการรวมตัวกันแน่น โครมาตินเกาะเป็นกลุ่ม และดีเอ็นเอถูกย่อยโดยเอ็นไซม์เอนโดนิวคลิเอสเป็นชิ้นเล็ก ๆ ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ข้างเคียง ซึ่งเมื่อทดสอบดูด้วยการย้อมสี DAPI จะเห็นการติดสีของนิวเคลียสเป็นลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในลักษณะนี้จะเกิดจากการกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์ ผ่านขบวนการหลัก ๆ 2 ขบวนการคือ extrinsic pathway และ intrinsic pathway/perforinGranzyme pathway ที่อาศัยเอนไซม์ cysteine aspartyl-specific proteases (caspase) ซึ่งเป็นตัวกลางในการควบคุมโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (ภาพที่ 7) (Elmore. 2007 : 498)



ภาพที่ 7 กลไกการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์ (Elmore. 2007 : 528)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

(Research methodology)

3.1 สารเคมี และน้ำยา

สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารเคมีที่เป็น analytical grade มีรายการดังต่อไปนี้

ชื่อ	บริษัท
Acetic acid	Merck
Acetonitrile	Sigma
Acrylamide	Amersham Biosciences
AE-1/AE-3 primary antibody	DAKO
Agarose	Research Organic
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen
Ammonium persulfate	Amersham Biosciences
Ammonium bicarbonate	Sigma
Antibiotic-antimycotic	Gibco
β-glycerophosphate	Sigma
β-mercaptoethanol	Merck
Bis-acrylamide	Amersham Biosciences
Bovine serum albumin	Sigma
Bradford	Biorad
Bromphenol blue	Sigma
Comassie blue R250	USB
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Fetal Bovine Serum	Gibco
HAM-12	Gibco
HEPES	Merck
LY294002	Cell Signaling
Methanol	Merck
MTT	USB
Prolong Gold antifade reagent	Invitrogen
Sodium dodecyl sulfate	Amersham Biosciences

ชื่อ	บริษัท
Sodium hydrogen carbonate	Merck
Sodium phosphate, dibasic	Merck
Sodium phosphate, monobasic	Merck
Sucrose	USB
TEMED	USB
TNF-alpha	Pacific Science
Triton X100	USB
Trypsin-EDTA	Gibco
U0126	Cell Signaling

เครื่องมือและอุปกรณ์พลาสติก

ชื่อ	บริษัท
6 well and 96 well tissue culture plates	Corning
24 well Transwell chamber	Corning
25 cm^2 and 75 cm^2 tissue culture flasks	Corning
60 mm and 100 mm tissue culture dishes	Corning
Autopipette	Gilson
Centrifuge	Hettich
CO_2 Incubator	Heraeus
Fluorescent microscope	Olympus, Nikon and Axioimage
Hemocytometer	Brand
Laminar flow	TIF-Filtrations
Light microscope	Meiji
Spectrophotometer	Shimazu
UV gel documentation	Biorad

3.2 Cell culture

ในการทดลองครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของคนไทยชนิด KKU-100 (Sripa B., 2005)

การเลี้ยงเซลล์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ คือ HAM's F12 (ตามสูตรข้างล่าง) ที่ผสม 10% FBS และ 100 U/ml of penicillin G and 100 ug/ml streptomycin แล้ว นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ก่อนนำไปใช้

HAM-F12 ปริมาตร 1 L pH 7.4

HAM-F12	1	pack
HEPES	3.57	g
Sodium bicarbonate	1.17	g
DW make to	1	L

(ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร)

2. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ จะทำให้ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar flow; TIF-Filtrations) และใช้ aseptic technique และระวังไม่ให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอยู่ภายนอกตู้เพาะเลี้ยงนานเกินไป

3. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จะทำการเปลี่ยนทุกๆ 2 วัน หรืออาจจะเปลี่ยนได้ก่อนหากสังเกตเห็นสีของ cell culture media เปลี่ยนไป เพื่อไม่ให้สภาพภายในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์มีความเป็นกรดมากเกินไป

Trypsinization

1. ล้างเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงไว้ใน flask ด้วย sterile PBS เพื่อกำจัด FBS ซึ่งมี anti-trypsin protein ออก

2. ใส่ 1x trypsin ปริมาตร 1 ml ลงไปใน flask กลิ้งให้ trypsin ได้โดนเซลล์ทั่วทั้งหมด และนำไปไว้ในตู้เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 นาที หรือ จนเซลล์กลมและเริ่มหลุด เคาะที่ flask และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS ลงไปเพื่อยับยั้งการย่อยของเอนไซม์ trypsin

4. นับเซลล์และเหลือเซลล์เอาไว้เท่าที่ต้องการ

5. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าไปให้ครบ 10 ml

Phosphat Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 1 L pH 7.4

NaCl	8	g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.15	g
KCl	0.2	g
KH_2PO_4	0.2	g
DW make to	1	L

การนับเซลล์ (Cell count)

1. นำเซลล์ที่ผ่านการ trypsinization มาปั่นด้วย centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบ เวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของเซลล์

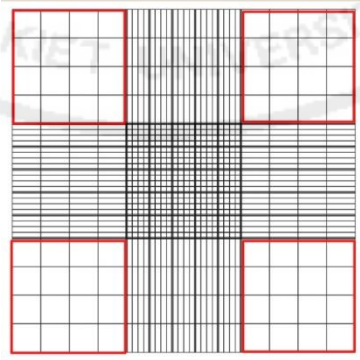
2. เติม media 1 ml และทำให้เซลล์การกระจายตัวด้วยเครื่อง vortex mixer

3. ดูดเซลล์ในข้อ 2. มาในปริมาตร 10 µl ผสมกับ 0.5% trypan blue 10 µl ผสมให้เข้ากัน และนำไปนับเซลล์ด้วย hematocytometer counting chamber

4. ทำการนับเซลล์โดยใช้ inverted microscope โดยนับเซลล์ในพื้นที่ hematocytometer counting chamber จำนวน 4 ช่อง ดังภาพที่ 8 กรอบสีแดงแสดงบริเวณที่ใช้นับเซลล์ และคำนวณจำนวนเซลล์ ดังสมการ ด้านล่าง

สมการ จำนวนเซลล์ (10^4 cells/ml) = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 1 ช่อง x DF x 10^4

: DF = dilution factor



ภาพที่ 8 พื้นที่ในการนับเซลล์ของ hematocytometer counting chamber

ที่มา : http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/counting_chamber1/

3.3 การทดสอบหาฤทธิ์ของ TNF- α ต่อการกระตุ้น MAPK signaling และ Akt signaling โดยวิธีWestern blot

การทดสอบหาฤทธิ์ของ TNF- α ต่อการกระตุ้น MAPK signaling และ Akt signaling ด้วยวิธี Western blot ทำโดยดูการแสดงออกของโปรตีน เมื่อใส่ TNF- α ลงไปที่ความเข้มข้มต่าง ๆ จากนั้นแยกโปรตีนโดยใช้หลักการของ gel electrophoresis และ transfer โปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane แล้ว จึงสามารถตรวจสอบโปรตีนที่สนใจ โดยใช้ Specific antibody โดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกัน โดยขั้นตอนดังนี้

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation) และวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford assay

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง KKU-100 ลงใน petri dish โดยใส่เซลล์ 5.0 x10^5 cells/10 ml ต่อ 1 petri dish จำนวน 5 dishes สำหรับ MAPK signaling และ อีก 5 dishes สำหรับ Akt signaling นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วนำมาทดสอบโดยการกระตุ้นด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80 และ160 ng/ml เป็นเวลา 15 นาที

3. เมื่อครบเวลานำเซลล์มะเร็ง KKU-100 มาล้างด้วย PBS และทำให้เซลล์แตก โดยใช้ lysis buffer (RIPA) นำ cell lysate ไปปั่นด้วย centrifuge ที่ 4 °C ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ ดูดส่วนใสเก็บไว้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนต่อไป โดยใช้ Bradford assay

Lysis buffer (RIPA)

RIPA buffer *	755	µl
10X Protease Inhibitor (Roche)	150	µl
1M NaF (Sigma)	50	µl
1M β-glycerophosphate (sigma)	40	µl
0.5 M Na_3VO_4 (Sigma)	4	µl
1M DTT (Amersham)	1	µl
Total Volume	500	µl

* RIPA buffer ประกอบด้วย 150mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS (sodium dodecylsulfate), 1% Sodium Deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 2mM EDTA

4. นำ Standard BSA ที่มีความเข้มเข้น 0.5, 1, 2, 4 ng/ml มาทำเป็น standard curve และนำสิ่งส่งตรวจที่เป็น lysate cells มาเจือจาง 20 เท่า และนำไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford ดังตารางที่ 1

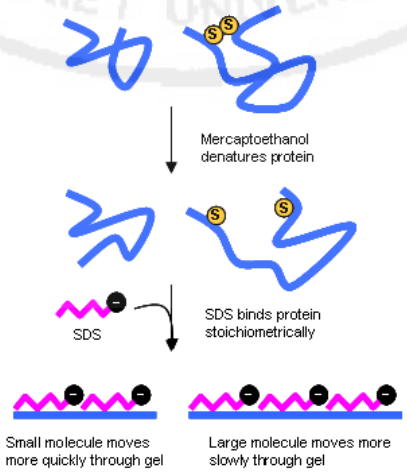
ตารางที่ 1 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

condition		BSA ng/ml				Sample TNF-α ng/ml (1:20)				
		0.5	1	2	4	Control	20	40	80	160
BSA (µl)		10	10	10	10	-	-	-	-	-
Sample (µl)		-	-	-	-	10	10	10	10	10
Bradford (µl)		190 µl								

นำไปวัดค่า O.D ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อหาปริมาณโปรตีน

- Gel electrophoresis

Gel electrophoresis เป็นวิธีการแยก และวิเคราะห์ชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักการที่ชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน โปรตีนมีประจุจากการแตกตัวของส่วนประกอบต่าง ๆ ได้แก่ การแตกตัวของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่นๆ ใน side chain การเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น detergent ที่มีประจุลบ ดังนั้น ประจุลบจะเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนเสียสภาพกลายเป็นเส้นตรงและทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ (ภาพที่ 9) และวิ่งไปยังประจุบวกของสนามไฟฟ้า โดยผ่าน polyacrylamide ซึ่งทำหน้าที่เป็น molecular sieve โดยการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าจะเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน



ภาพที่ 9 การเข้าจับของ SDS กับ โปรตีน ซึ่งทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นตรงและมีประจุลบ

ที่มา: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=18

Gel electrophoresis มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำโปรตีนที่วัดได้ในแต่ละ condition มาทำการผสมกับ loading buffer ให้เป็น 1X ซึ่งมีส่วนประกอบทั้ง SDS และ β-mercapto แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และทำให้เย็นที่ 4 °C รอไว้ใช้ในการแยกโปรตีน

2. เตรียมเจลที่ใช้แยกโปรตีนโดยใช้ 12%separating gel และ 4%stacking gel มีส่วนผสมดังสูตร เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงต่อชุด electrophoresis ทั้งหมดเข้าด้วยกัน

Loading buffer

1 M Tris-Hcl, pH6.8	3.125	ml
50% glycerol	5	ml
5% SDS	0.5	g
0.05% bromophenal blue	1.25	ml
500 mM β-mercapto	0.276	ml (เติมเวลาใช้)

Separating solution (12% gel)

29.2:0.8 % Acrylamide : Bisacrylamide solution	4	ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5	ml
10% SDS (Sodium Dodecylsulfate)	100	µl
DW	3.28	ml
10% Ammonium persulfate	50	µl
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	20	µl
Total volume	10	ml

Stacking solution (4 % gel)

29.2:0.8 % Acrylamide : Bisacrylamide solution	0.8	ml
1 M Tris-HCl, pH 6.8	0.75	ml
10% SDS (sodium dodecylsulfate)	60	µl
DW	4.324	ml
10% Ammonium persulfate	60	µl
TEMED	6	µl
Total volume	4	ml

3. เจือจาง 10x running buffer ให้เป็น 1x ด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 1 L แล้วเติมลงใน chamber แล้วจึงดึง comb ออกจาก stacking gel ล้างช่องสำหรับใส่สารที่ต้องการแยกบนเจล แล้วใส่ cell lysate ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ในช่องบน stacking gel ให้มีปริมาณโปรตีนเท่า ๆ กันทุกช่อง แยกโปรตีนจากสารตัวอย่างโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 120 volt เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง

10x running buffer

0.25 M	Tris-base
1.92 M	Glycine
1 %	SDS

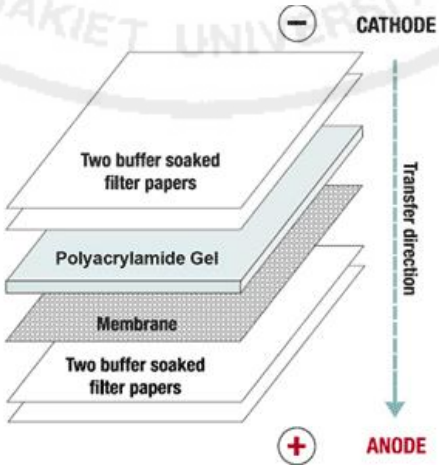
การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Protein transfer)

การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนเป็นการย้ายโปรตีนจากแผ่น polyacrylamide gel สู่ nitrocellulose membrane ที่มีประจุบวกด้วยวิธี electrophoresis ดังนี้

1. นำแผ่นเจลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis ประกบกับ nitrocellulose membrane แล้วนำมาแช่ใน transfer buffer โดยให้แผ่นเจลอยู่ด้านประจุลบและแผ่น nitrocellulose membrane อยู่ด้านประจุบวก โดยมีฟองน้ำประกบทั้งสองด้าน ภาพที่ 10

2. ตั้งค่าเครื่อง electrophoresis power supply ไว้ที่ 120 volt อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลานำแผ่น nitrocellulose membrane มาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ก่อนไป block non-specific antibody



ภาพที่ 10 ลำดับการวางแผ่น Polyacrylamide gel กับ Nitrocellulose membrane

ที่มา: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=18

Block non-specific antibody

การ block non-specific antibody เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific จากโปรตีนอื่นๆ เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน เมื่อย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว โปรตีนจะจับอยู่กับแผ่นเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ของแผ่นเมมเบรนที่โปรตีนไม่ได้เข้าจับจึงต้องทำการ blocking ด้วย bovine serum albumin (BSA) หรือ non-fat dry milk ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรน ดังนั้นการทำ blocking จะช่วยลดการเกิด false positives ด้วย มีขั้นตอนการทำดังนี้

1. นำแผ่น nitrocellulose membrane มา block non-specific antibody ด้วย 5% skim milk ใน TBS/T เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. ล้างด้วย TBS/T ใน water bath 5 นาที ทำซ้ำกัน 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปทำ Immunoblotting

TBS/T buffer (1 L)

1 M Tris, pH 8	10	ml
5 M NaCl	30	ml
Tween-20	1	ml
DW	959	ml

Immunoblotting

1. นำแผ่น nitrocellulose membrane มา probe ด้วยแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ดังนี้ phospho-MAPK primary antibody, phosphor-Akt antibody, total MAPK antibody และ total Akt antibody โดยนำมาเจือจางใน 3% skim milk ในสัดส่วน 1:1000 เป็น ที่ 4 ^{o}C เวลา 24 ชั่วโมง

2. ล้างแผ่น membrane ด้วย TBS/T 3 ครั้ง จากนั้นเติม secondary antibody 1:1000 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBS/T 3 ครั้ง

3. นำไปวิเคราะห์ผล (analysis) ด้วยวิธี chemiluminescent detection ด้วยเครื่อง (UV gel documentation: Biorad)

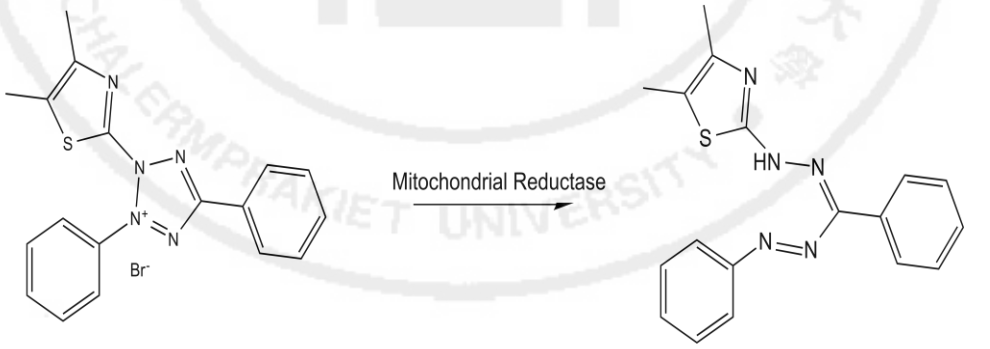
3.4 การทดสอบฤทธิ์ของ TNF-α ต่อการ proliferation ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 โดยวิธี MTT Assay

MTT assay เป็นการทดสอบ cytotoxicity ของเซลล์โดยใช้ความสามารถของ mitochondrial enzyme (mitochondrial succinate dehydrogenase) ที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองไปเป็น formazan product ที่มีสีม่วงมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ซึ่งระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ภาพที่ 11 (Tim M., 1983) มีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์มะเร็ง KKU-100 จำนวน 5.0 x 10^3 ใน 96 well plate ในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เติม TNF-α ที่ความเข้มข้นดังนี้ 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ng/ml ลงในเซลล์มะเร็ง KKU-100 นำเข้าไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง

3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจึงเติม 10%MTT (5mg/ml) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงไปในเซลล์ 100 µl/well แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงดูด media ที่มีสาร MTT ทิ้ง แล้วเติมด้วยสารละลาย dimethysulfoxide (DMSO) จำนวน 200 µl ทุกหลุม เขย่าให้ตะกอนสีม่วงของ MTT ละลายเข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader นำไปสร้างกราฟและวิเคราะห์ผล



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide **(MTT)**

(*E*,*Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan **(Formazan)**

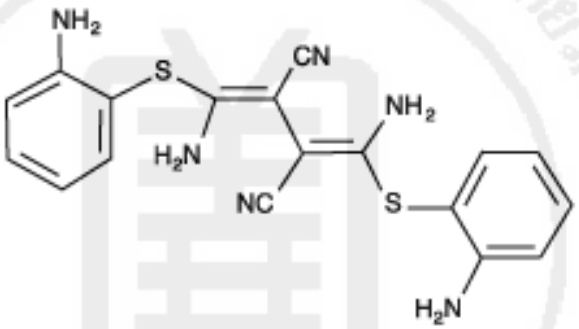
ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของ MTT ไปเป็น formazan เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

3.5 การทดสอบ Cytotoxicity ของ U0126 และ LY294002 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

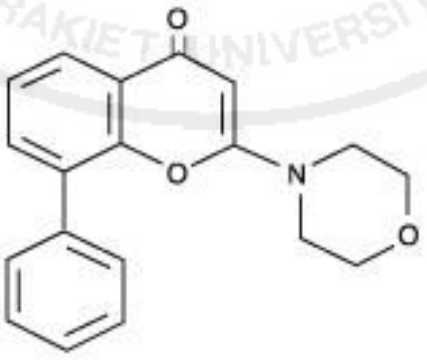
การทดสอบครั้งนี้ใช้ inhibitor สองชนิด คือ U0126 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (PI3 kinase inhibitor)

U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene) มีฤทธิในการยับยั้งต่อ MEK 1 และ MEK 2 ซึ่งทั้ง MEK1 และ MEK2 เป็นที่รู้จักหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า MAPK kinase หรือ Erk kinases โปรตีนทั้งคู่มีความจำเพาะต่อ MAPK ซึ่งทำงานโดย mitogen activated protein kinase cascade ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (Duncia., 1998) มีโครงสร้าง ดังภาพที่ 12 ส่วน LY294002 (PI3 Kinase Inhibitor) มีความสามารถสูงในการยับยั้ง phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase มีโครงสร้างดังภาพที่ 13



ภาพที่ 12 U0126 (MEK1/2 Inhibitor); Molecular Formula: $C_{18}H_{16}N_6S_2$

ที่มา: http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=2119#.VgqwV_meDGc



ภาพที่ 13 LY294002 (PI3 Kinase Inhibitor); Molecular Formula: $C_{19}H_{17}NO_3$

ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/LY294002

ขั้นตอนการทดสอบ cytotoxicity ของ U0126 และ LY294002 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 มีดังต่อไปนี้

1. เลี้ยงเซลล์มะเร็ง KKU-100 จำนวน 5.0 x 10^3 ใน 96 well plate ในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เติมสารต่าง ๆ ลงไปดังนี้

- TNF-α ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml เพียงอย่างเดียว และ
- TNF-α ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml ร่วมกับ MAPK inhibitor (U0126) และ Akt inhibitor (LY294002) ที่ความเข้มข้น 160 μM
- 3.2%DMSO เป็น control เนื่องจากเป็นตัวทำละลาย U0126 และ LY294002

และนำเข้าไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจึงเติม 10%MTT (5mg/ml) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงไปในเซลล์ 100 μl/well แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง MTT จะเปลี่ยนไปเป็น formazan crystal จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติมด้วยสารละลาย dimethysulfoxide (DMSO) จำนวน 200 μl ทุกหลุม

4. เขย่าให้ตะกอนสีม่วงของ formazan ละลายเข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟและวิเคราะห์ผล

3.6 การศึกษาผลของการเกิด Apoptosis โดยใช้ DAPI assay

1. เลี้ยงเซลล์มะเร็ง KKU-100 จำนวน 2.0 x 10^5 cells บน sterile cover slip ใน petri dish ในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- TNF-α ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml เพียงอย่างเดียว
- TNF-α ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml ร่วมกับ MAPK inhibitor (U0126) และ Akt inhibitor (LY294002) ที่ความเข้มข้น 160 μM
- 3.2%DMSO เป็น control เนื่องจากเป็นตัวทำละลาย U0126 และ LY294002 และนำเข้าไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator: Heraeus) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการดูด media ออกจาก petri dish ให้หมดจากนั้นล้างด้วย PBS

4. เติม 3% paraformaldehyde เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

5. เติม 0.1% Triton X-100 ใน PBS เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

6. ย้อมด้วยสี DAPI (50 μg/ml in PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางไว้ในที่มืด

7. เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว ล้างสี DAPI ที่เกินออกด้วย PBS 3 ครั้ง

8. หยด anti-fade บน cover slip แล้วนำไปวางบนสไลด์ที่มี mounting solution ปิดขอบด้วยยาทาเล็บ ดูภายใต้กล้อง fluorescent microscope

3% paraformaldehyde with 2% sucrose (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้)

Paraformaldehyde powder	0.45 g
PBS pH 7.4	15 ml

Heat at 65°C เป็นเวลา 20-25 นาที

เติม sucrose	0.3 g

Heat at 65°C เป็นเวลา 5 นาที

Anti-fade (p-phenylenediamine dihydrochloride)

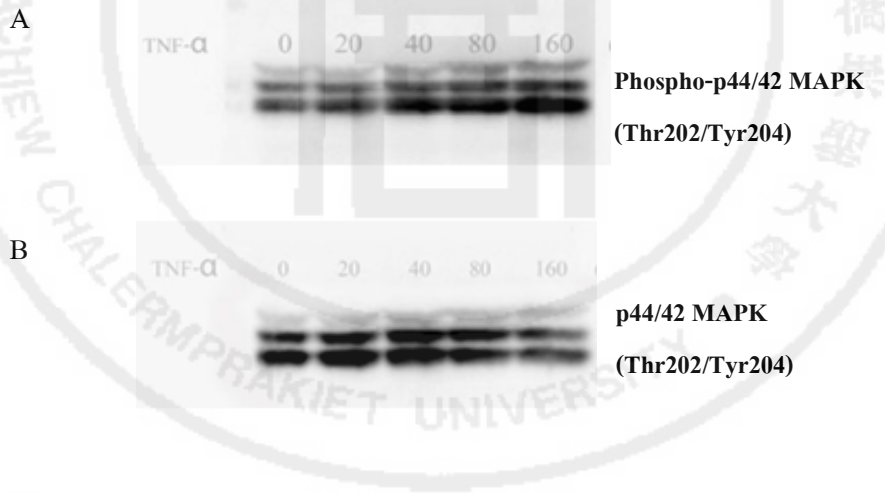
PPD 0.01-0.1 % in 70%glycerol in PBS

บทที่ 4 ผลการวิจัย

(Result)

4.1 ผลการศึกษาบทบาทของ TNF-α ในการกระตุ้น MAPK ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

เซลล์มะเร็งชนิด KKU-100 ได้ถูกนำมาทดสอบการกระตุ้นการทำงานของ MAPK ด้วย TNF-α ที่ความเข้มข้นดังนี้ 0, 20, 40, 80 และ 160 ng/ml โดยที่ 0 ng/ml จะใส่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำละลาย TNF-α ผลการทดสอบพบว่า TNF-α สามารถกระตุ้น phosphorylation form ของ MAPK ได้ โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นของ TNF-α ที่เข้มข้นมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเกิด Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) ซึ่งเป็น phosphorylation form ของ MAPK ให้เพิ่มขึ้นตามไปด้วย การทดสอบนี้ใช้ total MAPK ในการควบคุมปริมาณโปรตีนในแต่ละความเข้มข้น ดังภาพที่ 14

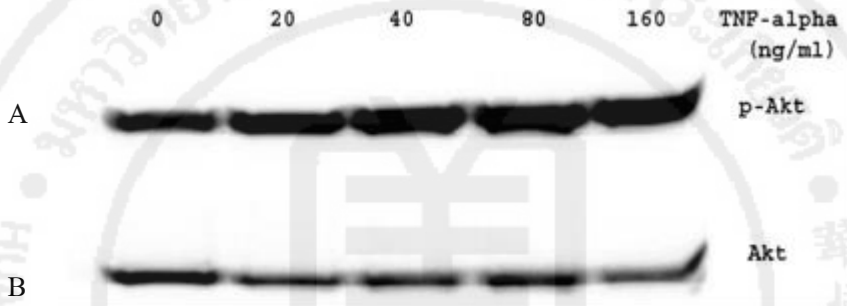


ภาพที่ 14 ภาพแสดงลักษณะการเกิด phosphorylation form ของ MAPK เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

A) Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) B) Total MAPK p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)

4.2 ผลการศึกษาบทบาทของ TNF-α **ในการกระตุ้น Akt ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100**

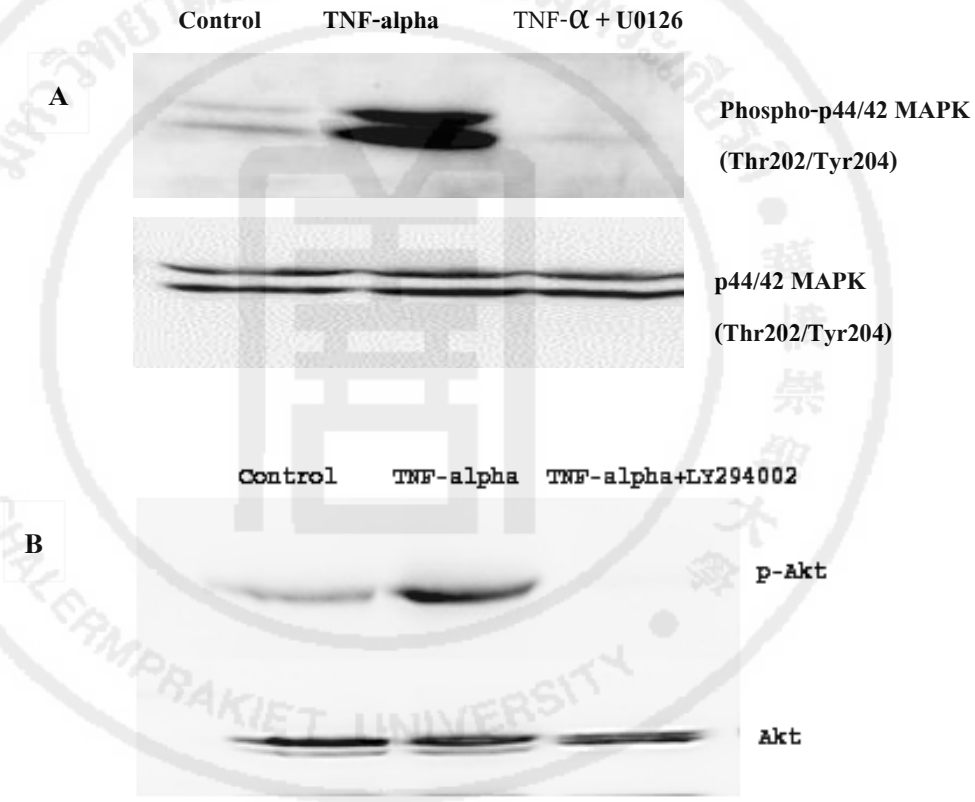
การทดสอบการกระตุ้น Akt signaling โดยใช้ TNF-α ที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 20, 40, 80 และ 160 ng/ml โดยที่ 0 ng/ml จะใส่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำละลาย TNF-α พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ TNF-α มากขึ้นจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น phosphorylation form ของ Akt เพิ่มขึ้นตามไปด้วย การทดสอบนี้ใช้ total Akt ในการควบคุมปริมาณโปรตีนในแต่ละความเข้มข้น ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ภาพแสดงลักษณะการเกิด phosphorylation form ของ Akt เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 A) Phosphor-Akt B) Total Akt

4.3 ผลการยับยั้ง TNF- α ในการกระตุ้น MAPK signaling และ Akt signaling ด้วย U0126 (MAPK inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor)

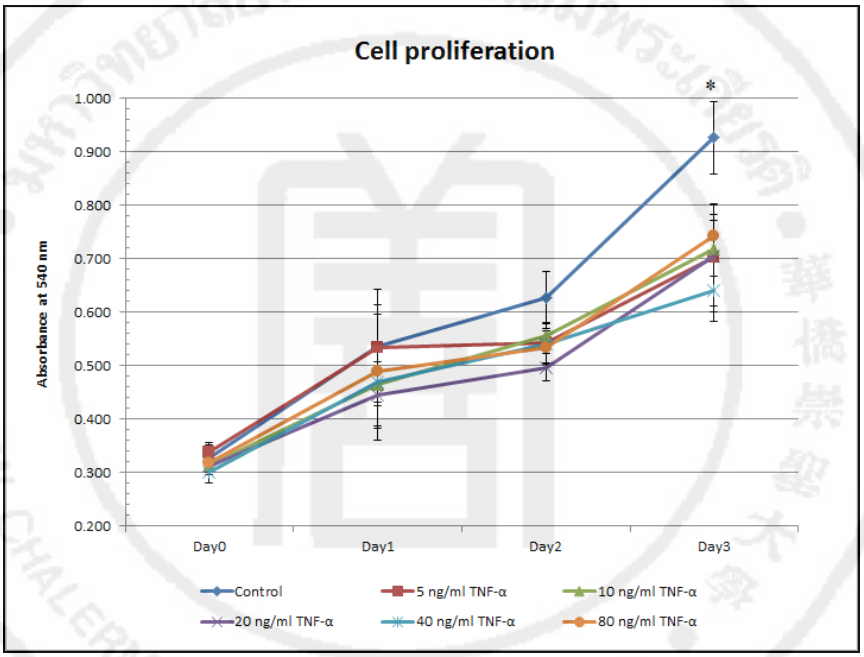
ผลการทดสอบการยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ MAPK และ Akt จากการกระตุ้นของ TNF-α ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml โดยใช้ U0126 และ LY294002 ที่ความเข้มข้น 160 μM โดยมี 3.2% DMSO เป็น control พบว่า U0126 และ LY294002 สามารถยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ MAPK และ Akt ได้โดย phosphorylation form ของ MAPK และ Akt ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่กระตุ้นด้วย TNF-α เพียงอย่างเดียว ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ภาพแสดงผลการเพิ่มขึ้นของ phosphorylation form ของ MAPK และ Akt signaling เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และการลดลงของ A) Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) เมื่อยับยั้งด้วย U0126 และ B) Phospho-Akt เมื่อยับยั้งด้วย LY294002

4.4 ผลการศึกษาบทบาทของ TNF-α ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต (proliferation) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 โดยใช้ MTT assay

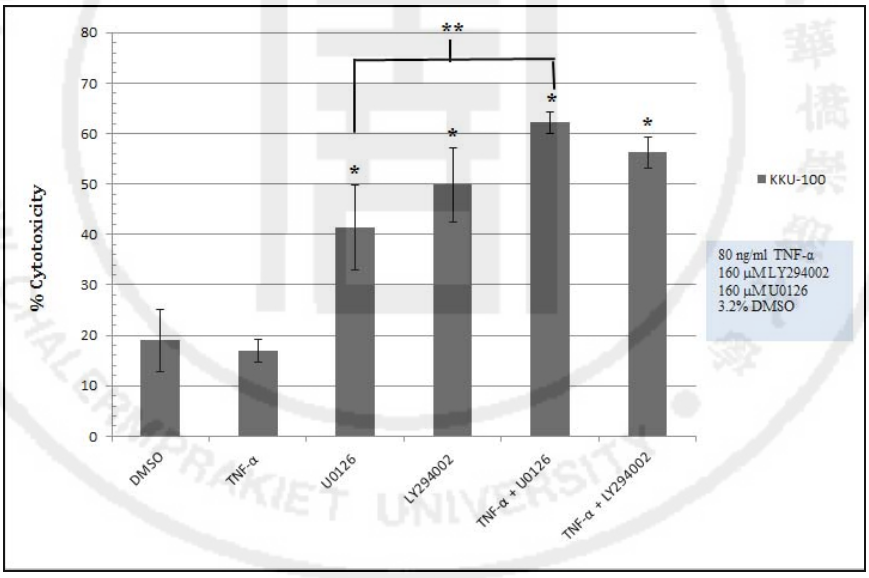
ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จากการกระตุ้นด้วย TNF-α ที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ng/ml พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 – 2 วัน ไม่พบความแตกต่างของแต่ละความเข้มข้นของ TNF-α และเมื่อเวลาผ่านไป 3 วันพบว่าภาวะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มี TNF-α มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าภาวะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มี TNF-α (control) ($p<0.05$) จึงสรุปได้ว่า TNF-α ไม่มีผลในการเพิ่มการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ผลการเกิด proliferation ในภาวะที่มี TNF-α ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

4.5 ผลการศึกษา cytotoxicity ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ภายหลังจากกระตุ้นด้วย TNF-α และการยับยั้งการกระตุ้น MAPK signaling และ Akt signaling โดยใช้ U0126 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (PI3K inhibitor)

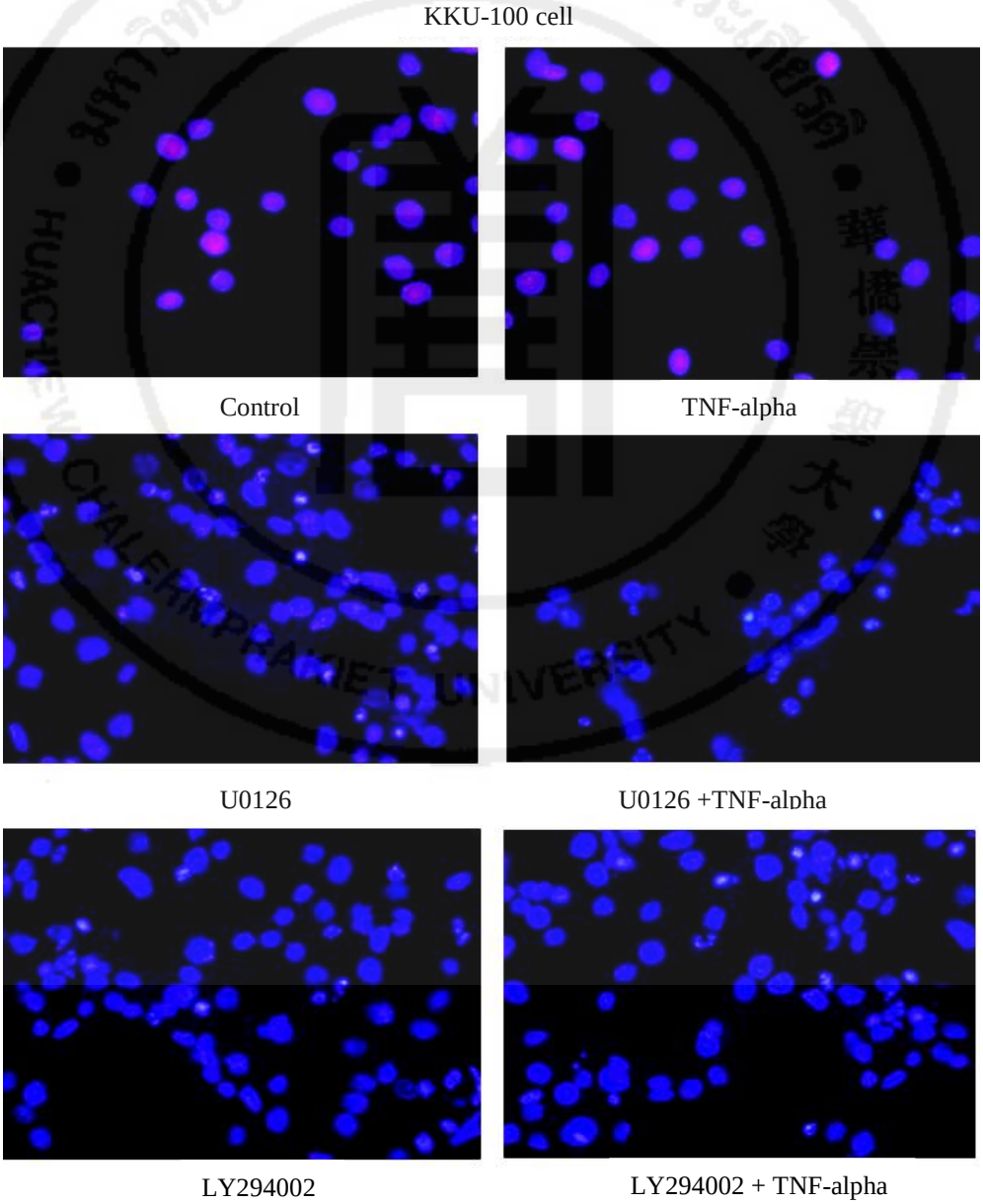
ผลการทดสอบ cytotoxicity ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 พบว่าเมื่อนำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมาทดสอบกับสารต่าง ๆ ดังนี้ 3.2%DMSO (control) 80 ng/ml TNF-α 160 µM U0126 160 µM LY294002 และ TNF-α ร่วมกับ inhibitor ทั้งสอง คือ U0126 และLY294002 พบว่า cytotoxicity ในภาวะที่มี TNF- α ไม่แตกต่างจากภาวะ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ เมื่อเปรียบเทียบ cytotoxicity ในสภาวะอื่น ๆ ได้แก่ TNF-α ร่วมกับ LY294002 และ TNF-α ร่วมกับ U0126 หรือ LY294002 และ U0126 เพียงอย่างเดียวก็จะเกิด cytotoxicity อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ One way ANOVA, SPSSv.17) เมื่อเทียบกับ TNF-α เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่า ภาวะที่มี U0126 ร่วมกับ TNF-α เกิดภาวะ cytotoxicity มากกว่า ภาวะที่มีเพียง U0126 เพียงอย่างเดียว ($p<0.05$, One way ANOVA, SPSSv.17) ส่วน ภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การเกิด cytotoxicity ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ในภาวะที่มี TNF-α และ inhibitor ต่อ MAPK และ Akt

4.6 ผลการศึกษาอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ในภาวะที่มี TNF-α และในภาวะที่มีการยับยั้งการกระตุ้น MAPK signaling และ Akt signaling โดยใช้ U0126 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (PI3K inhibitor)

ผลการทดสอบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 พบว่าเมื่อนำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมาทดสอบในภาวะต่าง ๆ ดังนี้ control (3.2%DMSO) 80 ng/ml TNF-α 160 µM U0126 160 µM LY294002 และ TNF-α ร่วมกับ inhibitor ทั้งสอง คือ U0126 และ LY294002 พบว่า TNF- α เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดอะพอพโตซิสได้เมื่อเทียบกับ control แต่เมื่อมีการยับยั้ง MAPK และ Akt signaling แล้วพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 เกิด apoptosis มากขึ้นเมื่อเทียบกับ control ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 การเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

บทที่ 5 อภิปรายผล

(Discussion)

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากผนังเยื่อบุท่อน้ำดี ซึ่งมีลักษณะการดำเนินของโรคที่ค่อนข้างช้า ผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์ในระยะสุดท้าย หรือระยะที่มีมะเร็งแพร่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่น ส่งผลให้การตรวจพบมะเร็งท่อน้ำดีในระยะต้นยังคงทำได้ยากในปัจจุบัน ประเทศไทยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดีสูงเป็นอันดับหนึ่งของโลก ส่วนใหญ่พบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งสอดคล้องกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (OV) ทำให้โรคมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและประเทศไทย

TNF-α เป็นไซโตไคน์ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์เมื่อมีภาวะอักเสบของร่างกาย TNF-α กระตุ้นผ่านรีเซฟเตอร์สองชนิด คือ TNFR1 และ TNFR2 โดยมีบทบาททั้งในการทำลายเซลล์มะเร็งผ่านทางอะพอพโทซิสและในทางตรงข้ามกับสนับสนุนเซลล์มะเร็งในเคลื่อนที่และบุกรุก (Gilbert. 2005 : E1011, Misseri. 2005 : F406, Zhou. 2015 : 1682-1683) ในปี ค.ศ.2006 พบว่า TNF-α สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา doxorubicin (DOX) ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงของมนุษย์ชนิด MCF-7/Adr และ MCF-7 ได้ โดยปกติ MCF-7/Adr และ MCF-7 จะดื้อต่อการรักษาด้วยยา doxorubicin (DOX) แต่เมื่อใส่ TNF-α ร่วมกับการรักษาด้วยยา doxorubicin (DOX) ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น โดยพบว่าการตายของเซลล์มะเร็งนี้เกิดจากการลดระดับ mRNA ของ anti-apoptosis protein (Cao. 2006 : 184-185) นอกจากนี้ยังพบว่า TNF-α สามารถกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสได้ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด HuCCA-1 และ HuCCA-1 Nu เมื่อใช้ TNF-α ร่วมกับ Actinomycin D (Utaisincharoen. 1999 : 42) ในทางตรงข้าม TNF-α สามารถกระตุ้นการบุกรุกได้ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด CCKS1 ได้โดยผ่านทาง TNFR2 โดยการกระตุ้น MAPK, Akt, NF-κB และการหลั่งของ MMP (Tanimura. 2005 : 209-211) และจากการวิจัยก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยพบว่า TNF-α ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดความเป็นพิษหรือตายได้ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และ KKU-M213 (ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. 2015 : 31-34) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาถึงกลไกในการต้านทานต่อการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงของคนไทยชนิด KKU-100 เป็นโมเดล เมื่อกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ด้วย TNF-α แล้ว พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกับงานวิจัยในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่พบว่า TNF-α สามารถกระตุ้น proliferation ได้ (Lin. 1999 : 13883) TF-1 (CD34+ myeloid progenitor stem cells) ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วย TNF-alpha ได้ (Gregory. 1999 : 9542)

เช่นเดียวกับงานวิจัยในปีค.ศ. 2005 ของ Arianne L.Theiss และคณะ ที่ทำการศึกษาในเซลล์ intestinal myofibroblasts (Theiss. 2005 : 36120) และในปีค.ศ. 2009 จากการศึกษาในเซลล์ cardiac fibroblast พบว่า TNF-α สามารถกระตุ้นให้เกิด proliferation ได้เช่นเดียวกัน (Kaliyamurthi. 2009 : 14424)

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า TNF-α สามารถกระตุ้น MAPK pathway และ Akt pathway ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ซึ่งจะเห็นได้จากแถบของโปรตีน Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) และ phospho-Akt ที่เพิ่มขึ้นและยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ TNF-α ก็จะยิ่งเพิ่มการกระตุ้น MAPK pathway และ Akt pathway ได้มากขึ้นด้วย จากการที่ TNF-alpha สามารถกระตุ้นได้ทั้งการตายและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและหากการที่มีการกระตุ้นการเจริญเติบโตเกินกว่าการการะตุ้นการตายอาจเป็นสาเหตุให้เซลล์มะเร็งมีชีวิตอยู่รอดได้ ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้จึงทำการยับยั้งการกระตุ้น MAPK pathway และ Akt pathway โดยใช้ MAPK inhibitor (U0126) และ Akt inhibitor (LY294002) และทดสอบภาวะการเกิด cytotoxicity และ apoptosis จาก TNF-alpha โดย MTT assay และ DAPI assay พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ด้วย TNF-α ร่วมกับการยับยั้ง MAPK pathway และ Akt pathway จะเกิด cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ TNF-α เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 18) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยในปี ค.ศ. 2007 Yu Fang Wang และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาในเซลล์ human melanoma (Wang. 2007 : 4940) และงานวิจัยของ Li Fen Yu และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ที่ศึกษาในเซลล์ colon cancer ซึ่งพบว่า U0126 สามารถยับยั้ง MAPK pathway ทำให้ส่งผลต่อการเกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ (Yu. 2007 : 2001)

การทดสอบการเกิดอะพอพโทซิสโดยใช้ DAPI assay เมื่อใช้ TNF-α ร่วมกับ U0126 และ LY294002 ส่งผลให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับ TNF-α เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 19) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Leelawat K. ซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และ RMCCA-1 ดื้อต่อการใช้ยา oxaliplatin แต่เมื่อยับยั้ง Akt signaling โดยใช้ LY294002 ร่วมกับการใช้ยา oxaliplatin พบว่าสามารถเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์และเพิ่มการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งสองชนิดนี้ได้ (Leelawat. 2009 : 6) นอกจากนี้ยังพบว่าในงานวิจัยของ Li H และคณะ ในปี 2011 ซึ่งศึกษาใน non-small cell lung cancer cell lines พบว่า เมื่อยับยั้ง PI3K และ MEK pathway ส่งผลให้เกิด apoptosis และยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากขึ้นในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา gefitinib (Li. 2011 : 280)

จากการทดลองในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า Akt และ MAPK signaling เป็นปัจจัยสำคัญในการที่ทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อการเกิด apoaptosis และดื้อต่อการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

บทที่ 6 สรุป

(Conclusions)

การศึกษาบทบาทของ TNF-α ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของคนไทยชนิด KKU-100 พบว่า TNF-α กระตุ้น MAPK และ Akt signaling โดยพบ phosphorylation ของ MAPK และ Akt เพิ่มตามความเข้มข้นของ TNF-α ซึ่ง MAPK และ Akt signaling มีบทบาทเกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งหลายอย่าง เช่น การอยู่รอดของเซลล์ การเจริญเติบโต และการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบผลของ TNF-α ต่อ proliferation โดยวิธี MTT assay พบว่า TNF-α ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100

เมื่อทำการยับยั้ง MAPK และ Akt signaling ที่เกิดจากการกระตุ้นโดย TNF-α โดยใช้ U0126 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (Akt inhibitor) และนำเซลล์ไปทดสอบคุณสมบัติทางด้าน cytotoxicity และ apoptosis โดยใช้ TNF-α ร่วมกับ U0126 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (Akt inhibitor) พบว่าผลการกระตุ้นให้เกิด cytotoxicity เกิดในภาวะที่มีการยับยั้งการกระตุ้น MAPK และ Akt signaling โดย U0126 (MAPK inhibitor) และ LY294002 (Akt inhibitor) ซึ่งสอดคล้องกับผลอะพอพโทซิสที่พบว่ามีการเกิดอะพอพโทซิสมากขึ้นเมื่อยับยั้ง MAPK และ Akt signaling pathway

การผลทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ จึงสรุปได้ว่า การทำงานของ TNF-α ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 นั้น มีการกระตุ้น survival pathway ผ่านทาง MAPK และ Akt signaling ซึ่งส่งผลให้ไปยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส ดังนั้น MAPK และ Akt signaling จึงเป็นโมเลกุลสำคัญในการศึกษากลไกการดื้อยาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่อย่างไรก็ตามผลการทดสอบนี้ได้ทำในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 เพียงชนิดเดียว ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

บรรณานุกรม

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (มิถุนายน-ธันวาคม 2558) “Differential effects of TNF-alpha on the viability of cholangiocarcinoma cell lines” **มฉก. วิชาการ.** 19 : 37 หน้า 25-38.

Anderson, C.D. et al. (2004) “Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma” **The oncologist**. 9 (1) page 43-57.

Baud, V. (1999) “Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain” **Genes & development**. 13 page 1297-1308.

Baud, V., Karin, M. (2001) “Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives” **Trends Cell Biol**. 11 (9) page 372–377.

Bazzoni, F., Beutler B. (1996) “The tumor necrosis factor ligand and receptor families” **The New England journal of medicine**. 334 page 1717-1725.

Bhargava, P. et al. (2003) “Gemcitabine and irinotecan in locally advanced or metastatic biliary cancer: preliminary report” **Oncology**. 17 (9 Suppl 8) page 23-26.

Cao, W. et al. (2006) “A combined treatment TNF-alpha/doxorubicin alleviates the resistance of MCF-7/Adr cells to cytotoxic treatment” **Biochimica Biophysica Acta.** 1763 page 182-187.

Cargnello, M., Roux, P. (2011) “Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases” **Microbiology and molecular biology reviews.** 75 (1) page 50-83.

Chen, G., Goeddel, D.V. (2002) “TNF-R1 signaling: a beautiful pathway” **Science**. 296 (5573) page 1634–1635.

Devin, A. et al. (2000) “The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation” **Immunity**. 12 page 419-29.

Elmore, S. (2007) “Apoptosis: a review of programmed cell death” **Toxicol Pathol.** 35(4) page 495-516.

Ghezzi, P., Cerami, A. (2004) “Tumor Necrosis Factor as a Pharmacological target” **Methods in molecular medicine**. 98 page 1-8.

บรรณานุกรม

Gilbert, L.C., Rubin, J., Nanes, M.S. (2005) "The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis" **American journal of physiology.** 288 (5) page E1011-E1018.

Giuliani, F. et al. (2006) "Gemcitabine and cisplatin for inoperable and/or metastatic biliary tree carcinomas: a multicenter phase II study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM)" **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**. Suppl 7 page vii73-7.

Gores, G.J. (2003) "A spotlight on cholangiocarcinoma" **Gastroenterology**. 125(5) page 1536-1538.

Gregory, T.B. (1999) "Tumor necrosis factor –alpha mediates both apoptosis cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression" **J Bio Chem.** 274 (14) page 9539-9547.

Gupta, S. (2002) "A decision between life and death during TNF-α induced signaling" **J Clin Immunol**. 22(4) page 185–194.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) "Hallmarks of cancer: the next generation" **Cell**. 4: 144 (5) page 646-674.

Hennedige, T.P., Neo, W.T., Venkatesh, S.K. (2014) "Imaging of malignancies of the biliary tract- an update. **Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society.** 14 page 14

Kaliyamurthi, V. et al. (2009) "WISP1, A Pro-Mitogenic, Pro-Survival Factor, Mediated TNF-α Stimulated Cardiac Fibroblast Proliferation, But Inhibits TNF-α induced Cardiomyocyte Death" **J Biol Chem.** 22: 284 (21) page 14414-14427.

Leelawat, K. (2009) "Inhibition of PI3K increases oxaliplatin sensitivity in cholangiocarcinoma cells" **Cancer cell international.** 9 (3) page 1-8.

Li, H., Schmid-Bindert, G., Wang, D. (2011) "Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathway can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines" **Adv Med Sci.** 56 (2) page 275-284.

Lin, M.H. et al. (2003) "A phase II trial of gemcitabine in the treatment of advanced bile duct and periampullary carcinomas" **Chemotherapy**. 49 (3) page 154-158.

บรรณานุกรม

Misseri, R. et al. (2005) "TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling" **Am J Physiol Renal Physiol**. 288 (2) page F406-F411.

Natoli, G., Ianni, A. (1997) "Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway" **Cellular signalling**. 275 page 200-203.

Raguz, S., Yague, E. (2008) "Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem" **British journal of cancer**. 5: 99 (3) page 387-391.

Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T. (2004) "Involvement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in the MEK/MAPK signal transduction pathway" **J Biol Chem.** 279 (32) page 33759–33767.

Sripa, B. et al. (2005) "Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100)" **World J Gastroenterol**. 11 (22) page 3392-3397.

Sripa, B. et al. (2007) "Liver fluke induces cholangiocarcinoma" **PLoS medicine**. 4 (7) page e201.

Sripa, B., Pairojkul C. (2008) "Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand" **Current opinion in gastroenterology.** 24 (3) page 349-356.

Tanimura, Y. et al. (2005) "Tumor necrosis factor –alpha promotes invasiveness of cholangiocarcinoma cells via its receptors, TNFR2." **Cancer Letters.** 219 page 205-213.

Theiss, A.L. et al. (2005) "Tumor Necrosis Factor (TNF) Increases Collagen Accumulation and Proliferation in Intestinal Myofibroblasts via TNF Receptor 2" **J biological chemistry**. 280 (43) page 36099–36109.

Utaisincharoen, P. et al. (1999) "Binding of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) to TNF-RI induces caspase(s)-dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell lines" **Clin Experimental Immunol**. 116 (1) page 41-47.

Vandenabeele, P. (1995) "Two tumour necrosis factor receptors: structure and function" **Trends Cell Biol**. 5 (10) page 392–399.

บรรณานุกรม

Wang, Y.F., Chen, C.J., Kelly, A.K. (2007) "Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Inhibition of MEK Is Caspase-Independent and Mediated by the Bcl-2 Family Members PUMA, Bim, and Mcl-1" **Clin Cancer Research**. 13 page 4934-4942.

Zhou, JP. (2015) "Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF-alpha induced cancer cell invasion and migration in OSCC" **Am J Cancer Res.** 5 (5) page 1680-1691.

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Panthip Rattanasinganchan

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	**ปี พ.ศ.**	**สถานศึกษา**
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	2550	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	2544	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	2540	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ติดต่อ

คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
18/18 ถนน บางนา-ตราด กม. 18 ตำบล บางโฉลง
อำเภอ บางพลี จังหวัด สมุทรปราการ 10540
โทร. 02-312-6300 ต่อ 1221
โทรสาร 02-312-6414
Email: r_panthip@hotmail.com

ผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Rutaiwan Tohtong

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา Ph.D. (Molecular Genetics)
The Ohio State University, Ohio,
USA 2550

สถานที่ติดต่อ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
272 ถนนพระรามหก แขวงทุ่งพญาไท
เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
โทร. 02-201-5596
Email: scrth@mahidol.ac.th